



İskelet kası iskemi-reperfüzyon hasarının hangi evresinde lokal soğuk uygulaması daha etkilidir?

In which period of skeletal muscle ischemia-reperfusion injury is local hypothermia more effective?

Ahmet EGE, Egemen TURHAN, Sibel BEKTAŞ,¹ Kamuran PAMUK,² Ahmet BAYAR, Selcuk KESER

Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, ¹Patoloji Anabilim Dalı;

²Afyon Kocatepe Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı

Amaç: Sıçan modelinde lokal hipotermi uygulamasının iskemi-reperfüzyon hasarının farklı evrelerindeki etkileri incelendi.

Çalışma planı: Gracilis kası iskemi-reperfüzyon modeli için, her birinde altı sıçan olan dört grup oluşturuldu. Femoral arterin altı saat süreyle klemplenmesiyle iskemik hasar oluşturulan kaslara sadece iskemik dönemde (İH), sadece dört saatlik reperfüzyon döneminde (RH) veya iskemi ve reperfüzyon dönemlerinde (İRH) 10 °C'de lokal hipotermi uygulandı. Kontrol grubuna hipotermi uygulanmadı. Yirmi dört saatlik reperfüzyon dönemi sonunda yaşamları sonlandırılan deneklerin gracilis kasları çıkarıldı ve örneklerde kas ödemi (yaş/kuru ağırlık oranı), polimorfonükleer lökosit (PMNL) sayımı ve nekroz yüzdesi incelendi.

Sonuçlar: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında (193.7±38.9), PMNL sayıları İH grubunda (111.5±36.2; p<0.004), RH grubunda (82±18.6; p<0.002) ve İRH grubunda (54.5±21.8; p<0.002) anlamlı derecede düşük bulundu. Hipotermi grupları arasında PMNL açısından anlamlı tek fark İRH ve İH grupları arasında idi (p<0.004). Doku nekroz oranları, kontrol grubuyla (%22.5±5.2) karşılaştırıldığında, hipotermi gruplarının hepsinde anlamlı derecede düşük bulundu (İH: %11.7±5.2, p<0.004; RH: %10.8±3.8, p<0.004; İRH: %6.7±2.6, p<0.002). Kas ödemi, kontrol grubuyla (2.89±0.46) karşılaştırıldığında, hipotermi gruplarında anlamlı derecede düşük düzeylerdeydi (İH: 2.01±0.26, p<0.001; RH: 1.98±0.34, p<0.001; İRH: 1.97±0.43, p<0.001). Nekroz oranları ve kas ödemi açısından hipotermi grupları arasında anlamlı fark yoktu.

Çıkarımlar: Bulgularımız, iskemi ve reperfüzyon süreçlerinde uygulanan lokal hipotermi'nin iskemi-reperfüzyon hasarını azaltmada belirgin yararı olduğunu göstermiştir.

Anahtar sözcükler: Hipotermi oluşturma; iskemi; kas, iskelet kan desteği; sıçan; reperfüzyon hasarı/önleme ve kontrol.

Objectives: We investigated the potential beneficial effects of local hypothermia applied during different periods of ischemia-reperfusion injury in a rat model.

Methods: An isolated gracilis muscle model of ischemia-reperfusion injury was used consisting of four groups, each with six rats. Ischemic injury was induced by clamping the femoral artery for six hours. Local hypothermia at 10 °C was applied during only ischemia (IH), during reperfusion (RH) for four hours, and during both ischemia and reperfusion (IRH). The control group remained untreated. After 24 hours of perfusion, the rats were sacrificed and the gracilis muscles were removed to determine muscle edema (wet-to-dry weight ratio), polymorphonuclear leukocytes (PMNL), and the percentage of necrosis.

Results: Compared to the control group (193.7 ±38.9), the PMNL count was significantly lower in the IH, RH, and IRH groups (111.5±36.2, p<0.004; 82±18.6, p<0.002; 54.5±21.8, p<0.002, respectively). The only significant difference in the PMNL count was between the IH and IRH groups (p<0.004). In all the hypothermia groups, the percentage of necrosis was found significantly less than that of the control group (22.5±5.2% vs 11.7±5.2% in IH, p<0.004; 10.8±3.8% in RH, p<0.004; 6.7±2.6% in IRH, p<0.002). Similarly, muscle edema was significantly decreased in the study groups (control, 2.89±0.46 vs 2.01±0.26 in IH, p<0.001; 1.98±0.34 in RH, p<0.001; 1.97±0.43 in IRH, p<0.001). There were no significant differences between the three hypothermia groups with respect to the percentage of necrosis and muscle edema.

Conclusion: Our results show that local hypothermia applied during ischemic and reperfusion periods is significantly effective in reducing ischemia-reperfusion injury.

Key words: Hypothermia, induced; ischemia; muscle, skeletal/ blood supply; rats; reperfusion injury/prevention & control.

Vasküler travma ya da arteriyel tıkanma sonucunda alt veya üst ekstremitelerde oluşan akut iskemiyi yarattığı önemli morbidite ve mortalite sorunları tüm çabalara rağmen devam etmektedir. İleri derecede iske-mi oluştuktan sonra revaskülarizasyon gerçekleşirse yüksek oranda mortalite (%48) ve amputasyon (%52) beklenebilir.^[1] Gecikmiş revaskülarizasyon sonrasında oluşan reperfüzyon ödeminin kompartman sendromuna, reperfüzyon hasarına ve sonuçta ekstremitenine yol açabildiği iyi bilinmektedir. Kas iske-mi-reperfüzyon hasarının patofizyolojisi henüz bütün ayrıntıları ile açıklanamamıştır ve tartışmalıdır. Bu sorunun bilinmesine rağmen, reperfüzyon hasarının önlenmesi için yapılan araştırmaların klinik uygulanabilirliği konusunda zorluklar bulunmaktadır.

İskemik ekstremitenin korunması amacıyla lokal hipotermi uygulaması, Euro-Collins solüsyonu, Wisconsin University solüsyonu, serbest radikal süpürücüler ve çeşitli medikal ajanların etkisi literatürde yer almaktadır.^[2-6] Bu yöntemler hipotermili ya da hipotermisiz basit korunma ve devamlı perfüzyon olmak üzere genel olarak iki gruba ayrılabilir. İskemik süreçte hipotermi ile basit koruma çoğu klinik olguda başarı ile kullanılmıştır ve pratiktir.^[7] Ancak, basit hipotermik koruma sonrası kasların canlılığını değerlendirmek kolay değildir.

Deneyssel olarak iskemik ekstremitelerde hipotermi-nin ekstremitenine kaybını ve mortaliteyi azalttığı ilk kez Allen tarafından gösterilmiştir.^[8] Kısa süreli dondurmayla veya ısının uygun derecelere düşürülmesiyle, uzun süreli akut ekstremitenine iskemisi güvenle tolere edilebilir. Bu etki, ekstremitenin ezilme (crush) yaralanması modeliyle kas ödemi sürecinde normotermik koruma ve hipotermik korumayı karşılaştıran Duncan tarafından doğrulanmıştır.^[9]

Hamel ve Moe^[10] köpeğin arka ekstremitelerine beş saat turnike uygulaması sonucunda oluşturulan iske-mi modelinde, 18 °C lokal hipotermi ve normotermik turnike iskemisini karşılaştırmışlar ve hipotermi uygulanan ekstremitelerde daha az ödem ve ekstremitenine kaybı gözlemlenmiştir. Brunelli^[11] ise 24 saat hipotermik iskemiden sonra köpeklerin arka ekstremitelerinin tamamen fonksiyonel olarak başarıyla replantasyonunu bildirmiştir.

Akahene ve ark.^[12] iskelet-kas canlılığının devamlılığını sürdürmede altı saate kadar basit hipotermik korumanın verimliliğini, iskemik kaslarda gen ekspresyon düzeyini ölçerek araştırmışlar ve klinik ola-

rak hipotermik ortamın damarsal yaralanma bulunan ekstremitenin korunmasında altı saate kadar etkili olduğu sonucuna varmışlardır.

Birçok çalışmada hipotermi-nin etkisi reperfüzyondan önce değerlendirilmiştir. Çoğu araştırmacı iske-mi süresince hipotermi uygulamasıyla lokal enflamatuvar yanıt duyarlılığında ve doku ödeminde azalma olduğunu bildirmişlerdir.^[13-21]

İske-mi-reperfüzyon hasarında reperfüzyon sırasında hipotermi uygulamak hala tartışma konusudur. Yaralanmış ekstremitelerde, reperfüzyon sırasında uygulanacak hipotermi-nin vazokonstriksiyonla sonuçlanabileceği düşünülmektedir.^[22] Öte yandan, birçok hayvan çalışmasında, özellikle serebrovasküler tıkanma ya da kardiyak bypass modellerinde reperfüzyon sırasında uygulanan hipotermi-nin olumlu etkileri gösterilmiştir.^[20,21,23-27] Erken reperfüzyon sürecinde 28-35 °C aralığında hafif hipotermi-nin hücresel düzeyde nöroprotektif etkileri olduğu bildirilmiştir.^[23-29]

Günümüzde ekstremitenin ezilmesi şeklindeki yaralanmalara yaygın bir şekilde önemli damar yaralanması da eşlik etmektedir. Kemik kırıklarının eşlik ettiği damar yaralanması gecikmiş damar onarımına ve sonuçta kompartman sendromuna neden olabilmektedir.

Bu çalışmada, reperfüzyon hasarının ölümcül sonuçlarını engellemeye yönelik klinik uğraşlara katkıda bulunmak amacıyla, iske-mi ve erken reperfüzyonun farklı süreçlerinde lokal hipotermi-nin potansiyel yararları araştırıldı.

Gereç ve yöntem

Denek seçimi ve cerrahi yaklaşım

Çalışmamızda ağırlıkları 300-370 gr arasında değişen 24 adet Wistar sıçan kullanıldı. Çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Komitesi tarafından onaylanmıştır. Hayvanlara intramusküler anestezi (ketamin 50 mg/kg ve ksilazin 4 mg/kg) uygulandı. Her 90 dakikada yarım doz ilave edilerek anestezi sürdürüldü.

Femoral-arteri klempleme

İnguinal ligaman kaudale kanca ile çekildikten sonra, epigastrik arterin dallarının distalinden femoral arter inguinal ligamanın tam altından mikroklemple ile klemplendi (Roboz Surgical Instruments, Rockville, MD, ABD). Klempleme işlemi sırasında yüzeysel ve derin femoral damarların dolaşımının tam olarak engellendiği gözlemlendi (Şekil 1).



Şekil 1. Femoral arterin inguinal ligamanın tam altından mikroklemplekle klemlenmesi.

Hipotermi prosedürü

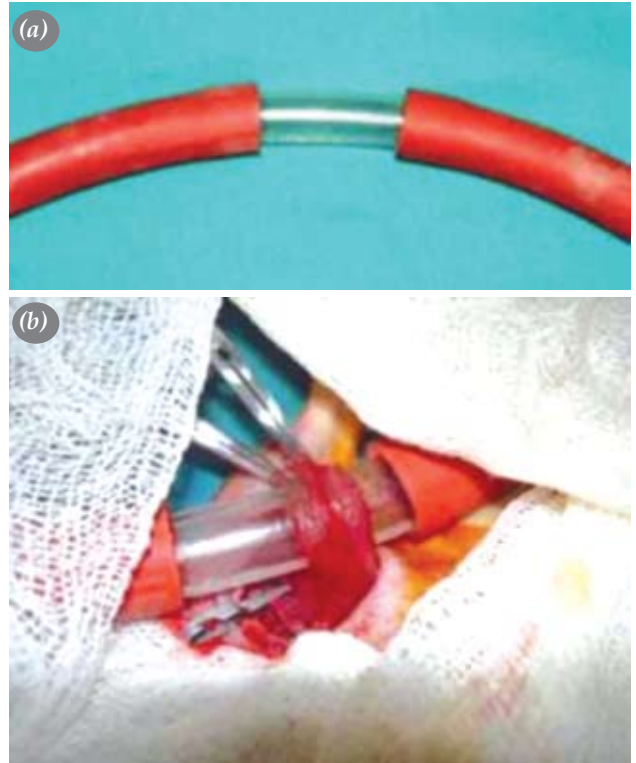
Mowlavi ve ark.^[22] tarafından tanıtılan soğutma sistemi uygulandı. Altı milimetre çapında bir cam tüp grasilis kasıyla sarılarak, 10 °C'ye soğutulmuş su termoplastik pompa vasıtasıyla devamlı olarak cam tüpe aktarıldı. Oda ısısı 25 °C'ye ayarlandı ve sıçanların vücut sıcaklığı rektal termometre ile izlendi. Grasilis kası ısısı iğne uçlu termometre ile ölçüldü (Şekil 2).

Deney modeli

İskemi ve reperfüzyon süreci boyunca uygulanan hipotermiye göre dört deney grubu oluşturuldu (Tablo 1). İskemik bırakılan kasların oda sıcaklığına kadar soğuyacakları öngörülerek oda sıcaklığının 25 °C'de sabit tutulmasına özen gösterildi ve sıçanların genel vücut ısısı olan 37 °C sürekli ölçülerek sistemik hipotermi olması engellendi.

Altı saatlik iskemiye takiben, mikrovasküler klemler açıldı ve hem yüzey hem de derin femoral arterlerdeki yeterli kan akışı büyütülerek incelendi. Grasilis kas flepleri dört saatlik reperfüzyon sürecinden sonra 0-5 Ethibond dikişle yerlerine dikildi. Bu süreçte kasın daha fazla zarar görmemesine dikkat edildi.

İskemi ve reperfüzyon işlemleri tamamlandıktan sonra, bütün kaslar anatomik olarak 4-0 Prolene ile tamir edildi ve vücut ısısında (37 °C) perfüze olmaları sağlandı. Perfüzyon sürecinin geri kalan kısmında hayvanların ayılmasına izin verildi. Yirmi dört saat-



Şekil 2. (a) Soğutma işlemi cam tüp içinden termoplastik pompa ile devamlı dolaşım yapılarak sağlandı. (b) Grasilis kası ile sarılmış cam tüp.

lik perfüzyondan sonra deney sonlandırıldı ve pentobarbital (42 mg/intraperitoneal) ile anestezi altında, 1 ml intrakardiyak lidokain enjeksiyonu ile deneklerin yaşamı sonlandırıldı. Grasilis kaslarından alınan dokular değerlendirme için toplandı. Toplanan kas örnekleri kas ödemi ölçümü ve histopatolojik inceleme için iki eşit parçaya bölündü. Mikroskopik incelemede interstisyel doku ödemi, enflamasyon tipi ve yoğunluğu, enflamasyonun yeri ve polimorfonükleer lökosit (PMNL) tipi ve sayısı değerlendirildi.

Histopatolojik inceleme

Dokular %10'luk formalin solüsyonunda tespit edildi, parafine gömüldü, altı kesit alındı ve hematoksilin-eosin ile boyandı. Bu kesitler ışık mikroskobu altında, iki ayrı patolog tarafından kör olarak incelendi. Göz-

Tablo 1. Kontrol ve deney gruplarının hipotermi uygulama dönemlerine göre dağılımı

	Kontrol grubu (°C) (n=6)	İskemi-hipotermi grubu (°C) (n=6)	Reperfüzyon-hipotermi grubu (°C) (n=6)	İskemi-reperfüzyon-hipotermi grubu (°C) (n=6)
6 saat iskemi	25	10	25	10
4 saat reperfüzyon	37	37	10	10
24 saat perfüzyon	37	37	37	37

lemlenen patolojik bulgular, kas dokusundaki nekroz ve nötrofil infiltrasyonu açısından ele alındı. Kas dokusu nekrozu, hiyalin dejenerasyonu, striyasyon kaybı, sarkolemmada granüler görüntü ve kas fiberlerinin fragmentasyonu ve infiltre olmuş enflamatuvar hücreler göz önünde bulundurularak değerlendirildi. Histolojik kas nekrozunun derecesi, kesitlerin histolojik hasar seviyesini gösteren yüzdelik alanına göre değerlendirildi. Kas dokusunda infiltre nötrofil sayısı, x400 büyütme altında üç bölgedeki nötrofil sayısının toplamı olarak sayıldı.

Kas ödemi

Kas ağırlığının ölçümü için, kasın bir yarısının ağırlığı yaşken manyetik terazide ölçüldü (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, Maryland, ABD), daha sonra 36 saat boyunca 28 °C'de etüvde kurutulularak bu işlem yineleni (kuru ağırlığı). Yaş ağırlığın kuru ağırlığa oranı kas ödeminin ölçümü için hesaplandı.

İstatistiksel değerlendirme

Bulgular SPSS programı ile analiz edilerek, ortalama değerler ortalama±standart sapma olarak gösterildi. Gruplar arasındaki farkı karşılaştırmak için Kruskal-Wallis varyans analizi, ki-kare testi ve Mann-Whitney U-testi kullanıldı.

Sonuçlar

Polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu

Normotermik kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (193.7±38.9), PMNL infiltrasyonunun iskemi-hipotermi (İH) grubunda (111.5±36.2; p<0.004), reperfüzyon-hipotermi (RH) grubunda (82±18.6; p<0.002), iskemi-reperfüzyon-hipotermi (İRH) grubunda (54.5±21.8; p<0.002) anlamlı derecede düşük bulundu. Çalışma grupları arasında yapılan karşılaştırmada ise, PMNL infiltrasyonu İRH grubunda İH grubuna göre anlamlı derecede düşüktü (p<0.004). Reperfüzyon-hipotermi grubu ile diğer iki grup arasında bu açıdan anlamlı farklılık yoktu (p>0.05). Bir başka deyişle, hipotermimin sadece iskemik dönemde uygulanması ile erken reperfüzyon döneminde uygulanması PMNL infiltrasyonunda farklılığa yol açmamıştı (p=0.093).

Patolojik incelemede, PMNL infiltrasyonu lokal hipotermi uygulanan çalışma gruplarında perifasyal bölgeyle sınırlı kalırken, kontrol grubunda endomisyumaya kadar ulaştığı görüldü (Şekil 3).

Doku nekrozu

Doku nekroz oranları, normotermik kontrol grubuyla (%22.5±5.2) karşılaştırıldığında, çalışma gruplarının hepsinde anlamlı derecede düşük bulundu (İH grubu %11.7±5.2, p<0.004; RH grubu %10.8±3.8, p<0.004; İRH grubu %6.7±2.6, p<0.002); ayrıca, nekroz oranları açısından çalışma grupları arasında fark yoktu (İH-İRH grupları için, p=0.093; RH-İH grupları için, p=0.937; RH-İRH grupları için, p=0.093).

Kas ödemi

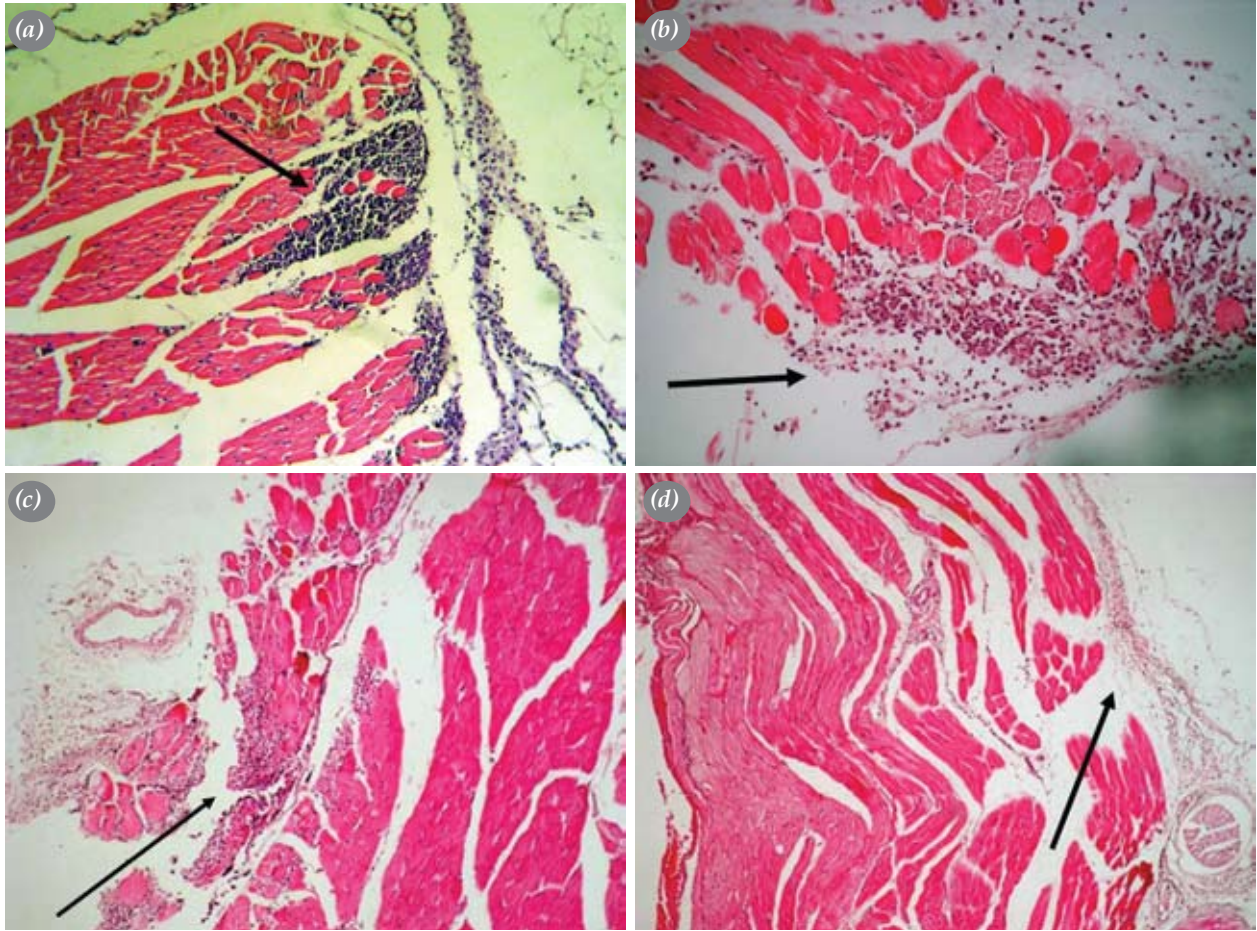
Kas ödemi (ıslak/kuru kas ağırlığı oranı), normotermik kontrol grubuyla (2.89±0.46) karşılaştırıldığında, çalışma gruplarında anlamlı derecede düşük düzeylerdeydi (İH grubu 2.01±0.26, p<0.001; RH grubu 1.98±0.34, p<0.001; İRH grubu 1.97±0.43, p<0.001). Çalışma grupları arasında bu oranlar açısından fark yoktu (İH-İRH grupları için, p=0.192; RH-İH grupları için, p=0.337; RH-İRH grupları için, p=0.223).

Tartışma

Bu çalışmada, önemli arteriyel hasara uğramış bir ekstremitedeki iskemiye andıran bir modelde, temel enflamatuvar reaksiyonlar patolojik yöntemlerle incelenerek iskemi ve reperfüzyon döneminde uygulanan lokal hipotermimin etkisi araştırıldı. Çalışmamızdan çıkardığımız ilk sonuç, lokal soğuk uygulamasının iskemi-reperfüzyon hasarını engellemede belirgin ölçüde etkili olduğudur. Elde ettiğimiz diğer bir önemli sonuç da, kas ödemi ve nekrozu gibi temel parametreler göz önünde bulundurulduğunda, farklı evrelerde soğuk uygulamasının benzer ölçüde olumlu etkilerinin olduğudur. Benzer şekilde, PMNL infiltrasyonu tüm çalışma gruplarında kontrol grubuna göre belirgin derecede düşük bulunmuştur. Çalışma grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde ise, PMNL infiltrasyon oranı RH grubu ile diğer iki grup arasında benzer bulunurken, İH ve İRH grupları arasında (İRH grubu lehine) anlamlı fark göstermiştir.

Reperfüzyon hasarı 1960'lı yıllarda "deklamping şok" olarak biliniyordu. İlk olarak 1975 yılında Cerra ve ark.nın^[30] otopsi çalışmalarında, aortik kapak replasmanı sonrasında miyokard dokusunda klinik olarak tanımlanmıştır. Günümüzde reperfüzyon hasarıyla ilgili temel noktalar çeşitli klinik ve deneysel çalışmalarla aydınlatılmışsa da, hasardan korunmak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Reperfüzyon hasarı karmaşık bir enflamatuvar reaksiyondur. Dolaşımın restorasyonu hücre hasarı



Şekil 3. (a) Kontrol grubunda perimisyum ve endomisyuma doğru yoğun polimorfonükleer lökosit (PMNL) infiltrasyonu. (b) İskemi-hipotermi grubunda perimisyum ve endomisyum içine doğru orta derecede PMNL infiltrasyonu. (c) Reperfüzyon-hipotermi grubunda kasın perifasiyal bölgesinde sınırlı PMNL infiltrasyonu, (d) İskemi-reperfüzyon-hipotermi grubunda kasın perifasiyal bölgesinde PMNL infiltrasyonu hafif derecede ve sınırlıdır.

evresinden sonra olursa, lökosit endotelial etkileşime ve immün kompleks aktivasyonuna neden olur. Ayrıca, reperfüzyon hasarı özellikle endotel hücrelerinde lipid peroksidasyonuna neden olan serbest oksijen radikallerini serbestleştirir. Sonraki aşamada bu serbest radikaller lökositler ve trombositlere etki ederek vazokonstriksiyon ve agregasyonu tetikler. Reperfüzyon hasarı sonuçta enflamasyon hücre hasarını artırmakta ve kompartman sendromu sonrasında ekstremitte kaybına yol açabilmektedir.^[31]

Hipotermi, hiperbarik oksijen, serbest radikal temizleyicileri, Euro-Collin solüsyonu, Wisconsin University solüsyonu ve perflorokarbonlar (perflorokimyasallar) devaskularize dokuyu korumak ve iskemik hasarı azaltmak için kullanılmıştır.^[3-6] Hipotermi uygulaması, iskemi sırasında ve sonrasında dokulara lökosit infiltrasyonunu, dolayısıyla serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkmasını azaltarak kas canlılığının

korunmasına yardımcı olmaktadır.^[22,32,33] Hipotermi bu alanda en çok araştırılmış olan yöntem olmasına karşın, uygulama zamanı hala tartışmalıdır.^[11,22] İskemi sırasında hipotermi etkileri bilinmektedir; fakat, iskemi sonrasındaki dönemde etkileri ise çok tartışılmamıştır.

Wright ve ark.^[34,35] *in vivo* şartlarda köpek *gracilis* modellerinde, iskemi sonrası reperfüzyona hipotermi'nin lokal etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmalar ile, iskemi sonrası hipotermi'nin interstiyel kas pH'sini artırdığı ve vücut sıcaklığındaki perfüze kaslar ile karşılaştırıldığında, albuminin vasküler geçirgenliğini azaltmadan reperfüzyon sonrası ödemi de azaltabileceği gösterilmeye çalışılmıştır. Aynı modelde yapılan çalışmada oksijen tüketiminin, kas yıkımının ve infarkt alanının da azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca, yaygın olan görüşün aksine, bu çalışmalarda hipotermi'nin tetiklediği vazokonstriksiyonun kuru-

yucu etkisi de aydınlatılmaya çalışılmıştır. Çalışmamız ise, iskemi ve reperfüzyon süreçleri sırasındaki lokal hipotermik reperfüzyonun doğrudan etkilerini kapsamamaktaydı.

Mowlavi ve ark.^[22] sıçan iskelet kas flebinde iskemi ve reperfüzyon hasarında, izole lokal hipotermimin kas canlılığı, kas ödemi, nötrofil integrasyonu ve infiltrasyonu ve nötrofil oksidasyonuna karşı yararlarını incelemişlerdir. Anılan çalışmada, erken reperfüzyon sırasında uygulanan lokal hipotermimin CD11b ekspresyonunu engelleyerek, nötrofil oksidatif potansiyelini ve nötrofil infiltrasyonunu baskılayarak iskelet kasını hasardan koruduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda iskemik süreç için tercihimiz altı saattir; çünkü, iskemiye bağlı iskelet kasındaki yapısal değişiklikler ilk dört saat içinde meydana gelmekte ve 6-8 saat sonra glikojen granüllerinin kaybolması, Z bandında düzensizlik, mitokondriyal şişme ve kristallerin disorganizasyonu, sarkoplazmik retikulumun şişmesi ve sarkolem membranın yıkılması gibi histolojik değişikliklerin olduğu, geri dönüşü olmayan kas nekrozu başlamaktadır.^[36-38] Sapega ve ark.^[32] kas dokusunu hipotermi ile korumak için iskemi sırasında lokal ısının 10 °C olmasını önermişlerdir. Bu sıcaklıkta lokal doku pH'si en stabil halde, ATP ile fosfokreatinin en yüksek düzeyde ölçülmüştür.^[32] Lokal ısı eğer 10 °C'den daha aşağı düşürülür ve -5 °C'ye ulaşırsa paradoksal bir yanıt ortaya çıkmakta ve laktat düzeyinde artış ile birlikte ATP ve fosfokreatinin düzeyinde azalma görülmektedir.^[22,32,39] Çalışmamızda da, bu veriler göz önüne alınarak hipotermi 10 °C olarak uygulandı. Busto ve ark.^[40] lokal hipotermimin reperfüzyonun ilk üç saatinde uygulanması gerektiğini, iki saatlik hipotermimin yararlı olduğunu, üç saatten fazla uzamış hipotermimin ise reperfüzyon hasarında yarar sağlamadığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızın bulguları, hipotermimin sadece iskemik dönemde uygulanmasıyla karşılaştırıldığında, iskemi ve resusitasyon süreçleri boyunca uygulanmasının PMNL infiltrasyonunu daha fazla azalttığını gösterdi. Bu açıdan İRH ve RH grupları arasında anlamlı fark olmaması da kayda değer bir sonuç olarak görünmektedir. Buradan hareketle, iskemik dönemde hipotermi uygulanmamış olsa bile, erken reperfüzyon döneminde uygulanacak hipotermi kaçırılmış olan bir fırsatın kısmen telafisi anlamına gelebilir.

Bu çalışmada kas ödeminin varlığı ve yoğunluğunun (şiddeti) değerlendirilmesi önemlidir; çünkü, in-

terstiyel doku ödeminin klinik yansıması kas nekrozu ve kompartman sendromudur. Enflamasyonlu kas dokusundaki PMNL infiltrasyonu, çeşitli mekanizmalarla interstiyel doku ödeme neden olur. Hipoksik doku, lipooksijenaz ve siklooksijenaz yolları ile lökositler için kimyasal mediatörler salgılar. Araşidonik asit türevleri, özellikle lökotrienler, reperfüzyon hasarının özelliği olan lökositlerin vasküler endotele tutunmasını ve postkapiller venüllerin geçirgenliğini artırır.^[32,41,42] Erken reperfüzyon sırasındaki hipotermimin, koruyucu etkisini ödem oluşumuna bağlı selektif nötrofil supresyonunu baskılamakla gösterdiği bildirilmiştir.^[22,43] Bununla birlikte çalışmamızda, lokal hipotermimin kas ödeme ve nekrozuna her üç çalışma grubunda da aynı ölçüde olumlu etkisi olduğu görüldü. Bu bulgular, erken reperfüzyon döneminde lokal hipotermi uygulamasının, korkulan aksine ek bir vazokonstriksiyona yol açarak ödem ve nekroz şiddetini artırmadığını, aksine koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir.

Klinik uygulamalarda yaralanmadan sonra iyi korunmuş dokulardan daha çok, iskemiye maruz kalmış ekstremitelerle karşılaşılır ve bazen de ekstremitenin kaybı kaçınılmaz olur. Ekstremitedeki önemli arteriyel yaralanma sonrası gecikmiş revaskülarizasyonun yıkıcı sonuçları iyi bilinmektedir; bundan dolayı, pratik ve basit koruma yöntemleri iskemik dokuyu koruyabilmek için önem kazanmaktadır. Tanımlanan birçok yöntemle rağmen, hipotermi uygulaması bilinen en pratik ve güvenilir yöntem olarak yerini korumaktadır.

Sonuçlarımız, erken reperfüzyon döneminde uygulanan hipotermi ile hem iskemi hem de erken reperfüzyon süreçlerinde uygulanan lokal hipotermimin reperfüzyon hasarından ekstermiteyi eşit ölçüde koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir. Bu bulgular ışığında, basit hipotermi tekniklerinin klinik uygulamalara girmesini sağlayacak pratik yöntemlerin geliştirmesi belirgin bir zorunluluk olarak görünmektedir.

Kaynaklar

1. Kendrick J, Thompson BW, Read RC, Campbell GS, Walls RC, Casali RE. Arterial embolectomy in the leg. Results in a referral hospital. *Am J Surg* 1981;142:739-43.
2. Nakagawa Y, Ono H, Mizumoto S, Fukui A, Tamai S. Subzero nonfreezing preservation in a murine limb replantation model. *J Orthop Sci* 1998;3:156-62.
3. Kihira M, Miura T, Ishiguro N. Preservation of skeletal muscle in tissue transfers using rat hindlimbs. *Plast Reconstr*

- Surg 1991;88:275-84.
4. Norden MA, Rao VK, Southard JH. Improved preservation of rat hindlimbs with the University of Wisconsin solution and butanedione monoxime. *Plast Reconstr Surg* 1997;100:957-65.
 5. Yokoyama K, Kimura M, Itoman M. Rat whole-limb viability after cold immersion using University of Wisconsin and Euro-Collins solutions. *Transplantation* 1996;62:884-8.
 6. Ono H, Nakagawa Y, Mizumoto S, Tamai S. Vascular compliance and vasoconstrictive reactions in rat hindlimbs: comparison between storage temperatures of -1 degree C and 4 degrees C. *J Reconstr Microsurg* 1997;13:409-14.
 7. May JW Jr, Hergrueter CA, Hansen RH. Seven-digit replantation: digit survival after 39 hours of cold ischemia. *Plast Reconstr Surg* 1986;78:522-5.
 8. Allen FM. Effects of ligations on nerves of the extremities. *Ann Surg* 1938; 108:1088-93.
 9. Wright JG, Araki CT, Belkin M, Hobson RW 2nd. Postischemic hypothermia diminishes skeletal muscle reperfusion edema. *J Surg Res* 1989;47:389-96.
 10. Hamel AL, Moe JH. Effect of total ischemia on hind limbs of dogs subjected to hypothermia. *Surgery* 1964;55:274-80.
 11. Brunelli G. Ischemia and reimplantation. In: Brunelli G, editor. *Ischemia and reimplantation*. Padua: Liviana Editrice; 1981. p. 1-49.
 12. Akahane M, Ono H, Ohgushi H, Takakura Y. Viability of hypothermic preserved muscle determined by gene expression levels. *Br J Plast Surg* 2002;55:136-9.
 13. Beris AE, Soucacos PN, Seaber AV, Urbaniak JR. Effects of cold ischemia on reflow patterns in the rat cremaster muscle microcirculation. *Int Angiol* 1995;14:248-52.
 14. Brunelli GA, Brunelli GR. Tissue changes at different periods of ischemia. *Int Angiol* 1995;14:253-63.
 15. Yoshioka T, Shires GT, Fantini GA. Hypothermia relieves oxidative stress in reperfused skeletal muscle following partial ischemia. *J Surg Res* 1992;53:408-16.
 16. Siemionow M, Romanowski L, Lister G. Leukocyte-depleting effect of hypothermia on muscle flap microcirculation following ischemia-reperfusion injury. *J Hand Surg [Am]* 1993;18:963-71.
 17. Wilson YT, Lepore DA, Riccio M, Hickey MJ, Penington AJ, Hayward PG, et al. Mild hypothermia protects against ischaemia-reperfusion injury in rabbit skeletal muscle. *Br J Plast Surg* 1997;50:343-8.
 18. Yabe Y, Ishiguro N, Shimizu T, Tamura Y, Wakabayashi T, Miura T. Morphologic and metabolic study of the effect of oxygenated perfluorochemical perfusion on amputated rabbit limbs. *J Reconstr Microsurg* 1994;10:185-91.
 19. Awerbuck D, Luong V, Plyley MJ, McKee NH. Skeletal muscle form and function after 4 hr ischemia-hypothermia. *J Surg Res* 1994;57:480-6.
 20. Gunnes S, Ytrehus K, Sørli D, Helgesen KG, Mjøs OD. Improved energy preservation following gentle reperfusion after hypothermic, ischemic cardioplegia in infarcted rat hearts. *Eur J Cardiothorac Surg* 1987;1:139-43.
 21. Nagano K, Gelman S, Bradley EL Jr, Parks D. Hypothermia, hepatic oxygen supply-demand, and ischemia-reperfusion injury in pigs. *Am J Physiol* 1990;258:G910-8.
 22. Mowlavi A, Neumeister MW, Wilhelmi BJ, Song YH, Suchy H, Russell RC. Local hypothermia during early reperfusion protects skeletal muscle from ischemia-reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg* 2003;111:242-50.
 23. Canevari L, Console A, Tendi EA, Clark JB, Bates TE. Effect of postischemic hypothermia on the mitochondrial damage induced by ischaemia and reperfusion in the gerbil. *Brain Res* 1999;817:241-5.
 24. Duan M, Li D, Xu J. Effects of selective head cooling on brain cell membrane activity during postischemic reperfusion. *Chin Med J* 1996;109:463-6.
 25. Laptook AR, Corbett RJ, Sterett R, Burns DK, Garcia D, Tollefsbol G. Modest hypothermia provides partial neuroprotection when used for immediate resuscitation after brain ischemia. *Pediatr Res* 1997;42:17-23.
 26. Huang FP, Zhou LF, Yang GY. The effect of extending mild hypothermia on focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat. *Neurol Res* 1998;20:57-62.
 27. Zhang RL, Chopp M, Chen H, Garcia JH, Zhang ZG. Postischemic (1 hour) hypothermia significantly reduces ischemic cell damage in rats subjected to 2 hours of middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 1993;24:1235-40.
 28. Xue D, Huang ZG, Smith KE, Buchan AM. Immediate or delayed mild hypothermia prevents focal cerebral infarction. *Brain Res* 1992;587:66-72.
 29. Carroll M, Beek O. Protection against hippocampal CA1 cell loss by post-ischemic hypothermia is dependent on delay of initiation and duration. *Metab Brain Dis* 1992;7:45-50.
 30. Cerra FB, Lajos TZ, Montes M, Siegel JH. Hemorrhagic infarction: A reperfusion injury following prolonged myocardial ischemic anoxia. *Surgery* 1975;78:95-104.
 31. Khalil AA, Aziz FA, Hall JC. Reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg* 2006;117:1024-33.
 32. Sapega AA, Heppenstall RB, Sokolow DP, Graham TJ, Maris JM, Ghosh AK, et al. The bioenergetics of preservation of limbs before replantation. The rationale for intermediate hypothermia. *J Bone Joint Surg [Am]* 1988;70:1500-13.
 33. Usui M, Ishii S, Muramatsu I, Takahata N. An experimental study on "replantation toxemia". The effect of hypothermia on an amputated limb. *J Hand Surg [Am]* 1978;3:589-96.
 34. Wright JG, Kerr JC, Valeri CR, Hobson RW. Regional hypothermia protects against ischemia-reperfusion injury in isolated canine gracilis muscle. *J Trauma* 1988;28:1026-31.
 35. Wright JG, Belkin M, Hobson RW 2nd. Hypothermia and controlled reperfusion: two non-pharmacologic methods which diminish ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *Microcirc Endothelium Lymphatics* 1989;5:315-34.
 36. Sanderson RA, Foley RK, McIvor GW, Kirkaldy-Willis WH. Histological response on skeletal muscle to ischemia.

- Clin Orthop Relat Res 1975;(113):27-35.
37. Makitie J, Teravainen H. Ultrastructure of striated muscle of the rat after temporary ischemia. *Acta Neuropathol* 1977; 37:237-45.
 38. Stenger RJ, Spiro D, Scully RE, Shannon JM. Ultrastructural and physiologic alterations in ischemic skeletal muscle. *Am J Pathol* 1962;40:1-20.
 39. Zhang JX, Wolf MB. Effect of cold on ischemia-reperfusion-induced microvascular permeability increase in cat skeletal muscle. *Cryobiology* 1994;31:94-100.
 40. Busto R, Globus MY, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD. Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. *Stroke* 1989;20:904-10.
 41. Lehr HA, Guhlmann A, Nolte D, Keppler D, Messmer K. Leukotrienes as mediators in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model in the hamster. *J Clin Invest* 1991;87:2036-41.
 42. Johnson M, Haddix T, Pohlman T, Verrier ED. Hypothermia reversibly inhibits endothelial cell expression of E-selectin and tissue factor. *J Card Surg* 1995;10(4 Suppl):428-35.
 43. Cornejo CJ, Kierney PC, Vedder NB, Winn RK. Mild hypothermia during reperfusion reduces injury following ischemia of the rabbit ear. *Shock* 1998;9:116-20.