

**T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
PLASTİK ve REKONSTRÜKTİF  
CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**SAFRA SALGISININ ARTER TONUSU ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN TAVŞAN KAROTİS ARTERİ  
MODELİNDE İN VİVO VE İN VİTRO İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Gökhan TEMİZ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Mehmet ALPER**

**İZMİR- 2009**

## **TEŞEKKÜR**

Bu tezin hazırlanmasında yapıcı ve bilimsel eleştirilerini esirgemeyen, hekimliğini örnek aldığım tez danışmanım hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet ALPER'e, araştırma görevliliğim süresince tüm sorunlarımıza anlayışla yaklaşan bilgi ve birikimlerini bizden esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Yalçın AKIN'a, Sayın Prof. Dr. Ecmel SONGÜR'e, Sayın Prof. Dr. Tahir GÜRLER'e, Sayın Doç. Dr. Cüneyt ÖZEK'e, Sayın Doç. Dr. Ufuk BİLKAY'a, birlikte çalıştığım ve yardımlarını esirgemeyen uzman ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve EÜTF Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Kliniđi hemşire ve personeline teşekkürü borç bilirim.

Organ banyosu kullanımında yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Mehtap ÇINAR'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat OLUKMAN'a, Sayın Dr. Birol SÖNMEZ, doppler ultrasonografik incelemeleri yapan Sayın Uz. Dr. Erkan KISMALI'ya histopatolojik incelemeleri ve değerlendirmeleri yapan Sayın Doç. Dr. Deniz NART'a, yardımlarından ötürü teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>GİRİŞ AMAÇ</b> .....	1
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	3
Mikrocerrahinin gelişimi ve karaciğer nakli .....	3
Endotel hücrelerinin genel özellikleri .....	5
Endotel hücrelerinin travmaya yanıtı .....	8
Endotel disfonksiyonu ve transplantasyon .....	8
Endotel fonksiyonunun değerlendirilmesi .....	8
İzole Organ Preparatlarının İn Vitro İncelenmesi .....	9
Düz kas kasılmasının kantitatif değerlendirilmesi .....	10
Doppler Ultrasonografi Fiziği .....	11
<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	13
Etik kurul onayı .....	13
Deney hayvanları ve deneyin yapıldığı ortam .....	13
Safranın elde edilmesi .....	13
Yöntem .....	13
İn vivo çalışma .....	14
İn vitro çalışma .....	21
Histokimyasal ve immünohistokimyasal değerlendirme .....	25
İstatistiksel değerlendirme .....	25
<b>BULGULAR</b> .....	26
İzole damar yanıtları .....	26
Birinci grup yanıtları .....	26
Kasılma yanıtları .....	26
Gevşeme yanıtları .....	28
İkinci grup yanıtları .....	30
Renkli doppler ultrasonografi verileri .....	30
Histokimyasal ve immünohistokimyasal bulgular .....	33
<b>TARTIŞMA</b> .....	36
<b>SONUÇ</b> .....	41
<b>ÖZET</b> .....	42
<b>KAYNAKLAR</b> .....	44

## GİRİŞ VE AMAÇ

Son dönem karaciğer yetmezliği olan hastaların tedavisinde karaciğer nakli tüm dünyada kabul gören bir yöntem halini almıştır. Canlıdan canlıya başarılı bir karaciğer nakli için hepatik arter rekonstrüksiyonu şarttır ve nakil prosedürünün en teknik işlemlerinden biridir. Mikrocerrahi tekniklerinin karaciğer naklinde kullanılmasından önce hepatik arter trombozu insidansı % 25 gibi rakamlara ulaşmaktaydı <sup>7</sup> ve 2 mm. den küçük çaplı hepatik arter, canlıdan canlıya karaciğer transplantasyonunda kontrendikasyon olarak kabul edilirdi <sup>8</sup>. Starlz ve arkadaşları 25 yıldan daha da önce hepatik arter rekonstrüksiyonunun çok özenli yapılmasını ve mikrocerrahi prosedürlerin kullanılmasını önermiştir <sup>9</sup>.

Karaciğer nakli işleminde sırası ile hepatik ve portal venlerin anastomozları yapılır, klemplerin açılması ile karaciğerin dolaşımı sağlanır bununla birlikte safra üretilmeye başlar. Safra kanalı anastomozu yapılmadığı için üretilen safra ortama akar ve safra salgısı yakın anatomik ilişkileri nedeni ile hepatik arter anastomoz hattına bulaşır, damar içine girerek endotele temas eder.

Fonksiyonel anatomi açısından kan damarları endotel ve damar düz kası olmak üzere iki tip hücreden oluşmaktadır. Kan damarlarının iç yüzünü döşeyen endotel hücrelerinin bu oluşumun en önemli parçası olduğu son yıllarda yapılan çalışmalar ile anlaşılmıştır. Organizmayı oluşturan hücrelerin solunumunu, beslenmesini ve metabolitlere olan ihtiyacını temin eden kan damarları fiziksel ve kimyasal uyarılara damar tonusu ve geçirgenliğini değiştirerek yanıt verir <sup>18,20</sup>.

Endotel hücre fonksiyonları beş ana bölüm altında özetlenebilir:

1. Kontrol edilemeyen makro moleküllü protein ve lipoproteinlerin çevre dokulara infiltrasyonuna karşı seçici bariyer olması.
2. Dolaşımda bulunan lipoproteinlerin metabolizmasına katılıp, subendotelial bölgeye geçecek lipoproteinlerin tabiatına karar vermek.
3. Trombosit agregasyonunu ve trombozisi önleme.
4. İmmünkompetan hücreler ile birlikte savunma mekanizmasına katılma.
5. Gevşetici ve kasıtırıcı maddeler salarak vasküler tonusun düzenlenmesine katkıda bulunma.

Eskiden sanıldığı gibi endotelin, dokularla kan arasında mekanik bir bariyer değil tam aksine sentezlediği ve salgıladığı mediatörlerle vasküler hemostaziste çok önemli rol oynayan ve vücudun her tarafına yayılmış bir organ olduğu artık bilinmektedir<sup>22</sup>.

Safra ile endotelin teması organizmada fizyolojik şartlarda mümkün olmamaktadır. Ancak karaciğer naklinde hepatik arter rekonstrüksiyonunun yapılması esnasında hepatik arter endoteline ve damar duvarına çoğu zaman safra teması olmaktadır. Endotelin damar tonusu üzerindeki etkileri düşünüldüğü zaman bu olay mikrocerrahi açısından çok büyük önem arz etmektedir.

Bizim bu çalışmadaki amacımız; safranın arter tonusu üzerine olan etkisini anlamaktır. Bunun için tavşan karotis arteri deneysel model olarak seçilmiştir. Tavşan karotis arteri üzerinde safranın etkisi üç farklı yöntem ile incelenmiştir.

1. Mikrovasküler anastomozun kan akımı indekslerinin renkli doppler ultrasonografi kullanarak in vivo incelenmesi.
2. Organ banyosu sistemi kullanılarak in vitro inceleme.
3. İn vitro çalışılan damar segmentlerinin histokimyasal ve immünohistokimyasal olarak incelenmesi.

## GENEL BİLGİLER

### Mikrocerrahinin Gelişimi ve Karaciğer Nakli

Damarlar yüzyıllar boyunca dokunulmaz olarak kabul edildiği için olsa gerek, kanamayı durdurmak için damarların ipek ile bağlanması ilk kez 1564 yılında Ambroise Pare tarafından kaydedilmiştir<sup>1</sup>. Damarların onarılması fikrini başarıyla uygulayan ilk cerrahın 1759'da Hallovell olduğu kaydedilmiştir<sup>1</sup>. Hallovell'in tekniği kısmi damar kesisinin iki kenarını tutacak şekilde dışardan içeri ve içerden dışarı geçecek şekilde bir iğne etrafına sekiz şeklinde sarılan bir iplik ile kesik damar dudaklarının yaklaştırılıp sarılması esasına dayanmaktaydı. Hallovell bu tekniği ilk kez brakial arter yaralanmasında kullanmıştı ve iyileşme tamamlandıktan sonra iğneyi çıkarmıştı. Yaralanmış bir damarı tek tek dikiş koyarak onarma işlemini ilk kez 1889'da Jassinowski'nin başardığı kaydedilmekle birlikte gerçek anlamda ilk damar anastomozunu Rus cerrah Nikolay Viladimiroviç Eck, Jassinowski'den çok önce 1877 yılında köpeklerde yapmıştır<sup>1</sup>. Tam arter kesisinin tek tek dikişler konarak uç uca onarımı ilk kez Briau tarafından 1896'da köpek karotisinde başarılmıştır. Asıl büyük değişim Alexis Carrel tarafından başlatılmış ve yaptığı çalışmalar sonucunda damar ve organ nakli cerrahisinin bir disiplin olarak temellerini atmıştır<sup>2,3</sup>.

Mikro düzeydeki damarların cerrahların ilgisini çekmesi makro düzeydeki başarıların cesaretlendirmesi ile olmuştur. Önce İkinci Dünya Savaşı sonra da Kore Savaşı sırasında damar onarımına ilişkin tecrübeler giderek küçülen damarların onarımı konusunda çalışmaları hızlandırmıştır. Schumacker ve Lowenberg 1948 yılında deneysel çalışmada 3.2 mm'den küçük damarların onarımında %53'lük bir başarı oranı yakalanmıştır. Bu çalışmaları takiben Seidenberg ve arkadaşları 1959'da servikal özefagus defektini onarmak için serbest jejunum flebini mikroskop kullanmadan denemişler ve başarısız olmuşlardır. Jacobson ve Suarez 1960 yılında mikro damarların onarımında mikroskobun üstünlüğünü ortaya koymuştur<sup>4</sup>. Mikroskopların ve daha ince dikişlerin kullanımı ile giderek daha ince damar ve sinir onarımına olanak sağlanmıştır. 1963 yılında Çin'de Chen Zong-Wel ve Chein Ying-Ching, 1962 ile 1964 yıllarında ise ABD'de Malt ve McKhann başarılı önkol

replantasyonlarını, 1965 yılında Japonya'da Kamatsu ve Tamal ilk başarılı başparmak replantasyonunu yapmışlardır <sup>5</sup>. 1964 yılında Nakayama, 1965 yılında Jurkiewicz, Seidenberg ve arkadaşlarının birkaç yıl önce başarısız oldukları jejunum flebini başarı ile uyguladıklarını bildirmişlerdir <sup>6</sup>. Bu olgular olasılıkla klinikteki ilk serbest flep nakilleridir. Mc Lean ve Buncke 1969 yılında kafa derisi defektini kapamak için yüzeysel temporal damarlara anastomozlarla ilk serbest omental flep transferini yapmışlardır ve bunu 1972'de yayınlamışlardır. 1971 yılında Antia ve Buch'un bildirdikleri serbest de-epitelize süperior epigastrik flep ise fasyal kontur onarımında kullanılmıştır. Bazı kaynaklarda ilk serbest flep gibi bildirilen Daniel ve Taylor'ın 1973 yılında yaptıkları serbest kasık flebi aktarımı ilk serbest deri flebi olarak kabul edilir. Ancak bununla aynı zamanda Çin'de Yang Tung-Yu ve arkadaşları serbest kasık flebini aktardıklarını bildirmişlerdir <sup>1</sup>.

Türkiye'de mikrovasküler cerrahi tekniklerinin dikkati çekmesi 1970'li yıllarda olmuştur. Kayda geçen ilk başarılı replantasyon İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yapılmıştır ve mikroskop kullanılmaksızın önkol replante edilmiştir. Mikroskop kullanılarak yapılan ilk olgu ise 1978 yılında Mitseo Yoshimura öncülüğündeki ekip tarafında aynı fakültede yapılan 4 parmak replantasyonudur. Bundan bir ay sonra Ayhan Gülgözen ve arkadaşları 5. parmak replantasyonunu başarmışlardır <sup>1</sup>.

Mikrocerrahi tekniklerin karaciğer naklinde kullanılmasından önce hepatik arter trombozu insidansı % 25 gibi rakamlara ulaşmaktaydı <sup>7</sup> ve 2 mm'den küçük çaplı hepatik arter, canlıdan canlıya karaciğer transplantasyonunda kontraendikasyon olarak kabul edilirdi <sup>8</sup>. Starlz ve arkadaşları 25 yıldan daha da önce hepatik arter rekonstrüksiyonunun çok özenli yapılmasını ve mikrocerrahi prosedürlerin kullanılmasını önermiştir <sup>9</sup>. Canlıdan canlıya başarılı bir karaciğer nakli için hepatik arter rekonstrüksiyonu şarttır ve nakil prosedürünün en teknik işlemlerinden biridir. Hepatik Arter Trombozu (HAT) fulminan karaciğer yetmezliği, gecikmiş safra kaçakları, bakteriemi gibi komplikasyonlara neden olarak yeniden transplantasyona ve hatta hastanın kaybedilmesine yol açabilir <sup>10</sup>.

Canlıdan canlıya karaciğer naklinde HAT riskini azaltmak için mikrocerrahiyi ilk kez Kyoto Gurubu kullanmıştır <sup>11</sup>. Daha sonra Hatano ve

arkadaşları hepatic arter rekonstrüksiyonunda mikrovasküler cerrahi ile HAT insidansında azalma elde ettiklerini bildirmişlerdir<sup>12</sup> ve daha sonra mikrovasküler tekniğin HAT insidansında belirgin bir azalmaya neden olduğunu gösteren birçok çalışma yayınlanmıştır<sup>11-13</sup>.

## **Endotel Hücresinin Genel Özellikleri**

Endotel adı altında toplanan vasküler ve lenf yatağının lümenal yüzeyini kaplayan yassı epitel hücreleri mezankimden gelişir. Bazı özellikleri bakımından endotel bağ dokusu içinde düşünülse de, morfolojik açıdan tipik epitel hücresi karakteri taşırlar.

Vasküler endotel damar uzun ekseni boyunca bir bazal lamina üzerinde yan yana dizilip tek katlı bir tabaka oluşturan çok yüzlü hücrelerden oluşmuştur. Yetişkin bir insanda endotel hücresinin kapladığı alan yaklaşık 6000 m<sup>2</sup> ve ağırlığı 2.5 kg civarındadır<sup>14-17</sup>.

Büyük arterleri, venleri, kapillerleri ve lenf yüzeyini döşeyen endotel hücrelerinde önemli yapısal ve işlevsel farklılıklar olmasına rağmen temel fonksiyonları benzerlik göstermektedir. Endotel hücresinin lümeneye bakan yüzeyi hücrenin sentezlediği bir proteoglikan takası ile kaplıdır ve bu tabaka antitrombojenik özellik taşımaktadır<sup>14</sup>.

Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalar, endotelin dokular ve kan arasında seçici bir bariyer oluşturmaktan başka hemostaziste çok önemli işlevleri olan bir doku niteliği taşıdığını göstermiştir. Endotel hücreleri salgıladıkları mediatörler ile koagulasyonu, fibrinolizisi, damar tonusunu, dolayısı ile kan akışı ve kan basıncını etkileyen çeşitli fizyolojik ve patolojik olaylarda rol oynayan aktif hücrelerdir<sup>18-20</sup>.

Endotel hücre fonksiyonları beş ana bölüm altında özetlenebilir<sup>21</sup>.

1. Kontrol edilemeyen makro moleküllü protein ve lipoproteinlerin çevre dokulara infiltrasyonuna karşı seçici bariyer olması.
2. Dolaşımda bulunan lipoproteinlerin metabolizmasına katılıp, subendotelial bölgeye geçecek lipoproteinlerin tabiatına karar vermek.
3. İmmünkompetan hücreler ile birlikte savunma mekanizmasına katılma

4. Trombosit agregasyonunu ve trombozisi önleme.
5. Gevşetici ve kasıtırıcı maddeler salarak vasküler tonusun düzenlenmesine katkıda bulunma.

Eskiden sanıldığı gibi endotel, dokular ile kan arasında bulunan pasif bir bariyer değildir. Özellikle yukarıda sıralanan dördüncü ve beşinci maddelerde ifade edilen işlevleri ile mikrovasküler cerrahi için büyük önem taşıdığı açıktır. Endotelin salgıladığı mediatörlerle vasküler hemostaziste çok önemli rol oynayan ve tüm vücuda yayılmış bir organ niteliğinde olduğu artık bilinmektedir<sup>22</sup>.

Endotel hücresi bulunduğu yere göre değişik yapı ve etkide hemostaz-vazoaktivite immun reaksiyon ve iltihabi olaylarda rol alan çok sayıda mediatörün sentezlenip salgılandığı yerdir (Tablo 1). Adeta çok fonksiyonlu bir salgı hücresi olarak iş yapmaktadır. Tablo 1’de gösterildiği gibi, endotel hücresinden şu ana kadar salgılandığını bildiğimiz 26 biyoaktif madde ile vasküler tonus, hücre proliferasyonu, kan pıhtılaşması, inflamasyon ve damar geçirgenliği düzenlenmektedir<sup>22,23</sup>.

**Tablo 1 : Endotel hücresinde sentezlenen ve salgılanan biyoaktif maddeler.**

<p style="text-align: center;"><i>Vazoaktif Proteinler</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Endotel kaynaklı gevşetici faktör EDRF (NO)</li> <li>• Endotelin</li> <li>• Prostosiklin (PGI<sub>2</sub>)</li> </ul>	<p style="text-align: center;"><i>Büyüme Faktörleri Ve Sitokinler</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Platalet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)</li> <li>• Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör</li> <li>• Platelet aktive edici faktör (PAF)</li> <li>• İnterlökin 1,6,8</li> <li>• Trombosit büyüme faktörü (TGF)</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><i>Prokoagülanlar</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Plazminojen aktivatör inhibitörü(PAI)</li> <li>• Fibronektin</li> <li>• F9 bağlayıcı protein</li> <li>• F5, F12 aktivatörü</li> </ul>	<p style="text-align: center;"><i>Antitrombotik Ve Antikoagulan Faktörler</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Doku plazminojen aktivatörü(t-PA)</li> <li>• Trombomodulin</li> <li>• Protein – S</li> <li>• EDRF(NO)</li> <li>• Ekstrinsik sistem inhibitörü (TTPAI)</li> <li>• Antitrombin 3</li> <li>• PGI-2</li> </ul>

ABD New York Downstate Üniversitesi Farmakoloji Bölümünden Furchgott ve Zawadski ilk olarak 1980 yılında kendisinin tanımladığı aortik damar şeritlerinin organ banyosu sisteminde noradrenalin, fenilefrin veya başka bir kasıcı agonistle submaksimal bir kasılma sağlandıktan sonra ortama asetilkolin (ACh) ilavesi ile gevşemelerin oluştuğunu gösterdiler. Bu gevşemenin endotel bağımlı olduğunu ve bu etkiden endotelden düz kasa geçebilen non-prostanoid labil bir maddenin sorumlu olduğunu ileri sürdüler. Bu hazırlanan gevşeme izole aort halkalarında endotel mevcutsa olmakta endoteli alınmış halkalarda olmamakta veya kasılmaya dönmekte. Endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) olarak adlandırılan bu maddenin daha sonra yapılan çalışmalarda NO (nitrik oksit) veya NO ile ilişkili bileşikler olduğu ortaya konmuştur<sup>24-26</sup>. Bu çalışmaları ile Furchgott 1998 yılında Nobel tıp ödülünü almıştır.

EDRF ile ilgili çalışmaların yoğunlaşmasından sonra vazokonstriktör bir peptidin de olabileceği düşünülmüş ve çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda endotel hücrelerinin vazokonstriktör bir peptid salgıladığı bulunmuştur. İlk kez 1988 yılında izole edilen bu peptide Endotelin (ET) adı verilmiştir. Trombin, noradrenalin, hipoksi, transmural basınç artışı ve mekanik gerilme gibi kimyasal ve mekanik unsurlar endotelin salınımına neden olurlar. ET yavaş salınmakta, etkisini yavaş göstermekte fakat uzun süreli bir tesir ortaya koymaktadır<sup>15,27,28</sup>.

Yukarıda da anlatıldığı üzere endotel damar duvarı ile kan arasında antitrombojenik bir bariyer oluşturmasının yanında kardiyovasküler hemostazisin sürdürülmesinde de önemli fonksiyonları vardır. Endotelin bu işlevi temel olarak vazodilatasyon ve vazokonstriksiyondur ve bunu yüzey proteinleri ve salgıladığı endotel kaynaklı biyoaktif ajanlar ile yapar.

Nitrik oksid (NO), prostasiklin ve adenosin ile vazodilatör etki yanında trombositlerin aktivasyonunu engellemekte, lökositlerin adezyonunu inhibe etmekte ve süperoksit radikallerinin neden olduğu hasara karşı endoteli korumaktadır<sup>29,30</sup>.

Günümüzde güncellenen, NO'nin intraluminal salgılanması kan akımına metabolik etkide bulunurken<sup>31</sup>, ekstraluminal olarak salgılanması ise vasküler düz kas tonusunu etkilemesi yanında kardiyovasküler olaylara yol açan düz kas hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir<sup>32</sup>.

## **Endotel Hücresinin Travmaya Yanıtı**

Son dönemlerde damar biyolojisi alanında önemli gözlemlerden biri de endotel hasarının vasküler cerrahide öneminin anlaşılmış olmasıdır. Endotel fiziksel uyarılara önemli derecede hassastır, uyarılar endotelde değişikliklere ve inflamatuvar yanıtta artışa yol açar<sup>33</sup>. Fiziksel uyarılara karşı endotelde oluşan fonksiyon değişikliğine “endotel hücre aktivasyonu” denir. Endotel hücre aktivasyonu sonucunda endotelin geçirgenliği, koagülasyon durumu, vazokonstriksiyon seviyesi, lökosit adezyonu ve düz kas hücre proliferasyonunda artma yanında intimada anormal fibrinoproliferatif yanıt oluşur<sup>33</sup>.

## **Endotel Disfonksiyonu ve Transplantasyon**

Endotel disfonksiyonu terimi, endotelin azalmış anti-koagulan özellikleri veya damarın yeniden şekillenmesinin düzenlenmesinde bozukluk gibi patolojik durumlar söz konusu olduğunda kullanılmaktadır. Fakat sıklıkla endotel disfonksiyonu dolaşımda endotele bağımlı vazodilatasyon kapasitesinin azalması nedeni ile asetilkoline karşı azalmış yanıtı göstermektedir<sup>34</sup>.

Endotel hücrelerinin transplant sürecinin başarısında ya da başarısızlığında hayati önemi vardır. Bu sürecin kendisi bir inflamatuvar kaskadı tetikleyerek endotel hasarına yol açan olaylara sebep olmaktadır. Bunun yanı sıra birçok immunsupresif ajan da bu sürece katkıda bulunmaktadır<sup>35</sup>.

## **Endotel Fonksiyonun Değerlendirilmesi**

Endotel fonksiyonu sıklıkla farmakolojik veya mekanik uyarılara vazodilatör cevabın değerlendirilmesi ile saptanmaktadır<sup>25</sup>. Endotele bağlı çok sayıda agonist bulunmaktadır, bunların arasında asetilkolin, serotonin, bradikinin, troponin sayılabilir. Endotel fonksiyonu eNOS’u (nitrik oksit sentetaz) iki yoldan stimüle ederek test edilebilir. Birincisi endotel üzerinde kan akımını artırarak sağlanabilir. Artmış kan akımı (shear stres) endoteli mekanik olarak uyarır. Buna cevap akım ile

ilişkisiz vazodilatasyondur. İkinci olarak endoteldeki reseptörleri stimüle eden maddeler infüze edilebilir. Bunlardan en sık kullanılanı asetilkolindir<sup>36</sup>.

İn vitro ortamda endotel fonksiyonu organ banyosu sisteminde (Şekil 1) asetilkolinin değişik konsantrasyonlarına vasküler halka gerilim cevabı ölçülerek değerlendirilmektedir. Asetilkoline normal arter cevabı vazodilatasyondur. Endotel disfonksiyonu varlığında vazokonstrüksiyon gözlenir. Arteriyal kan akımı arttığı durumlarda endotel NO ve diğer vazodilatörlerin salgılanması ile cevap verir. Anormal cevap ise azalmış vazodilatasyon veya bazen vazokonstrüksiyon ile karakterizedir<sup>25</sup>.

## **İzole Organ Preparatlarının İn Vitro İncelenmesi**

Organların fonksiyonel aktiviteleri vücut dışına çıkarılarak uygun bir ortamda incelenebilir. Böylesi bir inceleme organın fonksiyonları bakımından, tam vücutta incelemelere göre daha avantajlı ve etraflı bilgi vermektedir. Nitekim farmakoloji ve fizyolojideki pek çok ileri bilgiler ve yerleşmiş bulgular böylesi çalışmaların sonucudur. Vücut dışına çıkarılmış bir organın yaşamını sürdürmesi için optimum fizyolojik koşullara ihtiyaç vardır<sup>37</sup>. Bu koşullar şöyle özetlenebilir:

1. Organın izole edildiği ortam önemlidir.
2. Optimum oksijenlenme sağlanmalıdır.
3. Ortam sıcaklığı ayarlanmalıdır.

İzole organ preparatlarında, organın vücut dışına çıkarılarak hayvan türüne göre uygun bir ortamda canlı tutulması söz konusudur. Bu canlılık, ortamın kimyasal yapısının düzenlenmesi ortam sıcaklığının denetlenmesi ve optimum oksijenasyonun sağlanması ile yapılır. Organın normal in vivo fizyolojik kondisyonları in vitro temin edilmeden canlılığını devam ettirmesi mümkün değildir<sup>38</sup>.

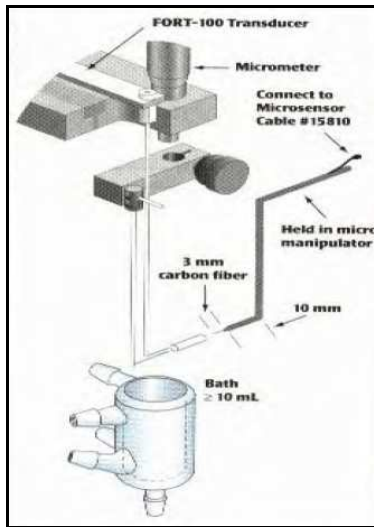
Vücut dışına çıkarılmış bir organın canlı kalmasındaki koşullardan en önemlisi kuşkusuz organın bulunduğu ortamdır. En iyi ortamın kan olduğu

tartışılmaz. Ancak izole organ preparatlarında kan kompozisyonuna yakın fizyolojik tuzlu su çözeltileri yaygın bir şekilde uygulama alanına girmiştir. Bugün bu konuda yüzyılı aşkın bir bilgi birikimi ve deneyim mevcuttur<sup>39</sup>.

### **Düz kas kasılmasının kantitatif değerlendirilmesi:**

Düz kaslı preparatlar farmakolojide sık kullanılmaktadırlar. Organ banyosu sistemlerinde (Şekil 1) şerit veya segment şeklinde kullanılan in vitro düz kaslı preparatlarında çeşitli etkiler ile meydana gelen kasılmaları ya da gerilim gelişmelerini ölçmede transdüsörler kullanılmaktadır<sup>37</sup>.

**Transdüsörler:** Bir sinyali, başka nitelikte ve ölçülmesi daha kolay ve pratik olan başka bir sinyale çeviren elektriksel araçlardır. Araştırmalarda kullanılan kan basıncı, perfüzyon basıncı ve kasılan kasın geliştirdiği gerilimi veya deplasman gibi mekanik sinyalleri, bunlarla doğrusal şekilde orantılı bir biçimde gelişen elektriksel sinyallere çevirir. Bu elektriksel sinyali; özel amplifikatörlerden ve analog-dijital dönüştürücülerden geçirmek suretiyle dijital sinyal şeklinde sayısal değer haline getirmek, bilgisayara aktarmak orada depolamak ve işlemek mümkün olmaktadır.



**Şekil 1 :Organ banyosu sisteminin şematik gösterimi**

## Doppler Ultrasonografi Fiziği

1842 yılında Avusturyalı fizikçi Johan Cristian Doppler tarafından tanımlanan Doppler Kayması'nın tıp alanında kullanımı 1957 yılında başlamış olup son on yılda belirgin olarak artmıştır.

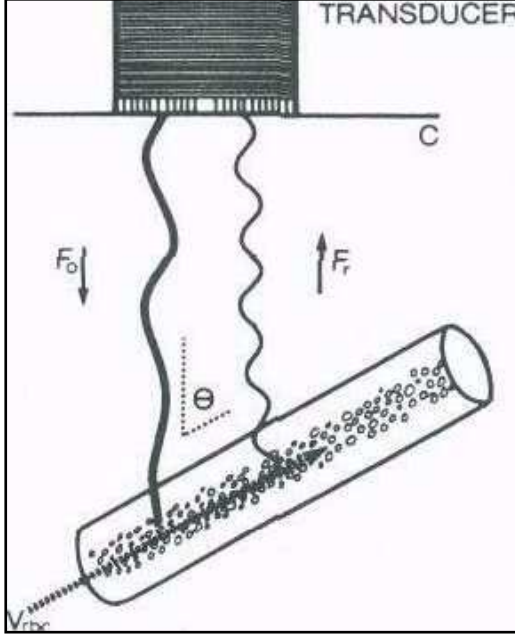
Klinik uygulamada kan akımının ultrason ile tanımlanmasında, iletici ve alıcı (aynı transdüserde farklı kristaller) sabittir, yansıtıcılar (çalışılan kan damarlarındaki eritrositler) hareket halindedir ve giden gelen ses dalgalarının aldığı yolun uzunluğunu değiştirmektedir<sup>54</sup>.

Doppler etkisi, akustik ya da ultrason dalgasının frekansının değişmesidir, bu da iletici ve alıcı kaynaklar arasındaki toplam yol uzunluğu değiştiğinde ortaya çıkar (Şekil 2). Doppler kan akımı çalışmalarında aralıklı (pulsed) ses dalgasının yolu üzerindeki kırmızı kan hücreleri ultrason ışını üzerine farklı etkiler oluşturur. Işınlardan transdüser doğru ya da ondan uzaklaşan tarzda yani her yöne doğru dağılmaktadır<sup>54</sup>.

Transdüser geri dönen ultrason ışınlarının oranı Doppler kaymasının hesaplandığı ve parçacık hızının ölçüldüğü bir eko oluşturur. Aletin gönderdiği frekans ayarlanabilmektedir. Doku içinde ilerleme hızını da sabit kabul edersek ve Doppler açısı da biliniyorsa, kan akım hızı ölçülen Doppler kaymasından hesaplanabilir. Eğer bu işlem saniyede birçok kez tekrarlanırsa, zamana göre hızdaki değişimler kan akım hızının dalga formu olarak gösterilebilir<sup>43</sup>.

Damar çapında bir daralma ortaya çıktığında kan akım hızı bununla ilişkili olarak artmaya başlamaktadır. Kan akımı belirlenmesindeki var olan zorluklardan dolayı, kan akım hızı dalga formu genellikle distal vasküler dallarda yüksek ve düşük rezistansla alakalı paternlerin ayrılmasında kullanılmaktadır. Yaygın kullanımdaki indeksler, sistolik/diyastolik oran (S/D oranı)<sup>40</sup>, ve rezistif indekstir (RI aynı zamanda Pourcelot oranı da denir)<sup>41</sup> S/D oranı basittir ve elle hesaplanabilir fakat diyastolik hızlar yoksa oran anlamsız olur. RI biraz komplikedir fakat diyastolik hız anormal bir şekilde düşük olduğunda yani 1.00 değerine yaklaştığı zaman rölatif olarak yüksek dirençli akımı işaret eder. Darlığın derecesi, gri skala incelemeye ve

sistol tepesi hızı (PS), diyastol sonu hızı (EDV), parametrelerine göre hesaplanır. PS'nin yüksek dereceli stenozlarda stenozu hesaplamada doğru bir parametre olduğu kanıtlanmıştır<sup>42</sup>.



Şekil 2 : Doppler etkisinin şematik gösterimi

**C = Sesin ortamdaki hızı**

**V<sub>rbc</sub> = Kan akım hızı**

**F<sub>r</sub> = Geri dönen ultrason frekansı**

**θ = Akımın yönü ile ultrason ışını arasındaki açı**

**F<sub>o</sub> = İletilen ultrason frekansı**

**F<sub>r</sub> = Geri dönen ultrason frekansı**

## **GEREÇ VE YÖNTEM**

### **Etik Kurul Onayı**

Çalışma, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alındıktan sonra ( 26-6-2008 tarihli ve 2008-50 sayılı) Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi A.D, Farmakoloji Deneysel Araştırma Laboratuvarlarında ve Radyoloji A.D. yapılmıştır.

### **Deney Hayvanları Ve Deneyin Yapıldığı Ortam**

Çalışma için 20 erkek Yeni Zelanda Beyaz Tavşanı (1.4-1.8 kg) kullanıldı. Çalışmanın in vivo kısmı Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Ve Rekonstrüktif Cerrahi A.D. Mikrocerrahi Laboratuvarı, in vitro parçası ise Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji A.D. laboratuvarında yapılmıştır. Renkli doppler incelemesi Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji A.D., histokimyasal ve immünohistokimyasal inceleme ise Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji A.D. tarafından yapılmıştır.

### **Safranın elde edilmesi**

Safra, hasta bilgilendirilerek ve onayı alınarak, karaciğer vericisinin kolesistektomi uygulanmış safra kesesinden elde edilmiştir. Safra bölünerek -20C'de saklandı ve çalışma öncesi çözülerek kullanıldı. Tüm çalışmada aynı safra kullanıldı.

### **Yöntem**

Çalışmanın yöntemini kısaca özetlemek gerekirse; amacı safranın arter tonusu üzerine olan etkisini anlamak olan bu çalışma in vivo ve in vitro olmak üzere iki parçadan oluşmaktadır.

İn vivo çalışmada tavşanın her iki ana karotis arteri; birisi kontrol diğeri çalışma grubu olarak kullanıldı. Her iki ana karotis damarların mikro makas ile kesilmesini takiben 'çalışma grubu safralı ortamda olmak üzere' standart mikrovasküler anastomoz yapıldı. Renkli doppler ultrasonografi kullanılarak preoperatif temel akım ve postoperatif kan akımları ölçüldü, kontrol ve çalışma grupları karşılaştırıldı.

İn vitro çalışmada bilateral ana karotisler alınarak 4mm'lik halkalar şeklinde kesildi, çalışma grubu safralı krebs solüsyonunda kontrol grubu standart krebs solüsyonunda bekletilerek organ banyosu sisteminde kasıcı ve gevşetici ajanlara karşı cevapları incelendi. İnceleme sonunda kullanılan parçalara histokimyasal ve immünohistokimyasal bakı yapıldı.

### **İn Vivo Çalışma**

10 adet Yeni Zelanda Beyaz Tavşanı (1.4-1.8 kg) kullanıldı. Her tavşana 50 mg/kg intramuskuler Ketamin, 15mg/kg Xylasin ile anestezi sağlandı. Hayvanlarda bireysel farklılıklar olabileceğinden her hayvanda sol taraf kontrol grubu sağ taraf çalışma grubu olarak seçildi. Cerrahi öncesi karotis akım indekslerinin tespiti için sağ ve sol karotis arterlere (Siemens® Sonoline Elegra, 13MHz lineer prob) renkli doppler ultrasonografi uygulandı (Resim 1). Sistol tepesi akım hızı (PS), sistol diyastol hız oranı (S/D), rezistif indeks (RI) değerleri kaydedildi (Resim 2). Cerrahi girişime hazırlık için boyun tüyleri tıraş edildi. Antiseptik solüsyon ile silinmesini takiben boyun orta hatta artı şeklinde insizyon yapıldı (Resim 4). Deri flepleri kaldırıldı (Resim 5). Orta hatta boyun kasları geçilerek trakea üzerine ulaşıldı (Resim 6) ve künt disseksiyon ile damar sinir paketleri trakeanın her iki tarafında ortaya çıkarıldı (Resim 7), kaslar laterale devrilerek ana karotis arterler mikroskop altında tamamen serbestleştirildi (Resim 8).

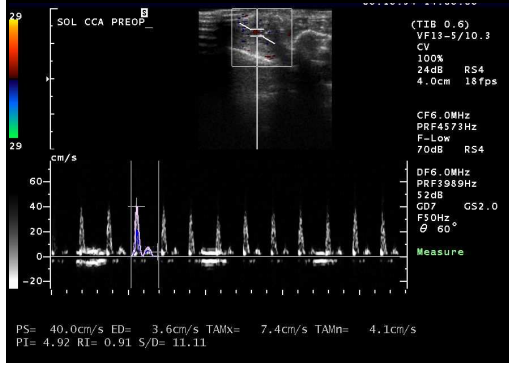
Kontrol grubunu oluşturacak olan sol tarafa yaklaşımcı mikro klemler yerleştirilerek damar mikro makas ile kesildi ve heparinize serum (10U/ml) ile irrigasyon yapıldı, adventisyal dokular temizlendi, iğne çapı 100 mikron, 5 mm lik 9/0 Monofilaman (Ethicon®, İngiltere) sütür materyali ve separe dikiş tekniği ile anastomoz uygulandı. Mikro klemler açılarak anastomozun çalıştığı izlendi (Resim 9)

Daha sonra çalışma grubunu oluşturacak olan sağ tarafa yaklaşımcı mikro klemler yerleştirilerek damar mikro makas ile kesildi ve heparinize serum (10U/ml) ile irrigasyon yapıldı, adventisyal dokular temizlendi, ortama %5'lik safra eklenerek anastomoz için safralı ortam hazırlandı (Resim 10) . Safranın kontrol damarına temas etmemesi sağlandı. Daha sonra iğne çapı 100 mikron, 5 mm lik 9/0 Monofilaman (Ethicon®, İngiltere) sütür materyali ve separe dikiş tekniği ile anastomoz yapıldı. Mikro klemler açılarak anastomozun çalıştığı izlendi (Resim 11). Damarın %5 safra ile tekrar yıkanmasını takiben safralı ortamda 30 dakika bekletildi (Resim 12).

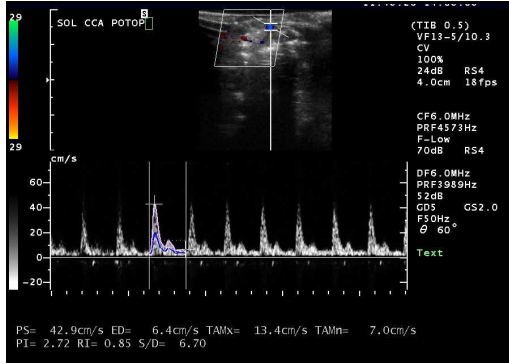
Anastomozların yapılmasını takiben 30. dakikalarda anastomoz sonrası akım indekslerinin tespiti için her iki karotis artere ( Siemens Sonoline Elegra,13mHz lineer prob ) renkli doppler ultrasonografi uygulandı ve PS, RI, S/D değerleri kaydedildi (Resim 3). İşlemlerin bitmesinin ardından hayvanlara intrakardiyak potasyum uygulanarak ötenazi yapıldı. Tablo 2'de doppler USG'nin tüm verileri sunulmuştur. Analizleri SPSS programı ile yapıldı.



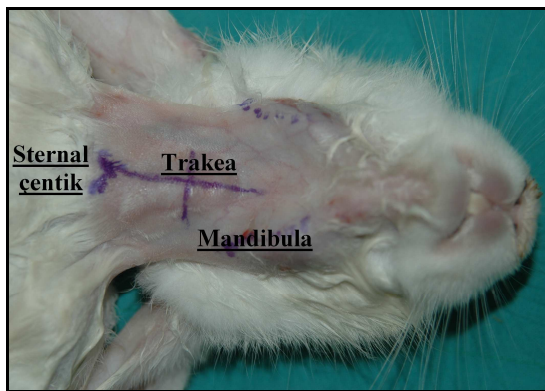
**Resim 1 : Doppler USG uygulaması**



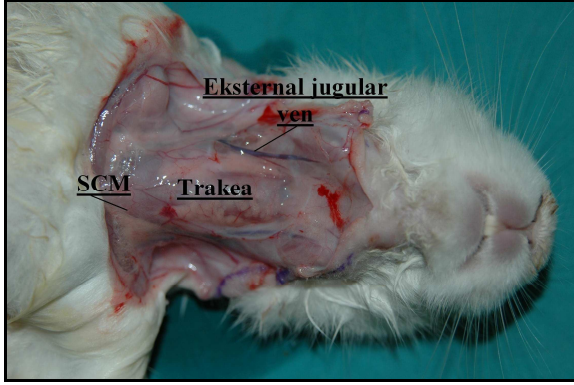
**Resim 2 : Preoperatif doppler ölçümü ve değerleri**



**Resim 3 : Postoperatif doppler ölçümü ve değerleri**



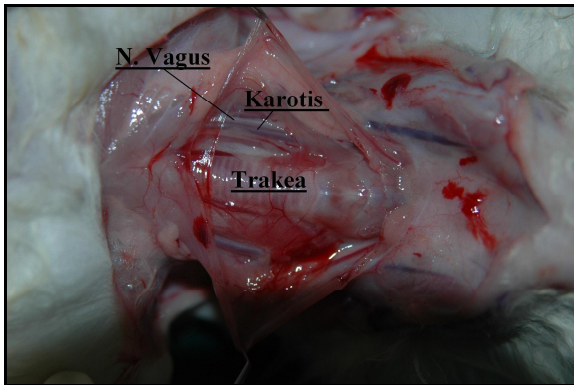
**Resim 4 : Boyunda insizyon hattı**



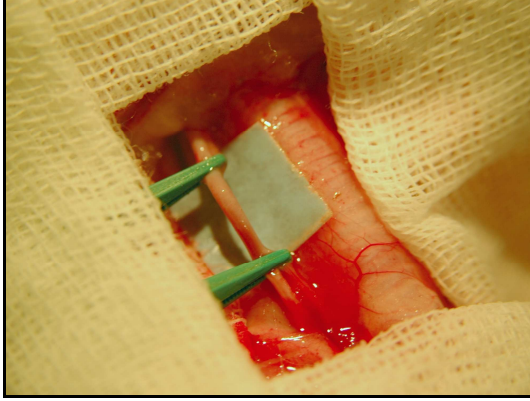
**Resim 5 : Boyun flelerinin kaldırılmasını takiben anatomik görünüş**



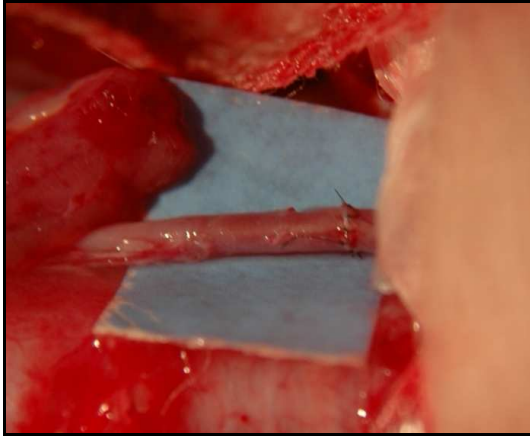
**Resim 6 : Orta hat yapılarını geçerek trakeanın ortaya konması**



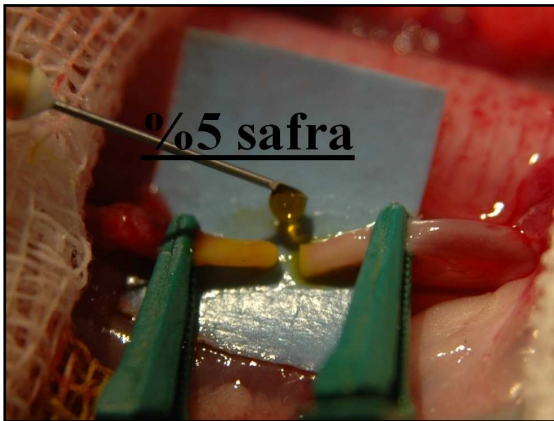
**Resim 7 : Kasların lateralize edilerek trakeanın her iki yanında damar sinir paketinin ortaya konması**



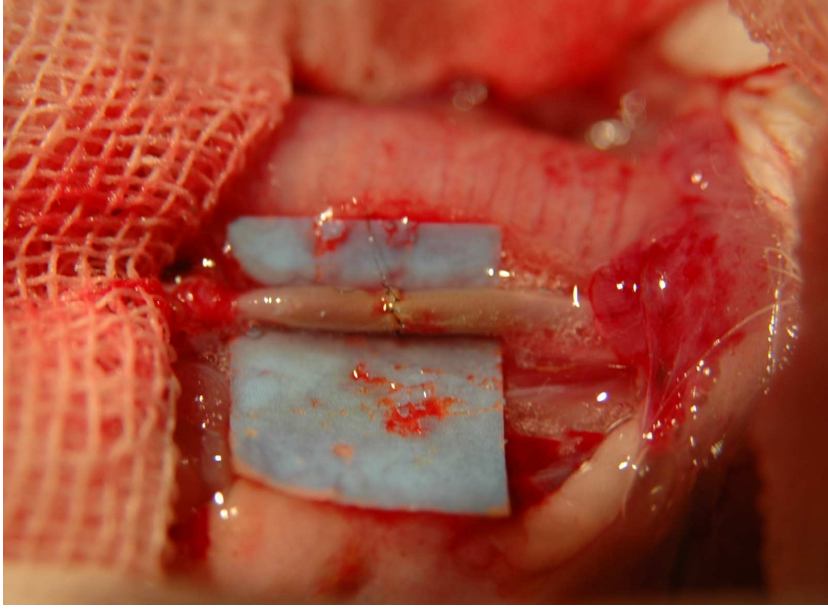
**Resim 8 : Karotisin disseke edilip yaklaştırıcı klempler ile asılması**



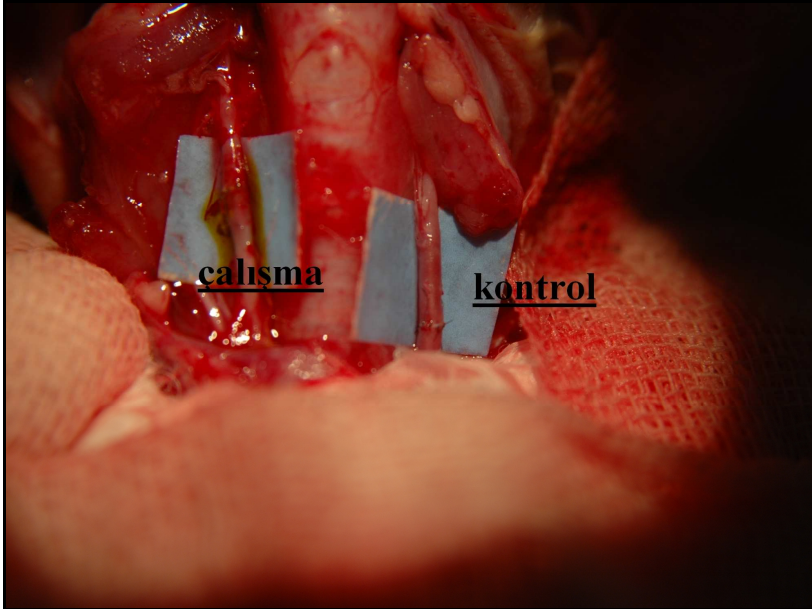
**Resim 9 : Kontrol damarında çalışan anastomoz**



**Resim 10 : Çalışma damarında safra ile yıkama**



**Resim 11 : Çalışma grubunda tamamlanmış anastomoz**



**Resim 12 : Her iki tarafta anastomozların tamamlanmış hali, çalışma tarafında ortamda safra görülmekte**

<b>TAVŞAN KAROTİS DOPPLER USG VERİLERİ</b>												
no	PS				RI				S/D			
	PRE		POST		PRE		POST		PRE		POST	
	K	Ç	K	Ç	K	Ç	K	Ç	K	Ç	K	Ç
	PRE PS	PRE PS	POST PS	POST PS	PRE RI	PRE RI	POST RI	POST RI	PRE S/D	PRE S/D	K POST S/D	Ç POST S/D
1	18,00	26,50	123,40	96,90	0,87	0,91	0,84	0,88	7,50	11,04	6,20	8,85
2	53,80	26,90	121,90	23,20	0,78	0,78	0,84	0,74	4,56	4,64	6,13	3,87
3	50,30	27,20	0,00	15,30	0,93	0,86	0,00	0,83	15,24	6,97	0,00	5,96
4	47,70	30,00	115,00	80,00	0,84	0,44	0,82	0,80	6,20	1,80	5,58	5,04
5	20,90	32,40	0,00	38,20	0,38	0,79	0,00	0,70	5,97	4,84	0,00	3,38
6	30,30	46,50	57,20	58,80	0,80	0,80	0,71	0,78	4,97	5,00	3,40	4,63
7	40,00	35,90	42,90	37,00	0,91	0,83	0,85	0,80	11,11	5,89	6,70	5,07
8	57,00	30,00	71,90	59,00	0,52	0,74	0,80	0,82	2,09	3,90	4,92	5,62
9	34,60	35,10	96,80	115,00	0,79	0,85	0,84	0,86	4,87	6,50	6,29	7,24
10	59,00	53,30	38,80	33,60	0,82	0,78	0,80	0,81	5,41	4,50	5,04	5,25

**Tablo 2 : Doppler USG verileri**

**PS: Sistol tepesi akım hızı**

**RI: Rezistif indeks**

**S/D: Sistol diyastol hız oranı**

**Pre: Preoperatif değer**

**Post: Postoperatif değer**

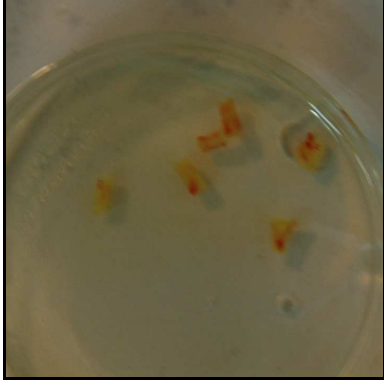
**K: Kontrol grubu**

**Ç: Çalışma grubu**

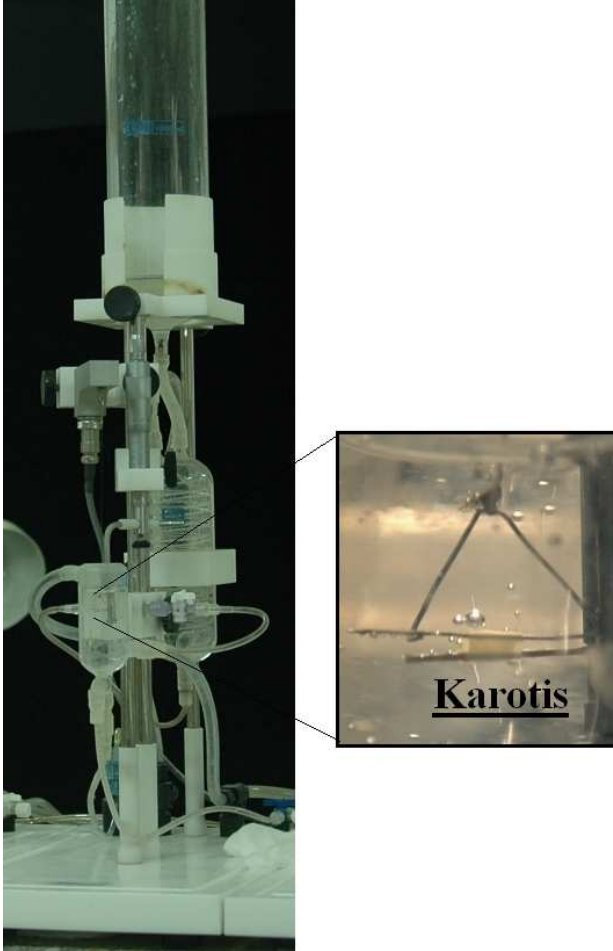
## İn Vitro Çalışma

50 mg/kg intramuskuler Ketamin, 15mg/kg Xylasin ile anestezi sağlandıktan sonra tavşan karotis arterleri ortaya kondu. Atravmatik teknik kullanılarak bilateral karotis arterler segmental olarak eksize edildi ve 4<sup>0</sup>C de krebs solüsyonuna alındı, damar endoteli ve düz kası hasarlanmadan periadventisyal yağ ve bağ dokuları temizlendi ve damarlar kesilerek 4 mm lik halkalara ayrıldı (Resim 12) . Kontrol gurubu olarak ayrılan damar halkaları (n=5) krebs solüsyonunda bekletildi. Birinci çalışma grubu (n=10) %5'e seyreltilmiş safra içerisinde 1 dakika, ikinci çalışma grubu (n=10) %5'e seyreltilmiş safra içinde 5 dakika bekletildi. Ardından halkalar 37<sup>0</sup>C'de krebs solüsyonu içeren 20 ml'lik organ banyolarına 2 gr istirahat gerilimi altında asıldı (Resim 13). Preparatlar istirahat gerilimine gelene kadar her 15dk'da bir 60dk. boyunca yıkandı (organ banyosunda damarın içinde bulunduğu krebs solüsyonu değiştirildi). Maksimal kontraksiyon elde etmek için kümülatif dozlarda ( $10^{-9}$  –  $3 \times 10^{-5}$ M) fenilefrin kullanıldı. Ortamda ki krebs solüsyonu değiştirildi ve bazal gerilim seviyesine dönülmesinin ardından fenilefrin ile submaksimal kontraksiyon (maksimal kontraksiyonun %80'i) sağlandı ve banyoya artan dozlarda asetilkolin ( $10^{-9}$  –  $3 \times 10^{-5}$ M) eklenerek gevşeme yanıtları değerlendirildi. Bazal seviyeye dönülmesinin ardından fenilefrin ile submaksimal kontraksiyon sağlandı ve banyoya artan dozlarda sodyum nitropurissid ( $10^{-9}$  –  $3 \times 10^{-5}$ M) eklenerek gevşeme yanıtları değerlendirildi. Tekrar bazal seviyeye dönülmesini takiben banyoya tek doz KCl (80mM) eklenmesi ile kontraksiyon yanıtları değerlendirildi. Tüm damar segmentlerine aynı standart prosedür uygulandı.

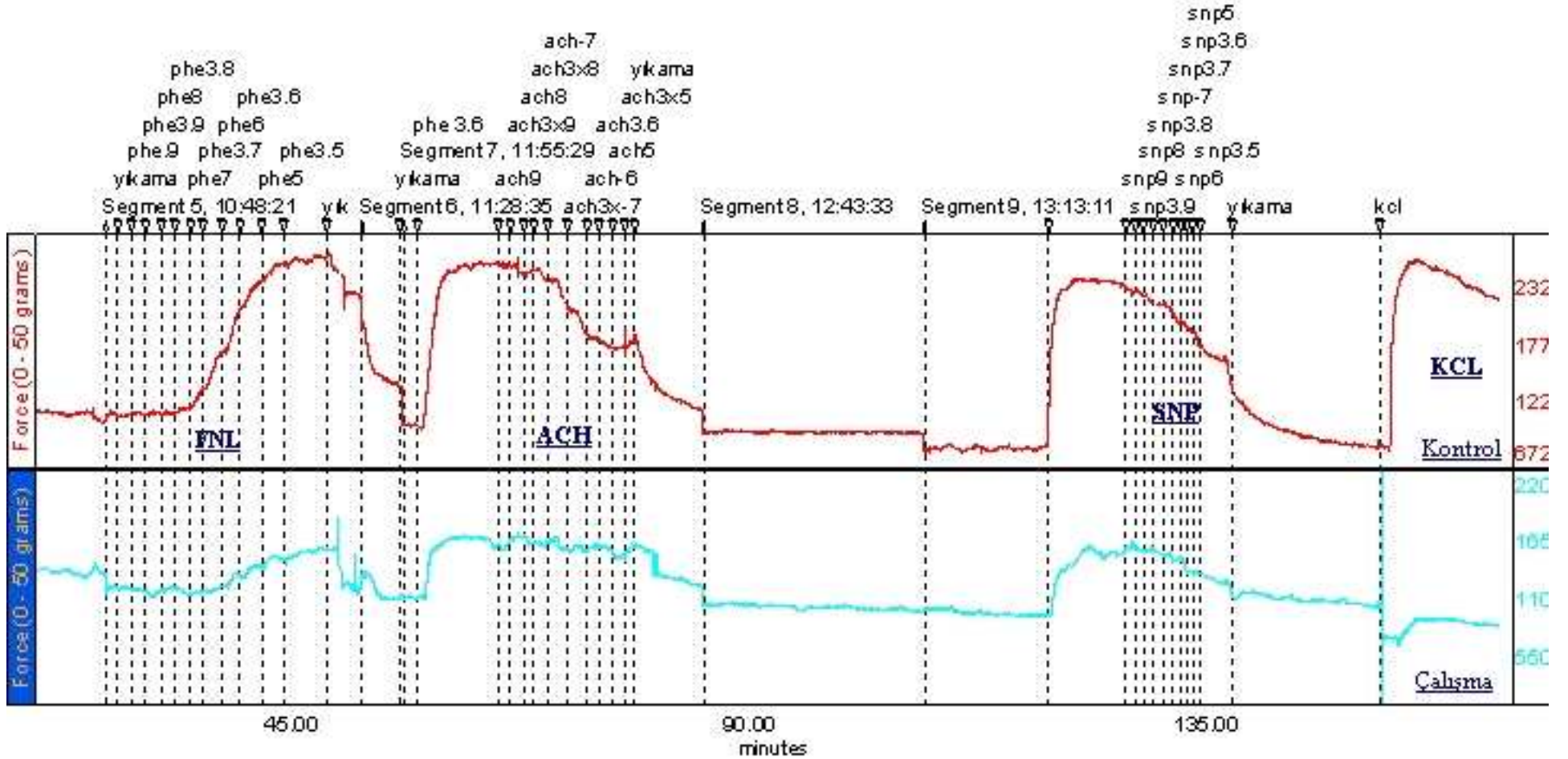
Oluşan gerilim değişiklikleri izometrik güç ileticisi ile (BIOPACT MP35 COMMAT İletişim Ltd., Ankara) bilgisayar ortamında kaydedildi (Tablo 3, Tablo 4) ve aynı program aracılığı ile analizi yapıldı. Grupların pD<sub>2</sub> değerleri hesabı Prism 3.0 (GraphPad Software, A.B.D.) programı ile yapıldı.



**Resim 12 : İn vitro çalışma için 4mm'lik karotis segmentleri. Safrada inkübe edilmesini takiben krebs solüsyonu içerisinde alınmış**

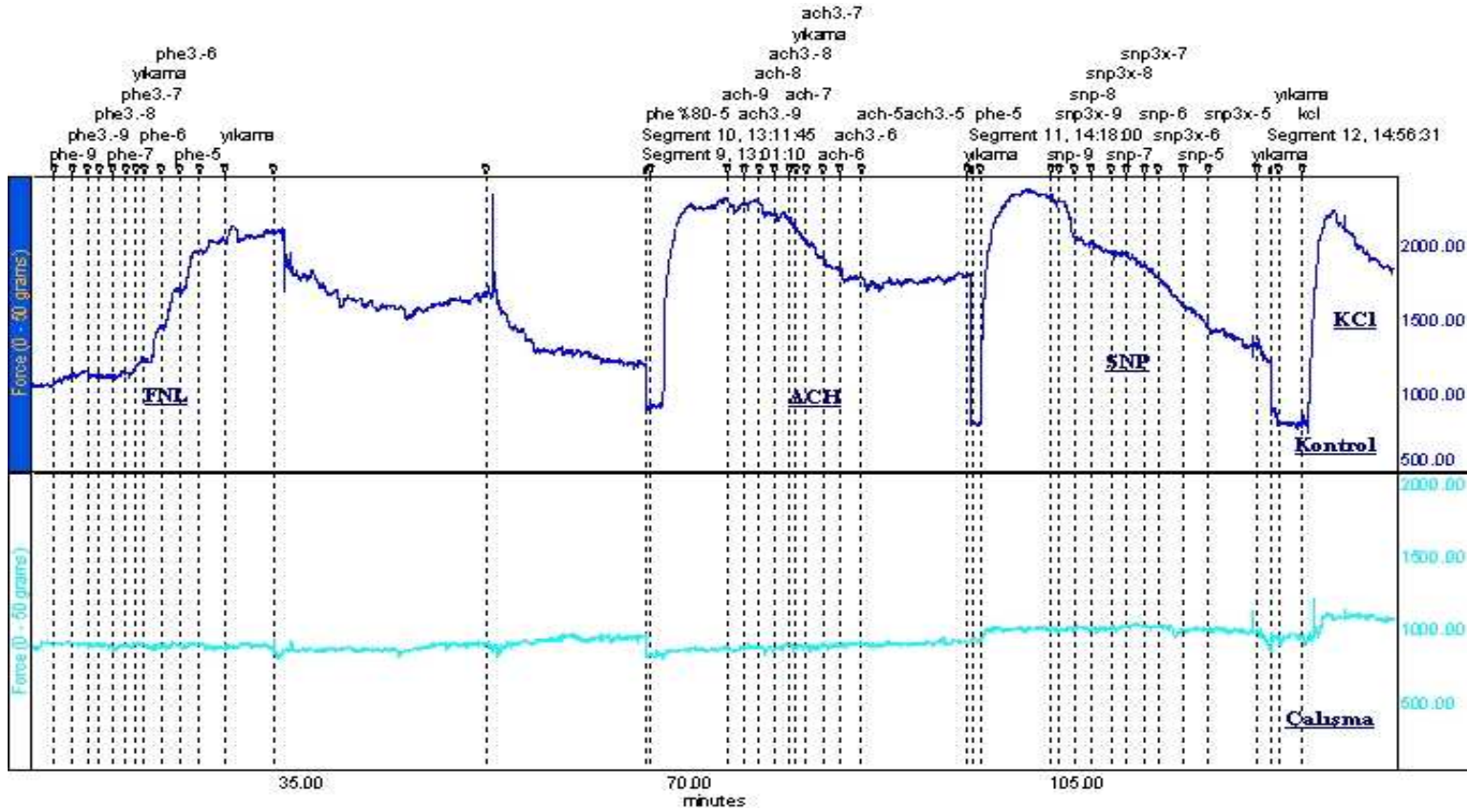


**Resim 13 : Organ banyosu sistemi. Krebs solüsyonu içerisinde 2 gr gerilimde asılmış karotis segmenti**



Tablo 3 : Birinci gruptan bir damar segmenti (%5 safrada 1 dk.) ile kontrol grubundan bir damar segmentinin organ banyosundan elde edilen kasılma ve gevşeme yanıtları. X eksenini zamanı, Y eksenini mg cinsinden kasılma yanıtını göstermektedir.

FNL: Fenilefrin      ACH: Asetilkolin      SNP: Sodyum nitroprusid      KCL: Potasyum klorür



Tablo 4 : ikinci gruptan bir damar segmenti (%5 safrada 5 dk.) ile kontrol grubundan bir damar segmentinin organ banyosundan elde edilen kasılma gevşeme yanıtları. X eksenı zamani, Y eksenı mg cinsinden kasılma yanıtını göstermekte.

FNL: Fenilefrin      ACH: Asetilkolin      SNP: Sodyum nitroprussid      KCL: Potasyum klorür

## **Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme**

### **Histokimyasal değerlendirme**

Alınan örnekler % 10 formalinde tespit edildikten sonra parafin bloklara gömüldü. Bu bloklardan hazırlanan kesitler hematoxilen-eosin ile boyanarak ışık mikroskobu altında değerlendirildi.

### **İmmünohistokimyasal değerlendirme**

Parafine yerleştirilmiş dokulardan 5µm kalınlığında kesitler alındı ve ksilenle deparafinize edildi ve rehidrate edildi. İmmun boyama üretici kılavuzuna (IVIEW™ DAB, BenchMarkXP, Ventana,ABD) uygun olarak otomatik immünohistokimyasal boya kullanılarak yapıldı. Otomatik program antijen bulma basamağını içeriyordu. Endojen peroksidaz aktivitesi 37°C de dört dakika %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanılarak engellendi. Kesitler monoklonal düz kas aktini antikoruyla 1:250 dilüsyonda inkübe edildi. Reaksiyon ürünü 3,3 diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB) kullanılarak ortaya çıkarıldı ve kesitler hematoksilenle boyandı.

### **İstatistiksel Değerlendirme**

İzole organ banyosu çalışmalarından elde edilen tekrarlayan veriler için two-way ANOVA testi yapıldı. Gruplar arası anlamlılık için Posthoc Benferonni testi yapıldı. pD2 değeri için students t testi yapıldı. p<0,05 anlamlı kabul edildi.

Doppler USG incelemesinden elde edilen RLS/D,PS değerleri istatistiksel olarak Wilcoxon Signed Ranks Test ile değerlendirildi. p<0.05 anlamlı kabul edildi. Kontrol grubunda ortaya çıkan vazospazm ise Chi-square test ile değerlendirildi. p<0.05 anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

### İzole Damar Yanıtları

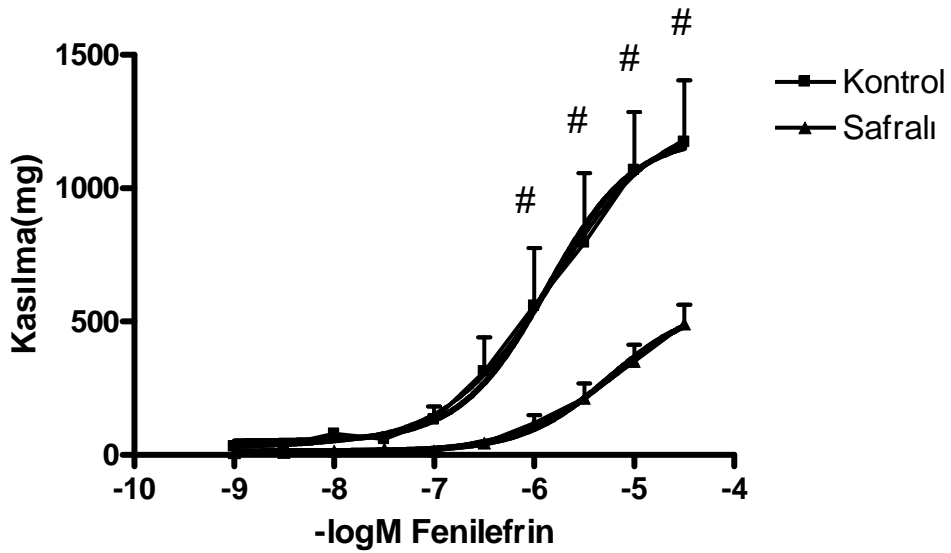
#### Birinci Grup

%5'lik safra solüsyonunda bir dakika bekleyen damar segmentleri. Çalışma ve kontrol grubundan birer örnekten elde edilen ham veri örnekleri tablo 3'te gösterilmiştir.

#### Kasılma yanıtları

##### Fenilefrin kasılma yanıtı

Karotis segmentlerinin fenilefrin ile elde edilen kasılma yanıtlarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %5'lik safra solüsyonunda bir dakika bekletilen grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir ( $P<0.05$ ). (Şekil 3, tablo 5)



Şekil 3 :Fenilefrin kasılma - doz grafiği.

# istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturan dozları göstermekte

FNL	pD2	SEM
Kontrol	5,694	0,248171
Safralı	5,0394	0,210179

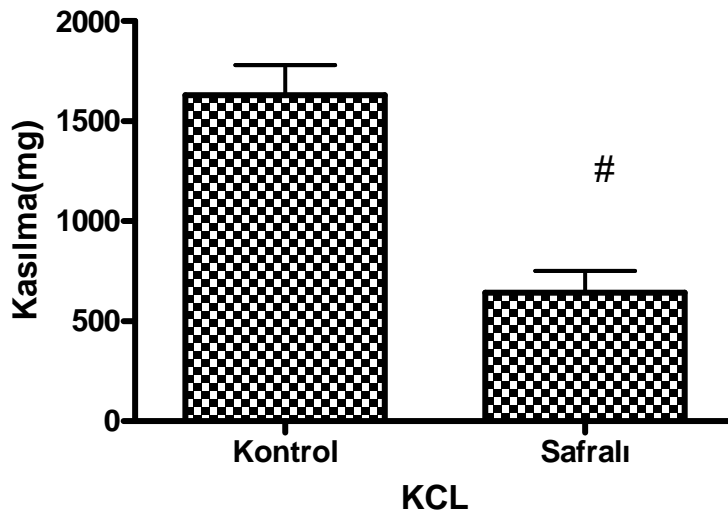
**Tablo 5 : Fenilefrin pD2 tablosu**

**P<0.0001**

**FNL: Fenilefrin SEM: Standart error minör**

### **KCl depolarizasyon yanıtları**

Tek doz KCl depolarizasyonu ile elde edilen kontraktıl yanıtlar kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. %5'lik safra solüsyonunda bir dakika bekletilen grupta kontrol grubuna göre kasılma yanıtında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma olduğu gözlenmiştir (P<0.05). (Şekil 4)



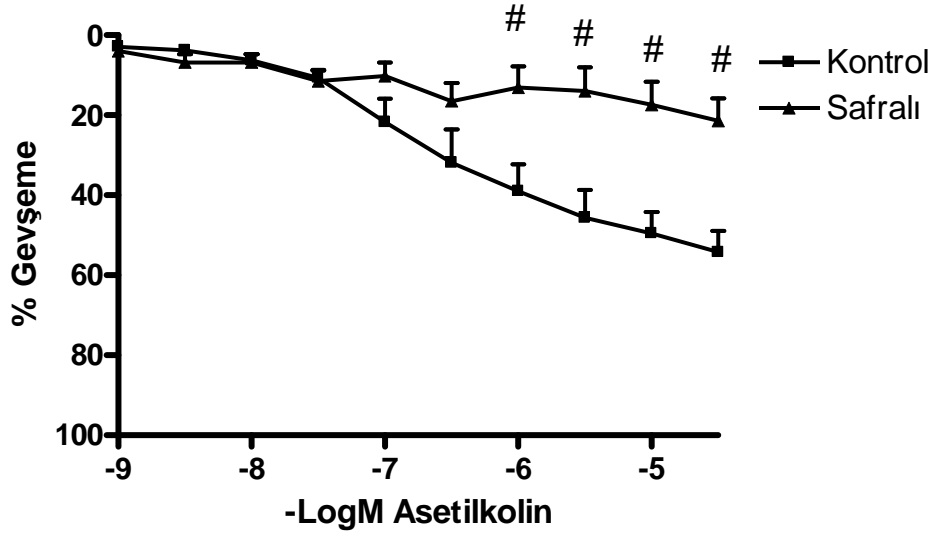
**Şekil 4 : Potasyum klorür kasılma grafiği.**

**# istatistiksel olarak anlamlı farkı gösterir**

## Gevşeme yanıtları

### Asetilkolin

%5'lik safra solüsyonunda 1 dakika bekletilen grupta asetilkolin ile gevşeme yanıtları kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Çalışma grubunda kontrol grubuna göre gevşeme yanıtında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma olduğu gözlenmiştir ( $P<0.05$ ). (Şekil 5, tablo 6)



Şekil 5 : Asetilkolin gevşeme, doz grafiği.

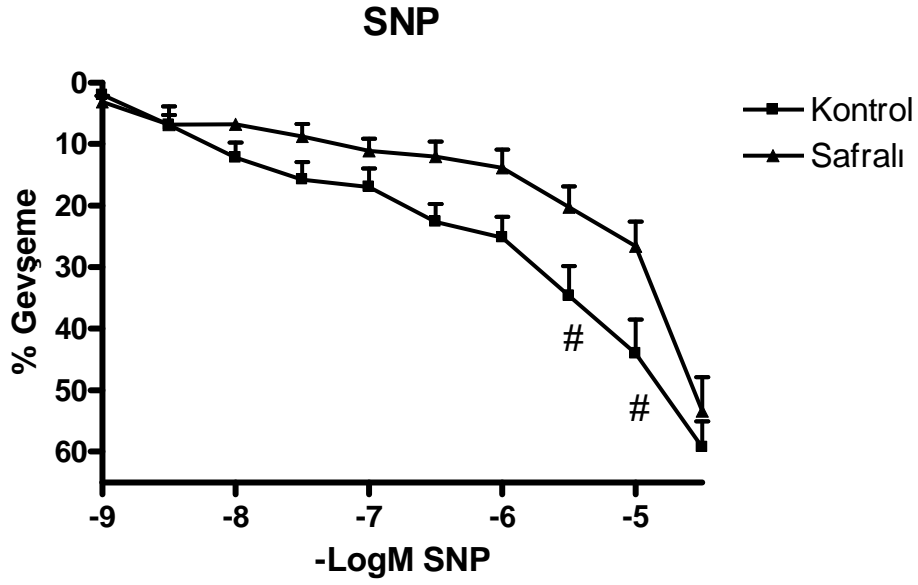
# istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturan dozları göstermekte

SNP	pD2	SEM
Kontrol	5,557	0,2762
Safralı	4,007	0,4126

Tablo 6 : : Sodyum nitropurissid pD2 tablosu  $P<0.0001$

## Sodyum nitroprussid

Sodyum nitroprussid ile elde edilen yanıtlar incelendiğinde, %5'lik safra solüsyonunda bir dakika bekletilen grupta kontrol grubuna göre gevşeme yanıtında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma olduğu gözlenmiştir ( $P < 0.05$ ).



Şekil 6 : Sodyum nitroprussid gevşeme doz grafiği.

# istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturan dozları göstermekte

SNP	pD2	SEM
Kontrol	5,557	0,2762
Safralı	4,007	0,4126

Tablo 7 : Sodyum nitroprussid pD2 tablosu.

$P < 0.0001$

## **İkinci Gurup**

%5'lik safra solüsyonunda beş dakika bekleyen damar segmentleri. Çalışma ve kontrol grubundan birer örnekten elde edilen ham kasılma gevşeme verileri tablo 4'te gösterilmiştir.

Kontrol gruplarında normal yanıtlar alınmasına karşın %5'lik safra solüsyonunda beş dakika bekleyen damar segmentleri kasıcı ve gevşetici ajanlara hiçbir yanıt vermemişlerdir. Bu nedenle ikinci grup damar segmentlerinden herhangi bir kasılma ve gevşeme yanıtı kayıt edilememiştir.

## **Renkli Doppler Ultrasonografi Verileri:**

Doppler incelemesini sonucunda elde edilen sistol tepesi akım hızı (PS), sistol-diyastol oranı (S/D), rezistif indeks (RI) değerleri tablo 2'de verilmiştir.

### **Kontrol ve çalışma grubunda postoperatif akım varlığı**

Çalışma ve kontrol damarları postoperatif 30. dakikada doppler USG ile değerlendirildi. Çalışma grubu olarak seçilen tüm damarlarda (n=10) 30. dakikada akım gözlemlendi. 3. ve 5. deneklerin kontrol karotislerinde postoperatif 30. dakikada akım gösterilemedi, doppler bakısında lümeninde tromboz izlenmedi, anestezinin derinleştirilip boyuna sıcak uygulamasını takiben 30. dakikada (postoperatif 1. saat) tekrar doppler USG ile değerlendirildi. Her iki denekte de kontrol karotislerde akımın normal şekilde başladığı ve çalışma grubunda devam ettiği izlendi. Kontrol grubunda gözlenen bu durum vazospazm olarak değerlendirildi.

Kontrol damarlarından iki tanesinde kan akımını kesecek ölçüde vazospazm olurken %5'lik safralı ortamda anastomozu yapılan çalışma grubunda spazma rastlanmaması istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ).

### **Kontrol ve çalışma gruplarının preoperatif değerlerinin birbiri ile karşılaştırılması**

Sağ ve sol ana karotislerin preoperatif S/D, PS, RI değerleri karşılaştırıldı, sağ ve sol arterler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Verileri grafik olarak gösterilmiştir ( Şekil 7, 8, 9 ).

### **Çalışma ve kontrol gruplarının postoperatif değerlerinin birbiri ile karşılaştırılması**

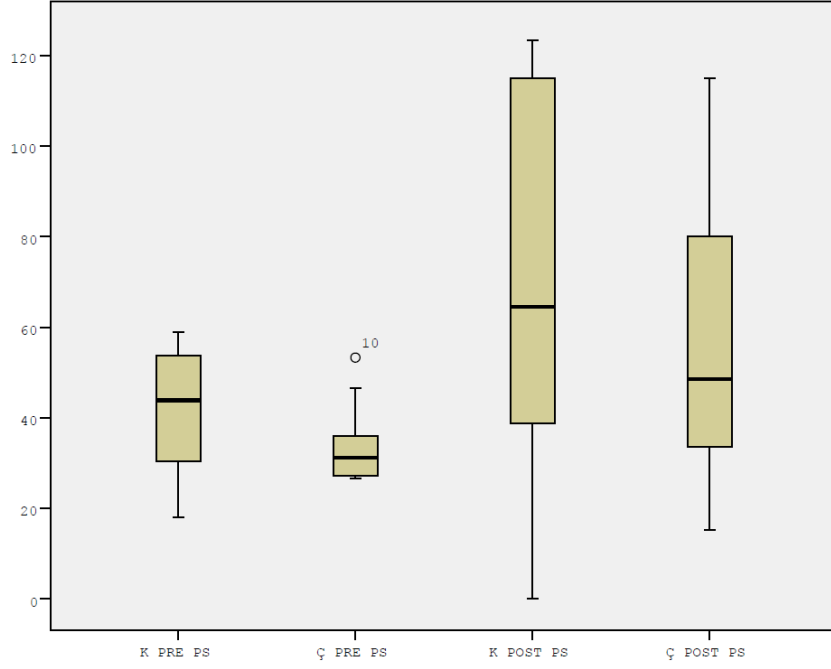
Sağ ve sol ana karotislerin postoperatif S/D, PS, RI değerleri karşılaştırıldı. Sağ ve sol arterler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Verileri grafik olarak gösterilmiştir ( Şekil 7, 8, 9 ).

### **Kontrol grubunun preoperatif ve postoperatif değerlerinin karşılaştırılması**

Kontrol grubunun preoperatif ve postoperatif S/D, PS, RI değerleri karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Verileri grafik olarak gösterilmiştir ( Şekil 7, 8, 9 ).

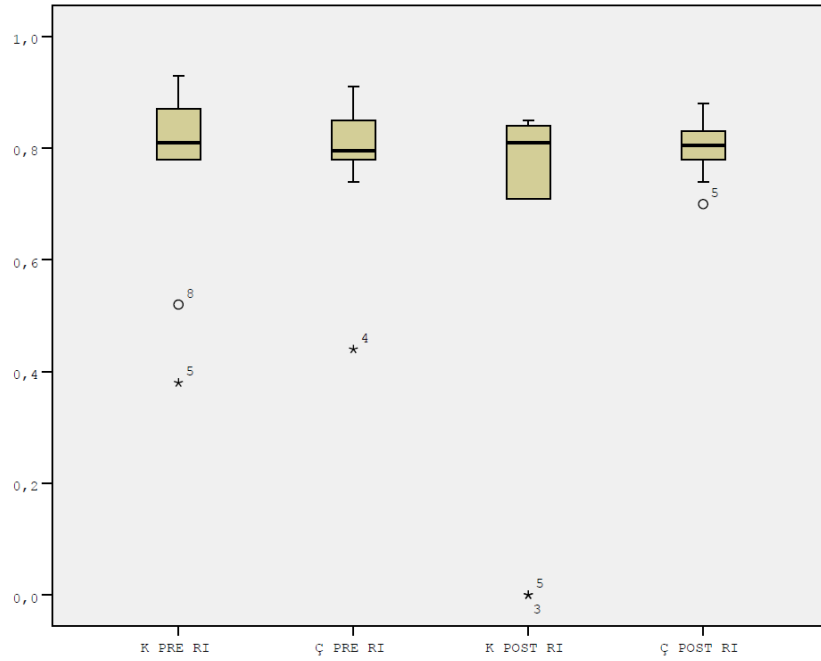
### **Çalışma grubunun preoperatif ve postoperatif değerlerinin karşılaştırılması**

Çalışma grubunun preoperatif ve postoperatif S/D, PS, RI değerleri karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Verileri grafik olarak gösterilmiştir ( Şekil 7, 8, 9 ).



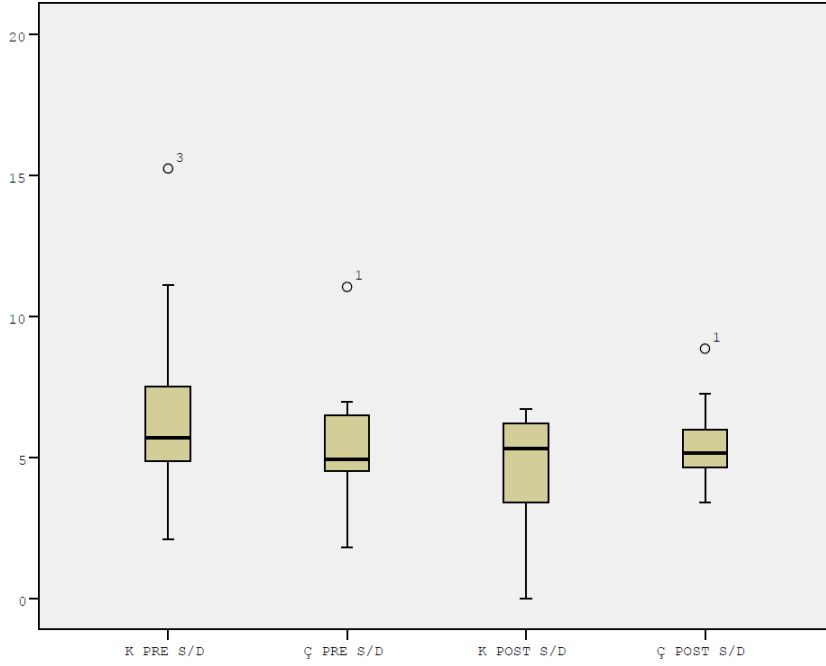
**Şekil 7 : Sistol tepesi akım hızı grafikleri.**

**K: Kontrol, Ç: Çalışma, Pre: Preoperatif, Post: postoperatif, PS: Piksistolik (sistol tepesi) Hız**



**Şekil 8 : Rezistif indeks grafikleri.**

**K: Kontrol, Ç: Çalışma, Pre: Preoperatif, Post: postoperatif, RI: Rezistif indeks**

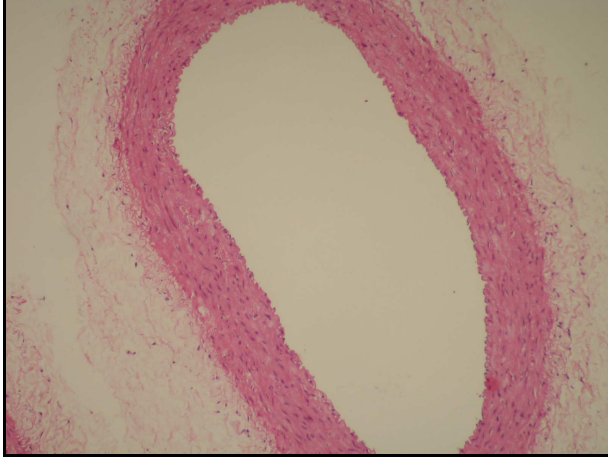


**Şekil 9 : Sistol Diyastol Oranı grafikleri.**

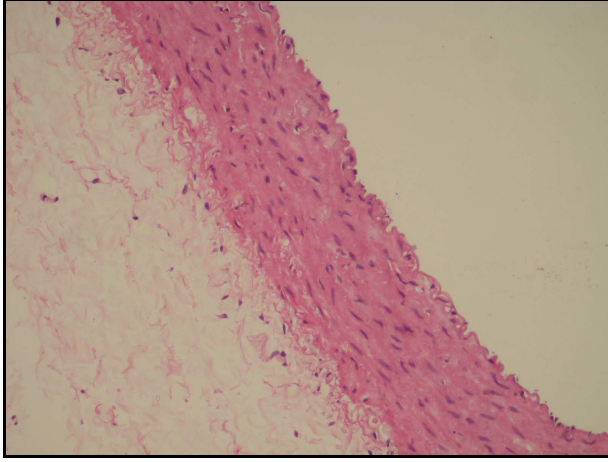
**K: Kontrol, Ç: Çalışma, Pre: Preoperatif, Post: postoperatif, S/D : Sistol diyastol oranı**

## **Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Bulgular**

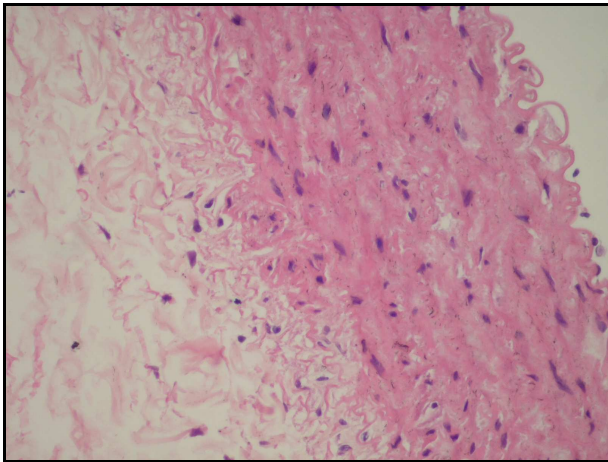
Hematoksilen Eosin ve düz kas aktini ile ayrı ayrı boyanan kontrol, birinci ve ikinci çalışma gruplarına ait damarlar ışık mikroskopunda incelendi. Tüm örneklerde damarda mikroskobik düzeyde bir deformasyon olmadığı izlendi. Endotel devamlılığının bozulmadığı izlendi ( Resim 14 A-B-C ). Düz kas aktini ile boyama sonucunda damar düz kasında yapısal bir deformite olmadığı görüldü ( Resim 15 A-B-C ). Tüm grupların incelenmesi sonucunda; gruplar arasında histokimyasal ve immünohistokimyasal bakılarında bir fark gözlenmedi. Tüm damarlar normal görünümde izlendi.



**Resim 14A**



**Resim 14B**

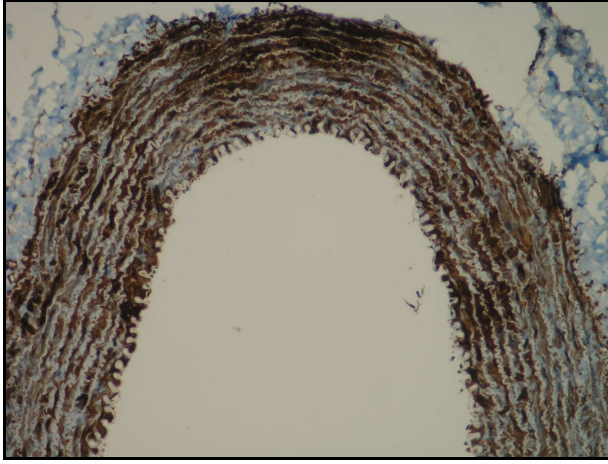


**Resim 14C**

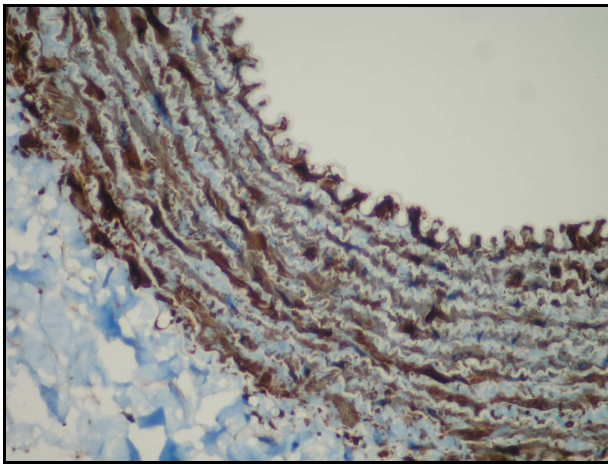
**Resim 14 A-B-C : Hematoksilen ve Eosin ile boyanan üçüncü grup damarların ( %5'lik safrada 5 dk ) görüntüsü. Damarlar normal sınırlarda izlenmekte.**



Resim 15A



Resim 15B



Resim 15C

Resim 15 A-B-C : Düz kas aktini ile boyanan üçüncü grup damarların ( %5'lik safrada 5 dk ) görüntüsü. Kahverengi bantlar damar duvarında bulunan düz kas liflerini göstermekte.

## TARTIŞMA

Karaciğer transplantasyonu 1980'li yıllarda son dönem karaciğer yetmezlikli hastaların tedavisinde tek efektif tedavi olarak ortaya çıkmıştır ve günümüzde dünyaca kabul edilmiş hayat kurtarıcı bir prosedürdür. Canlıdan canlıya karaciğer transplantasyonu kadavradan elde edilen karaciğer greftlerinin kısıtlılığı nedeni ile önemli bir prosedür olmuştur<sup>44</sup> ve hepatic arterin mikrovasküler rekonstrüksiyonu işlemin önemli bir basamağıdır<sup>48</sup>.

Hepatic arter anastomozu karaciğer naklinin en zor ve teknik aşamalarından biridir. Mikrovasküler cerrahi tekniklere uygun olarak yapılan bu işlem esnasında ortamda bulunan safra, damara ve damar endoteline temas eder. Bu durum hepatic arterin mikrovasküler rekonstrüksiyonunda sıklıkla karşılaşılan ama mikrovasküler cerrahi açısından sıra dışı bir durumdur. Vena kava ve vena porta anastomozunun yapılmasını takiben safra üretilmeye başlar, her zaman olmasa da çoğunlukla hepatic arterin üzerine doğru akar.

Damar duvarı ve damar endotelinin pasif bariyerden çok vasküler tonus yanıtından pıhtılaşma kaskatına kadar bir çok olayda aktif rol oynadığı düşünülürse<sup>18,19,20</sup> safranin etkisinin anlaşılması daha da önem kazanmaktadır. Literatürde safra ve mikrovasküler cerrahiye ilişkin bir çalışma bulunamamıştır.

Vazospazm tam olarak anlaşılammış kompleks etkileşim serisidir. Mikrovasküler cerrahide kan akımı azalmasından ve sonraki doku iskemisinden sorumlu olabilir<sup>45</sup>. Vazospazm oluşumunda lokal ve genel faktörler suçlanmaktadır; vasküler duvar gerilimine miyojenik yanıt, sıcaklık, pH, kan ekstrevasyonu söylenebilir. Lokal endotelial hücre hasarı, endotelial vazodilatör ve vazokonstriktörler arası dengelerin bozulması neden olabilir. Lokal yada sistematik nörojenik faktörlerinde vazospazmı indüklediğine inanılmaktadır<sup>45</sup>.

Tavşan karotis arteri mikrovasküler cerrahi için çok iyi bir trombojenik modeldir, ayrıca mikrovasküler anastomozda çeşitli ajanlar ile vasküler tonus değişimlerini değerlendirmek için ideal bir modeldir<sup>45,46</sup>.

Safranin içerisinde su %85.92, safra asitleri %9.14, solidler %14.8, musin ve pigmentler %2.98, kolesterol %0.26, yağ asitleri %0.32, inorganik tuzlar % 0.65 oranında bulunmaktadır. Özgül ağırlığı 1.04, pH'ı ise 6.9-7.7 arasında değişmektedir<sup>47</sup>.

Araştırmamızda tavşan karotis preparatları ile gerçekleştirilen organ banyosu çalışmalarında safrada inkübe edilmiş damar segmentleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; %5'lik safrada, 1 dakika inkübasyon (birinci grup) yapılan damarların yanıtları, kontrol grubuna göre fenilefrin ve KCl kasılma yanıtlarında, asetilkolin ve sodyum nitroprussid gevşeme yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır. %5'lik safrada, 5 dakika inkübasyon (ikinci grup) yapılan damarlarda, kasıcı ve gevşetici ajanlara karşı hiçbir yanıt alınmamıştır (verileri gösterilmemiştir).

Fenilefrin  $\alpha_1$  reseptör agonistidir.  $Ca^{+2}$  kanalları yolu ile hücre içine kalsiyum girişini aktive eder ve bir inozitol-1,4,5-trifosfat ( $IP_3$ ) duyarlı mekanizma ile sarkoplazmik retikulumdan hücre içine kasılmayı başlatacak olan kalsiyum salıverilmesini uyarır<sup>49</sup>. KCl damar düz kası için depolarizan bir ajandır ve sarkolemma membranı üzerinde uzanan voltaj bağımlı  $Ca^{+2}$  kanallarının açılmasını sağlar. Kanal açılması ile hücre içerisine  $Ca^{+2}$  girişi gerçekleşir, bu da kontraktıl proteinleri aktive ederek kasılmayı başlatır. Kalsiyum girişi,  $IP_3$  duyarlı olmayan bir mekanizma ile sarkoplazmik retikulumdan hücre içine kalsiyum salıverilmesini tetikler<sup>50</sup>. %5'lik safra ile 1 dakika inkübasyon ile fenilefrin yanıtının azalması, safranın  $\alpha_1$  reseptör duyarlılığında bir azalma veya reseptör sonrası olaylarda bir bozulmaya neden olabileceğini göstermektedir. KCl yanıtının azalması ise düz kas hücresinin ya da hücre içi kontraktıl elemanların etkilenmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Sodyum nitroprussid endotelden bağımsız direk etkili bir düz kas gevşeticisidir. Dokuda katalizlenen bir indirgenme reaksiyonu ile yapısında bulunan NO (nitrik oksit) açığa çıkar. Oluşan NO, direk damar düz kas intraselüler guanilaz siklazın sitozolik fraksiyonunu aktive eder. Sonuçta endojen vazodilatör olan cGMP (siklik guanozin monofosfat) artışına neden olur ve vazodilatasyon ortaya çıkar<sup>51,52</sup>. Asetilkolin indirek etki ile vazodilatasyon oluşturmaktadır. Endotelde bulunan muskarinik reseptörlere bağlanarak eNOS (endotelial nitrik oksit sentetaz) tarafından sentezlenen NO'nun salıverilmesine neden olur. Hızla damar düz kasına giren NO, guanilaz siklazı aktive ederek cGMP'yi artırır ve gevşeme olur<sup>25,51</sup>. Endotel aracılı ve direk düz kas aracılı gevşeme yanıtlarının beraber bozulması guanilaz siklaz aktivitesinde bir azalma veya cGMP yapımında bir bozulma veya

hedef doku duyarlılığında bir azalmanın neden olabileceğini düşündürebilir.

%5'lik safrada, 5 dakika inkübasyon (ikinci grup) yapılan damarlar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, kasıcı ve gevşetici ajanlara karşı hiçbir yanıt vermemesi meydana gelen hasarın derecesinin safraya maruziyet süresi ile orantılı olarak arttığını gösterebilir.

Safranın hem kasılma, hem de gevşeme yanıtlarını bozması vasküler yanıt duyarlılığında genel bir azalmaya neden olduğunu düşündürmektedir. Tüm bu yanıtlar değerlendirildiğinde damar düz kasının safradan etkilendiği kesin olarak söylenebilir. Fakat endotelin durumunu ve damarda meydana gelen değişikliğin mekanizmasını tam olarak ortaya koymak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

İn vivo kan akımını değerlendirmede kullanılan yöntemlerden biri de renkli doppler ultrasonografi tekniğidir. Bu teknikte hız ölçümleri prob ile kan damarı arasında bulunan açının değişiminden etkilenir. Bu etkilenmeyi ortadan kaldırmak için doppler ölçümlerinde çeşitli indeksler tanımlanmıştır. Rezistif indeks, sistol-diyastol oranı bunların başında gelmektedir. Bu ölçümler oran oldukları için açı değişimlerinden etkilenmezler ve birimleri yoktur. Bu ölçümlerde sistolün tepe yaptığı noktadaki hız ve diyastol sonu hız değerleri temel alınan noktalardır. Sistol tepesindeki akım hızı darlıkların kıymetli bir göstergesidir. Damar çapında bir daralma meydana geldiği zaman yani akım önündeki direnç arttığında akım hızında bir artış oluşmaktadır. Buna bağlı olarak rezistif indeks (RI), sistol diyastol oranı (S/D) ve sistol tepesi akım hızı (PS) artar<sup>40,41,43,53</sup>.

Çalışmanın in vivo basamağında tavşanlarda sağ ve sol ana karotislere preoperatif ve postoperatif doppler USG yapıldı.

Kontrol ve çalışma gruplarının preoperatif, değerleri birbiri ile karşılaştırıldığında, sağ ve sol ana karotislerin preoperatif S/D, PS ve RI değerleri incelendi, sağ ve sol arterler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Bu veri bize preoperatif çalışma ve kontrol damarları arasında deneklere bağlı farklılıklar olmadığını göstermektedir.

Kontrol grubunun preoperatif ve postoperatif değerlerinin karşılaştırılması sonucunda preoperatif ve postoperatif S/D, PS ve RI değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Bu sonuçlar ile standart mikrovasküler cerrahi

prosedürünü kullanarak yapılan anastomozlarda akıma karşı anlamlı bir direnç oluşmadığı sonucuna varılabilir.

Çalışma grubunun preoperatif ve postoperatif değerlerinin karşılaştırılması sonucunda preoperatif ve postoperatif S/D, PS ve RI değerleri arasında bir fark bulunmadı. Kontrol grubundan farklı olarak safranin kullanıldığı çalışma grubundan elde edilen bu veriler, kontrol grubundan elde edilen verilerin ışığında bize safranin damar üzerinde kasıcı ya da gevşetici bir etki yapmadığını göstermektedir.

Çalışma ve kontrol gruplarının postoperatif değerlerinin birbiri ile karşılaştırılması sonucunda sağ ve sol ana karotislerin postoperatif S/D, PS ve RI değerleri arasında bir fark bulunmadı. Bu sonuç daha önceki doppler USG verilerini destekler niteliktedir. İki grup arasında bulunan ve bizim incelediğimiz tek değişken olan safranin istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmaması kasıcı ya da gevşetici bir etki yapmadığı sonucunu destekler.

Kontrol ve çalışma grubunda postoperatif akım varlığı incelendi. Çalışma ve kontrol damarları postoperatif 30. dakikada doppler USG ile değerlendirildi. Çalışma grubu olarak seçilen tüm damarlarda (n=10) 30. dakikada akım gözlemlendi. 3. ve 5. deneklerin kontrol karotislerinde postoperatif 30. dakikada akım gösterilemedi, doppler bakısında lümeninde tromboz izlenmedi, anestezinin derinleştirilip boyuna sıcak uygulamasını takiben 30. dakikada (post operatif 1. saat) tekrar doppler USG ile değerlendirildi. Her iki denekte de kontrol karotislerde akımın normal şekilde başladığı ve çalışma grubunda devam ettiği izlendi. Söz konusu iki denekte postoperatif dönemde doppler USG yapılırken anestezinin yüzeyselleşmesi ile işleme bir reaksiyon meydana gelmiştir. Bu durum postoperatif dönemde tekrarlanan doppler USG verileri ile değerlendirildiğinde ağrının indüklediği bir vazospazm olarak düşünülebilir.

Kontrol damarlarından iki tanesinde kan akımını kesecek ölçüde vazospazm olurken %5'lik safralı ortamda anastomozu yapılan çalışma grubunda vazospazma rastlanmaması istatistiksel olarak anlamlı olarak bulundu. Buna ek olarak tablo 2'de görüleceği üzere çalışma grubunda preoperatif ve postoperatif değerlerde çok ciddi bir değişiklik olmaması dikkati çeken diğer bir nokta olmuştur. Çalışma grubunda kontrolden farklı olarak vazospazm izlenmemesi safraya maruz kalmış damarın kasıcı ajanlara yanıt veremediğini gösterebilir.

İn vitro çalışmada kullanılan kontrol ve safra ile inkübe edilmiş damar segmentlerinin histopatolojik ve immünohistokimyasal incelenmesinin ardından her üç grup arasında fark görülmedi. Tüm damar segmentlerinin normal görünümde olması safranın damarda morfolojik olarak fark edilemeyen, organel düzeyinde reseptör veya reseptör sonrası hücre içi olaylarda değişiklikler veya hedef doku duyarlılığında bir azalmaya neden olabileceğini gösterir.

Kliniğimizde daha önce yapılan bir çalışmada safranın anastomoza etkisi sıçan femoral arter modelinde araştırılmıştır ve safranın damar için nekrozitan bir madde olmadığı ortaya konmuştur. Bu çalışmada postoperatif 1. haftada damar segmentleri histopatolojik olarak incelenmişti. Bu çalışmanın sonucunda her iki grupta (kontrol ve çalışma) tüm anastomozlarda endotel devamlılığı mevcuttur. Her iki grupta yabancı cisim reaksiyonu görülmüştür. Çalışma grubunda ise kontrol grubundan farklı olarak artmış perivasküler PMNL infiltrasyonu görülmüştür. Her iki grupta da fibrinoid nekroz gözlenmemiştir<sup>55</sup>.

İn vivo çalışmanın sonucunda safranın kasıcı veya gevşetici bir etkisinin olmadığı bunun yanında arterin vazokonstriktif ajanlara karşı yanıtını engellediğini düşündürmüştür. İn vitro çalışma ise safraya kısa süreli maruziyetin (1 dakika) arterin kasılma ve gevşeme yanıtlarını azalttığı, uzun süreli maruziyetin (5 dakika) ise arterin kasıcı ve gevşetici ajanlara karşı yanıtını tamamen bloke ettiği izlenmiştir. İn vitro çalışılan damar segmentlerinde yapılan histopatolojik ve immünohistokimyasal analizde damarlarda morfolojik bir değişikliğe rastlanmamıştır.

İn vivo ve in vitro çalışmanın verileri birlikte değerlendirildiğinde organ banyosunda incelenen ikinci grup (%5'lik safrada, 5 dk. inkübasyon) damar segmentlerinde kasıcı ajanlara karşı hiç yanıt alınamaması ve mikrocerrahi uygulanan 10 tavşanın 2 tanesinin kontrol grubunda vazospazm olurken safra kullanılan çalışma grubunda vazospazma rastlanmaması birbirini destekleyen bulgulardır. Bütün bulguların ışığı altında damar segmentlerinin histopatolojik olarak normal yapıda olması safranın etkisiyle, tavşan karotis damar segmentinde kasıcı ve gevşetici ajanlara olan yanıtlardaki kaybın nedeninin damar duyarlılığındaki genel bir bozulma olabileceğini düşündürür.

## SONUÇ

Karaciğer nakli son dönem karaciğer yetmezlikli hastaların tedavisinde önemli bir yer almaktadır. Nakil işlemi için canlı donör kullanılacak ise hepatik arterin mikrovasküler rekonstrüksiyonu gerekir ve nakil prosedürünün en teknik işlemlerinden biridir. Bu işlemi standart mikrocerrahi prosedürlerinden ayıran önemli bir nokta anastomozun çoğu zaman safralı ortamda yapılmasıdır.

İn vivo ve in vitro çalışmanın verileri birlikte değerlendirecek olursak; organ banyosunda incelenen birinci grupta kasılma ve gevşeme yanıtlarında azalma meydana gelmiştir, ikinci grup damar segmentlerinde kasıcı ajanlara karşı hiç yanıt alınamamıştır. Mikrocerrahi uygulanan 10 tavşanın 2 tanesinin kontrol grubunda vazospazm olurken safra kullanılan çalışma grubunda vazospazma rastlanmamıştır, çalışma ve kontrol gruplarında akım indeksleri farklı bulunmamıştır. İn vitro çalışılan damarların histokimyasal ve immünohistokimyasal incelemesinde kontrol grubu ile diğer iki grup damar arasında morfolojik bir değişiklik tespit edilememiştir.

Birinci çalışma grubunda kasıcı ve gevşetici ajanlara karşı oluşan yanıtlarda zayıflama düz kas hücresinde kesin olarak bir hasar olduğunu göstermektedir bunun yanında da endotel hücresinin etkilenmediğini söylemek zordur. Birinci grupta azalmış yanıt varken ikinci grupta yanıt alınamaması safraya maruziyet süresinin hasarın miktarını artırdığı sonucuna götürmektedir. İkinci grup damar segmentlerinde kasıcı ajanlara karşı hiç yanıt alınamaması ve mikrocerrahi uygulanan 10 tavşanın 2 tanesinin kontrol grubunda vazospazm olurken safra kullanılan çalışma grubunda vazospazma rastlanmaması birbirini destekleyen bulgulardır ve safranın vazospazmdan koruyucu bir etki oluşturduğunu gösterirler. Doppler USG verilerinde kontrol ve çalışma damarlarının pre-postoperatif akım indeksleri arasında fark bulunmaması safranın kendisinin kasıcı ya da gevşetici bir etki oluşturmadığını göstermektedir. Histokimyasal ve immünohistokimyasal incelemenin normal sınırlarda damar göstermesi meydana gelen hasarın reseptör, hücre içi haberci, ya da end organ düzeyinde olabileceğini düşündürmektedir.

Safranın damar üzerinde meydana getirdiği değişikliğin yerini ve mekanizmasını ortaya koymak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu açıktır. Bu veriler ışığında safranın damarı vazospazmdan koruyarak mikrovasküler cerrahi için bir avantaj yarattığı söylenebilir.

## ÖZET

Son dönem karaciğer yetmezliği olan hastaların tedavisinde karaciğer nakli tüm dünyada kabul gören bir yöntem halini almıştır. Canlıdan canlıya başarılı bir karaciğer nakli için hepatik arter rekonstrüksiyonu şarttır ve nakil prosedürünün en teknik işlemlerinden biridir. Vena kava ve vena porta anastomozunun yapılmasını takiben safra üretilmeye başlar, her zaman olmasa da çoğunlukla hepatik arterin üzerine doğru akar.

Damar duvarı ve endotelin pasif bariyerden çok vasküler tonus değişikliğinden pıhtılaşma kaskatına kadar birçok olayda aktif rol oynadığı düşünülürse safranın damar duvarı ve endoteli üzerine olan etkisinin anlaşılması daha da önem kazanmaktadır.

Safranın arter tonusu üzerine olan etkisini anlamak amacı ile yapılan bu çalışma in vivo ve in vitro olmak üzere iki parçadan oluşmaktadır.

İn vivo çalışma mikrocerrahi basamağını oluşturmaktadır. Tavşanın her iki ana karotis arteri; birisi kontrol diğeri çalışma grubu olarak kullanıldı. Her iki ana karotise damarların mikro makas ile kesilmesini takiben ‘çalışma grubu safralı ortamda olmak üzere’ standart mikrovasküler anastomoz yapıldı. Renkli doppler ultrasonografi kullanılarak preoperatif ve postoperatif kan akım indeksleri ölçüldü.

İn vitro çalışma organ banyosu basamağını oluşturmaktadır. Bilateral ana karotisler alınarak 4mm’lik halkalar şeklinde kesildi, birinci çalışma grubu %5’lik safralı krebs solüsyonunda 1 dk. bekletildi, ikinci çalışma grubu %5’lik safralı krebs solüsyonunda 5 dk. ve kontrol grubu krebs solüsyonunda bekletilerek organ banyosu sisteminde kasıcı ve gevşetici ajanlara karşı cevapları incelendi. İnceleme sonunda kullanılan parçalara histokimyasal ve immünohistokimyasal inceleme yapıldı.

İn vivo çalışmanın sonucunda kontrol ve çalışma damarlarında preoperatif, postoperatif akımları arasında fark bulunamamıştır. Bunun yanında postoperatif doppler incelemesi esnasında iki adet kontrol damarında vazospazm (akım geçici bir süre izlenemedi) olmasına karşın çalışma grubunda hiç vazospazm olmaması anlamlı bulundu.

İn vitro çalışmada tavşan karotis preparatları ile gerçekleştirilen organ

banyosu çalışmalarında safrada inkübe edilmiş damar segmentleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; Birinci grupta (%5 safrada 1 dk. inkübasyon) kontrol grubuna göre fenilefrin ve KCl kasılma yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma, asetilkolin ve sodyum nitropurissid gevşeme yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı bir kayıp saptanmıştır. İkinci grupta ise (%5 safrada 5 dk. inkübasyon) kasıcı ve gevşetici ajanlara karşı hiçbir yanıt alınamamıştır.

İn vitro çalışılan damar segmentlerinde yapılan histopatolojik ve immünohistokimyasal analizde damarlarda morfolojik bir değişikliğe rastlanmamıştır.

Birinci çalışma grubunda kasıcı ve gevşetici ajanlara karşı oluşan yanıtlarda zayıflama, ikinci grupta ise bu yanıtlarda kayıp, düz kas hücrelerinde kesin, endotelde şüpheli bir hasar olduğunu ve safraya maruziyet süresinin hasarın miktarını artırdığı sonucunu doğurmaktadır. İkinci grup damar segmentlerinde kasıcı ajanlara karşı hiç yanıt alınmaması ve mikrocerrahi uygulanan 10 tavşanın 2 tanesinin kontrol grubunda vazospazm olurken safra kullanılan çalışma grubunda vazospazma rastlanmaması birbirini destekleyen bulgulardır ve safranın vazospazmdan koruyucu bir etki oluşturduğunu gösterirler. Doppler USG verilerinde kontrol ve çalışma damarları pre-postoperatif akım indeksleri arasında fark bulunmaması safranın kendisinin kasıcı ya da gevşetici bir etki oluşturmadığını göstermektedir. Histokimyasal ve immünohistokimyasal incelemenin normal sınırlarda damar göstermesi meydana gelen hasarın reseptör, hücre içi haberci, ya da end organ düzeyinde olabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Mikrocerrahi, safra, arter yanıtı

## KAYNAKLAR

- 1 Mehmet Bayramiçli. Deneysel mikrocerrahi, temel araştırma , doku ve organ nakli modelleri. 1.baskı Mayıs 2005; s.4-7.
- 2 Carrel A. The operative technique of vascular anastomosis and transplantation of organs. Lyon Med. 98: 859, 1902.
- 3 Carrel A. Guthrie C. C. Anastomosis of blood vessels by the patch method and transplantation of the kidney. JAMA. 47: 1648, 1906b.
- 4 Jacobson J. H, Suarez E. L. Microsurgery in anatomosis of small vessels. Surg Forum. 11: 243, 1960.
- 5 Chen C. W. Chien Y. C. PAo Y. S. Salvage of the forearm following complete traumatic amputation. Report of a case. Chin Med J. 82: 632, 1963
- 6 Seidenberg B, Hurwitt Es. Immediate reconstruction of the cervical esophagus by a revascularized isolated jejunal segment. Surg Forum. 1958;9:413-6.
- 7 Broelsch CE, Whittington PF, Emond JC, et al. Liver transplantation in children from living related donors: surgical techniques and results. Ann Surg. 1991;214:428-437
- 8 Broelsch CE, Whittington PF, Emond JC, Heffron TG, Thistlethwaite JR, Stewens L, Piper J, Whittington SH, Lichtor JL. Liver transplantation in children from living related donor. Ann Surg 1991;21:428-439
- 9 Starlz TE,Porter KA, Putnam CW, Schroter GP, Halgrimson CG, Weil R III, Hoelscher M, Reid HA. Orthotopic liver transplantation inninety-three patients. Surg Gynecol Obstet 1976;142:487-505
- 10 Rela M, Muiesan P, Bhatnagar V, Baker A, Mowat AP, Mieli- Vergani G, Karani J, Williams R, Heaton ND. Hepatic artery thrombosis after liver transplantation in children under 5 years of age. Transplantation 1996;61.1355-1357

- 11 Mori K, Nagata I, Yamagata S, Sasaki H, Nishizawa F, Takada Y, Moriyasu F, Tanaka K, Yamaoka Y, Kumada K, Kikuchi H, Ozawa K. The introduction of microvascular surgery to hepatic artery reconstruction in living- donor liver transplantation- its surgical advantages compared with conventional procedures. *Transplantation* 1992;54:263-268
- 12 Inomoto T, Nishizawa F, Sasaki H, Terajima H, Shirakata Y, Miyamoto S, Nagata I, Fujimoto M, Moriyasu F, Tanaka K, Yamaoka Y. Experiences of 120 microsurgical reconstructions of hepatic artery in living relater liver transplantation. *Surgery* 1996;119:20-26
- 13 Uchiyama H, Hashimoto K, Hiroshige S, Harada N, Soejima Y, Nishizaki T, Shimada M, Suehiro T. Hepatic artery reconstruction in living donor liver transplantation:review of its techniques and complications. *Surgery* 2002;131:200-204
- 14 Gottlieb AI, Langille BL, Wong MKK, Kim DW. Structure and function of the endothelial cytoskeleton. *Lab Invest*, 65: 123-137, 1991.
- 15 Born GVR, Schwartz CJ. *Vascular endothelium: Physiology Pathology and Therapeutic Opportunities*. Stuttgart, Schattauer, 1977.
- 16 Camilleri JP, Berr JN, Fiessinger JB. *Endotelial and smooth cell*. London, Springer-Verlag, 1989.
- 17 Alexander JS, Hechtman HB, Shepro D. Phalloidin enhances endothelial barrier function and reduces inflammatory permeability in vitro. *Microvasc Res* 35: 308-15,1988
- 18 Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncedo S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327:524-26, 1987.
- 19 Gardiner SM, Compton AM, Benett T, Palmer RMJ, Mocado S. Regional haemodynamk changes during oral ingestion of N-monomethyl-L-arginin methyl ester in conscious Brattleboro rats. *Br J Pharmacol* 101:10-12, 1990.

- 20 Pahl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension* 8:27-44,1986.
- 21 Emre M, Şan M. Endoteldeki iyon kanalları ve işlevleri. *Erciyes Tıp dergisi* 2004;26(4), 168-193
- 22 Stemerman MB, Colton C, Morell E. Perturbations of the endothelium. In *Progress in Hemostasis and Thrombosis* Ed: T.H.Spact, 289-324, 1984.
- 23 Schini VB, Vanhoutte PM. Endothelium derived vasoactive factors. In *thrombosis and hemorrhage*. Ed: J Loscal 20, I. Schafer Blackwell Scientific Publications, oxford349-367, 1994.
- 24 Taylor SG, Weston AH. Endothelium derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends Pharmacol Sci*, 91 : 272-274, 1988.
- 25 Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288:273-376, 1980.
- 26 Furchgott RF. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ. Res.* 53:557-73, 1983.
- 27 Yanagisawa M, Kurihara S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 322:411-5, 1989.
- 28 Wenzel RR, Noll G, Lüscher TF. Endothelin receptor antagonists inhibit endothelia in human skin microcirculation. *Hypertension* 23: 581-6,1994.
- 29 Radovski MW, Palmer RMJ, Moncada S. The anti aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 1987;92:693-6.
- 30 Radovski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987; 2:1057-8.
- 31 Kalm M, Schrader J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ Res* 1990;66:1561-75.

- 32 Pearson PJ, Evora PRB, Scheaf HV. Bioassay of EDRF from internal mammary arters: implications for early and late bypass greft patancy. *Ann Thoruc Surg.* 1992; 54:1078-84
- 33 Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 791-804.
- 34 Ayşe Parlar. Sirolimusun dammar endotel hücre fonksiyonu ve serum homosistein, kolesterol, trigliserid düzeylerine etkileri. EÜTF Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Uzmanlık tezi 2007.
- 35 Nickel T, Schlichting CL, Weis M. Drugs modulating endothelial function after transpantation. *Transpalntation* 2006;82:41-46.
- 36 Osto E, Coppolino G, Volpe M, Cosentio F. Restoring the dysfunctional endothelium. *Curr Pharma Des.* 2007;13(10):1053-68.
- 37 Bökesoy T.A. İzole organ preparatları, düz kas preparatları. *Türk Farmakoloji Derneği Eğitim Sempozyumları.* 1993.
- 38 Levy J.V. Isolated arterial preparations. *Methods in Pharmacology, Vol 1, s. 96, Meredith, New York, 1971.*
- 39 Macconaili M. Calcium precipitation from mammalian physiological salines (ringer salutions) and preparation high Ca media. *J. Pharmacol. Methods* 1985;14:147-155.
- 40 Stuart B. Drumrn J, Pitzgerald DE, et al. Fetal blood velocity waveforms in normal pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol.* 1980;87:780-785.
- 41 Pourcelot L. Appiications cliniques de l'examen Doppler transcutane. in: Pourcelot L, ed. *Seminaire INSERM.* Paris: Editions INSERM; 1974:213-240.
- 42 Trudinger BJ, Stevens D, Conneliy A, et al. Umbilical artery flow velocity wavefomis and placental resistance. The effects of embolization of the umbilical circulation. *Am J Obstet Gynecol.* 1987;157:1443-1449.

- 43 Gosling R, King D. Ultrasonic angiography. in: Hascus AW, Adamson L, eds. Arteries and Veins. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1975;61-98.
- 44 Sugawara Y, Makuuchi M. Technical advances in living-related liver transplantation. *J Hepatobil Pancreat Surg* 1999;6:245-253.
- 45 Evans GR, Gherardini G, Gürlek A, Langstein H, Joly GA, Cromeens DM, Sukumaran AV, Williams J, Kilbourn RG, Wang B, Lundeborg T. Drug-induced vasodilation in an in vitro and in vivo study: the effects of nicardipine, papaverine, and lidocaine on the rabbit carotid artery. *Plast Reconstr Surg.* 1997 Nov;100(6):1475-81.
- 46 Van Der Lei, B., Robinson, P. H., Bartels, H. L., and Wildevuur, C. R. H. Microarterial grafting into the carotid artery of the rabbit. Some considerations concerning species-dependent thrombogenicity. *Br. J. Plast. Surg.* 45: 59, 1989.
- 47 Harper's Biochemistry, Robert K. Murray, Daryl K. Granner, Peter A. Mayes, Victor W. Rodwell. Appleton&Lange 1990; 729-730
- 48 Alper M, Gundogan H, Tokat C, Ozek C. Microsurgical reconstruction of hepatic artery during living donor liver transplantation. *Microsurgery* 2005;25(5):278-83
- 49 Bigaud M, Julou S.G, Parrat J.R, Stoclet J.C. Endotoxin induced impairment of vascular smooth muscle contractions elicited by different mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* 1990;190:185-192.
- 50 Ghatta S, Tustall R, Karem S, Rahman M, O'Rourke S. Sirolimus causes relaxation of human vascular smooth muscle: A novel action of sirolimus mediated via ATP-sensitive potassium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007;320:1204-8.
- 51 Paemer R.M.J. the discovery of nitric oxide in the vessel wall. *Arch. Surg.* 1993;128:396-401.

- 52 Gürlek A, Gherardini G, Cromeens D, Joly GA, Wang B, Evans GR. Drug-induced vasodilation: the effects of sodium nitroprusside, hydralazine, and cromakalin on the rabbit carotid artery: in vitro and in vivo study. *J.Reconstr Microsurg.* 1997 Aug;13(6):415-21.
- 53 Bluth EI. Doppler US velocity measurements. *Radiology* 2002;223:882
- 54 Jacobs NM, Grant EG, Schellinger D et al. Duplex carotid sonography: criteria for stenosis, accuracy, and pitfalls. *Radiology*;154:385-391. 1985
- 55 Kılıç K. Safra salgısının arter anastomozuna etkisini sıçan femoral arter anastomozu modelinde değerlendirilmesi. EÜTF Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Uzmanlık Tezi 2007.
- 56 Hatano E, Terajima H, Yabe S, Asonuma K, Egawa H, Kiuchi T, Yemoto S, Inomata Y, Tanaka K, Yamaoka Y. Hepatic artery thrombosis in living related liver transplantation. *Transplantation* 1997;64:1443-1446
- 57 Şan M. Endotel ve sistemlerimiz. 2005;s:1-25,227-254.