

## Sıçan torasik aortları vasküler reaktivite cevapları bozulmadan soğukta saklanabilir

Rat thoracic aorta can be cold-preserved without any change in vascular reactivity

Anacak Yetik G <sup>1</sup>, Erol A <sup>2</sup>, Çınar G M <sup>2</sup> Catravas D.J. <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji ABD

<sup>2</sup> Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji ABD

<sup>3</sup> Medical College of Georgia, Vascular Biology Center, Georgia-USA

### Özet

Vasküler dokuların uzun süre canlılığının bozulmadan saklanabilmesi, hem organ transplantasyonunun hem de farmakolojik araştırmaların verimliliği açısından önemlidir. Böylece ilaçların uzun süreli etkilerini değerlendirebilmek, örnek sayısını artırmak ve insan damarlarında çalışma olanağını artırmak mümkün olabilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda sıçan aortlarında, endotel ve vasküler düz kas fonksiyonlarının +4 °C de, Krebs-bikarbonat çözeltilisinde saklamak sureti ile korunup korunamayacağını araştırmayı hedefledik.

Bu amaçla sıçan torasik aortik halkaları izolasyondan hemen sonra ya da +4°C'de, Krebs-bikarbonat solüsyonunda 1 veya 15 saat bekletildikten sonra vasküler reaktivite cevapları değerlendirildi. Endotele bağımlı gevşeme cevapları  $10^{-6}$  M fenilefrin ile önkastırma sonrasında asetilkolin ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M), düz kasa bağımlı gevşeme cevapları ise tromboksan agonisti U46619 ( $3 \cdot 10^{-8}$  M) ile prekontraksiyon sonrasında nitroglicerine ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M) verilerek alındı.

Taze izole edilmiş, +4°C'de 1 ya da 15 saat saklanmış damarların fenilefrin ve U46619'a karşı verdikleri maksimum kasılma cevapları, endotele veya düz kasa bağımlı maksimum gevşeme cevapları ve duyarlılıkları arasında herhangi bir fark görülmedi.

Bu sonuçlar, kullanılan damar türüne göre uygun solüsyon ve uygun süre seçilerek damarların vasküler fonksiyonlarının bozulmadan saklanabileceği ideal şartların sağlanabildiğini ve sıçan aortunun endotele ve düz kasa bağımlı kasılma ve gevşeme cevaplarının korunabileceği ideal şartların 15 saate kadar +4 °C'de Krebs-bikarbonat solüsyonunda saklamak sureti ile elde edilebildiğini ortaya koymaktadır.

**Anahtar sözcükler:** Soğuk, saklama, Krebs-bikarbonat, sıçan aortu, endotele bağlı gevşeme, düz kasa bağlı gevşeme, düz kas kasılması, vasküler reaktivite

### Summary

*It is important to preserve vascular functions of isolated blood vessel for productivity of both organ transplantation and pharmacological and physiological research. Thus it is possible to investigate long-term effect of drugs, increase sample number taken from the same animal and study on human blood vessel. The aim of this study was, therefore, to determine whether vascular smooth muscle and endothelial cell function could be preserved in thoracic aorta after storage in Krebs-bicarbonate solution at 4°C.*

*Vascular reactivity has been evaluated in rat thoracic aortic rings; either fresh isolated or preserved in Krebs-bicarbonate solution at 4°C for 1 or 15 hour. Endothelium-dependent relaxation responses were evaluated by acetylcholine ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M), after precontraction with phenylephrine ( $10^{-6}$  M) and endothelium-independent relaxations were obtained by nitroglycerine ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M) following U46619-induced precontraction. There were no statistically significant differences in contractile and relaxant responses between all groups.*

*These results demonstrated that it is possible to provide ideal condition to preserve vascular reactivity of isolated blood vessel by using appropriate storage solution and period depend on vessel type and suggested that the ideal conditions can be achieved by storing rat thoracic aortic rings in Krebs-bicarbonate solution at 4°C for up to 15 hour to preserve contractile and relaxant responses of both endothelium and vascular smooth muscle.*

**Keywords:** Cold, preservation, Krebs-bicarbonate, rat aorta, endothelial dependent relaxation, endothelial independent relaxation, smooth muscle contraction, vascular reactivity

## Giriş

Damarların fizyolojik ve farmakolojik cevaplarının incelenmesine olanak veren izole organ banyosu deneylerinde, hücre fonksiyonlarının bozulmadan kullanılması gereği bu araştırmaların kısıtlayıcı tarafını oluşturmaktadır. Vasküler endotelyumun izolasyon ve saklama sırasında hasar görebileceğini bildiren pek çok çalışma nedeniyle (1, 2) damarlar izolasyondan hemen sonra organ banyolarına asılmaktadır. Damarların taze kullanılması gereği aynı hayvandan alınacak damar segmentlerinde sürdürülecek araştırmaların sayısını kısıtlamakta ve kardiyovasküler hastalıkların damar duvarlarındaki etkilerinin incelendiği deneysel hayvan modellerinde her farklı damar tipi için farklı bir hayvanın kullanılmasına neden olmaktadır. İnsan damarlarının kullanıldığı durumlarda bu damarlara ulaşmak çok daha zor olacağı için bu konu farmakolojik araştırmalar için önemli bir problem oluşturmaktadır.

Damar dokularının saklanması sadece deneysel araştırmaların yapılmasını kolaylaştırmak açısından değil aynı zamanda organ transplantasyonunun başarısı açısından da önemli bir rol oynamaktadır. Vasküler endotelyum damarın fizyolojik fonksiyonları için gerekli olan pek çok vazoaaktif maddenin yapısından sorumlu dinamik bir yapıdır (3). Bu yapının bütünlüğünün korunması hem organın bütünlüğü, hem de vasküler allograftın transplantasyonu açısından son derece önemlidir. Vasküler dokuların yeterince iyi korunmadığı durumlarda nitrik oksit üretiminde azalma, vazospazm ve artmış trombojeniteye bağlı transplante edilen dokunun fonksiyonlarında azalma görülebilmektedir (4, 5). Bunların yanı sıra ilaçların uzun süreli etkilerini değerlendirebilmek için de vasküler dokuların uzun süre canlılığının bozulmadan saklanabilmesi önemlidir.

Tüm bu nedenlerle damarları güvenilir ve pratik bir yolla saklamak amacıyla araştırmacılar buzdolabında saklama (1, 2, 6) veya çok daha düşük sıcaklıklarda dondurarak saklama yöntemini kullanmışlardır (7). Ancak bu çalışmalarda endotele ve düz kasa bağlı cevapların bozulmadan kalabildiği koşullar net olarak ortaya çıkmamıştır.

Vasküler dokuların fonksiyonlarının korunması temel olarak seçilen saklama solüsyonuna ve süresine bağlıdır (8). Bu çalışmada belli bir süre saklama sonrasında sıçan aortlarında endotelial ve düz kasa bağımlı kasılma ve gevşeme cevaplarının bozulmadan korunabileceği bir ortamın sağlanıp sağlanamayacağının test edilmesi

amaçlanmıştır. Bir kaç gün boyunca soğukta saklanan izole damar preparatlarında kasılma cevapları ile birlikte endotele bağımlı gevşeme cevaplarının bozulduğu bildirilmiştir (1,6). Gece boyunca soğukta saklanan dokular da ise kullanılan saklama solüsyonuna bağlı değişmek üzere daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenle bu çalışmada damar fonksiyonlarının korunmasını sağlayacak optimum saklama periyodunu yakalamak amacıyla dokular 15 saat +4°C' de saklanacaklar ve saklama solüsyonu olarak da ekstraselüler tipte bir iyon içeriğine sahip olan Krebs-bikarbonat solüsyonunu kullanılmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Sıçanların torasik aortaları izole edilmiş ve hemen Krebs-bikarbonat çözeltisi içine alınmıştır. Krebs-bikarbonat çözeltisi, içeriğinde; NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.21 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.92 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, dekstroz 5.5 mM ve pH:7.4 olacak şekilde hazırlanmıştır.

Dokular kendilerini çevreleyen bağ dokusu ve yağdan dikkatlice temizlenmiş ve yaklaşık 3-4 mm uzunluğunda halka şeklinde dört adet damar segmenti alınmıştır. Torasik aortadan alınan damar segmentleri hemen (0 saat; kontrol) ya da 1 saat veya 15 saat süreyle + 4 °C Krebs-bikarbonat çözeltisinde bekletildikten sonra izole organ banyolarına asılmışlardır. Organ banyoları %95 O<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub> ile gazlandırılan ve sıcaklığı 37°C de sabit tutulan Krebs-bikarbonat solüsyonu ile doldurulmuştur. Elde edilen izometrik kasılma ve gevşeme cevapları bir poligraf aracılığıyla kaydedilmiştir (Danish Myo Technology A/S).

Damar segmentleri, 15 dakikalık dengelenme süresinden sonra, literatürde verilen ve ön deneylerle doğrulanan 2 g dinlenme gerilimine aşamalı olarak getirilmişlerdir. Damarlar, bu koşullarda stabilizasyon için 90 dakika süreyle bekletilmişlerdir. Bu sırada her 15 dakikada bir Krebs-bikarbonat çözeltisi ile yıkanmaları sağlanmıştır. Sadece endotele bağlı gevşeme faktörünün etkilerini araştırmak amacıyla; endojen prostanoit sentezini inhibe etmek üzere siklooksijenaz sentez inhibitörü indometazin, banyo final konsantrasyonu 10<sup>-5</sup> M olacak şekilde Krebs-bikarbonat çözeltisi içerisine ilave edilmiştir.

Düz kas kasılma cevabını oluşturmak üzere fenilefrin hidroklorür kümülatif konsantrasyonlarında (3x10<sup>-10</sup>-

$10^{-4}$ ) verilmiş ve submaksimal kasılma cevabı  $10^{-6}$  M fenilefrine karşı alınmıştır. Daha sonra bu konsantrasyonda ( $10^{-6}$  M) tek doz olarak verilen fenilefrin ile ön kasılmayı takiben endotele bağımlı gevşeme cevaplarını oluşturmak üzere kümülatif asetilkolin (ACh;  $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M) uygulanmıştır. Düz kasa bağımlı cevaplar ise tromboksan agonisti U46619 ( $3.10^{-8}$  M tek doz) ile ön kasılmayı takiben nitrogliserin (NTG;  $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) verilerek oluşturulmuştur.

Konsantrasyon-cevap eğrileri arasında dokular 45 dakika süreyle dinlenmeye bırakılmış ve bu süre içinde banyonun her 15 dakikada bir yıkanması sağlanmıştır.

**Materyal:** U46619 Calbiochem'den (San Diego, CA) fenilefrin, indometazin, asetilkolin ve nitrogliserin Sigma'dan (St. Louis, MO) alınmıştır. Fenilefrin ve nitrogliserin stok solüsyonları distile suda, indometazin stok solüsyonu ise etanolde çözülerek hazırlanmıştır.

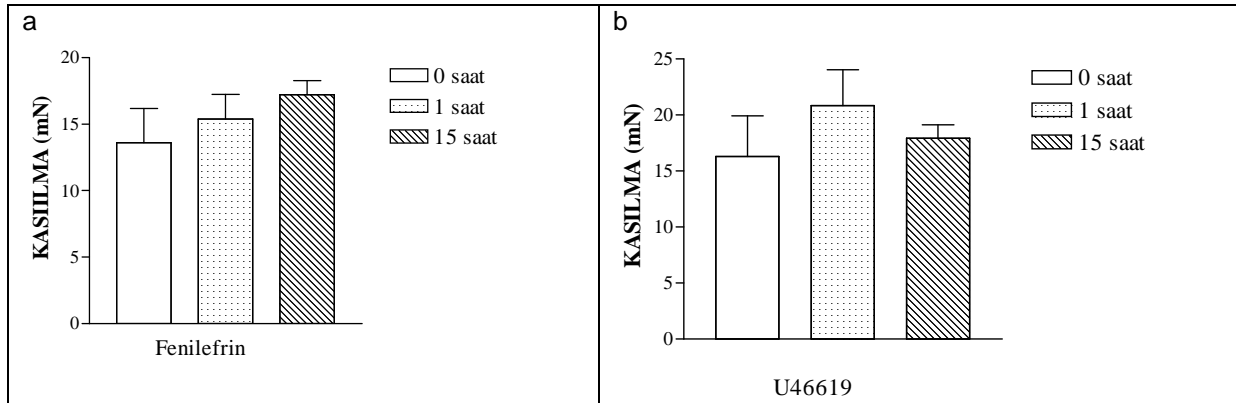
**İstatistiksel Analizler:** Tüm veriler ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası ( $O \pm O.S.H$ ) şeklinde verilmiştir. Her bir deneyde n değeri damarların alındığı tavşan sayısını göstermektedir. Gevşeme cevapları ön kasılmayı oluşturan ajana karşı alınan maksimum kasılma cevabının yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Asetilkoline karşı % 45'den daha az maksimum gevşeme cevabı veren damar segmentleri istatistiksel değerlendirmeye alınmamıştır.

Vasküler reaktivite analizlerinde maksimum gevşemenin veya kasılmanın yarısını oluşturan konsantrasyonun negatif logaritması (-logEC50 veya pD<sub>2</sub>) değerinin hesaplanması iteratif nonlineer regresyonla yapılmıştır. Bunun için Prism 3.0 (GraphPad Software, A.B.D.) bilgisayar yazılımı kullanılmıştır. İstatistiksel analizlerde grupları karşılaştırmak için Prism 3.0 bilgisayar yazılımının varyans analiz (one-way ANOVA) modülü kullanılmıştır. P değeri 0.05'ten küçük bulunduğu zaman fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## Bulgular

### Kasılma cevapları

Taze izole edilmiş damarlarda milinewton (mN) cinsinden saptanan maksimum kasılma cevabının %80'ini oluşturan konsantrasyon  $10^{-6}$  M olarak saptanmış ve endotele bağımlı gevşemeleri incelemek amacı ile dokuların ön gerilimi  $10^{-6}$  M fenilefrin verilerek sağlanmıştır. İzolasyondan hemen sonra asılan sıçan torasik aort preparatları  $10^{-6}$  M fenilefrine karşı güçlü kasılma cevabı oluşturmuş ve bu cevaplar 1 saat veya 15 saat +4°C de bekletilen damarlara göre herhangi bir farklılık göstermemiştir (Şekil 1a). Benzer şekilde  $3.10^{-8}$  M U46619'a karşı gelişen kasılma cevabı soğukta bekletilen damarlarda değişmemiştir (Şekil 1b).

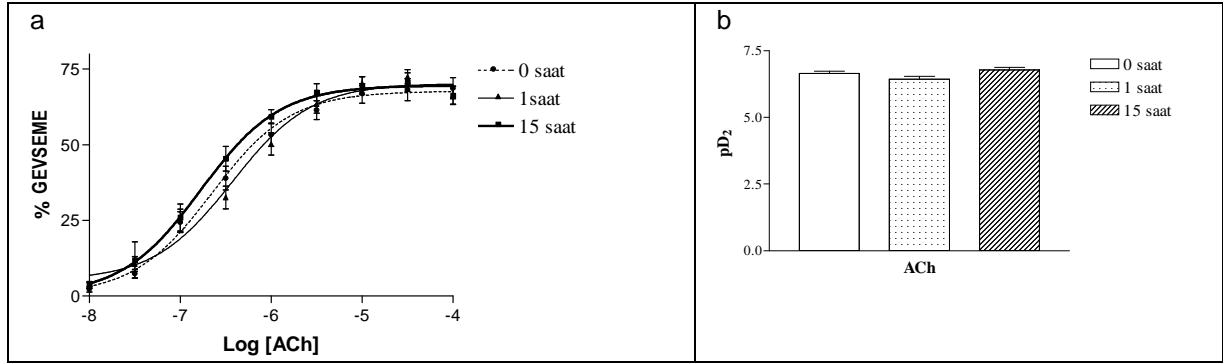


**Şekil 1.** Taze izole edilmiş, 1 saat ya da 15 saat + 4 °C de Krebs-bikarbonat s olüsyonunda saklanmış sıçan torasik aortlarında kasılma cevaplarının mN (milinewton) değerleri üzerinden karşılaştırılması. a) Fenilefrin  $10^{-6}$  M, b) U46619  $3.10^{-8}$  M'a karşı verilen maksimum kasılma cevaplarını gösteren grafikler.

### Gevşeme cevapları

Sıçan torasik aort preparatlarında  $10^{-6}$  M fenilefrinle ön kasılmayı takiben verilen asetilkolin (ACh), konsantrasyona bağımlı olarak gevşeme cevapları oluşturmuştur. Taze izole edilmiş veya 1 saat ya da 15 saat soğukta bekletilmiş torasik aort preparatlarında asetilkolinin neden olduğu maksimal gevşeme

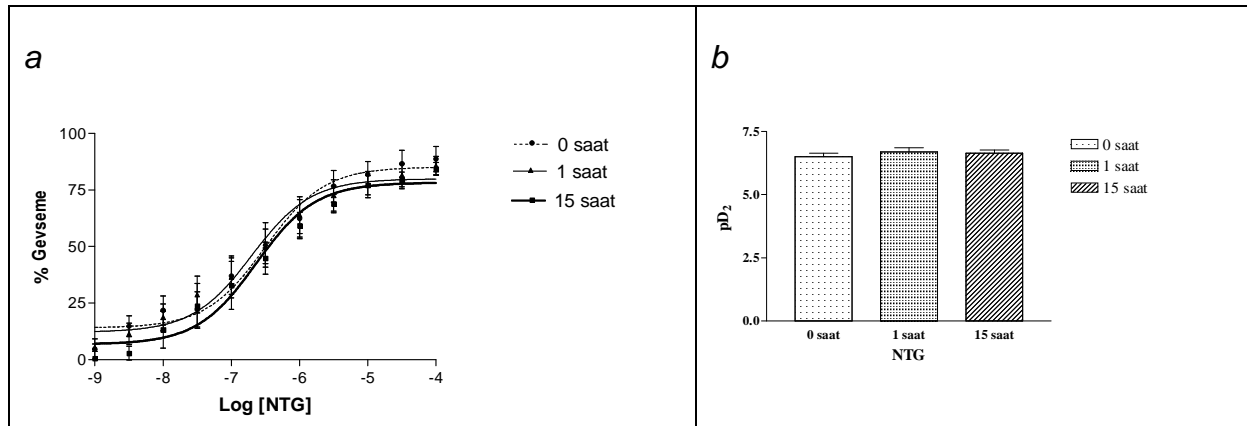
cevabında (Şekil 3a) veya duyarlılıkta (Şekil 3b) istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir azalma bulunmamıştır. ACh'nin neden olduğu endotele bağımlı gevşeme cevapları soğukta bekletme işleminden etkilenmemiş ve vasküler endotelial hasar olmadığı ortaya konmuştur.



**Şekil 2.** Taze izole edilmiş, 1 saat ya da 15 saat + 4 °C de Krebs-bikarbonat s olüsyonunda saklanmış sıçan torasik aortlarında endotele bağlı gevşeme cevaplarının karşılaştırılması. ACh a karşı verilen a) Maksimum gevşeme cevabı b) Duyarlılık değerlerini gösteren grafikler.

Düz kasa bağlı gevşeme cevabı oluşturan nitrogliserin taze izole edilmiş torasik aort segmentlerinde %88'lik bir maksimum gevşeme cevabı oluşturmuştur. Kısa ya da uzun süre soğukta Krebs-bikarbonat çözeltisi içinde bekletme işlemi bu cevabı etkilememiştir. Düz kasa

bağımlı gevşeme cevabına duyarlılık ne 1 saat ne de 15 saat soğukta saklanmasından etkilenmemiştir.



**Şekil 3.** Taze izole edilmiş, 1 saat ya da 15 saat + 4 °C de Krebs-bikarbonat s olüsyonunda saklanmış sıçan torasik aortlarında endotelten bağımsız gevşeme cevaplarının karşılaştırılması NTG'ye karşı verilen a) Maksimum gevşeme cevabı b) Duyarlılık değerlerini gösteren grafikler.

## Tartışma

Vasküler dokuların uzun süre canlılığının bozulmadan saklanabilmesi deneysel çalışmaların verimliliği açısından önem kazanmaktadır. Dokuların fonksiyonel olarak saklanabilmesi bu dokuların izole organ banyosu çalışmalarında eğitim verilmesi sırasında kullanılması veya aynı hayvana ait farklı damarların ya da uzun süreli inkübasyonların etkilerinin araştırılmasına imkan sağlaması nedeni ile hayvanlardan alınan dokuların daha verimli kullanılabilmesine olanak tanıyacaktır. Ayrıca transplante edilen organlar genellikle hemen yakınlarındaki damar yatakları ile birlikte transplante edildikleri için transplantasyonunun başarısı açısından damarların fonksiyonlarının bozulmadan saklanabilmesi

önemlidir. Literatürde bu amaca yönelik olarak damar dokularının kültürünün yapılması, dondurularak ya da soğukta (+4°C ) saklanması yöntemleri denenmiştir. Kültüre edilen damarlarda kasılma cevaplarının farklılaştığı ve düz kasların kasılmadan çoğalan düz kas tipine dönüştüğünü gösteren pek çok çalışma mevcuttur (9, 10). Diğer bir yöntem ise damarların sıvı azotta dondurularak saklanmasıdır. Ancak bu yöntemde endotele ve düz kasa bağlı gevşeme cevapları ile düz kas kasılmalarının bozulduğu bildirilmiştir (11-19). Son zamanlarda dondurulma işlemi sırasında dokuların saklama solüsyonlarına dimetil sulfoksit (DMSO) ve sükröz gibi koruyucu ajanlar ilave edilmesi veya aşamalı olarak dondurulması ve çözündürülmesi gibi manipulasyonlarla fonk-

siyonel kaybın en aza indirilmesine yönelik araştırmalar yapılmıştır (12-14). Ancak bu çalışmalardan hiç birinde vasküler dokuların kasılma cevapları ile birlikte EDRF (endotel kaynaklı gevşetici factor ) ve düz kas kaynaklı gevşeme cevaplarının bozulmadan kalmasını sağlayan bir sonuç elde edilememiştir.

Soğukta saklama yöntemini kullanan çalışmalarda çeşitli saklama solüsyonları, süre ve sıcaklıklarda vasküler fonksiyonlar test edilmiştir (1, 2, 6, 20-35). Ancak bu çalışmalarda endotele ve düz kasa bağlı cevapların bozulmadan kalabildiği koşullar net olarak ortaya ık-mamıştır. Günler boyunca (uzun süre) soğukta saklanan izole damar preparatlarında kasılma cevapları ile birlikte endotele bağımlı gevşeme cevaplarının bozulduğu bildi-rilmiştir (1, 6). Daha kısa süreli, gece boyunca soğukta saklanan dokularda ise kullanılan saklama solüsyonuna bağlı değişmek üzere daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin University of Wisconsin (UW) zeltisi ile köpek koroner mikrovasküler damarlarında endotele veya düz kasa bağlı gevşeme cevaplarında korunma sağlanabil-miştir (36).

Hepes-Krebs zeltisinde 24-48 saat saklanan sıçan aortlarında Ach'e duyarlılığın değişmediği ancak Ach ve kasıcı ajanlara karşı verilen maksimal cevabın azaldığı bildirilmiştir (34). Bu bulguya paralel olarak biz de alış-mamızda 15 saat +4°C de Krebs-bikarbonat zeltisinde saklama sonrasında Ach'ye bağlı duyarlılığın değişmedi-ėini gösterdik. Çalışmamız ayrıca Ach'e karşı verilen maksimum gevşeme cevabının da 15 saat soğukta sak-lama işleminden etkilenmediğini göstermektedir. Bizim çalışmamızdan farklı olarak yukarıda bahsedilen alış-mada Ach' e karşı maksimal gevşeme cevabındaki azalmanın, kullanılan saklama solüsyonların içeriklerinin farklılığından değil saklama süresinden kaynaklanması muhtemeldir. Çünkü söz konusu çalışmada kullanılan zeltinin bizim çalışmamızda kullanılanıdan farkı; tamponlayıcı olarak bikarbonat yerine hepes kullanılmış olmasıdır ve bu saklama süresi kadar önemli bir etken olarak görünmemektedir. Nitekim 15 saatlik saklama sresinin aşıldığı diğer çalışmalarda intraselüler iyon içeriğini taklit eden Belzer (UW) ve eurocollins solüsyon-ları gibi çok daha farklı saklama zeltileri denenmiş olmasına karşın 24 saat saklama sonrasında sıçan aortlarında endotele bağlı gevşeme cevaplarının azal-dığı bildirilmiştir (34). Saklama sresinin önemini vurgu-layan diğer bir çalışma da böbrek arterlerinde 2 saat gibi daha kısa süreli saklama süresi sonrasında gevşeme cevaplarının etkilenmediği bildirmiştir (25). Bu verilerin işığında +4°C'de Krebs solüsyonunda saklanan sıçan aortlarında endotele bağlı cevapların 15 saate kadar bozulmadan korunabildiği sonucuna varılmaktadır.

Etkinlikleri karşılaştırılan soğukta saklama solüsyonları arasında en sık kullanılan solüsyonlar ekstraselüler elektrolit içeriğini taklit eden krebs ve ringer zeltileri ile intraselüler elektrolit içeriğini örnek alan Euro Collins (37) ve University of wisconsan (UW) zeltileridir. Pank-

reas böbrek ve karaciğer transplantasyonlarında başarılı sonuçlar alınmasını sağlayan Belzer' in bulduğu UW zeltisi (38) antioksidan olarak adenosine, glutatyon içermekte ve ozmolaliteyi sağlamak amacıyla rafinoz, allopurinol ve laktobionat ve pentastarch içermektedir. Ancak UW zeltisinin kalp nakillerinde diğer zeltilere göre daha fazla başarı sağlamadığı kabul edilmektedir (37). Bunların dışında "celsior" solüsyonu gibi ekstraselüler elektrolit içeriğine sahip solüsyonlara sukroz, mannitol gibi membranlardan geçmeyen bir elektrolit ile hiperozmotik hale getirildiği zaman da hücre şişmesi nlenebilmiştir.

Endoteliumun fonksiyonlarının bozulduğu ve dolayısıyla nitrik oksit (NO) retiminin azaldığı durumlarda nitrik oksitin sağladığı bazal gevşemenin azalmasına bağlı olarak kasılma cevaplarının arttığı bilinmektedir (39-41). Çalışmamızda endoteliumun fonksiyonel olduğunun diğer bir göstergesi de kasılma cevaplarında herhangi bir artışın görülmemesidir.

Çalışmamızda soğukta saklama işlemi ne nitroglicerine (NTG) e karşı verilen duyarlılığta ne de maksimum gevşeme cevabında herhangi bir değişikliğe neden ol-mamıştır. Bu bulgumuz sıçan aortlarında soğukta sak-lama sonrası endotelden bağımsız gevşeme cevapları-nın değişmediğini gösteren diğer çalışmalarla uyum içindedir (25, 34). Bu çalışmada 15 saat soğukta beklet-me işleminin sıçan torasik aortunda NO duyarlılığını ve kasılma cevaplarını etkilememesi düz kasın karakteristik özelliklerinin değişmediği fikrini vermektedir.

Vasküler dokuların fonksiyonlarının korunması temel olarak, seçilen saklama solüsyonuna ve süresine bağlı-dır (8). NO donörlerine ve reseptöre bağlı ya da bağım-sız vazokonstriktrlere karşı cevapların korunmasını sağlayan uygun saklama solüsyonları kullanan diğer çalışmalar bizim çalışmamızda kullanılan sıçan aortun-dan farklı türler ve/veya farklı arterler kullanılarak ge-ekleştirilmiştir (31). Bizim alışmamızda sıçan torasik aortunda da kısa süre +4°C de saklama işlemi sonrasın-da vasküler cevapların korunduğu bulgusu damarların fonksiyonel olarak soğukta saklanması için uygun bir saklama solüsyonu seçildiğini göstermektedir. Saklama solüsyonlarındaki en önemli fark solüsyonlardaki iyon konsantrasyonlarının Krebs solüsyonları gibi ekstraselüler veya Euro Collins ya da UW solüsyonları gibi intraselüler iyon içeriğini taklit etmesidir (37).

Bizim yaptığımız çalışmada saklama solüsyonu olarak ekstraselüler iyon konsantrasyonunu taklit eden Krebs-bikarbonat zeltisi kullanılmıştır. Anaerobic-hipotermik saklama sırasında Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaz aktivitesinin baskı-lanması sonucu Na<sup>+</sup> ve Cl<sup>-</sup> iyonları hücre içine girerek hücre şişmesine neden olmaktadır. Her ne kadar daha önceleri düşük sodyum / yüksek potasyum içerikli sol-syonların bu durumu engelleyebileceği ve bu nedenle intraselüler sıvı içeriğini örnek alan zeltilerin daha iyi bir performans sağladığına inanılmamışsa da (42) son yapılan çalışmalar her iki solüsyon tipinin de organ

transplantasyonlarında eşit derecede etkin olduğunu ve hatta ekstraselüler tipdeki solüsyonların kalp nakillerinde daha başarılı olduğunu göstermiştir (43). 4 saat gibi daha kısa süreli soğukta saklama işleminin uygulandığı çalışmalarda Krebs solüsyonunun diğer solüsyonlara göre endotele bağlı gevşeme cevaplarında görülen azalma ve kasılma cevaplarındaki artış üzerinde daha başarılı olduğu bildirilmiştir (22). Ekstraselüler tip solüsyonların bu başarısında potasyumun neden olduğu vazospazma bağlı vasküler direnç artışını engellemeleri de (21, 44) rol alabilir.

Bizim çalışmamızda +4°C de 1 saat veya 15 saat saklanan sıçan aortlarının hem endotele hem düz kasa bağlı vasküler reaktivite cevaplarının korunduğu bulgusu, sıçan aortlarının kısa süreli fonksiyonel olarak saklanabilmesi için ekstraselüler sıvı içeriğini taklit eden Krebs-bikarbonat solüsyonunun kullanılmasının uygun olduğunu göstermektedir.

Seçilen saklama solüsyonunun yanı sıra saklama süresi de vasküler fonksiyonların korunması üzerinde son derece önemli bir rol oynamaktadır (45). Bizim çalışmamızda Krebs solüsyonunda 1 saat gibi çok kısa süreli saklama süresi sonunda hem kasılma hem gevşeme

cevaplarında bozulma görülmemiştir. Benzer şekilde koroner arterlerin 1 saat süre ile UW solüsyonunda saklanması ile de aynı korunmanın sağlandığı bildirilmiştir (46). Oysa 24 saat süre ile + 4° C de Krebs çözeltisi kullanılarak saklanan sıçan aortunda yapılan çalışmalarda norepinefrin ve potasyum klorüre (KCl) bağlı kasılma cevaplarında azalma görüldüğü bildirilmiştir (34).

Bununla birlikte tavşan aortası (1, 2) sıçan mesenterik arterleri (26) gibi farklı hayvan veya damarlarda 24 saat süre ile soğukta saklama işleminin norepinefrin veya KCl'ye (47) karşı verilen kasılma cevaplarını etkilemediğini rapor eden çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar damarların soğukta saklanma koşullarının damarın kaynaklandığı hayvana ve damar tipine göre değişkenlik gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak çalışmamız; kullanılan damar türüne göre uygun solüsyon ve uygun süre kullanılarak damarların fonksiyonlarının bozulmadan saklanabileceği ideal şartların sağlanabildiğini göstermektedir. Sıçan aortlarının 1 saat gibi kısa veya 15 saat gibi orta vadeli bir süre sonunda Krebs-bikarbonat solüsyonu kullanılarak endotele bağlı ve endotelden bağımsız kasılma ve gevşeme cevaplarının bozulmadan saklanabileceğini ortaya koymaktadır.

#### Kaynaklar

1. Kristek F, Torok J, Sikulova J. Morphological and functional alterations in endothelium, smooth muscle, and nerve fibers in rabbit aorta after storage at 4 degrees C. *Cryobiology* 1993;30:376-385.
2. Torok J, Kristek F, Mokrasova M. Endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta after cold storage. *Eur J Pharmacol* 1993;228:313-319.
3. Yetik-Anacak G, Catravas JD. Nitric oxide and the endothelium: History and impact on cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol* 2006;45:268-276.
4. Dragun D, Hoff U, Park JK, Qun Y, et al. Prolonged cold preservation augments vascular injury independent of renal transplant immunogenicity and function. *Kidney International* 2001;60:1173-1181.
5. Chong WC, Ong PJ, Hayward C, Moat N, et al. Effects of storage solutions on in vitro vasoreactivity of radial artery conduits. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122:470-475.
6. Shibata S. Effect of prolonged cold storage on the contractile response of strips of rabbit aorta to various agents. *Circ Res* 1969;24:179-187.
7. Ku DD, Liu Q, Norton P, Caulfield JB. Cryopreservation of Coronary Endothelium and Endothelial-Mediated Responses. *Cryobiology* 1994;31:82-89.
8. Jahania MS, Sanchez JA, Narayan P, Lasley RD, et al. Heart preservation for transplantation: principles and strategies. *Ann Thorac Surg* 1999;68:1983-1987.
9. Thyberg J. Differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells in culture. *Int Rev Cytol* 1996;169:183-265.
10. Binko J, Meachem S, Majewski H. Endothelium removal induces iNOS in rat aorta in organ culture, leading to tissue damage. *Am J Physiol* 1999;276:E125-134.
11. Muller-Schweinitzer E. Applications for cryopreserved blood vessels in pharmacological research. *Cryobiology* 1994;31:57-62.
12. Stanke F, Riebel D, Carmine S, Cracowski JL, et al. Functional assessment of human femoral arteries after cryopreservation. *J Vasc Surg* 1998;28:273-283.

13. Rendal Vazquez ME, Rodriguez Cabarcos M, Martinez Santos MV, Fernandez Mallo RO, et al. Functional assessment of cryopreserved human femoral arteries for pharmaceutical research. *Cell Tissue Bank* 2004;5:105-110.
14. Muller-Schweinitzer E, Mihatsch MJ, Schilling M, Haefeli WE. Functional recovery of human mesenteric and coronary arteries after cryopreservation at -196 degrees C in a serum-free medium. *J Vasc Surg* 1997;25:743-750.
15. Cardon A, Aillet S, Desjardins JF, Hocdet V, et al. [Biomechanical study of the vasomotor system of the arterial smooth muscle after long-term cryopreservation of a human arterial graft at two different temperatures -80 and -150C]. *J Mal Vasc* 1999;24:118-125.
16. Langerak SE, Groenink M, van der Wall EE, Wassenaar C, et al. Impact of current cryopreservation procedures on mechanical and functional properties of human aortic homografts. *Transpl Int* 2001;14:248-255.
17. Rendal E, Rodriguez M, Martinez MV, Fernandez RO, et al. Function of cryopreserved pig aortas. *J Surg Res* 2004;120:304-311.
18. Rendal Vazquez ME, Rodriguez Cabarcos M, Martinez Santos MV, Fernandez Mallo RO, et al. Functional assessment of cryopreserved human aortas for pharmaceutical research. *Cell Tissue Bank* 2004;5:119-123.
19. Rendal Vazquez ME, Rodriguez Cabarcos M, Martinez Santos MV, Fernandez Mallo RO, et al. Functional assessment of cryopreserved pig aortas for pharmaceutical research. *Cell Tissue Bank* 2004;5:111-118.
20. Akbarali H, Bieger D, Triggler CR. Effects of cold storage on relaxation responses in the rat oesophageal tunica muscularis mucosae. *Can J Physiol Pharmacol* 1987;65:23-29.
21. Chan BB, Kron IL, Flanagan TL, Kern JA, et al. Impairment of vascular endothelial function by high-potassium storage solutions. *Ann Thorac Surg* 1993;55:940-945.
22. Dagenais F, Buluran J, Cartier R. [In vitro endothelial dysfunction after cold storage: comparison with various preservative solutions]. *Ann Chir* 1995;49:700-705.
23. Ge ZD, He GW. Comparison of University of Wisconsin and St Thomas' Hospital solutions on endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated function in coronary micro-arteries. *Transplantation* 2000;70:22-31.
24. Kato T, Bishop AT, Tu YK, Wood MB. Function of the vascular endothelium after hypothermic storage at four degrees Celsius in a canine tibial perfusion model. The role of adrenomedullin in reperfusion injury. *J Bone Joint Surg Am* 1998;80:1341-1348.
25. Massa G, Ingemansson R, Sjoberg T, Steen S. Endothelium-dependent relaxation after short-term preservation of vascular grafts. *Ann Thorac Surg* 1994;58:1117-1122.
26. McIntyre CA, Williams BC, Lindsay RM, McKnight JA, et al. Preservation of vascular function in rat mesenteric resistance arteries following cold storage, studied by small vessel myography. *Br J Pharmacol* 1998;123:1555-1560.
27. Nardo B, Cavallari G, Catena F, Santoni B, et al. Comparison between university of wisconsin and celsior solution on morphology and viability of rat aorta after cold storage. *Transplantation Proceedings* 2000;32:35.
28. Neil DAH, Maguire SH, Walsh M, Lynch SV, et al. Progression of changes in arteries following cold storage preservation in UW and collins solution in a syngeneic aortic transplant model. *Transplantation Proceedings* 1997;29:2561-2562.
29. Neil DAH, Lynch SV, Hardie IR, Effenev DJ. Cold Storage Preservation and Warm Ischaemic Injury to Isolated Arterial Segments: Endothelial Cell Injurydoi:10.1034/j.1600-6143.2002.20502.x. *American Journal of Transplantation* 2002;2:400-409.
30. Payne SJ, Benjamin IS, Alexander B. Cold storage of rabbit thoracic aorta in University of Wisconsin solution attenuates P2Y(2) purine receptors. *Cryobiology* 2002;44:91-102.
31. Piepot HA, Pneumatikos IA, Groeneveld AB, van Lambalgen AA, et al. Cold storage sensitizes rat femoral artery to an endotoxin-induced decrease in endothelium-dependent relaxation. *J Surg Res* 2002;105:189-194.
32. Rinaldi GJ. Influence of several methodological procedures utilized to obtain in vitro vascular preparations on endothelial activity. *Endothelium* 2001;8:235-242.
33. Sinanovic O, Chiba S. Responsiveness of monkey skeletal muscle arteries to vasoconstrictor substances before and after cold storage. *Jpn J Pharmacol* 1988;46:237-246.

34. Stanke-Labesque F, Cracowski JL, Devillier P, Caron F, et al. Functional assessment of rat aorta after cold storage in different media. *Fundam Clin Pharmacol* 1999;13:310-319.
35. Yang X-P, Chiba S. Effects of prolonged cold storage on double peaked vasoconstrictor responses to periarterial nerve stimulation in isolated canine splenic arteries. 1999;126:1810-1814.
36. Murphy M, Charles O., Chih M, Pan-, Gott M, John Parker, Guyton M, Robert A. Coronary Microvascular Reactivity After Ischemic Cold Storage and Reperfusion. *The Annals of Thoracic Surgery* 1997;63:20-27.
37. Muhlbacher F, Langer F, Mittermayer C. Preservation solutions for transplantation. *Transplant Proc* 1999;31:2069-2070.
38. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *TRANSPLANTATION* 1988;45:673-676.
39. Amerini S, Mantelli L, Ledda F. Enhancement of the vasoconstrictor response to KCL by nitric oxide synthesis inhibition: a comparison with noradrenaline. *Pharmacol Res* 1995;31:175-181.
40. Vo PA, Reid JJ, Rand MJ. Attenuation of vasoconstriction by endogenous nitric oxide in rat caudal artery. *Br J Pharmacol* 1992;107:1121-1128.
41. Mendizabal VE, Feleder EC, Adler-Graschinsky E. Effects of the chronic in vivo administration of L-NAME on the contractile responses of the rat perfused mesenteric bed. *J Auton Pharmacol* 1999;19:241-248.
42. Sumimoto R, Kamada N, Jamieson NV, Fukuda Y, et al. A comparison of a new solution combining histidine and lactobionate with UW solution and eurocollins for rat liver preservation. *Transplantation* 1991;51:589-593.
43. Urushihara T, Sumimoto R, Sumimoto K, Jamieson NV, et al. A comparison of some simplified lactobionate preservation solutions with standard UW solution and Eurocollins solution for pancreas preservation. *Transplantation* 1992;53:750-754.
44. Marshall VC, Howden BO, Jablonski P, Scott DF, et al. Analysis of UW solution in a rat liver transplant model. *Transplant Proc* 1990;22:503-505.
45. Iwaki H, Sakamoto A, Tanaka S. Effects of temperature and preservation time on the pharmacological response of isolated vascular endothelial and smooth muscle function. *Nippon Ika Daigaku Zasshi* 1999;66:15-20.
46. Ekin ST, Pearson PJ, Evora PR, Schaff HV. One-hour exposure to University of Wisconsin solution does not impair endothelium-dependent relaxation or damage vascular smooth muscle of epicardial coronary arteries. *J Heart Lung Transplant* 1993;12:624-633.
47. Laing RJ, Jakubowski J, Morice AH. An in vitro study of the pharmacological responses of rat middle cerebral artery: effects of overnight storage. *Journal Of Vascular Research*;32:230-236.