

İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARININ KAS FLEBİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN MİKROSİRKULATUAR DÜZEYDE GÖSTERİLMESİ (DENEYSEL ÇALIŞMA)

Gökhan ADANALI, Mustafa NİŞANCI, Asuman TUNCEL, Dilek ŞENEN, Murat TÜREGÜN

Ankara Numune Araştırma ve Eğitim Hastanesi I. Plastik Cerrahi Kliniği, GATA Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı, Ankara

ÖZET

Büyük ve komplike defektlerin tek seansta form ve fonksiyon açısından başarıyla rekonstrüksiyonunu sağlamaları kas fleplerinin plastik cerrahi pratiğinde yaygın olarak kullanılmalarına yol açmıştır. Uzamış global iskemiye maruz kalan iskelet kası bunu takip eden reperfüzyon süresince ciddi hasara maruz kalmaktadır. Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalarda iskemi sonrası reperfüzyona bağlı doku hasarının ve no-reflow fenomeninin gelişiminde lökositlerin anahtar role sahip olduğu gösterilmiştir. Bu deneysel çalışmada rat kremaster kas flebinde oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarının etkileri mikrosirkulatuar düzeyde incelenmiş ve global iskemi ve bunu takip eden reperfüzyona maruz kalan kas dokusunda mikrosirkulatuar düzeyde lökositlerin aktive olarak flepte mikrosirkulatuar dolaşımı ve akım hemodinamiklerini istatikselsel olarak anlamlı derecede olumsuz olarak etkiledikleri ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Kremaster, reperfüzyon hasarı, kas flebi

SUMMARY

Effects of Ischemia Reperfusion Injury on Muscle Flap at Microcirculatory Level (An Experimental Study)

The fact that muscle flaps enable reconstruction of large and complicated defects with satisfactory results in terms of appearance and function at a single session led them to be employed commonly in the practice of plastic surgery technique. Muscles exposed to prolonged global ischemia sustain severe damage during reperfusion process following ischemia. In recent experimental investigations, it has been demonstrated that leukocyte play a key part in the development of tissue damage and "no-reflow" phenomenon due to reperfusion. In the present study, effects of ischemia and reperfusion on rat cremaster muscle flap were examined at microcirculatory level and it has been shown that leukocytes are activated in microcirculatory level in muscle tissue exposed to global ischemia and subsequently reperfusion and influence micro circulation and flow hemodynamics adversely, with a statistical significance.

Key Words: Cremaster; reperfusion injury and muscle flap.

GİRİŞ

Büyük ve komplike defektlerin tek seansta form ve fonksiyon açısından başarıyla rekonstrüksiyonunu sağlamaları kas fleplerinin plastik cerrahi pratiğinde yaygın olarak kullanılmalarına yol açmıştır. Mikrocerrahi tekniklerin gelişimine ve artan cerrahi tecrübeye rağmen serbest kas aktarımı sırasında oluşan iskemik kas nekrozu halen ciddi bir komplikasyon olmaya devam etmektedir. Uzamış global iskemiye maruz kalan iskelet kası bunu takip eden reperfüzyon süresince ciddi hasara maruz kalmaktadır. İskemi-reperfüzyon hasarı (IRH) olarak bilinen bu süreçte mikrosirkulatuar düzeyde nötrofiller aktive olarak hasarlanan endotele değişik mediatörlerin varlığında yapışmakta artan permeabilite ile damar dışına migre olmakta ve inflamasyona yol açmaktadırlar. Uzun süreli iskemiye maruz kalmış dokunun reperfüzyonu genellikle mikrovasküler disfonksiyon ve no-reflow fenomeninin gelişimi ile sonuçlanır. Kan akımı yeniden

sağlandığında, yeterli perfüzyon basıncının tekrar oluşturulmasına rağmen kapillerlerin önemli bir miktarı tekrar perfüze olmaz¹. İskelet kasındaki postiskemik bir perfüzyon defektine ait ilk tanımlama 1948 yılında yapılmış ve uzun süreli iskeminin iskelet kasının reperfüzyonu esnasında no-reflow fenomeninin gelişmesine neden olduğu ortaya konmuştur. Bundan 20 yıl sonra yapılan çalışmalar ile, bu postiskemik perfüzyon bozukluğunun mikrovasküler yatağa lokalize mekanizmalar meydana geldiği ve postiskemik iskelet kasında büyük damarlar patent kalırken kapiller perfüzyonun azaldığı ortaya konmuştur²⁻⁴. Son yıllarda no-reflow fenomeninin gelişimine neden olabilecek veya katkıda bulunabilecek mekanizmalar konusunda çok fazla sayıda ve çok detaylı deneysel çalışma yapılmış ve önemli sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre iskemi sonrası reperfüzyona bağlı doku hasarının ve no-reflow fenomeninin gelişiminde lökositlerin anahtar role

sahip olduğunu göstermektedir.^{2,5-12}

Bu deneysel çalışmanın amacı global iskemi ve bunu takip eden reperfüzyona bırakılan rat kremaster kas flebinde mikrosirkuluar düzeyde akım hemodinamikleri ve IRH nda çok etkili olan lökosit-endotel ilişkisi üzerine etkilerini değerlendirmektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışma "Cleveland Clinic Foundation" Plastik Cerrahi Kliniği mikrocerrahi laboratuvarlarında yapılmıştır. Deney hayvanları ayrı kafeslerde, oda sıcaklığında laboratuvar yemleri ve su ile beslenerek bakılmış ve kafesler 12 saat gündüz/geceyi oluşturacak şekilde ışıklandırılmıştır. Cerrahi prosedür ve ölçümler için hayvanlar pentobarbital (50mg/kg) intraperitoneal olarak kullanılmış deney sonunda hayvanlara aşırı doz pentobarbital (100 mg/kg) ile ötanazi uygulanmıştır. Bu deneysel çalışmada ağırlıkları 150-175 gr. arasında değişen Sprague-Dawley cinsi 12 erkek rat iki gruba ayrılarak kullanıldı. Grup I kontrol grubu olarak düzenlendi ve kremaster kas ada flebi iskemi reperfüzyon hasarına maruz bırakmadan cerrahi disseksiyonu takiben intravital ölçümler yapıldı. Grup II Kremaster kas ada flebi disseksiyonunu takiben flep dört saat global iskemi ve bunu takiben bir saat süre ile reperfüzyona bırakıldıktan sonra intravital ölçümler yapıldı.

CERRAHİ TEKNİK

Deneyde kremaster kas flebi kullanılmıştır. Ventral inguinal kesi ile kremaster kası testis ve spermatik kord ile birlikte ciltten disseke edildi. Kasa yapılan insizyondan testis ve spermatik kord çıkarıldıktan sonra kremaster kası iliak arterden kaynaklanan pudik-epigastrik pedikülü üzerinde izole edildi ve pediküle uzak tarafından elektrokoter ile yapılan longitudinal insizyon ile ada flebi haline getirildi ve gruplarına göre

deney protokolü uygulandı.

Grup I (kontrol) de sadece cerrahi disseksiyon yapıldı. İskemi oluşturmadan kas flebi disseksiyonunu edilmiştir.

Grup II de (I/R grubu) cerrahi disseksiyonu takiben pediküle mikroklemler konarak 4 saat süre ile global iskemi oluşturuldu. İskemi takiben flep 1 saat reperfüzyona bırakıldı ve bunu takiben intravital mikroskopi ölçümleri yapıldı (Şekil 1,2).

İNTRAVİTAL MİKROSKOBİ ÖLÇÜMLERİ

Gruplara göre deney protokolü uygulandıktan sonra kremaster kas flebi intravital ölçümler için doku banyosu içinde transillümine edildi ve mikrosirkülasyon intravital mikroskop (Nikon oprithop-2) altında 1800 büyütme ile renkli video kamera (Sony CCD-IRIS) ve renkli monitor (Panasonic AG-1730) kullanılarak kaydedildi (Şekil 3-6).

Yapılan ölçümler;

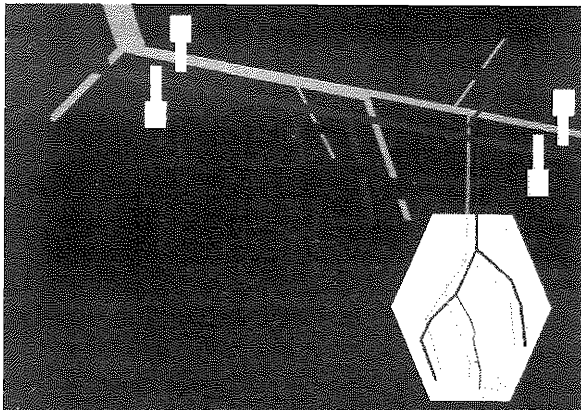
Damar çapları kremaster kasını besleyen arteriol ve post kapiller venüllerin çapları "video image system" kullanılarak ölçüldü (VIA-150, Boeckler, Tucson-Arizona)

Eritrosit kan akım hızı optik doppler velosimetre kullanılarak arteriol ve venüllerde kan akım hızları ölçüldü (Texas A&M, College station).

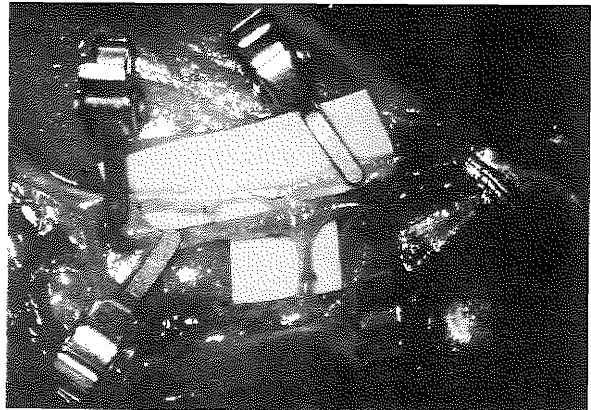
Lökosit aktivasyonu flep proksimal orta ve distal kısmında çapı 30-40 mikron arasında değişen birer postkapiller venül belirlenerek her birinde iki dakika süre ile dolaşan, endotele yapışan ve damar dışına migre olan nötrofiller sayıldı.

Perfüze kapiller sayısı gözlem yapılan her postkapiller venülün çevresindeki dokuz mikroskop alanında yani kasın proksimal, orta ve distalindeki toplam 27 alanda perfüze olan kapillerler sayıldı.

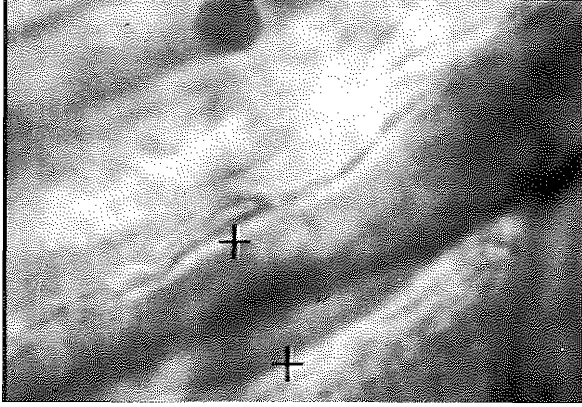
Endotelial ödem indeksi endoteldeki hasarın gösterilmesi için, ölçüm yapılan postkapiller venüllerin



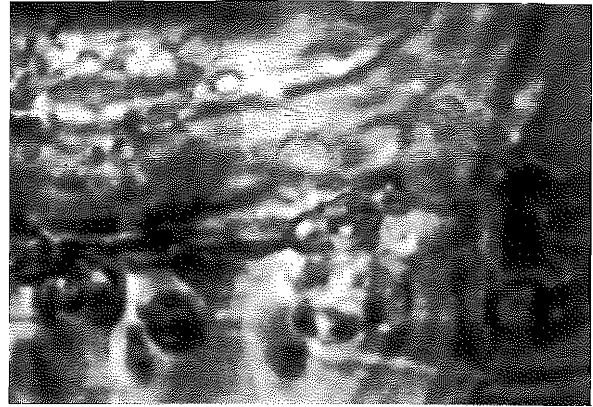
Şekil 1: Rat kremaster kası için oluşturulan iskemi reperfüzyon modelinin şematik gösterimi.



Şekil 2: Rat kremaster kas flebi pedikülüne mikroklemlerin konulması



Şekil 7: Grup 1 de rat kremaster kasında yapılan intravital gözlemede post kapiller venüde normal bir mikrosirkulasyon



Şekil 8: İskemi-reperfüzyon uygulanan grupta lokositlerin aktive olarak postkapiller venüde damar duvarına yapışıp, endotel dışına transmigre olmaları ve oluşan inflamasyon.

gösterilmiştir. İskemik dönemde oksijenden yoksun hücrelerde metabolizma anaerobik yoldan gerçekleşmektedir. Buna bağlı olarak mikrosirkuluar düzeyde nötrofillerde NADPH ve intrasellüler CA birikimi olurken endotel hücresinde hypoxanthine seviyeleri artmaktadır. Normal koşullarda lökositler ile endotel arasında fizyolojik bir ilişki vardır. Buna göre nötrofiller serbest olarak mikrosirkulasyonda dolaşmakta ve bunların ancak %10 kadarı endotel duvarına yapışarak diapedez yapmaktadırlar. Kas aktarımı sırasında maruz kalınan iskemik dönem ve bunu takip eden reperfüzyon döneminde serbest oksijen radikallerinin birikimi, nötrofil, endotel hücreleri, mast hücreleri, plateletler gibi hücrelerden salınan TXA₂, LTB₄, PAF gibi mediatörler, TNF α , IL-1 gibi sitokinlerin etkisi ile nötrofil-endotel ilişkisi aktive olmakta ve oluşan bu inflamasyonun sonucu olarak nötrofillerin adheransı artmakta ve hasarlanmış endoteldeki vasküler permeabilite artışı ile ekstravasküler dokuya nötrofil göçü oluşmaktadır¹. Bu da akut bir inflamasyon tablosunu ortaya çıkarmaktadır. Yaptığımız deneyde iskemik reperfüzyon oluşturulan grup 2 deki deneklerde dolaşan, endotele yapışan ve transmigre olan lökosit sayılarındaki anlamlı artış literatür bu inflamasyon tablosu ile uyumlu olmuştur. Schmid-Schönbain enflame bir dokudan salınan proenflamatuar ajanlar ile aktive olan nötrofillerin kapiller damarlar içinden geçecek kadar sertleştiklerini ortaya koymuştur¹³. No-reflow fenomeninin gelişiminde nötrofillerin anahtar rolü üstlendiği kavramını destekleyici diğer gözlemler şöyle özetlenebilir; a) Nötropeni kalp beyin ve iskelet kasında İRH'nin neden olduğu kapiller no-reflow'u hafifletmiştir^{2-4,6,7,11,12} b) ICAM-1 ("Intracellular Adhesion Molecule") lokositlerin yüzeyindeki CD11a/18 ve CD11b/18 için karşı reseptör olarak işlev gören ve endotelial hücre yüzeyinde oluşan yapışma glikoproteinidir. İRH na

maruz kalan dokularda sitokinlerin açığa çıkması ile aktive olan nötrofiller ve endotel arasında ICAM-1 ile CD11/18'in aracılık ettiği etkileşim olmakta ve nötrofiller endotele yapışarak kapiller düzeyde mikrotıkacıların oluşmasına yol açmaktadırlar. İskemi reperfüzyon grubundaki deneklerde yapılan mikrosirkuluar ölçümlerde kapiller sayılarının kontrol grubuna göre %50 azalması da bu bulguları desteklemektedir. ICAM-1 ve CD11a/18'e özgü monoklonal antikorlar kullanıldığı taktirde İRH na maruz bırakılan dokularda no-reflow fenomeni gelişmemektedir^{3,4,6,14}. Mikrosirkulasyondaki bu akut inflamasyon halinden sorumlu tutulan bir diğer madde de P-selektin adı verilen bir yapışma glikoproteinidir. Oksidanların ve komplemanın aktivasyonunun, postiskemik kas dokusunda İRH'nin yol açtığı lokosit infiltrasyonu ile ilişkili olduğu ve bunuda P-selektin stimülasyonu ile yaptıkları ortaya konmuştur^{4,12,15,16}. Yine P-selektin monoantikorları kullanarak yapılan çalışmalarda postiskemik kasa no-reflow'un azaldığı gözlenmiştir^{4,12,17}.

Özet olarak; İRH, postkapiller venüller boyunca CD11/18 ve ICAM-1 tarafından aracılık edilen kalıcı yapışma etkileşimlerinin ortaya çıkmasına yol açan P-selektine bağlı lokosit yuvarlanmasını başlatır. Yapışık lokositler göçe başladığında endotelial bariyer yıktır ve transendotelial sıvı akışı artar. Sıvı hücrelerarası boşlukta toplandıkça, hücrelerarası sıvı basıncı önemli derecede vasküler kompresyon oluşturmaya yetecek seviyelere yükselir. Bu kompresyon kapiller ve venüler çapta bir düşüşe böylece mikrosirkuluar düzeyde akım durmasına yani no-reflow'a yol açar. Üzerinde yıllardır çalışılmasına rağmen, gelişen teknoloji ve moleküler biyoloji ile beraber son yıllarda patogenezinin açıklanabilmesinde büyük mesafeler kaydedilen İRH'na bağlı no-reflow'da gözlenen; 1) lökosit yapışma ve göçü 2) artmış mikrovasküler permeabilite 3) ödem formasyonu birbirine bağlı faktörlerdir ve hepsinde anahtar

faktör lökositlerdir .

Sonuç olarak; Klinikte serbest kas aktarımı yapılan vakalarda uzayan cerrahiye bağlı olarak oluşabilecek iskemi ve bunu takip eden dönemdeki reperfüzyon dönemindeki kas dokusunda oluşacak doku hasarı (İRH), bu hasarda etkili mediatörlere spesifik antikorların kullanımı ve lökosit aktivasyonunun baskılanması ile önlenebilecektir.

Dr. Gökhan ADANALI
Kültür Defne Sitesi
1. Blok Daire no:40
06530 Ümitköy, ANKARA

KAYNAKLAR

1. Kerrigan CL, Stofland MA: Ischemia-reperfusion injury: a review. *Microsurgery*, 14(3); 165-75, 1993.
2. Barraso-Aranda J, Schmid-Schönbein GW, Zweibach BW, Engler RL: Granulocytes and No-Reflow Phenomenon in Irreversible Hemorrhagic Shock. *Circ. Res.*, 63:437-447,1988.
3. Jerome SN, Smith CW, Korthuis RJ: P-selectin and ICAM-1 Dependent Adherence Reactions. Role in the Genesis of Post ischemic no-reflow. *Am. J. Physiol* 266: H1316-H1321, 1994.
4. Jerome SN, Akimitsu T, Korthuis RJ: CD-18 Dependent Adherence Reactions Play an Important Role in the Development of the No-reflow Phenomenon. *Am J Physiol* 264: H479-H483, 1993.
5. Bagge U, Amundson B, Lauritsen C: White Blood Cell Deformability and Plugging of Skeletal Muscle Capillaries in Hemorrhagic Shock. *Acta Physiol Scand* 108:159-163,1980.
6. Barker J, Acland RD, Anderson GL, Patel J: Microcirculatory Disturbances Following Passage of Emboli in an Experimental Free Flap Model. *Plast Reconstr Surg* 90(1): 95-102, 1992.
7. Carden DL, Smith JK, Korthuis RJ: Neutrophil-mediated Microvascular Dysfunction in Postschemic Canine Skeletal Muscle. *Circ Res* 66:1436-1444, 1990.
8. Engler RL, Dahlgren MD, Peterson MA, Dobbs A, Schmid-Schönbein GW: Accumulation of Polymorphonuclear Leukocytes during 3-h experimental Myocardial Ischemia. *Am J Physiol* 251: H93-H100,1986.
9. Engler RL, Dahlgren MD, Morris DD, Peterson MA, Schmid-Schönbein GW: Role of Leukocytes in Response to Acute Myocardial Ischemia Reflow in Dogs. *Am J Physiol* 251:H314-H322, 1986.
10. Hernandez LA, Grisham MB, Twohig B, Arfors KE, Harlan JM, Granger DN: Role of Neutrophils in Ischemia-Reperfusion Induced Microvascular Injury. *Am J Physiol* 253:H699-H703,1987.
11. Korthuis RJ, Grisham MB, Granger DN: Leukocyte Depletion Attenuates Vascular Injury in Postschemic Skeletal Muscle. *Am J Physiol* 254. H823-H827, 1988.
12. Korthuis RJ, Anderson DC, Granger DN: Role of Neutrophil-Endothelial Cell Adhesion in Inflammatory Disorders. *J Crit Care* 9.1-26, 1994.
13. Schmid-Schönbein GW: Capillary Plugging by Granulocytes and the No-reflow Phenomenon in the Microcirculation. *Federation Proc.* 46:2397-2401, 1987.
14. Jerome SN, Akimitsu T, Korthuis RJ: Leukocyte Adhesion , Edema, and Development of Postschemic Capillary No-reflow. *Am J Physiol* 266: H1329-H1336, 1994.
15. Bienvenu K, Granger DN: Molecular Determinants of Shear Rate Dependent Leukocyte Adhesion in Postcapillary Venules. *Am J Physiol* 264. H1504-H1508, 1993.
16. Doré M, Korthuis RJ, Granger DN, Entman ML, Smith CW: P-Selectin Mediates Spontaneous Leukocyte Rolling in Vivo. *Blood*, 82:1308-1316, 1993.
17. Rubin BB, Smith A, Liauw S, Isenman De, Romaschin AD, Walker PM: Complement Activation and White Cell Sequestration in Postschemic Skeletal Muscle. *Am J Physiol* 259: H525-H531, 1990.