

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

**SİRKADİYEN RİTMİN İZOFLURAN
UYGULANAN YENİDOĞAN RATLARDA
NÖROTOKSİSİTE ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DR. ALPER DOĞAN

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2008

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

**SİRKADİYEN RİTMİN İZOFLURAN
UYGULANAN YENİDOĞAN RATLARDA
NÖROTOKSİSİTE ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. ALPER DOĞAN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Ali GÜNERLİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR	i
TABLO LİSTESİ	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iii
RESİM LİSTESİ	iv
GRAFİK LİSTESİ	v
KISALTMALAR	vi
ÖZET	1
SUMMARY	2
GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
GENEL BİLGİLER	
Genel Anesteziklerin Santral Sinir Sisteminde Etki Mekanizmaları	6
İzofluran.....	8
Apopitoz.....	9
Genel Anesteziklerin Neden Olduğu Nöroapopitoz.....	10
Kronobiyoloji ve Anestezi.....	13
Sirkadiyen Ritmin Anatomik Temelleri.....	14
Melatonin.....	15
Genel Anestezikler için Sirkadiyen Ritim.....	19
Barbitüratlar.....	19
Benzodiazepinler.....	20
Ketamin, etomidat, Propofol, ve Halojenli Ajanlar.....	20
GEREÇ VE YÖNTEM	21
Volatil anestezik ajan uygulaması.....	21
Çalışma Grupları	22
Histopatolojik Değerlendirme.....	23
İstatiksel Değerlendirme.....	25
BULGULAR	26
Arteriyel Kan Gazı Sonuçları.....	27
Histopatolojik Bulgular.....	31
TARTIŞMA	31
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	36
KAYNAKLAR.....	37
EKLER	
Ek 1: ETİK KURUL İZİN BELGESİ.....	45

TEŞEKKÜR

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

Tez araştırmamın tüm aşamalarında katkı ve yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Necati GÖKMEN'e,

Tez araştırmam sırasında bana yardımcı olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Alper BAĞRIYANIK'a ve Araş. Gör. Dr. Müge KİRAY'a,

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 eşime ve oğlum Sarp'a

Sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Dr. Alper DOĞAN

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1. Gece izofluran ve gündüz izofluran gruplarının
arteriyel kan gazı analizi sonuçları

26

SEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. İnsan ve rat beyninin midsagital kesitleri	6
Şekil 2. İzofluranın kimyasal formülü	8
Şekil 3. Talamus ve serebral kortekste apopitotik yollara anestezinin etkisi	12
Şekil 4. Memeli sirkadiyen ritminin şeması	15
Şekil 5. Melatonin sentezi	17
Şekil 6. Melatoninin anestezikle indüklenen apopitotik aktivasyona etkisi	18

RESİM LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Resim 1. Deney düzeneği	21
Resim 2. Yenidoğan rata kraniyotomi uygulanması	23
Resim 3. Kraniyotomi ile çıkarılan rat beyni	24
Resim 4. Talamus paraventriküler nükleus düzeyinden alınan kesitlerde Kaspaz-3 ile boyalı x40 büyütmedeki resimler.	27
Resim 5. Korteks düzeyinden alınan kesitlerde Kaspaz-3 ile boyalı x40 büyütmedeki resimler	29
Resim 6. Hipokampus CA1 düzeyinden alınan kesitlerde Kaspaz-3 ile boyalı x40 büyütmedeki resimler.	30

GRAFİK LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Grafik 1. Talamus paraventriküler nükleus gruplarının karşılaştırılması	27
Grafik 2. Korteks gruplarının karşılaştırılması	28
Grafik 3. Hipokampus CA1 gruplarının karşılaştırılması	30

KISALTMALAR

NMDA.....: N metil D aspartat

GABA.....: Gama amino bütirik asit

SSS.....: Santral sinir sisitemi

CA1.....: Cornu ammonis 1

IPSA.....: İnhibitör postsinaptik akım

Cl.....: Klorür

N₂O..... : Azot protoksit

NGF.....: Sinir büyüme faktörü

Apaf-1.....: Apopitoz proteazı aktive eden faktör-1

BDNF.....: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör

NF.....: Nörotrofik faktör

Trk.....: Tropomiyozin reseptör kinaz

ÖZET:

SİRKADİYEN RİTMİN İZOFLURAN UYGULANAN YENİDOĞAN RATLARDA NÖROTOKSİSİTE ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Alper Doğan , Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi,
Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, İZMİR

Amaç: Sedasyon ve anestezi uygulamalarında kullanılan bazı ilaçlar gelişmekte olan hayvan santral sinir sisteminde histopatolojik değişikliklere neden olur. Bu gözlemler anestezi ajanların pediatrik hastalarda kullanımlarıyla ilgili kaygıları ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmanın amacı sirkadiyen ritmin izofluranın neden olduğu nörotoksisite üzerine olası etkilerini araştırmaktır.

Yöntem: Apoptotik nörodejenerasyonu tetiklemek için daha önceki çalışmalarda tanımlanan şekilde 7 günlük rat yavrularına 6 saat süresince %1,5 izofluran uyguladık. 26 yenidoğan rat çalışmaya alındı ve 4 gruba randomize edildi. Yavru ratlara 07:00-13:00 (gündüz grubu) ve 19:00-01:00 (gece grubu) saatleri arasında anestezi uygulandı ve kontrol grupları aynı zaman aralıkları süresince oda havasında tutuldu. İzofluran anestezisinin sona ermesinden iki saat sonra ratlar histopatolojik çalışmalar için sakrifiye edildi.

Bulgular: Histopatolojik bulgular değerlendirildiğinde hem gece hem de gündüz grubunda %1,5 konsantrasyonda uygulanan izofluranın gelişmekte olan rat beyninde nöroapoptotik etkisi bulundu ($p<0.05$). Nöroapoptotik yanıtın, talamus paraventriküler nükleus, korteks ve hipokampus CA1 bölgelerinde gündüz izofluran uygulanan grupta, gece izofluran uygulanan gruba göre daha fazla olduğu saptandı ($p<0.05$).

Sonuç: Bulgularımıza göre izofluranın oluşturduğu nöroapoptozun sirkadiyen bir ritminin olduğu ve deneysel çalışmalardan elde edilen bulguların pediatrik anestezi uygulamalarına uyarlamadan önce iyi tasarlanmış klinik araştırmalara gereksinim olduğu kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: İzofluran, rat, sirkadiyen ritim, nörotoksisite

SUMMARY:

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF CIRCADIAN RHYTHM ON NEUROTOXIC EFFECT OF ISOFLURANE ADMINISTRATION IN NEWBORN RATS

Alper Dogan, MD. Dokuz Eylul University, School of Medicine,
Department of Anesthesiology and Reanimation, IZMIR.

Aim: Some drugs used for sedation and anesthesia procedures produce histopathologic central nervous system changes in juvenile animals. These observations have raised concerns regarding the use of these drugs in pediatric patients. The aim of this study is to investigate the possible effects of circadian rhythm on neurotoxicity triggered by isoflurane.

Material and Methods: We have administered 1,5% concentration of isoflurane anesthesia for 6 hours to 7 day old infant rats as previously described in order to trigger apoptotic neurodegeneration. 26 newborn rats were involved and randomized to four groups. Rat pups were exposed to anesthesia between 07:00 am-01:00 pm (day group) and 07:00 pm-01:00 am (night group) and controls were exposed to room air during same time intervals. Two hours after cessation of isoflurane anesthesia rats were sacrificed for histopathological studies.

Results: Histopathological studies have confirmed the neurotoxic effect of 1,5% concentration of isoflurane anesthesia in developing rat brain either in day or night groups ($p<0.05$). Neuroapoptotic response in thalamus paraventricular nucleus, cortex and hippocampus CA1 region was observed stronger in day group than night group ($p<0.05$).

Conclusion: According to our findings we decided that there is a circadian rhythm in isoflurane neurotoxicity and well designed clinical investigations are needed to assess the potential relevance of the animal findings to pediatric anesthesia.

Keywords: Isoflurane, rat, circadian rhythm, neurotoxicity

GİRİŞ

Günümüzde prematür bebeklere ve çok küçük çocuklara değişik nedenlerle genel anestezi uygulaması sık karşılaşılan bir durumdur. Geleneksel olarak genel anesteziklerin güvenli olduğu bilinmesine karşın, deneysel çalışmalarda bu ajanların gelişimini tamamlamamış memeli beyinde zararlı etkilerinin olabileceği bildirilmiştir.¹⁻⁵ Gelişmekte olan beyin sinaptogenez sırasında N-metil D-aspartat (NMDA) glutamat reseptörü bloke edici veya gama amino bütirik asit (GABA_A) reseptörlerini potensiyalize edici ajanlara maruz kalması sonucu, yaygın apoptotik nörodejenerasyonun tetiklenebileceği gösterilmiştir.² Halen kullanılmakta olan ajanlar anestezi etkilerini NMDA reseptör blokajıyla [Ketamin, N₂O (Azot protoksit), Xenon] veya GABA_A reseptör potensiyalizasyonu (benzodiyazepinler, barbitüratlar, propofol, etomidat, izofluran, enfluran ve halotan) gösterirler.

Uemura ve ark.³ uzun süreli halotan uygulamasının (8 saat/gün, 5gün) sinaptik dansiteyi azalttığını ve davranış gelişimini durduğunu bildirmişlerdir. Ikonomidou ve ark.⁴ bir NMDA reseptör antagonisti olan MK-801'in 7 günlük ratlarda kullanılmasının, yaygın apoptosize neden olduğunu saptamışlardır. Hayashi ve ark.⁵ tek doz (25, 50 ve 75 mg/kg⁻¹) ketamin uygulamasının apoptozise neden olmadığını, ancak (25 mg/kg⁻¹) 9 saat süresince 7 kez enjeksiyon yapılmasının nörodejenerasyona neden olduğunu göstermişlerdir.

Jevtovic-Todorovic ve ark.'nın¹ 7 günlük ratlarda 6 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda veya kombinasyonlarda N₂O, izofluran ve midazolam uyguladıkları çalışmalarında, tek başına N₂O veya midazolam uygulamalarının apoptotik nörodejenerasyona neden olmadığını, izofluranın ise tek başına (% 0.75, 1 veya 1.5) doz bağımlı nörodejenerasyona neden olduğunu saptamışlardır. Ayrıca aynı çalışmada midazolamın toksik olmayan dozunu (9 mg/kg) takiben izofluran minimal toksik konsantrasyonda (% 0.75) 6 saat uygulandığında, apoptotik nörodejenerasyonda tek başına izofluran uygulamasına göre belirgin artış olduğunu bildirmişlerdir.

Johnson ve ark.⁶ 5-7 günlük yenidoğan farelere farklı konsantrasyon ve sürelerde (%0.75-4 saat, %1.5-2 saat, %2-1 saat) uygulanan izofluranın, nöroapoptozda belirgin artışa neden olduğunu göstermiştir.

Deneyisel çalışmalarda, genel anestezi ajanlarının uygulandığı zamana göre anestezi etkisinin zamansal değişiklikleri bildirilmiştir.⁷⁻¹¹ Ratlarda 35 mg/kg pentobarbital ile 16:00–22:00 saatleri arasında yapılan anestezi uygulamasında anestezi süresinin günün diğer zamanlarına göre daha uzun olduğunu saptanmıştır.⁷ Farelere saat 10:00 da enjekte edilen ketaminin hipnotik etkisi, yaklaşık 50 dk iken, 22:00 de enjekte edildiğinde 70 dk olarak bulunmuştur.⁸ Rebuelto ve ark.⁹⁻¹⁰ ratlarda ketamin veya ketamin ve midazolam kombinasyonuna en uzun anestezi yanıtın gün içi dönemde (ratlarda dinlenme periyodu) ortaya çıktığını göstermişlerdir. Charlette ve ark.¹¹ ratlarda propofolün maksimal etkinliğinin ışıklar yandıktan 7 saat sonra (dinlenme periyodunun ortası) ortaya çıktığını saptamışlardır.

Halojenli ajanların etkinliğinde veya toksisitesindeki zamansal değişiklikler çok az araştırılmıştır. Ratlarda halotanın minimum alveoler konsantrasyonu (MAK) saat 12:00 de % 1.26 iken, saat 20:00 de %1.45'e çıktığı bildirilmiştir.¹² Bu sirkadiyen değişikliklerin mekanizmaları bilinmemektedir. Reseptör sayı ve aktivitesindeki sirkadiyen ritmisite olduğu kadar, dağılım ve metabolizmasındaki ritmisitenin de bu değişikliklerde etkili olabileceği düşünölmektedir.¹³

Pubmed' de (Mayıs 2008 tarihine kadar) yaptığımız literatür taramasında, sirkadiyen ritmin, yenidoğan ratlarda oluşturulan genel anestezi nörotoksitesi üzerindeki etkisini araştırın çalışma bulunmadığını saptadık.

AMAC

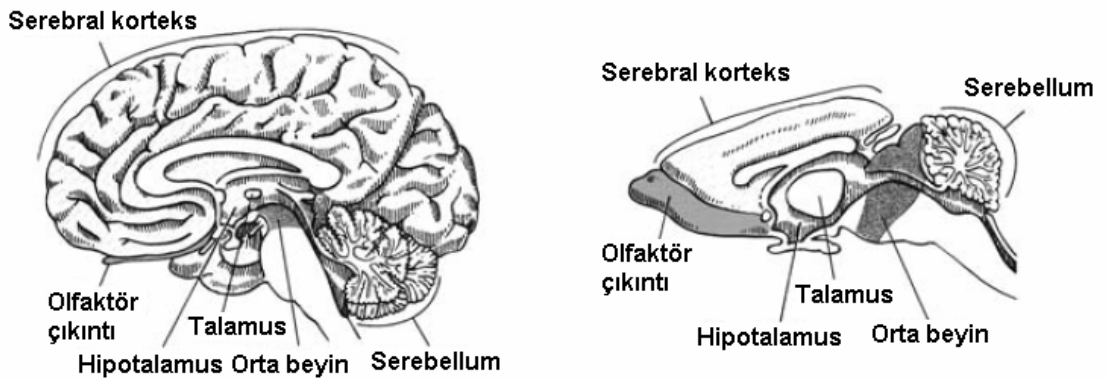
Bu çalışmada, yenidoğan ratlarda izofluranın neden olduğu n6rotoksisiteye, sirkadiyen ritmin olası etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Günümüzde yapılan operasyonlarda çeşitli anestezi ajanları kullanılmaktadır. Anestezi uygulamalarında kullanılan ajanların insanlar üzerindeki çoğu etkileri bilinmekle birlikte, bu ajanların neden olduğu farklı etkiler sürekli olarak araştırılmaktadır. Pediyatrik anestezide kullanılan anestezi ajanlarının gelişmekte olan santral sinir sistemine (SSS) etkileri halen en sık araştırılan konular arasında önceliğini korumaktadır. Değişik nedenlerle anestezi almak zorunda kalan pediyatrik yaş grubunda, inhalasyon ajanlarının çocuğun beyin gelişimi ve öğrenmesi üzerine etkileri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Anestezi ajanlarının gelişmekte olan SSS üzerindeki etkilerini bilmek, pediyatrik anestezi uygulamalarında büyük yarar sağlayacaktır.

Genel Anesteziklerin Santral Sinir Sisteminde Etki Mekanizmaları

Ratlarla yapılan çalışmalarda anestezi ajanlarının rat beyininde (Şekil 1) ve özellikle hipokampus bölgesinde yaptığı değişiklikler sık olarak araştırılmıştır.^{1,2,14,15} Bunun nedeni, hipokampus bölgesinin SSS'de anestezi ajanlarının sinaptik transmisyon üzerine etkilerinin en iyi gösterilebildiği bölge olmasıdır. Hipokampus afferent ve efferent yapılar, nörotransmitterler ve birçok katmandan meydana gelen (gyrus dentatus, hipokampus, fimbria hippocampi) limbik bir yapıdır. Ayrıca anestezi ajanlarının ana hedef bölgelerindedir.¹⁴



Şekil 1. İnsan (solda) ve rat (sağda) beyininin midsagittal kesitleri.¹⁶

Hipokampüste, internöronlar içinde GABA ve onun sentezleyici enzimleri bulunur. Bu nöronlar eksitator sinaptik akımların ve piramidal hücre deşarjının inhibisyonunu sağlar.¹⁵

GABA_Aerjik internöronlar tüm nöron popülasyonununun %10'unu oluşturur. GABA_Aerjik internöronlar hipokampus ve diğer kortikal bölgelerdeki nöronal aktivitenin uyarılabilirliğinde ve senkronizasyonunda önemli rol oynamaktadır.^{15,17} Bununla birlikte global ve lokal beyin fonksiyonlarında rol oynayan inhibitör internöronlar üzerine anestezi ajanlarının hücrel ve moleküler düzeyde etkileşimleri henüz tam olarak bilinmemektedir.¹⁵

Kullanılan genel anestezi memeli SSS'de iki mekanizma üzerinden etki göstermektedirler.^{1,14}

1. GABA_A reseptörleri yoluyla inhibisyonda artış (benzodiyazepinler, barbitüratlar, propofol, etomidat, izofluran, enfluran ve halotan)
2. NMDA reseptörlerinin eksitasyonunda azalma (ketamin, N₂O, xenon)

Volatil anestezi ajanlar memeli SSS'nde nöronal aktiviteyi deprese eder ve GABA_A reseptör-iyon kanal kompleksinden Cl⁻ akımının inhibisyonunu arttırmaları. Ayrıca konsantrasyona bağımlı şekilde, spontan olarak, neokortikal nöronların aksiyon potansiyel ateşlemelerini deprese ederler.¹⁸

Volatil anesteziğin sinaptik GABA_A reseptörleri üzerinde;

- 1- *Decay Phase*' da uzama
- 2- İnhibitör postsinaptik akım'ların (İPSA) pik amplitüdünün azalması
- 3- Glutamat salınımını inhibe etme gibi özellikleri bulunmaktadır.^{15,19}

Birçok çalışmada anesteziğin, nöron kültürlerinde GABA_A reseptörleriyle ilgili sinaptik akımları ve in vivo olarak cornu ammonis 1'deki (CA1) piramidal hücrelerde ve beyin kesitlerinde *Decay Phase*'ı uzattığı bulunmuştur.¹⁷ İnhibitör akımların bu şekilde uzaması sinaptik inhibisyonun kuvvetlenmesi ve SSS'nin anesteziğe bağlı depresyonunun artması ile sonuçlanır. Literatürde, genel anesteziğin hipokampüsteki etkilerinin, inhibitör nöronlar üzerinden olduğu gösterilmiştir.¹⁷

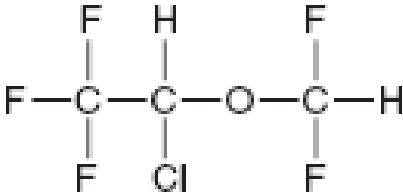
İzofluran

Enfluran izomeri olan bir metil etil eter olup onun birçok özelliklerini taşır. 1965 te Terrell tarafından sentezlenmiş ve 1971 de klinik kullanıma başlanmıştır.²⁰

Kimyasal ve fiziksel özellikleri

Kimyasal olarak bir 1-kloro-2,2,2,-trifloretil diflorometil eter'dir (Şekil 2). Renksiz, patlayıcı ve yanıcı olmayan, koruyucu içermeyen, kimyasal olarak stabil bir maddedir. Molekül ağırlığı 184.5 g, kaynama noktası 48.5 °C, özgül ağırlığı 1,5 dir. Buhar basıncı (20 °C de) 238 mmHg olup halotana yakındır. Bu nedenle bir halotan buharlaştırıcısı ile doğru yoğunluklar elde edilebilir. Ancak bu uygulama, komplikasyon veya herhangi bir sorun çıktığında hangi ajanın kullanıldığı konusunda karışıklığa neden olacağından sakıncalıdır.²⁰

MAK değeri oksijen içinde 1.15, %70 N₂O içinde 0.56 dir. Partisyon katsayıları, kan:gaz için 1.4, su:gaz için 0.6, yağ dokusu:gaz için 94.5 dir. Bu değerler halotan ve enfluranın partisyon katsayılarından düşük olduğu için, uyuma ve uyanma onlardan daha hızlıdır. Bu özellikler anestezi derinliğinin de daha iyi kontrol edilmesine olanak verir.²⁰



Şekil 2. İzofluranın kimyasal formülü.²¹

Metabolizma ve Toksisitesi

Oldukça stabildir, sodalime, metal ve ultraviyoleyle reaksiyona girmez. Ancak %0.2 si metabolize olur. 3 MAK/saat sonunda plazma florür düzeyi 2-3 mmol/L dir. Bütün bu özellikler, izoflurana akut ve kronik toksisite yönünden diğer ajanlara göre daha güvenilir bir nitelik kazandırmaktadır. Uzun süreli veya tekrarlayan uygulamaları renal hasara neden

olmaz ve böbrek hastalığı olanlarda kullanılabilir. Çok az metabolize olması ve molekülünün stabil olması nedeniyle hepatotoksik etkisi olmayacağı belirtilmektedir.²⁰

Santral Sinir Sistemine Etkisi

Serebral oksijen tüketimini azaltır. Yüksek konsantrasyonlarda serebral kan akımını, dolayısıyla serebral kan basıncını arttırır. Ancak bu etki halojeninkinden az olup yer tutan lezyon varlığında bile hiperventilasyonla kontrol edilebilir.²⁰

Klinik uygulama

İndüksiyon ve derlenme hızlıdır. Ancak hafif eter kokusunda olması inhalasyonunu güçleştirebilir. Uyanma döneminde öksürme, sekresyon artışı ve huzursuzluk olabilir. Bu, bir analjezikle önlenabilir. Çocuklarda indüksiyon sırasında öksürük, laringospazm ve sekresyon artışına neden olabilir. Atropin premedikasyonu ve yoğunluğun yavaş yavaş arttırılması ile bu sakınca kaldırılabilir. 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. Adrenalin 4.5 µg/kg'a kadar güvenle kullanılabilir.²⁰

Apoptoz

Apoptoz; programlı hücre ölümü, normal doku veya organ homeostazında enerji bağımlı bir işlem olarak ilk kez 1972 yılında tanımlanmıştır.²² Hücre proliferasyonu ve hücre ölümü normal dokularda denge halindedir. Yetişkin dokularında bu denge hali doku hacminin devamlılığını sağlar. Hücre ölümü embriyoda organogenez sırasında ve yetişkinlerde hücre devri ve diferansiyasyonu sırasında fizyolojik olarak gerçekleşirken, çeşitli hasarlanmalara yanıt şeklinde patolojik işlem olarak da gerçekleşir.²³ Apoptoz organize, enerji bağımlı bir olaydır ve membran fragmanları içinde hücrenin parçalanmasıyla karakterizedir. Beyin gelişiminde önemli bir rol oynar. Gelişen beyinde hücrelerin %50'si apoptoz sonucu ölür. İmmatür hücrelerin matür hücrelere göre apoptoze daha duyarlıdır.²⁴

Apoptoz ve nekroz farklı morfolojik ve biyokimyasal kriterleri içerir. Apoptozda organize kromatin kondensasyonu ve plazma membran bütünlüğü varken, nekrozda sitolizis

ve doku inflamasyonu vardır. Birçok çalışmada apoptozun periferik ve santral sinir sisteminde önemli bir rol oynadığı ve fizyolojik, gelişimsel ve patolojik hücre ölümünü düzenlediği görülmüştür. Morfolojik olarak apoptoz nükleer kromatinin parçalanması, sitoplazma ve çekirdeğin kondenzasyonu ve DNA fragmentasyonu; nekroz ise hücrenin şişmesi, endoplasmik retikulumun dilatasyonu, mitokondrinin bozulması ve plazma membranının rüptürü ile karakterizedir.²⁴ Apoptoz sonrası, hücre yüzey membranı balonlaşır ve sferik apoptotik şekiller ortaya çıkar.²⁵ Apoptozda en önemli değişiklik hücre nükleusunda gerçekleşir; organeller ve membran sağlamdır.²³

SSS gelişimi sırasında sinaptogenez evresinin herhangi bir aşamasında meydana gelen patoloji, apoptotik kaskadda hayatla bağdaşmayan şiddetli migrasyonel defektlere neden olabilir. İnsanlarda beynin gelişim süreci gebeliğin 6. ayında başlar ve doğumdan sonra 3 yaşına kadar devam eder. Nöral gelişim evresinde meydana gelen geçici değişiklikler bile, gelişen beyin hücrelerinin milyonlarcasında apoptotik dejenerasyonu tetikleyebilir. İmmatür memeli beyninde nöronal apoptoz, sinaptogenez periyodunda NMDA reseptörlerinin geçici blokajıyla veya GABA_A reseptörlerinin aşırı uyarımıyla tetiklenebilir.²

Genel Anesteziklerin Neden Olduğu Nöroapoptoz

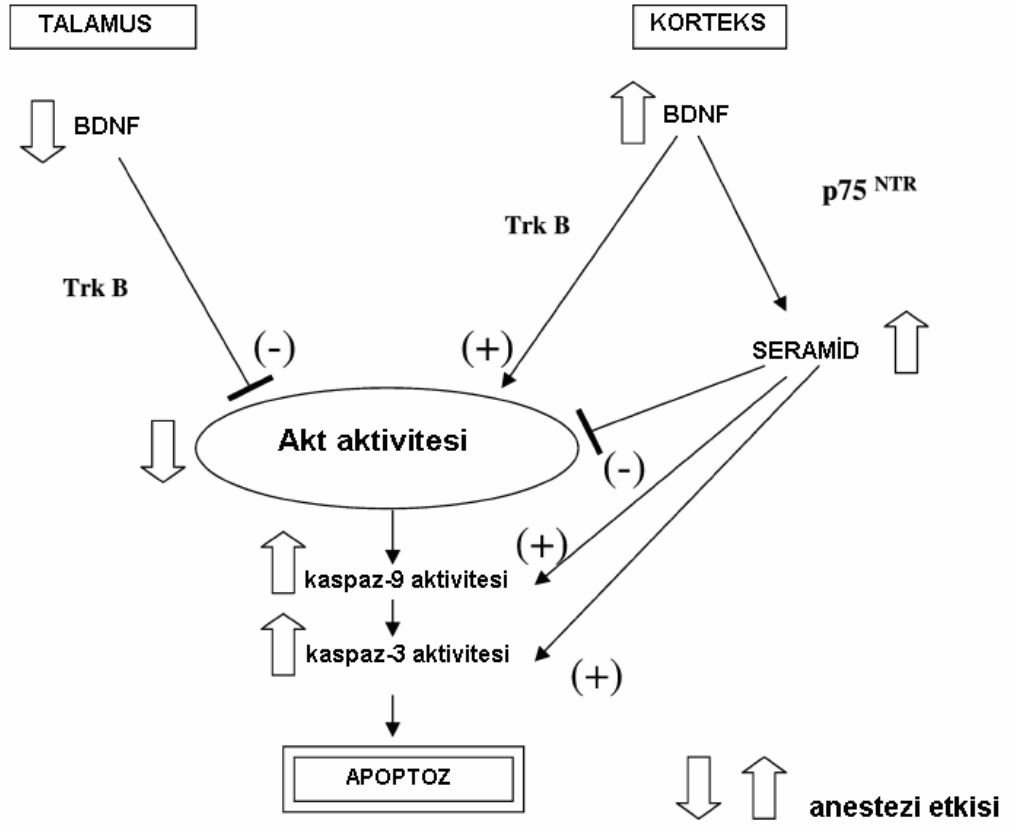
Nörotrofinler, NGF (sinir büyüme faktörü), BDNF (beyin kaynaklı nörotrofik faktör), NT (nörotrofik faktör)-3 ve NT4/5'i içeren bir büyüme faktörü ailesidir ve nöronal sağkalımı, diferansiyasyonu ve sinaptik plastisitenin bazı formlarını destekleyerek memeli beyninde sinaptogenezde önemli bir rol oynarlar.²⁶ Nörotrofinlerin farklı biyolojik fonksiyonlarını düzenleyen sinyal ileti sistemleri iki farklı plazma membran reseptörü üzerinden gerçekleşir: Trk (Tropomiyozin reseptör kinaz) reseptörleri ve p75 nörotrofik reseptörü (p75^{NTR}). Güncel veriler p75^{NTR} nin temel fizyolojik fonksiyonlarının Trk reseptör aktivasyonunu ve sinyalizasyonu kontrol etmek ve ayrıca Trk-bağımsız sinyal transdüksiyon kaskadını aktive etmektir.²⁷ Trk bağımlı ve bağımsız kaskadlar nöronların major sağkalım yolağında temel faktör olan Akt serin/treonin kinazın aktivasyonunu (fosforilasyonunu) düzenler.²⁸

Nörotrofinler nöronlar tarafından sentezlenir ve salınırlar ve biyosentezleri ve sekresyonları nöronal aktiviteye bağımlıdır.²⁹ Nöronal aktivitenin aşırı baskılanması nörotrofinlerce regüle edilen sağkalım sağlayan sinyalleri bozabilir.³⁰ İlginç olarak aktive olan nörotrofinle indüklenen hücre sinyal sistemine göre apoptoz engellenir veya tetiklenir.²⁶

Nöronal depresyonu indükleyen farmakolojik ajanların önde gelen örneği olan genel anesteziklerle ilgili güncel çalışmalarda GABAerjik anesteziklerden barbitüratların, benzodiyazepinlerin, volatil anesteziklerin (örn.izofluran) veya NMDA antagonisti ketaminin, kliniğe uygun dozlarının, immatür rat beyninde sinaptogenez sırasında, masif ve yaygın apoptotik nörodejenerasyonu tetiklediği gösterilmiştir.^{1,5,6} Ciddi olarak etkilenmiş beyin bölgelerinin ultrastrüktürel analizinde gelişmekte olan nöronlardaki nükleer ve sitoplazmik değişiklikler “fizyolojik” hücre ölümünde tanımlananlarla benzerdir ancak genel anesteziklerin normal oluşan sinaptogenezi bozduğunu ve çok sayıda nöronu “gereksiz” kategorisine sürükleyerek ölümlerine neden olduğunu gösterecek şekilde, normal hücre ölümünden çok fazla oranda ve yoğunlukta bulunmuştur.³¹

Çalışmalar, anesteziyle indüklenen nöroapoptozun erken dönemdeki altta yatan mekanizmalarını açıklamaya çalışsa da, güncel veriler iki temel apoptotik yolağın [intrensek (mitokondriyal) ve ekstrinsek (ölüm reseptörü) yolakları] önemli bir rol oynadığını ve mitokondri bağımlı yolağın anestezi maruziyetinin erken döneminde aktive olurken ölüm reseptörü bağımlı yolağın daha geç dönemde aktive olduğunu göstermiştir.³²

Sık kullanılan genel anesteziklerin nörotrofinlerin fonksiyonlarını değiştirip değiştiremediği ve anesteziyle indüklenen gelişimsel nöroapoptoza nörotrofinlerin aracılık edip etmediği araştıran Lu ve ark.³¹ genel anesteziklerin, gelişmekte olan beyinde bolca bulunan iyi tanımlanmış bir nörotrofik faktör olan BDNF²⁶ üzerindeki modülatör rolü üzerinde çalışmışlardır. Bu çalışmada, araştırmacılar immatür beyinde ciddi apoptotik nörodejenerasyon ve yaşamın kalanında belirgin uzun dönemli öğrenme/bellek bozukluğunu indüklediği gösterilen¹ midazolam, izofluran ve N₂O’i içeren klinikle uyumlu anestezi kokteyli kullanmışlardır. Bu çalışmayla gelişmekte olan immatür rat beynindeki klinikte kullanılan anesteziklerin indüklediği nöroapoptotik hasarın, en azından kısmen, BDNF aracılı apoptotik kaskad üzerinden düzenlendiğine dair kanıtlar ilk kez sunulmuştur. Bu veriler temel alındığında anestezi iki mekanizma ile nörotrofin-aracılı apoptotik yolakları aktive eder: hem Trk-bağımlı hem de Trk- bağımsız, p75^{NTR}-bağımlı apoptotik kaskadları aktive eder ve her bir yolağın önemi beyin belirli bölgelerine spesifiktir.³¹ (Şekil.3)



Şekil 3. Talamus ve serebral kortekste apoptotik yollara anestezinin etkisi.³¹ (BDNF: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör, Akt: serin treonin kinaz)

Anestezi, talamusta aktive kaspaz-9 ve 3'ün aktivasyonu ile sonuçlanan BDNF protein ve aktive Akt düzeylerinde azalmaya ($P75^{NTR}$ ve seramid düzeylerini etkilemeksizin) neden olurken, serebral kortekste olasılıkla TrkB sinyal yolağı aktivasyonuna, Trk-bağımsız $P75^{NTR}$ bağımlı kaskadın aktivasyonu ile artmış seramid üretiminin TrkB sinyal yolağının ağır basması sonucu aktive Akt düzeyleri düşerken ve kaspaz-9 ve -3 aktiviteleri artarken, BDNF düzeylerinde artmaya neden olur.³¹ (Şekil 3)

Kronobiyoloji ve Anestezi

Kronobiyoloji, yaşayan organizmanın organizasyonundaki biyolojik ritimleri inceler. Biyolojik ritimler, zaman içinde periyodik ve öngörülebilir olan farklı biyolojik fenomenleri içerir. Aydınlık veya karanlıktaki gibi sabit durumlar süresince devamlılıklarından da anlaşılacağı gibi genetik olarak tanımlanmışlardır. Senkronize ediciler olarak tanımlanan aydınlık-karanlık, dinleme-aktivite, açlık-beslenme ve diğer çevresel koşulların döngülerindeki geçici değişiklikler organizmaya geçici işaretler verir ve böylece dönemlerini bu biyolojik ritimlere kabul ettirirler. Bu nedenle bu ritimler sirkadiyen (yaklaşık 24 saat olan bir dönem), ultradiyen (1 günden daha kısa bir dönem) infradiyen (haftalar, aylar veya mevsimler süren bir dönem) gibi farklı dönemler şeklinde nitelendirilebilir. Bu ritimler, gün boyunca insan vücudunda, kan basıncını, immün sistem aktivitesini, kan koagülasyonunu ve gastrik ve renal fonksiyonları etkileyerek değiştirir. Neredeyse tüm hormonlar sirkadiyen ritimlerle düzenlenir. Örneğin kortizol en düşük konsantrasyonlarına uyku sırasında düşer ve sabah erken saatlerde en yüksek konsantrasyonlarına ulaşır.¹³

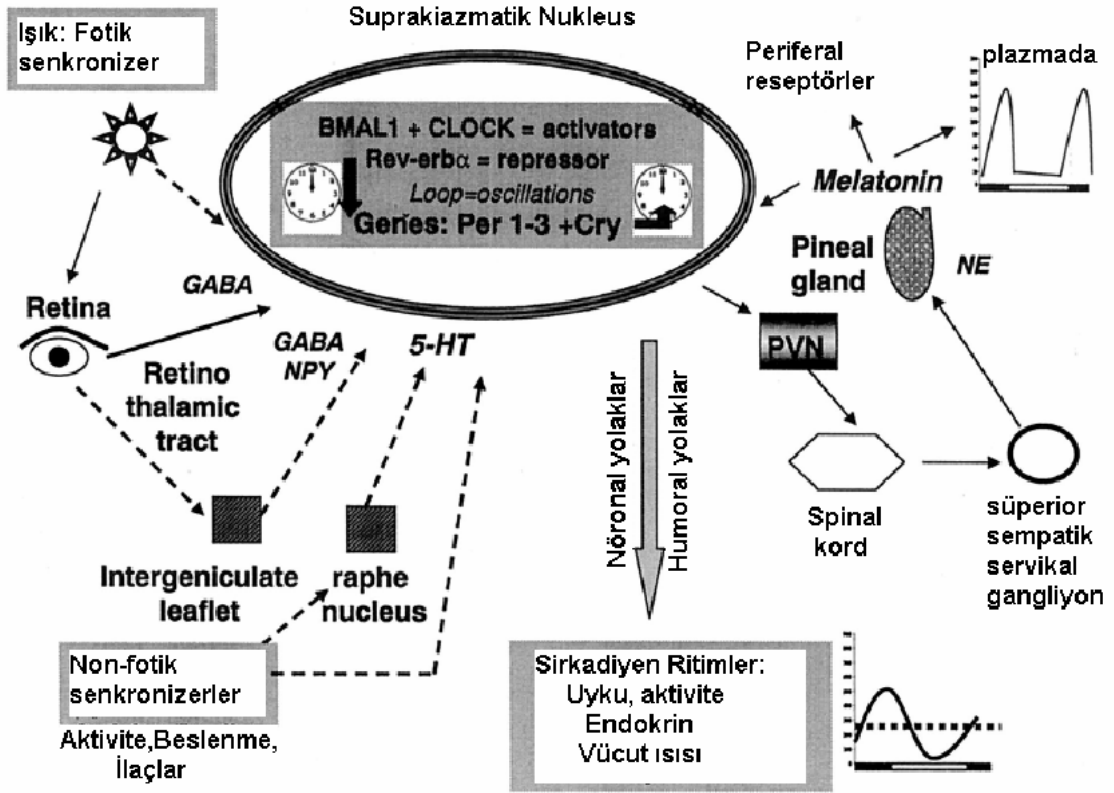
Biyolojik ritimler *jet lag* ve mesai saatleri gibi sosyoekolojik faktörler kadar hastalık ve ilaçlardan da etkilenir. Varolan klinik veriler, belirti ve semptomların zaman içinde sabit olmadığını ve genellikle sıklık paterne sahip olduklarını göstermiştir. İnme ve kalp krizlerinin çoğu günün herhangi bir saatiyle karşılaştırıldığında sabahları oluşur ve osteoartriti olan hastalar sabahları geceye göre daha az ağrı duyma eğilimindedir. Çalışmalar ayrıca kemoterapi, astım ve osteoartrit tedavilerinin, ilaçlar dikkatlice seçilmiş zamanlarda yapıldığında daha fazla efektif ve daha az toksik olabileceğini göstermiştir. İlaç uygulaması için gün içinde zaman seçerek tıbbi tedavide sirkadiyen ritmin göz önüne alınmasına kronoterapi denir. Hastalığın sirkadiyen paterni temelinde ilaç uygulamasıyla ilaç etkileri optimize edilebilir ve yan etkiler azaltılabilir.¹³

Kronofarmakoloji, bir ilacın uygulama anının (saat, ay ve yıl) organizmanın ilaca yanıtına etkisini araştırır. Kronofarmakoloji ayrıca biyolojik ritimlerin ilaçla indüklenen değişimlerini araştırır. Kronofarmakolojinin iki yönü mutlaka ayrılmalıdır: bir ilacın uygulanma zamanı, kalitatif veya kantitatif bir bakış açısı (kronofarmakodinamik) ve/veya farklı bir etkin ilaç konsantrasyonu nedeniyle (kronofarmakokinetik) farklı bir yanıt oluşturabilir. Farmakokinetik parametreler sirkadiyen ritmi gösteren farklı fizyolojik fonksiyonlardan etkilenir. İlaç kinetiğindeki zamansal değişimler hayvanlarda ve insanlarda

anestezikleri de içeren yüzde fazla ilaç için yayınlanmıştır. Örneğin heparinin sabit bir infüzyon hızına rağmen geceleri kanama riski ve aktive parsiyel tromboplastin daha yüksektir. Kronofarmakokinetik veri, kronofarmakodinamik fenomeni kısmen açıklayabilir. İlaç kinetiğinde ilaç uygulama zamanının etkisinin bilgisi, günlük toplam dozun 24 saat boyunca dağılımını ayarlayarak uygulama bulabilir.¹³

Sirkadiyen Ritmin Anatomik Temelleri

Ritmisitenin düzenlenmesi, santral bir merkeze (*pacemaker*) ve bu merkezi dış çevreye bağlayan girdi yollarına ve çıkış yollarına (senkronize ediciler) gereksinim gösterir. Memelilerde, santral sirkadiyen *pacemaker* hipotalamusun suprakiazmatik nükleusunda yer alır (Şekil 4) ve ana senkronize edici ışıktır. Suprakiazmatik nükleus fotik uzantı içerir. Retinada yer alan fotoreseptörler retinotalamik yol ile doğrudan suprakiazmatik nükleusa uzanır. Glutamata bu sinaptik bağlantıda temel sinyal molekülüdür. Fotik bilgi ayrıca dolaylı olarak da genikulohipotalamik yoldan daha fazla intergenikulat yaprak yoluyla suprakiazmatik nükleusa ulaşabilir. GABA tip A ve nöropeptid Y bu sinaptik bağlantıda sinyal molekülü olarak işlev görür. Sirkadiyen *pacemaker* ayrıca lökomotor aktivite, ilaçlar ve beslenme gibi non-fotik senkronize edicilerle de ayarlanabilir. Raphe nükleustan serotoninerjik afferent aktivite ve intergenikulat yapraktan nöropeptid Y-GABA aracılı (GABAerjik) girdiler bu yollarda yer alır. Asetilkolin, histamin ve seratonin suprakiazmatik nükleusun kontrolünde yer alır.¹³



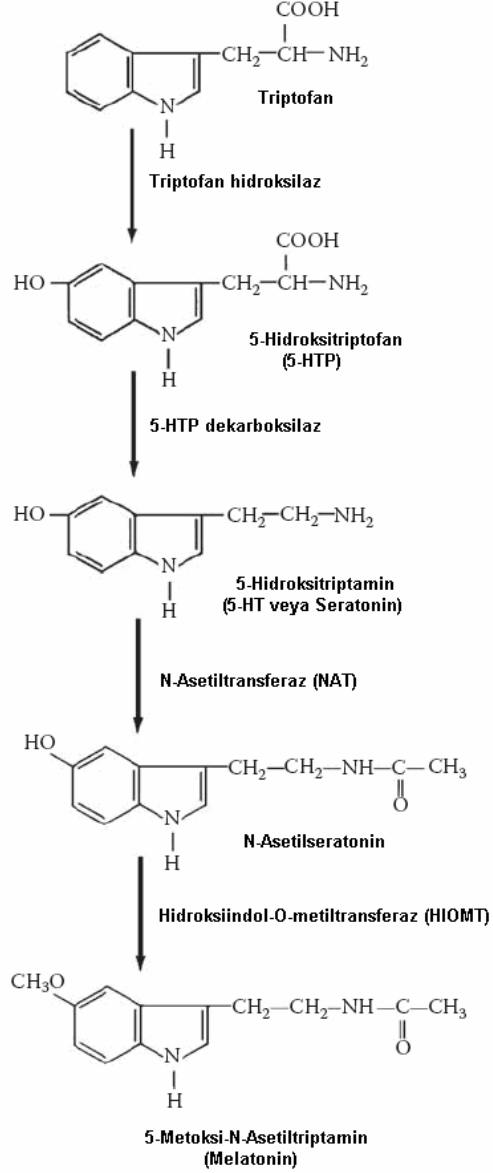
Şekil 4. Memeli sirkadiyen ritminin şeması.¹³ (GABA = γ -amino-butirik asid. 5-HT=5-hidroksitriptamin; NE=norepinefrin; NPY=nöropeptid Y; PVN= Paraventricüler nükleus)

Melatonin

Melatonin (*N*-asetil-5-metoksitriptamin) pineal gland tarafından neredeyse sadece geceleyin veya ışısız bir çevrede üretilir. Melatonin, bir anesteziğe benzer şekilde uykuyu etkiler ve melatonin tedavileri insomni, uyku apnesi, ve *jet lag* gibi uyku ilişkili problemlerin tedavisinde kullanılır. Ayrıca hekimler antik çağlardan beri geceleri hastaların daha az ağrısı olduğunu ve daha az analjeziğe gereksinimleri olduğunu belirtmişlerdir. Melatoninin maksimal analjezik etkisi gece ortaya çıkar ve pinealektomiyle ortadan kalkar. Opioid reseptör blokajı nosisepsiyondaki sirkadiyen ritmi engeller. Melatonin farelerde morfin toleransını ve bağımlılığını geri çevirebilir.¹³

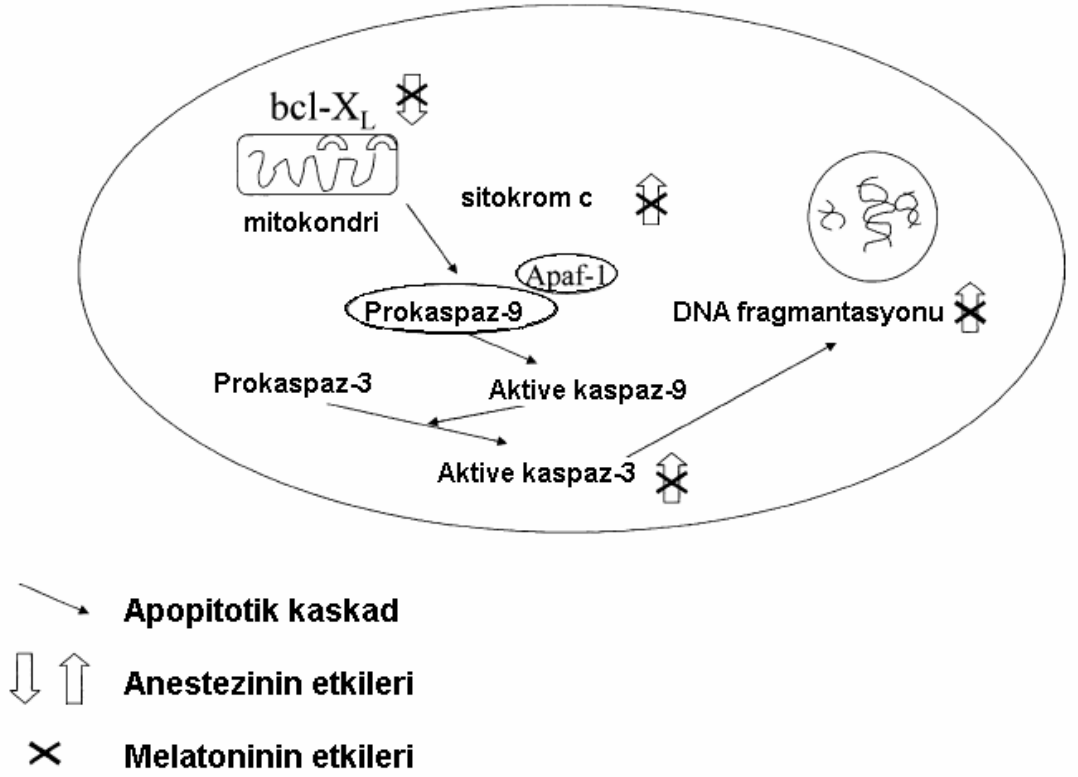
Melatonin ayrıca hücre aracılı immüniteyi ve bazı hormonların üretimini ve ardışık etkilerini etkiler. Melatonin, kan basıncı ve ısı regülasyonu gibi bazı santral fizyolojik süreçlerde ve iştah, hafıza ve duygu durum gibi bazı nörofizyolojik fonksiyonlarda yer alan güçlü bir nörotransmitter olan serotoninle beraber çalışır. Bu değişimler kognitif zafiyet kadar postoperatif periyotta da sıklıkla gözlenir. Post-operatif veya yoğun bakım hastalarındaki bazı stresle indüklenen yanıtlar hem melatoninin sirkadiyen sekresyonunun kaybına hem de sirkadiyen ritimdeki ilaçla indüklenen faz kaymasına bağlı olabilir.¹³

Melatonin antioksidan, onkostatik, anti-inflamatuar ve antikonvülzan etkilere ve sirkadiyen ritimlerin düzenlenmesi, reproduktif aksın düzenlenmesi gibi önemli fizyolojik fonksiyonlara sahip bir hormondur.³³ Pineal glandda melatonin sentezi (Şekil 5) suprakiazmatik nükleus tarafından kontrol edilen ritimlerden biridir. Pineal glandı düzenleyen nöronal girdi yolağı, retinotalamik trakt ile suprakiazmatik nükleusa lifler gönderen retinadan kaynaklanır. Sinyal suprakiazmatik nükleustan paraventriküler nükleua geçer, medial ön beyini izler ve üst torasik spinal kordun intermediolateral hücre kolonunda sona erer. Buradan, sempatik nöronları pineal glandı innerve eden süperior servikal gangliona bir projeksiyon vardır. Pineal glanda sinyal, ışıkla inhibe olan norepinefrindir. Bu nedenle melatoninin sentez ve salınımı karanlıkla uyarılır ve ışıkla inhibe olur. Melatoninin günlük salınımı ayrıca paraventriküler nükleusa GABAerjik projeksiyonlarla suprakiazmatik nükleus tarafından da kontrol edilir.¹³



Şekil 5. Melatonin sentezi.³⁴

Melatoninin ekzojen uygulamasının gelişmekte olan rat beyinde, özellikle serebral korteks ve anterior talamusta, anesteziyle indüklenen apoptotik nörodejenerasyona karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir.³⁵ Anestezi etkisiyle, anti apoptotik bir protein olan bclX_L düzeylerindeki azalma sonucunda iç mitokondri membranı destabilize olur ve sitoplazmaya sitokrom c salınır. Sitokrom c sitoplazmada sitoplazmik apoptoz proteazı aktive eden faktör-1'e (Apaf-1) bağlanır. Bu kompleks kaspaz-9 u aktive ederek aktive kaspaz-3 oluşumuna neden olur. Aktive kaspaz-3, DNAaz'ı aktive eder ve DNA fragmentasyonuna, apoptotik cisim formasyonuna ve hücrenin ölmesine (apoptotik nörodejenerasyon) neden olur.³⁵



Şekil 6. Melatoninin anesteziyle indüklenen apoptotik aktivasyona etkisi.³⁵

Melatonin, kaskadda bclX_L protein düzeylerinin up-regülasyonu, sitokrom c salınımının azalması ve kaspaz-3 aktivasyonunun inhibisyonu gibi belirli anahtar basamakları inhibe ederek anesteziyle indüklenen apoptotik nörodejenerasyonda belirgin azalmaya neden olur.³⁵(Şekil 6)

Suprakiazmatik nükleusun sirkadiyen mesajı adrenal beze iletirken otonomik nöronal yolları kullandığı gösterilmiştir. *Clock* genleri sirkadiyen ritimden sorumludur. Salınımları birçok organda denetlenir ve salınım santral *pacemaker*'a sınırlı değildir. Otomatik mekanizmanın merkezinde bir transkripsiyonel *feedback* döngü yer alır. CLOCK, BMAL1, ve Rev-erba, iki kriptokrom genin (*cry1* ve *cry2*) ve üç dönem geninin (*per1-3*) salınımı düzenleyen transkripsiyon faktörleridir. Per ve cry proteinleri CLOCK ve BMAL1'i inhibe ederek kendi sentezlerini engellerler. Bu *feedback* salınımlar yaparak gecikir. En önemlisi ışık olan senkronize edicilere yanıt olarak bu *feedback* döngüsünü kodlayan genlerdir. Kalp ve karaciğer gibi periferik organlarda ve ayrıca izole hücrelerde sirkadiyen ritim tanımlandığından ritimler santral saate sınırlı değildir. Sirkadiyen ritim, kültürlenmiş suprakiazmatik nükleus nöronlarında devam eder ve konakçı suprakiazmatik nükleusun

hasarlanmasından sonra suprakiazmatik nükleus hücre transplantasyonu sirkadiyen fonksiyonu düzeltebilir. Glukokortikoidler ayrıca suprakiazmatik nükleus etkilenmeksizin periferik dokuda gen ekspresyonu aracılığıyla da değişebilir. Sonuçta güncel anlayış memeli sirkadiyen ritimlerinin hipotalamik suprakiazmatik nükleustaki sinyal yollarını hedef alan senkronize ediciler tarafından düzenlendiği yönündedir. Sirkadiyen ritimlerin genetik temelleri tanımlanmıştır ve organlarda veya hücrelerdeki biyolojik süreçlerin neredeyse tamamı herhangi bir düzeyde sirkadiyen saat tarafından etkilenmektedir.¹³

Genel Anestezikler için Sirkadiyen Ritim

Birçok çalışma genel anestezikleri için zamansal değişiklikler yayınlamıştır. Bu çalışmalar daha yeni anestezik ajanlar olan propofol, desflurane ve sevofluranın keşfinden önce yapılmıştır. Ancak eski ajanlarla yapılan farmakokinetik çalışmalar, daha yeni ajanlar için olası uygulanabilirlikleri nedeniyle ilgi çekmektedir. Başlangıç çalışmalar bu ilaçların toksisitesindeki ve etkinliğindeki sirkadiyen değişiklikleri araştırmıştır.³⁶

Barbitüratlar

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.⁷ Gönüllülere oral hegzobarbital uygulaması akşamları sabaha göre daha etkin bulunmuştur.³⁷ Bu araştırmalar ayrıca hepatik ilaç metabolizmasındaki endojen değişikliklerin ilaç etkinliğindeki sirkadiyen değişikliklerle korele olduğunu göstermiştir. Klinik etkinlikteki zamansal değişiklikler için bir başka açıklama da barbitüratlar için hedef reseptördeki diüurnal değişiklikleri olabilir. Tip A GABAerjik ve N-metil D- aspartat reseptörleri, genel anestezik etkisi için önemli alanlar olarak görülmektedir.¹³ Birçok çalışmada, barbitüratların maksimal etkinliğinin sürmesiyle uyumlu olarak, post sinaptik tip A GABAerjik aktivitenin nokturnal saatlerde arttığına dair kanıtlar bulmuştur.³⁸

Benzodiazepinler

Benzodiazepinlerin gün içindeki sedatif veya anesteziik özelliklerinin halen iyice araştırılması gerekmektedir.¹³ 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.³⁹ Tersine diazepamın serbest fraksiyonu saat 23:00-08:00 arasında en yüksek ve saat 09:00 da daha düşüktür.⁴⁰ 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).⁴¹

Bu sirkadiyen değişikliklerin mekanizmaları olasılıkla multifaktöryeldir. Ratlarda benzodiazepin reseptörlerinin sayı ve aktivitesindeki sirkadiyen değişiklikler, dinlenme periyodunda daha fazla olmak üzere bildirilmiştir.⁴² Post sinaptik tip a GABAerjik aktivitede gece saatlerindeki pik, hamster serebral korteksinde gösterilmiştir.³⁸

Ketamin, Etomidat, Propofol, ve Halojenli Ajanlar

Ketamin etkilerinin sirkadiyen ritmini göstermek için yapılmış bir insan çalışması yoktur.¹³ Bununla birlikte çok sayıda hayvan çalışması beyindeki NMDA reseptör ekspresyonunda sirkadiyen ritmin varlığı gösterilmiştir.⁴³ Halen propofol ve etomidatın sirkadiyen değişiklikleriyle ilgili bir veri yoktur.¹³ 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.¹² Bu sirkadiyen değişikliklerin mekanizmaları çalışılmamıştır. Diğer genel anesteziikler gibi reseptör sayı aktivitesinde sirkadiyen ritmisite olduğu kadar dağılım ve metabolizmasında da olabilir.¹³

GEREC VE YÖNTEM

Çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanı Araştırmaları Etik Kurulu onayı alındıktan sonra (EK-1) Multidisipliner Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda yapıldı. Çalışmaya postnatal 7. günde (P7) olan, *Wistar* cinsi, ağırlıkları 9-11 gr arasında değişen, 26 dişi yavru rat alındı. Annelerinin yavru ratları emzirdikleri göz önüne alınarak, kanibalizmi önlemek amacıyla, ratlara mümkün olduğu kadar pamukla dokunuldu. Yavru ratlar doğumlarından itibaren 12 saat aydınlık (07:00-19:00), 12 saat karanlık ortamda izlendi.

Volatil anestezi ajan uygulaması

Anestezi düzeneği ve başlangıcı: Her deneysel 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 akım hızında %100 oksijen içinde % 1.5 konsantrasyonda izofluran (Forane, Abbott Lab. İstanbul, Türkiye) girişi sağlandı. Anestezi gaz konsantrasyonu 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 1) .



Resim 1. Deneysel düzeneği

Çalışma Grupları

Ratlar randomize olarak dört gruba ayrıldı. Deneysel uygulamalar gündüz grubundaki deneklerde saat 07:00-13:00 arasında, gece grubundaki deneklerde ise saat 19:00-01:00 arasında yapıldı. Gece gruplarındaki deneklerin ışıktan etkilenmemesi için ratlar deney süresince karanlık ortamda tutuldular (Çalışma Protokolü Şeması).

Grup gece kontrol (Grup Gc-K) (n:6): Denekler 6 saat süresince oda havasında izlendi.

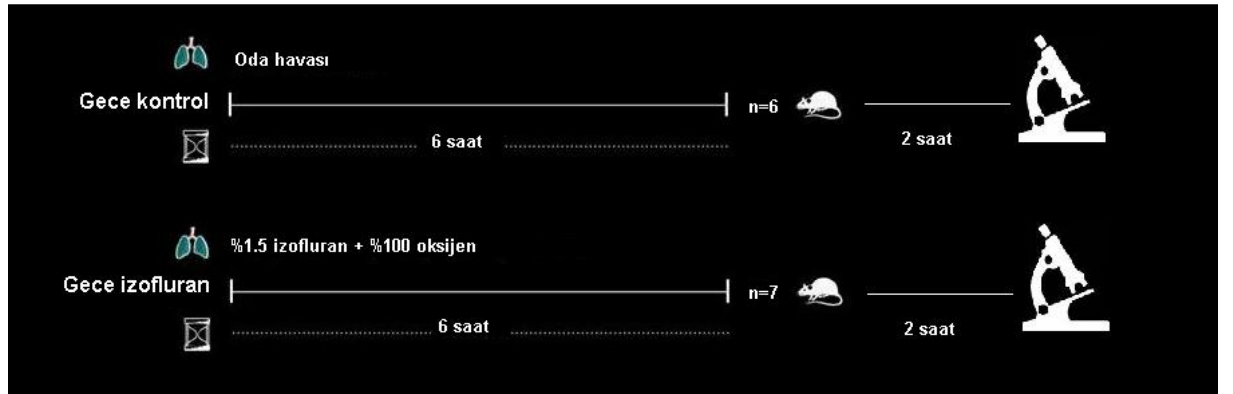
Grup gece izofluran (Grup Gc-İ) (n:7): Deneklere 6 saat süresince %100 O₂ içinde % 1.5 izofluran solutuldu.

Grup gündüz kontrol (Grup Gn-K) (n:6): Denekler 6 saat süresince oda havasında izlendi.

Grup gündüz izofluran (Grup Gn-İ) (n:7): Deneklere 6 saat süresince %100 O₂ içinde % 1.5 izofluran solutuldu.

Anestezi sonlandırılması: Volatil anestezi uygulaması 6 saatlik sürenin sonunda kesilerek 6 L/dk akım hızında %100 O₂ verilerek deneklerin derlenmeleri sağlandı. Derlenmelerinin sonunda ratlar annelerinin yanına alındı.

ÇALIŞMA PROTOKOLÜ ŞEMASI



Anestezi uygulamasının neden olabileceği olası solunumsal veya metabolik bozuklukları saptamak için anestezi uygulaması yapılan gruplardan 6 saatin sonunda birer denek rastgele seçildi. Deneklere %100 oksijen 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 yapılana kadar buz içine konularak saklandı. Deneklerin arteriyel kan örneklerinde pH, pCO₂, PO₂ ve glukoz düzeyleri Stat Profil M cihazı (*Nova Biyomedikal Corp., Waltham, ABD*) ile ölçüldü. Arteriyel kan örneği alınan denekler anestezi altında sakrifiye edildi.

Histopatolojik Değerlendirme

Anestezi uygulamasının sona ermesinden iki saat sonra histopatolojik çalışma uygulanacak ratlara, eter anestezisi altında torakotomi uygulanarak sağ atrium kesisi yapıldıktan sonra, sol ventriküle enjekte edilen %4 paraformaldehid ile perfüze edilerek fiksasyon uygulandı. Kraniyotomi (Resim 2) ile çıkartılan beyin örneklerine (Resim 3) parafin takibi uygulandı.



Resim 2. Yenidoğan rata kraniyotomi uygulanması



Resim 3. Kraniyotomi ile çıkarılan rat beyni

Parafin Takibi aşağıdaki sıra ile gerçekleştirildi;

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

Etüvden çıkarılan dokular parafine gömülerek bloklandı. Her bloktan alınan 5 µm kalınlığında seri kesitler lizinli lamlara yerleştirildi. Kesitler immunohistokimyasal yöntemle boyandı, Kaspaz-3 immunreaktivitesinin gösterilmesi amacıyla rat spesifik anti-kaspaz-3 (1:200; Neomarkers, Fremont, Kanada) antikoru kullanıldı. Talamus paraventriküler

nükleus, hipokampus CA1 ve korteks düzeylerinde hücre sayımları yapılarak, kaspaz-3 pozitif apoptotik hücre sayıları tespit edildi.

İstatistiksel Değerlendirme

İstatistik analiz *SPSS for Windows* istatistik programının 11.0 versiyonu kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma biçiminde verildi. İstatistiksel analizde Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel olarak, $p < 0.05$ düzeyi anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya kontrol gruplarında altışar, izofluran gruplarında yedişer rat olmak üzere dört grupta toplam 26 yavru rat alındı. Deneklerin tümü çalışma protokolünü tamamladı. İzofluran gruplarından birer rat kan gazı analizi amacıyla kullanıldı. Histopatolojik değerlendirmeler her gruptan beşer denek randomize olarak seçilerek, toplam 20 denek üzerinde yapıldı.

Arteriyel Kan Gazı Sonuçları

Grup Gc-İ ve Grup Gn-İ gruplarındaki iki rattan alınan arteriyel kan gazı analizlerinde, pH, PCO₂, PO₂ değerlerinde metabolik ve solunumsal bozukluk görülmedi; kan glukoz değerleri normal sınırlarda bulundu (Tablo 1).

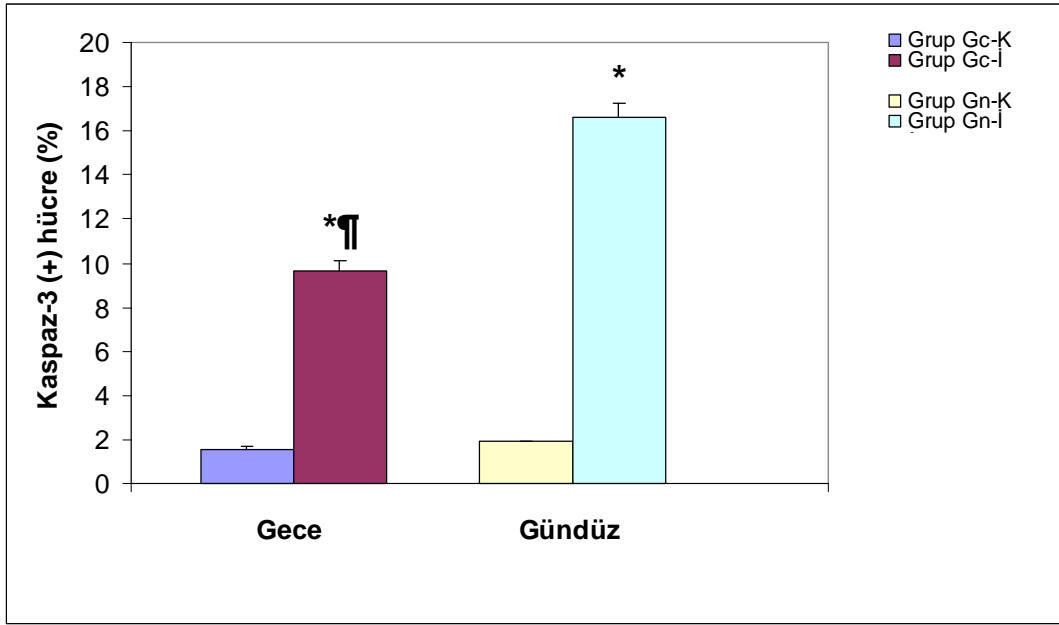
Tablo 1. Gc-İ ve Gn-İ gruplarının kan gazı analizi sonuçları

	pH	pO₂(mmHg)	pCO₂ (mmHg)	Glukoz(mg/dL)
Grup Gc-İ (n:1)	7.42	138.6	25.7	148
Grup Gn-İ (n:1)	7.34	125.7	28.9	124

Histopatolojik Bulgular

Talamus Paraventriküler Nükleus

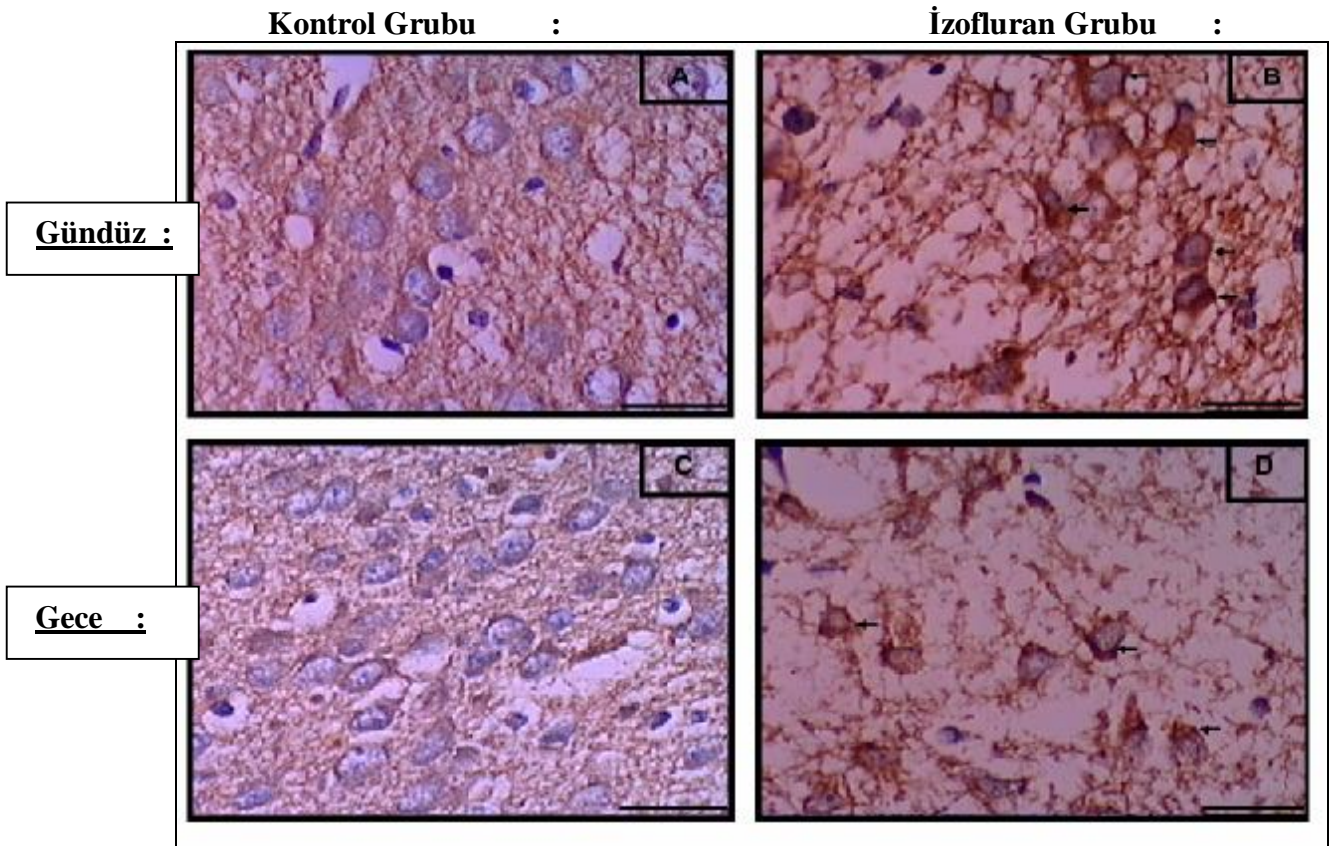
Talamus paraventriküler nükleus düzeyinden alınan kesitlerden elde edilen apoptotik hücre ortalama değerleri Grup Gc-K ile Grup Gn-K, Grup Gc-İ ve Grup Gn-İ karşılaştırıldığında; Grup Gc-İ ve Grup Gn-İ apoptotik hücre ortalama değerleri anlamlı yüksek bulunurken (sırayla p= 0.008, p=0.008) Grup Gn-K apoptotik hücre ortalama değerleri arasında fark saptanmadı (p= 0.151). Grup Gn-K ile Grup Gn-İ ve Grup Gc-İ karşılaştırıldığında; Grup Gn-İ ve Grup Gc-İ apoptotik hücre ortalama değerleri anlamlı yüksek bulundu (sırayla p= 0.008, p=0.008). Grup Gn-İ ve Grup Gc-İ karşılaştırıldığında; Grup Gn-İ apoptotik hücre ortalama değerleri anlamlı yüksek bulundu (p= 0.008) (Grafik 1 , Resim 4).



Grafik 1. Talamus paraventricüler nükleus gruplarının karşılaştırılması

* ; $p < 0.05$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

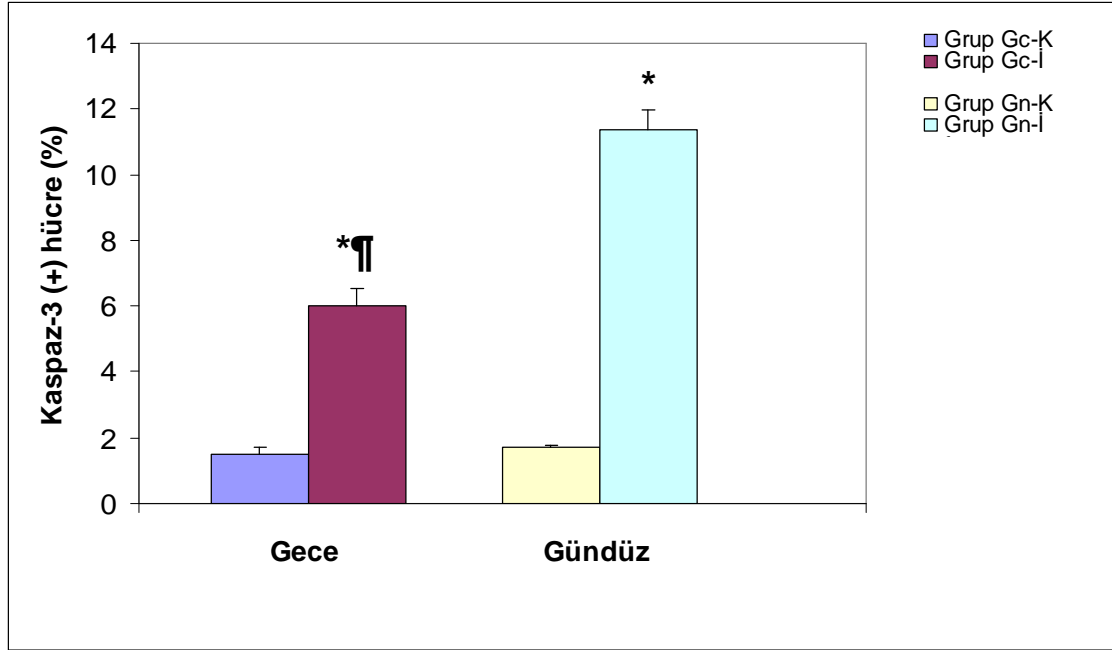
¶ ; $p < 0.05$ Grup Gn-İ ile karşılaştırıldığında



Resim 4. Talamus paraventricüler nükleus düzeyinden alınan kesitlerde Kaspaz-3 ile boyalı x40 büyütmedeki resimler. A: Grup Gn-K B: Grup Gn-İ C: Grup Gc-K D: Grup Gc-İ. İşaretli (←) hücreler sitoplazması kaspaz-3 ile kahverengi boyanmış apoptotik nöronları göstermektedir.

Korteks

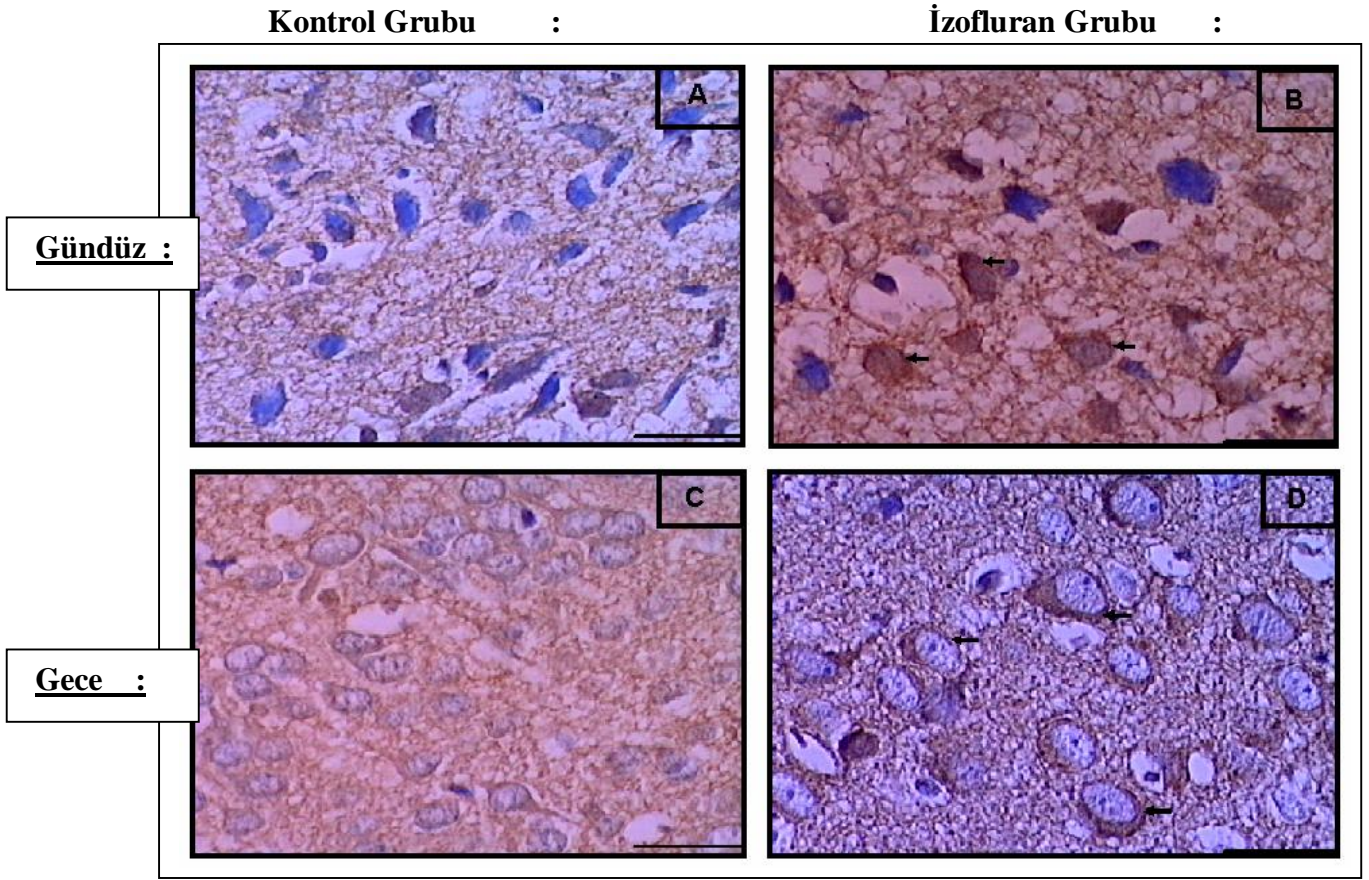
Korteks düzeyinden alınan kesitlerden elde edilen apoptotik hücre ortalama değerleri Grup Gc-K ile Grup Gn-K, Grup Gc-İ, Grup Gn-İ karşılaştırıldığında; Grup Gc-İ ve Grup Gn-İ apoptotik hücre ortalama değerleri anlamlı yüksek bulunurken (sırayla $p= 0.008$, $p=0.008$) Grup Gn-K apoptotik hücre ortalama değerleri arasında fark saptanmadı ($p= 0.222$). Grup Gn-K ile Grup Gn-İ ve Grup Gc-İ karşılaştırıldığında; Grup Gn-İ ve Grup Gc-İ apoptotik hücre ortalama değerleri anlamlı yüksek bulundu (sırayla $p= 0.008$, $p=0.008$). Grup Gn-İ ve Grup Gc-İ karşılaştırıldığında; Gn-İ apoptotik hücre ortalama değerleri anlamlı yüksek bulundu ($p= 0.008$) (Grafik 2 , Resim 5).



Grafik 2. Korteks gruplarının karşılaştırılması

* ; $p < 0.05$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

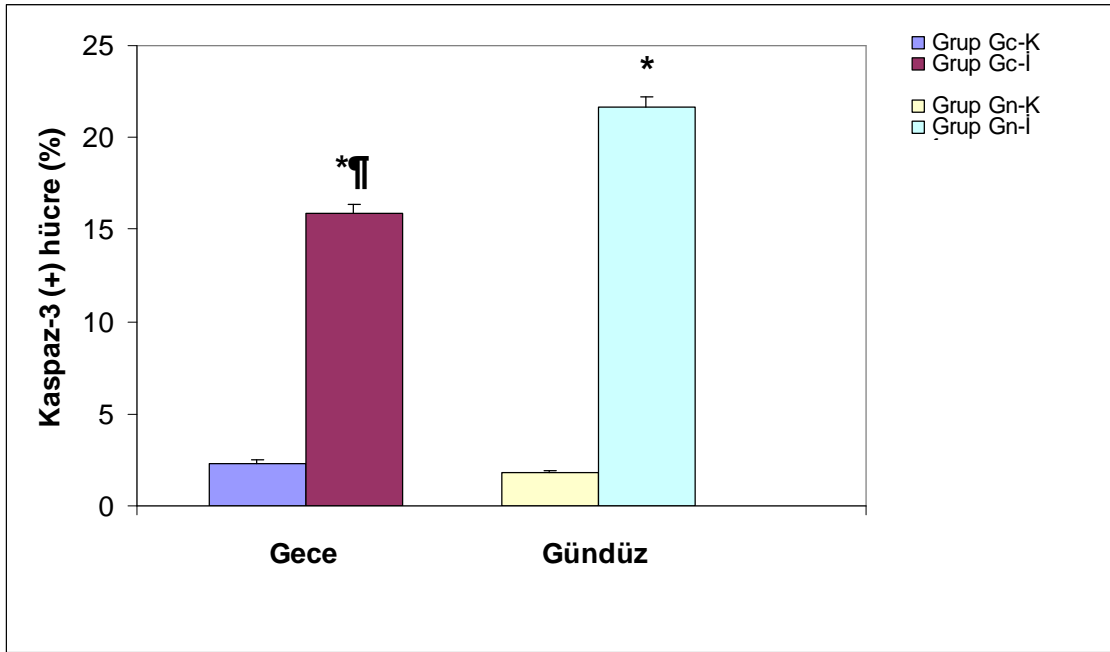
¶ ; $p < 0.05$ Grup Gn-İ ile karşılaştırıldığında



Resim 5. Korteks düzeyinden alınan kesitlerde Kaspaz-3 ile boyalı x40 büyütmedeki resimler. A: Grup Gn-K B: Grup Gn-İ C: Grup Gc-K D: Grup Gc-İ. İşaretli (←) hücreler sitoplazması kaspaz-3 ile kahverengi boyanmış apoptotik nöronları göstermektedir.

Hipokampus CA1

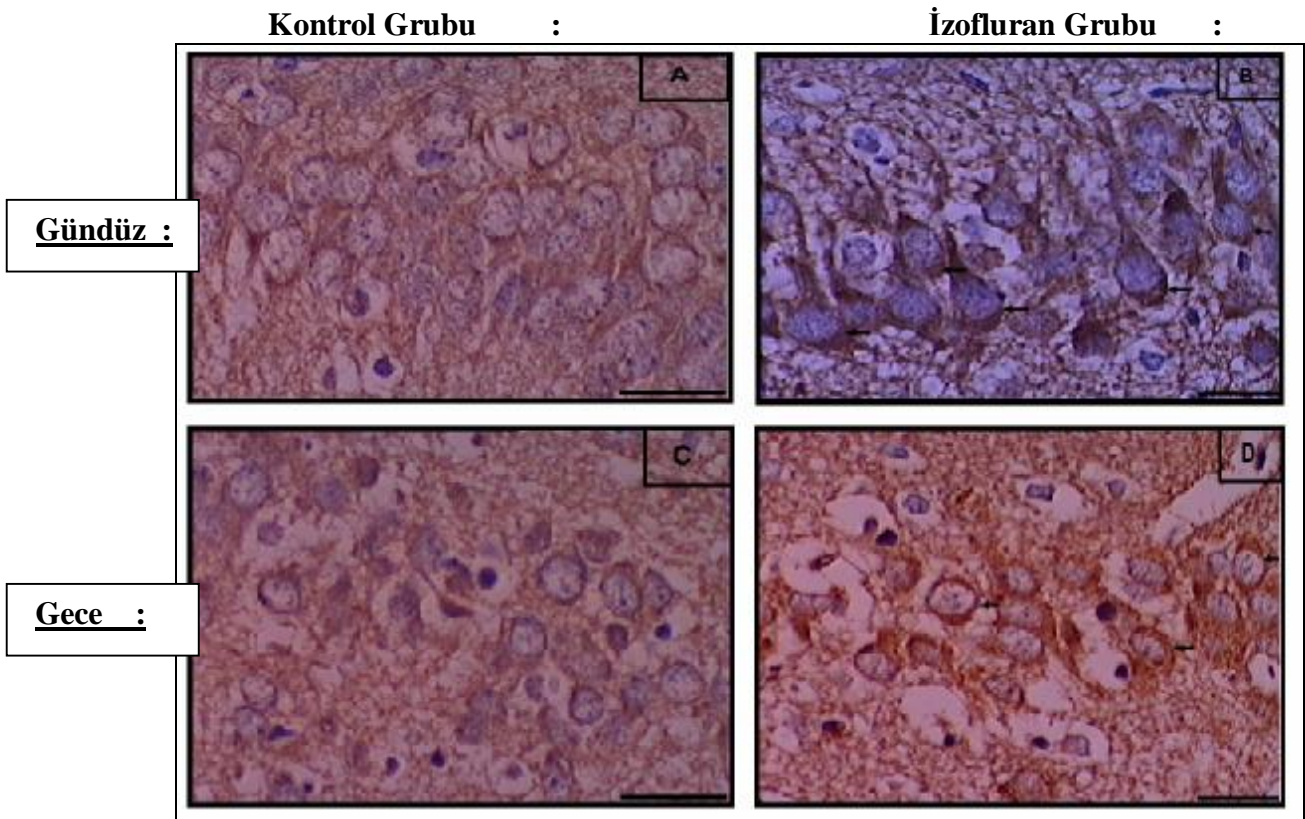
Hipokampus CA1 düzeyinden alınan kesitlerden elde edilen apoptotik hücre ortalama değerleri Grup Gc-K ile Grup Gn-K, Grup Gc-İ, Grup Gn-İ karşılaştırıldığında; Grup Gc-İ ve Grup Gn-İ apoptotik hücre ortalama değerleri anlamlı yüksek bulunurken (sırayla $p=0.008$, $p=0.008$) Grup Gn-K apoptotik hücre ortalama değerleri arasında fark saptanmadı ($p=0.116$) Grup Gn-K ile Grup Gn-İ ve Grup Gc-İ karşılaştırıldığında; Grup Gn-İ ve Grup Gc-İ apoptotik hücre ortalama değerleri anlamlı yüksek bulundu (sırayla $p=0.008$, $p=0.008$). Grup Gn-İ ve Grup Gc-İ karşılaştırıldığında; Gn-İ apoptotik hücre ortalama değerleri anlamlı yüksek bulundu ($p=0.008$) (Grafik 3 , Resim 6).



Grafik 3. Hipokampus CA1 gruplarının karşılaştırılması

* ; $p < 0.05$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

¶ ; $p < 0.05$ Grup Gn-İ ile karşılaştırıldığında



Resim 6. Hipokampus CA1 düzeyinden alınan kesitlerde Kaspaz-3 ile boyalı x40 büyütmedeki resimler. A: Grup Gn-K B: Grup Gn-İ C: Grup Gc-K D: Grup Gc-İ. İşaretli (←) hücreler sitoplazması kaspaz-3 ile kahverengi boyanmış apoptotik nöronları göstermektedir.

TARTIŞMA

Literatürde anestezi ajanlarının etkilerindeki zamansal değişiklikleri inceleyen çalışmalar bulunmaktadır. Yenidoğan deneysel modellerinde bir inhalasyon anestezisi olan izofluranın nörotoksik etkisi gösterilmiştir.^{1,6} İzofluranın nörotoksik etkisindeki sirkadiyen ritim ile ilişkili değişiklikler ilk kez çalışmamızda ele alınmıştır. Çalışmamızda yedi günlük yenidoğan ratlara altı saat süresince %1.5 konsantrasyonda uygulanan izofluranın hem gece hem de gündüz uygulanmasının, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında belirgin olarak daha fazla nöroapoptotik yanıtı neden olduğunu ve bu nörotoksik etkinin sirkadiyen ritimle değiştiğini, gece izofluran uygulamasının gündüz izofluran uygulamasına göre gelişmekte olan rat beyinde daha az nörotoksik etkisinin olduğunu saptadık.

Ratlarla yapılan birçok çalışmada inhalasyon anestezikleri kullanıldığından, bu ajanların yaşamın erken dönemindeki MAK değerlerinin belirlenmesi gerekmektedir. Gilles ve ark.⁴⁴ 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,⁴⁴ 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.⁴⁴ Çalışmamızda kullanılan % 1.5 konsantrasyonda izofluran bu yaş grubu için yaklaşık 0.64 MAK'a karşılık gelmektedir.

Anesteziyle indüklenen nöroapoptoz çalışmalarında¹⁻⁵ denek olarak sıklıkla ratlar kullanıldığından çalışmamızda, gelişmekte olan memeli beyinde anesteziyle indüklenen nörotoksiteyi çalışmak üzere Wistar türü ratları kullandık.

Bazı araştırmacılar bu nöroapoptotik sürecin sadece ratlarda saptandığını ve türe spesifik olarak gösterilebildiğini öne sürmüşlerdir.^{45,46} İnfant farelere, tavşanlara, domuzlara⁴⁵ veya terme yakın koyunlara⁴⁶ 4 veya 6 saat izofluran uygulamasının nöroapoptozu tetiklemediği bildirilmiş, histopatolojik çalışmalar ilaç uygulamasından sonraki 48. saatte⁴⁵ ve altıncı günde⁴⁶ yapılmıştır. Bu çalışmalarda kullanılan türlerde nöroapoptozun saptanamamasının en uygun açıklaması çalışmacıların anestezi ajan uygulamasının sonlanması sonrası, uygun bir dönem içinde histopatolojik değerlendirme yapmamaları olabilir. Nöroapoptotik yanıtı göstermek için en geç zaman aralığının 24. saat

olduğu, bu geç evrede ancak yüksek doz ilaç uygulamasıyla indüklenen sıra dışı aşırı yanıt tespit edilebileceği ve ilaç uygulamasından sonraki birkaç saat içinde hızla ölen en duyarlı hücreler ilk 6-12 saat içinde fagosite edilirken, daha dirençli nöronların çoğunun 18.-24. saatlerde fagosite edilmesi nedeniyle, akut olarak etkilenen nöronların 48. saatte veya 6. günde belirlenmesinin mümkün olamayacağı bildirilmiştir.⁴⁷

Akut nörodejeneratif sürecin tespiti aynı zamanda kullanılan histolojik yöntemle bağlıdır. Gümüş boyamanın ciddi nörodejeneratif reaksiyonu belirlemek için uygun bir yöntem olduğu bildirilmiştir.⁴⁷ Aktive kaspaz-3 tüm hücre gövdesinde ve dentritik ağaçta olduğundan, aktive kaspaz-3 immünohistokimyasal boyama, gümüş boyamadan önce, duyarlı nöronlarda erken dejeneratif süreci göstermede ideal bir yöntemdir.⁴⁷ Hücre gövdesi ve tüm bileşenleri bu boya sayesinde detaylı olarak gösterilebilir. Ancak hücre ayrıştıkça immün reaktivitesini kaybeder ve bu boyaya karşı görünmez olur. Bu nedenle hem histolojik işlem hem de uygulama sonrası zaman aralığı nöroapoptotik yanıtın kesin ve doğru değerlendirilmesinde kritik öneme sahiptir.⁴⁷ Çalışmamızda erken dönem nöroapoptotik yanıtı değerlendirmek üzere aktive kaspaz-3 immünohistokimyasal boyama yöntemini seçtik.

Çalışmalarda birçok anestezinin infant rat beyinde nöroapoptozu tetiklediği gösterilmiştir.^{1,5} Anand⁴⁸ ratların anestezile indüklenen nöroapoptozu, insanlardan ve diğer türlerden daha duyarlı olduğu belirtmiştir. Ratlarda nöroapoptozu değerlendirmek için çok hassas yöntemlerin kullanıldığından ve aynı yöntemler etik nedenlerden dolayı insanlarda kullanılmadığından, Anand'ın⁴⁸ bu değerlendirmelerinin doğru bir yorumlama olarak kabul edilemeyeceği bildirilmiştir.⁴⁷

Ikonudou ve ark.² tekrarlayan dozlarda (90 dk aralıklarla 9 saat süresince 20 mg/kg SC) ketamin uygulamasının infant rat beyinde apoptozu tetiklediğini ancak tek bir dozun (25, 50 ve 75 mg/kg) infant rat beyinde nöroapoptozu tetiklemediğini bildirmişlerdir.⁵ Takip eden diğer çalışmalar bu bulguları doğrulamış,⁴⁹ Soriano ve ark.^{50,51} insan anestezisinde sıklıkla infant ratlarda toksik olduğu gösterilen dozun altında tek doz olarak kullanıldığından, ketaminin pediatrik anestezisi için güvenli olabileceğini belirtmişlerdir. Anand⁴⁸ da anestezik ilaçların hayvan beyinde apoptozu tetiklemesi için “çok yüksek dozlara ve uzun süreli maruziyete” gereksinim olduğunu bildirmiştir. Young ve ark.⁵² ise subanestezik (bir insan infantına anestezisi uygulamak için gerekli ketamin dozu 5 mg/kg iken bir fare için 80 mg/kg'dır.⁵³) tek doz ketaminin (20 mg/kg) infant fare beyinde belirgin

nöroapoptotik yanıtı tetiklediğini bildirmişlerdir. Midazolamın⁵² veya propofolün⁵⁴ subanestezik uygulamalarının da infant rat beyinde nöroapoptozu tetiklediği bildirilmiştir. Benzer bulgular izofluran için de bildirilmiştir.^{1,6} Johnson ve ark.⁶ infant farelere 1 saat % 2, 2 saat % 1.5 ve 4 saat % 0.75 izofluran uygulamış ve tüm bu 1 MAK altı (infant fare için izofluranın MAK'ı : % 2.26⁵⁵) izofluran uygulamalarının belirgin nöroapoptozu indüklediğini göstermişlerdir. Ma ve ark.⁵⁶ ve Jevtovic-Todorovic ve ark.¹ % 0.75 izofluranın (0.33 MAK) infant rat beyinde nöroapoptozu tetiklediğini göstermişlerdir. Bu çalışmaların ışığında “çok yüksek dozlara ve uzun süreli maruziyete” gereksinim olduğunu görüşünün savunulamayacağı açık olarak görülmektedir. Çalışmamızda anesteziyle indüklenen nöroapoptozu tetiklemek için yedi günlük ratlara % 1.5 konsantrasyonda (0.64 MAK) izofluran uyguladık.

Çalışmamızda anestezi uyguladığımız yenidoğan ratlarda hipoksi/iskemi veya hipoglisemi de anestezik ilaç uygulamasıyla ilişkili nörodejeneratif reaksiyondan sorumlu olabilir; ancak çalışmamızda izofluran uyguladığımız gruplardan randomize olarak seçilen birer rattan alınan arteriyel kan gazı analizi sonuçlarında herhangi bir metabolik ve solunumsal anormallik saptamadık ve kan glukoz düzeylerini normal sınırlar tespit ettik. Anestezi altındaki yenidoğan ratların hemodinamik ve solunumsal monitörizasyonları küçük boyutlarından dolayı teknik olarak uygulanabilir olmadığından³⁵ ve elimizdeki cihazlar hemodinamiyi etkilemeyecek düzeyde alınan küçük kan volümlerinde (100 µL) ölçüme uygun olmadığından, çalışmamızda tüm deneklere hemodinamik monitörizasyon ve arteriyel kan gazı analizi yapamadık. Literatürdeki mevcut bulgular da anestezi uygulanan yenidoğan ratlarda hipoksi/iskeminin^{50,51} veya hipogliseminin⁵⁶ anestezik ilaç uygulamasıyla ilişkili nörodejeneratif reaksiyondan sorumlu olabileceği görüşüyle ters düşmektedir. Hipoksi/iskemiye yanıt olarak akut hücre ölümünün, anesteziyle indüklenen nöroapoptozdaki yapısal analizden belirgin olarak farklı olduğu birçok kez gösterilmiştir.⁵⁶⁻⁵⁷ Nöroapoptoz oluşturan dozda ketamin⁵² veya izofluran, N₂O ve midazolam kombinasyonu³¹ uygulanan infant ratların kan gazı değerleri normal sınırlarda bulunmuştur. Infant 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.⁵⁵ hipoksi/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^{6,56} ve infant ratlara üçlü anestezi kokteyl (izofluran, midazolam ve N₂O) şeklinde uygulanmış¹, çalışmalarda nöroapoptoz tetiklenirken hipoglisemi tespit edilmemiştir.

Ratlarda ketaminin farmakolojik yanıtını ve toksisitesini araştıran bir çalışmada⁹, etki süresi ve toksisitesi aydınlık fazda daha yüksek bulunmuş ve bu etki karaciğer metabolizmasındaki diüurnal değişikliklere bağlanmıştır. İnhalasyon anesteziğinin, özellikle de izofluranın çok düşük oranda (%0.2) metabolize olması nedeniyle²⁰ aynı görüşün çalışmamızdaki sonuçlara uyarlanmasının mümkün olmadığını düşünmekteyiz.

İnhalasyon anesteziğinden sadece halotanın MAK'ındaki sirkadiyen değişim araştırılmış ve ratlarda halotanın MAK'ı saat 12:00 de %1.26 iken, saat 20:00 de %1.45'e çıkmıştır.¹² 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 altı 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 yenidoğan ratlarda izofluranın neden olduğu nörotoksisiteyi tespit etmek üzere paraventricüler talamik nükleus, hipokampus CA1 ve korteks kesitlerinde nöroapoptoz değerlendirildi. Anesteziyle indüklenen gelişimsel nöroapoptozun tüm beyin bölgelerini¹⁻⁶ hatta medulla spinalisi etkilediği gösterilmiştir.⁵⁸ Genel anesteziğinin özellikle öğrenme ve bellek fonksiyonlarında yer alan hipokampus CA1 bölgesinde ve kortikal alanlarda olumsuz etkilerinin bildirildiği çalışmada¹ uygulanan izofluran, midazolam ve N₂O kombinasyonunun nöroapoptotik yanıtta, paraventricüler talamik nükleusta 34 kat, hipokampus CA1 bölgesinde 21 kat ve kortikal düzeylerde 18-35 kat artışa neden olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızda gece uygulanan izofluranın, gündüz uygulamasına göre daha az nöroapoptotik yanıtı neden olduğunu saptadık. Önceki çalışmalara dayanarak bu sonucun açıklanmasında iki hipotez öne sürülebilir. İlki anestezi gereksinimindeki zamansal değişiklikler,¹² ikincisi ise sadece karanlıkta salınan bir hormon olan melatoninin, anesteziyle indüklenen gelişimsel nöroapoptoz üzerindeki azaltıcı etkisidir.³⁵

Literatürde anestezi ajanlarının gelişmekte olan memeli beyininde oluşturduğu nörotoksik etkiyle ilişkili çok sayıda yaygın olmasına karşın¹⁻⁶ bu nörotoksik etkideki zamansal değişikliklerle ilişkili yaygın bulunamamıştır. Çalışmamızda nöroapoptotik yanıtı tetiklemek üzere uyguladığımız anestezi ajanı olan izofluran ile ilgili kronofarmakolojik çalışma literatürde yoktur. İnhalasyon ajanlarından sadece halotanla yapılan bir çalışmada gece anestezi ajan gereksinimi gündüze göre %19 daha fazla bulunmuştur.¹² İzofluran gereksiniminde de gece saatlerinde benzer şekilde artış olduğunu ve bu nedenle gece ve gündüz gruplarına eşit konsantrasyonda uyguladığımız izofluranın, gece grubu için daha düşük MAK'a karşılık geldiğini varsayarsak, doz bağımlı bir süreç olan anestezi nörotoksitesindeki gece ortaya çıkan azalmanın kısmen açıklanabileceğini düşünmekteyiz.

Yenidoğan ratlara melatonin (1-20 mg/kg, s.c.) verildiği bir çalışmada melatoninin anesteziyle ilişkili apoptotik yanıtta doz bağımlı azalmaya neden olduğu gösterilmiştir.³⁵ Melatoninin bu etkisindeki kesin mekanizma belirsiz olsa da iç mitokondrial membran stabilizasyonundan başlayarak apoptotik kaskadın belirli anahtar evrelerini etkilediği öne sürülmüştür.³⁵ Çalışmamızda ortaya çıkan gece daha az etkilenmenin nedeninin melatonin düzeylerindeki artış ile ilişkilendirilebileceğini düşünebiliriz..

SONUC ve ÖNERİLER:

Yenidoğan ratlarda yaptığımız bu çalışma ile %1.5 konsantrasyonda uygulanan izofluranın gece veya gündüz uygulamasının nörotoksik etkisi olduğu, gece izofluran uygulamasının gündüz uygulamasına göre daha düşük oranda nöroapoptotik yanıtı neden olduğunu saptadık.

Genel anesteziğin etkilerindeki ve yan etkilerindeki sirkadiyen değişiklikler, bu ajanların istenmeyen etkilerini azaltmak üzere anestezi pratiğine uyarlanabilir. Bununla birlikte genel anestezi ajanları ile ilgili kronofarmakolojik çalışmaları anestezi pratiğine uyarlamadan önce daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y et al. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci* 2003; 23: 876–882.
2. Ikonomidou C, Bittgau P, Koch C et al. Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochem Pharmacol* 2001; 62:401–405.
3. Uemura E, Levin ED, Bowman RE. Effects of halothane on synaptogenesis and learning behavior in rats. *Exp Neurol* 1985;89: 520–529. Abstract
4. Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M et al. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 1999; 283: 70–74.
5. Hayashi H, Dikkes P, Soriano SG. Repeated administration of ketamine may lead to neuronal degeneration in the developing rat brain. *Paediatr Anaesth* 2002; 12: 770–774.
6. Johnson SA, Young C, Olney JW. Isoflurane-induced Neuroapoptosis in the Developing Brain of Nonhypoglycemic Mice. *J Neurosurg Anesthesiol.* 2008 Jan; 20(1):21–8.
7. Scheving LE, Vedral D, Pauly JA: Circadian susceptibility rhythm in rats to pentobarbital sodium. *Anat Rec* 1968; 160:741–50 Abstract
8. Sato Y, Kobayashi E, Hakamata Y, et al. Chronopharmacological studies of ketamine in normal and NMDA epsilon1 receptor knockout mice. *Br J Anaesth* 2004; 92:783–792.
9. Rebuelto M, Ambros L, Montoya L, et al. Treatment-time-dependent difference of ketamine pharmacological response and toxicity in rats. *Chronobiol Int* 2002; 19:937–945.

10. Rebuerto M, Ambros L, Waxman S, et al. Chronobiological study of the pharmacological response of rats to combination ketamine-midazolam. *Chronobiol Int* 2004; 21:591–600.
11. Challet E, Gormelen S, Pevet P, et al. Reciprocal relationships between general (propofol) anesthesia and circadian time in rats. *Neuropsychopharmacology* 2007; 32:728–735.
12. Munson ES, Martucci RW, Smith RE. Circadian variations in anesthetic requirement and toxicity in rats. *Anesthesiology* 1970; 32:507–514.
13. Chassard D, Bruguerolle B. Chronobiology and anesthesia. *Anesthesiology* 2004 Feb;100:413-27.
14. 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.
15. Nishikawa K, MacIver M. Agent-selective effects of volatile anesthetics on GABA_A receptor-mediated synaptic inhibition in hippocampal interneurons. *Anesthesiology*, 2001; 94:340-7.
16. Banks M, Pearce R. Dual actions of volatile anesthetics on GABA_A IPSCs: Dissociation of blocking and prolonging effects. *Anesthesiology*, 1999; 90:120-34.
17. Nishikawa K, MacIver M.B. Membrane and synaptic actions of halothane on rat hippocampal pyramidal neurons and inhibitory interneurons. *J Neurosci*, 2000; 20:5915-23.
18. Antkowiak B, Helfrich-Forster C. Effect of small concentration of volatile anesthetics on action potential firing of neocortical neurons in vitro. *Anesthesiology*, 1998; 88:1592-60
19. Refinetti R. *Circadian Physiology* Second Edition CRC Press 2006; p:339

20. Zeynep Kayhan. Klinik Anestezi. Genişletilmiş üçüncü baskı, İstanbul, Logos Yayıncılık Tic. A.Ş, 2004:90-92
21. David E.Longnecker. Anesthesiology. The McGraw-Hill Companies Inc. 2008 p:741
22. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972 Aug;26:239-57
23. Cinel İ, Oral U. SIRS, Sepsis, MODS patofizyolojisinde apopitoz. Türk Anest Rean Cem Mecmuası, 2001; 29:52-8.
24. Van De Berg WDJ, Schmitz C, Steinbusch HWM, Blanco CE. Perinatal asphyxia induced neuronal loss by apoptosis in the neonatal rat striatum: A combined TUNEL and stereological study. Experimental Neurology, 2002;174:29-36.
25. Conti A, Raghupathi R, Trojanowski J, Mcintosh T. Experimental brain injury induces regionally distinct apoptosis during the acute and delayed post-traumatic period. J Neurosci, 1998; 18:5667-72
26. Bibel M, Barde YA Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. Genes Dev 2000;14:2919–2937
27. Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. Cur Opin Neurobiol 2000; 10:381–389
28. Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ et al Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. Science 1997; 275:661–665
29. Thoenen H. Neurotrophins and neuronal plasticity. Science 1995; 270:593–598
30. Bittigau P, Sifringer M, Genz K, Reith E et al Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Proc Nat Acad Sci 2002; 99:15089–15094

31. 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.
32. 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
33. NaguibM, Gottumukkala V, Goldstein PA Melatonin and anesthesia: a clinical perspective *J. Pineal Res.* 2007; 42:12–21
34. Refinetti R. *Circadian Physiology*, Second Edition, CRC Press 2006; p:130
35. Yon JH, Carter LB, Reiter RJ, Jevtovic-Todorovic V. Melatonin reduces the severity of anesthesia-induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *Apoptosis* 2006; 11:1603–1615
36. 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
37. Altmayer P, Groterath E, Lucker PW, Mayer D, von Mayersbach H, Rindt W, Watzelsberger K: Circadian fluctuations of pharmacokinetic parameters after oral administration of hexobarbital [author's translation]. *Arzneimittelforschung* 1979; 29:1422–8 Abstract
38. Jaliffa C O, Saenz D, Resnik E, Sarmiento ,MK, Rosenstein RE Circadian activity of the GABAergic system in the golden hamster retina. *Brain Research* 2001; 195–202
39. Ross FH, Sermons AL, Owasoyo JO, Walker CA: Circadian variation of diazepam acute toxicity in mice. *Experientia* 1981; 37:72–3 Abstract

40. 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
41. Koopmans R, Dingemans J, Danhof M, Horsten GP, van Boxtel CJ: The influence of dosage time of midazolam on its pharmacokinetics and effects in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1991; 50:16–24 Abstract
42. Brennan MJW, Volicser 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
43. 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
44. Gilles O, Benoit V, Olivier L, Belaid B. Minimal alveolar concentration of volatile anesthetics in rats during postnatal maturation. *Anesthesiology*, 2001; 95:734-9.
45. Loepke A, McCann JC, Miles L. General anesthesia does not cause widespread neuronal cell death in the neonatal brain—a study in three mammalian species. *American Society of Anesthesiology Annual Meeting 2004 Abstract*
46. McClaine RJ, Uemura K, de la Fuente SG. General anesthesia improves fetal cerebral oxygenation without evidence of subsequent neuronal injury. *J Cerebral Blood Flow Metab* 2005;25: 1060–9
47. Jevtovic-Todorovic V, Olney JW. PRO: Anesthesia-induced developmental neuroapoptosis: status of the evidence. *Anesth Analg*. 2008 Jun;106:1659-63.
48. Anand KJS. Anesthetic neurotoxicity in newborns. Should we change clinical practice? *Anesthesiology* 2007;107:2–4

49. Scallet AC, Schmued LC, SlikkerWJr, Grunberg N, Faustino PJ, Davis H, Lester D, Pine PS, Sistare F, Hanig JP. Developmental neurotoxicity of ketamine: morphometric confirmation, exposureparameters, and multiple fluorescent labeling of apoptotic neurons. *Toxicol Sci* 2004;81:364–70
50. Anand KJS, Soriano SG. Anesthetic agents and the immature brain: are these toxic or therapeutic? *Anesthesiology* 2004;101:527–30
51. 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
52. Young C, Jevtovic-Todorovic V, Qin YQ, Tenkova T, Wang H, Labruyere J, Olney JW. 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
53. Green CJ, Knight J, Precious S, Simpkin S. Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10 years of experience. *Lab Anim* 1981;15:163–70
54. Cattano D, Young C, Olney JW. Sub-anesthetic doses of propofol induce neuroapoptosis in the infant mouse brain. *Anesth Analg* 2008;106:1712-4
55. Loepke AW, McCann JC, Kurth CD, McAuliffe JJ. The physiologic effects of isoflurane anesthesia in neonatal mice. *Anesth Analg* 2006;102:75–80
56. Ma D, Williamson P, Januszewski A, Nogaro MC, Hossain M, Ong LP, Shu Y, Franks NP, Maze M. Xenon mitigates isoflurane induced neuronal apoptosis in the developing rodent brain. *Anesthesiology* 2007;106:746–53
57. Dikranian K, Ishimaru MJ, Tenkova T, Labruyere J, Qin YQ, Ikonomidou C, Olney JW. Apoptosis in the *in vivo* mammalian forebrain. *Neurobiol Dis* 2001;8:359–79

58. Sanders RD, Xu J, Shu Y, Fidalgo A, Ma D, Maze M. General anesthetics induce apoptotic neurodegeneration in the neonatal rat spinal cord. *Anesth Analg.* 2008 Jun;106:1708-11.

EKLER:

EK-1. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırmaları
Etik Kurulu Onayı



Sayı : 24
Tarih : 25/02/2008
Toplantı No : 03/05/2008
Toplantı Tarihi : 22/02/2008

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

19/2008 Protokol No'lu; Anesteziyoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlilerinden Dr.Alper DOĞAN'ın sorumlusu olduğu, "Sirkadiyen ritmin izofluran uygulanan yenidoğan ratlarda nötrotoksisite üzerine etkisinin araştırılması" isimli projede; kontrol grubu için, gece kontrol grubu olarak bir grup daha ilave edilmesinden sonra projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Prof. Dr. Mustafa OLGUNER
Deney Hayvanı Araştırmaları
Etik Kurulu Başkanı