

**T. C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON ANABİLİM DALI**

**TAVŞANLARDA AKUT ALT EKSTREMİTE İSKEMİ-REPERFÜZYON
HASARI SONUCU OLUŞAN SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ VE
DNA HASARI ÜZERİNE SEVOFLURAN VE PROPOFOLÜN
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. SEMA ÖNCÜL**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. LALE KARABIYIK**

**ANKARA
NİSAN 2009**

**T. C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON ANABİLİM DALI**

**TAVŞANLARDA AKUT ALT EKSTREMİTE İSKEMİ-REPERFÜZYON
HASARI SONUCU OLUŞAN SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ VE
DNA HASARI ÜZERİNE SEVOFLURAN VE PROPOFOLÜN
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. SEMA ÖNCÜL**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. LALE KARABIYIK**

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2007-84
proje numarası ile desteklenmiştir.

**ANKARA
NİSAN 2009**

TEZ TUTANAĞI

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anestezi ve Reanimasyon Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Dr. Sema ÖNCÜL “**Tavşanlarda Akut Alt Ekstremité İskemi-Reperfüzyon Hasarı Sonucu Oluşan Serbest Oksijen Radikalleri ve DNA Hasarı Üzerine Sevofluran ve Propofolün Etkilerinin Karşılaştırılması**” konulu uzmanlık tezi anabilim dalımızda incelendiğinde 2 sayfa giriş, 35 sayfa genel bilgiler, 12 sayfa gereç ve yöntem, 13 sayfa bulgular, 17 sayfa tartışma ve sonuç, 2 sayfa özet saptanmıştır.

Adı geçen doktor tarafından / / tarihinde teslim edilen tezi, tez danışmanı Doç. Dr. Lale KARABIYIK ve sınav jüri üyeleri tarafından incelenerek oy birliği ile “**uzmanlık tezi olarak kabul edilmesine**” karar verilmiştir.

Prof. Dr. Kadir KAYA
Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.
A.D. Başkanı

Prof. Dr. Hülya ÇELEBİ
Anesteziyoloji ve Reanimasyon

Prof. Dr. Berrin GÜNEYDİN
Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.

Doç. Dr. Lale KARABIYIK
Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.

Doç. Dr. Alparslan Şenköylü
Ortopedi ve Travmatoloji A.D.

KISALTMALAR

ATP: Adenozin 5 trifosfat

BİS: Bispektral indeks

DAB: Diyastolik arter basıncı

DKA: Düşük kaynama dereceli agaroz

DNA: Deoksiribonükleik asit

EEG: Elektroensefalogram

EKG: Elektrokardiyogram

GPX: Glutasyon peroksidaz

İR: İskemi reperfüzyon

iv: İntravenöz

KAH: Kalp atım hızı

MDA: Malondialdehit

O₂: Oksijen

OAB: Ortalama arter basıncı

SAB: Sistolik arter basıncı

SOD: Süperoksit dismutaz

SOR: Serbest oksijen radikalleri

SPO₂: Periferik oksijen satürasyonu

THJE: Tek hücre jel elektroforez

YKA: Yüksek kaynama dereceli agaroz

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

Kabul ve onay.....	i
Kısaltmalar	ii
İçindekiler	iii
Tablolar	vi
Şekiller	vii
Resimler	vii
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Turnike	3
2.2. İskemi.....	4
2.3. Reperfüzyon	5
2.4. Serbest radikaller.....	7
2.4.1. Tanımı ve genel özellikleri	7
2.4.2. Serbest oksijen radikalleri	8
2.4.3. Serbest oksijen radikallerinin hücrel kaynakları.....	10
2.4.4. Oksijen radikallerinin zararlı etkileri	12
2.4.4.1. Proteinlere etkileri	14
2.4.4.2. Nükleik asitlere etkileri	15
2.4.4.3. Membran lipidleri üzerine etkileri.....	16
2.4.5. İn vivo serbest radikal reaksiyonlarının ölçümü	18
2.4.6. Antioksidan savunma sistemleri.....	19
2.4.6.1. Antioksidan etki mekanizmaları	20
2.4.6.2. Enzim yapısında antioksidanlar	20

2.5. Genel anestezi yöntemleri	23
2.5.1. Sevofluran.....	24
2.5.2. Propofol	26
2.6. Anestezi derinliğinin monitörizasyonu	31
2.7. Anestezi ve toksikolojide hayvan deneyleri.....	32
2.8. İnhalasyon anestezikleri ve genotoksisite	35
2.8.1. Genetik materyalin yapı ve özellikleri	35
2.8.2. Mutasyonlar	35
2.8.3. Genotoksisite	36
2.8.4. Anestezik gazların kromozomlara etkileri	36
2.8.5. Tek hücre jel elektroforez yöntemi	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	38
3.1. Denek seçimi.....	38
3.2.Kullanılan yöntemler	38
3.3. Tek hücre jel elektroforez uygulaması	45
3.3.1. Kimyasal maddeler.....	47
3.3.2. Alet ve malzemeler.....	47
3.3.3. Çözeltiler.....	48
3.4. İstatistiksel değerlendirme	49
4. BULGULAR.....	50
5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇ	79
7. KAYNAKLAR.....	80
8. ÖZET	95
9. SUMMARY	97
10. EKLER	99

10.1. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu	
Onayı.....	99
11. ÖZGEÇMİŞ	100

TABLÖLAR

	Sayfa No
Tablo 1. Oksijen türevi bileşikler	10
Tablo 2. Serbest O ₂ radikallerinin kaynakları.....	11
Tablo 3. Serbest radikallerin hedefleri	14
Tablo 4. İnsan ve tavşan fizyolojisi ve biyokimyasının karşılaştırılması....	34
Tablo 5. Deneklerin ağırlıkları	50
Tablo 6. KAH değerleri.....	51
Tablo 7. SAB değerleri	53
Tablo 8. DAB değerleri.....	54
Tablo 9. OAB değerleri	56
Tablo 10. MDA düzeyleri	57
Tablo 11. Tail moment değerleri	59
Tablo 12. Tail length değerleri	59
Tablo 13. Tail intensity değerleri	60
Tablo 14. MDA ve Tail moment korelasyonu	61
Tablo 15. MDA ve Tail length korelasyonu.....	61
Tablo 16. MDA ve Tail intensity korelasyonu.....	62

ŞEKİLLER

	Sayfa No
Şekil 1. İskemi-reperfüzyon mekanizması	7
Şekil 2. Reaktif oksijen ürünlerinin sentezi ve detoksifikasyonu	9
Şekil 3. Ksenobiyotiklerin metabolizması.....	13
Şekil 4. MDA düzeyleri.....	58
Şekil 5. DNA hasarı	62

RESİMLER

	Sayfa No
Resim 1. Oksidatif DNA hasarı görüntüleri.....	37
Resim 2. Tavşanın tartılması	39
Resim 3. Kulaktan intraarteriyel kateter yerleştirilmesi.....	39
Resim 4. Kulaktan intravenöz kanül yerleştirilmesi	40
Resim 5. Puls oksimetre probunun yerleştirilmesi	41
Resim 6. Monitör ve anestezi cihazının genel görünümü.....	41
Resim 7. Sevofluran inhalasyonu ile indüksiyon	42
Resim 8. Propofol infüzyonu ile indüksiyon.....	42
Resim 9. Turnike uygulanması.....	42
Resim 10. BİS probunun yerleştirilmesi.....	44
Resim 11. BİS monitörizasyonu.....	44
Resim 12. Lenfositlerin mikroskopik görünümü.....	46

1. GİRİŞ

Ekstremitte cerrahisinde distal kan akımının engellenmesi, cerrahi kanamanın azaltılması ve sahanın daha iyi görülebilmesi amacıyla sıklıkla turnike uygulanır. Ancak turnikenin cerrahi işlem sonunda açılması “*iskemi-reperfüzyon hasarı*” meydana getirir¹.

Bir organa gelen kan akımının çeşitli nedenlerle yetersiz kalmasına ya da durmasına “*iskemi*” denir. İskemi sonucunda oksijenize olamayan dokuda “*hipoksik doku hasarı*” görülür. İskeminin süresine bağlı olarak hücrelerin bütünlüğü bozulur ve hücre ölümü oluşur. “*Reperfüzyon*” ise iskemiden sonra dokunun yeniden kanlanmaya başlamasıdır. Uzun süren iskemi dönemlerinden sonra dokuların reperfüzyonu ve oksijenin daha önce iskemik kalmış alana hızla girişi, süperoksit radikalleri ve hidrojen peroksit gibi serbest oksijen radikallerinin (SOR) oluşumuna yol açar. Serbest radikaller hücre zarında lipid peroksidasyonuna ve iskelet kasının damar geçirgenliğinin artmasına yol açabilir. Bu olaya “*reperfüzyona bağlı doku hasarı*” denir. Süperoksitler, iskelet kası damar endotelinde ksantin oksidaz enzimi tarafından yıkım yoluyla üretilir. SOR aşırı reaktif ve çok kısa ömürlü olduklarından direkt olarak ölçülebilmeleri zordur. Lipid peroksidasyon ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA) ölçülmesi en sık kullanılan indirekt ölçüm yöntemidir².

Serbest oksijen radikallerinin potansiyel zararlarına, çok sayıda hücre koruyucu enzimlerle karşı koyulur ve antioksidan maddelerle oksijen radikallerine bağlı hasar sınırlandırılmaya çalışılır. Hücresel antioksidan enzimler, antioksidan maddeler ve serbest radikaller arasındaki ilişki normalde bir

denge oluşturmaktadır. Antioksidan savunmada öncelikle etkili olanlar; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GPX) ve glutatyon redüktaz gibi enzim yapısında antioksidanlardır².

Propofolün lipid peroksidasyonunu azalttığı ve antioksidan aktiviteyi artırdığı bilinmektedir³. İskemi reperfüzyon çalışmalarında da farklı dozlarda propofol uygulamalarının lipid peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir^{1,4-6}. Lökosit aktivasyonu ile SOR serbestleşir ve reperfüzyona bağlı mikrosirkülatuar bozukluk meydana gelir. Reperfüzyona bağlı oluşan oksijen radikallerinin lökositlerdeki oksidatif DNA hasarı üzerine etkisi konusundaki bilgiler sınırlıdır⁷. Sevofluranın geçici DNA hasarı yaptığı^{8,9}, propofolün ise bu hasarı azalttığı gösterilmiştir¹⁰. Bir genotoksisite testi olan “*Tek Hücre Jel Elektroforez*” (THJE) tekniğinde, DNA hasarı mikroskopik görünüme göre değerlendirilir¹¹.

DNA hasarının THJE yöntemiyle değerlendirildiği bu araştırma, cerrahi işlem uygulanmasından kaçınabilmek ve sevofluran/propofölü tek ajan olarak uygulayabilmek amacıyla deneysel olarak planlanmıştır. Bu şekilde, cerrahinin ve anestezi ilaç kombinasyonlarının, sonuçlar üzerindeki etkilerinden kaçınmak hedeflenmiştir.

Tavşanlarda turnike ile akut alt ekstremitte iskemi-reperfüzyon modeli oluşturulan bu çalışmada amaçlarımız:

1. İskemi-reperfüzyonun oksidatif stres ve DNA hasarı üzerine etkilerini belirlemek ve bu etkiler arasındaki ilişkileri araştırmak,
2. Sevofluran ve propofol anestezilerinin bu etkiler ve ilişkiler üzerindeki etkilerini karşılaştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Turnike

Pnömatik turnike; kansız bir ortam sağlayarak girişimi kolaylaştırmak, kanamaya bağlı kan kaybını azaltarak transfüzyon ihtiyacını azaltmak ve süreyi kısaltmak için ortopedik cerrahide sık kullanılır. Hava ile şişirilen pnömatik turnike ekstremitte cerrahisinde ilk olarak 1904 yılında Harvey Cushing tarafından kullanılmıştır^{2,12}.

Turnike yerleştirildikten sonra basınç uygulanmadan önce ekstremitte iki dakika süre ile eleve edilir ya da elastik bandajla sarılarak ekstremitenin kan volümü boşaltılır. Turnikenin şişirilebileceği güvenli basınç tam olarak belirlenmemiştir. Doğru basınç hastanın yaşı, kan basıncı ve ekstremitenin boyutuna göre belirlenir. Üst ekstremitede 135-255 mmHg, alt ekstremitede ise 175-305 mmHg basınç hemostaz sağlamak için yeterlidir. Üst ekstremitte için sistolik kan basıncının 50-75 mmHg üzeri, alt ekstremitte için ise sistolik kan basıncının 100-150 mmHg üzerinde olmasının yeterli olduğu öne sürülmektedir¹³.

Turnike paralizisi; aşırı basınç, yetersiz basınç sonucu lokal konjesyona bağlı nöral hemorajik infiltrasyon, çok uzun süreli turnike kullanımı ve lokal anatomi gözönüne alınmadan turnike yerleştirilmesi gibi durumlarda ortaya çıkabilir. Hastanın yaşı ve ekstremitenin vasküler durumuna göre farklılıklar gösterebildiğinden, turnikenin güvenli olarak ne kadar süre kalabileceği tam olarak ortaya konulamamıştır. Bununla birlikte 50 yaş altı sağlıklı erişkinlerde turnikenin iki saatten fazla tutulmaması önerilir¹³.

Turnike uygulanmasının, cerrahi alanın perfüzyonunu engelleyerek kan kaybını azaltması ve cerrahi işlemi kolaylaştırması gibi avantajları olmakla beraber,

artan doku ödemi, kas gücü kaybı, nöropraksi, yara hematomu, vasküler hasar, doku nekrozu ve kompartman sendromu gibi lokal sorunlar meydana gelebilir. Kardiyovasküler, solunumsal, serebral, hematolojik, metabolik ve vücut ısısı değişiklikleri gibi bazı sistemik komplikasyonlar ise turnike uygulamalarının olası dezavantajlarıdır^{12,14}.

Turnike uygulamasıyla oluşan hemodinamik ve metabolik değişiklikler; turnike fazına (inflasyon-deflasyon), turnike inflasyon süresine, iskemik alanın büyüklüğüne, anestezi yöntemine ve hastanın kardiyovasküler durumuna göre değişir¹⁵.

Turnikenin uygulandığı sürede ekstremitede iskemi oluşurken, turnike açıldığında oksijenin dokuya yeniden girişiyle reperfüzyon dönemi başlar. İnsanlarda kansız bir ekstremitte ameliyatı için gerekli olan turnike uygulaması ve turnikenin operasyon bitiminde açılarak ekstremitenin yeniden kan ve oksijenle karşılaşması, iskemi-reperfüzyon hasarı için iyi bir modeldir⁴.

2.2. İskemi

Dokuya kan akımı engellendiğinde, hücresel ve interstisyel ödem, hücresel disfonksiyon ve hücre ölümüyle sonuçlanır¹⁶. İskeminin neden olduğu nekroza yol açabilen patolojik süreçler yaşamı tehdit eden durumlardır. İskemik kalp hastalığı gibi bir durumda ölüm nedeni olabilen ve günümüzde özellikle vasküler cerrahi ve transplantasyon cerrahisinde sıkça karşılaşılan bir durumdur^{16,17}.

Oksijen (O₂), hücre fonksiyonunda temel yakıttır. Aerobik metabolizma hücre fonksiyonları için gerekli olan yüksek enerjili fosfatları sağlar. O₂ yokluğu anaerobik metabolizma ile sonuçlanır ve lokal olarak laktik asit konsantrasyonu artar. Sonuçta oluşan

asidoz enzim kinetiklerini değiştirir, yüksek enerjili bileşikler oluşturur ve normal hücre homeostazını devam ettirmek için hücrede gerekli enerji kalmaz^{16,17}.

İşkemik nekrozda; plazma membran değişiklikleri, sodyum ve kalsiyum iyon dengesinin kaybı, asidoz, ozmotik çok, kromatin kümeleşmesi ve nükleer piknoz gelişir. Çevredeki interstisyum ile ozmotik dengeyi korumak amacıyla sodyum iyonları hücre içine hareket ederken potasyum iyonları hücreden interstisyuma geer¹⁸. Bu değişikliklere, mitokondriyal aktivasyon, oksidatif fosforilasyon ve ATP retiminde azalmanın yol açtığı sentetik ve homeostatik kapasitede azalma eşlik eder¹². Bu duruma sekonder otoliz (lizozomların şişmesi, endoplazmik retikulumun dilatasyonu ve veziklasyonu, enzim ve proteinlerin kaybı ve hüresel kompartmanların kaybı) gelişir, membran bütünlüğü sağlanamaz ve hücre ölümü (apopitoz) geliřir¹⁹.

2.3. Reperfüzyon

İşkemik dokuda kan akımının geri dönüşüyle enerji kaynağı yeniden sağlanır ve toksik metabolitler uzaklaştırılabilir. Ancak beraberinde toksik metabolitlerin sistemik dolaşıma dönmesi ciddi metabolik olaylara neden olduğundan, reperfüzyonla ciddi doku hasarı meydana gelebilir^{16,20}.

Ekstremitte iskemisini izleyen reperfüzyon sendromu lokal ve sistemik olmak üzere iki komponentden oluşur. Lokal yanıt ekstremitte ödemiyle oluşurken, sistemik yanıtlara bağlı olarak organ yetmezliği ve ölüm meydana gelebilir. İşkelet kası iskemiye oldukça dayanıklı olduğundan ancak üç saat iskemiden sonra mikrovasküler hasara paralel olarak irreverzibl hücre hasarı bařlar²¹.

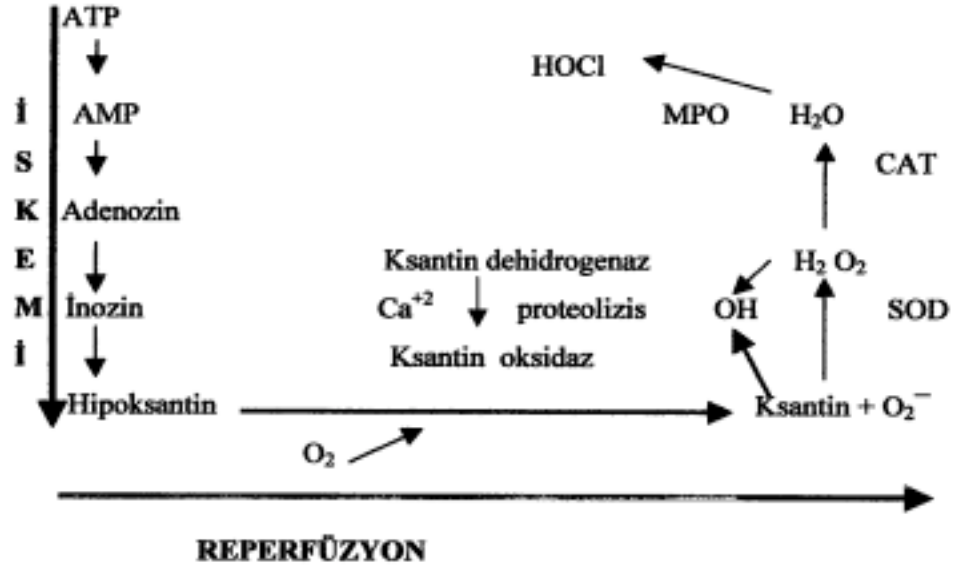
Mikrovasküler perfüzyonun yetersizliği gelişmesinde rol oynayan patofizyolojik olaylar; intrasellüler kalsiyum artışı, serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu hasar ve arasıdonik asit metabolizmasındaki değişikliklerdir. Bu süreç, endotelyumdan parankimal hücrelerin disfonksiyonuna kadar uzanan irreverzibl hasar oluşturur²². Serbest oksijen radikallerinin oluşumu, nötrofillerin sekestrasyonu ve aktivasyonu iskelet kasında iskemi reperfüzyon (İR) hasarını oluşturan mekanizmalardır²³.

Dolaşım durduğunda, iskelet kasında ATP hipoksantine indirgenir. Eş zamanlı artan kalsiyum iyon konsantrasyonu ksantin dehidrogenaz enzimini ksantin oksidaza (KO) dönüştürür. Hipoksantini etkileyen KO, hidroksil ve süperoksit serbest radikallerini oluşturur. Reaktif metabolitler olan serbest radikaller, kapiller permeabilityi arttırarak endotelial hücre yapısına zarar verir ve nötrofil kemotaksisine neden olurlar^{24,25}.

İskemik ekstremiteye kan akımının tekrar başlaması; kas ödemi, kas nekrozu ve kas fonksiyon bozukluğuyla sonuçlanan biyolojik ve hücresel olayları başlatır. Reperfüze olan ekstremiteden serbestleşen kimyasal mediyatörlerin dolaşıma karışması, mortalite ve morbiditeyi arttırarak, akciğer ve böbrek gibi uzak organların hasarlanmasına ve disfonksiyonuna yol açar²⁶.

İskemi endotel hücreleri içinde hipoksantin ve ksantin birikimine yol açar. Ortama reperfüzyon sırasında yeniden oksijenin girmesi, süperoksit anyonunun (O_2^-) ve diğer reaktif oksijen metabolitlerinin ortaya çıkmasına yol açar. Hidroksil radikali (OH^-), Fe^{+2} veya Cu^{+2} katalizörlüğünde Haber-Weiss reaksiyonu ile veya sadece Fe^{+2} katalizörlüğünde H_2O_2 ile etkileşerek (Fenton reaksiyonu) ortaya

çıkar. Nötrofil aktivasyonu sonrasında miyeloperoksidaz (MPO), nötrofillerde HOCl oluşumuna yol açar (CAT:Katalaz) (Şekil 1).



Şekil 1. İskemi-reperfüzyon mekanizması²⁷

2.4. Serbest radikaller

2.4.1. Tanımı ve genel özellikleri

Serbest radikaller, dış yörüngesinde bir ya da daha fazla paylaşılmamış elektron içeren atom ya da moleküllerdir. Yörüngesindeki paylaşılmamış elektron nedeni ile yarım ya da açık bağa sahip olması serbest radikale kimyasal reaktivite kazandırır²⁸. Pozitif yüklü, negatif yüklü ya da elektriksel olarak nötr olabilen serbest radikallerin reaksiyona girme olasılıkları elektriksel yüklerine bağlıdır²⁹.

Serbest radikaller, hücrenin normal metabolizması sırasında oluşabildikleri gibi, antineoplastik ilaçlar, anesteziik maddeler ve aromatik hidrokarbonların hücre içindeki metabolizması sırasında ve dış etkenler (ısı, ışık,

radyasyon, hava kirliliği, sigara) etkisiyle de oluşabilmektedirler. Yaşam süreleri oldukça kısa olmasına karşın, yapılarındaki dengesizlik nedeniyle diğer moleküllerle kolaylıkla elektron alışverişi yaparak onların yapılarını bozarlar³⁰. Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler²⁹.

Serbest radikaller üç yolla meydana gelmektedir:

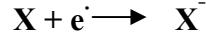
1. Molekülün kovalent bağının homolitik kırılması sonucu bağ yapısındaki iki elektronun her birinin ayrı atom üzerinde kalması



2. Normal bir molekülden bir elektronun kaybı



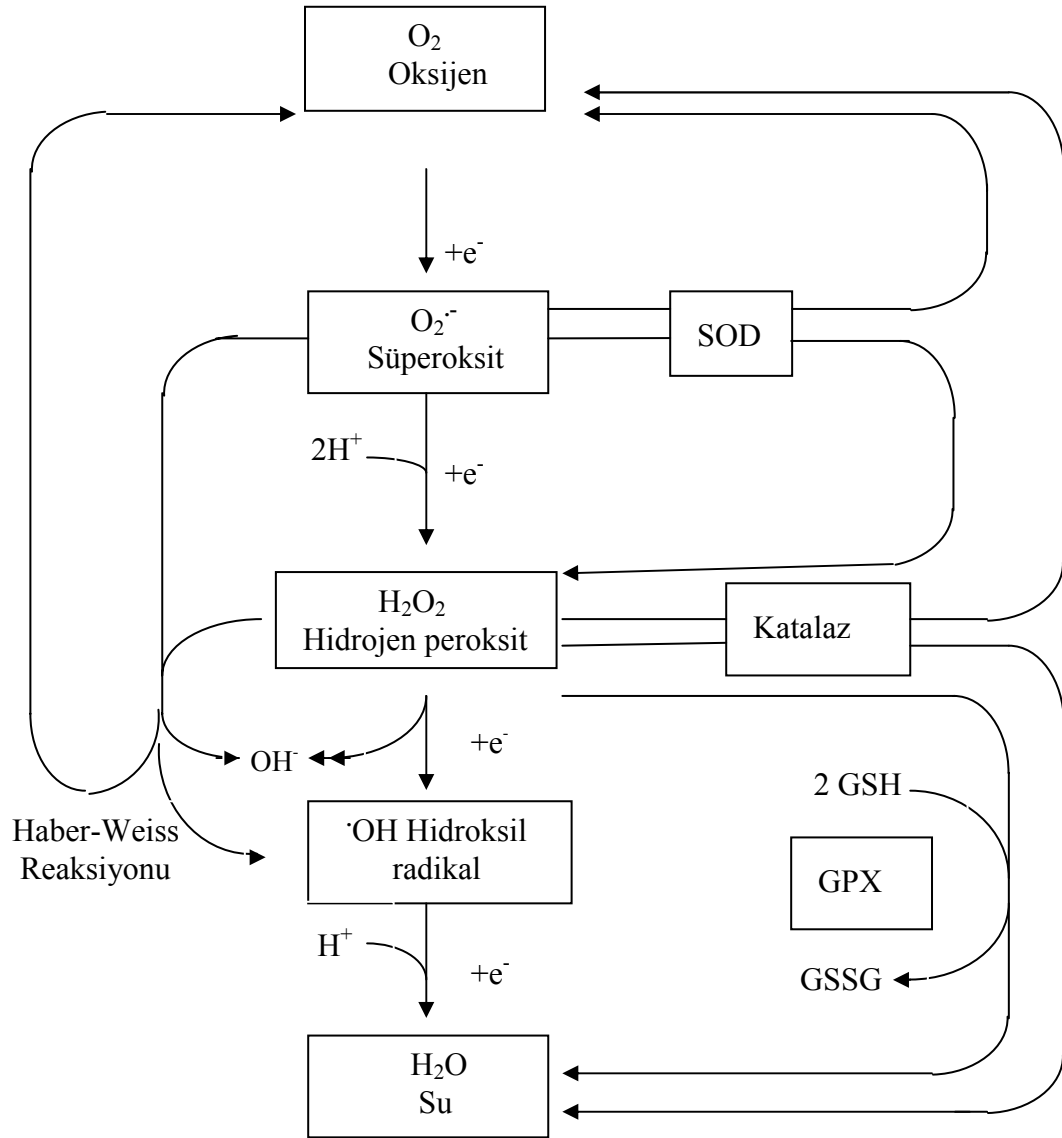
3. Normal bir moleküle bir elektron eklenmesi



2.4.2. Serbest oksijen radikalleri

Moleküler oksijen ve oksijenin en stabil formu olan H₂O ile arasında üç ara basamak bulunmaktadır. Bu ara formlar; süperoksit (O₂^{·-}), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikali (HO[·]), moleküler oksijene birer elektron eklenmesi ile oluşurlar, oksijen radikallerinin en reaktif formu hidroksil radikalidir. H₂O₂ ve singlet oksijen (O₂), bu radikallere ek olan reaktif oksijen ürünleridir ancak radikal değildirler. O₂, değiştirilmiş oksijene dönüşürken; H₂O₂, demir ve bakır gibi metal iyonların varlığında oksijen radikallerinin üretimine neden olur. Bu iki reaktif oksijen molekülü de potansiyel olarak toksiktir. Radikaller serbest

elektronlarını diğer bileşiklere verirler ve zincirleme reaksiyonlara polimer kırılmalarına ve lipid peroksidasyonuna neden olurlar³⁰ (Şekil 2). Oksijen türevi bileşikler, radikal ve radikal olmayan bileşikler olarak iki gruba ayrılır (Tablo 1).



Şekil 2. Reaktif oksijen ürünlerinin sentezi ve detoksifikasyonu³⁰.

Tablo 1. Oksijen türevi bileşikler

Radikaller	Radikal olmayanlar
Hidroksil (HO $\cdot$)	Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)
Alkoksil (RO $\cdot$)	Singlet Oksijen (O ₂)
Peroksil (ROO $\cdot$)	Ozon (O ₃)
Süperoksit (O ₂ $\cdot^-$)	Hipoklorid (HOCl)
Nitrik oksit (NO)	Lipid Hidroperoksit (LOOH)
Azot dioksit (NO ₂)	Peroksinitrit (ONOO $\cdot$)

2.4.3. Serbest oksijen radikallerinin hücrel kaynakları

İçinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle devamlı bir radikal yapımı vardır. Hücrel koşullarda da önemli bir miktar ve çeşitlilikte radikaller üretilmektedir³¹. Subsellüler organeller, yapısal komponentler ve sitoplazmik oluşumların hepsi radikal oluşumunda rol oynar^{32,33}. Organizmada bulunan oksijen radikalleri kaynakları Tablo 2’de gösterilmektedir.

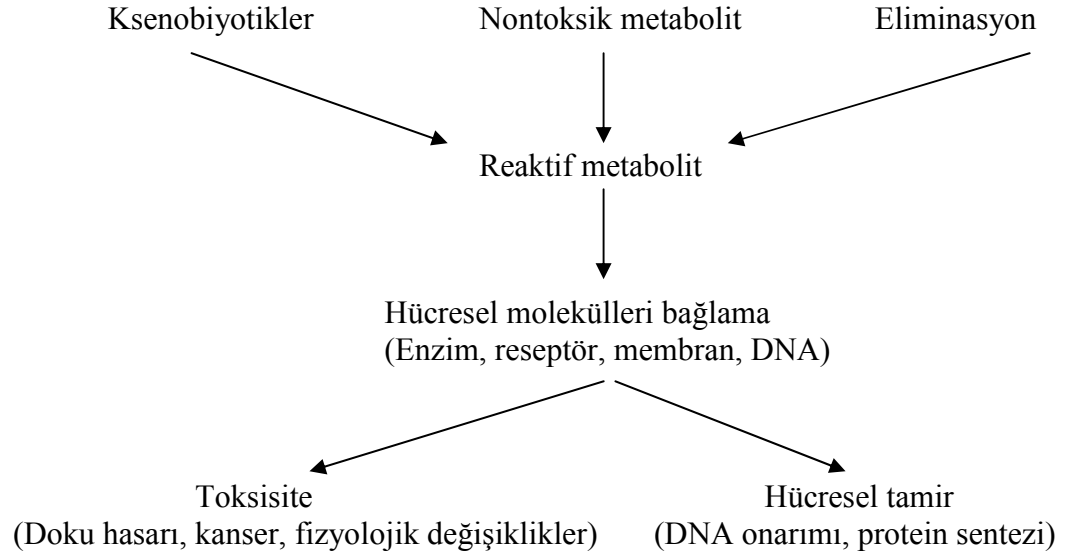
Tablo 2. Serbest O₂ radikallerinin kaynakları³³

Endojen Kaynaklar
Mitokondriyal elektron transport sistemi
Mikrozomal elektron transport sistemi
Kloroplast elektron transport sistemi
Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemi
Oksidan enzimler
Ksantin oksidaz
Triptofan dioksijenaz
Galaktoz oksidaz
Siklooksijenaz
Lipooksijenaz
Fagositik hücreler
Nötrofiller
Monosit ve makrofajlar
Eozinofiller
Endotelyal hücreler
Otooksidasyon reaksiyonları
Eksojen kaynaklar
Redoks potansiyelli maddeler (paraquat, doksarubisin, alloksan)
İlaç oksidasyonları (parasetamol, karbontetraklorür)
Sigara
İyonize radyasyon
Güneş ışığı
Isı şoku
Okside glutatyon

2.4.4. Oksijen radikallerinin zararlı etkileri

Organizmada çeşitli reaksiyonlar sonucu oluşan serbest radikaller tüm hücre bileşenleriyle etkileşirler. Hücre bileşenlerinin kimyasal modifikasyonları metabolik ve yapısal değişikliklere neden olur ve bu değişiklikler hücre ölümüne kadar ilerleyebilir. Bu tür reaksiyonlar süresiz olarak sürebildiği gibi serbest radikalleri kaldırıcı ya da temizleyici bileşiklerin etkisi ile kısmen ya da tamamen ortadan kaldırılabilirler. Serbest radikallerin oluşum hızı ile etkisizleştirilme hızı arasındaki denge devam ettiği sürece organizma bu maddelerden etkilenmemektedir³³⁻³⁵.

Vücut tarafından oluşturulan ve çevreden alınan pek çok ekzojen içeriğin (ksenobiyotikler) metabolize edilmesi ile aşırı reaktif ara ürünler oluşur. Bu metabolitler hücresel yapılarla çeşitli yollarda reaksiyona girerler. Örneğin; kovalent olarak makromoleküllere bağlanırlar ya da lipid peroksidasyonunu stimüle ederler. Bu biyotransformasyon rölatif olarak etkisiz kimyasallardan yüksek reaktif metabolitlerin oluşumuna aracılık edebilir. Bu reaktif metabolitler de metabolik aktivasyon ya da biyoaktivasyona uğrarlar ve toksisiteye neden olabilirler. Reaktif metabolitler ayrıca reaksiyona girerek (örneğin glutatyon ile) detoksifiye edilebilirler. Reaktif metabolitler elektrofilitirler ve hücresel nükleofillerle reaksiyona girerek glutatyon, protein ve nükleik asitlere dönüşürler. Diğer reaktif metabolitler serbest radikal olabilirler ya da radikal jeneratörü olarak oksijenle reaksiyona girerek reaktif oksijen ürünleri oluştururlar ve membranlara, DNA'ya ve diğer makromoleküllere hasar verebilirler³⁶ (Şekil 3).



Şekil 3. Ksenobiyotiklerin metabolizması³⁶.

Radikal reaksiyonları içinde en hassas olanı lipidlerle olsa da radikallerin protein, karbonhidrat, nükleik asit ve sitozolik komponentler gibi makromoleküllerle etkileşimi durumunda hücre yapı ve fonksiyonlarında önemli değişiklikler görülür^{28,29,33}. Hücre komponentlerinin serbest radikal reaksiyonları ve sonuçları Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Serbest radikallerin hedefleri³³.

Hedef	Sonuç
Küçük moleküller, doymamış ve tiol içeren aminoasitler	Protein denatürasyonu ve çapraz bağların oluşumu, enzim inhibisyonu. Organel ve hücre permeabilitesinde değişim
Nükleik asitlerin bazıları	Hücre siklusunda değişim, mutasyon
Karbonhidratlar	Hücre yüzeyi reseptörlerinde değişim
Doymamış yağlar	Kolesterol ve yağ asitlerinin oksidasyonu, lipid çapraz bağları, organel ve hücre permeabilitesinde değişim
Kofaktörler	Nikotinamid ve flavin içeren kofaktör aktivitesinde azalma, askorbat porfirin oksidasyonu
Nörotransmitterler	Aktivitede azalma (serotonin, epinefrin gibi)
Antioksidanlar	α -tokoferol ve β -karotende azalma
Makromoleküller	
Protein	Peptid zincirinde kırıklar, denatürasyon
DNA	Sarmal kırıklar, baz modifikasyonu
Hiyalüronik asit	Sinoviyal sıvı viskozitesinde azalma

2.4.4.1. Proteinlere etkileri

Proteinler serbest radikal saldırılarına doymamış yağ asitlerinden daha az duyarlıdır. Çok yoğun bir saldırı olmadıkça fazla hasar görmezler²⁹. Serbest

radikallerin proteinlere etkisi aminoasit içeriklerine göre değişmektedir. Aminoasit moleküllerindeki sülfidril ya da amino gruplarının serbest radikallerle etkileşmesi sonucunda proteinlerde; aminoasitlerin modifikasyonu, proteinlerin fragmentasyonu, proteinlerin agregasyonu ve çapraz bağlanmaları gibi yapısal değişiklikler meydana gelir. En fazla sülfür içeren aminoasitleri (metionin ve sistein) olan proteinler etkilenir. Proteinin temel yapısında meydana gelen değişme, antijenitesinde değişmeye ve proteolize karşı duyarlı hale gelmesine yol açar. Serbest radikaller membran proteinleri ile de reaksiyona girebilir ve nörotransmitter, enzim ve reseptör fonksiyonlarının bozulmasına yol açabilirler^{37,38}.

Protein, geçiş metal iyonunu özel bir bölgeden bağlarsa, geçiş metal iyonu H_2O_2 ile reaksiyona girerek $OH^\cdot$ radikalini oluşturur. $OH^\cdot$ radikali de hasar verici etkisini metal bağlanma bölgesinde ya da ona yakın bölgelerde meydana getirir. Peroksitlerin ve karbonillerin oluşumu proteinlere karşı serbest radikal atağıyla sonuçlanır. Karbonillerin saptanması proteinlerde oluşan oksidatif hasarın ölçülmesi için kullanılabilir²⁹.

2.4.4.2. Nükleik asitlere etkileri (oksidatif DNA hasarı)

İyonize edici radyasyona maruz kalınmasıyla oluşan serbest oksijen radikalleri DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyon meydana getirirler. Bu etkileşimin yaşlanma ve tümör oluşumuna neden olduğu son yıllarda gösterilmiştir. Çok basamaklı bir oluşum olan karsinogenezde serbest radikal reaksiyonlarının önemli etkilerinin olduğu belirlenmiştir²⁸. DNA, okside edici

radikaller tarafından kolaylıkla hasara uğratılabilmektedir²⁹. Reperfüzyonun neden olduğu mikrosirkülatuar bozukluğun patofizyolojisinde lökosit aktivasyonunun asıl rolü adhezyon ve serbest oksijen radikallerinin salınımıdır⁷. Sitotoksik etki; büyük oranda nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine ya da DNA'daki diğer değişikliklere bağlıdır. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolaylıkla reaksiyona girer. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit, membranlardan kolaylıkla geçip hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre fonksiyon bozukluğuna ve aynı zamanda hücre ölümüne neden olabilir. Bu yüzden DNA, serbest oksijen radikallerinin kolay zarar verdiği önemli bir hedeftir^{29,37,39}. Reperfüzyon hasarı nötrofillerin baskılanması ile belirgin olarak azalır. Bu durum toksik oksijen radikallerinin farmakolojik inhibisyonu ve monoklonal antikorlar ile lökosit adhezyonunu önlemesiyle oluşur⁷.

2.4.4.3. Membran lipidleri üzerine etkileri

Biyolojik sistemlerde doymamış yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri ile oksidasyonu, “*lipid peroksidasyonu*” olarak adlandırılır^{28,29}. En duyarlı bileşikler membran fosfolipidleri olduğundan lipid peroksidasyonunun yol açtığı en önemli hasar hücre membranında gözlenir ve geri dönüşümsüzdür²⁸. Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan bir serbest oksijen radikalının etkisiyle membran yapısında bulunan doymamış yağ asidi zincirinin metilen (CH₂) grubundan bir hidrojen atomunun uzaklaştırılmasıyla başlar. Böylece yağ asidi zinciri bir “lipid radikali” niteliği kazanır. Oluşan lipid radikali reaktif bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipid radikali molekülleri oksijenle etkileşerek lipid

peroksil radikallerini oluşturur. Lipid peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğerk poliansatüre yağ asitlerini de etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine dnüşürler^{29,38,40}.

Membranların zedelenmesine neden olan lipid peroksidasyonu hücrelerde iki mekanizmayla hasar oluşturabilmektedir:

1- Membranların anatomik bütünlüğünün bozulması

2- Üretilen toksik bileşiklerin üretildiği yerden diffüzyonla diğerk yerlere ulaştırılarak hasara yol aması

Lipid peroksidasyonu, biyolojik membranlarda membran akıcılığının kaybolmasına, spesifik olmayan iyon geçirgenliğinde artışa (K^+ , Ca^{++}) neden olarak, membranlardaki enzimlerin aktiviteleri için gerekli olan tiollerin okside olmasını ve membran transport mekanizmasının bozulmasını sağlayarak membranların bütünlüğünü ve işlevini bozar^{28,41}.

Aldehit ve MDA gibi lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ürünler difüzyonla oluştukları yerden salınırlar³³. Günümüzde doku hasarının en etkin göstergesi olarak lipid peroksidasyonunun ölçümü gösterilmektedir. MDA, alkanlar, lipid hidroperoksitler, dien konjugatları, pentan ve etan gibi ürünlerin ölçümü lipid peroksidasyonunun göstergeleri olarak kabul edilmektedirler^{41,42}.

2.4.5. İn vivo serbest radikal reaksiyonlarının ölçümü

Serbest radikallerin insan hastalıklarındaki yeri ve öneminin giderek daha fazla anlaşılması, onların ve reaksiyonlarının ölçümünde değişik ve alternatif yöntemler bulunmasını gerekli kılmıştır. Burada araştırmacıların önündeki en büyük problem bu maddelerin aşırı reaktif ve ömürlerinin mikrosaniyeler seviyesinde kısa olmalarıdır. Bu durum onların ölçümünü imkansız hale getirmiş ve serbest radikallerin girdikleri reaksiyonlarda oluşan ürünleri ya da bu reaksiyonlardaki ihtiyaç duydukları enzimlerdeki değişiklikleri ölçerek serbest radikaller hakkında bilgi edinmeye zorlamıştır. Lipid, protein ve DNA ile serbest radikallerin girdikleri reaksiyonlardaki çeşitli son ürünlerin saptanması, serbest radikallerin in vivo ölçümünde genellikle kullanılan yöntemlerdir⁴³.

Özellikle lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin en önemli patolojik reaksiyonu olduğundan tercih edilir. Lipid peroksidasyonu, lipid peroksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesiyle sona ermektedir. Bu bileşiklerden biri MDA'dır³⁵.

Malondialdehit üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu ile meydana gelir ve tiyobarbitürik asitle ölçülebilir. Bu metod lipid peroksit ürünlerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır. MDA; yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir, fakat lipid peroksidasyonunun derecesiyle korelasyon gösterir^{35,44}. Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir reaksiyon zinciridir. Membran yapısını doğrudan etkiyerek, dolaylı reaktif aldehitler üreterek hücre elemanlarına zarar verir²⁹.

Malondialdehit oldukça mutajen ve karsinojendir. MDA ayrıca prostaglandin biyosentezi sırasında da bir yan ürün olarak oluşabilmektedir. DNA ile reaksiyona girerek DNA'nın yapısındaki değişikliklere yol açar⁴⁵. Serum MDA düzeyinin belirlenmesi, iskemi-reperfüzyon hasarının şiddetini değerlendirmede yaygın kullanılan geleneksel yöntemlerden biridir, ancak duyarlılığı ve özgünlüğü düşüktür⁴⁶.

2.4.6. Antioksidan savunma sistemleri

Serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ve neden oldukları hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizması gelişmiştir. Bunlar “antioksidan savunma sistemleri” ya da “*antioksidanlar*” olarak adlandırılır. Antioksidanlar, peroksidasyon reaksiyonlarını engelleyerek ve/veya serbest oksijen radikallerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Endojen ve ekzojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar³⁷:

A. Endojen antioksidanlar

1- Enzim olanlar; SOD, GPX, CAT, GST, GPX, mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi

2- Enzim olmayanlar; α - tokoferol (E vitamini), β -karoten, askorbik asit, melatonin, ürik asit, bilürubin, glutatyon, seruloplazmin, albumin, transferin, ferritin.

B. Ekzojen antioksidanlar

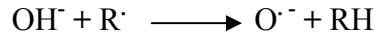
Allopürinol, folik asit, C vitamini, troloks-C, asetilsistein, mannitol, adenozin.

2.4.6.1. Antioksidan etki mekanizmaları

Antioksidan aktivite için üç farklı mekanizma tanımlanmıştır:

1. Radikal karakterin bir reaktif antioksidan aracılı radikale

dönüşüm formasyonu:



Bu reaksiyonla radikal karakterdeki molekül “antioksidan” bir moleküle dönüştürülmektedir. Antioksidan aracılı radikal oluşumu, oksidan aktiviteye sahip doğal bir süreçtir. Antioksidan aracılı radikallerin kimyasal reaktivitesine, α tokoferoksil radikali aracılığıyla *low density lipoprotein* (LDL)’in lipid peroksidasyonunun artışı iyi bir örnektir.

2. Stabil ya da inert serbest radikal tuzaklarının oluşumu ile serbest radikallerin engellenmesi

3. Antioksidan enzim aktivitesini taklit eden moleküller:

Antioksidan aktivite sentetik bileşiklerle ortaya konur. Bu bileşikler glutatyon peroksidaz ve SOD gibi antioksidan enzimlerin katalizörü olarak rol aldığı spesifik reaksiyonları taklit ederler³⁰.

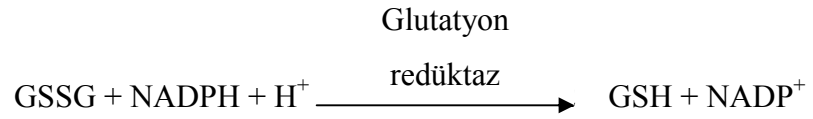
2.4.6.2. Enzim yapılı antioksidanlar

Bunlardan GPX hücrelerin daha çok sitozollerinde bulunur ve hem hidrojen peroksit (H₂O₂) hem de organik peroksitlerin redüksiyonunu sağlayarak membran lipidlerini ve hemoglobini oksidatif hasara karşı korur. Selenyuma (Se) bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki farklı yapıda GPX bulunmaktadır. Selenyuma bağımlı GPX, H₂O₂ ve organik hidroperoksitlerin glutatyon tarafından

indirgenmesini katalize eden peroksidazlardan biridir. Tetramerik 4 Se atomu içeren sitozolik bir enzimdir^{38,47}.

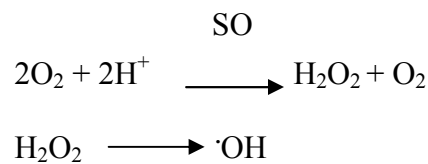


Hidrojen peroksit ve organik peroksitlerin indirgenmesi sırasında oksitlenen GSH, başlıca pentoz fosfat yolundan sağlanan NADPH ve GPX enzimleri yardımıyla indirgenerek reaksiyonların devamlılığı sağlanır.



Glutasyon peroksidaz, fagositik hücrelerde önemli fonksiyonlara sahiptir. Eritrositlerde GPX oksidatif strese karşı en etkin antioksidandır. GPX aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksitin artmasına ve şiddetli hücre hasarına neden olur⁴⁸.

Süperoksit dismutaz; oksijen tüketen tüm organizmalarda bulunan bir metalloproteindir ve substratı olan süperoksitin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar.



Bu reaksiyon spontan olarak da meydana gelebilir. SOD ile katalizlendiğinde reaksiyon hızı 4000 kat artar. SOD'nin iki tipi vardır:

SOD-1; Cu-Zn SOD: Sitoplazmada bulunur.

SOD-2; Mn-Fe SOD: Mitokondride bulunur.

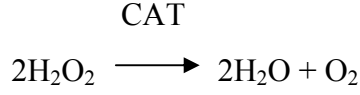
Süperoksit radikali; lipidlerin otooksidasyonunda, inflamasyonda, reperfüzyon hasarında, yaşlanmada ve kanserde önemli role sahiptir. Süperoksit radikali oksijenin ilk metabolitidir ve direkt kendisi ya da ikincil ürünleri yoluyla bir dizi hasara neden olmaktadır. Enzimin fizyolojik fonksiyonu, oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe etmektedir⁴⁹.

Oksijen kullanımı yüksek olan dokularda SOD aktivitesi artmaktadır. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından süperoksit anyonu üretimi artmasına rağmen SOD sayesinde intrasellüler süperoksit seviyesi düşük tutulur. SOD enziminin hücre dışı aktivitesi oldukça düşüktür⁵⁰.

Süperoksit dismutaz fagosit edilmiş bakterilerin hücre içinde öldürülmesinde de görev alır. Hücreyi özellikle DNA'yı radyasyonun iyonizan etkisine karşı koruyucu özellik göstermektedir⁵¹.

Katalaz (CAT, H₂O₂ oksidoredüktaz), bütün memeli hücrelerinde genellikle kan, kemik iliği, karaciğer peroksizomları ve diğer dokuların subsellüler organellerinin iç kısmında bulunur. Katalaz aktif merkezinde 4 hem grubu içeren tetramerik yapıya sahiptir. Katalazın görevi; hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalamaktır. Katalaz, peroksidaz aktivitesinin yanısıra

bir molekül hidrojen peroksidi elektron verici bir substrat olarak, diğeri de oksidan ya da elektron alıcısı olarak kullanabilir.



Katalazın indirgeyici aktivitesi, hidrojen peroksit metil ve etil hidroperoksitler gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllu lipid hidroperoksitleri ise etkilemez^{37,52}.

Glutasyon, γ -glutamil sisteinilglisin yapısında olup, karaciğerde sentezlenir. Radikallerle reaksiyona girerek hücreyi korumasının yanı sıra proteinlerdeki SH gruplarını redükte durumda tutarak onları oksidasyona karşı korur²⁹.

2.5. Genel anestezi yöntemleri

İnhalasyon anestezikleri genel anestezinin sağlanmasında en yaygın kullanılan ajanlardır. İnspire edilen oksijene volatil anestezinin %1 kadar küçük bir oranda eklenmesi bile bilinç kaybı ve amneziye neden olur⁵³. Erişkinlerde cerrahi girişimlerde uygulanan en popüler inhalasyon ajanları sevofluran, desfluran ve izofluran iken, pediatrik hastalarda halotan ve sevoflurandır⁵⁴. İntravenöz anestezide, aralıklı bolus uygulamalar yerine belli bir hızla sürekli intravenöz infüzyon uygulandığında ilaçların titrasyonu daha güvenilir olarak sağlanır. En sık kullanılan ajanlar; opioidler, benzodiazepinler ve propofoldür⁵³.

2.5.1. Sevofluran

Sevofluran ilk kez 1968 yılında Regan tarafından sentezlenmiş ancak parçalanma ürünlerinin toksik olabileceği düşüncesiyle anestezide kullanımı sınırlanmıştır. Daha sonraları bu anesteziik bileşiğin toksisitesi ve klinik özellikleri ile ilgili çalışmalar hızlanmıştır⁵⁵. 1987’de rutin olarak kullanıma girmiş olan ancak biyodegradasyon ile ilgili sorunlar nedeniyle ABD’de kullanımı ancak 1990’lı yıllarda yaygınlaşabilen bir metil propil eterdir⁸.

Sevofluran doğal bir stabiliteye sahiptir ve oksijen ve azot protoksit ile birleştiğinde yanmaz ve patlamaz. Kanda düşük çözünürlüğü nedeniyle hızlı indüksiyon ve anestezi derinliğinde kontrol kolaylığı sağlar. Hoş kokuludur ve irritan değildir⁵⁶. Sevofluranın kauçuk ve plastiklerde daha az çözünürlüğü nedeniyle anestezi devresinden daha az oranda absorbe edilir. Karbondioksit absorbanı olarak en sık kullanılan sodalime ya da baralime ile direkt teması sonucunda bileşik A ve B (compound A ve B) meydana getirebilir⁵⁷.

Sevofluranın biyotransformasyon ürünleri hexafluoroisopropanol (HFIP) ve inorganik florid’dir. Sevofluran insanda %5 konsantrasyonun üzerinde uygulandığında sitokrom P450’nin 2E1 bölümü ile metabolize olarak belirgin bir şekilde deflorinlenir. HFIP, hızlı bir şekilde glukronize edilip idrarla glukronik konjugatı olarak atıldığından, dolaşımda sadece çok az konsantrasyonda HFIP bulunur. Bu nedenle sevofluran metabolizma ve metabolik ürünlerin atılımı için faz II biyotransformasyona gereksinim duyan tek halojenlenmiş inhalasyon anesteziğidir. İnorganik florid konsantrasyonları sevofluran anestezisinin son iki saatinde pik yapar ve genellikle uygulamadan sonraki 48 saat içinde kontrol

değerine döner⁵⁵. Nefrotoksik plazma pik florür seviyesi 50 µmol/L olarak belirlenmiştir ve renal yetmezlik için kritik düzey 90 µmol/L olarak bildirilmiştir. Plazma florür seviyesi 1-3 µmol/L'dir. Ortalama pik serum flor seviyesi postoperatif ikinci saat içinde 10-66 µmol/L iken 24-72 saat içerisinde bazal düzeye inmektedir^{56,58}.

Sevofluranın çeşitli organlar üzerinde olası etkilerinin belirlenmesine karşın genetik materyalle etkileşiminin mekanizmasıyla ilgili kesin veri yoktur. Ancak genotoksik etkinin sevofluranın karbondioksit absorbanlarıyla etkileşmesi sonucunda oluşturduğu bileşiklerden biri olan vinil eter yapısındaki Compound A'dan ileri geldiği düşünülmektedir⁵⁶.

Sevofluran, doza bağlı olarak periferik ve negatif inotropik etkisiyle kardiyovasküler sistemi deprese eder, sistemik vasküler rezistansı azaltır⁵⁹. Ancak sistemik vasküler rezistans ve arteriyel kan basıncını düşürücü etkisi desfluran veya izoflurandan daha azdır. Sevofluran kalp atım hızını izoflurana göre daha fazla etkiler. Koroner çalma sendromuna neden olmaz. QT intervalini uzatabilir, ancak bunun klinik önemi bilinmemektedir⁵⁵.

Sevofluran düşük kan/gaz ve doku/kan katsayılarına sahip olduğundan alveolar anestezi madde konsantrasyonu iyi kontrol edilebilir. İndüksiyon sırasında alveolar anestezi madde konsantrasyonunda hızlı yükselme ve anesteziden sonra hızlı bir derlenme sağlar. Sevofluran solunumu deprese eder ve izoflurana benzer şekilde solunumu deprese eder⁵⁶.

Sevofluran orta serebral arter kan akım hızını azaltır, epileptik EEG aktivitesine neden olmaz ve intrakraniyal basıncı arttırmaz⁶⁰. Bütün inhalasyon ajanlarında olduğu gibi serebral metabolizmayı da azaltır⁵⁶.

Allaouchiche ve ark³ propofol, sevofluran ve desfluranın oksidatif strese etkisini araştırmışlar ve desfluranın oksidatif stresi artırdığını, buna karşın sevofluranın bir değişiklik oluşturmadığını bulmuşlardır. MDA düzeyleri desfluranda artmış, propofolde düşük konsantrasyonda bulunmuş ve sevofluran grubunda ise değişiklik olmamış. Yine GPX aktivitesi desfluranda azalırken, propofolde belirgin olarak artmış ve sevofluran grubunda ise değişmemiş. Başka bir çalışmada da propofol-remifentanil ve sevofluran uygulanan hastalarda klinik uygulama dozlarında propofol-remifentanilin oksidatif strese etkisinin olmadığı ve sevofluranın eritrositleri oksidatif strese karşı koruyabileceğini göstermişlerdir⁶¹.

Sevofluran kötü olmayan bir kokuya sahiptir bu nedenle indüksiyon sağlamak için kullanıldığında olumsuz bir etkiye yol açmaz. Sevofluranla alveoler/inspire edilen konsantrasyondaki artışın hızlı olması, hızlı bir anestezi indüksiyonu sağlar. Sevofluran hızlı bir anestezi indüksiyonu için hem çocuklarda hem de erişkinlerde kullanılabilir. Salivasyon, nefes tutma, öksürük ya da laringospazm insidansı halotandan daha düşüktür^{62,63}.

2.5.2. Propofol

Propofol ilk kez 1977 de Kay ve Rolly tarafından anestezi indüksiyonunda kullanılmıştır. Anestezi indüksiyonu ve idamesinde kullanılmakla beraber

ameliyathane içi ve dışı uygulamalarda sedasyon sağlama amacıyla da kullanılmaktadır⁶⁴.

Propofol (2,6 diisopropilfenol-propofol ya da disoprofol) iki izopropil grubunun eklendiği bir fenol halkasından oluşur ve alkilfenol grubunda yer alan bir moleküldür. Alkilfenoller oda ısısında yağ konumunda iken aköz solüsyonlarda çözünmemektedirler ancak lipid solüsyonlarda yüksek çözünürlükleri vardır. %1 propofol; %10 soya fasülyesi yağı, %2.25 gliserol ve %1,2 saf yumurta fosfatidi şeklindedir. Emülsiyondaki mikrobiyal aktivasyonu engellemek amacıyla solüsyona disodyum edetat (%0.005) eklenmiştir. Bu formülasyonun pH'sı 7'dir ve visköz süt beyazı rengindedir. Tüm formlar oda ısısında stabildir ve ışığa karşı duyarlılıkları yoktur. Dilue edilmeleri gerektiğinde sadece %5 dekstroza kullanılabilir⁶⁵.

Propofol karaciğerde konjugasyonla suda eriyen bileşikler olan glukuronid ve sulfata metabolize olur ve bunlar böbrekler aracılığıyla atılır. %1 den az kısmı değişmeden idrarla atılırken %2'lik kısmı ise feçesle atılmaktadır. Metabolitleri aktif değildir. Propofolün klirensi hepatik kan akımından fazla olduğundan ekstrahepatik metabolizma ya da ekstra renal eliminasyonu olduğu düşünülmektedir⁶⁵.

Genel anestezi indüksiyonunda sadece iv uygulama için uygundur. Tek bolus uygulanım sonrası total kan propofol seviyesi redistribüsyon ve eliminasyona bağlı olarak hızla düşmektedir. Bunun nedeni başlangıç (2-8 dk) ve yavaş dağılım (30-70 dk) fazlarının oldukça kısa sürmesidir⁶⁵.

Propofolün farmakokinetiği; yaş, ağırlık, eşlik eden hastalık, eş zamanlı medikasyonla değişebilir. Hepatik kan akımını azaltarak kendi klirensini azaltabilmektedir. Kardiyak debiye olan etkisi ile kompartmanlar arasındaki klirensi etkileyebilmektedir. Kadınlarda distribüsyon volümü daha fazla ve klirens hızı yüksektir ancak eliminasyon yarı ömrü kadın ve erkeklerde aynıdır. Propofolün klirensi tiyopentalden 10 kat daha hızlıdır⁶⁶.

Propofolün yağdaki yüksek çözünürlüğü, etkisini bir kol-beyin dolaşım zamanı içerisinde göstermesini sağlar. Çok kısa başlangıç dağılım yarı ömrüne (2-8 dk) bağlı olarak tek bir bolus dozu takiben uyanma çok hızlıdır. Bu özelliği ile gününbirlik anestezide iyi bir seçenek haline gelmiştir. Düşük dağılım hacminden dolayı yaşlılarda daha düşük indüksiyon dozu önerilir. Kadınlar erkeklere göre daha yüksek doza gereksinim duyarlar ve daha hızlı uyanmaktadırlar. Çocuklar daha hızlı klirens ve daha geniş santral kompartman volümüne sahiptirler⁶⁴.

Propofol hipnotik bir ajandır. Bu etkisini GABA_A reseptörleri üzerindeki β subunitine bağlanarak göstermektedir. 2.5 mg/kg dozunda iv bolus uygulamada bir kol-beyin dolaşımı süresinde (yaklaşık 1 dk) hipnoz sağlar, pik etki 90-100 sn'de olmaktadır⁶⁵.

Yüksek infüzyon dozunda kullanıldığında EEG de burst supresyon yapmaktadır. Propofol bispektral indeks (BİS)'de doz bağımlı düşmeye neden olur. İntrakraniyal basıncı (İKB) normal ya da artmış hastalarda İKB'yi düşürür. İntraoküler basıncı da düşürmektedir. Propofol infüzyonu sırasında normal serebral karbondioksit yanıtı ve otoregülasyon korunmaktadır. Serebral metabolik

oksijen gereksinimini %36 azaltmaktadır. Antikonvülzan özelliği ile status epileptikusun sonlandırılmasında kullanılabilir ve epileptik hastalarda güvenle uygulanabilir⁶⁵.

Propofolün indüksiyon dozunun ardından; kullanılan doza, enjeksiyon hızına ve premedikasyona bağlı olarak apne görülebilir. Opioidlerle birlikte kullanıldığında apne süresi uzar. Propofol ile uzamış apne insidansı diğer indüksiyon ajanlarından daha yüksektir⁶⁴. İnfüzyonla kullanıldığında tidal volümde %40 azalma, solunum sıklığında ise %20 artma meydana gelir.

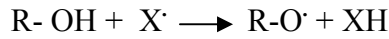
Propofol üst havayolu reflekslerini tiyopentale oranla daha iyi deprese ederek paralizi olmaksızın entübasyon ve laringeal maske yerleştirilmesine olanak sağlamaktadır. Histamin salınımına yol açabilmekle beraber, astmatik ve astmatik olmayan hastalarda barbitürat ve etomidatla karşılaştırıldığında wheezing insidansı daha düşüktür ve astmatik hastalarda kontrendike değildir⁶⁵.

İndüksiyon sırasında sistemik vasküler rezistans, kardiyak kontraktilite ve preloadda azalmaya ve arteriyel kan basıncındaki düşme meydana gelir. 2-2.5 mg/kg'lık indüksiyon dozunu takiben sistolik kan basıncında %25-40 kadar düşme gözlenmektedir ve benzer azalma ortalama ve diyastolik kan basınçlarında da meydana gelmektedir⁶⁵.

Propofol ile kardiyak debi ve kardiyak indeksde %15, stroke volüm indeksinde %23 ve sistemik vasküler rezistansda %19 azalma görülmüştür⁶⁴. Propofol kalp hızında değişiklik oluşturmamaktadır. Propofol doz bağımlı olarak atropin bağımlı kalp hızı değişimlerini de azaltmaktadır. Propofolün vazodilatör ve miyokardial depresan etkisinin doz bağımlı olması nedeniyle kan basıncındaki

düşme bolus uygulamalarda infüzyona göre daha belirgindir. İnfüzyon sırasında miyokardial kan akımı ve oksijen tüketimi oranı belirgin olarak azalır⁶⁵.

Propofol, lipid peroksidasyonunu önleyen bütillenmiş hidroksitoluen ve endojen antioksidan olan α -tokoferole (E vitamini) benzeyen antioksidan bir etkiye sahiptir ve bu etkinin anestezik konsantrasyonlarda görüldüğü bildirilmiştir. Serbest radikallerle birleşip fenoksil radikali oluşturarak antioksidan rol oynar^{4,5,66}. Fenol bazlı antioksidanlar (R-OH), serbest radikal tüketicileri (X $\cdot$) ile hidrojen çıkararak fenoksil radikallerini (R-O $\cdot$) oluştururlar ve bu reaksiyon düşük reaktiviteye sahiptir.



Propofolün, permanganatla okside edildiğinde benzer yol ile davrandığı ve fenoksil radikallerinin oluştuğu gösterilmiş⁶⁶. Propofolün antioksidan etkinliğinin doz bağımlı olduğu ve 60 μ g/mL'nin altındaki konsantrasyonlarda antioksidan etkinin azaldığını ileri sürülmüştür⁶⁷.

Propofol lipid peroksitlerinin oluşumunu inhibe eder ve MDA üretimini azaltır^{5,68}. Propofolün antioksidan etkinliğini gösteren birçok çalışmada oksijen radikallerinin neden olduğu lipid peroksidasyonunun bir ara ürünü olarak ortaya çıkan MDA seviyesi, tiyobarbitürik asit reaksiyonları üzerinden değerlendirilmiş ve MDA seviyesindeki azalma, serbest oksijen radikallerinin azalmasının indirekt göstergesi olarak yorumlanmıştır⁶¹. İn vitro bir çalışmada propofolün karaciğer mikrozomları, mitokondri ve beyin sinaptozomlarında oksidatif stresle indüklenen lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiş⁶⁹.

Propofol özellikle lipofilik membranlarda olmak üzere biyolojik membranlarda birikerek dokuların oksidatif strese karşı savunmasını artırır⁵. Oksidatif stres; aerobik metabolizma sırasında üretilen ve yine endojen olarak tüketilen serbest oksijen radikallerinin üretim ve tüketimi arasındaki denge bozukluğu ile ortaya çıkmaktadır. SOD ve GPX önemli antioksidan enzimler olup, seviyelerindeki artış antioksidan potansiyelin arttığını göstermektedir⁷⁰. Propofol terapötik dozda kullanıldığında, iskemi-reperfüzyona bağlı lipid peroksidasyonunu azaltır⁴.

Anestezi indüksiyonu, idamesi ve sedasyon amacıyla kullanılmaktadır. Propofol hem bolus hem de sürekli infüzyon şeklinde anestezi idamesinde kullanılabilen bir ajandır. İndüksiyon dozu 1-2.5 mg/kg ve premedikasyonsuz erişkin hastalarda ED₉₅ değeri 2.25–2.5 mg/kg'dır. 60 yaşın üzerinde ED₉₅ dozu premedikasyonsuz hastalarda 1.75 mg/kg, premedikasyon uygulananlarda 1 mg/kg'dır. İnfüzyon hızı indüksiyon dozunun ardından genellikle 100-200 µg/kg/dk'dır. 30 µg/kg/dk üzerindeki infüzyon hızında genellikle amnezik etki göstermektedir ve sedasyon amacıyla kullanılabilir⁶⁵.

2.6. Anestezi derinliğinin monitörizasyonu

Anestezinin yüzeysel oluşu, ağırlı uyarılara verilen nöroendokrin ve refleks yanıtları yeterince önleyemediği için zararlı olabilir. Derin anestezi ise vital fonksiyonları aşırı baskılayarak, hemodinamik dengenin bozulması ile birlikte uyanma döneminin uzaması ve bunlara eşlik edebilen birçok vital problemi bereberinde getirmektedir⁵³.

Elektroansefalografi (EEG), subkortikal talamik nukleus tarafından kontrol edilen toplanmış eksitator ve inhibitör postsinaptik aktiviteden kaynaklanan kortikal elektriksel aktiviteyi gösterir⁶⁵. Bispektral indeks (BİS), EEG sinyalinin bileşenleri arasında akut faz çiftleşmesinin derecesini sayısallaştıran bir yorum yöntemidir. Sedasyon ve hipnoz seviyesi, frontotemporal bölge üzerine yerleştirilen bir algılayıcı yardımı ile BİS monitöründen 0-100 arasında sayısal değer olarak izlenebilir⁷¹. BİS monitörizasyonu ile daha iyi derlenme koşullarının oluştuğu ve maliyetin azaltılabildiği bildirilmektedir⁵⁴. Tavşanlarda, propofol anestezisinde sevoflurana göre daha yüksek BİS değerleri elde edilmiştir⁷².

2.7. Anestezi ve toksikolojide hayvan deneyleri

Toksikolojik araştırmalarda insanın model olarak kullanılması; maliyeti yüksek, deney için kullanılacak doz miktarının sınırlı oluşu ve deney koşullarının oluşturulmasındaki zorluk gibi dezavantajları nedeniyle ideal değildir. Ayrıca insanda asetilasyon ve laktoz metabolizma oranları da ırksal farklılık göstermektedir. Sıçanlar, toksikoloji çalışmalarında en sık kullanılan hayvan türüdür. Ancak boyutları nedeniyle alınabilen kan miktarı kısıtlı olduğundan, tekrarlanan kan örneği gereken çalışmalar için uygun değildir⁷³.

Solunum sayısının yüksek oluşu, inhalasyon ajanının alımını artırarak dozun kontrol edilebilirliğini zorlaştırır. Tavşanların solunum hızı 30-55 soluk/dk arasında değişir ve fare ve sıçanların solunum sayısından daha düşüktür. İnsan ve

tavşan solunum sayıları ile birlikte, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması Tablo 4’te görülmektedir.

İntravenöz anestezi ajanlarından olan propofol infüzyon ya da tekrarlayan dozlarda kedi ve köpeklerde kullanılmıştır. Propofol; hızlı etki, kısa anestezi süresi ve tekrarlayan dozlarda minimal birikici etkisi nedeniyle tavşanlarda uzun süreli anestezilerde uygun ajandır⁷⁴. Hayvan çalışmalarında maske inhalasyonu günde 6 saatten, haftada beş günden fazla uygulanmamalıdır⁷⁴. Turnike uygulamasına bağlı iskemi-reperfüzyonu araştırılan hayvan deneylerinde denek olarak tavşan kullanılmasının nedeni ise, alt ekstremitedeki kas kitlesinin diğer hayvan türlerinden daha fazla olmasıdır. Tavşanlar için önerilen çevresel koşullar, 16-20 °C oda sıcaklığı, %50-60 arasında nem oranı, 14 saat aydınlık, 10 saat karanlık periyodu olarak belirlenmiştir⁷⁵.

Tablo 4. İnsan ve tavşan fizyolojisi ve biyokimyasının karşılaştırılması⁷⁶

	<i>İnsan</i>	<i>Tavşan</i>
Kan Basıncı (Sistolik/ Diastolik)	120/80 mmHg	120/80 mmHg
Kalp atım hızı	60-80/dk	180-270/dk
Solunum hızı	12-20/dk	32-60/dk
Tidal volüm	500 mL	21 mL
Dakika volümü	70-80 mL/kg	55.6-57.3 mL/kg
Rektal ısı	36.5-38.2 °C	38-41 °C
Total kan volümü	80-85 mL/kg	57.7-70 mL/kg
Hemoglobin	12-17.2 g/100 mL	12.9-13.4 g/100 mL
Eritrosit sayısı	4.70-5.20(x 10 ⁶ /mm ³)	6.26-6.30(x 10 ⁶ /mm ³)
Kan pH	7.35-7.45	7.21-7.57
pCO ₂	35-45 mmHg	20-46 mmHg
HCO ₃	24-27 mmol/L	17 mmol/L
CO ₂ konsantrasyonu	20-32 mmol/L	11-25 mmol/L
Serum glukoza	75-110 mg/dl	80-110 mg/dl
Kan üre nitrojeni	7-30 mg/dl	5-20 mg/dl
Serum sodyum	135-146 mEq/L	140-145 mEq/L
Serum potasyum	3.5-5.3 mEq/L	5-7 mEq/L
Serum klorür	96-106 mEq/L	105 mEq/L
Serum kalsiyum	8.5-10.3 mg/dl	9-12 mg/dl
Serum magnezyum	1.8-3.0 mg/dl	2.7 mg/dl
Serum fosfor	2.5-4.5 mg/dl	5-6 mg/dl
Serum protein	6-8.5 g/dl	7.2 g/dl

2.8. İnhalasyon anestezikleri ve genotoksisite

2.8.1. Genetik materyalin yapı ve özellikleri

Temelde canlılar prokaryot ve ökaryot olarak ikiye ayrılırlar. Ökaryotları prokarotlardan ayıran en önemli özellik, genetik materyallerini oluşturan kromozomların bir çekirdek zarı ile çevrili olmasıdır. Genetik bilgi çekirdek dışında, sitoplazmada bulunan mitokondrilerde bulunur. Ökaryotik hücreler her kromozomun iki kopyasını taşıdıkları için diploid, tek kromozom kopyası taşıyan prokaryotik hücreler ise haploid olarak adlandırılırlar. Bir insan genomu 22 çift otozom, bir çift cinsiyet kromozomundan oluşur⁷⁷.

Nükleik asitler protein gibi polimerik yapıya ve kalıtsal bilgi taşıma yeteneğine sahiptir. Nükleik asitlerin yapı taşı olan nükleotidler; bir fosfat grubu, riboz (RNA) ya da deoksiriboz (DNA) olarak adlandırılan beş karbonlu şeker ve şekerlerin birini karbonuna glikozidik bağla tutunmuş bazlardan oluşur. DNA, bazlar arası hidrojen bağları ile birbirine tutunmuş iki zincirden oluşur⁷⁸. Yüksek ısı ve aşırı pH derecelerinde DNA yapısı, hidrojen bağlarının çözülmesi ile tek iplikli hale geçer (denatürasyon), ancak tek iplikli DNA hidrojen bağları kurarak tekrar çift iplikli hale geçebilir (renatürasyon)⁷⁹.

2.8.2. Mutasyonlar:

DNA'da ortaya çıkan sürekli değişiklere “mutasyon”, mutasyona neden olan etkenlere ise “mutant” denir. Mutasyonlar; genom mutasyonları, kromozom mutasyonları ve gen içi mutasyonlar olarak meydana gelebilirler. Mutasyonlar ayrıca; somatik ve genetik mutasyonlar olarak ikiye ayrılır.

2.8.3. Genotoksisite:

DNA yapısında değişiklik oluşturabilen ya da kırıklara neden olabilen çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların bu yolla oluşturdukları hücresel disfonksiyonları kapsar. Bu mutasyonlar kanser gibi çeşitli bozukluk ve hastalıklara eşlik edebilir⁸⁰.

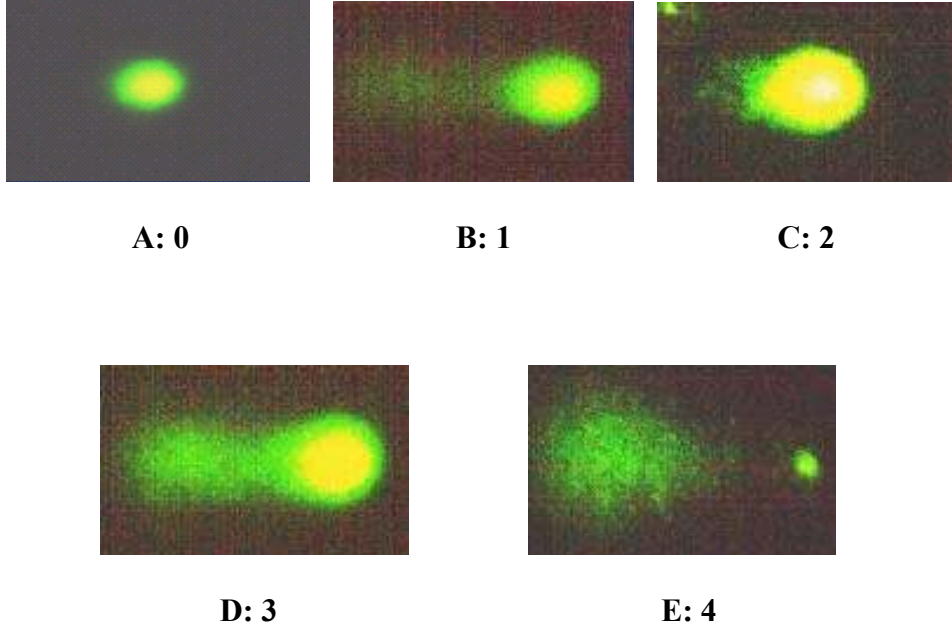
2.8.4. Anestezik gazların kromozomlara etkileri

Ameliyathanede çalışan kadınlarda; spontan abortus, artmış kanser riski, çocuklarında anomaliler, erkeklerde spermatogenez bozuklukları, kromozom yapı bozuklukları, oluşan patolojilerden bazılarıdır⁸¹. Ameliyathane ortamında DNA hasarı için en fazla suçlanan ajanlar inhalasyon anestezikleri ve nitröz oksittir^{82,83}.

2.8.5. Tek hücre jel elektroforez yöntemi

DNA hasarını araştırmada insan hücrelerinin en sık kullanıldığı testler *Sister Chromatid Exchange (SCE)* ve tek hücre jel elektroforez yöntemi (THJE) olarak da adlandırılan “comet tekniği”dir. Bu tekniklerle DNA sarmal kırıkları hassas, hızlı ve güvenilir bir şekilde saptanabilir⁸⁴⁻⁸⁶. THJE yöntemi; DNA hasar ve onarımını ve mekanizmalarını pek çok deneysel şartlarda inceleyebilir^{87,88}.

Normal lenfositler; yuvarlak, kenarları daha az yoğun olmak üzere ortada parlak görünümlü çekirdek vardır. DNA kırıklarının çekirdek dışına göçünün başlamasıyla düzensiz kenarlı bir görünüm kazanır. Hasar arttıkça lenfositler kuyruklu yıldız (*Comet*) şeklini alırlar⁸⁹. Lenfositlerde oksidatif DNA hasarı görüntüleri Resim 1’de verilmiştir.



Resim 1. Oksidatif DNA hasarı görüntüleri.

0: Normal hücre, 1: Minimal hasarlı hücre, 2: Migrasyon oluşmuş hücre, 3: Hasar ve migrasyon artmış hücre, 4: Bütünlüğünü kaybetmiş ve migrasyon uzunluğu artmış hücre.

Hasarın şiddetine göre hücrenin mikroskopik görüntüsünde merkezden kenara doğru uzama meydana gelir. Kuyruktaki floresan yoğunluğu (*Tail intensity*) hasarın derecesiyle paraleldir. Görüntü analizinde; göç etmiş hücreler kuyruk uzunluklarına (*Tail length*) göre sınıflandırılarak ayırt edilebildikleri gibi, bilgisayar sistemine sahip görüntü analiz sistemiyle kuyruktaki DNA yüzdesi (*Tail moment*) ölçülebilir⁸⁹.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından G.Ü.ET-07.040 kod numarası ile onaylanmıştır. Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 01/2007-84 kod numarası kabul edilmiş ve desteklenmiştir.

3.1. Denek seçimi

Araştırmamız etik kurul izni alındıktan sonra (25.06.2007) Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarı'nda Mart-2008'de gerçekleştirildi. Çalışmada 7 aylık 3000 ± 1000 g ağırlığında 14 adet beyaz Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. Tavşanlar en fazla ikişer adet olmak üzere standart kafeslere yerleştirildi, deney öncesi en az on gün laboratuvarında bekletildi ve standart laboratuvar diyetiyle beslendi. Onikişer saatlik gece gündüz siklusu uygulanarak ortama adapte olmaları sağlandı.

3.2. Kullanılan yöntemler

Tavşanlar rastgele birinci grup (Grup S) sevofluran, ikinci grup (Grup P) ise propofol olmak üzere iki eşit gruba ayrıldı.

Anestezi verilmek üzere hazırlanan tavşanlar tartılarak, BIS elektrotlarını ve damar kanüllerini yerleştirmek amacıyla alın ve kulak tüyleri traşlandı (Resim 2). Kulak arterinden 22G intraket (Bıçakçılar B-CAT2, İstanbul, Türkiye) ile kanülasyon yapılarak kontrol kan örnekleri alındı (Resim 3) ve invazif arter basınç sistemine bağlandı. 22 ya da 24G intraket ile marjinal kulak veninden

damar yolu açılarak 5 mL/kg/sa serum fizyolojik infüzyonuna başlandı (Resim 4). Ayarlanabilir ısıtıcı kullanılarak çalışma süresince deneklerin vücut ısısının 38-41°C arasında kalması sağlandı.



Resim 2. Tavşanın tartılması



Resim 3. Kulaktan intraarteriyel kateter yerleştirilmesi



Resim 4. Kulaktan intravenöz kanül yerleştirilmesi

Deneklerin solunum sayıları, arteriyel transducer (Sasan Medical Disposable Products pressure set, Deutschland) ile kan basınçları ve kalp atım hızları monitörize edildi (Nihon Cohden, Life Scope BSM-5135K, Japonya). Sol üst ekstremitesine puls oksimetre probu yerleştirilerek periferik oksijen saturasyonu (SpO_2) izlendi (Resim 5 ve 6). Daha önceden traşlanmış olan alına BİS probu (BİS pediatrik sensör, Aspect Medical Systems, Inc. Norwood, USA) yerleştirildi. İndüksiyon, sevofluran grubunda %100 oksijen ve %7-8 sevofluran karışımı ile inhalasyon yoluyla (Resim 7), propofol grubunda ise 1-2 mg/kg/dk infüzyona başlanarak sağlandı (Resim 8). İndüksiyonun yeterliliğine kornea refleksinin ve göz hareketlerinin kaybolması ve BİS<60 olması ile karar verildi. Sol yan pozisyona getirilen hayvanın sağ alt ekstremitesinin venöz dolaşımı esmarch bandajı ile boşaltılarak turnike uygulandı (Pediatrik manşon No:2, De Royal 200 Debusk Lane Powell, TN 37849 USA) ve 200 mmHg basınçta şişirildi (ERKA, sphygmomanometer-Germany) (Resim 9). Anestezi idamesi sevofluran grubunda %100 oksijen ile %2.5-4 sevofluran, propofol grubunda ise %100

oksijen ile 1-2 mg/kg/dk propofol infüzyonu (infüzör Baxter, ABD) ile sağlandı. Gaz karışımı açık sistemde (İntersurgical 500 mL complet respiratory systems, Wokingham Berkshire, England) 4 L/dk akım hızında, yüz maskesi (No:1, şeffaf) kullanılarak anestezi cihazından uygulandı (Dameca No:10750 /223, Denmark).



Resim 5. Puls oksimetre probunun yerleştirilmesi



Resim 6. Monitör ve anestezi cihazının genel görünümü



Resim 7. Sevofluran inhalasyonuyla indüksiyon



Resim 8. Propofol infüzyonu ile indüksiyon



Resim 9. Turnike uygulanması

Anestezi idamesi BİS %40-60 arasında tutulacak şekilde sağlandı (Resim 10 ve 11) ve SpO₂ en az %94 olacak şekilde spontan solunuma izin verildi. Cerrahi bir işlem yapılmaksızın 120. dk bekledikten sonra turnike açılarak anesteziye son verildi.

İndüksiyonun 1. (kontrol) ve 5. dk (İnd 5. dk), turnike sonrası 1 (TS 1), 5 (TS 5), 10 (TS 10), 15 (TS 15), 20 (TS 20), 25 (TS 25), 30 (TS 30), 40 (TS 40), 50 (TS 50), 60 (TS 60), 70 (TS 70), 80 (TS 80), 90 (TS 90), 100 (TS 100), 110 (TS 110), 120. (TS 120) dk ve turnike açıldıktan sonra 1(TAS 1) ve 5. (TAS 5) dk'da; kalp atım hızı (KAH), sistolik arteriyel basınç (SAB), diyastolik arteriyel basınç (DAB), ortalama arteriyel basınç (OAB), periferik oksijen satürasyonu (SpO₂) ve BİS değerleri kaydedildi. İndüksiyon öncesi deneklerin immobilizasyonu sağlanamadığı için indüksiyon öncesi kontrol ölçümleri yapılamadığından indüksiyon 1. dk değerleri kontrol değeri olarak kabul edildi. Kanülasyon sırasında alınan kontrol kan örneklerine ek olarak; turnike açılmadan önceki 120. dk'da, turnike açıldıktan sonra 15. ve 120. dk'larda arter kan örnekleri alındı. Alınan her bir kan örneği: DNA hasarı tayini için 3 mL heparinli tüplere, MDA tayini için ise 2 mL'lik EDTA'lı tüplere ayrıldı. DNA hasarı tayini için alınan kan örnekleri 24 saat içinde laboratuvar incelemesi tamamlanacak şekilde ilgili laboratuvara teslim edilirken, MDA tayini için alınanlar ise santrifüj edilip plazmaları ayrılarak -80°C'de saklandı.

Deney sonunda deneklere ötenazi uygulanmadı ve canlı olarak laboratuvara teslim edildi.



Resim 10. BIS probunun yerleştirilmesi



Resim 11. BIS monitörizasyonu

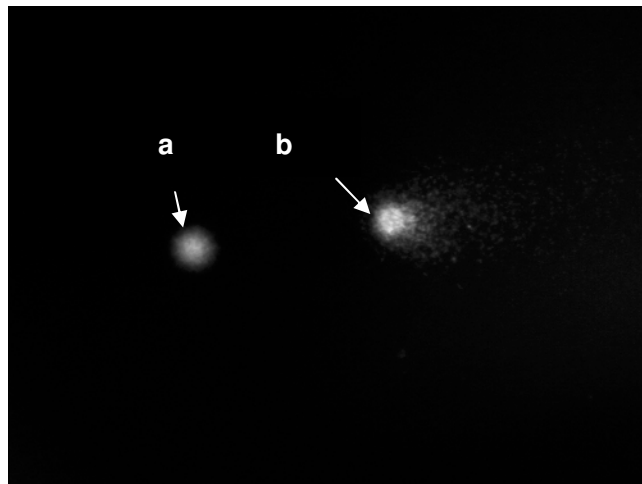
Plazma MDA düzeyi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya laboratuvarında, tiyobarbitürik asitin MDA ile reaksiyon vermesi esasına dayanan kolorimetrik yöntem uygulanarak ölçüldü⁹⁰. Glutasyon peroksidaz düzeylerinin tayini planlanarak, ilgili kit proje kapsamında alınmış ve laboratuvara teslim edilmiş olmakla birlikte, yapılan analizler sonucunda teknik problemler nedeniyle değerlendirme yapılamadığı belirtildi.

3.3. Tek hücre jel elektroforez uygulaması:

Tam kandan lenfosit izolasyonu için ependorf tüplere 1 mL Tc-199 konuldu ve heparinli kandan 150 µl eklenerek karıştırıldı. Lenfosit ayırma solüsyonu enjektörle tüpün dibinden ilave edilerek mikrosantrifüj cihazında 3000 devirde 5 dk çevirildi. Tüpte oluşan üç tabakadan ortadaki bulut görünümündeki “*buffy coat*” tabakası pipetle alınarak başka bir ependorf tüpe aktarıldı. Bu tüpe 1 mL Tc-199 ilave edilip yeniden santrifüj edilerek, lenfositlerin tüpün alt bölümünde kalması sağlandı. Lamlar Yüksek kaynama dereceli agaroz (YKA) içine batırılıp kurumaya bırakıldı. Agarozun katılaşması için buz torbası üzerinde 10 dakika bekletildi. 60 derecelik su banyosunda eritilmiş düşük kaynama dereceli agaroz (DKA)’dan 75 µl, 120 µl tam kandan elde edilen lenfositler üzerine eklenip karıştırıldı. Bu karışımın 70 µl’si pipet yardımı ile YKA’lı tabaka üzerine ilave edildi ve lamelle kapatıldı. Buz torbası üzerinde 10 dk bekletildi. Lamel kaldırılıp 70 µl DKA eklendi. Buz torbası üzerinde tekrar 10 dk bekletildi. Lameller kaldırılıp lamlar petri kutusuna alındı. Lizing solüsyonundan ilave edildi ve bir saat soğukta (+ 4°C) bekletildi. Lizing solüsyonu hazırlamak için 8.9 mL lizing solüsyonu 1 mL dimetilsülfoksit (DMSO) ve 1 µl triton çözeltisi karıştırıldı. Lamlar elektroforez tankına yerleştirilip seyreltik elektroforez tamponu ilave edildi (seyreltik elektroforez tamponu için stok elektroforez tamponundan 50 mL alınıp 500 mL’lik balon jojede distile su ile tamamlandı). Tank çalıştırılmayıp 40 dk seyreltik elektroforez tamponu içinde bekletilerek (DNA sarmalının çözülmesini sağlamak amacıyla), 25V-300mA’de cihaz çalıştırılıp 20 dk kadar işlem sürdürüldü. Böylece hasarlı DNA’nın anoda doğru

göçmesi sağlandı. Bu işlemler ek DNA hasarının oluşmasını önlemek için, yumuşatılmış sarı ışık altında gerçekleştirildi. Lamalar kuru zemine alınıp üzerlerine beşer dakika arayla üç kez nötralizasyon tamponu eklendi. Preparat üzerine, floresan renk vermesi için 50 µl ethidium bromid damlatılarak 30 dk bekletildi. Lamelle kapatılıp 30 dk bekletildi ve mikroskop ile değerlendirildi.

Lamlar Comet Görüntü Analiz Programı (COMET III, Perceptives-UK) kullanılarak floresan mikroskopta 40x büyütmede değerlendirildi. Bunun için her örnek için iki lamdan (25x2) toplam 50 hücre sayıldı. Okülere yerleştirilen mikron seviyesinde ölçüm yapabilen cetvelden yararlanılarak gerçekleştirilen mikroskopik görüntü analizinde; kuyruktaki DNA yüzdesi (*Tail moment*), göç etmiş hücrelerin kuyruk uzunlukları (*Tail length*) ve kuyruktaki floresan yoğunluğu (*Tail intensity*) incelenerek oksidatif DNA hasarı değerlendirildi (Resim 12).



Resim 12. Lenfositlerin mikroskopik görünümü, 40x. a)Normal lenfosit, b)Lenfositte DNA hasarına bağlı kuyruklu yıldız (comet) görünümü

3.3.1. Kimyasal maddeler

- Sodyum klorür (NaCl) (Merck)
- Potasyum klorür (KCl) (Merck)
- Dimetilsülfoksit (DMSO) (Merck)
- Sodyum hidroksit (Merck)
- Potasyum hidroksit (Merck)
- Fosfat tampon tabletleri (PBS) (Sigma, P-4417)
- Histopaque 1077 (Sigma, 1077-1)
- Düşük kaynama dereceli agar (LMA) (Sigma, A-4018)
- Yüksek kaynama dereceli agar (HMA) (Sigma, A-7174)
- Etilendiamin tetraasetikasit (EDTA, Sigma, ED2SS)
- Trizma Base (Sigma, T-1503)
- Triton-X 100 (Sigma, 9002-93-1)
- Etidyum Bromür (Sigma)

3.3.2. Alet ve malzemeler

- pH metre
- Terazî
- 2000 derecede sabit kalabilen mikrosantrifüj
- Elektroforez tankı (yatay jel elektroforez tankı)
- Otomatik pipet
- 515-560 nm eksitasyon filtreli, 590 nm bariyer filtreli, 100 W civa lambalı, kamera ataçmanlı fotoğraf makineli mikroskop

- Su banyosu
- Mikrosantrifüj tüpü (1.5 mL)
- Buzdolabı
- Laboratuvar saati
- Mezür, pipet, lam kutusu, lamel, petri
- Buz kutusu
- Siyah-beyaz film (100 ASA)
- Balon joje, beher, erlen
- Pens, kağıt bant

3.3.3. Çözeltiler

- Lizing solüsyonu (146.1 g NaCl, 37.2 g EDTA, 1.2 g tris, 1.3 g sodyum sarkosinat) tartılıp 1000 mL distile suda çözülüp, çözeltinin pH'sı NaOH ile 10'a ayarlandı. Her deneyde kullanılmak üzere taze olarak 17.8 mL lizing solüsyonu üzerine 0.2 mL Triton X-100 ve 2 mL DMSO ilave edilerek soğukta bekletildi.
- Nötralizasyon tamponu: 24.25 gr tris 500 mL distile suda çözülerek pH'sı 1N HCl ile 7.5'a ayarlanıp oda ısısında saklandı.
- YKA: 1 tablet PBS, 500 mg DKA, sıcak distile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.
- DKA: 1 tablet PBS, 500 mg YKA, sıcak distile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

- Stok etidyum bromid (boyama solüsyonu), 10 mg Etidyum Bromid 50 mL distile suda çözülür.
- Seyreltik etidyum bromid solüsyonu: Stok boyama solüsyonundan 1 mL alınarak, distile suyla 10 mL'ye tamamlanır. Alüminyum folyoya sarılarak karanlıkta saklanır.
- Stok elektroforez tamponu (120 g NaOH, 3.72 g EDTA), distile suyla 1000 mL'ye tamamlandı.
- Seyreltik elektroforez tamponu: Stok elektroforez tamponundan 50 Ml alınarak distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

3.4. İstatistiksel değerlendirme

İstatistiksel değerlendirmeler SPSS 15.0 bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirildi ve veriler ortalama $\pm$ standart sapma (ort $\pm$ SS), (en az-en çok) olarak sunuldu.

Grup içi kontrol değerlere göre zamana bağlı değişimler, *Paired t* testi ve *Wilcoxon-X* testiyle, gruplar arası karşılaştırmalar ise *Student's t* testi ve *Mann-Whitney U* testi ile karşılaştırıldı. *Tail moment*, *tail length* ve *tail intensity* ile MDA arasındaki ilişki ise *Pearson korelasyon analizi* ile değerlendirildi. $P<0.05$ anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda incelenen 14 denekten oluşan iki grup arasında vücut ağırlıkları bakımından fark yoktu (Tablo 5).

Tablo 5. Deneklerin ağırlıkları [Ort±SS, (en az-en çok)]

	Grup S (n=7)	Grup P (n=7)
Ağırlık (g)	2734.29±162.07 (2480-2960)	2872.86±137.56 (2600-3010)

Grupların SpO₂ değerleri hiçbir ölçüm zamanında % 94'ün altına düşmedi. BIS değerleri gerek anestezi indüksiyonunda gerekse anestezi idamesinde % 40-80 arasında kaldı.

Gruplara ait KAH ortalamaları Tablo 6'da verildi. KAH ölçümleri ile elde edilen değerler karşılaştırıldığında aynı grup içindeki ve gruplar arası verilerin benzer olduğu bulundu.

Tablo 6. KAH değerleri, atım/dk (Ort±SS).

Zaman (dk)	Grup S (n=7)	Grup P (n=7)
Kontrol	265.28±36.30	281.71±19.74
İnd 5	281.14±23.88	289.14±12.43
TS 1	285.42±26.34	282.57±36.27
TS 5	284.43±30.12	280.00±38.95
TS 10	288.57±27.34	284.57±34.10
TS 15	288.00±24.11	286.57±35.53
TS 20	301.86±48.03	290.86±28.84
TS 25	288.86±20.19	291.29±26.46
TS 30	290.29±20.41	293.00±25.75
TS 40	291.14±23.26	285.00±23.89
TS 50	289.14±22.62	286.00±24.19
TS 60	288.29±28.53	282.14±26.49
TS 70	286.57±32.18	282.29±28.74
TS 80	282.71±26.20	273.14±40.33
TS 90	282.00±25.50	277.14±31.85
TS 100	274.57±30.45	279.00±32.33
TS 110	283.57±23.11	274.14±34.73
TS 120	279.14±29.00	273.57±33.75
TAS 1	280.57±27.83	265.14±34.69
TAS 5	281.57±26.66	269.57±33.61

Sistolik arter basıncı indüksiyon sonrası 1. dk değerleri karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı fark görülmedi. İndüksiyon sonrası tekrarlı ölçümlerde kontrol değerine göre zaman içerisindeki grup içi farklılıklar araştırıldığında; Grup S’de TAS 1 SAB ortalama değerinin kontrol SAB ortalamasından anlamlı olarak düşük olduğu görüldü ($p<0.05$). Grup P’de İnd 5, TS 1, TS 5, TAS 1, TAS 5 SAB ortalama değerlerinin, kontrol SAB ortalamasından anlamlı olarak düşük olduğu görüldü ($p<0.05$). Değişik zaman dilimlerindeki SAB değerleri incelendiğinde ise; TS 80 ile TS 120 arasında Grup S’deki SAB değerleri Grup P’ye göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu ($p<0.05$) (Tablo 7).

Grupların DAB kontrol değerleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark görülmedi. Aynı grup içindeki DAB ortalama değerlerinin kontrol değere göre zaman içerisindeki farklılıkları araştırıldığında; Grup S’de TAS 1 değeri kontrol DAB ortalamasından anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.05$). Grup P’de İnd 5, TS 1, TS 5, TAS 1 ve TAS 5 DAB değerlerinin kontrolden anlamlı olarak düşük olduğu görüldü ($p<0.05$). Grupların değişik zaman dilimlerindeki DAB değerleri istatistiksel yönden incelendiğinde ise; TS 70, TS 90, TS 100 ve TS 110 DAB ölçüm değerleri Grup S’de Grup P değerlerine göre anlamlı düşük bulundu ($p<0.05$) (Tablo 8).

Tablo 7. SAB değerleri, mmHg (Ort±SS).

Zaman (dk)	Grup S (n=7)	Grup P (n=7)
Kontrol	105.71±29.15	114.19±22.14
İnd 5	110.14±22.12	98.71±22.81 *
TS 1	109.57±16.32	89.71±12.35 *
TS 5	105.57±14.08	92.71±15.11 *
TS 10	104.86±15.12	101.57±18.84
TS 15	113.00±13.28	109.71±17.38
TS 20	116.86±13.37	117.14±15.32
TS 25	119.42±9.90	115.00±13.89
TS 30	119.71±4.86	115.14±13.87
TS 40	114.86±3.93	113.71±13.43
TS 50	109.71±6.85	110.57±13.16
TS 60	103.00±8.79	111.14±12.50
TS 70	95.57±20.09	113.43±13.40
TS 80	93.86±9.97 ⁺	113.00±16.10
TS 90	88.85±17.60 ⁺	110.43±11.83
TS 100	88.00±14.97 ⁺	108.43±8.75
TS 110	86.00±11.49 ⁺	107.86±13.28
TS 120	85.43±11.39 ⁺	104.57±14.63
TAS 1	78.00±6.54 *	86.57±19.16 *
TAS 5	96.00±10.92	93.86±18.84 *

*, $p<0.05$, kontrol ile karşılaştırma, ⁺: $p<0.05$, grup P ile karşılaştırma, TS: Turnike sonrası, TAS: Turnike açıldıktan sonra

Tablo 8. DAB değerleri, mmHg (Ort±SS).

Zaman (dk)	Grup S (n=7)	Grup P (n=7)
Kontrol	80.71±25.07	88.14±17.00
İnd 5	86.42±18.62	77.29±18.95 *
TS 1	73.14±31.29	71.86±11.75 *
TS 5	80.43±14.31	74.00±15.74 *
TS 10	76.29±21.68	80.29±17.14
TS 15	85.71±11.24	84.00±17.76
TS 20	89.86±10.95	87.86±13.38
TS 25	91.43±8.36	90.71±18.40
TS 30	90.86±4.95	89.57±12.96
TS 40	86.00±3.06	89.71±11.83
TS 50	83.00±4.16	84.86±13.32
TS 60	77.86±4.67	83.14±16.55
TS 70	74.57±5.56 ⁺	89.71±14.15
TS 80	71.43±11.80	86.57±14.37
TS 90	67.57±15.18 ⁺	84.43±12.48
TS 100	65.43±15.40 ⁺	81.57±8.42
TS 110	63.43±11.31 ⁺	79.00±12.00
TS 120	64.00±13.98	74.29±11.97
TAS 1	52.71±8.99 *	60.29±20.06 *
TAS 5	70.00±9.13	69.71±14.09 *

*: $p<0.05$, kontrol değeri ile karşılaştırma, ⁺: $p<0.05$, grup P ile karşılaştırma, TS: Turnike sonrası, TAS: Turnike aıldıkdan sonra

Grupların OAB kontrol değerleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark görülmedi. Kontrol değere göre zaman içerisindeki grup içi farklılıklar araştırıldığında; Grup S’de TAS 1’in anlamlı olarak düşük olduğu bulundu ($p<0.05$). Grup P’de İnd 5, TS 1, TS 5, TAS 1 ve TAS 5 değerlerinin anlamlı olarak düşük olduğu görüldü ($p<0.05$). Grupların zamana bağlı OAB değişiklikleri istatistiksel yönden incelendiğinde ise; TS 70 ile TS 110. arasında Grup S değerleri Grup P değerlerinden anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.05$) (Tablo 9).

Tablo 9. OAB değerleri, mmHg (Ort±SS).

Zaman (dk)	Grup S (n=7)	Grup P (n=7)
Kontrol	994.57±23.59	98.14±18.31
İnd 5	96.71±20.20	85.00±20.58 *
TS 1	95.57±16.59	77.57±12.83 *
TS 5	90.86±15.83	81.14±15.31 *
TS 10	90.00±15.78	88.14±18.13
TS 15	96.86±12.19	97.86±21.78
TS 20	88.14±36.62	100.29±14.82
TS 25	102.57±9.38	98.71±14.16
TS 30	102.57±4.35	100.57±13.30
TS 40	97.14±2.19	99.14±11.32
TS 50	92.71±4.42	95.00±13.39
TS 60	87.00±6.11	93.14±15.25
TS 70	84.14±7.45 ⁺	98.86±13.38
TS 80	80.29±11.56 ⁺	96.29±15.01
TS 90	76.71±17.23 ⁺	94.57±11.47
TS 100	74.43±15.48 ⁺	93.43±7.76
TS 110	71.71±11.66 ⁺	90.00±12.21
TS 120	73.14±13.52	86.71±12.62
TAS 1	62.14±8.15 *	70.14±19.92 *
TAS 5	80.33±7.89	79.14±14.90 *

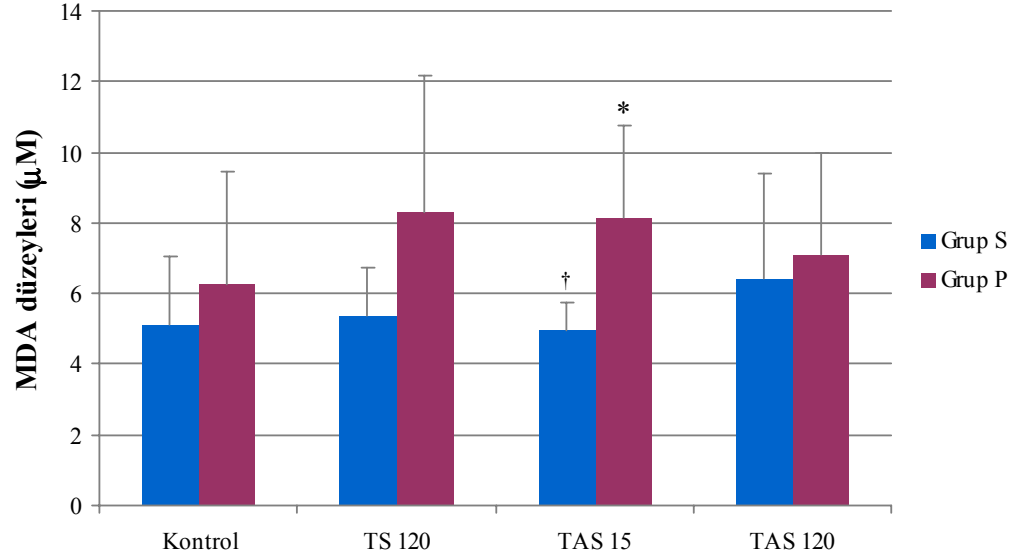
*: $p<0.05$, kontrol ile karşılaştırma, ⁺: $p<0.05$, grup P ile karşılaştırma, TS: Turnike sonrası, TAS: Turnike açıldıktan sonra

Grupların ortalama MDA kontrol değerleri arasında gruplar arası fark bulunmadı. Grup içi kontrol değere göre grup içi zamana bağlı değişiklikler araştırıldığında; Grup S’de MDA ortalama değerlerinin istatistiksel olarak farklı olmadığı görüldü. Grup P’de TAS 15 MDA değerinin, kontrol MDA değerinden anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü ($p<0.05$). Grupların değişik zaman dilimlerindeki MDA değerleri istatistiksel yönden incelendiğinde ise; gruplar arasında istatistiksel fark vardı ($p<0.05$). Grup S’deki TAS 15 MDA lm değeri Grup P’ye göre anlamlı düşük bulundu ($p<0.05$) (Tablo 10) (şekil 4).

Tablo 10. MDA düzeyleri (μM) [Ort $\pm$ SS, (en az-en çok)]

Zaman (dk)	Grup S (n=7)	Grup P (n=7)
Kontrol	5.10 $\pm$ 1.94 (1.53-7.24)	6.26 $\pm$ 3.19 (3.32-13.05)
TS 120	5.40 $\pm$ 1.36 (3.43-7.12)	8.32 $\pm$ 3.86 (4.55-14.28)
TAS 15	4.98 $\pm$ 0.77 ⁺ (4.22-6.12)	8.15 $\pm$ 2.61 [*] (5.45-13.39)
TAS 120	6.40 $\pm$ 3.00 (2.76-12.16)	7.09 $\pm$ 2.91 (3.88-11.37)

*: $p<0.05$, kontrol ile karşılaştırma, ⁺: $p<0.05$, grup P ile karşılaştırma, TS: Turnike sonrası, TAS: Turnike açıldıktan sonra



Şekil 4. MDA düzeyleri (Ort±SS).

*: $p<0.05$, kontrol ile karşılaştırma, †: $p<0.05$, grup P ile karşılaştırma, TS: Turnike sonrası, TAS: Turnike açıldıktan sonra

Sayılan 50 hücredeki *tail moment* ortalamalarının kontrol değerleri arasında iki grup arasında fark bulunmadı. Kontrol değere göre zamana bağlı grup içi farklılıklar araştırıldığında; Grup S’de, TAS 120 ölçümünde, Grup P’de TAS 15 ölçümde istatistiksel olarak önemli farklılıklar saptandı ($p<0.05$). Zamana bağlı değişimler açısından karşılaştırıldığında ise; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmedi (Tablo 11).

Tablo 11. Tail moment değerleri, 50 hücrede [Ort±SS, (en az-en çok)].

Zaman (dk)	Grup S (n=7)	Grup P (n=7)
Kontrol	0.75±0.27 (0.36-1.17)	0.63±0.27 (0.29-1.17)
TS 120	1.12±0.38 * (0.77-1.86)	1.80±1.72 (0.58-5.32)
TAS 15	1.51±1.70 (0.51-5.34)	1.05±0.45 * (0.50-1.90)
TAS 120	1.12±0.68 (0.65-2.63)	1.06±0.56 (0.51-1.89)

*: $p<0.05$, kontrol ile karşılaştırma, TS: Turnike sonrası, TAS: Turnike açıldıktan sonra

Gruplara ait *tail length* ortalamaları Tablo 12’de verildi. *Tail length* ölçümleri karşılaştırıldığında, grupların kontrol değerleri arasında, grup içi değişikliklerde ve gruplar arasında herhangi bir anlamlı farklılık bulunmadı.

Tablo 12. Tail length değerleri, 50 hücrede [Ort±SS, (en az-en çok)].

Zaman (dk)	Grup S (n=7)	Grup P (n=7)
Kontrol	25.19±1.88 (22.93-28.81)	25.25±3.55 (22.10-32.87)
TS 120	30.34±9.79 (24.98-52.23)	35.10±18.05 (23.66-71.39)
TAS 15	34.46±24.90 (23.61-90.89)	27.69±7.73 (21.77-44.36)
TAS 120	29.13±9.51 (21.99-49.89)	26.22±5.28 (21.11-36.68)

TS: Turnike sonrası, TAS: Turnike açıldıktan sonra

Tail intensity ortalamalarında, grupların kontrol değerleri arasında fark bulunmadı. Kontrol değere göre zaman içerisindeki grup içi farklılıklar araştırıldığında; Grup S’de TS 120 değerinde, Grup P’de ise TAS 15 değerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulundu ($p<0.05$). Zaman içerisindeki değişimler açısından değerler gruplar arasında karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmedi (Tablo 13).

Tablo 13. Tail intensity değerleri, 50 hücrede [Ort±SS, (en az-en çok)]

Zaman (dk)	Grup S (n=7)	Grup P (n=7)
Kontrol	4.55±1.37 (2.43-6.76)	3.76±1.26 (1.73-6.07)
TS 120	6.14±1.48* (4.41-8.62)	7.53±4.23 (3.53-14.43)
TAS 15	7.47±5.96 (3.52-20.76)	5.33±1.56 * (3.33-8.42)
TAS 120	6.15±3.35 (3.83-13.53)	5.45±2.09 (3.38-8.85)

*: $p<0.05$, kontrol ile karşılaştırma, TS: Turnike sonrası, TAS: Turnike açıldıktan sonra

Tail moment ile MDA arasındaki korelasyona bakıldığında sevofluran grubunda TAS 15 değerlerinde ters yönde, TAS 120 değerlerinde ise aynı yönde korelasyon izlendi (Tablo 14).

Tablo 14. MDA ve tail moment korelasyonu

Zaman (dk)	Grup S (n=7)	Grup P (n=7)
Kontrol	r= .223 p=0.630	r= -.079 p=0.867
TS 120	r= -.404 p=0.369	r= -.554 p=0.197
TAS 15	r= -.792 * p=0.034	r= .087 p=0.854
TAS 120	r= .832 * p=0.020	r= .243 p=0.600

Çalışma gruplarında, MDA ve *tail length* değerleri arasında herhangi bir korelasyon saptanmadı (Tablo 15).

Tablo 15. MDA ve tail length korelasyonu

Zaman (dk)	Grup S (n=7)	Grup P (n=7)
Kontrol	r= 092 p=0.845	r= -.068 p=0.885
TS 120	r= 038 p=0.936	r= 486 p=0.269
TAS 15	r= -.380 p=0.400	r= -.034 p=0.942
TAS 120	r= 717 p=0.070	r= 142 p=0.761

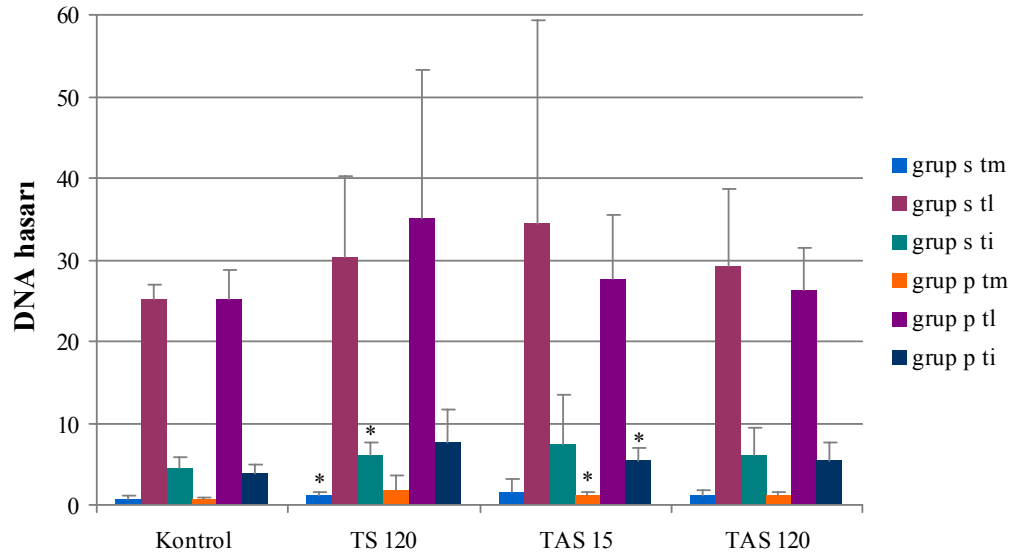
TS: Turnike sonrası, TAS: Turnike açıldıktan sonra

MDA ile *tail intensity* arasındaki korelasyona bakıldığında sevofluran grubunda TAS 120 değerlerinde aynı yönde korelasyon izlendi (Tablo 16).

Tablo 16. MDA ve tail intensity korelasyonu

Zaman (dk)	Grup S (n=7)	Grup P (n=7)
Kontrol	r= 250 p=0.589	r= -043 p=0.928
TS 120	r= -574 p=0.178	r= 536 p=0.215
TAS 15	r= -405 p=0.367	r= 145 p=0.756
TAS 120	r= 817 * p=0.025	r= 475 p=0.281

Grupların DNA hasarı ile *tail moment*, *tail length* ve *tail intensity* korelasyonları şekil 5’te verilmiştir.



Şekil 5. DNA hasarı (tail moment, tail length ve tail intensity).

*: $p < 0.05$, kontrol ile karşılaştırma, +: $p < 0.05$, grup P ile karşılaştırma, TS: Turnike sonrası, TAS: Turnike açıldıktan sonra, tm: tail moment, tl: tail length, ti: tail intensity.

5. TARTIŞMA

Aerobik metabolizma sırasında üretilen ve endojen olarak tüketilen “serbest oksijen radikallerinin üretim ve tüketimi arasındaki denge bozukluğu” ile ortaya çıkan “oksidatif stres”, hücre membranının bozulmasını takip eden “DNA hasarı” ile sonuçlanabilir⁷⁰. Oksidatif stres sürecinde meydana gelen serbest radikallerin meydana getirdiği “lipid peroksidasyonu” ise biyolojik membranların yapısını bozarak MDA gibi toksik metabolitler üretir⁶⁹.

Çalışmamızdaki özellikle reperfüzyon döneminde ve propofol verilen deneklerde olmak üzere, İR’ye bağlı MDA artışı meydana gelmiştir. Propofol grubundaki bu artış reperfüzyonun 15. dakikasında hem başlangıç değerinden ($6.26 \pm 3.19 \mu\text{M}$) hem de sevofluran grubundan ($4.98 \pm 0.77 \mu\text{M}$) belirgin olarak yüksek bulundu ($8.15 \pm 2.61 \mu\text{M}$). Sevofluran uygulamasında turnike sonrası İR’ye bağlı lipid peroksidasyonunu reperfüzyon döneminde propofolde olduğundan daha iyi baskılanabildiği gözlemlendi.

Anestezikler vücuda yabancı kimyasal bileşikler olan ksenobiyotiklerdendir. Birçok ksenobiyotik gibi anestezikler de esas olarak karaciğerde yüksek aktiviteye sahip olan mikrozomal enzim sisteminde metabolize olurlar ve genellikle ana bileşiğe göre daha az toksik olan metabolitlere dönüşürler⁵⁶.

Oksidatif DNA hasarı yaptığı bilinen sevofluranın, çeşitli organlar üzerindeki etkileri belirlenmiş olmakla birlikte, genetik materyalle etkileşiminin mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır. Ancak bu genotoksik etkinin sevofluranın karbondioksit absorbanlarıyla etkileşmesi sonucunda oluşturduğu

vinil eter yapısındaki Compound A'dan ileri geldiği düşünülmektedir^{55,56}. Compound A ile memeli hücrelerinde yapılan tek sitogenetik çalışma olan Eger ve ark.⁹¹ tarafından hamster over hücrelerinde yapılan çalışmada ise sevofluranın toksik metaboliti Compound A'nın yaptığı DNA hasarından söz edilmektedir. Sevofluranın genotoksik etkisi, Compound A'nın DNA molekülüne bağlanarak yapısal değişiklikler meydana getirebilme özelliğiyle açıklanmaktadır. Compound A'nın yüksek reaktif yapısı nedeniyle elektrofilik bileşikler oluşturuucu etkisi, alkilleyici ajanların, makromoleküllerin nükleofilik merkezine afinite gösterme özelliklerine bağlanabilir. Ayrıca Compound A'nın bir makromolekül olan DNA'ya da bağlanabileceği sonucuna varılmıştır. Ancak diğer taraftan, Compound A ile SCE'de önemli artış olmasına rağmen, pozitif kontroller ile karşılaştırıldığında bu artışın önemsiz olduğu iddia edilmektedir.

Bizim çalışmamızda DNA hasarını gösteren *tail moment* ve *tail intensity* değerleri propofol ve sevofluran gruplarında zaman içinde artmış olarak bulundu. Bu artışların önemli ve birbiriyle eşzamanlı oldukları gözlemlendi. Bu değişimlere bağlı olarak meydana geldiği ortaya konulan oksidatif DNA hasarı gerek iskemi gerekse reperfüzyon döneminde, sevofluran ve propofol gruplarında benzer özellikteydi. Ancak anestezi uygulamamızda kullandığımız açık anestezi sisteminde karbondioksit absorbanı bulunmadığından, sevofluran uyguladığımız deneklerde meydana gelen oksidatif DNA hasarının Compound A ile ilişkisi olmadığını düşünüyoruz.

Bir anestezik ajan olan 2,6-diizopropilfenol yapısındaki propofolün bütülen hidroksitoluen (BHT) ve E vitamini gibi fenol bazlı radikal

temizleyicilere kimyasal olarak benzemesi, propofolün de radikal temizleyici özelliği olabileceğini düşündürmektedir. Plazmada çok düşük miktarlarda bulunsa bile hücre membranının lipofilik bölgelerini oksidan strese karşı koruyabilen E vitamininin doku konsantrasyonunun artması için uzun süre geçmesi gerekir. Halbuki propofol kısa süreli uygulansa bile lipofilik membranlarda birikerek dokuların antioksidan savunmasını artırabilmektedir. Aynı çalışmada deneysel koşullarda, propofolün E vitaminine benzer şekilde molekül başına iki radikal temizlediği ileri sürülmüştür⁶⁶.

Propofol gibi fenol bazlı antioksidanlar (R-OH), serbest radikalleri temizlerken bir hidrojen kaybeder ve böylece kendileri fenoksil radikaline (R-O[•]) dönüşürler⁶⁶. Oluşan fenoksil radikali, üzerindeki serbest elektron fenol halkası üzerine dağıldığı için yeni radikaller oluşturacak kadar reaktif değildir.

Mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber İR harabiyetine serbest radikaller neden olmaktadır. Reperfüzyona bağlı oluşan oksijen radikallerinin oksidatif DNA hasarı oluşturarak DNA kırılmalarına yol açtığı belirtilmiştir^{7,92}. İR'nin söz konusu olmadığı klinik ve deneysel çalışmalarda, sevofluranın geçici DNA hasarı yaptığı^{8,9}, propofolün ise bu hasarı azalttığı gösterilmiştir¹⁰. Ancak İR'ye bağlı ortaya çıkan oksidatif stres ile ilişkili DNA hasarı üzerinde anesteziğin ne gibi etkiler oluşturdukları henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada tavşanlarda, turnike ile oluşturulan alt ekstremitte İR hasarı ve bu hasarın DNA ile ilişkisini, ek olarak bu ilişki üzerinde farklı iki anesteziğin etkilerini araştırdık. Deneklerimizde cerrahi işlem yapılmaksızın, iskemi oluşturmak için turnike uygulanmış ve karşılaştırılan anesteziğin ajanlar gruplara

tek başına verilmiştir. Bu şekilde turnikeye bağlı meydana gelen İR hasarı üzerinde cerrahinin ve klinik uygulamalarda eklenmesi zorunlu olan diğer anestezi ajanlarının olası etkileri engellenebilmiş ve izole olarak sevofluran ve propofolün etkileri araştırılmıştır.

Çalışmamızda propofol ve sevofluranın antioksidan etkinliğini göstermek için, serbest oksijen radikallerinin neden olduğu lipid peroksidasyonunun bir ürünü olarak oluşan MDA düzeyi değerlendirilmiştir. Antioksidan etkinliği araştıran pek çok çalışmada, tiyobarbitürik asit reaksiyonları üzerinden değerlendirilen MDA düzeylerindeki artış, serbest oksijen radikallerindeki artışın dolaylı göstergesi olarak kabul edilmiştir. Bu tez çalışmamızda da sevofluran ve propofolün lipid peroksidasyonunu artırıcı etkileri olduğu ve özellikle sevofluran verilmesi durumunda bu etkilerin oksidatif DNA hasarı ile paralel olduğu ortaya konulabilmiştir.

Musacchio ve Rizzoli⁶⁹, rat karaciğer mitokondrisi, mikrozomları ve beyin sinaptozomlarında yaptıkları in vitro çalışmalarında propofolün, en az BHT kadar antioksidan etkisinin olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada propofolün MDA'yı %50 inhibe edebilen konsantrasyonu 1.1 µM, BHT'nin 1.6 µM olarak bulunmuştur. Plazmada propofolün serbest anestezi konsantrasyonu bu dozun üzerinde olduğu için in vivo koşullarda da etkili olabilmesi beklenir.

Green ve ark⁶⁷, propofolün antioksidan özelliğini BHT ile karşılaştırdıkları çalışmalarında aköz süspansiyonlarda propofolün MDA oluşumunu inhibe etme ve radikal temizleme yönünden BHT'den daha etkili

olduğunu belirtmişlerdir. Diğer taraftan, propofolün serbest radikallerin yanı sıra peroksinitritleri de temizlediği gösterilmiştir⁹³.

Murphy ve ark⁹⁴, rat karaciğer mikrozomlarında propofol anestezisinin E vitaminindeki radikal temizleyici etkiye benzer bir aktivitesinin olup olmadığını araştırmışlardır. Daha önce in vitro koşullarda antioksidan etkinliği gösterilmiş olan propofolün anestezi dozlarının, Fe⁺⁺ aracılı lipid peroksidasyonuna karşı karaciğer mikrozomlarının direncini artırdığı gösterilmiştir. Bolus dozda en yüksek olan bu etkinin, 60 dakikalık sürekli infüzyonla daha az belirgin olduğu belirtilmiştir. Bu değişkenlik propofol klirensine bağlı olarak kan ve doku konsantrasyonlarındaki değişimlerine bağlanabilir.

De La Cruz ve ark⁹⁵, etomidat, tiyopental ve propofolün sıçanlarda oksidatif stres üzerine in vitro etkilerini karşılaştırdıkları araştırmada, propofolün konsantrasyona bağlı olarak tiyobarbitürik asite reaktif maddelerin oluşumunu inhibe ettiğini, tiyopental ve etomidatın ise herhangi bir etkisi olmadığını belirtmişlerdir. Aynı çalışmada propofolün GPX aktivitesini azaltırken, glutatyon redüktaz ve transferaz aktivitelerini artırdığı izlenmiştir. Sonuçta propofolün sadece lipid peroksidasyonunu inhibe etmediği aynı zamanda hücrenin antioksidan savunma sistemi olan glutatyon sistemini de güçlendirdiği ileri sürülmüştür. Çalışmamızda ise, GPX düzeyleri üzerinden antioksidan savunma sistemlerinin değerlendirilmesi planlanmışsa da, teknik problemler nedeniyle deneklerden aldığımız kan örneklerinin laboratuvar değerlendirilmesi mümkün olamamıştır.

Bir çalışmada serbest radikal ürünleri ve lipid peroksidasyonunun, turnikenin açılmasını takiben sadece propofol tarafından engellenebildiği, propofol ve halotan gruplarında MDA seviyeleri başlangıç değerlerine göre azalmakla birlikte, yalnızca propofol grubunda önemli azalma izlenmiştir⁵. Propofol ile MDA düzeylerinin azaldığı bu çalışmaya karşın antioksidan özelliği bilinen propofol ve ketamin uygulansa bile MDA düzeylerindeki artışın devam ettiğini gösteren araştırmalar da mevcuttur^{4,96, 97}.

Concannon ve ark⁹⁶, tümüne ketamin anestezisi uyguladıkları tavşanlarda, değişik turnike ve ara reperfüzyon dönemleri uyguladıktan iki saat sonra tüm gruplarda İR hasarına bağlı olarak MDA'nın belirgin olarak yükseldiğini göstermişler. Bir başka çalışmada alt ekstremitte cerrahisinde turnike uygulanan olgularda ketaminin etkileri araştırılmış ve doku MDA ile hipoksantin düzeylerindeki artış ketamin uygulamasıyla daha iyi baskılanabilmiş, böylece ketaminin antioksidan etkisi olabileceği sonucuna varılmıştır⁹⁷. Kahraman ve ark⁴ da, propofol ile izofluranı karşılaştırdıkları çalışmalarında reperfüzyondan 45 dk sonra propofol gruplarında daha az olmak üzere MDA konsantrasyonlarının %47 oranında arttığını göstermişlerdir. Bu örneklerde, antioksidan özelliği bilinen ilaçlar olan ketamin ve propofol uygulansa bile İR döneminde oksidatif stresin tam olarak baskılanamadığı görülmektedir.

Çalışmamızda da propofol grubunda daha belirgin olmak üzere her iki grupta da MDA değerlerinde artış izlenmiştir. Propofol grubundaki bu artış reperfüzyonun 15. dakikasında ($8.15 \pm 2.61 \mu\text{M}$) hem başlangıç değerinden ($6.26 \pm 3.19 \mu\text{M}$) hem de sevofluran grubundan ($4.98 \pm 0.77 \mu\text{M}$) belirgin olarak

yüksek bulundu. Propofol grubundaki bu belirgin artış başlangıç değerine göre %30 oranındaydı. Sevofluran uygulamasında turnike sonrası İR'ye bağlı lipid peroksidasyonunun propofolde olduğundan daha iyi baskılanabildiği gözlemlendi.

Malondialdehit analizlerinin plazmada gerçekleştirildiği bu çalışmada, sevofluran ve propofolün iskemi döneminde lipid peroksidasyonu üzerindeki etkileri benzer bulunmuştur. Ancak çalışmamızda plazma MDA analizleri yanı sıra iskemik dokuda MDA incelemelerinin yapılmamış olması iskemi dönemindeki bulgularımızı kısıtlamakla birlikte, reperfüzyon sürecinde elde ettiğimiz sonuçların etkilenmeyeceği açıktır.

Klinik çalışmalarda propofol kullanıldığında, MDA değişikliklerindeki bu farklılıklar, propofolün yanı sıra verilen diğer anesteziik ilaçlardan ve yapılan cerrahi işlemlerden kaynaklanıyor olabilir. Kahraman ve ark⁴'nın çalışmasında izofluranın yanı sıra fentanil, tiyopental ve veküronyum kullanılırken, propofol grubunda ise fentanil ve veküronyum verildiği dikkati çekmektedir. Yine diğer çalışmada⁵ da halotan grubunda fentanil, tiyopental ve veküronyum, propofol grubunda da fentanil ve veküronyum kullanılmış⁵ olması bu görüşü desteklemektedir. Ek olarak bu iki çalışmanın her ikisinde de, çalışmamızda olduğunun tersine, hastalara cerrahi işlemler uygulanmıştır. Cerrahinin oksidatif stres oluşturuıcı etkisi bilinmektedir⁹⁸. Bu nedenle ideal koşulların sağlanmaya çalışıldığı deneysel araştırmamızda, cerrahi etkiyi ortadan kaldırarak tek ajan olarak kullandığımız sevofluran ve propofolün oksidatif strese etkinliğini daha güvenilir koşullarda değerlendirdik.

Plazma propofol konsantrasyonları ile antioksidan etki arasında her zaman tam bir korelasyon gözlenmemektedir^{99,100}. Propofolün insanda kullanımı sırasındaki klinik kan konsantrasyonu 0.7-20 µg/mL'dir. Green ve ark⁶⁷ ile Ebel ve ark¹⁰¹ propofolün antioksidan etkinliğinin doz bağımlı olduğunu ve anestezide terapötik olarak kullanılan dozlardan daha yüksek konsantrasyonların sağlanması gerektiğini ileri sürmüşlerdir. Murphy ve ark¹⁰² ise yaptıkları in vitro çalışmada klinik kan konsantrasyonu ile uyumlu olarak 2.2 ve 8.8 µg/mL dozda propofolün eritrositleri antioksidan strese karşı koruyabildiğini belirtmişlerdir. Cheng ve ark¹'nin yaptıkları bir çalışmada ise spinal anestezi altındaki hastalara düşük doz propofol infüzyonu uygulandığında bile reperfüzyona bağlı oluşan ROS ürünlerinin azaldığı gösterilmiştir. Ancak bu çalışmada kontrol grubuna midazolam uygulandığı, iskemi süresinin 70 dk ile sınırlı olduğu dikkati çekmektedir. Ek olarak spinal anestezi yönteminin ve bu amaçla verilen lokal anestezi ilacın da sonuçlar üzerine etkisi olabilir.

Murphy ve ark'nın¹⁰² in vitro çalışmalarında propofol ile tiyopental karşılaştırılmış ve propofolün eritrositleri oksidatif strese karşı daha iyi koruduğu sonucuna varılmıştır. *In vitro* ve *in vivo* deneysel çalışmalarda^{96,102} propofolün antioksidan etkinliği gösterilmiş olmasına rağmen klinik kullanımdaki kan konsantrasyonlarındaki etkisi hala araştırma konusudur. Sonuç olarak propofolün henüz netlik kazanmamış olan bu antioksidan etkisinin klinik olarak da gösterilmesi gerektiği vurgulanmıştır.

İskemi-reperfüzyon koşulları olmaksızın histerektomi operasyonu için propofol-remifentanil ve sevofluran-N₂O uygulanan hastalarda yapılan bir başka

çalışmada, klinik uygulama dozlarında propofol-remifentanil kombinasyonunun oksidatif strese etkisinin olmadığı ancak sevofluranın eritrositleri oksidatif strese karşı koruyabildiği ileri sürülmüştür⁶¹.

Bazı çalışmalarda^{3,103} propofol ve sevofluranın antioksidan özelliklerinin, desflurandan daha fazla olduğu belirtilmektedir. Allaouchiche ve ark³, turnike uygulamasının sözkonusu olmadığı ve herhangi bir cerrahi işlem yapılmayan deneysel hayvan çalışmasında; propofol, sevofluran ve desfluranın oksidatif strese etkisini araştırmışlar ve desfluranın oksidatif stresi artırdığını, buna karşın sevofluranın bir değişiklik oluşturmadığını bulmuşlardır. MDA düzeyleri desfluranda artmış, propofolde azalmış ve sevofluran grubunda ise değişiklik olmamıştır. Yine aynı çalışmada GPX aktivitesi MDA düzeylerindeki değişikliklerle korele olarak, desfluranda azalırken propofolde belirgin olarak artmış ve sevofluran grubunda ise değişmemiştir. Köksal ve ark¹⁰³ ise, sevofluran ve desfluranın lipid peroksidasyonu üzerine etkilerini karşılaştırdıkları çalışmalarında hastalardan alınan bronko alveoler lavaj örneklerinde MDA ve SOD değerlerini karşılaştırmışlardır. Desfluran grubunda MDA düzeylerinin sevofluran grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu, SOD değerlerinde ise anlamlı fark olmadığı, sonuç olarak desfluranın sevoflurana göre lipid peroksidasyonunu artırdığını bildirmişlerdir.

Her ne kadar bu iki çalışmada İR koşulları oluşturulmamışsa da sevofluranın lipid peroksidasyonunu artırmadığı belirtilmektedir. Bu veriler paralelinde, turnike uygulayarak İR koşulları oluşturduğumuz çalışmamızda da

sevofluranın lipid peroksidasyonunu propofolden daha iyi kontrol altında tutabildiğini gözledik.

Bazı hayvan çalışmalarında^{104,105} İR'ye bağlı reperfüzyon döneminde oluşan oksijen radikallerinin DNA hasarı oluşturduğu belirtilmiştir. İrritasyon, iyonize radyasyon, hiperbarik oksijen tedavisi ve fiziksel egzersiz gibi nedenlerle insanlarda oksidatif DNA hasarına neden olan oksijen radikalleri olduğu bilinmesine karşın, sadece birkaç çalışmada^{7,92} reperfüzyon sırasında meydana gelen oksijen radikallerinin DNA hasarı oluşturduğu gösterilmiştir.

Willy ve ark'nın⁷ insan lökositlerindeki çalışmalarında, reperfüzyon süresince meydana gelen SOR'daki artış ile oksidatif DNA hasarı arasında önemli bir paralellik olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada insan lökositlerinde çalışmamızda da kullanılan THJE tekniğiyle, turnike iskemisinin oksidatif yanıt ve DNA hasarını indüklemesi araştırılmış, DNA hasarının turnike açılmasından 5-30 dk sonra belirgin olarak meydana geldiği gösterilmiş ve iki saat sonra bu hasarın başlangıç değere dönemese de azaldığı ortaya konmuştur. Bu çalışmada, oksidatif cevap DNA hasarı ile eşzamanlı olarak artmış olduğundan, reperfüzyon sırasında artan serbest oksijen radikallerinin DNA hasarı oluşturma potansiyeline sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Diğer bir çalışmada da akut miyokard infarktüsü nedeniyle başarılı tromboliz uygulandıktan sonra kaybedilen hastalarda postmortem reperfüze miyokard örnekleri incelendiğinde DNA kırılmaları tespit edilmiştir⁹².

Bir hayvan çalışmasında bir saatlik serebral arter oklüzyonunun ardından bir dakika reperfüzyon uygulandıktan sonra nöronlarda DNA tek kol kırıklarının

oluştugu gözlenmiştir¹⁰⁶. Başka bir çalışmada farelerde 30 dakikalık ön beyin iskemisinden 15 dakika sonra ve reperfüzyondan 60 dakika sonra DNA’da tek kol kırıklarının belirgin derecede artmış olduğu tespit edilmiştir¹⁰⁷. Bu çalışmalara göre İR sürecinin DNA’ya etkileri, iskeminin ortadan kalkmasından 1-6 saat sonra en yüksek değere ulaşmış ve 4-24 saat sonra azalarak bazal değerine dönmüştür^{106,107}.

Literatürde yer alan çalışmalara göre, oksijen radikalleri aracılığıyla DNA hasarı yapan ajanların birbirleriyle karmaşık etkileşimleri insan lökositlerinde THJE (*comet*) testi kullanılarak gösterilebilir. Singh ve ark¹⁰⁸ tarafından tanımlanan bu test; hızlı, güvenilir, basit ve DNA hasarını saptamada duyarlı bir tekniktir. DNA hasarı ve onarımını göstermek için, biyomonitörizasyonda ve genotoksisiteyi saptamada kullanılan bu teknikle, DNA’nın tek kolundaki hasarın bile saptanması mümkündür⁸. Bu teknik çeşitli somatik hücrelerde uygulanabilmekle birlikte, elde edilmesi daha kolay olduğundan ve daha fazla laboratuvar deneyimimiz bulunduğundan DNA hasarını saptayabilmek için periferik kandan elde edilen lenfositleri incelemeyi tercih ettik. Genotoksisite testi için alınan kan örneklerinin aynı gün içinde ilgili laboratuvarde değerlendirilmesi sağlanarak bekleme süresine bağlı oluşabilecek DNA hasarı artışından kaçınılmıştır.

In vivo ve *in vitro* yapılan çalışmaların sonucunda inhalasyon anesteziklerinin taşıdığı genotoksik potansiyel nedeniyle DNA hasarı meydana getirdikleri ortaya konmuştur^{109,110}. Halojenli inhalasyon anestezikleri “*The International Agency for Research on Cancer (IARC)*” in sınıflandırmasına göre

insanlardaki karsinojenik etkileri yönünden “*sınıflandırılmayan*” bileşiklerdir. Bu tanımlama; “*inhalasyon anesteziklerinin karsinojenik oldukları da karsinojenik olmadıkları da söylenemez*” anlamı taşır. İnhalasyon anesteziklerinden izofluran ve halotanın orta derecede genotoksik potansiyel etkisi gösterilmiş olmakla birlikte klinik pratiğe daha sonra giren sevofluranın potansiyel genotoksik etkisinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Genotoksik aktivite her üçünde de periferik lenfositlerde *THJE* tekniği ile değerlendirilmiştir¹¹¹. Bu bileşiklerin toksik etkilerini, hücresel protein ve lipidler gibi makromoleküllere kovalant olarak bağlanan reaktif metabolitleri aracılığı ile gösterdikleri bilinmektedir. Bu metabolitler aynı zamanda DNA’ya da bağlanabilmektedirler¹¹².

Şardaş ve ark¹¹³, izofluran anestezisi verilen hastalarda *THJE* (*alkalin comet*) tekniği ile DNA hasarını araştırmışlar; kuyruklu yıldız (*comet*) görünümlü hücre sayısının anestezinin 60. dk’da anlamlı olarak arttığını, 120. dk’da en yüksek değerlere ulaştığını, artmış olan bu hücrelerin postoperatif 1. ve 3. gün azalmaya başladığını, 5. gün ise anestezisi öncesi değerlere dönebildiğini saptamışlardır. Aynı çalışmada izofluran uygulanan hastaların periferik kan lenfositlerinde geçici DNA hasarının meydana geldiği sonucuna varılmıştır.

Robbiano ve ark’ın¹¹⁴ yaptıkları çalışmada, sevofluranın genotoksik etkisi mikroçekirdek yöntemi ile incelenmiş ve sevoflurana maruz kalan sıçanların böbrek hücrelerinde mikroçekirdek sıklığının anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. Bu çalışmada halojenli bileşiklerin biyotransformasyon yolağı ile reaktif

metabolitlere dönüştüğü ve bu reaktif metabolitlerin proteinlere, lipidlere ve DNA'ya bağlanıp genotoksik etki gösterebildiği belirtilmiştir.

İnsanda sevofluran ile yapılan çalışmalar sınırlıdır. Karabıyık ve ark.⁸ sevofluran ve izofluran anestezisi alan olgularda gelişen hasarı THJE tekniğiyle değerlendirdikleri çalışmalarında heriki ajanla da geri dönebilir nitelikte DNA hasarı meydana geldiği ancak, iki ajan arasında fark olmadığı sonucuna varmışlardır. Bir başka çalışmada da sevoflurana maruziyet sonucu polimorfonükleer lökositlerde oksidatif stres ve hücresel hasarın arttığı THJE tekniği ile gösterilmiştir¹¹⁵. Yapılan bir diğer çalışmada sevofluran anestezisi uygulanan, hem benign hem de malign hasta gruplarının lenfositlerinde, özellikle operasyonun ikinci saatinde maksimum düzeyde olmak üzere DNA hasarı meydana geldiği gözlenmiştir. Ancak bu hasarlanmanın benign hasta grubunda 5. günde tamamen operasyon öncesi değerlere dönerken; malign hasta grubunda ise hücre DNA'sındaki bu bozulmanın tam olarak düzelmediği, sonuç olarak DNA onarım mekanizmaları sağlam olan kişilerde sevofluranın genotoksik etkilerinin geri dönebilir nitelikte olduğu belirtilmiştir¹¹⁶. Alver'in¹¹⁷ yapmış olduğu bir çalışmada da azot protoksit ve remifentanil ile birlikte kullanılan sevofluranın DNA hasarı üzerine etkileri araştırılmış, tüm gruplarda genotoksik hasar tespit edilmiştir. Ancak bu hasar sevofluranın remifentanil ile birlikte kullanıldığı olgularda postoperatif 5. günde preoperatif değerlere gerilerken sevofluranın azot protoksit ile birlikte ve tek başına kullanıldığı olgularda preoperatif değerlere dönemediği gözlenmiştir. Anestezi idamesinde eklenen remifentanilin etkisi ile sevofluranın daha düşük dozlarda kullanımı sağlanarak genotoksik hasarın

düzelmesi üzerine olumlu etki oluşturduğu düşünülmüştür. Bu çalışma sonucunda kanser dışı olgularda özellikle iki saatin üzerinde süren ve tekrarlanan anestezi uygulamaları için sevofluran kullanılmasında sakıncalar olabileceği öne sürülmüştür. Daha önceki çalışmaların aksine bir çalışmada¹¹¹ *in vivo* ve *in vitro* olarak sevofluranın kalıcı genotoksik etkisi olmadığı gösterilmiştir.

Krause ve ark'nın¹¹⁸ yaptığı çalışmada kısa süreli sevofluran anestezisi uygulanan çocuklarda, 3 L/dk akımda taze gaz kullanılırken, en yüksek doz olarak %8 sevofluran uygulanması SCE'yi indüklememiş, kısa süren pediyatrik anestezide sevofluranın genotoksik etki potansiyeli olmadığı sonucuna varılmıştır. Bununla beraber, sevofluran anestezisi boyunca kuru soda lime veya düşük taze gaz akımı ile meydana gelen Compound A ve diğer degradasyon ürünleri genotoksik etkiye neden olabilir. Atık anestezi gazların, ameliyathane çalışanlarında genotoksik etkiye yol açtığı bilinmekle birlikte¹¹⁹⁻¹²¹ uygulandıkları hastalarda sonuçlar hala çelişkilidir.

İnhalasyon anesteziplerinin yanı sıra intravenöz anesteziplerinin DNA hasarı üzerine etkileri de araştırılmıştır. Ketaminin genotoksik etkisi olduğu ise *in vitro* olarak SCE tekniği kullanılarak gösterilmiş¹²². Propofolün astrosit kültürlerinde peroksinitrit aracılı DNA hasarını azalttığı gösterilmiş¹⁰.

Bu çalışmada DNA hasarını gösteren *tail moment*, *tail length* ve *tail intensity* değerleri propofol ve sevofluran gruplarında zaman içinde artmış olarak bulundu. Bu artışlardan özellikle *tail moment* ve *tail intensity* ile ilgili olanların, önemli ve birbiriyle eşzamanlı oldukları gözlemlendi. Bu değişimlere bağlı olarak

meydana geldiği ortaya konulan oksidatif DNA hasarı, sevofluran ve propofol gruplarında benzer özellikteydi.

Tail moment ve *tail intensity* ile MDA arasındaki ilişki değerlendirildiğinde reperfüzyonun 120. dk değerlerinde sevofluran grubunda aynı yönde korelasyon izlendi (sırasıyla, $r=0.832$, $r=0.817$). Bu da sevofluran grubunda turnike açıldıktan 120 dk sonra serbest oksijen radikalleri üretimi ile DNA hasarı arasında anlamlı bir paralellik olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda sadece oksidatif yanıtla ilgili olarak lipid peroksidasyonu çalışılabilmiş ve antioksidan savunma sisteminin değerlendirilememiş olması sonuçlarımızı yorumlamakta güçlük yaratmaktadır. Nitekim reperfüzyonun 15. dakikasında *tail moment* ve *tail intensity* değişiklikleri incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber propofol grubunda sevofluran grubuna göre DNA hasarının derecesinde azalma meydana gelmektedir.

Bu çalışmada cerrahi etki ortadan kaldırılarak sadece turnike uygulanmasının etkisine bakılmış ve turnikeye bağlı İR ve DNA hasarı üzerinde cerrahinin ek bir etkisi olması engellenmiştir. Bu çalışmanın insan yerine hayvanlarda planlanmış olmasının diğer nedenleri, cerrahinin ve ek anestezi ilaçların sonuçlar üzerindeki potansiyel etkilerini ortadan kaldırabilmektir. Turnike uygulamasına bağlı İR araştırılacağı için alt ekstremitedeki kas kitlesi diğer hayvan modellerine göre daha fazla olduğundan denek olarak bu çalışmada tavşan seçilmiştir.

Biz çalışmamızda genel anestezi için sevofluran veya propofol kullanırken beraberinde premedikasyon ajanı veya başka bir intravenöz indüksiyon ajanı

kullanmamaya özen gösterdik. Böylece diğer ajanların İR ve DNA hasarı üzerine olabilecek karıştırıcı etkilerinden kaçınmayı amaçladık.

Oksijenizasyonun monitörize edildiği bu çalışma süresince, deneklerin hipoksik kalmaması sağlanmıştır. Böylece olası hipoksik hücre hasarının, sonuçlarımız üzerine yapabileceği olumsuz etkiler önlenmiştir. Diğer taraftan uygulamalarımızda kullanılan anestezi cihazının teknik özelliğine bağlı olarak oksijenin havayla karıştırılamaması nedeniyle, deneklerimize oksijen %100 oranında uygulanmıştır. Oksidatif stresi artırıcı etkisi bilinen oksijenin, benzer şekilde %100 verildiği hayvan çalışmalarında 60 saat uygulanması sonucunda bile oksidatif stresin minimal derecede arttığı görülmüştür¹²³. Gerek açık anestezi devresinden maske ile uygulandığından, gerekse uygulama süresi iki saatle sınırlı olduğundan, bu çalışmada araştırdığımız oksidatif stresin uyguladığımız oksijen oranı nedeniyle artmadığı kanısındayız.

Çalışmamızda izlenen parametrelerden KAH'da deney süresince her iki grupta da farklılık izlenmezken; propofol grubunda turnike sonrası ilk 5 dk dahil olmak üzere özellikle indüksiyon sonrası ve reperfüzyon döneminde SAB, DAB ve OAB kontrole göre azalmıştır. Yeterli anestezi derinliği elde edebilmek için tavşanlara verilmesi gereken dozun 1-2 mg/kg/dk gibi yüksek bir doz olmasından ve ilacın kendisine ait hipotansif özelliğinden kaynaklanmaktadır. Sevofluran grubunda ise turnike uygulamasının ikinci saatinde kan basıncı propofol grubundan düşük bulunmuş olsa da gerek bu dönemde gerekse diğer dönemlerde klinik olarak normal sınırlar içinde kaldı. Çalışmamız süresince deneklerin hemodinamik stabiliteleri sağlanarak koşulların güvenilirliği sağlanmıştır.

6. SONUÇ

Bu deneysel çalışmanın sonucunda klinik dozlarda tavşanlara uygulanan sevofluranın İR'ye bağlı lipid peroksidasyonunu propofolden daha iyi baskılayabildiğini belirledik. Propofol ile ortaya çıkan lipid peroksidasyonundaki artışın reperfüzyonun erken döneminde belirgin olduğunu, sevofluran ve propofole bağlı bu farklılığın reperfüzyonun geç döneminde ortadan kalktığını gözledik.

Hem sevofluran hem de propofolün DNA hasarını artırıcı etkisi benzer nitelikte gibi görünmekle beraber propofol grubunda bu etkinin reperfüzyonun erken döneminde daha belirgin olduğu bulundu. Oluşan DNA hasarı, onarılarak geri dönebilir nitelikte olup, her iki grupta da reperfüzyondan iki saat sonra ortadan kalkmaktadır.

Propofolün oluşturduğu lipid peroksidasyonu ve genotoksik etki arasında herhangi bir ilişki belirlenemedi. Ancak sevofluranda lipid peroksidasyonu baskılanması reperfüzyonun geç döneminde DNA hasarı ile paralel gelişti.

Bu çalışmada belirlenen oksidatif stres ve genotoksik etki reperfüzyon döneminde ortadan kalktığından, turnike uygulanan ekstremitte cerrahisi için anestezi uygulamalarında, sevofluran ve propofolün birbirine üstünlükleri bulunmadığı sonucuna varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Cheng YJ, Wang YP, Chien CT, Chen CF. Small dose propofol sedation attenuates the formation of reactive oxygen species in tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury under spinal anesthesia. *Anesth Analg* 2002;94:1617-20.
2. Sarban S, Şanata T, Işıkan E, Atik Ş. Turnikeye bağlı nöromuskuler hasarın patofizyolojisi. *J. Arthroplasty Arth Surg.* 2003;14:235-40.
3. Allaouchiche B, Debon R, Goudable J, Chassard D, Duflo F. Oxidative stress status during exposure to propofol, sevoflurane and desflurane. *Anesth Analg* 2001;93:981-5.
4. Kahraman S, Kilinc, KDal D, Erdem K. Propofol attenuates formation of lipid peroxides in tourniquet-induced ischaemia-reperfusion injury. *Br J Anaesth* 1997;78:279-81.
5. Aldemir O, Celebi H, Cevik C, Duzgun E. The effects of propofol or halothane on free radical production after tourniquet induced ischaemia-reperfusion injury during knee arthroplasty. *Acta Anaesthesiol Scand* 2001;45:1221-5.
6. Turan R, Yagmurdur H, Kavutcu M, Dikmen B. Propofol and tourniquet induced ischaemia reperfusion injury in lower extremity operations. *Eur J Anaesthesiol* 2007;24:185-9.
7. Willy C, Dahouk S, Starck C, Kaffenberger W, Gerngross H, Plappert UG. DNA damage in human leukocytes after ischemia/reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 2001;28:1-12.

8. Karabıyık L, Şardaş S, Polat U, Aygün N, Karakaya AE. Comparison of genotoxicity of sevoflurane and isoflurane in human lymphocytes studied in vivo using the Comet Assay. *Mutat Res* 2001;492: 99-107.
9. Alleva R, Tomasetti M, Solenghi MD, Stagni F, Gamberini F, Bassi A, Fornasari PM et al. Lymphocyte DNA damage precedes DNA repair or cell death after orthopaedic surgery under general anaesthesia. *Mutagenesis* 2003;18:423-428.
10. Acquaviva R, Campisi A, Murabito P, Raciti G, Avola R, Mangiameli S, et al. Propofol attenuates peroxynitrite-mediated DNA damage and apoptosis in cultured astrocytes: an alternative protective mechanism. *Anesthesiology* 2004;101:1363-71.
11. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 1995;339:37-59.
12. Klenerman L. The tourniquet in surgery. *J Bone Joint Surg* 1962;44:937-43.
13. Andrew H, Crenshaw J. *Surgical Techniques and Approaches*. In: S. Terry Canale, editor. *Campbell's Operative Orthopaedics*. Vol 1. 10th ed. Philadelphia: Mosby inc, 2003;3-122.
14. Pedowitz RA, Gershuni DH, Fridén J, Garfin SR, Rydevik BL, Hargens AR. Effects of reperfusion intervals on skeletal muscle injury beneath and distal to a pneumatic tourniquet. *J Hand Surg* 1992;17:245-55.
15. Girardis M, Milesi S, Donato S, Raffaelli M, Spasiano A, Antonutto G, et al. The hemodynamic and metabolic effect of tourniquet application during knee surgery. *Anesth Analg* 2000;91:727-31.

16. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994;81:637-47.
17. Windsor AC, Mullen PG, Fowler AA, Sugerman HJ. Role of the neutrophil in adult respiratory distress syndrome. *Br J Surg* 1993;80:10-7.
18. Chaudry IH, Clemens MG, Baue AE. Alterations in cell function with ischemia and shock and their correction. *Arch Surg* 1981;116:1309-17.
19. Cheung JY, Bonventre JV, Malis CD, Leaf A. Calcium and ischemic injury. *N Engl J Med* 1986;314:1670-6.
20. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 2001;94:1133-8.
21. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg* 2002;10:620-30.
22. Allen DM, Chen LE, Seaber AV, Urbaniak JR. Pathophysiology and related studies of the no reflow phenomenon in skeletal muscle. *Clin Orthop Relat Res* 314:122-33,1995.
23. Bushell A, Klenerman L, Davies H, Grierson I, Jackson MJ. Ischemia-reperfusion-induced muscle damage. Protective effect of corticosteroids and antioxidants in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1996;67:393-8.
24. Hardy SC, Homer-Vanniasinkam S, Gough MJ. Effect of free radical scavenging on skeletal muscle blood flow during postischaemic reperfusion. *Br J Surg* 1992;79:1289-92.
25. Bulkley GB. Reactive oxygen metabolites and reperfusion injury: aberrant triggering of reticuloendothelial function. *Lancet* 1994;344:934-6.

26. Homer-Vanniasinkam S, Gough MJ. Role of lipid mediators in the pathogenesis of skeletal muscle infarction and oedema during reperfusion after ischaemia. *Br J Surg* 1994;81:1500-3.
27. Mccord JM. Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985;312:159-63.
28. Basaga HS. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 1990;68:989-98.
29. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993;49:481-93.
30. Cadenas E. Mechanisms of antioxidant action. In: Tomris Özben, editor. *Free Radicals, Oxidative Stress and Antioxidants*. New York: Plenum Press, 1998;237-251.
31. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*. 2002;33:110-118.
32. Andreoli SP. Reactive oxygen molecules, oxidant injury and renal disease. *Pediatr Nephrol* 1991;5:733-42.
33. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982;47:412-26.
34. Rangan U, Bulkley GB. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *Br Med Bull* 1993;49:700-18.
35. Erden M. Serbest radikaller. *T. Klin.Tıp Bilimleri Dergisi* 1992;12:201-207.

36. Randy L. Rose, Patricia E. Levi. *Reactive Metabolites*. In: Ernest Hodgson, editor. *Modern Toxicology*. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2004;149-161.
37. Akkuş İ. *Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri*. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi I. Ed Mimoza Yayınları. Konya 1995.
38. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. *Pathological aspects of active oxygens free radicals*. *Jpn J Physiol* 1996;46:15-32.
39. Halliwell B. *Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?* *Lancet* 1994;344:721-4.
40. Baynes JW. *Role of oxidative stress in development of complications in diabetes*. *Diabetes* 1991;40:405-12.
41. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN. *Role of oxygen-derived free radicals in digestive tract diseases*. *Surgery* 1983;94:415-22.
42. Hinder RA, Stein HJ. *Oxygen-derived free radicals*. *Arch Surg* 1991;126:104-5.
43. Jackson MJ, O'Farrell S. *Free radicals and muscle damage*. *Br Med Bull* 1993;49:630-41.
44. Valenzuela A. *The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress*. *Life Sci* 1991;48:301-9.
45. Marnett LJ. *Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage*. *Toxicology* 2002;27;181-182:219-22.
46. Sakamoto H, Corcoran TB, Laffey JG, Shorten GD. *Isoprostanes--markers of ischaemia reperfusion injury*. *Eur J Anaesthesiol* 2002;19:550-9.

47. Spallholz JE. *Selenium and glutathione peroxidase: essential nutrient and antioxidant component of the immune system. Adv Exp Med Biol* 1990;262:145-58.
48. Murrell GA, Francis MJ, Bromley L. *Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. Biochem J* 1990;265:659-65 .
49. Manfred K. *Reaktive oxygen metabolites. Boca Raton, Florida, CRC press*;2000.
50. Ceballos-Picot I, Trivier JM, Nicole A, Sinet PM, Thevenin M. *Age-correlated modifications of copper-zinc superoxide dismutase and glutathione-related enzyme activities in human erythrocytes. Clin Chem* 1992;38:66-70.
51. Barber DA, Harris SR. *Oxygen free radicals and antioxidants: a review. Am Pharm.* 1994;NS34:26-35.
52. Aebi H. *Catalase in vitro. Methods Enzymol* 1984;105:121-6.
53. Kayhan Z. *Klinik Anestezi. 3. baskı. İstanbul: Logos Yayıncılık*; 2004.
54. Ebert T.J. *Inhalation Anesthesia. In: Barash Paul G,ed. Clinical Anesthesia. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2006; 801-882.*
55. Smith I, Nathanson M, White PF. *Sevoflurane--a long-awaited volatile anaesthetic. Br J Anaesth* 1996;76:435-45.
56. Jones RM. *Desflurane and sevoflurane: inhalation anaesthetics for this decade? Br J Anaesth* 1990;65:527-36.

57. Jackie L, Martin J, Dolores B. *Metabolism and Toxicity of Modern Inhaled Anesthetics*. In: Miller RD, editor. *Miller's Anesthesia*. Vol 1. 6nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone;2005, 231-272.
58. Cuhruk H. *İnhalasyon anestezikleri*. In: Morgan GE, editor. *Klinik Anesteziyoloji*. Çeviri editörleri: Tulunay M, Cuhruk H. 4. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, 2008;155-178.
59. Morita T, Tsukashi H, Sugaya T. *The effects of sevoflurane are similar to those of isoflurane on the neuromuscular block produced by vecuronium*. *Br J Anaesth* 1994;72:465-67.
60. Artru AA, Lam AM, Johnson JO, Sperry RJ. *Intracranial pressure middle cerebral artery flow velocity and plasma inorganic fluoride concentrations in neurosurgical patients receiving sevoflurane or isoflurane*, *Anesth Analg* 1997;85: 587-92.
61. Dikmen B, Erk G, Et G, Köş T, Horasanlı E, Kılıcı O, Öztürk HS. *Propofol/remifentanil anestezisi ile sevofluran anestezisinin insan eritrositleri üzerindeki oksidan ve antioksidan sistem üzerine etkileri*. *Türkiye Klinikleri J Anest Reanim* 2005;3:15-20.
62. Inomata S, Watanabe S, Taguchi M, Okada M. *End tidal sevoflurane concentration for tracheal intubation and MAC in peadiatric patient*. *Anesthesiology* 1994;80: 93-96.
63. Strum DP, Eger E. *The clinical pharmacology of sevoflurane*. *Anesth Analg* 1995;81: 65-69.
64. Aun CS. *New iv agents*. *Br J Anaesth* 1999;83:29-41.

65. *Reves JG, Glass P, Lubarsky DA, McEvoy MD. Intravenous Nonopioid Anesthetics. In: Miller RD, editor. Miller's Anesthesia. Vol 1.6nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005; 318-326.*
66. *Murphy PG, Myers DS, Davies MJ, Webster NR, Jones JG. The antioxidant potential of propofol (2,6-diisopropylphenol). Br J Anaesth 1992;68:613-8.*
67. *Green TR, Bennett SR, Nelson VM. Specificity and properties of propofol as an antioxidant free radical scavenger. Toxicol Appl Pharmacol 1994;129:163-9.*
68. *De La Cruz JP, Zanca A, Carmona JA, De La Cuesta FS. The effect of propofol on oxidative stress in platelets from surgical patients. Anesth Analg 1999;89:1050-5.*
69. *Musacchio E, Rizzoli V. Antioxidant action of propofol on liver microsomes, mitochondria and brain synaptosomes in the rat. Pharmacol Toxicol 69:75-7, 1991.*
70. *McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. Am J Med 2000;108:652-9.*
71. *Guignard B, Menigoux C, Dupont X, Fletcher D. The effect of remifentanyl and the bispectral index change and hemodynamic responses after orotracheal intubation. Anesth Analg 2000;90:161-167.*
72. *Martín-Cancho MF, Lima JR, Luis L, Crisóstomo V, Carrasco-Jiménez MS, Usón-Gargallo J. Relationship of bispectral index values, haemodynamic changes and recovery times during sevoflurane or propofol anaesthesia in rabbits .Lab Anim 2006;40:28-42.*

73. Roe FJC. *Influence of animal species, strain, age, hormonal and nutritional status.* In: Anderson D, Conning DM ,ed. *Experimental Toxicology-The Basic Issues. First ed, Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1990;23-34.*
74. Topal A. *Veteriner Anestezi.* Bursa: Nobel & Güneş Tıp Kitabevi, 2005
75. Silgin JC, Baker WH. *Laboratuary animal management.* In: Derelanko MJ, Hollinger MA, ed. *Handbook of Toxicology. 2nd ed, Washington D.C, CRP pres, 2002;1-68.*
76. Marti HH, Gassmann M, Wenger RH, Kvietikova I, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T. et al. *Detection of erythropoietin in human liquor: intrinsic erythropoietin production in the brain.* *Kidney Int* 1997;51:416-8.
77. Singeer M, *Genes and genomes.* California Blackwell Scientific Publications, 1991.
78. Luzio JP. *Molecular medical Biochemistry,*1990.
79. Russe PJ. *Genetics,* Harper Collins Publisher, Third Ed;1992.
80. Kent C. *Mutagens, teratogens and carcinogens. Basics of Toxicology* 1998;269-80.
81. Rasko I, Dounes CS. *Genes in medicine-molecular biology and human genetic disorders.* Chapman& Hall, London;1995.
82. Trudnowski RJ, Mehta MP, Rucinski M. *Evaluation of the mutagenic potential of enflurane and isoflurane by sister chromatid exchange.* *J Med* 1987;18:55-60.

83. Kant I, van Rijssen-Moll M, Borm PJ .Simulation of nitrous oxide concentrations in operating and recovery rooms .*Ann Occup Hyg* 1990;34:575-83.
84. Baden JM, Simmon VF. Mutagenic effects of inhalational anesthetics. *Mutat Res* 1980;75:169-89.
85. McKelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Méo MP, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat Res* 1993;288:47-63.
86. Sardaş S, Cuhruk H, Karakaya AE, Atakurt Y. Sister-chromatid exchanges in operating room personel *Mutat Res* 1992;279:117-20.
87. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;123:291-8.
88. Collins AR, Dobson VL, Dusinská M, Kennedy G, Stětina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res* 1997;375:183-93.
89. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 1995;339:37-59.
90. Yoshioka T, Kawada K, Shimada T, Mori M. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanisms against activated-oxygen toxicity in the blood. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 135:372-5.
91. Eger EI, Laster MJ, Winegar R, Han C, Gong D. Compound A induces sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Anesthesiology* 1997;86:918-22.

92. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 1997;95:320-3.
93. Kahraman S, Demiryürek AT. Propofol is a peroxynitrite scavenger. *Anesth Analg* 1997;84:1127-9.
94. Murphy PG, Bennett JR, Myers DS, Davies MJ, Jones JG. The effect of propofol anaesthesia on free radical-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Eur J Anaesthesiol* 1993;10:261-6.
95. De La Cruz JP, Sedeño G, Carmona JA, Sánchez de la Cuesta F. The in vitro effects of propofol on tissular oxidative stress in the rat. *Anesth Analg* 1998;87:1141-6.
96. Concannon MJ, Kester CG, Welsh CF, Puckett CL .Patterns of free-radical production after tourniquet ischemia: implications for the hand surgeon. *Plast Reconstr Surg* 1992;89:846-52.
97. Saricaoglu F, Dal D, Salman AE, Doral MN, Kiliç K, Aypar U. Ketamine sedation during spinal anesthesia for arthroscopic knee surgery reduced the ischemia-reperfusion injury markers. *Anesth Analg* 2005;101:904-9.
98. Stipancic I, Zarkovic N, Servis D, Sabolović S, Tatzber F, Busic Z. Oxidative stress markers after laparoscopic and open cholecystectomy. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2005;15:347-52.
99. Ansley DM, Lee J, Godin DV, Garnett ME, Qayumi AK. Propofol enhances red cell antioxidant capacity in swine and humans. *Can J Anaesth.* 1998;45:233-9.

100. Ansley DM, Sun J, Visser WA, Dolman J, Godin DV, Garnett ME et al. High dose propofol enhances red cell antioxidant capacity during CPB in humans. *Can J Anaesth* 1999;46:641-8.
101. Ebel D, Schlack W, Comfère T, Preckel B, Thämer V. Effect of propofol on reperfusion injury after regional ischaemia in the isolated rat heart. *Br J Anaesth*. 1999; 83:903-8.
102. Murphy PG, Davies MJ, Columb MO, Stratford N. Effect of propofol and thiopentone on free radical mediated oxidative stress of the erythrocyte. *Br J Anaesth* 1996;76:536-43.
103. Koksai GM, Sayilgan C, Aydin S, Uzun H, Oz H. The effects of sevoflurane and desflurane on lipid peroxidation during laparoscopic cholecystectomy. *Eur J Anaesthesiol* 2004;21:217-20.
104. Loft S, Larsen PN, Rasmussen A, Fischer-Nielsen A, Bondesen S, Kirkegaard P, et al. Oxidative DNA damage after transplantation of the liver and small intestine in pigs. *Transplantation* 1995;15;59:16-20.
105. Liu PK, Hsu CY, Dizdaroglu M, Floyd RA, Kow YW, Karakaya A et al. Damage, repair, and mutagenesis in nuclear genes after mouse forebrain ischemia-reperfusion. *J Neurosci* 1996;16:6795-806.
106. Chen J, Jin K, Chen M, Pei W, Kawaguchi K, Greenberg DA, Simon RP. Early detection of DNA strand breaks in the brain after transient focal ischemia: implications for the role of DNA damage in apoptosis and neuronal cell death. *J Neurochem* 1997;69:232-45.

107. Tobita M, Nagano I, Nakamura S, Itoyama Y, Kogure K. DNA single-strand breaks in postischemic gerbil brain detected by in situ nick translation procedure. *Neurosci Lett* 1995;200:129-32.
108. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175:184-91.
109. White AE, Takehisa S, Eger EI 2nd, Wolff S, Stevens WC. Sister chromatid exchanges induced by inhaled anesthetics. *Anesthesiology* 1979;50:426-3.
110. Baden JM, Kelley M, Wharton RS, Hitt BA, Simmon VF, Mazze RI. Mutagenicity of halogenated ether anesthetics. *Anesthesiology* 1977;46:346-50.
111. Szyfter K, Szulc R, Mikstacki A, Stachecki I, Rydzanicz M, Jalozyński P. Genotoxicity of inhalation anaesthetics: DNA lesions generated by sevoflurane in vitro and in vivo. *J Appl Genet* 2004;45:369-74.
112. Ogawa M, Doi K, Mitsufuji T, Satoh K, Takatori T. Drug induced hepatitis following sevoflurane anesthesia in a child . *Masui* 1991;40:1542-5.
113. Sardaş S, Karabiyik L, Aygün N, Karakaya AE. DNA damage evaluated by the alkaline comet assay in lymphocytes of humans anaesthetized with isoflurane . *Mutat Res* 1998;418:1-6.
114. Robbiano L, Mereto E, Migliazzi Morando A, Pastore P, Brambilla G. Increased frequency of micronucleated kidney cells in rats exposed to halogenated anaesthetics. *Mutat Res* 1998;413:1-6.

115. Wong CH, Liu TZ, Chye SM, Lu FJ, Liu YC, Lin ZC, Chen CH. Sevoflurane-induced oxidative stress and cellular injury in human peripheral polymorphonuclear neutrophils. *Food Chem Toxicol* 2006;44:1399-407.
116. Ertürk Ş. Sevofluranın DNA hasarı üzerine etkilerinin benign ve malign olgularda comet assay yöntemi ile değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi, 2001.
117. Alver FA. Sevofluranın azot protoksit veya remifentanil ile birlikte kullanımının DNA hasarı üzerine etkileri. Uzmanlık Tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi, 2001.
118. Krause T, Scholz J, Jansen L, Boettcher H, Koch C, Wappler F et al. Sevoflurane anaesthesia does not induce the formation of sister chromatid exchanges in peripheral blood lymphocytes of children. *Br J Anaesth* 2003;90:233-5.
119. Chandrasekhar M, Rekhadevi PV, Sailaja N, Rahman MF, Reddy JP, Mahboob M et al. Evaluation of genetic damage in operating room personnel exposed to anaesthetic gases. *Mutagenesis* 2006;21:249-54.
120. Hoerauf K, Lierz M, Wiesner G, Schroegendorfer K, Lierz P, Spacek A, et al. Genetic damage in operating room personnel exposed to isoflurane and nitrous oxide. *Occup Environ Med* 1999;56:433-7.
121. Hoerauf KH, Wiesner G, Schroegendorfer KF, Jobst BP, Spacek A, Harth M, et al. Waste anaesthetic gases induce sister chromatid exchanges in lymphocytes of operating room personnel. *Br J Anaesth* 1999;82:764-6.

122. Adhvaryu SG, Trivedi AH, Jani KH, Vyas RC, Dave BJ. Genotoxic effects of ketamine on CHO cells. *Arch Toxicol* 1986;59:124-5.
123. Calkovska A, Engler I, Mokra D, Drgova A, Sionova M, Tartarkova Z et al. Differences in oxidative status, lung function, and pulmonary surfactant during long-term inhalation of medical oxygen and partially ionized oxygen in guinea pigs. *J Physiol Pharmacol*. 2008;59 Suppl 6:173-81.

8. ÖZET

İskemik dokuların reperfüzyonu sırasında serbest oksijen radikalleri ve DNA hasarı meydana gelmektedir. Sevofluranın genotoksik etkisi ile propofolün antioksidan etkisi bilinmektedir. Bu çalışmada, alt ekstremitte iskemi-reperfüzyon hasarı sonucu oluşan serbest oksijen radikalleri ve DNA hasarı üzerine sevofluran ve propofolün etkilerinin karşılaştırılması amaçlandı. 14 adet Yeni Zelanda tavşanı rastgele iki eşit gruba ayrıldı. Gruplardan birine (Grup S) maske ile %2.5 4 sevofluran inhalasyonu, diğerine (Grup P) 1-2 mg/kg/dk propofol infüzyonu uygulanarak, alt ekstremitteye pnömatik turnike yerleştirildi. Kalp atım hızı, invazif kan basınçları, periferik oksijen satürasyonu ve anestezi derinliği monitörize edildi. Turnike uygulaması öncesi (kontrol), turnike uygulandıktan 120 dk sonra, turnike açıldıktan 15 ve 120 dk sonra alınan kan örneklerinde; MDA düzeyleri ile lipid peroksidasyonu, *tail moment*, *tail lenght* ve *tail intensity* ile DNA hasarı araştırıldı. Turnike açıldıktan 15 dk sonra MDA düzeyleri Grup P’de ($8.15 \pm 2.61 \mu\text{M}$), kontrolden ($6.26 \pm 3.19 \mu\text{M}$) ve Grup S’den ($4.98 \pm 0.77 \mu\text{M}$) yüksek bulundu ($p < 0.05$). Her iki grupta DNA hasarı etkisi benzer görülmekle beraber propofol grubunda bu etki reperfüzyonun erken döneminde daha belirgin bulundu (*tail moment* 1.05 ± 0.45 , *tail intensity* 5.33 ± 1.56 , $p < 0.05$). *Tail moment* ve *tail intensity*’de belirlenen bu artış, her iki grupta da turnike açıldıktan iki saat sonra kontrol değerlerine döndü. Grup S’de MDA düzeylerindeki artış ile *tail moment* ve *tail intensity*’de belirlenen artışlar arasında turnike açıldıktan iki saat sonra korelasyon belirlendi (*Tail moment*: $r=832$, $p=0.020$. *Tail intensity*: $r=817$, $p=0.025$). Bu çalışmada belirlenen oksidatif stres ve genotoksik etki reverzibl

özellikte olduğundan, iskemi reperfüzyon hasarına yol açılan ekstremitte cerrahisi için anestezi uygulamalarında, sevofluran ve propofolün birbirine üstünlükleri bulunmadığı sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Genotoksisite, oksidatif stres, propofol, sevofluran

9. SUMMARY

During reperfusion of ischemic tissues, free oxygen radicals and DNA injury develop. The genotoxic effect of sevoflurane and antioxidant effect of propofol are known. In this study, the effects of sevoflurane and propofol on free oxygen radicals and DNA injury that from as a result of ischemia-reperfusion of the lower extremities were investigated. Fourteen New Zealand Albino rabbits were randomly divided into two groups. The animals in one group (Group S) inhaled 2.5% - 4% sevoflurane using a mask, and the animals in the other group (Group P) were infused 1-2 mg/kg/dk propofol. Pneumatic tourniquet was placed on the lower extremity. The heart beat rate, invasive blood pressure, peripheric oxygen saturation, and anesthesia depth were monitored. Blood samples were obtained before the tourniquet application (control), 120 min. after the tourniquet application, and 15 min. and 120 min. after the tourniquet was removed. MDA levels, lipid preoxidation, *tail moment*, *tail length*, and *tail intensity* were determined to evaluate the DNA injury. Fifteen minutes after the tourniquet was removed, the mean MDA level of Group P was higher ($8.15 \pm 2.61 \mu\text{M}$) than those of the controls ($6.26 \pm 3.19 \mu\text{M}$) and Group S ($4.98 \pm 0.77 \mu\text{M}$) ($p < 0.05$). Although the increase of DNA injury was similar in both groups, this effect was more marked in the propofol group during the early reperfusion period (*tail moment* 1.05 ± 0.45 ; *tail intensity* 5.33 ± 1.56 ; $p < 0.05$). These increases in the *tail moment* and *tail intensity* were normalized in both groups 2 hours after the turnpike was removed. Two hours after the tourniquet was removed, the increase in the MDA level of Group S and the increase in the *tail moment* and *tail intensity* were found

to be correlated (*Tail moment*: $r=832$; $p=0.020$; *Tail intensity*: $r=817$, $p=0.025$).

The oxidative stress and genotoxic effect determined in this study are reversible; thus, sevoflurane and propofol used in anesthesia for extremity surgery that leads to ischemia reperfusion were not found to be superior to each other.

Key Words: Genotoxicity, oxidative stress, propofol, sevoflurane

10. EKLER

10.1. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu Onayı



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı

25.06/2007

SAYI : B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/bk-10029
KONU:

Sayın

Doç.Dr.Lale KARABIYIK
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anestezi ve Reanimasyon Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

G.Ü.ET-07.040 kod numaralı ve "Sevofluran ve propofolün tavşanlarda akut alt ekstremité iskemî-reperfüzyon hasarı üzerine etkilerinin karşılaştırılması" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-07.040 and entitled "Comparison of the effects of sevoflurane and propofol on lower extremity acute ischemia-reperfusion damage in rabbits" is in compliance with Gazi University Ethical Council regulations.

With my best regards.


Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı
Chairman
Gazi University Experimental Animals Ethical Council

Prof.Dr.Engin ÇALGÜNER

Prof.Dr.Nedret KILIÇ

Prof.Dr.Sevil PEHLİVAN

Prof.Dr.Deniz ERDOĞAN

Prof.Dr.Deniz ERBAŞ

Prof.Dr.Fatma AKAR

Prof.Dr.Altan DOĞAN

Uzman Dr. Şeyda DİKER

11. ÖZGEÇMİŞ

- Adı** : Sema
- Soyadı** : Öncül
- Doğum yeri ve tarihi** : Zonguldak- 23/11/1976
- Eğitimi** : Araştırma Görevlisi Dr.
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anestezi ve Reanimasyon AD. 2003- Halen
İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi,
1999
İstanbul Suadiye Lisesi, 1993
İstanbul Hasan Leyli İlköğretim Okulu,
1990
Zonguldak Bahçelievler İlköğretim Okulu,
1987
- Yabancı dil** : İngilizce
- Üye olduğu bilimsel kuruluşlar** : Yok
- Bilimsel etkinlikler** : Tavşanlarda akut alt ekstremitte iskemi-reperfüzyon hasarı sonucu oluşan serbest oksijen radikalleri ve DNA hasarı üzerine sevofluran ve propofolün etkilerinin karşılaştırılması. Tez çalışması. Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2007-84 proje kod numarası ile desteklenmiştir.
- Çift lümenli tüp deneyimlerimiz: 200 olguda.
Ünal Y, Öncül S, Arpacı H, Altınsoy A, Kurtipek Ö.
Türkiye Klin. J. Anest. Rean 2008,6:1-8.
- Klinik çalışma** : “Laringeal Mask Airway (LMA), Cobra Perilaringeal Airway (Cobra PLA) ve Endotrakeal Entübasyon

Uygulamalarının Göz içi Basıncına Etkilerinin Karşılaştırılması”, Karabıyık L, Emmez G, Öncül S, Karadenizli Y, 2007, klinik çalışma halen devam ediyor.

Poster bildiri özetleri : The malposition of subclavian catheter which was placed by indirect method in pediatric liver transplantation case. Coskun D, Mahli D, Oncul S, Ilvan G, Dalgıç A

Washing of wisconsin solution during liver transplantation in pediatric cases.

Mahli A, Coskun D, Ilvan G, Sema Oncul, Aydın Dalgıç, Hakan Sozen

Çift lümenli tüp deneyimlerimiz: 200 olguda. Ünal Y, Öncül S, Arpacı H, Altınsoy A, Kurtipek Ö

Perkütan transkateter yerleştirilen ASD yamasının mobilizasyonu. Ünal Y, Kula S, Emmez G, Oğuz D, Öncül S, Olguntürk R, Yardım Ş