

T.C.
ZONGULDAK KARAEMLAS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**AZOT PROTOKSİT'İN İNFLAMATUAR, ANTIİNFLAMATUAR
VE ANJİOGENEZ PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Yasemin HAKİMOĞLU

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Murat CAN

ZONGULDAK
2010

T.C.
ZONGULDAK KARAEMLAS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**AZOT PROTOKSİT'İN İNFLAMATUAR, ANTIİNFLAMATUAR
VE ANJİOGENEZ PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Yasemin HAKİMOĞLU

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Murat CAN

ZONGULDAK
2010

TEZ ONAY TUTANAĞI

Tezin Teslim Edildiği Üniversite/Fakülte: Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tez Başlığı : Azot Protoksitin İnflamatuar, Antiinflamatuvar ve Anjiogenezis Parametreleri Üzerine Etkisi

Tez Yazarı : Arş. Gör. Dr. Yasemin HAKİMOĞLU

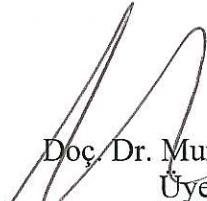
Tez Savunma Tarihi: 28/12/2010

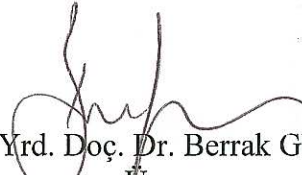
Tez Danışmanı : Doç. Dr. Murat CAN

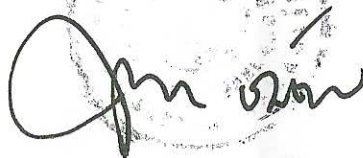

Doç. Dr. Görkem MUNGAN
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Işıl ÖZKOÇAK TURAN
Üye


Doç. Dr. Şereften AÇIKGÖZ
Üye


Doç. Dr. Murat CAN
Üye


Yrd. Doç. Dr. Berrak GÜVEN
Üye

UYGUNDUR
28/12/2010

Prof. Dr. Mahmut ÖZER
Dekan Vekili

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince ve bu çalışmanın planlanıp yürütülmesinde bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, desteklerini esirgemeyen başta tez danışmanım Doç. Dr. Murat Can olmak üzere, değerli hocalarım Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. A. Görkem Mungan'a, Doç. Dr. Şerefden Açıkgöz'e ve Yrd. Doç. Dr. Berrak Güven'e sonsuz teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, iyi ve kötü günleri paylaştığım Biyokimya Anabilim Dalındaki asistan doktor arkadaşlarıma, teknisyen ve personel arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez hastalarımın temin edilmesinde katkıda bulunan, Üroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. N. Aydın Mungan, Anestezi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Işıl Özkoçak Turan ve numunelerin toplanmasında yardımcı olan eşim Dr. Sedat Hakimoğlu'na teşekkür ederim.

Tez çalışmasının istatistiksel olarak planlanması ve analizinde katkıda bulunan Biyoistatistik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Vildan Sümbüloğlu'na ve Öğretim Görevlisi Füzuran Köktürk'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamın yürütülmesi için maddi destek sağlayan Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim.

Her zaman bana destek olan, yaşamım boyunca bana güvenen ve sevgilerini benden esirgemeyen, başta annem ve babam olmak üzere kardeşlerime, tüm aileme, eşime ve canım oğlum Ahmet Fatih'e TEŞEKKÜR EDERİM.

Dr. Yasemin HAKİMOĞLU

Zonguldak, 2010

ÖZET

Yasemin Hakimoğlu, Azot Protoksit'in İnflamatuar, Antiinflamatuvar ve Anjiogenez Parametreleri Üzerine Etkisi. Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Tezi. Zonguldak, 2010.

Anestezi ve cerrahi girişim, sistemik inflamatuvar yanıtın gelişmesine neden olmaktadır. Gelişen inflamatuvar yanıtın şiddeti kullanılan anestezi maddelerin farmakolojik etkisine ve anestezi süresine bağlıdır. Çalışmamızda anestezi ajanı azot protoksit'in inflamatuvar, antiinflamatuvar ve anjiogenetik parametreler üzerine olan etkisini araştırmayı amaçladık.

Çalışmaya, elektif ürolojik cerrahi girişim geçiren 44 erişkin hasta dahil edildi. Anestezi idamesi Grup 1'de 1-2 MAC sevofloran ile % 50 O₂, % 50 N₂O olacak şekilde, Grup 2'de 1-2 MAC sevofloran ile % 50 O₂ % 50 hava olacak şekilde 4 L/dk taşıyıcı gaz altında sağlandı.

Serum IL-6, TNF α , hsCRP, IL-10, VEGF ve VEGFR1 ölçümü için anestezi öncesi, anestezinin 60. dakikasında, anestezi induksiyonu bittikten sonra ve operasyondan 24 saat sonra kan örnekleri alındı. İstatistiksel analizde, tekrarlı ölçümlerde varyans analizi ve Bonferroni testi kullanıldı.

Her iki grupta da serum CRP ve IL-6 düzeyleri postoperatif dönemde anlamlı arttı. Ancak bu periyotta TNF α düzeyleri anlamlı düşük bulundu. IL-6'daki artış oranı ve TNF α 'nın azalış oranı azot protoksit grubunda daha yüksek bulundu. Azot protoksit grubunda hsCRP'deki artış oranı daha düşüktü. IL-10 düzeylerinde her iki grupta da farklılık bulunmadı. Serum VEGF düzeylerinde her iki grupta postop dönemde anlamlı bir azalma görülürken VEGFR1 düzeylerinde ise bir farklılık bulunmadı.

Sonuç olarak azot protoksit'in inflamatuvar ve anjiogenetik parametreler üzerine önemli etkileri olduğu görülmüştür. Azot protoksit etkilerini değerlendirmek için daha detaylı ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Azot protoksit, IL-6, TNF α , hsCRP, IL-10, VEGF, VEGFR1

ABSTRACT

Yasemin Hakimoğlu, Effect of nitrous oxide on inflammatory, antiinflammatory and angiogenesis parameters. Zonguldak Karaelmas University Faculty of Medicine, Thesis in Medical Biochemistry. Zonguldak, 2010.

Anesthesia and surgical intervention, leads to the development of systemic inflammatory response. The severity of the inflammatory response depends on the pharmacological effects of anesthetic agents and duration of anesthesia. In our study, we aimed to investigate the effects of anesthetic agent nitrous oxide on inflammatory, antiinflammatory and angiogenesis parameters.

Forty-four patients undergoing elective urological surgery were included in the study. Anesthesia maintenance provided with 1-2 MAC sevoflurane, O₂ 50%, N₂O 50% in 4L/m transporter gase for group 1 and 1-2 MAC sevoflurane, O₂ 50%, air 50% in 4L/m transporter gase for group 2.

Venous blood samples for the measurement of IL-6, TNF α , hsCRP, IL-10, VEGF and VEGFR1 were taken before the induction of anaesthesia, 60 minutes of anaesthesia induction, at the end of anaesthesia and 24 hours after operation. In statistical analysis Bonferroni test and analysis of variance at the repeated measures were used.

In both groups serum CRP and IL-6 levels were significantly increased in the postoperative period. Whereas in this period TNF α levels were significantly decreased. The rate of increase for IL-6 and rate of decline for TNF α were found higher in nitrous oxide group. Also in nitrous oxide group the rate of increase for hsCRP were lower. IL-10 levels did not show a significant change in both groups. In the postoperative period serum VEGF levels had decreased significantly in both group whereas VEGFR1 did not show a significant change.

In conclusion nitrous oxide showed significant effect on inflammatory and angiogenic parameters. Further detailed studies are required to evaluate the effect of nitrous oxide.

Keywords: Nitrous oxide IL-6, TNF α , hsCRP, IL-10, VEGF, VEGFR1

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sistemik İnflamatuar Yanıt Sendromu.....	3
2.2. İnflamasyonda Rol Alan Mediatörler: Sitokinler	4
2.2.1. İnterlökin 6.....	7
2.2.2. Tümör Nekrozis Faktör α	9
2.2.3. C-Reaktif Protein.....	11
2.2.4. İnterlökin 10.....	13
2.3. Anjiogenez.....	15
2.3.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü	18
2.3.2. VEGF Reseptörleri	20
2.4. Azot Protoksit.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Hasta Grubu	23
3.2. Örneklerin toplanması	24
3.3. Ölçümler sırasında kullanılan cihazlar.....	24
3.4. Test ölçümleri	24
3.4.1. Test prensibi.....	25
3.4.2. IL-6 Ölçümü.....	26
3.4.3. TNF α Ölçümü.....	28
3.4.4. hsCRP Ölçümü.....	30
3.4.5. IL-10 Ölçümü.....	32

3.4.6. VEGF Ölçümü	34
3.4.7. Çözünebilir VEGFR1 Ölçümü.....	36
3.4.8. İstatistiksel Analiz	38
4. BULGULAR	39
5.TARTIŞMA.....	48
6. SONUÇLAR.....	55
7. KAYNAKLAR.....	56
8. EKLER.....	68
Ek 1. Etik kurul onayı	68

KISALTMALAR DİZİNİ

ASA	: Amerikan Anestezi Derneği
ASK1	: Apoptozis Sinyal Düzenleyici Kinaz 1
CRP	: C-Reaktif Protein
ECM	: Ekstrasellüler Matriks
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
ELISA	: Enzim Bağlı İmmün Ölçüm
FADD	: Fas ile İlişkili Ölüm Alanı
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
G-CSF	: Granülosit Stimülan Faktör
GM-CSF	: Granülosit-Makrofaj Stimülan Faktör
hsCRP	: Yüksek duyarlıklı CRP
HO1	: Hem oksijenaz-1
HIF-1	: Hipoksi ile İndüklenen Faktör
IL	: İnterlökin
IFN	: İnterferon
ICAM1	: İntersellüler Adhesyon Molekül 1
IGF-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
JAK	: Janus Kinaz
LPS	: Lipopolisakkarit
M-CSF	: Makrofaj Stimülan Faktör
MAPK	: Mitojen Aktiflenmiş Protein Kinaz
MAC	: Minumun Alveolar Konsantrasyon
NK	: Naturel Killer
NF-kB	: Nükleer Faktör-κB
NIK	: NF-kB İndükleyen Kinaz
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
NO	: Nitrik Oksit
N ₂ O	: Azot protoksit
PDGFG	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörleri
PIGF	: Plasenta Büyüme Faktörü

RIP	: Reseptörle Etkileşen Protein
s-VEGFR-1	: Çözünbilir-VEGFR-1
STAT 3	: Sinyal Dönüştürücü ve Aktivator Transkripsiyon 3
SOCS3	: Sitokin Sinyal Süpresör-3
ss	: Standart Sapma
TGF	: Transforme Edici Büyüme Faktörü
TNF α	: Tümör Nekroz Faktörü alfa
TNFR	: Tümör Nekroz Faktör Reseptörü
TRADD	: TNF Reseptör İlişkili Ölüm Alanı
TRAF2	: TNF Reseptör İlişkili Faktör 2
TYK	: Tirozin Kinaz
VCAM1	: Vasküler Hücre Adhesyon Molekül 1
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR	: VEGF Reseptör

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1: Akut faz cevabının aktivasyonu.....	3
Şekil 2: IL6 ‘nın hücreyel etkisi.....	7
Şekil 3: TNF α ’nın hücreyel etkisi	9
Şekil 4: CRP’nin pentamerik yapısı	11
Şekil 5: IL10’ un hücreyel etkisi.....	14
Şekil 6: ELISA test prensibi.....	25
Şekil 7: Azot protoksite verilen hasta grubunun zamana göre hsCRP ortalamaları	41
Şekil 8: Azot protoksite verilen hasta grubunun zamana göre TNF α ortalamaları	41
Şekil 9: Azot protoksite verilen hasta grubunun zamana göre IL-6 ortalamaları	42
Şekil 10: Azot protoksite verilen hasta grubunun zamana göre IL-10 ortalamaları ...	42
Şekil 11: Azot protoksite verilen hasta grubunun zamana göre VEGF ortalamaları ..	43
Şekil 12: Azot protoksite verilen hasta grubunun zamana göre çözünebilir VEGFR1 ortalamaları	43
Şekil 13: Azot protoksite verilmeyen hasta grubunda zamana göre hsCRP ortalamaları	45
Şekil 14: Azot protoksite verilmeyen hasta grubunda zamana göre TNF α ortalamaları	45
Şekil 15: Azot protoksite verilmeyen hasta grubunda zamana göre IL6 ortalamaları	46
Şekil 16: Azot protoksite verilmeyen hasta grubunda zamana göre IL10 ortalamaları	46
Şekil 17: Azot protoksite verilmeyen hasta grubunda zamana göre VEGF ortalamaları	47
Şekil 18: Azot protoksite verilmeyen hasta grubunda zamana göre çözünebilir VEGFR1 ortalamaları.....	47

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 1: Sitokinlerin sınıflandırılması.....	6
Tablo 2: Anjiogenik ve antianjiogenik faktörler	17
Tablo 3: VEGF reseptörleri, ligandları ve etkileri.....	20
Tablo 4: IL6 çalışma prosedürü.....	27
Tablo 5: TNF α çalışma prosedürü.....	29
Tablo 6: hsCRP çalışma prosedürü.....	31
Tablo 7: IL10 çalışma prosedürü.....	33
Tablo 8: VEGF çalışma prosedürü	35
Tablo 9: çözünebilir VEGFR1 çalışma prosedürü	37
Tablo 10: Hastalara ait demografik özellikler.....	39
Tablo 11: Azot protoksit verilen hasta grubunda zamana göre parametrelerdeki değişimin anlamlılığı	40
Tablo 12: Azot protoksit verilmeyen hasta grubunda zamana göre parametrelerdeki değişimin anlamlılığı	44

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu, vücutta enfeksiyon veya enfeksiyon dışı nedenlere karşı oluşan inflamasyonu tanımlar. Sistemik inflamatuvar yanıt multifaktöriyel olup, hem hasarlı hem de sağlam dokuda sekonder yanıt oluşturmaktadır. Bu süreç, kan damarları ve komşu dokularda sitolojik ve biyokimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan toksik metabolitlerin vücuttan uzaklaştırılması, onarım ve iyileşmeye yol açan temel metabolik cevap olarak tanımlanır. İnflamasyon mediatörlerinin sistemik artışı konağın savunma mekanizmasını da arttırır (1).

Sitokinler, doğal ve kazanılmış immunitede önemli bir rol oynayan mediyatör gruptur ve sistemik inflamasyona yanıt olarak sentezlenirler. Tümör nekroz faktörü alfa (TNF α) özellikle makrofaj ve monosit başta olmak üzere birçok hücrede üretilen bir inflamatuvar mediyatördür. TNF α , akut ve kronik inflamasyon sürecinde birçok lokal ve sistemik etkinin oluşumunda rol oynamaktadır. Düşük seviyelerde lokal inflamatuvar etkilere neden olurken, yüksek miktarda salgılandıklarında dolaşıma geçerek sistemik etkiler oluştururlar. İnterlökin 6 (IL-6) monositler ve makrofajlar tarafından üretilen bir proinflamatuvar sitokindir. IL-6'nın hepatositler ve B lenfositleri üzerinde önemli etkileri vardır ve yara iyileşmesinde de rol oynamaktadır. Sistemik inflamatuvar yanıtta TNF α ve IL-6 tarafından sentezi indüklenen pozitif akut faz reaktanı olan C-Reaktif Protein (CRP) düzeylerinde de artış beklenir. İnterlökin 10 (IL-10) makrofaj ve monositlerden proinflamatuvar sitokin üretimini baskılar. Antiinflamatuvar sitokin IL-10, inflamatuvar sitokinler gibi inflamasyon ve enfeksiyona sistemik yanıtın kontrolünde rol oynar (2)

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), endotel hücreleri için bilinen en spesifik mitojenik faktördür. Vaskülogenez ve anjiogenezde önemli derecede rol oynar. VEGF etkisi sonucu endotel hücreleri proliferasyon olmaktadır ve yeni damarlar için öncü olan tüp formasyonunun oluşmasını sağlamaktadır. VEGF, inflamasyonun geç dönemlerinde etkili olan monositler için güçlü bir kemotaksindir. Monosit ve makrofaj kökenli sitokinlerle birlikte endotelial doku faktörünün artışı sağlayarak, koagülasyon sistemi üzerine de etki eder (3).

VEGF endotel hücresinde etki gösterebilmesi için öncelikle VEGF reseptörlerine (VEGFR) bağlanabilmesi gerekir. VEGF'nin VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, çözünebilir-VEGFR-1 (sVEGFR-1) ve çözünebilir-VEGFR-2 (sVEGFR-2) olarak isimlendirilen 5 tane reseptörü tanımlanmıştır. VEGF anjiogenik etkisini başlıca VEGFR-2 üzerinden gösterir. VEGFR-1'in ile yapısal benzerlik gösteren ve kanda serbest olarak dolaştığı saptanan formuna s-VEGFR-1 adı verilmiştir. Bu form VEGFR-1'in kompetitif inhibitörü olarak görev yapmaktadır. Dolaşımdaki VEGF, bu reseptöre bağlanarak inaktive olmakta ve biyokimyasal etkilerini oluşturamamaktadır (4).

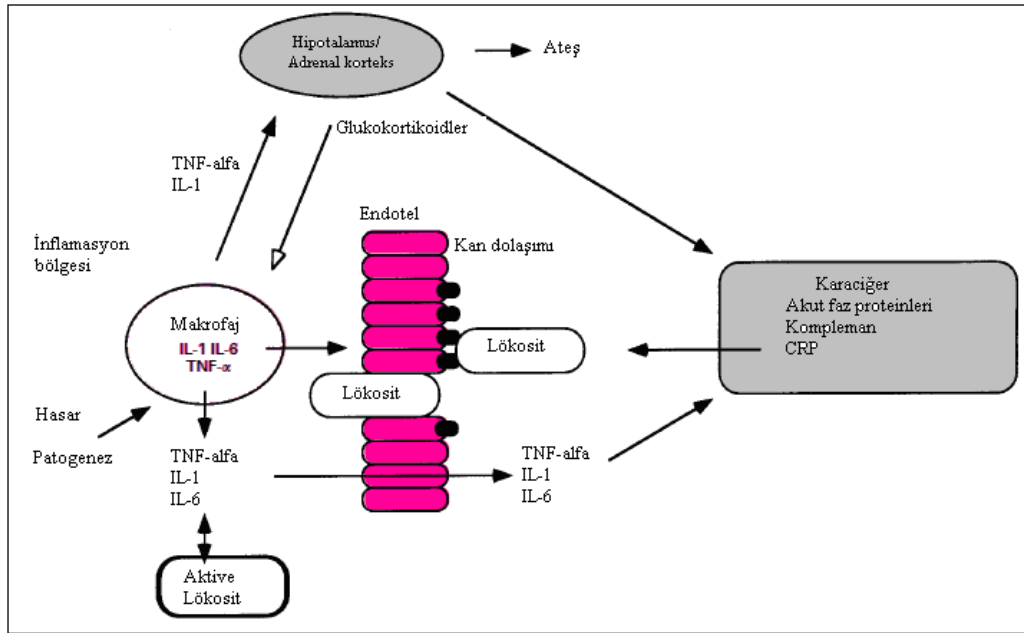
Cerrahi girişim, vücutta sistemik inflamatuvar yanıtın ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Gelişen inflamatuvar yanıtın şiddeti kullanılan anestezi maddelerin direkt farmakolojik etkisine, anestezi yönteminin şekil, süre ve derinliğine bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir (5). Azot protoksit sıkça kullanılan anestezi bir gazdır. Zayıf bir anestezi olup % 50-70 oranında diğer anesteziklerle beraber kullanılır. Etkisi hızlı başlayıp, hızlı sonlanır. Azot protoksit immunsupresif aktiviteye sahiptir ve nötrofil ile monositlerin kemotaktik migrasyonunu inhibe eder. Uyarılan nötrofillerin oksidatif yanıtını, yanıt veren nötrofillerin yüzdesini ve hidrojen peroksit yapımını azaltır (6).

Biz çalışmamızda azot protoksitin inflamatuvar, antiinflamatuvar ve anjiogenetik parametreler üzerine olan etkisini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sistemik İnflamatuar Yanıt Sendromu

Sistemik inflammatuar yanıt sendromu, vücutta enfeksiyon veya enfeksiyon dışı nedenlere karşı oluşan inflamasyonu ve geniş çaplı sistemik cevabı tanımlar. İleri derecede kompleks olan patofizyolojinin merkezinde sitokinler önemli bir yer tutmaktadır (2). Aktive makrofaj ve lökosit gibi inflammatuar hücreler proinflammatuar sitokinleri (IL-1, IL-6, TNF α), interferonları, büyüme faktörlerini içeren mediyatörleri üretirler (Şekil 1). Sitokinler lenfatik akım ve kan dolaşımı yolu ile vücuda yayılarak geniş sistemik cevabı başlatırlar. Kemik iliği kaynaklı hücrelerin üretimi ve farklılaşması artar, çeşitli organlarda metabolik değişiklikler ve karaciğerde CRP gibi proteinlerin sentez profilinde değişiklikler meydana gelir. Bu değişikliklerin hepsine akut faz cevabı denir ve amaç homostasisin sağlanması ve altta yatan sorunla mücadele için optimal koşulların oluşturulmasıdır (7).



Şekil 1: Akut faz cevabının aktivasyonu (8)

2.2. İnflamasyonda Rol Alan Mediatörler: Sitokinler

Sitokinler inflamatuvar ve immun yanıtın gelişimi ve düzenlenmesinde aracılık eden peptid veya glikoprotein yapıda kimyasal ileti molekülleridir. Birçok hücreden salgılanan ve molekül kütleleri 8-110 kDa arasında değişen sitokinler, başlıca T hücreleri ve makrofajlar tarafından üretilmektedir. Salgılandıkları hücreden kan dolaşımı ile hedef hücelere taşınan sitokinlerin endokrin, parakrin, otokrin ve jukstakrin etkileri bulunmaktadır. Farklı hücrelerden salgılanabilen bir sitokin pleotropik etkilidir. Bazı dokularda birbirleriyle sinerjistik etki gösteren sitokinler, başka dokularda antagonist etki de gösterebilmekte ve birbirlerinin etkilerini inhibe edebilmektedirler (9).

Yapılarında karbonhidrat ve disülfid köprülerinin bulunması, düşük molekül ağırlıklı moleküller olan sitokinlere çözünebilme ve parçalanmaya dirençli olma özelliği kazandırmaktadır. Monomer, dimer ve trimer yapıda olabilen sitokinlerin üç boyutlu yapılarında farklılıklar gözlenmekle beraber dört farklı aile grubu belirlenmiştir (9):

a.Dörtlü α -heliks demeti: En çok üyesi bulunan bu ailenin kısa zincir alt tipi (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, GM-CSF, M-CSF, SCF, IFN γ) ve uzun zincir alt tipi (IL-6, IL-12, Epo, G-CSF, IL-11, GH, IFN α , IFN β , IL-10) olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır.

b.Kısa zincir α/β yapıları: Üç alt grubu (ECF ailesi, kemokinler, insülinle ilişkili sitokinler) bulunmaktadır.

c.Uzun zincir β -tabakalı yapılar: Bu grupta TNF alt grubu (TNF α , TNF β), IL-1 ve FGF yer almaktadır.

d.Mozaik yapılar: Bu ailedeki sitokinler (IL-12) heterojen yapıdadır.

Sitokinler büyüme faktörlerinin izledikleri hücrenel yollarda etki gösterebilmektedir. Sitokinlere özgün reseptör aileleri bulunmakta ve büyüme faktörleri reseptörlerinden farklı olarak intrasellüler bölgelerinin katalitik aktiviteleri bulunmamaktadır. Sitokin-reseptör kompleksleri sitoplazmada bulunan reseptöre kovalent olmayan bağlarla bağlı protein tirozin kinazları aktive etmektedirler. Aktive olan bu tirozin kinazlar (JAK, Src protein) reseptörün hücre içi bölgesini fosforillemektedir. Hücrenel SH2 bölgesi içeren sinyal iletici moleküllerin (STAT)

fosforillenmiş reseptöre bağlanarak aktiflenmeleri ile hücresel ileti yolu başlamaktadır (9).

Organizmada immün yanıtların düzenlenmesi, inflamasyon, hematopoez ve yara iyileşmesi gibi hemen hemen tüm genel sistemik olaylarda işlev görmektedirler. Sitokinlerin embriyogenez ve organ gelişimlerinde (anjiogenez), nöroimmünolojik, nöroendokrinolojik süreçlerde anahtar rolleri bulunmaktadır. Mitoz, farklılaşma, hücre göçleri, hücre yaşamı ve hücre ölümü olaylarında negatif ve pozitif düzenleyicilerdir (9).

Sitokinler birincil olarak enfeksiyon ve hastalıklara karşı konak savunmasında görev alırlar. Enfeksiyöz ajanlara karşı konak savunmasında önemli bir rol oynar ancak aşırı üretimleri konak için zararlı etkiler oluşturmaktadır. Şok, doku hasarı, ağırlık kaybı gibi klinik belirtilere sebep olurlar (10).

Sitokinlerin bazıları inflamasyonun ilerlemesine sebep oldukları için, inflamatuvar sitokinler olarak adlandırılır. Bazıları ise, inflamatuvar sitokinlerin aktivitelerini baskırlar, bunlara da antiinflamatuvar sitokinler denilir (10). Genelde sitokinler bir inflamatuvar veya antijenik etkileşime yanıt olarak sentezlenirler. Sitokinler lenfositlerin olgunlaşım diferansiye olmalarını sağlarlar (11).

Artmış sitokin seviyesi inflamatuvar sürece bağlı oluşan primer konakçı cevabıdır. Sitokinler makrofaj, lenfosit ve endotelyal hücrelerden salınan moleküllerdir. Yarılanma ömürleri kısadır. Sistemik inflamatuvar yanıt gelişiminde proinflamatuvar sitokinler (IL-6, TNF α , IFN γ) ile antiinflamatuvar sitokinler (IL-4, IL-10) arasındaki denge, klinik belirtilerin ortaya çıkmasında çok önemlidir. Proinflamatuvar sitokinler, ekzojen patojenlere karşı etkili bir savunma yapmakla görevlidirler. Ancak aşırı üretimleri zararlı olabilir ve doku hasarı yapabilir. Antiinflamatuvar sitokinler ise, inflamatuvar süreci baskılayıcı ve homeostazisi tekrar sağlayıcı özelliklere sahiptir ancak fazla üretilmeleri, immün fonksiyonların bozulmasıyla sonuçlanır. Bu nedenle, IL-10'un sürekli yüksek bulunması veya IL-10 / TNF- α oranının yüksek olması, kötü prognoz işareti olarak kabul edilebilir. IL-6 / IL-10 oranının yüksek olması da kötü prognoz işaretidir ve şok, multiorgan yetersizliği ve ölüm ile ilişkili bulunmuştur (12). Sitokinlerin (özellikle IL-1, IL-6, TNF α , IL-8) ve bunlarla ilişkili reseptörlerin artışı ile sepsis arasında ilişki tam

olarak kurulamamış ve bu sitokinlerin sepsis dışı birçok hastalıkta ciddi olarak artış gösterdiği belirlenmiştir (13).

Sitokinler, aile grupları ve primer fonksiyonları gibi özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır (Tablo 1) (14).

Tablo 1: Sitokinlerin sınıflandırılması

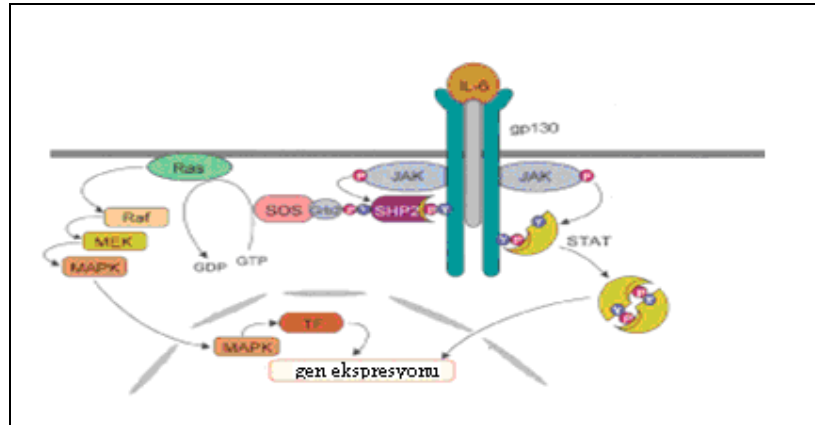
Elgert'in aile gruplarına göre:	
İnterlökinler	IL1 α , IL1 β , IL2, IL3, IL4, IL5, IL14, IL15,
Kemokinler	IL18, MCP-1
İnterferonlar	IFN α , IFN β , IFN γ
Sitotoksik/ immün düzenleyici /büyüme faktörleri	TNF β , TNF α , TGF β
Koloni uyarıcı faktörler	G-CSF, GM-CSF, M-CSF, IL3, IL7
Fonksiyonlarına göre:	
Hücre sel yanıtlarda:	IL2, IFN γ
Alerjik ve humoral yanıtlarda:	IL4, IL13, TGF β
Lenfosit aktivasyonu, büyüme ve farklılaşmasını düzenleyenler:	IL2, IL4, TGF β
Lökosit hareketini düzenleyenler:	IL8, IL3, IL7, C-Kit ligand, GM-CSF
Proinflamatuvar sitokinler:	TNF α , IL1, IL6, IL8 ve diğer kemokinler
Antiinflamatuvar sitokinler:	TNF β , IL10

2.2.1. İnterlökin-6

IL-6 molekül ağırlığı 20-29 kDa arasında değişen, 4 alfa helikal uzun zincire sahip olan pleiotropik bir sitokindir (14). IL-6 ve reseptörü kromozomal yerleşimi 7p21-14 (IL-6), 1 (IL-6 α), 5 ve 17 (gp130) olan genlerle kodlanmaktadır (15).

IL-6 T lenfositler, B lenfositler, monositler, makrofajlar, fibroblastlar, endotel hücreleri, epitel hücreleri, mast hücreleri, nöron hücreleri, astrositler, osteoblastlar, epidermal langerhans hücreleri, dentritik hücreler ve keratinositleri içine alan çok yaygın bir hücre grubu tarafından sentez edilirler (16). Bakteriye toksinler ve bakteri orjinli metalloproteinazlar IL-6' nın aktive olmuş nötrofil ve monositlerden salınımını uyarırlar (17,18). IL10 posttranskripsiyonel mekanizma ile IL-6'nın sentez ve sekresyonunu baskılar (19). IL-10 üretimi, insan T hücreleri içinde IL-6 ve IL-12 tarafından arttırılmaktadır (14).

IL-6 molekülü JAK üzerinden 2 mekanizma ile etkisini gösterir (Şekil 2). Birinci mekanizmada IL-6 gp130 reseptörüne bağlandıktan sonra JAK'ı aktifler. Daha sonra JAK ligandı üzerinde bulunan fosfor atomu SHP2 domainine aktarılaraq SHP2' nin aktiflenmesi sağlanır. Bundan sonra sırasıyla SOS, Ras, Raf, MEK ve (mitojen aktiflenmiş protein kinaz) MAPK yoluyla ilgili genin transkripsiyonu yapılır. İkinci yolda ise IL-6 gp130 reseptörüne bağlanınca JAK molekülü fosfat grubunu STAT ligandına verir ve iki STAT molekülü birbirine bağlanarak ilgili genin transkripsiyonunu başlatır (20).



Şekil 2: IL6 'nın hücresel etki mekanizması (20)

IL-6 konak savunmasında pekçok fonksiyona aracılık eder. T lenfositlerini aktive ederken; B lenfositleri için de bir farklılaşma faktörü olarak rol oynar. Kazanılmış immünitede B hücrelerinden antikor üretimini artırır. IL-6, IL-2 varlığında T hücrelerinin sitotoksik T hücrelerine farklılaşmasını ve timositlerin proliferasyonunu uyarır. T hücrelerinin ve timositlerin kostimulatörüdür. Ayrıca aktive olmuş makrofajların ve lenfositlerin etkilerini düzenler (17,18). IL-6, lenfositlerin adhezyonunu arttırmak için endotel hücreleri üzerine etki göstermektedir. Ayrıca bu sitokinin kemotaksis inhibitör etkiye sahip olduğu da ortaya çıkarılmıştır (21). IL-6, NK hücre aktivitesini de arttırmaktadır. Nötrofil, monosit, eozinofil ve megakaryositlerin proliferasyonunun desteklenmesi için IL-3 ile birlikte çalışmaktadır (14).

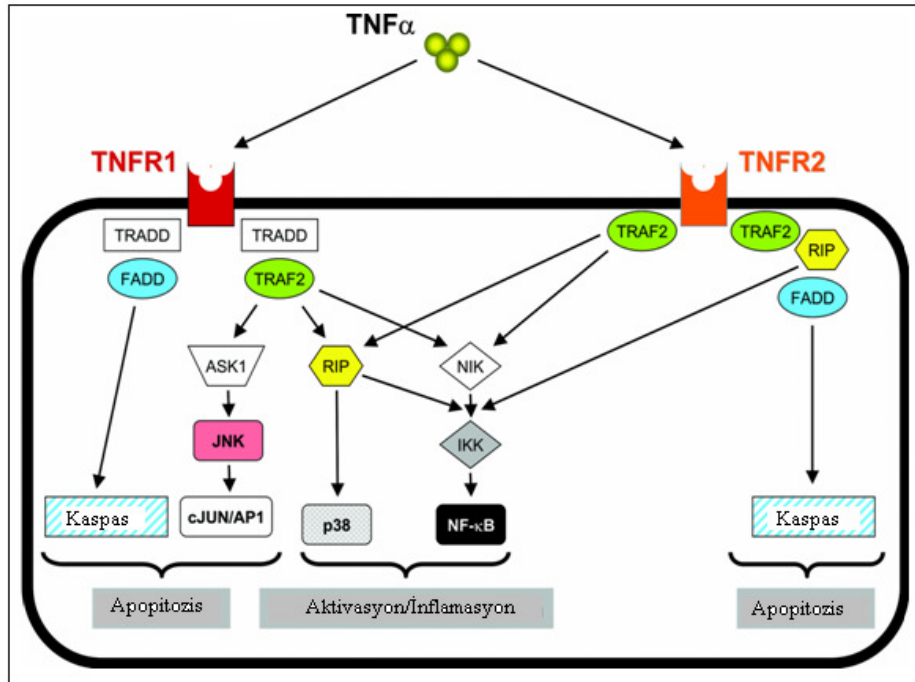
IL-6 akut faz cevabı için merkezi bir uyarandır. Hepatositlerde akut faz cevabının artmasında rol oynar. Bu etkisini CRP, haptoglobin, fibrinojen ve proteaz inhibitörleri gibi akut faz proteinlerinin üretimini arttırarak gerçekleştirir. IL-6, CRP'nin karaciğerde üretiminde primer belirleyicidir (18,19). Endotel hücrelerinde IL-1 ve TNF α sekresyonunu artırır, hepatosit ve sinir hücrelerinin rejenerasyonunda, embriyonel gelişim ve fertilitede de önemlidir (20).

IL-1 ve TNF ile ortak olarak, IL-6 ateşi oluşturan bir endojen pirojen olarak önemli rol oynar (14). IL-6'nın bir çok hücre tipi için otokrin büyüme faktörü olmasından dolayı fazla üretimi plasmositom, multiple myelom, uterin serviks karsinom ve kaposi sarkom gibi bazı malignensiler ile ilişkilendirilmiştir (15). Artmış serum IL-6 düzeyleri sepsis, otoimmün hastalıklar, lenfomalar, enfeksiyon ve transplant reddi gibi durumlarda da gözlenir. Adhezyon moleküllerinin uyarılması ve inflamasyona bağlı hasarda olası rolü olması nedeni ile aterogenez ve vasküler inflamasyonun gelişiminde ilişkisi olabileceği düşünülmektedir (17,18).

2.2.2. Tümör Nekrozis Faktör alfa

TNF α , kaşektin olarak da adlandırılan ve 17-70 kDa ağırlığında bir sitokindir (22). Homotrimer bir yapıya sahip olan TNF α , özellikle makrofajlar ve monositler başta olmak üzere fibroblast, endotel, adiposit ve B hücreleri gibi birçok hücre tarafından üretilmektedir (15,23). TNF α 6p21.3 kromozomu üzerinde bulunan gen tarafından kodlanır ve ileri derecede pleiotropik bir sitokindir.

TNF α molekülü için TNFR1 ve TNFR2 olarak isimlendirilen iki adet reseptör tanımlanmıştır. TNF α molekülü bu iki reseptöre de bağlanarak aktivitesini gösterebilmektedir (Şekil 3). TNF α TNFR1'e bağlandıktan sonra TNF reseptör ilişkili ölüm alanı (TRADD) aktiflenir. Aktiflenen bu molekül daha sonra TNF reseptör ilişkili faktör 2'yi (TRAF2) aktifler. Bundan sonra inflamasyonda görevli olan NF- κ B indükleyen kinaz (NIK) ve reseptörle etkileşen protein (RIP) yoluyla inflamasyon için gerekli olan genlerin transkripsiyonu gerçekleştirir. Diğer bir yolda ise TNF α diğer reseptörü olan TNFR2'ye bağlanır. TNFR2 doğrudan NIK ve RIP yoluyla gerekli genlerin transkripsiyonunu gerçekleştirir (20).



Şekil 3: TNF α 'nın hüresel etki mekanizması (24)

TNF α TNFR1'e bağlandığında TRADD üzerinden Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD) ve TRAF2'yi aktifler. Adaptör protein TRAF-2 ile etkileşen sinyal molekülleri NIK, RIP ve apoptozis sinyal düzenleyici kinaz 1'dir (ASK1). Bu moleküllerin inflamasyon ve hücre ölümü sinyal yetenekleri vardır. FADD ise kaspas kaskadını stimüle eder. TNF α 'nın TNFR2' ye bağlanması adaptör protein TRAF-2'yi aktifler. TRAF-2 NF- κ B yada p38, MAPK yolu ile inflamatuvar kaskadı direkt aktive eder. FADD ve RIP yolu ile kaspas aracılı hücre ölümünü aktive eder (24).

TNF α 'nın biyolojik etkisi konsantrasyonuna bağlıdır. Düşük konsantrasyonlarda TNF α , lokal olarak immünoinflamasyonun otokrin ve parakrin düzenleyicisidir. Yüksek konsantrasyonlarda ise sistemik etki göstermektedir. TNF α inflamatuvar cevabın aktivasyonunda ve regülasyonunda ana rol oynamaktadır. TNF α ; IL-1, IL-6, IL-8 ve IL-10'nun sentezini artırır. Ayrıca endotoksin, IL-1 ve IL-6'da TNF α sekresyonunu arttırmaktadır. TNF α üretimi IL-10 tarafından ise inhibe edilmektedir (20).

TNF α özellikle lipit metabolizması, koagülasyon, insülin rezistansı ve endotel üzerine etki etmektedir. Ayrıca damar endotel hücrelerinde vasküler hücre adhezyon molekül 1 (VCAM1), intersellüler adhezyon molekül 1 (ICAM1) ve E-selektin gibi adhezyon moleküllerinin sentezini arttırmaktadır (25). Bu özelliklerinin yanı sıra apoptozisi indükler, akut inflamasyon sırasında fagositlerin aktivasyonunu ve karaciğerde akut faz reaktanlarının sentezi ve salgılanmasını artırır (26).

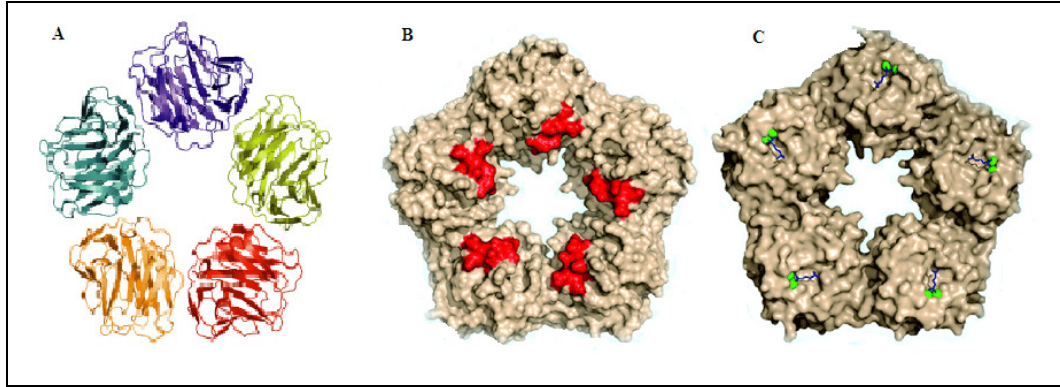
TNF α anjiogenezde ve immunmodülasyonda gerekli pleotropik bir sitokindir. Düşük düzeyde kollajen sentezini inhibe ederken yüksek konsantrasyonlarda fibroblastlarda kollojenaz sentezini stimüle eder. Diğer taraftan kollajen fagositozunu ve yapışmasını inhibe eder. TNF α 'nın antitümoral etkisi, tümör hücreleri üzerine direkt sitotoksik etkisine, tümör içine lenfositlerin göç hareketi ile vaskülaritedeki değişikliklere bağlıdır. TNF α 'nın klinik ilişkisinin en başında, septik şok ve infeksiyon hastalıklarındaki artışı gelir (14).

Metabolik etkileri ise; yağ dokusundan trigliseritlerin dolaşıma salınmasını artırır, iskelet kasında proteinlerin yıkımını uyarır, anaerobik glikolizi uyarır ve septik şokun patogenezinde etkilidir (ateşin yükselmesi, hemodinamik karaciğer ve koagülasyon fonksiyon bozukluklarının gelişmesine aracılık eder) (26).

2.2.3. C- Reaktif Protein

İlk olarak 1930 yılında Tillet ve Frances, akut hastalığı olan bireylerin serumlarında, *S.pneumoniae*'nin hücre duvarındaki C-polisakkaride bağlanıp çökelti oluşturan bir molekül tanımlamışlardır. 1941'de, bunun bir protein olduğu gösterilmiş ve CRP adı verilmiştir (14).

CRP kalsiyum bağlı ligand bağlayıcı plazma proteinlerinden pentaksin ailesinin bir üyesidir (27, 28, 29). Moleküler büyüklüğü 120 kDa dur. İnsan CRP molekül yapısı birbirine benzeyen beş polipeptid alt ünitesinden oluşur (Şekil 4). Her bir polipeptid ünitesi 206 aminoasid kalıntısı içerir. Bu beş protomer kovalent olmayan bağlarla halkasal biçimde bağlanarak pentamerik simetri oluştururlar (27, 28). Her bir protomer iki katlı β tabakadan oluşan tipik 'lektin kıvrımı' içermektedir. İki kalsiyum iyonunun bağlandığı spirallerden oluşan ligand bağlayıcı bölüm konkav yüzde yerleşmiştir. Diğer yüzde bir tek α heliks bulunmaktadır (30).



(A) CRP'nin pentamerik yapısı. (B) CRP'nin yüzeyinde bulunan reseptör ve C1q bağlayan bölgeler (kırmızı) gösterilmiştir. (C) Ligand bağlayan her bir protomerde, iki kalsiyum molekülü (yeşil) ile fosfokolin molekülünün (mavi) yerleşimi gösterilmiştir.

Şekil 4: CRP'nin pentamerik yapısı (31)

CRP inflamasyon, enfeksiyon ve doku hasarının yüksek duyarlılıktaki bir belirteçidir. Kompleman sistemini aktive ederek konağın enfeksiyona karşı savunma sistemini harekete geçirir (28). CRP'nin serumdaki yükselişi sentez hızıyla orantılıdır ve patolojik stimulus ortadan kalkınca hızla düşer (28,32). CRP hepatositler tarafından proinflamatuvar bir sitokin olan IL-6'nın transkripsiyonel kontrolü altında

üretir. Adipoz doku, CRP metabolizmasında aktif role sahiptir ve IL-6'nın bir kısmını üretir (28,33).

İnflamatuvar hastalıkta artacak olan ilk akut faz proteinlerinden ve aynı zamanda en dramatik düzey artışı gösterenlerden biridir. Plazma düzeyi miyokard enfarktüsü, stres, travma, enfeksiyon, inflamasyon, cerrahi veya neoplastik proliferasyon sonrası çok artmaktadır (14). Serum CRP düzeyi inflamatuvar, enfeksiyöz ve neoplastik hastalıklarda hastalık aktivitesi ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde kullanışlı bir biyolojik belirteçtir (34).

Karaciğer fonksiyon bozukluğu gelişen hastalıklarda CRP üretimi bozulur. CRP fosfotidilkolin, modifiye düşük dansiteli lipoprotein, hasarlanmış hücre zarı veya apoptotik hücreler gibi ligandlara bağlandığında; C1q ve faktör H tarafından algılanır ve kompleman yolunu aktive eder (28). CRP'nin kalıtsal immünite, proinflamatuvar patofizyolojik etkiler ve otoimmünitenin korunmasında da rol oynadığı belirtilmektedir (28,35).

CRP'in plazma yarı ömrü yaklaşık 19 saattir. Bu süre sağlık ve hastalıkta sabittir. Bu nedenle dolaşımdaki CRP düzeyinin tek belirleyicisi sentez hızıdır (32). Sentez hızı da, CRP üretimini uyaran patolojik durumların şiddetini gösterir. Üretimi arttıran uyarı tümüyle bittiğinde dolaşımdaki CRP düzeyi hızla düşer (36). CRP'in sentez hızına, duyarlılığına ve normal aralığına bakıldığında, genel toplumdaki her bir birey; travma, klinik inflamasyon, veya subklinik inflamasyonda olabilecek nadir yükselmeler dışında sabit bir CRP düzeyine sahiptir. Serum CRP düzeylerinde mevsimsel bir değişim gözlenmemektedir (37). Ayrıca diüurnal değişimi yoktur ve diyetten etkilenmez (30).

Yüksek duyarlıklı CRP (hsCRP), klasik CRP den farklı bir analit izlenimi yaratmasına rağmen gerçekte farklı değildir. Kullanılan ölçüm yöntemi ile daha düşük düzeydeki CRP'nin saptanabildiğini ifade eder (38). hsCRP' nin deteksiyon limiti 0,3 mg/L'den azdır (14). hsCRP düşük derecede sistemik inflamasyonun duyarlı bir belirteçidir. Sistemik inflamatuvar durumlar olarak bilinen akut enfeksiyonlar yanında; boy, vücut kütle indeksi, diyabet, sigara ve alkol tüketimi gibi özelliklerin de hsCRP düzeyini etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle hsCRP düzeyleri yorumlanırken bu özellikler göz önüne alınmalıdır (39).

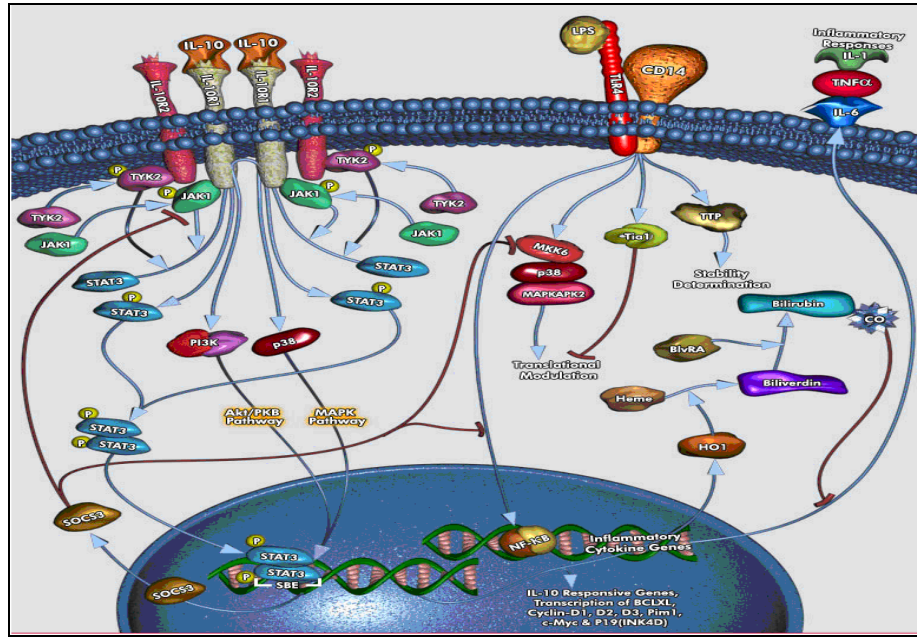
2.2.4. İnterlökin-10

IL-10, 34-40 kDa ağırlığında 160 aminoasitten oluşan protein yapısında bir moleküldür ve 4 alt üiteden meydana gelir (14). IL-10'nun sentezinden sorumlu olan IL-10 geni, 1. kromozom (1q31-32) üzerinde bulunur ve 4.89 kb uzunluğundadır. IL-10 T lenfositler, B lenfositler, makrofajlar, keratinositler gibi birçok hücre tarafından üretilir (23).

IL-10'un üretimi T lenfositlerde IL-12 ve IL-6 tarafından, monositlerde ise TNF α tarafından arttırılır. Lipopolisakkaritler tarafından uyarılan monositlerde proinflamatuvar sitokin olan TNF α 'nın üretimi ile antiinflamatuvar etkiye sahip olan IL-10 salınımı da gerçekleşir. IL-10, Tip II sitokin reseptörüne bağlanmaktadır. Makrofajların IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 ve TNF α salgılamasını ve T lenfositlerin IFN α salgılamasını baskılar. Bunu TNF α , IL-1 ve IL-6 gibi sitokinlerin sentezini transkripsiyonel (TNF α ve IL-1) ve posttranskripsiyonel (IL-1 ve IL-6) düzeyde baskılayarak gerçekleştirir (40,41).

Fonksiyonel IL-10 reseptör (IL-10R) kompleksleri, iki ligand bağlayıcı alt birim (IL-10R-Alfa veya IL-10R1) ve iki adet aksesuar sinyalizasyon alt birimden (IL-10R-Beta veya IL-10R2) oluşan tetramer yapısındadır (Şekil 5) (42). IL-10'nun ekstrasellüler IL-10R1'e bağlanması ile yapısal olarak IL-10R1 ve IL-10R2 ile ilişkili olan Janus kinaz-1 (JAK1) ve tirozin kinaz-2 (TYK2) fosforillenir. Bu kinazlar daha sonra IL-10R1 zincirinin intrasellüler kısmında bulunan spesifik tirozin rezidülerini fosforiller. JAK1 ile TYK2, latent transkripsiyon faktörü ve sinyal dönüştürücü ve aktivator transkripsiyon-3 (STAT3) için yerleştirme görevi yaparlar. Çekirdekte çeşitli IL-10 duyarlı genlerin aracılığı ile STAT bağlayıcı elemanlara yüksek afinite ile bağlanırlar. Yapısal olarak aktif STAT3 formları, anti-apoptotik ve hücre döngüsü-ilerleme genleri örneğin BCLXL, Cyclin-D1, Cyclin-D2, Cyclin-D3, Cyclin-A, Pim1, c-Myc ve p19 (INK4D)'nin transkripsiyonunu artırırlar (43). IL-10-duyarlı genlerinden biri olan sitokin sinyal süpresör-3 (SOCS3) JAK / STAT bağımlı sinyalleri inhibe eden yeni tanımlanmış gen ailesinin bir üyesidir ve TNF- α , IL-1 gibi endotoksinle indüklenen genleri içeren hücrelerde birçok genin ekspresyonunu inhibe edebilir. STAT3 ve SOCS3 her ikisinde LPS ve TNF gibi inflamatuvar uyarı ile aktive olabilirler. Bu yolun önemli özelliğinden biride SOCS3 aktivasyonunun STAT3'den bağımsız mekanizma ile indüklenebilir olmasıdır (44)

IL-10, TNF translyasyonunu aktive etmek için gerekli olan p38MAPK yolunun aktivasyonunda da rol oynar. IL-10 aracılı sinyaller öncelikle TNF mRNA translyasyonunu hedefler. IL-10, hem oksijenaz-1 (HO1)'in makrofaj ve J774 hücre dizisinde güçlü bir indükleyicisidir. HO1 indüksiyonu, transkripsiyon düzeyinde gerçekleşir ve p38 yolağı üzerinden aracılık etmektedir. HO1 hem biyosentezine katılır ve karbonmonoksit, serbest demir ve biliverdin reaksiyonlarını katalizler. Makrofajlarda HO1 ile hem degradasyonu sonucu oluşan CO, IL 10'nun antiinflamatuvar etkisine aracılık eder (45).



Şekil 5: IL10' un hücresel etkisi (42)

IL-10, Th2 lenfositleri tarafından üretilen sitokinleri inhibe etmesinden dolayı, allerjik reaksiyonların şiddetinin azalmasına neden olur (14). Pleiotropik bir etkiye sahip olan IL-10 bazı özel immün reaksiyonların kontrolünde ve hücre aracılı immün cevabın engellenmesinde rol oynamaktadır. IL-10 genel olarak proinflamatuvar sitokinleri ve akut faz cevabını inhibe ederken, B hücrelerinin plazmositlere dönüşümüne neden olmaktadır (22). Ayrıca makrofajlarda NOS'un uyarılmasını da azaltır. IL-10, IL-4 ve IL-13 ile birlikte fibrinojen biyosentezini baskılayarak koruyucu bir vasküler etki sağlar. IL-2 ve IL-3 bağımlı T lenfosit proliferasyonunu artırarak, lokal birikimini sağlar (46).

2.3. Anjiogenezis

Embriyonik ve postembriyonik dönemde, dolaşım sisteminin gelişmesi ve sürekliliği için yeni damar oluşumu gereklidir. Embriyonik dönemde görülen ve kök hücrelerinin farklılaşmasından meydana gelen yeni kan damarı oluşumu vaskülogenez olarak adlandırılır (47). Anjiogenezis ise varolan vaskülarite üzerinden yeni kan damarlarının büyüme ve gelişmesidir (48). Damarsal ağlarının uzanması ve değişimi için yeni kapillerlerin oluşması, tomurcuklanma ve önceden oluşan damar ağının yeniden düzenlenerek küçük ve büyük damarları oluşturması gerekmektedir (49). Gelişen damarsal yapıların olgunlaşmaları, perivasküler hücrelerin yeniden yapılanmasına ve bazal membran üzerinde yapılaşmasını sağlayan faktörlerin varlığına bağlıdır. Embriyonik damarsal sistemin gelişmesi esnasında meydana gelen olaylar ile embriyonun oksijen ve besin ihtiyacı, erişkin bir organizmada anjiogenezis oluşumunda, özellikle hipoksinin aktive ettiği metabolik cevaplarla benzerlik göstermektedir (50, 51).

Yeni damar oluşumu, bazal membranın proteolitik enzimler tarafından yıkılması, endotel hücrelerin aktivasyonu ve proliferasyonu ile tübül oluşumu, damar stabilizasyonu ve ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesi gibi olayları kapsayan çok basamaklı bir süreçtir. Anjiyogenezis süreci damar endotelini döşeyen kollajen, laminin gibi glikoproteinlerden ve heparan sülfat gibi proteoglikanlardan oluşan bazal membranın proteolitik yıkımı ile başlamaktadır (52).

Endotel hücreleri göç etmek ve çoğalmak üzere uyarıldığında membran ve hücreler arasında bir bölünme meydana gelmektedir. Normalde, endotel hücreleri yayılma etkisi göstermeyen tek bir tabaka oluşturmakta ancak anjiyogenezis sırasında çoğalıp yayılma göstermektedir. Sağlam veya hasarlı dokularda üretilip salgılanan anjiyogenik büyüme faktörleri komşu dokulara difüzyon yolu ile geçmektedir. Anjiyogenik büyüme, yakınlarında önceden var olan kan damarlarının endotel hücrelerinde bulunan özgün reseptörlere bağlanmaktadır. Büyüme faktörleri tarafından aktive edilen proteolitik enzimler, bazal membranın ve endotel hücrelerini döşeyen ekstrasellüler matriks bileşenlerinin yıkımına neden olmaktadır. Bu yıkımı da endotel hücrelerinin uyarılması ve kapiller filizlenme izlemektedir (53).

Anjiyogenik uyarı, proteolitik yıkım ile kısa bir süre sonra endotel hücreleri aktive etmektedir. Endotel hücreleri ekstrasellüler matrikse göç ederek çoğalmakta ve

bu süreçte en etkili anjiyogenik faktör olarak VEGF rol oynamaktadır (54). VEGF gibi büyüme faktörlerinin aktivasyonu, hücrelerin çoğalmasını ve ekstraselüler matriks içine göç etmesini uyarmaktadır. Aynı zamanda, büyüme faktörleri tarafından aktive edilen proteolitik enzimler bazal membranın ve endotel hücrelerini döşeyen ECM bileşenlerinin yıkılmasına neden olmaktadır. Mitojenik endotel hücreleri kapiller filizleri oluşturmakta, integrinler gibi membran proteinleri de bu süreç içinde yer alarak endotel hücrelerinin birbirine ve ECM'e tutunmalarına yardımcı olmakta, böylece yeni kapillerler oluşmaktadır. Büyüme faktörlerinin inhibisyonu veya büyüme faktör inhibitörlerinin varlığı anjiyogenezi inhibe etmekte, ECM'in proteolitik yıkımı da inhibe olarak yeni oluşmuş kapillerler etrafında matriks bileşenleri sentez edilmektedir (55).

Kan damarlarının gelişmesi proanjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler arasındaki dengeye bağlıdır (56). Proanjiyogenik faktörler ile antianjiyogenik faktörler arasında normalde bulunan dengenin proanjiyogenik faktörler lehine değişmesi sonucu yeni damar oluşumu meydana gelir. Anjiyogenezi uyaran en önemli sitokinler; VEGF ve FGF'dür (57). Anjiyogenez oldukça karmaşık bir mekanizma ile gerçekleşir. Ekstraselüler matriks ve matriksi çevreleyen hücrelerden salınan pek çok büyüme faktörü, sitokinler ve bunların reseptörleri anjiyogeneizde temel rol oynar (58,59). Damar endotelini oluşturan endotel hücreleri, anjiyogenez süreci içinde yer alan temel hücrelerdir. Perisitler ile birlikte kapiller damar duvarlarını oluşturarak ana damarları, dalları ve kapiller ağı oluşturuucu genetik bilgileri içermektedir (60).

Yeni kapiller damarlar düz kas içermeyen küçük venüllerden gelişir. Anjiyogenik uyarının varlığında venülün içindeki endotel hücreleri damar duvarından dışarı çıkarlar. Anjiyogenik uyarıya doğru endotel hücreleri lineer dizilim göstererek ilerler ve kapiller tomurcuklar oluştururlar. Daha sonra tomurcuğun içinde lümen oluşur. Endotel hücreleri prolifer olmaya devam eder ve tomurcuk şeklinde birbirleri ile birleşerek kan akımına yol açarlar. Son olarak da bazal membran gelişerek yeni damar oluşumu tamamlanır (61,62). Anjiyogenik uyarıların artışı ve anjiyogenez inhibitörlerinin azalması anjiyogenezi başlatmaktadır. Anjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler Tablo 2'de gösterilmektedir (63).

Tablo 2: Anjiogenik ve antianjiogenik faktörler

Proanjiogenik Faktörler	Antianjiogenik Faktörler
VEGF A	Endostatin, vazostatin
VEGF B	Anjiostatin
VEGF C	γ ve α interferon
VEGF D	Trombospondin (TSP)
Fibroblast büyüme faktörü (FGF)	Fibronektin
Anjiogenin	Trombosit faktör 4 fragment
Anjiopoetin-1	Epidermal büyüme faktörü fragmenti
Transforme edici büyüme faktörleri (TGF α , TGF β)	Doku metalloproteinaz inhibitörleri
Tümör nekrozis faktör (TNF α)	Retinoik asit
Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri (PDGFG)	Talidomid
Trombosit kaynaklı endotelial hücre büyüme faktörleri	IL1, IL12
Hipoksi ile indüklenen faktör (HIF-1)	Anti-VEGF
Bradikinin ve türevleri	Toramifen sitrat
IL2, IL6, IL8	NM-3
Granülosit stimulan faktör (G-CSF)	TNP-470
Granülosit-makrofaj stimulan faktör (GM-CSF)	Kortikosteroid
Epidermal büyüme faktörü (EGF)	Tip 1 kollajen peptidleri
İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1)	Anjiostatin plazminojen fragmenti
Hepatosit büyüme faktörü	Prolaktin
Plasental büyüme faktörü	XVIII kollojen fragmenti
Vitaxin α V β 3	Anti vitaksin, Anti α V β 3
12-Lipoksijenaz (12-LOX)	Arsenik trioksit

Mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının gelişmesi demek olan anjiyogenez, vücutta doğal olarak ortaya çıkan bir süreç olup, bazı durumlarda patolojik de olabilmektedir. Fizyolojik anjiyogenez; embriyogenez, yara iyileşmesi ve kadın üreme sisteminde gözlenmektedir (64). Ancak kontrolsüz anjiyogenez diyabetik retinopati, ateroskleroz, kronik inflamasyon, tümör büyümesi ve metastazı gibi birçok patolojik durumun varlığından sorumlu tutulmaktadır (65).

Proanjiogenik ve antianjiogenik faktörler arasındaki denge bozulduğunda anjiyogenez kontrol edilememektedir. İnflamatuvar hastalıklarda (artrit, kronik inflamasyon, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, psöriazis), çeşitli kanserlerde (meme, mesane, kolon, akciğer, nöroblastom, melanom, böbrek, pankreas, uterus, serviks, glioblastom) ve göz hastalıklarında (yaşla ilişkili maküler dejenerasyon, proliferatif retinopati) anjiyogenez patolojik olarak ortaya çıkmaktadır (66).

2.3.1.Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

Vasküler permeabilite faktörü veya vaskülotropin olarak da bilinen VEGF, 45 kDa'luk homodimerik bir glikoproteindir. VEGF, heparin-binding glikoprotein yapısında bir molekül olup çeşitli alt grupları tanımlanmıştır (67). VEGF, özellikle endotel hücreleri için özgül etkilere sahip olan multifonksiyonel bir büyüme faktörü ailesidir (68). Endotel hücresinin proliferasyonuna, migrasyonuna ve diferensiasyonuna sebep olur (69). VEGF hem gelişim sırasında, hem de erişkin dönemde vaskülogenez ve anjiogenez için önemli ve gereklidir (70). Arterler, venler ve lenfatiklerden köken olan mikrovasküler ve makrovasküler endotelyal hücreler için potenet bir mitojendir. Fakat diğer hücre tipleri için sürekli ve yoğun bir mitojenik aktivitesi yoktur. Anjiogenik etkilerine ek olarak endotelyal hücrelerin migrasyon aktivitesini uyarmaktadır. Bu faktörün geri çekilmesi halinde vaskülarizasyonun gerilediği gözlemlenmiştir (71).

VEGF üzerine yapılan çalışmalar, bu ailenin trombosit kaynaklı büyüme faktörleri (PDGF) süperailisinin önemli bir üyesi olduklarını ortaya koymuştur. Aynı zamanda VEGF ailesinin VEGF-A (Human-VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve Plasenta büyüme faktörü (PlGF) adı verilen altı üyeden meydana geldiği gösterilmiştir (72,73). VEGF'nin A,B,C,D,E ya da aminoasit sayılarına göre VEGF121, VEGF165, VEGF189, VEGF206 ve VEGF145 gibi izoformları bulunmaktadır. Bu izoformlar, moleküler kütle ve hücre yüzeyi heparan sülfat proteoglikanlarına tutunma gibi biyolojik yönlerden farklıdırlar (67,74).

VEGF165, VEGF'nin vücutta bulunan predominant izoformudur. Kısmen hücre yüzeyi ve ekstrasellüler matrikse bağlı kalan heparin bağlayıcı temel solubl homodimerdir. Ekstrasellüler matriksin heparin içeren proteoglikanlarına büyük oranda bağlı bulunmaları ve sınırlı salınımları nedeniyle VEGF145, VEGF189 ve VEGF206 izoformları dolaşımında çok az miktarda bulunurlar. VEGF121, heparine bağlanmayan serbest solubl proteindir. Anjiyogenez oluşturmada en etkili izoformları ise VEGF121 ve VEGF165'dir (75).

Embriyolojik gelişimin ilk dönemlerinin sonuna doğru VEGF düzeylerinde azalma, organogenez döneminde ise yükselme gözlenir. Yine VEGF yetişkinde akciğer alveolar hücrelerde, böbrek glomerüllerinde, proksimal tübüllerde ve düşük seviyede de olsa karaciğer hepatositleri ve beyinde gösterilmiştir (76). Ayrıca,

adrenal korteksin tüm hücrelerinde ve testiste Leydig hücrelerinde VEGF yapımına ait mRNA'ların sentezlendiği gösterilmiştir. VEGF'ün demonstrasyonu için yapılan immunositokimyasal çalışmalarda aktive makrofajlarda, arteriollerini çevreleyen fibroblastlarda, akciğer bronşiyol epitelinde, koroid pleksus epitelinde ve renal glomerül visseral epitelinde varlığı gösterilmiştir (77).

VEGF mRNA'sının transkripsiyonu; trombosit kaynaklı büyüme faktörü-BB, keratinosit büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü, TNF α , transforming büyüme faktörü- β 1 ve interleükin-1 β gibi çeşitli faktörler tarafından başlatılır. Sonuçta bu maddelerin mitojenik olmadığı, VEGF salgılanmasına yol açarak mitojeniteyi arttırdıkları gösterilmiştir (77). Ayrıca büyüme faktörlerinin haricinde, forbol esterleri ve prostaglandin E2 gibi bazı mediatörlerin de VEGF ekspresyonunu düzenledikleri görülmüştür (78).

Hipoksi, VEGF ve reseptörlerinin yapımını indükleyerek anjiogenezi başlatan en etkili stimuluslardan biridir. Buna örnek olarak büyüyen tümörlerin hipoksik merkezleri oluşması ve bunu engellemek için tümör hücrelerinden VEGF ekspresyonu ve yeni damar yapımı gösterilebilir. Yine kalp damarlarında tıkanmaya bağlı gelişen hipoksi sonrasında da VEGF ekspresyonu artmaktadır. Hipoksinin VEGF'ü artırma mekanizmasının sadece bir kısmı çözülebilmektedir. VEGF yapımı hipoksi tarafından tetiklenirken, CO tarafından da inhibe edilmektedir. Hipoksinin yanında azalan pH ve sitokinler ile de VEGF ekspresyonu artmaktadır (69).

2.3.2. VEGF Reseptörleri

Endotel hücreleri VEGF'den faydalanabilmek için onun bağlanabileceği özgül reseptörleri sentezlemesi gerekir. Bu reseptörler 5 tanedir: VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, sVEGFR-1 ve sVEGFR-2. VEGF reseptörleri, ligandları ve etkileri Tablo 3'de gösterilmiştir (4).

Tablo 3: VEGF reseptörleri, ligandları ve etkileri

Reseptörler	Büyüme Faktörleri	Biyolojik Etkileri
VEGFR-1	VEGF-A VEGF-B PlGF	Hücre-hücre ve hücre/matriks ilişkisinin kontrolü, vaskülogenez ve tuzak reseptör
VEGFR-2	VEGF-A VEGF-C VEGF-D VEGF-E	Anjiojenez, proliferasyon ve migrasyon
VEGFR-3	VEGF-C VEGF-D	Lenfanjiojenez, lenfatik metastaz
sVEGFR-1	VEGF-A VEGF-B PlGF	VEGFR-1'in kompetitif inhibitörü
sVEGFR-2	VEGF-A VEGF-C VEGF-D VEGF-E	sVEGFR-1'e benzer etki

İlk bulunan reseptörler VEGF reseptör-1 (VEGFR-1, flt-1, fms benzeri tirozin kinaz) ve VEGF reseptör-2 (VEGFR-2, flk-1, fetal karaciğer kinaz)'dir. Bunlar ilk olarak embriyogenez sırasında sentezlenirler (69). Bu iki reseptörün amino asitlerinin %44'ü ortaktır. Bu reseptörler yaklaşık 1300 amino asit ve iki parçadan oluşurlar. Birinci parça, hücre içinde kalan ve tirozin kinazın etkinlik alanlarını içeren hücre içi bölümdür. İkinci parça ise, hücre dışında kalan, tek, kısa membran köprüleri dizisi ve

ligand bağlama bölgeleri içeren 7 adet immüoglobülin benzeri yapıdan oluşan hücre dışı bölümdür (3).

Her iki reseptör de tirozin kinaz fonksiyonuna sahip olup endotel hücrelerinden ve retinal epitel hücrelerinden eksprese edilmektedir (79). VEGF reseptörleri özgül ligandlarına bağlandığında dimer yapısı oluşturur ve bu da hücre içerisindeki mekanizmaları tetikleyerek cevap oluşturmaktadır. VEGF'nin reseptörlerine bağlanması ile fosfolipaz C'i aktifleyerek inozitol 1,4,5-trifosfat ve kalsiyumun hücre içi düzeylerini artırır. Kalsiyum seviyelerindeki artış nitrik oksit sentazı (NOS) tetikleyerek NO üretimini sağlar. NOS aktivitesi VEGF'nin vasküler permeabiliteyi artırması ve anjiogenezi stimüle etmesi için gereklidir (80). Damar endotelinin en önemli büyüme ve idame faktörlerinden biri olan VEGF, hücre migrasyonunu uyarır ve apoptozu inhibe eder (54). Heparan sülfat da önemli bir rol üstlenerek VEGF'ün reseptörüne bağlanmasına yardım eder ve bu olayı düzenler (69).

VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin farklı sinyal özellikleri olduğu gösterilmiştir. VEGFR-1, VEGF'ün etki mekanizmasında önemli olmayıp, aksine tuzak ve yanıltıcı bir reseptördür (81). VEGFR-1 ya yanıltıcı olarak görev yapmakta ya da sinyalizasyonu baskılayarak negatif bir etki göstermektedir (68). VEGFR-2 ise VEGF'ün anjiogenetik etkilerini gösterdiği başlıca reseptördür. VEGF'nin üzerine yapılan çalışmalarda, bir başka VEGF reseptörü daha bulunmuş ve VEGFR-3 (flt-4) adı verilmiştir. Bu reseptörün özellikle lenfatik damarların gelişiminde rol alan VEGF-C ve VEGF-D'nin bağlandığı reseptörler olduğu ve lenfanjiogenezde önemli olduğu saptanmıştır(81).

Bu üç reseptörün yanısıra plazmada VEGFR-1'in 7 tane Ig benzeri bölümünün 6'sını içeren ve kanda serbest olarak dolaştığı saptanan başka bir reseptöre rastlanmıştır. Bu reseptörün VEGFR-1'in çözünebilir bir formu olduğu düşünülmüş ve çözünebilir VEGFR-1 (sVEGFR-1) adı verilmiştir (71). Bu form VEGF'in kompetitif inhibitörü olarak görev yapmaktadır. Dolaşımdaki VEGF, bu reseptöre bağlanarak diğer VEGFR'lerine bağlanamamakta, inaktive olmakta ve fonksiyonunu yapamamaktadır (82). VEGFR-2'nin de plazmada serbest olarak dolaşan çözünebilir bir formu olduğu tespit edilmiş, buna da sVEGFR-2 adı verilmiştir (83).

2.4. Azot Protoksit (N₂O)

Azot protoksit genel anestezi uygulamalarında volatil olarak kullanılan tek inorganik bileşiktir (1). Azot protoksit kontrollü bir şekilde ısıtılan amonyum nitrat'dan oluşur. Azot protoksit solunum yollarını irrite etmeyen renksiz ve kokusuz bir gazdır. Oda ısısında buhar basıncı 50 atmosferdir. Yanıcı değildir, fakat 450°C'nin üzerinde azot ve oksijene ayrılarak yanmayı kolaylaştırır. Kan-gaz dağılım katsayısı [0.47] ve kanda erirliği düşüktür. Bu özellikleri etkisinin hızlı başlayıp hızlı sonlanmasıyla ve anestezinin daha kolay kontrol edilebilmesiyle sonuçlanır (84).

Serebral kan akımı ve serebral kan volümünü artırarak kafa içi basıncında hafif yükselme yapar. Serebral oksijen tüketimini de artırır. Doğrudan etkiyle miyokard depresyonuna neden olur. Bu etki sağlıklı bireylerde sempatik aktivitenin artışı ile dengelenir. Bu mekanizma, koroner arter hastalığı ya da ciddi hipovolemisi olanlarda yetersiz kalabilir. Azot protoksit endojen katekolaminleri artırdığı için epinefrin kökenli disritmiler sık görülebilir. Solunum sayısını artırır, tidal volümü azaltır. Diğer inhalasyon ajanları gibi önemsiz derecede kas gevşemesi oluşturur. Hepatik ve renal kan akımını azaltır. Medulla oblongatada yer alan kusma merkezinin ya da kemoreseptör triger zonu uyarmasına bağlı olarak, postoperatif bulantı ve kusmaya neden olduğu düşünülmektedir (85).

Cerrahi girişim vücut için stres yaratıcı nitelikte olup, nöro-immüno-endokrin sistemlerinden değişik yanıtların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu yanıtlar farklı anestezi yöntemleri ve ajanlarıyla farklı sonuçlar doğurabilmektedir (5).

Anestezi ve cerrahi ile oluşan immünolojik değişiklikleri: T ve B lenfositlerin sayısında azalma, NK hücre aktivitesinde azalma, mitojenlere ve mikrobiyal antijenlere yanıtda depresyon olarak özetleyebiliriz (86). Azot protoksit nötrofil ve monositlerin kemotaktik migrasyonunu inhibe eder. Azot protoksit kompleman 5a (C5a) ile uyarılan nötrofillerin oksidatif yanıtını, yanıt veren nötrofillerin yüzdesini ve hidrojen peroksit yapımını azaltır (6).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Grubu

Tez çalışması ile ilgili olarak, Karaelmas Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu'nun 15.01.2009 tarih 2009/01/15 sayılı kararı ile çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna dair onay alındı (Ek 1).

Bu çalışmaya Ocak 2009 ile Ocak 2010 tarihleri arasında Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi, merkezi ameliyathanesinde 44 ASA I-III, 18-65 yaş arası, 1-4 saat sürecek elektif ürolojik cerrahi girişim geçirecek erişkin hastalar çalışmaya dahil edildi. Kronik metabolik hastalığı olan, kalp yetmezliği, böbrek yetmezliği, karaciğer yetmezliği, şiddetli anemisi olan hastalar çalışmaya alınmadı. Tüm hastalara standart olarak ameliyattan bir saat önce İM midazolam (0.07 mg/kg) premedikasyonu uygulandı. Hastalardan anestezi öncesi dönemde TNF α , IL-6, IL-10, hsCRP, VEGF, çözünebilir VEGFR1 düzeylerinin belirlenmesi amacıyla kan örneği alındı. Tüm hastalara indüksiyondan önce 5-7 ml/kg Ringer Laktat ile sıvı replasmanı uygulandı. Tüm hastalara 1 dakika süreyle 10 L/dk %100 oksijen ile preoksijenasyon uygulandı. Anestezi indüksiyonu 2.4 mg/kg propofol ve 1 μ g/kg fentanil ile sağlandı. Kas gevşetici olarak rokuronyum 0.6 mg/kg dozda verildikten 3 dk sonra entübasyon yapıldı. Entübasyonu takiben 5 dakika süre ile 6L/dk yüksek akım uygulandı. Anestezi idamesi grup 1 de 1-2 MAC sevofloran ile % 50 O₂ % 50 N₂O olacak şekilde, grup 2 de 1-2 MAC sevofloran ile % 50 O₂ % 50 hava olacak şekilde 4 L/dk taşıyıcı gaz altında sağlandı. Grup 2 de idame analjezi gereksinimi 1 mcg/kg/saat fentanil infüzyonu ile sağlandı. Ventilasyon tidal volüm (TV) 6-8 ml/kg, I:E oranı 1:2, solunum frekansı ise normokapniyi temin edecek olan Et CO₂, 35-40 mmHg düzeyini sağlayacak şekilde sağlandı. FiO₂ değeri %30-35 arasında korundu. Operasyon bitmeden son cilt sütürüne başlandığında anestezi kesilerek hasta % 100 O₂ ile ventile edildi. Kas gevşetici 0,05 mg /kg neostigmin ve 0,01 mg/kg atropin ile antagonize edildi. Hasta antagonistler yapıldıktan sonra elle solutulmaya başlandı, 10 sn de bir spontan solunum kontrol edildi. Tüm hastalardan anestezinin 60. dakikasında, anestezi ajan sonlandırılması ardından ve postoperatif (postop) 24. saatte TNF α , IL6, IL10, hsCRP, VEGF, çözünebilir VEGFR1 düzeylerinin belirlenmesi amacıyla kan örneği alındı.

3.2. Örneklerin Toplanması

Damar yolu açıldıktan sonra tüm hastalardan anestezi öncesinde (preoperatif), anestezinin 60. dakikasında (intraoperatif 60.dk), anestezi ajan sonlandırılması ardından (postoperatif 0.dk), postoperatif 24 saat sonra serum IL-6, TNF α , hsCRP, IL-10, VEGF ve çözünebilir VEGFR1 düzeyleri için kanlar 10 ml'lik jelli, seperatör içeren vakumlu tüplere (VACUETTE) alındı. Kanların pıhtılaşması beklendikten sonra 3500 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifuj sonrası ayrılan serum örnekleri ölçüm için -80°C 'de analiz edilene kadar saklandı. Laboratuvar çalışmaları Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapıldı.

3.3. Ölçümler Sırasında Kullanılan Cihazlar

1. Vorteks: ZX3 (Velp Scientifica, Milan, Italy)
2. Mikroplak Okuyucu: ELX800G (BIO-TEC Instruments, Winooski, USA)
3. Yıkama cihazı: ELX 50/8 (BIO-TEC Instruments, Winooski, USA)
4. Plak çalkalayıcı: Easy shaker EAS 2/4 (SLT Lab Instruments, Grödig, Austria)
5. -80°C Derin dondurucu: VXS490 (Jouan Saint, Herblain, France)
6. Cam ve otomatik pipetler (Eppendorf, Hamburg, Germany)
7. Santrifüj (Jouan Saint, Herblain, France)
8. Dispensör (0,05-50 ml)
9. Pipet ve dispensör uçları
10. Ependorf tüpleri
11. Balon joje(250 ml)
12. Mezur (250 ml)

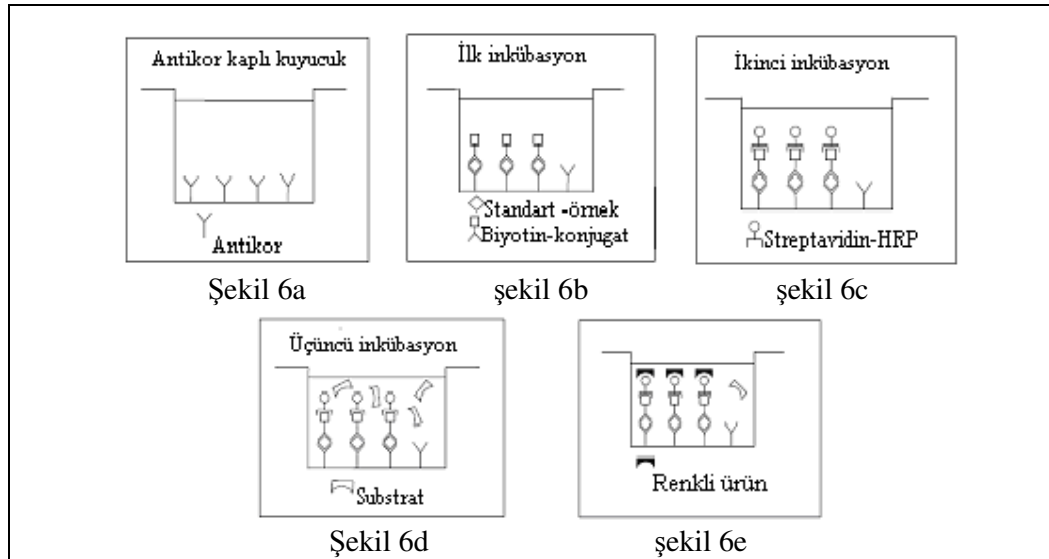
3.4. Test Ölçümleri

Serum IL-6, TNF α , hsCRP, IL-10, VEGF ve VEGFR1 düzeyleri solid faz sandviç ELISA yöntemiyle ölçüldü. IL-6, IL-10 ve VEGF ELISA kiti (Invitrogen, Camarillo, USA), hsCRP ELISA kiti (Biomerica, Newport Beach, USA), TNF α ELISA kiti,

(BioSource, Nivelles, Belgium), VEGFR1 ELISA kiti (Bender MedSystems Vienna, Austria) ELX 50/8 markalı yıkama cihazı ile ve ELX 800G markalı ELISA plak okuyucu cihazı kullanılarak numuneler çalışıldı.

3.4.1. Test prensibi

ELISA plak üzerinde bulunan kuyucukların iç yüzeyi ölçülmek istenen moleküle özgü antikorlar ile kaplıdır (Şekil 6a). Standartlar ve serum örnekleri ile biyotin kaplı poliklonal antikorların eklenerek inkübe edilmesi sonucu antikor-antijen-antikor'dan oluşan sandviç yapısı meydana gelir (Şekil 6b). İnkübasyonun ardından bağlanmayan moleküller kuyucuklardan yıkanarak uzaklaştırılır. Daha sonra bağlı haldeki biyotin konjugata spesifik olarak bağlanabilen streptavidin ile konjuge horseradish peroksidaz (HRP) eklenerek inkübe edilir (Şekil 6c). Serbest kalan konjugat yıkanarak uzaklaştırılır. Peroksidaz ile reaksiyona giren tetrametil benzidin (TMB) substratı kuyucuklara eklenerek reaksiyon başlatılır (Şekil 6d). Belirlenen inkübasyon süresinin bitiminde sülfirik asit ile durdurularak oluşan sarı renkli ürün ELISA okuyucu cihazında 450 nm'de okuma yapılır (Şekil 6e). Kalibrasyon eğrisi kullanılarak elde edilen okuma değerlerinden sonuçlar hesaplanır.



Şekil 6: Solid faz sandviç ELISA yönteminin prensibi

3.4.2. IL6 ölçümü

Serum IL-6 düzeyinin ölçümü solid faz sandviç ELISA prensibine dayanan İnvitrogen firmasının IL-6 (Catalog No: KHC006, 1 plate, Camarillo, USA) kiti kullanılarak yapıldı.

Kit İçeriği:

- IL-6 antikorları ile kaplanmış plak (8x12=96 kuyucuk)
- Standart (2500 pg/mL)
- Standart dilüsyon tamponu
- IL-6 Biotin konjugat (Biotin etiketli anti-IL6)
- Streptavidin peroksidaz (HRP)
- Streptavidin peroksidaz dilüent
- TMB substrat
- Stop solüsyonu (Sülfirik asit)
- Yıkama solüsyonu

Standartların hazırlanması: Konsantrasyonu 2500 pg/ml olan standart, standart dilüent ile çözülüp, yavaşça çalkalandı, 10 dk oda ısısında bekletildi. Bu stok çözelti, standart dilüent ile 1:5 oranında dilüe edilerek 500 pg/ml konsantrasyonundaki ilk standart oluşturuldu. Daha sonra seri dilüsyonlar ile 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8 konsantrasyonlarda 7 adet standart elde edildi. Kör olarak standart dilüenti kullanıldı.

Streptavidin peroksidaz solusyonunun hazırlanması: 100 kat konsantre olan konjugat, streptavidin peroksidaz dilüsyon tamponu ile seyreltildi. (12 ml konjugat 120 ml streptavidin peroksidaz dilüsyon tamponu ile seyreltildi).

Yıkama solüsyonu hazırlanması: 25 kat konsantre yıkama çözeltisi deiyonize ile seyreltildi (50 ml yıkama çözeltisi, 1.25 L deiyonize su ile çözüldü).

Tablo 4: IL-6 çalışma prosedürü

	Kör	Standart	Örnek
Kör (standart dilüent)	100 µl	-	-
Standart (1-7)	-	100 µl	-
Örnek	-	-	100 µl
Biyotin konjugat	50 µl	50 µl	50 µl
Oda ısısında 2 saat inkübasyon İnkübasyondan sonra yıkama cihazında her bir kuyucuk için 400 µl yıkama solusyonu ile 4 kez yıkama			
Streptavidin-HRP	100 µl	100 µl	100 µl
Oda ısısında 30 dakika inkübasyon İnkübasyondan sonra yıkama cihazında her bir kuyucuk için 400 µl yıkama solusyonu ile 4 kez yıkama			
Substrat	100 µl	100 µl	100 µl
Oda ısısında 30 dakika inkübasyon (karanlıkta)			
Stop solusyonu	100 µl	100 µl	100 µl

ELISA okuyucu cihazda 450 nm’de absorbanslar alındı. Sonuçlar kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı.

Üretici firma tarafından tespit edilmiş deteksiyon limiti <2 pg/ml olup ölçüm için kesinlik göstergesi olan gün içi CV % 5.1-7.7 ve günler arası CV % 7.8-9.3’dür.

Referans aralığı: Üretici firma tarafından 8 sağlıklı kişinin taze serumu ölçüldüğünde, 720 ile 12000 pg/ml (ortalama 2500 pg/ml) arası değerler elde edilmiştir.

3.4.3. TNF α ölçümü

Serum TNF α düzeyinin ölçümü solid faz sandviç ELISA prensibine dayanan BioSource firmasının TNF α (Catalog No: KAP1751: 1 plate, Nivelles, Belgium) kiti kullanılarak yapıldı.

Kit İçeriği:

- TNF α antikorları ile kaplanmış plak (8x12=96 kuyucuk)
- Standart
- Zero standart
- Kontrol
- TNF α konjugat
- Konjugat tampon
- İnkübasyon tampon
- TMB substrat
- Substrat tamponu
- Stop solüsyonu (sülfirik asit)
- Yıkama solüsyonu

Standartların hazırlanması: Standartlar ve kontroller 2 ml deiyonize su ile çözüldü. 0 pg/ml zero standart ve 6.8, 18, 52, 176, 518 pg/ml konsantrasyonlarda 5 adet standart elde edildi

Konjugat hazırlanması: 6000 μ l konjugat tamponuna 600 μ l konjugat eklenerek konjugat solüsyon elde edildi.

Substrat hazırlanması: 0.2 ml TMB substrat, substrat tamponuna eklenerek substrat solüsyonu elde edildi.

Yıkama solüsyonu hazırlanması: 200 kat konsantre yıkama çözeltisi deiyonize su ile seyreltildi.

Tablo 5: TNF α çalışma prosedürü

	Standart	Kontrol	Örnek
İnkübasyon tamponu	50 μ l	50 μ l	50 μ l
Standart (1-6)	200 μ l	-	-
Kontrol	-	200 μ l	-
Örnek	-	-	200 μ l
Oda ısısında 2 saat plak çalkalayıcıda 700 rpm'de inkübasyon İnkübasyondan sonra yıkama cihazında her bir kuyucuk için 400 μ l yıkama solusyonu ile 3 kez yıkama			
Zero standart	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Konjugat	50 μ l	50 μ l	50 μ l
Oda ısısında 2 saat plak çalkalayıcıda 700 rpm'de inkübasyon İnkübasyondan sonra yıkama cihazında her bir kuyucuk için 400 μ l yıkama solusyonu ile 3 kez yıkama			
Substrat	200 μ l	200 μ l	200 μ l
Oda ısısında 30 dakika plak çalkalayıcıda 700 rpm'de inkübasyon (karanlıkta)			
Stop solusyonu	50 μ l	50 μ l	50 μ l

ELISA okuyucu cihazda 450 nm'de absorbanslar alındı. Sonuçlar kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı.

Üretici firma tarafından tespit edilmiş deteksiyon limiti 0.7 pg/ml olup ölçüm için kesinlik göstergesi olan gün içi CV % 6.3-6.6 ve günler arası CV % 3.3-4.5'dir.

Referans aralığı: Üretici firma tarafından 30 sağlıklı kişinin taze serumu ölçüldüğünde, 4.6 ile 12.4 pg/ml arası değerler elde edilmiştir.

3.4.4. hsCRP ölçümü

Serum hsCRP düzeyinin ölçümü solid faz sandviç ELISA prensibine dayanan Biomerica firmasının hsCRP (Catalog No:7033: 1 plate Newport Beach, USA) kiti kullanılarak yapıldı.

Kit İçeriği:

- hsCRP antikorları ile kaplanmış plak (8x12=96 kuyucuk)
- Standart
- Kontrol
- hsCRP örnek dilüenti
- CRP enzim konjugat
- TMB substrat
- Stop solüsyonu
- Yıkama solüsyonu

Standartların hazırlanması: Standartlar 1 ml deiyonize su ile çözüldü. 0.005, 0.010, 0.025, 0.050, 0.100 mg/L konsantrasyonlarda 5 adet standart elde edildi.

Örneklerin hazırlanması: Örnekler 1:100 oranında örnek dilüenti ile dilüe edildi.

Yıkama solüsyonu hazırlanması: Yıkama solüsyonu olarak deiyonize su kullanıldı.

Tablo 6: hsCRP çalışma prosedürü

	Kontrol	Standart	Örnek
Standart (1-6)	-	10 µl	-
Örnek	-	-	10 µl
Kontrol	10 µl	-	-
CRP enzim konjugat	100 µl	100 µl	100 µl
Oda ısısında 45 dakika inkübasyon İnkübasyondan sonra yıkama cihazında her bir kuyucuk için 400 µl yıkama solusyonu ile 5 kez yıkama			
Substrat	100 µl	100 µl	100 µl
5 sn karıştırıp, Oda ısısında 20 dakika inkübasyon (karanlıkta)			
Stop solusyonu	100 µl	100 µl	100 µl

ELISA okuyucu cihazda 450 nm’de absorbanslar alındı. Sonuçlar kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı.

Üretici firma tarafından tespit edilmiş deteksiyon limiti 0.1 mg/l olup ölçüm için kesinlik göstergesi olan gün içi CV % 2.3-7.5 ve günler arası CV % 2.5-4.1’dir.

Referans aralığı: Üretici firma tarafından sağlıklı kişilerin taze serumu ölçüldüğünde, 0.068 ile 8.2 mg/L arası değerler elde edilmiştir.

3.4.5. IL-10 ölçümü

Serum IL-10 düzeyinin ölçümü solid faz sandviç ELISA prensibine dayanan İnvitrogen firmasının IL10 (Catalog No: KHC0101: 1 plate, Camarillo, USA) kiti kullanılarak yapıldı.

Kit İçeriği:

- IL-10 antikoları ile kaplanmış plak (8x12=96 kuyucuk)
- Standart(5000 pg/mL)
- Standart dilüsyon tamponu
- İnkübasyon tamponu
- IL-10 Biotin konjugat (Biotin etiketli anti-IL10)
- Streptavidin peroksidaz(HRP)
- Streptavidin peroksidaz dilüent
- TMB substrat
- Stop solüsyonu (Sülfirik asit)
- Yıkama solüsyonu

Standartların hazırlanması: Konsantrasyonu 5000 pg/ml olan standart, standart dilüent ile çözülüp, yavaşça çalkalandı, 10 dk oda ısısında bekletildi. Bu stok çözeltinin standart dilüent ile 1:5 oranında dilüe edilmesiyle 500 pg/ml konsantrasyonundaki ilk standart oluşturuldu. Daha sonra seri dilüsyonlar ile 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8 konsantrasyonlarda 7 adet standart elde edildi. Kör olarak standart dilüent kullanıldı.

Streptavidin peroksidaz (HRP) solusyonunun hazırlanması: 100 kat konsantre olarak verilen konjugat, streptavidin peroksidaz dilüsyon tamponu ile seyreltildi (12 ml konjugat 120 ml streptavidin peroksidaz dilüsyon tamponu ile seyreltildi).

Yıkama solüsyonu hazırlanması: 25 kat konsantre yıkama çözeltisi ile seyreltildi (50 ml yıkama çözeltisi, 1.25 L deiyonize su ile çözüldü).

Tablo 7: IL-10 çalışma prosedürü

	Kör	Standart	Örnek
Kör (standart dilüent)	50 µl	-	-
Standart (1-7)	-	50 µl	-
Örnek	-	-	50 µl
İnkübasyon tamponu	50 µl	50 µl	50 µl
Oda ısısında 2 saat inkübasyon İnkübasyondan sonra yıkama cihazında her bir kuyucuk için 400 µl yıkama solusyonu ile 4 kez yıkama			
Biyotin konjugat	100 µl	100 µl	100 µl
Oda ısısında 2 saat inkübasyon İnkübasyondan sonra yıkama cihazında her bir kuyucuk için 400 µl yıkama solusyonu ile 4 kez yıkama			
Streptavidin-HRP	100 µl	100 µl	100 µl
Oda 30 dakika inkübasyon İnkübasyondan sonra yıkama cihazında her bir kuyucuk için 400 µl yıkama solusyonu ile 4 kez yıkama			
Substrat	100 µl	100 µl	100 µl
Oda ısısında 30 dakika inkübasyon (karanlıkta)			
Stop solusyonu	100 µl	100 µl	100 µl

ELISA okuyucu cihazda 450 nm’de absorbanslar alındı. Sonuçlar kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı.

Üretici firma tarafından tespit edilmiş deteksiyon limiti <1 pg/ml olup ölçüm için kesinlik göstergesi olan gün içi CV % 2.9-4.8 ve günler arası CV % 2.9-5.5’dir.

Referans aralığı: Üretici firma tarafından 20 sağlıklı kişinin taze serumu ölçüldüğünde, <1 pg/ml elde edilmiştir.

3.4.6. VEGF ölçümü

Serum VEGF düzeyinin ölçümü solid faz sandviç ELISA prensibine dayanan İnvitrogen firmasının VEGF (Catalog No: KHG0112: 1 plate, Camarillo, USA) kiti kullanılarak yapıldı. Bu kitle VEGF165 izoformunun analizi yapılmaktadır.

Kit İçeriği:

- VEGF antikorları ile kaplanmış plak (8x12=96 kuyucuk)
- Standart (10.000 pg/ml)
- Standart dilüsyon tamponu
- İnkübasyon tamponu
- VEGF Biotin konjugat (Biyotin etiketli anti-VEGF)
- Streptavidin peroksidaz (HRP)
- Streptavidin peroksidaz dilüent
- TMB substrat
- Stop solüsyonu (Sülfirik asit)
- Yıkama solüsyonu

Standartların hazırlanması: Konsantrasyonu 10000 pg/ml olan standart, standart dilüent ile çözülüp, yavaşça çalkalandı. 10 dk oda ısısında bekletildi. Bu stok çözeltinin standart dilüent ile 1:5 oranında dilüe edilmesiyle 1500 pg/ml konsantrasyonundaki ilk standart oluşturuldu. Daha sonra seri dilüsyonlar ile 750, 375, 188, 93.8, 46.9, 23.4 konsantrasyonlarda 7 adet standart elde edildi. Kör olarak standart dilüent kullanıldı.

Streptavidin peroksidaz solüsyonunun hazırlanması: 100 kat konsantre olarak verilen konjugat, streptavidin peroksidaz dilüsyon tamponu ile seyreltildi (12 ml konjugat 120 ml streptavidin peroksidaz dilüsyon tamponu ile seyreltildi).

Yıkama solüsyonu hazırlanması: 25 kat konsantre yıkama çözeltisi ile seyreltildi (50 ml yıkama çözeltisi, 1.25 L deiyonize su ile çözüldü).

Tablo 8: VEGF çalışma prosedürü

	Kör	Standart	Örnek
İnkübasyon tamponu	-	50 µl	50 µl
Kör (standart dilüent)	100 µl	-	-
Standart (1-7)	-	100 µl	-
Örnek	-	-	50 µl
Standart dilüent	50 µl	-	50 µl
Oda ısısında 2 saat inkübasyon İnkübasyondan sonra yıkama cihazında her bir kuyucuk için 400 µl yıkama solusyonu ile 4 kez yıkama			
Biyotin konjugat	-	100 µl	100 µl
Oda ısısında 1 saat inkübasyon İnkübasyondan sonra yıkama cihazında her bir kuyucuk için 400 µl yıkama solusyonu ile 4 kez yıkama			
Streptavidin-HRP	-	100 µl	100 µl
Oda ısısında 30 dakika inkübasyon İnkübasyondan sonra yıkama cihazında her bir kuyucuk için 400 µl yıkama solusyonu ile 4 kez yıkama			
Substrat (karanlıkta)	100 µl	100 µl	100 µl
Oda ısısında 30 dakika inkübasyon (karanlıkta)			
Stop solusyonu	100 µl	100 µl	100 µl

ELISA okuyucu cihazda 450 nm’de absorbanslar alındı. Sonuçlar kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı.

Üretici firma tarafından tespit edilmiş deteksiyon limiti <5 pg/ml olup ölçüm için kesinlik göstergesi olan gün içi CV % 3.7-5.5 ve günler arası CV % 6.5-9.3’dür.

Referans aralığı: Üretici firma tarafından 15 sağlıklı kişinin taze serumu ölçüldüğünde, 40 ile 600 pg/ml (ortalama 270 pg/ml) arası değerler elde edilmiştir.

3.4.7. Çözünebilir VEGFR1 ölçümü

Serum çözünebilir VEGFR1 düzeyinin ölçümü solid faz sandviç ELISA prensibine dayanan Bender MedSystems firmasının çözünebilir VEGFR1 (Catalog No: BMS268/2: 1 plate, Vienna, Austria) kiti kullanılarak yapıldı.

Kit İçeriği:

- çözünebilir VEGFR1 antikoları ile kaplanmış plak (8x12=96 kuyucuk)
- Standart(20 ng/ml)
- çözünebilir VEGFR1 Biotin konjugat (Biotin etiketli anti- sVEGFR1)
- Konjugat dilüsyonu
- Assay tampon
- Streptavidin peroksidaz(HRP)
- TMB substrat
- Stop solüsyonu (Sülfirik asit)
- Yıkama solüsyonu

Standartların hazırlanması: Konsantrasyonu 20 ng/ml olan standart deiyonize su ile çözülüp, yavaşça çalkalandı. 10 dk oda ısısında bekletildi. Bu stok çözeltinin standart dilüent ile 1:2 oranında dilüe edilmesiyle 10 ng/ml konsantrasyonundaki ilk standart oluşturuldu. Daha sonra seri dilüsyonlar ile 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.32, 0.36 konsantrasyonlarda 7 adet standart elde edildi. Kör olarak standart dilüent kullanıldı.

Streptavidin peroksidaz solüsyonunun hazırlanması: 200 kat konsantre olarak verilen konjugat, konjugat dilüsyon tamponu ile seyreltildi (0.06 ml konjugat 11.94 ml konjugat dilüsyon tamponu ile seyreltildi).

Assay tampon hazırlanması: 20 kat konsantre olarak verilen assay tampon deiyonize su ile seyreltilir (5 ml assay tampon 95 ml deiyonize su ile seyreltildi).

Biotin konjugat hazırlanması: 100 kat konsantre olarak verilen biotin konjugat konjugat dilüsyon tamponu ile seyreltildi (0.06 ml konjugat 5.94 ml konjugat dilüsyon tamponu ile seyreltildi).

Yıkama solüsyonu hazırlanması: 20 kat konsantre yıkama çözeltisi ile seyreltildi (50 ml yıkama çözeltisi, 950 ml deiyonize su ile çözüldü).

Tablo 9: Çözünebilir VEGFR1 çalışma prosedürü

400 µl yıkama solusyonu ile 2 kez plak yıkama			
	Kör	Standart	Örnek
Standart (1-7)	-	100 µl	-
Assay tampon	100 µl	-	50 µl
Örnek	-	-	50 µl
Biyotin konjugat	50 µl	50 µl	50 µl
Oda ısısında 2 saat plak çalkalayıcıda 100 rpm’de inkübasyon İnkübasyondan sonra yıkama cihazında her bir kuyucuk için 400 µl yıkama solusyonu ile 4 kez yıkama			
Streptavidin-HRP	100 µl	100 µl	100 µl
Oda ısısında 1 saat plak çalkalayıcıda 100 rpm’de inkübasyon İnkübasyondan sonra yıkama cihazında her bir kuyucuk için 400 µl yıkama solusyonu ile 4 kez yıkama			
Substrat	100 µl	100 µl	100 µl
Oda ısısında 10 dakika inkübasyon İnkübasyondan sonra yıkama cihazında her bir kuyucuk için 400 µl yıkama solusyonu ile 4 kez yıkama			
Stop solusyonu	100 µl	100 µl	100 µl

ELISA okuyucu cihazda 450 nm’de absorbanslar alındı. Sonuçlar kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı.

Üretici firma tarafından tespit edilmiş deteksiyon limiti 6 ng/ml olup ölçüm için kesinlik göstergesi olan gün içi CV % 1-11 ve günler arası CV % 0.7-10.4’dür.

Referans aralığı: Üretici firma tarafından 40 sağlıklı kişinin taze serumu ölçüldüğünde, <0.5 ng/ml değeri elde edilmiştir.

3.4.8. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme SPSS 18.0 programı kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler sayısal veriler için aritmetik ortalama±standart sapma, kategorik yapıdaki veriler için sayı ve yüzde şeklinde ifade edildi. Ölçümle belirtilen değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi. Ölçümle belirtilen değişkenlerde gruplar arası farklılıklar için iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi kullanıldı. Kategorik yapıdaki değişkenler için gruplar arası farklılıklar Ki-kare testi ile değerlendirildi. Ölçümle belirtilen değişkenler için zaman içerisindeki değişimler tekrarlı ölçümlerde tek yönlü varyans analizi ile incelendi. Analiz sonucunda farklılık bulunduğu ikili karşılaştırmalar Bonferroni testi ile yapıldı. Sonuçlar % 95 güven aralığında değerlendirildi ve istatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda, hastanemiz merkezi ameliyathanesinde, ASA I-III, 1-4 saat arası süren elektif ürolojik cerrahi girişim geçiren, azot protoksit alan 17-49 (33.0±1.4) yaş aralığında 15 erkek 7 kadın toplam 22 ve azot protoksit almayan 21-46 (33.2±1.9) yaş aralığında 15 erkek, 7 kadın toplam 22 hastadan alınan kanlar incelendi.

Cinsiyet ve yaş bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=1.000, p=0.954). Hastaların cinsiyet ve yaşlarına ait tanımlayıcı özellikleri Tablo 10' da gösterilmiştir.

Tablo 10: Hastalara ait demografik özellikler

	Grup 1		Grup 2		p
Cinsiyet	n	%	n	%	
Erkek	15	68.2	15	68.2	1.000
Kadın	7	31.8	7	31.8	
Yaş (yıl)*	33.0±1.4 (21-46)		33.2±1.9 (17-49)		0.954

Grup 1: Genel anestezide azot protoksit verilen hastalar

Grup 2: Genel anestezide azot protoksit verilmeyen hastalar

* Sonuçlar ortalama ±SS (min-max) olarak gösterilmiştir.

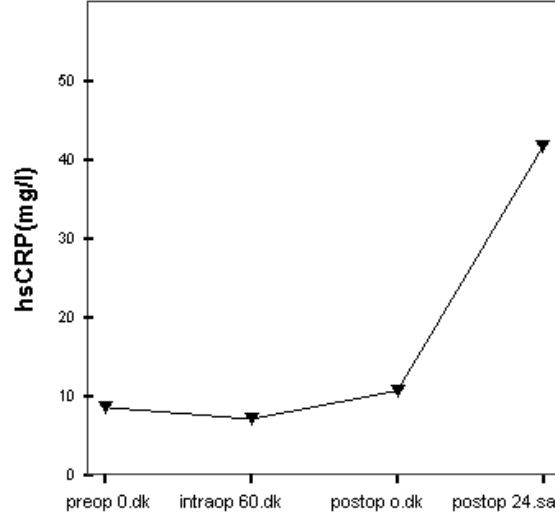
Azot protoksit verilen hasta grubuna ait preop, intraop 60. dk, postop 0. dk ve postop 24. saatteki hsCRP, TNF α , IL-6, IL-10, VEGF ve çözünebilir VEGFR1 ölçüm değerleri Tablo 11’de gösterilmiştir

Tablo 11: Azot protoksit verilen hasta grubunda zamana göre parametrelerdeki değişimin anlamlılığı*

	Preop 0. dk	İntraop 60.dk	Postop 0. dk	Postop 24. saat	p
hsCRP (mg/l)	8.5±12.05	7.01±10.32	10.6±20.7	41.67±22.12	<0.001
	(0.1-51.2)	(0.1-34.2)	(0.1-92.4)	(3.1-74.2)	
TNFα (pg/ml)	61.56±58.53	37.56±46.02	9.66±5.87	7.97±4.26	<0.001
	(21.3-553.3)	(13.9-360.1)	(14.9-36.2)	(10.3-30.3)	
IL-6(pg/ml)	17.07±21.03	13.15±26.25	20.30±30.97	36.00±38.95	<0.001
	(2.0-68.1)	(3.9-125.0)	(4.3-110.8)	(5.6-125.0)	
IL-10 (pg/ml)	3.76±3.08	4.19±2.75	3.89±2.88	4.74±3.62	0.100
	(1.0-15.9)	(1.4-13.4)	(1.9-15.0)	(1.9-17.7)	
VEGF (pg/ml)	364.06±153.66	262.88±136.91	237.72±136.91	233.64±120.01	<0.001
	(87.7-750.0)	(57.7-750.0)	(63.6-625.3)	(38.7-518.1)	
çözünebilir VEGFR1(ng/ml)	0.18±0.06	0.22±0.05	0.19±0.06	0.27±0.26	0.159
	(0.06-0.338)	(0.112-0.298)	(0.084-0.379)	(0.003-1.383)	

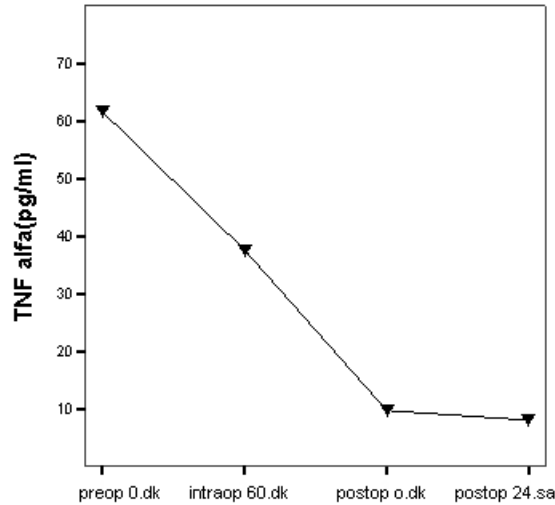
*Sonuçlar ortalama \pm SS (min-max) olarak gösterilmiştir.

Azot protoksit verilen grupta, hsCRP nin zaman içerisindeki değişimi anlamlı bulundu ($p<0.001$). İkili karşılaştırmalar sonucunda postop 24. saatteki hsCRP değerlerinin diğer zamanlardan istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu görüldü. Diğer zamanlardaki hsCRP değerleri arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı. hsCRP ortalamalarının zaman içindeki değişimi Şekil 7’ de gösterilmiştir.



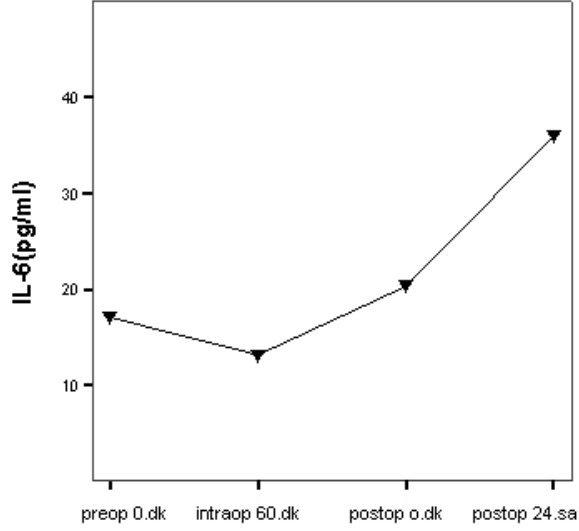
Şekil 7: Azot protoksit verilen hasta grubunun zamana göre hsCRP ortalamaları

Azot protoksit verilen grupta TNF α 'nın zaman içerisindeki değişimi anlamlı bulundu ($p<0.001$). Postop 0. dk ve postop 24. saatteki TNF α düzeyleri arasında istatistiksel fark anlamlı bulunmazken diğer tüm zamanlar arasındaki fark anlamlı bulundu. TNF α ortalamalarının zaman içindeki değişimi Şekil 8’ de gösterilmiştir..



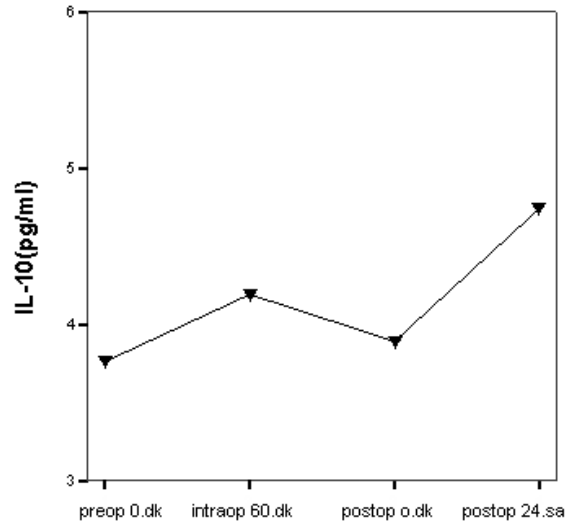
Şekil 8: Azot protoksit verilen hasta grubunun zamana göre TNF α ortalamaları

Azot protoksit verilen grupta IL-6'nın zaman içerisindeki değişimi anlamlı bulundu ($p<0.001$). Postop 24. saatteki IL-6 düzeyleri ile tüm zamanlardaki IL-6 düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı fark bulundu. Diğer zamanlardaki IL-6 değerleri arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı. IL-6 ortalamalarının zaman içindeki değişimi Şekil 9' da gösterilmiştir.



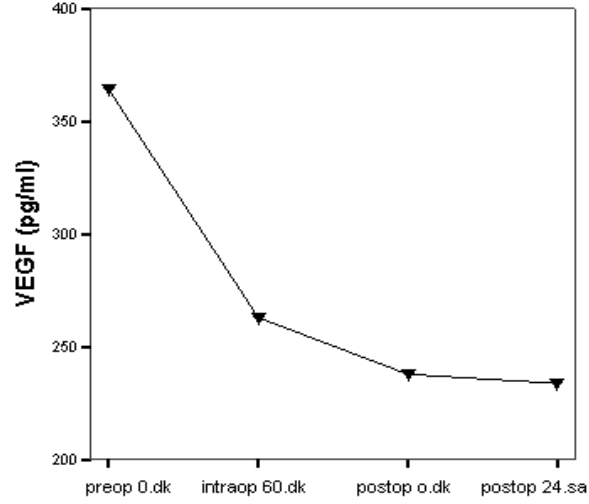
Şekil 9: Azot protoksit verilen hasta grubunun zamana göre IL-6 ortalamaları

Azot protoksit verilen grupta IL-10 açısından zamanlar arasında anlamlı fark tesbit edilmedi ($p=0.100$). IL-10 ortalamalarının zaman içindeki değişimi Şekil 10'da gösterilmiştir.



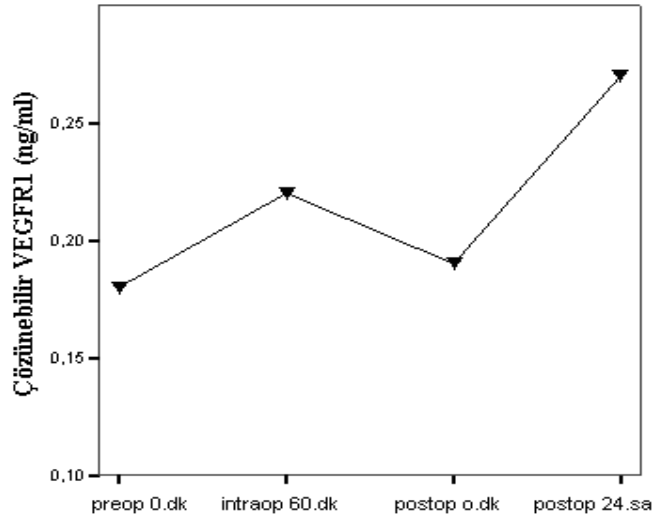
Şekil 10: Azot protoksit verilen hasta grubunun zamana göre IL-10 ortalamaları

Azot protoksit verilen grupta VEGF'nin zaman içerisindeki değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$). İkili karşılaştırmalar sonucunda preop 0. dk'daki VEGF değerlerinin tüm zamanlardan istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu görüldü. Diğer zamanlardaki VEGF değerleri arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı. VEGF ortalamalarının zaman içindeki değişimi Şekil 11'de gösterilmiştir.



Şekil 11: Azot protoksit verilen hasta grubunun zamana göre VEGF ortalamaları

Azot protoksit verilen grupta çözünebilir çözünebilir VEGFR1 açısından zamanlar arasında anlamlı fark tespit edilmedi ($p = 0.159$). Çözünebilir VEGFR1 ortalamalarının zaman içindeki değişimi Şekil 12'de gösterilmiştir.



Şekil 12: Azot protoksit verilen hasta grubunun zamana göre çözünebilir VEGFR1 ortalamaları

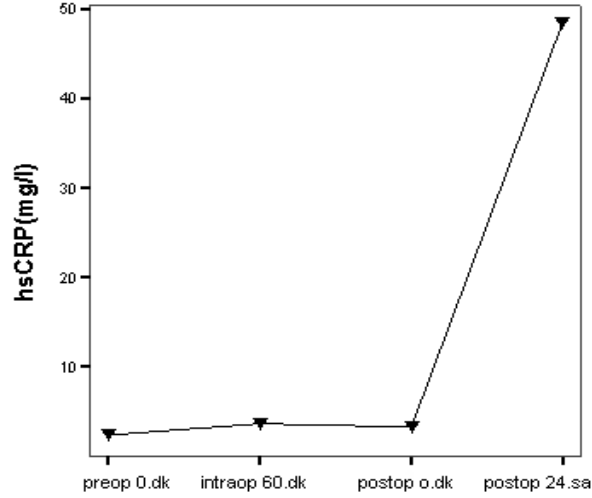
Azot protoksite verilmeyen hasta grubuna ait preop, intraop 60. dk, postop 0. dk ve postop 24. saatteki hsCRP, TNF α , IL-6, IL-10, VEGF ve çözünebilir VEGFR1 ölçüm değerleri Tablo 12’de gösterilmiştir.

Tablo 12: Azot protoksite verilmeyen hasta grubunda zamana göre parametrelerdeki değişimin anlamlılığı*

	Preop 0. dk	İntraop 60.dk	Postop 0.dk	Postop 24. saat	p
hsCRP (mg/l)	2.39±4.88	3.66±11.15	3.29±10.40	48.52±23.29	<0.001
	(0.1-23.7)	(0.1-53.4)	(0.1-49.7)	(2.0-85.6)	
TNFα (pg/ml)	4.68±1.82	4.48±2.41	4.45±3.11	3.49±1.42	0.029
	(2.4-10.6)	(2.5-13.8)	(2.0-16.7)	(1.5-7.3)	
IL-6 (pg/ml)	3.00±0.81	2.52±0.23	2.99±0.56	3.59±3.63	0.008
	(2.0-4.3)	(2.0-3.1)	(2.3-4.2)	(2.3-19.8)	
IL-10 (pg/ml)	2.54±1.19	2.14±1.04	1.82±0.58	2.42±2.07	0.127
	(1.2-7.0)	(1.1-6.0)	(1.0-3.6)	(1.0-10.9)	
VEGF (pg/ml)	95.95±45.97	86.30±47.10	82.44±47.22	82.75±35.21	0.013
	(40.5-209.7)	(25.7-192.7)	(22.2-207.6)	(33.4-159.4)	
çözünebilir VEGFR1 (ng/ml)	0.22±0.18	0.20±0.08	0.22±0.09	0.21±0.009	0.334
	(0.1-1.0)	(0.1-0.4)	(0.1-0.4)	(0.1-0.5)	

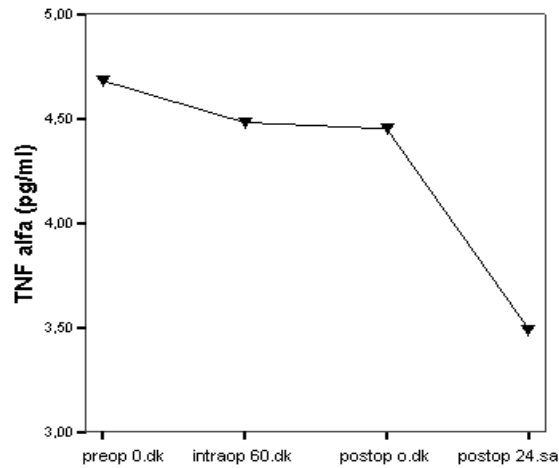
*Sonuçlar ortalama \pm SS (min-max) olarak gösterilmiştir.

Azot protoksit verilmeyen hasta grubunda hsCRP'nin zaman içerisindeki değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.001$). Postop 24. saatteki hsCRP değerleri tüm zamanlardan istatistiksel olarak farklı bulundu. Diğer zamanlardaki hsCRP değerleri arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı. hsCRP ortalamalarının zaman içindeki değişimi Şekil 13'de gösterilmiştir.



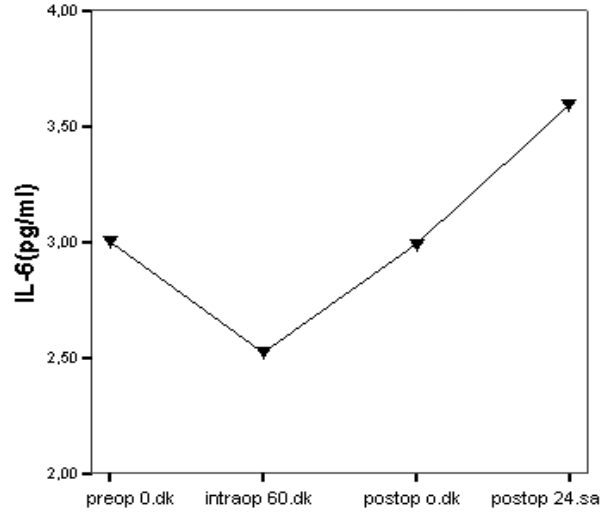
Şekil 13: Azot protoksit verilmeyen hasta grubunda zamana göre hsCRP ortalamaları

Azot protoksit verilmeyen hasta grubunda TNF α 'nin zaman içerisindeki değişimi anlamlı bulundu ($p=0.029$). Postop 24. saatteki TNF α değerleri ile tüm zamanlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Diğer zamanlardaki arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı. TNF α ortalamalarının zaman içindeki değişimi Şekil 14'de gösterilmiştir.



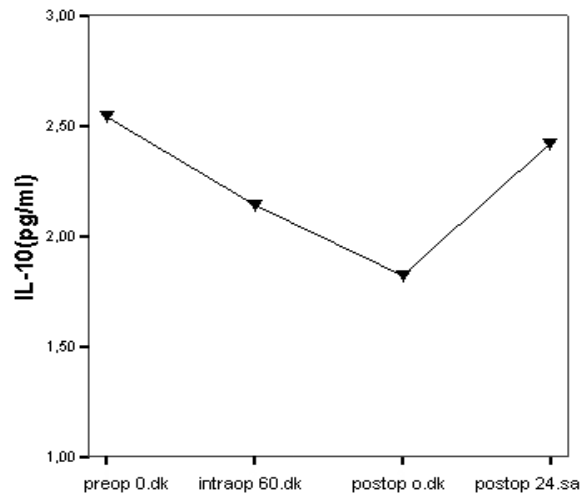
Şekil 14: Azot protoksit verilmeyen hasta grubunda zamana göre TNF α ortalamaları

Azot protoksit verilmeyen hasta grubunda IL-6'nın zaman içerisindeki değişimi anlamlı bulundu ($p=0.008$). Preop ve intraop 60. dk, intraop 60. dk ve postop 0. dk, intraop 60. dk ve postop 24. saatteki ikili karşılaştırmalarda IL-6 değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Diğer zamanlardaki IL-6 değerleri arasında anlamlı fark tespit edilmedi. IL-6 ortalamalarının zaman içindeki değişimi Şekil 15'de gösterilmiştir.



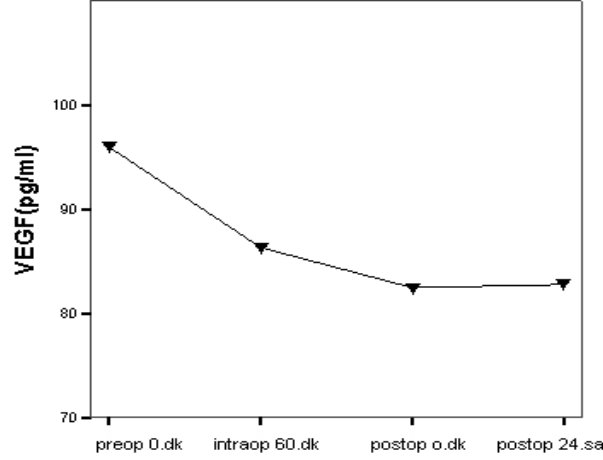
Şekil 15: Azot protoksit verilmeyen hasta grubunda zamana göre IL-6 ortalamaları

Azot protoksit verilmeyen hasta grubunda IL-10 açısından zamanlar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.127$). IL-10 ortalamalarının zaman içindeki değişimi Şekil 16'da gösterilmiştir.



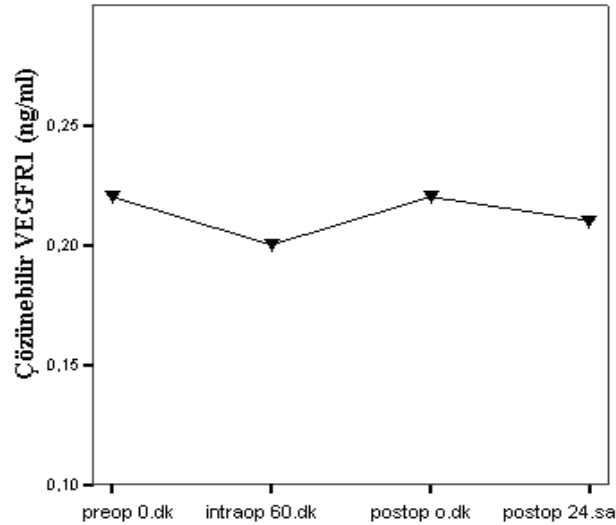
Şekil 16: Azot protoksit verilmeyen hasta grubunda zamana göre IL-10 ortalamaları

Azot protoksit verilmeyen hasta grubunda VEGF'nin zaman içerisindeki değişimi anlamlı bulundu ($p=0.013$). Preop VEGF değerleri ile diğer zamanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Diğer zamanlar arasında anlamlı fark tespit edilmedi. VEGF ortalamalarının zaman içindeki değişimi Şekil 17'de gösterilmiştir.



Şekil 17: Azot protoksit verilmeyen hasta grubunda zamana göre VEGF ortalamaları

Azot protoksit verilmeyen hasta grubunda çözünebilir VEGFR1 açısından zaman içerisinde fark yoktur ($p=0.334$). Çözünebilir VEGFR1 ortalamalarının zaman içindeki değişimi Şekil 18'de gösterilmiştir.



Şekil 18: Azot protoksit verilmeyen hasta grubunda zamana göre çözünebilir VEGFR1 ortalamaları

5.TARTIŞMA

Cerrahi travmaya yanıt, metabolizma, endokrin ve bağışıklık sistemleri açısından farklılıklar içerir. Bu değişiklikler, cerrahi bölgesinde afferent nöronların uyarılması, hasarlı dokudan sitokinlerin salınması, hücrel ve humoral immüitenin aktivasyonu ile ilişkilidir (87). Sistemik inflamatuvar yanıt, konak savunması ile ifade edilen fizyolojik ve koruyucu reaksiyon olmasına rağmen; doku hasarı sonucu sitokinlerin aşırı üretilmesini uyararak birçok organ üzerinde olumsuz değişikliklere sebep olabilmektedir (88).

Akut faz cevabı travma, cerrahi girişim ve enfeksiyonu takiben gelişir ve akut faz proteinlerinin üretimi ile karakterizedir (89). İnflamatuvar sitokinlerin bu cevapta önemli rol oynadıkları bilinmektedir. Sitokinlerin aşırı üretimi, lökosit ve endotel hücrelerinde adhezyon moleküllerinin indüksiyonuna, akciğerde lökosit sekestrasyonuna ve aktivasyonuna neden olur. Bu sitokin ilişkili reaksiyonlar sistemik inflamatuvar yanıt sendromu veya çoklu organ yetmezlik sendromu ile sonuçlanabilmektedir (90).

Azot protoksit 19. yüzyılın ortalarından beri insanlar üzerinde yaygın bir anestezik olarak kullanılmaktadır. Kısa etkili analjezik özellikleri nedeniyle kombine edilerek daha güçlü anestezik ihtiyacını azalmaktadır. Azot protoksit güvenli bir anestezik olarak kabul edilmektedir (91). Ayrıca immün sistem üzerine de etkisi bulunmaktadır. İn vivo ve invitro çalışmalarda azot protoksit nötrofillerin hareket ve kemotaksisinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (92). Ayrıca, azot protoksit verilen anestezi sonrası lökositler üzerinde bulunan endojen şeker reseptörlerin ekspresyonu ile lökosit adhezyon-aktivasyon kaskadının etkilediği belirlenmiştir (92,93). Bununla birlikte, megaloblastik anemi, homosisteinemi gibi yan etkileri bulunmaktadır. Ateroskleroz, tromboz, bilişsel disfonksiyon, nörotoksisite, olası teratojenite gibi riskleri de vardır. İntrakranial basınç ve serebral kan akımını arttırdığı, hipoksiye, postoperatif bulantı ve kusmaya sebep olduğu ve olası immünsüpresyon yaptığı bilinen etkileridir (91).

IL-6 karaciğer hücrelerinde akut faz proteinlerinin sentezini uyararak en önemli sitokindir. T hücrelerinin farklılaşması, proliferasyonu, aktivasyonu ve B hücrelerinin antikör üretimi gibi çeşitli etkileri vardır (94). Ayrıca IL-6'nın plazma seviyesinin

doku hasarının göstergesi olabileceği düşünülmektedir (95). IL-6'nın sirkülasyondaki konsantrasyonu düşüktür ve bazen saptanamayabilir. Cerrahi girişimin başlamasından 30-60 dakika sonra artmaya başlayan IL-6, yüksek konsantrasyonlara 2-4 saat içinde ulaşır. Bu artış cerrahiden sonra 24. saatte pik yapar ve yaklaşık 72 saat yüksek seyreder (96). IL-6'nın yarıömrü yaklaşık 1 saattir (88).

Farklı anestezi tekniklerinin sitokin seviyeleri üzerine etkilerini araştıran çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Dermitzaki ve arkadaşlarının 35 gebe ile yaptıkları çalışmada, 18 gebeye genel anestezi ve 17 gebeye nöroaksiyel anestezi uygulayıp genel anesteziye karşı nöroaksiyel anestezinin serum sitokin seviyelerine etkilerini araştırdıklarında, her iki anestezi yönteminde de serum IL-6 seviyelerini sezeryandan 24 saat sonra anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır (97). Farklı anestezi metodlarının sitokin cevabı üzerine etkisi araştırılan bir çalışmada, total kalça protezi ameliyatında hem genel hem de nöroaksiyel anestezi yöntemlerinde sirkülasyondaki IL-6 seviyelerinin postoperatif arttığını ve bu artışın cerrahiden 4 saat sonra pik değerine ulaştığını tespit etmişlerdir (98). Abdominal histerektomi yapılan 20 olgudan oluşan başka bir çalışmada azot protoksit verilen grup ile propofol ve alfentanil verilen grup karşılaştırıldığında, azot protoksit verilen grupta IL-6 seviyelerinde daha erken ve daha yüksek bir artış görülmüştür (99). Masato Kato ve arkadaşları major abdominal cerrahi sırasında ve sonrasında azot protoksit verilen grupta IL-6 düzeylerini artmış olarak bulmuşlardır. Bu artış postop birinci günde düşüş göstermiştir ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu çalışmada operasyon sonunda oluşan pik plazma IL-6 konsantrasyonu operasyon sırasında kaybedilen kan hacmi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (100). Radikal özefajektomi hastalarında anestezi tekniklerinin immünfonksiyon ve stres yanıt üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmada, azot protoksit ile genel anestezi verilen ve epidural anestezi uygulanan her iki grupta da postop 1. ve 3. gün IL-6 düzeyleri preop düzeylerine göre anlamlı yüksek seviyede belirlenmiştir (101).

Daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da her iki grupta IL-6 düzeylerinde artış belirlenmiştir. Ancak postop ve preop IL-6 düzeyleri karşılaştırıldığında azot protoksit grubundaki artış oranının (%211) azot protoksit verilmeyen hasta grubundan (%119) daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu artış bize azot protoksitin IL-6 üretimini aktive ettiğini düşündürmektedir. Çalışmamızda

sitokinlerin kaynağı her ne kadar çalışılmamış olsa da artmış olan IL-6 düzeylerinin muhtemelen cerrahi hasar bölgesinden salındığını bize düşündürmektedir.

TNF α önemli bir inflamatuvar mediyatördür. TNF α hipotansiyon, ateş, taşikardi, oligüri gibi pek çok fizyolojik değişikliklerden sorumludur. Ayrıca antijenik aktiviteye sahiptir ve bu aktivite monositlerden ve endoteliyal hücrelerden prostoglandin, IL-6, IL-8 ve doku faktörü-III'ün salınmasına sebep olur (102). TNF α kan beyin bariyerinin geçirgenliğini arttıran ve inflamatuvar mediyatörlerin salınımına öncülük ederek endotel adhesyon moleküllerinin sentezini indükleyen proinflamatuvar bir sitokindir (103).

Genel anestezi ve rejyonel anestezinin serum sitokin seviyelerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, preop ve postop dönemde hastaların serum TNF α değerlerinde bir azalma olduğu saptanırken; istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (97). Azot protoksit verilen genel anestezi ile spinal anestezinin, hemoroidektomi hastalarında stres yanıtı üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada ise; TNF α 'nın postop 24. saat düştüğünü gözlemlemişlerdir. Ancak bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildir (104). Beyin iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan ratlarda genel anestezide azot protoksit kullanımının plazma TNF α düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşmeye neden olduğu belirlenmiştir (105). Abdominal cerrahi sırasında epidural anestezinin immunsupresyon üzerine etkisini inceledikleri çalışmada genel anestezi verilen grupta cerrahi süresince TNF α düzeylerinde anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (106). Bir diğer çalışmada ise üst abdominal cerrahi başlangıcından iki saat sonra TNF- α üretiminde anlamlı bir azalma görülmüş ve cerrahi sonunda minimum değere ulaştığı gözlemlenmiştir (107).

Bizim çalışmamızda azot protoksit kullanılmayan genel anestezi grubunda operasyon süresince TNF α düzeylerinde bir değişiklik gözlenmezken, postop 24. saatte anlamlı bir azalma görüldü. Azot protoksit kullanılan genel anestezi grubunda ise TNF α düzeylerindeki düşme, intraop 60. dakika başlamakta ve postop 0. dakikaya kadar sürmektedir. Ancak postop 0 ile postop 24. saatte anlamlı bir değişiklik gözlenmemektedir. Bu da bize yarılanma süresi yaklaşık 6 dakika olan TNF α üzerine azot protoksitin ilk 60 dakika içerisinde etkisini gösterdiğini ve operasyon süresince bu inhibitör etkisini arttırdığını düşündürmektedir.

CRP inflamasyon, enfeksiyon ve doku hasarının yüksek duyarlılıktaki bir belirteçidir. Kompleman sistemini aktive ederek konağın enfeksiyona karşı savunma sistemini harekete geçirir (28). CRP çoğunlukla IL-6'nın transkripsiyonel kontrolünde hepatositlerden salgılanmaktadır. Karaciğerde CRP sentezi uyarı sonrası hızla başlar, yaklaşık altı saatte serum düzeyleri 5 mg/L üzerine çıkar ve 48 saat sonra da en yüksek düzeye yükselir (32). İnflamatuvar hastalıklarda ilk ve en dramatik artış gösteren akut faz proteinlerinden biridir. Plazma düzeyi miyokard enfarktüsü, stres, travma, enfeksiyon, inflamasyon, cerrahi veya neoplastik proliferasyon sonrası artış göstermektedir (14).

Hemoroidektomi hastalarında genel ve epidural anestezinin stres yanıt üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada, serum preop ve postop 24. saatteki CRP düzeyleri incelendiğinde bütün hastalarda istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır (104). Azot protoksit verilerek genel anestezi uygulanan radikal özefajektomi hastalarında bakılan serum CRP düzeylerinin operasyon sonunda yükseldiği ve bu artışın postop 24. saat ve postop 3. gün devam ettiği tespit edilmiştir (101). Anorektal cerrahi yapılan 58 hastanın yarısına %50 azot protoksit kullanılan genel anestezi, yarısına ise spinal anestezi uygulandığı çalışmada ise her iki grupta da cerrahi sonrası serum CRP seviyesi artmış olarak bulunmuştur ancak her iki yöntem arasında bir fark tespit edilememiştir (108).

Bizim çalışmamızda her iki grupta operasyon sürecinde CRP düzeylerinde bir değişiklik gözlenmezken postop 24. saatte bir artış belirlenmiştir. Azot protoksit verilen gruptaki artış oranı (5 kat) azot protoksit verilmeyen gruptan (20 kat) daha düşük bulunmuştur. Ancak azot protoksit grubunda CRP sentezinin major uyararı olan IL-6 artış oranının daha yüksek bulunurken; CRP artış oranının daha düşük olması bize azot protoksitin, karaciğerde CRP sentezi üzerine inhibitör etkisi olduğunu düşündürmektedir.

Cerrahi travma ve anestezi, proinflamatuvar ve antiinflamatuvar cevabın her ikisinin aktive olduğu immün sistemin kompleks disfonksiyonu ile ilişkilidir. Proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler arasındaki değişen dengenin postoperatif dönem boyunca immün disfonksiyona neden olan mekanizmaları temsil ettiği düşünülmektedir (109,102). IL-10, başlıca monosit ve Th2 hücrelerinden salgılanır (110). IL-10 proinflamatuvar sitokinlerin sentezini baskılayarak antiinflamatuvar işlev

gören pleotropik immün regülatör bir sitokindir (111,112). Enfeksiyon ve inflamasyonda, sistemik yanıtta rol oynadığı ve sepsis süresince üretildiği rapor edilmiştir (113).

Kawasaki ve arkadaşlarının epidural anestezinin cerrahi stres üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada, genel anestezi verdikleri grupta IL-10 düzeyinin cerrahi başlangıcından sonra arttığını ve cerrahinin sonunda pik değerine ulaşp, operasyon sonrası azalmaya başladığını, 4. günde ise preop seviyelerine düştüğünü gözlemişlerdir. IL-10 seviyesindeki bu artışın immün fonksiyonların baskılanma mekanizmaları ile ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir (106). Abdominal cerrahi yapılan 10 hastada azot protoksit kullanılan genel anestezi ve epidural anestezinin plazma IL-10 düzeylerine etkisini inceledikleri çalışmada, IL-10 düzeylerinin cerrahi başlangıcından iki saat sonra artmaya başlayıp dördüncü saatte pik yaptığının gözlemişlerdir. Postop dönemde IL-10 düzeylerinin düşmeye başladığını ve preop dönemdeki düzeylerine geldiğini göstermişlerdir (114). Azot protoksit verilmeyen genel anestezide; anestezi öncesi, operasyon bitiminde ve cerrahi sonrası 24. saatte ölçülen IL-10 düzeylerinin arttığı gözlenmiştir (115). Major cerrahi uygulanan 18 erişkin hastada prep ve postop bakılan IL-10 düzeylerinde anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Genel anestezisinde azot protoksit kullanılmayan bu çalışmada postop erken dönemde IL-10 artışının cerrahi travmadan sonra inflamasyonu sınırlandırmak için koruyucu bir mekanizma olduğunu öne sürmüşlerdir (116). Azot protoksit ile genel anestezi uygulanan 16 elektif parsiyel gastrektomi hastası üzerinde yapılan çalışmada operasyon sırasında IL-10 düzeylerinin arttığı ve postop 24. saatte de azaldığı rapor edilmiştir (117). Cerrahi sonrası antiinflamatuvar profilin değerlendirildiği çalışmada ise operasyon öncesi, operasyon sırasında ve cerrahi sonrası 1. 2. ve 4. günlerde bakılan IL-10 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilememiştir (118).

Bizim çalışmamızda azot protoksit verilmeyen grupta postop 0. ve postop 24. saatteki IL-10 düzeyleri preop düzeylere göre azalırken, azot protoksit kullanılan grupta bir artış görülmüştür. Ancak her iki grupta görülen değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu da bize her iki anestezi yönteminin de IL-10 üzerinden belirgin bir antiinflamatuvar değişikliğe neden olmadığını düşündürmektedir.

Angiogenesis major travma, tümör büyümesi gibi çeşitli patolojik olaylarda önemli rol oynar (119). VEGF endotel hücrelerin proliferasyonu ve anjiogenezin başlaması için gereklidir (120, 121). VEGF hiperpermeabilite için güçlü bir uyarıcı ve endotel hücreleri için spesifik bir mitojendir (120,122). Endotel hücreleri, megakaryositler, malign hücreler gibi çeşitli hücrelerden ve granülosit (120,123), aktive lenfosit (120,124), makrofaj (120,125) gibi inflamatuvar hücrelerden sentezlenir. VEGF inflamasyon alanının revaskülarizasyonunu uyardığı gibi inflamasyon gelişen dokunun lokal hiperpermeabilitesine de katkıda bulunur. VEGF için çeşitli spesifik reseptörler tanımlanmıştır. Bunlardan çözünebilir VEGFR1, VEGF'ye direkt bağlanarak VEGF'nin etkisini antagonize ettiği bilinmektedir (120,126).

Ryouhei ve arkadaşlarının major cerrahi hasarı takiben serum VEGF düzeylerinin incelendikleri çalışmada postoperatif birinci gün anlamlı olmayan bir düşme gözlenmiştir. Ancak 1. günden sonra VEGF düzeylerinde bir artış görülmüştür. Bu artışın postop 14.günde pik serum konsantrasyonuna ulaştığı bildirilmiştir. Araştırmacılar potoperatif VEGF artışını doku tamiri için anjiogenez cevabı olabileceğini öne sürmüşlerdir (119). Mastektomi ameliyatı olan 30 hastada azot protoksit kullanılarak genel anestezi uygulanan hastalarda postop 4. ve 24. saatlerde VEGF düzeyleri preoperatif düzeylerine göre düşük bulunmuş, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir (127). Özefagus kanser hastalarında VEGF düzeylerinde cerrahi travma sonrası 1.gün anlamlı bir düşme görülmüştür. Üçüncü gün artmaya başlayan VEGF düzeyleri 5. günde preop düzeylerine geri dönmüştür (128).

Azot protoksit verilmeden genel anestezi uygulanan 61 abdominal cerrahi hastası üzerine yapılan çalışmada VEGF ve çözünebilir VEGFR1 düzeylerine bakılmışlardır. Postop VEGF ve çözünebilir VEGFR1 konsantrasyonlarında bir düşme gözlemlenmişlerdir, ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir (120).

Açık ve laparoskopik kolektominin VEGF ve çözünebilir VEGFR1 üzerine etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada, zaman içinde VEGF ve çözünebilir VEGFR1 düzeylerinde anlamlı bir dalgalanma tespit edilmiştir. Serum VEGF düzeyleri intraop 1. saat en düşük düzeylerine sahipken, operasyon sonrasında bir artış görülmüştür ve postop 30. gün VEGF düzeyleri preop konsantrasyonlarına

gerilemiştir. Serum çözünebilir VEGFR1'de ise düzeyleri preop düzeyleri ile kıyaslandığında cerrahi esnasında 1. 2. ve 6. saatlerde bir düşme görülmüştür. 30. günde ise çözünebilir VEGFR1 düzeylerinin preop düzeylerinin altına indiği gözlenmiştir (129).

Bizim çalışmamızda, operasyon esnasında her iki grupta VEGF düzeylerinde azalma görüldü. Ancak VEGF düzeylerinin azot protoksit verilen grupta (%28), azot protoksit verilmeyen gruptan (%11) daha fazla düşmesi bize bu azalmanın azot protoksite bağlı olarak geliştiğini düşündürmektedir. Her iki grupta da serum çözünebilir VEGFR1 düzeylerinde anlamlı bir değişimin olmaması VEGF düzeylerindeki bu düşmeye çözünebilir VEGFR1'in bir katkısı olmadığını göstermektedir. Bu sonuçlar bize VEGF düzeylerindeki düşmenin stres cevaba bağlı dilüsyonel etki sonucu olduğunu düşündürmektedir.

6. SONUÇLAR

Genel anestezi uygulanan hastalarda, azot protokstitin inflamatuvar, antiinflamatuvar ve anjiogenetik parametreler üzerine etkisini incelediğimiz çalışmamızda:

- 1- Cerrahi travmaya sekonder gelişen inflamatuvar cevap değerlendirildiğinde her iki yöntemde cerrahi sonrası hsCRP, IL-6 artarken, TNF α düzeyleri azalmaktadır. Azot protoksit grubundaki IL-6'daki artış ile TNF α 'daki düşüş azot protoksit verilmeyen gruptan daha yüksek bulunurken, hsCRP'deki artış oranı daha düşük bulunmuştur.
- 2- Her iki grupta antiinflamatuvar etki IL-10 üzerinde değerlendirildiğinde anlamlı bir değişim saptanmamıştır.
- 3- Anjiogenez üzerine anestezi yöntemlerinin etkileri değerlendirildiğinde her iki grupta da VEGF anlamlı olarak operasyon sürecinde azalma göstermiştir ancak azot protoksit grubundaki düşme oranı yüksek bulunmuştur. VEGF'nin dolaşımdaki inhibitörü olan çözünebilir VEGFR1'de her iki grupta bir değişikliğin olmaması bize çözünebilir VEGFR1'in bu azalmada etkisi olmadığını düşündürmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Morgan GE, Michael JMS, Murray C, Larson JP, Critical Care. Clinical Anesthesiology, Lange, North America. pp: 951-994, 2002.
2. Korfalı G. Sepsis Anesteziye Temel Kavramlar s.285-291. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2003.
3. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. Nat Med. 9: 669- 676, 2003.
4. Yusufhan Yazır. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (Vegf):Reseptörleri Ve Fonksiyonları. C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi 29 (3): 128-136, 2007.
5. Esener ZY. Metabolik-Endokrin Sistem ve Anestezi Klinik Anestezi. Logos Yayıncılık, 1991.
6. Dagan D, Segal S. Effect of anesthesia on the immune system supression of the immunogenic capacity of macrophages and lymphocyte transformation. Immunol Invest. 18: 975, 1989.
7. Liselotte E. Jensen and Alexander S. Whitehead. Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response. Biochem. J. 334, 489-503, 1998.
8. Steel D.M. and Whitehead A.S. in The Natural Immune System: Humoral Factors (Sim, E., ed.). pp. 1-29, IRL Press, Oxford, 1993.
9. Onat T, Emerk K, Sözman E. İnsan Biyokimyası. 2. Basım, s.703-710, Palme Kitapevi, 2006.
10. Charles A. Dinarello, Proinflammatory Cytokines. Chest 118; 503-508, 2000.
11. Hall GM. Effects of anesthesia on the endocrine and metabolic stress response to surgery. General Anesthesia 5th Ed. pp. 252-259, 1989.
12. Dağoğlu T: Yenidođan sepsisi: Neonatoloji. Birinci baskı. Nobel Tıp Kitabevleri ltd, İstanbul. 657-673. 2000.
13. Llewelyn M, Cohen J. Diagnosis of infection in sepsis. Intensive Care Med 27 (Suppl 1) : S10- S32, 2001.

14. Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood, David E. Bruns. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics 4th Ed, 2006.
15. Abbas AK., Lichtman AH., Pober JS. Cytokines. Cellular and Molecular Immunology, 2nd Edition, Philadelphia, London, Toronto, WB Saunders Company 240-260, 1994.
16. Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. Arthritis Res. 4(3):233-242, 2002.
17. Ohno Y, Aoki N, Nishimura A. In vitro production of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in insulin dependent diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab. 77: 1072-1077, 1993.
18. Rader DJ. Inflammatory markers of coronary risk. N Engl J Med. 343:1179-1182, 2000.
19. Daftarian P M, Kumar A, Kryworuchko M, Diaz-Mitoma F. IL-10 production is enhanced in human T cells by IL-12 and IL-6 and in monocytes by tumor necrosis factor-alpha. J. Immunol. 157:12-20, 1996.
20. Barrett KE. Cytokines: sources, receptors, and signaling. Baillieres Clin Gastroenterol. 10:1-15, 1996.
21. Shibayama H, Tagawa S, Hattori H. Interleukin 6 inhibits the chemotaxis of human malignant plasma cell lines. Br. J. Haematol. 93:534-541, 1996.
22. Male D, Cooke A, Owen M, Trowsdale J, Champion B, Advanced Immunology, St Louis, C.V. Mosby. 4:273, 1996.
23. Callard R, Gearing A. The Cytokine Facts Book. Orlando, Academic Press 1994.
24. <http://www.clinsci.org/cs/109/0135/cs1090135f01.htm> sitesinden 01/10/2010 tarihinde ulaşılmıştır.
25. De Jongh RF, Vissers KC, Meert TF, Booij LH, De Deyne CS, Heylen RJ. The role of interleukin-6 in nociception and pain. Anesth Analg. Apr;96(4):1096-103, 2003.

26. Bienvenu J, Vignon E. Serum levels of YKL-40 and C reactive protein in patients with hip osteoarthritis and healthy subjects: a cross sectional study. *Ann Rheum Dis.* 59: 828-831, 2000.
27. Thompson D, Pepys MB, Wood SP. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure*; 7:169-177, 1999.
28. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest.* 111:1805-12, 2003.
29. Earl S.Ford, Wayne H. Giles, Gary L. Myers and David M. Mannino. Population Distribution of High-Sensitivity C-reactive Protein among US Men: Findings from National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2000, *Clin Chem.* Apr;49(4):686-90, 2003.
30. Mark B. Pepys and Gideon M. Hirschfield. C-reactive protein: a critical update Centre for Amyloidosis and Acute Phase Proteins, Department of Medicine, Royal Free and University College Medical School, London, United Kingdom *J. Clin. Invest.* 111:1805–1812. doi:10.1172/JCI200318921, 2003.
31. *Expert Rev Clin Immunol* 4(3):379-390, 2008.
32. Vigushin DM, Pepys MB, Hawkins PN. Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in healthy and disease. *J Clin Invest.* 91:1351-7, 1993.
33. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA.* 282:2131-5, 1999.
34. Shieh SC, Chou TC, Lin XZ, Kao PC. Determination of C-reactive protein with an ultra-sensitivity immunochemiluminometric assay. *J Immunol Methods.* 2006 Apr 20; 311(1-2):87-95. Epub Mar 2006.
35. Verma S, Szmitko PE, Yeh ET. C-reactive protein: structure affects function *Circulation.* 109(16):1914-7, 2004.
36. Hutchinson WL, Koenig W, Fröhlich M, Sund M, Lowe GD, Pepys MB. Immunoradiometric assay of circulating C-reactive protein: age-related values in the adult general population. *Clin Chem.* 46(7):934-8, 2000.

37. Szalai AJ, McCrory MA, Cooper GS, Wu J, Kimberly RP. Association between baseline levels of C-reactive protein (CRP) and a dinucleotide repeat polymorphism in the intron of the CRP gene. *Genes Immun.* 3:14-19, 2002.
38. Punzi L, Ramonda R, Oliviero F, Sfriso P, Mussap M, Plebani M, Podswiadek M, Todesco S. Value of C-reactive protein in the assessment of erosive osteoarthritis of the hand. *Ann Rheum Dis.* 64: 955-957, 2005.
39. Imhof A, Froehlich M, Brenner H, Boeing H, Pepys MB, Koenig W. Effect of alcohol consumption on systemic markers of inflammation. *Lancet.* 357: 763-767, 2001.
40. Baumann H, Wang Y, Morella KK, Complex of the soluble IL-11 receptor and IL-11 acts as IL-6- type cytokine in hepatic and nonhepatic cells. *J Immunol.* 35:284-290, 1996.
41. Jeannin P, Lecoanet S, Delneste Y, Gauchat JF, Bonnefoy JY. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J Immunol.* 160(7):3555-61, 1998.
42. Strle K, Zhou JH, Broussard SR, Venters HD, Johnson RW, Freund GG, Dantzer R, Kelley KW. IL-10 promotes survival of microglia without activating Akt. *J Neuroimmunol.* Jan;122(1-2):9-19. 2002.
43. Donnelly RP, Dickensheets H, Finbloom DS. The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *J Interferon Cytokine Res.* 19(6):563-73, 1999.
44. Meisel C, Vogt K, Platzner C, Randow F, Liebenthal C, Volk HD. Differential regulation of monocytic tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 expression. *Eur J Immunol.* Jul; 26(7):1580-6, 1996.
45. Lee TS, Chau LY. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med.* 8(3):240-6, 2002.
46. Mallat Z, Heymes C, Ohan J, Faggin E, Leseche G, Tedgui A. Expression of interleukin 10 in advanced human atherosclerotic plaques: relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19(3):611-6, 1999.

47. William G. Stetler-Stevenson. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *The Journal of Clinical Investigation* 103(9), 1237-1241 1999.
48. Timothy DH, Brian HA, George RM. Vascular endothelial growth factor in ischemia for vascular angiogenesis, *Circulation* 107:1359-1365, 2003.
49. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 267:10931-10934, 1992.
50. Folkman J. Angiogenesis and angiogenesis inhibition: An overview. *EXS Regul Angiogenesis* 79: 1-7, 1997.
51. Intaglietta M, Johnson PC, Winslow RM. Microvascular and tissue oxygen distribution. *Cardiovasc Res.* 32: 632-643, 1996.
52. Mignatti P, Rifkin DB. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein.* 49: 117- 137, 1996.
53. Ausprunk DH and Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res.* 14: 53-65, 1977.
54. Ferrara N. VEGF: An update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol.* 11: 517-24, 2000.
55. Konukoğlu D, Turhan S. M. Molecular basis of angiogenesis mechanisms and tumor angiogenesis. *Cerrahpaşa J Med.* 36: 42-48, 2005.
56. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Eng J Med.* 333: 1757-63, 1995.
57. Fayette J, Soria JC, Armand JP. Use of angiogenesis inhibitors in tumour treatment. *Eur J Cancer.* May;41(8): 1109-16, 2005.
58. Lawrence WT. Diegelmann RF. Growth factors in wound healing. *Clin Dermatol.* Jan-Mar;12(1):157-69, 1994.
59. Hu DE, Hori Y, Fan TP. Interleukin-8 stimulates angiogenesis in rats. *Inflammation.* 17: 135- 143, 1993.
60. Cleaver O, Melton DA. Endothelial signalling during development. *Nat Med.* 9: 661- 668, 2003.

61. Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res.* 46: 467-473, 1986.
62. Siemeister G, Martiny-Baron G, Marme D. The pivotal role of VEGF in tumor angiogenesis: molecular facts and therapy in experimental neuroblastoma and Wilms tumor. *J Pediatr Surg.* 36: 287-290, 2001.
63. Haroon ZA, Peters KG, Greenberg CS, Dewhirst MW. Angiogenesis and Oxygen Transport in Solid Tumors. In: Totowa, New Jersey, Teicher BA (eds). *Antiangiogenic Agents in Cancer Therapy.* 3- 21, Humana Press, 1999.
64. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 9: 653- 660, 2003.
65. Nie D, Tang K, Diglio C, Kenneth VH. Eicosanoid regulation of angiogenesis: role of endothelial arachidonate 12-lipoxygenase. *Blood.* 95: 2304-2311, 2000.
66. Issa R, Krupinski J, Bujny T, Kumar S, Kaluza J, Kumar P. Vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, in human brain tissue after ischemic stroke. *Lab Invest.* 9: 417-425, 1999.
67. Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vivo and in vitro. *Lab Invest.* 71:374-379, 1994.
68. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.* 407: 242-8, 2000.
69. Bikfalvi A, Recent developments in the inhibition of angiogenesis: examples from studies on platelet factor-4 and the VEGF/VEGFR system. *Biochem Pharmacol.* 68(6):1017-2. 2004.
70. Shalaby R, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu X, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. *Nature* 376:62, 1995.
71. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 18:4-25, 1997.

72. Kleespies A, Guba M, Jauch KW, Bruns CJ. Vascular endothelial growth factor in esophageal cancer. *J Surg Oncol.* 87:95-104, 2004.
73. Ortega N, L'faqihi F-E, Plouet J. Control of VEGF angiogenic activity by the extracellular matrix. *Biol Cell.* 90:381-390, 1998.
74. Neufold G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z, Vascular endothelial growth factor(VEGF) and its receptors. *The Faseb J.* 13:10-22, 1999.
75. Detmar M. Tumor angiogenesis. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 5(1):20-3, 2000.
76. Monacci WT, Merrill MJ, Oldfield EF. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *Am J Physiol.* 264:C995-C1002, 1993.
77. Thomas KA. VEGF, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chemistry* 271:603-6, 1996.
78. Harada S, Nagy JA, Sullivan KA, Thomas KA, Endo N, Rodan GA, et al. Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. *J Clin Invest.* 93:2490-6, 1994.
79. Chen YS, Hackett SF, Schoenfeld CL, Viores MA, Viores SA, Campochiaro PA Localisation of vascular endothelial growth factor and its receptors to cells of vascular and avascular epiretinal membranes. *Br J Ophthalmol.* 81(10):919-26, 1997.
80. Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(16):7533-7, 1993.
81. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Natura* 386, 1997.
82. Kendall RL, Wang G and Thomas KA. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun.* 226: 324-8, 1996.

83. Ebos JM, Bocci G, Man S, Thorpe PE, Hicklin DJ, Zhou D et al. A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Mol Cancer Res.* 2: 315-326, 2004.
84. Nagele P, Metz LB, Crowder CM: Nitrous oxide (N₂O) requires the N-methyl-D-aspartate receptor for its action in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8791–6, 2004.
85. Eger E III, Eisenkraft JB, Weiskopf RB. *The Pharmacology of Inhaled Anesthetics*. Ed.3. pp.1-130, 2003.
86. Adams Dh, Nash GB. Disturbance of leucocyte circulation and adhesion to the endothelium as factors in circulatory pathology. *Br J Anaesth.* 77:17-31,1996.
87. Hall GM, Desborough J P. Interleukin-6 and the metabolic response to surgery. *Br J Anaesth.* 69: 337–8, 1992.
88. Biffl W L, Moore E E, Moore F A, Peterson V M. Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation? *Ann Surg.* 224: 647–64, 1996.
89. Douglas RG, Shaw JH. Metabolic response to sepsis and trauma. *BrJ Surg.* 76:115-22, 1989.
90. Dinarello CA, Gelfand JA, Wolff SM: Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome. *JAMA.* 269:1829-35, 1993.
91. Lehmborg J, Waldner M, Baethmann A, Uhl E. Inflammatory response to nitrous oxide in the central nervous system. *Brain Res.* 2008 Dec 30;1246: 88-95. Epub 2008.
92. Frohlich, D, Rothe, G., Wittmann, S., Schmitz, G., Schmid, P, Taeger, K, Hobbhahn, J, Nitrous oxide impairs the neutrophil oxidative response. *Anesthesiology* 88, 1281–1290, 1998.
93. Bardosi L, Bardosi A, Gabius HJ. Changes of expression of endogenous sugar receptors by polymorphonuclear leukocytes after prolonged anaesthesia and surgery. *Can. J. Anaesth.* 39,143–150. 1992.

94. Naito Y, Tamai S, Shingu K et al. Responses of plasma adrenocorticotrophic hormone, cortisol, and cytokines during and after upper abdominal surgery. *Anesthesiology* 77: 426–31. 1992.
95. Rixen D, Siegel J H, Abu-Salih A, Bertolini M, Panagakos F, Espina N. Physiologic state severity classification as an indicator of posttrauma cytokine response. *Shock* 4: 27–38, 1995.
96. Desborough JP. The stress response to trauma and surgery. *Br J Anaesth.* 85(1):109-17. Review. 2000.
97. Dermitzaki E, Staikou C, Petropoulos G, Rizos D, Siafaka I, Fassoulaki A. A randomized study of maternal serum cytokine levels following cesarean section under general or neuraxial anesthesia. *Int J Obstet Anesth.* 2009;18(1):33-7. Epub 2008.
98. Hogevoid HE, Lyberg T, Kähler H, Haug E, Reikerås O. Changes in plasma IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 after total hip replacement surgery in general or regional anaesthesia. *Cytokine* 12(7):1156-9, 2000.
99. Crozier TA, Muller JE, Quittkat D. Effect of Anaesthesia on the Cytokine Responses to Abdominal Surgery *BJA.* 72: 280-5, 1994.
100. Kato M, Suzuki H, Murakami M, Akama M, Matsukawa S, Hashimoto Y. Elevated plasma levels of interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte colony-stimulating factor during and after major abdominal surgery. *J Clin Anesth.* 9(4):293-8. 1997.
101. Yokoyama M, Itano Y, Katayama H, Morimatsu H, Takeda Y, Takahashi T, Nagano O, Morita K. The effects of continuous epidural anesthesia and analgesia on stress response and immune function in patients undergoing radical esophagectomy. *Anesth Analg.* 101(5):1521-7, 2005.
102. Helmy SAK, Wahlay MAM and Nawaway M. The effect of anaesthesia and surgery on plasma cytokine production. *Anaesthesia* 54: 773-738, 1999.
103. Fantuzzi G, Di Santo E, Sacco S, et al. Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the regulation of TNF production in mice. *J Immunol.* 155:3552–5, 1995.

104. Buyukkocak U, Caglayan O, Daphan C, Aydinuraz K, Saygun O, Agalar F. Similar effects of general and spinal anaesthesia on perioperative stress response in patients undergoing haemorrhoidectomy. *Mediators Inflamm.* 2006(1):97257, 2006.
105. Nellgard B, Mackensen GB, Massey G, Pearlstein RD, Warner DS The effects of anesthetics on stress responses to forebrain ischemia and reperfusion in the rat. *Anesth Analg.* 91(1):145-51, 2000.
106. Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, Okamoto K, Sata T. Effects of epidural anaesthesia on surgical stress-induced immunosuppression during upper abdominal surgery. *Br J Anaesth.* 2007 Feb; 98(2):196-203. Epub 2007.
107. Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, Tomihisa T, Okamoto K, Shigematsu A. Surgical stress induces endotoxin hyporesponsiveness and an early decrease of monocyte mCD14 and HLA-DR expression during surgery. *Anesth Analg.* 92(5):1322-6, 2001.
108. Buyukkocak U, Daphan C, Caglayan O, Aydinuraz K, Kaya T, Saygun O, Agalar F. Effects of different anesthetic techniques on serum leptin, C-reactive protein, and cortisol concentrations in anorectal surgery. *Croat Med J. Dec;* 47(6):862-8, 2006.
109. Atwell DM, Grichnik KP, Newman MF, Reves JG, McBride WT. Balance of proinflammatory and antiinflammatory cytokines at thoracic cancer operation. *Ann Thorac Surg.* 66:1145–1150, 1998.
110. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A: IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol.* 147:3815–22. 1991.
111. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol.*11:165–190, 1993.
112. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: TH1, TH2 and more. *Immunol Today.*17:138 –146, 1996.
113. Marchant A, Deviere J, Byl B, De Groote D, Vincent JL, Goldman M: Interleukin-10 production during septicemia. *Lancet.* 343(8899):707–8, 1994.

114. Kato M, Honda I, Suzuki H, Murakami M, Matsukawa S, Hashimoto Y. Interleukin-10 production during and after upper abdominal surgery J . Clin Anesth. May; 10(3):184-8,1998.
115. Delogu G, Antonucci A, Signore M, Marandola M, Tellan G, Ippoliti F. Plasma levels of IL-10 and nitric oxide under two different anaesthesia regimens. Eur J Anaesthesiol. Jun; 22(6):462-6, 2005.
116. Delogu G, Famularo G, Moretti S, De Luca A, Tellan G, Antonucci A, Marandola M, Signore L. Interleukin-10 and apoptotic death of circulating lymphocytes in surgical/anesthesia trauma. J Trauma. Jul; 51(1):92-7, 2001.
117. Ogata M, Okamoto K, Kohriyama K, Kawasaki T, Itoh H, Shigematsu A. Role of interleukin-10 on hyporesponsiveness of endotoxin during surgery. Crit Care Med. Sep; 28(9):3166-70, 2000.
118. Lukaszewicz AC, Faivre V, Villa F, Payen D. Anti-inflammatory profile of circulating immune cells after surgery for seizure. Minerva Anesthesiol. Jul;76(7):477-84, 2010.
119. Futami R, Miyashita M, Nomura T, Makino H, Matsutani T, Sasajima K, Tajiri T. Increased serum vascular endothelial growth factor following major surgical injury. J Nippon Med Sch. Jun; 74(3):223-9, 2007.
120. Svendsen MN, Lykke J, Werther K, Bisgaard T, Christensen IJ, Nielsen HJ. Bacterial antigen induced release of soluble vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGFR1 before and after surgery. Scand J Clin Lab Invest. 65(3):237-47, 2005.
121. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. Nat Med. 1:149–53, 1995.
122. Brown LF, Detmar M, Claffey K, Nagy JA, Feng D, Dvorak AM, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. EXS. 79:233–69, 1997.

123. Gaudry M, Bregerie O, Andrieu V, El Benna J, Pocard MA, Hakim J. Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood*. 90:4153–61, 1997.
124. Freeman MR, Schneck FX, Gagnon ML, Corless C, Soker S, Niknejad K, et al. Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res*. 55:4140–5, 1995.
125. Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 55:410–22, 1994.
126. Barleon B, Reusch P, Totzke F, Herzog C, Keck C, Martiny-Baron G, et al. Soluble VEGFR-1 secreted by endothelial cells and monocytes is present in human serum and plasma from healthy donors. *Angiogenesis* 4:143–54, 2001.
127. O'Riain SC, Buggy DJ, Kerin MJ, Watson RW, Moriarty DC Inhibition of the stress response to breast cancer surgery by regional anesthesia and analgesia does not affect vascular endothelial growth factor and prostaglandin E2. *Anesth Analg* Jan; 100(1):244-9, 2005.
128. McDonnell CO, Harmey JH, Bouchier-Hayes DJ, Walsh TN. Effect of multimodality therapy on circulating vascular endothelial growth factor levels in patients with oesophageal cancer. *Br J Surg* Aug; 88(8):1105-9, 2001.
129. Svendsen MN, Werther K, Christensen IJ, Basse L, Nielsen HJ. Influence of open versus laparoscopically assisted colectomy on soluble vascular endothelial growth factor (sVEGF) and its soluble receptor 1 (sVEGFR1). *Inflamm Res*. Nov;54(11):458-63, 2005.

8. EKLER

Ek 1: Etik kurul onayı



T.C.
ZONGULDAK KARAELMAS ÜNİVERSİTESİ
Uygulama ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu

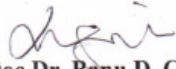
TOPLANTI TARİHİ : 15.01.2009
TOPLANTI NO : 2009/01

KARARLAR :

15- Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığının "Azot Protoksit'in İnflamatuar, Antiinflamatuvar ve Anjiogenezis Parametreleri Üzerine Etkisi" konulu başvurusunun Etik Kurallara uygun olduğuna,

Oy Birliği ile karar verilmiştir.

A S L I G İ B İ D İ R


Doç.Dr. Banu D. GÜN
Hastane Etik Kurulu Başkanı