



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

**TEKRARLAYAN DOZLARDA KETAMİNİN RAT
HİPOKAMPUSÜ ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Mehtap OKYAY KARACA

TOKAT
2012

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

**TEKRARLAYAN DOZLARDA KETAMİNİN RAT
HİPOKAMPUSU ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Mehtap OKYAY KARACA

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Mustafa SÜREN

TOKAT
2012

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince yakın çalışma olanağı bulduğum, bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen başta Gaziosmanpaşa Üniversitesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı Başkanı Sayın Yrd. Doç. Dr. Semih ARICI olmak üzere, tez hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa SÜREN ve anabilim dalımızın diğer hocaları Sayın Yrd. Doç. Dr. Ziya KAYA, Sayın Yrd. Doç. Dr. Serkan KARAMAN'a ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Serkan DOĞRU'ya Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı hocalarından Sayın Doç. Dr. Hüseyin ASLAN'a, bana asistanlık hayatım boyunca destek olan ve tezimde büyük emeği olan eşim Uzm. Dr. Zafer İsmail KARACA'ya ve enerji kaynağım kızım Zehra KARACA'ya uzmanlık eğitimim süresince beraber çalıştığım tüm arkadaşlarıma, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Mehtap OKYAY KARACA

ÖZET

Ketamin anestezi pratiğinde yaygın olarak kullanılan sıvı anesteziklerden biridir. Ketamin tıpta premedikasyon, sedasyon, anestezi indüksiyonu ve genel anestezi idamesi için kullanılır.

Ketamin bazı araştırmacılara göre nörotoksik iken, bazılarına göre ise tam tersine nöroprotektif etkili bir anestezik maddedir. Yapılan çalışmalarda tek doz ketamin verilmesi ile toksik etki tespit edilememişken, tekrarlayan dozlarda nörotoksik etki görülmüştür. Çalışmamızda, tekrarlayan dozlarda ketaminin beyin dokusuna nörotoksik etkisi olup olmadığını ve nörotoksik etki oluşuyorsa tekrarlayan dozlarda ketamin uygulamasından 16 gün sonra da nörotoksik etkinin devam edip etmediğini daha kantitatif ve objektif bir yöntem olan histolojik sterolojik metodla araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda, dişi ratlar beşerli üç gruba (Grup I, Grup II, Grup III) ayrıldı. 5 gün süreyle günde dört defa Grup I'de %0.9'luk salin solüsyonu, Grup II ve Grup III'te aynı dozda ketamin intraperitoneal olarak verildi. Grup I ve Grup II'deki ratlar 5. gün, son doz ketamin uygulamasından sonra Grup III'teki ratlar, 21. gün sakrifiye edilip ratların hipokampus dokusu çıkarıldı. Ratların hipokampus dokusunda cornu armonis (CA) ve gyrus dentatus (GD) bölgelerine optik fraksiyonlama yöntemi ile bakıldı.

Grupların hipokampusta CA bölgesindeki ortalama hücre sayıları karşılaştırıldığında Grup II de ortalama hücre sayısı Grup I'e göre %62.33 azalmış olarak bulundu. Grup III'te, Grup I'e göre ortalama hücre sayısı %34.25 daha az bulundu. Grup III ile Grup II'de ortalama sinir hücresi sayıları CA bölgesinde %74.54 oranında Grup III'te daha fazla idi. Grupların hipokampusta GD bölgesinde ki nöron sayıları karşılaştırıldığında Grup II de ortalama hücre sayısı Grup I'e göre %50.12 oranında azalmıştı. Grup III'te hücre sayısı Grup I'den %33.88 daha azdı. Grup III'te, Grup II'ye göre anlamlı düzeyde iyileşme vardı ancak bu Grup I seviyesinde değildi.

Sonuç olarak, tekrarlayan dozlarda ketaminin rat hipokampusünde nörotoksositeye neden olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: ketamin, hipokampus, nörotoksosite, NMDA, optik fraksiyonlama

Destekleyen kurumlar: GOÜ-BAP 2011/006

SUMMARY

REPEATED DOSE OF KETAMIN EFFECT TO THE RAT HIPPOCAMPUS TISSUE

Ketamine is one of the most widely used anesthetics. It is used clinically for premedication, sedation, anesthesia induction and maintenance of general anesthesia. There is much controversy in the scientific community as to whether ketamine causes neurotoxicity or is neuroprotective.

Studies have shown that when given as a single dose, ketamine does not induce toxic effects. However, neurotoxicity has been observed in repeated doses. In this study, we aimed to investigate whether or not there is a neurotoxic effect after repeated doses of ketamine; and if it does occur, our second objective was to study if the duration of neurotoxic effect persists beyond 16 days after ketamine administration using stereological analysis of histology.

15 Sprague-Dawley female rats were divided into three groups. Group I served as the control and received 0.9% saline, Group II and Group III received the same dose of ketamine administered intraperitoneally four times a day for five days. Hippocampus tissue was harvested from group I and II on Day 5 and from group III on Day 21 after administration of the last ketamine dose. Cornu ammonis (CA) and the gyrus dentatus (GD) regions in the hippocampus were examined by using optical fractionation.

The average cell number in the CA region of the hippocampus was decreased by 62.33% in Group I compared to Group II. The average cell number in group III was found to be decreased by 34.25% in Group III compared to Group I. The average number of nerve cells in the CA region was 74.54% more in Group III than Group II. When the number of neurons in the gyrus dentatus were compared between groups, the average number of cells was reduced by 50.12% in group I compared to group I. The number of cells in group III was 33.88% less than group I.

In our study, we show that repeated systemic doses of ketamine causes neurotoxicity in the rat hippocampus however there may an early period were some of this reversible.

Keywords: ketamine, hippocampus, NMDA, neurotoxicity

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
İÇ KAPAK	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	vii
TABLolar	viii
ŞEKİLLER	ix
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	2
GEREÇ VE YÖNTEM	7
BULGULAR	9
TARTIŞMA	14
SONUÇ VE ÖNERİLER	19
KAYNAKLAR	20

KISALTMALAR

İM:	İntramüsküler
İV:	İntravenöz
NMDA:	N-metil- D-aspartat
ACh:	Asetilkolin
CA:	Cornu armonis
GD:	Gyrus dentatus
CaMKII:	Ca ⁺² /calmodulin-bağlı protein kinaz II

TABLolar**SAYFA**

Tablo 1	Hipokampuste CA bölgesindeki toplam nöron sayıları	12
Tablo 2	Hipokampuste GD bölgesindeki toplam nöron sayıları.	13

ŞEKİLLER**SAYFA**

Şekil 1	Hipokampus resim	6
Şekil 2	Ratlara eter kutusu içerisinde eter solutuldu.	7
Şekil 3	Rat hipokampusünde CA ve GD bölgelerinin 40X büyütmede mikroskopik görüntüsü	11
Şekil 4	CA bölgesinde nöron sayısının gruplara göre dağılımı	12
Şekil 5	GD bölgesinde nöron sayısının gruplara göre dağılımı	13

GİRİŞ

Ketamin anestezi pratiğinde yaygın olarak kullanılan sıvı anesteziiklerden biridir. Ketamin premedikasyon, sedasyon, anestezi indüksiyonu ve genel anestezi idamesi için kullanılır. Son zamanlarda analjezi amacıyla kullanılan opiatlara toleransı ve hiperaljeziyi önlemek için düşük dozlarda ketamin kullanımına artan bir ilgi vardır (1). Yanık ve yara pansumanı gibi ağrılı müdahalelerde analjezik özelliğinden dolayı ketamin sıklıkla kullanılmaktadır. Ketamin, manyetik rezonans veya bilgisayarlı tomografi ile görüntüleme esnasında çocuklarda spontan solunumu diğer intravenöz anesteziiklere göre daha az baskıladığı için sedasyon (veya genel anestezi) amacıyla tercih edilmektedir (1).

Ketaminin olumlu etkilerinin yanında hastalarda derlenme sırasında halüsinasyon, ajitasyon gibi istenmeyen durumlara neden olması bu ilacın; rutin kullanımının azalmasına neden olmaktadır (1).

Ketamin bazı araştırmacılara göre nörotoksik iken (1, 2), bazılarına göre ise tam tersine nöroprotektif etkili bir anesteziik maddedir (3, 4). Yapılan çalışmalarda tek doz ketamin verilmesi ile toksik etki tespit edilememişken, ketaminin tekrarlayan dozlarda verilmesiyle nörotoksik etki görülmüştür (2). Bize göre, ketaminin nöronlar üzerine olan toksik etkisi ketaminin tekrarlayan dozlarda kullanılmasıyla ortaya çıkmaktadır. Hayashi ve ark.'nın (2) ratlar üzerinde yaptıkları çalışmanın sonucunda, ketamin maruziyetinin süresi ile nöron hasarı arasında paralellik olduğunu ketaminin beyin dokusuna etkisi hakkında daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu belirtmişlerdir.

Santral sinir sistemi içinde uzun dönem hafıza merkezi olduğu düşünülen hipokampus nörotoksik ilaçlara hassas beyin bölgelerinden birisidir (5, 6). Deneysel çalışmalarda ilaçların nörotoksik etkisini araştırmak için genellikle beynin hipokampus dokusu kullanılmıştır (2, 3). Çalışmamızda, tekrarlayan dozlarda ketaminin beyinde hipokampus dokusuna nörotoksik etkisi olup olmadığını ve şayet 5. günün sonunda nörotoksik etkisi oluyorsa 16 gün sonra da bu etki devam ediyor mu sorusuna cevap vermek için daha kantitatif ve objektif bir yöntem olan histolojik sterolojik metodla araştırmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

Genel anestezi, inhalasyon ajanlarının kullanılması ile sınırlı değildir. Oral, intramüsküler (İM) ve intravenöz (İV) yolla uygulanan pek çok ilaç, terapötik doz aralıklarında bir anestezi hali oluşturur veya anesteziyi artırırlar. Erişkin hastalarda anestezi indüksiyonu çoğu kez İV uygulama ile yapılır. Lokal anestetik içeren kremlerin üretilmesi çocuklarda da İV indüksiyonların popülaritesini arttırmıştır. Anestezinin idamesi bir total İV anestezi yöntemi ile yapılabilir Anestezi indüksiyonunda yaygın olarak kullanılan İV ilaçlardan birisi de ketamindir (7).

KETAMİN

Ketamine 2 O-clorofenil-2 methylamin o siklexanone hidroklorid olarak dizayn edilmiş nonbarbitürat bir anesteziktir. A2 asidik (PH= 3.5-5.5) olarak formüle edilmiş, İV veya İM enjeksiyon için 10-50 mg/ml veya 100 mg/ml konsantrasyonda kullanılan steril bir solüsyondur. Solüsyonun içine koruyucu olarak Phermerol (benzethonium klorid) eklenir (1).

Ketamin Pka'sı 7.5 olan, suda eriyen bir bileşiktir. Ketamin iki optik izomer üreten (spiral) bir merkeze sahiptir. S(+) izomeri, rasemik karışım veya R(-) izomeri ile aynı farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklere sahip olmasına rağmen, daha potent anestezik ve analjezik özelliklere sahiptir. Fakat bazı Avrupa ülkelerinden farklı olarak klinik kullanılan preparatı (Ketalar HCl) iki izomerin rasemik karışımıdır (1).

Ketamin hepatik mikrozomal sitokrom P450 enzimiyle metabolize olur ve onun primer metaboliti olan norketamine dönüşür. Norketamin ana bileşiğin 1/3-1/5'i kadar etkindir ve norketamin suda eriyen hidroksilat ve glukronidat konjugatları olarak böbrekten atılırlar. Barbitüratlar ve propofole benzer şekilde ketamin, rölatif olarak kısa distrübisyon yarı ömürlüdür. Ketamin eliminasyon yarı ömrü 2-3 saatte sonuçlanan yüksek hepatik klirens ve geniş dağılım oranına sahiptir. Yüksek hepatik yıkılma oranı, hepatik kan akımındaki değişikliklerin, ketamin eliminasyon oranına önemli şekilde etki etmesini sağlar. Ketamin disosiyatif anestezi denilen doz bağımlı santral sinir sistemi depresyonuna neden olur. Disosiyatif anestezide, hastalar bilinçli

olabilirler, ketamin faringeal ve laringeal refleksi koruyabilmelerine karşın, derin analjezi ve amnezi oluşturur. Bu kataleptik durumun mekanizması, talamokortikal yolların elektrofizyolojik olarak inhibisyonu ve limbik sistemin stimülasyonunu içerir. Daha sık olarak parenteral kullanılmasına rağmen, ketamin oral ve intranasal olarak çocukların premedikasyonunda kullanılır. Benzodiazepin premedikasyonunu takiben 1-2 mg/kg İV veya 4-8 mg/kg İM ketamin anestezi indüksiyonunda kullanılır. Ketaminin anestezi etkisinin başlaması hızlıdır. İV 2 mg/kg ketamin enjeksiyonu sonrası 30. saniyede cerrahi anestezi oluşur. Anestezik etki 10-20 dakikada sonlanır, daha uzun etki isteniyorsa ek olarak İV veya İM ketamin uygulanır. Böylece önemli kümülatif etki oluşturmadan anestezi sürdürülür. Tam derlenme oluşması 60-90 dakikayı gerektirir. S(+) ketamin, rasemik karışımla karşılaştırıldığında daha kısa derlenme süresine sahiptir (8).

Ketamin kullanımında erken derlenme döneminde psikomimetik reaksiyonlar görülür (halüsinasyonlar, kabuslar, kognitif fonksiyonlarda ve kısa dönemli hafızada değişiklikler). Doz bağımlı olan bu yan etkiler aynı zamanda benzodiazepinler, barbitürat veya propofol kullanımıyla önlenir. Derlenme odasında hastanın sözel, dokunma ve görsel stimülasyonlara maruziyeti en aza indirilirse psikomimetik reaksiyonlar azalır. Ketamin, sedasyon, hipnoz, somatik analjezi, bronkodilatasyon ve sempatik stimülasyonu içeren geniş bir farmakolojik etki spektrumuna sahiptir. Ketaminin sekresyonları arttırıcı özelliği, yüzeysel anestezi sırasında laringospazma neden olabilmektedir (1,8).

Ketaminin analjezik etkileri 0.1-0.5 mg/kg IV subanestezik dozlarda aşıkardır. Düşük doz (4 mcg/kg/dk) 2 mg/saat morfin infüzyonu ile eşdeğer postoperatif ağrı önleyici etkiye sahiptir. N-metil-D aspartat (NMDA) reseptör bloke edici etkisi, ketaminin preemtif analjezide ve opioidlere rezistans kronik ağrı durumlarında yüksek düzeyde etkili olmasına sebep olmaktadır (8).

Ketamin hipovolemik şokta, akut bronkospazmda, sağdan sola intrakardiyak şantlarda ve kardiyak tamponat durumlarında indüksiyon anestezisinde sık tercih edilmektedir (8).

Yan Etkiler

Kardiyovasküler sistem: Kan basıncı, nabız, ketamin uygulanımı sonrası sıklıkla yükselir. Kardiyak fonksiyonlar hipertansiyonu veya kalp yetmezliği olan hastalarda anestezi sırasında devamlı olarak monitörize edilmelidir.

Respiratuar Sistem: Ketaminle sıklıkla respirasyon stimüle edilmesine rağmen, hızlı şekilde uygulanım sonrası (60 saniye) respiratuar depresyon veya apne oluşabilmektedir.

Göz: Diplopi ve nistagmus, ketamin uygulanımı sonrası kaydedilmiştir. Ketamin sıklıkla intraoküler basınçta hafif yükselmeye neden olabilir.

Nörolojik sistem: Bazı hastalarda tonik klonik kasılmalarla bazen nöbete benzeyen değişmiş iskelet kas tonusu görülebilir. Ayrıca serebral kan akımı, serebral oksijen tüketimi ve intrakraniyal basınç değerleri yükselir.

Gastrointestinal sistem: Ketamin sonrası anoreksi, bulantı ve kusma gözlemlenmiştir, fakat bu sıklıkla ciddi değildir. Ketamin sonrası erken dönemde oral sıvı alınımına izin verilir.

Genel: Ketamin sonrası anaflaksi, enjeksiyon sahasında lokal ağrı, kızarıklık nadir olarak rapor edilmiştir (8).

Ketamin NMDA reseptör antagonistidir. NMDA reseptörü santral sinir sisteminde glutamat eksitatör amino asidinin bir alt gurubudur. NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılması nörotoksisite oluşumuna neden olmaktadır (2).

HİPOKAMPUS

İnsanda lateral ventrikül alt boynuzunun tabanında bulunan hipokampus, filogenetik olarak en eski beyin kısımlarından birisidir (Şekil 1). Kesitlerde C harfi şeklinde olan bu yapı ortalama 5 cm uzunluğundadır. Görünümü itibariyle denizatına benzetildiğinden hipokampus adı verilmiştir (5, 9). Algı ve bellek sistemleri arasında bağlantı kuran hipokampus, beynin birçok bölgesinden duyu lifleri almaktadır. Aldığı bu duyuları forniks aracılığıyla hipotalamus, talamus ve septal sahaya iletmektedir. Bunun yanı sıra, subkortikal alanlarla olan bağlantısıyla beynin birçok bölgesi ile iletişim halindedir. Öğrenme ve hafıza fonksiyonları üzerinde önemli role sahip olan hipokampus, yeni elde edilen bilgilerin depolanması ve anıların kısa süreli hafızadan uzun süreli hafızaya geçirilmesinde görev alır. Bu nedenle hipokampusta meydana gelebilecek bir hasar belirtilen fonksiyonlarda bozukluklara neden olabilir.

Nitekim hipokampus lezyonlarında, anıların kısa süreli bellekten uzun süreli belleğe alınmasında sorun olduğu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, verbal veya sembolik anıların hafızada tutulmasının da mümkün olamayacağı ifade edilmiştir (5, 6).

Hipokampus histolojik olarak iki bölgeye ayrılır. GD bölgesinde granüler hücreler, CA bölgesinde piramidal hücreler bulunur. GD bölgesindeki granüler hücreler CA bölgesindeki piramidal hücrelere kaynak oluşturmaktadır ve oluşan hücreler CA bölgesine doğru akmaktadır (10-12).

HİPOKAMPUS VE HAFIZA

Bellek beynin, öğrenme için gerekli olan bilgilerin depolanması ve geri çağırılması yeteneğini gösterir (13).

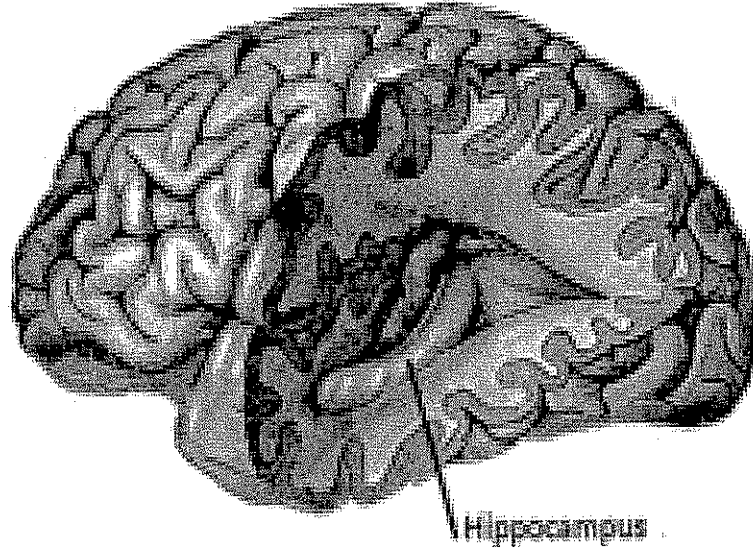
Geçici Hafıza Kaybı

Geçici hafıza kaybı, amnestik sendromun bir tipidir. Amnezinin en dikkat çekici örneği geçici (transient) global amnezi olup birkaç saat ile 24 saat içinde sonlanır. Bu sendromda, daha önceden kognitif açıdan iyi olan hastanın, aniden yakın zamana ilişkin olayları belleğinde tutamadığı, kendi çevresine ilişkin sürekli aynı soruları tekrarladığı ve bazen de karıştırdığı görülür (13).

Amnestik Sendrom

Amnestik sendrom yakın ve kısa süreli belleğin kaybını belirtir. Bu hastaların çoğunda iki taraflı hipokampal hasar bulunmaktadır. Anlık bellekleri korunmuştur. Uzak belleğin geri çağırma yeteneklerinin çoğu mevcuttur, örneğin çocukluk dönemlerini ve eğitim yıllarını hatırlarlar.

Amnestik sendromun nöroanatomi kognitif nöropsikolojide en iyi çalışılan alanlardan birisidir. Hayvan modellerinde hipokampus, parahipokampal girus ve entorinal korteksin iki taraflı lezyonları çok derin amnezi oluşturur. Temporal lobektomiye yapılan hastalar da epilepsi benzeri bulgular gösterdiği bildirilmiştir (13).



Şekil-1: Hipokampus beyinde medial temporal lobda yer alır. İnsan beyninin yandan görünüşünde, frontal lob solda, oksipital lob sağdadır, temporal ve parietal lob altında hipokampus ortaya çıkar (14).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Gaziosmanpaşa Üniversitesi (GOPÜ) Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından (2011 HADYEK-006) onaylandıktan sonra; GOPÜ Deneysel Araştırma Merkezi'nde yürütülmüş ve tüm hayvanlara; Uluslararası Laboratuvar Hayvanları Akademisinin ve National Institutes of Health'm Tüzüğüne göre davranılmıştır (NIH Publication 85-23, revised 1985).

Ortalama 250–300 gr ağırlığında 15 adet wistar albino cinsi dişi rat kullanıldı. Ratlar 5'erli olarak rastgele 3 gruba ayrıldı.

Grup I (kontrol grup): %0.9'luk salin solüsyonu (Serum Fizyolojik %0.9, ADEKA, Türkiye) 5 gün boyunca her gün saat 08:00, 12:00, 16:00, 20:00'de 4 kez olmak üzere insülin enjektörü ile (yaklaşık 300 gr ağırlığında olan ratlar için) 0.2 ml intraperitoneal enjeksiyon yapıldı.

Grup II, Grup III: 30 mg/kg ketamin (Ketalar®, PFİZER, Türkiye), 5 gün; saat 08:00, 12:00, 16:00, 20:00'de intraperitoneal olarak günde 4 kez uygulandı. Hayvanlara ketamin uygulamasını takiben bir saat süreyle anestezinin etkisi gözlemlendi.



Sekil 2: Ratlara eter kutusu içerisinde eter solutuldu.

Ratlar optimum yaşam şartlarında aynı ortamda aynı tür yiyecek ve su ihtiyaçları karşılanan barınaklarda Grup I ve Grup II, 5 gün, Grup III, 21 gün tutuldu. Grup I ve Grup II'deki ratlar 5. gün saat 20:00'da son doz ketamin uygulamasından sonra eksanguinasyon yöntemi uygulanarak sakrifiye edildiler. Grup III'teki ratlar 21. günün sabahında sakrifiye edildiler. Ratlara eksanguinasyondan önce eter kutusu içerisinde eter solutuldu (Şekil 2).

Ratlar öldükten sonra dekapite edildi, ardından makas yardımıyla kafa derisi uzaklaştırıldı. Kemik kesici makas yardımıyla foramen magnumdan girilerek öne doğru orta hat boyunca kafatası kemiği kesildi. Kemikler uzaklaştırılıp beyin künt olarak alttaki kafatası kemiklerinden ayrıldı. Ratların beyin dokuları çıkarılarak %10'luk formalin solüsyonu içerisine konuldu.

Histolojik tetkikler için ayrılmış olan beyin dokuları rutin histolojik işlemlerden geçirilerek parafine gömüldü. Parafine gömülen dokulardan rotary mikrotom ile 5 ve 20 mikronluk kesitler alındı. Alınan kesitler sistematik rastgele örnekleme yöntemiyle örneklendi. Bunun için; hipokampusün çalışmada kullanılacak bölgesi başından sonuna kadar kesildi. Elde edilen tüm kesitlerden sistematik rastgele örnekleme ile en az 10 kesit elde kalacak şekilde örnekleme yapıldı. Örneklemenin sistematikliği belli bir kesit örnekleme aralığında yapılması ile sağlandı. Bu ise şu şekilde belirlendi, diyelim ki elimizde toplam olarak "n" tane kesit olsun. Bu kesitlerden en az 10 tanesi elimizde kalabilmesi için $n/10 = k$ 'dan yola çıkarak her k'nci kesiti aldığımızda elimizde 10 kesit kalmış olur. Burada "k" kesit örnekleme aralığıdır. Örneklemenin rastgele olabilmesi ise 0 ile k arasındaki örneklenecek ilk kesitin rastgele olarak belirlenmesi temeline dayanır. Bunun için 0 ile k arasındaki (k dahil) kesitlerden biri ya rastgele sayı jeneratörü program ile veya kesit numaralarının her biri ayrı bir kağıda yazılıp içlerinden biri rastgele çekilerek seçilir. 0 ile k arasındaki kesit m'inci kesit olsun. Bu durumda örneklenen kesit numaraları şöyle olur: $\{m, m+k, m+2k, m+3k, \dots, m+9k\}$. Kesitlerin sistematik rastgele örnekleme şeması ile örneklenmesi neticesinde, yapının her yerinin eşit kesilme şansına sahip olması sağlanır.

Histolojik inceleme için preparatlar Cresyle Violet boyası ile boyanarak, beyinlerin hipokampus bölgeleri mikroskop altında ayırt edildi. Hipokampus

bölgesinde optik parçalama (optical fractionator) yöntemiyle sinir hücreleri sayılarak toplam nöron sayıları hesap edildi.

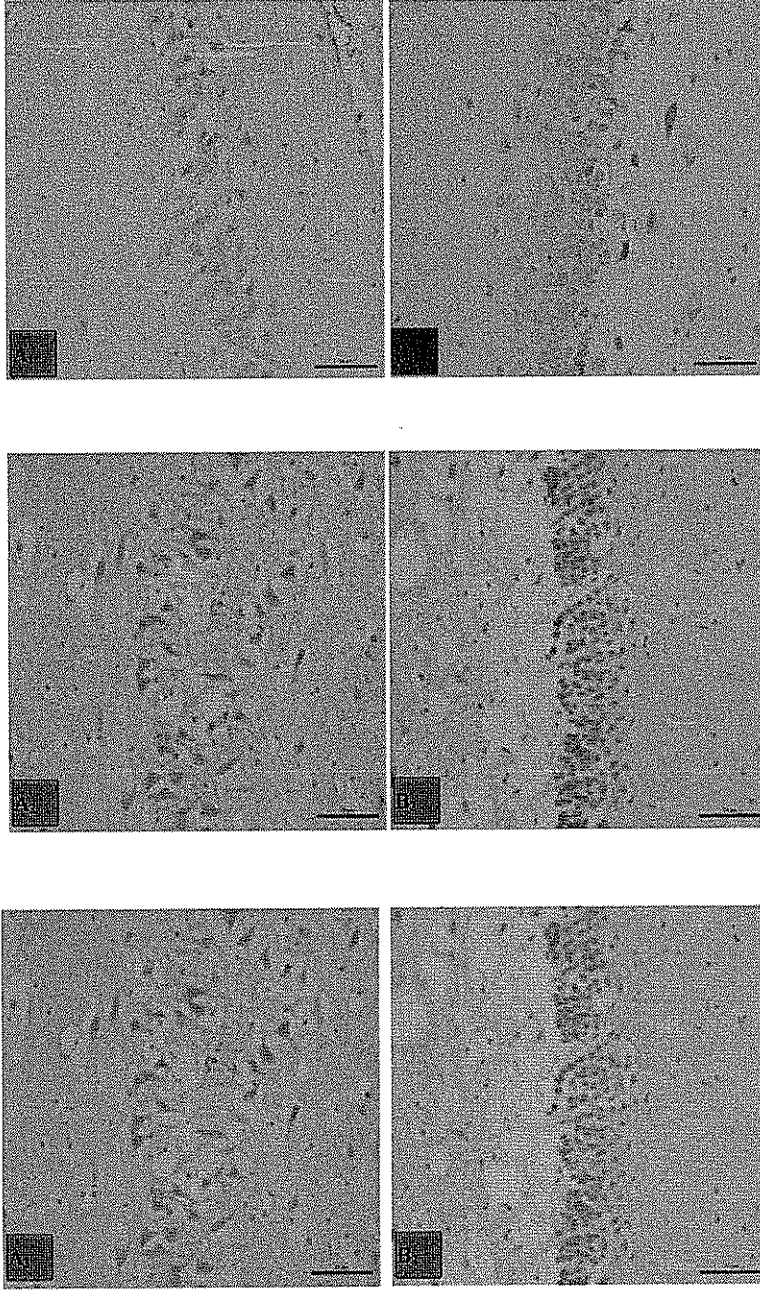
Çalışmada elde edilen veriler uygun istatistiksel yöntemler ile değerlendirildi (IBM SPSS istatistiks 19, SPSS inc., an IBM Co., somers, NY). Gruplar arasındaki karşılaştırma tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. İkili karşılaştırmalar ise post-hoc testlerinden Tukey testi ile gerçekleştirildi. Ölçülen değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-sminov testi ile analiz edildi.

BULGULAR

Gruplara ait rat hipokampusündeki CA ve GD bölgelerindeki hücrelerin mikroskopik görüntüsü Şekil 4'te gösterilmiştir. Sterolojik yöntemle hesaplanan ortalama toplam nöron sayısı CA bölgesinde Tablo 1'de, GA bölgesinde Tablo 2'de verilmiştir.

Grupların hipokampusta CA bölgesindeki ortalama nöron sayıları karşılaştırıldığında Grup II'de Grup I'e göre %62.33 azalmış olarak bulundu ve bu anlamlı kabul edildi ($p<0.001$). Grup III Grup I ile karşılaştırıldığında ortalama nöron sayısı Grup III'te %34.25 daha az bulundu ve anlamlı kabul edildi ($p<0.001$) (Tablo 1) (Şekil 4). Grup III ile Grup II'de ortalama nöron sayıları karşılaştırıldığında CA bölgesinde %74.54 oranında Grup III'te anlamlı olarak daha fazlaydı ($p<0.001$).

Grupların hipokampusteki GD bölgesindeki nöron sayıları karşılaştırıldığında Grup II'de Grup I'e göre %50.12 oranında azalma görüldü. Grup III ile Grup I karşılaştırıldığında hücre sayısı Grup I'e göre %33.88 daha azdı ($p<0.001$) (Tablo 2) (Şekil 5). Grup II ile Grup III'ün CA bölgesindeki hücre sayıları karşılaştırıldığında; Grup III'te (%28.08) anlamlı olarak daha fazlaydı ($p<0.001$). Grup II ile Grup III'ün GD bölgesindeki hücre sayısı karşılaştırılmasında Grup III'te %16.24 daha fazlaydı ve anlamlıydı ($p<0.001$).

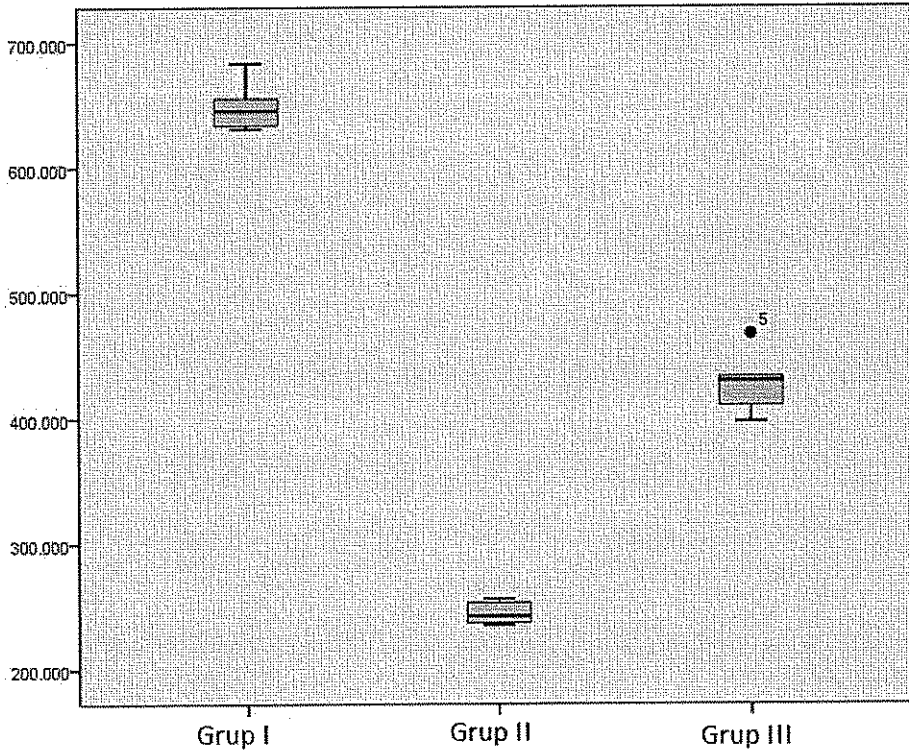


Şekil 3: Rat hipokampusünde CA ve GD bölgelerinin 40X büyütmede **mikroskobik görüntüsü** (A₁: Grup I CA bölgesi, B₁: Grup I GD bölgesi, A₂: Grup II CA bölgesi, B₂: Grup II GD bölgesi, A₃: Grup III CA bölgesi, B₃: Grup III GD bölgesi).

Tablo 1: Hipokampusta CA bölgesindeki toplam nöron sayıları.

Gruplar (n=5)	CV	Toplam nöron sayısı (Ort±SH)	p*
Grup I	0.3	649864,4±21071,95	<0.001
Grup II	0.3	244836,79±9388,26	<0.001
Grup III	0.6	427350,00±26598,33	<0.001

SH: standart hata, CV: varyasyon katsayısı (Coefficient of variation), Ort: ortalama
*: p değeri gruplar arası karşılaştırma için geçerlidir.

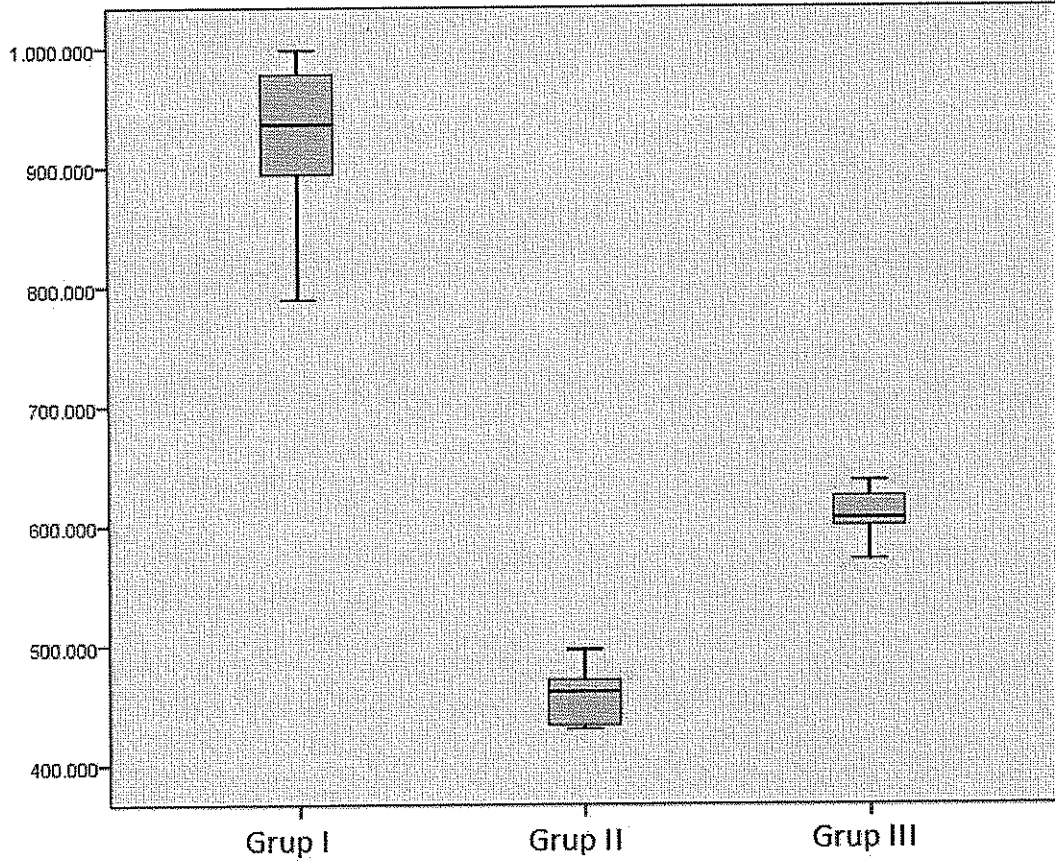


Şekil 4: CA bölgesinde nöron sayısının gruplara göre dağılımı

Tablo 2: Hipokampusta GD bölgesindeki toplam nöron sayıları.

Gruplar (n=5)	CV	Toplam nöron sayısı (Ort±SS)	p*
Grup I	0.08	919195,40±82800,85	<0.001
Grup II	0.05	458532,57±27649,69	<0.001
Grup III	0.04	607762,80±25071,84	<0.001

*: p değeri gruplar arası karşılaştırma için geçerlidir.



Şekil 5: GD bölgesinde nöron sayısının gruplara göre dağılımı.

TARTIŞMA

Ketamin insanlarda anestezide ve sedasyonda sık kullanılan hipnotik bir ilaç olmasına rağmen santral sinir sistemine olumsuz etkileri olduğunu belirten çalışmalar mevcuttur (2, 3). Çalışmamızda, tekrarlayan dozlarda verilen ketaminin; hipokampuste nöron sayısı üzerine olan etkilerini araştırdık. Tekrarlayan dozlarda ketamin, beyinde herhangi bir değişiklik oluşturuyorsa oluşan bu değişikliğin ketamin uygulamasından sonra (16 gün) devam edip etmediğini merak ettik. Çalışmamızda hücre sayım yöntemlerinden en tarafsız ve literatürde en çok kabul edilen yöntem olan optik fraksiyonlama metodu kullanıldı (15).

Hayashi ve ark. (2) tarafından belli dozlarda ve belli bir süre içinde ketaminin verilmesini takiben gelişmekte olan sıçan beyninde olumsuz etkisi olduğu gösterilmiştir. Çalışmalarında Cupric-Silver boyama ve sterolojik disektör yöntemini kullanmışlar. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tek doz ketaminin (25, 50 ve 75mg/kg) nöral dejenerasyonu arttırmadığını ancak ketaminin 90 dakikalık aralıklarla dokuz saat boyunca 25 mg/kg tekrarlayan dozlarda verilmesinin ise nöral dejenerasyonu arttırdığını göstermişlerdir. Çalışmamızda da ratlara tekrarlayan dozlarda ketamin uyguladık ve ketamin uygulamasını takiben Grup II ve Grup III'teki ratların hipokampusünün CA ve GD bölgesinde nöron sayısında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma olduğunu tespit ettik.

Grup III'te hücre sayısı CA bölgesinde Grup II'ye göre daha fazlaydı ve anlamlıydı ($p<0.001$). Bu farkın Grup III'teki ratların Grup II deki ratlardan 16 gün sonra sakrifiye edilmesine ve bu süre içerisinde yeni oluşan hücrelere bağlı olduğunu düşündük. Hipokampusteki nöronların azalmasını ketaminin hipokampus üzerine olan nörotoksik etkisine bağlı olduğunu düşündük.

Grup II ile Grup III'te CA ve GD bölgesindeki hücre sayıları karşılaştırıldığında Grup III'te daha fazlaydı ve anlamlıydı ($p<0.001$). GD bölgesinde fark daha azdı bu da GD bölgesinde hücre yapımının olduğunu göstermektedir (13-15).

Lopez-Galindo ve ark. (3) beyinin hipokampus ve amigdalea bölgelerinde sterolojik yöntemi kullanarak bir çalışma yapmışlardır. Lidokainden 30 dakika önce ketamin verildiğinde lidokainin sebep olduğu nörotoksiteye bağlı hücre hasarının

azaldığını görmüşlerdir. Lidokainin toksik etkisinin hücre içi kalsiyum hemostazını bozmasına veya NMDA reseptör aktive edici etkisine bağlı olabileceğini ve ketaminin NMDA reseptör bloke edici etkisiyle nöral hasarın engellenmiş olabileceğini düşünmüşler. Çalışmalarında tek doz ketamin uygulamışlardır biz ise tekrarlayan dozlarda ketamin uyguladık ve anlamlı düzeyde nöron kaybı olduğunu tespit ettik. Lopez-Galindo ve ark.'nın (3) kullandığı sterolojik yöntem baktığımız zaman bunun bizim çalışmamızda kullandığımız sterolojik yöntemin bir çeşidi olan optik fraksiyonlama yöntemi ile aynı olmadığını gördük. Çalışmalarında hücre değil, hücre profili (izdüşümü) saymışlardır. Profiller hücreyi temsil etse de kendileri hücre değildir. Çünkü üç boyutlu partiküller (hücreler) kesildiklerinde, büyüklükleri ve yönelimleri ile orantılı olarak iki boyutlu iz düşümler verirler. Yani bir kesit en büyük çapta olan hücre gövdeleri en çok sayıda, daha küçük çaplı çekirdekler daha az sayıda, en küçük çapta olan çekirdekçikler en az sayıda iz düşüm verirler (15). Ayrıca kesit kalınlığı da hücre sayımlarında bir handikaptır. Çünkü ne kadar ince olursa olsun, kesitlerinde bir kalınlığı vardır. Yine kesit kalınlığı arttıkça hücrelerin profil verme ihtimali artar. Bu nedenle sterolojik yöntem kullanmayan çalışmalarda önemli ön kabuller vardır. Bu ön kabüllerden birisi bütün hücreler aynı büyüklükte ve yönelimdedir, diğeri ise bütün kesitler aynı kalınlıkta ve kesitlerin her noktası aynı kalınlıktadır. Bu ön kabuller nedeniyle çalışmaya taraflılık katılmış olur ve taraflılık sistematik sapma gösterir (15). Biz çalışmamızda toplam hücre sayısını elde etmeye yarayan optik fraksiyonlama yöntemini kullandık. Bu yöntem en etkin ve en tarafsız (unbiased) yöntemdir (15-17). Elde ettiğimiz sonuçların taraflı yöntemler kullanılarak elde edilen sonuçlara göre daha güvenilir olduğunu düşünüyoruz.

Enomoto ve ark. (18) ketamin kullanımının hayvanlarda şizofreni ve benzeri psikotik ve kognitif semptomları tetikleyip tetiklemediğini araştırmak için, ketamin vermeden önce ratları eğitmişler ve 30 mg/kg günde iki defa, bir gruba beş gün süreyle, diğeri bir gruba on gün süreyle ketamin uygulamışlardır. Ketamin uygulamasını takiben on gün beklemişler ratları tekrar teste tabi tutmuşlar, on gün süreyle ketamin uyguladıkları rat grubunda hata yapma oranının kontrol grubuna göre arttığını gözlemlemişler. Tekrarlayan dozlarda ketamin uygulanmasının hafızayı olumsuz etkilediğini belirtmişlerdir. Biz onların beş günlük ketamin uygulamasında kontrol grubuna göre ratların hata yapma sayısının artmamasını oluşturan nöral hasarın

klirik bulgu verecek düzeyde olmamasından kaynaklanabileceğini düşünüyöruz. Günde dört defa 30 mg/kg ketamin uyguladık ve anlamlı seviyede mikrodüzeyde nöron kaybı oluştuğunu gördük (Tablo 1-2) (Şekil 3, 4).

Hunt ve ark. (19), subanesteziik hiperlokomotion ve sterotipi üretmek için tek doz ketamin (25 mg/kg) kullanımı ile yaptıkları çalışmada nükleus akkümbeşte uyarılmış potansiyellerin amplütüdünün düştüğünü görmüşlerdir. Bu bulgulara göre ketamin gibi NMDA reseptör antagonistlerinin sağlıklı bireylerde geçici şizofreniye benzer duruma sebep olabileceği ve şizofrenik hastalarda psikozları şiddetlendirebileceği sonucuna varmışlardır. Çalışmamızda tekrarlayan dozlarda ketamin uygulamasının hipokampusta nöron sayısında azalmaya neden olduğunu gördük.

Beyinde nöronlardan yaygın bir şekilde salınan asetilkolin (ACh) hafıza, öğrenme ve motor fonksiyonlar üzerinde etkili olabilir (20). Rat hipokampusünden ACh salınması kognitif fonksiyonlarla ilgili olabilmektedir (21). Hipokampüste artmış kolinerjik salınım bazı kognitif davranışları ortaya çıkarabilir (22). Sato ve ark. (23) mikrodializ yöntemini kullanarak ketamin ve pentobarbitalin rat hipokampus ve striatumundan ACh salınımına etkisini araştırmışlar ve ketaminin hipokampusta ACh salınımını arttırdığını bulmuşlardır. Ketaminin ACh salınımını uyarıcı etkisinin dopaminin DI reseptörüne bağlı olabileceğini düşünmüşler. Sato ve ark. (23) ACh salınımının hafıza ve öğrenme üzerinde etkili olabileceğini aynı zamanda ketamin anestezisi uygulanan hastaların kötü rüyalar görmesinin de buna bağlı olabileceğini düşünmüşlerdir.

Ketaminin halusinojenik, öforik ve amnezi yapıcı etkilerinden dolayı eğlence amacıyla kullanımı dünya çapında artmaktadır. Kafein içeren ketamin tabletlerinin üretimi ve kullanımı da artmaktadır (24). Hsu ve ark. (24) yaptıkları çalışmada kafeinin ketaminle indüklenen davranışsal ve toksik etkilerini incelemişlerdir. Ketaminle (20 mg/kg) birlikte kafein kullanımı ile lokomotor hiperaktivite gelişmiş, rotarod performas kaybı olmuş ve ölümler artmıştır. Bu bulgularla ketaminle birlikte kafein kullanımı ile ölüm riskinin arttığı ve ketaminle kafein arasında toksik etkileşim olduğu sonucuna varmışlardır. Çalışmamızda da ketaminin toksik etkisi görülmüştür.

Cui ve ark. (25) yaptıkları çalışmada ratların beyinlerindeki Ca^{+2}

/calmodulin-bağlı protein kinaz II (CaMKII)'nin total protein ve fotofosforilasyon seviyeleri üzerine propofol ve ketaminin etkilerini araştırmışlar. CaMKII yüksek konsantrasyonlarda, nöral dokularda bulunur ve Ca^{+2} aracılı hücrelerde biyosentez; hormon ve nörotransmitterlerin sekresyonu; aksonal taşınma ve reseptör fonksiyonunda rol alır (26-28). CaMKII'nin aktivasyonunu treonin 286 otofosforilasyonu yoluyla, nöral geçişte ve nöral uyarılmanın modülasyonu ile yapmışlardır. Ketamin ve propofolün (50, 100, 150 mg/kg) tek doz uygulanmasından sonra hipokampüs ve frontal kortekste immüno boyama ile p-CaMKII azalmasını teyit etmişler. Azalan p-CaMKII düzeylerini ketamin ve propofolle yapılan anestezi derinliği ile ilişkili bulmuşlar. Çalışmada tek doz ketamin uygulaması ile maksimum p-CaMKII azalması 60. dakikada görülmüş ve ortalama 240. dakikada bazal düzeye ulaşmıştır. Ketamin tekrarlayan dozlarda kullanılırsa nöronlarda apoptoza bağlı olarak p-CaMKII düzeyinin uzun süreli azalabileceğini ve aksonal taşınmada yavaşlama, nörotransmitterlerin sekresyonunda ve reseptör fonksiyonunda azalmaya neden olabileceğini düşünüyoruz

Anand ve ark. (4) ketaminin nöroprotektif etkilerinin olduğunu çalışmada ketamin ve %4 lk formaldehit kullanarak yenidoğan ratlarda inflamatuvar ağrıyı takiben hücre ölümünün arttığını saptamışlardır. Nroaktivasyonu Fos protein ile değerlendirmışler, hücre ölümünü FluoroJade-B ile, radyal kollu labirent ile bilişi, sıcak plaka ile ağrı eşiğini değerlendirmışler. Formaldehit kullanımı ile kortikal ve subkortikal alanda hücre ölümünün arttığını gözlemlemişler ve ketamin kullanımı ile nöral hasarın iyileşiğini gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak yenidoğanda tekrarlayan ağrının kortikal ve subkortikal alanda hücre ölümünü ve nöral eksitasyonu arttırdığını bulmuşlardır. Ketaminin bu yan etkilerin çoğunu azalttığını göstermişlerdir. Anand ve ark. (4) ketamini subanestezik dozda 2.5 mg/kg iki kez subkutan olarak uygulamışlar. Bu ketamin dozu, bizim uyguladığımız doza göre çok düşük bir dozdur. Bu doz ağrıyı ortadan kaldırmış ve inflamasyonu gidermiş olabilir. Biz yüksek dozlarda (30 mg/kg) ve 5 gün süreyle ketamin uyguladık ve Anand ve ark.'nın (4) aksine ketamin kullanımı ile hücre ölümünün arttığını bulduk.

Çalışmamızda sekiz haftalık ratlar kullanıldı ve tekrarlayan dozlarda ketamin verilmesi ile ratlarda hipokampuste sinir hücrelerinin azaldığı saptandı. Hayashi ve ark. (2) yenidoğan ratların kullanıldığı çalışmalarında tekrarlayan dozlarda ketaminin

beyinde nöral dejenerasyonu arttırdığını görmüşlerdir. Bildiğimiz kadarıyla literatürde ratlarda hipokampusta toplam hücre sayısını elde etmeye yarayan optik parçalama yöntemini kullanarak yapılmış çalışmalar yoktur. Tekrarlayan dozlarda ketamin uygulamasının hipokampus üzerine yaptığı etki çocuklarda, erişkinlerde ve yaşlılarda farklı farklı olabilir (4). Ayrıca biz ketamin uygulamasından 16 gün sonra (Grup III) incelediğimizde Grup II'ye göre hücre sayısının arttığını bulduk ve bunun hipokampus dokusunda, GD bölgesinde yeni oluşan hücrelerin CA bölgesine doğru göç etmesine bağlı olabileceğini düşündük. Bu nöral hasarın iyileşme düzeyi ve süresi, belki ratlarda insan beynindekinden farklı olabilir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda 5 gün tekrarlayan dozlarda ketamin uygulamasından hemen sonra ve 5 gün tekrarlayan dozlarda ketamin uygulamasından 16 gün sonra hipokampusteki hücre sayısı sterolojik yöntem kullanılarak hesaplanmıştır. 5 gün ketamin uygulamasından hemen sonra ve 5 günlük ketamin uygulamasından 16 gün sonra kontrol grubuna hücre sayısının azaldığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, 16 gün sonra bakılan Grup III'de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde iyileşme mevcut iken bunun kontrol grubu seviyesinde bir iyileşme olmadığı saptanmıştır. Ketamin anestezi uygulamalarında sık kullanılan bir ilaç olduğundan elde ettiğimiz sonuçlar ketamin uygulamalarının tekrar gözden geçirilebileceğini düşündürmektedir. Tekrarlayan dozlarda ketamin sonrası iyileşmenin ne kadar devam edip etmeyeceği, daha fazla denek sayısı, farklı dozda ketamin uygulamaları ve uygulamadan sonra daha uzun dönemleri kapsayacak şekilde çalışmalar yapılabilir. Sonuç olarak, çalışmamızda ketaminin tekrarlayan dozlarının hipokampus hücrelerinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- 1) Miller RD. Intravenous Anesthetics. In: Reves GJ, Glass P, Lubarsky DA ve ark. (Ed.). Miller's Anesthesia, 7th ed., USA: Churchill Livingstone. 2010: 719-58.
- 2) Hayashi H, Dikkes P and Soriano S. Repeated administration of ketamine may lead to neuronal degeneration in the developing rat brain. Paediatr Anaesth. 2002; 12: 770-74.
- 3) Lopez-Galindo GE, Cano-Europa E, Ortiz-Butron R. Ketamine prevents lidocaine-caused neurotoxicity in the CA3 hippocampal and basolateral amygdala regions of the brain in adult rats. J Anesth. 2008; 22: 471-74.
- 4) Anand K, Garg S, Rovnaghı CR ve ark. Ketamine reduces the cell death following inflammatory pain in newborn rat brain. Pediatr Research. 2007; 62: 32-42.
- 5) Songur A, Ozen OA, Sarsılmaz M. Hipocampus. J Med Sci. 2001; 21: 427-31.
- 6) Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology, 11 th ed., China: Elsevier Inc., 2006: 736.
- 7) Morgan GE, Clinical Anesthesiology, 5. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, Tulunay M, Cuhruk H. (Çev. Ed.).2005;180
- 8) Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK. Clinical Anesthesia. 5 th ed., Philadelphia:Williams and Wilkins , 2006: 336-37.
- 9) Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 3. Baskı, Ankara: Gunes Kitabevi, 2001: 318-321.
- 10) Lisman J. Formation of the non-functional and functional pools of granule cells in the dentate gyrus: role of neurogenesis, LTP and LTD. J Physiol. 2011; 589:1905-09.
- 11) Ming G, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. Neuron. 2011; 70: 687-02.
- 12) Mu Y, Gage FH. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. Mol Neurodegener. 2011; 6: 85-04.
- 13) Bradley WG. Neurology in Clinical Practice. 2 th ed., Newton. Butterweth-Heineman and Elsevier group. 1996: 59-79.
- 14) Gray H. Anatomy of the Human Body. 30th ed., Philadelphia: Lea and Febiger,1985: Fig. 739.
- 15) Geinisman Y, Gundersen HJ, Zee E ve ark. Unbiased stereological estimation of the total number of synapses in a brain region. J Neurocytol. 1996; 25: 805-19.

- 16) Cruz-Orive LM, Weibel ER. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *Am J Physiol.* 1990; 258: 148-56.
- 17) Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF ve ark. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 1988; 96: 857-81.
- 18) Enomoto T, Floresco SB. Disruptions in spatial working memory, but not short-term memory induced by repeated ketamine exposure. *Prog Neuro Psychopharmacol Biol Psychiatry.* 2009; 33: 668-75.
- 19) Hunt MJ, Kessal K, Garcia R. Ketamine induces dopamine-dependent depression of evoked hippocampal activity in the nucleus accumbens in freely moving rats. *J Neuroscience.* 2005; 25: 524-31.
- 20) Cooper JR. Unsolved problems in the colinergic nervous system. *J Neurochem.* 1994; 63: 395-99.
- 21) Imperato A, Obinu MC, Gessato GL. Effect of cocaine and amphetamine on acetylcholine release in the hippocampus and caudate nucleus. *Eur J Pharmacol.* 1993; 238: 377-81.
- 22) Imperato A, Obinu MC, Gessato GL. Stimulation of both dopamine D1 and D2 receptors facilitates in vivo acetylcholine release in the hippocampus. *Brain Res.* 1993; 618: 341-45.
- 23) Sato K, Wu J, Kukichi K, Wang Y ve ark. Differential effects of ketamine and pentobarbitane on acetylcholine release from the rat hippocampus and striatum. *Br J Anesth.* 1996; 77: 381-84.
- 24) Hsu HR, Mei YY, Wu H ve ark. Behavioural and toxic interaction profile of ketamine in combination with caffeine. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2009; 104: 379-83.
- 25) Cui X, Li J, Li T ve ark. Propofol and ketamine-induced anesthetic depth-dependent decrease of CaMKII phosphorylation levels in rat hippocampus and cortex. *J Neurosurg Anesthesiol.* 2009; 21: 145-54.
- 26) Soderling TR, Derkach VA. Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends Neurosci.* 2000; 23: 75-80.
- 27) Fukunaga K, Miyamoto E. A working model of CaM kinase II activity in hippocampal long-term potentiation and memory. *Neurosci Reserch.* 2000; 38: 3-17.

28) Takeuchi Y, Yamamoto H, Fukunaga K, ve ark. Identification of the isoforms of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II in rat astrocytes and their subcellular localization. *J Neurochem.* 2000; 74: 2557-67.