

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

RATLARDA OLUŞTURULAN KARACİĞER İSKEMİ VE
REPERFÜZYON MODELİNDE EPİDURAL BUPİVAKAİNİN
KARACİĞER HASARINA OLAN ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
Dr. ZEHRA SARIKUŞ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. FÜSUN BOZKIRLI

ANKARA
EYLÜL 2012

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İçindekiler	i
Kısaltmalar.....	iii
Tablolar, Şekiller Listesi.....	iv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İskemi reperfüzyon hasarının fizyopatolojisi	3
2.1.1.İskemi	3
2.1.2.Reperfüzyon	5
2.2. Hepatik iskemi reperfüzyon hasarı.....	5
2.2.1. Kompleman sistemi	6
2.2.2. Nitrik oksit	7
2.2.3.Sitokinler	8
2.2.4.Apoptozis	9
2.3. Serbest radikaller	9
2.3.1.Reaktif oksijen türevleri	12
2.4. Antioksidan sistem	13
2.5. Epidural anestezi	14
2.6.Rejyonel anestezinin stres yanıtı etkisi	15
2.7.Lokal anestezikler.....	18
2.7.1Bupivakain	19

3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1 Denek seçimi	23
3.2.Kullanılan yöntem	23
3.3.Araştırma parametreleri	26
3.4.İstatistiksel yöntem.....	29
4. BULGULAR	30
5. TARTIŞMA	35
6. SONUÇ	44
7. KAYNAKLAR.....	45
8. ÖZET	57
9. SUMMARY	59
10. EKLER.....	61
10.1 Etik Kurul Kararı	61

KISALTMALAR

ADP	: Adenozin difosfat
ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
ATP	: Adenin trifosfat
Cr	: Kreatinin
ICAM	: İntrasellüler adhezyon molekülü
IL	: İnterlökin
İv	: İntravenöz
İR	: İskemi reperfüzyon
KCFT	: Karaciğer fonksiyon testi
LDH	: Laktat dehidrogenaz
MDA	: Malondialdehit
MPO	: Miyeloperoksidaz
NADH	: Nikotin amid dinükleotid hidrojenaz
ROT	: Reaktif oksijen türevi
TEA	: Torakal epidural anestezi
TNF	: Tümör nekroz faktör
TUNNEL	: Terminal-deoksi Nükleotidil Transferaz Nick End-Labeling
VCAM	: Vasküler hücresel adhezyon molekülü

TABLÖLAR

Tablo 1: Oksijen türevi bileşikler

Tablo 2: Ratların kan örneğinde AST, ALT, IL-1 β ve TNF- α verileri

Tablo 3: Ratların karaciğer dokusunda MDA verileri

Tablo 4: Ratların karaciğer dokusunda histopatoloji verileri

ŞEKİLLER

Şekil 1: İskemi reperfüzyon hasarı

Şekil 2: Bupivakaininin kimyasal formülü

RESİMLER

Resim 1: Rat epidural kateter görünümü

Resim 2: Rat karaciğer dokusu normal parankim görünümü

Resim 3: Rat karaciğer dokusunda apoptotik hücre görünümü

Resim 4: Rat karaciğer dokusunda irregüler değişiklikler

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının dolaşım tarafından sağlanamaması ve oluşan artık ürünlerin dolaşım tarafından uzaklaştırılamaması iskemi olarak tanımlanmaktadır.¹ Bunu izleyen kan dolaşımının yeniden sağlandığı reperfüzyon döneminde dokunun oksijen ve diğer metabolik ihtiyaçları karşılanmakla birlikte paradoksal olarak hasar oluşmaktadır.² İskemiye izleyen reperfüzyon sonucu oluşan hasar, dokunun sadece iskemiye maruz kalması sonucu oluşan hasardan daha fazladır.³ Bu fenomen iskemi reperfüzyon (İR) hasarı olarak tanımlanmaktadır. İskemi reperfüzyon hasarının fizyopatolojisi tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen serbest radikallerin oluşumu, polimorf nüveli lökositlerin aktivasyonu, endotel ve kompleman sistemi gibi major komponentlerin rol oynadığı bilinmektedir.^{4,5}

Travma, safra yolunun tam veya kısmi tıkanıklıkları, kanser, karaciğer nakli gibi cerrahi girişimlerden sonra veya cerrahi girişim olmaksızın bir hemodinamik yanıt veya kardiyojenik şok sonrasında karaciğer iskemisi oluşabilir.⁶

Torakal epidural anestezi (TEA) pek çok amaçla ve yaygın olarak kullanılan, cerrahi travmaya bağlı gelişen intraoperatif sempatik stimülasyonu etkin biçimde azaltan bir nöronal deaferantasyon tekniğidir.⁷ Aynı zamanda TEA major abdominal ve torasik cerrahi sonrasında rehabilitasyonu hızlandırmak için kullanılan multimodel konseptin bir parçasıdır. Böylece TEA segmental sempatik blokaj yaparak kan akımının splanknik vasküler yatağa redistribüsyonunu sağlayarak barsakta olumlu etkiler oluşturmaktadır.⁸⁻¹⁰

Bu alışmada TEA'nin splanknik perfüzyon artışı ile karaciğer kan akımını ve doku oksijenlenmesini artırarak İR hasarına karşı koruyucu etkisi olabileceği hipotezi ile, ratlarda bupivakainle sağlanan TEA'nin İR hasarına etkilerinin AST, ALT, IL-1 β , TNF- α , MDA düzeylerine, dokuda apoptozis ve histopatolojik yanıtı bakılarak araştırılması planlandı.

2. GENEL BİLGİLER

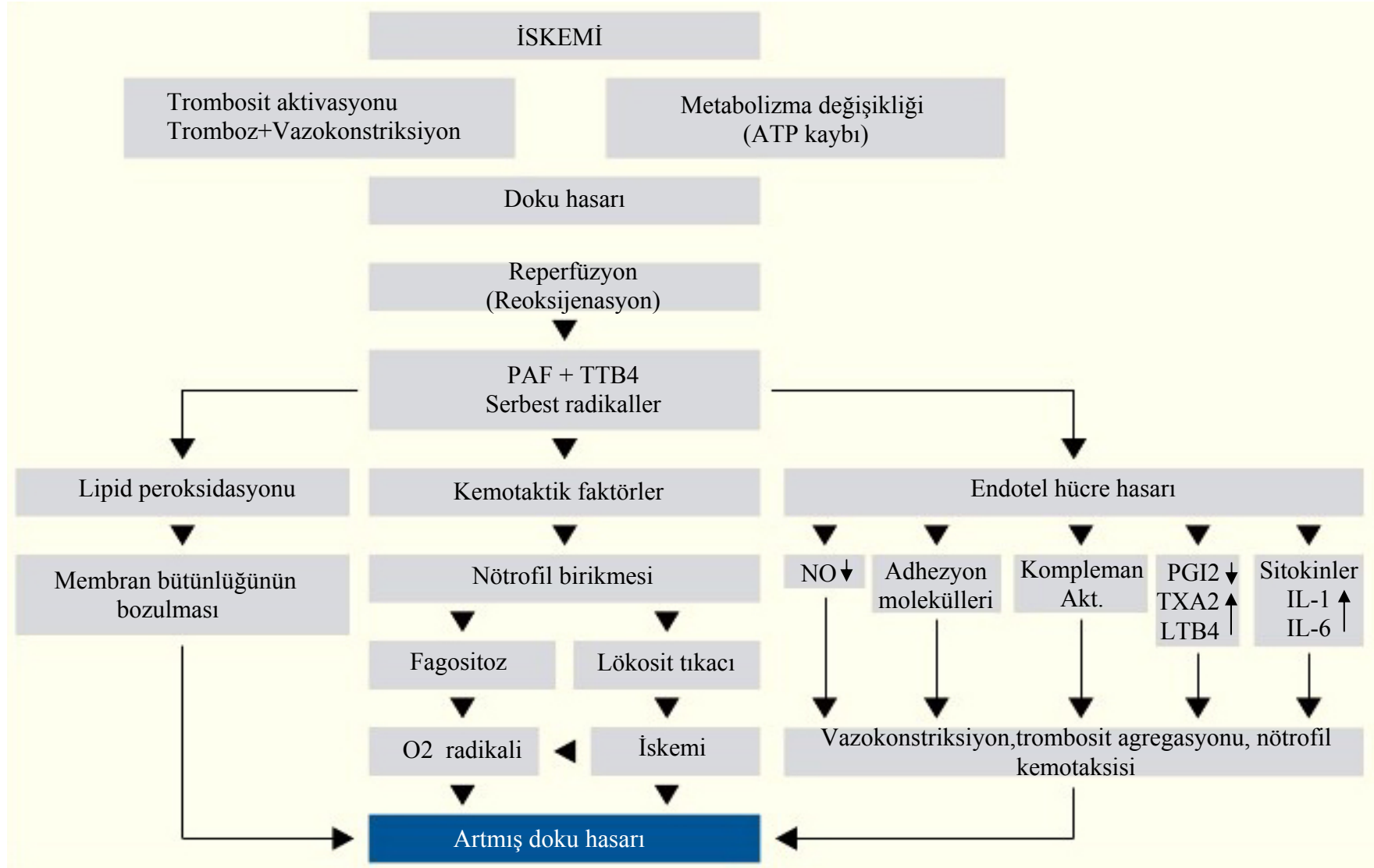
2.1. İskemi reperfüzyon hasarının fizyopatolojisi

2.1.1. İskemi

İskemi, organların kanlanmaması, oksijen ve besin maddelerinin dokulara yeterli düzeyde ulaştırılamamasıdır. İskemi, organı perfüze eden kan akımındaki azalmaya bağlı olarak gelişen geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz hücre zedelenmesine yol açar.¹¹

İskemi sırasında hücre yapısında ve metabolizmasında değişiklikler meydana gelir. Dokuya gelen kan akımının kesilmesine bağlı oksidatif fosforilasyon ile yüksek enerjili ATP ve fosfokreatinin seviyeleri azalır.¹² Hücrede enerji depolarınının boşalması ile membranında bulunan Na^+/K^+ -ATP'az pompası inhibe olur ve sonuçta hücre içi Na^+ ve Ca^{+2} konsantrasyonları artar.¹³ Hücrede enerji zalmasına bağlı olarak fosfolipid, polisakkarit, protein ve nükleik asitlerin spontan yada enzim katalizli degradasyonlarının ardından bu yapı taşları yeniden sentezlenemediğinden hücre bütünlüğü bozulur. Hücre içi Ca^{+2} artışı fosfolipaz, proteaz ve endonükleaz enzimlerini uyarak bu olaya katkıda bulunur.¹⁴

Şekil 1. İskemi reperfüzyon hasarı ¹⁵



2.1.2. Reperfüzyon

Hücrede iskemiden kaynaklanan irreversibl hücre hasarının önlenmesi için kan akımı yeniden sağlanmalıdır. Öte yandan iskemik dokunun tekrar kanlanması olarak tanımlanan reperfüzyon, iskeminin dokuda oluşturduğu hasardan daha çok hasara neden olur.¹⁶

Reperfüzyon ile ortam oksijenlenirken artan serbest oksijen radikalleri hücredeki, oksidatif stresi artırır.¹⁷ Ayrıca TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, kemokinler gibi proinflamatuvar sitokinlerin de etkisi ile vasküler endotel hücrelerinde adhezyon moleküllerinin (ICAM, VCAM, E-Selektin) ekspresyonu sonucu endotele yapışan nötrofiller, fagositoza ve lizozomal enzimlerin de desteği ile hasarın artmasına yardımcı olur.

Reperfüzyon sırasında oluşan reaktif oksijen radikalleri endotel hasarı, mikrovasküler permeabilite artışı ve doku ödemeine neden olur.¹⁹ Reperfüzyon hasarı lokal olduğu kadar sitokinler yoluyla uzak organlara da inflamatuvar yanıtı tetikleyerek organ yetmezliklerine neden olabilir.¹⁸ Reperfüzyon ile enerji tekrar sağlanırken, uzaklaştırılan toksik ürünler sistemik dolaşıma katılarak hiperkalemi, metabolik asidoz, myoglobinemi gibi ciddi sorunlarla lokal doku hasarının daha da artmasına neden olur.^{3,20}

2.2. Hepatik İskemi Reperfüzyon Hasarı

Hepatik İR hasarı ilk kez 1975'de Toledo Pereyra ve arkadaşları tarafından deneysel olarak gerçekleştirilen karaciğer naklinde gözlenmiştir.²¹

Karaciğerde İR hasarı iki fazdan oluşur:

1) Erken faz (0–2 saat); Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve hücre içi Ca⁺ artışının etkili olduğu dönemdir. Hepatosit hasarını başlatan erken

mekanizmalardan biri olan hücre içi Ca^{+2} artışı apoptozis ve nekroz yollarını da aktive eder.¹⁹

2) Geç faz (6–48 saat); Karaciğere nötrofil, makrofaj, lenfosit ve trombosit göçü ile inflamatuvar yanıtın uyarıldığı, sinüzoidal kan akımında değişikliklerin ortaya çıktığı dönemdir.²²

Mikrovasküler alanda nötrofil artışına bağlı, intrasellüler ödem ve intravasküler hemokonsantrasyon ile kupffer hücrelerinden ve nötrofillerden çeşitli proinflamatuvar mediatörlerin salgılanması ve trombosit-endotel hücresi arasındaki etkileşimler iskemi sonrası sinüzoidal akımının azalmasına katkıda bulunur. İskemi süresine bağlı olarak bu hücrelerin etkileşimleri de artar.^{23,24} Mikrodolaşımdaki bozukluğun sinüzoidal endotelial hücre hasarı ile nitrik oksit (NO) ve endotelin gibi vazodilatör ve vazokonstriktör moleküller arasındaki dengesizliğe bağlı olduğu düşünülmektedir.^{4, 25}

2.2.1 Kompleman sistemi

Hepatik, miyokardiyal, intestinal ve renal İR modellerinde komplemanın da rol oynadığı gösterilmiştir. Kompleman aktivasyonu sonucu ortaya çıkan anafatoksinler ve MAC (*membran attack complex*) gibi ürünler; karaciğerde nötrofil aktivasyonu, vazokonstriksiyon, mikrosirkülasyonda bozulma, vasküler permeabilite artışı ve hücre lizisi ile ilişkilidir.²⁶ Özellikle lokal ve sistemik inflamasyonun güçlü mediyatörlerinden biri olan C5a; nötrofil aktivitesini ve agregasyonunu, kemotaksisi, sitotoksik aktiviteyi ve reaktif oksijen türevlerinin ve proteazların salınımını uyarır ayrıca ICAM-1 ve VCAM-1'in up-regülasyonunu sağlar. Eozinofiller, bazofiller, monositler/makrofajlar ve mikrogial hücreler için güçlü kemotaktik etkiye sahiptir.²⁷

2.2.2. Nitrik Oksit

Birçok dokuda kan akımının kesilmesi gibi fiziksel uyarılarda endotel vazodilatörlere yanıt olarak NO üreterek kan akımının düzenlenmesinde önemli rol alır.²⁸ Nitrik oksit çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde rol alan ve NO sentaz izoenzimleri tarafından NADPH ve oksijen bağımlı bir reaksiyon ile L-argininin oksidatif metabolizması sonucu oluşan bir biyolojik habercidir.²⁹ Karaciğerde nitrik oksit sentazın 3 izoformu bulunur ve bunların içinde uyarılabilen-inflamatuvar NOS (iNOS, NOS-2) ve endotelial yapısal NOS en önemlileridir.^{30,31} Genellikle inflamatuvar mediyatörlere yanıt olarak, hepatositlerden, Kupffer hücreleri ve nötrofiller gibi inflamatuvar hücrelerden salınan iNOS geninin ekspresyonel düzenlenmesinde NF- κ B, merkezi rol oynar.³⁰

Nitrik oksit İR hasarında önemli rolü olan lökositlerin, adhezyon ve kemotaksisinin endojen inhibitörüdür ve bu etkilerini endotel hücrelerinden salınan ICAM-1 gibi adhezyon moleküllerini inhibe ederek gösterir. Nitrik oksit ayrıca hücrel immünite ve bakteriyel sitotoksitesi artırır, endotel proliferasyonu ve apoptozisi modüle eder.³² Nitrik oksit İR hasarında koruyucu etkilerine zıt olarak potent peroksinitrit üretimini artırır. İnflamatuvar nitrik oksit sentazın endotoksinlerle uyarılması sonucu artan NO, sistemik vazodilatasyon ve hipotansiyona neden olarak karaciğer kan akımını ve peroksinitrit uyarımını artırarak hücre hasarını şiddetlendirir.³³

İskemi reperfüzyon modeli uygulanan sıçanlara dışarıdan L-Arginin verilmesi İR hasarını azaltır fakat L-NAME (NOS'un spesifik olmayan inhibitörü) verilmesi hücrel hasarı ve mikrodolaşım bozukluğunu artırır.³⁴

2.2.3. Sitokinler

Karaciğer hasarı gelişmesinde TNF- α ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinler kupfer hücrelerinden erken mediatör olarak salınır.³⁵

Biyolojik etkileri hücre ölümünden hücre yenilenmesine kadar farklılık gösteren TNF- α 'nın hepatosellüler hasardaki etkisi yeterince anlaşılamamıştır. Ancak doğrudan mitokondriye toksik etkisi olabileceği gibi apoptozisi veya nekrozu da tetikleyebilir. Mitokondri tarafından üretilen reaktif oksijen türevleri TNF- α 'nın sitotoksik etkisine katkıda bulunur.³⁶ Septik şok, reperfüzyon dönemi sonrasındaki olaylarda ve çoklu organ yetmezliği gibi durumlarda kritik role sahip olan TNF- α ; IL-1, IL-6, IL-8 ve monosit kemotaktik protein-1 ekspresyonuna neden olur.³⁷ Ayrıca TNF- α , lokal bir kemokin olan epitelyal nötrofil aktive edici protein-78 (ENA-78)'in de üretilmesini indükler. Bu protein nötrofillerin kemotaksisinde önemli rol oynar ve kupfer hücrelerini, süperoksit radikalleri üretmesi için uyarır.³⁸

Rat karaciğerinden izole edilen kupfer hücrelerinde İR hasarının ardından TNF- α üretiminin kontrol grubuna göre 5 kat fazla arttığı gösterilmiştir.³⁹ Ayrıca ratlarda hepatik İR hasarında anti-TNF α antikollarının hepatik hasarlanmayı azalttığı, akciğer ödemi önlediği de tesbit edilmiştir gösterilmiştir.⁴⁰

İnterlökin-1,TNF- α 'a yanıt olarak salgılanır ve nötrofillerden serbest radikal üretimini uyarır.¹ Ratlarda IL-1'in reaktif oksijen türevi üretimini şiddetlendirdiği bilinmektedir.Bununla beraber IL-1 antagonistleri kullanımı TNF- α düzeylerini düşürerek karaciğer İR hasarını azaltır.⁴¹

2.2.4. Apoptozis

İlk kez 1972’de Ker tarafından terminolojiye giren apoptozis terimini 1974’ de Lusken, programlanmış hücre ölümü olarak tanımlamıştır.⁴² Genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümü olan apoptozis, organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlayan veya hasarlanan hücreleri, zararsız bir biçimde ortadan kaldırır. Apoptozis hücre içinden veya dışından gelen ölüm sinyalleri ile başlar.⁴³

Apoptozis, nekrozdan tamamen farklıdır. Hücre membran bütünlüğünün kaybı, hücresel ödem ve belirgin inflamasyon ile karakterize nekrozda, DNA iplikçikleri, apoptozisdeki gibi internükleozomal bağlantı noktalarından düzenli olarak değil rastgele kırılır.^{44,45,46}

Apoptozisi belirlemek için kullanılan terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı dUTP labeling (TUNEL) testinin güvenilirliği kısıtlıdır. Bu yöntem ile DNA dizisinde kırığı olan tüm hücreler, hücre hasarı tipinin nekroz (DNA çözülmesi daha rastgeledir) veya apoptozis (DNA dizi kırılması çok bol miktardadır) olması ayırt edilmeden boyanmaktadır.⁴⁷

2.3. Serbest Radikaller

Stabil moleküllerin dış yörüngesinde biri diğerine zıt yönde dönen elektron çiftleri vardır. Dış yörüngelerinde eşlenmemiş en az bir adet elektron içeren atom veya moleküle serbest radikal denir. Serbest radikaller oldukça reaktiftir ve elektron çiftlemek için diğer moleküllerle reaksiyona girme eğilimindedir.⁴⁸

Serbest radikaller başlıca 3 temel mekanizma ile oluşur.⁴⁹

1- Kovalent bağların homolitik bölünmesi (Kovalent bağlı molekülün bölünmesinden sonra, her bir parçasında ortak olan elektronlardan birinin kalması)

2-Normal bir molekülden tek elektron kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi (Radikal özelliği olmayan bir molekülden bir elektron kaybı sırasında dış orbitalinde ortaklanmamış elektron kalması)

3-Normal bir moleküle elektron transferi

Organizmada serbest radikal ve reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olan endojen ve ekzojen kaynaklar bulunmaktadır.⁵⁰

Serbest radikallerin biyolojik etkileri;

1-DNA hasarı

2-Nükleotit yapılı koenzimlerin yıkımı

3-Lipid peroksidasyonu, zar yapısı ve fonksiyonunun değişmesi

4-Protein ve lipidlerle kovalent bağlantılar oluşturmak

5-Zar proteinlerinin hasarı ve transport sisteminin bozulması

6-Protein hasarı

7-Tiollere bağlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması

8-Mukopolisakkaritlerin yıkımı olarak özetlenir.⁵¹

Lipid peroksidasyonu organizmada oluşan kuvvetli oksitleyici bir radikal etkisi ile zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinde bulunan alfa metilen gruplarından bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. En önemli uyarıcı ise hidroksil radikalidir. Oluşan lipid radikali bir seri reaksiyon sonucu lipid hidroksi peroksitlere dönüşür.⁵²

Lipid peroksitlerinin yıkım ürünlerinden biri de malondialdehit (MDA)'dır. Protein ve fosfolipidlere çapraz bağ ve polimerizasyon yaparak özelliklerinin

kaybolmasına neden olur. Malondialdehit deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir, sülfidril içeren enzimleri inaktive eder ve nükleik asitlerle etkileşime girerek mutasyona yol açar. Sonuçta enzim aktivite değişiklikleri, iyon transportu bozuklukları, hücre bileşenlerinin agregasyonları gibi değişiklikler ortaya çıkar.^{51,53}

Aminoasitlerin oksidasyona duyarlılıkları farklıdır. Mikrosirkülasyon sırasında oluşan serbest oksijen radikalleri proteinlerin, enzimlerin modifikasyonuna ve hücre fonksiyonlarının değişmesine yol açarak Na^+/K^+ ATP'az, Ca^{+2}/ATP 'az, laktat dehidrojenaz, glutamin sentetaz, alkol dehidrojenaz, kreatin kinaz, protein kinaz ve a1 proteinaz inhibitörlerinin inaktivasyonuna neden olur.^{54,55}

Organizmada serbest radikal ve reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olan endojen ve ekzojen kaynaklar bulunmaktadır.⁵⁰

Endojen kaynaklar:

- 1- Mitokondriyal ve endoplazmik retikulum elektron transport zinciri
- 2- Mikrozoal elektron transport sistemi
- 3- Kloroplast elektron transport sistemi
- 4- Nötrofil fagositoz sistemi
- 5- Oksidan enzimler
 - a. Ksantin oksidaz,
 - b. Triptofan dioksijenaz,
 - c. Galaktoz oksidaz,
 - d. Siklooksijenaz, lipooksijenaz

- 6- Araşidonik asit metabolizması
- 7- Enzimatik olmayan reaksiyonlar
- 8- Lenfosit, fibroblast ve endotelden düzenleyici moleküller olarak salgılanma
- 9- Otoksidasyon reaksiyonları

Ekzojen kaynaklar:

- 1-İyonizan radyasyon (X-ışını)
- 2-Hepatotoksinler (Karbon tetraklorür)
- 3-Ksenobiyotikler
- 4-Redoks siklusu yapan maddeler (Ör. paraquat, doksarubisin)
- 5-Kemoterapötikler (Adriamisin)
- 6-Hava kirliliği, UV ışınları, sigara
- 7-Okside glutatyon

2.3.1. Reaktif Oksijen Türevleri

Normal şartlarda mitokondrial elektron transport sisteminde oksijene dört elektron eklenir ve suya indirgenir. Ancak İR hasarında sadece bir elektron transferi ile oldukça reaktif serbest oksijen radikalleri olan, süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hipoklorik asit ($HOCl$) ve hidroksil ($HO^\bullet$) oluşur. Serbest oksijen radikalleri reperfüzyonun ilk birkaç dakikasında en fazla üretilir ve dolayısıyla reperfüzyon hasarı en fazla erken dönemde oluşur.⁵⁶

Oksijen türevi bileşikler, radikal ve radikal olmayan bileşikler olarak iki gruba ayrılır (**Tablo 1**).⁵⁷

Tablo 1. Oksijen türevi bileşikler

Radikaller		Radikal olmayanlar	
Hidroksil	(HO [•])	Hidrojen Peroksit	(H ₂ O ₂)
Alkoksil	(RO [•])	Singlet Oksijen	(O ₂)
Peroksil	(ROO [•])	Ozon	(O ₃)
Süperoksit	(O ₂ ^{•-})	Hipoklorid	(HOCl)
Nitrik oksit	(NO)	Hidroperoksit	(LOOH)
Azot dioksit	(NO ₂)	Peroksinitrit	(ONOO [•])
Hidro peroksil	(HO ₂)		

Hipoksi veya reoksijenasyon sonucu oluşan reaktif oksijen türevlerinin DNA'yı oksitleyen, membran lipidlerini peroksiteleyen ve enzim proteinlerini denatüre eden basit reaktanlardan çok, fizyolojik sinyal ileticisi olduğu tespit edilmiştir. Transkripsiyon faktörü nükleer faktör kappa B, p53 ve aktivatör protein-1 oksijen bileşikleri ile düzenlenir. Reaktif oksijen türleri hipoksi-uyarılabilen faktör-1, NF-kB, aktivatör protein-1 ve stresle aktive olan protein kinaz gibi transkripsiyonel düzenleyicilerin aktive olmasını sağlayan anahtar sinyal işlevini görmektedir.^{58,59,60}

2.4. Antioksidan Sistem

Reaktif oksijen türlerinin (ROT) birikimine karşı çeşitli savunma sistemleri bulunmaktadır. Bunlar enzimatik ROT yakalayıcıları; süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve enzimatik olmayan moleküller (vitamin A, C, E ve flavenoidler)'dir.⁶¹

Süperoksit radikallerinin oluşumunu ve meydana getirdikleri hasarı önleyen ve detoksifikasyonlarını sağlayan bu “antioksidan savunma sistemi”⁴ yolla etki gösterir.

- 1- Süpürücü etki; Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma, yok etme olup antioksidan enzimler ve küçük moleküller bu yolla etki gösterir.^{62,63}
- 2- İnaktif şekle dönüştürücü etki; Serbest oksijen radikalleri ile etkileşime girip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan etkidir. Vitaminler, flavinoidler bu yolla etki gösterir.⁶⁴
- 3- Zincir kırıcı etki; Serbest oksijen radikallerini bağlayıp zincirlerini kırarak fonksiyonlarını engelleyen etki. Hemoglobinin, seruloplazmin ve mineraller bu yolla etki gösterir.⁶⁵
- 4- Onarıcı etki; Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması şeklinde gösterilen etkidir.⁶⁶

2.5. Epidural Anestezi

Epidural anestezi spinal sinirlerin duradan çıkıp intervertebral foramenlere uzanırken epidural aralıkta anestetize edilmesi ile meydana gelen bir anestezi yöntemi olup başlıca sensörial sempatik lifler bloke olurken, motor sinirler kısmen veya tamamen bloke olabilir.^{67,68} Epidural anestezi ilk kez 1895’de Cathelin tarafından sakral bölgede, 1921’de ise Pages tarafından lomber bölgede uygulanmıştır. Spinal anestezi için 1945’de geliştirilen katater tekniğinin Curbelo tarafından 1949’da epidural blok sırasında kullanılması önemli bir aşamadır.^{67,68}

Epidural anestezi uygulanırken sagittal planda orta hattan girildiğinde geçilen dokular sırası ile cilt, cilt altı, supraspinöz ligament, interspinöz ligament

ve ligamentum flavumdur. Bu ligamenler lomber aralıkta daha kalındır. Epidural aralık geçildikten sonra subaraknoid aralığa ulaşılır.⁶⁷

Epidural aralık dural kılıf uzantılarını çevreleyen potansiyel bir boşluk olup dura ile vertebral kanalı döşeyen periost ve bunun ligamentlere verdiği fibröz uzantılar arasında yer alır. Ventral olarak dura ile dorsal olarak ligamentum flavum ile bağlanır. Foramen magnumdan sakral hiatusa uzanır. Ponksiyon yapılırken ligamenlerin oluşturduğu farklı dirençler epidural aralığın lokalizasyonu açısından önemlidir.^{69,70}

Subaraknoid veya epidural aralığa verilen lokal anestezikler ile önce preganglionik sempatik lifler sonra otonom lifler kalınlıklarına göre ısı, ağrı, dokunma ve son olarak basınç duyusunu taşıyan lifler bloke olur. Bununla uyumlu olarak sırası ile sempatik, duysal ve motor blok oluşur.⁷¹ Bloğun geri dönüşü ise önce motor sonra duysal ve en son sempatik blok şeklinde tam tersi yöndedir.^{67,72}

2.6. Rejyonel Anestezinin Stres Yanıt Üzerine Etkisi

Cerrahi, travma, lokalize inflamatuvar yanıt, somatik ve visseral afferent liflerin aktivasyonu ile bir nöroendokrin yanıt oluşturur. Bu yanıt ACTH, kortizol, epinefrin, norepinefrin ve vasopressin düzeylerinde artış ve renin-anjiotensin aldosteron sisteminin aktivasyonunu içerir. Klinik bulgular intraoperatif ve postoperatif hipertansiyon, taşikardi, hiperglisemi, protein katabolizması, immün yanıtın baskılanması ve böbrek fonksiyonlarında değişiklikleri içerir.⁷³

Ağrı ve cerrahi uyaran sempatik aktivasyona ve bir dizi hormonal ve metabolik değişikliklere neden olur. Anestezi seviyesi ve cerrahi girişimin yerine bağlı olarak epidural ve spinal anestezi cerrahi strese olan yanıtı azaltır. Alt karın bölgesindeki girişimlerde T₄-S₅ arası bir epidural blok, glikoz ve kortizol

düzeyindeki artışı önler ancak T₆-S₅ arası blok bu artışı önleyememektedir. Üst karın girişimlerinde ise C₆ düzeyine kadar çıkan bloklar bile stres yanıtı önemli derecede azaltır fakat tam olarak önleyemez. Burada vagal ve olasılıkla frenik efferent yolun bloke olmaması, sempatik blokajın yeterli olmaması, diyafram ve peritondaki serbest sinir uçlarının uyarılması sorumlu olabilir.⁶⁷

Epidural anestezi adrenal yanıtı baskılayarak hipertansiyon, miyokardial stres ve hiperglisemiye önler. Epidural anestezinin etkin olması için cerrahiden önce gerçekleştirilmesi ve sağlanan anestezik etkinin strese neden olan tüm süreci kapsamaması gerekir. Stres yanıtı oluştuğundan sonra epidural anestezi hipotalamik–hipofizer–adrenal aksın aktivasyonunu önleyemez. Katekolaminlerin epidural anestezi ile salınımının azalması, doğumda uterus kan akımında artmaya ve yeni doğanda asit-baz dengesinde iyileşmeye neden olur. Spinal anestezi ise derin bir analjezi sağlasa da sınırlı süresi nedeni ile stres yanıtı önlemede epidural analjezi kadar etkin değildir. Epidural anestezi uygulamalarında lokal anesteziklerin kullanımı metabolik ve endokrin stres yanıtı tamamen önlerken opioidler sempatik blokaj yapmadığından bu konuda yetersiz kalır.⁶⁷

Epidural anestezi doku hasarıyla oluşan süperoksit anyonları ve lizozomal enzimlerin salınımını önler, doku inflamasyonunu azaltabilir. Epidural kateterizasyon ile cerrahi yanıtın baskılanması, cerrahi girişimin sonucunu olumlu olarak etkilemektedir.^{74,75}

Epidural anestezi travmaya karşı gelişen metabolik yanıtın kısmen sorumlu olan adrenokortikol ve sempatik deşarjı kısmen veya tamamen önleyebilir. Epidural blok yeterli yükseklik ve sürede uygulandığında stres yanıtı en aza indirir hatta ortadan kaldırabilir.⁷³

Travma, kanama veya sirkulator şoka bağlı gelişen düşük sistemik perfüzyon sonrasındaki splanknik hipoperfüzyon, artan sempatik aktivite sebebi ile kan akışının splanknik organlardan diğer bölgelere redistribusyonu ya da mikrovasküler ağdaki kan akımının bozulmasından kaynaklanabilir. Yüksek riskli cerrahi operasyonlarda gastrointestinal organların perfüzyonun yeterliliği önemli bir yere sahiptir. Çünkü splanknik hipoperfüzyon, artmış mukozal geçirgenlik, endotoksemi ve organ yetmezliğine neden olabilmektedir.⁷⁶ Gastrointestinal sistem hipoperfüzyonu, artmış mortalite oranları ile ilişkilidir.^{77,78} Torakal epidural bloğun; azalmış mikrovasküler perfüzyona ve kanama/retransfüzyona bağlı gelişen lökosit endotel ilişkisine karşı barsakları, koruduğu gösterilmiştir.⁷⁹

Torakal epidural anestezi ile yapılan splanknik sempatik blokajın barsak perfüzyonu üzerinde olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir. Fizyolojik koşullarda TEA barsak perfüzyonunu splanknik sempatik yolları bloke ederek artırır,^{80,81} hipokside intestinal asidozisi geciktirir.⁸² Ayrıca peritoniti olan hastalarda mukozal pH'yı artırır.⁸³ Bu olumlu etkileri mikrosirkülasyonu direkt veya indirekt olarak artırır.

Septik ratlarda barsak mukoza mikrosirkülasyonunda sepsis tarafından oluşturulan perfüzyon bozukluğunun TEA ile azaldığı gösterilmiştir.⁸⁴

Splanknik perfüzyon üzerinde TEA'nin etkisi konusunda önemli noktalardan biri de epidural blok lokalizasyonudur. Splanknik bölgede total sempatik bloğun elde edilebilmesi için lokal anestetiğin T₅-T₁₀ arasındaki sempatik sinir liflerine etki etmesi gerekir. Lomber segmentlerdeki sempatik blokaj, baroreseptörler nedeniyle splanknik sinirlerde sempatik aktivite artışına neden olmaktadır.⁸⁵ Tavşanlar üzerindeki bir deneysel çalışmada splanknik sempatik sinirlerin epidural blokajı, splanknik bölgedeki venöz damarlarda

kapasitansı arttırmış ancak lomber bölgedeki epidural blok splanknik damarlarda refleks vazokonstriksiyona neden olmuştur.⁸⁶

Torakal epidural anestezinin sempatik blok etkilerinin sadece splanknik alan ile sınırlı olmadığı dikkate alınmalıdır. Torakal epidural anestezinin tercih edildiği hastalarda myokardial infarkt insidansındaki azalmanın TEA'nın, kalbin efferent sempatik outflowunda azalmaya bağlı olduğu gösterilmiştir.⁸⁷ Myokardiyal İR hasarı modelinde uygulanan TEA, enfarkt büyüklüğünü ve postiskemik hasarı azaltır.⁸⁸

2.7. Lokal Anestezikler

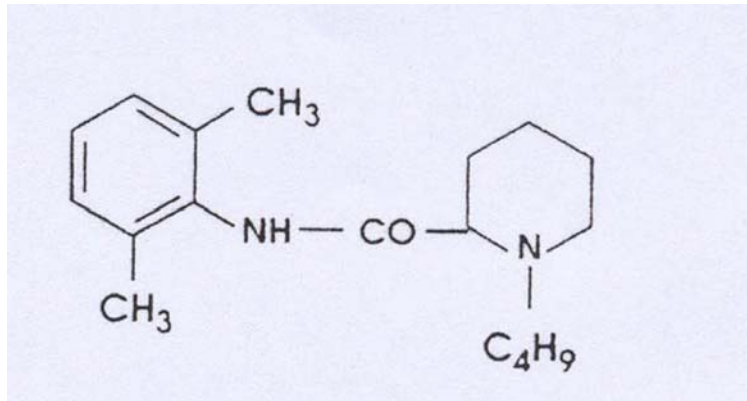
Lokal anestezikler etki yerlerine yeterli konsantrasyonda uygulandıklarında, aksonda aksiyon potansiyeli oluşumunu sağlayan Na^+ girişini, geri dönüşümlü bloke ederek sinir ve kas membranlarının elektriksel uyarı iletimini önleyen ajanlardır.⁸⁹ Son yıllarda yapılan çalışmalar iletim bloğunun Na^+ kanal blokajından daha komplike bir mekanizma ile Ca^{+2} , K^{+1} ve G-protein ilişkili regüle kanalların da etkili olduğu yönündedir.^{90,91,92}

Tipik bir lokal anestezik molekülü yapısında üç temel fonksiyonel üniteye sahiptir. Bu üniteler; lipofilik aromatik halka, genellikle tersiyer amin yapısındaki hidrofilik amin halkası ve bu halkaları birleştiren ester veya amid yapısındaki ara zincirdir.⁹³ Ara zincir ya ester ya da amid yapısındadır ve bu yapıya göre lokal anestezikler aminoamid veya aminoester bileşikleri olarak sınıflandırılır. Lidokain, mepivakain, prilokain, etidokain, artikain, bupivakain, ropivakain, ve levobupivakain aminoamid grubuna, kokain, prokain, kloroprokain ve tetrakain aminoester grubuna ait lokal anestezik ajanlardır.⁹⁴ Aminoester yapılı lokal

anestezikler doku ve kanda bulunan esteraz enzimleri ile, aminoamid yapıda olanlar ise karaciğer sitokrom p450 enzimleri tarafından hidrolize edilir.⁹⁰

2.7.1 Bupivakain

Aminoamid tipinde bir lokal anestezik ilaç olan bupivakain R (+) ve S (-) enantiomerlerinden oluşan rasemik bir ajandır. Rasemik iki enantiomerin 50:50 oranında karışımı olarak belirlenmiş ve 1960 yılının başlarında klinik pratiğe girmiştir. Bir bileşik eşit miktarda enantiomerlerin karışımını içeriyorsa genelde “rac” terimi (rasemik karışım) olarak adlandırılır.^{95,96} Kimyasal adı L butil-ol-piperidin-2-karboksilikasit-2-6-olimetil anilid hidroklorid. Molekül formülü: C₁₈N₂OH₂₈HCl. Kimyasal yapı formülü; Şekil-2’de görülmektedir.⁹⁶



Şekil 2. Bupivakainin açık formülü

Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri

Bupivakain molekül ağırlığı 288 kd, pH’sı 4.5–6.5, pKa değeri 8.1, yağda çözünürlüğü oldukça yüksek ve sistemik absorpsiyonu yavaş olan bir lokal anestezik ajandır.⁹⁷ Plazma proteinlerine en yüksek oranda (% 95,5) bağlanan ve en uzun etkili lokal anestezik ajandır.⁹⁸

Lidokain ve mepivakaine oranla yağda çözünürlüğü iki kat fazla olduğundan daha güçlü etkiye sahiptir. Tek doz epidural veya interkostal enjeksiyondan sonra 1–2 saat içinde plazma konsantrasyonu tepe plazma seviyesine ulaşır ve plazma seviyesi total doz ile direkt ilişkilidir. Bupivakain infiltrasyondan sonra 5 dk içinde kanda tespit edilebilir.^{97,98}

Bupivakainin epidural enjeksiyon sonrası etki başlama süresi 5–7 dk, anestezinin yerleşmesi ise 15–20 dk içinde olmaktadır. Spinal anestezide 3.5–4 saat devam eden anestezi etkinliği 3–4 dk içinde başlar. Bupivakainin anestezi etkisi periferik sinir bloklarında 5–6 saat, epidural blokta ise 3.5–5 saate kadar devam etmektedir. Periferik sinir bloklarında % 0.5 konsantrasyonda 35 mL volümde tam motor blok sağlayabilmektedir. Obstetrik analjezi ve perine cerrahisinde epidural uygulama için % 0.25 konsantrasyonunda, alt ekstremitte cerrahisinde % 0.5 konsantrasyonunda ve batin operasyonlarında ise % 0.75 konsantrasyonda 20 ml volüm olarak uygulanmaktadır.^{98,99}

Uzun etki süresine karşın, duyuşsal blok oluşturma etkisi motor blok yapıcı etkisinden daha fazladır ve bu özelliğı bupivakaini doğum analjezisi ve postoperatif analjezide popüler bir ajan haline getirmiştir. Bupivakain; reyonel intravenöz anestezi (RİVA), presakral ve paraservikal bloklar için uygun değildir.⁶⁷

Metabolizma

Bupivakain amid yapılı olduğu için primer olarak karaciğerde N-dealkalizasyona uğrar, ilacın çok küçük bir miktarı ise değişmeden idrarla atılır. Proteinlere yüksek oranda bağlanması nedeni ile plasental pasif diffüzyonu da düşüktür ancak fetus üzerindeki etkilerine ait kesin sonuçlar bildirilmemiştir.^{67, 100}

Toksisite

Lokal anestezik ajanlar ile oluşan etkiler; alerjik reaksiyonlar, sistemik ve lokal toksik etkilerdir. Sistemik toksik etkiler; santral sinir sistemi etkileri, kardiyovasküler sistem etkileri ve methemoglobinemiye içerir. Lokal toksik etkiler ise nörotoksisite ve miyotoksisiteyi içeren doku toksisitesi ile oluşur.⁶⁷

Bupivakainin maksimum plazma konsantrasyonları nadiren toksik seviyeye ulaşır ve toksik doz konsantrasyonu 4–5 µg/mL 'dir. Bupivakainin total dozu 2–2.5 mg/kg'dır ve eğer epinefrin kullanılacaksa 250 mg'ı geçmemelidir. Bupivakainin tekrarlanan dozları 24 saatte maksimum 400 mg'ı geçmemek şartı ile ilk dozun yarısı veya ¼'ü kadar uygulanabilir.^{97,99}

Santral Sinir Sistemi Etkileri

Bupivakain ile oluşan SSS toksisitesinde, başlangıçta serebral korteksteeki inhibitör yollar ve sonra tüm sistemler deprese olduğundan belirtiler önce stimülasyon sonra depresyon ile karakterizedir. Kortikal uyarılma sonucu heyecan, huzursuzluk, baş ağrısı, baş dönmesi, kulaklarda uğultu, nistagmus, ağız çevresinde ve dilde uyuşma, titreme ve kas seyirmelerini takiben konvülsiyon gelişir.^{67,95} Medüller merkezin uyarılması sonucu arter kan basıncı ve kalp atım hızında artma, bulantı, kusma, solunum sayısında artma ve ritminde değişiklik görölür. Depresyon belirtileri ise oryantasyon bozukluğu, sedasyon, bilinç kaybı, arteriyel kan basıncında düşme, kalp atım hızında azalma veya durma ve apnedir.^{67,100} Bupivakain gibi lipid özünölrlüğü ve proteine bağlanması yüksek olan ajanların eksitasyon fazı bazen kısa ve hafif şiddette geçer ve ilk bulgular bradikardi, siyanoz ve bilinç kaybı olabilir.¹⁰¹

Kardiyovasküler Sisteme Etkileri

Lokal anesteziyelere bağlı kardiyotoksisitede önce sempatik sinir sisteminin aktivasyonuna bağlı taşikardi ve hipertansiyonun baskın olduğu dönem ile artan plazma konsantrasyonları sonrası direkt miyokardiyal depresyon, aritmi, uzamış iletim süreleri ve son olarak kardiyovasküler kollapsın gelişimi takip eder.¹⁰²

Bupivakainin miyokardial Na^+ kanallarına yüksek afinitesi diğer ajanlardan daha fazla selektif kardiyak toksisite oluşturmaya neden olur. Ayrıca L-tipi kalsiyum kanallarında da inhibisyon yapar.¹⁰¹ Bupivakain Na^+ kanallarına hızlı bağlanır fakat yavaş terk eder ve miyokardın izometrik kontraksiyonunu %33 oranında düşürür. Yüksek dozda hızlı verildiğinde veya ven içine yanlışlıkla enjekte edildiğinde; önce atriyoventriküler ileti yavaşlar. Ayrıca EKG’de QRS kompleksinde genişleme, P-R segmentinde uzama, A-V blok, Q-T uzaması, ventriküler ritm bozukluğu (ventriküler taşikardi, ventriküler fibrilasyon sonrası asistoli) görülebilir ve hipotansiyon, bradikardi gelişebilir. Bupivakain ile oluşan kardiyotoksisite resüsitasyona kolay cevap vermemektedir.^{67,95,99}

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmanın gerçekleştirilebilmesi için Etik Kurul izni Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurulundan 30/06/2011 tarih ve G.Ü.ET-11-053 sayısı ile alındıktan sonra 2012 yılı Haziran ayında Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (GÜDAM)'da gerçekleştirildi.

3.1. Denek Seçimi

Araştırmada 250-330 gram ağırlığında 18 adet Wistar cinsi erişkin erkek rat kullanıldı. Ratlar, araştırma başlangıcına kadar 12 saat aydınlık-12 saat karanlık ortamda ve 24-25 °C oda sıcaklığında takip edildi. Rat gıdası olarak pellet yemine ve sıvıya serbest erişim sağlandı..

3.2. Kullanılan Yöntem

Ratlar randomize olarak 3 gruba ayrıldı.

I-Grup K (n=6) = Sham (laparotomi)

II-Grup S (n=6) = Kontrol (laparotomi, İR, epidural kateter, 20 mcg/kg/st % 0,9 NaCl)

III-Grup B (n=6) = Bupivakain (Marcain 1 mL=5mg, Astra Zeneca, İstanbul, Türkiye) (Laparotomi, İR, epidural kateter, 20 mcg/kg/st bupivakain)

Tüm ratlara 50 mg/kg ketamin (Ketalar 1 mL = 50 mg, Pfizer, İstanbul, Türkiye) ve 2.5 mg/kg Xsylazin (1mL=20mg,Egevet,İzmir,Türkiye) ile anestezi uygulandı. Ratların hidrasyonları kuyruk veninden 24 Gauge (G) intravenöz kanül (Ar-Es IV Neo, İzmir, Türkiye) kullanılarak sağlandı. İşlem öncesi tüm ratların cerrahi insizyon alanları tıraş edildi. İskemi ve reperfüzyon süresi boyunca ratlara optimum yaşamsal şartlar sağlandı.

Epidural kateter uygulaması

Sham grubu ratlara laparotomi ve karaciğer eksplorasyonu yapıldı. Epidural katater uygulaması yapılmadı. Epidural katater uygulaması yapılacak diğer grup ratlar (**Grup S ve Grup B**) cerrahi tablaların üzerine pron pozisyonda olacak şekilde kol ve bacaklarından tesbit edildi. Lumber bölge cilt antiseptikleri povidon iyot ile sağlandıktan sonra spinöz prosesler boyunca yaklaşık 2-3 cm'lik orta hat cilt insizyonu yapıldı ve lumbosakral fasya açıldı. İki taraflı paravertebral kaslar spinöz proses ve laminalardan künt diseksiyon ile subperiostal açıldı. Küçük ekartörler yardımı ile işlem sahası ortaya çıkarılarak operasyon mikroskopisi kullanılarak L₃-L₄ seviyesinden mikrocerrahi tekniği ile total laminektomi yapıldı. Dış çapı 0.6 mm olan polietilen kateter yerleştirildi. Kateter T-6 seviyesine kadar yaklaşık 2-3 cm ilerletildi. Negatif aspirasyon yöntemi ile kateterin subdural olmadığı doğrulandı. Ayrıca sakrifikasyon sonrası da yerleri belirlenerek teyid edildi. Kateterler fasyada suture edilerek tesbit edildi. Epidural kateterlerin ölü boşlukları (28 µl) verilmesi planlanan infüzyon sıvısı ile dolduruldu.

İskemi

Epidural kateterizasyon işleminden sonra supin pozisyona çevrilen ratlara povidon iyot ile cilt antiseptikleri sağlandıktan sonra % 1'lik lidokain HCl (Jetmonal %2, 5 mL ampul, Adeka, Samsun, Türkiye) ile cilt infiltrasyonu ve orta abdominal insizyonları yapıldı. Ratların sol portal triaddaki hepatik arterine atravmatik vasküler klemp yerleştirildi. İskemi süresi 60 dk. olarak belirlendi. Klemp yerleştirildikten sonra batın serum fizyolojik ile ıslatıldı ve 3/0 ipek

kullanılarak insizyon hatları suture edilip yaklastirildi. Islem boyunca ısı kaybının önlenmesi amacı ile ısıtıcı blanketler kullanıldı.

Epidural Kateter Kullanımı

İskemi işlemi başladıktan sonra epidural kateter ile **Grup S** için 20 mcg/kg/st %0,9 NaCl infüzyonu başlanırken, **Grup B** için 20 mcg/kg/st % 0.5 bupivakain infüzyonları başlandı.

Reperfüzyon

İskemi süresi sona eren ratların klempleri kaldırıldı ve reperfüzyon dönemleri başlatıldı. Reperfüzyon süresi 360 dk. olarak belirlendi. Abdominal bölgeleri SF ile yıkandıktan sonra tekrar suture edilerek kapatıldı.

Sakrifikasyon

İskemi/reperfüzyon dönemini tamamlayan ratların karaciğer doku örnekleri alındı. İntrakardiyak yaklaşık 4-5 mL kan örnekleri alındı ve sakrifikasyonları da sağlanmış oldu.



Resim 1. Rat epidural kateter görünümü

Karaciğer doku örneklerinin bir kısmı immünohistokimyasal değerlendirme için % 10 formaldehit solüsyonu içerisinde + 4 °C’de saklandı. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji Kliniğinde apoptozis ve histopatolojik değerlendirmeleri yapıldı. Karaciğer doku örneklerinin bir kısmı ise sıvı azot ile işlem gördükten sonra MDA analizi için -80 °C’de saklandı

Kan örnekleri TNF- α , IL-1 β , AST, ALT analizi için EDTA’lı tüplere alınıp santrifüj edilerek (3000 devir/dk, 5dk)(Centronic- BL, P selecta, Barcelona-Spain) serumlarının ayrılması sağlandı ve süpernatant kısmı, analiz edilinceye kadar -80°C’de muhafaza edildi.

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji laboratuvarında MDA ve TNF- α , IL-1 β , AST, ALT ölçümleri yapıldı.

3.3. Araştırma Parametreleri

Lipid peroksidasyon düzeyinin belirlendiği MDA analizi için doku örneği hepatosellüler hasarın değerlendirildiği AST, ALT değerleri ile inflamatuvar yanıtın değerlendirildiği IL-1 β ve TNF- α düzeyleri için kan örnekleri, apoptozis ve histopatolojik değerlendirilme için ise karaciğer doku örnekleri kullanıldı.

3.3.1. Karaciğer fonksiyon testleri analizi

Hepatosellüler hasarın değerlendirildiği AST, ALT enzim düzeyleri (Beckmann) Olympus AU2700 model otoanalizörde standart metodlarla standart ticari kitler kullanılarak çalışıldı.

3.3.2. Sitokin Analizi

İnflamatuvar yanıtın değerlendirildiği TNF- α ve IL-1 β sitokin ölçümleri eBioscience marka Elisa kitleri kullanılarak standart metodlarla çalışıldı .

Kullanılan Aletler

- Hassas terazi (Schimadzu, Libror, AEG 220)
- Homojenizatör (Virtis-Virtisheur)
- Vorteks (Heidolf Reax 200)
- Benmari (Heto)
- Santrifuj (Hermle Z 380K)
- Soğutmalı santrifuj (Damon IEC,B-20A soğutmalı,Hermle Z 323K)
- Spektrofotometre (Schimadzu, UV1601)
- Tecan Eliza okuyucu ve yıkayıcı
- pH metre (Jenway)

Karaciğer doku örnekleri 1/ 10 oranında 0.01 M Tris-HCl (pH=7.4) tamponda, buz içinde, soğukta homojenize edildi. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde 15.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatantlardan doku MDA düzeyi çalışıldı.(103)

3.3.3. Dokuda Malondialdehit Analizi

Ohkawa ve arkadaşlarının¹⁰⁴ tarif ettiği yönteme göre MDA düzeyleri tayin edildi. Bu yöntemin ilkesi; homojenattaki proteinlerin sodyum dodesil sülfat (SDS) ile bağlanmasından sonra örnekte bulunan MDA’nın ortam pH’sı 3,5

olduğu koşullarda tiobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu komplekse bağlı kırmızı rengin spektrofotometrik ölçümüne dayanır.

Kullanılan reaktifler

% 8,1 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS); distile su içinde hazırlandı

% 0.8 Tiobarbitürik asit (TBA); distile su içinde hazırlandı

% 20 Asetik asit; distile su içinde hazırlandı (NaOH ile pH=3,5'a ayarlandı) n-butanol/ piridin (15:1 v/v)

Malondialdehit tayini için doku süpernatantlarından 50 µl alınarak üzerine 50 µl %8,1 SDS eklendi. Ardından 375 µl % 0.8 TBA, 375 µl % 20 asetik asit (pH=3,5) ve 150 µl distile su eklendi. Elde edilen karışım 60 dk, 95 °C'de su banyosunda kaynatıldı. Bundan hemen sonra örnekler soğutularak üzerine 250 µl distile su ve 1,250 mL n-butanol/piridin (15/1v/v) ilave edilerek vortekslendi. Daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip üst faz 532 nm'de n-butanole karşı okundu. Malondialdehit standart olarak 1, 1, 3, 3 tetrametoksi propan kullanılarak standart grafik elde edildi ve örneklerin absorbens değeri nin nmol cinsinden MDA miktarı saptandı. Sonuçlar "nmol/g/yaş/doku" cinsinden belirlendi.

3.3.4. Histopatolojik Analiz

Deneklerden rezeke edilen karaciğer materyalleri %10'luk formalin solüsyonu içinde tesbit edildi. Her deneğe ait materyalden yaklaşık 1.5x1cm boyutlarında bir doku örneği alınarak doku kasetlerine yerleştirildi. Otomatik doku takibi cihazında, dokuların dereceli alkoller ve ksilenden geçirildiği rutin doku takibi işle mi yapıldı. Daha sonra doku örnekleri sıvı parafine gömölüp

buzlukta dondurularak parafin bloklar elde edildi. Deneklerin karaciğer doku örneklerini içeren parafin blokların herbirinden mikrotom yardımı ile standart 4 mikronluk kesitler alındı. Sıcak su banyosuna aktarılan kesitler kodlanarak her denek için ayrı bir lama alındı. Doku kesitlerini içeren lamalar daha sonra otomatik boyama cihazında Hematoksilen ve Eozinle boyandı. Yine otomatik kapama cihazında entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı. Daha sonra boyalı karaciğer doku örneklerine ait kesitler kör bir şekilde hepatopatolog tarafından incelendi.

3.4.İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme SPSS 17,0 bilgisayar programında aşağıda sıralanan testler kullanılarak gerçekleştirildi. İstatistiksel analiz verileri [ortalama $\pm$ standart sapma, (En az-En çok) olarak sunuldu. Yapılan tüm istatistiksel analizlerde anlamlılık sınırı olarak $p<0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

Ölçülebilen parametrelere Shapiro-Wilk testi uygulanarak dağılımın normal ya da anormal olup olmadığı belirlendi. Normal dağılım gösterenler için gruplar arasında fark olup olmadığını belirlemede bağımsız gruplarda tek yönlü ANOVA testi kullanıldı. Farklılık olması durumunda gruplar arası Bonferroni testi ile karşılaştırılma yapıldı.

İnflamatuar aktivite, apoptozis ve iskemi reperfüzyon hasarı verilerinin değerlendirilmesi ise Chi-square veya Fisher'in kesin Chi-square testleri ile yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

Gruplar AST enzim aktivitesi açısından kendi aralarında karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p=0,009$). AST enzim aktivitesi Grup S'de Grup K'ya göre anlamlı ölçüde yüksek bulundu ($p=0,001$). Grup K ile Grup B karşılaştırıldığında AST enzim aktivitesi benzer olarak bulundu ($p=0,112$) (**Tablo 3**).

Gruplar ALT enzim aktivitesi açısından kendi aralarında karşılaştırıldığında; anlamlı fark bulundu ($p=0,018$). ALT enzim aktivitesi Grup S'de Grup K'ya göre yüksek iken ($p=0,022$) Grup K ile Grup B değerleri arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0,087$). (**Tablo 3**).

Gruplar IL-1 β enzim aktivitesi açısından kendi aralarında karşılaştırıldığında; gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p < 0,0001$). IL-1 β enzim aktivitesi Grup S ve Grup B'de Grup K'ya göre anlamlı ölçüde yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,045$, $p<0,0001$,), (**Tablo 3**).

Gruplar TNF- α enzim aktivitesi açısından kendi aralarında karşılaştırıldığında; gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p=0,001$). TNF- α enzim aktivitesi Grup B'de Grup K ve Grup S'e göre anlamlı ölçüde yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,001$, $p<0,0001$), (**Tablo3**).

Tablo 3. Ratların kan örneğinde AST, ALT, IL-1 β ve TNF- α verileri [Ort $\pm$ SS (En az - En çok)]

	Grup K (n=6)	Grup S (n=6)	Grup B (n=6)	P**
AST (U/L)	242,67 $\pm$ 93,14 (155-393)	1981,50 $\pm$ 964,33* (523-3176)	1344,17 $\pm$ 1075,70 (496-3344)	0,009
ALT (U/L)	82,83 $\pm$ 20,20 (62-120)	2268,00 $\pm$ 945,64* (704-3400)	1780,67 $\pm$ 1887,17 (526-5322)	0,018
IL -1 beta (pg/mL)	8,07 $\pm$ 4,54 (2,83-13,32)	24,84 $\pm$ 14,88 (3,78-43,10)	58,96 $\pm$ 16,58*,& (36,35-76,13)	<0,000 1
TNF alfa (pg/mL)	12,54 $\pm$ 4,18 (9,07-18,21)	33,31 $\pm$ 14,35* (17,37-59,49)	50,91 $\pm$ 17,04* (28,23-70,60)	0,001

p**: ANOVA testi ile anlamlılıkdüzeyi p< 0.05

*p<0.05: Grup K ile karşılaştırıldığında

&p<0.05: Grup S ile karşılaştırıldığında

Tablo 4. Ratların karaciğer dokusunda MDA verileri [Ort $\pm$ SS (En az-En çok)]

	Grup K (n=6)	Grup S (n=6)	Grup B (n=6)	P**
MDA	120,63 $\pm$ 4,80 (116,20-127,40)	126,10 $\pm$ 9,30 (114-141,40)	127,87 $\pm$ 6,43 (119-137,20)	0,216

P**: ANOVA testi ile anlamlılık düzeyi p< 0.05

*p<0.05: Grup K ile karşılaştırıldığında

&p<0.05: Grup S ile karşılaştırıldığında

4.2. Histopatolojik Bulgular

Histopatolojik incelemede tüm gruplardaki deneklerde normal karaciğer mikroanatomisinin korunduğu izlendi. Sham grubunda belirgin bir patolojik değişiklik gözlenmedi.

Grup S’de yalnızca bir denekte portal alanların çevresinde konjesyon, hepatositlerde nükleus kaybı, kollaps ve hepatosit kordonlarında düzleşme ile karakterize hücresel zedelenme bulguları belirlendi. Seyrek apoptotik cisim gözlemlendi. Diğer deneklerde ise belirgin bir patolojik değişiklik gözlenmedi.

Grup B’de ise 3 denekte portal alanların çevresinde belirgin konjesyon, hepatositlerde nükleus kaybı, kollaps ve hepatosit kordonlarında düzensizleşme ile karakterize hücresel zedelenme bulguları saptandı. Bu gruptaki tüm deneklerde periportal alanlarda daha belirgin olmak üzere bir kısmı tek hücre nekrozu şeklinde bir kısmı ise kümelenmeler oluşturacak şekilde apoptotik cisimler izlendi. Santral venlerin çevresinde daha belirgin olan yer yer ise irregüler görünümde sinüzoidal dilatasyonlar görüldü. Parankimde hepatositlerde rejeneratif aktiviteyi düşündüren mitotik figürler izlendi.

Her üç grupta hiçbir denekte parankimde lobüler alanlarda ya da portal alanlarda inflamasyon izlenmedi. Safra duktuslarında patoloji saptanmadı. Gruplara ait histopatolojik sonuç verileri tablo 5’de gösterilmiştir. Ayrıca resim 2, resim 3 ve resim 4 ‘de de histopatolojik preparat mikroskobik görünümleri yer almaktadır.

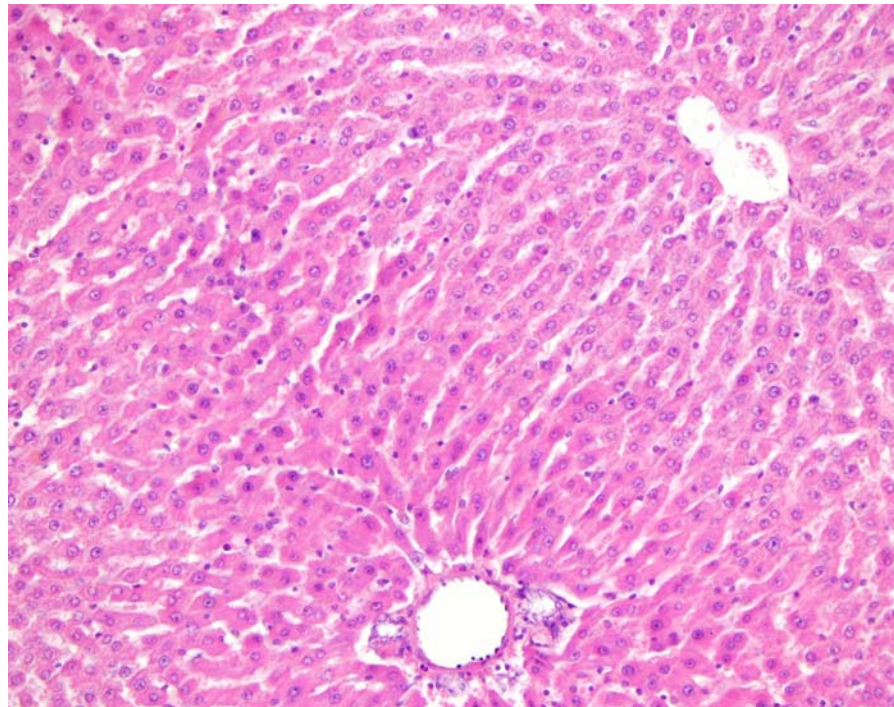
Tablo 5. Ratların karaciğer dokusunda histopatoloji verileri [n %]

	Grup K (n=6)	Grup S (n=6)	Grup B (n=6)	P**
İnflamatuvar aktivite (var/yok)	0/6	0/6	0/6	-
Apoptoz (var/yok)	6 (100)/0	5 (83,3)/1(16,7)	0/6(100)*, &	<0,0001
İR hasarı (var/yok)	6 (100)/0	5 (83,3)/1(16,7)	3 (50)/3(50)	0,069

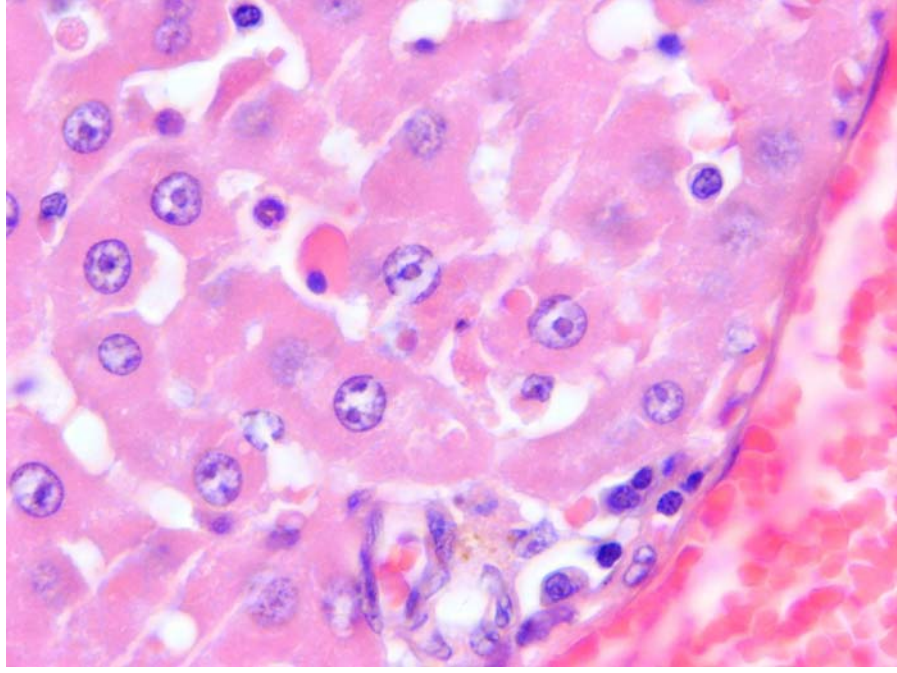
P**: X² testi ile anlamlılık düzeyi p< 0.05

*p<0.05: Grup K ile karşılaştırıldığında

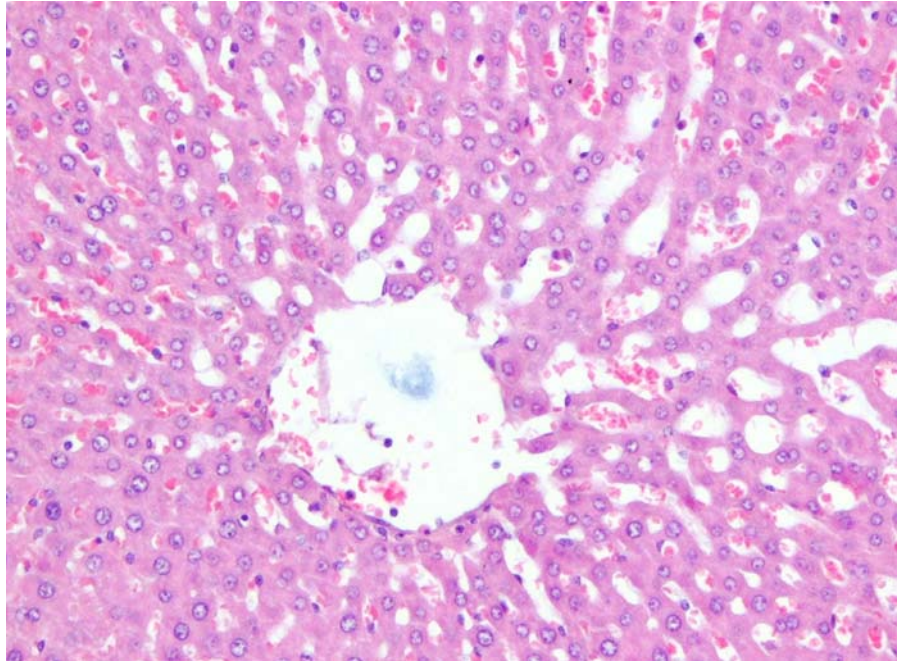
&p<0.05: Grup SF ile karşılaştırıldığında



Resim 2. Normal karaciğer parankim görünümü



Resim 3. Apoptotik cisim görünümü



Resim 4. Santral ven çevresinde irregüler sinüzoidal dilatasyonlar

5. TARTIŞMA

Bu çalışma, ratlarda oluşturulan karaciğer iskemi reperfüzyon modelinde epidural yol ile uygulanan bupivakainin splanknik perfüzyonunu dolayısı ile karaciğerin perfüzyonu ve oksijenasyonunu artırarak İR hasarına karşı koruyucu etkisi olabileceği hipotezi ile planlanmıştır.¹⁰⁵ Ancak elde edilen sonuçlar, bupivakainin sistemik inflamatuvar cevabı ve lipid peroksidasyonu önlemede yetersiz kaldığını ve karaciğer hücrelerinde apoptozise neden olduğunu göstermiştir.

Ratlarda deneysel hepatik İR hasarının oluşturulmasında parsiyel hepatik iskemi uygulaması tercih edilir. Bu şekilde total iskeminin neden olduğu mezenterik konjesyon önlenerek İR hasarının etkileri izole karaciğer parankiminde gösterilmiş olur.¹⁰⁶ Bu yöntemde portal ven ve hepatik arter avasküler klemplerle oklüze edilmektedir. Bu araştırmada parsiyel hepatik iskemi yöntemi tercih edilmiştir. Ancak bu yöntem alternatif olarak Chen MY. ve ark.¹⁰⁷ ratlarda hepatoduodenal ligamente %0.4 lidokain enjeksiyonu yaparak uyguladıkları hepatik İR modelinde karaciğer kan akımını kesmek yerine, klinik çalışmalarla desteklendiği takdirde, hepatoduodenal ligamente lidokain enjeksiyonu yapılmasının daha güvenli ve uygulanabilir bir yaklaşım gibi görüldüğü öne sürülmektedir.

Hepatik İR hasarının hücresel düzeyde en iyi göstergeleri arasında AST, ALT gibi karaciğer enzim düzeylerinin belirlenmesi ve oksidatif stresin göstergesi olarak da doku MDA tayini ile karaciğer dokusuna ait histopatolojik değerlendirmeleri sayılmaktadır.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ O nedenle araştırmamızda bu parametreleri kullandık.

Major abdominal operasyonlar sonrasında torakal epidural anestezinin karaciğer perfüzyonunda artış gösterdiği ancak lumber epidural anestezide böyle bir artış gözlenmediği tesbit edilmiştir.¹¹¹ Bu araştırmada TEA uygulamamızın nedenlerinden biri de bununla ilişkilendirilmiştir.

İskemi reperfüzyon hasarında önemli rol alan sitokinler nötrofil aktivasyonu, kemotaksis, nötrofil- endotel adezyonu ve nötrofik transmigasyonu ile ilişkilidir. İskemi reperfüzyon hasarı sırasında salınan sitokinlerden biri olan TNF- α konsantrasyonlarının artışı endotel hücrelerinden IL-6, IL-8 ve IL-1 β üretimini indükler.¹¹² Bu nedenle bu araştırmamızda inflamatuvar yanıtın göstergelerinden ilk sırada yer alan TNF- α ve IL-1 β düzeylerini çalışmayı belirledik.

Wei Lan ve ark.¹¹³ lidokainin 0,5 mg/mL dozunda kullanımının aktive edilmiş insan umbilikal ven endotel hücrelerinde (HUVEC) IL-1 β , IL-6 ve IL-8 konsantrasyonlarını kontrol grubuna göre azalttığını ancak 0,005 mg/mL klinikle uyumlu plazma konsantrasyonlarında, aktive endotelden salınan ICAM-1, IL-1 β , IL-6 ve IL-8 düzeylerinde değişiklik yapmadığını göstermiştir. Biz de çalışmamızda uygun konsantrasyonlarında epidural bupivakaininin IL-1 β düzeylerinde artışa neden olduğunu gözlemledik. Bu sonuca göre İR hasarında epidural bupivakainin inflamatuvar yanıtı baskılamadığı düşünülebilir.

Chika Kawasaki ve ark.¹¹⁴ bupivakain, lidokain, ropivakain ile inkübe, taze insan nötrofillerini izole ederek yaptıkları çalışmalarında bupivakain ve ropivakainin 400 μ m konsantrasyonlar ile nötrofil ve mitokondriyal fonksiyonlara etki etmediği halde, lidokain 400 μ m kullanımı nötrofil fonksiyonlarını ve mitokondriyal membran potansiyelini azaltmış, apoptozisi indüklemiş ayrıca ATP sentezini inhibe etmiştir. Nötrofillerde nekroz ise in vitro olarak bu üç lokal

anestezik için 4000 µm konsantrasyonlarında gözlenmiştir. İn vitro araştırmaya göre kullanılan konsantrasyonlar farklı olsa da bu deneysel çalışmamızda bupivakain % 0.5'lik epidural uygulamasının apoptozise neden olduğu tesbit edilmiştir.

Huang YH. ve ark.¹¹⁵ yaptığı başka bir in vitro çalışmada ise murine makrofajlarını, lipopolisakkarit (LPS) veya lipopolisakkarit+bupivakain (1,10 veya 100 mikrom) ile işlem gördükten sonra değerlendirdiklerinde bupivakain doz bağımlı olarak LPS'in COX-2 transkripsiyonu ve PGE2 üretimi üzerindeki etkileri ile bunların TNF-α, IL-1β ve IL-6 üretimi üzerine olan olumlu etkilerini de anlamlı derecede inhibe etmiş ancak IL-10 üretimi üzerinde anlamlı etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Bunun aksine araştırmamızda uyguladığımız İR rat modelinde ise bupivakain kullanımına bağlı TNF-α ve IL-1β düzeylerinde gözlenen artış sonucu inflamatuvar yanıtı baskılamadığını düşündük. Sonuçtaki bu farklılığın nedeni ise in vitro bir araştırmaya göre bizim yaptığımız araştırmanın klinik sonuçları açısından daha anlamlı olacağı düşünülebilir.

Ralph Thomas Kiefer ve ark.¹¹⁶ bupivakain, lidokain ve ropivakain inkübe edilen kan örneklerini S.aureus ilave ederek oluşturdıkları invitro çalışmalarında reaktif oksijen türleri jenerasyonu, CD11b ekspresyonu ve granülosit fagositoz aktivitelerinin lidokain ve bupivakainin en yüksek konsantrasyonlarında (1846 µM ve 770 µM) anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışma sonuçları değerlendirildiğinde, lokal anestezik ilaçların inflamatuvar yanıt üzerindeki etkilerinin doz bağımlı olarak değişebileceğini ve antiinflamatuvar etkilerinin de in vitro şartlarda genellikle en yüksek konsantrasyonlarında ortaya çıktığını göstermektedir.

İskemi ve reperfüzyon hasarına neden olan major faktörlerden biri de, reaktif oksijen ürünlerine bağlı gelişen lipid peroksidasyonudur. Malondialdehit lipid peroksidasyonunu sonucunda oluşan bir üründür. Bu nedenle lipid peroksidasyon düzeyi doku MDA seviyeleri ölçülerek değerlendirilebilir.¹¹⁷

Lokal anestezik ilaçların lipid peroksidasyonları üzerine etkilerinin değerlendirildiği çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Angela De Iuliis ve ark.¹¹⁸ bupivakainin gönüllü insan deneklerinde aktive edilmiş T-lenfositlerin adhezyonunu, sitokin ekspresyonunu ve rat karaciğer mikrozomlarının lipid peroksidasyonu üzerinde antioksidan etki gösteren human platelet agregasyonunu inhibe ettiğini tesbit etmiştir. Bu sonuç bupivakainin bir yandan inflamatuvar yanıtı baskıladığını gösterirken diğer yandan lipid peroksidasyonunu önleyici ya da koruyucu olmadığını göstermektedir. Bupivakaininin lipid peroksidasyonu üzerine etkisinin değerlendirildiği farklı bir çalışmada ise Leduc C. ve ark.¹¹⁹ oluşturdukları inflamatuvar hayvan modelinde, bupivakainin klinikte kullanılan konsantrasyonlarını siyatik sinire veya intraperitoneal uygulayarak karşılaştırıldıklarında, siyatik sinire uygulanan bupivakaininin lipid peroksidasyonu üzerinde antioksidan etkisi olduğunu göstermişlerdir. Bu sonuçlar dikkate alındığında bupivakainin sistemik veya rejyonel kullanımlarına bağlı olarak lipid peroksidasyonu üzerinde farklı etkiler oluşturabileceği düşünülebilir.

Bupivakainin mitokondriyal respiratuvar zincirdeki complex I'ı inhibe edebileceği, oksidatif fosforilasyonu bozarak ATP üretimini azaltabileceği ve mitokondriyal membran potansiyelini kollabe ederek apoptozise neden olabileceği çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir.^{120,121} Lokal anestezik ile indüklenmiş apoptoziste moleküler mekanizma tam olarak anlaşılamamış olsa da, mitokondri ve mitojen aktive protein kinaz(MAPK) yollarının ilişkili olduğu hem in vitro

hem de hayvan çalışmalarında gösterilmiştir.^{122,123} Boselli E. ve ark.¹²⁴ ile Perez Castro ve ark.¹²⁵ lokal anesteziklerin olası yan etkilerinden biri olan nörotoksisiteyi apoptozisle ilişkilendirmişlerdir. Park JC. ve ark.¹²⁶ yaptığı bir çalışmada bupivakaininin schwan hücrelerinde apoptozisi indüklediğini gösterirken benzer şekilde Jun Lu ve ark.¹²⁷ in vitro çalışmalarında bupivakainin mitokondri ilişkili apoptozisi indüklediğini tesbit etmişlerdir. Bu sonuçlar dikkate alındığında gerçekleştirdiğimiz araştırma da da apoptozisin gösterilmesi gerek in vitro gerekse klinik çalışmaların sonuçlarını destekler özelliktedir.

Karaciğer cerrahisi prosedürleri sonrasında gelişen hepatik İR hasarı postoperatif hepatik disfonksiyon veya yetmezlik riski yaratmaktadır. Sistemik lidokainin hepatosellüler hasar ve hepatik İR hasarı sonrasındaki karaciğer fonksiyonları üzerindeki etkilerini araştırmak için Wilmar de Graaf ve ark.¹²⁸ %70 İR hasarlı grup ve parsiyel hepatektomi ile 45 dk'lık iskeminin kombine edildiği diğer bir grup oluşturup iskemiden 30 dk önce başlayarak, reperfüzyonun 20. dakikasına kadar sürekli sistemik lidokain uygulamışlardır. Protombin, AST, ALT, antitrombin T, total bilirubin parametrelerini değerlendirdikleri çalışmalarında, kontrol ve lidokain gruplarında İR hasarı sonrasında, biyokimyasal ve histolojik hepatosellüler hasarda benzer anlamlı artış görülmüştür. Postoperatif karaciğer fonksiyonları iskemiye sekonder olarak olumsuz yönde etkilenmiş ancak kontrol ve lidokain grupları arasında farklılık saptanmamıştır. İnflamatuar yanıt açısından bakıldığında kontrol ve lidokain uygulanan deneklerde İR hasarına bağlı lökosit göçünde anlamlı fark saptanmamıştır. Terapötik konsantrasyonlardaki sistemik lidokainin, hepatik İR hasarı sonrasında hepatosellüler hasarı azaltmadığı gibi postoperatif karaciğer fonksiyonlarını da dzeltemediği gösterilmiştir.

Lee HT. ve ark.¹²⁹ ratlarda renal İR hasarı modelinde TNF- α , IL-1 β , ICAM-1 gen ekspresyon analizleri, apoptozis, MPO aktiviteleri, 24. ve 48. saat plazma Cr seviyeleri değerlendirilmiştir. Subkutan miniozmotik pumplar ile 70 kg'lık bir kişiye sürekli epidural infüzyon ile verilecek klinik dozlarla eşdeğer dozda %5 lidokain ($2 \text{ mg} \cdot \text{h}^{-1}$), bupivakain%1 ($0,4 \text{ mg} \cdot \text{h}^{-1}$), tetrakain %2,5 ($1 \text{ mg} \cdot \text{h}^{-1}$) ve $10 \text{ } \mu\text{L/h}$ salin verilen gruplara 30 dk'lık sol renal iskemi uygulanmış. Bazı ratlara %0,5'lik bupivakain yerine %1'lik bupivakain infüze edilmiştir. Salin infüzyonu alan ratlarda iskemiden 24 saat sonra orta düzeyde renal disfonksiyon, 48 saat sonra ise normal Cr. seviyeleri saptanmıştır. Bupivakain %1'lik infüzyon alan ve yalnızca sham opere ratlarda Cr seviyeleri 24. ve 48. saatlerde normal izlenmiştir.

Renal iskemi sonrası bupivakain%1, lidokain %5 yada tetrakain %2,5 konsantrasyonlarındaki kronik infüzyonları hasardan 24 ve 48 saat sonra renal fonksiyonu kötüleştirmiştir. Bupivakainin %0,5 devamlı infüzyonu salin uygulanan grupla benzer şekilde hasardan 24 ve 48 saat sonra renal fonksiyonları etkilememiştir. Aynı çalışmada apoptozis farklı şekillerde değerlendirilmiştir. Bunlar DNA ladderling, TUNNEL testi ve ışık mikroskopisi incelemesi (H&E ile boyanma). Sham opere ve İR+SF uygulanan ratlarda DNA ladderling gözlenmemiştir. Aksine, İR+lokal anestetik uygulanan ratlarda kolay gözlenen DNA fragmanlarından oluşan DNA ladderling mevcuttur. Sham grubunda TUNNEL-pozitif hücreler tespit edilememiştir. Salin infüzyon uygulanan ratlarda çok az sayıda TUNNEL- pozitif hücre gözlenmiş iken lokal anestetik uygulanan ve renal İR'ye maruz bırakılan ratlarda ileri derecede TUNNEL-pozitif hücreler gözlenmiştir. Tunnel boyanması nonspesifik olabildiğinden, ışık mikroskobu ile H&E ile boyanma ile de apoptotik cisimler incelendiğinde sham opere ratlarda ve

bupivakain %1'lik infüze edilen renal İR hasarı olmayan ratlarda, apoptozisin morfolojik belirtilerine rastlanmamıştır. Ancak bupivakain % 1 infüze edilen ve renal İR hasarı uygulanan ratlarda; salin infüze edilen ve İR hasarına maruz kalan ratlara kıyasla apoptotik cisim içeren tübül sayısı belirgin olarak fazladır (Sırası ile lidokain, bupivakain, tetrakain ve salin infüze). Lokal anestetik uygulanan ve İR hasarı uygulanmış ratlarda, sham opere ya da SF uygulanmış İR hasarına maruz kalan ratlara kıyasla ICAM-1 ve TNF- α 'yı kodlayan mRNA ekspresyonunda belirgin artış gözlenirken IL-1 β ekspresyonunda gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir. Yaptığımız araştırmada bu çalışma ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Sham opere grupta apoptozis gözlenmemiştir. Grup S'de çok az sayıda apoptozis tesbit edilirken epidural yol ile % 0.5 bupivakain infüze edilen ratların tamamında apoptozis gözlenmiştir. Bupivakain grubunda TNF- α enzim aktivitesi grup S ve grup K'ya oranla anlamlı derecede yüksek bulunurken IL-1 β enzim aktivitesi, hem grup B hem de grup S'de grup K'ya oranla anlamlı olarak yüksek bulundu.

İntestinal iskemi, trombus veya emboliye bağlı gelişen akut mezenterik oklüzyon ya da daha sıklıkla kardiyak yetmezliğe bağlı düşük mezenterik akım; hemorajik, travmatik veya septik şok; ciddi yanıklar veya bazı cerrahi prosedürler sonucunda ortaya çıkan bir klinik durumdur.^{130,131} Bedirli N. ve ark.¹³² ratlarda mezenterik İR modelinde epidural kateter ile uyguladıkları %0,5 konsantrasyonundaki 20 mL/h bupivakainin TNF- α , IL-6, IL-1 β ve MDA düzeyleri ile apoptozisi anlamlı derecede azalttığını tesbit etmişlerdir

Klinik olarak İR hasarı sıklıkla transplantasyon, iskemik serebrovasküler olay (*stroke*), miyokard infarktüsü, şok/resüsitasyon ve turnike uygulamalarından sonra görülmektedir.¹³³ Kardiyopulmoner by pass cerrahisi sistemik inflamatuvar

yanıtı tetikleyen cerrahi prosedürlerden biridir. Bach F. ve ark.¹³⁴ epidural infüzyon yoluyla %0,25 bupivakain sürekli uyguladıkları elektif kardiyopulmoner bypass cerrahisinde TNF- α ve lökosit sayısındaki artışın belirgin şekilde azalmasına bağlı olarak oluşan antinflamatuar etkilerin, epidural yolun splanknik kan akımını iyileştirme mekanizması ile değil de farklı mekanizmalarla oluşturduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Freise H. ve ark.¹³⁵ %0,5'lik bupivakainin 15 ul/h epidural infüzyonu uyguladıkları ve çekal ligasyon ve ponksiyon oluşturarak yaptıkları rat sepsis modelinde sepsis ile indüklenen sinüzoidal vazokonstriksiyon TEA tarafından düzeltilenmemiştir. Ayrıca sepsis+TEA grubunda, geçici venüller lökosit adezyonunun düzelmesine karşın sinüzoidal lökosit adezyonunda düzelme gözlenmemiştir. Sepsis ya da sepsis + TEA gruplarında kalıcı sinüzoidal lökosit adezyonu ve venüllerde lökosit adezyonu etkilenmemiştir. Sepsise bağlı olarak artan TNF- α ve ortaya çıkan karaciğer doku hasarının Sepsis + TEA tarafından etkilenmediği de gösterilmiştir. Sepsiste serum AST, ALT seviyelerinde artış gözlenirken bu artışlar TEA' den etkilenmemiştir.

Freise H. ve ark.¹³⁶ tarafından yapılan bir başka araştırmada ise, bupivakaini %0,5 konsantrasyonda 15 mcL/h torakal epidural yol ile uyguladıkları nekrotizan pankreatit oluşturulan ratlarda hepatik apoptozisi değerlendirdiklerinde pankreatit grubunda gözlenen hepatosit apoptozis artışı, pankreatit+TEA grubunda gözlenmemiştir. Ayrıca intrahepatik lökosit adezyonunun TEA tarafından etkilenmediği ve sinüzoidal vazokonstriksiyonun TEA ile düzeltildiği gösterilmiştir. Bu çalışmaya karşıt olarak, araştırmamızda torakal epidural yol ile uyguladığımız %0,5'lik 20mcg/kg/st bupivakainin iskemi reperfüzyon hasarı oluşturduğumuz tüm deneklerde apoptozise yol açtığını tesbit ettik. Epidural

uygulama ile bupivakain kullanımı sonucu hepatosit apoptozisi üzerinde farklı sonuçların ortaya çıkması muhtemelen kullanılan konsantrasyonuna bağlı olabileceğini ayrıca karaciğerin etkilenen primer yada sekonder organ olmasına göre de sonuçların değişebileceğini düşündürmektedir.

Hepatik İR hasarında veya farklı organlarda oluşturulan İR hasarının sonrasında karaciğer üzerine olan etkilerin araştırılması amacı ile Ginsenosid Rb1, Shen-Fu, Resveratrol gibi farklı ajanlar kullanılmıştır.

Ginsenosid Rb1'in immumodulatuar etkileri antioksidan, anti tümör aktivite ve antiinflamatuvar etki gibi çok geniş biyolojik aktiviteleri içerir.^{137,138,139} Beyin, kalp ve akciğer de iskemi reperfüzyon hasarında koruyucu olduğu gösterilmiştir.^{140,141,142} Jin Wang ve ark.¹⁴³ yaptığı çalışmalarında, intestinal İR tarafından indüklenen karaciğer hasarını düzelttiği ve karaciğer dokularında TNF- α ve MDA seviyelerini azalttığı gösterilmiştir

Chen T. ve ark.¹⁴⁴ kalp, beyin, böbrek ve akciğer gibi organları İR hasarından koruduğu gösterilen Shen-Fu' yu ortotopik karaciğer transplantasyonu yapılacak rat modellerinde araştırmışlardır. Shen-F grubunun daha düşük ALT, TNF- α seviyelerine neden olduğu ve erken dönem reperfüzyonda hepatositleri hasardan koruduğu, ileri dönem rat karaciğer greft fonksiyonlarını geliştirdiği gösterilmiştir. Başkibir çalışmada ise Gedik E. ve ark.¹⁴⁵ ratlarda uyguladıkları hepatik İR hasarı modelinde, Resveratrol uygulaması sonucu MDA seviyesi, hepatik hasar skoru ve karaciğerde histopatolojik değişikliklerin anlamlı olarak azaldığını göstermişlerdir.

6.SONUÇ

Bu deneysel araştırmanın sonucunda ;iskemi reperfüzyona maruz kalan ve sadece SF uygulanan ratlarda AST ve ALT düzeyleri sadece sham operasyonu yapılan iskemi reperfüzyon uygulanmamış gruba göre arttığı gözlemlendi. İskemi reperfüzyona maruz kalan ve bupivakain uygulanan ratlarda ise IL-1 β düzeylerinin hem SF uygulanan gruba hem de sham grubuna göre anlamlı bir artış gösterdiği tespit edildi. Ayrıca iskemi reperfüzyona maruz kalan hem SF hem de bupivakain uygulanan ratlarda TNF- α düzeylerinin sham grubundan daha yüksek olduğu saptandı.

Histopatolojik açıdan yapılan değerlendirmeler sonucunda ise bupivakain uygulaması tüm ratlarda apoptozise neden olmuştur.Ayrıca MDA düzeyleri açısından gruplar karşılaştırıldığında aralarında anlamlı fark olmadığı gözlemlendi.

Bu araştırmaya benzer renal veya mesenterik İR hasarı çalışmalarında torakal epidural anestezi yöntemi ile bupivakain kullanımına ait veriler çok az olmakla birlikte literatürde yer almaktadır.Bu nedenle torakal epidural anestezi uygulamasında bupivakain kullanımının İR hasarındaki etkilerinin belirlenmesi açısından daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

7. KAYNAK

1. Majino G., Jorris I.: Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of the cell death. *Am. J. Pathol.*, 1995, 146: 3-9
2. Zimmerman B. J., Granger N.: Reperfusion injury. *Surg. Clin. North. Am.* 1992; 72; 65-83
3. Parks D. A., Granger D. N.: Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesions formation. *Am. J. Physiol.*, 1986, 250: G749-753
4. Carden D. L., Granger D. N.: Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J. Pathol.*, 2000, 190: 255-66
5. Chamoun F., Burne M., O' Donnell M., Rabb H.: Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. *Front. Biosci.* 2000, 5: E103-E109
6. Kaplowitz N. Mechanisms of liver injury. *Journal of Hepatology.* 2000; 32: 39–47
7. Clemente A, Carli F: The physiological effects of thoracic epidural anesthesia and analgesia on the cardiovascular, respiratory and gastrointestinal systems. *Minerva Anesthesiol* 2008, 74: 549-563.
8. Low JH: Survey of epidural analgesia management in general intensive care units in England. *Acta Anaesthesiol Scand* 2002, 46: 799-805.
9. Spackman DR, McLeod AD, Prineas SN, Leach RM, Reynolds F: Effect of epidural blockade on indicators of splanchnic perfusion and gut function in critically ill patients with peritonitis: a randomised comparison of epidural bupivacaine with systemic morphine. *Intensive Care Med* 2000, 26: 1638-1645.
10. Sielenkamper AW, Van Aken H: Thoracic epidural anesthesia: more than just anesthesia/analgesia. *Anesthesiology* 2003, 99: 523-525.
11. Huang SS, Wei FC, Hung LM. Ischemic preconditioning attenuates postischemic leukocyte – endothelial cell interactions role of nitric oxide and protein kinase C. *Circ J* 2006; 70: 1070–1075
12. Jennings RB, Reimer KA, The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev. Med.* 1991; 42: 225-246

13. Green JC, Gower JD, Healing G, Cottenil LA, Fuller BJ, Simplan S, The importance of iron calcium and free radicals in reperfusion injury. an overview of studies in ischemic rabbits kidneys free radical Res Commun 1989;7:255-264
14. Siesjö BK. Historical overview. Calcium, ischaemia and death of brain cells. Ann NY Acad Sci 1988;522:638-61
15. Şener G, Sakarcan A, Yegen BC, Role of garlic in the prevention of ischemia - reperfusion injury Mol Nutr Food Res 2007 ;51:1345-1352
16. Collard, C.D., Gelman, S. Pathophysiology, Clinical Manifestations and Prevention of Ischemia-Reperfusion Injury. Anesthesiology 2001; 94:1133-1138.
17. Jassem W, Fuggle SV, Rela M, Koo DD, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. Transplantation 2002; 73:493-499.
18. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. Hepatology 2000; 32:169-173.
19. Olguner C, Koca U, Kar A, Karci A, İşlekel H, Canyılmaz M ve ark. Ischemic preconditioning attenuates the lipid peroxidation and remote lung injury in the rat model of unilateral lower limb ischemia reperfusion. Acta Anaesthesiol Scand 2006;50:150–155
20. Haimovici, M. Muscular, renal and metabolic complications of acute arterial occlusions. Myoneuropathic syndrome. Surgery 1989; 70:737-57.
21. Toledo-Pereyra LH, Simmons RL, Najarian JS. Protection of the ischemic liver by donor pretreatment before transplantation. American Journal of Surgery. 1975;129:513–517
22. Nieuwenhuijs VB, De Bruijn MT, Padbury RTA, Barritt GJ. Hepatic ischemia reperfusion injury: roles of Ca^{+2} and other intracellular mediators of impaired bile flow and hepatocyte damage. Digestive Diseases and Sciences 2006;51:1087-1102
23. Cutrin J.C, Perrelli MG, Cavalieri B et al. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. Free Radical Biology & Medicine, 2002; 33(9): 1200–1208

24. Khandoga A, Biberthaler P, Messmer K, Krombach F. Platelet– endothelial cell interactions during hepatic ischemia–reperfusion in vivo: a systematic analysis. *Microvascular Research*. 2003; 65: 71–77
25. Kaszaki J, Wolfárd A, Szalay L , Boros M. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 2006;38:826–828
26. Heijnen BHM, Straatsburg IH, Padilla ND, Van Mierlo GJ ve ark. Inhibition of classical complement activation attenuates liver ischaemia and reperfusion injury in a rat model. *British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology* 2005;143:15–23
27. Arumugam TV, Magnus T, Woodruff TM, Proctor LM, Shiels IA, Taylor SM. Complement mediators in ischemia-reperfusion injury. *Clin Chim Acta* 2006;374:33-45
28. Inglott FS,Habib NA,Mathie RT,Hepatic ischeamia reperfusion injury.The American Journal of Surgery 2001;181:160-161.
29. Mak Barocelli E, Ballomani V, Ghizzardi P, Cattaruzza F, Bertoni S,et al.The selective inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents intestinal ischemia reperfusion injury in mice *Nitric Oxide* 2006;14:121-218
30. Clemens MG. Nitric oxide in liver injury. *Hepatology*.1999; 30:1–5
31. Raghavan S.A.V, Dikshit M. Vascular regulation by the L-arginine metabolites, nitric oxide and agmatine. *Pharmacological Research* 2004; 49:397–414
32. Maxey K, Johnson J. NO: recent developments. *Cayman Currents*, 2002;11:14
33. Thiernemann C, Ruetten H, Wu CC, Vane JR. The Multiple organ dysfunction syndrome caused by endotoxin in the rat:attenuation of liver dysfunction by inhibitors of nitric oxide synthase *Br J. Pharmacol* 1995;116;2845-2851
34. Koti RS, Yang W, Dashwood MR et al. Effect of ischemic preconditioning on hepatic microcirculation and function in a rat model of ischemia reperfusion injury. *Liver Transplantation*. 2002;8(12): 1182–1191
35. Krishnaswamy K, Sushil K. Oxidative stres and Apoptosis. *Journal of Pathophysiology* 2000;7(27): 153–163
36. Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the tumor necrosis receptor superfamily. *Oncogene*. 1998; 17:3261–3270

37. Girn HR, Ahilathirunayagam S, Mavor AI, Homer-Vanniasinkam S. Reperfusion Syndrome: Cellular mechanisms of microvascular dysfunction and potential therapeutic strategies. *Vasc Endovascular Surg* 2007;41:177-93.
38. Shibuya H, Ohkohchi N, Tsukamoto S et al. Tumor necrosis factor-induced, superoxide-mediated neutrophil accumulation in cold ischemia/reperfusion in rat liver. *Hepatology* 1997;26:113–120
39. Wanner GA, Ertel W, Muller P. Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. *Shock*. 1996; 5: 34– 40.
40. Rudiger HA, Clavien P. Tumor necrosis factor alpha, but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology* 2002; 122: 202–210.
41. Shirasugi N, Wakabayashi G, Shimazu M. Up-regulation of oxygen-derived free radicals by interleukin-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Transplantation*. 1997; 64: 1398–1403.
42. Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 1997;53:451-465
43. Öztürk Feral. Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2002; 9(2): 143– 148
44. Ankarcrona M, Dybukt M, Bonfoco E. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*, 1995, 15:961-973,
45. Sastry P S, Subba KR. Apoptosis and the Nervous System. *J. Neurochem*. 2000, 74: 1-20
46. Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology*. 1995; 21; 1725-1741
47. Kelly KJ, Sandoval RM, Dunn KW et al. A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2003;284(5):1309–1318
48. Bekercioğlu M, Uğraş S, Dilek ON, Tercan M, Özyazgan İ. Serbest Radikaller. *Sendrom* 1998;10(3):85-94.
49. Cheeseman KH and Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993;49:481-93.

50. Freeman BA and Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982;47:412-2617
51. Cotran R: Hücre Zedelenmesi Adaptasyon, Basic Pathology Cotran R, Kumar V, Robbins S. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1994, S: 3 -11
52. Slater TF, Overwiev of methods used for detecting lipid peroxidation. *Methods enzymol* 1984; 105: 283-93
53. Green CJ, Healing G, Simpkin S et. al. Increased Susceptibility to Lipid Peroxidation in Rabbit Kidneys: A Consequence of Warm Ischemia and Subsequent Reperfusion. *Comp.Biochem. Physiol.* 1986, 83(3): 603 -606
54. Baykal Y, Kocabalkan F. Serbest radikaller ve hücre hasarı. *Sendrom* 2000;9:31-9.
55. Hunt JV, Bottoms MA, Mitchinson MJ. Oxidative alterations in the experimental glycation model of diabetes mellitus are due to protein-glucose adduct oxidation. *Biochem J* 1993;291(Pt 2):529-35. 1231
56. Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J et al. Oxidative stres and neutrophil activation-the twokeystones of ischemia/reperfusion injury. *Int J Cardiol.* 2002; 86(1): 41 -59
57. Duran E. Kalp ve Damar Cerrahisi. 1. Baskı. Edirne: Ekim 2004; cilt 1, 197
58. Krishnaswamy K, Sushil K. Oxidative stres and Apoptosis. *Journal of Pathophysiology* 2000;7(27): 153–163
59. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stres: signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology.* 2002;192:1–15
60. Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced moleculer damage and its application in pathology. *Pathol Int* 1999;49:91-102
61. Klaus Apel; Heribert Hirt. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signaling transduction. *Annual Review of Plant Biology. Health & Medical Complete.* 2004; 55:373–399
62. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidant defense mechanismsin the aging brain. *FASEB J* 1995; 9: 526-533
63. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS* 2007;115:81-103
64. Cherubini A, Ruggiero C, Morand C, Lattanzio F, Dell'aquila G, Zuliani G, Di Iorio A, Andres-Lacueva C. Dietary antioxidants aspotential

- pharmacological agents for ischemic stroke. *Curr MedChem.* 2008; 15: 1236-1248
65. Mickle DA, Weisel RD. Future directions of vitamin E and its analogues in minimizing myocardial ischemia-reperfusion injury. *Can J Cardiol* 1993; 9: 89-93.
 66. Virág L, Szabó C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 375-429
 67. Kayhan Z :Editör. Klinik Anestezi LogosYayıncılık Tic.Aş. İstanbul,2004
 68. Meymanis M. Chemistry and physiology of local anaesthesia *Br.J. of Anaesth*;1975;47:164
 69. Katz J. Atlas of regional Anaesthesia, Spinal and Epidural anatomy. A publish division of Prentice-Hall United States of America 1985
 70. Macintosh R, Leei A: Lumber puncture and spinal Analgesia 3th. Ed, Churcill Livingstone London, 1973, 15
 71. Bonica JJ. Kennedy WF. Marikawa K. "Circulatory affects of peridural block"; effect of levels of analgesia and dose of lidocain. *Anesthesiology*; 1970;33:619
 72. Morgan G.E, Jr. Maged S.M. Spinal, Epidural ve Kaudal bloklar. *Klinik Anesteziyoloji İstanbul* 2004; 253 -282
 73. Miller R.D; Anaesthesia 1st. Ed Churcill Livingstone, N.Y. 1981; pp:1096
 74. Salo M. Effects of anaesthesia and surgery on the immun response. *Acta Anaesth Scand* 1992;36:201-220
 75. Schriker T, Carli F, Schriber M, et al Propofol/Sufentanil anaesthesia suppresses metabolic and endocrine response during not after, lower abdominal surgery. *Anaesth Analg.* 2000;90:450-5
 76. Jakob SM: Splanchnic blood flow in low-flow states. *Anesth Analg* 2003;96:1129-38
 77. Doglio GR, Pusajo JF, Egurrola MA, Bonfigli GC, Parra C, Vetere L et al. Gastric mucosal pH as a prognostic index of mortality in critically ill patients. *Crit Care Med* 1991; 19:1037-40
 78. Poeze M, Takala J, Greve JW, Ramsay G: Pre-operative tonometry is predictive for mortality and morbidity in high-risk surgical patients. *Intensive Care Med* 2000; 26:1272-81

79. Adolphs J, Schmidt DK, Mousa SA, Kamin B, Korsukewitz I, Habazettl H, et al. Thoracic epidural anesthesia attenuates hemorrhage-induced impairment of intestinal perfusion in rats. *Anesthesiology* 2003; 99:685–92
80. Kapral S, Gollmann G, Bachmann D, Prohaska B, Likar R, Jandrasits O et al: The effects of thoracic epidural anesthesia on intraoperative visceral perfusion and metabolism. *Anesth Analg* 1999, 88:402Y406
81. Sielenkamper AW, Eicker K, Van Aken H: Thoracic epidural anesthesia increases mucosal perfusion in ileum of rats. *Anesthesiology* 2000, 93:844Y851
82. Ai K, Kotake Y, Satoh T, Serita R, Takeda J, Morisaki H: Epidural anesthesia retards intestinal acidosis and reduces portal vein endotoxin concentrations during progressive hypoxia in rabbits. *Anesthesiology* 2001, 94:263Y269
83. Spackman DR, McLeod AD, Prineas SN, Leach RM, Reynolds F: Effect of epidural blockade on indicators of splanchnic perfusion and gut function in critically ill patients with peritonitis: a randomised comparison of epidural bupivacaine with systemic morphine. *Intensive Care Med* 2000, 26:1638Y1645
84. Daudel F, Freise H, Westphal M, Stubbe HD, Lauer S, Bone HG et al. Continuous thoracic epidural anesthesia improves gut mucosal microcirculation in rats with sepsis. *Shock*. 2007 Nov;28(5):610-4.
85. Meissner A, Rolf N, Van Aken H: Thoracic epidural anesthesia and the patient with heart disease: Benefits, risks, and controversies. *Anesth Analg* 1997; 85:517-28
86. Hogan QH, Stekiel TA, Stadnicka A, Bosnjak ZJ, Kampine JP: Region of epidural blockade determines sympathetic and mesenteric capacitance effects in rabbits. *ANESTHESIOLOGY* 1995;83:604-10
87. Beattie WS, Badner NH, Choi P: Epidural analgesia reduces postoperative myocardial infarction: A meta-analysis. *Anesth Analg* 2001; 93:853-8
88. Groban L, Zvara DA, Deal DD, Vernon JC, Carpenter RL. Thoracic epidural anesthesia reduces infarct size in a canine model of myocardial ischemia and reperfusion injury. *J. Cardiothorac Vasc Anesth*. 1999 Oct;13(5):579-85.
89. Heavner JE. Local anesthetics. *Curr Opin Anaesthesiol* 2007; 20:336-342

90. Columb MO, MacLennan K. Local anesthetic agents. *Anaesth Intensive care Med* 2007; 8:159-162
91. Kindler CH, Yost CS. Two –pore domain potassium channels : New sites of local action anesthetics and toxicity. *Reg Anesth Pain Med* 2005; 30:260-275
92. Scholz A. Mechanisms of local anesthetics on voltage-gated sodium and other ion channels *Br. J. Anaesth* 2002; 89:52-61
93. Eti Z. Lokal Anestezikler. Tüzüner F ed. *Anestezi Yoğun Bakım Ağrı*. 1.Baskı, Türkiye 2010; 225-37.
94. Tetzlaff JE. The pharmacology of local anesthetics. *Anesthesiol Clin North Am* 2000; 18: 217-33
95. Kayaalp SO, editör. Lokal anestezikler. *Tıbbi Farmakoloji*. Ankara. 2000;789-820
96. Kocamanoğlu İ.S, Sarihasan B, Lokal Anestezikler. *O.M.Ü. Tıp Dergisi*. 2007; 24(1): 27–36
97. Mather LE, Huang YF, Veering B et al: Systemic and regional pharmacokinetics of levobupivacaine and bupivacaine enantiomers in sheep. *Anesth and Analg* 1998; 86: 805–811
98. Becker DE, Reed KL. Essentials of local anesthetic pharmacology. *Anesth Prog* 2006; 53: 98-109
99. Ronald D. Miller, editör. Local Anesthetics. *Anesthesia*. Philadelphia. 2000; 491–522
100. Morgan G.E. Jr, Maged S.M. Lokal Anestezikler. *Klinik Anestezioloji*. İstanbul. 2004;233–241
101. Cox B, Durieux ME, Marcus MAE. Toxicity of local Anaesthetics *Best Practice Research Clinical Anaesthesiology* 2003, 17:111-136
102. Zink W, Graf BM. The toxicity of local anesthetics: the place of ropivacaine and levobupivacaine. *Curr Opin Anaesthesiol* 2008; 21 (5): 645-50
103. İlhan A., Akyol O., Gurel A., Armutcu F., Iraz M., Oztas E.: Protective effects of caffeic acid phenethyl ester against experimental allergic encephalomyelitis induced oxidative stress in rats. *Free Radical Biology and Medicine*, (2004), 37, No:3, 386-394

104. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K.: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction . *Analytical Biochemistry*,(1979) 95, 351-358.
105. Mutz C,Vagts DA Thoracic Epidural Anaesthesia in sepsis –is it harmful or ptotective *Crit. Care* 2009;13(5):182
106. Yoshizimu T,Yanaga K,Soejima Y,Maeda T,Uchiyama E,Sugimachi K,Ameloration of liver injury by ischaemic preconditioning *Br J Surg* 1998;85:1636-1640
107. Chen MY, Li CH, Huang ZQ, Liu JC, Zhou NX, Huang XQ, Wang YSProtective effects of lidocaine injected into the hepatoduodenal ligament on warm ischemia-reperfusion injury to the rat liver. *Chin Med J (Engl)*. 2004 Feb;117(2):275-9.
108. Flecha, B.G., Cutrin, J.C., Boveris, A.Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion. *J. Clin. Invest.* 1993;91: 456-464.
109. Gupta, M., Dobashi, K., Greene, E.L., Orak, J.K., Singh, I.: Studies on hepatic injury and antioxidant enzyme activities in rat sub cellular organelles following in vivo ischemia and reperfusion. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1997; 176: 337-347.
110. Katayama, T, Yokoyama, S., Mitomi, T., Watanabe, K.: Alterations in glutathione peroxides activity following reperfusion injury to rat liver. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 1997;May 22(2): 33-44.
111. Kortgen A, Silomon M, Pape-Becker C, Buchinger H, Grundmann U, Bauer M. Thoracic but not lumbar epidural anaesthesia increases liver blood flow after major abdominal surgery.. *Eur J Anaesthesiol.* 2009 Feb;26(2):111-6
112. Mantovani A, Bussolino F, Introna M. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside.*Immunol Today* 1997;18:231– 40.
113. Wei Lan, Dominic C. Harmon, Jiang H. Wang,George D. Shorten, and Paul H. Redmond Activated Endothelial Interleukin-1 α , -6, and -8Concentrations and Intercellular Adhesion Molecule-1Expression Are Attenuated by Lidocaine , *Anesth Analg.* 2005 Feb;100(2):409-12.
114. Chika Kawasaki, Takashi Kawasaki, Masanori Ogata, Takeyoshi Sata, Irshad H. Chaudry, Lidocaine Enhances Apoptosis and Suppresses

Mitochondrial Functions of Human Neutrophil In Vitro (J Trauma. 2010;68: 401–408)

115. Y. H. Huang, P. S. Tsai and C. J. Huang. Bupivacaine inhibits COX-2 expression, PGE₂, and cytokine production in endotoxin-activated macrophages *Acta Anaesthesiol Scand* 2008; 52: 530–535
116. Ralph-Thomas Kiefer, Annette Ploppa, Wolfgang A. Krueger, Michael Plank, Boris Nohé, Local Anesthetics Impair Human Granulocyte Phagocytosis Activity, Oxidative Burst, and CD11b Expression in Response to *Staphylococcus aureus* . *Anesthesiology* 2003; 98:842–8
117. Requena JR, Fu MX, Ahmed MU, Jenkins AJ, Lyons TJ, ThorpeSR. Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. *Nephrol DialTransplant* 1996;5:48–53
118. De Iuliis A, Zanatta L, Vincenti E, Galzigna L Differences of ropivacaine and upivacaine relevant to antiinflammatory activity, platelet aggregation and antioxidant activity in vitro. *Farmaco*. 2001 Mar;56:153-7
119. Leduc C, Gentili ME, Estèbe JP, Le Corre P, Moulinoux JP, Ecoffey C, The effect of local anesthetics and amitriptyline on peroxidation in vivo in an inflammatory rat model: preliminary reports. *Anaesth Analg*. 2002 ;95:992-6
120. Kim H.J, Sung S.R, Seo K.S ,Lim S.W, Yoon T.G, Bupivacaine induced apoptosis in the primary cultured cardiomyocytes via p38MAPKs .*Korean. J.Anesthesiol*.2006,50,S48-S56
121. Lee J.C, Kassis S, Kumar S, Badger A, Adams J.L, p38 mitogen activated protein kinase inhibitors-mechanisms therapeutic potential. *Pharmacol.Ther* 1999,82,389-397
122. Gold M.S, Reichling D.B, Hampl KF, Drasner K., Levine JD, Lidocaine toxicityin primary afferent neurons from the rat.*J Pharmacol Exp .Ther*.1998, 285,413-421.
123. Grethe S, Ares M.P, Andersson T, Porn-Ares M.I, p38 MAPK mediates TNF-induced apoptosis in endothelialcells via phosphorylation and down regulation of bcl-x(L).*Exp. Cell.Res* 2004,298,632-642
124. Boselli E, Duflo F, Debon R, Allaouchiche B, Chassard D, Thomas L, Portoukalian The induction of apoptosis by local anesthetics: a comparison between lidocaine and ropivacaine. *Anesth Analg*. 2003 Mar;96(3):755-6,

125. Perez-Castro R, Patel S, Garavito-Aguilar ZV, Rosenberg A, Recio-Pinto E, Zhang J, Blanck TJ, Xu F Cytotoxicity of local anesthetics in human neuronal cells . *Anaesth Analg* MA;108(3):997-1007
126. Park CJ, Park SA, Yoon TG, Lee SJ, Yum KW, Kim HJ. Bupivacaine induces apoptosis via ROS in the Schwann cell line. *J Dent Res*. 2005 Sep;84(9):852-7
127. Lu J, Xu SY, Zhang QG, Xu R, Lei HY. Bupivacaine induces apoptosis via mitochondria and p38 MAPK dependent pathways. *Eur J Pharmacol*. 2011 Apr 25;657:51-8.
128. Wilmar de Graaf, Gwen M. P. Susanne Herroeder, Deha Erdogan, Markus W. Hollmann, and Thomas M. van Gulik, Systemic lidocaine does not attenuate hepatic dysfunction after liver surgery in rats. *Anesth Analg*. 2012;114:566-73.
129. Lee HT, Krichevsky IE, Xu H, Ota-Setlik A, D'Agati VD, Emala CW. Local anesthetics worsen renal function after ischemia-reperfusion injury in rats. *AmJ. Physiol Renal Physiol* 2004;286:111-9
130. Homer-Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ. Postischemic organ dysfunction: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997;14:195–203
131. Di Paola R, Melani A, Esposito E, Mazzon E, Petemiti I, Brementi P, Pedata F. Adenosine A2A receptor-selective stimulation reduces signalling Pathways in the development of intestine ischemia and injury. *Shock* 2010;33:541–51
132. Nurdan Bedirli, Nalan Akyürek, Ömer Kurtipek, Mustafa Kavutcu, Seyfi Kartal, and Asli Cavunt Bayraktar, Thoracic Epidural Bupivacaine Attenuates Inflammatory Response, Intestinal Lipid Peroxidation, Oxidative Injury, and Mucosal Apoptosis Induced by Mesenteric Ischemia/Reperfusion *Anesth Analg* 2011;113:1226–32
133. Howell JG, Zibari GB, Brown MF, Burney DL ve ark. Both ischemic and pharmacological preconditioning decrease hepatic leukocyte/endothelial cell interactions. *Transplantation* 2000;69:300–306.
134. Bach F, Grundmann U, Bauer M, Buchinger H, Soltész S, Graeter T, Larsen R, Silomon M. Modulation of the inflammatory response to cardiopulmonary bypass by dopexamine and epidural anesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2002 ;46:1227-35.

135. Freise H, Daudel F, Grosserichter C, Lauer S, Hinkelmann J, Van Aken HK, Thoracic epidural anesthesia reverses sepsis-induced hepatic hyperperfusion and reduces leukocyte adhesion in septic rats. *Crit Care*. 2009;13:R116
136. Freise H, Lauer S, Konietzny E, Hinkelmann J, Van Aken HK, Lerch MM Hepatic effects of thoracic epidural analgesia in experimental severe acute pancreatitis. *Anesthesiology*. 2009;111:1249-56.
137. Kenarova B, Neychev H, Hadjiivanova C, Petkov VD. Immunomodulating activity of ginsenoside Rg1 from *Panax ginseng*. *Jpn J Pharmacol*. 1990;54:447–454.
138. Attele AS, Wu JA, Yuan CS. Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions. *Biochem Pharmacol*. 1999;58:1685–1693.
139. Shibata S. Chemistry and cancer preventing activities of ginseng saponins and some related triterpenoid compounds. *J Korean Med Sci*. 2001;16:S28–S37.
140. Zeng HS, Liu ZX, Liu XC. Effect of ginsenoside-Rb1 and Re against cardiomyocyte apoptosis and expression of the related gene proteins in the experimental cardiac ischemia-reperfusion in rats. *Chin J Phys Med Rehabil*. 2003;25:402–405.
141. Geng Q, Wu D, Xie YC, Zhang BG, Wu H, Yin WH. Effects of ginsenoside Rb1 on apoptosis and Bcl-2, Bax gene expression in rabbits with lung ischemia/reperfusion injury. *Chin J TCM WM Crit Care*. 2005;12:159–161.
142. Li FC, Tao ZY, Liu AM, Li JL, Wu ZH, Lin JH. Effect of ginsenoside Rb1 on the expression of GLUT1 in penumbra area after cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Chin J Exp Surg*. 2005;22:196–197.
143. Wang J, Qiao L, Li Y, Yang G. Ginsenoside Rb1 attenuates intestinal ischemia-reperfusion-induced liver injury by inhibiting NF-kappaB activation. *Exp Mol Med*. 2008 ;40:686-98
144. Chen T, Cheng M, Yuan Z, Zhou S, Yu Z. Protective role of Shenfu on ischemia-reperfusion injury of rat liver grafts. *Transplant Proc*. 2012;44:978-81.
145. Gedik E, Girgin S, Ozturk H, Obay BD, Buyukbayram H. Resveratrol attenuates oxidative stress and histological alterations induced by liver ischemia/reperfusion in rats. *World J Gastroenterol*. 2008 14;14:7101-6

8. ÖZET

Ratlarda Oluşturulan Karaciğer İskemi ve Reperfüzyon Modelinde Epidural Bupivakainin Karaciğer Hasarına Olan Etkilerinin Karşılaştırılması

Yüksek riskli cerrahi operasyonlarda gastrointestinal perfüzyon önemli bir yere sahiptir. Çünkü splanknik hipoperfüzyon, endotoksemi, mukazal geçirgenlik artışı hatta organ yetmezliğine neden olabilir. İskemi sonrası reperfüzyon ise kısa süreli iskeminin tek başına oluşturduğu hasardan daha fazlasına neden olabilir. Hepatik iskemi reperfüzyon hasarı, geniş veya radikal hepatobiliyer cerrahi girişimlerine bağlı olarak ortaya çıkabilir. Geçici iskemi sonrası oluşan reperfüzyon, hepatositlerde letal hasar veya postoperatif karaciğer disfonksiyonuna neden olur.

Rejyonel anestezi yöntemlerinden biri olan TEA'nın splanknik kan akımı üzerindeki etkilerinin mekanizması net olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen, splanknik hipoperfüzyona karşı koruyucu olabileceği bilinmektedir. Ancak bu etkilerinin oluşmasında kullanılacak olan lokal anestezik ajanların da etkileri gözardı edilmemelidir.

Araştırmada denek olarak kullanılan 18 rat Grup K (n=6)=Sham (laparotomi), Grup S (n=6)=Kontrol (laparotomi, İR epidural kateter, 20 mcg/kg/st % 0,9 NaCl), Grup B (n=6)=Bupivakain (Laparotomi, İR epidural kateter, 20 mcg/kg/st bupivakain) şeklinde rastgele 3 gruba ayrıldı. Hepatik iskemi süresi 60 dakika reperfüzyon ise 360 dakika olarak uygulandıktan sonra karaciğer dokusu örneklerinden MDA, apoptozis ve histopatolojik inceleme yapıldı. Kan örneğinden TNF- α , IL-1 β , AST ve ALT düzeyleri ölçüldü.

İskemi reperfüzyona maruz kalan ve TEA amacıyla sadece serum fizyolojik uygulanan ratlarda karaciğer fonksiyon testleri dikkate alındığında,

AST ve ALT düzeyleri sadece sham operasyonu yapılan iskemi reperfüzyon uygulanmamış gruba göre arttığı gözlemlendi. İskemi reperfüzyona maruz kalan ve TEA amacıyla bupivakain uygulanan ratlarda ise IL-1 düzeylerinin hem TEA amacıyla serum fizyolojik uygulanan gruba hem de sham grubuna göre anlamlı bir artış gösterdiği tespit edildi. İskemi reperfüzyona maruz kalan ve TEA amacıyla hem SF hem de bupivakain uygulanan ratlarda TNF- α düzeyleri sham grubundan daha yüksek olduğu saptandı. Ayrıca TEA amacıyla bupivakain uygulaması tüm ratlarda apoptozise neden olduğu görülmüştür. Gruplar arasında MDA düzeyleri açısından anlamlı fark saptanmadı.

Bu sonuçlara dayanarak, sistemik inflamatuvar cevabı ve lipid peroksidasyonunu önlemede epidural bupivakainin yetersiz kaldığı ve karaciğer hücrelerinde apoptozise neden olduğu ortaya çıkmıştır. Ancak benzer İR hasarı modellerinde epidural bupivakain uygulanmasına karşın, hepatik İR hasarında epidural bupivakain kullanımına ait çalışmalara atlanılmadığından konu ile ilgili daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer iskemi reperfüzyon, Torakal Epidural, Bupivakain

9. SUMMARY

Comparison Of The Effects of Epidural Bupivacaine on Hepatic Injury in a Rat Model of Ischemia and Reperfusion

Gastrointestinal perfusion plays an important role in high-risk surgical procedures as the splanchnic hypoperfusion may cause endotoxemia, increase in mucosal permeability and even organ failure. Reperfusion may even cause more damage than the short period of ischemia. Hepatic ischemia reperfusion injury may be observed after extensive or radical hepatobiliary surgery. Lethal hepatocytes injury or postoperative liver dysfunction occur due to reperfusion observed after ischemia. Although the exact mechanism of the effects on splanchnic blood flow is obscure, TEA may be protective against splanchnic hypoperfusion. Nevertheless the choice of local anesthetic agent should also be taken into consideration for these effects.

Eighteen rats were randomly divided into 3 groups: Group K (n=6)=Sham (laparotomy), Group S (n=6)=Control (laparotomy, IR epidural catheter, 20 mcg/kg/h 0.9 NaCl) and Group B (n=6)=Bupivacaine (Laparotomy, IR epidural catheter, 20 mcg/kg/h bupivacaine). Liver tissue was harvested for MDA analysis, apoptosis and histopathological examination after 60 minutes of ischemia followed by 360 minutes of reperfusion. Blood samples were also collected for TNF- α , IL-1 β , AST and ALT analysis.

The AST and ALT levels were higher in ischemia and reperfusion group which took only normal saline for TEA than the sham group which was not subjected to ischemia reperfusion. In ischemia reperfusion group which took bupivacaine for TEA, IL-1 levels were significantly higher than both the group

which normal saline was given for TEA and sham group. TNF- α levels were higher in ischemia reperfusion groups which took both bupivacaine and normal saline for TEA than the sham group. Besides, bupivacaine administration for TEA revealed apoptosis in all animals.

These results showed that epidural bupivacaine is not a suitable agent for preventing inflammatory response and lipid peroxidation. Moreover epidural bupivacaine trigger apoptosis in hepatocytes. Further studies are needed as the literature review revealed no studies on the effects of epidural bupivacaine on hepatic ischemia reperfusion injury

Key Words: Hepatic Ischemia Reperfusion, Thoracic Epidural, Bupivacaine

10. EKLER

10.1.ETİK KURULONAYI



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/131-12273
KONU :

30.06/2011

Sayın

Prof.Dr.Fusun BOZKIRLI
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anestezi ve Reanimasyon Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Fusun BOZKIRLI, Zehra SARIKUŞ, Nurdan BEDİRLİ, Ümit BAĞRIAÇIK ve Güldal YILMAZ'dan oluşan, G.Ü.ET-11.053 kod numaralı ve **"Ratlarda Oluşturulan Karaciğer İskemi ve Reperfüzyon Modelinde Epidural Bupivakain'in Karaciğer Hasarına Olan Etkilerinin Karşılaştırılması"** başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-11.053 and entitled **"Comparison of the Effects of Epidural Bupivacaine on Hepatic Injury in a Rat Model of Ischemia and Reperfusion"** is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

EK : 1 Liste


Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı