



Çocuklarda Sevofluran ve Desfluran'ın Periferik Lenfositler Üzerine Genotoksik Etkilerinin Comet Assay Yöntemiyle Araştırılması

Investigation of Genotoxic Effect of Desflurane and Sevoflurane on Periferic Lymphocyte with Comet Assay Method

Yeşim Işıkçı, Ayşe Çiğdem Tütüncü, Pınar Kendigelen, Serpil Çakmakkaya, Fatih Altındaş, Güner Kaya

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Anestezi ve Reanimasyon Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Öz

Amaç: Anesteziklerin kromozomal değişikliklere neden olduğunu gösteren klinik, sitogenetik çalışmalar mevcuttur. Biz çalışmamızda, sevofluran ve desfluranın çocuklarda olası genotoksik etkilerini araştırmayı hedefledik.

Yöntemler: Araştırmada lenfositler, DNA tek, çift sarmalındaki kırıkların tespitinde kullanılan Comet Assay yöntemi kullanılarak incelendi. Çalışmada anestezi süresi en az 120 dk olan 1-10 yaş arası 26 çocuk alındı. Anestezi öncesi alınan 3 mL venöz kan kontrol olarak kabul edildi, induksiyon sonrası olgular rastgele iki gruba ayrılarak oksijen/hava ile desfluran (grup D) ve sevofluran (grup S) uygulanan grup olarak incelendi. Anestezi başlangıcından 60 dakika, 120 dakika, 1 gün ve 5 gün sonra alınan kan örneklerinden periferik lenfositler izole edilerek Comet Assay yöntemiyle incelendi. Lenfositler fluoressan mikroskopta değerlendirildi, görsel sınıflandırma yapılarak, % kuyrak faktörleri hesaplandı.

Bulgular: Anestezi öncesi Comet cevapları açısından Sevofluran ve desfluran grupları arasında fark bulunmadı. Grup D ve grup S'de anestezi başlangıcından sonraki 60. dakika, 120. dakika, 24. saat, beşinci gün alınan kan örneklerinden bazal değerlere yakın veya aynı sonuçlar elde edildi. Desfluran ile sevofluran arasında tüm zamanlar kan örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadığı görüldü.

Sonuç: Sevofluran, desfluran anestezi sonrasında çocuk hastaların lenfositlerinde çekirdek yapının etkilenmeyerek hasarlanmadığı ve DNA hasarı oluşmadığı gösterildi.

Anahtar Sözcükler: Sevofluran, desfluran, comet assay, pediatrik

Abstract

Aim: There are several clinical and cytogenetic studies that anesthetics cause chromosomal changes. We report data on the possible genotoxic properties of two inhalational anaesthetics, sevoflurane and desflurane in lymphocytes of children evaluated for genotoxic activity with comet assay.

Methods: In this study lymphocytes were investigated with Comet Assay which establishes single, double DNA strand breaks. Twent six children aged 1-10 years, who were anaesthetized for at least 120 minutes, were included in the study. After standard induction, anaesthesia was maintained with inhalation of sevoflurane or desflurane in oxygen-air mixture. Three millilitres venous blood samples were obtained before the induction of anaesthesia (control), at 60. and 120. minutes of anaesthesia and on the first and fifth days. Blood samples were evaluated by comet assay. Peripheral lymphocytes were isolated with blood samples and examined by Comet Assay method. Lymphocytes were evaluated with fluorescence microscopy, visual classification was performed and % tail factors were calculated.

Results: There was no difference in the mean comet response before anaesthesia between the two groups. However, there was no significant difference in the mean comet response at 60 and 120 minutes of anaesthesia and 1 and 5 days after surgery between patients who received sevoflurane and desflurane.

Conclusion: It was demonstrated that structure of lymphocytes nucleus did not causedamage and DNA injury after the sevoflurane and desflurane anesthesia in pediatric patients.

Keywords: Sevoflurane, desflurane, comet assay, pediatric

Giriş

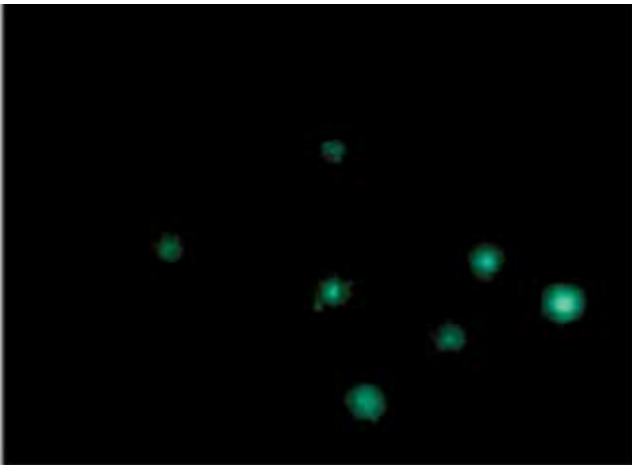
Yaygın kullanılan inhalasyon anesteziğin, DNA metabolizmasını etkilediği ve genetik materyalde mutajen ve karsinojen etkisi olduğu bildirilmektedir (1). Yine inhalasyon anesteziğinin kullanıldığı ortamda oluşturduğu genotoksik etki, bu ajanlara dolaylı da olsa maruz kalanlar için genetik açıdan risk oluşturabilmektedir (2-4). DNA hasarını araştırmada insan hücrelerinin kullanıldığı testlerden en sık başvurulan kardeş kromatid değişimi (KKD) ve Comet Assay testleridir (5,6). KKD, kromozom morfolojisi değişimsiz, kardeş kromatidler arasında, özdeş segmentlerin simetrik genetik materyal alışverişidir. Comet tekniği, tek hücre seviyesinde, DNA tek ya da çift sarmalındaki kırıkların tespitinde kullanılan duyarlı bir yöntemdir (Resim 1) (6). Günümüzde en fazla lenfosit hücrelerinde başarıyla uygulanmaktadır.

Çalışmamızda sevofluran ve desfluranın çocuklara klinik dozlarda uygulandığında, genetik açıdan akut *in vivo* mutajen etkisini Comet Assay yöntemiyle incelemeyi planladık.

Yöntemler

Etik kurul onayı alındıktan sonra anestezi süresi 120 dakikadan uzun olacak girişim geçirecek 1-10 yaş arası 26 çocuk çalışma kapsamına alındı. Hücresel işlemler tıbbi biyoloji ve genetik laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Çalışmaya son bir hafta içinde anestezi ve radyasyon alanlar, sistemik hastalığı olanlar, herhangi bir malignite veya malignite şüphesi bulunanlar, herhangi bir genetik hastalığı olanlar, akraba evliliğinden doğanlar, ailede ve ev ortamında sigaraya maruz kalanlar, yaşadığı mekanda ve çevrede mutajenik ve karsinojenik maddelerle teması olanlar, ameliyat esnasında skopi yapılanlar, ameliyat esnasında kan tranfüzyonu yapılanlar dahil edilmedi. Olgular rastgele iki gruba ayrılarak sevofluran grubunda (grup S) (n=13) ameliyat esnasında inhalasyon anesteziği olarak sevofluran,



Resim 1. Periferik lenfosit Comet mikroskopik görüntüsü

desfluran grubunda ise (grup D) (n=13), desfluran kullanıldı. Çalışma grubuna alınan ve premedikasyon uygulanmayan hastalardan ameliyathanede indüksiyondan önce heparinli enjektöre 3 mL venöz kan örneği (T1) alındı. Hastaların elektrokardiyografi, noninvaziv kan basıncı (sistolik, diyastolik, ortalama), $ETCO_2$, periferik transkütanöz oksijen satürasyonu (SpO_2) ve kalp atım hızı monitörizasyonu sağlandı. Tüm hastalarda, propofol, fentanil, atrakurium besilat kullanıldı.

Hastalardan indüksiyondan 1 saat (T2) ve 2 saat (T3) sonra heparinli enjektöre 3 mL venöz kan örneği alındı. Her üç kan örneği de $+4^\circ C$ 'de korunarak 2 saat içerisinde laboratuvara gönderildi ve çalışıldı. Operasyondan 24 saat (T4) ve 5 gün sonra (T5) de heparinli enjektöre 3 mL venöz kan örneği alındı ve aynı gün içerisinde laboratuvarında çalışıldı.

Heparinli tüplere alınan 3 mL venöz kan 1:1 oranında RPMİ 1640 ile sulandırıldı. 3 mL ficoll histopaque üzerine tabakalandıktan sonra 800 X g de 20 dakika santrifüj edildi. Bulutsu tabaka pipet yardımıyla toplanarak RPMİ ile yıkandı. 250 X g de 10 dakika santrifüj edildi. Bu şekilde 2 kez daha yıkandıktan sonra pellet 1 mL RPMİ ile sulandırılarak hemositometre yardımıyla lenfosit sayımı yapıldı. Düşük ve normal dereceli agaroz solüsyonları kullanılarak preparatlar hazırlandı. Lizis solüsyonu ile preparatların üzeri kaplanarak, 1 gece $+4^\circ C$ 'de bekletildi. Lizis aşamasını tamamlayan preparatlar enzim reaksiyon tamponu ile yıkanarak $37^\circ C$ 'lik etüvde 30 dakika enkübe edildi. Buzdolabında $+4^\circ C$ 'de soğutulan elektroforez tamponu soğuk odada elektroforez tankına döküldükten sonra preparatlar elektroforez tankına yerleştirilerek 40 dakika bekletildi. Daha sonra, preparatlar 25 V sabit akım altında 30 dakika elektroforez yapılarak nötralizasyon tamponunda beşer dakika süreyle üç kez yıkandıktan sonra DAPI ile boyandı ve floresan mikroskopta değerlendirildi. Her örnekte 100 civarında lenfosit incelendi. Anderson ve ark. (5) tarafından tariflenen beş kategoride sınıflandırıldı. Genotoksik hasarın gösterilmesinde kullanılan bu sınıflandırma sistemi kuyruktaki DNA yoğunluğuna göre yapılmaktadır.

Lenfosit Görsel Sınıflandırması

Sınıf 0: Hasarsız hücrelerin incelemesinde yuvarlak, kenarları daha az yoğun olmak üzere ortası parlak bir ışık görünümü olanlar,

Sınıf 1: DNA hasarı oluşmaya başlamış ve normalde düzgün kenarlı olan görüntü DNA kırıklarının çekirdek dışına göçünün de başlaması nedeni ile düzensiz kenarlı bir görünüm alanlar,

Sınıf 2: Hasar arttıkça lenfositlerde merkezden kenara doğru uzama olup kuyruktaki floresan yoğunluğu artanlar,

Olgu no	Kan örnekleri	Sınıf 0	Sınıf 1	Sınıf 2	Sınıf 3	Sınıf 4
D1	T1	98	2			
	T2	100	4	1		
	T3	97	1			
	T4	100				
	T5	100	1			
D2	T1	100				
	T2	98	1			
	T3	100				
	T4	100				
	T5	100				
D3	T1	100				
	T2	100				
	T3	99	1			
	T4	100				
	T5	100				
D4	T1	95	1			
	T2	98	2			
	T3	100				
	T4	100				
	T5	99	1			
D5	T1	100				
	T2	100				
	T3	100				
	T4	100				
	T5	100				
D6	T1	97	2	1		
	T2	96	3	1		
	T3	99	1			
	T4	100				
	T5	100				
D7	T1	100				
	T2	99	1			
	T3	100				
	T4	100				
	T5	100				
D8	T1	100				
	T2	100				
	T3	100				
	T4	100				
	T5	100				
D9	T1	96	1			
	T2	98	2			
	T3	99	1			
	T4	100				
	T5	100				
D10	T1	100				
	T2	100				
	T3	99	1			
	T4	100				
	T5	100				
D11	T1	100				

Olgu no	Kan örnekleri	Sınıf 0	Sınıf 1	Sınıf 2	Sınıf 3	Sınıf 4
	T2	100				
	T3	100				
	T4	100				
	T5	100				
D12	T1	100				
	T2	99	1			
	T3	100				
	T4	99	1			
D13	T5	100				
	T1	100				
	T2	100				
	T3	100				
	T4	100				
T5	99	1	1			

Olgu no / zamana göre kan örnekleri	T1	T2	T3	T4	T5
D1	2,7	3,14	2,4	2,5	2,62
D2	2,5	2,6	2,5	2,5	2,5
D3	2,5	2,5	2,6	2,5	2,5
D4	2,63	2,7	2,5	2,5	2,6
D5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
D6	2,85	3	2,6	2,5	2,5
D7	2,5	2,6	2,5	2,5	2,5
D8	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
D9	2,6	2,7	2,6	2,5	2,5
D10	2,5	2,5	2,6	2,5	2,5
D11	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
D12	2,5	2,6	2,5	2,6	2,5
D13	2,5	2,5	2,5	2,5	2,6

D: Desfluran

Desfluran grubu	n	% kuyruk faktörü ortalama	Standart sapma
T1	13	2,56	0,109
T2	13	2,642	0,206
T3	13	2,523	0,06
T4	13	2,508	0,028
T5	13	2,525	0,047

Sınıf 3: DNA hasarı daha da artmış olup kuyruklu yıldız (Comet) görünümü alan hücreler,

Sınıf 4: Hasar derecesinin en üst düzeyde olmasının sonucunda apoptotik hücre görünümü alanlar.

Daha sonra, DNA hasarını sayısallaştırma ve objektif ve hassas bir karşılaştırma yapmak için Diem ve ark.'nın (6) kullandıkları formüle göre alınan her kan örneği için % kuyruk faktörü değerleri hesaplandı.

% kuyruk faktörü aşağıdaki formüle göre hesaplanmaktadır (6):

% kuyruk faktörü= $AxFA+BxFB+CxFC+DxFD+ExFE$ /
sayılan toplam hücre sayısı.

A, 0 sınıfına dahil olan hücrelerin sayısı,

B, 1 sınıfına dahil olan hücrelerin sayısı,

C, 2 sınıfına dahil olan hücrelerin sayısı,

D, 3 sınıfına dahil olan hücrelerin sayısı,

E, 4 sınıfına dahil olan hücrelerin sayısı

FA, 0 sınıfının ortalaması (=2,5)

FB 1 sınıfının ortalaması (=12,5)

FC, 2 sınıfının ortalaması (=30)

FD, 3 sınıfının ortalaması (=67,5)

FE, 4 sınıfının ortalaması (=97,5)

Bu formüle göre;

A, 0 sınıfına dahil olan hücrelerin hasar derecesi <%5 olup FA=2,5 olan sabit bir değer ile ifade edilmektedir.

B, 1 sınıfına dahil olan hücrelerin hasar derecesi %5-20 olup FB=12,5 olan sabit bir değer ile ifade edilmektedir.

C, 2 sınıfına dahil olan hücrelerin hasar derecesi %20-40 olup FC=30 olan sabit bir değer ile ifade edilmektedir.

D, 3 sınıfına dahil olan hücrelerin hasar derecesi %40-95 olup FD=67,5 olan sabit bir değer ile ifade edilmektedir.

E, 4 sınıfına dahil olan hücrelerin hasar derecesi >%95 olup FE=97,5 olan sabit bir değer ile ifade edilmektedir.

Bulgular

Hastaların yaş ortalaması 5,5 yıl, ortalama anestezi süresi 152,6 dakika, vücut ağırlığı ortalaması ise 24 kg olarak saptandı. Yüzde kuyruk faktörleri karşılaştırıldığında (D grubu $2,56 \pm 0,10$; S grubu $2,61 \pm 0,21$) her iki grubun bazal değerlerinin birbirinden istatistiksel olarak farklı olmadığı görüldü ($p=0,41$).

Grup D'de; yaş ortalaması 5,6 yıl, ortalama anestezi süresi 143 dakika, ortalama ağırlık 22,1 kg ve cinsiyet dağılımı sekiz erkek beş kız olarak kaydedildi. Grup D hastalarında kan örneklerinde lenfosit sayısı ve sınıflandırılmaları Tablo 1'de görülmektedir. Bu grupta lenfositlerin çoğunun 0 sınıfına ait olduğu tespit edilmiştir. Desfluran grubu hastalarında lenfositler sınıflandırıldıktan sonra % kuyruk faktörleri hesaplanmıştır (Tablo 2). Grup D hastalarında hesaplanan % kuyruk faktörü ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 3'te görülmektedir. Bazal kan örneğinde % kuyruk faktörü ortalaması $2,56 \pm 0,1$, 60. dakika kan örneği ortalaması $2,64 \pm 0,2$ değerinde olup minimal bir artış gösterirken, 120. dakika kan örneği analizinde $2,52 \pm 0,06$, yani bazal değere yakın bir kuyruk faktörü yüzdesi tespit edildi. Postoperatif 24.

Tablo 4. Sevofluran grubunda T1, T2, T3, T4, T5. zamanlarda alınan kan örneklerinde lenfositlerin sınıflara göre dağılımı

Olgu no	Kan örnekleri	Sınıf 0	Sınıf 1	Sınıf 2	Sınıf 3	Sınıf 4
S1	T1	100				
	T2	100				
	T3	99	1			
	T4	100				
	T5	100				
S2	T1	95	2	2		
	T2	94	1	3		
	T3	96		2		
	T4	100				
	T5	100				
S3	T1	100				
	T2	100				
	T3	99	1			
	T4	100				
	T5	100				
S4	T1	100				
	T2	100				
	T3	100				
	T4	100				
	T5	100				
S5	T1	100				
	T2	98	1			
	T3	99		1		
	T4	100				
	T5	100				
S6	T1	100				
	T2	100				
	T3	99	1			
	T4	100				
	T5	98	2			
S7	T1	100				
	T2	100				
	T3	100				
	T4	100				
	T5	100				
S8	T1	98	1			
	T2	100				
	T3	100				
	T4	99	1			
	T5	100				
S9	T1	98	1	1		
	T2	97	2	1		
	T3	99	1			
	T4	100				
	T5	100				
S10	T1	100				
	T2	100				
	T3	100				
	T4	100				
	T5	100				
S11	T1	100				

Tablo 4'ün devamı						
Olgu no	Kan örnekleri	Sınıf 0	Sınıf 1	Sınıf 2	Sınıf 3	Sınıf 4
	T2	99	1			
	T3	99	1			
	T4	100				
	T5	100				
S12	T1	98	2			
	T2	99	1			
	T3	100				
	T4	99	1			
	T5	100				
S13	T1	100				
	T2	100				
	T3	98	2			
	T4	100				
	T5	99	1			

S: Sevofluran

Tablo 5. Sevofluran grubunda T1, T2, T3, T4, T5. zamanlarda alınan kan örneklerinde % kuyruk faktörü değerleri					
Olgu no/zamana göre kan örnekleri	T1	T2	T3	T4	T5
S1	2,5	2,5	2,6	2,5	2,5
S2	3,22	2,72	3	2,5	2,5
S3	2,5	2,5	2,6	2,5	2,5
S4	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
S5	2,5	2,57	2,6	2,5	2,5
S6	2,5	2,5	2,6	2,5	2,7
S7	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
S8	2,7	2,5	2,5	2,6	2,5
S9	2,9	2,97	2,6	2,5	2,5
S10	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
S11	2,5	2,6	2,5	2,5	2,5
S12	2,7	2,6	2,5	2,6	2,5
S13	2,5	2,5	2,7	2,5	2,6

S: Sevofluran

Tablo 6. Sevofluran grubu T1, T2, T3, T4. zamanlarda kan örnekleri % kuyruk faktörü ortalamadeğerleri, standart sapma ortalamadeğerleri			
Sevofluran grup	n	Ortalama	Standart sapma
1	13	2,6169	0,21998
2	13	2,5738	0,13641
3	13	2,5923	0,13821
4	13	2,5154	0,03755

saat analizinde ortalama $2,50\pm 0,02$ değeri bulundu ve 60 ve 120. dakikalarda alınan kan örnekleri kuyruk faktörü seviyelerinde olduğu kaydedildi. Beşinci gün analiz ortalamasında ise yüzde kuyruk faktörü $2,52\pm 0,04$ bulundu. Sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu. Grup D hastalarından alınan kan örnekleri sonuçları karşılaştırıldığında, sınıf 0'a ait lenfositlerin çoğunlukta olduğu, az da olsa Comet formasyonu görüldüğü, fakat % kuyruk faktörü değerleri arasında kontrol grubu değerleriyle karşılaştırıldığında ilerleyen zaman dilimlerinde belirgin fark olmadığı, hatta aynı kaldığı tespit edildi.

Grup S incelendiğinde; bu grupta yaş ortalaması 5,5 yıl, ortalama anestezi süresi 162,3 dakika, ortalama vücut ağırlığı 27,3 kg ve cinsiyet dağılımı sekiz erkek, beş kız şeklinde kaydedildi. Grup S hastalarında kan örneklerinde lenfosit sayısı ve sınıflandırılmaları Tablo 4'te görülmektedir. Bu grupta lenfositlerin çoğunun 0 sınıfına ait olduğu tespit edilmiştir. Grup S hastalarında lenfositler sınıflandırıldıktan sonra % kuyruk faktörleri hesaplanmıştır (Tablo 5). Grup S hastalarında hesaplanan % kuyruk faktörü ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 6'da görülmektedir.

Anestezilerinde sevofluran kullanılan hastaların yüzde kuyruk faktörü ortalama değeri $2,61\pm 0,21$ olarak bulundu. Altmışıncı dakika incelemelerinde ise bu değer ortalaması $2,57\pm 0,13$ olarak kaydedildi. Yüz yirminci dakikada ise $2,59\pm 0,13$ bulundu ve bazal ortalama değere göre minimal düşük, 60. dakika değerine göre minimal yüksek olduğu görüldü. Yirmi dördüncü saat kan örneğinde $2,51\pm 0,03$, 5. gün kan örneğinde ise $2,52\pm 0,05$ ortalama değerleri tespit edildi. Bazal kan örnekleri ortalama değerine göre 60. ve 120. dakika kan örnekleri ortalamaları daha düşük sonuçlar gösterdi.

Grup S hastalarından alınan kan örnekleri sonuçları karşılaştırıldığında, sınıf 0'a ait lenfositlerin çoğunlukta olduğu az da olsa Comet formasyonu görüldüğü fakat % kuyruk faktörü değerleri arasında kontrol grubu değerleriyle karşılaştırıldığında ilerleyen zaman dilimlerinde belirgin fark olmadığı, hatta aynı kaldığı tespit edildi. Grup S ve Grup D birlikte incelenip değerlendirildiğinde lenfositlerin zamanlara göre % kuyruk faktörleri ortalamaları Tablo 7'de görülmektedir. Grupların sadece başlangıç değerleri kıyaslandığında anlamlı fark bulunmadı ($p=0,41$).

Gruplar arası karşılaştırmalarda kontrol değerleri ve diğer zamanlarda alınan kan örneklerinde % kuyruk faktörleri değerleri arasında istatistiksel olarak belirgin bir fark saptanmadı.

Her grubun kendi içinde zamana göre kıyaslanması yapıldığında anlamlı fark kaydedilmemiştir.

Tartışma

İnhalasyon anesteziğinin mutajenite ve karsinojenitesi ile ilgili araştırmalar 1970'li yılların ikinci yarısından sonra hız kazanmıştır. Anesteziğ gazlara maruziyetin kromozomal değişikliklere neden olduğunu gösteren *in vivo* ve *in vitro* pek çok çalışma yapılmıştır (5-7). Çoğundan elde edilen güncel veriler anesteziğ gazların genotoksisite potansiyeli taşıdığı yönündedir. Birçok ulusal sağlık otoritesi ameliyathane ortamında maksimum gaz oranının azotprotoksit için 25 ppm, halojenize inhalasyon ajanları için 2 ppm ile sınırlandırılması önerisinde bulunmaktadır (7). Comet Assay yöntemi çabuk, basit ve ucuz, bir görsel tekniktir. Bu yöntemle DNA hasarı ve tamiri ile ilgili biyomonitörizasyon ve genotoksisite çalışmaları yapmak mümkündür. Bu teknik fibroblast ve epitel gibi çeşitli somatik hücrelerde de uygulanabilir. Gerçekten de, önceleri daha az gelişmiş tekniklerle yapılmış çalışmalarda, inhalasyon ajanlarının genotoksik özellikleri saptanamazken, bu teknik ile DNA hasarı daha net ve belirgin olarak tespit edilebilmiştir. Bu tekniğin hassasiyeti; DNA'nın tek kolundaki hasarı bile gösterebilmesinden kaynaklanmaktadır. Çalışmalarda farklı sonuçlar alınmasının bir diğer nedeni maruz kalan gazların konsantrasyonu ve sürelerinin değişik oluşudur (8). Hoerauf ve ark. (8) *in vitro* bir çalışma ile sağlıklı sigara içmeyen erkeklerden aldıkları lenfositleri isoflurane ve azotprotoksitde maruz bırakmışlar ve genetik hasarlanma meydana geldiğini göstermişlerdir. Ancak ekspozisyon sürelerinin uzun olduğunu ve bu sonucun kısa süreli işlemlerde klinik konsantrasyonlarda bu gazlara maruz kalan hastalar için aynı olmayabileceğini vurgulamaktadırlar. Yapılan araştırmalarda sigara içen bireylerde oluşan DNA hasarı içmeyenlere göre yüksek bulunmuştur (9-11). Husum ve ark. (12), ortopedik girişim yapılacak 30 hastaya (yaş ortalaması 29,5) isoflurane azotprotoksit karışımı uygulamışlar (ortalama süre 64 dk) ve anestezi öncesi, sonrası ve ertesi gün olmak üzere üç kan örneğinde KKD frekansında fark bulamamışlardır. Aynı çalışmada sigara içenlerde, ertesi gün bulunan KKD hızı, anestezi öncesine göre farklı bulunmuştur. Husum ve ark. (13) sigaranın tek başına DNA hasarını arttıran bir etken olarak ortaya çıktığını belirtmişlerdir.

Sardas ve ark. (11), ortalama 133 dk isofluran anesteziği verilen, sigara içmeyen 22-66 yaş arası 12 hastanın, Comet Assay tekniği ile DNA hasarına bakmışlardır. Anesteziğden önce, anesteziğnin 60. dakikasınca, 120. dakikasınca,

birinci, üçüncü ve beşinci günlerde kan örnekleri almışlar, anesteziğden önceki Comet sonuçlarının, sağlıklı kontrol grubundan farksız olduğunu, kuyruklu yıldız görünümü hücre sayısının, anesteziğnin 60. dakikasınca anlamlı olarak arttığını, 120. dakikasınca da en yüksek değerine ulaştığını; artmış olan Comet görünümü hücre ortalama değerlerinin birinci ve üçüncü gün azalmaya başladığını, beşinci gün değerlerinin ise anesteziğ öncesi değerlerden istatistiksel olarak farksız olduğunu tespit etmişlerdir. Sonuç olarak bu araştırmacılar Comet yönteminin isoflurane ile anesteziğ idamesi yapılan hastaların periferik kan lenfositlerinde DNA onarımı başlamadan önce genotoksik etki gösterdiğine karar vermişlerdir. Sardas ve ark. (9) diğer bir çalışmalarda, Comet yöntemi ile anesteziğ gazlara maruz kalan ameliyathane personeline DNA hasarını incelemişler; çalışmaya 66 ameliyathane çalışanını (25 doktor, 29 teknisyen, 12 hemşire) ve 41 sağlıklı, gazlara maruz kalmayan kontrol grubu olarak bireyi dahil etmişlerdir. Ameliyathanede çalışma süreleri 1-17 yıl arasında değişen çalışma grubunda comet hücre frekansında oldukça anlamlı bir artış saptanmıştır.

Karabiyik ve ark. (14) 24 erişkin hastanın (20-66 yaş arası) dahil edildiği bir çalışma yapmışlar, sevofluran ve isofluran anesteziğlerinin kullanımı (115-162 dk) sonrası oluşan genotoksik hasarı Comet Assay yöntemiyle göstermişlerdir. Sonuçlar karşılaştırılınca her iki ajanın da benzer etkileri olduğunu, 60. ve 120. dakikada alınan kan örnekleri sonuçlarında Comet formasyonu olduğunu, üçüncü günde azaldığını ve postoperatif beşinci günde DNA tamirinin tamamen tamamlandığını göstermişlerdir. Sevofluranın olası genotoksik etkisi Szyfter ve ark. (15) tarafından *in vitro* ve *in vivo* olarak Comet Assay yöntemiyle araştırılmış, *in vitro* çalışmada periferik lenfositlerde DNA hasarı gözlenmemiştir. Kronik ekspozisyona bağlı genotoksisiteyi araştırmak üzere yaş ortalaması 36,1 olan 29 ameliyathane personeli kan örneklerini 20 sağlıklı, anesteziğ maddelere maruz kalmayan bireyin kan örnekleriyle karşılaştırmışlar; Comet yöntemi sonuçlarına göre her iki grupta anlamlı fark bulunmamış, yani sevofluranın *in vivo* ve *in vitro* genotoksik etkisi olmadığını göstermişlerdir. Çocuklardaki tek çalışma Krause ve ark. (16) tarafından yapılmıştır. Küçük cerrahi girişim (süre: 49,6 dk) geçiren yaşları 1-14 arasında değişen (ortalama 5,4) 40 çocukta sevofluranın genotoksik etkisini KKD yöntemiyle araştırmışlar ve T lenfositlerde hasar meydana gelmediğini göstermişlerdir. Desfluran

Tablo 7. Desfluran ve sevofluran gurubu % kuyruk faktörü ortalama değerlerinin farklı zamanlarda karşılaştırılması

Grup/kan örnekleri	T1	T2	T3	T4	T5
D	2,56±0,10	2,64±0,20	2,52±0,05	2,50±0,02	2,52±0,04
S	2,61±0,21	2,57±0,13	2,59±0,13	2,51±0,03	2,52±0,05

S: Sevofluran, D: Desfluran

üzerinde yapılan çalışmalarda ise Karpinski ve ark. (17) bu anestezi maddenin insan lenfositlerini hasarlayıcı etkisini in vitro olarak Comet Assay tekniğiyle göstermişlerdir. Akin ve ark. (18) elektif cerrahi müdahale planlanan 26-54 yaş arası 15 erişkine uyguladıkları desfluran anestezisinden sonra 60 ve 120. dakikalarda yüksek düzeyde KKD saptamalarına rağmen bu durumun ameliyat sonrası birinci günden itibaren azalarak 12. günde tamamen ortadan kaybolarak geri dönüşümlü bir etki olduğunu göstermişlerdir. İnhalasyon anesteziğlerinin genotoksik etkileri hakkında daha önce yapılan in vivo çalışmaların genellikle erişkin hastalar ve ameliyathane personeli üzerinde oldukları görülmektedir (19). Çocuklar üzerinde yapılan çalışmalar azdır ve literatürde sadece Krause ve ark. (16) kısa girişimlerde sevofluranın genotoksik etkisini KKD yöntemiyle periferik lenfositleri araştırdıkları tek bir yayına rastlanmıştır. Bu çalışmada indüksiyon sevofluran ile idame sevofluran ve azotprotoksid/oksijen (%33/67) ile sağlanmıştır. Araştırmacılar ortalama anestezi süresi 49,6 dakika ardından aldıkları kanı indüksiyon öncesi kan ile karşılaştırmışlar ve her ikisi arasında fark bulamamışlardır.

Desfluranın genotoksik etkileri de in vitro ve KKD yöntemiyle araştırılmış fakat in vivo olarak Comet Assay yöntemiyle yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca, desfluran ve sevofluranın olası genotoksik etkileri daha önce hiçbir çalışmada karşılaştırılmamıştır. Biz, çalışmamızda pediatrik cerrahi anestezisinde sıkça kullanılan sevofluran ve desfluranın genotoksik etkilerini anestezi süresi en az 120 dakika olan (ortalama 152,6 dk) çocuk hasta popülasyonunda (yaş ortalaması 5,5) Comet Assay yöntemiyle araştırdık. Olası mutajen durumları ekarte etmek amacıyla, daha önce genotoksitesini kanıtlanmış olan, sigara içilen ortamlarda bulunan, sistemik kronik hastalığı olan, genetik hastalığı olan, kemoterapötik ilaç kullanan, radyasyona maruz kalmış ve peroperatif kan tranfüzyonu yapılan hastaları çalışma kapsamına almadık. Anestezi idamesinde mutajenik etkisi olmadığı kanıtlanmış intravenöz ilaçlar kullandık. Mutajenite oluşturma potansiyelinin maruz kalma süresiyle ilişkili olduğu söylenen azotprotoksidi kullanmadık. Rastgele gruplandığımız 26 çocuktan anestezi indüksiyonundan önce aldığımız 3 mL periferik venöz kanı Comet Assay analizlerini kontrol grubu olarak kabul ettik. İnhalasyon anesteziğleri ile daha önceden yapılan KKD ve Comet testlerinde operasyonun 120. dakikasında genotoksik etkilerin en yüksek düzeye ulaştığı, bazı çalışmalarda beş günde, bazı çalışmalarda 12 günde operasyon öncesi değerlere döndüğü gösterilmiştir. Bu nedenle birinci ve beşinci günü örnekler için bu zaman birimleri referans alınmıştır (9,11,14). Anestezi başlangıcından 1-2 saat sonra ve anestezi sonrası birinci gün ve beşinci günde alınan kan örneklerini aynı yöntemle inceledik. Periferik

lenfositleri görsel olarak sınıflandırdık ve sayısal objektif bir değer olan kuyruk faktörü % değerlerini hesapladık. Birçok çalışmada Comet Assay yöntemi kullanıldığında sadece kuyruk uzunluğu değerlendirilmesi subjektif olarak görsel uzunluk sınıflaması (kuyruksuz, kısa, uzun kuyruk) şeklinde yapılmıştır. Oysa bizim çalışmamızda Comet sınıflaması yapılmış ve sonrasında kuyruk yoğunluğu, oluşturulmuş formülle sabiteler kullanılarak daha objektif biçimde yorumlanmıştır. Sonuçları karşılaştırdığımızda S grubu ve D grubunda çeşitli zamanlarda anlamlı bir fark görülmezken, gruplar arası değerler de benzer bulundu. Yani, bu çalışmanın sonucunda, standart bir anestezi süresi boyunca sevofluran ve desfluran anestezisi uygulanan çocuk hasta gruplarının lenfositlerinde çekirdek yapının etkilenmeyerek hasarlanmadığı gösterildi.

Erişkinlerde sigara içimi veya uzun süre içilen ortamlarda bulunulması ekarte edilemediği için literatürde farklı sonuçlar elde edilmesi olası gibi görülmektedir (20). Oysa bizim hastalarımızın çocuk oluşu ve sigara içilmeyen ailelerden seçilmesi bu faktörü ekarte ettirmektedir. Ayrıca çocuk yaş grubu çevrenin kötü etkilerine maruz kalmamış veya henüz az etkilenmiş bir gruptur. Dolayısı ile anestezi ajanlarının etkilerinin bizim çalışmamızda daha izole ve daha objektif sonuca ulaştığı düşünülebilir. Nitekim Krause ve ark. (20) da çocuk yaş grubunda sevofluranın genotoksik etkisinin olmadığını ortaya koymuştur. DNA hasarını ortaya koymada çevre faktörlerinin ekarte edilmesi son derece önemlidir.

Sonuç

Çalışmamızda, pediatrik anestezide sıkça kullanılan sevofluran ve desfluranın en az 2 saat süren ameliyatlarda, Comet Assay yöntemine göre genotoksitesine yönünden güvenilir olduğu gösterilmiştir.

Etik

Etik Kurul Onayı: Çalışma için İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi, Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır. Onay no: 11880. Hasta Onayı: Çalışmamıza dahil edilen tüm hastalardan bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu ve editörler kurulu dışındaki kişilerce değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Anestezi Uygulama: Yeşim Işıkçı, Ayşe Çiğdem Tütüncü. Konsept: Güner Kaya, Yeşim Işıkçı. Dizayn: Güner Kaya, Yeşim Işıkçı. Veri Toplama veya İşleme: Yeşim Işıkçı. Analiz veya Yorumlama: Güner Kaya, Fatih Altındaş. Literatür Arama: Pınar Kendigelen, Serpil Çakmakkaya. Yazan: Güner Kaya, Yeşim Işıkçı, Ayşe Çiğdem Tütüncü.

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu makale ile ilgili olarak herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

Finansal Destek: Çalışmamız İÜ BAP (proje no:1479) tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Basler A, Rohrborn G. Lack of mutagenic effects of halothane in mammals in vivo. *Anesthesiology* 1981;55:143-7.
2. Natarajan D, Santhiya ST. Cytogenetic damage in operation theatre personnel. *Anaesthesia* 1990;45:574-7.
3. Hoerauf KH, Schrogendorfer KF, Wiesner G, et al. Sister chromatid exchange in human lymphocytes exposed to isoflurane and nitrous oxide in vitro. *Br J Anaesth* 1999;82:268-70.
4. Husum B, Wulf HC, Niebuhr E. Monitoring of sister chromatid exchanges in lymphocytes of nurse-anesthetists. *Anesthesiology* 1985;62:475-9.
5. Anderson D, Dewdney RS, Jenkinson PC, et al. Sister chromatid exchange (SCE) analysis in 106 control individuals. *Prog Clin Biol Res* 1986;207:39-58.
6. Diem E, Ivancsits S, Rudiger HW. Basal levels of DNA strand breaks in human leukocytes determined by comet assay. *J Toxicol Environ Health A* 2002;65:641-8.
7. Munday İT, Stoddart PA, Jones RM, et al. Urine osmolality during fluid deprivation following 9 MAC hours of anesthesia with enflurane or sevoflurane. *Anesthesiology* 1994;81:363.
8. Hoerauf KH, Schrogendorfer KF, Wiesner G, et al. Sister chromatid exchange in human lymphocytes exposed to isoflurane and nitrous oxide in vitro. *Br J Anaesth* 1999;82:268-70.
9. Sardas S, Aygun N, Gamli M, et al. Use of alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) to detect DNA damages in lymphocytes of operating room personnel occupationally exposed to anaesthetic gases. *Mutat Res* 1998;418:93-100.
10. Anderson D, Yu TW, Phillips BJ, et al. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat Res* 1994;307:261-71.
11. Sardas S, Karabiyik L, Aygun N, et al. DNA damage evaluated by the alkaline comet assay in lymphocytes of humans anaesthetized with isoflurane. *Mutat Res* 1998;418:1-6.
12. Husum B, Wulf HC, Niebuhr E, et al. Sister chromatid exchanges in lymphocytes of humans anaesthetized with isoflurane. *Br J Anaesth* 1984;56:559-64.
13. Husum B, Valentin N, Wulf HC, et al. Sister chromatid exchanges in cigarette smokers: effects of halothane, isoflurane or subarachnoid blockade. *Br J Anaesth* 1985;57:1100-3.
14. Karabiyik L, Sardas S, Polat U, et al. Comparison of genotoxicity of sevoflurane and isoflurane in human lymphocytes studied in vivo using the comet assay. *Mutat Res* 2001;492:99-107.
15. Szyfter K, Szulc R, Mikstacki A, et al. Genotoxicity of inhalation anaesthetics: DNA lesions generated by sevoflurane in vitro and in vivo. *J Appl Genet* 2004;45:369-74.
16. Krause T, Scholz J, Jansen L, et al. Sevoflurane anaesthesia does not induce the formation of sister chromatid exchanges in peripheral blood lymphocytes of children. *Br J Anaesth* 2003;90:233-5.
17. Karpinski TM, Kostrzewska-Poczekaj M, Stachecki I, et al. Genotoxicity of the volatile anaesthetic desflurane in human lymphocytes in vitro, established by comet assay. *J Appl Genet* 2005;46:319-24.
18. Akin A, Ugur F, Ozkul Y, et al. Desflurane anaesthesia increases sister chromatid exchanges in human lymphocytes. *Acta Anaesthesiol Scand* 2005;49:1559-61.
19. de Araujo TK, dS-GR, Barra Bisinotto FM, et al. Genotoxic effects of anesthetics in operating room personnel evaluated by micronucleus test. *J of Anesth and Clin Scien* 2013;26:1-6.
20. Krause T, Scholz J, Jansen L, et al. Sevoflurane anaesthesia does not induce the formation of sister chromatid exchanges in peripheral blood lymphocytes of children. *Br J Anaesth* 2003;90:233-5.