

ILIMLI DERECEDE ETANOL İNTOKSİKASYONUNUN RAT MCFARLANE FLEPLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Mustafa TERCAN, Kenan Y. ÇOBAN, Ahmet ÇİĞLİ, Süleyman ÖZEN, Ali GÜRLEK

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı, İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı, Biyokimya Anabilim Dalı, Patoloji Anabilim Dalı

ÖZET

İlimli derecede etanol intoksikasyonunun rat akut McFarlane flebi üzerine etkisini değerlendirmek için kontrollü deneysel çalışma yapıldı. Rasgele seçilmiş ratlar modifiye sıvı, etanol içeren modifiye sıvı ve standart solid diyetle beslendiler. Etanol çekilme semptomları (EÇS) derecelendirildi ve alkolik grup ilimli derecede etanol intoksikasyonu olarak değerlendirildi. Akut dorsal McFarlane flepleri hazırlandı ve yerlerine yeniden sütüre edildi. Flepte nekroz ve kontraksiyon değerlendirildi ve kan örnekleri alınarak superoxide dismutase (SOD), katalaz (catalase) ve malondialdehide (MDA) plazmada ve eritrositlerde postoperatif 10. günde ölçüldü. Alkolik grupta SOD ve MDA seviyeleri eritrositlerde düşük seviyede bulundu ($p<0.05$). Modifiye sıvı diyetle beslenenlerde flep kontraksiyonu diğerlerine göre daha az olarak değerlendirildi ($p<0.05$). Etanol içeren modifiye sıvı diyetle beslenenlerde fleplerde nekroz diğerlerine göre daha az tesbit edildi ($p<0.05$). Bu sonuçlar alkolik ratlarda artmış flep yaşama oranının antioksidan sistemin aktivasyonuna bağlı olabileceğini ve yüksek yağ içeren diyetle beslenenlerde flep kontraksiyonunda artış olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Alkolik rat, flep, antioksidanlar, etanol çekilme sendromu,

SUMMARY

The Effect of Alcohol Intoxication on McFarlane Flap in Rats

In order to evaluate the effects of moderate level of ethanol intoxication on the acute McFarlane flap in rats, a controlled experimental study was conducted. The rats were randomly fed with modified liquid, ethanol containing modified liquid and standard solid diets. Severe ethanol withdrawal symptoms (EWS) score was determined in the alcoholic group. Acute dorsal McFarlane flaps were elevated and re-sutured to the donor areas. The amount of necrosis and contraction were measured and blood samples were taken to evaluate superoxide dismutase (SOD), catalase and malondialdehyde (MDA) in plasma and erythrocytes on the postoperative 10th day. In the alcoholic group, SOD and MDA level in erythrocytes were found in low levels ($p<0.05$). The amount of flap contraction observed in modified liquid diet group was less than the others group ($p<0.05$). These results suggest that the increased skin flap survival observed in alcoholic rats may be due to the activation of antioxidant systems and feeding with high fat containing diet may increase skin flap contraction.

Key Words: Alcoholic rat, flap, antioxidants, ethanol withdrawal syndrome,

GİRİŞ

Alkolizm özellikle gelişmiş ülkelerde oldukça yaygın bir sorundur. Alkolizm ile ilgili pek çok deneysel ve klinik çalışma yapılmışsa da bunlarda hiçbir flep yaşamı ile ilgili değildir¹⁻⁴. Yakın zamanda yapılan çalışmalar kronik alkolizmin toksik etkisini protein azalması, membran iyon değişikliği, serbest radikal oluşumu, mitokondrial fonksiyon azalması, hücre içi kalsiyumunda azalma ve dokularda antijenik yapının artması şeklinde gösterdiğini bildirmiştir⁵⁻⁸. Bu çalışmada kronik alkolizmin ratlarda akut McFarlane flebi üzerine etkisi araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney grubu

Ağırlıkları 190-275 gr. arasında değişen 22 erkek Wistar ratı kullanıldı. Ratlar üç gruba ayrıldı.

Grup 1: Düşük yağ içerikli sıvı diyet grubu

Grup 2: Etanol içeren modifiye sıvı diyet grubu (MSD)

Grup 3: Standart katı diyet grubu

Tablo 1 diyet rejimlerini ve deney gruplarını göstermektedir.

MSD 'in hazırlanışı

MSD'in içeriğinde 925 ml düşük yağ içerikli inek sütü (Mis Süt, Türkiye), etanol %95,6, vitamin A

5000 IU (Akpa ilaç sanayi, Türkiye) ve sucrose 17 g. Bu karışım 1000 Kcal/L içermektedir. Kontrol grubunda MSD içeriğinde alkol bulunmamaktadır ve kalori açığı sucrose tarafında tamamlanmaktadır. Tablo 2 de diyet rejimlerinin kalori içeriği gösterilmektedir.

Tablo 1: Gruplardaki diyet rejimleri

Gruplar	Beslenme rejimi	Sayı
1	Sıvı diyet	7
2	Etanol + sıvı diyet	7
3	Katı diyet	8

Tablo 2: Diyet rejimlerinde kalori oranları (% Kcal)

Gruplar	Etanol	Yağ	Karbonhidrat	Protein
1	0	10	72	18
2	42.25	10	29.75	18
3	0	19.5	60.5	20

Uygulama

Çalışmanın ilk haftasında alkolik gruptaki ratlar alkol içermeyen sıvı diyetle beslendi. Yedinci günde ratlara % 2,5 alkol (v/v) verildi. Daha sonra etanol konsantrasyonu üç günde % 4,8 'e çıkarıldı ve on ikinci haftaya kadar % 7,2 olarak devam edildi.

Kan etanol seviyelerinin ölçümü

Kan örnekleri hava ile temas ettirilmeden femoral venden alındı. Kan etanol seviye ölçümleri spektrofotometre ile yapıldı (Cobas mira, Roche diagnostic systems, Switzerland).

Ratların Takibi

Ratların ağırlıkları haftada iki kez kayıt edildi. Günlük sıvı diyet tüketimleri tespit edildi.

Etanol çekilme sendromunun değerlendirilmesi (EÇS)

EÇS etanolla beslenmenin 12. Haftasında flep hazırlanmasından önce ve son 24 saatlik periyotta alkol verilmiş halde iken değerlendirildi. Tablo 3 de alkolik grupta EÇS derecelendirmesi görülmektedir.

Tablo 3: Etanol çekilme sendromunun değerlendirilmesi.

Semptomlar	Etanol çekilmesi sonrası gözlem süresi (saat)		
	2	4	6
Anormal postur	+	++	+++
Anormal yürüyüş	+	++	+++
İrritabilite	++	++	++
Stereotip davranış	+	+++	+++
Kataton	+	++	++
Kuyruk-kas rijiditesi	+	+	++
Spontan nöbet	—	—	—

Flep Hazırlanması

Ratlara periton içerisine Ketamine hydroclorid (40 mg/kg) ve Xylazine (5-6 mg/kg) verilerek anestezileri sağlandı. Flepler McFarlane'nin standart kaudal bazlı 3x9 cm lik flebi şeklinde hazırlandı ve kaldırıldıktan sonra tekrar yerlerine sütüre edildiler.

Eritrosit / Plazma SOD Katalaz ve MDA ölçümleri

Kan örnekleri femoral venden heparinize tüplere eritrosit sedimentleri oluşturmak üzere hafif anestezi altında alındı. Kan örnekleri 4 °C 'de 3000 devir/dk. da 5 dakika santrifuj edildi. Eritrosit sedimentinin üzerindeki tabaka ayrıldı. Eritrosit sedimenti plazma kalıntıları ayırmak için izotonik serumla üç kez yıkandı. Katalaz ve SOD aktivitesi Aebi ve Sun metodlarına göre ölçüldü^{10,11}. Wasowicz metoduna göre MDA seviyesi tespit edildi¹².

Flep yaşam alanları ve kontraksiyonunun değerlendirilmesi

Postoperatif onuncu günde hafif anestezi altındaki ratlarda ölçümler yapıldı. Siyah renk, dehidratasyon ve eskar oluşumu gibi tipik özelliklere göre nekrotik alanlar belirlendi. Canlı alanlar ve kontraksiyon şeffaf radyografi filmine işaretlendi ve ölçümleri yapıldı.

Histopatolojik değerlendirme

Biyopsiler fleplerin geçiş hatlarından postoperatif 10. günde alındı ve % 10 luk formaldehide solüsyonunda mikroskopik inceleme yapılmaya kadar tutuldu. Işık mikroskopisi incelemesine göre aşağıdaki şekilde derecelendirildi.

Skor 1: lokalize inflamatuvar değişiklikler

Skor 2: minimal ödem, inflamatuvar değişiklikler ve minimal epidermal nekroz

Skor 3: ileri derecede inflamasyon ve belirgin epidermal nekroz .

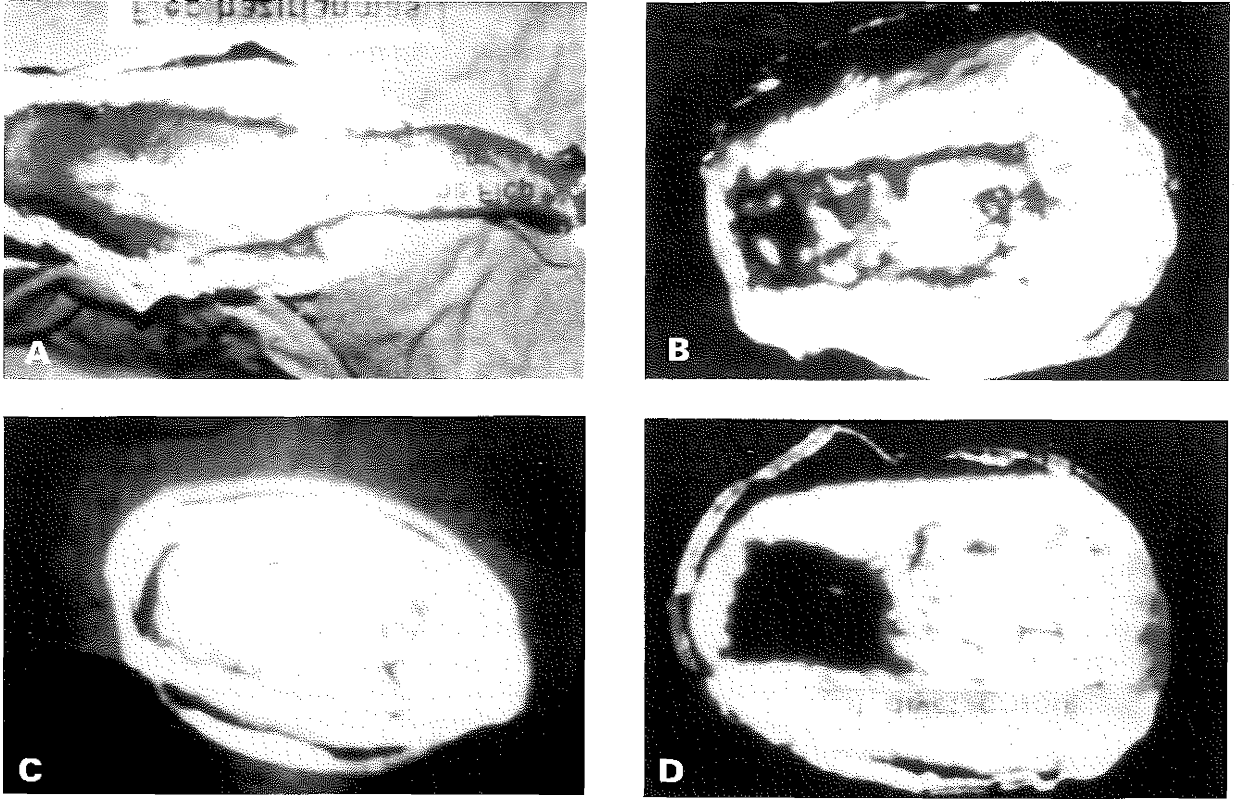
Değerlendirme alkolik ve alkolik olmayanlar olarak yapıldı.

İstatistiksel analiz

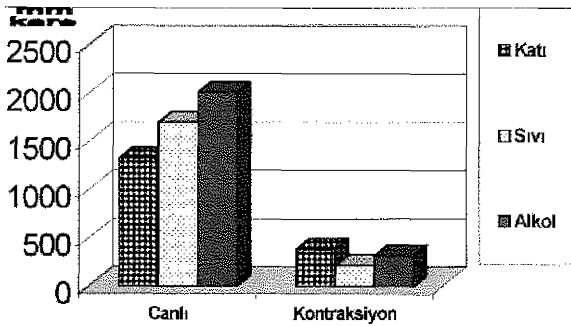
Kruskal Wallis varyans analizi grupların karşılaştırılmasında kullanıldı. Gruplar içindeki değişiklikler Mann-Whitney testi ile değerlendirildi. Post Hoc Tukey's HSD testi gruplar arasında belirgin farklılık olduğunda kullanıldı. Non-parametrik veriler Fisher's exact chi-square testi ile değerlendirildi.

Tablo 4: Fleplerdeki yaşam alanları.

Gruplar	Sayı	Canlı alan (mm ² ,ortalama ±SD)
1-Sıvı diyet	7	1696.5±139.9
2-Alkolik diyet	7	2005.1±242.7
3-Katı diyet	8	1320.8±180.3



Şekil 1 A: Flebin hazırlanması, B: sıvı diyet grubunda flep canlılığı, C: alkolik grupta flep canlılığı, D: Katı diyet grubunda flep canlılığı



Grafik 1: Fleplerdeki yaşam alanları ve kontraksiyon miktarları

SONUÇLAR

Alkolik grupta kan etanol seviyeleri $192 \pm 13,4$ mg/dl ve her bir rat için günlük etanol tüketimi 11-13 mg/kg'dı. Etanol kesildikten sonra ilk 6 saatten itibaren EÇS belirtileri ortaya çıkmaya başladı. Bir ratta sesli uyarı sonucu tonik-klonik nöbetler gözlemlendi.

Flep yaşama oranları sırasıyla alkolik grupta ortalama % 85,9, sıvı diyet grubunda % 69,9 ve katı diyet grubunda % 63,1 olarak tespit edildi (Şekil 1). Alkolik grupta nekroz oranı diğer gruplara göre daha azdı ($p < 0,05$). Katı diyet grubunda en fazla flep kontraksiyonu ölçüldü ve istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,05$) (Tablo 5)(Grafik 1). Eritrositlerdeki SOD aktivitesi alkolik grupta belirgin olarak düşüktü ($p < 0,05$).

Tablo 5: Fleplerdeki kontraksiyon miktarları.

Gruplar	Sayı	Kontraksiyon (mm², ortalama \pm SD)
1-Sıvı diyet	7	215.0 \pm 91.2
2-Alkolik diyet	7	313.4 \pm 118.7
3-Katı diyet	8	383.0 \pm 119.3

Tablo 6: Eritrosit içi SOD, Katalase and MDA ölçümleri.

Eritrosit	Alkolik	Alkolik olmayan	p
SOD (U/grHb)	1240.309 \pm 410.4	3018.261 \pm 1580	<0.05
Katalaz (k/grHb)	172.418 \pm 25.4	168.17 \pm 45.8	>0.05
MDA(mmol/L)	0.038 \pm 0.012	0.097 \pm 0.041	<0.05

Tablo 7: Plazma SOD, Katalase and MDA ölçümleri.

Plazma	Alkolik	Alkolik olmayan	p
SOD (U/grHb)	21.422 \pm 5.48	18.080 \pm 2.42	>0.05
Katalaz(k/grHb)	0.726 \pm 0.86	0.634 \pm 0.62	>0.05
MDA(mmol/L)	0.859 \pm 0.27	0.786 \pm 0.06	>0.05

Eritrositlerdeki MDA seviyesi de alkolik grupta belirgin olarak düşüktü ($p < 0,05$). Tablo 6 ve 7 da eritrosit ve plazmada SOD, katalaz ve MDA ölçümleri gösterilmektedir. Alkolik gruptaki histopatolojik skor diğerlerine göre daha kötüydü ($p < 0,05$) (Tablo 8).

Tablo 8: Histopatolojik skorlama.

Gruplar	Ratlar						
	1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 th	6 th	7 th
Alkol	1	1	1	2	2	3	1
Alkolik olmayan	2	2	3	3	1	2	2

Alkolik ratlarda deney süresince ağırlık artımı olmadı. Katı ve sıvı diyet gruplarında sırasıyla % 24,5 ve % 9,5 ağırlık artışı tespit edildi.

TARTIŞMA

Freund sıçanlara etanol içeren sıvı diyetin 3 gün verilmesi ve kesilmesi sonucu EÇS geliştiğini bildirdi¹³. Etanolü sıvı diyeti etanole karşı tolerans gelişimi, etanol çekilmesi ve etanolün biyomedikal etkileri için model teşkil etmektedir. Kronik etanol uygulamalarında inek sütü kullanımında vitamin A eksikliği olması en önemli noksanlıktır. Bu nedenle bizim çalışmamızda sıvı diyetine vitamin A eklenmiştir. Düşük yağ içerikli inek sütü kullanılarak karaciğer yağlanma ihtimali ortadan kaldırılmıştır¹⁴. Etanol uygulamalarında günlük etanol tüketimi ve kan etanol seviyeleri en önemli unsurlardandır. Bizim çalışmamızdaki günlük etanol tüketimi ve ortalama kan etanol seviyeleri diğer çalışmalarla uyumludur¹⁴.

EÇS'nun tetiklenmesi kronik etanol uygulamalarında diğer önemli bir parametredir. EÇS üçten fazla semptomun bulunması nedeniyle ileri dereceli olarak belirlendi. Diğer çalışmalarda gözlemlenen semptomlar ve zaman-şiddet profili¹⁴ bizim çalışmamızda da uyumlu olarak tespit edildi¹⁴.

Akut fleplerin random patternli bölgelerinde vazokonstriktör aktivitenin distal iskemiye artırdığı bildirilmiştir¹⁵. Bizim çalışmamızda, Flep yaşama oranları sırasıyla alkolik grupta en yüksek tespit edildi. Bunun nedenine yönelik araştırmada etanolün esas metaboliti olan

acetaldehide'in prostacyclin için güçlü stimülatör olarak belirlenmiş olduğu görüldü¹⁶. Böylece alkolik gruptaki yüksek yaşama oranının prostacyclin üzerinden olabileceği düşünüldü ancak buna yönelik bir araştırma yapılmadı.

Daha önceki çalışmalarda kronik etanol kullanımında kalp doku homojenatında SOD aktivitesinin arttığı bildirilmiştir¹⁷. Fakat deride kronik etanol kullanımında SOD aktivitesi hakkında herhangi bir bilgi yoktur. Ancak dışardan SOD verilmesiyle deri flep yaşamının arttığı bildirilmiştir¹⁸. Ayrıca¹⁸ oksidatif strese plazma SOD aktivitesi artmaktadır.

Bizim çalışmamızda da total plazma SOD aktivitesi yüksek bulundu ancak bu istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$)¹⁹. Bu bulgu diğer çalışmalarla uyumluk göstermektedir. Kronik alkoliklerde protein yıkımı plazma SOD aktivitesini etkilemiş olabilir.

Flep kontraksiyonlarına bakıldığında yüksek yağ içeren diyetle beslenen ratlarda flep kontraksiyonunun arttığı görülmektedir. Yüksek yağlı diyetle beslenmede karaciğerde perisinüzoidal ito hücrelerinde myofibroblastik değişim olduğu gösterilmiştir²⁰. Bizim çalışmamızda da benzer bir etkiye bağlı flep kontraksiyonunun arttığı düşünülmektedir.

Kronik etanol alınımında protein azalması olmaktadır. Bir çalışmada ratlarda protein eksikliğinin flep yaşamını artırdığı ileri sürülmüştür²¹. Bizim çalışmamızda alkolik grupta ağırlık artışı olmamıştır. Bunun sonucu olarak da protein eksikliğine bağlı flep yaşamında artış olabilir.

Sonuç olarak kronik etanol alınımında acetaldehide yoluyla prostacyclin artışı, SOD aktivite artımının ve protein eksikliğinin gelişmesine bağlı flep canlılık oranları artabilir. Bu mekanizmaların ortaya çıkarılmasına yönelik yeni çalışmalar planlanmıştır.

Dr. Mustafa TERCAN

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi

Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı

Kolejtepe 27070 GAZİANTEP

KAYNAKLAR

1. Alderman EL, Coltard DJ: Alcohol and the heart. Br Med Bull. 1982 Jan; 38(1): 77-80.
2. Lands WE: Cellular signals in alcohol-induced liver injury: a review. Alcohol Clin Exp Res. 1995 Aug; 19(4): 928-38. Review.
3. Robert A, Leung FW, Guth PH: Morphological and functional gastric cytoprotection by prostaglandin in rats receiving absolute ethanol orally. Gut. 1992 Apr; 33(4): 444-51.
4. Smith JW: Medical manifestations of alcoholism in the elderly. Int J Addict 1995 Nov-Dec; 30(13-14): 1749-98.
5. Preedy VR; Peters TJ: The acute and chronic effects of ethanol on cardiac muscle protein synthesis in the rat in vivo. Alcohol 1990 Mar-Apr; 7(2):97-102.
6. Wilke A; Kaiser A; Ferency I; Maisch B: [Alcohol and myocarditis]Alkohol und Myokarditis. Herz 1996 Aug; 21(4): 248-57.
7. Omodeo-Sale F; Lindi C; Palestini P; Masserini M: Role of phosphatidylethanol in membranes. Effects on membrane fluidity, tolerance to ethanol, and activity of membrane-bound enzymes. Biochemistry 1991 Mar 5; 30(9): 2477-82.
8. Worrall S; De Jersey J; Shanley BC; Wilce PA: Ethanol induces the production of antibodies to acetaldehyde-modified epitopes in rats. Alcohol Alcohol 1989; 24(3): 217-23.
9. McFarlane RM, De Young G, Henry RA: The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. Plast Reconstr Surg 1965; 35: 177.
10. Lebi H, Bergmeyer U: Catalase: In Methods of enzymatic analysis. Academic Press: New York and London 1974: 673-7.

11. Sun I; Oberley LW; Li Y :A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988 Mar; 34(3): 497-500.
12. Wasowicz W; Neve J; Peretz A:Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem* 1993 Dec; 39(12): 2522-6.
13. Ward LC :Animal models of chronic alcohol ingestion: the liquid diet. *Drug Alcohol Depend* 1987 Jul;19(4): 333-44.
14. Uzbay IT; Kayaalp SO :A modified liquid diet of chronic ethanol administration: validation by ethanol withdrawal syndrome in rats. *Pharmacol Res* 1995 Jan; 31(1): 37-42.
15. Sasaki GH; Pang CY:Experimental evidence for involvement of prostaglandins in viability and acute skin flaps: effects on viability and mode of action. *Plast Reconstr Surg* 1981 Mar; 67(3): 335-40.
16. Guivernau M; Baraona E; Lieber CS :Acute and chronic effects of ethanol and its metabolites on vascular production of prostacyclin in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1987 Jan; 240(1): 59-64.
17. Ribiere C; Hininger I; Rouach H; Nordmann R:Effects of chronic ethanol administration on free radical defence in rat myocardium. *Biochem Pharmacol* 1992 Oct 20; 44(8): 1495-500.
18. Im MJ; Manson PN; Bulkeley GB; Hoopes JE: Effects of superoxide dismutase and allopurinol on the survival of acute island skin flaps. *Ann Surg* 1985 Mar; 201(3): 357-9.
19. Brites FD; Evelson PA; Christiansen MG; Nicol MF; Basilico MJ; Wikinski RW; Liesuy SF:Soccer players under regular training show oxidative stress but an improved plasma antioxidant status. *Clin Sci (Colch)* 1999 Apr; 96(4): 381-5.
20. D'Almeida V; Monteiro MG; Oliveira MG; Pomarico AC; Bueno OF; da Silva-Fernandes ME :Long-lasting effects of chronic ethanol administration on the activity of antioxidant enzymes. *J Biochem Toxicol* 1994 Jun; 9(3):141-3.
21. Tsukamoto H; Cheng S; Blaner WS:Effects of dietary polyunsaturated fat on ethanol-induced Ito cell activation. *Am J Physiol* 1996 Apr; 270 (4 Pt 1): G581-6.
22. Ruberg RL; Falcone RE :Effect of proteins depletion on the surviving length in experimental skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 1978 Apr; 61(4):581-8.