

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

**DESFLURAN'IN YENİDOĞAN RATLARDA
NÖROTOKSİSİTESİNİN,
ÖĞRENME VE BELLEK ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DR. DUYGUHAN İŞGÜVEN

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2010

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

**DESFLURAN'IN YENİDOĞAN RATLARDA
NÖROTOKSİSİTESİNİN,
ÖĞRENME VE BELLEK ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. DUYGUHAN İŞGÜVEN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Ali Necati GÖKMEN

<u>İÇİNDEKİLER:</u>	Sayfa No
TEŞEKKÜR	i
TABLO LİSTESİ	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iii
RESİM LİSTESİ	iv
GRAFİK LİSTESİ	v
KISALTMALAR	vi
ÖZET	1
SUMMARY	2
GİRİŞ	3
AMAÇ	5
GENEL BİLGİLER	6
Genel Anesteziklerin Santral Sinir Sisteminde Etki Mekanizmaları	6
Desfluran	8
Fiziksel Özellikleri	8
Farmakodinamik Özellikleri	9
Farmakokinetik Özellikleri	10
Apoptoz	10
Genel Anesteziklerin Neden Olduğu Nöroapoptoz	11
Öğrenme ve Belleğin Değerlendirilmesi	14
Ratların Bilişsel ve Lokomotor Yetilerinin Değerlendirilmesi	14
Morris Su Tankı	16
GEREÇ VE YÖNTEM	19
Çalışma Grupları	20
Volatil Anestezik Ajan Uygulaması	20
Histopatolojik Değerlendirme	21
Öğrenme ve Belleğin Değerlendirilmesi (Morris Su Tankı Testi)	23
İstatistiksel Yöntem	25

BULGULAR	26
Arter Kan Gazı Analizleri Sonuçları	26
Histopatolojik Bulgular	27
Morris Su Tankı Testi Sonuçları	34
TARTIŞMA	38
SONUÇ VE ÖNERİLER	44
KAYNAKLAR	45
EKLER	52
Ek 1: Etik Kurul İzin Belgesi	52

TEŞEKKÜR:

DEÜTF Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD'ndaki uzmanlık eğitimim süresince bilgi, deneyim ve önerilerinden faydalandığım ve faydalanacağım, gerçekçi ve araştırmacı eğitimimde emeği geçen, hekimliğin ve anesteziğin temel ilkelerini öğrendiğim değerli hocalarım Prof.Dr. Zahide ELAR, Prof.Dr. Emel SAĞIROĞLU, Prof.Dr. Ali GÜNERLİ, Prof.Dr. Atalay ARKAN, Prof.Dr. Erol GÖKEL ve Prof.Dr. Semih KÜÇÜKGÜÇLÜ'ye,

Tezimin her aşamasında, gündüz-gece demeden (sirkadiyen ritmini önemsemeden) büyük emek ve vakit harcayan, sadece Anesteziyoloji ile ilgili değil her konuda desteğini esirgemeyen, hatalarımı gösterip doğrularımı överek eğitimim için sabırla uğraşan, hepimizin ağabeyi ve danışman hocam Prof.Dr. Necati GÖKMEN'e ve hayatının büyük bir kısmını bizler için ayırmasını hoşgörü ile karşılayan değerli ailesine,

Eğitimim süresince birlikte çalıştığım, ailemden daha çok vakit geçirdiğim, hüznü ve sevinci paylaştığım tüm öğretim üyelerime, uzmanlarıma ve eğitimleri bittiği için bölümde olmayanlar da dahil olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma; dostlarım olan tüm anestezi teknikerlerine; merkezi ameliyathane, gündüz hastanesi, poliklinik, yoğun bakım ünitesi, ağrı servisi ve diğer cerrahi bölümlerde görev alan birlikte çalıştığım bütün dostlarıma,

Tezimde katkı ve yardımlarından dolayı Histoloji AD'ndan Doç.Dr. Alper BAĞRIYANIK ve Dr. Müge KIRAY'a; Fizyoloji AD'ndan Doç.Dr. Ataç SÖNMEZ, Dr. Emre KARSLI ve Öğr.Gör.Dr. İlkey AKSU'ya; Deneysel Hayvan Araştırmaları AD'ndan Prof.Dr. Osman YILMAZ'a,

Uzmanlık eğitimime başladığım ilk günlerden kendisinin eğitimi bitene kadar, özellikle çalışma disiplini konusunda bana çok emeği geçen, hiçbir zaman unutamayacağım güzel anılarımız olan, Sayın kıdemlim Dr. Remzi Özgür ÖZAY'a,

Tezimin deneysel aşamasında yardımları ve güzel dostluğuyla hep yanımda olduğu için Dr. Özgür ÖZEL'e ve uykusuz gecelerimizde evde onu bekleyen eşi Özlem ile biricik kızı Duru'ya,

Eğitim sürecimde arkadaşlıklarıyla bana destek veren ve İzmir'e alışmamı sağlayan, keyifli dostlarım Eşref KARACA ve değerli ailesine, İnci Hanım'a ve Sefa Bey'e,

Hayatımdaki birçok "ilk"te yanımda olan ve çoğunu sabırla öğreten; her türlü cefamı çeken; karakteri gibi kendisi de güçlü dostum, özellikle kafasına koyduğu işi yapması konusunda örnek almaya çalıştığım, öğütlerine önem verdiğim ve birçok konuda akıl danıştığım, birlikte vakit geçirmekten zevk aldığım (kavga etsek bile), eğer "başka bir işi yoksa" yanımda olmaya çalıştığını bildiğim ve o istediği sürece hayatımda olacak canım arkadaşım, dostum Dr. Hakan AYGÜN'e; ayrıca sevgi ve destekleriyle hep yanımda olan değerli annesi Nevin AYGÜN ve değerli babası Bedri AYGÜN'e,

Burada tanışıp sonra arkadaşan-kardeşten de öte tarifi mümkün olmayan bir şekilde bağlandığımız, o kadar ki hocalarımız tarafından bile karıştırıldığımız ve birbirimizin ismiyle çağrıldığımız; tezimde olduğu kadar hayatımda da büyük yardımları olan; içtiğim en güzel kahveleri yapan; desteği, sevgisi, ilgisi ve güçlü karakteriyle her konuda yanımda olan ve ne olursa olsun yanımda olacağım, dostum, kardeşim Dr. İçten Ezgi İNCE'ye ve değerli ailesine,

Bugüne kadar benden sevgisini, desteğini, sabrını esirgemeyen ve bugünden sonra da esirgemeyeceğinden emin olduğum, vazgeçilmezlerim, canlarım; babam, annem, ablam ve bir tanem kardeşime,

Yürekten sevgi ve saygılarımı sunar, çok teşekkür ederim.

Dr.Duyguhan İŞGÜVEN

TABLO LİSTESİ:**Sayfa No****Tablo-1.** Hayvan deneylerinde kullanılan davranış testleri

16

Tablo-2. Gruplardaki toplam rat sayıları

26

Tablo-3. Arter kan gazı analizi sonuçları

26

Tablo-4. Ratların platformu bulması için geçen toplam süre

34

Tablo-5. Ratların kadrarlarda geçirdikleri sürenin yüzde değerleri

35

ŞEKİL LİSTESİ:**Sayfa No**

Şekil-1.	İnsan ve rat beyninin midsagital kesitleri	6
Şekil-2.	Desfluranın kimyasal yapısı	8
Şekil-3.	Talamus ve serebral kortekste apoptotik yollara anestezinin etkisi	13
Şekil-4.	Morris Su Tankı	17
Şekil-5.	Ratların platformu bulma süreleri	35
Şekil-6.	Desfluran grubu ratların kadranlarda geçirdiği sürelerin yüzde değerleri	36
Şekil-7.	Kontrol grubu ratların kadranlarda geçirdiği sürelerin yüzde değerleri	36

RESİM LİSTESİ:**Sayfa No**

Resim-1. Postnatal 7. günde olan ratlar	19
Resim-2. Volatil ilaç uygulaması	21
Resim-3. Morris Su Tankı	24
Resim-4. Talamus paraventriküler nükleus düzeyinden alınan kesitler	28
Resim-5. Prefrontal korteks düzeyinden alınan kesitler	30
Resim-6. Hipokampus düzeyinden alınan kesitler	32
Resim-7. Desfluran uygulanan grupta prefrontal kortekste sitoplazmada apoptotik cisim	33

GRAFİK LİSTESİ:**Sayfa No**

- Grafik-1.** Talamus paraventriküler nükleus düzeyinden alınan kesitlerdeki kaspaz-3 pozitif hücre oranları 27
- Grafik-2.** Prefrontal korteks düzeyinden alınan kesitlerdeki kaspaz-3 pozitif hücre oranları 29
- Grafik-3.** Hipokampus düzeyinden alınan kesitlerdeki kaspaz-3 pozitif hücre oranları 31

KISALTMALAR:

MAK : Minimum Alveolar Konsantrasyon

SSS : Santral Sinir Sistemi

NMDA : N-Metil D-Aspartat

GABA : Gama Amino Bütirik Asit

N₂O : Azot Protoksit

Cl⁻ : Klor

H⁺ : Hidrojen

Ca⁺⁺ : Kalsiyum

TUNEL : Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated Dntp Nick end Labeling Assay

DNA : Deoksiribonükleik Asit

İPSA : İnhibitör Postsinaptik Akım

CA1 : Cornu Ammonis 1

EEG : Elektroensefalografi

BIS : Bispektral İndeks

NGF : Nerve Growth Factor

BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor

NTF : Nörotrofik Faktör

Trk : Tropomiyozin Reseptör Kinaz

p75^{NTR} : p75 Nörotrofik Reseptörü

STK : Serin/Treonin Kinaz

HDD : Hayvan Davranış Deneyi

MST : Morris Su Tankı

ÖZET:

DESFLURAN'IN YENİDOĞAN RATLARDA NÖROTOKSİSİTESİ, ÖĞRENME VE BELLEK ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Duyguhan İŞGÜVEN, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, İZMİR

Amaç: Bu çalışmanın amacı desfluranın yenidoğan (7 günlük) ratlarda nörotoksitesisi, öğrenme ve bellek üzerine olası etkisini araştırmaktır.

Yöntem: 33 yenidoğan rat çalışmaya alındı ve 4 gruba randomize edildi. Grup-1 (n:7) ve Grup-3 (n:11): 450 mL cam kavanozlar içinde 6 saat süresince (07:00-13:00 saatleri arasında) minimum alveoler konsantrasyonu (MAK) bir olacak şekilde desfluran (%6,8) verildi. Grup-2 (n:6) ve Grup-4 (n:9): 6 saat süresince (07:00-13:00 saatleri arasında) 6 L.dk⁻¹ oksijen verildi. Desfluran anestezisinin sona ermesinden iki saat sonra apoptotik nörodejenerasyonu saptamak için Grup-1 ve Grup-2'deki ratlar sakrifiye edildi, beyin dokuları çıkarıldı ve %10'luk formole konuldu. Alınan kesitler rata özel antikaspaz-3 antikor boyası ile boyanarak apoptotik hücre sayısı sayıldı. Grup-3 ve Grup-4'deki ratlar, standart koşullarda bakılmak üzere annelerinin yanına alındı ve 4. hafta sonunda Morris Su Tankı testi ile öğrenme ve bellek testleri uygulandı.

Bulgular: Histopatolojik bulgular değerlendirildiğinde %6,8 konsantrasyonda desfluran uygulanan ratlarda (Grup-1); talamus paraventriküler nükleus, korteks ve hipokampus CA1 bölgelerinde nöroapoptoz bulguları saptandı ($p<0,05$). Öğrenme ve bellek deneyleri sonuçları değerlendirildiğinde ilk dört gün uygulanan öğrenme testlerinde Grup-3 ve Grup-4 arasında platformu bulma süreleri benzer bulundu ($p>0,05$). Beşinci gün uygulanan *probe trial*'de hedef, komşu sağ ve komşu sol kadranda kalış süresi iki grup arasında benzer bulundu ancak desfluran uygulanan grubun karşı kadranda daha uzun zaman geçirdiği saptandı ($p=0,036$).

Sonuç: Yenidoğan ratlara %6,8 konsantrasyonda uygulanan desfluranın nörotoksik olduğu ancak öğrenme ve bellek fonksiyonlarını etkilemediği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Desfluran, rat, nörotoksisite, öğrenme ve bellek.

SUMMARY:

THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF DESFLURANE ON NEUROTOXICITY, LEARNING AND MEMORY IN NEWBORN RATS

Duyguhan Isguven, Dokuz Eylul University, Faculty of Medicine,
Department of Anesthesiology and Reanimation, IZMIR

Aim: The aim of this study is to investigate the effects of desflurane on neurotoxicity, learning and memory in newborn (7 days old) rats.

Material and Methods: 33 newborn rats (7 days old) were included and randomized into 4 groups in the study. Group-1 (n:7) and Group-3 (n:11): Desflurane was administered at one minimum alveolar concentration (MAC) for 6 hours (between 7 am and 1 pm) in 450 mL glass jars. Group-2 (n:6) and Group-4 (n:9): 6 L.min⁻¹ of oxygen was administered for 6 hours (between 7 am and 1 pm). The rats in Group-1 and Group-2 were sacrificed two hours after desflurane anesthesia's ending to determine apoptotic neurodegeneration, brain tissues were removed and put into 10 % formol. Excised sections were stained with rat specific anticaspase-3 antibody dye and apoptotic cells were counted. The rats in Group-3 and Group-4 were put near their mothers to be looked after in standardized conditions and learning and memory tests were carried out using Morris Water Maze test at the end of the 4th week.

Results: In the evaluation of histopathological findings, neuroapoptosis evidences were determined in thalamus paraventricular nucleus, cortex and hippocampus CA1 zones in the rats that were administered 6,8 % concentration of desflurane (Group-1) ($p < 0,05$). In the evaluation of results of the learning and memory tests, platform locating times were found similar among two groups (Group-3 and Group-4) in learning tests performed on the first four day ($p > 0,05$). In probe trial performed at the fifth day; target, left and right adjacent quadrant staying times were found similar among two groups, however, it is determined that desflurane administered group stayed for a longer time at the opposite quadrant ($p = 0,036$).

Conclusion: It has been ascertained that the 6,8 % concentration of desflurane is neurotoxic to the newborn rats, but does not affect learning and memory functions.

Keywords: Desflurane, rat, neurotoxicity, learning and memory

GİRİŞ:

Günümüzde prematüre bebeklere ve çok küçük çocuklara değişik nedenlerle yapılan operasyonlarda genel anestezi uygulaması sıklıkla kullanılmaktadır. Genç/yavru hayvan modelleriyle yapılan deneysel çalışmalarda sedasyon ve anestezide kullanılan bazı ilaçların santral sinir sistemi (SSS) histopatolojik değişiklikleri oluşturduğu ayrıca öğrenme bellek fonksiyonlarını olumsuz etkilediği bildirilmiştir.^{1,2} Pediatrik anestezide kullanılan anestetik ajanların gelişmekte olan santral sinir sistemine etkileri halen en sık araştırılan konular arasında önceliğini korumaktadır.¹

Gelişmekte olan beynin sinaptogenez sırasında N-metil D-aspartat (NMDA) glutamat reseptörü bloke edici veya gama amino bütirik asit (GABA_A) reseptörlerini potansiyalize edici ajanlara maruz kalması sonucu, yaygın apoptotik nörodejenerasyonun tetiklenebileceği gösterilmiştir.² Halen kullanılmakta olan anestetik ilaçlar, anestetik etkilerini NMDA reseptör blokajıyla [ketamin, azot protoksit (N₂O), ksenon, kloralhidrat] veya GABA_A reseptör potansiyalizasyonu (benzodiyazepinler, barbitüratlar, propofol, etomidat, izofluran, desfluran, sevofluran, enfluran ve halotan) gösterirler.

İlk kez Jevtovic-Todorovic ve ark.'nın¹ 7 günlük ratlarda 6 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda veya kombinasyonlarda N₂O, izofluran ve midazolam uyguladıkları çalışmalarında, tek başına N₂O veya midazolam uygulamalarının apoptotik nörodejenerasyona neden olmadığını, izofluranın ise tek başına (% 0.75, 1 veya 1.5) konsantrasyon bağımlı nörodejenerasyona neden olduğunu saptamışlardır. Aynı çalışmada, midazolamın toksik olmayan dozunu (9 mg.kg⁻¹) takiben izofluran minimal toksik konsantrasyonda (% 0.75) 6 saat uygulandığında, apoptotik nörodejenerasyonda tek başına izofluran uygulamasına göre belirgin artış yaptığını bildirmişlerdir. Ayrıca yeni doğan ratların öğrenme ve bellek fonksiyonlarında anlamlı azalma olduğunu da göstermişlerdir.

Günümüzde ise birçok araştırma grubunun yaptığı çalışmalarda subanestetik dozda kullanılan ketamin³, midazolam³, propofol⁴, izofluran^{5,6}, sevofluran⁷ ve kloral hidratın⁸ yavru kemirgen beyinlerinde nöroapoptozu tetiklediği bildirilmiştir. Stratmann ve ark.⁹ neonatal dönemde izofluran uygulanan ratlarda kalıcı nörokognitif bozukluk saptandığını bildirmişlerdir.

Desfluran ve izofluran eter molekülünden sentezlenmiştir. İzofluran molekülünün 2. karbonunda bulunan klor (Cl) iyonu yerine desfluran molekülünde hidrojen (H⁺) iyonu

bulunmaktadır. Bu nedenle desfluran ve izofluranın sistemlere olan etkileri birbirine benzemektedir.¹⁰

İnhalasyon ajanlarının neden olduğu hücre zedelenmesinin mekanizması açık olmamakla beraber kalsiyum disregülasyonu suçlanmaktadır. Sevofluran ve desfluranın, izoflurana oranla intrasellüler kalsiyumu çok daha az etkileyerek daha az apoptoz oluşumuna neden olduğu bildirilmektedir.¹¹ İnhalasyon ajanlarına kısa süre maruziyet, subletal strese önkoşullanma ile nöroproteksiyon sağlarken, uzamış maruziyetler direkt sitotoksik etki ile apoptozise bağlı hücre hasarını artırmaktadır.¹²

Literatürde desfluranın ve sevofluranın nöronları koruyucu özelliğinin olduğunu bildiren yayın vardır.¹³ Neonatal rat korteksi kaynaklı nöronal hücre kültürlerinin kullandığı in vitro yapılan çalışmada desfluran veya sevofluran uygulanması sonrası kültürlerle 30, 60 ve 90 dakika oksijen (O₂) ve glukoz yoksunluğu uygulanmıştır. Bu dönemde de desfluran ve sevofluran verilmeye devam edilmiştir. Uygulamadan 48 saat sonra *Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling assay* (TUNEL) ve Deoksiribonükleik asit (DNA) jel elektroforezi ile hücreler çalışılmıştır. 30, 60 ve 90 dakikalık yoksunluk dönemlerinde desfluran ve sevofluranın nöronal hücre ölümünü belirgin olarak (yaklaşık olarak %98) azalttığı bildirilmiştir.¹³

8 aylık ratlarla yapılan in vivo çalışmada, ratlar 30 gün boyunca her gün 09:00-13:00 arasında 30 dakika subanestezik dozda (1/10 MAK) inhalasyon ajanlarına (halotan % 0.1, sevofluran %0.3 ve desfluran % 0.6) maruz bırakılmış ve deney sonunda deneklere davranış, öğrenme ve bellek testleri uygulanmıştır. Sonuç olarak subanestezik konsantrasyonlarda halotan, sevofluran ve desflurana 30 günlük maruziyetin; merak ve arama davranışında azalma, anksiyetede artma, öğrenme ve bellek fonksiyonlarında bozulma ile ilişkili olduğu saptanmış, öğrenme ve bellekteki bozulma desfluran uygulanan ratlarda daha fazla bulunmuştur.¹⁴

AMAC:

Bu çalışmada, desfluranın yenidoğan (7 günlük) ratlarda nörotoksisitesi, öğrenme ve bellek üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

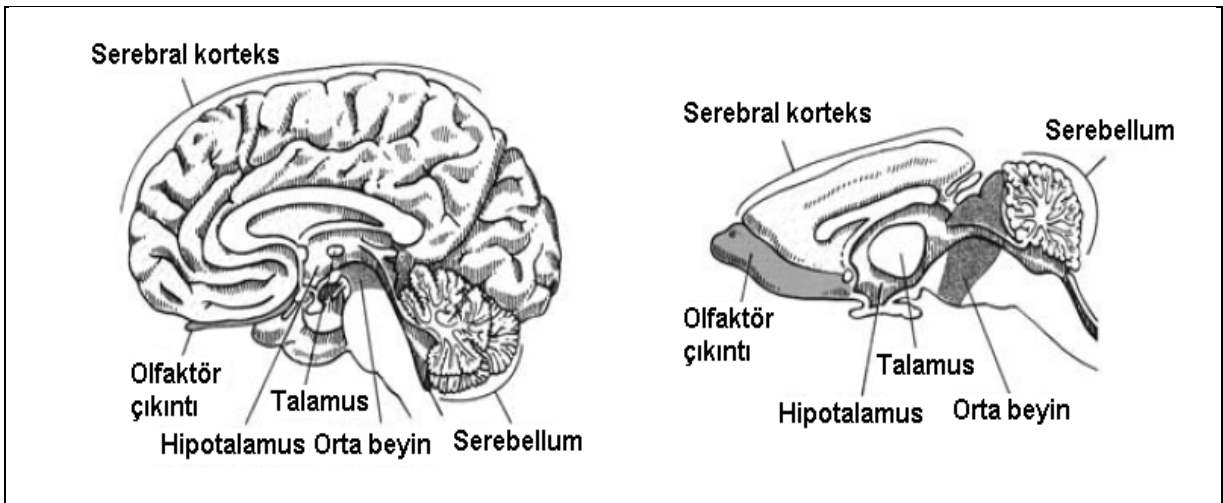
GENEL BİLGİLER:

Genel anestezi, geçici bilinç kaybı ve reflekslerde azalma ile karakterizedir. Bu durum, genel anestetik etkili ilaçların SSS'nde yaptığı, kortikal ve psişik merkezlerden başlayıp, bazal gangliyonlar, serebellum, medulla spinalis ve medüller merkezler sırasını izleyen inici bir depresyonun sonucudur.

Günümüzde prematüre bebeklere ve çok küçük çocuklara değişik nedenlerle yapılan operasyonlarda genel anestezi uygulaması sıklıkla kullanılmaktadır. Anestezi uygulamalarında kullanılan ajanların insanlar üzerindeki çoğu etkileri bilinmekle birlikte, bu ajanların neden olduğu farklı etkiler sürekli olarak araştırılmaktadır.¹ Pediatrik anesteziye kullanılan anestetik ajanların gelişmekte olan SSS'ne etkileri halen en sık araştırılan konular arasında önceliğini korumaktadır. Değişik nedenlerle anestezi almak zorunda kalan pediatrik yaş grubunda, inhalasyon ajanlarının çocuğun beyin gelişimi, öğrenme ve bellek fonksiyonları üzerine etkileri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Anestetik ajanların gelişmekte olan SSS üzerindeki etkilerini bilmek, pediatrik anestezi uygulamalarında büyük yarar sağlayacaktır.

Genel Anesteziklerin Santral Sinir Sisteminde Etki Mekanizmaları

Ratlarla yapılan çalışmalarda anestetik ajanların rat beyinde (Şekil-1) ve özellikle hipokampus bölgesinde yaptığı değişiklikler sık olarak araştırılmıştır.^{1,2,15,16,17} Bunun nedeni, hipokampus bölgesinin SSS'de anestetik ajanların sinaptik transmisyon üzerine etkilerinin en iyi gösterilebildiği bölge olmasıdır.



Şekil-1. İnsan (solda) ve rat (sağda) beyininin midsagittal kesitleri.¹⁷

Hipokampus afferent ve efferent yapılar, nörotransmitterler ve birçok katmandan meydana gelen (*gyrus dentatus*, hipokampus, *fimbria hippocampi*) limbik bir yapıdır. Ayrıca anestezi ajanlarının ana hedef bölgelerindedir.¹⁵

Hipokampüste, internöronlar içinde GABA ve onun sentezleyici enzimleri bulunur. Bu nöronlar eksitator sinaptik akımların ve piramidal hücre deşarjının inhibisyonunu sağlar.¹⁶ GABAerjik internöronlar tüm nöron popülasyonunun %10'unu oluşturur. GABAerjik internöronlar hipokampus ve diğerkortikal bölgelerdeki nöronal aktivitenin uyarılabilirliğinde ve senkronizasyonunda önemli rol oynamaktadır.^{16,18} Bununla birlikte global ve lokal beyin fonksiyonlarında rol oynayan inhibitör internöronlar üzerine anestezi ajanlarının hücresel ve moleküler düzeyde etkileşimleri henüz tam olarak bilinmemektedir.¹⁶

Kullanılan genel anesteziğin etkileri memeli SSS'de iki farklı mekanizma ile oluşmaktadır.^{1,15}

1. GABA_A reseptörleri yoluyla inhibisyonunda artış (benzodiyazepinler, barbitüratlar, propofol, etomidat, izofluran, enfluran, halotan ve desfluran)
2. NMDA reseptörlerinin uyarılabilirliğinde azalma (ketamin, N₂O, ksenon)

Volatil anestezi ajanları memeli SSS'nde nöronal aktiviteyi deprese eder ve GABA_A reseptör-iyon kanal kompleksinden Cl⁻ akımının inhibisyonunu artırırlar. Ayrıca konsantrasyona bağımlı şekilde, spontan olarak, neokortikal nöronların aksiyon potansiyel ateşlemelerini deprese ederler.¹⁹

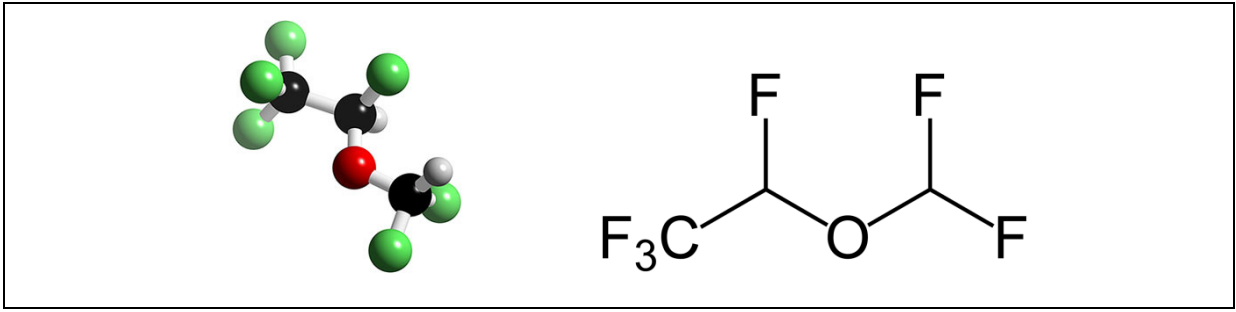
Volatil anesteziğin sinaptik GABA_A reseptörleri üzerinde;

1. *Decay Phase*'da uzama
2. İnhibitör postsinaptik akım'ların (İPSA) pik amplitüdünde azalma
3. Glutamat salınımını inhibe etme gibi özellikleri bulunmaktadır.¹⁶

Birçok çalışmada anesteziğin, nöron kültürlerinde GABA_A reseptörleriyle ilgili sinaptik akımları ve in vivo olarak *cornu ammonis* 1'deki (CA1) piramidal hücrelerde ve beyin kesitlerinde *Decay Phase*'ı uzattığı bulunmuştur.¹⁸ İnhibitör akımların bu şekilde uzaması sinaptik inhibisyonun kuvvetlenmesi ve SSS'nin anesteziğe bağılı depresyonunun artması ile sonuçlanır. Literatürde, genel anesteziğin hipokampüsteki etkilerinin, inhibitör nöronlar üzerinden olduğu gösterilmiştir.¹⁸

DESFLURAN

İzofluran ve diğer halojenli eter anestezikler gibi desfluran da ($\text{CHF}_2\text{-O-CF}_3$) eter türevi inhalasyon ajanlarındandır (Şekil-2). Hızlı ve tolere edilebilir anestezi induksiyonu ve anesteziden uyanma, anestezi derinliğinin hızlı ilerlemesi, uygun kas gevşetici özellik, toksisite oluşturuca doz ile farmakolojik etki oluşturan konsantrasyon arasındaki aralığın geniş olması, toksik etkilerin ve diğer yan etkilerinin olmaması nedeniyle klinik kullanımda giderek yaygınlaşmaya başlamıştır.²⁰



Şekil 2. Desfluranın kimyasal yapısı²⁰

Fiziksel Özellikleri

Kaynama noktası $23,5^\circ\text{C}$ olan desfluranın molekül ağırlığı 168.4, özgül ağırlığı ise 1.465'tir. Diğer inhalasyon ajanları ile karşılaştırıldığında yağ/gaz (18,7), kan/gaz (0,42) veya kan/beyin (1,3) partiyon katsayılarının da gösterdiği gibi düşük lipid solübilitesine sahiptir. Düşük lipid solübilitesi düşük anestezik potensini gösterir. Desfluran izoflurandan 5.2, halotandan ise 8.1 kez daha düşük potense sahiptir.²⁰

Desfluranın MAK'ı artan yaş ile birlikte azaldığı gibi, N_2O , fentanil, klonidin veya midazolam kullanımı ile birlikte azalır.^{20,21}

Desfluran kuru soda lime içinde izoflurana oranla 0°C 'de % 54 ve 40°C 'de ise % 23 oranında daha az yıkılmaktadır. Desfluran diğer inhalasyon anestezikleri ile karşılaştırıldığında, kauçuk ve plastikten yapılmış solunum devreleri içinde daha az çözölmektedir.²² Yüzde 15 oranında su içeren nemli sodalime içinde 60°C ve altında yıkılmaya dayanıklı iken, 80°C her saat % 0.45 oranında olmak üzere yavaş yavaş yıkılır. Bu bakımdan izofluran ve halotandan üstündür.²³

Desfluran ve izofluranın kimyasal olarak yıkımı sonucunda zararsız bir ürün olan *triflurometan* ortaya çıkar. Desfluran, izofluran ve enfluranın yıkımı kuru sodalime ve baralime içinde de meydana gelir. Bu durum karbonmonoksit oluşumu ile sonuçlanır. Bununla birlikte, karbonmonoksidin bu türlü oluşumu % 4,8 veya daha fazla su içeren

sodalime kullanımı ile veya % 9.7 veya daha fazla su içeren baralime kullanımı ile önlenebilir.²³

Farmakodinamik Özellikleri

Desfluran kardiovasküler, nöromuskuler, respiratuvar ve SSS'ni de içeren farklı vücut sistemlerini etkiler. Desfluran, izofluran ve diğerleri gibi doza bağımlı bir şekilde bu sistemleri deprese eder.²⁰

Beyin Üzerine Etkileri: İnhalasyon yolu ile kullanılan genel anesteziikleri, serebral metabolizma hızı, serebral kan akımı ve intrakraniyal basınç üzerine olan etkileri bakımından değerlendirmek gerekir.²⁴

Diğer inhalasyon anesteziikleri gibi desfluran da serebral damarları direkt olarak genişleterek normotansiyon ve normokarbide serebral kan akımını ve intrakraniyal basıncı artırır. Desfluran ile oluşturulan hipotansiyon sırasında metabolik gereksinimler için yeterli perfüzyon sağlanır. Elektroensefalografi (EEG) üzerindeki etkileri izofluran ile benzerdir. Desfluran kullanımı ile oluşan epileptik aktivite rapor edilmemiştir.²⁵

Smith ve arkadaşları²⁶ çocuklarda nöroanesteziide izofluran, propofol ve desfluranı karşılaştırmışlar, izoflurandan desflurana geçildiğinde serebral kan akımının (orta serebral arter kanlanmasını transkraniyal doppler ile ölçerek) değişmediğini fakat propofolden desflurana geçtiklerinde serebral kan akımının % 35 oranında arttığını görmüşler ve çocuklarda nöroanesteziide desfluranı potent bir vazodilatör olması nedeni ile önermemişlerdir.

Ting ve arkadaşları²⁷ skolyoz cerrahisi için yapılan *wake-up* testi sırasında 90'ın üzerindeki Bispektral indeks (BIS) değerlerini uyanıklık olarak kabul etmiş; desfluran grubundaki hastaların bu değerlerde tepki verdiğini ancak propofol-fentanil grubunda bu yüksek BIS değerlerine rağmen hastaların uyanıp tepki vermeleri için 3.3±1.2 dk kadar bir süre (latent period) geçmesi gerektiğini belirtmişler; *wake-up* testi sırasında hatırlamanın propofol-fentanil grubunda % 25 oranında olduğunu, desfluran grubunda ise hiçbir hastanın hatırlamadığını tespit etmişlerdir.

Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri: Desfluranın insanda kontrollü ventilasyon sırasında 0.83 ile 1.66 MAK arasındaki değerleri kardiyovasküler fonksiyon ve miyokardiyal kontraksiyon üzerinde doza bağlı depresyon oluşturur. Santral venöz basınçta ve kalp atım hızında doza bağlı artış; sistemik vasküler direnç, art yük, atım hacmi ve ortalama arteryel

basıncıta düşme gözlenir. Sol ventrikül atım hacminin azalmasına rağmen kalp debisi sabit tutulur.²⁸

Respiratuvar Sisteme Etkileri: Desfluran doza bağımlı olarak tidal volümde düşme ve buna bağımlı solunum frekansında artmaya neden olur. Desfluran ventilasyon hızındaki artmaya rağmen, dakika volümü ve alveoler ventilasyonu azaltır. Doza bağımlı diğer etkileri şunlardır;

- Arteriyel kandaki parsiyel karbondioksit basıncının (PaCO_2) artması,
- Karbondioksit (CO_2)'e olan ventilasyon cevabında azalma,
- İntrapulmoner şant oranının artması,
- Ölü boşluk hacminin tidal volüme olan oranının artması.²⁰

Farmakokinetik Özellikleri

Vücuda Alınım: Desfluranın kan ve diğer dokularda düşük oranda çözünbilme özelliği, hızlı eliminasyon ve *uptake* ile birlikte inspire edilen gaz ve doku parsiyel basınçlarının hızlı eşitlenmesine neden olur. Sonuçta farklı cerrahi uyarılarda anestezinin derinliği kolayca ayarlanabilir.²⁰

Eliminasyon: Desfluranın pulmoner klirensi (4.11 L.dk^{-1})'dir. Bu değer, halotan ve izofluran ile benzerdir. Desfluranın total vücut klirensi (4.6 L.dk^{-1}), izoflurandan (4.0 L.dk^{-1}) ve halotandan (3.94 L.dk^{-1}) daha büyüktür. Desfluranın ciltten kaybı total anestezik alınımının % 16'sıdır. Bu halotan için % 0.23, izofluran için % 0.2'dir. Total olarak desfluranın % 0.2–0.4'ü visseral plevra ve periton yoluyla kaybedilir.²⁰

Metabolizma: Desfluranın metabolizması ihmal edilebilir düzeydedir ve izofluranın % 10'u kadardır. Desfluran anestezisini takiben serum ve idrar inorganik florür düzeyleri genellikle değişmez.²⁰

Uygulama:

Desfluranın 20°C 'de 664 mmHg olan buharlaşma basıncı diğer inhalasyon ajanları ile kıyaslandığında, elektrik ile ısıtılan vaporizatörlerin özel olarak düzenlenmesini gerekli kılar (Ohmeda Tec 6TM vaporizatörler).²⁰

APOPTOZ

Apoptoz; programlı hücre ölümü, normal doku veya organ homeostazında enerji bağımlı bir işlem olarak ilk kez 1972 yılında tanımlanmıştır.²⁹ Hücre proliferasyonu ve hücre ölümü normal dokularda denge halindedir. Yetişkin dokularında bu denge hali doku hacminin devamlılığını sağlar. Hücre ölümü embriyoda organogenez sırasında ve yetişkinlerde hücre

devri ve diferansiyasyonu sırasında fizyolojik olarak gerçekleşirken, çeşitli hasarlanmalara yanıt şeklinde patolojik işlem olarak da gerçekleşir.³⁰

Apoptoz organize, enerji bağımlı bir olaydır ve membran fragmanları içinde hücrenin parçalanmasıyla karakterizedir. Beyin gelişiminde önemli bir rol oynar. Gelişen beyinde hücrelerin %50'si apoptoz sonucu ölür. İmmatür hücreler matür hücrelere göre apoptoze daha duyarlıdır.³¹

Apoptoz ve nekroz farklı morfolojik ve biyokimyasal kriterleri içerir. Apoptozda organize kromatin kondensasyonu ve plazma membran bütünlüğü varken, nekrozda sitolizis ve doku inflamasyonu vardır. Birçok çalışmada apoptozun periferik ve santral SS'nde önemli bir rol oynadığı ve fizyolojik, gelişimsel ve patolojik hücre ölümünü düzenlediği görülmüştür. Morfolojik olarak apoptoz nükleer kromatinin parçalanması, sitoplazma ve çekirdeğin kondensasyonu ve DNA fragmentasyonu; nekroz ise hücrenin şişmesi, endoplazmik retikulumun dilatasyonu, mitokondrinin bozulması ve plazma membranının rüptürü ile karakterizedir.³¹ Apoptoz sonrası, hücre yüzey membranı balonlaşır ve sferik apoptotik şekiller ortaya çıkar.³² Apoptozda en önemli değişiklik hücre nükleusunda gerçekleşir; organeller ve membran sağlamdır.³⁰

Santral sinir sistemi gelişimi sırasında sinaptogenez evresinin herhangi bir aşamasında meydana gelen patoloji, apoptotik kaskatta hayatla bağdaşmayan şiddetli migrasyonel defektlere neden olabilir. İnsanlarda beynin gelişim süreci gebeliğin 6. ayında başlar ve doğumdan sonra 3 yaşına kadar devam eder. Nöral gelişim evresinde meydana gelen geçici değişiklikler bile, gelişen milyonlarca beyin hücresinde, apoptotik dejenerasyonu tetikleyebilir.²

İmmatür memeli beyinde nöronal apoptoz, sinaptogenez periyodunda NMDA reseptörlerinin geçici blokajıyla veya GABA_A reseptörlerinin aşırı uyarımıyla tetiklenebilir.²

Genel Anesteziklerin Neden Olduğu Nöroapoptoz

Nörotrofinler, *nerve growth factor* (NGF), *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), nörotrofik faktör (NTF)-3 ve NTF4/5'i içeren bir büyüme faktörü ailesidir ve nöronal sağkalımı, diferansiyasyonu ve sinaptik plastisitenin bazı formlarını destekleyerek memeli beyinde sinaptogenezde önemli bir rol oynarlar.³³ Nörotrofinlerin farklı biyolojik fonksiyonlarını düzenleyen sinyal ileti sistemleri iki farklı plazma membran reseptörü üzerinden gerçekleşir: Tropomiyozin reseptör kinaz (Trk) reseptörleri ve p75 nörotrofik reseptörü (p75^{NTR}). Güncel veriler p75^{NTR} nin temel fizyolojik fonksiyonlarının Trk reseptör

aktivasyonunu ve sinyalizasyonu kontrol etmek ve ayrıca Trk-bağımsız sinyal transdüksiyon kaskadını aktive etmektedir.³⁴ Tropomiyozin reseptör kinaz bağımlı ve bağımsız kaskadlar nöronların major sağkalım yolağında temel faktör olan serin/treonin kinaz (STK)'ın aktivasyonunu (fosforilasyonunu) düzenler.³⁵

Nörotrofinler nöronlar tarafından sentezlenir ve salınırlar; biyosentezleri ve sekresyonları nöronal aktiviteye bağımlıdır.³⁴ Nöronal aktivitenin aşırı baskılanması nörotrofinlerce regüle edilen sağkalım sağlayan sinyalleri bozabilir.³⁶ İlginç olarak aktive olan nörotrofinle indüklenen hücre sinyal sistemine göre apoptoz engellenir veya tetiklenir.³³

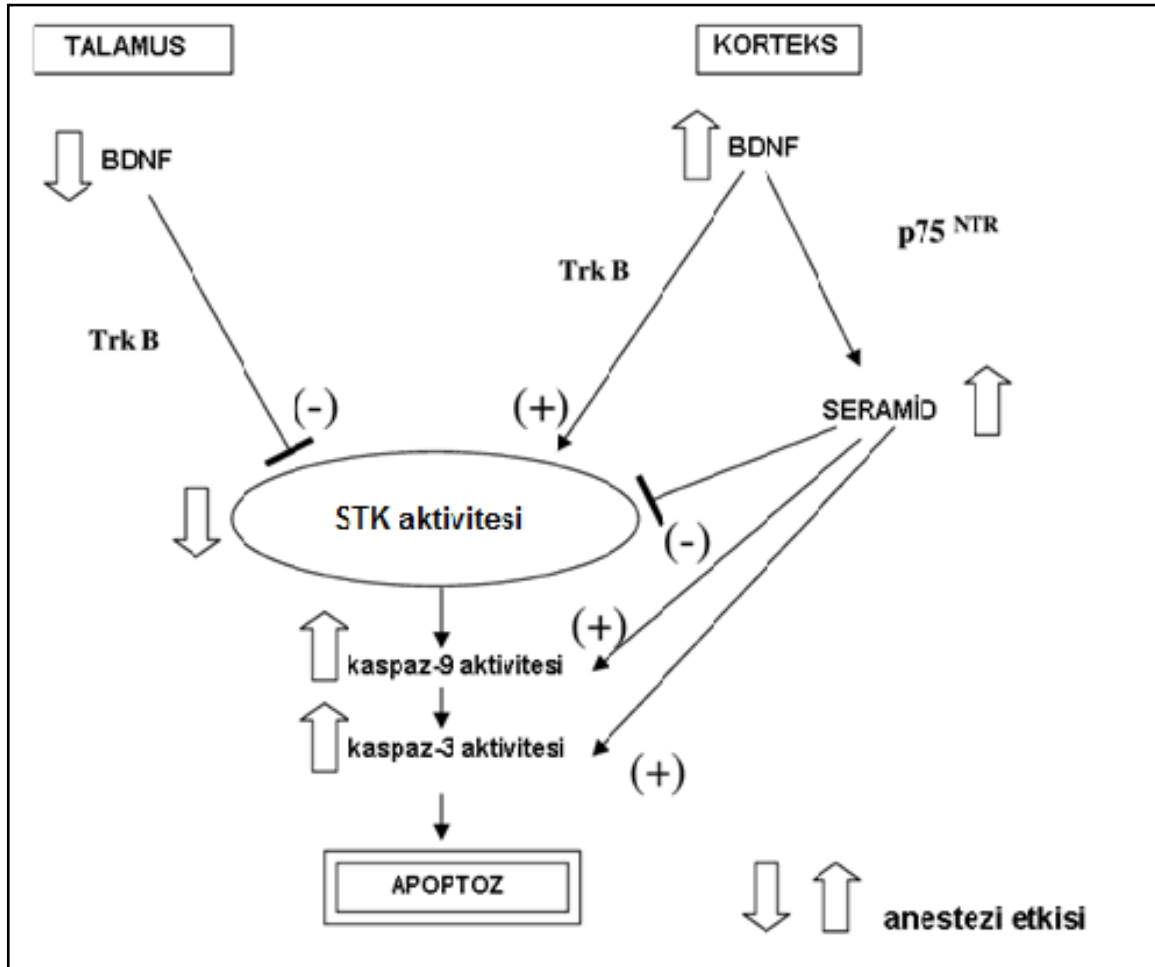
Nöronal depresyonu indükleyen farmakolojik ajanların önde gelen örneği olan genel anesteziyle ilgili güncel çalışmalarda GABAerjik anesteziyle barbitüratların, benzodiyazepinlerin, volatil anesteziyle (örn.izofluran) veya NMDA antagonisti ketaminin, kliniğe uygun dozlarının, immatür rat beyinde sinaptogenez sırasında, masif ve yaygın apoptotik nörodejenerasyonu tetikleyebileceği gösterilmiştir.^{1,6,37} Ciddi olarak etkilenmiş beyin bölgelerinin ultrastrüktürel analizinde gelişmekte olan nöronlardaki nükleer ve sitoplazmik değişiklikler “fizyolojik” hücre ölümünde tanımlananlarla benzerdir.³⁸ Ancak genel anesteziyle normal sinaptogenezi bozduğu ve çok sayıda nöronun ölümüne neden olduğu bulunmuştur.³⁸

Çalışmalar, anesteziyle indüklenen nöroapoptozun erken dönemdeki altta yatan mekanizmalarını açıklamaya çalışsa da güncel veriler iki temel apoptotik yolağın [intrinsek (mitokondriyal) ve ekstrinsek (ölüm reseptörü) yolaklar] önemli bir rol oynadığını ve mitokondri bağımlı yolağın anestezi maruziyetinin erken döneminde aktive olurken ölüm reseptörü bağımlı yolağın daha geç dönemde aktive olduğunu göstermiştir.^{37,39}

Sık kullanılan genel anesteziyle nörotrofinlerin fonksiyonlarını değiştirip değiştiremediği ve anesteziyle indüklenen gelişimsel nöroapoptozla nörotrofinlerin aracılık edip etmediği araştıran Lu ve ark.³⁸ genel anesteziyle, gelişmekte olan beyinde bolca bulunan iyi tanımlanmış bir nörotrofik faktör olan BDNF üzerindeki modülatör rolü üzerinde çalışmışlardır. Bu çalışmada, araştırmacılar immatür beyinde ciddi apoptotik nörodejenerasyon ve yaşamın kalanında belirgin uzun dönemli öğrenme/bellek bozukluğunu indüklediği gösterilen midazolam, izofluran ve N₂O' i içeren klinikle uyumlu anestezi kokteyli kullanmışlardır. Bu çalışmayla gelişmekte olan immatür rat beyindeki klinikte kullanılan anesteziyle indüklediği nöroapoptotik hasarın, en azından kısmen, BDNF aracılı apoptotik kaskad üzerinden düzenlendiğine dair kanıtlar ilk kez sunulmuştur. Bu veriler temel

alındığında anestezi iki mekanizma ile nörotrofin-aracılı apoptotik yolları aktive eder: hem Trk-bağımlı hem de Trk- bağımsız, p75^{NTR}-bağımlı apoptotik kaskadları aktive eder ve her bir yolağın önemi beyin belirli bölgelerine spesifiktir.³⁸(Şekil-3)

Kaspazlar (*caspase; cysteine-containing aspartate specific protease*) aktif merkezlerinde sistein içeren ve sitoplazmada inaktif halde bulunan enzimlerdir. Bilinen 14 adet kaspaz mevcuttur. Kaspaz 2, 8, 9, 10 başlatıcı ve 3, 6, 7 ise efektör kaspazlar olarak bilinmektedir.^{40,41} Sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesi ve prokaspaz 9'u uyarması ile apoptoz başlar.⁴⁰ Bu enzimler, özgün aspartik asit kalıntılarında sonra belirli proteinleri parçalar ve bu parçalanma sonucunda diğerleri de aktive olarak proteolitik bir süreci başlatır. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar.⁴⁰ Kaspazların baskılanması ile apoptozun önleneceği ve hipoksik iskemik beyin hasarının azaltılabileceği düşünülmektedir.



Şekil-3. Talamus ve serebral kortekste apoptotik yollara anestezinin etkisi.³⁸

Anestezi, talamusta aktive kaspaz-9 ve 3 ün aktivasyonu ile sonuçlanan BDNF protein ve STK aktivitesinde azalmaya (P75^{NTR} ve seramid düzeylerini etkilemeksizin) neden olur. Serebral kortekste ise olasılıkla TrkB sinyal yolağı aktivasyonuna, Trk-bağımsız P75^{NTR} bağımlı kaskadın aktivasyonu ile artmış seramid üretimine neden olur. TrkB sinyal yolağının ağır basması sonucu STK aktivitesi düşerken kaspaz-9 ve -3 aktiviteleri artar ve BDNF düzeylerinde artmaya neden olur.³⁸ (Şekil-3)

ÖĞRENME VE BELLEĞİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Davranışsal süreç ve mekanizmaların araştırılması, sadece hayvan ve insan beyninin nasıl çalıştığının anlaşılması için değil, aynı zamanda insandaki davranış bozukluklarına çözüm getirilmesi açısından da çok önemlidir. Karşılaştırmalı nörobiyolojik çalışmalar farklı memeli gruplarında beyin temel morfolojik ve işlevsel yapılarının çok benzer olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda davranış seviyesinde de yakın benzerlikler bulunmaktadır. Bu nedenle hayvan çalışmalarından elde edilen birçok bilgi insanlar için de geçerlidir.⁴²

Laboratuvar ortamında yapılan nörobiyolojik ve davranışsal çalışmalarda en yaygın kullanılan deney hayvanı rat ve maymundur. Dünyada çok az araştırma merkezinde maymunlar denek olarak kullanılmaktadır. Ratların üretim ve bakımı oldukça kolay ve ekonomik olduğu için günümüzde bilimsel araştırmalarda en çok kullanılan hayvandır.

Ratların Bilişsel ve Lokomotor Yetilerinin Değerlendirilmesi

Ratların bilişsel ve lokomotor yetilerinin değerlendirilmesinde bugüne dek tanımlanmış pek çok hayvan davranış deneyi (HDD) modeli mevcuttur. HDD'leri ile ratlarda anksiyete, otonom fonksiyonlar, öğrenme, hafıza ve lokomotor aktivite gibi pek çok özelliğin değerlendirilmesi yapılmaktadır. Bilimsel yeterlilik ölçütlerinin tümüne aynı anda sahip olan bir HDD modeli yoktur ve bu modellerin çoğu %100 kesinlikte sonuç sağlayamamaktadır. Ancak bilimsel teknolojiye gelişmelerle birlikte HDD'leri giderek daha ideal ölçütlerde yapılabilmektedir.

Davranış deneylerinin ratların çevresel (nöromotor) gelişimin tamamlandığı 80-85. günlerden sonra yapılması önerilmektedir.⁴³ Ancak ratların doğumu takiben kaç haftalık olduğu belirtilen ya da belirtilmeyen pek çok çalışmada, deneylerin ortalama 180-400 gr ağırlığındaki erişkin erkek ratlarla yapıldığı bildirilmiştir.⁴⁴⁻⁴⁶ Bu deneylerde ratların cinsiyetlerine göre farklı davranışlar sergilediği tespit edilmiştir. Özellikle uzaysal (spasyal) öğrenmenin değerlendirilmesinde erkek cinsiyetin daha uygun olduğu saptanmıştır. Bu

durumun hormonal farklılık ve hipokampus gelişimdeki farktan kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Son yıllarda yapılan pek çok çalışmada bu nedenle erkek rat kullanılmıştır.^{44,45}

Tüm HDD'lerin $23 \pm 1^\circ\text{C}$ oda sıcaklığında, 12 saatlik gece-gündüz ritminin sağlandığı bir odada ses, ışık, sıcaklık ve bekleme koşullarının standardize edildiği ortamlarda yapılması önerilmektedir. Bu standardizasyonun sağlanabilmesi için tüm hayvan gruplarının deney alanına deney gününden birkaç gün önce getirilmesi, deneylere başlanmadan önce tek tek bekleme kaplarına konmasının gerekliliği belirtilmektedir. Deney hayvanlarının tümünün daha önce doğum yapmış, bir gebelikte birbirine yakın sayıda yavru doğuran annelerin yavrularından seçilmesi, doğumdan sonra aynı günde süttten kesilerek anneden ayrılması, anneden ayrılan ratların her kafeste eşit sayıda olacak şekilde barındırılması, standart yem ile beslenmesi gibi temel koşulların sağlanması önerilmektedir. Burada amaç ratların davranış deneylerinin yapılacağı tarihte birbirine yakın ağırlıkta olmalarının, nöromotor gelişiminin eşit düzeyde olmasının sağlanmasıdır. Ayrıca daha önce yavru doğurmuş, yavrularına zarar vermediği bilinen annelerin yavrularının seçilmesi ile deneye alınacak ratların anne tarafından reddedilme ya da yenmesini önleme amaçlanmaktadır. Ratların her zaman aynı araştırmacı tarafından, aynı yöntemle düzeneklere konması, araştırmacının odada her zaman aynı yerde durması, aynı renk kıyafet giymesi ve hatta parfümünü bile deneyler süresince değiştirmemesi önerilmektedir.⁴⁷

Yayınlar değerlendirildiğinde ratlarda bilişsel ve motor yetilerin değerlendirilmesi amacıyla kullanılan pek çok farklı deney düzeneği olduğu görülmektedir (Tablo-1).⁴³⁻⁴⁷

Anksiyete, korku, tekrarlayan uygulamalarla öğrenme ve kısa hafıza değerlendirilmesinin artı labirent deneyi ile doğumdan sonraki altıncı haftada ve iki-üç gün süreyle yapılması önerilmektedir.⁴⁸ Ratların duygusal durumunu, sedasyonunu, lokomotor aktivitesini ölçmede açık alanın kullanılması ve çalışmanın doğumu takiben 10. haftada yapılması önerilmektedir. Prof. Dr. Richard Morris tarafından tanımlandığından bu yana kemirgenlerin öğrenme ve hafıza çalışmalarında sıkça kullanılan Morris Su Tankı (MST) düzeneği ile doğumdan sonraki 12. haftada beş gün süreyle uzak hafızanın (*reference memory*), 14. haftada ise dört gün süreyle yakın hafızanın (*working memory*) değerlendirmesi önerilmektedir.^{43,44}

Tablo-1. Hayvan Deneylelerinde Kullanılan Davranış Testleri

1. Pasif Kaçınma Testi
2. Aktif kaçınma ve kaçma testleri
3. Mekansal bellek testleri
 - a. Labirentler
 - i.T-Labirenti ve Y-Labirenti
 - ii.Yükseltilmiş radyal labirent
 - iii.Barnes Labirenti
 - iv.Morris Su Tankı
 - v.Dönen Arena
 - vi.Olay (Event) Arena
4. Örneğe gecikmeli eşleştirme/eşleştirmeme testi

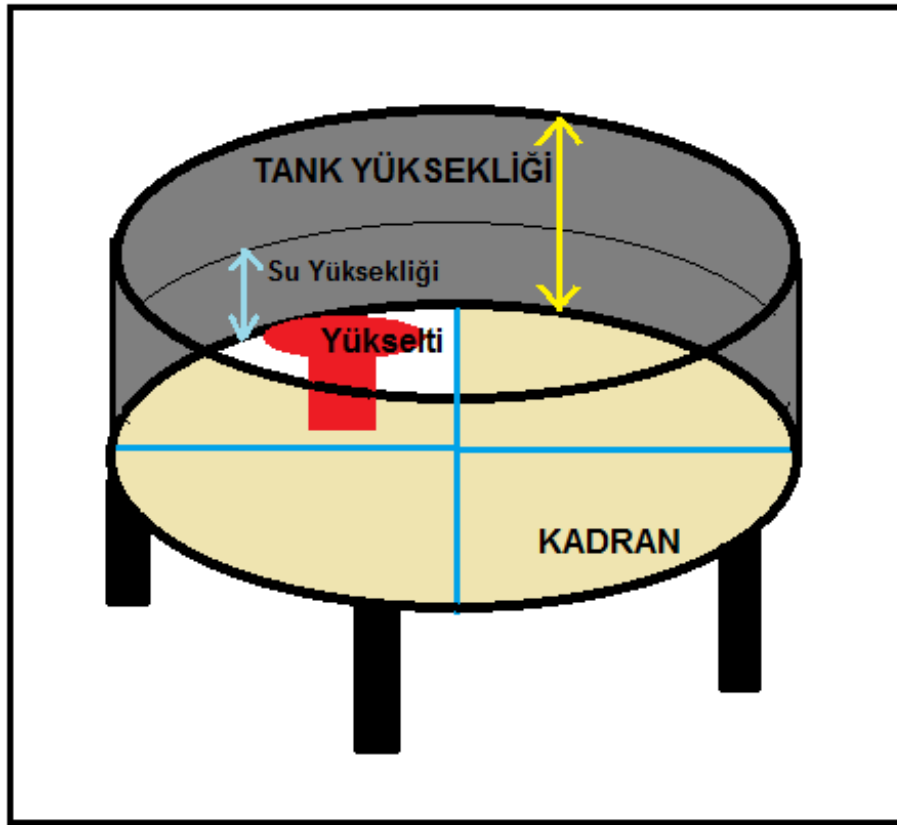
Morris Su Tankı

Rat ve fare gibi küçük kemirgenlerde hipokampusu bağı mekansal öğrenme bellek araştırmaları için bugünlerde çok yaygın olarak kullanılan su tankı, 1982 yılında Morris ve arkadaşları tarafından tasarlanmıştır.⁴⁹ MST deneyleri ile uzak hafıza, yakın hafıza ve öğrenme değerlendirilebilir.^{43,44,46}

Morris su tankı (Morris *water maze*) yaklaşık 60 cm (35-90 cm) yükseklikte ve 117 – 210 cm çapında dairesel bir tanktır (Şekil-4).⁴⁹

Bu tank 45 cm yüksekliğe kadar ılık matlaştırılmış su ile doldurulmuştur. MST deneyi sırasında oda sıcaklığının $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ve su sıcaklığının ise 21°C ile 26°C aralığında olabileceği pek çok yayında bildirilmiştir.^{46,47} Rat veya farenin havuzda takip edilmesi genellikle otomatik olarak bilgisayar destekli video kamera ile yapılır. Tank sanal olarak dörde bölünür ve bölünen 4 parçadan birinin ortasına, su seviyesinin 2 cm altında 10 cm X 10 cm boyutunda şeffaf pleksiglastan yapılmış gizli bir platform yerleştirilir. Tank, değişik ve sabit görsel işaretlerle donatılmış geniş bir odada bulunmaktadır. Deneyleri yapan kişinin bu sabit çevrenin bir parçası olduğu varsayıldığı için deneyler sırasında hep aynı pozisyonu alması beklenir. Bazı araştırmacılar deneylerin birinci gününde dış uyaranları izole etmek için su tanklarını perde ile çevirirler ve hayvanları suya alıştırmak ve platforma çıkmayı öğretmek amacıyla, platforma yakın bir mesafede onları suya bırakıp gerekirse platforma doğru yavaşça

yöneltirler. Gittikçe bu mesafe uzatılmalıdır. Bunu takip eden esas eğitim sırasında platformun yeri alıştırma eğitimindeki platform yerinden farklıdır. Esas eğitim günde 4 deneme ile 4 – 6 gün sürer. Günlük 4 denemede ratlar yüzleri havuzun duvarına bakacak şekilde havuzun çevresinde rastgele seçilmiş 4 farklı ama tüm denekler için aynı noktalardan havuza bırakılır. Hayvan suya bırakıldıktan sonra platformu bulana kadar veya 60 sn suda kalır. Ratlar su tankına her atıldığında, yüzmelerine izin verilen süreler eşit tutulmakta olup, bu süre çeşitli araştırmalarda 30 ile 180 sn arasında değişmektedir.⁵⁰ Platforma çıktıktan sonra yükselti üzerinde bekletilme süreleri 10 – 15 sn olup, 3 saniye⁴⁸ ile 30 saniye^{50,51} arasında değişmektedir. Genellikle gruptaki tüm ratları 1. denemeden geçirildikten sonra 2. deneme başlatılır ve böylece deneme arası süreler biraz uzar. Seyrek eğitim yoğun eğitime nazaran daha başarılıdır. Ancak farklı çalışmalarda deneme arası süreler çok farklılık gösterebilmekte, bu süre saniyelerle dakikalar arasında değişebilmektedir.



Şekil-4: Morris Su Tankı.

Geçmişte bu testte hayvanların başarısı platforma ulaşma süresi ile değerlendirilmekte ve bu süre kronometre ile değerlendirilmekteydi. Ancak bu ölçüm hayvanın yüzme hızına bağlıdır. Bu da hayvanlar arasında değişebilmektedir. Günümüzde hayvanların performansı genellikle video kamera ve görüntü analizi yapan bilgisayar sistemi ile değerlendirilmektedir.

Kaydedilen değerler arasında, hayvanların yüzerken izledikleri yol, bırakıldığı noktadan platforma ulaşınca kadar geçen süre, bırakıldığı noktadan platforma yüzülünceye kadar mesafe, sanal 4 kadranda harcadığı süre ve yüzme hızı bulunmaktadır. 150 cm çapı olan standart bir su labirentinde eğitimin dördüncü gününde normal genç ratların platformu bulma süresi 15 sn'ye inmektedir.⁵²

Öğrenmenin derecesini ölçmek için eğitimin bitiminde kaldırılmış platform ile yapılan yer tercihi testi uygulanmaktadır (*probe trial*). Bu test genellikle öğrenme eğitiminden bir gün sonra yapılır ancak bu süre daha da uzun olabilir. Daha uzun süreden sonra yapılan yer tercihi testi, aynı zamanda bilgileri bellekte tutma testi olacaktır (*memory retention test*). Bu testte hayvanın 60 sn içinde daha önce platformun bulunduğu bölgede diğer bölgelere nazaran ne kadar yüzdüğü kaydedilmektedir. Platformun yerini iyi öğrenmiş bir rat veya fareden harcadığı zamanın/yolun en az %35'ini platform bölgesinde geçirmesi beklenmektedir.

Davranış deneylerinde veri kayıtları, bilgisayar programları aracılığıyla veya kronometre kullanarak ratların gözle takibi yoluyla yapılabilmektedir.⁴⁸

GEREÇ VE YÖNTEM:

Çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alındıktan sonra (EK-1), anestezi uygulaması Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, histopatolojik değerlendirme Histoloji Anabilim Dalı'nda, öğrenme ve bellek testleri Fizyoloji Laboratuvarı'nda yapıldı. Çalışmaya postnatal 7. günde olan (Resim-1), *Wistar* cinsi, ağırlıkları 9-11 gr arasında değişen, 33 adet yavru rat alındı. Annelerinin yavru ratları emzirdikleri göz önüne alınarak, kanibalizmi önlemek amacıyla, ratlara mümkün olduğu kadar dokunulmamaya çalışıldı ve eğer dokunulacaksa pamuk ile dokunuldu. Yavru ratlar doğumlarından itibaren standart laboratuvar koşullarında (12 saat gündüz - 12 saat gece olacak şekilde ışıklandırma, 20-22°C oda ısısı, % 50-60 nem) izlendi.



Resim-1. Postnatal 7. günde olan ratlar

ÇALIŞMA GRUPLARI

Ratlar rastgele seçilerek 4 gruba ayrıldı:

Nörotoksisite (apoptozis) Değerlendirilmesi:

- Grup-1: Desfluran nörotoksisite grubu (n:7)
- Grup-2: Kontrol nörotoksisite grubu (n:6)

Öğrenme ve Belleğin Değerlendirilmesi:

- Grup-3: Desfluran öğrenme ve bellek grubu (n:11)
- Grup-4: Kontrol öğrenme ve bellek grubu (n:9)

Desfluran gruplarındaki ratlara (Grup-1 ve Grup-3) 07:00-13:00 saatleri arasında 6 saat süresince %6,8 desfluran ile anestezi uygulandı. Kontrol grupları (Grup-2 ve Grup-4) aynı saatlerde 6 L.dk⁻¹ O₂ ile izlendi.

VOLATİL ANESTEZİK AJAN UYGULAMASI

Anestezi düzeneği ve başlangıcı ve idamesi: Her deney hayvanı için ayrı olmak üzere 450 mL hacimli gaz giriş ve çıkış sistemi bulunan cam kavanozlar kullanıldı. Cam kavanozlara vaporizatör (*Desflurane Tec 6 Vaporizer, Abbott Lab, Almanya*) ile 6 L.dk⁻¹ akım hızında O₂ içinde %6,8 konsantrasyonda desfluran (*Desflurane, Abbott Lab, İstanbul/Türkiye*) girişi sağlandı. Anestezi idamesinde inspire edilen oksijen ve uygulanan volatil ajanın konsantrasyon düzeyleri çıkış hattına bağlanan anestezi gaz monitörü (*Anesthesia Gas Monitoring 1304, Brüel & Kjaer Sound & Vibration Measurement A/S Nærum, Danimarka*) ile izlenerek sabit tutuldu. Tüm kavanozlar 37°C sabit sıcaklıkta su banyosuna yerleştirildi (Resim-2). Deney hayvanları 6 saat süre ile bu kavanozlarda gaz karışımı soludu.

Anestezi sonlandırılması: Volatil anestezi uygulaması 6 saatlik sürenin sonunda kesilerek 6 L.dk⁻¹ akım hızında O₂ verilerek deneklerin derlenmeleri sağlandı. Derlenmelerinin sonunda ratlar annelerinin yanına alındı.

Anestezi uygulamasının neden olabileceği solunumsal veya metabolik bozuklukları saptamak için anestezi uygulaması yapılan gruplardan (Grup-1 ve Grup-3) 6 saatin sonunda birer denek rastgele seçildi. Seçilen deneklere 6 L.dk⁻¹ O₂ içinde %6,8 desfluran uygulaması altında laparotomi yapıldı ve barsaklar karın boşluğunun dışına çıkarılarak abdominal aort görünür hale getirildi. Abdominal aort pulsasyonu görüldü ve 26 Gauge iğne ile 0.20 mL kan örneği alındı. Alınan arteriyel kan örnekleri ölçümler yapılan kadar buz içine konularak

saklandı. Deneklerin arteriyel kan örneklerinde pH, PaCO₂, PaO₂ ve glukoz düzeyleri *Stat Profil Phox Plus L* cihazı (*Nova Biyomedikal Corp., Waltham, ABD*) ile ölçüldü. Arteriyel kan örneği alınan denekler anestezi altında sakrifiye edildi.



Resim-2. Volatil ajan uygulaması

HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Anestezi uygulamasının sona ermesinden iki saat sonra histopatolojik çalışma uygulanacak ratlara (Grup-1 ve Grup-2), eter anestezisi altında torakotomi uygulandı. Sağ atrium kesisi yapıldıktan sonra sol ventriküle enjekte edilen izotonik NaCl ve %4 paraformaldehid ile perfüze edilerek fiksasyon uygulandı. Kraniyotomi ile çıkartılan beyin örneklerine doku takibi uygulandı.

Işık Mikroskopisi İçin Doku Takibi

Aşağıdaki sıra ile gerçekleştirildi;

1. Fiksasyon: 48 saat % 10 formalin
2. 24 saat akan suda yıkama
3. % 70 etil alkol 20 dk
4. % 80 etil alkol 20 dk
5. % 96 etil alkol 20 dk
6. Aseton I 20 dk
7. Aseton II 20 dk
8. Aseton III 20 dk
9. Aseton IV 20 dk
10. Ksilol I 30 dk
11. Ksilol II 30 dk
12. 60°C'lik etüvde erimiş parafin I 1 saat
13. Parafin II 1 saat
14. Parafin içinde bloklama

Etüvden çıkarılan dokular parafine gömülerek bloklandı. Mikrotom yardımıyla (*Leica RM''%*) her bloktan alınan 5 mm kalınlığında seri kesitler lizinli lamlara yerleştirildi. Her hayvandan *Paxinos* ve *Watson*'un rat beyin atlasına göre tanımlanmış 11, 12, 21-23 ve 25. seviyelere denk gelen kesitler alındı.

İndirekt İmmünohistokimya Yöntemi

Kesitler immunohistokimyasal yöntemle boyandı, Anti-Kaspaz-3 immunreaktivitesinin gösterilmesi amacıyla rat spesifik anti-kaspaz-3 (1:100; *Neomarkers, Fremont, Kanada*) antikoru kullanıldı.

Lizinli kesitler üç değişim ksilol ile deparafinizasyon işlemine tabi tutuldu. Ardından azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. Dokuya zarar vermeden kurulanıp dakopen (*Dako, Glostrup, Danimarka*) ile çevreleri sınırlandı. Sitrat *buffer* (15-M103, *Bio Optica*) ile 5 dk kaynatılan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük Hidrojen peroksit uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler 1 saat oda ısısında bloklama solüsyonu (*İnvitrogen, Histostain- Plus Broad Spectrum, 85-9043*) ile enkübe edildi ve ardından yıkama yapılmadan anti-kaspaz-3 antikoru ile bir gece +4°C'de enkübe edildi. Ertesi gün fosfatlı tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder antikor (*İnvitrogen- Plus Broad Spectrum 85-9043*) ile 30 dk enkübe edildi. Sekonder antikor, enzimle işaretli

(peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) (*Histostain- Plus Broad Spectrum 85-9043*) ile bağlandıktan sonra reaksiyonun görünür hale getirilmesi için 0.02% Diaminobenzidin (*DAB, 1718096, Roche*) kullanıldı. Zemin boyaması *Mayers* hematoksilen ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ksilol ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı.

Hazırlanan preparatlar *Olympus BX-51* model ışık mikroskobu ve video kameradan (*Olympus DP71*) oluşan görüntü analiz sistemi (*DP Controller Olympus Corp. 3.1.1.267*) aracılığıyla bilgisayar ekranında kaydedilerek değerlendirildi.

Talamus paraventricüler nükleus, hipokampus CA1 ve korteks düzeylerinde apoptoz oranını belirlemek için 20X objektif ile her kesitte on farklı alandaki hücre sayımları yapılarak kaspaz-3 pozitif apoptotik hücre sayıları tespit edildi. Apoptotik hücre oranı yüzde cinsinden hesaplandı.

ÖĞRENME VE BELLEĞİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Grup-3 ve Grup-4'deki ratlara öğrenme ve belleğin değerlendirilmesi amacıyla Morris Su Tankı testi uygulanana kadar 3 hafta süre ile Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda standart koşullarda bakıldı. Ratlar öğrenme testleri başlamadan 1 hafta önce adaptasyon için Fizyoloji Laboratuvarı'na taşındı ve 1 hafta süre ile standart koşullarda bakıldı.

Morris Su Tankı Testi

Öğrenme testleri çapı 120 cm, derinliği 80 cm olan, siyah renkli pleksiglas maddeden imal edilmiş su ile dolu yuvarlak bir havuzda (su tankı) yapıldı (Resim-3).

Tankın içine ratın çevresel ipuçlarından faydalanarak bulabileceği 10 cm çapında gizli bir platform konuldu. Platform kadranslardan birisinin ortasına, suyun 3-4 mm kadar altında olacak şekilde sabitlendi. Suyun sıcaklığı 23 ± 1 °C olacak şekilde ayarlandı. Platform lifli yapıda bir kumaş ile kaplanarak ratın bu bölgede düşme tehlikesi yaşamadan, kendini güvende hissetmesi sağlandı. Testin yapıldığı odanın duvarlarına hayvanın su içinden de görebileceği şekilde renkli geometrik şekiller ya da resimler asıldı (Resim-3).

Deneyin başından sonuna kadar odada hiçbir şeyin yeri (dolap, perde, ışık vs.) değiştirilmedi. Hatta deney hep aynı kişi tarafından yapıldı; kıyafet, parfüm vs. değişikliği yapılmadı. Ratın çevre ipuçlarını kullanarak çevre ve platform arasında ilişki kurması ve platformun yerini bulması sağlandı.

Morris su tankı kuzey, güney, doğu ve batı kutuplar olmak üzere 4 kısma ayrıldı. 10 dakika aralıklarla günde 4 kez, 4 gün süre ile öğrenme denemeleri yapıldı, 5. gün test fazına alındı. Ratlar her gün farklı bir kutuptan bırakıldı ve platformu bulma süreleri tespit edildi (*learning trial*). Su içine bırakılan rata platformu bulması için 2 dakika süre verildi. Bu süre içinde platformu bulamaması durumunda rat platforma yönlendirilerek, zarar vermeden platform üzerine alındı ve 30 sn süresince etrafı tanmasına izin verildi. Daha sonra platform üzerinden alınarak havlu kağıt ile kurutuldu.



Resim-3. Morris Su Tankı

Test fazında ise platform kaldırıldı ve 30 sn yüzme süresi verildi. Ratın daha önce platform bulunan kadranda (hedef kadranda) geçirdiği sürenin yüzde olarak oranı değerlendirildi (*probe trial*). Deneyler sırasında bütün aşamalar “*HVS image*” kayıt ve analiz sistemi kullanılarak yapılmıştır. Bu sistem bir *CCD* kamera ve ulaşan görüntülerin analizini yapan bir yazılımdan oluşmaktadır.

İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

İstatistiksel analiz *SPSS for Windows* istatistik programının 15.0 versiyonu kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma biçiminde verildi.

Nörotoksisite bulgularının istatistiksel analizinde *Mann-Whitney U testi* kullanıldı.

Öğrenme ve bellek deneylerinin istatistiksel analizinde;

- Grup varyanslarının eşitliği (homojenliği) için *Levene's testi* kullanıldı. $P > 0,05$ olduğu için dağılımın eşit (homojen) olduğu kabul edildi.
- Gruplar arası karşılaştırmalarda *T-testi* kullanıldı.
- Grup içi karşılaştırmada *Wilcoxon Signed Ranks testi* kullanıldı
- $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR:

Çalışmaya toplam 43 yavru rat alındı. Deneklerin 3'ü deney sırasında, 6'sı öğrenme ve bellek testlerini bekleme süresi içinde eks oldu. Grup-4'deki 1 rat öğrenme ve bellek deneylerinde yüzemediği için çalışmadan çıkarıldı. Sonuç olarak deney gruplarının dağılımı Tablo-2'de sunulmuştur.

Tablo-2. Gruplardaki toplam rat sayıları

		n
Grup-1	Desfluran nörotoksisite grubu	7 (biri kan gazı için)
Grup-2	Kontrol nörotoksisite grubu	6
Grup-3	Desfluran öğrenme ve bellek grubu	11 (biri kan gazı için)
Grup-4	Kontrol öğrenme ve bellek grubu	9

Desfluran gruplarından birer rat (toplam 2 rat) kan gazı analizi amacıyla kullanıldı.

ARTER KAN GAZLARI ANALİZİ SONUÇLARI

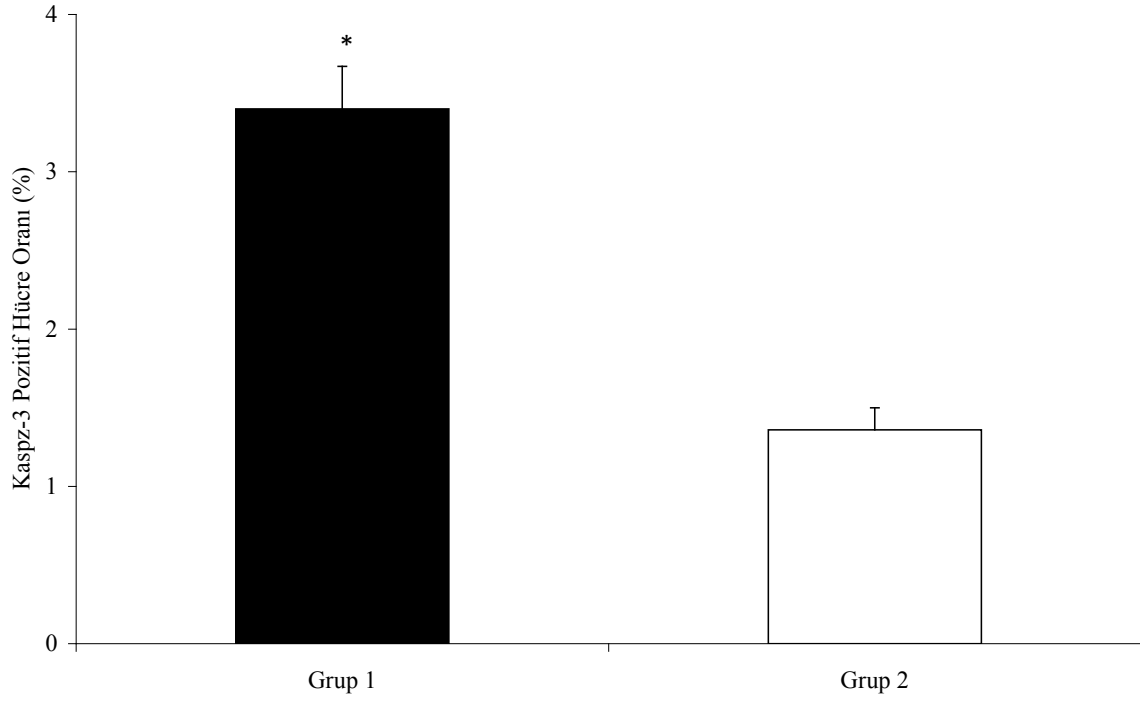
Grup-1 ve Grup-3 gruplarındaki iki rattan alınan arteriyel kan gazı analizlerinde, pH, PaCO₂, PaO₂ değerlerinde metabolik ve solunumsal bozukluk görülmedi; kan glukoz değerleri normal sınırlarda bulundu (Tablo-3).

Tablo-3. Arter kan gazları analizi sonuçları

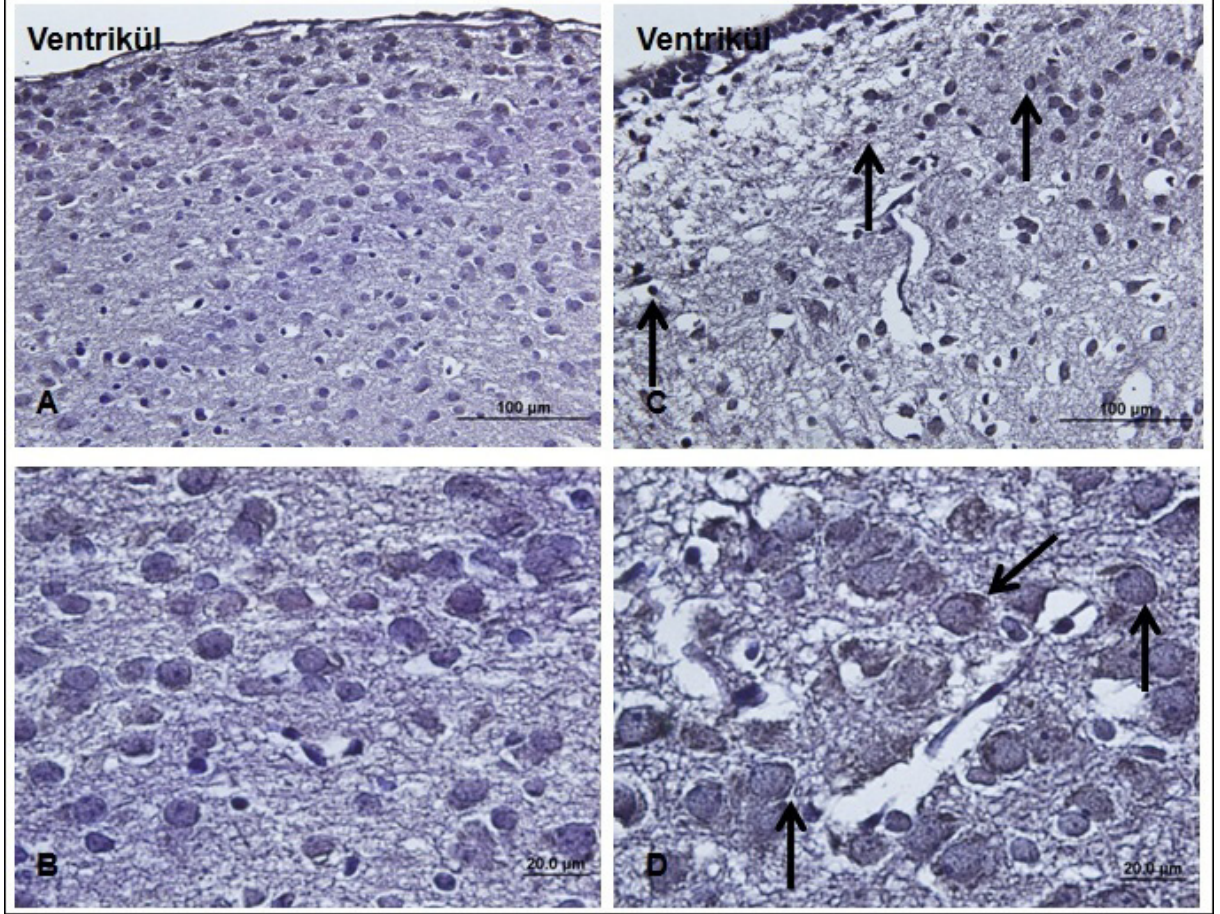
	pH	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)	Glukoz (mg.dL ⁻¹)
Grup-1 (n:1)	7.34	172,5	34,2	78
Grup-3 (n:1)	7.35	139,8	36,6	77

HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Talamus paraventricüler nükleus düzeyinden alınan kesitlerden elde edilen apoptotik hücre ortalama değerleri karşılaştırıldığında Grup-1'de apoptotik hücre ortalama değerleri anlamlı yüksek bulundu ($p=0.006$) (Grafik-1, Resim-4).

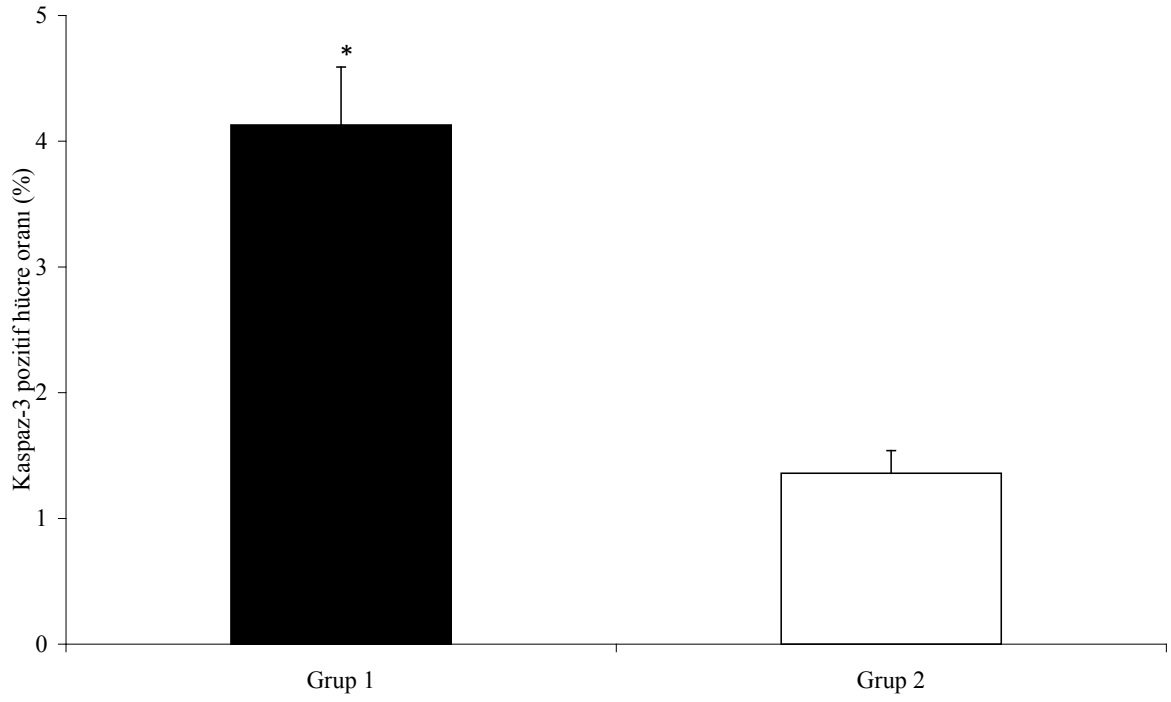


Grafik-1. Talamus paraventricüler nükleus düzeyinden alınan kesitlerdeki kaspaz-3 pozitif hücre oranları (* $p<0.05$)

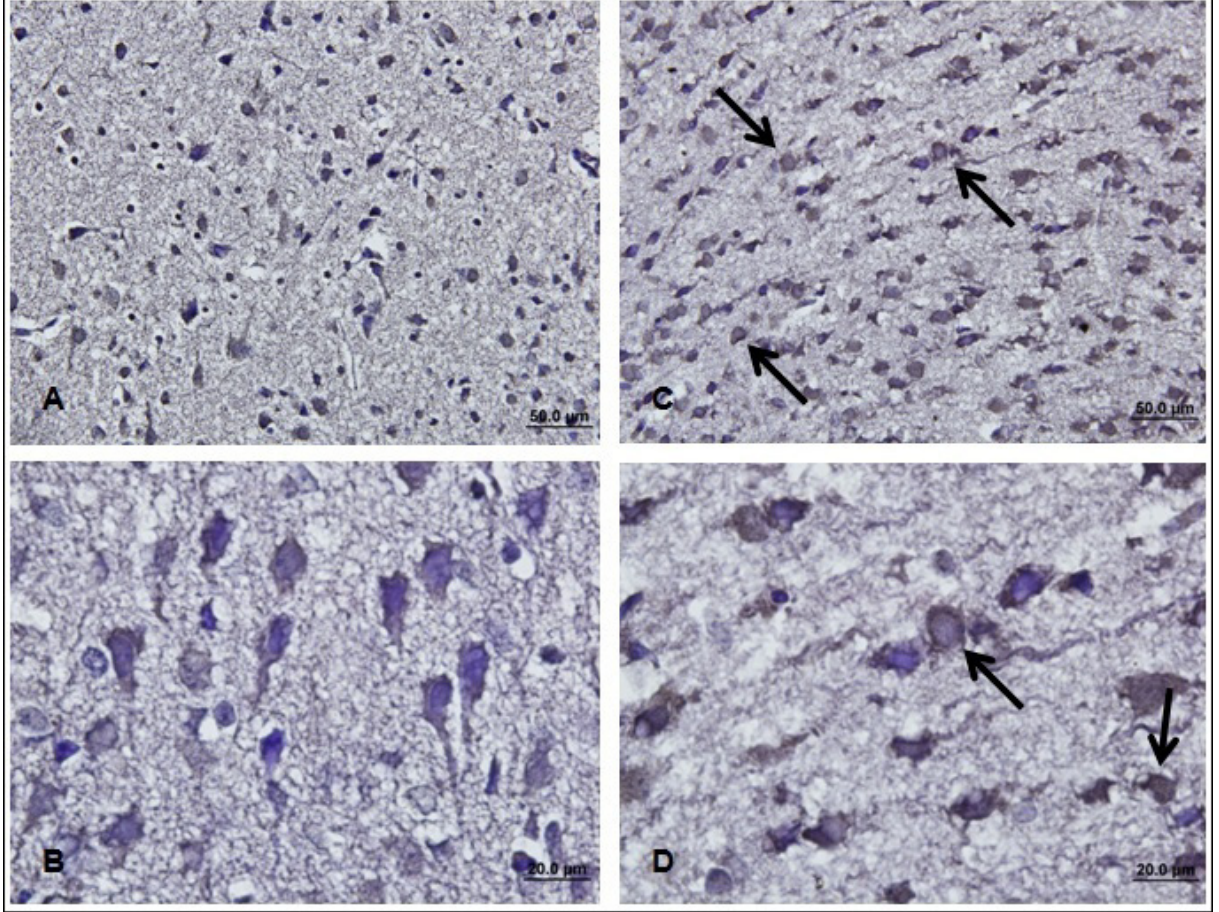


Resim-4. Talamus paraventriküler nükleus düzeyinden alınan kesitler. Grup-2 (kontrol grubu) normal hücreler A: x 40, B: x 100 objektif ile; Grup-1 (Desfluran grubu) apoptotik hücreler (Ok ile işaretli) C: x 40, D: x 100 objektif ile gösterilmektedir.

Prefrontal korteks düzeyinden alınan kesitlerden elde edilen apoptotik hücre ortalama değerleri karşılaştırıldığında Grup-1’de apoptotik hücre ortalama değerleri anlamlı yüksek bulundu ($p=0.006$) (Grafik-2, Resim-5).

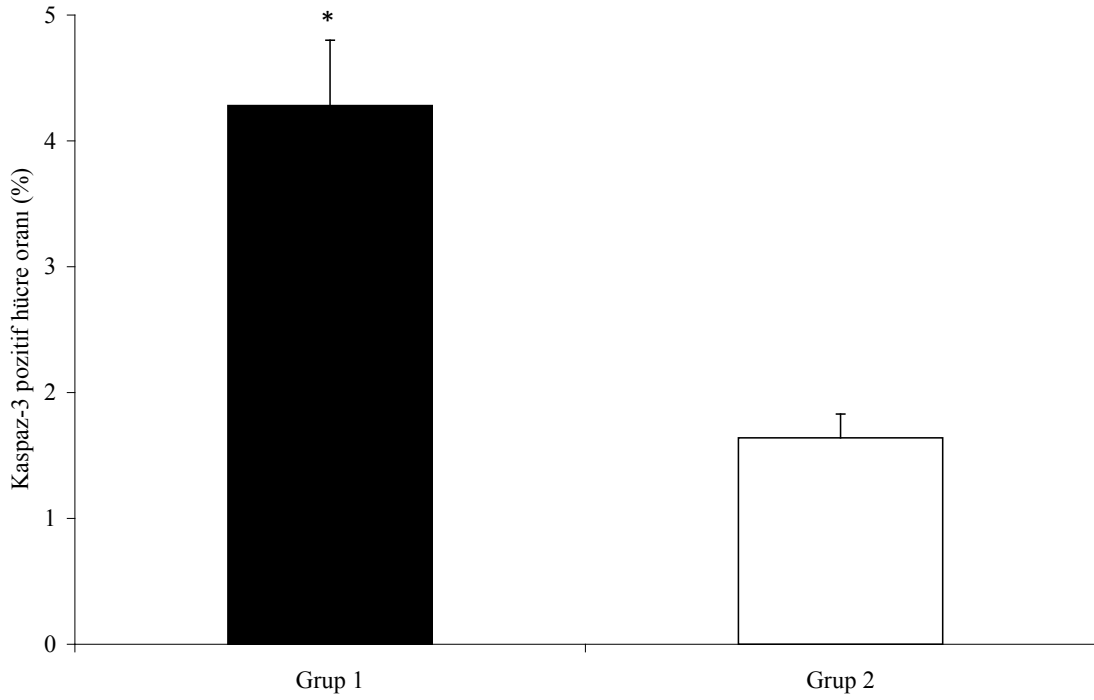


Grafik-2. Prefrontal korteks düzeyinden alınan kesitlerdeki kaspaz-3 pozitif hücre oranları (* $p<0.05$)

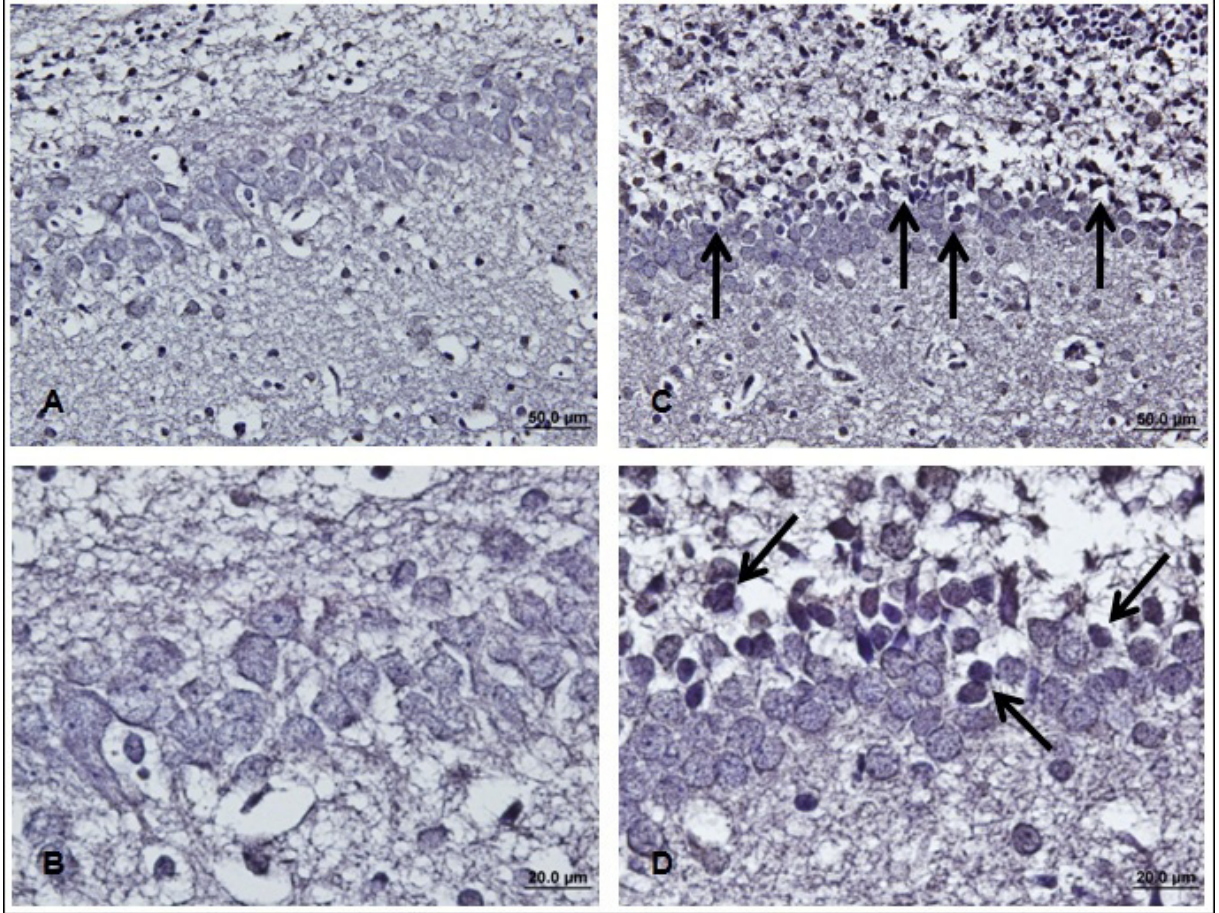


Resim-5. Prefrontal korteks düzeyinden alınan kesitler. Grup-2 (kontrol grubu) normal hücreler A: x 40, B: x 100 objektif ile; Grup-1 (Desfluran grubu) apoptotik hücreler (Ok ile işaretli) C: x 40, D: x 100 objektif ile gösterilmektedir.

Hipokampus CA1 düzeyinden alınan kesitlerden elde edilen apoptotik hücre ortalama değerleri karşılaştırıldığında Grup-1'de apoptotik hücre ortalama değerleri anlamlı yüksek bulundu ($p=0.006$) (Grafik-3, Resim-6,).

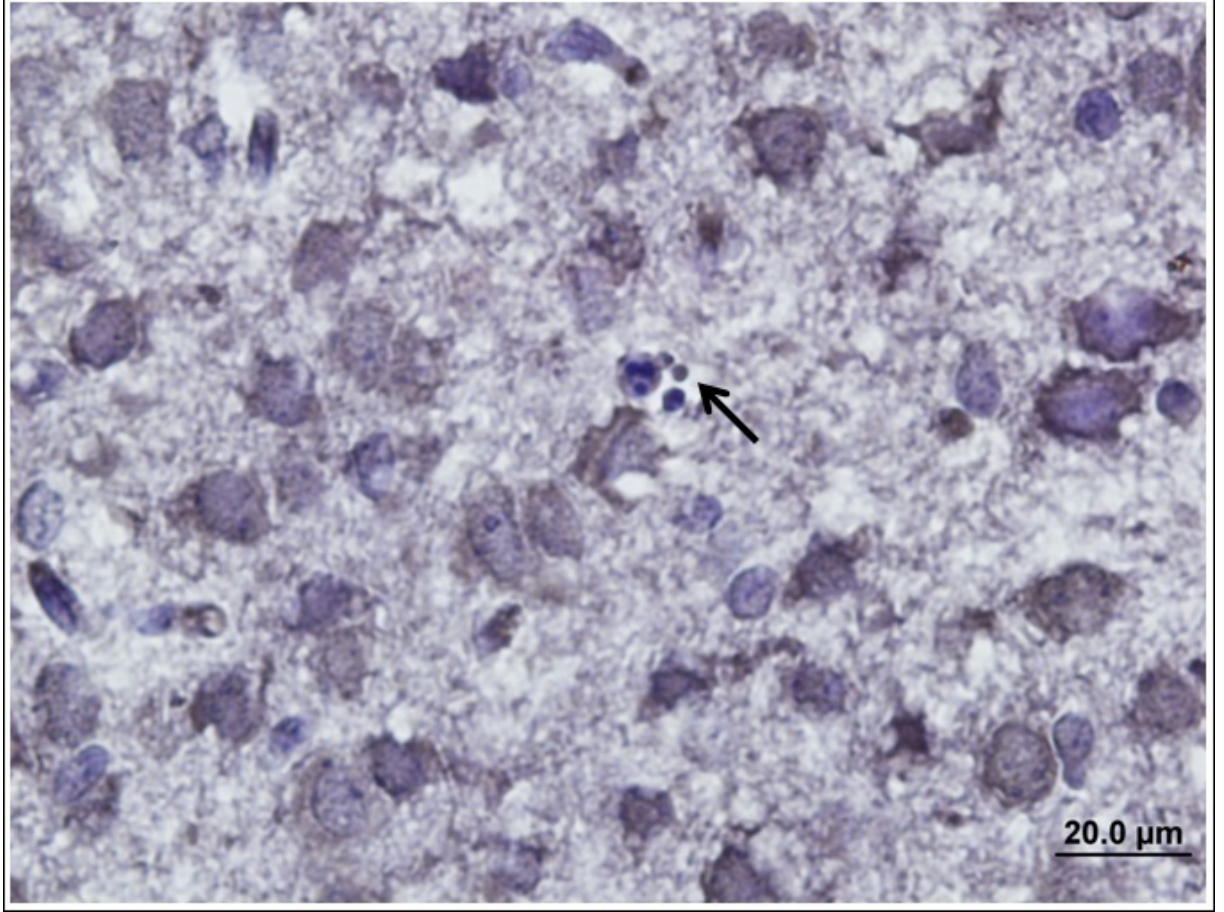


Grafik-3. Hipokampus düzeyinden alınan kesitlerdeki kaspaz-3 pozitif hücre oranları (* $p<0.05$)



Resim-6. Hipokampus düzeyinden alınan kesitler. Grup-2 (kontrol grubu) normal hücreler A: x 40, B: x 100 objektif ile; Grup-1 (Desfluran grubu) apoptotik hücreler (Ok ile işaretli) C: x 40, D: x 100 objektif ile gösterilmektedir.

Desfluran uygulanan grupta prefrontal korteksde hücre sitoplazmasında kaspaz-3 pozitif boyanan apoptotik cisim Resim-7’de okla gösterilmiştir.



Resim-7. Desfluran uygulanan grupta prefrontal kortekste sitoplazmada apoptotik cisim

MORRİS SU TANKI TESTİ SONUÇLARI

Morris su tankı testi uygulanan ratların platformu bulması için geçen toplam süre (*latency*) Tablo-4’de sunulmuştur.

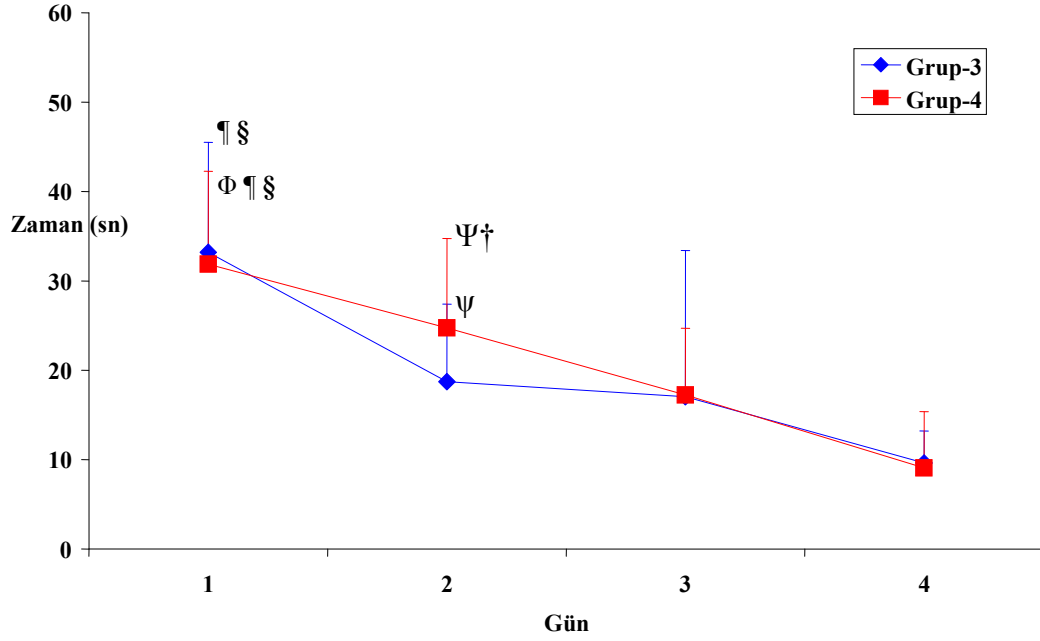
Tablo-4. Ratların platformu bulması için geçen toplam süre

	Platformu Bulma Süresi (sn) (Ortalama ± SD)		p
	Grup-3 (n:10)	Grup-4 (n:9)	
1.gün	33,19 ± 12,3¶§	31,87 ± 10,4 Φ¶§	0,80
2.gün	18,73 ± 8,7 ψ	24,75 ± 10† ψ	0,17
3.gün	17,04 ± 16,4	17,24 ± 7,5	0,97
4.gün	9,63 ± 3,6	9,8 ± 6,3	0,94

- Φ p<0,05 birinci ve ikinci gün karşılaştırılması
¶ p<0,05 birinci ve üçüncü gün karşılaştırılması
§ p<0,05 birinci ve dördüncü gün karşılaştırılması
† p<0,05 ikinci ve üçüncü gün karşılaştırılması
ψ p<0,05 ikinci ve dördüncü gün karşılaştırılması

Morris yüzme testi uygulanan ratların tekrarlayan uygulama-denemeler sonunda platformu bulma süreleri kısalmış ancak gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Şekil-5).

Grup içi karşılaştırılmasında kontrol grubunda birinci gün platformu bulma süresi ortalamasının, üçüncü ve dördüncü gün platformu bulma süresi ortalamasına göre anlamlı olarak uzun bulundu (sırasıyla ¶ $p=0,02$, § $p=0,008$). İkinci ve dördüncü gün platformu bulma süresi ortalamalarının karşılaştırılmasında ikinci gün platformu bulma süresi ortalaması anlamlı olarak uzun bulundu ($\psi p=0,008$). Desfluran grubunda birinci gün platformu bulma süresi ortalamasının, ikinci, üçüncü ve dördüncü gün platformu bulma süresi ortalamasına göre anlamlı olarak uzun bulundu (sırasıyla Φ $p=0,03$, ¶ $p=0,02$, § $p=0,008$). İkinci gün platformu bulma süresi ortalamasının üçüncü ve dördüncü gün platformu bulma süresi ortalamalarının karşılaştırılmasında ikinci gün ortalaması anlamlı olarak uzun bulundu (sırasıyla† $p=0,02$, ψ $p=0,02$).



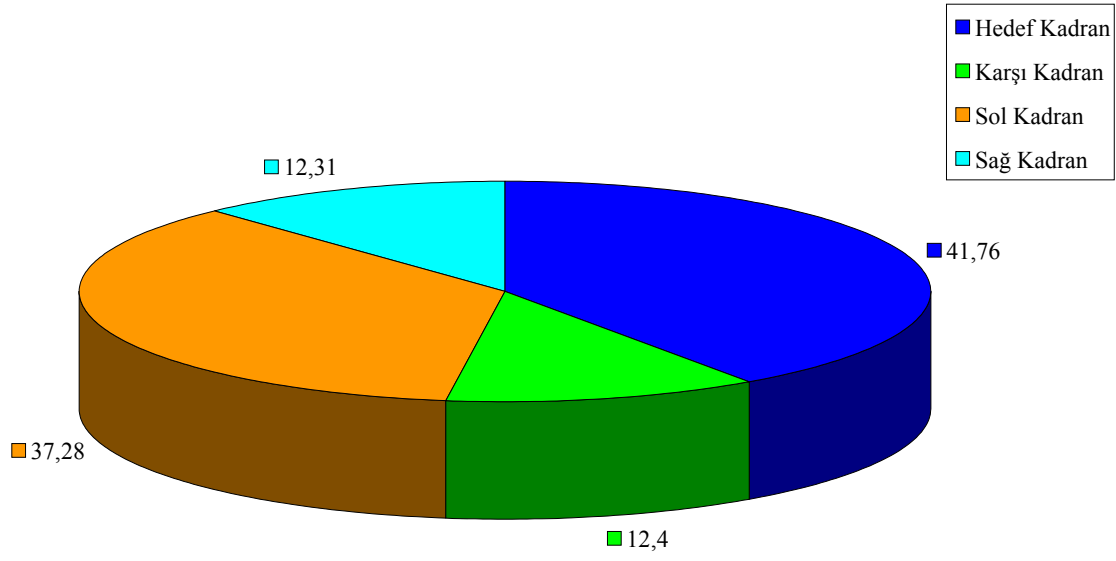
Şekil-5. Ratların platformu bulma süreleri

Dört gün süresince bütün denemelerde aynı yerde bulunan platform son gün kaldırıldıktan sonra ratların 30 sn'lik zaman diliminde (*probe trial*) daha önce platform olan kadranda (hedef kadrana) ve diğer kadrarlarda geçirdikleri zamanın yüzde olarak değerleri Tablo-5, Şekil-7 ve Şekil-8'de sunulmuştur.

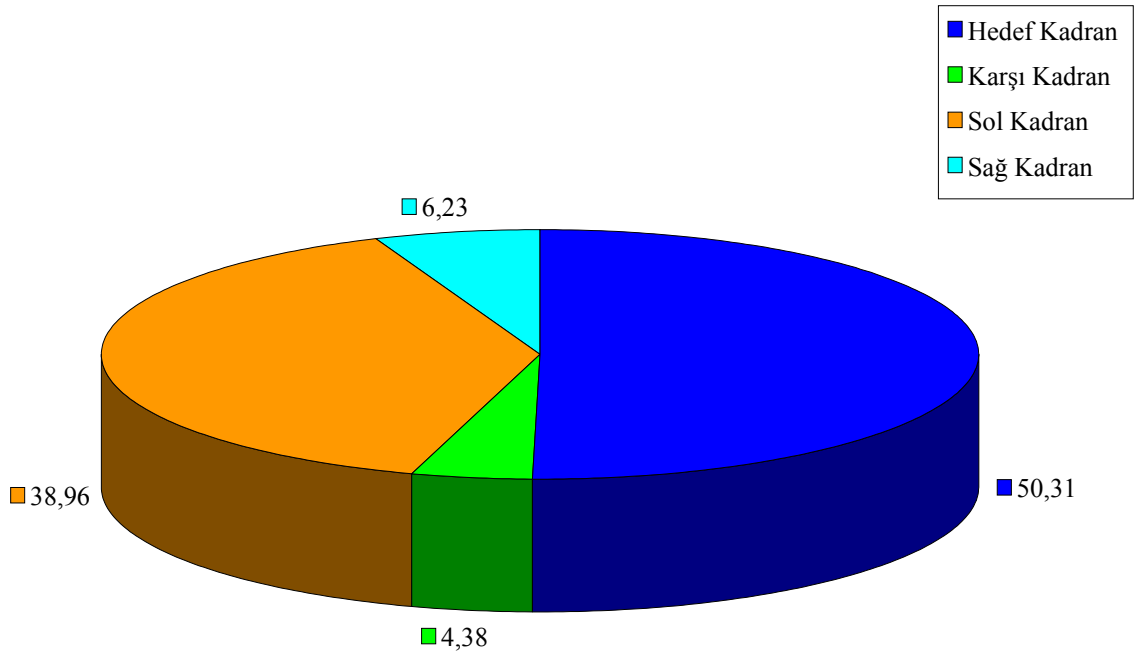
Tablo-5. Ratların kadrarlarda geçirdikleri sürenin yüzde değerleri

	Kadrarlarda Geçirilen Süre (%) (ortalama ± SD)			
	Hedef Kadrana	Komşu Sol Kadrana	Komşu Sağ Kadrana	Karşı Kadrana
Grup-3 (n:10) (desfluran)	41,76 ± 22,3	37,28 ± 16,2	12,31 ± 12,5	12,40 ± 9,56
Grup-4 (n:9) (kontrol)	50,31 ± 18,6	38,96 ± 16,1	6,23 ± 9,3	4,38 ± 4,6
p	0,38	0,82	0,25	0,036*

*p<0.05 Grup 3 ile Grup 4 karşılaştırıldığında



Şekil-6. Desfluran grubu ratların kadrarlarda geçirdiği sürelerin yüzde değeri



Şekil-7. Kontrol grubu ratların kadrarlarda geçirdiği sürelerin yüzde değeri

Hedef kadran, komşu sol kadran ve komşu sağ kadranda geçirilen sürelerin yüzdesinin ortalaması karşılaştırıldığında her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Karşı kadranda geçirilen sürelerin yüzdesinin ortalaması karşılaştırıldığında Grup-3'ün bu kadranda geçirdiği sürenin yüzdesinin ortalaması Grup-4'e göre anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır ($p=0,036$).

TARTIŞMA:

Çalışmamızda yedi günlük yenidoğan ratlara altı saat süresince %6,8 konsantrasyonda uygulanan desfluranın belirgin olarak daha fazla nöroapoptotik yanıtı neden olduğunu ancak öğrenme ve bellek fonksiyonlarını etkilemediğini saptadık.

Anesteziyle indüklenen nöroapoptoz çalışmalarında ve davranış testlerinde^{1,37} denek olarak sıklıkla rat kullanıldığı için çalışmamızda, gelişmekte olan memeli beyninde anesteziyle indüklenen nörotoksisite ve nörokognitif bozukluğu araştırmak üzere Wistar türü ratları kullandık.

Ratlarla yapılan birçok çalışmada inhalasyon anestezikleri kullanıldığından bu ajanların yaşamın erken dönemindeki MAK değerlerinin belirlenmesi gerekmiştir.⁵³ Ancak literatürde 7 günlük Wistar türü yeni doğan rat için desfluranın MAK değerini bulamadık ve bu nedenle desfluranın MAK değerini hesapladık. Erişkin Wistar türü rat için desfluranın MAK değeri % 5,7'dir.⁵⁴ Fang ve ark.⁵⁵ desfluranın MAK'nun yenidoğan ratlarda erişkin ratlara göre % 19 daha fazla olduğunu bildirmiştir. Hesaplamamız sonucunda Wistar türü 7 günlük yeni doğan rat için desfluranın MAK değerini % 6,78 bulduk ve çalışmamızda anesteziyle indüklenen nöroapoptozu tetiklemek için ratlara % 6,8 konsantrasyonda (1 MAK) desfluran uyguladık.

Çalışmamızda yenidoğan ratlarda desfluranın paraventriküler talamik nükleus, hipokampus CA1 ve korteks kesitlerinde nöroapoptoz oluşturduğunu saptadık. Desfluranın *in vivo* nöroapoptoz oluşturduğuna dair herhangi bir yayın bulunmamaktadır.⁵⁶ Ancak literatürde desfluranın ve sevofluranın nöronları koruyucu özelliğinin olduğunu bildiren yayın vardır.¹³ Neonatal rat korteksi kaynaklı nöronal hücre kültürlerinin kullanıldığı *in vitro* yapılan çalışmada desfluran veya sevofluran uygulanması sonrası kültürlerle 30, 60 ve 90 dakika oksijen (O₂) ve glukoz yoksunluğu uygulanmıştır. Bu dönemde de desfluran ve sevofluran verilmeye devam edilmiştir. Uygulamadan 48 saat sonra *Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling assay* (TUNEL) ve Deoksiribonükleik asit (DNA) jel elektroforezi ile hücreler çalışılmıştır. 30, 60 ve 90 dakikalık yoksunluk dönemlerinde desfluran ve sevofluranın nöronal hücre ölümünü belirgin olarak (yaklaşık olarak %98) azalttığı bildirilmiştir.¹³

Erken dönem nöroapoptotik yanıtı değerlendirmek üzere aktive kaspaz-3 immünohistokimyasal boyama yöntemini seçmemizin nedeni aktive kaspaz-3'ün tüm hücre gövdesinde ve dentritik ağaçta oluşması ve aktive kaspaz-3 immünohistokimyasal boyamanın, gümüş boyamadan önce duyarlı nöronlarda erken dejeneratif süreci göstermede ideal bir

yöntem olmasıdır.⁵⁷ Hücre gövdesi ve tüm bileşenleri bu boya sayesinde detaylı olarak gösterilebilir. Ancak hücre ayrıştıkça immün reaktivitesini kaybeder ve hücrenin bu boya ile gösterilmesi olanaksız hale gelir. Bu nedenle hem histolojik işlem hem de uygulama sonrası zaman aralığının nöroapoptotik yanıtın kesin ve doğru değerlendirilmesinde kritik öneme sahip olduğu bildirilmektedir.⁵⁷ Tüm bu bilgiler ışığında bu boya ile nöroapoptotik yanıtı göstermek için en geç zaman aralığının 24. saat olduğu, 24. saatden daha sonra yapılacak histolojik kesitlerdeki incelemelerle yüksek doz ilaç uygulamasıyla indüklenen sıra dışı aşırı yanıt tespit edilebileceği gösterilmiştir.⁵⁷ Ayrıca ilaç uygulamasından sonraki birkaç saat içinde hızla ölen en duyarlı hücreler ilk 6-12 saat içinde fagosite edilirken, daha dirençli nöronların çoğunun 18.-24. saatlerde fagosite edilmesi nedeniyle akut olarak etkilenen nöronların daha geç dönemde belirlenmesinin mümkün olamayacağı bildirilmiştir.⁵⁷ Çalışmamızda bu nedenle 2. saatte doku (beyin) örnekleri alınmıştır.

Çalışmamızda yenidoğan ratlarda desfluranın oluşturduğu nöroapoptozun sadece türe özgü olduğu görüşü savunulabilir. İnfant farelere, tavşanlara, domuzlara⁵⁸ veya terme yakın koyunlara⁵⁹ 4 veya 6 saat volatil anestezi uygulamasını takiben 48. saatte⁵⁸ ve altıncı günde⁵⁹ yapılan histopatolojik değerlendirmeler sonucunda nöroapoptoz saptanmadığı bildirilmiştir. Bu çalışmalarda kullanılan memeli türlerinde nöroapoptozun saptanamamasının nedeni, çalışmacıların anestezi ajan uygulaması sonrası uygun bir dönem içinde histopatolojik değerlendirme yapmamaları olabilir.

Anand⁶⁰ anestezi ilaçların hayvan beyinde apoptozu tetiklemesi için “çok yüksek dozlara ve uzun süreli maruziyete” gereksinim olduğunu bildirmiştir. Young ve ark.³ ise subanestezi (bir insan infantına anestezi uygulamak için gerekli ketamin dozu 5 mg/kg iken bir fare için 80 mg/kg’dır⁶¹) tek doz ketaminin (20 mg/kg) infant fare beyinde belirgin nöroapoptoz yanıtı tetiklediğini bildirmişlerdir. Volatil anesteziklerin subanestezi uygulamalarının da infant rat beyinde nöroapoptozu tetiklediği bildirilmiştir.^{1,6} Johnson ve ark.⁶ infant farelere 1 saat % 2, 2 saat %1.5 ve 4 saat %0.75 izofluran uygulamış ve tüm bu 1 MAK altı (infant fare için izofluranın MAK’ı:%2.26⁶²) izofluran uygulamalarının belirgin nöroapoptozu indüklediğini göstermişlerdir. Ma ve ark.⁵ ve Jevtovic-Todorovic ve ark.¹ %0.75 izofluranın (0.33 MAK) infant rat beyinde nöroapoptozu tetiklediğini göstermişlerdir. Bu çalışmaların ışığında “çok yüksek dozlara ve uzun süreli maruziyete” gereksinim olduğu görüşünün savunulamayacağı açık olarak görülmektedir. Desfluranın nörotoksik olup olmadığına dair daha önce yapılan bir çalışma olmadığı için çalışmamızda hesaplanan 1 MAK

konsantrasyonundaki desfluran, daha önceki çalışmalarla benzer şekilde 6 saat süresince uygulanmıştır ve nöroapoptotik yanıtın olduğu saptanmıştır. Desfluranın daha düşük konsantrasyonlarda ya da daha kısa süre uygulanmasıyla neden olabileceği nöroapoptotik yanıtı değerlendirmek için daha ileri çalışmalara gerek vardır.

Çalışmamızda anestezi uyguladığımız yenidoğan ratlarda hipoksi/iskemi veya hipoglisemi de anestezi ilaç uygulamasıyla ilişkili nörodejeneratif reaksiyondan sorumlu olabilir, ancak desfluran uyguladığımız gruplardan randomize olarak seçilen birer rattan alınan arteriyel kan gazı analizi sonuçlarında herhangi bir metabolik ve solunumsal anormallik saptamadık ve kan glukoz düzeylerini normal sınırlarda tespit ettik. Anestezi altındaki yenidoğan ratların hemodinamik ve solunumsal monitörizasyonları küçük boyutlarından dolayı teknik olarak uygulanabilir olmadığından³⁸ ve elimizdeki cihazların, hemodinamiyi etkilemeyecek düzeyde alınan küçük kan volümlerinde (100 mikrolitre) ölçüme uygun olmadığından, çalışmamızda tüm deneklere hemodinamik monitörizasyon ve arteriyel kan gazı analizi yapamadık.

Literatürdeki mevcut bulgular da anestezi uygulanan yenidoğan ratlarda hipoksi/iskeminin^{63,64} veya hipogliseminin⁵ anestezi ilaç uygulamasıyla ilişkili nörodejeneratif reaksiyondan sorumlu olabileceği görüşüyle ters düşmektedir. Hipoksi/iskemiye yanıt olarak akut hücre ölümünün, anesteziyle indüklenen nöroapoptozdaki yapısal analizden belirgin olarak farklı olduğu birçok kez gösterilmiştir.^{5,65} Nöroapoptoz oluşturan dozda ketamin³ veya izofluran, N₂O ve midazolam kombinasyonu³⁸ uygulanan infant ratların kan gazı değerleri normal sınırlarda bulunmuştur. İnfant fareler nöroapoptoz oluşturacak durumlara maruz bırakıldıklarında kan basıncı değerlerinin stabil kaldığını ve kan gazı değerlerinin anestezi uygulanmamış kontrollere göre belirgin olarak değişmediğini gösteren Loepke ve ark.⁶² hipoksi/iskemiye dair kanıt bulamasa da infant farelerin %1.8 izoflurana maruziyetinin kan glikoz değerlerinde $53 \pm 22 \text{ mg.dL}^{-1}$ (n=4) düşüşe neden olduğunu ve izofluranın infant farelerde oluşturabileceği nöroapoptozda, hipogliseminin katkısı olabileceğini bildirmişlerdir. Ancak daha fazla sayıda hayvanı içeren çalışmalarda, izofluran infant farelere üç farklı konsantrasyonda ve sürede^{5,6} ayrıca üçlü anestezi kokteyl (izofluran, midazolam ve N₂O) şeklinde uygulanmış¹, çalışmalarda nöroapoptoz tetiklenirken hipoglisemi saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda da kan gazları analiz sonuçlarının normal sınırlarda olması, nöroapoptotik yanıtın desfluran uygulaması ile ilgili olduğunu desteklemektedir.

İnhalasyon ajanlarının neden olduğu hücre zedelenmesinin mekanizması açık olmamakla beraber kalsiyum disregülasyonu suçlanmaktadır. Sevofluran ve desfluranın, izoflurana oranla intrasellüler kalsiyumu çok daha az etkileyerek daha az apoptoz oluşumuna neden olduğu bildirilmektedir.¹¹ İnhalasyon ajanlarına kısa süre maruziyette subletal strese önkoşullanma ile nöroproteksiyon sağlanırken, uzamış maruziyetlerde direkt sitotoksik etki ile apoptoze bağlı hücre hasarını artırmaktadır.¹²

Anestezinin indüklediği uzun dönem nörokognitif bozuklukların saptanması için uzaysal referans hafızasını değerlendiren, MST ve radyal kol testleri kullanılır.^{1,66,67} Kemirgenlerde uzaysal bellek hipokampal lezyonlardan etkilendiği için genellikle bu tasklar hipokampal bağımlı olarak kabul edilir.⁶⁸ Anterior talamik nükleuslar ve prefrontal korteks gibi diğer beyin yapılarını etkileyen lezyonlar da bu davranışsal bozuklukları taklit edebilir.⁶⁸ Bu testte performansın artmasında tekrarlamalar önemlidir. Deneme sayısı arttıkça hayvan ipuçlarını daha iyi değerlendirip hafızasına kaydeder ve özel haritalar oluşturarak daha sonraki denemelerde platformun yerini daha kolay bulur.

Yeni doğan döneminde kullanılan anestezi ajanlarına bağlı gelişebilecek nörokognitif bozukluğun saptanması için MST testlerinin yapılma zamanı ile ilgili görüş birliği yoktur. Literatürde MST testlerinin yenidoğan ratlara anestezi uygulamasından 2, 3, 4, 6, 8 ve 16 hafta sonra uygulandığı görülmektedir.^{9,69,70,71,72} Çalışmamızda MST testlerini anestezi uygulamasından 4 hafta sonra yaptık.

Çalışmamızda desfluranın nörokognitif fonksiyonlarını etkilemediğini saptadık. Platforma ulaşma süresi (öğrenme denemeleri) karşılaştırıldığında gruplar arasında fark olmamasına rağmen grup içi karşılaştırmada hem desfluran grubunun ve hem kontrol grubunun platforma ulaşma süresini kısalttığı saptanmıştır. Kontrol grubu ile benzer sürede platformu bulma ve bu sürenin 4. günde anlamlı olarak kısalması desfluran grubundaki ratların öğrenme fonksiyonlarının etkilenmediğini göstermektedir. Ayrıca platformun yerini öğrenme (hedef kadranda geçirilen süre) arasında fark bulunmadı. Platformun yerini iyi öğrenmiş bir rat veya fareden harcadığı zamanın/yolun en az %35'ini platform bölgesinde (hedef kadranda) geçirmesi beklenmektedir⁴⁷ (desfluran grubu % 41,76, kontrol grubu %50,31). Bu bulgular, desfluran uygulamasının platformlu alanı (hedef kadranda) tanıma (bellek) performansını etkilemediğini göstermektedir. Bulgularımızın aksine, 8 aylık ratlarla yapılan in vivo çalışmada¹⁴, ratlar 30 gün boyunca her gün 09:00-13:00 arasında 30 dakika subanestezi dozda (1/10 MAK) inhalasyon ajanlarına (halotan % 0.1, sevofluran %0.3 ve

desfluran % 0.6) maruz bırakılmış ve deney sonunda deneklere davranışsal, öğrenme ve bellek testleri uygulanmış, sonuç olarak subanestezi konsantrasyonlarda halotan, sevofluran ve desflurana 30 günlük maruziyet; merak ve arama davranışında azalma, anksiyetede artma, öğrenme ve bellek fonksiyonlarında bozulma ile ilişkili olduğu saptanmış ve öğrenme ve bellekteki bozulma desfluran uygulanan ratlarda daha fazla bulunmuştur.¹⁴ Bu çalışmadaki ratların erişkin olması, anestezi uygulamasının 30 gün boyunca ve toplam 15 saat olması nedeni ile çalışmamız ile benzerliği bulunmamaktadır.

Morris Su Tankı testi uygulanan hayvanlarda öğrenme performansının bozulması her zaman spasyal öğrenmenin bozulduğunu göstermez. Hayvanın bulunduğu ortamdan rahatsız olması, korkması da öğrenme performansını etkiler.⁷³ Bu deneylerde ratların cinsiyetlere göre de farklı davranışlar sergilediği, bu durumun hormonal farklılık ve hipokampus gelişimdeki farktan kaynaklandığı ve özellikle uzaysal (spasyal) öğrenmenin değerlendirilmesinde erkek cinsiyetin daha uygun olduğu saptanmıştır.^{44,45,46} Ancak çalışmamızda 7 günlük ratlarda cinsiyet belirleme imkanı olmadığı için desfluran uygulaması öncesi annelerinin yanından rastgele alınan ratların cinsiyetine önem verilmemiştir. *Probe trial*'de ratların en az karşı kadranda bulunmaları beklenmektedir. Çalışmamızda karşı kadranda geçirilen süre desfluran uygulanan grupta anlamlı olarak uzun bulunmuştur. Bu farkın grup içi bireysel farklılıktan (cinsiyet, korku, ortamdaki rahatsız olma) kaynaklandığı düşünülmüştür. *Probe trial*'de ölçülmek istenen, hedef kadranda geçirdiği süre (bellek fonksiyonunun değerlendirilmesi) olduğu için bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı olmasına rağmen tartışılmamıştır.

Kemirgenlerde anestezi uygulaması sonucu ortaya çıkan nörokognitif bozukluğun hücre ölümü ile direkt olarak ilişkili olduğu düşünülürse nörokognitif bozukluğun nöronal hücre ölümlerinden hemen sonra başlaması ve giderek artması beklenir. Buna rağmen izofluran uygulamasından hemen sonra nöronal hücre ölümü oluşmasına rağmen kognitif bozuklukların 4-6 hafta sonra belirgin hale geldiği gösterilmiştir.^{1,9,67} Nörokognitif bozukluklar arasında kemirgenlerin sosyal davranışlarındaki bozukluklar ile hipokampus kaynaklı (uzaysal öğrenme ve bellekteki) bozukluklar sayılabilir.^{1,9,66,67}

Çalışmamızda desfluran uygulaması sonrası belirgin hücre ölümü saptanmasına rağmen nörokognitif bozukluk oluşmamıştır. Benzer şekilde postnatal 7 günlük rat beyininde hücre ölümüne neden olan olayların hepsinin nörokognitif bozukluğa yol açmadığı belirtilmiştir.⁷⁴ Anestezinin indüklediği nörokognitif bozukluğun başlama zamanı, süresi ve karakteristikleri incelendiğinde, bu fonksiyon bozukluğunun nedeni olarak hücre ölümünün varlığı sorumlu

tutulamamaktadır. Strattman ve ark.'nın⁷⁴ yaptığı çalışmada ratlarda beyin hücre ölümü veya uzun dönemde nörokognitif bozukluk yaratacak dozu belirlemek için yenidoğan ratlara (7 günlük) 1,2 ve 4 saat süresince 1 MAK izofluran uygulanmış beyindeki hücre ölümü anesteziyenin 12 saat sonra ve kognitif değerlendirme anesteziyenin 8 hafta sonra yapılmıştır. Bu sonuçlara göre 1 saat izofluran uygulanan grupta beyin hücre ölümünde artış olmadığı saptanmıştır. 6 saat izoflurana maruz kalan neonatal ratlarda önceki çalışmalarla^{1,75} uyumlu olarak 2 veya 4 saat izofluran uygulamasının belirgin hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmanın ilginç bir sonucuda, tek başına hiperkarbinin aynı anestezi uygulamasının indüklediği hücre ölümü gibi duyarlı bölgelerde belirgin hücre ölümüne neden olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara göre 2 saat 1 MAK izofluran uygulaması beyinde hücre ölümlerinin ortaya çıkmasını sağlamaktadır ve bu hücre ölümlerinin bir kısmından izofluran uygulaması sonucu ortaya çıkan hiperkarbinin sorumlu olduğu ileri sürülebilir. Ancak araştırmacılar yalnızca hiperkarbi uygulanan gruptaki ölen hücre sayısının, 4 saat izofluran uygulanan grubun ölen hücre sayısından daha düşük olması nedeniyle izofluranın 4 saatlik uygulamasının hiperkarbi olmaksızın oluşturduğu sitotoksik etkiye bağlamışlardır. Anesteziyenin 8 hafta sonra nörokognitif fonksiyon değerlendirildiğinde ise sadece 4 saatlik izofluran uygulamasının özellikle uzaysal-ayrimsal bellek ve uzaysal *working memory* tasklarında nörokognitif bozukluğa neden olduğu bildirilmiştir. Önemli derecede anesteziyle indüklenen hücre ölümü olmasına rağmen ne 2 saat izofluran uygulanan grupta ne de 4 saatlik hiperkarbi grubunda bu tasklarla bir nörolojik bozukluk saptanmamıştır.⁷⁴ Aslında tüm diğer tedavi gruplarıyla karşılaştırıldığında 4 saatlik hiperkarbi artmış task performansı sağlamıştır. Bu ve diğer uygunsuzluklar nedeniyle anesteziyenin indüklediği hücre ölümünün daha önceden sanıldığı gibi anesteziyenin indüklediği nörokognitif bozuklukla sıkı sıkıya bağlı olmadığı gösterilmiştir. Bu çalışma bulguları 5 mg/kg midazolam kullanılarak laterodorsal talamik hücre ölümü saptanan ama defisit gözlenmeyen başka bir çalışmayla da desteklenmektedir.⁶⁶

SONUÇ ve ÖNERİLER:

Yenidoğan ratlarda yaptığımız bu çalışma ile % 6,8 konsantrasyonda uygulanan desfluranın nörotoksik olduğunu ancak öğrenme ve bellek fonksiyonlarını etkilemediğini saptadık. Bu çalışma desfluran'ın gelişmekte olan rat beyni üzerindeki etkileri inceleyen ilk çalışmadır.

Uzun zamandır var olan inanışın tersine anestezi ilaçlarının beyin yapısını ve fonksiyonunu değiştirme potansiyeli vardır. Desfluranın farklı konsantrasyonlarda ya da farklı sürelerde uygulanmasıyla neden olabileceği nöroapoptotik yanıtı değerlendirmek için daha ileri çalışmalara gerek vardır.

KAYNAKLAR:

1. Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, Benshoff DN et al. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci* 2003;23:876–82.
2. Ikonomidou C, Bittgau P, Koch C, Genz K et al. Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochem Pharmacol* 2001;62:401–5.
3. Young C, Jevtovic-Todorovic V, Qin YQ, Tenkova et al. Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain. *Brit J Pharmacol* 2005;146:189–97.
4. Cattano D, Young C, Olney JW. Sub-anesthetic doses of propofol induce neuroapoptosis in the infant mouse brain. *Anesth Analg* 2008;106:1712–4.
5. Ma D, Williamson P, Januszewski A, Nogaro MC et al. Xenon mitigates isoflurane-induced neuronal apoptosis in the developing rodent brain. *Anesthesiology* 2007;106:746–53.
6. Johnson SA, Young C, Olney JW. Isoflurane-induced neuroapoptosis in the developing brain of non-hypoglycemic mice. *J Neurosurg Anesth* 2008;20:21–8.
7. Zhang X, Xue Z, Sun A. Subclinical concentration of sevoflurane potentiates neuronal apoptosis in the developing C57BL/6 mouse brain. *Neurosci Lett* 2008;447:109–14.
8. Cattano D, Straiko MMW, Olney JW. Chloral hydrate induces and lithium prevents neuroapoptosis in the infant mouse brain. *American Society of Anesthesiologists Annual Meeting 2008, Abstr. #A315.*
9. Stratmann G, Sall JW, May LD, Bell JS et al. Isoflurane differentially affects neurogenesis and long-term neurocognitive function in 60-day-old and 7-day-old rats. *Anesthesiology* 2009; 110:834–48.
10. Terrell RC. The invention and development of enflurane, isoflurane, sevoflurane, and desflurane. *Anesthesiology* 2008;108:531-3.
11. Yang H, Liang G, Hawkins BJ, Madesh M et al. Inhalational anesthetics induce cell damage by disruption of intracellular calcium homeostasis with different potencies. *Anesthesiology* 2008;109:243-50.
12. Wei H, Xie Z. Anesthesia, calcium homeostasis and Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2009;6:30-5.

13. Wise-Faberowski L, Raizada MK, Sumners C. Desflurane and sevoflurane attenuate oxygen and glucose deprivation-induced neuronal cell death. *J Neurosurg Anesthesiol* 2003;15:193-9.
14. Ozer M, Baris S, Karakaya D, Kocamanoglu S et al. Behavioural effects of chronic exposure to subanesthetic concentrations of halothane, sevoflurane and desflurane in rats. *Can J Anaesth* 2006;53:653-8.
15. Wakasugi M, Hirota K, Roth Sh, Ito Y. The effect of general anesthetics on excitatory and inhibitory synaptic transmission in area CA1 of the rat hippocampus in vitro. *Anesth Analg* 1999;88:676-80.
16. Nishikawa K, MacIver M. Agent-selective effects of volatile anesthetics on GABA_A receptor-mediated synaptic inhibition in hippocampal interneurons. *Anesthesiology* 2001;94:340-7.
17. Banks M, Pearce R. Dual actions of volatile anesthetics on GABA_A IPSCs: Dissociation of blocking and prolonging effects. *Anesthesiology* 1999;90:120-34.
18. Nishikawa K, MacIver M.B. Membrane and synaptic actions of halothane on rat hippocampal pyramidal neurons and inhibitory interneurons. *J Neurosci* 2000;20:5915-23.
19. Antkowiak B, Helfrich-Forster C. Effect of small concentration of volatile anesthetics on action potential firing of neocortical neurons in vitro. *Anesthesiology* 1998; 88:1592-60.
20. Preckel B, Bolten J. Pharmacology of modern volatile anaesthetics. *Best Prac Res Clin Anaesth* 2005;19:331-48.
21. Ghouri AF, White PF. Effect of fentanyl and nitrous oxide on the desflurane anesthetic requirement. *Anesth Analg* 1991;72: 377-81.
22. Targ AG, Yauda N, Eger EI. Solubility of I-653, sevoflurane, isoflurane and halothane in plastics and rubber composing a conventional anesthetic circuit. *Anesth Analg* 1989;69: 218-25.
23. Fang ZX, Eger EI, Laster MJ, Chortkoff BS et al. Carbon monoxide production from degradation of desflurane, enflurane, sevoflurane, isoflurane and halothane by sodalime and baralyme. *Anesth Analg* 1995;80:1187-93.

24. Voss LJ, Ludbrook G, Grant C, Sleight JW et al. Cerebral cortical effects of desflurane in sheep: comparison with isoflurane, sevoflurane and enflurane. *Acta Anaesth Scand* 2006;50:313-9.
25. Vakkuri AP, Seitsonen ER, Jantti VL, Sarkela M et al. A rapid increase in the inspired concentration of desflurane is not associated with epileptiform encephalogram. *Anesth Analg* 2005;101:396-400.
26. Smith JH, Karsli C, Lagace A, Luginbuehl I et al. Cerebral blood flow velocity increases when propofol is changed to desflurane, but not when isoflurane is changed to desflurane in children. *Acta Anaesthesiol Scand* 2005;49:23-7.
27. Ting CK, Hu JS, Teng YH, Chang YY et al. Desflurane accelerates patient response during the wake-up test for scoliosis surgery. *Can J Anesth* 2004;51:393-7.
28. Owczuk R, Magdalena A, Wujtewicz A, Lasek J et al. The influence of desflurane on QTc interval. *Anesth Analg* 2005;101:419-22.
29. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
30. Cinel İ, Oral U. SIRS, Sepsis, MODS patofizyolojisinde apoptoz. *Türk Anest Rean Cem Mecmuası* 2001;29:52-8.
31. Van De Berg WDJ, Schmitz C, Steinbusch HWM, Blanco CE. Perinatal asphyxia induced neuronal loss by apoptosis in the neonatal rat striatum: A combined TUNEL and stereological study. *Experimental Neurology* 2002;174:29-36.
32. Conti A, Raghupathi R, Trojanowski J, Mcintosh T. Experimental brain injury induces regionally distinct apoptosis during the acute and delayed post-traumatic period. *J Neurosci* 1998;18:5667-72.
33. Bibel M, Barde YA. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* 2000;14:2919-37.
34. Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 2000;10:381-9.
35. Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ et al. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 1997;275:661-5.
36. Bittigau P, Sifringer M, Genz K, Reith E et al. Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Proc Nat Acad Sci* 2002;99:1508-9.

37. Hayashi H, Dikkes P, Soriano SG. Repeated administration of ketamine may lead to neuronal degeneration in the developing rat brain. *Paediatr Anaesth* 2002;12:770–4.
38. Lu LX, Yon JH, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V. General anesthesia activates BDNF-dependent neuroapoptosis in the developing rat brain. *Apoptosis* 2006;11:1603–15.
39. Yon JH, Daniel-Johnson J, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V. Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain *via* the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Neuroscience* 2005;135:815–27.
40. Northington JF, Graham EM, Martin LJ. Apoptosis in perinatal hypoxic–ischemic brain injury: how important is it and should it be inhibited? *Brain Res Rev* 2005;50:244–57.
41. Hu BR, Liu CL, Ouyang C, Blomgren K et al. Involvement of caspase-3 in cell death after hypoxia-ischemia declines during brain maturation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:1294–300.
42. Kesner RP, Hopkins RO. Mnemonic functions of the hippocampus: A comparison between animals and humans. *Biol Psychol* 2006;73:3–18.
43. Pereria LO, Arteni NS, Peterson RC, Padilha da Rocha A et al. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory* 2007;87:101–8.
44. Szyndler J, Piechal A, Blecharz-Klin K, Skórzewska A et al. Effect of kindled seizures on rat behavior in water Morris maze test amino acid concentrations in brain structures. *Pharmacological Reports* 2006;58:75–82.
45. Nowakawska E, Kus K, Czubak A, Glowacka D et al. Some behavioural effects of carbamazepin-comparison with haloperidol. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2007;58:253–64.
46. Nicholas A, Munhoz CD, Ferguson D, Campbell L et al. Enhancing cognition after stress with gene therapy. *The Journal of Neuroscience* 2006;26:11637–43.
47. D’Hooge RD, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev* 2001;36:60–90.
48. Lieben CK.J, Oorsouw KV, Deutz NEP, Blokland A. Acute tryptophan depletion induced by a gelatin-based mixture impairs object memory but not affective behavior and spatial learning in the rat. *Behav Brain Res* 2004;151:53–64.

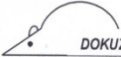
49. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984;11:47-60.
50. Yun YJ, Lee B, Hahm DH, Kang SK et al. Neuroprotective effect of palmul-chongmyeong-tang and ischemia-induced learning and memory deficits in the rat. *Biol Pharm Bull* 2007;30:337-42.
51. M Kiray, HA Bagriyanik, C Pekcetin, Ergur BU et al. Deprenyl and the relationship between its effects on spatial memory, oxidant stress and hippocampal neurons in aged male rats. *Physiol Res* 2006;55:205-12.
52. Dursun I, Jakubowska-Doğru E, Uzbay T. Effects of prenatal exposure to alcohol on activity, anxiety, motor coordination, and memory in young adult Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;85:345-55.
53. Orliaguet G, Vivien B, Langeron O, Bouhemad B et al. Minimum alveolar concentration of volatile anesthetics in rats during postnatal maturation. *Anesthesiology* 2001;95:734–9.
54. Steffey EP. Inhalation anesthetics, In: *Lumb and Jones' veterinary anesthesia* 4rd ed, (Thurman J, Tranquilli W, Benson J, eds). Baltimore, Williams & Wilkins. 355-93.
55. Fang Z, Laster MJ, Ionescu P, Koblin DD et al. Effects of inhaled nonimmobilizer, proconvulsant compounds on desflurane minimum alveolar anesthetic concentration in rats. *Anesth Analg* 1997;85:1149-53.
56. Loepke AW, Soriano SG. An assessment of the effects of general anesthetics on developing brain structure and neurocognitive function. *Anesth Analg* 2008;106:1681-707.
57. Jevtovic-Todorovic V, Olney JW. PRO: Anesthesia-induced developmental neuroapoptosis: status of the evidence. *Anesth Analg* 2008 Jun;106:1659-63.
58. Loepke A, McCann JC, Miles L. General anesthesia does not cause widespread neuronal cell death in the neonatal brain—a study in three mammalian species. *American Society of Anesthesiology Annual Meeting 2004 Abstract*.
59. McClaine RJ, Uemura K, De la Fuente SG. General anesthesia improves fetal cerebral oxygenation without evidence of subsequent neuronal injury. *J Cerebral Blood Flow Metab* 2005;25:1060–9.
60. Anand KJS. Anesthetic neurotoxicity in newborns. Should we change clinical practice? *Anesthesiology* 2007;107:2–4.

61. Green CJ, Knight J, Precious S, Simpkin S. Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10 year experience. *Lab Anim* 1981;15:163-70.
62. Loepke AW, McCann JC, Kurth CD, McAuliffier JJ. The physiologic effects of isoflurane anesthesia in neonatal mice. *Anesth Analg* 2006;102:75–80.
63. Anand KJS, Soriano SG. Anesthetic agents and the immature brain: are these toxic or therapeutic? *Anesthesiology* 2004;101:527–30.
64. Soriano SG, Loepke AW. Let's not throw the baby out with the bath water: potential neurotoxicity of anesthetic drugs in infants and children. *J Neurosurg Anesthesiol* 2005;17:207–9.
65. Dikranian K, Ishimaru MJ, Tenkova T, Labruyere J et al. Apoptosis in the in vivo mammalian forebrain. *Neurobiol Dis* 2001;8:359–79.
66. Fredriksson A, Archer T, Alm H, Gordh T et al. Neurofunctional deficits and potentiated apoptosis by neonatal NMDA antagonist administration. *Behav Brain Res* 2004;153:367–76.
67. Satomoto M, Satoh Y, Terui K, Miyao H et al. Neonatal exposure to sevoflurane induces abnormal social behaviors and deficits in fear conditioning in mice. *Anesthesiology* 2009;110:628–37.
68. Aggleton JP, Brown MW. Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behav Brain Sci* 1999;22:425– 44.
69. Culley DJ, Baxter M, Yukhananov R, Crosby G. The memory effects of general anesthesia persist for weeks in young and aged rats. *Anesth Analg* 2003;96:1004–9.
70. Culley DJ, Baxter MG, Crosby CA, Yukhananov R et al. Impaired acquisition of spatial memory 2 weeks after isoflurane and isoflurane-nitrous oxide anesthesia in aged rats. *Anesth Analg* 2004;99:1393–7.
71. Culley DJ, Baxter MG, Yukhananov R, Crosby G. Long-term impairment of acquisition of a spatial memory task following isoflurane-nitrous oxide anesthesia in rats. *Anesthesiology* 2004;100:309 –14.
72. Culley DJ, Raghavan SV, Waly M, Baxter MG et al. Nitrous oxide decreases cortical methionine synthase transiently but produces lasting memory impairment in aged rats. *Anesth Analg* 2007;105:83– 8.

73. Hölscher C. Stress impairs performance in spatial water maze learning tasks. *Behav Brain Res* 1999;100:225-35.
74. Stratmann G, May LD, Sall JW, Alvi RS et al. Effect of hypercarbia and isoflurane on brain cell death and neurocognitive dysfunction in 7-day old rats. *Anesthesiology* 2009;110:849–61.
75. Loepke AW, Istaphanous GK, McAuliffe JJ III, Miles L et al. The effects of neonatal isoflurane exposure in mice on brain cell viability, adult behavior, learning, and memory. *Anesth Analg* 2009;108:90–104.

EKLER:

EK-1. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Onayı


DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
35340, Inciraltı, İzmir-232 412254
<http://deu.edu.tr/idenyetik/>

Toplantı No : 05/21/2009
Toplantı Tarihi : 20 Kasım 2009


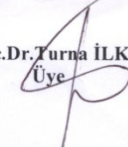
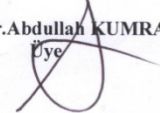
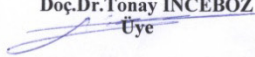

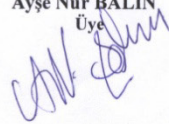
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

75/2009 Protokol No'lu; Anesteziyoloji Anabilim Dalı doktorlarından Dr.Duyguhan İŞGÜVEN'in yürütücüsü olduğu "Desfluran'ın yenidoğan ratlarda nörotoksisite, öğrenme ve bellek üzerine etkisinin araştırılması" isimli projede;

- Öğrenme testlerinin günün aynı saatinde tekrarlanması ve literatüre eklenmesi gerekmektedir.

Projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

 Prof.Dr.Osman YILMAZ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı	Doç.Dr.Ali Necati GÖKMEN Başkan Yardımcısı (araştırmacı)
Doç.Dr.Alper SOYLU Üye (top.katılmadı)	Prof.Dr.Ayşe GELAL Üye (top.katılmadı)
Doç.Dr. Hüseyin ASTARCIOĞLU Üye (top.katılmadı)	 Doç.Dr. Turna İLKNUR Üye
 Doç.Dr. Abdullah KUMRAL Üye	Doç.Dr.A.Hüseyin BASKIN Üye (top.katılmadı)
 Doç.Dr. Tonay İNCEBOZ Üye	Doç.Dr.H.Alper BAĞRIYANIK Üye (araştırmacı)
 Doç.Dr.O.Nejat SARIOSMANOĞLU Üye	Vtr.Hekim Adnan SERPEN Üye (top.katılmadı)
 Ayşe Nur BALIN Üye	