

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

SIÇANLARDA İZOFLURANIN APOPTOTİK ETKİSİNE DANTROLEN
VE KETAMİNİN ROLÜ

UZMANLIK TEZİ
Dr. SEYFİ KARTAL

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. D. BERRİN GÜNAYDIN

ANKARA
Haziran 2011

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

SIÇANLARDA İZOFLURANIN APOPTOTİK ETKİSİNE DANTROLİN
VE KETAMİNİN ROLÜ

UZMANLIK TEZİ
Dr. SEYFİ KARTAL

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. D. BERRİN GÜNAYDIN

Bu tez TÜBİTAK tarafından ‘110S514’ proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Haziran 2011

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı Uzmanlık Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Uzmanlık
Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : .../.../2011

BAŞKAN

Prof. Dr. Mehmet AKÇABAY

Anesteziyoloji ve Reanimasyon

Anabilim Dalı Başkanı

ÜYE

Prof. Dr. Hülya ÇELEBİ

Anesteziyoloji ve Reanimasyon

Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

ÜYE

Prof. Dr. D. Berrin GÜNAYDIN

Anesteziyoloji ve Reanimasyon

Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

ÜYE

Doç. Dr. Lale KARABIYIK

Anesteziyoloji ve Reanimasyon

Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

ÜYE

Doç. Dr. Çiğdem ELMAS

Histoloji ve Embriyoloji

Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

KISALTMALAR

GABA-A	: Gama Amino Bütirik Asit-A
NMDA	: N-Metil D-Aspartat
AIF	: Apoptozis İndükleyici Faktör
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
TNF	:Tümör nekroz faktörü
KSF	:Koloni stimulan faktörler
NGF	:Nöron gelişme faktörü
IGF	:İnsülin benzeri büyüme faktörü
Ca ⁺²	:Kalsiyum
DNaz	:Deoksiribonükleaz
IAPs	:İnhibitör apoptozis proteinleri
SSS	:Santral sinir sistemi
CA-1	:Cornu Ammonis 1
MAK	:Minimum Alveoler Konsantrasyon
ER	:Endoplazmik Retikulum
MH	:Malign Hipertermi

RYR	:Riyanodin Reseptörü
SR	:Sarkoplazmik Retikulum
O ₂	: Oksijen
ip	: intraperitoneal
dk	: dakika
sc	: subkutan
BrdU	:5-Bromo-2-deoksiuridin

İÇİNDEKİLER

Kabul ve onay	i
Kısaltmalar	iii
İçindekiler	v
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hücre Ölüm Mekanizmaları	3
2.1.1. Nekroz	3

2.1.2. Apoptozis	3
2.1.2.1. Apoptozisin Tanımı	3
2.1.2.2. Apoptozisin Morfolojisi	7
2.1.2.3. Apoptozisin Mekanizmaları	7
2.1.2.4. Apoptozisteki Yolaklar	11
2.1.2.4.1. Ekstresek Yolak	12
2.1.2.4.2. İntresek Yolak	13
2.2. Genel Anestezikler	14
2.2.1. Santral Sinir Sisteminde Etki Mekanizmaları	15
2.2.2. İzofluran	17
2.2.2.1. İzofluranın Apoptotik etki mekanizmaları	18
2.2.3. Ketamin	19
2.2.3.1. Ketaminin Apoptotik Etki Mekanizmaları	21
2.2.3.2 Kullanım Alanları	22
2.3. Dantrolen	22
2.3.1. Etki mekanizması	23
2.3.2. Dantrolenin Apoptotik Etki Mekanizması	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Denekler	24
3.2. Anestezi Uygulamaları	26

3.3. İmmünohistokimyasal Yöntem	27
3.4. İstatistiksel Analiz	30
4. BULGULAR	31
4.1.1. Hipokampus CA-1 bölgesindeki kaspaz 3, 8 ve 9 sonuçları	31
4.1.2. Hipokampus dentat girus bölgesindeki kaspaz 3, 8 ve 9 sonuçları	33
4.2. Hipokampus dokusunun histolojik değerlendirmesi	35
4.2.1. Kaspaz 3 Bulguları	35
4.2.2. Kaspaz 8 Bulguları	37
4.2.3. Kaspaz 9 Bulguları	40
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ	51
7. KAYNAKLAR	53
8. ÖZET	65
9. SUMMARY	66
10. EK: Etik Kurul Onay	68
11. ÖZGEÇMİŞ	69

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Apoptozis ile nekroz arasındaki farklar	4
Tablo 2. Artmış veya azalmış apoptoz ile ilgili hastalıklar	6
Tablo 3. Apoptozisi etkilenen bazı genler	10
Tablo 4. Hipokampus CA-1 bölgesindeki kaspaz 3, 8 ve 9'a ait immun tutulum gösteren hücre sayıları	32
Tablo 5. Hipokampus dentat gyrus bölgesindeki kaspaz 3, 8 ve 9'a ait immun tutulum gösteren hücre sayıları	34

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Programlanmış hücre ölümü (apoptozis)	9
Şekil 2. Kaspazların aktivasyon yolları	11
Şekil 3. Mitokondri yoluyla kaspaz aktivasyonu	14
Şekil 4. İzofluranın kimyasal formülü	17

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. Hipokampus Cornu Ammonis (CA) 1 ve 3 bölgeleri ile dentat girus (DG) bölgeleri	15
Resim 2. Sıçanların konulduğu özel çelik tel kafes	24
Resim 3. Sıçanlara anestezi uygulanan kapalı kafesler	26
Resim 4. Kaspaz 3 Hipokampus doku örnekleri	36
Resim 5. Kaspaz 8 Hipokampus doku örnekleri	39
Resim 6. Kaspaz 9 Hipokampus doku örnekleri	42

1. GİRİŞ

Programlı hücre ölümü ya da nöronal intihar olarak bilinen apoptozisin intrensek ve/veya ekstrensek iki yolakla indüklendiği bilinmektedir. Sıçanlar, snaptogenezin en yüksek seviyede olduğu dönemde genel anesteziğe maruz bırakıldığında, beyin dokularında gözlenen yaygın apoptotik nörodejenerasyon snaptogenezin en yüksek olduğu yaşamın 7. gününe karşılık gelmektedir (1).

Günümüzde kullanılan genel anesteziğlerden bir çoğunun etki mekanizmasında ya gama amino bütirik asit A (GABA-A) reseptör aktivasyonu (örneğin; izofluran, enfluran, desfluran ve sevofluran) ya da N-Metil D-Aspartat (NMDA) reseptör antagonizması (örneğin; ketamin) sorumludur. Ancak GABA-A reseptörlerinde aktivasyonun veya NMDA reseptörlerinde anormal inhibisyonun apoptozisi indüklediği bildirilmiştir (2).

Malign hipertermide kullanılan ve bir rıyanodin reseptör antagonisti olan dantrolen ise sarkoplazmik retikulumdan hücre içine kalsiyum serbestleşmesini önlediği bilinen bir ilaçtır (3). Çeşitli apoptozis modellerinde dantrolen nöroprotektif etkisini; membran stabilizasyonu ve protein katlanmasını önleyerek infarktı küçültmesi gibi farklı mekanizmalarla yapmaktadır (4).

Diğer taraftan inhalasyon anesteziğlerinin indüklediği oligomerizasyon ve kaspaz aktivasyonuna bağlı gözlenen apoptozisin; postoperatif kognitif disfonksiyon, deliryum, demans ve alzheimer patogeneğinde rol oynadığı bildirilmiştir (5-7).

Literatürde genç sıçanlarda anesteziğ ajanlara ait apoptotik nörodejenerasyona, snaptogenezin en yüksek olduğu büyüme dönemlerine ait

birçok çalışma bulunmasına rağmen erişkin sıçanlardaki etkileri ile ilgili kapsamlı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle erişkin sıçanlarda izofluranla indüklenen apoptotizis üzerine ketamin ve/veya dantrolenin etkilerinin araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hücre Ölüm Mekanizmaları

Hücre ölümü nekroz ve apoptoz olmak üzere başlıca iki şekilde meydana gelir.

Nekroz ve apoptoz arasında biyolojik ve morfolojik belirgin değişiklikler vardır (8).

2.1.1. Nekroz

Klasik hücre ölümü olarak bilinen nekroz, kimyasal ve fiziksel zedelenmeleri takiben ortaya çıkan patolojik bir ölüm şeklidir. Nekroz; sitoplazmik şişme, hücre içi yapılarda değişme, plazma membran bütünlüğünde bozulma ve enerji kaybıyla rastgele yaygın bir şekilde meydana gelmektedir (9, 10).

2.1.2. Apoptozis

2.1.2.1. Apoptozisin Tanımı

Apoptozis terimi, Yunanca **Apo** (ayrı) ve **Ptoxis** (düşmek) kelimelerinden oluşmuş, sonbaharda ağaç veya çiçek yapraklarının düşmesini veya terk etmesini tanımlamaktadır. Fizyolojik hücre ölümü olarak uzun süredir bilinmesine rağmen apoptoz terimi ilk kez 1972 yılında kullanılmıştır (11). Normal hücre ölümü, programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü ve hücre intiharı apoptozis ile eş anlamlı kullanılan diğer terimlerdir (12). Apoptozis biyokimyasal ve

morfolojik yönden klasik hücre ölümü olan nekrozdan oldukça farklı özellikler göstermektedir (13) (Tablo 1).

Tablo 1. Apoptozis ile nekroz arasındaki farklar (10, 13–17)

Özellik	Nekroz	Apoptozis
Nedenler	Her zaman patolojik Hipoksi Hipertermi İskemi Litik viral enfeksiyon Toksik maddeler Şiddetli oksidatif stres	Fizyolojik/Patolojik Hücre yaşlanması Büyüme faktör eksikliği Kanser ilaçları Radyasyon Yüksek doz glukokortikoid HIV Sitotoksik T lenfositler Oksidatif stres (aşırı olmayan) Fas/TNFR–1 reseptör aktivasyonu
Dağılım	Komşu hücre grupları	Tek tek hücre düzeyinde
Eksüdatif yangı	Genellikle var	Yok/hücresele immünitede
Işık mikroskopi bulguları	Piknozis Karyoreksis Karyolizis Bazofili	Kresentik görünüm Eozinofilik partikül
Elektron mikroskopi bulguları	Hücrede şişme Membranda yırtılma Kromatinde erime/kayıp	Volüm kaybı, hücrede küçülme Apoptotik cisimler
Fagositoz	Mononükleer hücreler	Fagositik hücreler tarafından temizlenir
Mekanizma	ATP azalması Membran zedelenmesi Serbest radikal hasarı Lizozomal enzimler salınır Hücre lizisi olur	Gen aktivasyonu Endonükleazlar Proteazlar Lizozomal enzim salınımı yoktur ATP gerekir (aktif hücresele yıkım)
Diğer	Skar oluşumu vardır İnflamasyona neden olur	Skar oluşumu yoktur İnflamasyon görülmez Hücre membranı sağlamdır

Canlı organizmasındaki her hücre, doğar, proliferer olur, diferansiye olur ve ölür. Apoptotik hücreler dokularda sürekli olarak oluşmakta ve bu oluşum ömür boyu doğal bir denge halinde devam etmektedir. Programlı hücre ölümü (apoptozis) ve yeniden yapımın (mitozis) doku homeostazisini dinamik bir denge halinde sürdürülmesinde vazgeçilmez bir rolü vardır (11, 18-20). Apoptozis embriyolojik gelişim ve hücre proliferasyonunun normal veya patolojik ilerlemesinde rol alır (21).

Apoptozis hücresel birçok gen ve gen ürününün aktivasyonunu ve karşılıklı etkileşimini içeren karmaşık bir süreçtir. Bu süreç, değişik şekillerde birçok iç ve dış sinyaller tarafından aktive edilebilmektedir. Bu dengenin bozulmasının birçok önemli hastalığın patogeneğinde rol aldığı gösterilmiştir (22). Vücudun organ işlevlerinde bozulma, neoplazi (23), viral enfeksiyonlar, otoimmün hastalıklar, dejeneratif hastalıkların (Alzheimer ve Huntington hastalığı), kazanılmış immün yetmezlik hastalığı (Acquired Immun Deficiency Syndrome: AIDS) gibi patolojik sonuçlar doğurabilir (24, 25) (Tablo 2).

Akut inflamatuvar cevabın düzelmesi, immün dengeyi sağlamak ve uygun olmayan doku yıkımını engellemek için, nötrofil apoptozisi esastır. Sistemik inflamatuvar yanıt sendromunun patogeneğinde, apoptozisin gecikmesi etken olarak ileri sürülmüştür (26). Volatil anestetiklere kronik maruziyetin, apoptozisin temel rol aldığı kronik hastalıklar (kanser, lösemi, karaciğer ve böbrek yetmezliği gibi), gebelerde erken doğum ve teratojenite insidansını artırdığı, nötrofillerde apoptozisi yavaşlattığı, maruz kalmayan kişilerle karşılaştırılarak gösterilmiştir (27-30).

Tablo 2. Artmış veya azalmış apoptoz ile ilgili hastalıklar (24,25)

Azalmış apoptoz ile ilgili hastalıklar	Artmış apoptoz ile ilgili hastalıklar
1. Kanser	1. AIDS
Foliküler lenfoma	2. Nörodejeneratif Hastalıklar
P53 mutasyonu ile ilgili karsinomlar	Alzheimer Hastalığı
Hormon bağımlı tümörler	Parkinson Hastalığı
✓ Meme kanseri	Amyotrofik Lateral Skleroz
✓ Prostat kanseri	Retinitis Pigmentoza
✓ Over kanseri	Serebellar Dejenerasyon
2. Otoimmün Hastalıklar	3. Myelodisplastik Sendrom
Sistemik lupus eritematozis	Aplastik anemi
İmmün aracılı glomerüleneftit	4. İskemik Hasar
3. Viral enfeksiyonlar	Miyokard İskemisi
Herpesvirüs	Strok (İnme)
Poksvirüs	Reperfüzyon Hasarı
Adenovirüs	5. Toksinlere Bağlı Karaciğer Hasarı
	Alkol

2.1.2.2. Apoptozisin Morfolojisi

Apoptozis, tek bir hücrede büzüşme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterize olup ana morfolojik olay, çekirdeğin yoğunlaşması ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır (31). Elektron mikroskopunda apoptozis esnasında, kromatinin yoğunlaşması, sitoplazmanın büzülmesi, plazma membranının kabarması, mitokondri dış membranında şişme, hasar ve mitokondri membran aralığında sitokrom c ve bir oksidoredüktaz ile ilişkili flavoprotein olan ‘Apoptozis İndükleyici Faktör’ (AIF) salıverilmesi, apoptotik cisimlerin şekillenmesi bilinen morfolojik değişikliklerdendir (11, 19, 32-34).

2.1.2.3. Apoptozisin Mekanizmaları

Programlı hücre ölümünde birbirini izleyen basamakların neler olduğu tam olarak bilinmemektedir. Apoptozis çok sayıda mediyatör tarafından düzenlenir. Bunlar arasında Apaf-1 (Apoptotik proteaz active edici faktör-1), kaspazlar ve Bcl-2 ailesi proteinleri temel rol alır. Diğer taraftan bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (c-myc), proteinler (p53) ve organeller (mitokondri) sayılabilir. Bazı mediyatörler hücreye özeldir, bazıları da apoptozisi başlatan etkiye göre farklılık gösterir (34).

Apoptozis zamanı gelen (daha önceden programlanmış) hücrelerde primer başlatılabilir ya da dışarıdan bir uyarı sonucu sekonder olarak gelişir. Hücre dışı uyarılar arasında tümör nekroz faktörü (TNF), koloni stimulan faktörler (KSF), nöron gelişme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), IL-2 gibi maddelerin ortamda azalması, glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli

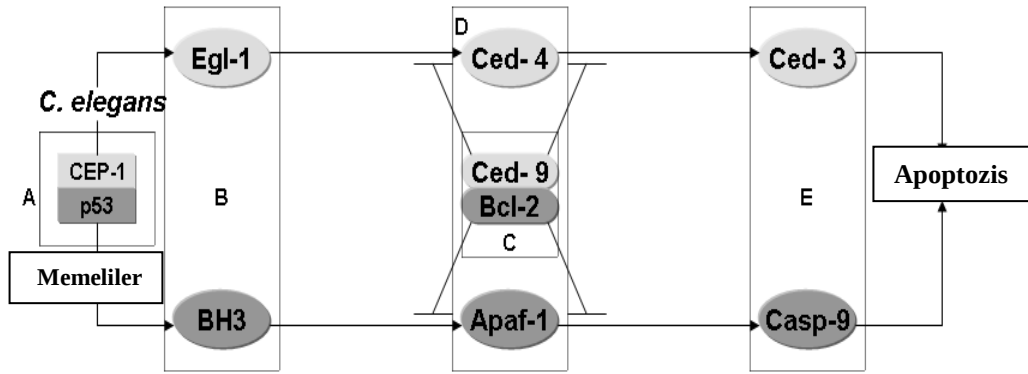
antijenler önemli yere sahiptir. Otoimmün hastalık gelişiminde rolü olduğu belirtilen Fas/FasL (3), sFas proteinleri, virüsler de (HIV gp120 proteini, influenza virüsü TNF reseptörü üzerinden adenovirüs hücre genetik yapısını bozarak) hücreyi apoptozise götürmektedir. Organizmada apoptozisi uyaran ve engelleyen çok sayıda gen bulunmaktadır (35).

Apoptozisi etkileyen hücre içi uyaranlar arasında sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarında artış, TNF, DNA hasarı nedeniyle bir tümör baskılayıcı gen olan p53'ün aktive olması, viral-bakteriyel enfeksiyonlar, glukokortikoidler ve onkojenlerin (cmec gibi) yer aldığı bilinmektedir. Ayrıca hipertermi, radyasyon, sitotoksik antikanser ilaçları ve hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler hafif dozlarda apoptoz meydana getirirler (36).

Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum (Ca^{+2}) girişı olur. Hücre içinde Ca^{+2} artışı, cAMP gibi hücre içi ikincil habercileri aktive etmektedir. Bu kaskadda hücre yapısında değişikliklere neden olan pek çok basamağı uyarılmaktadır. Örneğin; sitoplazmik Ca^{+2} miktarında hafif artış c-fas, c-myc ve ısı şoku proteini gibi yeni mRNA basamaklarını harekete geçirir. Ayrıca, apoptoziste etkili endonükleaz, transglutaminaz, proteaz, lipid modifiye edici enzimler gibi enzimleride aktive eder (37, 38). Bunlar da kromatinde parçalanmaya, hücre iskeletinde ve sitoplazmik proteinlerde değişikliklere neden olur. Sitoplazmik kalsiyum, kalmodulin ile bağlanırsa apoptozis inhibe edilebilir (25).

Canlıdaki programlanmış hücre ölümü, C. Elegans adındaki bir nematod üzerinde gösterilmeye çalışılmıştır. Erişkin hermafrodit oluşumu sırasında, apoptozis ile hücre sayısı 1090 dan 131 tane azalmıştır (39). Buradaki apoptozisi yürüten ve düzenleyen üç gen tanımlanmıştır: Bunlar ced-3, ced-4 ve ced-9. Ced-

3 bir serin proteazdır. Ayrıca ced-4 tarafından aktive edildiğinde hücre apoptozise giderken, ced-3 ve ced-4 engellendiğinde apoptozis gerçekleşmez. Ced-9 apoptozisin negatif düzenleyicisidir (antiapoptotik), mutasyonla inaktif olursa hücre ölümle sonuçlanan sürece gider. Ced-3 gen ürünlerinin memelilerdeki karşılığı kaspazlar, ced-4 Apaf-1, ced-9 un karşılığı ise bcl-2 ailesidir (40, 41) (Şekil 1).



Şekil 1. Programlanmış hücre ölümü (apoptozisin) C. Elegans ve memeli hücrelerdeki benzerliğinin şematik olarak gösterilmesi. **A** (CEP-1/p53), **B** (Egl-1/BH3), **C** (Ced-9/Bcl-2), **D** (Ced-4/Apaf-1) ve **E** (Ced-3/Casp-9) (40, 41)

Kaspazlar olarak bahsedilen proteazlar aktif bölgelerinde sistein kalıntısı taşımaları ve karşılaştıkları proteinleri aspartik asit kalıntılarından tanıyarak kesmeleri nedeniyle bu ismi almışlardır. Pek çok hedef proteinleri olmasına rağmen en önemli hedef proteinleri deoksiribonükleaz (DNaz; DNA'yı spesifik olarak kesip parçalayan enzim) inhibitörüdür (42, 43).

Apoptozise giden tüm hücrelerde sistein proteaz aktivitesi mevcut olup, hücre canlılığının devamı için kaspazların kontrolü ana rol oynamaktadır. Kaspazlar inaktif prekürsör olarak sentezlenip değişik uyarılarla aktif forma dönüşür. Ced-4 ve bunun memelilerdeki karşılığı Apaf-1 inaktif formda sentezlenmiş olan kaspazlara bağlanarak aktif formlara dönüşmelerine neden olur (44).

Ced-9 karşılığı olarak memelilerde bulunan bcl-2 ailesindeki üyelerin bir kısmı apoptozisi uyardığı (Bax, Bad, Bid, Bcl-Xs), bir kısmının ise azalttığı (Bcl-2, Bcl-X₁) yani pro-apoptotik veya anti-apoptotik olduğu gösterilmiştir (45, 46). Bcl-2 ailesinin bazı üyeleri kaspaz aktivitesini inhibe ederek ced-9 benzeri etki gösterirken diğer üyeler ise, kaspazların aktivasyonu ile hücre ölümüne yol açıp pro-apoptotik etki göstermektedir (36) (Tablo 3).

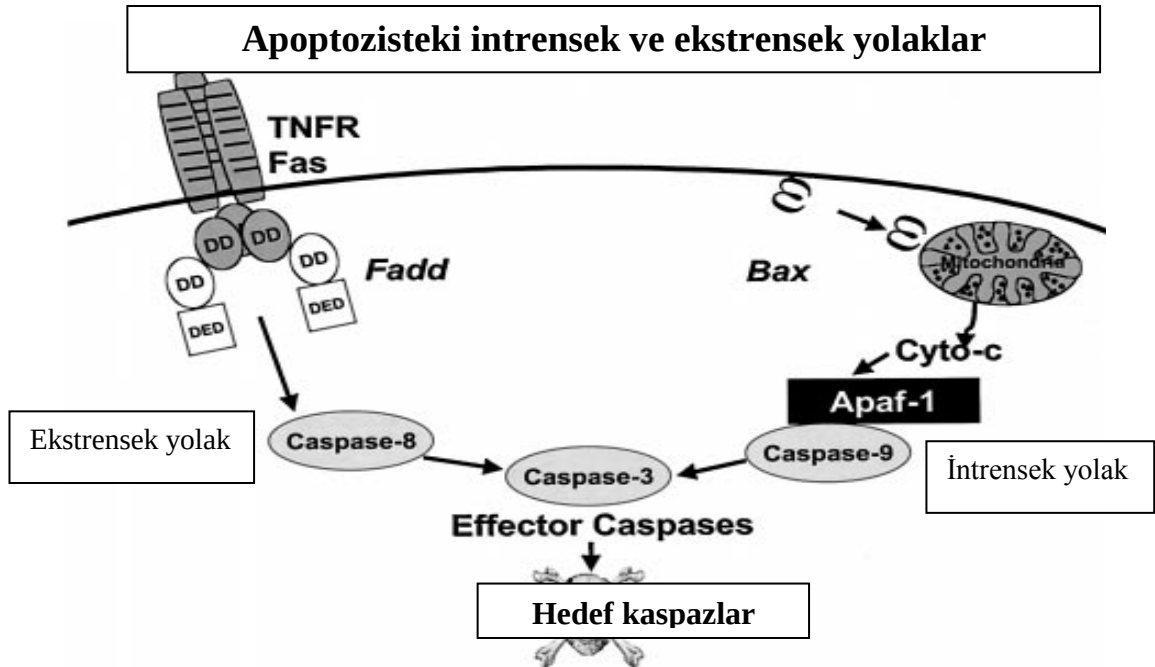
Tablo 3. Apoptozisi etkileyen bazı genler (36).

Apoptozisi azaltan genler	Apoptozisi artıran genler
✓ Bcl-2 grubundan; ✓ BHRL-1, bcl-xl, bcl-w, bfl-1, brag-1, mcl-1, A1 ✓ c-abl geni ✓ ras onkogeni ✓ çözünebilir fas ✓ p35 ✓ A20 ✓ IAPs	✓ Bcl-2 grubundan; ✓ Bad, Bax, Bak, Bcl-xS, Bid, Bik, Hrk1 ✓ c-myc ✓ p53, p21 ✓ Fas (CD95/APO1) ✓ FADD/MORT, RIP, FAST ✓ İnterlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler ✓ LOH (MTS1/CDK41)

Kaspazların aktivitelerini azaltarak apoptozu baskılayan diğer bir madde ise, apoptozis proteinleri inhibitörü (inhibitör apoptozis proteinleri: IAP_s) tarafından da düzenlenir (47).

2.1.2.4. Apoptozisteki Yolaklar

Apoptozisi birçok farklı yolak başlatabilmektedir. Apoptoziste ölümle sonuçlanan ortak yolağı aktive eden temelde ekstrinsek ve intrinsek olmak üzere iki yolak bulunmaktadır. Ekstrinsek yolakta ölüm reseptörlerinin aktivasyonuna neden olan kaspazların aktivasyonu mitokondri etkilenmeden önce olmaktadır. İntrinsek yolakta ise kaspaz aktivasyonundan önce sitokrom c mitokondriyal membran aralığından sitozole salıverilmektedir (9) (Şekil 2).



Şekil 2. Kaspazların aktivasyon yolakları. Memeli hücrelerinde temelde iki majör kaspaz aktivasyon yolağı mevcuttur, ekstrinsek (solda) ve intrinsek (sağda) (47). Ekstrinsek yolak TNFR1 ve Fas gibi TNF ailesinden sitokin reseptör üyeler

içerebilir. Bu proteinler özellikle pro-kaspaz-8'e bağlanma bölgeleri içeren DED, Fadd içeren sitozolik DDs adaptör proteinleri gerektirir. İntrensek yolak; değişik uyarılarla, bax gibi bcl-2 ailesinden apoptozis öncü proteinlerinin seviyelerinin yükselmesi ile mitokondriden sitokrom-c serbestleştirir. Sitozolda sitokrom-c Apaf-1'e bağlanır ve onu aktifleştirir, aktif apaf-1 pro-kaspaz-9'a bağlanabilir ve onu aktif hale getirir. Aktif kaspaz-9 (intrensek) ve 8 (ekstrensek) ortak yol olan hedef kaspaz-3'e bağlanır ve onu aktif hale getirir. Diğer bazı kaspazlar bu yollarda görev alır fakat onlara değinilmemiştir (47).

2.1.2.4.1. Ekstrensek Yolak

Reseptör aracılı veya ölüm reseptör aracılı yolak olarakta ifade edilmektedir. Hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörleri dışarıdan gelen sinyal polipeptidlerin bağlanması ile uyarılır. Ölüm reseptörleri gelen uyarıyı hücre içine ileterek apoptozisin başlamasında görev alır. Polipeptid yapıdaki sinyaller TNF ve ölüm reseptörleri de TNF reseptör ailesi üyeleridir (49, 50). TNF reseptör ailesi üyeleri hücre dışı bölgelerinde sisteinden zengin tip 1 membran proteinleridir. Diğer bazı üyeleri ise hücre içi bölgelerde '*death domain*' içerirler ve bu nedenle ölüm reseptörü 'TRADD' (TNFR-1 *associated death domain*) olarak adlandırılırlar. Fas/APO-1/CD95, TNFR1, DR₃, TRAIL R₁/DR₄, TRAIL R₂/DR₅, TRAIL R₂/DR₆ tanımlanan ölüm reseptörlerindendir (51). Fas reseptörü ailenin en iyi tanımlanan popüler üyesidir ve immün sistemde hücre ölümünün kontrolünde önemli rol oynamaktadır (52).

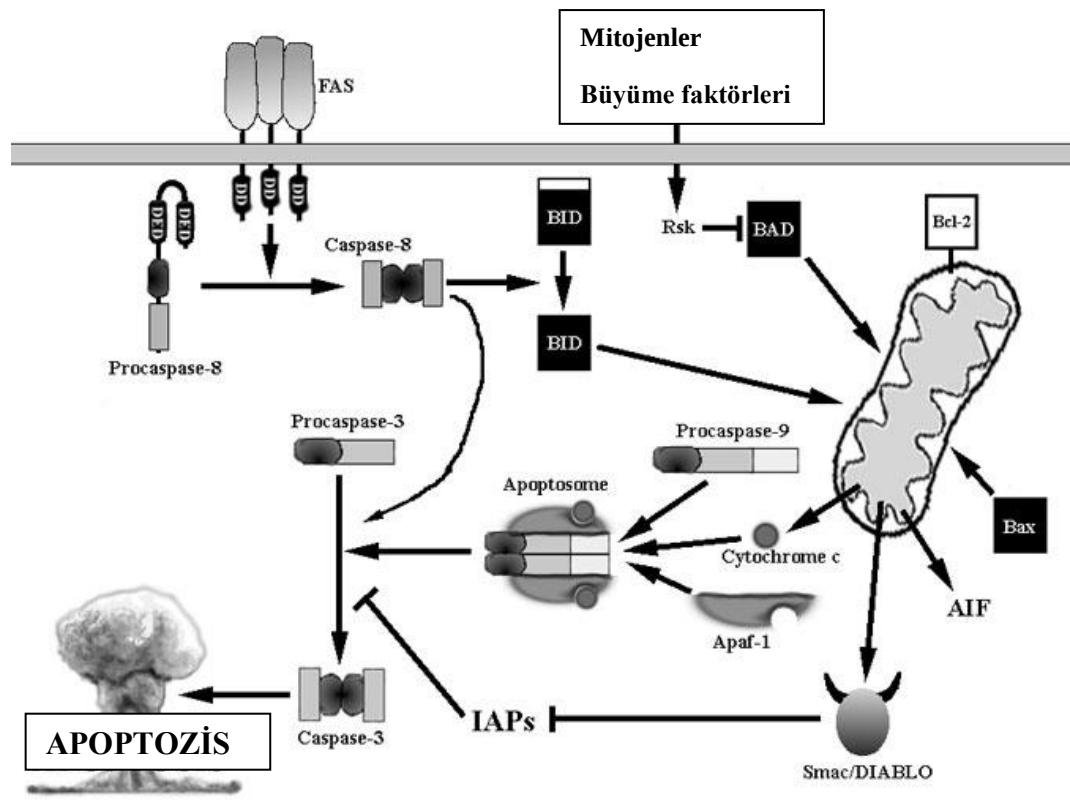
TNF reseptör ailesinin hücre içi bölgede yerleşmiş '*death domain*' içeren ölüm reseptörleri, kaspazlara bağlanmak için '*death effector domain*' bölgesi içermektedirler. Fas ve TRAIL reseptörü '*Fas-Associated Death Domain*' (FADD) adaptör molekülüne, adaptör molekülde kaspaz-8'e bağlanarak kaspaz 8 aktivasyonuna neden olmaktadır. Oluşan yeni yapı '*death inducing signaling complex*' (DISC) olarak adlandırılır. Kaspaz-8 aktivasyonu diğer kaspazların aktivasyonuna neden olur ve apoptoziste gözlenen biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler ortaya çıkar (35, 49, 52-54).

2.1.2.4.2. İntrensek Yolak

Mitokondri intrinsek apoptotik yolağın düzenlenmesinde temel etkindir (55). Mitokondri ile ilgili yolak birden çok mekanizma tarafından uyarılabilir. DNA hasarını uyarıcı veya DNA tamirini baskılayıcı ajanlar, oksidatif stres, staurosporin ve deksametazon gibi kimyasallar, kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar, büyüme faktörü yokluğu mitokondri hasarına neden olarak, mitokondriden sitozole sitokrom c salınımına neden olur (55, 56). Sitokrom c; apoptozisin en son basamağında görev alır, mitokondriden sitoplazmaya geçişi hücrenin apoptozis yolunda geri dönüşümsüz döneme girmiş olduğunu gösterir (13).

Sitokrom-c sitozolde bir sitoplazma proteini olan Apaf-1'e bağlanır. Bu bağlanma çok sayıda alt birimi olan ve 'apoptozom' olarak adlandırılan Apaf-1/kaspaz-9 kompleksinin oluşmasını tetikler. Apoptozom kompleksi kaspaz-9'u aktive eder, efektör bir seri kaspaz aktivasyonunu aracılığı ile apoptozise özgü değişikliklere neden olur (19, 48, 49, 52, 57).

Apoptozisin mitokondriyal yolağında, mitokondriden sitozole diğer bir protein olan apoptozis indükleyici faktör AIF) salıverilir. AIF kaspazlardan bağımsız bir şekilde çekirdek içinde DNA hasarına neden olarak apoptozise neden olur (51, 58) (Şekil 3).



Şekil 3. Mitokondri yoluyla kaspaz aktivasyonu (51, 58).

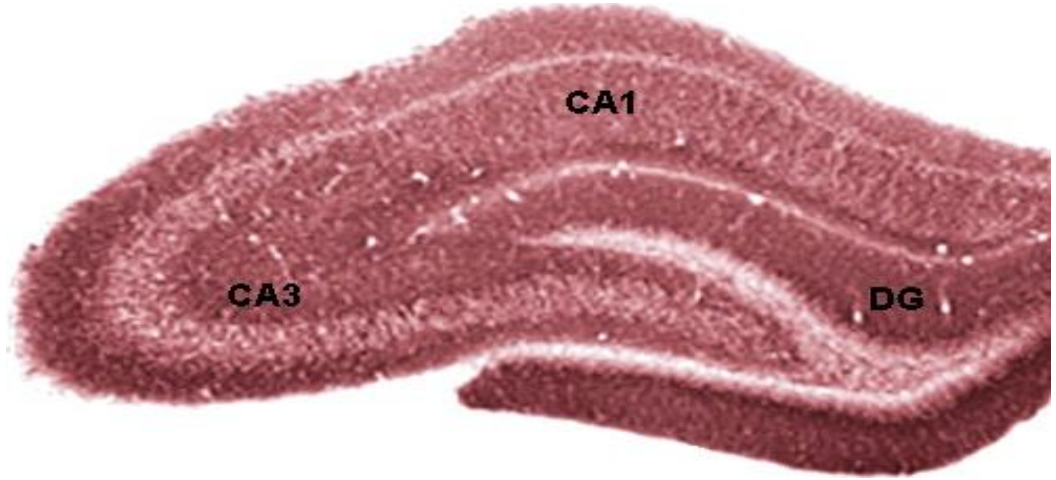
2.2. Genel Anestezikler

Günümüzde, çeşitli nedenlerden dolayı, birçok anestezik ajan genel anestezi ve sedasyon için kullanılmaktadır. Bu ajanların insanlar üzerindeki çoğu etkileri bilinmekte ancak özellikle gelişmekte olan santral sinir sistemi (SSS)

üzerine etkileri tam aydınlatılmadığı gibi, en sık araştırılan konular arasındadır (59).

2.2.1. Santral Sinir Sisteminde Etki Mekanizmaları

Yapılan çalışmalarda anestezi ajanların sıçan beyinde, sinaptik transmisyon üzerine etkileri en iyi hipokampus bölgesinde gösterilmiştir (59-62). Anestezi ajanların ana hedef bölgelerinden olan hipokampus; nörotransmitterler, afferent ve efferent yollar, çeşitli katmanlar (dentat girus, fimbria hipokampi ve Cornu Ammonis 1: CA-1) gibi birçok yapıyı içermektedir (61) (Resim 1)



Resim 1. Hipokampusun Cornu Ammonis (CA) 1 ve 3 bölgeleri ile dentat girus (DG) bölgeleri (61).

Hipokampus, lateral ventrikülün alt boynuz tabanı boyunca uzanan bir gri cevher tabakasıdır. Hipokampusa tüm duyularla alakalı, doğrudan veya dolaylı çok sayıda afferent lif gelir ve forniks yoluyla hipokampusu terk eder. Miyelinli liflerden meydana gelen forniks; talamus, hipotalamus ve septal sahada sonlanır. Bu da hipokampus ile subkortikal alanlar arasındaki çeşitli devrelerin varlığını

gösterir. Yine subkortikal alanlar aracılığı ile hipokampus, beyinde birçok bölge ile iletişim halindedir. Bu bağlantıların çokluğu, tek bir fonksiyon yerine, birçok beyin fonksiyonunda rol aldığını göstermektedir. Hareketlerin davranış biçimine dönüşmesinde önemli role sahip bulunan limbik sistem, çok sayıda sinyali hipokampustan alır. Yine hafıza ve özellikle de kısa süreli hafıza üzerinde rolü olan hipokampusun yokluğunda, verbal veya sembolik anıların saklanması mümkün olmayacaktır. Dentat girus lezyonlarında, uzaysal (yer) hafızası, yeni kayıtların silinmesi (yakın hafıza) gözlenir. Uzak hafızanın korunup yakın hafızanın bozulduğu Alzheimer hastalığında hipokampus ilk etkilenen bölgelerdendir (63).

Hipokampuste, internöronlar içinde GABA ve onun sentezleyici enzimleri bulunur. Bu nöronlar uyarıcı sinaptik akımların ve piramidal hücre salgılarının inhibisyonunu sağlar. Hipokampus ve diğer kortikal bölgelerdeki nöron aktivitesinin uyarılabilirliğinde ve eşgüdümünde önemli rol oynayan GABAerjik internöronlar tüm nöron topluluğunun % 10'undan daha azını oluşturur (64). Beyin fonksiyonlarında önemli rol oynayan inhibitör nöronlar üzerine anestezi ajanların hücresel ve moleküler düzeyde etkileri henüz tam olarak bilinmemektedir (62).

Memelilerde SSS'ye genel anesteziklerin etkisi iki mekanizma ile açıklanmaktadır (59).

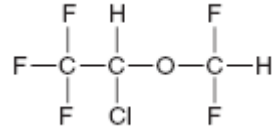
I. NMDA reseptörlerinin uyarılabilirliğinde azalma (ketamin, N₂O, zenon)

II. GABA_A reseptörleri aracılığı ile inhibitör etkide artış olması
(benzodiyazepinler, barbitüratlar, propofol, etomidat, izofluran, enfluran, halotan ve desfluran)

Volatil anestezik ajanlar memelilerde SSS’de nöronal aktiviteyi deprese ederler ve GABA_A reseptör kompleksinden klor akımını arttıırırlar. Ayrıca konsantrasyona bağımlı olarak, neokortikal nöronların spontan aksiyon potansiyel ateşlemelerini deprese ederler (61).

2.2.2. İzofluran

İzofluran, enfluran izomeri olan bir metil etil eter (CH₂F-O-CHClF₃) olup onun birçok özelliğini taşır. 1965’te Terrell tarafından sentezlenmiş ve 1981 de klinik kullanıma girmiştir (65, 66) (Şekil 4).



Şekil 4. İzofluranın kimyasal formülü (65)

İndüksiyon ve derlenme, sevofluran ve desflurana göre daha yavaştır. Kötü kokusu ve hava yollarını iritan etkisi nedeniyle indüksiyonda tercih edilmez. Uyanma döneminde öksürme, sekresyon artışı ve huzursuzluk olabilir. Minimum

alveolar konsantrasyon (MAK) değeri oksijen içinde 1.15, %70 N₂O içinde 0.56'dır (65).

Sıçanlarda MAK 1,46 olan izofluranın kan/gaz erirlik katsayısı 1,4 olduğundan hızlı bir anestezi indüksiyonu ve anesteziden uyanma sağlamaktadır (67).

Anesteziklerin atılımı ile ilgili olası üç yol dikkate alınmıştır: Bunlar transkutanöz ve transvisseral hareket ile metabolizmadır. Transkutanöz ve transvisseral hareket ihmal edilebilecek düzeydedir. Yaklaşık % 0.2 oranında biyotransformasyona uğrar. Sitokrom P450 2E1 sistemi ile triflorasetikasite ve inorganik floride metabolize olur (65). İzofluran akut ve kronik toksisite yönünden diğer ajanlara göre daha güvenilirdir. Çok az metabolize olması ve molekülünün stabil olması nedeniyle hepatotoksik ve nefrotoksik etkisi düşüktür (65).

2.2.2.1. İzofluranın Apoptotik Etki Mekanizmaları

Anestezide çok yaygın olarak kullanılan izofluran gelişmekte olan sıçan beyin nöronlarında, klinikte kullanılan dozlarda kaspaz aktivasyonuna ve apoptozise neden olduğu gösterilmiştir (1, 59).

Son zamanlardaki çalışmalarda izofluranın IP₃ reseptör aktivasyonu ile hücre içi Ca⁺²'yi artırarak apoptozise neden olduğu gösterilmiştir. İzofluran sadece endoplazmik retikulum (ER) membranındaki IP₃ reseptörleri artırarak değil aynı zamanda, post-sinaptik membrandaki GABA_A reseptörlerini aktive eder

ve NMDA reseptör aracılığı ile Ca^{+2} girişini hızlandırır. IP_3 ER membranında bulunur ve ER' den sitoplazma içine Ca^{+2} serbestleşmesini düzenler (68). IP_3 reseptörünün aktivasyonu sitoplazmadaki serbest Ca^{+2} seviyelerinin yükselmesine ve hücre ölümüne neden olur (69). İzofluranın artırdığı sitozolik Ca^{+2} fazlalığı, mitokondri zarında geçirgenliği artırır. Böylece sitokrom-c gibi apoptozis öncüsü faktörler sitoplazmaya geçer, apoptozom kompleksi oluşur, inaktif olan öncülerden kaspazlar aktive edilir. Şekil 3'te de daha önce belirtildiği gibi kaspaz 9 ve 3 aktivasyonu gerçekleştiğinde apoptozis ile sonuçlanır (2).

2.2.3. Ketamin

Ketamin diğer iv anestezi ajanlarından farklıdır. Ketaminin belirgin analjezik etkisi vardır. Kısmen suda çözünür, berrak ve renksizdir. Lipid çözünürlüğü yüksektir. Ketaminin iki stereoizomeri vardır; S (+) ve R (-) dir. S(+) izomeri daha potenttir ve daha az yan etkiye sahiptir (65).

Ketamin hepatik mikrozomal enzimlerce metabolize edilir. Önce N-demetilasyona uğrar ve norketamine dönüşür ve sonra hidroksilasyona uğrar ve hidroksinorketamin oluşur. Bu ürünler konjugasyona uğrar ve suda çözünür ürünler dönüşür ve idrarla atılır. Norketamin belirgin düşük aktivite göstermekle birlikte asıl aktif metabolit ketamindir (65).

Ketamin doza bağlı olarak bilinçsizlik ve analjezi sağlar. Yaptığı anesteziye disosiyatif anestezi denilmektedir. Yüksek lipid çözünürlüğünden dolayı kan beyin bariyerini hızlıca geçer. Ketamin verildikten sonra hastanın

gözleri açık, pupiller dilate, horizontal veya vertikal nistagmusun gözleendiği kataleptik bir durum oluşur, ancak anestezinin diğer evreleri normal uyku gibidir. Kornea, öksürük, yutkunma refleksleri devam eder. Sekresyon artışı olur, iskelet kas tonusu artar, baş, kollar, bacaklar, gövdede amaçsız hareketler görülebilir (65).

Ketaminin etkisini NMDA, opioid, muskarinik ve diğer bazı reseptörler aracılığı ile gösterir (70). Spinal kordaki polisaptik refleksleri engeller, beyinde bazı bölgelerinde ise uyarıcı nörotransmitterlerin etkilerini baskılar. Ketamin fonksiyonel olarak talamusu (duyusal uyarıları retiküler aktive edici sistemden serebral kortekse iletir) limbik korteksten (duyuların farkında olunması ile ilgili bölüm) ‘disosiyer’ eder yani ayırır. Beyindeki bazı nöronlar baskılansa da diğerleri tonik olarak uyarılır. Klinik olarak bu dissosiyatif anestezi durumu hastaların şuurlu gibi görünmesine rağmen duyuusal verileri değerlendirip yanıt verilememesine neden olur (71).

Ketaminin bazı önemli klinik etkileri vardır. Ketamin kardiyovasküler sistemi uyarır ve kan basıncı, kalp hızı ve kardiyak debi artar. Bunun sonucu miyokardın iş yükü ve oksijen tüketimi artar (65). Ketamin bronş düz kaslarını gevşetir (bronkodilatasyon). Ketaminin indüksiyon dozunun uygulamasından sonra dakika ventilasyonunda geçici bir azalma gözlenebilir. Reaktif hava yolu hastalığında ve bronkospazmda pulmoner kompliyansı iyileştirir. Ketamin sekresyon artışına neden olur. Sekresyonlar üst hava yolu obstrüksiyonuna neden olabilir (65).

Ketamin serebral kan akımını, oksijen tüketimini, intrakraniyal basıncı artırır. Ketamin SSS’de primer olarak talamokortikal sistemi etkiler. Limbik sistemi aktive eder. Ketamin, spinal kord ile beynin yüksek merkezleri arasında emosyonel komponentlerin geçişinde önemli olan medial medüller retiküler formasyona impuls geçişini baskılar (65).

2.2.3.1. Ketaminin Apoptotik Etki Mekanizmaları

Ketaminin doz ve süre bağımlı olarak nöroprotektif veya nörodejeneratif etkinliğinin olduğu bulunmuştur (59). Ketaminin bir NMDA reseptör (bir glutamat reseptör alt tipi) antagonisti olduğu gösterilmiştir. Açık olan NMDA kanallarını kapatarak sitozole Ca^{+2} girişini azaltır, ER membranında bulunan IP_3 oluşumunu ve sitozoldeki serbest Ca^{+2} seviyelerini azaltır (2). Doz bağımlı olarak nörotoksik etkinliği arttırdığı bildirilmiştir. Nörotoksik etkisini, glutamat reseptörleri yoluyla glutaminerjik sistemin aşırı uyarılması, NMDA reseptörlerinin ketamin uygulamasına ters yanıt olarak uyarılması, ikinci haberci olarak Ca^{+2} dengesinin bozulması ve oksidatif stres sonucu olabileceği bildirilmiştir (72).

2.2.3.2. Kullanım Alanları

- Ketamin premedikasyon, sedasyon, genel anestezi indüksiyonu ve idamesinde kullanılabilmektedir (65).

- Travma, hipovolemik veya septik şok, pulmoner hastalığı olan hastalar için ideal bir anestezi ajandır (70).
- Rejyonal anesteziyi tamamlamak için ve yanık pansumanlarında özellikle tercih edilir (65).
- Ketamin, pediyatrik girişimlerde (kardiyak kataterizasyon, radyasyon tedavisi, pansuman, radyolojik ve dental girişimler) güvenli ve etkin sedasyon sağlar (65).

2.3. Dantrolen

Malign Hipertermi (MH) tedavisinde kullanılan bir hidantoin türevidir. Dantrolen, ryanodin reseptörü (RYR) üzerinde iki adet bağlanma yerine bağlanarak, kalsiyumun sarkoplazmik retikulum (SR)'dan salıverilmesini azalttığı gibi SR'ye geri alınımını da artırır. Böylece hücre içi Ca^{+2} seviyesini azaltarak nöron hasarını önler veya azaltır (4).

2.3.1. Etki Mekanizması

Dantrolen; SR membranından hücre içine Ca^{+2} salıveren RYR baskılar. RYR, Ca^{+2} bağımlı protein olan kalmodulin tarafından düzenlenir (4). Memelilerde üç farklı RYR tanımlanmıştır. RYR1 daha sık olarak iskelet

kaslarında, RYR2 daha sık olarak kalp kasında, RYR3 daha az miktarda olup beyin, düz kas hücrelerinde bulunur (73). Dantrolen RYR1 ve RYR3'e etki eder ve kalmodulin aktivitesini değiştirerek Ca^{+2} seviyelerini azaltır. Dantrolen RYR2'ye etki etmez ve kalpte kasılma ile ilgili yan etkiye neden olmaz (74). Dantrolen beyindeki reseptörlere bağlanarak Ca^{+2} dengesindeki bozulmalara karşı beyin sinir hücrelerini korur. Dantrolenin son zamanlarda hayvan hücre kültür modellerinde, spinal kord hasarı, epilepsi nöbeti ve iskemi gibi çok sayıda nöronal hasara karşı hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir (75-79).

2.3.2. Dantrolenin Apoptotik Etki Mekanizması

Çeşitli apoptozis modellerinde dantrolen nöroprotektif etkisini membran stabilizasyonu, protein katlanmasını önleyerek infarktı küçültmesi ve dokuları nekrozdan koruması gibi farklı mekanizmalarla yapmaktadır (4). Dantrolen ER' deki ryanodin ve IP_3 reseptör antagonistidir, izofluran tedavisinde ER' den Ca^{+2} serbestleşmesi ile meydana gelen apoptozisi inhibe eder (80, 81).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan 02.08.2010 tarih ve 10.088 kod numaralı etik kurul onayı alındıktan sonra TÜBİTAK tarafından ‘110S514’ proje numarası ile desteklenerek, Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.1. Denekler

Çalışmada 200 ± 25 gram ağırlığında, genç erişkin, erkek Wistar cinsi sıçanlar kullanıldı. Sıçanların beslenme ve su ihtiyaçları serbest beslenme ile sağlandı. Ortam ısıları $21 \pm 1^\circ\text{C}$ 'ye ayarlı, 12 saat gece 12 saat gündüz olacak şekilde aydınlatılan özel çelik tel kafeslerde saklandı. Çalışmanın 7 gün öncesinden çalışma bitimine kadar bu şartlarda tutuldular (Resim 2).



Resim 2. Sıçanların konulduğu özel çelik tel kafes

İşlem öncesi sıçanlar rastgele 5 gruba ayrıldılar:

Grup Kontrol (% 100 O₂) (n=6): Kapalı kafese konan sıçanlara 2 saat sadece % 100 Oksijen (O₂) uygulandı.

Grup İzo (n=6): Kapalı kafese konan sıçanlara 2 saat süreyle % 100 O₂ içinde % 1,4 izofluran uygulandı.

Grup İzo+Dant (n=6): Sıçanlara, intraperitoneal (ip) 10 mg/kg dantrolen uygulandıktan 60 dakika (dk) sonra, 2 saat süreyle % 100 O₂ içinde % 1,4 izofluran uygulandı.

Grup İzo+Ket (n=6): Sıçanlara ketamin subkutan (sc) 40 mg/kg, uygulandıktan 60 dk sonra, 2 saat süreyle % 100 O₂ içinde % 1,4 izofluran uygulandı.

Grup İzo+Ket+Dant (n=6): Sıçanlara dantrolen ip 10 mg/kg hem de ketamin sc 40 mg/kg uygulandıktan 60 dk sonrada kapalı kafese konan sıçanlara 2 saat süreyle % 100 O₂ içinde % 1,4 izofluran uygulandı (Resim 3).



Resim 3. Sıçanlara anestezi uygulanan kapalı kafes

3.2. Anestezi Uygulamaları

Sıçanların özel kapalı kafeste solunumları spontan olarak devam ettirildi. Kafesin oksijen ve izofluran konsantrasyonu ekspiryum havasında, kalp hızı ve oksijen saturasyonu puls oksimetre ile sürekli monitörize edilerek takip edildi. Sıçanların anestezi altındaki vücut ısıları rektal olarak sürekli monitörize edildi, altına yerleştirilen ısıtıcı battaniye yardımıyla normal sınırlarda ($37 \pm 0,5$ °C) sabit tutuldu, 10 dk ara ile kaydedildi. Her grubun deneyine günün aynı saatinde (07:00) başlandı. Sıçanlar saydam yapılı, gaz giriş ve çıkış deliği bulunan kapalı kafese (*anesthesia chamber*) konuldu. Basınçlı oksijen tankından akım ölçer ile

gelen 4 L/dk O₂ standart izofluran vaporizatörüne (Ohmeda® Isotec 3 Abbott), % 1,4 izofluran ve % 100 O₂ karışımı ise bir hat yardımı ile anestezi kutusuna bağlandı. Anestezi verilen kutunun gaz çıkış hattına sürekli monitörizasyon için gaz analizatör detektörü bağlandı.

Sıçanlar iki saatlik anestezi sonunda oda havası solunan gözlem bölümüne alındıktan sonra spontan hareketleri geri döndüğünde kafeslerine yerleştirildi.

İşlemden 6 saat sonra sıçanlar, 60 mg/kg ketamin ip uygulanıp, intrakardiyak kan alınarak sakrifiye edildi. Ötenazi sonrası sıçanların beyin dokularının tamamı hızla çıkarıldı. Alınan dokular elektron mikroskopik inceleme için pH 7,4'te 1/15 µ fosfat tamponlu % 2,5'luk glutaraldehit tespit solüsyonu içine konuldu. Tespit sonrası hipokampus dokusu dikey kesiyle belirlendi. Işık mikroskopik inceleme için 1 cm³ büyüklüğünde kesilen doku parçaları % 10'luk nötral formalinde 72 saat tespit edildi ve sonra parafine gömüldü.

3.3. İmmunohistokimyasal Yöntem

Kontrol ve deney gruplarına ait beyin dokusu bloklarından polilizinli camlara 4 µm kalınlığında kesitler alınarak immunohistokimyasal boyamaları yapıldı. Çalışmada hipokampus bölgesinde apoptozisin izlenmesi amacıyla; kaspaz-9 (Caspase-9 LAB6/Ab- 4) tavşan poliklonal antikoru (Cat: RB- 1205-P, Lot:1205P306), kaspaz-8 (Caspase-8 FLICE/Ab-4) tavşan poliklonal antikoru (Cat: RB-1200-P, Lot: 1200P708C) ve kaspaz-3 (Caspase-3CPP32/Ab-4) tavşan poliklonal antikoru (RB-1197-P, Lot: 1197P701) uygulandı. Sekonder kit olarak Ultravision Detection System Anti-Rabbit HRP (RTU) (Cat: TP- 125 HL, Lot:

PBN70509, Lab Vision, Fremont, USA) ve HRP/AEC (Cat: TA-007-HAC, Lot: 007HAC13565) kullanıldı.

Kesitler 37°C'deki etüvde bir gece tutulduktan sonra deparafinizasyonu kolaylaştırmak amacıyla etüv ısısı 57°C'ye çıkarılarak 1 saat daha bekletildi. Camlar deparafinizasyonu tamamlamak için 2 kez 15'er dakika ksilolde bırakıldıktan sonra sırasıyla % 100'lük, % 96'lık ve % 80'lik alkol serilerinden 10'ar dakika geçirilerek sudan, 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirilerek alkolden temizlendi.

Kesitler doku içerisinde formaldehitin kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarılmasını sağlamak amacıyla mikrodalga fırında 1 M sitrat tamponuna (pH: 6.0) (Cat: AP- 9003- 500, Lot: 9003LT13610, Lab Vision, Fremont, USA) etkin bırakıldı. Oda ısısında 20 dakika soğutulduktan sonra 15 dakika süreyle hidrojen peroksit (Cat: TA-125-HP, Lot: 125HP14119, Lab Vision, Fremont, USA) uygulandı ve endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi.

Daha sonra, camlar 3 kez 3'er dakika PBS (Phosphate Buffer Saline) (pH: 7.4) ile yıkandıktan sonra özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi amacıyla 5 dakika Ultra V Block (Cat: TA-125-UB, Lot: AUB70803, Lab Vision, Fremont, USA) uygulandı. Bloklama aşamasının ardından kesitler yıkanmadan Caspase-8 (Cat: RB-1200-P, Lot: 1200P708C), Caspase-9 (Cat: RB-1205-P, Lot: 1205P306) ve Caspase-3 (RB-1197-P, Lot: 1197P701) primer antikorlarına etkin bırakılarak 60 dakika bekletildi. Camlar 60 dakikanın sonunda 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandıktan sonra 20 dakika biyotinli sekonder antikor (Cat: TR-125-BN, Lot: RBN70115, Lab Vision, Fremont, USA) uygulanarak primer antikora bağlanması

sağlandı. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra dokular enzimin biyotine bağlanması amacıyla 20 dakika streptavidin peroksidaz enzim kompleksine (Cat: TS-125-HR, Lot: SHR70515, Lab Vision, Fremont, USA) bırakıldı.

Camlar tekrar PBS ile yıkandıktan sonra kromojen olan AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) (Cat:TA-007-HAC, Lot: 007HAC13565, Lab Vision, Fremont, USA) uygulanarak gözle görülebilen immün reaksiyonun açığa çıkması sağlandı. Zemin boyamasında Mayer'in Hematoksileni (Cat: TA-125-MH, Lot: AMH70809, Lab Vision, Fremont, USA) kullanıldı ve camlar Ultramount (Cat: TA-125-UG, Lot: VM13518, Lab Vision, Fremont, USA) ile kapatıldı. Kesitler Leica DM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Vin 3 programında değerlendirildi ve fotoğraflandı.

4.İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme SPSS 15.0 bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirildi. Veriler, Ortalama $\pm$ Standart deviasyon (Ort. $\pm$ Sd) ve ortanca (minimum-maksimum değerler) olarak sunuldu.

Tüm gruplar için tanımlayıcı istatistikler yapıldıktan sonra grupların ortalama kaspaz 3, 8 ve 9 değerleri arasındaki fark Kruskal-Wallis Varyans Analizi ile değerlendirildi. İstatistiksel olarak anlamlı farkın kaynaklandığı grupları saptamak için non parametrik testlerden ‘Bonferroni’ düzeltmeli Mann-Whitney U Testi kullanıldı ve $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1.1. Hipokampus CA-1 bölgesindeki kaspaz 3, 8 ve 9 sonuçları

Hipokampus CA-1 bölgesi kaspaz 3, 8 ve 9 sonuçlarının kontrol grubuna göre karşılaştırmaları Tablo 4'te sunulmuştur.

Hipokampus CA-1 bölgesinde kaspaz 3 için yapılan kesitlerde grup İzo ve grup İzo+Ket'te immün tutulum gösteren ortalama hücre sayıları, kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p=0.004$ ve $p=0.004$). Kaspaz 8 ve 9 için yapılan kesitlerde ise grup İzo, grup İzo+Ket ve grup İzo+Ket+Dant'ta immün tutulum gösteren ortalama hücre sayıları kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p=0.004$, $p=0.004$ ve $p=0.004$). Ancak grup İzo+Dant'ta kaspaz 3, 8 ve 9 ait sonuçlarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 4).

Hipokampus CA-1 kaspaz 3, 8 ve 9 sonuçlarının gruplar arasında karşılaştırmalarına ait tüm sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde ise grup İzo+Ket'te immün tutulum gösteren ortalama hücre sayıları tüm diğer gruplardan (grup İzo, grup İzo+Dant ve grup İzo+Ket+Dant) istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p=0.004$). Grup İzo'da immün tutulum gösteren hücre sayıları sadece grup İzo+Dant'tan istatistiksel olarak yüksek bulundu ($p=0.04$). Grup İzo+Ket+Dant'ta ise sadece grup İzo+Dant'tan istatistiksel olarak yüksek bulundu ($p=0.04$) (Tablo 4).

Tablo 4. Hipokampus CA-1 bölgesindeki kaspaz 3, 8 ve 9'a ait immuntutulum gösteren hücre sayıları [Ort. $\pm$ Sd ve ortanca (minumum-maksimum değerler)]

	Kaspaz-3	Kaspaz-8	Kaspaz-9
Grup Kontrol (n = 6)	15,7 $\pm$ 1,9 15,2 (14,0-19,2)	15,2 $\pm$ 1,6 15,2 (12,3-16,8)	16,0 $\pm$ 1,8 15,6 (14,3-18,3)
Grup İzo (n = 6)	21,5 $\pm$ 2,0*# 20,8 (19,7-24,7)	21,4 $\pm$ 1,4*# 21,6 (18,8-23,0)	22,0 $\pm$ 1,6*# 22,6 (19,8-23,8)
Grup İzo+Dant (n = 6)	16,5 $\pm$ 0,5 16,6 (15,8-17,1)	16,0 $\pm$ 0,5 16,0 (15,3-16,5)	16,6 $\pm$ 0,6 16,7 (16,0-18,0)
Grup İzo+Ket (n = 6)	29,6 $\pm$ 1,7*#§ 29,3 (27,3-32,5)	28,3 $\pm$ 1,0*#§ 27,8 (27,3-29,8)	30,0 $\pm$ 4,0*#§ 29,8 (24,8-36,0)
Grup İzo+Ket+Dant (n = 6)	19,9 $\pm$ 1,6# 19,9 (18,1-22,3)	19,0 $\pm$ 1,5*# 18,8 (17,3-21,7)	20,4 $\pm$ 1,2*# 20,1 (19,2-22,7)

*p<0.05 kontrol grubu ile karşılaştırma

#p<0.05 grup İzo+Dant ile karşılaştırma

§p<0.05 grup İzo+Ket+Dant ile karşılaştırma

4.1.2. Hipokampus dentat girus bölgesindeki kaspaz 3, 8 ve 9 sonuçları

Hipokampus dentat girus kaspaz 3, 8 ve 9 sonuçlarının kontrol grubuna göre karşılaştırmaları Tablo 5'te sunulmuştur.

Hipokampus dentat girus bölgesinde kaspaz 3 ve 8 için yapılan kesitlerde grup İzo ve grup İzo+Ket'te immün tutulum gösteren ortalama hücre sayıları kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p=0.004$ ve $p=0.004$). Kaspaz 9 için yapılan kesitlerde ise grup İzo, grup İzo+Ket ve grup İzo+Ket+Dant'ta immün tutulum gösteren ortalama hücre sayıları kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p=0.004$). Ancak grup İzo+Dant'ta kaspaz 3, 8 ve 9 ait sonuçlarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmadı (Tablo 5).

Hipokampus dentat girus kaspaz 3 ve 8 sonuçlarının gruplar arası karşılaştırmalarına göre grup İzo+Ket'te immün tutulum gösteren ortalama hücre sayıları tüm diğer gruplardan (grup İzo, grup İzo+Dant ve grup İzo+Ket+Dant) istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p=0.004$). Grup İzo+Ket'te kaspaz 9 ise grup İzo'ya benzer ancak diğer iki gruptan (grup İzo+Dant ve grup İzo+Ket+Dant) istatistiksel olarak yüksek bulundu ($p=0.04$). Grup İzo+Ket+Dant'ta kaspaz 3 ve 9 sadece grup İzo'dan istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu ($p=0.04$). Ancak grup İzo+Ket+Dant'ta kaspaz 3, 8 ve 9 grup İzo+Dant arasında istatistiksel olarak anlamlı farka rastlanmadı (kaspaz 3, 8 ve 9 için sırasıyla $p=0.077$, $p=0.037$ ve $p=0.010$) (Tablo 5).

Tablo 5. Hipokampus dentat girus bölgesindeki kaspaz 3, 8 ve 9'a ait immün tutulum gösteren hücre sayıları [Ort. $\pm$ Sd ve ortanca (minumum-maksimum değerler)]

	Kaspaz-3	Kaspaz-8	Kaspaz-9
Grup Kontrol (n = 6)	18,5 $\pm$ 2,2 18,9 (15,5-21,0)	16,5 $\pm$ 1,3 16,7 (14,7-17,7)	18,4 $\pm$ 1,8 18,7 (15,8-20,5)
Grup İzo (n = 6)	24,7 $\pm$ 0,9*#§ 24,5 (23,7-26,1)	22,7 $\pm$ 0,9*# 22,8 (21,5-23,7)	29,7 $\pm$ 3,8*#§ 28,5 (25,5-34,3)
Grup İzo+Dant (n = 6)	19,4 $\pm$ 1,8 19,2 (17,2-22,0)	18,1 $\pm$ 1,0 18,1 (16,5-19,3)	19,9 $\pm$ 1,6 20,1 (17,2-21,5)
Grup İzo+Ket (n = 6)	34,2 $\pm$ 1,4*#§ 34,7 (31,5-35,7)	30,2 $\pm$ 2,0*#§ 30,2 (26,7-32,7)	39,3 $\pm$ 3,1*#§ 40,6 (33,8-42,5)
Grup İzo+Ket+Dant (n = 6)	21,0 $\pm$ 1,4 21,3 (18,5-22,3)	20,4 $\pm$ 1,8 20,8 (17,2-22,2)	22,9 $\pm$ 1,7* 22,6 (20,8-25,8)

*p<0.05 kontrol grubu ile karşılaştırma

#p<0.05 grup İzo+Dant ile karşılaştırma

§p<0.05 grup İzo+Ket+Dant ile karşılaştırma

4.2. Hipokampus dokusunun histolojik değerlendirmesi

4.2.1. Kaspaz 3 Bulguları

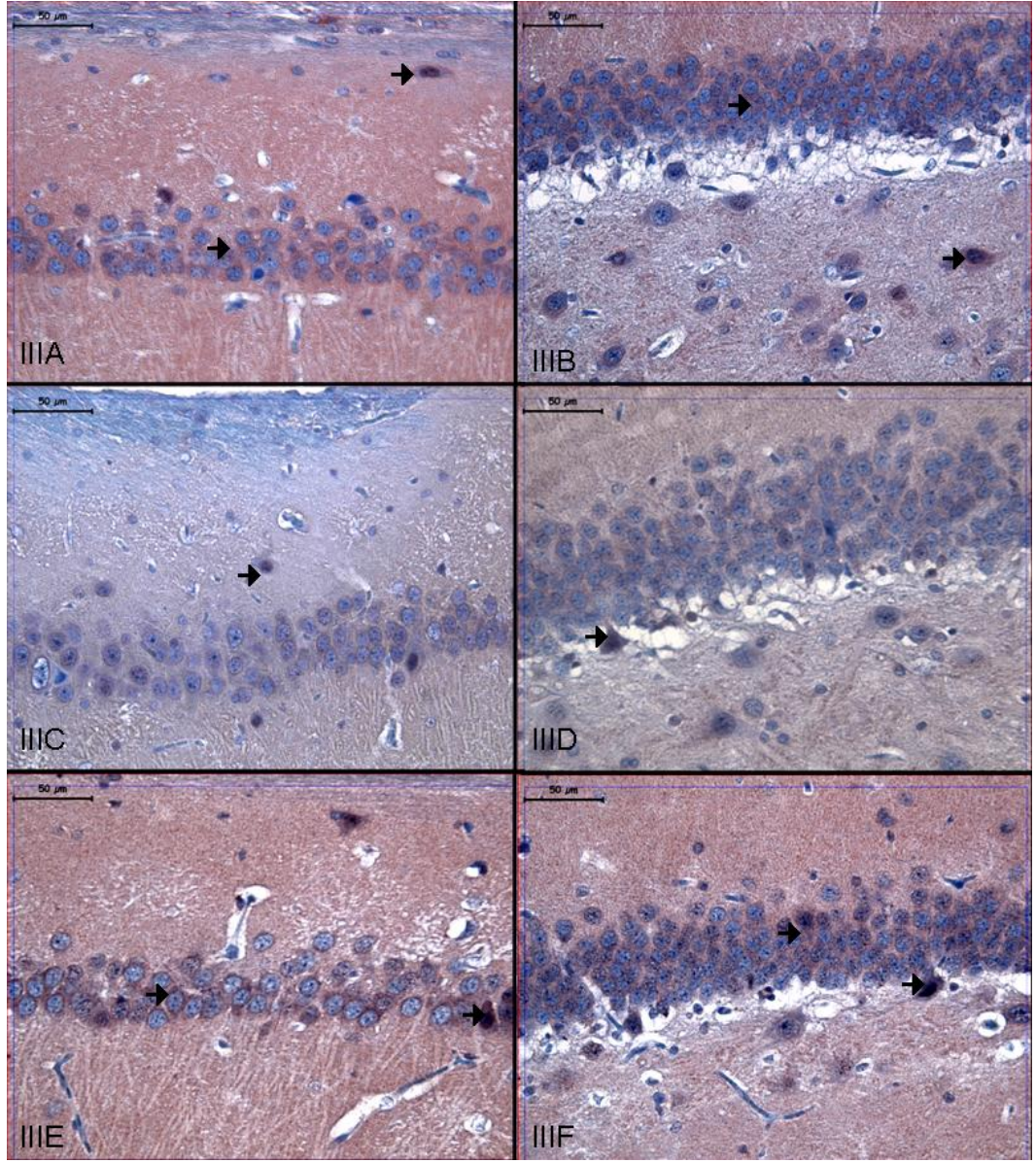
Kontrol grubuna % 100 O₂ uygulamasından hemen sonra alınan hipokampus örneklerinde belirgin bir kaspaz 3 immunreaktivitesine rastlanmadı.

Grup İzo'da; kaspaz 3 tutulumunun belirgin olduğu görüldü. CA-1 ve dentat girus bölgesinde tutulum belirgindi. Büyük büyötmeli (x 400) incelemelerde her iki bölgede de kaspaz 3 immunreaktivitesinin bir önceki gruba karşı artmıştı (Resim 4, IIIA ve IIIB).

Grup İzo+Dant'ta hipokampus örnekleri değerlendirildiğinde tutulumun grup İzo'ya göre azaldığı belirlendi. Hem CA-1 hem de dentat girusdaki nöronların, çekirdek yapıları ve belirgin çekirdekçikleriyle ayırt edilmesine karşı yer yer nörodejenerasyona rastlandı. Bu gruba ait damarlarda ve piamaterde tutulum ise orta derecedeydi (Resim 4, IIIC ve IIID).

Grup İzo+Ket+Dant hipokampus örneklerinde izlenen kaspaz 3 tutulumu grup İzo+Ket'e benzerdi. Dentat girusda grup İzo+Ket'e göre nörodejeneratif bulguların azalması dikkat çekti.

Grup İzo+Ket'teki hipokampus örneklerinde tutulum yaygındı. Her iki bölgedeki nöronlarda ve komşu alanlarda kaspaz 3 tutulumu vardı. Bazı nöronlarda perisellöler ve intrasitoplazmik ödem izlendi. Bu gruba ait damarlarda ve piamaterde tutulum artış gösteriyordu (Resim 4, IIIE ve IIIF).



Resim 4. Kaspaz 3 Hipokampus doku örneklerinde grup İzo'ya ait CA-1 bölgesi (IIIA), dentat gyrus bölgesi (IIIB), grup İzo+Dant'a ait CA-1 bölgesi (IIIC), dentat gyrus bölgesi (IIID), grup İzo+Ket'e ait CA-1 bölgesi (IIIE) ve dentat gyrus (IIIF) bölgesindeki kaspaz 9 immunreaktivitesi (→) izleniyor (immunperoksidaz & hematoksilin, X IA, IB, IC, ID, IE, IF X 400)

4.2.2. Kaspaz 8 Bulguları

Normal oda havası ile solunumuna devam eden, her hangi bir ilaç verilmeyen sıçanların hipokampus dokusunda kaspaz 8 immunreaktivitesinin zayıf olduğu görüldü. Her iki bölgedeki nöronlar normal görünümde ve sınırları belirgin şekilde hücre zarı bütünlüğü korunmuş bulundu.

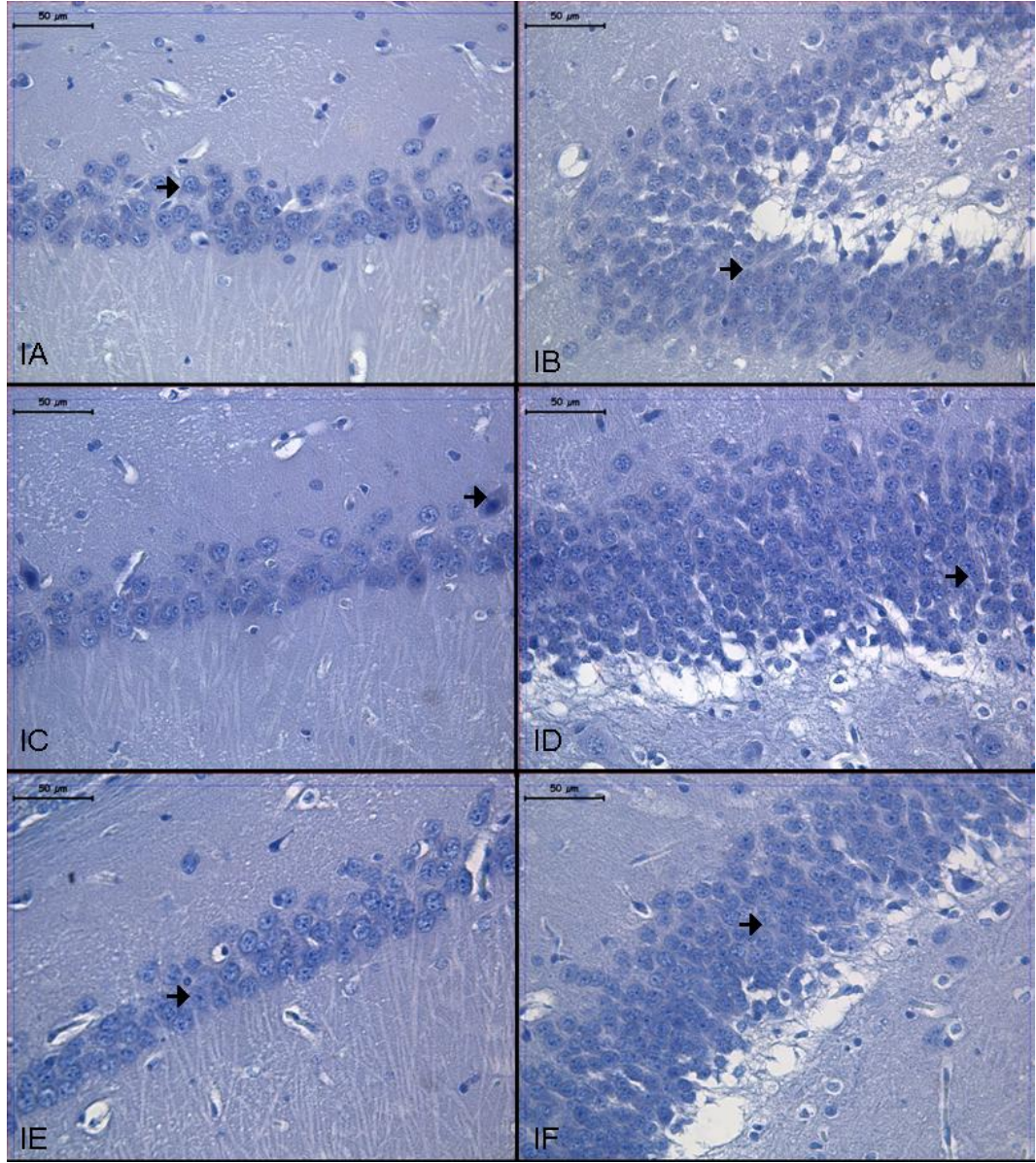
Kontrol grubuna % 100 O₂ uygulamasından hemen sonra alınan hipokampus örnekleri ise normal oda havası uygulanan gruba benzerdi. Kaspaz 8 tutulumu değerlendirildiğinde CA-1 bölgesinde ve dentat girusa ait bazı nöronlarda zayıf immunreaktivite gözlemlendi.

Grup İzo'da; hipokampus örneklerinde tüm tabakalar genel özellikleriyle ayırt edildi. Ancak dentat girus tabakasındaki ayrılma dikkat çekiciydi. Büyük büyütmelelerde yapılan incelemelerde CA-1 bölgesindeki nöronlarda çekirdek sınırları düzenli, kromatin dağılımı normal ve çekirdekçik belirgindi. Dentat girus bölgesinde ise bazı nöronlarda perisellüler ve intrasitoplazmik ödem izlendi. Bazı damarlarda zayıf-orta dereceli kaspaz 8 immunreaktivitesi gözlemlendi. Piamaterdeki kaspaz 8 tutulumu ise orta derecedeydi (Resim 5, IA ve IB).

Grup İzo+Dant'ta hipokampus örnekleri grup İzo'ya benzerdi. Tüm tabakalardaki damarlarda göreceli artış belirlendi. Bu gruba ait büyük büyütmele incelemelerde CA-1 bölgesindeki nöronlar normal şekil ve çekirdek yapılarıyla ayırt edilirken, dentat girus bölgesindeki bazı nöronlarda yer yer büzülme saptandı. Damarlarda ve piamaterde ise yer yer zayıf yer yer de orta dereceli kaspaz 8 immunreaktivitesi belirlendi (Resim 5, IC ve ID).

Grup İzo+Ket+Dant'ta alınan hipokampus örneklerinde tüm tabakalar ayırt edilmesine karşın diğer gruplardan ayrıcalıklı olarak dentat girus tabakasındaki ayrılmanın hilusa komşu tüm sınır boyunca belirginleştiği görüldü. Daha büyük büyütmelelerde (x 400) yapılan incelemelerde CA-1 bölgesinde piramidal nöronların dizilimi normal bulundu. Ancak hipokampal polimorfik tabakadaki hücrelerde perisellüler ve intrasitoplazmik ödem ayırt edildi. Dentat girus tabakasındaki ayrılmaya piramidal nöronlardaki belirgin büzülme, hücre ve çekirdek sınırlarında düzensizlik eşlik ediyordu. Bu gruba ait damarlarda ve piamaterde ise immunreaktivite orta dereceliydi.

Grup İzo+Ket'teki hipokampus örneklerinde bütünlüğün yer yer bozulduğu görüldü. Özellikle dentat girus tabakasında belirgin dejenerasyon dikkat çekti. Büyük büyütmelelerde yapılan incelemelerde, CA-1 bölgesindeki nöronlarda yer yer hücre ve çekirdek sınırlarında düzensizlikle birlikte çekirdek kromatininde yoğunluk saptandı. Bu bölgedeki nöronlarda tutulum zayıftı. Aynı gruba ait dentat girus bölgesindeki nöronlar normal görünümleriyle ayırt edildi. Bu gruba ait damarlar ve piamaterde ise grup İzo+Dant'a benzer olarak zayıftan orta dereceye doğru değişen immunreaktivite vardı (Resim 5, IE ve IF).



Resim 5. Kaspaz 8 Hipokampus doku örneklerinde grup İzo'ya ait CA-1 bölgesi (IA), dentat girus bölgesi (IB), grup İzo+Dant'a ait CA-1 bölgesi (IC), dentat girus bölgesi (ID), grup İzo+Ket'e ait CA-1 bölgesi (IE) ve dentat girus (IF) bölgesindeki kaspaz 8 immunreaktivitesi (→) izleniyor (immunperoksidaz & hemotoksilen, X IA, IB, IC, ID, IE, IF X 400)

4.2.3. Kaspaz 9 Bulguları

Normal oda havası ile solunumuna devam eden, her hangi bir ilaç verilmeyen sıçanların hipokampus dokusu örnekleri değerlendirildiğinde, CA-1 bölgesindeki bazı nöronlarda ortadan kuvvetliye değişen kaspaz 9 immunreaktivitesi belirlenirken, dentat girus tabakasındaki nöronlarda ise tutulum son derece zayıftı.

Kontrol grubuna % 100 O₂ uygulaması sonrasında alınan hipokampus örneklerinde kaspaz 9 tutulumunun biraz daha arttığı belirlendi. Büyük büyütme incelemelerde de CA-1 tabakasında ve hipokampal polimorfik tabakadaki bazı nöronlarda da immunreaktivite görüldü. Dentat girus tabakasındaki nöronlarda tutulumun zayıf olmasına karşın, hilus bölgesindeki nöronlarda yer yer zayıf yer yer orta dereceli tutulum vardı. Bu gruba ait bazı damarlarda ve piamaterde ise immunreaktivite oda havası soluyan gruba göre artmıştı.

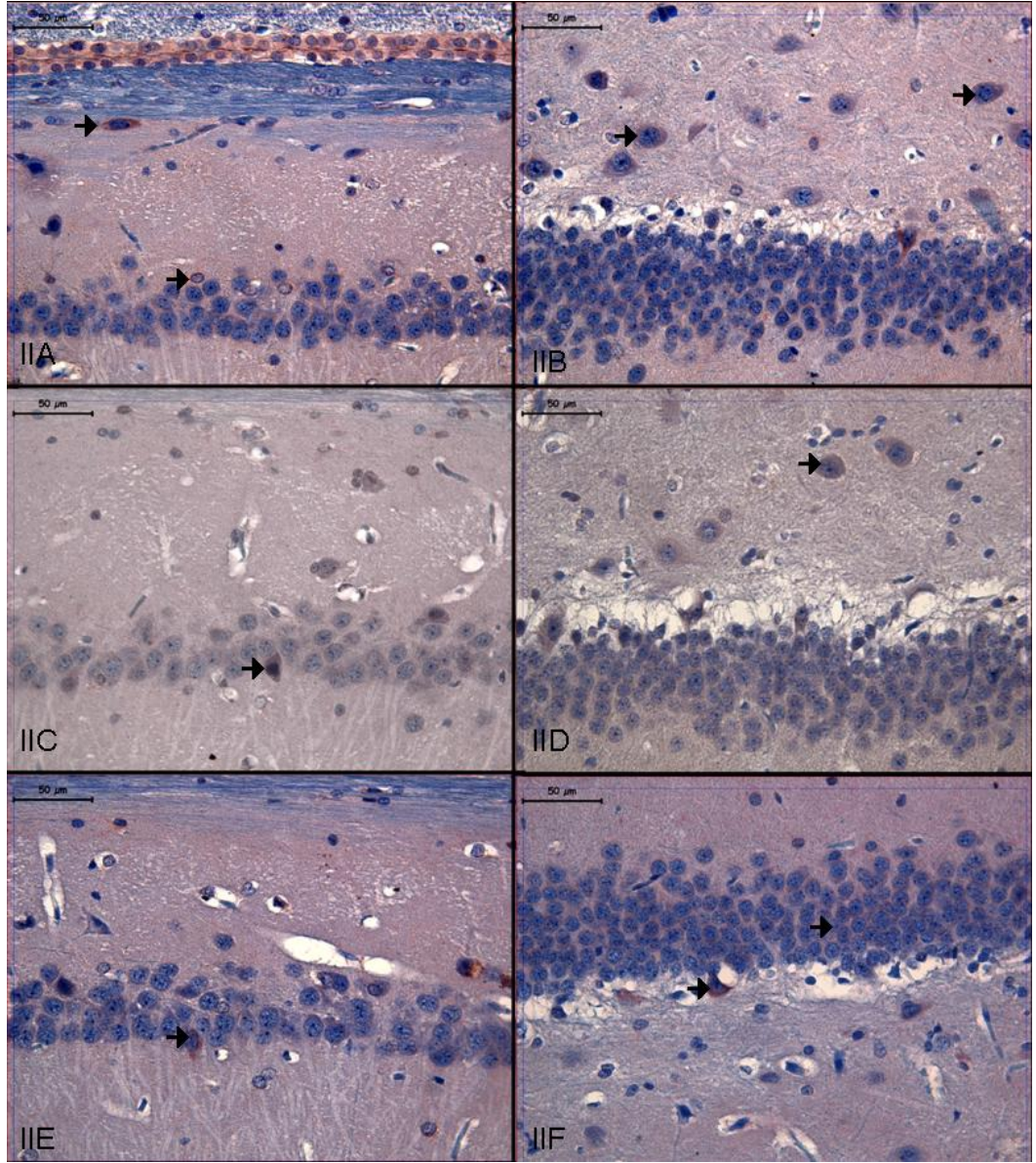
Grup İzo'da alınan hipokampus örneklerinde; hem CA-1 hem de dentat girus tabakalarında kaspaz 9 tutulumunun arttığı belirlendi. CA-1 bölgesine komşu alanlardaki nöronlarda da belirgin kaspaz 9 immunreaktivitesi ayırt edildi. Dentat girus bölgesindeki nöronlarda orta dereceli tutulum görüldü. Hilus bölgesindeki nöronlardaki kaspaz 9 tutulumu ise bir önceki gruba göre arttığı görüldü. Bu gruba ait damarlarda orta dereceli immunreaktivite izlenirken, piamaterdeki tutulumu artıyordu (Resim 6, IIA ve IIB).

Grup İzo+Dant'ta, alınan hipokampus örneklerinde, tutulum grup İzo'ya göre azalmıştı. CA-1 bölgesindeki piramidal nöronlarda tutulum ortadan

kuvvetliye değişiyordu. Bu bulguya benzer olarak dentat girus tabakasındaki ve komşu alanlardaki nörönlarda da tutulum grup İzo'ya benzerdi fakat ondan farklı olarak piamaterdeki tutulum belirgin olarak azalmıştı (Resim 6, IIC ve IID).

Grup İzo+Ket+Dant'a ait hipokampus örneklerinde, CA-1 bölgesindeki nörönlarda kaspaz 9 immunreaktivitesinin grup İzo+Ket'e göre azalmıştı. Dentat girus tabakasinda ve komşu alanlarda da yer yer kuvvetli kaspaz 9 immunreaktivitesi gösteren nörönlara belirgindi. Bu gruba ait damarlarda ve piamaterde tutulum artıyordu.

Grup İzo+Ket'te alınan hipokampus örneklerinde; tutulumun daha da arttığı görüldü. Dentat girus tabakasının hilusa komşu bölgelerinde doku bütünlüğünün bozulduğu, vakuolize alanlar vardı. Büyük büyütmele incelemedelerde CA-1, dentat girus tabakası ve komşu alanlarda kaspaz 9 tutulumu gösteren nörönlara yanı sıra, bazı nörönlarda perisellüler ve intrasitoplazmik ödem belirgindi. Bu gruba ait damarlarda ve piamaterde tutulum orta derecedeydi (Resim 6, IIE ve IIF).



Resim 6. Kaspaz 9 Hipokampus doku örneklerinde grup İzö'ya ait CA-1 bölgesi (IIA), dentat girus bölgesi (IIB), grup İzö+Dant'a ait CA-1 bölgesi (IIC), dentat girus bölgesi (IID), grup İzö+Ket'e ait CA-1 bölgesi (IIE) ve dentat girus (IIF) bölgesindeki kaspaz 9 immunreaktivitesi (→) izleniyor (immunperoksidaz & hemotoksilen, X IA, IB, IC, ID, IE, IF X 400)

5. TARTIŞMA

Bu araştırmada hipokampus CA-1 ve dentat girus bölgelerinden yapılan seri kesitlerde grup İzo ve grup İzo+Ket için kaspaz 3, 8 ve 9'a ait immun tutulum gösteren hücre sayılarının kontrol grubuna göre artarak apoptotik nörodejenerasyon gösterdiği bulunmuştur. Hipokampusun hem CA-1 hem de dentat girus bölgelerinde grup İzo+Ket'te kaspaz 3, 8 ve 9 açısından immun tutulum gösteren hücre sayılarının gerek grup İzo+Dant gerekse grup İzo+Ket+Dant'tan anlamlı şekilde fazla olduğu gözlenmiştir. Ancak hipokampusun hem CA-1 hem de dentat girus bölgelerinde grup İzo+Dant'ta kaspaz 3, 8 ve 9'a ait immunohistokimyasal sonuçları kontrol grubundan fark göstermemiştir. Hatta hipokampus dentat bölgesinde grup İzo+Dant ile grup İzo+Ket+Dant arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

Volatil anesteziklerden izofluranın apoptotik etkileriyle ilgili bu güne dek pek çok çalışma yapılmıştır (2, 7, 80 - 85). Değişik sonuçlar bulunmasına rağmen son zamanlardaki çalışmalarda, izofluranın apoptozise neden olduğu görüşü daha ön plandadır (7). Yapılan bir çalışmada 5-6 aylık sıçanlarda prefrontal korteks bölgesine % 1,4 izofluran 15 dk ara ile 2 saatlik 3 kez uygulandığında, kontrol grubuna (kapalı kafeste % 100 O₂ uygulanmış) göre kaspaz 3 tutulumunun anlamlı derecede arttığı gözlemlenmiştir. Sıçanlara % 1,4 izofluran 15 dk ara ile 2 saat uygulandığında kan basıncı, kan gaz dengesi ve karbondioksit birikimi gibi değerlerde değişikliğe neden olmadığı gözlemlenmiştir. Bir parsiyel NMDA reseptör antagonisti olan memantin, izofluranın sitozolik Ca⁺²artışı ile indüklediği kaspaz 3 artışı ve apoptozisi azalttığı saptanmıştır (68).

İki-üç aylık sıçanlarda izofluranın farklı (% 1, 1.5 ve % 2) konsantrasyonda 1 saatlik uygulamalarından 3 saat sonra sakrifikasyon yapılarak hipokampus CA-1 bölgesinde gözlenen apoptozis oranları karşılaştırıldığında, % 1'lik izofluran uygulamasında % 2'lik izofluranda gözlenenden daha yüksek oranda nörodejenerasyon olduğu bulunmuştur. Buna paralel olarak öğrenme ve bellek gibi hipokampus fonksiyonlarının düşük konsantrasyonda daha fazla bozulduğu gözlemlenmiştir (82). Çalışmamızda ise Zhang ve arkadaşlarına (68) benzer şekilde % 1,4 izofluran ile 2 saatlik anesteziden 6 saat sonra sakrifikasyon yapılan sıçanlarda apoptozisin arttığı gözlemlendi.

Bir başka araştırmada sıçanlarda, kapalı kafeste 2 saatlik % 100 O₂ içinde % 1,4 izofluran uygulamasından 2, 6, 12 ve 24 saat sonra sakrifiye edilen sıçanlarda, serebral kortekste kaspaz 3 aktivitesi araştırılmıştır. Kontrol (% 100 O₂ kapalı kafeste 2 saatlik uygulama) grubuna göre % 100 O₂ içinde % 1,4 izofluran uygulanıp 6 saat sonra sakrifiye edilen sıçanlarda serebral kortekste kaspaz 3'ün immunohistokimyasal tutulumu daha yüksek bulunmuştur. Aynı anestezi protokolünden 2 ve 24 saat sonra sakrifiye edilen sıçanlarda ise istatistiksel olarak anlamlı derecede kaspaz 3 tutulumuna rastlanmamıştır. Anesteziden 2 saat sonra izoflurana bağlı kaspaz 3 aktivasyonu için erken, 24 veya 48. saatler ise apoptotik hücreler beyinden hızla temizleneceği için apoptozisin saptanması açısından geç olduğu sonucuna varılmıştır (83). Bu nedenle % 1,4 izofluranın 2 saat uygulanmasından 6 saat sonra sakrifiye ederek yaptığımız çalışmada izofluranın apoptotik etkisi bakımından, izofluran konsantrasyonu ve uygulama süresi,

sakrifikasyon zamanı ve kaspaz 3 tutulum açısından bu çalışma ile benzer özelliktedir.

Gelişmekte olan 7 günlük sıçanlarda 4 saatlik, % 100 O₂ içinde % 0,75 izofluran, % 70 zenon ile % 30 O₂ ve % 0,75 izofluran % 70 zenon geri kalan kısmının O₂ ile tamamlandığı anestezi protokollerinden 2 saatte sonra sakrifiye edilen sıçanlarda serebral korteks, putamen ve/veya kaudat nükleus bölgelerinden immunohistokimyasal olarak yapılan kaspaz 3 tutulumuna bakıldığında, kontrol grubuna göre her 3 grupta da anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Zenonun izofluran ile kombinasyonun sadece izofluran uygulanan grup ile karşılaştırıldığında apoptozisi azalttığı gözlemlenmiştir (84). Bizim çalışmamızda da genç erişkin sıçanlarda, hipokampus CA-1 ve dentat girus bölgelerinde, immunohistokimyasal olarak yapılan kaspaz 3, 8 ve 9 tutulumu değerlendirildiğinde, sıçanların yaşları, izofluran konsantrasyon ve süresi, sakrifiye edilme zamanı ve beyindeki değerlendirilen bölgenin farklı olmasına rağmen bulgularımız % 1,4 izofluran ile apoptozisin indüklendiğini göstermiştir.

Hücre kültürü kullanılarak yapılan bir çalışmada; % 2,4 izofluran ve % 4 sevofluran (yaklaşık 2 MAK) 24 saat uygulandığında serebral kortekste nöronlarda kaspaz 3 ve 9 tutulumu değerlendirildiğinde, izofluran uygulama sonrası artış saptanırken, sevofluranda bu etki gözlemlenmemiştir (81). Bu nedenle bizde çalışmamızın hipotezini oluştururken volatil anesteziklerden izofluran ile indüklenen apoptozis modelini tercih ettik.

Genç erişkin sıçanlarda yapılan farklı bir çalışmada; % 100 O₂ içinde % 1,3 izofluran 6 saat süreyle uygulanmış, diğer gruba ise 75 mg/kg ketamin başlangıç doz olarak verilmiş, spontan solunum devam ederken klip tipi puls oksimetreyi tolere edecek şekilde yaklaşık her 1-3 saatte bir benzer dozlar tekrarlanmış ve mitojenik belirteç olan 5-bromo-2-deoksiuridin (BrdU) 200 mg/kg ip uygulanmış. Anesteziden 2 saat sonra ketamin 75 mg/kg ve pentobarbital 20 mg/kg ile sakrifikasyon sonrası hipokampus dentat girus bölgesinden immunoperoksidaz tekniği ile BrdU hücre sayısının, hem izofluran grubunda hem de ketamin grubunda, kontrol grubundan farklı olmadığı saptanmıştır. Aynı protokolün gece ve gündüz uygulamaları arasında fark olmaması nedeniyle, izofluranın sirkadiyen etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır (85). Bu tez çalışmasında genç erişkin sıçanlarda benzer izofluran konsantrasyonları ve daha düşük ketamin dozları kullanılmasına rağmen, bizden farklı olarak muhtemelen apoptozisi gösterme tekniğinin farklı olması nedeniyle nörodejenerasyonun saptanamadığını düşünüyoruz.

Yine 7 günlük sıçanlarda sc ketamin 5, 10, ve 20 mg/kg, tek veya birden çok (yaklaşık 2 saat ara ile) uygulamasından 6 saat sonra kaspaz 3 ELİSA ile frontal kortekste değerlendirildiğinde, ketamin 5 ve 10 mg/kg dozlarının 6 kez, 20 mg/kg'ın 1 ve 3 kez tekrarlanmasına rağmen nörotoksik etki görülmemiştir. Ancak ketamin 20 mg/kg dozunda 6 kez tekrarlandığında kaspaz 3 tutulumunun önemli derecede arttığı gözlemlenmiştir. Diğer bir ifade ile 20 mg/kg ketaminin tekrarlayan dozlarından 2 ve 4 saat sonraki apoptotik hücre değerlendirmesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. Ketamin sc

uygulanmasından 5 dk sonra beyin ve plazma en yüksek değerine ulaştığı, 2-4 saat sonra düşmeye başlayarak yaklaşık 6 saat sonra sıfır değerine yaklaştığı belirtilmiştir (86). Bu bulgulara paralel şekilde çalışmamızda genç erişkin sıçanlara ketamin sc 40 mg/kg tek doz uygulamasında bile apoptotik etkinin arttığı saptandı. Çalışmamızda tüm gruptaki sıçanlar 60 mg/kg ketamin uygulanıp intrakardiyak kan alınarak sakrifikasyon yapıldı ve hızlıca beyin dokusu çıkarıldı. Bu çalışmada da belirtildiği gibi ketamin uygulanmasından 5 dk sonra beyin ve plazma en yüksek değerine ulaşmıştır, apoptotik etkide 4 saat sonra bile anlamlı bir artış izlenmemiştir.

Benzer şekildeki başka bir çalışmada yine 7 günlük sıçanlarda ketaminin farklı dozları 5, 10, ve 20 mg/kg 6 saat süresince, 90 dk ara ile tekrarlanmış, başlangıç dozundan 6 saat sonra pentobarbital ip 100 mg/kg verilerek sakrifiye edilmiş ve korteks ile talamusta apoptozis değerlendirilmiştir. Ketaminin neden olduğu apoptoziste kaspaz 3 aktivasyonu 12 saat sonra artmış ve 24. saatte en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Hücre kültüründeki değerlendirmede ketamin 6 saat süreyle uygulandığında anlamlı değişiklik göstermezken, 48 saatlik uygulamada istatistiksel olarak anlamlı nörodejenerasyon saptanmıştır (87).

Başka bir çalışmada yine 7 günlük sıçanlarda, 20 mg/kg ketaminin 2 saat ara ile 6 kez tekrarlanmış, son ilaç dozundan 6 saat sonra frontal kortekste kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu ve in situ hibridizasyon ile değerlendirilmiştir. NMDA reseptörüne ait mRNA sinyalinin arttığı ve apoptozise neden olduğu gözlemlenmiştir (88). Yedi günlük sıçanlarda yapılan başka bir çalışmada, 20 mg/kg ketaminin 2 saat ara ile 6 kez uygulandığında sıçanlarda beyin frontal lob

incelemede ‘MicroPET’ görüntüleme (High-resolution positron emission tomography) ile apoptotik tutulum gösterilmiş ve bu tutulum ELİSA yöntemiyle doğrulanmıştır (89). Bizim çalışmamıza göre daha küçük sıçanlarda, farklı doz ve sürelerde ketamin ile nörodejenerasyon için değişik yöntemler kullanılmasına rağmen ketaminin apoptotik etkisi gösterilmesi nedeniyle bu çalışmalar bizim yaptığımız çalışmayı destekler niteliktedir.

Hücre kültüründe yapılan başka bir araştırmada ketaminin 48 saat uygulanması sonunda Bax/Bcl-2 oranı ve kaspaz 3 tutulumundaki değişme sonucu apoptozise neden olduğu gösterilmiştir (90). Çalışmamızda da olduğu gibi ketaminin apoptozis yapıcı etkisini daha çok mitokondriyal veya kaspaz 9 ve onun aktive ettiği kaspaz 3 üzerinden olduğunu desteklemiştir.

Genç erişkin farelere 1, 3 ve 6 ay süreyle 30 mg/kg/gün dozunda ketamin uygulanmıştır. Ketaminin 6 ay süreyle uygulanması sonrasında, farelerin nöromusküler fonksiyonlarında ve yer-yön bulma becerisinde önemli derecede bozulma olduğu, öğrenme ve çalışma yetisinin ise etkilenmediği görülmüş, aynı zamanda prefrontal kortekste anlamlı derecede apoptozis geliştiği saptanmıştır. Ketaminin fareler için LD₅₀ (Letal Doz) değerinin 600 mg/kg olduğu literatürde bildirildiğinden, 30 mg/kg’ı sadece sedasyon veya öfori dozu olduğu belirtilmiştir (91). Bu çalışmalarda apoptozisin saptanamamasını, bizim çalışmamıza göre düşük doz kullanmalarına ve farklı yöntemle (terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP nick-end labeling; TUNEL ve Western Blot) değerlendirmelerine bağlayabiliriz.

Dantrolenin SR'den sitozole Ca^{+2} salıverilmesini önleyerek hücre hasarlarına karşı koruyucu etkinliği son zamanlarda artan ilgiyle araştırılmaktadır (92). Ekstraselüler alandan sitozole Ca^{+2} girişi, çeşitli Ca^{+2} bağımlı enzimleri aktiveleştirerek geri dönüşümsüz hücre hasarını başlatır, mitokondri ve ER fonksiyon bozukluğu sonrası hücre ölümüne neden olur. Tavşanlarda travmatik spinal kord hasarına dantrolenin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Travmatik spinal kord hasarı oluşturulan tavşanlara 10 mg/kg dantrolen verilmiş ve apoptotik hücreler TUNEL yöntemi ile değerlendirilmiş. Spinal kord hasarından sonra apoptotik hücrelerin belirgin olarak arttığı, beraberinde dantrolen uygulanan grupta ise apoptozisin daha az olduğu saptanmıştır (93). Beyin iskemisi oluşturulmuş erişkin sıçanlarda ise sol ventrikül içine 3 gün süresince dantrolen verilerek 4 saat sonra hipokampus CA-1 bölgesi TUNEL yöntemiyle değerlendirildiğinde, dantrolenin iskemi sonrası, sinir hücresi ölümü ve beraberinde meydana gelen hücre DNA parçalanmasını önlediği bulunmuştur (94). Hipoksik beyin hasarı oluşturulan yedi günlük sıçanlarda da dantrolenin, yüksek oranda nöroprotektif etkinliği olduğu gözlemlenmiştir (95). Genç erişkin sıçanların kullanıldığı orta serebral arteri tıkanarak oluşturulan geçici iskemi modelinde, iskeminin kenar bölgelerinde, 1 ve 4. saatlerde değişiklik olmaz iken, 24. saatte anlamlı derecede artmıştır. Geçici iskemiden 90 dk sonra verilen 20 µg dantrolen ile, iskemiden 24 saat sonra iskeminin kenar bölgelerinde azalma olmasına karşın, merkezi bölgesinde 4 ve 24. saatlerde değişiklik saptanmamıştır (92). Dantrolen ile ilgili çalışmalarda dantrolenin geçici beyin iskemi modelinde, infarkt alanını küçülttüğü ve nöroprotektif etkisinin olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Hücre kültürü kullanılarak yapılan bir çalışmada; % 2,4 izofluran (yaklaşık 2

MAK) 24 saat uygulandığında serebral korteksteki nöronlarda apoptotik hücreleri kontrol grubuna göre (%2'ye karşın % 17) artırdığı saptanmıştır. İzofluran uygulamasından 30 dk önce dantrolen uygulandığında ise, izoflurana bağlı gelişen apoptotik hücre sayısını (% 17'den %7'ye) önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir (81).

Biz de % 1,4 izofluranı 2 saat uyguladığımız genç erişkin sıçanlarda, hipokampus CA-1 ve dentat girus bölgelerinde kontrol grubuna göre, kaspaz 3, 8 ve 9 immün tutulumu yaklaşık % 40-50 oranında artmıştır. Grup İzo'ya dantrolen eklendiğinde ise, grup İzo'ya bağlı gelişen apoptozis oranları kaspaz 3, 8 ve 9 için yaklaşık % 40 azalmıştır. Dantrolenin kullanıldığı çalışmalarda bu araştırmadan farklı olarak TUNEL yöntemi kullanılmış olsa da, izofluranın indüklediği kaspaz 9 tutulumunun daha baskın olduğu intrinsek veya mitokondriyal yolağı kullanarak oluşturduğu nörodejeneratif etki, ketaminin eklenmesi ile daha da arttığı ve dantrolenin eklenmesiyle ise bu etkinin azaldığı sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak sıçanlarda % 1,4 izofluranla indüklenen apoptozis modelinde 40 mg/kg ketamin eklenmesi ile nörodejeneratif etki daha da artarken, 10 mg/kg dantrolenle izofluranın bu nörodejeneratif etkisini hem intrinsek hem de ekstrinsek apoptozis yollarındaki kaspaz 3, 8 ve 9 üzerinden nöroprotektif etki gösterdiği saptanmıştır.

6. SONUÇ

Genç erişkin sıçanlarda % 1,4 izofluran uygulaması sonrası, kaspaz 3, 8 ve 9 incelendiğinde, intrinsek ve ekstrinsek yolak üzerinden apoptozisin hipokampusun hem CA-1 hem de dentat girus bölgesinde indüklenerek nörodejenerasyona neden olduğunu belirledik.

İzofluranla uygulamasına ketamin eklendiğinde ise, kaspaz 3, 8 ve 9 immün tutulumu hem CA-1 hem de dentat girus bölgesinde, kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek olmakla beraber, sadece izofluran uygulamasından da yüksek bulunmuştur.

İzofluran uygulamasına dantrolen eklendiğinde ise, kaspaz 3, 8 ve 9 immün tutulumu hem CA-1 hem de dentat girus bölgesinde, sadece izofluran uygulaması yapılan gruptan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olsa da birlikte kontrol grubuna göre anlamlı fark saptanmamıştır.

Ketamin ve izofluran uygulamasına, dantrolen eklendiğinde, kaspaz 3, 8 ve 9 immün tutulumu hem CA-1 hem de dentat girus bölgesinde, izofluran ve ketamin uygulamasına, hatta dentat girus bölgesinde kaspaz 3 ve 9'da sadece izofluran uygulamasına göre bile istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu.

Hipokampus genelinde kaspaz 9 tutulumunun tüm gruplarda daha belirgin olduğu ve anestezide kullanılan bu ilaçların apoptozisi iç yolak üzerinden uyarmış olabileceği kanısını uyandırdı.

Çalışmadaki uygulanan ilaçların doz ve süreleri göz önünde bulundurulduğunda izofluranın nörodejeneratif etkisinin olduğu, izoflurana

ketamin eklenmesinin bu nörodejeneratif etkiyi artırdığı, dantrolen eklendiğinde ise indüklenmiş nörodejenerasyonun azalarak nöroprotektif etkili olduğu sonucuna varılmıştır. İzofluran ve ketamin ile meydana gelen apoptotik nörodejenerasyonun, kısa süreli hafıza yer yön bulma yeteneği ile yakından ilgili olan hipokampus bölgelerinde gösterilmiş olması, anestezi altında bu fonksiyonların daha da bozulacağı yaşlı, Alzheimer ve demansı olan hastalar için önemli olabileceği düşünülebilir. Bu nedenle günümüzde sık olarak kullanılan bu anesteziklerle ortaya çıkabilecek nörodejeneratif etkilerin ve bunların klinik sonuçlarının önlenmesinde dantrolen gibi nöroprotektif etkinliği gösterilmiş ilaçların yararı olabilir, bu konuda daha ileri klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Yon JH, Johnson JD, Carter LB, Todorovic VJ. Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain via the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Neuroscience* 2005; 135: 815-27.
2. Xiang Q, Tan L, Zhao Y, Wang J, Luo A. Ketamine: The best partner for isoflurane in neonatal anesthesia? *Medical Hypotheses* 2008; 71: 868-71.
3. Frandsen A, Schousboe A. Dantrolene prevents glutamate cytotoxicity and Ca^{+2} release from intracellular stores in cultured cerebral cortical neurons. *J Neurochem* 1991; 56: 1075-8.
4. Muehlschlegel S, Sims JR. Dantrolene: Mechanisms of neuroprotection and possible clinical applications in the neurointensive care unit. *Neurocrit Care* 2009; 10: 103-15.
5. LeBlanc A, Liu H, Goodyer C, Bergeron C, Hammond J. Caspase-6 role in apoptosis of human neurons, amyloidogenesis and alzheimer's disease. *Biol Chem* 1999; 33: 23426-36.
6. Xie Z, Tanzi RE. Alzheimer's disease and post-operative cognitive dysfunction. *Exp Gerontol* 2006; 41: 346-59.
7. Xie Z, Dong Y, Maeda U, Moir R, Inouye SK, Culley DJ, et al. Isoflurane-induced apoptosis: A potential pathogenic link between delirium and dementia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2006; 61: 1300-6.
8. Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 1997; 53: 451-65.
9. Lossi L, Merighi A. In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. *Progress Neurobiol* 2003; 69: 287-312.

10. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Temel Patoloji 7. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. 2003; 26-8.*
11. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 249-56
12. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. *Am J Pathol* 1995; 146: 3-15.
13. Robertson JD, Orrenius S. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Crit Rev Toxicol* 2000; 30: 609–27.
14. Barisic K, Petrik J, Rumora L. Biochemistry of apoptotic cell death. *Acta Pharm* 2003; 53: 151-64
15. Brouckaert G, Kalai M, Krysko DV, Saelens X, Vercammen D, Ndlovu M, et al. Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 1089-100.
16. Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P. The apoptosis cascade- morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embryol* 1999; 200: 1-18.
17. Willingham MC. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J Hist Cytochem* 1999; 47: 1101-9.
18. Hikim APS, Wang C, Leung AR, Swerdloff S. Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology* 1995; 136: 2770-5.

19. Tomatır AG. Apoptoz: programlı hücre ölümü. *T Klin J Med Sci* 2003; 23: 499-508.
20. Wright SC, Wei QS, Kinder DH, Larrick JW. Biochemical pathways of apoptosis; nicotinamide adenine dinucleotide-deficient cells are resistant to tumor necrosis factor or ultraviolet light activation of the 24-kd apoptotic protease and DNA fragmentation. *J Exp Med* 1996; 183: 463-71.
21. Pratt RM, Martin GR. Epithelial cell death and cyclic AMP increase during palatal development. *Pro Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 874-7.
22. Mcphie DL, Coopersmith R, Peralta AH, Chen Y, Ivins KJ, Manly SP, et al. DNA synthesis and neuronal apoptosis caused by familial alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3. *J Neurosci* 2003; 23: 6914-27.
23. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis; its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73: 2013-26.
24. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-62.
25. Carson A, Rýbéýro JM. Apoptosis and disease. *Lancet* 1993; 341: 1251-5.
26. Fanning NF, Porter J, Shorten GD, Kirwan WO, Hayes DB, Cotter TG, et al. Inhibition of neutrophil apoptosis after elective surgery. *Surgery* 1999; 126: 527-34.
27. Guirguis SS, Pelmeear PL, Roy ML, Wong L. Health effects associated with exposure to anaesthetic gases in Ontario Hospital personnel. *Br J Ind Med* 1990; 47: 490-7.

28. Goto Y, Gallagher J, Fanning N, Wang J, McKusker S, Redmond P, et al. *Does chronic occupational exposure to volatile anesthetic agents influence the rate of neutrophil apoptosis? Can J Anaesth* 2000; 47: 350-3.
29. Tyther R, Halligan M, Wang J, Redmond HP, Shorten G. *Effects of chronic occupational exposure to anaesthetic gases on the rate of neutrophil apoptosis among anaesthetists. Eur J Anaesthesiol* 2002; 19: 604-8.
30. Tyther R, O'Brien J, Wang J, Redmond HP, Shorten G. *Effect of sevoflurane on human neutrophil apoptosis. Eur J Anaesthesiol* 2003; 20: 111-5.
31. Galle PR. *Apoptosis in liver disease. J Hepatol* 1997; 27: 405-12.
32. Roshal M, Zhu Y, Planelles V. *Apoptosis in AIDS. Apoptosis* 2001; 6: 103–16.
33. Saraste A, Pulkki K. *Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. Cardiovasc Res* 2000; 45: 528-37.
34. Staley K, Blaschke AJ, Chun J. *Apoptotic DNA fragmentation is detected by a semiquantitative ligation-mediated PCR of blunt DNA ends. Cell Death Differentiation* 1997; 4: 66 -75.
35. Bender LM, Morgan MJ, Thomas LR, Liu ZG, Thorburn A. *The adaptor protein TRADD activates distinct mechanisms of apoptosis from the nucleus and the cytoplasm. Cell Death Differentiation* 2005; 12: 473–81.
36. Öktem S, Özhan MH, Özol D. *Apoptozisin önemi. Toraks Dergisi* 2001; 2: 91-5.

37. Trapani JA, Smyth MJ. Killing by cytotoxic T cells and natural killer cells: multiple granule serine proteases as initiators of DNA fragmentation. *J Exp Med* 1993; 71: 201-8.
38. Squier MK, Miller AC, Malkinson AM, Coker JJ. Calpain activation in apoptosis. *J Cell Physiol* 1994; 159: 229-37.
39. Hengartner MO. Programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Recent Prog Horm Res* 1999; 54: 213-22.
40. Soini Y, Paakkö P, Lehto VP. Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. *Am J Pathology* 1998; 153: 1043-9.
41. Jiang X, Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* 2004; 73: 87-106.
42. Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 821-46.
43. Cryns V, Yuan J. Proteases to die for. *Genes Dev* 1998; 12: 1551-70.
44. Donepudi M, Grütter MG. Structure and zymogen activation of caspases. *Biophys Chem* 2002; 101: 145-53.
45. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 647-56.
46. Mund T, Gewies A, Schoenfeld N, Bauer MKA, Grimm S. Spike, a novel BH3-only protein, regulates apoptosis at the endoplasmic reticulum. *Faseb J* 2003; 17: 696-8.
47. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000; 157: 1415-30.
48. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355-65.

49. Grütter MG. *Caspases: key players in programmed cell death. Current Opin Struct Biol* 2000; 10: 649–55.
50. Essmann F. *Mechanisms of apoptosis in cancer; regulatory role of caspases. Doctoral Thesis. Berlin: Technic University of Berlin, 2000.*
51. Ashkenazi A. *Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. Nat Rev Cancer* 2002; 2: 420-30.
52. Chen M, Wang J. *Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. Apoptosis* 2002; 7: 313–9.
53. Shikama Y, Shen L, Yonetani M, Miyauchi J, Miyashita T, Yamada M. *Death effector domain-only polypeptides of caspase-8 and -10 specifically inhibit death receptor-induced cell death. Elsevier Science (USA)* 2002; 29: 484–93.
54. Thorburn J, Bender LM, Morgan MJ, Thorburn A. *Caspase- and serine protease-dependent apoptosis by the death domain of FADD in normal epithelial cells. Mol Biol Cell* 2003; 14: 67–77.
55. Kaufmann SH, Earnshaw WC. *Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. Exp Cell Res* 2000; 256: 42-9.
56. Wang X. *The expanding role of mitochondria in apoptosis. Genes Dev* 2001; 15: 2922-33.
57. Cooper GM, *The cell: a molecular approach. 3rd. ASM pres Sunderland, Massachusetts, 2004*
58. Kaneda K, Kashii S, Kurosawa T, Kaneko S, Akaike A, Honda Y, et al. *Apoptotic DNA fragmentation and upregulation of bax induced by transient ischemia of the rat retina. Brain Res* 1999; 815: 11-20.

59. Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, Benshoff ND, Dikranian K, Zorumski CF, et al. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci* 2003; 23: 876–82.
60. Ikonomidou C, Bittgau P, Koch C. Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochem Pharmacol* 2001;62:401–5.
61. Wakasugi M, Hirota K, Roth SH, Ito Y. The effect of general anesthetics on excitatory and inhibitory synaptic transmission in area CA1 of the rat hippocampus in vitro. *Anesth Analg* 1999; 88: 676-80.
62. Nishikawa K, MacIver M. Agent-selective effects of volatile anesthetics on GABAA receptor-mediated synaptic inhibition in hippocampal interneurons. *Anesthesiology* 2001; 94: 340-7.
63. Songur A, Özen OA, Sarsılmaz M. Hipokampus. *Türkiye Klinikleri Dergisi* 2001; 21: 427-31
64. Nishikawa K, MacIver M. Agent-selective effects of volatile anesthetics on GABAA receptor-mediated synaptic inhibition in hippocampal interneurons. *Anesthesiology* 2001; 94: 340-7.
65. Miller RD. *Miller Anestezi*, 6. Baskı, İzmir, Güven Kitabevi 2010; 345–350
66. Longnecker DE. *Anesthesiology*. New York, The McGraw-Hill Companies Inc. 2008: 741.
67. Pal SK, Lockwood GG, White DC. Uptake of isoflurane during prolonged clinical anaesthesia. *Br J Anaesth* 2001; 86: 645-9

68. Zhang G, Dong Y, Zhang B, Ichinose F, Wu X, Culley DJ, et al. Isoflurane induced caspase-3 activation is dependent on cytosolic calcium and can be attenuated by memantine. *J Neurosci* 2008; 28: 4551– 60.
69. Hanson CJ, Bootman MD, Roderick HL. Cell signaling: IP3 receptors channel calcium into cell death. *Cur Biol* 2004; 14: 933-5.
70. Sinner B, Graf BM. Ketamine. *Handbook of Exp Pharmacol* 2008; 182: 313-33.
71. Morgan GE, Mikhail MS, Murray MJ. *Klinik Anesteziyoloji*. 4. Baskı, Ankara, Öncü Basımevi 2008: 197.
72. Wang C, Slikker JW. Strategies and experimental models for evaluating anesthetics: Effects on the developing nervous system. *Anesth Analg* 2008; 106: 1643-58.
73. Giannini G, Conti A, Mammarella S, Scrobogna M, Sorrentino V. The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. *J Cell Biol* 1995; 128: 893–904.
74. Zhao F, Li P, Chen SR, Louis CF, Fruen BR. Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca^{2+} release channels. Molecular mechanism and isoform selectivity. *J Biol Chem* 2001; 276: 13810–6.
75. Thorell WE, Leibrock LG, Agrawal SK. Role of RyRs and IP3 receptors after traumatic injury to spinal cord white matter. *J Neurotrauma* 2002; 19: 335–42.

76. Pelletier MR, Wadia JS, Mills LR, Carlen PL. Seizure-induced cell death produced by repeated tetanic stimulation in vitro: possible role of endoplasmic reticulum calcium stores. *J Neurophysiol* 1999; 81: 3054–64.
77. Rutecki PA, Sayin U, Yang Y, Hadar E. Determinants of ictal epileptiform patterns in the hippocampal slice. *Epilepsia* 2002; 43: 179–83.
78. Mody I, MacDonald JF. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca^{2+} release. *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16: 356–9.
79. Wei H, Perry DC. Dantrolene is cytoprotective in two models of neuronal cell death. *J Neurochem* 1996; 67: 2390–8.
80. Wei H, Liang G, Yang H, Wang Q, Hawkins B, Madesh M, et al. The common inhalational anesthetic isoflurane induces apoptosis via activation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Anesthesiology* 2008; 108: 251–60.
81. Wei H, Kang B, Wei W, Liang G, Meng QC, Li Y, et al. Isoflurane and sevoflurane affect cell survival and BCL-2/BAX ratio differently. *Brain Res* 2005; 1037: 139–47.
82. Valentim AM, Giminiani PD, Ribeiro PO, Rodrigues P, Olsson AS, Antunes LM. Lower isoflurane concentration affects spatial learning and neurodegeneration in adult mice compared with higher concentrations. *Anesthesiology* 2010; 113: 1099–1108.
83. Xie Z, Culley DJ, Dong Y, Zhang G, Zhang B, Moir RD, et al. The common inhalation anesthetic isoflurane induces caspase activation and increases amyloid β -protein level in vivo. *Ann Neurol* 2008; 64: 618–27.

84. Cattano D, Williamson P, Fukui K, Avindan M, Evers AS, Olney JW, et al. *Potential of xenon to induce or to protect against neuroapoptosis in the developing mouse brain. Can J Anesth* 2008; 55: 429-36.
85. Tung A, Herrera S, Fornal CA, Jacobs BL. *The effect of prolonged anesthesia with isoflurane, propofol, dexmedetomidine, or ketamine on neural cell proliferation in the adult rat. International Anesthesia Res Soc* 2008; 106: 1772-7.
86. Zou X, Patterson TA, Sadovova N, Twaddle NC, Doerge DR, Zhang X, et al. *Potential neurotoxicity of ketamine in the developing rat brain. Toxicol Sci* 2009; 108: 149-58.
87. Soriano SG, Liu Q, Li J, Liu JR, Han XH, Kanter JL, et al. *Ketamine activates cell cycle signaling and apoptosis in the neonatal rat brain. Anesthesiology* 2010; 112: 1155-63.
88. Shi Q, Guo L, Patterson TA, Dial S, Li Q, Sadovova N, et al. *Gene expression profiling in the developing rat brain exposed to ketamine. Neuroscience* 2010; 166: 852-63.
89. Zhang X, Paule MG, Newport GD, Sadonova N, Berridge MS, Apana SM, et al. *MicroPET imaging of ketamine-induced neuronal apoptosis with radiolabeled DFNSH. J Neural Transm* 2011; 118: 203-11.
90. Mak YT, Lam WP, Lü L, Wong YW, Yew DT. *The Toxic Effect of ketamine on SH-SY5Y neuroblastoma cell line and human neuron. Mic Res Tech* 2010; 73: 195-201.

91. Sun L, Lam WP, Wong YW, Lam LH, Tang HC, Wai MS, et al. *Permanent deficits in brain functions caused by long-term ketamine treatment in mice. Human Exp Toxicol* 2010; 5: 1-10.
92. Li F, Hayashi T, Jin G, Deguchi K, Nagotani S, Nagano I, et al. *The protective effect of dantrolene on ischemic neuronal cell death is associated with reduced expression of endoplasmic reticulum stress markers. Brain Res* 2005; 1048: 58-65.
93. Aslan A, Cemek M, Buyukokuroglu ME, Altunbas K, Bas O, et al. *Dantrolene can reduce secondary damage after spinal cord injury. Eur Spine J* 2009; 18: 1442-51.
94. Yano T, Nakayama R, Imaizumi T, Terasaki H, Ushijima K. *Dantrolene ameliorates delayed cell death and concomitant DNA fragmentation in the rat hippocampal CA1 neurons subjected to mild ischemia. Resuscitation* 2010; 50: 117-25.
95. Gwak M, Park P, Kim K, Lim K, Jeong S, Baek C, et al. *The effects of dantrolene on hypoxic-ischemic injury in the neonatal rat brain. Neurosurg Anesthesiol* 2008; 106: 227-33.

8. ÖZET

Sıçanlarda izofluranla indüklenen apoptozis üzerine ketamin ve/veya dantrolenin etkilerinin araştırılması amacıyla 30 adet Wistar tipi erkek sıçan n=6 olacak şekilde rastgele 5 gruba ayrıldı. Kontrol grubunda kapalı kafeste 2 saat sadece % 100 O₂, diğer dört grupta ise 2 saat % 100 O₂ içinde % 1,4 izofluran uygulandı. Grup İzo+Dant'ta dantrolen ip 10 mg/kg, grup İzo+Ket ketamin sc 40 mg/kg, grup İzo+Ket+Dant dantrolen 10 mg/kg ve ketamin 40 mg/kg verildikten 6 saat sonra sakrifiye edildi. Hipokampus CA-1'de kaspaz 3 grup İzo ve İzo+Ket'te, kaspaz 8 ve 9 içinse grup İzo, İzo+Ket ve İzo+Ket+Dant'ta immün tutulum gösteren hücreler kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksekken, grup İzo+Dant'ta kaspaz 3, 8 ve 9 için kontrole göre anlamlı farka rastlanmadı. Hipokampus CA-1'de kaspaz 3, 8 ve 9 grup İzo+Ket'te immün tutulum gösteren hücreler tüm gruplardan daha fazlayken, grup İzo'da sadece İzo+Dant'tan daha yüksekti. Grup İzo+Ket+Dant'ta ise sadece İzo+Dant'tan fazlaydı. Dentat girusta kaspaz 3 ve 8 için grup İzo ve İzo+Ket'te; kaspaz 9 içinse grup İzo, İzo+Ket ve İzo+Ket+Dant'ta kontrole göre yüksekti ancak grup İzo+Dant'ta kaspaz 3,8 ve 9 sonuçlarında fark bulunmadı. Ayrıca kaspaz 3 ve 8 grup İzo+Ket'te tüm diğer gruplardan daha fazlaydı. Oysa grup İzo+Ket'te kaspaz 9 sonuçları grup İzo'ya benzer fakat grup İzo+Dant ve grup İzo+Ket+Dant'ta daha çoktu. Grup İzo+Ket+Dant'ta kaspaz 3 ve 9 sadece grup İzo'dan düşüktü. Ancak grup İzo+Ket+Dant ile grup İzo+Dant benzerdi. Sonuç olarak izofluranla indüklenen apoptozisin ketaminle arttığı, dantrolenle azaldığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: İzofluran, ketamin, dantrolen, apoptozis

9. SUMMARY

Role of ketamine and dantrolen on the apoptotic effect of isoflurane in rats

Thirty Wistar male rats were randomly assigned to five groups, each containing n=6, in order to investigate the effects of ketamine and/or dantrolen on the isoflurane induced apoptosis. Oxygen 100% was administered into the closed cage for 2 hours in the control group, whereas 1.4% isoflurane in 100% oxygen was administered in the other 4 groups. Six hours after intraperitoneal injection of dantrolen 10 mg/kg (Group Iso+Dant), ketamine 40 mg/kg (Group Iso+Ket) and dantrolen + ketamine (Group Iso+Dant+Ket), rats were sacrificed. Immunoreactive cells in the hippocampus CA-1 region for caspase 3 in group Iso+Ket and for caspase 8 and 9 in group Iso, group Iso+Ket, and group Iso+Ket+Dant were significantly higher than the control group. However, no significant differences were observed for caspase 3, 8 and 9 in the group Iso+Dant. Immunoreactive cells in the hippocampus CA-1 region for caspase 3, 8 and 9 in group Iso+Ket were significantly higher than all groups, whereas it was higher in group Iso with respect to only group Iso+Dant and it was higher for group Iso+Ket+Dant than group Iso+Dant. Significantly more immunoreactive cells in the dentat gyrus region for caspase 3 and 8 in groups Iso and Iso+Ket and for caspase 9 in groups Iso, Iso+Ket, and Iso+Ket+Dant versus control were observed. However, no significant differences were found for caspase 3, 8 and 9 in group Iso+Dant. Caspase 3 and 8 in group Iso+Ket was significantly more than the other groups. Whereas caspase 9 results in group Iso+Ket was similar to group Iso but higher than that of groups Iso+Dant and Iso+Ket+Dant. Caspase 3 and 9 results in group Iso+Ket+Dant was significantly lower than only group Iso. Caspase 3, 8 and 9 results were similar between groups Iso+Ket+Dant and Iso+Dant. As a result, isoflurane induced apoptosis increased by ketamine and decreased by dantrolen.

Key words: Isoflurane, ketamine, dantrolen, apoptosis

9. EK: Etik Kurul Onay



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

02./08./2010

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/156-12898
KONU:

Sayın

Prof.Dr.D.Berrin GÜNAYDIN
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Prof.Dr.D.Berrin GÜNAYDIN, Arş.Gör.Dr.Seyfi KARTAL, Doç.Dr.Süreyya BARUN ve Doç.Dr.Çiğdem ELMAS' dan oluşan, G.Ü.ET-10.088 kod numaralı ve "Sıçanlarda İzofluranın Apoptotik Etkisinde Dantrolen ve Ketamininin Rolü" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-10.088 and entitled "Role of Dantrolene and Ketamine in the Apoptotic Effect of Isoflurane in Rats" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

EK : 1 Liste


Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı : Seyfi

Soyadı : KARTAL

Doğum Yeri ve Tarihi : Mecitözü & 05.05.1976

Eğitimi :

2007- Halen: Gazi Üniversitesi Anestezi ve Reanimasyon AD.

1994-2000: Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi

1987-1994: Ortaokul ve Lise, AMASYA

1982-1987: İlkokul, Mecitözü

Yabancı Dili :İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluslar : Yok

Bilimsel Etkinlikleri :

- Sıçanlarda izofluranın apoptotik etkisinde dantrolen ve ketaminin rolü. Tez çalışması
- Yoğun Bakım Ünitesinde Tedavi edilen Zehirlenme Olgularının Analizi. TARD Dergisi 2009; 37: 227

Katıldığı Kongre ve Sempozyumlar:

- Klinik Toksikoloji Derneği 13. Bilimsel Toplantısı, 2008, Trabzon
- TARD 43. Ulusal Kongresi, 2009, Antalya.
- II. GÜTF ‘Periferik Sinir Blokları Kursu’, 2009, Ankara.
- Laboratuar Hayvanları Bilimi ve Deneysel Araştırmalar Sempozyumu 2009; Kırıkkale-Ankara

- TARD 44. Ulusal Kongresi, 2010, Antalya
- Yeşim Ateş Anestezi ve Ağrı Günleri-1, 2011, ANKARA