T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

BUPİVAKAİNİN OZONLANMASININ; BUPİVAKAİN İLİŞKİLİ NÖROTOKSİSİTENİN ÖNLENMESİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Mehmet Ali HARBELİOĞLU

Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR
2021

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

BUPİVAKAİNİN OZONLANMASININ; BUPİVAKAİN İLİŞKİLİ NÖROTOKSİSİTENİN ÖNLENMESİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Mehmet Ali HARBELİOĞLU

Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Yeliz KILIÇ

ESKİŞEHİR
2021

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Mehmet Ali Harbelioğlu'na ait "Bupivakainin Ozonlanmasının; Bupivakain İlişkili Nörotoksisitenin Önlenmesindeki Etkisinin Araştırılması" adlı çalışma jürimiz tarafından Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: ..../…./….

Jüri Başkanı Dr. Öğr. Üyesi Yeliz KILIÇ
Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı

Üye Prof. Dr. Birgül YELKEN
Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı

Üye Prof. Dr. Alparslan KUŞ
Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun ..…./…../..….
Tarih ve …….. Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. İ. Özkan ALATAŞ
Dekan

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı'nda asistanlık eğitimime başladığım günden bu yana, bana bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren sayın hocalarım Prof. Dr. Mehmet Sacit GÜLEÇ'e, Prof. Dr. Birgül YELKEN'e, Prof. Dr. Ayten BİLİR'e, Prof. Dr. Gülay ERDOĞAN KAYHAN'a, Doç. Dr. Serdar EKEMEN'e, Doç. Dr. Dilek ÇETİNKAYA'ya, Doç. Dr. Sema ŞANAL BAŞ'a , Dr. Öğr. Üyesi Yeliz KILIÇ'a, Doç. Dr. Ferda YAMAN'a, Uzm. Dr. Meryem ONAY'a, teşekkür ederim. Asistanlık eğitimim boyunca hem eğitimden sorumlu hocalığımı hem de tez danışman hocalığımı yaparak benden desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Yeliz KILIÇ'a minnetlerimi sunarım. Ayrıca tez jürimde bulunan Prof. Dr. Birgül YELKEN ve Prof. Dr. Alparslan KUŞ hocalarıma, tez planlama ve yazım aşamalarımda sürekli başını ağrıttığım Prof. Dr. M. Sacit GÜLEÇ hocama ilgileri ve destekleri için çok teşekkür ederim. Asistanlık hayatıma başladığım Harran Üniversitesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon bölümü öğretim üyeleri ve asistan arkadaşlarıma bana olan emekleri ve destekleri için çok teşekkür ederim. Eğitim sürecim boyunca her konuda yardımlarını esirgemeyen tüm ESOGÜ Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı araştırma görevlileri ve anestezi tekniker/teknisyenlerine tek tek teşekkür ederim. İstatistik bilgisiyle bana yardımcı olan arkadaşım Arş. Gör. Dr. Ayşegül MUTLU'ya teşekkür ederim. Tüm hayatım boyunca sevgi ve desteklerini her zaman arkamda hissettiğim, tüm zorluklarda sabırla yanımda olan annem Yıldız Harbelioğlu'na, babam Ali Harbelioğlu'na, kardeşlerim Yelda ve Alican Harbelioğlu'na maddi ve manevi desteklerinden dolayı nefes aldığım her gün teşekkür ediyorum. Hayatıma sonradan giren ve varlığı ile tüm eksik parçalarımı tamamlayan canım eşim Ceren Merve Harbelioğlu ve biricik oğlumuz Ali Çınar'a sonsuz aşkla teşekkür ediyorum.

ÖZET

Harbelioğlu, M.A. Bupivakainin Ozonlanmasının; Bupivakain İlişkili Nörotoksisitenin Önlenmesindeki Etkisinin Araştırılması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2021. Bu çalışmada amacımız, bupivakain ilişkili nörotoksisitenin önlenmesinde veya azaltılmasında; bupivakainin ozonlanmasının sıçan siyatik sinirlerindeki etkisini incelemek. Ayrıca sekonder amacımız da toksisitesi olan bir ilacın ozonlanarak toksisitesinin azaltılabileceğinin ilk kez gösterilmesidir. Öncelikle ozonlama işlemi ile bupivakainde yapısal değişiklik olmadığı 1H(Proton) Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) incelemesi ile gösterildi. Çalışmamızda sıçanları kontrol, bupivakain ve ozonlanmış bupivakain olmak üzere 3 ana gruba ayırdık. Ayrıca her grubu da 3. veya 7. gün örnek alınmak üzere 2 alt gruplara ayırdık. Ardından sıçanlar anestezi altında cerrahi diseksiyon ile siyatik sinir visualize edildi ve grubuna göre salin, bupivakain veya ozonlanmış bupivakain siyatik bifurkasyo proksimaline perinöral olarak enjekte edildi. Anesteziden derlenmeleri ile tüm sıçanlarda lokal anestezi etki süresinin ve fonksiyonel bloğun değerlendirilmesi yapıldı. 6 alt grubumuzdan siyatik sinir örnekleri gruplarına göre 3. veya 7. günde cerrahi olarak alındı ve immünohistokimyasal boyama, TUNNEL boyama ve transmission elekton mikroskobisi(TEM) ile nörotoksisite incelendi. Sonuçlarımızda ozonlanmış bupivakainin ışık mikroskobu incelemelerinde, immünohistokimyasal boyama (Neuroflament, S100, SOD, TNF-alfa) H-Skor analizlerinde ve TUNNEL boyama sonrası apoptotik indeks değerlerinde nörotoksisiteyi istatistiksel anlamlı olarak azalttığını gördük. Hem 3. gün gruplarında hem de 7. gün gruplarında bu protektif etki görüldü. Ayrıca yapılan fonksiyonel testlerde, bupivakain ile ozonlanmış bupivakain arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığını tespit ettik. Sonuç olarak yeni bir teknik olarak bupivakainin ozonlanmasının, ilaç etkinliğini bozmadan, sıçan siyatik sinir dokusunda nörotoksisitenin azalttığını gösterdik.

Anahtar Kelimeler: Bupivakain ilişkili nörotoksisite, bupivakain, nörotoksisite, ozon

ABSTRACT

Harbelioğlu MA, The Effect of Ozonation-Bupivacaine on the Prevention of Bupivacaine Induced Neurotoxicity. Osmangazi University Faculty of Medicine Anesthesiology and Reanimation Department Residency Thesis, Eskisehir, 2021. Our aim in this study is to demonstrate the efficacy of ozonated-bupivacaine in reducing or preventing bupivacaine-related neurotoxicity in rat sciatic nerves. In addition, our secondary aim is to show that, the toxic effect of a neurotoxic drug can be reduced by ozonation. We conducted our study in 60 male, 10-12 weeks old (250-350gr) rats. We obtained sciatic nerve samples from these rats on day 3 or 7 from the control, bupivacaine and ozonated bupivacaine groups. We examined these samples by immunohistochemical staining, TUNNEL staining and transmission electron microscopy (TEM). In addition, the duration of local anesthesia effect and functional block were evaluated in all rats. After the NMR examination, it was observed that there was no change in the molecular structure of bupivacaine with the ozonation process. Then, the sciatic nerve was visualized by surgical dissection under anesthesia and saline, bupivacaine or ozonated bupivacaine were injected perineurally according to the group. In our results, we found that ozonated bupivacaine statistically significantly reduced neurotoxicity in light microscopy examinations, immunohistochemical staining (Neuroflament, S100, SOD, TNF-alpha) H-Score analyzes and apoptotic index values after TUNNEL staining. This protective effect was seen in both the 3rd day groups and the 7th day groups. In addition, in the functional tests, we found that there was no statistically significant difference between bupivacaine and ozonated bupivacaine. As a result, we showed that ozonation of bupivacaine as a new technique reduces neurotoxicity in rat sciatic nerve tissue without impairing drug efficacy.

Key Words: Bupivacaine-induced neurotoxicity, bupivacaine, neurotoxicity, ozone

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
TABLOLAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Lokal Anestezikler	2
2.2. Lokal Anesteziklerin Tarihçesi	2
2.3. Lokal Anesteziklerin Kimyası	3
2.4. Lokal Anesteziklerin Farmakokinetiği	4
2.5. Lokal Anesteziklerin Farmakodinamiği	6
2.5.1. Etki Mekanizmaları	6
2.5.2. Lokal Anesteziklerin Yapısal Özelliklerinin Etkisi	7
2.5.3. Sinir Hücresinin Yapısal Özelliklerinin Etkisi	7
2.5.4. Blokajın klinik değişkenleri	8
2.6. Lokal Anestezi Toksisitesi	9
2.6.1. Lokal Anestezi Sistemik Toksisitesi	9
2.6.2. Lokal Anestezi Santral Sinir Sistemi Toksisitesi	9
2.6.3. Lokal Anestezi Kardiyotoksistesi	10
2.6.4. İmmünolojik Reaksiyonlar	10
2.6.5. Lokal Anestezinin Kas İskelet Sistemi Etkileri	11
2.6.6. Lokal Anestezi İlişkili Nörotoksisite	11
2.6.7. Lokal Anestezi Toksisitesinde Tanı ve Tedavi	11
2.6.8. Lokal Anestezi Toksisitesinin Önlenmesi	12
2.6.9. Lokal Anestezi Toksisite Tedavisi	13

Sayfa

2.7.	Sık Kullanılan Lokal Anestezikler	15
2.7.1.	Ester Grubu Lokal Anestezikler	15
2.7.2.	Amid Grubu Lokal Anestezikler	15
2.8.	Ozon Gazı	17
2.8.1.	Ozon Gazının Etki Mekanizması	18
2.8.2.	Ozon Gazının Medikal Kullanımı	19
2.8.3.	Ozon Tedavisinin Potansiyel Yan etkileri ve Kontraendikasyonları	24
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1.	Çalışmanın Planlanması ve İlaçların Temini	26
3.2.	Deney Hayvanlarına Uygulanan İşlemler	27
3.2.1.	Cerrahi Diseksiyon ve İlaç Uygulama	27
3.2.2.	Fonksiyonel Değerlendirme	29
3.2.3.	Doku Örneklerinin Toplanması	33
3.3.	Doku Örneklerinin Değerlendirilmesi	33
3.3.1.	Histolojik Yöntemler	33
3.3.2.	İmmunhistokimyasal Boyama Yöntemi	34
3.3.3.	TUNNEL Boyama Yöntemi	36
3.3.4.	Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile İnceleme	36
3.4.	İstatistiksel Değerlendirme	37
4.	BULGULAR	38
4.1.	Morfolojik Bulgular	38
4.1.1.	Elektron Mikroskobik Bulguları	38
4.1.2.	Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM) bulguları	41
4.2.	İmmünohistokimyasal Bulgular	43
4.3.	TUNNEL Bulguları	53
4.4.	Fonksiyonel Değerlendirme Bulgularımız	56
5.	TARTIŞMA	59
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	65
	KAYNAKLAR	66

SİMGELER VE KISALTMALAR

Ach	Asetilkolin
ASRA	Amerikan Rejyonel Anestezi ve Ağrı Derneği
GABA	Gama-aminobütirik asit
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
IgE	İmmünglobulin E
IgG	İmmünglobulin G
KPR	Kardiyopulmoner resüsitasyon
LA	Lokal Anestezik
LAST	Lokal Anestezi Sistemik Toksisitesi
LOPs	Lipid Peroksidasyon türevleri
mg	miligram
mmHg	Milimetre civa
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NMDA	N-metil-D-aspartat
Nml	nano mililitre
PABA	p-aminobenzoik asit
PUFA	Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
ROS	Serbest Oksijen Radikalleri
SSS	Santral Sinir Sistemi
TNF	Tümör Nekroz Faktör
USG	Ultrasonografi
WFOT	Dünya Ozon Terapisi Federasyonunun
Yy	Yüz yıl
µg	Mikrogram
^{o}	Derece

ŞEKİLLER

		Sayfa
2.1.	Lokal Anesteziklerin kimyasal yapısı	3
2.2.	Ozon peroksitleri	18
4.1.	Neuroflament H-Skoru	47
4.2.	S100 H-Skoru	47
4.3.	SOD H-Skoru	49
4.4.	TNF-alfa H-Skoru	49
4.5.	TUNNEL testi apopototik indeks değerleri	54
4.6.	Motor blok çözülme süreleri	57
4.7.	Duyusal Blok çözülme süreleri	57

RESİMLER

		Sayfa
3.1.	Cerrahi İşlemler	28
3.2.	Motor fonksiyonun değerlendirilmesi	30
3.3.	Bulldog Forceps ile Duyusal Blok değerlendirilmesi	31
3.4.	Hot-plate testi	32
3.5.	Hitachi HT 7800 marka Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)	37
4.1.	Hematoksilen-Eozin boyama bulguları	39
4.2.	LuxolFast Blue (LFB) boyama bulguları	40
4.3.	Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM) bulguları	42
4.4.	Neuroflament immünohistokimya boyaması	46
4.5.	S100 immünohistokimya boyaması	48
4.6.	Süperoksitdismutaz immünohistokimya boyaması	50
4.7.	TNF-alfa immünohistokimya boyaması	51
4.8.	Tunnel boyaması	55

TABLOLAR

		Sayfa
2.1.	Lokal Anesteziklerin Yarılanma Ömrü ve Etki Süresine Göre Gruplar	4
2.2.	Lokal Anesteziklerin Farmakokinetiği	6
2.3.	Sinir Liflerinin Fonksiyonel ve Yapısal Gruplandırması	8
2.4.	Ozon Gazının Sıklıkla Kullanılan Lokal Uygulama Yöntemleri	21
2.5.	Ozon Gazının Sıklıkla Kullanılan Sistemik Uygulama Yöntemleri	22
2.6.	Ozon Tedavisinin Uygulama Yolları	23
2.7.	Ozon Tedavisinin Endikasyonları ve Önerilen Uygulama Şekli	24
4.1.	3. gün siyatik sinir immünohistokimyasal boyama H-Skorları	44
4.2.	7. gün siyatik sinir immünohistokimyasal boyama H-Skorları	45
4.3.	Kontrol grubu İmmünohistokimyasal boyama 3. ve 7. gün H-Skorları	52
4.4.	Bupivakain grubu immünohistokimyasal boyama 3. ve 7. gün H-Skorları	52
4.5.	Ozonlanmış Bupivakain immünohistokimyasal 3. ve 7. gün H-Skorları	53
4.6.	Motor blok çözülme süreleri	56
4.7.	Duyu blok çözülme süreleri	58

1.GİRİŞ

Bupivakain; uzun etki süresi ve kolay ulaşılabilir olması, yan etki profilinin diğer lokal anesteziklere kıyasla daha az olması nedeniyle anestezi pratiğinde sıklıkla kullanılmaktadır. Rejyonel anestezinin korkulan komplikasyonlarının (lokal anestezi sistemik toksisitesi, sinir hasarı vb) USG kullanımı ve sinir stimulatörlerinin yardımı ile azalmasının ardından; yeni gündem verilen ilaçların direk kimyasal toksistesinin araştırılması ve bu toksisitelerin nasıl azaltılacağı olmuştur. Özellikle bupivakain kullanım sıklığı nedeniyle bupivakain ilişkili toksisite araştırmaları artmaktadır. Yapılan çalışmalar serbest oksijen radikallerine ve oksidadif strese işaret etmektedir. Anti oksidan etkinliği bilinen ve yine sitoprotektif bir molekül olması nedeniyle ozon ise doku iyileşmeleri ve protektif etkileri başta olmak üzere birçok konuda çalışmaların konusu olmaktadır. Yakın zamanda nöroprotektif etkisinin de gösterildiği ozon klinik olarak ulaşılabilir olması, kullanım kolaylığı sağlaması ve ucuz olmasının yanı sıra nöroprotektif etkisinin olduğu yolunda çalışmaların olması nedeniyle protektif ajan olarak seçilmiştir. Hipotezimiz ozonlanmış bupivakainin antioksidan mekanizması ve oluşturduğu lipid oksidayon ürünleri ile bupivakain ilişkili nörotoksisitenin azaltılabileceğidir. Çalışmamızda ozonlanmış bupivakainin, sıçan siyatik sinirlerinde bupivakain ilişkili nörotoksisiteyi azalttığını, kontrol ve bupivakain grupları ile karşılaştırarak göstermeyi amaçlıyoruz. Ayrıca sekonder amacımız da toksisitesi olan bir ilacın ozonlanarak, toksisitesinin azaltılabileceğinin ilk kez gösterilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Lokal Anestezikler

Lokal anestezik (LA) ilaçlar; uygulandıkları bölge, doz, hacim, konsantrasyon ve uygulama biçimine bağlı olarak sinir iletimini geçici bir süreliğine bloke eden ve bu sayede anestezi sağlayan ilaçlardır. Bu ilaçların kullanımı ile duyusal, motor ve sempatik sinirlerde iletimin bloke edilmesi sağlanmış olur. Kimi durumlarda bu etkilerin tamamı amaçlanırken, çoğu zaman duyusal blok esas amaç olmaktadır. Bu ilaçlar sıklıkla analjezik olarak kullanılsa da, tüm duyusal modalitelerin tamamen kaybolmasını sağlama yetenekleri de mevcuttur(1). Bu yetenekleri nedeniyle klinik pratikte oldukça yaygın kullanılan lokal anesteziklerin, daha detaylı araştırılması ve geliştirilmesi ihtiyacı mevcuttur.

2.2. Lokal Anesteziklerin Tarihçesi

Cerrahi müdahale esnasında lokal analjezi amacı ile farklı yöntemler denenmiştir. Ambroise Pare 16.yy'ın başlarında; ampütasyon öncesinde ekstremitenin sıkıştırılmasının, insizyondan kaynaklanan ağrıyı azalttığını gözlemlemiştir. Benjamin Bell, 1796 tarihli kitabında, ampütasyonlar esnasında ağrıyı azaltmak amacı ile sinir kompresyonunu tarif etmiştir(2). 1844'de Francis Rynd, enjektör öncülü kabul edilen, dokulara sıvı gönderebilen bir alet geliştirmiştir. Alexandr Wood ise bu aleti geliştirmiş ve bu delikli iğneyi kullanarak tedaviler uygulamıştır, bu sayede oral yol dışında uygulama tekniklerinin önü açılmıştır(3). 1858'deki raporunda ağrılı nöraljileri, hipodermik morfin ile tedavi ettiğini bildirmiştir. Sterilite ve bakteriyal aseptik koşulların iyileştirilmesi ile birçok doktor hipodermal enjeksiyon tekniğini kullanmaya başlamıştır.

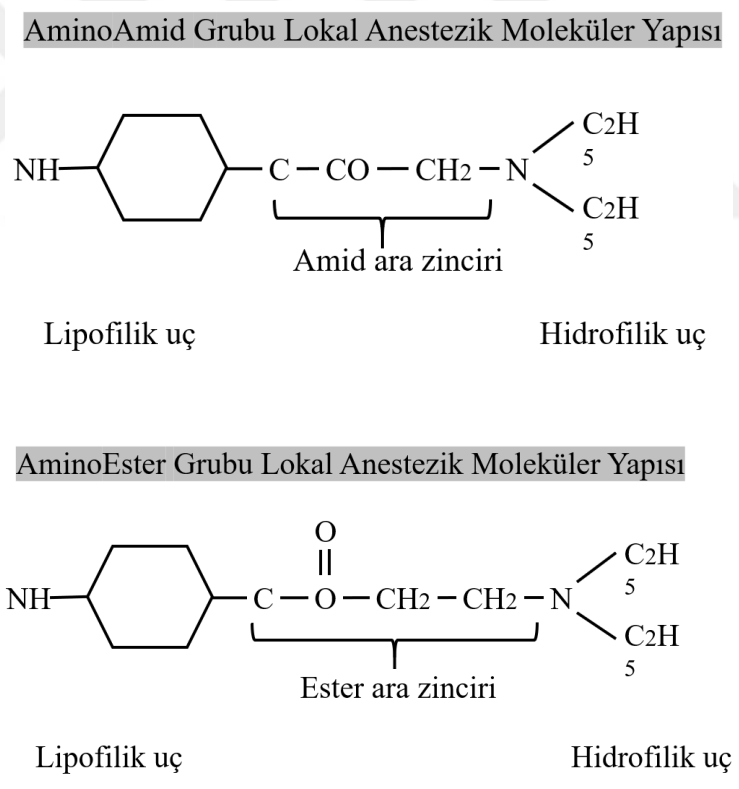
Albert Niemann tarafından 1856 yılında, doğal medikal bitki olan erythroxilon coca'dan kokainin izole edilmiştir. 1884 yılında bir göz doktoru olan Carl Koller'in kokaini topikal uygulama ile göz cerrahisinde anestezi oluşturulduğunu yayınlaması ile modern lokal anestezinin temelleri atılmıştır(4). August Bier, 1898'de %0,5'lik kokaini, intratekal uygulayarak ilk kez cerrahi amaçla spinal anestezi gerçekleştirmiştir(2). 1905'te Alfred Einhorn tarafından, daha az toksik bir lokal

anestezik olan prokain tanıtılmıştır. İlk brakiyal pleksusun perkütan blokları 1911'de tanımlanmış ve periferik sinir bloklarının gelişimi günümüze kadar devam etmiştir.

Son gelişmeler sayesinde sinirlerin doğrudan elektriksel uyarımı veya ultrasonla görüntülenmesi yoluyla sinir lokalizasyonu yapılabilmekte ve lokal anestezi uygulamaları yaygın biçimde kullanılmaktadır.

2.3. Lokal Anesteziklerin Kimyası

Lokal anestezik maddeler; çoğunlukla aromatik bir halka (lipofilik grup), iyonize olabilen tersiyer amin ve bir ara zincirden oluşmaktadır. Ara zincir ile iyonize olabilen (amin) grup arasında amid veya ester bağı bulunur (Şekil 2.1). Amid bağlarının hidrolize olma eğilimleri, ester bağlarına göre daha azdır ve bu sayede amid grubu ilaçların etki süreleri daha uzundur.



Şekil 2.1. Lokal Anesteziklerin kimyasal yapısı

Lokal anestezik ilaçlar zayıf bazik ilaçlardır. Bu ilaçların vücuttaki stabilitelerini ve çözünürlüklerini arttırmak için tuzlar şeklinde kullanılırlar. Lokal

anestezikler vücut sıvısının pH'sı ve ilacın pKa.sına göre; yüksüz bazlar ve konjuge asitler halinde Henderson-Hasselbach denklemine uygun oranlarda bulunurlar(1).

Lokal anesteziklerin büyük çoğunluğu 7,5- 9,0 pKa'ya sahiptir ve bu sayede fizyolojik pH'da yüklü (katyonik) formu yüksek oranda bulunur. Katyonik form reseptör bölgesinde en aktif formdur. Lokal anesteziklerin etki ettiği reseptör sodyum kanalının iç yüzeyindedir. Bu reseptöre ulaşmak üzere membrandan geçişi gereklidir ancak katyonik(yüklü) form geçiş açısından zayıftır(2). Lokal anesteziğin reseptörüne ulaşması için yüksüz hali, reseptörde etkinlik göstermesi de yüklü halinin dengesi ile sağlanmaktadır.

Lokal Anestezik ilaçlar; yapısında bulunan ara zincir ile iyonize olabilen grubun bağlanma biçimine göre amid ve ester gruplarına, etki sürelerine göre de kısa, orta ve uzun olarak gruplara ayrılmaktadır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Lokal Anesteziklerin Yarılanma Ömrü ve Etki Süresine Göre Gruplar

Lokal Anestezikler		**Yarılanma süresi (saat)**
Ester Grubu		
Klorprokain		0.1
Prokain	Kısa	0.1
Tetrakain		0.3
Kokain	Orta	0.7
Amid Grubu		
Artikain	Kısa	0.5
Prilokain		1.6
Lidokain	Orta	1.6
Mepivakain		1.8
Ropivakain		1.9
Etidokain	Uzun	2.6
Bupivakain		3.5

2.4. Lokal Anesteziklerin Farmakokinetiği

Lokal anestezikler; lokal, periferik ve santral nöroaksiyel anestezi amacı ile kullanılmaktadır. Bu nedenle sistemik absorbsiyon, dağılım ve eliminasyon lokal

anesteziklerin etkilerinin sonlandırılmasında görev üstlenirler(2). Bu nedenle bu ilaçların farmakokinetiği, etkinin sonlanmasındaki veya istenmeyen etkilerin ortaya çıkmasındaki rolleri incelenmelidir.

Absorbsiyon

Lokal anesteziklerin sistemik dolaşıma absorbsiyonu; ilacın lipo/hidrofilik özellikleri, pKa'sı, doz, enjeksiyon bölgesi ve doku kan akımı, vazokonstriktör kullanımı gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Lipidlerde çözünürlüğü fazla olanlar; çoğunlukla daha potens, etki başlangıç süreleri ve etki sonlanma süreleri daha uzundur.

Dağılım

Dağılım iki yönden değerlendirilmelidir. Dağılım açısından ilk değerlendirilmesi gereken konu; ilacın yapıldığı ve esas etkinin beklendiği lokalize bölgedeki dağılımı. Bu ilaç grubu hedef bölgeye direk olarak enjekte edildiği için bu bölgedeki dağılım dinamikleri ilacın etkinliğini ve etki alanını belirlemektedir. İlacın çözünürlüğü, barisitesi, dansitesi, konsantrasyonu ile bölgenin sıvı içeriği, kanlanma miktarı, alanın genişliği, doku basıncı gibi değişkenlerden etkilenmektedir. Dağılımın ile ilgili değerlendirilmesi gereken diğer konu ise; sistemik dağılımdır. İntravasküler ve ekstravasküler olmak üzere kompartman sistemi tanımlanmıştır. İki kompartmanlı modele uygun şekilde başlangıç fazı (alfa fazı); hızlı ve eksponansiyel düşüş ile karakterizedir. Hızlı perfüze olan beyin, karaciğer, kalp, böbrekler pik değerlere ilk olarak ulaşacaktır. Bu nedenle alfa fazı ile dağılıma uğrayan dokularda etki başlangıcı da daha erken olacaktır. Daha sonra daha az perfüze olan dokulara dağılım gösterir ve bu aşama ise konsantrasyondaki düşüşün yavaş olduğu beta fazıdır.

Eliminasyon

Ester tipi lokal anestezikler plazmada butiril-kolinesterazlar tarafından dakikalar içinde inaktif metabolitlerine hidrolize edilir. Oluşan metabolitler idrarla atılır. Atipik kolinesteraz aktivitesi ile azalmış veya tamamen kaybolmuş etkinlik durumunda, yüksek konsantrasyonlar birikmeye neden olabilir.

Amid grubu lokal anestezikler, karaciğerde mikrozomal enzimler tarafından karmaşık bir biyotransformasyona uğrarlar. Lokal anesteziklerin karaciğerde metabolizma hızları diğer bir değişle yarı ömürleri değişkendir: prilokain (en

hızlı)>lidokain>mepivakain>ropivakain≈bupivakain ve levobupivakain(en yavaş). Karaciğer yetmezliğinde uzamış etki ve toksisite riski oluşur.

Tablo 2.2. Lokal Anesteziklerin Farmakokinetiği

Ester ve Amid Grubu Lokal Anesteziklerin Farmakokinetiği		
	Ester Grubu	**Amid Grubu**
Metabolizma	Plazma kolinestarazları tarafından, Hızlı	Karaciğer tarafından, Yavaş
Sistemik Toksisite	Az	Fazla
Alerjik Reaksiyon	Daha sık	Nadir
Stabilite	Stabil değildir. Işık , ısı vb. durumlardan etkilenir	Stabildir
Etki Başlangıcı	Yavaş	Hızlı (orta-çok hızlı)
pKa	7,4'ten yüksektir	7,4'ten düşüktür

2.5. Lokal Anesteziklerin Farmakodinamiği

2.5.1. Etki Mekanizmaları

Voltaj bağımlı sodyum kanal blokajı lokal anestezik ilaçların başlıca etki mekanizmasıdır. Nöron hücre gövdesi ve aksonlarının uyarılabilir membranları, istirahat halinde transmembran potansiyeli -90mV ile -60mV arasındadır(1). Sodyum ve potasyumun hücre içi ve dışı arasındaki konsantrasyon farkının korunabilmesi için enerji tüketen sodyum-potasyum pompası aktif görev almaktadır. Na^+/K^+/ATPaz pompası 3 tane Na^+ iyonunu hücre dışına ve 2 tane K^+ iyonunu hücre içine taşır(1) böylece iyonik konsantrasyon farkı oluşmuş olur. Periferik sinir aksonlarının kimyasal, mekanik veya elektriksel olarak uyarılması ile sodyum kanalları açılır (aktive olur) ve hücre içine hızlı sodyum geçişi olur. Hücre içine hızlı Na akışı ile transmembran potansiyeli +40mV ulaşır ve membran depolarize olur. Bu etki tüm sinir membranı boyunca bir depolarizasyon dalgası olarak devam eder. Hızlı depolarizasyon sonucunda sodyum kanalları kapanır (inaktive olur) ve potasyum kanalları açılarak hücre içinden, hücre dışına potasyum çıkışı ile repolarizasyon ve istirahat membran potansiyeline dönüş gerçekleşir. Lokal anestezik ilaçlar voltaj bağımlı Na^+ kanallarını bloke ederek; hücre içine Na^+ girişini engeller ve bu sayede

depolarizasyonu dolayısı ile iletimi engelleyerek sinir hücresinde aksiyon potansiyeli oluşmasını durdurur. Bu etki mekanizması 1963'te Schanes tarafından membran stabilizatörü olarak tanımlanmış. Lokal anestezikler temel etki yeri olarak sinir hücre membranını hedef alırlar. Ancak bu etki ile beraber muhtemel mekanizmalardan da bahsedilmektedir(5).

- Membran stabilizatörü etkisinin fosfolipidlerle birleşerek Na^+, K^+ ve Ca^{++} iyonlarının membrandan geçişini engellediği görüşü de mevcuttur.
- Bir başka görüş ise lokal anestezik ilaçların protein reseptörleri ile birleşerek bu reseptörlerin por genişliğini arttırmasını engellediği şeklindedir.
- Membranın hidrokarbon bölgesine yerleşerek Na^+ kanallarını tıkayacak şekilde genişletmesi de öne sürülen bir başka mekanizmadır.

2.5.2. Lokal Anesteziklerin Yapısal Özelliklerinin Etkisi

Lokal anestezik ilaçların esas etki alanı Na^+/K^+/ATPaz kanallarının hücre içine bakan taraftaki reseptörleridir. Dolayısı ile bu reseptöre ulaşabilen aktif formu ile etkinlik doğrudan korelasyon gösterecektir. Küçük ve daha lipofilik olan lokal anestezikler Na^+ kanal reseptörü ile daha hızlı etkileşime geçecektir. Yapısal olarak yağda daha fazla çözünebilen tetrakain, ropivakain ve bupivakainin; suda daha fazla çözünebilen lidokain, prokain ve mepivakaine göre etki güçleri daha fazla ve daha uzundur(1).

2.5.3. Sinir Hücresinin Yapısal Özelliklerinin Etkisi

Sinir liflerinin lokal anesteziklere olan duyarlılıkları; sinirlerin çapına, miyelinizasyonuna, fizyolojik ateşlenme hızlarına, anatomik yerleşim yeri ve dağılımına göre değişkenlik gösteriyor. Genel olarak miyelinli ve küçük lifler daha kolay bloke olurlar. Aktive olmuş liflerde aksiyon potansiyeli ateşleme hızı yüksektir dolayısı ile bloke olma hızı da yüksek olacaktır(6). Sinir gövdesinin periferindeki lifler merkezdekilere göre daha erken lokal anestezi yüksek konsantrasyonuna maruz kalacak ve daha hızlı bloke olacaktır. Sinir liflerinin yapısal özelliklerine göre lokal anestezi duyarlılıkları tabloda özetlenmiştir (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. Sinir Liflerinin Fonksiyonel ve Yapısal Gruplandırması

Lif tipi	Alt grubu	Çapı (µm)	Fonksiyonu	Miyelin Durumu	İletim hızı (m/sn.)	Lokal Anestezi duyarlılığı
Tip A	Alfa	12-20	Propiyosepsiyon, Motor	Yoğun	70-12	+
	Beta	5-12	Dokunma, Basınç	Yoğun	30-70	++
	Gama	3-6	Kas İğcikleri	Yoğun	15-30	++
	Delta	2-5	Ağrı, Isı	Yoğun	12-30	+++
Tip B		<3	Pregangliyonik, Otonom	Hafif	3-15	++++
Tip C	Dorsal kök	0,4-1,2	Ağrı	Yok	0,5-2,3	++++
	Sempatik	0,3-1,3	Postgangliyonik	Yok	0,7-2,3	++++

2.5.4. Blokajın klinik değişkenleri

Lokal anestezik ilaçlara yanıt belirli bir sıra ile olur. İlk olarak sempatik blok ardından sıcaklık, ağrı, hafif dokunma ve en son olarak motor blok şeklindeki bir sıra ile oluşur. Ancak bu durum lokal anestezik uygulanan bölgenin sinir dağılımı ile farklılıklar gösterebilir. Örneğin spinal anestezi ile uygulanan blok esnasında dermatomal yayılım ile sıcaklık duyusu hızla kaybolurken sempatik sinir dağılımı nedeniyle sempatik blok gerilerden gelecektir. Bunun yanında periferik sinir bloğu uygulamalarında ise proksimal kaslardaki motor sinirler blok bölgesinde bulunan sinirlerin dış çevresinde bulundukları için daha erken bloke olurlar. Klinik karşılığı olarak periferik sinir bloklarında proksimal kaslarda kuvvet kaybını daha erken görmek mümkün olacaktır. Verilen anestezik maddeler sinirleri eşit ve homojen yayılım ile sarmayacaktır. Bunun sonucu olarak bölgesel farklı blok seviyeleri ile karşılamak mümkün olacaktır.

Blok süresinin uzunluğu lokal anestezik maddenin sinir etrafında kaldığı süre ile yakından ilişkilidir ve proteine bağlanma ile ilişkili olduğu yanlış bir algılamadır. Lokal anesteziklerin Na kanallarından ayrılmaları saniyelerle ölçülür ve bloğun çözülmesi ile ilişkisizdir(7). Lokal anesteziğin sinir etrafında kaldığı süre büyük ölçüde yağda çözünürlük, dokunun kanlanma düzeyi ve kullanılan vazokonstriktörlerin varlığı ile belirlenir.

Lokal anestezik ilaçlara eklenen vazokonstriktörler sistemik emilimi azaltarak; hem perinöral alanda daha uzun süre kalarak alımı arttıracaktır ve etki süresini

uzatacaktır, hem de sistemik dolaşıma daha düşük dozlarda karışması ile sistemik toksisite riskini azaltacaktır(1, 8).

Lokal anestezik ilaçların klinik uygulamalarında; Na kanal reseptörleri dışında birçok reseptöre daha bağlandığı gösterilmiştir. Bunlardan bazıları nikotinik asetilkolin(Ach) reseptörleri, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri, gama-aminobütirik asit (GABA) ve 5-HT_3 reseptörleridir(9-11). Bu çalışmalar ile lokal anesteziklerin sistemik etkilerinin de olabileceği ve hatta etkilerindeki farklılıkların da bu sebeple olabileceği düşünülüyor. Aynı şekilde lokal anesteziklerin yan etki ve toksisite risklerinin de bu reseptörlere olan etkileri sonucu olabileceği tartışılmaktadır.

2.6. Lokal Anestezi Toksisitesi

Lokal anestezik ilaçlara bağlı toksisite 2 farklı yolla oluşur. Birincisi lokal anesteziğin işlem sırasında yanlışlıkla intravasküler enjeksiyonu veya ilacın sistemik emilimi sonrası oluşan sistemik toksisitesi. İkincisi ise ilacın direk nöral lifler üzerinde oluşturduğu lokal nörotksisitesi.

2.6.1. Lokal Anestezi Sistemik Toksisitesi

Lokal anestezi sistemik toksisitesinin önlenmesi amacı ile birçok kaynak kitap maksimum doz rejimleri tanımlamıştır. Ancak klinik kullanıma ilişkin değişkenler nedeniyle toksik dozlar da değişkenlik gösterecektir. Dolayısı ile lokal anestezik maksimum dozları rejyonel anestezi pratiğinde kullanışsızdır(7). Lokal anestezik serum seviyesi enjeksiyon tekniği, enjeksiyon bölgesi ve eklenen adjuvanlar ile ilişkilidir. Her sinir bloğu prosedürüne spesifik maksimum dozlar belirlenmelidir(7).

2.6.2. Lokal Anestezi Santral Sinir Sistemi Toksisitesi

İntravenöz uygulama veya yüksek absorbsiyon sonucu yüksek plazma konsantrasyonlarına ulaşan bütün lokal anestezik ilaçlar santral sinir sistemi toksisitesi yapabilir. Santral sinir sistemi toksisitesinin ilk belirtileri ağız çevresinde ve dilde uyuşukluk, metalik tattır(3). Sedasyon ve sersemlik hissi, görsel ve işitsel bozukluklar huzursuzluk ile devam edebilir ve daha yüksek dozlarda nistagmus, kas seğirmesi ve takiben de tonik-klonik konvülsiyonlar oluşabilir. Bu durum kullanılan lokal anestezik

ilaç, ilacın dozu, uygulama yolu ve hastaya ait değişkenlikler nedeniyle farklı sıra ve ciddiyette gelişebilir. Serum ilaç konsantrasyonun hızlıca arttığı veya duyarlı kişilerde direk olarak jeneralize nöbetler veya santral respiratuar merkezin baskılanması ile solunum arresti ilk bulgu olabilir. SSS toksisitesi lokal anesteziklerin kortikal inhibitör yolların baskılanması ile oluştuğu düşünülmektedir. Profilaktik antikonvülzan etkili sedadifler (özellikle midazolam) önerilmekte(2) ancak olası toksisite bulgularını perdeleyeceği de unutulmamalıdır.

2.6.3. Lokal Anestezi Kardiyotoksistesi

Lokal anestezi uygulamalarında en korkulan komplikasyon kardiyak toksisitedir. Bu ilaçların kardiyak iletim ve fonksiyonlar üzerine çok güçlü etkileri bilinmektedir. Lokal anesteziklerin kardiyak toksisite yapabildiği ve mortal sonuçlar ile ilişkili olduğu 1979 yılında Albright'ın bupivakain ve etidokain sonrası ölüm ile sonuçlanan altı adet vaka sunumu ile tartışmaya açılmıştır. 4 yıl içinde %0,75 bupivakain ile uygulanan epidural anestezi sonrası kardiyak arrest görülen 12 olgunun bildirilmiş ve kardiyaktoksisite araştırmaları arttırılmış. Kardiyotoksisite; negatif inotropik ve aritmik etki ile sonuçlanan, kardiyak Na kanallarının bloke edilmesi ile oluşuyor. Lokal anestezikler doğrudan Purkinje liflerinde ve kardiyomiyositlerde iletimi azaltarak ve repolarizasyon süresini uzatarak etki eder. Lokal anestezik toksisitesinde yağ asidi metabolizmasının inhibisyonu, kalsiyum homeostazının değişmesi ve mitokondriyal solunum zincirinin bozulması da rol oynar(12). Tipik olarak kardiyovasküler komplikasyonlar, SSS komplikasyonlarından daha yüksek dozlarla oluşmaktadır. Ancak SSS komplikasyonları olmadan da kardiyotoksisite gelişebilir. Bunun olası sebebi ise SSS komplikasyonlarının başlamasına fırsat kalmadan ani gelişen ventriküler fibrilasyon veya duyarlı miyokartta ani başlayan aritmiler(7). İlaçlar arasında da nörotoksisite ve kardiyotoksisite riskleri açısından da farklar olduğu unutulmamalıdır.

2.6.4. İmmünolojik Reaksiyonlar

Lokal anestezik ilaçlar ile oluşabilen hipersensitivite reaksiyonları nadirdir. Alerjik reaksiyonlar sistemik toksisiteden farklı olarak aşırı plazma konsantrasyonları ile ilişkili değildir(13). Prokain ve benzokain gibi p-aminobenzoik asit (PABA)

deriveleri olan esterlerin; PABA kaynaklı IgG veya IgE aracılı alerjik reaksiyonlara sebep olma ihtimalleri daha yüksektir. Amid grubu lokal anestezik ilaçlarla oluşan reaksiyonlar sıklıkla bağlayıcı ya da koruyucu olarak kullanılan metilproben gibi ek maddelerden kaynaklanmaktadır.

2.6.5. Lokal Anestezinin Kas İskelet Sistemi Etkileri

Lokal anestezik ilaçların kas içine verilmesi zayıf miyotoksiktir. Ancak tekrarlayan dozlar, yüksek doz ve hacimde uygulamalar toksisteyi arttırır. Ayrıca eş zamanlı steroid veya epinefrin uygulamaları da miyonekroz oluşumuna neden olabilir.

2.6.6. Lokal Anestezi İlişkili Nörotoksisite

Lokal anestezik ilaçlardan kaynaklanan nörotoksisite, uygulanan çözeltinin veya koruyucu katkı maddelerinin toksisitesinden kaynaklanır. Klinik olarak kullanılan tüm amid ve ester grubu lokal anestetikler, yeterince yüksek intranöral konsantrasyonlara ulaşırlarsa sinirlere doğrudan toksisiteye sebep olabilirler (14). Ancak sıklıkla tercih edilen lokal anestezik ilaçlar; klinik kullanımda toksisite oluşturmayacak şekilde dilüe edilerek kullanılırlar. Bazı çalışmalarda dilüe etmenin de nörolojik semptom riskini azaltmadığı yönünde görüşler bildirilmiştir. Lokal anesteziye bağlı doğrudan sinir hasarı, klinik konsantrasyon seviyelerinde halihazırda meydana gelebilir(15, 16). Bloğun yapılması sırasında sinire olan yakınlık, kullanılan toplam doz, konsantrasyon ve kullanılan adjuvanların lokal anestezik ilişkili nörotoksisite riske katkıda bulunduğu unutulmamalıdır. Sinir iletiminde oluşan blok ile lokal anestezi toksisitesi arasında doğrudan ilişki gösterilememiştir(17). Lokal anestezi enjeksiyonları sonrasında geçici nörolojik sendrom, geçici radiküler irritasyon ve nadiren kauda equina sendromu görülebilmektedir(18, 19).

2.6.7. Lokal Anestezi Toksisitesinde Tanı ve Tedavi

Lokal anestezi toksisitesinde erken bulgular sıklıkla nörolojik bulgulardır. Bunun nedeni ise nörolojik yan etkilere yol açabilecek dozun, kardiyovasküler yan etki oluşturabilecek olan dozdan daha düşük olmasıdır. Ancak bupivakain bu kurala uymayabilir ve toksisitesini ilk olarak kardiyovasküler yan etkiler ile gösterebilir.

Lokal anestezikler öncelikle serebral korteksin inhibitör yolaklarının blokajına sebep olur ve dolaylı olarak eksitatör yolakların aktivitesi olarak kendini gösterir. SSS toksisitesinin ilk semptomları bayılma hissi, odaklanmada zorluk, ağız çevresinde uyuşma, kulak çınlaması ve konfüzyondur(20, 21). Benzer şekilde tremor, miyotoni, titreme objektif belirtiler olarak karşımıza çıkabilir. Lokal anestezik kan düzeyi arttıkça veya etki süresi uzadıkça tonik klonik konvülsiyonlar meydana gelir. SSS eksitasyon belirtilerinin devamında toksisitenin daha ileri aşamalarında SSS depresyonu gelişir(7). Nöbet aktivitesinin arkasından hızla gelişen solunum depresyonu ve solunum arresti SSS depresyonuna işarettir.

Kardiyovasküler olaylar ise sıklıkla aritmiler ile başlasa da sıralaması hastadan hastaya değişkenlik gösterebilir. Genellikle lokla anesteziklerin düşük kan düzeyi sempatik aktivitede artış ile kendini gösterir ve kalp debisinde, kan basıncında ve kalp atım hızında hafif artışa neden olur(7). Artan kan düzeyleri ile vasküler düz kaslarda gevşeme, tonus kaybı ile periferik vazodilatasyon sunucu hipotansiyon gelişebilir. Lokal anesteziklerin direk kardiyak ritim üzerine bloke edici etkileri olduğu düşünülmekte ve malign aritmilere neden olmaktadır(8, 13). Bu etkilerin kombinasyonu ile kardiyak debinin düşmesi ve aritmiler sonucu kardiyak kollaps ve arrest gelişebilir. Ancak kan düzeyi ile doku lokal anestezik düzeyleri arasında değişken oranlar mevcuttur(22, 23). Bu nedenle çok düşük kan düzeyleri bile ciddi yan etkilere neden olabilmektedir.

2.6.8. Lokal Anestezi Toksisitesinin Önlenmesi

Kural olarak uygulanacak lokal anestezik ilacın en uygun dozu ve konsantrasyonu; istenen etki için mümkün olan en düşük olanıdır(7). Ayrıca uygulanacak bölgenin de mümkün olan en güvenli ve kan damarlarına uzak bir alan seçimi de olası intravenöz enjeksiyon riskini azaltacaktır.

Premedikasyon olarak kullanılan benzodiazepinlerin yeri tartışmalı olup hafif yan etkileri maskeleyeceği ve hastanın hafif subjektif belirtiler bakımından doktorunu uyaramayacağı endişesi vardır.

Sistemik emilimin engellenmesi öncelikli hedeftir. Bu amaç ile USG kullanımı, intravasküler işaretler, enjeksiyon sırasında sık aspirasyon, daha düşük dozlar ve emilimin azalması amacı ile vazokonstüktif adjuvanlar denenmiştir.

USG kullanımın klinik pek çok yararı mevcuttur. Özellikle işlem bölgesinin direk olarak görüntülenebilmesi önemli avantajıdır. Bu sayede sinire mümkün olan en yakın, vasküler yapılardan da en uzak yerin seçilmesine olanak tanır. Sinire yakın komşuluk; istenen etkinin oluşması için gerekli olan lokal anestezi dozunun da minimuma indirilmesini sağlayacaktır(24-26). USG kullanımının LAST azaltacağı yönde kanıtlar mevcuttur(24, 27, 28).

İntravasküler işaretleyici olarak yapılan birçok çalışma 10-15µg epinefrinin test dozu olarak yapılmasına alınan yanıtı prediktif kabul etmiştir. Bu yanıtlar: kalp hızında alınan >10 atım/dk artış, sistolik kan basıncında >15mmHg artış(29) veya II. derivasyondaki T dalgasında %25ten fazla amplitüt düşüş olmasıdır(30). Ancak unutulmaması gereken bir başka değişken ise hastanın mevcut medikal tedavilerinde beta blokerler gibi epinefrine karşı azalmış yanıt alınabileceği ve yanlış negatif sonuçlara sebep olabileceğidir(7).

2.6.9. Lokal Anestezi Toksisite Tedavisi

LAST tedavisinin en önemli bileşeni erken tanınması ve ilaç enjeksiyonunun durdurulmasıdır. Havayolu güvenliğinden emin olunmalı ve monitorizasyon eksiksiz olarak sağlanmalıdır. Hastanın erken bulgu ve semptomları önemsenmeli, yakın takip edilmelidir. LAST tedavisi; nöbet kontrolü, kardiyak stabilizasyon (gerekli ise ileri yaşam desteği) ve %20 lipid emülsiyon tedavisi olmak üzere üç önemli bileşenden oluşmaktadır.

Nöbet tedavisinde ilk seçenekler; izole ve/veya hafif nöbet aktivitesi olan hastalarda benzodiazepinler tercih edilebilir. Bu sayede hastanın tonik-klonik veya jeneralize nöbet geçirmesi engellenerek hem hemodinamik bozulmalarının önüne geçilebilir hem de asidoz ve hipoksi gibi lokal anestezi toksisitesini agreve edecek komplikasyonlardan korunmuş olunur. Bu amaçla düşük doz propofol kullanımı tartışmalıdır. Bunun nedeni ise propofol ile olası kardiyak disfonksiyon daha da kötüleşebileceği düşüncesidir.

Kardiyak toksisite belirtilerinin gelişmesi halinde hızlı ve agresif tedavi yöntemleri gündeme gelmelidir. Son zamanlarda; özellikle malign aritmilerin görülmesi halinde, zaman kaybedilmeden %20 lipid emülsiyon tedavi protokolünün

başlatılması önerilmektedir(31-35). LAST tedavisinde lipid emülsiyon tedavisinin önemi gösterildikten sonra Amerikan Rejyonel Anestezi ve Ağrı Derneği (American Society of Regional Anesthesia and Pain Medicine - ASRA) tarafından LAST tedavi algoritması yayınlandı ve lipid emülsiyon tedavisi algoritmanın merkezinde yer almaktadır. Lokal anestezi toksisitesinde kardiyak arrest gelişmeden lipid tedavinin başlaması başarıyı anlamlı derecede arttırmaktadır. Ancak lipid tedavisine rağmen ciddi hipotansiyon, malign aritmiler ve asistol gelişme riski yüksektir. Hastalarda gelişen hipotansiyonun tedavisi olası periferik vazodilatasyonun azaltılması ve kardiyak kontraktilitenin güçlendirilmesi esasına dayanmaktadır. Ancak bu sebeple kullanılabilecek olan epinefrinin disritmileri arttırabileceği ve tabloyu daha da ağırlaştırabileceği gösterilmiştir(36). Bu sebeple sıvı resüsitasyonunu takiben, koroner perfüzyonu korumak, kan basıncını sürdürmek ve lokal anestezik metabolizmasını hızlandırmak amacı ile gereken minimum doz (epinefrin <1µg/kg) vazopresör ajan kullanımı uygun olacaktır(37). Lokal anetezik toksisitesi ile gelişen kardiyak aritmilerin malign seyirli olmaları nedeniyle birçok çalışma amiodaronun ilk tercih olarak kullanılmasını önermiştir. Kardiyak kollaps ve kardiyak arrest ile sonlanan toksisite durumunda ise lipid emüsiyon tedavisinin devamı ve ileri yaşam desteğinin usullerine uygun kardiyopulmoner resüsitasyonun(KPR) yapılması önerilmektedir. Ancak kardiyak toksisitenin, ilaç metabolizasyonu sonrasında ortadan kalkacağı ön görüsü ile KPR'nin en az yapılan ilacın metabolizasyonu için gerekli olan yarı ömrü kadar yapılmalıdır. Uzun süren KPR ve beraberinde lipid emülsiyon tedavilerine yanıt alındığına dair yayınlar mevcuttur. Hatta bazı hastanelerde bu hastaların kardiyopulmoner bypassa alınarak lokal anestezi elimine edilmesi için zaman kazanılmıştır(38).

Sonuç olarak lokal anestezi sistemik toksisitesi tedavisinin zor olması ve başarı oranı düşük olması nedeniyle ortaya çıkmasının önlenmesi en önemli tedavi yoludur denmektedir. Bu nedenle LAST tedavisi yerine öncelikle koruyucu önerilerin dikkatle uygulanması gerekmektedir. Ancak önlemlere rağmen LAST oluşabileceği de unutulmamalıdır. LAST tedavisinde en önemli basamak erken tanınması ve hızlı müdahale edilmesi olarak belirtilmektedir.

2.7. Sık Kullanılan Lokal Anestezikler

2.7.1. Ester Grubu Lokal Anestezikler

Kokain

Bilinen ilk lokal anestezik olan kokain; koka bitkisinin doğal ürünü olan bir benzoik asit esteridir. Lokal anestezik etkisinin yanında lokal norepinefrin geri alım inhibisyonu ile vazokonstriksiyon yapabilmektedir. Bu etkilerin dışında öfori ve kötüye kullanım nedeniyle kısıtlı kullanım alanı bulmuştur. Günümüzde kokain lokal anestezik olarak kısa süreli burun cerrahilerinde nadiren tercih edilmektedir.

Benzokain

Yüksek lipofilik özellikleri nedeniyle topikal kullanımda uzun yıllar boyunca tercih edilmiştir. Ancak günümüzde benzokainin methemoglobinemi yapma riski nedeniyle kullanım sıklığı azalmıştır. Ayrıca benzokain; non-spesifik esterazlar tarafından kanda hızla hidrolize edilir ve PABA gibi anafilaksi ile ilişkilendirilmiş metabolitler oluşturma riskine sahiptir.

Prokain

Alfred Eindhorn tarafından 1905 yılında ilk sentetik olarak üretilen lokal anesteziktir. Plazma psödokolinesterazları tarafından hızla hidrolize edilir. Benzokain gibi prokain de PABA metabolitleri nedeniyle anafilaksi riskine sahiptir. Hızlı etki başlangıcı (10 dakika) ve etki sonlanım süreleri (yaklaşık yarı ömrü 6 dakika) vardır(39). Dental kullanımda popüler olan prokainin yüksek vazodilatatör etkisi nedeniyle artan kanama komplikasyonları nedeniyle yeni lokal anesteziklerin bulunması ile kullanımı terk edilmiştir.

2.7.2. Amid Grubu Lokal Anestezikler

Lidokain

Nils Löfgren tarafından 1943 yılında bulunmuş ilk amid yapılı lokal anesteziktir(40). Lidokain aynı zamanda grup Ib antiaritmik olarak ventriküler taşikardi tedavilerinde de kullanılmaktadır. Lidokain karaciğerde mikrozomal enzimlerle monoetilglisein ve ksilidine metabolize edilir. Lidokain böbrekten atılır. Hızlı etki başlangıcına (3-5 dakika) ve orta-uzun süreli etkiye (yaklaşık yarı ömrü 90-120 dakika) sahiptir(39). Lidokainin maksimum dozu beraberinde vazokonstriktör

eklenmesine göre değişkenlik göstermektedir. Ancak son zamanlarda net bir maksimum doz belirlemek yerine işlem bölgesine göre dozun ayarlanmasının daha uygun olacağı belirtilmektedir. Ancak lidokain için önerilen maksimum doz 7mg/kg ve totalde 500mg olarak belirlenmiştir(41). Lidokain ülkemizde de sıklıkla kullanılan bir lokal anestezik ilaçtır. Piyasada %2 ve 10 luk konsantrasyonlarda mevcuttur ancak %10 luk lidokain olası lokal anestezik nörotoksisitesi nedeniyle kullanılmamaktadır. Aynı zamanda epinefrin içeren lidokain preparatları da mevcuttur. Özellikle dental girişimlerde Lidokain/epinefrin kombinasyonları kanamayı azaltması nedeniyle tercih edilmektedir. Lidokain topikal, lokal infiltrasyon, intravenöz rejyonel, periferik sinir bloğu, epidural ve spinal anestezi uygulamalarında uygun preparatlar seçilerek kullanılabilir.

Prilokain

Prilokain; lidokain ile benzer klinik kullanım alanlarına sahiptir. Prilokain amid yapılı lokal anestezikler arasında; karaciğerde en hızlı metabolize ve en yüksek klirense sahip olanıdır. Bu özelliği sayesinde lokal anestezik sistemik toksisitesine sebep olma olasılığının (lidokainden %40 daha az) düşük olduğu bilinmektedir(39). Ancak metabolitlerinden olan O-toluidin birikmesi ile önemli ölçüde methemoglobinemi riski vardır. Bu nedenle de idiopatik veya konjenital methemoglobinemili hastalarda, diğer hemoglobinopatili hastalarda, anemisi olan veya kardiyak/pulmoner hipoksemi riski olan hastalarda rölatif kontraendike kabul edilmektedir(39). Etki başlangıç süresi yaklaşık 5 dakika, yarı ömrü ise 90 dakikadır. Maksimum dozu 8mg/kg ve totalde 600mg olarak belirlenmiştir.

Bupivakain

Bupivakain; 1957 yılında A.F. Ekenstam tarafından bulunmuş amid yapılı lokal anesteziktir. Mepivakainin metil grubu yerine bütil grubu eklenmesi ile oluşturulmuş daha uzun etkili bir türevidir. Lidokain, prilokain ve mepivakainden 4 kat daha potent, aynı zamanda da daha az toksiktir. Bu özellikleri ile bupivakain ülkemizde ve dünyada en sık kullanılan lokal anesteziklerden biridir.

Bupivakainin diğer lokal anesteziklerden farklı olarak ciddi kardiyotoksik etkilere sahiptir. Bu etkilerin; sistemik emilim sonrasında kardiyak Na iyon kanallarında oluşan bloğun yanı sıra, miyokardiyal depresyon ve atriyoventriküler nodun iletimini bozulması ile ortaya çıktığı düşünülmektedir. Sistemik emiliminin kardiyotoksisite

riskleri nedeniyle dar bir terapötik aralığı vardır. Aynı zamanda bu riskleri nedeniyle, rejyonel intravenöz anestezi amacı ile kullanımı uygun değildir.

Bupivakain; lidokain ve mepivakaine göre daha hidrofobik yapıya sahiptir; bu da etki başlangıç süresinin daha yavaş (6-10 dakika) olmasına sebep olur. Aynı zamanda proteine bağlanma oranı yüksektir ve bu da uzun yarılanma süresine (2-6 saat) sahip olmasını sağlayacaktır. Bupivakain karaciğerde amidazlar tarafından metabolize edilir ve böbreklerden atılır. Bupivakain maksimum dozu 3mg/kg (Kanada-2mg/kg) ve totalde 250mg (Kanada-200mg) olarak belirlenmiştir. Periferik blok, infiltrasyon blok uygulamalarında, epidural ve spinal anestezide sıklıkla kullanılmaktadır(13).

Ropivakain

Ropivakain; mepivakainin enantiyomeri olarak elde edilir. Yüksek konsantrasyonlarda bupivakain ile eş değer potense sahiptir ancak bupivakain anlamlı derecede uzun etkilidir. Yapılan çalışmalarda rasemik bupivakaine kıyasla %40 daha az kardiyotoksiktir(42). Bupivakain ile benzer dozlar ve kullanım alanlarına sahiptir.

Levobupivakain

Levobupivakain; bupivakainin S(-) enantiomeri olarak izole edilmiştir. Yapılan çalışmalar levobupivakainin, bupivakainden %35 daha az kardiyotoksik olduğunu göstermiştir(43, 44). Bupivakain ile aynı dozlarda ve aynı konsantrasyonlarda kullanılmaktadır.

2.8. Ozon Gazı

Ozon gazının kullanımı 1839 yılında Christian Friedrich Schönbein tarafından keşfedilmiştir. Ozon gazının ilk olarak dezenfeksiyon amacı ile kullanılmıştır. Bu amaç ile kullanımı içme sularının ozonlanması şeklinde olmuştur. Tıbbi amaçla kullanılan ozon, saf oksijen moleküllerinin yüksek enerjili voltaj gradiyentinden geçirilmesi ile elde edilmektedir.

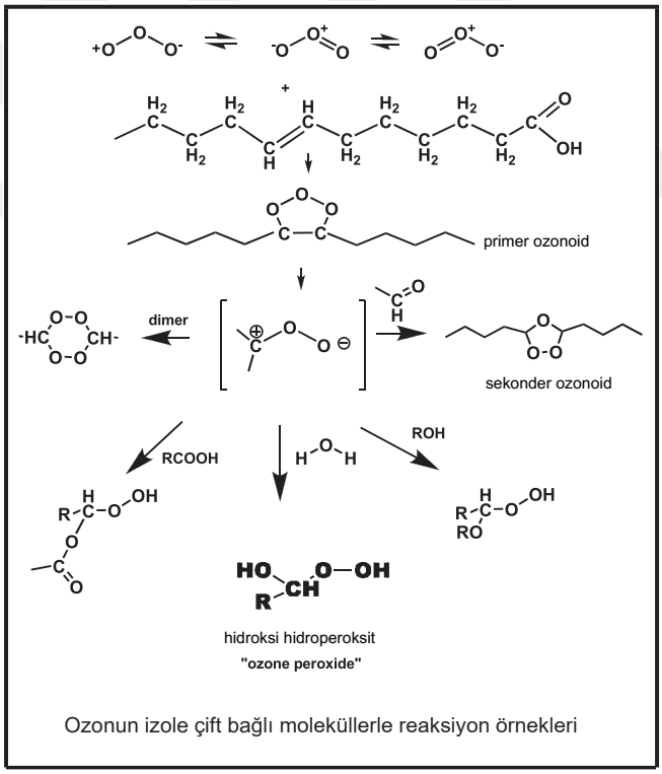
$$3O_2 + 168{,}400\ \text{cal} \longrightarrow 2O_3$$

Ozon yapısı gereği üç oksijen atomundan oluşan kararsız bir moleküldür. Bu nedenle okside olabilecek tüm organik bileşiklerle reaksiyona girebilir ve oksidasyona sebep olabilir. Güçlü oksidan özellikleri, dezenfektan etkisinin temelini oluşturur. Ozonun herhangi bir bileşik ile reaksiyonu sunucu iki önemli mekanizma tetiklenir.

Serbest oksijen radikalleri (ROS) oluşumu ve Lipid Peroksidasyon Türevleri(LOPs) oluşumu; ozonun etki mekanizmasında rol alır.

2.8.1. Ozon Gazının Etki Mekanizması

Oksijenden farklı olarak kararsız kimyasal yapıda olması nedeniyle hızlıca reaksiyona giren ozonun aktif metabolitleri olan "ozon peroksitler" sistemik etkiden sorumludur (Şekil 2.2). Ozon/oksijen karışımı olarak uygulanan ozon molekülü sırasıyla; çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA; polyunsaturated fatty acids), askorbik asit, ürik asit, sistein, indirgenmiş glutatyon ile reaksiyona girebilir. Daha yüksek dozlarda ise albümin gibi proteinler, karbonhidratlar, DNA ve RNA ile reaksiyona girebilir. Bütün bu bileşikler oksidasyona uğrayarak elektron vericisi olarak rol alır(45).



Şekil 2.2. Ozon peroksitleri

Ozon ile bileşikler arasındaki reaksiyon hem ex vivo (canlı dışı bileşiklerde) hem de in vivo (canlı hücrelerde) gerçekleşebilir. Bu nedenle ozon hem serum

fizyolojik gibi sıvıların ozonlanması ile hem de direk intra lezyoner uygulamalarda kullanılabilmektedir. Reaksiyon sonucunda H_2O_2 ve ozon peroksitler oluşur(45). Bu yeni oluşan radikaller iki fazda etki gösterir.

İlk fazda serbest oksijen radikalleri (ROS) rol alır. ROS ürünlerinden olan H_2O_2 non-iyonize bir molekül olması nedeniyle hızla hücre zarını geçebilir ve sitoplazmada hücre içi yolakları tetikler. Bu tetikleme ile hücrede yüksek konsantrasyonda bekleyen antioksidan mekanizmalar uyarılmış olur ve H_2O_2 suya indirgenir. Bu durum güçlü oksidan olan ozonun paradoksu olarak tanımlanır(46). Ozon düşük etkinlikli oksidan uyarı ile güçlü antioksidan mekanizmaları tetikleyerek ön koşullanma benzeri koruma sağladığı düşünülmektedir.

İkinci faz ise oluşmuş olan lipoperoksidasyon türevleri (LOPs) aracılı olur. LOPs daha stabildir ve daha geç metabolize olur. Bu sayede sistemik dolaşımda daha uzun süreler kalabilir ve tüm dokulara ulaşma imkanı bulur. ROS ile benzer olarak ön koşullanma ile oluşturacağı antioksidan özellikler dışında ikinci mesajcı olarak da görev alır.

Bu her iki faz ve etkinlik için önemli olan uygulanacak ozonun dozudur. Düşük dozlarda hiçbir mekanizmayı tetiklemeyeceği veya yüksek dozlarda direk hücre harabiyeti yapabileceği gösterilmiştir(47). Bu nedenle terapötik doz aralığının doğru hesaplanması ve verilecek doku/konsantrasyon ilişkisinin hassas olarak ölçülmesi önemlidir. Terapötik dozlarda redoks (indirgenme-oksidasyon) mekanizmalarında modülasyona yardımcı olduğu gösterilmiştir. Bu dozlarda ozon, Nrf2/Keap1 veya NF-kB/IkB gibi moleküler redoks düzenleyicileri aracılığıyla; hücre canlılığını değiştirmeden hücre koruyucu yolakları ve nükleer transkripsiyonu uyarır(48).

2.8.2. Ozon Gazının Medikal Kullanımı

Ozon gazının terapötik kullanımı için; uygulanacak bölge ve uygulama yoluna göre farklı doz/konsantrasyon önerileri mevcuttur. Ozon gazının terapötik kullanım kapsamı ilki 2010 yılında ve sonuncusu 2020 yılında yayınlanan “Ozon Tedavisinde Madrid Deklarasyonu” ile netlik kazanmıştır(49). Günümüzde uygulama yöntemine ve süresine göre değişkenlik gösteren terapötik doz aralıkları belirlenmiştir. Sistemik uygulamalarda terapötik doz aralığı her seans için maksimum 5-6mg olabilmektedir. Uygulama amacı ile kullanılacak ozon konsantrasyonu ise 5µg/Nml ile 50µg/Nml

arasında olarak belirlenmiştir(50). Lokal uygulamalarda ise 4µg/Nml ile 80µg/Nml konsantrasyon ve maksimum 1mg önerilmektedir. Ancak her uygulama için ayrı ayrı doz hesaplaması önerilmektedir. Güçlü öneri olarak da düşük doz ile başlanmasını, yavaş uygulanması ve kademeli olarak arttırılması önerilmektedir.

Ozon Tedavisinin Temel İlkeleri

Terapötik dozlar etki mekanizma ve amaca göre 3 gruba ayrılmaktadır.

a) Düşük dozlar: Bu dozlar immünomodülatör etkinin ön planda amaçlandığı durumlarda kullanılmaktadır. İmmün suprese durumlarda, immün yanıtın artmasını sağladığı düşünülmektedir. Bu nedenle kanser hastalarında, yaşlı ve düşkün hastalarda düşük dozlar önerilmektedir.
b) Orta düzey dozlar: Bu dozlar hem immünomodülatör etkinin hem de antioksidan etkinliğin birlikte olduğu dozlardır. Bu dozlar kronik dejeneratif hastalıklar başta olmak üzere diyabet, ateroskleroz, KOAH, Parkinson gibi hastalıklarda kullanılmak üzere tercih edilmektedir.
c) Yüksek Dozlar: Özellikle serum fizyolojik, su ve yağın ozonlanmasında kullanılmaktadır. Bu sıvılar ile muamele edilen dokularda ozon etkinliğinin sağlanması hedeflenir. Yüksek dozlarda ozon uygulaması genellikle ülser ve enfekte yaraların inflamasyonunun inhibe edilmesi amacı ile kullanılır.

Ozon Tedavisinin Önerilen Uygulama Yöntemleri

Ozon tedavisi 100 yılı aşkın süredir terapötik amaçlar ile kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda ozon tedavisinin klinik sınırları ve doz rejimleri üzerine yapılan çalışmalar artmıştır. Özellikle İtalyan, Rus ve Alman kaynakları referans alınarak hazırlanan Madrid deklarasyonu ile Dünya Ozon Terapisi Federasyonunun (WFOT) rehberleri esas alınmaktadır.

Ozon tedavisi birçok yoldan uygulanabilmektedir. Sistemik ve lokal olmak üzere iki ana başlıkta incelenebilir. Ozon gazının sıklıkla kullanılan uygulama yöntemleri tabloda verilmiştir(Tablo 2.4-2.5)(46).

Tablo 2.4. Ozon Gazının Sıklıkla Kullanılan Lokal Uygulama Yöntemleri

En yaygın uygulama yolları: LOKAL					
Metod	O_3/O_2	Doz Rejimleri			Açıklama
		Düşük	Orta	Yüksek	
Aurikular	C. (µg/NmL)	4	10	20	50ml.lik silikonlu (lateks içermeyen) enjektör kullanılarak 5dk.da yavaş yıkama ile
	V. (mL)	50	50	50	
	Doz (mg)	0.2	0.5	1	
Torba	C. (µg/NmL)	30-20	50-40	80-60	Tedaviden 20-30dk öncesinde uygulama alanı nemlendirilmelidir.
	V. (L)	torbanın boyutuna bağlı değişken			
	Dose (mg)	torbanın hacimine bağlı değişken			
Paravertebral	C. (µg/NmL)	10	15	20	Detaylar için ISCO3 (2014) ve ISCO3 (2016) 'e bakınız.
	V. (mL)	5-20			
	Doz (µg)	50-200	75-300	100-400	
Intradiskal. Lomber	C. (µg/NmL)	25	30	35	servikal spinal uygulamalar için 3-5ml volümde ozon kullanılır.
	V. (mL)	10	10	10	
	Doz (µg)	250	300	350	
Subkutanöz	C. (µg/NmL)	5	8	10	Maksimum 100 mL/seans. Selülit tedavisinde 200ml
	V. (mL)	1-2			
	Doz (µg)	5-10	8-16	10-20	
Ellerin subkütanöz infiltrasyonu (eldiven tekniği)	C. (µg/NmL)	20	10	5	Haftada 2 kez, toplam 6 hafta uygulanır.
	V. (mL)	10-40			
	Doz (µg)	50-200	100-400	200-800	
Intra-artikülar (omuz, dirsek, kalça, diz, el/ayak bileği vb.)	C. (µg/NmL)	5	10	15-20	Detaylar için ISCO3 (2014)ve ISCO3 (2016) 'e bakınız. *"Ozone in Non-Rheumatic Locomotor System Pathologies"*
	V. (mL)	5-20			
	Doz (µg)	25-100	50-200	75-100 300-400	

Not: İnhalasyon yolu ile uygulanması önerilmez (toksisite riski yüksektir).
C: konsantrasyon; V: volüm;

Ozon gazının sistemik uygulama yolları ile öncelikle eritrosit ve lökosit gibi kan hücreleri olmak üzere doku ve organ sistemleri üzerine etkileri mevcuttur. Ozonun tıbbi etkilerinden bazıları:

-eritrositlerde H_2O_2 tarafından glikolizin aktivasyonu sonucu ATP ve 2,3-difosfogliserat (2,3-DPG) oluşumu artar ve dokulara O_2 sunumu arttırılır(51).

-yağ asitlerinin oksidasyonu ile antioksidan sistemlerin uyarılması sonucu antioksidan mekanizmaların aktivasyonu(50),

Tablo 2.5. Ozon Gazının Sıklıkla Kullanılan Sistemik Uygulama Yöntemleri

En yaygın uygulama yolları: SİSTEMİK					
Metod	O_3/O_2	Doz Rejimleri			Açıklamalar
		Düşük	Orta	Yüksek	
Major Autohemoterapi (MAH)	C. (µg/NmL)	10-20	20-30	35-40	Bazı durumlarda (otoimmün hastalıklar ve viral enfeksiyonlar gibi), 50-60µg/NmL'ye kadar olan dozların daha yüksek sitokin indüksiyon kapasitesine sahip ve güvenli olduğu düşünülmektedir.
	V. (mL)	50 - 100			
	Doz (mg)	0.5-1.0 1.0-2.0	1.0-1.5 2.0-3.0	1.75-2.0 3.5-4.0	
Minor Autohemoterapi (MiAH)	C. (µg/NmL)	5-10	15-20	30-40	5ml.'ye kadar düşük volümlerde kan alınarak uygulanır.
	V. (mL)	5			
	Doz (µg)	25-50	75-100	150-200	
Vajinal	C. (µg/NmL)	10-15	20-25	30-35	Akış hızı 0.1-0.2 L/dk olmalı ve yaklaşık 10dk'da yavaş infüzyon verilmelidir.
	V. (L)	1-2			
	Doz (µg)	10-15 20-30	20-25 40-50	30-35 60-70	
Rektal Insufflasyon (RIO_3)	C. (µg/NmL)	10-15	20-25	25-30	40µg/mL'lik konsantrasyonlar enterosite zarar verebilir. (Tek istisna, ülseratif hemorajik kolittir.)
	V. (mL)	100	150	200	
	Doz (mg)	1.0-1.5	3.0-3.75	5.0-6.0	
Extrakorporyal kan oksijen/ozonizasyon	C. (µg/NmL)	0.1	0.25	0.4	Optimum akış hızı 30-35 ml/dk.dır
	V. (L)	18			
	Doz (mg)	1.8	4.5	7.2	
Sauna*	C. (µg/NmL)	5	8	10	ozon ile 10-15 dakika yıkanma, ardından 40-45°C su buharı ile 10-15 dakika durulanma
	V. (mL)	Değişken			
Akupunktur/ refleksoloji	C. (µg/NmL)	6	7	9	Akupunktur noktaları: Her bir akupunktur noktasına intradermal veya subkutan olarak O3/O2 enjekte edilir. Tetik noktaları: O3/O2, her tetik noktasına kas içine enjekte edilir.
	V. (mL)	0.1 - 0.3			
	Doz (µg)	0.6-1.8	0.7-2.1	0.9-2.7	
Ozonlanmış Salin Solüsyonu (O_3SS)	C. (µg/NmL)	0.4	0.8	2	Uygulamadan önce doygunluğun sağlanması için 10 dakika boyunca ozon ile muamele gerektirir. Ardından konsantrasyonun stabil olmasını sağlamak için ozon muamelesi devam etmelidir.
	V. (mL)	200 mL			
	Doz (µg/kg)	1	2	5	

Not:. * Lokal uygulama yoludur ancak sistemik etkilere sebep olur.
Dikkat: Direk intra-venöz uygulama önerilmez, hiperbarik ozon önerilmez, intraperitoneal ozon önerilmez
C: konsantrasyon; V: volüm;

-platelet agregayonundan başlamak üzere pıhtılaşma kaskadının her aşamasında antikoagülan etkileri ile koagülasyonda orta dereceli azalmaya eğilim yaratır(50). Ayrıca fibrinolizisi uyararak fibrin oluşumunu inhibe eder.

-peroksit formasyonu ile uyarılan hücrelerde oluşan fagositoz aktivasyonu ile immünmodülatör etkileri mevcuttur. Özellikle kronik enfeksiyöz durumlarda azalmış olan fagositik immün yanıtta iyileşmeler görülür. Ayrıca IFN-γ, IFN-β, IL-2, IL-6, IL-8, TNF-α gibi sitokinlerin artışı ile immünstimülan etkileri gösterilmiştir(52).

-hücre membranında katyon/anyon dengesi üzerine etkileri ile analjezik etkinliği olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur(50, 51)

-nöronlarda O_2'li solunumun uyarılması ile nöroprotektif etkilerin olduğu ve nöronlarda yapısal hasarın azaltıldığı gösterilmiştir

-santral modülasyon ve opioid benzeri etkinlik ile ağrı restorasyonu ve kronik ağrı oluşmasının azaltılması

-ozonun araşidonik asit kaskadı üzerinden analjezik ve antiinflamatuar etkinliği olduğu düşünülmektedir(50)

-antibakteriyal etkinliği, oluşan oksijen radikalleri ve fagositik stimülasyon etkilerine bağlı gelişmektedir.

Tablo 2.6. Ozon Tedavisinin Uygulama Yolları

Ozon gazının uygulama yolları	
-Subkütan	-Nazal
-İntramuskuler	-Tubal
-İntraperitoneal	-Oral
-İntraplevral	-Auriküler
-İntraartiküler	-Vajinal
-İntradiskal	-Üretral ve mesane içi
-İntralezyoner	-Rektal
-İntraforaminal	-Dental
-İntravenöz (indirekt uygulama ile)	-Kütanöz
-Major Otohemoterapi(MAH)	
-Minör Otohemoterapi(MiAH)	

Ozon tedavisinin endikasyonları her geçen gün artmaktadır. Gelişen teknolojik altyapı, farklı endikasyonlar için farklı uygulama metodları kullanılmasını mümkün kılmıştır. Ozon tedavisinin endikasyonlarından bazıları ve önerilen uygulama yöntemleri tabloda özetlenmiştir (Tablo 2.7).

Tablo 2.7. Ozon Tedavisinin Endikasyonları ve Önerilen Uygulama Şekli

Ozon tedavinin endike olduğu durumlar ve önerilen uygulama şekilleri	
Endikasyon	**Önerilen uygulama Şekli**
1-Dolaşım bozukluklukları -Periferal arterial yetmezlik -Serebral dolaşım bozuklukları	✓ Major Otohemoterapi ✓ Minör Otohemoterapi
2-Deri lezyonları ve ülserler -Diyabetik Gangren -Yatak yarası (dekübit) -Yanık -Postoperatif bası lezyonları -Radyasyon yaraları	✓ İntralezyoner insüfflasyon ✓ Ozonlanmış distile su ile kompres ✓ Sauna
3-İntestinal bozukluklar -Kolit ve ülseratif kolit -Crohn Hastalığı	✓ Rektal insüfflasyon
4-Kanser ve Karsinoid Sendromlar	✓ Değişken seçenekler
5-Viral Enfeksiyonlar	✓ Major Otohemoterapi
6-Sepsis	✓ Major Otohemoterapi
7-Geriatrik Destek	✓ Major Otohemoterapi
8-Romatolojik bozukluklar	✓ İntraartiküler uygulama
9-Dental Tedaviler	✓ Ozonlanmış distile su
10-Algolojik İşlemler	✓ Akapunktur/intraforaminal
11-Ortopedik Bozukluklar	✓ İntraartiküler omuz/diz
12-Nörolojik bozukluklar	✓ İntradiskal/ Major Otohemotarapi

2.8.3. Ozon Tedavisinin Potansiyel Yan etkileri ve Kontraendikasyonları

Ozon tedavisinin yeteri kadar popüler olmamasının temel nedeni ROS oluşumu ile oluşabilecek yan etki ve toksisite endişesidir. Ancak ozon tedavisi sırasında; doğal yollarla vücutta oluşan ROS'a göre çok daha düşük düzeylerde, ölçülebilir ve topografik olarak ROS'tan farklı süperoksitler meydana gelmektedir. Ayrıca son çalışmalar normal hidrojen peroksit üretiminin hücre yaşamı için gerekli olduğu konusunda bir fikir birliği var ve revize edilen kavram, "reaktif türlerin yalnızca hücresel ıstırabın araçları değil, normal hücresel fizyolojinin araçları" olduğudur(53, 54). Hücre içi mekanizmalar dışından uyarılmış antioksidan mekanizmalar bu nedenle enzimler, proteinler, RNA ve DNA gibi tüm hayati hücresel bileşenlerin güvende tutulacağı düşünülmektedir(55-57). Antioksidan içeriğin üretilemediği ortamlarda ise ozon ve oksijenin toksik olabileceği yönde de çalışmaların mevcuttur.

Çok yüksek doz olan 5mM ozon maruziyeti ile genotoksik olabileğine dair çalışmalar mevcuttur(58). Ancak terapötik olarak önerilen dozlarda bu genotoksik etkiler gösterilememiştir. Milyonlarca ozon tedavi verisinden derlenen olası yan etki insidans çalışması ozonun toksisitesinin %0,0007 olarak oldukça düşük olduğunu bildirmiştir(51).

Ozon tedavisi sırasında 1980-1990 yılları arasında görülen hipokalsemi benzeri yan etklilerin tamamının ozon dayanıklı olmayan torba ve materyalin kullanılması nedeniyle olduğu gösterildi. 2000 yılından itibaren ozon dayanıksız malzemenin ozon tedavisinde kullanımı yasaklandı ve bu yan etkilerin tamamı kayboldu.

IM enjeksiyondan hemen sonra, ozon konsantrasyonu 20-25 μg/ml ve gaz hacmi 10 ml'yi aşarsa işlem bölgesinde akut ağrıya neden olabilir. Bu nedenle IM enjeksiyonların her zamanki tedbirle uygulanması ve gazın çok yavaş enjekte edilmesi önerilir.

Kontraendikasyonları:

-Favizm, G6PD enzim eksikliği,

-Gebelik,

-Hipertiroidizm,

-Trombositopeni,

-Kontrolsüz pıhtılaşma bozuklukları,

-Ciddi kardiyovasküler instabilite.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurul onayı (Etik kurul tarih/no: 10.10.2019/771) alındıktan sonra, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde, (TICAM) uygulama kurallarına uyularak gerçekleştirildi. Çalışmada normal motor aktiviteye sahip, 250-330gr. arası, 60 adet, Sprague-Dawley türü, erkek rat kullanıldı. Deney öncesinde ratlar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda bırakıldı ve ortam adaptasyon süresi olarak 10 gün belirlendi. Beslenmelerinde bu süreçte herhangi bir değişiklik yapılmadı.

3.1.Çalışmanın planlanması ve ilaçların temini

Çalışma için gerekli ilaç, tüketim materyalleri ve deney hayvanlarının teminini sağlamak amacı ile gerekli bütçe Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (proje kodu: TTU-2021-1581) kapsamında gerçekleştirildi. Öncelikle Bupivacaine hydrochloride (Sigma-Aldrich B5274-1G) bidistile su ile %0,5 konsantrasyonda hazırlandı. Hazırlanan bupivakain solüsyonu lateks içermeyen enjektörlere çekilen 80µg/Nml konsantrasyonda ozon ile 10dk boyunca kabarcık oluşturma yöntemi (bubbling) ile ozonlandı. Ozonlama işleminin bupivakainin etkin bölgesinde kimyasal değişiklik yapıp yapmadığı ve dolayısı ile lokal anestezik etkinliğinde değişiklik yapıp yapmadığı incelendi. Bu nedenle bupivakainin ozonlanmasının etkin bölgede kimyasal değişiklik yapıp yapmadığının tespiti amacı ile hem bupivakain hem de ozonlanmış bupivakaine 1H(Proton) Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) inceleme yapıldı. 80µg/Nml konsantrasyonda ozon ile 10dk boyunca kabarcık oluşturma yöntemi ile ozonlanmış 0,2ml %0.5 bupivakain ile saf bupivakain arasında NMR incelemede fark olmadığı görüldü ve doz bu şekilde kesinleştirildi.

Ratlar randomize olarak 3 ana (kontrol-bupivakain-ozonlanmış bupivakain) gruba ayrıldı. 20'şer adet rattan oluşan üç ana grubumuz oldu. Her ana grup ise örneklerin alınacağı güne göre 3. ve 7. gün grupları olmak üzere 2 alt gruba ayrıldı. Bu şekilde toplam 10'ar sıçandan oluşan 6 alt grup oluşturuldu.

Gruplarımız;

3. gün örnek alınacak gruplar 3-K, 3-B, 3-OB

7. gün örnek alınacak gruplar 7-K, 7-B, 7-OB olarak isimlendirildi.

3.2.Deney Hayvanlarına uygulanan işlemler

Sıçanlar 1'den 60'a kadar numaralandırıldı. Bilgisayar modelli kura metodu ile randomize edildi. İşlem yapılacak olan sıçan numara sırasına göre alındı bu sayede gruplar arası araştırmacı el becerisindeki gelişme biasından kaçınılmış oldu. Sıçanı seçen kişi ile işlemi ve sonrasında ölçümleri yapan kişi farklıydı ve enjekte edilecek maddenin hangi gruba ait olduğunu bilmiyordu (çift kör).

Seçilen sıçana 15dk aralıklarla 3 kere hot-plate testi uygulandı. Sıçanın el veya ayaklarını yalaması, hızlı ayak çekme/zıplama hareketi ağrıya tepki olarak kabul edildi ve yapılan 3 testin ortalaması alınarak süreler kaydedildi.

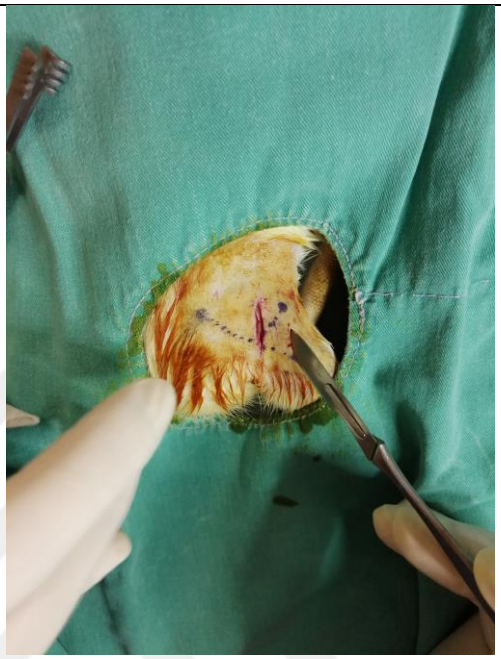
3.2.1.Cerrahi diseksiyon ve ilaç uygulama

İşleme alınan sıçan 50mg/kg ketamin (ketamin hidroklorür, Keta-control®, 1mL=100mg, Doğa ilaç) + 10mg/kg ksilasin (Xylazin Bio %2®, 1ml=20mg, Bioveta) intraperitoneal olarak uygulanarak anestezi sağlandı. Cilt ve ayak parmak sıkıştırma testi ile anestezi derinliği takip edildi. Yüzüstü pozisyonda tespit edildikten sonra cerrahi alan temizliği ve işaretleme yapıldı. Siyatik sinire posterior yaklaşım ile ulaşılması hedeflendi. Sağ bacak torakanter majör, iskial tuberositas ve diz eklemi işaretlendi (Resim 3.1a). Paralel kesi ile yaklaşık 1cm cilt insizyonu yapıldı (Resim 3.1b). Ardından biceps femoris ve gluteal kas arasındaki sulkustan künt diseksiyon ile kaslar ayrıldı (Resim 3.1c) ve siyatik sinire ulaşıldı (Resim 3.1d) . Siyatik sinirin bifurkasyo noktası görülerek 1mm proksimali hedef bölge olarak seçildi. Enjeksiyonlar sinir üzerindeki fasiya altına 30G insülin enjektörü ile geçilerek, perinöral olarak verildi. K grubuna 0,2ml distile su, B grubuna 0,2ml %0.5 bupivakain, OB grubuna 0,2ml ozonlanmış %0.5 bupivakain yapıldı ve enjeksiyon saati kaydedildi. Ardından kas planları anatomik yapısına uygun olarak 4-0 prolen ile yaklaştırıldı (Resim 3.1e). Cilt ise 3-0 prolen ile suture edilerek kapatıldı (Resim 3.1f).

Tüm ilaçlar cerrahi işlemi yapmayan bir başka kişi tarafından hemen işlemden 5 dakika öncesinde hazırlandı. Böylece hem uygulayıcı biası hem de ozonun uzamış bekleme süresi olmadan işlemler gerçekleştirilmiş oldu.



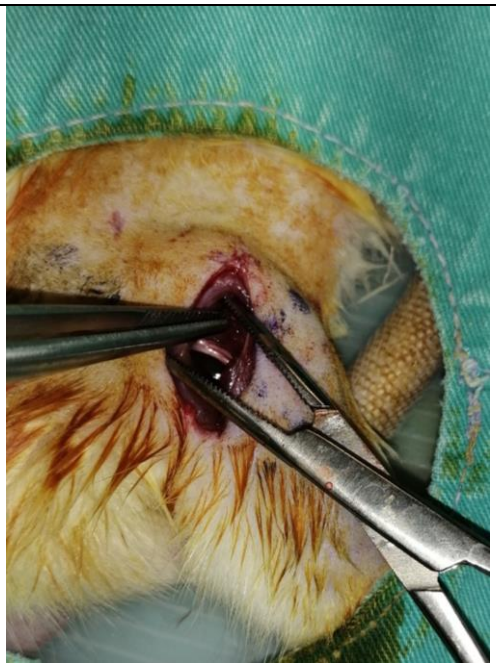
Resim 3.1a. İşaretleme



Resim 3.1b. İnsizyon



Resim 3.1c. Kasların künt açılması



Resim 3.1d. Siyatik sinirin görülmesi



Resim 3.1e. Kasların yaklaştırılması



Resim 3.1f. Cildin kapatılması

Resim 3.1. Cerrahi İşlemler

3.2.2.Fonksiyonel değerlendirme

Fonksiyonel değerlendirme testlerimizin tamamını her sıçan için hem işlem yaptığımız (kontrol-bupivakain-ozonlanmış bupivakain) ayakta, hem de işlem yapılmadığımız diğer ayakta uyguladık. Bu sayede her sıçanın işlem yapılmayan diğer ayağındaki fonksiyonel değerlerinin normale gelme süreleri ile de karşılaştırma imkânı bulduk.

Motor Fonksiyonun Değerlendirilmesi

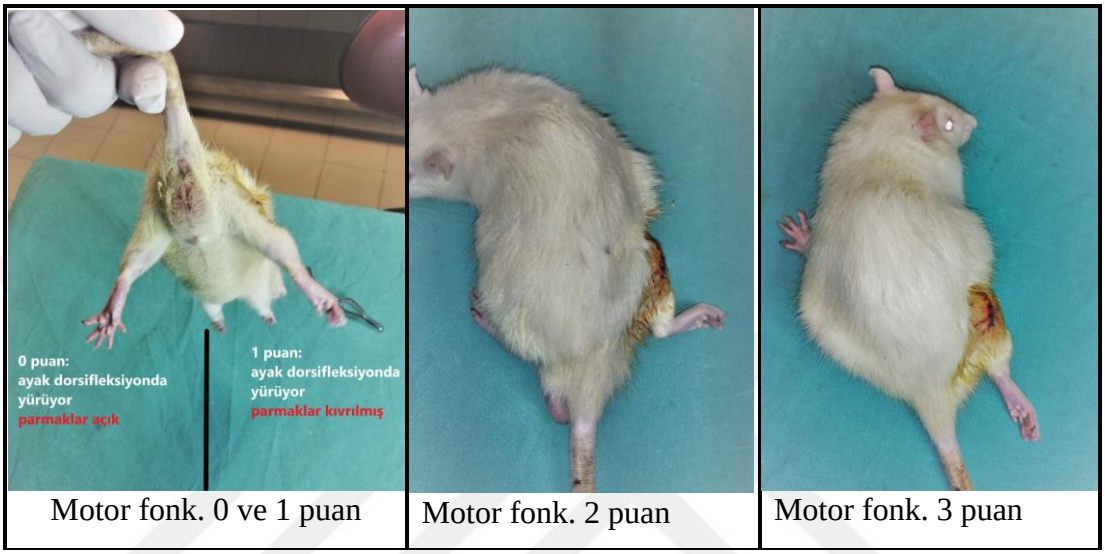
Sıçanlarda motor fonksiyon değerlendirmek için farklı yöntemler mevcuttur(59-63). Siyatik sinir motor fonksiyonları açısından sıklıkla kullanılan yöntem ise 4 puanlı skorlama sistemidir(60, 63). Biz de 4 puanlı skorlama sistemini kullandık (Resim 3.2). İşlem yapılan ve işlem yapılmayan her iki ayak için ayrı ayrı skorlama yapıldı.

0 puan = Ayak dorsifleksiyonda, yürüyebiliyor, parmaklar açık

1 puan = Ayak dorsifleksiyonda, yürüyebiliyor, parmaklar kıvrılmış

2 puan = Ayak ekstansiyondan fleksiyona kısmen geçebiliyor, sürünerek yürüyebiliyor, parmaklar kıvrılmış

3 puan = Ayak ekstansiyondan fleksiyona geçemiyor, yürüyemiyor, parmaklar kıvrılmış.



Motor fonk. 0 ve 1 puan | Motor fonk. 2 puan | Motor fonk. 3 puan

Resim 3.2. Motor fonksiyonun değerlendirilmesi

Duyusal fonksiyonun değerlendirilmesi

Sıçanlarda duyusal fonksiyon elektriksel, termal, mekanik ve kimyasal uyaranlar ile değerlendirilmektedir. Biz de çalışmamızda termal (hot plate) ve mekanik (pençe sıkıştırma, ayak çekme testi) olarak duyusal değerlendirmemizi yaptık.

Pençe sıkıştırma/ ayak çekme testi

Ayak çekme testine yanıt kalça, diz ve ayak bileğindeki fleksör kasların kontraksiyonu ile oluşur. Polisinaptik bir reflekstir ve ektremiteye ağrılı uyaran verilerek indüklenir. Çalışmamızda yüzeyel ağrı duyusu için lateral metatars üzerindeki cilt katlantısına, derin ağrı duyusu için beşinci ayak parmağının distal falanksına basınç uygulandı. Her seferinde tanımlanan bölgelere tek bir ağrılı uyaran; uygulayıcı sapmalarını önlemek amacı ile bulldog forceps (Resim 3.3) kullanılarak, sabit şiddette ve sabit sürede (1 sn) uygulandı. Sıçanların verdiği tepkiler skorlandı(60, 61).

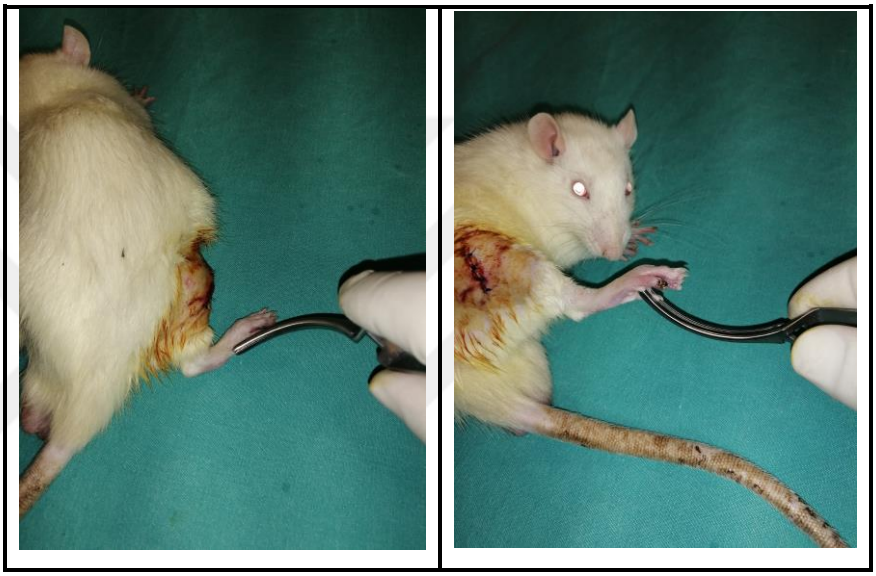
Pençe sıkıştırma/ ayak çekme testine verilen yanıtlara göre skorlama aşağıdaki gibi yapıldı.

0 puan = güçlü ayak çekme ve güçlü vokalizasyon

1 puan = orta derece ayak çekme ve vokalizasyon

2 puan = zayıf ayak çekme ve çok azalmış/hiç vokalizasyon

3 puan = ayak çekme yok ve vokalizasyon yok



Resim 3.3. Bulldog Forceps ile Duyusal Blok değerlendirilmesi

Hot plate testi

Termal uyarılardan hot plate testi kolay uygulama ve görece ucuz maliyeti nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır. Hot plate testi akut, kutanöz ağrı duyarlılığını değerlendirmek için kullanır. Hayvanlar 50-56°C'de tutulan bir yüzey üzerine tek tek yerleştirilir ve hareketleri bir silindir tarafından sınırlandırılır. Arka pençeyi yalama ve/veya sallama veya zıplama gecikmesi kaydedilir(Resim 3.4)(64).

Testimizi 52°C sıcaklıkta hazırlanmış hot plate üzerine sıçanlar bırakıldı. Bir ayağa işlem planlanması nedeniyle iki ayakta da eşik ölçülmesi amacı ile ilk tepkinin ardından diğer ayakta da tepkinin görülebilmesi amacı ile en fazla 10 saniye olmak üzere beklendi. Sıçanlarda hasar oluşmaması amacı ile plaka üzerinde maksimum 60

saniye tutulması şartı ile süreler kaydedildi. Tekrarlayan testlerimizi hiperaljezi oluşmaması amacı ile 15 dakika aralıklarla yaptık.

Çalışmamızda hot plate testini iki aşamada kullandık.

Doğal pozisyon	Termal ağrıya yanıt (arka ayak yalama)
	

Resim 3.4. Hot-plate testi

Öncelikle sıçanların termal ağrıya olan eşik değerlerinin tespiti amacı ile cerrahi işlem öncesinde her sıçana 3 test yapıldı ve ortalamaları eşik değeri (giriş değeri) olarak kabul edildi.

İkinci aşamamız ise; cerrahi işlem sonrası ölçümlerdi. İşleme alınan sıçanların hot plate testine alınabilmesi için ön koşul olarak, motor fonksiyonlarının normale (0 puana) dönmesi beklendi. Ardından hot plate testleri yapıldı. Hot plate testleri giriş değerlerine ulaşana kadar 15 dakikada bir tekrarlandı. Bu aşamada bir ayağın işlemli ayak olması nedeniyle her iki ayak için değerler ayrı ayrı kaydedildi. İşlem yapılmayan ayakta tepki görüldükten sonra; işlem yapılan ayakta tepkinin olup olmayacağının tespiti için en fazla 10 saniye daha beklendi. İşlem yapılan ayakta tepki olmadıysa veya giriş değerinden gecikmiş tepki süresi var ise 15 dakika sonra test tekrarlandı. Hasar oluşturmamak amacı ile; 10 saniye bekleme süresi dahil her test için toplam sürenin

60 saniyeyi aşmaması şartı burada da uygulandı. Hot plate testine yanıt süresi giriş değerine ulaştığında test sonlandırıldı.

3.2.3.Doku Örneklerinin toplanması

Sıçanlara; gruplarına göre 3. gün veya 7. gün, siyatik sinir örneklerinin toplanması amacı ile yeniden 50mg/kg ketamin (ketamin hidroklorür, Keta-control®, 1mL=100mg, Doğa ilaç) + 10mg/kg ksilasin (Xylazin Bio %2®, 1ml=20mg, Bioveta) intraperitoneal olarak uygulanarak anestezi sağlandı. Ardından önceki kesi yerlerinde süturler açılarak aynı diseksiyon yöntemleri ile siyatik sinire ulaşıldı. İşlem sonrasında sakrifiye edileceği için bu aşamada siyatik sinir daha net vizüalize edilebilmesi amacı ile daha geniş açıldı. İşlemin yapılmış olduğu bifurkasyonun 1mm proksimali merkezde olacak şekilde yaklaşık 3mm.lik örnekler 11 numaralı bistüri ile tek seferde hasar verilmeden alındı. Ardından sıçanlar dekapitasyon yöntemi ile sakrifiye edildi.

3.3.Doku örneklerinin değerlendirilmesi

3.3.1.Histolojik Yöntemler

Siyatik Sinir doku örnekleri ışık mikroskobik inceleme için ilk olarak %4 Paraformaldehit solüsyonunda tespit edildi. Tespit işleminden sonra doku örnekleri kasetlere konularak akar su altında 2 saat süresince yıkandı. Suyun uzaklaştırılması için dokular artan derecelerde alkol serilerinden (%60, %70, %80, %90, %96 %100) geçirildiler. Sonrasında dokular parlatılmaları amacıyla ksilolden geçirildi ve ardından parafine gömüldüler.

Hematoksilen-Eosin Boyama Yöntemi

Deney gruplarından alınan kesitler 60°C etüvde 60 dakika bekletildikten sonra 3x5 dakika ksilole alınarak parafinden arındırılmaları sağlandı. Daha sonra lamlar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip (%100, %96, %90, %70) 1 dakika akar suda yıkandıktan sonra, Harris Hematoksilen'de 2 dakika boyandı ve 2x2 dakika akar suda yıkandılar. %1 Amonyak-Su karışımına batırılıp tekrar 1 dakika akar suda yıkandı. Lamlar 2 dakika Eozinde bekletilip artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek (%70, %80, %96, %100), 2x1 dakika ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı.

Luxol Fast Blue Histokimyasal Boyama Yöntemi

Tüm deney gruplarına ait Sinir dokularından lamlara 6 µm kalınlığında Cryostat cihazı ile kesitler alındı. Lamlar metanolde 10 dakika bekletildikten sonra 2x1 dakika distile suda bekletildi.%95 etil alkolde 1 dk bekletilen kesitler:

Luxol fast blue solution for 37°C etüvde 1 gece bekletildi. %70 alkol 2-3 saniye lamlar çalkalandı. Lamlar distiler suyunda yıkandı. Diferansiye etmek için lithium carbonate solüsyonunda 30 saniye bekletildi. Lamlar distiler suyunda yıkandı. Cresyl violet solüsyonu: 10 dk bekletildi. Diferansiye etmek için, cresyl violet differentiator solüsyonunda 5 saniye bekletildi. Lamlar çeşme suyunda yıkandı. %100 N-Butanol alkolde 2x1 dakika bekletilerek ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı.

Kit bilgileri

Marka: Atom Scientific

CatNo: RRSK345

3.3.2.İmmunhistokimyasal Boyama Yöntemi

İmmünohistokimyasal boyamalar için; doku örnekleri mikrotomda4 mikron kalınlığında kesilerek su banyosuna alındı, burada açılan doku örnekleri Poly L-Lysine (ThermoScientific) ile kaplı özel lamlar üzerine alınarak 40°C'deki ısıtıcı tabla (Leica) üzerinde 1 saat yapışması sağlandı. Tüm doku örnekleri boyamaya kadar lam saklama kutularında saklanmıştır. Tüm doku örnekleri 1 saat süre ile 60°C' deki etüvde bekletilerek parafini giderildikten sonra iki kez ksilenden geçirilerek parafininin tamamen dokulardan uzaklaştırılması sağlandı. Daha sonra dereceli alkollerden (absolü, %96, %80 , %70, %50) geçirilerek doku örnekleri hem ksilenden temizlendi hem de suları giderildi (dehidrasyon). Distile suda bekletildikten sonra deiyonize su ile hazırlanan %0,3'lük Triton X100 (SantaCruzBiotechnology) solüsyonunda 10 dk. bekletilerek, hücre ve çekirdek zarlarında bulunan porlardan solüsyonların daha iyi geçmesi sağlandı. Sonrasında tekrar deiyonize sudan geçirilen doku örnekleri, Neuroflament, S100, SOD, TNF-alfa boyamaları için, içinde citratebuffer (pH:6, dilüsyon, 1:9) solüsyonu bulunan ısıya dayanıklı plastik şalelere konularak 40 dk. süre ile 95°C'deki su banyosunda (nüve) bekletildi. Pappen ile sınırlanan doku örnekleri üçer kez 3 dk. süre ile PBS ile yıkandı ve hücre içindeki peroksidaz enzimini bloke

etmek için her bir doku örneğinin üzerine peroksidaz blok solüsyonu (DiagnosticBioSystems) konularak 30 dk. süre ile bekletildi. Sonrasında her doku örneği tek tek PBS ile üçer kez 3 dk. süre ile yıkandı, her örneğin etrafında kalan PBS solüsyonu kurutma kâğıdı ile temizlenerek üzerlerine serum blocking solüsyonu (LAB-SA DetectionSystem, Histostain-Plus Bulk Kit; A solüsyonu, Invitrogen) eklenerek 30 dk bekletildi. Neuroflament, S100, SOD ve TNF-alfa(abcam) primer antikorları eklendi. Bu işlem her antikor için ayrı ayrı olarak uygulandı. Antikorlar eklenen doku örnekleri 37˚C'lik etüvde 1 saat süre ile inkübe edildi. Daha sonra biotinylatedSeconderantibody solüsyonu (LAB-SA DetectionSystem, Histostain-Plus Bulk Kit; A solüsyonu, Invitrogen) 30 dk. uygulandı. PBS solüsyonu kurutma kağıdı ile temizlenerek üzerlerine kromojen madde olarak 3,3´-Diaminobenzidene tetrahydrochloride (DAB, Invitrogen Corporation) solüsyonu 5 dk karanlık ortamda uygulandı. Doku örnekleri 2 kez ve 2 dk. süre ile deiyonize suda bekletildikten sonra, zıt boyama için Mayer'sHematoxylin' de 5 dk. bekletildi ve çeşme suyunda 10 dk. yıkama yapıldı. Sonrasında ksilen ve dereceli alkollerden geçirilip, entellan (BioMount, Bio-Optica) kullanılarak lamel ile kapatıldı.

Doku Örneklerinin değerlendirilmesi ve istatistik: Boyanan tüm doku örnekleri Zeiss AXIO Scope 1 marka araştırma mikroskobunda değerlendirilerek dijital kamera (AxioCamICc 3) ile fotoğraflandı. Leica LAS V3.8 görüntü analiz sistemi kullanılarak Neurflament, S100, SOD ve TNF-alfaimmunoreaktif hücreler tespit edildi.

Sonuçların değerlendirilmesi sırasında, seçilen alanlarda immünopozitif hücrelerin tüm hücrelere oranı hesaplanarak H-skor yöntemi ile immünreaktivite değerlendirildi(65). İmmünoreaktif hücre sayımı, kör bir gözlemci tarafından yapıldı ve aşağıdaki gibi derecelendirildi: 0 boyanma olmadığını; 1 zayıf boyanma; 2 orta dereceli boyanma; 3 belirli bir alanda güçlü boyanma anlamına gelir.

Genel puan daha sonra aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

H- skoru = (0'da boyanmış hücrelerin %) x 0 + (1 +'de boyanmış hücrelerin %) x 1 + (2 +'de boyanmış hücrelerin %) x 2 + (3+'de boyanmış hücrelerin %) x 3.

H-skor değeri 0 ile 300 arasında değişir (65).

3.3.3.TUNNEL Boyama Yöntemi

Hücre ölümünün belirlenmesinde apoptotik hücreleri boyama olanağı sağlayan Terminal TransferasedUTPNickEndLabeling (TUNEL, ApopTag® Plus PeroxidaseInSituApoptosis Kit) yöntemi kullanıldı. Alınan kesitler deparafinizasyon işlemini takiben önce distile suda daha sonra 3x5 dk PBS solüsyonu ile yıkandı. Sonra PBS solusyonu ile 1/500 oranında seyreltilen 20-µg/ml Proteinaz-K oda sıcaklığında 15 dk uygulandı. PBS ile yıkamayı takiben 5 dk %3'lük H_2O_2 ile muamele edildikten sonra yeniden 3x5 dk PBS ile yıkama yapıldı. Örnekler Equilibrationbuffer ile oda ısısında 5 dk tutulduktan sonra TdT-enzimi ile nemli ortamda 370C de 1 saat bekletildikten sonra Stop WashBuffer ile 10 dk ve sonra AntidioksigeninPeroksidazKonjugatı ile 30 dk muamele edilen örnekler 3x5 dk PBS ile yıkandı. Ardından DAB ile boyaması yapılarak artalan boyaması Mayer's Hematoksileni ile yapıldı. Kör yöntemle TUNEL pozitif hücreler saptanarak ortalamalar istatiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.3.4.Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile İnceleme

TEM incelememiz gruplar arasından rastgele seçilmiş siyatik sinir örneklerinden 10 tanesine yapıldı. Gruplardan seçilen siyatik örneklerinin Doku örnekleri, 0,1M fosfat tamponu içinde %2,5 glutaraldehit içinde 24 saat 4°C'de fiksasyon yoluyla hazırlandı ve ardından sodyum fosfat tamponu ile durulandı. Örnekler 0,1 M fosfat tamponu içinde %1 osmiyum tetroksit ile oda sıcaklığında 2 saat boyunca tespit edildi. Tüm numuneler daha sonra artan dereceli etil alkol solüsyonlarında (%30, %50, %70, %90, %96 ve %100) dehidrate edildi, propilen oksit ile berraklaştırıldı ve epon-araldit reçinesine gömüldü. Ultra ince kesitler (60 nm), bakır ızgaralar (Leica Ultracut RM, Wetzlar, Almanya) üzerinde bir ultramikrotom ile alındı ve uranil asetat-kurşun sitrat ile zıt boyama yapıldı.

Numuneler, dijital görüntüleme özelliklerine sahip bir TEM (Hitachi HT 7800) (Resim 3.5) kullanılarak incelendi ve fotoğraflandı(66, 67).



Resim 3.5. Hitachi HT 7800 marka Geçirimli Elektron Mikroskobu(TEM)

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Sürekli veriler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir. Kategorik veriler ise yüzde (%) olarak verilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğunun araştırılmasında Shapiro Wilk's testinden yararlanılmıştır. Normal dağılım gösteren grupların karşılaştırılmasında grup sayısı üç ve üzerinde olan durumlar için Tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) kullanılmıştır. Grup etkilerinin ve etkileşim etkisinin testi için İki Yönlü Varyans Analizi testi kullanılmıştır. Analizlerin uygulanmasında IBM SPSS Statistics 21.0 (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.) programından yararlanılmıştır. İstatistiksel önemlilik için $p<0.05$ değeri kriter kabul edilmiştir.

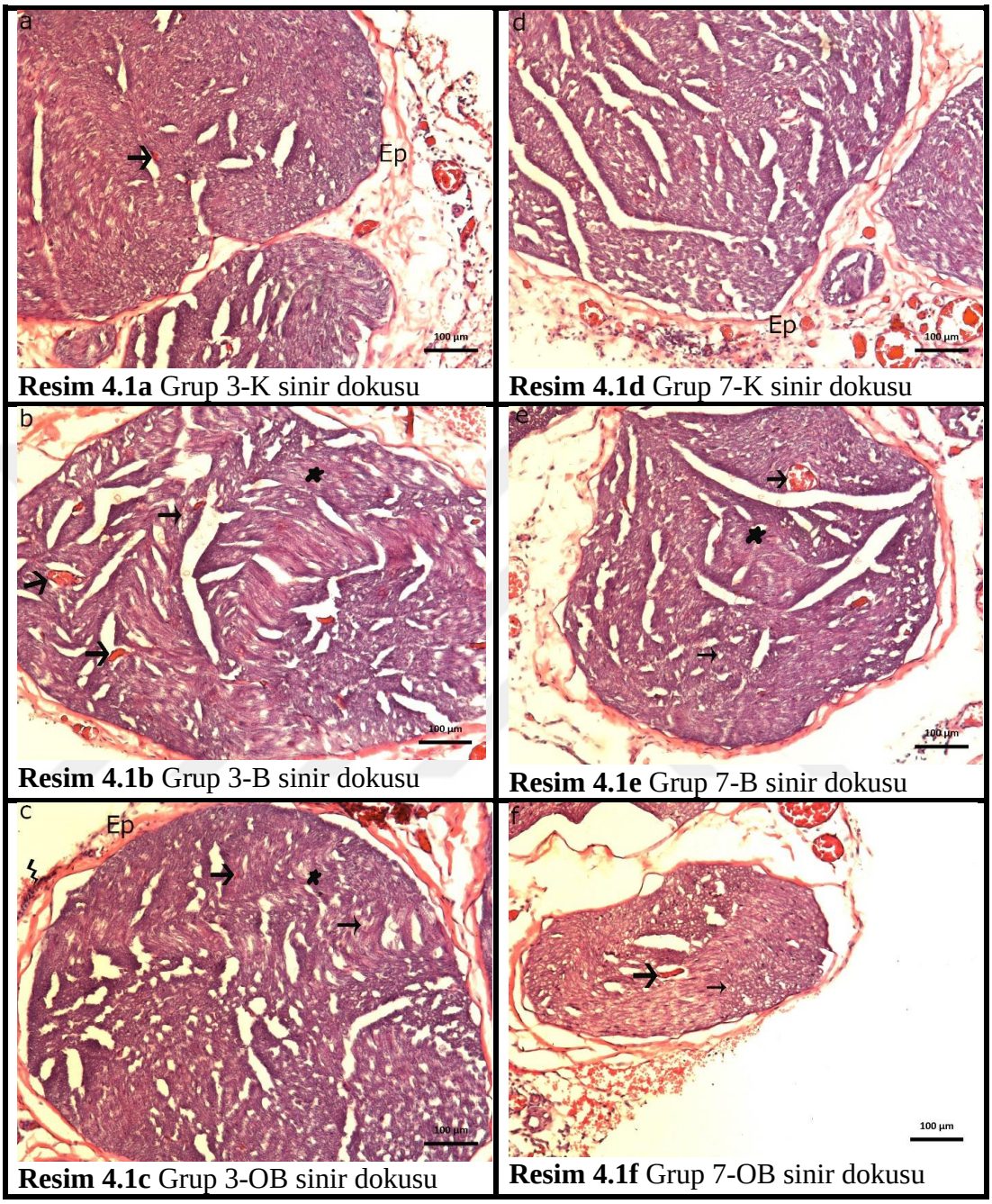
4.BULGULAR

Çalışmamamıza 60 adet sıçan herhangi bir kayıp yaşanmadan dahil edildi. Sadece 1 sıçanda hot-plate testi sırasında tırnaklarını plakaya takması sonucu ön ayak tırnaklarında kanama olması nedeniyle hot-plate testi tekrarlanamadı ve kayıp veri olarak girildi. Her grubun siyatik sinir örnekleri gününe uygun şekilde başarı ile alındı. Veriler çalışma defterine kaydedildi.

4.1.Morfolojik Bulgular

4.1.1.Elektron Mikroskobik Bulguları

Siyatik sinirde uygulanan ilaç veya kimyasallara bağlı histopatolojik değişiklikler olabilir. Sinir dokusu ve siyatik siniri incelenerek değişiklikler tanımlanır ve meydana gelen hasar bir sıçan modelinde kolayca gösterilebilir. Yaptığımız çalışmada serum fizyolojik, bupivakain ve ozonlanmış bupivakain'in nörotoksik etkileri histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Hematoksilen-Eozin ile yapılan histolojik boyamada, serum fizyolojik uygulandıktan sonra üçüncü gün örnekleri alınan 3-K Grubu ve serum fizyolojik uygulandıktan sonra yedinci gün örnekleri alınan 7-K gruplarda yer alan sıçanların siyatik sinir dokularında aksonal şişme ve az miktarda vasküler prolifersyon ve epinöryumda lenfosit infiltrasyonu ile inflamatuar bulgulara rastlandı. Sinir dokusunun sinir lifi demetlerini saran epinöryum, perinöryum ve endonöryum bağ dokusundan oluştuğu ve normal olduğu gözlendi (Resim 4.1a ve 4.1d). Bupivakain uygulandıktan sonra üçüncü gün örnekleri alınan 3-B ve yedinci gün örnekleri alınan 7-B gruplarında, aksonal dejenerasyon, vasküler proliferasyon, demiyelinizasyon ve epinöryumda mononükleer hücre infiltrasyonu dikkati çekmiştir. Özellikle 7-B grubunda nörotoksisitenin daha etkili olduğu görülmüştür. Demiyelinizasyon ve inflamasyon bu grupta daha yoğun gözlemlenmiştir (Resim 4.1b ve 4.1e). Ozonlanmış bupivakain uygulanan üçüncü gün örnekleri alınan 3-OB ve yedinci gün örnekleri alınan 7-OB gruplarında histopatolojik gerileme olduğu, inflamasyon devam etse de sinir lifi demetindeki bütünlük ve aksonal dejenerasyonda ki gerileme önemli bulgular arasındadır (Resim 4.1c ve 4.1f).



Resim 4.1a Grup 3-K sinir dokusu

Resim 4.1d Grup 7-K sinir dokusu

Resim 4.1b Grup 3-B sinir dokusu

Resim 4.1e Grup 7-B sinir dokusu

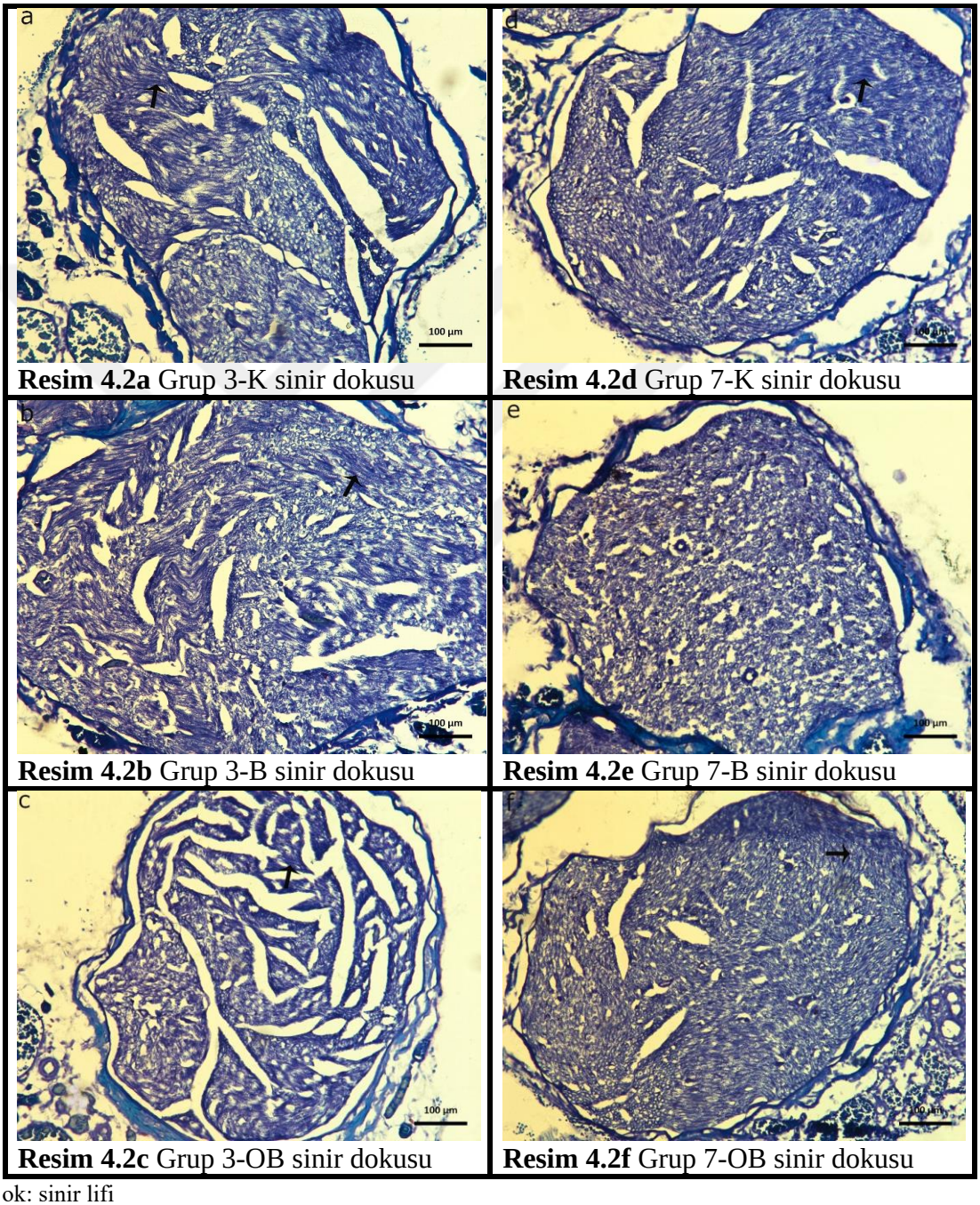
Resim 4.1c Grup 3-OB sinir dokusu

Resim 4.1f Grup 7-OB sinir dokusu

kısa ok: vaskülerproliferasyon, uzun ok:aksonal dejenerasyon, yıldız demiyelinizasyon, şimşek: lenfosit infiltrasyonu

Resim 4.1. Hematoksilen-Eozin boyama bulguları

LuxolFast Blue (LFB) boyaması ile serum fizyolojik uygulanan 3-K ve 7-K gruplarında miyelin kaybının çok az olduğu (Resim 4.2a ve 4.2d), bupivakain uygulanan 3-B ve 7-B gruplarında demiyelinizasyonun arttığı (Resim 4.2b ve 4.2e), ozonlanmış bupivakain uygulanan gruplarda ise demiyelinizasyonun daha az gerçekleştiği belirlenmiştir (Resim 4.2c ve 4.2f).



Resim 4.2a Grup 3-K sinir dokusu

Resim 4.2d Grup 7-K sinir dokusu

Resim 4.2b Grup 3-B sinir dokusu

Resim 4.2e Grup 7-B sinir dokusu

Resim 4.2c Grup 3-OB sinir dokusu

Resim 4.2f Grup 7-OB sinir dokusu

ok: sinir lifi

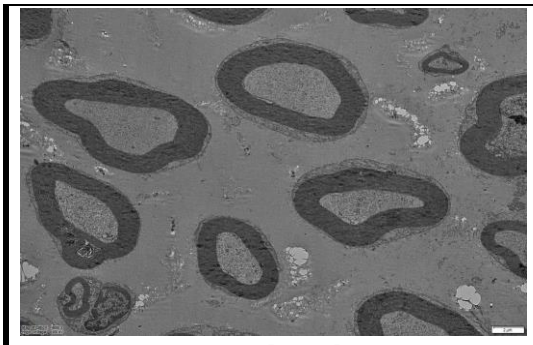
Resim 4.2. LuxolFast Blue (LFB) boyama bulguları

4.1.2.Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM) bulguları

TEM ile elde edilen görüntülerde kontrol grubuna ait kesitlerde aksonlar organize ve iyi boyanmış bir filament ağı ile karakterizedir. Akson stoplazmasının normal ultra yapısal morfoloji sergilediği görülmüştür. Ayrıca miyelin lif yapısının iyi bir biçimde korunduğu tespit edilmiştir (Resim 4.3a ve 4.3b). Daha yüksek boyutlarda akson sitoplazmasındaki mitokondrilerin de sağlıklı morfolojide oldukları görülmektedir (Resim 4.3c ve 4.3d).

Bupivakain grubuna ait verilerde en belirgin morfolojik değişikliklerden biri miyelinli aksonlarda gözlenen vakuolizasyonlardır (Resim 4.3e). Ayrıca miyelin kılıf düzensizlikleri ve lamellar seperasyonlar göze çarpmaktadır. Genel görüntüde miyelin hasarlarının özellikle büyük miyelinli liflerde daha belirgin olduğu görülmektedir (Resim 4.3f). Özellikle büyük miyelinli liflerde aksonal shrinkage(büzüşmeler) ve içe çökmeler görülmektedir (Resim 4.3g ve 4.3h). Ayrıca yakın büyütmelerde aksonal sitoplazmada mitokondrial hasar görülmektedir (Resim 4.3h). Schwann hücresi normal görünümdedir (Resim 4.3e). Bupivakain uygulanmış grupta aksonal shrinkage, mitokondri hasarı, akson sitoplazmalarında azalma ve miyelin hasarı görülmektedir (Resim 4.3f, 4.3g ve 4.3h).

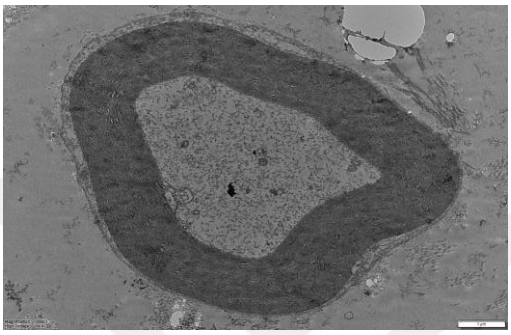
Ozonlanmış bupivakain grubunda aksonal erimeler ve miyelin düzensizlikleri görülmektedir (Resim 4.3i). Miyelin liflerinde içe çökmeler ve ayrışmalar görülmüştür (Resim 4.3j ve 4.3m). Aksonal büzüşmeler ve mitokondri hasarı yine ozonlanmış bupivakain grubunda da görülmektedir (Resim 4.3k).



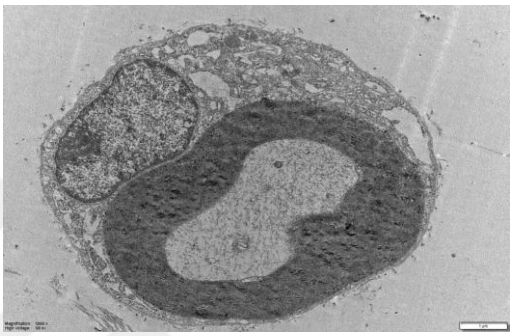
Resim 4.3a Kontrol Grubu



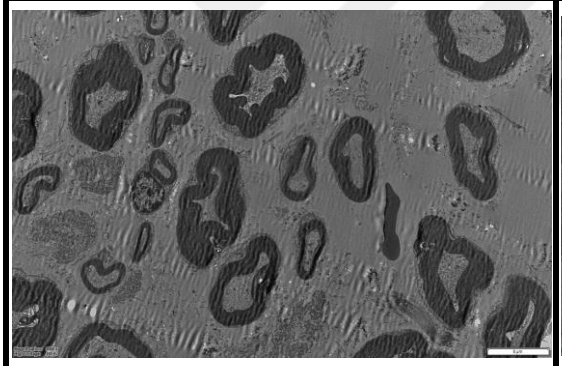
Resim 4.3b. Kontrol Grubu



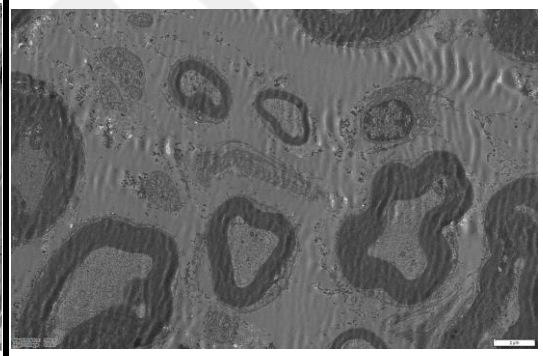
Resim 4.3c. Kontrol Grubu



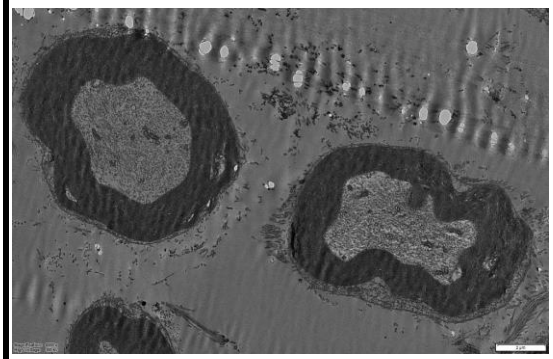
Resim 4.3d. Kontrol Grubu



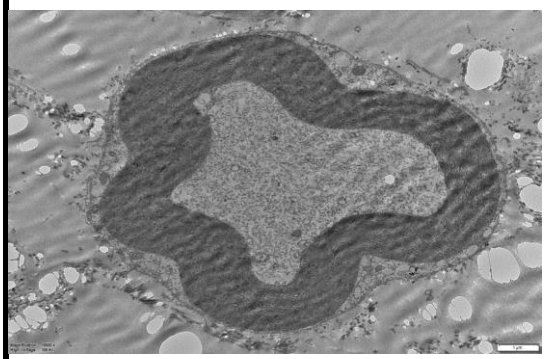
Resim 4.3e. Bupivakain Grubu



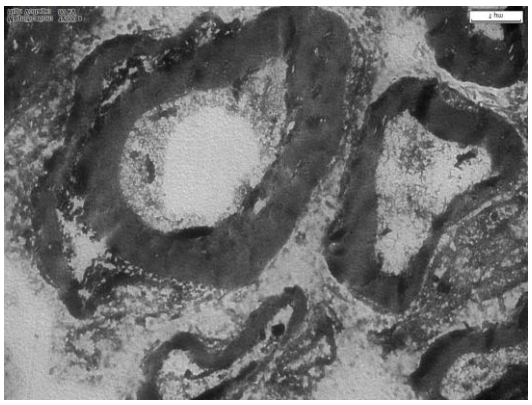
Resim4.3f. Bupivakain Grubu



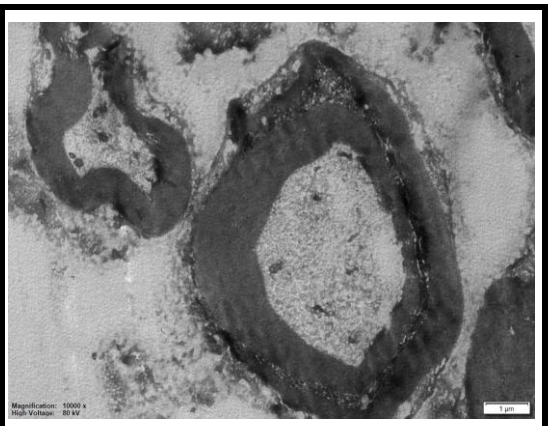
Resim4.3g. Bupivakain Grubu



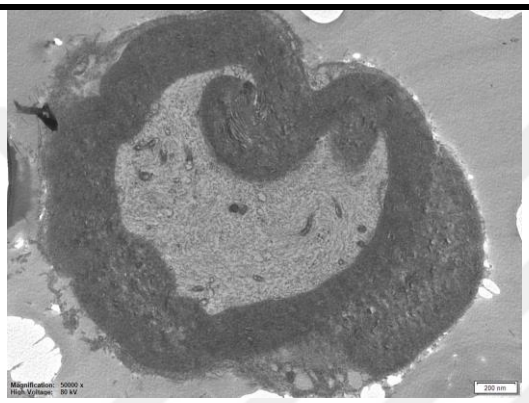
Resim 4.3h. Bupivakain Grubu



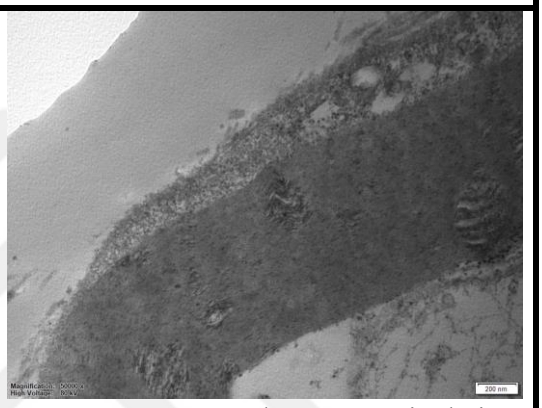
Resim 4.3i. Ozonlanmış Bupivakain



Resim 4.3j. Ozonlanmış Bupivakain



Resim 4.3k. Ozonlanmış Bupivakain



Resim 4.3m. Ozonlanmış Bupivakain

Resim 4.3. Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM) bulguları

Kontrol gruplarında korunmuş olan ultrayapısal bulguları, sitoplazmik ve miyelin kılıf bulguları bupivakain ve ozonlanmış bupivakain gruplarında dikkat çekici şekilde bozulmuş olarak görüldü. Bupivakain ve ozonlanmış bupivakain gruplarının benzer bozulmalara neden olmasına rağmen; alınan örnek sayısının kısıtlı olması nedeniyle bu gruplar arasında istatistiksel anlamlılık incelenememiştir.

4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

Nörofilament biyolojisi, radyal büyüme ile akson çapının oluşturulması gibi aksonların yapısal özelliklerini anlamak için önemlidir. Nörofilament boyaması periferik sinirlerinin aksonlarında ki nörofilament seviyesi gösterildi. Ayrıca miyelin kılıf oluşumunda oldukça önemli protein olan S100 antikor boyaması ile Schwann hücrelerinin miyelinizasyon için seviyesi belirlenmeye çalışıldı. Anti nöroflament boyamasında 3-K ve 7-K gruplarındaki immün reaktivite şiddetli olup istatistiksel

olarak bupivakain ve ozonlanmış bupivakain gruplarına göre anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0,05$). Sadece bupivakain uygulanan gruplar arasında anlamlı fark tespit edilememiştir ($p>0,05$). En yüksek istatistiksel anlamlılık serum fizyolojik uygulanan 7-K grubu ile bupivakain uygulanan gruplar arasında tespit edilmiştir ($p<0,001$).

Ozon anti-oksidatif ve anti-inflamatuar etkilere sahiptir. Nöroinflamasyon ve oksidatif stresin, nöropatik ağrının patogenezinde çok önemli bir rol oynadığı kabul edilmiştir. Nöroinflamasyonu değerlendirmek için proinflamatuar sitokin olan tümör nekroz faktörü (TNF-α) konsantrasyonu ölçüldü. Ek olarak, oksidatif stres seviyesini ortaya çıkarmak için süperoksitdismutazın (SOD) enzimatik aktivitesi ölçüldü. Ozon uygulanan siyatik sinir dokusunda SOD aktivitesinin oldukça azaldığı görüldü. Verilerimiz, sıçan nörotoksisite modelinde oksidatif stresi ve nöroinflamasyonun önemli ölçüde azalttığını gösterdi.

Tablo 4.1. 3. gün siyatik sinir immünohistokimyasal boyama H-Skorları

	Kontrol Grubu (K)	**Bupivakain Grubu (B)**	**Ozonlanmış Bupivakain Grubu (OB)**	**P Değeri**
Neuroflament	230±3.38	161±3.11	187±4.52	<0.001 (tüm gruplar arasında)
S100	245±2.58	183±2.52	221±2.00	<0.001 (tüm gruplar arasında)
SOD	164±2.71	132±1.55	148±1.79	<0.001 (tüm gruplar arasında)
TNF-alfa	176±1.94	244±1.67	204±1.87	<0.001 (tüm gruplar arasında)

Sıçanlardan 3. günde alınan siyatik sinir örneklerinde beklenildiği gibi kontrol grubu tüm boyamalardan hesaplanan H skorlarında diğer iki gruptan anlamlı şekilde olumlu sonuçlara sahipti.

3. gün siyatik sinir örnekleri alınan Ozonlanmış bupivakain grubu ise 3. gün bupivakain uygulanan gruba göre yine tüm boyamalarda anlamlı ($p<0,001$) şekilde olumlu sonuçlara sahipti.

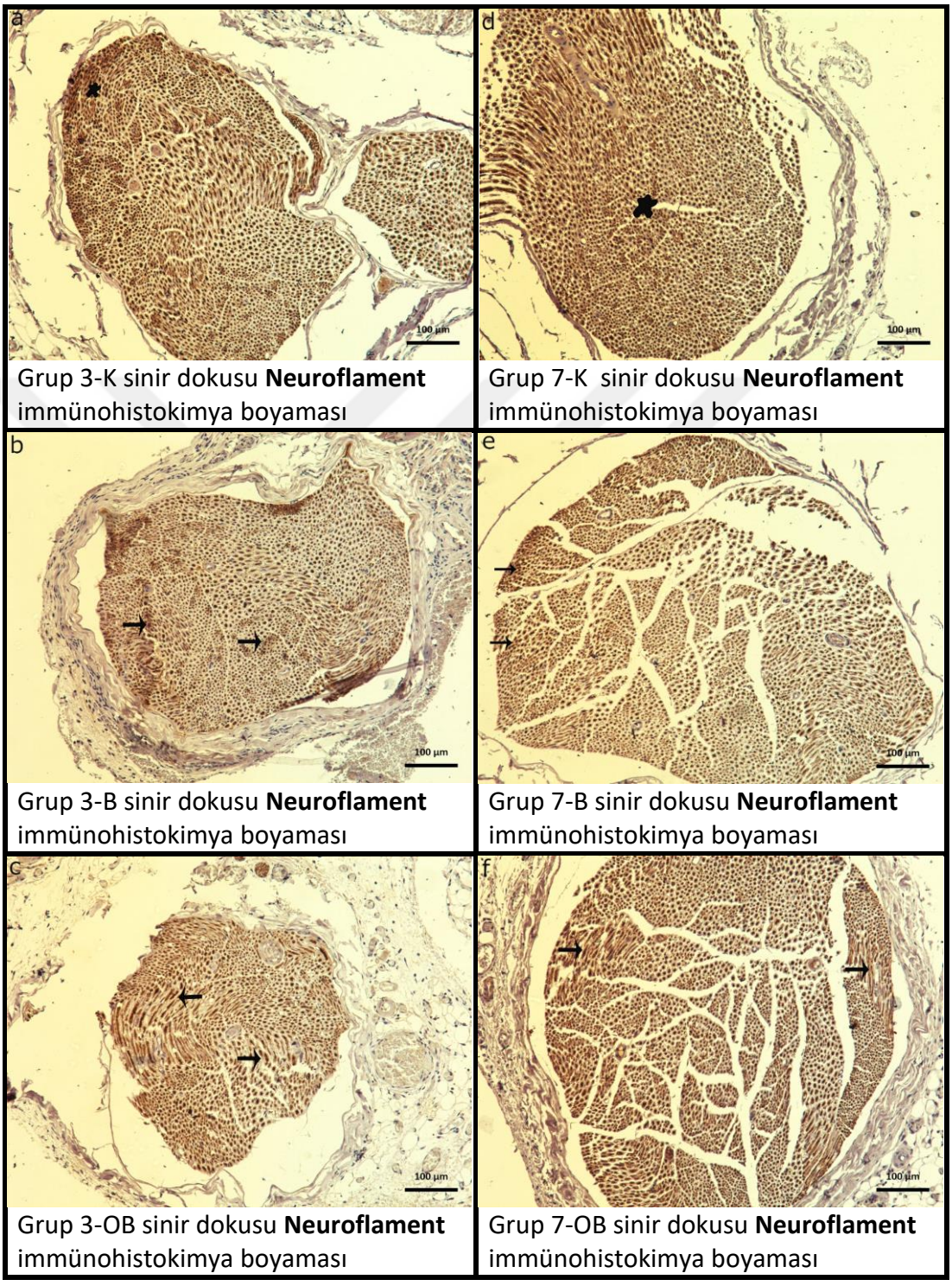
Tablo 4.2. 7. gün siyatik sinir immünohistokimyasal boyama H-Skorları

	Kontrol Grubu (K)	**Bupivakain Grubu (B)**	**Ozonlanmış Bupivakain Grubu (OB)**	**P Değeri**
Neuroflament	237±3.30	151±3.58	207±2.22	<0.001 (tüm gruplar arasında)
S100	242±2.80	173±2.11	246±2.43	<0.001 (B-K ve B-OB gruplarında) 0.092 (K-OB grubunda)
SOD	163±2.08	124±1.61	154±2.18	<0.001 (B-K ve B-OB gruplarında) 0.034 (K-OB grubunda)
TNF-alfa	187±2.42	247±2.56	209±1.86	<0.001 (tüm gruplar arasında)

Sıçanlardan 7. günde alınan siyatik sinir örneklerinde beklenildiği gibi kontrol grubu Nöroflament/SOD/TNF-alfa boyamalarından hesaplanan H skorlarında diğer iki gruptan anlamlı şekilde olumlu sonuçlara sahipti. Ayrıca 7. gün örneklerinde S100 boyamasından hesaplanan H skorlarında; kontrol grubu ile ozonlanmış bupivakain grubu birbirine istatistiksel olarak benzer sonuçlar vermiş ve bupivakain grubundan anlamlı şekilde daha olumlu sonuçlara sahip bulunmuştur.

7. gün siyatik sinir örnekleri alınan Ozonlanmış bupivakain grubu ise 7. gün bupivakain uygulanan gruba göre yine tüm boyamalarda anlamlı ($p<0,001$) şekilde olumlu sonuçlara sahipti.

Neuroflament immünohistokimyasal boyaması sonucu tüm gruplardan örnek fotoğraflar:



Grup 3-K sinir dokusu **Neuroflament** immünohistokimya boyaması

Grup 7-K sinir dokusu **Neuroflament** immünohistokimya boyaması

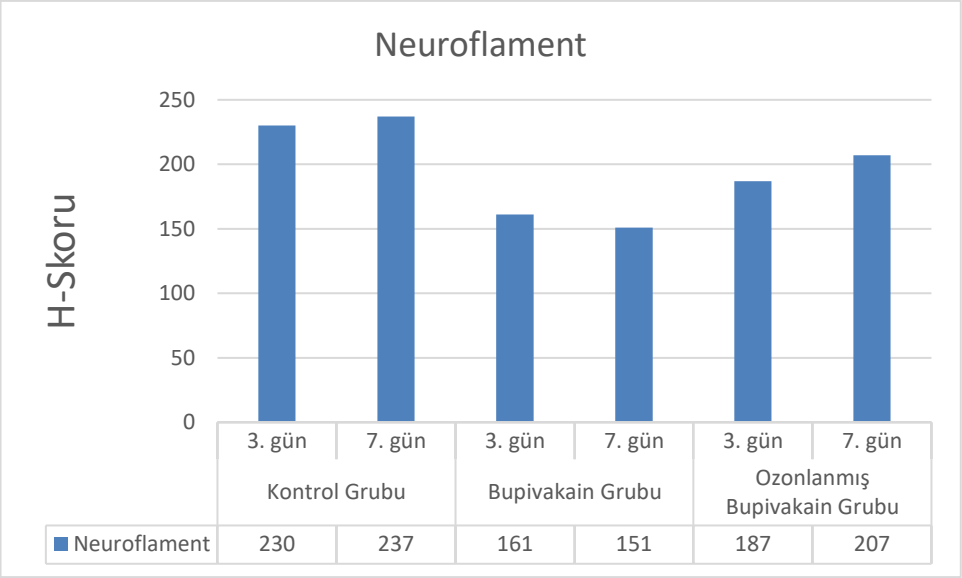
Grup 3-B sinir dokusu **Neuroflament** immünohistokimya boyaması

Grup 7-B sinir dokusu **Neuroflament** immünohistokimya boyaması

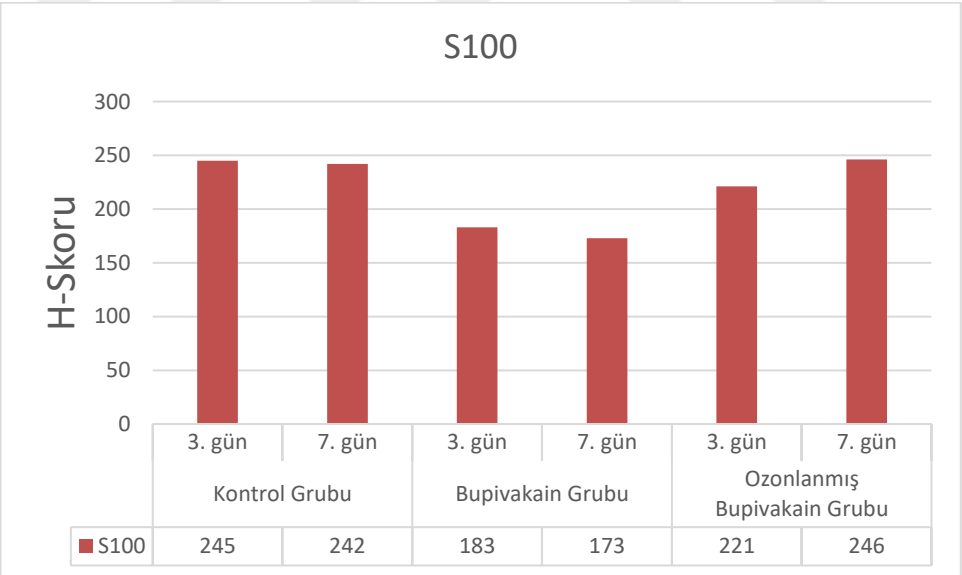
Grup 3-OB sinir dokusu **Neuroflament** immünohistokimya boyaması

Grup 7-OB sinir dokusu **Neuroflament** immünohistokimya boyaması

Resim 4.4. Neuroflament immünohistokimya boyaması (ok: immünopozitif hücreler)

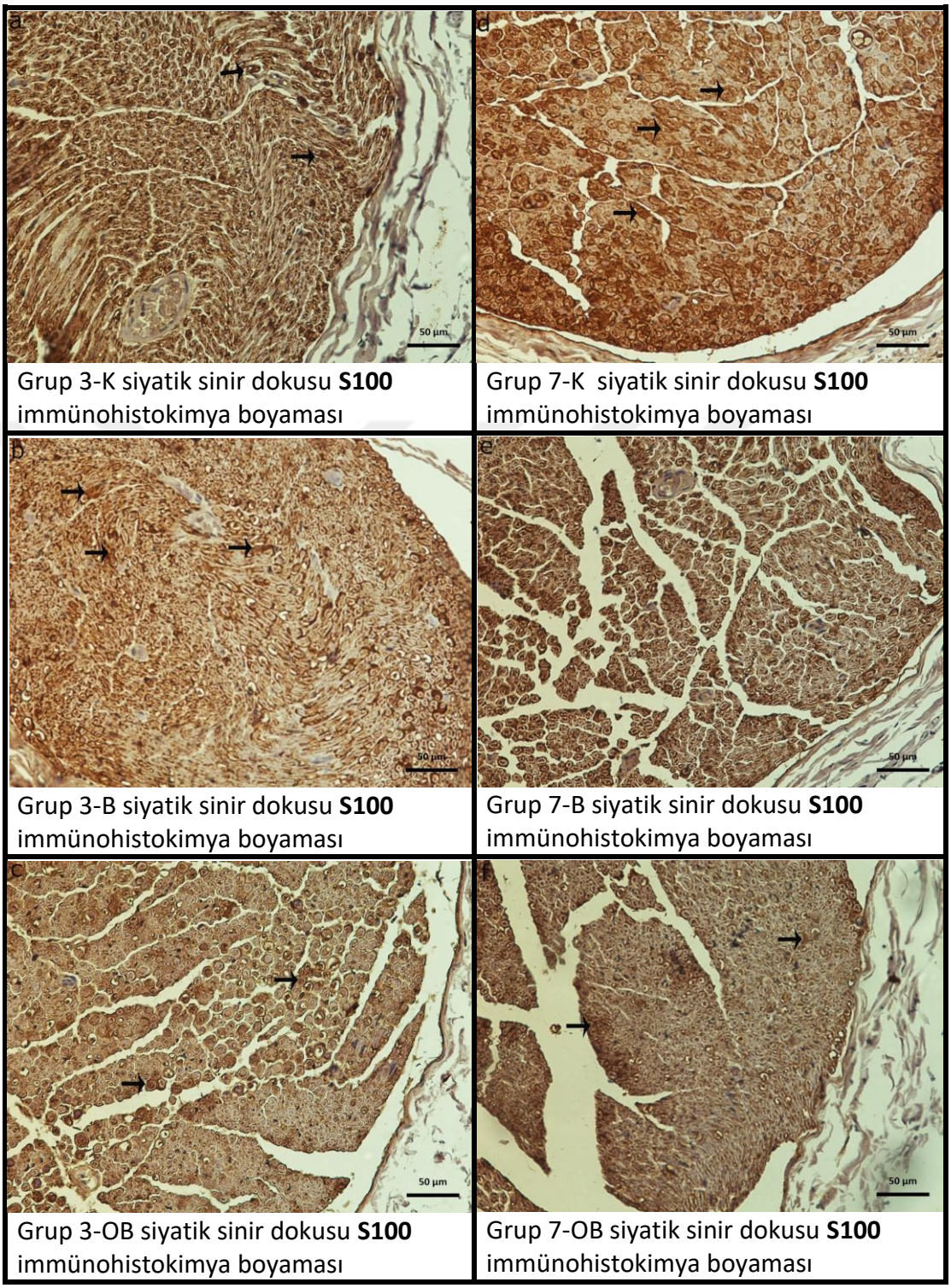


Şekil 4.1 Yüksek Neuroflament H-Skoru; nöroflament açısından zengin akson varlığını ifade etmektedir. Düşük değerler nörotoksisite göstergesidir.



Şekil 4.2. Yüksek S100 H-Skoru Schwann hücrelerinin miyelinizasyonu göstermektedir. Düşük değerler nörotoksisite göstergesidir.

S100 immünohistokimya boyaması sonucu tüm gruplardan örnek fotoğraflar:



Grup 3-K siyatik sinir dokusu **S100** immünohistokimya boyaması

Grup 7-K siyatik sinir dokusu **S100** immünohistokimya boyaması

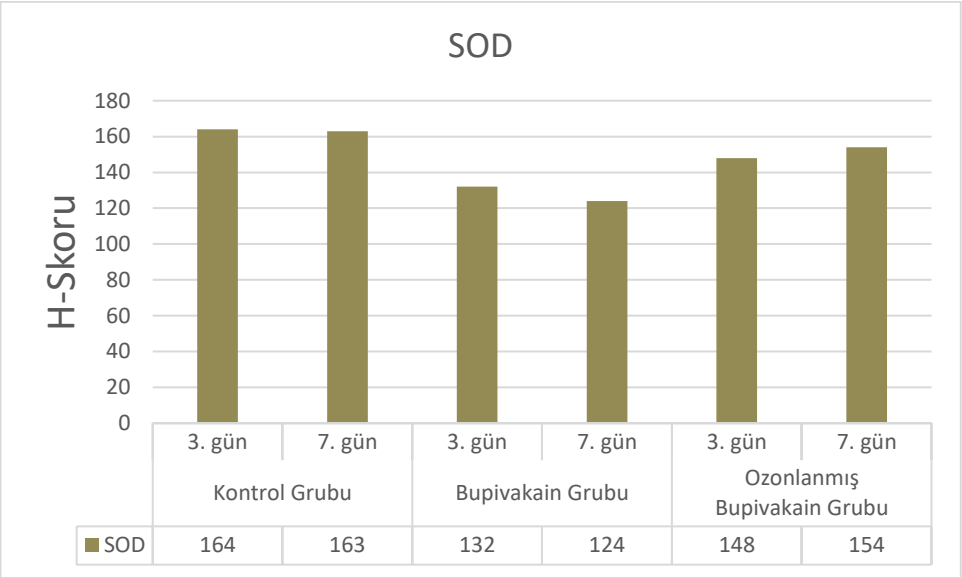
Grup 3-B siyatik sinir dokusu **S100** immünohistokimya boyaması

Grup 7-B siyatik sinir dokusu **S100** immünohistokimya boyaması

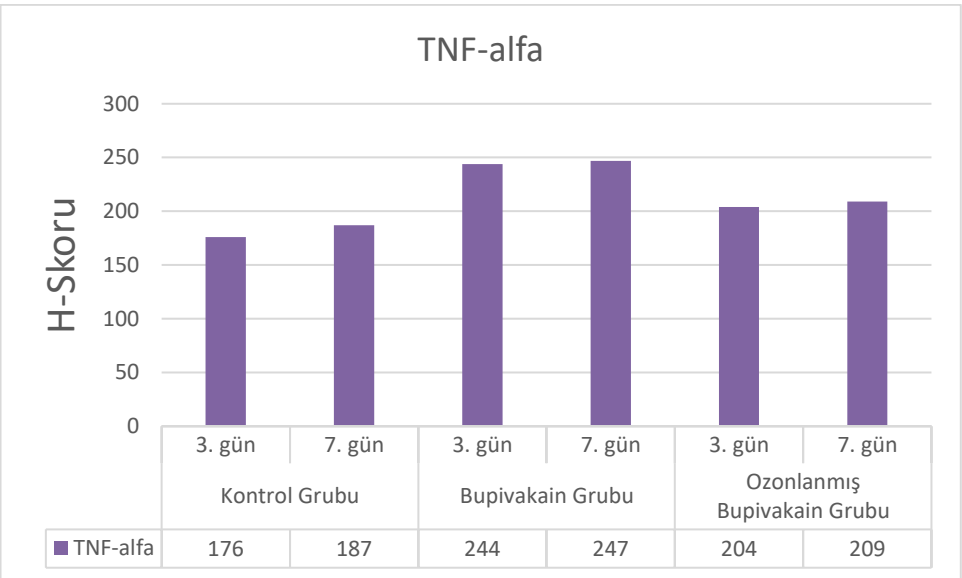
Grup 3-OB siyatik sinir dokusu **S100** immünohistokimya boyaması

Grup 7-OB siyatik sinir dokusu **S100** immünohistokimya boyaması

Resim 4.5. S100 immünohistokimya boyaması (ok: immünopozitif hücreler)

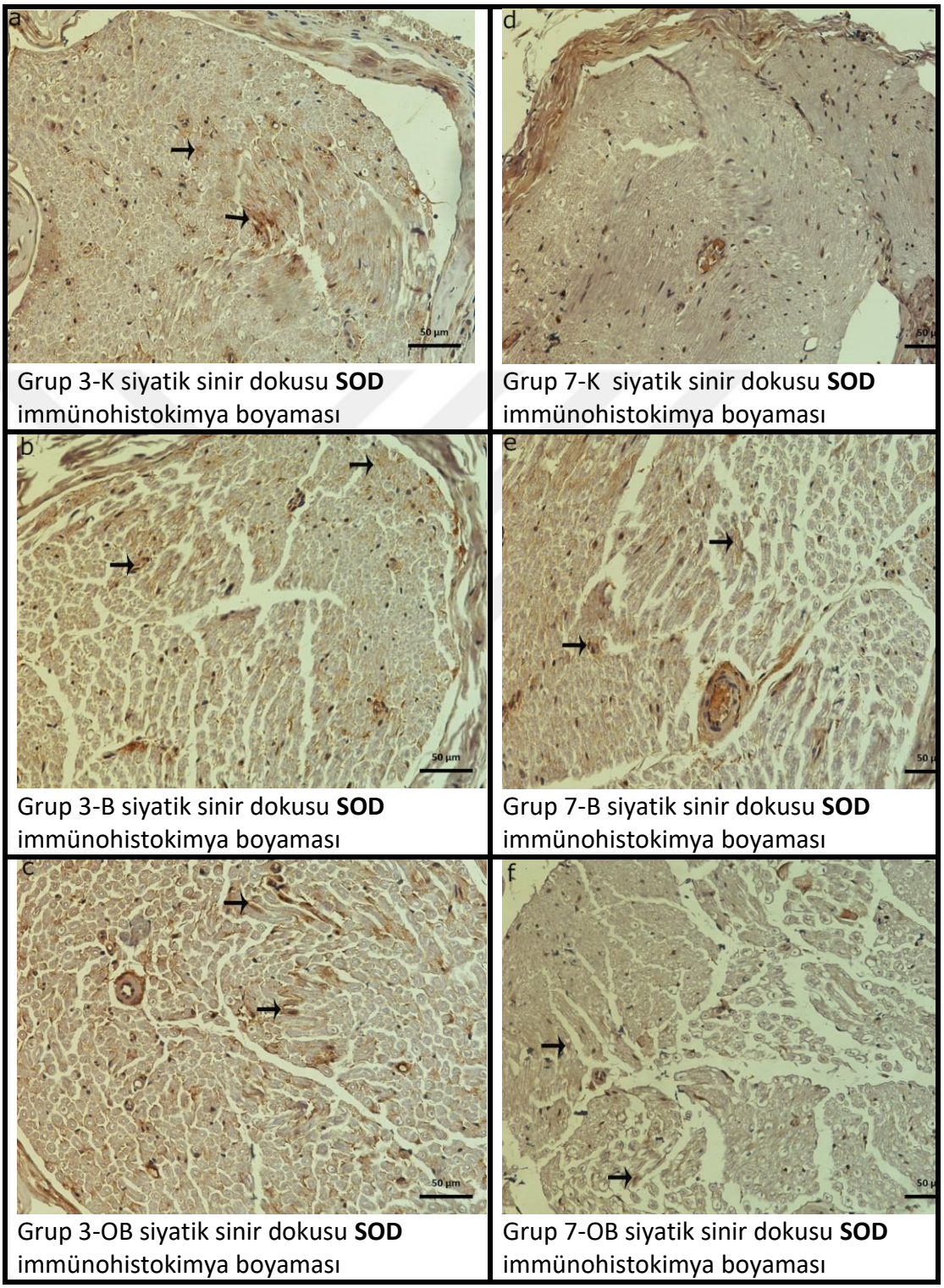


Şekil 4.3. Yüksek SOD H-Skoru; süperoksit dismutaz aktivitesinin az olduğunu ifade etmektedir. Düşük değerler oksidatif stresin yüksek olduğunu ve nöroinflamasyonun göstergesidir.



Şekil 4.4. Yüksek TNF-alfa H-Skoru; nöroinflamasyonun yüksek olduğunu ifade etmektedir. Düşük değerler nörotoksisitenin az olduğunun göstergesidir.

SüperOksitDismutaz(SOD) immünohistokimya boyaması sonucu tüm gruplardan örnek fotoğraflar:



Grup 3-K siyatik sinir dokusu **SOD** immünohistokimya boyaması

Grup 7-K siyatik sinir dokusu **SOD** immünohistokimya boyaması

Grup 3-B siyatik sinir dokusu **SOD** immünohistokimya boyaması

Grup 7-B siyatik sinir dokusu **SOD** immünohistokimya boyaması

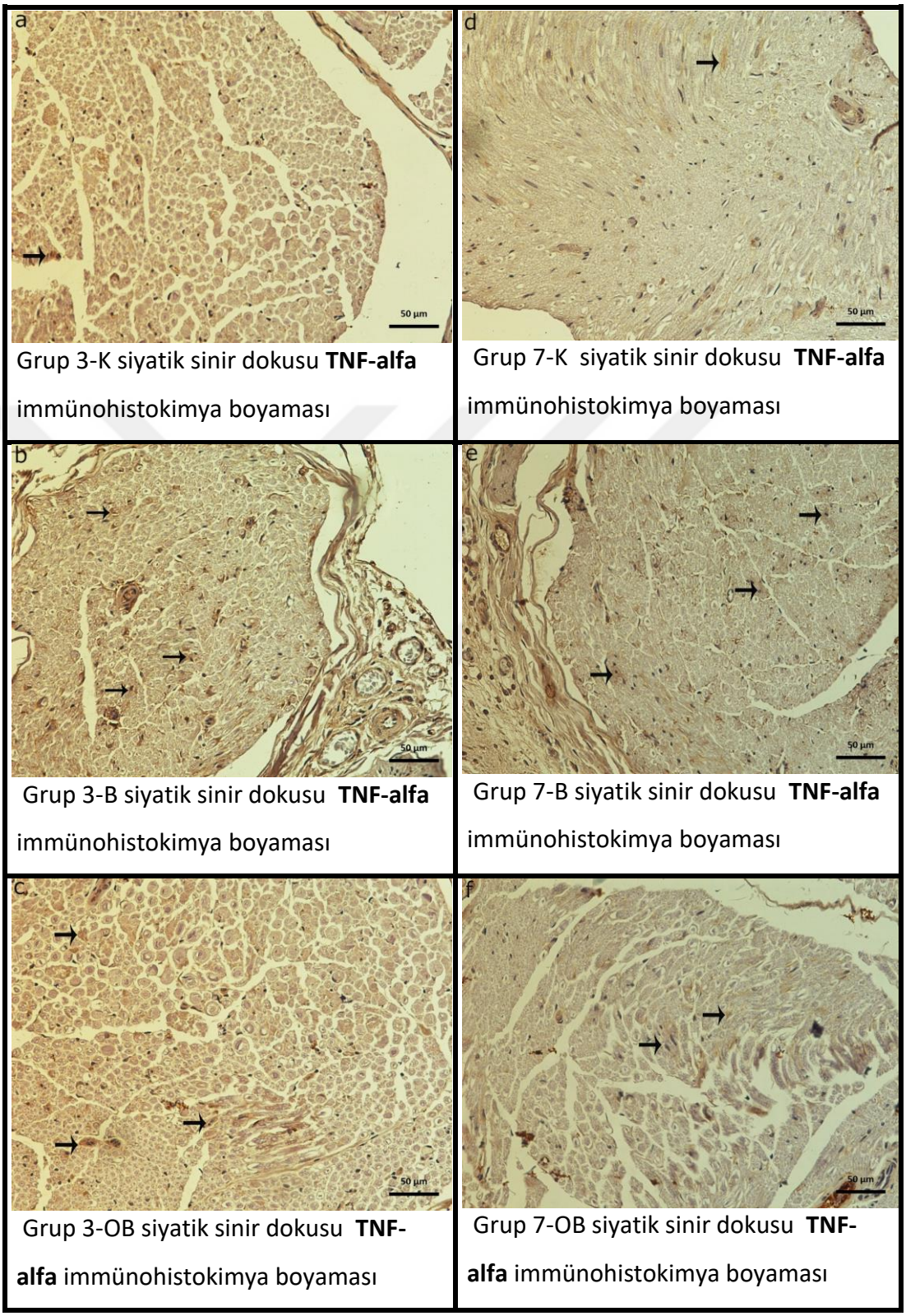
Grup 3-OB siyatik sinir dokusu **SOD** immünohistokimya boyaması

Grup 7-OB siyatik sinir dokusu **SOD** immünohistokimya boyaması

ok: immünopozitif hücreler

Resim 4.6. Süperoksitdismutaz immünohistokimya boyaması

TNF-alfa immünohistokimya boyaması sonucu tüm gruplardan örnek fotoğraflar:



Grup 3-K siyatik sinir dokusu **TNF-alfa** immünohistokimya boyaması

Grup 7-K siyatik sinir dokusu **TNF-alfa** immünohistokimya boyaması

Grup 3-B siyatik sinir dokusu **TNF-alfa** immünohistokimya boyaması

Grup 7-B siyatik sinir dokusu **TNF-alfa** immünohistokimya boyaması

Grup 3-OB siyatik sinir dokusu **TNF-alfa** immünohistokimya boyaması

Grup 7-OB siyatik sinir dokusu **TNF-alfa** immünohistokimya boyaması

Resim 4.7. TNF-alfa immünohistokimya boyaması (ok: immünopozitif hücreler)

Ayrıca 3. gün ve 7. gün toksisite bulgularının karşılaştırılması amacı ile her grubun kendi içinde zamana göre değişimi değerlendirildi.

Tablo 4.3. Kontrol grubu İmmünohistokimyasal boyama 3. ve 7. gün H-Skorları

	Kontrol Grubu		**P Değeri**
	3. gün	**7. gün**	
Neuroflament	230±3.38	237±3.30	0.594
S100	245±2.58	242±2.80	0.973
SOD	164±2.71	163±2.08	0.991
TNF-alfa	176±1.94	187±2.42	0.008

Kontrol grubunda TNF-alfa boyamasına ait H skoru istatistiksel anlamlı olarak artmış olarak bulundu bu durum nöroinflamasyonun 7. günde daha yüksek olduğunu ifade etmektedir. Kontrol grubuna ait diğer boyamalarda ise istatistiksel anlamlı değişim olmamıştır.

Tablo 4.4. Bupivakain grubu immünohistokimyasal boyama 3. ve 7. gün H-Skorları

	Bupivakain Grubu		**P Değeri**
	3. gün	**7. gün**	
Neuroflament	161±3.11	151±3.58	0.341
S100	183±2.52	173±2.11	0.030
SOD	132±1.55	124±1.61	0.087
TNF-alfa	244±1.67	247±2.56	0.883

Bupivakain grubunda S100 boyamasına ait H skoru istatistiksel anlamlı olarak azalmış olarak bulundu bu durum miyelinizasyon kaybının 7. günde daha yüksek olduğunu ifade etmektedir. Bupivakain grubuna ait diğer boyamalarda ise istatistiksel anlamlı değişim olmamıştır.

Tablo 4.5. Ozonlanmış Bupivakain grubu immünohistokimyasal 3. ve 7. gün H-Skorları

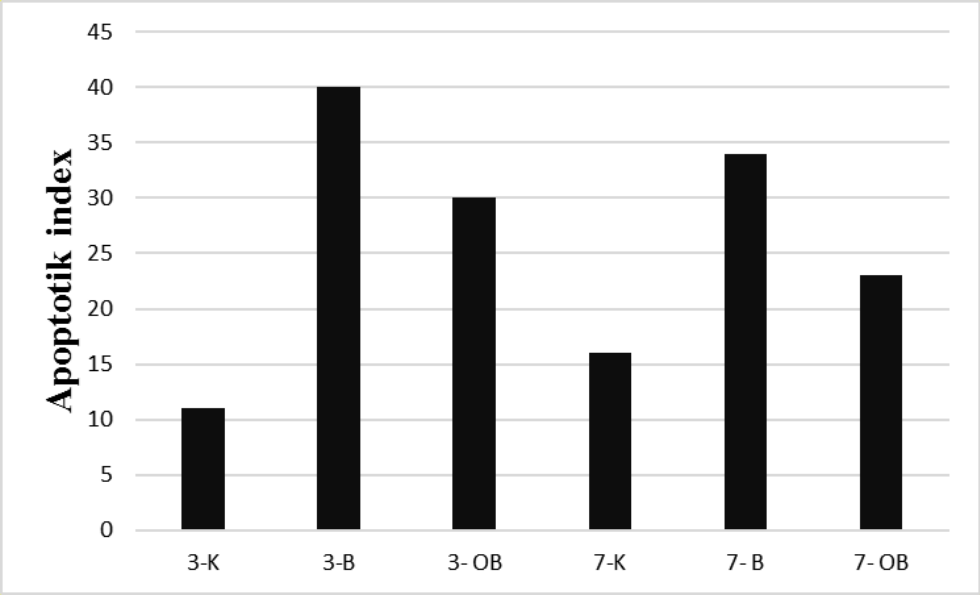
	Ozonlanmış Bupivakain Grubu		**P Değeri**
	3. gün	**7. gün**	
Neuroflament	187±4.52	207±2.22	0.002
S100	221±2.00	246±2.43	<0.001
SOD	148±1.79	154±2.18	0.271
TNF-alfa	204±1.87	209±1.86	0.430

Ozonlanmış Bupivakain grubunda Neuroflament ve S100 boyamasına ait H skoru istatistiksel anlamlı olarak artmış olarak bulundu bu durum hem Neuroflament artışı hem de miyelinizasyonun 7. günde daha yüksek olduğunu ve toksisitenin azalmakta olduğunu ifade etmektedir. Ozonlanmış Bupivakain grubuna ait diğer boyamalarda ise istatistiksel anlamlı değişim olmamıştır.

4.3. TUNNEL Bulguları

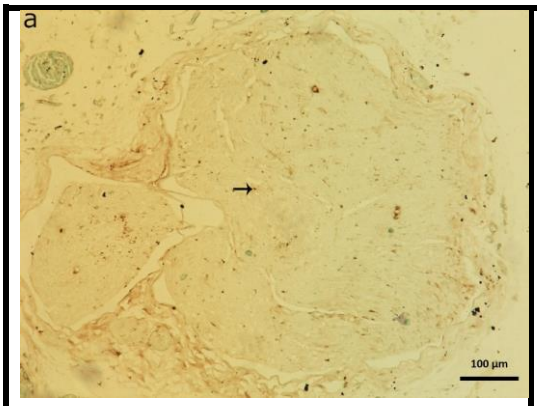
Programlı hücre ölümü mekanizması genellikle embriyonik dokularda meydana gelirken, erişkin dokuda oksidan/antioksidan dengenin bozulması ve dokudaki dejenerasyona bağlı ortaya çıkmaktadır. Nörotoksik ajanlara maruz kalan sinir dokusunda oksidatif stres ve enflamasyon glial hücreler ve nöronların apoptoza sürüklenmesine neden olur. Dokudaki fonksiyonel işlemlerin aksaklığı apoptozis için önemli tetikleyici durumlardan biridir. TNF- alfanın kupffer hücrelerinden salınımı ile apoptotik mekanizma aktive olur ve hücrelerde apoptotik süreç başlar. Bu olay sadece hücresel ölümle sonuçlanmaz aynı zamanda yeni onarım için şartların uygun hale

getirilmesini sağlar. Çalışmamızda apoptozisin tüm gruplarda tetiklendiği ve özellikle bupivakain uygulanan gruplarda TUNEL reaktivitesinin şiddetli olduğu gözlemlenmiştir. Serum fizyolojik uygulanan gruplarda apoptoz daha hafif ve özellikle stellat hücrelerde meydana geldiği görülmüştür. Ozonlanmış Bupivakain uygulanan gruplarda ise apoptozun gerilediği gözlemlenmiştir. Gruplar arasında Apoptotik indeks değerlerine göre istatistiksel anlamlılık görülmüştür. TUNEL pozitifliğinde gruplar arasındaki en fazla anlamlılık serum fizyolojik uygulanan gruplarla ve bupivakain uygulanan gruplar arasında ($p<0,0001$) belirlenmiştir. Serum fizyolojik uygulanan gruplar arasında en az anlamlılık görülürken ($p<0,05$), bupivakain ve ozonlanmış bupivakain uygulanan gruplar arasında $p<0,001$ olarak anlamlılık tespit edilmiştir.

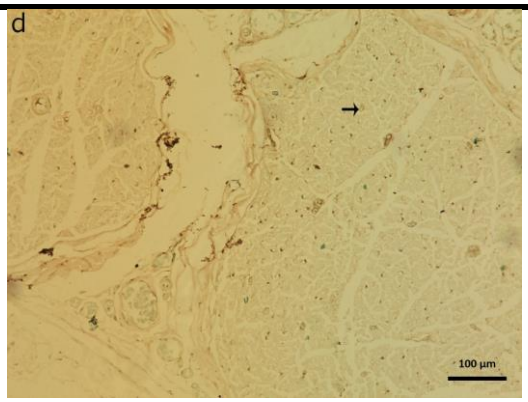


Şekil 4.5. TUNNEL testi apopototik indeks değerleri

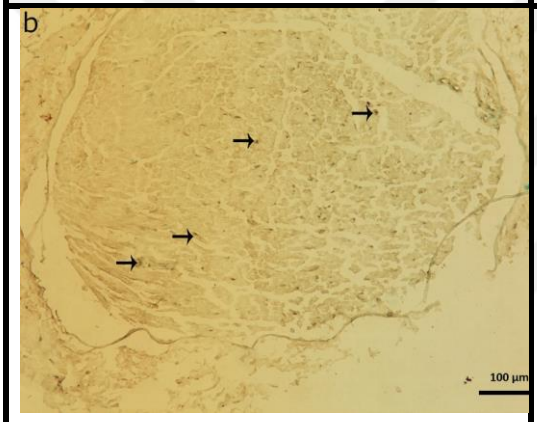
TUNNEL boyaması sonucu tüm gruplardan örnek fotoğraflar:



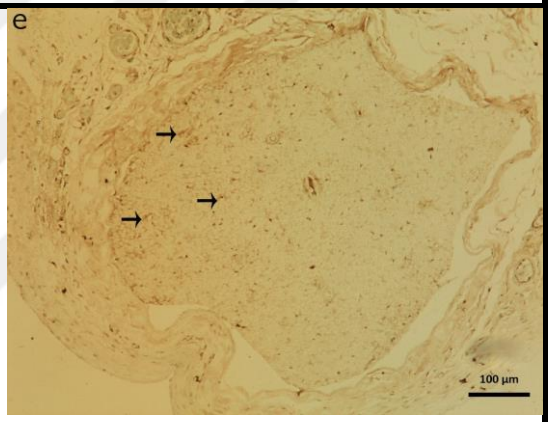
Grup 3-K siyatik sinir dokusu **TUNNEL** boyaması



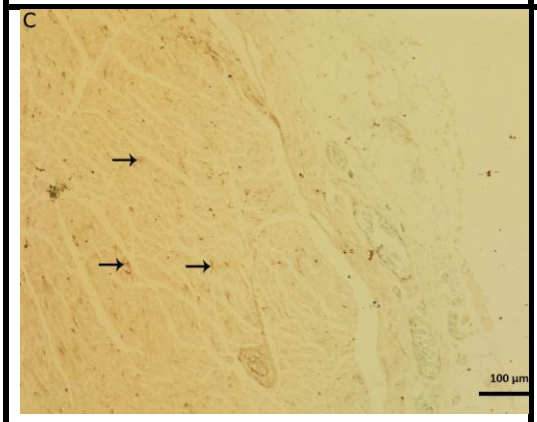
Grup 7-K siyatik sinir dokusu **TUNNEL** boyaması



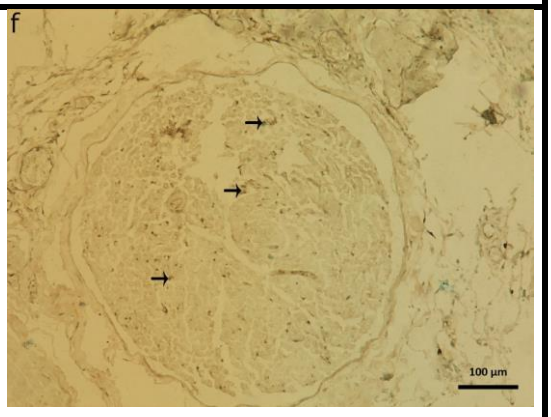
Grup 3-B siyatik sinir dokusu **TUNNEL** boyaması



Grup 7-B siyatik sinir dokusu **TUNNEL** boyaması



Grup 3-OB siyatik sinir dokusu **TUNNEL** boyaması



Grup 7-OB siyatik sinir dokusu **TUNNEL** immünohistokimya boyaması

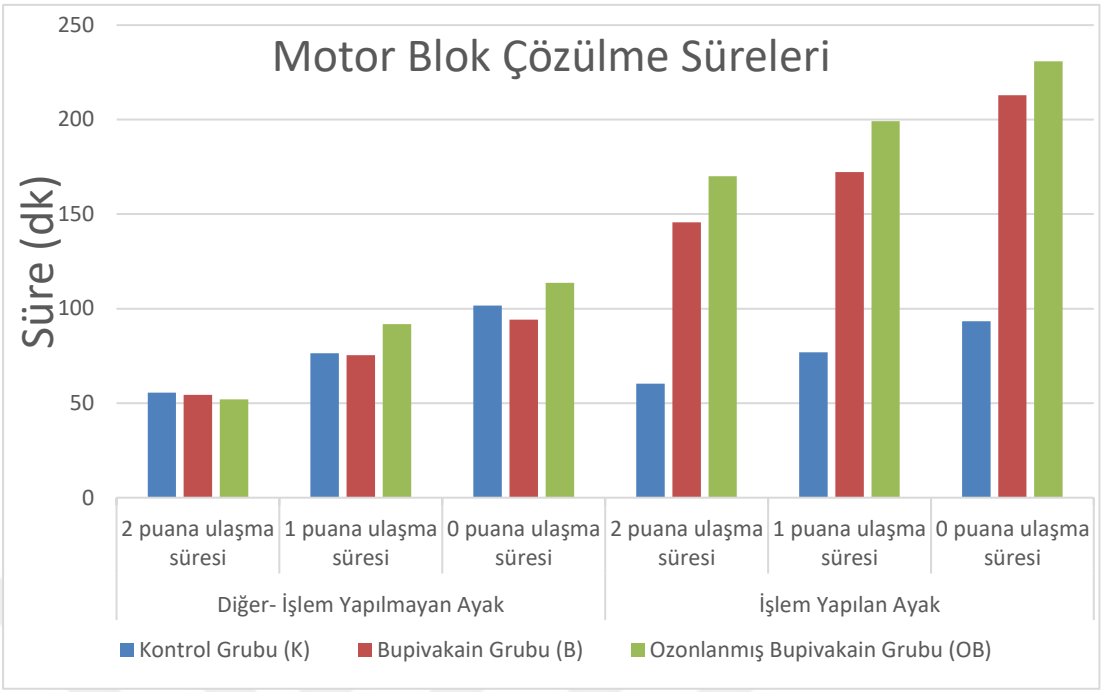
Resim 4.8. Tunnel boyaması (ok: tünel pozitif hücreler)

4.4.Fonksiyonel Değerlendirme Bulgularımız

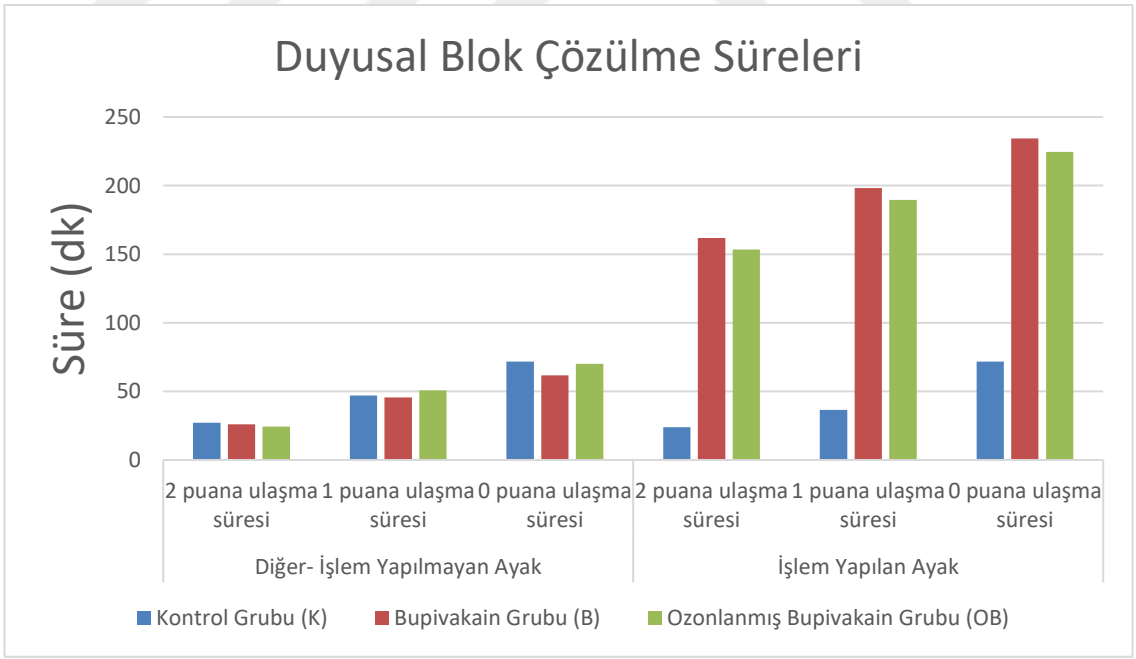
Anestezi ilişkili gecikme hatalarının gözden kaçmamasını sağlamak amacı hiçbir işlem yapmadığımız (Diğer-İşlem yapılmayan) ayaklarda da testlerimizi yaptık. Çalışmamızın sonucunda hem motor hem de duyusal blok sürelerinin çözülme zamanları açısından işlem yapılmayan ayaklarda beklediğimiz gibi gruplar arasında fark olmadığını gördük.

Tablo 4.6. Motor blok çözülme süreleri

		Kontrol Grubu (K)	Bupivakain Grubu (B)	Ozonlanmış Bupivakain Grubu (OB)	P değeri
Diğer- İşlem Yapılmayan Ayak	Motor Blok çözülme 2 puana ulaşma süresi	55.65	54.40	52.10	>0,05 (her grup için)
	Motor Blok çözülme 1 puana ulaşma süresi	76.35	75.35	91.75	>0,05 (her grup için)
	Motor Blok çözülme 0 puana ulaşma süresi	101.65	94.25	113.60	>0,05 (her grup için)
İşlem Yapılan Ayak	Motor Blok çözülme 2 puana ulaşma süresi	60.25	145.70	170.00	<0,0001 (K-B ve K-OB) >0,05 (B-OB arasında)
	Motor Blok çözülme 1 puana ulaşma süresi	76.95	172.20	199.10	<0,0001 (K-B ve K-OB) >0,05 (B-OB arasında)
	Motor Blok çözülme 0 puana ulaşma süresi	93.35	212.90	230.80	<0,0001 (K-B ve K-OB) >0,05 (B-OB arasında)



Şekil 4.6. Motor blok çözülme süreleri



Şekil 4.7. Duyusal Blok çözülme süreleri

Blok uyguladığımız ayaklar arasında ise ozonlanmış bupivakain ve bupivakain grupları, kontrol grubuna göre anlamlı olarak uzamış motor ve duyusal blok sürelerine sahipti. Ancak bupivakain grubu ile ozonlanmış bupivakain grubu arasında motor ve duyusal blok süreleri açısından istatistiksel anlamlı fark görülememiştir.

Ozonlanmış bupivakain uygulanan ayaklarda ortalama motor blok süreleri daha uzunken, bupivakain uygulanan ayaklarda ise ortalama duyusal blok süreleri daha uzun görülmüş ancak istatistiksel olarak bu durum anlamlı bulunmamıştır.

Tablo 4.7. Duyu blok çözülme süreleri

		Kontrol Grubu (K)	**Bupivakain Grubu (B)**	**Ozonlanmış Bupivakain Grubu (OB)**	**P değeri**
Diğer- İşlem Yapılmayan Ayak	Duyusal Blok çözülme 2 puana ulaşma süresi	27.25	26.00	24.35	>0,05 (her grup için)
	Duyusal Blok çözülme 1 puana ulaşma süresi	46.90	45.50	50.80	>0,05 (her grup için)
	Duyusal Blok çözülme 0 puana ulaşma süresi	71.65	61.60	70.10	>0,05 (her grup için)
İşlem Yapılan Ayak	Duyusal Blok çözülme 2 puana ulaşma süresi	23.85	161.80	153.30	<0,0001 (K-B ve K-OB) >0,05 (B-OB arasında)
	Duyusal Blok çözülme 1 puana ulaşma süresi	36.55	198.20	189.60	<0,0001 (K-B ve K-OB) >0,05 (B-OB arasında)
	Duyusal Blok çözülme 0 puana ulaşma süresi	71.75	234.25	224.50	<0,0001 (K-B ve K-OB) >0,05 (B-OB arasında)

5.TARTIŞMA

Lokal anesteziklerin nörotoksisiteye neden oldukları yapılan çalışmalarla gösterilmiş. Bu etkiden özellikle yüksek dozlarda uygulanan lidokain suçlu bulunmuş olsa da devam eden çalışmalar aslında tüm lokal anesteziklerin benzer sonuçlara sebep olabileceğini göstermiştir [69]. Nörotoksisitenin verilen lokal anesteziğin dozu (veya konsantrasyonu), süresi ve yapısı ile ilişkilidir [14, 69].

Lokal anestezik ilişkili nörotoksisite; yapılan hayvan, hücre hattı ve insan çalışmalarında çeşitli mekanizmalarla gösterilmiştir(68-70). Sinir hücrelerinin lokal anesteziklere olan duyarlılıkları hücrelerin tipine ve yaşına göre farklılık göstermektedir(71-73). Tavşanlarda yapılan bir çalışmada dorsal root giriş bölgesindeki (Obersteiner-Redlich zone) oligodentrositler tarafından oluşturulan miyelin kılıfları lokal anesteziklere daha hassas bulunmuştur(71).

Periferik sinir lifleri, nöronal aksonlar, Schwann hücreleri tarafından sentezlenen miyelin kılıflar ve kollajenden zengin hücre dışı matristen oluşan histolojik yapılardır. Schwann hücreleri, miyelinli lifleri oluşturabilen lipid açısından zengin çok katmanlı miyelin kılıfları oluşturabilir. Histokimyasal tekniklerin kullanımı, periferik sinirlerdeki patofizyolojik durumlar hakkında bilgi sağlar. Histolojik çalışmalarda aksonal dejenerasyon ve demiyelinizasyonu göstermek için kullanılan en güvenilir yöntemlerden ve altın standart tekniklerden biri LuxolFast Blue (LFB) boyamadır. Periferik sinir sistemi için çok uygun bir boyama metodu olmasa da nörotoksisite sonucu meydana gelen demiyelinizasyonu belirlemekte fayda sağlayabilmektedir. Bizde çalışmamızda hem hematoksilen eozin hem de luxolfast blue boyamalarını kullandık. Bu sayede demiyelinizasyonu değerlendirdik. Sonuçlarımıza göre her iki boyama yöntemi ile de ozonlanmış bupivakainin, bupivakaine oranla daha az nöronal demiyelinizsyona neden olduğunu gözlemledik.

Ayrıca yapılan çalışmalar kesinlik kazanmış olmasa da motor nöronların lokal anesteziklerden kaynaklanan hasara duyusal nöronlardan daha duyarlı olduğunu göstermiştir(69, 74). Bizim çalışmamızda motor ve duyusal sinirlerde toksisite açısından ayrı ayrı değerlendirme yapılmadı.

Lokal anestezi ilişkili nörotoksisite karmaşık bir fenomendir. Ayrıca çok sayıda klinik faktörden etkilenmekte olan nörotoksisitenin lokal anestezi ile ilişkisinin

belirlenmesi oldukça zordur. Bugün itibariyle, nörotoksisite için olası bir mekanizma olarak birden fazla yol tanımlanmıştır, ancak tek dominant yol bulunamamıştır(9, 73, 75). Biz de çalışmamızda öncelikle radikal oksijen ürünleri aracılı toksisite değerlendirilmiş olsa da miyelin kaybı ve inflamasyon belirteçleri de incelenmiştir.

Lokal anesteziklerin etkilerinin doz ile de değişkenlik gösterebileceği öne sürülmüştür. Yapılan çalışmalarda örneğin Jurkat hücrelerinde (ölümsüzleştirilmiş lenfositler), klinik kullanımdaki lidokain konsantrasyonları apoptozu indüklerken, daha yüksek konsantrasyonlar spesifik olmayan hücre ölümüne ve nekroza neden olabilmektedir(76, 77). Lokal anestezikler ayrıca; DNA'nın parçalanmasına neden olabilir ve mitokondride membran potansiyelini bozarak CASPASE enzim yolağı ile apoptozu tetikleyebilir. Lokal anestetiklerle aktive edilebilen diğer pro-apoptotik enzim örnekleri, p38 mitojenle aktive edilmiş protein kinaz(MAP-Kinaz) ve Jun N-terminal kinazdır(68). Bir başka öne sürülen mekanizma ise reaktif oksijen ürünleri aracılı oksidatif stresin sebep olduğu nörotoksisitedir(78). Biz de çalışmamızda hem immünohisyokimyasal boyamalar hem de tunnel boyaması ile bupivakain ilişkili nörotoksisiteyi istatistiksel anlamlı olarak gösterdik. Çalışmamızda, literatür ile benzer oranlarda bupivakain ilişkili nörotoksisite değerleri görüldü. Çalışmamızda kullandığımız oksidatif stres belirteçleri olan immünohistokimyasal boyamaların sonuçları da, literatürde yer alan oksidatif stres aracılı nörotoksisite ile uyumluydu.

Motor lifler, duyusal lifler veya otonom sinir liflerinin lokal anestezik duyarlılıkları değişken olabilmektedir. Lokal anestezik ilaçların özellikle duyusal sinir lifleri üzerine daha toksik olduğu görüşü mevcuttur ancak bizim çalışmamızda sinir liflerinin türüne özel değerlendirme yapılmamıştır. Bakılan blok sürelerinin uzunluğu ile toksisite arasında anlamlı ilişki görülmemiştir.

Fare siyatik siniri ile yapılan bir çalışmada bupivakain perinöral enjeksiyonu sonrası 2. ve 7. günde alınan siyatik sinirlerde miyelin dejenerasyonu ve aksanol hasar görüldüğü belirtilmiştir(79). Aynı zamanda yapılan hayvan deneylerinde aksonal dejenerasyon ve yapısal değişikliklerin 2. ve 7. günlerde maksimum düzeyde olduğu gösterilmişti(80). Akut etkinin 1-3. günlerde görüldüğü subakut etkinin ise 7. günde, kronik etkinin ise 14-21. günlerde görüldüğü belirtilmiş. Biz de çalışmamızda akut ve subakut etkiyi değerlendirmeyi amaçladık. Klinisyenler arasında bupivakain ilişkili nörolojik defisitlerin klinik bulgu vermeden kendiliğinden onarıldığı ve sekelsiz

düzeldiği düşüncesi mevcuttur. Bu klinik deneyimin histopatolojik ve fonksiyonel karşılığını incelemek istedik. Çalışmamızda sıçanlardan siyatik sinirleri örneklerimizi işlem sonrası 3. ve 7. gün olarak iki farklı zamanda aldık. Sonuçlarımızda Bupivakain grubunda S100 boyamasına ait H skoru istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmış olarak bulundu; bu durum miyelinizasyon kaybının 7. günde daha yüksek olduğunu ifade etmektedir. Bupivakain grubuna ait diğer boyamalarda ise toksisite artışı ile uyumlu sonuçlar olmasına rağmen istatistiksel anlamlı değişim olmamıştır. Sonuçlarımız literatürden farklı olarak 3. ve 7. gün örneklerinde toksisitenin azalmadığı, bazı ölçümlerde toksisitenin arttığı şeklindedir ancak zaman değişkeninin daha uzun dönemlerde nasıl sonuç vereceği incelenmemiştir.

Bupivakain ile blok uygulanmış ve takibinde motor ve duyusal bloğun tamamen normale dönmüş ratlarda yapılan birçok çalışmada histopatolojik değişiklikler gösterilmiştir(81, 82). Biz de çalışmamızda hem TEM bulguları hem de immünohistokimyasal bulgular ile bupivakain uygulanan tüm gruplarda, kontrol grubuna göre anlamlı nörotoksisite gösterilmiştir.

BIN (bupivakain ilişkili nörotoksisite) mekanizması yapılan çalışmalarda net olarak anlaşılamamıştır. Serbest Oksijen Radikalleri (ROS), LDH salınımı, mitokondrial potansiyelde azalma, nükleer yoğunlaşma ve hücre apoptosizi aracılı toksisite araştırmaların dikkat çeken unsurlarıdır(83, 84). SH-SY5Y hücre hattında BIN ile ilgili yapılan çalışmalarda ROS patlamalarının; DNA hasarı, mitekondrial disfonksiyon ve hücre organellerinde hasar yaptığı görüldü(85-87). Bu nedenle ROS patlaması; bupivakain kaynaklı sitotoksisite ve neurotoksisitede kilit noktalardan biri gibi görünüyor. Bununla birlikte, mevcut çalışmaların çoğu, ROS'un aşırı üretimi sonucu ortaya çıkan yaralanmaya odaklanmıştır (88). ROS, hücre çoğalması, farklılaşması, göç ve konak savunmasında önemli bir rol oynar(89). Aşırı ROS, apoptoza neden olabilecek proteinlerin, lipidlerin, nükleer asitlerin, zarların ve organellerin fonksiyonlarını geri dönüşümsüz şekilde tahrip edebilir veya değiştirebilir(89, 90). Bu dejeneratif değişikliklerin ve apoptotik hasarın geçici nörolojik hasar ve nörolojik defisitler ile ilişkili olabileceği belirtiliyor.

Klonlanmış fare nöroblastom Neuro 2a hücre hattında yapılan bir çalışmada deksametazon ile treonin-serin protein kinaz B (AKT) yolağının aktivasyonu hedef alınmış ve bupivakain ilişkili nörotoksistenin azaldığı gösterilmiştir(83). 18 sağlıklı

Sprague-Dawley sıçanlarıyla yapılan çalışmada sıçanlara intratekal verilen bupivakain ile nörotoksisite gösterilmiştir. Oluşan nörotoksisitenin azaltılması amacı ile intratekal rapamisin verilerek otofajinin güçlendirilesi apoptoz ve kaspas-3 seviyelerini düşürerek nöronal hasarı azaltmıştır(91). SH-SY5Y hücre hattı ile yapılan çalışmada bupivakain ile hücre canlılığı azaldı apoptosis armış olduğu görüldü. Yapılan bu çalışmada ROS üretimini baskılamak ve PI3K/PKB yolunun inaktivasyonu hedeflenerek Artemisia capillaris tedavisi denenmiştir. Capillarisin, ROS aracılı oksidatif stresi, mitokondriyal hasarı ve endoplazmik retikulum stresini inhibe ederek SH-SY5Y hücrelerini bupivakainin neden olduğu apoptoza karşı korunduğu gösterilmiş(92). Ratlarda intratekal bupivakain uygulaması ve SH-SY5Y hücre hattının birlikte değerlendirildiği bir diğer çalışmada ise artan bupivakain dozları ile hücre apoptozunda artış ve canlılığında azalma görülmüştür. Yine aynı çalışma p47phox aracılı sitoplazmik ROS üretimini hedef almıştır. İntravenöz verilen NOX2 inhibitörü (VAS2870) ile in vivo ve in vitro olarak hücre canlılığında artış, ROS üretiminde azalma ve apoptosiste anlamlı azalma görülmüştür(93). Bizim çalışmamızda bupivakain ilişkili nörotoksisitenin önlenmesi amacı ile antioksidan mekanizmalardan biri olan ozonlama işlemi uygulanmıştır. Yapılan bütün immünohistokimyasal boyama H-Skor analizlerinde; sadece bupivakain uygulanan gruplarda, Ozonlanmış bupivakain uygulanan deney gruplarına göre anlamlı düzeyde nörotoksisite görülmüştür. Ozonlanmış bupivakain uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre nörotoksisite daha yüksek görüldü. Sadece S100 immünohistokimyasal boyama H-Skor analizinde kontrol grubu ile ozonlanmış bupivakain grubu arasından anlamlı fark bulunmadı. Bu durum ozonlanmış bupivakainin özellikle miyelinizasyon açısından protektif etkisinin daha ön planda olabileceğini düşündürdü. TEM incelemesinde ise ozonlanmış bupivakain ile sadece bupivakain uygulanan gruplar arasında toksisite açısından fark olmadığı gözlendi ancak bakılan TEM örnek sayılarının yetersiz olması nedeniyle istatistiksel anlamlılık değerlendirilemedi.

Reaktif oksijen ürünler (ROS), LDH salınımı, mitokondrial potansiyelde azalma/dejenerasyon, nükleer kondansasyon(yoğunlaşma) ve hücre apoptosis (AKT/PI3K pathway inhibisyonu ile) olası mekanizmalar olarak görülmüş ve üzerine çalışmalar yapılmıştır(82, 88). Ozonun bu toksisite mekanizmalarından reaktif oksijen radikalleri, mitokondrial dejenerasyon, oksidatif stres, olumlu etkilerinden

faydalanarak azaltmasını bekliyoruz. Yapılan çalışmalarda özellikle lipid peroksidasyonu, reaktif oksijen radikalleri ve anti oksidan mekanizmalar üzerinden etkinliğini kanıtlamıştır (94). 2008 yılında yayınlanmış olan bir derlemede diyabetin sitotoksik etkilerinin; oksidatif stresin azaltılması ve lipid peroksidasyonu aracılı olarak azalttığı gösterilmiş(95). Yine aynı çalışmada ozonun (Parkinson hastalığının olası mekanizmalarından birinin oksidatif stres ve mitokondrial oksidatif hasar olduğu bilinmekte olup) ratlarda rotenon ile oluşturulmuş Parkinson modellerinde; özellikle de orta beyinde, histopatolojik olarak anlamlı koruyuculuğu gösterilmiş(95). Yapılan bir başka çalışmada radyoterapi ilişkili beyin hasarının iskemi, nörotoksisite, perfüzyon ve hipometabolizma aracılı olduğu görülmüş. Ozon tedavisi uygulanan hastada SPECT ve PET görüntülemeleri ile toksistenin ve perfüzyonun düzeldiğin ve klinik performans açısından da iyileşme sağladığı görülmüş (96). Son olarak ratlarda kesi ile oluşturulan siyatik sinir hasarının iyileştirilmesinde ozon tedavisi incelenmiş ve anlamlı iyileşme ile histopatolojik düzelme görülmüştür(97). Biz de çalışmamızda nörotoksisitenin birincil tetikleyicisi olduğunu düşündüğümüz oksijen radikallerinin önlenmesi amacı ile ozon molekülünü protektif ajan olarak seçtik. Bupivakainin ozonlanmasının etkin bölgede kimyasal değişiklik yapıp yapmadığının tespiti amacı ile hem bupivakain hem de ozonlanmış bupivakaine 1H(Proton) Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) inceleme yapıldı. 80µg/Nml konsantrasyonda ozon ile 10dk boyunca kabarcık oluşturma yöntemi ile ozonlanmış 0,2ml %0.5 bupivakain ile saf bupivakain arasında NMR incelemede fark olmadığı görüldü ve doz bu şekilde kesinleştirildi. Ozonlama işlemi süre bağımlı kayıplar olmaması amacı ile her uygulama öncesinde yapılarak ozonlanmış bupivakain bekletilmeden enjekte edildi. Verilen ozon dozunun daha yüksek dozlarda nasıl bir etki edeceği çalışmamızda yer veremediğimiz bir değişkendir. Doz bağımlı nöroprotektif/nörotoksik etkileri başka bir çalışma ile değerlendirilmesi gerekmektedir.

Çalışmamızda apoptotik sürecin takip edilebilmesi amacı ile TUNNEL boyaması uygulanmıştır. Ozonlanmış bupivakain ile sadece bupivakain uygulanan grup arasında apoptotik indeks açısından anlamlı fark görülmüş ve sadece bupivakain grubunda apoptozun daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile ozonlanmış bupivakain grupları arasında da anlamlı fark görülmüş ve bu fark 3. gün

örneklerinde daha yüksek iken 7. günde farkın azaldığı tespit edilmiştir. Ancak daha uzun süreler ile kronik süreçte bu etkilerin nasıl değişeceğine çalışmamızda yer veremedik. Ayrıca nöropatik hastalarda veya bir sebeple travmaya uğramış hasarlı sinir dokusunda ozonlanmış bupivakainin etkisinin ne olacağı da başka bir araştırma konusudur.

Bupivakain etki süresinin ozonlama işlemi sonrasında nasıl bir değişime uğrayacağının değerlendirilmesi amacı ile yapılan fonksiyonel değerlendirmelerimizi yaptık. Ozonlanmış bupivakain motor blok sürelerinde uzamaya, duyusal blok sürelerinde kısalmaya neden olsa da bu durum istatistiksel anlamlı bulunmadı. Ancak motor ve duyusal sinirlerdeki bu farklı etkiler ile sinirlerin toksisiteye duyarlılıkları arasında korelasyon bizim araştırmamızda yer almadı.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda; sıçanlarda siyatik sinir örneklerine uyguladığımız salin, bupivakain ve ozonlanmış bupivakain enjeksiyonlarının toksisitesi ve motor/duyusal blok sürelerinin analizini yaptık. Bulgularımız ışığında ozonlama işleminin bupivakain ilişkili nörotoksisiteyi anlamlı şekilde azalttığını buldu. Bu protektif etkinin öncelikle reaktif oksijen radikalleri belirteçleri olan immünohistokimyasal boyamaların sonuçları ile gösterdik. Ayrıca apoptoz indeksinin de anlamlı şekilde ozonlanmış bupivakain grubunda toksisiteyi azalttığını bulduk. Bu etkiler hem 3. gün hem de 7. gün alınan siyatik sinir örneklerinde istatistiksel anlamlı şekilde protektif bulundu. Ayrıca çalışmamız 3. gün ve 7. gün olmak üzere iki farklı zamanda örneklerin alınması sayesinde, toksisitenin zaman ile değişimini de gözlemlendik. Kontrol grubu ile bupivakain gruplarında 3. ve 7. gün örneklerinde anlamlı değişim olmaz iken ozonlanmış bupivakain grubunda 7.gün alınan örneklerde hem Neuroflament artışı hem de miyelinizasyonun daha yüksek olduğunu ve toksisitenin azaldığını gördük. Ozonlama işlemi ile bupivakainin motor ve duyusal blok çözülme sürelerinde anlamlı fark olmadı. Çalışmamızda daha önce uygulanmamış bir yöntem olması nedeniyle, ozon dozunu "düşük başla, yavaş yavaş yükselt" prensibine uygun olarak hafif-orta doz rejimine göre belirledik. Bundan sonraki çalışmalarda ideal ilaç ozonlama dozunun belirlenmesi için farklı doz rejimleri ile yeni araştırmaların yapılmasına ihtiyaç vardır. Çalışmamızda radikal oksijen ürünleri aracılı toksisite belirteçleri olan immünohistokimyasal boyama yöntemi bulguları ile ışık mikroskobu bulguları ve TUNNEL boyama bulguları korelasyon gösterdi. Ozonlanmış bupivakainin de aynı yöntemler aracılı protektif etkinliğinin görülmesi; reaktif oksijen ürünlerinin toksisite mekanizmalarından önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. Bu nedenle ozon ve diğer antioksidan ajanların bu toksisitenin azaltılmasında yardımcı olabileceği düşünüldü. Ayrıca TEM örneklerimizin az olması nedeniyle doku örneklerimiz istatistiksel anlamlılık değerlendiremedik. Zaman değişkenin 7.günden sonrasında olası değişikliklerin de değerlendirilebilmesi amacı ile daha uzun dönemli çalışmaların yapılması önerilir. Bupivakain ilişkili nörotoksisitenin giderilmesinde işe yaradığı düşünülen ozonlama işlemi diğer nörotoksik ilaçlar için de uygulanabileceği düşünüldü.

KAYNAKLAR

1. Katzung BG. Basic and clinical pharmacology: Mc Graw Hill; 2018.
2. Miller R. Miller Anestezi (Çeviri Ed. D Aydın). İzmir Güven Kitabevi. 2010.
3. Fink BR. Leaves and needles: the introduction of surgical local anesthesia. The Journal of the American Society of Anesthesiologists. 1985;63(1):77-83.
4. Koller C. On the use of cocaine for producing anaesthesia on the eye. The Lancet. 1884;124(3197):990-2.
5. Kayhan Z. Klinik Anestezi. İstanbul2004.
6. Trevor AJ, Katzung BG, Masters SB, Akkan AG. Katzung ve Trevor farmakoloji: sınav & gözden geçirme: Nobel Tıp Kitabevleri; 2005.
7. Hadzic A, Kurt E. Hadzic Periferik Sinir Blokları ve Ultrason Eşliğinde Rejyonal Anestezi için Anatomi2013.
8. Thiele EL, Nemergut EC. Miller's Anesthesia. Anesthesia & Analgesia. 2020;130(6).
9. Ueta K, Suzuki T, Sugimoto M, Uchida I, Mashimo T. Local anesthetics have different mechanisms and sites of action at recombinant 5-HT3 receptors. Regional Anesthesia & Pain Medicine. 2007;32(6):462-70.
10. Sugimoto M, Uchida I, Mashimo T. Local anaesthetics have different mechanisms and sites of action at the recombinant N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. British journal of pharmacology. 2003;138(5):876-82.
11. Ueta K, Sugimoto M, Suzuki T, Uchida I, Mashimo T. In vitro antagonism of recombinant ligand-gated ion-channel receptors by stereospecific enantiomers of bupivacaine. Regional Anesthesia & Pain Medicine. 2006;31(1):19-25-19-25.
12. Weinberg GL, Riou B. Lipid emulsion infusion: resuscitation for local anesthetic and other drug overdose. The Journal of the American Society of Anesthesiologists. 2012;117(1):180-7.

13. Morgan GE, Mikhail MS, Murray MJ, Larson CP. Clinical anesthesiology. 6th ed: Lange Medical Books/McGraw-Hill New York; 2018.

14. Werdehausen R, Fazeli S, Braun S, Hermanns H, Essmann F, Hollmann MW, et al. Apoptosis induction by different local anaesthetics in a neuroblastoma cell line. British journal of anaesthesia. 2009;103(5):711-8.

15. Selander D, Brattsand R, Lundborg G, Nordborg C, Olson Y. Local anesthetics: importance of mode of application, concentration and adrenaline for the appearance of nerve lesions: an experimental study of axonal degeneration and barrier damage after intrafascicular injection or topical application of bupivacaine (marcah®). Acta Anaesthesiologica Scandinavica. 1979;23(2):127-36.

16. Lirk P, Haller I, Myers RR, Klimaschewski L, Kau Y-C, Hung Y-C, et al. Mitigation of direct neurotoxic effects of lidocaine and amitriptyline by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in vitro and in vivo. The Journal of the American Society of Anesthesiologists. 2006;104(6):1266-73.

17. Sakura S, Bollen AW, Ciriales R, Drasner K. Local anesthetic neurotoxicity does not result from blockade of voltage-gated sodium channels. Anesthesia & Analgesia. 1995;81(2):338-46.

18. Freedman JM, Li D-K, Drasner K, Jaskela MC, Larsen B, Wi S. Transient neurologic symptoms after spinal anesthesia: an epidemiologic study of 1,863 patients. The Journal of the American Society of Anesthesiologists. 1998;89(3):633-41.

19. Eberhart LH, Morin AM, Kranke P, Geldner G, Wulf H. [Transient neurologic symptoms after spinal anesthesia. A quantitative systematic overview (meta-analysis) of randomized controlled studies]. Anaesthesist. 2002;51(7):539-46.

20. Scott D. Evaluation of the toxicity of local anaesthetic agents in man. British Journal of Anaesthesia. 1975;47(1):56-61.

21. Scott D. Toxioty caused by local anaesthetic agents. Oxford University Press; 1984.

22. Hiller N, Mirtschink P, Merkel C, Knels L, Oertel R, Christ T, et al. Myocardial accumulation of bupivacaine and ropivacaine is associated with reversible effects on mitochondria and reduced myocardial function. Anesthesia & Analgesia. 2013;116(1):83-92.

23. Fettiplace MR, Pichurko A, Ripper R, Lin B, Kowal K, Lis K, et al. Cardiac depression induced by cocaine or cocaethylene is alleviated by lipid emulsion more effectively than by sulfobutylether-β-cyclodextrin. Academic Emergency Medicine. 2015;22(5):508-17.

24. Orebaugh SL, Kentor ML, Williams BA. Adverse outcomes associated with nerve stimulator–guided and ultrasound-guided peripheral nerve blocks by supervised trainees: update of a single-site database. Regional Anesthesia & Pain Medicine. 2012;37(6):577-82.

25. Neal JM. Ultrasound-guided regional anesthesia and patient safety: an evidence-based analysis. Regional Anesthesia & Pain Medicine. 2010;35(Suppl 1):S59-S67.

26. Salinas FV, Hanson NA. Evidence-based medicine for ultrasound-guided regional anesthesia. Anesthesiology clinics. 2014;32(4):771-87.

27. Barrington MJ, Kluger R. Ultrasound guidance reduces the risk of local anesthetic systemic toxicity following peripheral nerve blockade. Regional Anesthesia & Pain Medicine. 2013;38(4):289-99.

28. Sites BD, Taenzer AH, Herrick MD, Gilloon C, Antonakakis J, Richins J, et al. Incidence of local anesthetic systemic toxicity and postoperative neurologic symptoms associated with 12,668 ultrasound-guided nerve blocks: an analysis from a prospective clinical registry. Regional Anesthesia & Pain Medicine. 2012;37(5):478-82.

29. Kahn RL, Quinn TJ. Blood Pressure, not Heart Rate, as a Marker of Intravascular Injection of Epinephrine in an Epidural Test Dose. Regional Anesthesia: The Journal of Neural Blockade in Obstetrics, Surgery, & Pain Control. 1991;16(5):292-5.

30. Tanaka M, Nishikawa T. A comparative study of hemodynamic and T-wave criteria for detecting intravascular injection of the test dose (epinephrine) in sevoflurane-anesthetized adults. Anesthesia & Analgesia. 1999;89(1):32-6.

31. Weinberg Guy L, VadeBoncouer T, Ramaraju Gopal A, Garcia-Amaro Marcelo F, Cwik Michael J. Pretreatment or Resuscitation with a Lipid Infusion Shifts the Dose-Response to Bupivacaine-induced Asystole in Rats Anesthesiology. 1998;88(4):1071-5.

32. Weinberg Guy L, Riou B. Lipid Emulsion Infusion: Resuscitation for Local Anesthetic and Other Drug Overdose. Anesthesiology. 2012;117(1):180-7.

33. Weinberg G. Lipid Infusion Resuscitation for Local Anesthetic Toxicity: Proof of Clinical Efficacy. Anesthesiology. 2006;105(1):7-8.

34. Weinberg GL. Lipid resuscitation: More than a sink*. Critical Care Medicine. 2012;40(8):2521.

35. Rosenblatt Meg A, Abel M, Fischer Gregory W, Itzkovich Chad J, Eisenkraft James B. Successful Use of a 20% Lipid Emulsion to Resuscitate a Patient after a Presumed Bupivacaine-related Cardiac Arrest. Anesthesiology. 2006;105(1):217-8.

36. Heavner JE, Pitkanen MT, Shi B, Rosenberg PH. Resuscitation from Bupivacaine-Induced Asystole in Rats: Comparison of Different Cardioactive Drugs. Anesthesia & Analgesia. 1995;80(6):1134-9.

37. Krismer AC, Hogan QH, Wenzel V, Lindner KH, Achleitner U, Oroszy S, et al. The Efficacy of Epinephrine or Vasopressin for Resuscitation During Epidural Anesthesia. Anesthesia & Analgesia. 2001;93(3):734-42.

38. Soltesz EG, van Pelt F, Byrne JG. Emergent cardiopulmonary bypass for bupivacaine cardiotoxicity. J Cardiothorac Vasc Anesth. 2003;17(3):357-8.

39. Malamed SF. Handbook of local anesthesia-e-book. Elsevier health sciences; 2019.

40. Löfgren N. Studies on local anesthetics: Xylocaine: a new synthetic drug: Hæggströms boktr.; 1948.

41. CARTRIDGE SD. 2% Xylocaine DENTAL with epinephrine 1: 50,000 (Lidocaine HCl 2% and Epinephrine 1: 50,000 Injection) 2% Xylocaine DENTAL with epinephrine 1: 100,000 (Lidocaine HCl 2% and Epinephrine 1: 100,000 Injection).

42. Casati A, Putzu M. Bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine: are they clinically different? Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology. 2005;19(2):247-68.

43. Gristwood RW. Cardiac and CNS toxicity of levobupivacaine. Drug Safety. 2002;25(3):153-63.

44. Mather LE, Chang DH-T. Cardiotoxicity with modern local anaesthetics. Drugs. 2001;61(3):333-42.

45. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. Archives of medical research. 2006;37(4):425-35.

46. Bocci V, Borrelli E, Travagli V, Zanardi I. The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. Medicinal research reviews. 2009;29(4):646-82.

47. Bocci VA, Zanardi I, Travagli V. Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship. Journal of Translational Medicine. 2011;9(1):1-11.

48. Costanzo M, Cisterna B, Vella A, Cestari T, Covi V, Tabaracci G, et al. Low ozone concentrations stimulate cytoskeletal organization, mitochondrial activity and nuclear transcription. European journal of histochemistry: EJH. 2015;59(2).

49. Schwartz A, Sánchez GM, Sabah F. Madrid declaration on ozone therapy. Madrid; 2010.

50. Schwartz A, Sánchez GM, Sabah F, Avilés MH. Madrid declaration on ozone therapy. Madrid; 2020.

51. Committee WSA. WFOT's Review on Evidence Based Ozone Therapy. World Federation of Ozone Therapy; 2015. p. 8-49.

52. Bocci V. A reasonable Approach for the Treatment of HIV Infection in the Early Phase with Ozonetherapy (Autohaemotherapy). How 'Inflammatory' Cytokines may have A therapeutic Role. Mediators Inflamm. 1994;3(5):315-21.

53. Forman HJ, Fukuto JM, Miller T, Zhang H, Rinna A, Levy S. The chemistry of cell signaling by reactive oxygen and nitrogen species and 4-hydroxynonenal. Archives of biochemistry and biophysics. 2008;477(2):183-95.

54. Forman HJ. Hydrogen peroxide: the good, the bad, and the ugly. Oxidants in biology: Springer; 2008. p. 1-17.

55. Van der Zee J, Van Beek E, Dubbelman T, Van Steveninck J. Toxic effects of ozone on murine L929 fibroblasts. Damage to DNA. Biochemical Journal. 1987;247(1):69.

56. Stadtman ER, Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins: physiological consequences. The Journal of biological chemistry (Print). 1991;266(4):2005-8.

57. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(17):7915-22.

58. Díaz-Llera S, González-Hernández Y, Prieto-Gonzalez E, Azoy A. Genotoxic effect of ozone in human peripheral blood leukocytes. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2002;517(1-2):13-20.

59. Gerner P, Luo SH, Zhuang Z-Y, Djalali AG, Zizza AM, Myers RR, et al. Differential block of N-propyl derivatives of amitriptyline and doxepin for sciatic nerve block in rats. Regional Anesthesia & Pain Medicine. 2005;30(4):344-50.

60. Brummett CM, Norat MA, Palmisano JM, Lydic R. Perineural administration of dexmedetomidine in combination with bupivacaine enhances sensory and motor blockade in sciatic nerve block without inducing neurotoxicity in rat.

The Journal of the American Society of Anesthesiologists. 2008;109(3):502-11.

61. Kau Y-C, Hung Y-C, Zizza AM, Zurakowski D, Greco WR, Wang GK, et al. Efficacy of lidocaine or bupivacaine combined with ephedrine in rat sciatic nerve block. Regional Anesthesia & Pain Medicine. 2006;31(1):14-8--8.

62. Carnaval TG, Sampaio RM, Lanfredi CB, Borsatti MA, Adde CA. Effects of opioids on local anesthesia in the rat: a codeine and tramadol study. Brazilian oral research. 2013;27(6):455-62.

63. Erdogan MA, Polat A, Yucel A, Aydogan MS, Parlakpinar H, Tekin S, et al. Effects of perineural administration of dexmedetomidine in combination with levobupivacaine in a rat sciatic nerve block. Current Therapeutic Research. 2013;74:74-8.

64. Langford DJ, Mogil JS. Pain testing in the laboratory mouse. Anesthesia and analgesia in laboratory animals: Elsevier; 2008. p. 549-60.

65. Numata M, Morinaga S, Watanabe T, Tamagawa H, Yamamoto N, Shiozawa M, et al. The clinical significance of SWI/SNF complex in pancreatic cancer. International journal of oncology. 2013;42(2):403-10.

66. Kocman AE, Dag I, Sengel T, Soztutar E, Canbek M. The effect of lithium and lithium-loaded hyaluronic acid hydrogel applications on nerve regeneration and recovery of motor functions in peripheral nerve injury. Rendiconti Lincei Scienze Fisiche e Naturali. 2020;31(3):889-904.

67. Köse AA, ÖzatİK O, Koçman AE, Dağ İ, Musmul A, Şengel T. Periferik Sinirde Kronik Konstrüksiyon Hasarı Tedavisi Üzerine Dekompresyonun Etkisi. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi. 2016.

68. Verlinde M, Hollmann MW, Stevens MF, Hermanns H, Werdehausen R, Lirk P. Local anesthetic-induced neurotoxicity. International journal of molecular sciences. 2016;17(3):339.

69. Koo C-H, Baik J, Shin H-J, Kim J-H, Ryu J-H, Han S-H. Neurotoxic Effects of Local Anesthetics on Developing Motor Neurons in a Rat Model. Journal of Clinical Medicine. 2021;10(5):901.

70. Radwan IA, Saito S, Goto F. The neurotoxicity of local anesthetics on growing neurons: a comparative study of lidocaine, bupivacaine, mepivacaine, and ropivacaine. Anesthesia & Analgesia. 2002;94(2):319-24.

71. Kaneko S, Matsumoto M, Tsuruta S, Hirata T, Gondo T, Sakabe T. The nerve root entry zone is highly vulnerable to intrathecal tetracaine in rabbits. Anesthesia & Analgesia. 2005;101(1):107-14.

72. De Hert SG, Gillebert TC, Ten Broecke PW, Mertens E, Rodrigus IE, Moulijn AC. Contraction-relaxation coupling and impaired left ventricular performance in coronary surgery patients. The Journal of the American Society of Anesthesiologists. 1999;90(3):748-57.

73. Nouette-Gaulain K, Capdevila X, Rossignol R. Local anesthetic 'in-situ'toxicity during peripheral nerve blocks: update on mechanisms and prevention. Current Opinion in Anesthesiology. 2012;25(5):589-95.

74. Rigler ML, Drasner K, Krejcie TC, Yelich SJ, Scholnick FT, DeFontes J, et al. Cauda equina syndrome after continuous spinal anesthesia. Anesthesia and analgesia. 1991;72(3):275-81.

75. Pollock JE. Transient neurologic symptoms: etiology, risk factors, and management. Regional anesthesia and pain medicine. 2002;27(6):581.

76. Werdehausen R, Braun S, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Walczak H, Lipfert P, et al. Lidocaine induces apoptosis via the mitochondrial pathway independently of death receptor signaling. Anesthesiology. 2007;107(1):136-43.

77. Johnson ME, Uhl CB, Spittler K-H, Wang H, Gores GJ. Mitochondrial injury and caspase activation by the local anesthetic lidocaine. The Journal of the American Society of Anesthesiologists. 2004;101(5):1184-94.

78. Ji Z-H, Liu Z-J, Liu Z-T, Zhao W, Williams BA, Zhang H-F, et al. Diphenyleneiodonium mitigates bupivacaine-induced sciatic nerve damage in a diabetic neuropathy rat model by attenuating oxidative stress. Anesthesia & Analgesia. 2017;125(2):653-61.

79. An K, Elkassabany NM, Liu J. Dexamethasone as adjuvant to bupivacaine prolongs the duration of thermal antinociception and prevents bupivacaine-induced rebound hyperalgesia via regional mechanism in a mouse sciatic nerve block model. PLoS One. 2015;10(4):e0123459.

80. Mueller M, Wacker K, Ringelstein EB, Hickey WF, Imai Y, Kiefer R. Rapid response of identified resident endoneurial macrophages to nerve injury. The American journal of pathology. 2001;159(6):2187-97.

81. Ma R, Wang X, Lu C, Li C, Cheng Y, Ding G, et al. Dexamethasone attenuated bupivacaine-induced neuron injury in vitro through a threonine–serine protein kinase B-dependent mechanism. Neuroscience. 2010;167(2):329-42.

82. Wang Z, Shen J, Wang J, Lu T, Li C, Zhang X, et al. Lithium attenuates bupivacaine-induced neurotoxicity in vitro through phosphatidylinositol-3-kinase/threonine-serine protein kinase B-and extracellular signal-regulated kinase-dependent mechanisms. Neuroscience. 2012;206:190-200.

83. Ma R, Wang X, Lu C, Li C, Cheng Y, Ding G, et al. Dexamethasone attenuated bupivacaine-induced neuron injury in vitro through a threonine-serine protein kinase B-dependent mechanism. Neuroscience. 2010;167(2):329-42.

84. Wang Z, Shen J, Wang J, Lu T, Li C, Zhang X, et al. Lithium attenuates bupivacaine-induced neurotoxicity in vitro through phosphatidylinositol-3-kinase/threonine-serine protein kinase B- and extracellular signal-regulated kinase-dependent mechanisms. Neuroscience. 2012;206:190-200.

85. Lu J, Xu SY, Zhang QG, Xu R, Lei HY. Bupivacaine induces apoptosis via mitochondria and p38 MAPK dependent pathways. Eur J Pharmacol. 2011;657(1-3):51-8.

86. Li L, Ye XP, Lu AZ, Zhou SQ, Liu H, Liu ZJ, et al. Hyperglycemia magnifies bupivacaine-induced cell apoptosis triggered by mitochondria dysfunction and endoplasmic reticulum stress. Journal of neuroscience research. 2013;91(6):786-98.

87. Zhao W, Liu Z, Yu X, Lai L, Li H, Liu Z, et al. iTRAQ proteomics analysis reveals that PI3K is highly associated with bupivacaine-induced neurotoxicity pathways. Proteomics. 2016;16(4):564-75.

88. Li Y-j, Zhao W, Yu X-j, Li F-x, Liu Z-t, Li L, et al. Activation of p47phox as a mechanism of bupivacaine-induced burst production of reactive oxygen species and neural toxicity. Oxidative medicine and cellular longevity. 2017;2017.

89. Bedard K, Krause K-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiological reviews. 2007;87(1):245-313.

90. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. 2016;1863(12):2977-92.

91. Xue X, Lv Y, Leng Y, Zhang Y. [Autophagy activation attenuates the neurotoxicity of local anaesthetics by decreasing caspase-3 activity in rats]. Braz J Anesthesiol. 2020;70(6):627-34.

92. Zhao T, Wang Q. Capillarisin protects SH-SY5Y cells against bupivacaine-induced apoptosis via ROS-mediated PI3K/PKB pathway. Life Sci. 2020;259:118279.

93. Li YJ, Zhao W, Yu XJ, Li FX, Liu ZT, Li L, et al. Activation of p47phox as a Mechanism of Bupivacaine-Induced Burst Production of Reactive Oxygen Species and Neural Toxicity. Oxid Med Cell Longev. 2017;2017:8539026.

94. Schwartz A, Sánchez GM. Ozone therapy and its Scientific Foundations. Ozone Therapy Global Journal. 2012;2(1):199-232.

95. Andreula C. Ozone therapy. Neuroradiology. 2011;53(1):207.

96. Clavo B, Suarez G, Aguilar Y, Gutierrez D, Ponce P, Cubero A, et al. Brain ischemia and hypometabolism treated by ozone therapy. Forsch Komplementmed. 2011;18(5):283-7.

97. Ogut E, Yildirim FB, Sarikcioglu L, Aydin MA, Demir N. Neuroprotective effects of ozone therapy after sciatic nerve cut injury. The Kurume medical journal. 2019:MS654002.