

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

**RAT MODELİNDE SEVOFLURAN VE
İZOFLURAN'IN AKCİĞER DOKUSU ÜZERİNE
ETKİLERİNİN BİYOKİMYASAL VE
HİSTOPATOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ**

DR. FATMA ACİL

**UZMANLIK TEZİ
İZMİR 2008**

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

**RAT MODELİNDE SEVOFLURAN VE
İZOFLURAN'IN AKCİĞER DOKUSU ÜZERİNE
ETKİLERİNİN BİYOKİMYASAL VE
HİSTOPATOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. FATMA ACİL

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Uğur Koca

ÖZET	1
SUMMARY.....	3
GİRİŞ ve AMAÇ.....	5
GENEL BİLGİLER.....	7
GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
BULGULAR	21
TARTIŞMA	34
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	43
KAYNAKLAR.....	44

Tablo 1. Grupların akciğer dokusu miyeloperoksidaz aktivitesi (U/g yaş doku).....	21
Tablo.2. Grupların akciğer dokusu <i>thiobarbituric acid reactive substance</i> düzeyleleri ($\mu\text{mol/L}$)	22
Tablo 3. Grupların kalp atım hızı, sistolik arteriyel kan basıncı ve diyastolik arteriyel kan basıncı değerleri: [median (minimum, maksimum)].....	24
Tablo 4. Grupların pH, P_aO_2 ve P_aCO_2 değerleri: [mediyan (minimum, maksimum)].....	25
Tablo 5. Gruplardaki alveoler makrofaj sayıları (makrofaj sayısı/0.016 mm^2 'lik alan)	26
Tablo 6. Grupların M-30 pozitif hücre sayısı/0.016 mm^2 alan	27

- Şekil 1. Nötrofil fonksiyonlarının şematik gösterimi. 9
- Şekil 2. Serbest oksijen radikallerinin dokulardaki direkt ve indirekt etkileri..... 10

Resim 1. Apoptozis yolakları	12
Resim 2. Trakeostomi ve arter kanülasyonunun uygulanması.....	17
Resim 3. Mekanik ventilatör ile inhalasyon anestezisi uygulaması	18
Resim 4. Kontrol grubunun farklı büyütmelelerdeki ışık mikroskopik görüntüleri	28
Resim 5. İzofluran grubunun farklı büyütmelelerdeki ışık mikroskopik görüntüleri.	29
Resim 6. Sevofluran grubunun farklı büyütmelelerdeki ışık mikroskopik görüntüleri.....	30
Resim 7. Kontrol grubunun M-30 pozitif hücre görüntüleri.....	31
Resim 8. İzofluran grubunun M-30 pozitif hücre görüntüleri.....	32
Resim 9. Sevofluran grubunun M-30 pozitif hücre görüntüleri.....	33

Grafik 1. Grupların akciğer dokusu miyeloperoksidaz aktiviteleri	22
Grafik 2. Grupların akciğer dokusu <i>thiobarbituric acid reactive substance</i> düzeyleri	23
Grafik 3. Grupların alveoler makrofaj sayıları.....	26
Grafik 4. Grupların M-30 pozitif hücre sayısı/0.016 mm ² alan.....	27

KISALTMALAR

SOR	: Serbest Oksijen Radikali
DNA	: Dezoksiribo Nükleik Asit
TBARS	: <i>Thiobarbituric Acid Reactive Substance</i>
MPO	: Miyeloperoksidaz
MAK	: Minimum Alveoler Konsantrasyon
NO	: Nitrik Oksit
LDH	: Laktik dehidrogenaz
N₂O	: Azot protoksit
ALI	: <i>Acute Lung Injury</i>
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HOCl	: Hipoklorik asit
PNL	: Polimorfonükleer lökosit
Tec-99m HMPAO	: <i>Technetium-99m hexamethylpropylene amine oxime</i>
Tec-99m DTPA	: <i>Technetium-99M labeled diethylene triamine pentaacetic acid</i>
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
Fas-L	: Fas ligand
sFas-L	: Solubl Fas ligand
NK	: <i>Natural killer</i>
ARDS	: Akut Respiratuvar Distres Sendromu
LPS	: Lipopolisakkarit
MCP-1	: <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MIP-1β	: <i>macrophage inflammatory protein-1β</i>
MIP-2	: <i>macrophage inflammatory protein -2</i>
PaO₂	: Arteriyal kan oksijen parsiyel basıncı
PaCO₂	: Arteriyel kan karbondioksit parsiyel basıncı
ATII	: <i>Alveolar Type II</i> hücre
IL-6	: İnterlökin-6
BAL	: Bronkoalveoler lavaj
TxB₂	: Tromboksan B ₂
LTB₄	: Lökotrien B ₄

PGE2 : Prostaglandin E2
CK 18 : *Cytokeratin* 18
mM : Milimolar

ÖZET

Sevofluran ve İzofluran'ın Akciğer Dokusu Üzerine Etkilerinin Biyokimyasal ve Histopatolojik Olarak Rat Modelinde İncelenmesi

Dr. Fatma Acil DEÜTF Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD, İZMİR

Amaç: Son yıllarda inhalasyon anesteziklerinin genel anestezi sırasında yaşanan pulmoner komplikasyonlardan sorumlu olabileceği savı gündeme gelmiştir. Bu ajanlara bağlı akciğer hasarının mekanizmasında aktive nötrofillerin yol açtığı endotelial hücre zedelenmesinin, üretilen serbest oksijen radikallerinin ve/veya proteazların rol aldığı düşünülmektedir. Bu deneysel çalışmada, sevofluran ve izofluranın akciğer dokusu üzerine etkilerinin rat modelinde incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Deney Hayvanları Etik Kurulu onamı alındıktan sonra 21 adet erişkin erkek *Wistar Albino* rat rastgele üç gruba ayrıldı, Kontrol Grubu (n=6); %50 oksijen + %50 hava; İzofluran Grubu (n=7) % 1.2 İzofluran (1 MAK) + %50 oksijen + %50 hava, Sevofluran Grubu (n=6) % 2.4 Sevofluran (1 MAK) + %50 oksijen + %50 hava ile 2 saat boyunca mekanik ventilatör ile solutuldu. Çalışma bitiminde ratlar mediyan sternotomi sonrası akciğerleri çıkartılarak sakrifiye edildi. Sol akciğer miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ve *thiobarbituric acid reactive substance* (TBARS) düzeyinin incelenmesi ve sağ akciğer histopatolojik incelemeler için kullanıldı. Histopatolojik değerlendirmede hematoksilen-eosin ile ışık mikroskobu istatistiksel analizinde, alveoler makrofaj sayısı ve M-30 immun histokimya ile apoptozis değerlendirildi. Veriler Kruskal Wallis ve Mann – Whitney U testleri kullanıldı. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular: Gruplar arasında hemodinamik veriler ve kan gazları parametreleri açısından fark saptanmadı. Sevofluran Grubu'nda, Kontrol ve İzofluran Grubu'na göre MPO aktivitesi (*sırasıyla; p:0.041, p:0.001*) ve TBARS düzeyi (*sırasıyla; p:0.041, p:0.035*) anlamlı derecede düşük saptandı.

İzofluran Grubu'nda, Kontrol ve Sevofluran Grubu'na göre alveoler makrofaj sayısı (*sırasıyla; p:0.001, p:0.001*) ve M-30 pozitif hücre sayısı (*sırasıyla; p:0.001, p:0.001*) anlamlı yüksek, Sevofluran Grubu'nda ise Kontrol Grubu'na göre anlamlı yüksek olarak saptandı (*sırasıyla; p:0.002, p:0.002*). Işık mikroskopik incelemede Sevofluran grubu ve daha fazla olmak üzere İzofluran Grubu'nda yaygın mononükleer hücre infiltrasyonu, diffüz alveoler

hasar, alveoler ödem, alveoler septumlarda kalınlaşma, alveol lümeninde yoğun alveoler makrofaj ve daha az miktarda nötrofil ve tip II pnömositler gözlemlendi. Parankimde ise yaygın hemoraji, mononükleer hücre infiltrasyonu, ödem ve vasküler konjesyon saptandı.

Sonuç: Bu çalışmanın sonuçlarına göre sevofluranın, izoflurana göre daha az pulmoner makrofaj aktivasyonu ve apoptozise neden olduğu saptanmıştır. Sevofluran Grubu'nda Kontrol Grubu'na göre daha düşük pulmoner MPO aktivitesi ve TBARS düzeyinin bulunması, sevofluranın antiinflamatuvar etkinlik gösterdiği şeklinde yorumlanabilir. Bununla birlikte hasarlı akciğer dokusu ile gerçekleştirilecek çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar Kelimeler: izofluran, sevofluran, akciğer hasarı, apoptozis, inhalasyon ajanı, genel anestezi

SUMMARY

Investigation of Biochemical and Histopathological Effects of Sevoflurane and Isoflurane on Lung in Rat Model

Dr. Fatma Acil, Dokuz Eylul University Medical Faculty, Department of Anesthesiology and Reanimation, İzmir/Turkey

Objective:

In recent years, the thesis on inhalational anesthetics can be the reason for pulmonary complications during general anesthesia has come into a question. The probable mechanism of lung injury due to these agents has been considered as; endothelial cell injury caused by activated neutrophils, formation of reactive oxygen radicals and/or proteases. In this trial, it has been aimed to investigate the effects of sevoflurane and isoflurane on lung tissue in rat model.

Method:

After the approval of ethics committee for Research Animals, 21 adult male *Wistar Albino* rats were randomly allocated into three groups. The subjects were mechanically ventilated for 2 hours in Control group (n=7) with 50 % oxygen + 50 % air mixture; in Isoflurane group (n=7) with % 1.2 (1 MAC) isoflurane + 50 % oxygen + 50 % air and in Sevoflurane Group (n=7) with %2.4 (1 MAC) sevoflurane + 50 % oxygen + 50 % air mixture. At the end of the study, a median sternotomy was performed, lungs were removed and rats were sacrificed. Left lung was used for pulmonary tissue myeloperoxidase activity and thiobarbituric acid reactive substances (MPO and TBARS) determinations, right lung was used for histopathological determinations. Histopathological determinations were included, light microscope image analysis, alveolar macrophage count and M-30 immune histochemical analysis of apoptosis. Data were analyzed using Kruskal Wallis and Mann - Whitney U tests and $p < 0.05$ were regarded as statistically significant.

Results: There were no statistical significance between groups when hemodynamic (heart rate, systolic blood pressures- diastolic blood pressures) and blood gases parameters (pH,

P_aO_2 , P_aCO_2) were compared. MPO activity in Sevoflurane group compared to isoflurane and control groups ($p:0.001$, $p:0.041$, *respectively*.) were significantly low. Furthermore, TBARS levels in Sevoflurane group compared to the other groups ($p:0.035$, $p:0.041$, *respectively*) were also significantly low. MPO activity in Isoflurane group were significantly high compared to control group.

Alveolar macrophage counts ($p:0.001$, $p:0.001$, *respectively*) and M-30 positive cell counts ($p:0.001$, $p:0.001$, *respectively*) in Isoflurane group were significantly high compared to sevoflurane and control groups. On the other hand, the alveolar macrophage counts ($p:0.002$) and M-30 positive cell counts ($p:0.002$) in sevoflurane group were significantly high compared to control group. Light microscopic findings observed in sevoflurane group and any more in isoflurane group were; diffuse mononuclear cell infiltration, diffuse alveolar injury, alveolar oedema, thickening of alveolar septums, dense alveolar macrophage and light neutrophil and type II pneumocytes infiltration in alveol lumen. Furthermore, the paranchimal changes were diffuse hemorrhage, mononuclear cell infiltration, oedema and vascular congestion.

Conclusion:

This study is concluded as, sevoflurane produces pulmonary macrophage activation and apoptosis less than isoflurane does and since sevoflurane group has lower pulmonary tissue MPO activity and TBARS levels than control group, it can be pronounced that sevoflurane has an anti-inflammatory activity. Nevertheless, more studies should be made on injured lung tissue.

Keywords: isoflurane, sevoflurane, lung injury, apoptosis, inhalational agent, general anesthesia

GİRİS ve AMAC

Klinik pratikte genel anestezi uygulamalarından sonra pulmoner problemlerin görülmesi, genel anestezinin akciğer fonksiyonlarına etkisine ve akciğerde volatil anesteziklerin alımı ve eliminasyonuna olan merakı artırmıştır¹⁻³.

Akut akciğer hasarının (*Acute Lung Injury- ALI*) patogenezinde sorumlu birçok etken gösterilmiştir. Bunlar arasında trombosit, nötrofil ve monosit gibi dolaşan hücreler, intravasküler ve alveoler makrofajlar, tip 2 alveol epitel ve fibroblast gibi akciğere ait hücreler sayılabilir. Olayın gelişiminde etkili olması olası hümmoral ve sellüler mediyatörler ise kompleman sistemi, prostaglandinler ve lökotrienler, serbest oksijen radikalleri (SOR), proteazlar, tümör nekrozis faktör ve diğer sitokinlerdir⁴.

Serbest oksijen radikallerinin yüksek seviyelere ulaşması, lipid peroksidasyonunun yanı sıra dezoksiribo nükleik asit (DNA) ve proteinlerin de oksidasyonu yoluyla hücre hasarına neden olmaktadır⁵. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan doku hasarı, *thiobarbituric acid reactive substance* (TBARS) ve miyeloperoksidaz (MPO) enzim aktivitesi ile saptanabilmektedir⁶.

Apoptozis, süregen bir hücre intiharı olup mekanizması tüm hücre nükleuslarındaki kromozomlarda şifrelenmiştir. Bu fizyolojik hücre ölümü mutasyonlarda, viral enfeksiyonlara karşı savunmada, doku homeostazında ve gelişiminde istenmeyen hücreleri yok etmede önemli bir rol oynamaktadır⁷.

Apoptozis, ölümü indükleyen reseptörlerin veya spesifik kaspazların aktivasyonuna yol açan uyarılar ile tetiklenebilir^{7,8}. Apoptozis 'ölüm reseptörleri' adı verilen spesifik hücre membran reseptörlerinin aktivasyonuna veya sitokrom-c gibi mitokondriyal ürünlerin salımına yanıt olarak tetiklenebilir.

İnhalasyon anesteziklerinin akciğerlerde proinflamatuvar sitokin gen ekspresyonunu ve makrofaj agregasyonunu artırarak inflamatuvar yanıtı açtığı gösterilmiştir⁹. Klinik önemi

olup olmadığı bilinmemektedir ancak inhalasyon anesteziğinin önceden inflamatuvar akciğer hastalığı veya hasarı olanlarda klinik tabloyu alevlendirebileceği görüşü mevcuttur⁹.

Anesteziğ ajanların immun sisteme etkisi tam olarak tanımlanamamıştır. Anesteziğ ajanların hem spesifik hem de nonspesifik komponentlerle immun yanıtı baskıladığı gösterilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalar volatil anesteziğlerin farklı immunomodölatör etkisi olduğunu bildirilmiştir¹⁰.

Bazı çalışmalarda inhalasyon anesteziğlerinin akciğer dokusu üzerine koruyucu etki oluşturduğu da gösterilmiştir. Liu ve ark.'ları¹¹ 1 MAK izofluran uygulamasının iskemi reperfüzyon modelinde akciğer hasarlanmasında rol oynayan tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), nitrik oksit (NO) ve laktit dehidrogenaz (LDH) sentezini azalttığını saptamışlardır. Bunun sonucunda da alveoler interstisyel ödemi azalttığını göstermişlerdir.

Literatürdeki verilere göre inhalasyon anesteziğleri inflamatuvar akciğer hasarında koruyucu rol oynayabilirler veya akciğerde inflamatuvar mediyatörlerin ve immunolojik hücrelerin aktivasyonuna yol açarak akut akciğer hasarına neden olabilirler⁹⁻¹¹.

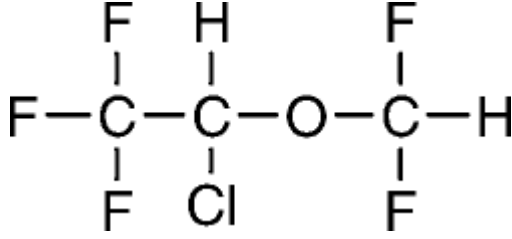
Ulaşabildiğimiz kaynaklara göre, inhalasyon anesteziğlerinin akciğer dokusunun akut inflamasyonu ile olan ilişkileri ve inhalasyon ajanlarının alveoler epiteliyal apoptozise etkilerinin araştırılmadığı saptanmıştır. Bu nedenle, çalışmamızda rat modelinde izofluran ve sevofluranın, alveoler epiteliyal apoptozise etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Genel anestezi bilinçsizlik, analjezi, amnezi ve bir miktar kas gevşemesi ile karakterize bir durumdur¹².

İnhalasyon anesteziklerinin etki mekanizmaları açıkça anlaşılmamış olsa da, etkilerinin santral sinir sisteminde terapötik bir doku konsantrasyonuna ulaşmalarına bağlı olduğu düşünülmektedir. Tüm inhalasyon anestezikleri tarafından paylaşılan makroskopik etki yerleri retiküler aktive edici sistem, serebral korteks, nükleus kuneatus, olfaktor korteks ve hipokampüstür^{12,13}.

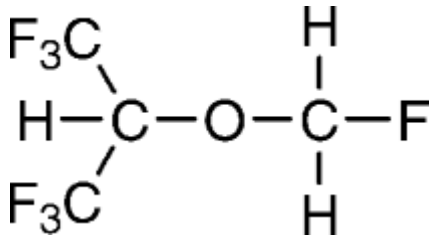
İZOFLURAN (C₃H₂OCIF₅)



Enfluranın izomeri olan bir metil etil eterdir. İzofluran 1965'te Terrell tarafından sentezlenmiş ve 1971'de klinik kullanıma girmiştir.

Molekül ağırlığı 184.5 g, kaynama noktası 48.5 °C, buhar basıncı 20 °C'de 238 mm Hg'dır. Minimum alveoler konsantrasyon (MAK) değeri oksijen içinde %1.15, %70 azot protoksit içinde %0.56'dır. Partisyon katsayıları; kan: gaz için 1.4 ve yağ: gaz için 94.5'tir¹³.

SEVOFLURAN (C₄H₃OF₇)

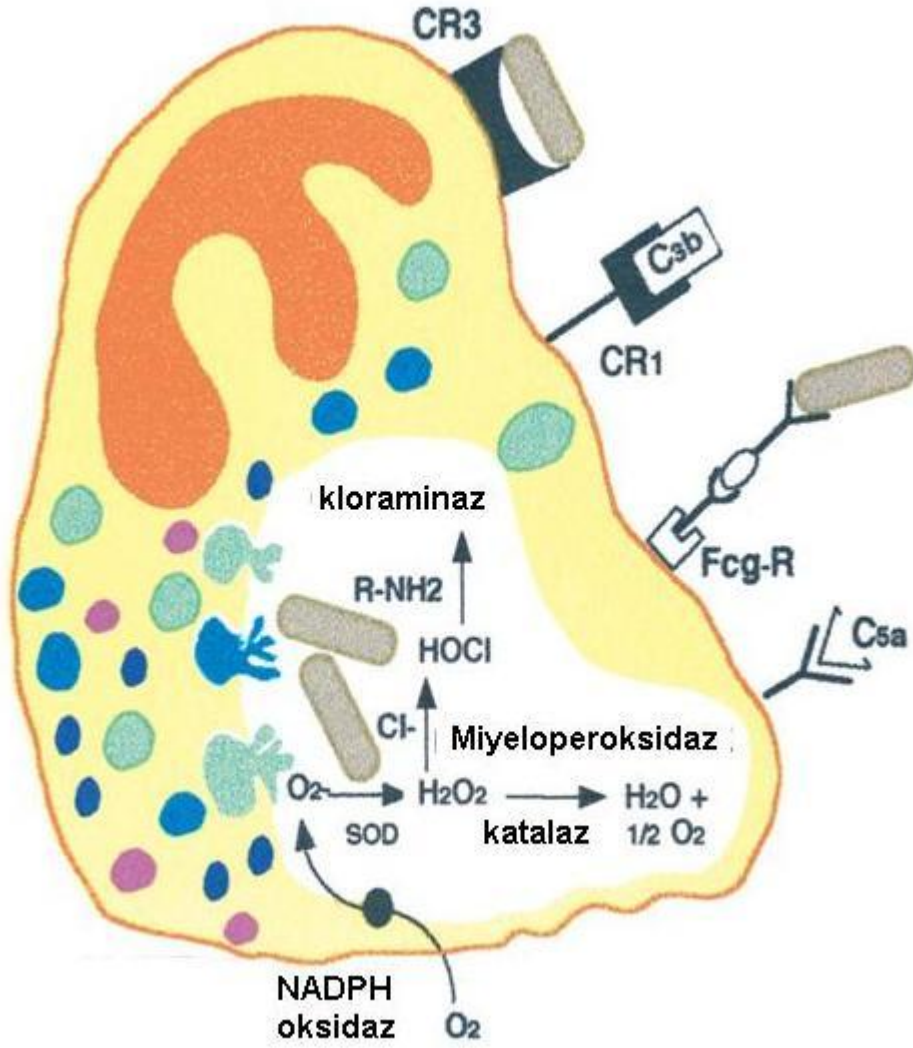


Sevofluran, 1970'de izole edilmiş ve 1975'te ilk klinik kullanımı bildirilmiş olan bir metil propil eterdir. Kaynama noktası 58,5 °C, buhar basıncı 20 °C'de 160 mm Hg, partisyon

katsayıları; kan:gaz için 0.69, yağ:gaz için 47.2'dir. MAK değeri oksijen içinde %2, %60 azot protoksit içinde %0.66 olarak bulunmuştur. Deney hayvanlarında soda *lime* ve *baralyme* ile etkileşmesi sonucu renal, pulmoner ve serebral toksisitesi olan yıkım ürünleri ortaya çıkmaktadır¹³.

Akut akciğer hasarı, sistemik inflamatuvar yanıtın bir komponenti olarak kabul edilir. Başlangıçtaki olay ve izleyen inflamatuvar yanıtta göre değişebilen mekanizmalar ve olaylar zinciri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. ALI patofizyolojisindeki temel özellik alveolo-kapiller membranda ciddi hasar oluşmasıdır. Oluşan hasarın tipine bağlı olmaksızın akciğerin oluşan inflamatuvar yanıtı reaksiyonu benzer şekilde oluşmaktadır. İnflamatuvar reaksiyon büyük miktarda sitokinlerin ve diğer sekonder mediyatörlerin serbest kalmasını ve kompleman, koagülasyon, fibrinolitik ve kinin kaskatlarının aktive olmasını içermektedir. Akciğerdeki nötrofillerin ve makrofajların aktivasyonu akciğer parankimini serbest oksijen radikallerine ve proteazlara maruz bırakmaktadır^{4,14}.

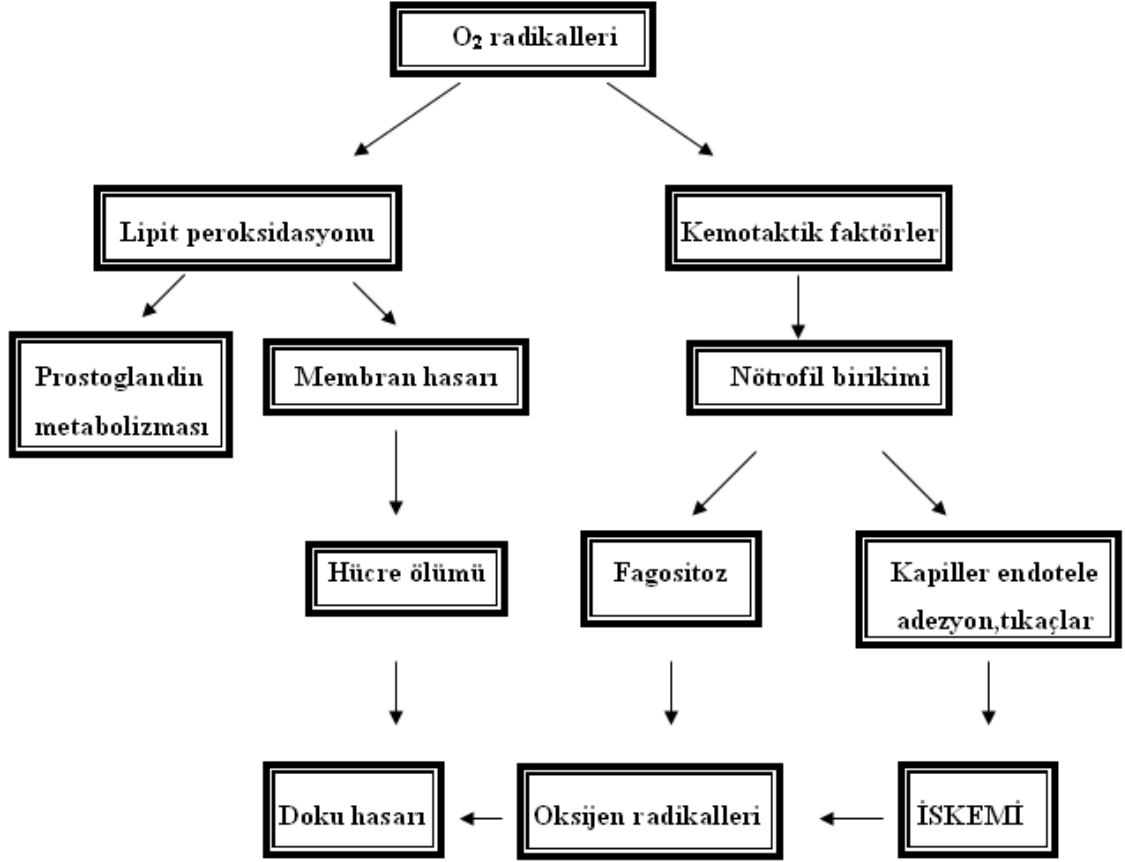
Miyeloperoksidaz enzimi nötrofillerdeki sitoplazmik granüllerde bol miktarda bulunmaktadır. Bu enzim nötrofil aktivasyonu esnasında ekstrasellüler alana salınır ve H₂O₂'yi hipoklorik asite dönüştürür. MPO'nun inhibisyonu ise hedef hücrelerdeki nötrofil aracılı DNA kırılmalarına neden olmaktadır. MPO, enfeksiyon ve/veya inflamasyonun modülasyonunda kritik bir enzimdir, çünkü nötrofillerin hem mikrobisidal hem de proinflamatuvar aktivitesi ile ilişkilidir¹⁵.



Şekil 1: Nötrofil fonksiyonlarının şematik gösterimi: Patojen kompleman C3b ve C4b, CR1 ve CR3 reseptörleri tarafından tanınır. IgG opsoninleri immunglobin reseptörleri yoluyla tanınmaktadır (FcγR). Oksidatif mikrobisidal yanıtta açığa çıkan serbest oksijen radikalleri sonucunda oluşan NADPH-oksidadz kompleksinin aktivasyon ürünü olan H_2O_2 , miyeloperoksidaz ile HOCl ve kloraminaza parçalanmaktadır. İkinci mikrobisidal yol oksijene bağlı olmayan yoldur ¹⁶.

Genel anestezi, inflamatuvar reaksiyon sırasındaki alveoler makrofajlara bağlı savunma mekanizmasını bozmaktadır. Yaygın inflamatuvar reaksiyonda, lökositlerin saldığı inflamatuvar mediyatörler ve SOR rol oynamaktadır⁴. Akut akciğer hasarında polimorfonükleer lökositler (PNL) ve alveoler makrofajlar süperoksit radikal iyonlar, H_2O_2 ve

radikal olmayan oksidanlar gibi serbest oksijen radikallerinin abartılı üretiminde rol oynamaktadırlar⁶.



Şekil 2. Serbest oksijen radikallerinin dokulardaki direkt ve indirekt etkileri¹⁷

Pulmoner mikrovasküler hasar inhalasyon anesteziplerinden kaynaklanabilir ve postoperatif akut pulmoner problemlere neden olabilir. *Technetium-99m hexamethylpropylene amine oxime* (Tec-99m HMPAO) ile erken ve minimal akciğer hasarı saptanabilmektedir. Bu metod ile halotan ile solutulan olgularda akciğerde anlamlı ölçüde permeabilite artışı saptanmıştır. Ancak izofluran ile, kontrol grubuna göre minimal değişiklikler olduğu görülmüştür. İnhalasyon ajanlara bağlı pulmoner mikrovasküler hasarın nedeni hala tam olarak açıklanamamıştır¹⁸.

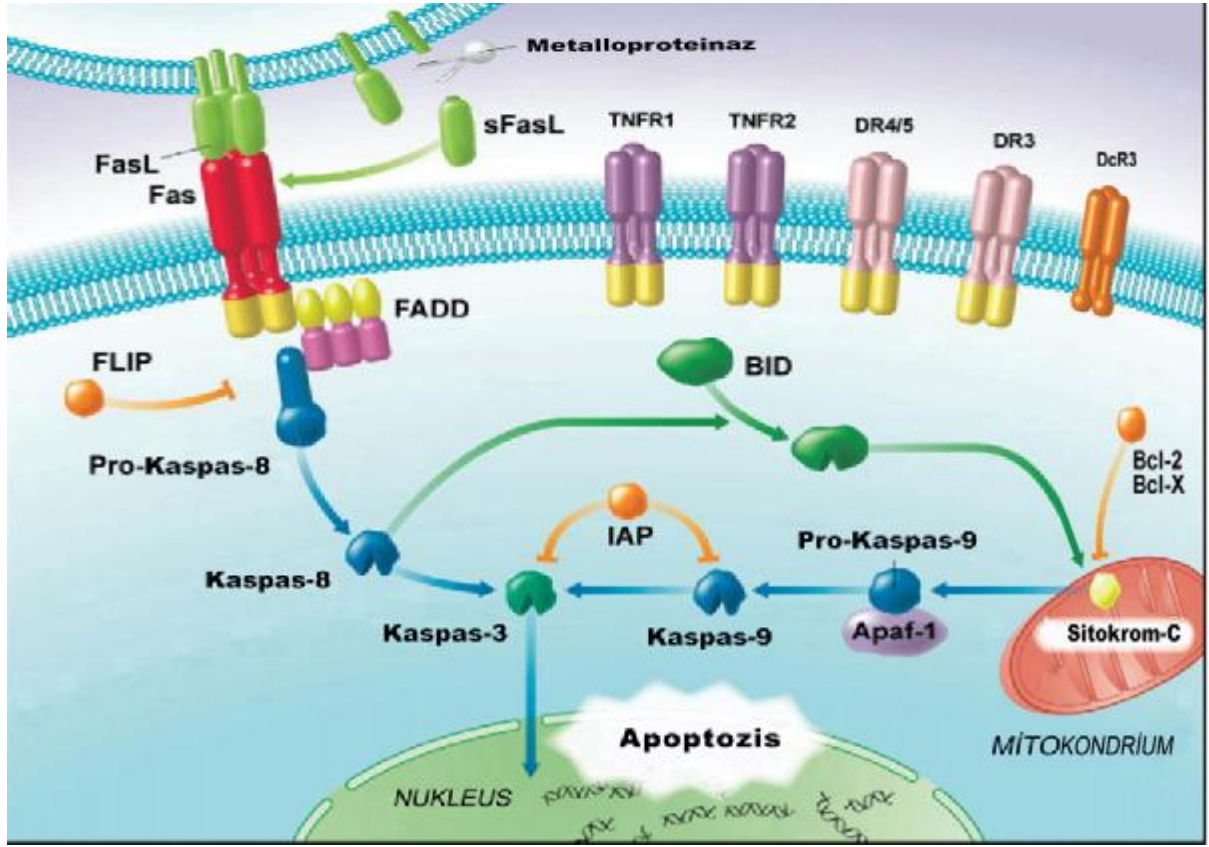
Akciğerler inhalasyon anesteziplerinin hem alımının hem de eliminasyonun yapıldığı yerdir ve pek çok inhalasyon anesteziğin alveolo-kapiller permeabiliteyi etkilediği

düşünülmektedir¹⁹. Pulmoner mikrovasküler hasar, son araştırmalarda akciğerlerle ilgili pek çok komplikasyondan sorumlu tutulan bir fenomendir. alışmalar akut inhalasyon anestezi maruziyetinin alveolar mikrovasküler hasara yol açtığını gstermiştir^{18,20,21}.

Apoptozis kompleks bir moleküler sinyal sistemi tarafından düzenlenmektedir. Doku iskemisi ve reperfzyonunda, kalp ve beyin gibi kritik organların hücresel bütünlüğü sağlamak ve hedef organları korumak için bu moleküler sistem aktive olmaktadır. Apoptotik hücre, enerji bağımlı enzimatik reaksiyonlar sonucunda karakteristik moleküler fragmanlara, DNA, lipit ve diğer makromoleküllere parçalandıktan sonra, küçük veziküllere paketlenerek fagosite edilir^{7,22}.

Ölüm reseptör ailesi TNF reseptörlerini (I – II) ve Fas reseptörlerini (CD 95) içerir. Fas reseptörü sitotoksik lenfositlerin yüzeyindeki Fas ligandı (Fas-L) veya bunun solubl formu (sFas-L) ile aktive olmaktadır⁴.

Akut akciğer hasarındaki epitelial hücre apoptozisinde en az  major yolak rol oynamaktadır. Reseptör aracılı yolakta (ekstresek yolak), Fas (CD 95) ve TNF reseptörleri gibi transmembran selüler ölüm reseptörlerinin bağlanması sonucunda intraselüler kaspaz-8 aktivasyonu oluşmaktadır. Bu da diğer kaspazların aktivasyonuna ve apoptozisin progresyonuna neden olmaktadır. Apoptozisin ikinci yolağında (intresek yolak) DNA hasarı, oksidanlar, radyasyon ve intraselüler kalsiyum aşırı yükü gibi hasarlandırıcı olaylar sonucunda mitokondriden sitozole sitokrom-c gibi apoptotik faktörler salınmaktadır. Son olarak, sitotoksik T hücreleri ve doğal öldürücü hücrelerin (natural killer-NK) rol aldıkları yolak, virüsle enfekte hücrelerin temizlenmesinde olağanüstü bir başarı gstermiřtir²².



Resim 1: Apoptozis yolları

Apoptozis, herhangi bir ölüm reseptörünün veya spesifik kaspazların aktivasyonu sonucunda oluşmaktadır. Sonrasında DNA kırılmaları, nükleer yoğunlaşma, sitoskeletal reorganizasyon, plazma membranının kabarcıklanması ve hücre adezyonunun kaybolması ile sonuçlanan bir intrinsek intihar programının aktivasyonu ile bu hücreler yok olmaktadır. *Cytokeratin 18* (CK 18), tek katlı ve glandüler epitelial hücrelerin major komponenti olan bir tip-1 intermediate filament proteinidir. Apoptozis esnasında epitelial efektör kaspaz 3, 6 ve 7'nin aktivasyonu sonucunda CK-18 açığa çıkmaktadır. Bir monoklonal antikor olan *M-30*, bir neoepitop olup, kaspaz aktivasyonu sonucu açığa çıkan CK-18'i spesifik olarak saptamaktadır. *M-30*, sadece kaspaz aktivasyonu sonucu açığa çıkan CK-18' saptamakta ancak sağlam CK-18'i saptamamaktadır²³. Leers ve ark.'ları²⁴, *M-30* antikorlarının sadece apoptotik hücreleri saptadığını, ancak nekrotik hücreleri saptamadığını immunohistokimyasal olarak göstermiş ve *M-30* antikorunun reaktivitesinin, apoptoziste bir indeks olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

İnhalasyon anestetiklerinin iskemi reperfüzyon hasarındaki apoptozis üzerine olan etkilerini inceleyen çalışmalar yapılmıştır. Raphael ve ark.'ları²⁵, tavşanların sol *anterior*

descending koroner arterinin distalini klemlemek suretiyle oluşturdıkları rejyonel iskemi ve reperfüzyon modelinde, iskemi süresince 1 MAK izofluran uygulamasının miyokardiyal apoptozis ve kalpteki infarkt alanını azalttığını göstermişlerdir. Abegg ve ark.'ları²⁶ yaptıkları başka bir çalışmada rat ventriküllerinden alınan miyokard hücrelerini hipoksi, hidrojen peroksit (H₂O₂) ve nötrofillere maruz bırakmışlardır. İzofluranın miyokardiyal hücrelerde hipoksinin, H₂O₂'in ve aktive nötrofillerin oluşturduğu apoptozisi azalttığını göstermişlerdir. Zhang ve ark.'ları²⁷ iskemi-reperfüzyon modelinde iskemik nöronlar üzerinde izofluran ve sevofluranın etkilerini araştırmışlardır. Ratların median serebral arterlerini 1 saat süreyle oklüde ettikleri çalışmalarında, reperfüzyondan 24 saat sonra hipokampüsteki apoptotik hücreleri, izofluranın %54 ve sevofluranın %40 oranında azalttığını göstermişlerdir.

Anestezik ajanların immun sisteme etkisi tam olarak tanımlanamamıştır. Anestezik ajanların hem spesifik hem de nonspesifik komponentlerle immun yanıtı baskıladığı gösterilmiştir. Önceki yapılan çalışmalar inhalasyon anesteziklerinin farklı immunomodülatör etkisi olduğunu göstermiştir²⁸. Cerrahi ile anestezi uygulaması sonucunda lökosit dinamiklerindeki değişiklikler lenfopeni ve nötrofiliye neden olmaktadır²⁹.

Inhalasyon anesteziklerinin akciğerlerde proinflamatuvar sitokin gen ekspresyonunu ve makrofaj agregasyonunu artırarak inflamatuvar yanıtı açtığı gösterilmiştir. Klinik önemi olup olmadığı bilinmemektedir ancak inhalasyon anesteziklerinin önceden inflamatuvar akciğer hastalığı veya hasarı olanlarda klinik tabloyu alevlendirebileceği görüşü mevcuttur¹⁰.

Alveoler immun hücreler, akciğerin doğal hücreleridir. Bunların %90'ından fazlası alveoler makrofajlar olup, postoperatif akciğer infeksiyonlarına karşı kritik bir koruyucu rol oynamaktadırlar. Alveoler makrofajların diğer fonksiyonları ise ALI/ARDS gibi ciddi pulmoner hastalıklarda nötrofillerin aktivasyonunu ve kemotaksisini sağlamaktır. Aktive nötrofiller ise makrofaj agregasyonunu kolaylaştıracak olan adezyon moleküllerindeki artışı sağlamaktadır³⁰.

Bazı çalışmalarda inhalasyon anesteziklerinin akciğer dokusu üzerine koruyucu etkileri olduğu da gösterilmiştir. Liu ve ark.'ları¹¹ 1 MAK izofluran uygulamasının iskemi reperfüzyon modelinde akciğer hasarlanmasında rol oynayan TNF- α , nitrik oksit (NO) ve

LDH sentezini azalttığını saptamışlardır. Bunun sonucunda da alveoler interstisyel ödemi azalttığını göstermişlerdir.

Bakteriyel endotoksin olan lipopolisakkaritler (LPS), ALI/ARDS'ye yol açan sistemik inflamatuvar reaksiyonlara neden olabilirler. LPS'ler *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), *macrophage inflammatory protein-1 β* (MIP-1 β) ve *macrophage inflammatory protein-2* (MIP-2) gibi kemokinlerin ekspresyonu ve üretimini artırmaktadırlar. Alveoler epiteliyal hücreler, LPS ile stimülasyona inflamatuvar bir yanıt vermektedirler³⁵⁽³¹⁾. Suter ve ark.'ları³¹ bir çalışmalarında alveoler hücre kültürüne bakteriyel lipopolisakkarid uygulaması ile oluşturulan akut akciğer hasarında sevofluran uygulamasının etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, alveoler hücre kültürüne LPS uygulaması öncesinde 30 dk %1.1- %2.2 konsantrasyonlarda sevofluran uygulamasının, LPS'in indüklediği MCP-1, MIP-1 β ve MIP-2 kemokinlerinin ekspresyonunu ve üretimini inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Plachinta ve ark.'ları³² bir çalışmalarında intravenöz LPS uygulamasından 30 dakika önce %1.4 izofluran uygulamasının endotel aracılı vazodilatasyonu, asidozu ve tümör nekroz faktör- α (TNF- α) konsantrasyonundaki artışı azalttığını göstermişlerdir. Böylece izofluranın inflamasyon sonucu oluşan hücre hasarında koruyucu etkisi olabileceği sonucuna varmışlardır.

Topouzova ve arkadaşları³³, alveoler epiteliyal hücreleri *in vitro* olarak 3 mM halotana maruz bıraktıklarında, halotanın DNA ve hücre hasarına neden olduğunu saptamışlardır. Bu hasarın apoptotik hücre ölümüne neden olabileceğini belirtmişlerdir. Literatürde bu çalışma dışında epiteliyal apoptozis üzerine inhalasyon ajanların etkisi ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Literatürdeki verilere göre inhalasyon anesteziikleri inflamatuvar akciğer hasarında koruyucu rol oynayabilirler veya akciğerde inflamatuvar mediyatörlerin ve immunolojik hücrelerin aktivasyonuna yol açarak akut akciğer hasarına neden olabilirler.

GEREC VE YÖNTEM

Çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanı Araştırmaları Etik Kurulu onayı alındıktan sonra Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarı'nın olanakları kullanılarak yapıldı.

Çalışmada vücut ağırlıkları 200-250 g arasında değişen 21 adet *Wistar Albino* tipi erişkin erkek rat kullanıldı. Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan sağlanan denekler standart rat yemi ve su ile beslendiler ve 12 saatlik gündüz-gece siklusu uygulanarak tel kafeslerde yaşatıldılar. Çalışmadan 12 saat önce sadece su içmeleri sağlandı.

Deney Grupları

Ratlar randomize olarak üç gruba ayrıldı. Ratlar 1 MAK konsantrasyonda inhalasyon ajanı ile solutuldu^{34,35}.

Grup Kontrol (n=6): %50 O₂ + %50 hava ile

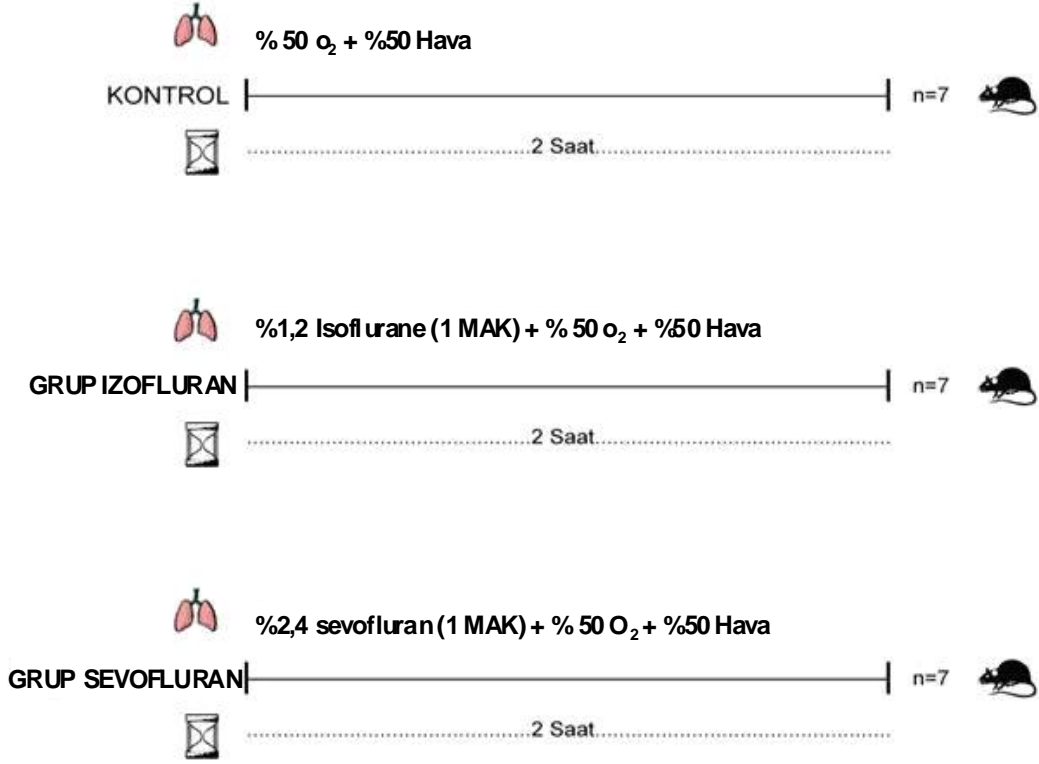
Grup İzofluran (n=6): %1,2 İzofluran (1 MAK) + %50 O₂ + %50 hava ile

Grup Sevofluran (n=7): %2,4 Sevofluran (1 MAK) + %50 O₂ + %50 hava ile, 2 saat solutuldu.

Deney Protokolü

Trakeostomi ve arteria karotis kanülasyonu öncesinde deneklere 75 mg/kg ketamin(*Ketalar*®, Pfizer Pharma GMBH, Germany) ve 10 mg/kg *xylazine hidrochloride* (*Alfazyne*®, %2, Alfasan International, 3440 AB, Woerden, Holland) intraperitoneal olarak uygulanarak anestezi sağlandı³⁶. Çalışma süresince, hareketlilik ve spontan solunumun gelişmesi halinde deneklerin hareketsizliğini sağlamak için aynı anestezi dozları tekrarlandı ve kaydedildi.

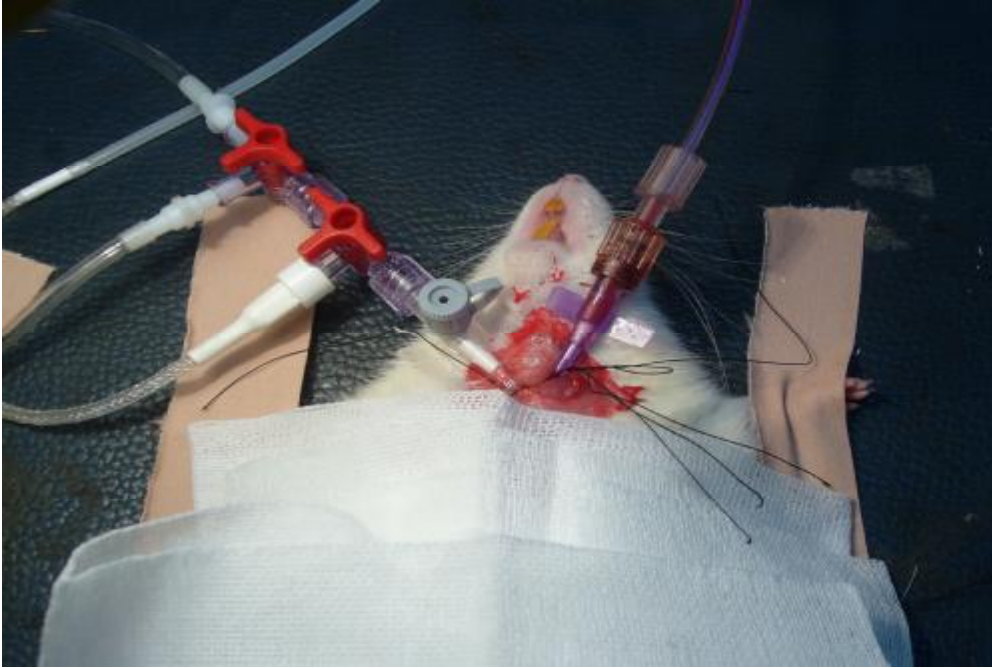
ÇALIŞMA PROTOKOLÜ ŞEMASI



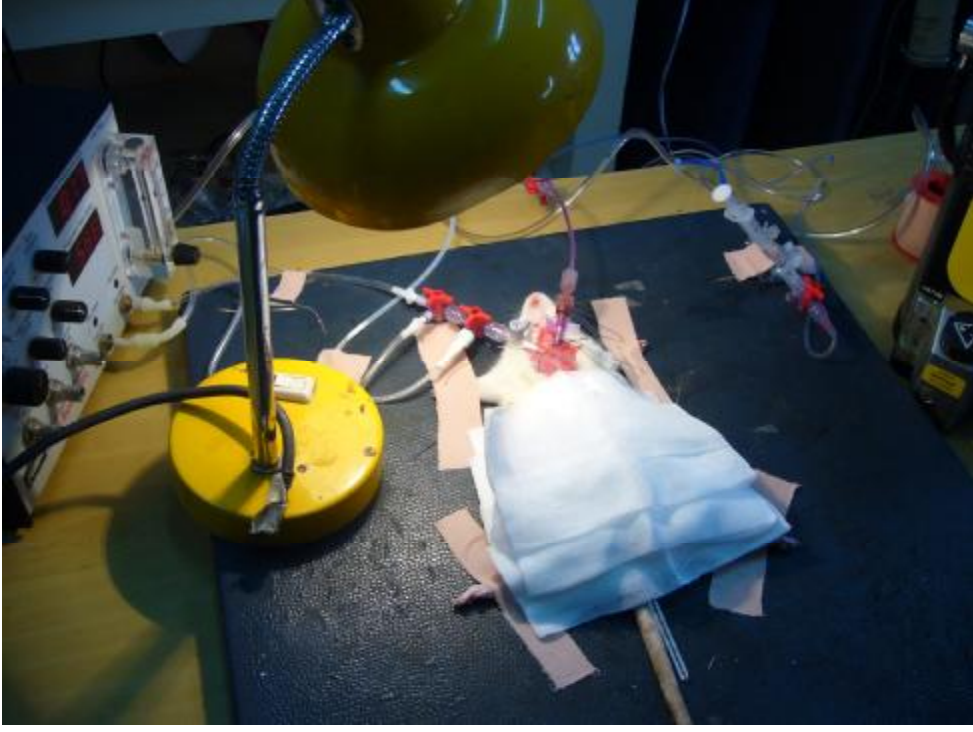
Ratlar çalışma süresince operasyon masasında supin pozisyonda ekstremitelemi sabitlenmiş olarak tutuldu. İntraperitoneal anestezi sonrası %1 lidokain ile lokal anestezi uygulanarak cerrahi olarak 16 gauge intravenöz polietilen kanül (*Mediflon®*, *Eastern Medikit LTD, Gurgaon, India*) ile trakeostomi açıldı. Solunum sayısı 60/dk, 3 mL tidal volüm ve 0 PEEP ile arteriyel kan karbondioksit parsiyel basıncı (PaCO₂) 36-42 mmHg olacak şekilde rodent ventilatörü (*Kent Scientific, 325 Norfolk Rd, Litchfield CT, USA*) ile mekanik ventilasyon uygulandı (Resim 2,3). Ventilatör parametrelerinde değişiklik yapılması halinde değişiklikten 20 dakika sonra arteriyel kan gazları örneği alındı. İki saat süreyle genel anestezi altında ventile edilen ratlar, gruplarına göre belirlenen inhalasyon anesteziklerle solutuldu. *End-tidal* inhalasyon anestezi konsantrasyonu monitörize edildi (*Anesthesia Gas Monitoring 1304, Bruel and Kjaer, Naerum, Denmark*). Deneklerin vücut sıcaklığının 37-38 °C arasında olması sağlanarak, rektal termometre ile takip edildi.

Trakeostomiyi takiben sol karotid artere, heparinli serum fizyolojik (100 Ü/mL) içeren 26 gauge kateter yerleştirilerek (*Mediflon®*, *Eastern Medikit LTD, Gurgaon, India*) invaziv arteriyel monitorizasyon sağlandı. Mekanik ventilatöre bağlandıktan ve arter kanülasyonundan sonra geçen 20 dakikalık stabilizasyon sürecinin ardından arteriyel kan gazı analizleri yapıldı.

Ratlar, işlem süresince EKG, arteriyel basınç transdüseri (*MLT844 Physiological Pressure Transducer, Interlab LTD, İstanbul, Türkiye*) yardımı ile arteriyel kan basıncı (sistolik/diyastolik, mmHg) ve kalp atım hızı (atım/dk) (*Petaş KMA 450, Petaş LTD, Ankara, Türkiye*) monitörize edilerek 10 dk. aralıklarla kaydedildi. Başlangıç, 30.dk, 60. dk ve 120. dk verileri değerlendirmeye alındı. Çalışma süresinin sonunda orta hattan sternotomi uygulandı. Sol ventriküle yerleştirilen iğne ile tüm ratlar 3 mL fosfat tamponlu salin solüsyonu ile perfüze edildi. Perfüzyonun ardından her iki akciğer çıkarıldı. Sol akciğer biyokimyasal, sağ akciğer dokusu histopatolojik ve elektron mikroskopik değerlendirmeler için kullanıldı.



Resim 2: Trakeostomi ve arter kanülasyonunun uygulanması



Resim 3: Mekanik ventilatör ile inhalasyon anestezisi uygulaması

I. Biyokimyasal incelemeler

Biyokimyasal analizler gruplar açısından kör olan iki adet biyokimya hekimi tarafından yapıldı.

a- TBARS düzeyi ölçümü:

Sol akciğerden 100 mg doku 900 μ L % 1.15'lik KCl içinde homojenize edildi. 0.2 mL homojenat 0.2 mL sodyum dodesil sülfat (SDS), 1.5 mL asetik asit, 1.5 mL TBA reaktifleri ve 0.6 mL distile su ile 95 $^{\circ}$ C'de 60 dk bekletildikten sonra soğutularak 1 mL distile su ve 5.0 mL n-butanol ile iyice çalkalanarak 3500 rpm'de santrifüje edildi. Üstte kalan organik faz 532 nm'de spektrofotometri (Pharmacia biotech, Ultrospec 2000, UV –Vis Spektrofotometre, Varian Cary 50 Bio, Australia) ile okundu. Sonuçlar mikromol/L olarak ifade edildi.

b- MPO aktivitesi ölçümü:

Sol akciğerden 200-400 mg'lık doku örneği alınarak buz üstünde çok küçük parçalara ayrılarak test tüpüne aktarıldı. 50 mM fosfat tampon pH 6,0 ile hazırlanan %0,5'lik heksadesiltrimetilammonium bromür (HTAB) çözeltisinden 1 mL konuldu. Homojenizatör 2 kez 1 mL HTAB ile yıkanmak sureti ile toplam 3 kez 30 sn. süre ile buz üzerinde homojenize edildi. Toplanan homojenat (3mL) 10 sn süre ile sonike edilerek 3 kez dondurulup çözüldü. 10 000 G'de (gravity) 10 dk santrifüj edildikten sonra homojenatta enzim aktivitesi ölçüldü. MPO aktivitesi ölçümü 460 nm'de spektrofotometrik (Pharmacia biotech, Ultrospec 2000 UV-Vis Spektrofotometre, Varian Cary 50 Bio, Australia) olarak yapıldı. Sonuçlar U/g yaş doku ağırlığı olarak ifade edildi.

II- Histopatolojik Değerlendirme

Tüm histopatolojik analizler, grupları bilmeyen iki histolog tarafından gerçekleştirildi. Elektron mikroskopik analizler için doku ayrıldı.

a- Hematoksilen-eosin ve İmmunhistokimyasal inceleme

Sağ akciğer dokuları alınarak %10'luk tamponlu formaldehite konuldu. 2 gün bekletildikten sonra rutin histolojik takip işlemlerinin ardından dokular parafine gömüldü. Mikrotom yardımıyla akciğer dokularından 5-6 µm kalınlığında kesitler alınarak örnekler lizinli lamlara yerleştirildi. Örnekler 24 saat 60°C etüvde bekletildikten sonra hematoksilen-eosin ve M-30 immünohistokimyasal yöntemlerle boyandı. M-30 immünreaktivitesinin gösterilmesi amacıyla rat spesifik anti-M30 antikoru (M-30 cytodeath PEVİVA AB, Broma, Sweden) kullanıldı. Lizinli kesitler anti-M30 antikoru ile bir gece +4 °C'de bekletildikten sonra biyotinlenmiş sekonder antikor ile 30 dk enkübe edildi. Sekonder antikor Vector Elite ABC kit (Vector Laboratories Inc. Burlingame, USA) ile bağlandıktan sonra antikor-biyotin-avidin-peroksidaz kompleksi %0.02'lik 3,3' diaminobenzidine (DAB) solüsyonu kullanılarak görünür hale getirildi. Harris hematoksilen (Surgipath 01562Europe LTD, Cambridgeshire, USA) ile zemin boyaması yapıldıktan sonra kesitlerde görüntü analizleri yapıldı.

i- Alveoler Makrofaj Sayımı

Kesitler *toluidin blue* ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Her kesitin alveoler ve kapiller alanındaki makrofaj sayısı randomize 10 sahada 40 kat büyütürerek sayıldı (sayı/0,016 mm²).

ii- Apoptozisin Değerlendirilmesi

Sağ akciğer dokularından elde edilen üçer seri kesitte apoptozis, M-30 (*M-30 cyto death PEVIVA AB, Broma, Sweden*) immunhistokimyasal boyanması ile değerlendirildi. Kromatin yoğunlaşması, nükleer fragmantasyon, sitoplazmanın büzüşmesi ve apoptotik cisimlerin oluşumu apoptotik hücrelerin temel özellikleri olarak kabul edilerek kesitler incelendi. Kesitlerdeki M-30 pozitif hücre sayısının belirlenmesi için birim alandaki M-30 pozitif hücre sayısı x 40'lık büyütmede sayıldı (0,016 mm²). Apoptotik hücre sayısı ışık mikroskopunda M-30 pozitif hücre sayısı/0.016 mm² alan olarak hesaplandı.

iii- Görüntü Analiz Metodu

Boyama tamamlandıktan sonra kesitler ışık mikroskopunda (*Olympus BH-2 Tokyo, Japan*) incelendi ve görüntüler yüksek çözünürlüğe sahip kamera yardımıyla bilgisayara aktarıldı (*JVC TK-890E, Japan*) (*Aver TV Studio Video Capture Version 4.21.0.0, Aver Media Technologies, Inc.*). Bütün kesitler dijital olarak fotoğraflandı. Kesitlerden elde edilen görüntülerin incelenmesinde bilgisayarlı video kamera esaslı görüntü analiz yöntemi kullanıldı (*UTHSC Image software*). Tüm kesitler (her doku için en az 4 kesit) analiz edilerek; sadece boyamaya bağlı belirgin artefaktları olan kesitler değerlendirme dışı tutuldu.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme için *Statistical Package of Social Sciences 11*(SPSS) programı kullanıldı. Grupların MPO aktiviteleri, TBARS düzeyleri, alveoler makrofaj sayıları ve alveoler epiteliyal apoptotik hücre sayıları *tek yönlü varyans analizi* (ANOVA) ile değerlendirildi. İkili grup karşılaştırmaları ise *Mann-Whitney U* testi ile yapıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Her grupta 7 rat çalışmaya alındı; Kontrol ve Sevofluran Grubu'nda birer rat deney aşamasında ölmeleri nedeniyle çalışma dışı bırakıldı. Kontrol ve Sevofluran Grupları'nda altışar, İzofluran Grubu'nda 7 rattan elde edilen veriler istatistiksel olarak analiz edildi. Sonuçlar medyan (minimum, maksimum) olarak verildi.

I. Akciğer dokusu MPO aktiviteleri

Sevofluran Grubu'ndaki MPO aktivitesi Kontrol Grubu'na göre anlamlı derecede düşük saptandı ($p:0.041$). İzofluran Grubu'ndaki MPO aktivitesi Kontrol ve Sevofluran Grubu'na oranla anlamlı olarak yüksek saptandı (sırasıyla, $p:0.001$, $p:0.001$) (Tablo 1).

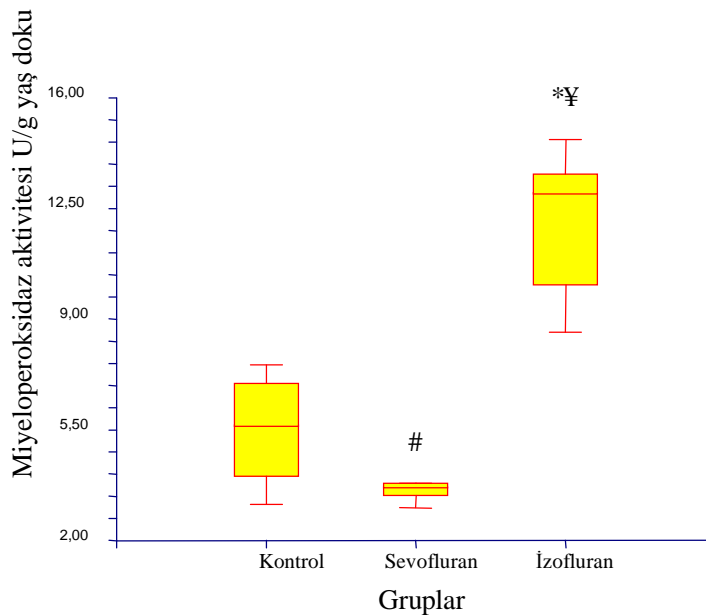
Tablo 1: Grupların akciğer dokusu miyeloperoksidaz aktivitesi (U/g yaş doku)

Grup	Minimum	Maksimum	Mediyan
Kontrol (n=6)	3.14	7.55	5.64
Sevofluran (n=6)	3.03	3.82	3.70#
İzofluran (n=7)	8.59	14.68	12.99*¥

$p:0.041$; Kontrol Grubu ile karşılaştırıldığında

* $p:0.001$; Kontrol Grubu ile karşılaştırıldığında

¥ $p:0.001$; Sevofluran Grubu ile karşılaştırıldığında



Grafik 1: Grupların akciğer dokusu miyeloperoksidaz aktiviteleri

p:0.041; Kontrol Grubu ile karşılaştırıldığında

* p:0.001; Kontrol Grubu ile karşılaştırıldığında

¥ p:0.001; Sevofluran Grubu ile karşılaştırıldığında

II. Akciğer dokusu TBARS değerleri

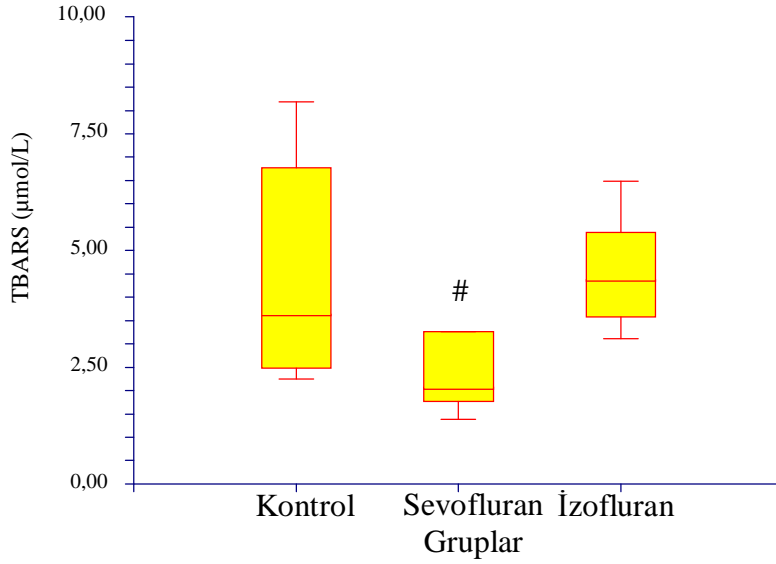
Sevofluran Grubu'ndaki TBARS düzeyi, Kontrol ve İzofluran Grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olarak saptandı (sırasıyla, $p:0.041$, $p:0.035$) (Tablo 2).

Tablo 2: Grupların akciğer dokusu *thiobarbituric acid reactive substance* düzeyleri ($\mu\text{mol/L}$)

Grup	Minimum	Maksimum	Median
Kontrol (n=6)	2.24	8.18	3.63
Sevofluran (n=6)	1.38	5.52	2.07 # *
İzofluran (n=7)	3.11	6.48	4.37

p:0.041, Kontrol Grubu ile karşılaştırıldığında

* p:0.035 İzofluran Grubu ile karşılaştırıldığında



Grafik 2: Grupların akciğer dokusunda *thiobarbituric acid reactive substance* düzeyleri

p:0.041, Kontrol Grubu ile karşılaştırıldığında

* p:0.035, İzofluran Grubu ile karşılaştırıldığında

III. Grupların kalp atım hızı (KAH), sistolik arteriyel kan basıncı (SAB), diyastolik arteriyel kan basıncı (DAB) değerleri:

Grupların zaman içindeki KAH (atım/dk), SAB (mm Hg) ve DAB (mm Hg)'in median (minimum, maksimum) değerleri ve istatistiksel anlamlılık düzeyleri aşağıdaki tabloda yer almaktadır (Tablo 3). İlerleyen zaman içinde gruplar arasında hemodinamik değerler açısından istatistiksel olarak bir fark saptanmamıştır.

Tablo 3: Grupların kalp atım hızı, sistolik arteriyel kan basıncı ve diyastolik arteriyel kan basıncı değerleri: [median (minimum, maksimum)]

Parametre	Grup	Zaman			
		Başlangıç	30.dk	60.dk	120.dk
KAH	Kontrol	344 (342, 346)	345 (341, 349)	346 (340, 347)	345 (341, 347)
	Sevofluran	343 (336, 345)	344 (342, 348)	345 (343, 348)	344 (342, 346)
	İzofluran	345 (342, 347)	346 (343, 350)	345 (340, 348)	346 (342, 349)
SAB	Kontrol	91 (88, 94)	90 (87, 94)	82 (80, 85)	78 (74, 80)
	Sevofluran	89 (86, 93)	88 (86, 92)	81 (79, 84)	76 (73, 80)
	İzofluran	90 (88, 93)	89 (85, 92)	80 (77, 84)	75 (72, 79)
DAB	Kontrol	61 (57, 63)	60 (57, 64)	54 (49, 57)	48 (43, 50)
	Sevofluran	60 (58, 65)	58 (53, 62)	52 (48, 56)	47 (45, 54)
	izofluran	59 (56, 64)	59 (53, 64)	53 (47, 55)	48 (44, 52)

IV. Grupların pH, P_aO₂ ve P_aCO₂ değerleri:

Gruplar arasında, başlangıç ve stabilizasyon sonrası alınan arteriyel kan gazlarındaki pH, P_aO₂ ve P_aCO₂ değerleri incelendiğinde, istatistiksel olarak bir fark saptanmamıştır. Değerler aşağıdaki tabloda gösterilmektedir (Tablo 4).

Tablo 4: Grupların pH, P_aO₂ ve P_aCO₂ değerleri: [mediyan (minimum, maksimum)]

Parametre	Grup	Zaman	
		Başlangıç	Stabilizasyon
pH	Kontrol	7.42 (7.40, 7.45)	7.40 (7.38, 7.41)
	Sevofluran	7.40 (7.38, 7.42)	7.39 (7.37, 7.43)
	İzofluran	7.39 (7.37, 7.42)	7.41 (7.39, 7.44)
PaO ₂	Kontrol	119 (108, 169)	139.3 (116, 159)
	Sevofluran	165 (113, 192)	116.4 (112, 146)
	İzofluran	153 (110, 177)	143.7 (109, 173)
PaCO ₂	Kontrol	38.2 (36.7, 40.1)	40.2 (38.7, 41.8)
	Sevofluran	37.5 (37.1, 41.2)	39.9 (37.5, 41,5)
	İzofluran	39.7 (38.8, 41.9)	40.2 (37.2, 41.7)

pH, P_aCO₂ (mmHg), P_aCO₂ (mmHg)

V. Alveoler makrofaj sayısı:

İzofluran Grubu'nda alveoler makrofaj sayısı Kontrol ve Sevofluran Grupları'na göre anlamlı derecede yüksek olarak saptandı (sırasıyla, $p:0.001$, $p:0.001$). Sevofluran Grubu'ndaki alveoler makrofaj sayısı da Kontrol Grubu'na göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p:0.002$) (Tablo 5).

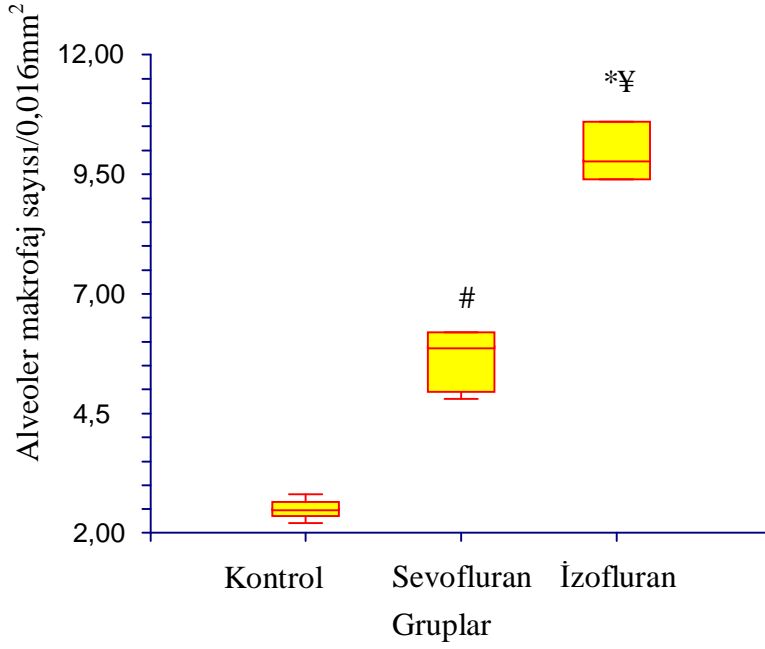
Tablo 5: Gruplardaki alveoler makrofaj sayıları (makrofaj sayısı/ 0,016 mm²)

Grup	Minimum	Maksimum	Mediyan
Kontrol (n=6)	2.20	2.80	2.50
Sevofluran (n=6)	4.80	6.20	5.90#
İzofluran (n=7)	9.40	10.60	9.80*¥

$p:0.002$; Kontrol Grubu ile karşılaştırıldığında

* $p:0.001$; Kontrol Grubu ile karşılaştırıldığında

¥ $p:0.001$; Sevofluran Grubu ile karşılaştırıldığında



Grafik 3: Grupların alveoler makrofaj sayıları

p:0.002; Kontrol Grubu ile karşılaştırıldığında

* p:0.001; Kontrol Grubu ile karşılaştırıldığında

¥ p:0.001; Sevofluran Grubu ile karşılaştırıldığında

VI. Alveoler Epiteliyal Apoptotik Hücre Sayısı

İzofluran Grubu'na ait M-30 pozitif hücre sayısı/ 0.016 mm² alan Kontrol ve Sevofluran Grubu'na oranla anlamlı olarak yüksek saptandı (sırasıyla, *p*:0.001, *p*:0.001). Sevofluran Grubu'ndaki apoptotik hücre sayısı da Kontrol Grubu'na oranla yüksek olarak saptandı (*p*:0.002). Grupların apoptotik hücre sayıları aşağıdaki tabloda gösterilmektedir (Tablo 6).

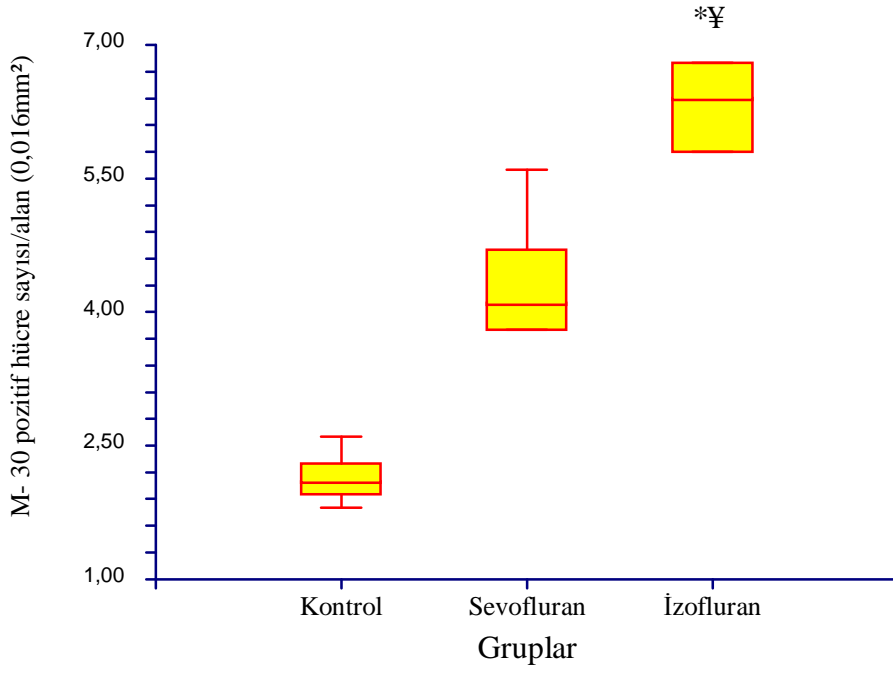
Tablo 6: Grupların M-30 pozitif hücre sayısı/0.016 mm² alan

Grup	Minimum	Maksimum	Medyan
Kontrol (n=6)	1.8	2.6	2.1
Sevofluran (n=6)	3.8	5.6	4.1#
İzofluran (n=7)	5.8	6.8	6.4*¥

p:0.002; Kontrol Grubu ile karşılaştırıldığında

* p:0.001; Kontrol Grubu ile karşılaştırıldığında

¥ p:0.001; Sevofluran Grubu ile karşılaştırıldığında



Grafik 4: Grupların M-30 pozitif hücre sayısı/0.016 mm² alan

p:0.002; Kontrol Grubu ile karşılaştırıldığında

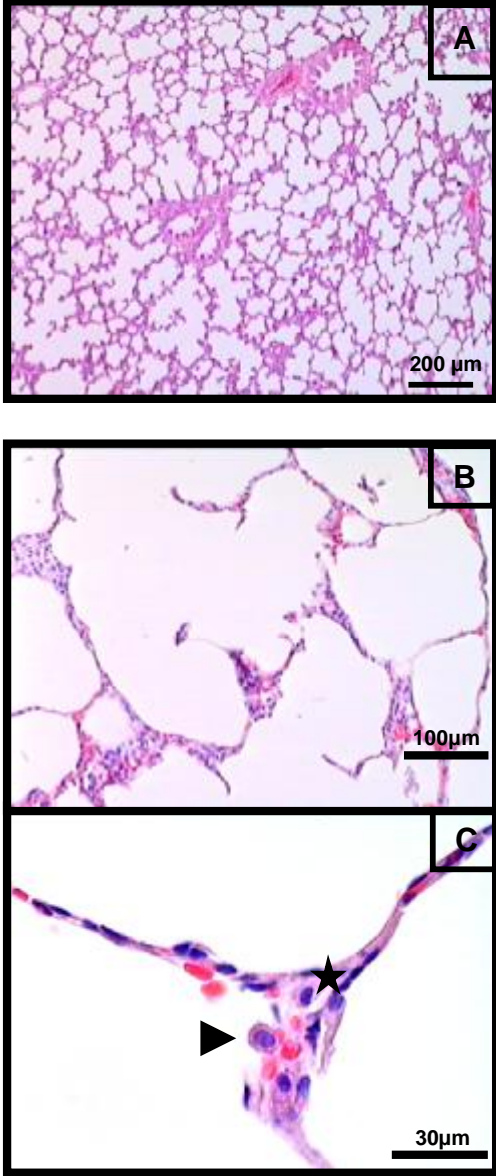
* p:0.001; Kontrol Grubu ile karşılaştırıldığında

¥ p:0.001; Sevofluran Grubu ile karşılaştırıldığında

VII. Histopatolojik Görüntüler

VII.a. Işık Mikroskopisi: Hematoksilen& Eosin ile boyama sonucu görüntüler

Kontrol Grubu : %50 O₂ + %50 hava ile 2 saat solutulan kontrol grubunda akciğerlerin yapısı normal olarak gözlemlendi (Resim 4).

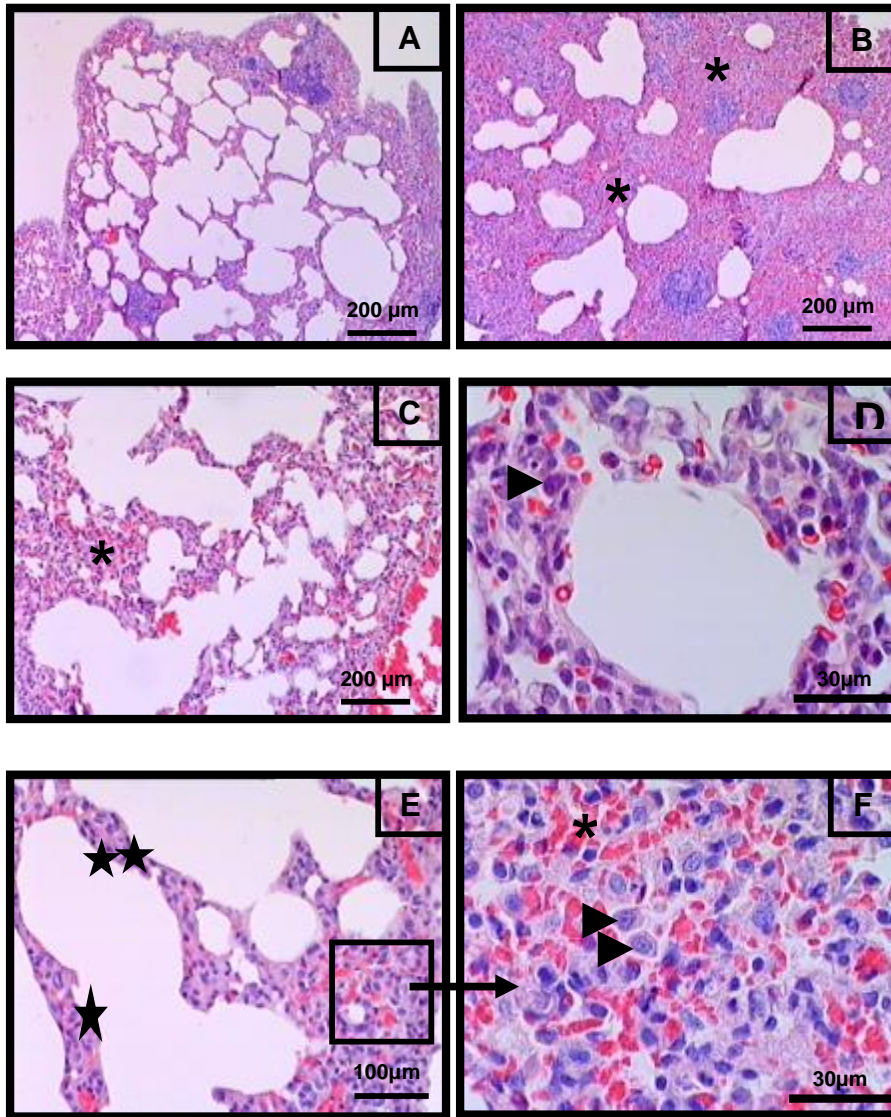


Resim 4: Kontrol grubunun farklı büyütmelelerdeki ışık mikroskopik görüntüleri: H&E;

A: x 4, B: x 10, C: x 40

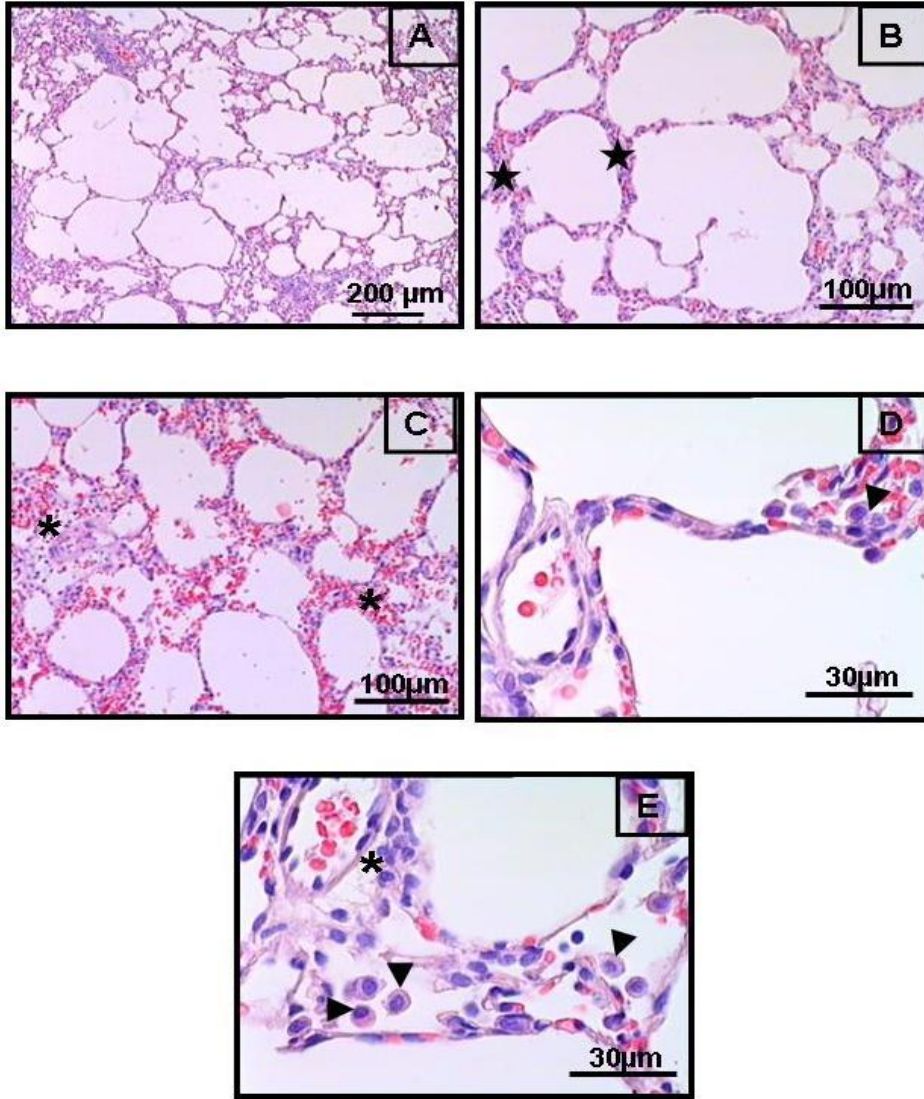
Resim 4: Kontrol grubunun farklı büyütmelelerdeki ışık mikroskopik görüntüleri: H&E;

İzofluran Grubu : %1.2 İzofluran (1 MAK) +%50 O₂ + %50 hava ile 2 saat süreyle solutulan grupta ise Kontrol Grubu ile karşılaştırıldığında yaygın akut akciğer hasarı gözlemlendi. Bu grupta yaygın mononükleer hücre infiltrasyonu saptandı. Alveollerin histopatolojik olarak değerlendirilmesinde diffüz alveoler hasar, alveoler ödem, alveoler septumlarda kalınlaşma, alveol lümeninde yoğun alveoler makrofaj ve daha az miktarda nötrofil ve tip II pnömositler gözlemlendi. Parankim incelendiğinde yaygın hemoraji, mononükleer hücre infiltrasyonu, ödem ve vasküler konjesyon saptandı (Resim 5).



Resim 5: İzofluran Grubu'nun farklı büyütme ölçeklerindeki ışık mikroskopik görüntüleri H&E; **A+B+C:** x 4, **D+F:** x 40, **E:** x 10. (*) intraparakimal mononükleer hücre infiltrasyonu, hemoraji, ödem ve vasküler konjesyondaki artışı,

Sevofluran Grubu: % 2.4 Sevofluran (1 MAK) + %50 O₂ + %50 hava ile 2 saat süreyle solutulan grup, İzofluran Grubu ile karşılaştırıldığında daha az oranda akut akciğer hasarı gözlemlendi. Alveollerin değerlendirilmesinde alveoler ödem, alveoler septumlarda kalınlaşmaya daha az rastlandı. Alveol lümeninde İzofluran Grubu'nda yoğun olarak görülen alveoler makrofaj, nötrofil ve tip II pnömositler daha az miktarda gözlemlendi. Parankim incelemesinde; izofluran grubunda yoğun olarak görülen yaygın hemoraji, mononükleer hücre infiltrasyonu, ödem ve vasküler konjesyon daha az oranda saptandı (Resim 6).



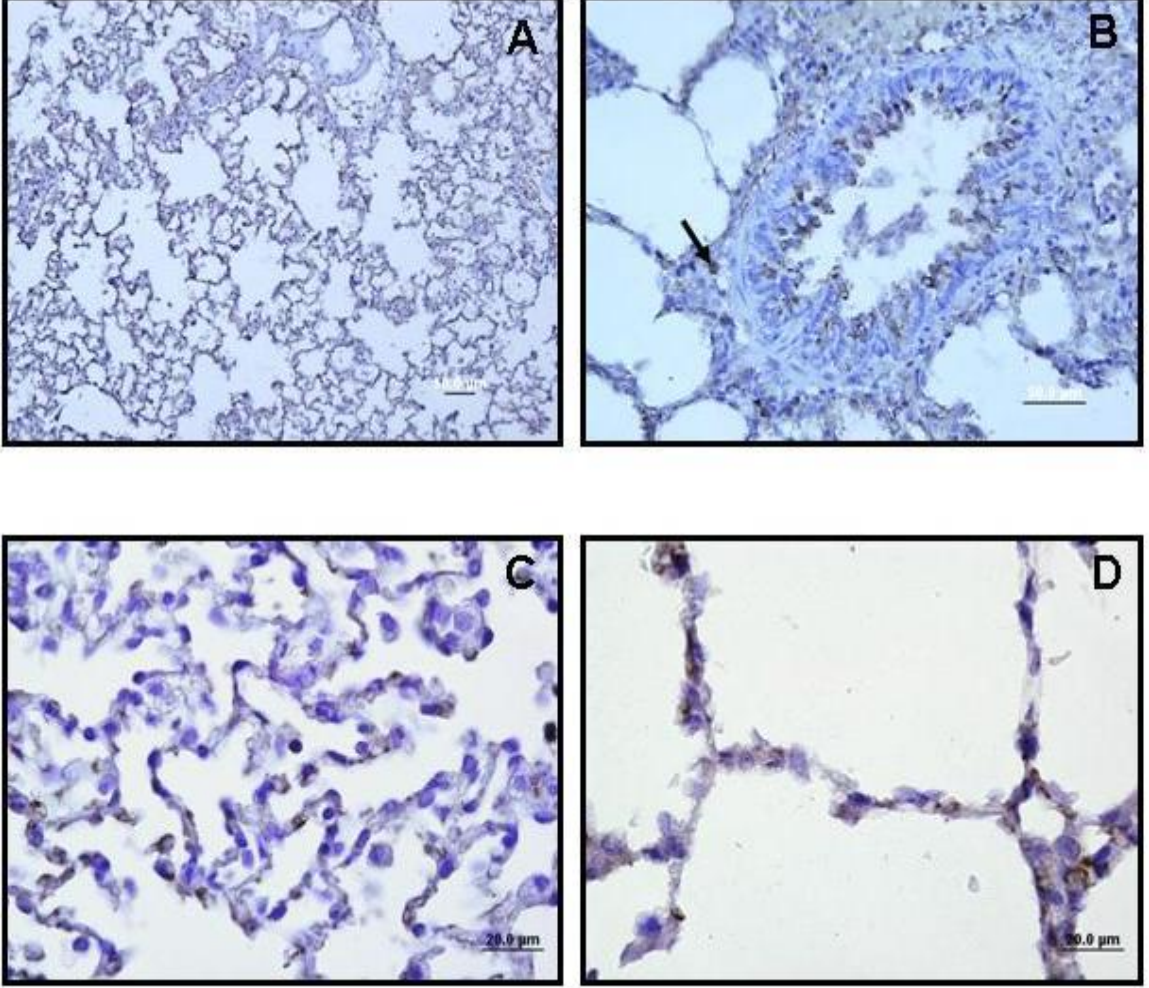
Resim 6: Sevofluran grubunun farklı büyütme ölçeklerindeki ışık mikroskopik görüntüleri. H&E; **A:** x 4, **B** ve **C:** x 10, **D** ve **E:** x

(*) intraparankimal mononükleer hücre infiltrasyonu, hemoraji ve vasküler konjesyondaki artışı

(▶) alveoler makrofajları, (O) interalveoler septum kalınlaşmasını göstermektedir

VII.b Işık mikroskopisi: M 30 antikoruna boyama sonucu görüntüler

Kontrol Grubu :

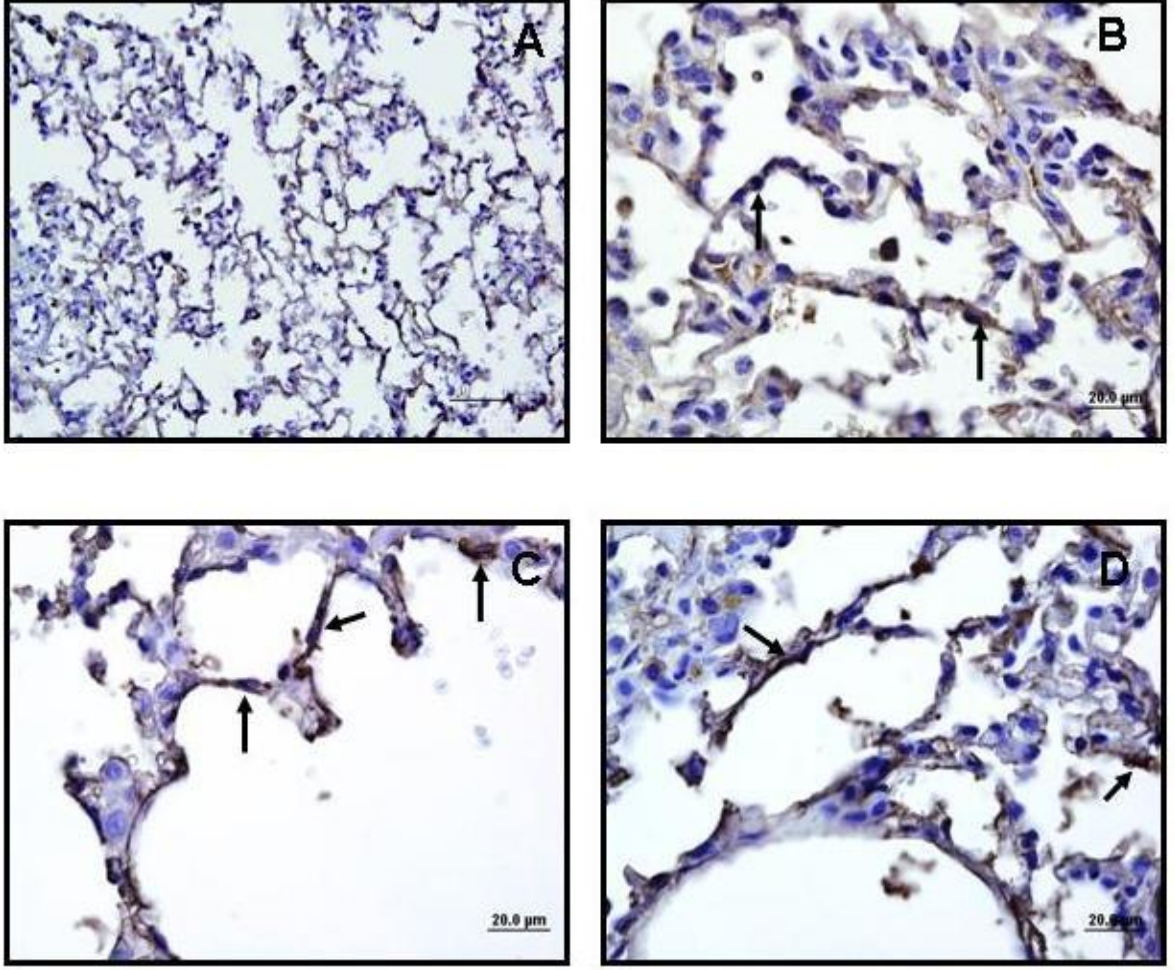


Resim 7: Kontrol grubunun M-30 pozitif hücre görüntüleri.

A: x 4, **B:** x 20, **C** ve **D:** x 40

(→) işareti; M30 antikoruna boyanan apoptotik hücreyi göstermektedir.

Sevofluran Grubu :

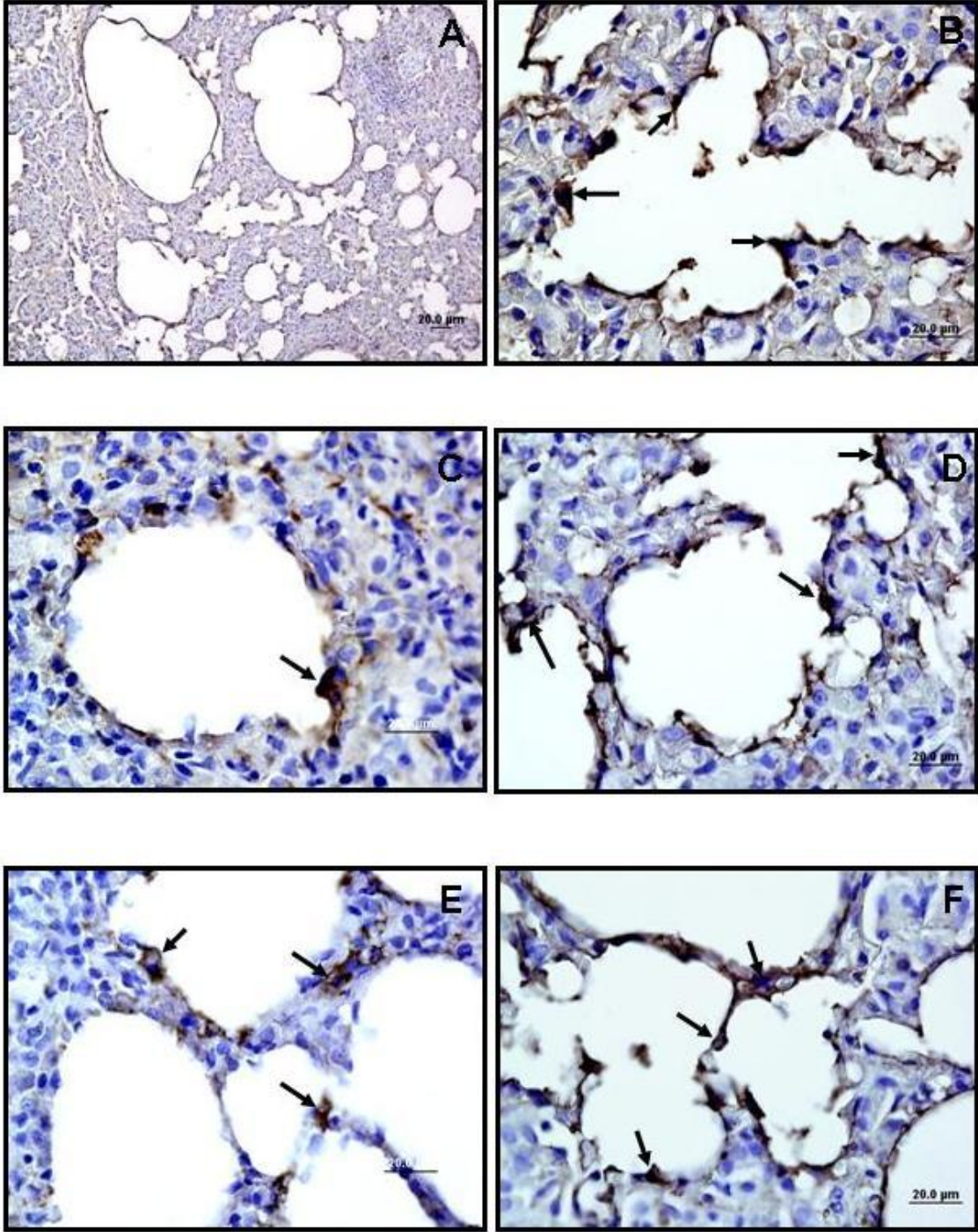


Resim 8: Sevofluran grubunun M-30 pozitif hücre görüntüleri.

A : x 4, **B,C** ve **D:** x 40

(→) işareti; M30 antikoru ile saptanan apoptotik hücreyi göstermektedir.

İzofluran Grubu :



Resim 9: İzofluran grubunun M-30 pozitif hücre görüntüleri.

A: x 4, B,C ve D: x 40.

(→) işareti; M30 antikoruna ile saptanan apoptotik hücreyi göstermektedir

TARTISMA

Kompleks bir süreç olan akut inflamatuvar akciğer hasarının patofizyolojisinde, aktive nötrofillerden salınan proinflamatuvar sitokinler ve nötrofil proteazları gibi çeşitli mediyatörlerin endotelial hücrelerde oluşturdukları hasar rol almaktadır. Akut akciğer hasarındaki nötrofil aktivasyonunu saptamak için miyeloperoksidaz aktivitesi ve lipid peroksidasyonu göstergesi olan tiyobarbitürik asit ile reaksiyona giren maddelerin düzeyinin ölçümü kullanılmaktadır^{37,38}. Çalışmamızda İzofluran Grubu'ndaki yüksek MPO düzeyleri, bu gruptaki yaygın bir akciğer dokusu inflamasyonunun varlığını işaret etmektedir. Bu grupta ışık mikroskopisi ile görüntüleme, birim alanda çok sayıda alveoler makrofaj saptanmış ve alveoler septaların destrükte olduğu gözlenmiştir. Alveoler yapının bozulması da, bu grupta yoğun bir akciğer dokusu inflamasyonunun oluştuğunu göstermektedir. Sevofluran Grubu'ndaki MPO değerlerinin diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olması, alveoler makrofaj sayısındaki artışın İzofluran Grubu'ndakine göre anlamlı ölçüde daha az olması ve ışık mikroskopisinde alveoler yapının kısmen korunmuş olması, sevofluranın izofluran kadar belirgin bir inflamatuvar akciğer hasarına neden olmadığı şeklinde bir yoruma neden olabilir.

Çalışmamızda Sevofluran Grubu'nda TBARS düzeyi Kontrol ve İzofluran Grubu'na göre anlamlı ölçüde düşük olarak saptanmıştır. Bu bulgu, Sevofluran Grubu'nda lipid peroksidasyonunun dolayısıyla hücre membranı hasarlanmasının daha az olduğunu göstermektedir. Sevofluran Grubu'ndaki istatistiksel olarak anlamlı düşük TBARS düzeyleri, sevofluran uygulamasının inflamatuvar akciğer olaylarında koruyucu olabileceği sonucunu doğrulamaktadır.

Akciğerler, inhalasyon anesteziğin alımının ve eliminasyonunun gerçekleştiği yerdir ve inhalasyon anesteziğin alveoler epiteliyal permeabiliteye etkisinin olduğu düşünülmektedir. Wollmer ve ark.'ları³⁹ yaptıkları çalışmalarında halotan ve izofluran ile solutulan hastalarda akut akciğer hasarını *Technetium-99m labeled diethylene triamine pentaacetic acid (Tec-99m DTPA)* akciğer sintigrafisi yöntemi ile saptamayı amaçlamışlardır. Bu çalışmanın sonunda izofluran ile solutulan hasta grubunda postoperatif 1. saatte alveolo-epiteliyal permeabilitede anlamlı bir artış saptamışlardır. Operasyondan 1 hafta sonra çekilen

akciğer sintigrafisinde ise sintigrafi bulgularının preoperatif normal düzeylerine ulaştığını göstermişler ve hasarlanmamın geçici olduğu üzerinde durmuşlardır. Halotan ve kontrol grubunda ise alveolo-epitelial permeabilitede anlamlı bir artış saptamamışlardır.

Alveoler Tip II hücrelerin (ATII), alveoler homeostazı sağlayan pek çok önemli fonksiyonları vardır. Akciğer hasarı sonrasında alveoler sürfaktan sentezi ile alveoler duvarın re-epitilizasyonunu ve transepitelial sıvı geçişini sağlamaktadırlar. Alveoler sürfaktan düşük akciğer volümlerinde alveol kollapsını ve alveoler alana sıvı geçişini engelleyerek akciğer ödemi önlemektedir. Sürfaktan aynı zamanda pulmoner antibakteriyel savunma sisteminin de bir elemanıdır. Bundan dolayı tip II alveoler hücreler akciğerin normal fonksiyonlarının sağlanmasında oldukça önemli bir role sahip olup, inhalasyon anestezi ajanlarının indüklemesi sonucu metabolizmalarında herhangi bir değişiklik oluşması postoperatif pulmoner komplikasyon gelişmesini kolaylaştırmaktadır. Ancak inhalasyon anesteziğinin ATII hücreleri üzerine olan etkileri henüz tam aydınlatılamamıştır⁴⁰.

Molliex ve ark.'ları⁴⁰ ATII hücrelerini izoflurana 4 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda (%1, %2, %4 ve %6) ve %1 konsantrasyonda farklı sürelerde (2, 4, 8, ve 12 saat) maruz bırakmışlardır. Sürfaktan biyosentezinin bir göstergesi olarak fosfatidil kolin düzeyine bakmışlardır. Çalışmada 2, 4, 8 ve 12 saat süreyle %1 konsantrasyonda izofluran ile solutulan gruplarda fosfatidilkolin sentezinde sırasıyla %13, %14, %19 ve %24 oranında azalma saptanmıştır. 4 saat süreyle %1, %2, %4 ve %6 konsantrasyonda solutma sonucunda ise fosfatidilkolin sentezinde sırasıyla %14, %18, %23 ve %32 oranında azalma saptanmıştır. İzofluranın fosfatidilkolin sentezi üzerine inhibitör etkisinin hızla geri döndüğünü belirtmişlerdir. Öyle ki; %1 izofluran uygulamasının sonlandırılmasından 1 saat sonraki fosfatidilkolin düzeyi %82 iken ikinci saatin sonunda bu düzey %92'ye çıkmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. İnhalasyon anesteziğinin laktat üretimini artırması sonucunda da NAD-bağımlı substratların mitokondriyal oksidasyonunu inhibe etmesinin hücre ATP içeriğini azattığını belirtmişlerdir⁴⁰.

Hu ve ark.'larının⁴¹ izole akciğerler üzerinde yaptıkları bir araştırmada, akciğerler 30 dakika süreyle oda havası, 1 ve 2 MAK izofluran ve sevofluran ile solutulmuştur. İnhalasyon anesteziğinin kapiller albumin geçişine etkilerini radyoaktif işaretli ¹²⁵I-albumin ile

araştırılmışlardır. Sonuçta 2 MAK izofluran uygulanan akciğerlerde %48 ¹²⁵I-albumin geçişi artışı saptanırken, 1 MAK izofluran ve sevofluran ve 2 MAK sevofluran uygulanan akciğerde ¹²⁵I-albumin geçişinde herhangi artış saptamamışlardır. Yine Hung⁴² ile ChangLai ve ark'larının¹⁹ çalışmalarında izofluranın alveolar epiteliyal permeabilite artışına yol açtığı gösterilmiş ve geçici akciğer hasarına neden olduğu belirtilmiştir. Bu artışta ise inhalasyon anesteziğin alveoler sürfaktanı destabilize etmelerinin etkisi olabileceği üzerinde durulmuştur³⁹. Çalışmamızın sonuçları, yukarıdaki izoflurana bağlı gelişen akciğer hasarı ile ilgili çalışmaların sonuçlarını desteklemektedir.

Özellikle yoğun bakım hastalarında gözlenen akut akciğer hasarı hala %40-50 oranında mortaliteye sahiptir. Her ne kadar ALI'ye pek çok neden yol açsa da, sürfaktan sentezindeki disfonksiyon da patogeneze rol oynamaktadır. Yapılan deneysel çalışmalar, olgu sunumları ve insan çalışmalarında ALI/ARDS'de eksojen sürfaktan uygulamasının gaz değişiminde iyileşmeye yol açtığı görülmüştür⁴³.

Bizim çalışmamızda gruplar arasında arteriyel kan gazındaki pH, P_aO₂ ve P_aCO₂ değerleri arasında herhangi bir fark saptanmamıştır. Belki sürenin 2 saat ile sınırlı kalması pulmoner gaz değişiminin etkilenmesi açısından kısıtlı bir süre olarak kalmış olabilir. İnhalasyon anesteziğinin pulmoner gaz değişimi üzerine olan etkileri daha uzun süreli bir çalışma ile incelenebilir.

Spragg ve ark.'larının⁴⁴ yaptığı çalışmada bir grup ALI hastasına standart tedavi uygulanmış, bir gruba ise standart tedaviye ilave olarak sürfaktan verilmiştir. Sonuçta sürfaktan verilen grupta anlamlı ölçüde IL-6 düzeyinde azalma saptanmıştır. Bu bulgu sürfaktanın anti-inflamatuvar etkisini desteklemektedir. Sonuç olarak inhalasyon anesteziği uygulaması sonucunda sürfaktan yapımının azalmasına bağlı olarak inflamatuvar yanıtta bir artış beklenebilir ve dolayısıyla hücre hasarında artış meydana gelebilir.

Anestezi ve major cerrahi sonrası inflamatuvar stres yanıt ve postoperatif immunsupresyon periferik T hücre lenfopenisi ve lökositoz ile karakterizedir. Son yıllarda genel anesteziğin inflamatuvar stres yanıtını değiştirebildiği gösterilmiştir. Bu da enfeksiyöz komplikasyonlara duyarlılık, sistemik inflamatuvar yanıt sendromu ve sepsis ile

sonuçlanabilir. Anesteziklerin lenfosit sayısı ve fonksiyonlarını nasıl etkiledikleri konusunda çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Halotan ve nitroz oksit gibi inhalasyon ajanları uygulanan hastalarda periferik lenfopeni oluşmuştur²⁹. Oysa sevofluran, tersine bir etki göstererek lenfosit sayısını artırırken nötrofil sayısını azaltmıştır. Diğer bir çalışmada sevofluranın, minimal invaziv cerrahi boyunca nötrofil apoptozisi oranlarını etkilemediği gösterilmiştir⁴⁵.

Tüm bu çalışmaların yanında inhalasyon anesteziklerinin inflamasyondan koruyucu etkilerini gösteren çalışmalar da vardır. Suter ve ark.'ları³¹ sevofluranın lipopolisakkaride bağlı gelişen akut akciğer hasarında nötrofil akümülyasyonunu ve adezyonunu azalttığını, inflamatuvar mediyatörlerin üretimini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Bu çalışmalarında *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), *macrophage inflammatory protein-1 β* (MIP-1), *macrophage inflammatory protein-2* (MIP-2) düzeylerine bakmışlardır. Öncesinde 30 dakika %1.1 sevofluran uygulanan alveoler hücre kültüründe, lipopolisakkarid verildikten 1, 3, 5, 12 ve 24 saat sonra MCP-1 ekspresyonunda anlamlı azalma saptamışlardır. Lipopolisakkarit uygulamasından 5 saat sonra MIP-1 β düzeyinde %24, MIP-2 düzeyinde ise 7 saat sonra %22 azalma olduğunu göstermişlerdir.

Plachinta ve ark.'ları³² intravenöz lipopolisakkarit uygulamasından 30 dakika önce %1.4 izofluran uygulamasının endotel aracılı vazodilatasyonu, asidozu ve TNF- α konsantrasyonundaki artışı azalttığını göstermişlerdir. Böylece izofluranın inflamatuvar hücre hasarında koruyucu etkili olabileceği sonucuna varmışlardır. Bizim çalışmamızda ise inhalasyon anestezikler sağlıklı akciğerlere uygulandı ve izofluran grubunda daha belirgin olmak üzere yaygın inflamatuvar yanıt ile karşılaştık. İzofluranın fosfatidilkolin sentezi üzerine inhibitör etkisinin hızla geri döndüğünün⁴⁰ ve sevofluran ve izofluranın önceden hasarlanmış akciğerlerde antiinflamatuvar etki gösterdiklerinin saptanmış olması^{31,32} inhalasyon anesteziklerinin inflamasyon ile ilgili etkilerinin hasarlı ve sağlıklı akciğerlerde zamana bağlı olarak karşılaştırılması gerektiğini doğurmaktadır.

Loop ve ark.'larının⁴⁶ yaptığı çalışmada sevofluran ve izoflurana maruz kalan CD3 T lenfositler ve Jurkat T lenfositlerin apoptozise uğradığı, bunun ise kaspaz 3 aktivasyonu yoluyla olduğu gösterilmiştir. Ancak desfluranın lenfositler üzerinde herhangi bir apoptotik etkisi olmadığı görülmüştür. Sevoflurana maruz kalan T hücrelerinin mitokondriyal

fraksiyonunun sitokrom-c içeriğinde küçük ancak anlamlı azalma tespit edilmiştir. Bu veriler, sevofluranın T hücrelerinde apoptozis indüksiyonu için mitokondriyal sinyal yolağını kullandığını göstermektedir.

Mitsuhata ve ark.'ları⁴⁷ yaptıkları çalışmada *in vitro* T hücre kültürünü %1.7 sevofluran ve %1.15 izoflurana maruz bırakmışlardır. Çalışmalarının sonunda hem sevofluran hem de izofluranın *in vitro* olarak T hücre kültüründe doza ve zamana bağımlı olarak apoptozise neden olduğu sonucuna ulaşılmışlardır. 24 saat süreyle 1.0 ve 1.5 mM konsantrasyonda ve 12 saat süreyle 1.5 mM konsantrasyonda izofluran uygulaması sonucu apoptotik lenfosit yüzdesini sevoflurana göre anlamlı ölçüde yüksek olarak saptmışlardır. Bu sonuca göre izofluranın lenfositotoksik potensinin eşmolar likit konsantrasyonda sevoflurana göre daha fazla olduğu sonucuna varmışlardır.

İnhalasyon anesteziklerinin lenfosit apoptozisine yol açışının mekanizması açıklanamamıştır. *In vitro* olarak periferik plazma mononükleer hücre kültüründe, inhalasyon anesteziklerinin sitokin salımını inhibe ettiği bildirilmiştir⁴⁷. Ancak inhalasyon anesteziklerinin Fas-Fas ligand etkileşimini direkt etkisi hakkında çalışma bildirilmemiştir. Aksine *in vitro* ve klinik çalışmalarda izofluranın genotoksik etkisi olduğu rapor edilmiştir^{48,49}. Bu çalışmalara göre izofluranın ve sevofluranın T lenfositleri inhibe etmesi sonucu sitokinlerin salımının azalmasına bağlı olarak inflamasyonun dolayısıyla hücre hasarının azalması beklenmektedir. Ancak çalışmamızda Sevofluran ve daha fazla olmak üzere İzofluran Grubu'nda yaygın olarak alveoler epiteliyal apoptozis ve alveoler makrofaj aktivasyonunda artış saptanmıştır. Bu farklılık anestezi uygulama süresindeki farklılıktan kaynaklanabilir. Çünkü çalışmacılar 12 ve 24 saat süreyle sevofluran ve izofluran uygulaması sonrasında bu sonuçlara ulaşmışlardır, biz ise süreyi 2 saat ile sınırlı tuttuk. İnhalasyon anesteziklerine bağlı lenfosit inhibisyonunun dolayısıyla da anti-inflamatuvar özelliklerinin daha baskın hale gelmesi uygulama zamanı ile ilgili olabilir.

Nötrofillerdeki apoptozisin gecikmesi kısmen de olsa postoperatif nötrofiliyi açıklamaktadır. İnhalasyon anesteziklerin nötrofil apoptozisinde inhibisyon yapan mekanizması henüz açıklanmış değildir ancak sevofluran uygulamasından sonra gözlenen nötrofil apoptozisinin, mitokondriyal depolarizasyona bağlı olarak geliştiği gözlemlenmiştir.

Ancak nötrofil apoptozisinin inhibisyonu için inhalasyon anesteziğinin yanında, hücre ölümü yolağında sitoplazmik kalsiyum, kaspaz aktivitesi ve protein kinaz-C gibi ögeler gerekmektedir⁵⁰.

Önceki çalışmalar inhalasyon anesteziğinin makrofaj agregasyonunu ve akciğerlerdeki proinflatuvar sitokinlere ait gen ekspresyonunu artırdığını göstermiştir^{30,51-3}. Domuzlarda bir gruba intravenöz tiyopental, diğer gruba ise 1.5 MAK konsantrasyonunda sevofluran uygulanmıştır. Venöz kanda lökosit sayımı ve bronkoalveoler lavaj sıvısında (BAL) prostoglandin E2 (PGE2), tromboksan B2 (TxB2) ve lökotrien B4 (LTB4) ölçümü yapılmıştır. Tiyopental grubunda BAL'da, TxB2 ve LTB4 düzeyi kontrole göre yüksek bulunurken, sevofluran grubu ile kontrol grubu arasında BAL'da PGE2, LTB4 ve nitrik oksit (NO₂) düzeyleri arasında fark saptanmamıştır. Kan nötrofil ve lenfosit sayısı sevofluran grubunda tiyopental grubuna göre önemli ölçüde azalmış olarak saptanmış fakat iki grupta da kan lökosit sayıları 2 saat içinde bazal değerlerine dönmüştür¹⁰.

PNL'ler patojen mikroorganizmaları fagositoz ile yok etmede major hücreler olup yüksek miktarda reaktif oksijen radikali üretirler. Pek çok proinflatuvar madde ve kimyasal uyarı PNL'lerde serbest oksijen radikali üretilmesine neden olabilir. Bir araştırmada çalışmacılar oksidatif stres ve hücre hasarını değerlendirmede; intraselüler hidrojen peroksit, süperoksit ve nitrik oksit (NO) üretimi, intraselüler glutatyon içeriği, mitokondriyal transmembran potansiyelinde azalma, kaspaz 3/7'nin aktivasyonu ve apoptozis belirteçlerini kullanmışlardır⁵⁴. Çalışmada 1 saat süreyle %1 ve %3 sevoflurana maruz bırakılan her iki grubun PNL'lerinde intraselüler serbest oksijen radikali ve nitrik oksit düzeyi anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. Bir antioksidan olan glutatyon düzeyinde, mitokondriyal transmembran potansiyelinde ve kaspaz 3/7 düzeyinde ise anlamlı ölçüde azalma saptanmıştır. 2 saat süreyle %1 konsantrasyonda sevofluran uygulaması sonrası apoptotik hücrelerin oranı %1.95'ten %6.01'e çıkarırken, %3 konsantrasyonunda sevofluran uygulaması sonucunda ise apoptotik hücre oranı ise %10.08'e çıkmıştır. Yine aynı çalışmada %3 konsantrasyonda 1 ve 1.5 saat süreyle sevoflurana maruziyet sonucunda DNA hasar skoru araştırılmıştır. Kontrol grubunda DNA hasar skoru 83 +/- 4 iken, 1 saat sevofluran uygulaması sonunda 165 +/- 5 ve 1.5 saatin sonunda ise 196 +/- 9 olarak bulunmuştur⁵⁴.

Kotani ve ark.'larının⁵³ yaptığı çalışmada %1-1.5 konsantrasyonda izofluran ile solutulan olgulardan alınan bronkoalveoler lavajın hücre içerikleri incelenmiştir. BAL örnekleri indüksiyondan hemen sonra, peroperatif 2., 4., 6. saatte ve operasyonun sonunda alınmıştır. Sonuçta izofluran ile solutulan olgularda ilerleyen zamanla nötrofil sayısında anlamlı bir artış, ancak makrofaj sayısında anlamlı bir azalma saptanmıştır. Bu değişiklikler özellikle 4. saatten sonra meydana gelmiştir. Bizim çalışmamızda ise izofluran grubunda daha fazla olmak üzere izofluran ve sevofluran gruplarında anlamlı düzeyde yüksek alveoler makrofaj saptandı. Ancak belirgin bir nötrofil birikimine rastlanmadı. Bu çelişkili bulgu deney süremizin 4 saatten kısa olup 2 saat ile sınırlı olmasına bağlı olabilir.

Apoptotik lökositler, doku makrofajlarının spesifik yüzey reseptörleri tarafından tanınmakta ve fagosite edilmektedir. Ancak bu süreç oldukça hızlı olduğundan inflamasyonlu dokuda görünebilir apoptotik lökosit sayısı genellikle düşük olarak saptanır. Apoptotik PNL hücreleri hematoksilen eozin boyama ile kendine özgü nükleer boyama ile tanınabilir. İlginç bir şekilde bazı örneklerin elektron mikroskopik incelenmesinde, %30'tan fazla makrofajın içinde PNL'in miyeloperoksidaz granülleri gibi spesifik hücre kalıntıları görülebilmektedir. Bu bulgu aktive alveoler makrofajların apoptotik PNL'leri hızlı bir şekilde içine aldığını göstermektedir⁷. Çalışmamızda apoptotik PNL'lerin fagosite edilmesi nedeniyle, ışık mikroskopunda PNL'den ziyade çok sayıda alveoler makrofajın görülmesi yukardaki bulguları açıklayabilir.

Topouzova ve ark.³³, alveoler epiteliyal hücreleri in vitro olarak 3 mM halotana maruz bıraktıklarında DNA ve hücre hasarına neden olduğunu saptamışlardır. Bu hasarın apoptotik hücre ölümüne neden olabileceğini belirtmişlerdir. Bu hücrelerin apoptotik ölüm mekanizmalarının ekstrensek, intrensek, kaspaz bağımlı veya bağımsız sinyal yolları ile ilgili olabileceğini ve bu konunun araştırılması gerektiğini belirtmişlerdir. Bu çalışma dışında literatürde alveoler epiteliyal apoptosis üzerine inhalasyon ajanlarının etkisi ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda İzofluran ve Sevofluran Grupları'ndaki apoptotik hücre sayılarının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olması, sevofluranın ve özellikle izofluranın akciğer epiteliyal hücrelerinde apoptotik hücre ölümüne neden olduklarını göstermektedir. Çalışmamızda inhalasyon anesteziğine maruziyet sadece 2 saat

ve anestezi konsantrasyon 1 MAK olup, farklı süre ve konsantrasyonlar kullanılarak ileri çalışmalar yapılabilir.

Çalışmamızda izoflurana bağlı akciğer dokusu MPO aktivitesinin diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek olması ve TBARS düzeyinin Sevofluran Grubu'na göre yüksek olması nedeniyle, izofluranın akut akciğer inflamasyonuna daha fazla neden olduğu sonucuna varılmıştır. İzofluran Grubu'ndaki TBARS düzeyi Kontrol Grubu'na göre yüksek olarak saptanmış fakat bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildir. İzofluran Grubu'ndaki alveoler makrofaj ve epiteliyal apoptotik hücre sayılarının diğer gruplara göre anlamlı ölçüde fazla oluşu izofluranın daha fazla alveoler makrofaj aktivasyonuna ve apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu düşündürmektedir. Sevofluranın izoflurana göre daha az pulmoner makrofaj aktivasyonuna ve apoptozise neden olması ve sevofluran grubunda kontrol grubuna göre daha düşük pulmoner MPO aktivitesi ve TBARS düzeyi saptanmış olması nedeniyle, sevofluranın antiinflamatuvar etkinlik gösterdiği söylenebilir. Çalışmamız sağlıklı rat akciğerlerinde yapıldığı için, akciğer hastalıklarına sahip hastalarda inhalasyon ajan seçime yol göstermesi amacıyla, önceden pulmoner inflamatuvar hastalık varlığında yapılacak ileri çalışmalara gereksinim vardır.

SONUC VE ÖNERİLER

Bu deneysel çalışmada; bir grup rat %1.2 izofluran (1 MAK) ve diğer grup rat ise %2.4 sevofluran (1 MAK) ile 2 saat süreyle solutularak kendi aralarında ve kontrol grubuyla histopatolojik ve biyokimyasal olarak karşılaştırılmıştır. İzofluran Grubu ratların akciğer dokularında MPO aktivitesi, alveoler makrofaj ve apoptotik hücre sayıları Kontrol ve Sevofluran Grubu'na göre belirgin olarak yüksek olarak saptanmıştır. Bununla beraber ışık mikroskobu ile yapılan incelemede yaygın alveoler hasarın gözlenmesi, bize İzofluran Grubu'nda ileri derecede bir inflamasyonun oluştuğunu düşündürmektedir. Sevofluran Grubu'nda ise akciğer dokusu TBARS düzeyleri Kontrol ve İzofluran Grubu'na göre daha düşük olarak saptanmıştır. Aynı zamanda Sevofluran Grubu'nda, İzofluran Grubu'na göre alveoler makrofaj ve apoptotik hücre sayılarının daha az olması, ışık mikroskopik incelemede daha az alveoler hasarın saptanması, sevofluranın antiinflamatuvar etkisinin olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Çalışmamızda sağlıklı ratlarda sadece 2 saat süreyle ve 1 MAK konsantrasyonda inhalasyon ajanı kullanılmıştır. İnhalasyon ajanlarının zamana bağlı ve inflamatuvar akciğer hastalıklarındaki etkilerinin incelenmesi için, sağlıklı ve inflame akciğerlerde yapılacak ileri çalışmalara gerek vardır.

KAYNAKLAR

1. Staub NG, Hyde RW, Crandall E. Workshop on techniques to evaluate lung alveolar microvascular injury. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 1071-7.
2. Dueck R, Young I, Clausen J, Wagner P. Altered distribution of pulmonary ventilation and bloodflow following induction of inhalational anesthesia. *Anesthesiology* 1980;52: 113-25
3. Milic-Emili J, Robatto FM, Bates JH. Respiratory mechanics in anaesthesia. *Br J Anaesth* 1990;65: 4-12.
4. Kayhan Z, Yoğun bakım- sorunlar ve tedavi: Klinik Anestezi, 3. baskı, Ankara: Logos Yayıncılık Tic.AŞ; 2004: 866-8
5. Goraca A, Okonkwo G. Protective effects of early treatment with lipoic acid in LPS induced lung injury in rats. *Journal of physiology and pharmacology* 2007;58: 541-9.
6. Akca T, Canbaz H, Tataroglu C et al. The effect of *N*-Acetylcysteine on pulmonary lipid peroxidation and tissue damage. *Journal of Surgical Research* 2005;129: 38–45
7. Martin T, Hagimoto N, Nakamura M et al. Apoptosis and epithelial injury in the lungs. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2: 214-20
8. Hassoun HT, Kone BC, Mercer DW et al. Post-injury multiple organ failure: the role of the gut. *Shock* 2001; 15:1-10
9. Mainus MR, Ertel W, Chaudry IH et al. The gut: a cytokine-generating organ in systemic inflammation? *Shock* 1995;4:193-9
10. Takala RS, Soukka HR, Salo MS et al. Pulmonary inflammatory mediators after sevoflurane and thiopentone anaesthesia in pigs. *Acta anaesthesiol Scand* 2004;48: 40-5

11. Liu R, Ishibe Y, Ueda M. Isoflurane- sevoflurane administration before ischemia attenuates ischemia–reperfusion induced injury in isolated rat lungs. *Anesthesiology* 2000; 92: 833-40.
12. Morgan EG, Mikhail SM, Murray MJ, İnhalyasyon anesteziikleri: Klinik Anesteziyoloji. Çev.Edt: Cuhruk H, Tulunay M., 3.baskı, Ankara: Güneş Kitabevi LTD. ŞTİ; 2004: 133-46
13. Kayhan Z, Genel anestezi: Klinik Anestezi, 3. baskı, Ankara: Logos Yayıncılık Tic.AŞ; 2004: 75-92
14. Morgan EG, Mikhail SM, Murray MJ, Yoğun Bakım: Klinik Anesteziyoloji. Çev.Edt: Cuhruk H, Tulunay M, Ünal N., 3.baskı, Ankara: Güneş Kitabevi LTD. ŞTİ; 2004 972-3
15. Reynolds W, Gaudelus I, Gausson V et al. Myeloperoxidase promoter polymorphism –463G is associated with more severe clinical expression of cystic fibrosis pulmonary disease. *Mediators of Inflammation* 2006;2006:1–8.
16. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B et al. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Laboratory Investigation* 2000;80: 617-53.
17. Crack PJ, Taylor JM. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radical Biology & Medicine* 2005;38:1433–44
18. Gunaydın B, Karadenizli Y, Babacan A. Pulmonary microvascular injury following generalanaesthesia with inhalasyone anaesthetics – halothane and isoflurane: a comparative clinical and experimental study. *Respiratory Medicine* 1997;91: 351-60

19. ChangLai S, Hung W, Lio K . Detecting alveolar epithelial injury following inhalasyone anesthetics by 99mTc DTPA radioaerosol inhalation lung scan. *Respiration* 1999; 66:506-10
20. Dueck R, Young I, Clausen J et al. Altered distribution of pulmonary ventilation and blood flow following induction of inhalational anesthesia. *Anesthesiology* 1980;52: 113-25
21. Sun S, Hsieh J, Tsai S et al. Transient increase in alveolar epithelial permeability induced by inhalasyone anaesthesia with isoflurane. *Lung* 2000;178: 129-35
22. Bem R, Bos A, Matute-Bello G et al. Lung epithelial cell apoptosis during acute lung injury in infancy. *Pediatr Crit Care Med* 2007; 8: 132–37
23. Roth G, Krenn C, Brunner M et al. Elevated serum levels of epithelial cell apoptosis specific cytokeratin 18 neoepitope M30 in critically ill patients. *Shock* 2004; 22: 218–20
24. Leers M, Kölgen W, Björklund V et al. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J. Pathol* 1999;187: 567-72
25. Raphael J, Abedat S, Rivo J et al. Inhalasyone anesthetic preconditioning attenuates myocardial apoptosis in rabbits after regional ischemia and reperfusion via akt signaling and modulation of *bcl-2* family proteins. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2006;318: 186-94
26. Abegg J, Weihrauch M, Dorothee D et al. Isoflurane inhibits cardiac myocyte apoptosis during oxidative and inflammatory stress by activating akt and enhancing *bcl-2* expression. *Anesthesiology* 2005;103: 1006-14
27. Zhang SD, Zhai J, Zhang H et al. Protective effect of isoflurane and sevoflurane on ischemic neurons and expression of *bcl-2* and *ICE* genes in rat brain. *Biomed Environ Sci* 2006;19: 143-6
28. Helmy SA, Al-Attayah RJ. The effect of halothane and isoflurane on plasma cytokine levels. *Anaesthesia* 2000;55: 904-10

29. Morisaki H, Aoyama Y, Shimada M et al. Leucocyte distribution during sevoflurane anaesthesia. *Br J Anaesth* 1998;80: 502-3
30. Kotani N, Hashimoto H, Sesler D et al. Expression of genes for proinflammatory cytokines in alveolar macrophages during propofol and isoflurane anesthesia. *Anesth Analg* 1999;89: 1250 –6
31. Suter D, Sphan D, Blumenthal S. The immunomodulatory effect of sevoflurane in endotoxin-injured alveolar epithelial cells. *Anesth Analg* 2007;104: 638 -45
32. Plachinta R, Hayes J, Cerilli L et al. Isoflurane pretreatment inhibits lipopolysaccharide induced inflammation in rats. *Anesthesiology* 2003; 98: 89-95
33. Topouzova T, Hristova A, Daza P et al. Inhalasyone anaesthetic halothane causes DNA damage in A549 lung cells. *Toxicology in Vitro* 2006;20: 585–93
34. Koblin D, Mechanisms of action, in Miller RD, Fleisher LA, Johns RA. editors. *Miller's anesthesia*. 6thed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005. p.259
35. Boost K, Flondor M, Hofstette C et al. The beta-adrenoceptor antagonist propranolol counteracts anti-inflammatory effects of isoflurane in rat endotoxemia. *Acta.anaesth Scand* 2007;51: 900-8
36. Filho L, Morandin RC, Almeida AR et al. Hemodynamic parameters and neurogenic pulmonary edema following spinal cord injury: an experimental model. *Arg Neuropsiquiatr* 2005;63: 990-6.
37. Koca U, Olguner C, Ozkardesler S et al. Antithrombin III pretreatment reduces neutrophil recruitment into the lung in a rat model of abdominal sepsis. *Acta Anaesth Scand* 2005;49: 203-8
38. Duru S, Koca U, Oztekin S et al. Antithrombin III pretreatment reduces neutrophil recruitment into the lung and skeletal muscle tissues in the rat model of bilateral lower limb ischemia and reperfusion: a pilot study. *Acta Anaesth Scand* 2005;49: 1142-8
39. Wollmer P, Schairer W, Bos J et al. Pulmonary clearance of Tc-99m DTPA during halotane anaesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand* 1990; 34: 572-5
40. Molliex S, Crestani B, Dureuil B et al. Differential effects of isoflurane and i.v. anaesthetic agents on metabolism of alveolar type II cells. *British Journal of Anaesthesia* 1999;82: 767-9.

41. Hu G, Schwartz D, Shajahan A et al. Isoflurane, but not sevoflurane, increases transendothelial albumin permeability in the isolated rat lung. *Anesthesiology* 2006; 104: 777-85
42. Hung C, Liu F, Chuen R et al. The influence of inhalation anesthetics on alveolar epithelial permeability measured by noninvasive radionuclide lung scan. *Annals of Nuclear Medicine* 2003;17: 213–8
43. Kesecioglu J, Haitsmab J. Surfactant therapy in adults with acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care* 2006;12: 55–60
44. Spragg RG, Lewis JF, Wurst W, et al. Treatment of acute respiratory distress syndrome with recombinant surfactant protein C surfactant. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:1562–66.
45. Goto Y, Ho S, McAdoo J et al. General versus regional anaesthesia for cataract surgery: effects on neutrophil apoptosis and the postoperative pro-inflammatory state. *Eur J Anaesthesiol* 2000; 17: 474-80
46. Loop T, Akude D, Frick M et al. Inhalation anesthetics induce caspase-dependent mitochondria-mediated apoptosis in human T lymphocytes in vitro. *Anesthesiology* 2005; 102:1147-57
47. Mitsuhashi H, Shimizu R, Yokoyama M. Suppressing effects of inhalation anesthetics on cytokine release in human peripheral blood mononuclear cells. *Int J Immunopharmacol* 1995; 17: 529-34
48. Sardas S, Karabiyik L, Aygun N et al. DNA damage evaluated by the alkaline comet assay in lymphocytes of humans anaesthetized with isoflurane. *Mutat Res* 1998; 418:1-6
49. Sardas S, Aygun N, Gamli M et al. Use of alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) to detect DNA damages in lymphocytes of operating room personnel occupationally exposed to anaesthetic gases. *Mutat Res* 1998; 418: 93–100
50. Tyther R, Brien J, Wang J et al. Effect of sevofluran on human neutrophil apoptosis. *European Journal of Anaesthesiology* 2003;20: 111-5
51. Kotani N, Takahashi S, Sessler DI et al. Inhalation anesthetics augment expression of proinflammatory cytokines in rat alveolar macrophages during mechanical ventilation. *Anesthesiology* 1999; 91: 187-97.

52. Nader-Djalal N, Knight P, Bacon MF et al. Alterations in the course of acid-induced lung injury in rats after general anesthesia: inhalation anesthetics versus ketamine. *Anesth Analg* 1998; 86: 141-6
53. Kotani N, Lin C-Y, Wang J-S, et al. Loss of alveolar macrophages during anesthesia and operation in humans. *Anesth Analg* 1995; 81: 1255-62
54. Wong C, Liu T, Chye S et al. Sevoflurane-induced oxidative stress and cellular injury in human peripheral polymorphonuclear neutrophils. *Food and Chemical Toxicology* 2006;44:1399-1407