

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

İNSAN RETİNA EPİTEL HÜCRELERİNDE
PRİLOKAİNE BAĞLI İNFLAMASYONUN
ARAŞTIRILMASI

Aleyna ÖZTÜZÜN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2022-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

İNSAN RETİNA EPİTEL HÜCRELERİNDE
PRİLOKAİNE BAĞLI İNFLAMASYONUN
ARAŞTIRILMASI

Aleyna ÖZTÜZÜN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mutay ASLAN

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2022-5989 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2022-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;

Bu alışma j¼rimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Programında y¼ksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. .../...../.....

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mutay ASLAN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

¼ye : Prof. Dr. Dijle KİPMEN KORGUN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

¼ye : Doç. Dr. G¼zin AYKAL
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri ¼yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstit¼ M¼d¼r¼

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Öğrencinin

Aleyna ÖZTÜZÜN

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Mutay ASLAN

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başlama serüvenimde ilk tanıştığımız andan itibaren bana olan sıcak yaklaşımıyla, inancıyla ve sonsuz desteğiyle yanımda olan, beni ekibinin bir parçası haline getiren, akademi kavramını en iyi şekilde bana empoze eden ve gerek laboratuvar çalışmalarında gerekse özel hayatımda beni her zaman en doğruya ve en iyiye yönlendiren, benim için hayatımdaki yeri her zaman çok farklı olacak olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Mutay ASLAN'a sonsuz saygı ve sevgilerimi sunarım.

Laboratuvara geldiğim ilk günden itibaren bana olan sıcak ve sevgi dolu yaklaşımlarından dolayı, büyük bir sabır ve özveri ile bana kendi bildikleri her şeyi tüm detaylarıyla öğrettikleri için, deneylerim esnasında gece gündüz demeden yanımda oldukları ve yardım ettikleri için, sadece iş arkadaşı olarak kalmayıp bana küçük sıcak bir aile oldukları için, benim için kelimelerle ifade edemeyeceğim kadar değerli olan canım arkadaşlarım Tuğçe ÇEKER ve Çağatay YILMAZ'a çok teşekkür ederim.

Bugüne kadar her koşulda yanımda olan, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen, beni koşulsuz bir sevgiyle büyüten ve varlıklarıyla bana sonsuz bir güç veren, hayatımdaki en önemli iki insana ANNEM ve BABAM'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Prilokain (PRL) bölgesel anestezide sık kullanılan lokal anesteziktir. Göz içi cerrahisinde lokal anestezinin başarılı kullanımına rağmen kaza sonucu intravitreal enjeksiyon durumlarında lokal anesteziğin retina üzerinde toksik etkileri oluşabilmektedir. Bu çalışma, PRL toksisitesi tarafından aktive edilen sinyal iletim yollarını inceledi ve insan retinal pigment epitel (ARPE-19) hücrelerinde nitrik oksit sentaz-2 (NOS2) inhibisyonunun koruyucu rolünü belirledi.

Gereç ve Yöntemler: Hem PRL'nin toksik dozunu hem de bir NOS2 inhibitörü olan Asperglaucide'in (ASP) koruyucu etkinliğini belirlemek için toksisite analizi (MTT testi) yapıldı. Nükleer faktör kappa B p65 (NF- κ B p65), fosforile NF- κ B p65, fosfo AKT, NOS2, nitrotirozin, kesilmiş kaspaz-3 protein seviyeleri, immüno Floresan boyama ve/veya western blot analizi ile değerlendirildi. Interlökin-6 (IL-6) ve nitrozile protein seviyeleri ELISA ile ölçülürken, kaspaz -3 aktivitesi ve nitrit/nitrat seviyeleri florometrik bir yöntemle belirlendi.

Bulgular: NF- κ B p65, fosforile NF- κ B p65 ve fosforile AKT'nin PRL toksisitesinde önemli ölçüde arttığı gözlemlendi. Benzer şekilde, IL-6, NOS2, nitrit/nitrat ve nitrotirozin seviyeleri, kontrollere kıyasla PRL uygulanan hücrelerde önemli ölçüde daha yüksekti. ASP'nin PRL ile muamele edilmiş hücrelere uygulanması, NF- κ B p65, fosforile edilmiş NF- κ B p65 ve fosforile edilmiş AKT'yi önemli ölçüde azalttı. IL-6, NOS2, nitrit/nitrat ve nitrotirozin seviyeleri de PRL kaynaklı toksisitede ASP tedavisini takiben önemli ölçüde geriledi. Kaspaz-3'e bağlı apoptotik yolda aktivasyon gözlenmedi.

Sonuç: Bu çalışma insan retinal epitel hücrelerinde PRL toksisitesine bağlı NF- κ B p65 aracılı sinyal yolu aktivasyonunu gösterdi ve ASP'nin koruyucu etkinliğini belirledi.

Anahtar Kelimeler: Prilokain, nükleer faktör kappa B p65, nitrik oksit sentaz-2.

ABSTRACT

Objectives: Prilocaine (PRL) is a commonly used local anesthetic. Despite the successful use of regional anaesthesia for intraocular surgery, toxic effects of local anesthetics can occur on the retina in cases of accidental intravitreal injection. This study examined signal transduction pathways activated by PRL toxicity and determined the protective role of nitric oxide synthase-2 (NOS2) inhibition in human retinal pigment epithelial (ARPE-19) cells.

Materials and Methods: Toxicity analysis (MTT test) was performed to determine both the toxic dose of PRL and the protective efficacy of ASP, a NOS2 inhibitor. Nuclear factor kappa B p65 (NF- κ B p65), phosphorylated NF- κ B p65, phospho AKT, NOS2, nitrotyrosine, cleaved caspase-3 protein levels were evaluated by immunofluorescence staining and/or western blot analysis. Interleukin-6 (IL-6) and nitrated protein levels were quantified by immunoassay, while caspase -3 activity and nitrite/nitrate levels were measured via a fluorometric method.

Results: It was observed that NF- κ B p65, phosphorylated NF- κ B p65 and phosphorylated AKT were significantly increased in PRL toxicity. Likewise, IL-6, NOS2, nitrite/nitrate and nitrotyrosine levels were significantly higher in PRL-treated cells compared to controls. Application of ASP to PRL treated cells significantly reduced NF- κ B p65, phosphorylated NF- κ B p65 and phosphorylated AKT to basal levels. IL-6, NOS2, nitrite/nitrate and nitrotyrosine levels were also considerably decreased following ASP treatment in PRL-induced toxicity. No activation was observed in the caspase-3-dependent apoptotic pathway.

Conclusions: NF- κ B p65-mediated signal transduction pathway is activated due to PRL toxicity and can be down regulated by ASP. Supported by a grant from TÜBİTAK #121S194 and BAP# TYL-2022-5989.

Key Words: Prilocaine, nuclear factor kappa B p65, nitric oxide synthase-2.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Göz Anatomisi	3
2.1.1. Göz Küresinin Tabakaları	3
2.2. Retina	4
2.2.1. Retina Pigment Epiteli	6
2.2.2. Retina Pigment Epitel Hücresinin Fonksiyonel Özellikleri	6
2.3. Göz Cerrahisinde Rejyonal Anestezi	6
2.4. Oftalmik Anestezi için Sınıflandırma	7
2.4.1. Retrobulbar Anestezi	7
2.4.2. Peribulbar Anestezi	9
2.4.3. Sub-Tenon's Anestezi	11
2.5. Lokal Anestezikler	13
2.5.1. Lokal Anesteziklerin Tanımı	13

2.5.2. Lokal Anesteziklerin Etki Mekanizması	13
2.5.3. Lokal Anesteziklerin Fizikokimyasal Özellikleri	14
2.5.4. Lokal Anesteziklerin Farmokinetikleri	17
2.5.5. Lokal Anesteziklerin Yan Etkileri	17
2.6. Prilokain	18
2.6.1. Prilokainin Kimyasal Yapısı	18
2.6.2. Prilokainin Farmakokinetiği	19
2.6.3. Prilokainin Organ Sistemine Etkisi ve Toksisitesi	20
2.7. Metabolik Yolaklar	21
2.7.1. Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B Yolağı)	21
2.7.1.1. IL-6 Ekspresyonu	23
2.7.1.2. Nitrik Oksit Salınımı ve Protein Nitrasyonu	24
2.7.2. Fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K) /Akt Sinyal Yolağı	26
2.8. Asperglaucide	28
3. GEREÇ ve YÖNTEM	29
3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	29
3.1.1. Hücre Besiyerinin Hazırlanması	29
3.1.2. Hücrelerin Çözülmesi ve Kültür Başlangıcı	29
3.1.3. Hücrelerin Pasajlanması	29
3.1.4. Hücrelerin Dondurulması	30

3.2. Hücre Tedavi Protokolleri ve Canlılık Analizi	31
3.2.1. Retina Pigment Epitel Hücrelerinde Prilokain Toksisitesinin Oluşturulması	31
3.2.2. Nitrik Oksit Sentaz-2 İnhibitör Doz Çalışması	31
3.2.3. Hücre Canlılığı Deneyi	31
3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması	32
3.4. İmmünofloresan Boyama	32
3.5. Nitrik Oksit Oluşumunun Belirlenmesi	34
3.6. Kaspaz-3 Aktivitesinin Belirlenmesi	34
3.7. Protein Nitrasyonun Belirlenmesi	35
3.8. Fosforile Edilmiş NF- κ B p65 Protein Seviyelerinin Belirlenmesi	35
3.9. İnterlökin-6 Seviyelerinin Belirlenmesi	35
3.10. Protein Ölçümleri	35
3.11. İstatistiksel Analiz	36
4. BULGULAR	39
4.1. Hücre Canlılığı Analizi ve Asperglaucide'nin Koruyucu Etkinliğinin Değerlendirilmesi	37
4.2. İnterlökin-6, NF- κ B p65 ve fosforillenmiş NF- κ B p65 Seviyelerinin Belirlenmesi	39
4.3. Nitrik Oksit ve Nitrotirozin Düzeylerinin Belirlenmesi	40

4.4. Fosfo-Akt Düzeylerinin Belirlenmesi	41
4.5. Kaspaz Aktivitesinin Belirlenmesi	42
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	50
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	57



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Göz küresinin anatomisi	3
Şekil 2.2. Retinanın tabakaları	5
Şekil 2.3 Retrobulbar anestezi şeması	8
Şekil 2.4. Peribulbar anestezi şeması	10
Şekil 2.5. Sub-Tenon's anestezi şeması	12
Şekil 2.6. Lokal anesteziklerin kimyasal yapısı	15
Şekil 2.7. Prilokainin kimyasal yapısı	19
Şekil 2.8. NF- κ B sinyal iletim yolağının aktivasyonu	23
Şekil 2.9. IL-6 ekspresyonu	24
Şekil 2.10. NOS2 ekspresyonu ve protein nitrasyonu	25
Şekil 2.11. PI3K/Akt sinyal iletim yolağının aktivasyonu	27
Şekil 2.12. Asperglaucide'in kimyasal yapısı	28
Şekil 4.1. RPE hücrelerinde MTT analizi ile hücre canlılığının değerlendirilmesi	38
Şekil 4.2. RPE hücrelerinde IL-6, NF- κ B p65 ve pNF- κ B p65 seviyeleri	40
Şekil 4.3. RPE hücrelerinde NOS2 ve nitrotirozin seviyeleri	41
Şekil 4.4. RPE hücrelerinde p-AKT immüno Floresans düzeyleri	42
Şekil 4.5. RPE hücrelerinde kesilmiş kaspaz-3 protein immüno Floresans ve aktivite düzeyleri.	43
Şekil 4.6. NF- κ B ve PI3K/Akt yollarının aktivasyonu	44

SİMGELER ve KISALTMALAR

7-AAD	: 7-amino-aktinomisin D
ARPE-19	: İnsan retina pigment epiteli
ASP	: Asperglaucide
BCR	: B hücresi reseptörü
CTCF	: Düzeltilmiş toplam hücre floresansı
DAN	: 2, 3-diaminonaftilen
DEVD-AFC	: Asp-Glu-Val-Asp-7 amino-4-triflorometil kumarin
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
FBS	: Fetal sığır serumu
FITC	: Floresan izotiyosiyanat konjugatı
IKK	: İkB kinazlar
IL-1	: İnterlökin-1
IL-6	: İnterlökin-6
LD50	: Yarı maksimum sitotoksik etki
LPS	: Lipopolisakkarit
MAPK	: Mitojenle aktive olan protein kinaz
MTT	: 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difenil tetrazolyum bromür

NF-κB p65	: Nükleer faktör kappa B p65
NGS	: Normal keçi serumu
NO[•]	: Nitrik oksit
NO₂⁻	: Nitrit
NO₂Tyr	: Nitrotirozin
NO₃⁻	: Nitrat
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NOS1	: Nitrik oksit sentaz-1
NOS2	: Nitrik oksit sentaz-2
NOS3	: Nitrik oksit sentaz-3
O₂^{-•}	: Süperoksit anyonu
ONOO⁻	: Peroksinitrit
PDK1	: Fosfatidilinositol 3-bağımlı kinaz
PI3K	: Fosfoinositid 3-kinaz
PIP2	: Fosfatidilinositol-4, 5-bifosfat
PIP3	: Fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfat
PKB	: Protein kinaz B
pKa	: İyonizasyon sabiti

PRL	: Prilokain
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
RPE	: Retina pigment epiteli
TCR	: T hücresi reseptörü
TNF-α	: Tömür nekroz faktör α
TNFR	: Tümör nekrozis faktör reseptörleri
TLR	: Toll benzeri reseptörü
TLR2	: Toll benzeri reseptör 2
TLR3	: Toll benzeri reseptör 3
Tyr	: Tirozin

1. GİRİŞ

Erişkinlerdeki göz ameliyatlarının çoğu lokal anestezi altında yapılır (C. Kumar ve Dowd, 2008). Lokal anestetik ilaçlar sinir zarını geçer, iyonize olur ve voltaj kapılı hızlı sodyum kanallarına bağlanarak aksiyon potansiyelinin yayılmasını engeller (Boublik ve ark., 2016). Lokal anestetik ajanlar, uygun konsantrasyonlarda sinir liflerinde uyarı iletimini geri dönüşümlü olarak durdurur. Birçok lokal anestetik, amino esterler ve amino amidler olmak üzere iki genel kimyasal sınıfa ayrılır (Wang ve ark., 2021). Amide bağlı lokal anestetiklerin metabolizması, ester bağlı anestetiklere kıyasla daha fazla adım içerir ve daha uzun sürer. Sonuç olarak, amid ajanları kullanıldığında ilaç birikiminden ve plazma seviyelerinde yükselmeden kaynaklanan toksisitenin ortaya çıkması daha olasıdır (Martin-Flores, 2013). Oftalmik cerrahide kullanılan amid grubu lokal anestetiklerin örnekleri arasında lidokain (Cabral ve ark., 2021), PRL (Pilger ve ark., 2021) ve bupivakain (Hamid ve ark., 2022) bulunur. Lokal anestetik seçimi, etki hızına, blok süresine ve istenen etki gücüne bağlı olarak yapılır. Bu üç özellik, sırasıyla ilacın ayrışma sabitine (pKa; birleşmiş ve iyonize moleküllerin 50:50 olduğu pH), protein bağlama kapasitesine ve ilacın lipid çözünürlüğüne bağlıdır (Wang ve ark., 2021). Prilokain, stabil ve suda çözünür bir hidroklorür tuzu olarak ticari olarak temin edilebilir. Prilokainin pKa'sı 7.9'dur ve normal doku pH'sı 7.4'te yaklaşık %75 iyonize olur. Bu nedenle suda çözünebilir ve kabul edilebilir bir hızda anestezi başlangıcı ile dokuya yayılabilir. Prilokainin lipid çözünürlüğünün diğer lokal anestetiklere göre daha düşük olduğu bildirilmektedir. Prilokainin protein bağlanmasının da (%55) benzer lokal anestetiklere göre daha düşük olduğu bildirilmektedir (Moore ve Hersh, 2010).

Oftalmik cerrahide lokal anestezi terimi, lokal anestetik göz damlalarının basit topikal uygulamasından iğne bazlı bölgesel enjeksiyon tekniklerine kadar çeşitli farklı teknikleri tanımlar. Yaygın olarak kullanılan lokal anestetik enjeksiyon teknikleri arasında Sub-Tenon anestezisi, retrobulbar ve peribulbar anestezi yer alır (McRae ve Presland, 2020). Sub-Tenon'un tekniği, anestezi uygulanmış konjonktivada çok küçük bir kesi yapılmasını, önceden kavisli körleştirilmiş bir iğnenin Sub Tenon boşluğu arasındaki boşluğa geçişini ve ardından anestetik uygulanmasını gerektirir (McRae ve Presland, 2020). Retrobulbar anestezi, iğnenin göz küresi altına sokulduğu bölgesel bir anestezi sinir bloğudur. İğne göz küresinin arkasındaki boşluğa ulaşmak için içeri

ve yukarı doğru hedeflenir. Peribulbar anestezi için alt göz kapağından lokal anestezikler de uygulanabilir (McRae ve Presland, 2020). Bulbar enjeksiyonlar akinezi sağlar, böylece glob hareketini engeller ancak retrobulber hemoraji, glob ponksiyonu, optik sinir hasarı, kas felci, subaraknoid boşluğa enjeksiyon ve retinal vasküler tıkanıklıklar gibi ciddi komplikasyonlarla ilişkili olabilir (Lai ve ark., 2005). Lokal anesteziklerin toksisitesi hayatı tehdit edici olabilir ve intravasküler enjeksiyon veya aşırı doz ile ortaya çıkar (Chua ve ark., 2021). Anestezik maddelerin kazara intravitreal enjeksiyonu durumlarında ciddi oküler komplikasyonlar bildirilmiştir (Lincoff ve ark., 1985; Hoffman ve Fine, 1997; Wadood ve ark., 2002). Ayrıca intravitreal lokal anestezik uygulamasının retina üzerinde in vitro toksik etkileri bildirilmiştir (Grosskreutz ve ark., 1999; Olmez ve ark., 2005).

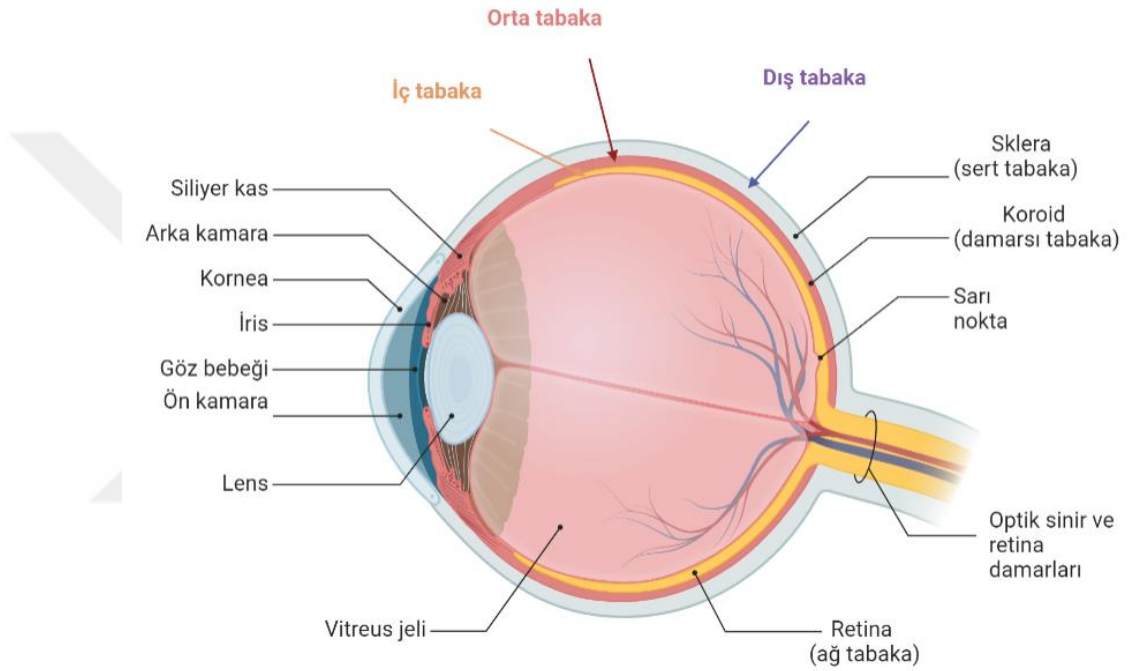
Prilokain, günümüzde bölgesel anestezi için en sık kullanılan lokal anesteziklerden biridir (Manassero ve Fanelli, 2017). Yakın zamanda bir sıçan PRL toksisite modelinde artan merkezi sinir sistemi NF- κ B p65 ve NF- κ B p50 ekspresyonları gösterilmiştir (Akgül ve ark., 2021). Bilindiği gibi, NF- κ B p65 inflamatuvar yolu, indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS; NOS2) enziminin ekspresyonunu artırır (Pautz ve ark., 2010).

Bu çalışmada ARPE-19 hücrelerinde PRL toksisitesinin indüklediği inflamatuvar sinyal iletim yolları araştırılmıştır. Daha önceki çalışmalarda kornea, nöral retina, retinal glial hücreler ve retina pigment epitel hücrelerinde NOS2 enzimi gösterilmiştir. (Aslan ve ark., 2006; Aslan ve ark., 2007). Nitrik oksit kaynaklı sitotoksosite, retinada apoptoza ve protein nitrasyonuna neden olur (Aslan ve ark., 2014) ve protein nitrasyonu hücre protein yapılarını bozarak hücre fonksiyonlarını etkiler (Aslan ve ark., 2008). Asperglaucide, *P. aurantiacum*'dan izole edilen bir aurantiamiddir (Suhas ve Channe Gowda, 2012) ve lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılan mikrogliya hücrelerinde NOS2 üretimini engellediği bildirilmiştir (Yoon ve ark., 2014). Asperglaucide'in bu etkisinin, LPS ile indüklenen fare BV2 mikrogliyal hücrelerinde NF- κ B ve mitojenle aktive olan protein kinazların (MAPK'ler) inhibisyonu yoluyla meydana geldiği gösterilmiştir (Yoon ve ark., 2014). Asperglaucide'in PRL toksisitesi tarafından oluşabilecek inflamatuvar sinyal iletim yolları üzerindeki olan etkisi bilinmemektedir. Retinal pigment epitel hücrelerinde PRL toksisitesinin neden olduğu inflamasyon üzerinde ASP'nin düzenleyici bir etkisinin olabileceği hipotezi kurulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Göz Anatomisi

Göz, insan vücudunda bulunan en karmaşık yapıya sahip organlardan biridir (Willoughby ve ark., 2010). Göz küresi, kafatası içinde orbitalara yerleşmiş halde bulunur ve üç tabakadan meydana gelir. Bu tabakalar dıştan içe doğru tunica fibrosa bulbi (dış tabaka), tunica vasculosa bulbi (orta tabaka) ve tunica interna bulbi (iç tabaka) şeklinde sıralıdır (Malkoç, 2006).



Şekil 2.1. Göz küresinin anatomisi (Almeida ve ark., 2011)'den uyarlanarak modifiye edilmiştir.

2.1.1. Göz Küresinin Tabakaları

Tunica Fibrosa Bulbi (Dış Tabaka): Göz küresinin en dış kısmında yer alan, koruyucu özellikteki fibröz tabakanın 5/6'sı gözün arka kısmında bulunan sklera, 1/6'sı ise gözün ön kısmında bulunan korneadan meydana gelir (Kaderli ve ark., 2021). Sklera, kollajen liflerin yapısında bol bulunmasından dolayı beyaz renge sahip, kalın ve oldukça dayanıklı bir tabakadır. Aynı zamanda kamaralar içinde oluşan hidrostatik basınca karşı direnç göstererek göz küresinin şeklini korur. Gözün ön kısmının 1/6'sını oluşturan kornea, ışınların göze ulaştığı dış tabaka kısmının çıkıntılı yapıya sahip

bölgesidir. Kalın ve saydam bir yapıdadır (Malkoç, 2006). Kornea, saydamlık özelliğini kan damarlarının olmaması, az miktarda su içermesi ve kollajen liflerinin paralel olarak dizilmesi sonucunda kazanır (Kaderli ve ark., 2021).

Tunica Vasculosa Bulbi (Orta Tabaka): Retina ve sklera arasında bulunan kalın, damarsal yapıda özelliğe sahip olan bir tabakadır (Malkoç, 2006). Yoğun pigmente sahip bu tabaka önden arkaya doğru iris, korpus siliare ve koroid olarak bir ayrım gösterir. İris, stromasında bulunan pigment granül miktarı ile gözün rengini belirler. Orta kısımda oluşturmuş olduğu pupilla açıklığı sayesinde göze giren ışık yoğunluğunu etkiler. İris ve koroid arasında bulunan korpus siliare, düz kas lifleri ve bağ dokudan oluşur. Korpus siliare, yakın mesafeye bakışta lensin kırıcılık özelliğini arttırmayı yönetir (Kocaçal ve ark., 2021). Koroid, gözün arka kısmını kaplayan, ince, vasküler ve koyu kahvrenge yapıda bir dokudur. Çoğunlukla yoğun kapiller pleksuslardan oluşmuş içerisinde kan damarları bulunan pigmentli yapıda olan bir tabakadır (Malkoç, 2006).

Tunica Interna Bulbi (İç Tabaka): Nöral tabaka ya da retina olarak da bilinen göz küresinin en iç kısmında bulunan ışığa en hassas tabakadır. Retina, iki katlı bir yapıdadır. Dış kısımda bulunan tek katlı yapı retina pigment epiteli (RPE), iç kısımda bulunan yapı ise nörosensöriyel retina adını alır (Willoughby ve ark., 2010). Retina, göz küresine düşen görüntünün veya görsel uyaranların elektrik sinyallerine dönüştürülmesinden ve optik sinir yoluyla iletilmesinden sorumludur (Singh ve Singh, 2012).

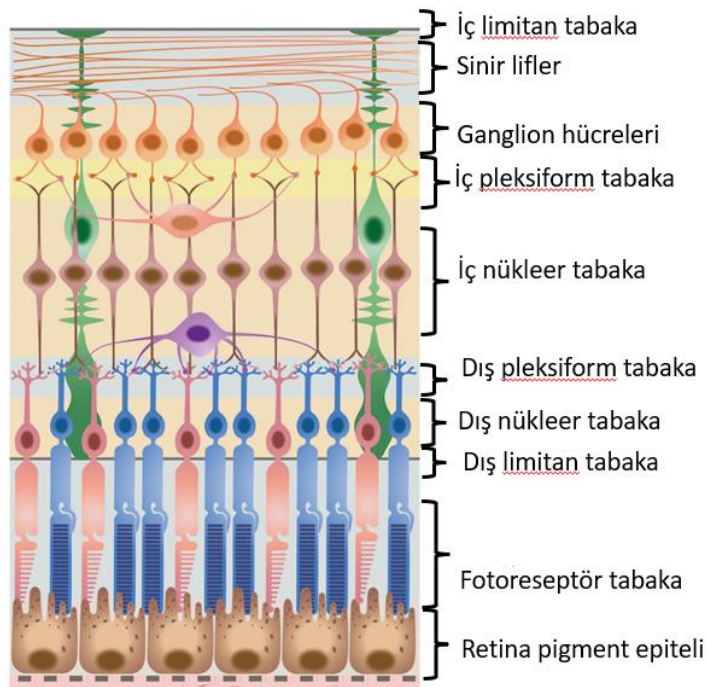
2.2. Retina

Göze gelen görüntünün algılanıp işlenmesi doğrultusunda oksipital kortekse gönderilmesinde görevli en önemli tabaka olarak bilinen retina tabakasının iç yüzeyi vitreus, dış yüzeyi ise potansiyel boşluk ve RPE ile temas halinde bulunur. Retina temel olarak 2 kısımda incelenir;

1. Nörosensöriyel tabaka
2. Retina pigment tabakası (RPE)

Retinanın dış kısımdan iç kısma doğru tabakalarının sıralaması şekil 2.2.'de gösterilmiştir (Altıntaş, 2013).

- 1- Retina Pigment Epiteli
- 2- Fotoreseptör tabaka
- 3- Dış limitan tabaka
- 4- Dış nükleer tabaka
- 5- Dış pleksiform
- 6- İç nükleer tabaka
- 7- İç pleksiform tabaka
- 8- Ganglion hücreleri
- 9- Sinir lifler
- 10- İç limitan tabaka



Şekil 2.2. Retinanın tabakaları (Ferrara ve ark., 2021)'den uyarlanarak modifiye edilmiştir.

2.2.1. Retina Pigment Epiteli

Yapısında melanin pigmenti içeren RPE, Bruch membranı üzerinde bulunur ve nörosensöriyel tabaka ile koroid arasında yer alır (Altıntaş, 2013). Retina pigment epitel hücreleri tek sıra halinde dizilerek küboidal hücrelerden oluşmuştur. Bu hücreler birbirleriyle ‘junctional kompleks’ adında sıkı bağlantılar kurar. Kurulan bu sıkı bağlantılar sayesinde kan-retina bariyeri oluşur. Retina pigment epitelinin birçok fonksiyonu olmasına rağmen başlıca fonksiyonu kan-retina bariyerinden sorumlu olmasıdır (Lakkaraju ve ark., 2020).

2.2.2. Retina Pigment Epitel Hücrelerinin Fonksiyonel Özellikleri

Retina pigment epitel hücrelerinin, gözün gelişimi ve fonksiyonu için önemli rolü vardır (Altıntaş, 2013). Retina pigment epitel hücrelerinin görevleri tam olarak bilinmemekle birlikte görme fonksiyonu ve retina hücrelerinin metabolik işlevlerinde önemli görevleri olduğu bilinir. Bu görevlerden başlıcaları şunlardır (Winkler, 2008):

1. Fotoreseptör dış segment fagositozu
2. Kan-retina bariyeri
3. Transepitelyal transport
4. Görsel siklus ve A vitamini metabolizması
5. Oksidatif strese karşı koruma
6. İmmün fonksiyon
7. Büyüme faktörleri ve sitokin salınımı

2.3. Göz Cerrahisinde Rejyonal Anestezi

Oftalmik cerrahide genel olarak topikal, lokal ve rejyonal anestezi kullanılır (Canan ve Çertuğ, 2015). Son yıllarda oftalmik cerrahi uygulaması için rejyonal anestezi teknikleri daha çok popüler hale geldi. Genel anestezi sırasında meydana gelebilecek risk oluşumunun rejyonal anestezide daha düşük olması, hızlı olarak anestezik etkinin oluşması, akinezi ve analjezinin yeterli seviyede gerçekleşmesi gibi avantajlar rejyonal anestezinin gittikçe daha fazla ön plana çıkmasına yol açtı (Parness ve Underhill, 2005). Bu sebeplerden dolayı birçok anestezi uzmanı ve cerrah oftalmik cerrahi uygulamalarında rejyonal anesteziyi kullanmaktan yanadır (Ripart ve ark., 2005). Analjezi ve akinezinin güvenli ve etkili olabilmesi için yaygın olarak kullanılan

enjeksiyon teknikleri arasında retrobulbar, peribulbar ve sub-tenon anestezisi yer alır (McRae ve Presland, 2020).

2.4. Oftalmik Anestezi İçin Sınıflandırma

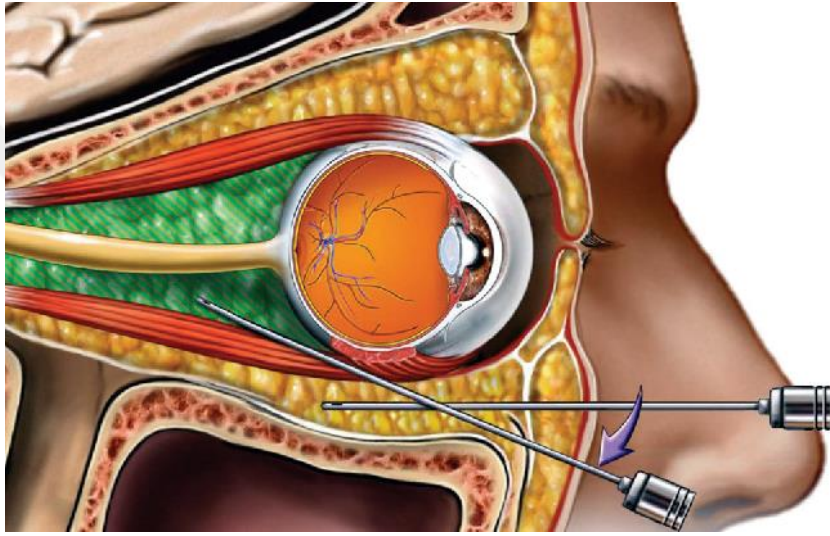
Gözde cerrahi bir operasyon geçirecek olan hastalara genel veya lokal anestezi uygulanarak cerrahi işlem gerçekleştirilir. Lokal anestezi yöntemleri dörde ayrılır. Bunlar; infiltrasyon anestezi, topikal anestezi, iletim veya sinir bloğu anestezi ve son olarak intrakameral anestezidir. Bu teknikler arasından günümüzde en yaygın ve sık kullanılanı infiltrasyon tekniğidir. İnfiltrasyon tekniği de kendi içinde retrobulbar anestezi, peribulbar anestezi ve sub-tenon anestezi olarak ayrılır (Jaichandran, 2013).

2.4.1. Retrobulbar Anestezi

Retrobulbar anestezi tekniği ilk kez 1884 yılında Knapp tarafından uygulanmıştır. Bu uygulama sırasında anestetik solüsyon olarak kokain kullanılmıştır (Altman ve ark., 1985). 1955 yılında Atkinson, retrobulbar anestezi tekniğinin detaylarını ileri sürerek modern uygulama sürecini başlatmıştır (Atkinson, 1953). 1981 yılında kadavraların orbitaları üzerinde bilgisayarlı tomografi kullanılarak yapılan çalışmalar neticesinde uygulama sırasında kullanılan iğne özellikleri ve bakış yönünde bazı modifikasyonlar yapılmıştır. Eskiden doku hasarının daha az olacağı düşünüldüğünden ucu künt ve daha ince çapa sahip iğneler kullanıma tercih edilirdi. Günümüzde ise keskin uca sahip iğnelerle az ağrı ve çok daha az doku hasarı meydana gelmektedir (C. M. Kumar, 2006; Alhassan ve ark., 2008).

Retrobulbar anestezi, duyu sinirlerini ve okülomotor siniri arka intrakonal kompartmanda bloke etmeyi amaçlamaktadır. Rektus kasları intrakonal bölümde yer aldığından dolayı blokaj sonucu akineziler meydana gelebilir ancak üst oblik kası ekstrakonal kısımda olduğundan biraz hareket görülebilir. Retrobulbar anestezi uygulanırken hastanın irisi tam orta hatta olacak şekilde ve hareketsiz halde karşıya bakar pozisyonda olmalıdır. Bu pozisyonda iğne elmacık kemiğine yakın olacak şekilde alt temporal orbital kenar kısmından lateral kantus ile lateral limbus bölgeleri arasından yarı mesafeden girilir. Uygulama sırasında iğne orbital tabanına 10° açı olacak şekilde ve iğnenin ucu gözün orta bölgesini geçene kadar yavaşça ilerletilir. Ardından iğne kemik ve kemik zarından kaçınarak medial kısma yönlendirilir. Bu yönlendirme sonucu iğne makula bölgesinin arkasındaki bir noktaya ulaşmış olur. İğnenin orta kısmı iris ile aynı hizaya geldiğinde iğnenin ucu intrakonal boşluğa doğru

gelir ve sonrasında göz küresinin 4-5 mm arkasına yerleşir. Bu uygulama sonucu iğnenin yerleşmesiyle aspirasyon yapılır ve sonrasında 2-5 ml lokal anestezik maddenin enjekte edilmesiyle bloklama gerçekleşmiş olur. Uygulama sırasında kullanılan iğneler keskin yapıda, 25 ya da 27 gauge çapında olmalıdır. Optik sinirlerden kaçınmak amacıyla 31 mm'den daha uzun olmamalıdır (Yanoff ve Duker, 2018).



Şekil 2.3. Retrobulbar anestezi şeması (Kandavel, 2009)'den alınmıştır.

Kullanım Alanları:

1. Enükleasyon cerrahileri (gözün cerrahi olarak çıkarılması işlemi)
2. Evisserasyon cerrahileri (göz küresinin içindeki dokuların boşatılması işlemi)
3. İntraoküler cerrahi işlemleri (katarakt, vitrektomi)
4. Göze tüp veya stent yerleştirilmesi

Kullanılamama Durumları:

1. Kullanılacak olan lokal anestezik maddeye karşı allerji olma durumu
2. Uygulama yapılacak olan bölgede enfeksiyon durumu (de Alba ve ark., 2021).

Rölatif Kontrendikasyon Durumları:

1. Antikoagülan kullanımı olduğu durumlar
2. Tiroid ilişkili orbitopati
3. Aksiyal uzunluğun artmış olduğu durumlar
4. Kanama diyatezi (Yao ve ark., 2004).

Avantajları ve Dezavantajları:

Avantajları; anestezinin en iyi şekilde oluşturulması ve akinezi için güvenilir özellikte olması, genel anestezi ile karşılaştırıldığında olası risklerin ortadan kalkmasına yol açması, peribulbar anestezi tekniğine göre daha az miktarda anestezi madde verildiğinden dolayı daha az kemozise neden olması ve etkinin başlama süresinin peribulbar anesteziye göre daha kısa olması şeklinde sıralanabilir (Feibel, 1985; Hay ve ark., 1991; Parness ve Underhill, 2005).

Dezavantajları ise; yan etki oranının yüksek olması, görme işlevi kaybının peribulbar anesteziye göre daha fazla olması ve tekniğin ağırlı olması şeklinde sıralanabilir (Blanc ve ark., 1983).

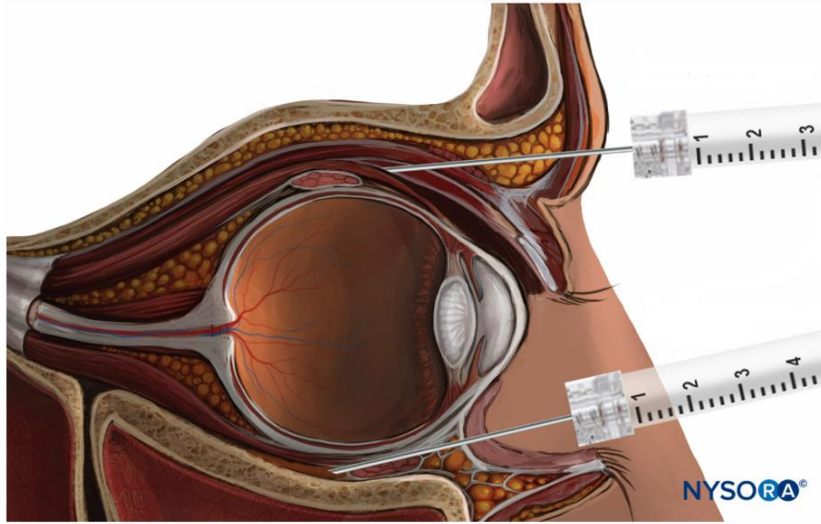
Olası Komplikasyonlar:

Minimal düzeyde görülen komplikasyonlar ile karşılaşıldığı zaman operasyon durdurulabilir. Buna karşın ağır düzeyde komplikasyonlar hayatı tehdit edici boyutta olabilir. Genelde %1-3 oranında komplikasyonlar meydana gelir. Bu gibi sebeplerden dolayı anestezistin operasyonu takibi ve müdahalesi tavsiye edilir. Retrobulbar hemoraji, görme keskinliğinde azalma, pulmoner ödem, solunum depresyonu, retinal vasküler oklüzyon olası komplikasyonlara örnek verilebilir. (Hamilton, 2000).

2.4.2. Peribulbar Anestezi

Peribulbar tekniği ilk kez 1986 yılında Davis ve Mandel tarafından açıklanmıştır (Davis ve Mandel, 1986). Daha sonra Bloomberg peribulbar anestezi tekniğinde bazı modifikasyonlar yapmıştır. Yapılan tüm modifikasyonlarda globdan uzağa yönlendirilme yapılarak kısa boylu iğne kullanımı esas alınmıştır. Sağlamış olduğu anestezi ve akinezi bakımından retrobulbar anestezi tekniği ile bir farkı yoktur (Alhassan ve ark., 2008).

Peribulbar anestezi tekniğinin temel prensibi lokal anestezik maddenin kas konusu dışına (ekstrakonal) doğru verilmesi ve optik sinirden uzak kalmaktır. Bundan dolayı yüksek hacim özelliği gösteren anestezikler ve basınç aleti ile uygulama yapılmalıdır. Retrobulbar anestezi tekniğine göre peribulbar anestezi için daha kısa uzunlukta iğneler kullanılmaktadır. Uygulama şakakaltından alt orbital kenardan olacak şekilde lateral kantus ile lateral limbus bölgelerinin ortasından yapılır. Enjeksiyon yapılmadan önce göz primer bakış yönünde hazır olmalıdır. Uygulama sırasında kullanılan iğneler 25 veya 27 gauge çapında olmalıdır. Bu iğneler orbital tabana paralel şekilde alt orbital çaptan 2,5 cm derine doğru ilerletilerek aspirasyon ardından enjeksiyon yapılır. Enjeksiyondan 5-10 dk sonrasında akinezi değerlendirilmesi yapılır. Hem iç rektus hem de üst oblik kasın rezidüel aktivitesine göre yetersiz akinezi gelişebilme ihtimaline karşı ikinci enjeksiyon gerekebilir. İkinci enjeksiyon sırasında 25 gauge çapında 2,5 cm iğne ile mediyal kantus ve karunkül bölgeleri arasından girilir. Daha sonra iğne posteriora doğru yönlendirilir. Son olarak mediyal check ligamentten içeri girerek bu noktada 3-10 ml anestezik madde ile bloklama işlemi gerçekleştirilir. Fazla miktarda anestezik madde kullanılması ve anesteziğin ekstrakonale verilmesi sebebiyle 20-30 dk boyunca honan balonu veya masaj yöntemiyle basınç uygulaması yapılır (McGrath ve Bradshaw, 2013).



Şekil 2.4. Peribulbar anestezi şeması (Prineas, 2013)’den alınmıştır.

Endikasyonları ve Kontrendikasyonları:

Endikasyonları retrobulbar anestezi tekniği ile benzerdir. Kontrendikasyonları ise aksiyal uzunluğun artmış olması dışında retrobulbar anestezi tekniği ile ortaktır (Calenda ve ark., 2000).

Avantajları ve Dezavantajları:

Avantajları; komplikasyonların meydana gelme riskinin retrobulbar anesteziye göre daha az olması, uygulama sırasında hissedilen ağrının az olması, işlem sırasında ve işlemten sonra amorozis gelişmiyor olması şeklinde sıralanabilir.

Dezavantajları ise; teknikte birden fazla sayıda enjeksiyon gerekme durumu, retrobulbar anestezi tekniğine kıyasla daha fazla miktarda anestezi ajan kullanılması, anestezi etkisinin 30 dakikaya kadar süren zaman diliminde başlayabilmesi ve periorbital ekimoz ve kemozis gelişebilme durumları şeklinde sıralanabilir.

Olası Komplikasyonlar:

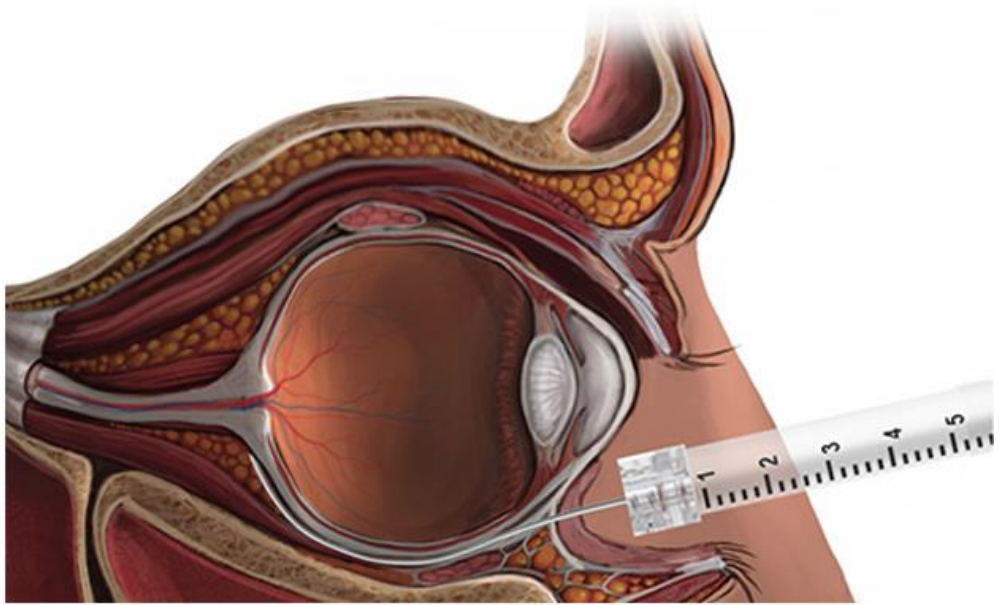
Olası komplikasyonlar retrobulbar anesteziye görülen komplikasyonlar ile aynı olmasına rağmen peribulbar anestezi de komplikasyon oranının daha düşük olduğu bilinmektedir. (C. M. Kumar, 2006).

2.4.3. Sub-Tenon's Anestezi

Sub-Tenon's anestezi tekniği ilk olarak 1992'de Stevens tarafından tanımlanmıştır. Bu tarihten itibaren oftalmoloji alanında lokal anesteziye kullanılmaktadır (Stevens, 1992). 1997 yılında MR tekniği ile yapılan görüntülemelerde subtenon boşluğa az miktarda uygulanan enjeksiyon ile anestezi maddenin bu bölgede yayılarak analjezi ve anestezi oluşturması, optik sinir hattında sensoryel blokaja yol açtığı bilinmektedir. Uygulamada kullanılan anestezi ajan, transkonjunktival yol ile subtenon boşluğa uygulanır. Kullanılan diğer tekniklerde görülen risklerden subtenon tekniği ile kaçınılır. Subtenon anestezi tekniği çeşitli alanlarda kullanılır. Buna örnek olarak katarakt cerrahisi, trabekülektomi, şaşılık cerrahisi, vitreoretinal cerrahi verilebilir (Roman ve ark., 1997).

Bu teknik kullanılırken ilk olarak lokal anestezi bir madde damlatılarak konjunktiva uyuşturulur. Uygun steril ortam hazırlanarak hastanın yukarı ve dışa doğru baktırılması sağlanır. Vorteks ven hasarının minimal düzeyde olması hedeflendiğinden limbusun 3 mm alt nazal bölgesinden, konjunktiva forseps kullanılarak tutulur ve

cerrahi makas yardımıyla konjunktiva ve tenona insizyon yapılır. Bu işlemten sonra subtenon bölge makas ile diseke edilir. Uygulamada kullanılan iğne sert, 19 gauge çapında 33 mm olan ve künt uçlu, metal yapıda yarım ay şeklinde olmalıdır. Bu iğne yardımıyla insizyondan girilir. İğne ekvatora ulaştığında skleral tenon bağlantılara ulaştığından dolayı dirençle karşılaşılır. İğne yavaş şekilde ilerletilirken enjeksiyon yapılmaya başlanır ve böylece dokular kenara itilmiş olur. Böylece iğnenin ilerlemesi de sağlanmış olur. İğne ilerledikten sonra hızlıca enjeksiyon yapılır. Diseksiyon konjunktivadan başlar ve açık skleraya kadar devam ettirilir (Tsuneoka ve ark., 1993). Subtenon anestezi uygulaması için kullanılan anestetik maddenin miktarı ile ilgili literatürde var olan bilgiler 0,25-5 ml arasında değişmektedir. Yaygın olarak tercih edilen bu teknikte minör komplikasyonlar diğer tekniklere göre daha fazla görülürken majör komplikasyonlar retrobulbar ve peribulbar anesteziye daha sık görülmektedir (El-Hindy ve ark., 2009).



2.5. Sub-Tenon's anestezi şeması (<https://www.vrmny.com/procedures/subtenon-injection/>, Erişim tarihi; 20.11.2022)'den alınmıştır.

Endikasyonları ve Kontrendikasyonları:

Endikasyon ve kontrendikasyonları retrobulbar/peribulbar anestezi tekniği ile benzerdir.

Avantajları ve Dezavantajları:

Avantajları; ciddi komplikasyonların meydana gelmemesi, göz içinde oluşan basıncın diğer tekniklere kıyasla daha az oluşması, uygulamanın daha az ağrılı olması, etkisinin 60 dakikaya yakın devam etmesi, göz küresinin cerrahın isteğine göre kolayca hareket ettirilebilir olması, az miktarda anestezi madde kullanılması şeklinde sıralanabilir.

Dezavantajları ise; operasyon sırasında her zaman steril koşulların mutlaka sağlanmasının gerekliliği aksi durumlarda enfeksiyon riskinin ortaya çıkma durumu, kullanılan anestezi maddenin tenon kapsülü içine enjekte edildiği durumlarda anestezi maddenin etkinliğinin azalması şeklinde sıralanabilir (C. M. Kumar, 2006).

Olası Komplikasyonlar:

Bu tekniğin kullanılmaya başlandığı tarihten şu ana dek 5000'e yakın subtenon anestezi uygulaması yapıldığı durumlarda sklera hasarı, glob perforasyonu ve bunlara ek olarak orbita hemorajisi gibi ciddi boyutta komplikasyonlarla karşılaşılmasına rağmen kemozis komplikasyonu ile karşılaşmaktadır. Bunun sebebi tenon kapsülünün kalın olduğu durumlarda subtenon boşluğa ulaşmak oldukça zor olduğundan dolayı enjekte edilen sıvının subkonjunktival bölgeye verilmesiyle kemozis meydana gelmektedir. Meydana gelen bu komplikasyon dikkatli şekilde diseksiyon ve doğru bölgeye enjeksiyon yapımıyla aşılabılır. Operasyondan önce uygulanacak işlemle ilgili stres yaşayan hastalarda ağrı ile karşılaşmakta fakat ağrının en fazla 1-2 dakika sürdüğü bilinmektedir (Rüschén ve ark., 2003).

2.5. Lokal Anestezikler

2.5.1. Lokal Anesteziklerin Tanımı

Anestezi, ağrı oluşumu yaratan uyarımların sinir yolları aracılığıyla geri dönüşümlü olarak bloke edilmesidir. Sinirlerde veya sinir uçlarındaki uyarımların oluşumuna geçici olarak engel olan kimyasal özellikteki maddelere lokal anestezikler denir (Gulec ve ark., 2004).

2.5.2. Lokal Anesteziklerin Etki Mekanizması

Lokal anestezik özelliği gösteren maddelerin etki mekanizması; aksiyon potansiyellerini düzenleme görevi olan voltaj bağımlı sodyum kanallarını baskılaması ve aksonal aksiyon potansiyelinin bloğunu kullanarak gerçekleştirmesine dayanmaktadır (Hollmann ve ark., 2004). Sodyum kanalları, plazma membranına bağlı

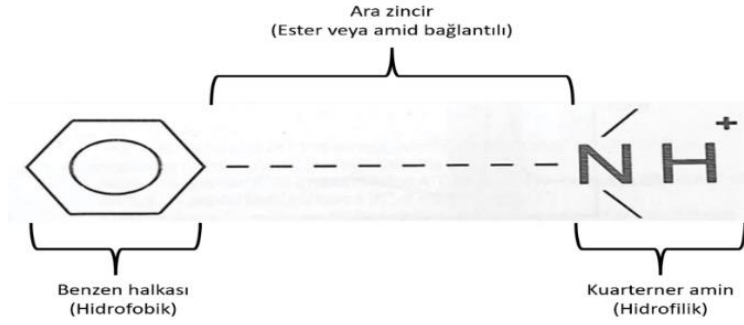
olan zar proteinleridir. Lokal anestezikler, sodyum kanallarına bağlandıkları zaman, kanalın sodyuma karşı olan geçirgenliğini engellemiş olur. Bunun sonucunda da aksiyon potansiyeli başlangıcı ve yayılımı önlenmiş olur (Morgan Jr ve Mikail, 1996).

Erişkinlerdeki göz ameliyatlarının çoğu lokal anestezi altında yapılır (C. Kumar ve Dowd, 2008). Lokal anestezik ilaçlar sinir zarını geçer, iyonize olur ve voltaj kapılı hızlı sodyum kanallarına bağlanarak aksiyon potansiyelinin yayılmasını engeller (Boublik ve ark., 2016). Lokal anestezik ajanlar, uygun konsantrasyonlarda sinir liflerinde uyarı iletimini geri dönüşümlü olarak durdurur. Birçok lokal anestezik, amino esterler ve amino amidler olmak üzere iki genel kimyasal sınıfa ayrılır (Wang ve ark., 2021). Amide bağlı lokal anesteziklerin metabolizması, ester bağlı anesteziğe kıyasla daha fazla adım içerir ve daha uzun sürer. Sonuç olarak, amid ajanları kullanıldığında ilaç birikiminden ve plazma seviyelerinde yükselmeden kaynaklanan toksisitenin ortaya çıkması daha olasıdır (Martin-Flores, 2013). Amid grubunda bulunan lokal anestezikler; lidokain, mepivakain, bupivakain, etidokain, PRL, ropivakain ve levobupivakain şeklindedir. Ester grubunda bulunan ve yaygın olarak kullanılan anestezik ajanlar ise; prokain, 2-kloroprokain, tetrakain, kokain ve benzokaindir (Tetzlaff, 2000).

2.5.3. Lokal Anesteziklerin Fizikokimyasal Özellikleri

Lokal anestezik ajanların klinik alandaki etkileri kimyasal özellikleri ile bağdaşır. Kimyasal özellikleri anestezik maddenin etki gücü ve süresi hakkında yol göstericidir. Lokal anestezik maddeler kimyasal yapılarına göre üç gruba ayrılır (Strichartz ve ark., 1990).

1. Hidrofobik kısım
2. Hidrofilik kısım
3. Ester ya da amid yapılı zincir kısmı



2.6. Lokal anesteziklerin kimyasal yapısı (Mumba ve ark., 2017)'den uyarlanarak modifiye edilmiştir.

Hidrofobik aromatik halka kısmı lipid moleküllerinin çözünürlük seviyelerinin arttığı kısımdır. Lipidlerin çözünürlük seviyelerinin artması sinir kılıflarına yönelik difüzyonu kolaylaştırır. Lokal anesteziğin maddenin potansi ve etki süresi çözünürlük seviyesinin artması ile ilişkilidir. Sinir membran yapıları ve bağ doku membran yapıları lipoprotein özelliği taşımaktadır. Yağda erime özelliği yüksek olan lokal anesteziğin maddeleri bu membranlardan kolay şekilde geçiş yapar ve bu durum için daha az moleküle gereksinim duyar. Lokal anesteziğin maddelerden bupivakain ve tetrakain yağda erime özelliği en yüksek olan lokal anesteziğin maddeleridir. İkinci sırada lidokain yer alır. Lidokainin ardından mepivakain gelir. Yağda erime özelliği en düşük olan lokal anesteziğin ise prokaindir (Heavner, 2007).

Hidrofilik tersiyer amin grubu kısmı, lokal anesteziğin maddenin hem suda hem yağda çözünebilir yapıda olmasını sağlayan kısımdır (Altın, 2014).

Hidrofobik ve hidrofilik kısım arasındaki bağlantıyı sağlayan ester (-CO) ya da amid (-NHC) özelliği gösteren zincir yapı, lokal anesteziklerin sınıflandırılmasında temel etki gösterir (Kocamanoğlu ve Sarihasan, 2007).

Lokal anestezikler ana zincir yapısının amid ya da ester özellik göstermesine göre ikiye ayrılır.

1. Amid lokal anestezikler; lidokain, ropivakain, PRL, levobupivakain, mepivakain, etidokain, dibukain, bupivakaindir. Amid grubunda olan bu ilaçların metabolize olması karaciğer aracılığıyla yavaş şekilde gerçekleşir. Bu grupta yer alan lokal anestezikler nadiren allerjik reaksiyon gösterir. Toksisitesi ester grubundaki ilaçlara

göre daha fazladır. Etki başlangıcı hızlı şekilde gerçekleşir. Nötr pH'dan düşük bir pH'a sahiptir.

2. Ester lokal anestezikler; klorprokain, kokain, prokain, benzokain ve tetrakain şeklinde sıralanabilir. Bu grupta bulunan lokal anestezik maddeler para-aminobenzoik asit türevi olarak bilinir. Bu ilaçlar plazma kolinesterazı aracılığıyla hızlı şekilde metabolize olurlar. Amid lokal anesteziklere göre daha fazla allerjik özellikleri vardır. Toksisite oranı amid grubundaki ilaçlara göre daha düşüktür. Işık, ısı gibi faktörlerden etkilenirler. Etki başlangıcı oldukça yavaş gerçekleşir. Nötr pH'dan yüksek bir pH'a sahiptir (Subramaniam ve Tennant, 2005; Heavner, 2007).

Lokal anestezik maddelerin fizikokimyasal özellikleri, kimyasal yapısındaki gruplara göre belirlenir (Kocamanoğlu ve Sarihasan, 2007). Amino ester bağlı yapıdaki lokal anestezik ilaçların ilk örneği prokain, amino amid yapıdaki lokal anestezik ilaçların ilk örneği ise lidokaindir (Heavner, 2007). Bu iki grup arasında fizikokimyasal özellikleri bakımından ciddi farklılıklar vardır. Ester yapıdaki lokal anestezik maddeler solüsyonlar içerisinde stabil özellik göstermezken amid yapılı lokal anestezik maddeler stabil özellik gösterir. Bu sebepten dolayı ester yapıdaki lokal anesteziklerin yarılanma ömrü amid yapılı lokal anesteziklere göre daha kısadır ve yüksek sıcaklıklara olan duyarlılıkları daha fazladır (Strichartz ve ark., 1990). Lokal anestezik maddeler zayıf baz olarak bilinir. Hidrofilik veya bunun dışında nötral formda bulundukları söylenebilir. Lokal anestezikler enjeksiyon yapılacağı sırada kuarterner yapıda bulunur ve suda çözünebilir haldedir. Bu özelliklere sahipken nöron membranından geçme imkanları yoktur. Lokal anestezik maddenin hangi formda olacağını dokunun pH değeri ve iyonizasyon sabiti (pKa), proteine bağlanma gücü ve bunlar dışında disosiasyon sabiti belirler. Lokal anestezik ajanın etkisi, fizyolojik pH'da tersiyer yapıda olması ve yağda çözünebilir forma dönüşmesi ile başlar. Lokal anestezik maddelerin tümünün pKa değeri 8,0-9,0 aralığında olmalıdır. Dokunun bir sebeple asidotik olmasıyla birlikte kuarterner formda gittikçe bir artış gözlenir ve buna bağlı olarak nöral hücrelere doğru geçiş yapan lokal anestezik maddenin miktarı azalmış olur. Benzer şekilde dokunun pH değerinin yükselmesi ve bazik özelliğin görülmesi yağda çözünme özelliği gösteren tersiyer formun artmasına ve bununla birlikte nöronların membranından geçecek olan lokal anestezik maddelerin miktarlarında artış yaşanmasına sebebiyet verir (Borgeat ve Aguirre, 2010).

2.5.4. Lokal Anesteziklerin Farmokokinetikleri

Absorbsiyon: Lokal anesteziklerin uygulama alanları müköz membranlar ve cilt altı bölgeleridir. Aynı zamanda dokulara da enjekte edilebilir. Müköz membranlarda lokal anesteziklere karşı zayıf bir bariyer olmasından dolayı anestezik maddenin etkisi hızlı bir şekilde başlar. Bu durumun tersine eğer lokal anestezinin, bariyeri sağlam bir deriden geçişi söz konusu ise; yüksek su çözünürlüğü gerekir. Analjezi oluşması için ise lipid çözünürlüğü yüksek seviyede olan lokal anestezik maddenin bazının olması gerekir. Enjeksiyonu yapılan lokal anestezik maddelerin sistemik emilimi kan akımı ile ilişkilidir. Kan akımının etkilendiği bazı faktörler vardır. Bunlar;

1. Enjeksiyon yeri: Sistemik emilimin hızı lokal anestezinin enjekte edildiği bölgenin damarlanması ile orantılıdır.
2. Vazokonstriktör kullanımı: Adrenalin eklenmesi sonucu vazokonstriksiyon oluşur ve absorpsiyon yavaşlar. Bunun sonucu emilimde azalma meydana gelir ve nöronlara geçiş artar. Etki süresinde uzama ve toksik etkilerde azalma görülür.

Dağılım: Lokal anestezik maddelerin çoğunluğu plazmada proteinlere bağlanır. Bir kısmı ise eritrositlere doğru hareket ederek dokular tarafından tutulur. Uzun etkili amid yapılı lokal anesteziklerde genelde proteine bağlanma görülür. Lokal anestezik maddelerin bağlanma yaptığı proteinler alfa (α) 1-asit glikoprotein ve albümindir. Bu anesteziklerin kan beyin bariyerini aşması oldukça kolaydır. Mideden absorbe olamazlar.

Metabolizma ve Atılım: Ester yapıda olan lokal anestezikler, plazma ve eritrositlerde kolinesterazlar yardımıyla hızlı bir şekilde hidrolize olur. Amid yapıdaki lokal anestezikler ise karaciğerde amid hidrolizi, dealkilasyon ve bu yollara ek olarak aromatik hidroksilasyon ile yıkılır. Yıkım sonucu oluşan ürünlerin atılımı böbreklere olur (Kocamanoğlu ve Sarihasan, 2007).

2.5.5. Lokal Anesteziklerin Yan Etkileri

Uygulama sırasında kaza sonucu intravasküler ya da intratekal olarak enjeksiyon yapılması ile veya ilaç uygulanırken doz miktarının aşılması sonucu bazı toksik etkiler görülebilir. Bunun dışında lokal anesteziklerin bazılarında spesifik toksik etkiler de meydana gelebilir. Buna ester yapıdaki lokal anesteziklerde görülen allerjik reaksiyonlar ve bunun dışında PRL vasıtasıyla meydana gelen methemoglobinemi

örnek olarak gösterilebilir. Lokal anesteziklerin yan etkisi olarak ortaya çıkan toksik reaksiyonlar dört başlığa ayrılır. Bunlar;

1. Sistemik toksisite
2. Allerji
3. Lokal toksisite
4. Methemoglobinemi

Sistemik toksisite: Yüksek plazma düzeyleri oluştuğunda, hızlı şekilde absorpsiyon gerçekleştiğinde veya yanlış intravasküler enjeksiyon sonucunda sistemik toksisiteler meydana gelebilir. Lokal anesteziklerin kortekte bulunan inhibitör etkinliği kaldırmalarıyla kortikal eksitabilitede artış meydana gelir ve eksitasyon bulguları arasında yer alan kulak çınlaması, bulantı, huzursuzluk, baş dönmesi gibi yan etkiler görülebilir.

Allerji: Ester yapıya sahip lokal anestezik maddelerde görülür. Reaksiyona sebebiyet veren paraaminobenzoik asittir (PABA). Bunun sonucunda allerjinin lokal anestezik ile bir ilişkisi olmasa da allerji görülebilir. Oluşan yan etkiler ciltte görülen basit reaksiyonlardan anaflaksiye kadar değişim gösterebilir.

Lokal toksisite: Oldukça nadir görülen bir toksisitedir. Nöronlara direkt olarak ilaç enjekte etmemek için periferik sinir bloklarında kullanılan sinir stimülatörü eğer 0,1 miliamperde (mA) stimülasyona yanıt veriyorsa lokal anestezik ilaç enjeksiyonu yapılmamalıdır.

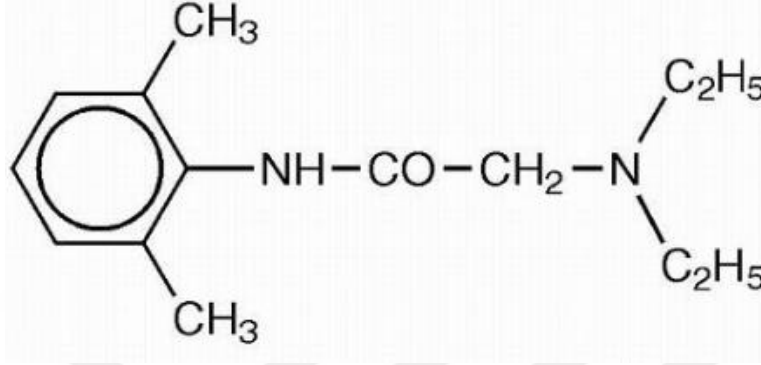
Methemoglobinemi: Prilokainin yüksek dozda kullanılması sonucu metabolitleri birikir ve hemoglobin methemoglobine dönüşür. Lokal anestezik özelliği taşıyan spreylerde kullanılan benzokain de aynı toksisiteye neden olabilir (Cummings ve ark., 2011).

2.6. Prilokain

2.6.1. Prilokainin Kimyasal Yapısı

Prilokain, 1953'te Löfgren ve Tegner aracılığıyla sentezlenmiştir. Klinikte ilk kullanımı ise 1960 yılında Eriksson ve Gordh tarafından gerçekleştirilmiştir. Kimyasal yapı olarak lidokaine benzerlik gösterir, farkı ise PRL'nin ksilen yerine toulene içermesi

olarak bilinir. Kimyasal adı α -npropylamine-2 methylpropionanide şeklinde tanımlanmıştır. Moleküler ağırlığı 220 g/mol'dür. İzotonik NaCl solüsyonları ve buna ek olarak suda yüksek erime kapasitesine sahiptir. Piyasada hidroklorür tuzu olarak bulunur. Proteinlere bağlanma oranı yaklaşık olarak % 40-55 oranındadır. Lipid partisyon katsayısı 0,4' dür. pKa değeri 7,9'dur (Manassero ve Fanelli, 2017)



2.7. Prilokainin kimyasal yapısı (Sarıtış, 2009)'dan alınmıştır.

2.6.2. Prilokain Farmakokinetiği

Farmakolojik olarak incelendiğinde en çok benzerlik gösterdiği anesteziik ilaç lidokaindir. Lidokaine kıyasla çok daha hızlı metabolize olur ve atılımı daha kolay gerçekleşir. Lidokainden daha az toksik etki gösterir. Bunun sebebi dağılım hacminin daha geniş olmasıdır. Etki süresi bakımından lidokainden daha uzun süre etkisi sürer. Prilokain amid sınıfı lokal anesteziik sınıfında yer alır. Orta düzeyde etkiye sahip, ısı, asit ve alkali gibi parametrelerden etkilenmeme özelliği gösteren stabil bir ilaçtır. Yaygın olarak topikal anesteziide olmakla birlikte birçok farklı alanda uygulanmaktadır (Esener, 2004).

Prilokain uygulamasının ardından en yüksek plazma konsantrasyonuna erişimi ve ilacın etki süresi; ilacın uygulandığı doza, uygulama şekline ve uygulama yapılan bölgedeki damar yoğunluğuna, ortamda bulunan sinirlerin anatomik yapısına ve yerleşimlerine göre değişim gösterir. Prilokain, amid grubunda bulunan diğer tüm lokal anesteziik ajanlar gibi uygulama gerçekleştikten sonra ilk olarak akciğerler ile etkileşime girer. Büyük oranda bir kısmı akciğerlerde tutulur ve böylece diğer organlar çok fazla miktarda lokal anesteziik maddeye maruz kalmamış olur. Akciğerlerde tutulan lokal anesteziik ilacın miktarı uygulanan ilaca göre değişim gösterir. Prilokainin akciğerlerde tutulumu lidokaine göre daha fazla miktarda gerçekleşir. Sisteme karışan

PRL'nin metabolize olması karaciğerde bulunan mikrozomal P-450 enzimleri sayesinde gerçekleşir. Karaciğer dışında akciğer ve böbreklerde de PRL'nin metabolize edilmesi söz konusudur. Prilokainin metabolize olması sonucu meydana gelen metabolitlerin atılımı yüksek oranda idrarla gerçekleşir. Çok az bir kısmı feçes yoluyla ya da böbreklerden atılır. Karaciğer fonksiyonlarında herhangi bir sıkıntı olduğunda ya da karaciğer kan akımının azalması sonucunda PRL metabolizması yavaşlar ve bu durum neticesinde sistemik toksisite riskinde artış görülür.

2.6.3. Prilokainin Organ Sistemlerine Etkisi ve Toksisitesi

Solunum Sistemi: Prilokain toksisitesine bağlı olarak apne gelişimi görülebilmektedir. Bu durum PRL'nin optik sinir kılıfına doğrudan enjekte edilmesi sonucunda gerçekleşmektedir. Huzursuzluk ve bunun yanında şuur kaybına yol açan bir durumdur.

Santral Sinir Sistemi: Lokal anesteziik maddelerden kaynaklanan toksisiteye duyarlı olan santral sinir sistemi, uyanık olan hastalarda toksik belirtilerin ilk fark edildiği yerdir. Prilokainin santral sinir sistemindeki toksisite durumları lokal anesteziik maddelerde görülen toksik etkiler ile aynıdır. Genelde ortaya çıkan yan etkiler; baş dönmesi, bulanık görme, kulak çınlaması gibi etkilerdir. Buna ek olarak ilacın uygulanan konsantrasyonunda bir artış söz konusu olduğunda kas seğirmeleri ve bilinç bulanıklığı meydana gelebilir (Sarıkartal, 2018).

Geçici Nörolojik Semptomlar: Prilokaine bağlı ortaya çıkan nörolojik semptomlar çoğu zaman bir haftalık bir süre sonunda düzelmektedir. Prilokainde nörolojik semptom gelişme ve görülme sıklığı diğer lokal anesteziiklerle karşılaştırıldığında daha düşüktür (Manassero ve Fanelli, 2017).

Kardiyovasküler Sistem: Prilokainin toksik olan dozu, kalp kasında bulunan sodyum kanallarının blokajına sebep olur ve otonom sinir sistemi inhibisyonunu ortaya koyar. Toksik olmayan normal doz aralığında herhangi bir yan etki ya da toksisiteye sebep olacak durumlarla karşılaşmaz.

İmmünolojik Sistem: Genelde lokal anesteziik ilaçlara duyarlı olan kişilerde allerjik reaksiyonlar, ödem, ciltte bazı lezyonlar meydana gelebilir.

Kas İskelet Sistemi: Prilokain maddesinin kasa doğrudan enjekte edilmesi miyotoksisite meydana gelmesine sebep olur.

İlaç Etkileşimleri: Simetidin, propranolol türevi ilaçlar hepatik klirensi azaltır. Bunun sonucunda da PRL'nin kan düzeylerinde artış görüleceğinden toksisite riskinde de artış meydana gelir. Bunun dışında sülfonamidler ve sıtma ilaçları tarzında methemoglobinemiye sebep olabilen ilaçlar PRL'nin yan etkisini arttırmış olur (Sarıkartal, 2018).

Methemoglobinemi: Prilokainin metabolize olması sonucunda meydana gelen metabolitleri, hemoglobini methemoglobine dönüştürür. Methemoglobin seviyelerinde artış görebilmek için yüksek dozlarda (900 mg ya da > 10 mg/kg) PRL uygulaması gereklidir (Akgül ve ark., 2021).

Üriner Retansiyon: Spinal anestezi uygulamalarının ardından sıklıkla karşılaşılan bir sorun olarak bilinir. Spinal anestezi sırasında kullanılan her lokal anestetik ajanda bu klinik sorun görülmesine rağmen, PRL'nin orta derecede etkili lokal anestetik sınıfına girmesinden dolayı diğer lokal anesteziklere göre üriner retansiyon daha az sıklıkla görülür (Manassero ve Fanelli, 2017).

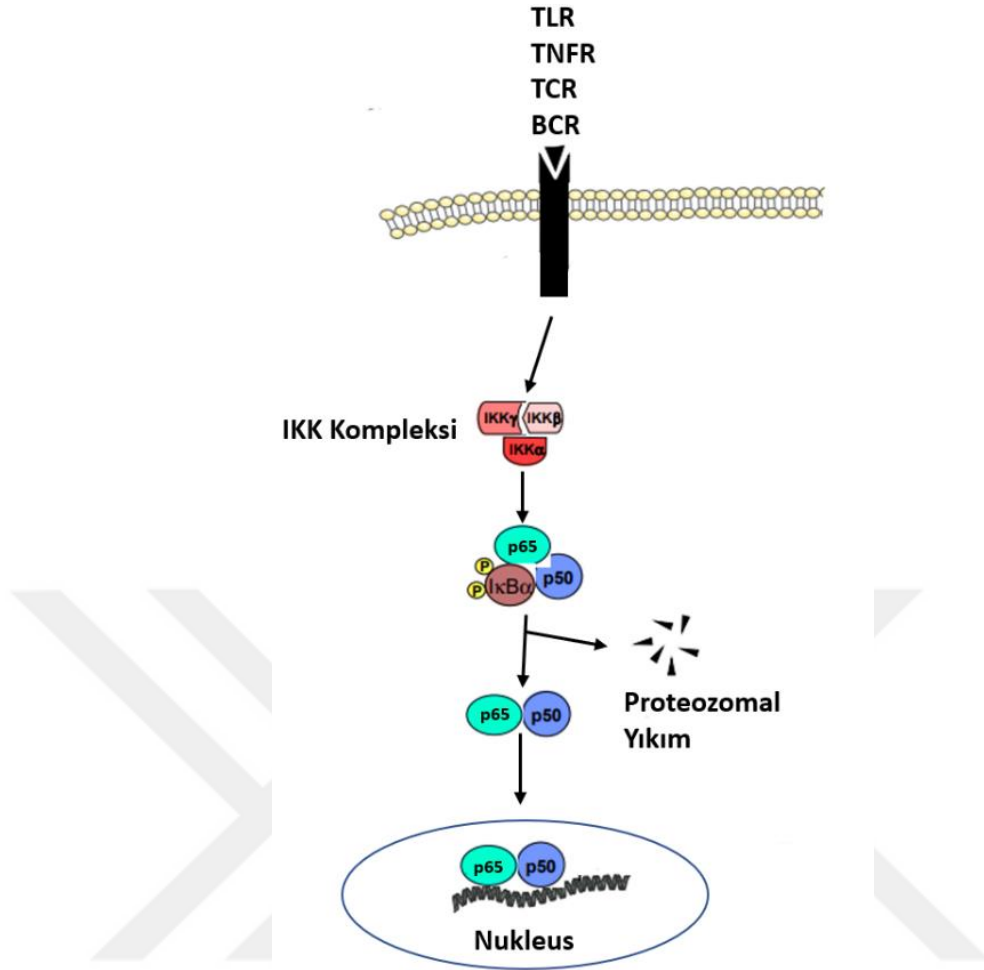
2.7. Metabolik Yolaklar

2.7.1. Nükleer Faktör Kappa B (NF-κB) Yolağı

NF-κB, immün ve inflamatuvar yanıtların farklı süreçlerinde yer alan geniş bir gen dizisini düzenleyen, indüklenebilir transkripsiyon faktörleri ailesini temsil eder. Bu aile, NF-κB 1 (p50), NF-κB 2 (p52), NF-κB 3 (RelA, p65), RelB ve bağlanma yoluyla hedef genlerin transkripsiyonuna aracılık eden c-Rel dahil olmak üzere yapısal olarak ilişkili beş üyeden oluşur (Liu ve ark., 2017). İndüklenebilir özelliğe sahip transkripsiyon faktörü olan NF-κB, çeşitli uyaranlara yanıt olmak üzere aktive olur. NF-κB'nin aktivasyonu üzerinde etkili olan birçok faktör vardır. Bunlar; sitokinler, oksidatif stres, kemokinler şeklinde örneklendirilebilir (Chen ve ark., 2003). NF-κB'nin en iyi şekilde karakterize edilmiş olan indükleyicileri arasında çeşitli sitokin reseptörlerinin ligandları, Toll benzeri reseptörler (TLRs), tümör nekrozis faktör reseptörleri (TNFR), T hücresi reseptörü (TCR) ve B hücresi reseptörü (BCR) dahil olmak üzere çeşitli uyaranlar bulunmaktadır (Liu ve ark., 2017). Bu indükleyiciler NFκB sinyal iletim yolunu aktive olmasını sağlayarak inflmasyonu, hücre

proliferasyonunu ve hücre sağkalımını indüklemektedir (Hayden ve Ghosh, 2014). Diğer taraftan NF- κ B, normal hücrelerde çok sık olmamakla birlikte aktif halde bulunur ve sadece belirli uyaranlar yardımıyla aktive olur. Böylece hedef genlerin transkripsiyonunu düzenler. Daha sonra belirli düzenleyici mekanizmalar NF- κ B'yi tekrar inaktif haline döndürür. Bu sebeple NF- κ B aktivasyonu indüklenebilir ve geçici bir süreç olarak tanımlanır (Karin, 1999).

NF- κ B sinyal iletim yolunun aktivasyonu, indükleyici uyaranların etkisi ile başlar. İndükleyici uyarı sayesinde I κ B proteinlerinin fosforile olmasına ve bozulmasına sebep olan IKK kompleksinin (I κ B kinaz) aktivasyonu ile sonuçlanır. Aktif hale gelen IKK kompleksi, I κ B alt birimlerinin fosforilasyonuna yol açar. Bu fosforilasyon, proteazomlar yardımıyla I κ B'yi işaretleyerek parçalanmaya sebep olur. Bu degradasyon sonucu NF- κ B (p50/p65) serbest kalır. Bunu takiben, NF- κ B proteinleri sitoplazmadan ayrılarak hedef dizilerine bağlandıkları ve aynı zamanda gen transkripsiyonunun aktive hale geldiği nukleusa taşınır. Nukleusa taşınan NF- κ B proteini, hedefi olan genlerin transkripsiyonunu gerçekleştirebilmek adına promotör DNA'ya spesifik olarak bağlanma gösterir (Hayden ve Ghosh, 2014). DNA'ya olan bağlanma sonrasında hücrenin hayatta kalması ve inflamasyon ile ilgili çok çeşit genlerin transkripsiyonu düzenlenir (Hoesel ve Schmid, 2013; Hayden ve Ghosh, 2014).

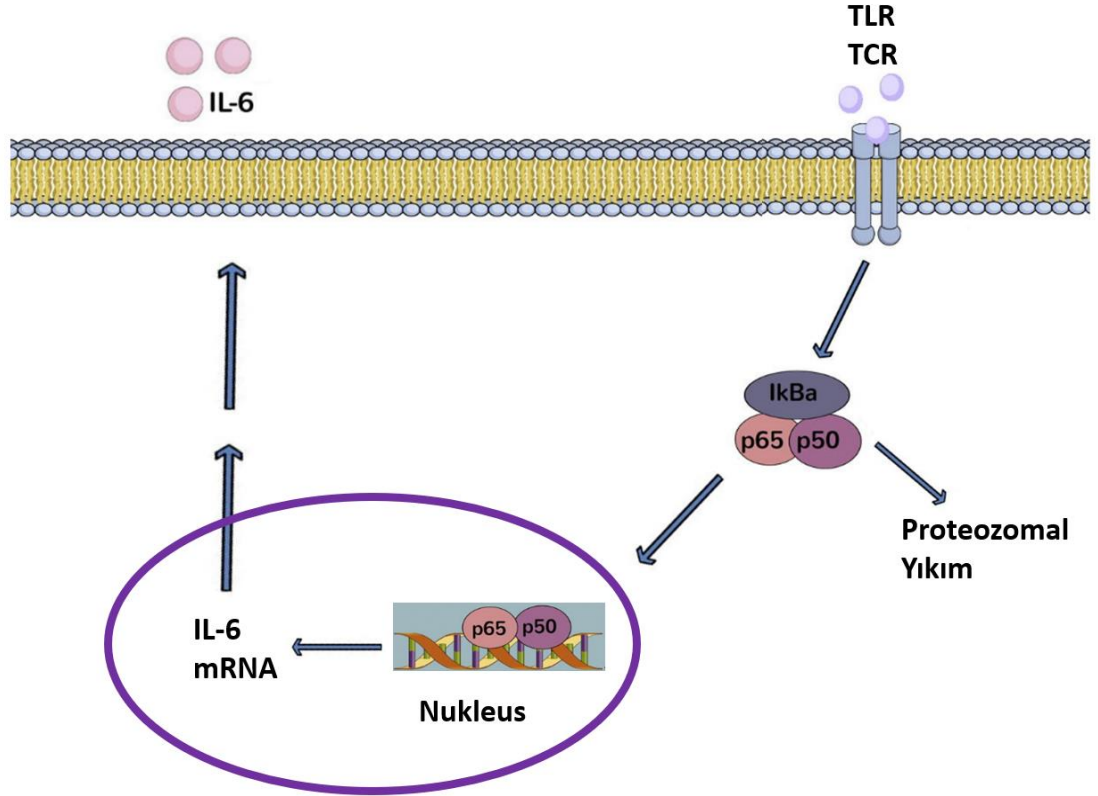


2.8. NF-κB sinyal iletim yolağının aktivasyonu (Baud ve Collares, 2016)'dan uyarlanarak modifiye edilmiştir.

2.7.1.1. IL-6 Ekspresyonu

İnterlökin 6, yaklaşık 26 kD ağırlığında ve içeriğinde 184 aminoasitin bulunduğu bir sitokindir. Monositler, fibroblastlar, mezenkimal hücreler ya da endotelial hücrelerce sentezlenirler (Kishimoto, 2015). İnterlökin 6, inflamasyon sonucunda yapılan düzenlemelerde, hücre çoğalmaları ve farklılaşmalarında, bağışıklık sistemi üzerindeki düzenlemelerde rol oynayan geniş biyolojik etkinliğe sahip bir sitokindir. Aynı zamanda IL-6'nın hücre siklusundaki devamlılığın sağlanmasında ve apoptoz inhibisyonunda etkili bir yeri olduğu bilinmektedir (Palomares ve ark., 2014).

NF- κ B sinyal iletim yolunun aktivasyonunda önemli role sahip olan indükleyiciler aynı zamanda IL-6'nın ekspresyonunda da görev alır. Toll benzeri reseptörler (TLRs) ve T hücresi reseptörleri (TCR) aracılığıyla aktive olan NF- κ B yolağını takiben IL-6'nın üretimi gerçekleşmektedir. NF- κ B'nin hedef geni olarak adlandırılan IL-6'nın ekspresyonunun gerçekleşmesinde NF- κ B sinyal iletim yolağının aktivasyonunun önemli bir rolü vardır (Keller ve ark., 1996).



2.9. IL-6 ekspresyonu (Castellani ve ark., 2016)'den uyarlanarak modifiye edilmiştir.

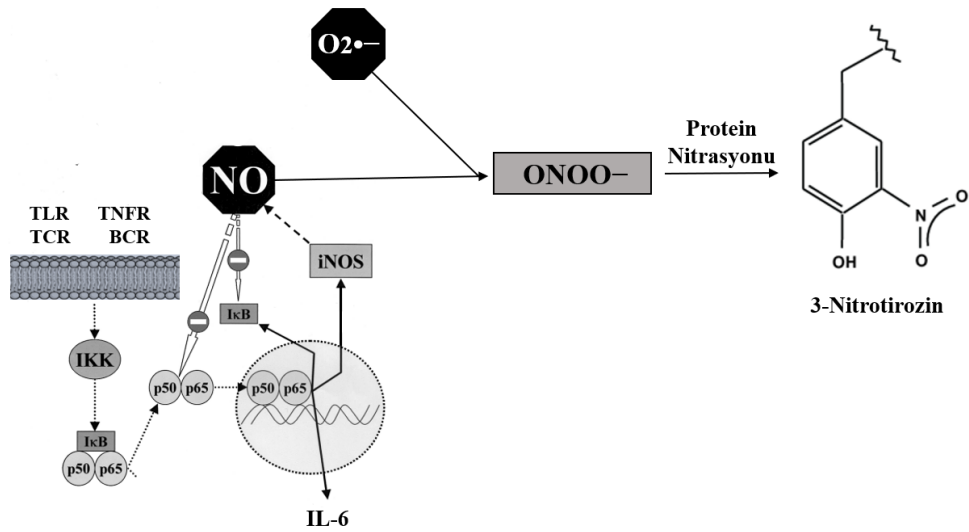
2.7.1.2. Nitrik Oksit Salınımı ve Protein Nitrasyonu

Nitrik oksit, lipidlere geçirgen özellikte ve serbest radikalleri bünyesinde taşıyan çeşitli biyolojik olaylarda rol alan bir moleküldür (Förstermann ve Sessa, 2012). Nitrik oksitin, trombosit agregasyonunu inhibe etmesi, kan basıncını düzenlemesi ve vasküler genişlemeyi sağlaması gibi fonksiyonları vardır. Nitrik oksit üretimi, nitrik oksit sentazlar (NOS) aracılığıyla gerçekleşmektedir. Nitrik oksit sentazlar, üç farklı izoforma sahiptir. Bunlar; periferel sinir sisteminde yer alan nöronal NOS (nNOS, NOS1), vasküler endotelde yer alan endotelial NOS (eNOS, NOS3), sitokin ve endotoksinler aracılığıyla indüklenebilen indüklenebilir NOS'dur (iNOS, NOS2). NOS1 ve NOS3'ün aktivasyonu için Ca^{2+} gerekliyken, NOS2'nin aktive olması için böyle bir gereklilik yoktur. NOS1 ve NOS3 ekspresyonunun düzenlenmesinde protein

fosforilasyonu yer alırken NOS2’de transkripsiyonel ve post transkripsiyonel düzenlemeler yer alır.

İndüklenebilir nitrik oksit sentazın, makrofajlar ve nötrofiller dahil olmak üzere birçok hücrede sentezi gerçekleşir. Hücrelerin içeriğinde fizyolojik şartlar altında NOS2 olmamasına rağmen, lipopolisakkaritler (LPS), tümör nekroz faktör α (TNF- α) ve interlökin-1 (IL-1) gibi sitokinlerle ya da NF- κ B transkripsiyon faktörleri ile uyarım sonucu ekspresyonu aktive olmaktadır (Król ve Kepinska, 2020).

İndüklenebilir nitrik oksit sentazın NF- κ B sinyal yolağı üzerinden eksprese olması ve düzenlenmesi oldukça önemlidir. Bunun sebebi inflamatuvar süreçlerde NF- κ B yolunun önemli bir bölge olmasıdır. NF- κ B, sitozolde aktif olmayan şekilde ve I κ B-NF- κ B kompleksi halinde bulunur. Bu kompleksin sitozolden nükleusa translokasyonu ve buna bağlı gelişen NOS2 geninin indüklenmesi NF- κ B sinyal yolağının aktivasyonunda görevli olan indükleyici ajanlar sayesinde gerçekleşir (Aktan, 2004).



2.10. NOS2 ekspresyonu ve protein nitrasyonu (Connelly ve ark., 2001; Upmacis, 2008)’den uyarlanarak modifiye edilmiştir.

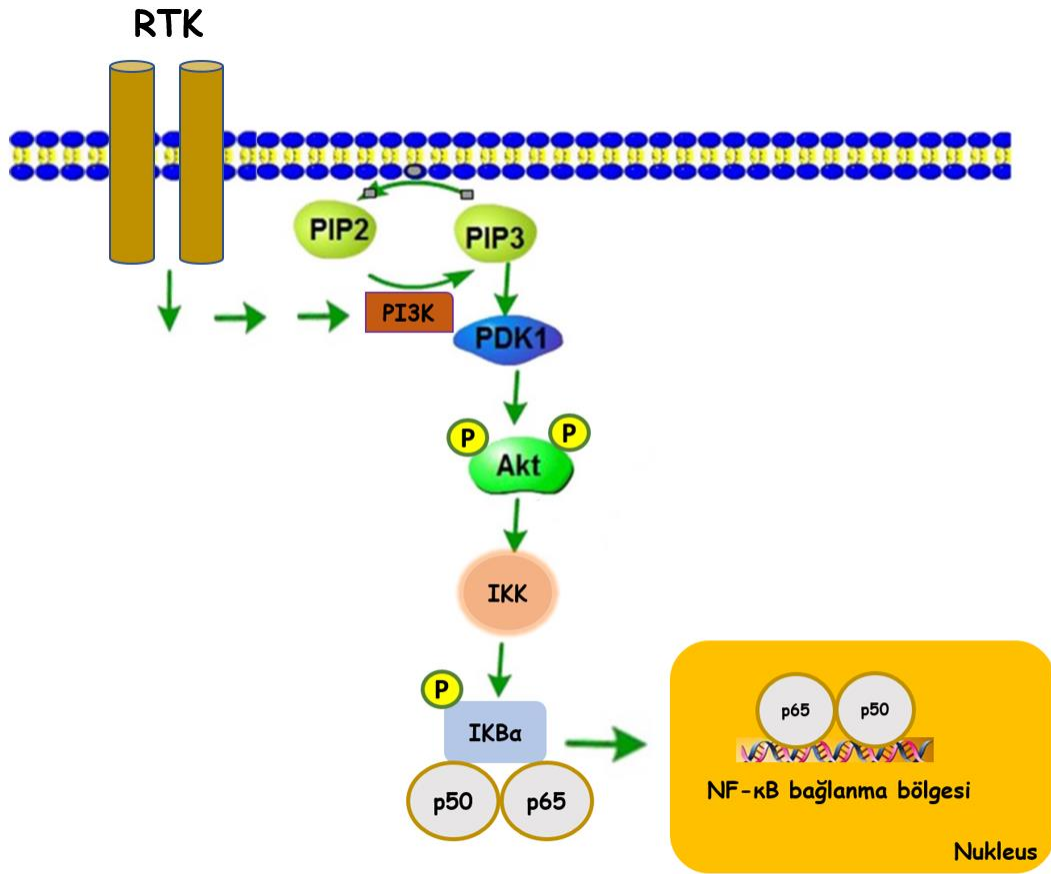
İndüklenebilir nitrik oksit sentaz tarafından yüksek miktarda üretilen NO, inflamasyonda önemli bir yere sahiptir. Antimikrobiyal, antitümör, antiviral etkileri olduğu belirtilmiştir. Antimikrobiyal aktivitesine hücrelerin ve mikropların üzerindeki toksisite oluşumu aracılık eder. Buna ek olarak birçok patolojik koşullarda NOS2

tarafından üretilmiş yüksek miktardaki NO, oldukça önemli reaktif nitrojen türlerinin (RNS) temel kaynağıdır (Lee ve ark., 2017).

Protein nitrasyon oluşumu, reaktif nitrojen metaboliti ile proteinlerdeki tirozin (Tyr) aminoasiti arasındaki reaksiyon üzerinden gerçekleşir. Reaksiyonun gerçekleşmesi üzerine tirozil fenol halkasının 3-pozisyonuna bir -NO₂ grubu eklenir ve reaksiyon sonuçlanmış olur. Fizyolojik ve patofizyolojik olarak, protein Tyr nitrasyonundan sorumlu olan reaktif nitrojen türleri NOS enzim ailesi tarafından sentezlenmiş NO üzerinden gelişir. Bundan dolayı, NOS2 ekspresyonunda görülen artışa bağlı olarak üretilen NO seviyeleri protein nitrasyonu oluşmasında oldukça etkin bir role sahiptir (Upmacis, 2008). Nitrik oksitin süperoksit anyonu (O₂^{•-}) ile difüzyonla sınırlı reaksiyonu sebebiyle, in vivo olarak yüksek oranda oksitleyici bir tür olan peroksinitrit (ONOO⁻) oluşur. Peroksinitrit, NO₂Tyr oluşumunda ve dolayısıyla sitotoksitede rol oynar (Aslan ve ark., 2014).

2.7.2. Fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K)/Akt Sinyal Yolağı

Fosfatidilinositol-3 kinaz/Akt sinyal iletim yolağı; metabolizma, büyüme, çoğalma ve bunların dışında apoptoz gibi birçok farklı hücrel sürecin düzenlenmesinde rol alan bir yoldur. Fosfatidilinositol 3 kinazlar (PI3K)'lar, hem yapıları hem de substratları ele alındığında üç sınıfa ayrılmış olan hücre içi lipid kinazlar olarak bilinir. Sınıf I PI3K'lar, reseptör tirozin kinazlar (RTK) varlığında ya da G-proteini kenetli reseptörler aracılığıyla fosfatidilinositol-4,5-bifosfat (PIP₂)'I, fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfat (PIP₃) haline getirmek üzere aktive edilir (Engelman ve ark., 2006). Fosfatidilinositol 3 kinazın hedef olarak seçtiği molekül serin/treonin kinaz Akt, diğer adıyla protein kinaz B'dir. Akt, genel olarak hücre proliferasyonundan ve hücre sağkalımından sorumlu olan bir serin/treonin protein kinaz enzimi olarak tanımlanabilir. Akt, fosfatidilinositol 3-bağımlı kinaz 1 (PDK1) yardımıyla fosforillenerek aktive hale gelir (Stokoe, 2005). PI3K/Akt sinyal yolu, bir hayatta kalma yolu olarak kabul edilir (Kauffmann-Zeh ve ark., 1997) ve Akt, IKK'nın fosforilasyonu ile NF-κB p65'in aktivasyonunu sağlayabilir. Bu durum da NF-κB'nin transkripsiyon aktivitesinde artışa yol açar (Ozes, 1999).

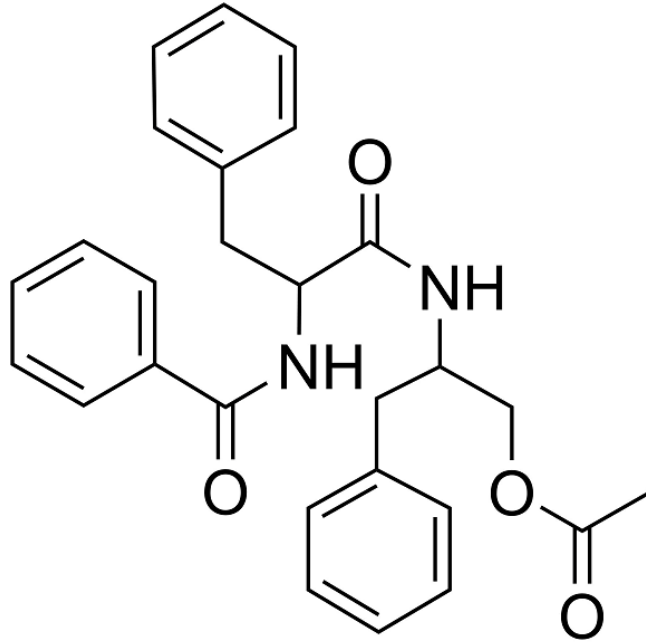


2.11. PI3K/Akt sinyal iletim yolağının aktivasyonu (Sui ve ark., 2014; Yang ve ark., 2019)’den uyarlanarak modifiye edilmiştir.

Hücre proliferasyonu, normal şartlar altında hücrelerin yaşam siklusu için gereklidir. Ancak aşırı proliferasyon gerçekleştiği zaman DNA’yı hedef alan karsinojen etkinliğe sebep olabilir (Preston-Martin ve ark., 1990). Apoptoz kavramı, hücre proliferasyonunu düzenleyen bir mekanizmadır ve bu mekanizmanın süreci farklı yollarla regüle edilebilir. Apoptoz, hücre membranında bulunan ölüm reseptörlerinin aktive olması ile başlar. Ölüm reseptörlerinin aktive olması başlatıcı kaspazlar olan kaspaz-8 ve 10’un aktive olmasına yol açar. Başlatıcı kaspazlar ise; kaspaz-3 gibi efektör kaspaz olarak tanımlanan kaspazları aktive eder. Efektör kaspazların aktivasyonu ise hücre için yaşamsal öneme sahip proteinlerin ayrıştırılmasına ve buna bağlı olarak hücre ölümüne sebep olur (Van Gurp ve ark., 2003).

2.8. Asperglaucide

Asperglaucide, *P. aurantiacum*'dan izole edilebilen ve antiinflamatuvar, antibakteriyel, antioksidan ve antikanser özelliklere sahip bir aurantiamiddir (Suhas ve Channe Gowda, 2012). Aurantiamid ve aurantiamid asetat, çeşitli biyolojik etkilere sahip, yemesi güvenli bir yeşillik olan semizotu'nun başlıca etkili bileşenleridir. Aurantiamid dipeptit bir yapıya sahiptir ve N-benzoilfenilalanin ve fenilalaninden oluşur (Banerji ve Das, 1975). Asperglaucide, lipopolisakarit (LPS) ile uyarılan mikrogliya hücrelerinde indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) üretimini inhibe eder (Yoon ve ark., 2014). Asperglaucide'in yapısı şekil 2.12.'de verilmiştir.



2.12. Asperglaucide'in kimyasal yapısı (<https://biomarmt.com/en/producto/cl0233/>, Erişim tarihi; 20.11.2022)'den alınmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.1.1. Hücre Besiyerinin Hazırlanması

Çalışmamızda ARPE-19 (ATCC® CRL-2302™) insan retina pigment epitel hücre hattı American Type Culture Collection tarafından sağlanmıştır (ATCC; Manassas, Virginia, USA). Hücreleri çoğaltmak için ATCC tarafından formülize edilen Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM): Ham's Nutrient Mixture (F-12), 1:1 (Gibco, Life Technologies Limited, Paisley, UK) kullanıldı. 500 ml'lik şişede bulunan besiyeri içerisine son konsantrasyonları %10 (v/v) olacak şekilde fetal bovin serum (FBS; Gibco, Life Technologies Corporation, Paisley, UK), %1 olacak şekilde penisilin-streptomisin (Gibco, Life Technologies, Grand Island, USA) ve 100 µl Amfoterisin-B (Gibco, Life Technologies Limited, Paisley, UK) eklenerek karışım hazır hale getirildi. Hazırlanan bu karışım 0.22 µm bottle-top filtreden geçirildi, steril hale getirildi ve +4°C'de saklandı.

3.1.2. Hücrelerin Çözülmesi ve Kültür Başlangıcı

Hücrelerin çoğaltımı 37°C'de %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren steril CO₂ inkübatöründe gerçekleştirildi. Hücrelerin %80-90 yoğunluğa ulaşma süresi 2-4 gün arasında gerçekleşti. Sıvı azot içerisinde donmuş olarak bulunan hücre vialini çıkartmadan önce hazırlanan besiyeri 37°C su banyosunda ısıtıldı ve böylece hücrelerin çoğalması için gerekli olan sıcaklığa getirildi. Sıvı azot tankından çıkarılan hücre viali 37°C su banyosunda hafif şekilde sallanarak çözülmesi sağlandı ve hücre viali %70 alkol ile silinerek laminar flow kabine alındı. Bu aşamadan sonra yapılan bütün işlemler aseptik koşullar altında gerçekleştirildi. 9 ml önceden ısıtılmış besiyeri üzerine 1 ml hücre aktarıldı. Hücreler 125 x g'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Sonrasında besiyeri ile resüspansiyon yapılarak 25 cm² flasklara aktarıldı ve 37°C CO₂ inkübatörüne kaldırıldı.

3.1.3. Hücrelerin Pasajlanması

ARPE-19 hücreleri %80-90 yoğunluğa ulaştıkları zaman %0,05 tripsin-EDTA (Gibco, Life Technologies Limited, Paisley, UK) ile tutundukları flaskın yüzeyinden kaldırıldı ve yeni flasklara pasajlandı. Pasajlama işlemine başlamadan önce gerekli miktarda besiyeri, tripsin-EDTA ve steril fosfat tampon salin (PBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis,

MO, USA) 37°C su banyosuna koyularak hücrelerin çoğalması için uygun sıcaklığa getirildi. Pasajlanacak flastaki hücrelerin morfolojisine ve yoğunluğuna mikroskop altında bakıldı. Ardından hücre flastı %70 alkol ile silinerek laminar flow kabin içine alındı. Bu aşamadan sonraki bütün adımlar sıkı aseptik koşullar altında gerçekleştirildi. İlk olarak hücre flastındaki var olan eski besiyeri yavaşça flastan uzaklaştırıldı. Tripsin-EDTA'nın etkisini en iyi şekilde gösterebilmesi için 5-10 ml steril PBS flastın köşesinden yavaşça eklendi ve PBS flast içinde birkaç dakika kadar bekletilerek atıkların temizlenmesi sağlandı. Flast yüzeyine tutunmuş hücreleri kaldırmak için 25 cm² flastka yaklaşık 3 ml olacak şekilde, 75 cm² için yaklaşık 9 ml olacak şekilde 37°C su banyosunda önceden ısıtılmış tripsin-EDTA eklendi. Tripsin-EDTA eklenen flast yaklaşık 5 dakika kadar 37°C CO₂ inkübatöründe bekletildi ardından mikroskop altında kontrol edildi ve hücrelerin tümünün kalktığından emin olduktan sonra flast tekrar %70 alkol ile temizlenerek laminar flow kabin içerisine alındı. Eklenen tripsin-EDTA miktarının iki katı olacak şekilde besiyeri flastka ilave edilerek tripsin-EDTA'nın inaktivasyonu gerçekleştirildi. Besiyeri eklendikten sonra kabin içerisine önceden alınan steril pipet kullanılarak birkaç kez pipetleme yapıldı. Hücrelerin biraraya gelerek oluşturduğu kümelenmelerin ayrılması sağlandı ve flast içeriğinin tamamı alınarak 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. 125 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün ardından süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti 10 ml önceden ısıtılan besiyeri ile resüspanse edildi. Pasajlama işlemi tamamlandığında flastlar 37°C'de %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren steril CO₂ inkübatörüne kaldırıldı. Çalışmamız boyunca 7. ile 25. arası pasaj hücreleri kullanıldı.

3.1.4. Hücrelerin Dondurulması

Daha sonraki çalışmalarımızda kullanmak amacıyla hücrelerin bir kısmı kademeli şekilde dondurularak sıvı azot tankına konuldu. Dondurma işlemi için %80-90 yoğunluğa ulaşmış ARPE-19 hücreleri protokole uygun adımlar ile donduruldu. İlk olarak PBS ile flast yüzeyi yıkanarak atıkların uzaklaştırılması sağlandı. Ardından tripsin-EDTA ile hücreler yüzeyden kaldırıldı. Besiyeri ile tripsinin inaktivasyonu sağlandı ve hücreler 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktararak 125 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj aşamasından sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti %5 (v/v) dimetil sülfoksit (DMSO; Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA) içeren besiyeri ile resüspanse edildi. Resüspanse edilen hücreler, her kriyo vialde 1 ml olacak şekilde viallere aktarıldı ve kademeli dondurma işleminin gerçekleştirilebilmesi için

kriyo vialler izopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) içeren dondurma kabına (freezing-container) konuldu. Ardından -80°C’de bir gece boyunca bekletildi. Son olarak da kriyo vialdeki hücreler sıvı azot tankına transfer edildi.

3.2. Hücre Tedavi Protokolleri ve Canlılık Analizi

3.2.1. RPE Hücrelerinde Prilokain Toksisitesinin Oluşturulması

Çalışmamızda PRL toksisitesi, PRL’nin N-(2-Metilfenil)-2-(propilamino) (CITANEST® %2, Sanofi ilaç sanayi, Kırklareli, Türkiye) farklı dozlarda uygulanması ile oluşturuldu. Prilokainin optimum toksik dozunu belirlemek için 1,21-4,87 mM dozlar 12-24 saat aralığında uygulandı (Malet ve ark., 2015).

3.2.2. NOS2 İnhibitör Doz Çalışması

Literatürde RPE hücrelerinde PRL toksisitesi ve bu toksisitede NOS2 inhibitörünün koruyucu etkinliğini inceleyen bir çalışma yoktur. Sunulan tezde NOS2 inhibitörü olarak ASP (ASPERGLAUCIDE; Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada) 0,78-3,125 µM doz aralığında 12-24 saat uygulandı (Yoon ve ark., 2014). MTT testi ile ASP uygulamasının hücre canlılığına etkisi değerlendirildi. Asperglaucide moleküler ağırlığı 444.5 g/mol’dür. 10 mg ASP, 225 µl DMSO içerisinde çözülerek 100 mM stok çözelti hazırlandı ve farklı ASP dozları bu stok çözeltiden seri dilüsyon ile elde edildi.

3.2.3. Hücre Canlılığı Deneyi

Hücre canlılığının analizi için yaygın olarak kullanılan 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT; Gold Biotechnology Inc., St. Louis, MO, USA) testi uygulandı. MTT, çözünmeyen bir formazana indirgendiği zaman mor renk oluşturan sarı bir kromojendir. Bu indirgenme hücrelerde bulunan mitokondriyal NADH veya NADPH'a bağlı oksidoredüktaz enzimleri ile gerçekleştirilir. Aktif oksidoredüktaz enzimlerinin seviyesi, hücrel metabolik aktiviteyi ortaya koyar. Hücrelerde üretilmiş olan formazanın çözünmesi ile absorbans ölçümü gerçekleştirilir. Absorbans değerleri dikkate alınarak hücrel metabolik aktivitenin belirlenmesi kontrol grubu ile karşılaştırılarak sağlanır. Çalışmamızda 5 mg MTT tozu 1 ml PBS içinde çözüldü. Ardından hücre kültüründe kullanılmak amacıyla 0.22 µm çapındaki filtreden geçirilerek steril hale getirildi. Hazırlanmış olan bu çözelti 6 ay süresince -20°C’de stabil halde saklanabilir. MTT analizine başlamadan önce çalışmamızda kullanılan RPE hücreleri bulunduğu flask içerisinde %80-90 yoğunluğa ulaştığı zaman hücre

medyumu uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkama yapıldı. Daha sonra %0,05 tripsin-%0,02 EDTA ile hücreler flask yüzeyinden kaldırıldı. Tripsinizasyon işleminin ardından flask içeriği 15 mL'lik santrifüj tüpe aktarıldı. 125 x g'de 5 dakika santrifüjasyon sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve hücrelerin sayımı yapıldı. Sayım sonrası 96 kuyucuklu plakanın her kuyucuğunda 10.000 hücre olacak şekilde 200 µl hacimde hücre ekildi. Ekimi yapılan hücreler yüzeye tutunmaları amacıyla 1-2 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bitiminde her kuyucuğa 200 µl belirlenen konsantrasyonlarda doz uygulamaları yapıldı ve 12-18-24 saat inkübasyon süreleri bittikten sonra karanlık ortamda MTT protokolü gerçekleştirildi. Grup başına 12 tekrar olacak şekilde çalışıldı. İnkübasyon medyumu yavaşça aspire edildi ve her kuyucuğa daha öncesinde medyum ile hazırlanmış olan %10 (v/v) MTT çözeltisinden 100 µl eklendi. MTT çözeltisi eklenen 96 kuyucuklu plaka dışından ışık geçirmeyecek şekilde kaplanarak 2 saat boyunca 37°C, %5 CO₂ inkübatöründe bekletildi. İnkübasyon bitiminde kuyucukların dibinde mor renkli formazan kristallerinin oluştuğu görüldü. Yavaş ve hassas şekilde kuyucuklardaki sıvı aspire edildi ve ardından her bir kuyucuğa 100 µl DMSO eklendi. Formazan kristallerinin en iyi şekilde çözünmesi için 96 kuyucuklu plaka 5 dakika boyunca yatay çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Bu aşamadan sonra mikroparka okuyucuda (MicroQuant Plate Reader, Bio-Tek Instruments Inc. Vermont, USA) 570 ve 690 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirildi. 690 nm'deki absorbans değerleri 570 nm'deki absorbans değerlerinden çıkarıldı. Tüm gruptaki formazan kristalinin oluşma miktarları, kontrol grubuna kıyasla % canlılık olarak belirlendi.

3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmamızda MTT analizleri sonuçlarına dayanarak beş farklı deney grubu oluşturuldu. 1) Kontrol [sağlıklı RPE hücreleri]; 2) DMSO [NOS2 inhibitörü çözgeni olan DMSO (1µl/ml) ile 12 saat boyunca inkübe edilen RPE hücreleri]; 3) Prilokain toksisitesi [18 saat boyunca 2,43 mM PRL ile muamele edilen RPE hücreleri]; 4) NOS2 inhibitörü [12 saat boyunca 3,125 µM ASP ile inkübe edilen RPE hücreleri]; 5) Prilokain + NOS2 inhibitörü [18 saat, 2,43 mM PRL toksisitesinde 12 saatlik koruyucu doz olan 3,125 µM ASP ile inkübe edilen RPE hücreleri]

3.4. İmmüno Floresan Boyama

Hücrede nitrik oksit (NO) oluşturan bir enzim olan indüklenebilir nitrik oksit sentaz (NOS2/iNOS), apoptoz belirteçlerinden kesilmiş kaspaz-3, protein nitrasyonunu

gösteren nitro tirozin ve inflamatuvar yolak belirteçleri arasında bulunan NF- κ B p65, pNF- κ B p65 ve p-AKT immüno floresan mikroskopi yöntemi ile belirlendi. Bunun için flask içerisinde %80-90 yoğunluğa ulaşan hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırıldı ve hücre sayımı yapılarak her kuyucuğa yaklaşık 100.000 hücre olacak şekilde 8 kuyucuklu chamber-slide'a (Merck Millipore, Cork, Ireland) ekim yapıldı. Ekim yapıldıktan sonra chamber slide gece boyunca 37°C, %5 CO₂ inkübatöründe bekletilerek hücrelerin tutunması ve morfoloji kazanması sağlandı. %70-80 yoğunluğa ulaşmış olan hücrelere deney gruplarına göre gerekli doz uygulamaları yapıldı. Sonrasında chamber slide içerisinde bulunan besiyeri aspire edildi ve kuyucuklar 0,01 M soğuk PBS ile iki kez yıkandı. Hücreler oda sıcaklığında bulunan ve taze hazırlanmış olan %4 paraformaldehit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ile 10 dakika fikse edildikten sonra üç kez soğuk PBS ile yıkandı. Yıkamanın ardından hücreler PBS içerisinde hazırlanmış %0,2 Triton-X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ile 10 dakika permeabilize edildi. Permeabilizasyon aşamasını takiben 5 kez soğuk PBS ile yıkama yapıldı ve 30 dakika boyunca PBS içerisinde hazırlanmış %5 normal goat serum (NGS; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) ile inkübe edilerek bloklama yapıldı. 30 dakikalık inkübasyonun ardından bloklama çözeltisi uzaklaştırıldı. Daha sonra herhangi bir yıkama yapılmadan kuyucuk başına 200 µl olacak şekilde rabbit poliklonal anti-NOS2 (1:100, #610332, BD Biosciences Pharmingen), rabbit poliklonal anti-cleaved kaspaz-3 (1:100, #9661, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), rabbit poliklonal anti-nitro tirozin (1:200, #bs-8551R, Bioss, Cambridge, MA, USA), rabbit poliklonal anti-NF- κ B p65 (1:100, #ab16502, Abcam, Cambridge, MA, USA), rabbit poliklonal anti-p-NF- κ B p65 (1:100, #3031, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), rabbit poliklonal anti-p-AKT (1:200, #649001, BioLegend Enabling Legendary Discovery) primer antikorları eklenerek 4°C'de ve karanlıkta bir gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün chamber slidelar oda sıcaklığında 5 kez olacak şekilde PBS ile yıkandı. Ardından karanlık ortamda her kuyucuğa 200 µl Alexa Fluor-488 konjuge goat anti-rabbit (1:300, # A11008 life Technologies, USA) sekonder antikoru eklendi ve 45 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon bitiminde kuyucuklar PBS ile 3 kez yıkandı. Yıkama işlemi bittikten sonra hücre çekirdeğini gözlemlemek için DAPI boyaması (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) yapıldı. Chamber slidelerin görüntülenmesi floresan mikroskopta (Olympus IX81, inverted fluorescein microscope Tokyo, Japan) uygun olan filtreler kullanılarak yapıldı.

Yapılan görüntülemelere göre floresans yoğunluğu NIH ImageJ 1.53e yazılımı yardımıyla analiz edildi. Her grup için hücrelerin floresans ışıma yapan bölgeleri baz alındı ve integrated yoğunluk program ile belirlendi. Hücrelerin doğrulanmış total floresans (CTCF) miktarlarını hesaplayabilmek için ‘‘CTCF= Integrated Yoğunluk – (Seçilen hücrenin alanı x Background okumaları ortalaması)’’ formülü kullanıldı. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesi istatistiksel olarak gerçekleştirildi.

3.5. Nitrik Oksit Oluşumunun Belirlenmesi

Deney gruplarında $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ miktarı florometrik assay kit (Katalog #780051 Cayman Chemical, MI, USA) ile hücre medyumunda ölçüldü. Analiz iki aşamada gerçekleşti. İlk aşamada nitrat redüktaz tarafından nitrat (NO_3^-) nitrite (NO_2^-) indirildi. İkinci aşamada, asidik bir çözelti olan 2,3-diaminonaftelen (DAN) ortamdaki NO_2^- ile reaksiyona girerek floresan veren 1 (H) naftotriazole dönüştü. Örneklerde floresan ölçümleri 375 nm eksitasyon ve 417 nm emisyon dalga boyunda gerçekleştirildi. Ortamdaki total NO_2^- miktarı (μM) oluşturulan standart eğriden hesaplandı ve sonuçlar $\mu\text{M}/\text{hücre}$ sayısı olacak şekilde rapor edildi.

3.6. Kaspaz-3 Aktivitesinin Belirlenmesi

Kaspaz-3 aktivitesi hücre lizatlarında florometrik assay kit kullanılarak ölçüldü (Katalog #K105-200 BioVision Milpitas, CA, USA). Analiz, DEVD (Asp-Glu-Val-Asp)-7-amino-4-triflorometik kumarin (DEVD-AFC) substratının parçalanmasının belirlenmesine dayanmaktadır. DEVD-AFC 400 nm’de (λ_{maks}) ışıma yapmaktadır. Substratın kaspaz-3 ile parçalanması sonucu oluşan serbest AFC, 500 nm’de (λ_{maks}) sarı-yeşil bir floresan oluşturur. Deney gruplarında hücreler kit içeriğinde bulunan liziz tamponu ile toplandı ve hücre pelletleri homojenize edilerek 10 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Kaspaz-3 aktivitesinin değerlendirilmesi için her bir grubun protein konsantrasyon miktarları belirlendi ve çalışmada 100 μg hücre lizatı kullanıldı. Örnekler 400 nm eksitasyon ve 505 nm emisyon dalga boyunda florometrik olarak (BioTek SynergyTM MX florometrik plaka okuyucu, USA) ölçüldü. Örneklerde ölçülen AFC floresansı, kontrol grubu floresansı ile karşılaştırılarak kaspaz-3 aktivitesindeki değişim yüzde olarak belirlendi. Sonuçlar yüzde kontrol olarak rapor edildi.

3.7. Protein Nitrasyonunun Belirlenmesi

Protein nitrasyonu hücre lizatlarında ELISA kit (Katalog # E-EL-0040 Elabscience, USA) kullanılarak ölçüldü. Analiz, kompetitif-ELISA prensibine dayanmaktadır. Deney gruplarından elde edilen hücre pelletleri 1×10^6 hücreye 250 μ L soğutulmuş PBS olacak şekilde süspanse edildi. Ardından hücreler tamamen parçalanana kadar sonikasyon (Bandelin Sonopuls HD 2070, Bandelin Elec., Germany) yapıldı. 2-8° C'de $1500 \times g$ 'de 10 dakika santrifüj edilerek hücre lizatı elde edildi. Hücre lizatlarında nitrotirozin miktarı kit prosedürü uygulanarak 450 nm'de spektrofotometrik olarak belirlendi. Sonuçlar ng/mg protein olarak verildi.

3.8. Fosforile Edilmiş NF- κ B p65 Protein Seviyelerinin Belirlenmesi

Fosfo NF- κ B p65 protein seviyeleri hücre lizatlarından florometrik assay kit kullanılarak ölçüldü (Katalog #PEL-NF- κ B p65-S536 RayBiotech, GA, USA). Analiz, nonkompetatif sandwich ELISA prensibine dayanmaktadır. Deney gruplarındaki hücreler kit içeriğinde bulunan liziz tamponu ile toplandı ve 2-8°C'de gece boyunca yatay çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bitiminde 2-8°C'de 10 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant toplandı. Kit prospektusunda verilen ölçüm protokolü uygulandı ve örnekler 450 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek p-NF- κ B p65 protein seviyeleri kontrol grubunun optik dansitesine göre yüzde olarak verildi.

3.9. İnterlökin 6 (IL-6) Seviyelerinin Belirlenmesi

İnterlökin-6 seviyeleri hücre medyumunda nonkompetatif sandwich ELISA kiti kullanılarak ölçüldü (Katalog # E0090Hu BT LAB, Bioassay Technology Laboratory, Jiaxing, Zhejiang, China). İnkübasyon sürelerinin bitiminde hücre kültürü medyumları toplandı. Kit prospektusunda verilen protokol uygulandı ve 450 nm'de ölçüm yapılarak IL-6 seviyeleri belirlendi. Ortamdaki total IL-6 seviyesi oluşturulan standart eğriye göre hesap edilip ng/L olarak rapor edildi.

3.10. Protein Ölçümleri

ARPE-19 hücre lizatlarında protein konsantrasyonları 595 nm'de modifiye Bradford yöntemiyle ölçüldü. Yöntemde standart olarak bovin serum albümin (BSA) ile Coomassie Plus reaktifi içeren ticari kit kullanıldı (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Hücre lizatlarındaki protein konsantrasyonu BSA standart grafiği yardımıyla hesaplandı.

3.11. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler 8.4.3 GraphPad Prism yazılımı kullanılarak yapıldı. (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Elde edilen istatistiksel analiz sonuçları şekil açıklamalarında ayrıntılı olarak yazılmıştır.

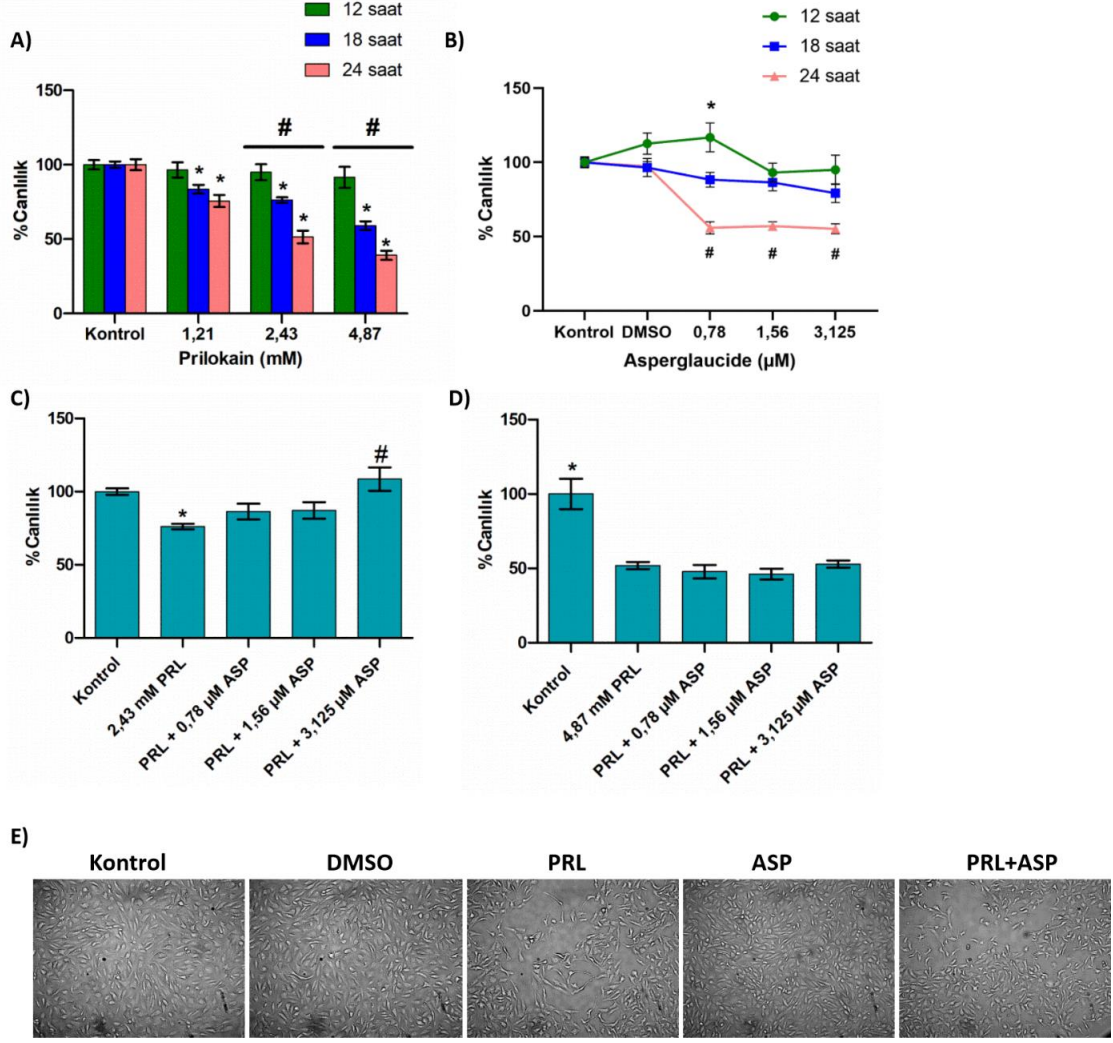


4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılığı Analizi ve Asperglaucide'in Koruyucu Etkininin Değerlendirilmesi

Prilokain ile indüklenen RPE hücrelerinde doz bağımlı 24 saatlik hücre canlılığı analizi **Şekil 4.1A**'da gösterilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla 12 saatlik 1,21, 2,43 ve 4,87 mM PRL uygulaması sitotoksikite göstermedi. Hücrelerin 18 ve 24 saat 1,21, 2,43 ve 4,87 mM PRL ile inkübasyonu, aynı zaman dilimlerinde kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığını anlamlı ölçüde azalttı. Benzer şekilde 18 ve 24 saatlik 2,43 ve 4,87 mM PRL uygulaması, aynı doz konsantrasyonlarında tüm saatler ile karşılaştırıldığında hücre canlılığını anlamlı olarak azalttı.

Asperglaucide dozlarının (0,78-3,125 μ M) hücre canlılığı analizi **Şekil 4.1B**'de gösterilmiştir. 12 saat 0,78 μ M ASP uygulaması aynı saat diliminde 1,56 ve 3,125 μ M doz grupları ile karşılaştırıldığında hücre canlılığını anlamlı olarak arttırdı. 24 saat 0,78-3,125 μ M ASP uygulaması kontrol ve DMSO grupları ile karşılaştırıldığında canlılığı anlamlı olarak azalttı. Toksik etkisi gözlenen PRL dozlarında (2,43 ve 4,87 mM) ASP'nin koruyucu etkisi incelendi (**Şekil 4.1C**). Bu amaçla 18 saatlik 2,43 mM PRL uygulamasının 6. saatinde ASP (0,78-3,125 μ M) inkübasyonuna başlandı ve 12 saatlik koruyucu etkisi değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar 3,125 μ M ASP'nin anlamlı ölçüde hücre canlılığını arttırdığını gösterdi (**Şekil 4.1C**). 18 saatlik 4,87 mM PRL uygulamasının 6. saatinde ASP (0,78-3,125 μ M) inkübasyonuna başlandı ve 12 saatlik koruyucu etkisi değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar, 4,87 mM PRL'nin toksisitesinin uygulanan ASP dozları ile giderilemediğini gösterdi (**Şekil 4.1D**). **Şekil 4.1E**, PRL ve ASP uygulamasının RPE hücreleri üzerindeki morfolojik değişikliklerini göstermektedir. Hücrelerde 12 saat DMSO (1 μ l/ml) ve ASP (3.125 μ M) uygulaması sonucu bir değişim gözlenmezken, 18 saat 2,43 mM PRL uygulaması sonucunda küçülme, kümelenme, yüzeyden ayrılma ve yuvarlaklaşma gibi morfolojik değişimler görüldü. PRL grubunda hücre popülasyonunda da bir azalma kaydedildi. 12 saat 3,125 μ M ASP uygulamasının, PRL uygulamasına bağlı morfolojik bozulmaları azalttığı gözlemlendi.

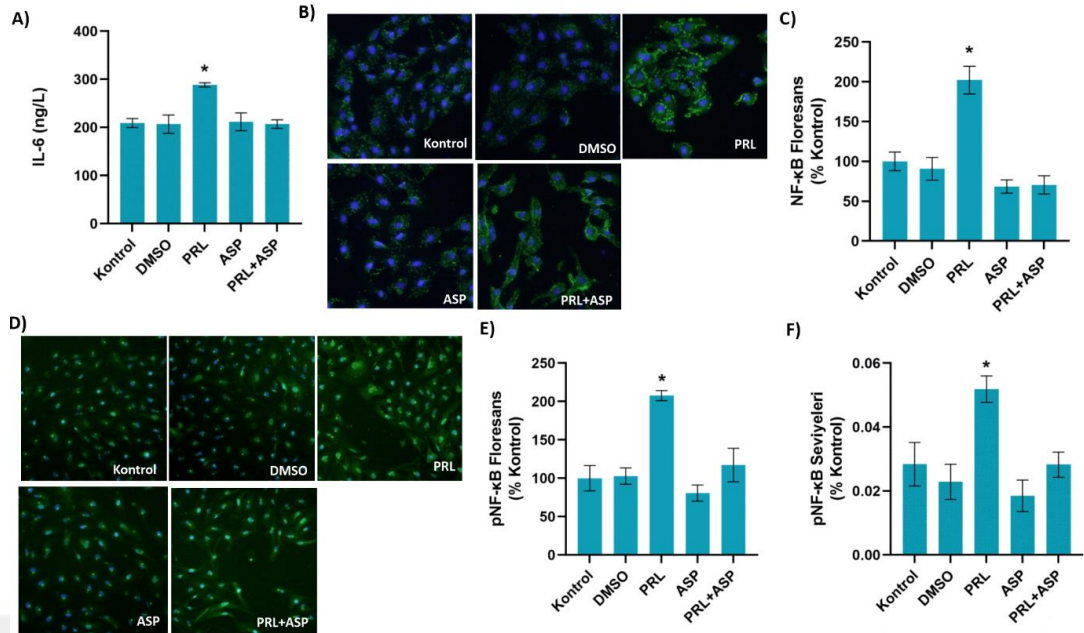


Şekil 4.1. RPE hücrelerinde MTT analizi ile hücre canlılığının değerlendirilmesi. **A)** 12- 24 saatlik 1,21, 2,43 ve 4,87 mM Prilokain (PRL) uygulamasının hücre canlılık analizi. Veriler 11-12 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA analizi ile yapıldı. Gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlendi. *, $p < 0,05$ kontrol grubu ile aynı zaman dilimleri karşılaştırıldığında. #, $p < 0,05$ aynı doz aralığında tüm saatler birbirleri ile karşılaştırıldığında. **B)** 12-24 saatlik ASP uygulamasının hücre canlılık analizi. DMSO, dimetil sülfoksit (1µl/ml) ile muamele edilmiş hücreler. Veriler 8-12 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA analizi ile yapıldı. Gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlendi. *, $p < 0,05$, 12 saat, 1,56 ve 3,125 µM grupları ile karşılaştırıldığında. #, 24 saat, $p < 0,05$, kontrol ve DMSO grupları ile karşılaştırıldığında. **C)** 18 saat, 2,43 mM PRL toksisitesinde 12 saatlik 3,125 µM ASP uygulamasının koruyucu etkinliği gözlemlendi. 2,43 mM PRL uygulamasından 6 saat sonra 0,78-3,125 µM ASP uygulandı. Toplam inkübasyon süresi 18 saat. Veriler 10-12 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA analizi ile yapıldı. Gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlendi. *, $p < 0,05$, kontrol ile karşılaştırıldığında. #, $p < 0,05$, 2,43 mM PRL ile karşılaştırıldığında. **D)** 18 saat, 4,87 mM PRL toksisitesinde 12 saatlik 3,125 µM ASP uygulamasının koruyucu etkinliği gözlemlenmedi. 4,87 mM PRL uygulamasından 6 saat sonra 0,78-3,125 µM ASP uygulandı. Toplam inkübasyon süresi 18 saat. Veriler 9-10 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz Kruskal-Wallis analizi ile yapıldı. Gruplar arasındaki farklılık Dunn's testi ile belirlendi. *, $p < 0,05$, tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. **E)** Prilokain ve ASP uygulanan ARPE-19 hücrelerinin ışık mikroskop görüntüsü (10X büyütme). Hücrelerde 12 saat DMSO (1µl/ml) ve ASP (3,125 µM) uygulaması sonucu bir değişim gözlenmezken, 18 saat 2,43 mM PRL uygulaması sonucunda küçülme, kümelenme, yüzeyden ayrılma ve yuvarlaklaşma gibi morfolojik değişimler gözlemlendi. PRL grubunda hücre popülasyonunda da bir azalma

kaydedildi. 12 saat 3,125 μ M ASP uygulamasının, PRL uygulamasına bağılı morfolojik bozulmaları azalttığı gözlemlendi.

4.2. İnterlökin 6, NF- κ B p65 ve pNF- κ B p65 Seviyelerinin Belirlenmesi

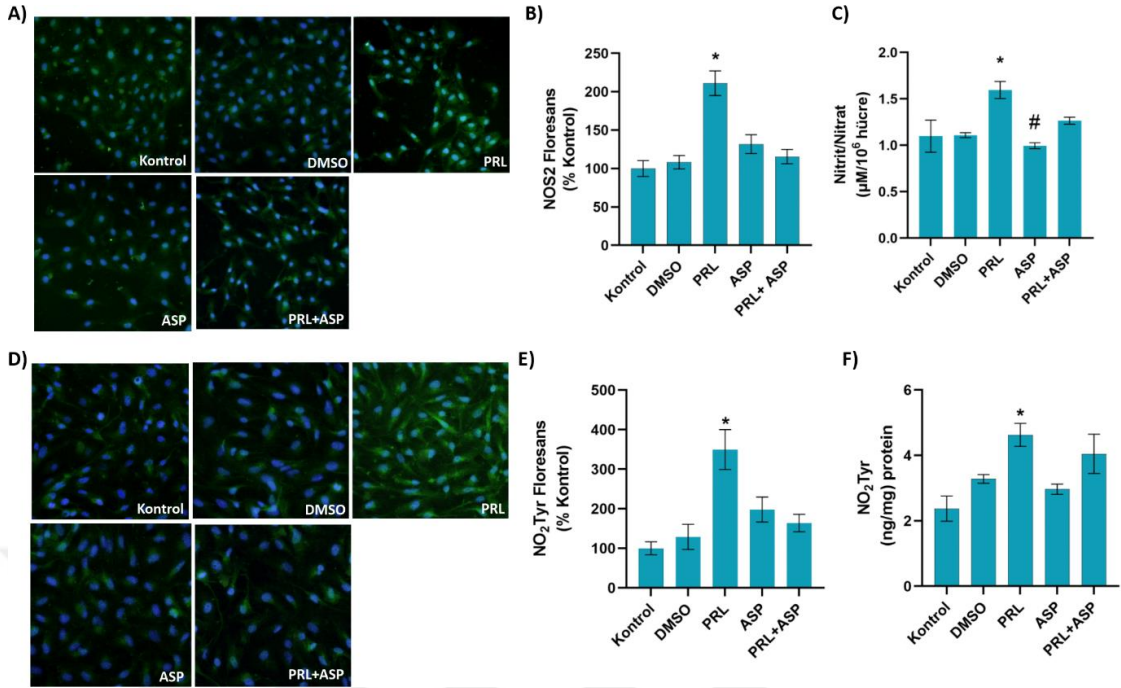
Yapılan klinik bir araştırmada yüksek PRL serum düzeylerinin serum IL-6 seviyelerini arttırdığı rapor edilmiştir (Schmittner ve ark., 2010). Toll benzeri reseptörlerin IL-6 düzeylerini arttırdığı bilinmektedir (Frost ve ark., 2006) ve RPE hücrelerinde hem TLR2 hem de TLR3 reseptörleri tanımlanmıştır (Patel ve Hackam, 2013; Mulfaul ve ark., 2020). Yapılan bu çalışmaları referans alarak RPE hücrelerinde PRL'nin TLR reseptörleri üzerinden etki edebileceğini düşündük ve PRL ile muamele edilen RPE hücre medyumunda IL-6 düzeylerini ölçtük. RPE hücrelerinin IL-6 salgılayabildiği bilinmektedir (Qin ve Gao, 2018). Prilokain (2,43 mM) ile 18 saat muamele edilen RPE hücre medyumunda IL-6 düzeylerinin diğer tüm deney gruplarına göre anlamlı olarak arttığı görüldü. 3,125 μ M ASP uygulaması PRL uygulanan hücrelerde IL-6 düzeylerini anlamlı şekilde azalttı (**Şekil 4.2A**) Toll benzeri reseptörlerin aktivasyonu NF- κ B yolağını aktive etmektedir (Liu ve ark., 2017). Bu sebepten dolayı oluşturulan hücre deneyi modelimizde NF- κ B p65 ve pNF- κ B p65 seviyelerini ölçtük. **Şekil 4.2B** ve **4.2C** sırasıyla NF- κ B p65 immün boyaması ve kantitasyonunu göstermektedir. **Şekil 4.2D** ve **4.2E** sırasıyla pNF- κ B p65 immün boyaması ve kantitasyonunu göstermektedir. **Şekil 4.2F** ise pNF- κ B p65 düzeylerini göstermektedir. Diğer gruplara kıyasla PRL ile muamele edilmiş hücrelerde NF- κ B p65 ve pNF- κ B p65 seviyelerinin anlamlı olarak arttığı gözlemlendi. 18 saat PRL (2,43 mM) uygulanan hücrelerde 12 saat (3,125 μ M) ASP uygulaması hem NF- κ B p65 hem de pNF- κ B p65 protein artışını bazal seviyelere indirdi.



Şekil 4.2. RPE hücrelerinde IL-6, NF-κB p65 ve pNF-κB p65 seviyeleri. DMSO, 12 saat 1 µl/ml dimetil sülfoksit ile muamele edilen hücreler; PRL, 18 saat 2,43 mM PRL ile muamele edilmiş hücreler; ASP, 12 saat 3,125 µM ASP ile muamele edilmiş hücreler; PRL+ASP, 18 saat 2,43 mM PRL toksisitesinde 12 saatlik 3,125 µM ASPe uygulaması. PRL uygulamasından 6 saat sonra 3,125 µM ASP uygulandı. Toplam inkübasyon süresi 18 saat. **A)** IL-6 seviyeleri. Veriler 8 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Dunn's çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, p<0,05, tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. **B)** RPE hücrelerinde NF-κB p65 temsili immüno Floresan boyama görüntüleri. **C)** NF-κB p65 floresan boyamasının ImageJ programı ile kantitasyonu. Veriler 12 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Dunn's çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, p<0,05, tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. **D)** RPE hücrelerinde pNF-κB p65 temsili immüno Floresan boyama görüntüleri. **E)** pNF-κB p65 floresan boyamasının ImageJ programı ile kantitasyonu. Veriler 12 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Dunnett's T3 çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. *, p<0,05, tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. **F)** pNF-κB p65 seviyeleri. Veriler 8 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, p<0,05, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

4.3. Nitrik Oksit ve Nitrotirozin Düzeylerinin Belirlenmesi

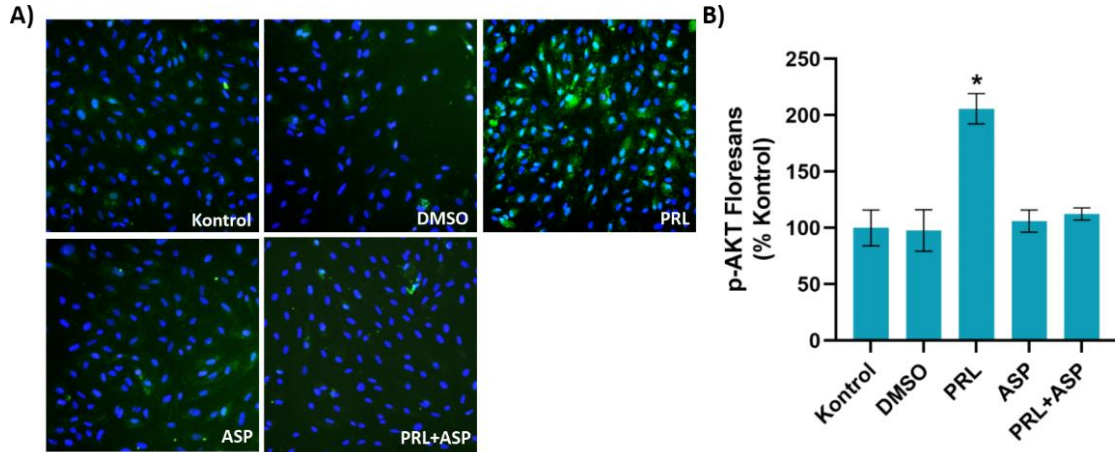
NF-κB sinyal yolağının aktivasyonu NOS2 protein ekspresyonunu arttırmaktadır (Aktan, 2004). Bu nedenle hücre kültürü modelimizde NOS2 protein ekspresyonu, nitrit/nitrat ve protein nitrotirozin seviyeleri ölçülmüştür. **Şekil 4.3A, 4.3B ve 4.3C'** de sırasıyla NOS2 immün boyaması, kantitasyonu ve nitrit/nitrat seviyeleri verilmiştir. **Şekil 4.3D, 4.3E ve 4.3F'** de sırasıyla nitrotirozin immün boyaması, kantitasyonunu ve nitrotirozin protein düzeyleri rapor edilmiştir. Diğer gruplara kıyasla PRL ile muamele edilmiş hücrelerde NOS2, nitrit/nitrat ve nitrotirozin seviyelerinin anlamlı olarak arttığı gözlemlendi. 18 saat PRL (2,43 mM) uygulanan hücrelerde 12 saat (3,125 µM) ASP uygulaması nitrit/nitrat, NOS2 ve nitrotirozin protein artışını bazal seviyelere indirdi.



Şekil 4.3. RPE hücrelerinde NOS2 ve nitrotirozin seviyeleri. DMSO, 18 saat 1 μl/ml dimetil sülfoksit ile muamele edilen hücreler; PRL, 18 saat 2,43 mM PRL ile muamele edilmiş hücreler; ASP, 12 saat 3,125 μM ASP ile muamele edilmiş hücreler; PRL+ASP, 18 saat 2,43 mM PRL toksisitesinde 12 saatlik 3,125 μM ASP uygulaması. PRL uygulamasından 6 saat sonra 3,125 μM ASP uygulandı. Toplam inkübasyon süresi 18 saat. **A)** RPE hücrelerinde NOS2 temsili immüno Floresan boyama görüntüleri. **B)** NOS2 floresan boyamasının ImageJ programı ile kantitasyonu. Veriler 12 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Dunn's çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, p<0,05, tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. **C)** Nitrit/nitrat seviyeleri. Veriler 8 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Dunn's çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, p<0,05, Kontrol, DMSO ve ASP grupları ile karşılaştırıldığında. #, PRL+ASP grubu ile karşılaştırıldığında. **D)** RPE hücrelerinde nitrotirozin temsili immüno Floresan boyama görüntüleri. **E)** Nitrotirozin floresan boyamasının ImageJ programı ile kantitasyonu. Veriler 12 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. *, p<0,05, tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. **F)** Nitrotirozin seviyeleri. Veriler 8 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Dunn's çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, p<0,05, Kontrol ve ASP grupları ile karşılaştırıldığında.

4.4. Fosfo Akt Düzeylerinin Belirlenmesi

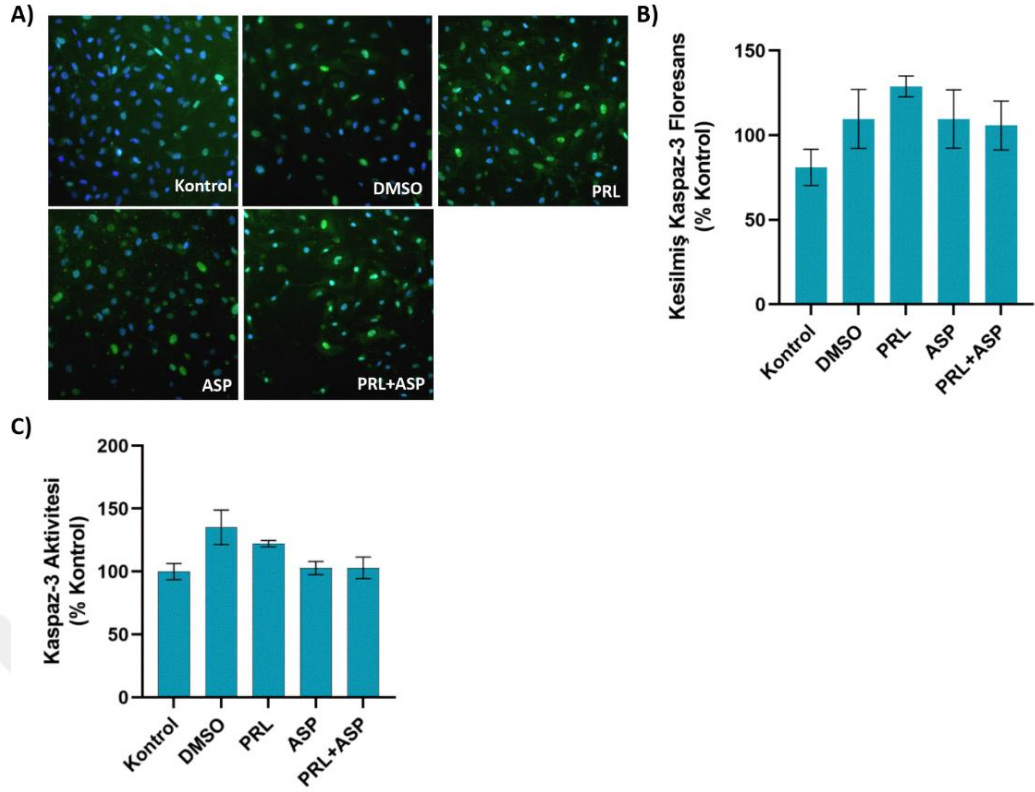
NOS2 seviyelerinin artışı PI3K/AKT sinyal yolağının aktive olması ile ilişkilendirilmiştir (Bae ve ark., 2006). Bu neden tez çalışmasında p-Akt seviyeleri de ölçülmüştür. **Şekil 4.4A** ve **Şekil 4.4B** sırasıyla p-AKT immün boyaması ve kantitasyonunu göstermektedir. Fosforillenmiş Akt protein miktarı 18 saat PRL uygulanan hücrelerde anlamlı ölçüde artmış ve bu artış 12 saat ASP uygulaması ile baskılanmıştır.



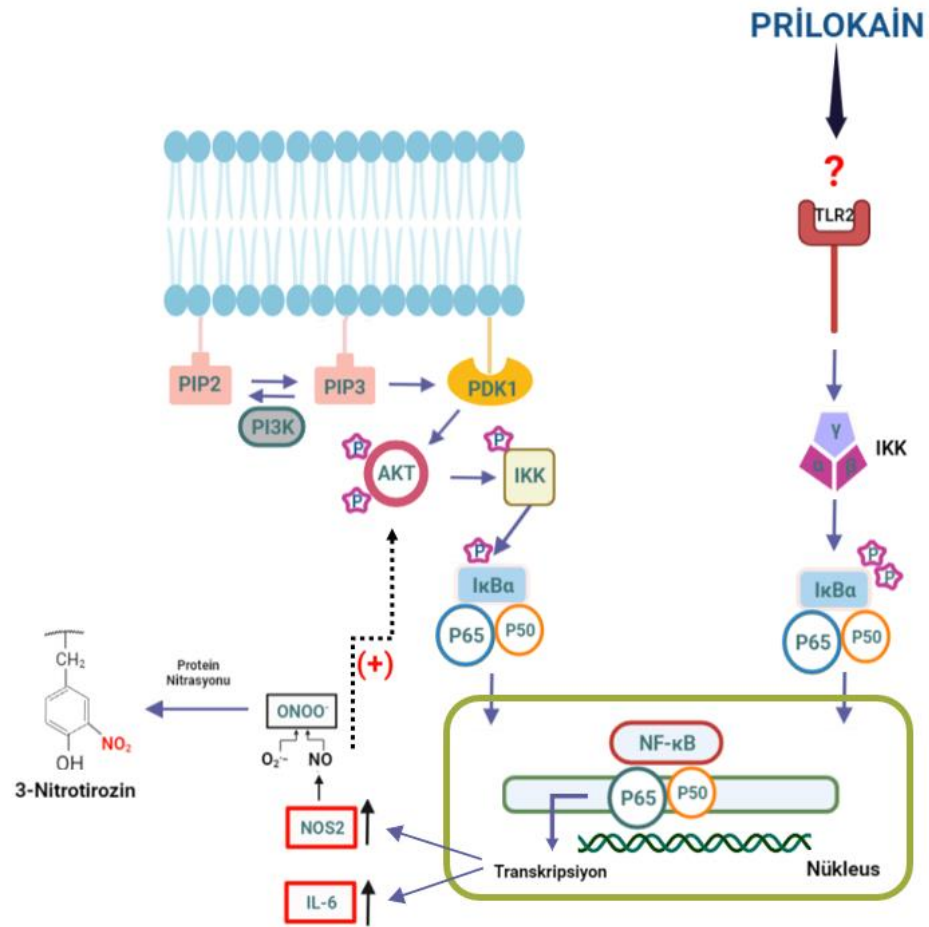
Şekil 4.4. RPE hücrelerinde p-AKT immüno Floresans düzeyleri. DMSO, 18 saat 1 µl/ml dimetil sülfoksit ile muamele edilen hücreler; PRL, 18 saat 2,43 mM PRL ile muamele edilmiş hücreler; ASP, 12 saat 3,125 µM ASP ile muamele edilmiş hücreler; PRL+ASP, 18 saat 2,43 mM PRL toksisitesinde 12 saatlik 3,125 µM ASP uygulaması. PRL uygulamasından 6 saat sonra 3,125 µM ASP uygulandı. Toplam inkübasyon süresi 18 saat. **A)** RPE hücrelerinde p-AKT temsili immüno Floresan boyama görüntüleri. **B)** p-AKT Floresan boyamasının ImageJ programı ile kantitasyonu. Veriler 12 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. *, $p < 0,05$, tüm gruplar ile karşılaştırıldığında.

4.5. Kaspaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Şekil 4.5A, 4.5B ve 4.5C'de sırasıyla kesilmiş kaspaz-3 immün boyaması, kantitasyonunu ve kaspaz aktivitesinin florometrik olarak ölçümü verilmiştir. Gruplar arasında bir farklılığın olmaması kaspaz-3'e bağlı apoptotik yolda aktivasyon olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.5. RPE hücrelerinde kesilmiş kaspaz-3 protein immüno Floresans düzeyleri. DMSO, 12 saat 1 μ l/ml dimetil sülfoksit ile muamele edilen hücreler; PRL, 18 saat 2,43 mM PRL ile muamele edilmiş hücreler; ASP, 12 saat 3,125 μ M ASP ile muamele edilmiş hücreler; PRL+ASP, 18 saat 2,43 mM PRL toksisitesinde 12 saatlik 3,125 μ M ASP uygulaması. PRL uygulamasından 6 saat sonra 3,125 μ M ASP uygulandı. Toplam inkübasyon süresi 18 saat. **A)** RPE hücrelerinde kesilmiş kaspaz-3 proteini temsili immüno Floresan boyama görüntüleri. **B)** Kesilmiş kaspaz-3 proteini Floresan boyamasının ImageJ programı ile kantitasyonu. Veriler 11-12 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Dunn's çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. **C)** Kaspaz-3 aktivitesi. Veriler 4 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir.



Şekil 4.6. NF-κB ve PI3K/Akt yollarının aktivasyonu. Toll-like reseptör 2 (TLR2)'nin uyarımı sonucu NF-κB yolu aktive olur (Liu ve ark., 2017). NF-κB yolağı aktivasyonunun birincil mekanizması, çok alt birimli bir IκB kinaz kompleksinin (IKK) aktive olmasıdır. IKK, IKKα ve IKKβ olmak üzere iki katalitik alt birimden ve IKKγ adlı düzenleyici bir alt birimden oluşur. TLR2 reseptörü üzerinden aktive olan IKK, iki N-terminal serinde IκBα'yı fosforile eder (Sakurai ve ark., 2003). Fosforilasyon sonucunda NF-κB alt birimlerinden p50/p65 dimerlerinin nükleusa translokasyonu gerçekleşir (Liu ve ark., 2017). Nükleusta aktif halde bulunan NF-κB NOS2 ve IL-6 ekspresyonunu indükler (Aktan, 2004; Frost ve ark., 2006). NOS2 seviyelerindeki artış nitrik oksit (NO) salınımına bağlı olarak protein nitrasyonuna sebep olur (Upmacis, 2008). NOS2 ekspresyonu PI3K/Akt yolağının ekspresyonuna yol açar (Bae ve ark., 2006).

5. TARTIŞMA

Tez çalışmamızda PRL toksisitesinin insan retina hücrelerinde NF- κ B p65, fosforile NF- κ B p65 ve fosforile AKT seviyelerini arttırdığı bildirilmektedir. Benzer şekilde, IL-6, NOS2, nitrit/nitrat ve nitrotirozin seviyeleri, kontrollere kıyasla PRL ile muamele edilen hücrelerde önemli ölçüde yükselir. Prilokain ile muamele edilen hücrelere ASP uygulaması, fosforile edilmiş NF- κ B p65 (Ser 536) ve fosforile edilmiş AKT protein seviyelerini azaltırken NF- κ B p65 ve NOS2 protein ekspresyonlarını düzenler. Bildiğimiz kadarıyla araştırmamız, PRL toksisitesinde inflamatuvar sinyal yolunu tanımlayan ilk çalışmadır.

Bu çalışmada, insan retinal pigment epitel hücre hattının in vitro bir modelini kullandık ve PRL'nin önemli bir sitotoksik profile sahip olduğunu gösterdik. 18-24 saat boyunca 1,21-4,87 mM PRL ile hücrelerin inkübasyonunun, kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığını gözlemledik (**şekil 4.1.A.**). Prilokainin sitotoksitesi, farklı kökenlere sahip farklı in vitro hücre modellerinde değerlendirilmiştir. Bulgularımız, insan osteoblastik Saos-2 hücrelerinde PRL'nin neden olduğu hücre ölümünün araştırıldığı bir çalışma ile uyumludur (Nakamura ve ark., 1999). Prilokainin, Saos-2 hücrelerinde 12 ila 48 saat arasında 10 mM konsantrasyona kadar doza ve zamana bağlı bir şekilde hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. Prilokain toksisitesini değerlendirmek için nöroblastom hücre dizisi SH-SY5Y de kullanılmıştır (Malet ve ark., 2015). Prilokain 2-22 mM konsantrasyon aralığında uygulanmıştır ve 20 dakikalık kısa bir maruziyetten sonra hücre canlılığı ölçülmüştür. Yaklaşık %50 hücre ölümünü indükleyen PRL konsantrasyonu (LD50), doz yanıt eğrisinden türetilen bir denklemden hesaplanmış ve 4.32 ± 0.39 mM olduğu bulunmuştur. Prilokainin insan nöroblastom hücre dizisi SHEP'te sitotoksik olduğu gösterilmiştir (Werdehausen ve ark., 2009). 24 saatlik inkübasyondan sonra yarı maksimum nörotoksik etkiye (LD50) yol açan PRL konsantrasyonu 3.85 ± 0.53 mM olarak hesaplanmıştır. Bu farklı çalışmalarda rapor edilen PRL'nin sitotoksik konsantrasyonlarında gözlenen farklılık, hücre modelindeki değişkenlik ve temas süresi ve kültür koşulları gibi deneysel koşullar ile açıklanabilir. Farklı hücre tipleri üzerindeki PRL sitotoksitesi, fizyolojik mikro-ortamlarda etkili olan lokal faktörlerden etkilenir. Prilokainin oküler dokuda difüzyonu ve zaman içinde dağılan

miktarı, konsantrasyon gradiyentinden, lipidlere olan afinitesinden, pKa'dan ve protein bağlama yeteneğinden etkilenmesi muhtemeldir.

Asperglaucide'in 12 saat tedavisi, PRL toksisitesinde hücre canlılığını önemli ölçüde arttırdı. Asperglaucide (3,125 μ M), PRL (2,43 ve 4,87 mM) işleminden 6 saat sonra, toplam PRL inkübasyon süresi 18 saat olacak şekilde uygulandı. ASP'nin sitotoksik aktivitesi, ARPE-10 hücrelerinde MTT analizi ile de belirlendi (**şekil 4.1.B.**). Sonuçlarımız 10 μ M aurantiamid asetatın 24 saatlik inkübasyonunun insan malign glioma U87 hücrelerinde canlılığı önemli ölçüde azalttığını gösteren bir çalışma ile kısmi olarak uyumludur (Yoon ve ark., 2014).

Bir klinik çalışmada yüksek PRL serum düzeylerinin serum IL-6 düzeylerinde artışa yol açtığı bildirilmiştir (Schmittner ve ark., 2010). Toll-benzeri reseptörlerin aktivasyonunun IL-6 seviyelerini arttırdığı bilinmektedir (Frost ve ark., 2006) ve hem TLR2 hem de TLR3 reseptörleri retina pigment epitel hücrelerinde tanımlanmıştır (Patel ve Hackam, 2013; Mulfaul ve ark., 2020). Retinal pigment epitel hücrelerinin IL-6 salgılayabildiği bilinmektedir (Qin ve Gao, 2018). İnterlökin-6, karaciğerde akut faz proteinlerinin üretiminin temel uyarıcısıdır (Pfähflin ve Schleicher, 2009). Özellikle, sistemik inflamatuvar yanıt için bir belirteç olan C-reaktif proteinin (CRP) ekspresyonu, IL-6'nın doğrudan etkisi altındadır (Gabay ve Kushner, 1999).

Toll benzeri reseptörlerin aktivasyonu ayrıca NF- κ B yolunu da aktive eder (Liu ve ark., 2017) ve yakın zamanda bir sıçan PRL toksisite modelinde merkezi sinir sistemi NF- κ B -p65 ve NF- κ B -p50 ekspresyonlarının arttığını gösterilmiştir (Akgül ve ark., 2021). Bu nedenle deneysel hücre modelimizde NF- κ B p65 seviyelerini ölçtük (**şekil 4.2.B, 4.2.C.**). Memelilerde NF- κ B transkripsiyon faktörlerinin beş üyesi vardır, bunların arasında hücrede en çok bulunan p65 ve p50'dir. Hücresel uyarı olmadan, NF- κ B sitoplazmada I κ B B inhibitör proteinleri tarafından inaktive edilir. Uyarıcı bir yanıtın ardından, I κ B'ler I κ B kinazlar (IKK) tarafından fosforile edilir ve ubiquitinasyon ve proteozomal degradasyon ile yok edilir. Serbest kalan p65, NOS2 ve IL-6 dahil olmak üzere hücrenin hayatta kalmasına ve inflamasyona neden olan çok sayıda gen dizisinin transkripsiyonunu koordine ettiği, hücre çekirdeğine geçer (**şekil 4.6.**) (Vermeulen ve ark., 2002). p65 transkripsiyon faktörü bir nükleer lokalizasyon sinyali, bir DNA bağlanma ve dimerizasyon bölgesine ve transaktivasyon alanlarına (TA1 ve TA2) sahiptir. TA1 alanı, önemli bir işlem alanıdır ve C-terminal 30 amino

asidi içerir. NF- κ B transaktivasyonu, bu alandaki birkaç fosforilasyonla senkronize edilir. p536 fosforilasyon bölgesi TA1 alanında yer alır ve çeşitli türler arasında korunur. p65'in fosforilasyonunun, p65 transkripsiyonel aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (Viatour ve ark., 2005). NF- κ B p65 ve fosforile edilmiş NF- κ B p65 (Ser 536) protein seviyelerinin PRL ile tedavi edilen hücrelerde diğer gruplara göre önemli ölçüde arttığı gözlemlendi. Asperglaucide uygulaması, PRL verilen hücrelerde NF- κ B p65 protein seviyelerini azaltmıştır. Asperglaucide'in bu etkisinin NF- κ B ve MAPK yollarının inhibisyonu yoluyla gerçekleşmesi muhtemeldir (Yoon ve ark., 2014).

Daha önce belirtildiği gibi, NF- κ B sinyal yolunun aktivasyonu, NOS2 protein ekspresyonunu artırır (Pautz ve ark., 2010). Bu nedenle hücre kültürü modelimizde NOS2 protein ekspresyonu, nitrit/nitrat ve protein nitrotirozin seviyeleri ölçüldü (**şekil 4.3.**). Nitrik oksit sentaz 2, $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ve nitrotirozin seviyeleri, diğer gruplara kıyasla PRL ile tedavi edilen hücrelerde önemli ölçüde arttı. Bulgularımız, PRL tedavisinin fare nöroblastom NB2a hücre hattında NOS2 protein seviyelerini arttırdığını gösteren önceki bir çalışma ile uyumludur (Mete vd, 2015). NOS2 proteininde gözlenen artış ve artan NO_2^- ve NO_3^- seviyeleri, aşırı nitrik oksit ($\text{NO}^\cdot$) üretiminin PRL sitotoksitesine dahil olduğunu düşündürür. Nitrik oksitin süperoksit anyonu ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ile difüzyonla sınırlı reaksiyonu, oldukça oksitleyici bir tür olan peroksinitritin (ONOO^-) oluşumuna yol açar. Peroksinitrit, nitrotirozin (NO_2Tyr) oluşumunda ve dolayısıyla sitotoksitede rol oynar (Aslan ve ark., 2014). Asperglaucide uygulaması ile PRL ile muamele edilmiş hücrelerde NOS2 proteininin önemli ölçüde azaldığını gözlemledik. NF- κ B sinyal yolunun inhibisyonu, NOS2 gen transkripsiyonunu azaltır (Yoon ve ark., 2014). Hem akut hem de kronik inflamasyon sırasında birden fazla türde, organ sisteminde ve hücre tipinde tirozin kalıntılarının nitrasyonu tespit edilmiştir (Aslan, 2012). Tirozin nitrasyonu için birkaç farklı yolun varlığı, bu post-translasyonel modifikasyonun hücre sinyalizasyonu ve inflamasyondaki olası öneminin altını çizmektedir. Bu nedenle tirozin nitrasyonu, inflamatuvar koşullar sırasında sıklıkla değişen protein fonksiyonuyla ilişkili olan oksidatif hasarın bir göstergesidir (Aslan, 2012). Önceki çalışmalar, PRL toksisitesinde oksidatif stresin ortaya çıktığını rapor etmiştir (Akgül ve ark., 2021).

Artan NOS2 seviyeleri, fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/AKT sinyal yolunun aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Bae ve ark., 2006). AKT aynı zamanda protein kinaz B (PKB)

olarak da bilinir ve aktivasyonuna PI3K aktivasyonu aracılık edebilir. PI3K/AKT yolu, bir hayatta kalma yolu olarak kabul edilir (Kauffmann-Zeh ve ark., 1997). Bu sinyal yolağı AKT, IKK'nın fosforilasyonu ve NF- κ B p65'in aktivasyonu tarafından uyarılır, Bu da pozitif feedback olarak NF- κ B p65'in transkripsiyonel aktivitesini artırır (Ozes, 1999) (şekil 4.6.).

İnflamasyon, apoptoz ve nekroz ile ilişkili hücre ölümüne yol açabilir. Retinal pigment epitel hücreleri, 18 saat boyunca 2,43 mM PRL ile inkübe edildiğinde kaspaz-3'e bağlı apoptotik yolda aktivasyon olmadığını gözlemledik (şekil 4.5.). Önceki çalışmalar, PRL'in insan osteoblastik Saos-2/MG63 hücrelerinde ve fare osteoblastik MC3T3-E1 hücrelerinde apoptozu indüklediğini göstermiştir. Saos-2 hücreleri, 48 saat boyunca 5 mM PRL ile muamele edilmiş ve apoptozu belirlemek için nükleer parçalanma, floresan mikroskopu altında incelenmiştir (Nakamura ve ark., 1999). Prilokain kaynaklı apoptoz, insan nöronal hücrelerinde de araştırılmıştır. Prilokain, 24 saat boyunca 3,85 mM'lik bir LD50 konsantrasyonunda ilave edilmiştir. Floresein izotiyosiyanat (FITC)-konjuge anneksin V boyaması ve 7-amino-aktinomisin D (7-AAD) ile boyama, erken apoptozdaki hücre yüzdesini belirlemek için yapılmıştır (Werdehausen ve ark., 2009). Fosfatidilserin, apoptotik hücrelerde plazma membranlarının dış katmanına geçer ve Annexin V'i bağlar. Sağlam membranlara sahip hücreler ise 7-AAD boyasını almazlar. Bu nedenle, 7-AAD boyaması, membran bozulmasını gösterir ve birincil veya ikincil nekrotik hücre ölümünün bir göstergesidir. Yalnızca anneksin V-FITC boyaması için pozitif olan hücreler erken apoptotik olarak tanımlanır (Vermes ve ark., 1995). Uygulanan PRL konsantrasyonunda analiz edilen hücrelerin %50'sinden daha azı anneksin V için pozitif sonuç verdi. Bu durum, analiz edilen hücrelerin en azından bir kısmında erken apoptozu gösterdi. Verilen PRL konsantrasyonunda, anneksin V/7-AAD için pozitif boyanan hücrelerin de mevcut olduğu görüldü ve geç apoptoz veya nekrozu işaret etti (Werdehausen ve ark., 2009). Çalışmamızda apoptotik aktivasyonun olmaması, daha düşük sitotoksik PRL konsantrasyonunun uygulanması ve daha kısa inkübasyon süresinin yanı sıra hücre modelindeki farklılık ile açıklanabilir. Deneysel modelimizde azalan hücre canlılığı, muhtemelen PRL'nin neden olduğu nekrozdan kaynaklanmaktadır. Fibroblastlarda, tenositlerde (Zhang ve ark., 2017) ve kondrositlerde (Gomoll ve ark., 2006) bupivakain için amid grubu lokal anesteziklerin neden olduğu nekroz bildirilmiştir.

Hücre kültürü çalışmaları, kontrollü bir ortam aracılığıyla gerçekleştirildiği için tekrarlanabilir ve kesinlik açısından test edilebilir. Hücre kültürü farklı molekülleri standart olarak karşılaştırma ve sitotoksosite mekanizmalarını değerlendirme seçeneği sunar. Hücre kültürü çalışmalarının bazı sınırlamaları da vardır. Bu sınırlamalar, olası genetik kararsızlık, çeşitli hücre tipi etkileşimlerinin olmaması, hücre dışı matriks ve parakrin etkiler gibi spesifik çevresel faktörlerin olmamasıdır. Hücre kültürü çalışmaları, test edilen ilacın dokuya bağlı farmakokinetiğini etkileyen doku emilimi ve dağılımı gibi kritik değişkenleri de taklit edemez.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuçlarımız yaygın olarak kullanılan bir lokal anestezik olan PRL'nin yüksek konsantrasyonlarda ve uzun süreli maruziyette insan retinal epitel hücreleri üzerinde toksik etkileri olabileceğini düşündürmektedir. Toksisite mekanizması, artan NOS2 protein ekspresyonu ile sonuçlanan NF- κ B sinyal yolu aracılığıyla bir inflamatuvar yanıtın indüklenmesini içerir. Reaktif nitrojen türlerinin oluşumu, hücresel yıkımı daha da kötüleştirebilir ve hücre canlılığının azalmasına yol açabilir (şekil 4.6.).



KAYNAKLAR

- Akgül, B., Ayçan, İ., Hidişoğlu, E., Afşar, E., Yıldırım, S., Tanrıöver, G., . . . Aslan, M. Alleviation of prilocaine-induced epileptiform activity and cardiotoxicity by thymoquinone. *Daru*. 2021; 29 (1): 85-99.
- Aktan, F. Inos-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci*. 2004; 75 (6): 639-653.
- Alhassan, M. B., Kyari, F., & Ejere, H. O. Peribulbar versus retrobulbar anaesthesia for cataract surgery. *Anesth Analg*. 2008; 107 (6): 2089.
- Almeida, S., Veloso, A. I., Roque, L. G., & Mealha, Ó. (2011). *The eyes and games: A survey of visual attention and eye tracking input in video games*.
- Altın, H. Kardiyak otonom nöropatili diyabetik sıçanlarda bupivakain ile indüklenen asistoli tedavisi için lipid infüzyonunun resüsitasyona etkisi. 2014.
- Altıntaş, N. The importance of retinal pigment epithelium in hereditary retinopathies and the light at the end of the tunnel: The genetic of retinitis pigmentosa/leber congenital amaurosis. *Van Med J*. 2013; 20 (2): 116-124.
- Altman, A. J., Albert, D. M., & Fournier, G. A. Cocaine's use in ophthalmology: Our 100-year heritage. *Surv Ophthalmol*. 1985; 29 (4): 300-306.
- Aslan, M. Functional consequences of actin nitration: In vitro and in disease states. *Amino Acids*. 2012; 42 (1): 65-74.
- Aslan, M., Basaranlar, G., Unal, M., Ciftcioglu, A., Derin, N., & Mutus, B. Inhibition of neutral sphingomyelinase decreases elevated levels of inducible nitric oxide synthase and apoptotic cell death in ocular hypertensive rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014; 280 (3): 389-398.
- Aslan, M., Cort, A., & Yucel, I. Oxidative and nitrate stress markers in glaucoma. *Free Radic Biol Med*. 2008; 45 (4): 367-376.
- Aslan, M., Yucel, I., Ciftcioglu, A., Savaş, B., Akar, Y., Yucel, G., & Sanlioglu, S. Corneal protein nitration in experimental uveitis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2007; 232 (10): 1308-1313.
- Aslan, M., Yücel, I., Akar, Y., Yücel, G., Ciftçioğlu, M. A., & Sanlioglu, S. Nitrotyrosine formation and apoptosis in rat models of ocular injury. *Free Radic Res*. 2006; 40 (2): 147-153.
- Atkinson, W. S. Akinesia of the orbicularis. *American Journal of Ophthalmology*. 1953; 36 (9): 1255-1258.
- Bae, J. H., Jang, B. C., Suh, S. I., Ha, E., Baik, H. H., Kim, S. S., . . . Shin, D. H. Manganese induces inducible nitric oxide synthase (inos) expression via activation of both map kinase and pi3k/akt pathways in bv2 microglial cells. *Neurosci Lett*. 2006; 398 (1-2): 151-154.
- Banerji, A., & Das, R. Aurantiamide & aurantiamide acetate: New amides from piper aurantiacum wall. *Indian journal of chemistry*. 1975.
- Baud, V., & Collares, D. Post-translational modifications of relb nf-kb subunit and associated functions. *Cells*. 2016; 5 (2): 22.
- Blanc, V. F., Hardy, J. F., Milot, J., & Jacob, J. L. The oculocardiac reflex: A graphic and statistical analysis in infants and children. *Can Anaesth Soc J*. 1983; 30 (4): 360-369.
- Borgeat, A., & Aguirre, J. Update on local anesthetics. *Current Opinion in Anesthesiology*. 2010; 23 (4): 466-471.
- Boublik, J., Gupta, R., Bhar, S., & Atchabadian, A. Prilocaine spinal anesthesia for ambulatory surgery: A review of the available studies. *Anaesth Crit Care Pain Med*. 2016; 35 (6): 417-421.

- Cabral, S. A., Carraretto, A. R., Sousa, A. M., & Gomez, R. S. Effect of adding clonidine to lidocaine on ocular hemodynamics during sub-tenon's anesthesia: Randomized double-blind study. *Braz J Anesthesiol*. 2021; 71 (6): 628-634.
- Calenda, E., Olle, P., Muraine, M., & Brasseur, G. Peribulbar anesthesia and sub-tenon injection for vitreoretinal surgery: 300 cases. *Acta Ophthalmol Scand*. 2000; 78 (2): 196-199.
- Canan, B., & Çertuğ, A. Oftalmik cerrahide anestezi. *Ege Tıp Dergisi*. 2015; 54 (1): 46-53.
- Castellani, G., Paliuri, G., Orso, G., Paccagnella, N., D'Amore, C., Facci, L., . . . Bova, S. An intracellular adrenomedullin system reduces il-6 release via a nf-kb-mediated, camp-independent transcriptional mechanism in rat thymic epithelial cells. *Cytokine*. 2016; 88: 136-143.
- Chen, L.-W., Egan, L., Li, Z.-W., Greten, F. R., Kagnoff, M. F., & Karin, M. The two faces of ikk and nf-kb inhibition: Prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Nature medicine*. 2003; 9 (5): 575-581.
- Chua, M. J., Lersch, F., Chua, A. W. Y., Kumar, C. M., & Eke, T. Sub-tenon's anaesthesia for modern eye surgery-clinicians' perspective, 30 years after re-introduction. *Eye (Lond)*. 2021; 35 (5): 1295-1304.
- Connelly, L., Palacios-Callender, M., Ameixa, C., Moncada, S., & Hobbs, A. Biphasic regulation of nf-kb activity underlies the pro-and anti-inflammatory actions of nitric oxide. *The Journal of Immunology*. 2001; 166 (6): 3873-3881.
- Cummings, D. R., Yamashita, D. D., & McAndrews, J. P. Complications of local anesthesia used in oral and maxillofacial surgery. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2011; 23 (3): 369-377.
- Davis, D. B., 2nd, & Mandel, M. R. Posterior peribulbar anesthesia: An alternative to retrobulbar anesthesia. *J Cataract Refract Surg*. 1986; 12 (2): 182-184.
- de Alba, M. A., Justin, G. A., & Masters, J. S. Retrobulbar anesthesia. 2021.
- El-Hindy, N., Johnston, R. L., Jaycock, P., Eke, T., Braga, A. J., Tole, D. M., . . . Sparrow, J. M. The cataract national dataset electronic multi-centre audit of 55,567 operations: Anaesthetic techniques and complications. *Eye (Lond)*. 2009; 23 (1): 50-55.
- Engelman, J. A., Luo, J., & Cantley, L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*. 2006; 7 (8): 606-619.
- Esener, Z. Klinik anestezi. Genişletilmiş 3. Baskı. Logos Yayıncılık. 2004: 104-113.511.
- Feibel, R. M. Current concepts in retrobulbar anesthesia. *Surv Ophthalmol*. 1985; 30 (2): 102-110.
- Ferrara, M., Lugano, G., Sandinha, M. T., Kearns, V. R., Geraghty, B., & Steel, D. H. W. Biomechanical properties of retina and choroid: A comprehensive review of techniques and translational relevance. *Eye (Lond)*. 2021; 35 (7): 1818-1832.
- Förstermann, U., & Sessa, W. C. Nitric oxide synthases: Regulation and function. *European heart journal*. 2012; 33 (7): 829-837.
- Frost, R. A., Nystrom, G. J., & Lang, C. H. Multiple toll-like receptor ligands induce an il-6 transcriptional response in skeletal myocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006; 290 (3): R773-784.
- Gabay, C., & Kushner, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*. 1999; 340 (6): 448-454.
- Gomoll, A. H., Kang, R. W., Williams, J. M., Bach, B. R., & Cole, B. J. Chondrolysis after continuous intra-articular bupivacaine infusion: An experimental model investigating chondrotoxicity in the rabbit shoulder. *Arthroscopy*. 2006; 22 (8): 813-819.
- Grosskreutz, C. L., Katowitz, W. R., Freeman, E. E., & Dreyer, E. B. Lidocaine toxicity to rat retinal ganglion cells. *Curr Eye Res*. 1999; 18 (5): 363-367.

- Gulec, S., Aydin, Y., Uzuner, K., Yelken, B., & Senturk, Y. Effects of clonidine pre-treatment on bupivacaine and ropivacaine cardiotoxicity in rats. *Eur J Anaesthesiol.* 2004; 21 (3): 205-209.
- Hamid, M., Shiwani, H. A., & Hamid, F. A survey of anaesthetic preferences in cataract surgery. *Int J Ophthalmol.* 2022; 15 (2): 342-345.
- Hamilton, R. C. A discourse on the complications of retrobulbar and peribulbar blockade. *Can J Ophthalmol.* 2000; 35 (7): 363-372.
- Hay, A., Flynn, H. W., Jr., Hoffman, J. I., & Rivera, A. H. Needle penetration of the globe during retrobulbar and peribulbar injections. *Ophthalmology.* 1991; 98 (7): 1017-1024.
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2014). *Regulation of nf-kb by tn timer family cytokines*. Paper presented at the Seminars in immunology.
- Heavner, J. E. Local anesthetics. *Current opinion in anesthesiology.* 2007; 20 (4): 336-342.
- Hoesel, B., & Schmid, J. A. The complexity of nf-kb signaling in inflammation and cancer. *Molecular cancer.* 2013; 12 (1): 1-15.
- Hoffman, R. S., & Fine, I. H. Transient no light perception visual acuity after intracameral lidocaine injection. *J Cataract Refract Surg.* 1997; 23 (6): 957-958.
- Hollmann, M. W., Herroeder, S., Kurz, K. S., Hoenemann, C. W., Struemper, D., Hahnenkamp, K., & Durieux, M. E. Time-dependent inhibition of g protein-coupled receptor signaling by local anesthetics. *Anesthesiology.* 2004; 100 (4): 852-860.
- Jaichandran, V. Ophthalmic regional anaesthesia: A review and update. *Indian J Anaesth.* 2013; 57 (1): 7-13.
- Kaderli, A., Karalezli, A., Kaya, C., Yiğit, Ç., Çevik Kaşıkçı, D., Alaçamlı, G., . . . Sül, S. (2021). Tıp fakültesi öğrencileri için göz hastalıkları. In: Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi.
- Kandavel, R. (2009). *Local anesthesia for cataract surgery*.
- Karin, M. How nf-kb is activated: The role of the ikk kinase (ikk) complex. *Oncogene.* 1999; 18 (49): 6867-6874.
- Kauffmann-Zeh, A., Rodriguez-Viciana, P., Ulrich, E., Gilbert, C., Coffey, P., Downward, J., & Evan, G. Suppression of c-myc-induced apoptosis by ras signalling through pi (3) k and pkb. *Nature.* 1997; 385 (6616): 544-548.
- Keller, E. T., Chang, C., & Ershler, W. B. Inhibition of nfkb activity through maintenance of ikba levels contributes to dihydrotestosterone-mediated repression of the interleukin-6 promoter. *Journal of Biological Chemistry.* 1996; 271 (42): 26267-26275.
- Kishimoto, T. (2015). *Development of a new 48 ca enrichment method and the candles experiment*. Paper presented at the APS Division of Nuclear Physics Meeting Abstracts.
- Kocaçal, E., Eşer, İ., & Eğrilmez, S. Effect of polyethylene cover on the treatment of exposure keratopathy in icu. *Nurs Crit Care.* 2021; 26 (4): 282-287.
- Kocamanoğlu, İ., & Sarihasan, B. Lokal anestezikler: Yeni bir lokal anestezi levobupivakain. *Journal of Experimental and Clinical Medicine.* 2007; 24 (1): 27-36.
- Król, M., & Kepinska, M. Human nitric oxide synthase—its functions, polymorphisms, and inhibitors in the context of inflammation, diabetes and cardiovascular diseases. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020; 22 (1): 56.
- Kumar, C., & Dowd, T. Ophthalmic regional anaesthesia. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2008; 21 (5): 632-637.
- Kumar, C. M. Orbital regional anesthesia: Complications and their prevention. *Indian J Ophthalmol.* 2006; 54 (2): 77-84.
- Lai, M. M., Lai, J. C., Lee, W. H., Huang, J. J., Patel, S., Ying, H. S., . . . Handa, J. T. Comparison of retrobulbar and sub-tenon's capsule injection of local anesthetic in vitreoretinal surgery. *Ophthalmology.* 2005; 112 (4): 574-579.

- Lakkaraju, A., Umapathy, A., Tan, L. X., Daniele, L., Philp, N. J., Boesze-Battaglia, K., & Williams, D. S. The cell biology of the retinal pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res.* 2020; 100846.
- Lee, M., Rey, K., Besler, K., Wang, C., & Choy, J. Immunobiology of nitric oxide and regulation of inducible nitric oxide synthase. *Macrophages.* 2017; 181-207.
- Lincoff, H., Zweifach, P., Brodie, S., Fuchs, W., Gross, S., Kornmehl, E., . . . Jakobiec, F. Intraocular injection of lidocaine. *Ophthalmology.* 1985; 92 (11): 1587-1591.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. Nf-kb signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017; 2: 17023-.
- Malet, A., Faure, M. O., Deletage, N., Pereira, B., Haas, J., & Lambert, G. The comparative cytotoxic effects of different local anesthetics on a human neuroblastoma cell line. *Anesth Analg.* 2015; 120 (3): 589-596.
- Malkoç, İ. Göz küresinin tabakaları: Anatomik ve histolojik bir derleme. *Eurasian J Med.* 2006; 38: 124-129.
- Manassero, A., & Fanelli, A. Prilocaine hydrochloride 2% hyperbaric solution for intrathecal injection: A clinical review. *Local and regional anesthesia.* 2017; 10: 15.
- Martin-Flores, M. Clinical pharmacology and toxicology of local anesthetics and adjuncts. *Small animal regional anesthesia and analgesia.* 2013: 25-40.
- McGrath, L. A., & Bradshaw, C. P. Transconjunctival approach to peribulbar block. *Clin Ophthalmol.* 2013; 7: 1073-1076.
- McRae, L., & Presland, A. A review of current ophthalmic anaesthetic practice. *Br Med Bull.* 2020; 135 (1): 62-72.
- Moore, P. A., & Hersh, E. V. Local anesthetics: Pharmacology and toxicity. *Dent Clin North Am.* 2010; 54 (4): 587-599.
- Morgan Jr, G. E., & Mikail, M. S. (1996). Clinical anesthesiology. In *Clinical anesthesiology* (pp. 881-881).
- Mulfaul, K., Ozaki, E., Fernando, N., Brennan, K., Chirco, K. R., Connolly, E., . . . Doyle, S. L. Toll-like receptor 2 facilitates oxidative damage-induced retinal degeneration. *Cell Rep.* 2020; 30 (7): 2209-2224.e2205.
- Mumba, J. M., Kabambi, F. K., & Ngaka, C. T. (2017). Pharmacology of local anaesthetics and commonly used recipes in clinical practice. In *Current topics in anesthesiology*: IntechOpen.
- Nakamura, K., Kido, H., Morimoto, Y., Morimoto, H., Kobayashi, S., Morikawa, M., & Haneji, T. Prilocaine induces apoptosis in osteoblastic cells. *Can J Anaesth.* 1999; 46 (5 Pt 1): 476-482.
- Olmez, G., Soker Cakmak, S., Ipek Soker, S., Nergiz, Y., & Yildiz, F. Effects of intravitreal ropivacaine on retinal thickness and integrity in the guinea pig. *Curr Ther Res Clin Exp.* 2005; 66 (4): 394-400.
- Ozes, O. Mayo Id, gustin ja, pfeffer sr, pfeffer lm, and donner db. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature.* 1999; 401: 82-85.
- Palomares, O., Martin-Fontecha, M., Lauener, R., Traidl-Hoffmann, C., Cavkaytar, O., Akdis, M., & Akdis, C. Regulatory t cells and immune regulation of allergic diseases: Roles of il-10 and tgf- β . *Genes & Immunity.* 2014; 15 (8): 511-520.
- Parness, G., & Underhill, S. Regional anaesthesia for intraocular surgery. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain.* 2005; 5: 93-97.
- Patel, A. K., & Hackam, A. S. Toll-like receptor 3 (tlr3) protects retinal pigmented epithelium (rpe) cells from oxidative stress through a stat3-dependent mechanism. *Mol Immunol.* 2013; 54 (2): 122-131.
- Pautz, A., Art, J., Hahn, S., Nowag, S., Voss, C., & Kleinert, H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide.* 2010; 23 (2): 75-93.

- Pfäfflin, A., & Schleicher, E. Inflammation markers in point-of-care testing (poc). *Anal Bioanal Chem.* 2009; 393 (5): 1473-1480.
- Pilger, D., Maier, A. K., Bertelmann, E., Jousen, A., & Torun, N. Use of topical anaesthesia and peribulbar anaesthesia in descemets membrane endothelial keratoplasty. *Eur J Ophthalmol.* 2021; 31 (3): 1431-1436.
- Preston-Martin, S., Pike, M. C., Ross, R. K., Jones, P. A., & Henderson, B. E. Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer research.* 1990; 50 (23): 7415-7421.
- Prineas, S. (2013). Local and regional anesthesia for ophthalmic surgery. In: NYSORA.
- Qin, T., & Gao, S. Inhibition of proteasome activity upregulates il-6 expression in rpe cells through the activation of p38 mapks. *J Ophthalmol.* 2018; 2018: 5392432.
- Ripart, J., Nouvellon, E., & Chaumeron, A. Regional anesthesia for eye surgery. *Reg Anesth Pain Med.* 2005; 30 (1): 72-82.
- Roman, S. J., Chong Sit, D. A., Boureau, C. M., Auclin, F. X., & Ullern, M. M. Sub-tenon's anaesthesia: An efficient and safe technique. *Br J Ophthalmol.* 1997; 81 (8): 673-676.
- Rüschen, H., Bremner, F. D., & Carr, C. Complications after sub-tenon's eye block. *Anesth Analg.* 2003; 96 (1): 273-277, table of contents.
- Sakurai, H., Suzuki, S., Kawasaki, N., Nakano, H., Okazaki, T., Chino, A., . . . Saiki, I. Tumor necrosis factor- α -induced ikk phosphorylation of nf-kappab p65 on serine 536 is mediated through the traf2, traf5, and tak1 signaling pathway. *J Biol Chem.* 2003; 278 (38): 36916-36923.
- Sarikartal, A. Farklı etken maddeleri içeren lokal anesteziğin etkilerinin karşılaştırılması. 2018.
- Sarıtaş, A. Aksiller yaklaşımla uygulanan brakiyal pleksus blokajında prilokain ile levobupivakain'in etkilerinin karşılaştırılması. 2009.
- Schmittner, M. D., Faulhaber, J., Kemler, B., Koenen, W., Thumfart, J. O., Weiss, C., . . . Beck, G. C. Influence of high dose tumescent local anaesthesia with prilocaine on systemic interleukin (il)-6, il-8 and tumour necrosis factor- α . *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2010; 24 (12): 1400-1405.
- Singh, H., & Singh, J. Human eye tracking and related issues: A review. *International Journal of Scientific and Research Publications.* 2012; 2 (9): 1-9.
- Stevens, J. D. A new local anesthesia technique for cataract extraction by one quadrant sub-tenon's infiltration. *Br J Ophthalmol.* 1992; 76 (11): 670-674.
- Stokoe, D. The phosphoinositide 3-kinase pathway and cancer. *Expert Reviews in Molecular Medicine.* 2005; 7 (10): 1-22.
- Strichartz, G. R., Sanchez, V., Arthur, G. R., Chafetz, R., & Martin, D. Fundamental properties of local anesthetics. II. Measured octanol:Buffer partition coefficients and pka values of clinically used drugs. *Anesth Analg.* 1990; 71 (2): 158-170.
- Subramaniam, S., & Tennant, M. A concise review of the basic biology and pharmacology of local analgesia. *Australian dental journal.* 2005; 50: S23-S30.
- Suhas, R., & Channe Gowda, D. Structure-based rationale design and synthesis of aurantiamide acetate analogues—towards a new class of potent analgesic and anti-inflammatory agents. *Chemical Biology & Drug Design.* 2012; 79 (5): 850-862.
- Sui, H., Pan, S.-F., Feng, Y., Jin, B.-H., Liu, X., Zhou, L.-H., . . . Han, Z.-F. Zuo jin wan reverses p-gp-mediated drug-resistance by inhibiting activation of the pi3k/akt/nf-kb pathway. *BMC complementary and alternative medicine.* 2014; 14 (1): 1-10.
- Tetzlaff, J. E. The pharmacology of local anesthetics. *Anesthesiol Clin North Am.* 2000; 18 (2): 217-233, v.
- Tsuneoka, H., Ohki, K., Taniuchi, O., & Kitahara, K. Tenon's capsule anaesthesia for cataract surgery with iol implantation. *European Journal of Implant and Refractive Surgery.* 1993; 5 (1): 29-34.
- Upmacis, R. K. Atherosclerosis: A link between lipid intake and protein tyrosine nitration. *Lipid insights.* 2008; 2: LPI. S1030.

- Van Gurp, M., Festjens, N., Van Loo, G., Saelens, X., & Vandenabeele, P. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003; 304 (3): 487-497.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin v. *J Immunol Methods*. 1995; 184 (1): 39-51.
- Vermeulen, L., De Wilde, G., Notebaert, S., Vanden Berghe, W., & Haegeman, G. Regulation of the transcriptional activity of the nuclear factor-kappaB p65 subunit. *Biochem Pharmacol*. 2002; 64 (5-6): 963-970.
- Viatour, P., Merville, M. P., Bours, V., & Chariot, A. Phosphorylation of nf-kappaB and ikappaB proteins: Implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci*. 2005; 30 (1): 43-52.
- Wadood, A. C., Dhillon, B., & Singh, J. Inadvertent ocular perforation and intravitreal injection of an anesthetic agent during retrobulbar injection. *J Cataract Refract Surg*. 2002; 28 (3): 562-565.
- Wang, Y. H., Wang, D. R., Liu, J. Y., & Pan, J. Local anesthesia in oral and maxillofacial surgery: A review of current opinion. *J Dent Sci*. 2021; 16 (4): 1055-1065.
- Werdehausen, R., Fazeli, S., Braun, S., Hermanns, H., Essmann, F., Hollmann, M. W., . . . Stevens, M. F. Apoptosis induction by different local anaesthetics in a neuroblastoma cell line. *Br J Anaesth*. 2009; 103 (5): 711-718.
- Willoughby, C. E., Ponzin, D., Ferrari, S., Lobo, A., Landau, K., & Omid, Y. Anatomy and physiology of the human eye: Effects of mucopolysaccharidoses disease on structure and function—a review. *Clinical & Experimental Ophthalmology*. 2010; 38: 2-11.
- Winkler, B. S. An hypothesis to account for the renewal of outer segments in rod and cone photoreceptor cells: Renewal as a surrogate antioxidant. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49 (8): 3259-3261.
- Yang, L., Hu, X., & Mo, Y.-Y. Acidosis promotes tumorigenesis by activating akt/nf-kb signaling. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2019; 38 (1): 179-188.
- Yanoff, M., & Duker, J. S. *Ophthalmology*: Elsevier Health Sciences; 2018, p:
- Yao, F. S., Tseng, C. C., Ho, C. Y., Levin, S. K., & Illner, P. Cerebral oxygen desaturation is associated with early postoperative neuropsychological dysfunction in patients undergoing cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2004; 18 (5): 552-558.
- Yoon, C.-S., Kim, D.-C., Lee, D.-S., Kim, K.-S., Ko, W., Sohn, J. H., . . . Oh, H. Anti-neuroinflammatory effect of aurantiamide acetate from the marine fungus *aspergillus* sp. Sf-5921: Inhibition of nf-kb and mapk pathways in lipopolysaccharide-induced mouse bv2 microglial cells. *International Immunopharmacology*. 2014; 23 (2): 568-574.
- Zhang, A. Z., Ficklscherer, A., Gülecü, M. F., Paulus, A. C., Niethammer, T. R., Jansson, V., & Müller, P. E. Cell toxicity in fibroblasts, tenocytes, and human mesenchymal stem cells—a comparison of necrosis and apoptosis-inducing ability in ropivacaine, bupivacaine, and triamcinolone. *Arthroscopy*. 2017; 33 (4): 840-848.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Aleyna	Uyruğu	
Soyadı	ÖZTÜZÜN	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise		
Lisans		
Yüksek Lisans		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)

Burslar-Ödüller:**Yayınlar ve Bildiriler:****Hakemli Kongre/Sempozyum Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar:****Diğer Dergilerde Yayınlanan Makaleler:**