

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

**YENİDOĞAN RATLARDA GECE-GÜNDÜZ
İZOFLURAN UYGULAMASININ ÖĞRENME VE
BELLEK ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DR. ÖZGÜR ÖZEL

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2010

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

**YENİDOĞAN RATLARDA GECE-GÜNDÜZ
İZOFLURAN UYGULAMASININ ÖĞRENME VE
BELLEK ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. ÖZGÜR ÖZEL

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
İzofluran	7
Fiziksel ve Kimyasal Özellikler	7
Santral Sinir Sistemi Üzerine Etkileri	7
Biyotransformasyon ve Atılım	7
Klinik Uygulama	8
Kronobiyoloji ve Anestezi	8
Biyolojik Ritimler	8
Sirkadiyan Ritmin Anatomik Temelleri	10
Biyolojik Saatlerin Moleküler Mekanizması	12
Genel Anestezikler ve Sirkadiyan Ritim	13
Öğrenme ve Belleğin Değerlendirilmesi	14
Morris Su Tankı	15
İzofluran – Öğrenme ve Bellek Fonksiyonları	17

GEREÇ VE YÖNTEM	18
Araştırmada Kullanılan Hayvanlar	18
Çalışma Grupları	19
Volatil Anestezik Ajan Uygulaması	19
Öğrenme ve Belleğin Değerlendirilmesi (Morris Su Tankı Testi)	20
İstatistiksel Analiz	22
BULGULAR	23
Arter Kan Gazları Analizi Sonuçları	23
Morris Su Tankı Testi Sonuçları	24
TARTIŞMA	28
SONUÇ VE ÖNERİLER	33
KAYNAKLAR	34
EKLER	43
Ek 1: Etik Kurul İzin Belgesi	43

TEŞEKKÜR:

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım hocalarım; Sayın Prof. Dr. Zahide ELAR, Sayın Prof. Dr. Ali GÜNERLİ, Sayın Prof. Dr. Atalay ARKAN, Sayın Prof. Dr. Erol GÖKEL, Sayın Prof.Dr. Semih KÜÇÜKGÜÇLÜ, Prof.Dr. Sermin ÖZTEKİN'e,

Uzmanlık tezimin her aşamasında; gece-gündüz demeden, gösterdiği yoğun çaba, verdiği büyük emek ve harcadığı değerli vaktiyle, bana bir araştırmanın projesinden son cümlesinin yazımına kadar tüm noktalarını titizlikle ve sabırla öğreten, danışman hocam Prof. Dr. Necati GÖKMEN'e, ve bu dönemde gösterdikleri hoşgörülerinden ötürü değerli ailesine,

Tez araştırmamı yapmaya başladığım ilk günden bitimine kadar tüm çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Osman Yılmaz, Uzm.Dr.Duyguhan İŞGÜVEN ve Dr.Fusun ÖZKAYA'ya,

Asistanlığım süresince birlikte çalıştığım, eğitimime katkıda bulunan bölümümüzün tüm öğretim üyelerine ve uzmanlarına,

Anestezinin heyecanını paylaştığım tüm asistan arkadaşlarıma,

Anestezi teknikerlerine, ameliyathane, yoğun bakım, derlenme ünitesi, ağrı ünitesi, gündüz hastanesi hemşirelerine ve tanıma fırsatı bulduğum tüm hastane çalışanlarına,

Benden desteğini, sevgisini ve sabrını esirgemeyen eşim Özlem Ulaş ÖZEL ve biricik kızım Deniz Duru ÖZEL'e,

Sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Dr.Özgür ÖZEL

TABLO LİSTESİ:**Sayfa No****Tablo-1.** Temel Biyolojik Ritimler

9

Tablo-2. Gruplardaki Toplam Rat Sayıları

23

Tablo-3. Arter Kan Gazları Analizi Sonuçları

23

Tablo-4. Ratların Platformu Bulması İçin Geçen Toplam Süre

24

Tablo-5. Ratların Kadranlarda Geçirdikleri Sürenin Yüzde Değerlerinin Ortalaması

26

ŞEKİL LİSTESİ:**Sayfa No****Şekil-1.** İzofluranın Kimyasal Formülü

7

Şekil-2. Retina-SKN Yolağı

11

Şekil-3. Memeli Sirkadiyan Ritminin Şeması

11

Şekil-4. Morris Su Tankı

16

RESİM LİSTESİ:

Sayfa No

Resim-1. Postnatal 7. Günde Olan Ratlar

18

Resim-2. Anestezi Uygulaması Düzenegi

21

Resim-3. Morris Su Tankı

22

GRAFİK LİSTESİ:

Sayfa No

Grafik-1. Ratların Platformu Bulma Süresi Ortalamaları

25

Grafik-2. Ratların Kadranlarda Geçirdiği Sürelerin Yüzde Değerlerinin Ortalaması

26

KISALTMALAR:

GABA	: Gamma Aminobütirik Asit
NMDA	: N-Metil D-Aspartat
SKN	: Suprakiazmatik Nukleus
CA1	: Cornu Ammonis 1
SSS	: Santral Sinir Sistemi
MAK	: Minimum Alveolar Konsantrasyon
EEG	: Elektroensefalografi
VIP	: Vazoaktif İntestinal Polipeptid
GSH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
5HT	: 5-hidroksitriptamin
NE	: Norepinefrin
NPY	: Nöropeptid Y
PVN	: Paraventriküler Nukleus
HDD	: Hayvan Davranış Deneyi
MST	: Morris Su Tankı

ÖZET

YENİDOĞAN RATLARDA GECE-GÜNDÜZ İZOFLURAN UYGULAMASININ ÖĞRENME VE BELLEK ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Özgür ÖZEL, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, İZMİR

Amaç: Bu çalışmanın amacı izofluran uygulanan yenidoğan (7 günlük) ratlarda sirkadiyan ritmin öğrenme ve bellek üzerine etkisini araştırmaktır.

Yöntem: 42 yenidoğan rat çalışmaya alındı ve rastgele 4 grup oluşturuldu. Grup-1 (n:11) ve Grup-3 (n:11)'e 450 mL cam kavanozlar içerisinde 6 saat süresince %1,5 izofluran uygulandı. Grup-2 (n:10) ve Grup-4 (n:10) 6 saat süresince oda havasında tutuldu (kontrol). Gece grupları (Grup-1 ve Grup-2) 19:00-01:00 saatleri arasında, gündüz grupları (Grup-3 ve Grup-4) 07:00-13:00 saatleri arasında izlendi. İzofluran anestezisinin sona ermesinden iki saat sonra ratlar öğrenme ve bellek testlerinin uygulanacağı zamana dek bakılmak üzere annelerinin yanına alındı. Ratlara 5 hafta sonra öğrenme ve bellek fonksiyonlarının değerlendirilmesi amacıyla Morris Su Tankı testi uygulandı. Verilerin istatistiksel analizi yapıldı.

Bulgular: Öğrenme ve bellek deneyleri sonuçları değerlendirildiğinde ilk dört gün uygulanan öğrenme testlerinde platformu bulma süreleri değerlendirildiğinde gruplar arasında fark saptanmadı ($p>0,05$). Beşinci gün uygulanan *probe trial*'de hedef kadranda kalış süreleri değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

Sonuç: İzofluran uygulanan yenidoğan ratlarda sirkadiyan ritmin öğrenme ve bellek fonksiyonlarını etkilemediği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: İzofluran, rat, sirkadiyan ritim, öğrenme ve bellek.

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF NIGHT-DAY ON LEARNING AND MEMORY UNDER ISOFLURANE ADMINISTRATION IN NEWBORN RATS

Ozgun OZEL, Dokuz Eylul University, Faculty of Medicine
Department of Anesthesiology and Reanimation, IZMIR

Aim: The aim of this study is to evaluate the effect of circadian rhythm on learning and memory in isoflurane administrated newborn (d:7) rats.

Material and Methods: 42 newborn rats were involved in this study and randomised to four groups. Group-1 (n:11) and Group-3 (n:11) were received to %1.5 concentration of isoflurane for 6 hours. Group-2 (n:10) and Group-4 (n:10) were exposed to room air for 6 hours (controls). Night groups (Group-1 and Group-2) were studied during between 07:00 pm - 01:00 am and day groups (Group-3 and Group-4) were studied during between 07:00 am - 13:00 pm. Two hours after cessation of isoflurane anesthesia rats were carried out to their own mother's sides until learning and memory tests were performed. Five weeks later Morris Water Maze test was performed in order to evaluate learning and memory functions.

Results: Learning and memory test results have shown that there was no difference between groups also in platform finding times of initial four days performances ($p>0,05$). There was no difference in evaluation of standing times on target quadrant in probe trial administration during fifth day ($p>0,05$).

Conclusion: We concluded that circadian rhythm has no effect on memory and learning functions in isoflurane administrated newborn rats.

Keywords: Isoflurane, rat, circadian rhythm, learning and memory.

GİRİŞ

İzofluran tek başına veya diğer anestezi ajanlarıyla beraber genel anestezi oluşturmak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Genel anestezi oluşumundaki mekanizmalar tam olarak bilinmemekle beraber gamma aminobütirik asit tip A ($GABA_A$), N-metil D-aspartat (NMDA) ve glutamat reseptörlerinin sinaptik iletimindeki değişikliklerin genel anestezi oluşumunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (1). Ayrıca bu reseptörlerin memelilerde beyin gelişimi için zorunlu olduğu ve bu nedenle volatil anestezi ajanlarına maruz kalınmasının normal beyin gelişimini etkileyebileceği bildirilmiştir (2,3). Yenidoğan ratlarda ve farelerde yapılan çalışmalarda izofluran uygulamasını takiben saatler içerisinde nöronal hücre ölümü meydana geldiği saptanmıştır (4,5). İzofluran uygulamasının hangi mekanizmalar ile hücre ölümü meydana getirdiği henüz bilinmemektedir. Bu bulgular beyin gelişimi döneminde izoflurana maruz kalınmasıyla nörolojik sekel oluşması olasılığı yönündeki kuşkuları arttırmaktadır (6-8). Ayrıca birçok çalışmada yoğun bakım ünitelerinde uzun süreli izofluran uygulaması sonrası geçici nörolojik sekel oluşumu gözlenmiştir (9-11).

Yenidoğan ratlarda, farelerde, gine domuzlarında, domuzlarda ve maymunlarda izofluran uygulamasını takiben saatler içerisinde nöroapoptozis olduğu bildirilmiştir (4,12-18). İzofluranın farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde uygulandığı yenidoğan ratlarda apoptotik nörodejenarasyonun arttığı gözlenmiş ve erişkin çağa ulaşan ratlarda öğrenme ve bellek fonksiyonlarının azaldığı saptanmıştır (16,19).

Memelilerde, sirkadiyan ritmin kontrolü anterior hipotalamusda bulunan, suprakiazmatik nükleusdur (SKN) (20). Suprakiazmatik nöronlar yaklaşık 24 saatlik bir ritim ile çevresel uyarı yokluğunda bile elektriksel aktivite gösterirler. Normal koşullarda SKN aktivitesini gün içinde retinadan giren ışık ile gece ise melatonin ile düzenlemektedir. Suprakiazmatik nükleusun salınımları ve melatonin salgılanması retinohipotalamik yolak tarafından taşınan uyarılar ile olmaktadır. Retinohipotalamik yolak ışığa duyarlı ganglion hücrelerini içermektedir ve ganglion hücreleri glutamat ile aktive olmaktadır. Suprakiazmatik nükleus uyku-uyanıklılık döngüsünü, hormon salgısını, termoregülasyonu ve diğer fizyolojik olayları düzenlemektedir (21). Suprakiazmatik nöronların aktivasyonunda primer nörotransmitter GABA'dır.

Deneysel çalışmalarda, genel anestezi ajanlarının uygulandığı zamana göre anestezi etkinin zamansal değişiklikleri bildirilmiştir (22-26).

Bölümümüzde Doğan ve ark. (27) tarafından yapılan çalışmada apoptotik nörodejenerasyonu tetiklemek için 7 günlük rat yavrularına 07:00-13:00 (gündüz grubu) ve 19:00-01:00 (gece grubu) saatleri arasında, 6 saat süresince %1,5 izofluran uygulanmış, hem gece hem de gündüz grubunda %1,5 konsantrasyonda uygulanan izofluranın gelişmekte olan rat beyinde nroapoptotik etkisi olduğu gösterilmiştir. Nroapoptotik yanıtın, talamus paraventriküler nükleus, korteks ve hipokampüs *cornu ammonis 1* (CA1) bölgelerinde gündüz izofluran uygulanan grupta, gece izofluran uygulanan gruba göre daha fazla olduğu saptanmıştır. Ancak bu çalışmada ratların öğrenme ve bellek fonksiyonları çalışılmamıştır.

AMAC

Bu çalışmada, yenidoğan ratlarda gece-gündüz izofluran uygulamasının öğrenme ve bellek üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Günümüzde birçok anestezi ajanı genel anestezi ve sedasyon için kullanılmaktadır. Bu ajanların insanlar üzerindeki çoğu etkileri bilinmemekte ancak özellikle gelişmekte olan santral sinir sistemine (SSS) etkileri en sık araştırılan konular arasındadır. Anestezi uygulamasına maruz kalan pediatrik yaş grubunda, farklı inhalasyon ajanlarının çocuğun beyin gelişimi, öğrenme ve bellek üzerine etkileri henüz aydınlatılamamıştır (4).

Genel Anesteziklerin Santral Sinir Sisteminde Etki Mekanizmaları

Ratlarla yapılan çalışmalarda anestezi ajanlarının rat beyininde, özellikle SSS'de bu ajanların sinaptik transmisyon üzerine etkilerinin en iyi gösterilebildiği bölge olması nedeniyle hipokampüste yaptığı değişiklikler sık olarak araştırılmıştır (4, 28-30). Limbik sistemin bir parçası ve anestezi ajanlarının ana hedef bölgelerinden olan hipokampus; afferent ve efferent yapılar, nörotransmitterler ve birçok katmandan meydana gelmektedir (29).

Hipokampüste, internöronlar içinde GABA ve onun sentezleyici enzimleri bulunur. Bu nöronlar uyarıcı sinaptik akımların ve piramidal hücre boşalmalarının inhibisyonunu sağlar. Hipokampus ve diğer kortikal bölgelerdeki nöron aktivitesinin uyarılabilirliğinde ve eşgüdümünde önemli rol oynayan GABAerjik internöronlar tüm nöron topluluğunun %10'unu oluşturur (30,31). Ancak tüm ve bölgesel beyin fonksiyonlarında rol oynayan inhibitör internöronlar üzerine anestezi ajanlarının hücresel ve moleküler düzeyde etkileri henüz tam olarak bilinmemektedir (30).

Memeli SSS'de genel anesteziklerin etkisi iki mekanizma ile açıklanmaktadır (4,29):

- I. GABA_A reseptörleri aracılığı ile inhibitör etkide artış olması (benzodiyazepinler, barbitüratlar, propofol, etomidat, izofluran, enfluran, halotan ve desfluran)
- II. NMDA reseptörlerinin uyarılabilirliğinde azalma (ketamin, N₂O, xenon)

Volatil anestezi ajanları memeli SSS'nde nöronal aktiviteyi deprese ederler ve GABA_A reseptör kompleksinden Cl⁻ akımını arttırlar. Ayrıca konsantrasyona bağımlı olarak, neokortikal nöronların spontan aksiyon potansiyel ateşlemelerini deprese ederler (29).

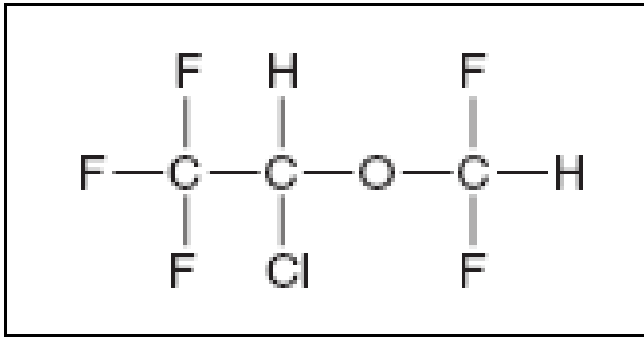
Birçok çalışma ile anesteziklerin, nöron kültürlerinde GABA_A reseptörleriyle ilgili sinaptik akımları ve in vivo olarak hipokampus CA1'deki piramidal hücrelerde ve beyin kesitlerinde *Decay Phase*'ı uzattığı saptanmıştır (31). İnhibitör akımların uzaması, sinaptik inhibisyonun artması ile SSS'nin anesteziklere bağlı depresyonunun uzamasıyla sonuçlanır.

Literatürde, genel anesteziklerin hipokampüsteki etkilerinin, inhibitör nöronlar üzerinden olduğu bildirilmiştir (31).

İZOFLURAN

Fiziksel ve Kimyasal Özellikler

İzofluran, enfluran izomeri olan bir metil etil eter ($\text{CH}_2\text{F}-\text{O}-\text{CHClF}_2$) olup onun birçok özelliklerini taşır (Şekil-1). 1965'te Terrell tarafından sentezlenmiştir (32). Renksiz, patlayıcı ve yanıcı olmayan, koruyucu içermeyen, kimyasal olarak stabildir. Ultraviyole ışık ve soda lime ile bozulmaz (32). Minimum alveolar konsantrasyon (MAK) değeri oksijen içinde 1.15, %70 N_2O içinde 0.56'dır. 37°C 'de partiyon katsayıları, kan:gaz için 1.4, su:gaz için 0.6, yağ dokusu:gaz için 94.5 dir. Bu özellikler anestezi derinliğinin de daha iyi kontrol edilmesine olanak verir (32).



Şekil-1. İzofluranın kimyasal formülü (33)

Santral Sinir Sistemi Üzerine Etkisi

İzofluran 1 MAK'dan büyük konsantrasyonlarda serebral kan akımını ve intrakraniyal basıncı artırır. Bu etki halotaninkinden daha az olup, yer tutan lezyon varlığında bile hiperventilasyon ile kontrol edilebilir. İntrakraniyal basınç artışı olan vakalarda izofluranın kullanım üstünlüğü vardır. İzofluran metabolik oksijen gereksinimini azaltır ve 2 MAK'da elektriksel olarak sessiz elektroensefalogram (EEG) oluşturur. EEG'nin baskılanması serebral iskemide ataklarında bir dereceye kadar beyin koruması sağlamaktadır (32).

Biyotransformasyon ve Atılım

Yaklaşık % 0.2 oranında biyotransformasyona uğrar. Sitokrom P450 2E1 sistemi ile triflorasetikasit'e ve inorganik florüre metabolize olur (32). İzofluran akut ve kronik toksisite yönünden diğer ajanlara göre daha güvenilirdir. Çok az metabolize olması ve molekülünün stabil olması nedeniyle hepatotoksik etkisi olmayacağı belirtilmektedir (32).

Klinik Uygulama

İndüksiyon ve derlenme hızlıdır. Ancak hafif eter kokusunda olması inhalasyonunu güçleştirebilir. Uyanma döneminde öksürme, sekresyon artışı ve huzursuzluk olabilir. Çocuklarda indüksiyon sırasında öksürük, laringospazm ve sekresyon artışına neden olabilir. Düşük yoğunlukta (%0.75) sezaryen girişiminde kullanılabilir. Konvulsif etkisinin olmayışı, intrakraniyal basınç ve serebral perfüzyonun hiperventilasyonla sabit tutulabilmesi, uyarılmış sensöryel yanıtlar ve serebral metabolizmanın korunması, kontrollü hipotansiyon sağlayabilmesi gibi nedenlerle, inhalasyon anesteziikleri için tercih edilen bir ilaçtır (32).

KRONOBİYOLOJİ VE ANESTEZİ

Canlıların farklı biyolojik faaliyetlerinde belli bir ritmin gözlendiği çok eski zamanlarda fark edilmiştir. Ancak, biyolojik ritimlerin bir bilim dalı olması 19. yüzyılın sonlarına rastlar. Günümüzde, biyolojik ritimleri ve onları yöneten etkenleri araştıran bilim dalı “kronobiyoloji” olarak adlandırılmıştır (34).

Biyolojik fonksiyonların ritimleri, genellikle çevre şartlarının döngüsel özellikleriyle eş zamanlı olarak yürür. Bir canlı dış ortamla ilişkili ise ve ritimlerini dış dünyadan gelen uyarılara göre düzenleyebiliyorsa, böyle ritimlere “bağlı (*entrained*) ritimler” denir. Eğer canlı, laboratuvar ortamında, çevresel işaretlerden yalıtılmış bir biçimde yetiştirilirse, tam olarak çevresel işaretlerle tutarlı olmasa da, bir iç ritmi sürdürdüğü görülür. Bu tip ritimlere de “serbest (*free-running*) ritimler” denir (35). Canlının çevreden aldığı sinyallerin bir kısmı, ritimlerini düzenlemesi için bir işaret görevi yapar. Örneğin, ışık ve karanlık, canlının gece ve gündüz göstereceği faaliyetleri ayarlaması için çevresel bir işaret olarak kullanılır. Bunun gibi çevresel işaretlere “*zeitgeber*” (Almanca, zeit=zaman, geber=vermek) veya "ritim verici" denir. Bu ritim verici faktörler ayın devri, yılın mevsimleri, güneşin durumu vb. olabilir ve bunların arasında en önemlisi ışıktır (36,37).

Biyolojik Ritimler

Senkronize ediciler olarak tanımlanan aydınlık-karanlık, dinlenme-aktivite, açlık-beslenme ve diğer çevresel koşulların döngülerindeki değişiklikler organizmaya geçici işaretler verir ve böylece dönemlerini bu biyolojik ritimlere kabul ettirirler. Bu ritimlerin (temel biyolojik saat çeşitleri) sınıflandırılması Tablo-1’de gösterilmiştir (36,37).

Tablo-1. Temel Biyolojik Ritimler (37)

Sirkadiyan (Dünyanın dönüşü)	24 saat (22-26 saat)
Ultradiyen	<20 saat
İnfradiyen (haftalar, aylar veya mevsimler süren bir dönem)	>28 saat
Sirkaseptan	7±3 gün
Sirkadiseptan	14±3 gün
Sirkavijintan	21±3 gün
Sirkatrivijintan	30±5 gün
Sirkatidal	11-14 saat
Sirkalunar	26-30 gün
Sirannual	330-400 gün

Günümüzde birçok canlının iç ve dış kaynaklı ritimlere sahip olduğu bilinmektedir. Bu ritimler, gün boyunca insan vücudunda, kan basıncını, immün sistem aktivitesini, kan koagülasyonunu ve gastrik ve renal fonksiyonları etkileyerek değiştirir. Neredeyse tüm hormonlar sirkadiyan ritimlerle düzenlenmektedir. Örneğin kortizol uykusu sırasında en düşük konsantrasyonuna ulaşır ve sabahın erken saatlerinde ise en yüksek konsantrasyonlarına ulaşır (38).

Biyolojik ritimler *jet lag* ve çalışma saatleri gibi sosyoekolojik faktörler kadar hastalık ve ilaçlardan da etkilenir. Mevcut klinik veriler, belirti ve bulguların zaman içinde sabit olmadığını ve genellikle tekrarlayan bir yapıya sahip olduklarını göstermiştir. İnme ve kalp krizlerinin çoğu, günün herhangi bir saatiyle karşılaştırıldığında sabahları daha sık oluşur ve osteoartriti olan hastalar sabahları geceye göre daha az ağrı duymaktadırlar. Çalışmalar ayrıca kemoterapi, astım ve osteoartrit tedavilerinin seçilmiş zamanlarda uygulandığında daha fazla efektif ve daha az toksik olabileceğini göstermiştir. İlaç uygulaması için gün içinde zaman seçerek tıbbi tedavide sirkadiyan ritmin göz önüne alınmasına kronoterapi denir. Hastalığın

sirkadiyan paterni temelinde ilaç uygulamasıyla ilaç etkileri en uygun hale getirilebilir ve yan etkiler azaltılabilir (38).

Sirkadiyan Ritmin Anatomik Temelleri

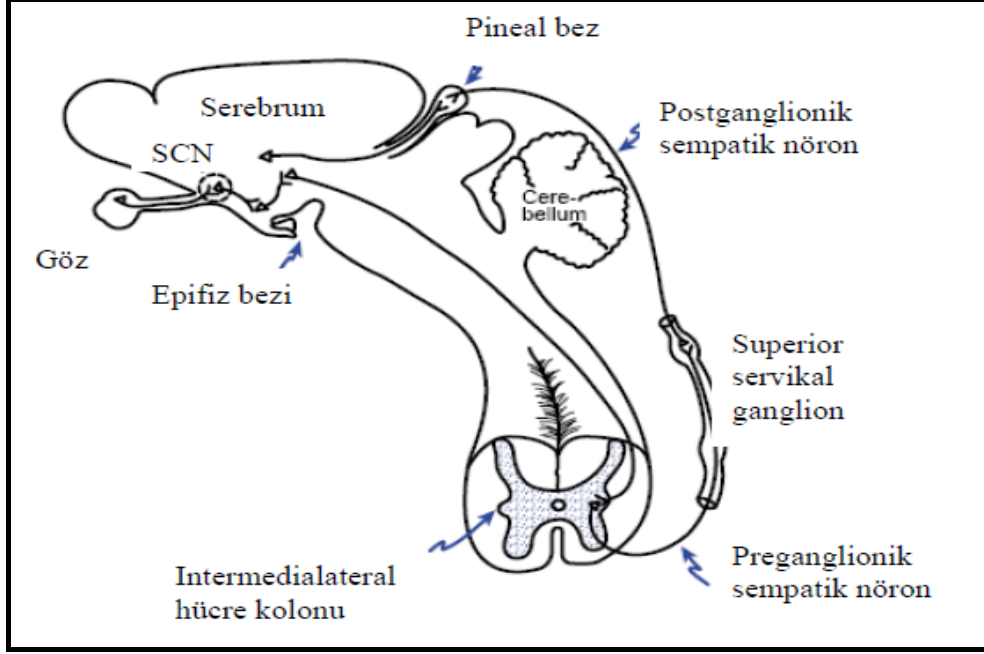
Biyolojik ritimlerin temelini oluşturan mekanizmalar hücresel düzeyde etkili olduğundan, hücre fonksiyonu üzerine etkisi olan birçok faktör, doğrudan ritimleri de etkiler. Bunlardan en önemlileri, başta K^+ ve Ca^{+2} olmak üzere, hücredeki temel fonksiyonları yürüten iyonların dengeleri ve hücrenin fonksiyonunu kontrol eden önemli birimlerinden biri olan hücre zarının yapısındaki değişimlerdir. Organ düzeyinde sirkadiyan ritimlerin düzenlenmesinden, beyinde bulunan, SKN adı verilen yapı sorumludur. Bu yapı, hipotalamusun ön kısmında, optik çaprazın (*chiasma opticum*) hemen üst kısmında yer alan bir hücre grubudur. Bu bölge, retinadan özel girişler aldığı gibi, başta epifiz (pineal) bezi olmak üzere, birçok bölgeyle de doğrudan veya dolaylı ilişki içerisindedir (Şekil-2) (39). SKN'un sirkadiyan ritimleri yönetmesi, özellikle yakın zamanlarda yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Başka ritim üreten bölgeler olsa da, SKN bir "üst saat" gibi iş görür ve diğer ritmik fonksiyon gösteren hücrelerin faaliyetlerini düzenler.

Suprakiazmatik nukleusun ışıkla aktive olması, retinadan bu bölgeye bir bağlantı olmasını gerekli kılar. Bu yola "retinohipotalamik yol" adı verilmektedir. Bunun yanında, retinadan SKN'a bir de dolaylı yol bulunmaktadır. Bu yol, optik sinirle giden görme uyarılarının genikulat çekirdeklerden SKN'a yönlendirilmesi ile oluşur. Bu yolda kullanılan sinir ileti maddesinin glutamat ve nöropeptid Y olduğu bildirilmiştir. Bu yollarla retinadaki ışık durumundan haberdar edilen SKN, Şekil-2'de gösterildiği gibi, diğer beyin bölgelerini uyararak, canlının vücut ritimlerini düzenlemesini sağlar (35, 36, 40, 41). SKN üzerinde yapılan diğer çalışmalar, bu bölgenin çok sayıda sinir ileti maddesi içerdiğini belirlemiştir. Bu bölgede yer alan sinir ileti maddelerinden önemlileri: nöropeptid Y, vazopressin, vazoaktif intestinal polipeptid (VIP), gonadotropin salgılatıcı hormon (GSH) ve somatostatindir (37, 39).

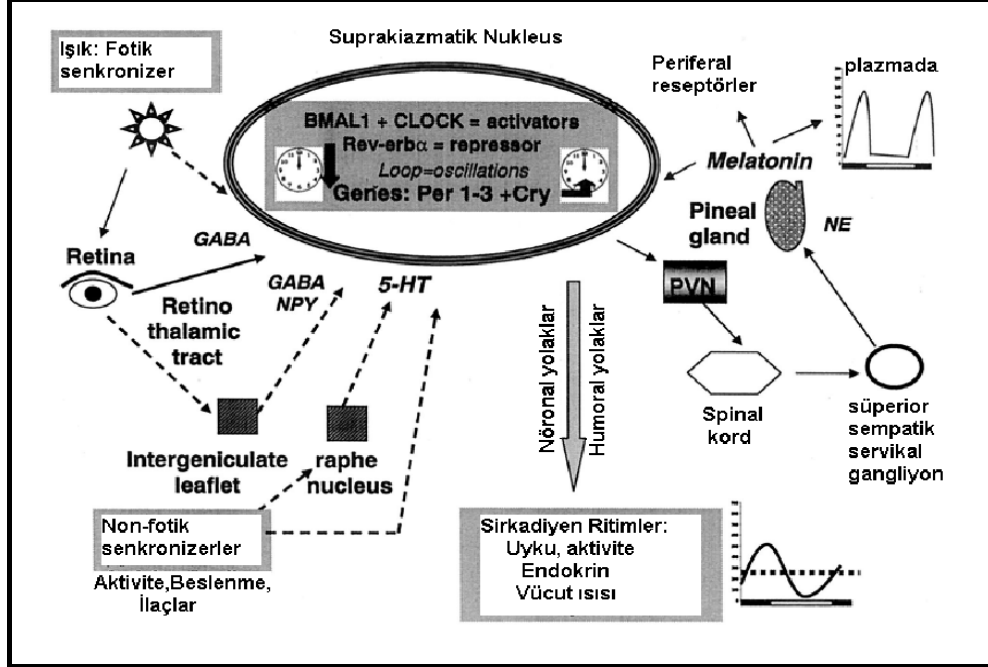
Fotik bilgi ayrıca dolaylı olarak da genikulohipotalamik yoldan daha fazla intergenikulat ağları yoluyla SKN'a ulaşabilir. $GABA_A$ ve nöropeptid Y bu sinaptik bağlantıda sinyal molekülü olarak işlev görür. Sirkadiyan *pacemaker* ayrıca vücudun hareketi, ilaçlar ve beslenme gibi non-fotik senkronize edicilerle de ayarlanabilir. Raphe nükleustan serotoninerjik afferent aktivite ve intergenikulat ağdan nöropeptid Y-GABA aracılı

(GABAerjik) girdiler bu yollarda yer alır. Asetilkolin, histamin ve serotonin SKN'un kontrolünde bulunmaktadır (38).

Memeli sirkadiyan ritminin şeması Şekil-3'de gösterilmiştir.



Şekil-2. Retina-SKN yolağı (39)



Şekil-3. Memeli sirkadiyan ritminin şeması (38)

(GABA= γ -amino-butirik asid. 5-HT=5-hidroksitriptamin; NE=norepinefrin; NPY=nöropeptid Y; PVN= Paraventriküler nükleus)

Biyolojik Saatlerin Moleküler Mekanizması

Biyolojik saatleri araştıran çalışmalarla hücre düzeyindeki ritimlerin varlığının saptanmasından sonra, ritim oluşturabilecek hücre içi bir moleküler saat mekanizmasının bulunabilmesi için çok sayıda çalışma yapılmıştır (42,43). Meyve sinekleri (*Drosophila melanogaster*) zerinde yapılan çalışmalar, ritmin hücresel düzeyde düzenlenmesi konusundaki temel genetik mekanizmanın ortaya çıkmasını sağlamıştır (44). Buna göre meyve sineklerinde ilk önce, mutasyonu sonucu hayvanlarda günlük ritimlere uyma davranışının ortadan kalktığı bir gen tespit edilmiş ve bu gene *per* (*period*) adı verilmiştir. *Per* geninin ürünleri, hem ritmi oluşturmakta, hem de ritmin hızını belirlemektedir. Daha sonra keşfedilen bir başka gen ise *tim* (*timeless*) olarak adlandırılmıştır. Bu genin ürünleri de yine sirkadiyan ritmin oluşabilmesi için gereklidir. Bu iki genin ürünü olan PER ve TIM proteinleri, zaman oluşturucu bir kimyasal dönüt (*feedback*) devresi gibi davranarak, hücresel ritmin düzenlenmesi için gereken metabolik düzenlemelerin gerçekleştirilmesi için bir anahtar gibi iş görmektedirler (35).

Suprakiazmatik nükleusun sirkadiyan mesajı adrenal beze iletirken otonomik nöronal yolları kullandığı gösterilmiştir. *Clock* genleri sirkadiyan ritimden sorumludur. Salınımları birçok organda denetlenir ve salınım santral *pacemaker*a sınırlı değildir. Otomatik mekanizmanın merkezinde bir transkripsiyonel *feedback* döngü yer alır. *CLOCK*, *brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (BMAL1) ve *orphan nuclear receptor* (Rev-erb_α) iki *cryptochrome* genin (*Cry1* ve *Cry2*) ve üç *period* geninin (*Per 1-3*) salınımları düzenleyen transkripsiyon faktörleridir. Meyve sineği işığa maruz kaldığında, sineklerin beyin hücrelerinde bulunan PER-TIM protein bileşikleri birbirlerinden ayrılarak, PER ve TIM proteinleri şeklinde dağılmaya başlarlar. PER-TIM bileşiği, PER ve TIM proteinlerini kodlayan *per* ve *tim* genlerinin aktivitesini baskılamak gibi bir role sahiptir. Işıkla karşılaşılan bu saati sabah olarak kabul edersek, öğle saatleri civarında PER ve TIM proteinleri tamamen dağılmaya başladığında, *CYCLE* ve *CLOCK* adındaki diğer iki proteininin hücre içinde artma dönemi başlar. Bu iki protein birleşip bir birleşik yaparlar ve bu birleşik, PER ve TIM genlerini aktifleyerek PER ve TIM proteinlerinin yapılmasını başlatır. Bu yapım işlemi, akşam saatlerinde gereken derişimde PER-TIM birleşikleri oluşumu ile devam eder. Gece saatlerinde, PER-TIM birleşikleri hücre çekirdeğinde, *CLOCK* ve *CYCLE* proteinlerini üreten genlerin aktivitelerini baskırlarlar. Bu baskılama, *CYCLE-CLOCK* birleşiği PER ve TIM proteinlerinin yapımını başlattığından, PER ve TIM proteinlerinin kendi üretimlerini

baskılaması anlamına gelir. Sabah saatlerinde ışığın etkisiyle PER-TIM birleşiklerinin yine parçalanmaya başlaması, döngüyü yeniden başlatır. Bu temel mekanizma, memeliler ve insan da dahil olmak üzere, bir çok canlıda ortak bir temel mekanizmadır. İnsanda bir kaç farklı protein ve gen ilave olarak bu sisteme katılmaktadır (39).

Sonuç olarak memeli sirkadiyan ritimlerinin hipotalamik SKN'daki sinyal yollarını hedef alan senkronize ediciler tarafından düzenlendiği kabul edilmektedir. Sirkadiyan ritimlerin genetik temelleri tanımlanmıştır ve organlarda veya hücrelerdeki biyolojik süreçlerin neredeyse tamamı herhangi bir düzeyde sirkadiyan saat tarafından etkilenmektedir (38).

GENEL ANESTEZİKLER VE SİRKADİYEN RİTİM

Birçok çalışmada genel anestezi için zamansal değişiklikler yayınlanmıştır (45). Ratlarda 35 mg/kg pentobarbital ile oluşturulan ortalama anestezi süresi saat 09:00 da 53 dakikadan saat 19:00 da aynı dozla 90 dakikaya kadar değiştiği ve pentobarbitalin etkinliği maksimal saat 17:00-20:00 arasında tespit edilmiştir (22). Gönüllülere oral hegzobarbital uygulaması akşamları sabaha göre daha etkin bulunmuştur (46). Bu araştırmalar ayrıca hepatik ilaç metabolizmasındaki endojen değişikliklerin ilaç etkinliğindeki sirkadiyan değişikliklere bağlı olduğunu göstermiştir. Klinik etkinlikteki zamansal değişiklikler için bir başka açıklama da barbitüratlar için hedef reseptördeki diürinal değişiklikleri olabilir. Tip A GABAerjik ve NMDA reseptörleri, genel anestezi etkisi için önemli alanlar olarak görülmektedir (38). Birçok çalışmada, barbitüratların etkinliğinin en yüksek olduğu dönem ile uyumlu olarak, post sinaptik tip A GABAerjik aktivitenin nokturnal saatlerde arttığı bildirilmiştir (47).

Benzodiazepinlerin gün içindeki sedatif veya anestezi özellikleri hala araştırılmaktadır (38). Farelerde intraperitoneal diazepam aydınlık fazda, karanlık faza göre daha toksiktir. Farmakokinetik çalışmalar total diazepamın ve metaboliti olan N-desmetildiazepamın plazma konsantrasyonlarının saat 23:00-08:00 arasında beklenenden daha düşük ve saat 09:00'da daha yüksek olduğunu bildirmiştir (48). Tersine diazepamın serbest fraksiyonu saat 23:00-08:00 arasında en yüksek ve saat 09:00'da daha düşüktür (49). Midazolamın eliminasyon yarı ömrü saat 14:00'de en kısa ve saat 02:00'de en uzun bulunmuştur (1.26 ± 0.47 saate karşın 1.57 ± 0.44 saat) (50). Bu sirkadiyan değişikliklerin mekanizmalarının multifaktöryel olduğu düşünülmektedir. Ratlarda benzodiazepin reseptörlerinin sayısı ve aktivitesindeki sirkadiyan değişiklikler, dinlenme periyodunda daha fazla olduğu bildirilmiştir

(51). Post sinaptik tip A GABAerjik aktivitede gece saatlerindeki yükselme, hamster serebral korteksinde gösterilmiştir (47).

Ketamin etkilerinin sirkadiyan ritmini göstermek için yapılmış bir insan çalışması yoktur (38). Bununla birlikte çok sayıda hayvan çalışması beyindeki NMDA reseptör ekspresyonunda sirkadiyan ritmin varlığı gösterilmiştir (52).

Halojenli ajanların etkinliğinde veya toksisitesindeki diurnal değişiklikler de çok az araştırılmıştır. Ratlarda halotanın MAK'ı saat 12:00 de %1.26 iken, saat 20:00 de %1.45'e çıkmıştır (53). Bu sirkadiyan değişikliklerin mekanizmaları çalışılmamıştır.

ÖĞRENME VE BELLEĞİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Davranışsal deneyleri sadece hayvan ve insan beyninin nasıl çalıştığının anlaşılması için değil, aynı zamanda insandaki davranış bozukluklarına çözüm getirilmesi açısından da çok önemlidir. Yapılan karşılaştırmalı araştırmalar farklı memeli gruplarında beynin temel morfolojik ve işlevsel yapılarının oldukça benzer olduğunu göstermektedir (54). Aynı zamanda davranış seviyesinde de yakın benzerlikler bulunmaktadır. Bu nedenle hayvan çalışmalarından elde edilen birçok bilgi insanlar için de geçerlidir (54). Laboratuvar ortamında yapılan nörobiyolojik ve davranış deneylerinde en sık kullanılan deney hayvanı rat ve maymundur. Ratların üretim ve bakımı daha kolay ve ekonomik olduğu için bilimsel araştırmalarda en çok kullanılan deney hayvanıdır (54).

Ratların bilişsel ve lokomotor fonksiyonlarının değerlendirilmesinde çeşitli hayvan davranış deneyi (HDD) modelleri mevcuttur. HDD'leri ile ratlarda anksiyete, otonom fonksiyonlar, öğrenme ve bellek gibi pek çok özelliğin değerlendirilmesi yapılmaktadır. HDD modellerin çoğu %100 kesinlikte sonuç sağlayamamaktadır. Ancak bilimsel teknolojiye gelişmelerle birlikte HDD'leri günümüzde daha ideal ölçütlerde yapılabilmektedir (54).

Tüm HDD'lerinin $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ oda sıcaklığında, 12 saatlik gece-gündüz periyodunun sağlandığı bir odada yapılması; ses, ışık, sıcaklık ve bekleme koşullarının standardize edilmesi önerilmektedir. Bu standardizasyonun sağlanabilmesi için tüm hayvan gruplarının deney alanına deney gününden birkaç gün önce getirilmesi, deneylere başlanmadan önce tek tek bekleme kaplarına konması gerekmektedir. 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. Amaç ratların davranış deneylerinin yapılacağı

tarihte birbirine yakın ağırlıkta ve 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 (55).

Ratlarda bilişsel ve motor fonksiyonlarının değerlendirilmesi amacıyla kullanılan farklı testler mevcuttur. Bunlardan bazıları rotator düzeneği, sekiz kollu ışmsal labirent, T labirent, yükseltilmiş artı labirent, açık alan ve Morris su tankıdır. Anksiyete, korku, tekrarlayan uygulamalarla öğrenme ve kısa hafıza değerlendirilmesinin artı labirent deneyi yapılması önerilmektedir (56). Ratların duygusal durumunu, sedasyonunu, lokomotor aktivitesini ölçmede açık alan testinin kullanılması önerilmektedir (56). Öğrenme ve bellek fonksiyonlarının değerlendirilmesinde ise çoğunlukla Morris su tankı (MST) testi kullanılmaktadır (57,58).

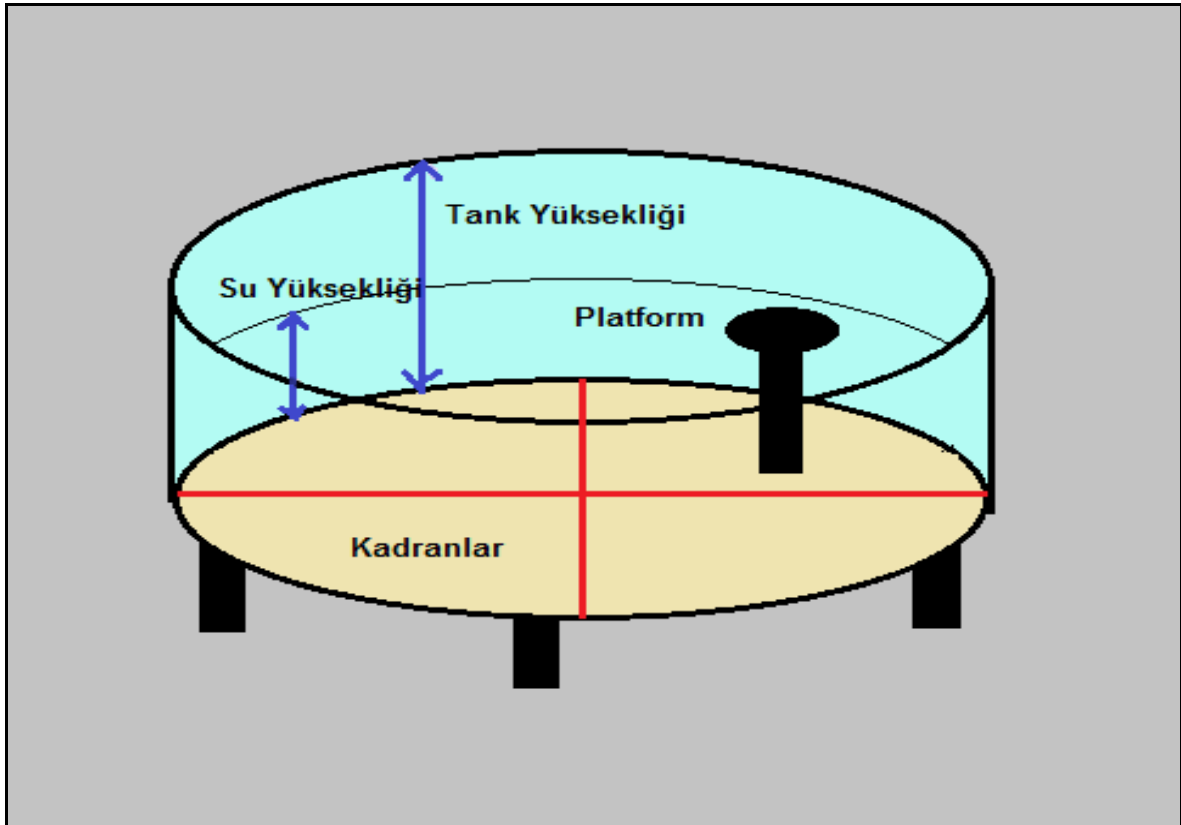
Morris Su Tankı

Rat ve fare gibi küçük kemirgenlerde hipokampusa bağlı mekansal öğrenme bellek araştırmaları için günümüzde çok yaygın olarak kullanılan su tankı, 1982 yılında Morris ve arkadaşları tarafından tasarlanmıştır (59). MST deneyleri ile uzak hafıza, yakın hafıza ve öğrenme değerlendirilebilir (57,58,60).

Morris su tankı (*Morris water maze*) yaklaşık 60 cm (35-90 cm) yükseklikte ve 117 – 210 cm çapında dairesel bir tanktır (Şekil-4) (59).

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 (55,60). 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 yönlendirir. Gittikçe bu mesafe uzatılmalıdır. Bunu takip eden esas eğitim sırasında platformun yeri alıştırmaya 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 (61). Platforma çıktıktan sonra yükselti üzerinde bekletilme süreleri 10–15 sn olup, 3 saniye (56) ile 30 saniye (61,62) 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 ulaşmaya 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 (63).

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 30-60 sn içinde daha önce platformun bulunduğu bölgede diğer bölgelere kıyasla ne kadar yüzdüğü kaydedilmektedir. Platformun yerini iyi öğrenmiş bir rat veya fareden harcadığı zamanın/yolun en az %30'unu platform bölgesinde geçirmesi beklenmektedir.

Davranış deneylerinde veri kayıtları, bilgisayar programları aracılığıyla veya kronometre kullanarak ratların gözle takibi yoluyla yapılabilmektedir (56).

İZOFLURAN – ÖĞRENME VE BELLEK FONKSİYONLARI

Yenidoğan ratlarda izofluran uygulamasını takiben saatler içerisinde nöronal hücre ölümü meydana geldiği birçok çalışma ile gösterilmiştir (4,5). İzofluran uygulamasının hangi mekanizmalar ile hücre ölümü meydana getirdiği henüz bilinmemektedir. Bu bulgular beyin gelişimi döneminde izoflurana maruz kalınmasıyla nörolojik sekel oluşması olasılığı yönündeki kuşkuları arttırmaktadır (6-8).

İzofluran, midazolam ve nitroz oksid karışımının 6 saat boyunca uygulandığı yenidoğan ratlarda apoptotik nörodejenarasyonun arttığı gözlenmiş ve ratların erişkin çağa ulaştığında öğrenme ve bellek fonksiyonlarının azaldığı saptanmıştır (22). Yapılan diğer bir çalışmada yenidoğan ratlara 4 saat uygulanan izofluranın uzaysal öğrenmeyi erişkin yaşta bozduğu ortaya konmuştur (18). Yenidoğan farelerde yapılan başka bir çalışmada ise 6 saat boyunca uygulanan %1,5 izofluranın erişkin çağda uzaysal öğrenme ve bellek üzerine etkisinin olmadığı bildirilmiştir (64). Yenidoğan ratlarda yapılan çalışmalarda izofluran, nitroz oksid ve midazolam anestezisi sonrası uygulanan melatoninin doz bağımlı olarak nörodejenasyonu azalttığı gösterilmiştir (65).

GEREC VE YÖNTEM

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alındıktan sonra (EK-1), anestezi uygulaması Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, öğrenme ve bellek testleri Fizyoloji Laboratuvarı'nda yapıldı.

ARAŞTIRMADA KULLANILAN HAYVANLAR

Çalışmaya postnatal 7. günde olan (Resim-1), *Wistar* cinsi, ağırlıkları 9-11 gr arasında değişen, 42 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.

- Grup-1: Gece izofluran grubu (n:11)
- Grup-2: Gece kontrol grubu (n:10)
- Grup-3: Gündüz izofluran grubu (n:11)
- Grup-4: Gündüz kontrol grubu (n:10)

Gündüz grubuna (Grup-3) 07:00 - 13:00, gece grubuna (Grup-1) 19:00 - 01:00 saatleri arasında 6 saat süresince %1,5 izofluran verildi. Kontrol grupları (Grup-2 ve Grup-4) aynı saatler arasında oda havasında izlendi.

VOLATİL ANESTEZİK AJAN UYGULAMASI

Anestezi uygulaması: Her deney hayvanı için ayrı olmak üzere 450 mL hacimli gaz giriş ve çıkış sistemi bulunan cam kavanozlar kullanıldı. Cam kavanozlara vaporizatör (*Isoflurane, Vapor 19.1, Abbott Lab, Almanya*) ile 6 L.dk⁻¹ akım hızında oksijen içinde %1.5 konsantrasyonda izofluran (*Forane, Abbott Lab. İstanbul, Türkiye*) girişi sağlandı.



Resim-2. Anestezi uygulaması düzeneği

İnspire edilen oksijen ve uygulanan volatil ajanın konsantrasyon düzeyleri, çıkış hattına bağlanan anestezi gaz monitörü (*Anesthesia Gas Monitoring 1304, Danimarka*) ile izlenerek sabit tutuldu. Tüm kavanozlar 37°C sabit sıcaklıkta su banyosuna yerleştirildi (Resim-2). Ratlar 6 saat süre ile bu kavanozlarda gaz karışımı soludu.

Anestezi sonlandırılması: Volatil anestezi uygulaması 6 saatlik sürenin sonunda kesildi ve 6L.dk⁻¹ akım hızında oksijen 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 %1,5 izofluran 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 yapılanaya 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.

ÖĞRENME VE BELLEĞİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Ratlar öğrenme ve belleğin değerlendirilmesi amacıyla MST testi uygulanana kadar 5 hafta süre ile Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda standart koşullarda izlendi.

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 kadranlardan 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 ANALİZ

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

Öğrenme ve bellek testlerinin istatistiksel analizinde;

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

BULGULAR

Çalışmaya toplam 42 yavru rat alındı. İzofluran gruplarından birer rat (toplam 2 rat) kan gazı analizi amacıyla kullanıldı. Grup-2'den 2 rat, Grup-4'den 1 rat Morris Su Tankı testleri sırasında yüzemedikleri için çalışmadan çıkarıldı. Sonuç olarak deney gruplarının dağılımı Tablo-2'de sunulmuştur.

Tablo-2. Gruplardaki toplam rat sayıları

	Gruplar	Denek sayısı (n)
Grup-1	Gece izofluran grubu	10
Grup-2	Gece kontrol grubu	8
Grup-3	Gündüz izofluran grubu	10
Grup-4	Gündüz kontrol grubu	9

ARTER KAN GAZLARI ANALİZİ SONUÇLARI

İzofluran ile anestezi uygulanan Grup-1 ve Grup-3 gruplarındaki iki rattan alınan arter kan gazları 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	PaO₂ (mmHg)	PaCO₂ (mmHg)	Glukoz (mg.dL⁻¹)
Grup-1 (n:1)	7,38	153	23	42
Grup-3 (n:1)	7,41	155	24	41

MORRİS SU TANKI TESTİ SONUÇLARI

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

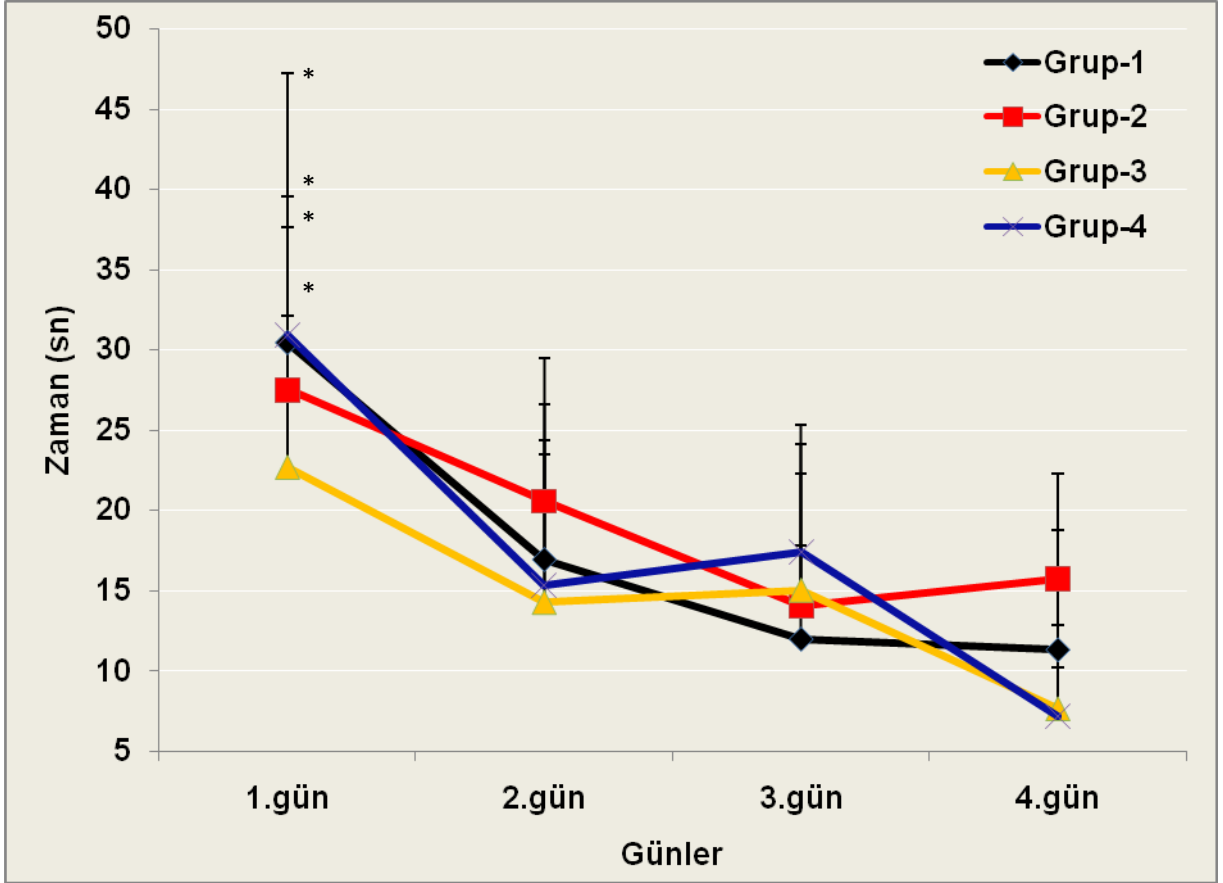
Tablo-4. Ratların platformu bulması için geçen toplam süre

	Platformu Bulma Süresi (sn) (Ortalama ± SD)			
	Grup-1 (n:10)	Grup-2 (n:8)	Grup-3 (n:10)	Grup-4 (n:9)
1.gün	30,47 ± 9,07*	27,53 ± 10,10*	22,66 ± 9,47*	30,91 ± 16,31*
2.gün	16,93 ± 9,70	20,60 ± 8,84	14,26 ± 10,09	15,33 ± 8,14
3.gün	11,96 ± 5,86	14,08 ± 10,08	15,01 ± 7,31	17,41 ± 7,89
4.gün	11,30 ± 7,43	15,77 ± 6,55	7,65 ± 5,20	7,21 ± 3,03

* Tüm gruplarda grup içi 1.gün ile 4.gün karşılaştırılmasında $p < 0,05$.

Grup-1 ile Grup-2, Grup-3 ile Grup-4, Grup-1 ile Grup-3’ün ratların platformu bulma süresinin 1., 2., 3. ve 4. gün ortalamaları açısından karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$) (Grafik-1).

Grup içi karşılaştırılmasında tüm gruplarda (Grup-1, Grup-2, Grup-3 ve Grup-4) birinci gün platformu bulma süresi ortalamasının, dördüncü gün platformu bulma süresi ortalamasına göre anlamlı olarak uzun bulundu (sırasıyla $p = 0,012$, $p = 0,049$, $p = 0,009$, $p = 0,008$) (Grafik-1).

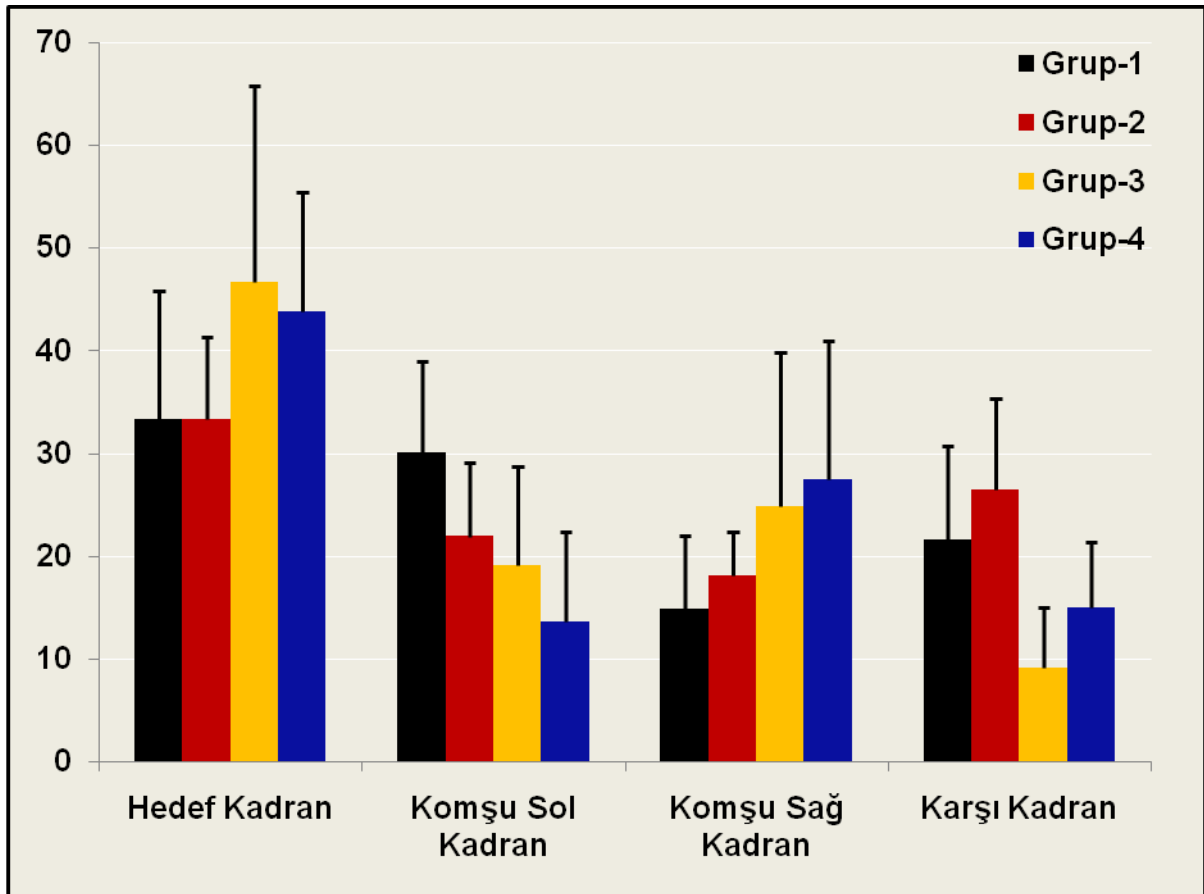


Grafik-1. Ratların platformu bulma süresi ortalamaları (*1gün ile 4.gün karşılaştırılmasında $p<0,05$)

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 ve Grafik-2'de sunulmuştur.

Tablo-5. Ratların kadrarlarda geçirdikleri süre nin yüzde değerlerinin ortalaması

	Kadrarlarda Geçirilen Süre (%) (ortalama \pm SD)			
	Hedef Kadran	Komşu Sol Kadran	Komşu Sağ Kadran	Karşı Kadran
Grup-1 (n:10)	33,37 \pm 12,40	30,05 \pm 8,88	14,87 \pm 7,05	21,57 \pm 9,10
Grup-2 (n:8)	33,31 \pm 8,01	21,91 \pm 7,20	18,12 \pm 4,19	26,51 \pm 8,83
Grup-3 (n:10)	46,71 \pm 19,15	19,08 \pm 9,70	24,88 \pm 14,94	9,09 \pm 5,93
Grup-4 (n:9)	43,80 \pm 11,63	13,63 \pm 8,68	27,43 \pm 13,48	14,98 \pm 6,33



Grafik-2. Ratların kadrarlarda geçirdiği srelerin yüzde değerlerinin ortalaması. (Grup-1: Gece izofluran grubu, Grup-2: Gece kontrol grubu, Grup-3: Gündüz izofluran grubu, Grup-4: Gündüz kontrol grubu)

Hedef kadranda geçirilen srelerin yüzdesinin ortalaması; Grup-1 ile Grup-2; Grup-1 ile Grup-3; Grup-3 ile Grup-4; Grup-2 ile Grup-4 karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla $p=0,99$; $p=0,081$; $p=0,69$; $p=0,050$).

TARTIŞMA

Çalışmamızda sirkadiyan ritmin izofluran uygulanan yenidoğan (7 günlük) ratlarda öğrenme ve bellek fonksiyonları üzerine etkili olmadığını saptadık.

Literatürde anestezi ajanlarının gelişmekte olan memeli beyinde oluşturduğu nörotoksik etkiyle ilişkili çok sayıda yayın olmasına karşın (1-6) bu nörotoksik etkiye sirkadiyan ritimin etkisi konusunda herhangi bir yayın bulunmamıştır. Doğan ve ark. (27) tarafından izofluranın nörotoksik etkisindeki sirkadiyan ritim ile ilişkili değişiklikler ilk kez tanımlanmıştır. Bu çalışmada yedi günlük yenidoğan ratlara altı saat süresince %1.5 (0,64 MAK) konsantrasyonda uygulanan izofluranın hem gece hem de gündüz uygulanmasının kontrol grupları ile karşılaştırıldığında belirgin olarak daha fazla nöroapoptotik yanıtı neden olduğu ve bu nörotoksik etkinin sirkadiyan ritimle değiştiğini, gece izofluran uygulamasının gündüz izofluran uygulamasına göre gelişmekte olan rat beyinde daha az nörotoksik etkisinin olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar gece anestezi uygulamasına bağlı daha az nörotoksitite görülmesini; izofluranın MAK değerinin gece artmasına veya sirkadiyan ritime bağlı artmış olan melatonin düzeyi ile ilişkili olduğunu düşündüklerini bildirmişlerdir. Bu görüşlerini inhalasyon ajanlarından biri olan halotanın gece anestezi ajan gereksinimi gündüze göre %19 daha fazla bulunduğunu saptayan bir çalışma ile desteklemişlerdir (53). Ancak izofluran ile ilgili sirkadiyan ritimin etkisini gösteren herhangi bir çalışma literatürde bulunmamasına rağmen izofluran gereksiniminde de gece saatlerinde benzer şekilde artış olduğunu ve bu nedenle gece ve gündüz gruplarına eşit konsantrasyonda uygulanan izofluranın, gece grubu için daha düşük MAK'a karşılık geldiğini, doz bağımlı bir süreç olan anestezi nörotoksitesindeki (6) gece ortaya çıkan azalmanın açıklanabileceği belirtmişlerdir. Gece artan melatonin düzeyinin ise; yenidoğan ratlara melatoninin (1-20 mg/kg, s.c.) verildiği bir çalışmada; melatoninin anesteziyle ilişkili apoptotik yanıtta doz bağımlı azalmaya neden olduğu gösterildiğini ve melatoninin bu etkisinin kesin mekanizma belirsiz olsa da iç mitokondrial membran stabilizasyonundan başlayarak apoptotik kaskadın belirli evrelerini etkilediği öne sürüldüğünü (65). Bu nedenle gece nöroapoptozun daha az olduğu görüşünü bildirmişlerdir.

Çalışmamızda izofluranın yenidoğan ratlarda nörokognitif fonksiyonları etkilemediğini saptadık. Platforma ulaşma süresi (öğrenme denemeleri) karşılaştırıldığında gruplar arasında fark olmamasına rağmen grup içi karşılaştırmada hem izofluran grubunun hem de kontrol grubunun platforma ulaşma süresini kısalttığı saptanmıştır. Kontrol grubu ile benzer sürede

platformu bulma ve bu sürenin 4. günde anlamlı olarak kısalmış olması izofluran grubundaki ratların öğrenme fonksiyonlarının etkilenmediğini göstermektedir. MST testinde performansın artmasında tekrarlamaların önemli olduğu bildirilmiştir (66). Deneme sayısı arttıkça hayvan ipuçlarını daha iyi değerlendirip hafızasına kaydeder ve özel haritalar oluşturarak daha sonraki denemelerde platformun yerini daha kolay bulduğu saptanmıştır.

İzofluranın gündüz veya gece uygulanması ile (Grup-1 ve Grup-3) platformun yerini öğrenme (hedef kadranda geçirilen süre) fonksiyonlarının etkilenmediği saptanmıştır. Platformun yerini iyi öğrenmiş bir rat veya fareden harcadığı zamanın/yolun en az %30'unu platform bölgesinde (hedef kadranda) geçirmesi beklenmektedir (55). Çalışmamızda tüm grupların hedef kadranda beklenen süreyi geçirdikleri saptanmıştır (Grup-1: %33.37, Grup-2: %33.31, Grup-3: %46.71, Grup-4: %43.80). Benzer şekilde postnatal 7 günlük rat beyinde hücre ölümüne neden olan olayların hepsinin nörokognitif bozukluğa yol açmadığı belirtilmiştir (67). Strattman ve ark.'nın (67) yaptığı çalışmada ratlarda beyin hücre ölümü veya uzun dönemde nörokognitif disfonksiyon yaratacak dozu belirlemek için yenidoğan (7 günlük) ratlara 1,2 ve 4 saat süresince 1 MAK izofluran uygulanmış, 1 saat izoflurana maruz kalan grupta beyin hücre ölümünde artış olmadığı, 6 saat izoflurana maruz kalan yenidoğan kemirgenlerdeki önceki bulgularla (4,68) uyumlu olarak 2 veya 4 saat izofluran maruziyetinin belirgin hücre ölümüne neden olduğu saptanmıştır. Anesteziden 8 hafta sonra nörokognitif fonksiyon değerlendirildiğinde sadece 4 saatlik izofluran özellikle uzaysal- bellek ve uzaysal *working memory* tasklarında nörokognitif defisite neden olduğu ve bu nedenle anestezinin indüklediği hücre ölümü daha önceden sanıldığı gibi anestezinin indüklediği nörokognitif disfonksiyonla sıkı sıkıya bağlı olmadığı bildirilmiştir. Bu durum 5 mg/kg midazolam kullanılarak dorsolateral talamik hücre ölümü saptanan ama defisit gözlenmeyen başka bir çalışmayla da desteklenmektedir (69). Bizim bulgularımızın aksine Jevtovic-Todorovic ve ark.'nın (4) 7 günlük ratlarda 6 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda veya kombinasyonlarda N₂O, izofluran ve midazolam uyguladıkları çalışmalarında, üçlü kombinasyonun (midazolam+ N₂O+ izofluran) yeni doğan ratların öğrenme ve bellek fonksiyonlarında anlamlı azalma yaptığını da göstermişlerdir. Bu çalışmanın sonucunun bizim çalışmamızdan farkı ratlara izofluran ile birlikte midazolam ve N₂O uygulamış olmaları olduğunu düşünüyoruz.

Çalışmamızda gece-gündüz anestezisi uygulamasına bağlı öğrenme ve bellek fonksiyonlarını değerlendirmek için MST testini kullandık. Anestezinin indüklediği uzun

dönem nörokognitif bozuklukların saptanması için uzaysal referans hafızasını değerlendiren, MST ve radyal kol testleri sıklıkla kullanılmaktadır (4,69,70). Kemirgenlerde uzaysal bellek hipokampal lezyonlardan etkilendiği için genellikle bu tasklar hipokampal bağımlı olarak kabul edilir (66).

Morris Su Tankı testlerini anestezi uygulamasından 5 hafta sonra yaptık. Ancak yeni doğan döneminde kullanılan anestezik ajanlara 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, 5, 6, 8 ve 16 hafta sonra uygulandığı görülmektedir (71-75). Ayrıca 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 beklenmektedir (72). İzofluran uygulamasından hemen sonra nöronal hücre ölümü oluşmasına rağmen kognitif bozuklukların 4-6 hafta sonra belirgin hale geldiği gösterilmiştir (4,70,71). Nörokognitif bozukluklar arasında kemirgenlerin sosyal davranışlarındaki bozukluklar ile hipokampus kaynaklı (uzaysal öğrenme ve bellekteki) bozukluklar sayılabilir (4,69-71).

Morris Su Tankı testi uygulanan hayvanlarda öğrenme performansının bozulması her zaman uzaysal öğrenmenin bozulduğunu göstermez. Hayvanın bulunduğu ortamdan rahatsız olması, korkması da öğrenme performansını etkiler (76). Bu deneylerde ratların cinsiyetlere göre de farklı davranışlar sergilediği, bu durumun hormonal farklılık ve hipokampus gelişimdeki farktan kaynaklandığı ve özellikle uzaysal öğrenmenin değerlendirilmesinde erkek cinsiyetin daha uygun olduğu saptanmıştır (76). Ancak çalışmamızda 7 günlük ratlarda cinsiyet belirleme olanağı olmadığı için izofluran uygulaması öncesi annelerinin yanından rastgele alınan ratların cinsiyetine önem verilmemiştir.

Ratlarla yapılan birçok çalışmada inhalasyon anestezikleri kullanıldığından bu ajanların yaşamın erken dönemindeki MAK değerlerinin belirlenmesi gerekmiştir. Orliaguet ve ark. (77) 9 günlük yavru ratlar için izofluranın 1 MAK değerini % 2.34 olarak saptamışlardır. Ratların postnatal maturasyonu sırasında sevofluran, halotan ve izofluranın MAK değerlerinin araştırıldığı bu çalışmada (77) infant ratlarla insan infantları arasında iyi bir uyum olduğu bildirilmiştir. İki günlük ratların yaklaşık 24 haftalık prematür insanlarla, 9 günlük ratların tam gelişmiş neonatlarla ve 30 günlük ratların insanda genç erişkinlerle eşdeğer olduğu

varsayılmıştır (77). Çalışmamızda kullanılan % 1.5 konsantrasyonda izofluran bu yaş grubu için yaklaşık 0.64 MAK'a karşılık gelmektedir.

Anesteziyle indüklenen nöroapoptoz çalışmalarında ve davranış deneylerinde (4,78) denek olarak sıklıkla ratlar kullanıldığından çalışmamızda, gelişmekte olan memeli beyninde anestezi ilaçlarının neden olduğu nörokognitif bozukluğa sirkadiyan ritmin etkisini araştırmak üzere Wistar türü ratları kullandık.

İnhalasyon anesteziklerinden sadece halotanın MAK'ındaki sirkadiyan değişim araştırılmış ve ratlarda halotanın MAK'ı saat 12:00 de %1.26 iken, saat 20:00 de %1.45'e çıkmıştır (53). Bu nedenle çalışmamızda altı saatlik anestezi uygulaması için anestezi gereksiniminin en fazla değişkenlik gösterdiği zaman dilimlerini içeren ve günün aydınlık ve karanlık epizotlarında yer alan altışar saatlik uygulama sürelerini, aralarında 12 saat fark olacak şekilde, gece grubu için 19:00-01:00 ve gündüz grubu için 07:00-13:00 saatleri olarak seçtik.

Çalışmamızda anestezi uygulanan yenidoğan ratlarda hipoksi, iskemi veya hipogliseminin de anestezi ilaç uygulamasıyla ortaya çıkması beklenen nörodejeneratif reaksiyondan sorumlu olabileceği düşünülebilir, ancak çalışmamızda izofluran uyguladığımız gruplardan (Grup-1 ve Grup-3) randomize olarak seçilen birer rattan alınan arter kan gazları analizleri sonuçlarında herhangi bir metabolik ve solunumsal anormallik saptamadık ve kan glukoz düzeylerini normal sınırlar tespit ettik. Anestezi altındaki yenidoğan ratların hemodinamik ve solunumsal monitörizasyonları küçük boyutlarından dolayı teknik olarak uygulanabilir olmadığından (65) ve elimizdeki cihazların, hemodinamiyi etkilemeyecek düzeyde alınan küçük kan volümlerinde (100 µL) ölçüme uygun olmadığından, çalışmamızda tüm deneklere hemodinamik monitörizasyon ve arter kan gazı analizi yapamadık.

Literatürdeki mevcut bulgular anestezi uygulanan yenidoğan ratlarda hipoksi/iskeminin (79,80) veya hipogliseminin (14) anestezi ilaç uygulamasıyla ilişkili nörodejeneratif reaksiyondan sorumlu olabileceği görüşüyle ters düşmektedir. Hipoksi ve iskemiye yanıt olarak oluşan akut hücre ölümünün, anesteziyle indüklenen nöroapoptozdaki hücresel yanıtlarının belirgin olarak farklı olduğu birçok kez gösterilmiştir (14,81). Nöroapoptoz oluşturan dozda ketamin (82) veya izofluran, N₂O ve midazolam kombinasyonu (8) uygulanan yenidoğan 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. (83) hipoksi ve iskemiye dair kanıt bulamasa da infant farelerin %1,8 izoflurana maruziyetinin kan glikoz değerlerinde 53 ± 22 mg/dL (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 (5,14) ve infant ratlara üçlü anestezi kokteyl (izofluran, midazolam ve N₂O) şeklinde uygulanmış (4), çalışmalarda nöroapoptoz tetiklenirken hipoglisemi tespit edilmemiştir.

SONUÇ ve ÖNERİLER:

Yenidoğan ratlarda yaptığımız bu çalışma ile %1.5 konsantrasyonda (0.64 MAK) uygulanan izofluranın gece veya gündüz uygulamasının öğrenme ve bellek fonksiyonlarını etkilemediğini saptadık. Bu çalışma sirkadiyan ritmin izofluran uygulanan yenidoğan ratların öğrenme ve bellek fonksiyonları üzeri etkilerini inceleyen ilk çalışmadır.

Sirkadiyan ritimin anestezi uygulamasına etkisi tam bilinmemektedir. Yenidoğan döneminde izofluranın farklı konsantrasyonlarda veya tekrarlayan gece-gündüz uygulamalarının neden olabileceği nörokognitif bozukluğu değerlendirmek için daha ileri çalışmalara gerek vardır.

KAYNAKLAR

1. Campagna JA, Miller KW, Forman SA. Mechanisms of actions of inhaled anesthetics. *N Engl J Med* 2003;348:2110–24.
2. Varju P, Katarova Z, Madarasz E, Szabo G. GABA signalling during development: new data and old questions. *Cell Tissue Res* 2001;305:239–46.
3. De Lima AD, Opitz T, Voigt T. Irreversible loss of a subpopulation of cortical interneurons in the absence of glutamatergic network activity. *Eur J Neurosci* 2004;19:2931–43.
4. Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, Benshoff ND ve ark. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci* 2003;23:876–82.
5. Johnson SA, Young C, Olney JW. Isoflurane-induced neuroapoptosis in the developing brain of nonhypoglycemic mice. *J Neurosurg Anesthesiol* 2008;20:21–8.
6. Jevtovic-Todorovic V, Olney JW. PRO: anesthesia-induced developmental neuroapoptosis: status of the evidence. *Anesth Analg* 2008;106:1659–63.
7. Loepke AW, McGowan FX Jr, Soriano SG. CON: The toxic effects of anesthetics in the developing brain: the clinical perspective. *Anesth Analg* 2008;106:1664–9.
8. 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.
9. Arnold JH, Truog RD, Rice SA. Prolonged administration of isoflurane to pediatric patients during mechanical ventilation. *Anesth Analg* 1993;520-6.
10. McBeth C, Watkins TG. Isoflurane for sedation in a case of congenital myasthenia gravis. *Br J Anaesth* 1996;77:672–4.
11. Sackey PV, Martling CR, Radell PJ. Three cases of PICU sedation with isoflurane delivered by the ‘AnaConDa’. *Paediatr Anaesth* 2005;15:879–85.

12. Ma D, Williamson P, Januszewski A, Nogaro MC ve ark. Xenon mitigates isoflurane-induced neuronal apoptosis in the developing rodent brain. *Anesthesiology* 2007;106:746–53.
13. Olney JW, Wang H, Qin Y, Labruyere J ve ark. Pilocarpine pretreatment reduces neuroapoptosis induced by midazolam or isoflurane in infant mouse brain. Program No. 286.15. 2006 Neuroscience Meeting Planner. Atlanta, GA: Society for Neuroscience, 2006.
14. Rizzi S, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V. Clinically used general anesthetics induce neuroapoptosis in the developing piglet brain. Program No. 251.7.2005 Abstract/Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2005.
15. Rizzi S, Yon JH, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V. Short exposure to general anesthesia causes widespread neuronal suicide in the developing guinea pig brain. Program No. 251.6. 2005 Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2005.
16. Stratmann G, Bell JD, Bickler P, Alvi R ve ark. Neonatal isoflurane anesthesia causes a permanent neurocognitive deficit in rats. Program No. 462.7.2006 Neuroscience Meeting Planner. Atlanta, GA: Society for Neuroscience, 2006.
17. 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.
18. Brambrink AM, Evers AS, Avidan MS, Farber NB ve ark. Isoflurane-induced neuroapoptosis in the neonatal rhesus macaque brain. *Anesthesiology* 2010;112:834-41.
19. Loepke AW, Istaphanous G, Albers E, McCann JC ve ark. Neonatal isoflurane anesthesia does not impair neurocognitive function and behavior in the same mice in adulthood. Society of Pediatric Anesthesia Winter Meeting 2007, Phoenix, AZ, Available at <http://www.pedsanesthesia.org/meetings/2007winter/pdfs/P8.pdf>.

20. Challet E. Minireview: entrainment of the suprachiasmatic clockwork in diurnal and nocturnal mammals. *Endocrinology* 2007;148:5648–55.
21. Saper CB, Lu J, Chou TC, Gooley J. The hypothalamic integrator for circadian rhythms. *Trends Neurosci* 2005;28:152–7.
22. Scheving LE, Vedral D, Pauly JA. Circadian susceptibility rhythm in rats to pentobarbital sodium. *Anat Rec* 1968;160:741–50 Abstract.
23. Sato Y, Kobayashi E, Hakamata Y ve ark. Chronopharmacological studies of ketamine in normal and NMDA epsilon1 receptor knockout mice. *Br J Anaesth* 2004;92:783–92.
24. Rebelto M, Ambros L, Montoya L ve ark. Treatment-time-dependent difference of ketamine pharmacological response and toxicity in rats. *Chronobiol Int* 2002;19:937–45.
25. Rebelto M, Ambros L, Waxman S ve ark. Chronobiological study of the pharmacological response of rats to combination ketamine-midazolam. *Chronobiol Int* 2004;21:591–600.
26. Challet E, Gourmelen S, Pevet P ve ark. Reciprocal relationships between general (propofol) anesthesia and circadian time in rats. *Neuropsychopharmacology* 2007;32:728–35.
27. Doğan A, Sirkadiyen Ritmin İzofluran Uygulanan Yenidoğan Ratlarda Nörotoksisite Üzerine Etkisinin Araştırılması. DEÜTF Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD Uzmanlık Tezi 2008.
28. Ikonomidou C, Bittgau P, Koch C ve ark. Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochem Pharmacol* 2001;62:401–5.
29. 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.

30. Nishikawa K, MacIver M. Agent-selective effects of volatile anesthetics on GABAA receptor-mediated synaptic inhibition in hippocampal interneurons. *Anesthesiology* 2001;94:340-7.
31. Nishikawa K, MacIver MB. Membrane and synaptic actions of halothane on rat hippocampal pyramidal neurons and inhibitory interneurons. *J Neurosci* 2000;20:5915-23.
32. Zeynep Kayhan. Klinik Anestezi. Genişletilmiş üçüncü baskı, İstanbul, Logos Yayıncılık Tic. A.Ş, 2004:90-2.
33. David E. Longnecker. *Anesthesiology*. The McGraw-Hill Companies Inc. 2008 p:741.
34. Lee Kavanau J. Biological time-keeping mechanisms: A need for broader perspectives? *Medical Hypotheses* 2006;67:1358–62.
35. Korf HW, Von Gall C, Stehle J. The circadian system and melatonin: lessons from rats and mice. *Chronobiol Intern* 2003; 20(4): 697-710.
36. Schibler Ueli. The daily rhythms of genes, cells and organs. *EMBO reports* 2005;6:9-13.
37. Okamura H. Circadian and seasonal rhythms: Integration of mammalian circadian clock signals from molecule to behavior. *J Endocrinol* 2003;177:3-6.
38. Chassard D, Bruguerolle B. Chronobiology and anesthesia. *Anesthesiology* 2004;100:413-27.
39. Zhang J, Dong X, Fujimoto Y, Okamura H. Molecular signals of mammalian circadian clock. *Kobe j Med Sci* 2004; 50;101-9.
40. Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM ve ark. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in human. *Acta Biochimica Polonica* 2003;50:1129-46.
41. Reiter RJ. Melatonin: clinical relevance. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003;17:273-85.

42. Bunney, WE, Bunney, BG. Molecular Clock genes in Man and Lower Animals: Possible Implications for Circadian Abnormalities in Depression. *Neuropsychopharmacology* 2000;22:335-45.
43. Earnest DJ, Liang FQ, Ratcliff M, Cassone VM. Immortal time: circadian clock properties of rat suprachiasmatic cell lines. *Science*. 1999;283:693-5.
44. Stanewsky R. Clock mechanisms in *Drosophila*. *Cell Tissue Res* 2002;309:11-26.
45. Matthews JH, Marte E, Halberg F. A circadian susceptibility-resistance cycle to Fluothane in male B1 mice. *Can Anesth Soc J* 1964;11:280–90.
46. Altmayer P, Groterath E, Lucker PW, Mayer D ve ark. Circadian fluctuations of pharmacokinetic parameters after oral administration of hexobarbital [author's translation]. *Arzneimittelforschung* 1979;29:1422–8 Abstract
47. Jaliffa CO, Saenz D, Resnik E, Sarmiento MK ve ark. Circadian activity of the GABAergic system in the golden hamster retina. *Brain Research* 2001;912:195–202.
48. Ross FH, Sermons AL, Owasoyo JO, Walker CA: Circadian variation of diazepam acute toxicity in mice. *Experientia* 1981;37:72–3 Abstract
49. Naranjo CA, Sellers EM, Giles HG, Abel JG. Diurnal variations in plasma diazepam concentrations associated with reciprocal changes in free fraction. *Br J Clin Pharmacol* 1980;9:265–72.
50. Koopmans R, Dingemanse J, Danhof M, Horsten GP ve ark. The influence of dosage time of midazolam on its pharmacokinetics and effects in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1991;50:16–24 Abstract
51. Brennan MJW, Volicer L, Moore-Ede MC, Borsook D. Daily rhythms of benzodiazepine receptor numbers in frontal lobe and cerebellum in the rat. *Life Sci* 1985;36:2333–7 Abstract

52. Ishida N, Matsui M, Mitsui Y, Mishina M. Circadian expression of NMDA receptor mRNAs, epsilon 3 and zeta 1, in the suprachiasmatic nucleus of rat brain. *Neurosci Lett* 1994;166:211–5 Abstract
53. Munson ES, Martucci RW, Smith RE. Circadian variations in anesthetic requirement and toxicity in rats. *Anesthesiology* 1970;32:507–14.
54. Kesner RP, Hopkins RO. Mnemonic functions of the hippocampus: A comparison between animals and humans. *Biol Psychol* 2006;73:3-18.
55. 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.
56. Lieben CKJ, 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.
57. Pereria LO, Arteni NS, Peterson RC, Padilha da Rocha A ve ark. 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.
58. Szyndler J, Piechal A, Blecharz-Klin K, Skórzewska A ve ark. Effect of kindled seizures on rat behavior in water Morris maze test amino acid concentrations in brain structures. *Pharmacological Reports* 2006;58:75-82.
59. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984;11:47-60.
60. Nicholas A, Munhoz CD, Ferguson D, Campbell L ve ark. Enhancing cognition after stress with gene therapy. *The Journal of Neuroscience* 2006;26:11637-43.
61. Yun YJ, Lee B, Hahm DH, Kang SK ve ark. Neuroprotective effect of palmul-chongmyeong-tang and ischemia-induced learning and memory deficits in the rat. *Biol Pharm Bull* 2007;30:337-42.

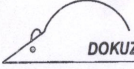
62. M Kiray, HA Bagriyanik, C Pekcetin, Ergur BU ve ark. Deprenyl and the relationship between its effects on spatial memory, oxidant stress and hippocampal neurons in aged male rats. *Physiol Res* 2006;55:205-12.
63. Dursun I, Jakubowska-Doğru E, Uzbay T. Effects of prenatal exposure to alcohol on activity, anxiety, motor coordination, and memory in young adult Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;85:345-55.
64. Li Y, Liang G, Armstead W, Wei H. Isoflurane inhibits spontaneous apoptosis in rat fetal developing brains and improves postnatal spatial reference memory. Program No. 462.6. 2006 Neuroscience Meeting Planner. Atlanta, GA: Society for Neuroscience, 2006.
65. Yon JH, Carter BL, Reiter RJ, Jevtovic-Todorovic V. Melatonin reduces the severity of anesthesia-induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *Neurobiol Dis* 2006;21:522–30.
66. Aggleton JP, Brown MW. Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behav Brain Sci* 1999;22:425– 44.
67. Stratmann G, May LD, Sall JW, Alvi RS ve ark. Effect of hypercarbia and isoflurane on brain cell death and neurocognitive dysfunction in 7-day old rats. *Anesthesiology* 2009;110:849–61.
68. Loepke AW, Istaphanous GK, McAuliffe JJ III, Miles L ve ark. The effects of neonatal isoflurane exposure in mice on brain cell viability, adult behavior, learning, and memory. *Anesth Analg* 2009;108:90–104.
69. Fredriksson A, Archer T, Alm H, Gordh T ve ark. Neurofunctional deficits and potentiated apoptosis by neonatal NMDA antagonist administration. *Behav Brain Res* 2004;153:367–76.
70. Satomoto M, Satoh Y, Terui K, Miyao H ve ark. Neonatal exposure to sevoflurane induces abnormal social behaviors and deficits in fear conditioning in mice. *Anesthesiology* 2009;110:628–37.

71. Stratmann G, Sall JW, May LD, Bell JS ve ark. Isoflurane differentially affects neurogenesis and long-term neurocognitive function in 60-day-old and 7-day-old rats. *Anesthesiology* 2009; 110:834–48.
72. 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.
73. Culley DJ, Baxter MG, Crosby CA, Yukhananov R ve ark. Impaired acquisition of spatial memory 2 weeks after isoflurane and isoflurane-nitrous oxide anesthesia in aged rats. *Anesth Analg* 2004;99:1393–7.
74. 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.
75. Culley DJ, Raghavan SV, Waly M, Baxter MG ve ark. Nitrous oxide decreases cortical methionine synthase transiently but produces lasting memory impairment in aged rats. *Anesth Analg* 2007;105:83–8.
76. Hölscher C. Stress impairs performance in spatial water maze learning tasks. *Behav Brain Res* 1999;100:225-35.
77. Gilles O, Benoit V, Olivier L, Belaid B. Minimal alveolar concentration of volatile anesthetics in rats during postnatal maturation. *Anesthesiology* 2001;95:734-9.
78. 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.
79. Anand KJS, Soriano SG. Anesthetic agents and the immature brain: are these toxic or therapeutic? *Anesthesiology* 2004;101:527–30.
80. 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.

81. Dikranian K, Ishimaru MJ, Tenkova T, Labruyere J ve ark. Apoptosis in the *in vivo* mammalian forebrain. *Neurobiol Dis* 2001;8:359–79.
82. Young C, Jevtovic-Todorovic V, Qin YQ, Tenkova T ve ark. Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain. *Br J Pharmacol* 2005;146:189–97.
83. Loepke AW, McCann JC, Kurth CD, McAuliffe JJ. The physiologic effects of isoflurane anesthesia in neonatal mice. *Anesth Analg* 2006;102:75–80.

EKLER

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

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**

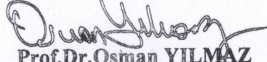
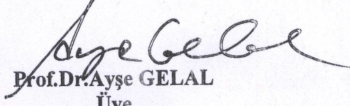
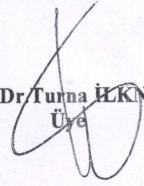
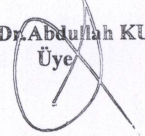
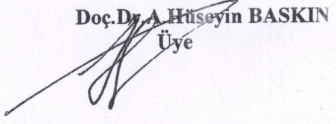
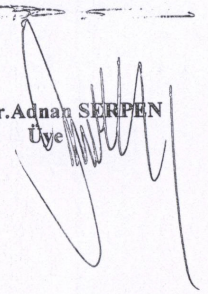
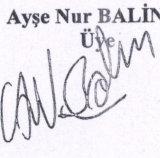
35340, Inciraltı, İzmir-232 412254
<http://deu.edu.tr/idenyetik/>

Toplantı No : 10/14/2009
Toplantı Tarihi : 03 Temmuz 2009

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

52/2009 Protokol No'lu; Anesteziyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı Öğretim doktorlarından Dr.Özgür ÖZEL'in yürütücüsü olduğu "Sirkadiyen ritmin izofluran uygulanan yenidoğan ratlarda öğrenme ve bellek üzerine etkisinin araştırılması" isimli 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 (katılmadı)	 Prof.Dr.Ayşe GELAL Üye
Doç.Dr. Hüseyin ASTARCIOĞLU Üye (katılmadı)	 Doç.Dr.Tunna İLKNUR Üye
 Doç.Dr.Abdullah KUMRAL Üye	 Doç.Dr.A.Hüseyin BASKIN Üye
Doç.Dr.Yücel ARISOY Üye	Doç.Dr.Tonay İNCEBOZ Üye
 Vtr.Dr.Adnan SERPEN Üye	 Ayşe Nur BALIN Üye