

Tekrarlanan Desfluran Anestezi Uygulamalarının Yaşlı Sıçanların Karaciğer Histopatolojisi Üzerindeki Etkisinin Paraoksonaz Düzeyi ile İlişkisinin Belirlenmesi

The Relation of Paraoxonase Levels with the Histopathology of the Old Rat Liver Tissue After Repeated Desflurane Anesthesia

Neslihan CÜCE,^a
Alper YOSUNKAYA,^b
Hale BORAZAN,^b
Hasan ESEN,^c
Said BODUR^d

^aAnesteziyoloji ve Reanimasyon AD,
Dr. Halil İbrahim Özsoy Bolvadin
Devlet Hastanesi, Afyonkarahisar
^bAnesteziyoloji ve Reanimasyon AD,
^cPatoloji AD,
^dHalk Sağlığı AD,
Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi
Meram Tıp Fakültesi, Konya

Geliş Tarihi/Received: 28.05.2012
Kabul Tarihi/Accepted: 13.12.2012

Bu çalışma, Türk Anesteziyoloji ve
Reanimasyon Derneği 46. Ulusal Kongresi
(07-11 Kasım 2012, Gırm, KKTC)nde
sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Yazışma Adresi/Correspondence:
Hale BORAZAN
Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi
Meram Tıp Fakültesi,
Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD,
Konya,
TÜRKİYE/TURKEY
borazan@hotmil.com

ÖZET Amaç: Bu çalışmada, yaşlı sıçanlarda tekrarlanan desfluran anestezi uygulamalarının karaciğer üzerinde etkisinin, plazma ve doku paraoksonaz (PON1) düzeyi ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. **Gereç ve Yöntemler:** Wistar tipi, 250-300 gr ağırlığında 28 adet 12 aylık erkek sıçan rastgele olarak, her grupta 7 sıçan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. I. grup kontrol grubunu oluşturdu ve bu gruba herhangi bir işlem uygulanmazken, II. gruba 1 kez, III. gruba 2 kez ve IV. gruba 3 kez 72 saat ara ile 6 lt/dk hacimde, %6 inspiratuar konsantrasyonda desfluran 2 saat süre ile uygulandı. Anesteziden hemen sonra öldürülen sıçanlardan karaciğer dokusu ve kan örnekleri alındı. Plazma PON1, aspartam aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri, doku örneklerinde ise doku PON 1 ve malonaldehid (MDA) düzeyleri ölçüldü. Karaciğer doku örneklerinden bir kısmı ise ışık mikroskopisi ile histopatolojik olarak incelendi. **Bulgular:** Plazma PON1, AST ve ALT değerleri açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). Doku PON1 seviyesi tüm gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma gösterdi ($p>0,05$). Doku MDA düzeyi ise kontrol grubuna göre III ve IV. grupta daha yüksek bulundu ($p<0,05$). Anestezi alan gruplar arasında doku MDA düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). Histopatolojik değerlendirmede, hidropik dejenerasyon (HD), nükleer polimorfizm (NP), portal nötrofil infiltrasyonu (PNI), portal lenfosit infiltrasyonu (PLI), fokal nekroz (FN), santral ven etrafında nötrofil (SVN) ve santral ven etrafında lenfosit (SVL) birikmesi açısından yapılan değerlendirmede, desfluran uygulanan gruplarda puanlar daha yüksek bulundu ($p<0,05$). HD, PLI, FN ve SVL puanları IV. grupta II ve III. gruplara göre daha yüksek bulundu ($p<0,05$). **Sonuç:** Bu çalışmada, yaşlı sıçanlarda tekrarlanan desfluran anestesizinin, hücresel düzeyde oksidan/antioksidan dengesini bozarak lipid peroksidasyonu yoluyla histopatolojik olarak tespit edilen karaciğer hasarına neden olabileceği, ancak hasarın PON düzeyi ile korelasyon göstermediği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Anestezikler, inhalasyon; arildialkilfosfataz; dezfloran

ABSTRACT Objective: This study aimed to investigate the effect of repeated desflurane anesthesia on old rat liver and to determine whether this effect is correlated with plasma and tissue paraoxonase (PON1) levels. **Material and Methods:** Twenty-eight 12-month old Wistar male rats ranging between 250-300 gr were randomly allocated into 4 groups (n=7 in each group). While Group I (control group) had no intervention, Group II received 6% desflurane for 2 hours once, Group III twice and Group IV three times at an interval of 72 hrs. The rats were sacrificed and blood and liver tissue sampling was performed. PON1, aspartam aminotransferase (AST), alanine transferase (ALT) levels were measured in blood samples and PON1 and MDA levels were measured in tissue samples, which also underwent histopathologic examination. **Results:** There was no difference between groups in terms of PON 1, AST, and ALT levels in plasma ($p>0,05$). The tissue levels of PON1 was higher in the control group compared to the intervention groups, but it was not statistically significant ($p>0,05$). The tissue MDA level was higher in Group I and II than in the Control group ($p<0,05$). The difference in levels of MDA between the anesthesia groups was not significant ($p>0,05$). Histopathological examination revealed that hydropic degeneration (HD), nuclear polymorphism (NP), portal neutrophil infiltration (PNI), portal lymphocyte infiltration (PLI), focal necrosis (FN), central venous neutrophile (SVN) and central venous lymphocyte (SVL) scores of the intervention groups were higher compared to the Control group ($p<0,05$). HD, PLI, FN and SVL scores of Group IV was higher than in Group II and III ($p<0,05$). **Conclusion:** The present study suggested that repeated desflurane anesthesia on old rats damaged oxidant/anti-oxidant balance at the cellular level and caused liver injury due to lipid peroxidation; however, the PON levels were not correlated with the histopathological injury.

Key Words: Anesthetics, inhalation; arylalkylphosphatase; desflurane

doi: 10.5336/medsci.2012-30654

Copyright © 2013 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2013;33(3):716-25

Inhalasyon anestezikleri, anestezi uygulamalarının en önemli yapı taşlarından birini oluşturmaktadır.¹ Volatil anesteziklerden halotanın postoperatif karaciğer fonksiyonlarını bozduğu bilinmesine rağmen, izofluran, sevofluran ve desfluran gibi diğer volatil ajanların da hepatite sebep olabileceği, ancak bu oranın çok daha düşük olduğu bildirilmiştir.^{1,2}

Desfluran (I-653), alifatik yapıda, birden fazla flor içeren bir metilli eter türevi olup, molekülünün *in vivo* ortamda yüksek oranda stabil ve biyotransformasyona dayanıklı olduğu gösterilmiştir.³⁻⁵ Desfluran, yapısında florin olması nedeniyle ideal inhalasyon anestezisi modeli için istenen kinetik özellikleri taşıyan, vücuttan çabuk eliminasyonu nedeniyle koordinasyon ve muhakkemenin daha çabuk geri kazanılmasına olanak sağlayan ve bu nedenle özellikle yaşlılarda ve iki saatten uzun sürecek cerrahilerde tercih edilen bir maddedir.⁶ Ancak son yıllarda hem diğer 3. jenerasyon inhalasyon anestezisi sevoflurana hem de desflurana bağlı hepatit vakalarının sayılarında artış görülmektedir.^{3,7} Bu maddelere bağlı hepatotoksistede artış yaşa, cinsiyete veya farklı fizyolojik durumlara bağlı olabilir.⁸

Inhalasyon anesteziklerinin karaciğere etkisinin mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte, genellikle karaciğer kan akımını değiştirerek, karaciğerdeki ilaç metabolizmasından sorumlu enzimleri etkileyerek veya doğrudan hepatotoksisteye ya da immün sistemin aktivasyonu yoluyla olabileceği düşünülmektedir.^{9,10} Özellikle tekrarlanan anestezi uygulamalarının bu immüno-lojik yanıtın ortaya çıkmasında epeyce önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir.^{3,11}

Oksidatif stres, organizmadaki birçok patolojik süreçte rol almaktadır. Organizmada serbest oksijen radikalleri, antioksidan sistem tarafından etkisizleştirilerek bir denge oluşturulmaktadır. Bu denge bozulduğunda doku hasarı oluşabilmektedir. Inhalasyon anesteziklerinin karaciğer üzerindeki etkisinde oksidatif stresin önemli bir faktör olduğu belirtilmektedir.¹¹ Yapılan çalışmaların bir kısmı, halotan ve desfluranın değişik dokuların oksidatif sistemi üzerinde negatif bir etkiye sahip olduğunu

gösterirken, herhangi bir değişikliğe yol açmadığını veya pozitif bir etkiye sahip olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur.¹¹⁻¹⁴

Literatürde desfluranın hepatik ve antioksidan sisteme etkisi incelenmiş olmasına rağmen, tekrarlayan desfluran uygulamalarının özellikle yaşlılarda karaciğer üzerindeki etkisinin doku ve plazma paraoksonaz (PON1) enzim düzeyleri ile ilişkisi araştırılmamıştır.^{11,14-16} Bu nedenle, bu çalışmada, yaşlı sıçanlarda tekrarlanan desfluran anestezisi uygulamaları sonucunda karaciğerde ortaya çıkan histopatolojik değişimlerin plazma PON1, aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) enzim aktivitelerinin, karaciğer dokusu PON1 aktivitesi ve malondialdehit (MDA) düzeyi ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun izni alındıktan sonra, Selçuk Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde ve Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi'nin (15 Ekim 1978) 1, 8 ve 11. maddelerine uyularak gerçekleştirildi.

Çalışmada, ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen 28 adet Wistar albino türü 12 aylık erkek sıçan kullanıldı. Seçilen sıçanların daha önce herhangi bir çalışmada kullanılmamış ve herhangi bir ilaca maruz kalmamış, tamamen sağlıklı olmalarına dikkat edildi. On iki saat gece, 12 saat gündüz ritmine sahip ve ısı 20-24°C olan bir odada tutulan sıçanların, standart sıçan yemi ile ağızdan beslenmesine ve serbest suya erişimine anestezi verilmeden 2 saat öncesine kadar izin verildi.

Çalışmaya başlamadan önce anestezik gaz vaporezörleri kalibre edildi. Anestezik gaz olarak Desfluran (Suprane®, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye), literatürde belirtilen doz ve hacme göre Minimum Alveoler Konsantrasyonda (1 MAK) %6 hacimde ayarlanarak uygulandı.^{17,18} Anestezi uygulanması için, her sıçan grubunun girebileceği ve rahatça gözlemlenebileceği 40x40x70 cm boyutlarında şeffaf plastik bir konteyner hazırlandı. Konteyner yarı açık solutma sistemli anestezi makinesine (AMS,425, Senior) statik hortumlarla bağlandı.

Randomize olarak yapılan çalışmada sıçanlar, her grupta 7 adet olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Grup I kontrol grubu olarak belirlendi ve bu sıçanlar, çalışmanın ilk gününde herhangi bir işleme tabi tutulmadan servikal dislokasyonla öldürüldü; laparotomi ile sıçanların abdominal aortlarından kan ve karaciğerlerinden doku örnekleri alındı.

Geriye kalan 21 sıçana, konteyner içinde 2 saat süre ile 6 L/dk hacimde %100 oksijen içinde %6 inspiratuar konsantrasyonda Desfluran uygulandı. Anestezi işleminden sonra 7 sıçan rastgele seçilerek Grup II (Tek Anestezi Grubu) oluşturuldu. Geriye kalan 14 sıçana, 3. gün yine 2 saat süre ile 6 L/dk hacimde %100 oksijen içinde %6 inspiratuar konsantrasyonda Desfluran uygulandı ve 7 sıçan rastgele seçilerek Grup III (İki Anestezi Grubu) oluşturuldu. Son olarak, kalan 7 sıçana, 5. gün aynı şekilde ve sürede anestezi işlemi uygulanarak Grup IV (Üç Anestezi Grubu) oluşturuldu. Böylece hiç anestezi uygulanmayan kontrol grubu, bir kez desfluran anestezisi alan II. Grup, iki gün ara ile iki kez desfluran anestezisi alan III. Grup ve yine 2 gün ara ile 3 kez desfluran anestezisi alan IV. Grup oluşturulmuş oldu.

Desfluran anestezisinden hemen sonra II, III ve IV. gruptaki sıçanlar da servikal dislokasyonla öldürüldü; laparotomi ile sıçanların abdominal aortlarından kan ve karaciğerlerinden doku örnekleri alındı. Karaciğer biyopsisi örnekleri, doku bütünlüğü korunarak ve travmatize etmemeye özen gösterilerek alınıp, kan kontaminasyonuna engel olmak amacıyla soğuk deiyonize su ile yıkandı. Daha sonra bu örneklerin bir kısmı dokuda PON 1 ve MDA düzeylerinin ölçümü için -20°C'de saklanırken, diğer kısmı rutin takibi yapmak ve ışık mikroskopunda histopatolojik değişiklikleri araştırmak üzere karaciğerin kapsülü çıkarılarak nötral formalin içinde tespit edildi. Biyokimya tüpüne alınan kan örneklerinin 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmesi ile plazma elde edildi ve -20°C'de saklandı. Plazmada PON1 düzeyi, AST ile ALT enzim aktivitelerine, karaciğer dokusunun bir kısmında da PON1 aktivitesine ve MDA düzeylerine bakıldı.

PLAZMA AST-ALT ÖLÇÜMÜ

AST ve ALT aktiviteleri Olympus AU 600 (Olympus Optical Co Ltd, Japan) marka klinik kimya otoanalizöründe Olympus firmasının ticari kitleri kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar mg/dL olarak ifade edildi.

PLAZMA PON 1 ÖLÇÜMÜ

PON1 aktivitesi ticari kitler (Relassay, Türkiye) kullanılarak Jerry Beltwoski yöntemine göre ölçüldü. 2 mmol/l CaCl₂, 1 mol/l NaCl ve 2 mmol/l paraokson (O,Odietyl-O-p-nitrofenilfosfat) içeren 0,1 mol/l pH: 8 Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak hazırlanan bu reaktif karışımdan 3,5 ml alındı ve üzerine 100 µl plazma örneği ilave edildi. Sonuçta oluşan 4-nitrofenolün artış düzeyi, 37°C'de 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek belirlendi.¹⁹

PON1 aktivitesi için 1 Ünite, 1 nmol 4 nitrofenol/ml serum, plazma/dk. olarak tanımlanmıştır.

KARACİĞER PON 1 VE MDA ÖLÇÜMÜ

Çalışma anına dek -20°C'de bekletilen dokular oda sıcaklığına getirildi. Yumuşak doku örneği 0,001 hassasiyetindeki terazi ile tartıldı. Örnek miktarının 9 katı kadar çalışma solüsyonu eklenip mekanik homojenizatör ile homojenize edilerek 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.

Karaciğer PON1 aktivitesi için üst sıvı alınıp "Rel Assay E" otoanalizöründe kolorimetrik olarak çalışıldı. Çalışmalarda "Rel Assay" markalı kitler kullanıldı.

Karaciğer MDA düzeyi 90-100°C'de tiyobarbütirik asit (TBA) ile reaksiyonuna dayanan Esterbauer metodu ile ölçüldü.²⁰ TBA reaksiyon testinde, MDA ve MDA benzeri maddeler TBA ile reaksiyona girdi ve maksimum 532 nm'de absorbe olabilen pembe pigmentli ürün oluştu. Bu reaksiyon pH = 2-3 iken 90°C'de 15 dakika sürdürüldü. Örnek, proteinlerin çökmesi için 2 kat yoğun soğuk %10 (w/v)'luk TBA ile karıştırıldı. Çökelti santrifüj edilerek topaklandı ve kalansız ayrışan üst sıvı kısmı eşit hacimdeki %0,67(w/v)'luk TBA ile kaynar su banyosunda 10 dakika reaksiyona sokuldu. Soğuduktan sonra, 532 nm'de absorbansı okundu.

Sonuçlar nmol/g yaş doku olarak ifade edildi.

HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Karaciğer dokuları sıçanların öldürülmesinden hemen sonra %10'luk nötral formaldehit içinde tespit edildi. İki günlük tespit işleminden sonra dokular sırasıyla 30'ar dakika olmak üzere %50-60-70-80-90-96 ve absölu alkol içinde tespit edildi. Tespit işleminden sonra dokular kurutma kâğıdında bekletilerek alkol solüsyonunun uçması sağlandı. Daha sonra dokular, şeffaflaşması için ksilenle 3 saate yakın bekletildi. Ksilen işlemini bittikten sonra dokular 3 ayrı sıcak parafinde toplam 6 saat bekletildi. Bu işlemten sonra parafin blok makinesinde dokular bloklandı ve parafin bloklarından 4'er mikron (μ) kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilin-Eozin boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirildi.

Karaciğerin histopatolojik değişikliklerinin değerlendirilmesinde hidropik dejenerasyon (HD), nükleer polimorfizm (NP), portal nötrofil infiltrasyonu (PNI), portal lenfosit infiltrasyonu (PLİ), fokal nekroz (FN), santral ven etrafında nötrofil (SVN) ve santral ven etrafında lenfosit (SVL) birikmesi değerlendirildi (Tablo 1).^{15,16,21}

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

İstatistiksel değerlendirmede SPSS 20.0 bilgisayar programı kullanıldı. Veriler ortanca (min-maks) değer olarak gösterildi. Gruplar arasında doku MDA, doku PON1, plazma PON1, AST ve ALT değerleri Kruskal-Wallis Testi ile karşılaştırıldı. Sonucun istatistiksel anlamlı bulunması halinde gruplar arasındaki anlamlılığın belirlenmesi için Bonferonni düzeltmeli ($\alpha/6$) Mann-Whitney U Testi uygulandı. Karaciğer histopatoloji değerleri

için aynı testler uygulandı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İki aşamalı test yapıldığından anlamlılık için 0,05 ile yetinildi ve aşırı p değeri kullanılmadı.

BULGULAR

Plazma AST ve ALT değerleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$). Plazma PON1 düzeyleri karşılaştırıldığında, kontrol grubu ile anestezi alan diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p > 0,05$) (Tablo 2).

Karaciğer dokusundan çalışılan MDA değerleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Grup III ($p = 0,043$) ve Grup IV'te ($p = 0,008$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunurken, Grup II ile karşılaştırıldığında anlamlı fark görülmedi ($p > 0,05$). Karaciğer dokusunda çalışılan doku PON1 değeri de kontrol grubunda, desfluran anestezisi alan diğer gruplarındakine göre daha yüksek tespit edilmesine rağmen, diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$) (Tablo 2).

KARACİĞER DOKUSUNUN HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ

Karaciğerlerin histopatolojik değerlendirmesinde HD açısından kontrol grubu ile desfluran anestezisi alan diğer gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p < 0,01$) (Resim 1, 2). Anestezi alan gruplar karşılaştırıldığında, Grup II ile Grup IV ve Grup III il Grup IV arasında da istatistiksel açıdan anlamlı fark saptandı (sırasıyla $p = 0,016$, $p = 0,01$) (Tablo 3).

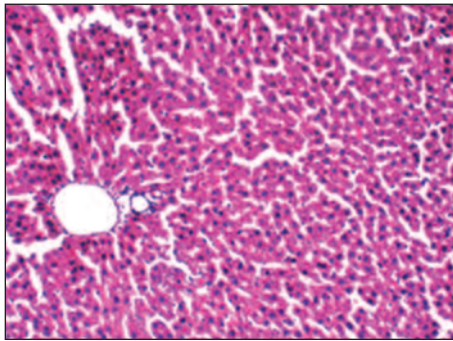
TABLO 1: Karaciğer histopatolojik parametrelerinin skorlaması.

| | 0 | 1 | 2 | 3 |
|--------------------------------------|----------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| Hidropik Dejenerasyon (HD) | Değişiklik yok | %10-20 hücrede | %20-50 hücrede | %50'den fazla hücrede |
| Nükleer Polimorfizm (NP) | Değişiklik yok | %10-20 hücrede | %20-50 hücrede | %50'den fazla hücrede |
| Portal Nötrofil İnfiltrasyonu (PNI) | Değişiklik yok | 1-2 portal alanda | 3-5 portal alanda | 6'dan fazla portal alanda |
| Portal Lenfosit İnfiltrasyonu (PLİ) | Değişiklik yok | 1-2 portal alanda | 3-5 portal alanda | 6'dan fazla portal alanda |
| Fokal Nekroz (FN) | Değişiklik yok | 1-2 portal alanda | 3-5 portal alanda | 6'dan fazla portal alanda |
| Santral Ven Etrafında Nötrofil (SVN) | Değişiklik yok | 1-2 santral ven etrafında | 3-5 santral ven etrafında | 6'dan fazla santral ven etrafında |
| Santral Ven Etrafında Lenfosit (SVL) | Değişiklik yok | 1-2 santral ven etrafında | 3-5 santral ven etrafında | 6'dan fazla santral ven etrafında |

TABLO 2: Grupların doku MDA ve PON1, Plazma PON1, AST ve ALT değerleri [ortanca (min-maks)].

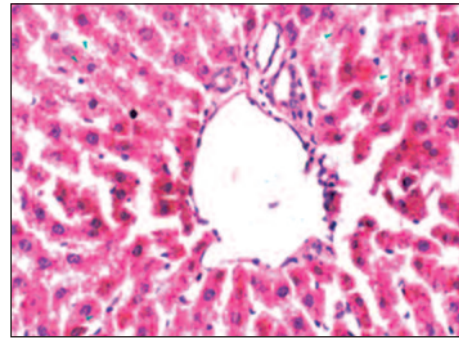
| | Grup I (Kontrol) (n=7) | Grup II (Tek Anestezi) (n=7) | Grup III (İki Anestezi) (n=7) | Grup IV (Üç Anestezi) (n=7) | Anlamlılık (p) | |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|-------------------|--|
| Doku MDA (nmol/gww) | 0,07 (0,07-0,08) | 0,08 (0,08-0,09) | 0,08 (0,07-0,09) | 0,08 (0,08-0,10) | 0,01 | I-II 0,29 I-III 0,043 I-IV 0,008 II-III 0,82 II-IV 0,33 III-IV 0,83 |
| Doku PON1 (nmol/gww) | 40 (32-57) | 32 (27-40) | 33 (27-43) | 38 (25-45) | 0,86 | |
| Plazma PON1 (U/L) | 176 (23-388) | 188 (28-507) | 191 (22-240) | 180 (23-269) | 0,11 | |
| AST (mg/dL) | 169 (148-184) | 150 (131-259) | 133 (117-155) | 135 (120-173) | 0,057 | |
| ALT (mg/dL) | 67 (52-82) | 59 (52-130) | 53 (39-64) | 60 (48-70) | 0,11 | |

MDA: Malondialdehit; PON: Paraoksonaz; AST: Aspartat amino transaminaz; ALT: Alanin amino transaminaz.



RESİM 1: Kontrol grubu karaciğer parankim dokusu, portal alan görülmektedir (HE, x40).

(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)



RESİM 2: Hidropik dejenerasyon ve yangının birlikte görüldüğü alan. Oklar hidropik dejenerasyonu göstermektedir (HE, x40).

(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)

NP için yapılan istatistiksel değerlendirmede, kontrol grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı fark bulunurken ($p < 0,05$), diğer üç grup arasında fark görülmedi ($p > 0,05$) (Resim 3, Tablo 3).

Karaciğerin histopatolojik incelemesinde PNI açısından yapılan istatistiksel değerlendirmede, kontrol grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı fark varken ($p < 0,05$) anestezi alan üç grup arasında fark görülmedi ($p > 0,05$) (Tablo 3).

PLİ ile karaciğerin histopatolojik değerlendirilmesi yapıldığında ise yine benzer olarak kontrol grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$). Anestezi alan gruplar karşılaştırıl-

dığında, Grup II ile IV arasında ve Grup III ile IV arasında anlamlı fark bulundu (sırasıyla $p < 0,001$, $p = 0,016$) (Resim 4, Tablo 3).

FN için yapılan istatistiksel değerlendirmede de kontrol grubu ile Grup IV arasında ($p < 0,001$), Grup II ile IV arasında ve Grup III ile IV arasında anlamlı fark bulundu (sırasıyla $p = 0,001$, $p = 0,01$) (Tablo 3).

SVN açısından tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken ($p > 0,05$), SVL için yapılan istatistiksel değerlendirmede ise kontrol grubu ile anestezi alan diğer gruplar arasında ($p < 0,01$) ve Grup II ile Grup IV arasında anlamlı fark tespit edildi ($p = 0,004$) (Resim 5, 6, Tablo 3).

TABLO 3: Anestezi alan grupların histopatolojik parametreleri [ortanca (min-maks)].

| | Grup I (Kontrol) (n=7) | Grup II (Tek Anestezi) (n=7) | Grup III (İki Anestezi) (n=7) | Grup IV (Üç Anestezi) (n=7) | | Anamlılık (p) | |
|--------|---------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------|------------------|------------------|
| HD | 0,0 (0-0) | 1,0 (1-2) | 1,0 (1-2) | 2,0 (1-3) | <0,001 | I-II | <0,01 |
| | | | | | | I-III | <0,01 |
| | | | | | | I-IV | <0,01 |
| | | | | | | II-III | 0,07 |
| | | | | | | II-IV | 0,016 |
| III-IV | 0,01 | | | | | | |
| NP | 0,0 (0-0) | 1,0 (0-1) | 1,0 (1-2) | 1,0 (1-2) | <0,001 | I-II | 0,02 |
| | | | | | | I-III | 0,01 |
| | | | | | | I-IV | <0,01 |
| | | | | | | II-III | 1,00 |
| | | | | | | II-IV | 0,08 |
| III-IV | 1,00 | | | | | | |
| PNİ | 0,0 (0-0) | 1,0 (0-2) | 1,0 (1-2) | 2,0 (1-3) | 0,001 | I-II | 0,043 |
| | | | | | | I-III | <0,01 |
| | | | | | | I-IV | <0,01 |
| | | | | | | II-III | 0,96 |
| | | | | | | II-IV | 0,06 |
| III-IV | 0,11 | | | | | | |
| PLİ | 0,0 (0-0) | 1,0 (1-2) | 2,0 (1-2) | 3,0 (2-3) | <0,001 | I-II | 0,022 |
| | | | | | | I-III | <0,01 |
| | | | | | | I-IV | <0,01 |
| | | | | | | II-III | 0,068 |
| | | | | | | II-IV | <0,001 |
| III-IV | 0,016 | | | | | | |
| FN | 0,0 (0-0) | 0,0 (0-1) | 0,0 (0-1) | 1,0 (1-2) | 0,001 | I-II | 0,046 |
| | | | | | | I-III | 0,046 |
| | | | | | | I-IV | 0,01 |
| | | | | | | II-III | 0,057 |
| | | | | | | II-IV | 0,001 |
| III-IV | 0,01 | | | | | | |
| SVN | 0,0 (0-0) | 0,0 (0-1) | 0,0 (0-1) | 1,0 (0-1) | 0,08 | | |
| SVL | 0,0 (0-0) | 0,0 (0-1) | 1,0 (1-2) | 2,0 (1-2) | <0,001 | I-II | <0,01 |
| | | | | | | I-III | <0,01 |
| | | | | | | I-IV | <0,01 |
| | | | | | | II-III | 0,08 |
| | | | | | | II-IV | 0,004 |
| III-IV | 0,26 | | | | | | |

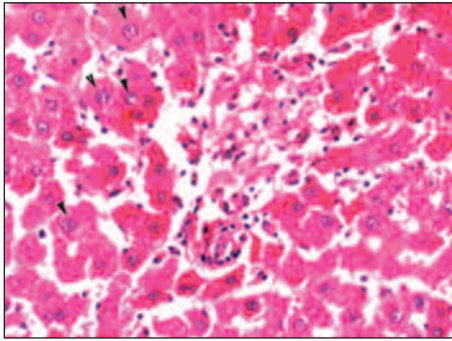
HD: Hidropik dejenerasyon; NP: Nükleer polimorfizm; PNİ: Portal nötrofil infiltrasyonu; PLİ: Portal lenfosit infiltrasyonu; FN: Fokal nekrozis; SVN: Santral ven etrafında nötrofil; SVL: Santral ven etrafında lenfosit.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, tekrarlanan desfluran anestezisinin yaşlı sıçanlarda karaciğer üzerindeki etkileri, histopatolojik inceleme, antioksidan sisteminin göstergesi olarak PON1 doku ve plazma düzeyi ve lipid

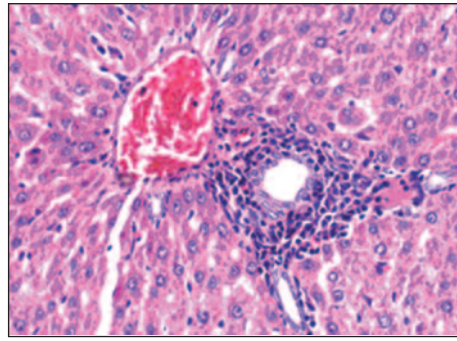
peroksidasyonun göstergesi olarak doku MDA düzeyi ile değerlendirilmiştir.

Desflurana bağlı hepatotoksisitedeki artış, yaşa, anestezi tekrarına (daha önce farklı bir inhalasyon anestezisi ile duyarlılaşma da olabilir) veya obezite, cinsiyet ve değişik fizyolojik durumlara



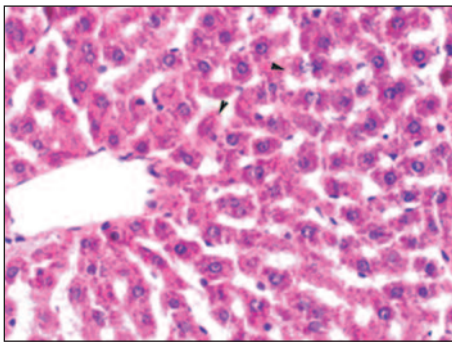
RESİM 3: Fokal nekrozla birlikte oklar nükleer polimorfizmi (NP) göstermektedir (HE, x40).

(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)



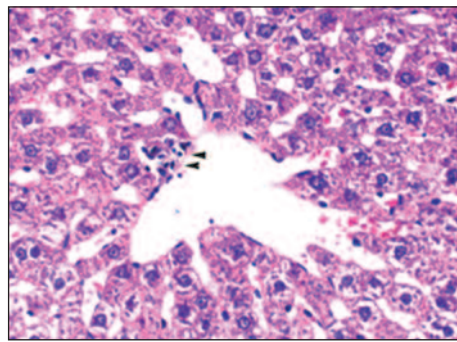
RESİM 4: Karaciğer dokusunda portal alandaki yangı görülmektedir (HE, x40).

(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)



RESİM 5: Yangı olmayan santral ven. Oklar hidropik dejenerasyonu göstermektedir (HE, x40).

(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)



RESİM 6: Santral ven etrafında yangı. Oklar yangıyı göstermektedir (HE, x40).

(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)

bağlı olabilir. Literatürde, desfluran ile ilişkilendirilen hepatotoksisite olgularının yaşlı kadınlar olduğu görülmektedir.²²⁻²⁴ Hepatik fonksiyonun değerlendirildiği çalışmalarda ise, genç hayvanlarda desfluranın hepatik enzimlerde herhangi bir artış oluşturmadan çok az histopatolojik değişikliğe neden olduğu, yaşlı sıçanlarda desfluran anestezisinin, hem genç sıçanlara hem de sevoflurana göre daha fazla hepatik hasara yol açtığı bildirilmiştir.^{15,16,25}

Bu çalışmada, hepatik hasarın belirlenmesinde aminotransferaz enzimlerinin düzeyleri kullanılmış, ancak AST ve ALT değerleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. AST ve ALT düzeyi, hepatik hasarın delili olarak veya hasarın zamanla değişimini takip etmek ya da derecesini değerlendirmek için kullanılmaktadır.²⁶ Ancak bu iki transaminazın ölçümünün doğruluğu için hasarın tipi ve çalışılan tür

önemlidir. Kimyasal bir madde tarafından oluşturulan karaciğer hasarının tipi, hasara karşı enzimatik yanıtın temel özelliklerini belirlerken, enzimlerin serum seviyelerinde hızlı bir artışa neden olur; buna karşılık steatoza bağlı hasarda transaminazların ölçümü, steatoza nekroz eşlik etmediğinden belirleyici değildir. AST ve ALT bu durumda çok hafif yükselebilir.²⁶

Çalışmamızda AST ve ALT değerlerinde kontrol grubuna göre desfluran anestezisi uygulanan gruplarda fark görülmemesinin sebebini, desfluranın hepatik nekroza neden olmamasına bağlamaktayız. Karaciğer hasarına bağlı histopatolojik değişiklikler için HD, NP, PNİ, PLİ, FN, SVN ve SVL birikmesi değerlendirilmiş ve desfluran gruplarında, SVN hariç daha yüksek skor bulunmuştur. Yine HD, PLİ, FN ve SVL'nin tekrarlanan desfluran anestezisi ile daha yüksek skorlara ve yüzdelere ulaşıldığı, karaciğerde histopatolojik değerlendirme

ile ortaya çıkarılan bir hasarın olduğu ve bu hasarın 72 saat ara ile tekrarlan desfluran anestezileri ile daha da arttığı gösterilmiştir. Histopatolojik değerlendirmede desfluran gruplarında yüksek patolojik skorların elde edilmesi, desfluran anestezisinin karaciğerde hasar oluşturduğunun göstergesidir. Ayrıca, histolojik değişikliklerin toksisitede enzim düzeyindeki yükselmeden daha duyarlı olduğu da bilinmektedir.^{27,28} Yapılan çalışmalarda, sevofluran ve desfluranın yaşlı sıçanlarda gençlere göre karaciğerde daha fazla hasar yaptığı, yaşlı dişi sıçanlarda desfluran ile daha fazla hasar olduğu belirtilirken, başka bir çalışmada da desfluranın doz ve süresinin değiştirildiği deney gruplarında önemli derecede histopatolojik değişiklikler gözlemlenmiştir.^{15,29}

Son yıllarda, serbest radikallerin de hepatotoksisiteye yol açabileceği belirtilmektedir. Anestezi esnasında; hipoksinin, antioksidan vitamin ve ya enzim düzeyinin azalmasının hücresel seviyede oksidan/antioksidan dengesinin bozulmasına yol açabileceği düşünülmektedir.¹² Desfluran hepatotoksitesisi için özgül bir radikal bulunmamasına rağmen, antioksidan vitamin ya da enzim seviyelerinde değişikliğe neden olan dolaylı bir etki ile hepatotoksitesinin geliştiği gösterilmiştir.^{12,13} Çalışmamızda oksidatif stres değerlendirilirken, antioksidan gösterge olarak, büyük oranda karaciğerde sentez edilip salgılanan PON1 temel alınmıştır.^{30,31} Primer olarak organafosfat detoksifikasyonunda rol alan PON1, doğal antioksidan bir enzim olarak kabul edilmektedir. Bu enzim, yüksek dansiteli lipoprotein (HDL)'nin yapısında bulunarak, düşük dansiteli lipoprotein (LDL)'e bağlı olan lipid peroksidasyon ürünlerinin oluşumunu ve dolayısı ile sitotoksisiteyi önlemektedir.³¹ Yapılan çalışmalarda kronik karaciğer hastalıklarında PON1 ve nitrik oksit (NO) seviyeleri anlamlı derecede düşük, MDA seviyelerin ise yüksek bulunmuş ve hepatosteatozlu hastalarda oksidatif stresin PON1'i anlamlı derecede baskıladığı sonucuna varılmıştır.^{32,33} Ferre ve ark. çalışmalarında, kronik karaciğer hastalığında PON1 aktivitesini düşük ve hasar düzeyi ile ilişkili bularak, serum PON1 aktivitesinin karaciğer hasarının belirlenmesinde önemli bir gösterge olduğu sonucuna varmışlardır.³⁴

Biz de tekrarlanan desfluran anestezisi uygulamalarında doku ve plazma PON1 seviyesini desfluran anestezisi uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre daha düşük bulduk. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bunun nedeninin, muhtemelen kullandığımız sıçan sayısının düşük olmasına, tekrarlanan anestezisi sayısının ve süresinin yetersiz olmasına bağlamaktayız. Çalışmamızda 2 saatlik anestezisi uygulamalarından hemen sonra sıçanlar öldürülerek kan ve doku örnekleri alınmıştır. Karaciğer dokusunda sentez edilen PON1'in karaciğer dokusu içindeki değişikliklerinin plazma düzeyine yansımalarının muhtemelen bu kısa süre içerisinde mümkün olmadığını ve bu nedenle PON1 düzeyleri açısından fark bulunmadığını düşünmekteyiz. Erhan ve ark. ise çalışmamızın aksine, tekrarlanan halotan anestezisinin ardından serum PON1 düzeyinde azalma tespit etmişler ve halotanla oluşan akut akciğer hasarının belirlenmesinde ucuz, basit, hızlı ve önemli bir gösterge olarak serum PON1 düzeyi ölçümünün faydalı olabileceğini ileri sürmüşlerdir.³⁵

Doku MDA düzeyi, dokulardaki lipid peroksidasyonunun ve dolayısıyla oksidatif stresin hassas göstergelerinden birisidir ve lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan serbest radikallerin yaptığı hücre zarı hasarının bir göstergesi olarak volatil anestezik ajanların etkilerini ölçen çalışmalarda kabul edilmiştir.^{11,36} Çalışmamızda doku MDA değerleri 2 ve 3 kez desfluran anestezisi alan gruplarda yüksek düzeyde bulunmuştur. Tekrarlanan desfluran anestezisinde doku PON1 düzeyi ile MDA oluşumu arasında ters bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Literatürde, u çalışmada elde edilen bulgulara benzer şekilde, desfluran ve sevofluran anestezisi uygulanan sıçanlarda MDA seviyelerinin doku ve kanda kontrol grubundakine göre daha yüksek olduğu, ayrıca desfluran uygulanan grupta sevofluran grubuna göre hafifçe yüksek olduğu ama bu farkın anlamlı olmadığı bildirilmiştir.^{11,14} Başka bir çalışmada, desfluran ve sevofluran anestezisi alan hastalarda PON düzeyi değerlendirilmiş, her iki ajanın da oksidatif stres üzerinde benzer etkileri bulunmakla birlikte, desfluranda bu etkinin anlamlı ölçüde daha yüksek olduğu gösterilmiştir.³⁷

Sonuç olarak çalışmamızda, yaşlı sıçanlarda tekrarlanan desfluran anestezisi uygulamalarının, kara-

ciğerde ışık mikroskopu ile gösterilen histopatolojik hasara yol açtığı ve bu hasarın 72 saat ara ile tekrarlan desfluran anestezileri ile daha da arttığı, ancak PON düzeyi ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir. Karaciğer dokusundan çalışılan MDA değerlerindeki yükseklik, desfluranın neden olduğu karaciğer hasarının lipid peroksidasyonuna bağlı olduğu ve desfluran anestezisinin, antioksidan enzimlerdeki azalmaya bağlı olarak hücresel seviyede oksidan/antioksidan dengesini bozarak dolaylı etkiyle karaciğer hasarı yapabilmesine bağlanmıştır. Bu çalışma, tekrarlanan desfluran anestezisi ile karaciğer doku PON1 ve plazma PON1 düzeyi arasındaki ilişkiyi in-

celeyen ilk çalışma olup, erken dönemde plazma PON1 düzeyine göre, doku PON1 düzeyinin desfluran anestezisi ile azaldığını ortaya koymuştur. Doku ve plazma PON1 düzeyinin desflurana bağlı karaciğer hasarının bir göstergesi olarak kullanılabilmesi için, desfluran uygulamasından sonra PON1 düzeyinin zamana göre değişiminin belirlendiği, farklı süre ve hacimlerde, cinsiyet karşılaştırmalı ileri çalışmaların yapılması gerektiği kanaatindeyiz.

Teşekkür

Histolojik değerlendirmedeki katkısı için Öğr.Gör.Dr. Gökhan Cüce'ye teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Jakobsson J. Desflurane: a clinical update of a third-generation inhaled anaesthetic. *Acta Anaesthesiol Scand* 2012;56(4):420-32.
- Barash GP, Cullen FC, Stoelting RK. [Inhalation Anesthetics]. Günaydın B, Demirkıran O, çeviri editörleri. *Klinik Anestezi. Kısım III, Bölüm 15. 5. Baskı. İstanbul: Logos Yayıncılık; 2011. p. 384-420.*
- Martin JL. [Volatile anesthetics and liver injury: a clinical update or what every anesthesiologist should know]. *Can J Anaesth* 2005;52(2): 125-9.
- Yıldırım GB. [Desflurane: new inhaled anesthetics]. *J Kartal TR* 2002;13(3):213-5.
- Eger El 2nd. New inhaled anesthetics. *Anesthesiology* 1994;80(4):906-22.
- Heavner JE, Kaye AD, Lin BK, King T. Recovery of elderly patients from two or more hours of desflurane or sevoflurane anaesthesia. *Br J Anaesth* 2003;91(4):502-6.
- Cengiz M, Baysal Z, Ganıdağlı S, Sarban S. [Severe hepatotoxicity after desflurane anesthesia in an elderly patient]. *Turkish Journal of Anesthesia and Reanimation* 2005;33(1):61-2.
- Sear JW. Implication of aging on anesthetic drugs. *Curr Opin Anaesthesiol* 2003;16(4): 373-8.
- Guyton AC, Hall JE. *The Liver as an Organ. Textbook of Medical Physiology. 9th ed. India: WB Saunders; 1996. p.883-6.*
- Miller RD. *History of Anesthetics, Metabolism and Toxicity of Modern Inhaled Anesthetics, Anesthesia and the Hepatobiliary System. Textbook of Anesthesia. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 1986. p.3-8; 581-745; 1199-249.*
- Dikmen B, Unal Y, Pampal HK, Nurlu N, Kurtipek O, Canbolat O, et al. Effects of repeated desflurane and sevoflurane anesthesia on enzymatic free radical scavenger system. *Mol Cell Biochem* 2007;294(1-2):31-6.
- Naziroglu M, Günay C. The levels of some antioxidant vitamins, glutathione peroxidase and lipoperoxidase during the anaesthesia of dogs. *Cell Biochem Funct* 1999;17(3):207-12.
- Morris DM, Smith HO, Liu W, Genesen MC, Vander Jagt DH, Glew RH, et al. Are antioxidant levels measured immediately postoperatively an indicator of magnitude of injury? *Am J Surg* 2000;180(3):212-6.
- Türkan H, Aydın A, Sayal A, Eken A, Akay C, Karahalil B. Oxidative and antioxidative effects of desflurane and sevoflurane on rat tissue in vivo. *Arh Hig Rada Toksikol* 2011;62(2): 113-9.
- Arslan M, Ozkose Z, Akyol G, Barit G. The age- and gender-dependent effects of desflurane and sevoflurane on rat liver. *Exp Toxicol Pathol* 2010;62(1):35-43.
- Arslan M, Isik B, Kavutcu M, Kurtipek O. Effects of desflurane on oxidant/antioxidant status of female young versus old rat liver tissue. *Journal of Animal and Vet Advances* 2010; 19(9):2502-7.
- Eger El 2nd, Johnson BH. MAC of I-653 in rats, including a test of the effect of body temperature and anesthetic duration. *Anesth Analg* 1987;66(10):974-6.
- Haelewyn B, Zhu L, Hanouz JL, Persehaye E, Roussel S, Ducouret P, et al. Cardioprotective effects of desflurane: effect of timing and duration of administration in rat myocardium. *Br J Anaesth* 2004;92(4):552-7.
- Gülcü F, Gürsu MF. [The standardization of paraoxonase and arylesterase activity measurements]. *Turk J Biochem* 2003;28(2):45-9.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990;186:407-21.
- Demirel CB, Kösem M, Katı İ, Özbek H, Hüseyinoğlu Ü, Koçoğlu H. The histopathologic effect of repeated halothane, isoflurane and sevoflurane anesthesia on mice liver. *Anestezi Dergisi* 2000;8(3):289-95.
- Martin JL, Plevak DJ, Flannery KD, Charlton M, Poterucha JJ, Humphreys CE, et al. Hepatotoxicity after desflurane anesthesia. *Anesthesiology* 1995;83(5):1125-9.
- Berghaus TM, Baron A, Geier A, Lamerz R, Paumgartner G. Hepatotoxicity following desflurane anesthesia. *Hepatology* 1999;29(2): 613-4.
- Tung D, Yoshida EM, Wang CS, Steinbrecher UP. Severe desflurane hepatotoxicity after colon surgery in an elderly patient. *Can J Anaesth* 2005;52(2):133-6.
- Lind RC, Gandolfi AJ, Hall PD. Age and gender influence halothane-associated hepatotoxicity in strain 13 guinea pigs. *Anesthesiology* 1989;71(6):878-84.
- Zimmerman HJ. Experimental hepatotoxicity. In: Zimmerman HJ, ed. *Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and Other Chemicals on the Liver. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 1999. p. 201-28.*
- Feinman L, Rubin E, Lieber CS. Adaptation of the liver to drugs. In: Orlandi F, Jezequel AM, eds. *Liver and Drugs. 1st ed. New York: Academic Press; 1972. p.41-83.*
- Grice HC, Barth ML, Cornish HH, Foster GV, Gray RH. Correlation between serum enzymes, isozyme patterns and histologically detectable organ damage. *Food Cosmet Toxicol* 1971;9(6):847-55.

29. Kati I, Tekin M, Tas A, Ragbetli C, Ugras S. Histopathological effects of desflurane on the liver and the kidney using light microscopy. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2010;14(9):1940-42.
30. Aviram M. Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease? *Mol Med Today* 1999;5(9):381-6.
31. Rodrigo L, Hernández AF, López-Caballero JJ, Gil F, Pla A. Immunohistochemical evidence for the expression and induction of paraoxonase in rat liver, kidney, lung and brain tissue. Implications for its physiological role. *Chem Biol Interact* 2001;137(2): 123-37.
32. Kilic SS, Aydin S, Kilic N, Erman F, Aydin S, Celik I. Serum arylesterase and paraoxonase activity in patients with chronic hepatitis. *World J Gastroenterol* 2005;11(46):7351-4.
33. Atamer A, Bilici A, Yenice N, Sele S, Ilhan N, Atamer Y. The importance of paraoxonase 1 activity, nitric oxide and lipid peroxidation in hepatosteatosis. *J Int Med Res* 2008;36(4): 771-6.
34. Ferré N, Camps J, Prats E, Vilella E, Paul A, Figuera L, et al. Serum paraoxonase activity: a new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage. *Clin Chem* 2002;48(2):261-8.
35. Erhan ÖL, Özer AB, Gürsu F, Yılmaz F, Timurkaan N, Gülcü F, et al. Determination of paraoxonase activity in Halothane Induced Hepatotoxicity. *Fırat Medical Journal* 2004; 9(4):103-7.
36. Bezerra FJ, Rezende AA, Rodrigues SJ, Almeida Md. [Thiobarbituric acid reactive substances as an index of lipid peroxidation in sevoflurane-treated rats]. *Rev Bras Anesthesiol* 2004;54(5):640-9.
37. Yalçın S, Aydoğan H, Serdaroğlu H, Yıldız S, Büyükfırat E, Karahan MA, et al. Impact of volatile anesthetics on oxidative stress in patients undergoing laparoscopic cholecystectomy for gallstones. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2012; 32(1):112-9.