

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI

**RATLARDA SEREBRAL İSKEMİ
REPERFÜZYON MODELİNDE PROPOFOL VE
REMİFENTANİLİN NÖROPROTEKTİF
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

DR. ULAŞ BAĞATIR

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2007

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI

**RATLARDA SEREBRAL İSKEMİ
REPERFÜZYON MODELİNDE PROPOFOL VE
REMİFENTANİLİN NÖROPROTEKTİF
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. ULAŞ BAĞATIR

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Sermin Öztekin

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ.....	i
ŞEKİL LİSTESİ.....	ii
RESİM LİSTESİ.....	iii
KISALTMALAR.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET.....	1
SUMMARY.....	3
GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
GENEL BİLGİLER.....	7
1. İSKEMİ / REPERFÜZYON HASARININ FİZYOPATOLOJİSİ.....	7
1.1. Serbest Oksijen Radikalleri.....	8
1.2. Lipit Peroksidler.....	9
1.3. Nötrofiller.....	10
2. BEYİN DOKUSUNDA İSKEMİ / REPERFÜZYON HASARI.....	11
3. ANESTEZİ İLİŞKİLİ NÖROPROTEKSİYON.....	14
3.1. Volatil Anestezik Ajanlar.....	14
3.2. İntravenöz Anestezik Ajanlar.....	14
3.3. Opioidler.....	15
3.4. Remifentanil.....	17
GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
BULGULAR.....	24
TARTIŞMA.....	28
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	32
KAYNAKLAR.....	33
EKLER.....	39

Tablo 1. İskemide serebral kan akımı düzeyindeki azalmaların dokuya etkileri..... 13

Tablo.2. Deney gruplarında rat ağırlıkları 24

Tablo 3. Deney gruplarında serebral infarkt alanı yüzde değerleri 25

Şekil 1. Moleküler oksijene elektron eklenmesi ile serbest radikallerin oluşumu	8
Şekil 2. Serbest oksijen radikallerinin dokulardaki direkt ve indirekt etkileri.....	9
Şekil 3. Serebral iskemi sonrası mitokondrideki oksidatif stres sinyalleri.....	12
Şekil 4. Opioidlerin hücre içi yolakları.....	16
Şekil 5. Remifentanil ve metabolitleri.....	18
Şekil 6. Deney protokolü.....	21
Şekil 7. Deney gruplarında ortalama arter basıncı değerleri.....	24
Şekil 8. İnfarkt alanları yüzde değerleri.....	26

Resim 1. Trakeostomi ve mekanik ventilasyon.....	22
Resim 2. Karotid arterlerin disseksiyonu.....	22
Resim 3. Çalışma ilaçlarının infüzyonu.....	23
Resim 4. Karotid arterlerin klemplenmesi.....	23
Resim 5. Remifentanil grubunda serebral kesitlerde infarkt	26
Resim 6. Propofol grubunda serebral kesitlerde infarkt alanı.....	27
Resim 7. Kontrol grubunda serebral kesitlerde infarkt alanı.....	27

KISALTMALAR

ALT.....	Alaniltransferaz
Apaf.....	Apopitotik proteaz aktive edici faktör
ATP.....	Adenozin Trifosfat
Ca ⁺⁺	Kalsiyum
CAD.....	Kaspas-aktive edici DNaz
CD11.....	Beta 2 integrin CD11
CD18	Beta 2 integrin CD18
CED-4.....	Sistein proteaz
DNA.....	Deoksiribonükleik asit
EC 50.....	Maksimal efektif yarı konsantrasyon
EEG.....	Elektroensefalografi
FAS	Tip 1 glikolize transmembran reseptörü
GABA.....	Gama amino butirik asit
H ₂ O	Su molekülü
H ₂ O ₂	Hidrojenperoksit
ICAM-1.....	İntraselüller adezyon molekül-1
K.....	Potasyum
Kaspas.....	Aspartat-spesifik sistein proteaz
K-ATP.....	ATP bağımlı potasyum kanalı
MAC.....	Minimal alveoler konsantrasyon
MDA.....	Malonil dialdehid
Na ⁺	Sodyum
NMDA.....	N-Metil-D-Aspartat
O ₂	Oksijen
O ₂ [•]	Süperoksit radikali
OH [•]	Hidroksi radikali
Pa CO ₂	Parsiyel Arteriyel Karbondioksit Basıncı
PARP.....	Poli Adenindifosfat Riboz polimeraz
PKC.....	Protein kinaz c
SSS.....	Santral Sinir Sistemi
TNF.....	Tümör Nekroz Faktör
TTC.....	Tetrazolyum triklorid

TEŞEKKÜR

DEÜTF Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD'da geçirdiğim asistanlık dönemim süresince bilgi ve deneyimleriyle bana ve tüm arkadaşlarıma yol gösteren başta hocalarımız Prof. Dr. Zahide Elar, Prof. Dr. Emel Sağıroğlu, Prof. Dr. Ali Günerli, Prof. Dr. Atalay Arkan, Prof. Dr. Erol Gökel'e olmak üzere tüm öğretim üyeleri ve uzmanlarımıza;

Tezimin hazırlanmasında, araştırma projesinin planlanmasından yazımının tamamlanmasına kadar her aşamada yardım ve desteğini esirgemeyen; bilgisi, deneyimi ve özverisiyle bana bir araştırmanın nasıl yapılması gerektiğini öğreten, en kısa zamanda sağlığına kavuşmasını dilediğimiz danışmanım Doç. Dr. Sermin Öztekin'e ;

Zor ve sıkıntılı anlarda hep tatlı ve güler yüzlü olmayı bilen Yrd. Doç. Dr. Aydın Taşdöğen'e;

Bilgi ve emeğiyle bana yol gösteren, tezimin tamamlanmasında her türlü desteği ve sabrı gösteren Yrd. Doç. Dr. Çimen Gülben Olguner'e ve Yrd. Doç. Dr. Sevda Özkardeşler'e;

Asistanlığım boyunca sevincimi ve üzüntümü paylaştığım başta. Dr. Filiz Kaymakçı, Dr. Sibel Akgül, Dr. Füsün Erden, Dr. Ozan Özkaya olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma, anestezi teknikerlerimize, ameliyathane, poliklinik, yoğun bakım hemşire ve personellerine;

Asistanlığım boyunca nazımızı çeken sevgili Filiz ve Hediye ablaya;

Beni bu günlere getiren, hayatın anlamını öğreten, her zaman yanımda olan ve sevgileriyle beni büyüten değerli annem, babam ve çok sevgili kardeşim Işıl'a;

İyi ve kötü günüyle hayatımı paylaşan, tüm zorluklara rağmen dostluğu ve sevgisiyle daima benimle olan sevgili nişanlım Reyhan Demir'e;

Sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimle.

Dr. Ulaş BAĞATIR

ÖZET

Ratlarda Serebral İskemi/Reperfüzyon Modelinde Propofol ve Remifentanilin Nöroprotektif Etkinliğinin Karşılaştırılması

Dr. Ulaş Bağatır DEÜTF Anesteziyoloji ve Reanimasyon ABD, İZMİR

Amaç: Perioperatif dönemde oluşabilen serebral iskemi ciddi mortalite ve morbiditeye yol açabilmektedir. Serebral dokuyu iskemi/reperfüzyon hasarından koruyacak stratejiler anesteziistler için önemlidir. Anestezik ajanların nöroprotektif etki gösterdiği bilinmektedir. Bu randomize, kontrollü, deneysel çalışmayla anestezi altındaki ratlarda uyguladığımız serebral iskemi/reperfüzyon modelinde propofol ile yeni bir opioid olan remifentanil'in serebral infarkt alanına etkisini karşılaştırdık.

Yöntem: On sekiz adet erişkin erkek Wistar-Albino rat üç gruba ayrıldı. Anestezi altında, mekanik ventilasyonla solutulan ratlarda trakeostomi ve invaziv monitorizasyon uygulandı. Serebral iskemi sağlanmadan 20 dakika önce Kontrol Grubuna (Grup K, n= 6) 2.1 ml/sa serum fizyolojik, Remifentanil Grubuna (Grup R, n= 6) 2 µg.kg⁻¹.dk⁻¹ remifentanil, Propofol Grubuna (Grup P, n= 6) 96 mg/kg/sa propofol infüzyonuna başlandı. Yirminci dakikada bilateral karotid arterler klemplenerek serebral iskemi sağlandı. Yirmi dakika süreyle iskemi uygulandıktan sonra 40 dk reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyon sonunda ratlar sakrifiye edildi ve dekapitasyon uygulandı. Beyin dokusu çıkarılarak koronal kesitler alındı. % 2 Tetrazoliumtriklorid (TTC) ile boyanan serebral kesitlerin fotoğrafları çekildi. İnfarkt alanının toplam kesit alanına oranı yüzde değer olarak hesaplandı. $p < 0.05$ düzeyi anlamlı kabul edildi.

Bulgular: İnfarkt alanlarının ortalama değerleri karşılaştırıldığında; Propofol Grubunda infarkt alanı % 11.9 olmak üzere en düşük, Remifentanil Grubunda % 13.5, Kontrol Grubunda % 22.9 olmak üzere en yüksek saptandı. Remifentanil ile Propofol Grubunda elde edilen verilerde Kontrol Grubuna kıyasla anlamlı fark olduğu saptandı ($p= 0.003$). Remifentanil Grubu ile Propofol Grubu arasındaki fark anlamlı değildi.

Sonuç: Bu çalışmanın sonuçları çok kısa etkili yeni bir opioid ajan olan remifentanil'in iskemi/reperfüzyon hasarına karşı propofol kadar etkin koruma sağladığını düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Remifentanil, propofol, serebral iskemi/reperfüzyon, nöroproteksiyon.

SUMMARY

Neuroprotective Effect of Propofol and Remifentanil in the Rat Cerebral Ischaemia/Reperfusion Model

Ulaş Bağatır MD, Department of Anesthesiology and Reanimation, Dokuz Eylül University Medical School, IZMIR.

Objectives: Cerebral ischaemia can cause serious mortality and morbidity at perioperative period. Neuroprotective strategies are important for anaesthesiologist. Anaesthetic agents have neuroprotective properties. In this randomized, controlled experimental study, we compared the neuroprotective effect of propofol and remifentanil on the cerebral ischaemia/reperfusion model in rats.

Methods: Eighteen male adult Wistar-Albino rats were divided into three groups. The anesthetized rats were mechanically ventilated using a tracheotomy cannula and invasively monitored. Before 20 minutes of clamping both common carotid arteries, in Group Control (Group C, n= 6) 2.1ml/h saline, in Group Remifentanil (Group R, n= 6) 2 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ remifentanil, in Group Propofol (Group P, n= 6) 96 mg/kg/hr propofol was infused. After 20 minutes of ischaemia it was allowed reperfusion for 40 minutes. At the end of the reperfusion the rats were sacrificed by decapitation and the brains were collected. Each brain was sectioned coronally planes. This sections were immersed promptly in the solution of 2% 2,3,5-triphenyl-2-H-tetrazolium chloride (TTC). Photographs of the brain coronal sections were taken. The photographs were analysed and the infarcted area was determined to be an average of coronal planes. A value of $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results: Median value of average percent infarcted area in Group P %11,5 and mean value of average percent infarcted area in Group R % 13,5 was significantly lower than Group C % 22.9 ($p= 0.003$). There was no significantly differences in mean value of average percent infarcted areas between Group P and Group R ($p>0.05$).

In conclusion, ultra short acting new opioid agent remifentanil may have a neuroprotective effect as well as propofol.

Key words: Remifentanil, propofol, cerebral ischaemia/reperfusion, neuroprotection.

GİRİŞ ve AMAC

Perioperatif dönem sürecinde iskemik hasarı önlemek veya azaltmak ve nörolojik skoru iyileştirmek amacıyla bir seri profilaktik önlemlerin alınması “perioperatif beyin koruması” kavramı içinde uzun süredir anestezi uzmanları için araştırılması gereken bir ilgi alanı olmuştur. Bu noktada, nöroprotektif stratejilerin, fizyolojik değişikliklerin kontrolüne, anestezi uygulamalarına, anestezi olmayan farmakolojik ajan kullanımına ve önkoşullama olarak tanımlanan yöntemlerin varlığına dayandığı ileri sürülmektedir.^{1,2,3}

Perioperatif süreçte beynin iskemiden korunmasında rol oynayan fizyolojik faktörler olarak ısı ve kan şekeri düzeyinin kontrolü yanı sıra arteriyel basıncın önemli rol oynadığı da vurgulanmakta; arteriyel hipotansiyonun kafa travmalı olgularda ve serebral anevrizma klipi uygulanan hastalarda prognozu kötüleştirdiği bilinmektedir.^{4,5}

Perioperatif dönemde uygulanan nöroprotektif stratejilerin nöronal hasarda ve hücre ölümünde azalma ile sonuçlandığının gösterilmesi, anestezi ajanlarının bu konudaki rollerinin araştırılmasını hızlandırmıştır.⁶

Nöroprotektif ajan olarak başlangıçta “altın standart” olarak kabul edilen barbitüratların bu etkilerini araştıran sonraki klinik çalışmaların verilerine göre; barbitüratlarla elde edilen nöroprotektif etkinin diğer anestezi ajanlarıyla elde edilenden üstün olmadığı ve hipotermi eşliğinde sağlanan additif etkiden yoksun olduğu sonucuna varılmıştır.^{6,7}

Günümüzde anestezi induksiyon ve idamesinde sıkça kullanılan propofolün antioksidan etkisinin araştırıldığı gerek deneysel^{8,9,10} ve gerek klinik¹¹ çalışmalarda anlamlı protektif etkisi ortaya konmuştur.

Anestezi induksiyon ve idamesinde yer alan opioidlerin kardiyoprotektif etkilerini araştıran çalışmalar fentanilin ratlarda post iskemik ventriküler disfonksiyonu kaldırdığı gibi global serebral iskemi/reperfüzyon sırasında da proinflatuar sitokinleri inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır.^{12,13}

Postoperatif solunum depresyonu korkusu olmaksızın cerrahi girişim sürecinde yüksek dozların kullanılabilmesi gibi kendine özgü farmakokinetik bir profile sahip yeni bir opioid ajan olan remifenanilin anestezide kullanımı giderek artmaktadır.^{14,15} Bugüne değin remifentanilin antioksidan etkisini araştıran deneysel çalışmalarda kardiyoprotektif etkisi¹⁶⁻¹⁹ yanı sıra profilaktik kullanımı ile de hepatik hasarlanmayı azalttığı saptanmıştır.²⁰

Buna karşın; literatürde remifentanilin serebral iskemi/reperfüzyon durumunda nöroprotektif etkisinin araştırıldığı deneysel ya da klinik bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Ratlarda serebral iskemi/reperfüzyon modeli oluşturularak yapılan bu çalışmada remifentanilin propofole kıyasla serebral infarkt alanı üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

İskemi/reperfüzyon hasarı, yetersiz oksijen sunumu ile başlayan, serbest oksijen radikallerinin ve immun sistemin rol aldığı ikincil yangısal yanıtla genişleyen, karmaşık bir süreçtir. Dokunun hipoperfüzyonu ile oluşan hasarlanma, ekstremitte iskemisi, serebrovasküler olay ve miyokard infarktüsünde görüldüğü gibi değişik dokularda farklı klinik sonuçlarla ortaya çıksa da hücresel düzeydeki patolojik süreçlerin evreleri benzerdir.²¹⁻²³

Dokuya giden kan akımı kesintiye uğradığı zaman hücresel disfonksiyona yol açan ardışık kimyasal olaylar tetiklenir. Hücresel homeostazın bozulmasına ve hücre ölümüne neden olabilecek süreç hızla ilerler. Oksidatif fosforilasyon kaybı ve Adenin Trifosfat (ATP) düşüşünün eşlik ettiği asidoz, kromatin kümelenmesi, piknoz gibi olaylar sonucunda oluşan plazma membranı değişiklikleri hücresel iyon dengesini bozar. Hücre içine Na⁺ iyonu ile birlikte su girişi olurken K⁺ iyonu interstisyuma geçer. Hücre içinde artan Ca⁺⁺ iyon yükü mitokondri membranının fonksiyonunu bozar. Endoplazmik retikulumun veziküllenmesi, lizozomların şişerek patlaması, enzim ve proteinlerin kaybı, sellüler kompartmanların dağılması, membran bütünlüğünün bozulmasıyla otoliz ve hücre ölümü gerçekleşir.^{23,24}

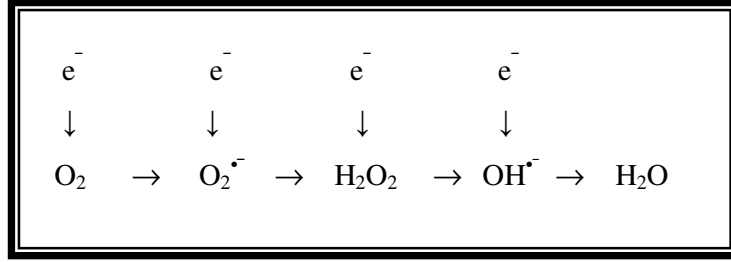
Hücresel disfonksiyonun derecesini iskeminin genişliği ve süresi belirler. Yeniden kan akımının sağlanması olarak tanımlanan reperfüzyon, hücresel disfonksiyonun geri dönebilmesi için gerekli olmakla birlikte tehlikeli metabolik sonuçlara da neden olur. Bölgesel doku hasarını genişletebilir ve toksik metabolitlerin genel dolaşıma geçmesini sağlayarak sistemik hasara yol açabilir.²⁴⁻²⁹

1. İskemi / Reperfüzyon Hasarının Fizyopatolojisi

İskemi/reperfüzyonun yol açtığı doku hasarının büyük kısmı reperfüzyon aşamasında oluşur. Doku hasarının oluşumunda reperfüze dokularda biriken nötrofillerin aktif rol oynadığını gösteren birçok kanıt mevcuttur. Nötrofillerin kemotaktik aktivitesinin başlatılmasında serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksitler sorumlu tutulmaktadır.²²

1.1. Serbest Oksijen Radikalleri

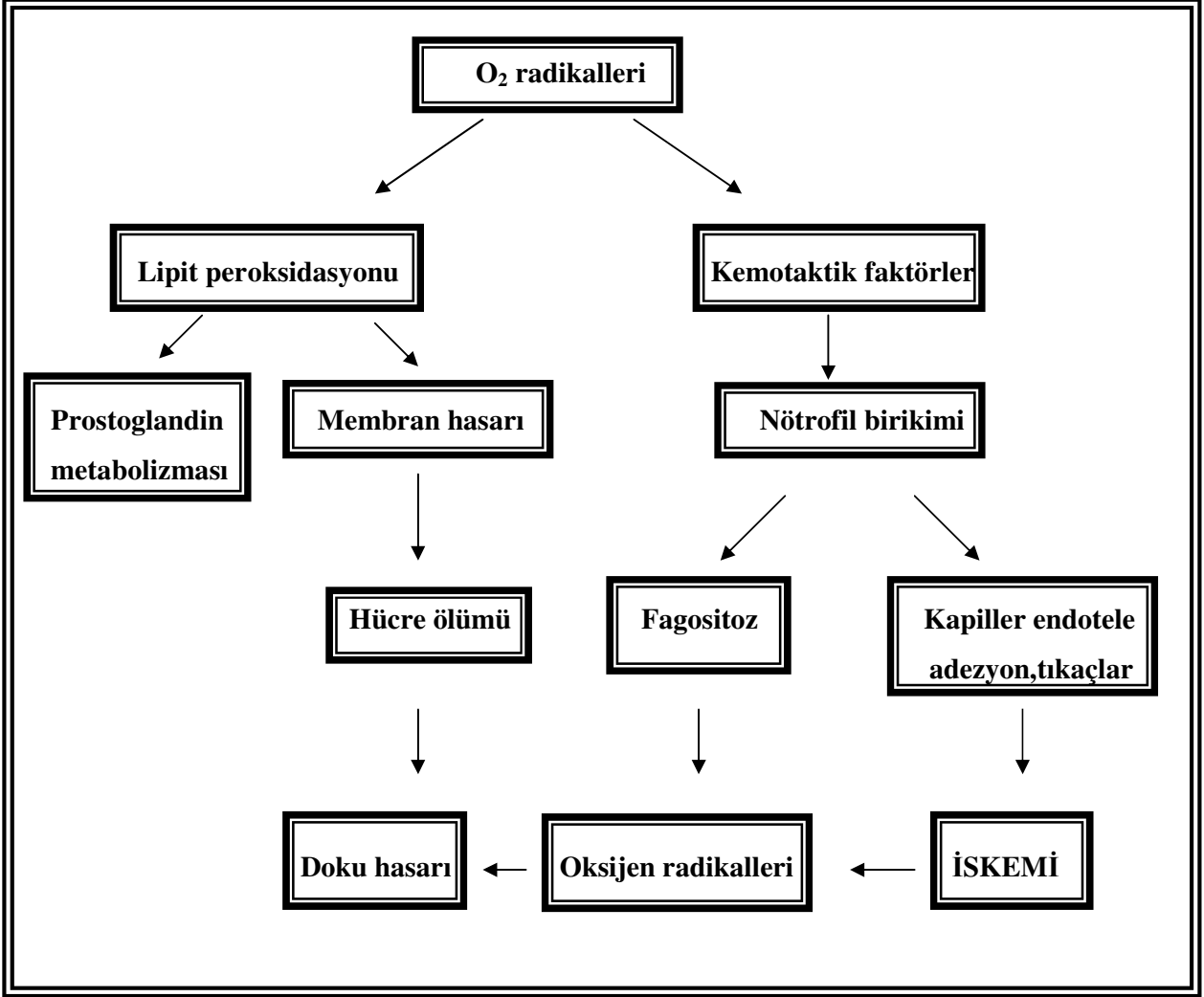
Serbest oksijen radikalleri moleküler oksijenin indirgenmesi ile oluşurlar. Moleküler oksijene 1 elektron eklenmesiyle süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), 2 elektron eklenmesi ile hidrojen peroksit (H_2O_2), 3 elektron eklenmesi ile hidroksi radikali ($OH^{\cdot-}$), 4 elektron eklenmesi ile su (H_2O) oluşmaktadır (Şekil 1).²²



Şekil 1. Moleküler oksijene elektron eklenmesi ile serbest radikallerin oluşumu.²²

Süperoksit radikali stabil değildir ve hızlıca daha zayıf etkili oksidan olan hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene (O_2) dönüşür. Hidrojen peroksit doku hasarlanmasında temel etken olan radikal ürünü değildir. Hidrojen peroksiti oksijen ve suya indirgeyen enzim olan katalazın reperfüzyon hasarında etkili rol oynadığı bilinmektedir. Süperoksit dismutaz, katalaz ve dimetil sülfoksit (hidroksil toplayıcı ajan) ile yapılan çalışmalar, doku hasarını başlatan radikalın Haber-Weiss (Fenton) reaksiyonu ile oluşan hidroksi radikali ($OH^{\cdot-}$) olduğunu ortaya koymuştur.²²

Serbest oksijen radikalleri normalde mitokondri membranına bağlı bulunurlar ve çok küçük miktarlardaki artışları hücre için yüksek derecede toksiktir. Reperfüzyon döneminde artan oksijen radikalleri hücre içinde deoksiribonükleik asit (DNA), proteinler ve poliansatüre yağ asitleri ile reaksiyona girer ve bu da hücre zarında lipid peroksidasyonuna yol açar (Şekil 2).²²



Şekil 2. Serbest oksijen radikallerinin dokulardaki direkt ve indirekt etkileri²²

1.2. Lipit Peroksitler

Hidroksi radikali en kısa ömürlü ve en reaktif oksijen radikalidir. Poliansatüre yağ asitleri ile girdiği reaksiyon, lipit peroksidasyonu ile sonuçlanır. Lipit peroksidasyonu sırasında karbon bağlarının kopması ile aldehid yapısında yıkım ürünleri ortaya çıkar. Bu metabolitlerden malonil dialdehid (MDA) ve 4-hidroksi nonenol gibi aldehit yapıdaki ürünler serbest radikal aktivitesiyle paralel artış göstermektedirler. Lipit peroksitler dokuda nötrofil birikimi ile indirekt hasarı da tetiklerler.²³

1.3. Nötrofiller

Nötrofiller direkt migrasyon yaparak reperfüze dokuda birikirler. Aynı zamanda oksijen metabolitleri ve proteolitik enzim sentezinin artışından da sorumludurlar. Aktive nötrofillerin salgıladıkları elastaz, jelatinaz ve kollajenaz gibi enzimler endotel hücrelerinin devamlılığının bozulmasına yol açarlar. Vasküler endotel bariyerinin bozulması da iskemi/reperfüzyon hasarının oluşmasında kilit rol oynar. Endotel hasarına nötrofiller ve proteazlar dışında serbest oksijen radikalleri de katkıda bulunurlar. Endotel devamlılığının bozulması ile ortaya çıkan sitotoksik mediyatörler ile mikrovasküler geçirgenlik artar. İntersitisyel alana sıvı kaybı nedeniyle interstisyel ödem ve hemokonsantrasyon oluşur. Sonuç olarak kapiller lümen daha da daralarak, perfüzyon bozulur.²¹⁻²³

Mikrovasküler hasarlanma olması için sadece nötrofillerin ortamda bulunması yeterli değildir. Aynı zamanda endotele adezyon göstermeleri gereklidir. Nötrofil-endotel adezyonu zedelenmeye neden olan ajanların yüksek konsantrasyonlara ulaşmasını tetikleyen bir mikro ortam oluşturur. Reperfüze dokuya gelen nötrofiller endotele daha fazla adezyon yapma yeteneğindedir; oksijen metabolitleri ve proteolitik enzim sentezinin artışından sorumludur.²³

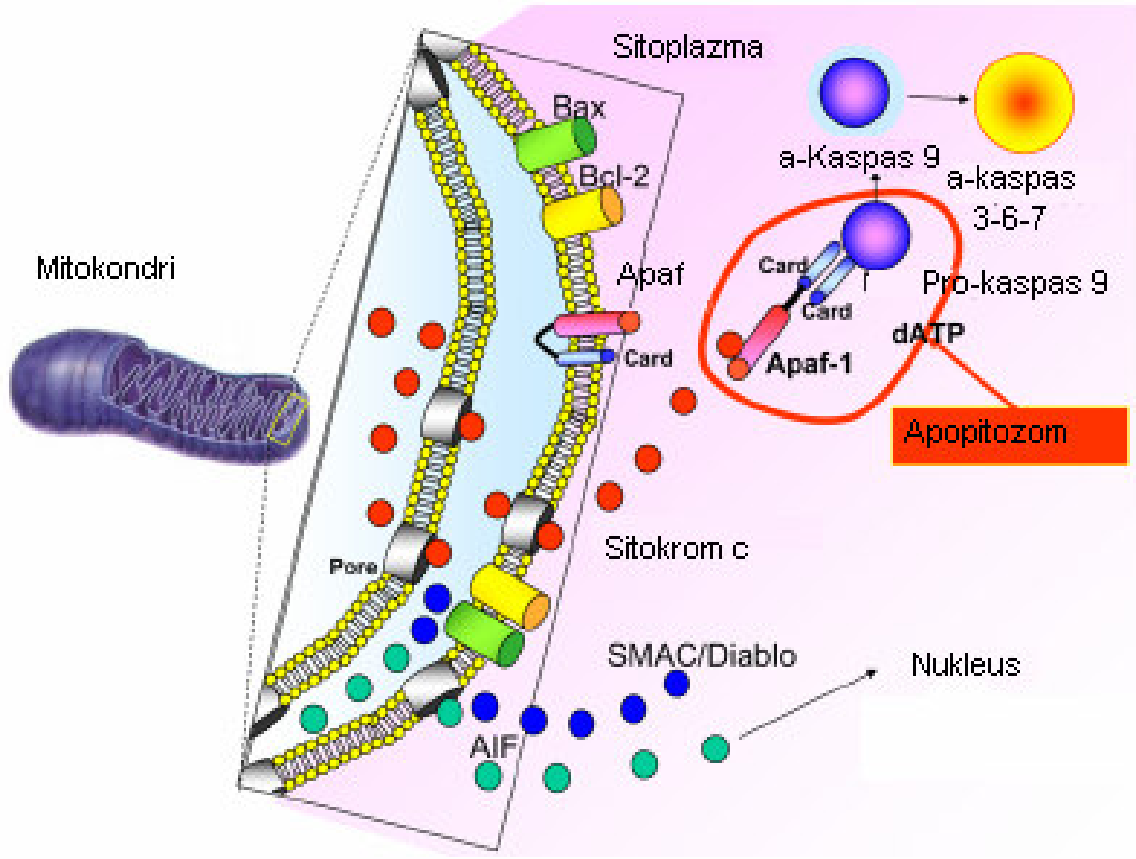
Reperfüzyon hasarı sırasında adezyonun önemi, hayvan deneylerinde nötrofil adeziv glikoproteinlerine (CD11, CD18 integrinler) karşı üretilen monoklonal antikorlar kullanılarak gösterilmiştir. Bu antikorlar ile reperfüze dokuda nötrofillerin birikmesi ve endotele adezyonu önenebilir. Lökosit sayısında azalma ve lökosit adezyonunun inhibisyonu ile mikrovasküler geçirgenlik artışı düzelmekte, ağır hücrel hasar önlenmektedir. Lökositlerin endotel hücrelerinin adezyon molekülleri ile bağlanması, serbest radikaller ve bazı proteazların ekstrasellüler ortama geçmesi ile oluşan hasarı tetikler. Adezyon molekülleri akciğer ve karaciğer gibi uzak organlarda nötrofil birikimine de aracılık eder. Dokuda nötrofil birikimi, dokunun myeloperoksidaz aktivitesi ölçülerek saptanabilmektedir. Myeloperoksidaz enzimi nötrofillerin sitozolik granüllerinden salınmaktadır ve indirekt olarak nötrofil birikimini göstermektedir.^{23,24}

2. Beyin Dokusunda İskemi / Reperfüzyon Hasarı

İskemiye duyarlılığı son derece yüksek olan beyin dokusunda iskemi sırasında, hücre düzeyinde giderek artan enerji eksikliği hücre içi asidoza neden olur. Bunun sonucunda proteinler ve nükleik asitler gibi makromoleküllerin sentezi durur. Hücre membranındaki iyon pompalarının çalışmaması sonucu hücre içi ve dışı iyon dengesi bozulur. Böylece hipoksantin ve ksantin gibi ATP yıkım ürünleri hücre içinde birikir. Tüm bu süreçlerin sonunda ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri hücrenin makromoleküllerini zedeleyerek hücre ölümüne neden olur.²⁴⁻²⁸

Serbest oksijen radikalleri doğrudan oluşan nöron hasarının dışında hücre içinde apoptotik süreci ve ekzitotoksik nöron hasarını başlatan yolları aktive ederek hücre ölümüne yol açar. Apoptotik nöron ölümü in vitro ve invivo global-fokal iskemi/reperfüzyon modellerinde çalışılmıştır. Apoptozise, hücre içi yaşam/ölüm sinyal yollarının aktivasyonu neden olur. Hücre içi ölüm sinyal yolları mitokondri ve hücre ölüm reseptör ailesi ile ilişkilidir.²⁷

Mitokondrideki hücre ölüm sinyal yollarından biri olan sitokrom *c*, mitokondri membran proteinlerinden biridir ve aynı zamanda mitokondriyal solunum zincirinde yer alır. Geçici fokal iskemiye maruz bırakılmış serebral dokuda mitokondriden sitozolik kompartmana salınır. Geçici global iskemiye maruz kalmış serebral dokuda hipokampal nöronlarda sitozolik sitokrom *c* artışı gözlenir. Sitokrom *c* CED-4 homolog, Apoptotik proteaz active edici faktor (Apaf-1), Deoksiadenozin Trifosfat ile etkileşerek apoptozomu oluşturur. Aynı zamanda aspartate-spesifik sistein proteaz'ı (kaspas-9) aktive eder. Sitokrom *c* ilişkili kaspas kaskadının başlangıcı olan kaspas-9 sırasıyla kaspas-3,-2,-6,-8 ve -10 aktive eder. Kaspas-3, kaspas-3 ilişkili Deoksiribonükleik asit proteaz'ı (DNAaz) aktive ederek DNA hasarına yol açar (Şekil 3).²¹⁻²⁴



Şekil 3. Serebral iskemi sonrası mitokondrideki oksidatif stres sinyalleri²¹

Apoptozisin reseptör ailesi, tip 1 glikolize transmembran (FAS) reseptörleri ve Tümör Nekroz Faktör (TNF) ile ilişkilidir. Ekstraselüler Fas ligandı reseptöre bağlandığında bir adaptör protein olan Fas ilişkili ölüm domain proteini sentezlenir ve bu protein prokaspas-8'i aktive eder. Kaspas-8, kaspas-3, Poliadenindifosfat-riboz polimeraz (PARP) ve aktive Kaspas ilişkili Deoksiribonükleikaz (CAD) yoluyla DNA hasarı ilişkili hücre ölümüne neden olur²⁴.

İskemi sonucu gelişen ekzitotoksik nöron ölümünde mekanizma eksitator nörotransmitterler ile ilişkilidir. Nöronal hücrede ATP bağımlı iyon kanallarının iskemi sonucu çalışamaz hale gelmesi membran bütünlüğünde bozulmaya yol açar. Hücre içinde depolanmış durumda bulunan glutamat gibi ekstitator nörotransmitterlerin ortama salınması ile glutamat konsantrasyonu 3-10 kat artar. Glutamata hücre içine alan enerji bağımlı mekanizmaların da çalışmaması ile ortamda biriken glutamat, glutamat reseptör alttipi olan N-Metil-D-Aspartat (NMDA) reseptörünün aktivasyonuna neden olur. NMDA reseptörünün aktivasyonu nöronda aşırı depolarizasyon oluşturur. Nöronda meydana gelen bu aşırı aktivasyon hücre içi iyon dengesini bozar ve hücre içinde aşırı kalsiyum birikmesi ile ekzitotoksik hücre ölümü meydana gelir.^{6,24,25}

Sonuç olarak; beynin vasküler yapıları ve parankim dokusu iskemi/reperfüzyon sonucu gelişen olayların kümülatif etkileri ile ortaya çıkan iskemi/reperfüzyon hasarına uğrar. Serebral kan akımındaki azalmanın beyin dokusundaki sonuçları Tablo 1’de gösterilmiştir.^{1,6,22,25,26}

Tablo 1. İskemide serebral kan akımı düzeyindeki azalmaların dokuya etkileri²⁴

Serebral Kan Akımı (mL/100g/dk)	Dokudaki Etkisi
35-55	Bozulmuş protein sentezi
40-50	Selektif gen ekspresyonu (hsp-70 vb.)
25-35	Azalmış glukoz kullanımı
20-30	Uyarıcı amino asit salınımı, asidoz
15-30	ATP azalması
10-15	İyon denge kaybı ve anoksik depolarizasyon

3. Anestezi İlişkili Nöroproteksiyon

Anestezik ajanların iskemik beyin dokusunda nöroprotektif etki gösterdiği 1960'lı yılların başında saptanmıştır. Son dönemde ise deneysel iskemi/reperfüzyon modellerinde bir çok anestezik ajanın potansiyel nöroprotektif etkisinin olduğu ortaya konmuştur. Anestezik ajanların nöroprotektif etkinliklerinin anestezik potensleri ile korele olmadığı ileri sürülmüştür.^{1,2,3,6,27,28}

Anestezik ajanların oluşturduğu nöroproteksiyon bu ajanların pek çoğunun bağlandığı ve anestezik etkisini gösterdiği inhibitör Gama amino butirik asit (GABA) reseptörüdür. GABA reseptör alttipinin modülasyonu nöronal eksitasyonu azaltır. Nöronal eksitasyonun azalması ise ekzitotoksik hücre ölümünü önleyebilmektedir.^{1,6}

Anestezik ajanların pek çoğu serebral metabolik hızı azaltır. Hücre metabolizmasının yavaşlaması hücrenin iskemiye olan toleransını artırır. Anestezi ilişkili nöroproteksiyonun başka bir mekanizmasının da serebral metabolik hızın azalması olduğu düşünülmektedir.^{1,2,3,6}

3.1. Volatil Anestezik Ajanlar

İzofluran son iki dekada nöroprotektif potansiyel açısından yoğun olarak çalışılmıştır. İzofluranın anlamlı nöroprotektif etkinliği lokal ve global iskemi modellerinde gösterilmiştir.^{30,31} İzofluran apopitotik nöron ölümünü önleyemezken, ekzitotoksik hasarı glutamat reseptör alttipi aracılığıyla azaltır.³⁰ İzofluran'ın bir "minimal alveoler konsantrasyon"luk (MAC) anestezi dozu elektroensefalografi'de (EEG) *burst* supresyon yapan dozları kadar etkin nöroproteksiyon sağlar. Halotan ve desfluranın da izofluran kadar potent nöroprotektif etkinliği olduğu ratlarda beyin iskemi/reperfüzyon modelinde bildirilmiştir.^{30,31}

3.2. İntravenöz Anestezik Ajanlar

1970'lerin başlarında metohexitalin nöroprotektif etkisinin olabileceğinin rapor edilmesinden sonra barbituratlarla yapılan deneysel çalışmalarda olumlu sonuçlar bildirilmiştir. Barbituratların deneysel modellerde izofluran kadar etkin nöroproteksiyon

sağladığı bildirilmiştir. Ancak barbitüratların nöroprotektif etkisi için EEG’de *burst* supresyon yapan dozları gereklidir. Klinik çalışmaların sonuçları ise halen tartışmalıdır.^{6,33,34}

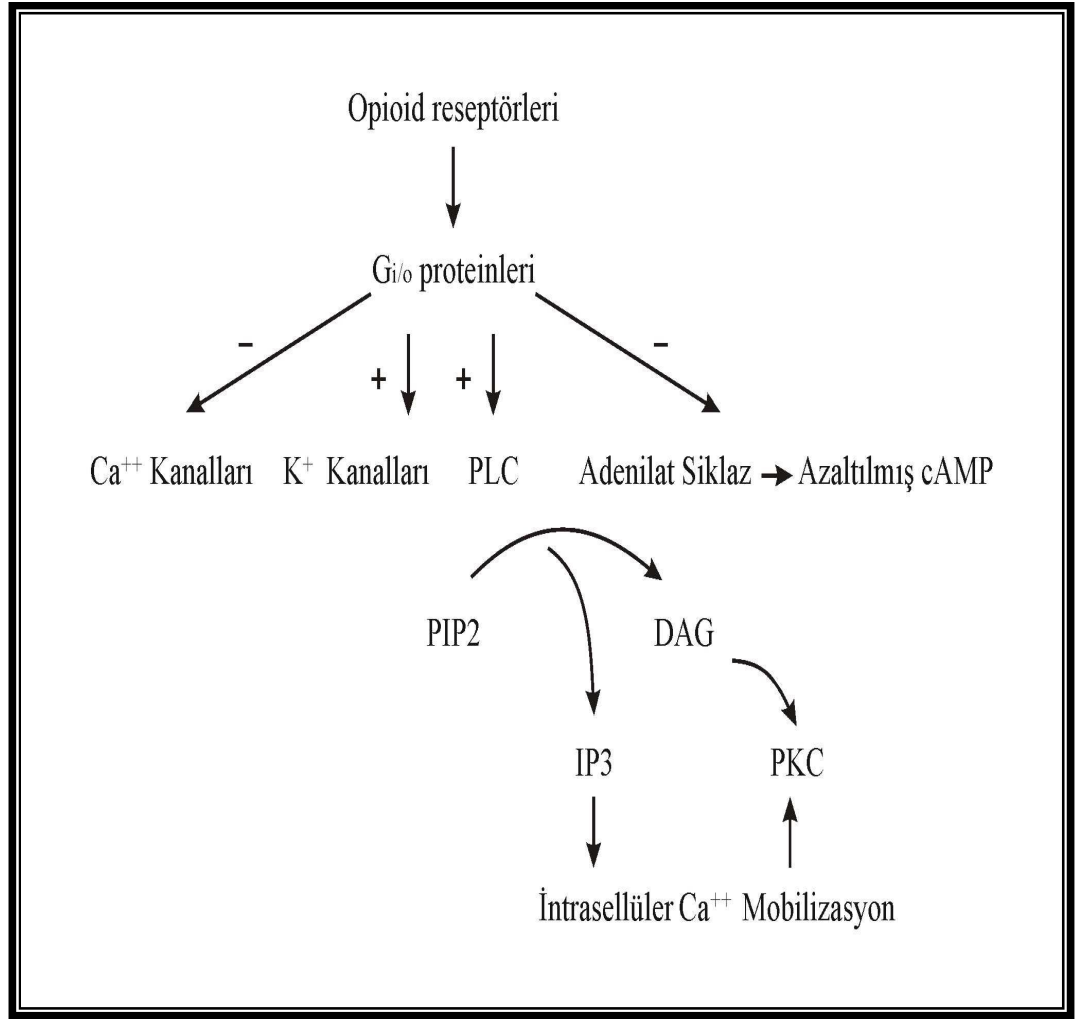
Propofol’un nöroprotektif etkinliği lokal ve global serebral iskemi modellerinde gösterilmiştir. Propofol içeriğindeki antioksidan fenolik hidroksil grubuyla nöron hasarını önlediği gibi, apoptotik yolaklardaki ikincil sinyallerin modülasyonunu değiştirerek anti-apoptotik etki de gösterir.^{10,11,36-38} Lee ve ark.¹⁰, ratlarda bilateral karotid arterlerin klemplenmesi ile oluşturdukları iskemi/reperfüzyon modelinde propofolün, infarkt alanını kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azalttığını göstermişlerdir.

3.3. Opioidler

Opioidler, insanın ağrıyla olan savaşımında uzun yıllardan beri önemli bir yer tutmaktadır. Doğada ekzojen olarak buldukları gibi insan bedeninde de endojen olarak üretilebilen maddelerdir. Opioidlerin santral sinir sistemi (SSS) ve diğer organ sistemlerine olan etkileri birçok bilimsel çalışmaya konu olmuştur. Opioidler son zamanlarda analjezik ve antinosiseptif etkilerinin yanı sıra özellikle beyin ve kalp dokusunda iskemi/reperfüzyon sonucu gelişen hücre hasarını sınırlamaları ile gündeme gelmişlerdir.^{16-19,39,40}

Endojen opioidlerin memelilerin kış uykusunda oynadığı rol, opioidlerin dokuyu iskemiye karşı koruduğunun en önemli kanıtıdır. Memelilerde görülen kış uykusu, hücre düzeyinde iskemiye benzer şekilde hücre içi asidoz ve hipoksi ile karakterizedir. Hücre düzeyinde iskemiye karşı toleransın oluşmasında endojen opioidler önemli rol oynamaktadır. Endojen opioid artışı ile memelilerdeki kış uykusu tetiklenir ve bu durum opioid antagonistleri verildiğinde geri döndürülebilir.^{40,41}

SSS, kalp ve periferik dokularda bulunan opioid reseptörleri fonksiyonel etkilerini kendilerine bağlanan peptidlerin aktivasyonu ile göstermektedir. Opioid reseptör ailesi, temel olarak adenil siklazı inhibe eden inhibitör G (Gi) proteinlerine bağlı μ , kappa, ve delta olmak üzere üç gruptan oluşur. Farmakolojik çalışmalarda her üç grubun kendi alt gruplarının olduğu saptanmıştır. Opioid reseptör aktivasyonu, G proteini üzerinden voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını inhibe ederken, potasyum kanallarını aktive etmekte ve böylece hücrenin stabilizasyonunu sağlayarak nörotransmitter salınımını önlemektedir (Şekil 4).⁴¹



Şekil 4. Opioidlerin hücre içi yolakları⁴¹

Opioid reseptör agonistleri ile yapılan deneysel hayvan çalışmalarında her üç reseptör ilişkili nöroprotektif etki saptanmıştır. Nöronal hücre kültüründe yapılan çalışmada ise delta reseptör aktivasyonu neokortikal nöronları glutamat ve hipoksi ilişkili hasardan korumaktadır.⁴² Delta reseptör aktivasyonu tüm vücut hipoksisi uygulanan ratlarda yaşam süresini belirgin olarak arttırmıştır.⁴³

3.4. Remifentanil

Remifentanil, ilk olarak 1996 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde klinik kullanıma sunulmuştur. Yapısal olarak bir piperidin derivativesidir (3-4-methoksikarbonil-4-[(L-oksopropil)-fenilamino]-L-piperidin). Remifentanil hidroklorid şeklinde lipofize toz olarak kullanıma sunulmuştur. Yağda çözünebilmektedir ve %92 oranında plazma proteinlerine bağlanır.¹⁴

Farmakodinamik olarak fentanil ve derivelerine benzer şekilde maksimal efektif yarı konsantrasyon (EC 50) değeri 2,6 nM olan güçlü bir μ reseptör agonisti iken kappa (EC 50 = 6.1nM) ve delta (EC =66nM) afinitesi düşüktür ve insanlarda hedef kontrollü infüzyon olarak kan düzeyi 5-20 ng/ml olacak şekilde titre edilmektedir. Remifentanilin terminal eliminasyon yarı-ömrü 3.8-8.3 dakikadır. Metabolizmasının, plazma kolinesteraz inhibisyonundan veya düzeyinden etkilenmediği gösterilmiştir. İçerdiği ester bağı sayesinde, kan ve diğer dokuların non-spesifik esterazları ile metabolize olması, diğer opioidlerden farklı bir farmakokinetik profile sahip olmasıyla sonuçlanmaktadır. Hızlı gerçekleşen klirensi ve organ fonksiyonlarından bağımsız olarak etkisinin sonlanması önemli klinik avantaj sağlar. Remifentanil asit, en önemli metabolitidir ve remifentanilden 4600 kez daha az potenttir (Şekil 5).^{14,16-18}

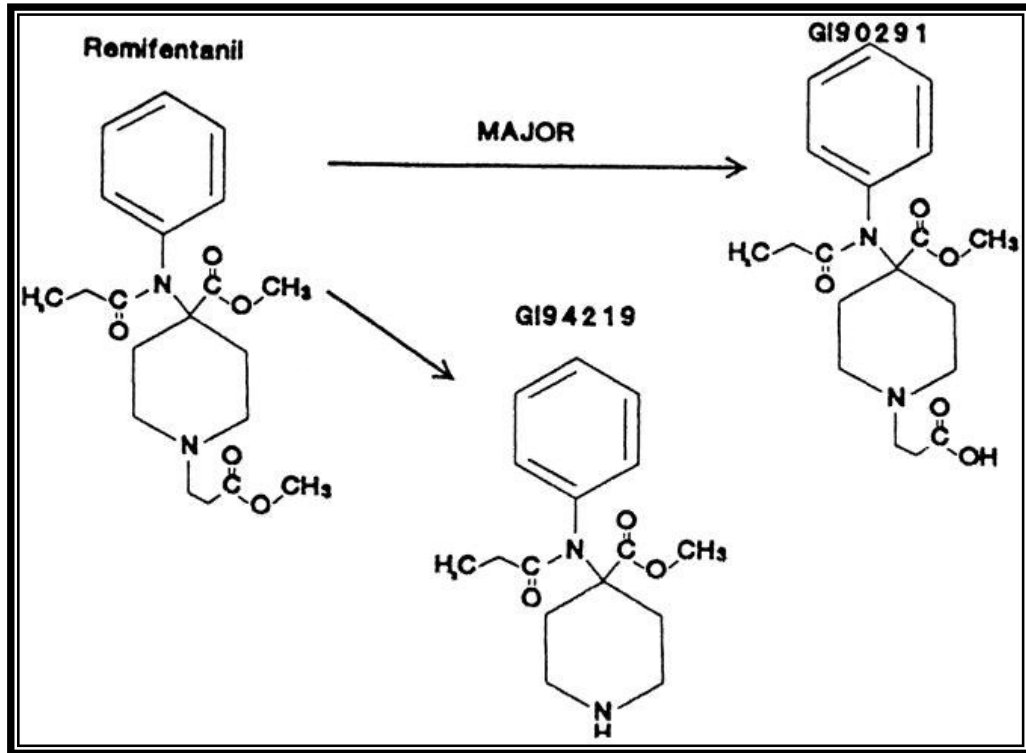
Remifentanil, EEG'de doza bağımlı olarak supresyon yapar; intravenöz uygulaması sırasında nöbet aktivitesi gözlenmemiştir. Serebral kan akımına, intrakraniyal basınca ve serebral kan akımına olan etkileri diğer μ reseptör agonistlerden farklı değildir. Diğer opioid ajanlarda olduğu gibi kas rijiditesi insidansında doza bağımlı artışa neden olur. Etkisinin hızlı başlaması nedeniyle sufentanil ve fentanile oranla rijidite klinik olarak daha fazla gözlenirse de eş potent dozlarında rijidite insidansı benzerdir.¹⁴

Doza bağımlı analjezik etkinlik sağlayan remifentanil ile gönüllülerde yapılan tek doz bolus uygulamada, remifentanilin alfentanilden 20-30 kat daha potent bir ajan olduğu; respiratuvar depresyon oluşturma kapasitesinin ise alfentanilden 10 kat fazla olduğu saptanmıştır. Diğer μ opioid reseptör agonistlerine benzer şekilde doza bağlı solunum depresyonu yapan remifentanilin, ağırlı uyarının varolmadığı durumlarda, 0.05-0.1 $\mu\text{g}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{dk}^{-1}$ İV infüzyon hızı ile dakika ventilasyonunu %50 oranında deprese ettiği bildirilmektedir.

Ayrıca, solunum depresyonunun derecesinin sadece uygulanan doz ile bağımlı olmadığı; yaş, genel tıbbi koşullar, ağrının varlığı ve diğer uyarıların varlığından da etkilendiği belirtilmektedir.¹⁴

Remifentanil ile ratlarda kalp ve karaciğer iskemi/reperfüzyon modellerinde yapılmış beş çalışmaya ulaşılmıştır.¹⁶⁻²⁰ Ratlarda ve tavşanlarda intakt kalp iskemi/reperfüzyon modelinde remifentanil iskemiden önce uygulanmış ve tetrazolium triklorid (TTC) ile değerlendirilen infarkt alanını belirgin olarak azaltmıştır.^{16,17,19} İzole kalp iskemi/reperfüzyon modelinde benzer şekilde infarkt alanını belirgin olarak azalttığı bildirilmiştir.¹⁸

Ratlarda hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde iskemiden 30 dk önce profilaktik olarak sürekli infüzyon şeklinde $2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{dk}^{-1}$ dozlarında verildiğinde anlamlı hepatik koruma sağlamıştır.²⁰ Literatür taramamızda remifentanilin deneysel ya da klinik olarak beyin iskemi/reperfüzyon hasarına etkisini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.



Şekil 5. Remifentanil ve metabolitleri¹⁴

GEREC ve YÖNTEM

Çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanı Araştırmaları Etik Kurulu onayı alındıktan sonra “Multidisipliner Deneysel Hayvanları Laboratuvarı Merkezi”nin olanakları kullanılarak yapıldı.

Çalışmada vücut ağırlığı 250-300 g arasında değişen 18 adet erkek *Wistar* rat kullanıldı. Multidisipliner Deneysel Hayvanları Laboratuvarı’ndan sağlanan denekler standart diyetle beslendiler ve 12 saatlik gündüz gece siklusu uygulanarak ortama adapte edildiler.

Deneysel Protokolü

Ratlarda intraperitoneal 80 mg/kg ketamin (*Ketalar®*) ve 5 mg/kg ksilazin (*Rompun®*) uygulaması ile anestezi sağlandı. Ratlar çalışma süresince operasyon masasında supin pozisyonda ekstremiteleri sabitlenmiş olarak tutuldu. Cerrahi olarak 14 *Gauge* intravenöz polietilen kanül (*PE 50 OD mm [in.] .97 [.038] ID mm [in.] .58 [.023]*) ile trakeostomi açıldı. Solunum sayısı dakikada 60, tidal volüm 3 ml ve kan parsiyel arteriyel karbon dioksit basınçları (PaCO_2) 35–40 mmHg olacak şekilde mekanik ventilasyon (*Rodent Ventilator 7025 Hugo Sachs Elektronik, Almanya*) uygulandı (Resim 1,2).

Sağ femoral arter ve sol femoral ven, polietilen kanül (*PE 50 OD mm [in.] .97 [.038] ID mm [in.] .58 [.023]*) ile kanüle edildi ve arteriyel basınç transdüseri (*MLT844 Physiological Pressure Transducer, Interlab LTD, İstanbul, Türkiye*) yardımı ile monitörize edildi. Ratlar üflemlili ısıtma sistemi (*Sinbo, İstanbul, Türkiye*) ile ısıtılarak rektal ısı 37-38⁰C arasında tutuldu. Deneye başlamadan önce tüm hayvanlar 15 dk stabilizasyona bırakıldı. Daha sonra bazal değerler olarak arteriyel kan parsiyel karbondioksit basıncı (PaCO_2) ve ortalama arter basıncı (OAB) kaydedildi (20, 40, 60 ve 80. dk).

Serebral iskeminin oluşturulmasından 20 dk önce ratlar üç gruba ayrıldı ve sol femoral venden:

Remifentanil grubunda (Grup R) (n=6): $2 \mu\text{g.kg}^{-1}\text{dk}^{-1}$ remifentanil (*Ultiva®*) infüzyonuna (*Braun, Perfusor Compact S, Almanya*) başlandı (Resim 3) ve bu uygulama reperfüzyonun sonuna kadar sürdürüldü.²⁰

Propofol grubunda (Grup P) (n=6): $96 \text{mg.kg}^{-1}\text{sa}$ propofol (*Diprivan®*) infüzyonuna başlandı ve iskemi ile eş zamanlı olarak $72 \text{mg.kg}^{-1}\text{sa}$ ' e düşürülerek bu uygulama reperfüzyonun sonuna dek sürdürüldü.¹⁰

Kontrol grubunda (Grup K) (n=6): Diğer gruplarda uygulanan ilaçların volümü ($\approx 2,1 \text{ml/sa}$) kadar serum fizyolojik infüzyonu reperfüzyonun sonuna dek uygulandı (Şekil 6).

İlaç infüzyonunun başlanmasından 20 dk sonra, ortalama arter basıncını 50 mmHg'nın altına düşünceye kadar arteriyel kanülden kontrollü olarak 3-4 ml'lik arteriyel kan enjektör ile aspire edildi. Ardından her iki karotid arter plastik damar klempleri ile klemlenerek serebral iskemi sağlandı (Resim 4).

Yirmi dakikalık iskemi sürecinin ardından klempler açıldı. Aspire edilen kan tekrar infüze edildi. Yarı şeffaf olan karotid arterdeki pulsasyonunun gözlenmesi ile reperfüzyon doğrulandı. Kırk dakikalık reperfüzyon sonrası ratlar dekapite edilerek sakrifiye edildi. Ratlardan çıkarılan beyin dokusu, polivinil film tabakası ile sarıldıktan sonra -20°C 'de 30 dk süre ile tutularak yarı donmuş hale getirildi. Her beyin dokusundan posteriyorden frontal pole doğru 2 mm aralıklarla 4, 6, 8, 10 ve 12 mm'lik kesitler alındı.¹⁰

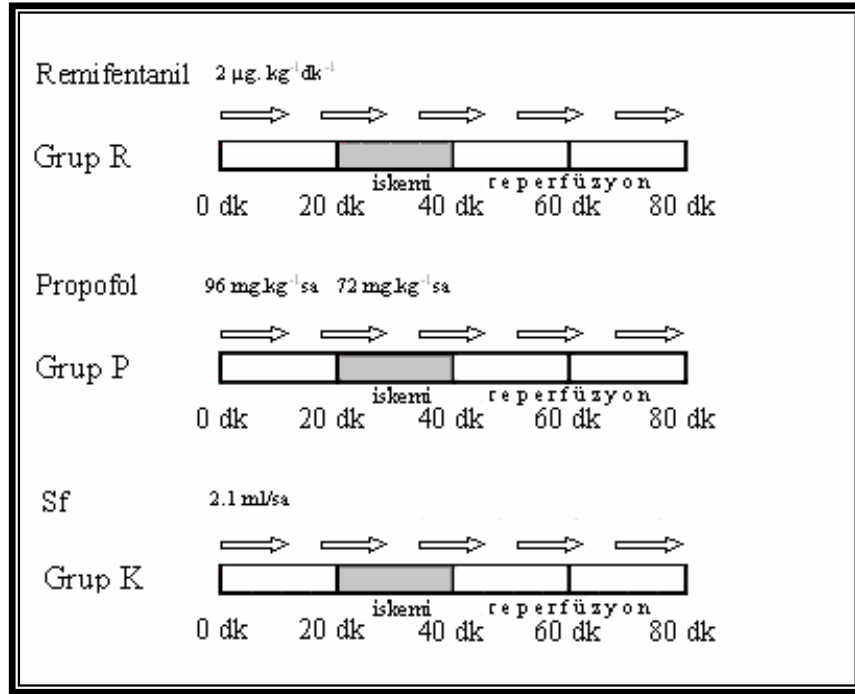
Tetrazolium Triklorid ile Boyama

Alınan kesitler %2 lik 2,3,5-trifenil 2H-tetrazolium (TTC) (*Sigma Inc, St Luis, MO, ABD*) solüsyonu ile 38°C 'de 10 dk süre ile enkübe edildi. Enkübasyondan sonra alınan örnekler %10 formalin solüsyonu içinde fikse edildi. Her koronal kesitin fotoğrafı çekildi. Boya almayan infarkt alanları bilgisayar ortamında planimetrik olarak (*SigmaScan 4.0, Systat*

Software Inc, CA, ABD) değerlendirildi. İnfarkt alanının kesit alanına oranı yüzde değer olarak kaydedildi¹⁰ (Resim 5).

İstatistiksel Analiz

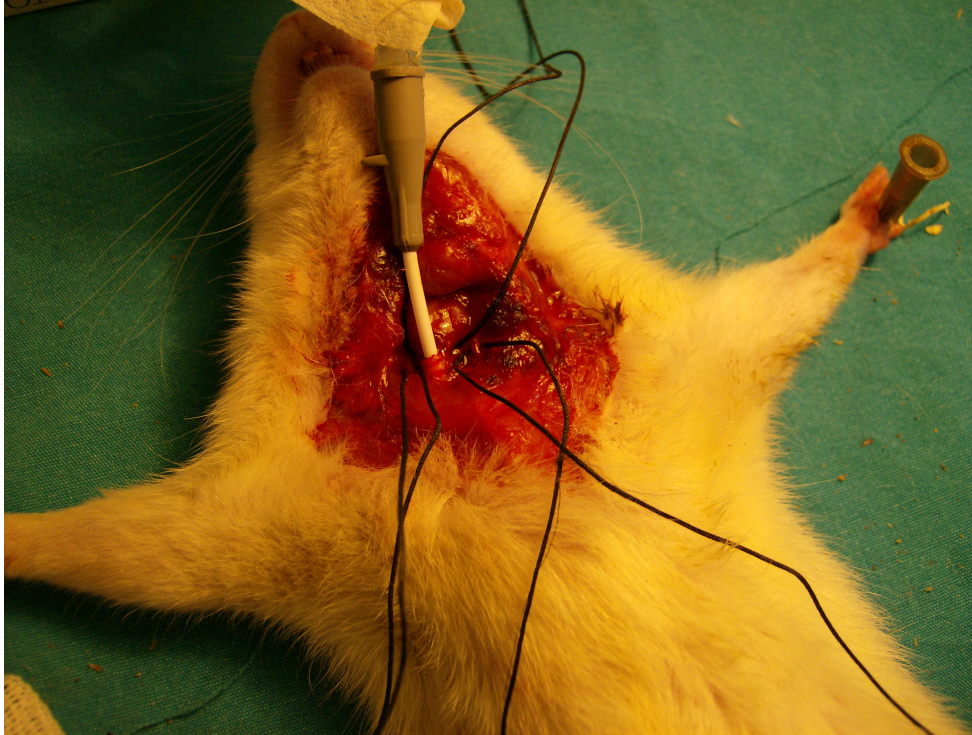
İstatistiksel değerlendirme için *Statistical Package of Social Sciences 11* (SPSS 11) programı kullanıldı. Ortalama arter basıncı değerleri tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi ve gruplar arası fark olup olmadığı araştırıldı. İnfarkt alanları arasındaki farkları saptamak amacıyla *Kruskall Vallis* ve *Mann-Whitney U* testlerinden yararlanıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 6. Deney protokolü



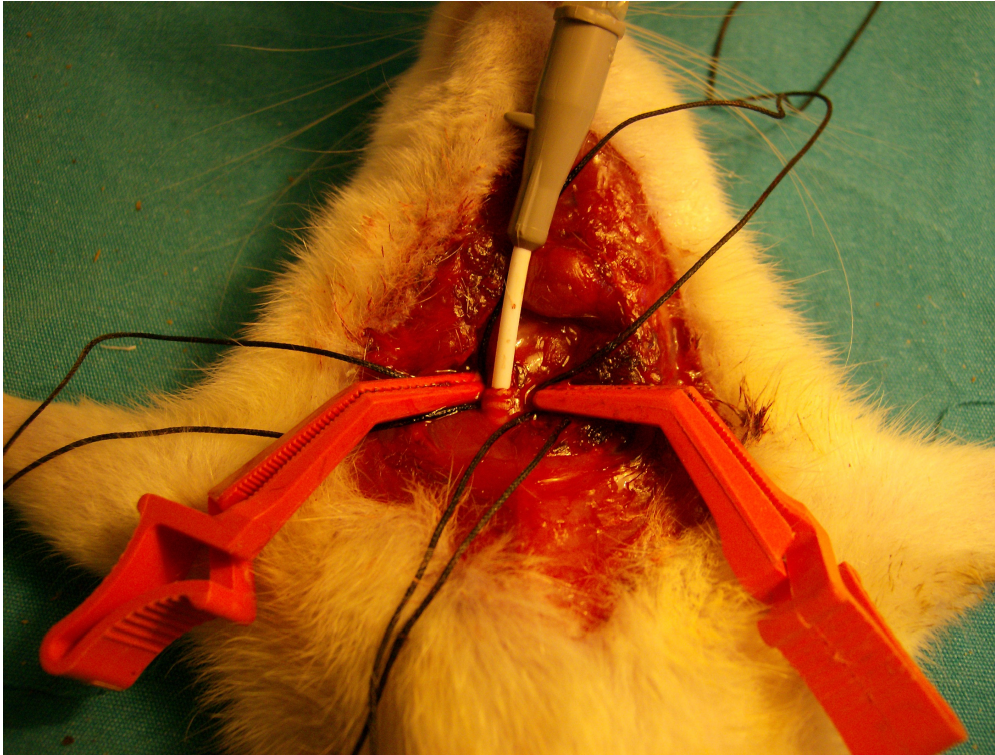
Resim 1. Trakeostomi ve mekanik ventilasyon



Resim 2. Karotid arterlerin disseksiyonu



Resim 3. Çalışma ilaçlarının infüzyonu



Resim 4. Karotid arterlerin klemplenmesi

BULGULAR

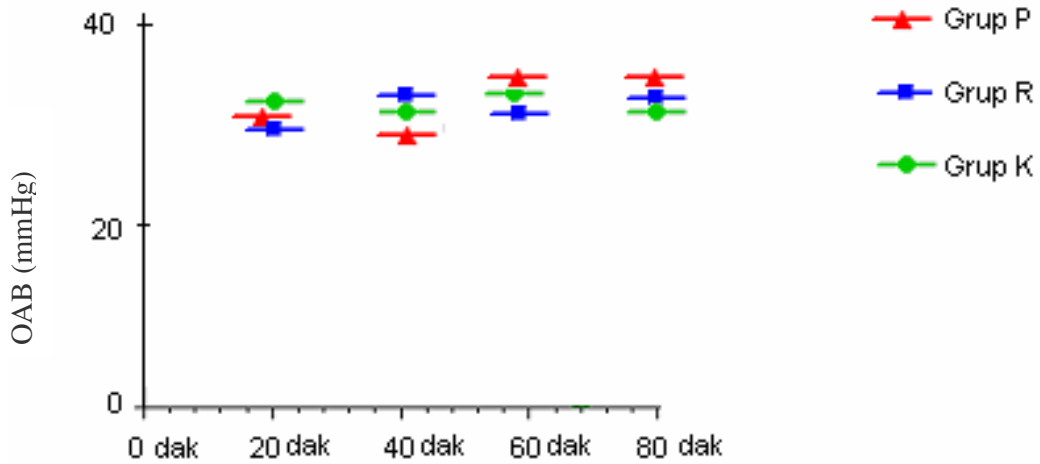
Her biri 6 denek içeren üç grupta (n=6), toplam 18 rat çalışmaya alındı. Deneklerin hepsinde çalışma tamamlandı ve çalışma boyunca ek anestezi ihtiyacı olmadı. Tüm gruplarda rat ağırlıklarının ortalamalarının birbirine yakın olduğu saptandı ($p > 0.05$, Tablo 2).

Tablo 2. Deney gruplarında rat ağırlıkları

	Grup P (n=6)	Grup R (n=6)	Grup K (n=6)	P <i>değeri</i>
Gram (g)	264,5±7,1	266±6,9	263,8±8,8	0.81

Ratların kan gazları analizlerinden elde edilen bazal arteriyel kan parsiyel karbondioksit basınç değerleri her üç grupta birbirine yakındı ($p > 0.05$).

Deney sürecindeki ölçümlerde ratların Ortalama Arter Basıncı (OAB) arasında fark saptanmadı ($p > 0.05$) (Şekil 7).



Şekil 7. Deney gruplarında ortalama arter basıncı değerleri (Ortalama ± Standart Hata)

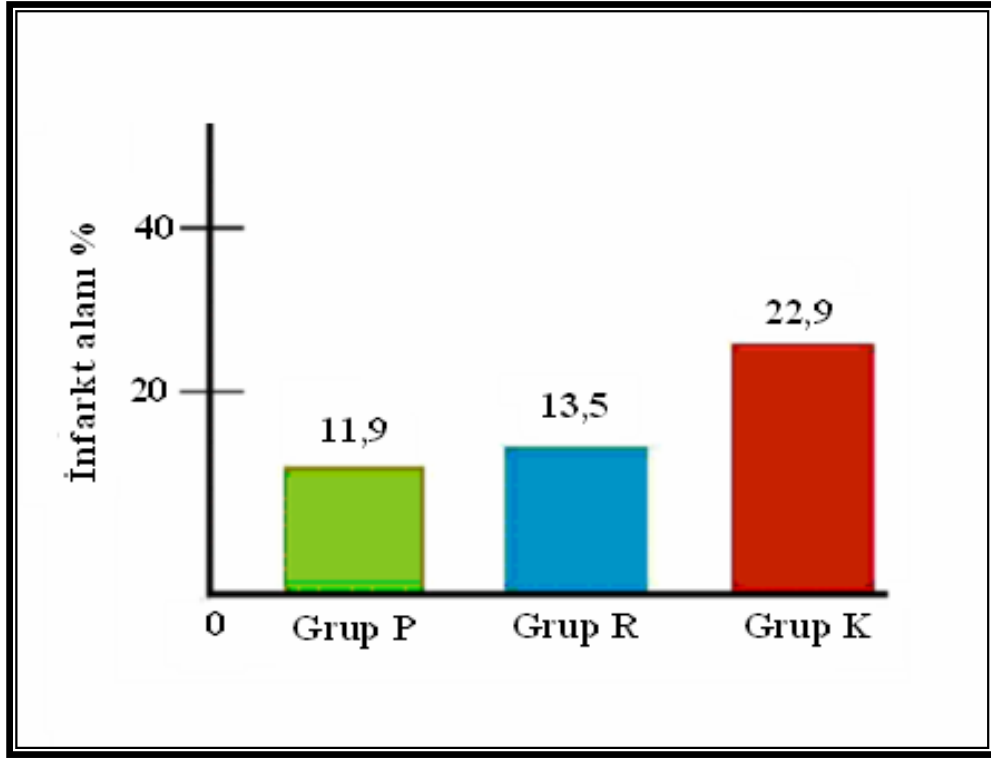
İnfarkt alanları karşılaştırıldığında; propofol grubunda infarkt alanı yüzdesinin en düşük, kontrol grubunda en yüksek olduğu saptandı (Tablo 3). Grup P ve Grup R değerleri ile Kontrol Grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p= 0.003$). Grup R değerleri ile Grup P değerleri birbirine yakındı ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

Tablo 3. Deney gruplarında serebral infarkt alanının yüzde değerleri

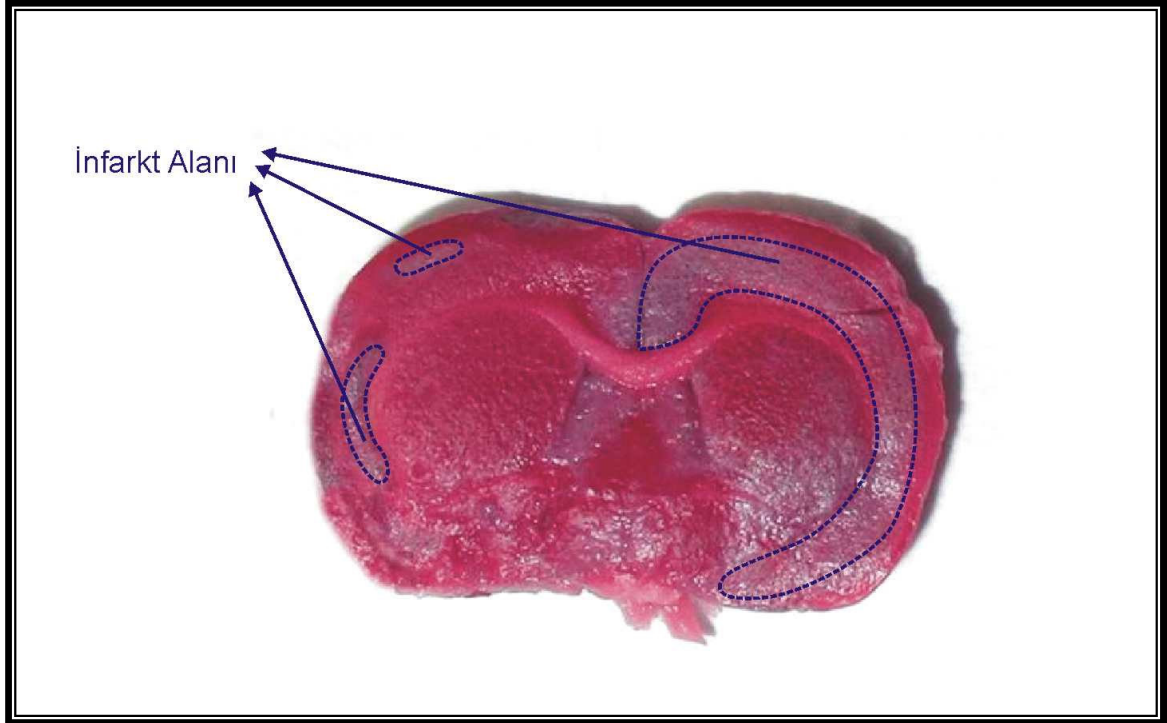
	Grup P (n=6)	Grup R (n=6)	Grup K (n=6)	<i>p</i> <i>değeri</i>
İnfarkt Alanı (%)	11.90±1.20*	13.50±2.98 [†]	22.90±3.28	0.003

* $P < 0.05$, Kontrol Grubuyla karşılaştırıldığında

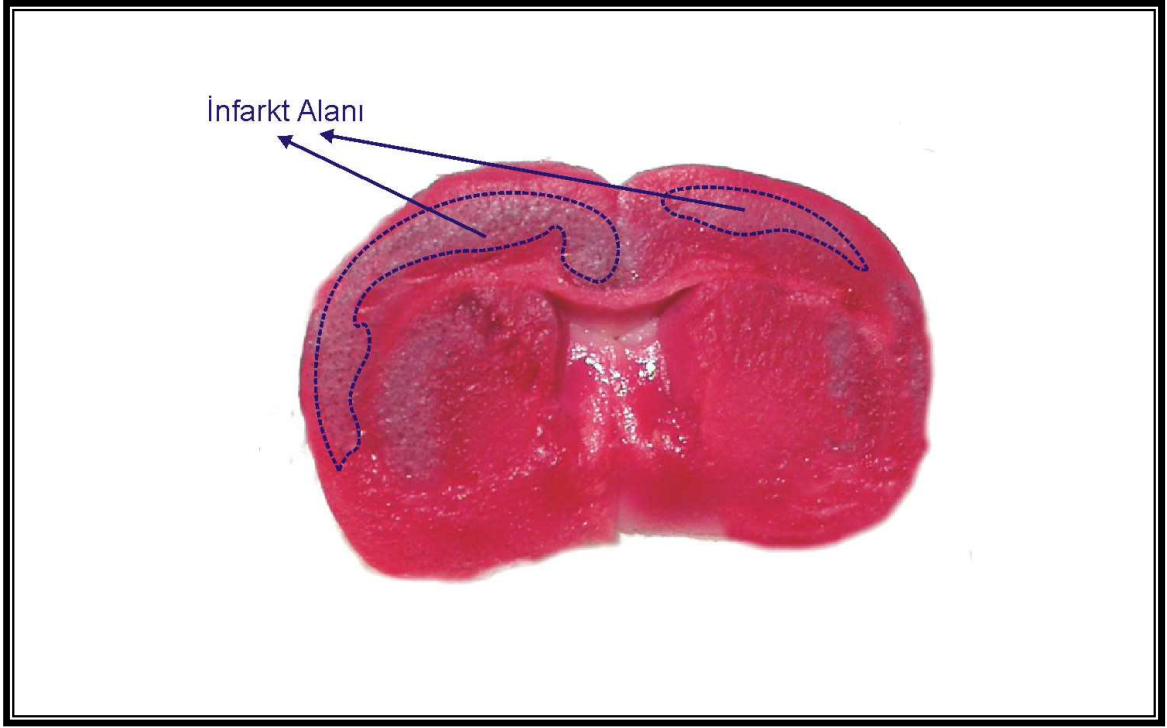
[†] $P < 0.05$, Kontrol Grubuyla karşılaştırıldığında



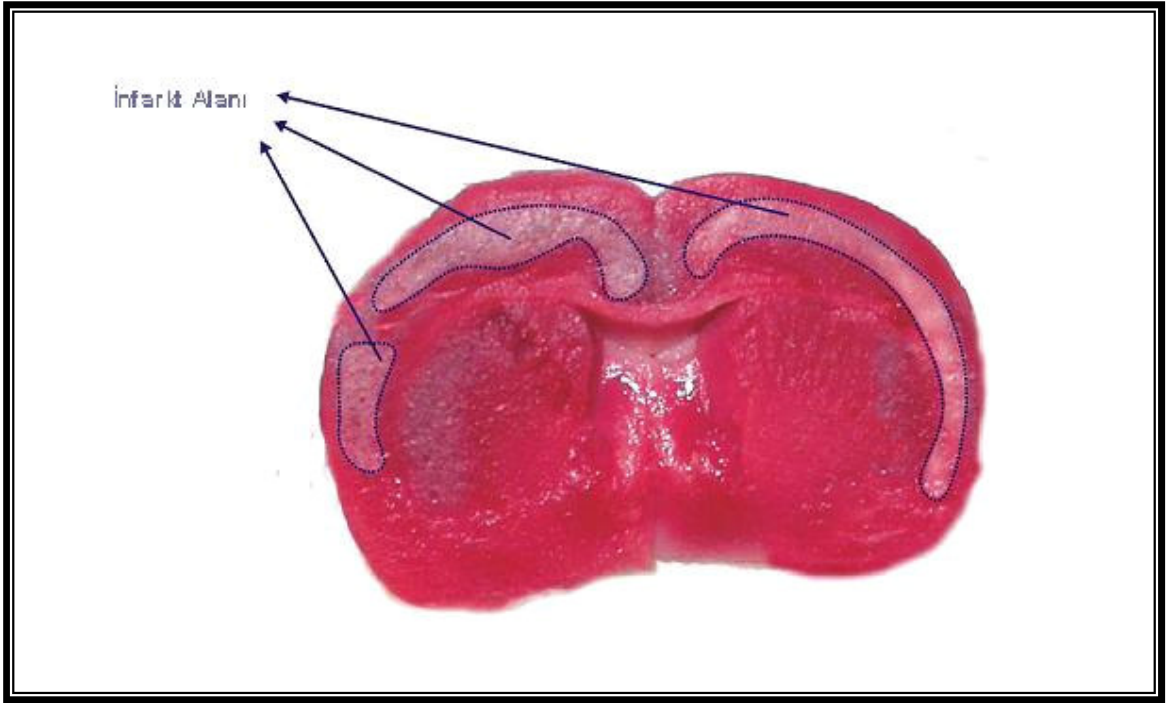
Şekil 8. İnfarkt alanları yüzde değerleri



Resim 5. Remifentanil grubunda serebral kesitlerde infarkt alanı



Resim 6. Propofol grubunda serebral kesitlerde infarkt alanı



Resim 7. Kontrol grubunda serebral kesitlerde infarkt alanı

TARTIŞMA

Beyne kan desteğinin kısmen veya tümüyle kesilmesi olarak tanımlanan serebral iskemi, reperfüzyon veya kan akımının restorasyonu izlemektedir. Fokal serebral iskemi ani olarak geri döndürülemediğinde, tıkalı arterlerle beslenen bölgelerde genellikle prognozu belirleyen doku infarktüsü gelişmektedir.²²

Serebral iskemi sırasında hücre kaybına neden olan mekanizmalar halen tamamen anlaşılmamış olmakla birlikte son 20 yılı geçen bir süreçte büyük ilerlemeler de kaydedilmiştir. Hücresel beyin hasarı oksijen desteğinde oluşan ciddi azalmalar kadar ATP, fosfokreatinin ve glikojen gibi enerjii destekleyen maddelerde azalmaya yol açan glukoz ve diğer besin öğelerindeki eksikliklerle de ilişkilidir.^{22,25,27}

Son zamanlarda hücrenin “güç evi” olarak tanımlanan mitokondrinin iskemi/reperfüzyon hasarındaki rolünün ne olduğunu araştıran çalışmaları derleyen ve irdeleyen Cristophe ve Nioas²⁷, mitokondriyel araştırmaların gelişmesiyle iskemik hasarda mitokondrinin belirleyici rolünün gösterildiğini, farmakolojik ve biyomedikal araştırmalarda mitokondrinin ümit veren yeni bir terapötik hedef olarak görüldüğünü tartışmaktadırlar. Ayrıca nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde yer alan mitokondriyel olayların keşfedilmesinin iskemi/reperfüzyon hasarında etkili tedavilerin gelişimine yardımcı olabileceği ümit edilmektedir.²⁷

Ratlarda mitokondriyel oksidatif enzim sistemindeki bozulmanın büyüklüğüne profilaktik propofol tedavisinin etkinliğini araştıran Lee ve ark.¹⁰ bu amaçla *forebrain iskemi modeli* oluşturmuşlar ve bu modelde propofolün nöroprotektif etkisinin doğrulanmamış olmasından yola çıkmışlardır. Bizim de çalışmamızda örnek aldığımız bu deneysel modelde, ratlarda billateral karotid arterlerin geçici oklüzyonu ile *forebrain iskemi ve reperfüzyonu* oluşturulmuştur. Bu işlem sonunda oluşacak infarkt alanının değerlendirilmesinde mitokondriyel respiratuvar enzimler için bir histokimyasal endikatör olarak bilinen TTC boyama işlemi kullanılmıştır. Nöroprotektif olduğu varsayılan bileşiklerin etkinliğini ölçmede en sık kullanılan araç TTC boyamasıdır. Bu ucuz ve hızlı teknik, makroskopik olarak canlı dokunun infarkt alanlarından kolayca ayırt edilmesini sağlamaktadır.⁴⁴ Renksiz TTC, en fazla

mitokondride bulunan dehidrogenazlarla enzimatik olarak kırmızı bir ürüne indirgenmektedir. Boya yoğunluğunun mitokondrinin fonksiyonel aktivitesi ve sayısı ile ilişkili olduğu bilinmektedir.⁴⁴

Son zamanlarda ratlarda fokal iskemi sonrası reperfüzyonun erken fazlarında doku hasarının değerlendirilmesinde TTC boyamasını in vivo ve in vitro teknikle kullanarak karşılaştıran Benedek ve ark.⁴⁶ TTC boyamasının kullanımının doku hasarını belirlemede hızlı bir teknik olduğunu doğrulamışlardır. Ancak, çalışmacılar TTC boyamasının dehidrogenaz aktivitesini ölçen fonksiyonel bir test olduğunu vurgulamakta ve bu nedenle geçici metabolik bozulmaların hatalı negatif sonuçlara neden olabileceğine dikkat çekmektedirler. Ayrıca çalışmacılar doku nekrozu gelişimini geciktirebileceği umuduyla nöroprotektif ajanların test edilmesi söz konusu olduğunda, değerlendirme sürecinin reperfüzyonun erken fazlarıyla sınırlanmaması gerektiği görüşünü ileri sürmüşlerdir.

Biz çalışmamızda TTC boyamasının erken sonuç verdiği bilgisine dayanarak bu işlemi 40 dk'lık reperfüzyon süresi sonunda yani, çalışmanın 80. dakikasında uygulamış olduk. Benedek ve ark.'nın⁴⁶ görüşlerine göre reperfüzyonun daha geç safhalarında değerlendirmemiş olmamız çalışmamızın kısıtlaması olarak değerlendirilebilirse de aynı modeli uyguladığımız ve 30 dk'lık reperfüzyon süresi uygulayan Lee ve ark. nın¹⁰ yaklaşımı ile uyum sağlamaktadır. Bozulmuş serebral mitokondriyal oksidatif sistemler üzerine propofol ön tedavisini kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede etkin bulan söz konusu çalışmacıların sonuçları ile bizim aynı başlangıç ve idame dozlarını kullandığımız propofol grubunda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Deney sırasında ratlarda kullanılacak propofol dozu Lee ve ark.'nın¹⁰ uyguladığı doz esas alınarak belirlenmiş ve ortalama arter basınç izlemlerinde gruplar arası anlamlı fark olmadığı saptanmıştır. Yapılan işlem rölatif olarak basit olmakla birlikte oklüzyon, hipotansiyon periyodu veya reperfüzyon döneminde rat kaybı söz konusu olabileceğinden aşırı dikkat gerektirmektedir.

Litaratür araştırmasında propofolün oksidatif stres üzerine etkisini araştıran deneysel çalışmalar^{8,9,37,38} yanında insan çalışmalarının da yer aldığı gözlenmiştir. Ortak bir sonuç olarak propofolün lipit peroksit formasyonunu azalttığını öne süren bu çalışmalarda Dela Cruz ve ark.¹¹ propofol anestezisi altında cerrahi girişim uygulanan hastalarda trombositlerde

oluşacak oksidatif stres komponentleri araştırmışlar; propofolün genellikle anestezi sırasında kullanılan dozlarda trombosit membranındaki lipit peroksit üretimini anlamlı derecede inhibe ettiğini saptamışlardır.

Stres sırasında opioid peptitlerin salınması nedeniyle⁴¹, opioidlerin iskemi/reperfüzyon hasarına karşı miyokardiyumun endojen protektif yanıtında kısmen rol aldığı ileri sürülmektedir.⁴⁰ Anestezi pratiğinde kullanımı oldukça yaygın olan fentanilin kardiyoprotektif etkisi ile ratlarda postiskemik ventriküler disfonksiyonu kaldırdığını gösteren çalışmalardan^{12,13} sonra global serebral iskemi/reperfüzyon sırasında da proinflatuar sitokinler üzerinde inhibisyon etkisi olduğu saptanmıştır.³⁹

Periopertif dönemde bir opioid olarak kullanımı birçok ülkede onaylanmış olan ve titre edilebilir olmasının yanında postoperatif solunum depresyonuna neden olmaması gibi avantajlara sahip olan remifentanil ile yapılmış birçok çalışma olmakla birlikte^{14,20} nöroprotektif etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Remifentanilin morfin ve fentanil gibi iskemiye bağlı hasara karşı kardiyoprotektif etkisini ratlarda yaptığı çalışma ile test eden Zhang ve ark.¹⁶, bu opioidin iskemik ön koşullamanın kardiyoprotektif etkisini taklit ettiğini ve oluşan infarkt alanını doza bağlı olarak azalttığını öne sürmüşlerdir. Remifentanilin indüklediği ön koşullama ile sunulan proteksiyonda protein kinaz c'nin (PKC) rolünün çalışılmadığını gözleyen çalışmacıların bir sonraki araştırması¹⁷ postiskemik kalpte remifentanile bağlı ön koşullamanın koruyucu etkisinin iskemik ön koşullamaya kıyasla PKC aracılığı ile olup olmadığı araştırmak olmuştur.

Çalışmacılar remifentanilin iskemik hasara karşı iskemik ön koşullamadakine benzer ve PKC aktivasyonunu da içeren mekanizma ile miyokardiyal koruma sunduğunu saptamışlardır.¹⁷ Remifentanile bağlı ön koşullama ile oluşan kardiyoprotektif etkinin üç tip opioid reseptör antagonisti ile kaldırılabilir olması nedeniyle remifentanile bağlı ön koşullama ile oluşan kardiyoproteksiyonla üç tip opioid reseptörün rolüne işaret etmişlerdir.¹⁷ Ancak kalpte kappa ve delta reseptörlerinin bulunduğunu gösteren önceki çalışmalar^{47,48} nedeniyle, remifentanil önkoşullaması ile elde edilen kardiyoproteksiyonda μ reseptörlerini ekstra

kardiyak olabileceğini düşünmüşler ve ratlarda yaptıkları izole kalp çalışması ile bu hipotezlerini test etmişlerdir.¹⁸ Çalışmacıların verileri hipotezlerini doğrulamış ve remifentanil ön koşullaması ile elde edilen kardiyoproteksiyonda kardiyak delta ve kappa reseptörlerinin rol oynadığına işaret etmişlerdir.

Geri dönüşümlü miyokardiyal iskemik hasarda remifentanilin etkisini araştıran diğer çalışmacılar¹⁹ tavşanlarda oluşturdukları rejyonal miyokardiyal iskemi/reperfüzyon modelinde iskemi öncesi geçici olarak verilen remifentanilin propofol ile anestezize deneklerde infarkt alanını anlamlı derecede azalttığını saptamışlardır. Remifentanil iskemik ön koşullamaya bağlı proteksiyonda ek bir koşullama sağlayıp sağlamadığını test etmek için üç denek grubunda çalışan Kuzume ve ark.¹⁹ uzamış süre ile verilen remifentanilin iskemik ön koşullamaya bağlı infarkt sıramalasındaki korunma eşiğini yüksettiğini öne sürmüşlerdir.

Remifentanilin ön koşullama şeklinde verilmesi rutin klinik uygulamada olanaklı değildir. Klinik uygulamalarda remifentanilin sürekli infüzyon şeklinde verilmesi önerildiğinden², çalışmamızda klinik uygulamaya uyacak şekilde serebral iskemi öncesi sürekli infüzyon olarak verilmesi planlanmış ve reperfüzyonun sonuna dek sürdürülmüştür.

Ratlarda kardiyak iskemi/reperfüzyon modelinde remifentanilin çeşitli infüzyon dozları ön koşullama şeklinde çalışılmış ve intakt rat kalbinde $6 \mu\text{cg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{dk}^{-1}$, izole kalp modelinde ise 100 ng/mL dozun kardiyoproteksiyonu sağlayan en efektif doz olduğu bildirilmiştir.^{16,19}

Çalışmamızda remifentanili ön koşullama yerine sürekli infüzyon şeklinde verecek olmamız nedeniyle, hepatik iskemi/reperfüzyon modelinde sürekli infüzyonu kullanarak proteksiyon elde eden çalışmacılara benzer şekilde $2 \mu\text{cg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{dk}^{-1}$ dakika dozu uygulamayı uygun bulduk. Deneklerin ortalama arter basıncı ölçümlerinde gruplar arası fark bulunmamış olması ve aşırı hipotansif bir süreç ile denek kaybının olmaması nedeniyle bu infüzyon dozunun doğru seçilmiş olduğu kanısındayız.

Çalışmamızda remifentanil grubunda propofol grubuna benzer şekilde infarkt alanında azalma saptanması nedeniyle remifentanilin de diğer opioidler gibi nöroprotektif özellik taşıdığı kanısına varılmıştır.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda remifentanilin serebral iskemi/reperfüzyon hasarına karşı propofol kadar etkin serebral koruma sağladığını saptadık. Bu çalışmanın ve daha önce yayınlanan deneysel araştırmaların sonuçları dikkate alındığında;

1. Reperfüzyonun daha ileri aşamasındaki etkilenmenin araştırılmasına,
2. Klinik kullanıma benzer şekilde propofol ve remifentanil kombinasyonu ile elde edilecek verilerin değerlendirilmesine,
3. Klinik çalışmalarda güvenilir metodlarla remifentanilin nöroprotektif etkisinin araştırılmasına gereksinim olduğu kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Hans P, Bonhomme V. The rational for perioperative brain protection. *EJA* 2004; 21: 1-5.
2. Schaller B, Graf R. Cerebral ischemic preconditioning. An experimental phenomenon or a clinical important entity of stroke prevention?. *J Neurol* 2002;249:1503-11.
3. John XW, Adrian WG. Free radicals, antioxidants, and neurologic injury: possible relationship to cerebral protection by anesthetics. *Journal of Neurosurgical Anesthesiology* 2002;14(1):66-79.
4. Chesnut RM, Marshall LF, Klauber MR. The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury. *J Trauma* 1993; 34: 216–222.
5. Chang HS, Hongo K, Nakagawa H. Adverse effects of limited hypotensive anesthesia on the outcome of patients with subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 2000; 92:971–975.
6. Sanders R, Daqing Ma, Maze M. Anaesthesia induced neuroprotection. *Best Practice and Research Clinical Anaesthesiology* 2005;1:461-47.
7. Ward JD, Becker DP, Miller JD. Failure of prophylactic barbiturate coma in the treatment of severe head injury. *Journal of Neurosurgery* 1985; 62: 383–388.
8. DeLa Cruz JP, Seden˜o G, Carmona JA, Sanchez DeLa Cuesta F. In vitro effects of propofol on tissular oxidative stress in the rat. *Anesth. Analg.* 1998;87:1141-6.
9. DeLa Cruz JP, Villalobos MA, Seden˜o G, Sanchez DeLa CuestaF. Effect of propofol on oxidative stress in an *in vitro* model of anoxia-reoxygenation in the rat brain. *Brain Res.* 1998;800:136-44.

10. Lee Y, Chung C, Oh Y. The effectiveness of propofol pretreatment on the extent of deranged cerebral mitochondrial oxidative enzyme after incomplete forebrain ischemia/reperfusion in rats. *Journal Korean Med Sci.* 2000;15:627-30.
11. Cruz J.P, Zanca A, Carmona J.A, Cuesta F. The effect of propofol on oxidative stress in platelets from surgical patients. *Anesth. Analg.* 1999;89:1050-5.
12. Kato R, Foex P. Fentanyl reduces infarction but not stunning via deltaopioid receptors and protein kinase C in rats. *Br J Anaesth* 2000; 84:608–14.
13. Kato R, Ross S, Foex P. Fentanyl protects the heart against ischaemic injury via opioid receptors, adenosine A1 receptors and KATP channel linked mechanisms in rats. *Br J Anaesth* 2000; 84:204–14.
14. Glass P.SA, Gan T.J, Howell S. Review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of remifentanil. *Anesth. and Analg.* 1999;89 (4S):7-15.
15. Egan TD. Remifentanil versus alfentanil: Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy adult male volunteers. *Anesthesiology* 1996;84:821-33.
16. Zhang Y, Micheal G, Irwin M, Tak MW. Remifentanil preconditioning protects against ischemic injury in the intact rat heart. *Anaesthesiology* 2000;101:918-23.
17. Zhang Y, CHEN Z, Girwin M, Wong T. Remifentanil mimics cardioprotective effects of ischemic preconditioning via protein kinase c activation in open chest of rats. *Acta Pharmacology* 2005;200:446-500.
18. Zhang Y, Micheal G, Irwin M, Tak MW, Chen M, Cao C. Remifentanil preconditioning confers cardioprotection cardiac κ - and δ - opioid receptors. *Anesthesiology* 2005;102:371-8.

19. Kuzume Ko, Kuzume Ka, Wolff R, Chien G, Winkle DM. Remifentanil limits infarct size but attenuates preconditioning-induced infarct limitation. *Coronary Artery Disease* 2004;15: 449-458.
20. Zhang GH, Shan XF, Wen LC, Tao SH, Peng LK. Experimental study of preservation effect of remifentanil on hepatic ischemia reperfusion in rats. *Anesthesiology* 2006;105:A1623.
21. Neblina FL, Toledo AH, Pereyña LHT. Molecular biology of apoptosis in ischemia reperfusion. *Journal of Investigative Surgery* 2005;18:335-350.
22. Crack PJ, Taylor JM. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radical Biology & Medicine* 2005;38:1433–1444.
23. Su-Lan L, Wen-Yin C, Shue-Ling R, Jon-Son K, Chun-Jung C. Association of immune responses and ischemic brain infarction in rat. *Molecular Neuroscience* 2001;12:1943-1947.
24. Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, Whan G, Saito A, Hayashi T, Narasimhan P, Maier CM, Chan PH. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *The American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2004;1:17-25.
25. DeGracia DJ, Kumar R, Owen C, Krause G, White BC. Molecular pathways of protein synthesis inhibition during brain reperfusion. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2002;22:127-141.
26. Tan S, Sagara Y, Liu Y, Maher P, Schubert D. The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J Cell Biol* 1998;141:1423-32.
27. Christophe M, Niolas S. Mitochondria: A target for neuroprotective interventions in cerebral ischemia/reperfusion. *Current Pharmaceutical Design* 2006;12:739-757.

- 28.** Xiong Li-ze. Neuroanesthesia and neuroprotection: where are we now? *Chinese Medical Journal* 2006; 119(11):883-886.
- 29.** Engelhard K, Werner C, Reeker W, Lu H, Möllenberg, Mielke L, Kochs E. Desflurane and isoflurane improve neurological outcome after incomplete global ischemia in rats. *British Journal of Anaesthesia* 1999,83: 415-421.
- 30.** Hoffmann WE, Thomas C, Albrecht RF. The effect of halotane and isoflurane on neurological outcome following incomplete cerebral ischemia in the rat. *Anesth. Analg.* 1993;76(2):279-83.
- 31.** Krimbo JR, Kelly PJ, Drummond JC, Cole DJ, Patel PM. Isoflurane and pentobarbital reduces AMPA toxicity in vivo in the rat cerebral cortex. *Anesthesiology* 2000;92:806 -812.
- 32.** Daqing Ma, Hossain M, Rajakumaraswamy N, Franks NP, Maze M. Combination of xenon and isoflurane produces a synergistic protective effect against oxygen-glucose deprivation injury in a neuronal-glial co-culture model. *Anesthesiology* 2003;99:748-51.
- 33.** Westermaier T, Zausinger S, Baethmann A, Steiger HJ, Schmid-Elsaesser R, No additional neuroprotection provided by barbiturat-induced burst suppression under mild hypothermic conditions in rats subjected to reversible focal ischemia. *Journal of Neurosurgery* 2000;93:835-844.
- 34.** Ward JD, Becker DP, Miller JD, Choi SC, Marmarou A, Wood C, Newlon PG, Kenan R. Failure of prophylactic barbiturate coma in the treatment of severe head injury. *Journal of Neurosurgery* 1985;62:383-388.
- 35.** Demiryürek AT, Cinel İ, Kahraman S, Tecder-Ünal M, Gögüş N, Aypar Ü, Kanzık İ. Propofol and intralipid interact with reactive oxygen species: a chemiluminescence study. *Br J Anaesth.* 1998;80:649-54.

36. Yamaguchi S, Midorikawa Y, Okuda Y, Kitajima T. Propofol prevents delayed neuronal death following transient forebrain ischemia in gerbils. *Canadian Journal of Anaesthesia* 1999;46:593-598.
37. Young Y, Menon DK, Tisavipat N, Matta BF, Jones JG. Propofol neuroprotection in a rat model of ischemia reperfusion injury. *Eur J Anaesthesiology* 1997;14:320-326.
38. Kristin E, Werner C, Eberspacher E, Pape M, Stegemen U, Kellermann K, Hollweck R, Hutzler P, Kochs E. Influence of propofol on neuronal damage and apoptotic factors after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Anesthesiology* 2004;101:912-7.
39. Oh WS. Effect of fentanyl on TNF-alpha and IL-1 levels during global ischemia/reperfusion in rats. *Int. J Tissue React* 2002;24(1):11-21.
40. Sanders R, Daqing Ma, Maze M. Anaesthesia induced neuroprotection. *Best Practice and Research Clinical Anaesthesiology* 2005;1:461-47.
41. Barry U, Zuo Z. Opioids: old drug for potential new applications. *Current Pharmaceutical Design* 2005;1:1343-1350.
42. Perat JN, Gross ER, Gross GJ. Opioid induced preconditioning: recent advances and future perspectives. *Vascular Pharmacology* 2000;42 (5-6):211-8.
43. Mayfield KP, D'Alecy LG. Delta-1 opioid agonist acutely increases hypoxic tolerance. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 1994;268:683-688.
44. Chiamulera C, Terron A., Reggiani A, Cristofori P. Qualitative and quantitative analysis of the progressive cerebral damage after middle cerebral artery occlusion in mice. *Brain Res.* 1993;606:251-258.
45. Goldlust, EJ, Paczynski RP, He YY, Hsu CY, Goldberg MP. Automated measurement of infarct size with scanned images of triphenylterazolium chloride-stained rat brains. *Stroke* 1996;27:1657-1662.

46. Benedek A, Moricz K, Juranyi Z, Gigler G, Levay G, Harsing LG,jr, Matyus P, Szenasi G, Albert M. Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phases of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. *Brain Research* 2006;1116:159-165.
47. Wong TM, Lee AY, Tai KK. Effects of drugs interacting with opioid receptors during normal perfusion or ischemia and reperfusion in the isolated rat heart: An attempt to identify cardiac opioid receptor subtype(s) involved in arrhythmogenesis. *J Mol Cell Cardiol.* 1990; 22:1167-75.
48. Ventura C, Spurgeon H, Lakatta EG, Guarnieri C, Capogrossi MC. Kappa and delta opioid receptor stimulation affects cardiac myocyte function and Ca release from an intracellular pool in myocytes and neurons. *Circ. Res.* 1992;70:66–81.

Ek-1

Ek-2