

Deneysel Epigastrik Ada Flep Modeli Yaşayabilirliğinde Hiperbarik Oksijen ve/veya Antioksidan Vitamin Kombinasyonunun Etkinliği

EFFECTS OF HYPERBARIC OXYGEN AND/OR ANTIOXIDANT VITAMIN COMBINATION ON VIABILITY OF EXPERIMENTAL EPIGASTRIC ISLAND SKIN FLAPS

Şükrü ÖTER*, Ahmet KORKMAZ*

*Dr.,GATA Fizyoloji AD, ANKARA

Özet

İskemiye maruz kalmış bir flepte perfüzyonun yeniden sağlanması flep surveyini garanti emeye yeterli değildir. Aksine reperfüzyon ile beraber oluşan serbest oksijen radikallerinin neden olacağı daha ileri hasarlar meydana gelebilmektedir. Özellikle E ve C vitaminleri olmak üzere, çeşitli antioksidan vitaminleri kullanarak, deri fleplerindeki reaktif oksijen türevi (ROT) kaynaklı zararlı etkilerin azaltılabildiği gösterilmiştir. Flep yaşayabilirliğinin hiperbarik oksijen (HBO) uygulamaları ile de artırılabilirdiği yönünde bulgular vardır. Bu bilgiler ışığında gerçekleştirilen bu çalışmada, E ve C vitaminleri ile HBO uygulamalarının sıçan epigastrik ada flep modelinin yaşayabilirliği üzerine olan etkisi incelenmiştir. Deney için, Sprague-Dawley türü dişi sıçanlar 10'ar hayvanlık 4 eşit gruba ayrılmıştır: Kontrol, HBO, Vitamin (E+C), HBO + Vitamin (E+C). Anestezi sonrasında hayvanların karın bölgesi traşlanarak 6x3.5 cm boyutlarında epigastrik ada deri flebi kaldırıldı. Sonra, epigastrik arter ve veni içeren, inferior epigastrik pedikül klampe edilerek flep tekrar yerine dikildi. 8 saatlik iskemik süresinden sonra klempler açılarak dokunun reperfüzyonu sağlandı. HBO, 7 gün boyunca, 2.5 ATA basınç altında, günde 1 kez ve 1 saat süreyle uygulanırken, vitamin (E+C) kombinasyonuna (40+200 mg/kg), ilk dozu operasyondan 3 gün önce olmak üzere 3 günde bir devam edilerek toplam 4 doza tamamlandı. Postoperatif 7. günde flep yaşayabilirlik oranları değerlendirildi; buna göre canlı flep alanı kontrol grubunda %28.6±6.9, HBO grubunda %59.2±3.8, HBO + vitamin grubunda %66.3±5.9, vitamin (E+C) grubunda ise 82.0±3.9 olarak bulundu. Her üç deney grubunda da flep yaşayabilirliği kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artmış bulundu ($p<0.01$). Denebilir ki, antioksidan vitamin E ve C flep yaşayabilirliğini son derece olumlu yönde etkilemiş, bunun yanında HBO'nun etkinliği ise relatif olarak zayıf kalmış ve ilave araştırmalara gereksinim bırakmıştır.

Anahtar Kelimeler: Hiperbarik oksijen, Antioksidan vitamin, Deri flebi

T Klin Tıp Bilimleri 1999, 19:73-77

Geliş Tarihi: 07.11.1998

Yazışma Adresi: Dr.Şükrü ÖTER
GATA Fizyoloji AD 06018 Etlik, ANKARA

T Klin J Med Sci 1999, 19

Summary

Reperfusion is not enough to guarantee the survey in a flap subjected to ischaemia. Conversely, further damage caused by reactive oxygen species (ROS) produced together with reperfusion may occur. It was shown that harmful effects of ROS in skin flaps can be reduced by using different antioxidant vitamins such as vitamins E and C. There are also reports that flap survey may increase with hyperbaric oxygen (HBO) treatment. In this study, performed in the light of these data, effects of vitamins E and C and HBO exposure on rat epigastric skin flap survival were investigated. 40 Sprague-Dawley rats were divided into four equal group as control, HBO, vitamin (E+C), HBO + vitamin (E+C). Abdominal area of animals were shaved after anesthesia and epigastric skin flaps, in the dimensions of 6x3.5 cm, were raised. After clamping inferior epigastric pedicle, including epigastric artery and vein, flaps were resutured into its bed. Reperfusion was obtained by removing the clamps after 8 hours of ischaemia. HBO exposure was performed at 2.5 ATA for one hour duration once a day and was continued seven days. Combination of vitamin E and C (40+200 mg/kg) were administered intraperitoneally, initiated 3 days before the operation, continued at each three day and completed to a total of four doses. Flap viability ratios were evaluated at postoperative 7th day. According to these measurements, viable area ratios were found to be %28.6±6.9 in control, 59.2±3.8 in HBO, %66.3±5.9 in HBO + vitamin and %82.0±3.9 in vitamin group. Flap viability ratios were found higher for all treatment groups as compared with control ($p<0.01$). It may suggest that antioxidant vitamins E and C affected the flap viability exceptionally well, nevertheless positive effect of HBO remained relatively weak and let need for further investigation.

Key Words: Hyperbaric oxygen, Antioxidant vitamin, Skin flap

T Klin J Med Sci 1999, 19:73-77

Açık yaraların deri flepleri ile tedavisinde yara bölgesinde kaçınılmaz bir iskemi artışı meydana gelmektedir. Oluşan doku hipoksisi, flebi nekroza

götüren en yaygın nedendir. Bu şekilde iskemiye maruz kalmış bir flepte perfüzyonun yeniden sağlanması (reperfüzyon) flep surveyini garanti etmeye yeterli değildir. Aksine reperfüzyon ile beraber flep dokusuna giren oksijenin ve dolayısıyla da oluşan serbest oksijen radikallerinin neden olacağı daha ileri hasarlar meydana gelebilmektedir (iskemi-reperfüzyon hasarı) (1,2). İskemi-reperfüzyon hasarından kaynaklanan en önemli değişiklikler ödem, hücresel şişme, vazokonstriksiyon, serbest oksijen radikal ürünleri ve trombozistir. Tüm bu faktörler dokunun yaşayabilirliğini etkilemekte ve yeterli önlemlerin alınmadığı durumlarda nekroz oluşmaktadır (3,4).

İskemi-reperfüzyon hasarının oluşumunda birçok etken rol oynamakla beraber, son yıllarda “reaktif oksijen türevleri” (ROT) oldukça güncel bir araştırma konusu haline almıştır (1,3). ROT, biyolojik makromoleküllerde oksidatif hasara neden olabilir. Örneğin, hidroksil radikalının sülfidril gruplarını okside ederek enzimlerin inaktivasyonuna neden olduğu veya DNA hasarına yol açtığı gösterilmiştir. Bu radikal, aynı zamanda hücre zarındaki doymamış yağ asitleri ile de reaksiyona girerek lipid peroksidasyonuna neden olabilir. Genel olarak ROT, proteinlerde yapısal değişiklikler ve enzimatik aktivite kayıpları meydana getirebilir. Reaktif oksijen türevlerinin lipidler, proteinler ve DNA üzerindeki toksik etkileri, hücrelerde yapısal ve fonksiyonel bozukluklara neden olabilir. ROT, aminoasitlerin oksidasyonu yanında, peptid bağlarının hidrolizi, disülfid bağları oluşumu ve çapraz bağlanmalara yol açabilir. Bunun sonucunda çeşitli enzimler fonksiyon kaybına uğrayabilir. Bazı ekstrasellüler proteinlerde de (α -1-antitripsin, α -2-makroglobulin vb) aktivite kaybı olur. Bu ise antiproteolitik etkinin kaybı sonucu doku hasarına yol açabilir (5).

Bazı araştırmacılar, çeşitli serbest radikal süpürücülerini kullanarak, deri fleplerindeki, ROT kaynaklı zararlı etkileri azaltmayı başarmışlardır; bunlar arasında özellikle E ve C vitaminleri kullanılarak yapılan çalışmalar dikkat çekicidir (2,6,7). Bunların yanında, flep yaşayabilirliğinin hiperbarik oksijen (HBO) uygulamaları ile artırılması konusunda da çok sayıda çalışma yayınlanmıştır (7-11).

Deri fleplerinde surveyi artırmak amacıyla kullanılmış - sözü edilen - bu yöntemlerden HBO uygulamaları, yüksek plazma oksijen konsantrasyonları oluşturmak yoluyla etkili olan ve kendisine birçok endikasyon alanı bulmuş bir klinik tedavi metodudur (12,13). Suda çözünen vitaminlerden olan C vitamini (L-askorbat), ekstrasellüler sıvıların en önemli antioksidanı olarak kabul edilmekte ve antioksidan olarak da birçok hücresel aktivitesi bilinmektedir. Yağda çözünen bir antioksidan olan E vitamini (α -tokoferol) ise, dokuda organik peroksil radikalleri ile reaksiyona girerek radikal kaynaklı lipid peroksidasyonunu engelleyebilmektedir (7,14).

Daha önce gerçekleştirilen sıçan random-pattern flep modelindeki çalışmayı (15) tamamlar nitelikte tasarlanan bu çalışmada, antioksidan E ve C vitaminleri ile HBO uygulamalarının sıçan epigastrik ada flep modelindeki (2) yaşayabilirlik üzerine olan etkisi incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem

Deney süresince aynı laboratuvar koşullarda (standart oda sıcaklığı ve normal gün ışığı), rat yemi ve çeşme suyu ile beslenerek tutulan ve ağırlıkları 200-225 g arasında değişen toplam 40 adet Sprague-Dawley türü dişi sıçan 4 eşit gruba ayrıldı: Kontrol, HBO, Vitamin (E+C), HBO + Vitamin (E+C) (her grup için n=10).

Kas içi (im) olarak uygulanan ketamin hidroklorid (65 mg/kg) + ksilazin hidroklorid (0.65 mg/kg) anesteziinden sonra hayvanların karın bölgesi traşlanarak ciltleri povidon-iyodin solüsyonu ile temizlendi ve 6x3.5 cm boyutlarında - Zaccaria'nın tarif ettiği - epigastrik ada deri flebi kaldırıldı (2). Hem epigastrik arteri, hem de veni içeren ve intakt bırakılan inferior epigastrik pedikül, özel bir mikroklemp aracılığıyla, klempe edilerek flep tekrar yerine dikildi. Flep bölgesi 8 saat süreyle total iskemiye maruz bırakıldıktan sonra klempler açılarak dokunun reperfüzyonu sağlandı. Bu arada otokanalizasyonu önlemek için epigastrik sinirin hasar görmemesine dikkat edildi.

Operasyon sonrasında her bir hayvan ayrı bir kafese yerleştirilerek 7 gün boyunca takibe alındı. Postoperatif ilk 48 saat boyunca im butorphanol tartarate (0.01 mg/kg) ile analjezi sağlandı.

Tedavi olarak verilen antioksidan vitamin kombinasyonu ve HBO uygulaması bir önceki çalışmada anlatılan prosedürler ile aynı doğrultuda gerçekleştirildi (15). Buna göre HBO, 2.5 ATA basınç altında, günde 1 kez ve 1 saat süreyle, 7 gün boyunca uygulanırken, vitamin E+C kombinasyonuna (40+200 mg/kg) intraperitoneal yoldan olmak üzere operasyondan 3 gün önce başlanarak 3 günde bir devam edildi ve toplam 4 doza tamamlandı. HBO + Vitamin (E+C) grubunda ise bu iki prosedür birlikte uygulandı.

Postoperatif 7. günde, Sasaki'nin paper-template yöntemi kullanılarak, flep yaşayabilirlik oranları hesaplandı (16). Bunun için hayvanlar yeniden anestezi edilerek şeffaf asetat kağıdına renkli asetat kalem ile flep boyutları ve nekroz hattı kopye edildi. Elde edilen şekillerden önce tüm flebin alanı, sonra da yalnızca yaşayan deriyi gösteren alan hassas terazi ile tartılarak, bulunan değerler birbirine oranlandı ve % yaşayabilirlik olarak ifade edildi.

Gruplardaki hayvan sayısı 10 olduğundan, istatistiksel analizler için nonparametrik testler kullanıldı. Kruskal Wallis Varyans Analiz yöntemi ile tüm gruplar arasındaki anlamlılık araştırılmış; gruplar arası fark önemli bulunduğunda ise ikişerli karşılaştırmalar Mann-Whitney U Testi ile gerçekleştirilmiş ve "p<0.05" bulunduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular

Operasyondan 7 gün sonra yapılan yaşayabilirlik değerlendirmesinde kontrol hayvanlarındaki yaşayan flep alanının tüm flep alanına oranı %28.6±6.9 olarak bulundu. Bu oranın tek başına HBO uygulanan grupta %59.2±3.8'e, HBO ve antioksidan vitamin kombinasyonunun birlikte uyguladığı grupta %66.3±5.9'a, tek başına vitamin (E+C) verilen grupta ise 82.0±3.9'a yükseldiği görüldü. Her üç deney grubunun flep yaşayabilirlik oranında gösterdiği bu artış kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bulundu (p<0.01).

Bunun yanında hem HBO'ya vitamin ilave edilen grubun, hem de tek başına vitamin uygulanan grubun flep yaşayabilirliğini HBO grubuna göre anlamlı derecede arttırdığı görüldü (p<0.05). Ayrıca yalnızca vitamin verilen grupta elde edilen yaşayabilirlik oranı, HBO ile vitamin tedavisinin kombine edildiği gruba göre de anlamlı düzeyde yüksek bulundu (p<0.05).

Tablo 1. Deney gruplarının flep yaşayabilirlik oranları yönünden karşılaştırılması (ortalama ± standart sapma)

Gruplar	Hayvan sayısı (n)	Flep yaşayabilirlik oranı (%)
Kontrol	10	28.6±6.9
HBO	10	59.2±3.8*
Vitamin + HBO	10	66.3±5.9*.*.†
Vitamin	10	82.0±3.9*.*.‡

*Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı (p<0.01); ‡HBO grubuyla; †Vitamin grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).

Flep yaşayabilirlik oranları yönünden deney gruplarının gerek kontrol grubuyla, gerekse kendi aralarındaki karşılaştırmaları ayrıntılı olarak Tablo 1'de verilmiştir.

Tartışma

Bilindiği gibi O₂ ürünü serbest radikaller, deneysel deri ada fleplerinde iskemiye takip eden reperfüzyon hasarı oluşumunda önemli medyatörlerdir (1). Bu tip fleplerde, postoperatif HBO tedavisi ile flep survey oranlarının artırılabilirliği gösterilmiştir (10). HBO, herhangi bir nedenle iskemi oluşan dokulara uygulandığında, sağladığı yüksek orandaki doku oksijenizasyonuna bağlı olarak, doku ödemi azaltmakta ve iskemik dokulardaki normal hücrel osmolaritenin korunmasına yardımcı olmaktadır (16). HBO seansları arasında geçen sürelerde relatif bir hipoksi oluşmaktadır. Bu hipoksi kapiller filizlenme için çok gereklidir (11). Bu şekilde relatif hipoksi dönemleri içeren aralıklı HBO uygulamaları; doku tamiri ve iyileşmesi için gerekli olan anjiyogenezis, fibroblast proliferasyonu, kollajen formasyonu ve lökosit aktivasyonuna yol açmaktadır (17).

Deri fleplerinde iskemi-reperfüzyon süreciyle oluşan oksidan hasarın, vitamin E ve C gibi değişik antioksidanlarla azaltılabildiğini bildiren çalışmalar yapılmıştır (2,7). Bu çalışmaya da model teşkil eden, Zaccaria ve arkadaşlarının sıçan epigastrik ada fleplerinde gerçekleştirdikleri bir çalışmada, C vitamininin iskemi-reperfüzyon hasarını azalttığı görülmüştür (2). Reaktif oksijen türevlerinin, oksidatif endotel hasarına neden olarak vasküler per-

meabiliteyi arttırdığı ve çok miktarda plazmanın ekstrasvazasyonuna yol açtığı bilinmektedir (5,6). C vitamini ise ekstrasellüler sıvıda etkindir ve kapiller permeabiliteyi azaltarak doku ödemi ortadan kaldırmaktadır (2,14).

Yağda çözünen vitaminlerden olan E vitamini ise, lipidleri peroksidatif hasara karşı koruyan önemli bir antioksidandır (14). Sıçanlarda yapılan çalışmalarda, iskemik şartlarda E vitamininin azaldığı, iskemi öncesinde vitamin E desteği sağlandığında ise reperfüzyon fazında oluşan lipid peroksidasyonunun engellenerek doku hasarının azaltılabildiği tespit edilmiştir (18). Aynı anda hem sıvı, hem de lipid fazda etkinlik sağlamak için E ve C vitaminlerin kombine edilerek uygulandığı çeşitli çalışmalarda sinerjist bir etkiye rastlanmıştır (19,20).

Bu çalışmada da, ilk bakışta birbirinden çok farklı gibi görünen HBO ve antioksidan vitaminler E+C kombinasyonunun birlikte ve ayrı ayrı uygulanmalarıyla, iskemiye maruz bırakılan sıçan epigastrik ada flep modelinde, flep surveyi üzerine olan etkileri gözlenmiştir. Sonuçta elde edilen bulgular, daha önce aynı prosedürlerin uygulandığı - fark olarak ilave bir iskeminin oluşturulmadığı - farklı bir flep modelinde (random-pattern flep; 15) görülen sonuçlara benzemekle beraber önemli farklılıklar da sergiledi. En başta göze çarpan bulgu, random-pattern modeldeki sonuç ile de örtüşecek şekilde, tek başına vitamin E+C kombinasyonunun flep yaşayabilirliğini büyük oranda arttırdığı olmuştur. Yalnızca HBO uygulamasına maruz bırakılan grupta ise, kötüleştirici yönde etki görülen random-pattern flep çalışmasının aksine, - vitamin grubundaki ölçülerde olmasa da - anlamlı düzeylerde bir iyileşme gözlendi; ki literatür bilgisince beklenen sonuç da zaten bu doğrultuda idi. Ne var ki bu çalışmada da, HBO ile vitaminler kombine edildiğinde aditif bir etki görülmemiş, elde edilen survey oranı her iki prosedürün tek başlarına uygulanmasıyla alınan sonuçların arasında yer almıştır.

Literatürde HBO'nun serbest oksijen radikali üretimini arttırmak yoluyla zararlı etkilere de yol açabileceğini bildiren çalışmalar da yer almaktadır (21,22). Bölümümüzce daha önce gerçekleştirilen bir çalışmada, sıçan eritrositlerinde HBO uygulamaları ile oluşturulan lipid peroksidasyon ürün-

lerindeki artışın vitamin E+C kombinasyonu ile önlenildiği gösterilmiştir (23).

Bu bilgiler ışığında denebilir ki, tek başına uygulanan HBO sıçan epigastrik ada flebinde surveyi olumlu yönde etkilemekle beraber, daha olumlu etkinliği ortada olan E ve C vitaminleri ile birlikte kullanıldığında, artırdığı serbest oksijen radikali üretimi nedeniyle bu vitaminlerin serbest radikal süpürücü etkisini relatif olarak azaltmaktadır. Bununla beraber çeşitli flep çalışmalarında HBO'nun yararlı etkilerini bildiren çok sayıda araştırma (7-11) göz önünde bulundurulduğunda, genel anlamda HBO aleyhine bir sonuç çıkarmak mümkün değildir. Bu yönde daha sağlıklı bir kaniya varabilmek için farklı basınç ve sürelerle HBO'nun uygulandığı ilave araştırmaların şekillendirilmesi bir zorunluluk olarak görülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Manson PN, Anthenelli RM, Im MJ, Bulkley GB, Hoopes JE. The role of oxygen free radicals in ischemic tissue injury in island skin flaps. *Ann Surg* 1983; 198(1):87-90.
2. Zaccaria A, Weinzweig N, Yoshitake M, Matsuda T, Cohen M. Vitamin C reduces ischemia-reperfusion injury in a rat epigastric island skin flap model. *Ann Plast Surg* 1994; 33(6):620-3.
3. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312:159-63.
4. Marzella L, Jesudass RR, Manson PN, Myers RAM. Functional and structural evaluation of the vasculature of skin flaps after ischaemia and reperfusion. *Plast Reconstr Surg* 1988; 81:742-50.
5. Farber JL, Kyle ME, Coleman JB. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest* 1990; 62(6):670-9.
6. Knight KR, Angel MF, Lepore DA, Abbey PA, Arnold LI, Gray KA, Mellow CG, O'Brien BMCC. Secondary ischaemia in rabbit skin flaps: The roles played by thromboxane and free radicals. *Clin Sci* 1991; 80:235-40.
7. Stewart RJ, Moore T, Bennett B, Easton M, Newton GW. Effects of free radical scavengers and hyperbaric oxygen on random-pattern skin flaps. *Arch Surg* 1994; 129:982-8.
8. Kaelin CM, Im MJ, Myers RAM, Manson PN, Hoopes JE. The effects of hyperbaric oxygen on free flaps in rats. *Arch Surg* 1990; 125:607-9.
9. Jurell G, Kaijser L. The influence of varying pressure and duration of treatment with hyperbaric oxygen on survival of skin flaps. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1973; 7:25-8.
10. Tan CM, Im MJ, Myers RAM, Hoopes JE. Effects of hyperbaric oxygen and hyperbaric air on the survival of island skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 1984; 73:27-8.
11. Kindwall EP, Gottlieb LJ, Larson DL. Hyperbaric oxygen therapy in plastic surgery: A review article. *Plast Reconstr Surg* 1991; 88(5):898-908.

12. Myers RA. Hyperbaric oxygen therapy, a committee report. Bethesda, Md: Undersea Medical Society 1986.
13. Grim PS, Gottlieb LJ, Boddie A, Batson E. Hyperbaric oxygen therapy. JAMA 1990; 263(16):2216-20.
14. Sies H, Stahl W, Sundquist AR. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, Beta Carotene, and other carotenoids. Ann NY Acad Sci 1992; 669:7-20.
15. Öter Ş, Korkmaz A. Hiperbarik oksijen ve antioksidan vitamin kombinasyonunun deneysel random-patern deri fleplerindeki canlı doku alanına etkisi. T Klin Tıp Bilimleri 1998; 18(5):299-303.
16. Nylander G, Lewis D, Nordstrom H, Larsson J. Reduction of postischemic edema with hyperbaric oxygen. Plast Reconstr Surg 1985; 76:596-601.
17. Knighton DR, Silver IA, Hunt TK. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. Surgery 1981; 90:262-8.
18. Masayuki M, Hiroshi T, Makoto M, Yorihiro Y, Etsuo N. Free radical chain oxidation of rat red blood cells by molecular oxygen and its inhibition by alfa-tocopheral. Arch Biochem Biophysics 1987; 258:373-80.
19. Klein HH, Pich S, Lindert S, Nebendahl K, Niedmann P, Kreuzer H. Combined treatment with vitamins E and C in experimental myocardial infarction in pigs. Am Heart J 1989; 118:667-73.
20. Etlik Ö, Tomur A, Kutman MN, Yörükan S, Duman O. The effects of sulfur dioxide inhalation and antioksidan vitamins on red blood cell lipoperoxidation. Environ Res 1995; 71:25-8.
21. Monstrey ST, Mullick P, Narayanan K, Ramasastry SS. Hyperbaric oxygen therapy and free radical production: An experimental study in doxorubicin (adriamycin) extravasation injuries. Ann Plast Surg 1997; 38:163-8.
22. Nylander G, Otamiri T, Lewis DH, Larsson J. Lipid peroxidation products in postischemic skeletal muscle and after treatment with hyperbaric oxygen. Scand J Plast Reconstr Surg 1989; 23:97-103.
23. Etlik Ö, Tomur A, Dünder K, Erdem A, Gündoğan NÜ. The effect of antioxidant vitamins E and C on lipoperoxidation of erythrocyte membranes during hyperbaric oxygenation. J Basic Clin Physiol Pharmacol 1997; 8(4):269-77.