

DENEYSEL DONUK TEDAVİSİNDE BİR PROSTASİKLİN ANALOĞU, İLOPROST® KULLANIMI

İrfan ÖZYAZGAN*, Mustafa TERCAN**, Mehmet BEKERECİOĞLU***, Hüseyin ÜSTÜN****

* Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı

** İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı,

*** Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı,

**** Ankara Hastanesi Patoloji Bölümü

ÖZET

Lokalize soğuk yaralanmasındaki dermal iskemiden araziidonik asit yıkım ürünleri sorumlu tutulmaktadır. Bu nedenle deneysel donuk tedavisinde antiprostaglandin ajanlar denenmiş ve donuk bül sıvılarında agregan ve vazokonstriktör prostaglandin F2a ve tromboksan B2'nin arttığı gösterildikten sonra klinik tedavide aspirin ve ibuprofen kullanılır olmuştur. Ancak bu ajanlar etkilerinde seçici değildir. Antiagregan ve vazodilatör etkileri olan (prostasiklin gibi) tüm prostaglandinlerin de yapımını engellemektedirler. Bu durumda klinik donuk tedavisinde kabul görmüş antiprostaglandin ajanların kullanımı tartışılmalı ve donuk fizyopatolojine göre başka tedavi alternatifleri düşünülmelidir. Bu çalışmada tavşan kulaklarında yapılan deneysel donukta bir sentetik prostasiklin analogu olan "iloprost®" un etkinliği araştırıldı. Kulaklarında donuk oluşturulan tavşanlara 3 gün, günde 2 kez, 20mg/kg, intraperitoneal iloprost® verildi. İloprost®, donuk dokuda iltihabi hücre (nötrofil lökosit ve mast hücresi) sayılarını azaltırken donuk doku canlılık oranını artırdı. Klinikte başka kullanım alanları bulunan iloprost®'un, yeni çalışmalar ile de donukta etkinliğinin gösterilmesi halinde, klinik donuk tedavisinde bir alternatif olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: donuk, prostaglandin, iloprost®

GİRİŞ

"Donuk", soğuk yaralanmalarının lokalize tipidir. Donuk fizyopatolojisi tam anlaşılammış olmakla birlikte, sonuçtaki doku kaybından soğukun yaptığı direk hücre hasarı, erimenin gerçekleşmesinden sonra görülen arteriyel daralma ve kan akımının bozulması ile ilerleyen mikrovasküler tromboz olayları sorumlu tutulmaktadır¹⁻⁵. Donukta, donan kanın dolaşımının tamamen durması ve erime olayından sonra kan akımının tekrar başlaması şeklinde bir "no-reflow" fenomeni gözlenir⁶. Donuğun klinik tedavisi ile ilgili temel prensipler deneysel bazı

SUMMARY

The Use Of A Prostacycline Analogue, Iloprost® in Experimental Frostbite Injury

The degradation products of arachidonic acid have been accused of the dermal ischemia in frostbite injury. Antiprostaglandin agents have been experienced in experimental frostbite injury for this respect and aspirin and ibuprofen have been used in clinical frostbite since the increase of prostaglandin F2 a and thromboxane B2 had been detected in human frostbite bulla. But these agents are not selective and inhibit the production of all prostaglandins including vasodilator and antiaggregant such as prostacycline. Hence the use of them should discuss and alternative treatment methods should be considered.

In this study, we examined the effects of Iloprost®, a synthetic prostacycline analogue, in experimental frostbite injury of rabbit ears. Iloprost® was injected intraperitoneally to the rabbits which their ears had been subjected to frostbite injury, at 20mg/kg, 2 times in a day for 3 days. Iloprost® increased the survival while reducing the number of inflammatory cells (neutrophil leukocytes and mast cells) in frostbitten tissue. It was concluded that, Iloprost® which has been used in different clinical situations can be an alternative in clinical frostbite treatment if its efficacy could be shown in further frostbite experiments.

Key Words: frostbite, prostaglandin, iloprost®

çalışmalar ile klinik gözlemlerden kaynaklanmaktadır. Fazla sayıda görülmeyen donuk vakaları klinikte karşılaştırmalı çalışmalar yapılabilmesine imkan vermemektedir. Az sayıdaki çalışmanın sonucunda klinik donuk tedavisinde, etkinliği deneysel olarak gösterilmiş olan hızlı yeniden ısıtma⁷⁻¹⁰ ve lokal yara bakımına ek olarak, antiprostaglandin ajanlar olan aspirin ve ibuprofen ile klinikte donuk bül sıvılarında artmış olduğu gösterilen tromboksan A2 ve prostaglandin F2a gibi agregan ve vazokonstriktör prostaglandinlerin oluşumunun engellenmesine çalışılmaktadır¹¹. Deneysel

olarak prostaglandin E1^{9,12}, prostaglandin E2¹³ ve streptokinaz⁸ ile mikrosirkülasyonun iyileştirilmesine ve donukta doku hasarının azaltılmasına çalışılmıştır. Ayrıca serbest radikal oluşumunun engellenmesine yönelik çalışmalar da bulunmaktadır^{6,14}. Daha önceki çalışmalarımızda, donuk dokuda, iltihabi hücreler olan nötrofil lökositler ile mast hücrelerinin ve tromboksan A2 ile prostasiklinin arttığı, Defibrotide® (polideoksiribonükleotid-sodyum) ile tedavi edilen donuk dokuda iltihabi hücre sayısının azaldığı, prostasiklin düzeyinin daha da arttığı ve donuk doku yaşam oranının olumlu yönde etkilendiği gösterilmişti^{15,16}. Adı geçen deneyde donuk dokuda olumlu olarak kabul edilen sonuçların alınmasında, antiagregan, vazodilatör ve antiinflamatuvar etkilere sahip bulunan "prostasiklin" in etken olduğu ön görülebilir. Bu noktadan hareketle, bir prostasiklin sentetik analogu olan "iloprost®" adlı ilacın deneysel donuk tedavisinde faydalı olup olamayacağını göstermek amacıyla bu çalışma yapıldı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Deneyde ağırlıkları 1150-3200 gram arasında değişen 20 adet Yeni Zelanda tipi beyaz tavşan kullanıldı. Hayvanlar cins ayrımı yapılmadan, iloprost® ve kontrol olmak üzere 2 gruba ayrıldı.

Daha önceki deneysel donuk çalışmalarına benzer şekilde^{5,14-19}, aşağıdaki gibi donuk oluşturuldu: Tavşanların 80 mg/kg ketamin ile anestezisi sağlandıktan sonra kulaklarının her ikisi kuru olarak tıraş edildi. Kulak ucundan 5 cm proksimalden kulak eksenine bir dik çizilerek bu hattın distalinde kalan kısmın alanı bir şeffaf asetata aktarıldıktan sonra bir kalın bir kartona kalıpları çıkarıldı. Bu kalıpların ağırlıklarından yararlanarak yüzey alanı hesap edildi. Kulak ucundan 2 cm proksimale, deri altına bir "thermocouple" probu yerleştirilerek kulak ısısı takibi yapıldı. Kulaklar bu haliyle, önceden işaretlenmiş olan çizgiye kadar, bir bakır kabın içersinde bulunan -25 °C ısıdaki etil alkolle, 3 dakika süre ile daldırıldı. Üçüncü dakikadan sonra kulaklar alkolden çıkarılarak oda ısısında kendiliğinden erimeye bırakıldı. Donuk oluşturma ve erime sırasında kulak ısıları belli aralıklarla ölçüldü. Aynı işlem tavşanın diğer kulağı için de tekrarlandı. Donuk oluşturmak için seçilen süre ve ısı, önceki deneysel donuk çalışmalarına uygun olarak, canlılık oranı % 40 olacak şekilde ön çalışmalarda belirlendi.

Kulaklarda erime işleminin tamamlanmasından sonra iloprost® grubundaki tavşanlara, günde 2 kere intraperitoneal, 20mg/kg iloprost® (Schering) injekte edildi. Kontrol grubundaki tavşanlara ise aynı yolla serum fizyolojik verildi. Dördüncü gün tavşanların birer kulağından deri örneği alındı. Deri örneği, ön

çalışmalarda tedavisiz takip edilen kulaklarda gözlenen nekroz alanı ile canlı alan sınırmı içinde bulunduracak şekilde ayarlandı. Böylelikle, bu deri örneklerinde yapılacak değerlendirmelerin, donuğa bağlı iskemi alanının durumunu yansıtacağı düşünüldü. Deri örnekleri histopatolojik çalışma için formolin içinde saklandı.

Diğer kulaklar ise üçüncü haftaya kadar takip edilerek nekrotik kısmın ayrılması beklendi.

Histolojik analiz:

Formolin içinde saklanan deri örneklerinin basit doku takibinden sonra 5mm kalınlıkta doku kesitleri elde edildi. Kesitler nötrofil lökositler için hemotoksilen-eozin ve mast hücreleri için toluidin mavisi ile boyandı. Her bir örnekte 10 farklı alandan 400 büyütme ile hücreler sayılarak ortalamaları alındı.

Kulak canlılık oranları:

Deri örneği alınmayan kulaklardan canlı kalmış olan alanların yüzeyi, başlangıçtaki donuk alanıninkine gibi hesaplandı. Canlı kalan alanın donuk alanına oranlanması ile canlılık yüzdesi belirlendi.

İstatistiksel analiz:

Grupların ortalama canlılık oranları ve hücre sayıları, örnek sayısının azlığı nedeni ile Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı "P" değerinin 0.05'e eşit veya küçük olduğu durumlarda ortalamalar arasındaki fark anlamlı kabul edildi.

SONUÇLAR

Tavşanların hepsi işlemi iyi tolere ettiler. Donuk sonrası birinci gün kulaklarda aşırı ödem ve hiperemi, bazı kulaklarda sonraki günlerde bül oluşumu ve seröz sızıntı gözlemlendi. Beşinci günden sonra donuk alanlarda kuru nekroz oluşumu başladı. Üçüncü hafta içinde nekrotik kulak alanı ayrıldı.

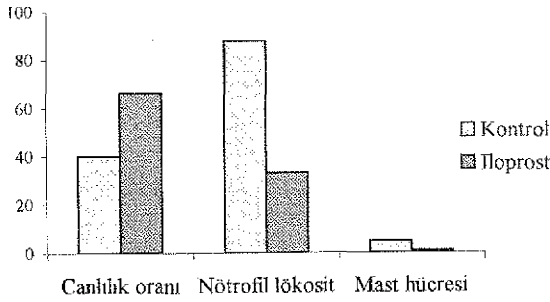
Donuk oluşturulmuş, serum fizyolojik ile tedavi edilmiş kontrol grubunda ortalama nötrofil lökosit sayısı 87.7, mast hücre sayısı 4.75 idi. İloprost® grubunda ise hücre sayıları, sırasıyla 33.25 ve 1 olarak belirlendi. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi (p<0.025).

Kontrol grubundaki canlılık oranı % 40.15, İloprost® grubunda ise % 66.25 idi. Grup ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi (p<0.05) (Şekil 1).

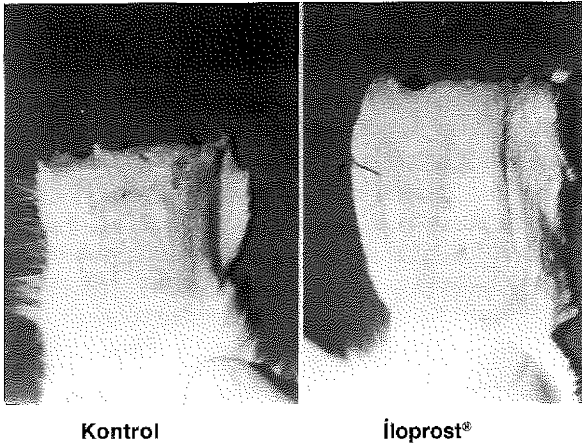
Tablo 1: Gruplarda ortalama canlılık oranları ve iltihabi hücre sayıları

Gruplar	Canlılık oranı (%) (SD)	Nötrofil lökosit sayısı (SD)	Mast hücresi sayısı (SD)
Kontrol	40.15 (24)	87.70 (7.6)	4.75 (0.9)
İloprost	66.25*(25)	33.25*(3.7)	1.00*(0.8)

* p<0.05. SD: Standart sapma



Grafik 1: Gruplarda ortalama canlılık yüzdesi ve iltihabi hücreler.



Şekil 1: Kontrol ve İloprost® grubu kulaklarda donuk sonrası oluşan nekrotik bölgenin ayrılmasından sonraki canlılık örnekleri.

TARTIŞMA

Donuk fizyopatolojisinde bazı bilinen gerçeklere rağmen olayların tümü aydınlatılamamıştır. Weatherley-White'ın donuk doku greftinin normal alıcı alanda yaşadığını göstermesinden sonra donuk doku canlılığını devam ettirmek, doku hasarını asgariye indirmek amacıyla çeşitli tedavi yöntemleri araştırılmıştır⁵. Bunlar içinde donuk bölgesinin hızlı yeniden ısıtılmasının faydası önceden beri bilinmektedir⁷⁻¹⁰. Ancak klinikte vakaların çoğu kez yavaş spontan erime ve ısınma olayının tamamlanmasından sonra görülmesi bu tedavi şeklinin pratik değerini ortadan kaldırmaktadır^{8,9}. Farmakolojik ajanlardan metil prednizolon, aloe vera krem, metimazol ve aspirin gibi siklooksijenaz inhibitörlerinin deneysel donukta canlılık oranını artırdığı gösterilmiştir¹⁷. Sonraki bir çalışma ile donuk vakalarında oluşan büllelerden alınan sıvılarda prostaglandin F2a ve tromboksan B2' nin artmış olduğu belirlenerek²⁰ siklooksijenaz inhibitörlerinin faydalı etkisinin nedeninin açığa çıktığı düşüncesi ile klasik donuk tedavisinde siklooksijenaz inhibitörlerinin kullanımı yerleşmiştir¹¹. Deneysel donukta nötrofil

lökosit ve mast hücresi gibi iltihabi hücrelerin sayısının arttığı bilinmektedir^{14,15}. Mileski ve arkadaşları da²¹, nötrofil lökositlerin adherans ve agregasyonunu engelleyen antikolar kullanarak deneysel donukta doku hasarını azaltmışlardır. Nötrofil lökositler serbest radikaller ve çeşitli proteazlar üreterek doku hasarına neden olduklarından, bu sonucun anlaşılabilirliği kolaydır²¹⁻²⁷. Nötrofil lökositler mikrodolaşıma olumsuz etkileri olan tromboksan üretimine de katkıda bulunmaktadır^{23,28,29}. Mast hücreleri, donukta doku ödemi artırıp doku perfüzyonunu azalttıkları için suçlanmıştır³⁰. Prostaglandin ve onun sentetik bir analogu olan iloprost®'un iltihabi hücre sayılarını azaltıcı etkileri iyi bilinmektedir³¹⁻³⁴. Bu çalışmada da iloprost grubunda, beklendiği gibi, iltihabi hücre sayıları azalmıştır. Donuk doku canlılığının artırılmasının bu bilgilerle açıklanması kolaydır. Defibrotide kullanımının deneysel donuk doku hasarını azalttığı çalışmamızda da iltihabi hücre sayılarının azaltılmış olması bu teoriyi destekler niteliktedir¹⁶.

İloprost®'un mikrodolaşım üzerindeki bilinen etkileri düşünüldüğünde ilk akla gelen sonuç dolaşımı artırmasıdır. Bu olay iskemik flep modelinde doğrulanmıştır³⁵. İloprost®'un ayrıca koroner arter ve grasilis kasında oklüzyon ve reperfüzyondan sonra, dokuda sirkülasyonu artırarak, nötrofil lökosit aktivasyonunu ve trombosit agregasyonunu azaltarak, infarkt alanını azalttığı gösterilmiştir^{34,36,37}. Mikrodolaşımı, vazodilatasyon ve antiagregasyonla iyileştirmek amacıyla prostasiklin kullanımı flep yaşamını artırmak için de denenmiştir^{38,39}. Prostaglandin ayrıca tromboksan A2 sentezini azalttığı bilinmektedir⁴⁰. Bu etkilerin toplam sonucu iskemik dokuda mikrodolaşımın artırılması, iltihabi olaylar ile zararlarının en aza indirilmesidir ki bu sonuç da donuk dokuda yaşam oranını artırılmasını sağlamış olabilir.

Donukta asıl fizyopatolojik olaya engel olunamamakta ve uygulanan tedavi yarı semptomatik görünmektedir. Bununla birlikte bölgedeki iltihabi olayların ve serbest radikal oluşumunun engellenmesi faydalı olabilmektedir. Kabul gören klinik tedavi şeklinde insan donuk bül sıvılarında arttığı gösterilen prostaglandin F2a ve tromboksan B2'nin oluşumunu engellemek için ibuprofen ve aspirin^{11,41-43} kullanılmaktadır. Ancak böyle bir durumda tüm prostaglandinlerin sentezleri engellenmiş olacağından antiagregan ve vazodilatör prostaglandinlerin yapımı da engellenmiş olmaktadır. Bu nedenle uygulanmakta olan tedavi şeklinin daha seçici prostaglandin sentez inhibitörlerinin kullanılması açısından yeniden gözden geçirilmesi gereklidir. Ayrıca dışarıdan antiagregan ve vazodilatör prostaglandinlerin verilmesi de bir tedavi şekli olabilir. Ne var ki bu ajanların yarı ömürleri çok kısadır ve sistemik yan etkileri bulunmaktadır. Bu

durumda daha uzun ve daha az yan etkili analoglarının verilmesi veya endojen sentezlerinin artırılması başka alternatifler olarak göz önüne alınmalıdır.

Dr. İrfan ÖZYAZGAN

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi

Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı

38039 Melikgazi - KAYSERİ

KAYNAKLAR

- Rakower S.R., Shakgoli S., Song L. Doppler ultrasound and digital plethysmography to determine the need for sympathetic blockage after frostbite. *J. Trauma* 18: 713, 1978.
- Snider R., Porter J.: Treatment of experimental frostbite with intra-arterial sympathetic blocking drugs. *Surgery* 77: 557, 1975.
- Bourne M.N., Piepkorn M.W., Clayton F., Leonard L.G.: Analysis of microvascular changes in frostbite injury. *J Surg Res* 40: 26, 1986.
- Reite P.B.: Functional qualities of small blood vessels in tissue injured by freezing and thawing. *Acta Physiol Scand* 63: 111, 1965.
- Weatherley-White R.C.A., Sjostrom B., Paton C.: Experimental studies in cold injury II. The pathogenesis of frostbite. *J Surg Res* 4: 17, 1964.
- Manson P.N., Jesudass R., Marzella L., Bulkley G.B., Im M.J., Narayan K.K.: Evidence for an early free radical-mediated reperfusion injury in frostbite. *Free Radic. Biol. Med.* 10: 7, 1991.
- Bellman S., Adams-Ray J.: Vascular reactions after experimental cold injury. A microangiographic study on rabbit ears. *Angiology* 7: 339, 1956.
- Salimi Z., Wolverson M.K., Herbold D.R., Vas W., Salimi A.: Treatment of frostbite with IV streptokinase: An experimental study in rabbits. *American Journal of Roentgenology* 149: 773, 1987.
- Yeager R.A., Campion T.W., Kerr J.C., Hobson R.W., Lynch T.G.: Treatment of frostbite with intra-arterial Prostaglandin E1. *Am Surg.* 49: 665, 1983.
- Hurley L.A.: Angioarchitectural changes associated with rapid rewarming subsequent to freezing injury. *Angiology* 8: 19, 1957.
- Mc Cauley L., Hing D.N., Robson M.C., Heggors J.: Frostbite injuries: A rational approach based on the pathophysiology. *J Trauma* 23: 143, 1983.
- Saito S., Shimada H.: Effect of prostaglandin E1 analogue administration on peripheral skin temperature at high altitude. *Angiology* 45: 455, 1994.
- Silverman D.G., Brousseau D.A., Norton K. J., Clark N., Weinberg H.: The effects of a topical prostaglandin E2 analogue on global flap ischemia in rats. *Plast Reconstr Surg* 84: 794, 1989.
- Marzella L., Jesudass R.R., Manson P.N., Myers A.M., Bulkley G.B.: Morphologic characterization of acute injury to vascular endothelium of skin after frostbite. *Plast Reconstr Surg* 83: 67, 1989.
- Özyazgan İ., Tercan M., Melli M., Bekercioğlu M., Üstün H., Günay G.K.: Eicosanoids and inflammatory cells in frostbitten tissue: Prostacyclin, Thromboxane, Polymorphonuclear leukocytes and Mast cells. *Plast Reconstr Surg* 101: 1881, 1998.
- Özyazgan İ., Tercan M., Bekercioğlu M., Melli M., Üstün H., Günay G.K.: Defibrotide activity in experimental frostbite injury. *Brit J Plast Reconstr Surg.* 51: 450, 1998.
- Raine T., London M.D., Goluch L. et al.: Antiprostaglandins and antithromboxanes for treatment of frostbite. *Surgical Forum* 31: 557, 1980.
- Knize D.M., Weatherley-White R.C.A., Paton B.C.: Use of antisludging agents in experimental cold injuries. *Surg Gynecol Obstet* 129: 1019, 1969.
- Sjostrom B., Weatherley-White R.C.A., Paton C.: Experimental studies in cold injury I. The individual response to standard cold environment. *J Surg Res* 4:12, 1964.
- Robson M.C., Heggors J.P.: Evaluation of hand frostbite blister fluid as a clue to pathogenesis. *J Hand Surg (Am)* 6: 43, 1981.
- Mileski W.J., Raymond J.F., Wynn R.K., Harlan J.M., Rice C.L.: Inhibition of leukocyte adherence and aggregation for treatment of severe cold injury in rabbits. *J Appl Physiol* 74: 1432, 1993.
- Hohlfeld T., Strobach H., Schrör K.: Stimulation of endogenous prostacyclin protects the reperfused pig myocardium from ischemic injury. *J Pharmacol Exp Ther* 264: 397, 1993.
- Hertz F., Cloarec A.: Pharmacology of free radicals ; recent views on their relation to inflammatory mechanisms. *Life Sci* 34: 713, 1984.
- Goddio A.S.: Oxygen derived free radicals in plastic surgery-Therapeutic interest of fighting free radicals: the superoxide dismutases. *European Journal of Plastic Surgery* 12: 11, 1989.
- Reilly M.C., Schiller H.J., Bulkley G.B.: Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 161: 488, 1991.
- Hecker G., Ney P., Schror K.: Cytotoxic enzyme release and oxygen centered radical formation in human neutrophils are selectively inhibited by E-type prostaglandins but not by PGI2. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 341: 308, 1990.
- Welbourn C.R.B., Goldman G., Patterson I.S., Valeri C.R., Shepro D., Hechtman H.B.: Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: Central role of the neutrophil. *Br J Surg* 78: 651, 1991.
- Weksler B., Goldstein I.M.: Prostaglandins: Interactions with platelets and polymorphonuclear leukocytes in hemostasis and inflammation. *Am J Med* 68: 420, 1980.
- Sedor J.R.: Free radicals and prostanoic synthesis editorial. *J Lab Clin Med* 108: 521, 1986.
- Waris T., Kyösola K.: Cold injury of the rat skin. *Scand. J. Plast. Reconst. Surg.* 16: 1, 1982.
- Higgs G.A., Moncada S., Vane J.R.: Prostacyclin reduces the number of 'slow moving' leukocytes in hamster cheek pouch venules. *J Physiol (Lond)* 280P: 55, 1978.
- Boxer L.A., Allen J.M., Schmydth M., Yoder M., Beahner R.L.: Inhibition of polymorphonuclear leukocyte adherence by prostacyclin. *J Lab Clin Med* 95: 672, 1980.

33. Nicolini F.A., Mehta P., Lawson D. et al.: Reduction in human neutrophil chemotaxis by the prostacyclin analog iloprost. *Thromb Res* 59: 669, 1990.
34. Hohlfeld T., Strobach H., Schrör K.: Stimulation of prostacyclin synthesis by defibrotide: Improved contractile recovery from myocardial "stunning". *J Cardivasc Pharmacol* 17: 108, 1991.
35. Junquera L.C., Carneiro J.: Mast Cells. In *Basic histology*. Lebanon, Typopress, pp110, 1986.
36. Reus W.F., Murohy R.C., Heggors J.P. et al.: Effect of intraarterial prostacyclin on survival of skin flaps in the pig: Biphasic response. *Ann Plast Surg* 13: 29, 1984.
37. Golino P., Cappelli-Bigazzi M., Perrone-Filardi P. et al.: Effects of PGI₂ analog iloprost on myocardial infarct size, regional myocardial blood flow and platelet function in rabbits with coronary artery occlusion followed by reperfusion. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 17: 377, 1987.
38. Zachary L.S., Heggors J.P., Robson M.C., Murphy R.C.: Combined prostacyclin and thromboxane synthetase inhibitor UK 38485 in flap survival. *Ann Plast Surg* 17: 112, 1986.
39. Knight K.R., Crabb D.J.M., Niall M.: Pharmacological modification of blood flow in the rabbit microvasculature with prostacyclin and related drugs. *Plast Reconstr Surg* 75: 692, 1985.
40. Jacob L.S.: Eicosanoids. In *Pharmacology*, Baltimore, Maryland, Williams&Wilkins, pp 165, 1992.
41. Robson C.M., Smith D.J.: Cold injuries. In McCarthy J G (ed): *Plastic Surgery Philadelphia*, WB Saunders Co., vol 1, pp851, 1990.
42. Vogel J.E., Dellon A.L.: Frostbite injuries of the hand. *Clin Plast Surg* 16: 565, 1989.
43. Murray J.F.: Cold, chemical and irradiation injuries. In McCarthy J G (ed): *Plastic Surgery, Philadelphia*, WB Saunders Co., vol 8, pp 5431, 1990.