

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

SIÇANLARDA NÖROAKSİYEL UYGULANAN
LİPOZOMAL BUPİVAKAİNİN KONTROLLÜ
SALINIM PATERNLERİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. İlker YİĞİT

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Berrin GÜNAYDIN

ANKARA

MART 2014

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

SIÇANLARDA NÖROAKSİYEL UYGULANAN
LİPOZOMAL BUPİVAKAİNİN KONTROLLÜ
SALINIM PATERNLERİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. İlker YİĞİT

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Berrin GÜNAYDIN

ANKARA

MART 2014

KABUL ve ONAY

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tez Sınav Tutanağı

Adı ve Soyadı	İlker Yiğit
Baba Adı	Mehmet
Doğum Yeri/Tarihi	Pazarcık / 18.07.1984
Diploma Tarihi/Diploma No	29.06.2009 -09-311-054
Mezun Olduğu Fakülte	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı/Bilim Dalı	Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD.
İhtisas Süresi	Yıl: 4 Ay:
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı

UZMANLIK TEZİNİN ADI: “Ratlarda Nöroaksiyel Uygulanan Lipozomal Bupivakainin Kontrollü Salınım Paternleri”

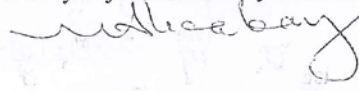
JÜRİ KARARI:

13 Mart 2014 tarihinde saat 10⁰⁰ da toplanan Sınav Jürisi, adayın yapmış olduğu “Ratlarda Nöroaksiyel Uygulanan Lipozomal Bupivakainin Kontrollü Salınım Paternleri” isimli uzmanlık tezini değerlendirmiş ve oy birliği ile yeterli olarak kabul etmiştir

JÜRİ ÜYELERİ

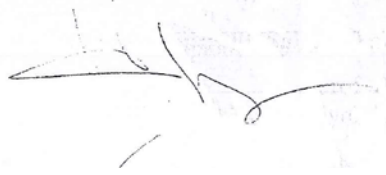
BAŞKAN

Prof. Dr. Mehmet AKÇABAY
Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD. Başkanı



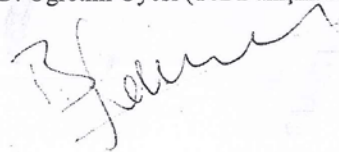
ÜYE

Prof. Dr. Hülya ÇELEBİ
Anesteziyoloji ve Reanimasyon
A.D. Öğretim Üyesi



ÜYE

Prof. Dr. Berrin GÜNAYDIN
Anesteziyoloji ve Reanimasyon
A.D. Öğretim Üyesi (Tez Danışmanı)



TEŞEKKÜR

Bu tez araştırmasının yapılmasında öncelikle lipozomların in vitro hazırlanmasını sağlayan Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (GÜEF) Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. İ.Tuncer Değim'e teşekkür ederiz. Ayrıca deneylerin yapılmasında büyük katkıları olan G.Ü Tıp Fakültesi Beyin Cerrahisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Hakan Emmez ve GÜEF Farmakoloji Anabilim Dalı'na ait Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarını kullanarak deneylerin yapılmasını sağlayan Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Orhan Uludağ ile Araştırma Görevlileri Nur Banu Bal ve Derya Elif Özdemir'e teşekkür ederiz.

KISALTMALAR

BHCl: Bupivakain HCl

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

CL: Konvansiyonel Lipozomlar

GUV: Çok büyük tek tabakalı Vesiküller

KVS: Kardiyovasküler Sistem

LA: Lokal Anestezik

LB: Lipozomal Bupivakain

LCL: Dolaşımda uzun süre kalan lipozomlar

LUV: Büyük tek tabakalı Vesiküller

MLV: Multilameller Vesiküller

MOE: Maksimum Olası Etki

MSS: Merkezi Sinir Sistemi

MUV: Orta büyüklükte tek tabakalı Vesiküller

MVV: Çok Vesiküllü Vesiküller

NNCA: Sodyum kanalına bağlı olmayan etkiler

OLV: Oligolameller Vesiküller

SUV: Küçük tek tabakalı Vesiküller

UV: Tek tabakalı Vesiküller

YVLB: Yüksek Verimli Lipozomal Bupivakain

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
Teşekkür	iii
Kısaltmalar	iv
İçindekiler	v
Tablolar Dizini	ix
Şekiller Dizini	x
Resimler Dizini	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Lipozom tanımı	3
2.1.1. Etki Mekanizmaları	5
2.1.2. Sınıflandırılması	6
2.1.3. Lipozom Hazırlanmasında Kullanılan Fosfolipitler	9
2.1.4. Lipozom Hazırlama Yöntemleri	10
2.1.5. Kullanım Alanları ve Avantajları	12
2.2. Lokal Anestezikler	15
2.2.1. Tarihçe	15

2.2.2. Etki Mekanizması	16
2.2.3. Kimyasal yapı ve Yapı-Aktivite İlişkisi	18
2.2.4. Farmokokinetik Özellikleri	21
2.2.4.1. Emilim	22
2.2.4.2. Dağılım	23
2.2.4.3. Atılım	23
2.2.5. Toksisite	24
2.2.5.1. Sistemik Toksisite	24
2.2.5.2. Lokal Toksisite	26
2.3. Lipozomal Bupivakain	29
2.4. Nöroaksiyel Blok	30
2.5. Sıçanlarda Nöroaksiyel Uygulama Açısından Anatomi	31
2.5.1. Vertebral Kolon	31
2.5.2. Medulla Spinalis	31

3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1. Laboratuvar Cihazları ve Gereçler	34
3.2. Kimyasal Maddeler	35
3.3. Deney Hazırlığı	35
3.3.1. In vitro Lipozomal Bupivakain Hazırlama Yöntemi	35
3.3.1.1. Lipozomal Bupivakain HCl Hazırlama	35
3.3.1.2. Yüksek Verimli Lipozomal Bupivakain HCl Hazırlama	36
3.4. In Vivo Deneylerin Yapılışı	37
3.4.1. Hayvan türü, bakım yeri ve koşulları	37
3.4.2. İntratekal ilaç uygulaması	37
3.4.3. Analjezik etkinin değerlendirilmesi	40
3.4.3.1. Kuyruk çekme testi	39
3.4.4. Motor bloğun değerlendirilmesi	41
3.4.5. Hayvan yaşamını sonlandırma yöntemi	42
3.4.6. İstatistiksel Analiz	42

4. BULGULAR	43
4.1. Kuyruk Çekme Süreleri	43
4.2. Maksimum Olası Etki Oranı (MOE%)	48
4.3. Motor Blok Dereceleri	50
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ	58
7. KAYNAKLAR	59
8. ÖZET	71
9. SUMMARY	73
10 EKLER	75
Ek 1. ETİK KURULU İZİNİ	75
11. ÖZGEÇMİŞ	76

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Lipozom tipleri, bileşimleri ve özellikleri	6
Tablo 2. Lipozomların yapısal özelliklerine göre sınıflandırılması	8
Tablo 3. Bupivakain'in özellikleri	20
Tablo 4. Bupivakain'in fizikokimyasal özellikleri	21

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Sulu kısmı lipit molekülleri tarafından oluşturulan membranla çevrilmiş mikropartiküler veya kolloidal çok tabakalı konvansiyonel lipozom	4
Şekil 2. MLV'nin kesitsel görüntüsü	8
Şekil 3. A) Bir fosfolipidin genel kimyasal yapısı B) Fosfatidiletanolamin (PE) ve Fosfatidilkolin (PC) 'nin kimyasal yapısı	9
Şekil 4. Lipozom hazırlama yöntemlerinin şematik gösterimi	12
Şekil 5. Lokal anesteziklerin kimyasal yapısı	19
Şekil 6. Sıçan iskelet sistemi	31
Şekil 7. Sıçan medulla spinalisinin servikal ve lumbar genişlemeleri	32
Şekil 8. Sıçan medulla spinalisi ve çevreleyen dokuların transvers kesiti	33
Şekil 9. Bupivakain içeren farklı formülasyonların intratekal enjeksiyonundan sonraki kuyruk çekme sürelerinin zamanla değişimi	44
Şekil 10. İntratekal BHCl enjeksiyonundan sonraki kuyruk çekme sürelerinin zamanla değişimi	45
Şekil 11. İntratekal LB enjeksiyonundan sonraki kuyruk çekme sürelerinin zamanla değişimi	46

Şekil 12. İntratekal YVLB enjeksiyonundan sonraki kuyruk çekme sürelerinin zamanla değişimi	47
Şekil 13. Bupivakain içeren farklı formülasyonların intratekal enjeksiyonundan sonraki % Maksimum Olası Etki (MOE) oranlarının zamanla değişimi	49
Şekil 14. Bupivakain içeren farklı formülasyonların intratekal enjeksiyonundan sonraki toplam motor blok derecelerinin zamanla değişimi	50
Şekil 15. Bupivakain içeren farklı formülasyonların intratekal enjeksiyonundan sonraki hayvanlarda motor blok yüzdelerinin zamanla değişimi	51

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Rotavapor cihazı	36
Resim 2. Sedasyon-anestezi için sevofluran ıslatılmış pamukla desikatöre konulan sıçan	39
Resim 3. İnsülin enjektörü ile intratekal ilaç enjeksiyonu	39
Resim 4. İntratekal ilaç enjekte edilmiş sıçanın <i>tail flick</i> (kuyruk çekme) cihazına yerleştirilmesi	41

1. GİRİŞ

Postoperatif ağrı tedavisi ve kullanılan analjeziklerin istenmeyen yan etkileri hasta konforu ve memnuniyetini önemli ölçüde etkiler (1, 2). Hastalarda postoperatif ağrının azaltılmasında sık kullanılan opiyoid ilaçların bulantı, baş dönmesi, kusma, idrar retansiyonu, kabızlık, kaşıntı gibi istenmeyen yan etkileri bulunmaktadır (3,4). Bu opiyoid ilişkili yan etkiler hastanede kalış süresini ve böylece hastane masraflarını artırmaktadır (5).

Postoperatif ağrının azaltılmasında analjezik amaçlı cerrahi kesi yerine lokal anesteziik infiltrasyonları uygulanmaktadır. Lokal anesteziik molekülleri hızla damar duvarını geçerek enjeksiyon bölgesinden uzaklaştığı için uzun etkili lokal anesteziikler bu amaçla en sık tercih edilmelerine rağmen analjezi süreleri kısıtlıdır. Bu süreyi uzatmak için hedef bölgeye kateter yerleştirilerek infüzyon pompaları bağlanmaktadır (6, 7). Ancak kullanılan bu kateterler hayatı tehdit eden enfeksiyon, sepsis, intravasküler yerleşim veya kateterin intravasküler alana göçü gibi komplikasyonlara neden olabilir (8). Buradan yola çıkılarak tek doz ilaç enjeksiyonuyla çok uzun süreler analjezi sağlayabilmek amacıyla lokal anesteziiklerin lipozomlar içinde enkapsülasyonları gündeme gelmiştir (9-12). Sıçanlarda, tavşanlarda ve farelerde lipozomal bupivakain ile yapılan deneysel araştırmalarda yara yerine infiltrasyon, intrasisternal veya subkutan uygulamanın nörotoksik yan etkileri araştırılmıştır (9-12). Sıçanlarda yara yerine multilameller lipozomal bupivakain infiltre edilmesinin analjeziyi uzattığı gösterilmiştir (9). Tavşanlarda intrasisternal uygulanan multilameller lipozomal bupivakainin daha

az sempatik blok yaptığı gösterilmiştir (10). Farelerde subkutan multiveziküler (MVV) lipozomal bupivakain enjeksiyonu sonrası analjezi süresinin uzadığı gösterilmiştir (11).

Ayrıca lipozomal bupivakainin periferik sinir ve nöroaksiyel blokta kullanımı ile ilgili devam eden hayvan çalışmaları ve faz 1 çalışmaları yanında in vitro koşullarda multilameller lipozomal bupivakain ile yapay beyin omurilik sıvısı (BOS) içindeki etkinliğini ve salınım süreleri gösterilmiştir (13-16).

Bu tez araştırmasında ise uzun etkili bir lokal anestezik olan bupivakainin analjezik etkisinden daha uzun süre faydalanabilmek için in vitro koşullarda hazırlanan multilameller lipozomal bupivakaini intratekal olarak sıçanlara uygulayarak lipozomal bupivakainin in vivo kontrollü salınım paternlerini göstermeyi amaçladık.

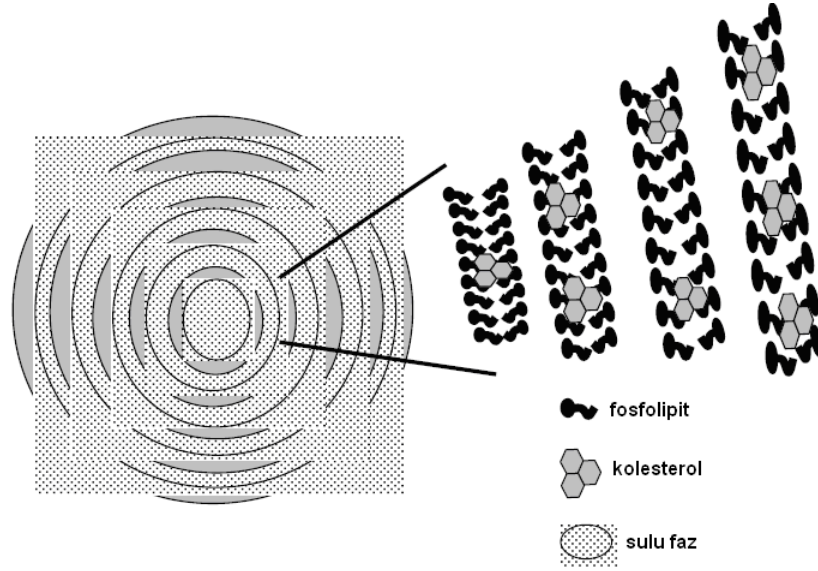
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Lipozom Tanımı

Fosfolipitler hidrate edildiğinde veya sulu ortamda dağıtıldıklarında oluşan mikroskobik küresel keseciklere lipozom denir (17). Önceleri biyolojik membran özellikleri nedeniyle çalışmalarda kullanılmış olan lipozomlar, günümüzde ilaç sunum sistemi olarak birçok bilim dalında farklı kullanım alanı bulmuştur (18).

Çapları nanometre ile mikrometre boyutları arasında değişen lipozom vezikülleri biyogeçimli ve biyoparçalanan özellikteki lipit içerikleri sayesinde hücre membran yapısına benzerlik gösterirler. Kimyasal modifikasyonlarla artırılabilen bu özellikleri sayesinde, ilaç hedeflendirme çalışmalarında ve immün modülasyonda yaygın kullanılırlar (19, 20).

Enkapsülasyon, ilacın lipozom içine hapsedilmesi olarak bilinir. Lipozomun, ilaç taşıyabilecek üç bölgesi mevcuttur. İlaç molekülü fosfolipit tabakaya (lipofilik etkin maddeler), sulu kısma (hidrofilik etkin maddeler) veya su-lipit ara yüzeyine (peptid ve küçük proteinler) hapsedilerek taşınabilir. Böylece hem lipofilik hem de hidrofilik etkin maddeler hatta orta derecede lipofiliteye sahip etkin maddeler lipozom şeklinde formüle edilebilir (17, 21, 22).



Şekil 1. Sulu kısmı lipit molekülleri tarafından oluşturulan membranla çevrilmiş mikropartiküler veya kolloidal lipit kesecikleri şeklinde olan çok tabakalı konvansiyonel lipozomun kesitsel görüntüsü (17)

Lipozomların diğer ilaç şekillerine göre birçok üstünlüğü bulunmaktadır. Bu sistemler, vücudun yapı taşı olan fosfolipitlerden oluştuğu için toksik ve immünojenik özellik göstermezler (23). Lipozomlar, ilacı kontrollü bir şekilde verdikleri için, etkin madde serum düzeyini istenilen süre terapötik değerde tutabilirler. Bu nedenle de, dozlama aralığını uzatırlar. Etkin madde kan konsantrasyonunu aniden yükseltmedikleri için de etkin maddenin yan ve toksik etkilerini çok azaltır veya ortadan kaldırır. Etkin maddeyi fosfolipit tabaka içinde korudukları için de ortamdaki enzimatik bozunmadan korurlar. Özellikle bu peptit/proteinlerin verilişinde oldukça önemlidir. Ayrıca, ilacı kontrollü bir şekilde verdikleri için de yarılanma ömrü kısa olan maddelerin yarılanma ömürlerini uzatırlar. Lipozomların hem hidrofilik hem de lipofilik kısımları olduğu için lipofilik ve hidrofilik etkin maddelerin verilişi için uygun sistemlerdir.

Bölgesel uygulandıklarında lipozomlar enjeksiyon tarafında kalırken, ilacı çevreleyen doku ve vücut boşluğuna yavaşça yayılır. İlacın doku ve vücut boşluğundan temizlenmesi plazmadan temizlenmesine göre daha yavaş olup, çok yüksek ve sürekli bölgesel konsantrasyon oluşmasına fakat çok düşük seviyede sistemik maruziyete neden olur.

2.1.1. Etki Mekanizmaları

Lipozomlar başlıca 5 yolla etki gösterirler.

1. Füzyon: Lipozomun en dış tabakasının hücre membranıyla birleşmesidir.
2. Adsorbsiyon: Lipozomun hücre yüzeyine sıkıca tutunmasıdır.
3. Lipit değişimi: Hücre membran yapısındaki lipitlerin, lipozom yapısında bulunan lipitlerle karşılıklı değişimidir.
4. Endositoz: Hücre yüzeyine temasta bulunan lipozomların fagositoz yoluyla hücre içine alınmasıdır.
5. Hücre içine lipozom sızıntısı: Hücre ve lipozomun bire bir temasının sonucu olarak lipozomların hücre içine girişi söz konusu olur. Bu giriş lipozomların serum albumini ve lipoproteinler ile etkileşimi sonucunda meydana gelir (24).

2.1.2. Sınıflandırılması

Lipozomlar; pH-duyarlı lipozomlar, katyonik lipozomlar, konvansiyonel lipozomlar (CL) dolaşımda uzun süre kalan lipozomlar (LCL) ve immünolipozomlar olmak üzere gruplara ayrılarak bileşimlerine ve ilaç taşıma özelliklerine göre sınıflandırılırlar (Tablo 1) (25).

Tablo 1. Lipozomların tipleri, bileşimleri ve özellikleri (25)

Tip	Bileşim	Özellikler
Konvansiyonel Lipozomlar (CL)	Nötral veya negatif yüklü fosfolipitler ve kolesterol	-Kısa yarı ömür Retikülo endotelyal sistem (RES) tarafından hızla alınır -RES'e hedeflendirme için uygun -Doza bağlı farmakokinetik
Katyonik Lipozomlar	Katyonik lipidler DDAB (dioktodesil dimetilamonyumbromid), DOGS (dioktodesil amigdoglisin spermin), DOSPA (2,3-dioleiloksi-N-[2 (spermin-karboksiamido) etil]-N,N-dimetil-1-propan aminyumtrifloroasetat)	-Negatif yüklü makromoleküllerin taşınması için uygun (DNA, RNA, vb) -Yapısal olarak stabil değil -Yüksek dozlarda toksik -Lokal kullanımı sınırlı

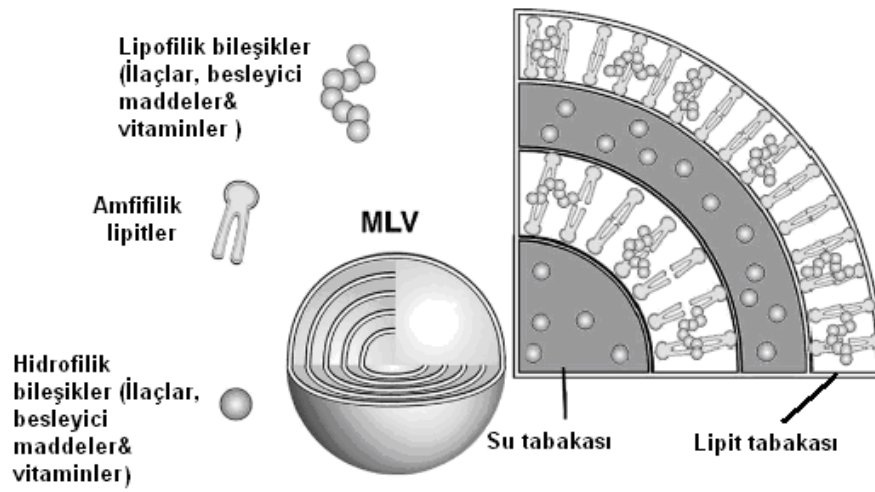
Dolaşımda uzun süre kalan lipozomlar (LCL)	Nötral yüksek camsı geçiş sıcaklığına sahip lipitler Kolesterol + % 5-10 PEG (poli etilen glikol)-DSPE (kuru katı polimer elektroliti), GM1 (galaktozil-N-asetilgalaktozaminil-(N-asetilnöroaminil)-galaktozilglikozil seramid) veya HPI (hidrojene fosfatidil inozitol)	-Hidrofilik yüzey kaplama -RES tarafından alımı zor -Dolaşımda kalış süresi uzun -Doza bağlı farmakokinetik
İmmünilipozomlar	Antikora bağlı CL veya LCL	-Hücreye spesifik bağlanma -Hedef doku çevresinde salıverilme

Ayrıca lipozomlar yapısal özelliklerine göre de sınıflandırılırlar (Tablo 2) (25, 26).

Tablo 2. Lipozomların yapısal özelliklerine göre sınıflandırılması (25, 26)

Kısaltma	Adı	Boyutu
MLV	Multilameller Büyük Kesecikler	> 0,5 μ m
OLV	Oligolameller Kesecikler	0,1-1 μ m
UV	Tek Tabakalı Kesecikler	Her boyutta olabilir
SUV	Küçük Tek Tabakalı Kesecikler	20-100 nm
MUV	Orta Büyüklükte Tek Tabakalı Kesecikler	
LUV	Büyük Tek Tabakalı Kesecikler	> 100 nm
GUV	Çok Büyük Tek Tabakalı Kesecikler	Çapları 1 μ m'den büyük
MVV	Çok Veziküllü Kesecikler	Genellikle 1 μ m'den büyük

Multilameller büyük kesecik tipi lipozomun kesiti Şekil 2'de gösterilmiştir (27).



Şekil 2. MLV'nin kesitsel görüntüsü (27)

2.1.3. Lipozom Hazırlanmasında Kullanılan Fosfolipitler

1. Kolin içeren fosfolipitler

Lesitin

Sfingomiyelin

Eter bağlanmış fosfatidil kolin

2. Yapısında doğal olarak fosfatidil bulunan fosfolipitler

Fosfatidil kolin (PC)

Fosfatidil-etanolamin (PE)

Fosfatidilserin (PS)

Fosfatidilgliserol (PG)

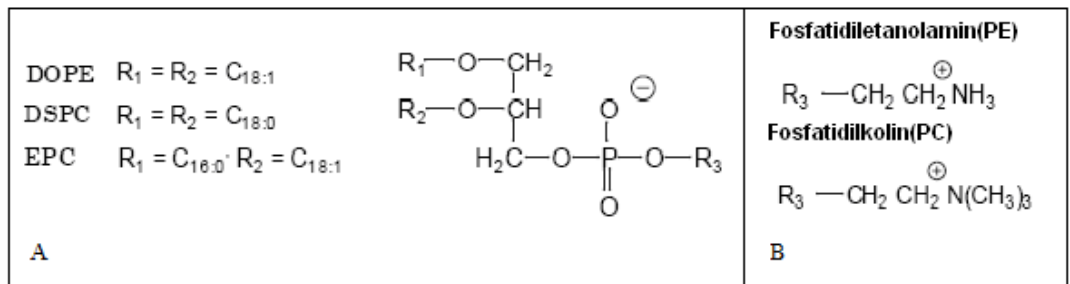
Fosfatidilasit (PA)

Fosfatidilinozitol (PI)

3. Değişik yağ asitleri içeren fosfolipitler

Lizolesitin

Kardiyolipin (19, 28)



Şekil 3. A) Bir fosfolipidin genel kimyasal yapısı **B)** PE ve PC'nin kimyasal yapısı

DOPE: Dioleoilfosfatidil-etanolamin

DSPC: Disteroil fosfatidil kolin

EPC: Yumurta sarısı lesitini

PE: Fosfatidil-etanolamin PC: Fosfatidil kolin

2.1.4. Lipozom Hazırlama Yöntemleri

Lipozomlar; mekanik dispersiyon, solvan dispersiyon ve deterjanda çözme gibi farklı yöntemlerle hazırlanabilir (19, 26).

1. Mekanik dispersiyon

- a. Elle çalkalama yöntemi: Cam balonun çeperlerinde oluşan lipit film, sulu faz eklendikten sonra elle çalkalanarak süspande edilir.

Bu yöntemle MLV'ler hazırlanır.

- b. Çalkalamadan hazırlama: Lipit film kuruduktan sonra, 15 dk boyunca suyla doymuş azot püskürtülür, böylece çalkalamadan sulu ortamda şişmesi sağlanır.

Bu yöntemle LUV'ler hazırlanır.

- c. Pro-lipozom hazırlama yöntemi

Bu yöntemle MLV'ler hazırlanır.

- d. Dondurup-kurutma yöntemi

Bu yöntemle MLV'ler hazırlanır.

- e. Lipit hidrasyon yöntemi

- f. Mikro-fluidizer yöntemi

Bu yöntemle mikroemülsifiye lipozomlar (MEL) hazırlanır.

- g. Sonikasyon yöntemi

Bu yöntemle SUV'ler hazırlanır.

Probe sonikasyon

Sonikasyon banyosu

- h. Membran ekstrüzyon yöntemi

- i. Kurutulmuş-rekonstitüe lipozom hazırlama yöntemi (DRV)
- j. Dondurma-çözme sonikasyon yöntemi (FTS)
- k. pH ile indüklenen vezikül oluşumu
- l. Kalsiyum ile indüklenen füzyon

Bu yöntemle LUV'ler hazırlanır.

2. Solvan dispersiyon yöntemi

- a. Etanol enjeksiyon yöntemi

Bu yöntemle SUV'ler hazırlanır.

- b. Eter enjeksiyon yöntemi
- c. s/y (yağ-içinde-su) emülsiyonu oluşturma yöntemi

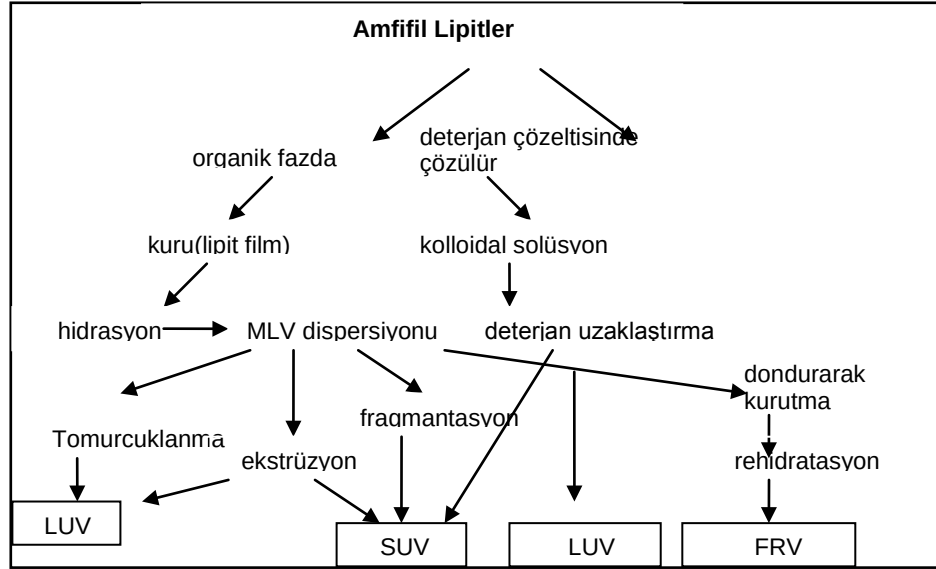
Bu yöntemle hücre büyüklüğünde veziküller ve MVL'ler hazırlanabilir.

- d. Ters faz buharlaştırma yöntemi

Bu yöntemle REV'ler hazırlanabilir.

3. Deterjanda çözme yöntemi (19, 26)

Lipozom hazırlama yöntemleri Şekil 4'te gösterilmiştir (28).



Şekil 4. Lipozom hazırlama yöntemlerinin şematik gösterimi (28)

2.1.5. Kullanım Alanları ve Avantajları

1. Düşük dozlarla terapötik etkinin elde edilmesine olanak sağlarlar.
2. Plazma etkin madde seviyesini istenen süre boyunca terapötik düzeyde tutabilirler ve bu sayede dozlama aralığı uzatılmış olur.
3. Yan ve toksik etkileri azaltabilirler veya tamamıyla ortadan kaldırabilirler.
4. Etkin maddenin enzimatik etkilerden korunmasını sağlarlar.
5. Kısa yarı ömre sahip maddelerin yarılanma ömrünü uzatırlar.
6. Hem lipofilik hem de hidrofilik özellikteki maddeleri taşıma özelliğine sahiptirler.
7. İlacı hedeflendirmek için kullanılabilirler. Lipozomlar, içine hapsedilmiş etkin maddelerin farmakokinetik özelliklerini değiştirirler.

8. Lipozomun içine hapsedilmiş etkin maddenin emilim, dağılım ve eliminasyon özellikleri serbest etkin maddeden tamamıyla farklıdır (29).

9. Lipozomlar günümüzde teşhis ve tedavide geniş klinik kullanım alanlarına sahiptir (19, 26, 29).

a. Tanısal görüntülemeye

Bilgisayarlı tomografi: Suda ve yağda çözünen iyot bileşikler kontrast bileşik olarak kullanılarak MLV, LUV ve MEL tipte lipozomlar hazırlanır.

Manyetik rezonans görüntüleme: Paramanyetik elementler ya da lipozomal lipitler kontrast bileşik olarak kullanılarak MLV tipte lipozomlar hazırlanır.

Radyonüklid görüntüleme: Gama (δ) ışını ya da pozitron yayan maddeler kontrast madde olarak kullanılarak MLV tipte lipozomlar hazırlanır (30).

b. Göz hastalıklarının tedavisinde: Etkin maddelerin, lipozomdan salımı, gözyaşı gibi biyolojik sıvılardaki stabilitesi, lipozomla birleşim şekli, elektrostatik özellikleri, partikül büyüklüğü dağılımı ile lipozomların yüzey özellikleri gibi değişkenler optimize edilerek oftalmik hastalıkların tedavisinde gayet olumlu sonuçlar alınabilmektedir (31).

c. Kanser tedavisinde: Kanser tedavisinde kullanılan farklı etkin maddelerin lipozom formülasyonları hazırlanmakta ve bu sayede etkin maddenin tümör bölgesinde yoğunlaşması amaçlanmaktadır (32, 33). Örneğin, beyin tümörlerinin tedavisinde ilaçları lipozom içine hapsetmek ve böylelikle kan-beyin engelini geçmelerini sağlamak üzere çalışmalar yapılmıştır (34).

- d. Enzim alışmalarında: Lipozom membranının hücre membranına benzerliğinden faydalanarak enzimlerin hücre içine girişi sağlanmaktadır (35).
- e. Paraziter hastalıkların tedavisinde: Lipozomlar özellikle mononükleer fagosit sisteminde lokalize enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır (36).
- f. Aşılarda: Katyonik lipozomlar DNA'nın ve protein yapısındaki aşıların vücuda verilmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca lipozom formülasyonları, hücresel bağışıklığı ve buna karşılık olarak immün cevabı artırmak için kullanılmaktadır (37-39).
- g. Kozmetik rnlerde: Lipozomların tabakalı yapısı vücuttaki doğal membranlara benzerlik göstermektedir. Bu sayede, hücre membranlarının akıcılık özelliklerini değiştirerek, hücrelerle etkileşebilmektedirler. MLV lipozomları taşıdıkları etkin maddeleri 30 dakika içinde derinin stratum korneum, epidermis ve dermis tabakalarına hızla geçirerek konvansiyonel preparatlara üstünlük sağlarlar (40).
- h. Gen tedavisinde: Lipozomlar gen tedavisinde terapötik aktiviteyi artırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (41, 42).

Lipozomların vücuda birçok yoldan verilmesi mümkündür. Bunlar; parenteral yol (intravenöz, intraperitoneal, intramüsküler, subkutan), oküler yol, nazal yol, pulmoner yol, oral yol, transdermal yol, rektal ve vajinal yol olarak

sayılabilir (26, 29). Ayrıca yapılan ilaç faz çalışmalarında perinöral, epidural ve intratekal yoldan verilme çalışmaları görülmektedir (13-15).

2.2. Lokal Anestezikler

Klinik uygulamalarda genellikle cerrahi esnasında ve sonrasında ağrıyı azaltmak ve anestezi sağlamak ya da akut ve kronik ağrı durumlarıyla mücadele amaçlı lokal anestezikler (LA) kullanılmaktadır (43). Lipozomal bupivakain formülasyonunun avantaj ve dezavantajlarını anlayabilmek için lokal anesteziklerin etki mekanizması ile sistemik ve lokal doku toksisitelerine kısaca değinilecektir.

2.2.1. Tarihçe

Koka bitkisinin Peru'dan Avrupa'ya ithalinden sonra, 1859 yılında *Albert Niemann* tarafından kokain izole edilmiştir. 1884 yılında *Karl Koller* tarafından gözde analjezik etkilerinin gösterilmesi ile klinik uygulamaya girmiştir. Kokainin klinikte hızla ve sıklıkla kullanılması sonucu görülen kokain entoksikasyonu yeni ajan arayışlarına neden olmuştur. Daha az toksik ajan olan benzokain 1900'de, prokain 1904'te *Alfred Einhorn* tarafından sentezlenmiştir (44). Prokaine klor eklenmesiyle kloroprokain oluşturulmuştur. Ester grubundaki son ajan tetrakain 1930'da sentezlenmiştir. İlk amid yapılı lokal anestezik olan lidokain 1944'te *Löfgren* tarafından sentezlenmiştir (45). Mepivakain 1957'de, prilokain 1960'da

sentezlendikten sonra uzun etkili ajan arayışları sonucunda 1963'te bupivakain keşfedilmiştir. Artikain ve etidokain 1972'de sentezlenmiştir. Bupivakain toksisitesi klinik olarak ilk kez 1966'da tanımlanmasına karşın daha az toksik olan ropivakain 1996'da, levobupivakain 1999'da klinik kullanıma girmiştir (46).

2.2.2. Etki Mekanizması

Her periferik sinir aksonu kendi aksolemması ve hücre membranına sahiptir. Otonomik postganglionik efferentler ve nosiseptif afferent C lifleri gibi miyelinsiz sinirler tek *Schwann* hücresi kılıfı içinde birçok akson içerir. Kalın motor ve duysal fibrillerin çoğu, aksonal gelişim sırasında kendi aksonlarının çevresini saran özelleşmiş *Schwann* hücresinin plazma membranından oluşan miyelin katman ile çevrilmiştir. Miyelin kılıfı boyunca periyodik kesintilere neden olan *Ranvier* düğümleri sinirin ileti hızını büyük oranda artırır. İmpuls doğmasına ve yayılmasına hizmet eden Na^+ kanalları, miyelinli fibrillerin *Ranvier* düğümlerinde yüksek konsantrasyonda bulunmakta, fakat miyelinsiz fibrillerin tüm aksonu boyunca dağılmış durumdadır (47).

İletim bloğu; sinir hücresi aksonundaki aksiyon potansiyeli oluşumunda rol alan voltaj bağımlı sodyum kanallarında sodyum akımının lokal anestezikler ile geçici olarak durdurulmasıdır. Sodyum kanalı polarizasyonda dinlenim membran potansiyelinin -40 mV üzerinde olduğu depolarizasyon fazında açık (aktif), -70 mV altında olduğu repolarizasyon fazında ise kapalı (inaktif)

pozisyonundadır. Lokal anestezi molekülü açık durumdaki sodyum kanalına ba  lanarak kanalın inaktif hale geçmesine neden olur. Bu durum bir sonraki uyarı ile hücre içine sodyum girişini ve depolarizasyonu engeller (48, 49).

Sinir lifleri A, B ve C lifleri olmak üzere üç gruba ayrılırlar. A grubu lifler miyelinli somatik, B grubu lifler miyelinli preganglionik, C grubu lifler ise miyelinsiz sempatik postganglionik ve ağrıyı ileten liflerdir. Her tip sinir lifi lokal anestezi  lerden etkilenir. Ancak bu etki, ince liflerde kalınlardan, miyelinsiz liflerde miyelinlilerden daha çabuk ve daha düşük yoğunluklarda görülür. Miyelinsiz lifler (C lifleri) erken etkilendiğinden a  rı ve ısı en erken, somatik motor g    en son etkilenir. Otonom lifler (ince miyelinli B ve miyelinsiz C lifleri) lokal anestezi  lerden en hızlı etkilenen liflerdendir. Klinik olarak fonksiyon kaybı sırasıyla; a  rı, ısı, dokunma, proprioseptif duyu ve iskelet kas tonusu şeklinde gerçekleşir (50,51).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda kalsiyum, potasyum ve G-protein ile regüle kanalların da iletim bloğunda etkili olduğu gösterilmiştir (46, 53-55).

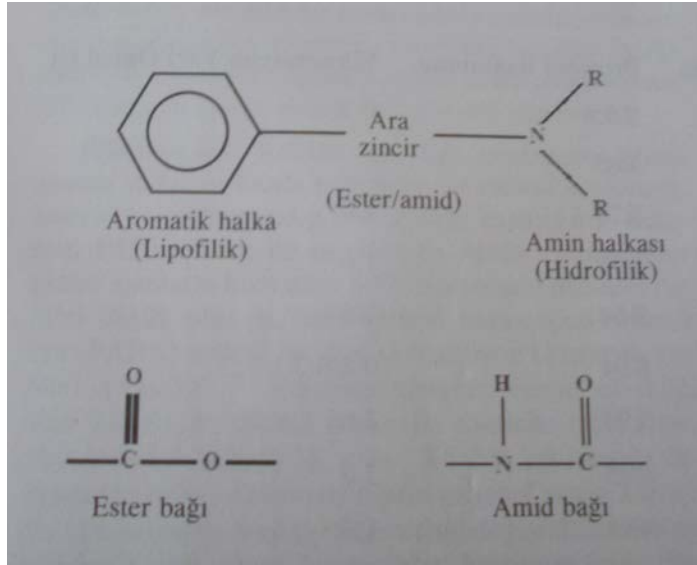
Voltaj kapılı sodyum kanalları nöronlarda ve diğer birçok elektriksel olarak uyarılabilir hücrelerin zarlarında oluşan aksiyon potansiyelinin yükselen fazından sorumludurlar (56). Lokal anestezi  ler bir akson içinde yeterince sodyum kanalında yer işgal edip buradaki aktiviteyi bozan, depolarizasyonu durduran ve böylece aksiyon potansiyel oluşumunu ve sinirsel iletişimin ilerleye  ini engelleyerek sinirsel iletimi geri dönüşümlü olarak bloke eden bileşiklerdir (57). Bunu yapabilmek için lokal anestezi  lerin sodyum kanallarının

iç deliğine bu kanallarının hücre içindeki kısmından girerek bağlanmaları gerekmektedir.

Klinikte kullanılan bütün lokal anestezik molekülleri üç kısımdan oluşmaktadır; lipofilik (aromatik) uç, hidrofilik (amin) uç ve bu uçlar arasındaki bağlantı. Bu bağlantı da ya aminoester ya da aminoamid zincir içerir ve bu bağlantıya göre lokal anestezikler aminoester-bağlı (halkalı) (kokain, prokain, benzokain) ya da aminoamid-bağlı (halkalı) (lidokain, bupivakain, ropivakain, levobupivakain) olarak ikiye ayrılmıştır (48). Aminoester halkalı lokal anestezikler doku ve kanda bulunan esteraz enzimleri tarafından hidrolize edilirken, aminoamid halkalı olanlar ise karaciğer sitokrom P450 enzimleri ile hidrolize edilirler.

2.2.3. Kimyasal Yapı ve Yapı – Aktivite İlişkisi

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 (Şekil 5) (52).



Şekil 5. Lokal anesteziklerin kimyasal yapısı (52)

Aromatik halka; molekülün lipofilik özelliklerini sağlar. Lipit çözünürlüğü; bileşiğin membran lipidleri ile etkileşim eğilimini ifade eder. Sinir hücre membranı lipoprotein yapısında olduğu için aromatik halka, lokal anestezik molekülünün hücre membranından geçerek aksoplazmaya ulaşmasını sağlar. Uygulanan dozun daha fazlasının hücre içine geçmesini sağladığı için lipid çözünürlük ile ajanın etki gücü arasında pozitif korelasyon mevcuttur (58).

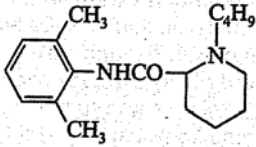
Amin halkası; baz yapısında, proton alıcısı olan kısımdır. Molekülün hidrofilik özelliklerini belirler. Sodyum kanalının tutulmasında rol alır. Amin halkasının durumu ajanın biyolojik membranlardan geçişini belirler (48).

Ara zincir; ya ester ya da amid yapısındadır ve bu yapıya göre lokal anestezikler aminoamid veya aminoester bileşikleri olarak sınıflandırılırlar. Lidokain, mepivakain, prilokain, etidokain, artikain, bupivakain, ropivakain, ve

levobupivakain aminoamid grubu iken kokain, prokain, kloroprokain ve tetrakain aminoester grubundaki lokal anestezi ajanlardır (49).

Tez araştırmamızda kullandığımız bupivakainin özellikleri Tablo 3’te gösterilmiştir (51).

Tablo 3. Bupivakain’in özellikler (51)

	Kimyasal Yapı	İlk Klinik Kullanıma Girdiği Yaklaşık Yıl	Temel Anestezi Olarak Kullanımı	Tipik Ticari Preparatlar
Bupivakain		1963	İnfiltrasyon Periferik sinir bloğu Epidural Spinal	2,5 mg/ml solüsyon 2,5 ve 5 mg/ml solüsyon 2,5, 5 ve 7,5 mg/ml solüsyon 5 ve 7,5 mg/ml solüsyon

Kimyasal adı L.butil-ol-piperidin-2-karboksilikasit-2-6-olimetil anilid hidroklorid (C₁₈N₂OH₂8HCl) olan aminoamid tipinde bir lokal anestezi ilaçtır. Bupivakain R(+) ve S(-) enantiomerlerinden oluşan bir rasemik ajandır. Epidural ve spinal anestezide % 0,5 - 0,75 konsantrasyonda kullanılır. Solüsyonun pH’sı 4,5-6,5, molekül ağırlığı 288, pKa değeri 8,1, yağda çözünürlüğü oldukça yüksek, sistemik absorpsiyonu yavaş, plazma proteinlerine %95 oranında bağlanabilen potent bir lokal anesteziiktir. Lipid/su partiyon katsayısı 27,5 dir. Piyasada HCl tuzu olarak bulunur (59).

Spinal anestezide anesteziik etkinlik 3-4 dk içinde başlamakta ve 3,5-4 saat devam etmektedir. Periferik sinir bloklarında %0,5 konsantrasyonda 35 ml volümde tam motor blok sağlayabilmektedir. Epidural aralığa enjeksiyon sonrası etkinin başlama süresi 5-7 dk, anestezinin yerleşmesi ise 15-20 dk içinde olmaktadır. Periferik sinir bloklarında 5-6 saat, epidural blokta 3,5-5 saate kadar anesteziik etki sürmektedir. Uzun etki süresine karşın, motor blok yapıcı etkisinden daha fazla olarak duyuusal blok meydana getirmektedir. Bu özelliğinden dolayı doğum analjezisi ve postoperatif analjezide popüler bir ajan haline gelmiştir (60)

2.2.4. Farmakokinetik Özellikleri

Lokal anesteziikler zayıf baz yapısında oldukları için dolaşımda alfa-1-asid glikoproteinlere bağlanırlar. Farklı oranlarda proteinlere bağlanırlar ve bu özellikleri aynı zamanda sodyum kanallarındaki proteinlere afiniteleri ile de korele olduğu için etki sürelerini belirleyen temel faktördür (Tablo 4) (52). Bupivakain en yüksek oranda (% 95,5) proteine bağlanan ve en uzun etkili lokal anesteziik ajandır (54).

Tablo 4. Bupivakainin fizikokimyasal özellikleri (52)

	pKa	Molekül Ağırlığı (dalton)	Proteine Bağlanma (%)	Eliminasyon Yarı Ömrü (st)
Bupivakain	8,1	288	95	3,5

2.2.4.1. Emilim

Kandaki lokal anesteziik konsantrasyonu; enjekte edilen miktar enjeksiyon alanından absorpsiyon oranı, doku yayılım oranı, biyotransformasyon oranı ve spesifik ilacın atılımı ile belirlenir. Yaş, kardiyovasküler durum ve hepatik fonksiyon gibi hasta ile ilişkili faktörler fizyolojik düzenlemeyi ve lokal anesteziğin son kan konsantrasyonunu etkiler (51).

Lokal anesteziiklerin sistemik emilimi enjeksiyon yerinin vaskülaritesi ile doğru orantılıdır. Damarlanması fazla olan bölgeye enjeksiyon ile emilim hızlı ve yüksek orandadır (intravenöz > trakeal > interkostal > paraservikal > epidural > brakiyal pleksus > siyatik sinir > subkutan) (52).

2.2.4.2. Dağılım

Lokal anestezikler vücutta tüm dokulara dağılırlar fakat doku ve sıvılardaki konsantrasyonları lipid çözünürlük ve proteine bağlanma özelliklerine göre değişkenlik gösterir. Fazla kanlanan organlar (beyin, akciğer, karaciğer, kalp, böbrekler) başlangıçtaki hızlı alımdan sorumludurlar ve ajan konsantrasyonları yüksektir. Sonraki yavaş dağılımdan ise orta dereceli kanlanan organlar (kas, barsaklar) sorumludur. Akciğerden de atıldıkları için pulmoner damarlardan geçerken kan konsantrasyonları düşer. En yüksek oranda iskelet kasında bulunurlar (52).

2.2.4.3. Atılım

Lokal anesteziklerin metabolizma paterni kimyasal sınıflamalarına göre değişir. Ester veya prokain benzeri ilaçlar, plazmada psödokolinesteraz enzimi ile hidrolize uğrar (61, 62).

Aminoamid ilaçlar primer olarak karaciğerde enzimatik yıkılıma uğrar. Lidokain mepivakainden daha hızlı metabolize edilirken bupivakain hem lidokainden hem de mepivakainden daha yavaş metabolize edilmektedir (63).

2.2.5. Toksisite

Lokal anestezi 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 (48).

2.2.5.1. Sistemik Toksisite

Lokal anesteziğın sistemik dolaşımdaki konsantrasyonu arttıkça, çeşitli kardiyovasküler sistem (KVS) ve merkezi sinir sistemi (MSS) bulguları ortaya çıkar. Kısaca MSS, lokal anestezi toksisitesine KVS'ye göre daha duyarlı olduğu için, entoksikasyon belli belirsiz MSS aktivasyonu bulgularına neden olur (terleme, kas seğirmesi ve tremor). Bunu takiben kortikal inhibitör nöronların öncelikli olarak bloke olmasına bağlı olarak tonik-klonik nöbetler olur. Daha da artan plazma seviyeleri sonrası hem inhibitör hem de uyarıcı yolakların bloke olmasına bağlı olarak tipik olarak hipoventilasyon ve koma ile seyreden yaygın bir MSS depresyonu gelişir (64). Benzer olarak lokal anesteziklerin neden olduğu kardiyotoksisitede ardışık iki evreli olaylar görülür. nce sempatik sinir sisteminin aktivasyonuna bağlı taşikardi ve hipertansiyon baskındır. Bu evreyi takiben artan plazma konsantrasyonları sonrası direkt miyokardiyal depresyon, aritmi, uzamış iletim süreleri ve son olarak kardiyovasküler kollaps gelişir (64). Lokal anesteziklere bağlı gelişen kardiyotoksisitenin fizyopatolojisi ok yönlü ve

karmaşıktır. Bupivakain Na^+ kanal blokajına bağımlı olarak kardiyak iletimi uzatır böylece PR aralığı ve QRS süresi artar.

Ayrıca, K^+ kanallarının iletkenliği üzerinde de belirgin etkisi vardır. QT aralığını uzatır ve inaktive Na^+ kanallarının blokajını artırır ve doza-bağımlı miyokardiyal depresyon yapar (64). Bu konuda stereoselektivitenin anahtar bir patojenik rolü olduğu gösterilmiştir (64, 65). Lokal anesteziklerin R- ve S-enantiyomerlerinin farklı iyon kanalları (Na^+ , K^+ ve Ca^{+2}), için farklı derecelerde bağlanma eğilimleri vardır ve bu R-enantiyomerleri ile karşılaştırıldığında S-enantiyomerlerinde MSS ve kardiyak toksisitede önemli derecede azalmayla sonuçlanır (66, 67). Bupivakain (dekstrorotatuar ve levorotatuar enantiyomerlerin rasemik bir karışımı) ile karşılaştırıldığında, ropivakain (göreceli olarak daha yeni ve yapısal olarak bupivakaine yakın saf levorotatuar amino-amid LA) ve levobupivakain (bupivakainin saf levorotatuar bir izomeri) MSS'ye belirgin olarak daha az toksiktir. Zira her iki ajanın dozlarının da MSS toksisitesi aşıkâr hale gelmeden önce % 10 – 25 daha fazla olduğu gösterilmiştir (64). İlginç olarak, bupivakain diğer ajanlara göre daha düşük kardiyovasküler MSS oranına sahip gibi gözükmemektedir ve lidokaine göre aritmilere daha yatkındır (64). Bütün ajanlar izotonik ve izometrik koşullarda kalp gevşemesini (lusitropi) önemli miktarda bozmasına rağmen, bupivakain ve levobupivakain ropivakaine göre daha fazla negatif lusitropik etkiye neden olmuşlardır (68). Anestezi almış köpeklerde dört farklı lokal anestezikle yapılan artışı doz aşımına bağıli gelişen kardiyak arrest sonrası resüsitasyon başarısızlığının rasemik bupivakain (% 50) verilen

hayvanlarda levobupivakain (% 30), ropivakain (% 10) ve lidokain (% 0) verilenlere göre daha yüksek olduğu görülmektedir (69).

Lipozomlar intravenöz uygulama sonrası enkapsüle ilaçların biyodağılımını modifiye ederler; tavşanlarda elde edilen deneysel veriler, multilameller lipozomlarda enkapsüle edilmiş bupivakainin, sıklıkla kullanılan ve total doz artımına bağlı olarak konvülziyon, kardiyak aritmi ve asistol gelişimine neden olan saf solüsyonlara göre daha iyi bir güvenlik marjı sağladığını göstermiştir (70).

2.2.5.2. Lokal Toksisite

Klinik olarak lokal anestezi ilaçlarının lokal doku toksisitesi oluşturması nadir ve yaygın olmayan yan etkiler olarak görülmektedir. Lokal anestezi verilmesi sonrası hastalarda gelişen miyotoksik komplikasyonların rapor edildiği sadece bir kaç tane olgu sunumu yayımlanmıştır. Bilhassa, sürekli periferik bloklar, yara kenarlarının infiltrasyonu, tetikleyici nokta enjeksiyonları, peribulbar ve retrobulbar bloklar sonrası oluşan klinikle uyumlu miyopati ve kas nekrozları tarif edilmiştir (71). Ancak, lokal anestezi ilaçlarının deneysel miyotoksik etkileri çok yoğundur ve tekrarlanabilir (72). 1980 yılında *Foster* ve *Carlson* test ettikleri lokal anestezi ilaçları içinde prokainin en az ve bupivakainin ise en çok kas harabiyetine yol açtığını bildirdiler (73). Daha yakın bir zamanda *Zink* ve ark. ropivakainin miyotoksik potansiyelinin bupivakainden daha az olduğu sonucuna vardılar (74). Bununla beraber her iki ilaç da sürekli periferik sinir

blokları sonrası kalsifiye kas nekrozunu, skar dokusu oluşumunu ve belirgin bir kas lifleri rejenerasyon hızını içeren morfolojik olarak eş paternler oluşturdular (71). En azından deneysel şartlarda, incelenen bütün lokal anestezi klinik konsantrasyonlarda uygulandığında, ilaca özel ve doz bağımlı toksisite oranıyla miyotoksik bulunmuştur (72). Dahası, son veriler bupivakainin ratlarda mitokondriyal yapıda değişime ve ultrayapısal kas hasarına neden olduğunu ve en ciddi değişimlerin yaşlı olanlarla karşılaştırıldığında genç hayvanlarda oluştuğunu göstermiştir (75).

Patofizyolojik olarak artmış hücre içi Ca^{+2} düzeyleri kas hücresi hasarında en önemli etken olarak görülmektedir. Farklı derecelerde, bupivakain, levobupivakain ve ropivakain klinik konsantrasyonlarında sarkoplazmik retikulumdan Ca^{+2} verilmesini uyarır ve eş zamanlı olarak sarkoplazmik retikuluma Ca^{+2} geri alınımını inhibe eder, böylece sitotoksik hücre içi Ca^{+2} seviyeleri oluşur (71).

Bu nedenle incelenen bütün lokal anestezi ajanlar miyotoksik olarak gözükmemektedir; kas hasarının genişliği doz bağımlıdır ve seri ya da sürekli uygulamalar özellikle genç kaslarda daha da kötüleşmeye neden olur.

Bununla birlikte kas dokusu lokal anestezi solüsyonla uzun temas sonrası zarar gören tek yapı değildir. Gelişmekte olan nöronlarda bu ajanlar büyüme bölgesi kollapsını ve sinir dejenerasyonunu tetikleyebilir, erişkin hücrelerde ise sinir apoptozu başlayabilir (76). Dahası yakın zamanda yapılan birçok çalışmada lokal anesteziğin eklem kartilajında bulunan kondrositlerde kartilaj dejenerasyonuna katkıda da bulunabilecek geri dönüşümsüz hasara neden

olabileceğini ortaya koymuştur. Deneysel modellerde özellikle bupivakainin derin bir kondrotoksik etkiye neden olduğu gösterilmiştir (77). Bu tartışmadaki anahtar nokta lokal anesteziklerin doku bağımlı etkilerinin sodyum kanallarının blokajına bağlı değil, diğer bölgelerle olan etkileşime bağlı olduğudur (NNCA-sodyum kanalına bağlı olmayan etkiler) ve NNCA bilhassa çok uzun etki süreleri olan lokal anestezik ilaçlarda daha fazla görülür, çünkü NNCA'nın etkileri baskın olarak zamana bağımlıdır (78). Örneğin hücreler lokal anesteziklerle dakikalar yerine saatlerce enkübe edilirse bu ajanların hücre reseptörleri ve nötrofil fonksiyonları üzerindeki inhibitör etkisi daha baskın hale gelir (54). Bupivakain, tromboksan A2 reseptörünün sinyallenmesini bir saatlik enkübasyondan sonra % 10 bloke ederken 24 saatlik enkübasyondan sonra bu oran % 75'e çıkar. Benzer şekilde nötrofillerde PAF (platelet aktive edici faktör) ile uyarılan süperoksit üretimi düşük konsantrasyonlu bupivakain ile 10 ila 30 dakikalık enkübasyonda etkilenmezken, aynı konsantrasyondaki solüsyon 6 saatlik enkübasyondan sonra nötrofil fonksiyonunu % 60'dan daha fazla deprese eder. Uzun enkübasyon sonrası artmış hassasiyetin altında yatan mekanizma, lokal anesteziklerin hücre zarındaki Gq proteinlerini zamana bağımlı olarak bloke etmeleridir (79). Bu laboratuvar bulgularını klinik olarak düşündüğümüzde, bileşiklerin saatlerce verildiğinde ortaya çıkan ve önemsiz gibi gözüken toksik etkilerinin bu ilaçlar daha da uzun verildiğinde klinik olarak daha da eksajere olabileceğini akla getirmektedir (78). Uzamış salınımlı bupivakain formülasyonlarının bütün potansiyel analjezik uygulamaları (perinöral, intraartiküler, yara infiltrasyonu) göz

önünde bulundurulduğunda, lokal doku toksisitesinin mutlaka temel bilimsel ve klinik çalışmalarla dikkatli bir biçimde incelenmesi gerekmektedir.

2.3. Lipozomal Bupivakain

Bupivakainin etkinliğini ve etki süresini artırmak bununla birlikte toksisitesini ve yan etkilerini azaltmaya yönelik lipozomal formülasyonlarla yapılan birçok çalışma olmuştur. (9-11). Lipozomal bupivakain çözeltilerinde lipozomlar bir çeşit bariyer gibi davranıp bupivakainin salınımını yavaşlatırlar. (80, 81). Bupivakainin lipozomal formülasyonlarının daha uzun motor blok süresi sağlandığı gösterilmiştir (10-12). Lipozomal bupivakain kullanımına Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi tarafından hemoroid ve bunyonektomi ameliyatlarında postoperatif analjezi amacıyla tek doz yara yeri infiltrasyonu şeklinde izin verilmektedir (82). Lipozomal bupivakainin klinik çalışmalarda en sık yan etkileri bulantı, kusma, kabızlık, ateş, baş dönmesi ve baş ağrısı olarak gösterilmiştir (83-85). Lipozomal bupivakain saf bupivakaine göre daha az sempatik blokaja neden olduğu için daha az hemodinamik değişikliğe neden olmaktadır (10).

2.4. Nöroaksiyel Blok

Nöroaksiyel blok amacıyla subaraknoid aralığa lokal anestezi enjeksiyonu yapılarak spinal anestezi gerçekleştirilir. Düşük volümde kullanılan lokal anestezikler, vücudun alt kısmındaki bütün duyuların bloke edilmesini sağlar. İşlem genellikle spinal kordun sonlandığı seviyenin altında yapılır. Beyin omurilik sıvısı (BOS) içine enjekte edilen lokal anestezi ilaç sinir dokusu tarafından alınarak ve damar içine absorbe olarak ortamdaki uzaklaştırılır. BOS içine verilen ilacın bir kısmı da yoğunluk farkı ile duradan diffüze olarak epidural aralığa geçer ve orada geçerli mekanizmalarla uzaklaştırılır (86).

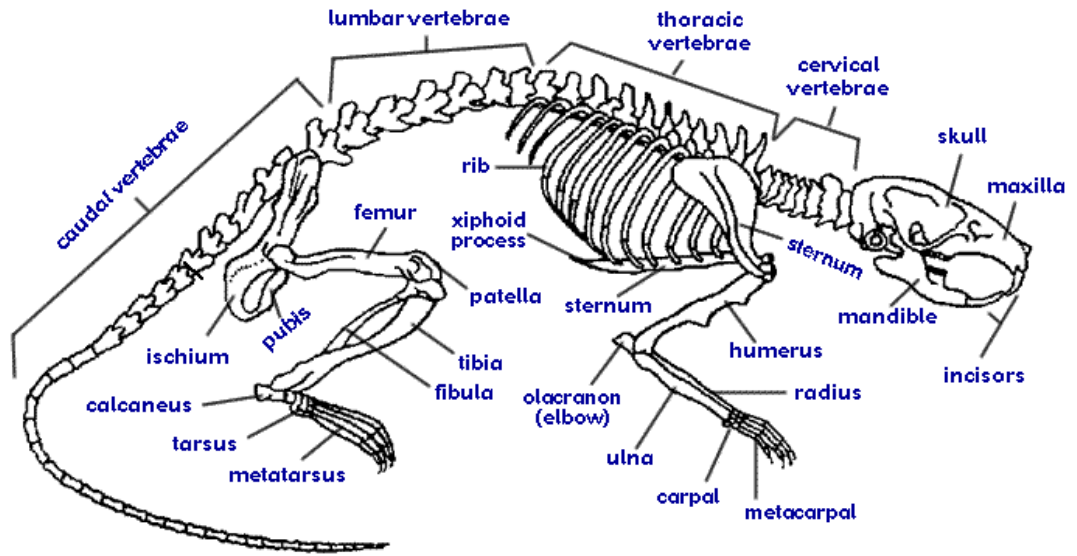
Sinir dokusu tarafından alınma, ilacın BOS içindeki yoğunluğu, sinir dokusunun lokal anestezi ile temas eden yüzeyinin genişliği, yağ içeriği ve kanlanması gibi etkenlere bağlıdır. Subaraknoid aralıktaki lokal anestezi, spinal kordun yüzeyel katlarını da etkiler; ancak asıl etki spinal kordun terk eden sinir kökleri ve dorsal kök ganglionları üzerinedir. Spinal anestezinin temel amacı duysal ve motor blok olup, birlikte gelişen sempatik denervasyon genellikle sistemik değişikliklere neden olan bir yan etki gibi görülür. Spinal anestezi sonucu lokal anestezinin kan düzeyi çok az yükselir ve bunun sistemik etkisi çok azdır. Spinal anestezi derin bir motor bloğa neden olur (86).

Anestezi süresi lokal anestezinin sinirleri terk etme hızına bağlıdır. İlacın önemli bir kısmı, BOS içine yayılır ve venöz drenajla, az bir kısmı da lenfatiklerle uzaklaştırılır. Damardan zengin pia mater burada en önemli rolü oynar (86).

2.5. Sıçanlarda Nöroaksiyel Uygulama Açısından Anatomi

2.5.1 Vertebral Kolon

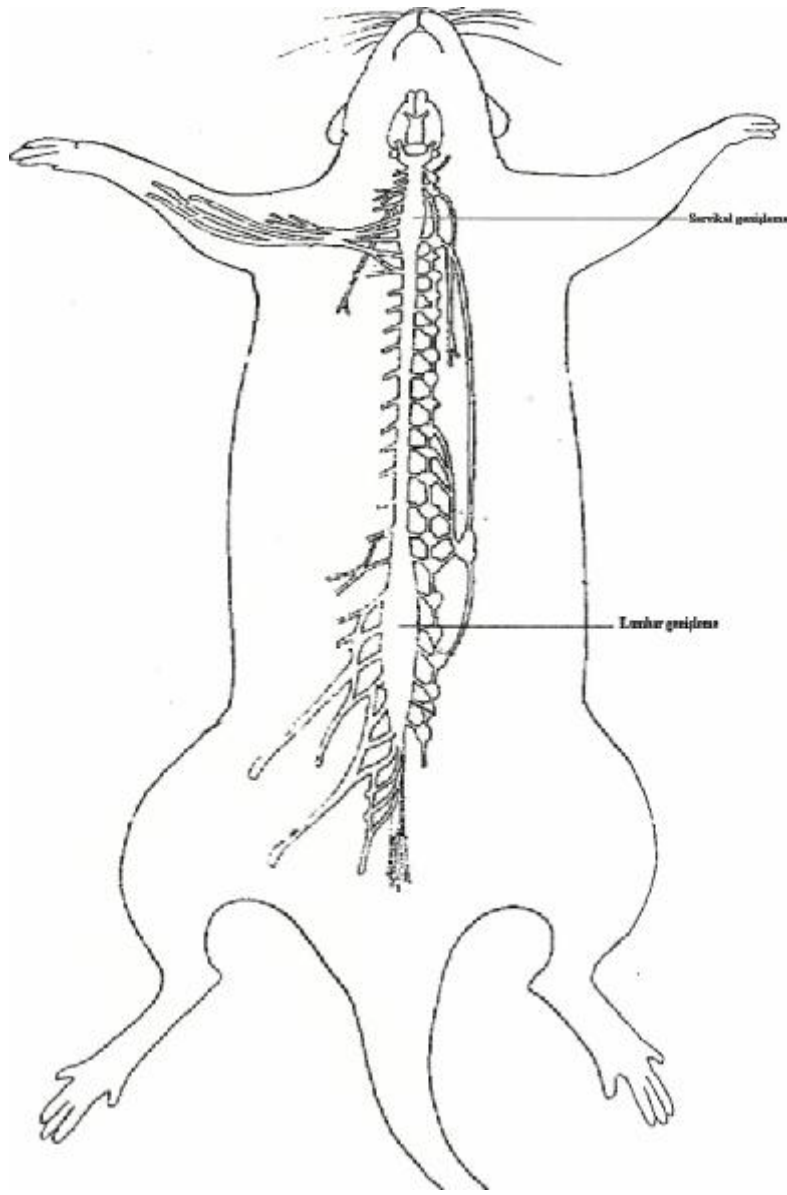
Kraniyalden kaudale doğru 7 adet servikal, 13 adet torakal, 6 adet lumbar, 4 adet sakral, 28 adet kaudal olmak üzere 58 adet vertebradan oluşmaktadır. Rat iskelet sistemi gösterilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. Sıçan iskelet sistemi (87)

2.5.2 Medulla Spinalis

Medulla spinalis kranialde medulla oblongatanın devamı olarak başlar. Nöral kanalın içinden geçer ve *filum terminale* ile sonlanır. Servikal ve lumbar alanlarda sinirlerin çıktığı yerde genişlemeler vardır. Sıçanın medulla spinalis özellikleri gösterilmiştir (Şekil 7) (88).



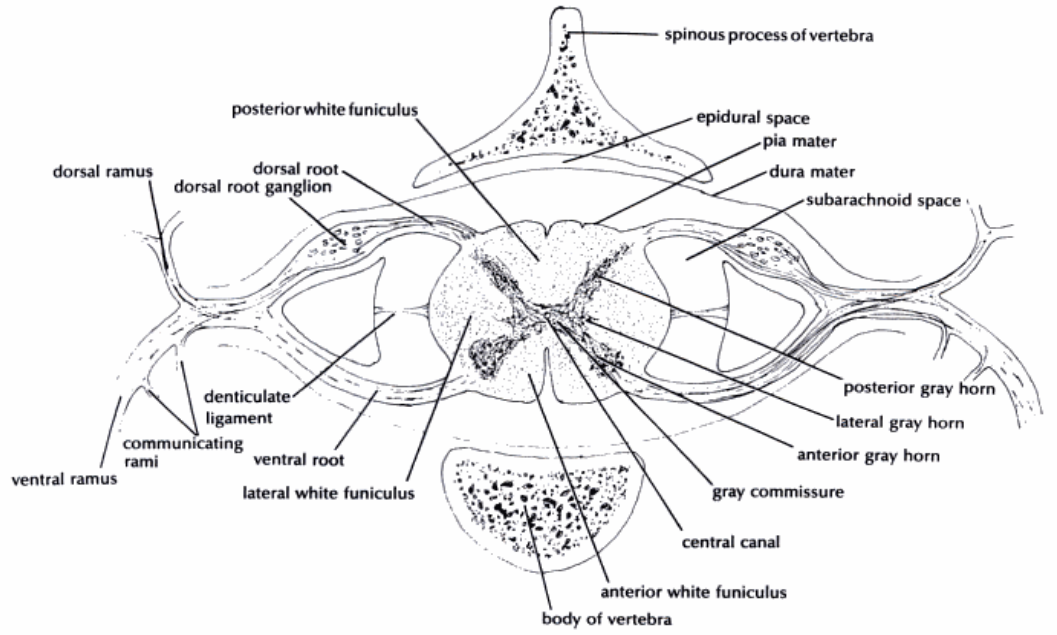
Şekil 7. Sıçan medulla spinalisinin servikal ve lumbar genişlemeleri (88)

Meninksler: Beyini saran meninkslerin devamıdır. Dıştan içe doğru sırasıyla dura mater, ortada araknoid ve en içte pia mater yer alır. Araknoid ve pia mater arasında serebrospinal sıvıyı içeren subaraknoid boşluk bulunur (88).

Gri cevher: İki ventral koluna anterior gri boynuz adı verilirken, iki dorsal kolu posterior gri boynuz olarak adlandırılır (88).

Daha küçük lateral yansımaları ise lateral gri boynuzlar olarak adlandırılır. Merkezindeki küçük boşluk santral kanal adı verilir. Gri madde destek doku ve nöron hücre cisimciklerini içerir. Fonksiyonel olarak ventral taraf motor ve dorsal taraf duysal sinir liflerini içermektedir (88).

Beyaz cevher: Gri cevheri çevreleyen sinir dokusudur. Duysal liflerin asendan yolunu ve motor liflerin desendan yolunu birleştirir. Medulla spinalisin kesitlerinde dört kolon olarak gözlenir: bir ventral, bir dorsal ve iki lateral (Şekil 8) (88).



Şekil 8. Sığır medulla spinalis ve çevreleyen dokuların transvers kesiti (88).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma, 1 Temmuz - 31 Aralık 2013 tarihleri arasında, Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan (G:Ü:ET-13.043) onay alındıktan sonra Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'na ait laboratuvarlarda lipozomal bupivakain hazırlanarak Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Ünitesinde gerçekleştirildi.

3.1. Laboratuvar Cihazları ve Gereçler

- Rotavapor (Büchi Rotavapor R-200, Almanya)
- Sıcak su banyosu ve su içine batabilen çoklu manyetik karıştırıcı (Nüve BM 402, Türkiye)
- Ultrasonik banyo (Bandelin Sonorex, Almanya)
- Santrifüj (Jouan MR 18 22, Danfoss, Slovenya)
- Desikatör
- Tail-Flick cihazı (Ugo Basile 37360, İtalya)
- Hassas tartı (Shimadzu AW 320, Japonya)
- Vorteks (Firlabo, Fransa)
- Vial (Waters, ABD)
- Enjektör 2 ml (Hayat, Türkiye)
- Enjektör 10 ml (Ayset, Türkiye)
- İnsülin enjektörü (26 G, Hayat, Türkiye)

- Çeşitli cam ölçü aletleri (pipet, balon jöje, şilifli balon v.b.) ve diğer laboratuvar malzemeleri

3.2. Kimyasal Maddeler

- Bu araştırmada çözelti olarak bupivakain hidroklorür (Bustesin® % 0,5 enjeksiyonluk çözelti içeren flakon, Vem, Türkiye) kullanılmıştır.
- Kolesterol (Sigma, ABD)
- Dipalmitoil fosfatidil kolin (Sigma, ABD)
- Metanol (Merck, Almanya)
- Sevorane Likid %100, 250 ml solüsyon (Abbott, İngiltere)
- Povidon iyot

3.3. Deney Hazırlığı

Deney, ilaç hazırlığı yapılan in vitro ve sıçanlarda analjezi testlerinden olan kuyruk çekme ve motor bloğun in vivo olmak üzere değerlendirildiği başlıca iki aşamada gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. İn vitro lipozomal bupivakain hazırlama yöntemi

3.3.1.1. Lipozomal Bupivakain HCl Hazırlama

Hacmi 100 mL olan şilifli balona; 20 mg dipalmitoil fosfatidil kolin, 20 mg kolesterol hassas tartıda tartılarak alındı. Üzerine 6 mL metanol ilave edildi, hafifçe sallayarak çözelti haline getirildi. Elde edilen metanollü çözelti rotavapor cihazına (Resim 1) takıldı. Kazan suyu sıcaklığı 60°C, soğutucu suyu sıcaklığı 10°C'ye ayarlanarak düşük basınçta (340 mbar) metanol uzaklaştırıldı. Balonda

kalan kalıntı üzerine bupivakain HCl % 0,5 10 mL ilave edilerek homojen bir dağılım için ultrasonik banyoda 30 dk tutuldu (89-92).



Resim 1. Rotavapor cihazı

3.3.1.2. Yüksek Verimli Lipozomal Bupivakain HCl Hazırlama

(Yüksek Verimli Lipozomal Bupivakain: *High Yield Drug Entrapment in Liposome*)

Hacmi 100 mL olan şilifli balona; 20 mg dipalmitoil fosfatidil kolin, 20 mg kolestrol hassas tartıda tartılarak alındı. Üzerine 6 mL metanol ilave edildi, hafifçe sallayarak çözelti haline getirildi. Elde edilen metanollü çözelti rotavapor cihazına takıldı. Kazan suyu sıcaklığı 60°C, soğutucu suyu sıcaklığı 10°C'ye ayarlanarak düşük basınçta (340 mbar) metanol uzaklaştırıldı. Balonda kalan kalıntı üzerine bupivakain HCl % 0,5 10 mL ilave edilerek homojen bir dağılım

için ultrasonik banyoda 30 dk tutuldu. Lipozomların yıkanması amacıyla bu lipozom çözeltisi santrifüj tüpüne aktarıldı, 10000 g devirde 15 dk santrifüj edildikten sonra tüpte ayrılan sıvı kısmın 9 mL'si mikropipet yardımı ile alınarak atıldı. Kalan kısım vortekslenerek homojen süspansiyon haline getirildi ve ultrasonik banyoda 15 dakika bekletildi (89-92).

3.4. In vivo deneylerin yapılışı

3.4.1. Hayvan türü, bakım yeri ve koşulları

Araştırmada Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nden alınan 250–300 gram (g) ağırlığında 18 dişi Wistar sıçan kullanıldı. Sıçanlar bir kafeste 3 adet olacak şekilde yerleştirilip, yiyebilecekleri kadar pelet yem ve su verildi. Hayvanlara 12 saat gündüz, 12 saat gece olacak şekilde ışık düzenlemesi yapıldı.

3.4.2. İntratekal ilaç uygulaması

Hayvanlar 3 gruba ayrıldı. Hylden ve Wilcox'un yönteminden yararlanarak her gruba 30 µl ilaç intratekal yoldan verildi (93).

Grup 1 (n=6): bupivakain HCl (BHCl)

Grup 2 (n=6): lipozomal bupivakain HCl (LB)

Grup 3 (n=6): yüksek verimli lipozomal bupivakain HCl (YVLB)

Hayvanlara intratekal ilaç verilmeden en az 2 gün önce işlem yapılacak saha tıraş edildikten sonra povidon iyot solüsyonu ile silindi. Çalışma gününde *tail flick* test (kuyruk çekme testi) ve motor fonksiyonlar için bazal ölçümler alındı.

Hayvanlara işlem öncesi kısa süreyle içinde sevofluran (SEVORANE® likid, inhalasyon anesteziği, Abbott-İngiltere) damlatılmış pamuk bulunan desikatöre konularak sedasyon-anestezi uygulandı (Resim 2). Göz kırpma refleksi ortadan kalkana kadar desikatörde bekletildi ve sonra anestezi altındaki hayvan işlem için dışarıya çıkartıldı. Yapılan bu işlem yaklaşık 3-4 dakikalık anestezi imkânı sağlamıştır. İşlemin uzadığı zamanlar sevofluran (SEVORANE® likid, inhalasyon anesteziği, Abbott-İngiltere) damlatılmış pamuk hayvanın burnuna tutuldu (94). Anestezi altındaki hayvanların lomber bölgesi povidon iyot solüsyonu ile silindi ve karın altına gazlı bez konularak hayvana uygun pozisyon verildi. Hayvanın L4-L5 interspinöz aralık bulunarak insülin iğnesi ile intratekal boşluğa düşme hissedilerek intratekal aralığa girildi (Resim 3). Intratekal aralığa giriş, hayvanların kuyruklarında elektrik şoku şeklinde hareketin gözlenmesiyle doğrulandı (95). Daha sonrasında 30 µl ilaç yavaş bir şekilde enjekte edildi. İlaç enjeksiyonuyla elektrik şok şeklinde olan kuyruk hareketi tekrar gözlemlendi. Her işlem yaklaşık 2-3 dakikada tamamlandı. Daha sonrasında her hayvan anesteziden ayılması için kafesine konuldu. Yaklaşık 5 dk sonra tüm hayvanlar ayıldı.



Resim 2. Sedasyon-anestezi için sevorane ıslatılmış pamukla desikatöre konulan sıçan

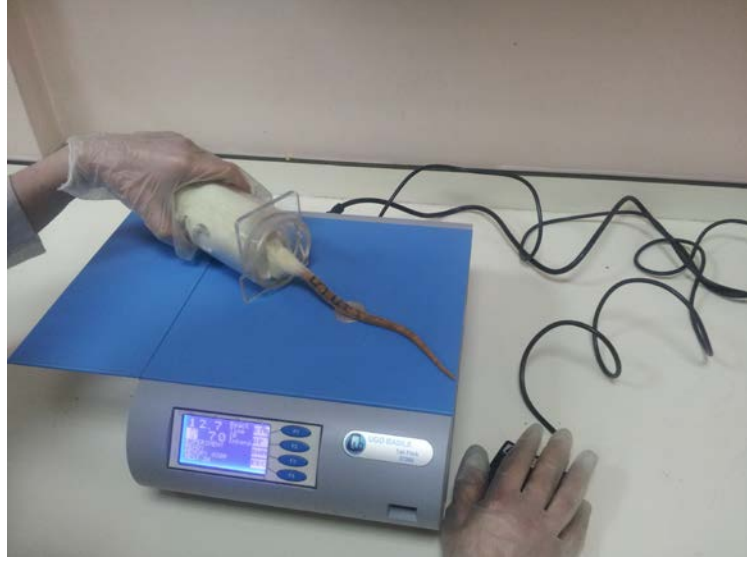


Resim 3. İnsülin enjektörü ile intratekal aralığa ilaç verilmesi

3.4.3 Analjezik etkinin değerlendirilmesi

3.4.3.1. *Tail Flick* (Kuyruk ekme) testi

Analjezik etkinliği ölçmek için yapılan kuyruk çekme testi, radyan ısı kullanan *Tail-Flick* cihazı (Ugo Basile 37360, İtalya) ile gerçekleştirildi. Cihazın ısı kalibrasyonu hayvanların kuyruk çekme süresi 3-5 saniye olacak şekilde ayarlandı. İlaç uygulamasından bir gün önce tüm denekler lm yapmaksızın hareket kısıtlayıcı aparata yerleştirilerek öğrenme alıştırması yapıldı. Termal stimlasyon kuyruğun 3-4 cm distali işaretlenerek uygulandı. Stimülasyonun başlaması ile kuyruk çekme arasında geçen zaman ölçüldü ve bu zaman “kuyruk ekme (*Tail-Flick*) süresi” olarak tanımlandı. Yapılan pilot arştırmalarımızda ilaç uygulanmamış sıçanların ortalama kuyruk çekme süresi yaklaşık 3-4 sn olup, bazal değer olarak kabul edildi. Tekrarlayan lmler sonucu kuyruk çekme yanıtında oluşabilecek olumsuzlukları engellemek için maksimum cevap alma süresi (*cut-off time*) veya deneyi kesme süresi 12 saniye olarak kabul edildi. İlaç uygulanmasından önce 0 (bazal), uygulamadan sonraki 10., 20., 30., 45., 60., 75., 90., 120. ve 150.dakikalarda ve 3., 4.,5. ,6., 12. ve 24. saatlerde kuyruk çekme lmleri alındı (Resim 4) (95).



Resim 4. İntratekal ilaç verilen sıçanın *tail-flick* cihazına yerleştirilmesi

3.4.4. Motor Bloğun Değerlendirilmesi

Motor blok değerlendirmesi 10., 20., 30., 45., 60., 75., 90., 120.,150.dakikalarda ve 3., 4., 5., 6., 12., 24. saatlerde yapılan kuyruk çekme testini takiben sıçanın düz bir zeminde yürümesi izlenerek arka bacaklarındaki motor kuvvet değerlendirildi. Sıçanların yürümede zorlanması, arka bacaklarını tam olarak çekemeyip sendelemesi “parsiyel blok” olarak değerlendirildi. Arka ekstremitelerdeki motor fonksiyon derecesi aşağıda belirtilen skala ile değerlendirildi (0= Tam motor blok, 1= Parsiyel blok, 2= Motor blok yok). Ölçümler sonucu motor fonksiyon dereceleri belirlenen hayvanların motor skorları toplanarak kayıt altına alındı (96).

3.4.5. Hayvan yaşamını sonlandırma yöntemi

Tüm denekler deney sonrasında intraperitoneal 120 mg/kg tiyopental ile sakrifiye edilmişlerdir.

3.5. İstatistiksel Analiz

Deneylerden elde edilen veriler “ortalama±standart hata ” şeklinde sunulmuştur. Bütün veriler *Student's t* testi ile değerlendirildi. İstatistiksel analizler bir paket program (*GraphPad Prism versiyon 5.00 for Windows: GraphPad Software, San Diego, California, Amerika*) kullanılarak yapılmıştır. $P < 0.05$ ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

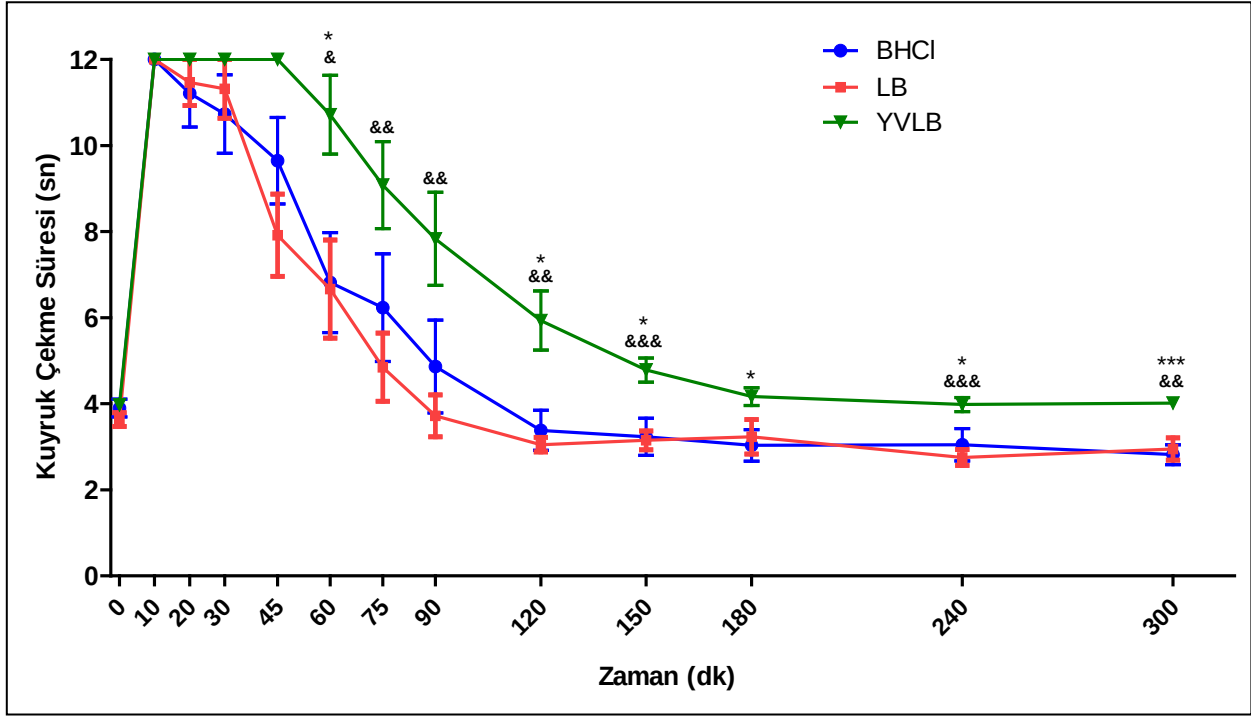
4. BULGULAR

Araştırmaya ait analjezik ve motor blok değerlendirmesi sonuçları; kuyruk çekme süresi, maksimum olası etkinin yüzdesi (%MOE) ile toplam motor blok derecesi ve motor blok gözlenen hayvan oranı (%) olarak gösterilmiştir.

4.1.Kuyruk Çekme Süreleri

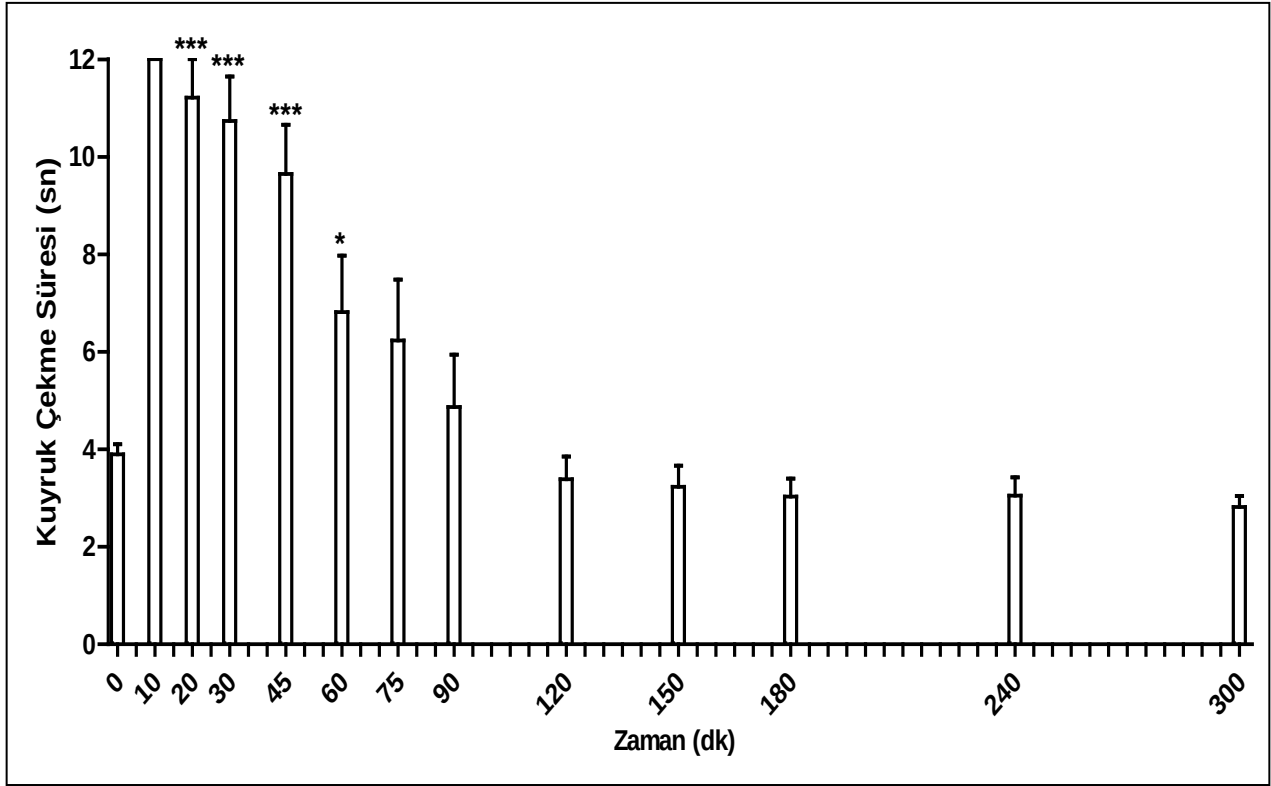
Sıçanlarda intratekal yoldan verilen BHCl (Grup 1), LB (Grup 2) ve YVLB'nin (Grup 3) kuyruk çekme süreleri üzerine olan etkileri karşılaştırıldı.

Her üç grupta daha önceden 12 sn olarak tanımlanmış olan *cut off* zamanına 10.dk'da ulaşıldı. Ancak YVLB grubunda bu süre 45 dk sürerken, diğer iki grupta 10.dk'dan itibaren hızla azalmaya başladı. Grup 3'te 45.dk. da halen *cut off* değerinde olduğu için kuyruk çekme süresinin 150. dk'ya kadar olan tüm ölçümlerinde hem BHCl hem de LB gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu bulundu ($p<0.05$)(Şekil 9). Yaklaşık 180. dakikada bütün gruplarda kuyruk çekme süresinin, ilaç verilmeden önceki bazal seviye olarak kabul edilen 3-4 sn'ye döndüğü gözlemlendi (Şekil 9).

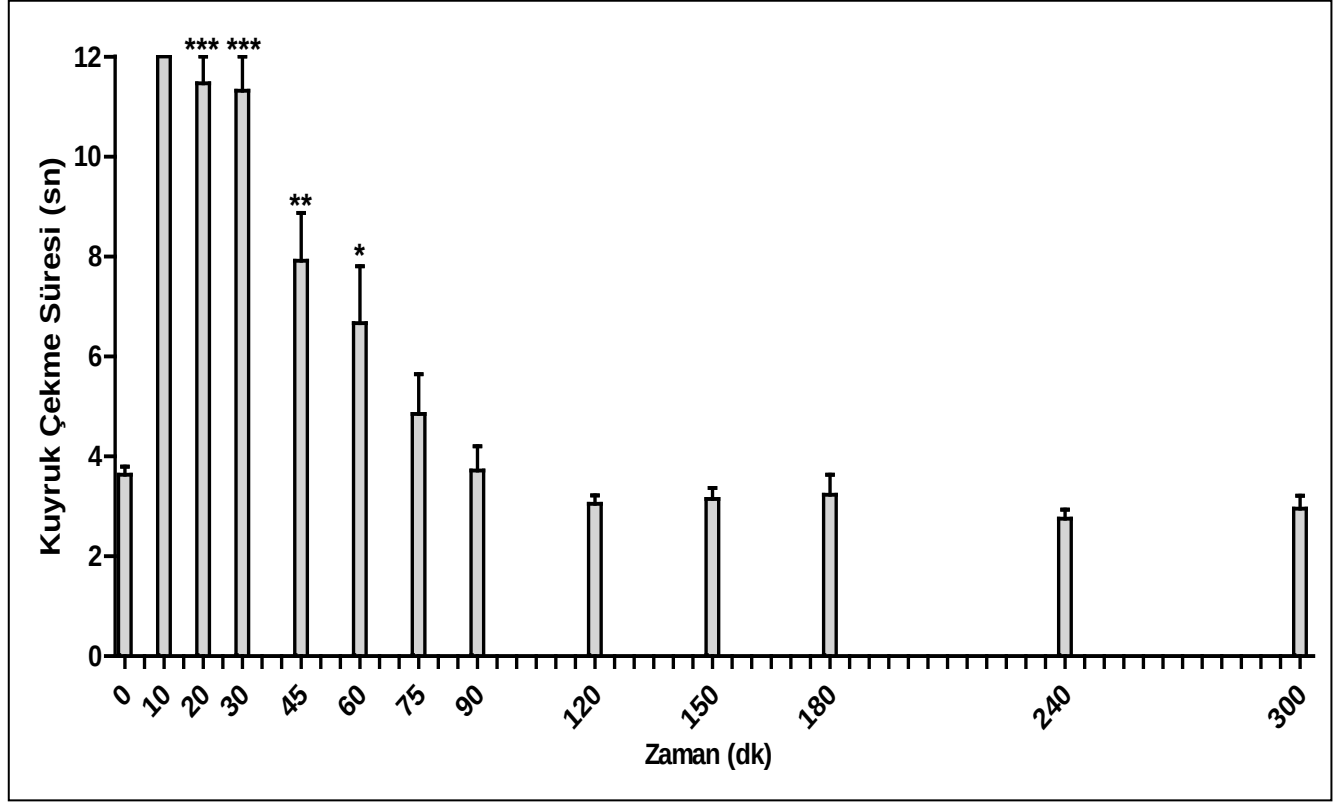


Şekil 9. Bupivakain içeren farklı formülasyonların intratekal enjeksiyonundan sonraki kuyruk çekme sürelerinin zamanla değişimi. BHCl= Bupivakain HCl, LB= Lipozomal bupivakain, YVLB=Yüksek Verimli Lipozomal Bupivakain (*High Yield Drug Entrapment in Liposome*). *BHCl'den farklı, &LB'den farklı. (Student's t testi; $p < 0.05$).

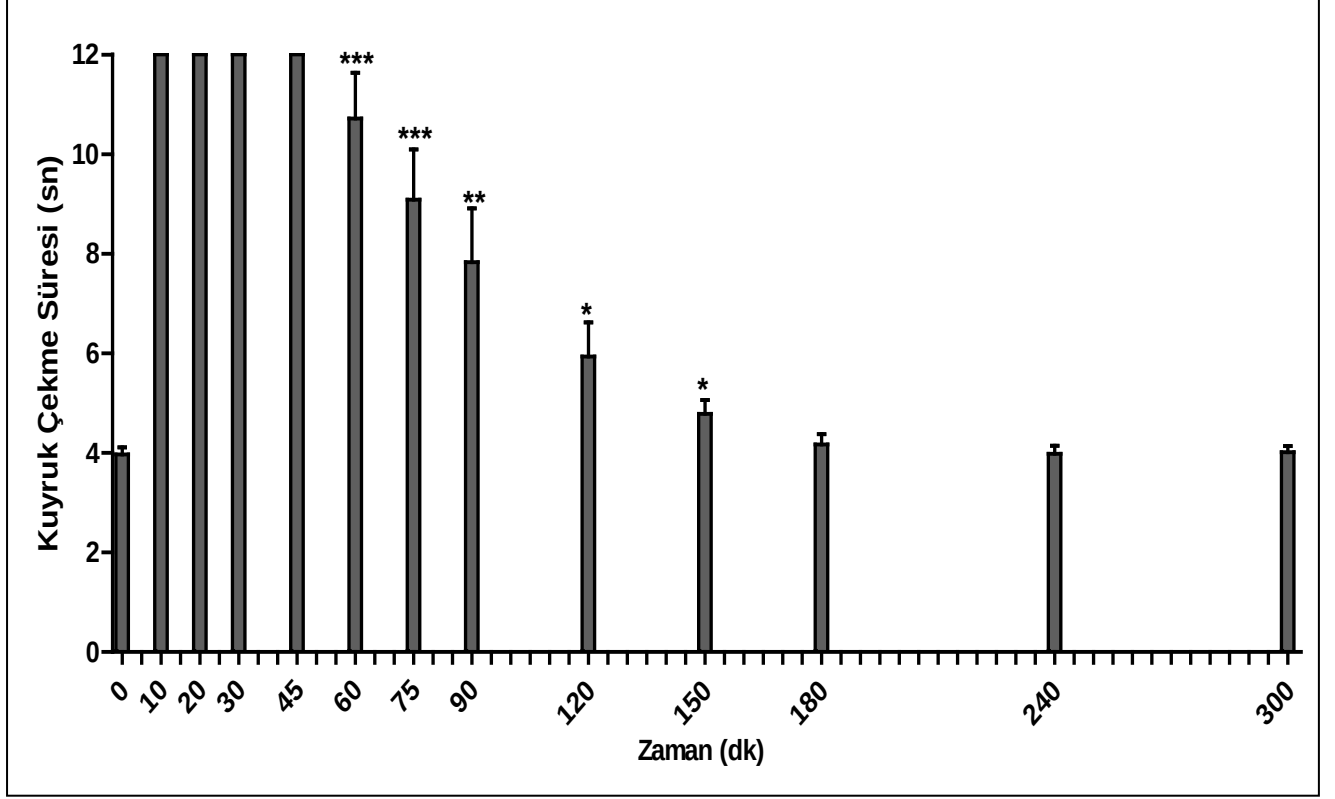
Ayrıca intratekal yoldan ilaç uygulanan grupların her birinin kendi içinde 0.dk (bazal) değerlerine göre karşılaştırmaları yapıldı. Kuyruk çekme sürelerinde uzama BHCl ve LB gruplarında 60.dakikadan sonra YVLB grubunda ise 150.dakikadan sonra anlamlılığını yitirdi (Şekil 10, 11 ve 12).



Şekil 10. İntratekal BHC1 enjeksiyonundan sonraki kuyruk çekme sürelerinin zamanla değişimi. *0. dakikadan farklı. (Student's t testi; $p < 0.05$).



Şekil 11. İntratekal LB enjeksiyonundan sonraki kuyruk çekme sürelerinin zamanla değişimi. *0. dakikadan farklı. (Student's t testi; $p < 0.05$).



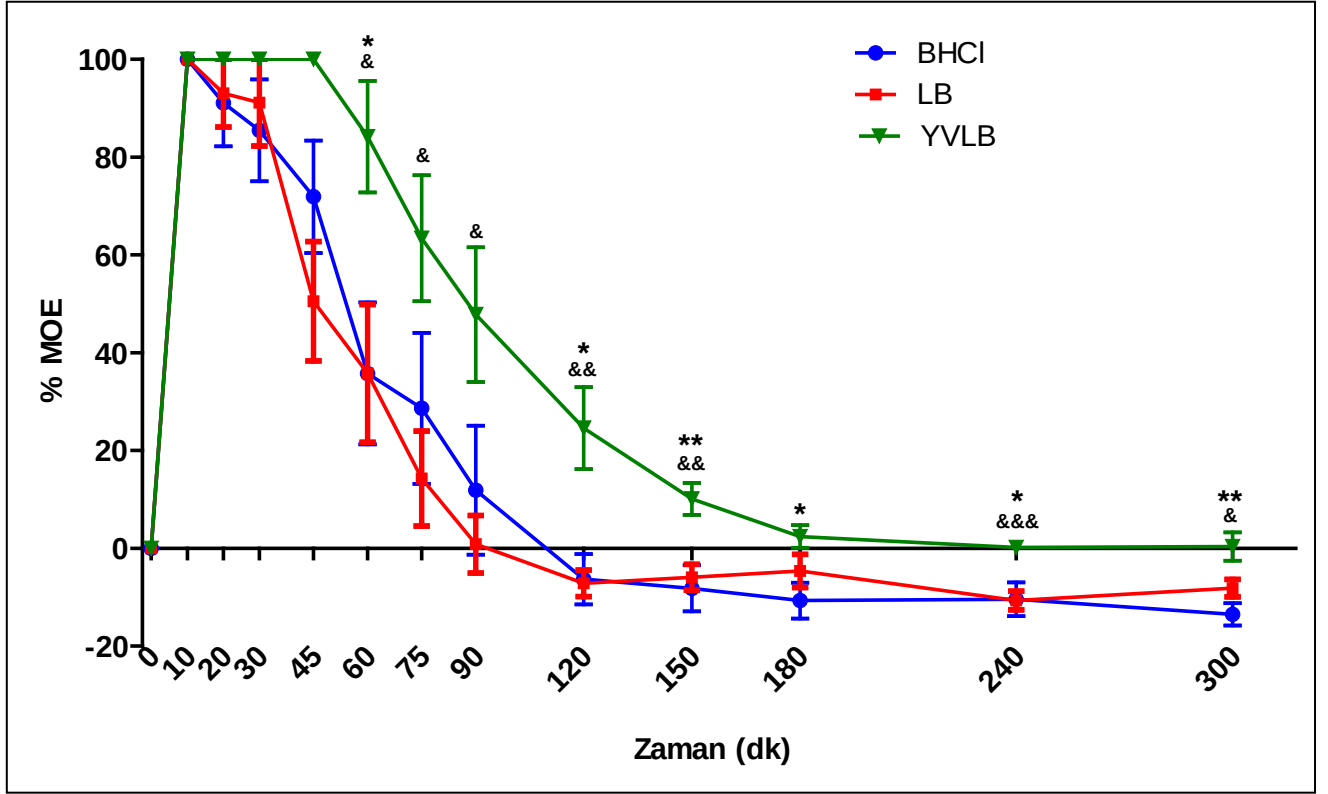
Şekil 12. İntratekal YVLB enjeksiyonundan sonraki kuyruk çekme sürelerinin zamanla değişimi. *0. dakikadan farklı. (Student's t testi; $p < 0.05$).

4.2 Maksimum Olası Etki Oranı (%MOE)

Sıçanlarda intratekal yoldan verilen BHCl, LB ve YVLB'nin %MOE değerleri kendi aralarında karşılaştırıldı. YVLB grubunda 45.dakikada MOE %100 iken, LB grubunda yaklaşık %50, BHCl grubunda ise yaklaşık %70 olarak bulundu (Şekil 13).

Yine kuyruk çekme süresiyle ilgili sonuçlarda olduğu gibi *cut off* zamanının grup 3'te 45 dk sürmesi, bu YVLB grubundaki %MOE değerlerinin diğer iki gruba göre istatistiksel olarak anlamlılık 60.dkda başlamış gibi görünse de, 45-150.dkdaki tüm ölçümlerde anlamlı şekilde yüksek olduğu gözlemlendi ($p<0.05$) (Şekil 13).

YVLB grubu 180. dakikada %0 MOE' ye inerken, LB grubu 90.dakikada, BHCl grubu ise 100. dakikada %0 MOE'ye inmiştir (Şekil 13).

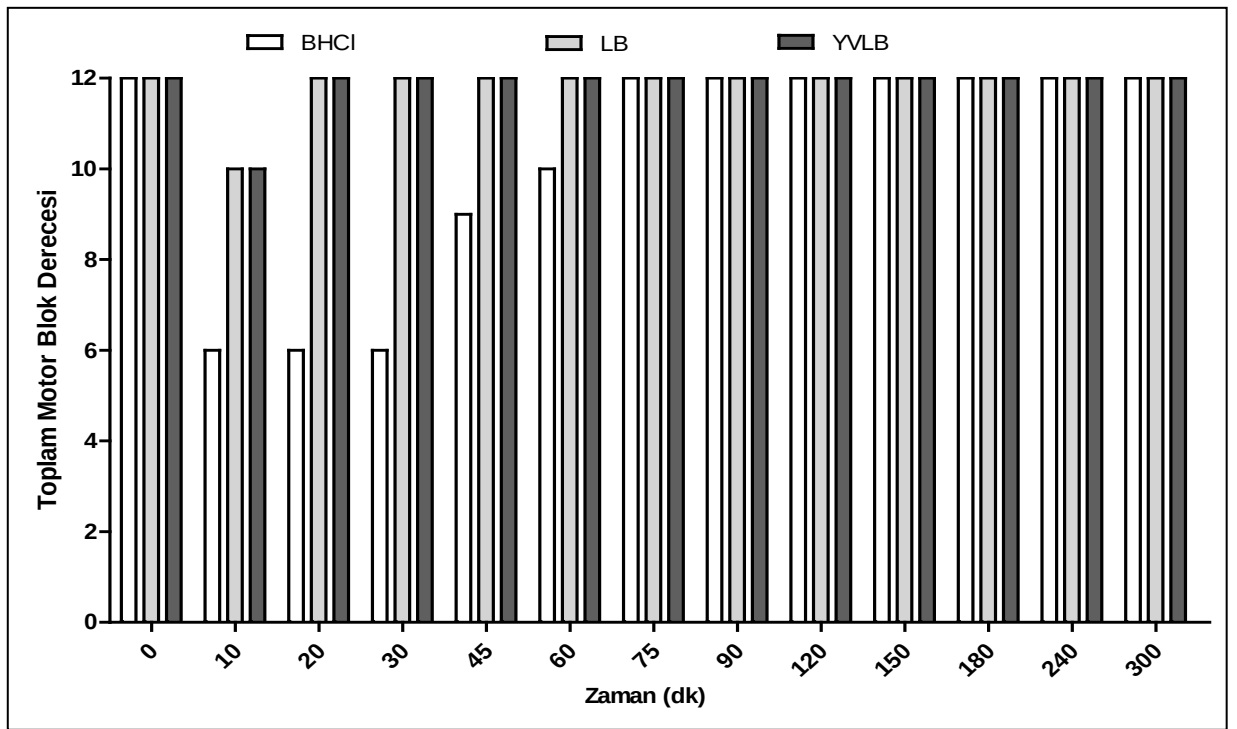


Şekil 13. Bupivakain içeren farklı formülasyonların intratekal enjeksiyonundan sonraki %MOE değerlerinin zamanla değişimi. MOE=Maksimum Olası Etki

*BHCL'den farklı, &LB'den farklı. (Student's t testi; $p < 0.05$).

4.3 Motor Blok Dereceleri

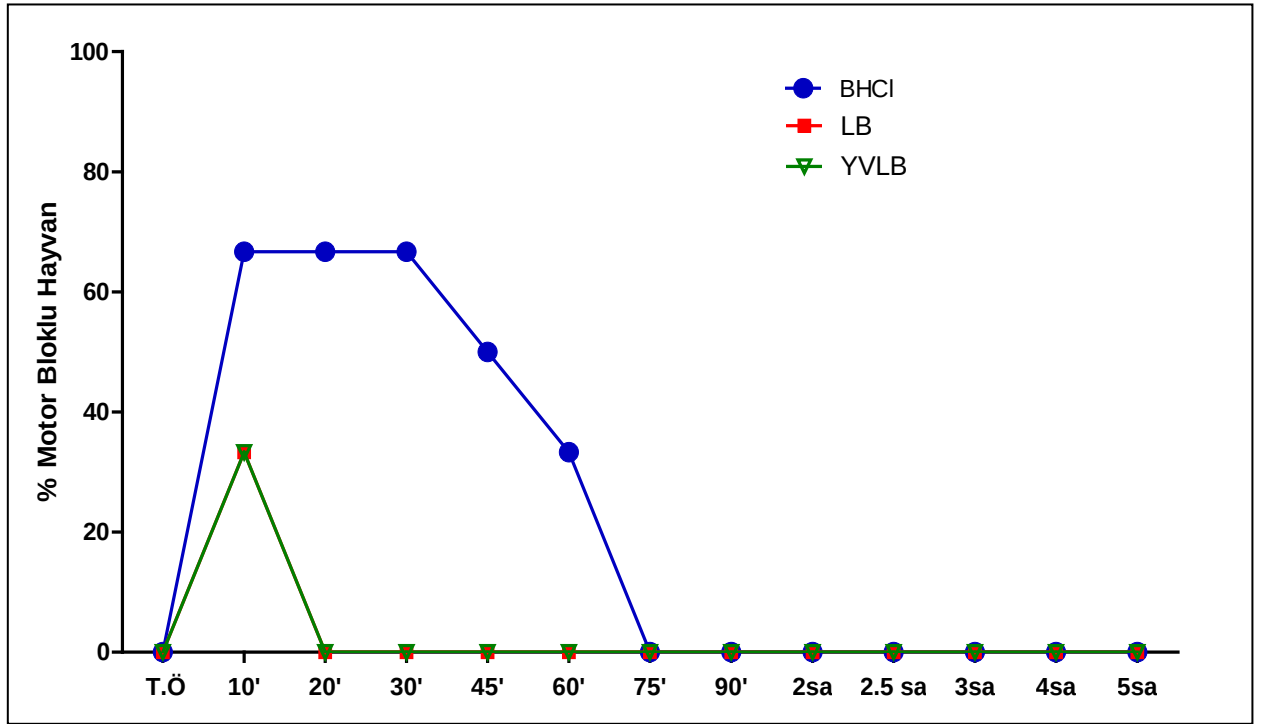
Toplam motor blok skoru 10.dakikada BHCl grubunda 6, LB ve YVLB grubunda 10 olduğu hesaplandı. Yirminci dakikada BHCl grubunda 6, LB ve YVLB grubunda 12 olduğu gözlemlendi (Şekil 14). Ancak 75. dakikaya kadar BHCl grubunda toplam motor blok skoru 12'nin altında idi (Şekil 14).



Şekil 14. Bupivakain içeren farklı formülasyonların intratekal enjeksiyonundan sonraki toplam motor blok derecelerinin zamanla değişimi. MOE=Maksimum Olası Etki, 0: tam motor blok var, 1: kısmi motor blok var, 2: motor blok yok (n=6).

Motor blok (0 veya 1.derece) gözlenen hayvan oranı BHCl grubunda 75. dk da sıfıra inerken, hem LB hem de YVLB grubunda ancak 20. dk da sıfır değerine ulaşmıştır (Şekil 15).

Yirminci dakikada BHCl grubunda motor bloklu hayvan yüzdesi yaklaşık %70 iken LB ve YVLB grubunda bu oran %0 idi (Şekil 15).



Şekil 15. Bupivakain içeren farklı formülasyonların intratekal enjeksiyonundan sonraki motor bloklu hayvan yüzdelerinin zamanla değişimi.

T.Ö=Tail Flick (Kuyruk Çekme) testi öncesi, %MB= Motor bloklu sıçan sayısının toplam sıçan sayısına göre yüzdesi.

5. TARTIŞMA

Bu tez araştırmasında sıçanlara intratekal olarak uygulanan YVLB'nin antinosiseptif etkisinin bupivakain ve LB'e göre daha uzun sürdüğünü gösterdik. YVLB ile kuyruk çekme testinde ve maksimum olası etki oranında 150 dk süren bir analjezik etki elde edildi. Ayrıca bu analjezik etkiye ilaveten LB ve YVLB gruplarında BHCl'ye göre daha kısa süren motor blok gözlemledik.

Kanai ve ark. (95), sıçanlara intratekal 30 µl %0,5 bupivakain, levobupivakain ve ropivakaini sırasıyla uyguladıklarında 40-50 dk arasında levobupivakain ve bupivakainin MOE oranı olarak ifade edilen kuyruk çekme zamanlarının ropivakainden anlamlı şekilde yüksek olduğu gösterilmiştir. Oysa her üç lokal anesteziğin %0,75 konsantrasyonları kullanıldığında, yaklaşık 45-60 dk arasında %MOE levobupivakain ve bupivakaininin ropivakainden daha fazla olduğu izlenmiştir. Bizim çalışmamızda hem epidural hem de spinal lokal anestezi antinosiseptif etkisini araştıran Kanai ve ark. dan (95) farklı olarak sadece intratekal uygulamayı ve lokal anestezi olarak da sadece bupivakaini tercih ederken, tam bir karşılaştırma yapabilmek amacıyla 30 µl volüm uyguladık. Ayrıca bupivakainin de farklı lipozomal formülasyonlarını intratekal uyguladık. Bupivakain gibi uzun etkili bir lokal anesteziği kontrollü salınım özelliği sağlayan iki farklı lipozomal formda (LB ve YVLB) uyguladığımızda kuyruk çekme zamanı ve MOE% ile belirlediğimiz analjezik ve/veya antinosiseptif etkinin Kanai ve ark'dan (95) daha uzun olduğunu gözlemledik. Yine bu araştırmada intratekal %0,5 ve %0,75 bupivakain gruplarında tüm sıçanlarda 5.dkda başlayan motor blok sırasıyla 35 dk ve 50 dk sürdüğünden artan konsantrasyonla motor blok

süresinin uzadığı gösterilmiştir (95). Çalışmamızda ise ilk ölçüm zamanımız olan 10.dk'dan itibaren izlenen motor blok %0,5 bupivakainle 75. dk'da ortadan kalkarken, LB ve YVLB gruplarında sadece 20 dk sürmüş, yani bupivakaine göre 55 dk daha erken ortadan kalkmıştır. Kanai ve ark (95) araştırmasıyla karşılaştırıldığında her iki lipozomal bupivakain formülasyonunun hem %0,5 hem de %0,75 bupivakainden daha kısa süren motor blok oluşturduğu izlenmiştir. Bunun nedeni lipozomal ilaç sunum sistemlerinin bir yandan antinosiseptif etkiyi uzatırken kontrollü salınım özelliği nedeniyle motor blok gibi istenmeyen etkiyi de zamana yayarak daha az etkili olması sonucuna varılabilir.

Grant ve ark. (9), sıçanlarda yara yerine cerrahi insizyondan 24 saat sonra hiperaljezik oldukları dönemde 0,3'er mL LB, BHCl, salin veya lipozom infiltre ettiklerinde analjezinin sadece BHCl (ortalama 23 dk) ve LB (ortalama 180 dk) gruplarında izlendiği belirtilmiştir. Ayrıca plazma bupivakain seviyesinin, LB grubunda BHCl grubuna göre daha az olduğu bulunmuştur. LB grubunda yaklaşık 8 kat daha uzun süren analjezi süresi ve daha az plazma bupivakain seviyeleri görülmüştür (9). İnsanlarda da yara yerine LB uygulaması güvenli ve etkin bir analjezi yöntemi olarak klinik uygulamaya girmiştir (85). Daha önce yapılan yapay BOS'daki in vitro LB'nin kontrollü salınım araştırmasının ardından (16), bu çalışmada sıçanlara nöroaksiyel uyguladığımız lipozomal bupivakain formülasyonlarından sadece YVLB ile yaklaşık 150 dk süren kuyruk çekme süresiyle belirlediğimiz analjezi süresinin hem BHCl hem de LB'den uzun (60 dk) olduğunu gösterdik.

Farelerde yapılan başka bir çalışmada hayvanların kuyruk köklerine LB verildikten 30 dk sonra kuyruk çekme testi ile analjezi süresi değerlendirilmiştir (80). Her gruba toplamda 40 µl olacak şekilde 1.gruba %1,1 lik LB, 2.gruba ilaç içermeyen lipozomal salin, 3.gruba %1,1 lik BHCl, 4.gruba 1:200000 epinefrinli %1,1 lik BHCl, 5.gruba da salin uygulanmıştır. LB verilen 1.grupta duyu bloğu süresi ortalama 130 dk olup, 3. ve 4.gruba göre anlamlı olarak uzun tespit edilmiştir. Salin ve sadece lipozom verilen gruplarda ise duyu bloğu oluşmamıştır. Ayrıca farelere intraperitoneal LB (120, 180, 240 ve 480 mg/kg) ile BHCl (30, 50, 70,90 ve 110 mg/kg) enjekte edilerek % 50 hayvanda öldürücü doz (LD50) gruplar arasında karşılaştırmıştır (80). BHCl ile LD50:61 mg/kg iken, LB ile LD50: 291 mg/kg bulunmuştur. Böylece LB'nin hem duyu bloğu süresini anlamlı şekilde uzattığını hem de sistemik ilaç toksisitesi açısından BHCl'ye göre daha güvenli olduğu bildirilmiştir. Bu araştırmaya benzer şekilde kuyruk çekme testiyle analjeziyi değerlendirdik. Ancak bu araştırmadan farklı olarak LB'yi kuyruk kökü yerine bir nöroaksiyel uygulama olan intratekal yolla ve 30 µl verdik. Çalışmamızda 30 µl intratekal YVLB ile 150 dk olan duyu bloğu süresi hem diğer iki grubumuza göre hem de Grant ve ark'nın (80) LB ile elde ettiği 130 dk'lık süreye göre uzun olduğu gözlenmiştir. Bu da YVLB'nin normal LB formülasyonlarından daha iyi olduğunun da bir göstergesidir.

Malinovsky ve ark (12) tavşanlara lomber epidural kateter ve femoral arter kateter yerleştirerek epidural kateterden LB ve BHCl vererek motor ve hemodinamik değişiklikleri karşılaştırmıştır. Tavşanlar 5 gruba ayrılarak epidural kateterden her gruba 1 mL olacak şekilde önce 1mL de 0,65, 1,25, 2,5, 3,75 ve

7,5 mg olacak şekilde bupivakain verilmiş ve 3 gün sonrasında aynı dozlarda LB gruplara verilmiştir. Her iki grupta doz arttıkça tam motor blok oluşma zamanları azalmıştır. Ayrıca her iki grupta motor blok süresi doz arttıkça uzamıştır. Maksimum etkinin yarısının (E_{50}) oluşması için gereken doz LB grubunda ortalama 2,61 mg iken, BHCl grubunda 4,49 mg'dır. Aynı zamanda LB ile maksimum motor blokaj süresi ortalama 202 dk iken BHCl grubunda bu süre ortalama 152 dk dır. Dolayısıyla LB epidural kateterden uygulanarak E_{50} dozu hesaplandığında doz arttıkça hem motor blok başlama zamanının hem de motor blok süresinin uzadığı gösterilmiştir. LB ile ilgili olsa da hem araştırma yapılan hayvan türü tavşan olduğu için hem de uygulama intratekal olmadığı için elde ettiğimiz sonuçların kıyaslaması yapılmamıştır.

Richard ve ark'nın (13) çalışmasında ise LB'nin lokal ve sistemik toksisitesini araştırmak için tavşan ve köpeklerde brakiyal pleksus bloğu yapılmıştır. Tavşanlar ve köpekler ayrı ayrı 5 gruba ayrılmış. Grup 1, 2 ve 3' e sırasıyla 9, 18 ve 25 mg/kg *EXPERAL (bupivacaine liposome injectable suspension)*, Grup 4'e 9 mg/kg bupivakain, Grup 5' e de salin verilmiştir. *EXPERAL* ilişkili kayda değer etki olarak 24 tavşanın 8'inde, 24 köpeğinde 7'sinde brakiyal pleksus etrafındaki yağlı dokuda hafif derece degranülatöz inflamasyon ortaya çıkmıştır. Bu durum lipozoma karşı yabancı cisim reaksiyonu olarak düşünülmüştür. Bunun dışında gruplar arasında herhangi bir ciddi lezyon farkı tespit edilmemiştir. Ayrıca çalışmalar süresince bupivakain toksisitesine ilişkin bir yan etkiye rastlanmamıştır. Böylece LB'nin daha uzun analjezi süresini daha yüksek dozlarda bile lokal veya sistemik toksisite göstermeden sağladığı

gösterilmiştir. Sıçanlardan farklı bir grup hayvanla araştırılmış olsa da LB ile periferik sinir bloğu yapıldığında toksisiteye rastlanmamış olması kontrollü salınım sistemlerinin güvenliği açısından önemli bir göstergedir.

İnsanlarda da LB ile yapılmış araştırmalara rastlanmaktadır (15, 97). Bunlardan birinde umblikal herni ameliyatı olacak 13 hastada *transvers abdominis plan* bloğu için 266 mg LB uygulandığında cerrahi sonrası en az 120 saat ağrı skoru (0=ağrı yok; 10=en dayanılmaz ağrı) 3'ün altında kalmıştır. Hastaların %77 si taburculuklarında postoperatif ağrı kontrolü açısından çok memnun olduklarını belirtmişlerdir (97). Diğer insan araştırmasında ise Viscusi ve ark (15), faz 1 randomize, çift kör bir çalışmada toplam 30 sağlıklı gönüllüde her grupta 10 kişi olacak şekilde tek doz epidural kateterden her gruptaki 8 kişiye sırasıyla 89, 155 ve 266 mg LB; her gruptaki 2 kişiye ise 50 mg BHCl yapılmıştır. İlaçların farmokinetik, farmodinamik ve güvenlik açısından etkileri izlenmiştir. LB verilen gönüllülerde bütün dozlarda BHCl ye göre maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşmak daha uzun sürmüştür. Ortalama maksimum plazma konsantrasyonu (Cmax) 89 ve 155 mg LB verilenlerde (266 mg hariç) BHCl 50 mg verilenlere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük olduğu tespit edilmiştir. BHCl verilen grupta Cmax 300 ng/mL iken LB 266 mg uygulanan grupta 250 ng/mL, LB 89 mg lık grupta 120 ng/mL olarak tespit edilmiştir. LB gruplarında yarılanma ömürleri (14-19,3 saat) iken BHCl grubundan yaklaşık olarak 3 kat daha uzundur (5,7 saat). Ortalama motor blok süresi LB 266 mg grubunda 1 saat iken, BHCl grubunda 2,8 saat olarak izlenmiştir. LB 266 mg grubunda *pin prick* ve soğuk duyarlılığı kaybı sırasıyla 36 ve 69 saat iken BHCl

grubunda her iki duyu blok testinde bu süre 12 saat olarak tespit edilmiştir. LB iyi tolere edilmiş; en sık görülen yan etki ise tüm gruplarda enjeksiyon yerindeki ağrı olmuş ve 30 gün içinde çoğu gönüllüde bu şikayet geçmiştir. Çalışmamızda da BHCl ve LB ile bazale göre kuyruk çekme süresi 60.dk'ya kadar, YVLB grubunda ise 150.dk ya kadar anlamlılık gösterirken, maksimum motor blok süresi YVLB ve LB gruplarında 20 dk sürerken BHCl grubunda 75 dk kadar sürmüş olsa da bu sonuçları insanlarda elde edilen sonuçlarıyla birebir karşılaştırmak doğru olmayabilir.

Lipozomal bupivakainin klinik kullanımına Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi tarafından postoperatif analjezinin sağlanmasında hemoroidektomi ve bunionektomi ameliyatlarında sadece tek doz yara yerine infiltrasyon uygulamasına izin verilmektedir (82). LB ile nöroaksiyel blok yapılan hayvan çalışmaları sınırlıdır. İntratekal YVLB ile sıçanlarda kuyruk çekme testiyle belirlenen analjezi-antinosiseptik etkinlik yanında literatüre göre oldukça kısa süren motor blok gösteren ilk araştırma olması bu konudaki önemli adımlardan biridir.

Sonuçta uzun etkili bir lokal anestezik olan bupivakainin in vivo olarak sıçanlara intratekal uygulanan YVLB formunun kontrollü salınımı antinosiseptif etkiyi uzatırken daha kısa süren bir motor bloğa neden olmuştur.

6.SONUÇ

In vitro koşullarda üretilen yüksek verimli lipozomal bupivakainin sıçanlarda in vivo koşullarda gösterilen kontrollü salınımı sonucunda motor blok süresini uzatmadan uzun etkili antinosiseptif etkinliği gösterildi. Bu sonuçlar gelecekte insanlarda nöroaksiyel kullanımı açısından umut verici olabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Myles PS, Williams DL, Hendrata M, Anderson H, Weeks AM. Patient satisfaction after anaesthesia and surgery: results of a prospective survey of 10,811 patients. *Br J Anaesth* 2000;84:6–10.
2. Hanna MN, González-Fernández M, Barrett AD, Williams KA, Pronovost P. Does patient perception of pain control affect patient satisfaction across surgical units in a tertiary teaching hospital? *Am J Med Qual* 2012;27:411–6
3. Benyamin R, Trescot AM, Datta S, et al. Opioid complications and side effects. *Pain Physician* 2008;11:105–20
4. Walder B, Schafer M, Henzi I, Tramèr MR. Efficacy and safety of patient-controlled opioid analgesia for acute postoperative pain. A quantitative systematic review. *Acta Anaesthesiol Scand* 2001;45:795–804.
5. Odera GM, Said Q, Evans RS, et al. Opioid-related adverse drug events in surgical hospitalizations: impact on costs and length of stay. *Ann Pharmacother* 2007;41:400–6
6. Tuominen M, Haasio J, Hekali R, Rosenberg PH. Continuous interscalene brachial plexus block: clinical efficacy, technical problems and bupivacaine plasma concentrations. *Acta Anaesthesiol Scand* 1989;33:84–8
7. Klein SM, Grant SA, Greengrass RA, et al. Interscalene brachial plexus block with a continuous catheter insertion system and a disposable infusion pump. *Anesth Analg* 2000;91:1473–8

8. Chelly JE, Ghisi D, Fanelli A. Continuous peripheral nerve blocks in acute pain management. *Br J Anaesth* 2010;105:86–96.
9. Grant GJ, Lax J, Susser L, Zakowski M, Weissman TE, Turndorf H. Wound infiltration with liposomal bupivacaine prolongs analgesia in rats. *Acta Anaesthesiol Scand* 1997;41:204-7.
10. Malinovsky JM, Benhamou D, Alafandy M, Mussini JM, Coussaert C, Couarraze G et al. Neurotoxicological assessment after intracisternal injection of liposomal bupivacaine in rabbits. *Anesth Analg* 1997;85:1331-6.
11. Grant GJ, Piskoun B, Bansinath M. Analgesic duration and kinetics of liposomal bupivacaine after subcutaneous injection in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003;30:966-8.
12. Malinovsky JM, Le Corre P, Meunier JF, Chevanne F, Pinaud M, Leverge R et al. A dose-response study of epidural liposomal bupivacaine in rabbits. *J Control Release* 1999;60:111-9.
13. Richard BM, Newton P, Ott LR, et al. The safety of EXPERAL (Bupivacaine liposome injectable suspension) administered by peripheral nerve block in rabbit and dogs. *J Drug Deliv* 2012;2012:1-10
14. Ilfeld BM, Malhotra N, Furnish TJ, et al. Liposomal bupivacaine as a single-injection peripheral nerve block: A dose response study. *Anesth Analg* 2013;117:1248-56
15. Viscusi ER, Candiotti KA, Onel E, et al. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of liposome bupivacaine administered via a single epidural injection to healthy volunteers. *Reg Anesth Pain Med* 2012;37:616-22

16. Duzlu A, Gunaydin B, Sukuroğlu M, Degim IT. Release patterns of liposomal bupivacaine in artificial cerebrospinal fluid. SOAP 2013; Abstract F20.
17. Uhumwangho MU, Okor RS. Current trends in the production and biomedical applications of liposomes: a review. J Med Biomed Res 2005; 4:9-21.
18. Lasic DD. Novel applications of liposomes. Tibtech 1998; 16:307-21.
19. New RRC. Liposomes: a practical approach. New York: Oxford University Pres;1990.
20. Garcia-Garcia E, Andrieux K, Gil S, Couvreur P. Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: A way to deliver drugs to the brain? Int J Pharm 2005; 298:274-92.
21. Allen TM. Liposomes: Opportunities in drug delivery. Drugs 1997; 4:8-14.
22. Matteucci ML, Thrall DE. The role of liposomes in drug delivery and diagnostic imaging: a review. Vet Rad Ultrasound 2000; 41:100-7.
23. Jaspart S, Bertholet P, Piel G, Dogne JM, Delattre L, Evrard B. Solid lipid microparticles as a sustained release system for pulmonary drug delivery. Eur J Pharm and Biopharm 2007; 65:47-56
24. Ostro MJ. Liposomes. New York: Marcel Dekker, Inc; 1983.
25. Sharma A, Sharma US. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. Int J Pharm 1997; 154:123-40.
26. Kreuter J. Colloidal drug delivery systems. USA: Marcel Dekker; 1994
27. Keller BC. Liposomes in nutrition. Trends F Sci & Tech 2001;12:25-31.
28. Torchilin VP, Weissig V. Liposomes. Boston: Oxford University Press; 2003.

29. Gürsoy AZ. *Kontrollü salım sistemleri.1. İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği; 2002.*
30. Erdoğan S, Özer AY, Hıncal AA. *Radyopak lipozomların nükleer tıpta kullanımları. FABAD J Pharm Sci 1995;20:105-16.*
31. Özer AY. *Oküler ilaç taşınmasında lipozomlar. FABAD J Pharm Sci 1995;20:173-80.*
32. Cheema SK, Gobin AS, Rhea R, Lopez-Berestein G, Newman RA, Mathur AB et al. *Silk fibroin mediated delivery of liposomal emodin to breast cancer cells. Int J Pharm 2007;341:221-9.*
33. Zavaleta CL, Phillips WT, Soundararajan A, Goins AB. *Use of avidin/biotin-liposome system for enhanced peritoneal drug delivery in an ovarian cancer model. Int J Pharm 2007;337:316-28.*
34. Bozdağ S, Vural İ, Çapan Y, Dalkara T. *Beyin tümörlerinin tedavisinde ilaç taşıyıcı sistemlerin uygulanması. FABAD J Pharm Sci 2002;27:89-104.*
35. Li C, Yoshimoto M, Fukunaga K, Nakao K. *Characterization and immobilization of liposome-bound cellulase for hydrolysis of insoluble cellulose. Biosource Tech 2007;98:1366-72.*
36. Hoiuchi A, Satou T, Akao N, Koike K, Fujita K, Nikaido T. *The effect of free and polyethylene glycol-liposome-entrappe albendazole on larval mobility and number in Toxocano canis infected mice. Vet Parasitol 2005;129:83-7.*
37. Yan W, Chen W, Huang L. *Mechanism of adjuvant activity of cationic liposome: Phosphorylation of a mapkinase, ERK and induction of chemokins. Mol Immun 2007;44:3672-81.*

38. Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamru N, Hoshimoto S, Nagasawa T et al. *Evaluation of a novel vaccine (HVJl-liposome/HSP65 DNA+IL-RNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. Vaccine* 2007;25:2990-3.
39. Feng-chun QI, Chun-i W, Ya-jun W, Xue-mei Z, Yan Z, Bo S et al. *Immunogenicity and efficacy of Liposome encapsulated influenza split vaccine in Balb/C Mice. Chem Res Chinese U* 2007;23:314-8.
40. Betz G, Aeppli A, Nenshutina N, Leuenberger H. *In vivo comparison of various liposome formulations for cosmetic application. Int J Pharm* 2005;296:255-60.
41. Serikawa T, Kikuchi A, Sugaya S, Suzuki N, Kikuchi H, Tanaka K. *In vitro and in vivo evolution of novel cationic liposomes utilized for cancer gene therapy. J Cont Rel* 2006;113:225-60.
42. Kajiwara E, Kawano K, Hattori J, Fukushima M, Hayashi K, Maitani Y. *Long circulating liposome encapsulated ganciclovir enhances the efficacy on HSV-TK suicide gene therapy. J Cont Rel* 2007;120:104-10.
43. Shipton EA. *New formulations of local anaesthetics-part I. Anesthesiol Res Pract* 2012; 2012
44. Cassuto J, Sinclair R, Bonderovic M. *Anti-inflammatory properties of local anesthetics and their present and potential clinical implications. Acta Anaesthesiol Scand* 2006;50:265-82.
45. Ruetsch YA, Böni T, Borgeat A. *From cocaine to ropivacaine: the history of local anesthetic drugs Curr Top Med Chem* 2001;1:175-82.

46. Columb MO, MacLennan K. Local anesthetic agents. *Anaesth Intensive Care Med* 2007;8:159-162.
47. Ritchie JM, Rogart RB: Density of sodium channels in mammalian myelinated nerve fibers and nature of the axonal membrane under the myelin sheath. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:211-15.
48. Heavner JE. Local anesthetics. *Curr Opin Anaesthesiol* 2007;20:336-42.
49. Tetzlaff JE. The pharmacology of local anesthetics. *Anesthesiol Clin North Am* 2000;18:217-33.
50. Kayhan Z. *Lokal anestezikler. Klinik Anestezi. 3. Baskı. Logos Yayıncılık, İstanbul, 2004, ss.503-23*
51. Miller RD. *Miller Anestezi, Aydın D. (Çeviri Editörü), Yentür EA, Bayram E. Lokal Anestezikler, 6.baskı. İzmir:İzmir Güven Kitabevi 2010;573-603*
52. Eti Z. *Lokal anestezikler. Tüzüner F, ed. Anestezi Yoğun Bakım Ağrı. 1.Baskı, Türkiye 2010;225-37.*
53. Kindler CH. Yost CS. Two-pore domain potassium channels: New sites of local anesthetic action and toxicity. *Reg Anesth Pain Med* 2005;30:260-75.
54. Hollmann MW, Herroeder S, Kurz KS, Hoenemann CW, Struemper D, Hahnenkamp K, Durieux ME. Time-dependent inhibition of G protein-coupled receptor signaling by local anesthetics. *Anesthesiology* 2004;100:852-60.
55. Scholz A. Mechanisms of (local) anesthetics on voltage-gated sodium and other ion channels. *Br J Anaesth* 2002;89:52-61.
56. Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000;26:13-25.

57. Fink BR. *The long and the short of conduction block. Anesth Analg* 1989;68:553-5.
58. Becker DE, Reed KL. *Essentials of local anesthetic pharmacology. Anesth Prog* 2006;53:98-109.
59. Apostolou GA, Zarmakoupis PK, Mastrokostopoulos GT. *Spread of epidural anesthesia and the lateral position. Anesth Analg* 1981;60:584-6
60. Miller RD. *Miller Anestezi, Aydın D. (Çeviri Editörü), Tekin İ. Spinal, Epidural ve Kaudal Anestezi. 6.baskı. İzmir:İzmir Güven Kitabevi* 2010;1653-83.
61. Strichartz GR, Sanchez V, Arthur GR, Chafetz R, Martin D. *Fundamental properties of local anesthetics. II. Measured octanol: buffer partition coefficients and pKa values of clinically used drugs. Anesth Analg* 1990;71:158-70.
62. Boyes RN. *A review of the metabolism of amide local anaesthetic agents. Br J Anesth* 1975;47:225-30.
63. Tucker GT, Wiklund L, Berlin-Wahlen A, Mather LE. *Hepatic clearance of local anesthetics in man. J Pharmacokinet Biopharm* 1977;5:111-22.
64. Zink W, Graf BM. *The toxicity of local anesthetics: the place of ropivacaine and levobupivacaine. Curr Opin Anaesthesiol* 2008;21:645-50.
65. Graf BM. *The cardiotoxicity of local anesthetics: the place of ropivacaine. Curr Top Med Chem* 2001;1:207-14.

66. Leone S, Di Cianni S, Casati A, Fanelli G. Pharmacology, toxicology, and clinical use of new long acting local anesthetics, ropivacaine and levobupivacaine. *Acta Biomed* 2008;79:92-105.
67. Aberg G. Toxicological and local anaesthetic effects of optically active isomers of two local anaesthetic compounds. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 1972;31:273-86.
68. David JS, Ferreti C, Amour J, Vivien B, Eve O, Petit P et al. Effects of bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine on myocardial relaxation. *Can J Anaesth* 2007;54:208-17.
69. Groban L, Deal DD, Vernon JC, James RL, Butterworth J. Cardiac resuscitation after incremental overdose with lidocaine, bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine in anesthetized dogs. *Anesth Analg* 2001;92:37-43.
70. Boogaerts J, Declercq A, Lafont N, Benameur H, Akodad EM, Dupont JC et al. Toxicity of bupivacaine encapsulated into liposomes and injected intravenously: comparison with plain solutions. *Anesth Analg* 1993;76:553-5.
71. Zink W, Bohl JR, Hacke N, Sinner B, Martin E, Graf BM. The long term myotoxic effects of bupivacaine and ropivacaine after continuous peripheral nerve blocks. *Anesth Analg* 2005;101:548-54.
72. Zink W, Graf BM. Local anesthetic myotoxicity. *Reg Anesth Pain Med* 2004;29:333-40.
73. Foster AH, Carlson BM. Myotoxicity of local anesthetics and regeneration of the damaged muscle fibers. *Anesth Analg* 1980;59:727-36.

74. Zink W, Seif C, Bohl JR, Hacke N, Braun PM, Sinner B et al. *The acute myotoxic effects of bupivacaine and ropivacaine after continuous peripheral nerve blockades.* *Anesth Analg* 2003;97:1173-9.
75. Nouette-Gaulain K, Dadure C, Morau D, Pertuiset C, Galbes O, Hayot M et al. *Age-dependent bupivacaine-induced muscle toxicity during continuous peripheral nerve block in rats.* *Anesthesiology* 2009;111:1120-7.
76. Radwan IA, Saito S, Goto F. *The neurotoxicity of local anesthetics on growing neurons: a comparative study of lidocaine, bupivacaine, mepivacaine, and ropivacaine.* *Anesth Analg* 2002;94:319-24.
77. Piper SL, Kim HT. *Comparison of ropivacaine and bupivacaine toxicity in human articular chondrocytes.* *J Bone Joint Surg Am* 2008;90:986-91.
78. White JL, Durieux ME. *Clinical pharmacology of local anesthetics.* *Anesthesiol Clin North Am.* 2005;23:73-84.
79. Hollmann MW, McIntire WE, Garrison JC, Durieux ME. *Inhibition of mammalian Gq protein function by local anesthetics.* *Anesthesiology* 2002;97:1451-7.
80. Grant GJ, Vermeulen K, Langerman L, Zakowski M, Tundorf H. *Prolonged analgesia with liposomal bupivacaine in a Mouse model.* *Reg Anesth* 1994;19:264-9
81. Mashimo T, Uchida I, Pak M, Shibata A, Nishimura S, Inagaki Y, Yoshida I. *Prolongation of canine epidural anesthesia by liposome encapsulation of lidocaine.* *Anesth Analg* 1992;74:827-34

82. US Food and Drug Administration. FDA Label Approved on 10/28/2011 (PDF) for EXPAREL. US Silver Spring, MD: US Food and Drug Administration. Available from: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/022496s000lbl.pdf. Accessed May 01, 2012.
83. Golf M, Daniels SE, Onel E. A phase 3, randomized, placebo-controlled trial of DepoFoam® bupivacaine (extended-release bupivacaine local analgesic) in bunionectomy. *Adv Ther.* 2011;28:776–88.
84. Smoot JD, Bergese SD, Onel E, Williams HT, Hedden W. The efficacy and safety of DepoFoam bupivacaine in patients undergoing bilateral, cosmetic, submuscular augmentation mammoplasty: a randomized, double-blind, active-control study. *Aesthet Surg J.* 2012;32:69–76.
85. Bramlett K, Onel E, Viscusi ER, Jones K. A randomized, double-blind, dose-ranging study comparing wound infiltration of DepoFoam bupivacaine, an extended-release liposomal bupivacaine, to bupivacaine HCl for postsurgical analgesia in total knee arthroplasty. *The Knee* 2012;19:530-6
86. Kayhan Z. *Santral Bloklar . Klinik Anestezi. 3. Baskı. Logos Yayıncılık, İstanbul, 2004, ss.559-70.*
87. Rat Dissection© John R. Sowash/ May 2009 (<http://jrsowash.wikispaces.com/file/view/rat.student.pdf>)
88. Wingerd BD. *Rat dissection manual. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, London. 1999:5-40.*
89. Degim IT, Gumusel B, Degim Z, Özçelikay T, Tay A, Güner S. Oral administration of liposomal insulin. *J Nanosci Nanotechnol*, 2006;6:2945-49.

90. Degim Z, Mutlu NB, Yilmaz S, Essiz D, Nacar A. Investigation of liposome formulation effects on rivastigmine transport through human colonic adenocarcinoma cell line (Caco-2). *Pharmazie*, 2010;65:32-40.
91. Alemdaroglu C, Degim Z , Celebi N , Sengezer M , Alomeroglu M , Nacar A . Investigation of epidermal growth factor containing liposome formulation effects on burn wound healing. *J Biomed Mater Res A*. 2008;85:271-83
92. Degim Z, Ünal N, Abbasoglu U, Essiz D. The Effect of Various Liposome Formulations on The Insulin Penetration Across Caco-2 Monolayer. *Life Sci*. 2004;75:2819-27
93. Hylden JL, Wilcox GL. Intrathecal morphine in mice: A new technique. *Eur J Pharmacol*. 1980;67:313-6
94. Popitz-Bergez FA, Leeson S, Strichartz GR, Thalhammer JG. Relation between functional deficit and intraneural local anesthetic during peripheral nerve block. *Anesthesiology* 1995;83:583-92.
95. Kanai Y, Tatayema S, Nakamura T, Kasaba T, Takasaki M. Effects of levobupivacaine, bupivacaine and ropivacaine on tail flick response and motor function in rats following epidural or intrathecal administration. *Reg Anesth Pain Med* 1999;24:444-52.
96. Morimoto K, Nishimura R, Matsunaga S, Mochizuki M, Sasaki N. Epidural Analgesia with a Combination of Bupivacaine and Buprenorphine in Rats. *J. Vet Med A* 2001;48:303-12.

97. Ilfeld BM. Liposome bupivacaine in peripheral nerve blocks and epidural injections to manage postoperative pain. *Expert Opin. Pharmacother* 2013;14:2421-31

8. ÖZET

Sıçanlarda Nöroaksiyel Uygulanan Lipozomal Bupivakainin Kontrollü Salınım Paternleri

Bu çalışmada uzun etkili bir lokal anestezi olan bupivakainin analjezik etkisinden daha uzun süre faydalanabilmek için in vitro koşullarda hazırlanan multilameller lipozomal bupivakaini intratekal olarak sıçanlara uygulayarak lipozomal bupivakainin in vivo kontrollü salınımını göstermeyi amaçladık.

Etik komite izni alındıktan sonra bupivakain HCl (BHCl) ve bupivakain baz ile kolesterol, dipalmitoil fosfatidil kolin, metanol kullanılarak rotavapor cihazında vakumlu distilasyon yapıldı, ultrasonik banyoda tutularak homojen dağılım sağlanarak iki çeşit lipozomal bupivakain formülasyonu elde edildi; Lipozomal Bupivakain (LB) ve Yüksek Verimli Lipozomal Bupivakain (YVLB). Her grup 6 adet sıçan içerecek şekilde 3 grup oluşturuldu. Grup 1: (BHCl), Grup 2: (LB), Grup 3: (YVLB). Sıçanlara işlem öncesi 3 dk içinde uyanmayı sağlayacak şekilde düşük konsantrasyonda sevoflurane inhalasyonu ile anestezi indüksiyonu yapıldı. Lokal anestezi formülasyonları lomber alandan intratekal boşluğa 30 µl (%0.5 BHCl) olacak şekilde elektrik şok şeklinde kuyruk hareketinin görülmesinden sonra verildi. Analjezi değerlendirilmesi *tail-flick* testi (kuyruk çekme testi) ile değerlendirilirken, motor blok derecesi (0= motor blok yok, 1=kısmi motor blok, 2=tam motor blok) belirlendi.

Kuyruk çekme süresi YVLB grubunda BHCl grubu ile karşılaştırıldığında enjeksiyon sonrası 150.dk'ya kadar anlamlı olarak daha uzun bulundu ($p<0.05$). Kuyruk çekme süresi YVLB grubunda bazale göre 150.dk'da anlamlılığını yitirirken, BHCl ve LB grubunda 60.dk da anlamlılığını yitirdi ($p<0.05$). BHCl grubunda tam ve kısmi motor bloklı (0 ve 1.derece) hayvan oranı 75.dk'da sıfıra inerken LB ve YVLB gruplarında 20. dk da sıfıra inmiştir.

Sonuç olarak in vitro koşullarda üretilen yüksek verimli lipozomal bupivakainin sıçanlarda in vivo koşullarda gösterilen kontrollü salınımı sonucunda motor blok süresini uzatmadan uzun etkili antinosiseptif etkinliği gösterildi. Bu sonuçlar gelecekte insanlarda nöroaksiyel kullanımı açısından umut verici olabilir.

Anahtar Kelimeler: Lipozom, bupivakain, intratekal, sıçan

9. SUMMARY

Controlled Release Patterns of Liposomal Bupivacaine After Neuraxial Administration in Rats

We aimed to evaluate the in vivo effect of intrathecal administration of liposomal bupivacaine on the duration of analgesia and the motor block in rats.

After approval of the ethics committee, bupivacaine HCl (BHCl), bupivacaine base, cholesterol, dipalmitoyl phosphatidylcholine and methanol were distilled with vacuum in rotavapor device. They were kept in an ultrasound bath to achieve homogenic distribution. Two different liposomal bupivacaine formulations were made as liposomal bupivacaine (LB) and High Yield Drug Entrapment in Liposome (HYDEL). Three groups consisting of 6 rats were assigned as Group 1 (BHCl), Group 2 (LB), Group 3 (HYDEL). Anesthesia induction was provided with sevoflurane inhalation at low concentrations that may allow awakening within approximately 3 minutes (min). Local anesthetic formulations were injected into the intrathecal space in volume of 30 µl (0.5 % BHCl) at lumbar region after achieving a positive indication of electrical shock-like tail movement and analgesia was assessed using the tail flick test while motor block degree was scored (0: Complete motor block, 1: Partial motor block, 2: No motor block).

Tail-flick latencies significantly prolonged with HYDEL compared to BHCl after 150 min of injection ($p < 0.05$). The prolongation of tail flick latencies in BHCl and LB groups have lost their significance after 60 min though the

prolongation has stayed for 150 min. in HYDEL group ($p < 0.05$). Complete or partial motor block (0 or 1 st degree) decreased to zero in 75 min in the BHCL group but it declined to zero after 20 min in LB and HYDEL groups.

Controlled-release pattern was observed after intrathecal administration of HYDEL bupivacaine in rats. The longer duration of antinociceptive activity in HYDEL than bupivacaine alone without prolonging the motor block might be promising for human studies in future.

Key words: Liposome, bupivacaine, intrathecal, rat

EKLER

Ek 1.



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

SAYI : 66332047-604.01.02/ 100-12320
KONU :

29/05/2013

Sayın

Prof.Dr.Berrin GÜNAYDIN
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Berrin GÜNAYDIN, İlker YİĞİT, İsmail Tuncer DEĞİM, Mecit Orhan ULUDAĞ, Hakan EMMEZ ve Nur Banu BAL'dan oluşan, G.Ü.ET-13.043 kod numaralı ve **"Ratlarda Nöroaksiyel Uygulanan Lipozomal Bupivakainin Kontrollü Salınım Paternleri"** 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-13.043 and entitled **"Controlled Release Patterns of Liposomal Bupivacaine After Neuraxial Administration in Rats"** is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

EK : 1 Liste

Prof.Dr. Leyla AÇIK
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı : İlker

Soyadı : Yiğit

Doğum Yeri ve Tarihi : Kahramanmaraş & 18.07.1984

Eğitimi :

1990-1995: Fatih İlkokulu, Kahramanmaraş

1995-2002: Çukurova Elektrik Anadolu Lisesi, Süleyman Demirel Fen Lisesi, Hoca Ahmet Yesevi Lisesi, Kahramanmaraş

2002-2009:Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

2009-2012: T.C S.B Dr.A. Yurtaslan Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kliniği, Asistan Doktor

2010-2012:Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Ön lisans Sağlık Kurumları İşletmeciliği

2012- Halen: Gazi Üniversitesi Anestezi ve Reanimasyon AD, Araştırma Görevlisi

Yabancı Dili : İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar : Yok

Katıldığı Kongre ve Sempozyumlar :

- Preoperatif Hasta Değerlendirmesi ve Postoperatif İzlem, TARD, 2010,Ankara
- 8.Nöropatik Ağrı Sempozyumu, 2011,Türk Nöroloji Derneği, Antalya
- Yeşim Ateş Anestezi ve Ağrı Günleri -1,Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi,2011,Ankara
- XII. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu, Gazi Üniversitesi Laboratuar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi,2012,Ankara
- Türk Anesyeziyoloji ve Reanimasyon Derneği, 47.Ulusal Kongresi, Mekanik Ventilasyon Kursu, 2013,Antalya
- Türk Anesyeziyoloji ve Reanimasyon Derneği, 47.Ulusal Kongresi,2013,Antalya