

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

90191

**LOKAL ANESTEZİKLERİN ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN
KEMİLÜMİNESANS YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ
DR. BERRİN GÜNAYDIN

TEZ YÖNETİCİSİ
DOÇ.DR. A.TUNCAY DEMİRYÜREK

90191

ANKARA – 2000

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

**‘ Tez danışmanım Sayın Doç. Dr. A. Tuncay Demiryürek’e ve doktora
eğitimim süresince benden yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer
öğretim üyeleri ve arkadaşlarıma teşekkür ederim’**



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
II. 1. Serbest Radikaller ve Kaynakları	3
II. 1. 1. Süperoksit anyonu	3
II. 1. 2. Hidrojen Peroksit	6
II. 1. 3. Hidroksil Radikali	7
II. 1. 4. Lipid Peroksil Radikali	8
II. 1. 5. Nitrik Oksit ve Peroksinitrit	8
II. 1. 6. Hipokloröz Asit	9
II. 1. 7. Singlet Oksijen	9
II. 2. Serbest Radikallerin Kemilüminesans (KL) Yöntemiyle Ölçülmesi	10
II. 2. 1. KL Yönteminde Kullanılan Problar	10
II. 2. 1. 1. Luminol	11
II. 2. 1. 2. Lusigenin	11
II. 2. 1. 3. İzoluminol	12
II. 3. Antioksidanlar	15
II. 3. 1. Enzim Antioksidanlar	16
II.3. 2. Önleyici Antioksidanlar	16
II.3. 3. Süpürücü Antioksidanlar	17
II. 3. 4. Ksantin Oksidaz İnhibitörleri	17

II. 4. Lokal Anestezikler	18
II. 4. 1. Amid yapıllar	21
II. 4. 1. 1. Lidokain	21
II. 4. 1. 2. Prilokain	22
II. 4. 1. 3. Bupivakain	23
II. 4. 1. 4. Artikain	24
II. 4. 2. Ester yapıllar	24
II. 4. 2. 1. Tetrakain	24
III. MATERYAL VE YÖNTEM	25
III. 1. Lökositlerin İzolasyonu	25
III. 2.. Farklı Stimülanlarla Oluşturulan KL'lar	25
III. 2. 1. N-formil-L-metiyonil-L-lösil-L-fenilalaninin (FMLP)	
Oluşturduğu KL	25
III. 2. 2. Ksantin-ksantin Oksidazın Oluşturduğu KL	26
III. 2. 3. Hidrojen Peroksitin Oluşturduğu KL	26
III. 2. 4. Demir Sülfatın Oluşturduğu KL	26
III. 2. 5. Hipokloröz Asitin Oluşturduğu KL	27
III. 2. 6. Peroksinitritin Oluşturduğu KL	27
III. 2. 6. 1. Peroksinitrit Sentezi	27
III. 3.. Deney Protokolü	28
III. 4.. İstatistiksel Analiz	28
III. 5. Kullanılan Malzemeler	28
III. 6. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Hazırlanmaları	29

III. 6. 1. Fosfat Tamponlu Tuzlu Su Solüsyonu (PBS)	29
III. 6. 2. Hanks'in dengeli tuz solüsyonu (HBSS)	29
III. 6. 3. Luminol Sodyum	29
III. 6. 4. Lusigenin	30
III. 6. 5. Ksantin	30
III. 6. 6. Ksantin Oksidaz	30
III. 6. 7. Katalaz	30
III. 6. 8. Sodyum Hipoklorit	30
III. 6. 9. Hidrojen Peroksit	30
III. 6. 10. Demir Sülfat	31
III. 6. 11. FMLP	31
III. 6. 12. Sodyum Sitrat	31
IV. BULGULAR	32
IV. 1. Lokal Anesteziklerin FMLP ile Uyarılmış Lökositler Üzerine Etkileri	32
IV. 2. Lokal Anesteziklerin Direkt Olarak Oluşturulmuş Serbest Radikaller ve Reaktif Metabolitleri Üzerine Etkileri	36
IV. 2. 1. Lokal Anesteziklerin Süperoksit Radikali Üzerine Olan Etkileri	36
IV. 2. 2. Lokal Anesteziklerin Hidrojen Peroksit Üzerine Olan Etkileri	36
IV. 2. 3. Lokal Anesteziklerin Demir Sülfatın Oluşturduğu KL Üzerine Etkileri	39
IV. 2. 4. Lokal Anesteziklerin Hipokloröz Asitle Oluşturulan KL Etkileri.	42
IV. 2 .5. Lokal Anesteziklerin Peroksinitritle Oluşturulan KL Üzerine	

Etkileri	42.
V. TARTIşMA VE SONUÇLAR	47
VI. ÖZET	53
VII. SUMMARY	55
VIII. KAYNAKLAR	57
IX. ÖZGEÇMİş	69



I. GİRİŞ

Nötrofil membranındaki nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) bağımlı oksidaz sisteminin aktivasyonu ile süperoksit radikali oluşmakta ve ekstraselüler ortama salıverilmektedir. Bu enzim aktive edildiğinde, oksijenin süperoksit radikale redüksiyonu hızlı bir şekilde katalizlenir ve süperoksitin dismutasyonu ile de hidrojen peroksit oluşur. Süperoksit radikalının kendisi toksik olabileceği gibi nötrofil ve monositlerin azurofilik granüllerinde yoğun olarak bulunan miyeloperoksidaz (MPO) enzimi tarafından hidrojen peroksitin halidler (klorid, Cl) ile reaksiyonu sonucu oluşan hipohaloz asit (hipokloröz asit) süperoksitin toksisitesine aracılık eder^{3,59}. Süperoksit radikali ve hidrojen peroksit etkileşerek Haber-Weiss reaksiyonu ile hidroksil radikalini oluşturur²¹. Stimüle edilen insan nötrofillerinden serbest radikallerden farklı bir biyosentetik yolla NO salıverildiği de bildirilmiştir⁶³. NO, eşlenmemiş elektron içerdiği için süperoksitle hızla reaksiyona girer ve kuvvetli oksidan peroksinitriti oluşturur. Peroksinitrit ise hidroksil ile nitrojen dioksit radikallerini oluşturma yeteneğindedir⁴.

Bugüne kadar kemilüminesans (KL) yöntemiyle farklı ilaçların antioksidan aktiviteleri gösterilmiştir ancak lokal anesteziklerin antioksidan aktiviteleriyle ilgili yapılan çalışmalar kısıtlı sayıdadır^{16, 40, 46, 47, 82}. Yapılan çalışmalarda, bazı lokal anesteziklerin lökositlerde süperoksit oluşumu ile lizozomal enzim salıverilmesini ve adhezyonunu inhibe ettikleri için lokal

anesteziklerin lökositlerin fonksiyonlarının belirlenmesinde iyi bir sistem olabileceği bildirilmiştir^{44, 62}. Mikawa ve ark⁵¹ klinik olarak kullanılan konsantrasyonlardan çok yüksek konsantrasyonlardaki lidokain ve mepivakainin insan nötrofillerinde *in vitro* olarak süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil oluşumunu azalttığını göstermişlerdir. Yine başka çalışmalarda da lidokainin membran stabilize edici özelliği ile lipid peroksidasyonuna neden olan sitotoksik reaktif oksijen türlerini (ROT) uzaklaştırdığı öne sürülmüştür^{10, 11}. Fakat lidokain dışındaki lokal anesteziklerin antioksidan etkileri ile mekanizması yanında, lokal anesteziklerin peroksinitrit gibi reaktif türlerle direkt olarak reaksiyona girip girmediğine ilişkin bir araştırma henüz bulunmamaktadır.

Bu çalışmada değişik kimyasal yapılara sahip olan ve lokal anestezik olarak kullanılan lidokain, prilokain, bupivakain, artikain ve tetrakainin insan izole lökositlerinden salıverilen serbest radikaller ve ROT üzerindeki etkilerinin KL yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır. Bu lokal anesteziklerin hücresiz ortamda kimyasal veya enzimatik yolla oluşturulan radikaller ve metabolitler üzerine etkileri de araştırılarak oluşan etkilerin lökosit düzeyinde mi yoksa salıverilen radikal ve metabolitler üzerinde direkt bir etki sonucunda mı olduğu gösterilmeye çalışılmıştır.

II. GENEL BİLGİLER

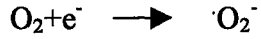
II. 1. Serbest Radikaller ve Kaynakları:

Dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren türler serbest radikal olarak tanımlanmaktadır. Stabil değildirler, kısa yarı ömürleri vardır ve oldukça reaktiflerdir. Serbest radikallerin birçok hastalığın patogeneğinde rol aldığı bilinmektedir^{12, 31, 32}. Son yıllarda ROT terimi, serbest radikaller yanında hidrojen peroksit, hipokloröz asit ve singlet oksijen gibi bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içermeyen fakat hücre dışı ve hücre içi ortamda serbest radikal oluşturma kapasitesine sahip molekülleri de içerecek şekilde genişletilmiştir³⁰.

ROT oluşumu, endojen antioksidanların kapasitesini aşınca çeşitli mekanizmalarla doku hasarı oluşur. Bunlar arasında DNA hasarı, lipid peroksidasyonu, protein hasarı, enzim oksidasyonu, hücre içi tiyol bileşiklerinin tüketimi ve nükleer faktör κ B aktivasyonu ile monosit ve makrofajlardan proinflatuar sitokin salıverilmesini stimüle etmek sayılabilir. Birçok ROT, oldukça kısa yarı ömre sahip olmalarına karşın serbest radikal zincir reaksiyonunu başlatarak doku hasarına yol açabilir⁵⁸.

II. 1. 1. Süperoksit Anyonu:

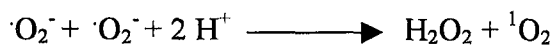
Oksijen molekülünün fazladan elektron almasıyla oluşur.

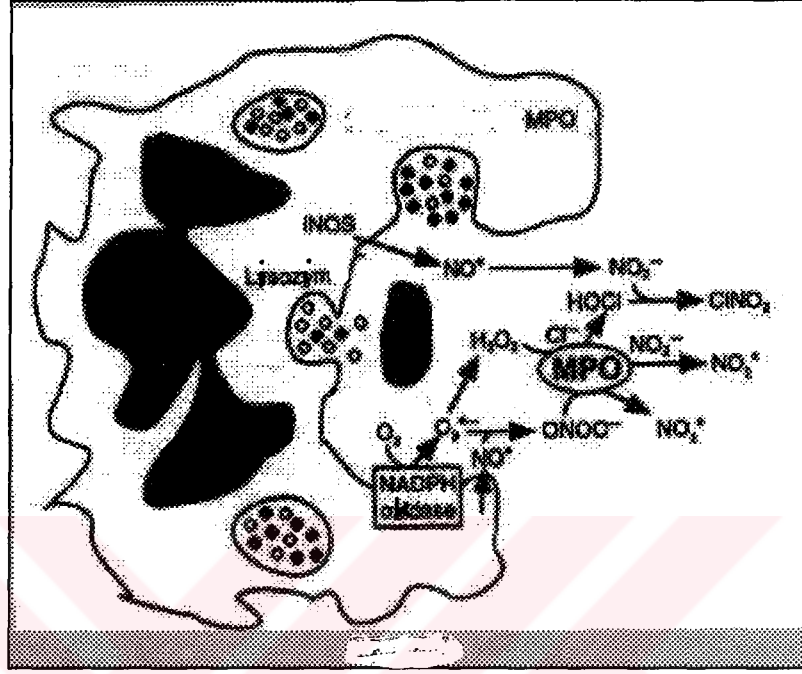


ROT, hücresel metabolizmanın normal ürünleri olarak sürekli oluşmaktadır. Oksidatif fosforilasyon sırasında mitokondriyal sitokrom oksidaz enzimi ile moleküler oksijen 4 elektron alarak suya indirgenir. Bununla birlikte bu yoldan oksijenin yaklaşık %1-5'i sızarak enzimatik olmayan basamaklı ve her basamakta tek elektronun kullanıldığı bir başka yolağa girerek toksik ara ürünler oluştururlar. Bu reaksiyonların ilkinde süperoksit oluşur⁵⁹. Fakat inflamasyonda en önemli süperoksit kaynağı aktive nötrofiller ile makrofajlardır ve daha az ölçüde eozinofiller, monositler ve lenfositlerdir. Nötrofil, makrofaj gibi fagositlerde süperoksit oluşumu membrandaki NADPH oksidaza bağlıdır (Şekil 1). Bu oksidaz kronik granülomatoz hastalığında fonksiyonel değildir ve bu hastalarda nötrofiller opsonize bakteriyi alırlar fakat öldüremezler^{29, 30}.



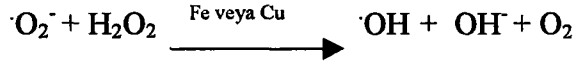
Nitrik oksit sentazın bilinen 3 izoformunun, substrat veya bazı kofaktörlerin yokluğunda oksijenden süperoksit oluşturduğu gösterilmiştir^{57, 75, 80}. Süperoksitin hidroksil radikale oranla reaktivitesi daha zayıftır, membranları geçemez ve az sayıda hücresel hedeflere hasar verir. Genel reaktivitesi sınırlıdır ve sadece NO gibi birkaç bileşikle hızlı reaksiyona girer. Spontan olarak sulu ortamda hidrojen peroksit ve singlet oksijene dismutasyonu sonucu hücre hasarı oluşturur.



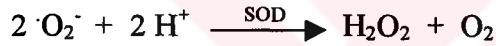


Şekil 1. Nötrofillerden serbest radikal salıverilmesi. Nötrofillerin stimülasyonu NADPH oksidaz enziminin aktivasyonuna, süperoksit ($O_2^{\cdot -}$) salıverilmesine ve miyeloperoksidaz (MPO) enziminin sekresyonuna yol açar. Nötrofillerden nitrik oksitin (NO) simultane oluşumu peroksinitrit ($ONOO^-$) ve nitrit (NO_2^-) oluşumuna neden olur.

Süperoksit, metal iyonlarının katalize ettiği reaksiyonlarla hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek hidroksil radikaline dönüşür (Haber Weiss reaksiyonu)¹².

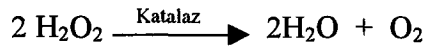


Süperoksit nitrik oksitle etkileşip, peroksinitrit ve hidroksil radikali oluşturabilir. Süperoksitin DNA veya proteinlerle direkt reaksiyona girip girmediği kesin değildir. Süperoksitin ortamdan uzaklaştırılması spontan olarak veya süperoksit dismutaz (SOD) ile hidrojen peroksite dismutasyonu ile oluşur.

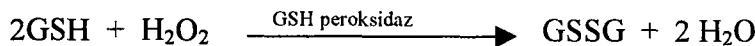


II. 1. 2. Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit fagositlerden salıverilen süperoksitin dismutasyonu ile oluşur ve birçok fizyolojik fonksiyona sahiptir. Ksantin oksidaz, glükopirrolat gibi bazı enzimler direkt olarak hidrojen peroksit oluştururlar³⁰. SOD tarafından oluşturulan hidrojen peroksit daha çok hücre içi ortamda bulunan katalaz enzimi ile suya ve oksijene dönüştürülür.



Hücre dışı ortamda katalazın görevini daha çok selenyum bağımlı enzim olan glutatyon (GSH) peroksidaz üstlenir.



Hidrojen peroksit zayıf bir oksidan olmasına karşın, hücre membranından kolayca difüze olabilme yeteneğinden dolayı hasar oluşturuca potansiyeli yüksektir. Fenton reaksiyonu ile metal iyonlarının bulunduğu yerlerde hidroksil radikaline bağlı doku hasarı oluşturur. Hidrojen peroksit proteinlerin tiyol gruplarını okside eder, hücre içi olayları indüklemesinden dolayı metabolik sinyal olarak etki gösterebileceği ileri sürülmüştür³².

II. 1. 3. Hidroksil Radikali

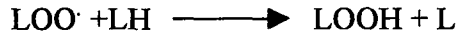
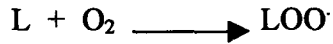
En reaktif okside edici radikaldır ve *in vivo* koşullarda $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ gibi yüksek bir reaksiyon hızıyla hemen hemen her moleküle saldırır.



Hidroksil radikali lipid peroksidasyonu olarak bilinen klasik serbest radikal zincir reaksiyonunu başlatabilir. Membran fosfolipidlerinin yanında hidroksil radikali olduğu zaman peroksil radikali, lipid peroksitler gibi radikaller oluşturur. Hidroperoksitlerin birikmesi membran fonksiyonunu bozabilir ve sitotoksik aldehytler oluşturabilir³². Lipid peroksidasyonunun son ürünleri olarak PGF_2 benzeri bileşikler oluşabilir⁵³.

II. 1. 4. Lipid Peroksil Radikali

Reaktif serbest radikaller ve metabolitler membrandan bir hidrojen uzaklaştırılmasıyla lipid peroksidasyonunu başlatırlar. Oluşan lipid radikal (L) oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksil radikalini (LOO[•]) oluşturur.



Lipid peroksil radikali başka bir lipidden (LH) hidrojen atomunu uzaklaştırır ve lipid hidroperoksit (LOOH) ile başka bir lipid radikali oluşturur. Bu zincir reaksiyonunun NO'un lipid peroksil radikali ile etkileşerek inhibe ettiği gösterilmiştir³³.

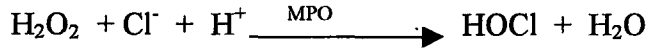


II. 1. 5. Nitrik Oksit ve Peroksinitrit

Fagositik hücrelerde L-arjinden NO oluştuğu bilinmektedir⁶⁸. NO prekürsörü L-arjinin ve NO donörleri lökositlerden ROT salıverilmesini inhibe ederler^{13, 14}. Bu etki muhtemelen direkt olarak NADPH oksidaz inhibisyonuna bağlıdır⁸. Nitrik oksitin süperoksitle reaksiyonu peroksinitrit üzerinden hidroksil ve nitrojen dioksit radikallerini oluşturur^{4, 50}. Peroksinitrit proteinlerdeki veya serbest haldeki tirozini orto pozisyonundan nitrolayarak 3-nitrotirozinin oluşturur. Peroksinitrit nötrofillerde etkin bir “priming” ajandır ve bu etkisine tirozin rezidülerinin nitrasyonu aracılık eder⁶⁰.

II. 1. 6. Hipokloröz Asit :

Hipokloröz asit nötrofillerden ve monositlerden salıverilen MPO enziminin hidrojen peroksit üzerine etkisiyle oluşur ve hücre dışına salıverilir. MPO inhibitörü olan azit ile oluşumu engellenebilir¹⁵.



Eozinofiller tercihen bromürü okside eden ve HOBr oluşturan benzer bir enzim olan eozinofil peroksidaz içerir. Endojen aminlerle reaksiyona girerek kuvvetli oksidan ve bakterisit etkili kloraminleri oluştururlar. HOCl'in, nitrit ile reaksiyona girerek nitril klorid (Cl-NO), klorin nitrit (Cl-ONO) ve NO gibi radikal ve reaktif ara ürünler oluşturduğu gösterilmiştir^{18, 19}. Hipohalöz asitler kuvvetli antibakteriyel etkiye sahip olmalarına rağmen düşük konsantrasyonlarda bazı proteinlerin fonksiyonlarını bozarlar⁷⁸. Yüksek konsantrasyonlarda ise hücre lizisine yol açarlar. Hücre membranında tiyol grupları kuvvetli oksidandır ve membran transport sistemlerini inhibe ederler ve de tirozin rezidülerinin klorlanmasına neden olurlar³².

II. 1. 7. Singlet Oksijen

Serbest radikal olmasına karşın kuvvetli oksidan bir ajandır ve birçok molekülle etkileşir. Membran lipidlerine etki ederek peroksitleri oluşturur. NO ve hidrojen peroksitin etkileşmesiyle de singlet oksijen oluşabilmektedir^{17, 54}.

II. 2. Serbest Radikallerin Kemilüminesans (KL) Yöntemiyle Ölçülmesi

Serbest radikal reaksiyonlarının *in vivo* olarak ölçüldüğü birçok yöntem vardır³⁴. Kararsız durumdaki uyarılmış bir atom veya molekül temel enerji düzeyine dönerken fazla enerjisinin tümünü veya bir kısmını ışık şeklinde atabilir. Böylece sistemden genel olarak “luminesans” olarak adlandırılan ışık yayılması gözlenir. Atom veya molekül gerekli uyarılma enerjisini kimyasal bir tepkimeden sağlıyorsa gözlenen luminesansa “kemiluminesans” (KL) adı verilir^{27, 81}. KL yöntemi ışık, sıcaklık, pH, hücre konsantrasyonu, yaşlılık ve kullanılan prob konsantrasyonu gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilir. Bu yöntem submikromolar düzeyde ölçüm yapabilecek duyarlılığa sahiptir. Tek bir prob veya kombinasyonu ile hızlı ve basit bir ölçüm sağlanabilmektedir. Problemlerin kullanıldıkları konsantrasyonlarda hiç bir toksisitesi saptanmamıştır²³.

II. 2. A. KL Yönteminde Kullanılan Problemler:

Solunum patlaması sırasında yayılan düşük miktardaki ışık ancak foton sayıcılarla tayin edilebilir. Bu nedenle düşük miktardaki KL sinyalini artırmak için toksik olmayan, okside olma özelliğine sahip luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazin-dion), lusigenin (bis-N-metil akridinyum nitrat), izoluminol (5,6-diamino-2,3-dihidro-1,4-ftalazin-dion), lusiferin analogları, penilin G, lofin ve L012 gibi substratlar tanımlanmıştır. Bu problemlerle artırılmış KL’sin başlıca avantajı her ölçümde daha az sayıda hücreye gereksinim olması ve farklı deney gruplarının doğru bir şekilde karşılaştırılmasına olanak vermesidir^{23,67}.

II. 2. 1. 1 . Luminol:

Luminol KL'si için önce α -hidroksi-hidroksi peroksit olarak tanımlanan luminolün bir basamak oksidasyonu ile oluşan luminol radikali ve daha sonraki basamakta bu anahtar araçlar dekompoze olmaktadır^{20, 49}. İlk basamak oksidanların tipine, eklenen kimyasal maddelere, tampon solüsyon ve pH'ya bağımlıyken, son basamak sadece sistemin pH'sına bağlıdır⁶¹. Luminolün oluşturduğu luminesansda hız kısıtlayıcı basamak pH bağımlı olan endoperoksitin dekompozisyon olayıdır. Fakat luminolün reaktif radikal formu tek değerli luminolün oksidasyonu ile oluşur²⁰ (Şekil 2).

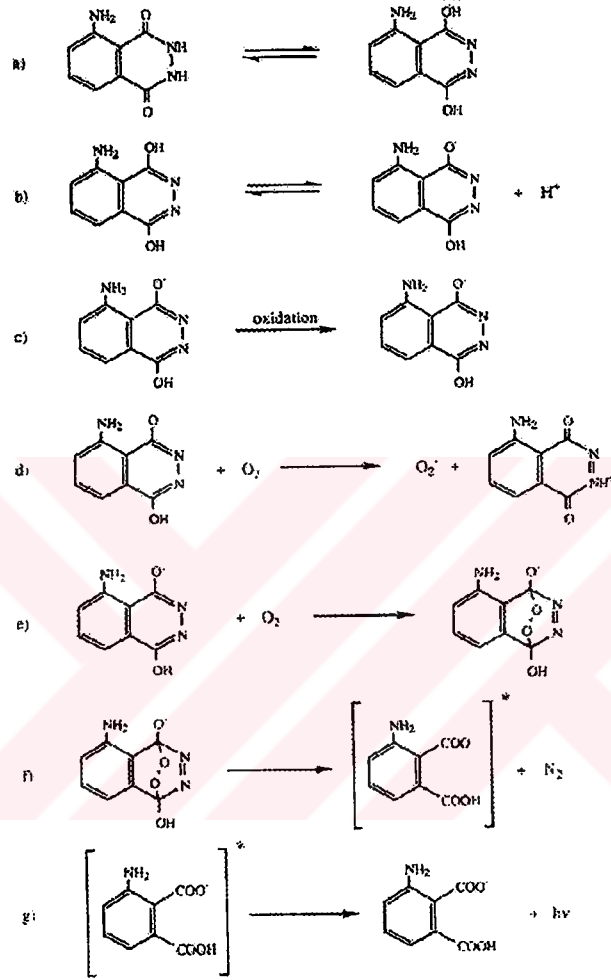
Polimorfonükleer lökositlerde (PMNL) luminol KL'si MPO - H₂O₂ bağımlıdır¹. Luminolün kendisi süperoksit radikali için kaynak oluşturduğundan, süperoksit tayininde güvenilir bir prob olarak kabul edilmemektedir^{20,56}.

II. 2. 1. 2 . Lusigenin:

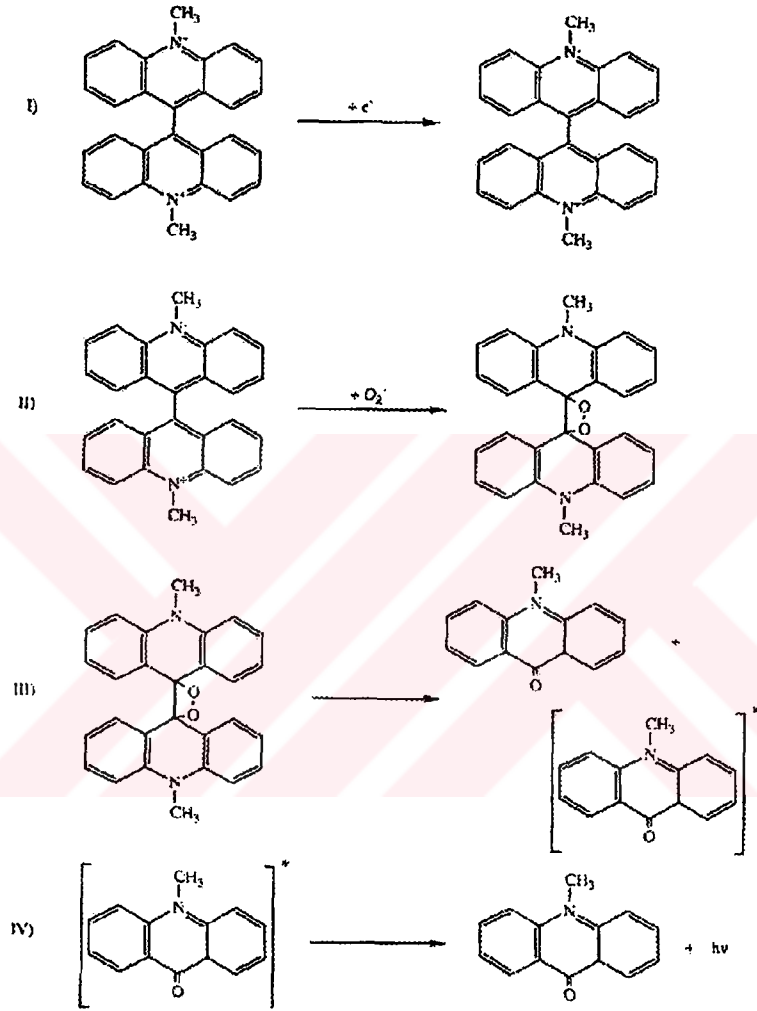
Lusigenin KL'si içinse, lusigeninin bir basamak indirgenmesi ile oluşan lusigenin radikali oluşmaktadır. Lüminesans veren bileşiğin radikal formu serbest radikallerle reaksiyona girerek ışık oluşturduğundan lusigenin KL'si da luminolünkine benzer. Fakat lusigeninin reaktif radikal formu tek değerli lusigeninin redüksiyonu ile gerçekleşir²⁰ (Şekil 3).

II. 2. 1. 3. İzoluminol:

İzoluminol, kimyasal yapısı yönünden luminolden sadece fitalat halkasındaki amino grubunun konumu yönüyle farklılık gösterir. KL oluşturma bakımından ise farklılık göstermez ancak amino grubunun aromatik halkadaki ilk karbon atomundan daha uzakta lokalize olması molekülün daha hidrofilik olmasına ve bunun sonucunda izoluminol molekülüne karşı biyolojik membranların geçirgen olmamasına neden olur. Bu nedenle izoluminol sadece hücre dışı ROT'nin tayininde kullanılır⁴³.



Şekil 2: Luminolün oksidasyon reaksiyonları.



Şekil 3: Lusigeninin redüksiyon reaksiyonları.

II. 3. Antioksidanlar

ROT'nin oluşumu ve sonucunda gelişen hasarı önlemek için vücutta geliştirilmiş olan savunma mekanizmaları “antioksidan savunma sistemleri” olarak bilinir^{30, 32}. Antioksidanlar düşük konsantrasyonlarda bile okside olabilme potansiyeline sahip bir maddenin oksidasyonunu ya belirgin şekilde önler ya da geciktirirler⁷³.

Normal aerobik metabolizma yoluyla bir çok hücrede oksijen ve metabolitleri oluşurken, patolojik durumlarda bu oluşum daha da artar ve oksidan oluşumu endojen antioksidan mekanizmaları aştığı zaman doku hasarı gelişir⁵⁹. Oksidatif aktivitenin arttığı bir çok patofizyolojik durum ve hastalık vardır. Örneğin; ateroskleroz, iskemi-reperfüzyon hasarı, transplantasyon, diabet, inflamasyon, romatoid artrit, inflamatuvar barsak hastalığı, pankreatit, kanser, nörolojik hastalıklar, hipertansiyon, göz hastalıkları, ilaç toksisitesi, akciğer hastalıkları, AIDS, hematolojik hastalıklar ve egzersiz bunlar arasında sayılabilir⁴⁸. Normalde kanda ve hücrelerde lipid peroksidasyonunu indükleyen serbest radikal zincir reaksiyonunun bloke edilmesiyle serbest radikal hasarı azaltılmaya çalışılır^{59, 73}. Yüksek oranda serbest radikallerin oluşumu hücre ölümüne veya apoptozise neden olur. Antioksidan enzim sistemleri mitokondri ve sitozolde bulunmaktadır. Potansiyel antioksidan savunma sistemleri doğal antioksidanlar, vitaminler ve antioksidan aktivitesi olan sentetik ajanları içermektedir^{28, 48}.

II. 3. 1. Enzim Antioksidanlar

Bunlar SOD, katalaz ve GSH peroksidazdır. Hücre içi ortamda oksidanların redüksiyonunu katalizler⁴⁸. SOD süperoksit radikalının hidrojen peroksitle dismutasyonunu katalizler ve hidroksil radikali oluşturmak için ortamda hidrojen peroksitle reaksiyona girecek süperoksit radikalini ortadan kaldırır. Bir metalloprotein olan katalaz, hidrojen peroksitten su ve oksijen oluşumunu katalize eder. GSH peroksidaz sitozol ve mitokondride SOD tarafından oluşturulan hidrojen peroksiti ortadan kaldıran başlıca enzimdir. Selenyum içeren GSH peroksidaz, katalitik fonksiyonlar için gerekli hidrojen peroksiti ortadan kaldırır³⁰.

II. 3. 2. Önleyici Antioksidanlar

Bu antioksidanların büyük çoğunluğu hücre dışındadır. Demir ve bakır gibi geçiş metalleri eşlenmemiş elektron içerirler ve hızlı bir şekilde serbest radikallerle reaksiyona girerler. Bir çok vücut sıvısında bulunan demir bağlayıcı protein laktoferrinin, demiri bağlamasıyla serbest radikal oluşumu önlenmiş olur. Bakır taşıyıcı protein olan seruloplazmin de aynı şekilde bakırı bağlayarak oksidan oluşumunu önler. Sentetik bir demir şelatörü olan desferrioksamin, demirle indüklenen lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Aşırı demir iyonu sitotoksik oksijen radikallerinin özellikle de hidroksil radikali üzerinden membran lipid peroksidasyonunu artırır. Demir şelasyon tedavisinin doku hasarının azalmasında etkili olabileceği ileri sürülmektedir. Desferrioksaminin peroksil radikalini süpürücü etkisi vardır. Lipid zinciri kırıcı antioksidan olarak etki eder⁴⁸.

II. 3. 3. Süpürücü Antioksidanlar

Süpürücü antioksidanlar hem hücre içi hem de hücre dışında lokalize olmuşlardır. Tokoferol ve karotenoid, lipidde çözünür ve peroksil radikalini yakalayarak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu bloke ederler. Pürin metabolizmasının son ürünü olan ürat, vücut sıvılarında yaklaşık 0.4 mM düzeyinde bulunur. GSH, insan hücrelerinde mM konsantrasyonda oluşur fakat çok az miktarda plazma ve diğer vücut sıvılarında bulunur. GSH, ürat, α -tokoferol ve askorbat katalitik olmayan bir reaksiyonla serbest radikalleri ortadan kaldırırlar⁴⁸.

Dihidrolipoik asit, sülfidril grubu içeren bir redüktandır. Süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikaline karşı antioksidan etkinlik gösterir. Dihidrolipoik asit membranda peroksil radikalinin potent süpürücüsü olarak lipid peroksidasyonunu önler. Özellikle hipokloröz asite karşı etkilidir. Vitamin E ve askorbat gibi diğer antioksidanların antioksidan potensini artırır. Salisilatlar ve bundan türeyen aminosalisilik asit de efektif serbest radikal süpürücülerdendir⁴⁸.

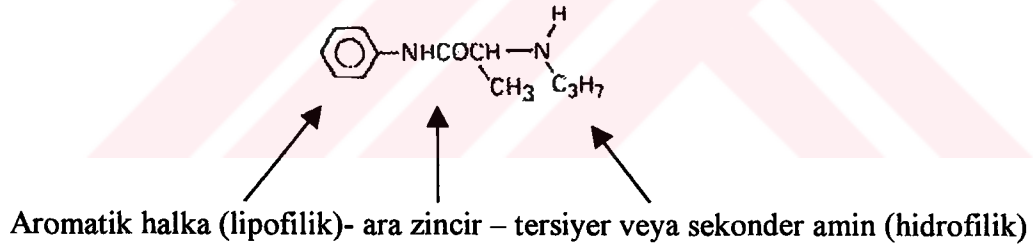
II. 3. 4. Ksantin Oksidaz İnhibitörleri

Ksantin oksidaz enzimi iskemik dokunun reperfüzyonu sırasında süperoksit radikalini oluşturur. Allopürinol gibi ksantin oksidaz inhibitörleri reperfüzyon hasarından korumada bazı hayvan modellerinde kullanılmıştır⁴⁸.

II. 4. Lokal Anestezikler

Lokal anestezikler sodyum kanallarını kullanan, sinir aksonları ve diğer uyarılabilen membranlar boyunca sinir iletimini geri dönüşümlü olarak bloke eden ilaçlardır⁴¹.

Pek çok lokal anestezik ajan, genelde tersiyer amin yapıda iyonize olabilen bir gruba ve ester veya amid içeren ara zincirle bağlanmış sıklıkla bir aromatik halka olan lipofilik gruptan oluşur. Optimal aktivite için bu grupların lipofilik ve hidrofilik güçleri arasında bir denge gereklidir⁴².



Lokal anestezikler zayıf bazlardır. Terapötik uygulama için erirlik ve stabilite nedenleri yüzünden genellikle suda eriyen hidroklorür tuzları halinde kullanılırlar. Vücutta ya yüksüz bazlar ya da kasyonlar halinde bulunurlar. Bu iki formun relatif oranları pKa ve vücut sıvılarının pH'ları ile belirlenir⁴¹.

$$\text{Log} \frac{\text{yüksüz form}}{\text{kasyonik form}} = \text{pH (dokunun)} - \text{pKa (ilacın)}$$

Pek çok lokal anesteziğin pKa değeri 8.0-9.0 arasında değiştiği için fizyolojik pH'da vücut sıvılarında daha fazla oranda yüklü halde yani katyonik formdadır. Katyonik formun reseptör bölgesindeki en aktif form olduğu düşünülmektedir. Katyonik ilaç, kapalı kanalları kolaylıkla geçemez. Ana yüksüz form ise biyolojik membranlara hızlı penetrasyon için çok önemlidir⁴¹.

Lokal anestezikler genellikle bloke edilecek sinir liflerinin olduğu bölgeye enjeksiyonla uygulanırlar. Böylece emilim ve dağılım, anestezinin başlangıç hızını etkilemede önemli rol oynamaz. Ancak lokal anesteziklerin topikal uygulamasında anestezi etkinin hem başlaması hem de sonlanması için ilacın difüzyonu gereklidir⁴¹.

Uygulama bölgesinden enjekte edilen lokal anesteziğin sistemik emilimi doz, enjeksiyon bölgesi, ilaç-doku bağlanması ve ilacın fizikokimyasal ile farmakolojik özellikleri gibi bir çok faktör tarafından değişir. Damarlardan zengin olan trakea mukozasına lokal anestezi uygulaması daha hızlı emilim ve kan düzeyine neden olurken, tendonlarda bu kadar hızlı emilim gözlenmez. Lokal anesteziklere vazokonstriktörlerin eklenmesi bazı lokal anesteziklerin etkilerini uzatır⁷⁶.

Amid lokal anestezikler intravenöz bolus uygulamadan sonra yaygın olarak dağılır. Sekestrasyon yağ dokusunda meydana gelir. Başlangıçta hızla beyin, karaciğer, böbrek ve kalp gibi perfüzyonu fazla olan organlara, daha sonra

da kas ve barsak gibi az perfüze olan organlara dağılır. Ester yapılların ise plazma yarılanma ömrü kısa olduğundan doku dağılımları bilinmemektedir⁴¹.

Lokal anestezipler karaciğerde veya plazmada suda erirliğı fazla olan metabolitlere dönüşür ve idrarla atılırlar. Ester yapıllı lokal anestezipler butirilkolineraz (psödokolineraz) tarafından kanda hızla hidrolize olur. Amid yapıda olanlar karaciğer mikrozomal enzimleriyle hidrolize olur⁴².

Lokal anestezipler sinir impulslarının oluşumu ve iletimini bloke ederler. Esas etki bölgesi hücre membranıdır. Lokal anestezipler membranın hafif depolarizasyonu ile oluşturulan Na^{+} 'ya karşı uyarılabilir membranlardaki aşırı miktarda geçiçi artışı önleyerek iletimi bloke ederler. Lokal anesteziplerin bu etkisi voltaj duyarlı sodyum kanallarıyla direkt olarak etkileşmesine bağıdır. Sodyum kanallarına ek olarak lokal anestezipler diğeri membrana bağılı proteinlere de bağlanabilirler, özellikle de K^{+} kanallarını da bloke edebilirler²⁵.

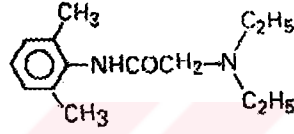
Lokal anestezipler kimyasal yapılarına göre amid yapıllar, ester yapıllar ve diğeri şeklinde üç gruba ayrılırlar. Ester yapıllı olanlar grubunda kokain, prokain, oksibuprokain, tetrakain (ametokain); amid yapıllar grubunda lidokain, bupivakain, prilokain, kartikain (artikain), dibukain (kinkokain), mepivakain, etidokain ve diğeri grubunda benzokain (etilaminobenzoat), butilaminobenzoat, butesin pikrat, siklometikain sülfat ve ortoform bulunur⁹.

Bu tezde kullanılan lokal anesteziplerden aşağıda kısaca bahsedilmiştir.

II. 4. 1. Amid yapıları:

II. 4. 1. 1. Lidokain:

Bu grubun prototipi 1943’de bulunmuş olan lidokaindir. Kimyasal olarak N-dietilamino asetil-2,6-ksilidin yapısındadır⁴².



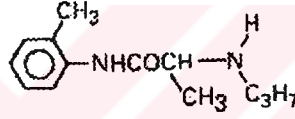
Lidokainin kimyasal yapısı.

Ester türevi lokal anestezikler gibi kanda kolinesterazlar tarafından parçalanmaz, karaciğerde hidroliz edilerek parçalanır. Lokal anestezik etkisi uygulandıktan 3-5 dakika sonra başlar ve 10-15 dakikada maksimuma erişir. Amid yapılı lokal anestezikler içerisinde en kısa etki süresine sahip olanıdır. Lidokain yüksek miktarda absorbe edildiğinde sedatif etki gösterir. Status epileptikusta i.v. olarak uygulandığında etkili olduğu bulunmuştur. Akut lidokain zehirlenmesinde santral sinir sistemi depresyonuna ait belirtiler görülürken zehirlenmenin ileri dönemlerinde konvülsiyonlar ortaya çıkar⁴¹.

Yüzeyel anestezilerde, santral ve periferik bloklarda, intravenöz bölgesel anesteziye kullanılması yanında ventriküler aritmilerin tedavisinde de antiaritmik olarak kullanılmaktadır⁴².

II. 4. 1. 2. Prilokain:

Kimyasal yapısı (2-propilaminopropiyono-2-toludid), *in vitro* ve *in vivo* koşullardaki lokal anestezik etkisinin gücü ve vücuttaki metabolizması yönünden lidokaine benzer, ancak etki süresi daha uzundur⁷⁶.



Prilokainin kimyasal yapısı.

Topikal uygulandığında mukozalarda eşdeğer aktivite gösterir. Mutad dozlarda kullanıldığında bile sık olarak methemoglobinemi yapar. Bu olaydan prilokainden oluşan o-toludin, p-hidroksitoludin ve nitrozotoludin gibi metabolitler sorumlu tutulmaktadır. Geri dönüşümlü olmasına rağmen intravenöz metilen mavisi ya da indirgeyici olarak askorbik asit oksijen inhalasyonu ile birlikte uygulanabilir⁴².

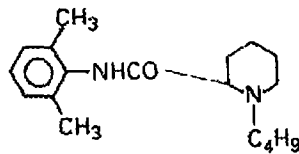
Periferik sinir bloklarında, spinal ile epidural bloklarda ve infiltrasyon anestezilerinde kullanılır⁹.

II. 4. 1. 3. Bupivakain:

Kimyasal yapısı (1-butil-2-piperidil formo-2',6'-ksilidid) mepivakaine benzer sadece metil yerine butil grubu içermesiyle farklılık gösterir⁷⁶.

Lokal anestezik etkinliği ve toksisitesi yaklaşık olarak lidokainden 4 kat daha fazladır ve etki süresi 2-3 kez daha uzundur. Genel sistemik etkileri diğer lokal anesteziklerin etkilerine benzer. Sinirler ve çevre dokularında lokal toksik etkiler bildirilmemiştir⁴².

İnfiltrasyon anestezisi, periferik sinir blokları, spinal, epidural ve kaudal anestezilerde kullanılır. Uzun etkili olması, duyuşal sinir liflerine motor sinir liflerinden daha seçici etki (diferansiye blok) yapması nedeniyle daha çok obstetrikte epidural anestezi için tercih edilir⁹.



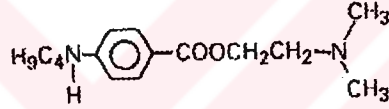
Bupivakainin kimyasal yapısı.

II. 4. 1. 4. Artikain:

Yapıca prilokaine benzer, ancak diğer amid türevi ilaçlardan farklı olarak tiyofen halkası içerir. Etkisi çabuk başlar, uzun sürer. İnfiltrasyon, epidural, spinal anestezielerde ve periferik sinir bloklarında kullanılır⁴².

II. 4. 2. Ester yapılı:

II. 4. 2. 1. Tetrakain:



Tetrakainin kimyasal yapısı.

Ester yapıda, dokuda ve karaciğerde metabolize olan tersiyer amin yapıda, oldukça hidrofobik bir sodyum kanal blokörüdür⁴².

Tetrakain, tüm lokal anesteziklerin bağlandığı ortak bir reseptöre bağlanarak kanal deliğinin lümenini daraltarak sodyum iyonlarının buradan difüzyonunu önler⁴².

İnfiltrasyon anestezisi ve sinir blokları için tavsiye edilmez, spinal ve yüzeysel anestezide kullanılır⁴².

III. MATERYAL VE YÖNTEM

III. 1. Lökosit izolasyonu:

Daha önceden belirtilmiş olan metoda göre izole edildi¹⁵. Sağlıklı insanlardan alınan 9 mL kan 1 mL (%3.8) sodyum sitrat ve 3 mL dekstran (% 6.0 MA:70 000, Makrodex®) eklenerek 60 dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra lökositlerden zengin olan üst faz alınıp, 20 dk 900 rpm'de santrifüj edildi. Faz ayrımı gerçekleştirildikten sonra alt faz alınarak eritrosit lizisi yapıldı. Hipotonik lizis için alınan kısım ise önce 2 mL %02'lik NaCl, daha sonra ise 2 mL %1.6'lık NaCl ile 30 sn karıştırıldı. Tekrar 900 rpm'de 15 dk santrifüj edildikten sonra alt faz 10 mL Hanks'ın dengeli tuz solüsyonu (HBSS) ile 3 kez yıkanıp santrifüj edilerek eritrositlerden temizlendi. Sonra alt faza 2 mL HBSS eklenerek stok hücre süspansiyonu elde edildi. Kan sayım cihazı (Contraves, Digicell 300, Zürih, İsviçre) ile hücre sayısı okunduktan sonra mL'de 10^7 hücre olacak şekilde HBSS ile dilüe edildi.

III. 2. Farklı Stimülanlarla Oluşturulan KL'lar:

III. 2. 1. N-Formil-Metiyonil-Lösil-Fenilalaninin (FMLP) Oluşturduğu KL:

1 mL'lik ölçüm küvetine 100 µL lökosit süspansiyonu (10^6 hücre/mL), 20 µl luminol (50 µM) solüsyonu eklendikten sonra toplam 1 mL'ye tamamlanacak miktarda HBSS ile karıştırıldı. Stimülan olarak FMLP (2 µM) ölçüm küvetine

enjekte edildi ve 37°C’de oluşan sinyal kemilüminometrede (BioOrbit 1250, Turku-Finland) önceki çalışmalardaki gibi ölçüldü⁸². Luminometer 1250 (version 1.12, BioOrbit) programı kullanılarak bilgisayara kaydedildi.

III. 2. 2. Ksantin-Ksantin Oksidazın Oluşturduğu KL:

Ksantin-ksantin oksidaz reaksiyonundan süperoksit radikali ve hidrojen peroksit oluşmaktadır¹⁵. 0.9 ml fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS; 10 mM KH₂PO₄ ve 150 mM NaCl, pH=7.4) 0.1 mL luminol (250 µM) solüsyonu bir kemilüminometre küvetinde karıştırıldı. 10 µL (0.1 mM) ksantin eklendikten sonra ksantin oksidaz (0.2 U/mL) enjekte edilerek oluşan KL sinyali ölçüldü.

III. 2. 3. Hidrojen Peroksitin (H₂O₂) Oluşturduğu KL:

PBS’de hazırlanmış olan 3.5 mM H₂O₂’in luminol (250 µM) veya lusigenin (250 µM) varlığında oluşturduğu KL sinyali üzerine lokal anesteziklerin etkileri incelendi.

III. 2. 4. Demir Sülfat’ın (FeSO₄) Oluşturduğu KL:

Luminol (250 µM) ve PBS içeren ölçüm küvetine 40 nM’lık FeSO₄’tan enjekte edilerek elde edilen sinyale lokal anesteziklerin etkileri daha önce yayınlanmış olan yöntemle göre incelendi⁸³.

III. 2. 5. Hipokloröz Asitin (HOCl) Oluşturduğu KL:

PBS ile dilüe edilen 5 µM NaOCl'in pH'sı 7.4'e ayarlandıktan sonra sadece luminol (250 µM) varlığında oluşan KL sinyali üzerine lokal anesteziklerin etkileri incelendi.

III. 2. 6. Peroksinitritin Oluşturduğu KL:

III. 2. 6. 1. Peroksinitrit sentezi:

Beckmann ve ark.nın⁵ “quenched flow reaction” adı verilen yöntemle göre nitrit ve asidifiye H₂O₂'den sentez edildi. Sentezde 0.6 M NaNO₂, 0.7 M HCl, 0.6 M H₂O₂ ve 1.2 M NaOH kullanıldı. H₂O₂'i ortamdan uzaklaştırmak için süzme aşamasında katı granüllü mangan dioksitten (MnO₂; 30 mg/mL) geçirildi. Sentezlenmiş olan alkali peroksinitritin -20°C'de saklanan solüsyonları 1 hafta içinde kullanıldı. Peroksinitrit stok solüsyonundan 1.2 M NaOH ile 100-1000 kez dilüe edilerek spektrofotometrik olarak 302 nm dalga boyundaki absorbans artışı ölçülerek molar absorpsiyon katsayısı 1670 M⁻¹cm⁻¹ kullanarak konsantrasyonu hesaplandı.

Beckman ve ark.⁵ tarafından belirtilen yöntemle göre sentez edilmiş olan peroksinitritin katalaz (50 U/mL) varlığında luminol (250 µM) veya lusigenin (250 µM) eklenerek 50 nM peroksinitrit enjekte edilerek oluşturduğu KL sinyali üzerine lokal anesteziklerin etkileri daha önce kullanılan yöntemlere göre incelendi.

III. 3. Deney Protokolü:

FMLP'nin maksimum stimülasyon yaptığı konsantrasyonda (2 μ M) lokal anesteziklerin etkileri araştırıldı. Hücresiz deneylerde de 2 μ M FMLP ile elde edilen KL sinyaline benzer sinyaller elde edilebilecek dozlarda ksantin-ksantin oksidaz (0.2 U/mL) , H₂O₂ (3.5mM), NaOCl (5 μ M), FeSO₄ (40 nM) ve peroksinitrit (50 nM) konsantrasyonları kullanıldı. Deneylerde lokal anestezik ilaçların etkileri ölçüm kuvetine konduktan sonra stimulanların ortama enjekte edilmesiyle araştırıldı. Her bir veri için iki ölçümün ortalaması alındı. KL sinyalinin maksimuma eriştiği nokta belirlendi ve sonuçlar maksimum KL (mV) ve kontrole göre % değişim olarak gösterildi.

III. 4. İstatistiksel Analiz:

Sonuçlar ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak verildi. Ortalamalar arasındaki farkın belirlenmesinde Student t testi kullanılırken, ikiden fazla ortalamanın karşılaştırılmasında ANOVA ve sonrasında Dunnett testi yapıldı. P<0.05 ise anlamlı kabul edildi.

III. 5. Kullanılan Malzemeler

Kemiluminometre (BioOrbit, 1250 Luminometre, Turku, Finlandiya), bilgisayar kontrollü kaydedici sistem (A/D bilgisayar kartı ve luminometre 1250 programı, sürüm 1.12, Finlandiya), pH metre (ETD Instruments, GP 353), su banyosu (Nüve, BM-402, Ankara), kan sayım cihazı (Contraves, Digicell 300, Zürih, İsviçre) ve spektrofotometre (Beckman, DU-650, Amerika).

III. 6. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Hazırlanmaları

Lidokain (Aritmal[®] ampul, %2, Tams), prilokain (Citanest[®] flakon, %2, Eczacıbaşı), artikain (Ultracain[®] ampul/flakon, %2, Hoechst), bupivakain (Marcaine[®] enjekteable solüsyon,%05, Eczacıbaşı) ve tetrakain HCl (Pantocaine[®] Botafarma).

Kullanılan diğer kimyasal maddelerin tümü Sigma Chemical Co.'dan (St. Louis, Amerika) sağlandı ve aşağıdaki şekilde hazırlandı.

III. 6. 1. Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu (PBS):

10 mM KH₂PO₄ ve 150 mM NaCl distile suda çözüldükten sonra pH'sı 7.4'e 2 M NaOH ile ayarlandı.

III. 6. 2. Hanks'ın Dengeli Tuz Solüsyonu (HBSS):

5.36 mM KCl, 0.441 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 0.31 mM NaH₂PO₄, 5.046 mM D-glukoz, 1 mM CaCl₂ distile suda çözüldü.

III. 6. 3. Luminol Sodyum:

4.4 mg luminol 250 µL 2 M sodyum hidroksitte çözüldükten sonra 9750 µL PBS ilave edilerek 2.5x10⁻³ M'lık çözelti hazırlandı.

III. 6. 4. Lusigenin:

6.4 mg lusigenin 5 mL PBS'de çözüldü (2.5×10^{-3} M).

III. 6. 5. Ksantin:

4.35 mg ksantin 2.5 mL distile su içinde çözüldü (10^{-2} M).

III. 6. 6. Ksantin Oksidaz (grade I):

450 µL 25 ünitelik ksantin oksidaz 550 µL PBS'de çözüldü (17.85 U/mL).

III. 6. 7. Katalaz:

3.6 mg katalaz 2 mL PBS'de hazırlandı (5000 U/mL).

III. 6. 8. Sodyum Hipoklorit:

HOCl, Vissers ve ark.'nın ⁷⁷ belirttiği yöntemle göre NaOCl PBS ile dilüe edildikten sonra pH'sı 7.4'e ayarlanarak 1:1 oranında HOCl ve OCl içerecek şekilde hazırlandı.

III. 6. 9. Hidrojen Peroksit:

110 µL hidrojen peroksit 890 µL PBS içinde çözülerek (1 M), gerekli dilüsyonlar yapılarak kullanıldı.

III. 6. 10. Demir Sülfat (FeSO₄):

15.2 mg demir sülfat 1 mL serum fizyolojik içinde çözöldü (10^{-1} M).

Gerekli dilüsyonlar yapılarak kullanıldı.

III. 6. 11. FMLP:

Absolü etanolde çözölmüş olan 10^{-2} M'lık stok çözeltiden deney öncesi

PBS ile dilüsyonlar yapılarak kullanıldı.

III. 6. 12. Sodyum Sitrat (%3.8):

3.8 gr sodyum sitrat 100 mL serum fizyolojikte çözöldü.

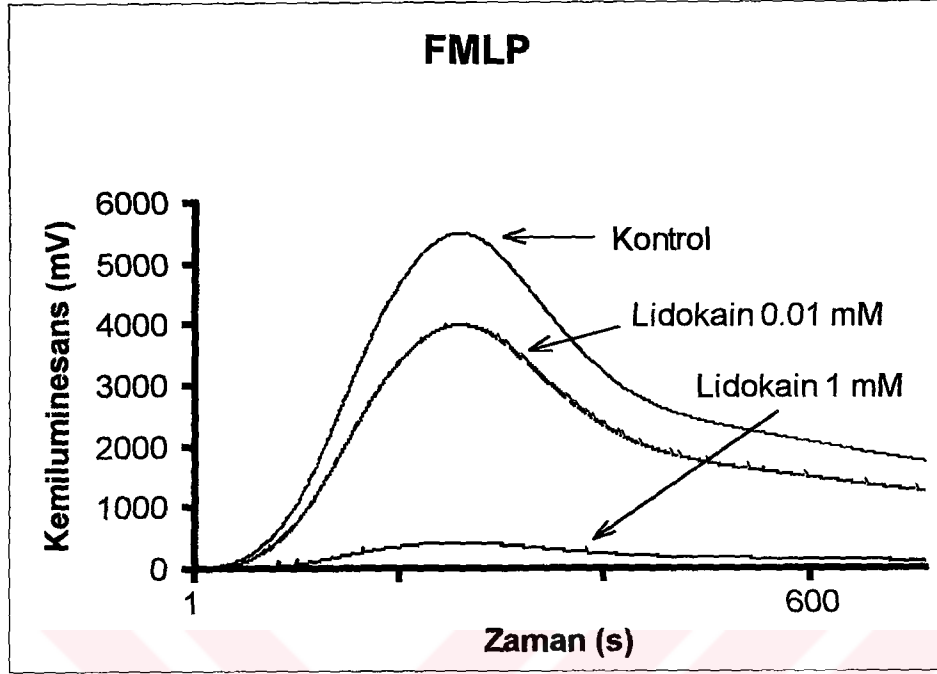
IV. BULGULAR

Lökosit deneylerinde 2 μ M FMLP 4079 ± 978 mV'luk (n=20) sinyal oluştururken, hücresiz deneylerde kullanılan H_2O_2 (3.5 mM), $FeSO_4$ (40 nM), HOCl (5 μ M), ksantin-ksantin oksidaz (0.2 U/mL) ve peroksinitrit (50 nM) ile sırasıyla 3641 ± 444 (n =61), 5308 ± 256 (n =32), 4711 ± 164 (n=72), 2500 ± 244 (n=56) ve 3969 ± 514 mV'luk (n=76) sinyaller kaydedilmiştir.

Deneylerimizde kullandığımız lidokain, prilokain, artikain, bupivakain ve tetrakainin 10^{-3} M konsantrasyondaki ölçülen pH değerleri sırasıyla 7.34, 7.35, 7.34, 7.35 ve 7.34 olarak bulunmuştur.

IV.1. Lokal Anesteziklerin FMLP ile Uyarılmış Lökositler Üzerine Etkileri

FMLP'nin oluşturduğu luminol KL sinyali üzerinde lidokain varlığında gözlenen inhibisyonlar Şekil 4'de gösterilmiştir.

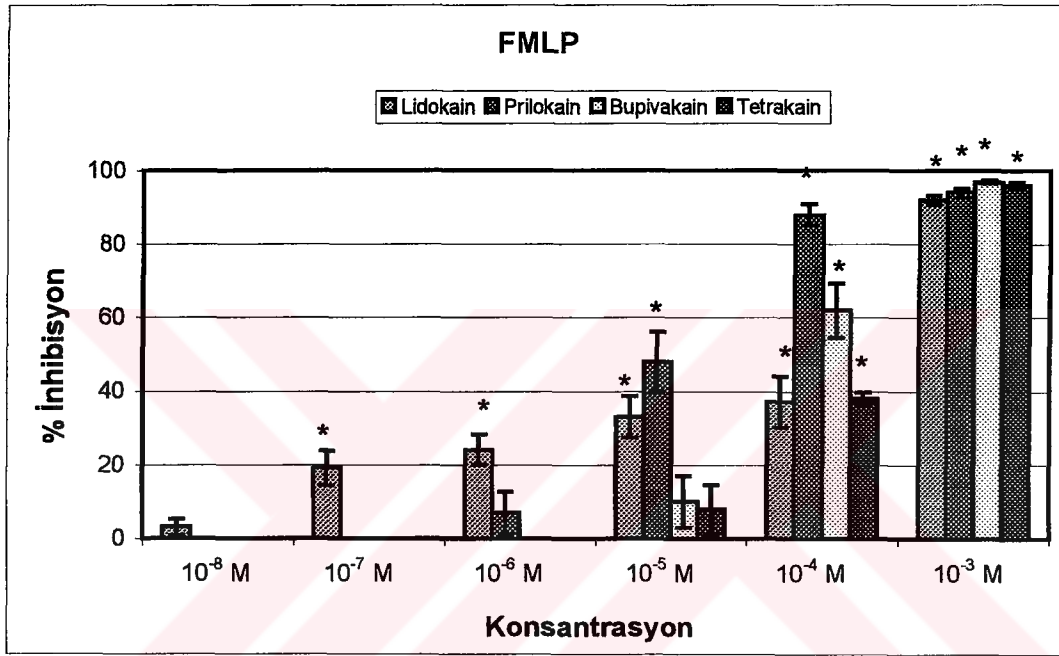


Şekil 4. FMLP ile stimüle edilen insan lökositlerinde lidokainin konsantrasyon bağımlı inhibitör etkisi.

Lidokain 10^{-8} - 10^{-3} M, prilokain 10^{-6} - 10^{-3} M, bupivakain 10^{-5} - 10^{-3} M ve tetrakain 10^{-5} - 10^{-3} M konsantrasyonlarda FMLP'nin oluşturduğu luminol KL sinyali üzerinde konsantrasyon bağımlı bir inhibisyon oluşturdu (Şekil 5).

Kullanılan en yüksek konsantrasyon olan 10^{-3} M'da lidokain, prilokain, bupivakain ve tetrakainin oluşturduğu inhibisyonlar sırasıyla 92 ± 1 (n=9), 94 ± 1 (n=5), 97 ± 0.4 (n=5) ve 96 ± 1 (n=6) oranında gözlemlendi. Artikain dışında diğer lokal anesteziklerle çalışılan en yüksek konsantrasyonlarda gözlenen inhibisyonların hepsinin birbirine çok yakın olduğu tespit edildi (Şekil 5).

Ancak artikain 10^{-3} M konsantrasyonda aktivasyona neden olurken (59 ± 7 , n=6), 10^{-4} M konsantrasyonda ise 13 ± 6 (n=5) oranında inhibisyon oluşturmuştur.



Şekil 5. FMLP ile stimüle edilen insan lökositlerinde lidokain (10^{-8} - 10^{-3} M, n=2-9), prilokain (10^{-6} - 10^{-3} M, n=3-7), bupivakain (10^{-5} - 10^{-3} M, n=3-5) ve tetrakainin (10^{-5} - 10^{-3} M, n=3-6) konsantrasyon bağımlı inhibitör etkileri (*P<0.05 kontrole göre).

IV. 2. Lokal Anesteziklerin Direkt Olarak Oluşturulmuş Serbest

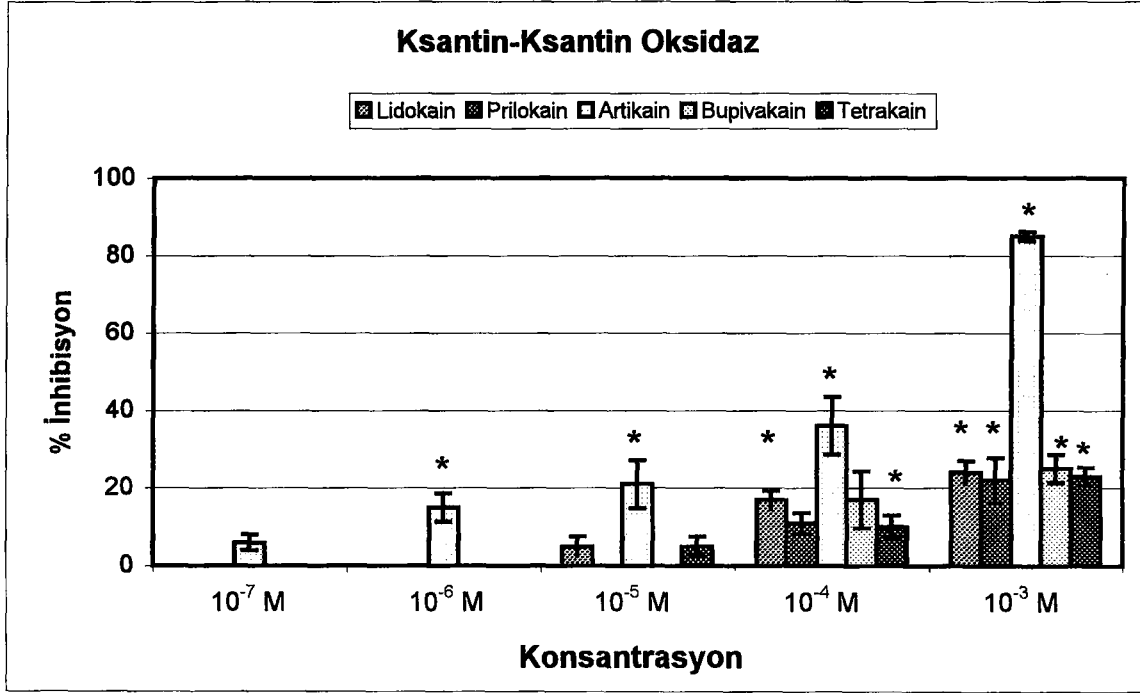
Radikaller ve Reaktif Metabolitleri Üzerine Etkileri:

IV. 2. 1. Lokal Anesteziklerin Süperoksit Radikali Üzerine Olan Etkileri

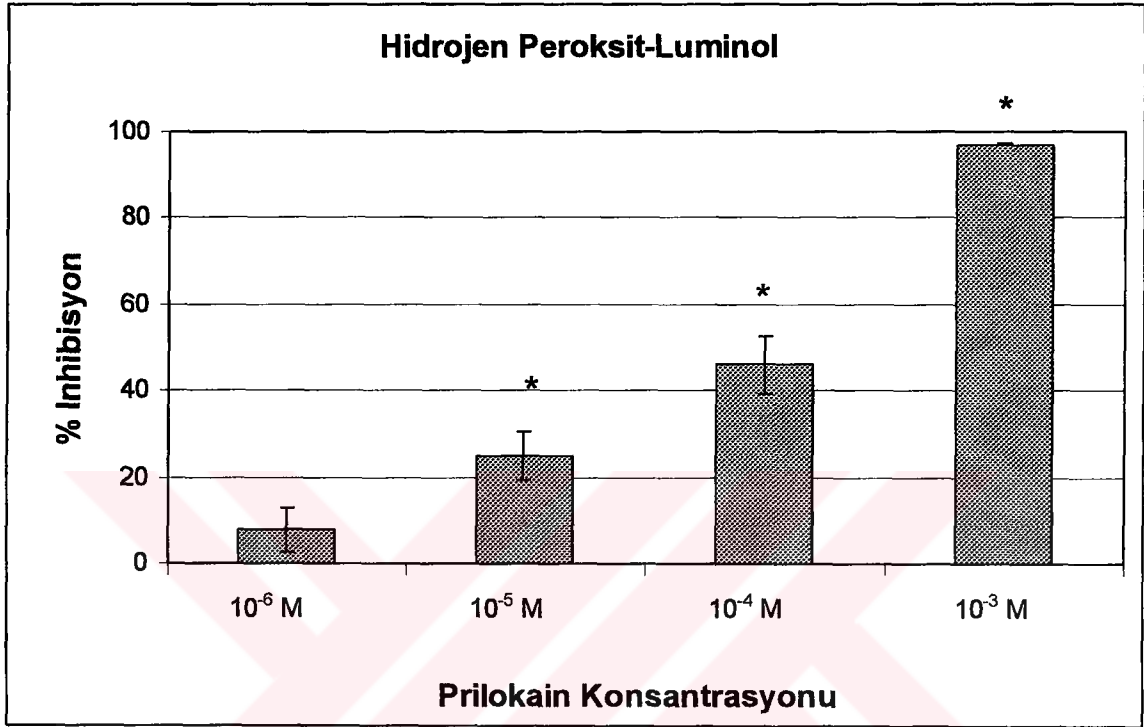
Lidokain 10^{-5} - 10^{-3} M, prilokain 10^{-4} - 10^{-3} M, artikain 10^{-7} - 10^{-3} M, bupivakain 10^{-4} - 10^{-3} M ve tetrakain 10^{-5} - 10^{-3} M konsantrasyonlarda ksantin-ksantin oksidazın oluşturduğu luminol KL sinyali üzerinde konsantrasyon bağımlı bir inhibisyon gösterdi. 10^{-3} M konsantrasyonda lidokain, prilokain, artikain, bupivakain ve tetrakainin oluşturduğu inhibisyonlar sırasıyla 24 ± 3 (n=8), 22 ± 6 (n=6), 85 ± 1 (n=6), 25 ± 4 (n=6) ve 23 ± 2 (n=6) bulundu. Artikain dışında diğer lokal anesteziklerle çalışılan en yüksek konsantrasyonlarda gözlenen inhibisyonların hemen hepsi birbirine çok yakındı (Şekil 6).

IV.2. 2. Lokal Anesteziklerin Hidrojen Peroksit Üzerine Olan Etkileri

Lidokain 10^{-5} - 10^{-3} M ile tetrakain 10^{-4} - 10^{-3} M konsantrasyonlarda hidrojen peroksitin oluşturduğu luminol KL'si üzerinde konsantrasyon bağımlı bir aktivasyon gösterdi. Lidokain ve tetrakainin 10^{-3} M konsantrasyonda oluşturdukları aktivasyonlar sırasıyla 61 ± 17 , n=8 ve 131 ± 19 , n=6 bulundu. Ancak 10^{-3} M konsantrasyonda bile artikain tarafından oluşturulan inhibisyon (5 ± 7 , n=5) ve bupivakain tarafından oluşturulan aktivasyonda (42 ± 17 , n=6) istatistiksel olarak anlamlı farklılığa rastlanmadı. Prilokain ise 10^{-6} - 10^{-3} M konsantrasyon bağımlı bir inhibisyon oluşturdu ve 10^{-3} M konsantrasyondaki inhibisyon 97 ± 0.3 , n=7 bulundu (Şekil 7).



Şekil 6. Ksantin-ksantin oksidazın oluşturduğu luminol KL'si üzerine lidokain (10^{-5} - 10^{-3} M, n=4-8), prilokain (10^{-4} - 10^{-3} M, n=5-6), artikain (10^{-7} - 10^{-3} M, n=4-6) bupivakain (10^{-4} - 10^{-3} M, n=5-6) ve tetrakainin (10^{-5} - 10^{-3} M, n=5-6) konsantrasyon bağımlı inhibitör etkileri (*P<0.05 kontrole göre).

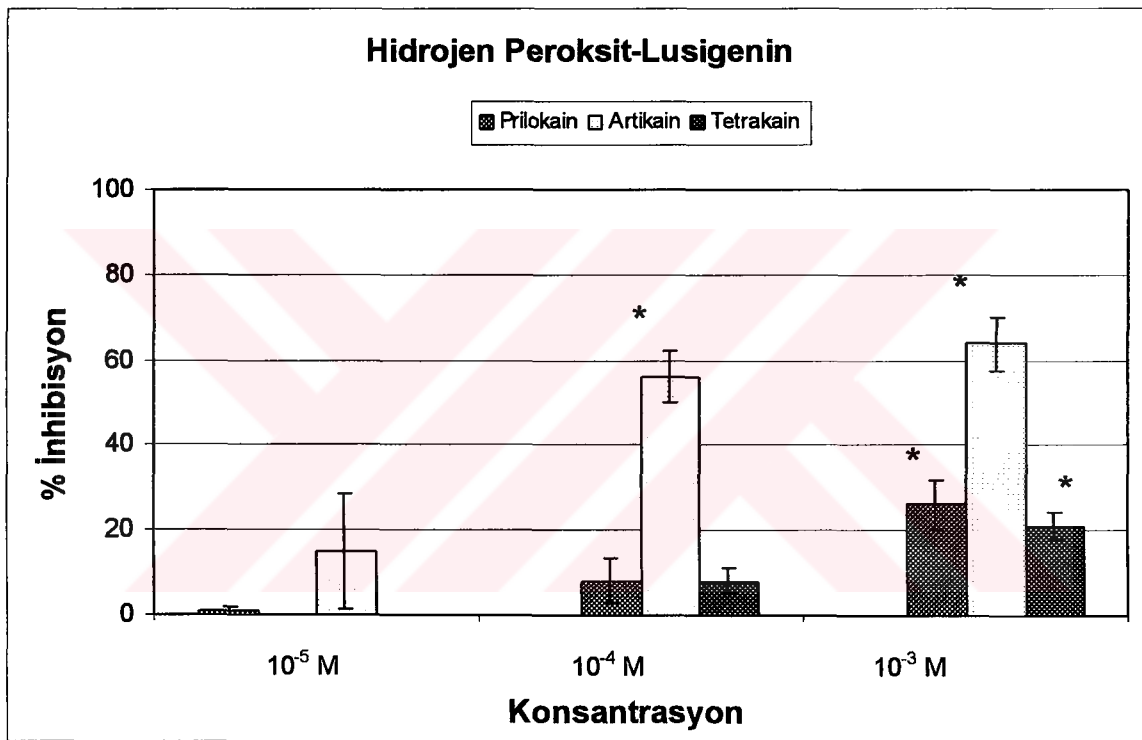


Şekil 7. Prilokainin (10^{-6} - 10^{-3} M , n=4-9) hidrojen peroksitle oluşturulan luminol KL'si üzerine konsantrasyon bağımlı inhibitör etkisi (*P<0.05 kontrole göre).

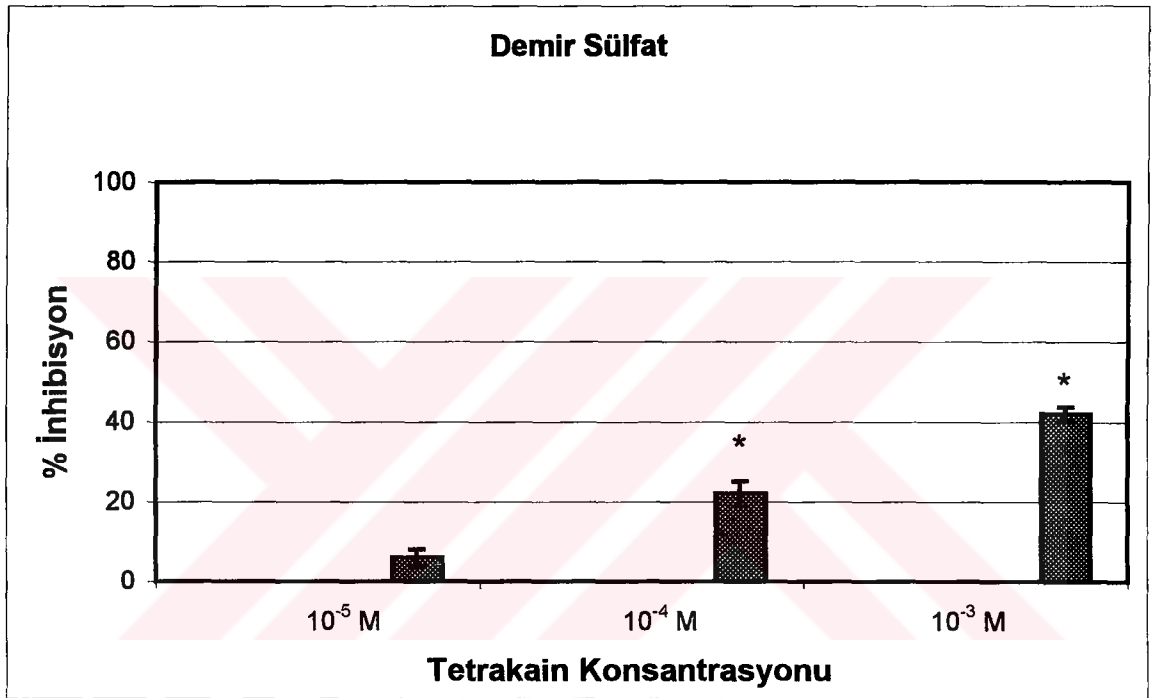
Prilokain 10^{-4} - 10^{-3} M, artikain 10^{-5} - 10^{-3} M ve tetrakain 10^{-4} - 10^{-3} M konsantrasyonlarda hidrojen peroksitin oluşturduğu lusigenin KL'si üzerinde konsantrasyon bağımlı bir inhibisyon oluşturdu (Şekil 8). Lidokain ve bupivakainin 10^{-3} M konsantrasyonda bile oluşturdukları inhibisyonlarda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa rastlanmadı ($\%10 \pm 4$, $n=4$ ve $\%20 \pm 4$, $n=5$). 10^{-3} M konsantrasyonda prilokain, artikain ve tetrakainin oluşturduğu inhibisyonlar ise sırasıyla $\%26 \pm 6$ ($n=8$), $\%64 \pm 6$ ($n=4$) ve $\%21 \pm 3$ ($n=6$) bulundu. Artikain hariç prilokain ve tetrakainle en yüksek konsantrasyonlarda gözlenen bu inhibisyonlar birbirine benzerdi.

IV. 2. 3. Lokal Anesteziklerin Demir Sülfatın Oluşturduğu KL Üzerine Etkileri

Tetrakain 10^{-5} - 10^{-3} M konsantrasyonlarda demir sülfatın oluşturduğu KL sinyali üzerinde konsantrasyon bağımlı bir inhibisyona neden oldu ve 10^{-3} M konsantrasyonda oluşturduğu inhibisyon $\%42 \pm 2$ ($n=6$) bulundu (Şekil 9). Lidokain, prilokain, artikain ve bupivakainin 10^{-3} M konsantrasyonda bile oluşturdukları inhibisyonlarda ise sırasıyla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa rastlanmadı ($\%5 \pm 3$ $n=6$, $\%1 \pm 4$ $n=6$, $\%6 \pm 3$ $n=6$ ve $\%4 \pm 4$ $n=7$).



Şekil 8. Hidrojen peroksitin oluşturduğu lusigenin KL'si üzerine prilokain (10^{-4} - 10^{-3} M, n=3-6), artikain (10^{-5} - 10^{-3} M, n=2-6) ve tetrakainin (10^{-4} - 10^{-3} M, n=5-6) konsantrasyon bağımlı inhibitör etkileri (*P<0.05 kontrole göre).



Şekil 9. Tetrakainin (10^{-4} - 10^{-3} M, n=5-6) demir sülfatla oluşturulan luminol KL'si üzerine konsantrasyon bağımlı inhibitör etkisi (* $P < 0.05$ kontrole göre).

IV. 2. 4. Lokal Anesteziklerin Hipokloröz Asitle Oluşturulan KL

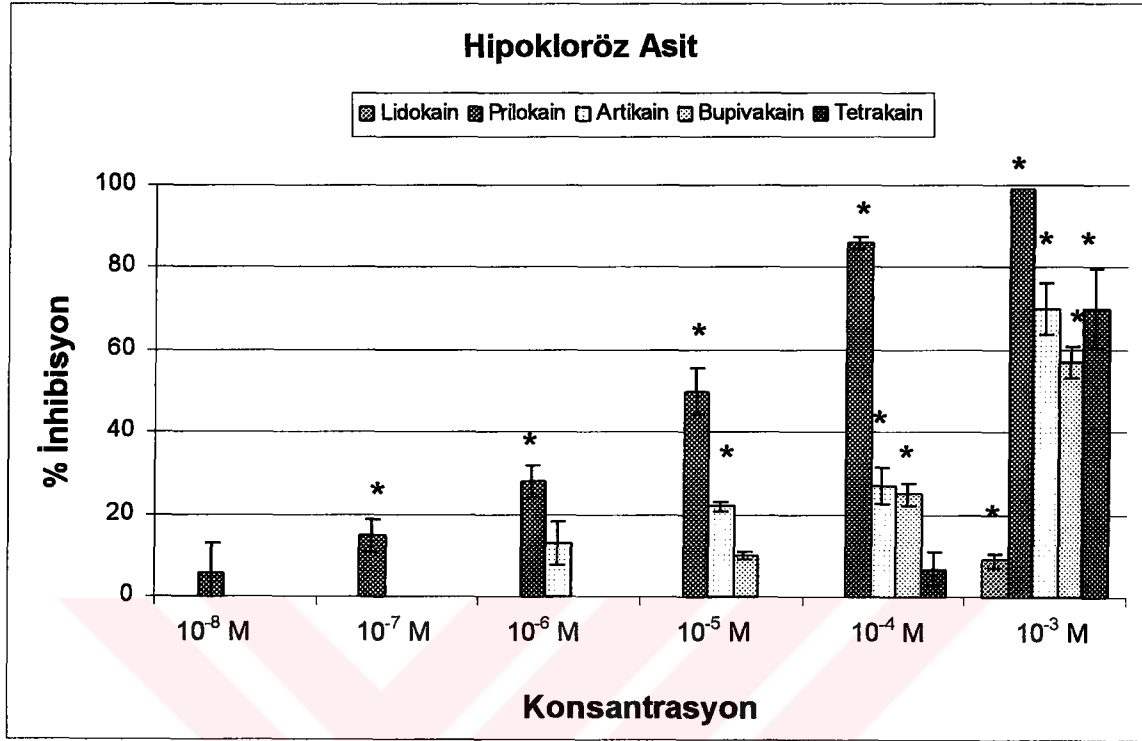
Üzerine Etkileri

Lidokain 10^{-3} M, prilokain 10^{-8} - 10^{-3} M, artikain 10^{-6} - 10^{-3} M, bupivakain 10^{-5} - 10^{-3} M ve tetrakain 10^{-4} - 10^{-3} M konsantrasyonlarda hipokloröz asitin oluşturduğu luminol KL sinyali üzerinde konsantrasyon bağımlı bir inhibisyon gösterdi. 10^{-3} M konsantrasyonda lidokain, prilokain, artikain, bupivakain ve tetrakainin oluşturduğu inhibisyonlar sırasıyla $\%9 \pm 2$ (n=6), $\%99 \pm 0.04$ (n=6), $\%70 \pm 6$ (n=7), $\%57 \pm 4$ (n=15) ve $\%70 \pm 10$ (n=5) bulundu. Lidokainle gözlenen inhibisyon istatistiksel olarak anlamlı olmasına rağmen diğer lokal anesteziklere göre oldukça düşük bulundu. Prilokainin HOCl KL'si üzerinde en etkin lokal anestezik olduğu saptandı ve 10^{-7} M konsantrasyonda bile anlamlı inhibisyon oluşturdu. Ancak diğerlerinin en yüksek konsantrasyonlardaki inhibisyonların hemen hepsi birbirine benzerdi (Şekil 10).

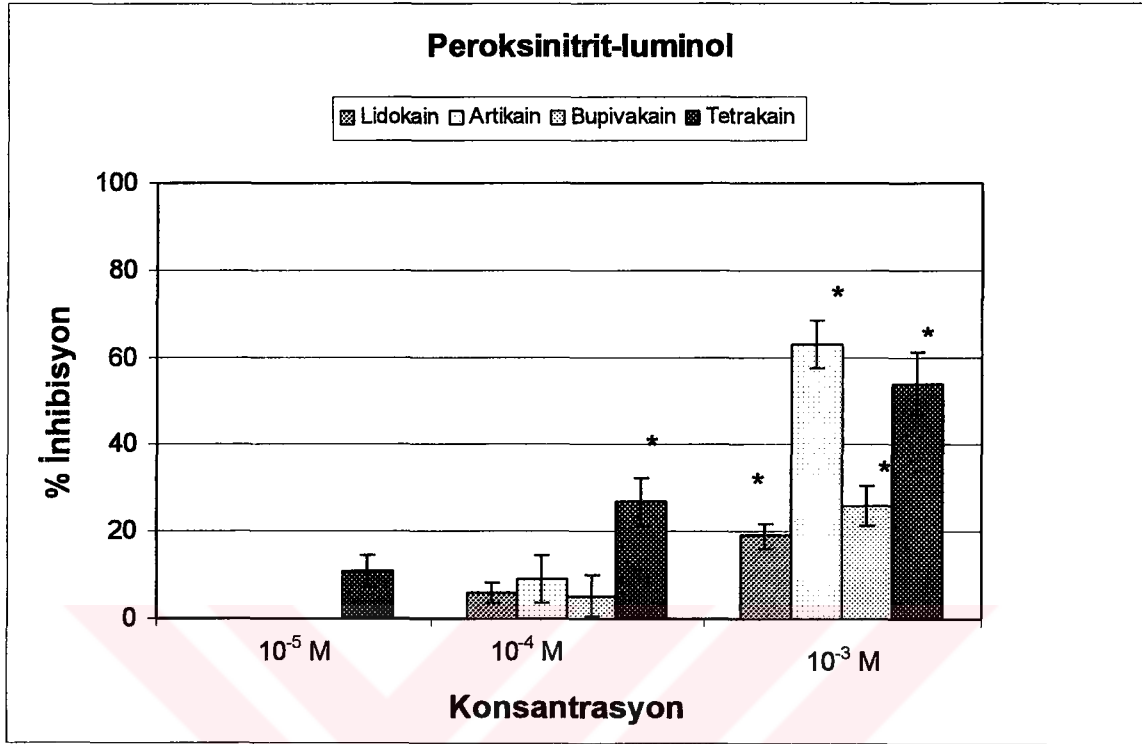
IV. 2. 5. Lokal Anesteziklerin Peroksinitritle Oluşturulan KL Üzerine

Etkileri

Lidokain 10^{-4} - 10^{-3} M, artikain 10^{-4} - 10^{-3} M, bupivakain 10^{-4} - 10^{-3} M ve tetrakain 10^{-5} - 10^{-3} M konsantrasyonlarda peroksinitritin oluşturduğu luminol KL'si üzerinde konsantrasyon bağımlı bir inhibisyon gösterdi (Şekil 11).



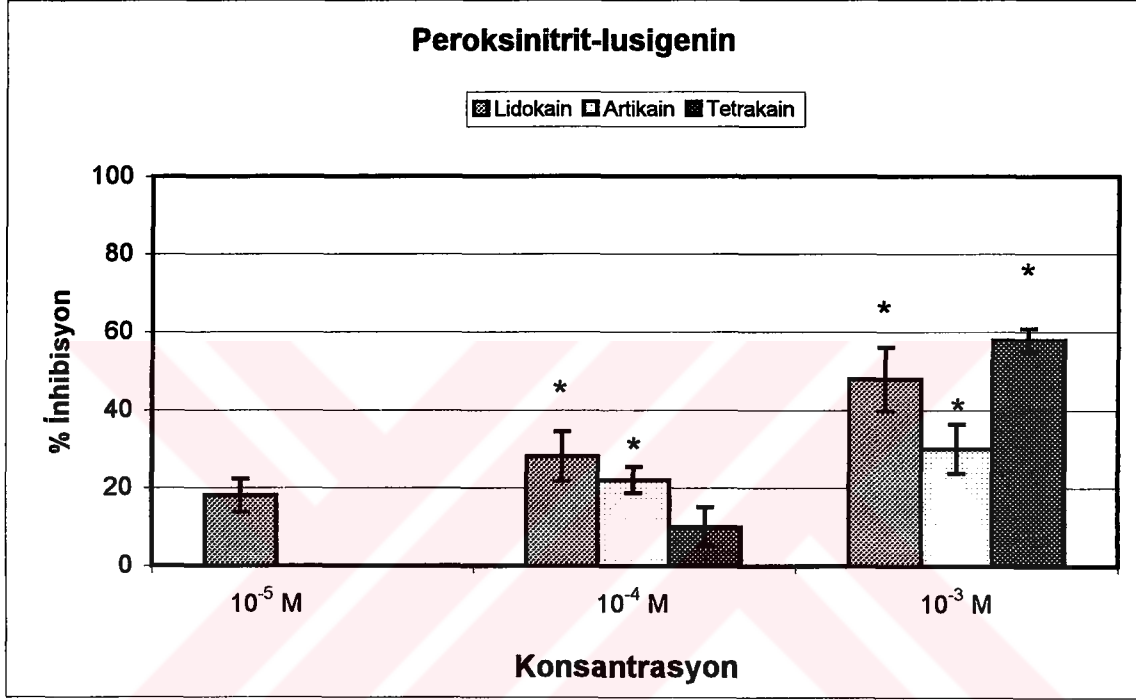
Şekil 10. Hipokloröz asitin oluşturduğu luminol KL'si üzerine lidokain (10^{-3} M, n=6), prilokain (10^{-8} - 10^{-3} M, n=6-8), artikain (10^{-6} - 10^{-3} M, n=3-6) bupivakain (10^{-5} - 10^{-3} M, n=6-15) ve tetrakainin (10^{-4} - 10^{-3} M, n=5) konsantrasyon bağımlı inhibitör etkileri (*P<0.05 kontrole göre).



Şekil 11. Peroksinitritin oluşturduğu luminol KL'si üzerine lidokain (10^{-4} - 10^{-3} M, n=6-7), artikain (10^{-4} - 10^{-3} M, n=8) bupivakain (10^{-4} - 10^{-3} M, n=8-13) ve tetrakainin (10^{-5} - 10^{-3} M, n=5-7) konsantrasyon bağımlı inhibitör etkileri (* $P < 0.05$ kontrole göre).

10^{-3} M konsantrasyonda bile prilokainle istatistiksel olarak anlamlı bir inhibisyon gözlenmedi ($\%7 \pm 3$, $n=9$) ancak aynı konsantrasyonda lidokain, artikain, bupivakain ve tetrakainin oluşturduğu inhibisyonlar sırasıyla $\%19 \pm 3$ ($n=7$), $\%63 \pm 6$ ($n=8$), $\%26 \pm 5$ ($n=8$) ve $\%54 \pm 7$ ($n=7$) bulundu. Lidokainle ile bupivakainin inhibisyonları benzer olup, artikain ve prilokaine göre daha düşüktü.

Lidokain 10^{-5} - 10^{-3} M, artikain 10^{-4} - 10^{-3} M ve tetrakain 10^{-4} - 10^{-3} M konsantrasyonlarda peroksinitritin oluşturduğu lusigenin KL sinyali üzerinde konsantrasyon bağımlı bir inhibisyon gösterdi (Şekil 12). Prilokain ve bupivakainle 10^{-3} M konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı bir inhibisyon gözlenmedi ($\%12 \pm 6$, $n=7$ ve $\%22 \pm 14$, $n=9$). Ancak aynı konsantrasyonda lidokain, artikain ve tetrakainin oluşturduğu inhibisyonlar sırasıyla $\%48 \pm 8$ ($n=6$), $\%30 \pm 6$ ($n=6$) ve $\%58 \pm 3$ ($n=6$) bulundu. Bu üç lokal anesteziğin inhibisyonlarının birbirine benzer olduğu tespit edildi.



Şekil 12. Peroksinitritin oluşturduğu lusigenin KL'si üzerine lidokain (10^{-5} - 10^{-3} M, n=5-6), artikain (10^{-4} - 10^{-3} M, n=3-6) ve tetrakainin (10^{-4} - 10^{-3} M, n=4-6) konsantrasyon bağımlı inhibitör etkileri (* $P < 0.05$ kontrole göre).

V. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Solunum patlaması sırasında tüketilen oksijenin %90'ı süperoksit ara ürünü üzerinden fagositler tarafından hidrojen peroksit'e dönüştürülmektedir^{47, 70}. Oluşan hidrojen peroksit MPO enzimiyle güçlü bir oksidan olan hipokloröz asite çevrilir⁵⁹. Nötrofillerin fagosit'e edilebilen partiküller ya da FMLP, forbol miristat asetat (PMA), opsonize zimosan (OZ) veya 1-oleil-2-asetil-gliserol (OAG) gibi çözünür agonistlerle uyarılması nötrofil membranına bağlı NADPH-oksidad enzimi aracılığıyla aktif bir süperoksit oluşumuna neden olur³⁷. FMLP'nin süperoksit yanında hidrojen peroksit, hipokloröz ve hidroksil radikali oluşumunu da uyardığı bilinmektedir^{6, 69, 71, 74}.

İlk olarak Goldstein ve ark.²⁶ tetrakainin OZ ile uyarılmış insan nötrofillerinde süperoksit oluşumunu inhibe ettiğini gösterdikten sonra Irita ve ark.³⁷ dibukain ile tetrakainin hem katalitik aktiviteyi hem de NADPH oksidad aktivitesini etkileyerek süperoksit oluşumunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Daha sonra Hyvönen ve Kowolik³⁶ tarafından bizim çalışmamıza benzer şekilde aynı yöntemle izole edilmiş ancak PMA ile stimüle edilmiş insan lökositlerinde kemiluminometre kullanılarak oluşturulan KL'da 1 mg/mL lidokainle oksijen radikali oluşumunda belirgin azalma gözlenmezken, 2, 3, 4 ve 8 mg/mL konsantrasyonlardaki lidokainle konsantrasyon bağımlı şekilde inhibisyon olduğunu bildirmişlerdir. Diğer yandan Mikawa ve ark.⁵¹, lidokainin (20-200

$\mu\text{g/mL}$) klinik konsantrasyonlarının (2-3 $\mu\text{g/mL}$) çok üstündeki konsantrasyonlarda insan nötrofillerinden oluşturulan süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi ROT'yi doz bağımlı inhibe ettiğini göstermişlerdir. Yaptığımız deneylerde amid yapılı lokal anesteziklerden lidokain, prilokain ve bupivakain ile ester yapılarından tetrakainin izole lökositlerde FMLP ile oluşturulan luminol KL'sini belirgin ve benzer şekilde konsantrasyon bağımlı olarak inhibe ettiğini ancak artikainin ise aksine aktive ettiği bulunmuştur. Peck ve ark⁵⁵ *in vitro* olarak PMA ya da OZ ile stimüle edilmiş insan nötrofillerine lidokain eklendiği zaman süperoksit anyonu, lizozomal enzim ve MPO'nun salıverilmesinin bozulduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, aynı araştırmacılar *in vivo* olarak da koroner yoğun bakımda lidokain tedavisi alan hastaların PMA ile stimüle edilmiş nötrofillerinden salıverilen süperoksit anyonunun, lidokain tedavisi almayan normal bireylere göre daha düşük olduğunu göstermişlerdir⁵⁵. Süperoksit salıverilmesindeki bozulmanın serum lidokain seviyelerinin terapötik konsantrasyon olan 1.0-5.6 $\mu\text{g/mL}$ arasında olduğunda anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda 10^{-5} M konsantrasyonda lidokainle elde ettiğimiz sonuçlar yaklaşık olarak Peck ve ark⁵⁵ tarafından belirtilen lidokainin terapötik plazma konsantrasyonun üst sınırı olan 5.6 $\mu\text{g/mL}$ 'ye (1.8×10^{-5} M) karşılık gelmektedir. Ancak diğer lokal anesteziklerin kesin olarak terapötik plazma konsantrasyonları bilinmediği için böyle bir yorum yapmak mümkün değildir. Artikain hariç diğer lokal anesteziklerin inhibisyon mekanizmasında bu maddelerin serbest radikal veya metabolitleriyle direkt etkileşmesi veya Irita ve ark.³⁷ çalışmasında olduğu gibi NADPH oksidazın

inhibisyonu rol alabilir. Artikainin yüksek konsantrasyonlarda oluşturduğu aktivasyonun mekanizması ise henüz açıklanamamıştır. Wysocka ve ark.⁷⁹ lidokainin ne spontan ne de uyarılmış süperoksit oluşumunu etkilemediğini önesürmüşlerdir. Siminiak ve ark.⁶⁶ ise başka bir araştırmada, farklı agonistlerle stimüle edilmiş nötrofillerde lidokainin luminol veya lusigenin KL'larını etkilemediğini bildirmişlerdir. Diğer taraftan Siminiak ve Wysocki⁶⁵ bizim çalışmamıza benzer şekilde izole nötrofillerde lidokainin süperoksit anyonu oluşumunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

İstirahatteki hücrelerde plazma membranına bağlı NADPH oksidazın süperoksit oluşturan katalitik aktiviteden sorumlu olabileceği bildirilmektedir². Ancak süperoksit oluşumundaki sinyal ileti mekanizmaları hala tam olarak açıklanamadığı için bu konuda çalışmalar devam etmektedir³⁸. Süperoksit oluşumuna neden olan uyaranlardan PMA ve OAG'nin, ortamda diaçilgliserol yokken *in vitro* protein kinaz C'yi aktive ettikleri bilinmektedir^{7, 39}. Bu uyaranlar nötrofillerde ne fosfatidilinozitol dönüşümünü indüklemekte ne de sitozolde serbest kalsiyum artışına neden olmaktadır²⁴. Mikawa ve ark.⁵² bupivakainin tip I protein kinaz C'nin katalitik fragmanını inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Tomoda ve ark.⁷² da lidokainin protein kinaz C aktivitesini inhibe ettiklerini bildirmişlerdir. Bizim deneylerimizde de lidokain ve bupivakainin lökositler üzerindeki etkilerinde protein kinaz C'yi inhibe etmesi mümkündür ancak kullandığımız diğer lokal anesteziklerin protein kinaz C'yi inhibe ettiği henüz gösterilmemiştir.

Ksantin oksidaz substratlarının oksidasyonunu katalizlerken hem süperoksit hem de hidrojen peroksit saliverilmesine neden olur²². Mikawa ve ark⁵¹. hücresiz deneylerde ksantin-ksantin oksidaz sistemiyle oluşturulan ROT'yi lidokain ve bupivakainin etkilemediğini bildirmişlerdir. Bizim yaptığımız hücresiz deneylerde ise kullanılan tüm lokal anesteziğin ksantin-ksantin oksidazla oluşturulan luminol KL'sini belirgin şekilde özellikle yüksek konsantrasyonda inhibe ettiği gösterildi. Bu da kullandığımız lokal anesteziğin direkt olarak süperoksit radikaliyle reaksiyona girerek inhibisyon oluşturabileceğini göstermektedir.

Biyolojik sistemlerde süperoksit radikalının belirlenmesinde sıklıkla hem luminol hem de lusigenin luminesansları kullanılır. Süperoksit radikaliyle reaksiyona giren tek değerli okside luminol ve tek değerli redükte lusigenindir²⁰. Lidokain ve tetrakain hidrojen peroksitle oluşturulan luminol KL'sini konsantrasyon bağımlı aktive ederken, prilokainin inhibe ettiği, bupivakain ve artikainin ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişiklik yapmadığı gösterildi. Ancak prilokain, artikain ve tetrakain hidrojen peroksitle oluşturulan lusigenin KL'sini konsantrasyon bağımlı inhibe ederken, lidokain ile bupivakainin ise etkilemedi. Yüksek konsantrasyonlarda hem tetrakain hem de lidokain ile luminol varlığında görülen aktivasyon, lusigenin varlığında gözlenmemiştir. Bu da hidrojen peroksit varlığında, bu lokal anesteziğin luminol ile etkileşebileceğini düşündürmektedir. İnhibisyon mekanizması lokal anesteziğin hidrojen peroksitle direkt etkileşmesiyle açıklanabilir ancak burada aktivasyonun

mekanizması henüz anlaşılamamıştır. Siminiak ve Wysocki⁶⁵ de lidokainin hidrojen peroksitin oluşturduğu luminol KL'sini ise etkilemediğini bildirmişlerdir.

Ferröz demir sadece luminol varlığında KL sinyali oluşturduğundan, hidroksil radikali üzerine ilaçların etkisinin monitorizasyonunda demir sülfatla oluşturulan luminol KL'si kullanılmaktadır⁸³. Bu çalışmada demir sülfatla oluşturulan luminol KL'si sadece tetrakain ile konsantrasyon bağımlı olarak inhibe edildi ve diğer lokal anesteziklerin hiçbirinin hidroksil radikali oluşumunu engellemediği gösterildi. Ancak Das ve Misra^{10, 11} tarafından elektron paramagnetik rezonans spektroskopisi ve deoksiribozun hidroksil bağımlı tiyobarbitürik asit reaktif ürünleri olarak ölçüldüğü, kullandığımız yöntemden farklı iki ölçüm tekniğiyle de lidokainin potent bir hidroksil radikali süpürücüsü olduğu ve NADPH bağımlı lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Farklı ölçüm yöntemlerinden kaynaklanan farklı sonuçları açıklamak için başka çalışmaların yapılmasına gereksinim vardır.

She ve ark⁶⁴ bronkoskopi için topikal lidokain uyguladıkları hastaların bronkoalveoler lavaj sıvılarında hipokloröz asitin lidokainle inhibe edildiğini göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da kullandığımız lokal anesteziklerin hepsi hipokloröz asitle oluşturulan KL'si konsantrasyon bağımlı şekilde inhibe ettiğini gösterdik. Prilokain, artikain, bupivakain ve tetrakainin hipokloröz asiti inhibe ettiği ise ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir.

Prilokain hariç diğer lokal anestezipler peroksinitritle oluşturulan luminol KL'sini, prilokain ve bupivakain hariç diğerleri ise peroksinitritin lusigenin KL'sini konsantrasyon bağımlı inhibe ettiği bulunmuştur. Bu inhibisyonların lokal anesteziplerle direkt etkileşmesiyle olabileceği sonucuna vardık.

Artikain dışında çalışılan diğer lokal anesteziplerle izole insan lökositlerinde belirgin şekilde FMLP ile oluşturulan luminol KL'si konsantrasyon bağımlı olarak inhibe edilmiştir. Hücresiz deneylerde ise lidokainin süperoksit, hipokloröz asit ve peroksinitritin; prilokainin süperoksit, hidrojen peroksit ve hipokloröz asitin; artikainin süperoksit, hidrojen peroksit, hipokloröz asit ve peroksinitritin; bupivakainin süperoksit ve hipokloröz asitin ve tetrakainin süperoksit, demir sülfat, hipokloröz asit ve peroksinitritin luminol ve/veya lusigenin KL'lerinin konsantrasyon bağımlı bir şekilde inhibe ettiği gösterildi. Sonuç olarak kullanılan lokal anesteziplerin serbest radikaller ve metabolitlerinin büyük bir çoğunluğuyla direkt olarak etkileştiği saptandı. Bu sonuçlara dayanarak amid yapılı lokal anesteziplerin ester yapılarına göre daha etkin olarak serbest radikal ve metabolitleriyle etkileştiği söylenebilir. Bu çalışmada kullanılan lokal anesteziplerin direkt olarak reaktif oksijen ve nitrojen türleriyle etkileşebilecekleri ve bu etkileşimin lökositler üzerinde oluşturdukları inhibisyona katkıda bulunabilecekleri sonucuna varılabilir.

VI. ÖZET

Bazı lokal anesteziklerin lökosit fonksiyonlarını etkilediği ve lizozomal enzim salıverilmesini inhibe ettiği bilinmektedir. Bu çalışmada lokal anesteziklerin uyarılmış insan lökositleri ya da hücresiz sistemlerde oluşturulan reaktif oksijen veya nitrojen türlerini inhibe etme gücü luminol yada lusigenin kemilüminesansı (KL) kullanılarak kimyasal ya da enzimatik olarak araştırılmıştır.

Dekstran ile sedimentasyon yapılmış sitratlı insan venöz kanından lökositler izole edilmiştir. Serbest radikal oluşumunu belirlemek için bir luminometre kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı 37°C 'de 10^6 hücre mL^{-1} , luminol ve uyarıcı (formil-metiyonil-lösin-fenilalanin=FMPLP, 2 μM) içeriyordu. Hücresiz deneylerde hidrojen peroksit (H_2O_2), hipokloröz asit (HOCl), hidroksil radikali, peroksinitrit ve ksantin-ksantin oksidazın luminol ve/veya lusigenin KL'ları 3.5 mM H_2O_2 , 5 μM sodyum hipoklorit, 40 nM FeSO_4 , 50 nM peroksinitrit ve 0.1 mmol/L ksantin ile 0.2 U/mL ksantin oksidaz ile oluşturulmuştur. Lokal anesteziklerin etkileri stimulan eklenmeden hemen önce uygulanarak araştırıldı. Pik KL ölçümünden sonra lokal anesteziklerin etkileri tek başına stimulanla oluşan yanıt ile karşılaştırılarak % değişim olarak gösterilmiştir.

Yapılan deneylerde lokal anesteziklerden lidokain, prilokain, bupivakain ve tetrakainin izole lökositlerde FMLP ile oluşturulan KL'si belirgin şekilde konsantrasyon bağımlı olarak inhibe ederken, artikainin ise yüksek konsantrasyonda aktive ettiği gösterildi. Hücresiz deneylerde ise kullanılan tüm lokal anesteziklerin ksantin-ksantin oksidazla oluşturulan KL sinyallerini belirgin şekilde konsantrasyon bağımlı olarak inhibe ettiği gösterildi. Ancak, lidokain, bupivakain ve tetrakain hidrojen peroksitle oluşturulan luminol KL'sinin konsantrasyon bağımlı şekilde aktive ederken, prilokainin inhibe ettiği, artikainin ise etkilemediği bulundu. Ayrıca prilokain, artikain ve tetrakainin hidrojen peroksitle oluşturulan lusigenin KL'sini konsantrasyon bağımlı inhibe ettiği gösterildi. Demir sülfatla oluşturulan KL sadece tetrakain ile konsantrasyon bağımlı olarak inhibe edildi. Kullanılan lokal anesteziklerin hepsi hipokloröz asitle oluşturulan kemilüminesansı konsantrasyon bağımlı şekilde inhibe etti. Prilokain hariç diğer lokal anestezikler peroksinitritle oluşturulan luminol KL'sini, prilokain ve bupivakain hariç diğerleri ise peroksinitritin oluşturduğu lusigenin KL'sini konsantrasyon bağımlı inhibe ettiği bulundu.

Bu çalışmanın sonucunda lokal anesteziklerin serbest radikaller ve metabolitlerinin büyük bir çoğunluğuyla direkt olarak etkileşmekte olduğu ve bu etkileşmenin lökositlerde görülen inhibisyonun da sorumlu olabilecekleri sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar lokal anesteziklerin kimyasal yapıları gözönüne alınarak antioksidan aktivitesi olan moleküllerin geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

VII. SUMMARY

EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF LOCAL ANESTHETICS BY CHEMILUMINESCENCE

Some of the local anesthetics are known to impair leukocyte functions and inhibit lysosomal enzyme release. The ability of local anesthetics to inhibit reactive oxygen and nitrogen species generated by stimulated human leukocytes or cell-free systems either chemically or enzymatically was investigated by using luminol- and lucigenin-enhanced chemiluminescence (CL).

Leukocytes were isolated from citrated human venous blood with dextran sedimentation and studied. A luminometer was used to assay free radical generation. The reaction mixture contained 10^6 cells mL^{-1} , luminol plus the stimulant (Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine=FMLP, 2 μM) at 37°C. In cell-free experiments, hydrogen peroxide (H_2O_2), hypochlorous acid (HOCl), hydroxyl radical and peroxynitrite-induced luminol and/or lucigenin CL were produced by H_2O_2 (3.5 mM), sodium hypochloride (5 μM), FeSO_4 (40 nM), peroxynitrite (50 nM) and xanthine (0.1 mmol/L) with xanthine oxidase (0.2U/mL). The effects of local anesthetics were examined by adding it immediately prior to the administration of stimulant agent. Following peak CL measurement, the effects of local anesthetics were expressed as % change from the response to the stimulant alone.

Lidocaine, prilocaine, bupivacaine and tetracaine inhibited FMLP induced-CL concentration dependently in isolated human leukocytes, whereas articaine activated at high concentrations. In cell free experiments, all of the studied local anesthetics markedly inhibited xanthine-xanthine oxidase induced-CL in a concentration dependent mannner. However, lidocaine, bupivacaine and tetracaine markedly activated hydrogen peroxide induced-CL while prilocaine inhibited. Additionally, prilocaine, articaine and tetracaine inhibited hydrogen peroxide induced lucigenin enhanced-CL. Only tetracaine inhibited ferrous iron-induced CL. All of the 5 local anesthetics inhibited hypochlorous acid induced CL. Other local anesthetics except prilocaine inhibited peroxynitrite induced luminol enhanced CL. The local anesthetics except prilocaine and bupivacaine inhibited peroxynitrite induced lucigenin enhanced CL.

In conclusion, local anesthetics interacted with most of the free radicals and its metabolites, which could be considered to be responsible from the inhibition observed in isolated human neutrophils. Those results might contribute to the development of new molecules possessing antioxidant activities in accordance with the chemical structure of the local anesthetics.

VIII. KAYNAKLAR

1. ANIANSSON, H., STENDAHL, O., DAHLGREN, C.: Comparison between luminol-and lucigenin dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes, *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. C.*, 92, 357-5. (1984)
2. BADWEY, J.A., KARNOWSKY, M.L.: Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes, *Ann. Rev. Biochem.*, 49, 695-726. (1980)
3. BAEHNER, R.L., BOXER, L.A., INGRAHAM, L.M.: Reduced oxygen by products and white blood cells in "Free Radicals in Biology", (Pryor, W.A., ed.), Vol: 5, 91, Academic Press, New York, (1982).
4. BECKMAN, J.S., BECKMAN, T.W., CHEN, J., MARSHALL, P.A., FREEMAN, B.A.: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 87, 1620-4. (1990)
5. BECKMAN, J.S., CHEN, J., ISCHROPOULOS, H., CROW, J.P.: Oxidative chemistry of peroxynitrite in "Oxygen Radicals in Biological Systems", (Packer, L., ed.), Part C Methods in Enzymology, 233, 229, Academic Press, San Diego, (1994)
6. BONNEAU, C., COUDERC, R., TISSOT, M., ATHIAS, A., ROCH-ARVEILLER, M., GIROUD, J.P.: Effects of human low density lipoproteins on superoxide production by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine activated polymorphonuclear leukocytes, *Eur. J. Clin. Biochem.*, 35, 73-80. (1997)
7. CASTAGNE, M., TAKAI, Y., KAIBUCHI, K., SANO, K., KIKAWA, U., NISHIZUKA, Y.: Direct activation calcium activated phospholipid dependent

- proteinkinase by tumour promoting phorbol ester, *J. Biol. Chem.*, 257, 7847-9. (1982)
8. CLANCY, R.M., LESZCZYNSKA-PÍZIÁK, J., ABRAMSON, S.B.: Nitric oxide, an endothelial cell relaxant factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase, *J. Clin. Invest.*, 90, 1116-21. (1992)
 9. COVINO, B.G.: Pharmacology of local anesthetic agents in "General Anesthesia", (Nunn, J.F., Utting, J.E., Brown, B.R., eds), 1036, Butterworth and Co., London, (1989).
 10. DAS, K.C., MISRA, H.P.: A hydroxyl radical scavenger and singlet oxygen quencher, *Moll. Cell. Biochem.*, 115, 179-85. (1992)
 11. DAS, K.C., MISRA, H.P.: Antiarrhythmic agents - Scavengers of hydroxyl radicals and inhibitors of NADPH-dependent lipid peroxidation in bovine lung microsomes, *J. Biol. Chem.*, 267 (27), 19172-8. (1992)
 12. DEL MAESTRO, R.F.: An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol. Scand.*, 492, 153-68. (1980)
 13. DEMİRYÜREK, A.T., ÇAKICI, İ., KANZIK, İ.: Peroxynitrite: A putative cytotoxin, *Pharmacol., Toxicol.*, 82, 113-17. (1998)
 14. DEMİRYÜREK, A.T., KENNEDY, S., WAINWRIGHT, C.L., WADSWORTH, R.M., KANE, K.A.: Influence of nitric oxide on luminol enhanced chemiluminescence measured from porcine stimulated leukocytes, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 30, 332-37. (1997)

15. DEMİRYÜREK, A.T., WAINWRIGHT, C.L., WADSWOTH, R.M., KANE, K.A.: Characterization of a method for the detection of drugs with free radical scavenging activity using porcine leukocytes, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 32, 35-40. (1994)
16. DEMİRYÜREK, A.T., CİNEL, İ., TECDER-ÜNAL, M., GÖĞÜŞ, N., AYPAR, Ü., KANZİK, İ.: Propofol and intralipid interact with eactive oxygen species: a chemiluminescence study, *Br. J. Anaesth.*, 80, 649-54. (1998)
17. DI MASCIO, P., BECHARA, E.J.H., MEDEIROS, M.H.G., BRIVIBA, K., SIES, H.: Singlet molecular oxygen production in the reaction of peroxynitrite with hydrogen peroxide, *FEBS Lett.*, 355, 287-89. (1994)
18. EISERICH, J.P., CROSS, C.E., JONES, A.D., HALLIWELL, B., VEN DER VLIET, A.: Formation of nitrating and clorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. A novel mechanism for nitric oxide mediated protein modifiation, *J. Biol. Chem.*, 271, 19199-208. (1996)
19. EISERICH, J.P., HIRISTOVA, M., CROSS, C.E., JONES, A.D., FREEMAN, B.A., HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., VAN DER VLIET, A.: Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils, *Nature*, 391, 393-97. (1998)
20. FAULKNER, K., FRIDOVICH, I.: Luminol and lucigenin as detectors for O_2^- , *Free Rad. Biol. Med.*, 15, 447-51. (1993)
21. FREEMAN, B.A., CRAPO, J.D.: Biology of disease. Free radicals and tissue injury, *Lab. Invest.*, 47, 412-26. (1982)

22. FRIDOVICH, I.: Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase, *J. Biol. Chem.*, 245, 4053-7. (1970)
23. FORMTLING, R.A., ABRUZZO, G.K.: Chemiluminescence as a tool for the evaluation of antimicrobial agent: A review, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 7, 493-500. (1985)
24. FUJITA, I., IRITA, K., TAKESHIGE, K., MINAKAMI, S.: Diacylglycerol, 1-oleyl-2-acetyl-glycerol stimulates superoxide generation from human neutrophils, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 120, 318-22. (1984)
25. GILLMAN, A.G., RALL, T.W., NIES, A.S., TAYLOR, P.: Goodman and Gillman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8.baskı, Vol 2, 311, McGraw- Hill Int., Singapore, (1991)
26. GOLDSTEIN, I.M., LIND, S., HOFFSTEIN, S., WEISSMAN, G.: Influence of local anesthetics upon human polymorphonuclear leukocyte function in vitro, *J. Exp. Med.*, 146, 483-94. (1977)
27. GREENWALD, R.A.: CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research, 343, CRC Press Inc., Florida, (1986).
28. GUTTERIDGE, J.M.C.: Biological origins of free radicals, and mechanisms of antioxidan protection, *Chem. Biol. Interact.*, 91, 133-40. (1994)
29. HALLIWELL, B.: Cellular stress and protection mechanisms, 24, 1023-7. (1996)
30. HALLIWELL, B.: Antioxidants: The basics-What they are and how to evaluate them, *Adv. Pharmacol.*, 38, 3-20. (1997)

31. HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., CROSS, C.E.: Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?, J. Lab. Clin Med., 119, 598-620. (1992)
32. HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C.: Free Radicals in Biology and Medicine, 2nd edition, Clarendon Press, Oxford, (1989).
33. HOGG, N., KALYARANAMAN, B., JOSEPH, J., STRUCK, A., PARTHASARTHY, S.: Inhibition of low density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis, FEBS Lett., 334, 170-4. (1993)
34. HOLLEY, A.E., CHEESEMAN, K.H.: Measuring free radical reactions *in vivo*, Med. Bull., 49 (3), 494-505. (1993)
35. HONDRUM, S.O., EZELL, J.H.: The relationship between pH and concentrations of antioxidants and vasoconstrictors in local anesthetic solutions, Anesth. Prog., 43, 85-91. (1996)
36. HYVÖNEN, P.M., KOWOLIK, M.J.: Dose dependent suppression of the neutrophil respiratory burst by lidocaine, Acta Anaesthesiol. Scand., 42, 565-9. (1998)
37. IRITA, K., FUJITA, I., TAKESHIGE, K., MINAKAMI, S., YOSITAKE, J.: Cinchocine and ametochnaine inhibit activation and activity of superoxide production in human neutrophils, Br. J. Anaesth., 58, 639-45. (1986)
38. IRITA, K., TAKESHIGE, K., MINAKAMI, S.: Protein phosphorylation in intact pig leukocytes, Biochem. Biophys. Acta, 805, 44-50. (1984)

39. KAIBUCHI, K., SANO, K., HOSIJIMA, M., TAKAI, Y., NISHIZUKA, Y.:
Phosphatidylinositol turnover in platelets activation: Calcium mobilization
and protein phosphorylation, *Cell Calcium*, 3, 323-8. (1982)
40. KANG, M.Y., TSUCHIYA, M., PACKER, L., MANABE, M.: *In vitro* study
on antioxidant potential of various drugs used in the perioperative period, *Acta
Anaesthesiol. Scand.*, 42, 4-12. (1998)
41. KATZUNG, B.G.: *Temel ve Klinik Farmakoloji*, Cilt 1, 530, Barış Kitapevi,
İstanbul, (1995).
42. KAYAALP, S., O.: *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, 8. Baskı,
Cilt 1, 807, Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd.Şti., Ankara, (1998).
43. LUNDQVIST, H., DAHLGREN, C.: Isoluminol-enhanced chemiluminescence:
A sensitive method to study the release of superoxide anion from human
neutrophils, *Free Rad. Biol. Med.*, 20, 785-92. (1996)
44. MCGREGOR, R.R., THORNER, R.E., WRIGHT, D.M.: Lidocaine inhibits
granulocyte adherence and prevents granulocyte delivery to inflammatory
sites, *Blood*, 56, 203-9. (1980)
45. MCCALL, T.B., PALMER, R.M.J., MONCADA, S.: Induction of nitric oxide
synthase in rat peritoneal neutrophils and its inhibition by dexametasone, *Eur.
J. Immunol.*, 21, 2523-27. (1991)
46. MARINOV, B.S., POZELUEVA, M.M.: Redox properties of benzocaine and
its homologs, *Membr. Cell Biol.*, 11(4), 507-13. (1997)
47. MARKERT, M., ANDREWS, C.P., BABIOR, B.: Measurement of O_2^-
production by human neutrophils, the preparation assay of NADPH oxidase-

- containing particles from human neutrophils, *Meth. Enzymol.*, 105, 358-67. (1984)
48. MAXWELL, S.R.J.: Prospects for the use of antioxidant therapies, *Drugs*, 49(3), 345-61. (1995)
49. MERENYI, G., LIN, J., ERIKSEN, T.E.: Luminol chemiluminescence: chemistry, excitation, emitter, *J. Biolumin. Chemilumin.*, 5, 53-6. (1990)
50. MERENYI, G., LIN, J., GOLDSTEIN, S., CZAPSKI, G.: Peroxynitrous acid homolyzes into OH and NO₂ radicals, *Chem. Res. Toxicol.*, 11, 712-3. (1998)
51. MIKAWA, K., AKAMATSU, H., NISHINA, K., SHIGA, M., MAEKAWA, N., OBARA, H., NIWA, Y.: Inhibitory effect of local anaesthetics on reactive oxygen species production by human neutrophils, *Acta Anaesthesiol. Scand.*, 41, 524-8. (1997)
52. MIKAWA, K., MAEKAWA, H., HOSHINA, H., TANAKA, O., SHIRAKAWA, J., GOTO, R., OBARA, H., KUSUNOKI, M.: Inhibitory effect of barbiturates and local anesthetics on protein kinase C activation, *J. Int. Med. Res.*, 18, 153-60. (1990)
53. MORROW, J.D., HILL, K.E., BURKE, R.F., NANMOUR, T.M., BADS, K.F., ROBERTS, L.J.: A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced *in vivo* humans by non-cyclooxygenase, free radical-catalysed mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87, 9383-7. (1990)
54. NORONHA-DUTRA, A.A., EPPERLEIN, M.M., WOOLF, N.: Reaction of nitric oxide with hydrogen peroxide to produce potentially cytotoxic singlet

- oxygen as a model for nitric oxide-mediated killing, *FEBS Lett.*, 321, 59-62. (1993)
55. PECK, S.L., JOHNSTON, R.B., HORWITZ L.D.: Reduced neutrophil superoxide anion release after prolonged infusions of lidocaine, *J. Pharmacol Exp. Ther.*, 235(2), 418-22. (1985)
56. PEDDINGHAUS, R.M.: Comparison of luminol- and lucigenin-amplified chemiluminescence (CL) of phagocytes, *Oxy. Rad. Chem. Biol.*, 881-2. (1985)
57. POU, S, POU, W.S., BRENDT, D.S., SYNDER, S.H., ROSEN, G.M.: Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase, *J. Biol. Chem.*, 267, 24173-6. (1992)
58. PRYOR, W.A.: Oxy-radicals and related species: their formation, and reactions, *Ann. Rev. Physiol.*, 48, 657-67. (1986)
59. REILLY, P.M., SCHILLER, H.C., BULKLEY, G.B.: Pharmacological approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites, *Am. J. Surg.*, 161, 488-503. (1991)
60. ROHN, T.T., NELSON, L.K., SIPES, K.M., SWAIN, S.D., JUTILA, K.L., QUINN, M.T.: Priming of human neutrophils by peroxynitrite: potential role in enhancement of the local inflammatory response, *J. Leukoc. Biol.*, 65, 59-70. (1999)
61. ROST, M., KARGE, E., KLINGER, W.: What do we measure with luminol-, lucigenin- and penicillin- amplified chemiluminescence? 1. Investigation with

hydrogen peroxide and sodium hypochlorite, J. Biolumin. Chemilumin., 13, 355-63. (1998)

62. SASAGAWA, S.: Inhibitory effects of local anesthetics on migration, extracellular release of lysosomal enzyme, and superoxide anion production in human polymorphonuclear leukocytes, Immunopharmacol. Immunotoxicol., 13(4), 607-22. (1991)
63. SCHMIDT, H.W., SEIFERT, R., BOHME, E.: Formation and release of nitric oxide from human neutrophil and HL-60 cells induced by chemotactic peptide, platelet activating factor and leukotriene B₄, FEBS Lett., 244, 357-60. (1989)
64. SHE, Z., LIMING, J.D., FAGAN, J.B., PACHT, E.R., DAVIS, W.B.: Inhibition of hypochlorous acid by lidocaine and native components of alveolar epithelial lining fluid, Am. Rev. Respir. Dis., 144, 227-30. (1991)
65. SIMINIAK, T., WYSOCKI, H.: The effect of lidocaine on oxygen free radical production by polymorphonuclear neutrophils, Agents Actions, Special Conference Issue, C 105. (1992)
66. SIMINIAK, T., WYSOIOCKI, H., VEIT, A., MAURER, H.R.: The effect of selected antiarrhythmic drugs on neutrophil free oxygen radicals production measured by chemiluminescence, Basic Res. Cardiol., 86, 355-62. (1991)
67. STEVEN, P., WINSTON, D.J., VAN DYKE, K.: *In vitro* evaluation of opsonic and cellular granulocyte function by luminol dependent chemiluminescence: Utility in patients with severe neutropenia and cellular deficiency states, Infect. Immun., 22, 41-51. (1978)

68. STUEHR, D.J., KWON, N.S., NATHAN, C.F.: FAD and GSH participate in macrophage synthesis of nitric oxide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 168, 558-65. (1990)
69. TAKAHASHI, R., EDASHIGE, K., SATO, E.F., INOUE, M., MATSUNO, T., UTSUMI, K.: Luminol chemiluminescence and active oxygen generation by activated neutrophils, *Arch. Biochem. Biophys.*, 285, 325-30. (1991)
70. TAKESHIGE, K., MINAKAMI, S.: Involvement of calmodulin in phagocytic respiratory burst of leukocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 99, 484-9. (1981)
71. THELEN, M., DEWALD, B., BAGGIOLINI, M.: Neutrophil by activated signal transduction and activation of the respiratory burst, *Physiol. Rev.*, 73, 797-821. (1993)
72. TOMODA, M.K., TSUCHIYA, M., UEDA, W., HIRAKAWA, M., UTSUMI, K.: Lidocaine inhibits stimulation-coupled responses of neutrophils and protein kinase C activity, *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR*, 22, 199-210. (1990)
73. TORUN, M., YARDIM, S.: Serbest radikallerin kalp damar hastalıkları ile ilişkisi ve savunma mekanizmaları, *FABAD J. Pharm. Sci.*, 18, 173-84. (1993)
74. TURNER, N.C., WOOD, L.J., FOSTER, M., GUEREMY, T.: Effects of PAF, FMLP and opsonized zymosan on the release of ECP, elastase and superoxide from human granulocytes, *Eur. Respir. J.*, 7, 934-40. (1994)

75. VASQUEZ-VIVAR, J., KALYARANAMAN, B., MARTASEK, P., HOGG, N., MASTERS, B.S., KAROUI, H., TORDO, P., PRITCHARD, K.A.J.: Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: The influence of cofactors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95, 9220-5. (1998)
76. VICKERS, M.D., MORGAN, M., SPENCER, P.S.J.: *Drugs in Anesthetic Practice*, 7. Baskı, 200, Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford, (1991)
77. VISSERS, M., STERN, A., KUYPERS, A., VAN DENBERG, J., WINTERBOURN, C.: Membran changes associated with lysis of red blood cells by hypochlorous acid, *Free Rad. Biol. Med.*, 16, 703-12. (1994)
78. WEISS, S.J.: Tissue destruction by neutrophils, *N. Engl. J. Med.*, 320, 365-76. (1989)
79. WYSOCKA, E., WYSOCKI, H., SIMINIAK, T., SZCEPANIK, A.: Effect of selected antiarrhythmic drugs on the superoxide anion production by polymorphonuclear neutrophils *in vitro*, *Cardiology*, 76, 264-9. (1989)
80. XIA, Y., ZWEITER, J.L.: Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 6954-8. (1997)
81. YILDIZ, A., GENÇ, Ö.: *Enstrümental Analiz*, Hacettepe Yayınları, Ankara, (1993).
82. YILDIZ, G., DEMİRYÜREK, A.T., ŞAHİN-ERDEMLİ, İ., KANZİK, İ.: Comparison of antioxidant activities of aminoguanidine, methyl guanidine and guanidine by luminol enhanced chemiluminescence, *Br. J. Pharmacol.*, 124, 905-10. (1998)

83. YILDIZ, G., DEMİRYÜREK, A.T.: Ferrous iron induced luminol chemiluminescence: A method for hydroxyl radical study, J. Pharmacol. Toxicol. Methods, 39(3), 179-84. (1998)



IX. ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: D.Berrin SOMUNKIRAN-GÜNAYDIN

İş Adresi: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon
Anabilim Dalı, Beşevler – ANKARA 06500

Ev adresi : Kızılırmak mah. 8.sok.7/35 C Blok Balgat ANKARA 06520

Tel ve faks: 312-28536 64

E-Mail:gunaydin@med.gazi.edu.tr

Doğum yeri ve tarihi: Maraş, 31.01.1965

Uyruğu : T.C.

EĞİTİMİ

İlkokul: Cumhuriyet İlkokulu ve Hamdullah Suphi İlkokulu, 1971-1976

Ortaokul ve Lise: Ankara Atatürk Anadolu Lisesi, 1976-1983.

Üniversite: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, 1983-1989.

Tıpta Uzmanlık Eğitimi: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve
Reanimasyon Anabilim Dalı, 1989-1994.

Çalıştığı yerler:

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim
Dalı'nda araştırma görevlisi (1989-1994).

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim
Dalı'nda uzman (1994-).

Medeni Hali: Evli ve bir çocuk annesi.

Yabancı Dili: İngilizce:KPDS derecesi -B-(84) ve Doçentlik İngilizce (başarılı-
83.75).