



T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ  
ANABİLİM DALI

**UZAMIŞ BACAK İSKEMİSİ OLAN SIÇANLARDA  
REVASKÜLARİZASYON SONRASI REPERFÜZYON  
ÖNCESİ BRETSCHNEIDER HİSTİDİN-TRİPTOFAN-  
KETOGLUTARAT SOLÜSYONU VERMEK YARARLI MI?**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. İsmail KAKİLLİOĞLU**

**Antalya, 2019**



**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ  
ANABİLİM DALI**

**UZAMIŞ BACAK İSKEMİSİ OLAN SIÇANLARDA  
REVASKÜLARİZASYON SONRASI REPERFÜZYON  
ÖNCESİ BRETSCHNEIDER HİSTİDİN-TRİPTOFAN-  
KETOGLUTARAT SOLÜSYONU VERMEK YARARLI MI?**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. İsmail KAKİLLİOĞLU**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Cengiz TÜRKAY**

*“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”*

**Antalya, 2019**

*Bu araştırma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TTU-2019-4361)*

## TEŐEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince ilgi ve desteğini sürekli hissettiğim, engin mesleki ve etik tecrübelerinden çok şey öğrendiğim, hocaların hocası Prof. Dr. Ömer BAYEZİD'a; eğitimimde bana büyük emekleri geçen ve eğitimim için gereken çaba ve hoşgörüyü fazlasıyla gösteren danışmanım Prof. Dr. Cengiz TÜRKEY'a; insanlıkları, tecrübeleri ve hekimlikleri ile bana örnek olan hocalarım Prof. Dr. İlhan GÖLBAŐI, Prof. Dr. Ozan ERBASAN'a,

Asistanlık eğitimim süresince bir öğretim üyesinden çok bir ağabeyim olan Dr. Öğr. Üyesi Cemal KEMALOĞLU'na; engin bilgi birikimini yeni bilgiler keşfetmeye adan ve bu tezin hazırlanmasında büyük emeği geçen Dr. Öğr. Üyesi Salih ÖZÇOBANOĞLU'na,

Uzmanlık tez çalışmalarım sırasında gereken motivasyon ve enerjiyi sağlayan başta İnt. Dr. Mehmet Berke GÖZTEPE'ye; tüm asistan arkadaşlarıma, tıp hayatına girdiğim günden beri maddi ve manevi desteğini esirgemeyen biricik anneme ve babama; her zaman yanımda olan ve hayatta bana en büyük desteği veren can yoldaşım, eşim Melike KAKİLLİOĞLU'na, oğlum Sencer, kızım Melisa'ya

*Sonsuz şükranlarımı sunarım...*

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>Simgeler ve Kısaltmalar Dizini</b>	<b>iv</b>
<b>Şekiller, Resimler ve Çizelgeler Dizini</b>	<b>v</b>
<b>1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER</b>	<b>1</b>
1.1. Akut Ekstremitte İskemisi	1
1.1.1. Klinik değerlendirme	4
1.1.2. Sınıflandırma	5
1.2. İskemi - Reperfüzyon Hasarı	6
1.3. Bretschneider'in Histidin-Triptofan-Ketoglutarat Çözeltisi (HTK)	8
<b>2. AMAÇ</b>	<b>10</b>
<b>3. MATERYAL VE METOD</b>	<b>11</b>
3.1. Hayvanlar	11
3.2. HTK Solüsyonu	13
3.3. Patoloji	13
3.4. İstatistiksel Analiz	14
<b>4. BULGULAR</b>	<b>15</b>
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>19</b>
<b>6. SONUÇLAR</b>	<b>22</b>
<b>7. ÖZET</b>	<b>23</b>
<b>8. ABSTRACT</b>	<b>25</b>
<b>9. KAYNAKLAR</b>	<b>27</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ABD</b>	Amerika Birleşik Devletleri
<b>ABI</b>	Akut Bacak İskemisi
<b>ATP</b>	Adenozin Trifosfat
<b>DNA</b>	Deoksiribo Nükleik Asid
<b>HIT</b>	Heparine Bağlı Gelişen Trombositopeni
<b>HTK</b>	Histidin Triptofan Ketoglutarat
<b>IRH</b>	İskemi-Reperfüzyon Hasarı
<b>PAH</b>	Periferik Arter Hastalığı
<b>PFK</b>	Fosfofruktokinaz
<b>PMNL</b>	Polimorf Nüveli Lökosit
<b>ROS</b>	Reaktif Oksijen Türleri
<b>SPSS</b>	Statistical Package for the Social Sciences
<b>SS</b>	Standart Sapma
<b>TÜBİTAK</b>	Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu

## ŞEKİLLER, RESİMLER VE ÇİZELGELER DİZİNİ

<b><u>Şekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
1.1. İskemi reperfüzyon hasarına doku yanıtının aşamaları	8

<b><u>Resim</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
3.1. İskemik gruplarda sağ ana iliak arterin 5.0 prolen ile oklüzyonu	12
4.1. HTK grubundan (Grup 4) iskelet kası (enine kesit)	16
4.2. İskemi grubu (Grup 3) iskelet kası (enine kesit)	17

<b><u>Çizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
1.1. Akut ekstremite iskemisinin Rutherford Sınıflandırması	5
1.2. HTK solüsyon içeriği	9
4.1. Tüm grupların kas liflerinde dejenerasyon ve lökosit infiltrasyonu açısından derecelendirilmesi	15
4.2. Gruplara göre kas lifi dejenerasyonunun derecelendirilmesi	16
4.3. Gruplara göre lökosit infiltrasyonu derecelendirilmesi	17

# 1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

## 1.1. Akut Ekstremitte İskemisi

Akut ekstremitte iskemisi veya akut bacak iskemisi (ABİ), herhangi bir nedenden dolayı ekstremitte perfüzyonunun ani olarak azalmasından kaynaklı, ekstremitenin canlılığını tehdit eden bir durum olarak tanımlanmaktadır [1]. Genellikle iki haftadan daha kısa sürede semptom gösteren hastaları ifade etmektedir. Bu nedenle akut ekstremitte iskemisi, birkaç saat boyunca ağrılı, soğuk ve beyaz ekstremiteden birkaç gün kısa mesafeli klodikasyo öyküsü olan veya periferik arteriyel arka plan üzerinde iskemik semptomlarda ani artış gösteren hastaya kadar uzanan geniş bir spektrum sergilemektedir.

Akut ekstremitte iskemi insidansının, yılda yaklaşık 6.000 kişide 1 olduğu tahmin edilmektedir [1]. İsveç'te yapılan kohort çalışmaları insidansın azaldığını göstermektedir [2]. 2002-2012 yılları arasında çalışan Oxfordshire'da yapılan prospektif, popülasyona dayalı çalışma 92.728 kişilik popülasyondaki tüm akut periferik arter olaylarının insidansını ve sonucunu belirleyerek, 803 müdahale gerektiren 386 hastada 510 akut olay tespit etmiştir [3]. Risk faktörleri arasında bulunan hipertansiyon, sigara ve diyabetes mellitus da büyük önem taşıyan sebeplerdir.

Akut ekstremitte iskemisi, emboli veya trombozdan veya nadiren diseksiyon veya travmadan kaynaklanır. Tromboz genellikle periferik vasküler hastalıktan (damar tıkanıklığına neden olan aterosklerotik hastalık gibi) meydana gelirken, emboli ise genellikle kardiyak kökenlidir [4]. Amerika Birleşik Devletleri'nde, yılda 100.000 kişiden 14'ünde akut ekstremitte iskemisinin gerçekleşeceği tahmin edilmektedir [5]. Uygun bir cerrahi tedavi ile akut ekstremitte iskemisi tedavi edilebilir bir durumdur; bununla birlikte, gecikmiş tedavi (6 ila 12 saat arasında), kalıcı sakatlık, amputasyon ve / veya ölümlerle sonuçlanabilir.

Romatizmal kalp hastalığının görülme sıklığının azalması ve atriyal fibrilasyonun yönetimindeki iyileşme nedeniyle embolik hastalığın neden olduğu akut ekstremitte iskemisinin oranının azaldığına dair bazı kanıtlar da mevcuttur [1]. Bu bağlamda, yaşlanan bir popülasyonda, akut ekstremitte iskemisinin ortaya çıkma olasılığı daha yüksek görünmektedir. Periferik arter hastalığı (PAH)

bulunan kronik bacak iskemisi olan kişilerde oluşan kollateral arteriyal yapıların varlığı klasik akut ekstremitte iskemisinin belirtilerini azaltabileceği için kronik bir zeminde oluşabilecek akut bacak iskemisi vakasını teşhis etmek gerçekten zorlaşabilir. 70 yaşın üzerinde özellikle embolik bir hastalığı olan kişilerin, %30'unda altta yatan periferik arter hastalığı bulunmuştur [6,7]. Bu da akut ekstremitte iskemilerinin büyük kısmının, periferik arter hastalığı zemininde ortaya çıktığını göstermektedir.

Akut ekstremitte iskemisinin tanısını koymak çok önemlidir. Günümüzde gelişen revaskülarizasyon teknikleri ve yoğun bakım koşullarının iyileşmesine rağmen mortalite oranları halen yüksek seyretmektedir. Bu durum, toplumların yaşlanması ve buna bağlı olarak aterosklerotik yükün artmasına bağlanmaktadır [1,2].

Akut ekstremitte iskemisi gelişmesini takiben, ekstremitenin kurtarılması %70-90 oranında başarılabilir [1, 8-12].

Akut bacak iskemisinin gelişiminde en önemli rolü emboli ve tromboz oynamaktadır. Emboli; dolaşım sistemi içerisinde taşınıp, bir kan damarı içerisine yerleşen ve damarın tıkanmasına neden olan bir madde (gaz, katı veya sıvı) olarak tanımlanır. Trombus ise damar iç lümeninde fibrin, trombosit ve hücrel elemanlardan oluşan pıhtıyı ifade eder.

Bu iki klinik tablonun seyirleri benzer olmasına rağmen tedavi ve prognozları farklılık göstermektedir.

#### **Emboli nedenleri:**

- Atriyal fibrilasyon
- Mural trombüs
- Miyokardiyal iskemi
- Sol ventrikül anevrizması
- Mekanik kalp kapakları
- Bakteriyel endokardit
- Atriyal miksona
- Paradoksal emboli
- Anevrizmalar (Özellikle popliteal)
- Ateroemboli

- Aterosklerotik damarlar (Özellikle torasik aort)

#### **Tromboz nedenleri:**

- Kronik aterosklerotik zemin üzerinde akut tromboz
- Greft trombozları
- Düşük kalp debisi
- Hiperkoagülabilite
- Malinite
- Trombofili
- Heparine bağlı gelişen trombositopeni (HIT)
- Arteriyel travma
- İyatrojenik travmalar
- Aortik/arteriyel diseksiyon
- Vazospazm
- Arteritler
- Popliteal entrapment sendromu
- Torasik outlet sendromu
- Filegmasia serula dolens

Akut ekstremitelerde iskemisinde emboli en sık kalpten (%80) kaynaklanmaktadır [9]. Emboli ayrıca, proksimal arterlerin hastalığında da (anevrizmalar veya stenozlar) ortaya çıkabilir ve aterom içerebilir. Bunlar, uzun için daha kötü bir prognoz taşımaktadır çünkü, tedavisi zor ve tromboliz için de elverişli değildir.

Trombüs genel olarak Virchows Triad'ında açıklanan üç faktörden köken almaktadır;

- 1- Azalmış kan akımı olayları (staz): Venöz staz, uzun cerrahi işlemler, uzun süreli hareketsizlik ve varisli damarlar örnek olarak verilebilir.
- 2- Damarın ve çevresinin tahrişiyle ilgili olaylar, örneğin endotel veya damar duvarı hasarı: Yaralanma veya travma, gerilmeden veya hipertansiyondan kaynaklanan hasarlar, bakteriler gibi prokoagülan yüzeyler ile temas eden yabancı maddeler, implantların veya tıbbi cihazların biyomateryalleri, aktive olmuş trombositlerin membranları ve kronik enflamasyondaki monositlerin membranları.

3- Kan pıhtılaşma bozuklukları, örneğin hiperkoagülabilitate: Hiperviskozite, pıhtılaşma faktörü V Leiden mutasyonu, pıhtılaşma faktörü II G2021A mutasyonu, antitrombin III, protein C veya S eksikliği, nefrotik sendrom, ciddi travma veya yanık sonrası değişiklikler, geç gebelik ve doğum, ırk, ileri yaş, sigara içme, hormonal kontraseptifler ve obezite gibi risk faktörleri.

### 1.1.1. Klinik değerlendirme

ABİ, klinikte klasik olarak 6 P belirtileri ile ortaya çıkar ancak bu belirtilere sahip hastaların kronik iskemi geçmişi varsa bu bulgular hafif seyredebilir.

6 P Belirtileri:

- 1- **Ağrı (Pain):** Çoğu durumda istirahatte ortaya çıkar, ancak akut başlangıçlı kısa mesafeli klodikasyon ile de kendini gösterebilir. Kötü perfüzyon sebebiyle, uzuvların (ayak parmaklarının) en distal kısmında istirahat ağrısı genellikle daha kötüdür. Kasların pasif hareketinde ağrı, potansiyel kompartman sendromunu gösterir ve kötü prognostik işarettir.
- 2- **Solukluk (Pallor):** Özellikle karşı uzuv ile karşılaştırıldığında yararlıdır; ayrıca venöz dolumu kontrol etmek için de faydalıdır. Akut iskemik uzuvlar mavi değil, klasik olarak beyazdır. Kronik kritik iskemik uzuvlar, gün batımı ayağı denilen telafi edici vazodilatasyon nedeniyle pembe görünebilir.
- 3- **Parestezi (Paraesthesia):** %50'den fazla olguda mevcuttur [1]. Duyusal sinirler motor sinirlerden daha küçüktür ve iskemiye daha duyarlıdır, bu nedenle ilk önce etkilenme eğilimindedir.
- 4- **Felç (Paralysis):** Kötü prognoza işaret eder ve geri dönüşü olmayan bir iskemi olduğunu gösterir.
- 5- **Soğukluk (Perishingly cold):** Karşı uzuv ile karşılaştırıldığında kullanılırsa faydalı bir işarettir.
- 6- **Nabızsızlık (Pulselessness):** Ekstremitede el ile nabızların hissedilememesidir, bununla birlikte, şüphede kalınan durumlarda doppler ultrasonografi ile arteriyel akım sinyalleri kontrol edilmelidir [1].

Önceden var olan PAH ve gelişmiş kollateralleri olan bir hastada klasik bulguların (6 P) şiddeti hafifleyebilir. Akut ekstremitte iskemi şüphesi olan tüm hastalara arteriyel Doppler yapılmalıdır.

### 1.1.2. Sınıflandırma

Hastanın değerlendirilmesi yapılırken, üç önemli soruya yanıt verilmesi gerekmektedir.

- Ekstremitte canlılığını korumakta mıdır?
- Ekstremitenin canlılığı akut olarak tehdit altında mıdır?
- Ekstremitenin korunmasını engelleyen geri dönüşsüz değişiklikler var mıdır?

Akut arter tıkanıklığının şiddetinin nasıl değerlendirilebileceği Çizelge 1.1'de özetlenmiştir: Tehdit altındaki ekstremitte canlılığını koruyan ekstremiteden ayıran üç esas nokta bulunmaktadır [6]:

- İstirahat ağrısı
- Duyu kaybı
- Kas kuvvetsizliği

Duyu ve kas fonksiyon kayıplarının olması ekstremitte yapılacak acil müdahale için belirleyici rol oynamaktadır. İrreversibl iskeminin bulgusu, derin paralizi ve değişmeyen solukluktur.

**Çizelge 1.1.** Akut ekstremitte iskemisinin Rutherford Sınıflandırması

<b>EVRE</b>	<b>Kapiller doluş</b>	<b>Kas Fonksiyon Kaybı</b>	<b>Duyu kaybı</b>	<b>Arterial Doppler sinyali</b>	<b>Venöz Doppler sinyali</b>
<b>I Canlı</b>	Çok İyi	Yok	Yok	Var	Var
<b>IIa Marjinal Tehdit</b>	İntakt/Yavaş	Yok	Parsiyel (Parmaklar)	Var	Var
<b>IIb Ciddi Tehdit</b>	Yavaş/ Yok	Parsiyel Paralizi	Yaygın	Yok	Var
<b>III İrreversibl</b>	Yok+Soluk	Tam Paralizi	Anestetik	Yok	Yok

## 1.2. İskemi - Reperfüzyon Hasarı

İskemi-Reperfüzyon Hasarı (IRH) veya Reoksijenizasyon Hasarı, belirli bir süre iskemik veya hipoksik kalmış bir dokuda, kan akımı yeniden sağlandığında meydana gelen hasardır.

Bir dokudaki hücreler reversibl olarak hasarlanırsa, kan akımının geri dönmesi hücre iyileşmesine neden olabilir [13]. Bununla birlikte, belirli koşullar altında, kan akımının iskemik fakat canlı dokulara geri dönmesi, hücreler irreversibl olarak hasarlanmış olmasalar bile, paradoksal olarak hücrelerin ölümü ile sonuçlanabilir [13]. Bu iskemia reperfüzyon hasarı, miyokard ve serebral iskemideki doku hasarına önemli ölçüde katkıda bulunabilecek klinik olarak önemli bir süreçtir [13].

Birkaç mekanizma, iskemik dokulara reperfüzyondan kaynaklanan hücre hasarının alevlenmesinden sorumlu olabilir:

- Reoksijenasyon sırasında parankimal hücrelerden, endotel hücrelerinden ve infiltre olan lökositlerden artan reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi yeni bir hasar başlatabilir. Dokulara oksijen arzı arttığında, özellikle mitokondriyal hasardan dolayı oksijen seviyelerinin azaltılamamasından ve lökositlerde, endotel hücrelerinde ve parankimal hücrelerde oksidaz aktivitesinden dolayı benzer şekilde ROS üretimi artar. Aynı zamanda hücresel antioksidan savunma mekanizmaları, serbest radikallerin birikimini artıran iskemi ile tehlikeye girebilir [13-17].
- İskemik hasarın neden olduğu inflamasyon, reperfüzyonla lökosit ve plazma proteinlerinin iskemik alana hücumundan dolayı artabilir. Aktive lökositlerin ürünleri ek doku hasarına neden olabilir. Kompleman sistemin aktifleşmesi ayrıca iskemi - reperfüzyon hasarına katkıda bulunur. Kompleman proteinleri hasarlı dokulara veya dokularda biriken antikörlere bağlanabilir ve daha sonraki kompleman aktivasyonu yan ürünler üretir bu da hücre hasarını ve iltihabı şiddetlendirir [13-17].

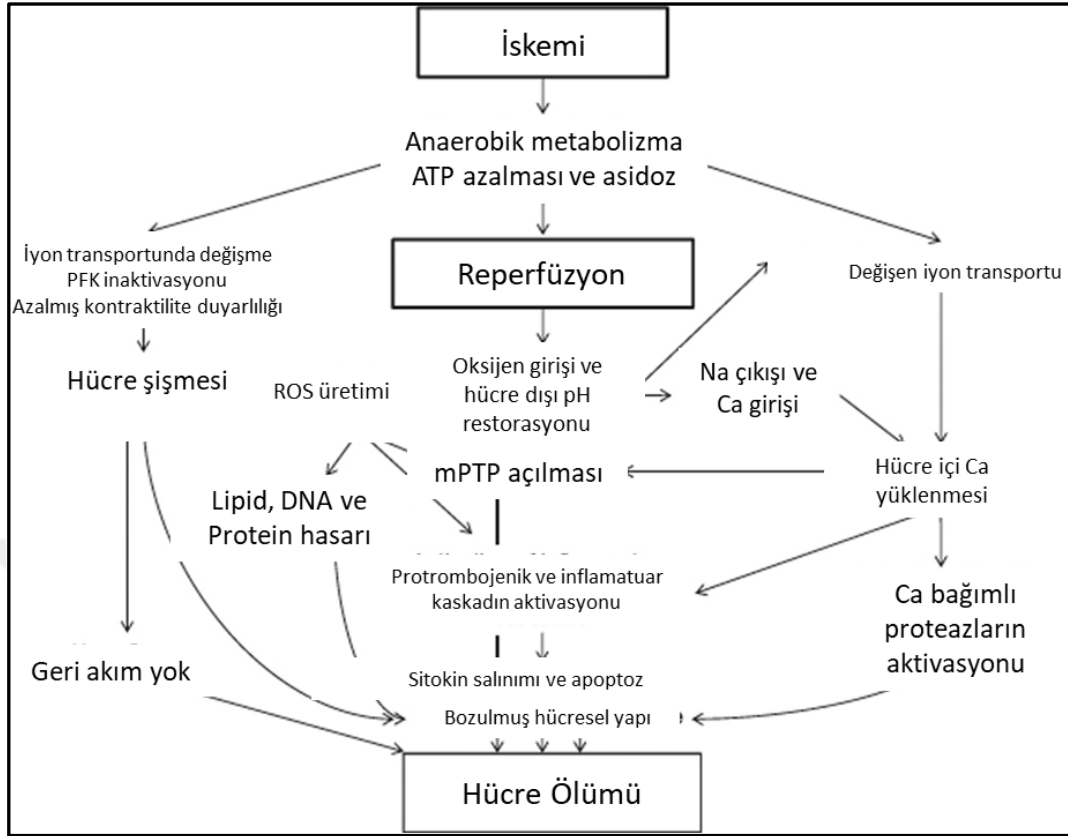
İskemik periyotta kandaki oksijen ve besinlerin bulunmaması; dolaşım geri döndüğünde, dokuda normal fonksiyonların restorasyonundan ziyade inflamasyon ve doku hasarı ile sonuçlanan oksidatif stres durumuna neden olur [18].

İskemik dokuların reperfüzyonu, genellikle dokularda difüzyon ve sıvı filtrasyonunda artışa neden olan kılcal damarların ve arteriyollerin geçirgenliğinin artması nedeniyle, sıklıkla mikrovasküler hasar ile ilişkilidir. Aktive olmuş endotel hücreleri daha fazla reaktif oksijen türevleri üretmektedir, ancak reperfüzyonun ardından daha az nitrik oksit üretirler ve bu olaylar zinciri daha sonraki süreçlerle inflamatuvar yanıtlarla sonuçlanmaktadır [18]. İnflamatuvar yanıt, reperfüzyon hasarının yarattığı patolojiden kısmen sorumludur (Şekil 1.1). İskemik bölgeye yeniden dönen kan akımı ile gelen lökositler, doku hasarına cevaben serbest radikallerin yanı sıra, interlökinler gibi bir dizi inflamatuvar faktör salgılamaktadır [19]. Geri dönen kan akımı, hücre proteinlere, DNA'ya ve hücre zarlarına zarar vermektedir. Hücre zarının hasar görmesi, serbest radikallerin daha da artmasına neden olmaktadır. Lökositler, ayrıca, küçük kılcal damarların endoteline yapışabilir, onları tıkayabilir ve daha fazla iskemi ortaya çıkarabilir [19].

Reperfüzyon hasarının özellikle, inme ve beyin travması olgularında beyin iskemik hasarında rol oynadığı bilinmektedir. Tekrarlayan iskemi ve reperfüzyon hasarı nöbetlerinin, ayrıca basınç yaraları ve diyabetik ayak ülseri gibi kronik yaraların oluşumuna neden olan bir faktör olduğu düşünülmektedir [20].

Uzun süreli iskemide (60 dakika veya daha fazla), hipoksantin, ATP metabolizmasının bir parçalanma ürünü olarak oluşur. Ksantin dehidrojenaz enzimi, reperfüzyonda oksijenin daha yüksek bulunmasının bir sonucu olarak bir ksantin oksidaz gibi ters yönde etki eder. Bu oksidasyon, moleküler oksijenin yüksek reaktif süperoksit ve hidroksil radikallerine dönüşmesine neden olur. Ksantin oksidaz, peroksinitrit gibi hem prooksidant hem de bir ROS temizleyicisi olarak işlev görebilen ürik asiti de üretir. Reperfüzyon sırasında üretilen aşırı nitrik oksit, güçlü reaktif türlerde peroksinitrit üretmek için süperoksit ile reaksiyona girer. Bu gibi radikaller ve reaktif oksijen türleri hücre zarı lipidlerine, proteinlerine ve glikozaminoglikanlara saldırarak daha fazla hasara neden olur.

Reperfüzyon hiperkalemiye neden olabilir [21]. Reperfüzyon hasarı, karaciğer nakil ameliyatlarında birincil endişe kaynağıdır [22].



**Şekil 1.1.** İskemi reperfüzyon hasarına doku yanıtının aşamaları (Salter JW, Krieglstein CF, Issekutz AC, Granger DN. Platelets modulate ischemia/reperfusion-induced leukocyte recruitment in the mesenteric circulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281(6):G1432-9).

### 1.3. Bretschneider'in Histidin-Triptofan-Ketoglutarat Çözeltisi (HTK)

HTK çözeltisi, kompleks kalp cerrahisinde miyokardın korunmasında ve nakil ameliyatlarında organların korunmasında bazı merkezler tarafından kullanılan bir intrasellüler kristalloid kardiyoplejik çözeltidir. HTK, kalp cerrahları için ilgi çekicidir, çünkü tek bir doz olarak uygulanır ve üç saat kadar süre boyunca miyokard koruması sağladığı ve karmaşık cerrahi operasyonların kesintisiz bir şekilde uygulanabileceği iddia edilir [1,2].

HTK 1970'lerde Bretschneider [3] tarafından tarif edildi. Düşük sodyum ve kalsiyum içeriği nedeniyle hücre içi, kristalloid kardiyoplejisi olarak sınıflandırılır. Ekstrasellüler boşlukta sodyum konsantrasyonunun azalması, miyosit plazma zarının hiperpolarizasyonuna neden olarak diyastolde kalp durmasına neden olur. Bu, potasyum içeriği yüksek ve zar depolarizasyonu ile

kardiyak arreste neden olan geleneksel "hücre dışı" kardiyoplejik çözeltilerden farklı bir etki mekanizmasıdır [4]. Çözeltinin bileşenleri Çizelge 1.2’de listelenmiştir. Yüksek bir histidin içeriği, uzun iskemik dönemde anaerobik metabolitlerin birikmesinden kaynaklanan asidozu tamponlar; Ketoglutarat reperfüzyon sırasında ATP üretimini arttırır; triptofan hücre zarını stabilize eder ve mannitol hücrel ödemi azaltır ve serbest radikal temizleyici olarak rol alır [2]. HTK’nın tüm bileşenleri vücutta doğal olarak bulunur (Çizelge 1.2). HTK’nın ozmolaritesi 310 mOsm /L’dir [23-28].

HTK’nın, Avrupa’da kalp cerrahisinde yaygın olarak kullanılmasına rağmen, vasküler cerrahide ekstremitelerde kas dokusuna etkinliğini karşılaştıran çok az veri vardır. Akut bacak iskemisinde ekstremitenin korunması için HTK’yı diğer çözeltilerle karşılaştıran veri eksikliği de vardır. HTK’nın yukarıda bahsedilen iskemi sonrası hücre içi ödemi azaltması, membran stabilizasyonu sağlaması, hipoksi nedeniyle ortaya çıkan asidozu tamponlaması, ATP üretimini hızlandırması ve periferik doku iskemilerinde hiç denenmemiş olması nedeniyle çalışmaya konu edilmiştir.

**Çizelge 1.2.** HTK solüsyon içeriği

<b>Madde</b>	<b>Miktar</b>
<b>Sodyum</b>	15 mmol/L
<b>Potasyum</b>	9 mmol/L
<b>Magnezyum</b>	4 mmol/L
<b>Kalsiyum</b>	0.015 mmol/L
<b>Ketoglutarat</b>	1 mmol/L
<b>Histidin</b>	198 mmol/L
<b>Mannitol</b>	30 mmol/L
<b>Triptofan</b>	2 mmol/L

## 2. AMAÇ

Bu çalışmanın amacı; kalp damar cerrahisi kliniğinde sık karşılaşılan akut olarak revaskularize edilmiş ekstremiteleri ratlarda simule etmek ve HTK solüsyonunun, akut olarak oluşturulan ekstremitte iskemisi ve reperfüzyonu sonrası oluşan iskemi/reperfüzyon hasarına etkisini ortaya koymaktır.



### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Hayvanlar

Bu çalışma için Akdeniz Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 06.10.2018 tarihinde 749 no'lu etik kurul onayı alınmıştır.

Bu çalışmada 32 adet Wistar cinsi rat kullanılmıştır. Ratlar, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvan ve Araştırma Laboratuvarından temin edilmiş, dişi ve yaşları 8-10 hafta olanlar tercih edilmiştir.

Ratlar 8'er hayvan olmak üzere 4 deney grubuna ayrılmıştır;

1. Grup: Kontrol,
2. Grup: Cerrahi stres,
3. Grup: İskemi,
4. Grup: HTK grubudur.

**Kontrol Grubu (Grup 1):** Bu gruba hiçbir işlem yapılmamış sadece Gastroknemius-Soleus kas grubunun distal yarısından biyopsi alınmıştır.

**Cerrahi Stres Grubu (Grup 2):** Bu gruptaki hayvanların cerrahi strese girebilmesi için, median laparotomi yapılmış ve sağ ana iliak arter açığa çıkarılmıştır. Daha sonra 5.0 prolen ile arter çevresinde dönülerek bırakılmıştır. Arter bağlanmamış, iskemi oluşturulmamıştır. Bu işlemden 2 saat sonra Gastroknemius-Soleus kas grubunun distal yarısından biyopsi alınmıştır.

**İskemi Grubu (Grup 3):** Bu grupta ekstremitte iskemisi oluşturabilmek için, median laparotomi yapılmış ve sağ ana iliak arter açığa çıkarılmıştır. Daha sonra iliak arter 5.0 prolen ile bağlanmıştır. 8 saatlik iskemi oluşturulmuştur. Daha sonra prolen çözülerek 2 saat süre ile reperfüzyon sağlanmıştır. Reperfüzyon sonrası, Gastroknemius-Soleus kas grubunun distal yarısından biyopsi alınmıştır.

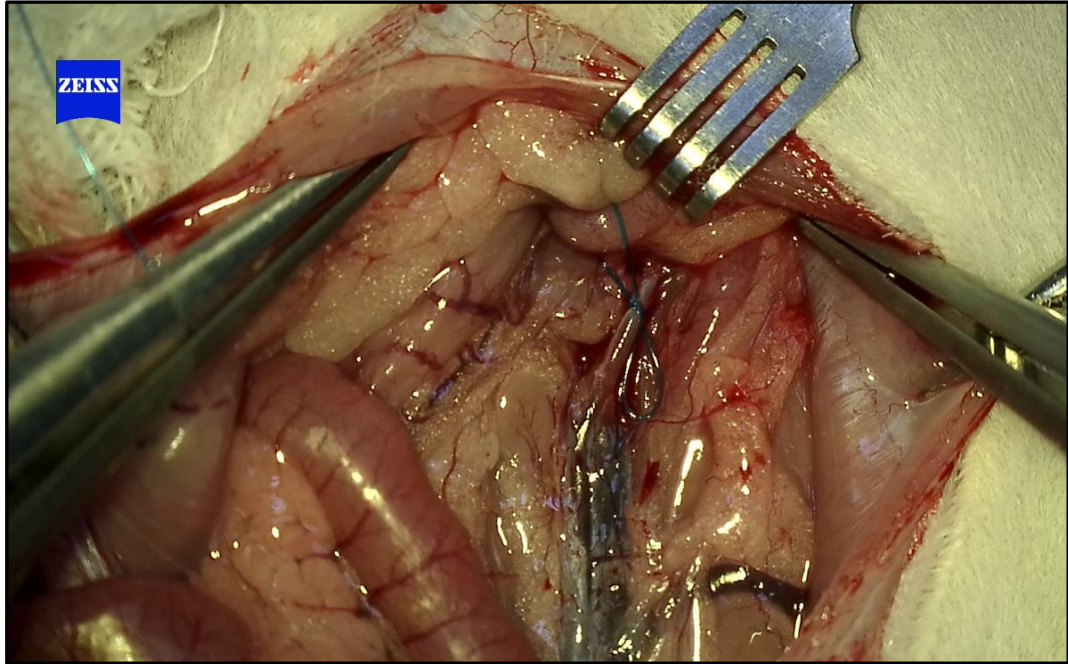
**HTK Grubu (Grup 4):** Bu gruptaki hayvanlarda, median laparotomi yapılmış ve sağ ana iliak arter açığa çıkarılmıştır. Daha sonra sağ ana iliak arter 5.0 prolen ile bağlanmıştır. 8 saatlik iskemi oluşturulmuştur. Bu süre sonunda, 26 Gauge\*1/2' iğne ucu ile distal abdominal aortaya girilerek, ipliğin çözülmesi ile eş zamanlı HTK solüsyonu klinikte kullanılan rutin dozun (40

ml/kg) 1/6'sı oranında yaklaşık 1 cc verilmiştir. Çünkü verilen HTK dışarı aspire edilemeyeceği için ve her iki alt ekstremitte total rat ağırlığının yaklaşık 1/6'sına denk geldiği için literatürdeki dozun 1/6'sı uygun görülmüştür. HTK solüsyonu verildikten sonra, iğne yeri kanaması, tampon ile baskı uygulanarak kontrol altına alınmıştır.

Sağ ana iliak arter, 2 saat süre ile reperfüzyona bırakılmış ve sonrasında Gastroknemius-Soleus kas grubunun distal yarısından biyopsi alınmıştır.

Tüm grupların işlemleri başlamadan önce, sağ arka ayak tabanına pulse-oksometre probu bağlanıp, normal Oksijen satürasyon dalga formu gözlenmiş ve pulse-oksometre cihazı, deney sonuna kadar bırakılmıştır. Devaskularize edilen gruplarda satürasyon dalga formunun kaybolduğu ve reperfüzyon ile yeniden oluştuğu gözlenmiştir.

Hayvanların tümü, her bir cerrahi işlem öncesi, ketamin (60 mg/kg) + Ksilazin (10 mg/kg) kombinasyonu ile intraperitoneal yoldan uyutulmuştur. Grup 2, Grup 3 ve Grup 4 ratlara, anestezi sonrası, 80 IU/kg subkutan heparin enjekte edilmiştir. Hiçbir grupta cerrahi işlem sonrası intraarteryal tromboz izlenmemiştir. Hayvanlar, deneyin sonunda yüksek doz anestezi ile sakrifiye edilmiştir.



**Resim 3.1.** İskemik gruplarda sağ ana iliak arterin 5.0 prolén ile oklüzyonu

### 3.2. HTK Solüsyonu

Kullanılan HTK solüsyonu intrasellüler kristaloid kardiyoplejik özelliklere sahip Carnamedica markasının PlegiStore modelidir.

HTK solüsyonu, işlem öncesinde soğuk zincir kurallarına uygun olarak +4 derecede muhafaza edilmiştir. Grup 4'deki her rata +4°C'de 40 ml/kg enjekte edilmiştir.

### 3.3. Patoloji

Biyopsi ile çıkarılan dokuların patolojik değerlendirilmesi Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalında yapılmıştır. Dokular %10'luk formaldehid ile fikse edilmiştir. Cerrahi stres, iskemi, HTK ve Kontrol gruplarına ait örnekler, fasyayı da içeren çizgili kas örnekleri şeklinde ortalama 1x1x0,5 cm boyutlarında ve 2 parça olarak bloklanmıştır.

Örnekler; Thermo marka otokleniken cihazında takip işlemine alınmıştır.

Takip aşamaları aşağıda sıralanmıştır:

- Formalin 2 saat
- Formalin 3 saat
- Alkol 1 saat
- Alkol 1 saat
- Alkol 1 saat
- Alkol 1 saat
- Alkol 1,5 saat
- Alkol 2,5 saat
- Ksilen 1 saat
- Ksilen 1,5 saat
- Ksilen 2,5 saat
- Parafin 2 saat
- Parafin 2 saat
- Parafin 2 saat

Takibi tamamlanan örnekler Thermo bloklama cihazında parafin blok haline getirilmiştir. Finesse 325 (Thermo) mikratom cihazı ile bloklardan 4 mm kesitler alınarak preparatlar boyaya hazır hale gelmiştir. Dako boya cihazı kullanılarak hemotoksilen eozin boyası ile boyanmış ve mikroskopik incelemeye hazır hale getirilmiştir. Hemotoksilen eozin boyalı kesitler ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir.

Mikroskopik incelemede kas liflerindeki dejeneratif değişiklikler ve lökosit infiltrasyonu; aşağıdaki gibi derecelendirilmiştir. Bu derecelendirme yapılırken kas lifleri çap farklılıkları, nekrotik değişiklikler ve rejeneratif değişiklikler incelenmiştir.

#### ***Mikroskopik Derecelendirme***

- 0 : Normal,
- 1 : Hafif (%1-%33 tutulma)
- 2 : Orta (%34-%66 tutulma)
- 3 : Şiddetli (%67-%100 tutulma)

#### **3.4. İstatistiksel Analiz**

Çalışmada elde edilen tüm veriler SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 22.0 paket programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Veriler tanımlayıcı tablolarda sayı ve yüzdelik dilimler şeklinde verilmiştir. İstatistiksel analizlerde gruplar arasındaki fark, Kruskal-Wallis testi ile test edilmiştir. Ayrıca dikatom veriler için ki-kare testi kullanılmıştır.

## 4. BULGULAR

Bu çalışmada, kontrol grubunda 8, cerrahi stres grubunda 8, iskemi grubunda 8 ve HTK grubunda 8 olmak üzere toplam 32 Wistar Rat bulunmaktadır. Yapılan patolojik değerlendirmede hiçbir grupta şiddetli kas lifi dejenerasyonu ve lökosit infiltrasyonu saptanmamıştır. Kontrol grubunda 7 ratta kas liflerinde hafif derecede dejenerasyon, 7 ratta ise hafif derecede lökosit infiltrasyonu saptanmıştır (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** Tüm grupların kas liflerinde dejenerasyon ve lökosit infiltrasyonu açısından derecelendirilmesi.

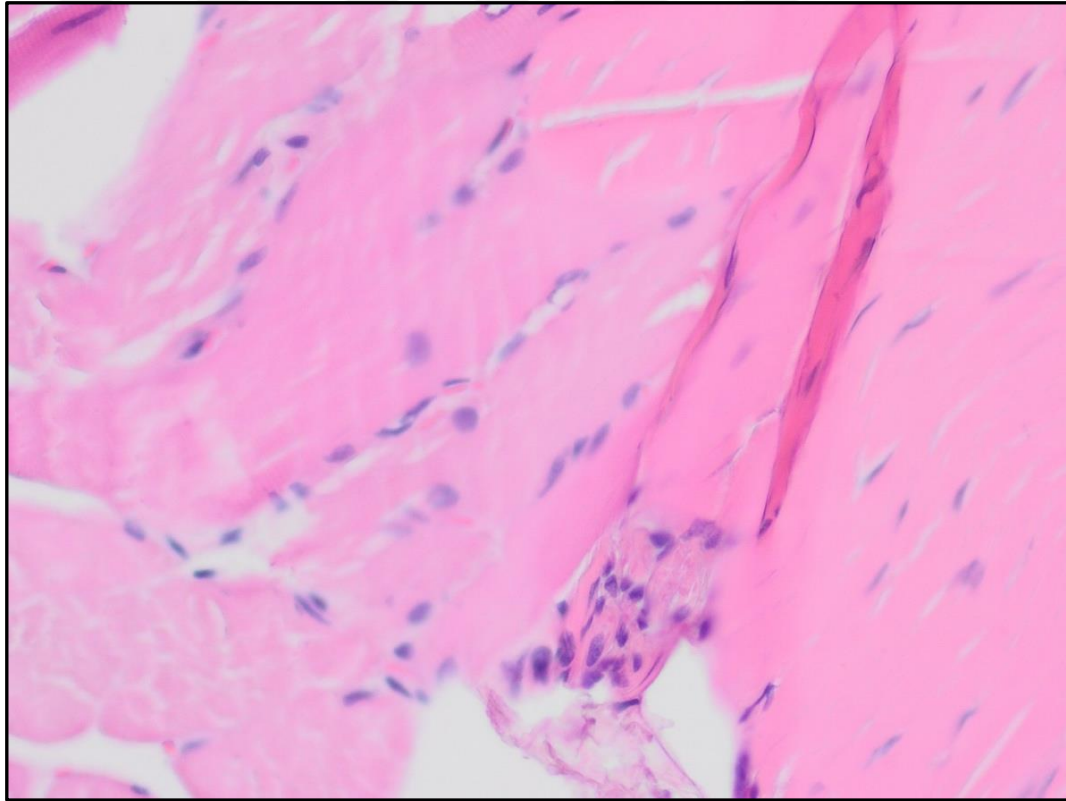
	<i>Gruplar</i>	<i>Kas liflerinde dejenerasyon</i>	<i>Lökosit infiltrasyonu</i>
<i>Grup 1</i>	<b>Kontrol 1</b>	0	1
	<b>Kontrol 2</b>	1	1
	<b>Kontrol 3</b>	1	1
	<b>Kontrol 4</b>	1	1
	<b>Kontrol 5</b>	1	0
	<b>Kontrol 6</b>	1	1
	<b>Kontrol 7</b>	1	1
	<b>Kontrol 8</b>	1	1
<i>Grup 2</i>	<b>Cerrahi Stres 1</b>	0	0
	<b>Cerrahi Stres 2</b>	0	0
	<b>Cerrahi Stres 3</b>	1	0
	<b>Cerrahi Stres 4</b>	1	0
	<b>Cerrahi Stres 5</b>	1	0
	<b>Cerrahi Stres 6</b>	1	0
	<b>Cerrahi Stres 7</b>	1	0
	<b>Cerrahi Stres 8</b>	1	1
<i>Grup 3</i>	<b>İskemi 1</b>	1	1
	<b>İskemi 2</b>	2	2
	<b>İskemi 3</b>	2	1
	<b>İskemi 4</b>	2	1
	<b>İskemi 5</b>	2	2
	<b>İskemi 6</b>	2	1
	<b>İskemi 7</b>	2	1
	<b>İskemi 8</b>	2	2
<i>Grup 4</i>	<b>HTK 1</b>	0	0
	<b>HTK 2</b>	1	0
	<b>HTK 3</b>	2	1
	<b>HTK 4</b>	2	1
	<b>HTK 5</b>	2	1
	<b>HTK 6</b>	2	1
	<b>HTK 7</b>	2	2
	<b>HTK 8</b>	2	1

**0:** Normal, **1:** Hafif (%1-%33 tutulma) **2:** Orta (%34-%66 tutulma) **3:** Şiddetli (%67-%100 tutulma)

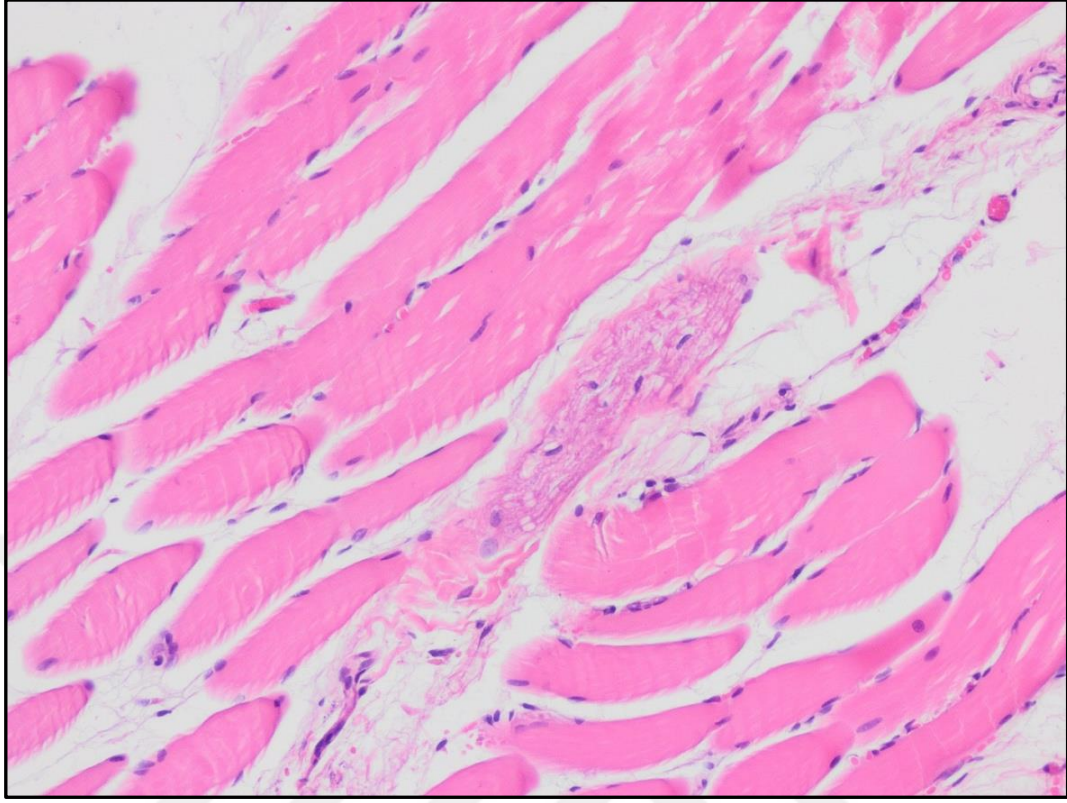
**Çizelge 4.2.** Gruplara göre kas lifi dejenerasyonunun derecelendirilmesi

Kas lifi dejenerasyonu	Gruplar <sup>T</sup>				Toplam
	Kontrol Grubu	Cerrahi Stres	İskemi	HTK	
	Sayı	Sayı	Sayı	Sayı	Sayı
Normal	1	2	0	1	4
Hafif	7	6	1	1	15
Orta	0	0	7	6	13
Şiddetli	0	0	0	0	0
<b>Toplam</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>32</b>

<sup>T</sup>: Kruskal Wallis; p: ,000



**Resim 4.1.** HTK grubundan (Grup 4) iskelet kası (enine kesit). Boya: Hematoksilen-Eozin (x400).



**Resim 4.2.** İskemi grubu (Grup 3) iskelet kası (enine kesit). Boya: Hematoksilen-Eozin (x200).

Gruplara göre kas liflerindeki dejenerasyonun dereceleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (p:,000). Bu anlamlı ilişki kontrol grubuyla, cerrahi stres grubu arasında saptanamamışken (p:,535) kontrol grubu ile HTK grubu arasında kas lifi dejenerasyonu açısından anlamlı bir ilişki bulunmuştur (p:,028). İskemi grubu ile HTK grubu arasında da anlamlı fark saptanamamıştır (p: ,487). Ancak kas lifi dejenerasyonu açısından iskemi grubunda normal bulgu saptanamamışken, 7 ratta orta derecede dejenerasyon saptanmıştır. HTK grubunda ise; 1 ratta normal, 1 ratta da hafif derecede dejenerasyon saptanmış olup 6 ratta orta derecede dejenerasyon bulunmuştur.

**Çizelge 4.3.** Gruplara göre lökosit infiltrasyonu derecelendirilmesi

Lökosit infiltrasyonu	Gruplar <sup>T</sup>				Toplam
	Kontrol Grubu	Cerrahi Stres	İskemi	HTK	
	Sayı	Sayı	Sayı	Sayı	Sayı
Normal	1	7	0	2	10
Hafif	7	1	5	5	18
Orta	0	0	3	1	4
Şiddetli	0	0	0	0	0
<b>Toplam</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>32</b>

<sup>T</sup>: Kruskal Wallis; p: ,001

Gruplara göre lökosit infiltrasyonu dereceleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (p:,001). Kontrol grubuyla, cerrahi stres grubu arasında lökosit infiltrasyonu açısından anlamlı bir fark saptanmıştır (p:,010). İskemi grubu ile HTK grubu arasında ise, anlamlı fark saptanamamıştır (p:,195). Kontrol grubuyla HTK grubunun karşılaştırılmasında ise bu grupların bir birine benzer olduğu saptanmıştır (p:,959).

## 5. TARTIŞMA

İskemi, dokulara ulaşan kan akımının kısıtlanmasından kaynaklanan ve hücre metabolizmasının devamlılığı için gerekli olan oksijen ve metabolitlerin hücreye ulaşmama durumudur. İskemik dokuya erken kan akışı, geri dönüşü olmayan hücre hasarı oluşturan iskemiye sınırlar. İskemik dokuya gecikmiş yeniden kan akışı, geri dönüşü olmayan bu doku hasarının önlenmesi için oldukça önemlidir; fakat bununla birlikte reperfüzyon, iskemiden kaynaklanan doku hasarını arttırabilir. Bu “iskemi-reperfüzyon hasarı” olarak tanımlanır ve çoklu organ disfonksiyonundan, geri dönüşlü hücre hasarına geniş bir patolojik spektruma neden olur [29,30].

İskemi ile ilgili reperfüzyon hasarı, iskemik bir dönemden sonra kanın dokulara dönüşü ile birlikte ortaya çıkan bir dizi patofizyolojik durumu ifade eder. İskemik dokunun reperfüzyonu, hücresel yapılar, membran lipitleri ve proteinler üzerinde hasara yol açabilir [31]. Serbest oksijen radikalleri, lenfositler, sitokinler, kompleman sistemi ve endotelial hücreler arasındaki çoklu etkileşimler reperfüzyon sürecinde önemli bir rol oynar [32,33].

İskemi reperfüzyon hasarı ciddi bir klinik durumdur. İskemik dokunun reperfüzyonu, paradoksal olarak lokal ödem ve kas dokusunun nekrozuna neden olur. Daha sonra, sistemik inflamatuvar yanıt sendromu oluşur ve çoklu organ yetmezliği (böbrek, solunum ve dolaşım sistemi vb.) bu patolojiyi takip eder ve bu da artan mortalite ve morbiditeye yol açar [34,35]. Reperfüzyon hasarının başlıca özellikleri hücre şişmesi, hücre iskeleti yapısının dejenerasyonu ve hücre zarında seçici geçirgenlik kaybıdır. Bu değişiklikler, doku ödemi ile birlikte azalmış bir kan akımı ile sonuçlanır [36].

Akut ekstremite revaskülarizasyonu sonrası artmış morbidite ve mortalite oranlarının ana nedeni reperfüzyon hasarıdır. Bu durum postiskemik sendrom, turnike sendromu veya Legrain-Cormier-Haimovici Sendromu olarak da bilinir. Bu sendromun orijinal açıklaması 1960 yılında Haimovici tarafından yapılmıştır. Daha sonra Cormier ve Legrain tarafından insan ve hayvanlarda akut bacak revaskülarizasyonunun tehlikelerini vurgulayan birçok rapor izlenmiştir [37]. İskemik bir ekstremiteye, embolektomi ile kan akışının ani restorasyonu, büyük

miktarda laktat, potasyum, miyogloblin ve olası bakteriyel toksinlerin sistemik arteriyal akıma salınmasına neden olur [22,38,39]. Eş zamanlı olarak, akut revaskularize edilmiş ekstremitte, hemokonsantrasyona ve hipovolemiye neden olabilecek masif ödem geliştirir, sonradan böbrek fonksiyon bozukluğu ve şoka sebep olabilir [37].

İskemi-reperfüzyon hasarının etkilerini durdurmak veya yavaşlatmak için birçok çalışma devam etmekte olup, aynı zamanda oksijen radikallerinin aktivitesini azaltmak veya durdurmak için moleküler çalışmalar da vardır [40-42].

Daha önce yapılmış pek çok çalışma, abdominal aorta çapraz kesişme sonucu oluşan reaktif oksijen radikallerinin varlığını ve kardiyovasküler cerrahide sık görülen bir hastalık olan abdominal aort anevrizmasının cerrahi tedavisinde inflamatuvar yanıtın neden olduğu miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarının varlığını bildirmiştir [41,43,44].

HTK çözeltisi, organların iskemiye tolere edebileceği süreyi uzatmak için, histidin / histidin hidroklorür aracılığıyla hücre dışı boşluğun yoğun bir şekilde tamponlanmasıyla birlikte, hücre dışı sodyum ve kalsiyumun geri çekilmesiyle ve organın soğutulması ile birlikte organ fonksiyonlarının inaktive edilmesi prensibine dayanır [23,24,28]. HTK'nın tüm bileşenleri vücutta doğal olarak bulunur.

HTK'nın, Avrupa'da kalp cerrahisinde yaygın olarak kullanılmasına rağmen, vasküler cerrahide ekstremitelerde kas dokusuna etkinliğini karşılaştıran çok az veri vardır. Akut bacak iskemisinde ekstremitenin tedavi sonrası korunması açısından HTK'yı diğer çözeltilerle karşılaştıran veri eksikliği de vardır. Son birkaç yılda seryum oksit, montelukast, iloprost, alprostadil ve asetaminofen gibi maddelerin iskemi reperfüzyon hasarındaki etkileri hayvan deneyleri ile araştırılmış, fakat HTK solüsyonunun iskemi reperfüzyon hasarı üzerindeki etkisi tarafımızca ilk kez sınanmıştır.

Biz bu çalışmamızda, klinikteki embolektomi ile revaskularize edilmiş ekstremiteleri ratlarda simule etmeyi ve HTK solüsyonunun etkilerini ortaya koymayı amaçladık. Deney sonrası çıkarılan biyopsi sonuçlarının istatistiksel analizinde iskemi oluşturulan gruplarla iskemi oluşturulmayan gruplar arasında iskeminin patolojik sonuçları açısından anlamlı bir fark bulunmuştur (p=0,001).

Bu veri bize rat ekstremitelerinde başarılı bir iskemi modeli oluşturduğumuzu göstermektedir. Ancak HTK verilen iskemik grup ile HTK verilmeyen iskemik grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p=0,195$ ). Bunun sebebi çalışılan gruplardaki hayvan sayısının azlığı olabilir. Buna rağmen HTK'nın %25 denekte iyileşme sağladığı da göze çarpmaktadır. HTK'nın rutin organ koruma pratiğinde iskemi ortaya çıkmadan önce HTK solüsyonu verilerek hücreler için iskemiye daha uzun süre dayanabilecekleri ekstrasellüler ortam oluşturulmaktadır. Böylece dokunun iskemiye dayanma süresi uzatılmaktadır. Ancak bu çalışmada HTK iskemi sonrası süreçte verilmiştir, bir kez iskemik hasar oluşuktan sonra istatistiksel olarak HTK'nın iskemiye karşı koruyucu özelliğinin ortadan kalkmakta olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada ABI ve revaskularizasyonu sonrası HTK'nın organ koruma etkisi incelenmek istenmiş olup, %25 denekte iskeminin patolojik sonuçlarında iyileşme saptanmış olması umut verici görünmektedir. Bu nedenle daha büyük popülasyonlu deneylerle sonuçların tekrar değerlendirilmesinin uygun olacağı düşünülmüştür.

Ratlarda HTK solüsyonunun hayatı tehdit edecek ciddi yan etkilerinin saptanmaması benzer deneylerin daha iri memeli hayvan (koyun, köpek vs.) gruplarına uygulanabileceğini akla getirmektedir.

## 6. SONUÇLAR

Bu deneysel çalışmada, ratlarda akut bacak iskemisi sonrası revaskularize edilmiş ekstremiteyi simule etmek ve HTK solüsyonunun post iskemi hücre koruyucu etkisini ortaya koymak amaçlanmıştır. Çıkarılan biyopsi materyallerinin ışık mikroskopisi incelemelerinin istatistiksel analizinde iskemi oluşturulan ve iskemi oluşturulmayan gruplar arasında iskeminin patolojik sonuçları açısından anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p=0,001$ ). Bu sonuç ratların alt ekstremitelerinde etkili iskemi yaratılabildiğinin kanıtıdır. Ancak HTK verilen iskemik grup ile HTK verilmeyen iskemik grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p=0,195$ ). Bunun sebebi HTK'nın preiskemik olarak verildiğinde elde edilen organ koruyucu etkisinin post iskemik olarak verildiğinde ortaya çıkmaması olabileceğidir. Ancak HTK verilen %25 denekte saptanan daha iyi patolojik sonuçlar elde edilen istatistiksel anlamsızlığın denek sayısı ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir. Denek sayısının artırılması ile daha kesin sonuçların alınabileceği düşünülmüştür. HTK solüsyonunun olumsuz yan etkilerinin saptanmaması benzer deneylerin daha iri memeli hayvan (koyun, köpek vs.) gruplarına uygulanabileceğini akla getirmektedir. Daha iri veya sayıca fazla memeli hayvan gruplarında yapılacak deneyler daha tatmin edici sonuçlar doğurabilecektir.

## 7. ÖZET

### **Uzamış Bacak İskemisi Olan Sıçanlarda Revaskülarizasyon Sonrası Reperfüzyon Öncesi Bretschneider Histidin-Triptofan-Ketoglutarat Solüsyonu Vermek Yararlı Mı?**

İskemi sonrası verilen HTK solüsyonunun; ratlarda, akut olarak oluşturulan ekstremitte iskemisi ve reperfüzyonu sonrası oluşan iskemi/reperfüzyon hasarına etkisini ortaya koymak amaçlanmıştır. Yapılan çalışmada, otuz iki adet Wistar dişi rat kullanılmıştır. Bu ratlar 4 gruba ayrılmıştır; Kontrol Grubu (Grup 1, n=8), cerrahi stres grubu (Grup 2, n=8), iskemi grubu (Grup 3, n=8) ve HTK grubu (Grup 4, n=8). Kontrol grubundan sadece biopsi alınmış, cerrahi stres grubunda ise median laparotomi ile sağ ana iliak arter ekspozurundan 2 saat sonra biopsi alınmıştır. İskemi ve HTK grubundaki hayvanlara median laparotomi sonrası, sağ ana iliak arter bağlanarak 8 saatlik iskemi ve ardından 2 saat süreli reperfüzyon sağlanmıştır. HTK grubunda cerrahi düğümün alınmasının hemen ardından 1 cc HTK solüsyonu abdominal aortadan bolus olarak enjekte edilmiştir (40 cc/kg- 1/6 oranında verilmiştir). Tüm gruplardan, Gastroknemius-Soleus kas grubunun distal yarımından histopatolojik inceleme için biyopsi alınmıştır. Örneklerin, kas lif dejenerasyonu ve lökosit infiltrasyonu açısından ışık mikroskopisi ile histopatolojik derecelendirilmesi yapılmıştır. Tüm gruplardan elde edilen histopatolojik veriler istatistiksel olarak incelendiğinde, ratlarda başarılı bir iskemi modeli oluşturulmuştur (p=0,001). Ancak HTK solüsyonu verilen iskemi grubu ile HTK solüsyonu verilmeyen iskemi grubu arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır (p=0,195). HTK verilen iskemik grup ile HTK verilmeyen iskemik grup arasında anlamlı bir fark saptanamamasının sebebi HTK 'nın preiskemik olarak verildiğinde elde edilen organ koruyucu etkisinin post iskemik olarak verildiğinde ortaya çıkmaması olabileceğidir. Ancak HTK verilen %25 denekte saptanan daha iyi patolojik sonuçlar elde edilen istatistiksel anlamsızlığın denek sayısı ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir. Denek sayısının artırılması ile daha kesin sonuçların alınabileceği düşünülmüştür. HTK solüsyonunun ciddi

yan etkilerinin saptanmaması benzer deneylerin diğer memeli hayvan (koyun, köpek vs.) gruplarına uygulanabileceğini akla getirmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** HTK Solüsyonu, Reperfüzyon Hasarı, Akut Ekstremitte İskemisi



## **8. ABSTRACT**

### **Is it Beneficial to use Bretschneider Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate Solution Before Reperfusion After Revascularization in Rats With Prolonged Limb Ischemia?**

The aim of this study was to determine the effect of the HTK solution on ischemia / reperfusion injury after acute onset of ischemia. Thirty two Wistar female rats were used in the study. These rats are divided into 4 groups; Control Group (Group 1, n= 8), surgical stress group (Group 2, n= 8), ischemia group (Group 3, n= 8) and HTK group (Group 4, n= 8). Only biopsy was performed in the control group, and biopsy was performed in the surgical stress group 2 hours after the right main iliac artery exploration with median laparotomy. The right common iliac artery of ischemia and HTK group animals were ligated after median laparotomy and 8 hours of ischemia followed by 2 hours of reperfusion was created. In the HTK group, 1 cc HTK solution was injected from the abdominal aorta immediately after the surgical knot was removed (40 cc/kg - 1/6). Biopsy was performed for histopathological examination of the distal half of Gastrocnemius-Soleus muscle group in all groups. The samples were histopathologically graded by light microscopy in terms of muscle fiber degeneration and leukocyte (PMNL) infiltration. When histopathological data obtained from all groups were analyzed statistically, a successful ischemia model was formed in rats ( $p= 0,001$ ). However, no significant difference was found between the ischemia group given the HTK solution and the ischemia group not given the HTK solution ( $p= 0,195$ ). A significant difference could not be found between HTK-administered ischemic group and non-HTG ischemic group, because it is possible that the organ-protective effect of HTK may be involved when given as a pre-ischemic, not post-ischemic. However, better pathological results in 25% of subjects with HTK suggest that the statistical significance could be related to the number of subjects. It is thought that more accurate results can be achieved by increasing the number of subjects. The absence of serious side effects

of the HTK solution suggests that similar experiments can be applied to other mammalian animals (sheep, dogs, etc.).

**Key Words:** HTK Solution, Reperfusion Injury, Acute Limb Ischemia



## 9. KAYNAKLAR

1. Jaff MR, White CJ, Hiatt WR, Fowkers GR, Dormandy J, Razavi M, et al. An Update on Methods for Revascularization and Expansion of the TASC Lesion Classification to Include Below-the-Knee Arteries: A Supplement to the Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II): The TASC Steering Committee. *Ann Vasc Dis* 2015; 8(4): 343-57.
2. Jivegard L, Wingren U. Management of acute limb ischaemia over two decades: the Swedish experience. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1999; 18(2): 93-5.
3. Howard DP, Banerjee A, Fairhead JF, Hands L, Silver LE, Rothwell PM, et al. Population-Based Study of Incidence, Risk Factors, Outcome, and Prognosis of Ischemic Peripheral Arterial Events: Implications for Prevention. *Circulation* 2015; 132(19): 1805-15.
4. Klonaris C, Georgopoulos S, Katsargyris A, Tsekouras N, Bakoyiannis C, Giannopoulos A, et al. Changing patterns in the etiology of acute lower limb ischemia. *Int Angiol* 2007; 26(1): 49-52.
5. Dormandy J, Heeck L, Vig S. Acute limb ischemia. *Semin Vasc Surg* 1999; 12(2): 148-53.
6. Fowkes FG, Housley E, Cawood EH, Macintyre CC, Ruckley CV, Prescott RJ. Edinburgh Artery Study: prevalence of asymptomatic and symptomatic peripheral arterial disease in the general population. *Int J Epidemiol* 1991; 20(2): 384-92.
7. Hirsch AT, Criqui MH, Treat-Jacobson D, Regensteiner JG, Creager MA, Olin JW, Krook SH, et al. Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *JAMA* 2001; 286(11): 1317-24.
8. Aune S, Trippestad A. Operative mortality and long-term survival of patients operated on for acute lower limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1998; 15(2): 143-6.

9. Berridge DC, Kessel DO, Robertson I. Surgery versus thrombolysis for initial management of acute limb ischaemia. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 6: CD002784.
10. Campbell WB, Ridler BM, Szymanska TH. Current management of acute leg ischaemia: results of an audit by the Vascular Surgical Society of Great Britain and Ireland. *Br J Surg* 1998; 85(11): 1498-503.
11. Eliason JL, Wainess RM, Proctor MC, Dimick JB, Cowan JA Jr, Upchurch GR, et al. A national and single institutional experience in the contemporary treatment of acute lower extremity ischemia. *Ann Surg* 2003; 238(3): 382-9; discussion 389-90.
12. Enezate TH, Omran J, Mahmut E, Patel M, Abu-Fadel MS, White CJ, et al. Endovascular versus surgical treatment for acute limb ischemia: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Cardiovasc Diagn Ther* 2017; 7(3): 264-71.
13. de Groot H, Rauen U. Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review. *Transplant Proc* 2007; 39(2): 481-4.
14. Auten RL, Davis JM. Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details. *Pediatr Res* 2009; 66(2): 121-7.
15. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 2005; 120(4): 483-95.
16. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med* 2009; 361(16): 1570-83.
17. Valko M, Leibfrits D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1): 44-84.
18. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000; 190(3): 255-66.
19. Denner L. Stroke and ischemia-reperfusion injury. *Drugs* 2001; 4(1): 20-2.
20. Mustoe T. Understanding chronic wounds: a unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy. *Am J Surg* 2004; 187(5A): 65-70.

21. Polderman KH. Application of therapeutic hypothermia in the ICU: opportunities and pitfalls of a promising treatment modality. Part 1: Indications and evidence. *Intensive Care Med* 2004; 30(4): 556-75.
22. Lemasters JJ, Thurman RG. Reperfusion injury after liver preservation for transplantation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 327-38.
23. Ringe B, Braun F, Moritz M, Zeldin G, Soriano H, Meyers W. Safety and efficacy of living donor liver preservation with HTK solution. *Transplant Proc* 2005; 37(1): 316-9.
24. Pokorny H, Rasoul-Rockenschaub S, Langer F, Windhager T, Rosenstingl A, Königsrainer A, et al. Histidine-tryptophan-ketoglutarate solution for organ preservation in human liver transplantation-a prospective multi-centre observation study. *Transpl Int* 2004; 17(5): 256-60.
25. Erhard J, Lange R, Scherer R, Kox WJ, Bretschneider HJ, Gebhard MM, Eigler FW, et al. Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) solution versus University of Wisconsin (UW) solution for organ preservation in human liver transplantation. A prospective, randomized study. *Transpl Int* 1994; 7(3): 177-81.
26. de Boer J, De Meester J, Smits JM, Groenewoud AF, Bok A, van der Velde O, et al. Eurotransplant randomized multicenter kidney graft preservation study comparing HTK with UW and Euro-Collins. *Transpl Int* 1999; 12(6): 447-53.
27. Spiegel HU, Schleimer K, Freise H, Diller R, Drews G, et al. Organ preservation with EC, HTK, and UW, solution in orthotopic rat liver transplantation. Part II. Morphological study. *J Invest Surg* 1999; 12(4): 195-203.
28. Hatano E, Kiuchi T, Tanaka A, Shinohara H, Mitai T, Satoh S, et al. Hepatic preservation with histidine-tryptophan-ketoglutarate solution in living-related and cadaveric liver transplantation. *Clin Sci (Lond)* 1997; 93(1): 81-8.
29. Geldi O, Kubat E, Ünal CS, Canbaz S. Acetaminophen Mitigates Myocardial Injury Induced by Lower Extremity Ischemia-Reperfusion in Rat Model. *Braz J Cardiovasc Surg* 2018; 33(3): 258-64.

30. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994. 81(5): 637-47.
31. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol* 2012; 298: 229-317.
32. Liu J, Wang H, Li J. Inflammation and Inflammatory Cells in Myocardial Infarction and Reperfusion Injury: A Double-Edged Sword. *Clin Med Insights Cardiol* 2016; 10: 79-84.
33. Qin L, Li G, Kirkiles-Smith N, Clark P, Fang P, Fang C, Wang Y, Yu ZX, et al. Complement C5 Inhibition Reduces T Cell-Mediated Allograft Vasculopathy Caused by Both Alloantibody and Ischemia Reperfusion Injury in Humanized Mice. *Am J Transplant* 2016; 16(10): 2865-76.
34. Lin B, Ginsberg MD, Busto R, Li L. Hyperglycemia triggers massive neutrophil deposition in brain following transient ischemia in rats. *Neurosci Lett* 2000; 278(1-2): 1-4.
35. Turchanyi B, Toth B, Racz I, Vendegh Z, Furesz J, Hamar J. Ischemia reperfusion injury of the skeletal muscle after selective deafferentation. *Physiol Res* 2005; 54(1): 25-32.
36. Homer-Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ. Post-ischaemic organ dysfunction: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997; 14(3): 195-203.
37. Beyersdorf F, Matheis G, Krüger S, Hanselmann A, Freisleben HG, Zimmer G, et al. Avoiding reperfusion injury after limb revascularization: experimental observations and recommendations for clinical application. *J Vasc Surg* 1989; 9(6): 757-66.
38. van der Spoel TI, Jansen of Lorkeers SJ, Agostoni P, van Belle E, Gyöngyö Doevendans PA, et al. Human relevance of pre-clinical studies in stem cell therapy: systematic review and meta-analysis of large animal models of ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res* 2011;; 91(4): 649-58.
39. Javadov S, Karmazyn M. Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection. *Cell Physiol Biochem* 2007; 20(1-4): 1-22.
40. dos Santos CHM, Aydos RD, Neto EN, Odashiro Mijji LN, Cassino PC, Alves II, et al. Ischemic Postconditioning Assessment in the Liver of Rats

Undergoing Mesenteric Ischemia and Reperfusion. *Braz J Cardiovasc Surg* 2016; 31(4): 287-90.

41. Kiris I, Okutan H, Savas C, Yonden Z, Delibas N. Gadolinium chloride attenuates aortic occlusion-reperfusion-induced myocardial injury in rats. *Saudi Med J* 2007; 28(3): 347-52.
42. Pierce B, Bole I, Patel V, Brown DL. Clinical Outcomes of Remote Ischemic Preconditioning Prior to Cardiac Surgery: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Am Heart Assoc* 2017; 6(2).
43. Bown MJ, Nicholson ML, Bell PR, Sayers RD. Cytokines and inflammatory pathways in the pathogenesis of multiple organ failure following abdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2001; 22(6): 485-95.
44. Grunenfelder J, Inderbitzin D, Zünd G, Avital I, Burkhardt T, Candinas D, Turina M. Increased susceptibility of the left compared to the right ventricle to remote ischemia/reperfusion injury in human C1-inhibitor-overexpressing transgene mice. *J Invest Surg* 2002; 15(5): 281-6.