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

LEVOBUPİVAKAİN, BUPİVAKAİN VE ROPİVAKAİNİN MİYOTOKSİK ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI; ELEKTRON MİKROSKOPİK İNCELEME VE APOPTOTİK AKTİVİTE ÇALIŞMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Özlem ÖZ GERGİN

KAYSERİ – 2011

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

LEVOBUPİVAKAİN, BUPİVAKAİN VE ROPİVAKAİNİN MİYOTOKSİK ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI; ELEKTRON MİKROSKOPİK İNCELEME VE APOPTOTİK AKTİVİTE ÇALIŞMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Özlem ÖZ GERGİN

Danışman
Doç. Dr. Karamehmet YILDIZ

KAYSERİ – 2011

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,

Doç. Dr. Karamehmet Yıldız'a,

Kıymetli vakitlerini tez çalışmam için ayıran ve laboratuarlarının kapılarını açan, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Sait Polat ve

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Saim Özdamar'a

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

Dr. Şamil Gergin'e

teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
KISALTMALAR iv
TABLO LİSTESİ v
ŞEKİL ve RESİM LİSTESİ vi
ÖZET vii
ABSTRACT ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. KAS DOKUSU 3
2.1.1. İskelet Kası 3
2.1.1.1. Miyofibriller 4
2.1.1.2. İskelet Kasının Elektron Mikroskopta Görünümü 5
2.1.1.3. Çizgili Kasın Kasılma Mekanizması 6
2.1.1.4. Sarkoplazmik Retikulum 7
2.1.1.5. Sarkoplazmadaki Diğer Yapılar 7
2.1.1.6. İskelet Kas Dokusunun Enerji Üretim Sistemi 8
2.1.1.7. İskelet Kas Dokusunda Rejenerasyon 8
2.1.1.8. İskelet Kas Dokusunda İnnervasyon 8
2.2. LOKAL ANESTEZİKLER 9
2.2.1. Lokal Anesteziklerin Tanımı ve Tarihçesi 9
2.2.2. Lokal Anesteziklerin Etki Mekanizmaları 9
2.2.3. Lokal Anesteziklerin Kimyasal Yapıları ve Sınıflandırılması 10
2.2.4. Lokal Anesteziklerin Etkisini Belirleyen Faktörler 12
2.2.5. Lokal Anesteziklerin Farmakokinetik Özellikleri 12
2.2.6. Lokal Anesteziklerin Yan Etkileri 13
2.2.7. Lokal Anesteziklere Bağlı İskelet Kas Dokusundaki Histopatolojik Değişikliklerin Patogenezi 15
2.2.8. Bupivakain (Marcaine®) 18
2.2.9. Ropivakain (Naropin®) 23
2.2.10. Levobupivakain (Chırocaıne®) 24
2.3. KAS İSKELET SİSTEMİNDE LOKAL ANESTEZİKLERE BAĞLI SUBSELLÜLER DEĞİŞİKLİKLER VE İNCELENME YÖNTEMLERİ 26

2.3.1. Apoptosiz 26
2.3.1.1 Apoptozis Oluşum Mekanizmaları 27
2.3.1.2.Apoptotik Hücrede Gözlenen Morfolojik Değişiklikler 27
2.3.1.3 Apoptozis Saptamasında Kullanılan Yöntemler 28
2.3.1.4 İskelet Kas Dokusundaki Apoptozisin Morfolojik Paternleri 30
2.3.2. Transmisyon Elektron Mikroskopta İskelet Kas Dokusundaki Hücre Organellerinin İncelenmesi 31
2.3.2.1. Lokal Anesteziklere Bağlı İskelet Kas Dokusundaki Histopatolojik Değişikliklerin Transmisyon Elektron Mikroskopta İncelenmesi 31
3. MATERYAL ve METOD 33
3.1. DENEYSEL ÇALIŞMANIN YAPILIŞI 33
3.2. IŞIK MİKROSKOBUNDA İNCELEME YÖNTEMİ 35
3.3. İMMUNOFLORESAN MİKROSKOPTA İNCELEME YÖNTEMİ 35
3.4. ELEKTRON MİKROSKOPTA İNCELEME YÖNTEMİ 35
3.5. HASAR SKORLAMA SİSTEMİ 37
3.6. İstatistiksel Analiz 37
4. BULGULAR 38
4.1. SF GRUBUNA AİT BULGULAR 38
4.1.1. Işık Mikroskobu Bulguları 38
4.1.2. Immunofloresan Mikroskop Bulguları 39
4.1.3. Elektron Mikroskop Bulguları 39
4.2. BUPİVAKAİN GRUBUNA AİT BULGULAR 42
4.2.1.Işık Mikroskobu Bulguları 42
4.2.2. Immunofloresan Mikroskop Bulguları 45
4.2.3. Elektron Mikroskop Bulguları 45
4.3. ROPİVAKAİN GRUBUNA AİT BULGULAR 50
4.3.1. Işık Mikroskobu Bulguları 50
4.3.2. Immunofloresan Mikroskop Bulguları 52
4.3.4. Elektron Mikroskop Bulguları 52
4.4. LEVOBUPİVAKİAN GRUBUNA AİT BUGULAR 55
4.4.1. Işık Mikroskobu Bulguları 55
4.4.2.Immunofloresan Mikroskop Bulguları 58
4.4.3. Elektron Mikroskop Bulguları 58
5. TARTIŞMA 62
6. SONUÇLAR 74
7. KAYNAKLAR 75

KISALTMALAR

DEKAM : Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi
TIBDAM : Çukurova Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi
Ca^{++} : Kalsiyum
Cm : Minimum Anestezik Konsantrasyon
EMG : Elektromyografi
G : Gauge
i.m : İntramüsküler
iv : İntravenöz
KVS : Kardiyovasküler Sistem
MRG : Magnetik Resonans Görüntüleme
Na^{+} : Sodyum
PABA : Paraaminobenzoik asit
PTP : Permeabilite Geçiş Poru
RyR : Ryonodin Reseptörü
SF : Serum Fizyolojik
SR : Sarkoplazmik Retikulum
ER : Endoplazmik Retikulum
GER : Granüllü Endoplazmik Retikulum
SSS : Santral Sinir Sistemi
TNS : "*Transient Neurologic Symptoms*"
Ml : Mikrolitre
EMLA : "*Eutectic mixture of lidocaine and prilocaine*"
TUNEL :*Terminal deoxynucleotidyl – transferase – mediated deoxyuridine triphospate – biotin insitu nick – end labelling*
ELISA : *Enzyme-linked İmmunosorbent Assay*
SEM : *Scanning Electron Microscope*
TEM : *Transmission Electron Microscope*
ROS : *Reactive Oxygen Species*
IVLE **:** Intravenöz Lipit Emülsiyonu
NAC **:** N-Asetilsistein
rhEPO **:** Rekombinant İnsan Eritropoetini
RİVA **:** Rejyonel İntravenöz Anestezi
TNF : Tümör Nekroz faktörü
CSF : Koloni Uyarıcı Faktörü
NGF : Nöron Büyüme Faktörü
IGF : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
DAPI : *4,6-Diamine-2'phenylindoledihydrochloride*
ATP : Adenozin Trifosfat
ADP : Adenozin Difosfat
PARP : Poli-ADP-riboz polimeraz

TABLO LİSTESİ

Tablo1. Bazı Lokal Anesteziklerin Fizikokimyasal Özellikleri 11

Tablo 2. Elektron Mikroskobik İncelemeye Yönelik Doku Takip Yöntemi 36

Tablo 3. *Benoit-Yagiela-Ferrell* Hasar Skorlama Sistemi 37

Tablo 4. Grupların 2. günde Kas Hasar Skorları [Med (min-max)] 60

Tablo 5. Grupların "*Kruskal – Wallis Test*" Sonuçları 61

Tablo 6. Grupların "*Mann Whitney - u Test*" Sonuçları 61

ŞEKİL ve RESİM LİSTESİ

Şekil 1. Lokal Anesteziklerin Yapısı 10
Şekil 2. Bupivakainin Açık Formülü 18
Şekil 3. Ropivakain 23
Şekil 4. Levobupivakain 25
Resim 1. Ratların enjeksiyon yapılan kaslarının disseke edilmesi 34
Resim 2. %0,9 normal salin enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin ışık mikroskopta görünümü 38
Resim 3. %0,9 normal salin enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin immünflorasan mikroskopta görünümü 39
Resim 4-7. %0,9 normal salin enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin elektron mikroskopta görünümü 40-42
Resim 8-11. % 0,5 bupivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin ışık mikroskopta görünümü 43-44
Resim 12. % 0,5 bupivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin immünflorasan mikroskopta görünümü 45
Resim 13-19. % 0,5 bupivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin elektron mikroskopta görünümü 46-49
Resim 20-23. % 0,5 ropivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin ışık mikroskopta görünümü 50-51
Resim 24. % 0,5 ropivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin immünflorasan mikroskopta görünümü 52
Resim 25-29. % 0,5 ropivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin elektron mikroskopta görünümü 53-55
Resim 30-33. % 0,5 levobupivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin ışık mikroskopta görünümü 56-57
Resim 34. % 0,5 levobupivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin immünflorasan mikroskopta görünümü 58
Resim 35-37. % 0,5 levobupivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin elektron mikroskopta görünümü 59-60

LEVOBUPİVAKAİN, BUPİVAKAİN VE ROPİVAKAİNİN MİYOTOKSİK ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI; ELEKTRON MİKROSKOPİK İNCELEME VE APOPTOTİK AKTİVİTE ÇALIŞMASI

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, tek doz intramüsküler enjeksiyonla verilen bupivakain, ropivakain ve levobupivakainin rat iskelet kas dokusundaki miyotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Çalışma Wistar-Albino türü, dişi cins 40 rat üzerinde gerçekleştirildi. Deney hayvanları, her biri 10 rattan oluşan 4 gruba ayrıldı. Ratların sağ gastrocinemius kasına, çalışma grubuna uygun olarak % 0,5 konsantrasyonda bupivakain, ropivakain ve levobupivakain ile %0,9 normal salin intramüsküler yoldan uygulandı. Her bir grupta yer alan ratlar enjeksiyondan sonraki 2. günde, ketamin anestezisi altında, servikal dislokasyon uygulanarak sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen ratların enjeksiyon yapılan kasları diseke edilerek ışık mikroskobu, elektron mikroskop ve immünflorasan mikroskopta incelenmek üzere hazırlandı. Işık mikroskobu için hazırlanan kesitler hemotoksilen-eozin ile boyanarak incelendi ve gözlenen kas hasarı "*Benoit, Yagiela ve Ferrell*" skorlama sistemi kulanılarak skorlandı. Söz konusu lokal anestezik ajanların iskelet kas dokusunda neden olduğu ultrastrüktürel değişiklikler transmisyon elektron mikroskop kullanılarak subsellüler düzeyde incelendi. Apoptotik aktivasyonun araştırılması için hazırlanan kesitler TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick and labelling assay) yöntemi ile boyandı ve immünflorasan mikroskopta değerlendirildi.

Bulgular: Işık mikroskobu incelemesinde Grup B, Grup L ve Grup R'de enjeksiyondan sonraki 2. günde gözlenen kas hasarı, Grup SF'de gözlenen kas hasarından anlamlı derecede fazlaydı ($p<0.05$). Her üç lokal anestezik ajanın neden olduğu iskelet kas dokusu hasarının kalitatif olarak benzer şekilde olduğu gözlendi. Kas hasarının kantitatif olarak, Grup B'de en fazla [Hasar Skoru = 3.0 (2.0-3.0)] , Grup R'de Grup B'den daha az [Hasar Skoru = 2.0 (2.0-3.0)] ve Grup L'de en az [Hasar Skoru = 1.0 (1.0-1.0)] olduğu gözlendi ($p<0.05$, her bir karşılaştırma için).

Hazırlanan kesitlerin elektron mikroskobik incelenmesinde, her üç lokal anestezik ajanın benzer şekilde; nispeten normal yapılarını koruyan kas lifleri ve hücre

çekirdeklerinin yanısıra, mitokondriyonlarda genişleme, mitokondriyon iç membranlarında parçalanma ve membranöz *whorl* oluşumları ile sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişlemeler şeklinde tanımlanan hücresel hasara neden olduğu gözlendi. Subsellüler hasarın, bupivakain grubunda en fazla, ropivakain grubunda bupivakain grubundan daha az ve levobupivakain grubunda en az olduğu gözlendi.

İmmünflorasan mikroskop incelemelerinde bupivakain verilen gruptan elde edilen kesitlerde apoptozise uğramış hücre kalıntıları gözlenirken, ropivakain ve levobupivakain verilen gruplarda apoptotik aktivasyon bulgularına rastlanmadı.

Sonuç: Bu çalışmada, bupivakainin rat iskelet kas dokusunda diğer iki ajandan daha fazla miyotoksik hasara neden olduğu, levobupivakainin ise hem bupivakainden hem de ropivakainden daha az miyotoksik hasara neden olduğu, ışık mikroskobu kullanılarak doku düzeyinde ve elektron mikroskop kullanılarak hücresel düzeyde gösterilmiştir. Çalışmada ayrıca, bupivakainin apoptotik hücre aktivasyonuna neden olduğu gözlenirken, ropivakain ve levobupivakainin böyle bir etkisinin olmadığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Lokal anestezikler, miyotoksisite, levobupivakain, bupivakain, ropivakain, elektron mikroskop, apoptozis.

COMPARISON OF MYOTOXIC EFFECTS OF LEVOBUPIVACAINE, BUPIVACAINE AND ROPIVACAINE; THE INVESTIGATION OF ELECTRONE MICROSCOPE AND THE EXAMINATION OF APOPTOTIC ACTIVITY

ABSTRACT

Aim: In this study, we aimed to investigate the myotoxic and apoptotic effects of levobupivacaine, bupivacaine and ropivacaine that were injected with single dosage intramuscular injection in the rat muscular tissue.

Materials and Methods: This study was conducted on 40 female Wistar-Albino rats. Rats were allocated to four groups as 10 rats in each group. Bupivacaine % 0,5, levobupivacaine % 0,5, ropivacaine % 0,5 and salin % 0,9 were injected intramuscularly into the right gastrocnemius muscle of rats, appropriate for the groups. Second day after the intramusculer injections, rats from the each group were sacrified by servical dislocation under ketamine anaesthesia. The muscles of the sacrified rats that were injected and dissected to prepare to examine under light microscope, electron microscope and immunofluorescence microscope for apoptotic activation. Preparates were examined by painting with the haematoxylin-eosin for light microscope and scored based on damage severity on an ordered scale, according to the *'Benoit, Yagiela and Ferrell'* scoring system. As mentioned ultrastructural changes caused by local anaesthesic agents were evaluated at subcellular level by electrone microscopy. Tissue preparations were painted via TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick and labelling assay) method, and evaluated at immunofluorescence misroscopy for apoptotic activation.

Results: Second day after the injection, the muscle damage in Group B, group L and group R were significantly more than group SF ($p<0.05$). We obtained qualitatively similar results between muscle tissue damage caused by local anasthesic agents in all groups. We observed the maximal quantitative muscle damage in Group B [damage score: 3.0(2.0-3.0)]; in Group R the damage was lesser than Group B [damage score: 2.0(2.0-3.0)] and minimally in Group L [damage score: 1.0(1.0-1.0)] ($p<0.05$, in each comparison).

The muscle samples in electron microcope, we observed normal structure on the muscle fibers and cell nucleous, mitochondrial expansion, disintegration in mitochondrial inner membrane, and cellular damage that was described as forming of membranous whorl and expansion in cisternas of sarcoplasmic reticulum, similarly for each local anesthetic regimens. We observed that the subcelluler damage in bupivacain group was maximal, in ropivacain group the damage was lesser than bupivacain group, and minimally in levobupivacain group.

In the examination of immunofluorescence microscope, although we observed apoptotic cellular remnants in the samples of bupivacain group, we did not observe any apoptotic activation findings in the ropivacain and levobuvacain groups.

Conclusion: In the present study, by using light microscope for the tissue level and electrone microscope for cellular level, it was shown that, bupivacaine caused the most myotoxic damage in the skeletal muscle tissue, levobupivacaine had lesser myotoxic effecs than both bupivacaine or ropivacaine. Additionally, in this study, bupivacaine caused the apoptotic cellular activation but ropivacaine and levobupivacaine have no such effect.

Key Words: Local anaesthetics, myotoxicity, levobupivacaine, bupivacaine, ropivacaine, electron microscope, apoptosis

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Çizgili kas dokusunda lokal anesteziklere bağlı oluşan histolojik değişikler ilk kez 1959 yılında Brun tarafından tanımlanmıştır (1). Lokal anesteziklerin istemli ya da istemsiz olarak i.m (intramüsküler) yoldan uygulanması, ilaca ve doza bağlı olarak, çizgili kas dokusunda myonekroza kadar ilerleyen hasara neden olmaktadır (1,5,6). Bölgesel ve lokal anestezi tekniklerinin klinik uygulamada giderek yaygınlaşmasına paralel olarak, lokal anestezik miyotoksisitesine bağlı olarak gelişen klinik sorunlar son yıllarda giderek artan sayıda rapor edilmektedir (1-4).

Bupivakain; uzun etkili olması ve etki potensinin yüksek olması nedeniyle klinik uygulamada yaygın olarak kullanılmakla birlikte bilinen en yüksek nörotoksik, kardiyotoksik ve miyotoksik etki potansiyeline sahip lokal anestezik ajandır (5-10). Ropivakain ise, bupivakainden daha az kardiyotoksik ve miyotoksik olduğu bilinen ve klinik uygulamada yaygın olarak kullanılan bir başka lokal anestezik ajandır (7-9). Levobupivakain, 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 (7,8,11).

Bupivakain ve diğer birçok lokal anestezik ajanın miyotoksik etkileri ile ilgili literatürde, çok sayıda araştırma (1,2,6,9) mevcut olmakla birlikte levobupivakainin myotoksisitesi ile ilgili halihazırdaki tek araştırma Efesoy ve Yıldız'ın (12) kliniğimizde gerçekleştirdikleri yayınlanmamış tez çalışmasıdır. Literatürde bupivakain ve ropivakainin miyotoksik etkilerini subsellüler düzeyde araştıran çalışmalar (6,9) bulunmakla birlikte, levobupivakainin iskelet kas dokusunda neden olduğu ultrastrüktürel değişiklikleri araştıran bir çalışma henüz yayınlanmamıştır. Benzer

şekilde, birçok lokal anestezik ajanın aksine, levobupivakainin miyositler üzerine apoptotik etkisini araştıran bir çalışmaya da rastlanmamıştır.

Çalışmamızda, bupivakain ve ropivakainin yanı sıra daha önceden yeterince araştırılmamış olan levobupivakainin miyotoksik etkilerini ve apoptotik aktivasyon potansiyelini, ışık mikroskobu, transmisyon elektron mikroskop (TEM) ve immünflorasan mikroskop kullanarak araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KAS DOKUSU

Kas dokusu, sitoplazmasında kasılan ve gevşeyebilen proteinler içeren farklılaşmış hücrelerden meydana gelmiştir. Bu proteinlerin biyolojik yapısı, bir bütün olarak vücutta belli başlı organlarda hareketi sağlayacak hücresel kasılma için gerekli olan güçleri oluşturmaktadır. Kas dokusu hücrelerinin sitoplazmalarında yer alan ve kasılıp gevşeyebilen protein ipliklerine *'miyoflamanlar'* adı verilir.

Kas dokusunun hücreleri genellikle ince uzun şekillidir. Kas lifleri demetler halinde bir araya gelmişlerdir. Aralarında ince bölmeler halinde gevşek bağ dokusu yer alır. İnsanda görev ve yapısal özelliklere bağlı olarak üç tip kas dokusu vardır. Bunlar düz kas, kalp kası ve iskelet kasıdır (13-15).

Kas dokusu için bazı özel terimler kullanılmaktadır. Kas hücresini kesintisiz olarak çevreleyen birim zara "*sarkolemma"*, kas hücresinin mitokondriyonuna "*sarkozom"* ve kas hücresinin sitoplazmasına "*sarkoplazma"* denir. Kas hücresinin endoplazmik retikulumuna ise "*sarkoplazmik retikulum* (SR)" adı verilir (15).

2.1.1. İskelet Kası

İskelet kası hücreleri, oldukca uzun (30 santimetrenin üzerinde) silindirik, çok çekirdekli hücrelerdir (13). Her bir kas lifi kesintisiz olarak sarkolemma ile çevrilidir. Oval biçimli olan çekirdekler genellikle periferde hemen sarkolemmanın altında yer alırlar. Bu şekildeki karakteristik çekirdek yerleşimi iskelet kasını, çekirdekleri merkezi olarak yerleşmiş olan kalp ve düz kastan ayırmakta kolaylık sağlamaktadır.

Işık mikroskobu altındaki iskelet kası hücreleri boyuna ve enine çizgilenme gösterirler. Boyuna çizgilenme kas hücresi sarkoplazması içinde uzunlamasına, birbirine paralel ve boylu boyunca uzanan miyofibrillerin varlığından ileri gelir. Enine çizgilenme ise yan yana duran miyofibrillerin uzunlukları boyunca farklı yapı ve ışık kırıcılıktaki silindir biçimli segmentlerin aynı hizada dizilmeleriyle ortaya çıkar (13,14).

Sarkoplazma kas hücresinin bütün organel ve inklüzyonlarının içinde yer aldığı sıvı kısmıdır. Sarkoplazmada kas proteinlerinin % 20 kadarı erimiş olarak bulunur. Sarkoplazma ışık mikroskopta, kas hücresinin sarkolemmaya yakın bölgelerinde homojen ve daha az yoğun bir öz madde (matriks) olarak gözlenir. Sarkoplazmada organel ve inklüzyonların yanı sıra myoalbumin, myoglobin ve myojen gibi kasılabilme özelliği bulunmayan proteinler de yer alır. Miyoglobin pigmenti kas lifine rengini verir (13-15).

Miyofibriller 1-2 mikrometre çapında longitudinal ve paralel seyreden silindirik yapılardır. Bu yapılar kas lifinin enine kesitinde noktalar halinde görülür. Gruplar halinde görülen bu noktacıklara "*cohneim alanları*" denir. Organeller miyofibrillerin arasında ve nükleusa yakın olarak bulunur. Mitokondrion çok sayıdadır ve sarkoplazma içine dağılmıştır. SR, kas lifi içinde çok özelleşmiş bir yapı gösterir ve miyofibriler arasına dağılmıştır (13-15).

Kırmızı kas hücresinde sarkoplazma oranı fazladır. Çekirdekler çok sayıdadır ve sarkolemmadan uzak dururlar. Miyofibriller daha az ve gevşektir. Yavaş kasılıp gevşer, ancak devamlı ve güçlü aktiviteye sahiptirler, kolay tetanize olurlar. Memelilerin ekstremitelerinde yer alan kaslar bu tiptedir (13).

2.1.1.1. Miyofibriller

Işık mikroskopunda gözlendigi gibi, boyuna kesiti alınan kas lifleri açık ve koyu bantlar halinde değişen enine çizgilenmeler gösterir. Sarkoplazma içinde hücrenin uzun eksenine paralel dizilim gösteren protein iplikleridir. Bu şekildeki dizilimleri kasın uzunlamasına çizgili görünmesini sağlar. Miyofibriller, miyoflaman adı verilen küçük birimlerden meydana gelmişlerdir. Ayrıca her miyofibril ince ve kalın olmak üzere iki tip miyofilamandan oluşmaktadır (13,15).

2.1.1.2. İskelet Kasının Elektron Mikroskopta Görünümü

Koyu ve kuvvetli boyanan anizotrop band ışığı çift kırar, ışık kırıcılıkları her yönde eşit değildir ve A bandı olarak adlandırılır. Açık ve zayıf boyanan iztotrop band ışığı tek kırar; ışık kırıcılıkları her yönde eşittir ve I bandı olarak adlandırılır. A ve I bandları daha ince disklere sahiptirler. I bandının ortasındaki koyu çizgi Z çizgisidir. Elektron mikroskopta her I bandının Z çizgisi denilen koyu transvers bir çizgiyle ikiye ayrıldığı gözlenir. Kasılabilir yapının kendini yenileyebilen en küçük parçası olan sarkomer bir Z çizgisinden diğerine uzanan kısımdır ve dinlenme halindeki kasta yaklaşık 2,5 μm uzunluğundadır. Elektron mikroskopik çalışmalar esasen sarkomerin bu düzeninin kalın ve ince 2 tip filamanın miyofibrillerin uzun eksenine paralel olarak simetrik şekilde dizilmesiyle meydana geldiğini göstermiştir. 1.6 μm uzunlugunda, 15 nm kalınlığındaki kalın filamanlar sarkomerin merkezi kısmında yer alan A bandını oluşturur. İnce filamanlar arasında bir uçları Z çizgisine tutunmuş olacak şekilde onlara paralel olarak uzanırlar. Bu düzenlenimin bir sonucu olarak I bandları, ince filamanların kalın filamanlar üzerine gelmeyen kısımlarından meydana gelir. A bandı ise, başlıca kalın filamanlardan ve ince filamanlarla üst üste gelen kısımlarından oluşur. Her kalın filamanı 6 ince filaman çevreler, bir altıgen oluşturur (16).

A bandının ortasındaki ise daha soluk renkli H diski ve ortasındaki koyu bir M çizgisi bulunur. M çizgisinin esas proteini kreatin kinazdır. Kreatin kinaz, bir fosfat grubunun fosfokreatinden ADP (Adenozin Difosfat)'ye aktarımında katalizör görevi üstlenir. Böylece kasın kasılması için gerekli ATP (Adenozin Trifosfat) sağlanır. Miyofibril boyunca art arda iki Z çizgisi arasındaki parçaya sarkomer adı verilir. Bir tam A bandı ile iki yarım I bandından meydana gelir. Çizgili kasta kasılma birimi olan sarkomer, kasılmanın en küçük yapı taşıdır. Sarkomer içine kasılıp gevşeme yeteneğindeki iki farklı flamanlar grubu yerleşmiş olarak bulunur. Kasılma anındaki fibriller daha kalın, sarkomer ise kısadır. İki Z çizgisi arasındaki mesafe kasılma arttıkça kısalır, I bandları daralır, Z çizgileri A bandına yaklaşır (13,15). I bandı yalnız ince aktin filamanlarından oluşurken, A bandı hem aktin hem de miyozin filamanlarından oluşur (13,14).

2.1.1.3. Çizgili Kasın Kasılma Mekanizması

Dinlenme halindeki sarkomerler kısmen üst üste binmiş kalın ve ince filamanlardan oluşmaktadır. Kas kasılmasında yaygın olarak kabul gören hipotez "*Kayan Filaman Hipotezi*"dir (15).

Miyofilaman demetlerinde kasılıp gevşeme, hücre organellerinin sıkı ve eş zamanlı desteği ile oluşur. Kasılma birimi olan sarkomer boyca kısalırken, ince aktin filamanları, kalın miyozin filamanlarının aralarında sarkomerin orta bölgesine doğru kayarlar. Böylece A bandının kalınlığı değişmezken, I bantları daralır. Aktin ve miyozin filamanlarının uzunluğu değişmemekte, birbirine göre olan pozisyonları değişmektedir (13).

Kasılmanın başlamasında, triad sistemi görevlidir. Aktinin yer değiştirmesindeki mekanizma, kısaca aşağıdaki gibidir (15,16):

1. Kasın uyarılması ile SR'deki kalsiyum (Ca^{++}) sarkoplazmaya boşalır.

2. Troponin C' nin Ca^{++} ile bağlanması ince filamanda konfigürasyon değişimine yol açar, tropomyozinin aşağı doğru kaymasıyla myozin ile birleşerek aktin yüzeyi serbestleştirir. Myozin başı ile aktinin serbest yüzeyi birleşir.

3. Başların bir yönde eğilmeleri, ince filamanların birbirine ters yönde çekilmesine neden olur.

4. Ca^{++} yeniden SR'e geri döner. Ca^{++} ortamdan ayrılınca tropomyozin-troponin ile aktin ilişkisi başlangıç durumuna döner, yani tropomyozin aktinin myozin ile bağlanma yerini bloke eder. Kasılma durur, bunu gevşeme izler.

5. Dinlenme halinde ise sarkomerler kısmen üst üste binmiş kalın ve ince filamanlardan oluşmaktadır. Dinlenme durumundaki kasta myozin ile aktin bağlantı kuramaz.

Kas kasılması için gerekli olan enerji mitokondrionlar tarafından sağlanmaktadır. Miyozinin baş kısmında bulunan ATP'az enzimi ile ATP'nin parçalanması sonunda enerji açığa çıkar. ATP' nin hidrolizi için Ca^{++} gereklidir. Tek bir kas kasılması yüzlerce bağlantının yıkılması sonucu ortaya çıkar. İnce ve kalın filamanların tam olarak üst üste binmesiyle olusan kas aktivitesi Ca^{++} iyonlarının serbestleşmesine ve Troponin-Tropomiyozin kompleksinin tekrar miyozin bağlayıcı kısımları örtmesine kadar devam eder (13-15).

2.1.1.4. Sarkoplazmik Retikulum

Sarkoplazmik retikulum (SR) miyofibriller arasında belirli bir düzende yerleşmiş olan endoplazmik retikulumdur (ER). SR hızlı kasılma ve gevşeme için gerekli olan Ca^{++} akışını düzenler. Ribozomlarla ilişkisi olmayan, agranüler tipteki bu SR, miyofibriller etrafında ağ şeklinde tübüler bir sistem oluşturur. SR tubulusları, miyofibrilin boyuna (longitudinal) ve enine (transvers) olmak üzere iki farklı şekilde yerleşir.

Longitudinal sarkoplazmik retikulum: Genellikle miyofibrillerin uzun eksenine parelel olarak A bandı seviyesinde yayılan tubuluslardan oluşur.

Transvers sarkoplazmik retikulum: Z çizgileri hizasında miyofibrillerin uzun eksenine dik olarak düzenlenmiş tubuluslardır (15,16).

2.1.1.5. Sarkoplazmadaki Diğer Yapılar

a) Mitokondrion (Sarkozom): Sarkolemmanın hemen altında, nükleusa yakın olarak çok sayıda bulunurlar. Kasılma için gerekli olan enerjiyi sağlayan ATP için kaynak oluştururlar. ATP sonradan bütün hücre için enerji kaynağı olarak kullanılır. Mitokondriyonlar 3 ana enzim sistemine sahiptir; Krebs (trikarboksilik asit) siklusu, hidrojen ve solunum zinciri elektron taşıyıcıları (elektron transport sistemi) ve fosforilasyon enzimleri gibi.

b) Glikojen: Kaba granüller şeklinde sarkoplazmada dağınık olarak bulunur. Kas kasılması sırasında hareketi sağlayacak enerjiyi depolamaya yardımcı olurlar.

c) Granüllü Endoplazmik Retikulum ve Ribozom: Granüllü Endoplazmik Retikulum **(**GER)'in esas fonksiyonu protein sentezidir. Bu nedenle az sayıda granüler endoplazmik retikulum ve ribozomlara sahiptirler. Hücreler bir tahribatla karşılaştığında veya ayırıcı santrifüje tabi tutulduğunda GER parçalanarak **mikrozomları** oluşturur. Ribozomlar bütün hücrelerde ya GER' e yapışmış ve onun bir parçası olarak veya sitoplazma içerisinde serbest halde bulunurlar.

d) Lipid: Sarkoplazmada değişik miktarlarda bulunabilir.

e) Miyoglobin: Hemoglobin gibi oksijen bağlar ve bir oksijen deposudur. Kasın oksijene olan ihtiyacı artınca oksijeni serbestleştirir (13-15).

2.1.1.6. İskelet Kas Dokusunun Enerji Üretim Sistemi

İskelet kası hücreleri, mekanik çalışmadan sonra oluşan devamlı kasılmalara yüksek derecede uyum gösterirler. Gerekli enerjinin çoğu, her ikisi de enerjiden zengin fosfat bileşikleri olan fosfokreatin ve ATP formunda depolanır. Kas dokusu fosfokreatin ve ATP şeklinde depolanan enerjiyi glikoz ve yağ asitlerini yakarak üretir. Yağ asitleri mitokondriyal matrikse yerleşmiş olan ß-oksidasyon enzimleri tarafından yıkılırlar. Asetatın sitrik asit döngüsü yoluyla okside olmasıyla, ATP şeklinde depolanan enerji ortaya çıkar (13).

2.1.1.7. İskelet Kas Dokusunda Rejenerasyon

Çizgili kas dokusunda değişik şekillerde meydana gelen dejenerasyon olayı sonucunda, rejenerasyon olayı kas hücrelerinde mitoz bölünme ile olmaz. Rejenerasyon kaynağının çizgili kas hücrelerine yakın komşuluktaki satellit hücreleri ve orijinal miyosit hareketlerinin olduğu kabul edilmektedir. Satellit hücreler kas liflerinin bazal laminası ile sarkolemması arasına yerleşmiş tek çekirdekli, gelişme potansiyeli olan hücrelerdir. Dejenerasyondan sonra bu hücreler aktif olarak çoğalırlar, kaynaşarak yeni kas fibrillerini meydana getirirler. Büyük kas defektlerinde rejenerasyon olmayabilir ve defekt bağ dokusuyla kapatılır (15).

2.1.1.8. İskelet Kas Dokusunda İnnervasyon

Miyelinli motor sinirler perimisyum içinde dallanırlar ve sonlandıkları bölgede çok sayıda nice dallar içerirler. İnnervasyon alanında sinir miyelin kılıfını kaybeder ve kas hücresi yüzeyi üzerine oturan motor son plak yapısını oluşturur. Bu bölgede akson Schwan hücresinin ince sitoplazma tabakası ile sarılır. Aksonun ucunda çok sayıda mitokondri ve sinaptik veziküller vardır. Bunlar asetilkolin nörotransmitterini içerir. Akson ve kas arasında sinaptik yarık adı verilen bir boşluk bulunur. Kas sinir ilişkisinde, sarkollemma derinlere bağlantı kıvrımları şeklinde uzantılar gönderir (15,16).

Motor son plak uyarıldığı zaman akson terminalinden asetilkolin serbestleştirilir, yarık boyunca dağılır ve bağlantı kıvrımlarının sarkolemmaları içindeki asetilkolin reseptörlerine tutunurlar. Transmitterlerin bağlanması sarkolemmayı Na^+ geçirgen hale getirir. Bu da membran depolarizasyonuyla sonuçlanır. Sinaptik aralığın bazal laminasına tutunan kolinesteraz enzimi asetilkolini hidrolize eder (16).

Motor son plakta başlayan depolarizasyon kas hücresinin yüzeyi boyunca ve transvers tübül sistemi aracılığıyla lifin derinliklerine doğru yayılır. Her triadta, depolarizasyon sinyali sarkoplazma retikulumu döngüsünü başlatan Ca^{++}'un serbestlenmesi ile sonuçlanır. Depolarizasyon sonuçlanınca Ca^{++} aktif olarak sarkoplazma retikulumu sisternalarına geri alınır ve kas gevşer. Tek bir akson bir kas lifini uyarabilir ya da dallanarak daha fazla kas lifinin uyarılmasını sağlayabilir. Birden fazla uyarımın gerçekleştirildiği bir sinir lifi ve onun uyardığı tüm kaslara "*Motor Ünite"* adı verilir. Kasılmanın gücünü değiştirmek için bir kas demeti içindeki liflerin aynı zamanda kasılmaları şart değildir. Kaslar motor ünitelere ayrıldıkları için tek motor aksonun uyarımı bu akson tarafından uyarılan kas liflerinin sayısıyla orantılı bir gerilme yaratır (16).

2.2. LOKAL ANESTEZİKLER

2.2.1. Lokal Anesteziklerin Tanımı ve Tarihçesi

Lokal anestezikler; vücuttaki tüm sinir liflerinde, nöronlarda ve diğer uyarılabilir dokularda depolarizasyon dalgasının oluşumunu ve yayılımını engelleyerek bu yapılarda geçici duyu, motor ve otonomik fonksiyon kaybına yol açan ilaçlara lokal anestezikler denir (17).

Yüzyıllar boyu Peru ve Bolivya yerlileri, "*Erythroxylon Coca*" yapraklarını çiğneyerek, yorgunluklarını gidermeye ve iştahlarını kesmeye çalışmışlardır. Bu etkiler bitkinin yapraklarında bulunan ana alkaloid olan kokaine aittir. Bitki, 19. yy'da Avrupalılar'ın ilgisini çekmiş ve 1860 yılında kokain alkolaidi Neiman tarafından izole edilmiştir. Kokainin lokal anestezik etkisi ise Karl Köller (1884) tarafından göze damlatılarak gösterilmiştir. Kokainin alışkanlık yapıcı ve toksik etkileri fark edildikten sonra, diğer lokal anestezikler sentezlenmiştir. Bunların önemlileri prokain (1905), lidokain (1948) ve bupivakain (1960) olmuştur. Prokain 1905'te sentezlenmiş ve lidokainin kullanımına kadar yaygın olarak kullanılmıştır. Prokain halen diğer lokal anesteziklerin etkinlikleri ve toksisitelerinin kıyaslanmasında referans ajan olarak kullanılmaktadır (17).

2.2.2. Lokal Anesteziklerin Etki Mekanizmaları

Lokal anestezikler özellikle periferik sinirlerde olmak üzere tüm uyarılabilir dokularda depolarizasyon blokajı yaparak membran stabilizasyonu sağlar. Çoğu lokal anestezik bu etkiyi, Na^{+} kanallarının iç yüzündeki reseptörlere bağlanarak kanalların aktivasyonu ve

membran depolarizasyonuna bağlı Na^+ geçişini önleyerek gerçekleştirir. Buna bağlı olarak sinir liflerinde ve diğer eksitabl hücrelerde;

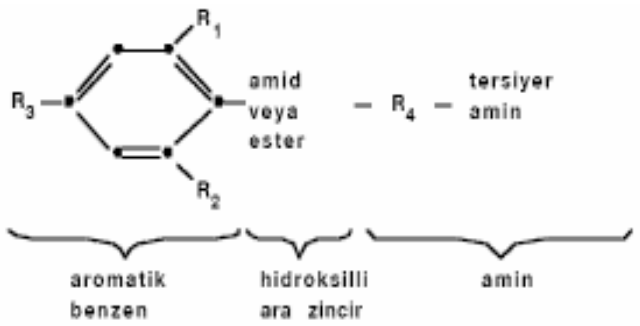
a) Aksiyon potansiyelinin yükseliş hızını yani depolarizasyon hızını yavaşlatırlar,
b) Aksiyon potansiyelinin amplitüdünü azaltırlar veya ortadan kaldırırlar,
c) SSS'de eksitasyon eşiğini azaltırlar,
d) İmpuls iletim hızını düşürürler ve iletimi tam bloke ederler.

Bazı lokal anestezikler ise reseptöre bağlanmak yerine membrana penetre olup membranda genişleme ve kanalda bozulmaya yol açabilir. Yüzey gerilim teorisine göre ise aksonal membrana lokal anesteziklerin parsiyel penetrasyonu transmembran potansiyelini yükseltir ve depolarizasyonu inhibe eder (17,18).

Sinir lifleri A, B ve C lifleri olmak üzere üç gruba ayrılırlar. A grubu lifler miyelinli somatik, B grubu lifler miyelinli preganglionik, C grubu lifler ise miyelinsiz sempatik postganglionik ve ağrıyı ileten liflerdir. Her tip sinir lifi lokal anesteziklerden etkilenir. Ancak bu etki, ince liflerde kalınlardan, miyelinsiz liflerde miyelinlilerden daha çabuk ve daha düşük yoğunluklarda görülür. Miyelinsiz lifler (C lifleri) erken etkilendiğinden ağrı ve ısı en erken, somatik motor güç en son etkilenir. Otonom lifler (ince miyelinli B ve miyelinsiz C lifleri) lokal anesteziklerden en hızlı etkilenen liflerdendir. Klinik olarak fonksiyon kaybı sırasıyla; ağrı, ısı, dokunma, proprioseptif duyu ve iskelet kas tonusu şeklinde gerçekleşir (17).

2.2.3. Lokal Anesteziklerin Kimyasal Yapıları ve Sınıflandırılması

Lokal anestezikler hepsi yağda eriyen alkoloidlerin suda eriyen tuzlarıdır (19). Lokal anestezikler bir lipofilik grup ile bir 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. İki grup arasındaki temel farklılık kimyasal stabilite, metabolizma ve allerjik potansiyellerdeki farklılıktır (17,20).



Şekil 1. Lokal Anesteziklerin Yapısı

Amino Grup Esterler

Benzoik asit veya orto, meta, para aminobenzoik asit türevleridir. Kokain, piperokain ve hekzikain benzoik asit esterleri iken benzokain, prokain, tetrakain ve klorprokain para aminobenzoik asit (PABA) esterleridir. Ester bağı genellikle stabil olmadığından bu ajanlar solüsyon içinde hidrolize uğrayarak, vücutta ise psödokolinesteraz ile yıkılırlar. Ayrıca bu gruptaki lokal anestezikler kısa etki süresi ve daha az toksik etki gibi özellikler de göstermektedir (17,19-21).

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 (17,19-21).

Lokal anesteziklerin etkilerinin ortaya çıkış süreleri, ilaçların lipid çözünürlüğü ve proteinlere bağlanma özellikleri ile ilişkilidir. Lokal anestezikler etkilerinin ortaya çıkış süreleri açısından, üç temel kategoride sınıflandırılırlar.

1. Düşük potensli (kısa etki süreli): Prokain, 2-kloroprokain
2. Orta potensli (orta etki süreli): Lidokain, mepivakain, prilokain
3. Yüksek potensli (uzun etki süreli): Bupivakain, tetrakain, etidokain, ropivakain, levobupivakain (17).

Tablo 1'de bupivakainin, ropivakainin, levobupivakainin fizikokimyasal özellikleri verilmiştir (7).

Tablo1. Bazı Lokal Anesteziklerin Fizikokimyasal Özellikleri

	Bupivakain	**Ropivakain**	**Levobupivakain**
Moleküler Ağırlığı (D)	288	274	288
pKa	8.1	8.1	8.1
Liposolubilite	30	2.8	30
Partisyon Katsayısı	28	9	28
Proteine Bağlanma (%)	95	94	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 (17).

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 olabilirler (17).

2.2.5. Lokal Anesteziklerin Farmakokinetik Özellikleri

a-Emilim: Lokal anesteziklerin uygulandıkları yerden emilerek sistemik dolaşıma geçiş özelliklerini, doz, enjeksiyonun yeri, ilacın pH'sı, yağda erirliği ve vazokonstrüktör madde eklenmesi ile fizikokimyasal ve farmakolojik özellikleri belirler. Yağda erirliği yüksek olan lokal anestezikler potenttir. Yüksek lipofilite ajanın sinir hücre membranına penetrasyonunu artırır ve sinir iletiminde daha fazla blok meydana gelir. Lokal anestezik emildikten sonra ilk karşılaştığı organ akciğerdir. Burada ilacın büyük kısmı geçici olarak tutulur ve diğer organların birdenbire büyük miktarda ilaçla karşılaşması engellenir (17,20,22).

b-Dağılım: : Lokal anesteziklerin büyük bir kısmı plazmada proteinlere bağlanarak, bir kısmı da eritrositlere girerek dokulara dağılır. Proteinlere bağlanma uzun etkili amid tipi ilaçlarda daha fazladır. Lokal anesteziklerin bağlandığı proteinler α-1 asit glikoprotein ve albümindir. Ester grubu anestezikler, çok hızlı yıkıldıklarından plazma yarı ömürleri çok kısadır. Amid grubundakiler ise, vücutta yaygın olarak dağılırlar.

c-Metabolizma ve Atılım: Ester grubu lokal anestezikler, plazma kolin esterazı ile hidrolize olarak suda eriyen alkol ve karboksilik asitlere dönüşürler. Bu ürünler, aktif olmayıp bazen antijenik özelliklerinden dolayı, hipersensitivite reaksiyonlarına yol açabilirler. Amid grubu lokal anestezikler, kasta mikrozomal enzimler tarafından hidrolize edilirler. Amid grubunun metabolizması iki yönden önemlidir. Amid grubunun metabolizması sonucu ortaya çıkan anilin deriveleri methemoglobinemiye yol açabilirler. İkinci olarak, kas hastalıklarında amid grubu ile yüksek plazma düzeylerine bağlı olarak toksisite artışı görülebilir (17,20,22).

2.2.6. Lokal Anesteziklerin Yan Etkileri

I. Ajanın direkt etkisi ile oluşan yan etkiler

A. Lokal: Lokal reaksiyonların genellikle solüsyonlara eklenen stabilizan, bakteriostatik ajanlar veya ağır metallerden 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 (20,23). Lokal anestezik ajanların uygun olmayan i.v enjeksiyonu yaşamı tehdit eden SSS ve KVS toksisitesine neden olabilir (24).

Santral sinir sistemi (SSS) üzerine etkileri: 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 başlayacağının habercisidir. Bunları sıklıkla koma ve solunum arresti takip eder (20,23,24).

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 arterioler dilatasyona neden olur. Bradikardi, kalp bloğu, hipotansiyon ve sonuçta kardiyak arrest gelişebilir. Hipoksemi ve solunumsal asidoz predispozan risk faktörleridir (20,24).

Solunum sistemi üzerine etkileri: Erken dönemde solunum hızı ve derinliği artar, daha sonra dispne, apne ve solunum arresti meydana gelir. Frenik ve interkostal sinir paralizisi 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 (20,23).

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 (20,23,24).

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 (25). Teropatik aralığın üstünde lokal anesteziğin epidural aralığa verilmesi sinir köklerinde kalıcı histolojik ve fonksiyonel hasarın doza bağlı olarak meydana geldiği gözlenmiştir (26).

Kas İskelet Sistemi Toksisitesi: Miyotoksisitenin klinik öneminin tam olarak bilinmemesi, yan etki olarak daha az önemsenmesine neden olmuştur. Bütün lokal anestezik ajanlar myotoksik olarak tanımlanmışlardır. Bu ajanların i.m enjeksiyonu geri dönüşümlü myonekrozla sonuçlanır. Seri ve sürekli uygulamalardaki kas hasarı doza bağlı olarak geri dönüşümsüz hale dönüşebilir (1). Lokal anesteziklerin konsantrasyonları ve maruziyet süreleri ile miyotoksisiteleri artmıştır (27). Steroselektivite ve lipofilik özellik lokal anestezik miyotoksisitesindeki patogenezde önemli rol oynamaktadırlar (28).

Son yıllarda, bölgesel anestezi tekniklerinin gelişmesi ve lokal anesteziklerin klinik kullanım alanlarının artması yan etki profilini de değiştirmiştir. Yapılan çalışmalarda, özellikle oftalmolojik vakalarda peri ve retrobulber blok sonrası lokal anesteziklerden kaynaklanan postoperatif müsküler disfonksiyonun oldukça sık olduğu belirlenmiştir (29-32). Ayrıca klinik olarak myonekroz, sürekli yapılan periferal bloklardan, yara kenarına yapılan infiltrasyonlardan, tetik noktalarına (trigger point) yapılan enjeksiyonlardan sonra da ortaya çıkmaktadır (2,33).

Lokal anesteziklere eklenen steroid ve epinefrinin miyotoksisiteyi daha çok arttırdığı bilinmektedir (34,35).

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

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

2.2.7. Lokal Anesteziklere Bağlı İskelet Kas Dokusundaki Histopatolojik Değişikliklerin Patogenezi

Lokal anesteziklerin iskelet kasındaki toksisitesi ile ilgili ilk vaka 1959'da Brun tarafından rapor edilmiştir. Lokal anesteziklerin i.m uygulamaları geri dönüşümlü kas hasarlanması ve myonekroz ile sonuçlanmaktadır. Hasarın derecesi doz bağımlı olarak, seri veya sürekli uygulama ile artmaktadır (1,9).

Enjeksiyon bölgesinde gözlenen histopatolojik bulgular genelde uniform ve nonspesifiktir. Enjeksiyon bölgesinde histopatolojik olarak 12 saat içinde geniş alana

yayılmış intersisyel ve miyoseptal ödem gözlenir (36). Lokal anestezik ajanlara maruziyetten 5 dakika sonra ilk olarak miyofibril bantlarının aşırı kasılması, miyotoksik değişiklerin ilk histopatolojik bulgusudur. Takip eden saatlerde, kas lifleri intrensek dejeneratif fazın içine girerler ve miyofilamentler parçalanır, kondanse olur. SR litik dejenerasyonu ve mitokondri dejenerasyona uğrar, miyonükleusta piknotik değişiklikler ve patolojik kromatin birikimi meydana gelir. Bu sırada nekrobiotik değişiklikler oturur ve fiberlerde vakuolizasyon, miyositlerde total ödem, intraselüler yapılarda myonekroz tam anlamıyla 1-2 gün içinde gerçekleşir (5,6,9,33). Miyoblast populasyonu 'satellit hücreler' olarak adlandırılır ve lokal anesteziklerden etkilenmezler. Böylece satellit hücreler myonekroz alanında çoğalırlar ve doku onarımında anahtar rol oynarlar (1). Satellit hücrelerine ek olarak, rejeneratif süreç boyunca nöromuskuler devamlılığın erken yenilenmesi ile motor sinir uçları da lokal anesteziklerin majör yıkıcı etkilerinden etkilenmemektedir (38).

Kas dokusunda oluşan bu destrüksiyon periyodu 24-48 saatten fazla sürer. Lokal anestezik miyotoksisitesi, fagositik hücre infiltrasyonu gerçekleşmesiyle ortaya çıkmaktadır. Nekrotik liflerin sarkolemmasına sızan ve kuşatan makrofajlar 48 saat içinde ortaya çıkmaktadır (36). Fagositer hücreler satellit hücreleri ve kas dokusu etrafındaki bazal laminayı etkilemeksizin nekrotik alanlarda bulunan debrisleri fagosite eder. Miyositlerin bu ajanlara sürekli maruziyeti, geri dönüşümsüz zedelenme ve nekroza neden olabilir (33). Vasküler yapılar, nöral yapılar ve bağ dokusu elemanları etkilenmezler (5,33,39). Direkt iğnenin yaptığı hasar, mekanik travmadır ve sadece kasta lokal zedelenme yapar, kas hasarına neden olmaz. Bu nedenle mekanik travma miyotoksisite mekanizmasından ayrı tutulmuştur (1,9,38).

Lokal anesteziklerin indüklediği miyotoksisitesinin patogenezi büyük oranda komplekstir. Kas fibrillerini etkileyen yüksek oksidatif stres, lokal anesteziklerin miyotoksisitesinin patogenezini oluşturur. Reaktif hidroksil radikalleri ve süperoksit anyonlarının yüksek olması miyotoksik hasardan sorumludur (40). Mitokondri düzeyinde oksidatif fosforilasyonu *F1-ATP-az* enzimiyle inhibe etmeleri ve SR'den Ca^{++} salınımı arttırmaları, lokal anesteziklerin kimyasal yapılarına bağlıdır (41).

Lokal anestezik ajanlar membran-aktifdirler ve miyositlerin her iki internal ve eksternal membran sistemlerini bozarlar. Böylece başlangıç Ca^{++} homeostazında ve permeabilitesinde değişiklik yapabilirler. Miyojenik hücrelerin internal membran

sistemleri, iskelet kas kontraksiyonu için gerekli olan büyük miktardaki Ca^{++} iyonlarını depolar (2,33,42).

Lokal anesteziklere bağlı gelişen miyotoksisitenin subsellüler mekanizmaları halen detaylı anlaşılamamıştır (1,39). Benoit ve arkadaşlarına göre (42), Ca^{++} hücre yaşamının devamı ve yapısal bütünlüğü için temel bir elementtir. Lokal anesteziklere bağlı gelişen myonekrozun temel nedeni, hücre içinde Ca^{++} iyonunun yükselmesidir. Hiperkontrakte miyofibriller, miyotoksisitenin en erken belirtileridir (42).

Miyoplazmik Ca^{++} düzeylerindeki artış, SR'deki Ca^{++} 'un geçirgenliğindeki artıştan çok lokal anesteziklerin Ca^{++} salan '*ryonodin reseptör*' (RyR) ile direk etkileşimidir. Bu etkileşimler oldukça kompleksdir ve bifazik doza bağlı olarak spesifik ajanlarla etkileşimidir. RyR'nin 3 subtipi vardır ve RyR_1 kalpte lokalize olanıdır Yüksek konsantrasyonlarda çoğu lokal anestezikler RyR'ni aktifler ve SR'den Ca^{++} salınımını indükler. Düşük konsantrasyonlarda bu kanallar inhibe olur. Bu reseptör etkileşimi pH bağımlıdır ve miyotoksisite yüksek intraselüler pH seviyelerinde potansiyelize olmaktadır. Sıklıkla RyR' nin aktive olması ve Ca^{++} ATP az'ın inhibe olması da intrasellüler Ca^{++} seviyelerini artırır (1,39,43-47).

Lokal anestezik uygulamasını takiben sistemik miyotoksisite gelişebilir. İntravenöz bloklar ve kazara sistemik dolaşıma lokal anestezik uygulanmasında sonra meydana gelen sistemik müsküler lezyonlar daha düşük oranda görülür. Uzun peryodda uygulananlar ise plazma seviyeleri çok yükseleceği için sistemik kas hasarına daha fazla neden olurlar. Kronik kokain kullanımı ve intoksikasyonu sonrası rabdomiyoliz ve öldürücü kas hasarları ciddi ve iyi bilinen bir komplikasyondur (48,49).

Lokal anestezik uygulamasının takibinde gelişen kas hasarının tanısı oldukça karmaşıktır. Belirtileri aşikar değildir, sıklıkla enjeksiyon bölgesinde sınırlıdır. Lokal anesteziklere bağlı miyotoksisite klinikte kas seyirmesi ve kasın kasılmasıyla ağrının artması, gevşemesiyle azalması ile belirti verir. Serumda kas kreatinin kinazı artar, EMG'de enflamatuar ve nekrotik miyopati gözlenir. Kesin tanı histopatolojik olarak konur (2). Bir istisna olarak ektraoküler kas disfonksiyonunun ortaya konması oldukça basittir.

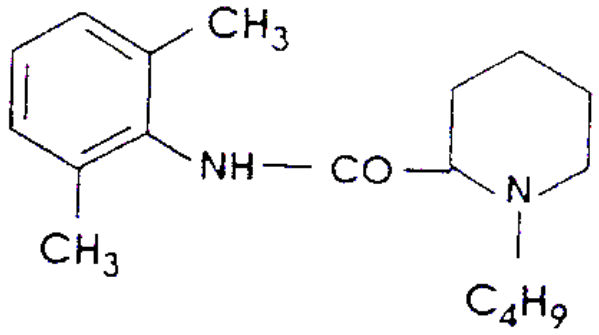
Lokal anestezi miyotoksisitesinden korunma amaçlı olarak mitokondri hedefli ilaçlar kullanıma girmiştir (50). Bupivakainin, mitokondride *komplex I-III* üzerindeki istenmeyen inhibitör etkisinden korunmak için N-*Asetilsistein* (NAC)'ın kullanılması

gerektiği bildirilmektedir (51,52). NAC ve Trolax gibi antioksidanlar tetrakaine bağlı apoptozisi belirgin olarak inhibe etmişlerdir (52). SR'den Ca^{++} salınımını önleyen Quercetin gibi antioksidanlar ve Ca^{++} antagonizması yapan ilaçların kullanımı da kas hasarını önleyebilecek ilaçlardır (1). Miyoblastlardaki lokal anesteziklere bağlı gelişen mitokondrial hasarın tamirinde Rekombinant İnsan Eritropoetini (rhEPO) kullanarak toksisiteden korunulmaya çalışılmıştır (53). Klinisyenler, lokal anestezik miyotoksisitesinden korunmak için antioksidanları (rhEPO, NAC) kullanmadan önce; lokal anesteziğin konsantrasyonunun düşürülmesi, uygun katater pozisyonu ve uygulama süresinin kısa olması gibi koşulları sağlamalıdır (54).

2.2.8. Bupivakain (Marcaine®)

Bupivakain, 1957 yılında İsveç'de 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 (7,17).

Kimyasal adı, "*L-n-Butyl-DL-Piperidin 2-Carbonsaure 2-6 dimethylanilid*"dir.



Şekil 2. Bupivakainin Açık Formülü

Farmakokinetik Özellikleri

Bupivakainin molekül ağırlığı 288, erime noktası 258ºC, dissosiyasyon katsayısı (pKa) 8,1 partisyon 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 ektremite cerrahisinde % 0,5 konsantrasyonunda ve batın operasyonlarında ise % 0,75 konsantrasyonda 20 ml volüm olarak uygulanmaktadır (19).

Metabolik özellikleri

Amid yapılı olduğu için primer olarak kasda metabolize edilir. N-dealkalizasyona uğrar, ilacın çok küçük bir miktarı ise değişmeden idrarla atılır. Plasenta bariyerini pasif diffüzyonla geçer. Proteinlere yüksek oranda bağlanması nedeni ile plasental diffüzyonu da düşüktür. Fetus üzerindeki etkilerine ait kesin sonuçlar bildirilmemiştir (19).

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 (17,18).

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, duyusal blok meydana getirmektedir. Bu özelliğinden dolayı doğum analjezisi ve postoperatif analjezide popüler bir ajan haline gelmiştir. Bupivakain; rejyonel intravenöz anestezi (RİVA), presakral ve paraservikal bloklar içinde uygun değildir (17,19).

Sistemik Toksisite

Aşırı dozun neden olduğu yüksek plazma yoğunlukları, hızlı absorbsiyon 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 (21). Kan tablosunda bir değişiklik yapmaz, methemoglobinemiye sebep olmaz (19,22). Sistemik toksik etkisi KVS ve SSS üzerine olmaktadır (19).

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 steroselektivite gösterir. Bu durum S izomer için azalmış toksisitesini açıklamaktadır. Steroselektivite ve lipofilik özellik lokal anesteziklerin miyotoksisitesinde patogenezde önemli risk taşımaktadır. Rasemik bupivakain doku hasarını daha belirgin yapmaktadır (46,47). Ayrıca bupivakainin olumsuz kardiyak etkilerinin, Ca^{++} kanalları ve intrasellüler Ca^{++} akımı ile etkileşimine ve mitokondrilerde ATP sentezi üzerine olan etkilerine bağlı olduğu bulunmuştur. Bunun yanında bupivakainin miyokard kontraksiyon gücünü azaltması, depolarizasyon hızını ve aksiyon potansiyel amplitüdünü düşürmesi kardiyak depresan etkiye katkıda bulunur (7,24,55-57).

Santral Sinir Sistemine Etkileri

Bupivakain ile oluşan SSS toksisitesinde, diğer lokal anesteziklerdeki gibi başlangıçta serebral korteksteki 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 (17,19).

Kardiyovasküler Sisteme Etkileri

Kardiyotoksisite, 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 kardiyotoksisite 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 kardiyotoksisitesi, 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 kardiyotoksisite resüsitasyona kolay cevap vermemektedir. Asidoz, hipoksemi ve hiperkapni bupivakainin kardiyotoksisitesini potansiyelize etmektedir (7,17,19,24). Lokal anesteziklere bağlı kardiyovasküler kollapstan etkilenen hastaların resüsitasyonu konusunda ümit verici bir gelişme olan İntravenöz Lipid Emülsiyonu (IVLE) kullanımı hızla yaygınlaşmaktadır (58).

Kas Dokusu Üzerine Etkileri

Periferik sinir bloklarında tekrarlayan bupivakain uygulamaları ile yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda kas dokusunda gelişen hasarın patogenezinde mitokondri kristolizisi ve otofaji gibi subselüler değişikliler rol oynamaktadır. Bupivakain şiddetli organel ve kas doku hasarına sebep olmanın yanısıra, kasta oksidatif kapasitede azalmaya sebep olmaktadır (59). Bupivakain enjekte edilen kasta mitokondrinin zar yapısındaki *F_1-F_{10} ATP sentetaz* oligomerizasyonunu etkileyerek mitokondriyal internal organizasyonda bozulmalara sebep olduğu ileri sürülmektedir (60).

Bupivakainin neden olduğu kas dokusundaki mitokondriyal toksisite mekanizmasını araştıran biyokimyasal çalışmaların sonucunda;

1-Mitekondriyal respiratuar zincirde *komplex-I* 'in spesifik inhibisyonu,

2- Oksidatif fosforilasyonun azalması **(OXPHOS),**

3-Mitekondriyal Adenozin Trifosfat (ATP) sentazın özel inhibisyonu,

4- Mitekondiyal membran potansiyelinin azalması,

5-Mitekondriyal ağ fragmantasyonun azalması,

6-Muhtemel mitoptozis başlangıcı ve

7- Bupivakaine uzun süreli maruz kalma ile solunum zinciri protein oranının azalması izlenebilmektedir.

Yüksek konsantrasyondaki bupivakain için *potent mitokondriyal inhibitör* de denilenebilir. Mitokondiriyal kompozisyondaki farklılıklar veya respiratuar kararlı durum, hastalarda gözlenen bupivakain sensitivitesindeki farklılıkları açıklayabilir. Mitokondriyal respiratuar zincir *kompleks I-IV* ve *sitrat sentaz* aktivitesinin azalmasıyla ATP sentezininde azalma sözkonusudur. Sonuç olarak mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu *kompleks-I* üzerinden engelleyerek kas liflerindeki şiddetli kas hasarına sebep olmaktadır (51,59).

Bupivakain, bilinen en yüksek miyotoksik etki potansiyeline sahip lokal anestezik ajandır (1,9,33). Bupivakainin miyotoksik etkisinin konsantrasyona ve etkilenme süresine bağlı olduğu bilinmektedir (6,27). Klinik konsantrasyonlarda SR' den Ca^{++} salınması yanında, SR'a Ca^{++} reuptake'ini inhibe etmektedir. Çünkü bupivakain, güçlü lipofilik bir ajandır ve miyoplazma içinde hızla birikerek iskelet kas liflerinde Ca^{++} un hücre içi konsantrasyonunu artırırlar. Bu sinerjik etkiler bupivakainin miyotoksik etkilerinden sorumludur (39,43-46). Ca^{++} 'un miyositlerden salınımını RyR aktivitesini arttırarak yapmaktadır. RyR üzerindeki bu spesifik etki ile birlikte SR membranları Ca^{++} geçirgenliğini arttırmaktadır (5,44,46).

Bupivakain miyotoksisitesi, Permeabilite Geçiş Poru (PTP) ve Ca^{++} disregülasyonunu kapsayan mitokondriyal disfonksiyonun uygun bir model olabileceğini kabul eden Irwin ve ark.'na göre (61), bupivakain doza bağlı olarak iskelet kas kasının mitokondrisinde ve izole kas fibrillerinde *"permeabilite geçiş porlarının"* (PTP) 'nin açılmasını indüklemektedir (PTP, iç mitokondriyal membranında lokalize yüksek geçirgenliğe sahip bir kanaldır). PTP' nin hücre ölüm yolaklarında en azından üç mekanizmasında etkili olduğunu öne sürülmektedir. Bu mekanizmalar; hücresel ATP miktarının azalması, sitoplazmik Ca^{++} yükselmesi ve sitokrom c, Endonükleaz G gibi apoptozis faktörlerinin salınmasıdır. Yakın zamanda bupivakaine maruziyet sonrası kas fibrillerinde invivo PTP 'nin açılması; mitokondriyal depolarizasyonuna sebep olarak hiperkontraksiyon ve devamında hücre ölümünün temelini oluşturan major sebep olduğu bildirilmiştir.

Akut miyosit hasarı, bupivakain kullanımı sonrası apoptozisle sonuçlanmaktadır (50,62,63). Lokal anestezikler, mitokondriyal DNA hasarına adenozin trifosfat ve mitokondriyal protein düzeylerinde azalmayla neden olmuştur. Apoptozis yoğun ve parçalanmış çekirdeklerinin gözlenmesiyle, *prokaspaze-3* ve prokaspaze -9 düzeylerinin azalmasıyla da doğrulanmaktadır. Bupivakain, kaspaz-3,-8,-9'u aktive ederek reseptör

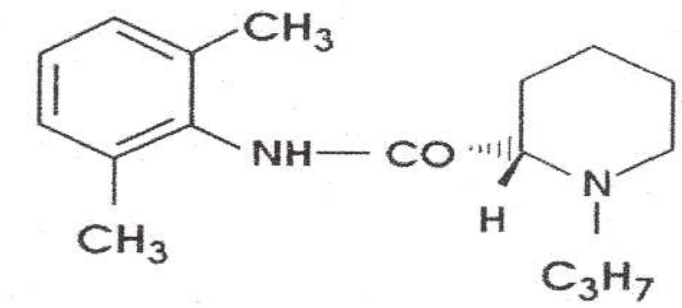
veya mitokondri bağımlı apoptozis ile DNA fragmantasyonunda rol oynamaktadır. Bupivakain ile uygulama sonrası Isı şok proteini(70), C-jun ve C-gen gibi birçok apoptozis ile ilgili genlerinin eksperesyonu arttırdığı gözlenmiştir. Bu sonuçlarla nörotoksik veya miyotoksisiteye giden bupivakainin indüklediği apoptozisin moleküler mekanizması daha iyi anlaşılmaktadır (62,64).

2.2.9. Ropivakain (Naropin®)

Ropivakain fizikokimyasal özellikleri ve etkinliği açısından bupivakaine benzer, Propyl-2,6-pipecoloxylidid hydrochloridemonohydrate yapısında ve S enantiomer uzun etkili amino-amid yapılı bir lokal anesteziktir (65).

Kimyasal Yapısı

Kimyasal adı "*1-izopropil, 2-piperidin, 2,6-dimetilanilid hidroklorid*"dir (65-67).



Şekil 3. S- (-)-Ropivakain

Fizikokimyasal Özellikler

Yüksek pKa ve düşük yağda çözünürlük özelliği, ağrı liflerini daha fazla, motor lifleri daha az bloke etmesini sağlar (65,67). Diğer lokal anestezikler gibi ropivakain de, sinir liflerindeki hücre membranlarından Na^+ iyonlarının girişlerini önleyerek, sinir liflerinde uyarıların iletilmesini geçici olarak bloke eder (65,68).

Ropivakainin fizikokimyasal özellikleri bupivakainle benzerdir ancak ropivakainin yağda çözünürlüğü bupivakainden daha düşüktür. Ropivakain daha düşük lipofilik yapısı nedeniyle mitokondrial ATP metabolizmasındaki bozulmalardan bupivakaine göre daha az sorumludur (48).

Metabolik Özellikleri

Plazmada temel olarak α-1-asit glikoproteine bağlanır ve yaklaşık % 6'sı serbest haldedir. Ropivakain, diğer amid tipi lokal anestezikler gibi karaciğerde aromatik hidroksilasyon yoluyla metabolize olur. Biyotransformasyon karaciğer oksidazları tarafından piperidil halkasının PPX'e dealkillenmesi ile başlar. Yıkım ürünleri 2,6-pipekolosilidid, 3-hidroksi-ropivakain ve 4-hidroksiropivakain'dir. 3-hidroksi-ropivakain ve 4-hidroksi-ropivakainin lokal anestezik etkisi olmakla birlikte, bu etkileri ropivakainin etkisinden azdır. İntravenöz uygulamalardan sonra dozun % 86'sı idrarla atılır ve bunun da sadece % 1'i değişmemiş haldedir (69).

Toksisite

Ropivakainin, yağda çözünürlüğünün düşük olması ve miyokard Na^+ kanallarına karşı daha düşük afiniteye sahip olması nedeniyle daha düşük toksisiteye sahiptir. Ropivakain, eşdeğer bupivakain dozlarından daha az, lidokainden daha fazla kardiyotoksiktir. Kalp hızını ve arteriyel kan basıncını artırır, ejeksiyon fraksiyonunu azaltır ve kardiyak out-put'u değiştirmez. Düşük dozlarda ve plazma konsantrasyonlarında kardiyovasküler depresan etkisi vardır. Bupivakain ile karşılaştırıldığında, yüksek plazma seviyelerinde ropivakainin ventriküler taşikardi ve ventriküler fibrilasyon gibi tehlikeli aritmilere yol açma riski daha düşüktür (70,71).

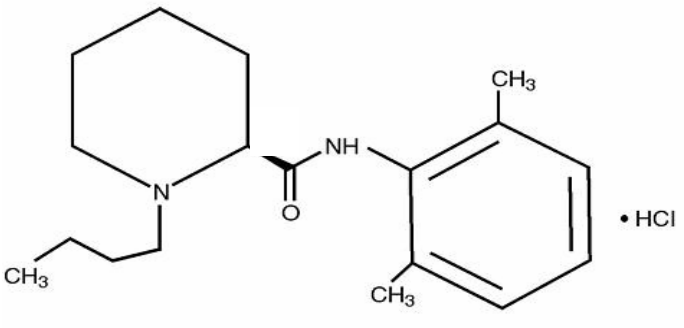
Ropivakain, doza bağlı olarak iskelet kas dokusunda miyotoksiktir. Ropivakain diğer lokal anesteziklere nazaran daha az lipofiliktir, sarkolemmal bariyerden yavaş penetre olur (6). Ropivakain enjeksiyonundan sonra intertisyel ve miyoseptal ödem oluşturarak bupivakaine rağmen fokal ve ılımlı kas lif hasarına yol açmaktadır (9).

Ropivakain, bupivakaine nazaran daha az kardiyotoksiktir (56,70,71,). Ropivakain, bupivakainle karşılaştırıldığında daha az miyotoksiktir. Aynı zamanda çizgili kas liflerinde apoptozisi daha az aktive etmektedir (64).

2.2.10. Levobupivakain (Chırocaıne®)

Levobupivakain, ülkemizde en son kullanıma sunulan bupivakain hidrokloridin saf S(-) enantiomeri olan uzun etkili aminoamid yapıda bir lokal anesteziktir (10,72).

Kimyasal adı, *S-1 butil, 2-piperidil, farmo 2',6' xy lipid hidroklorid*, molekül formülü; $C_{18}H_{28}N_2O$'dir (10).



Şekil 4. Levobupivakain

Farmakokinetik Özellikleri

Terapötik uygulamayı takiben, levobupivakainin plazma konsantrasyonu, doza ve uygulama yoluna bağlı olup, uygulama yerindeki emilim, dokunun vaskülaritesiyle ilgilidir. Levobupivakainin % 0,5 veya % 0,75'lik konsantrasyonlarından 15 ml epidural enjeksiyonu sonrası pik plazma konsantrasyonları sırasıyla 0,582 ve 0,8-1 mg/L olmakta, bu konsantrasyonlara 0,37 ve 0,29 saatte ulaşıldığı bildirilmiştir (10,72).

Levobupivakain yüksek oranda plazma proteinlerine bağlanır (%97), 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 (10,72).

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 (10,72).

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 (10,72).

Farmakodinamik Özellikleri

Levobupivakain rasemik bupivakainin S(-) izomeri olan amid tipte uzun etkili bir lokal anestezik olup bupivakaine benzer farmakodinamik özellikler gösterir. Toksik dozlarda erişilen kan konsantrasyonlarında kalpte iletim bozukluğu, eksitabilite, kontraktilite ve periferik vasküler dirençte değişimler yaptığı bildirilmiştir. Genelde invitro, invivo ve gönüllülerdeki sinir blokaj çalışmalarında levobupivakainin potensinin bupivakain kadar olduğu, benzer duyusal ve motor blok oluşturduğu gösterilmiştir (10,72-74).

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

Kardiyovasküler Sisteme Etkileri

Yapılan hayvan çalışmalarında bupivakainden daha az toksik etkiye sahip olduğu, QRS genişlemesi ve aritmi görülme sıklığının daha düşük olduğu gösterilmiştir (75). İzole perfüze tavşan kalpleriyle yapılan çalışmalarda, levobupivakainin bupivakainden daha az kardiyotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (72).

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 (75). Hayvan çalışmalarında konvülziyon ve apne oluşturma olasılığının daha düşük olduğu gösterilmiştir (74). Levopubivakainin vazokonstriktör etkisinin daha çok oluşu, ortaya çıkan duyusal bloğu daha uzun sürmesini ve SSS toksisitesinin daha düşük olmasını açıklamaktadır (10,75).

2.3. KAS İSKELET SİSTEMİNDE LOKAL ANESTEZİKLERE BAĞLI SUBSELLÜLER DEĞİŞİKLİKLER VE İNCELENME YÖNTEMLERİ

2.3.1. Apoptosiz

Çok hücreli organizmalarda hücre bölünmesiyle artan hücre sayısı hücre ölümleriyle dengelenir. Eğer bir organizmada bir hücreye artık gereksinim duyulmuyorsa, hücre içi haberci sistemleri aktive edilerek o hücrenin intihar süreci başlatılır. Bu intihar süreci Yunanca'da yaprak dökümü anlamına gelen "apoptoz" ya da "programlı hücre ölümü" ile gerçekleşir. Hücre ölümleri fizyolojik şartlarda meydana geldiği için bu ölüm şekli fizyolojik hücre ölümü (physiological cell death) olarak da adlandırılır.

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 (76).

Canlının başarılı bir organ gelişimini sağlayabilmesi embriyonik gelişme sırasında gerçekleşen hücre ölümlerine bağlıdır. Apoptoz; gelişim, dokularda hücre populasyonun korunması ve yaşlanma gibi homeostatik bir mekanizmanın sağlanması amacıyla fizyolojik olarak meydana gelir. Bunun yanında hücreler, hastalıklar veya zararlı ajanlar

tarafından zarar gördüğünde veya immun reaksiyonlarda koruyucu bir mekanizma olarak ortaya çıkar. Apoptotik hücreler organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmaktadırlar ve bu oluşum ömür boyu devam etmektedir. Böylece ölüm (apoptoz) ve yeniden yapım (mitoz) bu dokularda doku homeostazisini oluşturmak üzere dinamik bir denge halinde süregelir.

Apoptotik hücre ölümünün kanser dışında da pek çok durumda potansiyel patojenik rolü vardır; AIDS ve nörodejeneratif hastalıklar da olduğu gibi. Tümör büyümesi, yalnızca kontrol edilemeyen proliferasyon anlamına gelmez aynı zamanda azalmış apoptozisi de içerir. Total büyüme veya regresyonu değerlendirirken, apoptozis ve proliferasyon arasındaki denge önemlidir (77,78).

2.3.1.1 Apoptozis Oluşum Mekanizmaları

Programlı hücre ölümünde birbirini izleyen basamakların neler olduğu tam olarak bilinmemektedir. Hücrenin kendi otomatik saati olan genlerin aktivasyonu veya çevreden gelen sinyallerle apoptozis başlamaktadır. 1986 yılında Wyllie, glukokortikoid verilen kemirgenlerde timus timositlerinin apoptozisle öldüğünü göstermiştir. Apoptozis önceden hazır olan hücrelerde (primer) başlatılabilir ya da bir uyaran sonucu sekonder olarak gelişir. Hücre dışı uyaranlar tümör nekroz faktörü (TNF), koloni uyarıcı faktörler (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), IL-2 gibi maddelerin ortamda azalması, glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler gibi pozitif uyaranlar olabilir.

Özellikle son zamanlarda otoimmün hastalık gelişiminde rolü olduğu belirtilen Fas/FasL, sFas proteinleri, virüsler (HIV gp120 proteini, influenza virüsü TNF reseptörü üzerinden; adenovirus hücre genetik yapısını bozarak) hücreyi apoptozise götürmektedir. Uyarılar, hücre içinde Ca^{++} artışına neden olmakta ve/veya cAMP gibi hücre içi ikincil habercileri aktive etmektedir. Bu da "cascade" olarak isimlendirilen ve tam olarak açıklanamayan "şelale" sistemiyle hücre yapısında değişikliklere neden olan pek çok basamağı uyarmaktadır (79).

2.3.1.2.Apoptotik Hücrede Gözlenen Morfolojik Değişiklikler

1.Yüzey Organellerinin Kaybı

Apoptozise uğrayan hücrenin komşu hücrelerle bağlantıları kesilir, Hücre yüzeyindeki mikrovillusler ve diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlar ortadan kalkar, hücre yüzeyi yuvarlaklaşır (79).

2. Hücre Büzülmesi

Apoptotik hücre komşu hücreye göre daha küçük ve sitoplazması daha yoğundur. Endoplazmik retikulum dışında diğer hücre organelleri yapılarını korur. Sitoplazma yoğunluğu arttığı icin organeller kalabalık görünür. Hücre zarı sağlam olduğundan nekrozda olduğu gibi bir inflamatuar reaksiyon gözlenmez (79).

3.Kromatin Yoğunlaşması

Önemli yapısal değişiklik çekirdekten başlayarak izlenir. Çekirdek apoptoziste odak noktasıdır. Hücreden hücreye değişmekle birlikte genellikle cekirdek büzüşür. Kromatin çok yoğun bir hale gelir ve parçalar halinde bir araya toplanır. Çekirdek porları seçilemez. Çekirdek şekli düzensizleşir ve ileri evrede küçük çekirdek parçalarına bölünür. Çekirdekcik genişler ve granülleri kaba granüller halinde dağılır (79).

4. Sitoplazmik Baloncuklar ve Apoptotik Cisimciklerin Oluşması

Hücrede önce yüzeye doğru tomurcuklanmalar görülür. Bunlar sitoplazma parçacıkları içeren ve sıkı biçimde paketlenmiş organellerden oluşan zarla sarılı apoptotik cisimlere dönüşür. Hücre membran tomurcuklanması olurken fosfotidilserin açığa çıkar. Sağlıklı hücrelerde plazma membranının içinde bulunan fosfotidilserin apoptotik hücrelerde plazma membranının dış yüzünde bulunur ve fagositik hücreler icin sinyal görevi görür (79).

2.3.1.3 Apoptozis Saptamasında Kullanılan Yöntemler

1972 yılında, apoptozis terimi ilk kez kullanıldığında sadece hücrenin morfolojik görünümüne göre değerlendirme yapılırken, günümüzde morfolojik değerlendirmenin yanısıra apoptozise özgü olduğu bilinen bazı enzimlerin (örn. aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de saptanabilmektedir. Transmisyon elektron mikroskopi (TEM), apoptozisin morfolojik olarak tanınması için değerli bir yöntemdir. Bu yöntemle apoptotik hücrede görülen morfolojik değişiklikler (hücre büzülmesi, plazma ve nükleer membranın pul pul dökülmesi (*blebbing*), organellerin yeniden lokalizasyonu ve sıkıca paketlenişi, kromatin yoğunlaşması) çok açık olarak görülebilmektedir (80).

Hematoksilen ile boyanan preparatlar ışık mikroskobu ile incelenerek hücrelerin çekirdek morfolojisine göre apoptozis değerlendirilebilir. Dokuları boyamak suretiyle yapılan apoptotik hücre tayininde, DAPI (4,6-Diamine-2'phenylindoledihydrochloride) ve Azan boyası da kullanılabilir. DAPI, özellikli olarak DNA'yı boyar ve mavi floresans

verir. Tek tek hücreleri boyadığı için doku incelemelerinde çalışmayı sınırlar. Azan ise klasik bir doku boyasıdır. DNA'ya bağlanıp çekirdeği kırmızıya boyar. Apoptotik cisimciklerin içlerindeki nükleer materyali ve kromatin yoğunlaşmasını kısmen görmek mümkündür (80).

Agaroz Jel Elektroforezi DNA kırıklarının gösterilebildiği bir başka yöntemdir. DNA fragmantasyonunun tespitinde diğer bir yol da, ELISA yöntemi ile apoptotik süreç sonunda, parçalanmış ve sitoplazmaya sızmış mono ya da oligonükleozomların saptanmasıdır (81).

Fragmantasyon esasına dayanan diğer bir apoptozis saptama yöntemi ise TUNEL(**T**erminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin - d**U**TP **N**ick **E**nd **L**abeling) yöntemidir. Apoptotik hücrelere ait DNA'lar hızla parçalanmakta olduklarından, birdenbire hücre içerisindeki kromatin ağ, bütünlüğünü kaybeder ve 3'-OH içeren DNA parçacıklarının sayısı çok yükselir. Hücrede terminal deoxynucleotidyl transferaz (TdT) enzimi, ortama eklenen biotin dUTP'yi, parçalanmış DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına transfer eder. Biotin ile işaretlenmiş DNA parçacıkları, ortama FITC gibi floresans veren bir madde ile bağlanmış avidin eklendiğinde görünür hale gelirler. Apoptotik hücrelerin lokalizasyonu DNA fragmanları terminal transferaz UTP belirlenir ve TUNEL kullanılarak ayrılır. TUNEL başarılı bir şekilde apoptozisi diğer biyolojik olanlardan ayırır ve immunoseleksiyon meydana gelir. Bu yöntem tek tek hücrelerde insitu apoptozisi gösterebildiği için hücre kültürlerinde ve doku kesitlerinde oldukça duyarlı bir testtir (79,82).

Kaspas-3 aktivite testi ile de apoptozise uğramış hücreler tespit edilebilir. Normal bir hücrede inaktif olan pro-kaspas-3, hücrenin apoptozise gitmesi ile, aktif kaspas-3 molekülü haline dönüşmeye başlar. Yöntem, ELISA kuyucuklarında spesifik antikoru ile immobilize edilmiş kaspas-3 moleküllerinin, floresans veren spesifik substratları ile aktivitesinin ölçülmesi esasına dayanır (81).

Apoptozisin bu fizyopatolojik özelliklerinden istifade edilerek apoptotik hücreler tespit edilebilmektedir. Anneksin-V, hücrenin dış yüzeyinde ortaya çıkan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, hücre yüzeylerine Anneksin-V bağlanma oranı, o hücre topluluğundaki apoptozise uğramış hücrelerin oranını vermektedir (100,102). FITC-Anneksin komplesinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı flowcytometry ile ölçülebilmektedir (81,82).

2.3.1.4 İskelet Kas Dokusundaki Apoptozisin Morfolojik Paternleri

Doku canlılığında ve devamlılığında, enfekte hücrelerin ortadan kaldırılmasında ve normal fizyolojik ortamın korunmasında etkin olan apoptozis, iskelet kas dokusunda da sık saptanan ama halen tam anlamıyla anlaşılamamış bir fenomendir. Hücre ölümü iki şekilde meydana gelmekedir; nekrozis veya apoptozis'dir. Hücre nekrozu hücresel homeostazı tahrip eden nonfizyolojik durumlarla ilişkilidir. Buna karşın apoptozis düzenlidir ve genlerin bizzat kendisi hücre yıkımına programlanmaktadır. Doku homeostazında hücresel yıkımın normal kontrol içinde sağlandığı fonksiyonlar yaşam boyu çeşitli faktörler tarafından belirlenir. Kas nekrozunun erken fazlarında hücre yuvarlanması, plazma membranında fokal kayıplar izlenirken; bazı alanlarda mikrofibriller total olarak ayrılmaktadır. Apoptozise giren hücrede morfolojik açıdan büzülme, membran tomurcuklanması, nükleer kromozom yoğunlaşması, internükleozomal DNA parçalanmaları ve apoptotik kese formasyonu sergiler. Apoptozise giren hücrelerin bir apoptotik aktivite markırı nükleozomlar arası bölünme olup, birkaç nükleozom uzunluğunda DNA fragmanlarına ayrılır (83,84).

Son çalışmalar, mitokondrinin normal hücresel fonksiyonlar için ATP sentezlemenin yanısıra apoptozisin başlatılması ve regülasyonunda da rol oynadığını göstermektedir. Hücre içindeki mitokondiriyal Ca^{++} birikimi çok sıkı kontrol edilmesi gereken bir süreçtir. Ca^{++} 'un hücre içinde kontrolsüz birikimi apoptozisi başlatan önemli mekanizmalardan birisidir. Mitokondriden salınan proteaz aktivatörlerinin salınımı apoptozis için tetikleyici rol oynamaktadır. Membran potansiyel değişikliklerinin belirleyen mitokondrial sitokrom-c salınımı ve Ca^{++} disregülasyonu hücre apoptozisine yol açmaktadır (62).

Kas hücrelerinin birbirinden bağımsız fenotiplerinde ilerleyici doku değişiklikleri gözlenebilir. Bu değişikliklerin içinde miyofibril serbest bölgelerin formasyonu ile birlikte düzensizlik ve miyofibrillerin uzaysal disorganizasyonu içermektedir. Başlangıçta bu değişikliler miyonukleus çevresinde subsarkolemmal alanda açığa çıkarken daha sonra 2. fazda sarkoplazma doğrultusunda yayılır. İskelet kas hücresindeki tipik apoptotik kromatin değişiklikleri aynı sinsisyum içinde nonapoptotik, apoptotik ve nekrotik çekirdeklerin varlığı ile görülebilir. İskelet kas dokusundaki apoptozis ile ilgili çalışmalar potansiyel tanısal ve tedaviye yönelik hedefler olarak hücre markırlarının tanımlanmasında çok önemlidir (85).

2.3.2. Transmisyon Elektron Mikroskopta İskelet Kas Dokusundaki Hücre Organellerinin İncelenmesi

Biyolojik, Tıp ve mühendislik bilimlerinin pek çok dallarında yaygın şekilde kullanılan elektron mikroskobu birçok araştırmacı için vazgeçilmez bir araştırma ve uygulama cihazıdır. Elektron mikroskobu ile hücre içi organellerin yapılarını, hücre içindeki dağılımını ve diğer organellerle komşuluğunu, fonksiyonel ilişkilerini, çekirdeğin yapısını membran bütünlüğünü ya da membrandaki değişiklikleri görmek mümkündür.

Elektronlarla doku parçalarının etkileşimine dayanarak görüntünün elde edilmesini sağlayan elektron mikroskobunun geçirgen (Transmisyon) ve taramalı (Scanning) tipleri vardır. Geçirgen elektron mikroskopta (TEM) görüntüleme ışık mikroskobuna benzerdir ve elektronların dokudan geçmesi veya tutunmasına göre tutunmasına göre siyah-beyaz arası iki boyutlu görüntü elde edilir. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ise yüzeyden sapan elektronların bir detektör yardımı ile toplanmasıyla incelenen materyalin üç boyutlu olarak topografik görüntülenmesini sağlar.TEM karakteristik olarak kromatin kısalmasını gösterirken SEM tipik olarak memran *blebbing*'i (kabarıklaşması) göstermektedir (85).

2.3.2.1. Lokal Anesteziklere Bağlı İskelet Kas Dokusundaki Histopatolojik Değişikliklerin Transmisyon Elektron Mikroskopta İncelenmesi

Lokal anesteziklerin i.m enjeksiyonu reversbl myonekrozla sonuçlanmaktadır. İskelet kasında histolojik hasar paterni uniform olarak i.m enjeksiyondan 5 dakika sonra ortaya çıkan kontrakte miyofibriller, SR'de litik dejenerasyon, miyosit ödemi ve 1-2 gün içerisinde gerçekleşen nekroz şeklinde özetlenebilir. Miyoblast, bazal lamina ve kas dejenerasyonu ise 3-4 hafta içinde tanımlanmıştır (39).

Bupivakainin, akut ve fulminan kas yıkımını indüklemesi ile dejeneratif myonekroz sürecin önüne geçilememektedir. Bupivakain enjeksiyonundan sonra, elektron mikroskopta iskelet kas fiberlerinde şiddetli myonekroz görülmüştür. Myonekrozun mekanizması, Ca^{++} reuptakenin inhibisyonuyla sarkoplazmik retikulum fonksiyonunun bozulmasıdır. İntrasitoplazmik Ca^{++} artışı, sarkolemmal fosfolipid bozulmalara yol açar, bu kontraktil elementlerde lizisi başlatır. T Tübüler sistemin ve lateral terminal sisternalarda dilatasyon oluşur. Bu durumda sellüler destruksiyonda vakouller nadiren görülmektedir. Bütün mitokondrilerin etkilendiği gözlemlenmektedir ve kısmen dağılırlar. Mitokondride elektron spot dansitelerinin görünmesi aşırı Ca^{++} birikimini

göstermektedir (61,86). İçeride karakteristik olarak koyu çekirdek parçaları görülür. Buna ek olarak miyonukleus pilenotik, kromatin patolojik olarak koyulaşır (1). Kas dejenerasyonunun erken bulgusu Z bandının selektif hasarı elektron mikroskobik ve jel elektroferezinde gösterilmiştir. İyi korunmuş satellit hücreleri kas sistemindeki hızlı rejenerasyon ve kas lifi diferasyonundan sorumludur. Satellit hücrelerine ek olarak, motor sinir uçları lokal anesteziklerin majör yıkıcı etkilerinden korunmaktadır. Bu rejeneratif süreç boyunca nöromuskuler devamlılığın yenilenmesi ile olmaktadır (36,38).

Politi ve ark. (86) yukarıda belirtilen histopatolojik bulgulara benzer bulguları ratlarda bupivakain ile oluşturdukları rejenerasyon modelinde gözlemlemişlerdir. Birinci günde hasarlı fiberlerde A, I ve Z çizgilerini içeren sarkomerlerde değişik seviyelerde mononükler hücrelerle infiltre miyofibril bozulmaları, longitudinal kesitlerde hiperkontrakte bantlar şeklinde ve ayrıca endomisyum ödematöz olarak gözlemişlerdir. İkinci günde terminal sisternada birçok küçük vakouler yapılara ayrılarak sarkoplazmik retikulum dilatasyonla ayrılmıştı. Makrofajlar, yapısı bozulmuş nekrotize sarkoplazma ve içi boşalmış sarkolemmal tüpler gibi ortaya çıkan fiberleri ortadan kaldırdığını tesbit ettiler. Plazma membranı fokal olarak etkilenmeyip, şişen mitokondrinin subsarkolemmal ürünlerinden olan krista matriks ve yoğun elektron dens granüllerin kaybı ile beraberdi. Segonder lizozomlarla ilişkili dejenere lizozamal yapılar genel olarak *whorl* cisimcikleri, lipofusin granülleri ve otofajik vakuler formunda belirmeye başlamıştı. Mononükleer hücreler tarafından çizgili kas fiberlerin infiltrasyonu, tüm kas hasarlarında ve patolojik durumlarda karakteristik olarak görünen bir süreçtir. Makrofajlar, hasar gören çizgili kas dokusundan salınan kompleman kompenentleri tarafından stimüle edilip amorf materyalin uzaklaştırılmasında görev almaktadır.

3. MATERYAL ve METOD

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM) ve Çukurova Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi (TIBDAM)'nde yapılmıştır. Tüm işlemler Uluslararası Hayvan Hakları Evrensel Beyannamesine uygun olarak, Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun onayı (Tarih 10.02.2010 No: 10/22) alındıktan sonra veteriner hekim kontrolünde gerçekleştirilmiştir. Bu proje Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (TSU–10–2956).

3.1. DENEYSEL ÇALIŞMANIN YAPILIŞI

Çalışma, DEKAM laboratuarlarında yetiştirilen ve ağırlıkları 180–200 gram arasında değişen dişi cins Wistar-Albino türü 40 rat kullanılarak gerçekleştirildi. Deney hayvanları, her biri 10 rattan oluşan, dört gruba ayrıldı.

Birinci gruba (Grup SF, n=10); 100µl, %0.9 normal salin
İkinci gruba (Grup B, n=10) ; 100µl, %0,5 bupivakain,
Üçüncü gruba (Grup R, n=10); 100µl, %0,5 ropivakain,
Dördüncü gruba (Grup L, n=10); 100µl, %0,5 levobupivakain, i.m yoldan verildi.

Enjeksiyon için ratların sağ *gastrocnemius* kası kullanıldı. Kas elle tesbit edilerek, 27 G keskin uçlu iğne aracılığı ile çalışma grubuna göre 100 µL lokal anestezik veya %0.9 normal salin yavaşça enjekte edildi. Damar içi enjeksiyonu bertaraf etmek için her bir enjeksiyondan önce nazikçe aspirasyon uygulandı. B ve L gruplarına enjekte edilen lokal anestezikler için ticari preparatlar (sırasıyla *Marcaine % 0,5 20 ml flakon, Astra Zeneca, İngiltere* ve *Chirocaine % 0,5 10 ml flakon, Abbott, USA*) kullanıldı. R grubuna uygulanan lokal anestezik, ülkemizde %0,5 konsantrasyonda satışa sunulmadığı için, %

1 konsantrasyondaki ticari preparatı (*Naropin %1 10 ml flakon, Astra Zeneca, İngiltere*) %0,9 normal salin ile 1:1 oranında sulandırılarak %0,5 konsatrasyonda elde edildikten sonra kullanıldı.

Enjeksiyonları yapıldıktan sonra ratlar, her bir grup için ayrılmış kafeslere konuldu. Ratların bakımı aynı odada, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık olacak şekilde, ortam ısısı ve beslenme rejimleri aynı olmak kaydıyla, optimum yaşam koşullarında sağlandı.

Her bir grupta yer alan ratlar, enjeksiyonu takip eden ikinci günün sonunda, 8 mg/100 gr dozunda ketamin (*Ketalar 50 mg/ml, Pfizer Inc, New York, USA*) anestezisi altında servikal dislokasyon uygulanarak sakrifiye edildi. Ratların enjeksiyon yapılan ekstremitesinin cildi disseke edildikten sonra (Resim 1) künt diseksiyon yöntemi ile gastrokinemus kası ayrıldı.



Resim 1. Ratların enjeksiyon yapılan kaslarının disseke edilmesi.

Alınan kas dokusu örnekleri ışık mikroskobu incelemesi için Bouin sıvısı, immunofloresan mikroskop incelemesi için % 10' luk nötral formalin solüsyonu ve elektron mikroskobik inceleme için % 5'lik gluteraldehit içerisine alındı. Doku örnekleri Bouin solüsyonunda 24 saat, % 10'luk nötral formalin içerisinde 48 saat süreyle tespit edildi. Tespitten sonra doku örnekleri artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi, ksilen ile şeffaflaştırıldıktan sonra 60^{o}C'de eriyik parafinde bir gece bekletildi. Parafin bloklara yerleştirilen kas dokusu örneklerinden 5 mikron kalınlığında kesitler

alındı. Alınan kesitler, ışık mikroskobunda incelenmek üzere Hematoksilen-Eozin ile boyandı. Kesitlere ayrıca apoptotik aktivasyonun araştırılmasına yönelik, "Millipore TUNEL apoptozis belirleme kiti" kullanılarak boyandı.

3.2. IŞIK MİKROSKOBUNDA İNCELEME YÖNTEMİ

Bouin solüsyonunda 24 saat tespit edilen doku örnekleri çeşme suyunda yıkandıktan sonra sırasıyla %70, %80, %90, %96, %100 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 ^{o}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 yıkanaralk asit alkolden geçirilen dokular 4 dakika eozin ile muamele edildi. Doku örnekleri sırasıyla %70, %80, %90 alkol ve aynı konsantrasyonda ksilen içerisinde onar dakika bekletilerek doku kesitleri üzerine bir damla entellan damlatılarak lamelle kapatıldı ve ışık mikroskobunda incelenmeye hazır hale getirildi.

3.3. İMMUNOFLORESAN MİKROSKOPTA İNCELEME YÖNTEMİ

Polilizinli lamlara (Thermo Scientific) alındıktan sonra bir gece 37°C etüvde bekletilen 5 mikron kalınlığındaki kesitler üç kez onar ve bir kez 15 dakika ksilende bekletildikten sonra sırasıyla %100, %100, %90, %80 ve %70 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 H_2O_2 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. ELEKTRON MİKROSKOPTA İNCELEME YÖNTEMİ

Elektron mikroskobik değerlendirme için alınan kas doku örnekleri Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış, % 5'lik glutaraldehit solusyonu içerisine konuldu. % 5'lik

glutaraldehit solusyonunda 1 saat kadar bekletilen doku parçaları daha sonra içerisinde bir miktar % 5'lik glutaraldehit bulunan, dibi dişçi mumu ile kaplanmış, petri kutularına alındı ve jilet yardımıyla yaklaşık bir milimetreküp büyüklükte parçalara ayrıldı. Doku parçaları daha sonra tekrar 3 saat süreyle % 5'lik glutaraldehit solusyonuna alındı, böylece bu solusyonda toplam 4 saat tespit edildi. Tespit işleminden sonra, dokular Millonig fosfat tamponu ile çalkalandı ve bir gece boyunca bu solusyonda yıkandı. Ertesi gün dokular Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış % 1'lik osmium tetraoksit solusyonu ile ikinci kez tespit edildi. İkinci tespitten sonra dokular tekrar Millonig fosfat tamponu ile iki defa 10'ar dakika süreyle yıkandı ve derecesi giderek artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi (Tablo 2).

Tablo 2. Elektron Mikroskobik İncelemeye Yönelik Doku Takip Yöntemi

Solüsyon	**SÜRE (dk)**	**Sıcaklık (°C)**
% 50 Etil Alkol	15	+4
% 70 Etil Alkol	15	+4
% 86 Etil Alkol	15	+4
% 96 Etil Alkol	15	+4
% 100 Etil Alkol	10	+4
% 100 Etil Alkol	10	+4
% 100 Etil Alkol	10	Oda ısısında
Propilen oksit	15	Oda ısısında
Propilen oksit	15	Oda ısısında

Son % 100'lük etil alkol safhasına kadar olan işlemler +4 °C 'de buzdolabında yapıldı. Sonraki işlemler ise oda ısısında yapıldı. Dehidratasyondan sonra doku parçaları;

1 hacim propilen oksit + 1 hacim gömme materyali ile 30 dakika

1 hacim propilen oksit + 1 hacim gömme materyali ile 30 dakika immerse edildi.

Gömme Materyali :

- Araldit CY 212 20 ml
- Sertleştirici HY 964 20 ml
- Hızlandırıcı DY 064 0.6 ml
- Plastikleştirici Dibütil Fitalat 1 ml

Ertesi gün doku parçaları taze hazırlanmış gömme materyali kullanılarak 00 polietilen kapsüllere gömüldü ve 60º C etüvde 48 saat süreyle polimerize edildi. Daha sonra, elde edilen bloklar etüvden çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Bloklardan Reichert Ultracut S ultramikrotomu ile 50 nm kalınlığında kesitler alındı ve kesitler 200-300 gözenekli bakır gridlere toplandı ve % 70'lik etil alkolde doymuş uranil asetat ve Reynolds'un kurşun sitrat solüsyonları ile boyandı. Boyanan kesitler JEOL-JEM 1400 transmisyon elektron mikroskobu ile incelendi.

3.5. HASAR SKORLAMA SİSTEMİ

Işık Mikroskobunda incelenen doku kesitlerinden mikro fotoğraflar alındı, "*Benoit, Yagiela ve Ferrell"* skorlama sistemi (42) kullanılarak hasara dayalı skorlama yapıldı (Tablo 3) ve değerlendirildi.

Tablo 3. *Benoit-Yagiela-Ferrell* Hasar Skorlama Sistemi

Skor	Hasar Durumu
0	fibril hasarı yok
1	yer yer lokalize ve dağınık hasar
2	geniş ölçüde nekroz
3	kas kitlesinin tamamında destrüksiyon ve nekroz

3.6. İstatistiksel Analiz

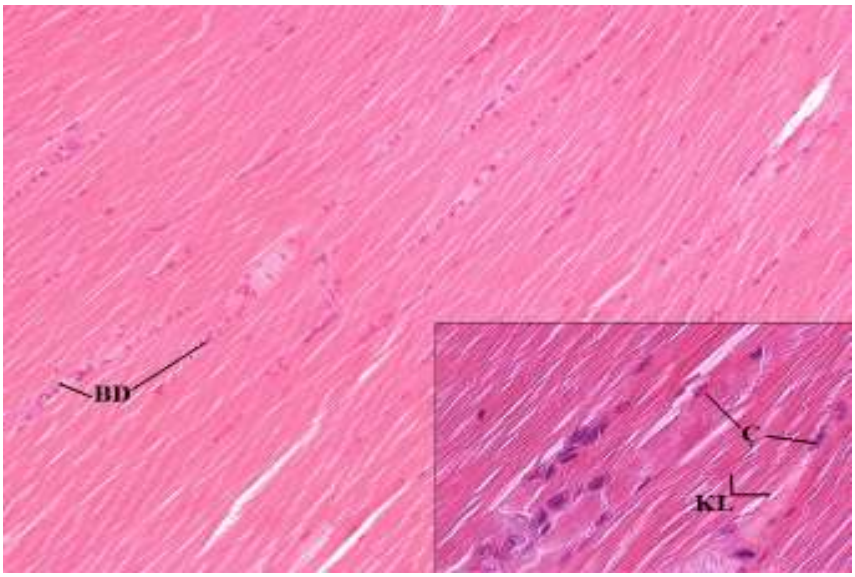
Çalışmanın istatistiksel analizleri "*SPSS for Windows 15.0"* bilgisayar programı kullanılarak yapıldı. İskelet kas hasarı skorları yönünden gruplar arasında belirgin farklılıklar *Kruskal-Wallis* testi ile değerlendirildi. *Kruskal-Wallis* testinde grup ortancalarının farklı bulunması üzerine, her bir grup ikişerli olarak *Mann-Whitney-u* testi ile karşılaştırıldı.

4. BULGULAR

4.1. SF GRUBUNA AİT BULGULAR

4.1.1. Işık Mikroskobu Bulguları

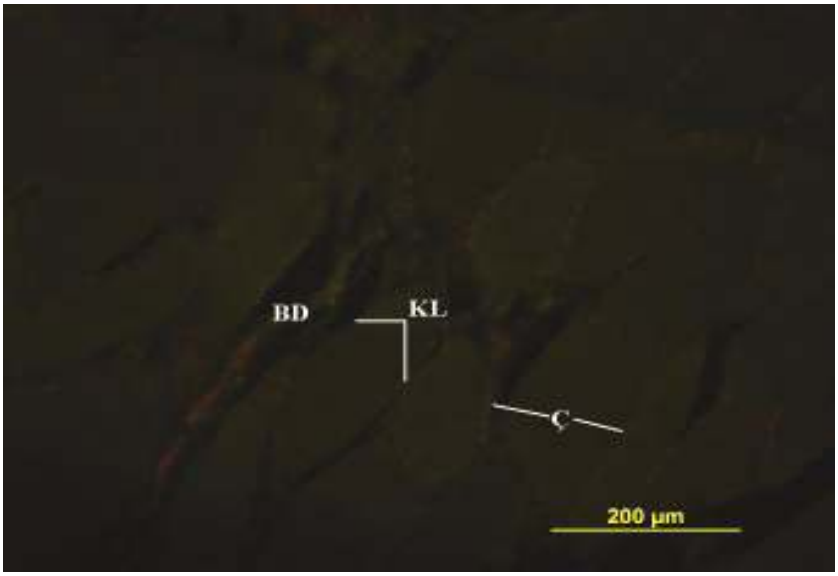
% 0.9 normal salin verilen grupta (Grup SF) enjeksiyondan sonraki 2. günde alınan çizgili kas dokusu örneklerinde, kas fiberlerinde ve onu çevreleyen bağ dokusu elementlerinde, histolojik lezyon ya da inflamatuar hücre infiltrasyonu gözlenmedi (Resim 2). *Benoit-Yagiela-Ferrel* skorlama sistemine göre SF Grubunun hasar skoru 0.0 (0.0-0.0) olarak değerlendirildi.



Resim 2. %0,9 normal salin enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin ışık mikroskobunda görünümü. (H&E, X20, sağ altta küçük resim X40) (BD: Bağ Dokusu, Ç: Çekirdek, KL: Kas Lifi). Hasar Skoru =0.0 (0.0-0.0).

4.1.2. Immunofloresan Mikroskop Bulguları

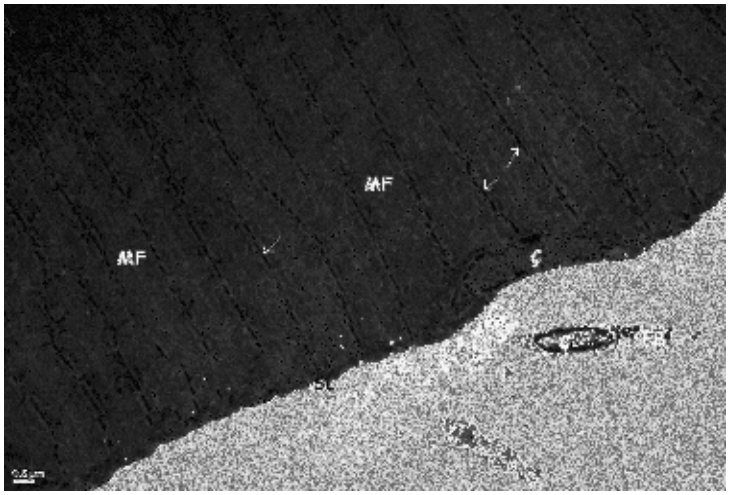
İmmunofloresan mikroskopta incelenen SF Grubuna ait kesitlerde apoptozisi yansıtan herhangi bir apoptotik hücre çekirdeğine rastlanmadı (Resim 3).



Resim 3. %0,9 normal salin enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin immünflorasan mikroskopta görünümü (TUNEL, X40, Bar 200µm) (BD: Bağ Dokusu, Ç: Çekirdek, KL: Kas Lifi).

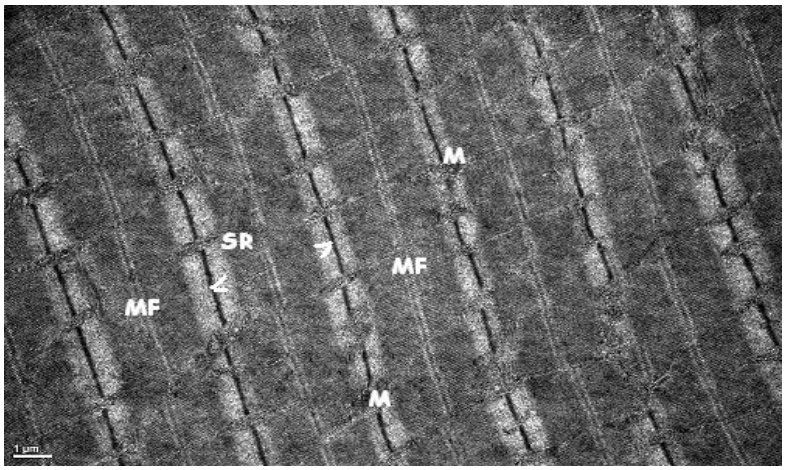
4.1.3. Elektron Mikroskop Bulguları

%0,9 normal salin enjeksiyonu yapılan gruba ait iskelet kası örneklerinin elektron mikroskobik incelenmesinde, kas lifleri (hücreleri)'nin enine ve boyuna çizgilenme gösteren tipik iskelet kas lifi özelliklerini taşıdıkları gözlendi. Uzunlamasına alınan kesitlerde kas liflerinin dıştan belirgin bir hücre zarı (sarkolemma) ile örtülü oldukları izlendi. Sarkolemma dıştan devamlılık gösteren belirgin bir bazal laminaya sahipti. Sarkolemmanın miyofibrilllerin A-I bandı kavşağında kas lifi içerisine doğru invagine olarak T-tübüllerini oluşturduğu gözlendi. Kas liflerinin subsellüler yapısında en belirgin özellik olarak, çok sayıdaki hücre çekirdeğinin subsarkolemmal alanlarda, periferik yerleşimleri dikkat çekmekteydi. Kas lifi çekirdekleri, çekirdek zarına yakın yerleşimli periferal heterokromatin içeriği yanında ökromatik alanlara da sahip, hafif yassılaşmış oval ya da ince uzun bir yapıda gözlendi (Resim 4).

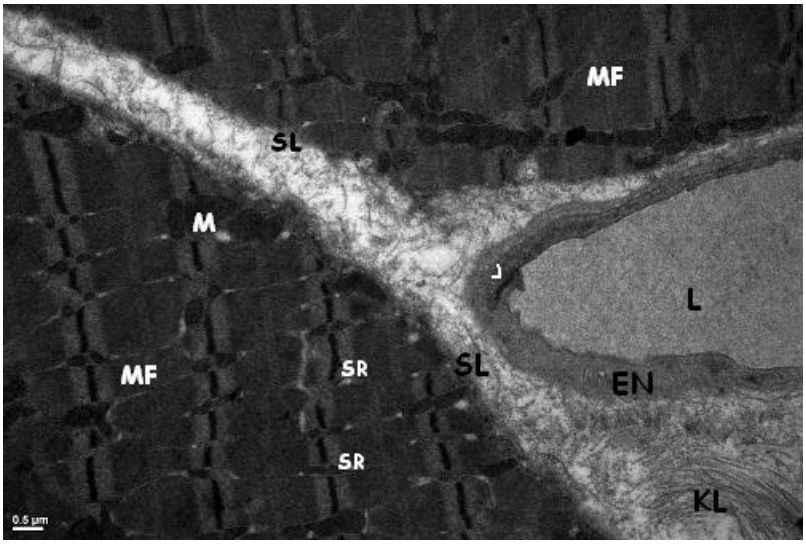


Resim 4. %0,9 normal salin enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin elektron mikroskopta görünümü. Kas lifinde sarkolemma **(SL),** çekirdek **(Ç)** ve miyofibrillerin **(MF)** normal yapıda oldukları görülmektedir. Mitokondriyonların **(M)** subsarkolemmal alanlarda ve miyofibrillerin aralarında yer aldıkları izlenmektedir. Fibroblast **(FB)**, Z bandı (Oklar) (Bar: 0,5mikron).

Kas lifi sitoplazmasında miyofiblillerin yanı sıra, çok sayıda mitokondriyonun varlığı gözlendi. Mitokondriyonlar subsarkolemmal alanlarda ve miyofibrillerin aralarında bulunmaktaydı. Özellikle kırmızı kas lifi tipinde mitokondriyonların çekirdek periferinde ve subsarkolemmal alanlarda yoğun şekilde bulunmaları dikkat çekiciydi. Mitokondriyonlar yanında kas liflerinde belirgin olan SR tübülleri miyofibriller boyunca yerleşim göstermekteydi. SR tübüllerinin enine kesitleri miyofibrillere komşu alanlarda, A-I bandı kavşağı yakınında izlenmekteydi. T tübülü ile birlikte çizgili kasta triad yapısının oluştuğu gözlendi. Az sayıda GER sisternaları da intermiyofibriler alanlarda bulunmaktaydı (Resim 5,6).

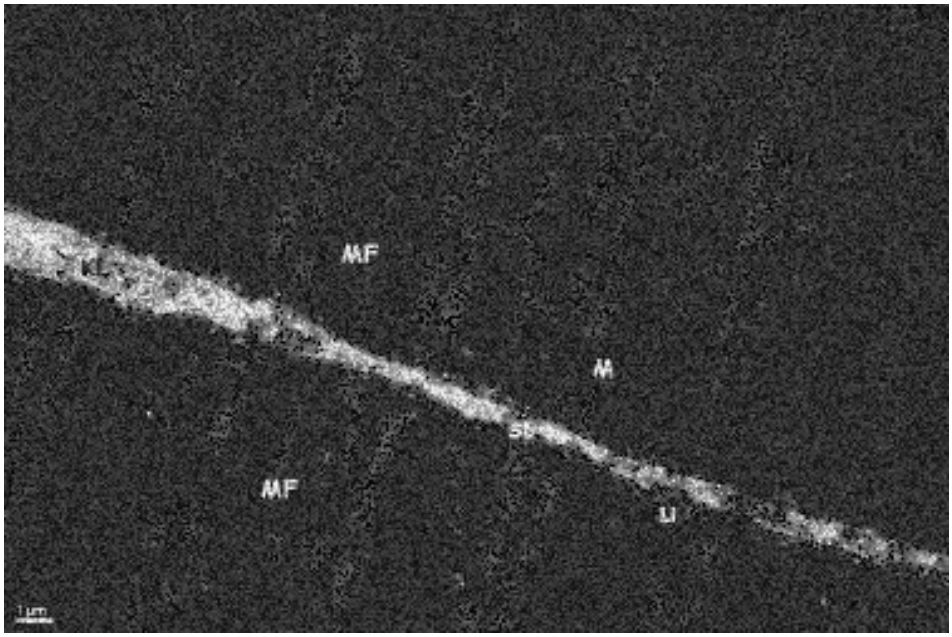


Resim 5. %0,9 normal salin enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin elektron mikroskopta görünümü. Kas lifi sitoplazmasında mitokondriyonların **(M),** sarkoplazmik retikülüm sisternalarının **(SR)** ve miyofibrillerin **(MF)** normal yapıda oldukları görülmektedir. Z bandları (ok başları) (Bar: 1 mikron).



Resim 6. %0,9 normal salin enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin elektron mikroskopta görünümü. Kas liflerinde sarkolemma **(SL),** mitokondriyonlar **(M)**, sarkoplazmik retikülüm **(SR)** ve miyofibrillerin **(MF)** normal yapıda oldukları izlenmektedir. Kas lifleri arasında yer alan kapiller damar duvarında, endotel **(EN)** hücrelerinin birbirlerine sıkı bağlantılar (okbaşı) ile bağlı oldukları görülmektedir. Kollajen lifler **(KL)** , Lümen **(L)** (Bar: 0,5 mikron).

Ayrıca serbest ribozomlar ve az sayıda lipid damlacıkları da ayırt edildi. Kas liflerinde subsarkolemmal alanlarda ve intermiyofibriler alanlarda glikojen partiküllerinin varlığı belirgindi. Glikojen partiküllerinin özellikle kırmızı kas liflerinde yoğun kümeler oluşturdukları gözlendi. Kas lifleri dıştan belirgin bir bazal lamina ile sarılıydı. Bazal lamina dış kısmında kollajen lifler ile desteklenmişti. Kas liflerine komşu olarak yerleşim gösteren ve bazal lamina ile sarılı olan satellit hücrelerine de nadiren rastlandı. Bunların yanında, kas lifleri ile yakın ilişkili olarak, birbirlerine sıkı bağlantılar ile bağlı, devamlılık gösteren endotel hücreleri ile döşeli kapiller damarlara da sıklıkla rastlandı (Resim 6,7).

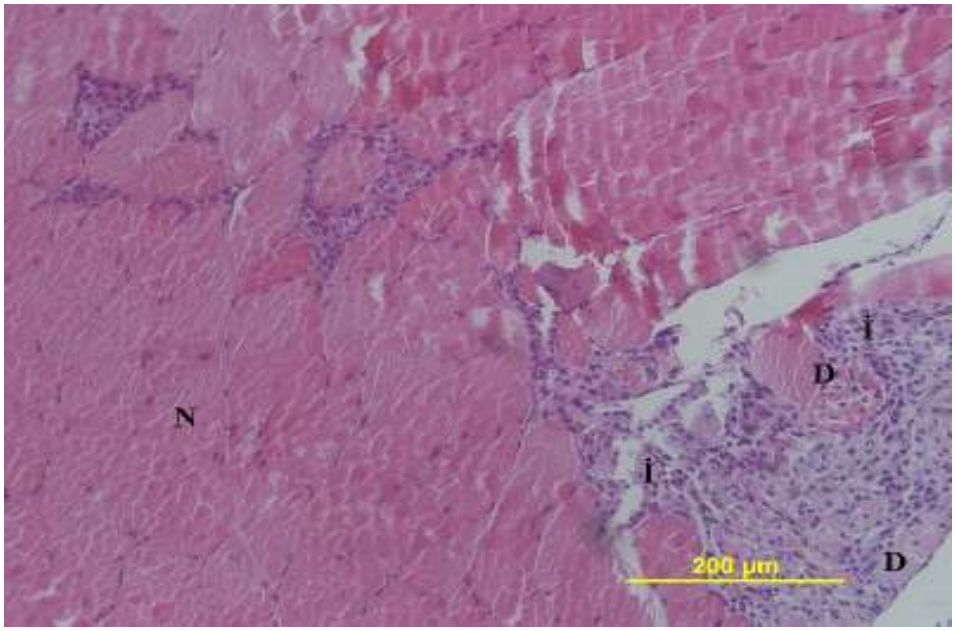


Resim 7. %0,9 normal salin enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin elektron mikroskopta görünümü. Kas liflerinde sarkolemma **(SL),** mitokondriyonlar **(M)** ve miyofibrillerin **(MF)** normal yapıda oldukları görülmektedir. Lipid damlacığı **(Li)**, Kollajen lifler **(KL)** (Bar: 1mikron).

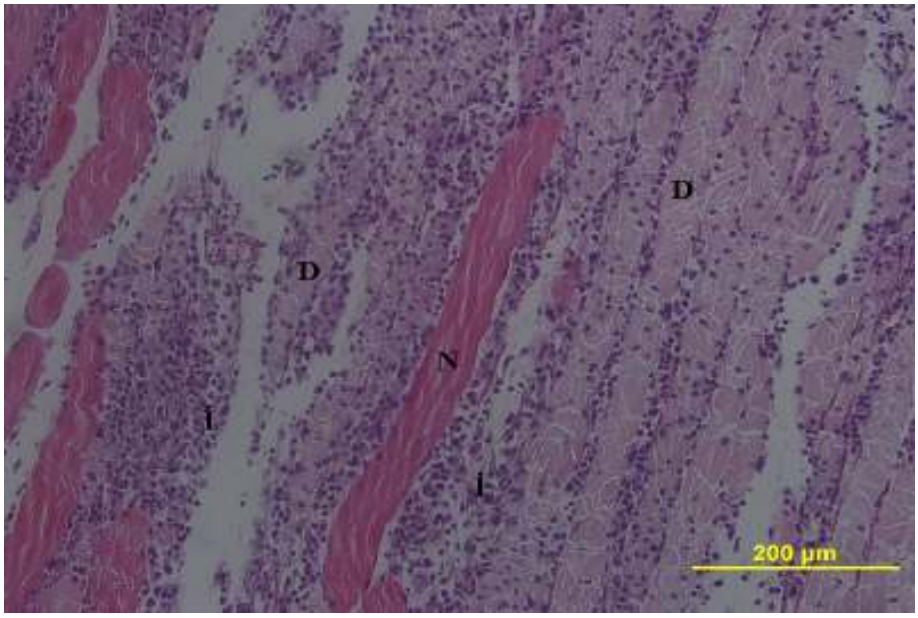
4.2. BUPİVAKAİN GRUBUNA AİT BULGULAR

4.2.1.Işık Mikroskobu Bulguları

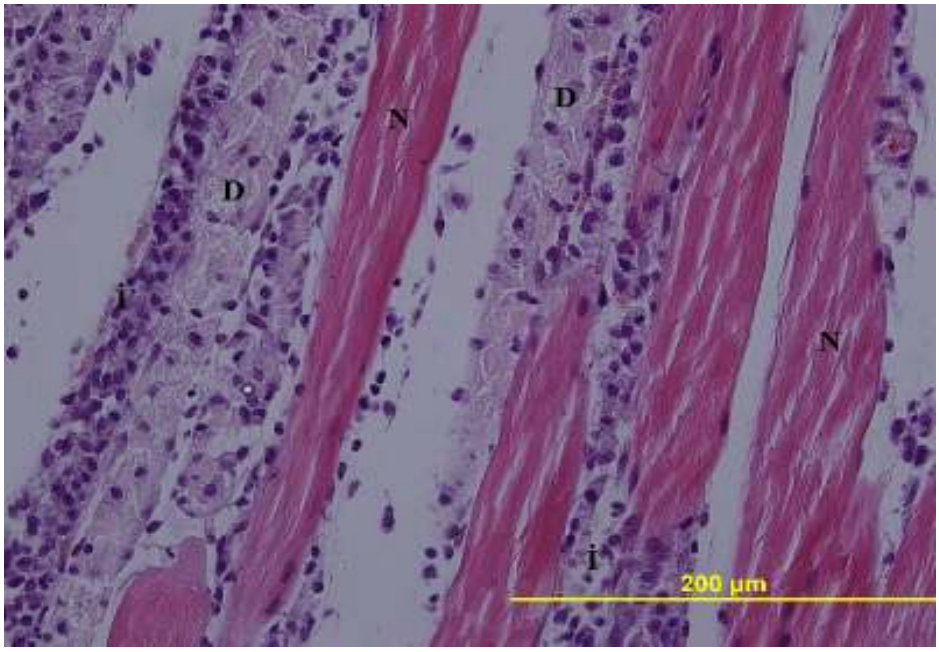
Bupivakain enjeksiyondan 2 gün sonra alınan doku örneklerinde, nekroza uğramış kas hücreleri arasında yaygın inflamasyonun hakim olduğu gözlendi. Yer yer sağlam görünen kas hücrelerinin yanında, miyofibriller arası yaygın mononükleer lökosit infiltrasyonu, yaygın nekrobiyotik değişiklikler ve dejenerasyon gözlendi (Resim 8–11). Ayrıca, septal bölgelerde geniş iltihabi ödem alanları ve miyositlerde kasılmayı yansıtan tarzda dalgalı görünüm ayırt edilmekteydi (Resim 9). [Hasar Skoru = 3.0 (2.0–3.0)].



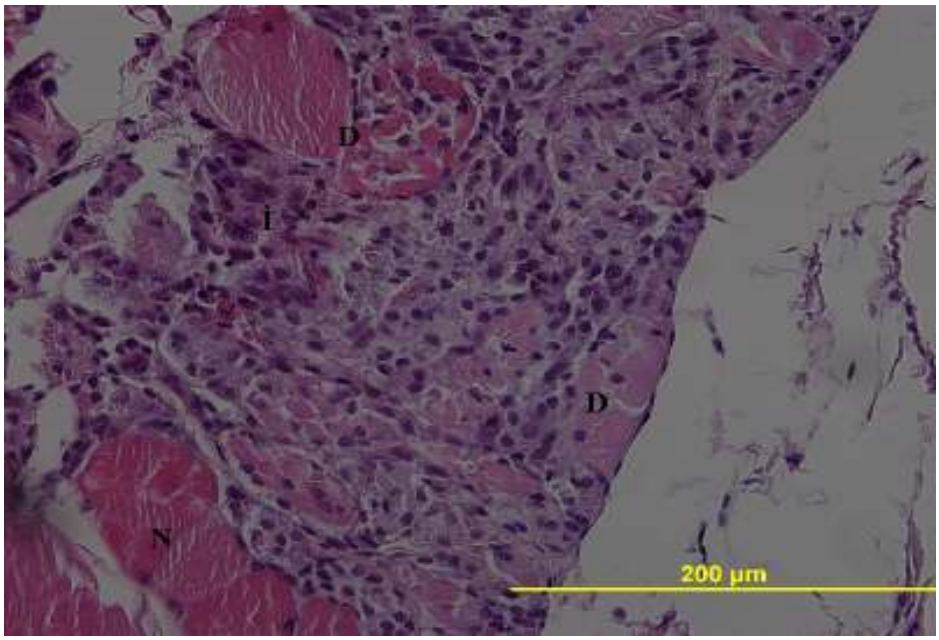
Resim 8. % 0,5 bupivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin ışık mikroskobunda görünümü. (H&E, X20, Bar 200 µm). (N: normal kas lifi, D: dejeneratif alanlar, İ: iltihabi alanlar). Hasar Skoru = 3.0 (2.0–3.0).



Resim 9. % 0,5 bupivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin ışık mikroskobunda görünümü. (H&E, X20, Bar 200 µm). (N: normal kas lifi, D: dejeneratif alanlar, İ: iltihabi alanlar). Hasar Skoru = 3.0 (2.0–3.0).



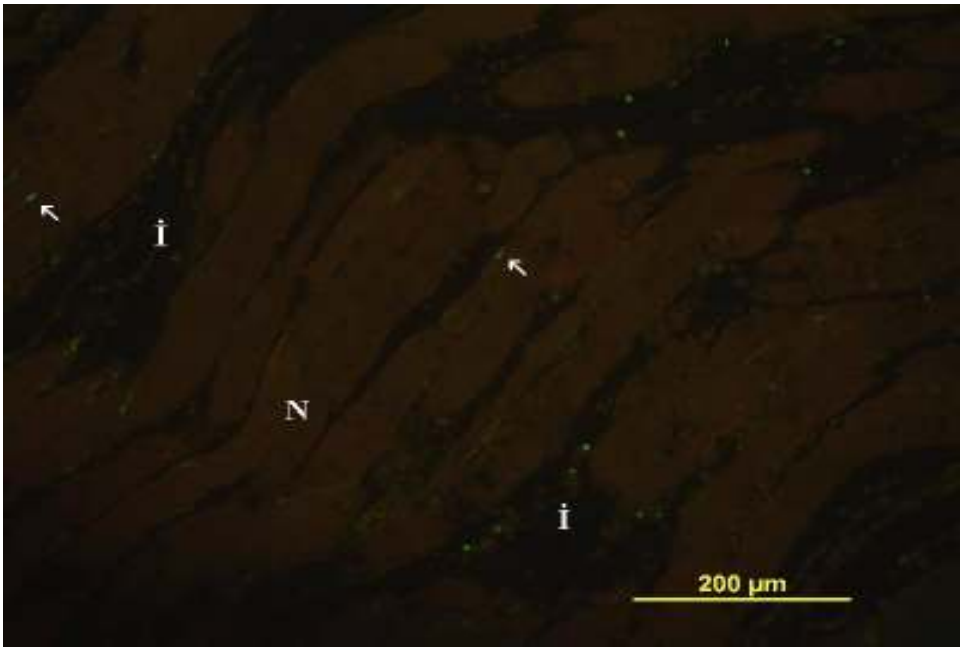
Resim 10. % 0,5 bupivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin ışık mikroskobunda görünümü. (H&E, X40, Bar 200 µm). (N: normal kas lifi, D: dejeneratif alanlar, İ: iltihabi alanlar). Hasar Skoru = 3.0 (2.0–3.0).



Resim 11. % 0,5 bupivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin ışık mikroskobunda görünümü. (H&E, X40, Bar 200 µm). (N: normal kas lifi, D: dejeneratif alanlar, İ: iltihabi alanlar). Hasar Skoru = 3.0 (2.0–3.0).

4.2.2. Immunofloresan Mikroskop Bulguları

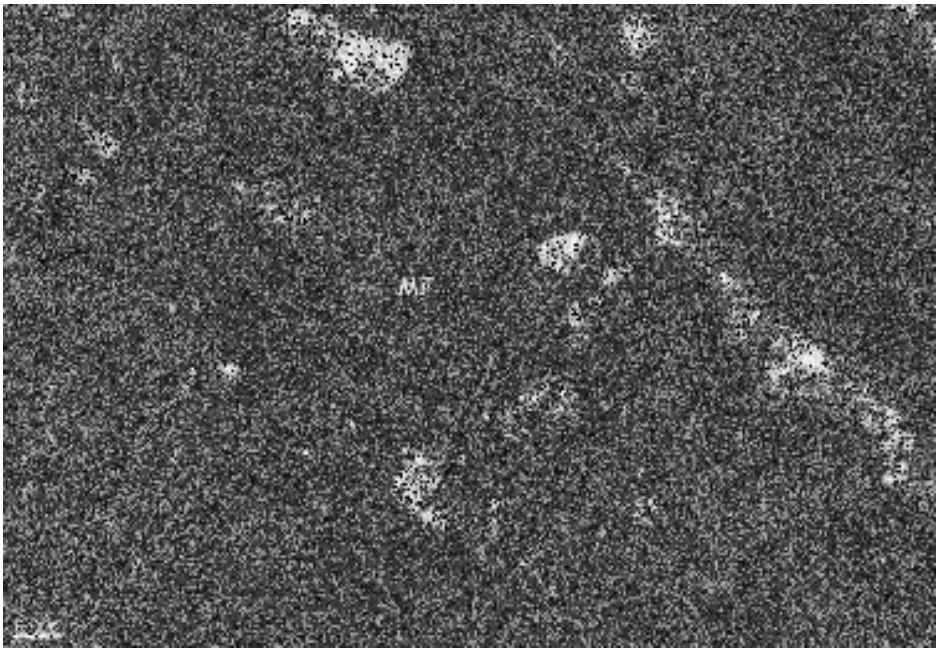
İmmunofloresan mikroskopta incelenen bupivakain grubuna ait kesitlerde birim alanda 2-3 apoptotik hücre çekirdeğine rastlandı (Resim 12).



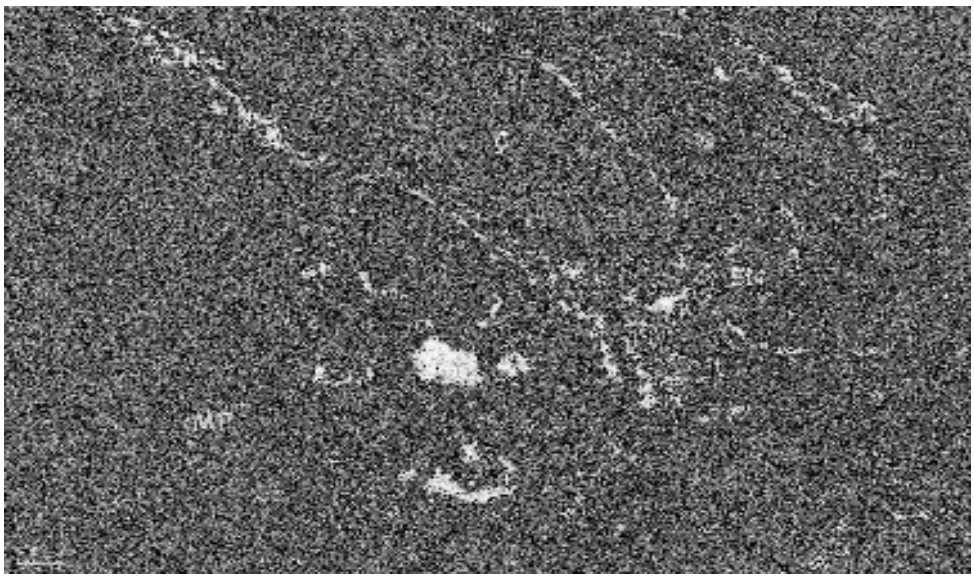
Resim 12. % 0,5 bupivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin immünflorasan mikroskopta görünümü (TUNEL, X20, Bar 200µm). (**N:** Normal kas lifi, İ: İltihabi Alanlar, Oklar: Apoptotik hücrelerin çekirdekleri)

4.2.3. Elektron Mikroskop Bulguları

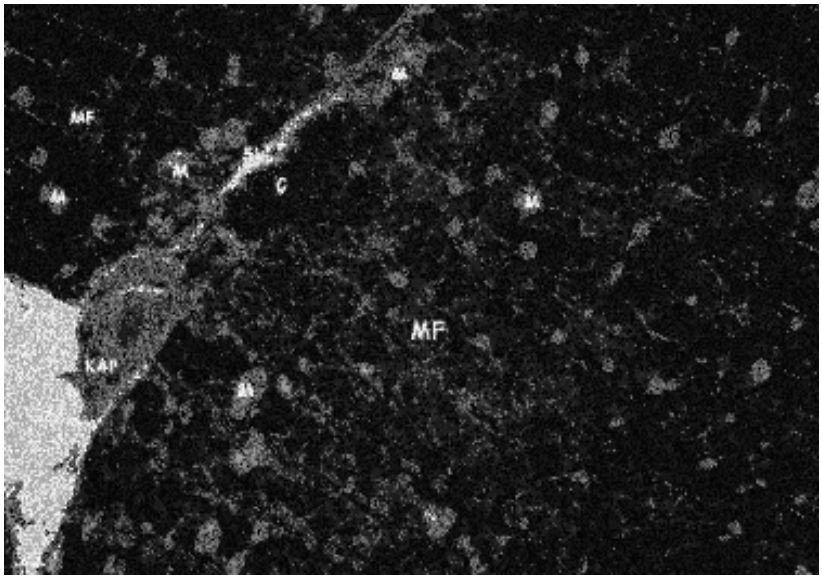
%0,5 bupivakain enjeksiyonu yapılan gruba ait iskelet kası örneklerinin elektron mikroskobik incelenmesinde, bazı kas liflerinin nispeten normal yapılarını korudukları gözlenmekle birlikte, kas liflerinin çoğunluğunda mitokondriyonlarda genişleme, mitokondriyon iç membranlarında parçalanma ve membranöz *whorl* oluşumlarına sıklıkla rastlandı (Resim 13–15).



Resim 13. % 0,5 bupivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin elektron mikroskopta görünümü. Kas lifinde mitokondriyonlarda **(M)** genişleme ve iç membranlarında parçalanma ile sarkoplazmik retikülüm sisternalarında **(SR)** genişleme görülmektedir. Miyofibril **(MF)**, Sarkolemma **(SL)** (Bar: 0,5 µm).

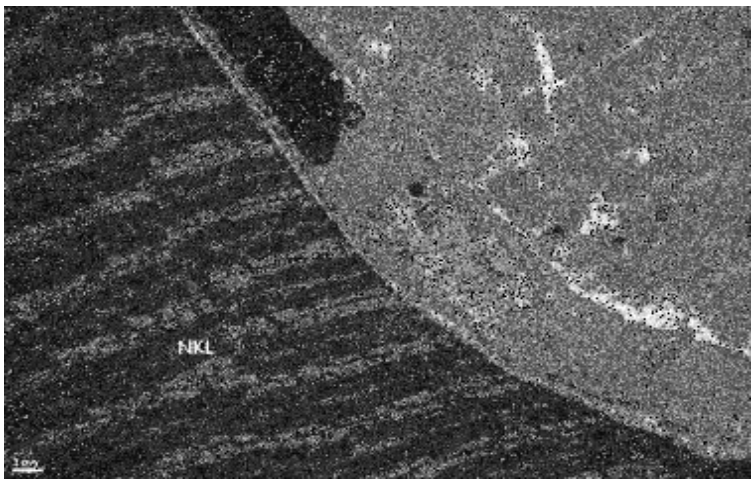


Resim 14. % 0,5 bupivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin elektron mikroskopta görünümü. Kas lifinde subsarkolemmal alanlarda mitokondriyonlarda **(M)** genişleme, iç membranlarında parçalanma ve membranöz whorl (oklar) yapılarının varlığı dikkati çekmektedir. Ayrıca intrasitoplazmik ödem alanlarını temsil eden boşluklar görülmektedir. (KAP: Kapiller damar, EN: Endotel hücresi, Ç: Çekirdek, MF: Miyofibril, SL: Sarkolemma) (Bar: 0,5 µm).

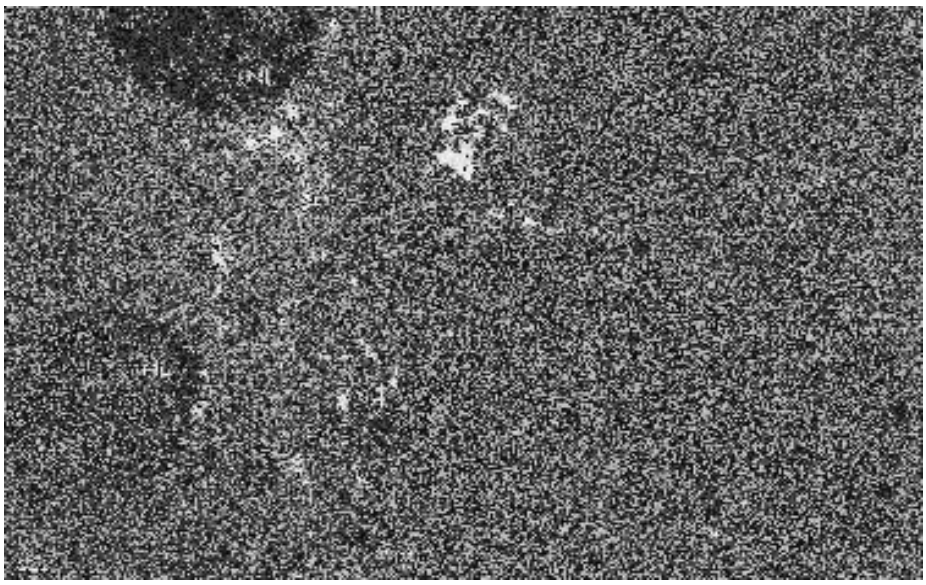


Resim 15. % 0,5 bupivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin elektron mikroskopta görünümü. Kas liflerinde çekirdekte **(Ç)** heterokromatin artışı, mitokondriyonlarda **(M)** yaygın halde genişleme ve iç membranlarında parçalanma gözlenmektedir. (MF: Miyofibril, SL: Sarkolemma, KAP: Kapiller damar) (Bar 1 μm).

Ayrıca sarkoplazmik retikülüm sisternalarınının genişlediği ve vakouler bir görünüm aldığı dikkati çekmekteydi. Subsarkolemmal alanlarda dejenere olan organel toplulukları ve hücresel ödemi temsil eden geniş boşluklar izlendi (Resim 16). İleri derecede dejenerasyona uğrayan kas liflerinde çekirdeğin piknotik hale dönüştüğü ve miyofibrillerin tipik görünümlerini kaybettikleri gözlendi (Resim 17).

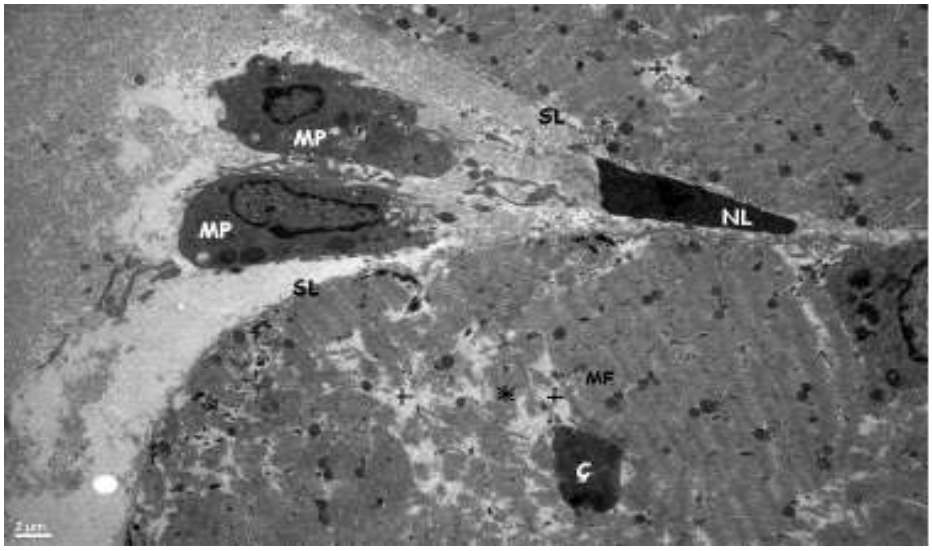


Resim 16. % 0,5 bupivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin elektron mikroskopta görünümü. Sol kısımda yer alan kas lifinde normal yapının korunmasına rağmen **(NKL)**, sağ tarafta bulunan kas lifinde miyofibriller **(MF)** organizasyonun bozulduğu (*), hücre organellerinin dejenerasyona uğradığı gözlenmektedir. Kas lifleri arasında kapiller damar **(KAP)** yapısı izlenmektedir (Bar: 2 μm).

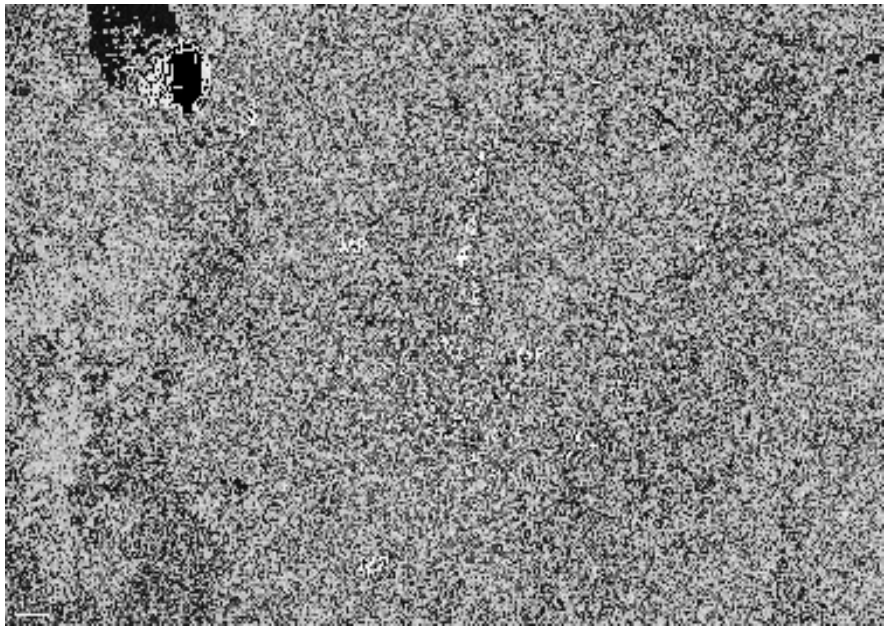


Resim 17. % 0,5 bupivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin elektron mikroskopta görünümü. Dejenerasyonun belirgin olduğu kas lifinde miyofibriler **(MF)** organizasyonun bozulduğu, hücre organellerinin dejenerasyona uğradığı, mitokondriyonların elektron dens hale dönüştükleri (oklar) gözlenmektedir. Sarkoplazma içerisinde intrasitoplazmik ödem alanlarını temsil eden boşluklar (*) görülmektedir. (**SL**: Sarkolemma, **NL**: Nötrofil lökosit) (Bar 2 μm).

Miyofibrillerde A-I bandlarının kaybolduğu, miyofilamanların homojen olarak sitoplazmada bir arada bulundukları, bazı liflerde miyofilamanların ileri derecede dejenere olmaları nedeniyle dağılım ve düzenlenmelerinin bozulduğu izlenmekteydi. Bu tip liflere komşu alanlarda çok sayıda makrofajın varlığı da ilgi çekiciydi. Makrofajların yanı sıra nötrofil lökositlere de sıklıkla rastlandı. Makrofajların dejenere kas lifleriyle olan yakın ilişkisi belirgindi. Makrofajların çoğunluğunda sitoplazmada pek çok fagozomun varlığı ayırt edilmekteydi (Resim 17-19).



Resim 18. % 0,5 bupivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin elektron mikroskopta görünümü. İleri derecede dejenere kas liflerinde çekirdeğin **(Ç)** piknotik hale geldiği, miyofibriler **(MF)** organizasyonun bozulduğu (*), hücre organellerinin dejenerasyona uğradığı, mitokondriyonların elektron dens hale dönüştükleri (oklar) gözlenmektedir. Ayrıca sarkoplazma içerisinde intrasitoplazmik ödem alanlarını temsil eden boşluklar **(+)** görülmektedir. Makrofajların **(MP)** dejenerasyona giden kas lifleriyle yakın ilişkileri ayırt edilmektedir. (**SL**: Sarkolemma, **NL**: Nötrofil lökosit) (Bar 2 µm).

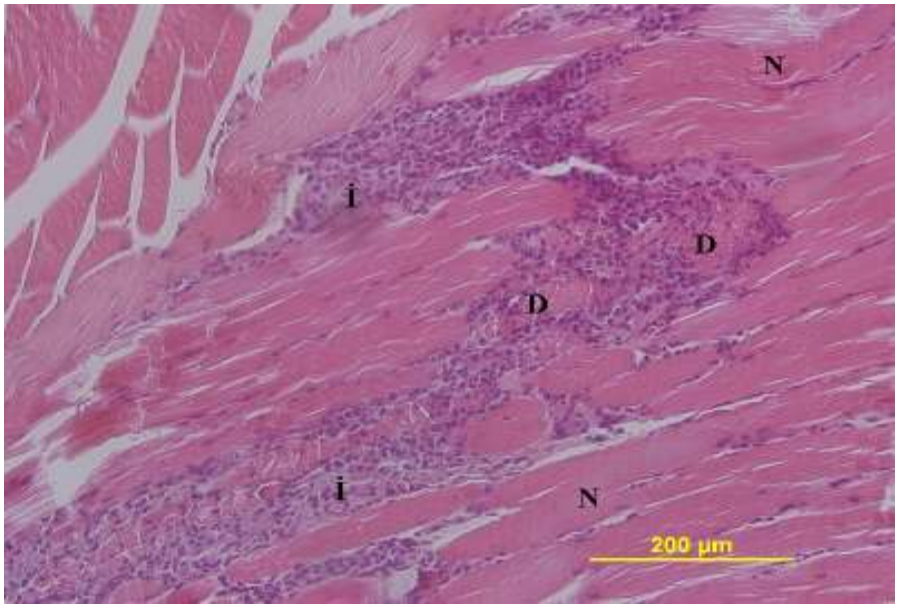


Resim 19. % 0,5 bupivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin elektron mikroskopta görünümü. Dejenere kas lifinde miyofibriler **(MF)** organizasyonun bozulduğu (*), hücre organellerinin dejenerasyona uğradığı görülmektedir (oklar). Sarkoplazma içerisinde intrasitoplazmik ödem alanlarını temsil eden boşluklar (+) görülmektedir. Makrofajların **(MP)** kas lifleriyle yakın ilişkileri gözlenmektedir. (**SL**: Sarkolemma) (Bar 2 µm).

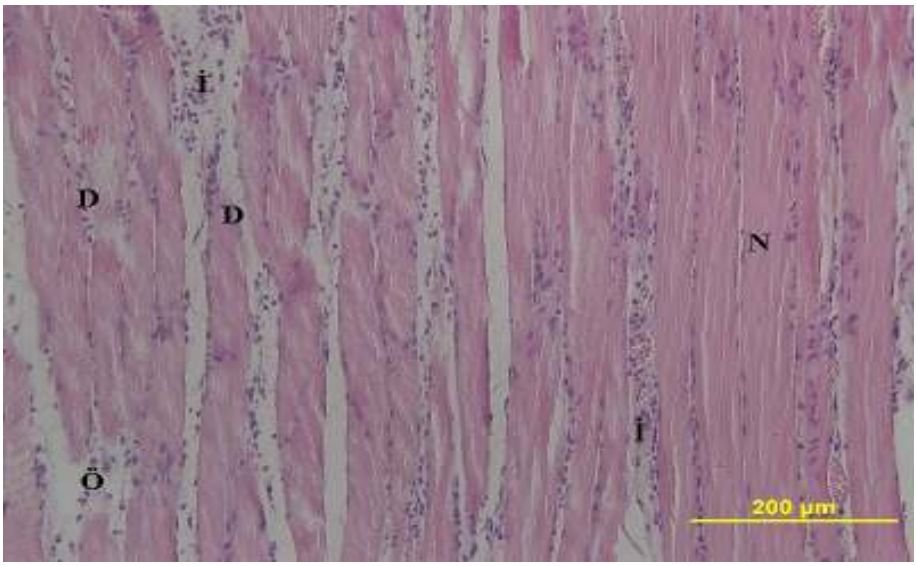
4.3. ROPİVAKAİN GRUBUNA AİT BULGULAR

4.3.1. Işık Mikroskobu Bulguları

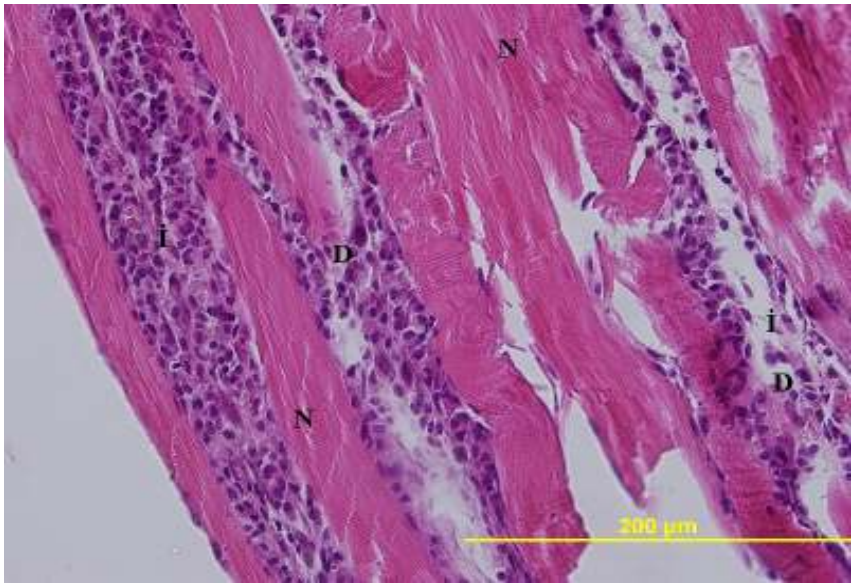
Ropivakain enjeksiyondan 2 gün sonra alınan doku örneklerinde, yer yer sağlam görünen kas lifleri arasında, miyosit yapısının tamamen kaybolduğu dejenerasyon bölgeleri ve lökosit infiltrasyonu gözlendi (Resim 20- 23). [Hasar Skoru = 2.0 (2.0-3.0)]



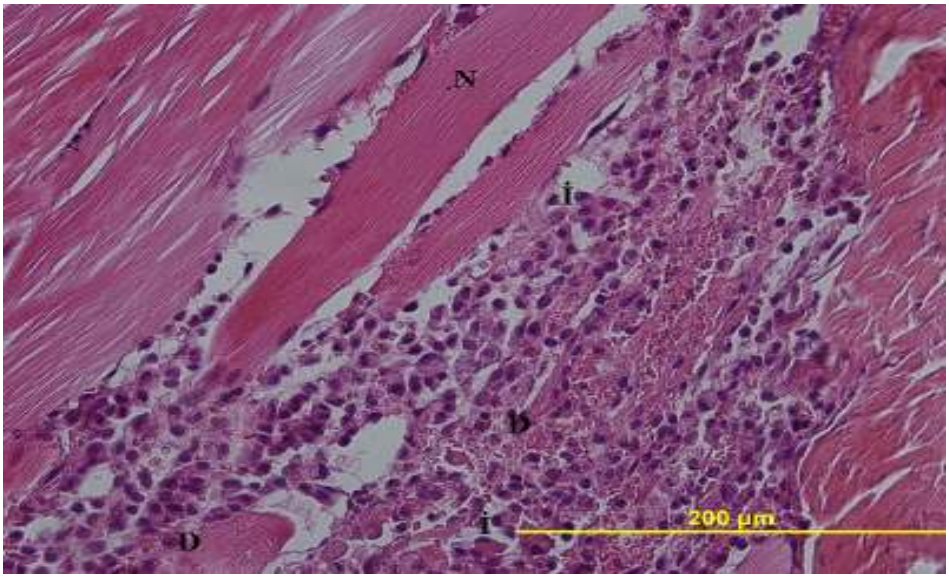
Resim 20. % 0,5 ropivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin ışık mikroskobunda görünümü. (H&E, X20, Bar 200 µm). (**N**: normal kas lifi, **D**: dejeneratif alanlar, **İ**: iltihabi alanlar). Hasar Skoru = 2.0 (2.0–3.0).



Resim 21. % 0,5 ropivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin ışık mikroskobunda görünümü. (H&E, X20, Bar 200 µm). (**N**: normal kas lifi, **D**: dejeneratif alanlar, **İ**: iltihabi alanlar, **Ö**: Ödem). Hasar Skoru = 2.0 (2.0–3.0).



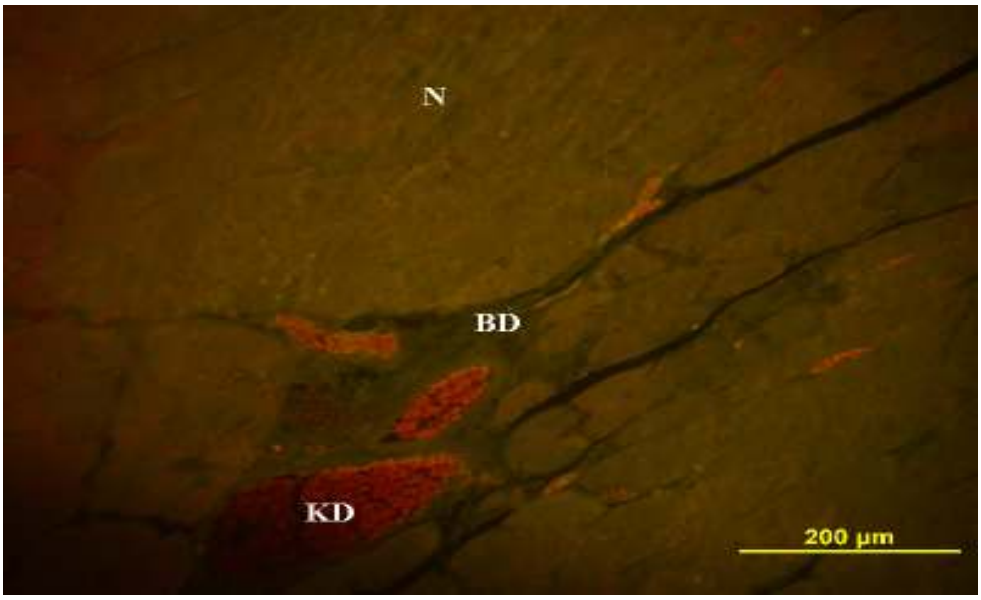
Resim 22. % 0,5 ropivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin ışık mikroskobunda görünümü. (H&E, X40, Bar 200 µm). (**N**: normal kas lifi, **D**: dejeneratif alanlar, **İ**: iltihabi alanlar) Hasar Skoru = 2.0 (2.0–3.0).



Resim 23. % 0,5 ropivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin ışık mikroskobunda görünümü. (H&E, X40, Bar 200 µm). (**N**: normal kas lifi, **D**: dejeneratif alanlar, **İ**: iltihabi alanlar) Hasar Skoru = 2.0 (2.0–3.0).

4.3.2. Immunofloresan Mikroskop Bulguları

İmmunofloresan mikroskopta incelenen ropivakain grubuna ait kesitlerde parlak apoptotik hücre kalıntılarına rastlanmadı (Resim 24).

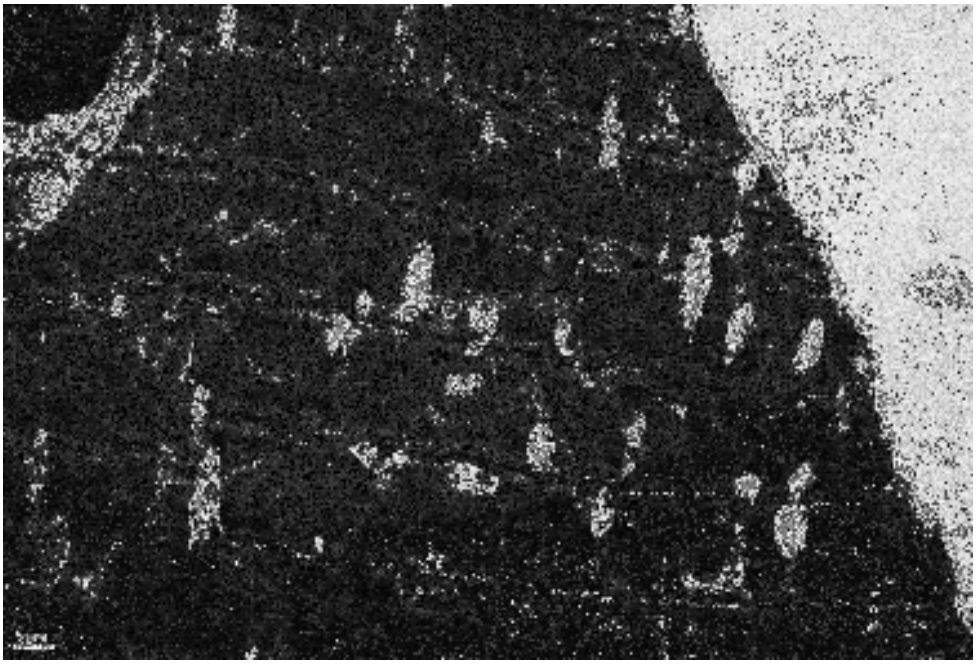


Resim 24. % 0,5 ropivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin immünfloresan mikroskopta görünümü (TUNEL, X40, Bar 200µm) (**N**: Normal kas lifi, **BD**: Bağ Dokusu, **KD**: Kan damarı).

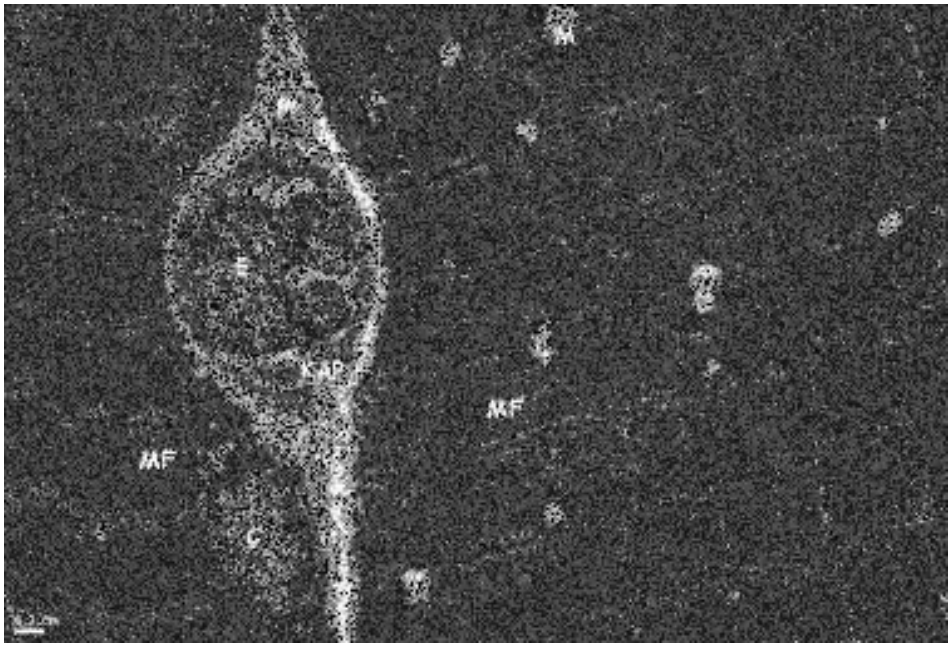
4.3.4. Elektron Mikroskop Bulguları

%0,5 ropivakain enjeksiyonu yapılan gruba ait iskelet kası örneklerinin elektron mikroskobik incelenmesinde, kas liflerinin çoğunluğunda hücre çekirdeklerinin ve miyofibrillerin genellikle normal yapılarını korudukları belirlendi (Resim 26- 29).

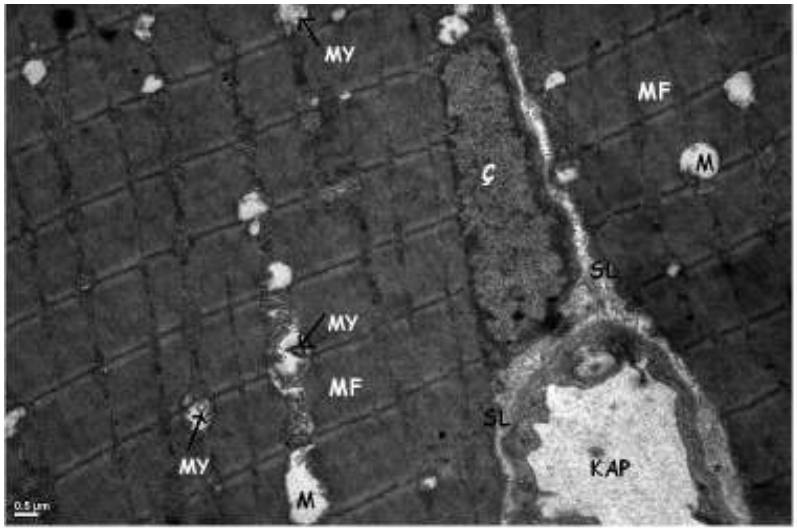
Bununla birlikte, mitokondriyonlarda genişleme, iç membranlarında kısmi veya tamamen parçalanma, bazı alanlarda membranöz *whorl* oluşumu ile SR sisternalarında hafif genişlemeler kas liflerinde gözlenen ortak bulgulardı. Ayrıca, bazı kas liflerinde subsarkolemmal alanlarda, mitokondriyonlarda gözlenen yapısal değişikliklerin daha da belirgin oldukları görüldü (Resim 25-29).



Resim 25. % 0,5 ropivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin elektron mikroskopta görünümü. Kas lifinde mitokondriyonlarda **(M)** genişleme ve iç membranlarında parçalanma izlenmektedir. (**MF**: Miyofibril, **SL**: Sarkolemma, **KAP**: Kapiller damar), (Bar 1 μm).

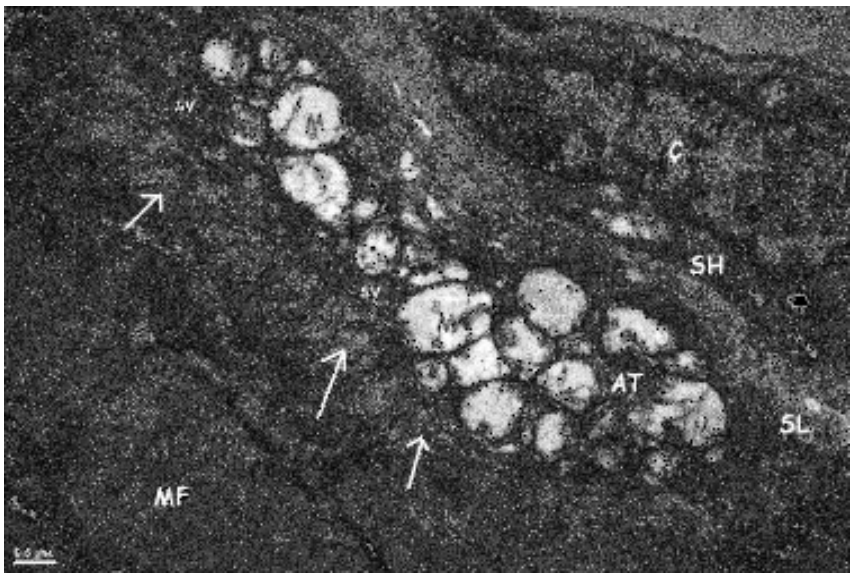


Resim 26. % 0,5 ropivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin elektron mikroskopta görünümü. Kas lifinde mitokondriyonların **(M)** bazılarında genişleme ve iç membranlarında parçalanma dikkati çekmektedir. Çekirdek **(Ç)** ve miyofibril **(MF)** yapısının normal olduğu ayırt edilmektedir. Miyofibril **(MF)**, Sarkolemma (SL), Kapiller damar **(KAP)**, Eritrosit **(E)** (Bar:0,5 μm).

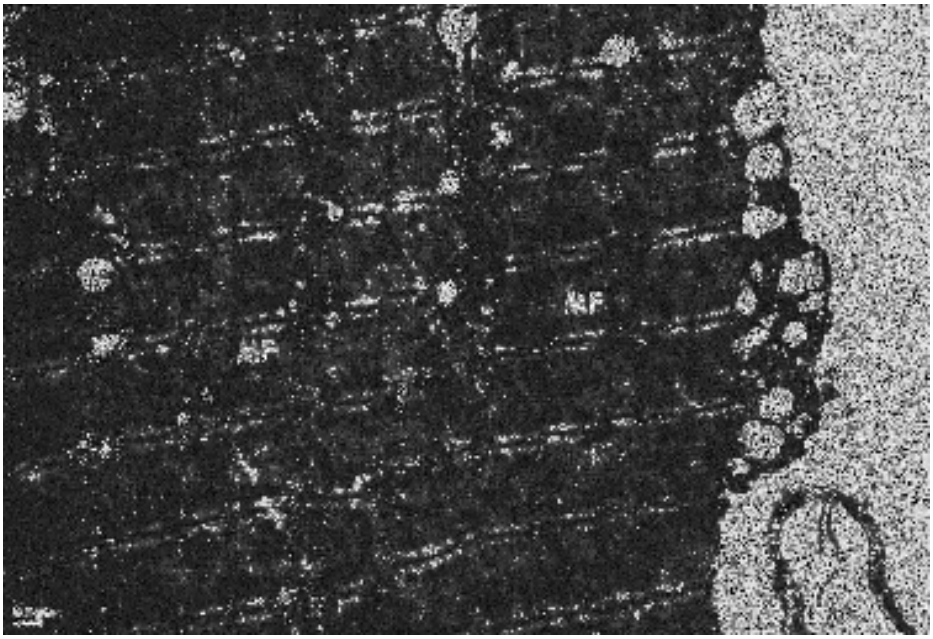


Resim 27. % 0,5 ropivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin elektron mikroskopta görünümü. Kas lifinde subsarkolemmal ve intermiyofibriler alanlarda mitokondriyonlarda **(M)** genişleme ve iç membranlarında parçalanma ve membranöz whorl **(MY)** yapılarının varlığı dikkati çekmektedir. Bununla birlikte, çekirdek **(Ç)** ve miyofibril **(MF)** yapısının normal olduğu görülmektedir. Sarkolemma **(SL)**, Kapiller damar **(KAP)** (Bar:0,5 μm).

Bunların dışında, kas sinir kavşağında akson terminali içerisinde yer alan mitokondriyonların ileri derecede genişlediği ve iç membranlarının parçalanarak vakuoler bir görünüm aldıkları gözlendi (Resim 28)



Resim 28. % 0,5 ropivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin elektron mikroskopta görünümü. Kas lifinde normal yapının korunduğu izlenmektedir. Bununla birlikte kas sinir kavşağını oluşturan akson terminalinde **(AT)** mitokondriyonlarda **(M)** aşırı genişleme ve iç membranlarında parçalanma dikkati çekmektedir. Miyofibril **(MF)**, Sarkolemma **(SL),** Schwann hücresi **(SH)**, Çekirdek **(Ç)**, sinaptik vezikül **(SV)**, subnöral katlantılar (Oklar) (Bar:0,5 μm).

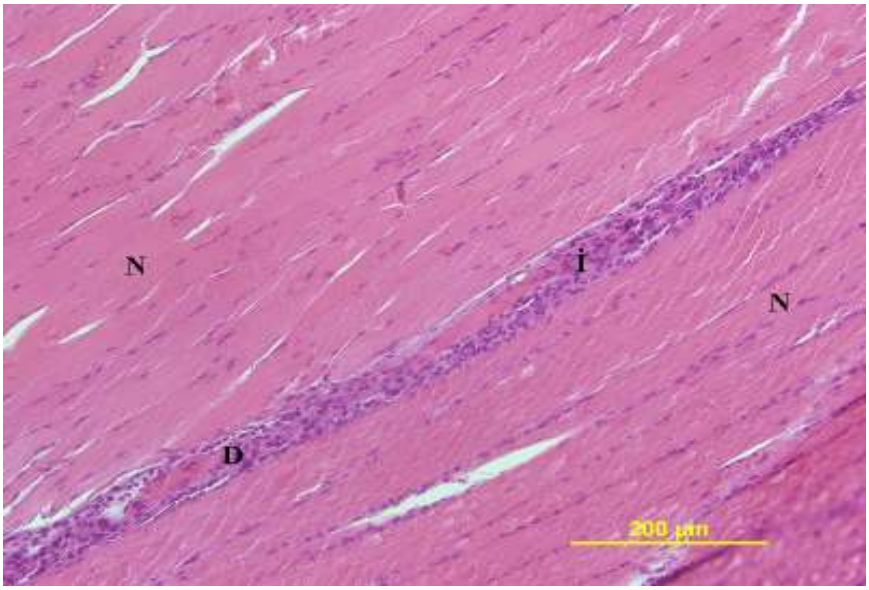


Resim 29. % 0,5 ropivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin elektron mikroskopta görünümü. Kas lifinde subsarkolemmal ve intermiyofibriler alanlarda yer alan mitokondriyonlarda **(M)** genişleme ve iç membranlarında parçalanmalar dikkati çekmektedir. Ancak miyofibril **(MF)** yapısının normal olduğu görülmektedir. Sarkolemma **(SL)**, Kapiller damar **(KAP)** (Bar:0,5 μm).

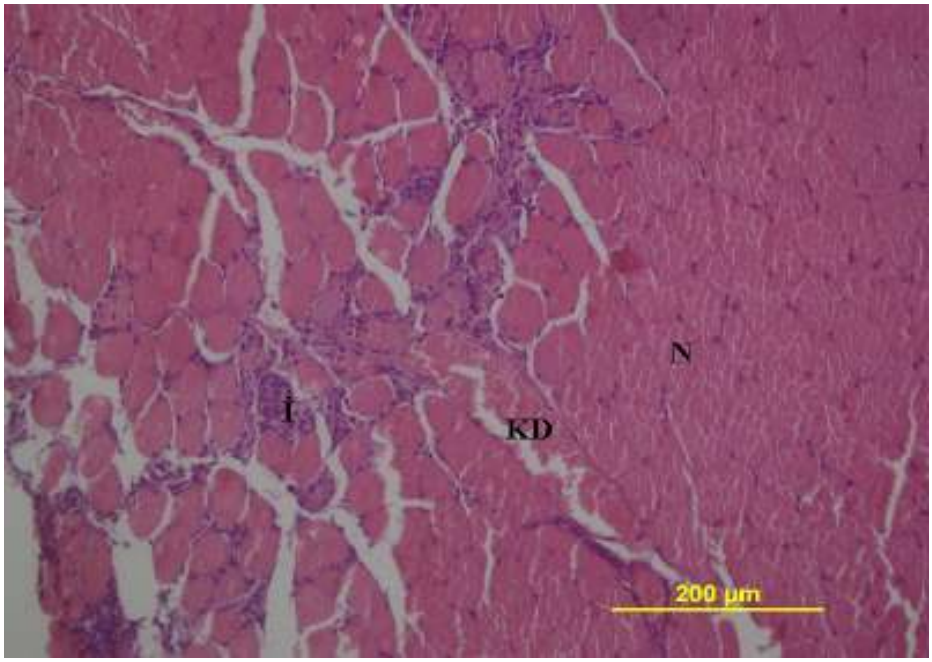
4.4. LEVOBUPİVAKİAN GRUBUNA AİT BUGULAR

4.4.1. Işık Mikroskobu Bulguları

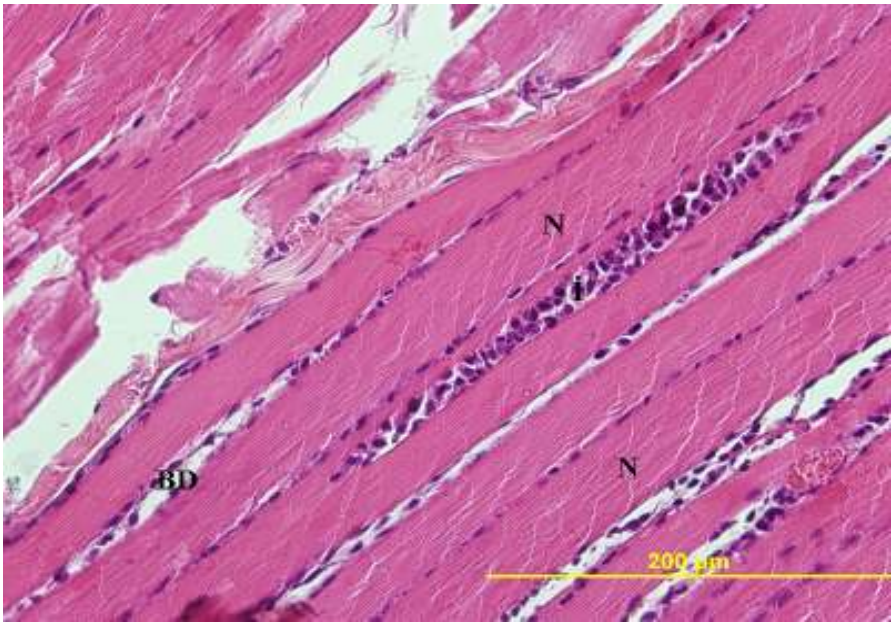
Levobupivakain enjeksiyondan 2 gün sonra alınan doku örneklerinde, nekroza uğramış kas hücreleri arasında yer yer sağlam görünen kas lifleri, yaygın iltihabi hücreler ve ödem alanları gözlendi. İltihabi hücrelerin yoğun olduğu bölgelerde dejenerasyona uğramış kas lifleri izlenmekteydi (Resim 30–33) [Hasar Skoru = 1.0 (1.0–1.0)].



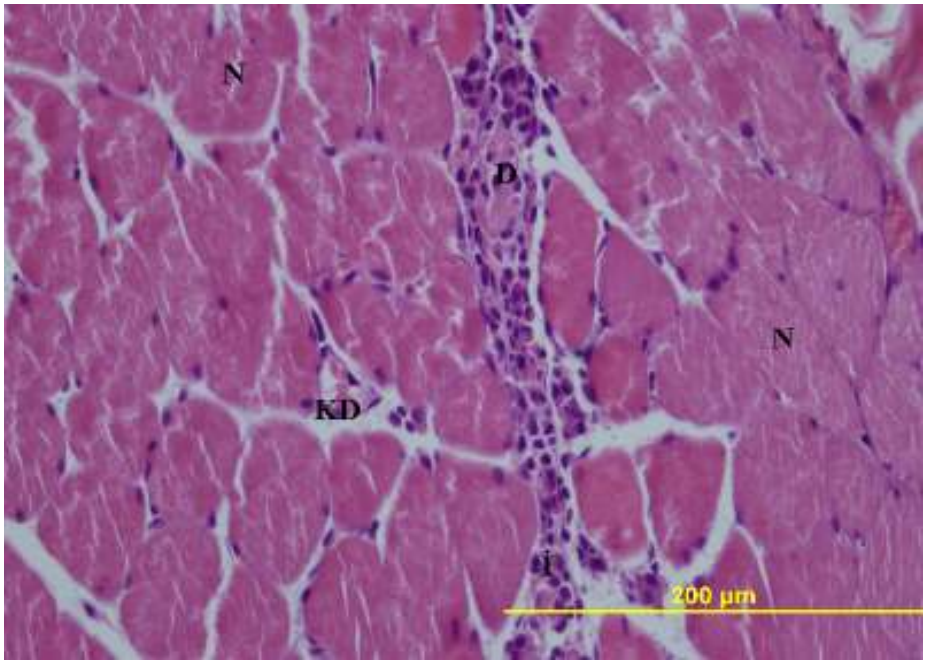
Resim 30. % 0,5 levobupivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin ışık mikroskobunda görünümü. (H&E. X20 Bar 200 µm) (**N**: normal kas lifi, **D**: dejeneratif alanlar, **İ**: iltihabi alanlar) Hasar Skoru = 1.0 (1.0–1.0).



Resim 31. % 0,5 levobupivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin ışık mikroskobunda görünümü. (H&E. X20 Bar 200 µm) (**N**: normal kas lifi, **KD**: Kan Damarı, **İ**: iltihabi alanlar) Hasar Skoru = 1.0 (1.0–1.0).



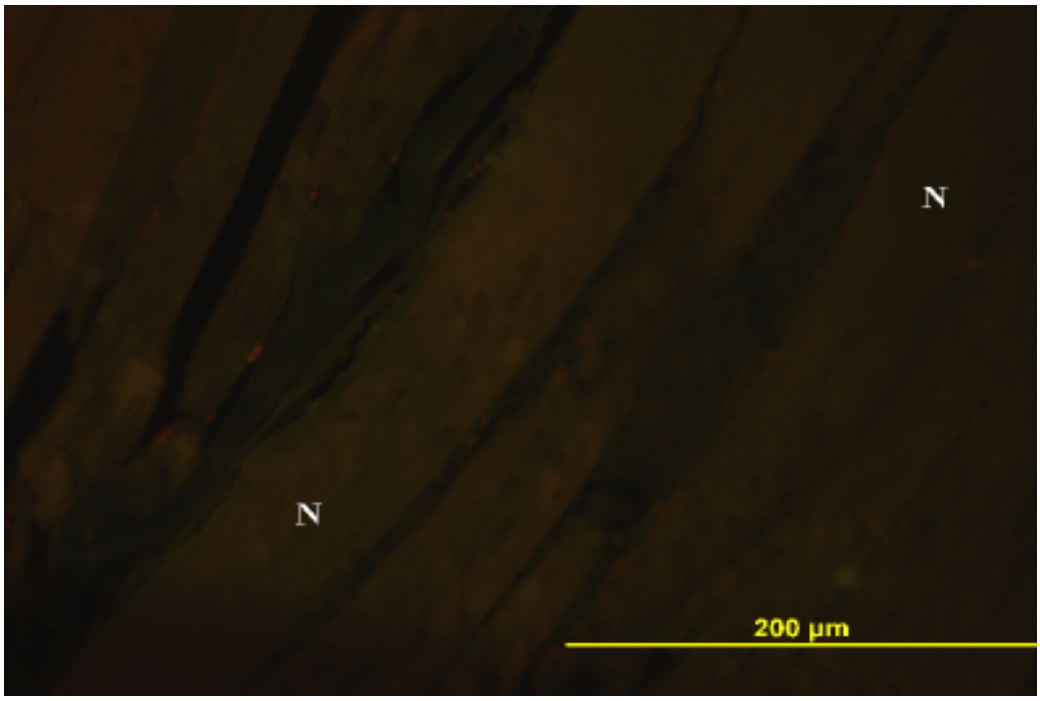
Resim 32. % 0,5 levobupivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin ışık mikroskobunda görünümü. ((H&E, X40, Bar 200 µm)) (N: normal kas lifi, BD: Bağ Dokusu, İ: iltihabi alanlar) Hasar Skoru = 1.0 (1.0–1.0).



Resim 33. % 0,5 levobupivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin ışık mikroskobunda görünümü (H&E, X40, Bar 200 µm) (N: normal kas lifi, KD: Kan Damarı, D: dejeneratif alanlar, İ: iltihabi alanlar) Hasar Skoru = 1.0 (1.0–1.0).

4.4.2.Immunofloresan Mikroskop Bulguları

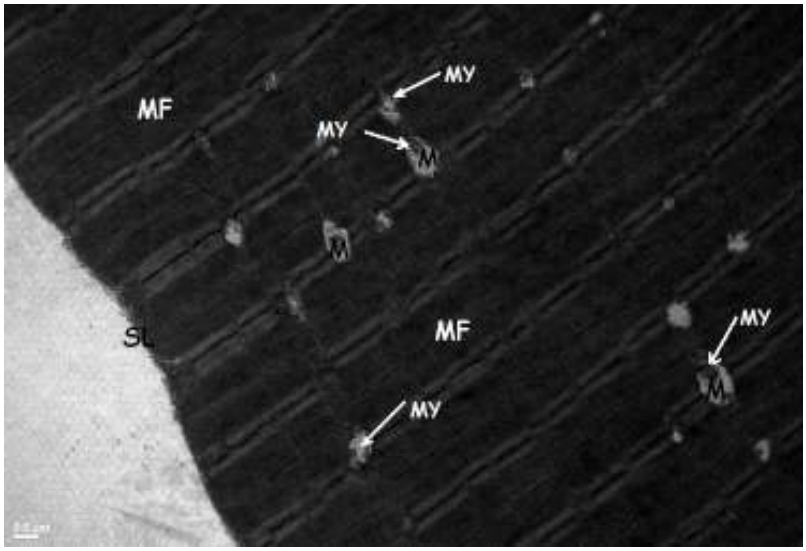
İmmunofloresan mikroskopta incelenen levobupivakain grubuna ait kesitlerde apoptozisi yansıtan herhangi bir apoptotik hücre çekirdeğine rastlanmadı (Resim 34).



Resim 34. % 0,5 levobupivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin immünfloresan mikroskopta görünümü (TUNEL, X40, Bar 200µm). (N: Normal kas lifi)

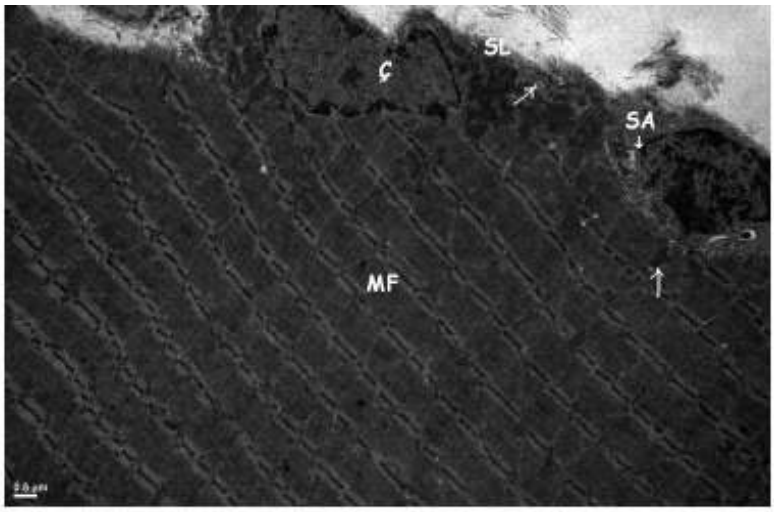
4.4.3. Elektron Mikroskop Bulguları

%0,5 levobupivakain enjeksiyonu yapılan gruba ait iskelet kası örneklerinin elektron mikroskobik incelenmesinde, kas liflerinin çoğunluğunda normal yapının korunduğu gözlenmekteydi. Bununla birlikte kas liflerinin bazılarında mitokondriyonlarda genişleme, iç membranlarında kısmi veya tamamen parçalanma, bazı alanlarda membranöz *whorl* oluşumlarına rastlandı (Resim 35).

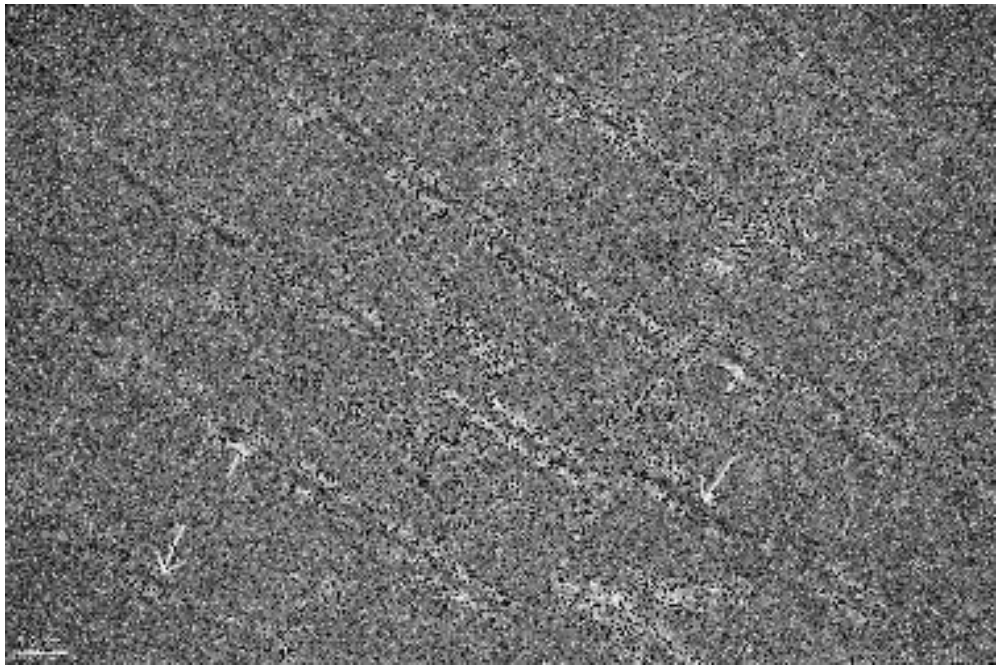


Resim 35. % 0,5 levobupivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin elektron mikroskopta görünümü. Kas lifinde intermiyofibriler alanlarda yer alan bazı mitokondriyonlarda **(M)** genişleme ve iç membranlarında parçalanma ve ayrıca membranöz whorl **(MY)** yapılarının varlığı dikkati çekmektedir. Bununla birlikte miyofibril **(MF)** yapının normal olduğu görülmektedir. Sarkolemma **(SL).** (Bar 0,5 µm).

Kas liflerinin çoğunluğunda, sarkolemma, çekirdek ve miyofibrillerde subsellüler yapının SF grubuna benzerlik gösterdiği dikkati çekmekteydi. Kas lifleri arasında yer alan endomisyuma ait bağ dokusu ve kapiller damar yapıları normal olarak değerlendirildi (Resim 36–37).



Resim 36. % 0,5 levobupivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin elektron mikroskopta görünümü. Kas lifinde her nekadar subsarkolemmal alanlarda bazı mitokondriyonlarda (M) hafif genişlemeler izlenmekteyse de çekirdek (Ç) ve miyofibriler (MF) yapının normal olduğu gözlenmektedir. Satellit hücre (SA), Sarkolemma (SL). (Bar 0,5 µm).



Resim 37. % 0,5 levobupivakain enjeksiyonundan 2 gün sonra alınan iskelet kası örneğinin elektron mikroskopta görünümü. Kas lifinde hücre organelleri ve miyofibriler **(MF)** yapının normal olduğu görülmektedir. Z bandları (Oklar). (Bar 0,5 μm).

Grup B, Grup R ve GrupL'de, 2. günde alınan bütün kas dokusu örneklerinde, damar ve sinir yapılarının histopatolojik olarak etkilenmediği gözlendi.

Grupların 2. günde gözlenen kas hasar skorları [Med (min-max)] Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. Grupların 2. günde kas hasar skorları [Med (min-max)]

Gruplar	Kas Hasar Skoru
SF	0.0 (0.0-0.0)
B	3.0 (2.0-3.0)
R	2.0 (2.0-3.0)
L	1.0 (1.0-1.0)

Grupların "*Kruskal – Wallis Test*" sonuçları Tablo 5'de, ortancaları farklı bulunan grupların *Mann-Whitney-u* testi sonuçları Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 5. Grupların "*Kruskal – Wallis Test*" sonuçları*

	Kruskal-Wallis Test		
Günler	**n**	**H**	**p**
2. gün	40	30	0.000**

***** Işık mikroskobu görüntülerinden elde edilen skorlara göre.

****** $p<0.05$ anlamlılık derecesine göre.

Tablo 6. Grupların "*Mann Whitney - u Test*" Sonuçları

Karşılaştırılan Gruplar	**u**	**p**
SF – B	0.00	0.000027*
SF – R	0.00	0.000038*
SF – L	0.00	0.000013*
B – R	25	0.028*
B – L	0.00	0.000027*
R – L	0.00	0.000034*

***** $p<0.05$ anlamlılık derecesine göre.

5. TARTIŞMA

Lokal anestezikler, santral ve periferik sinir bloklarından infiltrasyon anestezisine, ağrı tedavisinden, rehabilitasyon işlemlerinin kolaylaştırılması amacıyla uygulanan sinir bloklarına kadar bir çok amaçla klinik pratikte yaygın olarak kullanılan ajanlardır (1,2,33,59,87). Lokal anestezik ajanların istemli ya da istemsiz olarak im enjeksiyonu, bu işlemler esnasında oldukça sık karşılaşılan bir durumdur (1-5,29-32,88). Lokal anesteziklere bağlı iskelet kas dokusundaki histopatolojik değişikler ilk kez 1959 yılında Brun tarafından tanımlanmıştır (1). Bu tarihten günümüze kadar lokal anestezik ajanların miyotoksik etkileri, birçok deneysel ve klinik çalışma yapılarak araştırılmış (89,90) ve bütün lokal anesteziklerin klinikte kullanılan konsantrasyonlarda ilaca ve doza bağlı olarak, değişik derecelerde miyotoksik etkiye sahip oldukları bulunmuştur (1,5,91). Son yıllarda lokal anestezik enjeksiyonunu takiben gelişen miyonekroz ve buna bağlı ciddi kas fonksiyon bozuklukları giderek artan sayıda rapor edilmektedir (1–4,33,88).

Bupivakain, bilinen en yüksek kardiyotoksik, nörotoksik ve miyotoksik etki potansiyeline sahip ajan olmakla birlikte, etki potensinin yüksek olması ve etki süresinin uzun olması nedeniyle klinikte yaygın olarak kullanılan lokal anestezik ajandır (5,7,9,24,59). Ropivakain, yine klinik uygulamalarda yaygın olarak kullanılan ve bupivakainden daha az miyotoksik olduğu önceki araştırmalarda (1,9,12,33) bildirilmiş olan lokal anestezik ajandır. 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 (7,8,10). Levobupivakainin miyotoksik etkilerini araştıran halihazırdaki tek çalışma, Efesoy ve Yıldız (12) tarafından kliniğimizde yapılmış olan henüz

yayınlanmamış tez çalışmasıdır. Söz konusu araştırmada (12) miyotoksik etkileri yönünden bupivakain, ropivakain ve levobupivakain sadece ışık mikroskobu görüntüleri yönünden karşılaştırılmış ve levobupivakainin diğer iki ajandan daha az miyotoksik olduğu gösterilmiştir. Zink ve ark. (9,33) lokal anesteziklerin miyotoksik etkilerini araştırdıkları iki farklı çalışmalarında, kas dokusu örneklerinin karşılaştırılmasını ışık mikroskobunda elde ettikleri görüntüleri skorlayarak yapmışlardır. Amaniti ve ark. (6) da yine benzer şekilde miyotoksik etkileri yönünden lokal anestezikleri karşılaştırmak amacıyla ışık mikroskobu görüntülerini kullanmışlardır. Sözü edilen bu üç çalışmada (6,9,33), bupivakain ve ropivakainin miyotoksik etkileri incelenmiş ve kas hasarının yoğun olarak gözlendiği seçilmiş kesitler ayrıca elektron mikroskop kullanılarak subsellüler düzeyde değerlendirilmiştir. Levobupivakainin miyotoksik etkilerini subsellüler düzeyde araştıran bir çalışma ise henüz yayınlanmamıştır. Çalışmamızda Levobupivakain, bupivakain ve ropivakainin miyotoksik etkilerini, ışık mikroskobu görüntülerinin yanı sıra transmisyon elektron mikroskop (TEM) görüntülerini de esas alarak karşılaştırmayı amaçladık.

Lokal anestezik sitotoksisitesinin mekanizması henüz açıklık kazanmamıştır (92). Hücre ölümünün programlanmış, fizyolojik bir şekli olarak tanımlanan apoptozis, lokal anestezik sitotoksisitesinde rol oynayan önemli bir proses olarak kabul edilmektedir (89,92). Bupivakain ve ropivakainin iskelet kası üzerine apoptotik etkilerini araştıran çalışmalar (6,33,64) bulunmakla birlikte, levobupivakainin apoptotik aktivitesini araştıran bir çalışmaya henüz rastlanmamıştır. Çalışmamızda bupivakain, ropivakain ve levobupivakainin çizgili kasta neden oldukları ultrastrüktürel değişikliklerin yanı sıra apoptotik değişiklikleri de araştırmayı amaçladık.

Doku veya hücrelerde apoptotik aktivitenin varlığı, elektron mikroskopta çekirdek morfolojisi ve membran değişikliklerinin gösterilmesi, Agaroz jel elektroforezi, ELISA, TUNEL gibi birçok yöntemle gösterilebilmektedir (93). Doku kesitlerinde apoptozisin değerlendirilmesinde standart yöntem olarak kabul edilen TUNEL yönteminde preapoptotik hücrelerin de boyanması yöntemin duyarlılığını arttırmaktadır (82). Lokal anesteziklerin miyotoksik etkilerinin araştırıldığı birçok çalışmada (5,6,9,33), apoptotik aktivitenin belirlenmesinde TUNEL yöntemi tercih edilmektedir. Çalışmamızda apoptotik aktivitenin araştırılmasında çalışma materyalimiz olan doku kesitlerinde oldukça duyarlı bir yöntem olan TUNEL yöntemini kullanmayı uygun bulduk.

Rasmusse ve ark.(94) insan iskelet kasındaki biyoenerji (özelikle ATP) sentezi ve reaktif oksijen ürünleri ile detoksifikasyon mekanizmalarının kemirgenlerle benzer olabileceğini bildirmişlerdir. Klinik pratikte, cerrahi alana intraoperatif infiltrasyon, periferik sinir blokları ve ayaktan hastalarda ağrı tedavisi gibi işlemlerde, lokal anestezik ajanların tek doz enjeksiyonu sık kullanılan yöntemdir (1,2,87). Bu nedenlerle, çalışmamızda ratlarda tek doz im enjeksiyon tekniğini kullanmayı uygun bulduk.

Önceki araştırmalarda (1,5,6), kas dokusunda, miyotoksik ajana maruz kaldıktan 24–48 saat sonra rejenerasyonun başladığı ve rejenerasyonun başladığını gösteren fagositik hücre saldırısına kadar dokunun destrüksiyon durumunda kaldığı bildirilmektedir. Amaniti ve ark. (6), iki farklı konsantrasyon kullanarak, ratlarda ropivakainin miyotoksik etkilerini inceledikleri araştırmalarında, enjeksiyondan sonraki ikinci günde, fiberlerde dejenerasyon, nekroz, nekrotik alanlarda fagositik hücre infiltrasyonu ve fagositler arasında etkilenmemiş fiberler şeklinde nekrobiyotik değişikliklerin tam bir spektrumunu gözlediklerini bildirmektedirler. Efesoy ve Yıldız (12), bupivakain, ropivakain ve levobupivakainin miyotoksik etkilerini karşılaştırdıkları çalışmalarında kas dokusu örneklerini 2., 10. ve 20. günlerde almışlar ve her üç ajan için de en yüksek derecedeki miyotoksik hasarı 2. günde gözlemişlerdir. Horiguchi ve ark. (36), bupivakainin miyotoksik etkilerini ve rejenerasyon sürecini araştırdıkları çalışmalarında, bupivakain enjeksiyonundan 48 saat sonra miyonekrozun maksimum seviyede gözlendiğini bildirmektedirler. Çalışmamızda kas dokusu örneklerini, önceki çalışmaların (6,12,36) sonuçlarını esas alarak ve hayvan çalışmaları etik kurallarını gözeterek, sadece maksimum hasarın gözlendiği ikinci günde almayı yeterli bulduk.

Lokal anesteziklerin uygulanmasından sonra iskelet kas dokusunda görülen değişiklikler uniform ve nonspesifiktir (1,9,12). Lokal anestezik ajanlara bağlı olarak ortaya çıkan bu hasar altta yatan mekanizma açık olmamakla beraber, travmatik injüri ve basınç hasarını da içeren birçok injüri çeşidinde ortaya çıkabilir (1,5,9). Çalışmamızda tüm lokal anestezikler ve %0.9 SF, önceki çalışmalarda (5,6,12) yeterince araştırılmış ve travmatik hasara neden olmadığı belirlenmiş olan 27 G keskin uçlu iğne aracılığı ile yine basınç hasarına neden olmadığı belirlenen 100µL volüm içerisinde verildi.

Amaniti ve ark. (6) ropivakainin iki farklı konsantrasyonunun neden olduğu miyotoksik etkileri karşılaştırdıkları çalışmalarında rat çizgili kas dokusu örneklerini 2., 7. ve 10. günlerde almışlardır. İkinci günde alınan kas dokusu örneklerinin ışık mikroskobunda incelenmesinde fiberlerde dejenerasyon, hasarlı alanlarda fagositik hücre infiltrasyonu

ve nekrotik fiberler arasında kısmen intakt görünen fiberler gözlemişlerdir. Zink ve ark. (9) domuzlarda yaptıkları çalışmalarında bir femoral kateter yardımıyla infüzyon şeklinde bupivakain ve ropivakain uygulamışlar ve uygulamadan sonra aldıkları çizgili kas dokusu örneklerinde fiber vakuolizasyonu, intrasellüler yapıların total disintegrasyonu ve miyonekroz şeklinde tarif edilen doku hasarı gözlemişlerdir. Foster ve ark. (5), ratlarda yaptıkları araştırmalarında bupivakainle birlikte birçok lokal anestezik ajanın miyotoksik etkilerini incelemişler ve erken dönemde gözledikleri kas hasarını, her bir lokal anestezik için farklı derecelerde olmak üzere, fiber dejenerasyonu, hasarlanmış fiberlerde fragmentasyon, fagositik hücre infiltrasyonu ve yer yer rejenerasyon alanları olarak tanımlamışlardır. Efesoy ve Yıldız (12) ise ratlarda yaptıkları çalışmalarında 2. gün alınan kas dokusu örneklerinde yer yer sağlam görünen kas lifleri arasında, miyosit yapısının tamamen kaybolduğu dejenerasyon bölgeleri ve lökosit infiltrasyonu gözlediklerini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, kas dokusu hasarının en fazla bupivakain verilen grupta, en az levobupivakain verilen grupta gözlendiğini kaydetmişlerdir. Çalışmamızda enjeksiyondan sonraki ikinci günde alınan kas dokusu örneklerinin ışık mikroskobunda incelenmesinde; önceki araştırmacıların bulgularına benzer şekilde, sağlam görünen kas hücrelerinin yanında, miyofibriller arası yaygın mononükleer lökosit infiltrasyonu, yaygın nekrobiyotik değişiklikler ve dejenerasyon ayrıca septal bölgelerde geniş iltihabi ödem alanları gözlendi. Kas dokusu hasar skoru, bupivakain verilen grupta en yüksek [3.0 (2.0-3.0)], ropivakain verilen grupta bupivakainden daha düşük [2.0 (2.0-3.0)] ve levobupivakain verilen grupta en düşük [1.0 (1.0-1.0)] olarak belirlendi. Işık mikroskobu incelemesinden elde ettiğimiz bulgular, her üç lokal anestezik ajanın neden olduğu iskelet kas dokusu hasarının kalitatif olarak benzer olduğunu, bununla birlikte kantitatif olarak bupivakainin diğer iki ajandan da anlamlı derecede fazla kas hasarına neden olduğunu göstermektedir ($p<0.05$). Ayrıca ropivakain verilen gruptaki kas hasarı levobupivakain verilen gruptakinden anlamlı derecede fazlaydı ($p<0.05$). Işık mikroskobu bulgularımız önceki araştırmacıların (5,6,9,12) bulgularıyla benzer şekilde levobupivakainin, kalitatif olarak diğer lokal anesteziklerle aynı özellikte (uniform ve nonspesifik) olmak kaydıyla, hem bupivakain hem de ropivakainden daha az miyotoksik etkiye neden olduğunu göstermektedir.

Apoptozis fizyolojik hücre ölümünün en yaygın formudur. Apoptozis, 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 (95). Lokal anesteziklerin apoptotik aktivite üzerine etkilerini inceleyen birçok çalışma yapılmıştır (52,84,89,92,96). Sözü edilen bu çalışmalarda, lokal anesteziklerin nöral doku ve çizgili kas dokusunun yanı sıra, renal hücreler (96), kondrositler (97) ve korneal endotel hücreleri (95) gibi bir çok hücrede apoptotik değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir.

Lokal anesteziklerin indüklediği apoptoziste, hücre membranında *blebbing*, kromatin yoğunlaşması, nukleer parçalanma ve hücre fragmanlarının ayrışması ile karekterize morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler gözlenmektedir (83). Kim ve ark. (84) insan nöroblastoma hücrelerinde hidrofobik kimyasal yapısından dolayı güçlü bir membran afinitesine sahip olan dibukainin hücre içine Ca^{++} geçişini arttırarak prokaine nazaran daha fazla apoptotik aktivasyon yapabileceğini bildirmişlerdir. Tan ve ark. (83) invitro PC12 hücre kültüründe % 1 ve % 5 lidokain, % 0,5 ve 0,75 bupivakain ile % 0,25 ve 0,5 konsantrasyonlardaki tetrakain kullanarak yaptıkları çalışmalarında, doza bağımlı olarak en fazla apoptotik aktivasyona tetrakainin neden olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar (83), tetrakainin, neden olduğu hücre yüzeyindeki morfolojik değişikliklerin yanı sıra hücre içi Ca^{++} konsantrasyonlarını artırarak kaspaz-3 aktivasyonuna sebep olduğunu ve bu yolla apoptozis indüksiyonunda anahtar rol oynadığını savunmaktadırlar. Lee ve ark. (96) ise tetrakain, lidokain ve bupivakainin kaspaz-3 aktivasyonu ve antiapoptotik protein kinazların ($pERK_{1/2}$ ve P.K.B) inhibisyonu ile insan böbreği proksimal tübül hücrelerinde apoptozisi aktive ettiklerini bildirmişlerdir.

Lokal anesteziklere bağlı gelişen apoptozisten en çok bupivakain sorumlu tutulmaktadır (62,64). Bupivakainin invivo şartlarda hücre içi Ca^{++} seviyesini yükselttiği ve böylelikle Ca^{++} ile ilişkili hücre içi ölüm yolağını, yani apoptozisi tetiklediği savunulmaktadır. Birçok araştırmacı, bupivakainin neden olduğu apoptozis aktivasyonunu, ajanın lipofilik özelliğinden kaynaklanan yüksek miyotoksisite potansiyeline bağlamaktadır (1,9,33,62,64). Bupivakain intrasellüler Ca^{++} seviyesini artırmak suretiyle Ca^{++} ile bağlantılı olarak ve mitokondrideki oksidatif fosforilasyon basamaklarını kırarak apoptozise sebep olabilmektedir (1,62,64). Park ve ark. (11) bupivakain'in schwann hücresinde reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) üretimini indükleyerek kaspaz-3 aktivasyonu ve poli-ADP-riboz polimeraz (PARP) indirgenme yoluyla apoptozisi

indüklediğini savunmaktadırlar. Horiguchi ve ark. (36) im yoldan uygulanan % 0,5 bupivakainin neden olduğu apoptotik aktivasyonu TUNEL yöntemiyle araştırmışlar ve birinci günden itibaren giderek artan sayıda TUNEL pozitif hücre saptamışlardır. Zink ve ark. akut (9) ve uzun dönemde (33) bupivakain ve ropivakainin miyotoksik etkilerini araştırdıkları iki farklı çalışmada; enjeksiyondan sonraki 6. saatte ve 7. ve 28. günlerde aldıkları doku örneklerinde, sadece bupivakain verilen grupta, dağınık ve disintegre olmuş kas liflerinde apoptotik aktivasyon gözlediklerini bildirmişlerdir.

Boselli ve ark. (92), insan T hücre kültürlerinde lidokain ve ropivakaine bağlı gelişen apoptotik aktivasyonu belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmalarında, ropivakain verilen grupta apoptotik hücre sayısında artış olmazken lidokain verilen grupta apoptotik hücre sayısının arttığını tespit etmişlerdir. Zink ve ark.'nın bupivakain ve ropivakainin miyotoksik etkilerini araştırdıkları iki farklı çalışmada (9,33); bupivakain verilen grubun aksine, ropivakain verilen grupta apoptotik aktivasyon gözlemediklerini bildirmektedirler.

Levobupivakainin neden olduğu apoptotik aktivasyonla ilgili literatürde Borazan ve ark. (95)'nın çalışması dışında bir araştırma bulunmamaktadır. Borazan ve ark. (95) çalışmalarında tavşanlara intrakamaral injeksiyon yoluyla lidokain, ropivakain ve levobupivakain uygulamışlar ve 1. ve 7. günlerde TUNEL pozitif apopitotik hücre sayısını araştırmışlardır. Bu araştırmacılar (95), her üç ajanın da akut apoptotik süreci tetiklediğini ve korneal endotel hücrelerinde morfolojik değişikliklere neden olduğunu ancak bu etkinin geçici olup 7. günden sonra tamamen sonlandığını savunmaktadırlar.

Çalışmamızda bupivakain verilen grupta birim alanda 2-3 adet TUNEL pozitif apoptotik çekirdek gözlenirken, ropivakain ve levobupivakain verilen gruplarda TUNEL pozitif apoptotik hücre kalıntılarına rastlanmadı. Borazan ve ark (95), önceki araştırmacıların farklı dokularda apoptotik aktivasyona neden olmadığını bildirdikleri ropivakainin ve daha önce araştırılmamış olan levobupivakainin korneal endotel hücrelerinde apoptotik aktivasyona neden olduğunu savunmaktadırlar. Bulgularımız, bupivakain ve ropivakainin çizgili kas dokusunda neden olduğu apoptotik aktivasyonu araştıran önceki çalışmalarda (9,33,92) elde edilen bulgularla örtüşmektedir. Çalışmamızda, önceki çalışmalardan farklı olarak levobupivakainin, uygulandıktan 48 saat sonra rat iskelet kas dokusunda apoptotik aktivasyona neden olmadığını tespit ettik. Çizgili kaslarda görülen apoptotik aktivite intrasellüler Ca^{++} dengesini olumsuz etkileyen faktörlerle ilişkilendirilmektedir (1,7,8,64). Borazan ve ark. (95) ise intrasellüler Ca^{++} dengesi ve

diğer fizyolojik özellikleri yönünden çizgili kas dokusundan tamamen farklı bir dokuda çalışmışlardır.

Horiguchi ve ark. (36) çalışmamızda kullandığımız yönteme benzer şekilde % 0,5 bupivakainin rat çizgili kas dokusunda neden olduğu apoptotik aktivasyonu TUNEL yöntemiyle araştırmışlardır. Bu araştırmacılar (36) birinci günde bupivakaine bağlı apoptozis gösteren birkaç hücre gözlediklerini ancak bu sayının 3. ve 4. günlerde belirgin artış gösterdiğini savunmaktadırlar. Çalışmamızda sadece enjeksiyondan 48 saat sonra alınan doku kesitlerini değerlendirdik ve bupivakain verilen grupta birim alanda 2–3 apoptotik hücre kalıntısı gözledik. Bulgularımızı Horiguchi ve ark. (48)'nın bulgularıyla birlikte değerlendirdiğimizde, ikinci günden sonra alınacak kesitlerde apoptotik hücre sayısının artmış olabileceğini düşünmekteyiz.

Zink ve ark. (64) ropivakainin memeli çizgili kas dokusu hücrelerinde apoptotik aktivasyona neden olmadığını savunmaktadırlar. Çalışmamızda ropivakain verilen grupta apoptozis aktivasyonunu gösteren bir bulguya rastlamadık. Ropivakain, bupivakainden daha düşük liposolübiliteye sahip olduğu için sarkolemmal bariyeri daha yavaş geçmektedir. Buna bağlı olarak ropivakainin intrasellüler Ca^{++} dengesini daha ılımlı etkilediği (1,7,8,64) ve bunun sonucunda apoptotik aktivasyona neden olmadığı savunulmaktadır (46,64,95). Oysaki çalışmamızda liposolübülitesi bupivakainle aynı olmakla birlikte levobupivakain verilen grupta da apoptotik aktivasyona rastlamadık. Fizikokimyasal olarak, levobupivakainin rasemik bupivakainden en önemli farkı, pür S(-) enantiomer olması ve R(+) izomeri içermemesidir (10,72). Bupivakainin olumsuz kardiyak etkilerinin, Ca^{++} kanalları ve intrasellüler Ca^{++} akımı ile etkileşimine ve mitokondrilerde ATP sentezi üzerine olan etkilerine bağlı olduğu savunulmaktadır (7,24,55-57). Bupivakainin pür S(-) enantiyomeri olan levobupivakainin, intrasellüler Ca^{++} dengesi üzerine ılımlı etkisinden dolayı, daha az kardiyotoksik ve miyotoksik olduğu bilinmektedir. Apoptotik aktivasyonun oluşum mekanizmasında da intrasellüler Ca^{++} dengesinin sorumlu olduğu savunulmaktadır (1,7,8,64). Bu bulgularımız, bupivakainin neden olduğu apoptotik aktivasyonun ajanın liposolübülitesinden ziyade stereoselektivitesiyle ilgili olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, konunun açıklığa kavuşmasının ancak ileri araştırmalarla mümkün olabileceğini düşünmekteyiz.

Okland ve ark. (38) ratların ekstraoküler adalelerine (*Rectus lateralis kası*) tek doz 50 µl %2 mepivakain enjeksiyonunu takiben 15. dakikadan 30. güne kadar seri olarak elde ettikleri çizgili kas dokusu örneklerini elektron mikroskopta incelemişlerdir.

Araştırmacılar enjeksiyondan 15 dakika sonra etkilenen fiberlerde sarkolemma rüptürünün yanı sıra T-tübüller ve sarkoplazmik retikulumun şişerek rüptüre olduğunu, bununla birlikte çekirdeğin morfolojik olarak henüz etkilenmediğini gözlemişlerdir. Altıncı saatte sarkolemmada ve çekirdek zarında kesilmeler ve parçalanmalar gözlenirken, 12–24 saat sonra nekrotik myofiberlerde bütünlüğünü koruyabilen çok az sayıda çekirdek bulunduğunu bildirmektedirler. Okland ve ark. (38) sonuç olarak çizgili kas dokusunda, lokal anestezik ajana maruz kaldıktan birkaç dakika sonra SR membranında, birkaç saat içinde de mitokondri ve çekirdek membranında hasar gözlendiğini, ikinci günde ise bazal laminanın katlanarak dejenere kas liflerinin etrafını sardığını ve satellit hücrelerin bazal laminanın iç yüzü boyunca sıralandığını bildirmektedirler.

Politi ve ark. (86), ratların soleus kasına i.m % 0,5 bupivakain enjekte etmişler ve 1. günden 21. güne kadar elde ettikleri kas dokusu örneklerini elektron mikroskopta incelemişlerdir. Bu çalışmada (86), birinci günde hasarlı fiberlerde A, I ve Z bantlarını içeren sarkomerlerde mononükleer hücrelerle infiltre miyofibril hasarlanmaları ve endomisyum ödemi gözlenirken, ikinci günde terminal sisternalarda vakuolizasyon ve sarkoplazmik retikulumda dilatasyon gözlendiği bildirilmektedir. Ayrıca mitokondride subsarkolemmal krista ve matriks kaybı ile beraber lipofusin granülleri, membranöz *whorl* cisimcikleri ve otofajik vakuoller gibi dejenere lizozomal yapılar gözlediklerini bildirmektedirler. Politi ve ark. (86), bu araştırmalarında bupivakainin, intrasellüler Ca^{++} düzeyini yükselterek SR ve mitokondri hasarına/disfonksiyonuna yol açtığını ve bu yolla miyonekroza neden olduğunu savunmaktadırlar.

Zink ve ark. (9) domuzlarda yaptıkları çalışmalarında bupivakain ve ropivakaininin miyotoksik etkilerini elektron mikroskopta incelemişlerdir. Araştırmacılar bupivakain verilen grupta daha yoğun olmak kaydıyla miyotübüllerdeki çöküntüler, kaynaşmış vakuoller, mitokondride kısmi kümeleşmeler ve şişme, çekirdekte patolojik yoğunlaşmalar ve piknotikleşmelerle karakterize subsellüler kas hasarı bulgularını bildirmektedirler. Amaniti ve ark. (6) ratlarda yaptıkları çalışmalarında 7. Günde aldıkları iskelet kas dokusu örneklerinde elektron mikroskopik olarak Zink ve ark. (9)'nın bulgularına benzer bulgular tanımlamaktadırlar.

Çalışmamızda enjeksiyondan 48 saat sonra elde edilen iskelet kas dokusu örneklerinin elektron mikroskopta incelenmesinde ultrastrüktürel değişiklikleri en yoğun olarak bupivakain verilen grupta gözledik. Bupivakain grubunda mitokondrilerde genişleme ve

iç membranlarında parçalanma, membranöz *whorl* oluşumu gibi bulgulara sıklıkla rastlanırken ropivakain ve levobupivakain verilen gruplarda daha az yoğun olmak kaydıyla benzer ultrastrüktürel değişiklikler mevcuttu. Bununla birlikte levobupivakain verilen grupta çekirdek ve miyofibriler yapının normal olduğunu gözledik. Bupivakain verilen grupta ayrıca SR sisternalarınının genişlediği ve vakouler bir görünüm aldığı dikkati çekmekteydi. Dejenere kas lifleri çevresinde yaygın makrofaj ve nötrofil lökosit infiltrasyonu gözledik. Nekrotik alanlarda gözlenen bu infiltrasyonun, ölü debrisleri uzaklaştıracak olan fagositik hücrelerden oluştuğunu düşünmekteyiz.

Bu bulgularımız metodolojik olarak çalışmamızla benzerlik gösteren Politi ve ark. (86) ve Zink ve ark. (9)'nın bulgularıyla benzerlik göstermektedir. Politi ve ark. sözü edilen çalışmalarında sadece bupivakainin miyotoksik etkilerini ultrastrüktürel olarak incelemişlerdir. Zink ve ark. (9) ise bupivakain ve ropivakain kullanarak çalışmalarını yürütmüşlerdir. Çalışmamızda daha önce araştırılmış olan bupivakain ve ropivakainin yanı sıra henüz araştırılmamış olan levobupivakainin iskelet kas dokusunda neden olduğu ultrastrüktürel değişiklikleri de araştırdık. Bupivakain ve ropivakainin neden olduğu hücresel düzeydeki bu değişikliklere daha az yoğun olmak kaydıyla levobupivakainin de neden olduğunu gözledik.

Çalışmamıza benzer şekilde lokal anesteziklerin miyotoksik özelliklerini araştıran çalışmalarda (5,9,38,86) araştırmacılar, ışık mikroskobu görüntülerini *Benoit-Yagiela-Ferrel* hasar skorlama sistemini kullanarak skorlamışlar ve bu skorları istatistiksel olarak karşılaştırmışlar, bununla birlikte elektron mikroskop bulgularını istatistiksel olarak karşılaştırmaksızın sunmuşlardır. Sadece Nauette-Gaulain ve ark. (59) bupivakainin miyotoksik etkilerinin yaşa bağlı değişimini araştırdıkları çalışmalarında, elektron mikroskop bulgularını üç basamaklı (*focal-mederate-extreme* hasarlanma) bir skorlamaya tabi tutmuşlar ve elde ettikleri skorları istatistiksel olarak karşılaştırmışlardır. Sözü edilen araştırmacıların kullandıkları skorlama sistemi sadece bitişik miyofibrilleri ve sarkomerlerin devamlılığını esas alarak oluşturulduğu için oldukça karmaşık olan ve çok sayıda organeli kapsayan ultrastrüktürel değişiklikleri tam olarak yansıtmayabilir. Çalışmamızda elde ettiğimiz elektron mikroskop görüntülerini istatistiksel olarak karşılaştırmamıza olanak sağlayacak bir skorlama sistemi oluşturamadık ve bizden önceki araştırmacılar gibi bulgularımızı istatistiksel analiz yapmaksızın sunmakla yetindik.

Kas dokusu hasarından sonra miyosit öncülleri olan satellit hücrelerin doku rejenerasyonunda anahtar rol oynadığı bilinmektedir (1). Satellit hücreler olarak adlandırılan miyoblastların lokal anesteziklerin miyotoksik etkilerinden etkilenmediği önceki araştırmalarda gösterilmiştir (1,5,6,9,12). Çalışmamızda hem ışık mikroskobunda hem de elektron mikroskopta dejenerasyona uğramış kas lifleri etrafında normal görünümlü satellit hücreler gözledik. Lokal anesteziklere bağlı olarak gelişen miyotoksik doku hasarında damar, sinir ve bağ dokusu elemanlarının etkilenmediği bildirilmektedir (1,5,6). Işık mikroskobu ve elektron mikroskopta elde ettiğimiz görüntülerde kas lifleri arasında yer alan endomisyuma ait bağ dokusu ve kapiller damar yapıları normal olarak değerlendirildi.

Okland (38), Hall-Craggs (98) ve Politi (86), lokal anesteziklere bağlı iskelet kas dokusu hasarının intrasellüler Ca^{++} artışı ile ilişkilendirmekte ve miyonekrozun bu artışa bağlı olarak oluşan başta mitokondri olmak üzere hücre organellerini dejenere etmesi ve disfonksiyona uğratması sonucunda oluştuğunu savunmaktadırlar. İntrasellüler Ca^{++} artışı aynı zamanda yine hücre ölümüyle sonuçlanan apoptotik aktivasyonun başlatılmasından da sorumlu tutulmaktadır (1,7,8,64).

Bupivakain, miyotoksik etki potansiyeli en yüksek ajanlardan biridir (6,9,12,33). Bupivakain klinik konsantrasyonlarda SR' den Ca^{++} salınımını artırmakta aynı zamanda SR'ye Ca^{++} reuptakeini inhibe etmektedir. Bupivakainin bu etkisi, oldukça lipofilik bir ajan olmasına bağlanmaktadır. Bupivakain bu özelliği sayesinde miyoplazma içinde hızla birikerek iskelet kas liflerinde hücre içi Ca^{++} konsantrasyonunu artırmaktadır (39,43-46). Irwin ve ark. (76), bupivakain doza bağlı olarak iskelet kas mitokondrisinde ve izole kas fibrillerinde PTP'nin açılmasını indükleyerek, mitokondriyal depolarizasyonu ve piridin nükleotid oksidasyonuna yol açtığını göstermişlerdir. Bu araştırmacılar (61), PTP nin hücre ölümünde çeşitli yollarla potansiyel efektör olduğu düşünülmektedir. Bupivakaine bağlı apoptozis aktivasyonunun invivo PTP açılmasıyla ortaya çıktığı gösterilmiştir (61,62,64). Bupivakainin yine aynı mekanizmayla SR ve mitokondriyal membranı da etkileyerek Ca^{++} ile ilişkili hücre içi ölüm yolağını, yani apoptozisi tetiklediği savunulmaktadır (1,62,64). Ropivakainin, intraselüler Ca^{++} seviyesine ılımlı etkisi dolayısıyla bupivakainden daha düşük miyotoksik etki potansiyeline sahip olması, bupivakainden daha az lipofilik olmasıyla açıklanmaktadır (46,64). Komai ve ark. (44), tetrakainin SR, ryonodin reseptörleri ve intrasellüler Ca^{++} salınımı üzerine etkilerinin lokal anestezik lipofilitesinden bağımsız olduğunu

savunmaktadırlar. Nauette-Gaulain ve ark. (50), bupivakainle lipofilik özellikleri aynı olan levobupivakainin SR'deki RyR ve Ca-ATP'az pompasını aktifleyerek intrasellüler Ca^{++}'un miktarını arttırdığını savunmaktadırlar. Sözü edilen araştırmacılar (50), lipofilik özellikleri aynı olmakla birlikte bupivakainin aynı etkiyi göstermediğini bildirmekte ve bunu iki ajanın stereospesifik özellikleriyle açıklamaktadırlar. Günümüze kadar yapılan araştırmalardan anlaşıldığı üzere, lokal anesteziklerin miyotoksik etkilerinin mekanizmasının intrasellüler Ca^{++} homeostazıyla ilgili olduğu görüşü ağırlık kazanmaktadır. Bununla birlikte lokal anesteziklerin intrasellüler Ca^{++} homeostazı üzerine etkisini belirleyen faktörün lipofilik özellikleri mi, stereoselektif özellikleri mi olduğu konusu henüz açıklık kazanmamıştır.

Gomez-Arnau ve ark. (4) katarakt cerrahisi uyguladıkları 3587 hastadan oluşan geniş serilerinde, retrospektif olarak inatçı diplopi vakaları ile kullanılan anestezi yönteminin ilişkisini araştırmışlar ve lokal anestezik olarak bupivakain, lidokain ve mepivakain kullandıkları serilerinde anesteziye bağlı diplopi insidansını %0,25 olarak bulmuşlardır. Bu araştırmacılar (4), bazı vakalarında diplopinin postoperatif 1. aya kadar sürdüğünü rapor etmişlerdir. Söz konusu araştırmada araştırmacılar (4), anesteziye bağlı gözledikleri inatçı diplopi vakalarının hemen tamamını retrobulber blok uyguladıkları hastalarında gözlemişler ve bunu inferior rektus kasının direkt hasarına bağlamışlardır. Katarakt cerrahisi sonrası lokal anesteziklere bağlı diplopi insidansını Golnik ve ark. (29) % 0,85, Johnson (31) % 0,23, Wells ve Maslin (99) %11,7 olarak bildirmişlerdir. McLure ve Rubin (100), çift kör klinik çalışmalarında intraoküler cerrahi planladıkları 50 hastaya % 0,75 levobupivakain ve % 0,75 rasemik bupivakain kullanarak peribulber anestezi uygulamışlar ve cerrahiyi takiben bupivakain grubunda % 52, levobupivacain grubunda % 40 hastada diplopi tesbit etmişlerdir. Benzer şekilde Hogan ve ark. (2) bupivakain+ epinefrin uyguladıkları hastalarında sternokleidomastoid adalede, Parris ve ark. (88) ise bupivakain uyguladıkları hastalarında trapezius adalesinde, lokal anestezik miyotoksisitesine bağlı fonksiyon bozukluğu geliştiğini ve klinik düzelmenin aylar sonra gerçekleştiğini rapor etmektedirler. Her ne kadar lokal anesteziklere bağlı miyotoksisite, bu ilaçların nadir ve geri dönüşümlü bir yan etkisi olarak değerlendirilse de, özellikle oküler adaleler gibi küçük hacimli adalelerde tek doz enjeksiyonun dahi ciddi klinik sorunlara yol açtığı görülmektedir. Aynı şekilde adale büyüklüğü önemli olmaksızın lokal anesteziklerin sürekli infüzyonu ya da tekrarlayan enjeksiyonları da ciddi klinik sorunlara yol açmaktadır. Bu nedenlerle özellikle küçük hacimli adalelerin

bulunduğu bölgelerde daha az miyotoksik etki potansiyeline sahip lokal anestezik ajanların tercih edilmesinin gerektiği kanaatindeyiz.

Sonuç olarak, bupivakain, ropivakain ve levobupivakainin miyotoksik etkilerini karşılaştırdığımız çalışmamızda, bupivakainin en fazla, ropivakainin bupivakainden daha az ve levobupivakainin her iki ajandan da daha az olmak üzere miyotoksik etki potansiyeline sahip olduğunu gözledik. Elektron mikroskop görüntülerinde, ışık mikroskobu bulgularımızla uyumlu olarak en yoğun ultrastrüktürel dejenerasyonu bupivakain verilen grupta, bupivakainden daha az yoğun olmak kaydıyla ropivakain verilen grupta gözledik. Levobupivakain verilen gruptan elde edilen elektron mikroskop görüntülerinde ise her iki ajandan daha az yoğun olmak üzere ve her iki ajanın oluşturduğu hasara benzer nitelikte dejenerasyon gözledik. Sadece bupivakain verilen grupta apoptotik aktivasyona rastladık. Ropivakain ve levobupivakain verilen gruplarda apoptotik aktivasyon gösteren hücre kalıntıları gözlemedik.

Bu çalışma subsellüler düzeyde miyotoksik etkileri ve apoptotik aktivasyon potansiyeli daha önce araştırılmamış olan levobupivakainin, her iki ajandan da daha az yoğun olmak kaydıyla, kalitatif olarak bupivakain ve ropivakainin oluşturduğu ultrastrüktürel değişikliklere benzer şekilde hücresel hasara yol açtığını ve iskelet kas dokusunda apoptotik hücre aktivasyonuna neden olmadığını göstermektedir.

6. SONUÇLAR

1. Işık mikroskobu bulgularına göre iskelet kas dokusunda en fazla miyotoksik hasara neden olan ajan bupivakaindir. Ropivakain bupivakainden daha az, levobupivakain ise her iki lokal anestezik ajandan daha az miyotoksik hasara neden olmaktadır.

2. Elektron mikroskopta elde edilen görüntülerde, ışık mikroskobu bulgularına benzer şekilde, araştırılan üç ajanın neden olduğu ultrastrüktürel değişikliklerin şiddeti Bupivakain > Ropivakain > Levobupivakain şeklinde sıralanmaktadır.

3. Lokal anestezik enjeksiyonundan 48 saat sonra iskelet kas dokusunda bupivakainin apoptotik hücre aktivasyonuna neden olduğu gözlenmiş, ropivakain ve levobupivakainin ise böyle bir etkisi saptanmamıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Zink W, Graf BM. Local anesthetic myotoxicity. Reg Anesth Pain Med 2004; 29:333-340.

2. Hogan Q, Dotson R, Erickson S, Kettler R, Hogan K. Local anesthetic myotoxicity: A case and review. Anesthesiology 1994; 80:942-947.

3. Rubin AP. Complications of local anaesthesia for ophtalmic surgery. Br J Anaesth 1995; 75:93-96.

4. Gomez-Arnau JI, Yangüela J, González A et al. Anaesthesia-related diplopia after cataract surgery. Br J Anaesth 2003; 90:189-193.

5. Foster AH, Carlson BM. Myotoxicity of local anesthetics and regeneration of the damaged muscle fibers. Anesth Analg 1980; 59:727-773.

6. Amaniti E, Drampa F, Kouzi-Koliakos K et al. Ropivacaine myotoxicity after single intramuscular injection in rats. Eur J Anesth 2006; 23:130-135.

7. Casati A, Putzu M. Bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine: are they clinically different?. J Clin Anesth 2005; 15: 247-268.

8. 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.

9. Zink W, Seif C, Bohl JRE et al. The acute myotoxic effects of bupivacaine and ropivacaine after continuous peripheral nevre blockades. Anesth Analg 2003; 97:1173-1179.

10. Foster RH, Markham A. Levobupivacaine: A rewiev of its pharmacology and use as a local anaesthetic. Drugs 2000; 59:531-579.

11. 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.

12. Efesoy Ş. Levobupivakain, Bupivakain ve Ropivakainin miyotoksik etkilerinin karşılaştırılması, Tıpta Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri, 2009.

13. Junqueira LC, Carneiro JB, Kelley RO. Basic Histology (8nd ed). Appleton and Lang. Stomford, Conn 1998. p. 231-244.

14. Tekelioğlu M. Genel Tıp Histolojisi. Güneş Kitapevi, Ankara 1993. s. 147-166.

15. Kalaycı Ş. Histoloji. Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa 1986. s. 169-185.

16. Aytekin Y. Temel Histoloji. Barış Kitapevi, İstanbul 1993. s. 231-254.

17. Kayhan Z. Lokal Anestezikler. Klinik Anestezi. 3. Baskı. Logos Yayıncılık, İstanbul 2004. s. 503-523.

18. Scholz A. Mechanisms of (local) anaesthetics on voltage-gated sodium and other ion channels. Br J Anaesth 2002; 89:52.

19. Collins VJ. Local anesthetics: Principles of Anesthesiology. 3nd ed. Collins VJ (ed) Lea&Febiger, Philadelphia 1993. p. 1232-1240.

20. Morgan GE, Mikhail MS, Murray MJ (eds). Local Anesthetics. In: Clinical Anesthesiology. (3th ed). McGraw Hill, USA 2004. p. 233-242.

21. De Jong RH. Local anesthetic pharmacology. In: Regional Anesthesia and Analgesia. (1th ed). Brown DL (ed) WB Sounders, Philadelphia 1996. p. 124-142.

22. Erdine S: Sinir blokları. 1. Baskı. Emre Matbaacılık, İstanbul 1993. s. 187-196.

23. Golnik KC, Reed KL. Essentials of local anesthetic pharmacology. Anesth Prog 2006; 53:98-108.

24. Marcus MAE, Durieux ME, Cox B. Toxicity of local anaesthetics. Clinical Anaesthesiology 2003; 17:111-136.

25. Tasch MD, Butterworth JF. Toxicity of local anesthetics. ASA Refresher Courses in Anesthesiology 2006; 34:165-177.

26. Muguruma T, Sakura S, Saito Y. Epidural Lidocaine Induces Dose-Dependent Neurologic Injury in Rats. Anesth Analg 2006; 103:876-881.

27. Epstein-Barash H, Shichor I, Kwon AH et al. Prolonged duration local anesthesia with minimal toxicity. PNAS 2009; 106:7125–7130.

28. Kalso E, Lalla M, Rosenberg P et al. Evalution of the Myotoxicity of Bupivacain in Bier Blocks-A Biochemical and Electron Microscopic Study. Anesth Analg 1983; 62:796-801.

29. Golnik KC, West CE, Kaye E, Corcoran KT, Cionni RJ. İncidence of ocular misalignment and diplopia after uneventful cataract surgery. J Cataract Refract Surg 2000; 26:1205-9.

30. Esswein MB, von Noorden GK. Paresis of a vertical rectus muscle after cataract extraction. Am J Ophthalmol 1993; 116:424-430.

31. Johnson DA. Persistent vertical binocular diplopia after cataract surgery. Am J Ophthalmol 2001; 132:831-5.

32. Scott AB, Alexander DE, Miller JM. Bupivacaine injection of eye muscles to treat strabismus. Br J Ophthalmol 2007; 91:146-8.

33. 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.

34. Yagiela JA, Benoit PW, Buoncristiani RD, Peters MP, Fort NF. Comparison of myotoxic effects of lidocaine with epinephrine in rats and humans. Anesth Analg 1981; 60:471-480.

35. Benoit PW. Reversible skeletal muscle damage after administration of local anesthetics with and without epinephrine. J Oral Surg 1978; 36:198-201.

36. Horiguchi T, Shibata M, Ito Y et al. Macrophage Apoptosıs In Rat Skeletal Muscle Treated Wıth Bupıvacaıne Hydrochloride: Possıble Role Of MCP-1. Muscle Nevre 2002; 26:79–86.

37. Komorowski TE, Shepard B, Okland S, Carlson BM. An electron microscopic study of local anaesthetic-induced skeletal muscle fiber degeneration and regeneration in the monkey. J Orthop Res 1990; 8:495-503.

38. Okland S, Komorowski TE, Carlson BM. Ultrastructure of Mepivacaine-Induced Damage and Regeneration in Rat Extraocular Muscule. Invest Ophthalmol Vis Sci 1989; 30:1643-51.

39. Zink W, Graf BM, Sinner B et al. Differential effects of bupivacaine on intracellular Ca2+ regulation: potential mechanisms of its myotoxicity. Anesthesiology 2002; 97:710–6.

40. Wakata N, Sugimoto H, Iguchi H, Nomoto N, Kinoshita M. Bupivacaine hydrochloride induces muscle fiber necrosis and hydroxyl radical formation-dimethyl sulphoxide reduces hydroxyl radical formation. Neurochem Res 2001; 26:841-4.

41. Terada H, Shima O, Yoshida K, Shinohara Y. Effects of the local anesthetic bupivacaine on oxidative phosphorylation in mitochondria. Change from decoupling to uncoupling by formation of a leakage type ion pathway specific for H+ in cooperation with hydrophobic anions. J Bıol Chem 1990; 265:7837-7842.

42. Benoit PW, Yagiela A, Fort NF. Pharmacologic correlation between local anesthetic-induced myotoxicity and disturbances of intracellüler calcium distribution. Toxicol Appl Pharmacol 1980; 52:187-198.

43. Ibarra MCA, Ichihara Y, Hikita M et al. Effects of bupivacaine enantiomers on Ca^{2+} release from sarkoplasmic reticulum in skeletal muscle. Eur J Pharmacol 2005; 512:77-83.

44. Komai H, Lokuta AJ. Interaction of bupivacaine and tetracaine with the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channel of skeletal and cardiac muscles. Anesthesiology 1999; 90:835-843.

45. Shoshan-Barmatz V, Zchut S. The interaction of local anesthetics with the ryanodine receptor of the sarcoplasmic reticulum. J Membr Biol 1993; 133:171-181.

46. Zink W, Missler G, Sinner B et al. Differential effects of bupivacaine and ropivacaine enantiomers on intracellular Ca^{+2} regulation in murine skeletal muscle fibers. Anesthesiology 2005; 102:793-8.

47. Chedid NG, Sudo RT, Aguiar MI et al. Regulation of intracellular calcium by bupivacaine isomers in cardiac myocytes from Wistar rats. Anesth Analg 2006; 102:792–8.

48. Loghmanee F, Tobak M. Fatal malignant hyperthermia associated with recreational cocaine and ethanol abuse. Am J Forencis Med Pathol 1986; 7:246-8.

49. Warrian WG, Halikas JA, Crosby RD, Carlson GA, Crea F. Observations on increased CPK levels in 'asymptomatic' cocaine abusers. J Addict Dis 1992; 11:83-95.

50. 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.

51. 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.

52. 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.

53. Nouette-Gaulain K, Bellance N, Pre´vost B et al. Erythropoietin protects against Local Anesthetic myotoxicity during continuous regional analgesia. Anesthesiology 2009; 110:648–659.

54. Nouette-Gaulain K, Jose C, Capdevila X, Rossignol R. From analgesia to myopathy: When local anesthetics impair the mitochondrion. Int J Biochem Cell Biol 2011; 43:14-9.

55. Graf BM et al. Comparision of the direct cardiotoxicity of the ısomers of ropivacaine and bupivacaine. Anesthesiology 1998;89.

56. Reiz S, Nath S. Cardiotoxicity of local anesthetics agents. Br J Anaesth 1986; 58:736-746.

57. 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.

58. Cave G, Harvey M. Intravenous lipid emulsion as antidote beyond local anesthetic toxicity: a systematic review. Acad Emerg Med 2009; 16:815-824.

59. 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.

60. Paumard P, Vaillier J, Coulary B et al. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. EMBO J 2002; 21:221–230.

61. Irwin W, Fontaine E, Agnolucci L et al. Bupivacaine myotoxicity is mediated by mitochondria. J Biol Chem 2002; 277:12221-7.

62. Unamı A, Shınohara Y, Ichıkawa T, Baba Y. Bıochemıcal and mıcroarray analyses of bupivacaine-induced apoptosıs. J Toxicol Sci 2003; 28:77-94.

63. Bourret A, Nouette-Gaulain K, Galbes O et al. N-acetylcysteine protects against bupivacaine-induced myotoxicity caused by oxidative and sarcoplasmic reticulum stress in human skeletal myotubes. Anesthesiology 2010; 113:560–9.

64. 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.

65. McClure JH. Ropivacaine. Br J Anaesth 1996; 76:300-7.

66. John E, Tetzlaff MD. The pharmacology of local anesthetıcs. Anesthesiol Clin 2000; 18:217-233.

67. Mc Clellan KJ, Fauld D. Ropivacaine: An update of its use in regional anaesthesia Drugs 2000; 60:1065-1093.

68. Morton C. Ropivacaine. Br J of Hosp Med 1997; 58:97-8.

69. Tetzlaff JE. Ropivacaine In: Clinical pharmacology of local anesthetics. Woburn: Buttemorth-Heinemann 2000: 125-131.

70. Dony P, Dewinde V, Vanderick B et al. The comparative toxicity of ropivacaine and bupivacaine at equipotent doses in rats. Anesth Analg 2000; 91:1489-1492.

71. Mazoit JX, Decaux A, Bouaziz H, Edouard A. Comparative ventricular electrophysilogic effects of rasemic bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine on the isolated rabbit heart. Anesthesiology 2000; 93:784-792.

72. McCellan KJ, Spencer CM. Levobupivacaine. Drugs 1998; 56:355-362.

73. McLeod GA, Burke D. Review Article: Levobupivacaine. Anaesthesia 2001; 56:331-341.

74. Gristwood RW, Greaves JL. Levobupivacaine: a new safer long acting local anaesthetic agent. Expert Opin Investig Drugs 1999; 8:861-876.

75. 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.

76. Özay G, Ülker E. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler, Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, 2008; 2:73-78.

77. Raff MC. Social controls on celi survival and celi death. Nature 1992; 356:397-400.

78. Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR. Mechanisms and functions of celi death. Annu Rev Celi Biol 1991; 7:663-98.

79. Cohen JJ. Apoptosis: The physiological pathway of cell death. Hosp Pract(Off Ed) 1993; 28:35-43.

80. Ben-Hur H, Gurevich P, Huszar M et al. Apoptosis and apoptosis-related proteins in the epithelium of human ovarian tumors: immunohistochemical and morphometric studies. Eur J Gynaecol Oncol 1999; 20:249-253.

81. Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Haanen C. Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. Apoptosis 1998; 3:115-121.

82. 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.

83. Dohi S, Chen J, Banno Y, Nozawa Y, Tan Z. Involvement of the Mitogen-activated Protein Kinase Family in Tetracaine-induced PC12 Cell Death. Anesthesiology 2002; 96:1191–1201.

84. Kım 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.

85. D'Emilio A, Biagiotti L, Burattini S et al. Morphological and biochemical patterns in skeletal muscle apoptosis. Histol Histopathol 2010; 25:21-32.

86. Politi PK, Havaki S, Manta P, Lyritis G. Bupivacaine-induced Regeneration of Rat Soleus Muscle: Ultrastructural and Immunohistochemical Aspects. Ultrastructural Pathology 2006; 30:461–9.

87. Petterson N, Berggren P, Larsson M, Westman B, Hahn RG. Pain relief by wound infiltration with bupivacaine or high dose ropivacaine after inguinal hernia repair. Reg Anesth Pain Med 1999; 24:569-575.

88. Parris WC, Dettbarn WD. Muscle atrophy following nevre block therapy. Anesthesiology 1988; 69:289.

89. Pizzolato P, Renegar OJ. Histopathologic effects of long exposure to local anesthetics on peripheral nerves. Anesth Analg 1959; 38:138-141.

90. Pere P, Watanabe H, Pitkanen M, Wahlström T, Rosenberg PH. Local myotoxicity of bupivacaine in rabbits after continuous supraclavicular brachial plexus block. Reg Anesth 1993; 18:304-7.

91. Benoit PW, Belt WD. Some effects of local anesthetic agents on skeletal muscle. Exp Neurol 1972; 34:264-278.

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. Hewitson TD, Darby IA. In Situ Localization of Apoptosis Using TUNEL. Methods Mol Biol 2010; 611:161-170.

94. Rasmussen UF, Vielwerth SE, Rasmussen HN. Skeletal muscle bioenergetics: A comparative study of mitochondria isolated from pigeon pectoralis, rat soleus, rat biceps brachii, pig biceps femoris and human quadriceps. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 2004; 137:435–446.

95. 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.

96. Lee HT, Xu H, Siegel CD, Krichevsky IE. Local anesthetics induce human renal cell apoptosis. Am J Nephrol 2003; 23:129-139.

97. 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; 92:609-618.

98. Hall-Craggs ECB. Early ultrastructural changes in skeletal muscle exposed to the local anaesthetic bupivacaine (Marcaine). Br J Exp Pathol1980; 61:139-149.

99. Wells AP, Maslin K. Diplopia from peribulbar ropivacaine. Clin Experiment Ophthalmol 2000; 28: 32-3.

100. McLure HA, Rubin AP. Comparison of 0.75% levobupivacaine with 0.75% racemic bupivacaine for peribulbar anaesthesia. Anaesthesia 1998; 53:1160-4.

T.C.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Özlem ÖZ GERGİN'e ait "Levobupivakain, Bupivakain Ve Ropivakainin Miyotoksik Etkilerinin Karşılaştırılması; Elektron Mikroskopik İnceleme Ve Apoptotik Aktivite Çalışması" adlı çalışma, jürimiz tarafından Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalında **Tıpta Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 25 Şubat 2011

Başkan : Prof Dr. Adem BOYACI ..... İmza

Üye : Prof. Dr. Halit MADENOĞLU ..... İmza

Üye : Prof. Dr. Aliye ESMAOĞLU ..... İmza

Üye : Doç. Dr. Karamehmet YILDIZ ..... İmza

Üye : Doç. Dr. Mevlüt BAŞKOL ..... İmza