

İskelet Kası İskemi Reperfüzyon Hasarının Azaltılmasında Sodyum Askorbat

Kadir SAĞDIÇ*, Serdar ENER*, Esmâ GÜR**, Mert YILMAZ*, Şahsine TOLUNAY***, Ziya ÖZER*, Mete CENGİZ*

Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı Bursa
Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı
Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Askorbik asit (C vitamini) suda çözünen yapısıyla doğrudan doğruya süperoksitlerin sitoplazmada oluşmasını önlerken, dolaylı yolla E vitamininin hücre membranındaki düzeyini korur ve Karnitin sentez basamaklarını katalize ederek antioksidan etki gösterir. Sodyum askorbatın antioksidan etkisi kobayın (Guinea pig) tek ekstremitte iskemik reperfüzyon (I/R) modelinde araştırıldı. Denekler (Kobay) dört gruba ayrıldı, oda havasında 20°C'de Ketamin HCL 30 mg/kg ve Xylozin HCL 2 mg/kg İM uygulanarak anestezi sağlandı. Grup I (G1) (n= 6) sadece anestezi madde aldı. Grup II (G2) (n= 8) anestezi sonrası sağ arka ekstremitte kalça eklemi hizasından turnike uygulandı ve dört saat sonra turnike açılmadan soleus kası, karaciğer (KC) ve akciğer (AC) dokusu çıkartıldı. Grup III (G3) (n= 8) ve IV'de (G4) (n= 8) dört saatlik iskemik sonrası turnike açılarak iki saatlik reperfüzyon uygulandı. Turnike açılmadan hemen önce G3'e 0.4 ml serum fizyolojik, G4'e ise 75 mg/kg (0.4 ml) Sodyum Askorbat IV verildi. Tüm deneklerde çalışma süreci sonunda soleus kası, KC ve AC dokuları çıkartıldı. Doku örnekleri -80°C'de saklandı. Lipit peroksidasyon göstergesi olarak tiobarbiturat asid yöntemi ile doku Malondialdehyde (MA) düzeyleri ölçüldü. Her denekten alınan kas örneklerinin dört farklı düzlemdeki kesiti Nitroblue Tetrazolium ile boyanarak elde edilen ikiye mikrofotograf (X40) incelenerek canlı hücre oranı (CH %) belirlendi. Sonuçlar "Mann Whitney U" (MWU) ve "Kruskal-Wallis ANOVA by rank" (A) nonparametrik istatistiksel yöntemleri kullanılarak değerlendirildi.

G2 ve G3 soleus CH %, G1 e oranla anlamlı düzeyde düşük bulunurken G4 te fark anlamlı değildi. Yalnız anestezi uygulanan kontrol grubunda (G1) soleus, KC ve AC doku MA düzeyleri diğer tüm gruplardan (G2, 3, 4) daha yüksekti. Kontrol grubu hariç tutularak G2, G3 ve G4 karşılaştırıldığında Soleus MA ve KC MA düzeyleri anlamlı olarak farklı bulundu.

Uygulanan deneysel modelde, Sodyum askorbat kullanılmasıyla anlamlı düzeyde daha az hücre nekrozu olduğu histopatolojik olarak gösterilmiştir. Serbest oksijen radikalleri aracılıklı lipit membran hasarı göstergesi olan doku MA düzeylerinin gruplar arasında farklı bulunmakla birlikte kontrol grubunda belirgin olarak yüksek bulunmuştur. Bu bulgular I/R sonucu bazı serbest radikal tutucu endojen mekanizmaların harekete geçmesi olabileceği gibi tiobarbituric asit yöntemi ile de ilgili olabilir.

Bu çalışmada elde edilen veriler, klinik uygulamada akut arter tıkanmasına yönelik revaskülarizasyon girişimlerinde, lokal ve sistemik hasarın azaltılmasına yönelik olarak yüksek doz Sodyum askorbat kullanımının yararlı bir ek girişim olabileceğini desteklemektedir.

SUMMARY

Na Ascorbate in Reduction of Skeletal Muscle Ischemia-Reperfusion Injury

Ascorbate has been demonstrated to be an effective antioxidant. It can act both directly, by reaction with aqueous peroxyl radicals and indirectly, by restoring the antioxidant properties of fat soluble vitamin E and involving in the hydroxylation steps of carnitine biosynthesis. In a prospective study, the Guinea pig single hind limb ischemia-reperfusion (I/R) model was used for investigation of antioxidant effect of the Na ascorbate. Thirty Guinea pigs were anaesthetised with 30 mg/kg Ketamin HCL and 2 mg/kg xylazine HCL intramuscularly (IM) in room air and 20°C. Group 1 (G1) (n= 6) underwent 6h of general anaesthesia alone. Unilateral hind limb ischemia was induced with tourniquet for 4h in Group 2 (G2) (n= 8). Group 3 (G3) (n= 8) and Group 4 (G4) (n= 8) were subjected to 4h unilateral hind limb ischemia. 0.4 ml 0.09 NaCl and 75 mg/kg (0.4 ml) Na ascorbate were given IV just before 2h reperfusion in G3 and G4, respectively. Solues muscle, liver and lung of the animals were harvested and stored at -80 °C at the end of the study. Tissue Malondialdehyde level (MA) was measured by thiobarbituric acid assay as a marker of lipid peroxidation. The four different coronal section of each soleus muscle was stained with Nitroblue tetrazolium and two microphotographes (X40) were taken and examined to determine the viable cell ratio (% VC). The results were analysed using nonparametric statistical methods that were "Mann Whitney U" (MWU) and "Kruskal-Wallis ANOVA by ranks" (A).

Soleus % VC were significantly low in G2 and G3 compared to G1, but the difference was not significant statistically between G1 and G4. In G1 was anaesthetised alone, soleus muscle, lung and liver tissue MA levels were higher than all the other groups. When the G1 was excluded, multivariety analysis revealed significant between G2, G3 and G4 soleus and liver MA levels.

In this experimental I/R model, we could have been shown histopathologic less cell necrosis at significant level when Na Ascorbate was used. Tissue MA levels, that is indicator of oxygen free radical mediated lipid membran damage, were found statistically different between the groups and may be more interesting that the levels were higher in G1. These findings bring some questions on the method (thiobarbituric acid) used as well as on the endogenous free radical scavenging mechanisms probably triggered by I/R.

The results of this study reveals that high dose Na Ascorbate use can be beneficial as an additional measure together with revascularisation in order to decrease the local and systemic damage due to acute arterial occlusion. The assesment of the periodic control of tissue MA levels together with endogenous free radical scavenger levels in large experimental study groups using longer I/R period, will give beneficial information.

GİRİŞ

İskelet kası iskemisi, akut arter tıkanması sonucunda sık olarak karşımıza çıkan klinik bir problemdir. Akut iske mi ile karşılaş ılan ekstremiteye kan akımı tekrar sağlandığı (reperfüzyon) zaman, iskemik peryoddan daha fazla iskelet kası nekrozu meydana gelebilir. Bu etkilenen ekstremitede ödem, metabolik asidoz ve makroskopik myoglobini ile kendini gösterir. Reperfüzyon ürünlerinin sistemik etkisi ile bazı vakalarda akut renal yetmezlik, akut solunum yetmezliği, kalpte fonksiyon bozukluğu ve ölüm meydana gelebilir. Klinikte bu durum myonefropatik metabolik sendrom olarak bilinir. Bu olaylar sonucu % 15-52'yi bulan mortalite ve % 30'u bulabilen mayor amputasyon söz konusu olabilir (1).

Reperfüzyon hasarının önlenmesi veya azaltılması konusunda, birçok ilaçlar ve metodlar önerilmiştir. Ballmer ve ark. (2) açık kalp cerrahisi sırasında alınan kan örneklerinde C vitamini düzeyindeki belirgin azalmanın reaktif oksijen spesifik hasarı arttırdı-

đını göstermeleri, Sciammonna ve Lee'nin (3) farelerin iske miye maruz kalmış beyin dokularında mitokondri hasarının reperfüzyon sonrasında C vitamini ile azaldığını ortaya koymalarıyla C vitamininin antioksidan etkisi klinik ve deneysel olarak kanıtlanmıştır. Bu çalışmada, iskelet kasının reperfüzyon hasarından korunmasında C vitamininin rolü olup olmadığı araştırılmıştır.

YÖNTEM VE GEREÇLER

Çalışma Uludağ Üniversitesi (U.Ü), Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı alınarak U.Ü. Dene y Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda 1.12.1994-8.12.1995 tarihleri arasında gerçekleştirildi.

Hardy ve ark. nın (4) tarif ettiği akut iske mi reperfüzyon modeline uygun olarak, Guinea pig (kobay) akut iske mi reperfüzyon hasarı modeli oluşturuldu. Dişi, 500-700 gr ağırlığındaki 30 kobay dört gruba ayrıldı. Oda havasında, 20°C Ketamin HCl (Ketarlar® 30 mg/kg ve Xylozin Hydrochlorur Rompun® 2 mg/kg sol ön ayak adalesine



Şekil 1 a ve b. (A) % 90 oranında boyanan soleus kas preparatı (B) % 20 oranında boyanan soleus kas preparatı

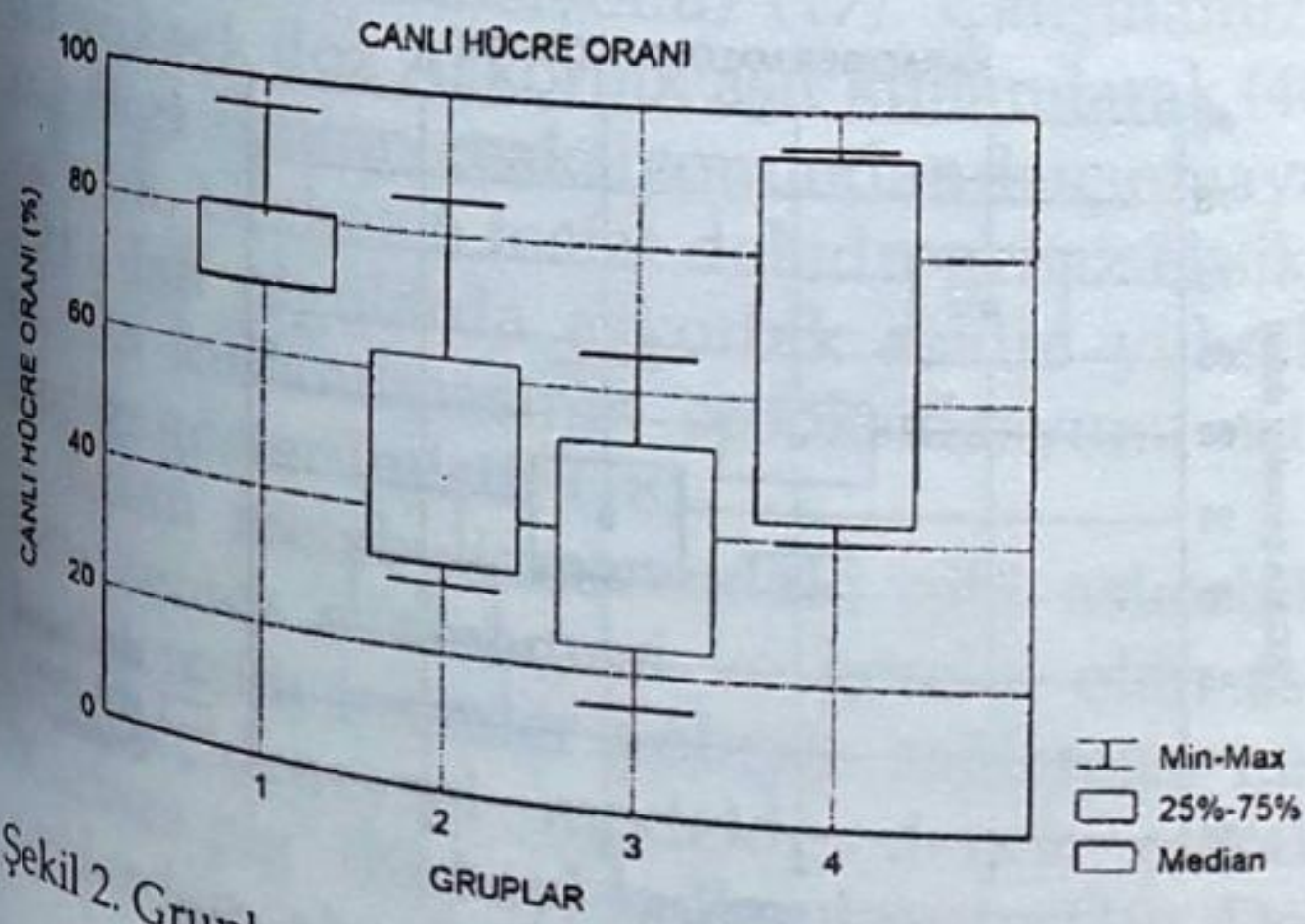
Tablo 1.

Soleus MA* (±) (A)	46.77±6.36	45.96±16.33	34.45±9.97	26.10±3.02
KC MA* (S) (A)	68.23±8.16	59.38±6.98	53.78±9.71	47.79±7.07
AC MA* (NS) (A)	80.88±9.64	43.49±19.32	56.72±12.47	53.57±14.97
Soleus CH %	80.5±9	49.4±19 (≠ MWU)	40.9±18 (S, MWU)	66.5±25 (NS, MWU)

* ortalama, ± SD, S: p < 0.05, ≠: p < 0.05, NS: Anlamlı değil

intramuskuler yolla uygulanarak anestezi sağlandı. Grup I'de (G1) (n= 6) sadece anestezi uygulandı ve 6 saat bekleme sonrasında soleus kası, KC ve AC dokusu çıkarıldı. Grup II'de (G2) (n= 8) anestezi verilmesini takiben sağ arka ekstremitte kalça eklemi hizasından turnike uygulandı ve dört saat bekletildi. Turnike açılmadan soleus kası, KC ve AC dokusu çıkartıldı. Grup III (G3) (n= 8) ve IV'de (G4) (n= 8) dört saatlik iske mi sonunda turnike açılarak iki saat süreyle reperfüzyon sağlandı. G3 deneklere turnike açılmadan hemen önce 0.4 ml serum fizyolojik, G4 deneklere ise 75 mg/kg/(yaklaşık volüm 0.4 ml) Sodyum askorbat (Redoxon®) sağ juguler ven yoluyla verildi. Reperfüzyon sonrasında tüm deneklerin soleus kası, KC ve AC dokuları çıkarıldı.

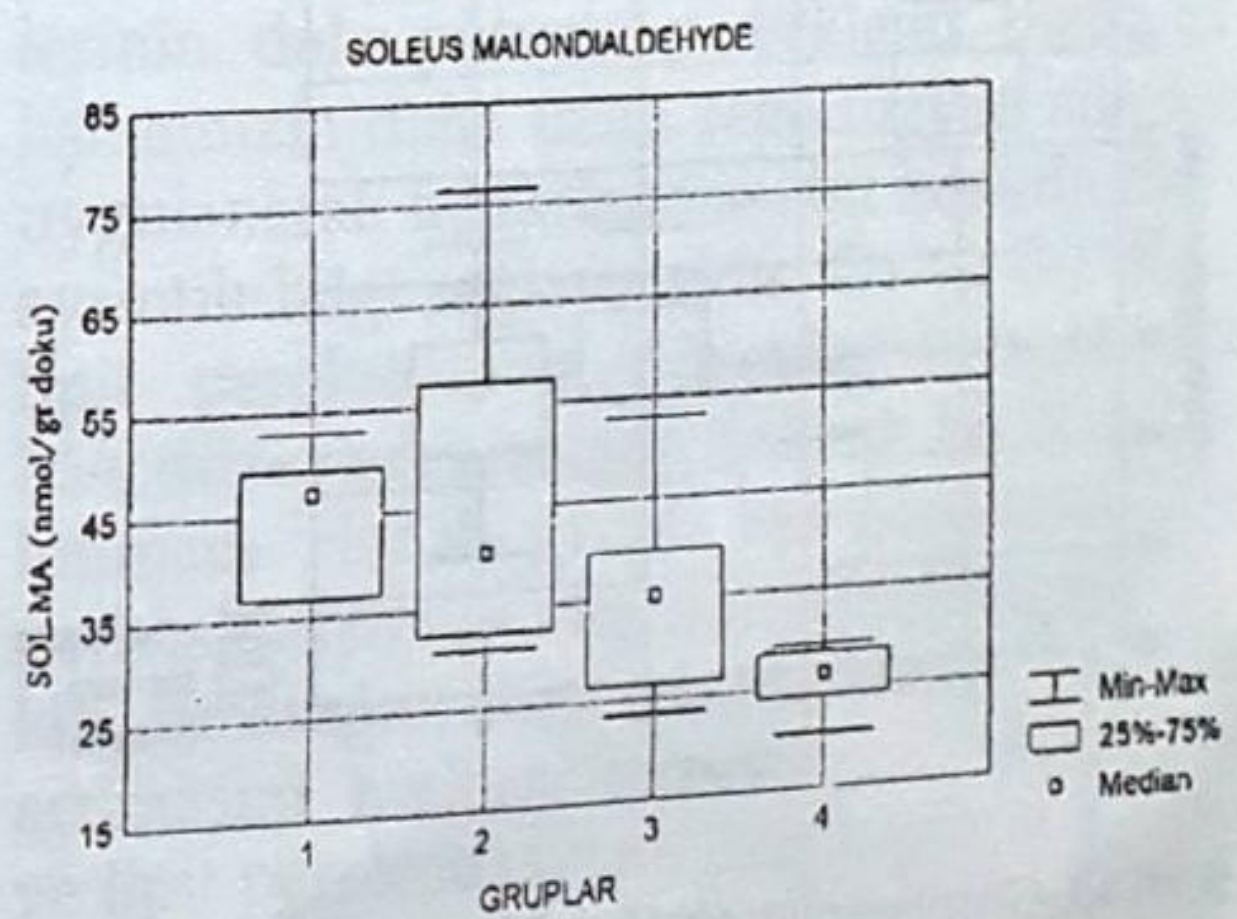
Biyokimyasal inceleme: Tüm deneklerin soleus kaslarında, KC ve AC dokularında lipid peroksidasyonu göstermek amacıyla Ohkawa ve ark. nın (5) tarif ettiği yöntem ile doku "Malondialdehide" (MA) düzeyi 532 nm de spektrofotometrik yöntemle ölçüldü (UV 1202 Shimadzu).



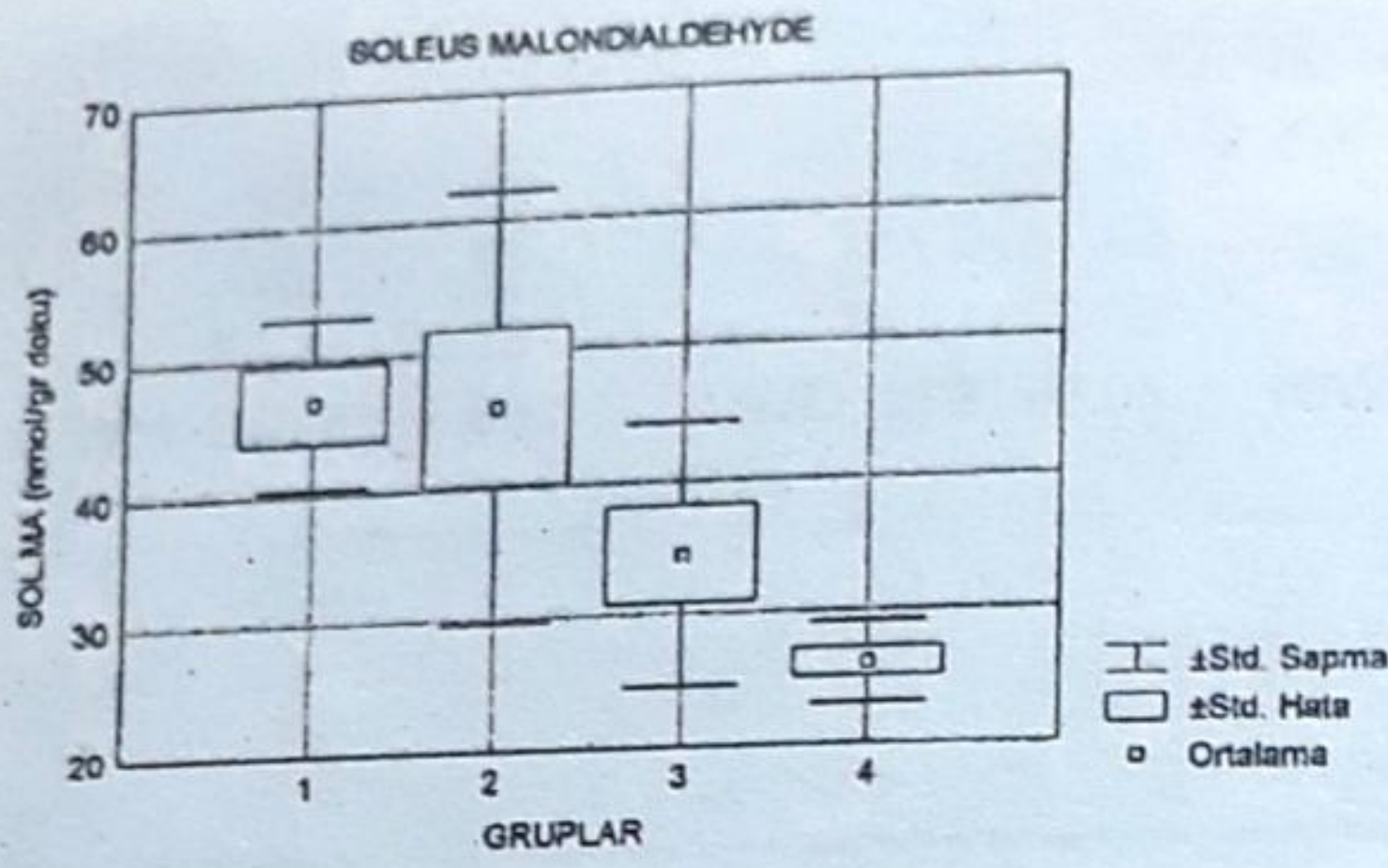
Şekil 2. Gruplararası canlı hücre oranları

Histopatolojik inceleme: Alınan soleus kaslarında canlı (CH %) hücre oranı Nitroblue Tetrazolium kullanılarak histokimyasal boyama yöntemiyle araştırıldı. Alınan kas örneklerinden cryocut (Reichert-jung cryocut 1800) kullanılarak dört farklı bölgeden koronal kesit elde edildi. Tris-HCL tampon çözeltisinde PH 7.4 olmak üzere, 50 mg/100 ml Nitroblue Tetrazolium (NBT) ile 37 C derecede 30 dakika bekletilerek ve Na süksinat ile 1/10 oranında karıştırılarak kesitler boyandı. Mikroskopik incelemede canlı hücreler koyu mavi renge boyanırken, nekroze hücreler soluk sarı renkte boya almamış olarak gözlemlendi. Her kas dokusunun dört farklı yerinden alınan doku kesitlerinden, X40 mikroskopik büyütmede alınan mikrofotografılarla (Şekil 1A ve 1B) canlı hücre yüzdesi palanimetrik yöntem ile saptandı. Canlı hücrelerin tüm alana oranı % olarak hesaplandı.

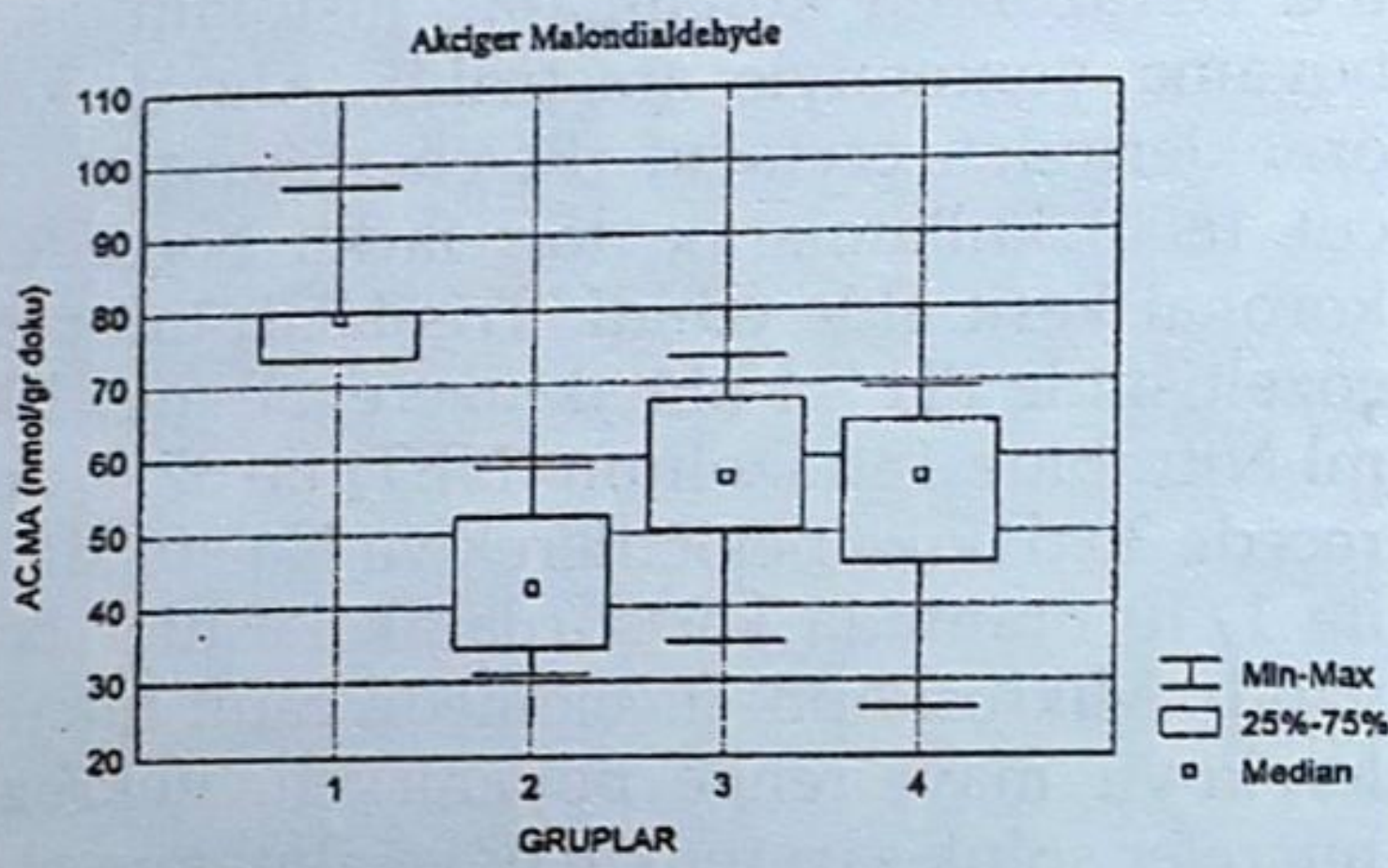
İstatistiksel yöntem: Tüm sayısal veriler ortalama ± standart sapma olarak gösterildi. Gruplar arasında Malondialdehide değerlendirilmesinde "Kruskal-Wallis ANOVA by ranks" (A); G2-G3 ve G4 gruplarının canlı hücre oranlarının G1 ile karşılaştırılması "Mann Whitney U" (MWU) nonparametrik



Şekil 3. Gruplararası soleus MA oranları



Şekil 3B. Gruplararası soleus MA oranları

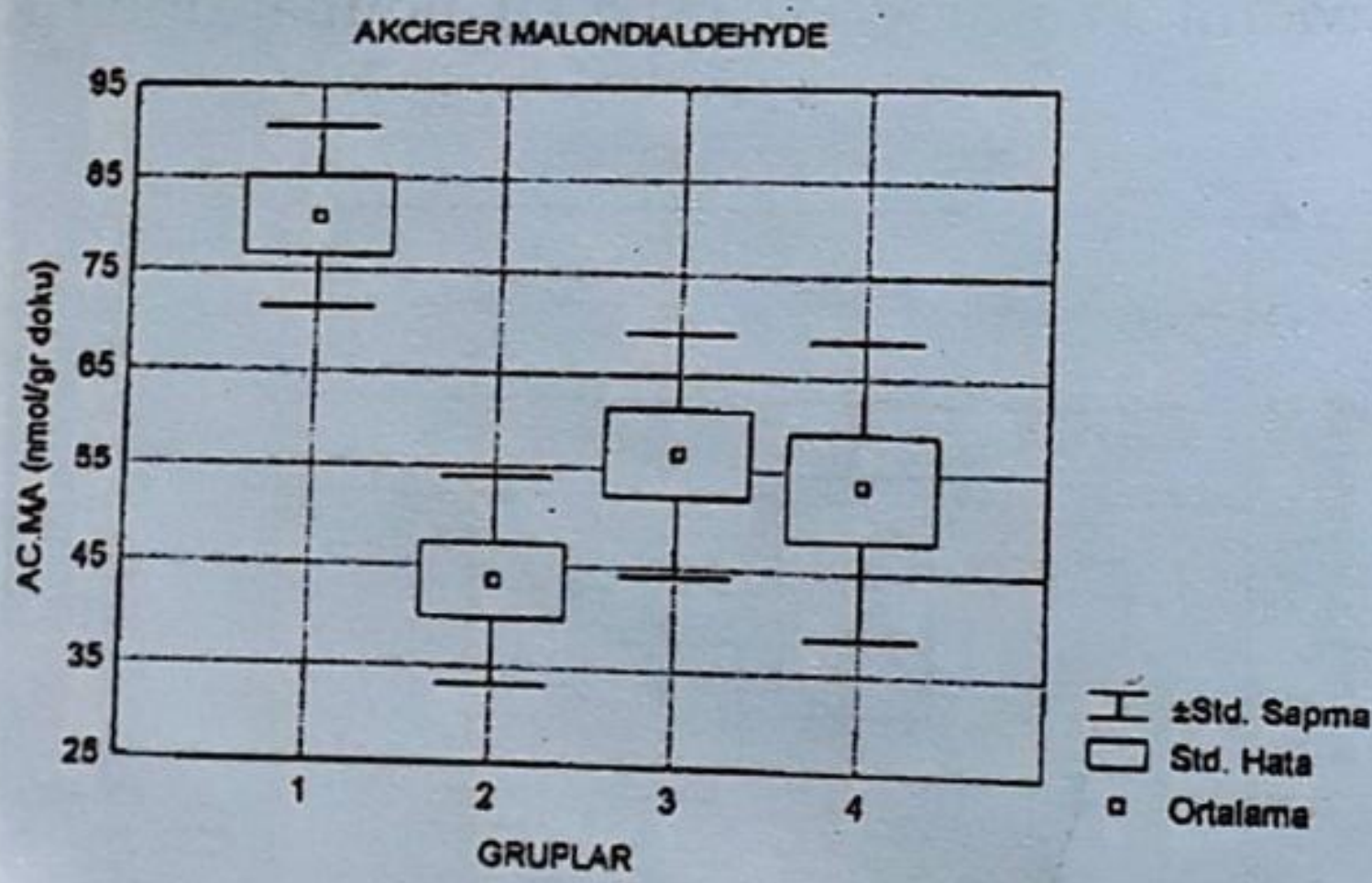


Şekil 4A. Gruplararası akciğer MA oranları

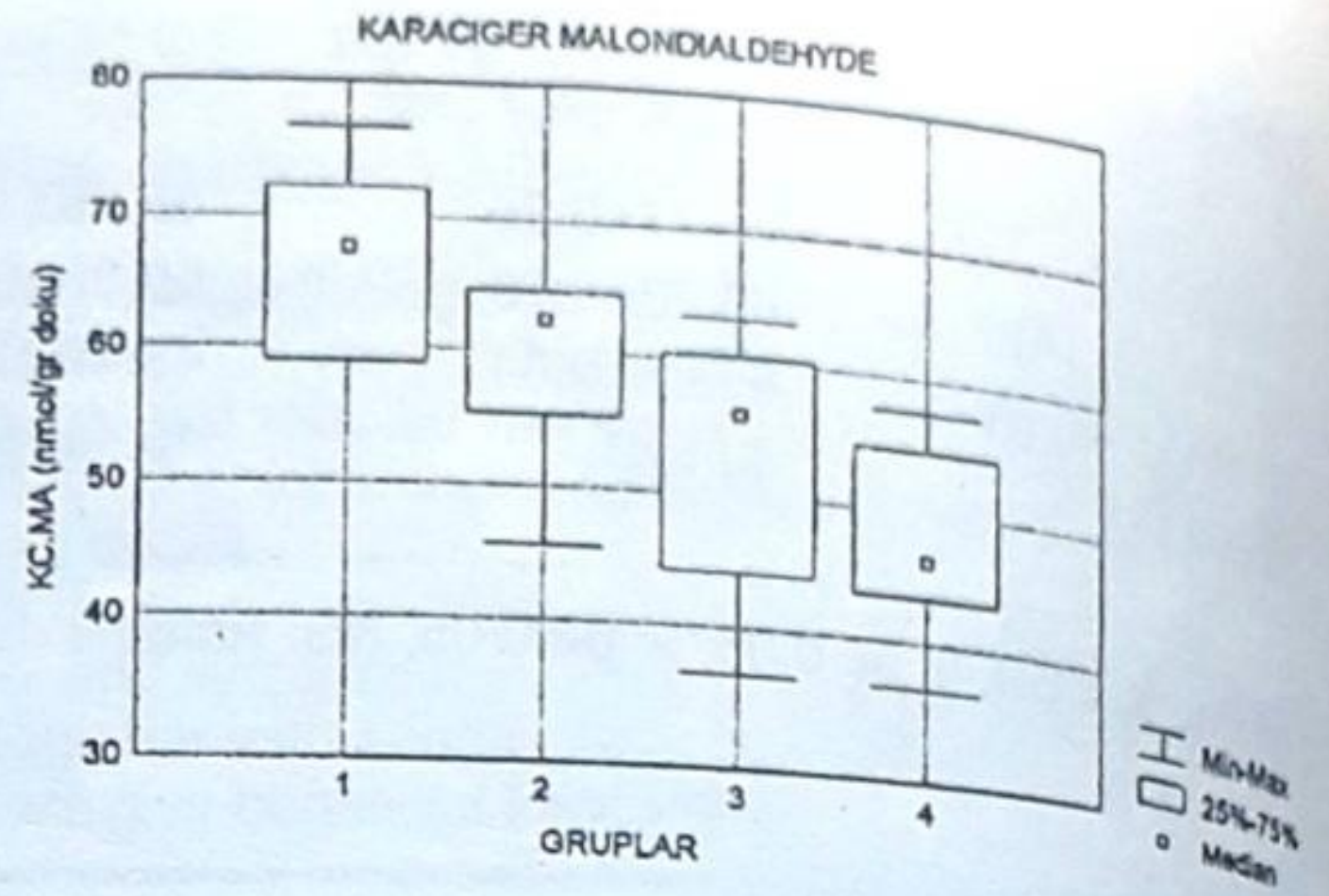
istatistiksel yöntemleri kullanıldı. $P < 0.05$ istatistiksel anlamlı olarak değerlendirildi.

SONUÇLAR

Tüm denekler çalışmayı tamamladı. Deney sırasında mortalite olmadı. Soleus kas dokusunun canlı hücre oranları Tablo 1 ve Şekil 2 de görülmektedir. Altı saat süreyle sadece anestezi uygulanan kontrol grubu



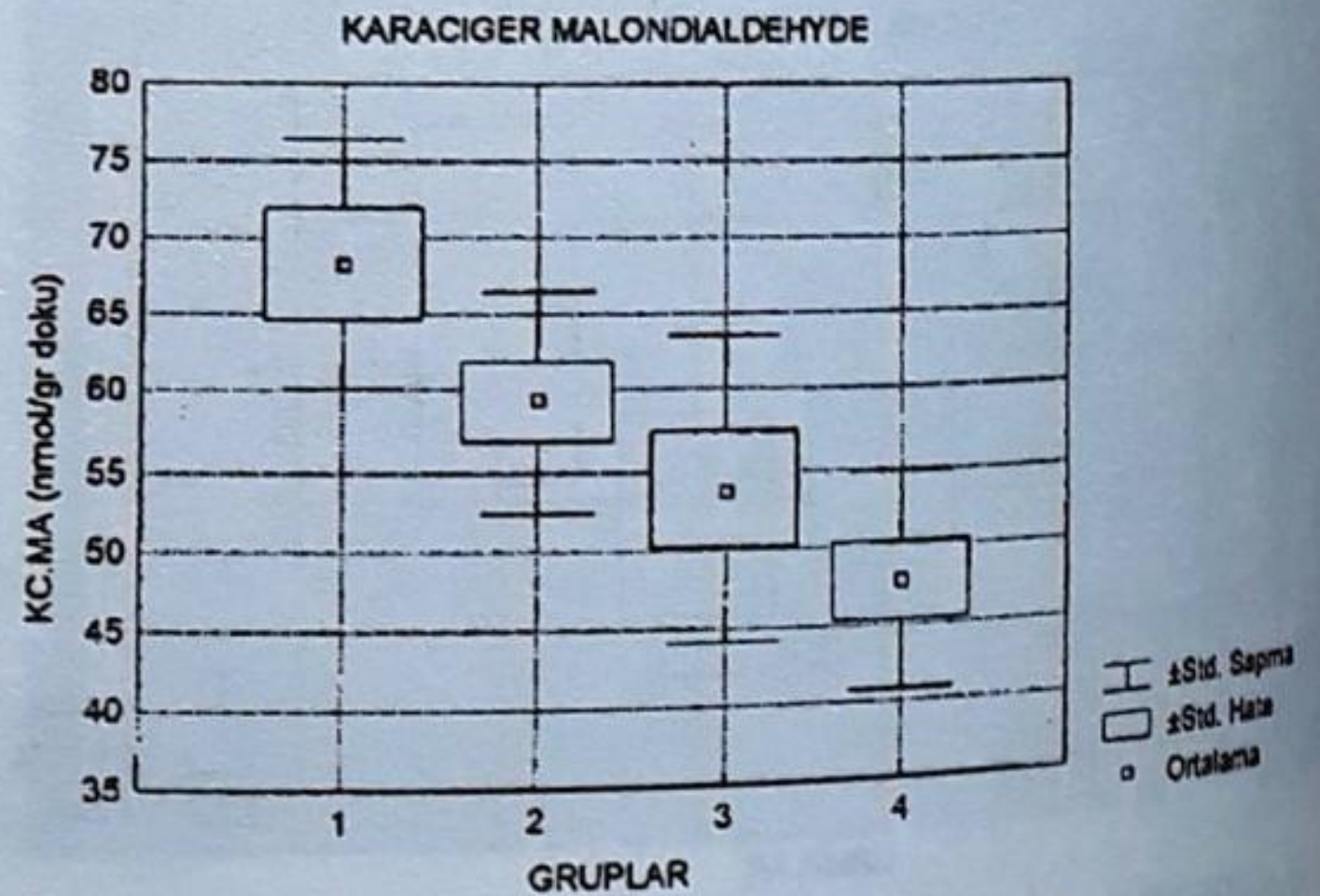
Şekil 4B. Gruplararası akciğer MA oranları



Şekil 5A. Gruplararası karaciğer MA oranları

deneklerin (G1) kas örneklerinde canlı hücre oranı $\% 80.5 \pm 9$ olduğu saptandı. Kontrol grubu ile dört saatlik iskemiye bırakılan deneklerin (G2) iskemiye maruz bırakılan soleus kasının canlı hücre oranları karşılaştırıldığında [ortalama $\% 80.5 \pm 9$ ve $\% 49.4 \pm 19$] istatistiksel anlamlı ($P < 0.05$) fark belirlendi. G3'de canlı hücre oranı (ortalama $\% 40.9 \pm 18$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($p < 0.005$) azalmıştı. Buna karşın Sodyum askorbat verilen G4'de hücre canlılığı oranı ortalama $\% 66.5 \pm 25$ bulundu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark yoktu.

Yalnız anestezi uygulanan kontrol grubunda (G1) soleus kası, KC ve AC doku MA düzeyleri diğer tüm gruplardan daha yüksekti (Tablo 1). Soleus kası MA düzeyleri G1 ile karşılaştırıldığında, G2'de anlamsız bulunurken, G3 ve G4 anlamlı bulunmuştur (Şekil 3). Kontrol grubu hariç tutularak G2, G3 ve G4 karşılaştırıldığında soleus MA ve KC MA düzeyleri gruplar arasında anlamlı dü-



Şekil 5B. Gruplararası karaciğer MA oranları

zeyde farklı bulunurken, AC MA farkı istatistiksel olarak önemli değildi (Şekil 4 ve 5).

TARTIŞMA

İskemiye takiben kan akımının yeniden sağlanması oksijen kaynaklı serbest radikal-lerin oluşmasına ve takiben reperfüzyon hasarı ile yüksek mortalite ve morbiditeye neden olur (1). İskemi sırasında, hücre biyomembran bütünlüğünü koruyamamakta, Ca ve fosfolipit A2 salınımına neden olmaktadır. Artan biyomembran hasarı, poliansatüre yağ asitlerin açığa çıkmasını ve yağ asit radikallerinin oluşmasını sağlamaktadır. İskeminin bu aşamasında oksijenin yeniden ortama girmesiyle yağ asit radikalleri oksijen ile birleşerek lipid peroksidasyon reaksiyon oluşturmaktadır (6). Bu etki böbrek (7), kalp (2) beyin (3) iskelet kası (8) ve barsaklarda (9) gösterilmiştir. Oluşturulan deneylerde vitamin E (6), lipid peroksidaz inhibitörleri (10), mannitol (11), catalaz ve süperoksit dismutaz (12), tromboksan A2 inhibitörleri (13) ve düşük basınçlı reperfüzyon (14) gibi çeşitli ajanlarla ve yöntemlerle reperfüzyonun neden olduğu hücre hasarı en az seviyeye indirilmeye çalışılmıştır.

Askorbit asit doğal bir antioksidan olup, suda eriyen yapısıyla doğrudan doğruya sitoplazmada süperoksit oluşumunu inhibe ederek, ve ayrıca dolaylı yolla alfa tokofenoksil radikallerini alfa tokoferol'e (Vitamin E) dönüşümünü (15) ve Carnitin sentez basamaklarını katalize ederek antioksidan etkisini gösterir (16). Plazmada 3 mmol/kg'dan daha düşük konsantrasyonda bulunan askorbik asit, + 3 değerlikli Fe iyonunu + 2 değerliğe indirir ve hidroksil radikallerinin oluşmasını sağlayarak pro-oksidan etki gösterir (Fenton reaksiyonu) (17). Çalışmamızda yüksek doz Askorbik asit kullanılarak (40 mg/kg) Fenton reaksiyonundan kaçınmaya çalıştık. Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz eksikliği olan olgularda askorbik asidin yüksek dozda kullanılmasının otooksidasyonu artırdığı gösterilmiştir (18).

İnsan metabolizmasındaki gibi askorbik asiti sentez edememesi ve gerekli olan askorbik asidi besinler yoluyla sağlaması nedeniyle deneysel modelde denek olarak "Guinea pig" (Kobay) kullanılmıştır (19). Deneklerden alınan soleus kas örneklerinde

CH % oranı G1'de % 80-5±9 saptanmıştır. Hücrelerin yaklaşık % 20 sinin boyanmaması soleus kas G1 örneklerinin alınması ve/veya -80 C dondurularak alınan frozen kesitlerinin boyanması sırasında bir kısım hücrelerin canlılığını yitirmesiyle ilgili olabilir. NBT boyama yöntemi 12-16 saat reperfüzyon sürecinden sonra yani sitoplazmik enzim aktivitesinin tamamen yokolmasından sonra en üst düzeyde doğruluk göstermektedir. Daha erken dönemde alınan kas örneklerinde hatalı pozitif oranının artması beklenmektedir (20). Tüm grupların aynı yöntemle ve aynı süre sonunda boyandığı düşünüldüğünde, G1 kontrol grubuna göre tüm grupların kıyaslamaları önem taşımaktadır. G2'de CH % oranı 49.4±19 doku olarak bulunması, bu oranın G1'e göre kıyaslandığında $p < 0.05$ (MWU) derecede anlamlı olduğu, bu da iskemi sonucu doku canlılığını gösteren sitokrom enzim aktivitesinin azaldığını göstermektedir. İstatistiksel olarak da G1 ile G4 arasında anlamlı bir fark yok iken G1 ile G3 arasındaki $p < 0.002$ (MWU) oranında fark saptanması nedeniyle yüksek doz Sodyum askorbat ile doku canlılığının korunduğu düşünülebilir.

Yalnız anestezi alan kontrol grubunda şaşırtıcı olarak soleus, KC ve AC doku MA düzeyleri diğer tüm gruplardan yüksek düzeyde bulunmuştur. Doku MA düzeylerinin ölçüldüğü başka çalışmalar incelendiğinde kontrol gruplarında elde edilen sonuçların bizim elde ettiğimiz sonuçlara uygun olduğu görülmektedir. İ/R sonrası MA düzeylerinin kontrol grubuna oranla daha düşük bulunması İ/R ile tetiklenen bazı radikal tutucu endojen mekanizmaların harekete geçtiğini düşündürmektedir. Bu mekanizmaların tükenmesiyle süre içerisinde MA düzeylerinin daha yükselmesi beklenir. Bizim çalışmamızın daha uzun reperfüzyon süreleri uygulanarak tekrarlanması bu konuda daha ayrıntılı bilgi sağlayacaktır. G1 ve G2 doku lipid peroksidasyon düzeyi göstergesi olan MA düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Her iki grupta eşit görülmesi lipid peroksidasyonun oluşmasında iskeminin etkili olmadığını düşündürmektedir. Turnike açılmasını takiben reperfüzyon oluşmakta ve lipid peroksidasyonu oluşan zincir reaksiyonu başlamaktadır. Lipid peroksidasyonu

nun en yüksek seviyeye ulaştığı reperfüzyon zamanı 18 saat ve en düşük seviye ise 2-4 saatler arasındadır (6, 21). G3 ve G4'de MA seviyeleri kas dokusunda reperfüzyonun 2. saatinde çalışıldığı için rölatif olarak daha düşük çıkmıştır. Aynı süreçte G4 MA düzeylerinin G3'e oranla düşük olması, Sodyum ascorbat'ın, İ/R'a maruz kalmış iskelet kasında lipit peroksidasyonu azaltıcı etkisi olduğu düşündürmektedir. Daha uzun süreli reperfüzyon sürecine maruz bırakılarak yapılacak çalışmalarda daha önemli fark elde edilmesi beklenebilir.

İskelet kası İ/R'nunu takiben akciğerlerde mikrovasküler permeabilite artması ve lökositlerin birikmesi ile non kardiojenik pulmoner ödem şeklinde akciğer hasarı oluşmaktadır. İ/R hasarı sonrasında salınan mediatörlerin lökositleri aktive etmeleri sonucu, sistemik dolaşımda akciğer dokusu tarafından bu lökositlerin tutulması ile hasar başlar (22). Aktive olan nötrofillerin akciğerde ve diğer organlarda birikmesi, multisistem organ yetmezliğinde önemli bir basamağı oluşturur (23). Seecamp ve Ward'ın (21) iskelet kası İ/R hasarından sonra akciğer dokusunda lökosit birikmesine bağlı hasarın, turnike açılmasını takip eden 2. ve 4. saatlerde oluşmaya başladığını göstermişlerdir. Reperfüzyonun ikinci saatinde aldığımız akciğer doku örneklerinde G3 ile G4 arasında, G2 ve G3 ve G4 arasında önemli fark olmaması reperfüzyonun ikinci saatinde akciğer dokusunda lökosit ve diğer intermediyerler aracılıklı membran hasarının henüz yoğun olmadığını göstermektedir.

KC dokusunun hepatitis, siroz gibi hastalıklarında serum MA düzeyinin yükseldiği gösterilmiştir (24). İskelet kası İ/R sonrasında karaciğer dokusunun lipit peroksidasyona maruz kaldığını gösteren bir literatür bilgisi yoktur. Çalışma grubumuzda G1 KC MA düzeyi, G3 ile kıyaslandığında zaman [$p < 0.02$ (MWU)] anlamlı derecede azalmış ve bu azalma G4'de Na ascorbatın etkisiyle [$p < 0.003$ (MWU)] daha da farklı bulunmuştur.

Bu çalışmada elde edilen veriler, klinik uygulamada akut arter tıkanmasına yönelik revaskülarizasyon girişimlerinde lokal ve sistemik hasarın azaltılmasına, yönelik olarak yüksek dozda Na ascorbat kullanımının

yararlı bir ek girişim olabileceğini düşündürmektedir. Daha geniş deneysel çalışmada doku MA düzeylerinin endojen radikal tutucu düzeyleriyle birlikte uzun İ/R süreçlerinde periyodik kontrolünün değerlendirilmesi yararlı bilgiler verecektir.

Teşekkür: Çalışmamıza gösterdikleri yardımlar nedeniyle Uludağ Üniversitesi Veteriner Hayvanları Araştırma Laboratuvarı Başkanı Prof. Dr. İsmail Hakkı Ulus ve çalışanlarına teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Haimovici H: Metabolic complications of acute arterial occlusions and related conditions: Role of free radicals (myonephropathic-metabolic syndrome): Haimovici H (ed), Haimovici's Vascular Surgery. Principles and Techniques, California, Appleton & Lange, 1989 pp: 386-409.
2. Ballmer EP, Reincort HM, Jordan P, Bühler E, Maser KU, Gey FK. Depletion of plasma vitamin C but not of vitamin E in response to cardiac operations. J Thorac Cardiovasc Surg 108: 311-320, 1994.
3. Sciamma MA, Lee CP, Ischemia-reperfusion induced injury of forebrain in mitochondria and protection by ascorbate. Arch Biochem Biophys 305: 215-224, 1993.
4. Hardy SC, Homer-Vanniasinkam S, Gough MS. The triphasic pattern of skeletal muscle blood flow in reperfusion injury: an experimental model with implications for surgery on the acutely ischaemic lower limb. Eur J Vasc Surg 4: 351-358, 1979.
5. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 95: 351-358, 1979.
6. Ikezawa T, Nishikimi N, Oba Y. Lipid peroxides in mechanism of ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle experimental studies. Vasc Surg 20: 191-201, 1993.
7. Defraigne JO, Detry O, Pincemail J, Franssen C, Meurisse M, Larry M, Limet R. Direct evidence of free radical production after ischemia and reperfusion and protective effect of desferrioxamine: ESR and vitamin E studies J Vasc Surg 8: 537-543, 1994.
8. Bayerstorf F. Protection of the ischaemic skeletal muscle. Thorac Cardiovasc Surgeon 39: 19-28, 1991.
9. Lindsay TF, Liaw S, Romaschin AD, et al. The effect of I/R on adenine nucleotide metabolism and xanthine oxidase production in skeletal muscle. J Vasc Surg 12: 8-15, 1990.
10. Homer-Vanniasinkam S, Hardy SC, Gough MS. Reversal of the post ischaemic changes in skeletal muscle blood flow and viability by a novel inhibitor of lipid peroxidation. Eur J Vasc Surg 7: 41-

- 45, 1993.
11. Blebea J, Kerr JC, Hobson RW, Padberg FT. The effect of oxygen free radical scavengers on skeletal muscle ischemia and reperfusion injury. *Curr Surg* 44: 396-398, 1987.
12. Nishimaki K, Urayama H, Maksuchi M, Numata M. Free radicals reperfusion injury after acute aortic occlusion. *Vasc Surg* 18: 612-617, 1992.
13. Homer-Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MS. Role of thromboxane A2 in muscle injury following ischaemia. *Brit J Surg* 81: 974-976, 1994.
14. Bayersdorf F, Sarai K, Mitreo Z, Eckel L, Ihnken K, Satter P. Studies of reperfusion injury in skeletal muscle: controlled limb reperfusion to reduce post ischaemic syndrome. *Cardiovasc Surg* 1: 330-336, 1993.
15. Lecine M. New concept in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *N Engl J Med* 314: 892-901, 1986.
16. Mc Coy PB. Vitamin E: Interactions with free radicals and ascorbate. *Ann Rev Nutr* 5: 323-340, 1985.
17. Rees S, Slater TF. Ascorbic acid and lipid peroxidation: The cross-over effect. *Acta Biochem Biophys Hung* 224: 241-149, 1987.
18. Cambell GD, Steinberg MH, Bower JD. Ascorbic acid induced hemolysis in G6PD deficiency. *Ann Int Med* 82: 810-815, 1975.
19. England S, Seifler S. The biochemical functions of ascorbic acid. *Ann Rev Nutr* 6: 365-406, 1986.
20. Labbe R, Lindsay T, Gatley R, Romaschin A, Mikle D, Wilson G, Houle S, Walker P. Quantitation of postischaemic skeletal muscle necrosis: Histochemical and radioisotope techniques. *J Surg Res* 44: 45-53, 1988.
21. Seekamp A, Word AP. Ischemia-reperfusion injury. *Agent Act Suppl* 41: 137-152, 1993.
22. Klauser JM, Paterson IS, Valeri CR, Shepero D, Hechtmon HB. Limb ischemia-induced increase in permeability is mediated by leucocytes and leukotrienes. *Ann Surg* 208: 755-760, 1988.
23. Deitch EA. Multiple organ failure. *Ann Surg* 216: 117-134, 1992.
24. Yagi Kunio. Lipid peroxides and human disease. *Chem Phys Lip* 45: 337-351, 1987.

YAZIŞMA ADRESİ

Dr. Kadir SAĞDIÇ
Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Göğüs Kalp ve Damar Cerrahisi
Görükle 16059 Bursa