

İSKELET KASI İSKEMİ REPERFÜZYON HASARININ AZALTIKMASINDA TIKLOPİDİN

TICLOPIDIN ON REDICING ISCHEMIA REPERFUSION INJURY IN SCALETAL MUSCLE

Dr. Işık ENKAYA*, Dr. Bige ÖKTEN*, Dr. Davit SABA*, Dr. Hakan GÜVEN*,

Dr. Melahat DİRİCAN**, Dr. Zehra SERDAR**, Dr. Şahsine TOLUNAY***, Dr. Ziya ÖZER*

*Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, BURSA

**Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, BURSA

***Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, BURSA

Adres: Yrd. Doç. Dr. Işık ŞENKAYA, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Kalp ve Damar Cerrahisi, 16059 Görükle-BURSA
e-mail: senkaya@superonline.com

Özet

Tiklopidin atherosklerotik hastalıklarda profilaksi amacıyla kullanılan antitrombositler bir ilaçtır. Reperfüzyon hasarı gelişiminde trombosit kümelenmesinin de değişik mediatörler aracılığı ile hasarı artıracığı bilindiğinden ticlopidinin iskemi reperfüzyon hasarını önlemede etkili olabileceği düşünüldü.

birisi kontrol grubu olmak üzere Sprague-Dawley cinsi, 32 dişi rat eşit şekilde dört gruba ayrılarak çalışma gerçekleştirildi. Grup 1'de (n=8) sadece anestezi uygulandı. Grup 2'de (n=8) anestezi verdikten sonra sağ arka ekstremitte, kalça eklemi hizasından turnike ile sıkıldı. Dört saat bekleme sonrası turnike açılmadan gerekli materyeller alındı. Grup 3 (n=8) ve Grup 4 (n=8) de ise dört saat iskemi sağlandıktan sonra turnike açıldı ve iki saat süreyle reperfüzyona bırakıldı. Grup 4 deneklerine, deney gününden önce olmak üzere beş gün süre ile 50 mg/gün ticlopidin (Ticlit®), orogastrik tüp aracılığı ile günde iki kez verildi. Lipit peroksidasyon göstergesi olarak thiobarbitürik asit yöntemi ile doku malondialdehide düzeyleri ölçüldü. Soleus kaslarında canlı hücre oranı tesbit edildi.

Akciğer malondialdehide düzeylerine bakıldığında ticlopidin'in, akciğer reperfüzyon hasarından koruduğu ortaya çıktı. Karaciğerde ve iskelet kasında istatistiksel anlamlı olmamakla birlikte malondialdehide düzeylerinde sayısal azalma vardı. Soleus kası canlı hücre oranları, iskemi ve iskemi-reperfüzyon uygulanan gruplarda, kontrol grubuna göre anlamlı azalırken, ticlopidin grubunda kontrol grubuna yakındı. İskemi ve reperfüzyon grubunda, ticlopidin grubuyla karşılaştırıldığında canlı hücre sayısı arasında oldukça anlamlı istatistiksel fark bulunurken, iskemik grup ile reperfüzyon grubunda canlı hücre oranları arasında fark yoktu. Bu çalışmada, ticlopidin'in iskelet kası iskemi-reperfüzyon hasarında görülen, lokal ve sistemik etkileri, hem histopatolojik hem biyokimyasal olarak azalttığı gözlenmiştir. Çalışma bütünüyle değerlendirildiğinde, özellikle kronik atherosklerotik hastalıkta profilakside kullanılan

ticlopidinin olası bir akut tıkanma durumunda reperfüzyonun sağlanmasına yönelik girişimler sonrasında oluşabilecek iskemi-reperfüzyon hasarını azaltmada faydalı olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: İskemi reperfüzyon hasarı, Tiklopidin

Summary

Ticlopidin is a well-known antithrombocytic drug used in the prophylaxis of arteriosclerotic diseases. Ticlopidin is supposed to reduce ischemia reperfusion injury with its effects against platelet aggregation which play important roles in ischemia reperfusion injury by means of different mediators.

32 female Sprague-Dawley rats were randomised to four groups one being as control in the study design. Only anesthesia was performed to group 1 (n=8). The right hind limb ischemia was induced by tourniquets applied at the hip level group 2 (n=8). After 4 hours the samples were collected before tourniquets were removed. Group 3 (n=8) and group 4 (n=8) rats were randomised to 2 hours of reperfusion after 4 hours of ischemia. Ticlopidin (50 mg/day) were given five days before the experiment day twice daily to the animals in the group 4. Tissue malondialdehyde levels were recorded by thiobarbituric acid method as a marker for lipid peroxidation. According to the lung levels of malondialdehyde, ticlopidin was found to be effective against lung reperfusion injury. Malondialdehyde levels showed numerical reduction in the skeletal muscle and liver without reaching statistical significance. The percentage of viable cells were similar between the ticlopidin and control group and it showed significant decrease in ischemia and ischemia reperfusion groups. In this study it is approved that ticlopidin reduced the local and systemic effects of ischemia reperfusion injury of the skeletal muscle by hystopathologic and biochemical means.

Ticlopidin, used as a profilactic agent against chronic arteriosclerotic diseases can prevent ischemia reperfusion injury in acute ischemic occlusions.

Keywords: Ischemia reperfusion injury, Ticlopidin

Giriş

Akut ekstremite iskemisi kollaterallerin gelişmiş olduğu kronik ateroskleroz varlığında bile ciddi mortalite ve morbiditeye yol açabilen klinik bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Akut iskemik duruma yol açan neden ortadan kaldırılıp reperfüzyon sağlandığında da mortalite ve morbidite riski devam etmektedir. Hatta cerrahi müdahalenin geciktiği olgularda bu riskler artarak karşımıza çıkmaktadır (1). Ekstremitte reperfüzyonu tam olarak sağlansa ible ekstremitte kaybına, akut böbrek ve solunum yezmezliğine, kalp, barsak, beyin, dalak gibi dokularda fonksiyon bozukluğuna yol açacak olaylar zinciri başlar (2). Bu “reperfüzyon hasarı” veya Haimovici'nin önerdiği şekliyle “myonefropatik metabolik sendrom” olarak adlandırılan olaylar özellikle geç girişim yapılmış akut olgularda mortalite ve morbiditenin esas nedenidir (3). Akut ekstremitte iskemisinin cerrahi olarak giderilmesi ile ilgili cerrahi tekniklerdeki gelişmelere rağmen bu istenmeyen olaylardan tamamen kurtulmak mümkün olmamıştır ve bu konuda çalışmalar devam etmektedir (4).

Doğaldır ki bu konumu önlemeye yönelik yöntem ve ilaçların bulunması için öncelikle bu durumu başlatan, ortaya çıkartan nedenleri ve olayların gelişiminin ortaya konması gerekmektedir. Bu konuda yapılan oldukça kapsamlı ve kıkis çalışmalarda reperfüzyon hasarı olarak adlandırılan %30-50 civarında ekstremitte kaybına %30-80 gibi değişen ve yüksek oranlarda mortaliteye neden olan bu olayda iskemi sonrası Ca²⁺ yüklenmesi, asidoz, enerji sağlayan depoların boşalması ve bu olaylar sonrası O₂'le yeniden karşılaşma döneminde oluşan serbest O₂ radikallerin başlattığı, hücre ölümü ile sonuçlanan nötrofil aktivasyonunun rol oynadığı gösterilmiştir (5). Antioksidan maddelerin kullanımı ile bu istenmeyen reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik çalışmalar devam etmektedir. Bu amaçla, C ve E vitamini, süperoksiz dismutaz, mannitol, allopurinol, desferioksamin gibi maddeler üzerinde çalışmalar yapılmıştır (6,14-16). Amacın akut iskemi sonrası reperfüzyon hasarını en aza indirmek olduğu düşünülerek bizde çalışmamızda antitrombotik bir ajan olan ticlopidinin akut ekstremitte iskemisinde rolünü Hardy ve arkadaşlarının (7) tanımladığı akut iskemi reperfüzyon modeli üzerinde canlı hücre ölümü ve serbest O₂ radikalleri ile başlayan olayların son ürünü olan malondialdehide (MA)'ın karaciğer, akciğer ve iskelet kasında ölçülmesi ile olası doku etkilerini araştırmayı amaçladık. Lapenna ve arkadaşlarının (8) ticlopidinin düşük dansiteli lipoproteinlerin oksidasyonu üzerine antioksidan etkisini gösterdikleri çalışmalarına ve platelet activating faktör (PAF) ile indüklenen trombosit kümeleşmesini önlediği görüşüne dayanarak bir antitrombotik ajan olan ve kronik iskemide koruyucu amaçlı kullanılan ticlopidinin özellikle kronik iskemi zemininde gelişebilecek, akut iskemi durumunda reperfüzyon hasarını azaltıcı etkisinin ortaya konması planlanarak çalışma gerçekleştirildi (9).

Materyal ve Metod

Çalışma Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı alındıktan sonra Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı. Sprague-Dawley cinsi, 350-450 gr. ağırlığında 32 adet dişi rat çalışma kapsamına alınarak 8 rattan oluşan 4 gruba ayrıldı. Grupların dağılımı şöyleydi:

GRUP 1: Kontrol grubu iskelet kası reperfüzyon hasarında ticlopidin

GRUP 2: Alt ekstremitte iskemisi oluşturulan ve reperfüzyon uygulanmayan grup

GRUP 3: Alt ekstremitte iskemisi ardından 6 saat sonra reperfüzyon yapılan grup

GRUP 4: Alt ekstremitte iskemisi yapılan, iskemi sonrası reperfüzyon uygulanan ve 5 gün önceden başlanarak oral ticlopidin verilen grup

Oda havasında, 20 °C'de, Ketamin HCl (Ketalar®) 30 mg/kg ve Xylozin HCl (Rompun®) 2 mg/kg sol ön ayak adelesine intramusküler yolla uygulanarak anestezi sağlandı. Grup 1'de (G1) (n=8) sadece anestezi uygulandı ve 6 saat beklemeden sonra soleus kası, karaciğer ve akciğer dokusu çıkarıldı. Grup 2'de (G2) (n=8) anestezi verdikten sonra sağ arka ekstremitte, kalça eklemi hizasından turnike ile sıkıldı. Dört saat bekleme sonrası turnike açılmadan soleuskası, karaciğer ve akciğer dokusu çıkarıldı. Grup 3 (G3) (n=8) ve 4'de (G4) (n=8) dört saat iskemi sağlandıktan sonra turnike açıldı ve iki saat süreyle reperfüzyona bırakıldı. Reperfüzyon süresi bittiğinde tüm deneklerin soleus kası, karaciğer ve akciğer dokuları çıkarıldı. Grup 4 deneklerine, deneyden önce beş gün süre ile diclopidin (Ticlid® 50 mg/kg), orogastrik tüp aracılığı ile günde iki kez verildi. Ticlopidinin parenteral formu olmadığından uygun dozda ve sürede oral formu kullanıldı. Tüm deneklerin soleus kaslarında, karaciğer ve akciğer dokularında lipit peroksidasyonu göstermek amacıyla doku lamondialdehide (MA) düzeyi 532 nm.de spektrofotometrik yöntemle ölçüldü (UV 1202 Shimadzu). Alınan soleus kaslarında canlı hücre oranını tesbit etmek için, nitroblue tetrazolium (NBT) ile histokimyasal boyama yöntemi kullanıldı. Alınan kas örneklerinden crycut (Reicher-jung crycut 1800) kullanılarak dört farklı bölgeden koronal kesit elde edildi. Tris-HCl tampon çözeltisinde pH 7.4 olmak üzere, 50 mg/100 ml NBT ile 37 °C'de 30 dakika bekletilerek ve NA süksinat ile 1/10 oranında karıştırılarak kesitler boyandı. Mikroskopik incelemede canlı hücreler koyu mavi renge boyanırken, mekroze hücreler soluk sarı renkte boya almamış olarak gözlemlendi. Her kas dokusunun dört farklı yerinden alınan doku kesitlerinden x100 mikroskopik büyütmede canlı hücre yüzdesi planimetrik yöntem ile saptandı. Canlı hücrelerin tüm alana oranı % olarak hesaplandı.

Tüm sayısal veriler ortalama ± standart sapma olarak gösterildi. Gruplar arasında malondialdehide değerlendirilmesinde “Kruskal-Wallis ANOVA by ranks” (A); G2, G3, G4 gruplarının canlı hücre oranlarının G1 ile karşılaştırılmasında “Mann Whitney U” (MWU) nonparametrik istatistiksel yöntemleri kullanıldı. P < 0.05 istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirildi. Tüm istatistiksel testler U.Ü. Tıp Fakültesi Bioistatistik bölümüne danışılarak bilgisayar ile Statistica® (statsoft inc) programı kullanılarak gerçekleştirildi.

Sonuç

Tüm denekler mortalite olmaksızın çalışmayı tamamladı. Olguların soleus kası, akciğer, karaciğer malondialdehide değerleri ve canlı hücre oranlarının her grupta ölçülen değerleri Tablo 1'de izlenmektedir.

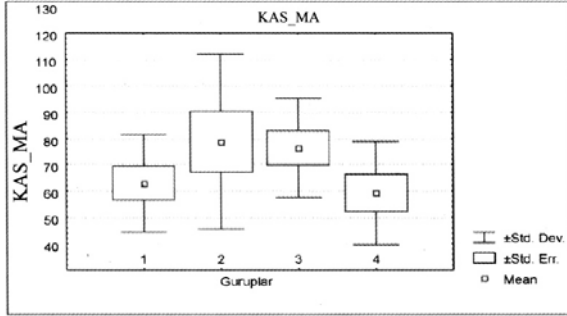
Tablo 1: Tüm gruplardan elde edilen doku Malondialdehide düzeyleri (nmol/gr doku) ve soleus kası canlı hücre oranları.

	G1 (n=8)	G2 (n=8)	G3 (n=8)	G4 (n=8)
Soleus kası MA	72.9±18.5	88.7±33.6	86.3±18.9	69.2±19.6
Karaciğer MA	311±28.0	332.8±67.1	362.1±47.8	347.2±45.9
Akciğer MA	150.2±32.5	159.2±50.9	186.4±30.1	123.9±24.5
Soleus kası CH %	71.7±5.7	31.6±8.6	27.5±5.4 *	68.7±8.8

MA: Malondialdehide CH: Canlı hücre

Soleus kası MA düzeyleri G1 ile karşılaştırıldığında, G2, G3 ve G4'de istatistiksel anlamlı olarak saptanmadı. Aynı şekilde G2 v G3; G3 ile G4 arasında da anlamlı farklılık yoktu (Grafik 1).

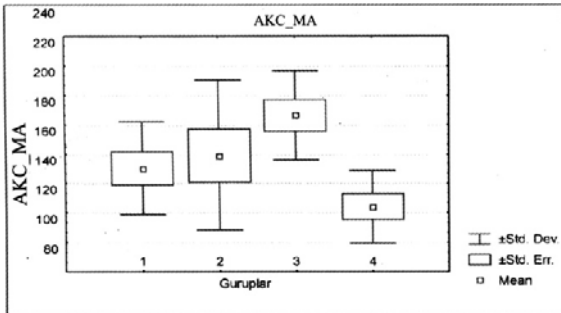
Grafik 1: Soleus kası malondialdehide sonuçları. Gruplar arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır.



KAS_MA: Kas Malondialdehide

Akciğer dokusu MA düzeylerine bakıldığında, G1 ile G2 karşılaştırıldığında anlamlı bir fark yokken, G1 ile G3'ün karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlı farklılık ($p < 0.05$) vardı. Yine G1 ile G4'in karşılaştırması yapıldığında anlamlı farklılık saptanmadı. Grup 2 ile G3 ve G4 arasında anlamlı fark saptanmazken, G3 ve G4 arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark mevcuttu ($p < 0.05$). Akciğer dokusu MA düzeyleri Grafik 2'de görülmektedir.

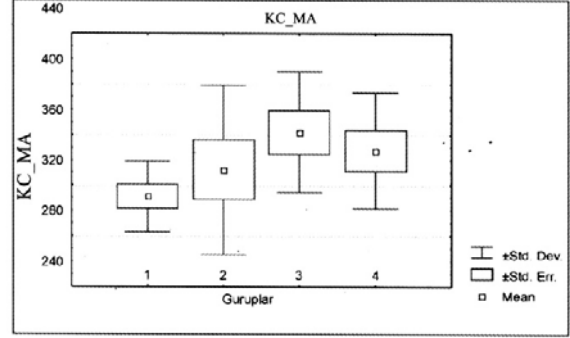
Grafik 2: Akciğer Malondialdehide seviyelerinin grafiksel görünümü. Gruplar arasında yapılan karşılaştırmada G1 ile G3 arasında ($p < 0.02$) ve G3 ve G4 arasında ($p < 0.002$) istatistiksel anlamlı fark saptandı.



AKC_MA: Akciğer Malondialdehide

Karaciğer dokusu MA düzeylerinde G1 ile karşılaştırıldığında G3'de istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış vardı ($p < 0.05$). Diğer gruplar arasında KC MA düzeyleri açısından anlamlı fark saptanmadı. Karaciğer dokusu MA düzeyleri Grafik 3'de belirtilmiştir.

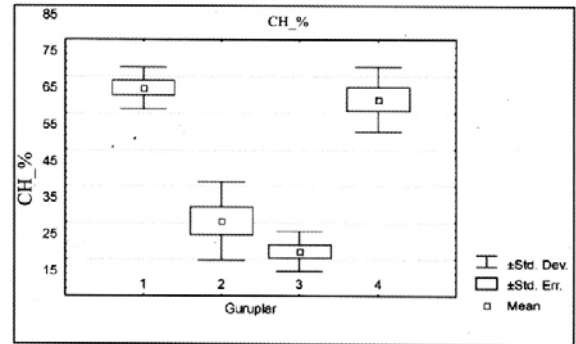
Grafik 3: Karaciğer Malondialdehide sonuçları grafik olarak gösterilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmada G1 ile G3 arasında istatistiksel fark saptanmıştır. $P < 0.01$



KC_MA: Karaciğer Malondialdehide

Altı saat süre ile sadece anestezi uygulanan kontrol grubu deneklerin (G1) kas örneklerinde canlı hücre oranı %71.1 olarak saptandı. Kontrol grubu ile dört saatlik iskemi uygulanan G2 karşılaştırıldığında canlı hücre oranlarında istatistiksel anlamlı ($p < 0.005$) fark saptandı. Grup 3'de kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı ($p < 0.005$) fark saptandı. Ticlopidin verilmiş olan G4'de ise, diğer grupların aksine kontrol grubuna göre farklılık yoktu. G2 ve G3 ile G4 arasında ise istatistik açıdan anlamlı fark saptandı. Grupların canlı hücre oranları Grafik 4'de gösterilmiştir.

Grafik 4: Gruplarda görülen canlı hücre oranı. G1 ile karşılaştırıldığında G2 ve G3 gurubunda anlamlı fark saptandı ($p < 0.005$). G1 ile G4 arasında istatistiksel bir fark saptanmadı.



CH_% : Canlı hücre yüzdesi

Tartışma

Akut ekstremitte iskemisini takiben, ekstremitenin yeniden kanlandırılması ve normal dolaşımın sağlanması halen şiddetli doku hasarı ve sistemik komplikasyonları birlikte getirmektedir. Literatürde ölüm oranı %15-52, amputasyon ise %12-22 olarak belirtilmiştir.

En iyi cerrahi müdahaleden sonra bile yalnızca %60-70 olguda tam düzelme sağlanabilmektedir (10). Bu artmış mortalite ve morbiditenin sebebi, reperfüzyon hasarının etkisiyle ortaya çıkan myonefropatik-metabolik sendromdur. Uzun süre iskemik kalmış ekstremitenin tekrar kanlandırılmasıyla ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin, endotel ve nötrofillerle etkileşerek, lipid peroksidasyonunu hızla arttırması lokal ve sistemik bir çok etkinin ortaya çıkmasına neden olur. Hücre şişmesi, ödem, toksin ve myoglobulin salınımı ile beraber serbest oksijen radikallerinin etkisi ile, akut böbrek yetmezliği, akciğer ödemi, ani erişkin solunum sıkıntısı sendromu, şok karaciğeri gibi sistemik hasarlar gelişebilir (11).

İskemi reperfüzyon (İR) hasarının mekanizmasının tam olarak anlaşılması hasarın çabuk ve en uygun şekilde önlenmesini sağlayacaktır. Klinikte uygulanabilecek stratejilerin geliştirilmesi için klinik olarak uygulanan tedavinin etkinliğinin doğru bir şekilde ölçülmesi gerekmektedir. Hayvan laboratuvarında intakt ekstremitede mikrovasküler hasarın ve doku hasarının morfolojik, biokimyasal olarak ortaya konabilmesi halen sorun yaratmaktadır (12). Ekstremitenin ve fonksiyonlarının korunması birinci derecede önemlidir ancak bu yalnızca doku korunmasının gözönünde olan bulgusudur, gerçekte önemli olan dokuların kurtarılmasıdır. Reperfüzyon hasarını önleyebilecek yöntemlerin geliştirilmesi öncelikle hasarın yoğunluğunun ve sağlam ekstremitede tedavinin etkin olabildiğinin gösterilmesi üzerine yoğunlaşmakla mümkün olacaktır. Tabii ki özellikle alt ekstremitede İR hasarının oluşumunun azalması için en önemli olan erken tanı ve mümkün olduğunca erken revaskülarizasyonun sağlanmasıdır.

Reperfüzyon hasarı dokunun yeniden oksijenle karşılaşma periodu sırasında üretilen toksik serbest oksijen radikallerine bağlı gelişmektedir (13). Serbest oksijen radikalleri organizma tarafından bazı temizleyici sistemlerle yok edilmeye çalışılır. Serbest oksijen radikallerinin etkisini önlemede mannitol, allopürinol, askorbik asit, süperoksit dismutaz gibi bazı maddeler denenmiştir ve deneysel olarak İR hasarını önlemede etkili oldukları gösterilmiştir (6,14-16).

Serbest radikaller dış halkasında eşitlenmemiş bir elektron bulunan atom veya moleküllerdir. Hücresel solunum ile moleküler oksijenin %98'i suya yıkılırken %2'si süper oksit radikale dönüşerek ortadan kalkar. Bu toksik molekül mikrosaniyeler içerisinde süperoksit dismutaz tarafından suya indirgenir. Normalde oluşan serbest radikallerden organizma, süperoksit dismutaz veya katalaz gibi intraselüler enzimler aracılığıyla korunur. İskemi sırasında anaerobik metabolizma fonksiyonları çalışmaya başlar. Hücrenin asidik hale gelmesiyle membran sistemleri bozulur ve kalsiyum ile katyonlar hücre içine girerler. Aynı zamanda adenosin trifosfat, inozin ve hipoksantine indirgenir (17). Reperfüzyon sırasında, hipoksantin kalsiyumun etkisiyle moleküler oksijenden serbest oksijen radikallerine yıkılır. Oluşan serbest oksijen radikalleri, hasarlanmış hücre membranındaki yağ asit radikalleri ile etkileşerek lipid peroksidasyon reaksiyonunu oluşturur (18,22). Bu etkiler, ekstremitenin bütünlüğünü bozabileceği gibi, sistemik olarak kalp, bağırsak, beyin, böbrekler, akciğer, dalak üzerine de etki göstererek yaşamı da tehdit edebilir (19).

Bu çalışma İR hasarının doku üzerine etkilerini ortaya koymak ve ticlopidinin koruyucu etki yapabileceği düşünülecek planlandı.

Ticlopidin bir tiopridin türevidir ve plazmada terapötik doza 72 saatte ulaşır (20). Hardy ve ark.'nın (7) tarif ettiği iskelet kası İR modeli kullanılarak çalışma gerçekleştirildi. Ekstremitenin kalça hizasından lastik bant ile bağlanması ekstremitede kan akımını %98 azalttığı gösterilmiştir (21). Arteriyel akımdaki bu submaksimal azalmanın insandaki akut arteriyel tıkanma ile benzerlik gösterdiği düşünülmektedir.

Lipit peroksidasyonun son ürünleri, aldehitler, hidrokarbon gazları ve malondialdehid. Serbest oksijen radikallerinin gösterilebilmeleri çok kısa ömürlü oldukları için son derece zordur. Özellikle biyolojik serbest oksijen reaksiyonları, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehidin (MA) gösterilmesine dayanır (23). Bu yüzden bu çalışmada reperfüzyon hasarının ortaya konabilmesi için MA ölçümü yapılmıştır.

Deneklerden alınan soleus kası örneklerinde canlı hücre oranı G1'de %71± 5.7 olarak saptanmıştır. Bu yaklaşık %30 civarındaki hücre kaybının kullanılan yöntemlerle ilgili olduğu düşünülmektedir. Canlı hücre oranındaki bu kayıp, G1 grubundan soleus kas dokusu örneklerin alınması ya da 80 °C dondurularak alınan frozen kesitlerinin boyanması sırasında bir miktar hücrenin canlılığını yitirmesi sonucu olabilir. Gene nitroblue tetrazolium (NBT) boyama yöntemi, 12-16 saat reperfüzyon sürecinden sonra yani sitoplazmik enzim aktivitesinin tamamen yok olmasından sonra en üst düzeyde doğruluk göstermektedir. Daha erken alınan kas örneklerinde hatalı pozitif oranı artabilir (24). Ancak tüm grupların aynı yöntemle ve aynı zamanda boyandığı düşünülürse, bu yöntemsel azalmanın anlamlı olmayacağı ve G1 kontrol grubuna göre diğer grupların karşılaştırılmaları yeterli olabilmektedir. Grup 2'de canlı hücre oranının, Grup 1'e göre belirgin bir şekilde azalması (%31 ± 8.6) ve istatistiksel olarak anlamlı (p < 0.05) olması, iskemi sonucu, doku canlılığını gösteren sitokrom enzim aktivitesinin azalmış olduğunu gösterir. G1 ile G4 arasında anlamlı farklılık yoktur ancak G2 ve G4 arasında canlı hücre sayısı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p < 0.05). Bu da ticlopidinin dokularda reperfüzyon sonrası gelişebilecek hücre ve doku kaybını önlemede etkin olabileceğinin bir göstergesidir. Benzer şekilde G1 ve G3 arasındaki karşılaştırmada azalmanın anlamlı farklılığının (p < 0.05) olması da bu görüşü desteklemekte ve reperfüzyon hasarının doku üzerinde yıkıcı etkisi olduğunu düşündürmektedir.

Soleus kası MA düzeylerinde gruplar arasında farklılığının olmaması, şu şekilde açıklanabilir: Lipit peroksidasyonunun en düşük olduğu seviye reperfüzyonun 2-4. saatlerinde, en yüksek seviyesi ise 18. saattedir (25). Grup 3 ve G4 MA düzeylerinin, reperfüzyonun 2. saatinde çalışıldığı için göreceli olarak düşük çıktığı düşünülebilir.

Akciğer dokusu MA düzeylerinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında G2'de anlamlı farkın olmaması yine iskeminin lipid peroksidasyonunu başlatmadığını düşündürür. G1, G3 karşılaştırmasında karaciğer MA düzeylerinde anlamlı artış (p < 0.05) saptanmıştır. Reperfüzyonun, erken dönemde lipid peroksidasyonu tetiklediği ve endojen koruyucu mekanizmaların erken tükendiği veya etkili olmadığı düşünülebilir.

Ekstremitede iskemisini takiben yapılan reperfüzyon sonrasında görülen akciğer hasarı da lipid peroksidasyonu sonrası gelişen toksik maddelerin akciğere olan etkileri sonucudur (11).

Reperfüzyon süresindeki hasarın büyük bölümü, polimorfonükleer lökositlerin inflamatuvar aktivitesiyle açıklanabilir. Akciğerdeki hasarlanma reperfüzyonun 30-45. dakikalarında başlar ve bu erken etkiler nötrofil aktivasyonu sonucudur (26). Akciğer hasarlanmasının esas nedeni nötrofillerle endotelin etkileşmesi sonucu gelişen daha önce açıkladığımız olaylar zinciridir. Akciğer dokusu malondialdehide düzeylerinde, G1 ile karşılaştırıldığında G4'de belirgin bir artış olmaması ve reperfüzyon grubu ile (G3) karşılaştırıldığında arada belirgin istatistiksel fark olması ($p < 0.05$) tiklopidinin iskemi reperfüzyon hasarının, akciğer üzerindeki etkilerini azalttığı düşündürmektedir.

Karaciğer dokusu MA düzeylerinde, kontrol grubuna göre G2 ve G4'de anlamlı farklılık yokken G3'de anlamlı şekilde artış ($p < 0.05$) görüldü. Bu iskeminin kendisinin karaciğerde lipid peroksidasyonu başlatmadığı, ancak reperfüzyon ile birlikte lipid peroksidasyonunun oluştuğunu göstermektedir. Ticlopidin grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da G1 ile belirgin fark saptanması ticlopidinin karaciğer lipid peroksidasyonuna etkisinin olduğunu düşündürülebilir.

Bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak, akut arter tıkanıklığına yönelik akımın tekrar oluşturulması sonrası oluşabilecek özellikle lokal ve sistemik etkilerin azaltılmasında ticlopidinin profilaktik olarak kullanımının faydalı olabileceğini düşündürmektedir. IR hasarının mekanizmasının tam olarak anlaşılması hasarın çabuk ve ne uygun şekilde önlenmesini sağlayacaktır. Klinikte uygulanabilecek stratejilerin geliştirilmesi için klinik olarak uygulanan tedavinin etkinliğinin doğru bir şekilde ölçülmesi gerekmektedir. Hayvan laboratuvarında intakt ekstremitede mikrovasküler ve doku hasarının morfolojik ve biokimyasal olarak ortaya konabilmesi halen sorun yaratmaktadır. Ekstremitenin ve fonksiyonlarının korunması birinci derecede önemlidir ancak bu yalnızca doku korunmasının gözönünde olan bulgusudur, gerçekte önemli olan dokuların kurtarılmasıdır. Reperfüzyon hasarını önleyebilecek yöntemlerin geliştirilmesi öncelikle hasarın yoğunluğunun ve intakt ekstremitede tedavinin etkin olabildiğinin gösterilmesi üzerine yoğunlaşmakla mümkün olacaktır. Tabii ki özellikle alt ekstremitede IR hasarının oluşumunun azalması için en önemli olan erken tanı ve mümkün olduğunca erken revaskülarizasyonun sağlanmasıdır.

Kaynaklar

1. Robert W. Hobson II, Vincent J. Milazzo, Walter N. Duran: Pathophysiology of skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. In: Haimovici's Vascular Surgery. Principal and Techniques (eds:H.Haimovici), 4thed. Blackwell Science, Cambridge 1996;497-508.
2. Parrino PE, Laubach VE, Gaughen JR, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase after myocardial ischemia increases coronary flow. *Ann Thorac Surg* 1998;66:733-9.
3. Haimovici H: Metabolic complications of acute arterial occlusions and skeletal muscle ischemia: Myonephropathic-metabolic syndrome: In: Haimovici's Vascular Surgery. Principal and Techniques (eds: H.Haimovici), 4th ed. Blackwell Science, Cambridge 1996;509-30.
4. Cohen LH, Kaplan M, Bernhard VM: Intraoperative streptokinase: an adjunct to mechanical thrombectomy in the management of acute ischemia. *Arch Surg* 1986;121:708-15.

5. Hearse DJ: Ischemia, reperfusion, and the determinants of tissue injury. *Cardiovasc Drugs and Ther* 1990;7:67-76.
6. Shah DM, Bock DE, Darling RC 3rd, Chang BB, Kapinski AM, Leather RP: Beneficial effects of hypertonic mannitol in acute ischemia-reperfusion injuries in humans. *Cardiovasc Surg* 1996;4:97-100.
7. Hardy SC, Homer- Vanniasinkam S, Gough MJ: The triphasic pattern of skeletal muscle blood flow in reperfusion injury: an experimental model with implications for surgery on the acutely ischemic lower limb. *Eur J Vasc Surg* 1990;4:587-92.
8. Lapenna D, de Gioia S, Ciofani G, et al. Antioxidant properties of ticlopidine on human low density lipoprotein oxycylation. *FEBS Lett* 1998;436:357-60.
9. Zusman RM, Chesebro JH, Comerota A, et al. Antiplatelet therapy in the prevention of ischemic vascular events: literature review and evidence-based guidelines for drug selection. *Clin Cardiol* 1999;22:559-73.
10. Homer- Vanniasinkam S, Gough MJ: Role of lipid mediators in the pathogenesis of skeletal muscle infarction and oedema during reperfusion after ischemia. *Br J Surg* 1994;81:1500-3.
11. Groeneveld AB, Raijmakers PG, Rauwerda JA, Hack CE: The inflammatory response to vascular surgery-associated ischemia and reperfusion in man: effect on postoperative pulmonary function. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997;14:351-9.
12. Hardy SC, Gough MJ: Pharmacological manipulation of gastrocnemius muscle blood flow in an animal model of reperfusion injury. *J Biomed Eng* 1991;13:263-6.
13. Ferrari R, Ceconi C, Curelo S, et al. Role of oxygen free radicals in ischemic and reperfused myocardium. *Am J Clin Nutr* 1991;53:215-22.
14. Smeets HJ, Camps J, Van Milligen de Wit AW, et al. Influence of low dose allopurinol on ischaemia-reperfusion injury during abdominal aortic surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1995;9:162-9.
15. Sciamanna MA, Lee CP: Ischaemia/reperfusion - induced of forebrain mitochondria and protection by ascorbate. *Arch Biochem Biophys*. 1993;305:215-24.
16. Genç F, Tütüncü A et al: Alt ekstremitenin deneysel iske-mi-reperfüzyon modelinde süperoksit dismutazın lokal-sistemik etkileri engellemedeki yeri. *Klinik ve Deneysel Cerrahi* 1998;6:211-7.
17. Ihnken K, Beyersdorf F, Winkelmann BR, Mitrev Z, Unkelbach U: Experimental application of controlled limb reperfusion after incomplete ischemia. *Br J Surg* 1996;83:803-9.
18. Beyersdorf F: Surgical management to avoid severe post-reperfusion syndrome. *Controlled limb reperfusion Transplant Proc* 1995;27:2795-8.
19. Lu YT, Hellewell PG, Evans TW: Ischemia-reperfusion lung injury: contribution of ischemia, neutrophils and hydrostatic pressure. *Am J Physiol* 1997;273:46-54.
20. Sharis PJ, Cannon CP, Loscalzo J: The antiplatelet effects of ticlopidine and clopidogrel. *Ann Intern Med* 1998; 129:394-405.
21. Mathru M, Dries DJ, Barnes L, Tonino P, Sukhani R, Rooney MW: Tourniquet-induced exsanguination in patients requiring lower limb surgery: an ischemia-reperfusion model of oxidant and antioxidant metabolism. *Anesthesiology* 1996;84:14-22.

22. Ikezawa T, Nishikimi N, Oba Y: Lipid peroxides in the mechanism of ischemia- reperfusion injury in skeletal muscle. *Vasc Surg* 1993;27:191-201.
23. Draper HH, Hadley M: Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation *Methods Enzymol* 1990; 186:421-31.
24. Labbe R, Lindsay T, Gatley R, et al. Quantitation of postischemic skeletal muscle necrosis: histochemical and radioisotope techniques *J Surg Res* 1988;44:45-53.
25. Blaisdell FW, Steele M, Allen RE: Management of acute lower extremity arterial ischemia due to embolism and thrombosis *Surgery* 1978;84:822-34.
26. Tassiopoulos AK, Hakim TS, Finck CM, et al. Neutrophil sequestration in the lung following acute aortic occlusion starts during ischaemia and can be attenuated by tumour necrosis factor and nitric oxide blockade. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1998; 16:36-42.