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

PRİLOKAİN TOKSİSİTESİNDE TİMOKİNONUN KORUYUCU ETKİNLİĞİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Barış AKGÜL

Antalya, 2019

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

PRİLOKAİN TOKSİSİTESİNDE TİMOKİNONUN KORUYUCU ETKİNLİĞİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Barış AKGÜL

Tez Danışmanı: Doç.Dr. İlker ÖNGÜÇ AYCAN

"Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir"

Antalya, 2019

Bu araştırma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TTU-2017-2551)

TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı'ndaki eğitimim süresince ve tez çalışmamın her aşamasında bana yol gösteren, bilimsel çalışmalar konusunda desteğini ve güvenini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. İlker ÖNGÜÇ AYCAN'a, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Necmiye HADİMİOĞLU şahsında tüm öğretim üyelerine tüm kalbimle teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca tüm sıkıntıları ve sevinçleri birlikte yaşadığım, beraber çalışmaktan gurur ve mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma, iş yükümüzü biraz olsun hafifleten tekniker arkadaşlarıma, kliniğimizin çok değerli sekreteri, kendinden ödün vererek bizim için canla başla çalışıp her daim destekçimiz olan Elif ONAT DİKMEN'e çok teşekkür ederim.

Yaşamımın her döneminde desteğini esirgemeyen, bugüne kadarki eğitim ve öğretim sürecinde sonsuz sabır gösterip bu günlere gelmemi sağlayan başta rahmetli babam İbrahim AKGÜL olmak üzere tüm aileme; uzmanlık eğitimi sürecinde tanıştığım ve hayatımı birleştirdiğim, yaşama sevinciyle sevgisini ve desteğini her daim hissettiren, tez yazımımın başından sonuna kadar beni motive eden ve yönlendiren sevgili eşim Gözde YALÇIN AKGÜL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	**vi**
Tablolar Dizini	**viii**
Şekiller Dizini	**ix**
Resimler Dizini	**xiii**
1. GİRİŞ VE AMAÇ	**1**
2. GENEL BİLGİLER	**2**
2.1. Lokal Anestezikler	2
2.1.1. Lokal Anestezinin Tanımı	2
2.1.2. Lokal Anestezinin Etki Mekanizması	2
2.1.3. Lokal Anesteziklerin Fizikokimyasal Özellikleri	4
2.1.4. Lokal Anesteziklerin Klinik Farmakolojisi	5
2.2. Lokal Anestezik Sistemik Toksisitesi (LAST)	6
2.2.1. Risk Faktörleri	7
2.2.2. LAST Mekanizması ve Klinik Bulguları	10
2.2.2.1. Santral sinir sistemi toksisitesi ve kliniği	10
2.2.2.2. Kardiyovasküler toksisite ve kliniği	11
2.2.2.3. Belirtilerin ortaya çıkma zamanı	12
2.2.3. LAST Yönetimi ve Tedavisi	13
2.2.3.1. Hava Yolu, Oksijen ve Ventilasyon	13
2.2.3.2. Nöbet Aktivitesi	13
2.2.3.3. Kardiyovasküler Destek ve Doku Perfüzyonunun Korunması	13
2.2.4. İntravenöz Lipit Solüsyonları	14
2.2.4.1. LAST İçin En İyi Lipit Solüsyonu Nedir?	15
2.2.4.2. Lokal Anestezik Sistemik Toksisitesinde Önerilen Lipit Solüsyon Tedavisi	16
2.2.4.3. Lipit Solüsyonlarının Yan Etkileri	17
2.3. Prilokain	19
2.3.1. Prilokain Farmakokinetiği	19
2.3.2. Prilokainin Organ Sistemlerine Etkisi ve Toksisitesi	20
2.4. Nigella Sativa (Çörek Otu)	23

2.5. Timokinon (TQ) 25
2.5.1. Timokinonun Fizikokimyasal Özellikleri 26
2.5.2. Timokinonun Farmakokinetik Özellikleri 26
2.5.3. Timokinonun Moleküler Etki Mekanizması ve Görevleri 26
2.6. Timokinonun Farmakolojik Etkileri 27
2.6.1. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkisi 27
2.6.2. Sinir Sistemi Üzerindeki Etkisi 28
2.6.3. Antioksidan Etkisi 29
2.6.4. Antitümöral ve Antikanserojenik Etkisi 31
2.6.5. Antiinflamatuar, Antihistaminik ve İmmün Sistem Üzerine Etkisi 33
2.6.6. Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkisi 34
2.6.7. Üriner Sistem Üzerine Etkisi 35
2.6.8. Hepatoprotektif Etkisi 35

3. GEREÇ VE YÖNTEM 37

3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Çalışma Prosedürleri 37
3.2. Laboratuvar Koşulları 39
3.3. Deneyde Kullanılan İlaçların Uygulanma Prosedürleri 39
3.4. Çalışmada Kullanılan Araç Gereçler 40
3.5. Elektrofizyolojik Kayıtların Alınması 41
3.5.1. EEG Elektrotların İmplantasyonu 41
3.5.2. EEG ve EKG Monitörizasyonu 42
3.6. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü 43
3.7. İmmünohistokimyasal İncelemelerin Yapılması 45
3.7.1. Image-J Analizi 46
3.8. İstatistiksel Analiz 46

4. BULGULAR 47

4.1. Sıçanların Vücut Ağırlıklarının Değerlendirilmesi 47
4.2. Elektrofizyolojik Kayıtlar 47
4.3. Hemodinamik Parametreler 50
4.4. Biyokimyasal Parametreler 51
4.5. Kan Gazı Parametreleri 54
4.6. İmmünohistokimyasal İncelemeler 55
4.6.1. Serebellum 55
4.6.2. Talamik Nukleus 59

4.6.3. Koroid Pleksus 63
4.6.4. Serebral Korteks 67
4.6.5. Cleaved Caspase-3 Analizi 70

5. TARTIŞMA **71**

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER **83**

7. ÖZET **84**

8. ABSTRACT **86**

9. KAYNAKLAR **88**

10. EKLER **102**

Ek 1. Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Onayı 102
Ek 2. Çalışma Formu 103

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ASRA	Amerikan Rejyonel Anestezi ve Ağrı Tıbbı Derneği
ATP	Adenozin Trifosfat
AQP4	Akuaporin 4
Aβ	Beta-Amiloid
BUN	Kan Üre Nitrojeni
CC	Kardiyovasküler Kollaps
CCL4	Karbon Tetraklorür
CK-MB	Kreatin Kinaz MB
CNS	Santral Sinir Sistemi
COX	Siklooksijenaz
DAB	3,3-Diaminobenzidin Tetraklorid
DCFH	Diklorodihidrofloresein
DKB	Diyastolik Kan Basıncı
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DTQ	Ditimokinon
EEG	Elektroensefalografi
EKG	Elektrokardiyografi
GABA	Gamma-Aminobütirik Asit
GSH-Px	Glutatyon Peroksidaz
IFN-γ	İnterferon Gama
IVLE	İntravenöz Lipid Emülsiyonu
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
K^+	Potasyum
KVS	Kardiyovasküler Sistem
LA	Lokal Anestezik
LAST	Lokal Anestezik Sistemik Toksisitesi
LCT	Uzun Zincirli Trigliserid
MCT	Orta Zincirli Trigliserid

MDA	Malondialdehit
mRNA	Mesajcı RNA
mV	Mikrovolt
Na^+	Sodyum
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa Beta
NO	Nitrik Oksit
NS	Nigella Sativa
O_2^-	Süperoksit Radikal Anyonu
OAB	Orta Arter Basıncı
OH^-	Hidroksil
PBS	Fosfat Buffered Salin
pCO2	Parsiyel Karbondioksit Basıncı
pO2	Parsiyel Oksijen Basıncı
PTZ	Pentilenetetrazol
RIVA	Rejyonel İntravenöz Anestezi
ROS	Serbest Oksijen Radikalleri
SKB	Sistolik Kan Basıncı
SOD	Superoksit Dismutaz
SSAT	Spermidin/Spermin N-1-Asetil-Transferaz
SSS	Santral Sinir Sistemi
TAK	Total Antioksidan Kapasite
TBARS	Tiobarbiturik Asit Reaktif Maddel
TBHQ	Sentetik Tertbutilhidroquinon
THQ	Dihidrotimokinon
THY	Timol
TQ	Timokinon

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
2.1.	Lokal anesteziklerin fizikokimyasal özellikleri	**5**
2.2.	Lokal anesteziklerin etki başlangıç hızı, anestezi potansiyeli, etki süresi ve maksimum dozları	**6**
2.3.	*Nigella sativa* L. tohumu yağının doymuş ve doymamış yağ asit bileşenleri	**25**
2.4.	Nigella sativa'nın antikanser aktivitesinde ileri sürülen mekanizmalar	**32**
2.5.	Timokinonun çeşitli kanser hücrelerinde farklı moleküler hedefleri düzenlemesi	**33**
4.1.	Çalışma öncesi ve deney öncesinde gruplardaki ratların ağırlık ortalamaları	**47**
4.2.	Prilokain ve Timokion + Prilokain gruplarında prilokain toksisite bulgularının görüldüğü ortalama prilokain dozları	**49**
4.3.	Prilokain ve Timokinon + Prilokain gruplarında hemodinamik değişikliklerin gözlendiği prilokain dozları	**51**
4.4.	Serum Myoglobin ve CK-MB'nin ortalama değerleri	**52**
4.5.	Beyin ve kalp dokusundaki Total Antioksidan Kapasitesi ve Serbest Oksijen Radikallerinin ortalama değerleri	**53**
4.6.	Kan gazı parametreleri sonuçları	**54**
4.7.	Serebellumda görülen AQP4, p50 ve p65 ekspresyonlarının ortalama yüzdeleri	**59**
4.8.	Talamik nukleusta AQP4 ve p65 ekspresyonlarının ortalama yüzdeleri	**62**
4.9.	Koroid pleksusta görülen AQP4, p50 ve p65 ekspresyonlarının ortalama yüzdeleri	**66**
4.10.	Serebral kortekste AQP4 ve p65 ekspresyonlarının ortalama yüzdeleri	**70**

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.	Sinir hücresinde aksiyon potansiyeli oluşumu	**3**
2.2.	Na^{+}-K^{+} ATP pompası	**3**
2.3.	Lokal anesteziklerin kimyasal yapısı	**4**
2.4.	Prilokain'in kimyasal yapısı	**19**
2.5.	Nigella sativa tohumunun aktif bileşenlerinin kimyasal yapısı	**25**
3.1.	Stereotaksik atlasa göre belirlenen temsili elektrot lokasyonları	**42**
4.1.	Tüm gruplarda yapılan frontoparietal EEG ve EKG kayıtlarının monitörizasyonu	**48**
4.2.	İlk epileptik aktivite, izoelektrik EEG	**49**
4.3.	Prilokain ve Timokinon+Prilokain grupları arasında nabız ve kan basıncı değişikliklerinin karşılaştırılması	**50**
4.4.	Serum Myoglobin ve CK-MB düzeylerinin karşılaştırılması	**51**
4.5.	Beyin ve kalp dokusundaki Total Antioksidan Kapasite düzeylerinin karşılaştırılması	**52**
4.6.	Beyin ve kalp dokusundaki Serbest Oksijen Radikalleri düzeylerinin karşılaştırılması	**53**
4.7.	Gruplar arasındaki ekspresyon farklarının Image J analizi ile değerlendirilmesi sonucunda elde edilen grafik	**56**
4.8.	**a)** AQP4 immunohistokimyasıyla gruplar arasında ödeme bağlı olarak ortaya çıkan AQP4 ekspresyonu görülmektedir. Sham grubunda görülen AQP4 ekspresyonunun, Prilokain grubunda artışı ve Prilokain+Timokinon grubunda da azalışı dikkati çekmektedir. **b)** Oklar Purkinje hücrelerinin sitoplazmalarındaki ekspresyonu işaret etmektedir. Skala bar 100µm'dir	**56**
4.9.	Gruplar arasındaki ekspresyon farklarının Image J analizi ile değerlendirilmesi sonucunda elde edilen grafik.	**57**
4.10.	**a)** p50 immunohistokimyasıyla gruplar arasında ekspresyon şiddeti görülmektedir. Prilokain grubunda gözlenen p50 ekspresyonunun Prilokain+Timokinon grubunda azaldığı görülmektedir. **b)** Fotoğraflar 40x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiştir. Oklar purkinje hücrelerindeki ekspresyonu işaret etmektedir. Skala bar 100µm'dir	**58**
4.11.	Gruplar arasındaki ekspresyon farklarının Image J analizi ile değerlendirilmesi sonucunda elde edilen grafik	**58**

Şekil		**Sayfa**
4.12.	**a)** p65 immunohistokimyası sonrasında **10x** objektif büyütmesiyle elde edilen paneller görülmektedir. Sham grubunda az görülen p65 ekspresyonunun, Prilokain grubunda toksisite kaynaklı nöroinflamasyona bağlı olarak arttığı dikkati çekmektedir. Prilokain grubunda gözlenen p65 artışının, Prilokain+Timokinon grubunda azaldığı görüldü. **b)** Fotoğraflar **40x** objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiştir. Oklar ekspresyon bölgelerini işaret etmektedir. Skala bar 100µm'dir	**59**
4.13.	Gruplar arasındaki ekspresyon farklarının Image J analizi ile değerlendirilmesi sonucunda elde edilen grafik	**60**
4.14.	**a)**Talamik nukleuslarda AQP4 ekspresyonunun gruplar arasındaki değişimi görülmektedir. Fotoğraflar 10x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiş olup AQP4 ekspresyonları ile epilepsi ve tedavi grubu arasındaki farklanmalar dikkati çekmektedir. **b)** Fotoğraflar 40x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiştir. Oklar ekspresyon bölgelerini işaret etmektedir. Skala bar 100µm'dir	**60**
4.15.	Gruplar arasındaki ekspresyon farklarının Image J analizi ile değerlendirilmesi sonucunda elde edilen grafik	**61**
4.16.	**a)** p65 immunohistokimyasıyla gruplar arasındaki ekspresyon farkı görülmektedir. Fotoğraflar 10x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiş olup p65 ekspresyonları ile epilepsi ve tedavi grubu arasındaki farklar mevcuttur. Sham grubunda p65 ekspresyonu görülmezken, Prilokain grubunda toksisite kaynaklı nöroinflamasyona bağlı olarak ekspresyonun arttığı görülmektedir. Prilokain grubunda gözlenen p65 artışının, Prilokain+Timokinon grubunda azaldığı görülmüştür. **b)** Fotoğraflar 40x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiştir. Oklar ekspresyon bölgelerini işaret etmektedir. Talamik nukleuslarla birlikte ortamda yer alan glial ekspresyon da dikkati çekmekte ve bunun da gruplar arasındaki değişimi paralellik sergilemektedir. Skala bar 100µm'dir	**62**
4.17.	Gruplar arasındaki ekspresyon farklarının Image J analizi ile değerlendirilmesi sonucunda elde edilen grafik	**63**

Şekil		**Sayfa**
4.18.	**a)** AQP4 immunohistokimyasıyla gruplar arasında ekspresyon farkı görülmektedir. Fotoğraflar 10x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiştir. Sham grubunda normal düzeyde görülen AQP4 ekspresyonunun, Prilokain grubunda arttığı; Timokinon+Prilokain grubunda ise azaldığı görülmüştür. Yalnız Timokinon verilen grupta ise normal seviyelerde ekspresyon mevcuttur. **b)** Fotoğraflar 40x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiştir. Oklar ekspresyon bölgelerini işaret etmektedir. Skala bar 100µm'dir	**64**
4.19.	Gruplar arasındaki ekspresyon farklarının Image J analizi ile değerlendirilmesi sonucunda elde edilen grafik	**64**
4.20.	**a)** p50 immunohistokimyasıyla gruplar arasında ekspresyon şiddeti görülmektedir. Fotoğraflar 10x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiştir. Sham grubunda az görülen p50 ekspresyonunun, Prilokain grubunda toksisiteye bağlı olarak arttığı görülmektedir. Prilokain grubunda gözlenen p50 artışının, Prilokain+Timokinon grubunda azaldığı görülmüştür. **b)** Fotoğraflar 40x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiştir. Oklar ekspresyon alanlarını işaret etmektedir. Skala bar 100µm'dir	**65**
4.21.	Gruplar arasındaki ekspresyon farklarının Image J analizi ile değerlendirilmesi sonucunda elde edilen grafik	**65**
4.22.	**a)** p65 immunohistokimyasıyla gruplar arasında nöroinflamasyon şiddeti görülmektedir. Fotoğraflar 10x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiş olup p65 ekspresyonları ile epilepsi ve tedavi grubu arasındaki farklanmalar dikkati çekmektedir. Sham grubunda az görülen p65 ekspresyonunun, Prilokain grubunda toksisite kaynaklı nöroinflamasyona bağlı olarak arttığı görülmektedir. Prilokain grubunda gözlenen p65 artışının, Prilokain+Timokinon grubunda azaldığı görülmüştür. **b)** Fotoğraflar 40x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiştir. Oklar ekspresyon alanlarını işaret etmektedir. Skala bar 100 µm'dir	**66**
4.23.	Gruplar arasındaki ekspresyon farklarının Image J analizi ile değerlendirilmesi sonucunda elde edilen grafik	**67**

Şekil		**Sayfa**
4.24.	**a)** AQP4 immunohistokimyasıyla gruplar arasında farklar görülmektedir. Fotoğraflar 4x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiştir. Sham grubunda normal düzeyde görülen AQP4 ekspresyonunun, Prilokain grubunda toksisite kaynaklı ödeme bağlı olarak yüksek oranda arttığı görülmektedir. Prilokain grubunda gözlenen yoğun AQP4 immunreaksiyonunun, Timokinon+Prilokain grubunda azaldığı görülmüştür. Yalnız Timokinon verilen grupta ise normal seviyelerde ekspresyon mevcuttur. **b)** Fotoğraflar 40x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiştir. Oklar ekspresyon alanlarını işaret etmektedir. Skala bar 100µm'dir	**68**
4.25.	Gruplar arasındaki ekspresyon farklarının Image J analizi ile değerlendirilmesi sonucunda elde edilen grafik	**69**
4.26.	**a)** p65 immunohistokimyasıyla gruplar arasındaki nöroinflamasyon görülmektedir. Fotoğraflar 10x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiştir ve ekspresyon net olarak çok görülmediğinden 40x objektif büyütmesi tercih edilmiştir. **b)** Fotoğraflar 40x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiştir. Oklar ekspresyon alanlarını işaret etmektedir. Hem nöronlarda hem de glia hücrelerindeki ekspresyon dikkati çekmektedir. Skala bar 100µm'dir	**69**
4.27.	Serebellumda gruplara göre cleaved caspase-3 ekspresyonu	**70**

RESİMLER DİZİNİ

Resim		**Sayfa**
2.1.	Nigella Sativa bitkisi ve tohumu	**24**
3.1.	Sıçanların hemodinamik monitörizasyonlarının yapılmış hali	**38**
3.2.	Biyofizik laboratuvarı	**39**
3.3.	EEG elektrotların implantasyonu	**42**
3.4.	EKG ve EEG'nin eş zamanlı monitörizasyonu	**43**

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde, genel anestezi uygulamalarında oluşabilecek komplikasyonlardan kaçınılması gibi bir avantajı olması nedeniyle rejyonal anestezinin kullanım sıklığı gün geçtikçe artmaktadır (1).

Rejyonel anestezinin; operasyon sırasında hastanın bilincinin açık olması, spontan solunumun devam etmesi, havayolu reflekslerinin korunması, postoperatif dönemde analjezinin devam etmesi ve hastanın erken mobilizasyonu gibi önemli avantajları olmasından dolayı uygun operasyonlarda rejyonel anestezinin uygulanması öncelikli tercih olmaktadır (1).

Lokal anestezikler rejyonel anestezide kullanılan temel ilaçlardır. Lokal anestezik konsantrasyonlarındaki artışlar otonom, sensitif ve motor uyarıların iletiminin inhibisyonunu sağlar ve sempatik blokaj, analjezi ve anestezi ile sonuçlanır (1).

Lokal anesteziklerin sistemik etkileri kan konsantrasyonlarına bağlı olarak değişmektedir. Sistemik toksisite genellikle istenmeyen vasküler enjeksiyon sonucunda ya da aşırı doz verilmesi durumunda meydana gelmektedir. Toksik etkiler esas olarak santral sinir sistemi ve kardiyovasküler sistemde görülmektedir (1).

1953 yılında Löfgren ve Tegner tarafından sentezlenen ve klinikte ilk defa 1960'da Eriksson ve Gordh tarafından kullanılan prilokain, günümüzde rejyonel anestezi amacıyla sık kullanılan lokal anesteziklerdendir (2).

Bazı deneysel epilepsi modellerinde yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalarda TQ'nun antikonvulsan aktivite gösterdiği görülmekteyken (3); Nagi ve ark.'nın yaptığı çalışmada Siklofosfamid kaynaklı kardiyotoksisiteye karşı TQ'nun etkilerini incelemişlerdir ve çalışmanın sonuçlarına göre TQ'nun Siklofosfamide bağlı kardiyotoksisiteyi azalttığı, kısmen de olsa mitokondriyal fonksiyon ile enerji üretiminde iyileşme sağladığı bulunmuştur (4).

Bu çalışmada, prilokainin neden olduğu epileptiform aktivitede ve kardiyotoksisitede TQ'nun etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Lokal Anestezikler

2.1.1. Lokal Anestezinin Tanımı

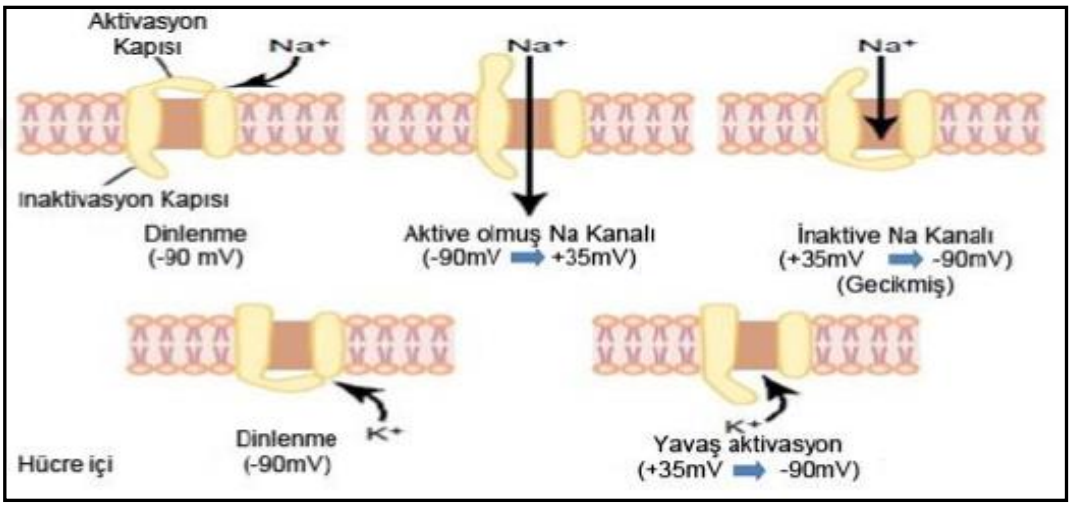
Lokal anestezikler; uygun konsantrasyonda ve dozda verildiklerinde uygulama yerinden başlayarak sinir iletiminin geçici blokajını sağlayan ajanlardır. Sinirlerde impulsların doğmasına ve sinir lifi boyunca ilerlemesine veya sinir uçlarında uyarımların şekillenmesine geçici olarak engel olurlar (5).

2.1.2. Lokal Anestezinin Etki Mekanizması

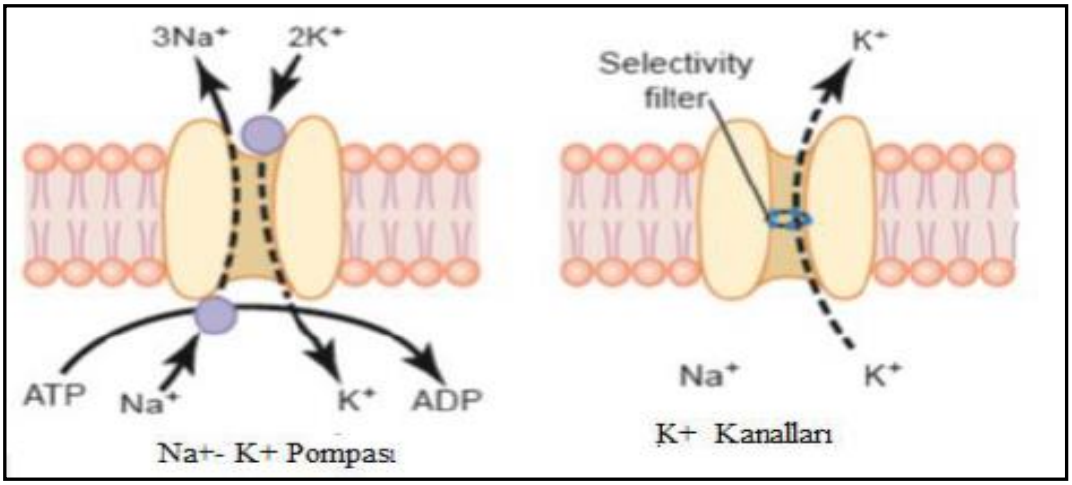
Lokal anesteziklerin etki mekanizması; aksiyon potansiyellerini düzenleyen voltaj bağımlı sodyum kanallarının iletimini engelleyerek, aksonal aksiyon potansiyelinin blokajını sağlaması üzerine gerçekleşmektedir. Antiinflamatuvar etkileri ise G protein bağımlı reseptörler ile etkileşmesi sonucu oluşur (6).

Fizyolojik olarak sinir hücreleri polarize olarak bulunmaktadır. Sinir hücresinin dışında Na^+ içerisinde de potasyum (K^+) iyonları bulunur ve bu iyon miktarları arasındaki fark sinir hücreleri uyarı durumunda değilken hücre içi ve dışı arasında -70 milivoltluk (mV) bir fark vardır. Bu fark, "dinlenim potansiyeli" olarak tanımlanır. Sinir hücrelerinin istirahat membran potansiyelini koruması, iyonların aktif transport ve pasif difüzyonları ile sağlanır. Na^{+}-K^+ pompası hücrenin dışına Na^+ atılımı ve hücre içine K^+ alımını sağlar. Bu transport 3 veya 4 Na^+'a karşı 1 veya 2 K^+ şeklinde gerçekleşmektedir (Şekil 2.1). Bu durum konsantrasyon gradienti yaratması sonucu K^+'un ekstrasellüler ve Na^+'un intrasellüler difüzyonunu kolaylaştırmasını sağlar. Uyarının yayılması genellikle sinir membranının depolarizasyonu ile meydana gelir. Depolarizasyon eşik düzeyi olan -55 mV'luk membran potansiyelini geçerse membrandaki Na^+ kanalları aktive olur, hücre içine hızlı ve spontan Na^+ iyon geçişi gerçekleşir. Na^+ permeabilitesindeki bu yükselme sonucu, +20/40 mV'luk membran potansiyeline yol açan (+) yüklü iyonlarda rölatif olarak artış görülür. Sonrasında Na^+ permeabilitesinde düşme (Na^+ kanallarının inaktivasyonuna bağlı) ve K^+ geçişinde artma (K^+'un hücre dışına daha fazla çıkmasına sebep olur); membranın istirahat potansiyeline dönmesini sağlar. Sonunda Na^{+}-K^+ pompası ile bazal

konsantrasyon farkı tekrar oluşur. Aksonal membran potansiyelinde oluşan tüm bu değişiklikler *aksiyon potansiyeli* olarak adlandırılır (Şekil 2.2). Lokal anestezikler etkilerini özellikle periferik sinirlerde olmak üzere tüm uyarılabilir dokularda depolarizasyon blokajı yaparak gösterirler. Bu blokajı da, çoğu lokal anestezik ajan Na^+ kanallarının iç yüzeyindeki reseptörlerine bağlanarak kanalların aktivasyonu ve membran depolarizasyonuna bağlı Na^+ geçişini önleyerek gerçekleştirir (Şekil 2.2) (6).



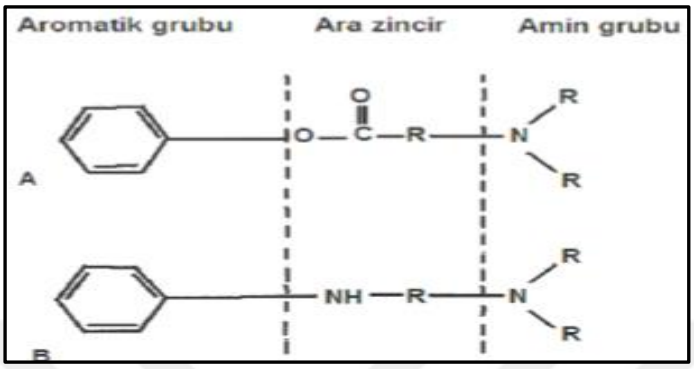
Şekil 2.1. Sinir hücresinde aksiyon potansiyeli oluşumu (6)



Şekil 2.2. Na^+-K^+ATP pompası (6)

2.1.3. Lokal Anesteziklerin Fizikokimyasal Özellikleri

Lokal anesteziklerin etki süresi ve etki gücü gibi özellikleri, o anestetiğin fizikokimyasal özelliğine dayanmaktadır. Tüm lokal anestetikler 3 komponentten oluşmaktadır (6) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Lokal anesteziklerin kimyasal yapısı (6)

1. *Hidrofobik aromatik halka*, lipid çözünürlüğünü arttıran kısmıdır. Lokal anesteziğin sinir kılıflarına difüzyonu lipid çözünürlüğünün artması ile kolaylaşır. Bu özellik aynı zamanda lokal anesteziğin etki süresi ve potensi ile ilişkilidir. Sinir membranlarının ve bağ dokularının membranları lipoprotein yapısındadır. Yağda erirliği yüksek olan lokal anesteziklerin membrandan geçişi daha kolaydır ve daha az miktarda moleküle ihtiyaç duyar. Lokal anesteziklerin yağda erirlik sıralaması bupivakain-tetrakain>lidokain-mepivakain>prokain şeklindedir.

2. *Hidrofilik tersiyer amin grup*, lokal anesteziğin suda veya yağda çözünür yapıdabulunmasını belirleyen kısmıdır.

3. Her iki grup arasında bağlantıyı sağlayan *ester ya da amid yapıda bir zincirdir*.

Bu ara zincir veya bağlantı, sınıflandırma için uygun bir temel sağlar ve aynı zamanda biyotransformasyonun modelini belirler.

I- Amid grubu lokal anestezikler: Artikain, bupivakain, dibukain, etidokain, levobupivakain, lidokain, mepivakain, prilokain ve ropivakaindir.

II- Ester grubu lokal anestezikler: Kokain, klorprokain, tetrakain, benzokain ve prokaindir.

III- Alkoller: Etil alkol, aromatik alkollerdir.

IV- Diğerleri: Holokain, quinoline deriveleri, eucupirindir (6).

Klinik özellikleri belirleyen üç önemli özellik şunlardır:

a. *İyonizasyon; pKa–düşük:* hızlı başlangıç, daha fazla lipidde çözünürlük, *yüksek:* yavaş başlangıç, daha diferansiyel blok.
b. *Vazokonstriksiyon (Cocaine)/ vazodilatasyon* (kısa etki süresi, daha toksik).
c. *Optik izomerizasyon;* Lokal anesteziklerin bir diğer önemli fiziksel özelliği de steroizomerik karışım halinde olmaları ve bunun klinik etkilerini değiştirmesidir. Steroizomer; aynı yapısal formüle sahip olup farklı uzaysal formüle sahip olma özelliğidir (6).

Tablo 2.1. Lokal anesteziklerin fizikokimyasal özellikleri (6)

	Anestezik madde	**Molekül Ağırlığı**	**pKa**	**Proteine bağlanma** (%)	**Toksisite**
Amid Grubu	Lidokain	234	7,7	64	Düşük
	Mepivakain	246	7,9	77	Düşük
	Bupivakain	288	8,1	95	Yüksek
	Levobupivakain	288	8,1	96	Orta
	Ropivakain	274	8,1	94	Orta
	Prilokain	220	7,9	55	Düşük
	Artikain	321	7,8	95	Düşük
Ester Grubu	Kokain	303	8,7	98	Çok Yüksek
	Prokain	236	8,9	6	Düşük
	Tetrakain	264	8,2	76	Orta

2.1.4. Lokal Anesteziklerin Klinik Farmakolojisi

Etki başlangıcı, lipitte çözünürlük ve pKa gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir. Sinir membranı lipoprotein yapısında olmasından dolayı lokal anestezik ilacın etkinliğini belirleyen en önemli faktör yağda çözünürlüğüdür. Lokal anestezikler ticari olarak suda çözünür hidroklorit tuzlar olarak bulunurlar (pH 6 - 7). Epinefrin bazik solüsyonlarda stabil olmadığı için ticari lokal anestezik solüsyonlar daha asidiktirler (pH 4 - 5). Bu preparatların kullanım sırasında kullanıcı tarafından epinefrin eklendiğinde daha yavaş bir etki ve başlama süresine sahip olur. Benzer şekilde lokal anestezik asidik dokuya enjekte edildiği takdirde baz/katyon oranı azalır ve etki başlama süresinde gecikme meydana gelir

(6). Lokal anesteziğin membran proteinlerine afinitesi ve bağlanma yeteneği etki süresini belirleyen en önemli faktörlerdendir (Tablo 2.2).

Lokal anestezikler etkinlikleri ve etki süreleri yönünden de üç gruba ayrılabilirler:

1- Zayıf güçte - Kısa etkili - Procaine (Novokain)
2- Orta etkinlikte - Orta etki süreli - Lidocaine (Aritmal), Prilocaine (Citanest)
3- Güçlü ve uzun etkili - Bupivakain (Marcaine), Levobupivakain (Chirocaine)

Tablo 2.2. Lokal anesteziklerin etki başlangıç hızı, anestezi potansiyeli, etki süresi ve maksimum dozları (6)

	Anestezik madde	**Başlangıç**	**Potansiyel**	**Etki süresi**	**Maksimum doz (mg/kg)**
Amid Grubu	Lidokain	Hızlı	Orta	Orta	5
	Mepivakain	Yavaş	Orta	Orta	5
	Bupivakain	Yavaş	Yüksek	Uzun	2
	Levobupivakain	Yavaş	Yüksek	Uzun	2.5
	Ropivakain	Yavaş	Orta	Uzun	2.5
	Prilokain	Hızlı	Orta	Orta	5
	Artikain	Hızlı	Orta	Orta	7
Ester Grubu	Kokain	Yavaş	Yüksek	Uzun	1.5
	Prokain	Yavaş	Düşük	Kısa	8
	Tetrakain	Yavaş	Orta	Orta	1.5

2.2. Lokal Anestezik Sistemik Toksisitesi (LAST)

Lokal anestezik sistemik toksisitesi (LAST), çeşitli sağlık kuruluşlarında lokal anestezik tekniklerinin giderek yaygın olarak kullanılmasına bağlı olarak görülen yan etkiler olup, major SSS ve kardiyak toksisite sonucu morbidite ve mortaliteye sebep olabilen bir durumdur. Güncel çalışmalar LAST'ın nispeten nadir olduğunu (10.000 epiduralda 0.7-1.8) göstermektedir (10,11). Lokal anestezik sistemik toksisitenin (LAST) nadirliği ve kontrollü klinik çalışmalar gibi araştırmaların yapılması etik olmayacağından dolayı bu klinik varlığın kesin bir tanımı yapılamamaktadır. Yüksek volümlü fasyal düzlem yaklaşımlarının ortaya çıkması, sürekli kateter tekniklerinin artan ilgisi ve aynı hastada birden

fazla lokal anestezik tekniği kullanılması gibi lokal anestezik tekniklerinin evrimi, LAST oluşma riskine katkıda bulunmaktadır (8).

Lokal anestetik ajanlara karşı gelişen sistemik reaksiyonların %99'undan lokal anesteziğin kan seviyesinde yüksek dozda bulunması sorumludur. Genelde epidural blok ve periferik sinir bloğu gibi uygulamalar sırasında yanlışlıkla yapılan intravasküler enjeksiyonlar, hızlı sistemik emilim veya yüksek doz ilaç kullanılması sonucu oluşmaktadır (Tablo 2.3). Sistemik toksisiteyi etkileyen faktörler plazma seviyesini etkilemektedir. Bunlar total doz, absorbsiyon hızı, dağılım, metabolizma hızı olarak sayılabilir. Absorbsiyon enjekte edilen bölgedeki kan akımına bağlı olmasının yanısıra absorbsiyon hızı vazokonstriktör ajan uygulaması ile yavaşlatılabilir. Dağılım yüksek kan akımı çok olan organlardan (beyin, kalp, karaciğer ve akciğer), düşük kan akımı olan (kasa ve yağ) organlara doğru gerçekleşir (6).

Ayrıca sistemik toksisiteyi etkileyen temel faktörlerden bazıları şunlardır (6):

- Lokal anestezi için kullanılan ajanların proteine bağlanması,
- Yağda çözünürlüğü,
- pH,
- Enjeksiyon yapılan alanın vaskülaritesi,
- Çözünürlük sabiti (pKa),
- İlacın veriliş hızı ve dozu,
- Hastanın asid-baz dengesi,
- Eşlik eden hastalığı,
- Yaş,
- Gebelik.

2.2.1. Risk Faktörleri

LAST gelişimi için risk faktörleri; enjekte edilen ilaç, hasta veya teknik ile ilgili olanlara kategorize edilebilir.

A) İlaç

Kardiyovasküler kollaps /SSS (CC / CNS) oranı "nöbet üretmek için gerekli olan ilaç dozuna katastrofik kardiyovasküler kollapsa neden olmak için gerekli

ilaç dozunun oranıdır. Düşük bir CC / CNS oranı daha fazla kardiyotoksik ajan ile ilişkili iken, daha yüksek bir CC / CNS oranına sahip lokal anestezikler daha fazla güvenlik sınırına sahiptir. Bunun nedeni, CNS belirtilerin daha erken görülmesi sonucu kardiyovasküler kollapsın ortaya çıkmadan önce LAST'in daha erken teşhisini (ve dolayısıyla tedavisini) hızlandırabilmesidir. Örneğin ropivakain ve levobupivakain; rasemik bupivakainden daha yüksek CC / CNS oranlarına sahiptir. Bu nedenle, uzun etkili lokal anesteziker arzu edildiğinde bu ilaçları tercihen kullanmak mantıklı görünmektedir. Ancak bu ilaçlar da LAST gelişimine neden olabilir (8).

Lokal anestezikler ayrıca farklı intrinsik vazoaktif etkilere sahiptir. Levobupivakain ve ropivakain, vazodilatatör özelliklere sahip olan ve daha hızlı sistemik absorpsiyona yol açabilen ajanlar iken; bupivakainin potansiyel olarak süresini ve yavaş sistemik emilimi uzatabilecek doza bağımlı vazokaktif özelliklere sahiptir (8).

B) Hasta Özellikleri

Yaş

Aşırı yaşlı hastaların sürekli olarak en büyük LAST riski altında olduğu gösterilmiştir. Yenidoğan ve bebeklerde plazmadaki fraksiyonunu artırabilen bağlayıcı protein α1-asit glikoprotein ve olgunlaşmamış hepatik enzim sistemlerinin azaltmasına bağlı olarak lokal anestezik serbest plazma konsantrasyonlarında artış görülebilir. Bu nedenle dozlama, <4 aylık hastalarda %15 oranında azaltılmalıdır (8).

Yaşlı hastalarda, azalmış metabolik organ perfüzyonu ve farmakodinamik fonksiyonuna bağlı olarak lokal anestesteziğin klirensini azalmaktadır. Bundan dolayı lokal anestezik sürekli infüzyonları veya tekrarlanan bolusları ile ilaç birikimi potansiyeli artmaktadır. Yaşlı hastalar birden fazla komorbiditeye sahip olabilir ve dejeneratif değişiklikler lokal anesteziğin sistemik etkilerine daha duyarlı hale gelmesine neden olabilir. Bu nedenle, bu hastalarda %10-%20'lik bir doz azaltımı önerilmektedir (8).

Gebelik

Gebelikte α1-asit glikoproteini plazma konsantrasyonları azalmasından dolayı LA'nın proteine bağlanması azalır ve kardiyak output artmıştır. Bu iki durum, enjeksiyon bölgelerinde perfüzyonun hızlanmasına, hızlı LA emilimine ve daha yüksek LA konsantrasyonlarına yol açar. Ek olarak, epidural venöz ağ yapısı nedeniyle, ilaç emilimini ve/veya kateter yerleşiminin intravenöz olma olasılığını artırabilir. Gebelikteki biyokimyasal ve hormonal değişiklikler LA'ya nöronal duyarlılığı arttırır ve aynı zamanda LAST'daki nöbetler için eşiği de azaltabilir. Tüm bu nedenlerin bir araya gelmesi gebelerde artmış risk oluşturur. Bu nedenle, periferal ve merkezi nöroaksiyal LA'ların dozlarının azaltılması tavsiye edilir (8).

Renal Hastalık

Şiddetli böbrek hastalığı olan hastalar sadece hiperdinamik dolaşıma ve LA'ların daha az klirensine sahip olmakla kalmaz, aynı zamanda artmış α1-asit glikoprotein konsantrasyonuna sahiptirler. Sonuç olarak, LA'nın serbest plazma konsantrasyonları büyük ölçüde değişmez ve hasta metabolik asidozda ve üremik olmadıkça doz azaltımı genellikle gereksizdir (8).

Kardiyak Hastalık

Kardiyak hastalığı olan hastalar LAST için artmış riske sahiptir. Mevcut iletim bozukluklarına sahip olanlar kardiyovasküler toksisiteye yatkın olabilir ve dikkatli dozlama ile ropivakain veya levobupivakain gibi daha az kardiyotoksik ilaçların kullanılması önerilir.

Şiddetli kardiyak disfonksiyonu olan hastalar, azalmış metabolizma ve eliminasyona bağlı olarak azalmış hepatik ve renal perfüzyona sahiptir. Bunun sonucunda özellikle LA kaynaklı miyokardiyal depresyon ve aritmilere duyarlıdır. Enjeksiyon bölgesinin kötü perfüzyonu LA'nın pik plazma konsantrasyonunu azaltabilir, ancak dolaşım süresi uzarsa, intravenöz LA ajanın saptanması gecikebilir. Doku perfüzyonunun korunduğu orta şiddetli kalp yetmezliğinde doz azaltma gereksizdir ancak ciddi kalp yetmezliğinde doz azaltılmalıdır (8).

Hepatik Disfonksiyon

İzole karaciğer fonksiyon bozukluğunda, LA'ların tek doz rejyonel anestezi teknikleri için doz ayarlaması gerektirmez. Daha büyük hacimde dağılım ve α1-asit glikoprotein sentezinin korunması, karaciğer hastalığı olan hastalarda güvenlik payı sağlar. Ancak tekrarlanan bolus veya sürekli LA infüzyonu alan hastalarda, birlikte bulunan kardiyak veya böbrek hastalığı olan hastalarda doz azaltma önerilir (8).

2.2.2. LAST Mekanizması ve Klinik Bulguları

2.2.2.1. Santral sinir sistemi toksisitesi ve kliniği

Lokal anestezikler, nöronal dokuda hücre içi voltaj kapılı hızlı sodyum kanallarını bloke eder, depolarizasyonu inhibe eder ve nöronal iletimi önler. Yükselen LA plazma konsantrasyonlarının etkileri, SSS'de serebral kortikal inhibitör yolaklarının blokajı ile belirgin hale gelir (12). Santral sinir sistemi semptomları doza bağımlıdır ve kan konsantrasyonları yükseldikçe şiddeti daha da ilerler.

Bu semptomlar uygulamadan bir dakikadan daha kısa sürede ortaya çıkabilir ve şu semptomları içerir:

- Huzursuzluk,
- Sinirlilik,
- Dil uyuşukluğu,
- Kulak çınlaması,
- Baş dönmesi,
- Metalik tat,
- Nistagmus,
- Konfüzyon,
- Tremor,
- Ajitasyon,
- Konvülziyon,
- Koma,
- Solunumsal arrest (13).

2.2.2.2. Kardiyovasküler toksisite ve kliniği

Miyokardiyal hücresel düzeyde, lokal anestezikler kardiyovasküler sistem üzerinde potasyum ve kalsiyum kanallarını bloke ederek üç baskın patofizyolojik etkilere yol açar: disritmiler, miyokardiyal depresyon ve sistemik vasküler dirençteki değişiklikler (12).

Lokal anestezikler; hücrelerin, özellikle de his demetlerinde sodyum kanallarını bloke eder ve dinlenme membran potansiyelini daha negatif hale getirir. Bu aksiyon potansiyelindeki düşüş PR, QRS ve ST sürelerinin uzamasına, ayrıca hem bradiaritmi, hem de yeniden taşiaritmi oluşma riskinin artmasına sebep olur. Ekstra potasyum kanal inhibisyonu; sodyum kanal blokajını artırır, yeniden giren disritmileri arttırır, miyosit repolarizasyonunu azaltır ve QT aralığını uzatır (12).

Lokal anestezi kaynaklı miyokardiyal depresyonun mekanizması multifaktöryel ve karmaşıktır. Hücre içi kalsiyum salınımı, kalsiyum kanal blokajı ve miyokardiyal sodyum-kalsiyum kanal pompasının inhibisyonu ile azalır. Bu, uyarma-kontraksiyon döngüsünü bozar ve böylece kontraktilite azaltır. Lokal anestezikler ayrıca, hücre içi adenosin trifosfat depolarını tüketen oksidatif fosforilasyonu ve serbest yağ asitlerinin alımını engelleyerek mitokondriyal enerji metabolizmasını bozar. Sonuç olarak, lokal anestezikler siklik adenosin monofosfatın üretimine doğrudan müdahale etmektedir. Kardiyovasküler kollapsa katkıda bulunan sistemik etkiler, baroreseptör refleksinin baskılanmasını ve vasküler tonda doğrudan azalmayı içerir (12).

LAST'in en korkulan sonuçları malign ventriküler aritmiler ve kardiyak arrest olmasına rağmen, daha sık görülebilecek geniş spektrumlu kardiyovasküler sistem üzerine etkisi vardır. Bu belirtiler; hipertansiyon, taşikardi (LAST'in SSS eksitatuvar faz fenomeni sırasında sempatik aktivasyonu sonucu), hipotansiyon, bradikardi ve asistoli dahil olmak üzere KVS depresyonu bulgularını (doğrudan miyokardiyal toksisite) içerir (9).

2.2.2.3. Belirtilerin ortaya çıkma zamanı

LAST olaylarının çoğunluğu, lokal anestezik enjeksiyonunun birkaç dakikası içinde gerçekleşir ve KVS değişikliklerine eşlik eden ya da etmeyen SSS bulguları ile görülür (9,12). LAST'ın hem zamanlama hem de klinik belirtiler açısından genellikle atipik olduğunu belirtmek önemlidir. Semptomların başlangıcı bolus enjeksiyonunu takiben 60 dakikaya kadar ertelenebilir ve daha çok sedasyon ve genel anestezi altındaki hastalarda karşılaşılan herhangi bir SSS toksisite belirtisi bulunmadan KVS toksisite bulguları oluşabilir (9). LAST'ın olmazsa olmaz koşulu, yükselmiş bir LA plazma konsantrasyonudur ve bu üç yoldan biriyle meydana gelebilir: yanlışlıkla intraarterial enjeksiyon, intravenöz enjeksiyon veya sistemik absorpsiyon.

İntraarterial enjeksiyonla ilişkili lokal anestezik sistemik toksisitesi klasik olarak baş ve boyundaki sinir bloklarının (örn. stellat ganglion, interskalen veya derin servikal pleksus blokları) uygulaması sırasında meydana gelir. Özellikle nöbet olmak üzere merkezi sinir sistemi semptomları çok hızlı meydana gelir (12). Bu hızlılık aynı zamanda, verilen dozların küçük olma eğiliminde olması nedeniyle kardiyovasküler kollaps gelişmesinin nadir olduğu anlamına gelir.

Yanlışlıkla yapılan intravenöz LA enjeksiyonu, herhangi bir bölgesel anestezi tekniğinin uygulanması sırasında meydana gelebilir. Ancak daha büyük hacimlerde (5-10 mL) enjekte edildiğinde LAST ile sonuçlanma eğilimindedir. Semptomlar genellikle beş dakika içinde görülse de ve uygun önlemler alınmazsa şiddetli bir şekilde hızla ilerleyebilir (9).

LA'nın sistemik absorpsiyonundan kaynaklanan lokal anestezik sistemik toksisite, gecikmiş bir prezentasyon (20-30 dk veya daha uzun bir bolus enjeksiyonunu takiben) ile karakterizedir ve genellikle başka bir risk faktörü varlığında nispeten yüksek bir LA dozu uygulandığında ortaya çıkar (12). Lokal anestezik sistemik toksisitesi, LA'nın sürekli infüzyonu durumunda da meydana gelebilir. Bu durumda, belirtilerin başlangıcı infüzyonun başlamasından saatler sonra olabilir (9).

2.2.3. LAST Yönetimi ve Tedavisi

Yeterli dozda LA alan tüm hastalar oksijen, standart izleme ve intravenöz girişe sahip olmalıdır. Gecikmiş belirtiler gittikçe arttığından, enjeksiyonun tamamlanmasından sonra en az 30 dakika boyunca izleme devam edilmelidir (8). LAST gelişimi söz konusu olduğunda ilk olarak, LA enjeksiyonunu durdurulmalı ve yardım istenmelidir. Acil öncelik hava yolu, solunum ve dolaşımın yönetilmesidir.

2.2.3.1. Hava Yolu, Oksijen ve Ventilasyon

Hipoksemi ve asidozdan (metabolik veya respiratuar) kaçınmak, LAST'ı yönetmede kritik öneme sahiptir. Her iki faktörün de laboratuvar çalışmalarında LAST'ı şiddetlendirdiği gösterilmiştir ve devam etmesine izin verildiği takdirde, spontan dolaşımın geri dönüşünü engelleyebilir ve kardiyak arreste kadar ilerleyebilir. Bununla birlikte, hiperventilasyon ile ortaya çıkan solunumsal alkalozun da zararlı olabileceği ve kaçınılması gerektiği belirtilmelidir (8).

2.2.3.2. Nöbet Aktivitesi

Uzun süreli nöbet aktivitesi metabolik asidozu şiddetlendirir ve derhal tedavi edilmelidir. Benzodiazepinler, genellikle aşırı kardiyovasküler instabiliteyi tetiklemedikleri için birinci basamak tedavi olarak önerilmektedir. Propofol sadece benzodiazepinler yoksa veya nöbetler tedaviye dirençliyse kullanılmalıdır, çünkü subklinik kardiyotoksisiteyi şiddetlendirebilir ve özellikle büyük dozlar uygulanırsa dolaşım kollapsına sebep olabilir (12). Düşük doz süksinilkolin, kas kasılmalarına sekonder metabolik asidozu azaltmak için refrakter nöbetlerde önerilebilir (13).

2.2.3.3. Kardiyovasküler Destek ve Doku Perfüzyonunun Korunması

Kardiyak arrest durumunda, hamile hastalarda kardiyoversiyon veya uterus deplasmanı endikasyonları da dahil olmak üzere kardiyopulmoner resüsitasyon için standart İleri Kardiyak Yaşam Desteği algoritmaları takip edilmelidir. Göğüs kompresyonları hemen başlatılmalı ve spontan dolaşımın geri gelinceye kadar sürdürülmelidir. Lokal anestezik, kardiyak miyositlere doğrudan zarar vermez ve

doku hipoksisinden kaçınıldığı sürece, uzun süreli kardiyopulmoner resüsitasyondan sonra bile tam iyileşme mümkündür. Yeterli dolaşımın sürdürülmesi, LA'nın kalp dokusundan uzaklaştırılmasını kolaylaştırarak iyileşme sürecini hızlandırır (12). İleri yaşam desteği önlemleri ve intravenöz lipid emülsiyonu (IVLE) tedavisini takiben hızlı iyileşme olmadığında; kardiyopulmoner bypass bir dolaşım desteği aracı olarak gecikmeden düşünülmesi gerekir (13). Lipit emülsiyon tedavisinin inotropik etkisi, ancak miyokardiyal LA seviyeleri, iyon kanalı blokajı konsantrasyonlarına karşılık gelen bir eşiğin altında olduğunda ortaya çıkar.

Epinefrin, sistemik vasküler rezistansı ve miyokardiyal kontraktiliteyi iyileştirmek için kullanılabilir, ancak küçük dozlarda uygulanmalıdır (<1 μg/kg). Daha büyük dozların hayvan çalışmalarında taşiaritmileri arttırdığı ve IVLE terapisine kıyasla daha kötü bir sonuçla ilişkili olduğu gösterilmiştir (12).

İleri Kardiyak Yaşam Desteği algoritmalarında sözü edilen çeşitli antiaritmik ilaçlardan LAST'da sadece amiodaron kullanılması önerilir. Lidokain ve diğer sodyum kanal blokerlerinden (örn., Prokainamid) kaçınılmalı, beta-blokerler ve kalsiyum kanal blokerler kardiyodepresan ve vazodilatör etkilerinden dolayı uygulanmamalıdır.

2.2.4. İntravenöz Lipit Solüsyonları

Lipid emülsiyonu ilk olarak 1960'larda parenteral beslenme için geliştirilmiştir Ancak lokal anestezik kaynaklı sistemik toksisiteyi tedavi etmek için şu anda lipit emülsiyonu kullanılmaktadır (15). Lipid emülsiyonunun etki mekanizmaları tam olarak anlaşılmamasına rağmen son gelişmeler, LAST'in yönetiminde bu terapötik modalitenin önemini vurgulamaktadır. Veriler, lipit emülsiyonunun, herhangi bir LA ajanın, kalp ya da beyin gibi yüksek kan akışlı organlardan, kaslar ya da karaciğer gibi depolama ya da detoksifikasyon organlarına taşıyabildiğini düşündürmektedir. Lipid emülsiyon terapisi ayrıca kardiyak output ve kan basıncını da düzeltirken aynı zamanda toksisite sonrası miyokardiyal koruma da oluşturabildiği düşünülmektedir (8).

Lipit solüsyonlarının etkisinin düşünülen mekanizmalar arasında şunlar vardır;

- Lipofilik lokal anestezik moleküllerinin önemli bir miktarını bağlayan ve inaktive eden bir intravasküler lipid "çukur" etkisi,
- Miyokardiyal hücrelerde mitokondriyal yağ asidi metabolizmasının ve ATP sentezinin desteklenmesi
- LA kaynaklı kardiyotoksisitede lipit solüsyonlarının kalsiyum ve potasyum kanallarını aktive etmesi
- Miyokardiyal hücrelerde artmış hücre içi kalsiyum içeriğine bağlı doğrudan inotropik etki.

Lipit emülsiyon tedavisinin klinik etkinliğini gösteren büyük ölçekli, yüksek kaliteli veriler, veri toplanmasındaki zorluklar, ileriye dönük çalışmaların sınırlı fizibilitesinden kaynaklanmaktadır. Lipit solüsyonlarının kullanımı ile ilgili birçok hayvan çalışması yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, resüsitatif girişimlerle birlikte lipid emülsiyon tedavisi uygulamasının, mortaliteyi azaltmada güçlü bir destek olduğunu göstermektedir (8).

Lipit solüsyonu uygulaması, bupivakain, levobupivakain, ropivakain, lidokain ve mepivakainin de dahil olduğu lokal anestezik toksisitesinin neden olduğu merkezi sinir sistemi semptomlarının ve kardiyovasküler kollapsın tedavisinde etkilidir. Ayrıca, kalsiyum kanal blokerleri (verapamil), trisiklik antidepresanlar (amitriptilin) ve beta blokerleri dahil olmak üzere lokal anestezik olmayan ilaçların toksik dozlarının neden olduğu inatçı kardiyovasküler kollapsın tedavisinde de etkili olabilmektedir (15).

2.2.4.1. LAST İçin En İyi Lipit Solüsyonu Nedir?

Intralipid® %20 ve Lipovenoes® %20 soya fasulyesi yağından yapılmış %100 uzun zincirli trigliserit içerir. İçerisinde uzun zincirli yağ asitleri bulunan Intralipid®; %53 linoleik asit, %24 oleik asit, %11 palmitik asit, %8 alfa-linolenik asit ve %4 stearik asit içerir. Lipofundin® MCT / LCT %20 ve Medialipid® %20; hindistancevizi yağından üretilen %50 orta zincirli trigliseritleri ve soya fasulyesi yağından yapılan %50 uzun zincirli trigliseritleri içerir. Aynı zamanda Lipofundin® MCT / LCT, %20 orta zincirli yağ asitleri, %28.5 kaprilik asit, %20

kaprik asit, %1 laurik asit ve %0.5 kaproik asit, %29.1 linoleik asit, %11 oleik asit, %7.4 palmitik asit, %4.5 alfa-linolenik asit ve %2 stearik asit içerir. SMO Flipid® %20; %30 soya fasulyesi yağı, %30 hindistan cevizi yağı, %25 zeytinyağı ve %15 balık yağı içerir. ClinOleic® %20, %20 soya fasulyesi yağı ve %80 zeytinyağı içerir (15).

Intralipid® tampon çözeltisinin bupivakaine bağlanma kapasitesi Medialipid®'den 2,5 kat daha yüksektir. Lipofundin® MCT / LCT'de, Intralipid®'den daha fazla plazmadan bupivakain çeker. Intralipid® (%1), bupivakain ile indüklenen kardiyak sodyum kanallarının bloke edilmesini azaltırken, Lipofundin® MCT / LCT (%1) önemli ölçüde değiştirmez. Amerikan Rejyonel Anestezi ve Ağrı Tıbbı Derneği (ASRA); Intralipid®'in; bupivakain toksisitesinin lipid emülsiyon aracılı resüsitasyonunda orta zincirli ve uzun zincirli yağ asitlerinin karışımı olan lipid solüsyonlarından daha iyi sonuç verdiğini belirtmektedir (13,15).

2.2.4.2. Lokal Anestezik Sistemik Toksisitesinde Önerilen Lipit Solüsyon Tedavisi

Lokal anestezik sistemik toksisitede lipid solüsyon tedavisi, Amerikan Rejyonel Anestezi ve Ağrı (ASRA) ve Büyük Britanya ve İrlanda Anestezistleri Derneği tarafından şu şekilde önerilmektedir:

1) Intralipid® %20 oranında 1 dakika içinde bolus uygulaması (1.5 ml/kg), ardından Intralipid® %20'nin infüzyonu (yağsız vücut kütlesine bağlı olarak 0.25 ml/kg/dak, 17 ml/dk, yaklaşık 1000 ml/saat), hemodinamik stabilite sağlandıktan sonra en az 10 dk infüzyon.
2) Eğer hemodinamik stabilite sağlanamazsa, Intralipid® %20'nin en fazla iki tekrarlanan bolusu (1.5 ml/kg) ve daha sonra artan dozda (0.5 ml/kg/dk 2000 ml/saat) sürekli Intralipid® %20 infüzyonu.
3) Intralipid® %20 önerilen maksimum dozu 10 ml/kg'dır (13,15).

Akılda kalması amacıyla kolay hesaplanması için şu örnek verilebilir: 70 kg olan bir hastada intravenöz bolus uygulaması 1 dakikada 100 ml Intralipid® %20, devamında 1000 ml/saat Intralipid® %20 sürekli infüzyon. Lokal anestezik toksisitesine bağlı kardiyak arrest nedeniyle lipid solüsyon infüzyonu sırasında

kardiyopulmoner resüsitasyon ve oksijenasyon devam edilmelidir. Hasta lipit emülsiyonuna ve vazopressör tedavisine cevap vermiyorsa, kardiyopulmoner bypass düşünülmelidir (13,15).

2.2.4.3. Lipit Solüsyonlarının Yan Etkileri

Çoğu durumda, lokal anestezik toksisitesini tedavi etmek için lipit emülsiyonu kullanıldığında, önerilen maksimum seviyenin altında ise yan etkiler ekarte edilmiş olur. Son zamanlarda lipit emülsiyonunun yan etkilerini tanımlayan raporlar olmuştur; ancak bunların çoğu, lokal anestezikler dışındaki ilaçların neden olduğu toksisite için verilen tedaviden sonra ortaya çıkmıştır (14).

IVLE kullanırken; anemi, şiddetli karaciğer hastalığı, koagülopatiler, pulmoner hastalık ve yağ embolisi riski olan hastalarda dikkatli olunmalıdır. Genellikle IVLE kullanımından kaynaklanan en yaygın yan etkiler, IVLE ile birlikte infüze edilen diğer solüsyonlara bağlı olarak uygulama alanının kontaminasyonu ve damarların irritasyonu ile ilişkilidir. IVLE'nin erken veya ani yan etkileri arasında hiperlipidemi, alerjik reaksiyonlar, baş ağrısı, uyuşukluk, baş dönmesi, terleme, dispne, bulantı- kusma, hipertermi ve hiperkoagülopati yer alır (16). IVLE'nin gecikmiş yan etkileri arasında trombositopeni, sarılık, aşırı yüklenme sendromu, artmış karaciğer fonksiyon testleri, lökopeni, hepatomegali, splenomegali ve nadiren de pankreatit sayılabilir (16). Doz veya hız ile ilişkili olabilecek yan etkiler arasında pulmoner emboli veya yağ embolisi bulunur. Ayrıca pulmoner vazokonstriksiyon da IVLE'nin bolus uygulamasından kaynaklanabilir (16). Ayrıca parenteral beslenme için kullanılan lipit emülsiyon tedavisinin yan etkileri arasında ek olarak enfeksiyon, azalmış bağışıklık yanıtı, girişim ve parenteral beslenme ile ilişkili karaciğer hastalığı sayılabilir. Lipid solüsyon infüzyonu sonucu oluşan yan etkiler, lokal anestezik toksik dozları tarafından tetiklenen kardiyovasküler depresyon ve kardiyak arrest gibi ölümcül komplikasyonlara kıyasla, kısa süreli, hafif ve geçicidir (15).

Kısaca LAST yönetimi ve tedavisi özetlenecek olursa, toksisite şüphesi varlığında derhal yapılacak işlemler şunlardır:

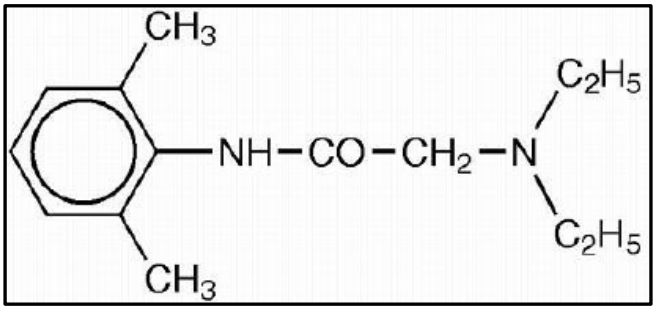
1) Lokal anestezinin uygulanmasının durdurulmalı,
2) Yardım çağırılmalı,
3) Tansiyon, EKG, nabız oksimetresi takibi yapılmalı,
4) Güvenli damar yolu olmalı,
5) Hava yolu güvene alınmalı ve %100 oksijen uygulanmalı; gerekirse trakeal entübasyonu yapılıp mekanik ventilatör desteği sağlanmalı (hipoksi ve asidoz lokal anestezik toksisitesini arttırır),
6) Konvülsiyonlar tedavi edilmeli (Nöbetler benzodiazepin (midazolam, 1 ila 5 mg) ile tedavi edilmelidir. Nöbetler benzodiazepin ile kontrol edilmezse, asidoz ve hipoksi riskini azaltmak için küçük bir süksinilkolin dozu verilmelidir. Nöbet sırasında görülen asidoz ve hipoksi; artmış laktat üretimine, oksijen tüketimine ve yetersiz solumaya bağlıdır (15),
7) Eğer zaman ve olanak varsa lokal anesteziklerin kan konsantrasyonunun ölçümü yapılmalı,
8) Ciddi hipotansiyon ve aritmi gelişmesi halinde lipit solüsyonu uygulanmalı, standart prosedürlere göre resusitasyon başlanmalı, yanıt alınamaması durumunda ekstrakorproyal dolaşım düşünülmelidir. Lokal anestezi toksik dozlarının neden olduğu kardiyak arrest tedavisinde epinefrin küçük dozda (10 ila 100 μg) tercih edilmelidir. Vazopressörler önerilmemekle birlikte ventriküler aritmi varlığında, amiodarondan başka ajan uygulanmamalıdır (13).

Kardiyovasküler sistemle ilgili yan etki görülen LAST olayından sonra hastalar yakın hemodinamik monitörizasyon altında en az 6 saat boyunca izlenmelidir. İzole ve hızlı şekilde gerilemiş SSS yan etki oluşan hastalarda ise en az 2 saat izlem altında tutulmalıdır (9,12,13).

2.3. Prilokain

Stabil ve suda eriyen hidroklorür tuzu olarak piyasada bulunan prilokainin kimyasal formülüα-N-propylamine- 2 methylpropionanide'dir (Şekil 2.4). Kimyasal olarak mepivakain ve lidokaine benzer ve moklekül ağırlığı 220 g/mol'dür. Amid yapısında, propiyonik asid ve amonyum içeren bir bileşik olan ksilenin reaksiyonu sonucu oluşan bir anilindir. Lidokainden ayrımı da bu ksilen molekülünün yerini toluen içermesiyle ayrılır. Plazmada özellikle α1- asid-glikoprotein olmak üzere %40-55 oranında proteinlere bağlanma özelliği vardır. Plazma yarı ömrü 1,6 saat olan prilokainin lipit partisyon katsayısı 0,4, pKa'sı 7,9'dur. Prilokain kandan hızla dağılır ve dağılım hacmi 190-260 litre arasında seyreder (2). Ayrıca tersiyer bir amin olan lidokainin aksine, toksisite açısından avantajlara sahip olan sekonder bir amindir (17).

Prilokain, amid grubunda yer alır. Orta etkili, ısı, asit ve alkalilerden etkilenmeyen stabil bir ajandır. İnfiltrasyon anestezisinde, ekstremite ve kaudal bloklarında, epidural ve spinal anestezide, topikal anestezide kullanılır. RİVA için de %0,5'lik konsantrasyonda kullanımı mevcuttur (2). Prilokainin Amerika Birleşik Devletleri'nde intratekal uygulaması hiçbir zaman onaylanmamasına rağmen, 1978'e kadar İngiltere'de ve 1998'e kadar Fransa'da spinal anestezi için standart bir ilaç olarak kullanıldı. Elverişli anestezi profiline rağmen bu ajanlar piyasadan geri çekilmiştir (17).



Şekil 2.4. Prilokain'in kimyasal yapısı (7)

2.3.1. Prilokain Farmakokinetiği

Prilokain, orta etkili, ısı, asit ve alkalilerden etkilenmeyen stabil bir ilaçtır. Prilokain uygulanmasından sonra en yüksek plazma konsantrasyonuna ulaşma ve etki süresi; doza, uygulama yoluna, uygulama bölgesinin damarsal açıdan zenginliğine, vazokonstriktör madde eklenip eklenmemesine, sinirin anatomik

yapısına ve sinirin yerleşim yerine bağlı olarak değişim gösterir. Ayrıca uygulanan ilaca ve bölgeye göre sinir gövdesinde önce ince lifler sonra kalın lifler etkilenir. 200-600 mg dozları arasında prilokain uygulaması sonrası plazma konsantrasyonları, uygulama bölgesine göre interkostal > lomber > epidural > brakial pleksus > subkutanöz enjeksiyonu şeklinde sıralanmaktadır (2).

Akciğerler, tüm amid yapılı lokal anesteziklerin uygulandıktan sonra ilk karşılaştıkları organdır. Prilokainin de büyük bir kısmı akciğerlerde sekstre olması sebebiyle diğer organların büyük miktarlarda lokal anestezik ajana maruz kalması engellenmiş olur. Akciğerlerin tuttuğu lokal anestezik miktarı ajana göre değişim göstermektedir. Prilokain akciğerlerde lidokaine kıyasla daha fazla miktarda sekestrasyona uğrar. Daha sonra sisteme karışan prilokain karaciğerde mikrozomal P-450 enzimleri tarafından N-dealkilizasyon ve hidroksilasyona uğrayarak metabolize olur. Prilokainin hidroksilasyonu sonucu önce O-Toluidin ve N-Propyl-L-Alanin'e dönüşür. Hemoglobinin methemoglobine oksidasyonundan da bu metabolitlerden O-Toludin sorumlu tutulmaktadır. O-Toluidin hidroksilasyonu ile de 2- Amino-5-Hydroksitoluen ve 2-Amino–3-Hydroksitoluen oluşmaktadır. Son olarak bu metabolitler esas olarak idrarla atılmaktadır. Çok az bir kısmı feçesle ve renal klirensten bağımsız olarak böbreklerden değişmeden atılır. Karaciğer fonksiyonları bozuk veya karaciğer kan akımının azaldığı durumlarda prilokain metabolizması azalır ve bunun sonucunda sistemik toksisite riski artmaktadır (2,6).

2.3.2. Prilokainin Organ Sistemlerine Etkisi ve Toksisitesi

A) Solunum Sistemi

Prilokain toksisitesine bağlı apne gelişebilmektedir. Bunun sebebi, frenik ve interkostal sinirlerin paralizisi veya medüller solunum merkezlerinin direkt maruziyeti (postretrobulber apne sendromu) olarak belirtilebilir. Postretrobulber apne sendromu, prilokainin optik sinir kılıfı içine direkt enjeksiyonu sonucu meydana gelen; huzursuzluk ve şuur kaybına sebep olan bir durumdur. Apne 20 dakika içinde gelişir ve bir saat içerisinde semptomlar geriler. Apne sırasında hipoksi, bradikardi ve kardiyak arresti önlemek için hava yolu kontrolü, mekanik ventilatör gibi destekleyici tedavi uygulanması oldukça önemlidir (6).

B) Santral Sinir Sistemi

Santral sinir sistemi; lokal anestezik toksisitesine duyarlı olmakla birlikte, uyanık hastada toksik belirtilerin ilk görüldüğü yerdir. Prilokainin toksisite bulguları da, lokal anesteziklerin genel toksisite bulgularıyla aynıdır. Genel bulgular; ağız çevresinde ve dilde parestezi, baş dönmesi, kulak çınlaması, bulanık görme ve ajitasyondur. İlaç konsantrasyonu artmaya devam ettikçe kas seğirmeleri, bilinç bulanıklığı, konvülziyon ve solunum arresti, devamında kardiyak arrest meydana gelebilir. Konvülziyonlar SSS'deki inhibitör yolakların selektif blokajısonucu ortaya çıkmaktadır (6).

C) Geçici Nörolojik Semptomlar

Ayrı bir kategori olarak incelemek gerekirse, prilokaine bağlı gelişen geçici nörolojik semptomlar genellikle 1 hafta içinde düzelmektedir. Postoperatif dönemde veya ilk 24 saat içinde, başarılı bir spinal bloktan sonra bile görülebilen bu semptomlar gluteal bölgeden köken alan semptomlardan oluşur. Uzun yıllar boyunca bu semptomlardan lidokain suçlanmıştır. Ancak daha sonraki yıllarda mepivakain, prokain gibi başka lokal anesteziklerin de geçici nörolojik semptomlara sebep olması nedeniyle, daha çok spinal anestezi yönteminin buna etken olduğu bildirilmiştir. Buna rağmen geçici nörolojik semptom gelişme insidansı prilokainde, diğer ajanlara göre daha düşüktür (17).

D) Kardiyovasküler Sistem

Prilokainin toksik dozunda; direkt kalp kası Na+ kanallarının blokajı ve otonom sinir sistemi inhibisyonu meydana gelir. Bunun sonucunda miyokardiyal otomatisite baskılanır, refraktör periyod azalır. Daha yüksek konsantrasyonlarda miyokardiyal kontraktilite ve iletim hızı baskılanır. Son evre olarak da bradikardi, ventriküler disritmi ve kardiyak kollaps olarak sonuçlanır. Majör kardiyak toksisite gelişmesi için konvülziyon oluşturacak dozun yaklaşık üç katı fazla konsantrasyonda doz gerektirmektedir. Normal dozlarda prilokainin miyokard kontraktilitesi ve arteriyel kan basıncı üzerinde etkisi genellikle görülmez (6).

E) İmmünolojik Sistem

Alerjik reaksiyonlar nadir olsa da kutanöz cilt lezyonlar, ürtiker, ödem gibi genel alerji bulguları görülebilirken, çok nadir olsa da anaflaktik şok meydana gelebilir. Genelde diğer lokal anestezik ajanlara duyarlı olan hastalarda ortaya çıkar. Ayrıca nötrofil aktivasyonun inhibisyonu sonucu cerrahiye olan inflamatuar yanıtta azalma gözlenebilir (2,6).

F) Kas İskelet Sistemi

Prilokainin direk kas içine enjeksiyonu miyotoksisite oluşturur. Beraberinde steroid veya adrenalin uygulanması miyonekrozu daha da agresifleştirir (6).

G) İlaç Etkileşimleri

Nondepolarizan kas gevşetici ajanların blokajını potansiyalize ederek bu ajanların etki süresini uzatır. Simetidin, propranolol gibi ilaçlar hepatik klirensi azaltması sebebiyle, prilokain kan düzeylerini arttırarak toksisite riskini arttırırlar. Ayrıca sülfonamidler ve sıtma ilaçları gibi methemoglobinemiye yol açabilecek ilaçlar, prilokainin bu yan etkisini arttırır (6).

H) Methemoglobinemi

Methemoglobin, ferröz (Fe^{++}) hemoglobin demirinin oksidasyon ile ferrik (Fe^{+++}) hale geçmesi sonucu oluşan ve oksijen taşıma kapasitesi olmayan hemoglobin şeklidir. Prilokainin o-toluidin, 4- ve 6-hidroksitoluidine metabolizasyonu sonucu ortaya çıkan metabolitler, hemoglobinin methemoglobine dönüşümünde sorumlu bileşiklerdir. Metabolitleri okside edici bir ajan olmakla birlikte methemoglobin redüktaz enzimini inhibe ederek hemoglobini (Hb^{++}) methemoglobine (Hb^{+++}) dönüştürür. Methemoglobin seviyesi yükselmesi için yüksek doz (900 mg veya > 10 mg/kg) prilokain verilmesi gerekmektedir. Methemoglobinemi seviyesi sağlıklı insanlarda %1'den azdır ve önemsizdir. Ancak; kardiyak veya pulmoner hastalığı olan hastalarda oksijen taşınmasında hafif bir bozukluğun olması halinde hemen tedavi edilmesi gereklidir. Ayrıca infantlarda eritrositteki methemoglobin redüktaz enzimi eksik olmasından dolayı, bu hastalarda da methemoglobinemi oluşması halinde acil

müdahale gerekmektedir. Kandaki methemoglobinemi konsantrasyonu 10-20 g/L olması halinde siyanoz meydana gelir. Tedavide metilen mavisi (%1'lik solusyondan 1-2 mg/kg dozda) veya askorbik asit (C vitamini, 2 mg/kg dozda) önerilmektedir (2).

I) Üriner Retansiyon

Üriner retansiyon spinal anestezi sonrasında sıkça karşı karşıya çıkan bir sorundur. Spinal anestezi sonrası normal mesane fonksiyonunun geriye gelmesinden önce sistometrik kapasitenin aşması olarak tanımlanabilir. Spinal anestezi sonrası hastanın spontan idrarını yapabilme fonksiyonu, motor bloğun çözülmesinden sonra düzelecek son fonksiyon olduğu bilinmektedir. Bunun için duyusal blokajın gerilemesi S3 dermatom seviyesine ulaşması gerekmektedir. Spinal anestezide kullanılan her ajanda bu klinik görülmesine rağmen; prilokain orta etkili lokal anestezik olmasından dolayı, diğer uzun etkili lokal anesteziklere kıyasla daha az sıklıkla görülür (17). Hastanede yatış süresinin uzamasına neden olan bu durumun gelişmesi halinde hemen üriner kateterizasyon yapılmalıdır.

2.4. Nigella Sativa (Çörek Otu)

Nigella Sativa; İngilizcede 'black cumin' ya da 'black seed', Arapçada 'Habba-tusawda' olarak bilinen Ranunculaceae (düğün çiçeğigiller) familyasına ait bir bitkidir (18). Çörek otu da bu bitkinin bir türü olup Güney ve Doğu Avrupa ile Doğu Akdeniz ülkeleri anavatanı olarak bilinmektedir. Türkiye'de de başta Burdur, Isparta, Antalya, Kütahya, Konya yörelerinde olmak üzere birçok şehirde yetişebilmektedir (19). Çörek otu doğrusal mızrak şeklinde yapraklara sahip olup, çiçekleri 5-10 parçadan oluşmaktadır. Genellikle sarı, beyaz, pembe, soluk mavi ve mor renklidir olarak bulunurlar (Resim 2.1). Bitkinin meyveleri, 3-7 adet birleşmiş folikulden oluşur ve her birinde birçok tohum bulunmaktadır. Ülkemizde sadece Nigella Sativa'nın ticareti yapılmakta olup, meyvesi olgunlaştıktan sonra içerisindeki tohumlar havaya maruz bırakılır. Böylece tohum havayla teması sonucunda kararır. Besin olarak bitkinin kapsül içerisinde oluşan tohumu kullanılır. Tohumlar yassı, oblong, angular ve huni biçiminde olup,0.2 cm uzunluğunda ve 0.1 cm genişliğindedir (20,21,22) (Resim 2.1).

Resim 2.1. Nigella Sativa bitkisi ve tohumu

Ülkemizde 12 Nigella türü yetişirken bunlardan Nigella Sativa, Nigella Damascena ve Nigella Arvensis'in tohumları baharat olarak ve Orta Doğu ve Uzak Doğu ülkelerinde geleneksel tıpta; astım, öksürük, bronşit, inflamatuvar hastalıklar, ateş, ağrı, baş dönmesi, böbrek ve karaciğer işlev bozuklukları, sinir sistemi hastalıkları, diyabet, egzema, mide-bağırsak sistemi problemleri, hipertansiyon, kanser dahil çeşitli semptomların ve hastalıkların tedavisinde kullanımı mevcuttur (23).

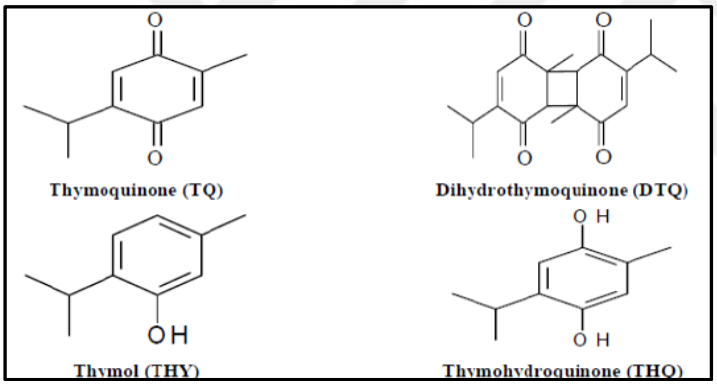
Çörek otu tohumunun besin değeri yüksek olup çeşitli aktif kimyasal bileşenler içermektedir. Çörek otu tohumunun yapısında; başlıca doymuş/doymamış sabit yağlar (%31-35.5), uçucu yağlar (%0.4-0.45), karbonhidratlar (%33-34), proteinler (%16-19.9) ile çeşitli aminoasitler, alkoloidler, tanenler, saponinler, lifler, mineraller (kalsiyum, çinko, fosfat), vitaminler (askorbik asit, tiamin, niasin, pridoksin ve folik asit) bulunmaktadır (24).

Çörek otu tohumunda doymamış yağ asitlerinden (~%85); linolenik (omega-6) asit, oleic asit, linoleic asit, araşidonik asit, palmitoleik asit ve eikozadienoik asit bulunurken, doymuş yağ asitlerden de (~%18); palmitik asit, stearik asit ve miristik asit bulunmaktadır (24) (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. Nigella sativa L. tohumu yağının doymuş ve doymamış yağ asit bileşenleri (24)

Bileşenler	% (a/a)	Bileşenler	% (a/a)
Linoleik asit	44.7-56	**Eikosadienoik asit**	2-2.5
Oleik asit	20.7-24.6	**Palmitik asit**	12-14.3
Linolenik asit	0.6-1.8	**Stearik asit**	2.7-3
Araşidonik asit	2-3	**Miristik asit**	0.16
Palmitoleik asit	3	**Steroller**	0.5

Çörek otu; p-simen, timokinon (TQ), ditimokinon (DTQ), dihidrotimokinon (THQ), β-pinen ve timol (THY) olmak üzere 4 bileşenden oluşmaktadır ve bu bileşikler Nigella Sativa tohumlarının major bileşikleri olarak kabul edilmiştir (Şekil 2.5). TQ, *Nigella sativa*'nın farmakolojik olarak bilinen en aktif içeriğidir (25-28).



Şekil 2.5. Nigella sativa tohumunun aktif bileşenlerinin kimyasal yapısı (29)

2.5. Timokinon (TQ)

TQ, ilk defa 1963 yılında El-Dakhakhny tarafından yapılan bir çalışma ile izole edilmiştir (33). TQ, sadece çörek otunda (*Nigella sativa* L.) değil, *Monarda fistulosa* L. (Yabani bergamot veya arı melisa), *Callitris quadrivalvis* Vent. (syn. *Thuja articulata* Vahl., Sandarak, Sakız ardıç), *Juniperus cedrus Webb* ve *Berth.* (Kanarya adaları ardıcı), *Tetraclinis articulata* (Vahl.) Masters (Sandarak, Sakız ardıç), ve *Nepeta leucophylla* Benth (Nane ailesi türü) bitkilerinin bileşiminde de bulunmaktadır. Ancak bulunma miktarları değişim göstermektedir (34,35).

2.5.1. Timokinonun Fizikokimyasal Özellikleri

Timokinon; koyu sarı renkli kristallere sahip, kimyasal formülü 2-izopropil-5-metil-1,4-benzokinon ($C_{10}H_{12}O_2$) olan ve yapısında zayıf van der Waals bağları içeren bir monoterpen kinondur. Ağırlığı 164,201 g/mol'dür ve çörek otunda ortalama %0.01-0.1 olarak değişim gösterir (25,26,27,30). Timokinon hidrofobik bir molekül olup, ışığa karşı yüksek duyarlılığa sahiptir ve ışığa maruziyeti sonucu degredasyona uğrar. Timokinonun artan pH'larda stabilitesi azalırken asidik pH'da minimum degredasyon görülmektedir (23).

2.5.2. Timokinonun Farmakokinetik Özellikleri

Timokinon hidrofobik bir yapıda olmasından dolayı ilaç formülasyonu oldukça sınırlıdır (31). Timokinonun iv, ip, oral yolları çeşitli çalışmalarda denenmiştir (23). Timokinonun iv uygulama sonrası toplam klerensi 7.19 ml/kg/dk, denge durumunda dağılım hacmi 700.9 ml/kg iken; oral uygulamada toplam klerensi 12.3 ml/kg/dk, tahmini dağılım hacmi ise 5109.46 ml/kg'dır. Yarı ömrü 274 dk civarındadır. İntravenöz 5 mg/kg uygulamada plazma konsantrasyonunda lineer kinetik gösteren timokinon, oral uygulama sonrası yavaş absorbsiyon ve hızlı eliminasyon gösteren bir bileşiktir. Timokinon, yapılan bazı çalışmalara göre oral alınımından sonra karaciğer enzimleri [DT- diaforaz (kinin reduktaz)] ile metabolize olur ve hidrokinona indirgenir. Bu da daha sonra merkaptürik asite dönüştürülerek idrarla atılır (23). Ayrıca timokinon-protein bağlanmasının tahmini yüzdesi, tavşanlarda %99.19, insanlarda %98.99 olduğu bildirilmiştir (32).

2.5.3. Timokinonun Moleküler Etki Mekanizması ve Görevleri

Timokinonun etki mekanizması beraberinde birçok bileşiğin varlığından dolayı net değildir. Timokinon patofizyolojik durumlarda birden fazla faktörü hedef aldığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Başlıca etkileri hücre ve çoğalması, anjiyogenez, apoptoz, migrasyon, invazyon ve metastaz, inflamasyon ve oksidatif stres üzerinedir.

Çörek otunun farklı kısımlarının ekstreleri ve izole edilen fitokimyasal bileşenlerinin; antiülser (36), antioksidan (37-39), antihepatotoksik (40,41),

antienflamatuar, analjezik (42-46) antitümöral, antikanserojenik (20,47-51), antimikrobiyal (52-55), antidiyabetik (56-58), antialerjik (41,59,60), antihiperlipidemik antihiperkolesterolemik (61-64) gibi farklı birçok biyolojik, toksikolojik ve farmakolojik özellikleri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Bu özelliklerinin yanı sıra sindirim (30,65-67), sinir(28,68-70), solunum (71-73) boşaltım (74-76), immün (20,21,77) ve dolaşım sistemine (78,79), ayrıca karaciğer (80-82) ve kemik (83,84) dokusu üzerinde de birçok olumlu etkisi bulunmuştur.

2.6. Timokinonun Farmakolojik Etkileri

2.6.1. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkisi

Ratlar üzerine yapılan çalışmalar sonucu timokinonun doza bağımlı olarak arteryal kan basıncını azalttığı ve kalp atım hızında düşüş sağladığı gösterilmiştir (78). Ayrıca araşidonik asit ile indüklenen trombosit kümeleşmesi ve kanın pıhtılaşmasını timokinonun engellediği, trombozis tedavisinde kullanılan aspirinden 30 kat daha güçlü etki gösterdiği bulunmuştur (85).

Transplantasyonda kullanılan immun baskılayıcı bir ajan olan Siklosporin A'nın etkisi ratlarda incelenmiştir. Bir çalışmada ratlar; klinik kullanımı sınırlanan ve nefrotoksisite, hipertansiyon, hepatotoksisite ve kardiyotoksisite gibi büyük yan etkileri olan Siklosporin A'ya maruz bırakılmıştır. Bunun sonucunda kalp ve böbrek dokusunda timokinonun; SOD, katalaz ve GSH-Px'ın aktivitelerini arttırdığı ve MDA, nitrik oksit ve protein karbonil seviyelerini azalttığı görülmüştür. Böylece timokinonun siklosporin A'nın neden olduğu doku hasarını azaltabildiği gösterilmiştir (86).

Birçok kanser kemoterapisi ve immunsupresif protokollerde yaygın şekilde kullanılan ve farklı tiplerdeki tümörlere karşı antineoplastik aktiviteye sahip olan Siklofosfamid kardiyotoksik bir ajandır. Siklofosfamid kaynaklı kardiyotoksisiteye karşı TQ'nun etkileri incelendiğinde; TQ'nun siklofosfamid kaynaklı kardiyotoksisiteyi azalttığı, kısmen de olsa mitokondriyal fonksiyon ile enerji üretiminde iyileşme yaptığı, antioksidan enzimlerin aktivitesini koruduğu saptanmıştır (4).

Doksorubisin, yumuşak doku sarkoması, mesane, meme, akciğer, mide, tiroit kanserleri olmak üzere birçok kanser tedavisinde kullanılan, geniş spektrumlu antrasiklin grubu kemoterapötik bir ilaçtır. Ancak başta kardiyomiyopati, kalp krizi ve kardiyotoksisite olmak üzere çok ciddi yan etkileri olmasından dolayı kullanımı oldukça sınırlıdır. Doksorubisin toksisitesi oluşturulan modellerde yapılan bir çalışmada timokinonun; potent süperoksit radikal süpürücüsü olduğu, lipit peroksidasyonunu engellediği ve doksorubisin kardiyotoksisitesi oluşmasında koruyucu etkinliği olduğu gösterilmiştir (79).

2.6.2. Sinir Sistemi Üzerindeki Etkisi

Timokinonun rat hipokampüsünde geçici önbeyin iskemi/reperfüzyon nöronal hasarına karşı nöroprotektif olduğu gösterilmiştir (70). Ayrıca sıçanlarda kronik toluen maruziyetine bağlı hipokampus nörodejenerasyonunun TQ etkisi ile morfolojik düzelme sağlandığı ve tedavide katkıda sağladığı bildirilmiştir (68).

Parkinsonlu hastalardan elde edilen hücre kültürlerinde birincil dopaminerjik nöronlarda timokinonun koruyucu olduğu ve dopaminerjik immunoreaktif hücreleri koruduğu görülmüştür (87).

Deneysel epilepsi modelleriyle yapılan çalışmalarda timokinonun antikonvulsan etki gösterdiği bulunmuştur. Pentilenetetrazol (PTZ) ve Maksimal Elektroşok ile indüklenmiş nöbet modelinde, TQ'nun nöbet başlangıcını uzattığını ve miyoklonik nöbetleri azalttığı belirtilmektedir (28). Ayrıca timokinonun GABAerjik ve nitrierjik modulasyon aracılığıyla anksiyolitik aktivite gösterdiği; stresli rat modellerinde plazma nitritte azalma ve beyin GABA içeriğinin azalmasının tersine çevirerek anksiyolitik etkide bulunduğu gösterilmiştir (88).

Streptozosin ile oluşturulan diyabetik sıçan modellerinde timokinonun oksidatif stresi ve noropatiyi engellediği gösterilmiştir. Ayrıca serotonin seviyelerini arttırmasına, norepinefrin ve dopamin seviyelerini ise azalmasına sebep olmuştur (89).

Beta-amiloid (Aβ) peptidlerin Alzheimer hastalığının patogenezinde büyük rol oynamaktadır. Timokinonun da Aβ ile indüklenen toksisiteyi ve sinaptik fonksiyonların bozulmasını engellediği, ayrıca ROS üretimini baskıladığı bildirilmiştir (90).

2.6.3. Antioksidan Etkisi

Serbest radikaller ortaklanmamış elektronlara sahip olması nedeniyle kararsız bir yapıya sahip olan, biyolojik yapılarda özellikle kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok hastalığın patofizyolojisi ile ilişkisi gösterilen bileşiklerdir (91). Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar olarak adlandırılan enzimlerin etkinlik göstermeleri ile vücutta denge halindedir. Hastalıklardan veya yaşa bağlı faktörlerden dolayı dengenin bozulması sonucu denetlenemeyen oksidanlar, hücresel değişiklikler ve kritik hastalıklara sebebiyet vermektedir (92).

Glutatyon hücresel koruyucu mekanizmalarda önemli işlevlere sahip olan ve karaciğerde yüksek düzeylerde bulunan bir moleküldür. Glutatyonun tükenmesi ve takibinde oksidatif stres artması; toplam tiyol bileşenin azalmasına, protein inaktivasyonuna, protein oksidasyonuna, lipid peroksidasyonuna, kalsiyum hemostazında bozulmasına ve hücre canlılığının kaybına sebep olmaktadır. Timokinon tedavisinin; malondialdehiti azalttığı, toplam tiyol bileşen ve glutatyon seviyesini arttırdığı ve sonuç olarak oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir. Timokinon ile serbest radikallerin azaltılmasının, bu radikallerin DNA'ya zarar verme riskini ve böylece bazı kanserlerin riskini azaltabileceği düşünülmektedir. Timokinonun, birçok ksenobiyotik biyotransformasyonunda rol alan hepatik CYP1A1/A2 izozimlerinin aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (93).

Timokinonun, katalaz aktivitesini arttırdığı ve bu yolla iskemi-reperfuzyon yaralanmasına karşı karaciğer dokusunu koruyabileceği düşünülmektedir (38). Ayrıca, timokinonun CYP3A1 ve spermidin/spermin N-1-asetil-transferaz (SSAT) gen ekspresyonunu azalttığı, böylelikle antioksidan mekanizma aracılı böbreğin iskemi/reperfüzyon hasarını engellediği bildirilmiştir. İskemi reperfüzyon hasarı, böbrek ve karaciğer dokusunda katabolik bir enzim olan SSAT'ın mRNA ekspresyonun indüksiyonuna sebep olmaktadır. Timokinonun, karaciğer ve böbrekte SSAT mRNA ekspresyonunu belirgin derecede engellediği bildirilmiştir (94).

Timokinonun farklı mekanizmalar ile antioksidan özellik gösterdiği, süperoksit radikal anyonu (O_2^-) ve hidroksil (OH^-) radikallerini içeren birçok reaktif oksijen türlerinin yakalayıcısı olduğu ileri sürülmüştür. Sentetik

tertbutilhidroquinon (TBHQ) ve TQ'nun güçlü prooksidan ve antioksidan oldukları, (konsantrasyona bağımlı olarak) demire bağlı mikrozomal lipit peroksidasyonunu inhibe ettikleri ve TQ'nun süperoksit radikal süpürücüsü olarak TBHQ'dan daha güçlü olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (33). Ayrıca TQ'nun polimorfonükleer lökositleri uyarması sonucu süperoksit radikallerinin (O_2^-) hasarlayıcı etkilerine karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (79).

Timokinon, oksidatif streste rolü olan indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunu engelleyebildiği ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve superoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonunu arttırabildiği, ayrıca NADH düzeyini ve $NADH^-$-NAD^+ değişimini azaltarak hepatositlerde lipojenez inhibisyonuna neden olduğu belirtilmiştir (37).

Timokinon oksidatif hasara karşı hücre, doku ve organ üzerinde birden fazla koruyucu özellikler içerir. Etanolün indüklediği akut gastrik ülserasyonlarda TQ tedavisinin malondialdehit (MDA) düzeyini azaltarak GSH düzeyini arttırdığı gösterilmiştir (30). Timokinonun sisplatin, doksorubisin, gentamisin, vankomisin ve cıva klorürün neden olduğu böbrek toksisitesine; karbon tetraklorür, siklofosfamid, asetaminofen ve aflotoksin B1 ile indüklenen hepatotoksisiteye; ve siklofosfomid ve doksorubisinin kalp toksisitesine karşı koruyucu etkinliği birçok çalışmada gösterilmiştir. Ayrıca siklofosfamid, toluen ve bleomisin kaynaklı akciğer hasarını azaltılmasında, benzopiren kaynaklı mide tümörlerinin engellenmesinde ve gentamisin ototoksisitesinin önlenmesinde koruyucu rol oynar (23).

Timokinonun antioksidan özelliklerini özetle şu şekilde sıralanabilir;

- Demir ilişkili lipid peroksidasyonunu engellemesi,
- Toplam tiyol bileşeni ve GSH seviyesini arttırması,
- Radikal süpürücü olması,
- Karaciğer CYP1A1/A2 izozimlerinin aktivitesini engellemesi,
- iNOS ekspresyonunu engellemesi,
- Kinon redüktaz, katalaz, SOD ve glutatyon transferaz aktivitelerini arttırması,
- Hepatositlerde lipojenezi engellemesi

2.6.4. Antitümöral ve Antikanserojenik Etkisi

Kanser; ölüm sebepleri arasında miyokard infarktüsünden sonra ikinci sırada gelmektedir. Tanım olarak hücrelerin sürekli ve kontrolsüz olarak çoğalması olarak belirtilebilir. Kanser oluşum mekanizmasında en çok hücrelerin çoğalmasından, farklılaşmasından ve hücre döngüsünü kontrol eden genlerde meydana gelen değişikliklerden söz edilmektedir (95).

Timokinon; antioksidan ve antiinflamatuvar etkisi ile oksidatif stresi azaltarak antioksidan enzimlerin ekspresyonunu ve aktivitesini arttırır. Ayrıca kanserin gelişmesinde önemli bir basamak olan apopitozu indükleyerek hücreleri kanserden koruma özelliği gösterir (96,97). ROS ile indüklenen oksidatif DNA hasarını engelleyen timokinon kanser riskinin azaltmada rol alabilir (96).

İn vitro ve in vivo ortamda osteosarkoma üzerine yapılan bir çalışmada TQ'nun antitümör ve anti-anjiyojenik etkisi incelenerek timokinonun insanlarda osteosarkoma hücrelerinde büyümeyi inhibe ettiği ve apopitoza neden olduğu bulunmuştur. Altında yatan mekanizmanın da NF-κB ve efektör moleküllerinin inhibisyonu olduğu belirtilmiştir (98) (Tablo 2.5).

Yapılan birçok çalışmalar sonucunda TQ'nun; kan kanseri (99), akciğer ve over adenokarsinomu (100), hepatik kanser (81), kolon kanseri (47), pankreatik kanser (101), prostat kanseri (50), fibrosarkoma tümörleri (102), insan osteosarkomu (51) gibi pek çok kanser türünde hücrelerin proliferasyonu üzerine inhibitör etki göstererek antitümoral etkinlik gösterdiği bulunmuştur.

Timokinonun antitümoral aktivitesinde birçok karmaşık mekanizmalar ileri sürülmektedir (Tablo 2.4):

Tablo 2.4. Nigella Sativa'nın antikanser aktivitesinde ileri sürülen mekanizmalar (104).

Mekanizmalar	Etki
Timidinin inhibisyonuyla DNA sentezinde hatalar ve DNA sentezi sırasında birleşme	Kanserli hücre büyümesinin inhibisyonu
E2F-1 proteini ve androjen reseptörlerinin down-regülasyonu	Kanser hücre apopitozu
Bc12 ve diğer anti-apoptotik genlerin down-regülasyon ekspresyonu	Kanser hücre ölümü
Apopitotik gen ifadesinin up-regülasyonu (kaspaz-3,8,9 ve Bax)	Kanser hücre apopitozu ve ölümü
AKT ve ekstraselüler sinyal düzenleyen kinazın aktivasyonunun önlenmesi	Kanser hücre ölümü
Çeşitli kanserojen maddeler ile indüklenen NF-Kappa B'nin aktivasyonunun önlenmesi	Onkogen ekspresyonu ve kanser kontrolü
SOD, CAT, GPx gibi antioksidan enzim aktivitelerinin artması	Artmış antioksidan enzim aktivitesi ile kansere karşı hücreleri koruması
Tümör anjiogenez ve hücre invazyonun inhibisyonu	Metastaz inhibisyonu
Alfa-hederin kanserli hücrelerde ROS üretimini artırır	Mitokondriyal fonksiyonların bozulması ve apoptoza neden olur
C-Jun NH(2)-terminal kinaz ve p38 mitojen aktivite protein kinaz yolağının aktivasyonu	Kanser hücrelerinin apoptozu

Tablo 2.5. Timokinonun çeşitli kanser hücrelerinde farklı moleküler hedefleri düzenlemesi (103).

Timokinonun hedef moleküler yolağı	Kanser hücre tipleri	Timokinon tarafından düzenlenen moleküler hedefler
p53 – bağlı	HCT116 kolorektal kanser hücreleri	p53 ve p21 up-regüle edilir, Bcl-2 inhibe edilir
p53 – bağlı	p53-null HCT116 kolorektal kanser hücreleri	Nukleustaki Chek-1 apopitozun direncine neden olur
p53 – bağlı	p53 null MG63 ve p53-mutant MNNG/HOS osteosarkom hücreleri	p53-mutant, p53-null osteosarkom hücrelerden daha yüksek dirence sahiptir
p53 – bağımsız	p53-null HL-60 myeloblastik lösemili hücreleri	Kaspaz 8,9 ve 3 aktive edilir
PTEN	MCF-7/DOX göğüs kanser hücreleri	PTEN up-regüle ve p-Akt inhibe edilir
p73	Akut lenfoblastik lösemi Jurkat hücreleri	P73 up-regüle ve UHRF1 down-regüle edilir
STAT3	U266 multiple miyelom hücreleri	STAT3 ve STAT-regule gen ürünleri inhibe edilir
NF-Kb	KBM-5 insan miyeloid hücreleri	NF- κB regüle gen ürünleri inhibe edilir
DNA hasarı	M059J ve M059K gliyoblastom hücreleri	Telomeraz inhibe edilir ve telomer hasarına neden olur
Mucin-4	FG/COL0357 pankreatik kanser hücreleri	Mucin-4 downregüle edilir ve JNK ve p38 aktive edilir
ROS	Akut lenfoblastik lösemi Jurkat hücreleri	Mitokondri membran potansiyel kaybına neden olur
	DLD-1 insan kolon kanser hücreleri	JNK ve ERK fosforilasyonu artırır

2.6.5. Antiinflamatuar, Antihistaminik ve İmmün Sistem Üzerine Etkisi

İnflamasyonun düzenlenmesinde, siklooksijenaz (COX) ve lipooksijenaz enzimleri rol alır. COX yolunda prostaglandinlerin sentezi gerçekleşirken, lipooksijenaz yoluyla da lökotrienler sentezlenmektedir. Timokinon, hem COX hem de lipooksijenaz yollarının inhibasyonunu sağlar ve inflamasyona neden olan eikosanoid üretimini güçlü bir şekilde engeller (23,93). Ayrıca TQ'nun, makrofajlardan salınan NO üretimini baskılayarak inflamasyonlu ve otoimmün hastalıkların tedavisinde yararlı etkileri olabileceği bildirilmiştir (77).

Alerjik akciğer inflamasyonlu fare modelinde, timokinonun akciğerdeki inflamatuvar hücre infiltrasyonunu, Th2 sitokinleri ve akciğer eozinofilisini azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca serumdaki yükselmiş IgG1 ve ovalbumin spesifik IgE seviyelerini azaltarak alerjik astımda pulmoner inflamasyonun azalmasını sağladığı gösterilmiştir. Bronkoalveoler lavaj sıvısında IFN-γ üretimini indüklediği ve IL-4, IL-5 ve IL-13 üretimini sınırladığı bulunmuştur. LTC4 ve LTB4 üretimini ve 5-lipooksijenaz ekspresyonunu azaltarak hava yolundaki inflamasyonun düzelmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (72,73).

Timokinonun kobaydan izole edilen trakeal ve ileum düz kaslarında histamin ve serotoninin etkinliğini tamamen ortadan kaldırarak ve histamin ve serotonin reseptörlerini nonselektif blokasyonunu sağlayarak antialerjik etki gösterdiği bulunmuştur (60). Ayrıca timokinon uygulanmasının IgE, histamin ve sitokinlerin seviyesini azalttığı, alerjik konjonktivitteki göz semptomlarının önemli derecede gerilemesinde katkısı olduğu gösterilmiştir (105).

2.6.6. Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkisi

Birçok çalışma, timokinonun mide-bağırsak sistemi üzerine koruyucu etkinliğini göstermiştir. İskemi/reperfüzyon oluşturulan rat modellerinde, gastrik mukoza redoks durumunun korunması ile ilişkili olarak NS yağı ve TQ'nun gastrik lezyonlara karşı gastroprotektif etkiye sahip olduğu bulunmuştur (65). %3 asetik asidin intrakolonik enjeksiyonu ile kolit oluşturulan rat modellerinde yapılan çalışma sonucu timokinonun antioksidan özellik göstermesinden dolayı biyokimyasal ve histopatolojik açıdan olumlu değişiklikler gözlendiği bildirilmiştir (67).

Diklofenak ile indüklenen akut gastrik hasarın değerlendirildiği bir çalışmada, TQ'un hasarı engellenebildiği ve gastroprotektif etki gösterdiği belirtilmiştir (110). Ayrıca NS'nin glutatyon ve müsin seviyesinde anlamlı derecede artış yapması, bunun sonucunda mide mukoza histamin içeriğinde azalma yaparak antiülserojenik özellik gösterilmiştir (36).

2.6.7. Üriner Sistem Üzerine Etkisi

İnsanlarda birçok kanserin tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçlar nefrotoksisite, hepatotoksisite ve nörotoksisite gibi yan etkilere sebep olabilmektedir. Sisplatin nefrotoksisitesinde timokinonun etkinliği araştırılan bir çalışmada timokinonun, serum üre ve kreatin düzeylerinde belirgin azalmayla birlikte kreatin klirensi, böbrek ağırlığı ve poliüride belirgin iyileşme sağladığı gösterilmiştir (74). Böbrek taşları üzerine etkisi araştırılan bir çalışmada timokinonun, serum kalsiyum düzeyini anlamlı olarak arttırdığı, idrar oksalat düzeyini düşürdüğü böylece kalsiyum oksalat birikintilerini azalttığı gösterilmiştir (76).

Timokinonun gentamisin ile oluşturulan nefrotoksisite modelinde; artmış kreatin, kan üre nitrojeni (BUN), tiobarbiturik asit reaktif maddeleri (TBARS) ve nitrat/nitrit düzeylerinde belirgin düşme sağladığı, ayrıca böbrek dokusunda azalmış olan glutatyon, glutatyon peroksidaz, katalaz ve ATP düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir (75). Vankomisin ile oluşturulan böbrek hasarına karşı timokinonun; serum kan üre nitrojen, kreatinin ve MDA seviyelerini düşürdüğü ve böbrek dokusunda SOD ve GSH-Px aktivitelerini yükselttiği, sonuç olarak nefrotoksisitenin korunmasında önemli rol oynadığı bildirilmiştir (106). Ayrıca timokinonun, sıçanlarla asetaminofenin neden olduğu nefrotoksitede koruyucu etkinliği gösterilmiştir (109).

2.6.8. Hepatoprotektif Etkisi

Timokinonun karaciğer üzerindeki koruyucu etkisi yapılan birçok çalışmalarda gösterilmiştir. Genelde bu etkiyi antioksidan ve antiinflamatuar etkileri ile gösterdiği düşünülmektedir.

CCL4 ve desferrioksamin ile hepatotoksisite oluşturulan modelle yapılan bir çalışmada, timokinonun karaciğer enzim ve hepatik MDA düzeylerini azalttığı gösterilmiştir (80). Etanolle oluşturulan hepatotoksisiteye (82) karşı koruyucu etkinlik gösteren timokinonun aynı zamanda karaciğerde bulunan detoksifiye edici enzimler olan kinon redüktaz ve glutatyon transferazın aktivitelerini arttırdığı rapor edilmiştir (81).

Kadmiyum hepatotoksisitesi üzerinde önleyici etkisi (107) gösterilen timokinonun; sıçanlarla asetaminofenin neden olduğu hepatotoksisite modelinde karaciğer toksisitesine karşı tedavide yeri olduğu ve bunu antioksidan sistemi upregüle ederek yaptığı saptanmıştır (108).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Yürütücülüğünü Doç. Dr. İlker ÖNGÜÇ AYCAN'ın yaptığı bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TTU-2017-2551). Ayrıca, Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 06.02.2017 tarih ve 15 sayılı kararı ile onaylanmıştır (Ek-1).

3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Çalışma Prosedürleri

Tüm hayvan deneyleri, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde Kurumsal Hayvan Bakım ve Kullanım Kurulu tarafından belirlenen standartlara uygun olarak yapıldı. 350–450 g ağırlığındaki 40 adet erkek Wistar rat, paslanmaz çelik kafeslere yerleştirildi ve yiyecek, su ve ilaçları verildi. Hayvanlar her zaman 12 saatlik aydınlık karanlık döngülerde ve 23±1°C sabit sıcaklıkta tutuldu. Sıçanların vücut ağırlıkları çalışma öncesi ve 4. gün olan deney öncesinde tartılarak kaydedildi.

Sıçanlar çalışmanın başlangıcında her grupta 10 hayvan olmak üzere rastgele dört gruba ayrılmıştır:

1) Sham Grubu (S, n=10)

2) Prilokain Grubu (P, n=10)

3) Timokinon Grubu (T, n=10)

4) Prilokain + Timokinon Grubu (TP, n=10)

Çalışmada sıçanlara genel anestezi için ketamin (0,15 mg/kg) ve %2'lik xylazin hidroklorid (0,02 mg/kg) karışımı intraperitoneal yolla uygulandı. Tüm sıçanlara genel anestezi sağlandıktan sonra, EEG monitörizasyonu için EEG elektrotları yerleştirildi ve ardından trakeostomi açıldı. 6 CH aspirasyon sondası trakeaya yerleştirilerek mekanik ventilatöre bağlandı. Mekanik ventilatör ayarları 10 mg/kg (%50 O_2/hava), 50-55 solunum/dk olacak şekilde ayarlandı.

Prilokain infüzyonunun uygulanması için 24 G branül ile sol femoral ven kateterizasyonu yapıldı. Ratlara prilokain infüzyonu belirlenen doz ayarlanarak Braun Compact Perfüzör® cihazı ile uygulandı. İnvazif kan basıncı ölçümü ve kan gazı ölçülerinin yapılabilmesi için 24 G branül ile sağ femoral arter kateterizasyonu yapıldı. İnvazif kan basıncı monitörizasyonu; Art Line® Tek Kanallı Basınç Transducer Seti ile NIHON KOHDEN® BSM 5105 monitör bağlantısı yapılarak gerçekleştirildi. Son olarak ratlar, EKG monitörizasyonu ve EEG monitörizasyonu bağlantıları sağlanarak çalışmaya hazır hale getirildi (Resim 3.1). Çalışma süresi boyunca dakikalık nabız ve sistolik, diyastolik ve orta arter kan basınçları kayıtları alındı.

Resim 3.1. Sıçanların hemodinamik monitörizasyonlarının yapılmış hali

3.2. Laboratuvar Koşulları

Çalışma Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı laboratuvarlarında EKG ve EEG monitörizasyonlarının çeşitli dış ses veya artefaktlardan etkilenmemesi amacıyla ses yalıtım uygulanmış özel bir odada gerçekleştirildi (Resim 3.2).

Resim 3.2. Biyofizik laboratuvarı

3.3. Deneyde Kullanılan İlaçların Uygulanma Prosedürleri

Timokinon (TQ): Thymoquinon'nun suda çözünürlüğü 0.67 mg/ml olarak rapor edilmiştir (31). TQ, literatürde rapor edildiği şekilde, 0.5 mg/ml olarak serum fizyolojik içerisinde çözeltisi oluşturuldu. Timokinon verilen gruplarda 3 gün 3x5 mg/kg/gün intragastrik gavaj ile, 4. gün (deneysel işlemlerin yapıldığı gün) 15 mg/kg tek doz intraperitoneal uygulandı (108).

Prilokain: Gerekli monitörizasyon işlemleri sağlandıktan sonra prilokain verilecek olan gruplara Priloc® %2 enjeksiyon solüsyonu, daha önce yayınlanan çalışmalarda belirtildiği şekilde femoral ven kateterinden 8 mg/kg/dk dozunda iv olarak başlandı. 20 dakika süre sonunda kardiyak arrest gelişmemesi durumunda doz 12 mg/kg/dk'ya çıkıldı (114).

3.4. Çalışmada Kullanılan Araç Gereçler

A) Elektrofizyolojik Kayıtlar İçin Gerekli Malzemeler

1. 240 adet paslanmaz çelik vida elektrot (Cat No: E363/20/1.6/SP, Plastics One INC. USA)
2. 10 adet vida-konektör bağlantısı (MS363 Cap, Plastics One INC. USA)

B) Biyokimyasal Analizler için Gerekli Malzemeler

1. CK (sıçan serumu) 2 kutu (toplam 48 ölçüm)
2. CKMB (sıçan serumu) 2 kutu (toplam 48 ölçüm)
3. 0.5 ml fuji film biyokimya tüpü (100 adet)
4. DRI-CHEM NX500 cihazı için pipet ucu. 1 kutu (100 adet)
5. ABL80 FLEX CO-OX blood gazı ölçüm cihazı için standart kit (50 ölçüm).
6. 1 adet STA-347 OxiSelect™ In Vitro ROS/RNS Assay Kit (Green Fluorescence) 96 assay CAYMAN
7. 1 adet STA-360 OxiSelect™ Total Antioxidant Capacity Assay Kit 96 assay CAYMAN
8. Rat serumuna spesifik myoglobin ELİSA kiti (Life Diagnostics, Inc., Catalog Number: MYO-2)

C) İmmünohistokimya için Gerekli Malzeme

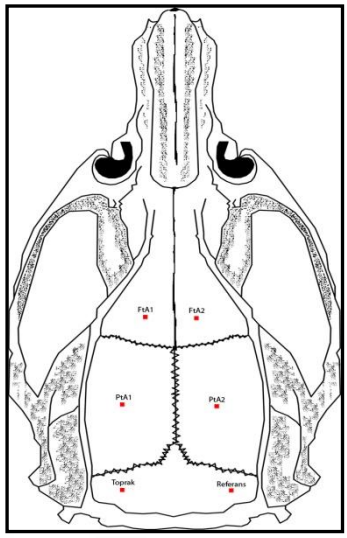
1. Etanol
2. Etanol (%96'lık)
3. Ksilol
4. Parafin
5. Lamel (24X50 mm)
6. Mikrotom bıçağı
7. Entellan
8. Lam-superfrost
9. Sitrik asit
10. Potasyum dihidrojen fosfat

11. Di sodyum hidrojen fosfat
12. Metanol
13. 12.Hidrojen peroksit
14. Pap pen
15. NaCl
16. Preparat saklama kabı
17. HRP-Anti-Polyvalent Lab Pack
18. Mayer’s hematoksilen
19. Anti-aquaporin 4 Antibody
20. Anti-Caspase 9 Antibody
21. p50 antikoru
22. ANTİ- p65 (NFκB)
23. Biotinylated Anti-Rabbit Antibody
24. 1000’lik mavi tip
25. 200’lük sarı tip
26. 10’luk beyaz tip
27. DAB tablet

3.5. Elektrofizyolojik Kayıtların Alınması

3.5.1. EEG Elektrotların İmplantasyonu

Genel anestezi altında stereotaksik cihaza yerleştirilen sıçanların başı, cihazın kulak çubuklarıyla sabitlendi. Sabitleme işleminin arından Şekil 3.1’de gösterilen lokasyonlara kayıt elektrotları implante edildi. Kayıt elektrotları bilateral olarak frontal (AP: 4.5 mm, ML: +2 ve -2 mm) ve parietal (AP: -4.5 mm, ML: +3.5 ve -3.5 mm) korteks bölgelerine, referans elektrot serebellum (AP:-12.72 mm, ML: 2.5 mm) ve toprak elektrot ise (AP: -12.72 mm, ML: -2.5 mm) koordinatlar üzerine yerleştirildi (111,112) (Resim 3.3).



Şekil 3.1. Stereotaksik atlasa göre belirlenen temsili elektrot lokasyonları

Resim 3.3. EEG elektrotların implantasyonu

3.5.2. EEG ve EKG Monitörizasyonu

Kalp hızı ölçümleri ve elektrokardiyografik kayıtların yapılması için ventral torasik bölge dikkatlice tıraş edildikten sonra sağ ve sol ön ekstremitelere subkutan olarak iğne elektrotlar II. derivasyondan kayıt alacak şekilde yerleştirildi (Resim 3.3). EEG ve EKG monitörizasyonu için Hallowell EMC Microvent cihazı kullanıldı.

Sıçanların kayıt öncesinde, ortam koşullarına adapte olmaları sağlandı. Adaptasyon sürecinin ardından, belirtilen koordinatlara yerleştirilen paslanmaz çelikten yapılmış vida elektrotlar (E363/20/1.6/SP, Plastics One INC. USA) ile EEG kayıtları ve subkutan olarak yerleştirilmiş iğne elektrotları ile de EKG

kayıtları; Brainamp EEG/EP yükselteci kullanılarak deney gruplarında gerçekleştirilecek uygulamalara uygun olacak şekilde alındı (Brainamp EEG/EP Amplifier, Brain Products, Munich, Germany). Tüm elektrotların empedansları 5 kOhm'dan az olacak şekilde ayarlandı. BrainVision Recorder (Brain Products, Munich, Germany) cihazı kullanılarak EEG ve EKG verileri 0.01-250 Hz 48 dB/oktav band ile filtre edildikten sonra 40 dk boyunca 500 nokta/s örnekleme hızı ile sayısallaştırılarak bilgisayara kaydedildi. Ayrıca deneysel işlemler sırasında, hem EEG hem de EKG aktivitesinde meydana gelen değişimler eş zamanlı olarak monitörize edildi (Resim 3.4).

Resim 3.4. EKG ve EEG'nin eş zamanlı monitörizasyonu

3.6. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

1) Serumda CK-MB ve myoglobin tayini

Serum biyokimya parametreleri Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında bulunan DRI-CHEM NX500 cihazında standart kitler kullanılarak yapıldı. Myoglobin rat serumuna spesifik ELİSA kiti ile bakıldı. Serum örnekleri sıçanların sakrifikasyonu sonrasında alındı.

2) Tam kanda methemoglobin, pH, pO2,pCO2 düzeyleri

Çalışmada kan gazı ölçümü, Adli Tıp Toksikoloji laboratuvarında bulunan ABL80 FLEX CO-OX kan gazı ölçüm cihazında standart kitler kullanılarak ölçüldü. Ölçümler ilk kateterizasyondan alınan kanda,15. dk'da ve sıçanlar ex olduktan sonra arteryal kandan yapıldı.

3) Kalp ve beyin dokusunda biyokimyasal analizler

Total Antioksidan Kapasitenin (TAK) Tayini

Sıçanların sakrifikasyonu sonrasında alınan doku örnekleri sıvı nitrojen içerisinde dondurulduu.

1 g doku 5 ml fosfat buffered salin (PBS) içerisinde homojenize edildi. Homojenatlar 10,000 x g'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Süpernatantlar ölçüm yapılana kadar -80°C'de saklandı. Dokularda total antioksidan kapasite, OxiSelect™ Total Antioxidant Capacity Assay kit kullanılarak değerlendirildi. Bu metod Fenton reaksiyonu ile oluşan potent bir radikal olan hidroksil radikalinin renksiz bir substrat olan o-dianisidine ile reaksiyona girerek parlak sarı-kahve renkli dianisil radikali oluşturması esasına dayanmaktadır. Bu metoda göre supernatantlara hidroksil radikalinin ilave edilmesi oksidatif reaksiyonları başlatır ve bu reaksiyon antioksidanlar tarafından baskılanır, renk değişimi önlenir. Bu süreçte dokudaki TAK'ın efektif ölçümü sağlanır.

Total Serbest Radikal Aktivite Tayini

Sıçanların sakrifikasyonu sonrasında alınan doku örnekleri sıvı nitrojen içerisinde dondurulduu. 10-50 mg doku, 1 ml PBS içerisinde homojenize edildi. Homojenatlar 10,000 x g'de 5 dk 4°C'de santrifüj edildi. Süpernatantlar ölçüm yapılana kadar -80°C'de saklandı. Total serbest radikal aktivite tayini, OxiSelect™ In Vitro ROS/RNS Assay Kit kullanılarak ölçüldü. Bu metodta, örnekte bulunan oksidanlar oksidatif reaksiyonu hızlandırmaya yardımcı olan bir katalizatör aracılığı ile diklorodihidrofloresein (DCFH) probunu okside etmektedir. Okside olan probun floresansı 480 nm eksitasyon ve 530 nm emisyonda plak okuyucuda ölçüldü. Örnekler hidrojen peroksit ve 7'-diklorodihidrofloresein standardına karşı florometrik olarak ölçüldü. Örnekte

mevcut olan oksidan moleküllerin serbest radikal içeriği, önceden belirlenmiş DCF veya hidrojen peroksit standart eğrisiyle karşılaştırma yoluyla belirlendi.

3.7. İmmünohistokimyasal İncelemelerin Yapılması

Çalışmada sıçanlar sakrifiye edildikten sonra beyin dokusunun tek bir hemisferi immunohistokimyasal analizler için alındı ve sagital olarak parafine gömülen dokularda ödem biomarkerı akuaporin P4 (AQP4), apoptozis biomarkerı caspase-9, inflamasyon biomarkerı NF-κB, p50 ve p65 proteinlerinin ekspresyonları değerlendirildi. İmmünohistokimyasal reaksiyonlar image-J analizleriyle konfirme edilerek gruplar arasında anlamlılık olup olmadığı değerlendirildi.

Beyin kesitleri %10'luk formalin fiksatifinde fikse edildi, fiksasyon sonrası dokular yarım gün akarsuda yıkandı, takiben yükselen alkol serilerinde birer gün bekletildi. Ksilol ile şeffaflaştırmadan sonra parafin içerisine gömüldü. Mikrotomda parafin bloklardan Poly-L lizinle kaplı lamlar üzerine 5µm kalınlığında kesitler alındı ve bu kesitler immünohistokimyasal boyamalar için 45°C'deki etüvde bir gece, ertesi sabah 60°C'deki etüvde 1 saat bekletildi. Parafini slaytların üzerinden uzaklaştırmak için 20'şer dakika 2 kez ksilolden ve takiben de %100'lük, %90'lık, %80'lik ve %70'lik alkollerden 5'er dakika sürelerle geçirildikten sonra 5 dakika suda, 5 dakika da PBS'te (Fosfat Buffer Saline, ph: 7.2-7.4) bekletildi. Ardından kesitler, 900 ml distile suda 2.1 gr sitrik asitin çözülmesi ile hazırlanan ve pH'sı NaOH ile 6.0'a ayarlanan sitrik asit çözeltisinde, dokudaki antijenik maskelenmeyi ortadan kaldırmak amacıyla, 10 dakika mikrodalga fırının "med-high" ayarında kaynatılarak oda ısısında 20 dakika soğutuldu. Bu işlem 2 kez tekrarlandıktan sonra slaytlar PBS içerisine alındı. 3 defa yıkamanın ardından slaytlar, dokudaki endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için %3'lük hidrojen peroksit içerisinde 15 dakika inkübe edildi. Tekrar PBS ile 3 defa yıkandıktan sonra hidrofobik kalem ile kesitlerin çevresi çizilerek tüm slaytlar 3 kez 5'er dakika PBS'den geçirildi. Ortaya çıkabilecek non-spesifik reaksiyonların bloklanması için Ultra V blok ile kesitler 7 dakika muamele edilip; herhangi bir yıkama basamağı yapılmadan kesitler, pozitif gruplara önerilen oranda dilüe edilmiş primer antikorlar ve negatif

gruplara ise aynı oranda IgG içeren immungloblulinler damlatılarak +4°C'deki buzdolabında gece boyu inkübe edildi. Primer antikoru test etmek için kullanılan IgG negatif kontrolümüz olup; boyanmaları test etmemizi sağlamıştır. Ertesi sabah 3 kez 5'er dakika PBS'de yıkanan kesitler sekonder antikorda oda ısısında 1 saat inkübe edildikten sonra, 3 kez 5'er dakika PBS'de yıkandı. HRP-konjuge Streptavidin damlatılarak 40 dakika oda ısısında bekletilip; takip eden yıkama sonrasında önerilen şekilde hazırlanan DAB enzim solüsyonunda 3 dakika inkübe edilerek gelişen reaksiyon mikroskop altında değerlendirildi.

Dokulardan seri kesitler alınarak total beyinde; ortaya çıkacak ödemi belirleyebilmek için *AQP4,* inflamasyon belirteci olarak *p50 ve p65* tayinleri yapıldı.

3.7.1. Image-J Analizi

İmmünohistokimyasal reaksiyonları değerlendirmek, her antikorun ekspresyon derecesini bir diğeri ile kıyaslamak ve kantitatif bir değer belirlemek için; tüm boyanma reaksiyonları dokulara göre Image-J (Image Processing and analysis in Java-NIH) analizleri yapılarak değerlendirildi. Serebellumda purkinje hücreleri, kortekste motor nöron hücreleri, koroid pleksusta ependimal hücreler ve talamik nükleus hücreleri ayrıntılı incelendi. Analizde ekspresyon gösteren alanların total alana oranı ile reaksiyon yüzdeleri hesaplandı.

3.8. İstatistiksel Analiz

Sıçanların vücut ağırlıklarının değerlendirilmesi için Paired-Sample T Testi yapıldı. Hemodinamik parametrelerin istatistiksel açıdan değerlendirilmesi için Unpaired T-testi kullanılırken; tüm biyokimyasal parametrelerin istatistiksel analizleri için Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks yöntemi kullanıldı. Ayrıca immünohistokimyasal incelemeler; Graph Pad Prism (Version 6.0c) programı yardımıyla istatiksel olarak değerlendirildi. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık için One-way Anova testi kullanıldı. Tüm istatistiksel analizlerde 0.05'ten düşük bir p değeri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Sıçanların Vücut Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Çalışma öncesi ve 4. gün olan deney öncesinde ölçülen vücut ağırlıkları istatistiksel açıdan incelendi. Çalışma öncesinde ölçülen vücut ağırlıkları değerlendirildiğinde, vücut ağırlıklarının normal dağılım gösterdiği ve gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığı belirlendi. Ayrıca çalışmamızda, çalışma öncesi ile deney öncesi vücut ağırlıkları karşılaştırıldı. Timokinon + Prilokain grubunda her iki ağırlıklar arasında anlamlı derecede artma gözlenirken ($p<0,035$), diğer gruplarda vücut ağırlıklarında anlamlı bir değişiklik gözlenmedi.

Tablo 4.1. Çalışma öncesi ve deney öncesinde gruplardaki ratların ağırlık ortalamaları

Gruplar	Çalışma Öncesi Ağırlık Ortalamaları (gr)	Deney Öncesi Ağırlık Ortalamaları (gr)
Sham	334,75±18,66	-
Prilokain	314,40±19,33	290,60±33,87
Timokinon + Prilokain	288,44±25,93	295,22±27,06 *
Timokinon	324,87±28,48	326,62±32,58

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

*, Timokinon + Prilokain grubunda çalışma öncesi ortalama ağırlığa göre anlamlı derecede farklıdır ($p<0,035$, İstatistik analizde Paired-Sample T Testi kullanıldı).

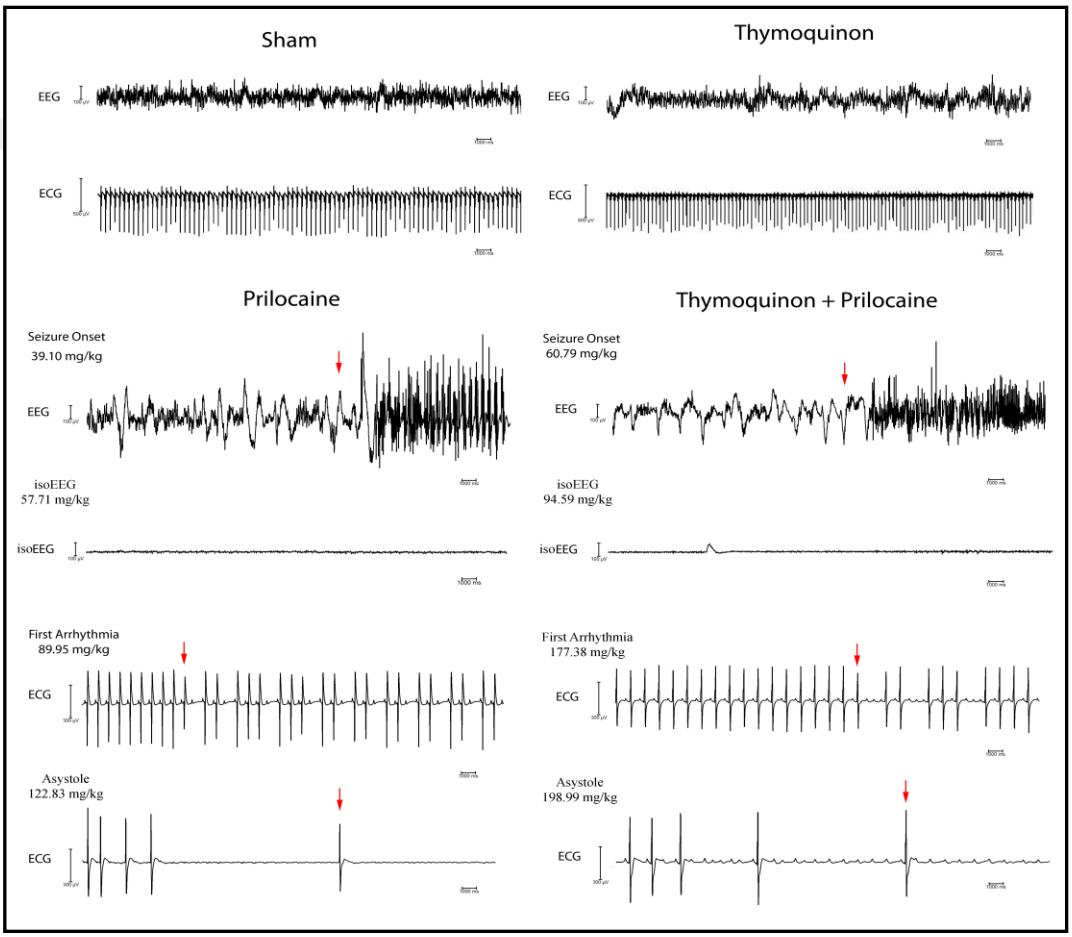
4.2. Elektrofizyolojik Kayıtlar

Çalışmada 4 grup ve her grupta 10 rat olmak üzere toplam 40 rat kullanıldı. Çalışmada elektrofizyolojik kayıtlar göz önünde tutularak ilk nöbet, izoelektrik EEG, ilk aritmi ve asistol görülme zamanları ve prilokain dozları gruplar arasında karşılaştırıldı.

Prilokain grubunda ilk nöbet ortalama 39.10 mg/kg dozunda görülürken; Timokinon + Prilokain grubunda ilk nöbet ortalama 60.79 mg/kg dozunda görüldü. İzoelektrik EEG görülme dozu Prilokain grubunda ortalama 57.71 mg/kg

iken; Timokinon + Prilokain grubunda ortalama 94.59 mg/kg olarak bulundu (Şekil 4.1, Tablo 4.2).

Prilokain grubunda ilk aritmi gözlenen doz miktarı ortalama 89,95 mg/kg iken; Timokinon + Prilokain grubunda ilk aritmi ortalama 177.38 mg/kg dozunda görüldü. Prilokain grubunda asistoli ortalama 122.83 mg/kg dozundan görülürken; Timokinon + Prilokain grubunda ortalama 198.99 mg/kg dozunda asistoli görüldü (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Tüm gruplarda yapılan frontoparietal EEG ve EKG kayıtlarının monitörizasyonu. Sham ve Timokinon grubunda normal EEG ve EKG kayıtları görülmekteyken, Prilokain ve Timokinon + Prilokain grubunda okla gösterilen zamanlar prilokain toksisitesine bağlı gelişen 4 farklı noktayı göstermektedir (Epileptik aktivite başlangıcı, izoelektrik EEG oluşumu, ilk aritmi, asistol).

Tablo 4.2. Prilokain ve Timokion + Prilokain gruplarında prilokain toksisite bulgularının görüldüğü ortalama prilokain dozları

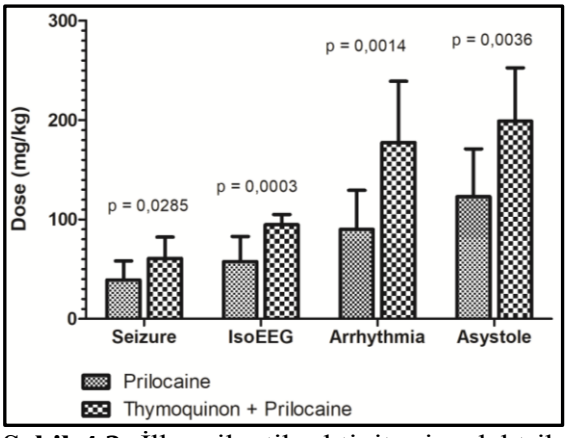
Gruplar	Nöbet Aktivitesi (mg/kg)	İzoelektrik EEG (mg/kg)	İlk Aritmi (mg/kg)	Asistol (mg/kg)
Prilokain	39,10±19,19	57,71±25,05	89,95±39,35	122,83±48,00
Timokinon + Prilokain	60,79±21,46 [a]	94,59±10,43 [b]	177,38±61,60 [c]	198,99±53,47 [d]

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.
[a], Prilokain grubunda ilk nöbet görülmesi için gereken prilokain dozuna göre anlamlı derecede farklıdır (p=0,0285, İstatistik analizde Unpaired T-testi kullanıldı).
[b], Prilokain grubunda izoelektrik EEG oluşması için gereken prilokain dozuna göre anlamlı derecede farklıdır (p=0,0003, İstatistik analizde Unpaired T-testi kullanıldı).
[c], Prilokain grubunda ilk aritmi oluşması için gereken prilokain dozuna göre anlamlı derecede farklıdır (p=0,0014, İstatistik analizde Unpaired T-testi kullanıldı).
[d], Prilokain grubunda asistol oluşması için gereken prilokain dozuna göre anlamlı derecede farklıdır (p= 0,0036, İstatistik analizde Unpaired T-testi kullanıldı).

Sham ve Timokinon gruplarında yapılan elektrofizyolojik kayıtlarda, herhangi bir değişiklik (nöbet, aritmi, asistol) gözlenmezken; diğer gruplarda prilokain toksisitesine bağlı olarak anlamlı değişikler gözlendi.

İlk nöbetin görüldüğü doz miktarları karşılaştırıldığında, Timokinon + Prilokain grubunda Prilokain grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu (p=0,0285). Aynı şekilde izoelektrik EEG görülme dozları da Prilokain grubuna kıyasla, Timokinon + Prilokain grubunda anlamlı derecede yüksek bulundu (p=0,0003) (Şekil 4.3).

Prilokain grubu ile Timokinon + Prilokain grupları arasında ilk aritmi ve asistolü görülme dozları karşılaştırıldığında, Timokinon + Prilokain grubunda anlamlı derecede yüksek bulundu (Aritmi: p=0,0014, Asistoli: p= 0,0036) (Şekil 4.2).

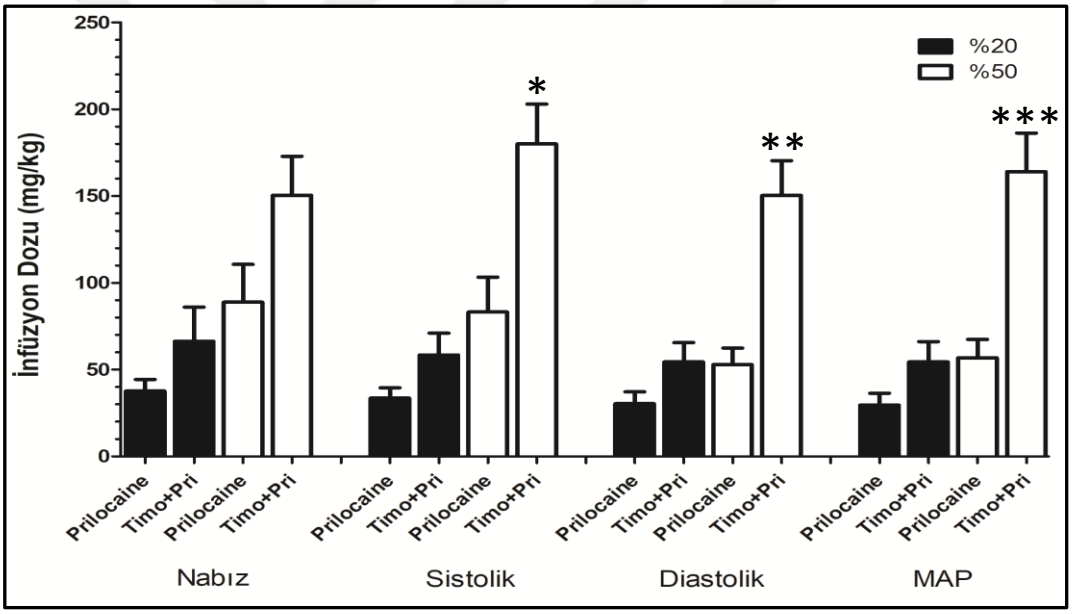


Şekil 4.2. İlk epileptik aktivite, izoelektrik EEG. İlk aritmi ve Asistol durumlarının görüldüğü prilokain ortalama dozlarının (mg/kg), Prilokain ile Prilokain + Timokinon grupları arasında karşılaştırılması (p<0,05 istatistiksel olarak anlamlıdır)

4.3. Hemodinamik Parametreler

Çalışmada ayrıca nabız ve kan basıncı değişiklikleri de kaydedildi. Sham ve Timokinon gruplarında nabız ve kan basıncı değerlerinde herhangi bir değişiklik gözlenmezken, prilokain verilen gruplarda prilokain dozuna bağlı olarak değişiklikler gözlendi.

Prilokain ve Timokinon + Prilokain grupları arasında nabız ve kan basıncının %20 ve %50 değişiklik görüldüğü dozlar karşılaştırıldı. Sistolik, diyastolik ve orta arter basıncındaki (OAB) %50 oranındaki değişiklikler Timokinon + Prilokain grubunda, Prilokain grubuna göre anlamlı derecede yüksek dozlarda gözlendi (SKB: p=0,0052, DKB: p=0,0003, OAB: p= 0,0004). Diğer değişkenlerde anlamlı farklılık gözlenmedi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Prilokain ve Timokinon+Prilokain grupları arasında nabız ve kan basıncı değişikliklerinin karşılaştırılması

* Sistolik kan basıncındaki %50 oranında değişikliklerin karşılaştırılması ($p < 0,005$)
** Diastolik kan basıncındaki %50 oranında değişikliklerin karşılaştırılması ($p < 0,0003$)
*** Orta arter basıncındaki %50 oranında değişikliklerin karşılaştırılması ($p < 0,0004$)

Tablo 4.3. Prilokain ve Timokinon + Prilokain gruplarında hemodinamik değişikliklerin gözlendiği prilokain dozları

%	Gruplar	Nabız (mg/kg)	SKB (mg/kg)	DKB (mg/kg)	OAB (mg/kg)
20	Prilokain	37,60±6,75	33,60±5,93	30,40±6,83	29,60±6,75
	Timokinon + Prilokain	66,40±19,60	58,40±12,57	54,40±11,17	54,40±11,73
50	Prilokain	88,80±21,81	83,20±20,03	52,80±9,55	56,80±10,63
	Timokinon + Prilokain	150,4±22,43	180,0±22,92 *	150,4±19,95 **	164,0±22,26 ***

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. SKB: Sistolik Kan Basıncı, DKB: Diyastolik Kan Basıncı, OAB: Orta Arter Basıncı

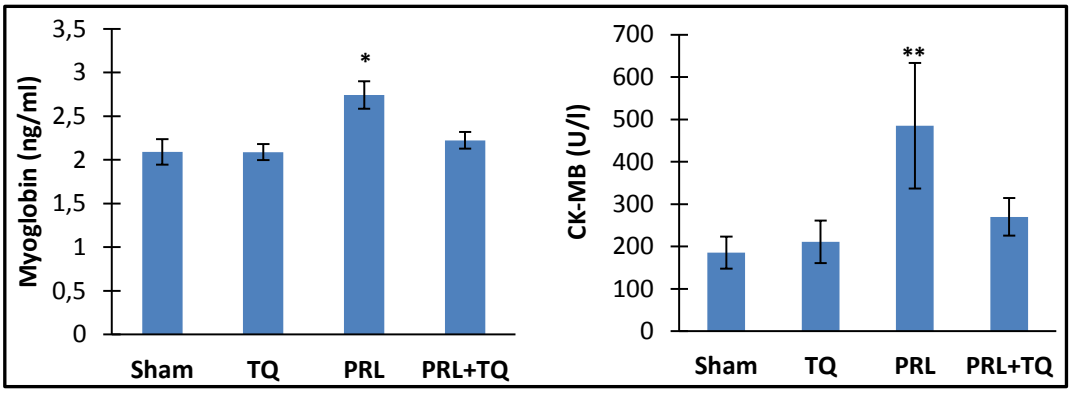
*, Prilokain grubunda sistolik kan basıncındaki %50 değişiklik görülen prilokain dozuna kıyasla anlamlı derecede farklıdır ($p < 0,005$, İstatistik analizde Unpaired T-testi kullanıldı).

**, Prilokain grubunda diyastolik kan basıncındaki %50 değişiklik görülen prilokain dozuna kıyasla anlamlı derecede farklıdır ($p < 0,0003$, İstatistik analizde Unpaired T-testi kullanıldı).

***, Prilokain grubunda orta arter basıncındaki %50 değişiklik görülen prilokain dozuna kıyasla anlamlı derecede farklıdır ($p < 0,0004$, İstatistik analizde Unpaired T-testi kullanıldı).

4.4. Biyokimyasal Parametreler

Çalışmada prilokainin serum Myoglobin ve CK-MB düzeyleri üzerine etkisi karşılaştırıldı. Prilokain grubunda diğer gruplara kıyasla Myoglobin ve CK-MB düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,001$). Ayrıca Timokinon ve Timokinon + Prilokain gruplarında, Sham grubuna göre Myoglobin ve CK-MB düzeylerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Serum Myoglobin ve CK-MB düzeylerinin karşılaştırılması. TQ: Timokinon grubu, PRL: Prilokain grubu, PRL+TQ: Prilokain+Timokinon grubu

* Prilokain grubunda Myoglobin düzeyinin diğer gruplarla karşılaştırılması ($p<0,001$)

** Prilokain grubunda CK-MB düzeyinin diğer gruplarla karşılaştırılması ($p<0,001$)

Tablo 4.4. Serum Myoglobin ve CK-MB'nin ortalama değerleri

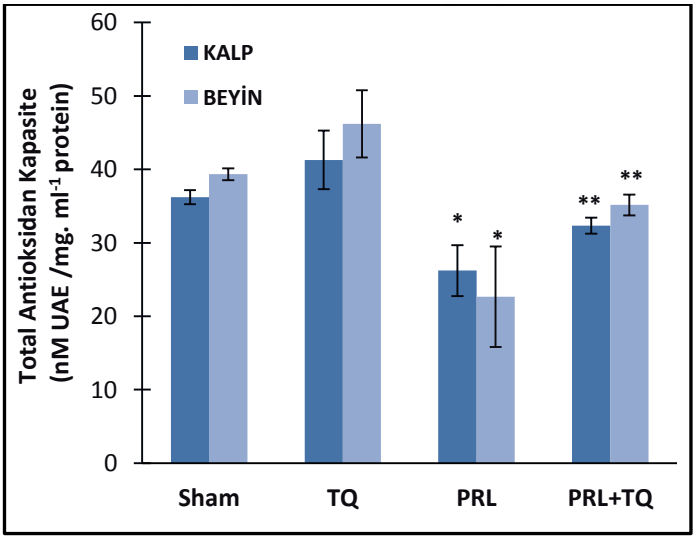
Gruplar	Myoglobin (ng/ml)	CK-MB (U/I)
Sham	2,09±0,15	185,5±38,0
Timokinon	2,09±0,09	211,0±50,5
Prilokain	2,74±0,16 *	484,8±148,2 *
Timokinon + Prilokain	2,22±0,09	270,0±44,3

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

*, Sham, Timokinon, Timokinon+Prilokain gruplarına kıyasla anlamlı derecede farklıdır ($p<0,01$, İstatistik analizde One Way ANOVA testi kullanıldı)

Çalışmada sıçanların sakrifikasyonu sonrasında alınan kalp ve beyin doku örneklerinden yapılan Total Antioksidan Kapasitesi (TAK) ve Serbest Oksijen Radikalleri tayinleri yapıldı.

Gruplar arasında Total Antioksidan Kapasitesi düzeyleri karşılaştırıldığında, Prilokain grubunda diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0,001$). Ayrıca timokinon grubunda, prilokain verilen gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulundu (Şekil 4.5).

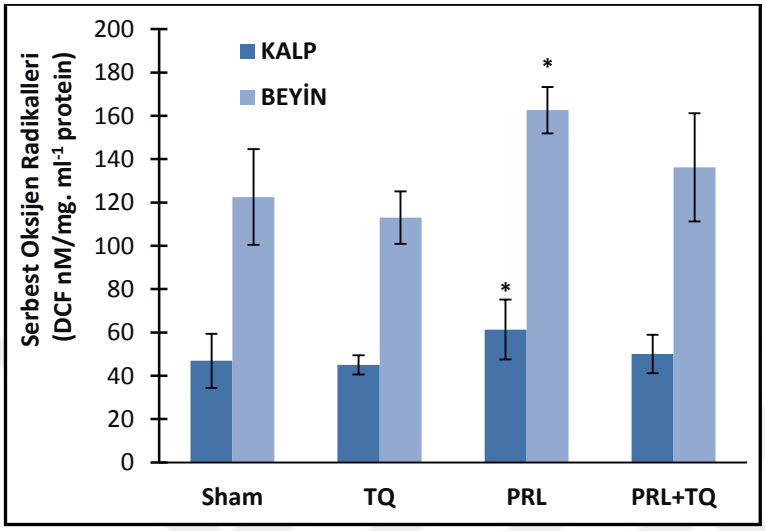


Şekil 4.5. Beyin ve kalp dokusundaki Total Antioksidan Kapasite düzeylerinin karşılaştırılması. TQ: Timokinon grubu, PRL: Prilokain grubu, PRL+TQ: Prilokain+Timokinon grubu

* Prilokain grubundaki TAK seviyesinin diğer gruplara göre anlamlı derecede düşüktür ($p<0,001$).

** PRL+TQ grubundaki TAK düzeyleri, PRL ve TQ grubuna göre anlamlı derecede farklıdır ($p<0,01$)

Gruplar arasında Serbest Oksijen Radikalleri düzeyleri karşılaştırıldığında Prilokain grubunda, diğer gruplarla kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Şekil4.6).



Şekil 4.6. Beyin ve kalp dokusundaki Serbest Oksijen Radikalleri düzeylerinin karşılaştırılması. TQ: Timokinon grubu, PRL: Prilokain grubu, PRL+TQ: Prilokain+Timokinon grubu

* Kalp ve beyin doksunda Prilokain grubunda serbest oksijen radikal düzeyi, diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede yüksektir ($p<0,001$)

Tablo 4.5. Beyin ve kalp dokusundaki Total Antioksidan Kapasitesi ve Serbest Oksijen Radikallerinin ortalama değerleri

Gruplar	Total Antioksidan Kapasitesi (nM UAE/mg.ml-1 protein)		Serbest Oksijen Radikalleri (DCF (nM))	
	Kalp	Beyin	Kalp	Beyin
Sham	36,21±0,95	39,33±0,81	1,01±0,04	1,80±0,06
Timokinon	41,28±3,98	46,20±4,58	1,02±0,03	1,61±0,31
Prilokain	26,22±3,47*	22,66±6,84*	1,18±0,13*	2,11±0,09*
Timokinon + Prilokain	32,34±1,10**	35,15±1,40**	1,08±0,02	1,92±0,02

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

*, Sham, Timokinon ve Timokinon+Prilokain gruplarına göre anlamlı derecede farklıdır ($p<0,001$, İstatistik analizde One Way ANOVA testi kullanıldı).

**, Prilokain ve Timokinon gruplarına göre anlamlı derecede farklıdır ($p<0,01$, İstatistik analizde One Way ANOVA testi kullanıldı).

4.5. Kan Gazı Parametreleri

Yapılan kan gazı analizleri sonucunda hem gruplar içerisinde hem de gruplar arasında bazı farklılıklar izlendi (Tablo 4.6). Prilokain grubunda bazal kan gazındaki ortalama pH değerleri ile 15. dk'daki ve arrest sonrası alınan kan gazındaki ortalama pH değerleri arasında anlamlı derecede farklı bulundu ($p<0,01$). Ayrıca Prilokain grubunda 15. dakikada alınan kan gazındaki ortalama pH değeri ile diğer gruplarda alınan tüm kan gazındaki ortalama pH değerleri arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,01$).

Tablo 4.6. Kan gazı parametreleri sonuçları

Grup		Kan pH	pCO_2	pO_2	FMethHb (%)
SHAM (n=4)	***Başlangıç***	7,37±0,01	46,78±3,96	82,00±7,12	3,88±0,10
	1. Analiz	7,34±0,07	48,68±11.42	95,50±14,11	4,08±0,31
	2. Analiz	7,34±0,04	47,33±5,53	99,75±14,06	4,25±0,24
TQ (n=8)	***Başlangıç***	7,31±0,12	56,18±19,52	77,38±19,83	2,29±0,25
	1. Analiz	7,31±0,08	50,24±9,93	85,13±10,38	2,41±0,19
	2. Analiz	7,35±0,10	43,56±12,35	96,63±22,10	2,49±0,21
PRL (n=12)	***Başlangıç***	7,33±0,13	48,41±19,51	81,33±32,27	2,30±0,79
	1. Analiz	7,06±0,27[a,*]	65,86±33,24	66,27±48,55	2,23±0,77
	2. Analiz	7,09±0,14a	63,13±32,15	51,00±50,08[≠]	2,97±1,07
PRL+TQ (n=9)	***Başlangıç***	7,34±0,09	42,59±11,62	101,78±29,48	2,67±0,82
	1. Analiz	7,22±0,16	51,14±24,52	102,11±43,92	3,14±1,00
	2. Analiz	6,92±0,24[b,**]	77,48±33,82	29,50±11,50[c,≠]	3,60±0,94

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. TQ: Timokinon grubu, PRL: Prilokain grubu, PRL+TQ: Prilokain+Timokinon grubu, pCO_2: Parsiyel karbondioksit basıncı, pO_2: Parsiyel oksijen basıncı, FMetHb: Methemoglobin fraksiyonu

a, Prilokain grubunda bazal pH değeri ile, 2. ve 3. ölçümlerdeki pH değeri arasında anlamlı farklılık vardır ($p<0,01$, İstatistik analizde Paired-T testi kullanıldı).

b, PRL+TQ grubundaki 2. kan gazı ölçümündeki pH değeri ile, bazal ölçümdeki pH değeri anlamlı derecede farklıdır ($p<0,001$, İstatistik analizde Paired-T testi kullanıldı).

c, PRL+TQ grubunda 2. kan gazındaki pO_2 ile, bazal ve 1. kan gazlarındaki pO_2 değerleri anlamlı derecede farklıdır ($p<0,001$, İstatistik analizde Paired-T testi kullanıldı).

*, Prilokain grubunda 1. kan gazındaki ph değeri, diğer tüm kan gazlarındaki pH değerleri ile anlamlı derecede farklıdır ($p<0,01$, İstatistik analizde One Way ANOVA testi kullanıldı).

** PRL+TQ grubunda 2. kan gazındaki ph değeri ile, Sham ve TQ grubunda 2. kan gazındaki pH değerleri arasında anlamlı derecede fark vardır ($p<0,001$, İstatistik analizde One Way ANOVA testi kullanıldı).

PRL+TQ grubunda 2. kan gazındaki pO_2 değeri ile, Sham ve TQ grubunda 2. kan gazındaki pO_2 değerleri arasında anlamlı derecede fark vardır ($p<0,001$, İstatistiksel analizde One Way ANOVA testi kullanıldı).

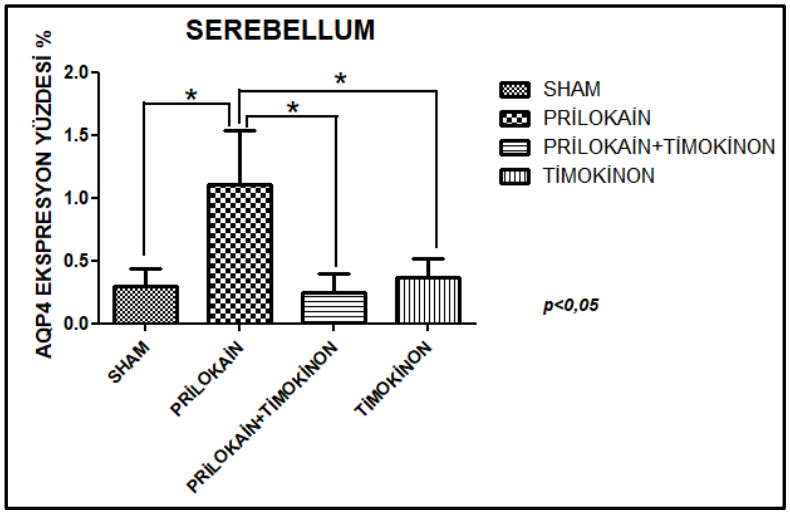
4.6. İmmünohistokimyasal İncelemeler

Çalışmada tüm ekspresyonlar beyin dokusunun 4 farklı alanında değerlendirilmiş ve yorumlanmıştır. Bu alanlar serebellum, talamik nukleus, korteks ve koroid pleksus olarak belirlenmiş ve tüm ekspresyonlar gruplar arasında kıyaslanmıştır.

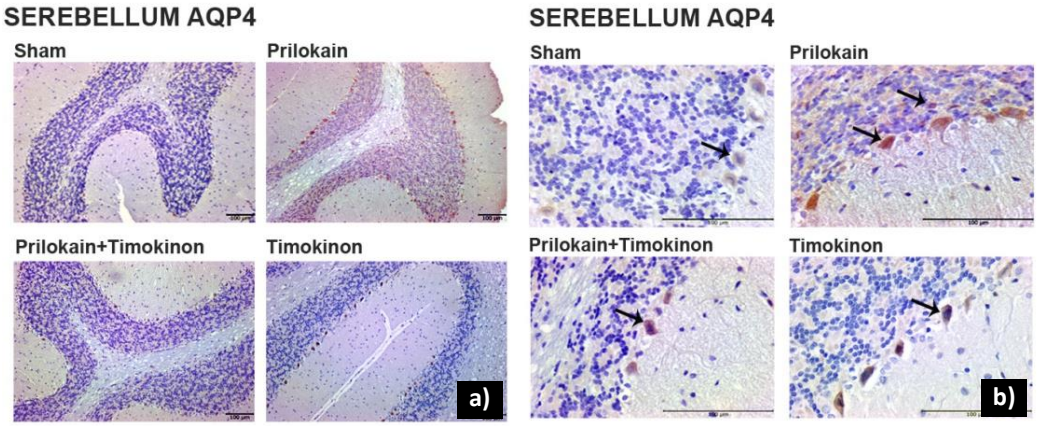
4.6.1. Serebellum

AQP4 immunohistokimyası

AQP4 ekspresyonunun, neokorteks, supraoptik nukleus, serebellumda astrositlerin son ayakçıklarında varlığı literatürde gösterilmiştir (113). Bu bilgiden yola çıkarak çalışmada da serebellumdaki ekspresyon profili gruplara göre değerlendirildi. Buna göre; serebellumdaki AQP4 ekspresyonu; Prilokain grubunda toksisiteyle oluşan ödeme bağlı olarak artmış, Prilokain+Timokinon grubunda ise Timokinonun tedavi edici etkisi ile azalmış görülmektedir. Sham ve sadece Timokinonun verildiği grupların ekspresyon profillerinin de değerlendirilmesiyle bulgular istatistiksel analizlerle anlamlandırılmıştır. Çalışmada her grupta yer alan 5 hayvanın aynı alanlarından elde edilen alanda en az 5 fotoğrafın değerlendirilmesiyle yapılan Image J analizleri sonrasında elde edilen boyanma şiddetleri grafik haline getirilmiş ve gruplar arasındaki farklar anlamlılık açısından yorumlanmıştır (Şekil 4.7). Elde edilen boyanma paternlerine göre gruplar aşağıdaki farklar, 10x (Şekil 4.8-a) ve 40x (Şekil 4.8-b) objektif büyütmesi kullanılarak panele yansıtılmıştır.



Şekil 4.7. Gruplar arasındaki ekspresyon farklarının Image J analizi ile değerlendirilmesi sonucunda elde edilen grafik. Sham ve Prilokain grupları arasında, Prilokain ve Prilokain+Timokinon grupları arasında, Prilokain ve Timokinon grupları arasında anlamlı farklar elde edilmiştir (*p <0,05).

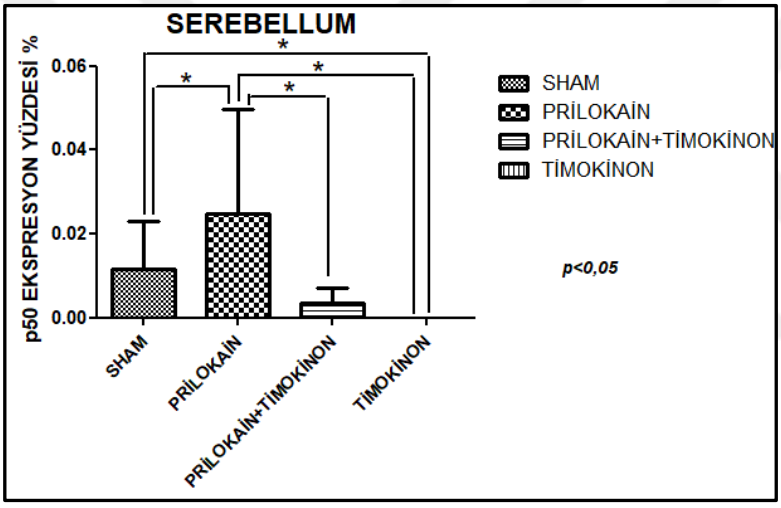


Şekil 4.8. a) AQP4 immunohistokimyasıyla gruplar arasında ödeme bağlı olarak ortaya çıkan AQP4 ekspresyonu görülmektedir. Sham grubunda görülen AQP4 ekspresyonunun, Prilokain grubunda artışı ve Prilokain+Timokinon grubunda da azalışı dikkati çekmektedir. **b)** Oklar Purkinje hücrelerinin sitoplazmalarındaki ekspresyonu işaret etmektedir. Skala bar 100µm'dir.

Elde edilen sonuçlar, Timokinonun, deneysel olarak epilepsi oluşturulan ratlarda ödemi azaltıcı bir etkisinin olduğunu düşündürmektedir. Ekspresyonun astrositik ayakçıklardan çok Purkinje hücrelerinde görülmesi serebellumun ciddi oranda etkilendiğinin bir göstergesi olabilir.

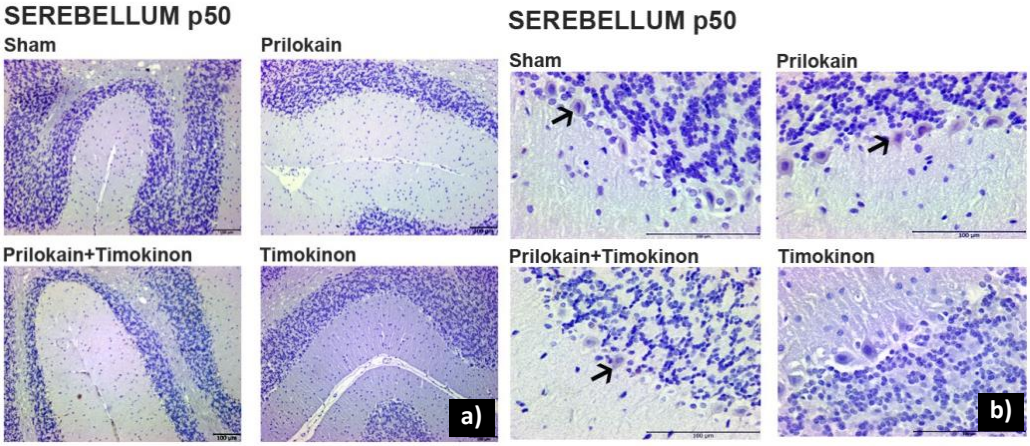
p50 İmmunohistokimyası

Çalışmada AQP4'ün serebellumda gösterdiği ekspresyon paterni dikkate alınarak aynı bölgelerde ödeme bağlı oluşabilecek nöroinflamasyon p50 ve p65 antikorları kullanılarak değerlendirildi. Tüm gruplarda p50 ekspresyonunun düşük oluşu dikkati çekmekteydi. Ancak bu az ekspresyon paterni de değerlendirilmiş ve sham grubuna ait kesitlerde düşük olan ekspresyonunun; Prilokain grubunda arttığı görülmüştür. Bu durum epilepside ortaya çıkabilecek ödeme bağlı inflamasyonu akla getirmektedir. Ayrıca Prilokain+Timokinon grubunda p50 ekspresyon şiddetinin azaldığı, sadece Timokinon uygulanan grupta da p50 ekspresyonunun neredeyse hiç olmadığı görülmektedir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Gruplar arasındaki ekspresyon farklarının Image J analizi ile değerlendirilmesi sonucunda elde edilen grafik. Sham ve Prilokain grupları arasında, Prilokain ve Prilokain+Timokinon grupları arasında, Prilokain ve Timokinon grupları arasında, Sham ve Timokinon grubu arasında anlamlı farklar elde edilmiştir (*p <0,05).

Elde edilen boyanma paternlerine göre gruplar aşağıdaki farklar, 10x ve 40x (Şekil 4.10-a, Şekil 4.10-b) objektif büyütmesi kullanılarak panele yansıtılmıştır. Sham grubunda nadiren gözlenen p50 ekspresyonunun, Prilokain grubunda toksisite kaynaklı nöroinflamasyona bağlı olarak arttığı görülmektedir. Bu artışın, Prilokain+Timokinon grubunda azaldığı görülmüştür. Bu durum Timokinonun epilepside ödeme bağlı oluşan inflamasyonu azaltıcı etkisi olduğunu düşündürmektedir. Timokinon verilen grupta ise ekspresyonun hiç olmayışı olası inflamasyonu bile tamamen baskıladığını düşündürmektedir.

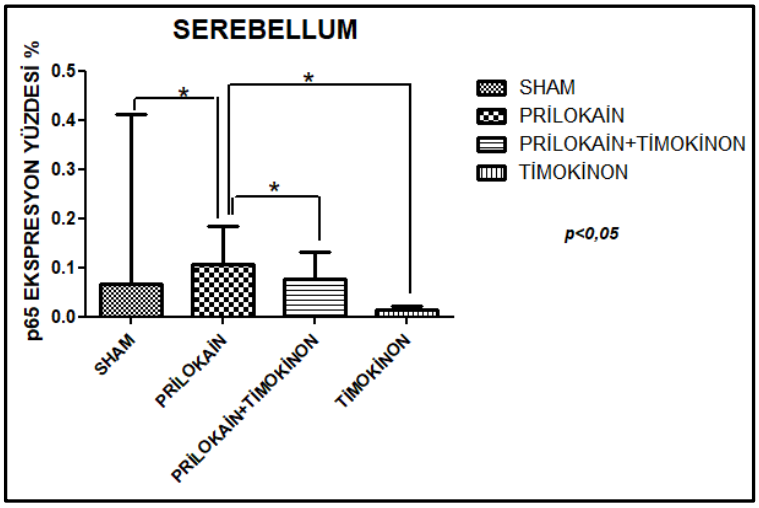


Şekil 4.10. a) p50 immunohistokimyasıyla gruplar arasında ekspresyon şiddeti görülmektedir. Prilokain grubunda gözlenen p50 ekspresyonunun Prilokain+Timokinon grubunda azaldığı görülmektedir. **b)** Fotoğraflar 40x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiştir. Oklar purkinje hücrelerindeki ekspresyonu işaret etmektedir. Skala bar 100µm'dir.

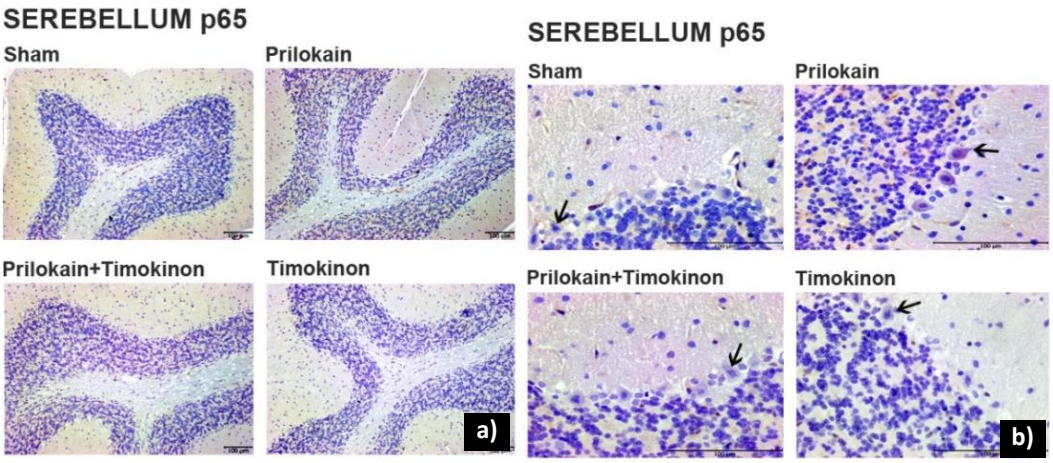
p65 İmmunohistokimyası

p65'de NFκB yolağında yer alan başka bir protein olduğundan yolağı anlamak için yapılan immunohistokimyasal analizlerde; p50 ekspresyonuna benzer bir ekspresyon profilinin varlığı görüldü.

Sham grubuna ait kesitlerde nadiren gözlenen p65 ekspresyonunun; Prilokain grubunda artışı görülmektedir. Prilokain+Timokinon grubunda ise p65 ekspresyon şiddetinin azaldığı görüldü. Sadece Timokinon uygulanan grupta ise ekspresyonun çok daha az olduğu görülmektedir (Şekil 4.11) (Şekil 4.12-a ve b).



Şekil 4.11. Gruplar arasındaki ekspresyon farklarının Image J analizi ile değerlendirilmesi sonucunda elde edilen grafik. Sham ve Prilokain grupları arasında, Prilokain ve Prilokain+Timokinon grupları arasında, Prilokain ve Timokinon grupları arasında anlamlı farklar elde edilmiştir (*p <0,05).



Şekil 4.12. a) p65 immunohistokimyası sonrasında **10x** objektif büyütmesiyle elde edilen paneller görülmektedir. Sham grubunda az görülen p65 ekspresyonunun, Prilokain grubunda toksisite kaynaklı nöroinflamasyona bağlı olarak arttığı dikkati çekmektedir. Prilokain grubunda gözlenen p65 artışının, Prilokain+Timokinon grubunda azaldığı görüldü. **b)** Fotoğraflar **40x** objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiştir. Oklar ekspresyon bölgelerini işaret etmektedir. Skala bar 100µm'dir.

Tablo 4.7. Serebellumda görülen AQP4, p50 ve p65 ekspresyonlarının ortalama yüzdeleri

Gruplar	AQP4 (%)	p50 (%)	p65 (%)
Sham	0,29±0,14	0,01±0,01*	0,06±0,34
Timokinon	0,37±0,14	0±0	0,01±0,006
Prilokain	1,10±0,42**	0,02±0,02**	0,10±0,07**
Timokinon + Prilokain	0,24±0,14	0,003±0,003	0,07±0,05

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

***** Timokinon grubuna göre anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$, İstatistik analizde One Way ANOVA testi kullanıldı).

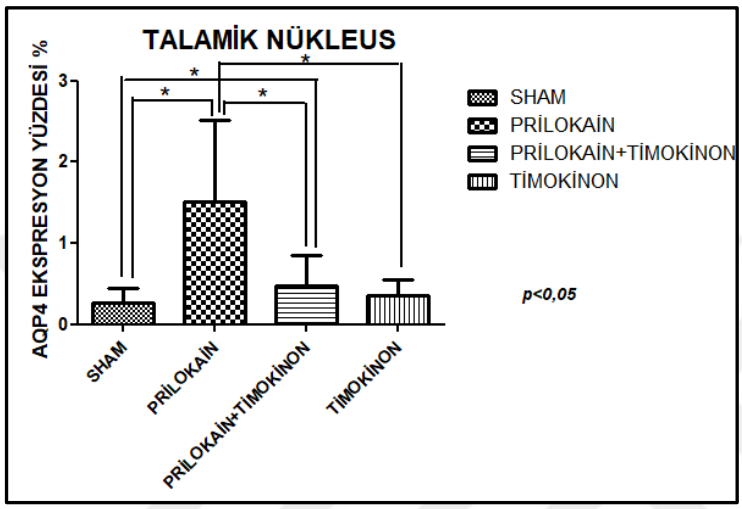
****** Sham, Timokinon ve Timokinon+Prilokain gruplarına göre anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$, İstatistik analizde One Way ANOVA testi kullanıldı).

4.6.2. Talamik Nukleus

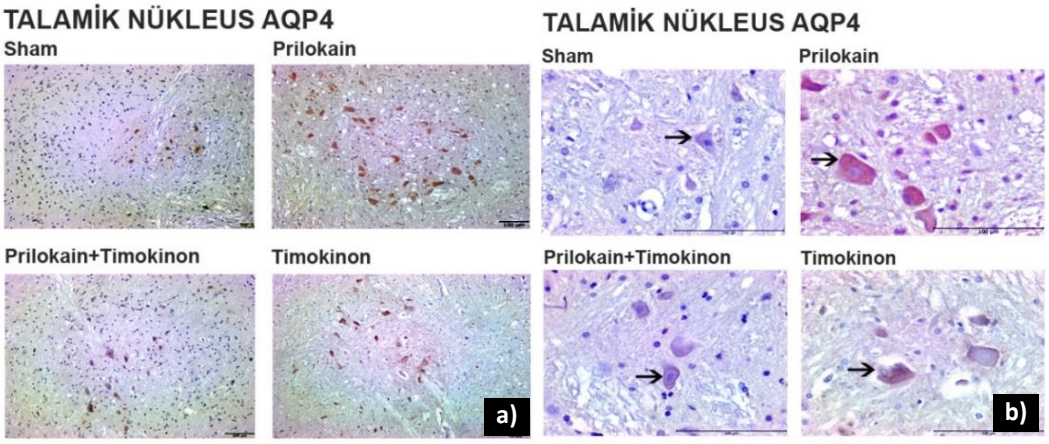
Literatürde talamik nükleuslarda AQP4 ekspresyonunun daha önce değerlendirilmediği dikkati çekmiştir. Çalışmada Prilokain ile oluşturulan epilepsi modelinde talamik nukleusların olduğu alanda AQP4 ekspresyonunun değiştiği dikkati çekmiştir. Buna göre tüm gruplarda ekspresyon paterni değerlendirilmiş ve görüntüler panele yansıtılmıştır.

AQP4 İmmunohistokimyası

Sham ve timokinon gruplarında az görülen AQP4 ekspresyonunun Prilokain grubunda ciddi oranda arttığı buna karşın; Prilokain+Timokinon grubunda ise bir o kadar azaldığı görüldü. Bu bulgular istatistiksel analizlerle anlamlandırıldı (Şekil 4.13, Şekil 4.14-a ve Şekil 4.14-b).



Şekil 4.13. Gruplar arasındaki ekspresyon farklarının Image J analizi ile değerlendirilmesi sonucunda elde edilen grafik. Prilokain ile Sham, Timokinon, Prilokain+Timokinon grupları arasında, Sham ve Prilokain+Timokinon grupları arasında, anlamlı farklar elde edilmiştir (*p < 0,05).



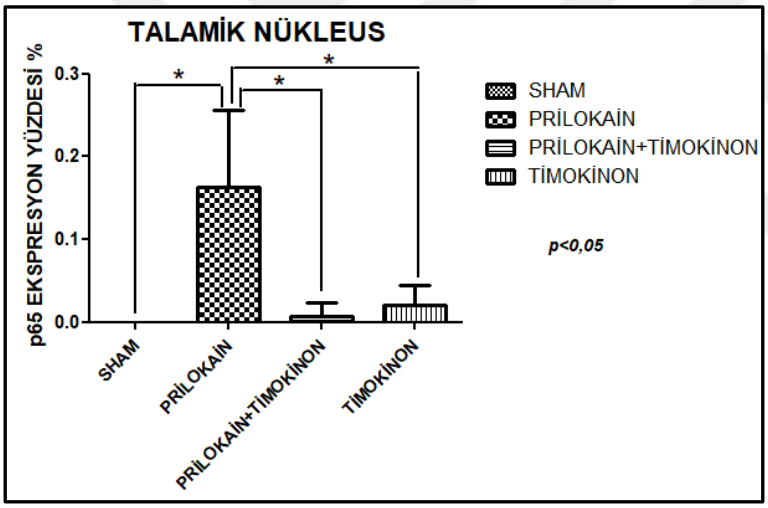
Şekil 4.14. a) Talamik nukleuslarda AQP4 ekspresyonunun gruplar arasındaki değişimi görülmektedir. Fotoğraflar 10x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiş olup AQP4 ekspresyonları ile epilepsi ve tedavi grubu arasındaki farklanmalar dikkati çekmektedir. **b)** Fotoğraflar 40x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiştir. Oklar ekspresyon bölgelerini işaret etmektedir. Skala bar 100µm'dir.

p50 İmmunohistokimyası

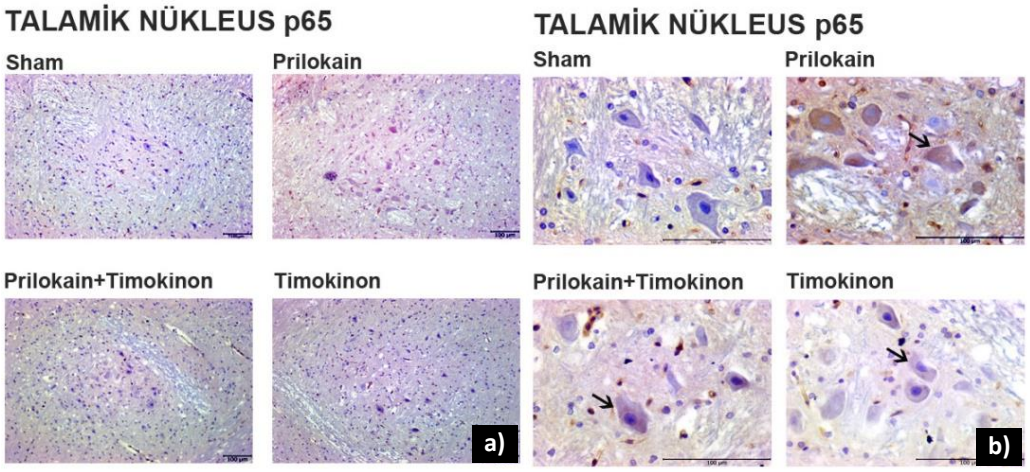
Çalışmada AQP4'ün talamik nükleusta gösterdiği ekspresyon paterni dikkate alınarak aynı bölgelerde ödeme bağlı oluşabilecek nöroinflamasyon p50 ve p65 immunohistokimyasıyla değerlendirilmiştir. Ancak, gruplarda p50 ekspresyonu görülmemiştir. Bu durumda, talamik nükleusların inflamatuvar yanıta verdiği cevapta p50 yolağını kullanmadığını akla getirmektedir.

p65 İmmunohistokimyası

Çalışmada p65 ekspresyonunun Sham gruplarında görülmediği ve timokinon gruplarında nadiren gözlendiği dikkati çekmiştir. Prilokain gruplarında ise ekspresyonun artışı; Prilokain+Timokinon gruplarında da önemli derecede azalışı görülmektedir (Şekil 4.15, Şekil 4.16-a ve Şekil 4.16-b).



Şekil 4.15. Gruplar arasındaki ekspresyon farklarının Image J analizi ile değerlendirilmesi sonucunda elde edilen grafik. Sham ve Prilokain grupları arasında, Prilokain ve Prilokain+Timokinon grupları arasında, Prilokain ve Timokinon grupları arasında anlamlı farklar elde edilmiştir (*p < 0,05).



Şekil 4.16. a) p65 immunohistokimyasıyla gruplar arasındaki ekspresyon farkı görülmektedir. Fotoğraflar 10x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiş olup p65 ekspresyonları ile epilepsi ve tedavi grubu arasındaki farklar mevcuttur. Sham grubunda p65 ekspresyonu görülmezken, Prilokain grubunda toksisite kaynaklı nöroinflamasyona bağlı olarak ekspresyonun arttığı görülmektedir. Prilokain grubunda gözlenen p65 artışının, Prilokain+Timokinon grubunda azaldığı görülmüştür. **b)** Fotoğraflar 40x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiştir. Oklar ekspresyon bölgelerini işaret etmektedir. Talamik nukleuslarla birlikte ortamda yer alan glial ekspresyon da dikkati çekmekte ve bunun da gruplar arasındaki değişimi paralellik sergilemektedir. Skala bar 100µm'dir

Tablo 4.8. Talamik nukleusta AQP4 ve p65 ekspresyonlarının ortalama yüzdeleri

Gruplar	AQP4 (%)	p65 (%)
Sham	0,26±0,17 *	0±0
Timokinon	0,34±0,19	0,02±0,02
Prilokain	1,50±1,00 **	0,16±0,09 **
Timokinon + Prilokain	0,47±0,37	0,007±0,01

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

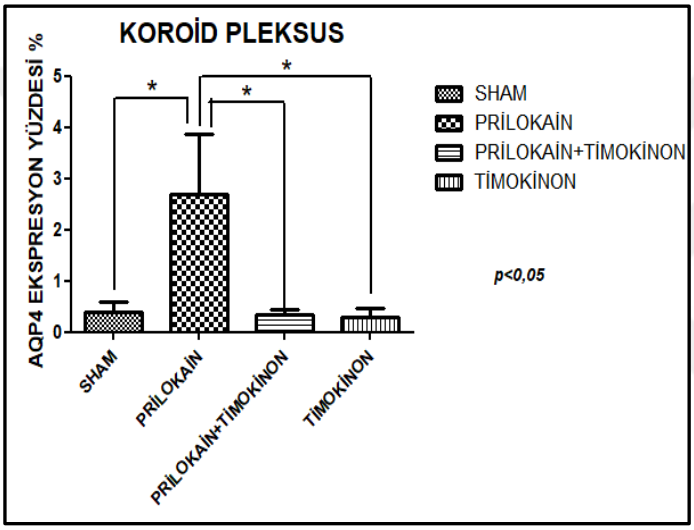
*, Timokinon+Prilokain grubuna göre anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$, İstatistik analizde One Way ANOVA testi kullanıldı).

**, Sham, Timokinon ve Timokinon+Prilokain gruplarına göre anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$, İstatistik analizde One Way ANOVA testi kullanıldı).

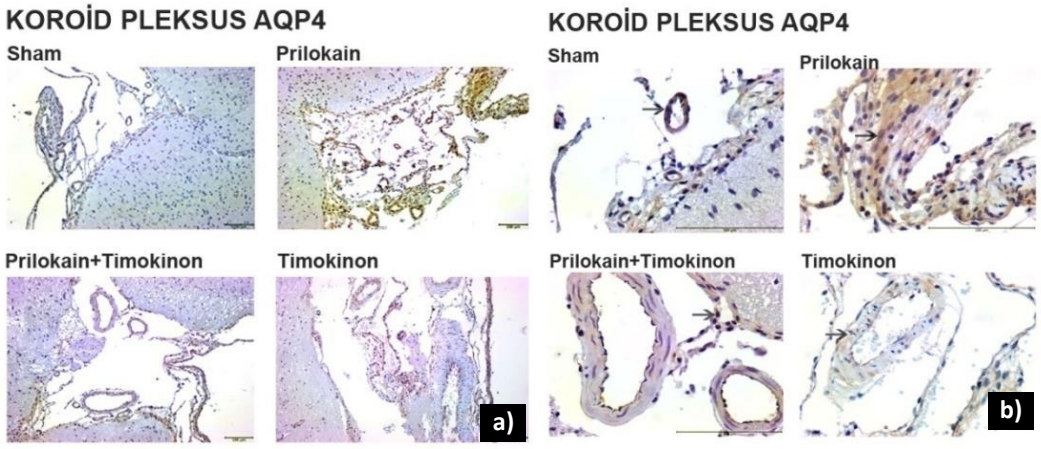
4.6.3. Koroid Pleksus

AQP4 İmmunohistokimyası

Literatürde Koroid Pleksusta da AQP4 ekspresyonu daha önce değerlendirilmemiştir. Ancak gruplar arasındaki ekspresyon farkı bizi koroid pleksusdaki AQP4 ekspresyonunu değerlendirmeye itmiştir. Prilokain grubunda artan ekspresyon şiddetinin Prilokain+Timokinon gruplarında azaldığı görülmüştür. Bu bulgular istatistiksel analizlerle anlamlandırılmıştır (Şekil 4.17, Şekil 4.18.-a ve Şekil 4.18.-b).



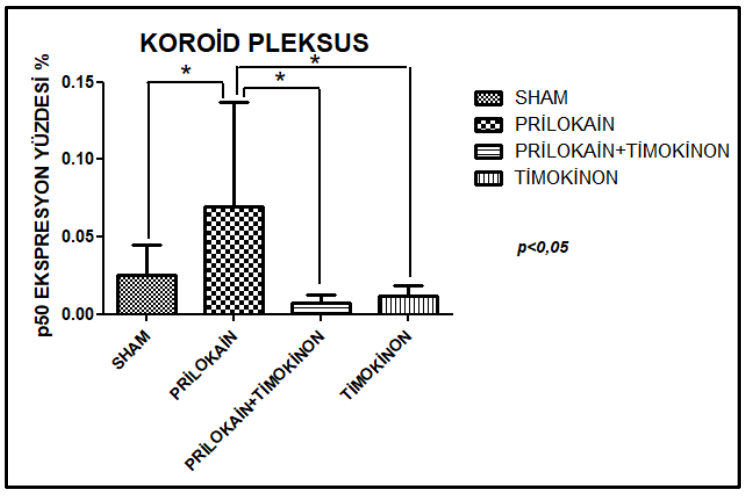
Şekil 4.17. Gruplar arasındaki ekspresyon farklarının Image J analizi ile değerlendirilmesi sonucunda elde edilen grafik. Sham ve Prilokain grupları arasında, Prilokain ve Prilokain+Timokinon grupları arasında, Prilokain ve Timokinon grupları arasında anlamlı farklar elde edilmiştir (*p < 0,05)



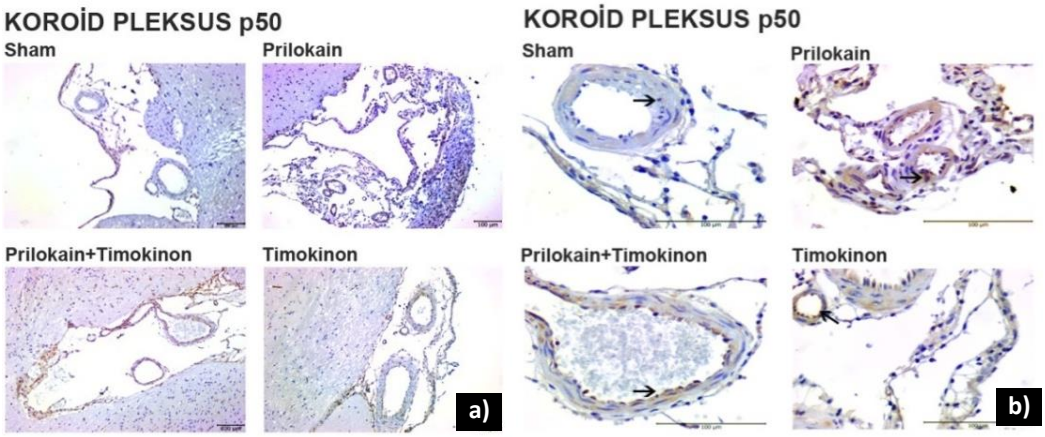
Şekil 4.18. a) AQP4 immunohistokimyasıyla gruplar arasında ekspresyon farkı görülmektedir. Fotoğraflar 10x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiştir. Sham grubunda normal düzeyde görülen AQP4 ekspresyonunun, Prilokain grubunda arttığı; Timokinon+Prilokain grubunda ise azaldığı görülmüştür. Yalnız Timokinon verilen grupta ise normal seviyelerde ekspresyon mevcuttur. **b)** Fotoğraflar 40x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiştir. Oklar ekspresyon bölgelerini işaret etmektedir. Skala bar 100µm'dir.

p50 immunohistokimyası

Tüm gruplarda total p50 ekspresyonunun düşük olması dikkati çekmektedir. Buna rağmen gruplar arasında anlamlı farklar bulunmaktadır. Prilokain grubunda artan p50 ekspresyonunun; Prilokain+Timokinon grubunda da şiddetinin azaldığı görülmüştür (Şekil 4.19, Şekil 4.20-a ve Şekil 4.20-b).



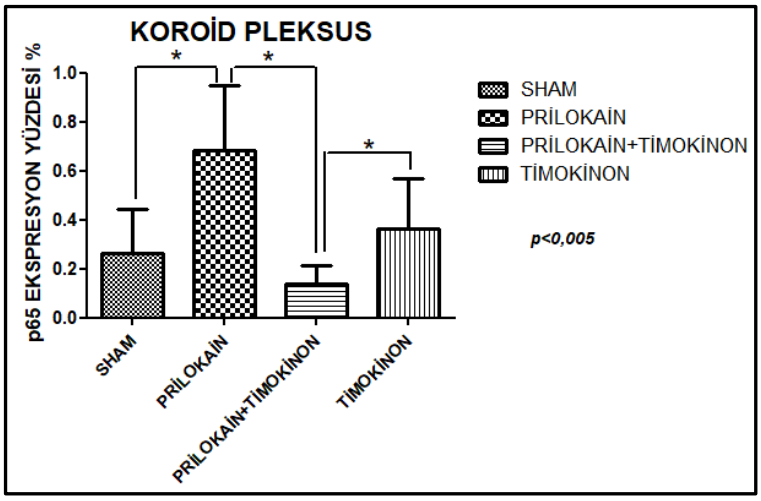
Şekil 4.19. Gruplar arasındaki ekspresyon farklarının Image J analizi ile değerlendirilmesi sonucunda elde edilen grafik. Sham ve Prilokain grupları arasında, Prilokain ve Prilokain+Timokinon grupları arasında, Prilokain ve Timokinon grupları arasında anlamlı farklar elde edilmiştir (*p <0,05).



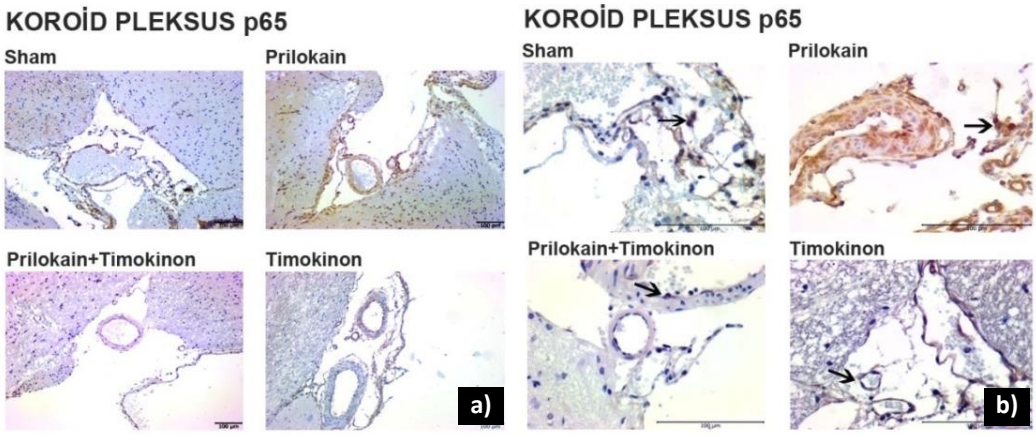
Şekil 4.20. a) p50 immunohistokimyasıyla gruplar arasında ekspresyon şiddeti görülmektedir. Fotoğraflar 10x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiştir. Sham grubunda az görülen p50 ekspresyonunun, Prilokain grubunda toksisiteye bağlı olarak arttığı görülmektedir. Prilokain grubunda gözlenen p50 artışının, Prilokain+Timokinon grubunda azaldığı görülmüştür. **b)** Fotoğraflar 40x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiştir. Oklar ekspresyon alanlarını işaret etmektedir. Skala bar 100µm'dir.

p65 İmmunohistokimyası

Çalışmada P50 ekspresyonuna benzer bir p65 ekspresyonunun olduğu görüldü. Sonuçlar image J analizi ile değerlendirildi ve istatistiksel olarak anlamlandırıldı (Şekil 4.21, Şekil 4.22-a, 4.22-b).



Şekil 4.21. Gruplar arasındaki ekspresyon farklarının Image J analizi ile değerlendirilmesi sonucunda elde edilen grafik. Sham ve Prilokain grupları arasında, Prilokain ve Prilokain+Timokinon grupları arasında, Prilokain+Timokinon ve Timokinon grupları arasında anlamlı farklar elde edilmiştir (*p <0,05).



Şekil 4.22. a) p65 immunohistokimyasıyla gruplar arasında nöroinflamasyon şiddeti görülmektedir. Fotoğraflar 10x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiş olup p65 ekspresyonları ile epilepsi ve tedavi grubu arasındaki farklanmalar dikkati çekmektedir. Sham grubunda az görülen p65 ekspresyonunun, Prilokain grubunda toksisite kaynaklı nöroinflamasyona bağlı olarak arttığı görülmektedir. Prilokain grubunda gözlenen p65 artışının, Prilokain+Timokinon grubunda azaldığı görülmüştür. **b)** Fotoğraflar 40x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiştir. Oklar ekspresyon alanlarını işaret etmektedir. Skala bar 100µm'dir.

Tablo 4.9. Koroid pleksusta görülen AQP4, p50 ve p65 ekspresyonlarının ortalama yüzdeleri

Gruplar	AQP4 (%)	p50 (%)	p65 (%)
Sham	0,39±0,18	0,02±0,01	0,26±0,17 **
Timokinon	0,28±0,17	0,01±0,007	0,36±0,20
Prilokain	2,68±1,19 *	0,069±0,067 *	0,68±0,26
Timokinon + Prilokain	0,34±0,10	0,007±0,005	0,13±0,07 ***

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

*, Sham, Timokinon ve Timokinon+Prilokain gruplarına göre anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$, İstatistik analizde One Way ANOVA testi kullanıldı).

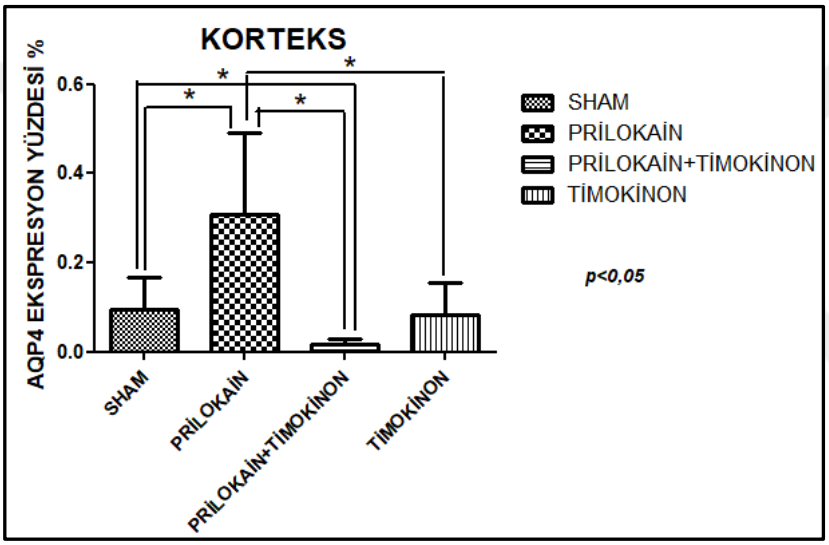
**, Prilokain grubuna göre anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$, İstatistik analizde One Way ANOVA testi kullanıldı).

***, Timokinon ve Prilokain gruplarına göre anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$, İstatistik analizde One Way ANOVA testi kullanıldı).

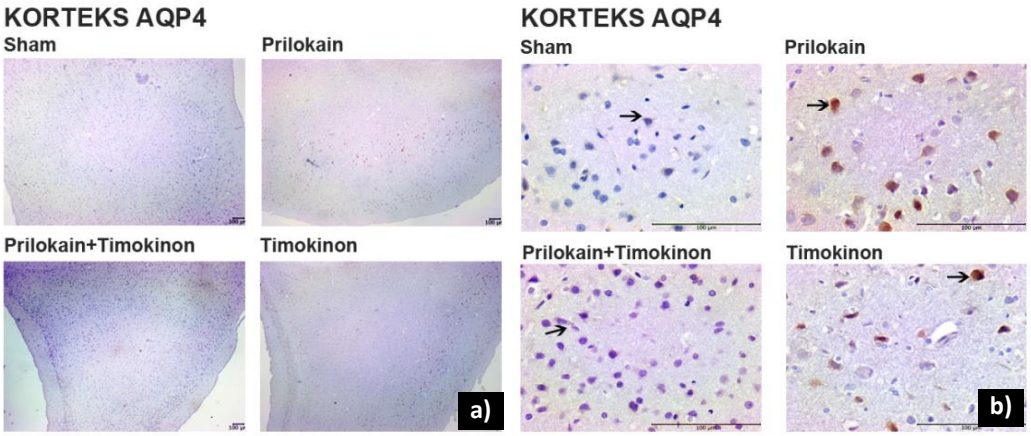
4.6.4. Serebral Korteks

AQP4 İmmunohistokimyası

Yapılan çalışmalarda serebral korteksde AQP4 ekspresyonunun varlığı tanımlanmıştır (113). Bu nedenle çalışmada, serebral korteksin (neokorteks) tamamı yerine ekspresyon farkını gördüğümüz 2. ve 5. laminalarına odaklanıldı. Bu iki laminada gruplar arasında ekspresyon farkı Prilokain grubunda gözlenen artış ve Prilokain+Timokinon grubunda ise azalışla karakterizeydi (Şekil 4.23, Şekil 4.24-a ve Şekil 4.24-b).



Şekil 4.23. Gruplar arasındaki ekspresyon farklarının Image J analizi ile değerlendirilmesi sonucunda elde edilen grafik. Prilokain grubu ile Sham, Timokinon ve Prilokain+Timokinon grupları arasında, Sham ve Prilokain+Timokinon grupları arasında anlamlı farklar elde edilmiştir (*p <0,05).



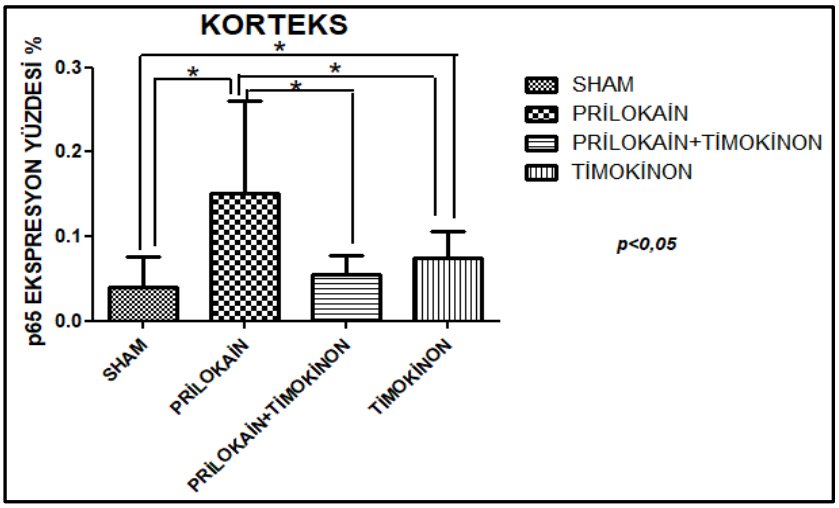
Şekil 4.24. a)AQP4 immunohistokimyasıyla gruplar arasında farklar görülmektedir. Fotoğraflar 4x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiştir. Sham grubunda normal düzeyde görülen AQP4 ekspresyonunun, Prilokain grubunda toksisite kaynaklı ödeme bağlı olarak yüksek oranda arttığı görülmektedir. Prilokain grubunda gözlenen yoğun AQP4 immunreaksiyonunun, Timokinon+Prilokain grubunda azaldığı görülmüştür.Yalnız Timokinon verilen grupta ise normal seviyelerde ekspresyon mevcuttur. **b)** Fotoğraflar 40x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiştir. Oklar ekspresyon alanlarını işaret etmektedir. Skala bar 100µm'dir.

p50 İmmunohistokimyası

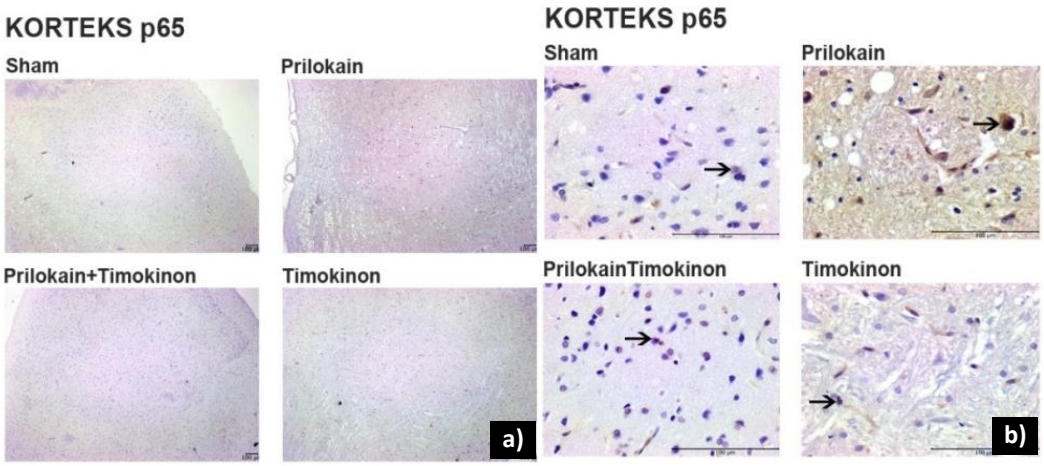
Çalışmada AQP4'ün kortekste gösterdiği ekspresyon paterni dikkate alınarak aynı bölgelerde ödeme bağlı oluşabilecek nöroinflamasyon değerlendirilmiştir. Fakat gruplarda p50 ekspresyonu görülmemiştir. Bu durum inflamatuvar yanıtta p50 yolağını kullanmadığını düşündürmektedir.

p65 İmmunohistokimyası

Çalışmada p65 ekspresyonunun da az da olsa gruplar arasında fark yaratacak düzeyde olduğu görüldü. Buna göre; Prilokain grubunda gözlenen artışın tedavi grubunda azaldığı dikkat çekti (Şekil 4.25, Şekil 4.26-a ve Şekil 4.26-b).



Şekil 4.25. Gruplar arasındaki ekspresyon farklarının Image J analizi ile değerlendirilmesi sonucunda elde edilen grafik. Prilokain ile Sham, Timokinon ve Prilokain+Timokinon grupları arasında ve Sham ile Timokinon grupları arasında anlamlı farklar elde edilmiştir (*p < 0,05).



Şekil 4.26. a) p65 immunohistokimyasıyla gruplar arasındaki nöroinflamasyon görülmektedir. Fotoğraflar 10x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiştir ve ekspresyon net olarak çok görülmediğinden 40x objektif büyütmesi tercih edilmiştir. **b)** Fotoğraflar 40x objektif büyütmesi kullanılarak çekilmiştir. Oklar ekspresyon alanlarını işaret etmektedir. Hem nöronlarda hem de glia hücrelerindeki ekspresyon dikkati çekmektedir. Skala bar 100µm'dir.

Tablo 4.10. Serebral kortekste AQP4 ve p65 ekspresyonlarının ortalama yüzdeleri

Gruplar	AQP4 (%)	p65 (%)
Sham	0,39±0,18	0,04±0,03
Timokinon	0,28±0,17	0,07±0,03 **
Prilokain	2,68±1,19 *	0,15±0,10 *
Timokinon + Prilokain	0,34±0,10 **	0,05±0,02

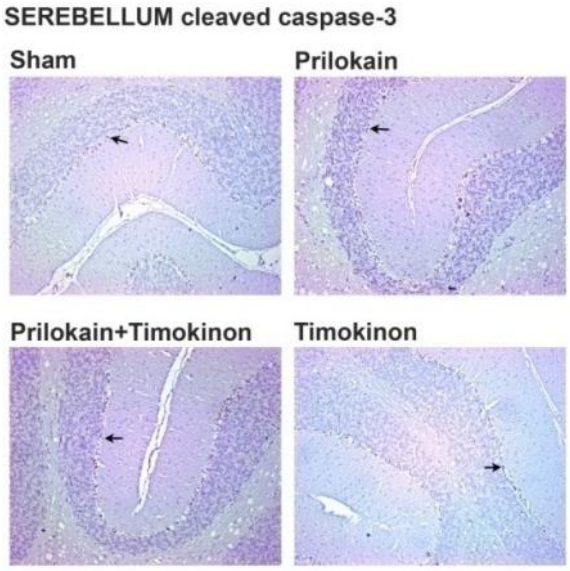
Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

*, Sham, Timokinon ve Timokinon+Prilokain gruplarına göre anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$, İstatistik analizde One Way ANOVA testi kullanıldı).

**, Sham grubu ile kıyasla anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$, İstatistik analizde One Way ANOVA testi kullanıldı).

4.6.5. Cleaved Caspase-3 Analizi

Çalışmada Caspase 9 immunohistokimyası planlanmıştı, ancak ekspresyonun net olarak belirlenememesi üzerine apoptoz yolağının en son basamağını teşkil eden cellat caspase olarak bilinen cleaved caspase-3 incelendi. Bu belirteç apoptotik yolağın son ürünü olduğundan, nukleusta boyanır ve ölmüş hücreleri göstermektedir. Buna göre gruplar arasında belirgin bir fark görülmedi. Prilokain grubunda ekspresyonel bir artış gözlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlılık ifade etmiyordu (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. Serebellumda gruplara göre cleaved caspase-3 ekspresyonu görülmektedir. Gruplar arasında farklılık görülmemektedir.

5. TARTIŞMA

Günümüzde rejyonel anestezi, gelişen teknoloji ve görüşlerin ilerlemesi sonucunda sıkça uygulanmakta ve genel anesteziye kıyasla daha güvenilir bir anestezi yöntemi olmasından dolayı popülaritesini halen korumaktadır. Bu yüzden lokal anestezik ajanların kullanımı ve toksisitesi klinikte önemli bir unsur hale gelmiştir. Lokal anestezik ajanlara gelişen sistemik toksisitenin en fazla sorumlusu, ilacın yüksek kan seviyesidir. Yanlışlıkla yapılan intravasküler enjeksiyonlar, hızlı sistemik emilim veya yüksek doz ilaç kullanılması sonucu SSS ve KVS'ye ait toksik belirtiler ortaya çıkmaktadır (6).

Di Gregorio ve ark.'nın yaptığı 1979-2009 yılları arasında bildirilen LAST olgularının klinik prezentasyonunun değerlendirildiği çalışmada 93 vaka tanımlanmıştır. Bunların 83'ünde (%89) SSS semptomları bildirilirken, bu semptomların en çoğu nöbet aktivitesi (%68) olarak belirtilmiştir. Aynı çalışmada 51 hastada (%55) kardiyovasküler sistem toksisite semptomları görülmüştür. Kardiyovasküler toksisite semptomu olarak en fazla bradikardi-asistol (%27) görülürken, bunu hipotansiyon (%18) ve bradikardi (%16) izlemiştir (9).

Ocak 2014 - Kasım 2016 arasındaki LAST olgularının derlendiği bir çalışmada toplam 47 LAST olgusu değerlendirilmiştir. Bu çalışmada da en çok yan etki SSS semptomu (%77) görülürken, bunlardan en fazla görülen semptom nöbet aktivitesi (%53) olmuştur. %23 oranında da kardiyovasküler sistem semptomları görülmüştür. 10 hastada, 2-10 dk arasında kardiyak destek tedavisine (örn. kardiyopulmoner resusitasyon, inotrop ve vazopressör ajan kullanımı) ihtiyaç duyulmuştur (121).

Timokinon; çörek otu bitkisinin yapısında bulunan lipit yapılı bir bileşik olup, yapılan çeşitli çalışmalarda timokinonun; antiülser, antioksidan, antihepatotoksik, antienflamatuar, analjezik, antitümöral, antikanserojenik, antimikrobiyal, antidiyabetik, antialerjik, antihiperlipidemik antihiperkolesterolemik gibi farklı birçok biyolojik, toksikolojik ve farmakolojik özellikleri gösterilmiştir (36-64). Literatürde lokal anestezik toksisitesinde timokinonun etkinliğini araştıran herhangi bir çalışma henüz bulunmamaktadır.

Lokal anestezik toksisitesinde görülen kardiyotoksisite ve nörotoksisite üzerinde timokinonun koruyucu etkinliği olup olmadığını araştırdığımız bu çalışmada günlük hayatta infiltrasyon anestezisinde sık uygulanan prilokaini kullandık. Literatürlerde sıkça karşılaşılması, ulaşımının kolay olması, uygun maliyette olması ve çalışma kolaylığı sağlamasından dolayı deney hayvanı olarak ratları seçtik.

Toplam 40 ratın kullanıldığı ve prilokain toksisitesine bağlı olarak kardiyak değişiklikler ve epileptik aktivitelerin izlendiği çalışmamızda ayrıca hücresel düzeyde meydana gelen değişikliklerin belirlenmesi için kalp ve beyin dokusunda immünohistokimyasal incelemeler yapıldı. Lokal anestezik olarak prilokain seçmemizdeki amaç; ilk görülen EKG değişiklikleri, epiletik aktiviteyi ve izoelektrik EEG görülme zamanlarını ayrı ayrı göstermek ve daha kolay ayırt edebilmesine olanak sağlamasıdır.

Prilokainin sistemik toksisitesi sadece intravenöz uygulamalarda değil, infiltrasyon anestezisi, periferik blok uygulamaları ve spinal anestezi gibi rejyonel anestezi uygulamalarının sonrasında da görülebilmektedir.

James ve ark.'nın yaptığı izole kalp dokusunda lokal anesteziklerin kardiyotoksisitesinin in vitro olarak değerlendirildiği çalışmada prilokainin diğer lokal anesteziklere kıyasla kardiyotoksisitesi en az gösterilen ajan olduğunu bildirilmiştir (119).

Copeland ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, ortalama 45-50 kg koyunlardan oluşan gruplara farklı lokal anestezikler literatürde belirtilen en yüksek dozlarda uygulanmıştır. 3 dakika süresinde 350 mg prilokain iv. uygulanan gruptaki tüm koyunlarda SSS toksisitesi izlenirken, koyunlardan birisi polimorfik ventriküler taşikardi ve kardiyak kollaps nedeniyle öldü (120).

Rosenberg ve ark.'nın yaptığı ve ratlarda klorprokain ile prilokainin akut kardiyotoksisite ve akut nörotoksisitenin karşılaştırıldığı çalışmada ilk kardiyak değişiklikler, epileptik aktivite, izoelektrik EEG ve asistol zamanları değerlendirilmiştir. Bu çalışmada prilokain verilen grupta ilk aritmi ortalama 162,4 mg/kg dozunda görülürken, asistol ortalama 169,6 mg/kg dozunda meydana gelmiştir (114).

Bizim yaptığımız çalışmamızda da, Prilokain grubu ile Timokinon + Prilokain grubunda ilk aritmi ve asistol gerçekleşme dozları ve zamanları karşılaştırıldı. Çalışmamızın sonucunda ilk aritmi Prilokain grubunda ortalama 89,95 mg/kg dozunda gerçekleşirken, asistol meydana gelme dozu ortalama 122,83 mg/kg olarak bulundu. Aynı parametreler Timokinon + Prilokain grubunda bakıldığında ilk aritmi 177,38 mg/kg dozunda görülürken, asistol ortalama 198,99 mg/kg dozunda meydana geldi. Bu iki grup karşılaştırıldığında Timokinon + Prilokain grubunda aritmi ve asistol oluşturmak için gereken doz, Prilokain grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu (Aritmi: p= 0,0014, Asistol: p= 0,0036). Bu bulgular ışığında timokinonun; aritmi ve asistol oluşması için gereken prilokain miktarını anlamlı derecede yükselttiği ve sonuç olarak timokinonun kardiyotoksisiteyi önlediği ve kardiyoprotektif özelliğe sahip olduğunu gösterdik.

Prilokainin RIVA yönteminde kullanımı güncelliğini yitirse de, geçmiş yıllarda prilokain ile yapılan RIVA'nın çeşitli toksisiteye yol açtığı bildirilmiştir.

Hollingworth ve ark.'nın yaptığı ve RIVA'da bupivakain ile prilokainin karşılaştırıldığı çalışmada oluşan yan etkiler incelenmiştir. Prilokain uygulanan 7 hastada parmaklarda karıncalanma, 1 hastada ağızda metalik tat rapor edilirken; ciddi yan etki rapor edilmemiştir (115).

Kern ve ark.'nın prilokain ile yapılan RIVA olgusunda, turnike kafının erken inmesine bağlı olarak hastada generalize konvülsiyon ve ventriküler ekstrasistol geliştiği belirtilmiştir (116). Aynı şekilde Machado ve ark. (117) bildirdiği prilokain ile RIVA olgusunda, hastada ventriküler taşiartimi, dudak ve kulakta parestezi geliştiği rapor edilirken, McGlone ve ark. yaptığı çalışmada, prilokain ile uygulanan RIVA sonrasında 6 saat süren radyal sinir paralizi vakası bildirmiştir (118).

Litz ve ark.'nın bildirdiği bir olguda dirsekte bursit nedeniyle operasyonu planlanan hastaya 30 ml %1 mepivakain ile infraklavikular blok uygulanmıştır. 15 dakika geçtikten sonra ulnar sinir blokajı olmaması üzerine aksiller yaklaşımla 10 ml %1 prilokain uygulanmıştır. Prilokain uygulaması sonrasında 5 dk içerisinde hastada mide bulantısı, ajitasyon ve bilinç bozukluğu meydana gelmiş, ayrıca supraventriküler taşiaritmi gelişmiştir (122).

Karabiber ve ark.'nın bildirdiği bir vakada, 3,5 aylık bir erkek bebeğe karaciğer biyopsisi için subkutan 1 ml %2 prilokain uygulanmıştır. Prilokain enjeksiyonu sonrası hastada SSS depresyonu meydana gelmiştir. Letarjik olması ve solunumu düzensizleşmesi nedeniyle pediatrik yoğun bakıma alınan hastada prilokain nörotoksisitesi düşünülmüştür (123).

Prilokain toksisitesinde sık görülen klinik bulgulardan birisi de methemoglobinemidir. Kan gazı analizlerinde methemoglobin düzeylerini de incelediğimiz çalışmamızda, prilokainin sıçanlarda methemoglobinemi oluşturmadığını tespit ettik. Bundan dolayı çalışmamızda timokinonun, prilokain toksisitesine bağlı methemoglobinemiyi önlemede etkin olup olmadığı belirlenemedi.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda hem Nagilla Sativa bitkisinin, hem de bu bitkinin yapısında bulunan timokinonun çeşitli etkenlere bağlı kardiyotoksisite ve nörotoksisiteyi önlemesi, ayrıca kardiyoprotektif ve nöroprotektif özellikler göstermesi üzerine; biz de timokinonun prilokaine bağlı kardiyotoksisite ve nörotoksisiteyi önlemede de etkin olabileceğini düşündük.

Uz ve ark. yaptığı çalışmada (86), Nagilla Sativa bitkisinin Siklosporin-A ile indüklenen kardiyotoksisitede kardiyoprotektif etki gösterdiğini bildirilirken, Ansam'ın yaptığı çalışmada (124), miyokardiyal iskemik reperfüzyon hasarı oluşturulan rat modellerinde, Nigella Sativa'nın bu hasarı engellediği gösterilmiştir.

Norouzi ve ark. yaptığı çalışmada inflamasyona bağlı miyokardiyal fibrozis oluşturulan ratlarda, Nigella Sativa'nın fibrozisi azalttığı gösterilmiş ve bu etkisinin antioksidan özelliği üzerinden gösterebileceği düşünülmüştür (125).

Ayrıca Nigella Sativa bitkisinin kardiyovasküler sistem üzerindeki etkileri araştırılan bazı çalışmalarda, Nigella Sativa'nın kalp hızı, kan basıncı, endotel fonksiyonları üzerinde etkisi olduğu gösterilmiştir (126,127).

Nörofarmakolojik etkilerinin araştırıldığı çeşitli çalışmalarda Nigella Sativa'nın, nöroprotektif özellik gösterdiği, çeşitli nörolojik hastalıklarda kullanılabileceği ve bu etkilerini GABA, opioid ve NO gibi nörotransmitterler üzerinden gösterdiği bildirilmiştir (128,129,132,133,134,135).

Nigella Sativa bitkisinin nöroprotektif özelliği gösterilen birçok çalışma bulunmaktadır. Kloroform ve petrol eteri ile ratlarda stroke modeli oluşturulan bir çalışmada (130), Nigella Sativa'nın oluşan serebral iskemiyi önlemede etkili olduğu gösterilirken, ratlarda global serebral iskemi modelinin oluşturulduğu başka bir çalışmada (131), Nigella Sativa ektratının hipokampusta iskemi-reperfüzyon hasarını engellediği ayrıca beyin ödemi oluşumunu önleyebileceği rapor edilmiştir.

Malik ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, ratlara haloperidol verilerek ektrapiramidal semptom oluşturulmuş ve bu semptomların üzerinde Nigella Sativa'nın etkisi araştırılmıştır. İmmünohistokimyasal analizlerle de desteklenen bu çalışma sonucunda Nigella Sativa'nın ekstrapiramidal semptomları azaltmada antipsikotik ajanlara yardımcı olabileceği belirtilmiştir (136).

Kanter M.'nin kronik toluene maruz bırakılarak nörodejenerasyon modeli oluşturulan ratlarla yaptığı 2 çalışmada, Nigella Sativa'nın oluşan nörodejenerasyonu azalttığı ve tedavide potansiyel olarak yer alabileceği bildirilmiştir (68,137).

Farklı ajanlarla deneysel epilepsi oluşturulmuş modellerle yapılan çeşitli çalışmalarda, Nigella Sativa bitkisinin antiepileptik etkinliği araştırılmıştır.

Pentilentetrazol ile deneysel epilepsi oluşturulan 2 çalışmada, Nigella Sativa bitkisinin antiepileptik özellik gösterdiği ayrıca antioksidan özellik göstererek nöronal hasarı engellediği rapor edilmiştir (138,139).

Noor ve ark.'nın yaptığı çalışmada pilokarpin ile epilepsi modeli oluşturulan ratlarla çalışılmış ve antiepileptik aktivite açısından Nagilla Sativa ve valproik asit karşılaştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda Nagilla Sativa'nın antiepileptik ajanlarla adjuvan kullanılabileceği, böylelikle antiepileptik ilaçların dozlarının azaltılabileceği belirtilmiştir (140).

Ayrıca Raza ve ark. yaptığı bir çalışmada, epilepsi oluşturulan hayvan modelinde Nagilla Sativa'nın, antiepileptik olarak kullanılan valproik asitin potansiyelini GABA reseptörleri üzerinden arttırdığı bulunmuştur (141).

Arafa ve ark. yaptığı çalışmada Nigella Sativa bitkisinin nörotransmitter üzerindeki rolü incelenmiştir. Siprofloksasin ile oluşturulan epilepsi modellerinde

Nigella Sativa'nın GABA ve glisin nörotransmitterler üzerinden etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (142).

Çalışmamız doğrultusunda yapılan birçok çalışmada, Nagilla Sativa'nın yanı sıra bu bitkinin yapısındaki en önemli madde olan timokinonun etkileri de araştırılmıştır.

İn vivo ve in vitro olmak üzere yapılan birçok çalışmalar sonucunda, çeşitli ajanlardan dolayı kardiyak hasar oluşan modellerde timokinonun kardiyoprotektif özelliği gösterilmiştir (143,144).

Doksorubisin antrasiklin yapısından olan ve çoğu kanser türlerinde etkinliği bilinen geniş spektrumlu bir sitotoksik antibiyotiktir. Tedavide yüksek dozda kullanılmasına bağlı olarak sağlıklı dokularda toksik etkileri görülebilmektedir.

Yapılan bazı çalışmalarda, doksorubisine bağlı kardiyotoksisite oluşturulan ratlar üzerinde timokinonun etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda timokinonun oluşan kardiyotoksisitede hasarı azalttığı ve kardiyoprotektif özellik gösterdiği bildirilmiştir (79,145).

Liu ve ark.'nın fareler üzerinde yaptığı çalışmada sepsis modeli oluşturulmuş ve oluşan kardiyak hasar üzerinde timokinonun etkinliği araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda timokinonun proinflamatuar sitokin ekspresyonunu azaltarak sepsise bağlı kardiyak hasarı azalttığı gösterilmiştir (146).

Diazinona bağlı kardiyotoksisite oluşturulan bir çalışmada (147), timokinonun protektif etkisi araştırılmış ve timokinonun kardiyotoksisite oluşmasında koruyucu etkinlik gösterdiği belirtilirken; Nagi ve ark. yaptığı çalışmada, siklofosfamide bağlı kardiyotoksisite oluşturulan ratlarda timokinonun kardiyotoksisiteyi azalttığı rapor edilmiştir (4).

Adalı ve ark. yaptığı çalışmada (148) sisplatine bağlı oluşan kardiyotoksisite tedavisinde timokinonun etkin olabileceğini gösterirken; Atta ve ark. (149) streptozosin ile oluşturulmuş kardiyomiyopati modelinde yaptığı çalışmada, timokinonun kardiyak hasarın tedavisinde rol alabileceğini bildirmiştir.

Bizim çalışmamızda da ratlarda prilokain ile kardiyotoksisite oluşturuldu ve timokinonun bu toksisite üzerindeki etkileri gösterildi. Toksisite nedeniyle ilk aritmi ve asistol meydana geldiği prilokain dozlarının karşılaştırıldığı

çalışmamızda, Timokinon + Prilokain grubunda Prilokain grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu (Aritmi: p= 0,0014, Asistol: p= 0,0036). Ayrıca kardiyotoksisiteye bağlı nabız ve kan basıncı değişikliklerinin de incelendiği çalışmamızda, Timokinon + Prilokain grubunda Prilokain grubuna göre daha yüksek prilokain dozlarında nabız ve kan basıncı değişiklikleri meydana geldiğini gözlemledik.

Yapılan birçok çalışma sonucunda timokinonun değişik sistemler üzerine faydaları gösterilmesinin yanı sıra, sinir sistemindeki etkileri de büyük önem taşımaktadır.

Timokinonun sinir sistemi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çeşitli çalışmalarda, timokinonun nörofarmakolojik olarak antidepresan, anksiyolitik, anti-iskemik, analjezik ve antipsikotik olarak faydalı olabileceği gösterilmiş olup, alzheimer, parkinson ve multiple sklreoz gibi nörodejeneratif hastalıklarda da mevcut tedaviye yardımcı olabileceği iddia edilmiştir. Ayrıca malign SSS tümörlerinde progresyonu yavaşlattığı, antikanserojenik etki gösterdiği belirtilmiştir (150,151,152,153).

Ayrıca bir çalışmada spinal kord hasarı oluşturulan hayvan modellerinde timokinonun etkileri araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda timokinon travmaya bağlı spinal kord hasarını iyileştirici etkide olduğu bulunmuştur (154).

Timokinonun nöroinflamasyon üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, timokinonun çeşitli yolaklarla sitokin oluşumunu inhibe ettiği ve mikroglia hücrelerinin aktivitesine yardımcı olduğu gösterilmiştir (155,156). Ayrıca başka bir çalışmada timokinonun nöroinflamasyonu NF-κB yolu üzerinden inhibe ettiği bildirilmiştir (157).

Jakaria ve ark. yaptığı çalışmada timokinonun dejeneratif nörolojik hastalıklardaki etkisi araştırılmış ve timokinonun nörolojik hastalıklarda tedavide yer alabileceği belirtilmiştir (158). Ayrıca timokinonun alzheimer hastalığı üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, mevcut tedaviye eklendiğinde faydalı olduğu ve hipokampal nöronlarda anti-nörodejeneratif özellik gösterdiği rapor edilmiştir (159,160,161).

Sedaghat ve ark. yaptığı çalışmada, ratlarla 6-hidroksidopamin ile parkinson modeli oluşturmuş ve timokinon parkinson tedavisinde faydalı görülmüştür (162).

Ayrıca Ebrahimi ve ark. yaptığı çalışmada timokinonun parkinson oluşturulan ratlarda, parkinsona bağlı motor disfonksiyonunu azaltabileceği ve tedavide yer alabileceği gösterilmiştir (163).

Diabetik periferik nöropati modeli oluşturularak yapılan çalışmalarda, timokinonun etkinliği incelenmiş ve bu çalışma sonucunda timokinon nöropatik hasarı azaltmıştır (164,165).

Timokinonla yapılan nörotoksisite çalışmaları da literatürde önemli bir yere sahiptir. Ratlarda akrilamid ile oluşturulan nörotoksisitede timokinonun etkinliğinin araştırıldığı çalışmada timokinonun nörotoksisiteyi azalttığı belirtilirken; D-galaktoz ve alüminyum kloridin oluşturduğu nörotoksisitede de etkili olduğu bulunmuştur (166,167).

Kronik toluen maruziyeti sonucu frontal korteksteki nöronal hasarda iyileşme gösteren timokinon; arseniğin oluşturduğu nörotoksisiteyi de azalttığı bulunan çalışmalar mevcuttur (168,169).

Radad ve ark. yaptığı çalışmada (89) timokinonun ratlarda kurşuna bağlı beyin hasarını önlediği bildirilirken; Üstün ve ark. yaptığı çalışmada (170) sisplatin ile dorsal kök ganglion hasarı oluşturulmuş ve timokinonun bu hasarı iyileştirmiştir.

β-Amyloid beyin dokusunda birikimiyle nörodejenerasyona neden olduğu bilinmektedir. Timokinonun β-Amyloid birikimi sonucu oluşan nörodejenerasyon üzerine etkisini göstermek için yapılan çalışmalarda, β-Amyloid ilişkili nörotoksisitenin önlenmesinde timokinon etkili bulunmuştur (90,171).

Timokinonun yapılan çalışmalar sonucunda nörodejenerasyonu engelleyerek nöroprotektif özellikler göstermesi üzerine epilepsi tedavisinde de etkili olabileceği düşünülmüş ve çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

Akhondian ve ark. yaptığı bir pilot çalışmasında refrakter epilepsisi olan çocuklar değerlendirilmiştir. Çift kör olarak yapılan çalışmada bir gruba mevcut tedaviye ek olarak timokinon uygulanmış ve antiepileptik özellikler karşılaştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucuna göre inatçı epilepsili çocuklarda, timokinon etkili ve tolere edilebilir bir ajan olarak değerlendirilmiştir (172).

Ayrıca pentilentetrazol ile indüklenen epilepsi modelleriyle yapılan çeşitli hayvan çalışmalarında da timokinonun etkinliği araştırılmıştır. Bu çalışmalar

sonucunda timokinonun antiepileptik aktivite gösterdiği ve bu etkiyi de muhtemelen GABAerjik yolu aktifleştirmesi ve NO overekspresyonunu sağlayarak gerçekleştirdiği bildirilmiştir (28,173,174,177).

Penisilin ile oluşturulmuş epilepsi modelleriyle yapılan bir çalışmada (175), epilepsinin hem önlemesinde hem de tedavisinde timokinonun faydalı olduğu gösterilirken; lityum ve pilokarpin kullanılarak oluşturulan epilepsi modelinde de timokinonun etkinliği gösterilmiş ve bu etkiyi NF-κB yolu üzerinden oluşturduğu belirtilmiştir (176).

Shao ve ark. yaptığı çalışmada, ratlarda epilepsi modeli oluşturulmuş ve meydana gelen beyin hasarı üzerinde timokinonun etkisi araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda timokinonun beyin hasarını azalttığı bulunmuş ve bunu SOD ekspresyonunu arttırarak ve sonuç olarak antioksidan etkinliği ile gerçekleştirdiği rapor edilmiştir (178).

Rosenberg ve ark. yaptığı klorprokain ile prilokainin akut kardiyotoksisite ve akut nörotoksisitenin karşılaştırıldığı çalışmada, prilokain verilen grupta ilk epileptik aktivite görülme ve izoelektrik EEG oluşma dozları sırasıyla ortalama 47,2 mg/kg ve 100 mg/kg olarak bulunmuştur (114).

Bizim yaptığımız çalışmamızda da, Prilokain grubu ile Timokinon + Prilokain grubunda ilk nöbet aktiviteleri ve izoelektrik EEG gerçekleşme dozları ve zamanları karşılaştırıldı. Çalışmamızın sonucunda ilk nöbet aktivitesi Prilokain grubunda ortalama 39,10 mg/kg dozunda gerçekleşirken, izoelektrik EEG meydana gelme dozu ortalama 57,71 mg/kg olarak bulundu. Aynı parametreler Timokinon + Prilokain grubunda bakıldığında epileptik aktivite ortalama 60,79 mg/kg dozunda başlarken, izoelektrik EEG ortalama 94,59 mg/kg dozunda meydana geldi. İki grup arasında karşılaştırma yapıldığında Timokinon + Prilokain grubunda epileptik aktivite ve izoelektrik EEG oluşturmak için gereken doz, Prilokain grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu (Nöbet aktivitesi: $p= 0,0285$, izoelektrik EEG: $p= 0,0003$). Bu bulgular ışığında timokinonun; nöbet aktivitesini geciktirdiği, beyin ölümünün bir bulgusu olan izoelektrik EEG oluşması için gereken prilokain miktarını anlamlı derecede yükselttiğini ve sonuç olarak timokinonun antiepileptik ve nöroprotektif özelliklere sahip olduğunu gösterdik.

Timokinonun daha önce bahsedilen özelliklerinin yanı sıra antioksidan özellik göstermesi de literatürde geniş yer almaktadır. Yapılan çoğu çalışmada timokinonun gösterilen bazı yararlı etkilerini antioksidan özelliği üzerinden gösterdiği, bunu da farklı mekanizmalar üzerinden gerçekleştirdiği bildirilmiştir.

İzproterenol ile oluşturulan myokard iskemisi modelinde yapılan çalışmalarda timokinonun antioksidan özelliği ve nöroprotektif olduğu belirtilirken (179,180); Ojha ve ark. yaptığı çalışmada (181) timokinonun myokard hasarının başlamasını ve ilerlemesini önlemede etkin olduğu ve bunu oksidatif stres ve inflamasyonu azaltma yoluyla yaptığı gösterilmiştir.

Lu ve ark. yaptığı çalışmada (182), timokinonun myokardial iskemi-reperfüzyon hasarını SIRT1 geni sinyal yolunun aktivasyonu yoluyla azalttığı bildirilirken; timokinonun oksidatif stres üzerindeki etkisinin araştırıldığı başka çalışmada, timokinonun antioksidan özelliğini PI3K/Akt yolu üzerinden sağladığı rapor edilmiştir (183,184).

Yapılan çalışmalarda timokinonun nöroprotektif özelliği göstererek çeşitli hasarlanmaları azalttığı bilinmektedir. Periferik sinirde aksonal hasar oluşturulan bir çalışmada timokinonun hasarı azalttığı gösterilirken (185), etanole bağlı nörotoksisite oluşturulan ratlarda timokinonun etkin olduğu bulunmuştur (186).

Dopaminerjik hücre hasarı oluşturulan bir çalışmada (187), timokinonun hasarlı mitokondri hücrelerini temizleyerek hasarı azalttığı belirtilirken; Hamdy ve ark. yaptığı çalışmada streoptozosin ile nöropati oluşturulmuş ve timokinonun oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir (188).

Toksikoloji üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda timokinonun etkisi değerlendirilmiş ve antioksidan etkinliği araştırılmıştır. Kassab ve ark. yaptığı çalışmada (189), sodyum arsenat ile oluşturulan nörotoksisitede timokinonun nörotoksisiteyi iyileştirdiği ve oluşan oksidatif stresi antioksidan mekanizmalarla azalttığı belirtilirken; bir çalışmada glutamata bağlı nörotoksisitede timokinon, antioksidan etki göstererek nöromodülatör etki göstermiştir (190).

Angeles ve ark.'nın yaptığı çalışmada (191) timokinonun parkinson nedeniyle oluşan dejeneratif hasarı antioksidan özelliğiyle azalttığı bulunmuştur. Ayrıca β-Amyloid nedeniyle oluşan nörotoksisitede de etkinliği gösterilmiş ve

alzheimer dahil nörodejeneratif hastalıklarda timokinonun kullanılabileceği rapor edilmiştir (192).

Timokinonun antioksidan etkinliğinin gösterilmesi için iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulmuş modellerle çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Beynin çeşitli dokularında iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulan çalışmalarda timokinonun bu hasarı azalttığı; bu etkiyi de oksidatif ürünleri ve proinflamatuar sitokinleri azaltarak ve SOD, GSH-Px ve katalaz gibi antioksidan maddeleri arttırarak gösterdiği belirtilip, iskemik hastalıkların tedavisinde yer alabileceği bildirilmiştir (193-196).

Timokinonun antioksidan etkilerinin gösterilmesi için, total antioksidan kapasite ve biyokimyasal parametrelerin ölçümü yapılan bir çalışmada; ratlara gruplar arasında farklı dozlarda timokinon verilmiş ve total antioksidan kapasite ölçümleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda gruplar arasında anlamlı fark görülmemiştir (197).

Kalp ve beyin dokusunda total antioksidan kapasitesi ölçümleri yaptığımız çalışmamızda gruplar arasında karşılaştırmalar yapıldı. Çalışmamızın sonucuna göre, antioksidan kapasitesi düzeyi Prilokain grubunda diğer gruplara göre anlamlı derecede düşük bulunurken; Timokinon grubunda, prilokain verilen gruplara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ayrıca kalp ve beyin dokusunda serbest oksijen radikallerinin ölçüldüğü çalışmamızda, Prilokain grubunda diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek bulunurken, timokinon verilen gruplarla Sham grubu arasında anlamlı bir fark bulunamadı.

Ayrıca kalp ve beyin dokusunda biyokimyasal incelemelerde bulunduğumuz çalışmamızda, CK-MB ve myoglobin düzeyleri karşılaştırıldı. İncelemelerimiz sonucunda CK-MB ve miyoglobin düzeyleri, Prilokain grubunda diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu. Ayrıca timokinon verilen gruplarla Sham grubu arasında anlamlı fark bulunamadı. Bu sonuçlar ışığında, prilokain toksisitesine bağlı olan myokard ve nöronal hasarının timokinon tarafından engellenebileceği ve azaltılabileceğini gösterdik.

Timokinonun antioksidan özelliğinin hangi mekanizmalar üzerinden gösterdiğini araştıran çeşitli çalışmalarda, timokinonun NFκB yolundaki gen ekspresyonlarını modüle ettiği, bunun sonucunda proinflamatuar sitokin

ekspresyonlarını engelleyerek nöroinflamasyonu önlediği, ayrıca apoptozisi indükleyerek antineoplastik özellik gösterdiği bildirilmiştir (198,199,200).

Beyin dokusunda immünohistokimyasal incelemelerde bulunduğumuz çalışmamızda, beynin değişik bölümlerinde ödem, apoptozis ve inflamasyon biyomarkerları olan proteinlerin ekspresyonları değerlendirildi. Çalışmamız sonucunda timokinonun, prilokain toksisitesi sonucunda ödeme bağlı artan AQP4 ekspresyonunu azalttığını, ayrıca NFκB yolağı proteinleri olan p50 ve p65 ekspresyonlarındaki artışı da düşürdüğünü gösterdik.

Apoptotik hücrelerde oluşan ve apoptozun spesifik belirteçlerinden birisi olan caspase-3'de yapılan çalışmalarda sık araştırılan parametrelerden biridir. Timokinonun caspase-3 düzeyi üzerine etkisi araştıran çalışmalarda, timokinonun caspase-3 seviyesini anlamlı derecede düşürdüğü gösterilmiştir (201-203). Timokinonun cleaved caspase-3 ekspresyonu üzerinde etkisinin incelendiği bir çalışmada, timokinonun cleaved caspase-3 ekspresyonunu anlamlı derecede düşürdüğü gösterilirken (204), bizim çalışmamızda cleaved caspase-3 ekspresyonunda herhangi bir farklılık gözlemlenmedi. Cleaved caspase-3 ekspresyonunda farkın olmaması oluşturulan epilepsi modelinde, ödem ve inflamatuvar yanıtın gelişmesine rağmen hücrelerin ölüm yolağına girişinde bir etken olmadığını göstermektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Diğer lokal anestezikler gibi prilokain de yüksek dozlarda uygulandığında toksik etki göstermektedir. LAST'ın klinik prezentasyonu genel olarak kardiyotoksisite, nörotoksisite ve methemoglobinemidir. Ancak ratlarda prilokaine bağlı methemoglobinemi oluşmamaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda kardiyoprotektif etkinliği gösterilen timokinonun, aritmi ve kardiyak arrest süresini uzatarak prilokain toksisitesini engellemede de etkin olduğunu, antiaritmik ve kardiyoprotektif özellik gösterdiğini sonuçlarımızla destekledik. Ayrıca timokinon, nöbet aktivitesi ve izoelektrik EEG oluşumunu geciktirmesiyle timokinonun nöroprotektif ve antiepileptik özellikte olduğunu belirledik.

İmmünohistokimyasal incelemeler yaptığımız çalışmamızda LAST'a bağlı nörotoksisite bulgularını belirlemek için, beyin ödemi belirteci AQP4 ve nöroinflamasyon belirteçleri p50, p65 düzeylerine bakıldı. Çalışmamız sonucunda timokinonun AQP4, p50 ve p65 ekspresyonlarını belirgin derecede azalttığını, böylelikle nörotoksisiteye bağlı oluşan beyin ödemi ve nöroinflamasyonu önlemede etkin olduğunu gösterdik.

Doku düzeyindeki hasarı belirlemek için çalışmamızda, serum CK-MB ve Miyoglobin ile kalp ve beyin doku örneklerinden Total Antioksidan Kapasitesi düzeylerine bakıldı. Timokinonun serum CK-MB ve Miyoglobin düzeylerini belirgin derecede düşürdüğü ve Total Antioksidan Kapasitesi düzeyini arttırdığını, bunun sonucunda timokinonun antioksidan özellik gösterdiğini belirlemiş olduk.

Sonuç olarak: Çalışmamızın bulguları doğrultusunda timokinonun, lokal anestezik toksisitesinde kardiyoprotektif ve antiaritmik, nöroprotektif ve antiepileptik etkinlik gösterdiğini bulgularımızla desteklemiş olduk. Timokinon bu etkinliğini lipit yapıda ve antioksidan özellikte olmasından dolayı göstermiş olabilir. Ayrıca lokal anestezik toksisitesi tedavisinde geleneksel olarak lipit solüsyonlarının kullanılmasından dolayı, timokinonun da lipit yapısında olması nedeniyle tedaviye alternatif olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Ancak timokinonun klinik kullanımda uygulanması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. ÖZET

Prilokain Toksisitesinde Timokinonun Koruyucu Etkinliği

Prilokain lokal anestezi amacıyla çok yaygın olarak kullanılmakta ve terapatik dozlarda güvenle kullanılan amid tipi lokal anestetiktir. Karaciğerde metabolize olur ve toksisitesi çok azdır. Ancak yüksek dozlarda intravenöz rejyonel anestezi için kullanıldığı zaman santral ve kardiyak toksik etkilere neden olabilmektedir. Timokinon (TQ), Nigella sativa tohumundan elde edilen güçlü antioksidandır. TQ, doksorubisine bağlı gelişen kardiyotoksisiye karşı koruyucu etki göstermektedir. Ayrıca timokinonun penisilin ile indüklenen epilepsiyi önlediği gösterilmiştir. Bu çalışmada, prilokainin neden olduğu nörotoksisiteye bağlı epileptiform aktivitede ve kardiyotoksisitede TQ'nun etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada 350-450 g ağırlığında 40 erkek Wistar rat kullanıldı. Sıçanlar rastgele olarak Sham (S, n=10), Prilokain (P, n=10), TQ (T, n=10) ve Prilokain + TQ (TP, n=10) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Çalışmada sıçanlara genel anestezi altında, gerekli kateterizasyon ve elektrot yerleştirme işlemleri yapıldıktan sonra EEG, EKG ve hemodinamik monitörizasyonu sağlandı. Deney süresince EEG, EKG ve invazif kan basıncı kayıtları alındı. Hayvanların sakrifikasyon sonrasında biyokimyasal ve immünohistokimyasal incelemeler için kalp ve beyin dokuları çıkarıldı, serum örnekleri alındı.

Çalışmanın sonucunda timokinonun; prilokaine bağlı nörotoksisite sonucu görülen epileptiform aktivite ve izoelektrik EEG oluşumunu geciktirdiği, kardiyotoksisite belirtileri olan ilk aritmi ve asistol görülmesi için gereken prilokain miktarını da anlamlı derecede arttırdığı bulundu. Ayrıca timokinonun Total Antioksidan Kapasitesi düzeyini arttırdığını, nörotoksisiteye bağlı beyin ödemi ve nöroinflamasyonun belirteçleri olan AQP4, p50 ve p65 ekspresyonlarını belirgin derecede azalttığı görüldü.

Sonuç olarak; prilokain toksisitesinde timokinon; kardiyoprotektif, antiaritmik, nöroprotektif ve antiepileptik özellik göstermiştir. Bu bilgiler doğrultusunda lipit yapısında olan timokinonun, lokal anestezik toksisitesinde lipit

solüsyonlarına alternatif olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Ancak timokinonun klinik kullanımıyla ilgili ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Prilokain, Timokinon, Epileptiform, Kardiyotoksisite, Nörotoksisite

8. ABSTRACT

Protective Effectiveness Of Thymoquinone in Prilocaine Toxicity

Prilocaine is widely used for local anesthesia and amide type local anesthetic is used safely at therapeutic doses. It is metabolized in the liver and its toxicity is very low. However, when used in high doses for intravenous regional anesthesia, it may cause central and cardiac toxic effects. Thymoquinone (TQ) is a potent antioxidant derived from the Nigella sativa seed. TQ has a protective effect against doxorubicin-induced cardiotoxicity. In addition, TQ has been shown to prevent penicillin-induced epilepsy. The aim of this study was to investigate the efficacy of TQ in prilocaine induced central nervous system (CNS) and cardiovascular toxicity.

40 male Wistar rats weighing 350-450 g were used in the study. Rats were randomly divided into 4 groups: Sham (S, n=10), Prilocaine (P, n=10), TQ (T, n=10) and Prilocaine + TQ (TP, n=10). EEG, ECG and haemodynamic monitoring were performed in rats under general anesthesia after necessary catheterization and electrode placement procedures. EEG, ECG and invasive blood pressure were recorded during the experiment. Heart and brain tissues were removed for biochemical and immunohistochemical studies after sacrification of animals, and serum samples taken.

At the end of the study, it was found that thymoquinone significantly delayed epileptiform activity and isoelectric EEG formation due to prilocaine-induced neurotoxicity, and significantly increased the amount of prilocaine required for first arrhythmia and asystole with signs of cardiotoxicity. In addition, thymoquinone was found to increase Total Antioxidant Capacity levels and AQP4, p50 and p65 expressions, which are brain edema and neuroinflammation markers caused by neurotoxicity, were significantly reduced.

As a result, thymoquinone in prilocaine toxicity; showed cardioprotective, antiarrhythmic, neuroprotective and antiepileptic properties. In this information, we think that thymoquinone, which is a lipid structure, can be used as an

alternative to lipid solutions in local anesthetic toxicity. However, further studies are needed on the clinical use of thymoquinone.

Key Words: Prilocaine, Thymoquinone, Epileptiform, Cardiotoxicity, Neurotoxicity

9. KAYNAKLAR

1. Sarıtaş A. Aksiller yaklaşımla uygulanan brakiyal pleksusu blokajında prilokain ile levobupivakain'in etkilerinin karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Eskişehir2009.
2. Erdine S. Rejyonel Anestezi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2005; 1-3, 7-43, 83-85, 93-95, 104-108.
3. Akhondian J, Parsa A, Rakhshande H. The effect of nigella sativa l. (black cumin seed)on intractable pediatric seizures. Med Sci Monit 2007; 13(12): 555-9.
4. Nagi MN, Al-Shabanah OA, Hafez MM, Sayed-Ahmed MM. Thymoquinonesupplementation attenuates cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in rats.J Biochem Mol Toxicol 2011; 25(3): 135-42.
5. Gulec S, Aydın Y, Uzuner K, Yelken B, Senturk Y. Effects of clonidinepretreatment on bupivacaine and ropivacaine cardiotoxicity in rats. Eur J Anaesthesiol 2004;21(3):205-9.
6. Sarıkartal A. Farklı etken maddeleri içeren lokal anesteziklerin etkilerinin karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi,Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş Ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, Ankara2018.
7. Yeter H. Rejyonel İntravenöz Anestezide Prilokaine Deksmedetomidin İlavesinin Etkileri. Uzmanlık Tezi, Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi I. Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kliniği, İstanbul2007.
8. El-Boghdadly K, Pawa A, Chin KJ. Local anesthetic systemic toxicity: current perspectives. Local Reg Anesth 2018;11:35-44.
9. Neal JM, Bernards CM, Butterworth JF, Di Gregorio G, Drasner K, Hejtmanek MR et al. ASRA Practice Advisory on Local Anesthetic Systemic Toxicity. Reg Anesth Pain Med 2010;35(2):152-61.
10. Auroy Y, Benhamou D, Bargues L, Ecoffey C, Falissard B, Mercier FJ, et al. Major complications of regional anesthesia in France: The SOS Regional Anesthesia Hotline Service. Anesthesiology 2002; 97(5): 1274-80.
11. Brown DL, Ransom DM, Hall JA, Leicht CH, Schroeder DR, Offord KP. Regional anesthesia and local anesthetic-induced systemic toxicity: seizure frequency and accompanying cardiovascular changes. Anesth Analg 1995; 81(2): 321-8.
12. El-Boghdadly K, Chin KJ. Local anesthetic systemic toxicity: Continuing Professional Development. Can J Anaesth 2016;63(3):330-49.
13. Fencl JL. Local Anesthetic Systemic Toxicity: Perioperative Implications. AORN J 2015;101(6):697-700.
14. Safety Committee of Japanese Society of Anesthesiologists. Practical guide for the management of systemic toxicity caused by local anesthetics. J Anesth 2019;33(1):1-8.
15. Ok SH, Hong JM, Lee SH, Sohn JT. Lipid Emulsion for Treating Local Anesthetic Systemic Toxicity. Int J Med Sci 2018;15(7):713-22.

16. Felice K, Schumann H. Intravenous Lipid Emulsion for Local Anesthetic Toxicity: A Review of the Literature. J Med Toxicol 2008;4(3):184-91.
17. Manassero A, Fanelli A. Prilocaine hydrochloride 2% hyperbaric solution for intrathecal injection: a clinical review. Local Reg Anesth 2017;10:15-24.
18. Khan MA. Chemical composition and medicinal properties of Nigella sativa Linn. Int Immunopharmacol 1999; 7(1): 15-35.
19. Baytop T. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, Geçmişte ve Bugün (II. Baskı). Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 1999; 480.
20. Salem ML. Immunomodulatory and immunotherapeutic properties of the Nigella sativa L. seed. Int Immunopharmacol 2005; 5(13-14): 1749-70.
21. Kaya MS, Kara M, Özbek H. Çörek otu (Nigella sativa) tohumunun insan hücresel bağışıklık sisteminin $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ hücreleri ve toplam lökosit sayısı üzerine etkileri. Genel Tıp Derg 2003; 13(3): 109-12.
22. Forouzanfar F, Bazzaz BS, Hosseinzadeh H. Black cumin (Nigella sativa) and its constituent (thymoquinone): a review on antimicrobial effects. Iran Iran J Basic Med Sci 2014; 17(12): 929-38.
23. Darakhshan S, Bidmeshki, Pour A, Hosseinzadeh Colagar A, Sisakhtnezhad S. Thymoquinone and its therapeutic potentials. Pharmacol Res 2015; 95-96:138-58.
24. El-Tahir KEH, Bakeet DM. The black seed Nigella sativa L. a min for multicure: a plea for urgent clinical evaluation of its volatile oil. JTU Med Sc2006; 1(1):1-19.
25. Hajhashemi V, Ghannadi A, Jafarabadi H. Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and antiinflammatory drug. Phytother Res 2004; 18(3): 195-9.
26. Akgül A. Baharat Bilimi ve Teknolojisi. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, No: 15, Ankara 1993.
27. Ghosheh OA, Houdi AA, Crooks PA. High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (Nigella sativa L). J Pharm Biomed Anal 1999;19(5):757-62.
28. Hosseinzadeh H, Parvardeh S. Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of Nigella sativa seeds, in mice. Phytomedicine 2004; 11(1): 56-64.
29. Ragheb A, Attia A, Eldin WS, Elbarbry F, Gazarin S, Shoker A. The protective effect of thymoquinone, an anti-oxidant and anti-inflammatory agent, against renal injury: a review. Saudi J Kidney Dis Transpl 2009; 20(5): 741-52.
30. Arslan SO, Gelir E, Armutcu F, Coşkun O, Gurel A, Sayan H, et al. The protective effect of thymoquinone on ethanol-induced acute gastric damage in the rat. Nutr Res 2005; 25(7): 673-80.
31. Salmani, JM, Asghar S, Lv H, Zhou J. Aqueous solubility and degradation kinetics of the phytochemical anticancer thymoquinone; probing the effects of solvents, pH and light. Molecules 2014;19(5): 5925-39.
32. Alkharfy KM, Ahmad A, Khan RM, Al-Shagha WM. Pharmacokinetic plasma behaviors of intravenous and oral bioavailability of thymoquinone in a rabbit model. Eur J Drug Metab Pharmacokinet 2015;40(3): 319-23.
33. Badary OA, Taha RA, Gamal el-Din AM, Abdel-Wahab MH. Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. Drug Chem Toxicol 2003; 26(2): 87-98.

34. Bauer K, Garbe D, Surburg H. Common Fragrance and Flavor Materials. Preparation, Properties and Uses, Wiley-VCH, Weinheim 2001.

35. Buckingham J. Dictionary of Natural Products on DVD, Chapman and Hall/CRC. Boca Raton, FL, USA 2008.

36. El-Dakhakhny M, Barakat M, El-Halim MA, Aly SM. Effects of Nigella sativa oil on gastric secretion and ethanol induced ulcer in rats. J Ethnopharmacol 2000; 72(1-2): 299-304.

37. Khalife KH, Lupidi G. Nonenzymatic reduction of thymoquinone in physiological conditions. Free Radic Res 2007; 41(2): 153-61.

38. Yildiz F, Coban S, Terzi A, Ates M, Aksoy N, Cakir H, et al. Nigella sativa relieves the deleterious effects of ischemia reperfusion injury on liver. World J Gastroenterol 2008; 14(33): 5204-9.

39. Bourgou S, Pichette A, Marzouk B, Legoult J. Bioactivities of black cumin essential oil and its main terpenes from Tunisia. S Afr J Bot 2010; 76(2): 210-6.

40. Daba MH, Abdel-Rahman MS. Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. Toxicol Lett 1998; 95(1): 23-9.

41. Kanter M, Meral I, Dede S, Gunduz H, Cemek M, Ozbek H et al. Effects of Nigella sativa L. and Urtica dioica L. on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and some liver enzymes in CCl4-treated rats. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 2003; 50(5): 264-8.

42. El-Dakhakhny M, Madi NJ, Lembert N, Ammon HP. Nigella sativa oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. J Ethnopharmacol 2002; 81(2): 161-4.

43. Chakrabarty A, Emerson MR, LeVine SM. Heme oxygenase-1 in SJL mice with experimental allergic encephalomyelitis. Mult Scler 2003; 9(4): 372-81.

44. Mansour M, Tornhamre S. Inhibition of 5-lipoxygenase and leukotriene C4 synthase in human blood cells by thymoquinone. J Enzyme Inhib Med Chem 2004; 19(5): 431-6.

45. El Mezayen R, El Gazzar M, Nicolls MR, Marecki JC, Dreskin SC, Nomiyama H. Effect of thymoquinone on cyclooxygenase expression and prostaglandin production in a mouse model of allergic airway inflammation. Immunol Lett 2006; 106(1): 72-81.

46. El Gazzar MA, El Mezayen R, Nicolls MR, Dreskin SC. Thymoquinone attenuates proinflammatory responses in lipopolysaccharide-activated mast cells by modulating NF-kappaB nuclear transactivation. Biochim Biophys Acta 2007; 1770(4): 556-64.

47. Gali-Muhtasib H, Diab-Assaf M, Boltze C, Al-Hmaira J, Hartig R, Roessner A et al. Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. Int J Oncol 2004; 25(4): 857-66.

48. Islam SN, Begum P, Ahsan T, Huque S, Ahsan M. Immunosuppressive and cytotoxic properties of Nigella sativa. Phytother Res 2004; 18(5): 395-8.

49. Ivankovic S, Stojkovic R, Jukic M, Milos M, Milos M, Jurin M. The antitumor activity of thymoquinone and thymohydroquinone in vitro and in vivo. Exp Oncol 2006; 28(3): 220-4.

50. Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D, Sivanandam A, Tejwani S, Menon M et al. Androgen receptor and E2F-1 targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. Cancer Res 2007; 67(16): 7782-8.

51. Roepke M, Diestel A, Bajbouj K, Walluscheck D, Schonfeld P, Roessner A, et al. Lack of p53 augments thymoquinone-induced apoptosis and caspase activation in human osteosarcoma cells. Cancer Biol Ther 2007; 6(2): 160-9.

52. Aljabre SH, Randhawa MA, Akhtar N, Alakloby OM, Alqurashi AM, Aldossary A. Antidermatophyte activity of ether extract of Nigella sativa and its active principle, thymoquinone. J Ethnopharmacol2005; 101(1-3): 116-9.

53. Mahmoud MR, El-Abhar HS, Saleh S. The effect of Nigella sativa oil against the liver damage induced by Schistosoma mansoni infection in mice. J Ethnopharmacol2002; 79(1): 1-11.

54. Akhtar N, Alakloby OM, Aljabre SH, Alqurashi AM, Randhawa MA. Comparison of antifungal activity of thymoquinone and amphotericin B against Fusarium solani in vitro. Scientific Journal of King Faisal University (Basic and Applied Sciences) 2007; 8(2): 137-43.

55. Halawani E. Antibacterial activity of thymoquinone and thymohydroquinone of Nigella sativa L. and their interaction with some antibiotics. Advan Biol Res 2009; 3(5-6): 148-52.

56. Pari L, Sankaranarayanan C. Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. Life Sci 2009; 85(23-26): 830-4.

57. Fararh KM, Shimizu Y, Shiina T, Nikami H, Ghanem MM, Takewaki T. Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters. Res Vet Sci 2005; 79(3): 219-23.

58. Kanter M, Akpolat M, Aktas C. Protective effects of the volatile oil of Nigella sativa seeds on beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats: a light and electron microscopic study. J Mol Histol 2009; 40(5-6): 379-85.

59. Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of Nigella sativa. Phytother Res 2003; 17(4): 299-305.

60. Al-Majed AA, Daba MH, Asiri YA, Al-Shabanah OA, Mostafa AA, El-Kashef HA. Thymoquinone-induced relaxation of guinea-pig isolated trachea. Res Commun Mol Pathol Pharmacol 2001; 110(5-6): 333-45.

61. Zaoui A, Cherrah Y, Alaoui K, Mahassine N, Amarouch H, Hassar M. Effects of Nigella sativa fixed oil on blood homeostasis in rat. J Ethnopharmacol 2002; 79(1): 23-6.

62. Al-Naqeep G, Ismail M, Yazan SY. Effects of thymoquinone rich fraction and thymoquinone on plasma lipoprotein levels and hepatic low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes expression. J Funct Foods 2009; 1(3): 298-303.

63. Ismail M, Al-Naqeep G, Chan KW. Nigella sativa thymoquinone-rich fraction greatly improves plasma antioxidant capacity and expression of antioxidant genes in hypercholesterolemic rats. Free Radic Biol Med 2010; 48(5): 664-72.

64. Güllü EB, Avcı G. Effects of thymoquinone on plasma leptin, insulin, thyroid hormones and lipid profile in rats fed a fatty diet. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2013; 19 (6): 1011-6.

65. El-Abhar HS, Abdallah DM, Saleh S. Gastroprotective activity of Nigella sativa oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia/reperfusion in rats. J Ethnopharmacol 2003; 84(2-3): 251-8.

66. Kanter M, Demir H, Karakaya C, Ozbek H. Gastroprotective activity of Nigella sativa L oil and its constituent, thymoquinone against acute alcohol-induced gastric mucosal injury in rats. World J Gastroenterol 2005;11(42): 6662-6.

67. Mahgoub AA. Thymoquinone protects against experimental colitis in rats. Toxicol Lett 2003; 143(2): 133-43.

68. Kanter M. Nigella sativa and derived thymoquinone prevents hippocampal neurodegeneration after chronic toluene exposure in rats. Neurochem Res 2008; 33(3): 579-88.

69. Raza M, Alghasham AA, Alorainy MS, El-Hadiyah TM. Beneficial interaction of thymoquinone and sodium valproate in experimental models of epilepsy: reduction in hepatotoxicity of valproate. Sci Pharm 2006; 74(4): 159-73.

70. Al-Majed AA, Al-Omar FA, Nagi MN. Neuroprotective effects of thymoquinone against transient forebrain ischemia in the rat hippocampus. Eur J Pharmacol 2006; 543(1-3): 40-7.

71. Isik AF, Kati I, Bayram I, Ozbek H. A new agent for treatment of acute respiratory distress syndrome: thymoquinone. An experimental study in a rat model. Eur J Cardiothorac Surg 2005; 28(2): 301-5.

72. El Gazzar M, El Mezayen R, Nicolls MR, Marecki JC, Dreskin SC. Downregulation of leukotriene biosynthesis by thymoquinone attenuates airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. Biochim Biophys Acta 2006; 1760(7): 1088-95.

73. El Gazzar M, El Mezayen R, Marecki JC, Nicolls MR, Canastar A, Dreskin SC. Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. Int Immunopharmacol 2006;6(7): 1135-42.

74. Badary OA, Nagi MN, al-Shabanah OA, al-Sawaf HA, al-Sohaibani MO, alBekairi AM. Thymoquinone ameliorates the nephrotoxicity induced by cisplatin in rodents and potentiates its antitumor activity. Can J Physiol Pharmacol 1997; 75(12): 1356-61.

75. Sayed-Ahmed MM, Nagi MN. Thymoquinone supplementation prevents the development of gentamicin-induced acute renal toxicity in rats. Clin Exp Pharmacol Physiol 2007; 34(5-6): 399-405.

76. Hadjzadeh MA, Mohammadian N, Rahmani Z, Rassouli FB. Effect of thymoquinone on ethylene glycol-induced kidney calculi in rats. Urol J 2008; 5(3): 149-55.

77. El-Mahmoudy A, Matsuyama H, Borgan MA, Shimizu Y, El-Sayed MG, Minamoto N et al. Thymoquinone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase in rat macrophages. Int Immunopharmacol 2002; 2(11): 1603-11.

78. el Tahir KE, Ashour MM, al-Harbi MM. The cardiovascular actions of the volatile oil of the black seed (Nigella sativa) in rats: elucidation of the mechanism of action. Gen Pharmacol 1993; 24(5): 1123-31.

79. Nagi MN, Mansour MA. Protective effect of thymoquinone against doxorubicin induced cardiotoxicity in rats: a possible mechanism of protection. Pharmacol Res 2000; 41(3): 283-9.

80. Mansour MA. Protective effects of thymoquinone and desferrioxamine against hepatotoxicity of carbon tetrachloride in mice. Life Sci 2000; 66(26): 2583-91.

81. Nagi MN, Almakki HA. Thymoquinone supplementation induces quinone reductase and glutathione transferase in mice liver: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. Phytother Res 2009, 23(9): 1295-8.

82. Alsaif MA. Effect of thymoquinome on ethanol-induced hepatotoxicity in Wistar rats. J Med Sci 2007; 7: 1164-70.

83. Kirui PK, Cameron J, Benghuzzi HA, Tucci M, Patel R, Adah F, et al. Effects of sustained delivery of thymoqiunone on bone healing of male rats. Biomed Sci Instrum 2004; 40: 111-6.

84. Tekeoglu I, Dogan A, Ediz L, Budancamanak M, Demirel A. Effects of thymoquinone (volatile oil of black cumin) on rheumatoid arthritis in rat models. Phytother Res 2007; 21(9): 895-7.

85. Enomoto S, Asano R, Iwahori Y, Narui T, Okada Y, Singab AN, et al. Hematological studies on black cumin oil from the seeds of Nigella sativa L. Biol Pharm Bull 2001; 24 (3): 307-10.

86. Uz E, Uz B, Selcoki Y, Reyhan B, Kaya A, Faruk TH, et al. Cardioprotective effects of Nigella sativa oil on cyclosporine induced cardiotoxicity in rats. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2008;103(6):574-80.

87. Radad K, Moldzio R, Taha M, Rausch WD. Thymoquinone protects dopamin-ergic neurons against MPP^+ and rotenone. Phytother Res 2009;23(5):696-700.

88. Gilhotra N, Dhingra D. Thymoquinone produced antianxietylike effects in mice through modulation of GABA and NO levels. Pharmacol Rep 2011;63(3):660-9.

89. Radad K, Hassanein K, Al-Shraim M, Moldzio R, Rausch WD. Thymoquinone ameliorates lead-induced brain damage in Sprague Dawley rats. Exp Toxicol Pathol2014; 66(1):13-7.

90. Alhebshi AH, Gotoh M, Suzuki I. Thymoquinone protects cultured rat primary neurons against amyloid β-induced neurotoxicity Biochem Biophys Res Commun 2013;433(4):362-7.

91. Maxwell SR. Antioxidant vitamin supplements: update of their potential benefits and possible risks. Drug Saf 1999; 21(4): 253–66.

92. Kuhn MA. Oxygen free radicals and antioxidants. Am J Nurs 2003; 103(4): 58-62.

93. Mollazadeh H, Hosseinzadeh H. The protective effect of Nigella sativa against liver injury: a review. Iran J Basic Med Sci 2014;17(12):958-66.

94. Awad AS, Kamel R, SheriefMA. Effect of thymoquinone on hepatorenal dysfunction and alteration of CYP3A1 and spermidine/spermine N-1-acetyl-transferase gene expression induced by renal ischaemiareperfusion in rats. J Pharm Pharmacol 2011;63(8):1037-42.

95. Güllü EB, Avcı G. Timokinon: Nigella Sativa'nın biyoaktif komponenti. Kocatepe Vet J 2013; 6(1): 51-61.

96. Zubair H, Khan HY, Sohail A, Azim S, Ullah MF, Ahmad A, et al. Redox cycling of endogenous copper by thymoquinone leads to ROS-mediated DNA breakage and consequent cell death: putative anticancer mechanism of antioxidants. Cell Death Dis 2013; 6;4:e660.

97. Racoma IO, Meisen WH, Wang QE, Kaur B, Wani AA. Thymoquinone inhibits autophagy and induces cathepsin-mediated, caspaseindependent cell death in glioblastoma cells. PLoS One 2013; 9;8(9):72882.

98. Peng L, Liu A, Shen Y, Xu HZ, Yang SZ, Ying XZ, et al. Antitumor and anti-angiogenesis effects of thymoquinone on osteosarcoma through the NF-κB pathway. Oncol Rep 2013;29(2):571-8.

99. El-Mahdy MA, Zhu Q, Wang QE, Wani G, Wani AA. Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null yeloblastic leukemia HL-60 cells. Int J Cancer 2005; 117(3):409-17.

100. Shoıeb AM, Elgayyar M, Dudrıck PS, Bell JL, Tıthof PK. In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. Int J Oncol 2003;22(1):107-13.

101. Torres MP, Ponnusamy MP, Chakraborty S, Smith LM, Das S, Arafat HA, et al. Effects of Thymoquinone in the Expression of Mucin 4 in Pancreatic Cancer Cells: Implications for the Development of Novel Cancer Therapies. Mol Cancer Ther. 2010;9(5):1419-31.

102. Badary OA, Gamal El-Din AM. Inhibitory effects of thymoquinone against 20-methylcholanthrene-induced fibrosarcoma tumorigenesis. Cancer Detect Prev 2001;25(4):362-8.

103. Woo CC, Kumar AP, Sethi G, Tan KH. Thymoquinone: potential cure for inflammatory disorders and cancer. Biochem Pharmacol 2012;83(4):443-51.

104. Shafiq H, Ahmad A, Masud T, Kaleem M. Cardio-protective and anti-cancer therapeutic potential of Nigella sativa. Iran J Basic Med Sci 2014;17(12):967-79.

105. Hayat K, Asim MB, Nawaz M, Li M, Zhang L, Sun N. Ameliorative effect of thymoquinone on ovalbumin-induced allergic conjunctivitis in Balb/c mice. Curr Eye Res 2011;36(7):591-8.

106. Basarslan F, Yilmaz N, Ates S, Ozgur T, Tutanc M, Motor VK, et al. Protec-tive effects of thymoquinone on vancomycin induced nephrotoxicity in rats. Hum Exp Toxicol 2012;31(7):726-33.

107. Zafeer MF, Waseem M, Chaudhary S, Parvez S. Cadmiuminduced hepatotoxicity and its abrogation by thymoquinone. J Biochem Mol Toxicol 2012;26(5):199-205.

108. Aycan İÖ, Tüfek A, Tokgöz O, Evliyaoğlu O, Fırat U, Kavak GÖ, et al. Thymoquinone treatment against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. Int J Surg 2014;12 (3):213-8.
109. Aycan İÖ, Tokgöz O, Tüfek A, Alabalık U, Evliyaoğlu O, Turgut H et al. The use of thymoquinone in nephrotoxicity related to acetaminophen. Int J Surg 2015;13:33-7.
110. Aycan İÖ, Elpek Ö, Akkaya B, Kıraç E, Tuzcu H, Kaya S, et al. Diclofenac induced gastrointestinal and renal toxicity is alleviated by thymoquinone treatment. Food Chem Toxicol 2018;118:795-804.
111. Meeren HK, Pijn JP, Van Luijtelaar EL, Coenen AM, Lopes da Silva FH. Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. J Neurosci 2002;22(4):1480-95.
112. Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 6thEdition. Academic Press 2006.
113. Badaut J, Lasbennes F, Magistretti PJ, Regli L. Aquaporins in brain: distribution, physiology and pathophysiology. J Cereb Blood Flow Metab 2002;22(4):367-78.
114. Rosenberg PH, Zou J, Heavner JE.. Comparison of acute central nervou system and cardiovascular toxicity of 2-chloroprocaine and prilocaine in the rat. Acta Anaesthesiol Scand 1993;37(8):751-5.
115. Hollingworth A, Wallace WA, Dabir R, Ellis SJ, Smith AF. Comparison of bupivacaine and prilocaine used in Bier block-a double blind trial. Injury 1982;13(4):331-6.
116. Kern C, Gamulin Z. Generalised convulsions after intravenous regional anaesthesia with prilocaine. Anaesthesia 1994;49(7):642-3.
117. Machado HS, Bastos RS. Inadequate tourniquet inflation associated with a case of prilocaine toxicity. Eur J Anaesthesiol 1998;15(2):234-6.
118. McGlone R, Heyes F, Harris P. The use of muscle relaxant to supplement local anaesthetics for Bier's blocks. Arch Emerg Med 1988;5(2):79-85.
119. Heavner JE. Cardiac Toxicity of Local Anesthetics in the Intact Isolated Heart Model: A Review. Reg Anesth Pain Med 2002;27(6):545-55.
120. Copeland SE, Ladd LA, Gu XQ, Mather LE. The Effects of General Anesthesia on the Central Nervous and Cardiovascular System Toxicity of Local Anesthetics. Anesth Analg 2008;106(5):1429-39.
121. Gitman M, Barrington MJ. Local Anesthetic Systemic Toxicity A Review of Recent Case Reports and Registries. Reg Anesth Pain Med 2018;43(2):124-30.
122. Litz RJ, Roessel T, Heller AR, Stehr SN. Reversal of Central Nervous System and Cardiac Toxicity After Local Anesthetic Intoxication by Lipid Emulsion Injection. Anesth Analg 2008;106(5):1575-7.
123. Karabiber H, Selimoglu MA, Cetin M, Tekin S, Gurbuz S. Acute Central Nervous System Depressıon After Subcutaneous Use Of Prılocaıne In An Infant. J Emerg Med 2012;42(4):95-6.
124. Seif AA. Nigella sativa attenuates myocardial ischemic reperfusion injury in rats. J Physiol Biochem 2013;69(4):937-44.

125. Norouzi F, Abareshi A, Asgharzadeh F, Beheshti F, Hosseini M, Farzadnia M, et al. The effect of Nigella sativa on inflammation-induced myocardial fibrosis in male rats. Res Pharm Sci 2017;12(1):74-81.

126. Hebi M, Zeggwagh N, Hajj L, Bouhali BE, Eddouks M. Cardiovascular effect of Nigella sativa L. Aqueous Extract in Normal Rats. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets 2016;16(1):47-55.

127. Shabana A, El-Menyar A, Asim M, Al-Azzeh H, Al Thani H. Cardiovascular benefits of black cumin (Nigella sativa). Cardiovasc Toxicol 2013;13(1):9-21.

128. Beheshti F, Khazaei M, Hosseini M. Neuropharmacological effects of Nigella sativa. Avicenna J Phytomed 2016;6(1):104-16.

129. Al-Naggar TB, Gómez-Serranillos MP, Carretero ME, Villar AM. Neuropharmacological activity of Nigella sativa L. extracts. J Ethnopharmacol 2003;88(1):63-8.

130. Akhtar M, Maikiyo AM, Najmi AK, Khanam R, Mujeeb M, Aqil M. Neuroprotective effects of chloroform and petroleum ether extracts of Nigella sativa seeds in stroke model of rat. J Pharm Bioallied Sci 2013;5(2):119-25.

131. Hobbenaghi R, Javanbakht J, Sadeghzadeh Sh, Kheradmand D, Abdi FS, Jaberi MH et al. Neuroprotective effects of Nigella sativa extract on cell death in hippocampal neurons following experimental global cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. J Neurol Sci 2014;337(1-2):74-9.

132. Islam MH, Ahmad IZ, Salman MT. Neuroprotective effects of Nigella sativa extracts during germination on central nervous system. Pharmacogn Mag 2015;11(Suppl 1):182-9.

133. Akhtar M, Imam SS, Afroz Ahmad M, Najmi AK, Mujeeb M, Aqil M. Neuroprotective study of Nigella sativa-loaded oral provesicular lipid formulation: in vitro and ex vivo study. Drug Deliv 2014;21(6):487-94.

134. Butt UJ, Shah SAA, Ahmed T, Zahid S. Protective effects of Nigella sativa L. seed extract on lead induced neurotoxicity during development and early life in mouse models. Toxicol Res (Camb) 2017;7(1):32-40.

135. Khazdair MR. The Protective Effects of Nigella sativa and Its Constituents on Induced Neurotoxicity. J Toxicol 2015;2015:841823.

136. Malik T, Hasan S, Pervez S, Fatima T, Haleem DJ. Nigella sativa Oil Reduces Extrapyramidal Symptoms (EPS)- Like Behavior in Haloperidol-Treated Rats. Neurochem Res 2016;41(12):3386-98.

137. Kanter M. Protective Effects of Nigella sativa on the Neuronal Injury in Frontal Cortex and Brain Stem After Chronic Toluene Exposure. Neurochem Res 2008;33(11):2241-9.

138. Seghatoleslam M, Alipour F, Shafieian R, Hassanzadeh Z, Edalatmanesh MA, Sadeghnia HR, et al. The effects of Nigella sativa on neural damage after pentylenetetrazole induced seizures in rats. J Tradit Complement Med 2015;6(3):262-8.

139. Ilhan A, Gurel A, Armutcu F, Kamisli S, Iraz M. Antiepileptogenic and antioxidant effects of Nigella sativa oil against pentylenetetrazol-induced kindling in mice. Neuropharmacology 2005;49(4):456-64.

140. Noor NA, Aboul Ezz HS, Faraag AR, Khadrawy YA. Evaluation of the antiepileptic effect of curcumin and Nigella sativa oil in the pilocarpine model of epilepsy in comparison with valproate. Epilepsy Behav 2012;24(2):199-206.

141. Raza M, Alghasham AA, Alorainy MS, El-Hadiyah TM. Potentiation of Valproate-induced Anticonvulsant Response by Nigella sativa Seed Constituents: The Role of GABA Receptors.Int J Health Sci (Qassim) 2008;2(1):15-25.

142. Arafa NM, Abdel-Rahman M, El-khadragy MF, Kassab RB. Evaluation of the Possible Epileptogenic Activity of Ciprofloxacin: The Role of Nigella sativa on Amino Acids Neurotransmitters. Neurochem Res 2013;38(1):174-85.

143. Farkhondeh T, Samarghandian S, Borji A. An overview on cardioprotective and anti-diabetic effects of thymoquinone. Asian Pac J Trop Med 2017;10(9):849-54.

144. Xiao J, Ke ZP, Shi Y, Zeng Q, Cao Z. The cardioprotective effect of thymoquinone on ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart via regulation of apoptosis and autophagy. J Cell Biochem 2018;119(9):7212-7.

145. Alam MF, Khan G, Safhi MM, Alshahrani S, Siddiqui R, Sivagurunathan Moni S, et al. Thymoquinone Ameliorates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Swiss Albino Mice by Modulating Oxidative Damage and Cellular Inflammation. Cardiol Res Pract 2018;2018:1483041.

146. Liu H, Sun Y, Zhang Y, Yang G, Guo L, Zhao Y, et al. Role of Thymoquinone in Cardiac Damage Caused by Sepsis from BALB/c Mice. Inflammation 2019;42(2):516-25.

147. Danaei GH, Memar B, Ataee R, Karami M. Protective effect of thymoquinone, the main component of Nigella Sativa, against diazinon cardio-toxicity in rats. Drug Chem Toxicol 2018; 12:1-7.

148. Adalı F, Gonul Y, Kocak A, Yuksel Y, Ozkececi G, Ozdemir C, et al. Effects of thymoquinone against cisplatin-induced cardiac injury in rats. Acta Cir Bras 2016;31(4):271-7.

149. Atta MS, El-Far AH, Farrag FA, Abdel-Daim MM, Al Jaouni SK, Mousa SA. Thymoquinone Attenuates Cardiomyopathy in Streptozotocin- Treated Diabetic Rats. Oxid Med Cell Longev 2018;2018:7845681.

150. Javidi S, Razavi BM, Hosseinzadeh H. A review of neuropharmacology effects of Nigella sativa and its main component, thymoquinone. Phytother Res 2016;30(8):1219-29.

151. Farkhondeh T, Samarghandian S, Shahri AMP, Samini F. The neuroprotective effects of thymoquinone: A review. Dose Response 2018; 16(2): 1559325818761455.

152. Farkhondeh T, Samarghandian S, Hozeifi S, Azimi-Nezhad M. Therapeutic effects of thymoquinone for the treatment of central nervous system tumors: A review. Biomed Pharmacother 2017;96:1440-4.

153. Elmaci I, Altinoz MA. Thymoquinone: An edible redox-active quinone for the pharmacotherapy of neurodegenerative conditions and glial brain tumors:A short review. Biomed Pharmacother 2016;83:635-40.

154. Üstün N, Aras M, Ozgur T, Bayraktar HS, Sefil F, Ozden R et al. Thymoquinone attenuates trauma induced spinal cord damage in an animal model. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg 2014;20(5):328-32.

155. Xuan NT, Shumilina E, Qadri SM, Götz F, Lang F. Effect of Thymoquinone on Mouse Dendritic Cells. Cell Physiol Biochem 2010;25(2-3):307-14.

156. Velagapudi R, El-Bakoush A, Lepiarz I, Ogunrinade F, Olajide OA. AMPK and SIRT1 activation contribute to inhibition of neuroinflammation by thymoquinone in BV2 microglia. Mol Cell Biochem 2017;435(1-2):149-62.

157. Velagapudi R, Kumar A, Bhatia HS, El-Bakoush A, Lepiarz I, Fiebich BL, et al. Inhibition of neuroinflammation by thymoquinone requires activation of Nrf2/ARE signalling. Int Immunopharmacol 2017;48:17-29.

158. Jakaria M, Cho DY, Ezazul Haque M, Karthivashan G, Kim IS, Ganesan P et al. Neuropharmacological Potential and Delivery Prospects of Thymoquinone for Neurological Disorders. Oxid Med Cell Longev 2018;2018:1209801.

159. Cascella M, Bimonte S, Barbieri A, Del Vecchio V, Muzio MR, Vitale A, et al. Dissecting the Potential Roles of Nigella sativa and Its Constituent Thymoquinone on the Prevention and on the Progression of Alzheimer's Disease. Front Aging Neurosci 2018;10:16.

160. Ibrahim AbdEl Fattah L, Zickri MB, Aal LA, Heikal O, Osama E. The Effect of Thymoquinone, α7 Receptor Agonist and α7 Receptor Allosteric Modulator on the Cerebral Cortex in Experimentally Induced Alzheimer's Disease in Relation to MSCs Activation. Int J Stem Cells 2016;9(2):230-8.

161. Poorgholam P, Yaghmaei P, Hajebrahimi Z.Thymoquinone recovers learning function in a rat model of Alzheimer's disease. Avicenna J Phytomed 2018; 8(3): 188-97.

162. Sedaghat R, Roghani M, Khalili M. Neuroprotective Effect of Thymoquinone, the *Nigella Sativa* Bioactive Compound, in 6-Hydroxydopamine-Induced Hemi-Parkinsonian Rat Model. Iran J Pharm Res 2014; 13(1): 227-34.

163. Ebrahimi SS, Oryan S, Izadpanah E, Hassanzadeh K. Thymoquinone exerts neuroprotective effect in animal model of Parkinson's disease. Toxicol Lett 2017; 276: 108-14.

164. Kanter M. Effects of Nigella sativa and its Major Constituent, Thymoquinone on Sciatic Nerves in Experimental Diabetic Neuropathy. Neurochem Res 2008; 33(1): 87-96.

165. Chen L, Li B, Chen B, Shao Y, Luo Q, Shi X, et al. Thymoquinone alleviates the experimental diabetic peripheral neuropathy by modulation of inflammation. Sci Rep 2016; 6: 31656.

166. Mehri S, Shahi M, Razavi BM, Hassani FV, Hosseinzadeh H. Neuroprotective effect of thymoquinone in acrylamideinduced neurotoxicity in Wistar rats. Iran J Basic Med Sci 2014; 17(12): 1007-11.

167. Abulfadl YS, El-Maraghy NN, Ahmed AAE, Nofal S, Badary OA. Protective effects of thymoquinone on D-galactose and aluminum chloride induced neurotoxicity in rats: biochemical, histological and behavioral changes. Neurol Res 2018; 40(4): 324-33.

168. Kanter M. Protective effects of thymoquinone on the neuronal injury in frontal cortex after chronic toluene exposure. J Mol Histol 2011; 42(1): 39-46.

169. Firdaus F, Zafeer MF, Waseem M, Ullah R, Ahmad M, Afzal M. Thymoquinone alleviates arsenic induced hippocampal toxicity and mitochondrial dysfunction by modulating mPTP in Wistar rats. Biomed Pharmacother 2018; 102: 1152-60.

170. Üstün R, Oğuz EK, Şeker A, Korkaya H. Thymoquinone prevents cisplatin neurotoxicity in primary DRG neurons, Neurotoxicology 2018; 69: 68-76.

171. Ismail N, Ismail M, Mazlan M, Latiff LA, Imam MU, Iqbal S, et al. Thymoquinone Prevents b-Amyloid Neurotoxicity in Primary Cultured Cerebellar Granule Neurons. Cell Mol Neurobiol 2013;33(8):1159-69.

172. Akhondian J, Kianifar H, Raoofziaee M, Moayedpour A, Toosi MB, Khajedaluee M. The effect of thymoquinone on intractable pediatric seizures (pilot study). Epilepsy Res 2011;93(1):39-43.

173. Ullah I, Badshah H, Naseer MI, Lee HY, Kim MO. Thymoquinone and Vitamin C Attenuates Pentylenetetrazole- Induced Seizures Via Activation of GABAB1 Receptor in Adult Rats Cortex and Hippocampus. Neuromolecular Med 2015;17(1):35-46.

174. Abdel-Zaher AO, Farghaly HSM, Farrag MMY, Abdel-Rahman MS, Abdel-Wahab BA. A potential mechanism for the ameliorative effect of thymoquinone on pentylenetetrazole-induced kindling and cognitive impairments in mice. Biomed Pharmacother 2017;88:553-61.

175. Beyazcicek E, Ankarali S, Beyazcicek O, Ankarali H, Demir S, Ozmerdivenli R. Effects of thymoquinone, the major constituent of Nigella sativa seeds, on penicillin-induced epileptiform activity in rats. Neurosciences (Riyadh) 2016;21(2):131-7.

176. Shao Y, Feng Y, Xie Y, Luo Q, Chen L, Li B, et al. Protective effects of thymoquinone against convulsant activity induced by lithium-pilocarpine in a model of status epilepticus. Neurochem Res 2016;41(12):3399-406.

177. Hosseinzadeh H, Parvardeh S, Nassiri-Asl M, Mansouri MT. Intracerebroventricular administration of thymoquinone, the major constituent of Nigella sativa seeds, suppresses epileptic seizures in rats. Med Sci Monit 2005;11(4):BR106-10.

178. Shao YY, Li B, Huang YM, Luo Q, Xie YM, Chen YH. Thymoquınone Attenuates Braın Injury Vıa An Antıoxıdatıve Pathway In A Status Epılepticus Rat Model. Transl Neurosci 2017;8:9-14.

179. Randhawa MA, Alghamdi MS, Maulik SK. The effect of thymoquinone, an active component of Nigella sativa, on isoproterenol induced myocardial injury. Pak J Pharm Sci 2013;26(6):1215-9.

180. Al-Nimer MS, Rajab BR, Al-Aani HA. Thymoquinone protects the heart against isoproterenol-induced myocardial ischemia in mice: A histopathological study. Indian J Pharmacol 2016;48(1):97-8.

181. Ojha S, Azimullah S, Mohanraj R, Sharma C, Yasin J, Arya DS, et al. Thymoquinone Protects against Myocardial Ischemic Injury by Mitigating Oxidative Stress and Inflammation. Evid Based Complement Alternat Med 2015;2015:143629.

182. Lu Y, Feng Y, Liu D, Zhang Z, Gao K, Zhang W, et al. Thymoquinone Attenuates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury Through Activation of SIRT1 Signaling. Cell Physiol Biochem 2018;47(3):1193-206.

183. Liu H, Liu HY, Jiang YN, Li N. Protective effect of thymoquinone improves cardiovascular function, and attenuates oxidative stress, inflammation and apoptosis by mediating the PI3K/Akt pathway in diabetic rats. Mol Med Rep 2016;13(3):2836-42.

184. Chen Y, Wang B, Zhao H. Thymoquinone reduces spinal cord injury by inhibiting inflammatory response, oxidative stress and apoptosis via PPAR-γ and PI3K/Akt pathways. Exp Ther Med 2018;15(6):4987-94.

185. Üstün R, Oğuz EK, Şeker A, Korkaya H. Thymoquinone protects DRG neurons from axotomy-induced cell death. Neurol Res 2018;40(11):930-7.

186. Ullah I, Ullah N, Naseer MI, Lee HY, Kim MO. Neuroprotection with metformin and thymoquinone against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in prenatal rat cortical neurons. BMC Neurosci 2012;13:11.

187. Radad KS, Al-Shraim MM, Moustafa MF, Rausch WD. Neuroprotective role of thymoquinone against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced dopaminergic cell death in primary mesencephalic cell culture. Neurosciences (Riyadh) 2015;20(1):10-6.

188. Hamdy NM, Taha RA. Effects of Nigella sativa Oil and Thymoquinone on Oxidative Stress and Neuropathy in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Pharmacology 2009;84(3):127-34.

189. Kassab RB, El-Hennamy RE. The role of thymoquinone as a potent antioxidant in ameliorating the neurotoxic effect of sodium arsenate in female rat. Egyp Jour Bas App Sci 2017; 4(3): 160–7.

190. Fouad IA, Sharaf NM, Abdelghany RM, El Sayed NSED. Effect of Thymoquinone in Attenuating Glutamate-Mediated Neurotoxicity Targeting the Amyloidogenic and Apoptotic Pathways. Front Neurol 2018;9:236.

191. Angeles DC, Ho P, Dymock BW, Lim KL, Zhou ZD, Tan EK. Antioxidants inhibit neuronal toxicity in Parkinson's disease-linked LRRK2. Ann Clin Transl Neurol 2016;3(4):288-94.

192. Khan A, Vaibhav K, Javed H, Khan MM, Tabassum R, Ahmed ME et al.Attenuation of Aβ-induced neurotoxicity by thymoquinone via inhibition of mitochondrial dysfunction and oxidative stress. Mol Cell Biochem 2012;369(1-2):55-65.

193. Xiao XY, Zhu YX, Bu JY, Li GW, Zhou JH, Zhou SP. Evaluation of Neuroprotective Effect of Thymoquinone Nanoformulation in the Rodent Cerebral Ischemia-Reperfusion Model. Biomed Res Int 2016;2016:2571060.

194. Silachev DN, Plotnikov EY, Zorova LD, Pevzner IB, Sumbatyan NV, Korshunova GA, et al. Neuroprotective Effects of Mitochondria-Targeted Plastoquinone and Thymoquinone in a Rat Model of Brain Ischemia/Reperfusion Injury. Molecules 2015;20(8):14487-503.

195. Gökce EC, Kahveci R, Gökce A, Cemil B, Aksoy N4, Sargon MF, et al. Neuroprotective effects of thymoquinone against spinal cord ischemia-reperfusion injury by attenuation of inflammation, oxidative stress, and apoptosis. J Neurosurg Spine 2016;24(6):949-59.

196. Abdel-Daim MM, Shaheen HM, Abushouk AI, Toraih EA, Fawzy MS, Alansari WS, et al. Thymoquinone and diallyl sulfide protect against fipronil-induced oxidative injury in rats. Environ Sci Pollut Res Int 2018;25(24):23909-16.

197. Kurt E, Dede S, Ragbetli C. The Investigations of Total Antioxidant Status and Biochemical Serum Profile in Thymoquinone Treated Rats. Afr J Tradit Complement Altern Med 2015; 12(2):68-72.

198. Alhusaini A, Faddaa L, Ali HM, Hassan I, El Orabi NF, Bassiouni Y. Amelioration of the Protein Expression of Cox2, NFkB, and STAT-3 by Some Antioxidants in the Liver of Sodium Fluoride–Intoxicated Rats. Dose Response 2018;16(3):1559325818800153.

199. Cobourne-Duval MK, Taka E, Mendonca P, Soliman KFA. Thymoquinone increases the expression of neuroprotective proteins while decreasing the expression of pro-inflammatory cytokines and the gene expression NFκB pathway signaling targets in LPS/IFNγ-activated BV-2 microglia cells. J Neuroimmunol 2018;320:87-97.

200. Ashour AE, Ahmed AF, Kumar A, Zoheir KM, Aboul-Soud MA, Ahmad SF, et al. Thymoquinone inhibits growth of human medulloblastoma cells by inducing oxidative stress and caspase-dependent apoptosis while suppressing NF-κB signaling and IL-8 expression. Mol Cell Biochem 2016;416(1-2):141-55.

201. Sezen ŞC, Kucuk A, Özer A, Kılıç Y, Mardin B, Alkan M, et al. Assessment of the effects of levosimendan and thymoquinone on lung injury after myocardial ischemia reperfusion in rats. Drug Des Devel Ther 2018;12:1347-52.

202. Erkut A, Cure MC, Kalkan Y, Balik MS, Guvercin Y, Yaprak E, et al. Protective effects of thymoquinone and alpha-tocopherol on the sciatic nerve and femoral muscle due to lower limb ischemia-reperfusion injury. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2016;20(6):1192-202.

203. Arslan BA, Isik FB, Gur H, Ozen F, Catal T. Apoptotic Effect of Nigella sativa on Human Lymphoma U937 Cells. Pharmacogn Mag 2017;13(Suppl 3):628-32.

204. Beker M, Dallı T, Elibol B. Thymoquinone can improve neuronal survival and promote neurogenesis in rat hippocampal neurons. Mol Nutr Food Res 2018;62(5).

10. EKLER

Ek 1. Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Onayı

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

2017

KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Morfoloji Binası A Blok 1. Kat No: A1-05 Kampüs /ANTALYA
	TELEFON	0 (242) 249 69 54
	FAKS	0 (242) 249 69 03
	E-POSTA	akhadye@akdeniz.edu.tr
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI		Doç.Dr.İlker ÖNGÜÇ AYCAN
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Timokinonun prilokain toksisitesini engellemesine etkisi
BAŞVURU FORMU ID		625
PROTOKOL NO		2017.02.02
KARAR BİLGİLERİ	**Karar No: 15**	**Tarih: 06.02.2017**
	Yukarıda bilgileri verilen araştırma projesi görüşüldü ve ilgili projenin etik açıdan bir sakınca içermediği tespit edildiğinden, projenin yapılmasının **UYGUN** olduğuna karar verildi. Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	

Prof.Dr. Aysel AĞAR
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı

Prof.Dr. Aysel AĞAR
Başkan

Prof.Dr.Levent SARIKCIOĞLU
Başkan Yardımcısı

Prof.Dr. Erkan ÇOBAN
Üye

Prof.Dr. Vecihe Nimet UYSAL
Üye

Prof.Dr.Fetih GÜLYÜZ
Üye (İzinli)

Doç.Dr.Jale KORUN
Üye

Doç.Dr.Ethem Taner GÖKSU
Üye

Yrd.Doç.Dr.Esra CENKCİ
Üye (İzinli)

Yrd.Doç.Dr. Mustafa YAVUZ
Üye

Vet. Hekim Sefer KÜÇÜKER
Üye

Vet. Hekim Selman DERELİ
Üye

Dr.Özlem GİRAY
Üye

Ek 2. Çalışma Formu

GRUBU: KİLOSU: PRİLOKAİN DOZU:

TANSİYON- NABIZ TAKİBİ:

	NB	TANSİYON		NB	TANSİYON		NB	TANSİYON
1			21			41		
2			22			42		
3			23			43		
4			24			44		
5			25			45		
6			26			46		
7			27			47		
8			28			48		
9			29			49		
10			30			50		
11			31			51		
12			32			52		
13			33			53		
14			34			54		
15			35			55		
16			36			56		
17			37			57		
18			38			58		
19			39			59		
20			40			60		

İLK EPİLEPTİFORM AKTİVİTE ZAMANI:

İLK EPİLEPTİFORM AKTİVİTE ZAMANINDA TOTAL VERİLEN PRİLOKAİN MİKTARI:

İLK ARİTMİ ZAMANI:

İLK ARTİMİ ZAMANINDA TOTAL VERİLEN PRİLOKAİN MİKTARI:

KARDİYAK ARREST ZAMANI:

KARDİYAK ARREST ZAMANINDA TOTAL VERİLEN PRİLOKAİN MİKTARI:

KAN GAZI KONTROLLERİ:

	PH	PCO2	PO2	HCO3	BE	FMetHB	LACTAT
İNF. ÖNCESİ							
15. DK							
30.DK							