



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

LEVOBUPİVAKAİN VE BUPİVAKAİNİN
KONDROTOKSİK ETKİLERİ;
APOPİTOTİK AKTİVİTE ÇALIŞMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Osman ÇEVİK

KAYSERİ – 2013



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON ANABİLİM DALI**

**LEVOBUPİVAKAİN VE BUPİVAKAİNİN
KONDROTOKSİK ETKİLERİ;
APOPİTOTİK AKTİVİTE ÇALIŞMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Osman ÇEVİK

**Danışman
Prof. Dr. Karamehmet YILDIZ**

**Bu Uzmanlık Tezi Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi
Tarafından TSU-12-3958 No'lu Proje ile Desteklenmiştir.**

KAYSERİ – 2013

TEŞEKKÜR

Tıpta Uzmanlık Eğitimim süresince,
bilgi ve deneyimlerinden daima yararlandığım ve mesleğimi kazanmamda emeği geçen,
başta Anabilim Dalı Başkanımız

Prof. Dr. Adem Boyacı

olmak üzere

tüm hocalarıma,

Tez çalışmalarım esnasında,

bilgi ve deneyimlerini paylaşan, fikirleriyle bana her zaman yol gösteren,
destekleyen ve yüreklendiren hocam, tez danışmanım,

Prof. Dr. Karamehmet Yıldız'a,

Kıymetli vakitlerini tez çalışmam için ayıran ve laboratuvarlarının kapılarını açan,
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Özlem Canöz ve

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Öğretim
Üyesi

Prof. Dr. Mehmet Halıcı'ya

Tükenmeyen sevgi ve dostluklarıyla uzmanlık eğitimim süresince bana destek olan ve
onlarla çalışmaktan her zaman keyif aldığım

tüm asistan arkadaşlarıma,

anestezi ve yoğun bakım ekibine,

Hayatımın her aşamasında yardım ve desteğini yanımda hissettiğim canım aileme

ve

bana her zaman destek ve yardımcı olan sevgili eşim

Çiğdem ve kızlarım Beyza ve Esma Çevik'e

teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	iv
TABLO LİSTESİ	vi
GRAFİK LİSTESİ	vii
ŞEKİL ve RESİM LİSTESİ	viii
ÖZET	x
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. EKLEM KIKIRDAĞI	3
2.1.1. Eklem Kıkırdağının Yapısal Anatomisi	3
2.1.2. Eklem Kıkırdağının Yapısal Tabakaları	8
2.1.2.1. Hıyalin Kıkırdağın Büyüme Özellikleri	9
2.1.2.2. Hıyalin Kıkırdağın Onarım Kapasitesi	10
2.1.3. Elastik Kıkırdak	10
2.1.4. Fibröz Kıkırdak	11
2.1.5. Sinoviyal Doku	11
2.1.5.1. Kondrojenetik Özellikleri	11
2.2. LOKAL ANESTEZİKLER	12
2.2.1. Tarihçesi	12
2.2.2. Lokal Anesteziklerin Etki Mekanizmaları	13
2.2.3. Lokal Anesteziklerin Kimyasal Yapıları ve Sınıflandırılması	14
2.2.4. Lokal Anesteziklerin Etkisini Belirleyen Faktörler	16
2.2.5. Lokal Anesteziklerin Farmakokinetik Özellikleri	17
2.2.6. Lokal Anestezik Etki Süresinin Uzatılması	19
2.2.7. Lokal Anesteziklerin Yan Etkileri	20
2.2.8. Lokal Anesteziklere Bağlı Kıkırdak Dokudaki Histopatolojik Değişikliklerin Patogenezi	23

2.2.9. Bupivakain (Marcaine®)	23
2.2.10. Levobupivakain (Chirocaine®)	28
2.3. KIKIRDAK DOKUDA LOKAL ANESTEZİKLERE BAĞLI SUBSELLÜLER DEĞİŞİKLİKLER VE İNCELENME YÖNTEMLERİ	30
2.3.1. Apoptozis	30
2.3.2. Apoptozis ve Nekrozis Arasındaki Farklar	35
2.3.3. Kontrositlerde Apoptozis Mekanizması.....	36
2.3.4. Apoptozisi Belirleme Yöntemleri	37
3. MATERYAL ve METOD	42
3.1. DENEYSEL ÇALIŞMANIN YAPILIŞI	42
3.2. IŞIK MİKROSKOBUNDA İNCELEME YÖNTEMİ.....	44
3.3. İMMUNOFLORESAN MİKROSKOPTA İNCELEME YÖNTEMİ	44
3.4. İMMUNOFLORESAN VE IŞIK MİKROSKOPTA İNCELEME.....	44
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	45
4. BULGULAR	46
4.1. SF GRUBUNA AİT BULGULAR	46
4.1.1. SF Grubuna Ait Işık Mikroskobu Bulguları	46
4.1.2. SF Grubuna Ait Immunofloresan Mikroskobu Bulguları	47
4.2. BUPİVAKAİN GRUBUNA AİT BULGULAR.....	48
4.2.1. Bupivakain Grubuna ait Işık Mikroskobu Bulguları.....	48
4.2.2. Bupivakain Grubuna Ait Immunofloresan Mikroskobu Bulgular	49
4.3. LEVOBUPİVAKİAN GRUBUNA AİT BUGULAR	50
4.3.1. Levobupivakain Grubuna Ait Işık Mikroskobu Bulguları	50
4.3.2. Levobupivakain Grubuna Ait Immunofloresan Mikroskobu Bulguları.....	51
4.4. IŞIK MİKROSKOBİSİ BULGULARININ KARŞILAŞTIRILMASI.....	52
4.5. FLORASAN MİKROSKOBİSİ BULGULARININ KARŞILAŞTIRILMASI...	55
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇLAR	68
7. KAYNAKLAR	69

KISALTMALAR

DEKAM	: Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi
Cm	: Minimum Anestezik Konsantrasyon
ECM	: Extracelüler matrix
GAG	: Glukozaminoglikanlar
PAS	: Periyodik asit Schiff
PG	: Proteoglikanlar
EKG	: Elektrokardiografi
A-V iletim	: Atrio-Ventriküler iletim
G	: Gauge
i.m	: İntramüsküler
iv	: İntravenöz
ml	: Mikrolitre
SF	: Serum Fizyolojik
KVS	: Kardiyovasküler Sistem
Na⁺	: Sodyum
K⁺	: Potasyum
Ca⁺⁺	: Kalsiyum
Mg	: Mağnezyum
NO	: Nitroz Oksit
PABA	: Paraaminobenzoik asit
PTP	: Permeabilite Geçiş Poru
SSS	: Santral Sinir Sistemi
TNS	: <i>Transient Neurologic Symptoms</i>
TUNEL	: <i>Terminal deoxynucleotidyl – transferase – mediated deoxyuridine triphosphate – biotin insitu nick – end labelling</i>
HE	: Hematoksilen-Eozin
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
IVLE	: İntravenöz Lipit Emülsiyonu

RİVA	: Rejyonel İntravenöz Anestezi
TNF	: Tümör Nekroz faktörü
CSF	: Koloni Uyarıcı Faktörü
NGF	: Nöron Büyüme Faktörü
FGF	: Fibroblast Growt Faktör
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL-2	: İnterlökin-2
CYP	: Sitokrom P
C1q	: Kollektin
DAPI	: <i>4,6-Diamine-2'phenylindole dihydrochloride</i>
ATP	: Adenozin Trifosfat
ADP	: Adenozin Difosfat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit,
DNaz	: Endonükleaz,
TdT	: Terminal deoksinükleotidil Transferaz
dUTP	: Deoksiüridin trifosfat
AIDS	: Akiz İmmün Defisit Sendromu
CAD	: Caspase Activated DNaz (kaspazla - aktiveşen - deoksiribonükleaz)
ICAD	: İnhibitor of Caspase-Activated Deoxyribonuclease (kaspazla – aktiveşen - deoksiribonükleaz inhibitörü)
FADD	: Fas Associated Death Domain
TRADD	: TNFR-1 Associated Death Domain
TNFR-1	: Tümör Nekroz Faktör Reseptörü -1
Apaf-1	: Apoptotic Protease Activating Factor-1
Bax	: Proapoptotik faktör
AIF	: Apoptosis Inducing Apoptosis

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Eklem kırırdağının yapısal bileşenleri.....	4
Tablo 2. Bazı Lokal Anesteziklerin Fizikokimyasal Özellikleri	16
Tablo 3. Apoptozis ve Genler.....	33
Tablo 4. Işık mikroskopisinde deneklerin apoptotik indeks oranları	52
Tablo 5. Işık mikroskopisinde gruplara göre apoptotik indeks değişim oranları.....	52
Tablo 6. Işık mikroskopisinde grup S ve grup L nin karşılaştırılması	53
Tablo 7. Işık mikroskopisinde grup S ve grup B nin karşılaştırılması	53
Tablo 8. Işık mikroskopisinde grup L ve grup B nin karşılaştırılması.....	53
Tablo 9. Floresan mikroskopisinde deneklerin apoptotik indeks oranları	55
Tablo 10. Floresan mikroskopisinde gruplara göre apoptotik indeks değişim oranları	56
Tablo 11. Floresan mikroskopisinde grup S ve grup L nin karşılaştırılması.....	56
Tablo 12. Floresan mikroskopisinde grup S ve grup B nin karşılaştırılması	57
Tablo 13. Floresan mikroskopisinde grup L ve grup B nin karşılaştırılması	57

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1.	Işık mikro. 7. gün apoptotik indeks grafiği	54
Grafik 2.	Işık mikro. 28. gün apoptotik indeks grafiği	54
Grafik 3.	Işık mikro. 7./28. gün apoptotik indeks değişim grafiği	55
Grafik 4.	Floresan mikro. 7. gün apoptotik indeks grafiği	56
Grafik 5.	Floresan mikro. 28. gün apoptotik indeks grafiği	58
Grafik 6.	Floresan mikro. 7./28. gün apoptotik indeks değişim grafiği.....	59

ŞEKİL ve RESİM LİSTESİ

Şekil 1.	Kollajen matriksin, GAG ve PG' larla oluşturduğu yapı.....	8
Şekil 2.	Eklem kıkırdağının yapısal tabakaları.....	9
Şekil 3.	Lokal anesteziğin kimyasal yapısı	14
Şekil 4.	Bupivakain	24
Şekil 5.	Levobupivakain.....	28
Şekil 6.	Apoptoz esnasında Ca iyonunun rolünü göstermektedir.....	34
Resim 1.	Kondrositlerin elektron mikroskopik görüntüsü	5
Resim 2.	Hiyalin kıkırdağın ışık mikroskopik görüntüsü	6
Resim 3:	Elektron mikroskopu altında apoptotik bir hücre görülmektedir	39
Resim 4.	Apoptotik hücreler (oklar) (HE boyama)	39
Resim 5.	N, Normal hücreler- Hoechst boyama.....	40
Resim 6.	A, Apoptotik hücreler- Hoechst boyama.....	41
Resim 7.	TUNEL ile boyanmış apoptotik hücreler	41
Resim 8.	Tavşanların enjeksiyon yapılan diz eklemine diseksiyonu.....	43
Resim 9.	%0,9 normal salin enjeksiyonundan 7. gün (A) ve 28 gün (B) sonra alınan kıkırdak dokusu örneklerinin ışık mikroskopunda görünümü. (H&E, X200) (K: Kondrosit, İTM: İntrateritorial Matriks A: Apoptotik Hücre).....	46
Resim 10.	%0,9 normal salin enjeksiyonundan 7. gün (A) ve 28 gün (B) sonra alınan kıkırdak dokusu örneklerinin immünofloresan mikroskopta görünümü (TUNEL, X40, Bar 100µm) (K:Kondrosit, İTM: İntrateritorial Matriks, TM: Teritorial Matriks A: Apoptotik Hücre).....	47
Resim 11.	% 0,5 bupivakain enjeksiyonundan 7. gün (A) ve 28 gün (B) sonra alınan kıkırdak dokusu örneklerinin ışık mikroskopunda görünümü. (H&E, X200) (K: Kondrosit, İTM: İntrateritorial Matriks A: Apoptotik Hücre).....	48

- Resim 12.** % 0,5 bupivakain enjeksiyonundan 7. gün (A) ve 28 gün (B) sonra alınan kıkırdak dokusu örneklerinin immünfloresan mikroskopta görünümü (TUNEL, X40, Bar 100µm) (K:Kondrosit, İTM: İntrateritorial Matriks, A: Apopitotik Hücre) 49
- Resim 13.** % 0,5 levobupivakain enjeksiyonundan 7. gün (A) ve 28 gün (B) sonra alınan kıkırdak dokusu örneklerinin ışık mikroskobunda görünümü. (H&E, X200, X400) (K: Kondrosit, İTM: İntrateritorial Matriks A: Apopitotik Hücre)..... 50
- Resim 14.** % 0,5 levobupivakain enjeksiyonundan 7. gün (A) ve 28 gün (B) sonra alınan kıkırdak dokusu örneklerinin immünfloresan mikroskopta görünümü (TUNEL, X40, Bar 100µm) (K:Kondrosit, İTM: İntrateritorial Matriks, A: Apopitotik Hücre) 51

LEVOBUPİVAKAİN VE BUPİVAKAİNİN KONDROTOKSİK ETKİLERİ; APOPTOTİK AKTİVİTE ÇALIŞMASI

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, tek doz intraartiküler enjeksiyonla verilen bupivakain ve levobupivakainin tavşan diz eklemi kıkırdak dokusundaki kondrotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Çalışma Yeni Zelanda türü, dişi cins 40 tavşan üzerinde gerçekleştirildi. Deney hayvanları, her biri 20 tavşandan oluşan 2 gruba ayrıldı. Çalışma grubuna uygun olarak %0,5 konsantrasyonda bupivakain, levobupivakain veya %0,9 normal salin intraartiküler enjeksiyon yöntemiyle uygulandı. Her bir grupta yer alan tavşanlardan 10 tanesi enjeksiyondan sonraki 7. günde, kalan 10 tanesi ise enjeksiyondan sonraki 28. günde intraperitoneal pentotal sodyum uygulanarak sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen tavşanların enjeksiyon yapılan eklemleri diseke edilerek ışık mikroskobu ve immünflorasan mikroskopta incelenmek üzere hazırlandı. Işık mikroskobu için hazırlanan kesitler hemotoksilen-eozin ile boyanarak söz konusu lokal anestetik ajanların kıkırdak dokusunda neden olduğu apoptotik değişiklikler doku düzeyinde incelendi. İmmünfloresan mikroskop incelemesi için hazırlanan kesitler ise TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick and labelling assay) yöntemi ile boyandı, apoptotik hücreler araştırıldı ve apoptotik indeks hesaplandı.

Bulgular: Işık mikroskobu ile yapılan inceleme sonucunda; Bupivakain grubunda sırası ile 7. ve 28. günlerdeki apoptotik indeks değerlerinin, serum fizyolojik ve levobupivakain gruplarındaki apoptotik indeks değerlerinden anlamlı derecede daha yüksek olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$). Levobupivakain grubunda 7. ve 28.günlerdeki apoptotik indeks değeri serum fizyolojik grubundan anlamlı derecede daha yüksekti ($p < 0,05$). Levobupivakain grubunda 28. günde gözlenen apoptotik indeks değeri 7. güne nazaran anlamlı derecede yüksek bulunurken ($p < 0,05$), bupivakain grubunda 7. ve 28. günde gözlenen apoptotik indeks değerleri arasında istatistiksel olarak fark gözlenmedi ($p > 0,05$).

Floresan mikroskop ile yapılan inceleme sonucunda: Bupivakain grubunda sırası ile 7. ve 28. günlerdeki apoptotik indeks değerleri, serum fizyolojik ve levobupivakain gruplarındaki apoptotik indeks değerlerinden anlamlı derecede yüksekti ($p < 0,05$). Levobupivakain grubunda 28. günde gözlenen apoptotik indeks değeri 7. günde

gözlenen apopitotik indeks değeriinden yüksekti ($p < 0,05$). Bupivakain grubunda ise 7. ve 28. günlerde gözlenen apopitotik indeks değeriileri arasında istatistiksel olarak bir fark gözlenmedi ($p > 0.05$).

Sonuç: Bu çalışmada, tavşan kıkırdak dokusu üzerinde, bupivakainin daha fazla apopitotik aktivasyona neden olarak, levobupivakainden daha fazla kondrotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca, bupivakainin gösterdiği apopitotik aktivasyonun 7. günden sonra sabit bir şekilde 28. güne kadar devam ettiği, levobupivakainin göstermiş olduğu apopitotik aktivasyonun ise, 7. günden sonra da artmaya devam ederek 28. güne kadar artış gösterdiği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, bupivakain, kondrotoksisite, lokal anestezikler, levobupivakain.

CONDROTOXIC EFFECTS OF LEVOBUPIVACAINE AND BUPIVACAINE; THE EXAMINATION OF APOPTOTIC ACTIVITY

ABSTRACT

Aim: In this study, we aimed to investigate the condrotoxic and apoptotic effects of levobupivacaine and bupivacaine performed via single dosage intraarticular injection in the rabbit cartilage tissue.

Materials and Methods: This study was conducted on 40 female New Zealand rabbit. Rabbits were allocated to two groups as 20 rabbits in each group. In accordance with the study groups, Bupivacaine 0,5%, levobupivacaine 0,5% or normal saline 0,9% were injected intraarticularly into the right and left back knee joints of rabbits. In 7th and 28th days after the intraarticular injections, 10 rabbits from each group were sacrificed under intraperitoneal pentothal sodium anesthesia. The knee joints of the sacrificed rabbits were dissected and prepared for examination under light microscope and immunofluorescence microscope. Sections prepared for light microscopy were stained with hematoxylin-eosin and apoptotic changes in the cartilage tissue caused by local anesthetic agents were examined. Sections prepared for immunofluorescence microscopy were stained by the TUNEL method (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick and labeling assay), apoptotic cells were examined, and apoptotic indexes were calculated.

Results: As a result of the examination by light microscope: Apoptotic index values of Bupivacaine Group was significantly higher than the apoptotic index values of Saline, and Levobupivacaine Groups in 7th and 28th days ($p < 0.05$). Apoptotic index values of Levobupivacaine group in 7th and 28th days were significantly higher than the apoptotic index values of saline group ($p < 0.05$). Although the apoptotic index values in the 28th day were significantly higher than the apoptotic index values in the 7th day in the levobupivacaine group, ($P < 0.05$), no statistical significance was observed between the 7th and 28th day values in bupivacaine group ($p > 0.05$).

As a result of examination with fluorescence microscope: Apoptotic index values of Bupivacaine group was significantly higher than the apoptotic index values of saline, and levobupivacaine groups in 7th and 28th days ($p < 0.05$). The apoptotic index values in the 28th day were significantly higher than the apoptotic index values in the 7th day in the levobupivacaine group, ($P < 0.05$). No statistical significance was observed between the 7th and 28th day apoptotic index values in bupivacaine group ($p > 0.05$).

Conclusion: In this study, it is observed that, bupivacaine is showing more condrotoxic effect by causing more apoptotic activation than levobupivacaine on the rabbit cartilage tissue. Also, although the apoptotic activation due to bupivacaine observed in the 7th day continues constant until the 28th day, the apoptotic activation due to levobupivacaine observed in the 7th day continues to increase until the 28th day.

Key Words: Apoptosis, bupivacaine, condrotoxicity, local anaesthetics, levobupivacaine.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Hekimler için cerrahi müdahaleleri kolaylaştıracak optimal bir intraoperatif görüş alanı sağlamak kadar, hasta güvenliği, kullanılan ilaçların istenmeyen etkilerinin minimize edilmesi ve normal yaşam fonksiyonlarına dönüşün hızlandırılması da önemlidir (1).

Postoperatif ağrı hastalar için son derece önemli bir sorundur. Postoperatif ağrının kontrolünde, güvenli ve etkili yöntemlerden biri de bölgesel ve lokal anestezi ajan uygulamalarıdır. Artroskopik diz ameliyatlarından sonra intraartiküler lokal anestezi uygulanması postoperatif ağrı kontrolünde güncel ve popüler bir yaklaşım olarak kullanılmaktadır. Bupivakain artroskopik diz cerrahisi sonrasında postoperatif analjezi sağlamak amacıyla yaygın olarak kullanılan lokal anestezi ajandır. Aynı amaçla son yıllarda levobupivakain de kullanılmaya başlanmıştır (2).

Bupivakain; uzun etkili olması ve etki potansiyelinin yüksek olması nedeniyle klinik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmakla birlikte bilinen en yüksek nörotoksik, kardiyotoksik ve kondrotoksik etki potansiyeline sahip lokal anestezi ajandır (3-6). Levobupivakain ise, bupivakainin pür S(-) enantiomeridir ve rasemik bupivakainin kardiyotoksik etkilerinin daha çok R(+) enantiomeri ile ilgili olduğunun gösterilmesi sonucunda, daha az kardiyotoksik bir ajan elde etmek amacıyla geliştirilmiştir (7,8).

Bupivakainin kondrotoksik etkisi ile ilgili literatürde sınırlı sayıda araştırma bulunmakla birlikte, levobupivakainin kondrotoksik etkisi ile ilgili bir araştırmaya rastlamadık.

Lokal anesteziyelerin mitokondriyal üzerindeki toksik etkilerini açıklamak için, mitokondriyal hasarlanmayı ve K⁺ kanal bloğunda içeren birçok mekanizma öne sürülmüştür. Lokal anesteziyelerin mitokondriyal hasarlanmayı artırdığı, ATP'yi ve

mitokontrial protein seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir. Bu bulgularla, lokal anestezik toksisitesinden mitokontrial disfonksiyon ve apoptozis sorumlu tutulmaktadır (9).

Çalışmamızda bupivakain ve levobupivakainin kondrotoksik etkilerinin bir göstergesi olarak, kondrositler üzerine apoptotik etki potansiyellerini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. EKLEM KIKIRDAĞI

Vücudumuzda üç çeşit kıkırdak bulunmaktadır:

1. Hiyalin kıkırdak
2. Elastik kıkırdak
3. Fibröz kıkırdak

Mezenkimal doku kökenli olan eklem kıkırdağının yapısında hiyalin kıkırdak bulunmaktadır (10). Hiyalin kıkırdak, vücudumuzdaki diartrodial eklemlerdeki yük dağılımını ve basınç kontrolünü sağlayarak, sürtünmeyi azaltan dayanıklı bir mikro mimariye sahiptir. Diz eklemine sağlıklı fonksiyon görmesi için, eklem kıkırdağının varlığı ve canlılığı gereklidir. Aksi takdirde osteoartrit kaçınılmaz sonuç olarak karşımıza çıkmaktadır (11).

2.1.1. Eklem Kıkırdağının Yapısal Anatomisi

Eklem kıkırdağı, kondrositler, su ve hücre dışı matriks yapısal bileşenlerinden oluşan, vücudumuzun oldukça farklılaşmış ve özelleşmiş, viskoelastik bir dokusudur (Tablo 1) (12). Sinir dokusu, damar ve lenfatik içermeyen bir yapıya sahiptir. Kondrositlerin beslenmesi, difüzyon yoluyla kıkırdak matriks aracılığı ile olmaktadır. Vücutta bulunan diğer dokulara göre osmotik basıncının yüksek olması, hiyalin kıkırdağa yapısında en fazla bulunan suyu tutma özelliği kazandırmaktadır (13).

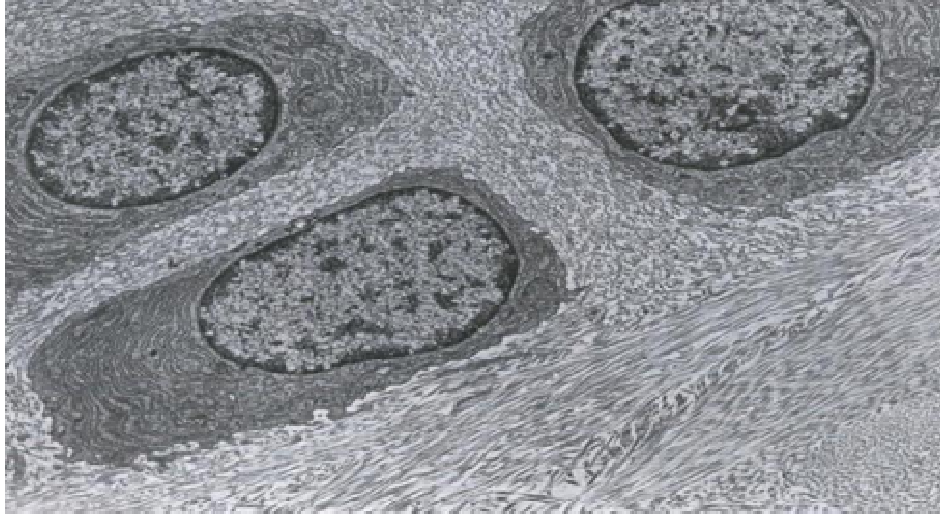
Kondrositler: Eklem kıkırdağının temel yapısal hücreleridirler. Kan damarları olmadığı için, düşük oksijen tansiyonu altında enerjisini sinoviyal sıvıdan hücre dışı matrikse difüzyon yolu ile gelen glukozu kullanarak anaerobik glikoliz ile sağlarlar.

Tablo 1. Eklem kıkırdağının yapısal bileşenleri (12)

Eklem kıkırdağının yapısal bileşenleri.	
Yüzde (%)	
Hücre dışı matriks	
Su 65–80	
Kollajen 10–20	
Proteoglikanlar 10–15	
Diğer bileşenler (Adhesivler ve yağlar)	<5

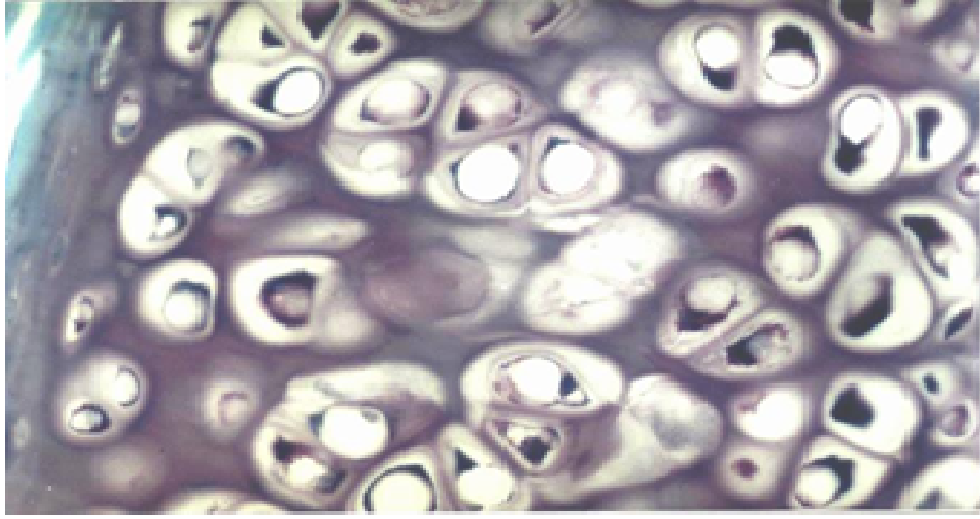
Mezenkimal kök hücrelerinin doğrudan farklılaşması sonucunda kondroblastlar oluşur. Matriks sentezi ve depolanması, kondroblastların birbirinden ayrılmasına neden olur. Daha yüzeysel yerleşimli olan hücreler tipik kondroblastlar olarak kalırken, kalsifiye kıkırdak tabakasına doğru farklılaşarak, laküna adı verilen matriks içerisindeki daha derin tabakalarda bulunan hücreler olan kondrositleri oluştururlar. Dokudaki kondrositlerin içinde yerleştikleri lakünayı tamamen doldurdıkları gözlenirken, inceleme yapılmak üzere tespit ve diğer histolojik laboratuvar yöntemlerinden geçirilirken hücrelerin özellikle suyunu kaybetmesi sonucu büzüştükleri ve bu yüzden laküna duvarından ayrılmış olarak gözükmektedirler. Elektron mikroskopta yapılan incelemelerde hücre yüzeylerinin düzgün olmadığı görülür. Kondrosit nükleusu yuvarlaktır ve bir veya daha çok nükleolus içerir. Sitoplazmadaki mitokondri, lipid damlacıkları ve glikojen hücrelerdeki diğer tipik organel ve inklüzyonlardır. Bunlar dışında kıkırdak matriksi veya kıkırdak dokusu tamiri yapıldığında hücrelerde çok iyi gelişmiş granüllü endoplazmik retikulumun yer aldığı görülür. Bu durumda golgi aygıtı daha çok belirginleşmiştir. Aktif evredeki kondrositler bazofilik renkte olup vakuollü bir hal almıştır. Olgun kondrositler, hücre dışı matriks ile devamlı ve yoğun bir kimyasal iletişim içerisindeydirler. İçerdikleri düz endoplazmik retikulum ve iyi gelişmiş Golgi kompleksi ile tip II kollajen, proteoglikanlar, hyalüronik asit, kondronektin ve kıkırdak yıkım enzimleri (metalloproteinazlar) ile yıkım önleyici enzimlerin (metalloproteinaz

doku inhibitörü) sentezini yaparlar. Lakünaların etrafı ve aralarındaki bölgeler farklı şekilde adlandırılırlar. Örneğin lakünanın hemen etrafındaki alana territorial alan denir. Burası liften fakir ancak ara maddeden zengin olup Toluidine mavisiyle yoğun bazofilik ve metakromazi gösterir, ayrıca PAS pozitif özelliktedir. Bunun nedeni buradaki yoğun proteoglikanlardır. Bir diğer deyişle, sentezi yapılan temel maddenin hücre dışına verildiği ilk bölge olması, bölgenin yoğun boyanmasına neden olur. Buna karşılık daha az yoğunlukta bazofilik özellik gösteren lakünalar arasındaki alana ise interterritorial alan adı verilir. Kondrositler yaşlandıkça, hücresel üretim aktiviteleri azalır. Hücre dışı matrikste bulunan protein makromoleküler kompleksin sentezi ve yıkımı arasındaki dengeyi sağlamada önemli bir role sahiptirler. Bu süreç birçok faktör tarafından etkilenmektedir: matriks bileşenleri, mekanik yüklenme, hormonlar, lokal büyüme faktörleri, sitokinler, yaşlanma ve kırık dokunun hasarlanması gibi. Bu etkileşimin kompleks olması, eklem kırık dokusunun in-vitro ortamda üretimini zorlaştırmaktadır (14).



Resim 1. Kondrositlerin elektron mikroskopik görüntüsü.

Lakünaların içinde kondrositler izlenmektedir (15).



Resim 2. Hiyalin kıkırdağın ışık mikroskopik görüntüsü.

Lakünaların içinde izogen gruplar halinde kondrositler izlenmektedir (15).

Hücre dışı matriks içeriği;

Hyalin kıkırdakta matriks homojen yapıdadır. Bunun nedeni yapısındaki lif ve temel maddenin ışık kırıcılığının birbirine çok yakın olmasıdır. Dolayısıyla lifleri direkt olarak ışık mikroskopide görmek zordur. Bunlar polarizasyon ve elektron mikroskopuyla daha rahat görülebilmektedir. Matriks, PAS (periyodik asit Schiff) yöntemiyle koyu bazofil boyanır. Ayrıca metakromatik özelliğinden dolayı Toluidine mavisiyle de pembe-kırmızı boyanmaktadır.

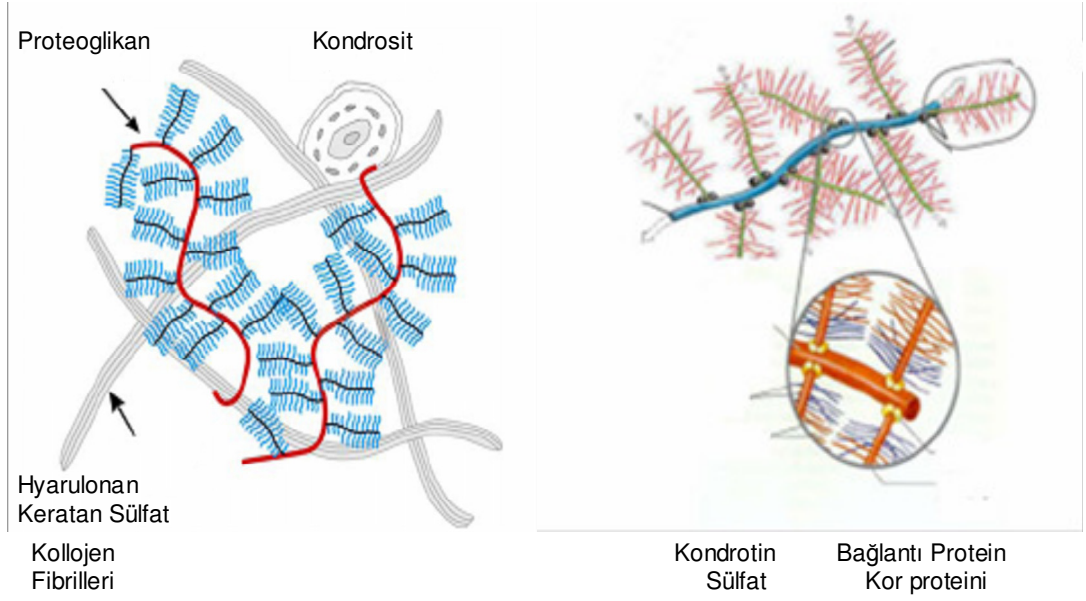
Su: Eklem kıkırdak ağırlığının %65-80'ini oluşturur. Bu oran, yüzeysel tabakada %80 iken, derin tabakada %65'e kadar düşmektedir. Doğal yaşlanma sürecinde ise su miktarının azaldığı görülmektedir. Kıkırdağa uygulanan stres durumlarında su matriksten çıkıp veya matrikse girerek kıkırdak yüzeyin şeklinin değişmesine neden olur. Kıkırdak dokunun beslenmesi ve kayganlığı açısından da su önemlidir.

Kollajen: Kıkırdak dokusunun %10-20'sini oluşturmaktadır. Hiyalin kıkırdağın yapısında en fazla tip II kollajen bulunmaktadır. Tip II kollajen toplam kollajen miktarının %90-95'ini oluşturur ve çok fazla miktarda çapraz bağ oluşturan, birbirine sıkı bir şekilde bağlı bir ağ yapısı meydana getirir. Bu sayede kıkırdak dokusu gerilme kuvvetlerine karşı direnç kazanır. Tip II kollajenin yarı ömrü yaklaşık 25 yıl olduğundan dolayı çok stabil bir yapı oluşturur. Fakat osteoartrit gibi kıkırdak hastalığı durumlarında

yıkım süreci belirgin bir şekilde artar ve hücre dışı matrikste hızlı bir mekanik yıkım ve yapısal bozulma gerçekleşir. Kollajenaz enzimleri bu süreçte önemli rol oynamaktadır. Matrisde az miktarda bulunan diğer kollajen tipleri ise şunlardır: Tip V, VI, IX, X ve XI. Bu minör kollajen tiplerinden en fazla miktarda bulunanları tip IX ve XI' dir. Tip IX kollajen, tip II kollajen ile çapraz bağ yapar ve hücre dışı matrikste bulunan proteoglikanlar ile entegre olur. Tip XI kollajenin asıl görevi ise tip II kollajenin fibril çapını düzenlemek ve kollajen örgünün bir arada tutulmasını sağlamaktır. Enkondral kemikleşme sırasında sadece hipertrofik kondrositler tarafından üretilen tip X kollajen, kıkırdağın kalsifikasyonu ile ilişkilidir. Diğer bir minör kollajen olan Tip VI miktarı ise osteoartritin erken dönemlerinde belirgin olarak artmaktadır.

Proteoglikanlar: Yapısal olarak protein polisakkaritlerdir. Kıkırdağın kompresif gücünü sağlarlar ve glikozaminoglikan alt ünitelerinden oluşurlar. 2 çeşit glikozaminoglikan vardır: kondroitin sülfat ve keratin sülfat. Kondroitin sülfat, eklem kıkırdağında en fazla bulunan glikozaminoglikandır. Glikozaminoglikanlar merkez bir protein çekirdeğe şeker bağları ile bağlanarak “proteoglikan agrekan” molekülü adını alan bu yapı hyalin kıkırdak için karakteristiktir. Bu agrekan molekülleri, uzun bir polisakkarit olan hyalüronik asit zincirine link proteinleri adı verilen küçük glikoproteinler ile bağlanarak “proteoglikan agregatı” adını alırlar. (Şekil 1,2) Proteoglikanlar 3 aylık bir yarı ömre sahiptirler ve eklem kıkırdağının yapısal özelliklerini sağlarlar. Yüksek oranda negatif yükle yüklenmiş olan proteoglikanlar (PG) ve glukozaminoglikanlar (GAG) dokunun su tutma özelliğini sağlarlar ve bu özellikleri ile kıkırdağa kompresif kuvvetlere karşı direnç kazandırır.

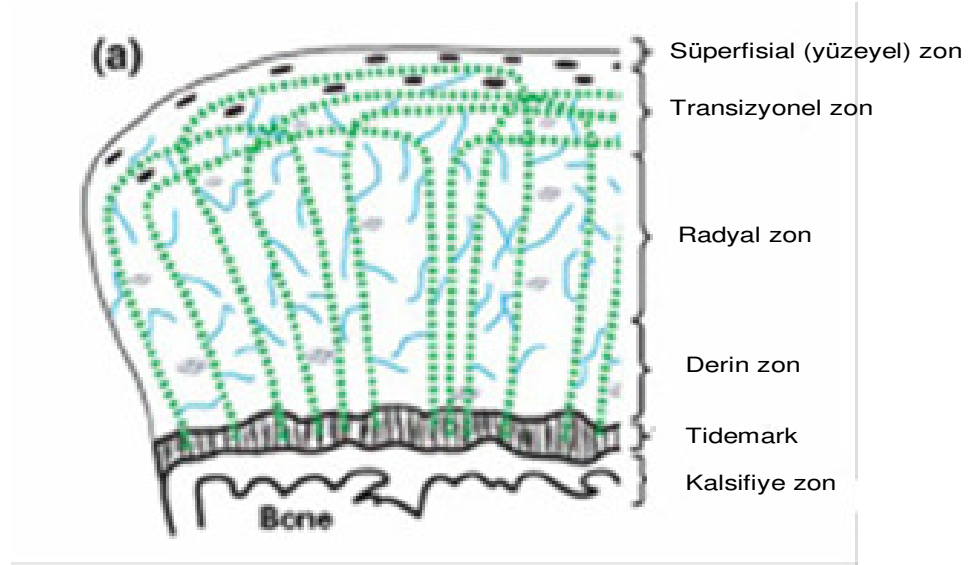
Diğer Matris Bileşenleri: Kollajen olmayan proteinler olarak bilinen adheziv moleküller arasında, fibronektin, kondronektin ve ankorin sayılabilir. Bunlar kondrositler ile kollajen fibriller arasındaki etkileşimden sorumludurlar. Yağların görevleri ise henüz tanımlanmamıştır (15).



Şekil 1. Kollajen matriksin, GAG ve PG' larla oluşturduğu yapı (16)

2.1.2. Eklem Kıkırdağının Yapısal Tabakaları

Eklem kıkırdağı, kollajen liflerinin ve kondrositlerin dizilimi açısından özel bir yapısal anatomiye sahiptir. (Şekil 2) Eklem kıkırdağı, hücresel morfoloji, biyomekanik bileşim ve yapısal özellikleri bakımından birbirinden farklı dört tabakadan oluşmaktadır: Yüzeyel, orta, derin ve kalsifiye (17). Derin tabaka ile kalsifiye tabaka arasında “tidemark” adı verilen bir geçiş bariyeri bulunmaktadır. Eklem yüzeyinden kemiğe doğru yaklaştıkça hem kondrositlerin, hem de kollajen lifleri ile hücre dışı matrikste yapısal değişiklikler olmaktadır. Kondrositler, eklem yüzeyine paralel iken vertikal hale geçerek, sayıları artar. Kondrositlerin çevresindeki matriksin hacmi, tutulan su miktarı ve biyolojik aktivitesi artar. Kollajen lifleri de paralel iken vertikal dizilim gösterirler. “Tidemark” da ise tekrar paralel hale geçerler ve sayıları azalır. Orta tabakadaki hücreler tip II kollajen ve agrekan üretirken, derin tabakadaki hücreler tip X kollajen ve alkalin fosfataz üretirler (18,12).



Şekil 2. Eklem kıkırdağının yapısal tabakaları (16)

2.1.2.1. Hıyalin Kıkırdağın Büyüme Özellikleri

Kıkırdağın gelişeceği bölgelerde mezenşimal hücreler, uzantılarını kaybeder, yuvarlaklaşarak yoğunlaşır. Böylece yoğun hücrelerden meydana gelen bir kondrifikasyon (kıkırdaklaşma) merkezi ortaya çıkar. Bu hücreler daha sonra kondroblastlara farklılaşırlar. Kondroblastlar hemen matriks sentezlerler. Bu süreç ilerlerken kondroblastlar kendine ait küçük kompartmanlar olan lakünalar içerisine hapsolurlar ve bundan sonra artık kondrosit olarak isimlendirilirler. Bu hücreler halen bölünme yeteneğini sürdürdüklerinden, bir laküna içinde 2–4 veya daha fazla hücre grubu oluştururlar, Bu grup izogen grup olarak tanımlanır ve bir tek ana hücrenin 1–2 veya daha fazla bölünmesi ile oluşmuştur. İzogen gruplar matriks ürettikçe lakünalar da birbirlerinden uzaklaşır, kıkırdak içerden büyümeye başlar. Bu içsel (İnterstisyel) tipte bir büyümedir.

Gelişmekte olan kıkırdağın periferindeki mezenşimal hücreler ise ilk olarak fibroblastlara farklılaşır. Fibroblastlar ise sıkı kollajenöz bir bağ dokusu olan perikondriyumu şekillendirir. Perikondriyum kıkırdağın varlığını ve büyümesini sürdürmesinden sorumludur. Perikondriyum iki tabakalıdır. Dışta fibröz olan tabaka Tip I kollajen, az fibroblast ve kan damarlarından oluşur. İç tabaka ise çoğunlukla kondrojenik hücrelerden oluşur. Kondrojenik hücreler bölünerek kondroblastlara farklılaşır. Bu hücreler matriks sentezleyerek kıkırdağın periferine ilaveler yaparlar. Bu büyüme tipi ise appozisyonel büyüme olarak tanımlanır.

İnterstisyel büyüme yalnızca hiyalin kıkırdağın oluşumu sırasında, perikondriyumu olmayan eklem kıkırdağı ve epifizial plaklarda (kemik boyuna büyümesi) meydana gelir. Bunların dışındaki vücut bölgelerinde ise büyüme çoğunlukla appozisyondur. Büyüme kontrollü bir süreç olup kıkırdağın yaşamı boyunca devam eder (19).

2.1.2.2. Hyalin Kıkırdağın Onarım Kapasitesi

Eklem kıkırdağının avasküler olması, kondrositlerin immobilitesi ve proliferasyon yeteneklerinin kısıtlı olması, yaş ilerledikçe telomeraz uzunluğundaki azalışa bağlı kondrosit apoptozunun meydana gelmesi ve kıkırdak lezyonunun orijinal hiyalin kıkırdak ile doldurulması, bu dokunun entegrasyonu ve korunmasındaki sorunlar gibi nedenlerden dolayı, erişkin çağıdaki eklem kıkırdağının onarım kapasitesi embriyonik dönemdekinden farklı olarak kısıtlıdır (20,21). Hasarlanmadan 3 gün sonra kondrosit hücrelerinin silyallerle uyarılması ile çevre kondrosit hücreleri prolifer olmaya ve ECM sentezlemeye başlarlar, tip 2 kollajende artış görülür. Perikondriumu olan dokulardaki iyileşme mekanizmasının yanında, eklem kıkırdağında subkondral kemiğe ulaşan Grade 3–4 hasarlanmalarında bir başka intrensek mekanizma devreye girer. Bu tip yaralanmalarda iyileşme subkondral kemik iliğinden hasarlı bölgeye geçen prekürsör veya stem hücrelerinin hyalin kıkırdak yerine fibröz kıkırdak doku oluşturması ile gerçekleşir. Osteokondral ya da tam kat kıkırdak defektlerinde vaskülarize bir kaynağa ulaşılmış olunur ve böylece kanama sonrası defektli alan fibrin dokusuyla dolar. Bir hafta boyunca kemik iliğinden miğre olan multipotent mezenkimal stem hücreleri fibrin dokuyu rezorbe etmeye başlar. Bir kaç hafta içinde stem hücreleri kondrosit benzeri hücrelere dönüşerek uyarılırlar, uyarılan hücreler ise büyük miktarlarda PG sentezleyerek hyalin kıkırdak dokusuna benzer bir dokuyla defekti kapatırlar (22).

2.1.3. Elastik Kıkırdak

Elastik kıkırdak pinna (kulak kepçesi), östaki borusu, epiglottis, larink (cuneiform kıkırdak) te yerleşmiştir. Elastik lif içeriğinden dolayı hiyaline göre daha sarı ve opak görünümlüdür. Birçok açıdan hiyalin kıkırdağa benzemesine karşın perikondriyumun dış fibröz tabakası elastik liflerce zengindir. Matrikste de bol miktarda inceden kalına kadar değişen ve tip II kollajen lifler arasında dallanan elastik lifler bulunur. Bu lifler elastik kıkırdak matriksini oldukça esnek yapar. Buna karşın matriks hiyalin kıkırdak kadar bol değildir, matriks kalsifikasyon göstermez (19).

2.1.4. Fibröz Kıkırdak

Fibröz kıkırdak intervertebral disklerde, simphysis pubis, bazı artiküler disklerde ve tendonların kemik insersiyolarında bulunur. Hiyalin kıkırdak ile sıkı bağ dokusu arasında geçiş formu sayılabilir. Pekikondrium içermez. Dermatan sülfat ve kondroidin sülfatça zengin az bir matrikse sahiptir. Asidofilik olarak boyanan tip I kollajen bantları yoğun olarak bulunur. Kondrositler genellikle doku üzerindeki zorlayıcı çekme gücü yönünde uzanan kaba kalın lif bantları üzerinde paralel sıralar oluştururlar. Burada kondrositler genellikle fibroblastlardan köken alırlar (19).

2.1.5. Sinoviyal Doku

Sinoviyal doku, diz ekleminde kan ve eklem sıvısı arasındaki madde değişiminden sorumludur.

Sinoviyal dokunun yapısal anatomisi ve histolojisi;

Sinoviyal doku diz ekleminde kapsülün iç tabakasını oluşturur. Arteriyel, venöz ve lenfatik dolaşımı mevcuttur. Sinoviyal eklem sıvısının salgılanmasından sorumludur. Vasküler, salgılayıcı gevşek bir bağ dokusuna sahiptir. Eklem ile ilişkili olduğu için gerçek anlamda bir zara sahip değildir (23).

Üç tip sinoviyal hücre bulunmaktadır;

Tip A: Fagositozdan sorumludurlar.

Tip B: (Fibroblast benzeri hücreler): Sinoviyal sıvının salgılanmasından sorumludurlar.

Tip C: (Geçiş hücre tipi): Henüz fonksiyonları tanımlanmamıştır

Ayrıca yapısında yağ hücreleri ve kondrogenetik özelliği de içinde barındıran multipotent mezenkimal kök hücrelerini de bulundurmaktadır (15).

2.1.5.1. Kondrogenetik Özellikleri

Sinoviyal dokunun asıl görevi, sinoviyal sıvının üretiminin sağlanmasıdır. Bunu sinoviyal hücrelerden tipB hücreler gerçekleştirir. Sinoviyal sıvının içerisinde; lubrisin, proteinaz, kollajenazlar ve prostaglandinler bulunmaktadır. Herhangi bir kırmızı kan hücresi veya pıhtılaşma faktörü bulunmamaktadır. Eklem kıkırdağının

kayganlaştırılmasından ve kıkırdağa difüzyon yoluyla besin taşınmasından sorumludur. Enflamasyon durumlarında lenfosit birikimi ve intimal kalınlaşma meydana gelir. Mezenkimal kök hücrelerin sahip oldukları multipotent olma ve kendilerini yenileme özellikleri, klinikte tedavi amaçlı kullanımları hakkında büyük bir ilgi uyandırmıştır (24). Sinoviyal hücrelerin mezenkimal kök hücreler kadar kondrojenetik özelliğe sahip olduğu saptanmıştır (25,26). Son yıllarda sinoviyal dokunun yapısında mezenkimal kök hücre içerdiği gösterilmiştir (25). Ayrıca hem proliferasyon yeteneği, hem de kondrojenetik özelliği en fazla olan dokunun da sinoviyal doku kaynaklı kök hücreler olduğu saptanmıştır (27).

2.2. LOKAL ANESTEZİKLER

Lokal anestezikler, uygun yoğunlukta verildiklerinde uygulama yerinden başlayarak, sinir iletimini geçici olarak bloke eden maddelerdir. Klinik yoğunluklarda uygulandıklarında bu etkileri geri dönüşümlü olup, sinir lifi ve hücresinde herhangi bir hasar olmaksızın sinir fonksiyonu tamamen geri döner (28).

2.2.1. Tarihçesi

Lokal anesteziklerin ilki olan kokain, Eritroksilon koka yapraklarından 1860 yılında Neimann tarafından izole edilen ilk lokal anestetiktir. Kokainin 1860'da Niemann tarafından izole edildikten yirmi yıl sonra 1884'de oftalmik anestezide klinik olarak kullanıma sunulmuş ve yaklaşık otuz yıl kullanılmıştır (28). Kısa süre sonra kokainin alışkanlık yapıcı santral sinir sistemi etkileri bulunmuş farklı lokal anestezik arayışları başlamıştır. Kokainin özelliklerini geliştirmek için, Einhorn 1905'de prokaini sentezlemiştir. Einhorn 1904'te paraaminobenzoik asit derivelerinin patentini almış ve bu bileşiklerden prokain ilk defa etkin ve geniş bir şekilde kullanılan sentetik lokal anestezik olmuştur (29). Ancak potent olmayışı ve allerjik potansiyelinin yüksek olması nedeniyle yeni arayışlar başlamıştır. 1948'de Löfgren tarafından lidokain ve daha sonra 1963'de Ekenstein tarafından bupivakain sentezlenmiştir (28,29). Kullanımda olan hiçbir lokal anestezik ajan ideal ajan değildir ve yeni ajanların geliştirilme çabaları hala devam etmektedir. Bugün kullanımda olan ve en sık kullanılan ajanların biri de bupivakaindir. Fakat bupivakainin de yüksek kardiyak toksisiteye sahip olması nedeni ile yeni lokal anestezik arayışları devam etmiştir (28,29). Aslında lokal anestezikler terapötik etkilerinin uzantısı olarak beyin ve dolaşım sistemi üzerinde toksik etkili

oldukları için geliştirilecek lokal anesteziklerin hepsi toksik etkiye sahip olacaktır. Sadece geliştirilen yeni ajanların toksik etkilerinin şiddeti azaltılabilir. Yeni ve daha az toksik lokal anestezik geliştirme çabalarının sonunda 1988 yılında sentezlenen ve LEA 103 olarak isimlendirilen ropivakain ve 2000'li yıllarda sentezlenen levobupivakain, aminoamid lokal anesteziklere katılan ajanlardandır (28,30). Yeni geliştirilen ropivakain ve levobupivakain fiziksel, kimyasal özellikleri ve etkinliği açısından bupivakaine benzer yapıdadır (31).

2.2.2. Lokal Anesteziklerin Etki Mekanizmaları

Sinir hücrelerinde ileti aksiyon potansiyeli oluşumları ile ilerler. Bir uyarı olmadığında sinir hücresi membranının iki yüzü arasında elektriksel yük (potansiyel) farkı vardır. Bu fark membranın iç yüzünde negatif olmak üzere -70/-90 civarındadır. Buna negatif istirahat membran potansiyeli adı verilir. Sinir hücreleri iyonların aktif transport ve pasif difüzyonları ile istirahat membran potansiyelini korurlar. $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ pompası Na^+ 'u hücre dışına atarken K^+ 'u hücre içine alır. Bu transport 1 veya 2 K^+ 'a karşı 3 veya 4 Na^+ şeklinde gerçekleşir. Bu durum konsantrasyon gradienti yaratarak K^+ 'un ekstraselüler ve Na^+ 'un intraselüler difüzyonunu kolaylaştırır (30,32).

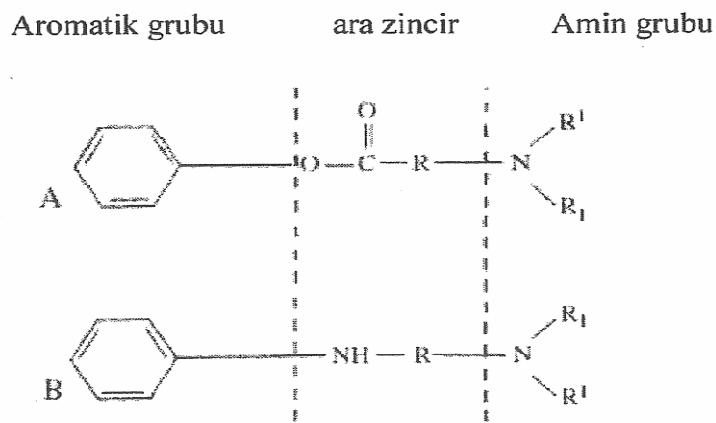
Kimyasal, mekanik, termal veya elektriksel uyarı sonrası oluşan akım sinir aksonu boyunca iletilir. Uyarının yayılması genellikle sinir membranının depolarizasyonu ile olur. Depolarizasyon eşik düzeyi geçerse (-55 mV'luk bir membran potansiyeli), membrandaki Na^+ kanalları aktive olur, hücre içine ani ve spontan Na^+ iyon geçişi gerçekleşir. Na^+ permeabilitesindeki bu yükselme, +20/+40 mV'luk membran potansiyeline yol açan (+) yüklü iyonlarda rölatif olarak aşırı artışa neden olur. Sonrasında Na^+ permeabilitesinde düşme (Na^+ kanallarının inaktivasyonuna bağlı) ve K^+ geçişinde artma (daha fazla K^+ hücre dışına çıkmasına yol açar) membranın istirahat potansiyeline dönmesini sağlar. Sonunda Na^+ pompası ile bazal konsantrasyon farkı oluşturulur. Aksonal membran potansiyelindeki tüm bu değişikliklere aksiyon potansiyeli adı verilir (32). Lokal anesteziklerin Na^+ kanalları içindeki özel bir reseptöre bağlanması ile sinir lifleri ve diğer uyarılabilir hücrelerde;

- a) Aksiyon potansiyelinin yükseliş hızını yani depolarizasyon hızını yavaşlatırlar,
- b) Aksiyon potansiyelinin amplitüdünü azaltırlar veya ortadan kaldırırlar,
- c) SSS'de eksitasyon eşliğini azaltırlar,
- d) İmpuls iletim hızını düşürürler ve iletimi tam bloke ederler.

Lokal anesteziklerin etkileri lokal ve sistemik olup, lokal etkileri sinirlerin yayılım alanında görülürken, sistemik etkileri doza bağımlı olarak ilacın enjekte edildiği yerden absorpsiyonu ile veya sistemik olarak verilmesiyle ortaya çıkar (30,32).

2.2.3. Lokal Anesteziklerin Kimyasal Yapıları ve Sınıflandırılması

Lokal anesteziklerin hepsi yağda eriyen alkaloidlerin suda eriyen tuzlarıdır. Lokal anestezikler genellikle bir benzen halkası olan lipofilik bir grup ile genelde tersiyer amin olan hidrofilik grup ve bunları ayıran ester veya amid bağı içeren ara karbon zincirinden oluşur. Ara zincirin yapısı, lokal anesteziklerin ester ve amid grubu olarak sınıflandırılmasını sağlar. Lokal anesteziklerin fizikokimyasal özellikleri; ara zincirdeki bağın tipine ve amin nitrojene bağlı alkil gruplarına göre belirlenir. Lokal anestezikler hem bazik hem de asidik yük taşıdıkları için amfoterik özellik gösterirler ve bu nedenle değişik pH değerlerinde çözünme özelliğine sahiptirler (33).



Şekil 3. Lokal anesteziklerin kimyasal yapısı

A. Ester

B. Amid

Amino Grup Esterler

Ester grubu lokal anestetikler benzoik asit veya orto, meta, para aminobenzoik asit türevleridir. Ester bağı genellikle stabil olmadığından bu ajanlar solüsyon içinde hidroliz ile vücutta ise plazma kolinesteraz ile yıkılmaktadır. Ester hidrolizi çok hızlıdır ve suda çözünen metabolitleri idrarla atılır. Metabolitlerden biri olan para-aminobenzoik asit (PABA) allerjik reaksiyona neden olabilmektedir (28). Genetik olarak anormal psödokolinesterazı olan hastalarda metabolizma yavaşlayacağı için toksik yan etki riski yükselir. BOS'ta esteraz enzimi olmadığından intratekal verilen ester tipi lokal anesteziğin etkisinin sonlanması kana absorpsiyonu ile gerçekleşir (33). Ester bağı kısa etki süresi ve toksisitenin azalması gibi özellikleri de sağlamaktadır. Kokain, prokain, klorprokain, tetrakain ester grubu lokal anestetiklerdir (28).

Amino Grup Amidler

Amid bağı daha stabildir ve sterilizasyon ya da pH değişikliklerinden etkilenmez. Bu ajanlar kasta metabolize olurlar ve çok az bir kısmı ise değişmeden idrarla atılır. Bu grupta klinikte kullanılan ajanlar; lidokain, prilokain, dibukain, mepivakain, etidokain, bupivakain, ropivakain, levobupivakain'dir. Lokal anestetiklerin etkilerinin ortaya çıkış süreleri, ilaçların lipid çözünürlüğü ve proteinlere bağlanma özellikleri ile ilişkilidir.

Lokal anestetikler etkilerinin ortaya çıkış süreleri açısından, üç temel kategoride sınıflandırılırlar.

1. Düşük potensli (kısa etki sürelili): Prokain, 2-kloroprokain
2. Orta potensli (orta etki sürelili): Lidokain, mepivakain, prilokain
3. Yüksek potensli (uzun etki sürelili): Bupivakain, tetrakain, etidokain, ropivakain, levobupivakain (28).

Tablo 2. Bazı Lokal Anesteziklerin Fizikokimyasal Özellikleri (5).

	Bupivakain	Levobupivakain
Moleküler Ağırlığı (D)	288	288
pKa	8.1	8.1
Liposolubilité	30	30
Partisyon Katsayısı	28	28
Proteine Bağlanma (%)	95	95

2.2.4. Lokal Anesteziklerin Etkisini Belirleyen Faktörler

Belirli bir lif kalınlığında ve belirli bir zamanda iletiyi bloke eden minimum anestezik konsantrasyonu “Cm” olarak adlandırılır.

Cm değerini etkileyen faktörler

- 1. Lif kalınlığı:** Sinir lifinin kalınlığı, tipi ve miyelinizasyonu Cm.’yi etkiler. Lokal anesteziklerin etkisi lifler inceldikçe artmaktadır. Bu kural A grubu lifler için geçerlidir. Miyelinsiz lifler daha çabuk ve daha düşük konsantrasyonlarda etkilenir.
- 2. pH:** Solüsyonun pH.’sı arttıkça Cm azalmaktadır (asit ortam bloğu antagonize eder).
- 3. Elektrolit konsantrasyonu:** Lokal anestezik potensi doku ortamının Ca^{++} konsantrasyonu ile ters orantılıdır (hipokalemi ve hiperkalsemi bloğu antagonize eder).
- 4. Sinir stimülasyonunun frekansı:** Yüksek uyarı hızlarında lokal anestezik ajanların potensinde artış olur. Klinik olarak fonksiyon kaybı; ağrı, ısı, dokunma, proprioseptif duyu ve iskelet kası tonusu sırasını izler. Normale dönüş sırası bunun tam tersidir. Periferdeki büyük sinirlerde motor lifler, genellikle çevrede yerleştiğinden ilaca daha erken ve fazla maruz kalırlar. Bu nedenle motor lifler sensoryal liflerden daha erken bloke olabılırlar (28).

2.2.5. Lokal Anesteziklerin Farmakokinetik Özellikleri

Absorbsiyon

Sağlam ciltten absorbe olmazlar. Lokal anestezikler mukoz membranlarda topikal olarak veya çeşitli dokulara enjekte edilerek kullanılabilir. Bir çok mukoz membran lokal anestezik geçişine karşı zayıf bariyer oluşturur, bu durum hızlı etki başlangıcına yol açar. Bununla beraber, sağlam ciltten emilebilmeleri için lokal anestezinin içerdiği su konsantrasyonunun yüksek olması ve analjezi sağlaması için de lipid çözünürlüğü yüksek olan bir baz içermesi gereklidir. Uygulanan lokal anestezinin sistemik absorpsiyonu kan akımına bağlıdır (30).

Absorpsiyonu etkileyen faktörler:

– Enjeksiyon yeri

Bir lokal anestezinin uygulandığı bölgenin kanlanması ne kadar fazla ise emilim de o kadar fazladır. Buna göre emilim en hızlıdan yavaşa doğru şöyle sıralanır; intravenöz, trakeal, interkostal, kaudal, paraservikal, epidural, brakial pleksus, intratekal, siyatik, subkutanöz.

– Vazokonstriktör eklenmesi

Epinefrin ya da daha az sıklıkla fenilefrin, norepinefrin eklenmesi uygulama bölgesinde vazokonstriksiyona yol açarak absorpsiyonu azaltır. Böylece nöronal alım artar, etki süresi uzar ve toksik yan etkiler sınırlanır.

– Lokal anestezik ilacın tipi

Yüksek doku bağlanma özelliği olan lokal anestezikler daha yavaş absorbe olurlar. Ayrıca kokain hariç tüm lokal anesteziklerin intrinsek vazodilatatör etkileri vardır ve bunun derecesi absorpsiyon hızını etkiler. Lipofilik özelliği olan ajanlar akıtma yerindeki dokulara daha fazla bağlanarak daha az sistemik emilime neden olurlar. pKa, bir maddenin katyon (iyonize) ve serbest (non-iyonize) baz miktarının eşit olduğu pH değeridir. İlacın pKa'sı fizyolojik pH'a ne kadar yakınsa, o kadar çok dissosiyasyon olur ve etki başlangıcı hızlanır.

– Lokal anestezi doz

Uygulanan lokal anestezi doz ve pik kan anestezi düzeyi doğru orantılıdır (28,30).

Dağılım

Lokal anesteziklerin büyük bir kısmı plazmada proteinlere bağlanarak, bir kısmı da eritrositlere girerek dokulara dağılır ve orada tutulur. Plazma proteinleri ile eritrositlere bağlanma arasında ters bir ilişki vardır. Amid yapılı lokal anestezikler plazmada proteinlere daha fazla bağlanırlar. Bağlanma albümin ve α_1 -asit glikoproteine olur. Romatoid artrit, yanık, miyokard enfarktüsü, kanser, travma, renal transplantasyon, enflamatuar hastalıklar ve üremi gibi durumlarda proteinlerin düzeyi artarken, yenidoğanda erişkine göre daha düşüktür. Bu değişiklikler, ilacın karaciğerde tutulmasını ve inaktive edilmesini etkiler. Lokal anestezikler akciğer dokusu tarafından hızlıca tutulur, bu da pulmoner dolaşımdan geçen ilacın kandaki konsantrasyonunun belirgin olarak düşmesine neden olur. Akciğerin tuttuğu ilaç miktarı lokal anestezi tipine göre değişir. Lokal anestezikler kan-beyin bariyeri ve plasentayı kolayca geçer. Mideden absorbe olmazlar (28,30).

Lokal anesteziklerin dağılımını etkileyen faktörler;

– **Doku perfüzyonu:** Damardan zengin dokular, ilacın plazmadan hızla alındığı ilk fazdan sorumludurlar. Daha yavaş olan fazda ise ilaç, perfüzyonu daha az olan dokulara dağılır.

– **Doku–kan dağılım katsayısı:** Güçlü protein bağlanma kapasitesi ilacın kanda kalmasını sağlarken, yüksek yağda çözünürlük ilacın doku tarafından alımını kolaylaştırır.

– **Doku miktarı:** Kas dokusu büyük kitlesinden dolayı lokal anestezikler için en büyük rezervuardır (28,30).

Metabolizma ve atılım

Lokal anesteziklerin metabolizması ve atılımı ester veya amid yapılı olmalarına göre değişir. Ester grubu lokal anestezikler, pseudokolinesteraz enzimi ile hidrolize uğrar. Ester hidrolizi çok hızlıdır. Suyla atılan metabolitleri idrar ile atılır. Bir metabolit olan

PABA, alerjik reaksiyonlardan sorumludur. Genetik olarak anormal enzim aktivitesi olan hastalarda metabolizma yavaşladığından, toksik yan etki görülme sıklığı artar. Serebropsinal sıvıda enzim bulunmadığı için intratekal verilen ester tipi lokal anesteziklerin etkisinin bitmesi o bölgeden kan akımına karışması ile olur.

Diğer ester tipi lokal anesteziklerden farklı olarak kokain, kısmen karaciğerde metabolize olur ve kısmen de değişmeden idrarla atılır.

Amid yapılı lokal anestezikler, karaciğerde mikrozomal enzimler tarafından metabolize edilir. Metabolizma hızı lokal anesteziğe göre değişir ancak ester hidrolizinden daha yavaştır. Karaciğer kan akımının azalması, siroz, konjestif kalp yetmezliği, hipotermi ve halotan, simetidin, propranolol gibi ilaçlar lokal anesteziklerin yıkımını veya uzaklaştırılmasını zorlaştırır ve hastalarda sistemik toksisite görülme oranı artar. Metabolitlerin atılımı renal klirensle bağlıdır ve çok az miktarda ilaç değişmeden atılır (28,30).

2.2.6. Lokal Anestezik Etki Süresinin Uzatılması

Vazokonstriktör kullanımı: Bu amaçla kullanılan, adrenalin, noradrenalin, efedrin ve bazı sentetik vazokonstriktörler lokal anesteziğin absorpsiyonunu geciktirirler. Böylece lokal anesteziklerin hem etki süreleri uzar, hem de sistemik toksik etkileri azalır. Vazokonstriktörlerle damarların daralması sonucu kanama azalır.

Karbonasyon: Lokal anesteziklerin karbondioksit ile doyurulmuş hidrokarbonat preparatları doku içine verildiğinde, lipofilik olan CO₂ hızla sinir gövdesi içine ve lifleri arasına girer ve bölgesel asidoz oluşturur. Böylece sinir lifi içindeki iyonize lokal anestezik yoğunluğu artar. Bu sayede karbonatlı solüsyon ile daha hızlı ve daha güçlü bir lokalanestezi elde edilir. Karbonasyonun bir sakıncası, CO₂'in yaptığı vazodilatasyonun ilacın absorpsiyonunu hızlandırmasıdır .

Alkalinizasyon: Lokal anestezik solüsyonunun pH'sının HCO₃ eklenmesi ile fizyolojik pH'ya yaklaştırılması, serbest iyonize kısmını artırarak, ilacın sinir lifi ve membranına diffüzyonunu kolaylaştırmakta ve etki başlangıcını hızlandırmaktadır (28).

2.2.7. Lokal Anesteziklerin Yan Etkileri

I. Ajanın direkt etkisi ile oluşan yan etkiler

A. Lokal: Lokal reaksiyonların genellikle solüsyonlara eklenen stabilizan, bakteriostatik ajanlar veya ağır metallardan kaynaklandığı bilinmektedir. Travmatik enjeksiyon, yüksek ilaç konsantrasyonu, kötü kanlanma ve mekanik nedenlerle de doku hasarı meydana gelebilir. En sık lokal reaksiyon, allerjik dermatit'dir.

B. Sistemik: Dört nedenden kaynaklanmaktadır.

a. İntolerans: Lokal anestezik ajanın plazmada analjezik düzeyin altındaki konsantrasyonda analjezik etki göstermesidir. Seyrek görülen bir yan etkidir. Asidoz, alkaloz, dehidratasyon, febril durumlar ve kas yetmezliği gibi patolojilerde toksisite alevlenir.

b. İdiosenkrazi: Kalıtsal, allerjik bir reaksiyon olduğu düşünülmektedir.

c. Allerjik reaksiyonlar: Prokain ve tetrakain gibi PABA deriveleri ile bildirilen allerjik reaksiyonlar amid gurubu lokal anesteziklerle pek görülmemektedir.

d. Yüksek dozaj: Yüksek plazma düzeyleri, hızlı absorbsiyon veya hatalı intravasküler enjeksiyon ile gelişebilmektedir. Na⁺ kanallarının blokajı vücutta aksiyon potansiyelinin yayılımını etkilediğinden lokal anesteziklerin sistemik toksisite riski vardır. Lokal anestezik karışımları aditif toksik etkiye sahiptir (30). Lokal anestezik ajanların uygun olmayan i.v enjeksiyonu yaşamı tehdit eden SSS ve KVS toksisitesine neden olabilir.

Santral sinir sistemi (SSS) üzerine etkileri: Uyanık hastada yüksek dozun ilk bulguları SSS ile ilgilidir. Lokal anestezikler kan-beyin engelini kolaylıkla aştıklarından SSS belirtileri sık görülür. Erken semptomlar huzursuzluk, baş ağrısı, baş dönmesi, ağız çevresinde uyuşukluk ve dilde parestezidir. Duyusal yakınmalar kulakda çınlama ve bulanık görmedir. Kas seğirmeleri tonik-klonik nöbetlerin başlayacağını habercisidir. Bunları sıklıkla koma ve solunum arresti takip eder (30).

Kardiyovasküler sistemi (KVS) üzerine etkileri: Genelde lokal anestezikler miyokardiyal otomatisiteyi deprese ederler. Bu etkiler direkt kardiyak kas membranı değişiklikleri ve otonom sinir sistemi inhibisyonu sonucunda oluşur. Lokal anestezikler

düz kaslarda düşük dozlarda vazokonstriksiyon, yüksek dozlarda vazodilatasyona neden olurlar. Kokain ise dozdan bağımsız olarak vazokonstriksiyon oluşturan tek lokal anesteziktir, bu etkiyi norepinefrinin geri emilimini inhibe ederek yapar. Düz kas gevşemesi arterioller dilatasyona neden olur. Bradikardi, kalp bloğu, hipotansiyon ve sonuçta kardiyak arrest gelişebilir. Hipoksemi ve solunumsal asidoz predispozan risk faktörleridir (30).

Solunum sistemi üzerine etkileri: Erken dönemde solunum hızı ve derinliği artar, daha sonra dispne, apne ve solunum arresti meydana gelir. Hipoksik cevabı (düşük P_{CO_2} 'e solunumsal yanıt) deprese eder. Frenik ve interkostal sinir paralizi veya doğrudan lokal anesteziklerin medüller solunum merkezini deprese etmesi apneye neden olabilir. Bronşial düz kaslarda gevşeme yapar. İntravenöz lidokain (1,5mg/kg) entübasyona bağlı bronkokonstrüksiyonu bloke etmede etkili olabilir (30).

İmmünolojik sistem üzerine etkileri: Lokal anesteziklere bağlı allerjik olaylar nadirdir. Daha çok para-amino benzoik asit türevi olan, ester tipi lokal anesteziklere karşı gelişir. Amid grubu lokal anesteziklere karşı reaksiyon nadirdir. Amid grubu ilaçlardaki allerjinin nedeni, bu solüsyonlara koruyucu olarak katılan, yapı olarak para-amino benzoik aside benzeyen metil parabendir (30).

Nörotoksisite: Klinikte kullanılan lokal anestezikler nadiren lokalize sinir hasarı oluştururlar. Sodyum bisülfid içeren, düşük pH'lı klorprokainin yanlışlıkla subaraknoid enjeksiyonu sonucu uzun süreli iletim bloğu gözlenmiştir. Sürekli spinal anestezide kullanılan % 5' lik lidokainin ve % 5' lik tetrakainin tekrarlayan dozları sonrası “cauda equina sendromu” ve “transient neurologic symptoms (TNS)” gözlenmiştir (34). Teropatik aralığın üstünde lokal anestezinin epidural aralığa verilmesi sinir köklerinde kalıcı histolojik ve fonksiyonel hasarın doza bağlı olarak meydana geldiği gözlenmiştir (35).

Kas İskelet Sistemi Toksisitesi: Bütün lokal anestezik ajanlar iskelet kasına direkt enjekte edildiklerinde miyotonik etki gösterirler (bupivakain>lidokain>prokain). Birlikte steroid veya epinefrin kullanımı toksisiteyi artırır. Miyofibril hiperkontraksiyonu, litik dejenerasyon, ödem ve geri dönüşümlü nekrozla sonuçlanır. Seri ve sürekli uygulamalardaki kas hasarı doza bağlı olarak geri dönüşümsüz hale dönüşebilir (36).

Steroselektivite ve lipofilik özellik lokal anestezi miyotoksitesindeki patogeneizde önemli rol oynamaktadırlar (37).

Lokal Anesteziklerin Kondrosit Toksisitesi;

Son yıllarda, lokal anestezi ilaçların tek seferlik enjeksiyon veya sürekli infüzyon şeklinde eklem aralığına uygulanması, özellikle artroskopik cerrahide perioperatif ağrı kontrolü için iyi tanımlanmış bir analjezi tekniği olarak kabul görmüştür. Bu amaçla tercih edilen yöntemler arasında, lokal anestezi içeren solüsyonun; cerrahi ekip tarafından operasyon bitiminde intra-artiküler enjeksiyonu veya operasyon sahasına yerleştirilen kateterden elastomerik balon pompası aracılığı ile tek seferlik enjeksiyon veya sürekli infüzyon şeklinde uygulanması yer almaktadır (38,39).

Tek başına veya diğer ilaçlarla birlikte kullanılan lokal anesteziklere uzun süre maruz kalan eklem kondrosit hücrelerinde potansiyel olarak hasar oluştuğuna dair çok sayıda olgu raporları mevcuttur.

Bu bağlamda, yapılan hayvan deneyleri, genel olarak kullanılan lokal anesteziklerin tümünün doz ve zaman bağımlı olarak kondrositler üzerinde toksik etkili olduğunu (40), eklem içine yüksek konsantrasyonda, uzun süre ve özellikle metilprednizolon ve epinefrin eklenerek yapılan lokal anestezi uygulamalarının bu kondrotoksitesiyi çok daha fazla arttırdığını göstermiştir (41). Kondrositler üzerine en toksik ajanın bupivakainin olduğu, mepivakainin ise lidokainden daha az toksik olduğu gösterilmiştir. Çeşitli faktörlerden etkilenmekle birlikte, anesteziklerin eklemler üzerindeki toksik etkisinin bir saatten daha kısa sürede başladığı ve uygulamadan 6 ay sonra bile bu etkinin devam ettiği gösterilmiştir (3,42).

II. Sekonder olarak ajan veya bloğun yarattığı fizyolojik değişiklikler: Lokal anestezi bloğunun sonucunda gelişen sempatik blokaja bağlı hipotansiyon; paralizye bağlı hipoventilasyon ve vazodilatasyona bağlı yanma bu gruba giren yan etkilerdir.

III. Ajan veya bloktan bağımsız olarak gelişen yan etkiler: Uygulama sırasında gelişen senkop, mani, histeri, kalp yetmezliği, beyin kanaması ve koroner spazm bunlardan bazılarıdır.

2.2.8. Lokal Anesteziklere Bağlı Kıkırdak Dokudaki Histopatolojik Değişikliklerin Patogenezi

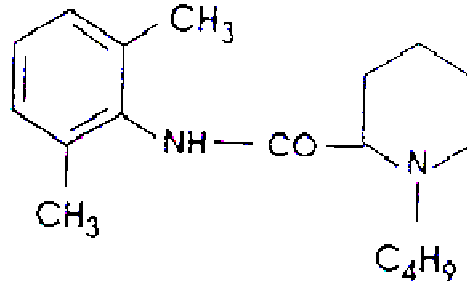
Lokal anesteziklerin sebep olduğu lokal ve sistemik toksisiteyi ilgilendiren birçok literatür olmasına rağmen bu ajanların kondrositler üzerindeki direk etkileri ile ilgili bilgiler çok azdır. Bu yüzden lokal anestezikler tarafından tetiği çekilen toksisite mekanizmasının ne olduğu hala açık değildir (43). Lokal anesteziklerin kondrositler üzerindeki toksik etkisini açıklamaya çalışan, K kanal blokajı ve mitokondrial zedelenmeyi de içine alan çeşitli mekanizmalar ileri sürülmüştür. Lokal anesteziklerin mitokondrial zedelenmeyi artırdığı, ATP ve mitokondrial protein seviyesini azalttığı gösterilmiştir (9).

Yüksek konsantrasyondaki bupivakain için potent bir mitokondrial inhibitör denilenebilir. Mitokondrial kompozisyonlardaki farklılıklar veya respiratuar kararlı durum, farklı hücre tiplerinde farklı toksik etkileri gözlenen bupivakainin sensitivitesindeki farklılıkları açıklayabilir. Ayrıca mitokondriyal respiratuar zincirdeki kompleks I-IV ve sitrat sentaz aktivitesinin azalması ATP sentezinin azalmasına neden olmaktadır (44). Bupivakain, kaspaz-3,-8,-9'u aktive ederek reseptör veya mitokondri bağımlı apoptozis ile DNA fragmentasyonunda rol oynamaktadır. Bupivakain uygulamasından sonra prokaspaze-3 ve prokaspaze -9 düzeylerinin azaldığı, ısı şok proteini, C-jun ve C-gen gibi birçok apoptozis ile ilgilienlerinin ise ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir (45). Bupivakain maruziyetinden sonraki 1. haftada kıkırdak metabolizmasında azalma, 3 ay sonra ise artmış sülfat alımı ve yüksek proteoglikan içeriği ile karakterize artmış "anabolik aktivite" tespit edilmiştir. Bu çelişkili sonuç ise kıkırdak fonksiyonlarının uygulamadan sonra geçici olarak bozulduğunu düşündürmektedir (46).

2.2.9. Bupivakain (Marcaine®)

Bupivakain, 1957 yılında İsveç'te Ekenstan ve arkadaşları tarafından sentez edilmiş ve ilk kez 1963 yılında L.J. Telivuo tarafından klinik uygulamaya sokulmuştur. Bupivakain R(+) ve S(-) enantiomerlerinden oluşan bir rasemik ajandır. Bupivakain, amid yapılı uzun etkili bir lokal anestezik ajandır. Piperidin halkası üzerine butil grubu eklenmiştir

Kimyasal adı, "L-n-Butyl-DL-Piperidin 2-Carbonsaure 2-6 dimethylanilid"dir. Moleküler formülü; C₁₈H₂₈N₂O.HCl şeklindedir (5,28).



Şekil 4. Bupivakain

Farmakokinetik Özellikleri

Bupivakainin molekül ağırlığı 288, erime noktası 258°C, dissosiyasyon katsayısı (pKa) 8,1 partiyon katsayısı 27,5 olup, bupivakainin plazma klirensi 0.58 lt/dk, eliminasyon yarılanma süresi 2.7 saat ve hepatik ekskresyon oranı 0.40'tır. Başta α -1 asit glikoprotein olmak üzere plazma proteinlerine % 96 oranında bağlanır. Plasentayı kolaylıkla geçer. Plazma proteinlerine bağlanma oranı anneye göre fetüste daha düşüktür.

Farmakodinamik Özellikleri

Epidural aralığa enjeksiyon sonrası etkinin başlama süresi 5-7 dk, anestezinin yerleşmesi ise 15-20 dk içinde olmaktadır. Periferik sinir bloklarında 5-6 saat, epidural blokta 3,5-5 saate kadar anestezik etki sürmektedir. Spinal anestezide ise anestezik etkinlik 3-4 dk içinde başlamakta ve 3,5-4 saat devam etmektedir. Periferik sinir bloklarında % 0,5 konsantrasyonda 35 ml volümde tam motor blok sağlayabilmektedir. Obstetrik analjezi ve perine cerrahisinde epidural uygulama için %0,25 konsantrasyonunda, alt ekstremitte cerrahisinde % 0,5 konsantrasyonunda ve batin operasyonlarında ise % 0,75 konsantrasyonda 20 ml volüm olarak uygulanmaktadır (47).

Metabolik özellikleri

Amid yapıları olduğu için primer olarak kasda metabolize edilir. N-dealkalizasyona uğrar, ilacın çok küçük bir miktarı ise değişmeden idrarla atılır. Plazenta bariyerini pasif diffüzyonla geçer. Proteinlere yüksek oranda bağlanması nedeni ile plasental diffüzyonu da düşüktür. Fetus üzerindeki etkilerine ait kesin sonuçlar bildirilmemiştir (47).

Etki Mekanizması

Uyarılabilir hücre membranlarında Na⁺ kanallarının açılmasını engelleyerek hücre içine yönelik hızlı Na⁺ akımını doza bağlı bir şekilde azaltır. Doza bağlı olarak kalpte Na⁺ kanallarını bloke ederek aksiyon potansiyelini uzatır ve miyokardın kontraksiyonunu deprese eder. Bu etki, bupivakainde diğerlerine göre daha belirgindir (28).

Anestezik Etkisi

Bupivakain yaklaşık olarak lidokain ve mepivakainden 3-4 kat, prokainden ise 8 kat daha potent olup etki süresi mepivakainden ve lidokainden 2-3 kat daha uzundur. Uzun etki süresine karşın, motor blok yapıcı etkisinden daha fazla olarak, duysal blok meydana getirmektedir. Bu özelliğinden dolayı doğum analjezisi ve postoperatif analjezide popüler bir ajan haline gelmiştir. Bupivakain; rejonel intravenöz anestezi (RİVA), presakral ve paraservikal bloklar içinde uygun değildir (28,47).

Sistemik Toksisite

Aşırı dozun neden olduğu yüksek plazma yoğunlukları, hızlı absorpsiyon ve en sık olarak da yanlışlıkla damar içi enjeksiyon sonucu ortaya çıkar. Bupivakainin toksik doz konsantrasyonu 4-5 µg/ml olup total dozu 2-2,5 mg/kg'ı geçmemelidir. Maksimum önerilen doz erişkin hasta için 200 mg'dır, eğer adrenalin eklenirse 250 mg geçmemelidir. Tekrarlanan dozlar ilk dozun yarısı veya ¼ ü kadar tekrarlanabilir, fakat 24 saatte maksimum 400 mg'ı geçmemelidir. Kan tablosunda bir değişiklik yapmaz, methemoglobinemiye sebep olmaz. Sistemik toksik etkisi KVS ve SSS üzerine olmaktadır (47).

Bupivakainin R ve S olmak üzere iki izomeri mevcuttur. R izomeri, S izomerine oranla A-V iletim zamanını daha belirgin şekilde uzattığı gibi, hem Na⁺ hemde K⁺ kanallarını inhibisyonunda daha potenttir. Kardiyak miyositlerde intrasellüler Ca⁺⁺ artışından sorumlu olan sarkoplazmik retikulumdan Ca⁺⁺ salınımında, R izomerinden daha potent izomer olan S izomeri için stero-selektivite gösterir. Bu durum S izomer için azalmış toksisitesini açıklamaktadır. Stero-selektivite ve lipofilik özellik lokal anesteziklerin miyotoksitesinde patogeneizde önemli risk taşımaktadır. Rasemik bupivakain doku hasarını daha belirgin yapmaktadır (48). Ayrıca bupivakainin olumsuz kardiyak

etkilerinin, Ca^{++} kanalları ve intrasellüler Ca^{++} akımı ile etkileşimine ve mitokondrilerde ATP sentezi üzerine olan etkilerine bağlı olduğu bulunmuştur (5).

Santral Sinir Sistemine Etkileri

Bupivakain ile oluşan SSS toksisitesinde, diğer lokal anesteziklerdeki gibi başlangıçta serebral kortekste inhibitör yollar ve sonra tüm sistemler deprese olduğundan belirtiler önce stimülasyon daha sonra depresyonla karakterizedir. Kortikal uyarılma ile heyecan, huzursuzluk, baş ağrısı, baş dönmesi, kulaklarda uğultu, nistagmus, ağız çevresinde ve dilde uyuşma, titreme ve kas seyirmeleri daha sonra da konvülsiyon gelişir. Medüller merkezin uyarılmasıyla arter kan basıncı, kalp atım hızı ve solunum sayısında artma ve ritminde değişiklik, bulantı kusma görülür. Depresyon belirtileri olarak da oryantasyon bozukluğu, sedasyon, bilinç kaybı, arteriyel kan basıncında düşme, kalp atım hızında azalma veya durma ve apne gelişir (28,47).

Kardiyovasküler Sisteme Etkileri

Kardiyotoksiste, muhtemelen hem doğrudan hem dolaylı kardiyak etkilerinin sonucudur. Doğrudan etkileriyle kardiyak debide azalma, hipotansiyon, kardiyak arreste yol açabilecek ventriküler taşikardi ve kalp bloğu göstergesi olan EKG değişikliklerini de içeren kardiyotoksiste oluşur. Dolaylı etkiler sempatik kardiyak innervasyonun blokajını veya diğer SSS ile ilgili mekanizmaları içerebilir. Miyokardiyal Na^{+} kanallarının blokajı, iletim gecikmesine ve QRS uzamasına yol açar. Bupivakainin kardiyotoksitesi, yüksek lipofilik özelliğine ve miyokard Na^{+} kanallarına karşı yüksek afinitesine bağlıdır. Yüksek dozda hızlı veya ven içine yanlışlıkla enjeksiyon yapıldığında; önce atriyoventriküler ileti yavaşlar. EKG’de QRS kompleksinde genişleme, hipotansiyon, bradikardi gelişebilir ve oldukça sık olarak ventriküler taşikardi, ventriküler fibrilasyon sonrası asistoli görülebilir. Bupivakain ile oluşan kardiyotoksiste resüsitasyona kolay cevap vermemektedir. Asidoz, hipoksemi ve hiperkapni bupivakainin kardiyotoksitesini potansiyelize etmektedir (28,47). Lokal anesteziyelere bağlı kardiyovasküler kollapstan etkilenen hastaların resüsitasyonu konusunda ümit verici bir gelişme olan İntravenöz Lipid Emülsiyonu (IVLE) kullanımı hızla yaygınlaşmaktadır (49).

Kıkırdak Dokusu Üzerine Etkileri

Tek başına veya diğer ilaçlarla birlikte kullanılan lokal anesteziyelere uzun süre maruz kalan eklem kondrosit hücrelerinde potansiyel olarak hasar oluştuğuna dair son yıllarda artan sayıda olgu raporları, bu tekniğe ait kaygıların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu bağlamda, yapılan hayvan deneyleri, lokal anesteziyelerin özellikle de bupivakainin doz ve zaman bağımlı olarak kondrotoksik olduğunu, özellikle epinefrin ile birlikte uygulanmasının bu toksisiteyi çok daha fazla arttırdığını göstermiştir (40).

İn vivo tavşan modelinde tek sefer intraartiküler %0,5 konsantrasyonda bupivakain enjeksiyonundan 10 gün sonra eklem kıkırdağında inflamasyona ait histolojik kanıtlar gösterilmiştir (50).

Domuz eklem kıkırdağında %0,5 bupivakainin etkilerini gösteren diğer bir in vivo çalışmada ise 3 günlük çalışma süresi boyunca proteoglikan sentezinin geçici olarak baskılandığını göstermişlerdir (51).

Chu ve ark. (42) in vitro model kullanarak hem hücre kültüründe, hem de osteokondral eksplantlarda bupivakain maruziyetinin etkilerini araştırmışlardır. Gomoll ve ark. (52) ise tavşan omuz modelinde glenohumeral ekleme yerleştirilen bir kateter aracılığı ile 48 saat boyunca bupivakain infüzyonu uyguladıkları in vivo çalışmalarının sonuçlarını yayınlamışlardır. Her iki çalışma da kondrosit ölümü ve azalmış kıkırdak metabolizması ile karakterize kondrotoksisite varlığını ortaya koymayı başarmıştır.

Tavşan omuz modelinde, erken dönemde gözlenen kondrotoksisitenin geçici olup olmadığını veya eklem kıkırdağında aşikâr ve kalıcı değişiklikler yaratıp yaratmadığını uzun dönem takipler sonrasında ortaya koymayı hedefleyen in vivo bir başka çalışmada intraartiküler bupivakain infüzyonunun uygulamadan 3 ay sonra kıkırdak fonksiyonunda kalıcı herhangi bir değişikliğe neden olmadığını ortaya koymuştur. Diğer taraftan, bupivakaine maruz kalmış kıkırdakta karşı taraf veya salin uygulanmış eklem ile kıyaslandığında artmış sülfat alımı ve yüksek proteoglikan içeriği ile karakterize artmış "anabolik aktivite" tespit edilmiştir. Bu çelişkili sonuçlar deneysel modellerde kıkırdak fonksiyonunun bupivakain maruziyetinden sonra geçici olarak bozulduğunu göstermektedir.

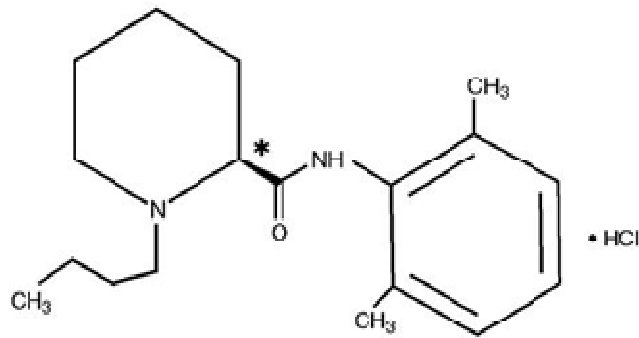
Bupivakain maruziyetinden sonraki 1. haftada kıkırdak metabolizmasında azalma olmakta ancak 3 ay sonra kıkırdak metabolizması yalnızca düzelmekle kalmayıp aynı zamanda artmaktadır. Bu sonucun muhtemel açıklaması ise 3. ayda artmış olan proteoglikan sentezinin zararlı uyaranlara karşılık onarıcı bir yanıt oluşturmuş olabileceğidir (46).

Fizyolojik bir model kullanarak insan kondrosit canlılığı üzerine ağrı pompası aracılığı ile uygulanan epinefrinli lidokain ve bupivakainin etkilerini değerlendirmek üzere tasarlanan bir başka çalışmada, uygulamadan sonraki 24, 48 ve 72. saatlerde epinefrin içeren lokal anesteziyelere maruz kalan kültürlerde kondrosit canlılığında belirgin düzeyde azalma tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında epinefrinli lidokainin en yüksek oranda nekroza neden olduğu ortaya koyulmuştur. Bu deneysel çalışma süresi boyunca %1 lidokain uygulanan kültürlerde kondrosit canlılığının çok az miktarda değiştiği ancak 48. saatte istatistiksel açıdan anlamlı düzeye ulaştığı ortaya koyulmuştur. Kontrol grupları ile kıyaslandığında 48 saate kadar %0.25 ile %0,5'lik bupivakainin kondrosit canlılığı üzerine minimal etkisi olduğu ancak 72 saat boyunca kullanılan %0,5'lik bupivakainin ve epinefrin içeren tüm medikasyonların belirgin oranda hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir (53).

2.2.10. Levobupivakain (Chirocaine®)

Levobupivakain, ülkemizde en son kullanıma sunulan bupivakain hidrokloridin saf S(-) enantiomeri olan uzun etkili aminoamid yapıda bir lokal anesteziktir (6,54).

Kimyasal adı , “S-1 butil, 2-piperidil, farmo 2',6' xy lipid hidroklorid” dir. Molekül formülü; C₁₈H₂₈N₂O' şeklindedir (6).



Şekil 5. Levobupivakain

Farmakokinetik Özellikleri

Levobupivakainin plazma konsantrasyonu, doza ve uygulama yoluna bağlı olup, uygulama yerindeki emilimi, dokunun vasküleritesiyle ilişkilidir. Levobupivakainin % 0,5 veya % 0,75'lik konsantrasyonlarından 15 ml' nin epidural enjeksiyonu sonrasında pik plazma konsantrasyonları sırasıyla 0,582 ve 0,8-1 mg/L iken, bu konsantrasyonlara 0,37 ve 0,29 saatte ulaşıldığı bildirilmiştir (6,54).

Levobupivakain yüksek (%97), oranda plazma proteinlerine bağlanır, ortalama yarılanma ömrü 1,4 saattir. Total plazma klirensi intravenöz infüzyondan 8 dk sonra 39 L/saattir. İnfüzyondan 15 dk sonra eliminasyon yarı ömrü 2,06 saattir (6,54).

Metabolizması

Levobupivakainin ana metaboliti olan 3-hidroksi levobupivakain, glukuronik asid ve sülfat ester konjugatlara çevrilerek idrarla atılır. Levobupivakain, sitokrom p450 (CYP) sisteminin CYP1A2 ve CYP3A4 izoformları tarafından metabolize edilir (6,54).

Etki Mekanizması

Levobupivakain, nöronal membranlarda voltaj-duyarlı iyon kanallarının blokajıyla sinir impulslarının geçişini önleyerek etki gösterir. Na⁺ kanallarını açılmasını önleyerek, lokalize ve geri dönüşlü anestezi oluşturur (6,54).

Farmakodinamik Özellikleri

Levobupivakain rasemik bupivakainin S(-) izomeri olan amid tipte uzun etkili bir lokal anestetik olup bupivakaine benzer farmakodinamik özellikler gösterir. Toksik dozlarda erişilen kan konsantrasyonlarında kalpte iletim bozukluğu, eksitabilite, kontraktile ve periferik vasküler dirençte değişimler yaptığı bildirilmiştir. Genelde invitro, invivo ve gönüllülerdeki sinir blokaj çalışmalarında levobupivakainin potensinin bupivakain kadar olduğu, benzer duyuşal ve motor blok oluşturduğu gösterilmiştir (6,54).

Terapötik uygulamayı takiben, levobupivakainin plazma konsantrasyonu, doza ve uygulama yoluna bağlı olup uygulama yerindeki emilim, dokunun vasküleritesi ile ilgilidir.

Kardiyovasküler Sisteme Etkileri

Yapılan hayvan çalışmaları bupivakainden daha az toksik etkiye sahip olduğu, QRS genişlemesi ve aritmi görülme sıklığının daha düşük olduğu gösterilmiştir (55). İzole perfüze tavşan kalpleriyle yapılan çalışmalarda, levobupivakainin bupivakainden daha az kardiyotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (54).

Santral Sinir Sistemine Etkileri

Levobupivakainin ortalama konvulzif dozu bupivakaine göre daha yüksektir. SSS uyarı bulguları bupivakain ile daha geç başlar ve daha uzun sürer. Levobupivakainin SSS yan etkilerinin daha az olduğu gösterilmiştir (55). Hayvan çalışmaları konvülziyon ve apne oluşturma olasılığının daha düşük olduğu gösterilmiştir. Levopubivakainin vazokonstriktör etkisinin daha çok oluşu, ortaya çıkan duyusal bloğu daha uzun sürmesini ve SSS toksisitesinin daha düşük olmasını açıklamaktadır (6,55).

2.3. KIKIRDAK DOKUDA LOKAL ANESTEZİKLERE BAĞLI SUBSELLÜLER DEĞİŞİKLİKLER VE İNCELENME YÖNTEMLERİ

2.3.1. Apoptozis

Çok hücreli organizmalarda hücre bölünmesiyle artan hücre sayısı hücre ölümleriyle dengelenir. Eğer bir organizmada bir hücreye artık gereksinim duyulmuyorsa, hücre içi haberci sistemler aktive edilerek o hücrenin intihar süreci başlatılır. Bu intihar süreci Yunanca'da yaprak dökümü anlamına gelen apoptoz ya da programlı hücre ölümüyle gerçekleşir. Hücre ölümleri fizyolojik şartlarda meydana geldiği için bu ölüm şekli fizyolojik hücre ölümü (physiological cell death) olarak da adlandırılır. Canlının başarılı bir organ gelişimini sağlayabilmesi embriyonik gelişim sırasında gerçekleşen hücre ölümlerine bağlıdır. Apoptoz; gelişim, dokularda hücre popülasyonunun korunması ve yaşlanma gibi hemostatik bir mekanizmanın sağlanması amacıyla fizyolojik olarak meydana gelir. Bunun yanında apoptozis hücreler, hastalıklar veya çeşitli ajanlar tarafından zarar gördüğünde veya immunolojik reaksiyonlarda koruyucu bir mekanizma olarak ortaya çıkar. Apoptotik hücreler organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmakta ve ömür boyu devam etmektedir. Böylece ölüm (apoptoz) ve yeniden yapım (mitoz) bu dokularda doku homeostazisini korumak adına dinamik bir denge halinde sürekli devam eder (56).

Apoptotik Hücrede Gözlenen Değişiklikler;

Apoptoz için sinyal alındıktan sonra hücrede birçok biyokimyasal ve morfolojik değişim gözlenir. Hücre küçülmeye ve kondanse olmaya başlar, hücre iskeleti dağılır ve çekirdek zarı yer yer erirken çekirdek DNA'sı da parçalara ayrılır (57).

Apoptoza uğrayan bir hücrede laminin ve aktin filamentlerinin parçalanması sonucu sitoplâzma çekilmeye ve küçülmeye başlar. Kromatin ve çekirdekte bulunan yapısal proteinlerin parçalanması sonucu çekirdekte kondensasyon başlar ve çoğu zaman çekirdek, kromatinin çekirdek membranının iç yüzüne yerleşmesi nedeniyle at nalı biçiminde görülür. Hücre büzülmeye ve küçülmeye devam ederek makrofajların tanıyabileceği ve normal hücrelerden daha kolay ayırt edilebileceği membranla çevrili küçük parçalara ayrılır. İçlerinde sitoplâzma, sıkıca paketlenmiş organeller ve hatta çekirdek parçaları da mevcut olan apoptotik cisimler meydana gelir (56,58,59). Çekirdekte hücre gibi büzüşür ve bazen membranla sarılı birkaç parçaya ayrılabilir. Nüklear porlar kromatinin membrana komşu olmadığı bölgelerde yoğunlaşırlar (58).

Apoptoz sırasında apoptotik hücrelerin membranlarında da değişiklikler olur. En belirgin değişiklik normalde hücre membranının sitoplazmik yüzeyinde yer alan negatif yüklü fosfatidilserin birimlerinin hücre membranının dış yüzeyine çıkmasıdır. Bunun sonucu olarak kollektin (C1q) adı verilen çeşitli proteinler apoptotik hücre zarına bağlanmaktadır. Normalde hücre zarında gizlenmiş olan N-asetil glikozamin ve N,N-diasetilşitabroz molekülleride apoptoz sırasında açığa çıkarlar ve makrofajlar tarafından tanınırlar (59). Apoptotik hücrelerde görülen morfolojik membran değişikliklerinden biri de hücre içeriklerini içerisine alan ve membranla çevrili veziküller biçiminde apoptotik hücrelerden kopan tomurcuklardır. Bu küçük tomurcuklar apoptotik cisim olarak da adlandırılırlar. Hücrelerdeki bu değişiklikler apoptotik sürecin sonlarına doğru görülür (56).

Apoptozun en belirgin özelliği hücre içi Ca ve Mg bağımlı endojen endonükleaz enziminin aktivasyonu ile kromozomal DNA'nın nükleozomal birimlere parçalanmasıdır. Apoptotik hücrelerin DNA'sı agaroz jel elektroforezinde merdiven basamağına benzer (ladder formasyonu) bir yapı biçiminde görülür. Bu, apoptoz için tipik bir görünüm sağlar (56). Fragmentasyon apoptotik hücrelerde CAD (caspase activated DNaz-kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz) enzimi tarafından DNA'nın

nükleozom birimlerine ayrılmasıyla sağlanır. CAD normal hücrelerde ICAD'a (inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease-kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü- DNA fragmentasyon faktör 45) bağlı inaktif formda bulunur ancak apoptoz sinyali alan hücrelerde kaspaz 3 tarafından aktive edilir ve bu enzim DNaz (endonükleaz) olduğu için çekirdek DNA'sının süratle 180–200 baz çiftlik nükleozomal fragmanlara ayrılmasını sağlar (56).

Bu değişikliklerin yanı sıra erken dönemde apoptotik hücreler üzerinde gelişen cepcikler (blebs) izlenebilir. Ayrıca, hücrelerin sitoplâzmasında ortaya çıkan vakuoller ile bazı hücre tiplerinde "blister" olarak adlandırılan hücrenin sitoplâzmasından dışarıya taşar gibi görülen bir veya birkaç tane büyük vakuol de gözlenebilir. Bu vakuoller (hayalet hücre - ghost cell) hücreden ayrılarak besiyeri içerisinde yüzebilirler (60).

Hücre Ölümünün Morfolojisi

Sitoplâzma Değişiklikleri

- a. Eozinofili artışı (asitlik artar) olur.
- b. Hücre içi protein yapısı bozulur.
- c. Sitoplazmik RNA miktarı (bazofili) azalır.
- d. Sitoplazmada vakuolizasyon olur.
- e. Hücre içi organellerin parçalanması görülür.

Çekirdek Değişiklikleri

Karyoliz: Piknotik çekirdeğin parçalanmasıdır. 1–2 gün içinde çekirdek tamamen ortadan kaybolur. DNAaz aktivitesi artar. Çekirdek bazofilisi ise azalır.

Piknoz: Çekirdeğin büzüşmesi ya da DNA'nın parçalanmasıyla oluşan DNA fragmentlerinin, difüzyonla çekirdek dışına çıkmasıyla gerçekleşen bir çekirdek değişimidir. Kromatinin yoğunlaşması da belirgin olarak görülür.

Karyoreksis: Piknotik veya kısmen piknotik çekirdeğin parçalanmasıdır (61,62).

Apoptozisin Mekanizmaları

Hücrenin kendi genlerinin otomatik aktivasyonu veya çevreden gelen sinyallerle apoptozis başlamaktadır (63). Apoptozis önceden hazır olan hücrelerde, primer olarak ya da bir uyaran sonucu sekonder olarak gelişir. Hücre dışı uyaranlar arasında; tümör nekroz faktörü (TNF), koloni uyarıcı faktörler (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) (64) ve IL-2 gibi maddelerin ortamda azalması ile birlikte radyasyon, glukokortikoidler, ilaçlar ve çeşitli antijenler yer alır. Otoimmün hastalık gelişimin de rolü olduğu belirtilen Fas/FasL (65), sFas proteinleri ile virüsler de (HIV gp120 proteini, influenza virüsü TNF reseptörü üzerinden; adenovirüs ise hücrenin genetik yapısını bozarak hücreyi apoptozise götürmektedir (63).

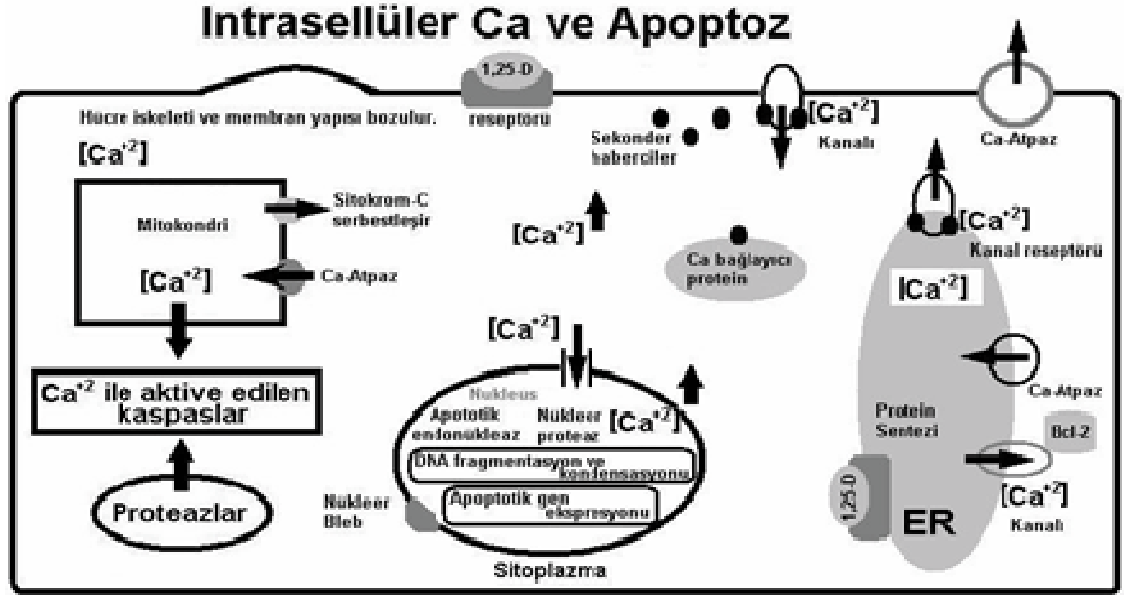
Organizmada apoptozisi uyaran veya engelleyen çok sayıda gen bulunmaktadır (64).

Tablo 3. Apoptozis ve Genler (64).

Apoptozisi baskılayan genler	Apoptozisi indükleyen genler
– Bcl-2 grubundan; BHRL-1, bcl-xl, bcl-w, bfl-1, brag-1, mcl-1, A1 – c-abl geni – ras onkogeni – çözünebilir fas – p35 – A20	– Bcl-2 grubundan; Bad, Bax, Bak, Bcl-xS, bid, bik, Hrk1 – c-myc – p53, p21 – fas 8CD95/APO1) FADD/MORT, RIP, FAST – interlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (İCE) – LOH (MTS1/CDK41)

Apoptozisi etkileyen hücre içi uyaranlar arasında sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarında artış, TNF, DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpressör gen olan p53'ün aktive olması, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar, glukokortikoidler ve onkojenlerin (cmec gibi) yer aldığı bilinmektedir. Ayrıca hipertermi, radyasyon, sitotoksik antikanser ilaçları ve hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler de hafif dozlarda apoptoz meydana getirirler. Apoptozda hücre ölümü çevreye rahatsızlık vermeksizin gelişse de bazen

apoptozis dolaylı olarak çevre dokularda nekrozu başlatabilir ya da tam tersi nekroz apoptozis gelişmesine yol açabilir (58).



Şekil 6. Apoptoz esnasında Ca iyonunun rolünü göstermektedir (66).

Apoptozis süreci;

Apoptozis süreci, DNA hasarına genlerin yanıtı, hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınması (Fas ligandı) veya hücreye doğrudan proteolitik enzim girişi (granzim) olmak üzere üç farklı şekilde işleyebilir. Apoptoz sürecinde belli başlı üç anahtar bileşen vardır. Bunlar; Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) proteinidir. Bu bileşenlerin biyokimyasal aktivasyonu, apoptozda gözlenen mitokondrial hasar, çekirdek zarı erimesi, DNA fragmentasyonu, kromatinin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişikliklerden sorumludur. Günümüzde apoptoz sürecinde rolü olan biyokimyasal ve genetik komponentlerin aydınlatılmasıyla birlikte apoptozun aktivasyonuna ya da inhibisyonuna yönelik çalışmalar; kanser, AIDS ve otoimmün bozukluklar gibi birçok hastalıkta yeni tedavi olanaklarını gündeme getirmektedir (67).

Apoptozun Regülasyonu;

Apoptozisin regülasyonu Bcl-2 / Bax gen ailesi ile sağlanır. Bu ailenin yaklaşık 20 üyesi tanımlanmıştır; bunlardan bazıları apoptozu inhibe ederken (antiapoptotik genler), bazıları da apoptozisi uyarır (proapoptotik genler). Apoptotik sinyalin alınmasından sonra Bax (proapoptotik) proteinleri, mitokondri zarının iyon geçirgenliğini (permeabilitesini) azaltabilir. Zardaki bu değişiklikler nedeniyle sitokrom c ve AIF (Apoptosis Inducing Factor) gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplâzmaya geçerler. AIF doğrudan yoğunlaşan kromatine ve parçalanan çekirdeğe yönelirken, sitoplazmaki sitokrom c apoptozun en son basamağında görev alır. Sitokrom c bir sitoplâzma proteini olan Apaf-1'e bağlanarak prokaspaz-9'u aktive eder ve oluşan bu yapı 'apoptosom' olarak isimlendirilir. Prokaspaz-9'un aktivasyonu, bir seri kaspaz aktivasyonunu da başlatır (67).

Apoptozisin İndüklenmesi;

Apoptosis hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (diğer isimleriyle APO-1 CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü -1 (TNFR-1)'in ilgili ligandları ile etkileşime girmesi (uyarılmalari) sonucu indüklenir. Bu hücre yüzey reseptörleri, hücre membranında bulunur ve TNFR ailesinin üyesidirler (68). Fas lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, akciğerlerde, hatta miyokard da bulunurlar. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri adı verilen TRADD (TNFR-1 associated death domain) ve FADD (Fas associated death domain) ile interaksiyona girerler. Böylece ölüm bölgeleri prokaspaz 8'i aktifleştirerek kaspazların kaskad tarzında aktivasyonlarını başlatırlar (65).

2.3.2. Apoptosis ve Nekrosis Arasındaki Farklar

- Nekroz fizyolojik bir ölüm şekli değilken apoptosis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir.
- Nekrosis de hücre şişerken apoptotik hücre tam tersine küçülür. Nekrosis de kromatin patterni hemen hemen normaldir.

- Apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır ve yoğunlaşır. Apoptozisin en önemli özgün yönü DNA'nın internükleozomal bölgelerden parçalanmasıdır.
- Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder. Apoptotik hücre membranı ise sağlamdır.
- Nekrotik hücre sonradan lizise uğrarken apoptik hücre küçük cisimciklere parçalanır.
- Nekroziste inflamasyon uyarılırken apoptoziste inflamasyon oluşmaz (69).

2.3.3. Kondrositlerde Apoptozis Mekanizması

Kondrositler yaşamlarının devamı için aderansal iletişime ihtiyaç duyan hücrelerdir. Hücrelerin birbirine olan teması, bir hücreden diğerine yaşamsal sinyallerin aktarılmasını sağlar. Bu yaşamsal sinyaller ise ECM'in spesifik komponentleri ile sağlanır, örneğin, ECM'nin bir komponenti olan Tip 2 kollajenin yokluğunda kondrositlerin kondanse ve fragmente bir nükleusa sahip oldukları görülür. Kondrositlerin fibronektine tutunması proteoglikan sentezini artırır. FGF ve IGF'ün proteoglikan sentezini artırması fibronektinin kondrosite tutunmasına bağlıdır. NO kondrositlerin fibronektine tutunmasını inhibe ederek proteoglikan sentezini azaltır. NO donörlerinden kaynaklanan ekzojen NO ve endojen stokin bağımlı NO lerin makrofajlarda, timositlerde, osteoblastlarda ve pankreatik hücrelerde apoptozisi indüklediği gösterilmiştir. Buna karşın hipoksantin /ksantin oksidaz kaynaklı oksijen radikalleri nekroza yol açarken apoptozisi indüklemeyiz. Kondrosit yaşamına etkisi tam çalışılmamış olsada IGF-1 diğer hücre tiplerinde apoptozisi inhibe eder.

Kondrosit ölümüne neden olan iki kondrosit özelliği vardır.

1. Kartilaj dokuda mononükleer fagosit hücreler bulunmaz buda ölü hücre kalıntılarının birikmesine, kıkırdak matriks yapısının etkilenmesine ve hatta sağlam kondrosit fonksiyonlarının bozulmasına neden olur.
2. Kartilaj dokuda mezenşimal kök hücre bulunmaz. Bu nedenle ölü kondrositlerin bulunduğu alanlar ya hiç doldurulamaz veya çok yavaş doldurulur. Buda kondrositlerin ECM sentezlemesini ve tamir yeteneğini bozar.

Kondrosit apoptozisi 4 haftadan daha kısa sürede gerçekleşir. Apoptotik kondrositler elektron mikroskopisinde düzensiz sitoplazmik membran, multb kabarcıklanmalar ve membranla kaplı hücre kalıntıları şeklinde görülürler. Kondrositler etrafında periselüler matriks yoktur ve ECM den ayrılmıştır. Proteoglikan boyanmasında azalmıştır. Apoptptik cisimler ATP hidrolizi ile pirofosfat üretilip Ca'u mobilize ederek kalsiyum-fosfat kristallerinin eklemlerde birikip çökmesine neden olur. Kıkırdak doku fagositik hücre içermediğinden apoptotik cisimler ortamda kalır, buda kondrositlerin ECM sentezlerini ve tamir yeteneğini bozar (70).

2.3.4. Apoptozisi Belirleme Yöntemleri

Apoptotik indeks, apoptotik hücre sayısının yaşayabilir hücrelere oranı ile belirlenmektedir. Bunun için öncelikle apoptozun hücrelerde görünür hale getirilerek belirlenmesi gerekir. Bu amaçla çeşitli morfolojik ve biyokimyasal yöntemler geliştirilmiştir.

Hücrede apoptozu belirlemek için kullanılan yöntemler aşağıdaki gibi sınıflandırılır (61).

A- Hücrede Apoptozu Belirleme Yöntemleri:

1. Elektron mikroskopi
2. DNA Ladder
3. Tunel Tekniği
4. FACS Analizleri
5. MTT Yöntemi
6. Annexin Yöntemi

B- Proapoptotik ve Antiapoptotik Gen Ürünlerinin Ölçümü:

1. İmmünohistokimya yöntemler
2. İmmünoiblot yöntemi

3. Semi-kantitatif mRNA analizleri

4. RNaz üretim metodu

5. Fas Analizi

6. Fas Ligand Analizi

7. TRAİL/TRAİL R Analizi

8. Bcl-2 Üretimi

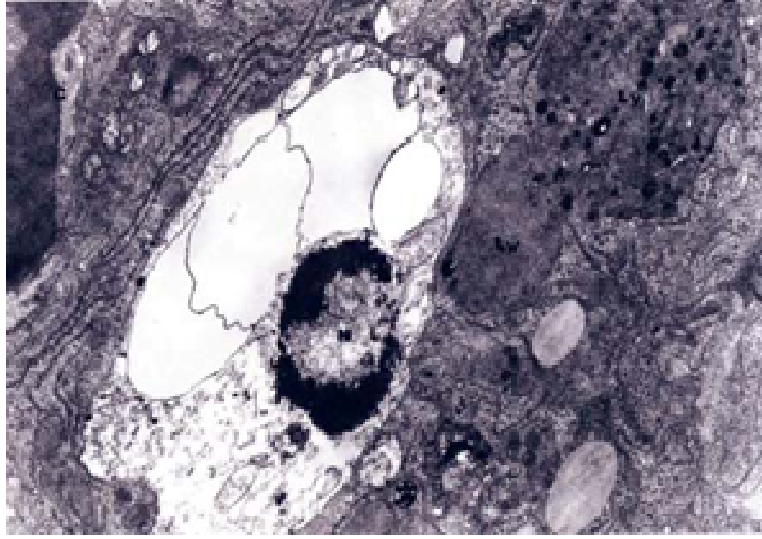
9. Bcl-XL Üretimi

10. Kaspaslar

11. Sitotoksosite (61).

1. Elektron Mikroskopi

Alınan hücreler sırasıyla gluteraldehit ve osmium tetraoksitle fiske edilir. Örnekler daha sonra dereceli alkol ya da aseton serilerinden geçirilir, propilen oksitle yıkanır ve Epon-resinle bloklanır. Alınan 50-80 nm kalınlığında kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanır. Gözlenen hücrelerdeki yoğunlaşmış ve küçülmüş çekirdekler apoptozun karakteristik özellikleridir (71). Aşağıdaki şekilde apoptotik bir hücrenin elektron mikroskopik görünümü izlenmektedir (Resim 3).

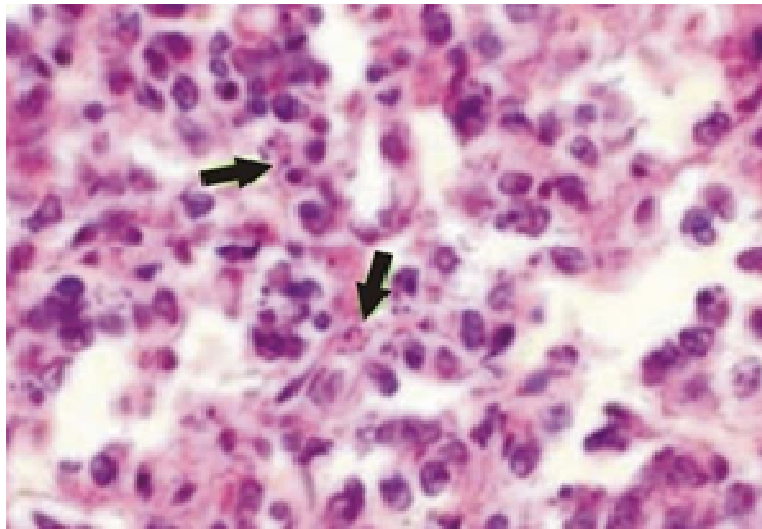


Resim 3: Elektron mikroskobu altında apoptotik bir hücre görülmektedir.

N; nükleusu simgelemektedir (62).

Hematoksilen-eozin boyama

Hematoksilen-eozin (HE) ile boyanan preparatlar ışık mikroskobu ile incelenir. HE hem hücre kültürü çalışmalarında hem de doku boyamalarında kolaylıkla kullanılabilir. HE boyamada, hematoksilen boyası kromatini boyadığından apoptotik hücreler nükleus morfolojisine göre değerlendirilir. Gözlenebilen değişiklikler: hücre küçülmesi veya sitoplazmik küçülme, kromatinin kondanse olması ve nükleus zarının etrafında toplanması, nükleusun küçülmesi veya parçalara bölünmesidir (58, 60) (Resim 4).



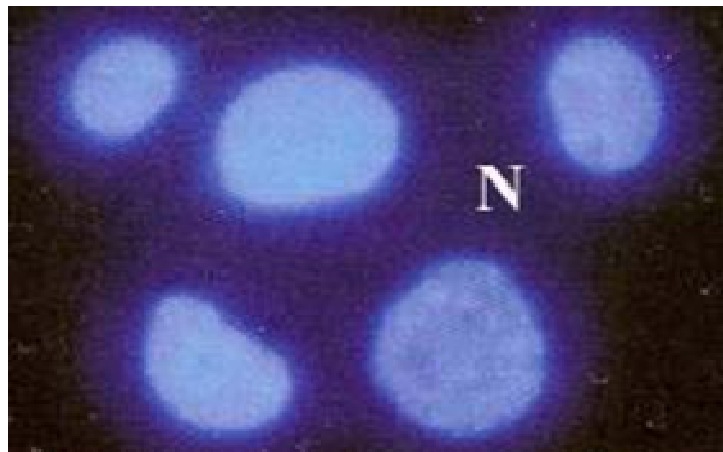
Resim 4. Apoptotik hücreler (oklar) (HE boyama) (72).

Giemsa boyama

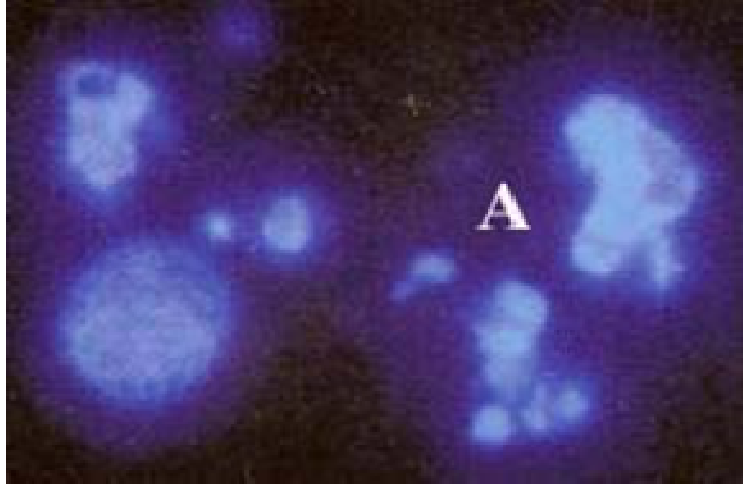
Giemsa ile boyamada, hematoksilen-eozin ile boyamada olduğu gibi nukleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır. Sitoplâzma sınırları hematoksilen boyamaya göre daha iyi seçilebilmekle birlikte hematoksilen boyamaya belirgin bir üstünlüğü yoktur (73).

2. Floresan mikroskopi

Floresan mikroskopi, floresan maddelerin (örn. Hoechst boyası, DAPI “4,6-diamidine-2’-phenylindole”, propidium iyodür, akridin orange, etidyum bromür, FITC “fluorescein isothiocyanate”) kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir. Floresan boyalar DNA’ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nukleusu görünür hale gelebilir. Hücre kültürü çalışmasında kullanılırlarsa, canlı hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına olanak tanır. Canlı ve ölü hücre ayırımı yapabilmek için, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen bir boya (örn. Hoechst boyası) ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya (örn. Propidium iyodür) beraber kullanılır. Membranı sağlam olan (canlı) hücreler, propidium iyodür gibi sadece membran bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücreleri boyayan bir madde ile boyanmazlarken, ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen Hoechst boyası ile boyanırlar. Kuşkusuz, bu yöntemle hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilir ama ölü hücrelerin apoptozla veya nekroz ile ölüp ölmediklerinin ayırımı, hematoksilen boyamada olduğu gibi nukleus morfolojisine bakılarak yapılır. Kromatin kondensasyonu veya nukleus fragmentasyonu olan hücrelerin apoptotik hücreler olduklarını düşündürür (60,73). (Resim 5, 6)



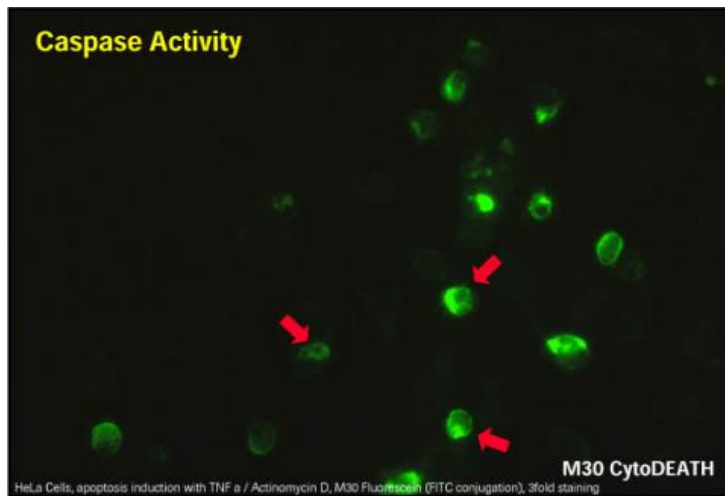
Resim 5. N, Normal hücreler- Hoechst boyama (74).



Resim 6. A, Apoptotik hücreler- Hoechst boyama (74).

3. TUNEL yöntemi

DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar (73). Apoptotik parçalanma sonucu DNA uçları, DNA polimeraz veya Klenow fragmenti kullanılarak işaretlenebilmektedir. Ancak terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak yapılan işaretleme göreceli olarak daha duyarlı bir yöntem olarak bulunmuştur. Konvansiyonel parafin kesitleri, TdT ve nonizotopik işaretli nükleotidler (sıklıkla biyotinli dUTP) kullanılarak yapılan in situ işaretlemenin ardından floresan veya enzimatik görüntüleme, apoptotik hücreleri diğerlerinden ayırmada yeterli olmaktadır. Bu yöntem yaygın olarak “TdT-dUTP nick-end-labelling” sözcüklerinin kısaltılması olan “TUNEL” yöntemi adıyla anılmaktadır (56,75). (Resim 7)



Resim 7. TUNEL ile boyanmış apoptotik hücreler

3. MATERİYAL ve METOD

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM) ve Erciyes Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapılmıştır. Tüm işlemler Uluslararası Hayvan Hakları Evrensel Beyannamesine uygun olarak, Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun onayı (Tarih 08.02.2012 No: 12/30) alındıktan sonra veteriner hekim kontrolünde gerçekleştirilmiştir. Bu proje Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (TSU-12-3958).

3.1. DENEYSEL ÇALIŞMANIN YAPILIŞI

Çalışma, DEKAM laboratuvarlarında yetiştirilen ve ağırlıkları $2,0 \pm 0,2$ kg arasında değişen dişi cins Yeni Zelanda türü 40 tavşan kullanılarak gerçekleştirildi. Denekler her biri 20 tavşandan oluşan rastgele 2 gruba ayrıldı. İntraartiküler enjeksiyon, 6 saatlik açlıktan sonra intramüsküler ketamin hidroklorid (10mg/kg Ketalar®; Eczacıbaşı Warner Lambert, İstanbul, Türkiye) ile anestezi uygulandıktan ve aseptik koşullar sağlandıktan sonra 38 G insülin enjektörü (Hayat G *38-50 mm. Hayat Tıbbi Aletler, İstanbul, Türkiye) kullanılarak gerçekleştirildi. Birinci gruptaki hayvanların (Grup L) sol arka diz eklemine %0.5 konsantrasyonda ve 0.25 mL volümde levobupivakain, ikinci gruptaki hayvanların (Grup B) sol arka diz eklemine ise aynı konsantrasyon ve volümde bupivakain enjekte edildi. Kontrol Grubu (Grup SF) için, her iki gruptan yeterli sayıda tavşanın sağ arka diz eklemine yine aynı yöntemle, 0.25 mL volümde %0,9 normal salin enjekte edildi.

Enjeksiyonları yapıldıktan sonra tavşanların bakımı, ayrı kafeslerde, aynı odada, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde, ortam ısısı ve beslenme rejimleri aynı olmak kaydıyla, optimum yaşam koşulları sağlanarak gerçekleştirildi.

Her bir gruptan rastgele seçilen 10 tavşan 7. günde, kalan 10 tavşan ise 28. günde intraperitoneal thiopental (150mg/kg; Pental Sodyum Enjektabl Flakon 1 g, I.E. ULAGAY, İstanbul, Türkiye) enjekte edilerek sakrifiye edildi. Aseptik koşullar altında eklem kapsülüne zarar verilmeden, enjeksiyon yapılan diz eklemi açığa çıkarıldı. (Resim 8)



Resim 8. Tavşanların enjeksiyon yapılan diz eklemine disseke edilmesi.

Daha sonra bistüri yardımı ile eklem yüzünü oluşturan eklem kıkırdagından yaklaşık 1cm uzunluğunda parça alındı. Kıkırdak dokusu örnekleri ışık ve immunofloresan mikroskop incelemesi için % 10' luk nötral formalin solüsyonu içerisine alındı ve 48 saat süreyle tespit edildi. Tespit işleminden sonra doku örnekleri 60°C'de eriyik parafinde bir gece bekletildi. Parafin bloklara yerleştirilen kıkırdak dokusu örneklerinden 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler, ışık mikroskopunda incelenmek üzere Hematoksilen-Eozin ile boyandı. Kesitlere ayrıca immünflorasan mikroskopta incelenmek üzere, apoptotik aktivasyonun araştırılmasına yönelik, "Millipore TUNEL apoptozis belirleme kiti" kullanılarak boyandı.

3.2. IŞIK MİKROSKOBUNDA İNCELEME YÖNTEMİ

% 10'luk nötral formalin sıvısı içerisinde 48 saat süreyle tespit edilen doku örnekleri çeşme suyunda yıkandıktan sonra sırasıyla %70, %80, %90, %96 ve %100 konsantrasyonda alkol serisinde birer gece tutularak dehidrate edildi. Daha sonra doku örnekleri üç ayrı kapta yer alan aynı konsantrasyondaki ksilen içerisinde birer saat tutularak şeffaflaştırıldı. Kalıplara yerleştirilen doku örnekleri üzerine, bir gece etüvde (60 °C) bekletilerek sıvılaştırılmış parafin eklendi ve oda ısısında bekletilerek parafinin katılaşması sağlandı. Böylece parafine gömülerek hazırlanan bloklardan mikrotom (Leica RM 2155) kullanılarak 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Hazırlanan doku örnekleri iki kez yirmişer dakika ksilende bekletildikten sonra sırasıyla onar dakika %90, %80 ve %70 konsantrasyonda alkol serisinden geçirildi. Örnekler 5 dakika distile su içerisinde bekletildikten sonra 8 dakika Hematoksilen ile muamele edildi. Daha sonra çeşme suyunda yıkanarak asit alkolden geçirilen dokular 4 dakika eozin ile muamele edildi. Doku örnekleri sırasıyla %70, %80, %90 alkol ve aynı konsantrasyonda ksilen içerisinde onar dakika bekletildi, doku kesitleri üzerine bir damla entellan damlatılarak lamelle kapatıldı ve ışık mikroskopunda incelenmeye hazır hale getirildi.

3.3. İMMUNOFLORESAN MİKROSKOPTA İNCELEME YÖNTEMİ

Polilizinli lamlara (Thermo Scientific) alındıktan sonra bir saat 60°C etüvde bekletilen 5 mikron kalınlığındaki kesitler iki kez onar dakika ksilende bekletildikten sonra sırasıyla %99, %96, %70 ve %50 konsantrasyonda etanol serisinde beşer dakika bekletildi ve 5 dakika PBS'de yıkandı. Ön muamele için proteinaz-K damlatılan örnekler 15 dakika bekletildikten sonra ikişer kez 2 dakika distile su ile yıkandı. Endojen peroksidazı gidermek için %30' luk H₂O₂ uygulanan örnekler iki kez beşer dakika distile suyla yıkandı. Daha sonra sırasıyla *Equilibration buffer*, *TdT enzim*, *Stop/wash buffer* ve *Anti-Digoxigen in Conjugate* uygulandıktan sonra zıt boyama işlemine tabi tutuldu ve kapatıcı medium ile kapatıldı.

3.4. İMMUNOFLORESAN VE IŞIK MİKROSKOPTA İNCELEME

Hematoksilen eozin ile boyanmış kesitlerin ışık mikroskobu incelemesinde apoptozun karakteristik özelliği olan nükleer kondensasyon ve fragmantasyon dikkate alınarak x200 büyütmede rastgele seçilen 10 farklı alandaki apoptotik kondrositler körlenmiş bir patolog tarafından sayıldı.

Yine Olympus (DP71) marka floresan mikroskopunda x40 büyütmede rastgele seçilen 10 alanda TUNEL metodu ile pozitif olarak işaretlenen apoptotik nükleuslar körlenmiş bir patolog tarafından sayıldı. Toplam apoptotik nukleus sayısı, alan sayısına bölünerek apoptotik indeks değerleri belirlendi (76).

Apoptotik indeks (APOİ) = Apoptotik nükleus sayısı / 10

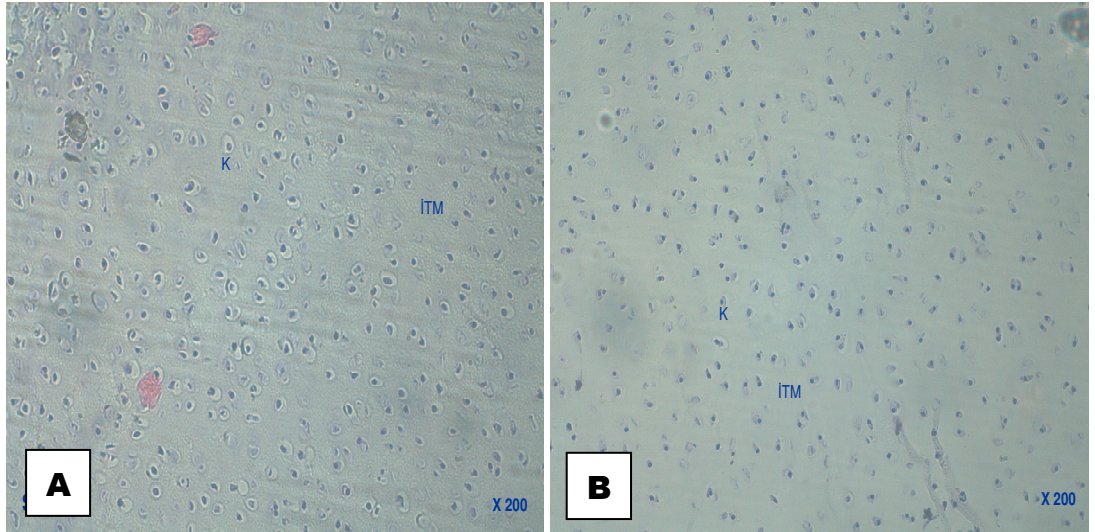
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde ortalama, standart sapma değerleri kullanılmıştır. Değişkenlerin dağılımı **Kolmogorov Simirnov** testti ile kontrol edildi. Niceliksel verilerin analizinde bağımsız örneklem **t test** kullanılmıştır. Tekrarlayan ölçümlerde eşleştirilmiş **örneklem t test** kullanılmıştır. Bütün analizler **SPSS 21,0** bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve “p<0.05” değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. SF GRUBUNA AİT BULGULAR

4.1.1. SF Grubuna Ait Işık Mikroskobu Bulguları

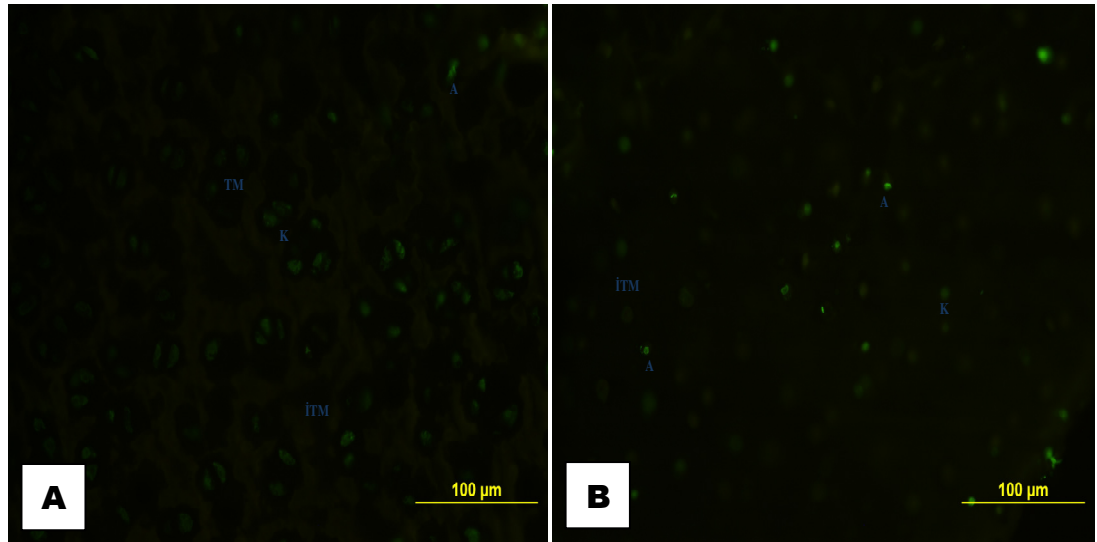


Resim 9. %0,9 normal salin enjeksiyonundan 7. gün (A) ve 28 gün (B) sonra alınan kıkırdak dokusu örneklerinin ışık mikroskopunda görünümü. (H&E, X200) (K: Kondrosit, İTM: İntrateritorial Matriks A: Apoptotik Hücre).

Hemotoksilen-eozin ile boyanmış SF Grubuna ait 7. ve 28. günde kesitlerin nükleer kondensasyon ve fragmantasyon dikkate alınarak yapılan ışık mikroskobu incelemesinde normal histolojik görünümdeki kondrositler arasında apoptotik indeks

değerleri sırası ile $1,88 \pm 0,59$ ve $2,00 \pm 0,37$ olan apoptotik kondrosit hücrelerine rastlandı. Kondrosit ve onu çevreleyen intrateritorial matrikste ise inflamatuvar hücre infiltrasyonuna rastlanmadı (Resim 9).

4.1.2. SF Grubuna Ait Immunofloresan Mikroskobu Bulguları

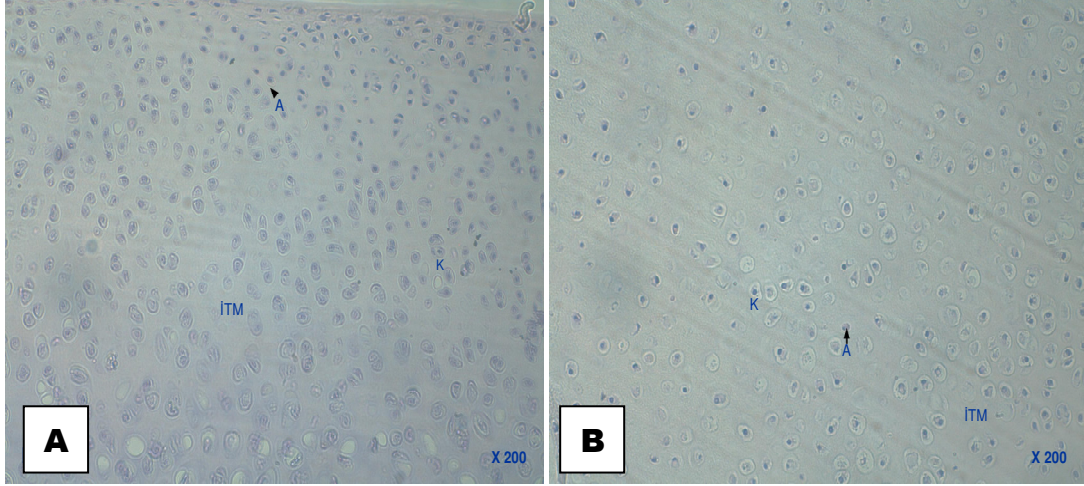


Resim 10. %0,9 normal salin enjeksiyonundan 7. gün (A) ve 28 gün (B) sonra alınan kıkırdak dokusu örneklerinin immünfloresan mikroskopta görünümü (TUNEL, X40, Bar 100µm) (K:Kondrosit, İTM: İntrateritorial Matriks, TM: Territorial Matriks A: Apoptotik Hücre).

İmmunofloresan mikroskopta incelenen SF Grubuna ait 7. ve 28. gündeki kesitlerde birim alandaki apoptotik indeks değeri sırası ile $0,68 \pm 0,23$ ve $1,02 \pm 1,05$ olarak hesaplandı (Resim 10).

4.2. BUPIVAKAİN GRUBUNA AİT BULGULAR

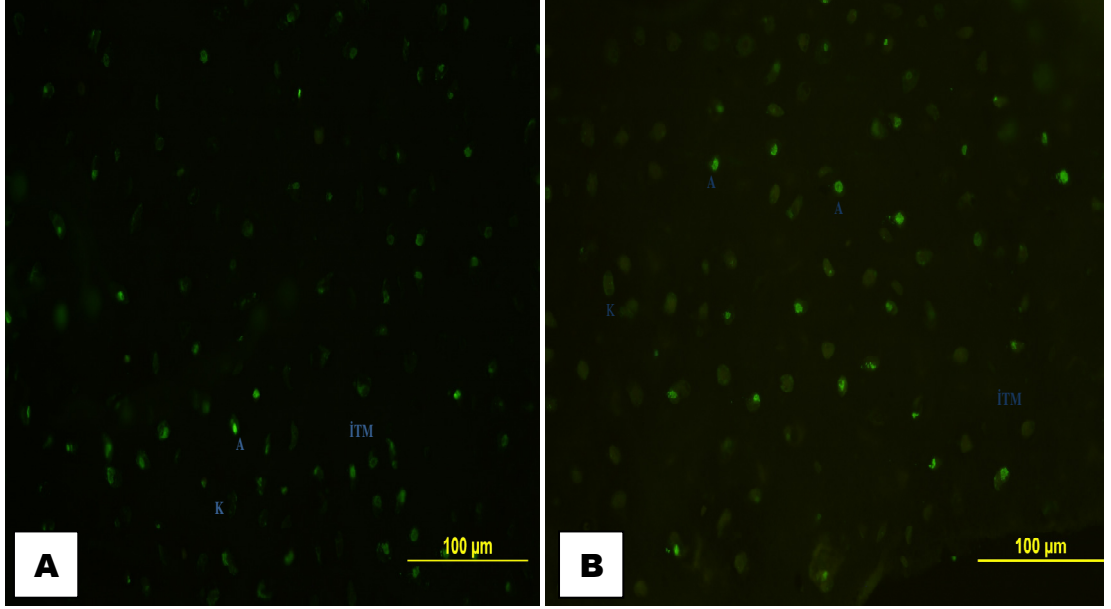
4.2.1. Bupivakain Grubuna ait Işık Mikroskobu Bulguları



Resim 11. % 0,5 bupivakain enjeksiyonundan 7. gün (A) ve 28 gün (B) sonra alınan kıkırdak dokusu örneklerinin ışık mikroskobunda görünümü. (H&E, X200) (K: Kondrosit, İTM: İntrateritorial Matriks A: Apoptotik Hücre).

Hemotoksilen-eozin ile boyanmış B Grubuna ait 7. ve 28. gündeki kesitlerin nükleer kondensasyon ve fragmantasyon dikkate alınarak yapılan ışık mikroskobu incelemesinde normal histolojik görünümdeki kondrositler arasında apoptotik indeks değerleri sırası ile $4,98 \pm 1,77$ ve $5,18 \pm 0,95$ olan apoptotik kondrosit hücrelerine rastlandı. Kondrosit ve onu çevreleyen intrateritorial matrikste ise inflamatuvar hücre infiltrasyonuna rastlanmadı (Resim 11).

4.2.2. Bupivakain Grubuna Ait Immunofloresan Mikroskobu Bulgular

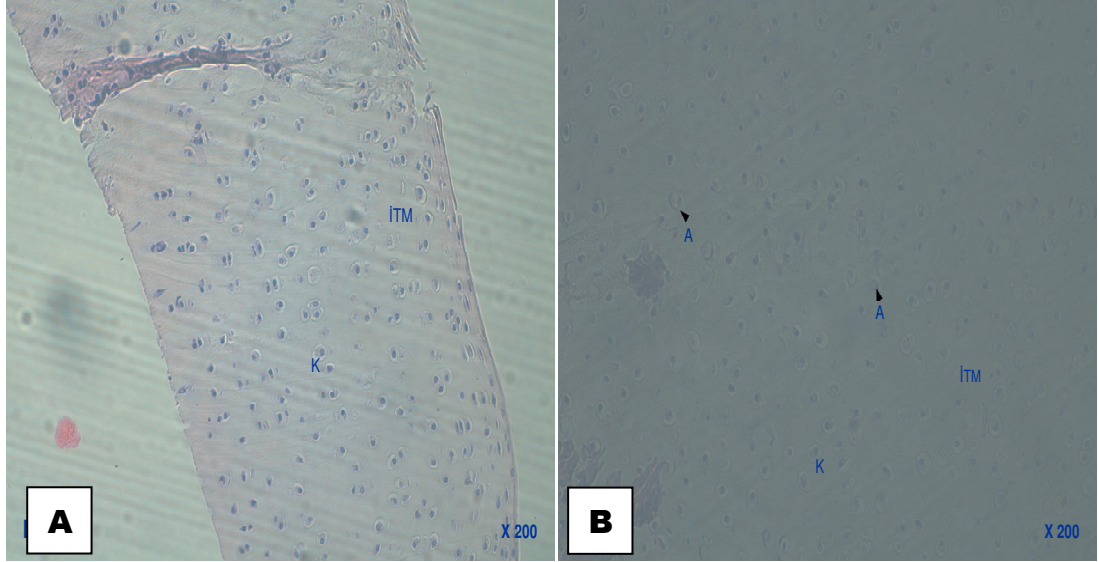


Resim 12. % 0,5 bupivakain enjeksiyonundan 7. gün (A) ve 28 gün (B) sonra alınan kıkırdak dokusu örneklerinin immünfloresan mikroskopta görünümü (TUNEL, X40, Bar 100µm) (K:Kondrosit, İTM: İntrateritorial Matriks, A: Apopitotik Hücre).

İmmunofloresan mikroskopta incelenen B Grubuna ait **7. ve 28. gündeki** kesitlerde birim alandaki apopitotik indeks değerleri sırası ile **5,54 ± 3,61** ve **5,15 ± 1,25** olarak hesaplandı (Resim 12).

4.3. LEVOBUPİVAKİAN GRUBUNA AİT BUGULAR

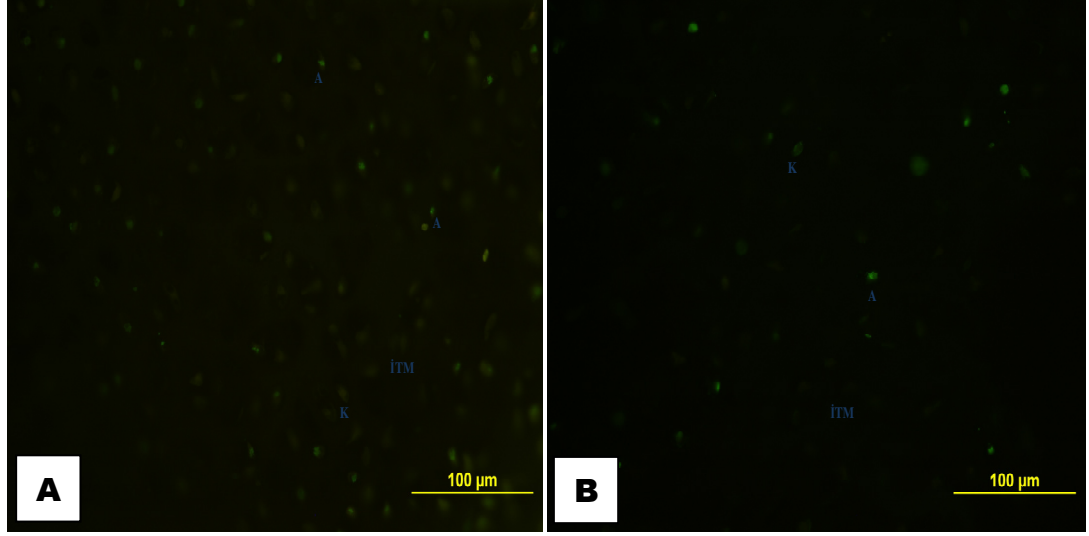
4.3.1. Levobupivakain Grubuna Ait Işık Mikroskobu Bulguları



Resim 13. % 0,5 levobupivakain enjeksiyonundan 7. gün (A) ve 28 gün (B) sonra alınan kıkırdak dokusu örneklerinin ışık mikroskobunda görünümü. (H&E, X200, X400) (K: Kondrosit, İTM: İntrateritorial Matriks A: Apoptotik Hücre).

Hemotoksilen eozin ile boyanmış L Grubuna ait 7. ve 28. **gündeki** kesitlerin nükleer kondensasyon ve fragmantasyon dikkate alınarak yapılan ışık mikroskobu incelemesinde normal histolojik görünümdeki kondrositler arasında apoptotik indeks değerleri sırası ile $2,66 \pm 0,49$ ve $3,30 \pm 0,48$ olan apoptotik kondrosit hücrelerine rastlandı. Kondrosit ve onu çevreleyen intrateritorial matrikste ise inflamatuvar hücre infiltrasyonuna rastlanmadı (Resim 13).

4.3.2. Levobupivakain Grubuna Ait Immunofloresan Mikroskobu Bulguları



Resim 14. % 0,5 levobupivakain enjeksiyonundan 7. gün (A) ve 28 gün (B) sonra alınan kıkırdak dokusu örneklerinin immünfloresan mikroskopta görünümü (TUNEL, X40, Bar 100µm) (K:Kondrosit, İTM: İntrateritorial Matriks, A: Apopitotik Hücre).

İmmunofloresan mikroskopta incelenen L Grubuna ait **7. ve 28. günde**ki kesitlerde birim alandaki apopitotik indeks değerleri sırası ile **0,57 ± 0,74** ve **1,93 ± 1,27** olarak hesaplandı (Resim 14).

4.4. IŞIK MİKROSKOBİSİ BULGULARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Tablo 4. Işık mikroskopisinde deneklerin apoptotik indeks oranları.

DENEKLER	GRUPLAR					
	S7	S28	L7	L28	B7	B28
1	1,20	2,60	2,20	2,60	4,60	4,40
2	1,80	2,00	3,40	3,20	9,20	5,20
3	2,00	1,40	2,20	3,40	4,40	4,00
4	1,40	1,80	2,40	3,00	3,60	6,80
5	0,80	2,20	2,60	3,40	3,80	4,60
6	2,60	2,20	3,20	4,00	5,80	4,80
7	2,20	2,40	2,40	3,20	3,40	4,60
8	2,00	1,60	3,40	3,00	6,40	6,20
9	2,20	2,00	2,60	4,20	3,80	6,40
10	2,60	1,80	2,20	3,00	4,80	4,80

Tablo 5. Işık mikroskopisinde gruplara göre apoptotik indeks değişim oranları

Işık mikroskopisinde apoptotik indeks		N	En Düşük	En Yüksek	Ort.±s.s.
Serum Fizyolojik Grubu	7.Gün	10	0,80	2,60	1,88 ± 0,59
	28.Gün	10	1,40	2,60	2,00 ± 0,37
	Değişim	10	-0,80	1,40	0,12 ± 0,77
Levobupivakain Grubu	7.Gün	10	2,20	3,40	2,66 ± 0,49
	28.Gün	10	2,60	4,20	3,30 ± 0,48
	Değişim	10	-0,40	1,60	0,64 ± 0,59
Bupivakain Grubu	7.Gün	10	3,40	9,20	4,98 ± 1,77
	28.Gün	10	4,00	6,80	5,18 ± 0,95
	Değişim	10	-4,00	3,20	0,20 ± 2,00

Levobupivakain grubunda, ışık mikroskopisinde hem 7.günde hem de 28.günde hesaplanan apoptotik indeks değerleri SF grubundan anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0,05$), (Grafik 1,2).

Tablo 6. Işık mikroskobisinde grup S ve grup L nin karşılaştırılması

Işık mikroskobisinde apoptotik indeks	Grup S	Grup L	p
	Ort.±s.s.	Ort.±s.s.	
7.Gün	1,88 ± 0,59	2,66 ± 0,49	0,005
28.Gün	2,00 ± 0,37	3,30 ± 0,48	0,000
Değişim	0,12 ± 0,77	0,64 ± 0,59	0,109
Değişim p	0,635	0,008	

Bağımsız örneklem t test / Eşleştirilmiş örneklem t test

Bupivakain grubunda, ışık mikroskobisinde hem 7.günde hem de 28.günde hesaplanan apoptotik indeks değerleri SF grubundan anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0,05$), (Grafik 1,2). Işık mikroskobisinde, hem SF hemde Bupivakain grubunun 7. ve 28. günlerdeki apoptotik indeks değerleri arasında istatistiksel olarak fark saptanmadı ($p > 0,05$), (Tablo 7). Levobupivakain grubunda ise ışık mikroskobisinde, 7. gün ve 28. gün apoptotik indeks değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark gözlemlendi ($p < 0,05$), (Tablo 6-8).

Tablo 7. Işık mikroskobisinde grup S ve grup B nin karşılaştırılması

Işık mikroskobisinde apoptotik indeks	Grup S	Grup B	p
	Ort.±s.s.	Ort.±s.s.	
7.Gün	1,88 ± 0,59	4,98 ± 1,77	0,000
28.Gün	2,00 ± 0,37	5,18 ± 0,95	0,000
Değişim	0,12 ± 0,77	0,20 ± 2,00	0,907
Değişim p	0,635	0,759	

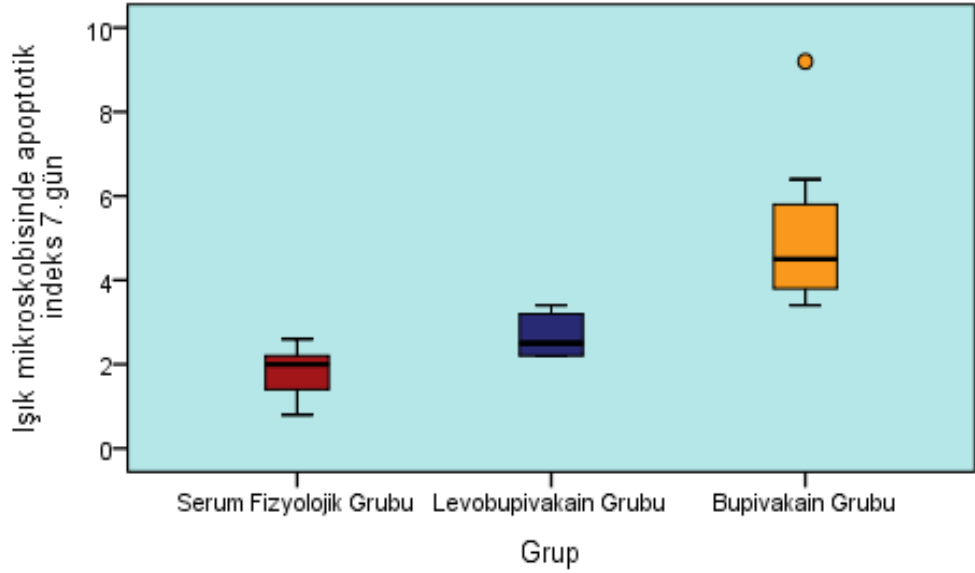
Bağımsız örneklem t test / Eşleştirilmiş örneklem t test

Tablo 8. Işık mikroskobisinde grup L ve grup B nin karşılaştırılması

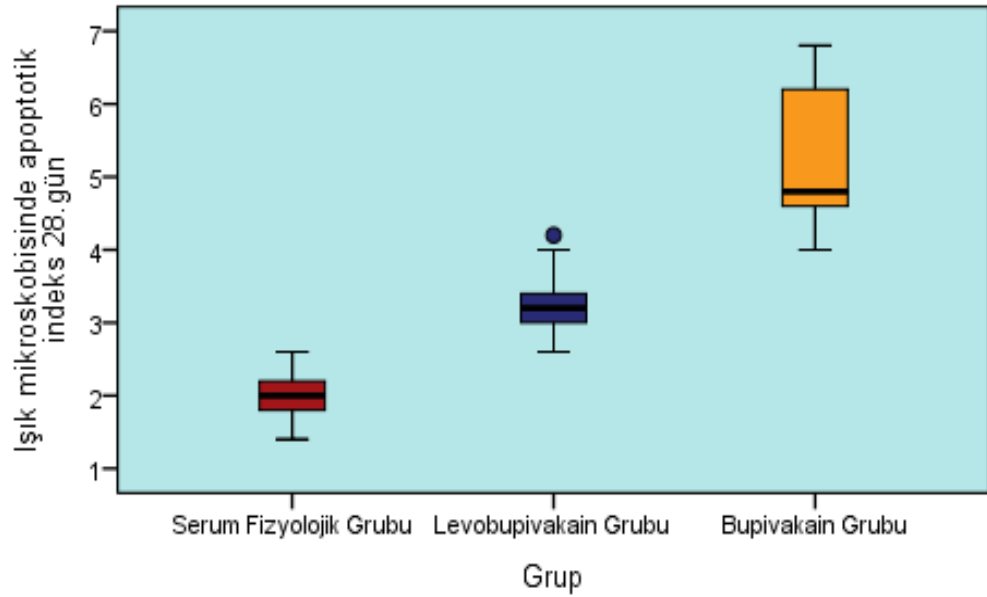
Işık mikroskobisinde apoptotik indeks	Grup L	Grup B	p
	Ort.±s.s.	Ort.±s.s.	
7.Gün	2,66 ± 0,49	4,98 ± 1,77	0,002
28.Gün	3,30 ± 0,48	5,18 ± 0,95	0,000
Değişim	0,64 ± 0,59	0,20 ± 2,00	0,519
Değişim p	0,008	0,759	

Bağımsız örneklem t test / Eşleştirilmiş örneklem t test

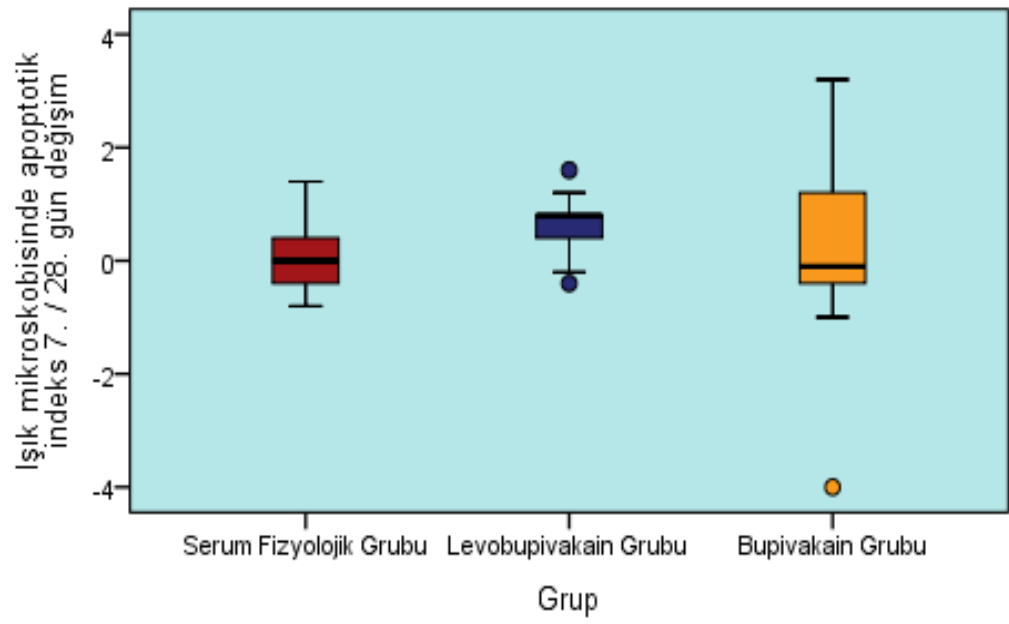
Işık mikroskopisinde, 7. Gün / 28. gün apoptotik indeks değerindeki değişim miktarı karşılaştırıldığında, SF ve Bupivakain gruplarında anlamlı fark gözlenmezken ($p>0.05$), Levobupivakain grubunda 7.gün ile 28.gün arasında apoptotik indeks değerleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı dercede değişim saptandı ($p<0.05$), (Grafik 3).



Grafik 1. Işık mikro. 7. gün apoptotik indeks grafiği



Grafik 2. Işık mikro. 28. gün apoptotik indeks grafiği



Grafik 3. Işık mikro. 7./28. gün apoptotik indeks değişim grafiği

4.5. FLORASAN MİKROSKOBİSİ BULGULARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Tablo 9. Floresan mikroskobisinde deneklerin apoptotik indeks oranları

DENEKLER	GRUPLAR					
	S7	S28	L7	L28	B7	B28
1	0,77	0,00	1,00	0,37	6,90	5,19
2	1,00	2,70	0,00	1,00	3,23	5,42
3	0,75	1,00	0,00	1,14	4,33	7,53
4	0,71	0,25	2,40	3,75	5,10	5,43
5	0,21	2,90	0,00	1,88	1,33	5,43
6	0,69	0,00	0,33	3,89	2,00	4,55
7	0,35	1,51	0,50	1,15	3,90	4,50
8	0,82	0,80	0,00	0,45	7,31	5,00
9	0,73	0,70	0,80	3,40	13,83	5,86
10	0,77	0,32	0,66	1,29	7,50	2,54

Tablo 10. Floresan mikroskopisinde gruplara göre apoptotik indeks değişim oranları

Apoptotik indeks		N	En Düşük	En Yüksek	Ort.±s.s.
Serum Fizyolojik Grubu	7.Gün	10	0,21	1,00	0,68 ± 0,23
	28.Gün	10	0,00	2,90	1,02 ± 1,05
	Değişim	10	-0,77	2,69	0,34 ± 1,15
Levobupivakain Grubu	7.Gün	10	0,00	2,40	0,57 ± 0,74
	28.Gün	10	0,37	3,89	1,93 ± 1,27
	Değişim	10	-0,63	3,56	1,36 ± 1,15
Bupivakain Grubu	7.Gün	10	1,33	13,83	5,54 ± 3,61
	28.Gün	10	2,54	7,53	5,15 ± 1,25
	Değişim	10	-7,97	4,10	-0,40 ± 3,85

Levobupivakain grubu ve SF Grubu arasında, floresan mikroskopisinde hem 7.günde hem de 28.günde hesaplanan apoptotik indeks değerleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0,05$), (Tablo 11), (Grafik 1,2).

Tablo 11. Floresan mikroskopisinde grup S ve grup L nin karşılaştırılması

Floresan mikroskopisinde apoptotik indeks	Grup S Ort.±s.s.	Grup L Ort.±s.s.	p
7.Gün	0,68 ± 0,23	0,57 ± 0,74	0,660
28.Gün	1,02 ± 1,05	1,93 ± 1,27	0,096
Değişim	0,34 ± 1,15	1,36 ± 1,15	0,061
Değişim p	0,376	0,004	

Bağımsız örneklem t test / Eşleştirilmiş örneklem t test

Bupivakain grubu ve SF Grubu arasında, floresan mikroskopisinde, hem 7.günde hem de 28.günde hesaplanan apoptotik indeks değerleri yönünden, istatistiksel olarak anlamlı derecede fark gözlendi ($p > 0,05$), (Tablo 12), (Grafik 1,2).

Bupivakain grubunda floresan mikroskopisinde hesaplanan apoptotik indeks değerleri, hem 7.günde hem de 28.günde, levobupivakain grubundan anlamlı derecede yüksek bulundu ($p > 0,05$), (Tablo 13).

Levobupivakain grubunda, 7. gündeki apoptotik indeks değerleri ile 28. gündeki apoptotik indeks değerleri arasında, istatistiksel olarak anlamlı derecede fark gözlendi

($p < 0,05$), (Tablo 11-13). SF grubu ve Bupivakain grubunda ise 7. gündeki apoptotik indeks değerleri ile 28. gündeki apoptotik indeks değerleri arasında fark saptanmadı ($p > 0,05$), (Tablo 11-13).

Tablo 12. Floresan mikroskobisinde grup S ve grup B nin karşılaştırılması

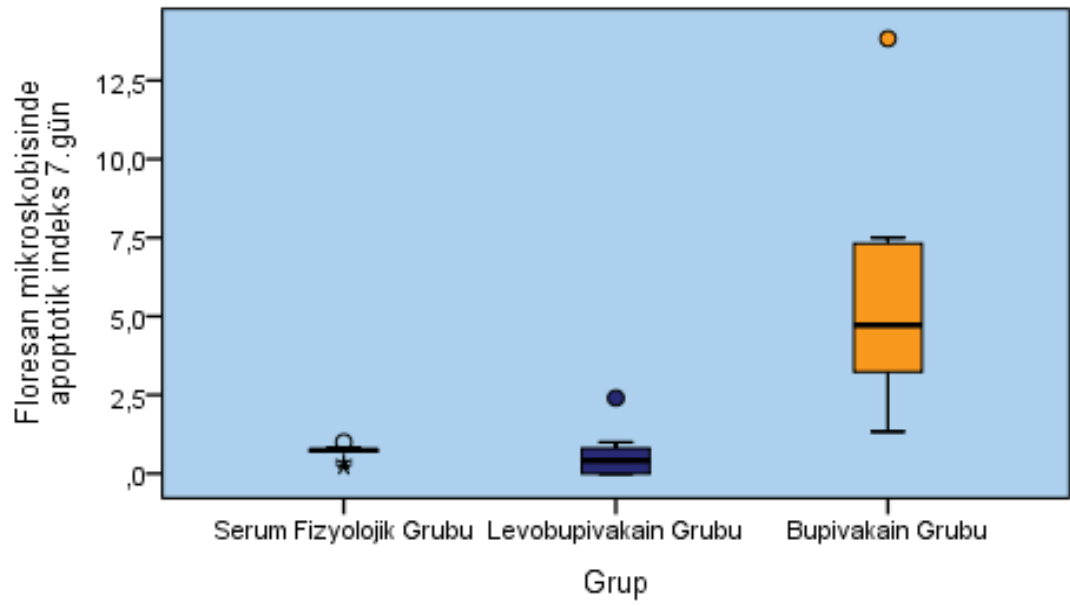
Floresan mikroskobisinde apoptotik indeks	Grup S Ort.±s.s.	Grup B Ort.±s.s.	p
7.Gün	0,68 ± 0,23	5,54 ± 3,61	0,002
28.Gün	1,02 ± 1,05	5,15 ± 1,25	0,000
Değişim	0,34 ± 1,15	-0,40 ± 3,85	0,575
Değişim p	0,376	0,751	

Bağımsız örneklem t test / Eşleştirilmiş örneklem t test

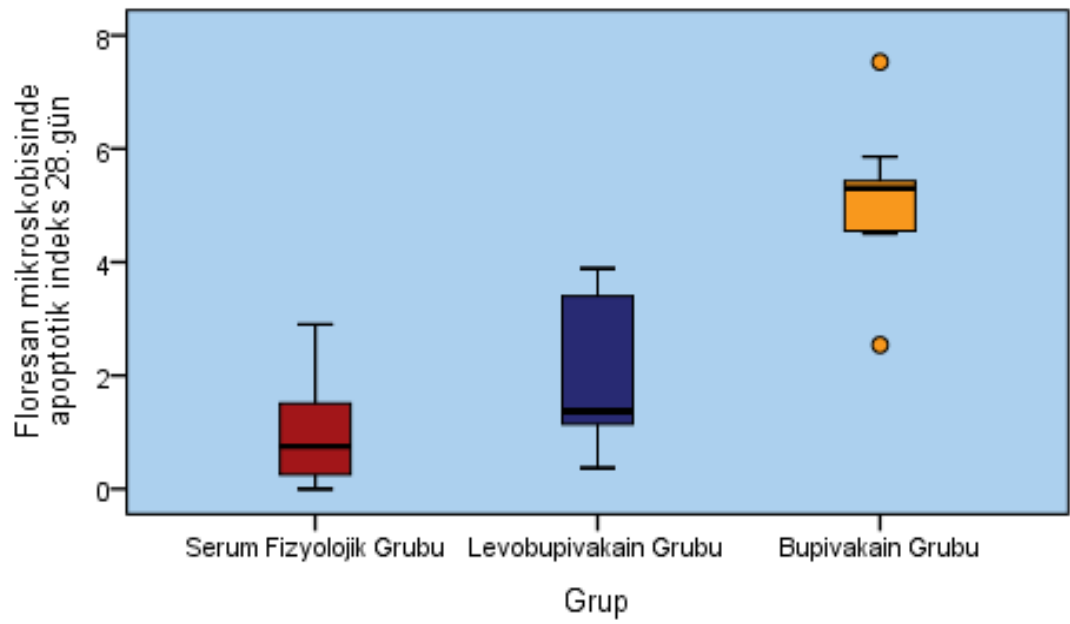
Tablo 13. Floresan mikroskobisinde grup L ve grup B nin karşılaştırılması

Floresan mikroskobisinde apoptotik indeks	Grup L Ort.±s.s.	Grup B Ort.±s.s.	p
7.Gün	0,57 ± 0,74	5,54 ± 3,61	0,002
28.Gün	1,93 ± 1,27	5,15 ± 1,25	0,000
Değişim	1,36 ± 1,15	-0,40 ± 3,85	0,194
Değişim p	0,004	0,751	

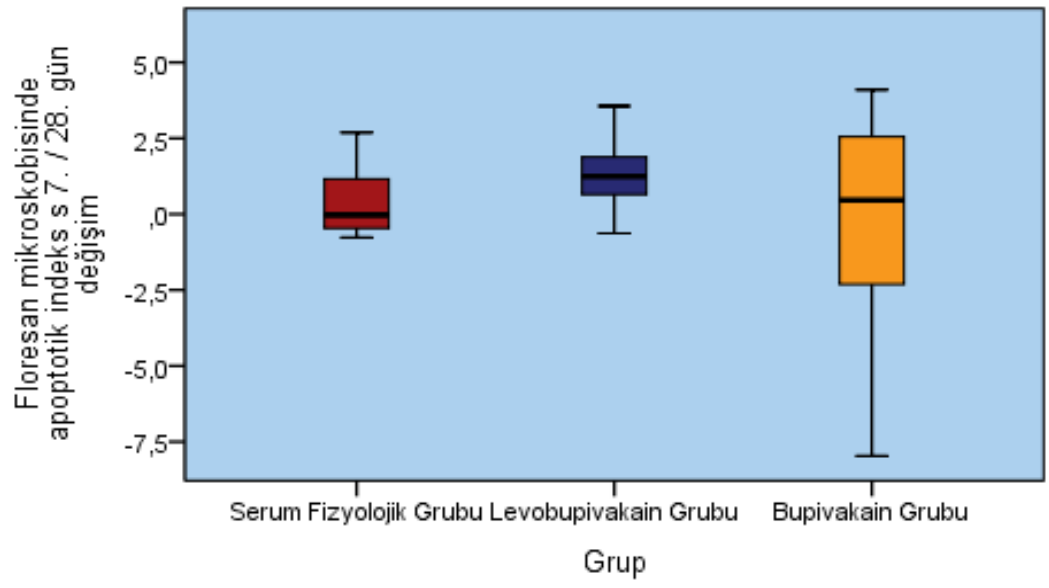
Bağımsız örneklem t test / Eşleştirilmiş örneklem t test



Grafik 4. Floresan mikro. 7. gün apoptotik indeks grafiği



Grafik 5. Floresan mikro. 28. gün apoptotik indeks grafiği



Grafik 6. Floresan mikro. 7./28. gün apoptotik indeks değişim grafiği

5. TARTIŞMA

Son yıllarda, bölgesel anestezi tekniklerinin gelişmesi ve lokal anesteziklerin yan etki profilinin değişmesi, postoperatif analjezi amacıyla lokal anesteziklerin kullanımını yaygınlaştırmıştır. Günümüzde özellikle omuz ve diz artroskopisinde perioperatif analjezi amacıyla lokal anestezi ajanların eklem aralığına tek seferlik enjeksiyon veya sürekli infüzyon şeklinde uygulanması, iyi tanımlanmış bir analjezi tekniği olarak kabul edilmektedir. Ancak, tek başına veya diğer ilaçlarla birlikte kullanılan lokal anesteziklere uzun süre maruz kalan kondrositlerde hasar oluştuğuna dair araştırma ve olgu raporlarına, son yıllarda giderek artan sayıda rastlanmaktadır. Bu durum söz konusu tekniğe ait kaygıların ortaya çıkmasına neden olmuştur.

Bupivakain etki potansinin yüksek ve etki süresinin uzun olmasından dolayı klinik kullanımda en fazla tercih edilen ajan olmakla birlikte, bilinen en yüksek kardiyotoksik, nörotoksik ve miyotoksik etki potansiyeline sahip lokal anesteziktir (5,77-80). Bupivakainin doza ve zamana bağımlı olarak kondrotoksik olduğu ve bu etkisinin özellikle epinefrin ile birlikte uygulandığında daha fazla olduğu bir çok araştırmada gösterilmiştir (4, 41, 52, 53, 81–85).

Yeni bir lokal anestezi ajanı olan levobupivakain, bupivakainin pür S(-) enantiomeridir ve rasemik bupivakainin kardiyotoksik etkilerinin daha çok R(+) izomeri ile ilgili olduğunun gösterilmesi sonucunda, daha az kardiyotoksik bir ajan elde etmek amacıyla geliştirilmiştir (5, 6, 7, 8). Levobupivakainin kondrotoksik özellikleri henüz araştırılmamıştır.

Bupivakainin olumsuz kardiyak etkilerinin, Ca^{++} kanalları ve intrasellüler Ca^{++} akımı ile etkileşimine ve mitokondride ATP sentezi üzerine olan etkilerine bağlı olduğu savunulmaktadır (5, 79, 86–88). Levobupivakainin daha az kardiyotoksik ve miyotoksik olduğu gösterilmiş ve bunun intrasellüler Ca^{++} dengesi üzerine ılımlı etkisine bağlı olduğu savunulmaktadır (5, 48, 54, 89). Aynı zamanda apoptotik aktivasyonun oluşum mekanizmasında da bozulmuş intrasellüler Ca^{++} dengesinin sorumlu olduğu savunulmaktadır (5, 7, 36, 62, 90).

R ve S enantiomerlerini bünyesinde barındıran rasemik bir karışım olan Bupivakain ile onun pür S(-) enantiomeri olan levobupivakain, benzer farmakodinamik özelliklere sahiptir. R- izomeri, S-izomerine oranla A-V ileti zamanını belirgin şekilde uzatmakla birlikte, hem Na^{+} hemde K^{+} kanallarında daha potent inhibisyona neden olmaktadır (48, 54).

Lokal anesteziğin kondrositler üzerindeki toksik etkisini ve apoptozisi açıklamak için, mitokondrial hasarlanmayı ve K^{+} kanal bloğunu da içerisine alan birçok mekanizma öne sürülmüştür. Lokal anesteziğin mitokondrial hasarlanmayı artırdığı, ATP ve mitokondrial protein seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir. Bu bulgulara dayanarak, lokal anesteziğin toksisitesinden, mitokondrial disfonksiyon ve hücre ölümünün programlanmış, fizyolojik bir şekli olarak tanımlanan apoptozis sorumlu tutulmaktadır (9, 91, 92). Apoptozis fizyolojik hücre ölümünün en yaygın formudur ve nekrozun aksine hücrenin kendisi tarafından başlatılır ve regüle edilir. Apoptotik süreç, stres faktörleri, ısı, hipoksi, iyonize radyasyon ve kimyasalların etkisiyle ekstrasellüler olarak başlatılabilir ve bir intrasellüler sinyal kaskadının aktivasyonu ile hücre ölümüne yol açabilir (93).

Çalışmamızda, artroskopik cerrahide yaygın olarak kullanılan ve kondrotoksik özellikleri bilinen bupivakain ile kondrotoksik özellikleri henüz araştırılmamış olan levobupivakaini karşılaştırmayı uygun bulduk.

Lokal anesteziğin kondrotoksik özellikleri, histopatolojik ve biyokimyasal olarak birçok yöntemle araştırılabilir. Levobupivakainin kardiyotoksik ve miyotoksik özelliklerinin tanımlanmasında intrasellüler Ca^{++} dengesinin rolü öne çıkmaktadır (36, 45, 78, 90, 94). Apoptotik aktivasyonun oluşum mekanizmasında da aynı faktörün öne sürülmesi (56, 66) nedeniyle, iki lokal anesteziğin kondrotoksik özelliklerini

araştırmış olduğumuz çalışmamızda apoptotik aktivasyon ve apoptotik indeksi değerlendirmeyi uygun bulduk.

Lokal anesteziğin apoptotik aktivite üzerine etkilerini inceleyen birçok çalışma yapılmıştır (91, 92, 95–97). Sözü edilen bu çalışmalarda, lokal anesteziğin nöral doku ve çizgili kas dokusunun yanı sıra, renal hücreler (97), kondrositler (9) ve korneal endotel hücreleri (93) gibi bir çok hücrede apoptotik değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Lokal anesteziğin indüklediği apoptoziste, hücre membranında blebbing, kromatin yoğunlaşması, nukleer parçalanma ve hücre fragmanlarının ayrışması ile karakterize morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler gözlenmektedir (9, 70, 93, 97).

Lokal anesteziğe bağlı gelişen apoptozisten en çok bupivakain sorumlu tutulmaktadır (45, 90). Bupivakainin *invivo* şartlarda hücre içi Ca^{++} seviyesini yükselttiği ve böylelikle Ca^{++} ile bağlantılı olarak mitokondrideki oksidatif fosforilasyon basamaklarını kırıp apoptozisi tetiklediği savunulmaktadır. Birçok araştırmacı, bupivakainin neden olduğu apoptotik aktivasyonun ajanın lipofilik özelliğinden kaynaklandığını savunmaktadır (36, 45, 78, 90–94). Park ve ark. (8) ise bupivakain'in schwann hücresinde reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) üretimini indükleyerek kaspaz-3 aktivasyonu ve poli-ADP-riboz polimeraz (PARP) indirgenme yoluyla apoptozisi indüklediğini savunmaktadırlar.

Literatürde levobupivakainin neden olduğu apoptotik aktivasyonu araştıran yegâne araştırma Borazan ve ark. (93)'nın çalışmasıdır. Borazan ve ark. (93) çalışmalarında tavşanlara intrakameral enjeksiyon yoluyla lidokain, ropivakain ve levobupivakain uygulamışlar ve 1. ve 7. günlerde TUNEL pozitif apoptotik hücre sayısını araştırmışlardır. Bu araştırmacılar, her üç ajanın da ön kamarada akut apoptotik süreci tetiklediğini ve korneal endotel hücrelerinde morfolojik değişikliklere neden olduğunu ancak bu etkinin geçici olup 7. günden sonra tamamen sonlandığını savunmaktadırlar.

Nauette-Gaulain ve ark. (89), bupivakainle lipofilik özellikleri aynı olan levobupivakainin sarkoplazmik retikulumdaki RyR ve Ca -ATP'az pompasını aktifleyerek intrasellüler Ca^{++} miktarını arttırdığını savunmaktadırlar. Sözü edilen araştırmacılar, lipofilik özellikleri aynı olmakla birlikte bupivakainin aynı etkiyi göstermediğini bildirmekte ve bunu iki ajanın stereospesifik özellikleriyle

açıklamaktadırlar. Bununla birlikte lokal anesteziklerin intrasellüler Ca^{++} homeostazı üzerine etkisini belirleyen faktörün lipofilik özellikleri mi yoksa stereoselektif özellikleri mi olduğu konusu henüz açıklık kazanmamıştır.

Tavşan arka bacak diz eklemi anatomik olarak insan diz eklemine oldukça benzer yapıdadır. Bu yönüyle tavşan diz eklemi, eklem yapıları ile ilgili bilimsel çalışmalarda iyi bir model olarak tanımlanmaktadır (50,98-100). Bu nedenle çalışmamızda tavşan modeli kullandık. Hayvan çalışmaları etik ilkelerini gözeterek, sakrifiye edilecek hayvan sayısını sınırlamak amacıyla, daha önce yapılmış benzer çalışmalarda (50, 101–103) olduğu gibi, tavşanların hem sağ hem de sol arka diz eklemlerini kullandık.

Bupivakainin intraartiküler dozunu gösteren daha önce yapılmış hayvan çalışmasına rastlanılmadığından, çalışmamızda, daha önce yapılmış benzer çalışmalarda olduğu gibi (50, 104, 105), her iki lokal anestezik için, insanda uygulanan intra artiküler bupivakain dozunun uyarlanmasıyla elde edilen volüm ve konsantrasyonu (0.25 mL, %0.5) kullandık. Kontrol grubunda ise aynı volümde SF kullandık.

Glicolizis için gerekli olan gliseraldehit–3-fosfat dehidrojenaz aktivitesinin inhibisyonu yoluyla eklem kondrositlerini öldürerek kondrolizisi indükleyen (106–109) monoiodoasetat, kondrolizisin gelişimindeki referans zaman dilimlerini elde etmek için kullanılmıştır (107). Monoiodoasetat enjekte edilen örneklerin eklem yüzeyleri, makroskopik incelemelerde 12 hafta boyunca sağlam kalırken, floresan ve ışık mikroskopisi ile 1. haftada yüzeyel kondrositlerin ve 4. haftada bütün tabakalardaki kondrositlerin lizise uğradığı gösterilmiştir (107). İnfüri sonrası kondrosit apoptozisinin tespiti için en uygun zamanın 7–10.günler olduğu bildirilmektedir (110). Doğan ve ark. (50) araştırmalarında kondrositlerdeki histopatolojik değişikliklerin ilk 24 saatte minimal olduğunu, enjeksiyondan 48 saat sonra ve 10. günde ise oldukça artmış olduğunu göstermişlerdir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, ışık mikroskobu ve floresan mikroskopta incelenmek üzere kartilaj dokunun 1. ve 4. haftalarda alınmasını uygun bulduk.

Kondrosit apoptozisinin belirlenmesinde, apoptozisin tipik histolojik değişikliklerini daha iyi tanımlayabildiği için konvansiyonel ışık mikroskobisi ile inceleme önerilmektedir. Hematoksilen-eozin (H&E) kromatini boyadığı için apoptotik hücrelerin nükleus morfolojisine göre değerlendirilmesine olanak tanır. Hücre küçülmesi veya

sitoplazmik küçülme, kromatinin kondanse olması ve nukleus zarının etrafında toplanması, nukleusun küçülmesi veya parçalara ayrılması ışık mikroskopisi ile gözlenebilen apoptotik değişikliklerdir (58, 60).

Floresan mikroskopisi ise sağlam dokulardaki apoptozisi tanımlamada oldukça spesifik ve sensitif bir yöntemdir. Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nukleusu görünür hale gelebilir (60,73). TUNEL boyama yöntemi, preapoptotik hücreleri de görünür kılarak floresan mikroskopisinin duyarlılığını arttırmaktadır (111).

Transmisyon elektron mikroskopisi (TEM), apoptozisin içerdiği selüler değişiklikleri tespit etmede oldukça sensitif olmasına rağmen pahalı ve ulaşılması konusunda kısıtlılıklar bulunan bir yöntemdir (112-114). Çalışmamızda kıkırdak dokusundaki apoptotik değişiklikleri H&E boyama tekniği ile ışık mikroskopunda değerlendirdik. Bunun yanı sıra doku örneklerini, preapoptotik hücreleri de değerlendirmemize olanak sağlayan TUNEL boyama tekniği ile ayrıca floresan mikroskopta da değerlendirmeyi uygun bulduk.

Artroskopik cerrahi sonrası omuz ve diz eklemde görülen postoperatif kondrolizis, kıkırdak matriksinin ve kondrositlerin lizisi veya ölümü sonucunda eklem kıkırdağının ortadan kaybolması olarak tanımlanmaktadır. Webb ve ark. (115) intraartiküler bupivakainin kondrotoksik etkileri konusundaki yayınları incelemişler ve yayınlanan 27 adet postartroskopik glenohumeral kondrolizis vakasından 25'inde bupivakain ile postoperatif sürekli intra-artiküler analjezi uygulandığını bildirmişlerdir. Chu ve ark. (81) in vitro olarak hem hücre kültüründe, hem de osteokondral eksplantlarda kıkırdak dokusu üzerine bupivakainin etkilerini araştırmışlardır. Gomoll ve ark. (52) ise tavşan omuz modelinde glenohumeral ekleme yerleştirilen bir kateter aracılığı ile 48 saat boyunca bupivakain infüzyonu uygulayarak yine bupivakainin kıkırdak dokusu üzerine etkilerini araştırmışlardır. Sözü edilen araştırmacılar her üç çalışmada da kondrosit ölümü ve azalmış kıkırdak metabolizması ile karakterize kondrotoksisite varlığını göstermişlerdir.

Dragoo ve ark. (53) total diz protezi ameliyatlarından elde ettikleri insan eklem kıkırdağı örneklerinde ağrı pompası aracılığı ile uygulanan epinefrinli lidokain ve bupivakainin kondrosit canlılığı üzerine etkilerini araştırmışlar ve epinefrin içeren lokal

anesteziklere maruz kalan kültürlerde kondrosit canlılığında belirgin düzeyde azalma tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada bupivakinin ilk 48 saatte kondrosit canlılığı üzerine minimal etkisi olduğu ve 72 saat süresince kullanılmasıyla epinefrinle kombine edilmiş bupivakinin belirgin düzeyde hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. Yine başka bir in vivo çalışmada %0,5 bupivakinin 3 gün uygulanması sonucunda, domuz eklem kıkırdığında proteoglikan sentezinin geçici olarak baskılandığı gösterilmiştir (51). Ancak Nole ve ark. (116) tarafından yapılan bir diğer çalışmada yine domuz diz eklemine tek doz uygulanan %0,5 bupivakin enjeksiyonundan 3 gün sonra sülfat alımının etkilenmediği gösterilmiştir. Tavşan omuz modelinde, erken dönemde gözlenen kondrotoksisitenin uzun dönem sonuçlarını araştıran in vivo bir başka çalışmada intra artiküler bupivakin infüzyonundan 3 ay sonra kıkırdak fonksiyonunda kalıcı herhangi bir değişikliğe rastlanmadığı bildirilmektedir. Diğer taraftan, aynı araştırmada bupivakaine maruz kalmış kıkırdakta artmış sülfat alımı ve yüksek proteoglikan içeriği ile karakterize "anabolik aktivite artışı" tespit edilmiştir. Bu çelişkili sonuçlar deneysel modellerde kıkırdak fonksiyonunun bupivakin maruziyetinden sonra geçici olarak bozulduğunu göstermektedir. Bupivakin maruziyetinden sonraki 1. haftada kıkırdak metabolizmasında azalma olmakta ancak 3 ay sonra kıkırdak metabolizması yalnızca düzelmekle kalmayıp aynı zamanda anabolik aktivite artmaktadır. Geç dönemde artmış olan anabolik aktivite ve proteoglikan sentezi, kıkırdak dokusunun zararlı uyaranlara karşı onarıcı yanıtı olarak değerlendirilebilir (46).

Kondrosit apoptozisinin mekanizmasını açıklamaya çalışan Lotz ve Hashimoto (70) kondrosit apoptozisinin 4 haftadan daha kısa sürede gerçekleştiğini bildirmektedir. Doğan ve ark (50), yaptıkları çalışmada tavşan diz eklemine bupivakin ve neostigmin'in artiküler kıkırdak dokusu ve synovium dokusu üzerine etkilerini araştırmışlardır. Hayvan modeli olarak tavşan arka bacak diz eklemine kullanılmış olduğu araştırmada bupivakin ve neostigmin'in kıkırdak doku ve synovial membranda enflamasyona, kondrositlerde ise yapısal değişikliklere neden olduğu savunulmaktadır. Söz konusu araştırmada bupivakinin artiküler kıkırdak dokusunda 24 ve 48. saatlerde minimal, 10. günde ise orta derecede enflamasyona neden olduğu gözlenmiştir (50).

Uzun dönemde daha fazla olmak kaydıyla bupivakin'in kartilaj doku üzerine kondrotoksik etkileri olduğu, yukarıda da bahsedildiği üzere, birçok araştırmada gösterilmiştir. Çalışmamızda bupivakinin, 7. ve 28. günlerde SF uygulanan gruba

nazaran, oldukça yüksek derecede apoptotik aktivasyona neden olduğunu saptadık. Daha önce kondrotoksik özellikleri araştırılmamış olan levobupivakainin ise bupivakainden oldukça düşük seviyede apoptotik aktivasyona neden olduğunu gözledik. Programlanmış hücre ölümü olan apoptozisin aktivasyonu, kondrolizis ve nekrozla sonuçlanan kondrotoksisiteden sorumlu tutulmaktadır (91,92). Levobupivakainin bupivakaine nazaran daha az apoptotik aktivasyona neden olması, daha az kondrotoksik olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, çalışmamızda söz konusu ajanların kartilaj doku üzerine enflamatuar etkilerini ayrıca değerlendirmedik.

Gomoll ve ark. (52) tavşan omuz modelinde glenohumeral ekleme yerleştirilen bir kateter aracılığı ile 48 saat boyunca bupivakain infüzyonu uyguladıkları in vivo çalışmalarında bupivakainin kondrotoksik etileri olduğunu bildirmektedirler. Diz eklemine bolus enjeksiyondan 30- 45 dakika sonra bupivakain maksimum kan konsantrasyonuna ulaşmaktadır (114). Gomoll ve ark. (52) tek doz enjeksiyonu takiben bupivakainin kısa zamanda emilerek sistemik dolşıma katılması nedeniyle etkili intraartiküler konsantrasyonunun azaldığını, bu yüzden devamlı infüzyon yöntemi ile uygulanan bupivakainin daha fazla kondrosit ölümüne neden olabileceğini savunmaktadırlar.

Ancak Gomoll ve ark. (52)'nin devamlı infüzyon yöntemi ile uygulanan bupivakainin, tek doz uygulanan bupivakainden daha fazla kondrotoksik olduğu görüşlerinin aksine, Doğan ve ark. (50) tavşan diz eklemi kıkırdak dokusunda inflammatuar değişiklikler gözledikleri araştırmalarında olduğu gibi tek doz intraartiküler enjeksiyon tekniğini kullandığımız çalışmamızda bupivakain grubunda daha yoğun olmak kaydıyla intra artiküler uygulanan her iki ajanın da hem 7. hem de 28. günde apoptotik aktivasyona neden olduğunu gözledik.

Çalışmamızda 7. günde gözlemiş olduğumuz bupivakainin neden olduğu apoptotik aktivasyonun 28. günde de aynı düzeyde gözlemlendiğini tespit ettik. İlginç olarak levobupivakainin neden olduğu apoptotik aktivasyonun, 7. günde minimal düzeyde olduğunu, 28. günde ise, bupivakainden daha az olmak kaydıyla artmış olduğunu gözledik. Bu bulgularımız, levobupivakainin kıkırdak dokusunda apoptotik aktivasyon etkisinin, bupivakainden oldukça düşük düzeyde olmasının yanı sıra, yavaş başlangıçlı olduğunu düşündürmektedir.

Uygulanan her iki lokal anestezi ajan için, hem ışık mikroskopisinde hem de floresan mikroskopta 28. günde apopitotik indeks değerlerinin 7. günde apopitotik indeks değerlerinden anlamlı derecede yüksek olduğunu saptadık. Yine hem ışık mikroskopisinde hem de floresan mikroskopta, apopitotik indeks değerleri yönünden, SF grubu ile bupivakain ve levobupivakain gruplarının ayrıca bupivakain grubu ile levobupivakain grubunun anlamlı derecede farklı olduğunu saptadık. Ancak, 7. gün ve 28. gün apopitotik indeks değerlerinin karşılaştırılmasında, ışık mikroskopisinde SF grubu ile levobupivakain grubu arasında anlamlı derecede fark bulunurken, floresan mikroskopta bu iki grup arasında fark saptayamadık. Işık mikroskopunda apoptozise dair bütün morfolojik değişikliklerden ziyade, sadece çekirdek yapısında görülen nükleer kondansasyon ve fragmantasyon gibi görünüşler dikkate alınarak sayım yapılabilmektedir. Floresan mikroskop incelemesinde kullanılan TUNEL boyama metodu ile parçalanmış nükleuslar spesifik olarak işaretlenerek görünür hale getirilebilmektedir. Işık mikroskopu bulgularımızla floresan mikroskop bulgularımız arasında farkın her iki incelemedeki yöntem farkına bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Sonuç olarak; bu çalışmada daha önce kondrotoksik özellikleri araştırılmamış olan levobupivakainin, bupivakainden daha az apopitotik aktivasyona neden olduğunu ve levobupivakainin neden olduğu apopitotik aktivasyonun daha yavaş seyirli olduğunu saptadık. İleri araştırmalarla desteklenmesi gerekmele birlikte, artroskopik cerrahi uygulanan hastalarda, postoperatif analjezi amacıyla uygulanan intraartiküler lokal anestezi enjeksiyonunda, daha az kondrotoksik olan levobupivakainin tercih edilmesinin önerebileceği kanaatindeyiz.

6. SONUÇLAR

1. Bupivakain enjeksiyonuna baēlı apopitotik aktivasyon 7. güne kadar oluşmakta ve aynı düzeyde 28. güne kadar devam etmektedir.
2. Levobupivakain enjeksiyonuna baēlı gelişen apopitotik aktivasyon yavaş seyirli olarak 7. günden sonra 28. güne kadar devam etmektedir.
3. 28. günde ulaşılan apopitotik indeks deēerine göre levobupivakain, bupivakaine nazaran daha az apopitotik aktivasyona neden olmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Jacobson E, Assareh H, Cannerfelt R, R, Jakobsson J. The postoperative analgesic effects of intra-articular levobupivacaine in elective day-case arthroscopy of the knee: a prospective randomized, double-blind clinical study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2006; 14: 120–124
2. Smith I, Hemelrijck J, White P, Shive R. Effects of Local Anesthesia on Recovery After Outpatient Arthroscopy. *Anesth analg* 1991; 73:536-9
3. Park J, Sutradhar BC, Hong G, Choi SH, Kim G. Comparision of the cytotoxic effects of bupivacaine, lidocaine and mepivacaine in equine articular chondrocytes. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 2011; 38:127-133
4. Chu CR, Izzo NJ, Coyle CH, Papas NE. The in vitro effects of bupivacaine on articular chondrocytes. *Journal of Bone and Joint Surgery – British* 2008; 90-B 814-820
5. Casati A, Putzu M. Bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine: are they clinically different? *J Clin Anesth* 2005; 15: 247-268.
6. Foster RH, Markham A. Levobupivacaine: A rewiev of its pharmacology and use as a local anaesthetic. *Drugs* 2000; 59:531-579.
7. Leone S, Di Cianni S, Casati A, Fanelli G. Pharmacology, toxicology, and clinical use of new long acting local anesthetics, ropivacaine and levobupivacaine. *Acta Biomed* 2008; 79: 92-105.
8. Park CJ, Park SA, Yoon TG, et al. Bupivacaine Induces Apoptosis via ROS in the Schwann Cell Line. *J Dent Res* 2005; 84:852-857.
9. Grishko V, Xu M, Wilson G, Pearsall AW. Apoptosis and mitochondrial dysfunction in human chondrocytes following exposure to lidocaine, bupivacaine, and ropivacaine. *J Bone Joint Surg Am* 2010; 92:609-18.
10. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. 8th ed. *Basic Histology* Appleton and Lange; 1995. p.124-31.
11. Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am* 1982; 64:460-6.
12. Miller MD. *Review of Orthopaedics*. 5th ed. Saunders Elsevier; 2008. p.39-40.

13. Hall AC, Horwitz ER, Wilkins RJ. The cellular physiology of articular cartilage. *Exp Physiol* 1996;81:535-45.
14. Ulrich-Vinther M, Maloney MD, Schwarz EM, Rosier R. Articular cartilage biology. *J Am Acad Orthop Surg* 2003;11:421-30
15. Bilge O, Doral MN, Dönmez G, Turhan E, Leblebicioğlu AG. Sinoviyal Dokunun Hiyalin Kıkırdak Oluşumuna Etkisi. *Türkiye Klinikleri J Orthop & Traumatol-Special Topics* 2011;4:87-94
16. Ronny M, Schulz AB. Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes. *Eur Biophys J* 2007; 36:539–568
17. Browne JE, Branch TP. Surgical alternatives for treatment of articular cartilage lesions. *J Am Acad Orthop Surg* 2000;8:180-9.
18. Wakitani S, Kawaguchi A, Tokuhara Y, Taka-Oka K. Present status and future direction for articular cartilage repair. *J Bone Miner Metab* 2008;26:115-22.
19. Kaloğlu C. Kıkırdak Dokusu. <http://tippedu.cumhuriyet.edu.tr> 27.02.2013
20. O'Driscoll SW. The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1998;80:1795-812.
21. Tognana E, Chen F, Padera RF, Leddy HA, et al. Adjacent tissues (cartilage, bone) affect the functional integration of engineered calf cartilage in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13:129-38.
22. Aydoğan FC. Diz ekleminde defekt iyileşmesine, elektromanyetik alanın etkileri. *Ortopedi ve Travmatoloji ABD. Uzmanlık tezi* 2008.
23. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. 8th ed. *Basic Histology* Appleton and Lange 1995. p.148-50.
24. Prockop DJ. Further proof of the plasticity of adult stem cells and their role in tissue repair. *J Cell Biol* 2003;160:807-9.
25. De Bari C, Dell'Accio F, Tyzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001;44:1928-42.
26. Nishimura K, Solchaga LA, Caplan AI, Yoo JU, Goldberg VM, Johnstone B. Chondroprogenitor cells of synovial tissue. *Arthritis Rheum* 1999;42:2631-7.

27. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue and muscle. *Cell Tissue Res* 2007;327:449-62.
28. Kayhan Z. Lokal anestezi. *Klinik Anestezi*. 3. Baskı. Ankara: Logos Yayıncılık 2004; 503-523.
29. Korfalı G. Lokal anestezi. *Anestezi Temel Konular*. 1. Baskı. Nobel Tıp Kitapevi 2003; 117-127.
30. Morgan GA, Maged SM, Murray MJ. Local Anesthetics. *Clinical Anesthesiology*. The McGraw-Hill Companies Inc, New York. 2002; 233-241.
31. Whiteside JB, Wildsmith JAW. Developments in lokal anaesth. 2001;87:27-35.
32. Kayaalp O. Lokal Anestezi. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. Logos Yayıncılık, Ankara 2002;789-806.
33. Kocamanoğlu İS, Sarihasan B. Lokal anestezi: Yeni bir lokal anestezi; Levobupivakain. *O.M.Ü. Tıp Dergisi* 2007;24:27-36.
34. Tasch MD, Butterworth JF. Toxicity of local anesthetics. *ASA Refresher Courses in Anesthesiology* 2006; 34:165-177.
35. Muguruma T, Sakura S, Saito Y. Epidural Lidocaine Induces Dose-Dependent Neurologic Injury in Rats. *Anesth Analg* 2006; 103:876-881
36. Zink W, Graf BM. Local anesthetic myotoxicity. *Reg Anesth Pain Med* 2004; 29:333-340.
37. Kalso E, Lalla M, Rosenberg P, et al. Evaluation of the Myotoxicity of Bupivacain in Bier Blocks-A Biochemical and Electron Microscopic Study. *Anesth Analg* 1983; 62:796-801.
38. Zeidan A, Kassem R, Nahleh N, et al. Intraarticular Tramadol Bupivacaine Combination Prolongs the Duration of Postoperative Analgesia After Outpatient Arthroscopic Knee Surgery. *Anesth Analg* 2008; 107: 292-9.
39. Axelsson K, Gupta A, Johanson E, et al. Intraarticular Administration of Ketorolac, Morphine, and Ropivacaine Combined with Intraarticular Patient-Controlled Regional Analgesia for Pain Relief After Shoulder Surgery: A Randomized, Double-Blind Study. *Anesth Analg* 2008; 106: 328-33.

40. Fester EW, Noyes FR. Postoperative chondrolysis of the knee: 3 case reports and a review of the literature. *Am J Sports Med* 2009; 37: 1848-54.
41. Seshadri V, Coyle CH, Chu CR. Lidocaine potentiates the chondrotoxicity of methylprednisolone. *Arthroscopy* 25:337–347
42. Chu CR, Coyle CH, Chu CT, et al. In vivo effects of single intra-articular injection of 0,5% bupivacaine on articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 2010; 92:599–608
43. Santos LC, Moraes AN, Saito ME. Effects of Intraarticular ropivacaine and morphine on lipopoly-saccharide-induced synovitis in horses. *Vet Anaesth Analg* 2009; 36, 280–286.
44. Cela O, Piccoli C, Scrima R, et al. Bupivacaine uncouples the mitochondrial oxidative phosphorylation, inhibits respiratory chain complexes I and III and enhances ROS production: Results of a study on cell cultures. *Mitochondrion* 2010; 10:487–496.
45. Unami A, Shinohara Y, Ichikawa T, Baba Y. Biochemical and microarray analyses of bupivacaine induced apoptosis. *J Toxicol Sci* 2003; 28:77-94.
46. Gomoll AH, Yanke AB, Kang RW, et al. Long-Term Effects of Bupivacaine on Cartilage in a Rabbit Shoulder Model. *Am J Sports Med* 2009; 37: 72-7.
47. Collins VJ. Local anesthetics: Principles of Anesthesiology. 3rd ed. Collins VJ Lea&Febiger, Philadelphia 1993;1232-1240.
48. Zink W, Missler G, Sinner B et al. Differential effects of bupivacaine and ropivacaine enantiomers on intracellular Ca²⁺ regulation in murine skeletal muscle fibers. *Anesthesiology* 2005; 102:793-8.
49. Cave G, Harvey M. Intravenous lipid emulsion as antidote beyond local anesthetic toxicity: a systematic review. *Acad Emerg Med* 2009; 16:815-824.
50. Doğan N, Erdem AF, Erman Z, Kızılkaya M. The Effects of Bupivacaine and Neostigmine on Articular Cartilage and Synovium in the Rabbit Knee Joint. *The Journal of International Medical Research* 2004; 32: 513 – 519
51. Fulkerson JP, Damiano P. Effect of prostaglandin E₂ on adult pig articular cartilage slices in culture. *Clin Orthop Relat Res* 1983; 179: 266-9.

52. Gomoll AH, Kang RW, Williams JM, Bach BR, Cole BJ. Chondrolysis after continuous intra-articular bupivacaine infusion: an experimental model investigating chondrotoxicity in the rabbit shoulder. *Arthroscopy* 2006; 22: 813-9.
53. Dragoo JL, Korotkova T, Kanwar R, Wood B. The Effect of Local Anesthetics Administered Via Pain Pump on Chondrocyte Viability. *Am J Sports Med* 2008; 36: 1484-8
54. McCellan KJ, Spencer CM. Levobupivacaine. *Drugs* 1998; 56:355-362.
55. Huang YF, Pryor M, Mather LE, Veering BT. Cardiovascular and central nervous system effects of intravenous levobupivacaine and bupivacaine in sheep. *Anesth Analg* 1998; 86:797-804.
56. Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi* 2008; 2; 73-78
57. Cohen J J. Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function. *American College of Physicians, CHEST* 1993; 103: 99-101.
58. Mountz J D, Zhou T (2001): Apoptosis and autoimmunity (in) *A Textbook of Rheumatology: Arthritis and allied conditions*. WJ Kopman (Editör), Lippincott-Williams&Wilkins
59. Öniz H (2004): Apoptoz: Ölmeye yatmak. *SSK Tepecik Eğitim Hastanesi Dergisi* 14.
60. Ulukaya E. Apoptozis Ders Notları. Erişim: [<http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozisersnotu.pdf>] Erişim tarihi: 04.05.2007.
61. Altunkaynak B. Z, Özbek E. Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir? *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2008; 6:93 -104
62. Ozbek E, Ozbek A. Microscopic pathology of the liver in rats fed a *Fusarium graminearum* inoculated diet. *J Int Med Res*. 2003; 31: 392-401
63. Erdoğan BB. Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-faslı bağımlı apoptozis. *Akciğer Arşivi* 2003; 4: 165-174
64. Bender LM, Morgan MJ, Thomas LR, Liu ZG, Thorburn A. The adaptor protein TRADD activates distinct mechanisms of apoptosis from the nucleus and the cytoplasm. *Cell Death and Differentiation* 2005; 12: 473–481.

65. Öktem S, Özhan M H, Özol D. Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi* 2001; 2: 91-95.
66. <http://www.medix.marshall.edu>.
67. Akşit H, Bildik A. Apoptozis. *YYÜ Veterinerlik Fakültesi Dergisi* 2008; 19: 55-63
68. Essmann F. Mechanisms of apoptosis in cancer; regulatory role of caspases. Doctoral Thesis, Tecnic University of Berlin, Berlin 2000.
69. Barisic K, Petrik J, Rumora L. Biochemistry of apoptotic cell death. *Acta Pharm* 2003; 53: 151-164.
70. Lotz M, Hashimoto S and Kühn K. Mechanisms of chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis and Cartilage* 1999; 7;389–391
71. Benchimol M, Silva Fontes R, Burla Dias AJ. *Tritrichomonas foetus* damages bovine oocytes in vitro. *Vet Res* 2007; 38: 399-408.
72. Palazzo IG, Lega A, Farinha GS, Berrotarán N, Ortiz S. Infrecuente neoplasia de utero: linfoma primario, presentacion de un caso. *Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomia Patologica* 2005.
73. Yılmaz İ. Erişkin ratlarda deneysel varikozel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi ve yükselmiş olan apoptozisin varikoselektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin tunel yöntemi ile değerlendirilmesi. *Uzmanlık Tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, İstanbul (2005)*.
74. Spector DL, Goldman RD, Leinwand LA. Culture and Biochemical Analysis of Cells (in) *Cells: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA 1998; 15.1-15.24,
75. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol* 2007; 35: 495–516.
76. Natori S, Selzner M, Valentino KL, et al. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism. *Transplantation* 1999; 15; 68: 89- 96
77. Foster AH, Carlson BM. Myotoxicity of local anesthetics and regeneration of the damaged muscle fibers. *Anesth Analg* 1980; 59:727-773.

78. Zink W, Seif C, Bohl JRE, et al. The acute myotoxic effects of bupivacaine and ropivacaine after continuous peripheral nerve blockades. *Anesth Analg* 2003; 97:1173-1179.
79. Marcus MAE, Durieux ME, Cox B. Toxicity of local anaesthetics. *Clinical Anesthesiology* 2003; 17:111-136.
80. Nouette-Gaulain K, Dadure C, Morau D, et al. Age-dependent Bupivacaine-induced Muscle Toxicity during Continuous Peripheral Nerve Block in Rats. *Anesthesiology* 2009; 111:1120–7.
81. Chu CR, Izzo NJ, Papas NE, Fu FH. In vitro exposure to 0,5% bupivacaine is cytotoxic to bovine articular chondrocytes. *Arthroscopy* 2006;22:693-9.
82. Hansen BP, Beck CL, Beck EP, Townsley RW. Postarthroscopic glenohumeral chondrolysis. *Am J Sports Med* 2007;35:1628-34.
83. Piper SL, Kim HT. Comparison of ropivacaine and bupivacaine toxicity in human articular chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am* 2008;90:986-91.
84. Karpie JC, Chu CR. Lidocaine exhibits dose and time dependent cytotoxic effects on bovine articular chondrocytes in vitro. *Am J Sports Med* 2007;35:1621-7.
85. Hasdoğan M, Yılmaz A, Ökten F. İntraartiküler Lokal Anestezikler Kondrolizise Neden Olur mu? *Anestezi Dergisi* 2010; 18: 63 - 67
86. Graf BM, et al. Comparison of the direct cardiotoxicity of the isomers of ropivacaine and bupivacaine. *Anesthesiology* 1998;89.
87. Reiz S, Nath S. Cardiotoxicity of local anesthetics agents. *Br J Anaesth* 1986; 58:736-746.
88. Sztark F, Malgat M, Dabadie P, Mazat JP. Comparison of effects of bupivacaine and ropivacaine on heart cell mitochondrial bioenergetics. *Anesthesiology* 1998; 5:1340-9.
89. Nouette-Gaulain K, Sirvent P, Canal-Raffin M, et al. Effects of Intermittent Femoral Nerve Injections of Bupivacaine, Levobupivacaine and Ropivacaine on Mitochondrial Energy Metabolism and Intracellular Calcium Homeostasis in Rat Psoas muscle. *Anesthesiology* 2007; 106:1026-34.
90. Zink W, Seif C, Bohl JRE, Martin E, Graf BM. Bupivacaine, but not ropivacaine induces apoptosis in mammalian skeletal muscle fibers. *Anesthesiology* 2002; 96:A971.

91. Pizzolato P, Renegar OJ. Histopathologic effects of long exposure to local anesthetics on peripheral nerves. *Anesth Analg* 1959; 38:138-141.
92. Boselli E, Duflo F, Debon R, et al. The Induction of Apoptosis by Local Anesthetics: A Comparison Between Lidocaine and Ropivacaine. *Anesth Analg* 2003; 96:755–6.
93. Borazan M, Karalezli A, Oto S. Induction of apoptosis of rabbit corneal endothelial cells by preservative-free lidocaine hydrochloride 2%, ropivacaine 1%, or levobupivacaine 0.75%. *J Cataract Refract Surg* 2009; 35:753–8.
94. Zink W, Bohl JR, Hacke N, et al. The long term myotoxic effects of bupivacaine and ropivacaine after continuous peripheral nerve blocks. *Anesth Analg* 2005; 101:548-554.
95. Lee WY, Park CJ, Shin TJ, et al. Only tetracaine and not other local anaesthetics induce apoptosis in rat cortical astrocytes. *Br J Anaesth* 2009; 103:719-25.
96. Kim M, Lee YS, Mathews HL, Wurster RD. Induction of Apoptotic Cell Death in a Neuroblastoma Cell Line by Dibucaine. *Exp Cell Res* 1997; 231:235–241.
97. Lee HT, Xu H, Siegel CD, Krichevsky IE. Local anesthetics induce human renal cell apoptosis. *Am J Nephrol* 2003; 23:129-139.
98. Llinas A, McKellop HA, Marshall GJ, et al. Healing and remodeling of articular incongruities in a rabbit fracture model. *J Bone Joint Surg Am* 1993;75:1508–1523.
99. Mitchell N, Shepard N. Healing of cartilage in intraarticular fractures in rabbits. *J Bone and Joint Surg Am* 1980;62:628–634.
100. Smith I, Shively RA, White PF. Effects of ketorolac and bupivacaine on recovery after outpatient arthroscopy. *Anesth Analg* 1992; 75: 208 – 212.
101. Zhao R, Ren Y, Sun B, Zhang R, Liang D. Experimental study on chitosan mediated insulin-like growth factor gene transfection repairing injured articular cartilage in rabbits. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2010; 24:1372-5.
102. Tosun N, Akpınar F, Dogan A. Effects of Glutaraldehyde on Synovial Tissue. *The Journal of International Medical Research* 2003; 31:422 – 427

103. Borrelli J, Tinsley K, William M, Burns R et. al. Induction of Chondrocyte Apoptosis Following Impact Load. *J Orthop Trauma* 2003;17:635–641
104. Cook TM, Tuckey JP, Nolan JP. Analgesia after day-case knee arthroscopy: double-blind study of intra-articular tenoxicam, intra-articular bupivacaine and placebo. *Br J Anaesth* 1997; 78: 163 – 168.
105. Doğan N, Erdem AF, Gündogdu C, Kursad H, Kızılkaya M. The effects of ketorolac and morfine on articular cartilage and synovium in the rabbit knee joint. *Physiol. Pharmacol* 2004; 82;502-505.
106. Guingamp CP, Gegout PP, Philippe L, Terlain B, Netter P, Gillet P. Monoiodoacetate induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum* 1997;40:1670-9.
107. Kuwata K, Sato S, Era S, et al. Cross relaxation times of normal and biochemically induced osteoarthritic rabbit knee cartilages. *Jpn J Physiol* 1997;47:291-7.
108. Pulichino AM, Rowland S, Wu T, et al. Prostacyclin antagonism reduces pain and inflammation in rodent models of hyperalgesia and chronic arthritis. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;319:1043-50.
109. Grossin L, Etienne S, Gaborit N, et al. Induction of heat shock protein 70 (Hsp70) by proteasome inhibitor MG 132 protects articular chondrocytes from cellular death in vitro and in vivo. *Biorheology* 2004;41:521-34.
110. Kockx MM, Muhring J, Knaapen MWM, De Meyer GRY. RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am J Pathol* 1998; 152:885-8.
111. Amaniti E, Drampa F, Kouzi-Koliakos K, et al. Ropivacaine myotoxicity after single intramuscular injection in rats. *Eur J Anesth* 2006; 23:130-135.
112. Stahelin BJ, Marti U, Solioz M, et al. False positive staining in the TUNEL assay to detect apoptosis in liver and intestine is caused by en- dogenous nucleases and inhibited by diethyl pyrocarbonate. *Mol Pathol* 1998;51:204–208.
113. Wolvekamp MCJ, Darby IA, Fuller JA. Cautionary note on the use of end-labeling DNA fragments for detection of apoptosis. *Pathology* 1998;20:267–271.
114. Convery PN, Milligan KR, Quinn P, Sjövall J, Gustafsson U. Efficacy and uptake of ropivacaine and bupivacaine after single intraarticular injection in the knee joint. *Br J Anaesth* 2001;87:570-6.

- 115.** Webb ST, Ghosh S. Intraarticular bupivacaine: potentially chondrotoxic? BJA 2009; 102: 439-41.
- 116.** Nole R, Munson NM, Fulkerson JP. Bupivacaine and saline effects on articular cartilage. Arthroscopy 1985; 1: 123-7.

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Osman ÇEVİK'e ait "**Levobupivakain Ve Bupivakainin Kondrotoksik Etkileri; Apoptotik Aktivite Çalışması**" adlı çalışması, Tez Jürimiz tarafından Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalında Tıpta **Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 24 / 06 / 2013

Başkan : Prof. Dr. Halit MADENOĞLU



Üye : Prof. Dr. Karamehmet YILDIZ



Üye : Doç. Dr. Recep AKSU

