

Araştırma

Sevofluran ve İzofluranın Sağlıklı Rat Akciğeri Üzerine İnflamatuar Etkilerinin İncelenmesi †

Fatma ACİL*^{ORCID}, Cem Kıvılcım KAÇAR*^{ORCID}, Osman UZUNDERE*^{ORCID}, Sedat KAYA*^{ORCID},
Abdulkadir YEKTAŞ*^{ORCID}

ÖZ

Amaç: Çalışmamızda, izofluran ve sevofluranın sağlıklı rat akciğerindeki inflammatuar etkilerini incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Yirmi bir adet rat rastgele 3 gruba ayrıldı. Kontrol Grubu (n=6); %50 oksijen + %50 hava; İzofluran Grubu (n=7) % 1.2 İzofluran + %50 oksijen + %50 hava, Sevofluran Grubu (n=6) % 2.5 Sevofluran + %50 oksijen + %50 hava ile 2 saat mekanik ventilatör ile solutuldu. Grupların MPO aktiviteleri, TBARS düzeyleri, alveoler makrofaj sayıları ve alveoler epiteliyal apoptotik hücre sayıları istatistiksel olarak değerlendirildi. $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular: Sevofluran Grubunda, Kontrol ve İzofluran Grubuna göre MPO aktivitesi ve TBARS düzeyi anlamlı derecede düşük saptandı. İzofluran Grubunda, Kontrol ve Sevofluran Grubuna göre alveoler makrofaj sayısı ve M-30 pozitif hücre sayısı anlamlı yüksek, Sevofluran Grubunda ise Kontrol Grubuna göre anlamlı yüksek olarak saptandı. Işık mikroskopik incelemede Sevofluran grubu ve daha fazla olmak üzere İzofluran Grubunda yaygın mononükleer hücre infiltrasyonu, diffüz alveoler hasar, alveoler ödem, alveoler septumalarda kalınlaşma, alveol lümeninde yoğun alveoler makrofaj ve daha az miktarda nötrofil ve tip II pnömositler gözlemlendi.

Sonuç: Bu çalışmanın sonuçları bize, sevofluranın sağlıklı rat akciğeri üzerine inflammatuar etkisinin izoflurana göre daha az olduğunu düşündürdü.

Anahtar kelimeler: izofluran, sevofluran, akciğer hasarı, apoptozis, genel anestezi

ABSTRACT

Analysis of the Inflammatory Effects of Sevoflurane and Isoflurane on Healthy Rat Lung

Objective: We aimed to investigate inflammatory effects of isoflurane and sevoflurane on healthy rat.

Material and Method: Twenty-one rats were randomly allocated into three groups. The rats were mechanically ventilated for 2 hours with 50 % oxygen + 50% air mixture in the Control (n=7); with 1.2% isoflurane + 50 % oxygen + 50 % air mixture in Isoflurane group (n=7) and with 2.4% sevoflurane + 50% oxygen + 50% air mixture in Sevoflurane Group (n=7). The MPO activities, TBARS levels, alveolar macrophage counts and alveolar epithelial apoptotic cell counts of the groups were evaluated statistically. $P<0.05$ was accepted as the level of significance.

Results: MPO activity, and TBARS levels in Sevoflurane group were significantly lower compared to Isoflurane and Control groups. Number of alveolar macrophage and M-30 positive cells in Isoflurane group were significantly higher compared to Sevoflurane and Control groups. On light microscopic examination sevoflurane group and any more in isoflurane group were; diffuse mononuclear cell infiltration, diffuse alveolar injury, alveolar edema, thickening of alveolar septa, diffuse alveolar macrophages and lesser number of neutrophil and type II pneumocytes were observed in alveolar lumen in the Sevoflurane, and more frequently in Isoflurane group.

Conclusion: According to the results of this study, it has been thought that sevoflurane has milder inflammatory effect on healthy lung than isoflurane.

Keywords: isoflurane, sevoflurane, lung injury, apoptosis, general anesthesia

*TC. Sağlık Bakanlığı Üniversitesi Diyarbakır Gazi Yaşargil Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Yazışma adresi: Uzm. Dr. Cem Kıvılcım Kaçar, Diclekent Mah. 616/1 Sok. Arya Yapı İçkapı No: 6 Kayapınar 21070 Diyarbakır
e-mail: cem.kacar@hotmail.com

ORCID-ID: orcid.org/0000-0002-0015-948X

Alındığı tarih: 06.12.2017

Kabul tarihi: 07.05.2018

†Bu makale 2008 de Ankara'da Ulusal Yoğun Bakım Kongresi'nde sunulmuştur.

GİRİŞ

Klinik pratikte volatil anesteziklerin uygulanmasından sonra pulmoner problemlerin görülmesi, volatil anesteziklerin akciğer fonksiyonlarına etkisine ve akciğerde volatil anesteziklerin alımı ve eliminasyonuna olan merakı artırmıştır ^[1].

Volatil anesteziklerin akciğerlerde proinflamatuvar sitokin gen ekspresyonunu ve makrofaj agregasyonunu artırarak inflamatuvar yanıtı yol açtığı gösterilmiştir. Klinik önemi olup olmadığı bilinmemektedir ancak volatil anesteziklerin önceden inflamatuvar akciğer hastalığı veya hasarı olanlarda klinik tabloyu alevlendirebileceği görüşü mevcuttur ^[2].

Bazı çalışmalarda, volatil anesteziklerin akciğer dokusu üzerine koruyucu etki oluşturduğu da gösterilmiştir. Liu ve ark. ^[3] rat modelinde yaptıkları çalışmada 1 MAK değerinde izofluran uygulanmasının iskemi reperfüzyon modelinde akciğer hasarlanmasında rol oynayan tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), nitrik oksit (NO) ve laktit dehidrogenaz (LDH) sentezini azalttığını saptamışlardır. Bunun sonucunda da alveoler interstisyel ödemi azalttığını göstermişlerdir.

Anestetiklerin immun sistem üzerine etkisi tam olarak tanımlanamamıştır. Anestetiklerin hem spesifik hem de nonspesifik olarak immun yanıtı baskılandığı gösterilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalar gaz anesteziklerin farklı immunomodülatör etkisi olduğunu göstermiştir ^[4].

Yoğun inflamasyon apoptotik hücre ölümüyle ilişkilendirilmiştir ^[5-11]. Apoptozis, süregelen bir hücre intiharı olup, mekanizması tüm hücre nükleuslarındaki kromozomlarda şifrenlenmiştir ^[12]. Pulmoner hücre ölümüne yol açan kesin mekanizmalar bilinmemekle birlikte, apoptozun bu hücre ölümünde önemli bir rol oynaması olasıdır ^[13].

Çalışmamızda, izofluran ve sevofluranın sağlıklı rat akciğeri üzerine inflamatuvar etkilerini incelenmeyi amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Denepleri Etik Kurulu'ndan onay alınarak

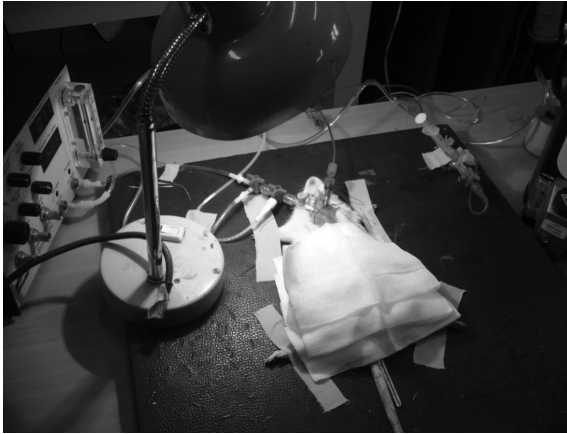
ve Helsinki Bildirisi'ndeki hayvan çalışması etik kurallarına uyularak GATA Araştırma ve Geliştirme Başkanlığı ve Fizyoloji BD bünyesindeki laboratuvarında gerçekleştirildi.

Çalışmada, vücut ağırlıkları 200-250 gr. arasında değişen 21 adet Wistar Albino tipi erişkin erkek rat kullanıldı. Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisipliner Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'ndan sağlanan deneklerin standart rat yemi ve su ile beslenmeleri sağlandı. 12 saatlik gündüz-gece siklusu uygulanarak tel kafeslerde yaşatıldılar. Çalışmadan 12 saat önce sadece su içmeleri sağlandı. Benzer çalışmalar gözetilerek gruplar 7'şerli 3 gruba randomize olarak ayrıldı ^[9,10,11,14,15].

Ratlar çalışma süresince ameliyat masasında supin pozisyonda ekstremiteleri sabitlenmiş olarak tutuldu. Deneklere 75 mg/kg ketamin (Ketalar[®], Pfizer Pharma GmbH, Germany) ve 10 mg/kg xylazine hidroklorid (Alfazyne[®], %2, Alfasan International, 3440 AB, Woerden, Holland) intraperitoneal olarak uygulanarak anestezi sağlandı. Çalışma süresince, hareketlilik ve spontan solunumun gelişmesi hâlinde deneklerin hareketsizliğini sağlamak için aynı anestezi dozları tekrarlandı.

İntraperitoneal anestezi sonrası %1 lidokain ile lokal anestezi uygulanarak cerrahi olarak 16 gauge intravenöz polietilen kanül (Mediflon[®], Eastern Medikit LTD, Gurgaon, India) ile trakeostomi açıldı. Trakeostomiye takiben sol ana karotid artere, heparinli serum fizyolojik (100 Ü/mL) içeren 26 gauge kateter yerleştirilerek (Mediflon[®], Eastern Medikit LTD, Gurgaon, India) invaziv arteriyel monitorizasyon sağlandı.

FiO₂ 0.40, Solunum sayısı 60/dk., 3 mL tidal volüm ve 0 PEEP ile arteriyel kan karbondioksit parsiyel basıncı (PaCO₂) 36-42 mmHg olacak şekilde rodent ventilatörü (Kent Scientific, 325 Norfolk Rd, Litchfield CT, USA) ile mekanik ventilasyon uygulandı (Resim 1). Ventilatör parametrelerinde değişiklik yapılması halinde değişiklikten 20 dk. sonra arteriyel kan gazları örneği alındı. İki saat süreyle volatil anesteziklerle ventile edilen ratlar, gruplarına göre belirlenen volatil anestezi ile solutuldu. End-tidal volatil anestezi konsantrasyonu monitörize edildi (Anesthesia Gas Monitoring 1304, Bruel and Kjaer, Naerum, Denmark). ET-Volatil anestezi monitorizasyonu ratlara 1 MAC



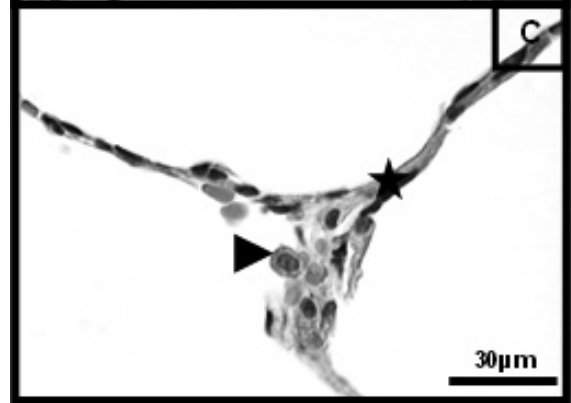
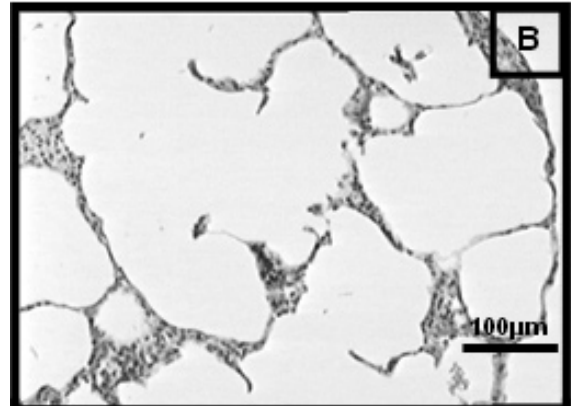
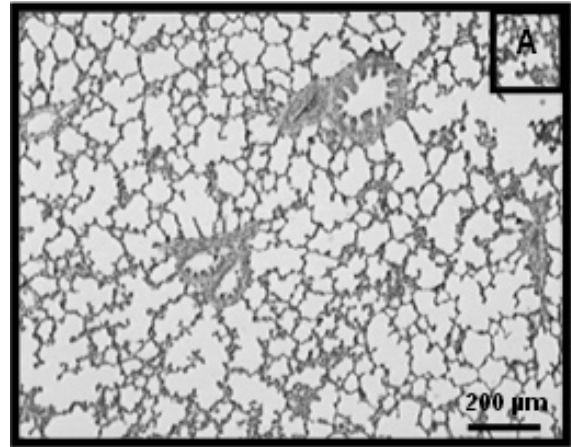
Resim 1. Mekanik ventilatör ile inhalasyon anestezisi uygulaması.

değerinde uygulanan isofluran (MAC=%1.2) ve sevofluran (MAC=%2) MAC değerleri ET-Volatil anestezik cihazında okunan isofluran ve sevofluran değerleri 1MAC değerine eşitleninceye kadar bekledi [16].

Deneklerin vücut sıcaklığının ısıtıcı lamba veya ıslak gazlı bezlerle ile 35-41°C arasında olması sağlanarak rektal termometre ile takip edildi. Mekanik ventilatöre bağlandıktan ve arter kanülasyonundan sonra geçen 20 dk.'lık stabilizasyon sürecinin ardından arteriyel kan gazı analizleri yapıldı.

Çalışma dışı bırakılma kriterleri:

1. Solunum sayısı PaCO₂ değeri 26-54 mmHg aralığında kalacak şekilde ayarlandı. PaCO₂ değerleri bu aralıkta tutulamayan ratlar çalışma dışı bırakıldı.
2. FiO₂ değeri %40 iken, PaO₂ değeri 12-58 mmHg aralığında tutulmaya çalışıldı ve tutulamazsa çalışma dışı bırakıldı.
3. Hiçbir ratta PEEP uygulanmadı. Ventilatör ayarlarının hiçbir ratta değiştirilmesine gerek kalmadı. Tidal volümü arttırmak gerektiğinde, PEEP açmak gerektiğinde, solunum sayısını arttırmak gerektiğinde FiO₂'yi arttırmak gerektiğinde ratlar çalışma dışı bırakıldı.
4. Tansiyon arteriyel değeri başlangıç değerinin %20'si azaldığı veya arttığında.
5. Arter-ven kanülasyonları ve trakeostomi sırasında aşırı kanama olup, sıvı replasmanı gerektiğinde
6. Volatil anestezikle solutma esnasında 1 MAC değerini geçince veya 1 MAC altına inince.
7. Ratların vucut ısıları 35 ve 41°C aralığında tutulmadığında.



Resim 2. Grup K'da farklı büyütmelerdeki ışık mikroskopik görüntüleri: H&E; (▲) alveoler makrofajları, (*) interalveoler septumu göstermektedir.

A: x 4, B: x 10, C: x 40

8. Ratlar bu süreçler sırasında arrest olduğunda çalışma dışı bırakıldı.
9. EKG, arteriyel kan basıncı (84-134/60-68 mmHg) ve kalp atım hızı (250-500/dk.) rat fizyolojisine uygun değer aralığında tutuldu ve müdahale gerektiğinde rat çalışma dışı bırakıldı [17].

Tüm ratların akciğerleri sağlıklı idi. Çalışmaya dahil ettiğimiz ratlar fiziksel olarak sağlıklı olduğunu gözlemlediğimiz ratlardan oluşuyordu. Kan gazı hedeflerimizi PH 7.25-7.58, PaCO₂ 26-54 mmHg, PaO₂ 12-58 mmHg, metabolik asidozu veya alkalozu olmayacak şekilde ve Stewart'a göre elektrolitleri Na(142-163), Cl (104-126) alkaloz veya asidoza neden olmadan, anyon açığı oluşmadan, hemoglobin ve hematokrit (%32-%40.2) değerleri düşmeden AKG değerlerini sürdürmek hedeflendi [18].

Uygulanan volatil anestezi çeşitine göre ratlar 3 gruba ayrıldı:

Grup Kontrol (Grup K) (n=6): %50 O₂ + %50 havayla solutuldu.

Grup İzofluran (Grup İ) (n=6): %1,2 İzofluran (1 MAK) + %50 O₂ + %50 havayla solutuldu.

Grup Sevofluran (Grup S) (n=7): %2,4 Sevofluran (1 MAK) + %50 O₂ + %50 havayla solutuldu.

Ratlar, işlem süresince EKG, arteriyel basınç transdüseri (MLT844 Physiological Pressure Transducer, Interlab LTD, İstanbul, Türkiye) yardımı ile arteriyel kan basıncı (sistolik/diyastolik, mmHg) ve kalp atım hızı (atım/dk.) (Petaş KMA 450, Petaş LTD, Ankara, Türkiye) monitörize edilerek 10 dk. aralıklarla kaydedildi. Başlangıç, 30. dk., 60. dk. ve 120. dk. verileri değerlendirilme alınıldı.

Çalışma süresinin sonunda, orta hattan sternotomi uygulandı. Sol ventriküle yerleştirilen iğne ile tüm ratların 3 mL fosfat tamponlu salin solüsyonu perfüze edilerek kalbi durduruldu. Ardından her 2 akciğer çıkarıldı. Sol akciğer biyokimyasal, sağ akciğer dokusu histopatolojik ve elektron mikroskopik değerlendirmeler için kullanıldı.

I. Biyokimyasal incelemeler

Biyokimyasal analizler grupları bilmeyen 2 adet biyokimya hekimi tarafından yapıldı.

a- Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) düzeyi ölçümü

Sol akciğerden 100 mg doku 900 µL %1.15'lik KCl

içinde homojenize edildi. 0.2 mL homojenat 0.2 mL sodyum dodesil sülfat (SDS), 1,5 mL asetik asit, 1,5 mL TBA reaktifleri ve 0.6 mL distile su ile 95 °C'de 60 dk. bekletildikten sonra soğutularak 1 mL distile su ve 5.0 mL n-butanol ile iyice çalkalanarak 3500 rpm'de santrifüje edildi. Üstte kalan organik faz 532 nm'de spektrofotometri (Pharmacia biotech, Ultrospec 2000, UV-Vis Spektrofotometre, Varian Cary 50 Bio, Australia) ile okundu. Sonuçlar µmol L⁻¹ olarak belirtildi.

b- Miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ölçümü

Sol akciğerden 200-400 mg'lık doku örneği alınarak buz üstünde çok küçük parçalara ayrılarak test tüpüne aktarıldı. 50 mM fosfat tampon pH 6,0 ile hazırlanan %0,5'lik heksadesiltrimetilammonium bromür (HTAB) çözeltisinden 1 mL konuldu. Homojenizatör 2 kez 1 mL HTAB ile yıkanarak ile toplam 3 kez 30 sn. süre ile buz üzerinde homojenize edildi. Toplanan homojenat (3 mL) 10 sn süre ile sonike edilerek 3 kez dondurulup çözüldü. 10.000 G'de (gravity) 10 dk santrifüj edildikten sonra homojenatta enzim aktivitesi ölçüldü. MPO aktivitesi ölçümü 460 nm'de spektrofotometrik (Pharmacia biotech, Ultrospec 2000 UV-Vis Spektrofotometre, Varian Cary 50 Bio, Australia) olarak yapıldı. Sonuçlar U/g yaş doku ağırlığı olarak belirtildi.

II- Histopatolojik Değerlendirme

Tüm histopatolojik analizler, grupları bilmeyen 2 histolog tarafından gerçekleştirildi. Elektron mikroskopik analizler için doku ayrıldı.

a- Hematoksilen-eosin ve İmmunhistokimyasal inceleme

Sağ akciğer dokuları alınarak %10'luk tamponlu formaldehite konuldu. 2 gün bekletildikten sonra rutin histolojik takip işlemlerinin ardından dokular parafine gömüldü. Mikrotom yardımıyla akciğer dokularından 5-6 µm kalınlığında kesitler alınarak örnekler lizinli lamlara yerleştirildi. Örnekler 24 saat 60°C etüvde bekletildikten sonra hematoksilen-eosin ve M-30 immünohistokimyasal yöntemlerle boyandı. M-30 immünreaktivitesinin gösterilmesi amacıyla rat spesifik anti-M30 antikoru (M-30 cytodeath PEVİVA AB, Broma, Sweden) kullanıldı. Lizinli kesitler anti-

M30 antikoru ile bir gece +4°C’de bekletildikten sonra biyotinlenmiş sekonder antikor ile 30 dk enkübe edildi. Sekonder antikor Vector Elite ABC kit (Vector Laboratories Inc. Burlingame, USA) ile bağlandıktan sonra antikor-biyotin-avidin-peroksidaz kompleksi %0.02’lik 3.3 diaminobenzidine (DAB) solüsyonu kullanılarak görünür hâle getirildi. Harris hematoksilen (Surgipath 01562Europe LTD, Cambridgreshire, USA) ile zemin boyaması yapıldıktan sonra kesitlerde görüntü analizleri yapıldı.

a.i- Alveoler Makrofaj Sayımı

Kesitler toluidin blue ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi (Olympus BH-2 Tokyo, Japan). Her kesitin alveoler ve kapiller alanındaki makrofaj sayısı randomize 10 sahada 40 kat büyütürek sayıldı (sayı/0.016 mm²).

a.ii- Apoptozisin Değerlendirilmesi

Sağ akciğer dokularından elde edilen 3’er seri kesitte apoptozis, M-30 (M-30 cytodeath PEVİVA AB, Broma, Sweden) immunhistokimyasal boyanması ile değerlendirildi. Kromatin yoğunlaşması, nükleer fragmantasyon, sitoplazmanın büzülmesi ve apoptotik cisimlerin oluşumu apoptotik hücrelerin temel özellikleri olarak kabul edilerek kesitler incelendi. Kesitlerdeki M-30 pozitif hücre sayısının belirlenmesi için birim alandaki M-30 pozitif hücre sayısı x 40’lık büyütmede sayıldı (Sayı/0.016 mm²). Apoptotik hücre sayısı ışık mikroskopunda M-30 pozitif hücre sayısı/0.016 mm² alan olarak hesaplandı.

a.iii- Görüntü Analiz Metodu

Boyama tamamlandıktan sonra kesitler ışık mikroskopunda (Olympus BH-2 Tokyo, Japan) incelendi ve görüntüler yüksek çözünürlüğe sahip kamera yardımıyla bilgisayara aktarıldı (JVC TK-890E, Japan) (Aver TV Studio Video Capture Version 4.21.0.0, Aver Media Technologies, Inc.). Bütün kesitler dijital olarak fotoğraflandı. Kesitlerden elde edilen görüntülerin incelenmesinde bilgisayarlı video kamera esaslı görüntü analiz yöntemi kullanıldı (UTHSC Image software). Tüm kesitler (her doku için en az 4 kesit) analiz edilerek, yalnızca boyamaya bağlı belirgin artefaktları olan kesitler değerlendirme dışı tutuldu.

b. Elektron mikroskopisi

Ratların akciğer dokuları küçük parçalara ayrılarak ve %2,5 glutaraldehitin 0.1 M sodyum cacodylate tamponu içinde 4 saat süreyle fiske edildi.

Dokular, %1 K₄Fe(CH)₆ (Potassium hexacyanoferrate) içinde %1 osmiyum tetrokside fikse edildi, derceli etanol ve propilen oksit konsantrasyonları ile kurutuldu, Epon812’ye gömüldü ve sonra bir ultra mikrotom ile kesitler alındı.

Uzunlamasına kesitler, uranil asetat ve kurşun nitratla boyandı ve bir H-600 elektron mikroskobu (Hitachi Limited, Japonya) ile görüntülenen bakır ızgaralara yerleştirilerek alveolerin ultrastrüktürel yapıları incelendi.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme için SPSS 16.00 for windows paket programı kullanıldı. Grupların MPO aktiviteleri, TBARS düzeyleri, alveoler makrofaj sayıları ve alveoler epiteliyal apoptotik hücre sayıları tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. İkili grup karşılaştırmaları ise post hoc testlerden Turkey testi ile yapıldı. p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Her grupta 7 rat çalışmaya alındı; Grup K ve Grup S’de birer rat deney aşamasında ölmeleri nedeniyle çalışma dışı bırakıldı, ölüm nedenleri Grup S’de volatıl anestezik verildikten sonraki bekleme süresinde 2. saatte hipotansif ve bradikardik arrest ve Grup K’da da yine aynı bekleme süresinde 15. dk.’da bradikardik ve hipotansif arrest gelişmesi sonucu oldu. Arrest olan bu ratlar dışında çalışma dışı bırakılan rat olmadı. Grup K ve Grup S’de altışar, Grup İ’de ise 7 rattan elde edilen veriler istatistiksel olarak analiz edildi.

I. Akciğer dokusu MPO aktiviteleri

Grup S’deki MPO aktivitesi Grup K’dakine göre anlamlı derecede düşük saptandı (p:0.041). Grup İ’deki MPO aktivitesi Grup K ve Grup S’dekine oranla anlamlı olarak yüksek saptandı (sırasıyla, p:0.001, p:0.001) (Tablo 1).

Tablo 1. Grupların akciğer dokusu miyeloperoksidaz aktivitesi (U/g yaş doku) (mean±SD).

Grup	Miyeloperoksidaz aktivitesi (U/g yaş doku)
Grup K (n=6)	5.04±2.12
Grup S (n=6)	3.70±1.89 #
Grup İ (n=7)	12.99±8.59*¥

p:0.041; Grup K ile karşılaştırıldığında

* p:0.001; Grup K ile karşılaştırıldığında

¥ p:0.001; Grup S ile karşılaştırıldığında

Tablo 3. Gruplardaki alveoler makrofaj sayıları (makrofaj sayısı/0.016 mm²) (mean±SD).

Grup	Alveoler makrofaj sayıları (makrofaj sayısı/ 0,016 mm ²)
Grup K (n=6)	2.50±1.20
Grup S (n=6)	5.90±3.40 #
Grup İ (n=7)	9.80±7.45 *¥

p:0.002; Grup K ile karşılaştırıldığında

* p:0.001; Grup K ile karşılaştırıldığında

¥ p:0.001; Grup S ile karşılaştırıldığında

II. Akciğer dokusu TBARS değerleri

Grup S'deki TBARS düzeyi, Grup K ve Grup İ ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olarak saptandı (sırasıyla, p:0.04, p:0.035) (Tablo 2).

III. Grupların kalp atım hızı (KAH), sistolik arteriyel kan basıncı (SAB), diyastolik arteriyel kan basıncı (DAB) değerleri

Grupların zaman içindeki KAH (atım/dk), SAB (mm Hg) ve DAB (mm Hg)'ın median (minimum, maksimum) değerleri arasında istatistiksel olarak bir fark saptanmamıştır.

IV. Alveoler makrofaj sayısı

Grup İ'deki alveoler makrofaj sayısı Grup K ve Grup S'dekine göre anlamlı derecede yüksek olarak saptandı (sırasıyla, p:0.001, p:0.001). Grup S'deki alveoler makrofaj sayısı da Grup K'dekine göre anlamlı derecede yüksek bulundu (p:0.002) (Tablo 3).

V. Alveoler Epitelial Apoptotik Hücre Sayısı

Grup İ'deki M-30 pozitif hücre sayısı/0.016 mm² alan Grup K ve Grup S'dekine oranla anlamlı olarak yüksek saptandı (sırasıyla, p:0.001, p:0.001). Grup

Tablo 2. Grupların akciğer dokusu thiobarbituric acid reactive substance düzeyleri (µmol/L) (mean±SD).

Grup	Thiobarbituric acid reactive substance düzeyleri (µmol/L)
Grup K (n=6)	3.63±2.24
Grup S (n=6)	2.07±1.38 # *
Grup İ (n=7)	4.37±3.11

p:0.041; Grup K ile karşılaştırıldığında

* p:0.035; Grup İ ile karşılaştırıldığında

Tablo 4. Grupların M-30 pozitif hücre sayısı/0.016 mm² alan (mean±SD).

Grup	M-30 pozitif hücre sayısı/0.016 mm ² alan
Grup K (n=6)	2.1±1.8
Grup S (n=6)	4.1±3.2 #
Grup İ (n=7)	6.4±4.7*¥

p:0.002; Grup K ile karşılaştırıldığında

* p:0.001; Grup K ile karşılaştırıldığında

¥ p:0.001; Grup S ile karşılaştırıldığında

S'deki apoptotik hücre sayısı da Grup K'dekine oranla yüksek olarak saptandı (p:0.002). Grupların apoptotik hücre sayıları aşağıdaki tabloda gösterilmektedir (Tablo 4).

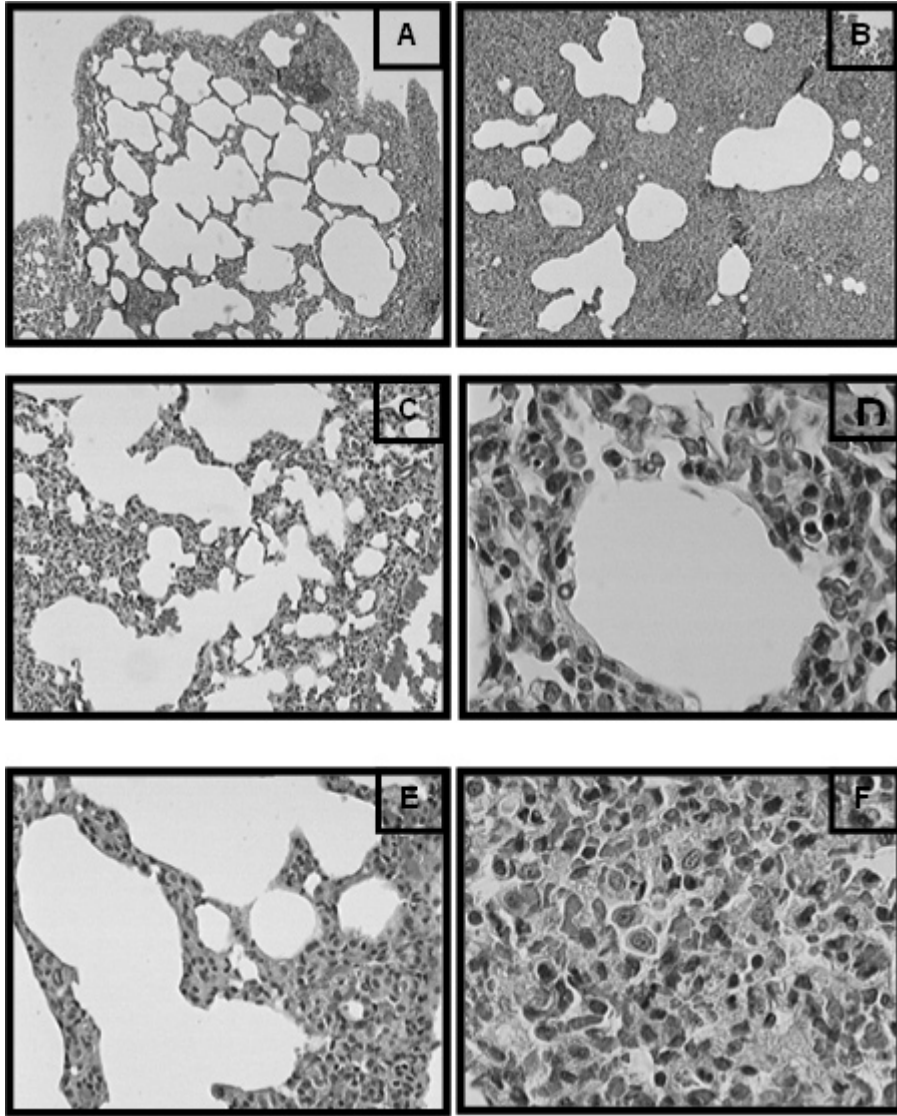
VI. Histopatolojik Görüntüler

VI.a. Işık Mikroskopisi: Hematoksilen&Eosin ile boyama sonucu görüntüler

Grup K: %50 O₂ + %50 hava ile 2 saat solutulan kontrol grubunda akciğerlerin yapısı normal olarak gözlemlendi (Resim 2).

Grup İ: %1.2 İzofluran (1 MAK) +%50 O₂ + %50 hava ile 2 saat süreyle solutulan grupta ise Grup K ile karşılaştırıldığında yaygın akut akciğer hasarı gözlemlendi. Bu grupta yaygın mononükleer hücre infiltrasyonu saptandı. Alveollerin histopatolojik olarak değerlendirilmesinde diffüz alveoler hasar, alveoler ödem, alveoler septumlarda kalınlaşma, alveol lümeninde yoğun alveoler makrofaj ve daha az miktarda nötrofil ve tip II pnömositler gözlemlendi. Parankim incelendiğinde yaygın hemoraji, mononükleer hücre infiltrasyonu, ödem ve vasküler konjesyon saptandı (Resim 3).

Grup S: %2.4 Sevofluran (1 MAK) + %50 O₂ + %50 hava ile 2 saat süreyle solutulan grup, Grup İ ile karşılaştırıldığında daha az oranda akut akciğer hasarı göz-



Resim 3. Grup İ'nin farklı büyütmelerdeki ışık mikroskopik görüntüleri H&E; (>) alveoler makrofajları, (*) interalveoler septum kalınlaşmasını göstermektedir. A+B+C: x 4, D+F: x 40, E: x 10

lendi. Alveollerin değerlendirmesinde alveoler ödem, alveoler septumlarda kalınlaşmaya daha az rastlandı. Alveol lümeninde Grup İ' de yoğun olarak görülen alveoler makrofaj, nötrofil ve tip II pnömositler daha az miktarda gözlemlendi. Parankim incelemesinde; Grup İ' de yoğun olarak görülen yaygın hemoraji, mononükleer hücre infiltrasyonu, ödem ve vasküler konjesyon daha az oranda saptandı (Resim 4).

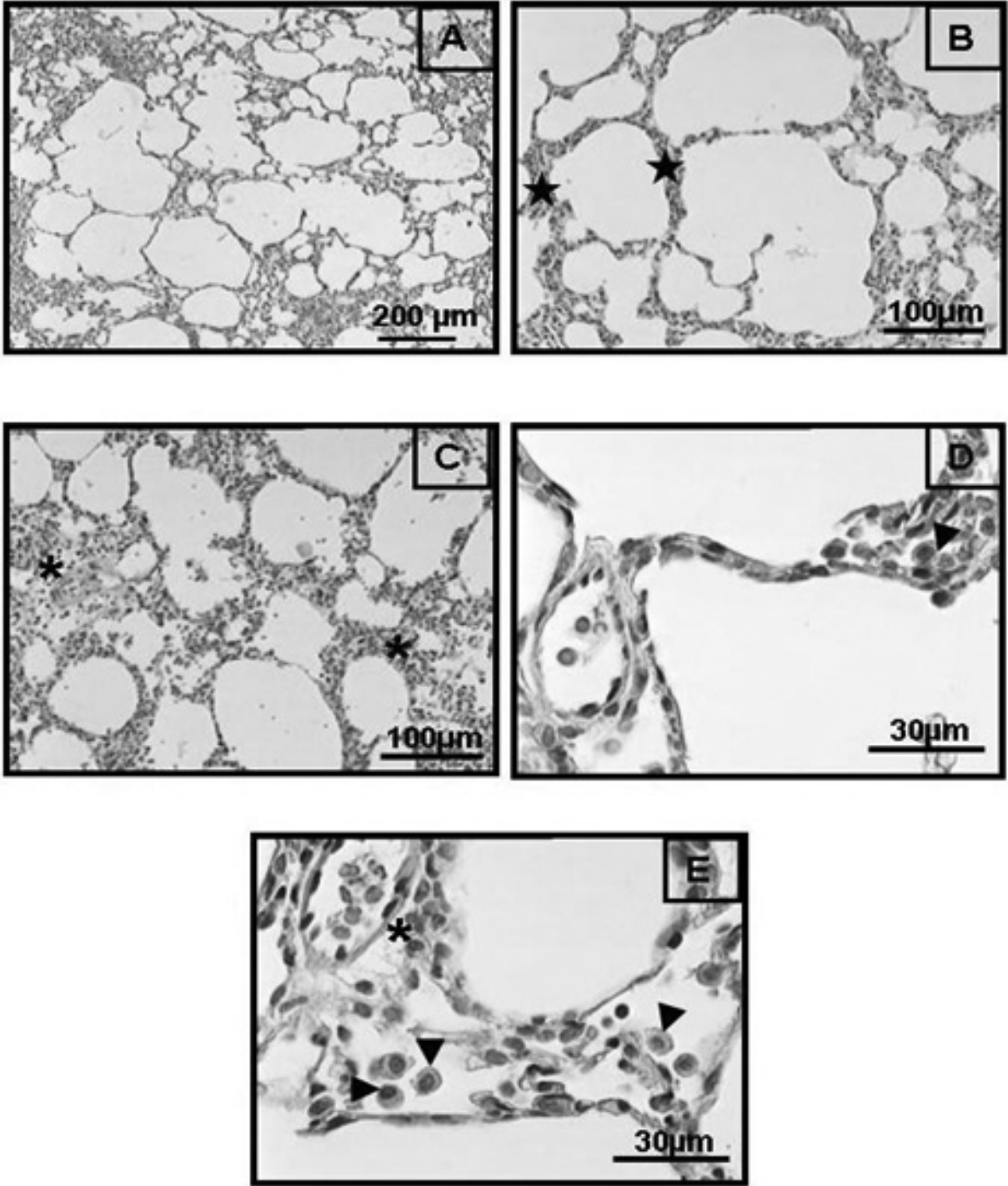
VI.b Işık mikroskopisi: M 30 antikorlu ile boyama sonucu görüntüler

Grup K: %50 O₂ + %50 hava ile 2 saat solutulan

Grup K'da akciğerlerin yapısı normal olarak gözlemlendi (Resim 5).

Grup İ: %1.2 İzofluran (1 MAK) + %50 O₂ + %50 hava ile 2 saat süreyle solutulan Grup İ'de ise Grup K ile karşılaştırıldığında akut akciğer hasarını gösteren yaygın apoptotik hücreler gözlemlendi (Resim 6).

Grup S: %2.4 Sevofluran (1 MAK) + %50 O₂ + %50 hava ile 2 saat süreyle solutulan Grup S'de, Grup İ ile karşılaştırıldığında daha az oranda apoptotik hücreler gözlemlendi (Resim 7).



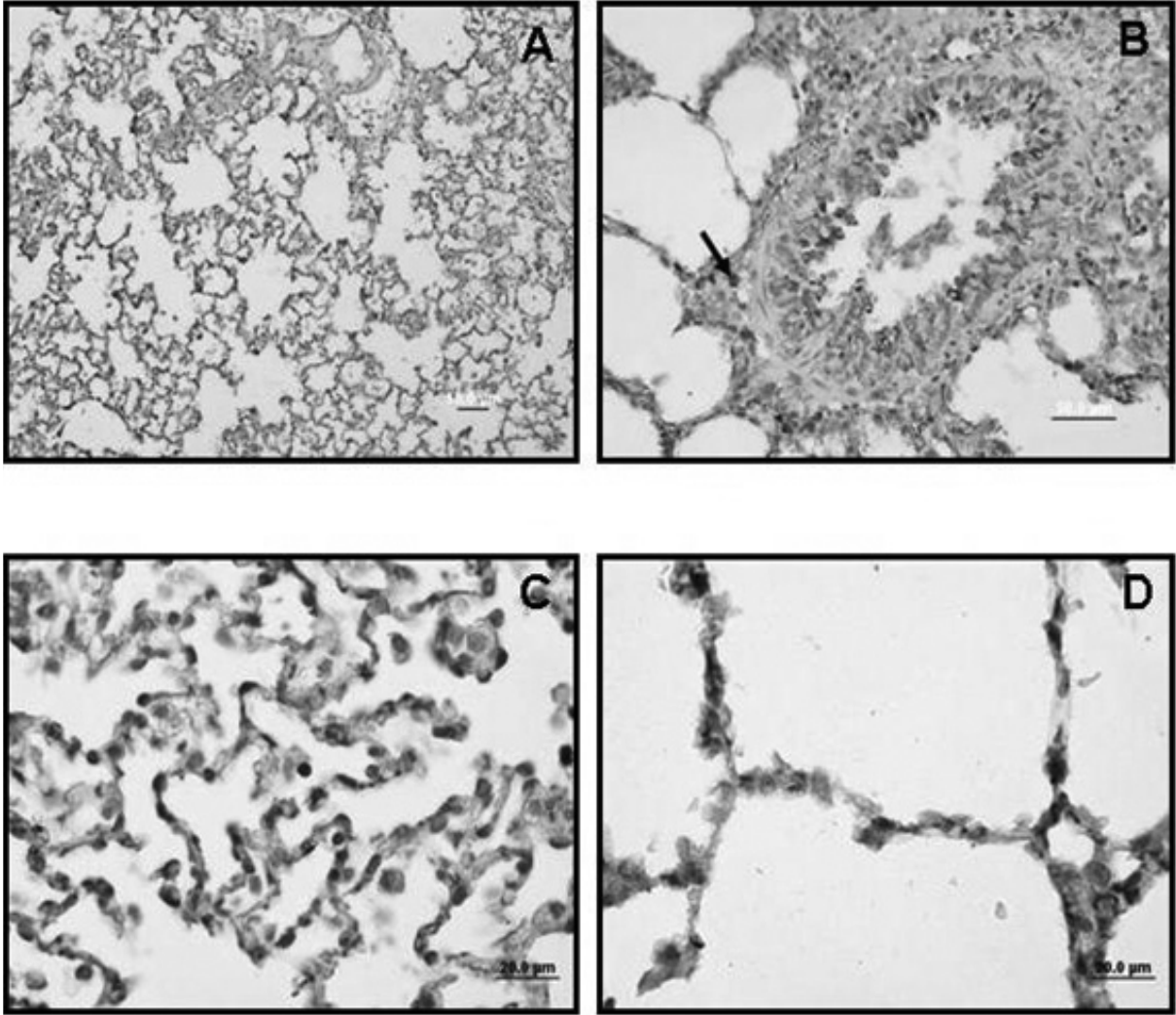
Resim 4. Grup S' in farklı büyütmelerdeki ışık mikroskopik görüntüleri. H&E;(▴) alveoler makrofajları, (*) interalveoler septum kalınlaşmasını göstermektedir. (*) intraparankimal mononükleer hücre infiltrasyonu, hemoraji ve vasküler konjesyondaki artışı.

A: x 4, B ve C: x 10, D ve E: x

VI.c Elektron mikroskobu

Grup K: %50 O₂ + %50 hava ile 2 saat solutulan kontrol grubunda akciğerlerin yapısı elektron mikros-

kopik görüntülemeye normal olarak gözlemlendi. Alveolar septum ve alveolar kapillerler normal görünümdeydi (Resim 8).



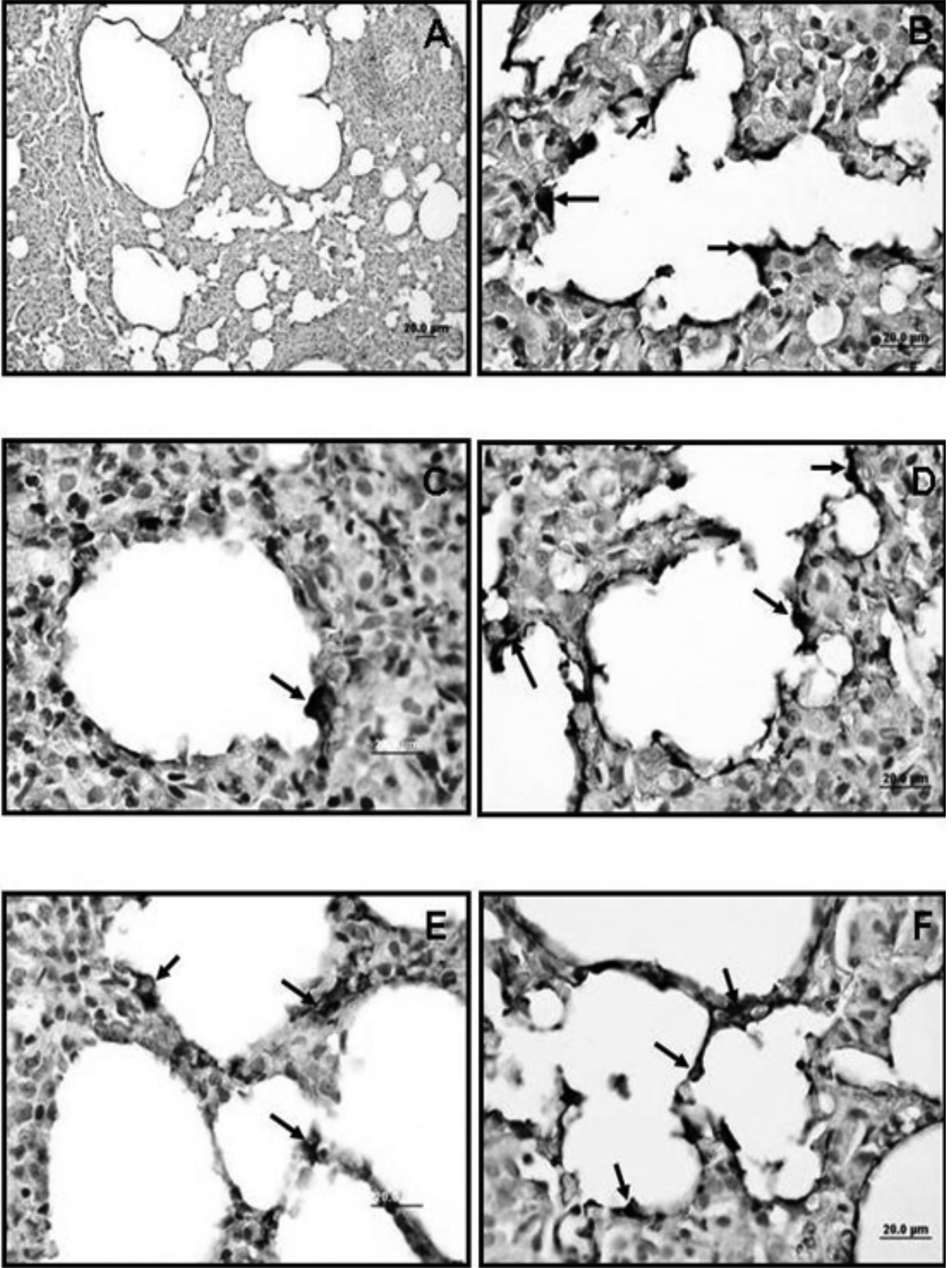
Resim 5. Grup K'ın M-30 pozitif hücre görüntüleri.
A: x 4, B: x 20, C ve D: x 40.
(→) işareti; M30 antikoruna ile saptanan apoptotik hücreyi göstermektedir.

Grup İ: %1.2 İzofluran (1 MAK) + % 50 O₂ + % 50 hava ile 2 saat süreyle solutulan grupta ise Grup K ile karşılaştırıldığında, yaygın olarak kromatin ile yoğunlaştırılmış apoptotik endotel hücreleri görülmüştür. Alveolar septumun normal yapısının bozulmuş olduğu, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, alveolar hücrelerde sitoplazmik inklüzyon ve vakuoller gözlenmiştir. Alveolar septumda bağ doku artışı gözlemlendi (Resim 9).

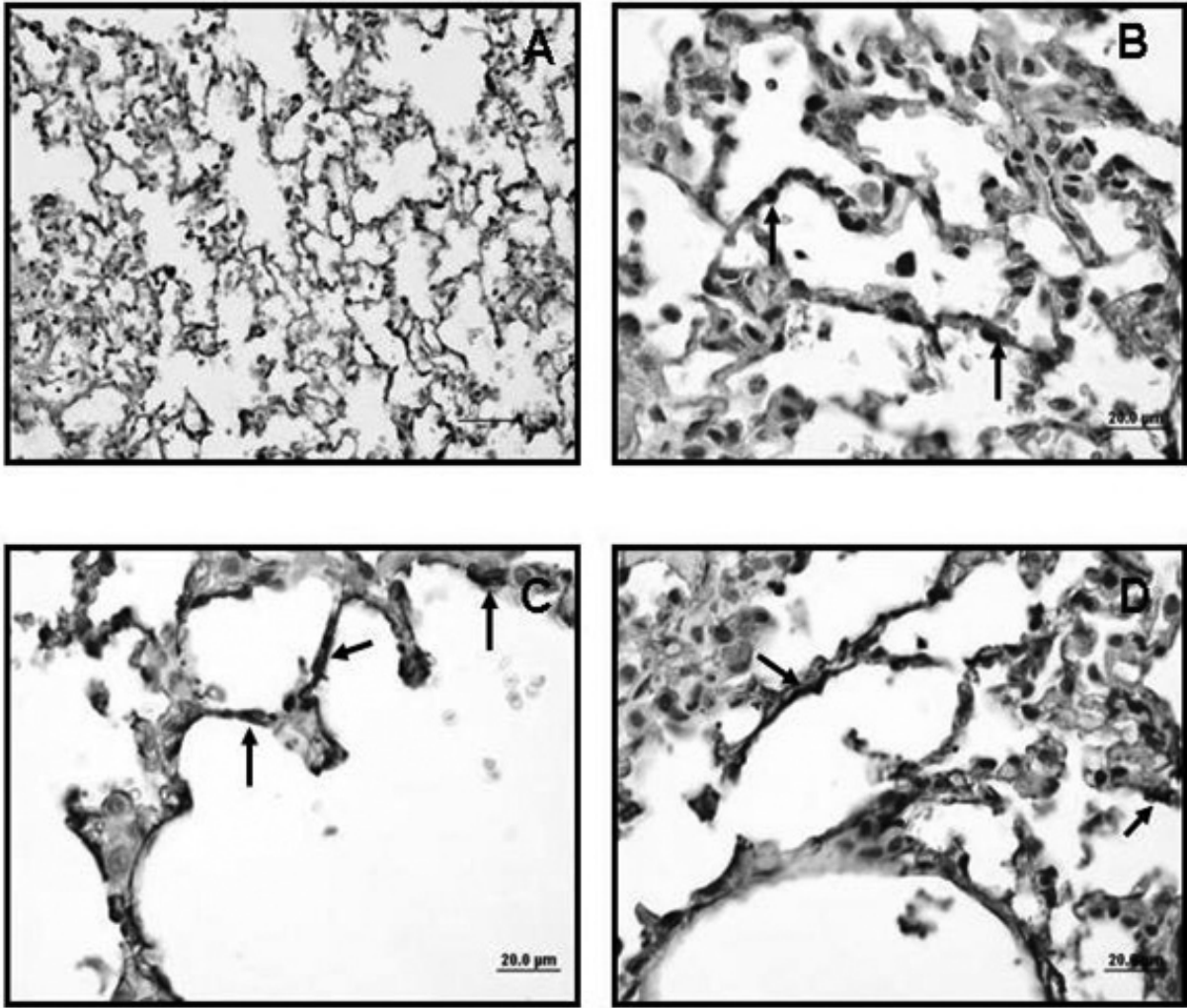
Grup S: %2.4 Sevofluran (1 MAK) + %50 O₂ + %50 hava ile 2 saat süreyle solutulan grupta, Grup İ ile karşılaştırıldığında daha az oranda alveoler bazal membran hasarı gözlemlendi. Daha az oranda sitoplazmik inklüzyon ve vakuoller gözlenmiştir (Resim 10)

TARTIŞMA

Akciğerler volatil anesteziklerin alımının ve eliminasyonunun gerçekleştiği yerdir. Volatil anesteziklerin alveoler epitelyal permeabiliteye etkisinin olduğu düşünülmektedir. Literatürde izofluranın alveollerde hasara ve bunun sonucunda alveoler epitelyal permeabilitede artışa neden olduğunu gösteren çalışmalar vardır [6,14,19,20]. Bizim çalışmamızda da Grup İ'de Grup K ile karşılaştırıldığında yaygın akut akciğer hasarı gözlemlendi. Grup İ'de yaygın mononükleer hücre infiltrasyonu saptandı. Alveollerin histopatolojik olarak değerlendirilmesinde diffüz alveoler hasar, alveoler ödem, alveoler septumlarda kalınlaşma, alveol



Resim 6. Grup I'de M-30 pozitif hücre görüntüleri. A: x 4, B, C ve D: x 40.
(→) işareti; M30 antikoruna ile saptanan apoptotik hücreyi göstermektedir.



Resim 7. Grup S'de M-30 pozitif hücre görüntüleri.

A: x 4, B, C ve D: x 40

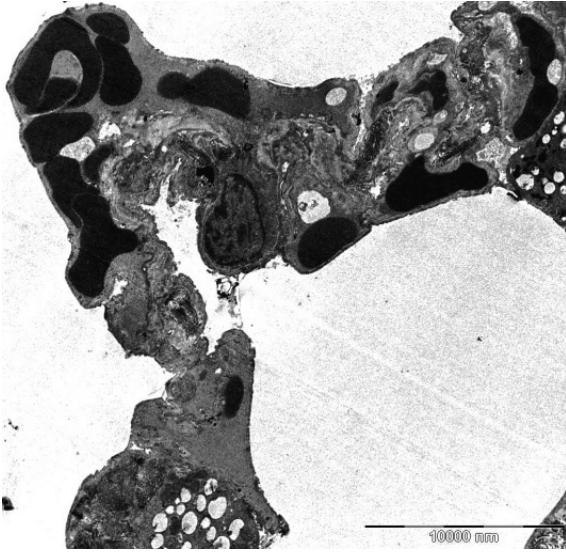
(→) işareti; M30 antikoruna ile saptanan apoptotik hücreyi göstermektedir.

lumeninde yoğun alveoler makrofaj ve daha az miktarda nötrofil ve tip II pnömositler gözlemlendi. Akciğer parankimi incelendiğinde yaygın hemoraji, mononükleer hücre infiltrasyonu, ödem ve vasküler konjesyon saptandı.

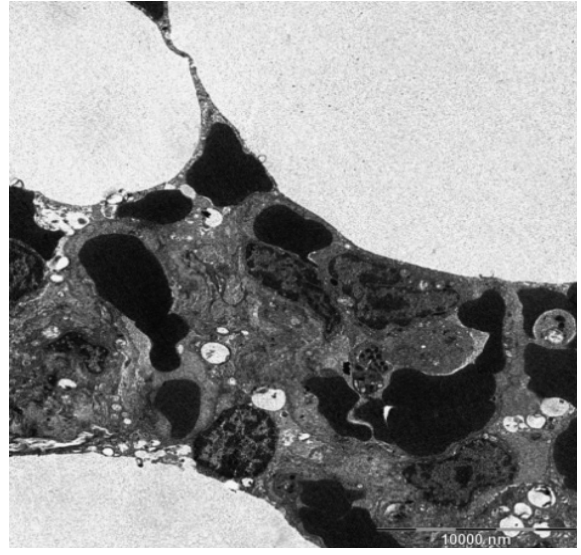
Kotani ve ark.^[7] 30'ar adet propofol (n=30) ve izofluran (n=30) anestezisi alan ortopedik cerrahi geçiren insanlarda makrofaj agregasyonu açısından izofluran ve propofol anestezisini karşılaştırmışlardır. Makrofaj agregasyondaki artış, izofluran anestezisinde propofol anestezisine göre anlamlı derecede yüksek olduğunu saptamışlardır. Aynı ekibin yaptığı bir sonraki çalışmada, 1,5 MAC volatil anestezi uygulanan ratlarda 2 saatlik anestezi ve cerrahi sonunda halotan, enfluran ve izofluran uygulanan gruplarda pulmoner lavaj sıvısındaki macrophage inflammatory protein-2

(MIP-2) düzeyi anlamlı derecede yüksek bulunmuştur^[8]. MIP-2'nin distal hava yolunda nötrofiller için en güçlü kemoatraktanlardan biri olduğu bilinmektedir. Birçok çalışma, halotan ve enfluranın nötrofil fonksiyonlarını bastırdığını göstermişken izofluranın bu etkisinin çok az olduğu gösterilmiştir. Bu izofluranın moleküler yapısından kaynaklı olabilir bu konuda daha çok çalışma yapılması gerektiğini düşünüyoruz. Huang ve ark.^[21] izofluranın TNF-alfa ve IL-1 beta üretimini inhibe etmede etkili olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda alveoler makrofaj sayısı Grup İ'de, Grup K ve Grup S'e göre anlamlı derecede yüksek olarak saptandı ve yaygın mononükleer hücre infiltrasyonu gözlemlendi.

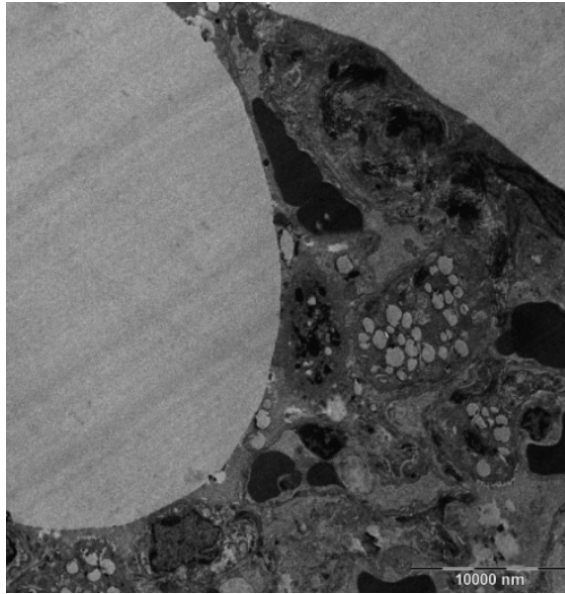
Sevofluranın hasar görmüş akciğerler üzerine olan



Resim 8. Grup K elektron mikroskopisi görüntüsü.



Resim 9. Grup İ elektron mikroskopisi görüntüsü.



Resim 10. Grup S elektron mikroskopisi görüntüsü.

koruyucu etkisini araştıran birçok çalışma literatürde mevcuttur. Bu çalışmalar incelendiğinde hasar görmüş akciğerlere sevofluran uygulanmasının TNF-alfa, IL-6, ICAM-1, mRNA ekspresyonunu azalttığı, alveolar kapiller membran geçirgenliğini koruduğu, alveolo-epiteliyal hücrelerde nötrofil kemotaksisi, nötrofil adezyonu ve nötrofile indüklenen apoptozisi azalttığı, alveolar epitel hücrelerinin nekrozunu azalttığı görülmektedir. Hasarlı akciğerlerde sevofluranın iyileştirici etkisi mevcuttur [9,10,11,14,15,22,23]. Biz sağlıklı rat akciğerleri üzerinde çalıştık, çalıştığımız volatil

anesteziklerden biri sevoflurandı. Çalışmamızın sonuçları bize sevofluranın izoflurana göre sağlıklı rat akciğerinde daha az alveoler hasara yol açtığını düşündürdü, çalışmamızın sonuçlarına paralel olarak literatürde de sevofluranın sağlıklı rat akciğeri üzerine inflamasyon yapıcı etkisinin daha az olduğu bildirilmiştir [9,10,18]. Tersine deneysel ve insan çalışmalarında sevofluranın hasarlı akciğer üzerinde iğleştirici etkisi olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda alveoler makrofaj ve apoptotik hücre sayısı Grup S'de Grup K'a göre anlamlı derecede yüksek bulundu.

Grup S, Grup İ ile karşılaştırıldığında alveoler ödem, alveoler septumlarda kalınlaşma, nötrofil ve tip II pnömositler daha az miktarda gözlemlendi (Resim 2, 3, 4, 8, 9, 10). Alveoler makrofaj sayısı ise Grup S de Grup İ ye göre istatistiksel olarak anlamlı miktarda azdı (Tablo 3) Parankim incelemesinde, Grup İ’de yoğun olarak görülen yaygın hemoraji, mononükleer hücre infiltrasyonu, ödem ve vasküler konjesyon daha az oranda saptandı (Resim 2, 3, 4, 8, 9, 10). Apoptotik hücre sayısı da Grup İ de Grup S ve K’ya göre istatistiksel olarak anlamlı fazlaydı (Tablo 4). Bu bulgulara dayanarak izofluranın sağlıklı rat akciğerinde sevoflurana göre daha fazla hasara neden olduğu görülmüştür.

Daha yakın tarihli bir çalışmada, L. Wang, sevofluranın akciğer üzerindeki koruyucu etkisini apoptozis inhibisyonu apoptotik indeks (AI), TUNEL boyama ve elektron mikroskopisi görüntülemesi ile göstermeyi amaçlamıştır. Bu amaçla 6 şar erişkin sağlıklı rat ile 3 grup oluşturmuş ve kontrol grubuna salin enjeksiyonu sonrası ve sevofluran grubunda LPS ile indüklenen gruptaki sıçanlara 30 dk. süreyle %2,5 sevofluran uygulanmış ve LPS grubuna is hiçbir gaz solutmamış, 12 saat sonra akciğer dokusu incelenmiş. Sonuçta, sevofluran grubu ve kontrol grubunda, LPS grubuna kıyasla TUNEL pozitif hücre sayısı azalmış, sevofluran inhalasyonunun aşırı hücre apoptozunu inhibe etmek için kaspaz-3 aktivasyonunu Bcl-x1 ve Bcl-2 ekspresyonun düzenleyerek inhibe ettiğini göstermişlerdir. Kontrol grubu ile sevofluran grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamışlardır [19]. Çalışmamızda Grup S’de apoptotik hücreyi gösteren M-30 pozitif hücre sayısını Grup İ’ye kıyasla anlamlı olarak azalmış bulduk. Ancak, Grup K ile karşılaştırdığımızda daha yüksek saptadık. Bu sonuç L. Wang’ın yaptığı çalışmadaki sevofluran grubu ile kontrol grubu arasındaki ilişki ile karşılaştırılabilir. Elektron mikroskopisi görüntüleme de izofluran grubunda belirgin alveolo-kapiller membran ve epiteliyal yapıyı hasarlanmış olarak bulduk. Bu hasarlanma Grup S’de belirgin olarak daha az olup Grup K’ye yakın idi. Bu da sağlıklı akciğerlerde sevofluranın izoflurana oranla daha az akciğer hasarına neden olduğunu göstermektedir. Bu sonuçta, L. Wang’ın yaptığı çalışmadaki kontrol grubu ile sevofluran grubu arasındaki ilişkiyle benzerdir.

Yu-LiPank ve ark.’nın yaptıkları çalışmada, ratlar 2

saat süreyle %1,5 izoflurana maruz bırakılmış ve 3 saatlik bir aradan sonra endotrakeal LPS enjekte edilmiş. Ratların 12 saat sonra kalbi durdurularak akciğer dokusunun alveolar-kapiller permeabilitesi değerlendirilerek, iNOS ve CD11b ekspresyonu ile MPO aktivitesi analiz edilmiş. Sonuçta, öncesinde izofluran uygulanan akciğerde yaş/kuru oranının azaldığı, dokuda iNOS ve CD11 ekspresyonu zayıflamış ve MPO enzimatik aktivitesinin azaldığını bulmuşlardır [24]. Buradaki iNOS ve CD11’nin endojen aktivasyonları insan ve hayvan modellerinde ALI’nin gelişimi için duyarlı biyomarkerlerdir [25,26]. Endojen iNOS ekspresyonunun artmasının bazı farmakolojik ajanların organ koruyucu etkisinden sorumlu önemli bir mekanik yol olduğunu düşündürmektedir [27]. LPS uygulanmadığında, izofluran inhalasyonunun rat akciğerinde başlangıçta iNOS’un ekspresyonunu artırdığını belirlemişler. LPS’in intratrakeal uygulamasından sonra ise bu proteini zayıflattığını tespit etmişlerdir yani izofluran sağlıklı rat akciğerinde inflammatuar etki yapmış ancak LPS ile ALI oluşturulduğunda koruyucu etki oluşturmuştur [24]. Bu sonuç, çalışmamızdaki izofluran uygulanan sağlıklı rat akciğerinde artmış MPO ve nötrofil infiltrasyonunu desteklemektedir. Aynı zamanda volatil anesteziklerinin sağlıklı ve hastalıklı akciğerde farklı etkilere yol açabileceğini akıllara getirmektedir. Bunun için daha fazla karşılaştırmalı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Ning Yin ve ark. [28] ratlara LPS enjekte ederek oluşturdukları ALI modeli çalışmalarında akciğer dokusunda bronkoalveoler lavaj sıvısını (BALF), MPO aktivitesi ve F4/80 pozitif hücrelerin, nötrofil ve makrofaj sayılarının LPS ile anlamlı şekilde arttığını, bununla birlikte izofluran uygulaması ile bu artışların azaldığını göstermişlerdir. Kontrol grubundaki sağlıklı akciğeri olan ratlarda ise izofluran ile solutulan ve oda havası ile solutulan ratların akciğer dokusu histopatolojisinde herhangi bir fark saptamamışlar. Jung-tang Li ve ark. yaptığı benzer bir çalışmada da yakın sonuçlar bulmuşlardır [5]. Biz ise çalışmamızda Grup İ’de belirgin MPO, TBARS, nötrofil ve alveolar makrofaj apoptozisinde artışı gözlemledik. Bu sonuçlar Ning Yin ve ark. yaptığı çalışmadaki izofluran grubu rat akciğerlerindeki sonuçlarla benzerlik göstermemektedir. Belki de izofluran uygulama süresinin bizde 2 saat, Ning Yin ve ark. ile Jung-tang Li ve ark. da ise 1 saat olmasının bunda bir etkisi olabileceğini düşünüyoruz. Ancak bu durum izofluranın farmakodinamik

ve farmakodinamiği ile ilgili olabilir bu kanuda daha fazla çalışma yapılmasında gerekmektedir.

Sonuç olarak, Grup S ve Grup K ile karşılaştırıldığında, Grup İ de ratların akciğer dokularında MPO aktivitesi, alveoler makrofaj ve apoptotik hücre sayıları Grup K ve Grup S'na göre belirgin şekilde yüksek olarak saptanmıştır. Bununla beraber ışık mikroskobu ile yapılan incelemede yaygın alveoler hasarın gözlenmesi, bize Grup İ'de ileri derecede bir inflamasyonun oluştuğunu düşündürmektedir. Grup S'de ise akciğer dokusu TBARS düzeyleri Grup K ve Grup İ'ye göre daha düşük olarak saptanmıştır. Aynı zamanda Grup S'de, Grup İ'ye göre alveoler makrofaj ve apoptotik hücre sayılarının daha az olması, ışık mikroskopik incelemede daha az alveoler hasarın saptanması, bize sevofluranın izoflurana göre sağlıklı rat akciğerinde daha az alveoler hasara yol açtığını düşündürdü. Günlük pratiğimizde çok sayıda sağlıklı akciğerli olguya volatile anesteziyelerle anestezi uyguladığımızdan, bu deneysel sonuçları göz önüne almamız gerektiği kanaatindeyiz. Sevofluranın bu inflamatuvar yanıtlarının alveolo-kapiller membranda yaptıkları değişimler ve bu değişimlerin gaz değişimlerini nasıl etkiledikleri daha ileri çalışmaları gerektirdiği düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Lee YM, Song BC, Yeum KJ. Impact of volatile anesthetics on oxidative stress and inflammation. *Biomed Res Int.* 2015;1-8. <https://doi.org/10.1155/2015/242709>
2. Goraca A, Józefowicz-Okonkwo G. Protective effects of early treatment with lipoic acid in LPS-induced lung injury in rats. *J Physiol Pharmacol.* 2007;58:541-9.
3. Liu R, Ishibe Y, Ueda M. Isoflurane-sevoflurane administration before ischemia attenuates ischemia-reperfusion-induced injury in isolated rat lungs. *Anesthesiology* 2000;92(3):833-40. <https://doi.org/10.1097/00000542-200003000-00027>
4. Akca T, Canbaz H, Tataroglu C, Caglikulekci M, Tamer L, Colak T, et al. The effect of N-acetylcysteine on pulmonary lipid peroxidation and tissue damage. *J Surg Res.* 2005;129(1):38-45. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2005.05.026>
5. Jun-tang Li, Hui Wang, Wei Li, Li-feng Wang, Li-chao Hou, Jing-lan Mu, et al. Anesthetic isoflurane posttreatment attenuates experimental lung injury by inhibiting inflammation and apoptosis. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:108928.
6. Hu G, Schwartz DE, Shajahan AN, Visintine DJ, Salem MR, Crystal GJ, et al. Isoflurane, but not sevoflurane, increases transendothelial albumin permeability in the isolated rat lung: role for enhanced phosphorylation of caveolin-1. *Anesthesiology* 2006;104(4):777-85. <https://doi.org/10.1097/00000542-200604000-00023>
7. Kotani N, Hashimoto H, Sessler DI, Kikuchi A, Suzuki A, Takahashi S, et al. Intraoperative modulation of alveolar macrophage function during isoflurane and propofol anesthesia. *Anesthesiology* 1998;89(5):1125-32. <https://doi.org/10.1097/00000542-199811000-00012>
8. Kotani N, Takahashi S, Sessler DI, Hashiba E, Kubota T, Hashimoto H, et al. Volatile anesthetics augment expression of proinflammatory cytokines in rat alveolar macrophages during mechanical ventilation. *Anesthesiology* 1999;91(1):187-97. <https://doi.org/10.1097/00000542-199907000-00027>
9. Romero A, Moreno A, García J, Sánchez C, Santos M, García J. Effects of sevoflurane on ventilator induced lung injury in a healthy lung experimental model. *Rev Esp Anestesiol Reanim.* 2016;63(1):22-8. <https://doi.org/10.1016/j.redar.2015.04.006>
10. Song SY, Zhou B, Yang SM, Liu GZ, Tian JM, Yue XQ. Preventive effects of sevoflurane treatment on lung inflammation in rats. *Asian Pac J Trop Med.* 2013;6(1):53-6. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60200-4](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60200-4)
11. Otsuki T, Ishikawa M, Hori Y, Goto G, Sakamoto A. Volatile anesthetic sevoflurane ameliorates endotoxin-induced acute lung injury via microRNA modulation in rats. *Biomed Rep.* 2015;3(3):408-12. <https://doi.org/10.3892/br.2015.428>
12. Wallach D, Kang TB, Dillon CP, Green DR. Programmed necrosis in inflammation: Toward identification of the effector molecules. *Science* 2016;352(6281):aaf2154. <https://doi.org/10.1126/science.aaf2154>
13. Martin TR, Nakamura M, Matute-Bello G. The role of apoptosis in acute lung injury. *Crit Care Med.* 2003;31:184-8. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000057841.33876.B1>
14. Reed R, Doherty T. Minimum alveolar concentration: Key concepts and a review of its pharmacological reduction in dogs. Part 2. *Res vet sci.* 2018 doi:10.1016/j.rvsc.2018.01.009. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.01.009>
15. Uribe-Escamilla R, Aparicio PS, Izquierdo AC, Alfaro-Rodriguez A. Reference values for electrolytes and blood gases in wistar rats with permanent cerebral ischemia: the effect of treatment with glycine on gastrometry and electrolytes. *Multiciencias* 2011;11(4):378-386.
16. Boening A, Assling-Simon L, Heep M, Boengler K, Niemann B, Schipke J. Et al. Blood cardioplegia for cardiac surgery in acute myocardial infarction: Rat experiments with two widely used solution. *Interact Cardiovasc thorac surgery* 2018 doi:10.1093/icvts/ivy011. <https://doi.org/10.1093/icvts/ivy011>
17. Hung CJ, Liu FY, Wu RS, Tsai JJ, Lin CC, Kao A. The influence of volatile anesthetics on alveolar epithelial permeability measured by noninvasive radionuclide lung scan. *Ann Nucl Med* 2003;17(3):213-8. <https://doi.org/10.1007/BF02990024>
18. Kalimeris K, Zerva A, Matsota P, Nomikos T, Fragopoulou E, Politou AN, et al. Pretreatment with sevoflurane attenuates direct lung injury. *Minerva Anesthesiol.* 2014;80(6):635-44.
19. Wang L, Ye Y, Su HB, Yang JP. The anesthetic agent sevoflurane attenuates pulmonary acute lung injury by modulating apoptotic pathways. *Braz J Med Biol Res.*

- 2017;50(3):1-8.
<https://doi.org/10.1590/1414-431x20165747>
20. ChangLai SP, Hung WT, Liao KK. Detecting alveolar epithelial injury following volatile anesthetics by (99m) Tc DTPA radioaerosol inhalation lung scan. *Respiration* 1999;66(6):506-10.
<https://doi.org/10.1159/000029449>
21. Yi Huang, Xiao-Xia Wang, Dong-Dong Sun, Ze-Xin Zhang, Wan-Wan Yang, Tian Shao, et al. Sub-anesthesia dose of isoflurane in 60% oxygen reduces Inflammatory Responses in Experimental Sepsis Models. *Chin Med J (Engl)* 2017;130(7):840-53.
<https://doi.org/10.4103/0366-6999.202734>
22. Yue T, Roth Z'graggen B, Blumenthal S, Neff SB, Reyes L, Booy C, et al. Postconditioning with a volatile anaesthetic in alveolar epithelial cells in vitro. *Eur Respir J*. 2008;31(1):118-25.
<https://doi.org/10.1183/09031936.00046307>
23. Voigtsberger S, Lachmann RA, Leutert AC, Schläpfer M, Booy C, Reyes L, et al. Sevoflurane Ameliorates Gas Exchange and Attenuates Lung Damage in Experimental Lipopolysaccharide-induced Lung Injury. *Anesthesiology* 2009;111(6):1238-48.
<https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181bdf857>
24. Pang YL, Chen BS, Li SP, Huang CC, Chang SW, Lam CF, et al. The preconditioning pulmonary protective effect of volatile isoflurane in acute lung injury is mediated by activation of endogenous iNOS. *J Anesth*. 2012;26(6):822-8.
<https://doi.org/10.1007/s00540-012-1456-9>
25. Mehta S. The effects of nitric oxide in acute lung injury. *Vascular Pharmacology* 2005;43:390-403.
<https://doi.org/10.1016/j.vph.2005.08.013>
26. Lam CF, Roan JN, Lee CH, Chang PJ, Huang CC, Liu YC, et al. Transplantation of endothelial progenitor cells improves pulmonary endothelial function and gas exchange in rabbits with endotoxin-induced acute lung injury. *Anesth Analg*. 2011;112(3):620-7.
<https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e3182075da4>
27. Khan M, Mohan IK, Kutala VK, Kotha SR, Parinandi NL, Hamlin RL, et al. Sulfaphenazole protects heart against ischemia-reperfusion injury and cardiac dysfunction by overexpression of iNOS, leading to enhancement of nitric oxide bioavailability and tissue oxygenation. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(4):725-38.
<https://doi.org/10.1089/ars.2008.2155>
28. Yin N, Peng Z, Li B, Xia J, Wang Z, Yuan J, et al. Isoflurane attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting ROS-mediated NLRP3 inflammatory activation. *Am J Transl Res*. 2016;8(5):2033-46.