

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

**YENİDOĞAN RATLARDA TEKRARLANAN  
DESFLURAN UYGULAMASI ALZHEİMER  
HASTALIĞI OLUŞTURUR MU?**

**DR. SİBEL ERGÜRZ**

**UZMANLIK TEZİ**

**İZMİR-2012**

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

**YENİDOĞAN RATLARDA TEKRARLANAN  
DESFLURAN UYGULAMASI ALZHEİMER  
HASTALIĞI OLUŞTURUR MU?**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. SİBEL ERGÜRZ**

**Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Ali GÜNERLİ**

Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi İdari Mali İşler Dairesi Başkanlığı Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2011-KB-SAĞ-33 sayılı proje ile desteklenmiştir.

## **İÇİNDEKİLER**

## **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.....	4
GENEL BİLGİLER.....	5
Genel Anestezi.....	5
Genel Anesteziklerin Santral Sinir Sistemine Etkileri .....	6
Desfluran .....	6
Alzheimer Hastalığı.....	9
GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
BULGULAR.....	19
TARTIŞMA.....	26
KAYNAKLAR .....	32
EKLER	

Ek 1: ETİK KURUL İZİN BELGESİ

## **TESEKKÜR**

DEÜTF Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD'ndaki uzmanlık eğitimim süresince bilgi, deneyim ve önerilerinden faydalandığım ve faydalanacağım, gerçekçi ve araştırmacı eğitimimde emeği geçen, hekimliğin ve anesteziğin temel ilkelerini öğrendiğim değerli hocalarım Prof.Dr. Ali GÜNERLİ, Prof.Dr. Zahide ELAR, Prof.Dr. Atalay ARKAN, Prof.Dr. Erol GÖKEL, Prof.Dr. Semih KÜÇÜKGÜÇLÜ, Prof.Dr. Bahar Kuvaki BALKAN, Prof.Dr. Sermin ÖZTEKİN, Prof.Dr. Deniz ÖZZEYBEK, Prof.Dr. Leyla İYİLİKÇİ, Prof.Dr. Hasan HEPAĞUŞLAR'a ve asistanlığım süresince birlikte çalıştığım, eğitimime katkıda bulunan bölümümüzün tüm öğretim üyelerine ve uzmanlarına

Eğitimimde, hayata bakış açımında büyük emeği ve katkısı olan, her konuda desteğini aldığım değerli tez hocam Prof.Dr. Ali GÜNERLİ'ye,

Tezimin her aşamasında, büyük emek ve vakit harcayan, sadece Anesteziyoloji ile ilgili değil her konuda desteğini esirgemeyen, hatalarımı gösterip doğrularımı överek eğitimim için sabırla uğraşan, hepimizin ağabeyi Prof.Dr. Necati GÖKMEN'e ve zamanının büyük bir kısmını bizler için ayırmasını hoşgörü ile karşılayan değerli ailesine,

Tezimin her aşamasında, büyük emek ve vakit harcayan, izinli olduğu günlerde bile benimle ilgilenen, her türlü nazımı çeken Uzm.Dr. Elvan ÖÇMEN'e,

Tez araştırmam sırasında bana yardımcı olan Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilimleri Anabilim Dalı'ndan Doç.Dr. Şermin GENÇ ve Araş.Gör.Dr. Kemal Uğur TÜFEKÇİ' ye

Anesteziğin heyecanını paylaştığım tüm asistan arkadaşlarıma, özellikle Dr.Şafak ŞALK' a

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

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

Benden desteğini, sevgisini ve sabrını esirgemeyen eşim Kemal'e,

Nilda'ma (kelimelerin anlamsızlaştığı an)

Yürekten sevgi ve saygılarımı sunar, çok teşekkür ederim.

**DR.Sibel ERGÜRZ**

## **TABLO LİSTESİ**

### **Sayfa No**

<b>Tablo 1 .Deney gruplarındaki hayvan dağılımı.....</b>	<b>19</b>
--	-----------

## **SEKİL LİSTESİ**

### **Sayfa No**

<b>Şekil 1.</b> Desfluranın kimyasal yapısı.....	7
<b>Şekil 2.</b> İnhalasyon anesteziklerin, hücre içi amiloid $\beta$ ( $A\beta$ ) seviyesinde artış, $A\beta$ -tau agregasyonu ve/veya intrasellüler kalsiyum homeostazisinde bozulma sonucu; sinaptik disfonksiyon ve nöronal apoptozis mekanizmaları.....	12
<b>Şekil 3.</b> <i>Tau</i> ekspresyon bant yoğunluklar .....	21
<b>Şekil 4.</b> <i>Tau</i> fosforilasyonunun bant yoğunlukları.....	22
<b>Şekil 5.</b> Amiloid beta ekspresyon bant yoğunlukları .....	24

## **RESİM LİSTESİ**

### **Sayfa No**

<b>Resim1.</b> Postnatal 7. günde olan ratlar.....	13
<b>Resim 2.</b> Anestezi uygulama düzeneği .....	15

## **GRAFİK LİSTESİ**

### **Sayfa No**

<b>Grafik 1:</b> AChE aktivite sonuçları .....	20
<b>Grafik 2:</b> <i>Tau</i> ekspresyonunun <i>aktine</i> göre normalize edilmiş bant yoğunlukları .....	21
<b>Grafik 3:</b> <i>Tau</i> fosforilasyonunun total tau'ya göre normalize edilmiş bant Yoğunlukları .....	23
<b>Grafik 4:</b> Amiloid-beta ekspresyonunun aktine göre normalize edilmiş bant Yoğunlukları .....	24
<b>Grafik 5:</b> Apoptoz değerleri.....	25



## **KISALTMALAR**

- AH.....: Alzheimer hastalığı**
- Na.....: Sodyum**
- K.....: Potasyum**
- Ca.....: Kalsiyum**
- Ach.....: Asetilkolin**
- GABA.....: Gama amino bütirik asit**
- TUNEL.....:Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated Dntp Nick end Labeling Assay**
- DNA.....: Deoksiribonükleik Asit**
- MAK.....: Minimum alveolar konsantrasyon**
- GABA<sub>A</sub>.....: Gama amino bütirik asit tip A**
- NMDA.....: N metil D aspartat**
- N<sub>2</sub>O.....: Azot protoksit**
- SSS.....: Santral sinir sisitemi**
- mAch.....: Muskarinik asetilkolin**
- nAch.....: Nikotinik asetilkolin**
- EEG.....: Elektroensefalografi**
- BIS.....: Bispektralindeks**
- PCO<sub>2</sub>.....: Parsiyel karbondioksit basıncı**
- CO<sub>2</sub>.....: Karbondioksit**
- A $\beta$ P.....: Beta Amiloid Protein**
- A $\beta$ .....: Amiloid-beta**
- APP.....: Amiloid prekürsör protein**
- BOS.....: Beyin omurilik sıvısı**
- MAP.....: Mikrotübülle ilişkili protein**
- MT.....: Mikrotübül**
- GSK-3 $\beta$ .....: Glikojen sentetaz kinaz-3 beta**
- PP2A.....: Protein fosfataz 2A**
- CTF  $\beta$  .....: C-terminal fragmanlar**
- BACE .....: $\beta$  amiloid prekürsör proteini dönüştürücü enzim**

## **ÖZET:**

### **YENİDOĞAN RATLARDA TEKRARLANAN DESFLURAN UYGULAMASI**

#### **ALZHEİMER HASTALIĞI OLUŞTURUR MU?**

Sibel Ergürz , Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, İZMİR

**Amaç:** Pediyatrik dönemde kullanılan anesteziklerin gelişmekte olan beyine etkileri sıklıkla araştırılmaktadır. Bu çalışmanın amacı yenidoğan (yedi günlük) ratlarda tekrarlanan desfluran uygulamasının Alzheimer hastalığı oluşturması üzerine olası etkisini araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmaya 37 yenidoğan rat alındı ve 6 gruba randomize edildi; bir kez anestezi uygulanan grup (GID) (n:6), beş kez anestezi uygulanan grup (GVD) (n:6), on kez anestezi uygulanan grup (GXD) (n:7) olarak üç gruba ayrıldı ve 6 L.dk<sup>-1</sup> akım hızında oksijen içinde %4,4 konsantrasyonda desfluran iki saat (48 saatte bir tekrarlanarak) uygulandı. Kontrol grubundaki ratlar (GIK) (n:6), (GVK) (n:5), (GXX) (n:6) ise oda havasında solutuldu. Ratlar son anestezi uygulamasından 24 saat sonra sakrifiye edildi, çıkarılan beyin dokusu -80 °C’de donduruldu.

**Sonuçlar:** Moleküler inceleme 1, 5 ve 10 kez 0.6 MAK desfluran uygulaması sonrası hipokampal tau, fosforile tau, asetil kolin esteraz ve amiloid β prekürsör protein düzeylerinde anlamlı bir artış olmadığı, apoptozu ise azaltıldığını saptadık. GXX tau ekspresyon düzeyleri GIK ve GVK tau ekspresyon seviyelerine göre anlamlı düşük bulundu (p=0,001; p=0,006). GXD tau ekspresyonları GID tau ekspresyon düzeylerine göre anlamlı düşük bulunurken (p=0,001); GVD tau ekspresyon düzeylerine ile GID tau ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmadı (p=0,078). GXD p-tau değerleri GID ve GVD p-tau değerlerine göre anlamlı yüksek bulundu (p=0,016; p=0,008). GVD amiloid-beta proteininin ekspresyon düzeyleri GID ve GXD amiloid-beta proteininin ekspresyon düzeylerine göre anlamlı düşük bulundu (p=0,001; p=0,001). GXD amiloid-beta proteininin ekspresyon düzeyleri GID amiloid-beta proteininin ekspresyon düzeylerine göre anlamlı düşük bulundu (p= 0,004). GID ve GVD ile GXD apoptoz değerleri karşılaştırıldığında; GXD apoptoz değerleri GID ve GVD apoptoz değerlerine göre anlamlı düşük bulundu (sırasıyla p=0,036; p=0,01).

**Tartışma ve Sonuç:** Çalışmamızda 7 günlük ratlarda 1,5 ve 10 kez 0.6 MAK desfluran uygulaması sonrası hipokampal tau, fosforile tau, asetil kolin esteraz ve amiloid β prekürsör protein düzeylerinde anlamlı bir artış saptanmadı. Ancak artan yaşla birlikte anestezi uygulaması ile hızlanan tau düzeyinde azalma ve fosforile tau düzeyinde artma olduğu görüldü.

**Anahtar Kelimeler:** Desfluran, rat, Alzheimer hastalığı, tau, amiloid beta, apoptoz

## **SUMMARY:**

### **DO REPEATED DESFLURANE TREATMENTS CAUSE ALZHEIMER DISEASE IN NEWBORN RATS?**

**Sibel Ergürz, Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine,**

**Aim:** The effects of anesthetic agents, used in pediatric anesthesia on developing brain are studied oftenly now a days. The aim of this study was to evaluate the effect of repeated desflurane treatments on Alzheimer disease development in newborn rats (7 days old)

**Material and methods:** Study included 37 newborn rats which were randomized to 6 groups; of them study groups were: the group anaesthetized for once (GID) (n=6), the group anaesthetized for five times (GVD) (n=6), the group anaesthetized for ten times (GXD) (n=7); and they received 4.4% desflurane in O<sub>2</sub> with a flow rate of 6 L/mn for 2 hours (repeated every 48 hours). The control groups (GIK) (n=6), (GVK) (n=5) (GXK) (n=6) breathed ambient air. 24 hours after the last anaesthesia, rats were sacrificed and their brains were removed and stored at -80 C.

**Results:** Molecular investigation did not show a significant increase in hippocampal tau, phosphorylated tau, acetylcholine esterase and amyloid  $\beta$  precursor protein levels after 1, 5 and 10 administrations of 0.6 MAC desflurane but ,apoptosis was decreased. When compared with GIK and GVK tau expression levels, GXK tau expression levels were significantly lower (p=0.001, p=0.006). GXD tau expression levels were significantly lower than GID tau expression levels (p=0.001), but there was not any significant difference between GVD and GID tau values (p=0.078). GXD p-tau levels were significantly higher than GID and GVD p-tau levels (p= 0.016, p=0.008). GVD amyloid  $\beta$  protein expression values were significantly lower than GID and GXD amyloid  $\beta$  protein expression amount (p=0.001, p=0.001). GXD amyloid  $\beta$  protein expression amounts were significantly lower than GID amyloid  $\beta$  protein expression levels (p=0.004).When apoptosis levels of GID, GVD and GXD were compared; GXD apoptosis values were significantly lower than GID and GVD apoptosis levels (p=0.036; p=0.01 respectively).

**Discussion and conclusion:** This study couldn't show a significant increase in hippocampal tau, phosphorylated tau, acetylcholine esterase and amyloid  $\beta$  protein levels after 1, 5 and 10 administrations of 0.6 MAC desflurane in 7 days old rats. However it was shown that aging causes the tau level, which increases with anaesthesia, to decrease and phosphorylated tau level to increase.

**Key words:** Desflurane, rat, Alzheimer disease, tau, amyloid beta.

## **GİRİŞ:**

Alzheimer Hastalığı (AH); kognitif fonksiyonlarda ilerleyici bozulma ile karakterize, küçük bir kısmı genetik nedenlerin baskın olduğu erken başlangıçlı, çoğunluğunu ise geç başlangıçlı sporadik tipte, yaşa bağlı demansların yaklaşık %50'sini oluşturan bir hastalıktır (1). Hastalığın patogenezi ve sorumlu nedenlerini araştıran çalışmacıların ortak görüşleri; beyinde yaşa bağlı ortaya çıkan senil plaklar ve nörofibriler yumaklar gibi çeşitli patolojik oluşumların sinir hücreleri üzerinde oksidatif-nitratif strese neden olarak inflamatuvar süreçleri tetiklediği ve sinir hücrelerinin ölümüne neden olduğu yönündedir (2,3,4). Alzheimer Hastalığı gelişimine; alüminyum, civa, virüsler ve prionlar gibi çevresel faktörlerin yanında, son zamanlarda hipoksi, hipokapni ve anestezi ajanlarının da katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Anestezi ajanları; iyon değişiklikleri (sodyum (Na) – potasyum (K) ve kalsiyum (Ca) kanalları ile) yaparak ve nörotransmitter reseptörlerine (nikotinik, asetilkolin (Ach), serotonin tip 3, gama amino bütirik asit (GABA), glisin, glutamat reseptörleri) etki ederek sinaps disfonksiyonuna ve sinaps sayılarında azalmaya neden olarak AH riskini arttırmaları (5). İnhalasyon ajanlarının neden olduğu hücre zedelenmesinin mekanizması açık olmamakla beraber kalsiyum disregülasyonu suçlanmakta, sevofluran ve desfluranın, izoflurana oranla intraselüler kalsiyumu daha az etkileyerek, daha az apoptoz oluşumuna neden olduğu bildirilmektedir (6). İnhalasyon ajanlarına kısa süre maruziyette subletal strese önkoşullanma ile nöroproteksiyon sağlanırken, uzamış maruziyetlerde direkt sitotoksik etki ile apoptozla ilgili hücre hasarı artmaktadır (7). Neonatal rat korteksinden elde edilen nöronal hücre kültürlerinin kullanıldığı in vitro bir çalışmada hücre kültürlerine 30 dakika desfluran veya sevofluran ardından da 30, 60 ve 90 dakika süre ile oksijen ve glukoz yoksunluğu uygulanmış, bu dönemde de kültürler desfluran ve sevofluran uygulamasına devam edilmiş, uygulamadan 48 saat sonra *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated Dntp Nick end Labeling Assay (TUNEL)* ve *Deoksiribonükleik Asit (DNA)* jel elektroforezi ile hücrelerde apoptozla bakılmış, sadece desfluran ve sevofluran uygulanmayan gruba göre; 30, 60 ve 90 dakikalık yoksunluk dönemlerinde desfluran ve sevofluran uygulanan grupta nöronal hücre ölümünün belirgin olarak (yaklaşık olarak %98) az olduğu bildirilmiştir (8).

İn vivo bir çalışmada, 8 aylık ratlar 30 gün boyunca her gün 09:00 - 13:00 arasında 30 dakika subanestetik dozda ( 1/10 Minimal Alveolar Konsantrasyon (MAK)) inhalasyon ajanlarına (halotan % 0.1, sevofluran %0.3 ve desfluran % 0.6) maruz bırakılmış ve deneyin sonunda ratlara davranışsal testler uygulanmış, sonuç olarak subanestetik konsantrasyonlarda halotan, sevofluran ve desflurana 30 günlük maruziyet; merak ve arama davranışında azalma, anksiyetede artma, hafıza ve öğrenme fonksiyonlarında bozulma ile ilişkili bulunmuştur.

Öğrenme ve hafıza bozukluğunun desfluranla daha fazla ilişkili olduğu bildirilmiştir (9).

## **AMAC**

Bu çalışmada, günümüzde çeşitli nedenlerle genel anestezi uygulanan yenidoğanlara benzer olan döneminiyle eş sayılan yedi günlük ratlarda, tekrarlayan desfluran uygulamalarının Alzheimer Hastalığı patogeneğinde rol alan asetilkolinesteraz antikorunu, tau, fosforile tau, amiloid beta actin düzeyleri ve apoptoz gelişimine etkilerinin incelemesi amaçlanmıştır.

## **GENEL BİLGİLER**

### **GENEL ANESTEZİ**

Genel anestezi, vital fonksiyonlarda değişiklik olmadan, geçici bilinç kaybı ve refleks aktivitede azalma ile karakterizedir.

Genel anestezi için kullanılan inhalasyon anesteziğin; şimdiye kadar bulunmuş en etkin ilaçlar olmalarına ve yüzyılı aşkın süredir kullanılmalarına rağmen, etki mekanizmaları hala tam olarak bilinmemektedir.

İnhalasyon anesteziğin; oda ısısı ve basıncındaki değişikliklere göre gaz ve sıvı olarak ikiye ayrılır :

1. Gaz anesteziğin: siklopropan, etilen, azotprotoksit
2. Sıvı inhalasyon anesteziğin: kloroform, eter, etil klorür, fluraksen, halotan, metoksifluran, enfluran, izofluran, sevofluran, desfluran 'dır. (10)

Genel anesteziğin etki mekanizmaları ise;

- Gama amino bütirik asit tip A ( $GABA_A$ ) reseptörleri ile inhibisyonda artış (benzodiyazepinler, barbitüratlar, propofol, etomidat, izofluran, enfluran, halotan ve desfluran)
- N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin uyarılabilirliğinde azalma (ketamin, azot protoksit ( $N_2O$ ), ksenon, kloralhidrat) olmak üzere ikiye ayrılır (11,12).

İnhalasyon anesteziğin akciğerler yoluyla alınıp, kan aracılığıyla vücudun değişik dokularına dağılır. Asıl etki yerleri olan, nöral membranların fonksiyonlarını; ya inhibitör fonksiyonların etkilerini artırarak ya da sinapslarda veya ince çaplı aksonların sinir uçlarından iletinin geçişini baskılayarak etkileşirler. Bu etkileri nedeniyle inhalasyon anesteziğin bilinçsizlik ve duyarsızlığa neden olurlar, bu durumun yeterli düzeyde olması, cerrahi girişimlerin herhangi bir reaksiyon olmaksızın yapılabileceği genel anesteziyi oluşturur.

Değişik anesteziğin etkilediği değişik beyin alanları şunlardır:

- Serebral korteks
- Retiküler aktive edici sistem
- *Cuneat* çekirdek
- Olfaktör korteks
- Hipokampus

Anestezik ajanların ana hedef bölgelerinden biri olan hipokampus, aferent ve eferent yapılar, nörotransmitterler ve birçok katmandan (gyrus dentatus, hipokampus, fimbria hippocampi) meydana gelen limbik bir yapıdır(12). Anterograd ve retrograd hafıza ve uzaysal yön bulmada önemli rolü vardır.

Hipokampusta, internöronlar içinde GABA ve onun sentezleyici enzimleri bulunur. Bu nöronlar eksitator sinaptik akımların ve piramidal hücre deşarjının inhibisyonunu sağlar (13). Anesteziklerin ayrıca spinal kord içindeki eksitator iletiyi, özellikle ağrı iletiminde rol oynayan arka boynuz internöronlar düzeyinde baskılayıcı etkileri vardır (14).

## **GENEL ANESTEZİKLERİN SANTRAL SINIR SİSTEMİNE ETKİLERİ**

Genel anesteziklerin santral sinir sistemine (SSS) etkisi farklı mekanizmalarla açıklanmaya çalışılmaktadır. Bunlar;

1. Kolinerjik sistemin ve Ach salınımının depresyonu,
2. Sinaps sayılarında azalma ve sinaps disfonksiyonu,
3. Kalsiyum (Ca) disregülasyonu,
4. Apoptotik dejenerasyon' dur.

Genel anestezi sırasında azalan Ach salınımı ve deprese olmuş kolinerjik sistem genel anestezinin bilinçsizlik, ağrı, istemli hareket ve hafıza kaybı gibi istenen etkilerini kolaylaştırır. Genel anestezide ve anestezi idamesinde kullanılan ilaçlar, santral kolinerjik sistemle etkileşir ve dejeneratif hastalıklarda beyinde kolinerjik sistem defisitleriyle birliktelik gösterirler. Postoperatif kognitif disfonksiyon ve deliryum patogenezinde rol oynarlar (15).

İnhalasyon anestezikleri; desfluran, izofluran ve sevofluran nikotinik ve muskarinik reseptörleri doz bağımlı olarak inhibe ederler. İntravenöz anesteziklerden barbitüratlar muskarinik Ach (mACh)'nin kompetatif antagonistidir, propofolün yüksek dozları, opioidlerden ise morfin ve fentanil mACh ve nikotinik Ach (nACh) reseptörlerini inhibe eder, remifentanil ise etkisizdir (16).

Anestezik ajanlar, iyon değişiklikleri (Na-K ve Ca kanalları ile) yaparak ve nörotransmitter reseptörlerine (nikotinik, Ach, serotonin tip 3, GABA, glisin, glutamat reseptörleri) etki ederek sinaps disfonksiyonuna ve sinaps sayılarında azalmaya neden olurlar. Bu da kognitif hasara ve AH gibi demansif hastalıkların oluşmasına neden olur (11).

## **DESFLURAN**

İzofluran ve diğer halojenli eter anestezikleri gibi desfluran da (CHF<sub>2</sub>-O-CF<sub>3</sub>) eter türevi inhalasyon anesteziklerindedir (Şekil-1). Hızlı ve tolere edilebilir anestezi

indüksiyonu ve anesteziden uyanma, anestezi derinliğinin hızlı ilerlemesi, uygun kas gevşetici özellik, toksisite oluşturu doz ile farmakolojik etki oluşturan konsantrasyon arasındaki aralığın geniş olması, toksik etkilerin ve diğer yan etkilerinin olmaması nedeniyle klinik kullanımda giderek yaygınlaşmaya başlamıştır (17).



**Şekil 1.** Desfluranın kimyasal yapısı (17)

### **Fiziksel Özellikleri**

Kaynama noktası 23,5°C olan desfluranın molekül ağırlığı 168.4, özgül ağırlığı ise 1.465'tir. Diğer inhalasyon anestezikleri ile karşılaştırıldığında yağ/gaz (18,7), kan/gaz (0,42) veya kan/beyin (1,3) partisyon katsayılarının da gösterdiği gibi düşük lipid çözünürlüğüne sahiptir.

Düşük lipid çözünürlüğü düşük anestezik potensini gösterir. Desfluran; izoflurandan 5.2, halotandan ise 8.1 kez daha düşük potense sahiptir(17).

Desfluranın MAK'ı ; artan yaş ve N<sub>2</sub>O, fentanil, klonidin veya midazolam kullanımı ile birlikte azalır (17,18).

Desfluran, izofluran ve enfluranın yıkımı kuru sodalime ve barolime içinde meydana gelir. Bu durum karbonmonoksit oluşumu ile sonuçlanır. Bununla birlikte, karbonmonoksidin bu türlü oluşumu % 4,8 veya daha fazla su içeren sodalime kullanımı ile veya %9.7 veya daha fazla su içeren barolime kullanımı ile önlenabilir (19). Desfluran, kuru sodalime içinde 0°C'de izoflurana oranla % 54 ve 40°C'de ise % 23 oranında daha az yıkılmaktadır. Desfluran, %15 oranında su içeren nemli sodalime içinde 60°C ve altında yıkılmaya dayanıklı iken, 80°C' de saatte % 0.45 oranında olmak üzere yavaş yavaş yıkılır. Bu bakımdan izofluran ve halotandan üstündür (19). Desfluran ve izofluranın kimyasal olarak yıkımı sonucunda zararsız bir ürün olan triflurometan ortaya çıkar. Desfluran diğer inhalasyon anestezikleri ile karşılaştırıldığında, kauçuk ve plastikten yapılmış solunum devreleri içinde daha az çözülmetedir (20).



## **Farmakodinamik Özellikleri**

Desfluran; kardiyovasküler, nöromuskuler, respiratuvar ve SSS'ni de içeren farklı vücut sistemlerini etkiler. Desfluran; izofluran ve diğerleri gibi doza bağımlı bir şekilde bu sistemleri deprese eder (17).

**Beyin Üzerine Etkileri:** İnhalasyon yolu ile kullanılan genel anesteziikleri, serebral metabolizma hızı, serebral kan akımı ve intrakraniyal basınç üzerine olan etkileri bakımından değerlendirmek gerekir (21).

Diğer inhalasyon anesteziikleri gibi desfluran da serebral damarları direkt olarak genişleterek normotansiyon ve normokarbide serebral kan akımını ve intrakraniyal basıncı artırır. Elektroensefalografi (EEG) üzerindeki etkileri izofluran ile benzerdir. Desfluran kullanımı ile epileptik aktivite rapor edilmemiştir (22).

Smith ve ark. (23) çocuklarda nöroanesteziide izofluran, propofol ve desfluranı karşılaştırmışlar, izoflurandan desflurana geçildiğinde serebral kan akımının (orta serebral arter kanlanmasını transkraniyal doppler ile ölçerek) değişmediğini fakat propofolden desflurana geçtiklerinde serebral kan akımının % 35 oranında arttığını görmüşler ve çocuklarda nöroanesteziide desfluranı potent bir vazodilatör olması nedeni ile önermemişlerdir.

Ting ve ark. (24) skolyoz cerrahisi için yapılan *wake-up testi* sırasında 90'ın üzerindeki Bispektralindeks (BIS) değerlerini uyanıklık olarak kabul etmiş; desfluran grubundaki hastaların bu değerlerde tepki verdiğini ancak propofol-fentanil grubunda bu yüksek BIS değerlerine rağmen hastaların uyanıp tepki vermeleri için  $3.3 \pm 1.2$  dk kadar bir süre (latent period) geçmesi gerektiğini belirtmişler; *wake-up testi* sırasında hatırlamanın propofol-fentanil grubunda % 25 oranında olduğunu, desfluran grubunda ise hiçbir hastanın hatırlamadığını tespit etmişlerdir.

**Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri:** Desfluranın insanda kontrollü ventilasyon sırasında 0.83 ile 1.66 MAK arasındaki değerleri kardiyovasküler fonksiyon ve miyokardiyal kontraksiyon üzerinde doza bağlı depresyon oluşturur. Santral venöz basınçta ve kalp atım hızında doza bağlı artış; sistemik vasküler direnç, art yük, atım hacmi ve ortalama arteriyel basınçta düşme gözlenir. Sol ventrikül atım hacminin azalmasına rağmen kalp debisi sabit tutulur (25).

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

- Arteriyel kandaki parsiyel karbondioksit basıncının ( $\text{PaCO}_2$ ) artması,
- Karbondioksit ( $\text{CO}_2$ )'e olan ventilasyon cevabının azalması,
- İntrapulmoner şant oranının artması,
- Ölü boşluk hacminin tidal volüme olan oranının artmasıdır (17).

### **Farmakokinetik Özellikleri**

**Vücuda Alınım:** Desfluranın kan ve diğer dokularda düşük oranda çözünebilme özelliği, hızlı eliminasyon ve alınım ile birlikte inspire edilen gaz ve doku parsiyel basınçlarının hızlı eşitlenmesine neden olur. Sonuçta farklı cerrahi uyarılarda anestezinin derinliği kolayca ayarlanabilir (17).

**Eliminasyon:** Desfluranın pulmoner klirensi  $4.11 \text{ L.dk}^{-1}$ 'dir. Bu değer, halotan ve izofluran ile benzerdir. Desfluranın total vücut klirensi ( $4.6 \text{ L.dk}^{-1}$ ), izoflurandan ( $4.0 \text{ L.dk}^{-1}$ ) ve halotandan ( $3.94 \text{ L.dk}^{-1}$ ) daha büyüktür. Desfluranın ciltten kaybı total anestezik alınımının % 16'sıdır. Bu halotan için % 0.23, izofluran için % 0.2'dir. Desfluranın % 0.2–0.4'ü visseral plevra ve periton yoluyla kaybedilir (17).

**Metabolizma:** Desfluranın metabolizması ihmal edilebilir düzeydedir ve izofluranın %10'u kadardır. Desfluran anestezisini takiben serum ve idrar inorganik florür düzeyleri genellikle değişmez (17).

**Uygulama:** Desfluranın  $20^\circ\text{C}$ 'de buharlaşma basıncının 664 mmHg olması elektrik ile ısıtılan vaporizatörlerin kullanılmasını gerektirir (Ohmeda Tec 6TM vaporizatörler) (17).

### **ALZHEİMER HASTALIĞI**

Alzheimer Hastalığı (AH); kognitif fonksiyonlarda ilerleyici bozulma ile karakterize, küçük bir kısmı genetik nedenlerin baskın olduğu erken başlangıçlı, çoğunluğunu ise geç başlangıçlı sporadik tipte, yaşa bağlı demansların yaklaşık %50'sini oluşturan bir hastalıktır (1).

Hastalığın patogenezi ve sorumlu nedenlerini araştıran çalışmacıların ortak görüşleri; beyinde yaşa bağlı ortaya çıkan senil plaklar ve nörofibriler yumaklar gibi çeşitli patolojik oluşumların sinir hücreleri üzerinde oksidatif-nitratif strese neden olarak inflamatuvar süreçleri tetiklediği ve sinir hücrelerinin ölümüne neden olduğu yönündedir (2,3,4). Son yıllarda AH'nın patogenezi aydınlatılmak amacıyla oluşturulan yeni hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara dayanılarak yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi hız kazanmıştır (16).

Hastalığın patolojik bulguları; progressif difüz serebral korteks atrofisi, buna bağlı ventriküler sistemde sekonder genişlemeler, serebrovasküler sistemde Beta Amiloid Protein (A $\beta$ P) birikimi, nörotik plaklar ve nörofibriller yumaklar olarak tanımlanmıştır (5).

Beyindeki masif nöron kaybı ve nöropatolojik değişiklikler hipokampus, korteks ve subkortikal bölgelerde (Amigdala ve Mynertin bazal nükleuslarında) ortaya çıkar (2).

Amiloid-beta (A $\beta$ ) bir transmembran glikoproteini olan in vivo olarak spesifik proteolitik amiloid prekürsör protein (APP) ayrılmasıyla oluşan 39–43 amino asitli bir peptiddir. Agrege olan A $\beta$ , Alzheimer hastalarının beyinde bulunan amiloid plakların ana bileşenidir. Solubl oligomerik A $\beta$  formları, amiloid plaklardan çok, hastalığın selüler patolojisinde yer alır ve insanlarda kognitif zayıflığın ağırlığı ile korelasyon gösterir. Değişik çalışmalar anesteziğin A $\beta$  peptidinin oligomerizasyonunu kolaylaştırabileceğini ve anesteziyle A $\beta$ -ile ilişkili toksisite arasında potansiyel bir bağlantı olduğunu göstermiştir (26). Tau beyin omurilik sıvısında (BOS) bol miktarda bulunan ve esas olarak aksonlarda eksprese edilen mikrotübülle ilişkili bir proteindir (MAP). İnsan beyinde, tau 16 eksonlu tek bir genle kodlanır (kromozom 17'de) ve 352–441 amino asitlerin 6 isoformunu oluşturur. Bir veya iki amino asit girişi varlığı veya yokluğuyla karakterize amino-terminal bölgesinin plazma membranıyla etkileştiği ve akson çapını belirlemek için gerekli olduğu bulunmuştur. Karboksi-terminal bölgesi tau'nun mikrotübül (MT) bağlanma özelliklerini yönlendiren ve MT stabilizasyonu ve polimerizasyonunu kolaylaştıran 3 veya 4 tekrarlar karakterizedir. Bu fonksiyonlar MT bağlanma domaininin içinde ve çevresinde pek çok bölgede fosforilasyonla negatif olarak düzenlenirler. Tau fosforilasyonu sayısız kinaz ve fosfatazla düzenlenir; ayrıca glikojen sentetaz kinaz-3 beta (GSK-3 $\beta$ ) ve protein fosfataz 2A (PP2A) in vivo olarak tau hiperfosforilasyonunu düzenleyen majör tau kinaz ve fosfatazlar olarak düşünülür. Anormal hiperfosforile olmuş tau'nun intraselüler agregatları AH'nı içeren ve taupatiler denilen bir grup nörodejeneratif hastalıkta bulunur. Tau patolojisinin AH'ndaki demans ve bellek kaybının ilerlemesini yakından yansıttığı düşünülür (26).

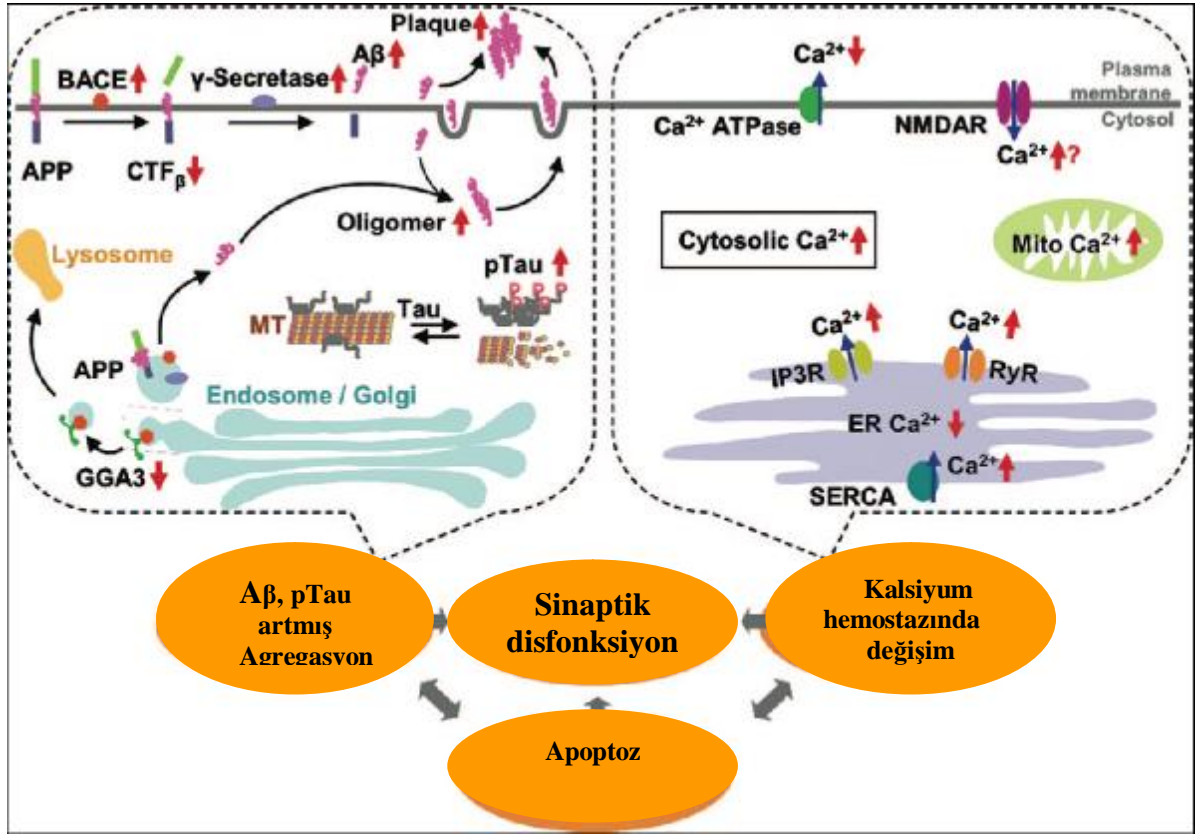
Alzheimer Hastalığı gelişimine; alüminyum, civa, virüsler ve prionlar gibi çevresel faktörlerin yanında, son zamanlarda hipoksi, hipokapni ve anestezi ajanlarının da AH oluşumuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Anestezi ajanları; iyon değişiklikleri (Na –K ve Ca kanalları ile) yaparak ve nörotransmitter reseptörlerine (nikotinik, Ach, serotonin tip 3, GABA, glisin, glutamat reseptörleri) etki ederek sinaps disfonksiyonuna ve sinaps sayılarında azalmaya neden olarak AH riskini artırırlar (5).

Anesteziğin, Ach reseptörleri ile etkileşip, kolinerjik sistem inhibisyonu yaparak postoperatif kognitif disfonksiyon ve deliryum patogenezinde rol oynarlar. İnhalasyon

anesteziklerden desfluran, izofluran ve sevofluran nikotinik ve muskarinik reseptörleri doz bağımlı olarak inhibe ederler (16).

Kolinerjik reseptörlerin anesteziklere duyarlılığının anestezinin değişik evrelerinde kilit rolü oynadığı bilinmektedir. Genel anestezi altında beynin oksidatif metabolizması ve kolinerjik uyarımın azalması bilinç ve istemli hareketlerin kaybolmasına yol açmaktadır. Bu etki, kavşak öncesi ve sonrası nikotinik ve muskarinik kolinerjik reseptörlerin inhibisyonuna bağlıdır. İnhalasyon anesteziklerden desfluran, sevofluran ve izofluran doza bağlı olarak her iki kolinerjik reseptörü de etkilemektedir. Hidrofobik yapıdaki volatil anesteziklerin, uygun durumlarda hücre zarındaki internal protein boşluklarına yerleşerek protein oligomerizasyonuna yol açtığı in vitro olarak gösterilmiştir. Amiloid  $\beta$  peptidin de AH'da beyin dokusunda biriken bir protein oligomeri olduğu düşünüldüğünde inhalasyon anestetiklerin AH'da dikkatli kullanılması önerilebilir, ancak bu konuda daha kesin kanıtlara gereksinim vardır (15,27,28).

İnhalasyon anesteziklerin sebep olabileceği; hücre içi amiloid A seviyesinde artış, A-tau agregasyonu ve/veya intrasellüler kalsiyum homeostazisinde bozulma gibi mekanizmalar, yaşlı beyinde, sinaptik disfonksiyon ve nöronal apoptozis sonucu kognitif bozulmaya sebep olabilir. Amiloid ve tau yolağında  $\beta$  amiloid prekürsör proteini dönüştürücü enzim (BACE) membrana bağlı APP'den c-terminal fragmanlar ( $CTF_{\beta}$ ) oluşturur.  $CTF_{\beta}$ 'nin  $\gamma$ -sekretaz ile ayrılması sonucu sitozolik ve ekstrasellüler boşluğa  $A\beta$  monomerleri salınır. Anestetiğe maruziyet BACE ve  $\gamma$ -sekretaz düzeylerini artırarak intrasellüler  $A\beta$  monomeri düzeyini yükseltir ve  $CTF_{\beta}$  düzeylerini düşürür. İnhalasyon anestetikler aynı zamanda  $A\beta$  monomerleri ile etkileşerek hücre içinde küçük çözünebilir oligomerlerin oluşumuna neden olur. Bu oligomerler daha sonra fibriller ve ekstrasellüler plak oluşturur ki bu yapılar transgenik Alzheimer hastalığı olan farelerde halotana maruziyet sonrası saptanmıştır. Mikrotübüle bağlı tau, anestetikler ve hipotermi ile hiperpolarize olur, tau agregatları oluşur ve MT stabilitesi azalır (29) (ŞEKİL-2).



**Şekil-2.** Şekilde inhalasyon anesteziğin, hücre içi A $\beta$  seviyesinde artış, A $\beta$ -tau agregasyonu ve/veya intrasellüler kalsiyum homeostazisinde bozulma sonucu oluşan sinaptik disfonksiyon ve nöronal apoptozis mekanizmaları gösterilmiştir (29).

Terapötik ve toksik dozlarda eter anestezisi uygulanan ratların; serebellum ve frontoparyetal kortekslerinden alınan örneklerde *Western Immunblot* yöntemi ile APP düzeylerine bakılmış. Eter anestezisinden 10 dk sonra ratların beyinlerinde hipokampusta AH'da görülen tau fosforilasyonunun başladığı ve anestezi sonlandırıldıktan 1 saat sonra fosforilasyonun normale döndüğü saptanmış, ayrıca kortikal APP konsantrasyonunun benzodiyazepinler tarafından değiştirilmediği de gözlemlenmiştir (30).

Anestezi uygulamalarında kullanılan ajanların insanlar üzerindeki çoğu etkileri bilinmekle birlikte, bu ajanların neden olduğu farklı etkiler sürekli olarak araştırılmaktadır (11). Artan sayıda kanıtlar genel anestetiklerin hem genç hem de yaşlanan beyinler için nörotoksik olabileceği öne sürülmektedir. Kanıtların çoğu hücreler, kemirgenler ve insan olmayan primatlarla yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalardan köken alır (31).

Günümüzde, prematüre bebeklere ve çok küçük çocuklara değişik nedenlerle yapılan operasyonlarda genel anestezi uygulaması sıklıkla uygulanmaktadır. Pediatrik anestezide kullanılan anesteziğin gelişmekte olan SSS'ne etkileri en sık araştırılan konular arasında önceliğini korumaktadır. Anesteziğin gelişmekte olan SSS üzerindeki etkilerini bilmek, pediatrik anestezi uygulamalarında büyük yarar sağlayacaktır.

## **GEREC VE YÖNTEM:**

Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alındıktan sonra (EK-1), anestezi uygulaması Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, moleküler inceleme ise Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmaya postnatal yedinci günde olan, *Wistar albino* suşu, ağırlıkları 9-11 gr arasında değişen, 37 adet yavru rat alınmıştır. Annelerinin yavru ratları emzirdikleri göz önüne alınarak, kanibalizmi önlemek amacıyla, ratlara mümkün olduğu kadar dokunulmamaya çalışılmış ve eğer dokunulacaksa pamuk ile dokunulmuştur. Yavru ratlar doğumlarından itibaren standart laboratuvar koşullarında (12 saat gündüz - 12 saat gece olacak şekilde ışıklandırma, 20-22°C oda ısısı, % 50-60 nem) izlenmiştir.



**Resim-1.** Postnatal 7. günde olan ratlar

### **Çalışma grupları;**

**GID: 1 kez desfluran uygulanan grup (n:6):** Ratlara %4.4 konsantrasyonda desfluran bir kez iki saat uygulanmış ve 24 saat sonra sakrifiye edilmiştir.

**GIK: Kontrol grubu (n:6):** Ratlar oda havasında solumuş, 24 saat sonra sakrifiye edilmiştir.

**GVD: 5 kez desfluran uygulanan grup (n:6):** Ratlara %4.4 konsantrasyonda desfluran 24 saat aralarla ardışık beş kez ikişer saat uygulanmış (Toplam 10 saat) ve 11.günde sakrifiye edilmiştir

**GVK: Kontrol grubu (n:5) :** Ratlar oda havasında solumuş, 11. günde sakrifiye edilmiştir.

**GXD: 10 kez desfluran uygulanan grup (n:7):** Ratlara %4.4 konsantrasyonda desfluran 24 saat aralarla ardışık on kez ikişer saat uygulanmış (Toplam 20 saat) ve 21.günde sakrifiye edilmiştir

**GXK: Kontrol grubu (n:6):** Ratlar oda havasında solumuş, 21. günde sakrifiye edilmiştir.

### **Anestezi uygulaması:**

Her rat için ayrı olmak üzere 450 mL hacimli gaz giriş ve çıkış sistemi bulunan cam kavanozlar 37°C sabit sıcaklıkta su banyosuna yerleştirilmiş, kavanozlara vaporizatör (*Desflurane Tec 6 Vaporizer, Abbott Lab, Almanya*) ile 6 L dk<sup>-1</sup> akım hızında oksijen içinde %4.4 konsantrasyonda desfluran (*Suprane Eczacıbaşı/Baxter İstanbul/Türkiye*) girişi sağlanarak ratlar 2 saat süreyle solutuldu.

İnspire edilen oksijen, karbondioksit ve uygulanan inhalasyon anestezi konsantrasyonu, çıkış hattına bağlanan anestezi gaz monitörü (*Anesthesia Gas Monitoring 1304, Danimarka*) ile izlenerek sabit tutuldu.



**Resim 2.** Anestezi uygulama düzeneği

#### **Anestezinin sonlandırılması:**

İnhalasyon anestezi uygulaması 2 saatlik sürenin sonunda kesilerek ve 6 L.dk<sup>-1</sup> akım hızında oksijen verilerek deneklerin derlenmeleri sağlandı, derlenmelerinin sonunda ratlar annelerinin yanına alındı, gruplarına göre ratlara ardışık, aynı dozda anestezi uygulaması yapıldı.

Daha sonra ratlar moleküler inceleme yapılmak üzere gruplarına göre uygulama bittikten 24 saat sonra eter anestezisi altında dekapitasyon yöntemi kullanılarak sakrifiye edilmiş, beyin dokuları çıkarılıp dondurularak -80°C'de saklandı.

#### **Beyin dokularından protein ekstraksiyonu:**

Saklanmış beyin dokuları ekstraksiyon işlemi öncesinde cerebellum, sağ ve sol beyin olmak üzere ayrıldı. Elde edilen sol beyin Tris (50mM), Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) (5mM), Nonidet-P40 (NP-40) (%1), Aprotinin (1 µg/mL) Leupeptin (1 µg/mL), Pepstatin (1 µg/mL) ve fenilmethansülfonilflorid (PMSF) (1 M) içeren lizis tamponu içerisinde sonikasyon ile parçalandı. Sonikasyon ardından elde edilen lizatın 12000 rpm hızda 15 dk santrifüj edilmesiyle protein ekstraktı elde edildi.



### **Protein konsantrasyonu belirlenmesi:**

Elde edilen protein ekstraktlarındaki protein miktarları Biçinkoninik asit (BCA) yöntemiyle (Sigma-Aldrich, ABD) belirlendi. Belirleme aşamasında 0-1000 ng/mL arasında değişen konsantrasyonlardaki albümin standart olarak kullanıldı. Örnekler 1:250 dilüsyon ile her örnekten 25 µL olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara eklendi. Biçinkoninik asit (BCA) kiti ile gelen A ve B reaktifleri 1:50 oranında örnek sayısına yetecek miktarda karıştırıldı ve her örnek ve standardın üzerine 200 µL eklenerek 30 dk 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından spektrofotometrede (BioTek) 562 nm dalga boyunda örnek absorbansları ölçüldü. Albumin standartlarının absorbanslarına göre çizilen standart eğrisi kullanılarak her bir örneğin protein konsantrasyonu belirlendi.

### **Western-Blotting yöntemi:**

Protein konsantrasyonu belirlenen örneklerden 30 µL'lik jel örnekleri hazırlandı. Örnek hazırlama aşamasında 24 µL toplam hacimde 200 µg protein olacak şekilde proteinler lizis tamponu ile karıştırıldı ve karışımın üzerine Sodyum dodesil sülfat (SDS), Tris, Gliserol, β-Merkaptoetanol ve Bromfenol mavisi içeren 5X jel yükleme boyası eklenerek 95°C'de 5 dk kaynatılarak denatürasyon gerçekleştirildi.

Örneklerin hazırlanmasının ardından %12'lik SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) resolving jeli hazırlandı. Bu jelin içeriğinde bulunan maddeler aşağıda listelenmiştir (10 mL için):

- Distile Su	3,3 mL
- %30 Akrilamid/Bisakrilamid	4 mL
- Tris (1,5 M, pH 8,8)	2,5 mL
- %10 SDS	0,1 mL
- %10 Amonyum persulfat	0,1 mL
- Tetrametiletildiamin (TEMED)	0,004 mL

Resolving jelinin polimerleşmesi için jel yüzeyi izopropanol ile kaplanarak 1 saat bekletildi. Jel katılaştıktan sonra üst katmana daha az yoğun olan ve içeriği aşağıda belirtilen stacking jeli döküldü (10 mL için):

- Distile Su	6,8 mL
- %30 Akrilamid/Bisakrilamid	1,7 mL
- Tris (1,5 M, pH 8,8)	1,25 mL
- %10 SDS	0,1 mL
- %10 Amonyum persulfat	0,1 mL
- Tetrametiletildiamin (TEMED)	0,001 mL

Hazırlanan jel karışımı resolving jelinin üzerine döküldü ve jel tarağı yerleştirilerek jel donmaya bırakıldı.

SDS-PAGE'de 200 µg protein % 12'lik jele yüklendi ve jel 20 mA akımla Tris, Glisin ve SDS içeren yürütme tamponunda 5 saat yürütüldü. Proteinlerin boyutlarına göre ayrılmasından sonra polivinilidinden florid (PVDF) membrana transfer gerçekleştirildi. Blotlamanın ardından membranlar, süt tozu içeren fosfat tamponlu fizyolojik su (PBS)-NP-40 solüsyonuyla bloklandı. Primer antikor olarak, fosforile tau, total tau, amiloid beta ve aktin kullanıldı.

Primer antikorla membranlar bir gece bekletildi. Sekonder antikor dilüsyonu 1:3500 ve 1 saat olarak uygulandı. Yıkama basamağının ardından görüntüleme ECLplus (Thermo, ABD) kiti ve CL-Xposure film (Thermo, ABD) kullanılarak yapıldı. UVP jel dökümantasyon sistemi yardımıyla bant yoğunluklarının analizi gerçekleştirildi. Analiz sonuçları aktin proteinine oranlanarak verilmiştir.

### **Apoptoz belirlenmesi:**

Anestezi sonrası beyinde oluşabilecek apoptotik hücre ölümü Cell death ELISA (Roche, Almanya) kitine göre belirlendi. Bu kit sayesinde apoptoz sırasında oluşan DNA kırıkları mononükleozom ve oligonükleozom miktarlarının ELISA yöntemiyle ölçülmesiyle belirlenmektedir. Beyin dokusunda apoptozun belirlenmesi sırasında kitin protokolü takip edildi. Protokole göre öncelikle 96 kuyucuklu plak kullanılacak örnek sayısına göre kitten çıkan Anti-Histon antikoruyla kaplandı. Kuyucukların kaplanmasının ardından beyin dokuları 1:500 seyreltmede kitin inkübasyon tamponuyla hazırlandı ve kuyucuklara 100 µl eklenerek örneklerin plak tabanında bulunan antikorlara bağlanması için 90 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Örneklerin inkübasyonunun ardından bağlanmayan proteinlerin uzaklaştırılması için kuyucuklar yıkama tamponuyla 3 kez yıkandı. Histanlara bağlı mono- ve oligonükleozomların belirlenmesi amacıyla anti-DNA-POD antikorları kuyucuklara 100 µl eklendi ve 90 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun bitiminde bağlanmayan antikorların uzaklaştırılması için kuyucuklar yıkama solüsyonuyla 3 kez yıkandı. Son olarak kuyucuklara 100 µl substrat solüsyonu eklendi ve mavi-yeşil renk oluşumu için 5 dk karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde kuyucukların absorbansı spektrofotometrede 405 nm dalga boyunda okutuldu. Bununla birlikte örneklerde protein miktarları BCA yöntemine göre belirlendi. Apoptoz belirlenmesinde toplam protein miktarına absorbansın oranlanmasıyla analiz gerçekleştirildi.

### **Asetilkolinesteraz aktivitesi belirlenmesi:**

Asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi DetectX Asetilkolinesteraz Floresan Aktivite test kiti (Arbor Assays, ABD) protokolüne göre belirlendi. Kit protokolünde insan AChE proteininin değişik konsantrasyonlarına göre (6,25-100 mU/mL) standartlar hazırlandı. 1:250 kat seyreltilmiş protein ekstraktlarından siyah renkli 96 kuyucuklu plağa her kuyucuğa 100µL denk gelecek şekilde dublike olarak eklendi. Ardından her kuyucuğa AChE substratı, Thiostar florometrik madde ve Dimetilsülfoksit (DMSO) içeren test reaktifinden 50 µL eklendi ve oda sıcaklığında 20 dk karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde 510 nm eksitasyon ve 370 nm emisyon dalga boyunda floresan okuma gerçekleştirildi. AChE ile oluşturulmuş standart eğrisi yardımıyla örneklerdeki AChE aktivitesi belirlendi. Örneklerin AChE aktivitesi gram protein başına oranlanarak verilmiştir.

### **İstatistiksel analiz:**

Deney ve kontrol grupları arasındaki farklılıkların değerlendirilmesinde SPSS programının 19.0 versiyonu kullanılmıştır. Grup varyanslarının eşitliği Levene's testi saptandı. İstatistiksel analizde gruplar arası farklar *one way ANOVA* ve ardından çoklu karşılaştırmalarda varyansları eşit olanlar için Sidak testi varyansları eşit olmayanlar için Tamhane's testi kullanıldı. İkili karşılaştırmalar *Student t* testi ile yapıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi olarak  $p < 0,05$  kabul edildi.

## **BULGULAR:**

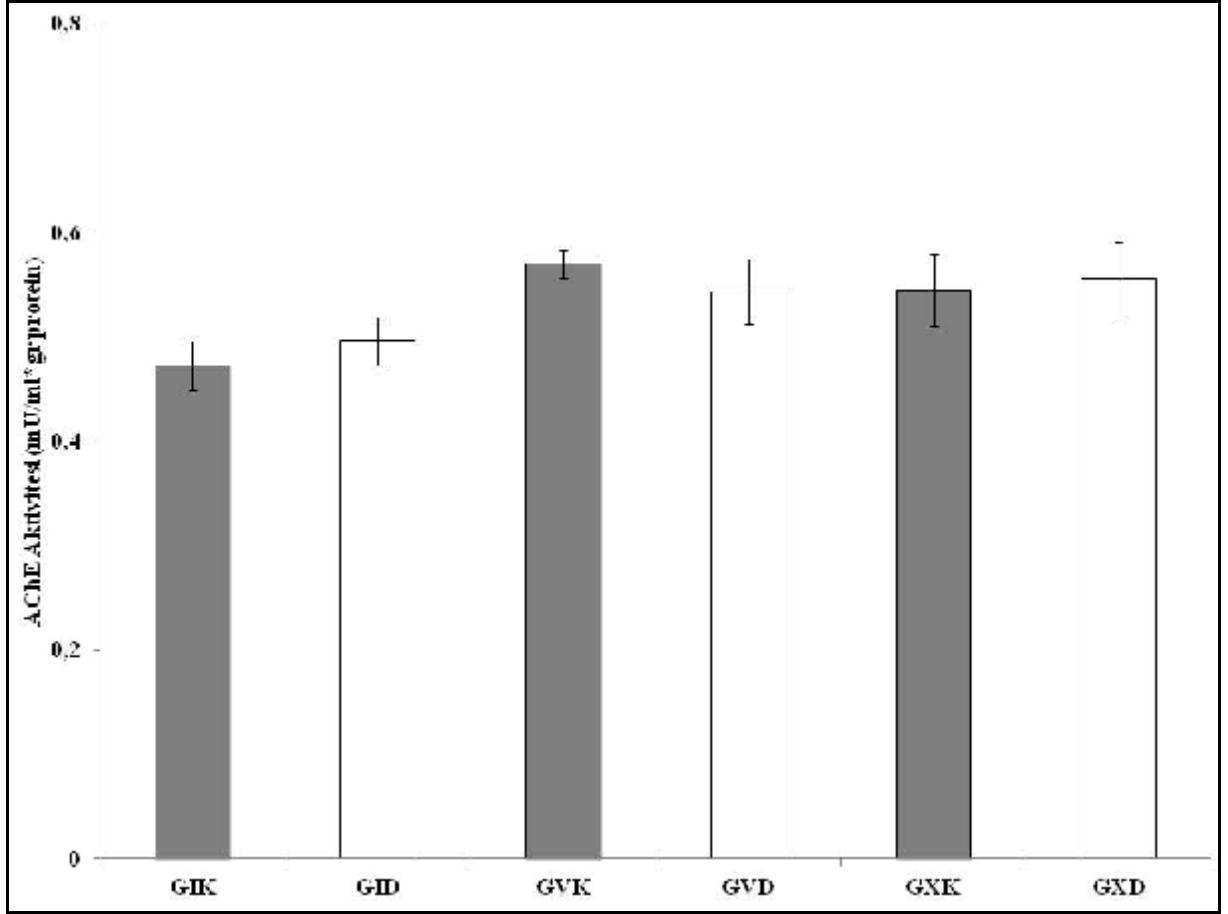
Çalışmaya toplam 37 rat alındı. Ratlardan 1 tanesi deney sırasında öldü. Deney gruplarının dağılımı Tablo 1;

**Tablo 1:**

<b>Grup Adı</b>	<b>Yapılan işlem</b>	<b>n</b>
GİK	1 Kez desfluran uygulanan grubun kontrolü	6
GİD	1 Kez desfluran uygulanan grup	6
GVK	5 Kez desfluran uygulanan grubun kontrolü	5
GVD	5 Kez desfluran uygulanan grup	6
GXX	10 Kez desfluran uygulanan grubun kontrolü	6
GXD	10 Kez desfluran uygulanan grup	7

### **Asetilkolin esteraz aktivite analizi:**

GİK ve GİD asetil kolin esteraz (AChE) aktivitesi karşılaştırıldığında; gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p=0,262$ ). GVK ve GVD AChE aktivite değerleri karşılaştırıldığında; AChE aktivitesinde anlamlı fark bulunmadı ( $p=0,715$ ) GXX ve GXD AChE aktivite değerleri karşılaştırıldığında; AChE aktivite değerleri arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p=0,775$ ). GİK ve GVK ile GXX AChE aktivite değerleri karşılaştırıldığında; gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p=0,05$ ). GİD ve GVD ile GXD AChE aktivite değerleri karşılaştırıldığında; AChE aktivite değerleri arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p=0,375$ ) (Grafik 1).

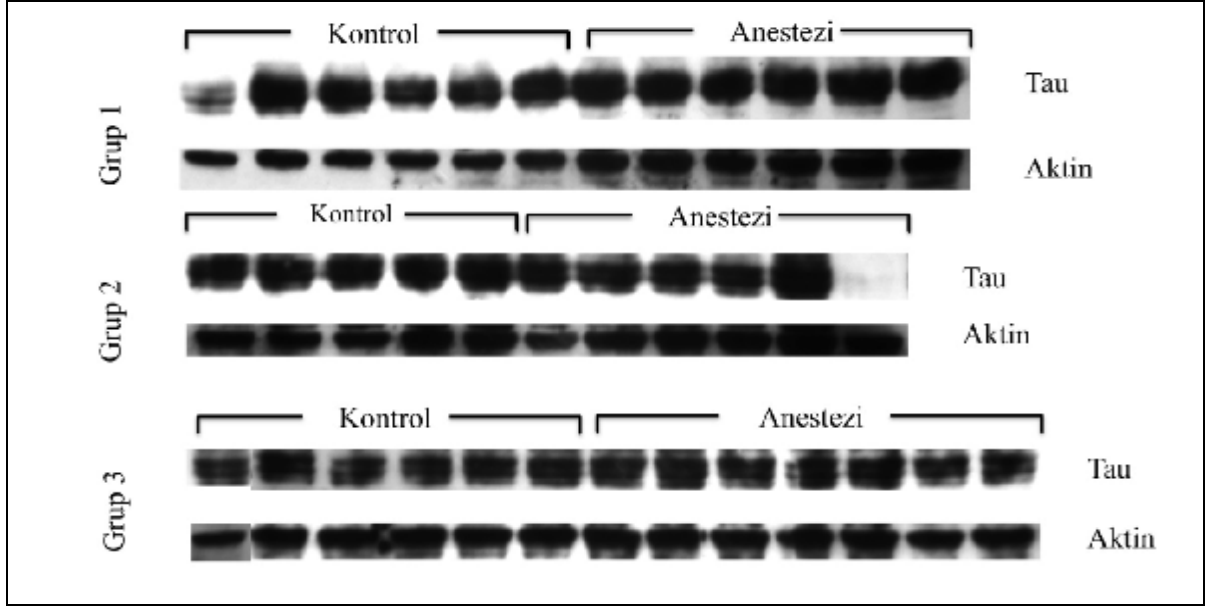


**Grafik 1:** AChE aktivite sonuçları

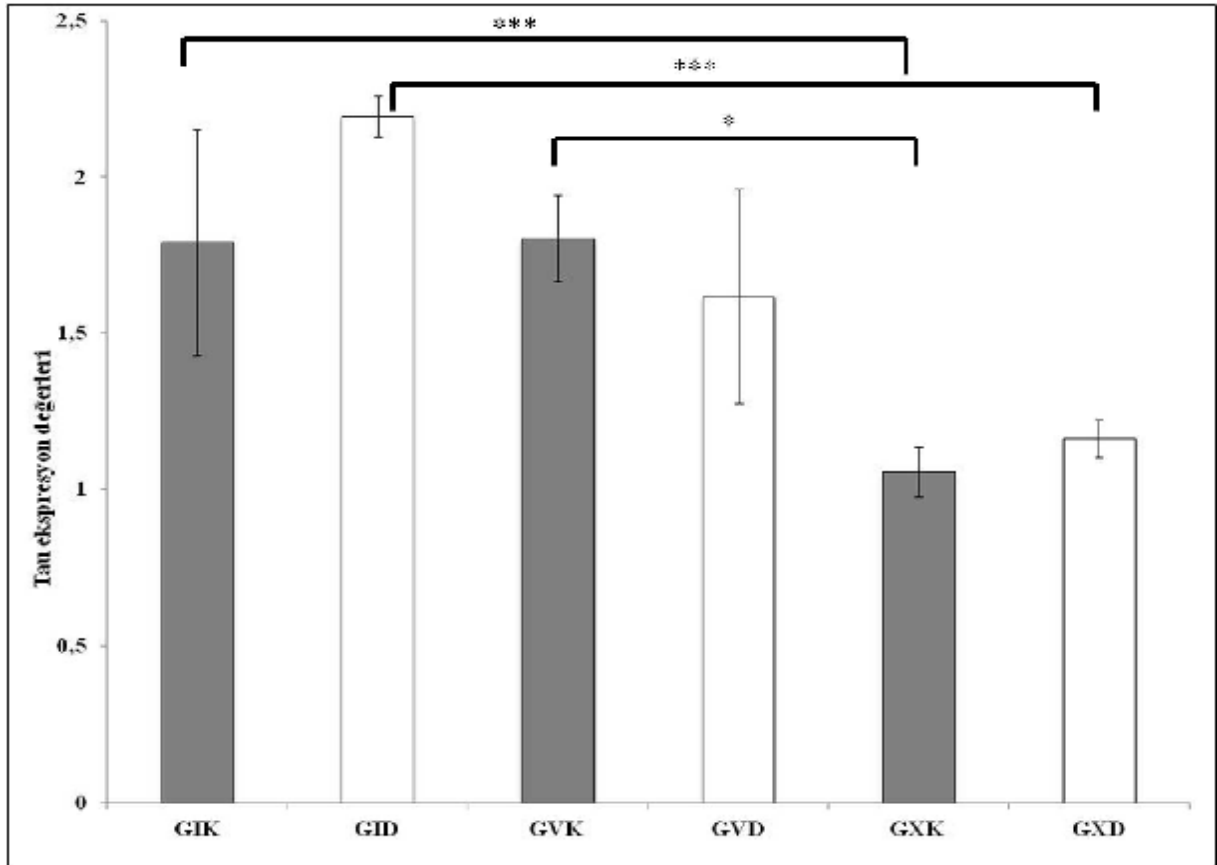
### Western Blot Analizi:

Western blot analizinde tau ile amiloid-beta ekspresyonları ve tau fosforilasyonu değerlendirildi.

GİK ve GİD tau ekspresyonları sonuçları karşılaştırıldığında tau ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p=0,715$ ). GVK ve GVD tau ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında değerler arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p=0,273$ ). GXK ve GXD tau ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p=0,116$ ). GİK ve GVK ile GXK tau ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında; GXK tau ekspresyon düzeyleri GİK ve GVK tau ekspresyon düzeyleri göre anlamlı düşük bulundu (sırasıyla  $p=0,001$ ;  $p=0,006$ ). GİD ve GVD ile GXD tau ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında; GXD tau ekspresyonları GİD tau ekspresyon düzeyleri göre anlamlı düşük bulunurken ( $p=0,001$ ); GVD tau ekspresyon düzeyleri ile GİD tau ekspresyon değerleri arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p=0,078$ ) (Şekil 3) (Grafik 2).



**Şekil 3:** Tau ekspresyon bant yoğunlukları



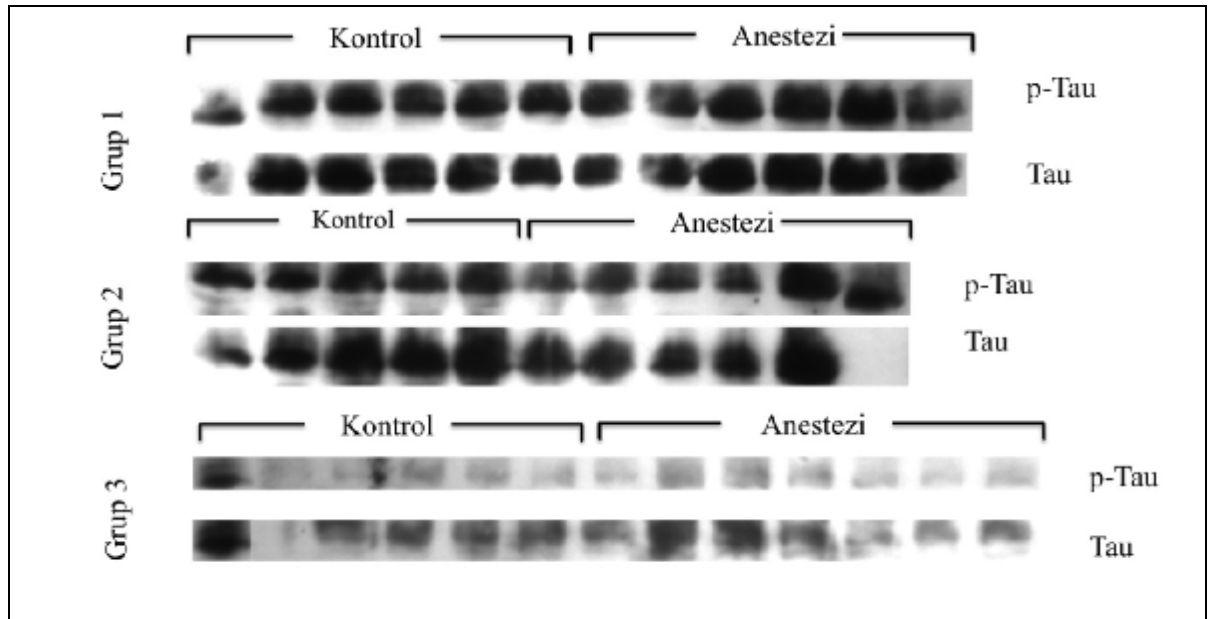
**Grafik 2:** Tau ekspresyonu düzeyleri

\*\*\*  $p < 0,001$  GXK & GİK karşılaştırıldığında anlamlı düşük

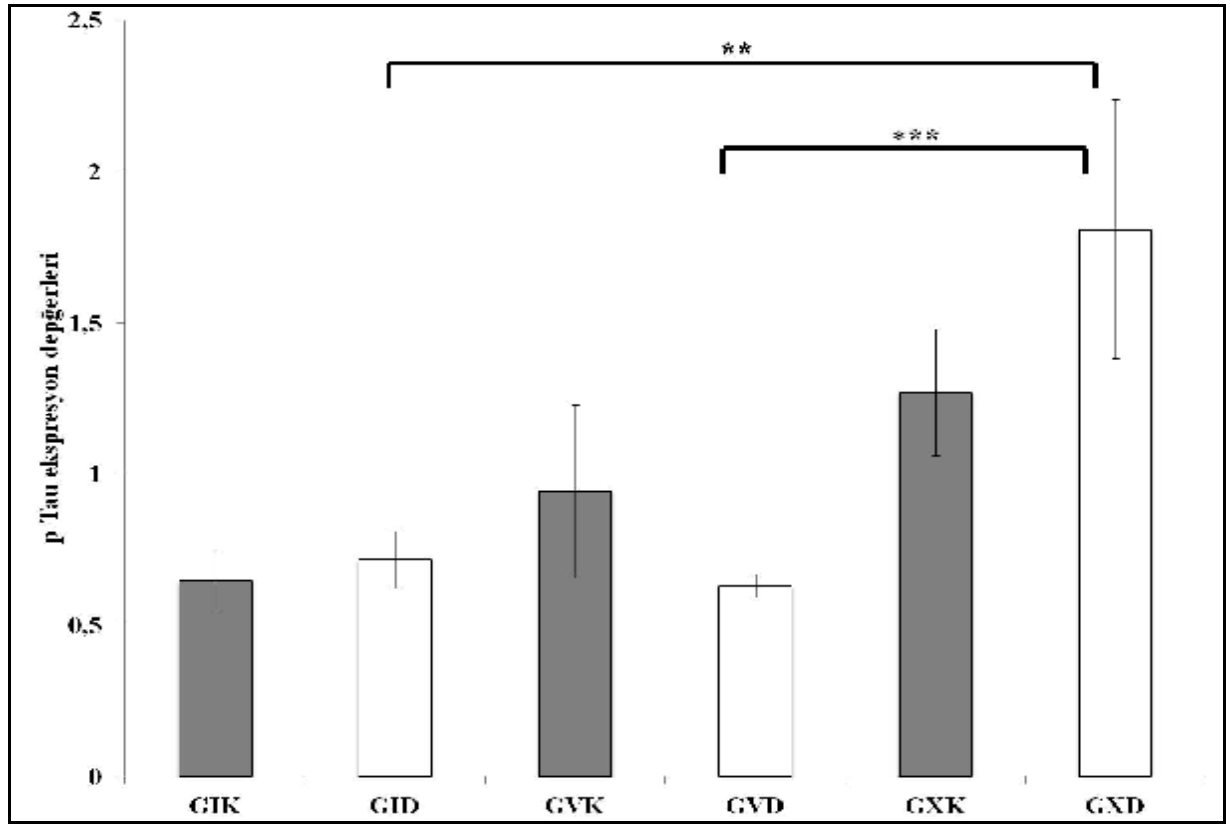
\*\*\*  $p < 0,001$  GXD & GİD karşılaştırıldığında anlamlı düşük

\*  $p < 0,05$  GXK & GİK karşılaştırıldığında anlamlı düşük

Tau proteinin fosforilasyonu (p-Tau) incelendiğinde; GIK ve GID grupları arasında p-tau düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p=0,347$ ). GVK ve GVD p-tau düzeyleri karşılaştırıldığında düzeyler arasında anlamlı fark bulunmadı ( $p=1,000$ ). GXK ve GXD p-tau düzeyleri karşılaştırıldığında düzeyler arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p=0,144$ ). GIK ve GVK ile GXK p-tau düzeyleri karşılaştırıldığında; gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p=0,152$ ). GID ve GVD ile GXD p-tau düzeyleri karşılaştırıldığında; GXD p-tau düzeyleri GID ve GVD p-tau düzeylerine göre anlamlı yüksek bulundu (sırasıyla  $p=0,016$ ;  $p=0,008$ ) (Şekil 4) (Grafik 3).



**Şekil 4:** Şekilde p-Tau bant yoğunlukları gösterilmektedir. Tau bant yoğunluklarına göre normalize edilerek değerlendirilmiştir.



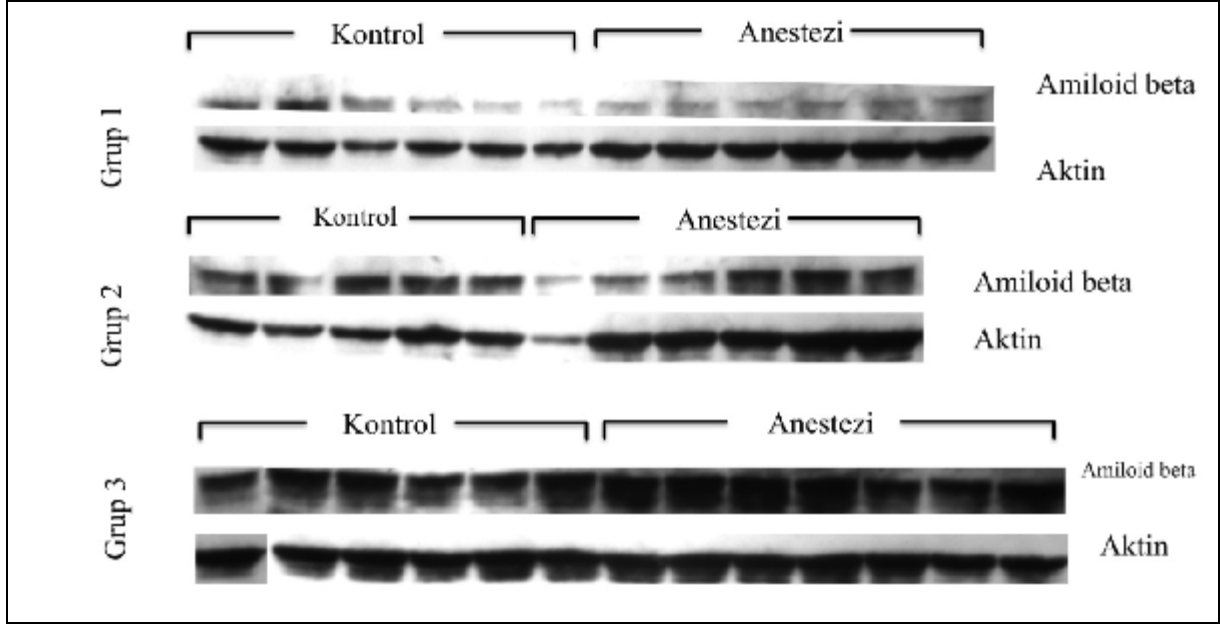
**Grafik 3:** Tau fosforilasyonunun total tau'ya göre normalize edilmiş bant yoğunlukları

\*\*\*  $p < 0,001$  GXD & GID karşılaştırıldığında anlamlı yüksek

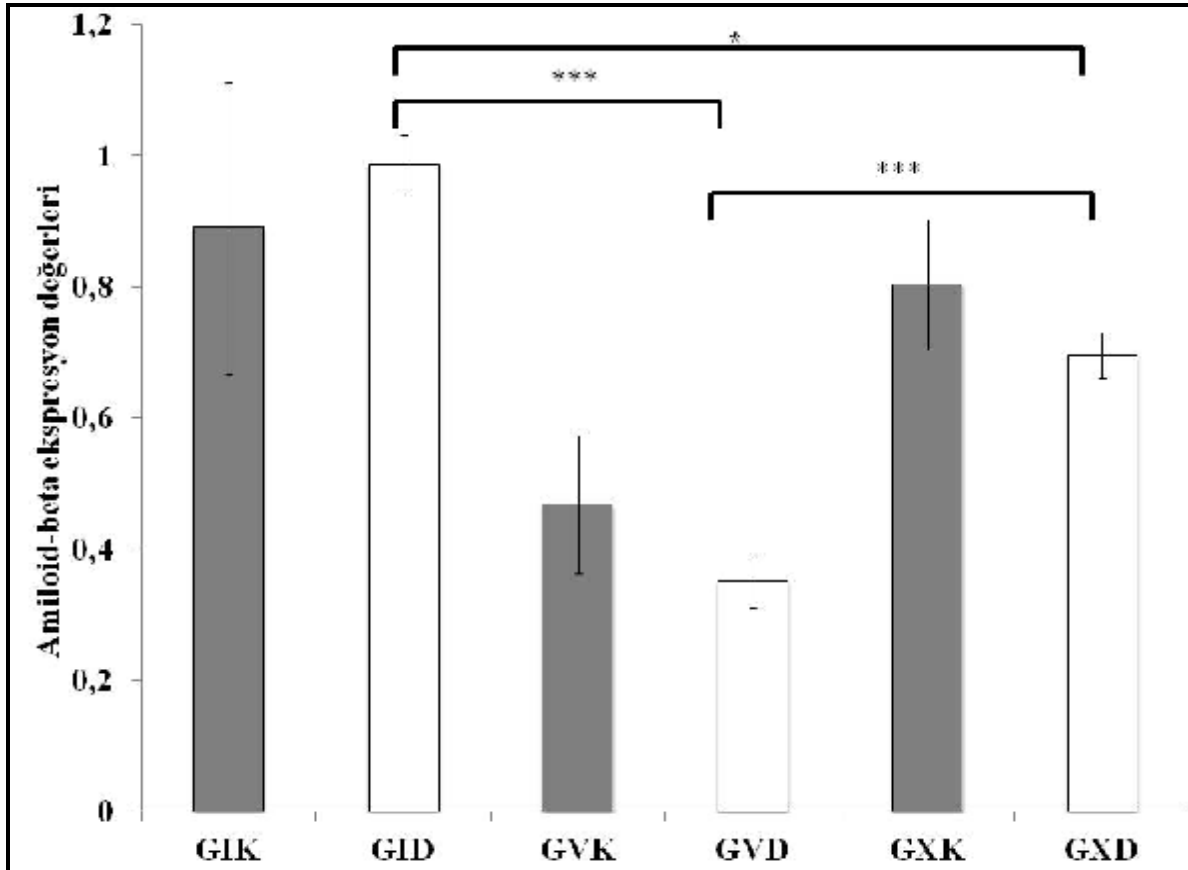
\*\*  $p < 0,01$  GXD & GID karşılaştırıldığında anlamlı yüksek

Amiloid-beta proteininin ekspresyon düzeyleri incelendiğinde; GIK ve GID grupları arasında amiloid-beta proteininin ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p=0,337$ ). GVK ve GVD amiloid-beta proteininin ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında değerler arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p=0,580$ ). G XK ve GXD amiloid-beta proteininin ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında değerler arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p=0,199$ ). GIK ve GVK ile G XK amiloid-beta proteininin ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında; gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p=0,206$ ). GID ve GVD ile GXD amiloid-beta proteininin ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında; GVD amiloid-beta proteininin ekspresyon düzeyleri GID ve GXD amiloid-beta proteininin ekspresyon düzeyleri göre anlamlı düşük bulundu (sırasıyla  $p=0,001$ ;  $p=0,001$ ) GID ve GXD amiloid-beta proteininin ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında; GXD amiloid-beta proteininin ekspresyon düzeyleri GID amiloid-beta proteininin ekspresyon düzeylerine göre anlamlı düşük bulundu ( $p= 0,004$ ) (Şekil 5) (Grafik 4).





**Şekil 5:** Amiloid beta bant yoğunlukları aktin bant yoğunluklarına göre normalize edilerek incelenmiştir.



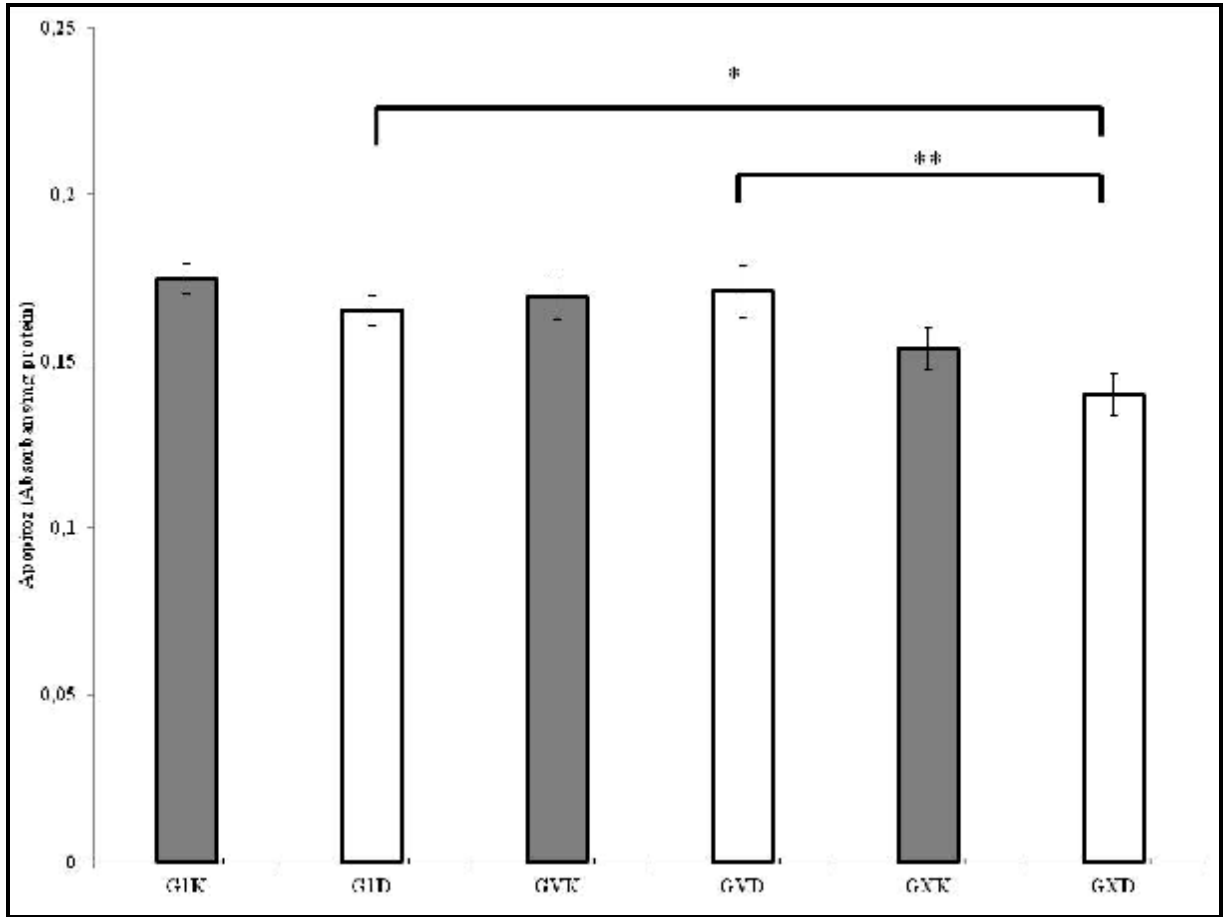
**Grafik 4:** Amiloid-beta ekspresyonunun aktine göre normalize edilmiş bant yoğunlukları

\*\*\* p < 0,001 GVD & GİD karşılaştırıldığında anlamlı düşük

\*\*\* p < 0,001 GVD & GXD karşılaştırıldığında anlamlı düşük

\* p < 0,05 GİD & GXD karşılaştırıldığında anlamlı düşük

Apoptoz değerlendirilmesinde; GIK ile GID grupları arasında apoptoz değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı ( $p=0.20$ ). GVK ile GVD grupları arasında apoptoz değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı ( $p=1.00$ ). GXK ile GXD grupları arasında apoptoz değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı ( $p=0.153$ ). GIK ve GVK ile GXK apoptoz değerleri karşılaştırıldığında; gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p=0,054$ ). GID ve GVD ile GXD apoptoz değerleri karşılaştırıldığında; GXD apoptoz değerleri GID ve GVD apoptoz değerlerine göre anlamlı düşük bulundu (sırasıyla  $p=0,036$ ;  $p=0,01$ ). GID ve GVD apoptoz değerleri karşılaştırıldığında; gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p= 1,00$ ) (Grafik 5).



**Grafik 5:** Apoptoz değerleri

\*  $p < 0.05$  GXD & GID karşılaştırıldığında anlamlı düşük

\*\*  $p < 0,01$  GXD & GVD karşılaştırıldığında anlamlı düşük

## **TARTISMA:**

Bu çalışmada yenidoğan döneminde tekrarlayan 0,6 MAK desfluran uygulamasının gelişmekte olan beyinde yaptığı değişiklikleri saptamak ve Alzheimer patogenezinde rol alan asetil kolin esteraz, tau, fosforile tau ve amiloid beta proteinlerine desfluran maruziyetinin etkisinin araştırılması amaçlandı.

Çalışmamızda tekrarlayan 0,6 MAK desfluran uygulamasının yenidoğan rat beyinde asetil kolin esteraz, tau, fosforile tau ve amiloid beta düzeylerini değiştirmediğini; tau ve fosforile tau düzeylerinde artan yaşla ilişkili değişiklikler olduğunu ve tau seviyesindeki azalma ile fosforile tau seviyesindeki artışın anestezi alan gruplarda daha yüksek olduğunu saptadık. Ayrıca tekrarlayan desfluran uygulamasının apoptozu azalttığını gösterdik.

Anesteziyle indüklenen nöroapoptoz çalışmalarında ve davranış testlerinde denek olarak sıklıkla rat kullanıldığı için çalışmamızda, gelişmekte olan memeli beyinde anesteziyle indüklenen nörotoksisite ve nörokognitif bozukluğu araştırmak üzere Wistar türü ratlar kullanılmıştır (11,32,33).

Ratlarda % 50 ağırlı uyarana cevapsızlığı sağlayan izofluran konsantrasyonu 1 MAK olarak kabul edilmektedir (34). Neonatal farelerde desfluran MAK'ı araştırılmışsa da neonatal Wistar ratlar için hesaplanmış bir desfluran MAK değerine literatürde rastlanmamıştır. Erişkin ratlarda desfluranın MAK değeri %5,72'dir (35). Neonatal ratlarda desfluran MAK değerinin %19 arttığı gösterilmiştir (36). Bu kaynaklar ışığında neonatal ratlar için hesaplanan MAK değeri %6.78'dir.

Erişkin ratlarda 1,25, 1,5 ve 1,75 MAK izofluran, sevofluran ve desfluran ile burst supresyon olduğu gösterilmiştir (37). Ayrıca 7 günlük ratlarda uzayan anestezi süresinin MAK'ı azalttığı gösterilmiştir (4 saatlik uygulama sonrası izofluranın MAK'ı %56 oranında azalmaktadır) (38). Nasu ve ark (39) 0,5 MAK izofluran verilen ratların kas gevşetici olmadığı halde ağırlı uyarı varlığında kaçma çabasında olmadıklarını ve bu MAK değeri ile hipotansiyon insidansının daha az olduğunu belirtmişlerdir. Anestezi uygulamalarında inhalasyon anestezikleri genellikle kas gevşeticiler ve analjeziklerle birlikte kullanıldığından anestezi idamesinde inhalasyon anestezikleri 1 MAK altındaki değerlerde kullanılmaktadırlar. Istaphanous ve ark (40) da çalışmalarında 0,55-0,6 MAK izofluran, sevofluran ve desfluran kullanmışlardır. Bu bilgiler ışığında bizde çalışmamızda 0,6 MAK desfluran kullandık. Çalışmalarda bu MAK değerlerinde kullanılan tüm inhalasyon ajanlarının benzer derecede nörotoksik oldukları saptanmıştır.

Anestezi altındaki yenidoğan ratlarda, küçük olmaları nedeniyle; elimizdeki cihazlarla hemodinamik ve solunumsal monitörizasyonları teknik nedenlerle uygulanabilir olmadığından

yapamadık. Ayrıca daha önce yapılmış çalışmalarda; gruplardan randomize olarak seçilen birer rattan alınan arteriyel kan gazı analizi sonuçlarında herhangi bir metabolik ve solunumsal anormallik saptanmamış olması ve kan glukoz düzeylerinin normal sınırlarda olduğunun tespit edilmiş olduğu çalışmaları (41-43) dikkate alarak, aynı deney düzeneğini kullandığımız çalışmamızda ayrıca elimizdeki cihazların, hemodinamiyi etkilemeyecek düzeyde alınan küçük kan volümlerinde (100 mikrolitre) ölçüme uygun olmaması nedeniyle çalışmamızda arteriyel kan gazı analizi yapamadık.

Yuvalarında yenidoğan ratların rektal ısıları, ortam sıcaklığı ve nemine bağlı olarak 32 ile 39°C arasında değişeceği vücut sıcaklığındaki değişikliklerin MAK'ı değiştireceği göz önünde tutularak (44), çalışmamızda tüm denekler bulunduğu kavanozlar sabit 37°C sıcak su banyosunda tutuldu.

Çalışmamızda 0,6 MAK desfluranın amiloid  $\beta$  protein oluşumunu 1, 5 veya 10 kez uygulama sonrası arttırmadığını saptadık. Artmış amiloid  $\beta$  üretimi ve agregasyonu AH'nın nöropatolojisini hızlandıran nedenler arasında sayılmaktadır. Deneysel hayvan modellerinde saptanan inhalasyon anesteziklerine maruziyet ile artan AH patolojilerinden kabul edilmektedir (45). Deneysel çalışmalarda izofluran, sevofluran ve halotanın amiloid  $\beta$  artışına neden olduğu, bunun da anestezisi ile nörokognitif hastalık patogenezi arasındaki ilişkiyi açıklayabileceği belirtilmiştir (46). Yüksek konsantrasyonlarda halotan ve izofluran, klinikte kullanılan konsantrasyonlarda izofluran ve desfluran anestezisinin amiloid beta oligomerizasyonuna neden olabileceği gösterilmiştir (26). Bianchi ve ark. (47) 5 gün boyunca her gün halotan veya izofluran anestezisi uyguladıkları farelerde kontrol grubuna göre daha fazla amiloid plak oluşumu saptamışlardır.

Zhang ve ark (48) 6 saat %12 desfluran uygulamasının tek başına kaspaz 3 aktivasyonu, amiloid protein prekürsörü veya amiloid  $\beta$  protein oluşumunu arttırmadığını ancak hipoksi (%18 O<sub>2</sub>) ile birlikteliğinde bu maddelerde artışa neden olduğunu göstermişlerdir. Çalışmacılar desfluranın sadece hipoksik koşullar varlığında AH nöropatogenezini artırabileceğini belirtmişlerdir. Bizim bulgularımızdan farklı olarak Mandal ve ark (49) izofluran ve desflurana tabi tuttıkları amiloid  $\beta$  peptid solüsyonunda amiloid  $\beta$  prekürsör proteinin arttığını bulmuşlardır. Çalışmacılar amiloid  $\beta$  peptidin yaşlı beyinde miktarının arttığını dolayısıyla anestezisi maruziyeti ile AH riskinin arttığını belirtmektedirler. Çeşitli çalışmalarda sevofluran (50,51), izofluran (52,53) ve hipokapninin (54) amiloid  $\beta$  artışına neden olabileceği gösterilmiştir. Benzodiazepinlerden diazepam ve midazolam ise bu açıdan güvenli görünmektedirler (55).

Loop ve ark. (56) T hücre kültürü kullandıkları çalışmalarında izofluran ve sevofluranın mitokondri membran geçirgenliğini artırarak apoptoz oluşturduğunu gösterirken desfluranın proapoptotik özelliğini saptayamamışlardır. Bir diğer hücre kültürü çalışmasında (yenidoğan rat serebral korteksinden hazırlanmış kortikal hücre kültürü) sevofluran ve desfluranın farklı konsantrasyonlarının oksijen ve glukoz yoksunluğunun tetiklediği hücre ölümünü azalttıkları gösterilmiştir (8). Zhang ve ark (57 ) izofluranın caspaz-3 aktivasyonu yaptığını ve öğrenme ve bellek fonksiyonunda bozulmaya neden olurken ekipotent dozda desfluranın bu etkileri göstermediğini saptamışlar, AH olan hastalarda desfluran kullanımının izoflurana göre daha güvenli olabileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmacıların sonuçları bizim çalışmamızın sonuçlarına benzerdir.

Çalışmamızda tekrarlayan desfluran uygulamasının apoptozu azalttığını gösterdik. Ancak kontrol gruplarında da apoptozun yenidoğan ratlarda ilerleyen yaşla birlikte istatistiksel anlamlılığı olmasada azaldığını saptadık. Bu sonucumuz Liu ve ark (58) rat hipokampuslerinde yaptıkları incelemelerde postnatal 7. günde apoptotik hücre sayısının en fazla olduğu ilerleyen yaşla birlikte azaldığını gösterdikleri ve apoptozun gelişen beyin için gerekli bir süreç olduğu ve nöronal gelişim için özellikle nöronal prekürsörler ve postmitotik nöronların öldüğü bildirdikleri sonuçlar ile benzerdir. Ayrıca Verney ve ark (59) da benzer şekilde postnatal 0. ve 14. günler arasındaki ratların pariyetal neokortekslerinde histogenetik hücre ölümünü araştırdıkları çalışmalarında hücre ölümünün 4. günden itibaren arttığını ve 8. günden sonra azalmaya başladığını göstermişlerdir. Çalışmamızdaki apoptoz sonuçlarımıza benzer şekilde Zhang ve ark (60 ) %2 konsantrasyonunda izofluranın apoptoz oluşturduğunu ancak %12 konsantrasyonda desfluranın apoptotik etkisini saptayamadıklarını belirtmişlerdir. H4 insan nörogloma hücre kültürüne desfluran uygulanan bir çalışmada hipoksinin olmadığı koşullarda desfluranın apoptoz oluşturmadığı gösterilmiştir (48). Bianchi ve ark (47) da tekrarlayan izofluran ve halotan anestezisi uyguladıkları farelerde apoptoz saptamamışlardır.

Bizim sonuçlarımıza zıt olarak Liang ve ark ( 64) neonatal farelerde 0,5 MAK izofluran ve sevofluranın 6 saat boyunca uygulanması sonrası belirgin olarak apoptozu arttırdığını bulmuşlardır. Johnson ve ark (65) izofluranın çeşitli konsantrasyonlarının (%2, %1.5 ve %0.75) neonatal farelerde apoptoz oluşturduğunu göstermiş, Istaphanous ve ark (40) ise 7 günlük farelerde 0,6 MAK desfluran, izofluran ve sevofluranın benzer düzeylerde apoptoz oluşturduğunu belirtmişlerdir. Kodama ve ark. (63) 6 günlük farelerde 0.7 MAK desfluran uygulamasının süre ve doza bağımlı olarak apoptotik nörodejenerasyonu arttırdığını göstermişlerdir. Ayrıca desfluranın nöroapoptotik etkisinin izofluran ve sevoflurana göre daha fazla olduğunu belirtmişlerdir (desfluran>izofluran>sevofluran). Bir diğer çalışmada 1 MAK

desfluran uygulamasının 7 günlük ratlarda caspaz-3 pozitif apoptotik hücre sayısını arttırdığı ancak öğrenme ve bellek testlerinde bozukluk yapmadığı saptanmıştır (34). Çalışmamızda 1, 5 ve 10 kez 0.6 MAK desfluran uygulamasının neonatal ratlarda apoptozu artırmadığını saptadık. Özellikle yenidoğan deneklerde yapılan tüm çalışmalarda bizim çalışmamızdan farklı olarak kontrol grubunun tek seçilmesi tekrarlayan anestezi uygulamalarında yaşa bağlı değişikliklerin fark edilmesini zorlaştırmış olabilir. Çalışmamızdaki bir diğer farklılığımız uyguladığımız desfluranın MAK düzeyinin düşük olmasıdır.

Tau proteini, AH'nın histopatolojik bulgularından biridir. Fosforile tau proteini de AH olanlarda normal beyine göre daha fazladır. Ayrıca açlık, insülin veya deoksiglukoz enjeksiyonu veya soğuk suda yüzmeye gibi stres durumlarında da arttığı gösterilmiştir. Tau fosforilasyonu, strese karşı nöral stres yanıt sistemi tarafından oluşturulan hızlı bir yanıt (30). Çalışmamızda ratların su ve yiyeceğe serbestçe ulaşmasına ve desfluran uygulaması dışında annelerinin yanında kalmalarına izin verilmiş, vücut sıcaklıkları deney süresince korunmuştur. Planel ve ark (64) yaptıkları deneysel çalışmalarda anestezinin, intraperitoneal kloral hidrat veya sodyum pentobarbital ve inhalasyon ajanlarından izofluranın, hızlı ve masif tau hiperfosforilasyonuna neden olduğunu göstermişlerdir. Ancak çalışmacılar amiloid beta artışı saptayamamış ve normotermi sağlandığında tau fosforilasyonunun normal düzeylere geldiğini tespit etmişlerdir. Bu nedenle tau fosforilasyonun anesteziden ziyade anestezinin neden olduğu hipotermiye bağlı olabileceğini belirtmişlerdir. Diğer bir çalışmada kısa süreli anestezi uygulamasının (30 sn eter veya 5 dk pentobarbital) hipotermiye neden olmadan da belirgin tau fosforilasyonuna neden olabildiği gösterilmiştir (65). Bu da anestezinin hipotermiden bağımsız bir mekanizmayla da tau fosforilasyonuna neden olabildiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda 1, 5 ve 10 kez desfluran uygulanan yenidoğan ratların tau ve fosforile tau değerlerinin kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklı olmadığını saptadık. Buna karşın tau düzeylerinin yaşla ilgili olarak, hem kontrol hem de anestezi gruplarında azaldığını, fosforile tau'nun ise benzer şekilde arttığını gösterdik. Watanabe ve ark. (66) 1 günlük ve 10 haftalık rat beyinde yaptıkları incelemelerinde erişkin beyinde fosforile tau düzeylerinin azaldığını saptamışlar, aradaki yaşlardaki değişiklikleri ise gösterememişlerdir.

Normal yaşlanmada bir miktar nöron ve hacim kaybı, akson ve dendrit yapısında yer alan sinaptik protein sentezinde azalma, mitokondriyal hasar, inflamatuvar yanıt,  $Ca^{+2}$  regülasyonunda değişiklik ve DNA tamir yeteneğinde azalma görülebilmektedir. Yaşlanma ile ilgili değişikliklerin bazıları tüm beyinde görülebilirken çoğunlukla etkilenen bölümler

frontal- pariyetal loblar ve hipokampustur (67). Paban ve ark. (67 ) 4 (genç), 18 (orta yaşlı) ve 30 (yaşlı) aylık ratlarda yaptıkları hipokampal incelemede tau proteininin orta yaşlı ratlarda genç ve yaşlı gruba göre anlamlı olarak daha yüksek miktarda olduğunu göstermişlerdir.

Weiss ve ark. (68) postnatal 5, 8, 12, 16 ve 20. günlerde proton magnetic resonance spectroscopy (1H MRS) ile yaptıkları beyin incelemelerinde tau düzeylerinin orta beyin, talamus, putamen ve bazal gangliada 12. güne kadar arttığını ancak sonraki ölçümlerde tekrar azalmaya başladığını göstermişlerdir. Çalışmacılar bu artışın diğer metabolit değişimleriyle birlikte gelişen beyinde dendrit ve akson büyümesi ve miyelin formasyonu için gerekli olduğunu ve gelişim sırasındaki etkilenmelerin mental bozukluklara neden olabileceğini belirtmişlerdir. Bizim sonuçlarımızda çalışmalardaki sonuçlar ile benzerdir.

Liu ve ark. (69) izofluran uyguladıkları yaşlı ratların öğrenme ve bellek testlerinin anestezi sonrası bozulduğunu ancak amiloid beta ve tau protein düzeylerinin değişmediğini göstermişlerdir. Ikeda ve ark (30) farelerde eter anestezisinin hipokampusta tau fosforilasyonunda artışa neden olduğunu göstermişlerdir. Perucho ve ark. (53) ise izofluran uyguladıkları farelerde amiloid  $\beta$  artışını gösterirken, tau veya fosforile tau artışı saptayamamışlardır.

Tekrarlayan anestezi uygulamaları nörotoksisite, öğrenme ve bellek fonksiyonlarında bozukluğa neden olabilir. Özer ve ark. (9) 30 gün boyunca subanestezik dozlarda halotan, sevoflurane ve desfluran uyguladıkları ratlarda öğrenme ve bellek bozuklukları ve davranış değişiklikleri olduğunu saptamışlar. Araştırmacılar üç inhalasyon anestezisi içinde en çok bozukluğa neden olanın desfluran olduğunu belirtmişlerdir. Perucho ve ark. (53) 3 ay boyunca haftada iki defa izofluran uyguladıkları vahşi tip farelerde öğrenme ve bellek bozukluğu veya nörotoksisite saptamamışlardır. İki hafta boyunca haftada iki defa 4 saat %1.3 konsantrasyonda izofluran uygulanan farelerde tau'nun mikrotübüllerden ayrıldığı [mikrotübüllerden ayrılan tau agregasyona uğrayarak AH patogenezinde yer alan toksik maddeleri oluşturur (26)] gösterilmiştir (64). Çalışmamızda öğrenme ve bellek testleri yapmamış olmakla birlikte 0,6 MAK desfluran uygulamasının AH ile ilişkilendirilen tau, fosforile tau, asetilkolinesteraz ve amiloid  $\beta$  protein düzeylerinde artışa neden olmadığını saptadık. Ancak anestezi uygulanan gruplarda saptadığımız tau azalmasında ve fosforile tau artışındaki hızlanma beyin gelişimini bozarak ileriki yaşlarda öğrenme/bellek fonksiyonlarında bozulmaya yatkınlığı artırıyor olabilir.

Artmış AChE aktivitesi insanlarda beyindeki amiloid plaklarla ilişkilendirilmiştir. Artmış AChE, AH olanlarda beyinde ve beyin-omurilik sıvısında gösterilmiş, ayrıca amiloid plakların etrafında yerleştiği saptanmıştır (70). Hu ve ark. (71) amiloid  $\beta$  artışının AChE

düzeşini enzim yıkımını azaltarak arttırdığını göstermişlerdir. Yapılan literatür taramasında anesteşinin AChE düzeylerine etkisi ile ilgili bir makaleye rastlanmamıştır. Çalışmamızda 0,6 MAK desfluran anesteşisinin AChE düzeylerini değiştirmedii saptanmıştır.

Çalışmamızda 7 günlük ratlarda 1,5 ve 10 kez 0,6 MAK desfluran uygulaması sonrası hipokampal tau, fosforile tau, asetil kolin esteraz ve amiloid  $\beta$  prekürsör protein düzeylerinde anlamlı bir artış saptanmadı, ancak artan yaşla birlikte anestezi uygulaması ile hızlanan tau düzeyinde azalma ve fosforile tau düzeyinde artma olduğu saptandı. Ayrıca tekrarlayan desfluran uygulamasının apoptozu azaltıldığını gösterdik.

Literatürde 7 günlük yenidoğan ratlarda desfluran uygulamasını takiben rat hipokampusunda AH patogeneşinde yer alan tau, fosforile tau, asetil kolin esteraz ve amiloid  $\beta$  prekürsör protein düzeylerinin araştırıldığđ bir çalışmaya rastlamadık. Bu yönüyle çalışmamız 7 günlük yenidoğan ratlarda yapılan literatürdeki ilk çalışmadır. Anesteşinin neden olduğu tau fosforilasyonundaki hızlanmanın ileriki yaşlarda öğrenme ve bellek fonksiyonları ve AH patogeneşini üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla daha ileri çalışmalara gereksinim vardır. Ayrıca tekrarlayan 0,6 MAK desfluran uygulamasının yaşla birlikte azalan apoptozu hızlandırdığını, bu sonucumuzunda düşük konsantrasyonda tekrarlayan desfluran anesteşisinin nöroprotektif etkisinin olduğunu düşündürmektedir.



## **KAYNAKLAR:**

1. Adams RD, Victor M, Ropper AH. Degenerative disease of the nervous system Principles of Neurology, 6.baskı, McGraw-Hill Companies, Inc, s. 1998. p 361-3
2. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer's disease changes. Acta Neuropathol 1991;82:239-59
3. Meraz-Rios MA, Lira-De Leon KI, Campos-Pena V, De Anda-Hernandez MA et al. Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease. J Neurochem 2010;112:1353-67
4. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide. Nat Rev Mol Cell Biol 2007;8:101-12
5. Xie Z, Tanzi RE. Alzheimer's disease and post-operative cognitive dysfunction. Exp Gerontol. 2006;41:346-59.
6. Yang H, Liang G, Hawkins BJ, Madesh M et al. Inhalational anesthetics induce cell damage by disruption of intracellular calcium homeostasis with different potencies. Anesthesiology 2008;109:243-50
7. Wei H, Xie Z. Anesthesia, calcium homeostasis and Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res. 2009;6:30-5
8. Wise-Faberowski L, Raizada MK, Sumners C. Desflurane and sevoflurane attenuate oxygen and glucose deprivation-induced neuronal cell death. J Neurosurg Anesthesiol 2003; 15:193-9
9. Ozer M, Baris S, Karakaya D, Kocamanoglu S et al. Behavioural effects of chronic exposure to subanesthetic concentrations of halothane, sevoflurane and desflurane in rats. Can J Anaesth 2006;53:653-8.
10. Esener Z. İnhalasyon anesteziikleri. Klinik Anestezi 2004:84-96
11. Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, Benshoff DN et al. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. J Neurosci 2003;23:876-82.
12. 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.
13. Nishikawa K, MacIver M. Agent-selective effects of volatile anesthetics on GABA<sub>A</sub> receptor-mediated synaptic inhibition in hippocampal interneurons. Anesthesiology 2001;94:340-7.

14. Miller Ronald D. Anesthesia, 5<sup>th</sup> edition, Churchill Livingstone, 2000. Chapter 4, Edmond I Eger, Uptake and Distribution
15. Fodale V, Quattrone D, Trecroci C, Caminiti V et al. Alzheimer's disease and anaesthesia: implications for the central cholinergic system. *Br J Anaesth* 2006; 97: 445-52
16. Götz J, Ittner LM. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9:532-44
17. Preckel B, Bolten J. Pharmacology of modern volatile anaesthetics. *Best Prac Res Clin Anaesth* 2005;19:331-48.
18. Ghouri AF, White PF. Effect of fentanyl and nitrous oxide on the desflurane anesthetic requirement. *Anesth Analg* 1991;72: 377-81
19. Fang ZX, Eger EI, Laster MJ, Chortkoff BS et al. Carbon monoxide production from degradation of desflurane, enflurane, sevoflurane, isoflurane and halothane by sodalime and baralyme. *Anesth Analg* 1995;80:1187-93
20. Targ AG, Yauda N, Eger EI. Solubility of I-653, sevoflurane, isoflurane and halothane in plastics and rubber composing a conventional anesthetic circuit. *Anesth Analg* 1989;69: 218-25.
21. Voss LJ, Ludbrook G, Grant C, Sleight JW et al. Cerebral cortical effects of desflurane in sheep: comparison with isoflurane, sevoflurane and enflurane. *Acta Anaesth Scand* 2006; 50: 313-9
22. Vakkuri AP, Seitsonen ER, Jantti VL, Sarkela M et al. A rapid increase in the inspired concentration of desflurane is not associated with epileptiform encephalogram. *Anesth Analg* 2005;101:396-400
23. Smith JH, Karsli C, Lagace A, Luginbuehl I et al. Cerebral blood flow velocity increases when propofol is changed to desflurane, but not when isoflurane is changed to desflurane in children. *Acta Anaesth Scand* 2005;49:23-7
24. Ting CK, Hu JS, Teng YH, Chang YY et al. Desflurane accelerates patient response during the wake-up test for scoliosis surgery. *Can J Anesth* 2004;51:393-7
25. Owczuk R, Magdalena A, Wujtewicz A, Lasek J et al. The influence of desflurane on QTc interval. *Anesth Analg* 2005;101:419-22
26. Papon ME, Whittington RA, El-Khoury NB and Planel E. Alzheimer's disease and anesthesia. *Front Neurosci* 2011;31:272-1
27. Fernandez CR, Fields A, Richards Todd et al. Anesthetic considerations in patients with Alzheimer's Disease. *J Clin Anesth* 2003;15:52-8
28. Palotás M, Palotás A, Bjelik A et al. Effect of general anesthetics on amyloid precursor

protein and mRNA levels in the rat brain. *Neurochem Res* 2005; 30(8):1021-6

**29.** Tang J, Eckenhoff MF, Eckenhoff RG. Anesthesia and the Old Brain. *Anesth Analg* 2010;110:421-6

**30.** Ikeda Y, Ishiguro K, Fujita SC. Ether stress-induced Alzheimer-like tau phosphorylation in the normal mouse brain. *FEBS Lett* 2007;581:891-7

**31.** Bittner AE, Yue Y, Xie Z. Brief review: Anesthetic neurotoxicity in the elderly, cognitive dysfunction and Alzheimer's disease. *Can J Anesth* 2011; 58:216-23

**32.** Zhang X, Xue Z, Sun A. Subclinical concentration of sevoflurane potentiates neuronal apoptosis in the developing C57BL/6 mouse brain. *Neurosci Lett* 2008;447:109-14

**33.** Fredriksson A, Archer T, Alm H, Gordh T et al. Neurofunctional deficits and potentiated apoptosis by neonatal NMDA antagonist administration. *Behav Brain Res* 2004;153:367-76

**34.** İşgüven D. Desfluran' in yenidoğan ratlarda nörotoksitesi, öğrenme ve bellek üzerine etkisinin incelenmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi. 2010

**35.** Steffey EP. Inhalation anesthetics, In: Lumb and Jones' veterinary anesthesia 4 ed, (Thurman J, Tranquilli W, Benson J, eds). Baltimore, Williams & Wilkins. 355-93

**36.** Fang Z, Laster MJ, Ionescu P, Koblin DD et al. Effects of inhaled nonimmobilizer, proconvulsant compounds on desflurane minimum alveolar anesthetic concentration in rats. *Anesth Analg* 1997;85:1149-53

**37.** Murrell JC, Waters D, Johnson CB. Comparative effects of halothane, isoflurane, sevoflurane and desflurane on the electroencephalogram of the rat. *Lab Anim* 2008;42:161-70

**38.** Stratmann G, Sall JW, Eger EI, Laster MJ et al. Increasing the duration of isoflurane anesthesia decreases the minimum alveolar anesthetic concentration in 7-day-old but not in 60-day-old rats. *Anesth Analg*. 2009;109:801-6

**39.** Nasu I, Yokoo N, Takaoka S, Takata K et al. The Dose-Dependent Effects of Isoflurane on Outcome from Severe Forebrain Ischemia in the Rat. *Anesth Analg* 2006;103:413-8

**40.** Istaphanous GK, Howard J, Nan X, Hughes EA et al. Comparison of the Neuroapoptotic Properties of Equipotent Anesthetic Concentrations of Desflurane, Isoflurane or Sevoflurane in Neonatal Mice. *Anesthesiology* 2011;114:578-87

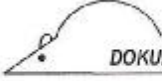
**41.** Culley DJ, Raghavan SV, Waly M, Baxter MG et al. Nitrous oxide decreases cortical methionine synthase transiently but produces lasting memory impairment in aged rats. *Anesth Analg* 2007;105:83- 8

**42.** Hölscher C. Stress impairs performance in spatial water maze learning tasks. *Behav Brain Res* 1999;100:225-35

43. Stratmann G, May LD, Sall JW, Alvi RS et al. Effect of hypercarbia and isoflurane on brain cell death and neurocognitive dysfunction in 7-day old rats. *Anesthesiology* 2009;110:849–61
44. Orliaguet G, Vivien B, Langeron O, Bouhemad B et al. Minimum alveolar concentration of volatile anesthetics in rats during postnatal maturation. *Anesthesiology* 2001;95:734–9
45. Baranov D, Bickler PE, Crosby GJ, Culley DJ et al. Consensus Statement: First International Workshop on Anesthetics and Alzheimer's Disease. *Anesth Analg* 2009;108:1627-30
46. Ologunde R, Ma D. Do inhalational anesthetics cause cognitive dysfunction?. *Acta Anaesthesiologica Taiwanica* 2011;49:149-53
47. Bianchi SL, Tran T., Liu C, Lin S et al. Brain and behavior changes in 12-monthold Tg2576 and nontransgenic mice exposed to anesthetics. *Neurobiol.Aging* 2008;29:1002–10
48. Zhang B, Dong Y, Zhang G, Moir RD et al. The Inhalation Anesthetic Desflurane Induces Caspase Activation and Increases Amyloid  $\beta$ -Protein Levels under Hypoxic Conditions. *The J Biochem* 2008;283:11866-75
49. Mandal PK, Fodale V. Isoflurane and desflurane at clinically relevant concentrations induce amyloid  $\beta$ -peptide oligomerization: An NMR study. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 379:716–20
50. Dong Y, Zhang G, Zhang B, Moir RD et al. The Common Inhalational Anesthetic Sevoflurane Induces Apoptosis and Increases  $\beta$ -Amyloid Protein Levels. *Arch Neurol* 2009; 66: 620-31
51. Lu Y, Wu X, Dong Y, Xu Z et al. Anesthetic Sevoflurane Causes Neurotoxicity Differently in Neonatal Naïve and Alzheimer's Disease Transgenic Mice, *Anesthesiology*. 2010; 112: 1404–16
52. Pan C, Xu Z, Dong Y, Zhang Y et al. The Potential Dual Effects Of Anesthetic Isoflurane On Hypoxia-Induced Caspase-3 Activation And Increases In  $\beta$ -Site Amyloid Precursor Protein-Cleaving Enzyme Levels. *Anesth Analg* 2011;113:145-52
53. Peruchoa J, Rubio I, Casarejos MJ, Gomez A et al. Anesthesia with Isoflurane Increases Amyloid Pathology in Mice Models of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2010;19:1245–57
54. Xie Z, Moir RD, Romano DM, Tesco G et al. Hypocapnia Induces Caspase-3 Activation and Increases A $\beta$  Production. *Neurodegenerative Dis* 2004;1:29-37
55. J. Kálmán, M. Palotás, M. Pákási, M. Hügyecz et al. Unchanged rat brain amyloid precursor protein levels after exposure to benzodiazepines in vivo. *EJA* 2006;23:772-5

- 56.** Loop T, Dovi-Akue D, Frick M, Roesslein M et al. Volatile Anesthetics Induce Caspase-dependent, Mitochondria-mediated Apoptosis in Human T Lymphocytes In Vitro. *Anesthesiology* 2005; 102:1147–57
- 57.** Zhang Y, Xu Z, Wang H, Dong Y et al. Anesthetics isoflurane and desflurane differently affect mitochondrial function, learning, and memory. *Ann Neurol* 2012;71(5):687-98
- 58.** Liu JP, Chang LR, Gao XL, Wu Y. Different expression of caspase-3 in rat hippocampal subregions during postnatal development. *Microscopy Research and Technique* 2008;71:633–38
- 59.** Verney C, Takahashi T, Bhide PG, Nowakowski RS et al. Independent controls for neocortical neuron production and histogenetic cell death. *Dev Neurosci*, 2000;22:125-38
- 67.** Zhang Y, Dong Y, Wu X, Lu Y et al. The mitochondrial pathway of anesthetic isoflurane-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2010;285:4025-37
- 61.** Liang G, Ward C, Peng J, Zhao Y et al. Isoflurane Causes Greater Neurodegeneration Than an Equivalent Exposure of Sevoflurane in the Developing Brain of Neonatal Mice *Anesthesiology*. 2010 ;112:1325-34
- 62.** Johnson SA, Young C, Olney JW. Isoflurane-induced Neuroapoptosis in the Developing Brain of Nonhypoglycemic Mice. *J Neurosurg Anesthesiol*. 2008 ;20:21-8
- 63.** Kodama M, Satoh Y, Otsubo Y, Araki Y et al. Neonatal Desflurane Exposure Induces More Robust Neuroapoptosis than Do Isoflurane and Sevoflurane and Impairs Working Memory. *Anesthesiology* 2011;115:979-91
- 64.** Planel E, Richter KE, Nolan CE, Finley JE et al. Anesthesia leads to tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. *J Neurosci* 2007;27:3090-7
- 65.** Planel E, Bretteville A, Liu L, Virag L et al. Acceleration and persistence of neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy following anesthesia. *FASEB J* 2009;23:2595-604
- 66.** Watanabe A, Hasegawa M, Swukin M, Takioll K et al. In Vivo Phosphorylation Sites IN Fetal AND Adult Rat Tau. *The J Biol Chem* 1993;268:25712-7
- 67.** Paban V, Fauvelle F, Alescio-Lautier B. Age-related changes in metabolic profiles of rat hippocampus and cortices. *Eur J Neurosci* 2010;31:1063–73
- 68.** Weiss K, Melkus G, Jakob PM, Faber C et al. In vivo <sup>1</sup>H spectroscopic imaging of metabolites in the early postnatal mouse brain at 17.6 T. *Magn Reson Mater Phy* 2009; 22:53–62

- 69.** Liu W, Xu J, Wang H, Xu C et al. Isoflurane-induced spatial memory impairment by a mechanism independent of amyloid-beta levels and tau protein phosphorylation changes in aged rats. *Neurol Res* 2012;34:3-10
- 70** Chauhan NB, Siegel GJ. Antisense inhibition at the beta-secretase-site of beta-amyloid precursor protein reduces cerebral amyloid and acetyl cholinesterase activity in Tg2576. *Neuroscience* 2007;146:143-51
- 71.** Hu W, Gray NW, Brimijoin S. Amyloid-beta increases acetylcholinesterase expression in neuroblastoma cells by reducing enzyme degradation. *J Neurochem* 2003;86:470–78



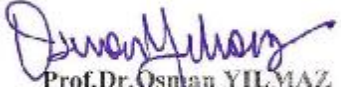
Toplantı No : 08/04/2011  
Toplantı Tarihi : 18 Şubat 2011

Sayın, Dr.Sibel ERGÜRZ  
Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı

10/2011 Protokol No'lu; Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı doktorlarından Dr.Sibel ERGÜRZ'ün yürütücüsü olduğu "Yendidoğan ratlarda tekrarlanan desfluran uygulanmasının Alzheimer hastalığı oluşumuna etkisi" isimli projede; proje isminin "Yendidoğan ratlarda tekrarlanan desfluran uygulanmasının Alzheimer hastalığı oluşturur mu?" olarak değiştirilmesi uygun bulunmuştur.

Projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

  
Prof.Dr.Osman YILMAZ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik  
Kurul Başkanı


Prof.Dr.A.Necati GÖKMEN  
Başkan Yardımcısı  
(Araştırmacı)


  
Prof.Dr.Alper SOYLU  
Üye

Prof.Dr.Ayşe GELAL  
Üye (topl.katılmadı)

Prof.Dr.Selman SÖKMEN  
Üye (topl.katılmadı)

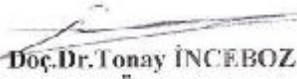
Prof.Dr.O.Nejat SARIOSMANOĞLU

  
Doç.Dr.Turna İLKNUR  
Üye

  
Doç.Dr.H.Alper BAGRİCANIK  
Üye

Prof.Dr.Abdullah KUMRAL  
Üye(topl.katılmadı)

Prof.Dr.A.Hüseyin BASKIN  
Üye

  
Doç.Dr.Tonay İNCEBOZ  
Üye

Vtr.Hekim Adnan SERPEN  
Üye

Ayşe Nur BALIN  
Üye

Doç.Dr.Şermin GENÇ  
Üye (Araştırmacı)

NOT: Projele yapılarak özelleştirilmemiş metin içinde bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.