

Langendorff-Perfüze Sıçan Kalbinde İskemi Süresi ile İskemi/Reperfüzyon Hasarı Arasındaki İlişki: Değerlendirme Kriterleri Neler Olmalı?

How to Interpret Relationship Between Ischemic Time and Ischemia/Reperfusion Injury in Langendorff Perfused Rat Hearts

Elif ERTUNA,^a
Saadet TÜRKSEVEN,^a
Hatice Mürvet HAYRAN,^b
Mustafa Fevzi SARGON,^b
Mukadder YASA^a

^aFarmakoloji AD,
Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
İzmir

^bAnatomi AD,
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Ankara

Geliş Tarihi/Received: 24.05.2012
Kabul Tarihi/Accepted: 30.10.2012

Bu makale, "İzole perfüze sıçan kalbinde iskemi/iskemik önkoşullama üzerinde levosimendanın etkileri" başlıklı projenin öncül çalışmalarından oluşmuş ve Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu (BAP-04ECZ026) tarafından desteklenmiştir.

Bu araştırma, International Postgraduate Student Meeting on Pharmaceutical Sciences (IPSMPS) (24-27 Haziran 2010, İzmir)'nde poster bildirisi olarak tebliğ edilmiştir.

Yazışma Adresi/Correspondence:
Elif ERTUNA
Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
Farmakoloji AD, İzmir,
TÜRKİYE/TURKEY
elif.ertuna@ege.edu.tr

ÖZET Amaç: Langendorff izole perfüze kalp modelinde yapılan çalışmalarda, iskemi sürelerinin ve hasar değerlendirme kriterlerinin çeşitliliği, sonuçların yorumlanmasını zorlaştırmaktadır. Bu çalışmada, izole sıçan kalplerinde farklı iskemi süreleri ile iskemi sonrası miyokardiyal fonksiyonel iyileşme, doku canlılığı ve ultrastrüktürel değişiklikler arasındaki ilişkinin araştırılması ve sonuçların doğru yorumlanabilmesi için kullanılması gereken kriterlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. **Gereç ve Yöntemler:** Sabit akımlı Langendorff düzeneğinde kalpler, sürekli perfüzyon (kontrol), 15 (İskemi15), 30 (İskemi30) veya 45 (İskemi45) dakika global iskemi sonrasında 30 dakika reperfüzyon uygulanan gruplara ayrılmıştır. İzole kalplerde LVDP, +dP/dtmaks, -dP/dtmaks, kalbin dakikadaki atım hızı, aritmi insidansı ve süresi ölçülmüştür. Koroner akım örneklerinden kreatin kinaz-MB (CK-MB) tayini, kalp dokusu kesitlerinde trifeniltetrazolyum boyama ve elektron mikroskobu ile morfolojik değerlendirmeler yapılmıştır (LVDP; LVDP = LV sistolik basınç – LV diastolik basınç). **Bulgular:** Kontrol ve İskemi15 gruplarında fonksiyonel parametrelerin tümü deney süresince değişmemiştir. İskemi30 grubunda sol ventrikül basınç gelişimi, kasılmanın maksimum hızı ve gevşemenin maksimum hızı erken reperfüzyon döneminde azalmış, zamana bağlı maksimum kasılma değeri reperfüzyon sonunda bazal değere dönmüş, kalp hızı azalmıştır. İskemi45 grubunda bütün fonksiyonel parametreler erken reperfüzyon döneminde azalmış ve reperfüzyon sonunda bazal değerlere dönmüş, kalp hızı değişmemiştir. İskemi uygulanan bütün kalplerde aritmi skorları artmıştır. Kontrol, İskemi15 ve İskemi30 gruplarında CK-MB düzeyi artmamış, trifeniltetrazolyum boyama sonuçları bu gruplarda geri dönüşümsüz doku hasarı meydana gelmediğini göstermiştir. İskemi45 grubunda hem CK-MB düzeyi artmış hem de nekrotik alan varlığı gözlenmiştir. Morfolojik çalışmalarda miyofibril skorları yüksek olmamakla birlikte en belirgin ultrastrüktürel değişiklikler İskemi15 grubunda görülmüştür. İskemi süresi arttıkça ödem, glikojen, mitokondri ve nükleus skorları olarak ifade edilen ultrastrüktürel değişiklikler azalmıştır. **Sonuç:** Çalışmamızın sonuçları, Langendorff izole perfüze sıçan kalplerinde yapılan iskemi reperfüzyon çalışmalarında sonuçların doğru yorumlanabilmesi için fonksiyonel parametrelerin morfolojik ve biyokimyasal verilerle birlikte değerlendirilmesi gerektiğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: İskemi; reperfüzyon hasarı; kalp; ultrastrüktür; sıçanlar

ABSTRACT Objective: Diversities in ischemia time and injury assessment criteria used in Langendorff perfused isolated heart models complicate evaluation of the results. In this study, relationship between myocardial functional recovery, tissue viability and ultrastructural changes following ischemia were investigated in order to determine criteria which should be used to make precise interpretations. **Material and Methods:** Hearts were perfused in the constant flow Langendorff mode and were subjected to either continuous perfusion (Control), or to 15 (Ischemia15), 30 (Ischemia30) or 45 (Ischemia45) minutes ischemia followed by 30 minutes reperfusion. Left ventricular developed pressure, maximum contraction and relaxation rates, heart rate, arrhythmia incidence and duration were evaluated. Coronary effluent and heart cross-sections were used for creatine kinase-MB (CK-MB) measurements and morphological studies, respectively. **Results:** All functional parameters remained unchanged in Control and Ischemia15 groups. In Ischemia30 group, LVDP, +dP/dtmax and -dP/dtmax declined in early reperfusion, +dP/dtmax returned to basal values and heart rate declined at the end of reperfusion. In Ischemia45 group, all functional parameters except for heart rate declined in early reperfusion and returned to basal values at the end of reperfusion. Arrhythmia scores increased in all hearts subjected to ischemia. CK-MB was not elevated and triphenyltetrasolium staining showed that tissues were viable in Control, Ischemia15 and Ischemia30 groups. Necrotic fields were found and CK-MB increased in Ischemia45 group. Despite low myofibril scores, most marked ultrastructural pathological changes were found in Ischemia15 group. As ischemia time increased, the ultrastructural changes expressed as edema, glycogen, mitochondria and nuclei scores decreased. **Conclusion:** Our findings show that functional parameters should be evaluated in conjunction with morphological and biochemical data to make precise interpretation in ischemia reperfusion studies in isolated Langendorff perfused rat hearts.

Key Words: Ischemia; reperfusion injury; heart; ultrastructure; rats

doi: 10.5336/medsci.2012-30601

Copyright © 2013 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2013;33(2):493-500

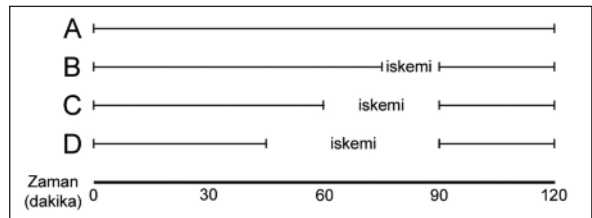
Kalp ameliyatları, perkütan koroner girişimler veya anjina atakları esnasında global veya bölgesel miyokard iskemisi meydana gelebilmektedir. İskemiye ve iskemik miyokardın yeniden perfüze olmasına bağlı olarak miyokardiyal sersemleme veya kalıcı miyokard hasarı gelişebildiği için, iskemi/reperfüzyon hasarının incelenmesine yönelik birçok araştırma yapılmaktadır.¹ Akut miyokardiyal iskeminin neden olduğu olayların ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılacak ilaçların etkilerinin incelenmesinde, Langendorff izole perfüze kalp sistemi *in situ* kalp modellerinden daha iyi kontrol edilebilir deney şartları sağlamaktadır.² Ancak fare, sıçan, tavşan ve kobay gibi farklı türler kullanılarak yapılan, iskemi/reperfüzyon hasarının etkilerinin incelendiği çalışmalar arasında, miyokard iskemisi süreleri ve post-iskemik hasar dereceleri arasındaki farklılıklar, elde edilen sonuçların karşılaştırılmasında güçlük oluşturmaktadır.³ Bu nedenle çalışmamızda Langendorff izole perfüze sıçan kalbinde iskemi süresine bağlı olarak meydana gelen yapısal değişiklikler ile fonksiyonel değişikliklerin birlikte değerlendirilerek, aralarındaki olası bağlantının belirlenmesi amaçlanmıştır. İskemi süresi ile miyokardiyal hasar arasındaki ilişkinin kurulabilmesi, miyokardiyal iskemi ve infarktüs tedavisi için düşünülen farmakolojik stratejiler için önemli veriler sağlayacaktır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmada 200-300 g ağırlığındaki erkek Wistar sıçanlar kullanıldı. Bu çalışma Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylanmış (onay no: 04-49/216) ve çalışmada kullanılan hayvanlar “Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Hakkında Rehber” (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) prensipleri doğrultusunda bakılarak, deneye alınmıştır. Sıçanlar anestezi uygulanmaksızın giyotin ile dekapite edildi. Toraks açılarak izole edilen kalpler soğuk perfüzyon solüsyonuna (Tyrode (g/l): NaCl, 7,5; KCl, 0,35; MgCl₂, 0,1; CaCl₂, 0,15; NaH₂PO₄, 0,05; NaHCO₃, 1,7; Glukoz, 2,0) koyularak durduruldu. Kalpler Langendorff düzeneğinde (Commat Ltd., Ankara, Türkiye) hazır bekletilen kanüle takılarak aort aracılığı ile retrograd olarak ve hayvanların ağırlıklarına göre dakikada 7-10 ml olacak

şekilde sabit akım uygulanarak perfüzyona başlandı. Perfüze 37 °C’de sabit tutularak %95 O₂, %5 CO₂ karışımı ile sürekli gazlandırıldı. Kalpler düzeneğe takıldıktan sonra fonksiyonel parametrelerin ölçümü için sol ventrikül içerisine 0-10 mmHg’lık bir ön yük oluşturacak şekilde bir kateter aracılığıyla basınç transdüsörüne bağlı olan içi sıvı dolu lateks bir balon yerleştirildi ve sol ventrikül basınç gelişimi (LVDP; LVDP = LV sistolik basınç – LV diyastolik basınç), zamana bağlı maksimum kasılma ve gevşeme değerleri (+dp/dt_{maks}, -dp/dt_{maks}), perfüzyon basıncı ve kalp hızı kaydedildi (Biopac MP35, Biopac Student Lab PRO 3.7.0, CA, ABD). Fonksiyonel parametrelere ilişkin ölçümler reperfüzyonun 10. dakikasında, erken reperfüzyon döneminde yapıldı. Kalbe yerleştirilen iğne elektrotlar ile bipolar elektrogram kaydı yapıldı ve deney sonrasında erken reperfüzyon dönemi (reperfüzyonun ilk 10 dakikası) bipolar EKG kayıtları incelenerek, Lambeth Conventions’a göre aritmi insidansı ve süresi saptanarak skorlandı.^{4,5} Stabilizasyon periyodu sonunda LVDP’si 60 mmHg’nin, aort perfüzyon basıncı 70 mmHg’nin altında olan kalpler deney dışı bırakıldı. Sıçanlar kontrol grubu (sürekli perfüzyon), 15, 30 ve 45 dakika global iskemi grupları olmak üzere 4 gruba (sırasıyla Kontrol, İskemi15, İskemi30 ve İskemi45) ayrıldı (Şekil 1). Bütün deney gruplarında 30 dakikalık stabilizasyon süresi sonundaki değerler; bazal değer, 90. dakika reperfüzyon başlangıcı, 100. dakika erken reperfüzyon dönemi ve 120. dakika reperfüzyon sonu olarak kabul edildi.

Kardiyak hücrelerde geri dönüşümsüz hasar oluşumunun tespit edilebilmesi amacıyla deneyin 30 ve 90. dakikalarında toplanan koroner akım örneklerinden CK-MB tayini yapıldı (BioDPC Turbo CK-MB - Immulite 1000, BioDPC). Bütün grup-



ŞEKİL 1: Sabit akım ile Langendorff modunda perfüze edilen kalplere uygulanan perfüzyon protokollerini. Kontrol (A; normal perfüzyon, n=5); İskemi15 (B; 15 dakika iskemi, n=4); İskemi30 (C; 30 dakika iskemi, n=5); İskemi45 (D; 45 dakika iskemi, n=5).

larda alınan örnekler enzim tayini yapılacak güne kadar -20 °C'de bekletildi.

Deney sonunda düzenekten çıkarılan kalplerden apekse komşu iki adet 1 mm'lik kesit alınarak elektron mikroskopik çalışmalar için ayrıldı. Alınan örnekler %2,5 gluteraldehit solusyonu içinde 24-48 saat süre ile bekletildi. Daha sonra %1'lik osmiyum tetroksit ile 1 saatlik postfiksasyon uygulandı. Sorenson fosfat tamponu ile yıkanan örnekler alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi, propilen oksit ile muamele edildikten sonra, propilen oksit ile araldit karışımı ile muamele edildi, araldit CY 212 içinde plastik bloklara gömüldü. Elde edilen araldit bloklardan LKB ultratom ile alınan 2 mikronluk yarı ince kesitlerde ince kesitler için kullanılacak sahalar tespit edildi. Daha sonra 60-90 nm kalınlıkta ince kesitler alındı; uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlandıktan sonra (boyama) JEOL JEM 1200 EX transmisyon elektron mikroskobu (Tokyo, Japonya) ile değerlendirildi, skorlama yapıldı ve fotoğraflandı. Skorlama için her gruptan dörder örnek değerlendirmeye alındı. Her örnek için intraselüler ödem ve kapiller skoru için 20 farklı saha, glikojen, nukleus ve miyofibril skorlaması için 20 hücre incelemeye alınarak skorlandı. Mitokondri skoru için ise her örnekte 100 mitokondri değerlendirildi. Tablo 1'de gösterilen skorlama kriterleri oluşturulurken literatürde yer alan tablolardan yararlanıldı.⁶ Bu kriterlerin belirlenmesi için bir ön inceleme yapıldı ve bu çalışma için uygun olan kriterler seçildi.

Ultrastrüktürel çalışmalar için ayrılan iki kesit dışındaki bütün kalp kesitlerinde geri dönüşümsüz hasar oluşumunun tespit edilebilmesi amacıyla kesitler, 37 °C'de 20 dakika %1'lik 2,3,5-trifeniltetrazolyum klorür çözeltisi (0.1M fosfat tampon çözeltisi, pH=7,4) ile inkübe edildi. Daha sonra %10'luk formalin çözeltisi ile fikse edilen kesitlerde kırmızıya boyanmamış infarktlı alan olup olmadığı görsel olarak değerlendirildi.⁷

VERİLERİN ANALİZİ

Bütün veriler medyan (minimum ve maksimum değer) olarak verildi. "n" kalplerin izole edildiği hayvan sayısını göstermektedir. Verilerin analizi SPSS 9.05 (Chicago, IL, ABD) programında yapıldı. Aynı

TABLO 1: Elektron mikroskopik çalışmada kullanılan skorlama kriterleri.

İntraselüler ödem	Yok	0
	Hafif ödem az vakuol	1
	Belirgin ödem ve çok sayıda vakuol	2
	Sarkolemmanda yırtılma	3
Glikojen	Normal	0
	Hafif azalma	1
	Orta derecede azalma	2
	Belirgin azalma veya yokluğu	3
Mitokondri	Normal	0
	Kristalların zigzag profili veya bal peteği görüntüsü	1
	Kristalların destrüksiyonu	2
	Mitokondrinin tam destrüksiyonu	3
Kapillerler	Normal endotel hücreleri	0
	Pinositotik veziküllerin azlığı	1
	Lokalize endotelial şişme	2
	İnterselüler birleşmelerde ayrılma ve dejenerasyon	3
Nukleus	Normal	0
	Homojen dağılımlı kromatin	1
	Topaklaşma ve marjınasyon	2
	Büzüşme	3
Miyofibriller	Normal I bandları	0
	Kontraksiyon bandlarının varlığı	1
	İleri derecede gevşek sarkomer	2
	Miyofibrillerde lizis	3

hayvandan elde edilen veriler için "Wilcoxon matched-pairs signed rank test" ve farklı hayvandan elde edilen veriler için "Mann-Whitney U testi" kullanıldı. Aritmi skorlarının değerlendirilmesinde "Mann-Whitney U-testi" kullanıldı. Elektron mikroskobu skorlarının değerlendirilmesi "Kruskal Wallis Testi" sonrasında "Mann-Whitney U testi" ve "Jonckheere Test for Ordered Alternatives" kullanılarak yapıldı. p değerleri 0,05'den küçük bulunduğu fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

İZOLE KALPLERDE ÖLÇÜLEN FONKSİYONEL PARAMETRELER

Sol Ventrikül Basınç Gelişimi (LVDP)

Kontrol ve İskemi15 gruplarında LVDP deney süresince değişmemiştir. İskemi30 ve İskemi45 grup-

larında LVDP iskemi sonrasında anlamlı şekilde azalmıştır ($p=0,043$) ve bu azalma İskemi30 grubunda deney sonuna kadar devam etmiş ($p=0,043$), İskemi45 grubunda ise bazal değerlere geri dönmüştür (Tablo 2).

Kasılmanın Maksimum Hızı (+dP/dt_{maks})

Kontrol, İskemi15 ve İskemi30 gruplarında +dP/dt_{maks} deney sonunda değişmemiştir. İskemi30 ve İskemi45 gruplarında +dP/dt_{maks} iskemiden sonra anlamlı şekilde azalmıştır ($p=0,043$) ve her iki grupta bu azalma deney sonunda bazal değerlere dönmüştür (Tablo 2).

Gevşemenin Maksimum Hızı (-dP/dt_{maks})

Kontrol ve İskemi15 gruplarında -dP/dt_{maks} deney süresince değişmemiştir. İskemi30 ve İskemi45 gruplarında -dP/dt_{maks} iskemi süresi sonrasında an-

lamlı şekilde azalmıştır ($p=0,043$). Bu azalma İskemi30 grubunda deney sonunda da devam etmiş ($p=0,043$), İskemi45 grubunda ise deney sonunda bazal değerlere geri dönmüştür (Tablo 2).

Kalbin Dakikadaki Atım Hızı

Kontrol ve İskemi15 gruplarında dakikadaki atım hızı deney süresince değişmemiştir. İskemi30 ve İskemi45 gruplarında kalbin dakikadaki atım hızı deney sonunda anlamlı şekilde azalmıştır ($p=0,043$), (Tablo 2).

Aritmi İnsidansı ve Süresi

Sıçan kalplerinde Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında iskemi uygulanan bütün gruplarda aritmi insidansı ve süresini ifade eden aritmi skorlarının [medyan (min-maks)] istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir (Kontrolle karşı İ-

TABLO 2: Fonksiyonel Parametreler, Stabilizasyon sonrası (Bazal, 30, dk), reperfüzyonun 10, dakikası (Erken reperfüzyon, 100, dk) ve reperfüzyon sonunda (120, dk) ölçülen kalbin fonksiyonel parametreleri, değerler [medyan (min-maks)] olarak verilmiştir.

	Kontrol (n=5)	İskemi15 (n=4)	İskemi30 (n=5)	İskemi45 (n=5)
LVDP (mmHg)				
Bazal	91 (72-135)	87 (85-120)	96 (78-115)	98 (79-110)
Erken reperfüzyon	100 (84-109)	67 (54-98)	57 (45-83)	81 (70-102)
p değeri	0,686	0,068	0,043	0,043
Reperfüzyon sonu	98 (83-107)	77 (72-100)	91 (76-110)	100 (88-109)
p değeri	0,893	0,068	0,043	0,345
+dP/dt maks (mmHg/sn)				
Bazal	2774 (2372-4125)	3009 (2879-3461)	3091 (2539-3799)	3060 (2617-3463)
Erken reperfüzyon	2959 (2800-3329)	1995 (1586-2849)	1672 (1417-2570)	2478 (1836-3051)
p değeri	0,500	0,068	0,043	0,043
Reperfüzyon sonu	2909 (2713-3193)	2597 (2489-3223)	3049 (2618-3513)	3093 (2727-3534)
p değeri	0,500	0,068	0,138	0,225
-dP/dt maks (mmHg/sn)				
Bazal	1751 (1247-2438)	1757 (1675-1922)	1884 (1460-2220)	1737 (1368-1946)
Erken reperfüzyon	1705 (1476-2011)	1080 (807-1769)	846 (713-1280)	1429 (1034-1796)
p değeri	0,500	0,068	0,043	0,043
Reperfüzyon sonu	1618 (1435-1844)	1304 (1189-1841)	1648 (1304-1761)	1656 (1359-1916)
p değeri	0,345	0,068	0,043	0,500
Kalbin dakikadaki atım hızı (atım/dk)				
Bazal	270 (252-298)	242 (240-279)	249 (224-258)	269 (237-280)
Erken reperfüzyon	267 (238-306)	247 (228-270)	247 (221-267)	273 (220-287)
p değeri	0,686	1,000	0,893	0,500
Reperfüzyon sonu	262 (244-290)	235 (232-243)	221 (190-251)	232 (214-253)
p değeri	0,104	0,144	0,043	0,043

+dP/dt_{maks}: Kasılmanın maksimum hızı; -dP/dt_{maks}: Gevşemenin maksimum hızı.

kemi 15, İskemi30 ve İskemi45 grupları için sırasıyla $p=0,016$, $p=0,008$, $p=0,008$ olmuştur (Tablo 3).

KORONER AKIMDA CK-MB DEĞERLERİ

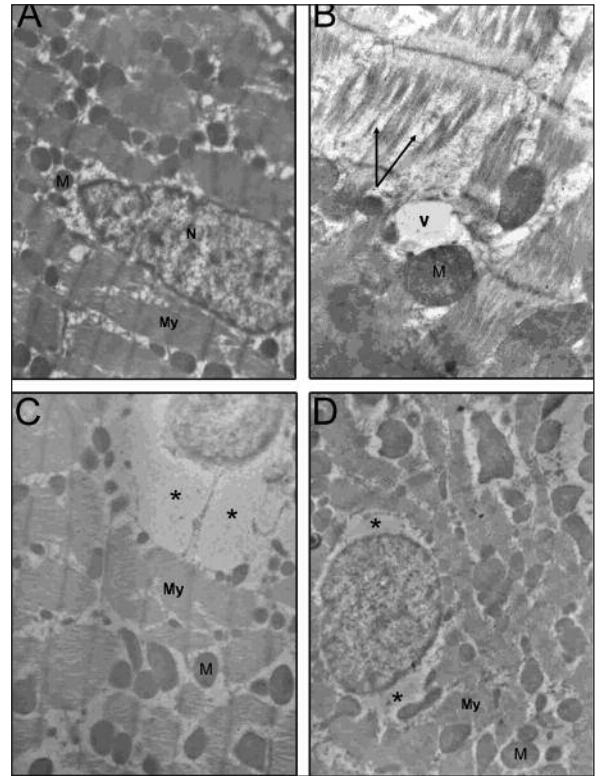
Tüm gruplarda deneyin 90. dakikasında koroner akım örnekleri alınarak CK-MB değerleri ölçülmüş ve sadece İskemi45 grubunda CK-MB değerinin bazal değerler ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p=0,043$), (Tablo 4).

İZOLE KALPLERDE İNFAKT ALANI

Kontrol, İskemi15 ve İskemi30 gruplarındaki kalplerden alınan kesitlerde trifeniltetrazolyum klorür boyama sonrasında belirgin infarkt alanına rastlanmamıştır. İskemi45 grubunda az sayıda örnekte infarktlı bölge gözlemlenmiştir (Veriler gösterilmemiştir).

İZOLE KALPLERDE İSKEMİ SÜRESİNE BAĞLI OLARAK OLUŞAN ULTRASTRÜKTÜREL DEĞİŞİKLİKLER

Skorlama için her gruptan dörder örnek değerlendirilmeye alındı. Her örnek için intraselüler ödem ve kapiller skorları için 20 farklı saha; glikojen, nükleus ve miyofibril skorlaması için 20 hücre incelemeye alınarak skorlandı. Mitokondri skorları için ise her örnekte 100 mitokondri değerlendirildi. Her örnek için değerlendirilen 20 hücre veya alan ve



RESİM 1: A) Kontrol Kalplerinde Ultrastrüktürel Görünüm. Normal bir kalp kası hücresi; mitokondri (M), miyofibriller (My) ve nükleus(N) (x6000). **B)** 15 Dakika İskemi Uygulanan Kalplerde Ultrastrüktürel Görünüm. Oklar miyofibriller ayrılmalara ve lizisi göstermektedir, mitokondri (M), glikojen miktarında azalma, hücre içi vakuol (V) mevcuttur, (x10000). **C)** 30 Dakika İskemi Uygulanan Kalplerde Ultrastrüktürel Görünüm. Belirgin ödem (*) ve miyofibrillerde (My) hafif ayrılma, hücre içi glikojen miktarında hafif azalma ve çoğu normal görünümlü mitokondri (M) izlenmektedir, (x6000). **D)** 45 Dakika İskemi Uygulanan Kalplerde Ultrastrüktürel Görünüm. Perinükleer ödem (*), mitokondri (M) ve miyofibriller (My), (x6000). Ultrastrüktürel görünüm deney sonunda düzenekten çıkarılan kalplerden apekse komşu iki adet 1 mm'lik kesit alınarak JEOL JEM 1200 EX transmisyon elektron mikroskobu kullanılarak değerlendirildi, skorlama yapıldı ve fotoğraflandı.

TABLO 3: Reperfüzyon başlangıcında (90, ile 100, dakikalar arasında) gözlenen aritmi insidansı ve süresi.

	Aritmi skoru [medyan (min-maks)]	p değeri
Kontrol (n=5)	1 (1-1)	
İskemi15 (n=4)	3 (2-4)	0,016
İskemi30 (n=5)	4 (2-5)	0,008
İskemi45 (n=5)	4 (3-5)	0,008

TABLO 4: Koroner akımda ölçülen CK-MB değerleri.

	CK-MB (ng/mL) [medyan (min-maks)]		p değeri
	Bazal (30. dk)	İskemi sonu (90. dk)	
Kontrol (n=5)	1,79 (1,66-1,96)	1,96 (1,44-2,08)	0,500
İskemi15 (n=4)	1,63 (1,43-1,88)	2,05 (1,61-2,37)	0,273
İskemi30 (n=5)	1,94 (1,60-2,34)	1,76 (1,58-1,94)	0,138
İskemi45 (n=5)	1,55 (1,14-1,84)	1,92 (1,54-2,17)	0,043

100 mitokondri için verilen skorlar toplanmış, her örnekte ultrastrüktürel değişiklikleri ifade eden bir total skor intraselüler ödem, glikojen, mitokondri, nükleus, kapiller ve miyofibriller için ayrı ayrı hesaplanarak istatistik yapılmıştır. İskemi süresinin hücrelere etkileri değerlendirildiğinde 0 dakika (kontrol grubu) ile 45 dakika arasında değişen iskemi süresinin hücresel ödem, glikojen, mitokondri ve nükleus üzerinde anlamlı etkileri olduğu belirlenmiştir (sırasıyla; $p=0,003$, $p=0,002$, $p=0,003$, $p=0,003$) (Resim 1). Bu değişikliklerin 15 dakika iskemi uygulaması sonrasında pik yaptığı gösterilmiştir ($p=0,029$). On beş dakikayı aşan sürelerdeki iskemi uygulamalarında, iskemi süresi arttıkça ha-

sarın azalma yönünde eğilim gösterdiği saptanmıştır [ödem ($p<0,001$), glikojen ($p<0,001$), mitokondri ($p=0,001$) ve nükleus ($p=0,001$)]. Kapiller ve miyofibril skorları bütün gruplardaki örneklerde 0 olarak bulunmuştur. Tablo 5'te iskemi hasarının incelendiği gruplarda hücrelerdeki intraselüler ödem ile glikojen, mitokondri ve nükleuslarda meydana gelen değişikliklerin total skorlarının medyan (min-maks) değerleri verilmektedir.

TARTIŞMA

Bu çalışmada Langendorff izole perfüze sıçan kalbinde iskemi süresine bağlı olarak meydana gelen yapısal ve fonksiyonel değişiklikler birlikte değerlendirilerek, aralarındaki olası bağlantının gösterilebilmesi ve deney sonuçlarının yorumlanmasında kullanılacak parametrelerin belirlenmesi hedeflenmiştir. Ölçülen bütün fonksiyonel parametreler Kontrol ve İskemi15 gruplarında deney süresince değişmemiştir. İskemi30 grubunda LVDP, $+dP/dt_{maks}$ ve $-dP/dt_{maks}$ reperfüzyonun erken döneminde azalmış, kalbin dakikadaki atım hızında ise sadece deney sonunda bir azalma gözlenmiştir. $+dP/dt_{maks}$ reperfüzyon sonunda bazal değerlere dönerken LVDP ve $-dP/dt_{maks}$ değerleri deney sonunda da düşük olarak belirlenmiştir. Lochner ve ark. da 30 dakika global iskemi uygulanan sıçan kalplerinde reperfüzyon sonunda LVDP'nin azaldığını göstermişlerdir.⁸ İzole sıçan kalplerinde farklı iskemi süreleri uygulanarak yapılan bir diğer çalışmada da, 30 dakika iskemi uygulandığında belirgin bir fonksiyonel bozukluk olduğu ancak bizim çalışmamızdan farklı olarak 15 dakika iskemi uygulamasının da sol ventrikülün

kontraktıl fonksiyonlarında orta şiddette bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir.⁹ Bizim çalışmamızda İskemi45 grubunda kalp hızı hariç ölçülen bütün fonksiyonel parametrelerin reperfüzyonun erken döneminde azaldığı, reperfüzyon sonunda bazal değerlere yakınlığı gözlenmiştir. Bu grupta sadece kalbin dakikadaki atım hızı deney sonunda azalmıştır. Wang ve ark.nın farelerde yaptıkları bir çalışmanın sonuçları kalp hızı ile ilişkili olarak bizim bulgularımızı destekler niteliktedir.³ Bu araştırmacılar, 25 dakikadan daha az süren iskeminin kalbin fonksiyonlarında geçici ve hafif bir bozukluğa neden olduğunu, fakat reperfüzyon sonunda mekanik işlevin düzeldiğini, uzun süren iskemi periyodlarında ise kalp fonksiyonlarında daha belirgin ve kalıcı bozukluklar oluştuğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda 45 dakika iskemi sonrasında gözlenen hasar ise kalıcı olmamıştır. Farklılığın nedeni bu iki araştırmada farklı hayvan türlerinin kullanılması olabilir. Ayrıca Wang ve ark. fare kalplerinde yapılan iskemi reperfüzyon çalışmalarında elde edilen sonuçların istikrarlı olmadığını da belirtmişlerdir.³

İskemi15, İskemi30 ve İskemi45 gruplarında iskemi uygulanması sonucunda izole kalplerde Kontrol grubuna göre aritmi insidansı ve süresi artmıştır. İskemi reperfüzyon hasarının aritmojenik etkisi bilinmektedir ve çalışmamızın bulguları literatür ile uyumludur.^{1,10}

Kalp hücrelerinde yapısal hasar oluştuğu zaman kardiyak enzimler hücrelerden dışarı sızar. Serumda normal değerlerin üzerinde kardiyak enzim bulunması miyokard infarktüsü ile ilişkili iskemiye de kapsayan çeşitli patolojik durumların kli-

TABLO 5: Hücrelerde meydana gelen yapısal değişikliklerin total skorları.

	Hücrelerde meydana gelen yapısal değişiklikler [medyan (min-maks)]			
	Ödem	Glikojen	Mitokondri	Nükleus
Kontrol (n=4)	1 (1-1)	1 (0-1)	15,5 (13-16)	1 (1-2)
İskemi15 (n=4)	28,5 (27-31)	20 (20-20)	69 (67-71)	32 (31-32)
p değeri (MW)	0,029	0,029	0,029	0,029
İskemi30 (n=4)	19 (17-21)	14 (13-15)	45 (39-54)	24 (23-26)
İskemi45 (n=4)	15 (13-16)	7,5 (5-10)	34 (28-43)	20,5 (20-24)
p değeri (KW, JT)	0,003, <0,001	0,002, <0,001	0,003, 0,001	0,003, 0,001

KW, Kruskal-Wallis test; JT, Jonckheere Test for Ordered Alternatives; MW, Mann-Whitney U-test.

nik tanısı için geniş ölçüde kullanılmaktadır. Ayrıca iskemi-reperfüzyon hasarını da içeren farklı deney şartları altındaki izole kalplerden enzim salıverilişini gösteren birçok çalışma da yapılmıştır.^{9,11-13} Kısa süreli iskemi periyodlarında CK değerlerinde yükselme olmamakta, ancak hücrede geri dönüşümsüz bir hasar meydana geldiğinde CK değerleri yükselmektedir.⁹ Çalışmamızda 15 ve 30 dakika iskemi uygulanan kalplerde CK-MB düzeylerinin artmaması, bu gruptaki kalplerde hücre ölümlerinin gerçekleşmediğini göstermektedir. Trifeniltetrazolyum boyama sonrasında bu gruptaki kalplerde nekrotik bölgelere rastlanmamış olması da 15 ve 30 dakika iskemi uygulamasının sıçan kalplerinde geri dönüşümsüz hasar oluşturmadığı yönündeki bulgularımızı desteklemektedir. Kırk beş dakika iskemi uygulaması reperfüzyonun ilk dakikalarında kalplerden salıverilen CK-MB miktarında bir artışa neden olmuştur. Trifeniltetrazolyum boyama ile bu grupta az miktarda nekrotik alana rastlanmış olması, 45 dakika iskeminin kardiyomiyositlerin bir bölümünde geri dönüşümsüz hasar oluşturduğunu düşündürmektedir.

Morfolojik değişikliklerin saptanabilmesi amacıyla yaptığımız elektron mikroskobu incelemelerinde, çalışma grupları içerisinde en belirgin ultrastrüktürel değişikliklerin saptandığı grup, İskemi15 grubudur. Miyofibrillerin dizilişi ve lizis oranı bu grup için diğerlerine göre daha belirgin olsa da, hücrelerin çoğunda çok yüksek skor değerlerine ulaşmamıştır. On dakika süren iskeminin intraselüler ozmotik etkili partikül miktarını artırdığı, hücrenin şişmesine neden olduğu ve meydana gelen bu değişikliklerin elektron mikroskobunda görülebildiği bilinmektedir.¹⁴ Bununla birlikte hücre ve hücre membranındaki geri dönüşümsüz hasarın 15 dakika gibi kısa süreli iskemi sonucunda oluşmadığı, tersinir iskemiye neden olan daha uzun süreli iskemik periyodlar sonucunda oluştuğu ileri sürülmektedir.^{14,15} Hücre içi ödem dikkate alındığında İskemi30 ve İskemi45 gruplarının skorlarının İskemi15 grubundakilere oranla daha düşük olduğu görülmüştür. İskemi15 grubunda miyofibrillerin ayrılmış görülmesi ve yer yer lizise rastlanmasının nedeni hücre içi ödem olabilir. On beş

dakika iskemi uygulanan örneklerde miyofibril skorunun düşük oluşu bu kalplerde belirgin bir fonksiyonel bozulma oluşmamasını açıklamaktadır. Mankad ve ark.nın yaptıkları bir çalışmada 15 dakika iskemi sonrasında koroner arterlerde endotel fonksiyon bozukluğu olduğu; bununla birlikte, endotel hasarına ilişkin elektron mikroskopik bulguların sadece 60 dakika iskemi sonrasında belirgin olduğu bildirilmiştir.¹⁶ Araştırmacılar, hasarlı bölgelerin homojen olarak dağılmaması nedeniyle fonksiyonel bozukluğa lokal elektron mikroskopik bulguların eşlik etmeyebileceğini ve bizim çalışmamızdakine benzer şekilde, lokalize yapısal değişiklikler ile global fonksiyon arasında korelasyon olmadığı için birbirlerinin belirteci olarak kullanılamayacaklarını belirtmişlerdir.¹⁶ Ayrıca, karaciğerde yapılan iskemi/reperfüzyon hasarının incelendiği başka bir çalışmada da ışık mikroskopik, elektron mikroskopik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal verilerin birlikte değerlendirilerek yorumlandığı görülmüştür.¹⁷

SONUÇ

Sonuç olarak çalışmamızda, 15 dakika global iskemi uygulaması sonrasında belirgin ultrastrüktürel değişiklikler meydana gelen kalplerde fonksiyonel bozulma olmamış ve geri dönüşümsüz hasar belirteçleri yönünden negatif sonuçlar alınmıştır. Otuz dakikanın üzerindeki sürelerde global iskemi uygulaması geri dönüşümsüz doku hasarına neden olmuş, fakat bu grupların elektron mikroskopik bulguları, kalbin fonksiyonel işlevlerindeki bozulmayı bire bir yansıtmamıştır. Bu nedenle, iskemik hasar derecesine karar verilirken fonksiyon ve ultrastrüktürel hasar korelasyonunun doğru bir şekilde yapılabilmesi için, elektron mikroskopik tekniklerle birlikte daha genel ve dokunun bütünü hakkında bilgi veren başka incelemelerin de çalışmaya dahil edilmesi gerekmektedir.

Teşekkür

Bu proje Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu (BAP-04ECZ026) tarafından desteklenmiştir. Şekillerin düzenlenmesindeki teknik destekleri nedeniyle Dr.Ecz. Mehmet Arun'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Inafuku H, Kuniyoshi Y, Yamashiro S, Arakaki K, Nagano T, Morishima Y, et al. Determination of oxidative stress and cardiac dysfunction after ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2012 Aug 31. doi: 10.5761/atcs.0a.12.01896.
2. Verdouw PD, van den Doel MA, de Zeeuw S, Duncker DJ. Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes. *Cardiovasc Res* 1998;39(1):121-35.
3. Wang QD, Swärdh A, Sjöquist PO. Relationship between ischaemic time and ischaemia/reperfusion injury in isolated Langendorff-perfused mouse hearts. *Acta Physiol Scand* 2001;171(2):123-8.
4. Grippo AJ, Santos CM, Johnson RF, Beltz TG, Martins JB, Felder RB, et al. Increased susceptibility to ventricular arrhythmias in a rodent model of experimental depression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286(2):H619-26.
5. Leprán I, Papp JG. Effect of long-term oral pretreatment with levosimendan on cardiac arrhythmias during coronary artery occlusion in conscious rats. *Eur J Pharmacol* 2003;464(2-3):171-6.
6. Taşdemir O, Katircioğlu SF, Küçükaksu DS, Göl K, Hayran M, Keçeligil T, et al. Warm blood cardioplegia: ultrastructural and hemodynamic study. *Ann Thorac Surg* 1993;56(2):305-11.
7. Li D, Li NS, Chen QQ, Guo R, Xu PS, Deng HW, et al. Calcitonin gene-related peptide-mediated cardioprotection of postconditioning in isolated rat hearts. *Regul Pept* 2008;147(1-3):4-8.
8. Lochner A, Genade S, Moolman JA. Ischemic preconditioning: infarct size is a more reliable endpoint than functional recovery. *Basic Res Cardiol* 2003;98(5):337-46.
9. Palmer BS, Hadziahmetovic M, Veci T, Angelos MG. Global ischemic duration and reperfusion function in the isolated perfused rat heart. *Resuscitation* 2004;62(1):97-106.
10. Maxwell SR, Lip GY. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int J Cardiol* 1997;58(2):95-117.
11. Galinanes M, Hearse DJ. Assessment of ischemic injury and protective interventions: the Langendorff versus the working rat heart preparation. *Can J Cardiol* 1990;6(2):83-91.
12. Wienen W, Jüngling E, Kammermeier H. Enzyme release into the interstitial space of the isolated rat heart induced by changes in contractile performance. *Cardiovasc Res* 1994; 28(8):1292-8.
13. Cordwell SJ, Edwards AV, Liddy KA, Moshkanbaryans L, Solis N, Parker BL, et al. Release of tissue-specific proteins into coronary perfusate as a model for biomarker discovery in myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Proteome Res* 2012;11(4):2114-26.
14. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation* 2001;104(24):2981-9.
15. Yellon DM, Baxter GF. Protecting the ischaemic and reperfused myocardium in acute myocardial infarction: distant dream or near reality? *Heart* 2000;83(4):381-7.
16. Mankad PS, Amrani M, Rothery S, Severs NJ, Yacoub MH. Relative susceptibility of endothelium and myocardial cells to ischaemia-reperfusion injury. *Acta Physiol Scand* 1997; 161(1):103-12.
17. Baykara B, Tekmen I, Cilaker Mıcılı S, Sönmez Ü, Erbil G, Özbal S, et al. [Prophylactic and therapeutic effects of carnosine in ischemia reperfusion injury of liver]. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2010;30(6):1896-905.