



T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TIBBİ FARMAKOLOJİ  
ANABİLİM DALI

FARELERDE DANTROLLEN SODYUMUN DEPRESYON, ANKSİYETE,  
ÖĞRENME VE BELLEK ÜZERİNE ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. AYKUT ÖZTÜRK

EYLÜL-2019



**T.C.**  
**SAKARYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TIBBİ FARMAKOLOJİ**  
**ANABİLİM DALI**

**FARELERDE DANTROLEN SODYUMUN DEPRESYON, ANKSİYETE,**  
**ÖĞRENME VE BELLEK ÜZERİNE ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. AYKUT ÖZTÜRK**

**DANIŞMAN: Prof. Dr. Mehmet Emin BÜYÜKOKUROĞLU**

**EYLÜL-2019**

## BEYAN

Bu araştırma T.C. Sakarya Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu'nun 04/04/2018 tarihli 16 sayılı kararı ile yapıldı. Bu tezin "kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını" beyan ederim.

Dr. Aykut ÖZTÜRK

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sürecince farmakolojinin temel ilkelerini engin bilgisiyle aktaran, ahlak değerlerinin her şeyden önce geldiğini, doğru, adil yönetici ve eğitmen nasıl olunacağını her daim gösteren tezimin tüm aşamalarında vaktini ayırıp sabır ve titizlikle bana yardımcı olan sayın hocam Prof. Dr. Mehmet Emin BÜYÜKOKUROĞLU'na teşekkür ederim.

Bir farmakoloğun laboratuvarını mükemmel hale getirip yönetirken bunun yanında eğitim verip bilimsel deneyler de yapılabileceğini en iyi şekilde gösteren, dört sene boyunca her zaman birlikte olduğumuz bilgi ve tecrübelerini tüm samimiyetiyle paylaşan, yanlışlarımı tatlı dille söyleyerek gelişmemi sağlayan, yeri gelip anne edasıyla beni oğullarından ayırmayan, danışman olmamasına rağmen tezime her türlü desteği veren sayın hocam Prof. Dr. Pelin TANYERİ'ye teşekkür ederim.

Tez deneylerim boyunca yardımını esirgemeyen bölüm arkadaşım sayın Dr. Kübra YAVUZ'a teşekkür ederim.

Hayat boyu olduğu gibi tez yazımı boyunca da destek ve anlayışını en üst seviyede gösteren özveriyle hayatımı kolaylaştıran, mutlu olmamın kaynağı olan henüz doğmamış kızımın annesi sevgili eşim Dr. Seda DUMAN ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Tezime direkt olmasa bile dolaylı yollardan katkı sağlayan hocalarıma, çalışma arkadaşlarıma, son olarak emekleri ödenemez olan anne ve babama teşekkür ederim.

Saygılarımla

Dr. Aykut ÖZTÜRK

## İÇİNDEKİLER

BEYAN .....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
KISALTMA VE SİMGELER.....	vi
ŞEKİLLER.....	vii
ÖZET.....	viii
SUMMARY .....	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. DANTROLLEN SODYUM KULLANIM TARİHÇESİ.....	2
2.2. DANTROLLEN SODYUM KİMYASAL YAPISI.....	3
2.3. DANTROLLEN SODYUM FARMAKOKİNETİĞİ .....	5
2.3.1. Absorbsiyon .....	5
2.3.2. Dağılım.....	6
2.3.3. Metabolizma.....	6
2.3.4. Atılım .....	7
2.4. DANTROLLEN SODYUM FARMAKODİNAMİSİ .....	8
2.5. DANTROLLEN SODYUM YAN ETKİLERİ .....	12
2.6. DANTROLLEN SODYUM İLAÇ ETKİLEŞİMLERİ.....	17
2.7. DANTROLLEN SODYUM ENDİKASYONLARI .....	18
2.7.1. Malign Hipertermi.....	20
2.7.2. Spastisite .....	22
2.8. DANTROLLEN SODYUM KONTRENDİKASYONLARI ...	24
2.9. DANTROLLEN SODYUM HAKKINDAKİ DİĞER ÇALIŞMALAR.....	24
2.10. DEPRESYON VE MODELLERİ.....	27
2.10.1. Reserpin Etkisi .....	27
2.10.2. Apomorfine Bağlı Hipotermi.....	27

2.10.3.	5-Hidroksitriptofana Bağlı Davranış Değişiklikleri .....	28
2.10.4.	Psikostimulan Yoksunluğu .....	28
2.10.5.	Öğrenilmiş Çaresizlik .....	28
2.10.6.	Zorunlu Yüzme Testi .....	28
2.10.7.	Kuyruktan Asma Testi .....	29
2.10.8.	Olfaktor Bulbektomi .....	29
2.10.9.	Kronik Hafif Stres.....	29
2.10.10.	Sosyal Stres.....	30
2.10.11.	Genetik Modeller .....	30
2.11.	ANKSİYETE VE MODELLERİ .....	30
2.11.1.	Yükseltilmiş Artı Labirent Testi.....	31
2.11.2.	Yükseltilmiş T-labirent Testi.....	31
2.11.3.	Açık Alan Testi.....	31
2.11.4.	Merdiven Testi .....	32
2.11.5.	Sosyal İzolasyon Testi .....	32
2.11.6.	Sosyal Etkileşim Testi .....	32
2.11.7.	Delikli Kutu Testi .....	32
2.11.8.	Yabancı Kokuya Maruz Bırakma .....	33
2.11.9.	Şartlı Zıtlama Testi.....	33
2.11.10.	Savunmaya Yönelik Gömme Testi.....	33
2.11.11.	Ayak Şoku Testi.....	34
2.11.12.	Dört Tabaka Testi .....	34
2.12.	ÖĞRENME BELLEK VE MODELLERİ .....	34
2.12.1.	İki Obje-Yeni Obje Tanıma Testi .....	35
2.12.2.	Gecikmeli Su Labirenti Testi.....	35
2.12.3.	Korku ile Şartlandırma.....	35
2.12.4.	Modifiye Barnes Labirent Testi.....	36
2.12.5.	Morris Su Labirenti.....	36
2.12.6.	Nesne-Lokasyon Belleği Testi.....	37
2.12.7.	Pasif Sakınma Testi .....	37

2.12.8.	T ve Y Labirent Testleri.....	37
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	38
3.1.	KİMYASAL MADDELER.....	38
3.2.	DENEY HAYVANLARI.....	38
3.3.	DENEYLER.....	38
3.3.1.	Zorunlu Yüzme testi (ZYT).....	38
3.3.2.	Yükseltilmiş artı-labirent testi (YALT).....	39
3.3.3.	Pasif Sakınma Testi.....	40
3.3.4.	Morris Su Labirenti.....	40
3.3.5.	Lokomotor Aktivite (Açık alan testi).....	41
3.4.	İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME.....	42
4.	BULGULAR.....	43
4.1.	DANTROLLEN SODYUM'UN ZORUNLU YÜZME TESTİNDE İMMOBİLİZASYON SÜRESİ ÜZERİNE ETKİSİ.....	43
4.2.	DANTROLLEN SODYUM'UN YÜLSELTİLMİŞ ARTI LABİRENT TESTİNDE AÇIK KOLA GİRİŞ SAYISI VE AÇIK KOLDA KALIŞ SÜRESİ ÜZERİNE ETKİSİ.....	44
4.3.	DANTROLLEN SODYUM'UN PASİF SAKINMA TESTİNDE ÖĞRENME VE BELLEK ÜZERİNE ETKİSİ.....	46
4.4.	DANTROLLEN SODYUM'UN MORRIS SU LABİRENTİ TESTİNDE ÖĞRENME VE BELLEK ÜZERİNE ETKİSİ.....	48
4.5.	LOKOMOTOR AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ.....	50
5.	TARTIŞMA.....	52
	Kaynakçalar.....	67



## KISALTMA VE SİMGELER

5-HTP	: 5-Hidroksitriptofan
5-HT	: Serotonin
ALS	: Amiyotrofik Lateral Skleroz
AOX1	: Aldehit Oksidaz 1
ATP	: Adenozintrifosfat
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
FDA	: ABD Gıda ve İlaç Dairesi
MAOI	: Monoamin oksidaz inhibitörleri
M.H	: Malign Hipertermi
M.H.S	: Malign Hipertermiye Sensitif
MS	: Multipl Skleroz
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
NA	: Noradrenalin
NAT2	: N-asetil transferaz 2
RYR	: Ryanodin Reseptörü
SGOT	: Aspartat Aminotransferaz
YALT	: Yükseltilmiş Artı Labirent Testi
ZYT	: Zorunlu Yüzme Testi

## ŞEKİLLER

**Şekil 1.** Dantrolen Sodyumun Kimyasal Yapısı

**Şekil 2.** Dantrolen Sodyum Metabolik Yolu

**Şekil 3.** Malign hipertermi ile ilişkili olarak iskelet kasının uyarılma gevşeme kaskadı

**Şekil 4.** Imipramin ve Dantrolen Sodyum'un ZYT'nde immobilizasyon süresi üzerine etkisi.

**Şekil 5a.** Diazepam ve Dantrolen Sodyum'un yükseltilmiş (+) labirent testinde açık kola giriş sayısı üzerine etkisi.

**Şekil 5b.** Diazepam ve Dantrolen Sodyum'un yükseltilmiş (+) labirent testinde açık kolda kalış süresi üzerine etkisi.

**Şekil 6a.** Skopolamin ve Dantrolen Sodyum ve kombinasyon gruplarının pasif sakınma testi üzerine etkisi (1. Gün)

**Şekil 6b.** Skopolamin, Dantrolen Sodyum ve kombinasyon gruplarının pasif sakınma testi üzerine etkisi (2. Gün)

**Şekil 7a.** Skopolamin, Dantrolen Sodyum ve kombinasyon gruplarının Morris su labirenti testi üzerine etkisi

**Şekil 7b.** Skopolamin, Dantrolen Sodyum ve kombinasyon gruplarının Morris su labirenti testi üzerine etkisi

**Şekil 7c.** Skopolamin ve Dantrolen Sodyum ve kombinasyon gruplarının Morris Su Labirenti testinde ortalama hız üzerine etkisi

**Şekil 8.** Salin, diazepam, imipramin, skopolamin, dantrolen ve kombinasyon gruplarının lokomotor aktivite testinde gidilen mesafe üzerine etkisi

## ÖZET

**AMAÇ:** Dantrolen sodyum, riyanodin reseptörlerine bağlanan ve sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum salımını bloke eden doğrudan etkili iskelet kası gevşeticisidir. Malign hipertermi ve spastisite tedavisinde kullanılmaktadır. Santral sinir sistemi üzerine yan etkileri bilinmektedir ancak son dönemlerde Alzheimer gibi hastalıklarda kullanılabileceğine dair yayınlar mevcuttur. Biz bu çalışmamızla hali hazırda literatürde net olarak aydınlatılamamış olan dantrolen sodyumun depresyon, anksiyete, öğrenme ve bellek üzerine etkilerinin olup olmadığını ortaya koymayı amaçladık.

**YÖNTEM:** Çalışma Sakarya Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'nun 04/04/2018 tarihli onayı alındıktan sonra 25-35 gram ağırlığında 9 haftalık 220 adet erkek BALB/c cinsi fare kullanılarak gerçekleştirildi. Davranış deneyleeri SÜDETAM laboratuvarında ve hergün aynı saatlerde (09:00-14.00) gerçekleştirildi. Tüm deney hayvanları sadece bir tedavi grubu için kullanıldı. Davranış deneyleeri dört yöntem olarak planlandı: zorunlu yüzme testi, yükseltilmiş artı labirent testi, Morris su labirenti testi ve pasif sakınma testi olarak sırayla yapıldı. Tüm deney grupları n=10 olarak belirlendi ancak bu testlerden önce farelere lokomotor aktivite testi yapılarak lokomasyon aktiviteleri yeterli olmayan fareler deney dışı bırakıldı. Dantrolen sodyum 1,3 ve 9 mg/kg dozlarında olmak üzere 3 farklı dozda uygulandı.

**BULGULAR:** Dantrolen sodyum zorunlu yüzme testi sonucunda üç dozda da anlamlı antidepresan etki göstermedi. Yükseltilmiş artı labirent testinde ise üç dozda da anksiyolitik etki gösterdi. Pasif sakınma ve Morris su labirenti testleri sonuçlarında belleği kontrol grubuna göre arttırmamakla birlikte skopolamin ile bozulmuş belleği düzeltti.

**SONUÇ:** Bu çalışma ile dantrolen sodyumun lokomotor aktiviteyi bozmadan anksiyolitik etki oluşturduğunu ve bozulmuş belleği düzeltebileceğini tespit ettik. Bu etkilerin riyanodin reseptörlerinin blokajı, nöroprotektif ve sitoprotektif etkileri sayesinde olması muhtemeldir.

**ANAHTAR KELİMELEER :** Dantrolen sodyum, fare, depresyon, anksiyete, öğrenme ve bellek

## SUMMARY

**AIM:** Dantrolene sodium is a direct acting skeletal muscle relaxant that binds to ryanodine receptors and blocks calcium release from the sarcoplasmic reticulum. It is used in the treatment of malignant hyperthermia and spasticity. Side effects on the central nervous system are known, but there have been recent reports that they can be used in diseases such as Alzheimer's. In this study, we aimed to determine whether dantrolene sodium, which has not been clarified in the literature, has effects on depression, anxiety, learning and memory.

**MATERIALS AND METHODS:** After the approval of Sakarya University Animal Experiments Local Ethics Committee dated 04/04/2018, 220 male BALB/c mice weighing 25-35 grams were used for 9 weeks. Behavioral tests were performed in the SÜDETAM laboratory and at the same times every day (09:00-14.00). All experimental animals were used only for one treatment group. Behavioral experiments were planned as four methods: forced swimming test, elevated plus maze test, Morris water maze test and passive avoidance test. All experimental groups were determined as n=10, but before these tests, the mice were tested for locomotor activity and the mice whose locomotion activities were not sufficient were excluded from the experiment. Dantrolene sodium was administered in 3 different doses, 1,3 and 9 mg/kg.

**RESULTS:** Dantrolene sodium showed no significant antidepressive effect in all three doses as a result of the forced swimming test. The elevated plus maze test showed anxiolytic effect at all three doses. The results of passive avoidance and Morris water maze tests did not increase the memory compared to the control group, but corrected the memory disrupted with scopolamine.

**CONCLUSION:** In this study, we determined that dantrolene sodium had an anxiolytic effect without impairing locomotor activity and could reverse impaired memory. These effects are likely to be due to blockade of ryanodine receptors, neuroprotective and cytoprotective effects.

**KEY WORDS:** Dantrolene sodium, mice, depression, anxiety, learning and memory

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dantrolen sodyum direkt etkili bir kas gevşetici ajandır. Portakal renkli, suda az çözünen bir ilaçtır, ancak hafif asitli doğasından dolayı çözünürlük alkali çözeltide biraz artar. İzole edilmiş sinir-kas preparatında, dantrolen sodyumun, doğrudan kasın kendisinde sinir-kas kavşağının ötesinde bir bölgede iskelet kasının kasılma tepkisini etkileyerek gevşeme ürettiği gösterilmiştir (Bannister 2012). İskelet kasında dantrolen sodyum, muhtemelen sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum salınımına müdahale ederek kasılma-gevşeme kaskadını ayrıştırır (Hopp, D'Angelo ve ark. (2014). Bu etki, yavaş kas liflerinde daha belirgindir, ancak genellikle her ikisini de etkiler. Dantrolen sodyumun insanlara ağız yoluyla verilmesinden sonra emilimi az ve yavaş fakat tutarlıdır. Doza bağlı kan seviyeleri elde edilir. İskelet kası gevşemesinin süresi ve şiddeti, dozaj ve kan seviyeleri ile ilgilidir. Yetişkinlerde dantrolen sodyumun biyolojik yarı ömrü 8,7 saat kadardır (Muehlschlegel and Sims 2009). İnsan gönüllülerinde dantrolen sodyumun eliminasyonunda spesifik metabolik yollar kurulmuştur. Metabolik kalıplar yetişkinlerde ve çocuk hastalarda benzerdir. Dantrolen sodyum muhtemelen karaciğer enzimleri tarafından metabolize edildiğinden, metabolizmasının diğer ilaçlarla değiştirilmesi mümkündür. Dantrolen sodyum rutin olarak malign hipertermi ve hastalıklara bağlı çizgili kas spazmlarının tedavisinde kullanılan bir ilaçtır.

Merkezi sinir sistemi (MSS) etkisi, uyuşukluk, baş dönmesi ve zaman zaman görülen genelleşmiş güçsüzlük ile oluşur. Dantrolen sodyumun yukarıda belirtilen MSS üzerine etkileri bilinmekle birlikte, diğer etkileri ve bunun derecesi bilinmemektedir. Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılabileceğine dair iddialar mevcuttur (Liang ve Wei 2015). Biz bu çalışmamızla hali hazırda literatürde net olarak aydınlatılamamış olan dantrolen sodyumun depresyon, anksiyete, öğrenme ve bellek üzerine etkilerinin olup olmadığını ortaya koymayı amaçladık.

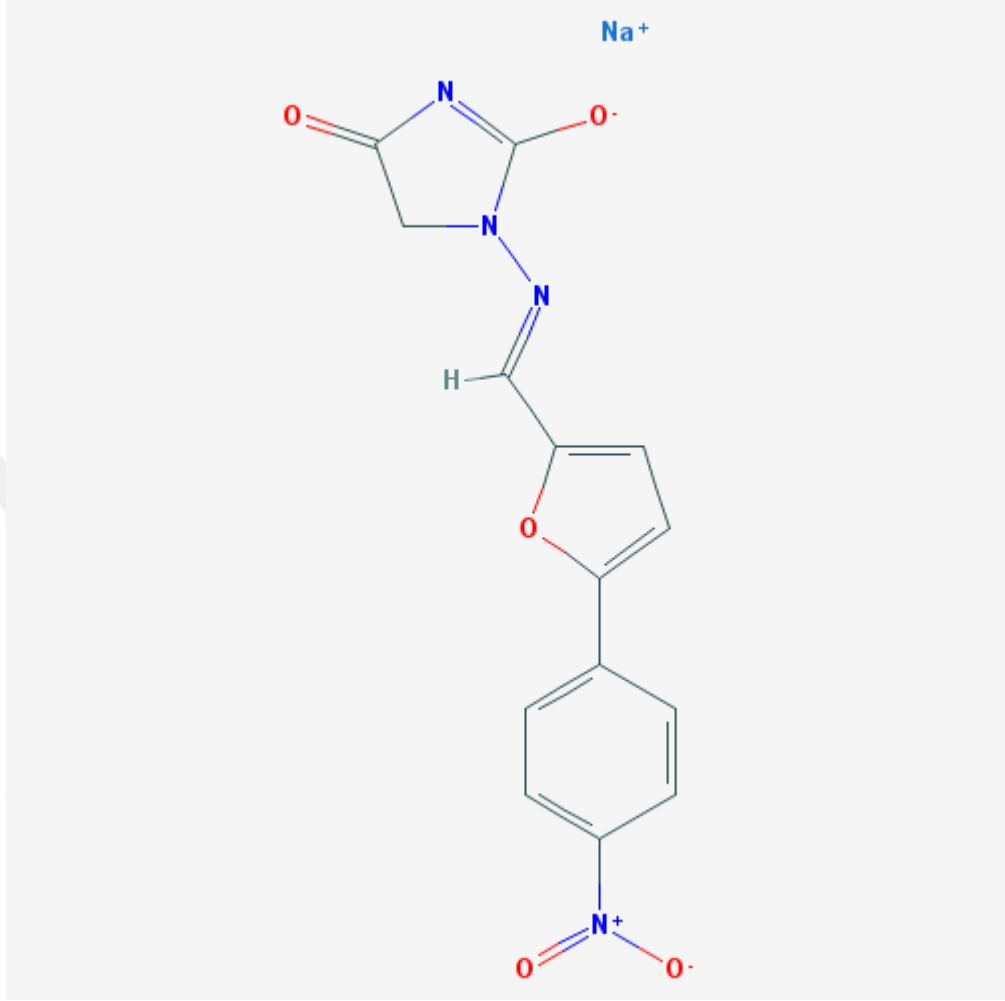
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. DANTROLEN SODYUM KULLANIM TARİHÇESİ

Dantrolen sodyum ilk olarak Snyder ve arkadaşları tarafından 1967'de sentezlendi (Snyder, Davis ve ark. 1967). Hayvanlarda intravenöz uygulamadan sonra iskelet kası gevşetici özelliklere sahip olduğu bulundu. Yeni bir kas gevşetici sınıfı olarak önerilen birçok hidantoin türevinden biri olarak tanımlandı. Çalışmalar, bu gevşetici özelliklerin uyarma-kasılma kaskadının depresyonuna bağlı olduğunu ortaya koydu. Bu karmaşık süreç iskelet kaslarının nöromüsküler kavşaktaki kimyasal bir sinyali kas kasılmasına dönüştürdüğünü gösterdi. Bu sebeple, dantrolen malign hipertermi (M.H) tedavisinden önce spastisite tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Malign hiperterminin tedavisindeki etkinliği Güney Afrikalı anestezi uzmanı Gaisford Harrison tarafından keşfedilip 1975 tarihli bir makalede bildirilmiştir (Harrison 1975). Landrace ırkı domuzlarda insanlarda genel anestezi ile indüklenen malign hipertermi krizlerine benzeyen strese bağlı bir sendrom gözlemlendi. Tedavi edilmeyenlerde ölüm oranı %100'e yaklaştı. Sendromun hayatı tehdit eden şiddeti insanlarda plasebo kontrollü çalışmaları yasakladığından, hastalığın patofizyolojisi ve tedavisini araştırmak için malign hipertermiye sensitif (M.H.S) domuzlar kullanıldı. Harrison, genetik olarak duyarlı domuzlarda, halotan anestezisi ile malign hipertermiyi deneysel olarak indüklemiş ve %87,5'lik bir sağkalım oranı elde etmiştir. Burada sekiz denekten yedisi, dantrolenin intravenöz uygulanmasından sonra hayatta kalmıştır. Dantrolen öncesinde, malign hipertermi tedavisi için mevcut tek ilaç prokain olup, hayvan deneylerinde %60'lık bir ölüm oranı görülmüştür.

Daha sonra bu sonuçlar Polonya Çin domuzları ve Pietrain domuzları gibi diğer M.H.S ırklarında doğrulandı. Dantrolenin M.H.S domuzlarında halotan kaynaklı iskelet kası kasılmalarının azaltılmasında ve önlenmesinde in vitro etkileri ilk olarak 1976'da bildirilmiştir (Anderson ve Jones 1976). Eylül 1977'den Mayıs 1979'a kadar çok sayıda hastada dantrolen tedavisinin M.H krizlerinde güvenliğini ve etkinliğini değerlendirmek amacıyla 65 hastaneden oluşan bir Kuzey Amerika çok merkezli çalışma yapıldı. Bu çalışma, anestezi sırasında M.H şüphesi olan hastalarda mortalitede önemli bir azalma olduğunu göstermiştir. Bu sonuçların yayınlanmasından sonra, M.H'nin klinik tedavisi için dantrolen tanıtıldı (Kolb, Horne ve ark. 1982).

## 2.2. DANTROLEN SODYUM KİMYASAL YAPISI



Şekil 1: Dantrolen Sodyumun Kimyasal Yapısı

Bir hidantoin türevi olan dantrolenin (hidratlanmış 1-(((5-(4-nitrofenil)-2-furanil)-metilen) amino)-2,4-imidazolidin dion sodyum tuzu) moleküler yapısı, fenol halkası hariç düzlemseldir (şekil 1).

Fenitoin ve nitrofurantoin ile yapısal benzerlikleri olan bir hidantoin türevi olan Dantrolen sodyum oldukça lipofildir ve bu nedenle suda zayıf çözünür. Susuz dantrolen sodyum, 336 g/mol moleküler ağırlığa sahiptir. Tıbbi dantrolen, 399 g/mol moleküler ağırlığa sahip turuncu bir hemiheptahidrat sodyum tuzudur. Suda çok az çözünür olan zayıf bir bazdır (pKa 7.5) (Krause, Gerbershagen ve ark. 2004). Dantrolen ticari olarak 25, 50 ve 100 mg oral kapsüller ve intravenöz uygulama için

20 mg (Dantrium®, Revonto®) ve 250 mg şişeler (Ryanodex®) olarak temin edilebilir. Yazılan marka adları ve formülasyonlar ABD'de mevcut olan ürünlerdir. Günümüzde, suda çözünürlüğü arttırmak için 3 g mannitol ilave edilen 20 mg liyofilize dantrolen sodyum içeren şişelerde intravenöz kullanım için mevcuttur. Şişelerin içeriğinin 60 ml su içinde çözülmesi gerekir, bu da pH 9.5'te 0.33 mg.ml<sup>-1</sup> nihai dantrolen konsantrasyonu verir. Ticari olarak temin edilebilir paket, 12 şişe dantrolen ve 12 şişe damıtılmış su içerir. Uygulamadan önce, çözelti berrak olmalı ve görünür parçacıklar olmamalıdır. Hazırlanan solüsyon ışıktan korunmalı ve 15 ila 25 °C'de saklanmalı ve hazırlandıktan sonra 6 saat içinde kullanılmalıdır. Elde edilen alkali çözelti periferik damarları oldukça tahriş edicidir ve bu nedenle büyük bir venden infüze edilmelidir.



Resim 1: dantrolen sodyum tuzu şişesi ve aktif molekül halı



### **2.3. DANTROLEN SODYUM FARMAKOKİNETİĞİ**

Sağlıklı gönüllülerde ve spastisiteli hastalarda yapılan çalışmaların sonuçları; dantrolenin oral uygulamadan sonra yavaş ve eksik bir şekilde emildiğini, büyük ölçüde karaciğerde metabolize edildiğini ve esas olarak idrar ve safra yoluyla elimine edildiğini gösterir (Kambayashi ve Dressman 2013). Doza bağlı kan seviyeleri elde edilir ve sabit durumdaki plazma seviyeleri bölünmüş dozajla korunabilir.

#### **2.3.1. Absorbsiyon**

Hayvan çalışmaları, ince bağırsağın dantrolen sodyum için temel absorpsiyon bölgesi olduğunu, ancak oral dozun maksimum %70'inin emildiğini göstermektedir. Yirmi dört sağlıklı gönüllüde 100 ila 125 mg'lik oral tek doz verilmesinden, 3 ila 6 saat sonra, 0.7 ila 1.7pg/ml pik kan seviyeleri elde edildi. Birkaç hafta boyunca günde 4 kez 100 mg dantrolen alan 4 paraplejik hastada, ilacın en yüksek seviyeleri, ilk sabah dozundan birkaç saat sonra 2 ila 3 pg/ml idi. Beş saat sonra, ikinci günlük dozdan sonra, bu seviyeler %20 ila 25 daha yüksek bulundu (Herman, Mayer ve ark. 1972). Kronik spastisiteli 19 çocukta, 1 ila 3 mg/kg dantrolen alımından 5-6 saat sonra yaklaşık 2 pg/ml pik plazma seviyeleri elde edildi. Pik konsantrasyonları, sağlıklı insan gönüllülerinde alımdan 4-8 saat sonra ortaya çıkar. Terapötik kan konsantrasyonları, spastisitelinin tedavisi için 0.3-0.6 µg/mL (1-1.9 µmol/L) ve malign hipertermi tedavisi için 2-4 µg/mL (6,4-9,5 µmol/L) dir (Allen, Cattran ve ark. 1988).

İlaç genellikle, alımdan sonra 24 saat veya daha fazla bir süre için plazmada saptanabilir (Muehlschlegel ve Sims 2009). Dantrolenin tek doz uygulama sonrası plazma seviyelerinde belirgin bir değişkenlik vardır ve bireyler arası farklılıklar belirgindir. Çocuklarda yapılan çift kör çaprazlama karşılaştırmada kapsül ve süspansiyon formülasyonlarına göre bireysel olarak farklılık daha fazla idi. İki hafta boyunca çoklu doz verilen 6 çocukta günde 4 kez 1 mg/kg ila 3 mg/kg arasında değişen dozlarda ilaç uygulaması sonrası plazma düzeyinde bir miktar dalgalanma olmasına rağmen yaklaşık 1.5 ila 2.0 pg/ml'lik bir platoya ulaştı.

Plazmada dantrolenin ortalama yarı ömrünün normal yetişkinlerde yaklaşık 8,7 saat ve kronik spastisiteli çocuklarda 7,3 saat olduğu bildirilmektedir. Kas gevşemesi serum dantrolen sodyum konsantrasyonu ile ilişkili olduğu için, yüksek dozda

dantrolen alan hastalarda ilacın kesilmesinin zamanlaması hakkında karar verirken ilacın yarı ömrünü düşünmek yararlı olacaktır (Jeon, Song ve ark. 2014).

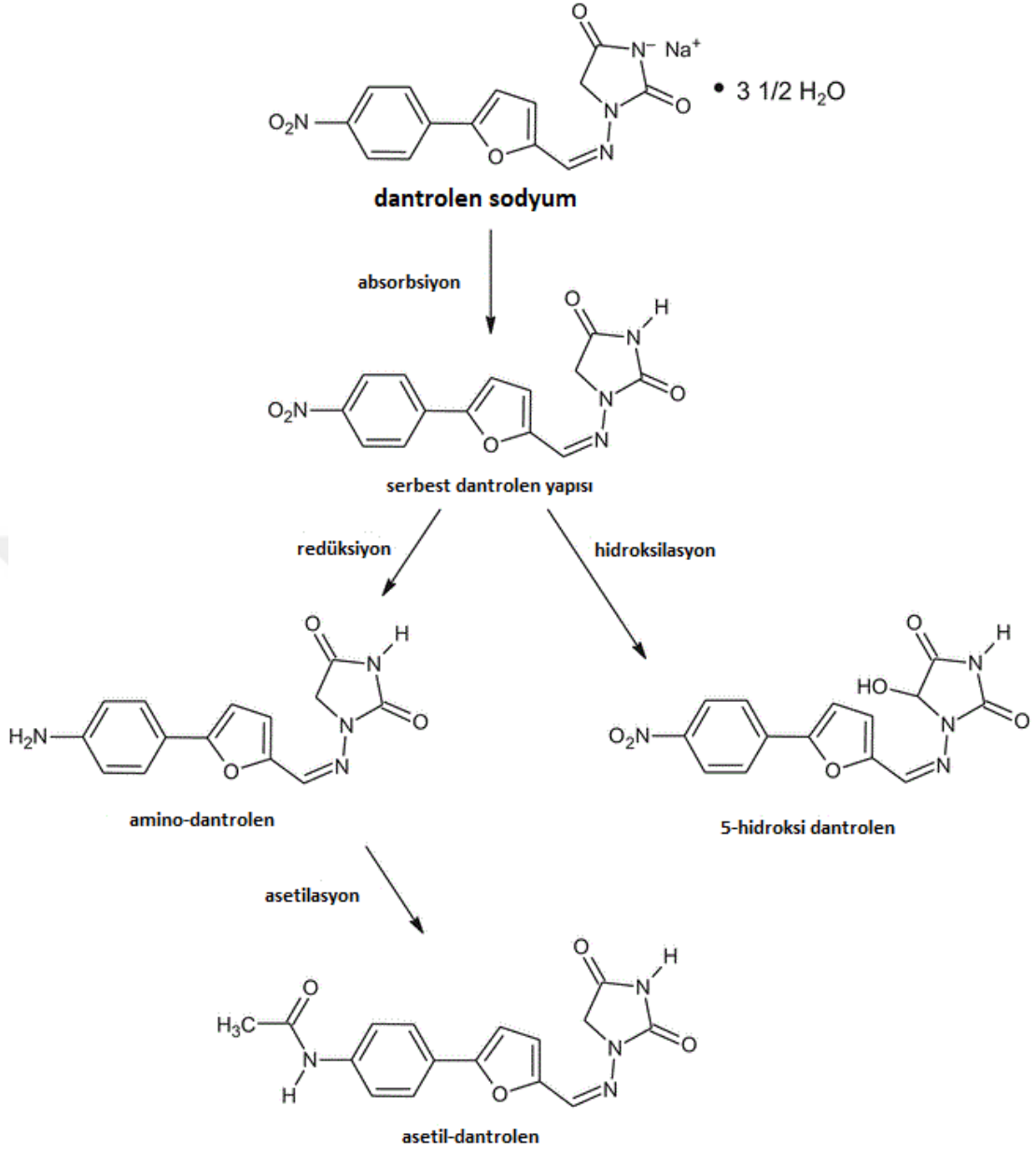
### **2.3.2. Dağılım**

İnsan serum albümini ile yapılan in vitro çalışmalar, yaklaşık  $4.3 \times 10^{-4}$  M'lik bir ilişki sabitini göstermektedir. Dantrolen esas absorbe olduğu bölge olan ince barsakta devamlı uygulama akabinde 5 saat sonrasında bu bölgede kademeli olarak birikmeye eğilim gösterir. Dağılımı göstermek amacıyla yapılan floresan boyama çalışmalarında dantrolenin ince barsak ve karaciğerden sonra safra kesesi, böbrek korteksi ve mesanede dağıldığı görülmüştür. Diğer ilgi çekici nokta ilaç konsantrasyonunun artmasının dağılım düzenini değiştirmemesi ve ilaç metabolizmasındaki tek önemli faktörün uygulama süresinin uzunluğu olmasıdır.

Sağlıklı yetişkin gönüllülerde yapılan çalışmada intravenöz olarak verildiğinde, dantrolen iki kompartmanlı bir dağılım modelini takip etmiştir. Yetmiş kg ağırlığındaki bir erişkin için başlangıç hacmi 3.24 L ve son hacim 22.9 L olarak belirlenmiştir. Birinci kompartmandan ikinci kompartmana dağılım hızla gerçekleşmiş olup, birinci kompartman içi dağılım yarı ömrü ( $t_{1/2a}$ ) 1.6 dk olmuştur (Podranski, Bouillon ve ark. 2005). Dantrolen, plasentayı insanlarda fetal-maternal serum konsantrasyon oranı 0,4-0,7 ile geçmektedir.

### **2.3.3. Metabolizma**

Dantrolen karaciğerde, esas olarak hidantoin halkası kısmının 5-hidroksilasyonu ile ve aynı zamanda nitro grubunun indirgenmesi ve ardından asetilasyonu ile metabolize edilir. Dantrolen sodyumun serbest halinin bu farmakokinetik değişimler sonucu oluşan iki ana metaboliti amino-dantrolen ve 5-hidroksi-dantrolendir. (şekil 2) Hem in vitro hem de hayvan çalışmalarında 5-hidroksi dantrolenin de iskelet kası gevşetici aktivitesine sahip olduğu, ancak dantrolenin kendisinden önemli ölçüde daha az etkili olduğu bulunmuştur (Ellis ve Wessels 1978). Amino-dantrolen ise inaktif form olan asetil-dantrolene asetillenir. Çocuklarda, kararlı durumdaki 5-hidroksi-dantrolen konsantrasyonları, dantrolenin %30-50'si kadardır. Zaman konsantrasyonu eğrileri dantrolen ve bunun 5-hidroksi türevi için benzer olmakla birlikte çocuklarda, kararlı durumdaki 5-hidroksi-dantrolen konsantrasyonlarının, dantrolenin %30-50'si kadar olduğu hesaplanmıştır (Haslam, Walcher ve ark. 1974)



Şekil 2 : dantrolen sodyum metabolik yolu

#### 2.3.4. Atılım

Yaklaşık olarak, emilen dantrolen dozunun üçte ikisi safrada ve üçte biri de idrar yoluyla atılır. İdrarda dantrolen, 5-hidroksi-dantrolen metaboliti olarak %79, indirgenmiş metabolitleri olan amino-dantrolen ve asetil-dantrolen olarak %17 oranında bulunur ve %4 değişmemiş formundadır (Dykes 1975). Bu oranlar ilacın uzun süreli tatbikinde de yaklaşık olarak aynı kalır. Sağlıklı gönüllülerde dantrolenin

renal klerensi 1.8-7.8 L/s'dir. Dantrolene'in serum yarı ömrü spastisiteli erişkinlerde 6-9 saattir. Malign hipertermi hastalarında dantrolenin ortalama yarı ömrü 12 saattir (Flewellen ve Nelson 1985). Çocuklarda yarı ömür 7-10 saattir. Yenidoğanlarda yarı ömür 20 saattir (Dykes 1975).

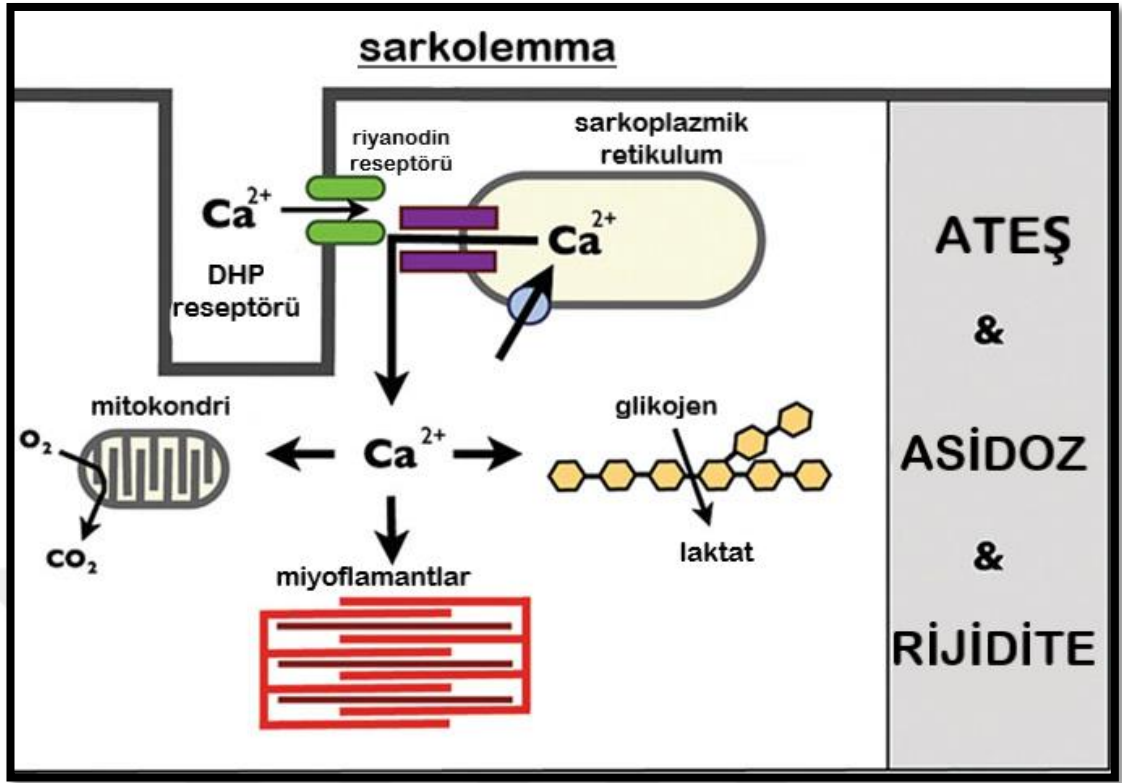
#### **2.4. DANTROLEN SODYUM FARMAKODİNAMİSİ**

T-tübül zarındaki voltaj değışiklikleri, iskelet kası liflerinin normal uyarma-kasılma birleşmesi sırasında dihidropiridin reseptöründeki konformasyonel değışiklikleri düzenler. Dihidropiridin reseptörleri, depolarizasyon sırasında intramoleküler şarj hareketine maruz kalan voltaj sensörleri olarak işlev görür. Bu fenomen muhtemelen, dihidropiridin reseptörünün alfa-1 alt ünitesinin transmembran alanları II ve III'ün arasındaki hücre içi döngünün bir hareketi ile sonuçlanır. Alfa-1 alt birimi ve sarkoplazmik retikulumun ana kalsiyum salınım kanalı olan ryanodin reseptörü izoformu (RyR1), yakın fizyolojik ortaklardır. RyR1'in açılması kalsiyum iyonlarının miyoplazmaya akışını indükler (Protasi 2002). Daha sonra, kalsiyum iyonları, kasılma proteinleri aktin ve miyosinin, troponin C tarafından inhibisyonunu zayıflatarak kas kasılmasını aktive eder. Gevşeme, hızlı bir adenosin trifosfat (ATP) akışı ile sağlanır. (ATP)-kalsiyum iyonlarının tekrar sarkoplazmik retikuluma aktarılmasıyla tüketilir ve miyoplazmik konsantrasyon, mekanik eşikten düşük olduğunda tamamlanır.

Dantrolen bir ryanodin reseptörü antagonistidir. Ryanodin reseptörleri (RyR), endoplazmik ve sarkoplazmik retikulum yüzeyinde bulunur. Değişken doku ifadesine sahip üç izoformda bulunurlar. RyR1, öncelikle iskelet kası dokusunda bulunur. RyR2 birincil olarak kalp kası içinde ifade edilirken, RyR3 öncelikle beyin ve düz kasta ifade edilir(Inan ve Wei 2010). RyR ligand kapılı ve ligand modülasyonludur. İskelet kasında RyR1, dihidropiridin reseptörleri ile fiziksel etkileşim ile aktive edilir. Diğer dokularda, RyR1, RyR2 ve RyR3, sitoplazmik kalsiyum konsantrasyonlarındaki artışlarla aktive olur (F Dulhunty, G Casarotto ve ark. 2011). Dantrolen, RyR1 ve RyR3 reseptörlerini inhibe eder, ancak RyR2 reseptörlerini inhibe etmez (de Carvalho Correia, Silva ve ark. 2012). Dantrolen, RyR'in N-terminaline bağlanır ve onu kapalı bir durumda stabilize eder ve böylece sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum salınımını önler, bu da troponin C'nin aktive olmasını ve aktin ve miyosinin etkileşimi önler (Wang, Zhong ve ark. 2011). İskelet kasının gevşemesi vücut ısısının daha verimli bir

şekilde korunmasını sağlar. Dantrolenin aynı zamanda hücre içine kalsiyum girişini sağlayan kanalları inhibe ederek endoplazmik retikulumların yenilenmesini sağladığına dair kanıtlar da vardır (Zhao, Weisleder ve ark. 2006). Dantrolen, iskelet kası kasılma-gevşeme kaskadının pretübüler adımlarını etkilemez. Düz kas üzerinde zayıf kas gevşetici etkisi vardır ve yalnızca terapötik dozlardan daha yüksek kullanıldığında kardiyak kasılma baskısı yapar.

Belirli maddelerin M.H krizlerini tetiklediği bilinse de kesin patolojik mekanizmalar tam olarak anlaşılammıştır. Bununla birlikte, M.H'ye duyarlılık muhtemelen, sarkoplazmik retikulumdaki değiştirilmiş bir RYR1'in neden olduğu iskelet kası lifinde anormal kalsiyum metabolizması ile açıkça ilişkilidir. M.H'ye duyarlı gönüllülerde, RYR1 reseptörünün uzun bir süre açık durumda olduğu ve bu nedenle radyoligandlara daha yüksek bir afiniteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu, sarkoplazmik retikulumdan miyoplazmaya daha fazla kalsiyum akışıyla sonuçlanır, bunu takiben aktin ve miyozinin uzun süreli ve yoğun bir etkileşimi sağlanır. Hiperkapni, hipertermi ve asidozun klinik semptomları, kalsiyum bağımlı diğer sitoplazmik metabolik işlemlerin aktivasyonu ile şiddetlenir. İskelet kas hücresinin başlangıçta geliştirilmiş aerobik metabolizması korunamaz. Sonuçta ortaya çıkan aşırı anaerobik metabolizma, laktik asidozun nedenidir; mitokondri içinde kalsiyum birikimine neden olur ve bunun sonucu olarak da oksidatif fosforilasyonun dekonjugasyonu sitolizle sonuçlanır. (Şekil 3)



Şekil 3: Malign hipertermi ile ilişkili olarak iskelet kasının uyarılma gevşeme kaskadı

Dantrolen, sarkoplazmik retikulumda hücre içi depodan kalsiyum salınımını bloke eden, doğrudan etkili bir iskelet kası gevşeticidir. Kas kasılmasını azaltıcı etkisi nöromüsküler kavşak yerinden bağımsız şekilde oluşur. Araştırmalar, iskelet kası hücresinin RYR1 reseptörüne, doğrudan veya dolaylı bir dantrolen eylem yeri olarak odaklanmaktadır (Scalco, Voermans ve ark. 2016). Radyoaktif ligandlarla yapılan deneylerde, domuz iskelet kasındaki sarkoplazmik retikulum membran fraksiyonları ile yakından ilişkili dantrolen ve ryanodin bağlanma bölgeleri bulunmuştur (Palnitkar, Mickelson ve ark. 1997). Bu sonuçlar, dantrolenin hem ryanodin bağlanmasını hem de sarkoplazmik retikulum keseciklerinden doğrudan kalsiyum salınımını inhibe ettiğini doğrulamıştır. Ek olarak, dantrolen etkisinin moleküler hedefini tanımlamak için, dantrolenin bir foto-afinite analogu olan azidodantrolen kullanılmıştır. Sodyum-dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi ve trityum florografisi ile analiz edilen foto çapraz bağlama deneyleri, varsayılan iskelet kası dantrolen reseptörü olarak 160-kDa proteinini ortaya çıkarmıştır (Paul-Pletzer, Palnitkar ve ark. 2001). Bununla birlikte, aynı yazarlar bu 160-kDa proteinini, bunun gerçek dantrolen reseptörü olmadığını belirterek, RYR1'in N-terminal bölgesi olarak belirtmişlerdir. Diğer

hayvan çalışmaları, RYR1'in 590-609 amino asitlerinin dantrolen için bağlayıcı bölgeyi temsil ettiğini göstermektedir (Paul-Pletzer, Yamamoto ve ark. 2002).

Bununla birlikte saflaştırılmış RYR1'in yapay bir düzlemsel lipit çift katmanına dahil edildiği başka çalışma, bu sonuçlarla çelişmektedir. Saflaştırma işleminin amacı, diğer proteinlerin lipit çift katmanına müdahalesini önlemektir. Elli  $\mu\text{M}$  dantrolene maruz kalması, kanal aktivitesinde bir değişiklik göstermemiş olup bu, RYR1'in dantrolenin moleküler hedefi olmadığı sonucuna yol açmıştır (Szentesi, Collet ve ark. 2001). Bu çalışmanın geçerliliği ile ilgili metodolojik kaygılar arıtma sürecine odaklanmaktadır. Bir yandan, bağlayıcı bölge, saflaştırma işleminin bir sonucu olarak kaybolmuş veya tahrip olmuş olabilir. Öte yandan, bağlanma sahasının ilave saflaştırma sistemi sırasında çıkarılmış olabilecek RYR1'in ilave elemanlarını gerektirdiği, lipit çift katmanında yeterince etkileşime giremediği tahmin edilmektedir. Henüz bilinmeyen bağlayıcı dantrolen bölgesine ek olarak, RYR1 aracılı kalsiyum akışının önlenmesi mekanizması bile deneysel bir çalışma konusudur. Olasılıklar arasında inaktivasyonun voltaj, akım veya kalsiyum bağımlılığı bulunur. Ayrıca, tartışma dantrolen veya bunun bağlanma bölgesinin dihidropiridin reseptörü ile etkileşimi ve bağlanma bölgesinden veya RYR1'in değiştirilmiş kapısından bir retrograd etki üzerinde odaklanmaktadır. Başka bir seçenek, RYR1 etki alanları arası etkileşimin stabilizasyonudur.

Üç ayrı gen, bilinen üç izoform ryanodin reseptörünü kodlar. Gen ekspresyonu dokuya özgü görünmemekle birlikte ryanodin reseptörleri öncelikle iskelet kası (RYR1), kalp kası (RYR2) ve beyin dokusunda (RYR3) ifade ediliyor. M.H ve bir musküler distrofi türevi olan Central Core Hastalığı, RYR1'in çeşitli mutasyonları ile ilişkilidir (Tilgen, Zorzato ve ark. 2001). RYR2 gen mutasyonları, katekolaminerjik ve tanıdık polimorf ventriküler taşikardilerin yanı sıra aritmojenik sağ ventrikül displazisi tip 2'yi de kodlar. Nöroleptik malign sendromuna, RYR3'ün genetik değişiminin neden olabileceği de öne sürülmüştür (Gurrera 2002). Domuz M.H duyarlılığı, RYR1 geninin bir nokta mutasyonuna dayanır, bu da reseptör proteininin 615 pozisyonunda argininin sisteine değişmesine neden olur. Bununla birlikte, insanda M.H hastalığı genetik olarak heterojendir. Bugüne kadar 26 adet mutasyon tespiti yapılmıştır; aşırı N-terminal bölgesi için 9, merkez için 16 ve aşırı C-terminal bölgesi için 1 adet (Sambuughin, Nelson ve ark. 2001). Ayrıca, RYR1'in merkez bölgesindeki tek bir amino asit silinmesi de M.H duyarlılığı ile ilişkili olabilir.

İzoform ryanodin reseptörlerinin homojenliğine rağmen, özellikle RYR1 ve RYR2 arasında, kalp kasının sarkoplazmik retikulumundan kalsiyum akışı dantrolen tarafından inhibe edilmez. RYR1'in yakın zamanda tanımlanmış olan amino asit alanının 590-609 arasının dantrolenin moleküler hedefi olabileceği varsayılmıştır. Bununla birlikte, dantrolenin neden tam olarak aynı amino asit sekansına (601-619) sahip olmasına rağmen RYR2'ye daha az afiniteye sahip olduğu ve ayrıca neredeyse aynı sekansa (577-597) sahip olan RYR3 için daha az afinitesi olduğu sorusu hala cevaplanamamaktadır. RYR3, RYR2'den 596. pozisyondaki tek bir amino asit ikamesi (valin-lösin) ile değişir. RYR3'ün dantrolene in vivo duyarlılığı henüz açıklığa kavuşturulmamıştır. Bununla birlikte, in vitro deneyler, nöronun iç deposundan kalsiyum akışının inhibe edildiğini göstermiştir ve dantrolenin düz kas hücreleri ve immün hücreler üzerindeki diğer çeşitli etkileri tarif edilmiştir. Klinik açıdan, RYR3 ve dantrolen arasındaki etkileşimin bilgisi çok anlamlıdır.

## **2.5. DANTROLEN SODYUM YAN ETKİLERİ**

Dantrolenin olumsuz etkileri doza, veriliş yoluna ve tedavinin süresine bağlıdır. Dantrolenin en sık görülen yan etkileri merkezi sinir sistemi veya gastrointestinal kökenlidir. Dantrolen genellikle tedavi başlangıcında geçici uyku hali, baş dönmesi, halsizlik, genel keyifsizlik, bitkinlik ve ishale neden olur (Brandom, Larach ve ark. 2011). Bu etkiler genellikle tedavinin kesilmesini gerektirmez ve dikkatli bir dozaj titrasyonu ile sıklıkla en aza indirilebilir veya önlenir. Genel olarak, bazı çalışmalarda görülme sıklığı çok daha yüksek olmasına rağmen, dantrolen tedavisi hastaların yaklaşık %2,5'inde yan etkiler nedeniyle geri çekilmek zorunda kalmıştır. Geriye dönük bir analizde M.H krizinden muzdarip 164 hasta dantrolen ile tedavi edilmiş olup bu hastalarda en sık gözlenen yan etkiler %22'de kas güçsüzlüğü, %10'unda flebit, %3 solunum yetmezliği ve %3'ünde gastrointestinal rahatsızlıktı (Brandom ve Larach 2002). Kısa süreli intravenöz tedavi ile ilişkili daha ciddi yan etkiler anafilaksi, solunum yetmezliği, ARDS ve hiperkalemidir. Bununla birlikte, M.H krizleri, dantrolen tedavisi ve yoğun bakım yönetimi sonrası hastalarda solunum fonksiyon çalışmaları yapılmamıştır. Dantrolen ile ilişkili kas gevşemesi, özellikle nöromusküler hastalığı olan hastalarda uzun süreli solunum yetmezliğine neden olabilir. Doz bağımlı solunum yetmezliği, altta yatan solunum hastalığı olmayan



hastalarda bile ortaya çıkabilir (Javed ve Bogdanov 2010). En sık görülen ikinci yan etki olan infüzyon bölgesindeki lokal inflamatuvar flebit, yüksek alkali çözeltiden kaynaklanır. Kazara ekstrasvasküler infüzyon ciddi doku nekrozuna neden olur. Şiddetli akneiform döküntü de yapma ihtimali vardır (Mowbray, Sinclair ve ark. 2009). Bu nedenle, dantrolenin büyük periferik damarlara veya merkezi venlere verilmesi tavsiye edilir.

Uyuşukluk ve baş dönmesi, sırasıyla hastaların yaklaşık %30'unda ve %14'ünde meydana gelmiştir. Diğer daha az sık görülen santral sinir sistemi etkileri baş ağrısı, sersemlik, sarhoşluk hissi, sinirlilik ve dizartridir. Daha nadir olarak, dantrolen alan bazı hastalarda geri dönüşlü halüsinasyonlar bildirilmiştir (Andrews, Muzumdar ve ark. 1975).

Bulantı ve kusma dantrolen alan hastaların yaklaşık %9'unda meydana gelmiştir ancak, ilacı geri çekmeyi gerektirecek kadar şiddetli olmamıştır. Anoreksi, disfaji, siyalore, gastrik irritasyon ve karın krampları daha az görülmüştür. Üriner retansiyon ve faringeal spastisite de bildirilmiştir (Locatelli, Pozzi ve ark. 2014). İshal, hastaların yaklaşık %2,5'inde meydana gelmiştir, ancak sebat etmesi sıklıkla spesifik bir tedaviyi veya dozdaki bir azalmayı veya dantrolen tedavisinin geçici olarak kesilmesini gerektirmiştir. Buna karşılık, abdominal distansiyon ile geçici kabızlık ve bağırsak tıkanıklığı belirtileri de 75 hastanın 3'ünde (%4) görülmüştür.

Genellikle birlikte ortaya çıkan halsizlik, bitkinlik ve güçsüzlük insidansı yaklaşık olarak uyuşukluk kadar yüksektir. Uyuşukluk yan etkisi dirençli olabilir, bu yüzden ara sıra dantrolen dozunda azalma veya ilacın geri çekilmesi gerekli olabilir. Bu yan etki multipl sklerozlu hastalarda, muhtemelen önceden var olan zayıflık derecesine bağlı olarak daha yaygın olabilir. Siyalore ve disfajinin, amyotrofik lateral sklerozu olan 8 hastanın 5'inde ortaya çıktığı tespit edildi ve bu hastalarda dantrolen dozu günde 75 mg'a ulaştığında 4 hastada şiddetli kas güçsüzlüğü izlenmiştir. Borderline solunum fonksiyonu olan 1 hastada, ventilasyon yardımcı solunum ve nihai trakeostomi gerektiren solunum depresyonu gelişmiştir.

Dantrolene karşı diğer advers reaksiyonlar arasında deri döküntüsü, akne benzeri dermatoz, enürezis ve görsel bozukluklar vardır. Uzun süreli dantrolen tedavisi alan serebral palsili 9 çocuktan 4'ünde nöbet geçirmesine dair rapor vardır. Ancak bu

hastalarda kullanılan dozlar oldukça yüksektir (4-12 mg/kg/gün) ve nöbetler genellikle bunun altındaki seviyelerde görülmez.

Dantrolen karaciğerde, aminodantrolene indirgenir ve ardından asetilasyon yoluyla asetilaminodantrolene metabolize edilir. Metabolizma sırasında hidroksilamin oluşumu karaciğer hasarı ile ilişkilendirilir. İnsanlarda dantrolen metabolizmasından sorumlu olarak aldehit oksidaz 1 (AOX1) ve rekombinant N-asetil transferaz 2 (NAT2) yüksek oranda tespit edilmiştir. Bir glutatyon tuzağı tutma deneyi, AOX1'e bağlı bir dantrolen azalması yoluyla hidroksilamin oluşumunu ortaya çıkarmıştır. Sonuç olarak, AOX1 ve NAT2'nin insanlarda dantrolen metabolizmasından sorumlu olduğunu ve AOX1'e bağımlı metabolizmanın dantrolen kaynaklı karaciğer hasarına yol açtığı düşünülmektedir (Amano, Fukami ve ark. 2018). Dantrolen kullanımıyla ilişkili karaciğer hastalığına bağlı 6 ölüm vakası FDA'ya bildirilmiştir. Bu, ilacı 60 gün veya daha uzun süre alan hastalarda ölümcül hepatit riski yaklaşık %0,1 ila 0,2 oranındadır. Dantrolen ile ciddi hepatotoksisite bildirilen az sayıda yayın vardır. Farelerde yapılan in vivo deneyler, hepatositlere karşı herhangi bir toksisite ortaya koymamıştır (Yamagishi, Komoda ve ark. 1993). Kronik dantrolen tedavisi ile ilişkili en ciddi iki yan etki hepatotoksisite ve eozinofilik pulmoner efüzyondur. Bu iki etkinin hiçbiri kısa süreli tedavi ile bildirilmemiştir. Dantrolene bağlı hepatotoksisite 1-6 ay uzun süreli ve genellikle 200-300 mg/gün dozundaki oral tedavinin ardından ortaya çıkma eğilimindedir. İntravenöz uygulamadan sonra tek bir hepatotoksisite vakası bildirilmiş olup, bu karaciğer transplantasyonu ile iyileşen bir hastadır (Fernandes, Azevedo ve ark. 2007). Ölümler, 35 yaşından büyük, primer multipl skleroz tanısı alan kadınlar ve 6-10 aydan daha uzun süre dantrolen alan hastalarda kümelenmiştir. Bu gözlemler, ABD Gıda ve İlaç İdaresi'ne neredeyse tamamen gönüllü raporlardan oluşan iki örtüşen vaka serisine dayanmaktadır. Dantrolen ilişkili hepatotoksisite riskini, kronik dantrolen kullanıcı popülasyonunun büyüklüğünü ve özelliklerini bilmeden ve dantrolen popülasyonunu benzer bir kontrol popülasyonu ile kıyaslamadan karakterize etmek mümkün değildir.

Dantrolen ile ilişkili hepatotoksisite insidansının en iyi tahmini, en az 60 gün boyunca dantrolen alan 1044 hastayı içeren premarketing klinik çalışmalardan alınan emniyet verilerinin incelenmesinden elde edilmiştir. Bu grupta uzun süre dantrolen alan hastaların %1,8'inde anormal karaciğer fonksiyon testleri gelişmiştir, %0,6'sında

hepatotoksisite klinik bulguları görülmüş ve %0,3'ü doğrudan hepatotoksisite sonucu ölmüştür. Bu denemelerde düzenli olarak yüksek dozlar kullanılmıştır, bu nedenle gerçek hepatotoksisite insidansının mevcut dozla daha düşük olması mümkündür. Günde 400 mg alan 243 hastanın ardından, bir hastada hepatotoksisite gelişti. Bu hastada kronik hepatit B olup günde 400 mg dantrolen aldığı belirtilmiştir (Kim, Chun ve ark. 2011).

Klinik bulgular, uzun süreli dantrolen tedavisi sırasında hepatotoksisitenin hassas göstergeleri değildir. Dantrolen kaynaklı hepatotoksisiteden şüphelenilen ve karaciğer biyopsisi yapılan dört hastadan, ikisinde klinik semptom bulunmamış, ancak biyopsi örneğinde hepatik nekroz tespit edilmiştir (Wilkinson, Portmann ve ark. 1979). Dantrolen karaciğer hasarı yarattığında, serum transaminaz enzimleri hafifçe yükselir (100-600 IU). Total serum bilirubinde ölüm 15-19 mg/dL (257-325 umol/L) arasında daha sık görülür. Karaciğer biyopsi örnekleri genellikle kronik aktif hepatit, submassif nekroz, masif nekroz veya köprüleşme nekrozu ile tutarlı değişiklikler göstermektedir. Dantrolen ile indüklenen hepatotoksisite tedavisi ilacın kesilmesidir. Çoğu durumda, serum transaminazları ve bilirubin 1-12 ay içinde normale döner. Ancak dantrolen tedavisine devam edilmesi gerekiyorsa, hasta hastaneye yatırılmalı ve ilaç kademeli artışlarla çok küçük dozlarda başlatılmalıdır (Riazi, Kraeva ve ark. 2018).

Uzun süreli dantrolen tedavisinin nadir, ancak ciddi bir yan etkisi eozinofilik plevral efüzyondur. Bugüne kadar on beş vaka yayınlanmıştır (Lê-Quang, Calmels ve ark. 2004). İki vakada, hastalarda ilaca bağlı perikardit belirlenmiştir. Başlangıcı 2 ay ile 15 yıl arasında değişmektedir. Hastalarda genellikle öksürük, nefes darlığı, hafif ateş (38-38.5 C) ve orta derecede periferik ve plevral eozinofili görülür. Akciğer grafisinde unilateral veya bilateral plevral efüzyon tespit edilmiştir. Her durumda, hastalar ilacın kesilmesinden sonra iyileşmiştir. Dozda, cinsiyette veya yaşta fark edilebilir bir düzen yoktur. Bu olumsuz etkinin kesin patofizyolojisi bilinmemektedir.

Bununla birlikte, kronik uygulamaların tümünde rutin karaciğer fonksiyon testleri yapılmalıdır. Dantrolen kullanan hastaların yaklaşık %10'unda küçük karaciğer fonksiyon anormalliklerine, özellikle aspartat aminotransferaz (SGOT) geçici yükselmelerine neden olduğu bilinmektedir. Hepatit riski kadınlarda, 35 yaşın üzerindeki hastalarda ve 60 günden daha uzun süren ilaç kullanımlarında daha yüksek

oranda görünmektedir. 45 günlük dantrolen tedavisinden sonra hiçbir fayda gözlenmezse ilaç kesilmelidir.

Dantrolen'in insanlarda uzun vadeli etkinliği ve güvenliği henüz belirlenmemiştir. Uzun süreli kullanımının yarar riski göz önünde bulundurulması özellikle önemlidir. Dantrolen, serebral palsili çocuklarda nöbetleri artırabilir veya şiddetlendirebilir. Dantrolen, solunum fonksiyon bozukluğu olan hastalarda, özellikle obstrüktif akciğer hastalığı olanlarda ve miyokard hastalığına bağlı kalp fonksiyon bozukluğu olan hastalarda dikkatli kullanılmalıdır. Diğer, daha az sık görülen yan etkiler kabızlık, gastrointestinal kanama, anoreksi, yutma zorluğu, mide tahrişi, karın krampları, konuşma bozuklukları, nöbet, baş ağrısı, sersemlik, görme bozukluğu, diplopi, tat değişikliği, uykusuzluk, taşikardi, artan kan basıncıdır. Zihinsel depresyon, konfüzyon, artan sinirlilik, kristallüri, hematüri, zor ereksiyon, idrar zorluğu, boğulma hissi, anormal kıllanma, akne benzeri döküntü, kaşıntı, ürtiker, terleme, üşüme, ateş de çok seyrek olarak görülebilir.

Dantrolen alırken hastalar bir motorlu taşıt kullanmaya veya tehlikeli mesleklere karşı uyarılmalıdır. Dantrolen muhtemelen güneş ışığına maruz kalması konusunda uyarılması gereken hastalarda bir ışığa duyarlılık reaksiyonu uyandırabilir. ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) dantrolen'in gebelik kategorisini C olarak belirlemiştir, bu da hayvan çalışmalarında bildirilen teratojenik etkiler olduğu anlamına gelmektedir. Gebelikte dantrolen kullanımının güvenliği henüz belirlenmemiştir. Teratojeniteye atfedilemeyen küçük iskelet anomalileri, farelerin yavrularında ve oral 60 mg/kg dantrolen verilen farelerde gözlenmiştir. Tedavi edici dozlar verilen koyunlarda veya yavrularında herhangi bir olumsuz etki gözlenmemiştir (Craft, Goldberg ve ark. 1988). Gebelik sırasında dantrolenin fetusa belirgin bir zarar vermeden kullanıldığına dair çeşitli vaka raporları vardır (Russell, Lang ve ark. 2001). Hamile kadınları içeren iki küçük vaka serisinde dantrolenin plasentayı geçtiği ancak annelere veya yenidoğanlara belirgin bir zarar vermediği gözlenmiştir. Yenidoğan dantrolen serum konsantrasyonları annelere göre %40-70 idi. Dantrolen ayrıca acil sezaryen sonrası malign hipertermi tedavisi gören bir annenin anne sütünde de tespit edilmiştir (Fricker, Hoerauf ve ark. 1998). En yüksek anne sütü konsantrasyonu doğumdan 36 saat sonra 1.2 µg/mL (3.8 µmol/L) idi. Anne sütünden geçen dantrolenin yarı ömrü 9 saattir.

Sezaryen sırasında anneye dantrolen verilmesi halinde yenidoğan “floppy bebek sendromu” riski altındadır (Krause, 2004).

## **2.6. DANTROLEN SODYUM İLAÇ ETKİLEŞİMLERİ**

Dantrolen karaciğerde metabolize edildiğinden enzim indükleyen ilaçların metabolizmasını değiştirmesi mümkündür. Diazepam veya fenobarbital ile önceden veya eşzamanlı tedavinin, dantrolen ve metabolitlerinin kan veya idrar seviyelerini değiştirdiğine dair hiçbir kanıt yoktur. Birlikte kullanılan dantrolen ve diazepam, bazı hastalarda spastisitenin tek başına herhangi bir ilaca göre daha iyi kontrol edilmesini sağlamıştır ve her iki ilacın dozunda da azalma sağlamıştır (Glass ve Hannah 1974). Bununla birlikte, bu kombinasyon ilave bir yatıştırıcı etkiye yol açabilir bu sebeple her iki maddenin dozajı uygun şekilde azaltılmalıdır. İn vitro çalışmalar, warfarin veya klofibrat varlığında dantrolenin insan serum albüminine bağlanmada azalma ve tolbutamid varlığında artma göstermiştir ama bu bulguların klinik önemi belirsizdir (Vallner, Perrin ve ark. 1976).

Kalsiyum kanal antagonistleri alan hastalarda dantrolenden kaçınılmalıdır. Anestezi uygulanmış domuzlarda, verapamil ve dantrolenin terapötik intravenöz dozları birlikte verilmiş, hızlı başlangıçlı üçüncü derece atriyoventriküler blok, hiperkalemi ve kardiyovasküler kollaps gelişmiştir (Saltzman, Kates ve ark. 1984). Benzer sonuçlar köpeklerde de görülmüştür. Dantrolen ve verapamilin birlikte uygulanmasından sonra hiperkalemi ve miyokard depresyonu ile ilgili tek bir insan vakası bildirilmiştir. Koroner arter hastalığı nedeniyle verapamil tedavisi alan 60 yaşındaki erkek hastaya ameliyattan 30 dakika önce dantrolen verilmiş olup, infüzyon bittikten 2,5 saat sonra (ameliyat tamamlandıktan 45 dakika sonra), kalp indeksinin 2.1'den 1.9 L/dak/m<sup>2</sup>'ye düştüğü ve serum potasyum seviyesinin 7.1 mmol/L'ye yükseldiği görülmüştür. Altı ay sonra, aynı hasta başka bir cerrahi işlemden önce dantrolen almış olup, ameliyattan 2 hafta önce nifedipine geçilmiş ve bu kez hiperkalemi ya da miyokard depresyonu gelişmemiştir (Rubin ve Zablocki 1987). Bu olumsuz etkiden sorumlu mekanizma tam olarak bilinmemektedir. Miyokard depresyonunun, yavaş kalsiyum kanalı blokajı ve miyokard içindeki bastırılmış kalsiyum salınımı kombinasyonundan kaynaklanması mümkündür. Etkileşim sadece verapamil ile görünse de uyarı tüm kalsiyum kanalı antagonistleri için yapılmıştır.

Dantrolen, vekuronyum kaynaklı kas bloğunu kuvvetlendirebilir. Bu etki kolinerjik terminal kalsiyum depolama bölgelerinden zayıflatılmış kalsiyum salınımı sonucunda nöromüsküler kavşakta transmitter salınmasının azalmasından kaynaklanabilir (Hunter 1987). Dantrolen karbamazepin ve metotreksatın serum konsantrasyonlarını da artırabilir. 16 yaşında bir kız çocuğu osteosarkom tedavisi için metotreksat (12 g/m<sup>2</sup>) almadan önce oral dantrolen almış ve plazma metotreksat konsantrasyonu dozdan 24 saat sonra yükselmiş (418 µmol/L) ve ardından metotreksat toksisitesinin klinik ve biyolojik belirtileri geliştiği tespit edilmiştir. Dantrolen kesildikten sonra hasta düşük doz metotreksat ile başarılı bir şekilde tedavi edilmiştir. Dantrolenin metotreksatın serum bağlanmasını ve böbrek eliminasyonunu azalttığı düşünülmüştür (André, Boyer ve ark. 2006). Ek olarak, karbamazepin alan 37 yaşında bir kadın dantrolen ve oksibutinin alırken zehirlenme belirtileri göstermiş ve yüksek serum karbamazepin konsantrasyonları ölçülmüştür. Oksibutinin, dantrolen ve karbamazepin kombinasyonundaki ilaçların metabolizması üzerine belirgin bir azalmayı tetikleyip tetiklemediği açık değildir (Vander, Odi ve ark. 2005).

Dantrolen, nöromüsküler transmisyon veya dinlenme veya aksiyon potansiyelleri gibi elektriksel özelliklere müdahale etmeden uyarma-kasılma kaskadına baskı yapar. Bununla birlikte dantrolen, iskelet kası kasılma kuvvetini azalttığı için, nöromüsküler aktarımı engelleyen ilaçlarla sinerjistik etkileri olması beklenir.

## **2.7. DANTROLEN SODYUM ENDİKASYONLARI**

Enjekte edilebilir dantrolen sodyum, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından 1982 senesinde malign hipertermi krizinin tedavisi için onaylanmıştır. Enjekte edilebilir ürün, ekstazi intoksikasyonunu, nöroleptik malign sendromu, tetanozu ve sıcak çarpmasını tedavi etmek için etiket dışı kullanılmıştır. Oral dantrolen sodyum, FDA tarafından kronik spastisitenin tedavisi ve malign hipertermi tedavisi için onaylanmıştır. FDA onayı, kanıtları ve diğer kullanımları destekleyen kanıtların gücünü göstermektedir. İntravenöz dantrolenin faydalı etkisi, malign hipertermi için kronik spastisite tedavisinden daha belirgindir. Malign hipertermi için, dantrolen kullanımıyla 1960'larda %64 olan ölüm oranı %9,5'e düşmüştür. Dantrolene'in kronik spastisite tedavisinde kullanımı 1970 ve 1980'lerde yapılan çift kör plasebo kontrollü klinik denemelere dayanmaktadır. Bu denemeler genellikle onaylanmamış sonuç

ölçütlerine, net olmayan teşhis kriterlerine, iyi tanımlanmamış randomizasyon yöntemlerine sahipti. Ayrıca, bu denemeler kısa süreli idi (<6 hafta). Spastisitede azalma, dantrolenin kullanımını küçük toleranslı hasta grubuyla sınırlandıran, sıklıkla belirgin kas güçsüzlüğü ile ilişkiliydi.

İki onaylı endikasyonu haricinde dantrolenin tetanoz hastalarında pozitif basınçlı ventilatör ihtiyacını azalttığına dair çalışmalar vardır (Checketts ve White 1993). Nöroleptik malign sendrom (TSUTSUMI, YAMAMOTO ve ark. 1998), ölümcül katatoni (Pennati, Sacchetti ve ark. 1991), melanom hastalarında interlökin 2 tarafından indüklenen titremenin tedavisi (Azari, Sheehan ve ark. 2012) gibi kas spazmı ile ilişkili diğer tıbbi durumların tedavisinde denenmiştir. Kara dul örümceği (*Latrodectus hesperus*) envenomasyonu (Ryan 1983), 3,4 metilendioksimethamphetamin (MDMA, “Ecstasy”) zehirlenmesi (Grunau, Wiens ve ark. 2010), fenelzin zehirlenmesi (Kaplan, Feinglass ve ark. 1986), teofilin zehirlenmesi (Parr ve Willatts 1991), karbonmonoksit zehirlenmesi (Ten Holter ve Schellens 1988), organofosfat zehirlenmesi ile ilişkili kas sertliğinin tedavisi (Ochi, Watanabe ve ark. 1995, Büyükokuroğlu, Cemek ve ark. 2008), doksorubisin tarafından indüklenen hematotoksisite (Buyukokuroglu, Taysi ve ark. 2007), adriamisin yaptığı kardiyotoksisitenin engellenmesi (Büyükokuroğlu, Taysi ve ark. 2004), gibi çok sayıda toksikasyon tedavisinde denenmiştir. Aynı zamanda dış üretral sfinkter spazmı ile ilişkili nörojenik mesane tıkanıklığı için bir tedavi olarak ve serebral vazokonstriksiyon için potansiyel bir tedavi olarak da kullanılmıştır (Muehlschlegel, Rordorf ve ark. 2009) (Majidi, Grigoryan ve ark. 2012).

1990'ların başından beri, sinir hasarının yüksek hücre içi kalsiyumun aracılık edebileceğine dair kanıtlar artmaktadır. Dantrolen, endoplazmik ve sarkoplazmik retikulumda depolanan kalsiyum salınımını önler. Son çalışmalar, Alzheimer hastalığı (Popugaeva ve Bezprozvanny 2013) (Liang ve Wei 2015) ve subaraknoid kanamaya ikincil nörotoksisite tedavisi için dantrolenin olası bir nöroprotektif ajan olarak kullanılmasına odaklanmıştır (Gwak, Park ve ark. 2008) (Muehlschlegel, Carandang ve ark. 2015).

### 2.7.1. Malign Hipertermi

Malign hipertermi, güçlü inhalasyon ajanlarına (halotan, izofluran, sevofluran, desfluran gibi), depolarize edici kas gevşetici suksinilkoline ve nadiren insanlarda şiddetli egzersiz gibi strese sokuculara karşı verilen hipermetabolik bir cevap olarak ortaya çıkan farmakogenetik bir hastalıktır. M.H neden olan mutasyonlarla kesin olarak ilişkilendirilen iki gen, RYR1 ve CACNA1S'dir.

M.H'ye duyarlı olan hastaların hemen hepsinde anestezi olmadan fenotipik değişiklikler olmadığından, duyarlılığı "tetikleyici" anesteziye maruz kalmadan veya spesifik tanı testleriyle teşhis etmek imkansızdır. Temel klinik özellikler arasında, artmış dakika ventilasyonu, kas sertliği ve rabdomiyoliz, hipertermi, taşikardi, asidoz ve hiperkalemi yer almaktadır. Anestezi sırasında M.H ataklarının görülme sıklığı 1:10000 ila 1:250000 anestezi arasında. Bir M.H krizi oluşması için M.H olayını tetiklediği bilinen ajanlarla anesteziye maruz kalması gerekse de ortalama olarak, hastalar tetiklenmeden önce üç anesteziye maruz kalırlar. Reaksiyonlar erkeklerde kadınlardan daha sık gelişir (2:1) (Riazi, Larach ve ark. 2014). En yüksek insidans, gençlerde olup, ortalama yaş 18,3'tür. 15 yaşın altındaki çocukların tüm reaksiyonların %52,1'ini oluşturduğu görülmüştür. Yenidoğanda tarif edilmesine rağmen, test ile onaylanan en erken tepki altı aylıktır.

M.H'ye duyarlılık ile ilişkili genetik anormalliklerin tahmini prevalansı 3000 kişide bir kadar büyük olabilir (Aralık 1:3000 ila 1:8500) ve daha yeni bir tahmin 400'de 1'dir (Gonsalves, Ng ve ark. 2013).

M.H anestezi sırasında ve postoperatif erken dönemde herhangi bir zamanda oluşabilir, ancak uçucu ajanların kesilmesinden bir saatten sonra artık ortaya çıkmaz. En erken bulgular taşikardi ve kas sertliğidir. Vücut ısısının yükseltilmesi, dramatik bir M.H belirtisi olabilir. Genel anestezi alan ve 60 dakikadan uzun süren tüm anestezi hastalarında vücut sıcaklığının monitörize edilmesi gerektiği görüşünü bildirilmektedir (Sessler 2008). Hipertermi, her beş dakikada bir 1-2°C'de sıcaklığında bir artışla işaretlenebilir. Şiddetli hipertermi (44°C'den yüksek vücut sıcaklığı) oluşabilir ve oksijen tüketimi, CO<sub>2</sub> üretimi, yaygın hayati organ fonksiyon bozukluğu ve yayılmış intravasküler pıhtılaşma (DIC) 'de belirgin bir artışa neden olabilir.



Azot oksit dışındaki tüm inhalasyon anesteziikleri M.H için tetikleyicidir. Kas gevşetici süksinilkolin de M.H için bir tetikleyicidir. Süksinilkolin ile indüklenen masseter kas sertliği, halotan tarafından indüklenen ve süksinilkolin verilen 100 anesteziide 1 çocukta görülür. Bir diğer potansiyel risk faktörü, yoğun bakım ünitesinde postoperatif bir dizi farklı koşullar için inhalasyon sedasyon cihazlarının kullanılmasıdır (Bomberg, Glas ve ark. 2014).

M.H, hipermetabolik bir duruma yol açan farmakogenetik bir hastalık olarak kabul edilir (Hopkins 2011). Deneysel kanıtlar, M.H belirtilerinin ve semptomlarının, iskelet kası sarkoplazmik retikulumundan (SR) kontrolsüz bir hücre içi  $Ca^{+2}$  salınımı ile ilişkili olduğunu açıkça göstermektedir (Jiang, Chen ve ark. 2008). M.H'ye duyarlı domuzlarda ve farelerde, çeşitli çevresel koşullar, çevresel ısı, egzersiz ve stres gibi faktörler SR'dan hızlandırılmış kalsiyum salınımı tetikleyebilir. Salınan kalsiyumun SR/ER  $Ca^{+2}$ -ATPase (SERCA) tarafından normal sekestrasyonu yetersizdir ve enerji, hücre içi  $Ca^{+2}$ 'un düşürülmesi amacıyla boşuna bir şekilde harcanır. Muhtemelen, ATP'nin azalan seviyeleri, zarın bütünlüğünün bozulmasına ve potasyum salınımına yol açmaktadır, ancak işlemdeki kesin adımlar kesin olarak gösterilmemiştir.

SR membranında bulunan kusurlu veya bozuk kalsiyum kanalı, M.H duyarlılığına neden olur. Bu kanal ryanodin reseptörü (RYR1) olarak adlandırılır. M.H'ye duyarlı ailelerin %70 kadarı, M.H için 34 nedensel mutasyondan birini barındırmaktadır, ancak daha birçok varyant karakterize edilmiştir. Kanal, voltaj değişiminin RyR1 reseptörüne transferine aracılık eden sarkolemmanın T-tübül bölgesinde yer alan dihidropiridin reseptörü (DHPR)  $Ca^{+2}$  kanalı gibi birçok başka protein ile yakından ilişkilidir. RyR1 fonksiyonunda potansiyel veya bilinen rollere sahip olan diğer proteinler, integral SR membran proteinleri (örneğin, SRP-27, junctate, geçici reseptör potansiyel katyon kanalı (TRPC) ailesi), plazma zarı ile ilişkili proteinlerdir (örneğin, CIC-1 klorür kanalları)(Golini, Chouabe ve ark. 2011). RyR1'in fonksiyonunu modüle eden proteinler arasında FK508 bağlayıcı protein FKBP12,  $Ca^{+2}$  bağlayıcı protein kalmodulin, histidin bakımından zengin  $Ca^{+2}$  protein, HRC ve lümenal  $Ca^{+2}$  tamponlu kalsifestrin bulunur. HRC hem triadin hem de SERCA ile etkileşime girdiği bilinen bir lümen proteinidir ve SR  $Ca^{+2}$  alımı ve salınımı arasında çapraz etkileşime aracılık etmede rol oynadığı öne sürülmüştür (Pritchard ve Kranias 2009). Ryanodin reseptörü fonksiyonu ayrıca diğer post-translasyonel modifikasyonlar ile

değiştirilebilir. Oksidasyon, fosforilasyon ve RyR1'in nitrosilasyonunun her birinin SR'den Ca<sup>+2</sup> salımını modüle ettiği gösterilmiştir (Andersson, Betzenhauser ve ark. 2012).

Dantrolen, M.H'yi spesifik olarak tedavi ettiği bilinen tek ilaçtır. Dantrolen'in DHPR'yi RyR1'e bağlı bir şekilde inhibe ettiği , RyR1 proteini üzerindeki belirli bir bölgeye bağlandığı ve sağlam kas hücrelerinde RyR1 kanal aktivitesini azalttığı bulunmuştur (Bannister 2013). Bununla birlikte, 10 mg/kg'dan daha fazla dantrolen uygulanırsa, M.H tanısı gözden geçirilmelidir. M.H benzeri semptomların diğer olası nedenleri sepsis, kafa içi kanama, zatüre, baklofen yoksunluğudur.

### **2.7.2. Spastisite**

Spastisite, bir üst motor nöron lezyonundan kaynaklanan, kasların aralıklı veya sürekli istemsiz aktivasyonları olarak ortaya çıkan düzensiz sensorimotor kontrol bozukluğu olarak tanımlanmıştır (Pandyan, Gregoric ve ark. 2005). Çok çeşitli merkezi nörolojik bozuklukları olan her yaştaki hastalarda görülebilen ve iyi bilinen bir fenomendir. Spastisite, tek bir travmatik olay veya kronik nörolojik koşullardan kaynaklanabilir. Bazı üst motor nöron patolojisi örnekleri arasında spinal kord yaralanması (SCI), serebral palsi, felç, amiyotrofik lateral skleroz (ALS) ve multipl skleroz (MS) bulunur. Spastisite, dünya çapında yaklaşık 12 milyon kişiyi etkilemektedir. Spastisite MS bozukluğu olan hastaların %90'ında görülen, en sık bildirilen semptomdur (Ashton 2011). Spastisitede görülen değişiklikler genellikle artan kas tonusu, spazm ve/veya klonus olarak ortaya çıkar. Spastisite herhangi bir zamanda çeşitli uyaranlarla tetiklenebilir. Kabızlık, idrar yolu enfeksiyonları ve basınç ülserleri gibi dış faktörler spastisiteyi ve semptomlarını şiddetlendirebilir (Kheder ve Nair 2012). Spastisite, azalmış eklem hareketliliği, azalmış kas esnekliği ve solunum yolu tıkanıklığına bağlı uyku bozuklukları dahil olmak üzere fonksiyonel olarak sınırlayıcı ve ağrılı sekellere sahip olabilir. Spastisitenin yeri, merkezi sinir sistemindeki (CNS) lezyona bağlıdır. Sık sık bel ve bacaklarda görülür, ancak üst vücutta spastisite veya ağrı da yaygındır. Tedavi edilmezse, spastisite düzeltilmesi zor olabilen kifoskolyoz ve kontraktürler gibi deformasyonlara yol açabilir. Deformiteler günlük aktivitelerde, önemli zorluklara neden olabilir. Spastisite çok zayıflatıcı olsa da ilaç tedavilerine cevap verebilir. Spastisite tedavisinde amaç, hastaların yan etkileri minimum şekilde, en az miktarda rahatsızlık ve kısıtlama ile yaşamalarını sağlamak için bu semptomları hafifletmektir.

Spastisiteyi kontrol etmek için çeşitli tedaviler vardır. Fiziksel terapiler, mesleki tedaviler ve tamamlayıcı ve alternatif tıp dahil olmak üzere tedavi yöntemleri ve portföyü genişler. Her tedavinin, spastisiteyi tedavi etmede etkili olduğu kanıtlanmış olsa da tedavilerin kendileri de kendi olumsuz etkileriyle gelir. Genel olarak, oral ajanlar kısa vadede daha ucuzdur ve kullanımı daha kolaydır, ancak sağlayabilecekleri potansiyel faydalardan daha ağır basabilecek istenmeyen sistemik etkilere sahiptirler. Aynı zamanda, bu sistemik ilaçlar jeneralize spastisiteli hastalar için daha iyi bir seçenek olabilir (Stevenson ve Playford 2012). Diğer yandan, girişimsel tedaviler prosedürel problemleri, prosedürü gerçekleştirmek için eğitilmiş bir sağlayıcı bulmada zorluk ve diğer komplikasyonları ortaya çıkarmaktadır. Her tedavinin olası riskleri ve yararları nedeniyle, hangi tedavi seçeneğinin en iyi olduğunu belirlemek için hastanın tıbbi geçmişini değerlendirmek önemlidir.

Dantrolenin multipl skleroz ile ilişkili spastisitede etkinliğine dair kanıt, diğer spastisite tiplerinde olduğu gibi ikna edici değildir, ancak vakaların seçilmesi ve ciddiyeti, sonuçların değişkenliğini açıklayabilir. Genel olarak, multipl skleroz hastalarının yaklaşık %30'unda ilacın faydalı olabileceği, ancak bazı denemelerin daha yüksek veya daha düşük derecede fayda sağladığı bildirilmiştir. Multipl sklerozu olan ve orta ila şiddetli spastisitesi olan 20 hastaya 5 hafta boyunca günde 4 kez 50 ila 200 mg dantrolen veya plasebo verilmiştir. Altı hasta dantrolen'den önemli ölçüde fayda sağlamış ve hem hasta hem de doktor değerlendirmesi aktif ilacı plaseboya göre tercih etmiştir (Gelenberg ve Poskanzer 1973). Dantrolenden yararlanan hastalar, spastisite ve ağrılı kramplardan kurtulma, sertlik ve klonusta azalma olduğunu bildirdi. Çalışmalar dantrolenin serebral palsili çocuklarda spastisiteyi azaltabildiğini göstermiştir. Bununla birlikte, periferik etki tarzına rağmen, güçsüzlüğe ve sedasyona neden olabilir. Çocuklarda dantrolen sodyum dozları 12 mg/kg/gün'e kadardır. Tedavi genellikle düşük bir dozda başlatılır ve tolere edildiği şekilde her 5 ila 7 günde bir yukarı titre edilir (Chung, Chen ve ark. 2011). Yapılan iki küçük çaplı çalışmada, 20 hastalık bir grup ve ona paralel 23 hastalık diğer gruba, 59 gün boyunca dantrolen ile plasebo karşılaştırması yapılmış, dantrolen günde dört kez 25 mg'dan başlayıp maksimum 100 mg'a titre edilmiştir. Çapraz deneme sonucunda hastaların %35'i plaseboya karşı dantroleni seçmiş, %20'si plaseboyu tercih etmiş ve %45'i tercih yapmamıştır. Daha sonraki bir çalışma, 2 haftalık bir süre boyunca sabit bir artan dozaj

programını kullanarak dantroleni diazepam ile karşılaştırmış, ardından 2 hafta daha maksimum doz izlenip hem dantrolen hem de diazepam düşük ve yüksek dozlarda spastisiteyi ve refleksleri azaltmış, ancak bu azalma dantrolen ile daha yüksek dozlarda önemli ölçüde daha belirgin bulunmuştur. Yapılan istatistiki değerlendirmede ise ilaçlar arasında anlamlı fark bulunmamıştır (Otero-Romero, Sastre-Garriga ve ark. 2016).

## **2.8. DANTROLEN SODYUM KONTRENDİKASYONLARI**

Alerjik reaksiyonlardan başka, dantrolenin kısa süreli intravenöz kullanımı için herhangi bir kontrendikasyon yoktur. Uzun süreli oral tedavi (> 45 gün), karaciğerdeki hasarı şiddetlendirme olasılığı nedeniyle aktif karaciğer hastalığı olan hastalarda kontrendikedir. Dantrolen, spastisiteli hastalarda lokomasyonun korunması amacıyla kullanımı da kontrendikedir.

## **2.9. DANTROLEN SODYUM HAKKINDAKİ DİĞER ÇALIŞMALAR**

Dantrolen sodyum merkezi sinir sistemi üzerinde belirgin bir etki olmadan hayvanlarda iskelet kasının doza bağlı gevşemesine neden olur. Kasılma mekanizmaları üzerindeki bu inhibe edici etki, iskelet kası için nispeten spesifiktir; dantrolenin, iskelet kası kasılmasının maksimum depresyonunu oluşturan dozlarda kardiyak veya düz kasın kasılması üzerinde etkisi yoktur veya çok azdır. Laboratuvar hayvanlarına oral veya periton içine verilen dantrolen (10 ila 1.600mg/kg), 200 mg/kg'lık bir oral dozdan 24 saat sonra hala sıçanda ölçülebilen sürekli kas gevşemesi sağlar. Sıçanlarda kas gevşemesi sağlamak için minimum etkili doz 25 mg/kg (po) idi, oysa kas inkoordinasyonu sadece 100 mg/kg'ın üzerindeki dozlarda belirgindir.(Ellis ve Carpenter 1974) Kas gevşemesi için tüm doz aralığında sedasyon ve refleks kaybı veya korneal refleksde bozulma kaybı yoktur. Dantrolen, farelerde Straub kuyruğunun gevşetilmesinde diazepam, klordiazepoksit, nöromusküler bloke edici ajanlar veya lokal anesteziklerden daha etkili ve spesifiktir ve ölümcül doz aralığı, kas gevşemesi için olandan oldukça fazladır.

Dantrolen, kalp veya bağırsak düz kasları üzerinde çok az etkiye sahiptir. Açık göğüs operasyonlu köpeklerde veya sağlıklı anestezi uygulanmış köpeklerde dantrolenin intravenöz infüzyonunu takiben arteriyel ve santral venöz basınçlarda, koroner kan

akışında, kalp atım hızında veya kalp çıkışında veya mide, duodenal ve kolonik kasın kasılma aktivitesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Halotan tarafından indüklenen malign hipertermi sendromlu domuzlarda, dantrolenin, miyokardiyumu etkilemeden terapötik etkinliğinin sınırına kadar olan dozlarda verilebileceğini gösterdi. Bununla birlikte, dantrolenin kendiliğinden sıçan kalbi üzerine in vitro olarak etkileri üzerine yapılan bir çalışmada, ilacın yüksek konsantrasyonlarının, kalp atış hızını etkilemeden uzun süreli doza bağımlı kasılma azalması ürettiğini göstermiştir. Kalp kası dantrolene karşı iskelet kası kadar belirgin şekilde daha az duyarlı görünüyordu.

Dantrolenin solunum etkileri önemsizdir. Anestezi uygulanmış kedilerde spontan solunum, kas dolaylı olarak uyarıldığında tibialis anterior kasının kasılmasını %90 oranında azaltacak kadar intravenöz dantrolen dozlarından sonra bile devam etmiştir. Bilinçli koyunlara verilen 1 ila 30mg / kg'lik intravenöz dozlar, solunum hacmindeki bir artışa bağlı gelgit hacminde, hacim hacminde genel bir değişiklik olmadığında bir düşüşe neden olmuştur. CNS depresyonu olmadığında, solunum merkezi hala ventilasyonu düzenleyebilir ve inspirasyonu ve ekspirasyonu destekleyen kasları daha hızlı hızlandırarak kasları sürerek doku solunmasını destekleyebilir ve böylece tidal hacimdeki azalmayı telafi edebilir.

60 mg/kg/gün'e kadar dozların verildiği iki sıçan suşunda yapılan ömür boyu çalışmaları, bir suşta tümörlerin görülme sıklığının artması durumunda diğerinde belirgin olmadığını göstermiştir. Mortalite ile bu tümörlerin görülme sıklığı arasında ilişki yoktur. Dantrolenin hamilelik süresini gebe bırakma veya değiştirme yeteneğini bozan, 45mg/kg/gün dozları verilen sıçanlar, tavşanlar ve maymunlar üzerindeki çalışmalardan hiçbir kanıt yoktur. İlaç genç hayvanların büyümesi üzerinde veya yavruların büyüklüğü ve ağırlığı, ölü doğum veya anormal fetuslar veya yenidoğan ölümleri üzerinde ciddi veya kalıcı etkiler göstermedi.

Gecikmiş dantrolen tedavisi M.H komplikasyon olasılığını artırır. Süksinilkolin veya uçucu anesteziklerin kullanılabileceği yerlerde dantrolen stoklanması önerilmektedir (Larach, Gronert ve ark. 2010).

Dantrolen sıçanlarda etanolle oluşturulmuş akut gastrik mukozal hasar üzerinde pozitif yararları gözlemlenmiştir. Dantrolen sodyumun, etanolün neden olduğu gastrik hasarı

ve malondialdehit seviyelerini önemli ölçüde azalttığı ve antioksidan enzimlerin süperoksit dismutaz (SOD) ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitelerini önemli ölçüde arttırdığı bulundu (Büyükokuroğlu, Taysi ve ark. 2002).

Dantrolen, sıçanlarda tüm vücut ışınlanması sırasında eritrositleri oksidatif strese karşı korur. Dantrolen'in radyasyona maruz kalmadan önce verildiğinde belirgin antioksidan özelliklere sahip olduğu ve radyasyonun neden olduğu hasara karşı koruyucu etkisinin, kısmen lipid peroksidasyonundaki azalmaya ve antioksidan enzimlerin SOD ve GSH aktivitesindeki artışa bağlı olduğu düşünülmektedir.(Emin Büyükokuroğlu, Taysi ve ark. 2003)

Dantrolene sodyum, eritrosit ve efüzyon malondialdehit seviyelerini düşürürken, GSH ve GSH'ye bağımlı enzimleri arttırmıştır. Bu bulgular, reaktif oksijen türlerinin (ROS) histamin kaynaklı orta kulak iltihabında rol oynadığını göstermektedir. Dantrolen sodyum ile ön muamele, antioksidan enzim aktivitelerini artırır ve lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehitin oluşumunu azaltır (Ucuncu, Taysi ve ark. 2005).

Dantrolenin aort iskemisi ve reperfüzyonunun neden olduğu nöronal yaralanma üzerindeki olası koruyucu etkisini araştırılması sonucu daha az vasküler proliferasyon, kanama, ödem ve nöron kaybına katkı sağladığı ve iskemiden sonra uygulanan dantrolenin, omuriliği iskemiye reperfüzyon hasarına karşı korumaya yardımcı olabileceği sonucuna varıldı (Kocogullari, Emmiler ve ark. 2008).

Dantrolen, farelerin hücre kültüründe bilirubine bağlı nörotoksisitede nimodipin, rutenyum kırmızısı ve bazilen mavisi ile çift ve üçlü kombinasyon halinde koruyucu aktivite gösterir. Dantrolenin tek başına etkili olduğu bulunmamakla birlikte, bilirubinin neden olduğu nörotoksisitede kombine uygulamada en potansiyel bileşik gibi görünmektedir (Gepdi` remen, Büyükokuroğlu ve ark. 2009)

Dantrolen tedavisi, lipid peroksidasyonunu ve arttırılmış endojen enzimik veya enzimik olmayan antioksidan savunma sistemlerini önledi. Yine dantrolen travmatik omurilik yaralanması tarafından indüklenen apoptotik hücre sayısını önemli ölçüde azalttı. Sonuç olarak, bu çalışmada gözlemlenen deneysel sonuçlar, dantrolen ile

tedavinin travmatik omurilik yaralanması için potansiyel faydalara sahip olduğunu göstermektedir (Aslan, Cemek ve ark. 2009).

## **2.10. DEPRESYON VE MODELLERİ**

Depresyon sık görülen, uzun süreli atakları olan ve yineleme gösteren, ciddi fiziksel ve psikososyal yeti kaybına neden olan psikiyatrik bir hastalıktır. Depresyon, yaşam boyu prevalansı yaklaşık %15-20 olan majör bir hastalıktır (Kessler, Berglund ve ark. 2005). Depresyonun neden olduğu yeti kaybı sosyal ve mesleki alanlarda olabilir ve kişinin aile düzeni ile ekonomik durumuna ciddi olumsuz etkiler yapabilir. Bununla birlikte depresyon birey kadar çevresi ve bakımını üstlenenler üzerinde de ciddi olumsuz etkiler yaratır. Depresyon karamsarlık, kendine bakmama, özgüven kaybı, suçluluk hissi, kararsızlık ve motivasyon kaybı gibi emosyonel belirtilerin yanı sıra; düşünme ve hareketlerde gerileme, libido kaybı, uyku bozuklukları ve iştah kaybı gibi biyolojik belirtilerle karakterizedir. Etiyolojisinde anahtar belirleyici olarak stresin rolü vurgulansa da yarıya yakınında genetik yatkınlık söz konusudur (Levinson 2006). Insandaki depresyona benzer tabloyu oluşturmak için çeşitli deneysel hayvan modelleri oluşturulmuştur. Bunların bir kısmı fiziksel yöntemlere dayanırken bir kısmı kimyasal ajanlarla oluşturulan deneysel modellerdir. Depresyon benzeri tablo oluşturmak için farelerde en çok kullanılan modeller:

### **2.10.1. Reserpin Etkisi**

Reserpin ve tetrabenazin uygulanmasıyla monoamin tüketiminin fizyolojik ve davranışsal etkilerinin incelenmesini sağlayan, deney hayvanlarında geliştirilen en eski depresyon modelidir. Hipoterminin serotonerjik agonistlerle ve katalapsinin beta adrenerjik agonistlerle düzeltilebilmesi deneyin çıkış noktasıdır (Leão, Sarmento-Silva ve ark. 2015).

### **2.10.2. Apomorfine Bağlı Hipotermi**

Dopamin agonisti apomorfinin neden olduğu hipotermi, antidepresan bileşiklerle tersine çevrilir. Bu etkinin, bileşiğin noradrenerjik terminallerdeki dopaminerjik reseptörler üzerindeki agonist etkisinden kaynaklanması muhtemeldir. Test kendi başına depresyonun davranışsal semptomlarından herhangi birini taklit etmeye çalışmaz, ama basitçe noradrenalinin sinaptik konsantrasyonlarının yükselmesinde rol oynayan bileşiklerin aktivitesini ortaya çıkarır. Yüksek norepinefrin seviyelerinin basit

*in vivo* göstergesi olarak, bu testin bu aktiviteye sahip bileşiklerin tanımlanmasında yararlı olduğu kanıtlanmıştır (O'Neil ve Moore 2003).

### **2.10.3. 5-Hidroksitriptofana Bağlı Davranış Değişiklikleri**

Serotonin sinaptik konsantrasyonlarını artırabilen ajanları tanımlamak için benzer bir mekanizmaya sahiptir. Başlangıçta sıçanlarda geliştirilen fakat farelerde daha rutin olarak kullanılan basit *in vivo* test, 5-Hidroksitriptofan (5-HTP) 'ın uygulanmasıyla indüklenen davranış sendromunu güçlendirmedeki potansiyelini ölçerek artan serotonin seviyelerini tespit eder. Bu test *in vivo* olarak nispeten hızlı ve doğru bir SSRI potansiyeli indeksi sağlar. Bu testler, serotonin veya norepinefrin düzeylerinin yükselmesinin, depresif semptomlardan kurtulmada rol oynadığı hipotezine dayanan antidepresan eylem için öngörülse geçerlilik sunar (Sánchez, Bøgesø ve ark. 2004).

### **2.10.4. Psikostimulan Yoksunluğu**

İnsanlarda psikostimulan yoksunluğuna eşlik eden anhedoninin depresyon ve şizofrenideki negatif belirtilerin modeli olarak hayvanlarda genellikle amfetamin türevi maddelerle oluşturulan bir modeldir (Barr, Zis ve ark. 2002).

### **2.10.5. Öğrenilmiş Çaresizlik**

Tekrarlayan şekilde kaçamayacakları şoka maruz bırakılan hayvanların, kaçabilecekleri koşullarda dahi kaçmamaları depresyondaki öğrenilmiş çaresizliğin hayvandaki karşılığı olarak kabul edilmektedir. Depresyonda öğrenilmiş çaresizlik hipotezi, depresyonun kontrol edilemeyen çevresel strese öğrenilmiş yanıt olduğunu öne sürer. Bu testte temel ilke, hayvanın hoşuna gitmeyen sonuca engel olamayacağı bir düzeneğe yerleştirilmesidir. İki bölmeli düzeneğin bir bölmesinde hafif elektrik şoku uygulanırken, diğer bölmede şok uygulanmaz. Uygulamanın diğer bir şekli, tek bir bölme içinde hayvanın müdahalesiyle şoku sona erdirecek bir pedalin yerleştirilmesidir. Şok öncesinde ışık ya da ses uyarısının tekrarlanmasıyla hayvanlar kısa sürede şoka engel olmayı öğrenebilirler. Antidepresan tedavi uygulanması, kaçma davranışında meydana gelen gecikmeyi azaltır ve öğrenilmiş çaresizlik oluşturulabilen hayvan oranını düşürür (Rybnikova, Mironova ve ark. 2007).

### **2.10.6. Zorunlu Yüzme Testi**

Zorunlu yüzme testi, Porsolt'un, öğrenmeyle ilgili kullanılan bir başka test olan Morris su tankında, su tankı içerisinde platformu bulamayan sıçanların bir süre sonra



hareketsiz kaldıkları gözleminden yola çıkarak geliştirdiği bir testtir (Porsolt, Anton ve ark. 1978). Porsolt'un zorunlu yüzme testi olarak da bilinen bu test, depresyon araştırmalarında, özellikle de antidepresan tedavi taramalarında, en sık kullanılan hayvan modelidir. Bir sıçan ya da fare, su doldurulmuş bir silindir tanka konulduğunda, hareketsiz kalıncaya kadar geçen süre ve belli bir süre içinde ne kadar hareketsiz kaldığı ölçülmektedir. Yirmi dört saat sonra tekrar tanka yerleştirilirse hareketsizliğe kadar geçen sürenin daha da kısaldığı görülür. Hareketsizlik kaçmaya yönelik davranışta ısrarın kaybolması “davranışsal umutsuzluk” olarak yorumlanır. Zorunlu yüzme testi aslında öğrenilmiş çaresizliğe benzer olarak, kaçamayacağı bir strese maruz kalan hayvanın kaçma çabasının sona ermesi üzerine kuruludur. İki tekrarlayan uygulama arasında antidepresan tedavi uygulanıp hayvanın yanıtındaki değişim gözlenmektedir. Antidepresan ilaçlar hareketsiz kalmaya kadar geçen süreyi uzatıp, toplam hareketsiz geçen süreyi azaltırlar. Uygulamanın kolaylığı nedeniyle bu model yaygın olarak kullanılmaktadır (Cryan, Markou ve ark. 2002).

#### **2.10.7. Kuyruktan Asma Testi**

Hayvanların kuyruklarından asılı tutuldukları ve sonrasında hareketsiz kalmalarına kadar geçen sürenin ölçüldüğü, zorunlu yüzme testindeki gibi davranışsal umutsuzluk üzerine kurulu bir modeldir. Antidepresan ilaç uygulamaları hareketsizlik süresini kısaltır (Başar ve Ertuğrul 2005).

#### **2.10.8. Olfaktor Bulbektomi**

Sıçan ve farelerin olfaktor bulbuslarının bilateral alınması, hayvanlarda depresyona benzer davranışsal, nörokimyasal, nöroendokrin ve nöroimmunolojik değişikliklere yol açmaktadır. Klasik olarak değerlendirilen davranış, açık alan testinde artmış hareketliliktedir. Bu değişiklikler akut antidepresan tedavisine yanıt vermezken, kronik uygulama ile düzelmektedir (Nowak, Szewczyk ve ark. 2003).

#### **2.10.9. Kronik Hafif Stres**

Kronik hafif stres modelinde, denekler nispeten hafif şiddette stresöre maruz bırakılır. Bunlar arasında izole olarak kafeslere konması, gece-gündüz döngüsünün bozulması, yemek ve sudan mahrum bırakılması, kafeslerine eğim verilmesi, sarsılması, kafesin zemininin ıslak tutulması sayılabilir. Bu stresörler birkaç saatliğine dönüşümlü olarak uygulanır, bu uygulama haftalar ya da aylar sürebilir. Sonuçta hayvanlarda ‘anhedoni’

olarak değerlendirilebilecek davranışsal değişiklikler ve kardiyovasküler değişiklikler gözlenir (Grippe, Beltz ve ark. 2003).

#### **2.10.10. Sosyal Stres**

Bu depresyon modelinde, hayvanlar arasındaki sosyal ilişkilerin neden olduğu stres kullanılmıştır. Küçük gruplar ya da çiftler halinde barındıkları zaman hayvanlar arasında bir hiyerarşi oluşmaktadır. Gruplar arasında baskın karakteri olmayan farelerde anksiyete benzeri davranışlar görülmeye başlanır. Anksiyetenin etkisi ile farelerin hareket ve davranışlarında, yeme-içmede ve sosyal etkileşimde azalma görülmektedir (Nestler ve Hyman 2010).

#### **2.10.11. Genetik Modeller**

Genetik yaklaşımlar hem depresyonun genetik belirleyicilerini tanımlamada hem de klinik beklenti ve talepleri daha yakından karşılamada yeni modeller üretme imkanı sunar (Henn ve Vollmayr 2005). Genetiğin ilerletilmesinde yaygın olarak kullanılan bir diğer strateji, sıçan ve farelerde başarıyla uygulanan seçici üremedir. Selektif üreme, depresyon veya antidepresan benzeri davranış paradigmlarında bireysel cevap verme konusundaki farklılıklardan yararlanır. FST'deki düşük hareketsizlik seviyeleri için yetiştirilmiş olan Rouen depresif fareler bu kümeye en iyi örnektir (El Yacoubi, Bouali ve ark. 2003).

### **2.11. ANKSİYETE VE MODELLERİ**

Anksiyete; günlük işlerde performansı etkileyen ve halk sağlığı için yüksek bir maliyete yol açan, ciddi psikiyatrik durumdur ve endişeli davranışların kaynağı genellikle tanımsız ya da bilinmemektedir (Campos, Fogaca ve ark. 2013). Bu nedenle anksiyete ve stresin hayvan modelleriyle geliştirilmesi, anksiyolitik ilaçların farmakolojik mekanizmalarını ve potansiyel klinik etkilerini ortaya çıkarmada önemli yer tutar. Hayvan anksiyete modelleri, yaklaşma-kaçınma durumlarının neden olduğu zıt motivasyonel durumları üretebilecek çatışma durumlarına dayanmaktadır. Anksiyete organizmanın biyolojik bir korunma sistemi olup potansiyel bir tehlike karşısında ortaya çıkarak organizmanın tehlikeli durumdan sakınarak yaşamının devam etmesini sağlar. Bilimsel çalışmaların sonuçları; gama aminobutirik asid (GABA), benzodiazepin reseptörü-Cl<sup>-</sup> iyonoforu kompleksi, noradrenerjik sistem ve serotonerjik sistem olmak üzere dört temel santral nörotransmitter sisteminin hem

normal hem de patolojik değişikliklerin anksiyete oluşumunda ve sürdürülmesinde en önemli mekanizmalar olduğunu göstermektedir. Bu temel nörotransmitter sistemlerinin yanı sıra dopaminerjik nöronlar ve kolinerjik nöronların da uyunç ve dikkati artırarak anksiyete gelişimine minimal düzeyde katkı sağladığı düşünölmekle birlikte antidopaminerjik ve antikolinerjik ilaçların belirgin bir anksiyolitik etkisinin olmaması dopaminerjik ve kolinerjik sistemlerin anksiyete ile direkt ilişkisini desteklememektedir. Hipotalamo-hipofizer yolağın anksiyete ile aktif olduğu bilinmektedir. Temel nörotransmitter sistemleri dışında santral nöropeptidler olan kolesistokinin ve P maddesi, santral sinir sisteminin GABA dışındaki diğer inhibitör nörotransmitteri olan adenozinin ile birlikte santral nitrik oksidin de anksiyete gelişiminde rolü tartışılmaktadır.

### **2.11.1. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi**

Yerden belli bir yükseklikte iki açık ve iki kapalı kolu olan artı şeklinde bir deney düzeneğidir. Farklı boyutlarda hazırlanarak fare ve sıçanlar için kullanılabilir. Kapalı kola konulan hayvanın açık kola girmesi için geçen süre ve bu kolda kalış süresini değerlendirmek için kullanılır. Anksiyolitik ajanların bu süreleri artırdığı bulunmuştur. Yükseltilmiş artı labirent düzeneğinin Y-maze ve Q-maze gibi çeşitleri de vardır. Kafesinden alınan denekte yeni çevre ve yükseklik anksiyeteye yol açar (Arantes, Tejada ve ark. 2013).

### **2.11.2. Yükseltilmiş T-labirent Testi**

Fare ve sıçan için farklı ebatlarda ve pleksiglasdan hazırlanan, genellikle yerden 40 santimetre yükseklikteki, üç kollu bir deney düzeneğidir. Hayvanın kapalı kolu terk etmesi için geçen süreler ile açık kolu terk etmesi için geçen süre değerlendirilir. Düşmeleri önlemek için, açık kolların, 1 cm yüksekliğinde bir pleksiglas jantla çevrelenmesi uygundur (Bulos, Pobbe ve ark. 2015).

### **2.11.3. Açık Alan Testi**

Daire, kare, dikdörtgen şeklinde ve ortamı ışıklandırılmış değişik formları vardır. Hayvanın türüne göre farklı ebatlarda hazırlanan, tabanı çizgili bölmelere ayrılmış, etrafı duvarlarla çevrili, üstü açık pleksiglasdan yapılmış bir kutudur. Açık alana bırakılan hayvanda anksiyete davranışı; hayvanın kendi ortamından alınıp tek başına

bilmediği bir ortama bırakılması ve agorofobi dediğimiz geniş alan korkusu olmak üzere iki faktör tarafından tetiklenir. Belli süre içerisinde hayvanın yatay düzlemdeki hareketleri, dikey düzlemdeki hareketleri (arka ekstremiteleri üzerinde yükselme), kaşınma davranışı ve defekasyon sayısı tespit edilir. Sağlıklı olmayan hayvanlar bölgede daha az hareket etme eğilimindedir. Duvarlara yakın durmayı ve kenarlarda daha fazla hareket etmeyi tercih eden fareler, kaygıya benzer davranış belirtileri gösterirken daha az kaygı sahibi olan fareler, kutunun merkezi, açık alanında daha fazla zaman harcama eğilimindedir (Kraeuter, Guest ve ark. 2019).

#### **2.11.4. Merdiven Testi**

Anksiyolitik aktiviteyi ölçmek için yapılan hızlı ve basit bir yöntemdir. Etrafı duvarlarla çevrili, üstü açık, beş basamaktan oluşan bir merdiven ile yapılır. Deney hayvanının çıktığı basamak sayısını arttıran ilaçlar anksiyolitik, vertikal düzlemde arka ekstremiteleri üzerinde yaptığı hareketlerin sayısını azaltan ilaçlar da sedatif etkili olarak kabul edilir (Ago, Takahashi ve ark. 2007).

#### **2.11.5. Sosyal İzolasyon Testi**

Annesinden ayrılmış on günlük yavru sıçanların çıkardığı duyulamayan çığlıkların, sıklık ve şiddetinin ultrasonik titreşimlere duyarlı bir mikrofonla kaydedilmesi esasına dayanır. Anksiyolitik maddelerin bu çığlıkları azalttığı bulunmuştur. Farelerde erken sosyal izolasyonun postsinaptik, serotonerjik reseptör gen transkripsiyonunda, motor hiperaktivitesinde ve davranışsal disinhibisyonda güçlü değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (Bibancos, Jardim ve ark. 2007).

#### **2.11.6. Sosyal Etkileşim Testi**

Ağırlıklarına ve cinsiyetlerine göre gruplandırılan hayvanlar çiftler halinde önce kendi ortamlarında daha sonra farklı bir ortamda tutulup, bu ortamlardaki diğer farelerle uyumu, takip etme, kaşınma, kavga etme, tımar etme gibi davranışlarının gözlenmesi esasına dayanır (Linck, da Silva ve ark. 2010).

#### **2.11.7. Delikli Kutu Testi**

Zemini 2,2 cm çapında 16 delikten oluşan bir düzenektir. Hayvanlar 30 dakika boyunca düzeneğin orta kısmına bırakılarak buldukları yeri tanımları sağlanır. Uyum döneminden sonra kutuda kat ettikleri yol, arka ekstremiteleri üzerinde yükselmeleri ve gittikleri delik sayıları kaydedilir (van Gaalen ve Steckler 2000).

### **2.11.8. Yabancı Kokuya Maruz Bırakma**

Hayvanda herhangi bir ağrıya neden olmadan duygusal durumunu değiştirir. Kedi idrarı, kedi dışkısı, kedi tüyü ya da doğrudan kedinin kendisi ile karşı karşıya kalan sıçanda meydana gelen korku hayvanın doğuştan kazandığı bir duygudur. Doğal stresörlere karşı doğal cevabın tespiti için uygun bir testtir (Blanchard, Yang ve ark. 2001).

### **2.11.9. şartlı Zıtlaşma Testi**

Su ve yem vererek ödüllendirme ya da ayak şoku vererek cezalandırma ilkesine dayanır. İki temel tipi vardır ve modeller Geller ve Vogel isimleriyle anılır.

#### **Geller Seifter Zıtlaşma Testi:**

Cezalandırma esasına dayanır. Deneyin ilk bölümünde özel bir kafes içine konulup, bir süre aç ve susuz bırakılan hayvan, kafesteki pedala basınca şekerli su verilerek ödüllendirilir. Bu dönemde hayvanın pedala kaç kez bastığı kaydedilir ve daha sonra ödüllendirme cezalandırma dönemine geçilir. Bu dönemde her pedala basışta ödüllendirme yapılır eş zamanlı olarak hayvanın ayağına elektroşok uygulanarak cezalandırma da yapılır. Ancak ses veya ışık uyarısıyla cezalandırma dönemine geçildiği öğretilmiş olur. Cezalandırma döneminde pedala basış sayısı düşer (Geller ve Seifter 1960).

#### **Vogel Zıtlaşma Testi :**

Temel olarak Geller Seifter testine benzer, ancak Vogel testinde elektriksel uyarı belirli aralıklarla hayvan su içerken verilir. 24 saat susuz bırakılan sıçanların 5 dakika su almasına izin verilir, daha sonra su kabını her 21. yalamada ayaktan elektriksel şok uygulanır. Toplam test süresi 3 dakikadır. Bu süre içinde hayvanların aldıkları şok sayılır (Frye, Petralia ve ark. 2000).

### **2.11.10. Savunmaya Yönelik Gömmе Testi**

Duvarlarla çevrili test aletinin zeminine konulan dikdörtgen şeklindeki materyale elektriksel uyarı verilmesi ve deney hayvanının elektrik şoku alması gibi istenmeyen durumlarda başını altına sokacak şekilde gömmesi esasına dayanır (Sena, Bueno ve ark. 2003).

### **2.11.11. Ayak Şoku Testi**

Hayvanların elektrik şokuna duyarlılığını test etmek için kullanılan bir yöntemdir. Deneş düzeneği, tabanı elektrik jeneratörüne bağlı ızgarayla kaplı bir kutudan oluşur. Kutunun içine konulan hayvanın her seferinde elektrik şoku alması sonucu verdiği tepkilerin test edilmesi esasına dayanır. Sıçrama sayısı, ses çıkarma sayısı kayıt altına alınır ve ayak şokları iki farklı yoğunlukta 0,2 mA ve 1,6 mA olarak uygulanabilir (Karakilic, Kizildag ve ark. 2018).

### **2.11.12. Dört Tabaka Testi**

Cihaz, birbirinden 4 mm aralıklarla ayrılmış dört metal plaka (11x8 cm) ile döşenmiş bir kafesten oluşmaktadır. Zemini dört eşit parçaya bölünmüş düzenek içerisine bırakılan hayvana maksimum 0,5 saniye süren 2 mA'lik elektrik şokları verilir ve bu süre içindeki bölme geçme sayısı kaydedilir (Dziubina, Szmyd ve ark. 2016).

## **2.12. ÖĞRENME BELLEK VE MODELLERİ**

Öğrenme, insanın hafızasında daha önce yer almayan bilgileri edinmesi ve sonucunda davranışlarında oluşan değişiklikleri ifade ederken; hafıza ise öğrenilen bilgilerin beyinde yer etmesi, saklanması ve geri çağırılması basamaklarını kapsamaktadır. İnsan hafızasının nasıl işlediğine dair yıllardır farklı bilim insanları tarafından birçok hafıza modelleri ortaya konmuştur (Baddeley 2012). Bu modeller birbirlerinden farklı olmakla birlikte hafızayı bilginin depolanma süresine göre kısa dönemli hafıza ve uzun dönemli hafıza olarak ikiye ayırmak mümkündür. Anatomik olarak beyindeki hafıza bölgesinin tespiti ile ilgili yapılan çalışmaların ilki 1950'lerde epilepsi tedavisi amacıyla temporal lobektomi uygulanan hastaların hafızalarının etkilenmesi ile ortaya konmuştur. Bu tedavi hipokampus bölgesini hafıza ile ilişkilendirilmesini sağlamıştır. Sol hipokampusün daha fazla sözel hafıza ile sağ hipokampusun mekansal hafıza ile ilişkili olduğu düşünölmektedir (Chen, Chuah ve ark. 2010). Hipokampus bölgesinin bilgiyi saklama ve geri çağırma işlevlerini kimyasal olarak nasıl gerçekleştirdiğine dair ortaya atılan en önemli hipotezler plastisite, (iç ve dış uyaranlara bağlı olarak sinapsların yapı ve fonksiyonlarındaki uzun dönemde oluşan değişim) ve engram teorisidir (engram hücreleri olarak tanımlanan ve belirli bir tip hafızanın oluşmasında primer rol oynayan hücreler) (Ekstrom ve Ranganath 2018). Öğrenme ve hafıza ile ilişkilendirilen nörotransmitterler

ise başta glutamat olmak üzere GABA, dopamin, asetilkolin, serotonin ve norepinefrindir (Lovinger 2010).

### **2.12.1. İki Obje-Yeni Obje Tanıma Testi**

Bu test, kemirgenlerin, bilinen bir nesneyle karşılaştırıldığında yeni bir nesneyi araştırmak için daha fazla zaman harcama eğilimine dayanmaktadır. Yeni nesneyi keşfetme seçimi, öğrenme ve tanıma hafızasının kullanımını yansıtır. Yeni nesne tanıma görevi, açık bir alanda iki farklı nesne türüyle gerçekleştirilir. Her iki nesne de genellikle yükseklik ve hacim olarak tutarlı, ancak şekil ve görünüm açısından farklıdır. Alışma sırasında, hayvanların boş bir alanı keşfetmelerine izin verilir. Alışkanlıktan yirmi dört saat sonra, hayvanlar aynı mesafeye yerleştirilmiş iki özdeş nesne ile tanıdık arenaya maruz bırakılmaktadır. Ertesi gün, farelerin tanıdık nesnenin ve uzun süreli tanıma hafızasını test etmek için yeni bir objenin varlığında açık alanı keşfetmesine izin verilir. Her bir nesneyi keşfetmek için harcanan zaman ve ayrımcılık indeksi yüzdesi kaydedilir (Chen, Chuah ve ark. 2010).

### **2.12.2. Gecikmeli Su Labirenti Testi**

Su labirent tankında geçirilen süre boyunca kaçış gecikmesi, hareket mesafesi ve hızını gözlemleyerek ve kaydederek mekansal belleği ve çalışma belleğini test etmek için tasarlanmıştır. Boya, opak hale gelinceye kadar suya eklenir ve gizli bir platform su yüzeyinin yaklaşık 1 cm altına yerleştirilir. Su tankının dörtte üçü görsel işaretlerle çevrelenir. Denekler, su tankının hemen üstünde yüzen bir video izleme sistemi ile izlenir ve ilgilenilen parametreler Ethovision yazılımı kullanılarak kaydedilir. Denekler randomize platform konumları ve bırakma yerleri ile test edilir. Her gün dört doksan saniyelik deneme yapılır. Denemeler fareler üç saniye boyunca gizli platformda durduğunda veya doksan saniye geçtikten sonra sona erer. Referans bellek protokolünün aksine, platform konumu günlük olarak değiştirilir. Denekler, her yeniden konumlandırılmada platformun yeni yerini öğrenmek zorundadır. Başarılı bir şekilde öğrenen denekler, her gün dört denemede kaçış gecikmesinde azalma olduğunu göstermektedir (Oshiro, Beasley ve ark. 2015).

### **2.12.3. Korku ile Şartlandırma**

Korku ile şartlandırma, farelerin belirli bir nötr koşullu uyaran ile olumsuz bir koşulsuz uyarıyı (genellikle hafif bir elektrik şoku) ilişkilendirmeyi öğrendiği ve koşullu bir

tepki gösterdiği, bir tür ilişkisel öğrenme görevidir. Tekrarlanan ikili uyarılardan sonra, fareler nötr uyarandan da korkmayı öğrenir. Davranışsal, genetik ve farmakolojik çalışmalar için faydalı olan çok kararlı ve uzun süreli bir davranış değişikliği üretilir (Shoji, Takao ve ark. 2014).

#### **2.12.4. Modifiye Barnes Labirent Testi**

Modifiye Barnes testi, CNS bozukluklarının kemirgen modellerinde bilişsel açıklarını değerlendirir. Test, platformun merkezi çevresinde halka şeklinde çok sayıda kaçış deliği bulunan dairesel bir platformda yapılır. Parlak üst aydınlatma, hayvanı bir kaçış borusuna bağlı hedef kaçış deliğini aramaya teşvik eder ve ışık kaçmayı teşvik edici bir uyarı oluşturur. Labirentin etrafına yerleştirilen görsel ipuçları mekansal algı için işlev görür.

Her denemenin başında fare platformun ortasına yerleştirilir ve hedef kaçış deliğini bulmak için belirli bir süre verilir. Bir hayvan, süre dolmadan hedef kaçış deliğine girerse, deney sona erer. Hedef deliğe zamanında girmeyen hayvanlar deliğe yönlendirilir ve hedef çıkış deliğinin konumu günlük olarak taşınır, diğer bileşenler aynı kalır. Deneklere toplam dört deneme yapılır. Denemeler, Ethovision ile kaydedilir ve kaçış gecikmesi, hareket mesafesi ve hız için ölçülür (Gawel, Labuz ve ark. 2016).

#### **2.12.5. Morris Su Labirenti**

Morris Su Labirenti, 30 yıldan daha uzun bir süre önce Richard Morris tarafından tanıtılmış ve laboratuvar kemirgenlerinde mekansal öğrenmeyi değerlendirmek için halen sıklıkla kullanılmaktadır. Dairesel bir havuz bir pigment eklenerek opak hale getirilmiş suyla doldurulur. Hayvanların sudan su yüzeyinin hemen altına gizlenmiş küçük bir platforma kaçmaları gerekir. Platformun konumu yalnızca su labirent havuzunu çevreleyen uzak görsel işaretlere göre kodlanabilir ve böylece uzamsal bellek kullanılır. Dengeli görsel ipuçları, havuz etrafındaki bir perde kullanılarak veya test odasında farklı yerlere yerleştirilmiş nesnelere kullanılarak sağlanabilir.

Farelerin yüzme yolu bir kamera kullanılarak kaydedilir ve gizli platforma ulaşmak için gecikme süresi, yol uzunluğu, kadrantlardaki süre, hız gibi mekansal öğrenme performansının farklı yönlerini tanımlayan parametreleri hesaplanır (Gallagher, Burwell ve ark. 2015).



### **2.12.6. Nesne-Lokasyon Belleği Testi**

SSS bozuklukları için yapılan kemirgen modellerinden biri olup özellikle mekansal bellek değerlendirilir. Bu test, kemirgenlerin, bilinen bir nesneden daha yeni bir nesneyi keşfetmek için daha fazla zaman harcama ve ayrıca bir nesnenin yerini değiştirdiğinde tanıma eğilimine dayanmaktadır. Test açık alanlı bir arenada yapılır ve ilk gün alıştıran hayvanlar ertesi gün, benzer malzemenin fakat farklı şekillerdeki dört nesne arenaya getirilir. İlk denemede, hayvanın dört nesneyle arenayı keşfetmesine izin verilir. Bundan kısa bir süre sonra yapılan ikinci denemede, hayvan, ikisinin sabitlenmiş pozisyonları olması haricinde, dört cisimle tekrar karşılaşır. Denemeler, arenanın üzerine monte edilmiş bir kamera kullanılarak kaydedilir ve nesnelere koklamak için harcanan süre boyunca puanlanır; nesne-konum ayrımcılık endeksi hesaplanır (Vogel- Ciernia ve Wood 2014).

### **2.12.7. Pasif Sakınma Testi**

Pasif Kaçınma görevi, yeni kimyasal varlıkların öğrenme ve hafıza üzerindeki etkilerini değerlendirmek ve bilişsel aktiviteleri incelemek için faydalıdır. İki bölmeli düzenek kullanılır. Bölmelerden biri karanlık ve hayvana elektrik şoku uygulanmasına uygun şekilde olup, diğer bölme aydınlık ve hayvanın elektrik şoku almadığı bölmedir. Karanlık bölmeye geçme süresi kaydedilir. Eğer ikinci kez aydınlık bölmeye konulan hayvan elektrik şoku alacağını anlayarak karanlık bölmeye geçmez ise olayı öğrenmiş kabul edilir (Shabani, Dahmardeh ve ark. 2018).

### **2.12.8. T ve Y Labirent Testleri**

Bu testler, kemirgenlerin yeni bir çevreyi keşfetme istekliliğine dayanmaktadır, yani bilinen bir kol yerine labirentin yeni bir kolunu ziyaret etmeyi tercih etmektedir. T testinde T harfi şeklinde kollar ve Y testinde ise, birbirinden 120° açıyla üç beyaz, opak plastik kol bulunur. Labirentin merkezine girdikten sonra, hayvanların üç kolu serbestçe keşfetmesine izin verilir. Tekrarlanan denemelerle, hayvanlar daha önce ziyaret edilen bir kola girme eğilimi göstermemelidir. Her kola giriş sayısı ve toplam deneme süresi kaydedilir. hipokampus bağımlı mekansal belleği tanımlamak için kullanılır (Ghafouri, Fathollahi ve ark. 2016).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. KİMYASAL MADDELER**

Bu çalışmada Dantrolen Sodyum (sigma), İmipramin (sigma), Diazepam (deva), Skopolami (sigma) kullanılmıştır. Tüm ilaçlar serum fizyolojik içinde çözündürülerek deney sabahı taze olarak hazırlanmış ve intraperitoneal (i.p.) olarak 25 g'lık ağırlık başına 0,4 ml olacak şekilde deneylerden 45 dakika önce verilmiştir. Kontrol grubuna %0,9 serum fizyolojik (SF) verilmiştir.

#### **3.2. DENEY HAYVANLARI**

Bu çalışmada 25-35 gram ağırlığında 9 haftalık 220 adet erkek BALB/c cinsi fare kullanıldı. Fareler Sakarya Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi'nden (SÜDETAM) temin edildi. Deney süresince 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık siklus içerisinde, yem ve sudan kısıtlama yapılmaksızın uygun laboratuvar koşullarında;  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'lik oda ısısı ve %55-60 nem oranında her grupta 7-10 hayvan olacak şekilde randomize olarak gruplandırıldı. Davranış deneyleri SÜDETAM laboratuvarında ve hergün aynı saatlerde (09:00-14.00) gerçekleştirildi. Tüm deney hayvanları sadece bir tedavi grubu için kullanıldı. Tüm deneyler etik kurallara uygun şekilde Sakarya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 04/04/2018 tarih ve 16 sayılı kararı ile gerçekleştirildi.

#### **3.3. DENEYLER**

##### **3.3.1. Zorunlu Yüzme testi (ZYT)**

ZYT fareler tek başlarına  $23-25^{\circ}\text{C}$  sıcaklığında su içeren Pleksiglas silindirlere (çap 12 cm) bırakılırlar ve orada 6 dakika boyunca tutulurlar. Bu durum kaçamayacakları bir durum olduğu için, hayvanlar çabucak hareketsiz hale gelirler, dikey pozisyonda su üstünde dururlar ve sadece kafalarını su üstünde muhafaza etmelerini sağlayacak küçük hareketler yaparlar. 6 dakikalık test süresinin son 4 dakikasındaki hareketsizlik (immobilizasyon) zamanı kaydedilir. Bu testte, antidepresan-benzeri etki gösteren ilaçların hareketsizlik süresini kısalttıkları ve hayvanların ortamdan çıkmak için daha çok çaba gösterdikleri gözlemlenmektedir.

Gruplar:

Kontrol (n=10)

İmipramin 30 mg/kg (n=10)

Dantrolen Sodyum 1 mg/kg (n=10)

Dantrolen Sodyum 3 mg/kg (n=10)

Dantrolen Sodyum 9 mg/kg (n=10)

### **3.3.2. Yükseltilmiş artı-labirent testi (YALT)**

Anksiyete ile ilişkili davranış yükseltilmiş artı-labirent testi ile ölçülür. Deneyler hafif aydınlık, yarı ses-geçirgen, masa lambası ile aydınlatılmış (80 lux) odada yapılır. Labirent tahtadan yapılmıştır ve iki açık (29 cm uzunluk x 5 cm genişlik) ve iki kapalı kolları (29 cm x 5 cm x 15 cm yükseklikte duvarları olan) birbirlerini çaprazlarlar ve 5cm'lik kare şeklinde merkez kısmı oluştururlar. Labirent yerden 40 cm yüksekliktedir. Her bir fare yüzü açık kollardan birine bakacak şekilde labirentin merkezine yerleştirilir, ve labirenti incelemesine izin verilir. Açık kol aktivitesi aşağıdaki şekilde değerlendirilir:

1)artı labirentte harcanan toplam zamana göre (300s) açık alanda harcanan zaman, yüzde olarak ifade edilir 2) hem açık hem kapalı kollara toplam giriş sayısına göre açık kollara toplam giriş sayısı, yüzde olarak ifade edilir. Bu değerler farede anksiyete göstergesi olarak kabul edilir.

Gruplar:

Kontrol (n=10)

Diazepam 2 mg/kg (n=10)

Dantrolen Sodyum 1 mg/kg (n=10)

Dantrolen Sodyum 3 mg/kg (n=10)

Dantrolen Sodyum 9 mg/kg (n=10)

### 3.3.3 Pasif Sakınma Testi

Bu düzenek iki bölmelidir. Bölmelerden biri karanlık ve hayvana elektrik şoku uygulanmasına uygun şekilde tasarlanmıştır. Diğeri aydınlık ve hayvanın elektrik şoku almadığı bölmedir.

Pasif sakınma testinde fareler ilk gün aydınlık kompartmana yerleştirilirler. Eğer fare karanlık kompartmana geçerse kaçınılmaz bir ayak şoku (0.25mA/saniye) uygulanır. Karanlık kompartmana girmek için geçen zaman kaydedilir. Herhangi bir hayvan 300 saniyede aydınlık kompartmandan karanlık kompartmana geçmeyi başaramazsa deney dışı bırakılır.

Kazanım (acquisition trial) denemesinden 24 saat sonra retansiyon denemesi yapılır. Retansiyon denemesinde şok uygulanmaz. Aydınlık bölmeye konulan hayvan elektrik şoku alacağını anlayarak karanlık bölmeye geçmez ise olayı öğrenmiş kabul edilir. Retansiyon süresinin kazanım süresine göre uzaması daha iyi bellek fonksiyonunun göstergesidir.

Gruplar:

Kontrol (n=10)

Skopolamin 0,6 mg/kg (n=10)

Dantrolen Sodyum 1 mg/kg (n=10)

Dantrolen Sodyum 3 mg/kg (n=10)

Dantrolen Sodyum 9 mg/kg (n=10)

Skopolamin 0,6 mg/kg + Dantrolen Sodyum 9 mg/kg (n=10)

### 3.3.4 Morris Su Labirenti

Hipokampusu bağımlı mekânsal (spatial) öğrenme belleği ölçer. Bu cihaz 90 cm çapında siyah bilyeler veya boya kullanılarak opak hale getirilen 22 C dereceye ısıtılmış su ile doldurulan dairesel bir havuzdan oluşmaktadır. Havuz 4 eşit kadrana ayrılır.

İlk 5 gün, farenin bırakıldığı noktalardan (3 farklı nokta) platforma ulaşmaya kadar geçen süre kaydedilir. 6. gün ilaç enjeksiyonları yapıp, Etovizyon-XT video takip

etme sistemi kullanılarak 1 dakika boyunca platformun olduğu kadranda harcanan zaman ve platforma ortalama uzaklık değerlendirilir.

Gruplar:

Kontrol (n=10)

Skopolamin 0,6 mg/kg (n=10)

Dantrolen Sodyum 1 mg/kg (n=10)

Dantrolen Sodyum 3 mg/kg (n=10)

Dantrolen Sodyum 9 mg/kg (n=10)

Skopolamin 0,6 mg/kg + Dantrolen Sodyum 9 mg/kg (n=10)

### **3.3.5 Lokomotor Aktivite (Açık alan testi)**

Verilen ilaçların hayvanların motor aktivitelerine olumlu veya olumsuz etkilerinin olup olmadığını değerlendirmek üzere bu test yapılmaktadır. Lokomotor aktivite kare bir arenada (40x40 cm) açık alan testi kullanılarak ölçülür. Hayvanlar cihazın merkezine yerleştirilir ve davranışları Etovizyon-XT video takip etme sistemi kullanılarak 5 dakika boyunca kaydedilir. Lokomotor aktivite cihazda katedilen toplam mesafe ve hayvanların hızı ölçülerek değerlendirilir. Testler öncesinde ilaçların verilmesinden sonra farelerin lokomotor aktiviteleri ölçülecek ve lokomotor aktiviteleri bozuk olan fareler deney dışı bırakılacaktır. Lokomotor aktiviteyi değiştiren ilaçlar, ZYT ve (+) labirent testinde yalancı negatif ve pozitif sonuçlara neden olabilmektedir. Bu nedenle ilaçların ZYT de saptanan antidepresan-benzeri etkilerinin ve (+) labirent testinde saptanan kaygı giderici etkilerinin hayvanlarda oluşabilecek lokomotor aktivite değişikliklerine bağlı olup olmadığını değerlendirmek amacıyla tüm deneklerin motor aktiviteleri değerlendirilmiş ve bozuk olanlar deney dışı bırakılmıştır.

### 3.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Sonuçların değerlendirilmesinde tek-yönlü ANOVA Post-hoc Tukey testi veya iki-yönlü ANOVA Post-hoc Dunnett testi kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ S.H.O olarak verilmiştir.

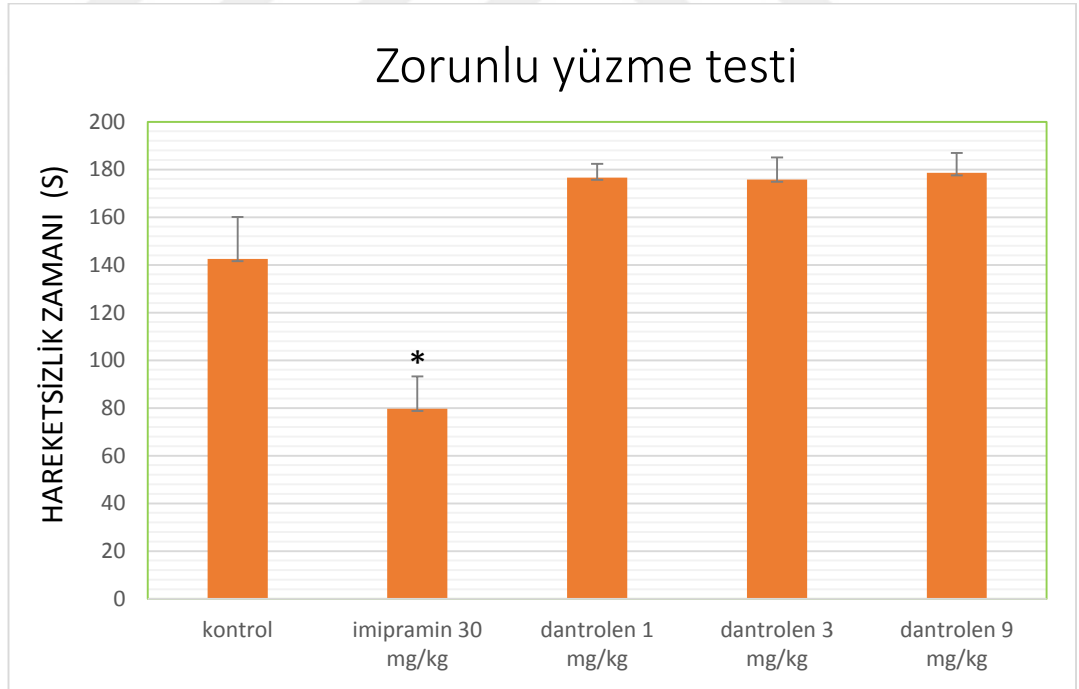


## 4. BULGULAR

### 4.1. DANTROLLEN SODYUM'UN ZORUNLU YÜZME TESTİNDE İMMOBİLİZASYON SÜRESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Farelerde ilaçların antidepresan benzeri etkilerinin gösterilmesi amacıyla uygulanan ZYT'de referans ilaç olarak imipramin kullanılmaktadır. İmipramin, 5-HT/noradrenalin gerilim inhibitörü olarak immobilizasyon süresini kontrol grubuna göre anlamlı olarak kısaltmıştır ( $p < 0,001$  Şekil 4). Bu bulgu, kullandığımız yöntemin antidepresan aktiviteyi değerlendirmede güvenilir bir yöntem olduğunu kanıtlamaktadır.

Dantrolen sodyumun antidepresan benzeri etkisinin araştırıldığı ZYT'de hayvanların 6 dakikalık test süresinin son 4 dakikasında immobil olarak kaldıkları süre Şekil 1'de gösterilmiştir. Şekil 4'deki gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında sadece imipramin ve kontrol grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ( $F(49,4)=14,216$ ,  $P < 0,01$ ). Dantrolen 1, 3 ve 9 mg/kg dozunda farelerde ZYT'nde immobilizasyon süresi üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermemiştir. ( $p > 0,05$ ) (Şekil 4).



Şekil 4: İmipramin ve Dantrolen Sodyum'un ZYT'nde immobilizasyon süresi üzerine etkisi. Değerler ort.±S.H.O olarak bildirilmiştir. \* =  $p < 0,001$ , (kontrol grubuyla karşılaştırıldığında)

#### 4.2 DANTROLLEN SODYUM'UN YÜLSELTİLMİŞ ARTI LABİRENT TESTİNDE AÇIK KOLA GİRİŞ SAYISI VE AÇIK KOLDA KALIŞ SÜRESİ ÜZERİNE ETKİSİ

İlaçların kaygı üzerine olan etkilerinin gösterilmesi amacıyla kullanılan (+) labirent testi değerlendirilirken 2 kritere bakılır:

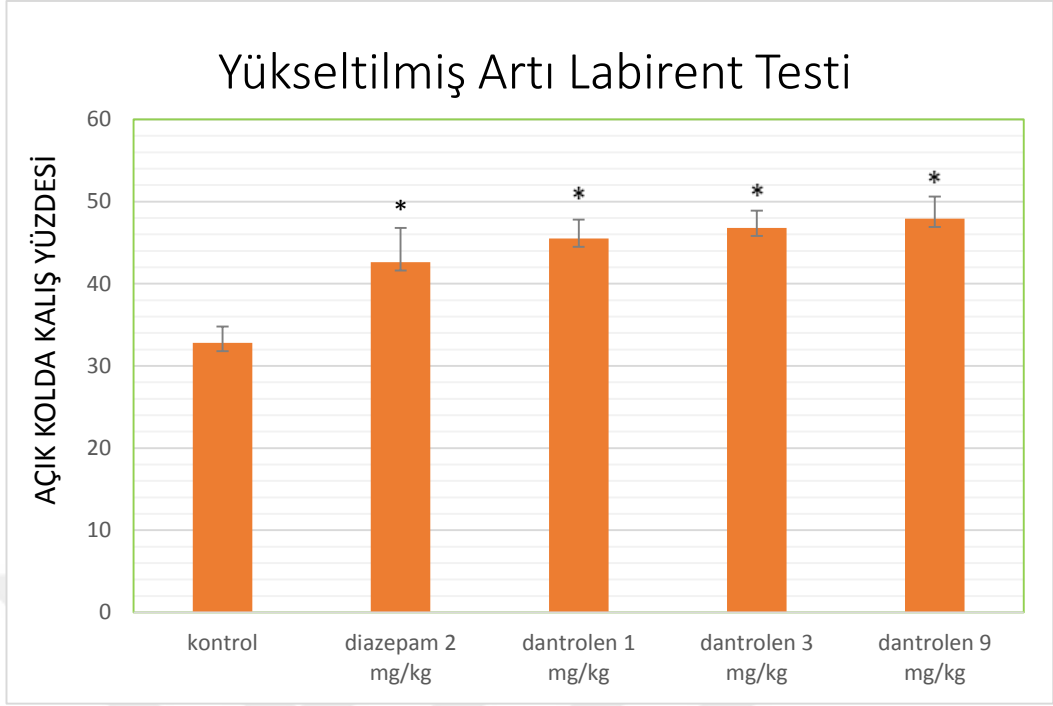
- 1) Deney hayvanının 5 dakikalık (300 sn) test süresince (+) labirent testinde açık kola giriş sayısının, toplam (açık+kapalı) kollara giriş sayısına oranının yüzdesi
- 2) Deney hayvanının (+) labirent testinde açık kollarda kalış süresinin, toplam deney süresine (5 dakika) oranının yüzdesi

Bulguların değerlendirilmesinde bu iki göstergenin aynı yönde değiştirilmesi ve bunlardan ikisinin veya birinin istatistiksel olarak anlamlı olması yeterli kabul edilmiştir. Bu testin kullanıldığı yayınlarda bu iki göstergeden herhangi biri ile elde edilen, istatistiksel olarak anlamlı bulgunun kaygı şiddetini yeterli ölçüde yansıtabileceği bildirilmiştir.

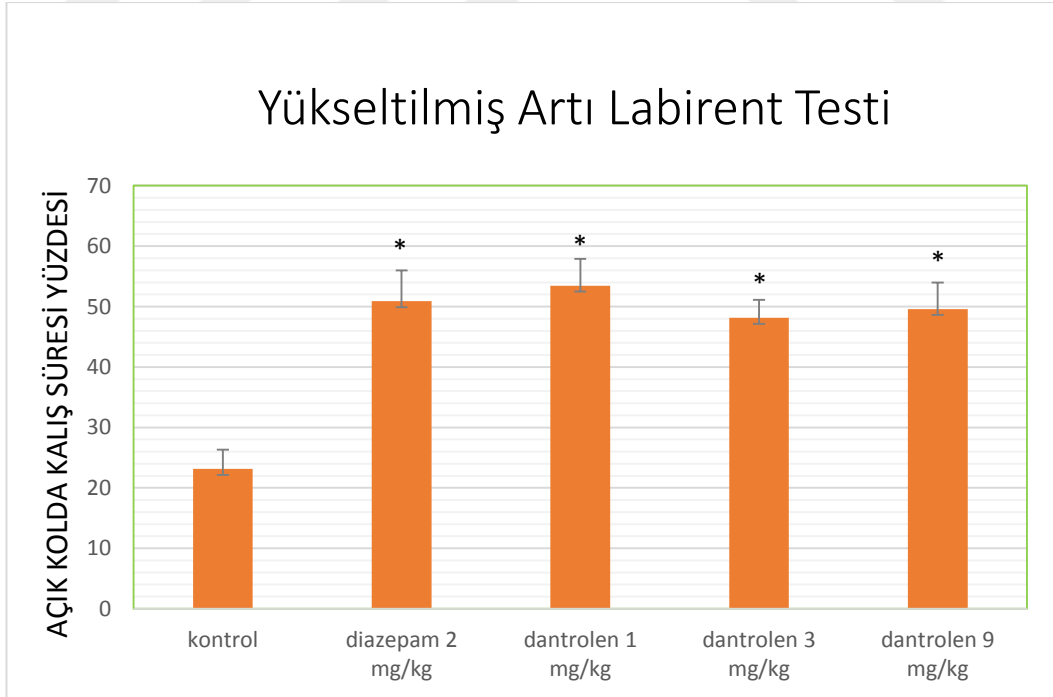
Farelerde ilaçların kaygı giderici etkilerinin gösterilmesi amacıyla kullanılan (+) labirent testinde referans ilaç olarak kullanılan diazepam, açık kola giriş sayısı ve açık kolda kalış süresi %'sini kontrol grubuna göre artırmıştır (sırasıyla  $p<0,01$  ve  $p<0,001$  şekil 5a,b). Bu sonuçlar, (+) labirent testinin kaygı düzeyini belirlemede güvenilir bir yöntem olduğunu ispat etmektedir.

Dantrolen soduyumun anksiyolitik etkisinin araştırıldığı (+) labirent testinde hayvanların 5 dakikalık test süresinde açık kola giriş sayısı yüzdesi  $F(49,4)=5,153$   $p<0,05$  bulunmuştur. (Şekil 5a) Açık kolda kalış süresi %'leri ise  $F(49,4)=8,916$   $p<0,0001$  bulunmuştur. (Şekil 5b) Dantrolen sodyum açık kola giriş sayısı %'sini anlamlı şekilde artırmıştır ( $p<0,01$  (şekil 5a) Açık kolda kalış süresi %'sini üç dozda da anlamlı şekilde arttırmıştır ( $p<0,001$ ). (Şekil 5b)





**Şekil 5a** : Diazepam ve Dantrolen Sodyum'un yükseltilmiş (+) labirent testinde açık kola giriş sayısı üzerine etkisi. Değerler ort. $\pm$ S.H.O olarak bildirilmiştir. \* =  $p < 0,01$  (kontrol grubuyla karşılaştırıldığında)



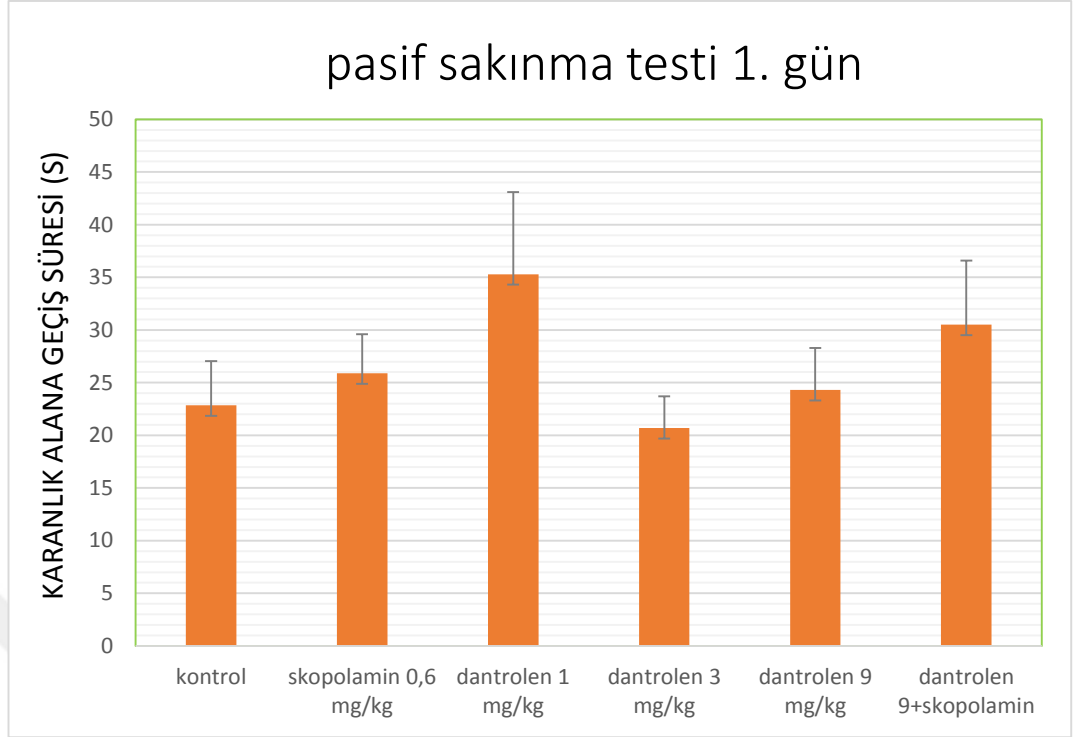
**Şekil 5b** : Diazepam ve Dantrolen Sodyum'un yükseltilmiş (+) labirent testinde açık kolda kalış süresi üzerine etkisi. Değerler ort. $\pm$ S.H.O olarak bildirilmiştir. \* =  $p < 0,001$ , (kontrol grubuyla karşılaştırıldığında)

### **4.3 DANTROLEN SODYUM'UN PASİF SAKINMA TESTİNDE ÖĞRENME VE BELLEK ÜZERİNE ETKİSİ**

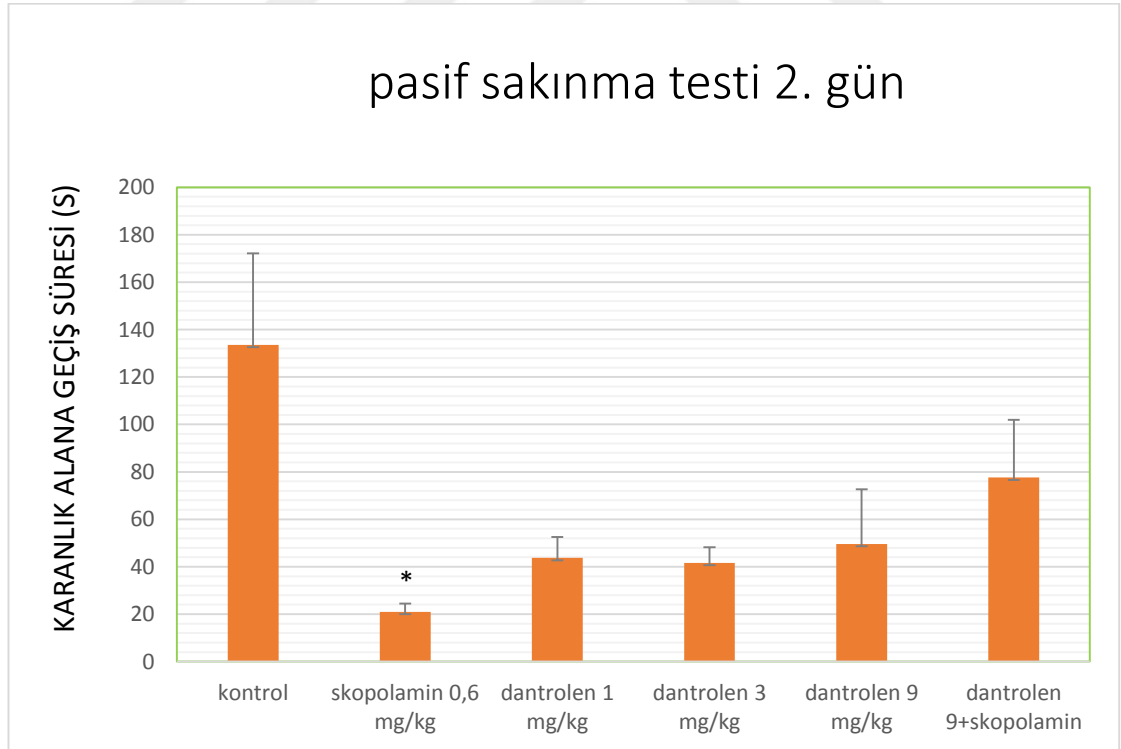
İlaçların öğrenme ve bellek üzerine olan etkilerinin gösterilmesi amacıyla yapılan testlerden biri de pasif sakinma testidir. Bu deney sırasında deney hayvanları ilk gün maksimum 300 saniyelik test süresince karanlık alana geçiş süreleri kaydedilir. İkinci gün ilaç uygulanan deney hayvanlarının karanlık alana geçiş süreleri karşılaştırılır. Eğer ikinci kez aydınlık bölme konulan hayvan elektrik şoku alacağını anlayarak karanlık bölme geçmez ise öğrenmiş kabul edilir.

Farelerde ilaçların öğrenme ve bellek üzerine etkilerinin gösterilmesi amacıyla kullanılan pasif sakinma testinde referans ilaç olarak kullanılan skopolamin, karanlık alana geçiş süresini kısaltmıştır. ( $p < 0,05$ ) Bu sonuç pasif sakinma testinin öğrenme ve bellek düzeyini belirlemede güvenilir bir yöntem olduğunu ispat etmektedir.

Dantrolen sodyumun öğrenme, bellek ve bozulmuş bellek üzerine etkisinin araştırıldığı pasif sakinma testinde hayvanların maksimum 5 dakikalık test süresinde karanlık alana geçiş süreleri kaydedilmiş olup, ilk gün ilaç uygulamayan gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır. ( $F(63,5)=1,025$ ;  $p > 0,05$ ) (Şekil 6a) İkinci gün ilaç uygulaması akabinde uygulanan deney sonuçlarına göre yalnızca skopolamin verilen grupla kontrol grubu arasında fark bulunmuştur. ( $F(63,5)=3.143$ ;  $p < 0,05$ ) (Şekil 6b)



**Şekil 6a:** Skopolamin ve Dantrolen Sodyum ve kombinasyon gruplarının pasif sakınma testi üzerine etkisi. Değerler ort.±S.H.O olarak bildirilmiştir.

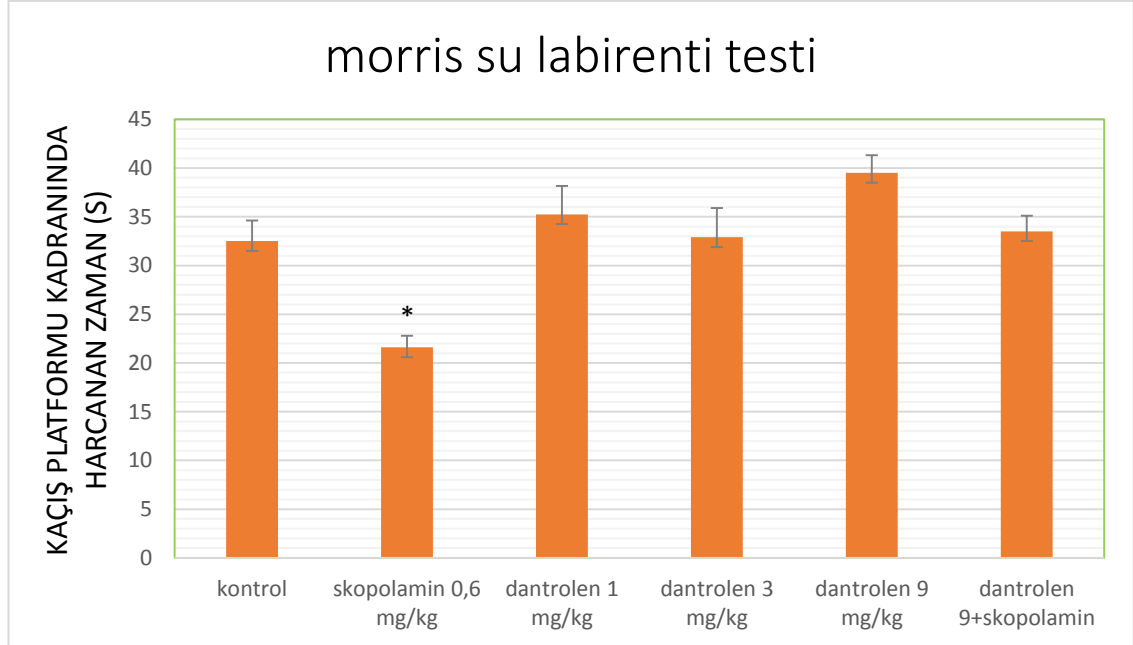


**Şekil 6b:** Skopolamin, Dantrolen Sodyum ve kombinasyon gruplarının pasif sakınma testi üzerine etkisi. Değerler ort.±S.H.O olarak bildirilmiştir. \*= p<0,05 (kontrol grubuyla karşılaştırıldığında)

#### 4.4 DANTROLEN SODYUM'UN MORRİS SU LABİRENTİ TESTİNDE ÖĞRENME VE BELLEK ÜZERİNE ETKİSİ

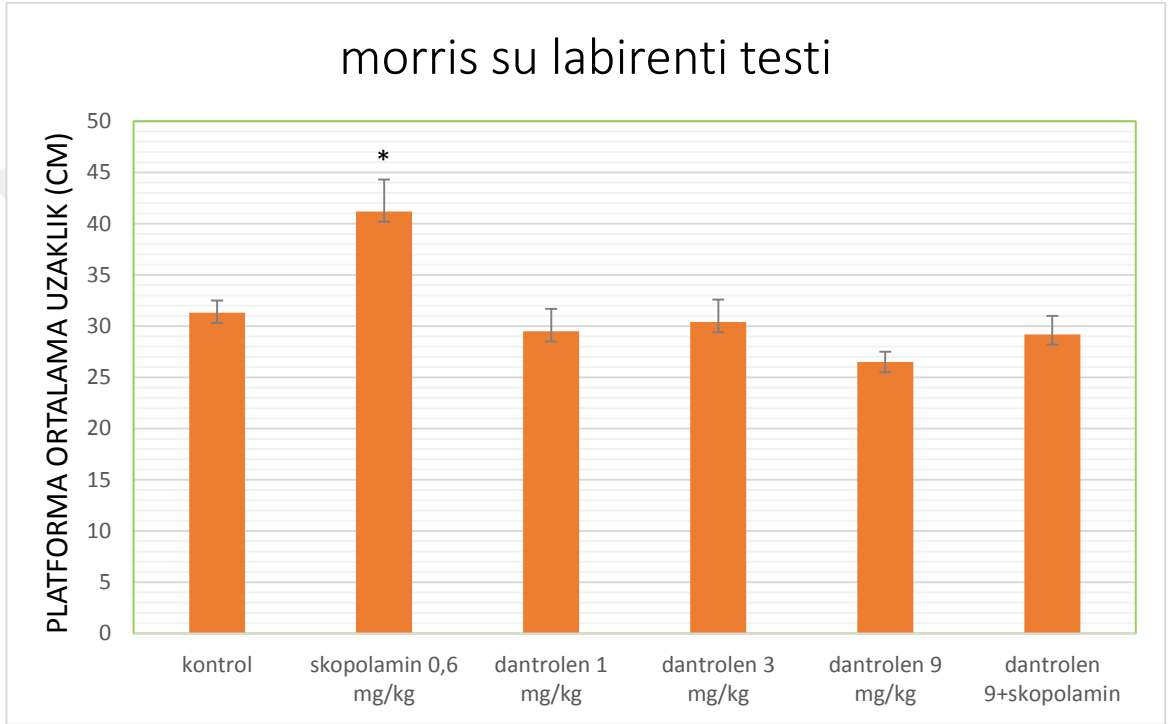
İlaçların öğrenme ve bellek üzerine olan etkilerini tespit etmeye yarayan diğer ve en önemli testlerden biri de Morris Su Labirenti testidir. Deney sırasında Etovizyon-XT video takip etme sistemi kullanılarak farelerin 1 dakika boyunca kaçış platformun olduğu kadranda harcadıkları zaman, platforma ortalama uzaklık ve ortalama hızları hesaplanmıştır. Belleği bozduğu bilinen skopoamin referans ilaç olarak kullanılmış ve kaçış platformunun olduğu kadranda harcanan zamanı azaltıp platforma olan ortalama uzaklığı arttırmıştır. Bu bulgular, kullandığımız yöntemin öğrenme ve bellek değerlendirmede güvenilir bir yöntem olduğunu kanıtlamaktadır.

Dantrolen soduyumun öğrenme bellek ve bozulmuş bellek üzerine etkisinin araştırıldığı Morris su labirenti testinde hayvanların 1 dakikalık test süresinde tüm hareketleri kamera yardımıyla kaydedilmiş olup, sonrasında yapılan istatistik çalışmasına göre kaçış platformunun olduğu kadranda harcanan zaman değerlendirmesinde skopolaminin kontrol grubuna göre anlamlı fark oluşturduğu bulunmuştur. (  $F(66,5)=5,730$   $p<0,05$ ) Ancak dantrolen sodyum her üç dozda ve skopolamin ile kombine olarak verildiği grupta kontrol grubuna göre fark yaratmamıştır. (Şekil 7a)



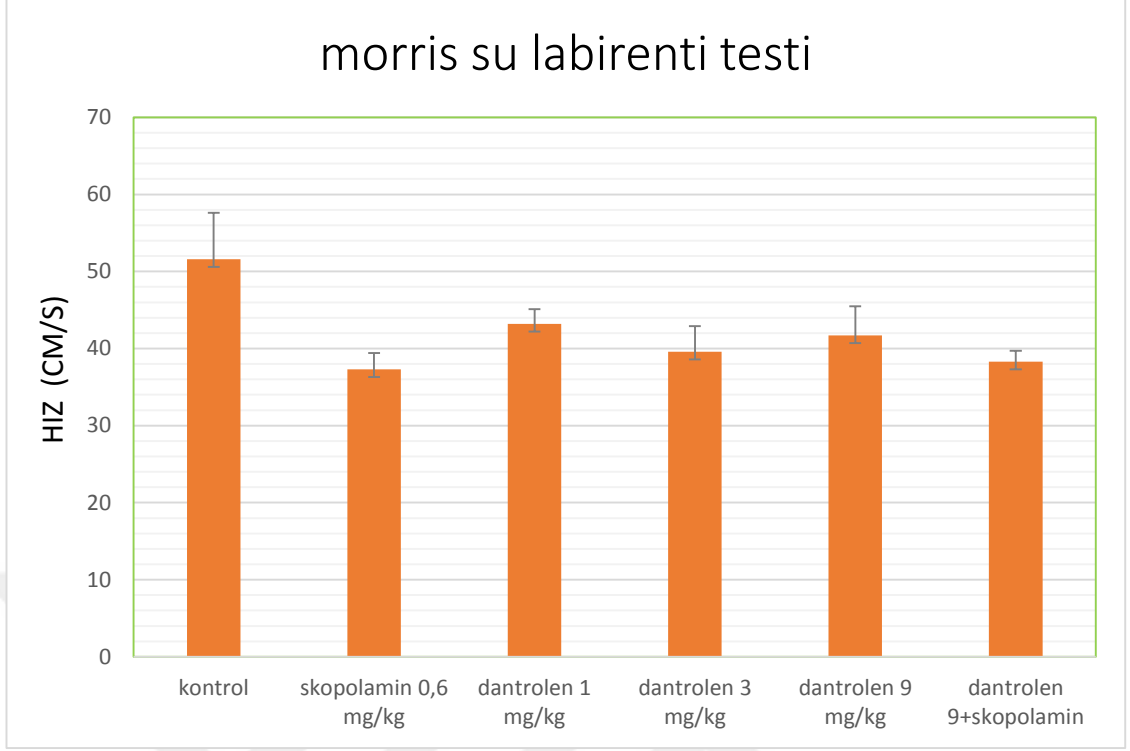
**Şekil 7a:** Skopolamin, Dantrolen Sodyum ve kombinasyon gruplarının morris su labirenti testi üzerine etkisi. Değerler ort.±S.H.O olarak bildirilmiştir. \*=  $p<0,05$  (kontrol grubuyla karşılaştırıldığında)

Morris su labirentinin bellek üzerine etkisini belirlemede değerlendirilen diğer parametre ratların platforma olan ortalama uzaklıklarıdır. Yapılan istatistik sonucunda skopolaminin kontrol grubuna göre platforma olan ortalama uzaklığı arttırdığı bulunmuştur. (  $F(66,5)=5,530$   $p<0,05$ ) Ancak dantrolen sodyum her üç doz grubunda ve skopolamin ile kombine olarak verildiği grupta kontrol grubuna göre anlamlı fark yaratmamıştır. (Şekil 7b)



**Şekil 7b:** Skopolamin, Dantrolen Sodyum ve kombinasyon gruplarının morris su labirenti testi üzerine etkisi. Değerler ort.±S.H.O olarak bildirilmiştir. \*=  $p<0,05$  (kontrol grubuyla karşılaştırıldığında)

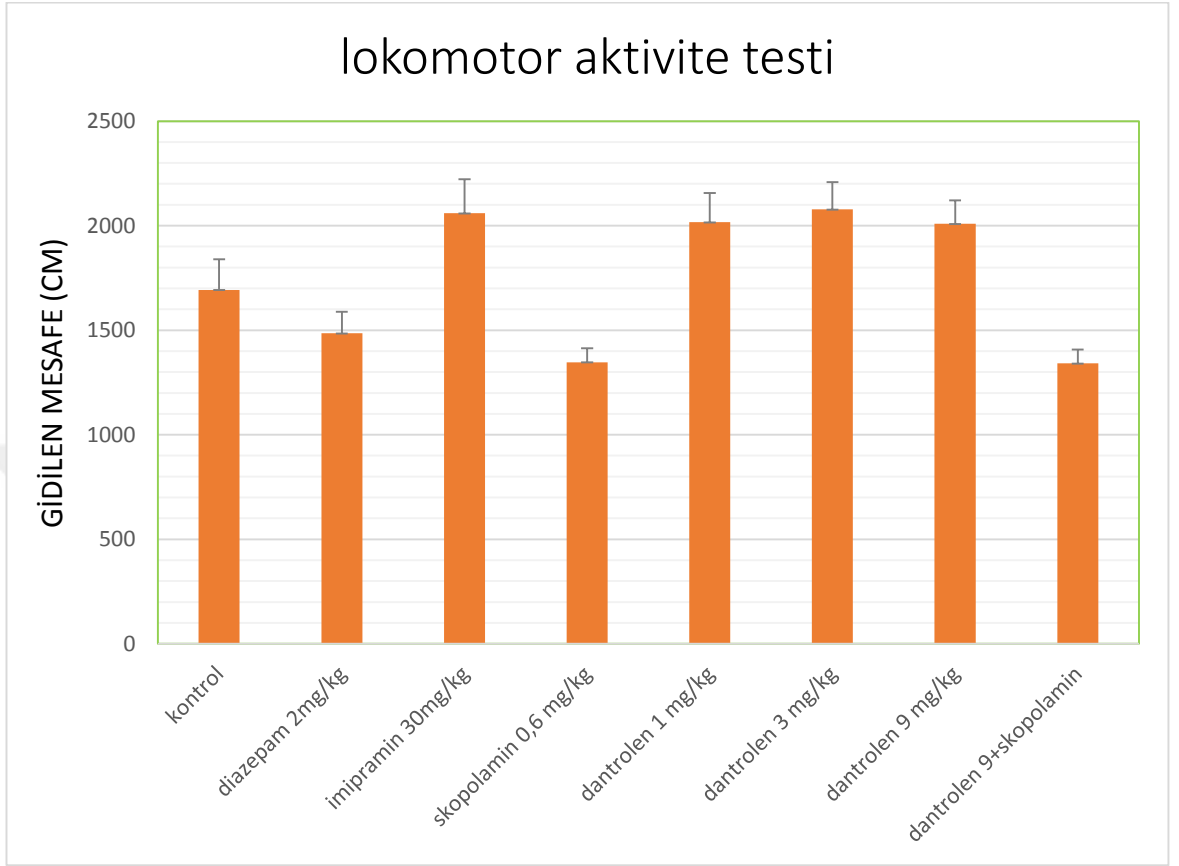
Deney öncesi lokomotor aktivite testi ile bilişsel faaliyetlerinde fark olmadığı tespit edilen farelerin Morris su labirenti testindeki ortalama hızlarının karşılaştırılması sonucunda da hiçbir grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. ( $F(66,5)=2,216$   $p>0,05$ ) (şekil:7c)



**Şekil 7c:** Skopolamin ve Dantrolen Sodyum ve kombinasyon gruplarının morris su labirenti testinde ortalama hız üzerine etkisi. Değerler ort.±S.H.O olarak bildirilmiştir.

#### 4.5 LOKOMOTOR AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ

İlaçların ZYT de saptanan kaygı giderici ve (+) labirent testinde saptanan antidepresan-benzeri etkileri, morris su labirenti tesinde ve pasif sakınma testinde bakılan öğrenme ve bellek etkilerinin lokomotor aktivitede oluşan değişikliklere bağlı olup olmadığını anlamak için fareler, bu testlerden önce lokomotor aktivite ölçme aletine konmuş ve 5 dakika süresince katettikleri mesafe ve total hareketleri Etovizyon-XT video takip etme sistemi ile kaydedilerek spontan lokomotor aktiviteleri ölçülmüştür. Yapılan istatistik sonucuna göre salin, dantrolen 1, 3 ve 9 mg/kg, diazepam 2 mg/kg, imipramin 30 mg/kg, skopolamin 0,6 mg/kg ve dantrolen 9 mg/kg ile kombine skopolamin 0,6 mg/kg dozlarında ilaçlar uygulanan ratlarda anlamlı fark tespit edilmemiştir. Bu deneyin sonucu olarak hayvanlar diğer deneylere katılmışlardır. ( $F(63,7)=7,270, p>0,05$ ) (şekil:8)



**Şekil 8:** salin, diazepam, imipramin, skopolamin, dantrolen ve kombinasyon gruplarının lokomotor aktivite testinde gidilen mesafe üzerine etkisi Değerler  $\text{ort.} \pm \text{S.H.O}$  olarak bildirilmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Yaklaşık yetmiş yıl önce iproniazid antidepresan olarak kabul edilen ilk molekül olarak keşfedilmiştir. 1954'te, tüberküloz hastalarının tedavilerine eklenerek kaygı giderici etki yaptığı görülmüştür. Bu sonuçlardan sonra, iproniazid ilk antidepresan ve monoamin oksidaz inhibitörü (MAO-I) ailesinin ilk üyesi olarak belirlenmiştir (Loomer, Saunders ve ark. 1957). Eş zamanlı olarak, imipramin de depresyon tedavisinde etkili bulunmuştur. Bu noktada tamamen yeni bir yaklaşım olan monoamin depresyon teorisi ortaya çıkmıştır. Günümüzde monoaminlerin ana rolü tartışılmamakla birlikte depresyonun patogenezi ve etiyojisini tam olarak tanımlanamamaktadır.

Depresyon klinik olarak farelerde çoğaltılamayan psikolojik, nöroendokrin ve somatik semptomların patolojik bir kompleksi olarak tanımlanmaktadır. Bu sebeple deneysel olarak oluşturulan hayvan depresyon modellerinin en güvenilir ve en düşük maliyetli olanlarının başında zorunlu yüzme testi gelmektedir (Holmes 2003). Biz de çalışmamızda bu sebeple dantrolen sodyumun antidepresan etkisini fareler üzerinde gözlemlemek için bu testi kullandık.

Zorunlu yüzme testinde farelerin immobilizasyon süresi antidepresan etkiyle ilişkilendirilmiştir. Hareketsizlik kaçınılmaz bir duruma adaptif bir cevap olarak görülebilir. Hareketsizliğin başlangıcı yorumlanması zor olsa bile, insanlardaki davranışsal umutsuzluğa yol açan strese yapısal benzerliği sebebiyle depresyon etiyojisine de ışık tutabilir (Geyer ve Markou 1995). Bilinen antidepresan ilaçların %94'ünün farelerde hareketsizlik süresini azalttığı gösterilmiş ve antidepresanları nöroleptik ve anksiyolitiklerden ayırdığı için antidepresanları tespit etmek amacıyla uygun bir model olduğu kanısına varılmıştır (Borsini ve Meli 1988). ZYT'nin ikinci bir özelliği, akut ilaç tedavilerinin bu modelde etkili olmasıdır. Bu olumlu özelliklerinin yanında testin duyarlılığı sudaki dalgalar, silindirin çapı, suyun derinliği, ilaç uygulaması ve test arasında geçen süre, suyun sıcaklığı, laboratuvar şartları, hayvanların yaşı ve cinsiyeti gibi çok sayıda parametreden etkilenmektedir. Cinsiyet üzerine yapılan çalışmalar erkek ve dişi farelerin farklı dozlarda ilaç uygulamasına karşı farklı duyarlılıkları olduğunu bu yüzden deneyde erkek farelerin kullanılmasının daha uygun olduğunu göstermiş ve östrojen döngüsünün antidepresan cevabı cinsiyete



bağlı olarak kısmi bir biçimde de olsa değiştirebileceği öngörülmüştür (Kokras, Antoniou ve ark. 2015). Biz de deneyimizde testin duyarlılığını korumak adına 8 haftalık sadece erkek fareler kullandık.

Dantrolen periferik etkili bir kas gevşetici olmakla birlikte santral sinir sistemi üzerinde uyuşukluk, baş dönmesi, baş ağrısı, sersemlik, sarhoşluk hissi ve sinirlilik gibi yan etkiler yaptığı bilinmektedir. Yüksek derecede lipofilik yapısı merkezi etki göstermesini kolaylaştırırken serotonin gibi depresyonda rolü bilinen reseptörler üzerine etkisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Antidepresan etkisini aydınlatmak amacıyla plandığımız çalışmamızda pozitif kontrol olarak kullandığımız imipraminin (30 mg/kg) farelerde immobilizasyon süresini anlamlı olarak kısalttığını ancak dantrolenin tüm dozlarda kontrol grubundan anlamlı olarak fark yaratmadığını tespit ettik. İstatistiki olarak anlamsız olmakla birlikte dantrolen tüm dozlarında salin grubuna göre immobilizasyon sürelerini arttırmıştır. Bu sonuçlar dantrolen sodyumun antidepresan etki oluşturmadığını göstermekle birlikte deney sırasında dantrolenin temel etkisiyle farelerde meydana gelen periferik kas gevşemesinin immobilize kalış süresinde artışa neden olabileceğini ve farelerin dar silindir içinde yüzme hareketlerini kısıtlayarak hareketsizlik sürelerini arttırma olasılığını da düşündürmüştür.

Sonuç olarak bulgularımız dantrolen sodyumun zorunlu yüzme testinde fareler üzerinde antidepresan etki oluşturmadığı ancak bu negatif görünen sonucun ilacın temel farmakodinamik etkisine bağlı olabileceği yönündedir.

Anksiyete, dünyadaki toplam nüfusun sekizde birini etkilediğinden psikofarmakoloji günden güne önemini artıran bir araştırma alanı olmuştur. Anksiyete bozukluklarının fiziksel belirtileri, vücuttaki hemen hemen her organ üzerinde etkili olan, adrenalin ve kortizol gibi stres hormonlarından kaynaklanmaktadır. Tedavi edilmeyen anksiyete bozuklukları, artmış kan basıncı, kalp çarpıntısı, göğüs ağrısı, hiperkapni, terleme, kas gerginliği, huzursuzluk, mide bulantısı ve ishal gibi birçok semptom ortaya çıkarabilir.

Psikopatoloji için kullanılan hayvan modelleri; genetik, çevresel ya da farmakolojik nedenlerin, belirli bir bozukluğu olan hastalara eşdeğer olan semptomları ortaya çıkaran sebeplerin çokluğunun analizinde paha biçilmez bir araç haline gelmiştir. YALT fare, kobay, hamster ve gerbil gibi türler için geliştirilen, anksiyete araştırmaları için en popüler davranış testlerinden biridir. Labirent yerden yüksektedir, böylece açık

kollar bilinmeyenlik, açıklık ve yükseklik unsurlarını birleştirir. YALT açık alanlara yönelimleri konusunda kemirgenlerin doğal olarak yoksunluğuna dayanmaktadır. Keşif ile yüksek açık alanlara yönelik isteksizlik arasında uyumsuzluk kullanılmakta ve keşif ile yaklaşım-kaçınma çatışmasının unsurlarını içermektedir. Bu nedenle, test genellikle koşulsuz bir şekilde kendiliğinden davranışsal çatışma modeli olarak anılır (Bourin 2015). Kafeslerinden alınıp test platformuna konulan fareler genellikle, kapalı kolları tercih edip, açık koldan kaçınma ile karakterize edilen bir davranış şekli gösterecektir. Bu eğilim anksiyolitikler tarafından bastırılır ve anksiyojenik ajanlar tarafından kuvvetlendirilir. Anksiyete ölçütleri, açık kollara girişlerin sayısının tüm kollara giriş sayısına bölümü ile elde edilen yüzde ve deney süresince açık kollarda harcanan zamanın yüzdesi olarak belirlenir.

Günümüzde kişilik araştırmacıları kaygı ve korkunun iki farklı davranış sistemi olduğunu kabul etmişlerdir (Depue ve Lenzenweger 2005). Korku sistemi anksiyolitik ilaçlara karşı duyarsızdır, anksiyete ise önleyici davranış ve gelişmiş risk değerlendirmesini içerir. Buna göre, kaygının temel özellikleri araştırma davranışını ve yenilik arayışını da artıran anksiyolitik ilaçlara karşı hassastır. Nörotransmitter düzeyinde yapılan çalışmalar Gama Amino Butirik Asid (GABA)-Benzodiazepin Reseptörü-Cl iyonofor kompleksi, noradrenerjik sistem ve serotonerjik sistemin hem normal hem de patolojik anksiyete oluşumunda ve sürdürülmesinde önemli rollere sahip olduğunu ortaya koymuştur. YALT'ndeki anksiyolitik benzeri etkilere duyarlılık ise, benzodiazepin ve GABA ile ilişkili bileşiklerle sınırlı kalmış ve noradrenerjik ve dopaminerjik mekanizmalara etki eden antidepresanlarla akut veya kronik olarak etki göstermemiştir (Borsini, Podhorna ve ark. 2002). Bu sebeple, testin pozitif kontrol ilacı olarak bizim de kullandığımız gibi diazepam tercih edilmektedir. GABA merkezi sinir sistemindeki en iyi bilinen inhibitör nörotransmitterdir. Merkezi sinir sistemindeki sinapsların yaklaşık %40'ında inhibisyondan sorumludur. GABA presinaptik ve postsinaptik bölgelerin her ikisinde de inhibitör etki oluşturabilmektedir. Postsinaptik bölgede birçok etkisini GABA-A reseptörü üzerinden göstermektedir. 1980'lerin başında yapılan çalışmalarla GABA reseptörlerinin benzodiazepin ve barbitürat gibi sedatif ve anksiyolitik etkili ilaçların etki ettiği reseptörlerle ve klorür iyonoforuyla beraber kompleks bir nöronlarda inhibisyondan sorumlu yapı oluşturduğunu ortaya çıkarmıştır (Braestrup ve Nielsen 1980, Olsen 1982). GABA

reseptör kompleksine bağlanan benzodiazepinler GABA'yı aktive ederler ve bunun sonucunda Cl kanalı açılır ve postsinaptik bölgeye çok sayıda klor iyonu geçerek inhibitör etkiler meydana getirir (Brick ve Erickson 1998). Bir benzodiazepin türeviden olan diazepam yaptığımız çalışmada da YALT'nde farelerin hem açık kola giriş sayı yüzdelerini hem de açık kollarda kalış sürelerini anlamlı şekilde artırdı. Dantrolen sodyumun 9 mg/kg dozu diazepam kadar olmak üzere tüm dozlarının farelerin açık kollara giriş sayısı yüzdesini anlamlı şekilde artırdığını; açık kollarda kalış sürelerini ise her üç dozda da diazepam kadar anlamlı olarak arttırdığını tespit ettik. Bu sonuçlar bize dantrolen sodyumun doğrudan veya dolaylı olarak anksiyolitik etkileri olduğunu düşündürmüştür.

Kalsiyumun anksiyete etiyolojisindeki rolü uzun yıllardır üzerinde durulan bir konudur. Kalsiyum kanal blokerleri kalsiyum metabolizmasını ve kalsiyumun taşınmasını yüksek derecede etkiler. Kalsiyum rolü için kanıtlar zayıf kalsa da kalsiyumu etkileyen ilaçlar anksiyete bozukluklarının tedavisinde faydalı olabilir. Verapamil, duygudurum bozukluklarını tedavi etmek için denenmiş ve tardiv diskinezili hastalarda etkili olduğu bulunmuştur (Höschl ve Kožený 1989). Diğer bir çalışmada farelerle yapılan YALT'nde diltiazem ve verapamilin anksiyolitik etkileri bulunmuştur (Krishna, Kumar ve ark. 2001). Bununla birlikte, anksiyete bozukluklarının tedavisinde kalsiyum kanal blokerlerinin kullanımı ile ilgili yayınların sayısı görece olarak azdır. Kalsiyum kanallarının P, Q, R, L, T ve N tipi olmak üzere genel olarak bilinen altı formu vardır. L tipi kalsiyum kanalları, en iyi bilinen ve özellikle hipertansiyon tedavisinde yaygın olarak kullanılan 1,4-dihidropiridinlerdir. Ancak L tipi kalsiyum kanallarının dört alt tipi olduğu ve bulunduğu dokulara göre spesifik işlevleri olabileceği ortaya çıkmıştır. Fare ön beyinindeki azalmış L2 ve 3 tipi kalsiyum kanal aktivitesi anksiyete benzeri davranışları arttırdığı bulunmuştur (Lee, Ra ve ark. 2012). Voltaj bağımlı kalsiyum kanallarından delta iki subuniti üzerinden etki ederek pregabalinin de yaygın anksiyete hastalığının tedavisinde kullanılabileceği bildirilmiştir (Wensel, Powe ve ark. 2012). T tipi kalsiyum kanal blokerleri ise, epilepsi, ağrı, obezite, uyku ve anksiyete açısından potansiyel terapötik hedefler olarak kabul edilir. T tipi kalsiyum kanallarının V3.2 olarak isimlendirilen izoformunun eksikliğinin farelerde anksiyeteyi arttırdığı gösterilmiştir (Gangarossa, Laffray ve ark. 2014). Dantrolen sodyumun ryanodin reseptörlerinin yanında L tipi kalsiyum

kanallarından kalsiyum akımını da inhibe ettiği bilinmektedir (Bannister 2013). Dantrolenin anksiyolitik etkisinin kısmen kalsiyum kanallarını bloke etmesiyle ilgili olması muhtemeldir.

Stresli bireylerin kan serumlarında anksiyete veya depresyondan muzdarip olmayanlardan daha az düzeyde antioksidan seviyelerine sahip oldukları görülmüştür (Saki, Bahmani ve ark. 2014). Hücrenin mitokondrisinde yer alan oksidatif fosforilasyon, aerobik solunumda ATP'nin ana kaynağıdır. Bu önemli sürecin dezavantajı serbest oksijen ve azot radikallerinin üretilmesidir. Tipik olarak hücresel solunumun zararlı bir bileşeni olarak tarif edilmesine rağmen, yaralanma veya enfeksiyona hücresel cevaplar, sinyal ve mitoz gibi normal fizyolojik süreçlerde yer alırlar. Bununla birlikte, oksidatif stres, aerobik metabolizma sırasında üretilen oksidan maddeler ile nötralizasyon işlevini yerine getiren antioksidan savunma sistemi arasında denge değiştirildiğinde ortaya çıkar. Bu hem enzimatik hem de enzimatik olmayan bir dizi koruyucu mekanizma içindeki disfonksiyonun göstergesidir. Süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimatik sistemde bulunur. Enzimatik olmayan sistem ise alfa-tokoferol (E vitamini), askorbik asit (C vitamini), flavonoidler, polifenol bileşikler ve mineraller (örneğin, çinko, bakır ve selenyum) gibi bileşikler içerir (Halliwell 2007). Uzun süreli veya yüksek oksidatif stres durumunun sonucu, apoptoz ile sonuçlanan başlıca hücresel makro molekül gruplarına zarar verir. Beynin vücutta en yüksek oksijen tüketim oranlarından birine sahip organ olduğu göz önüne alındığında, antioksidan savunma mekanizmaları ve oksidatif stresdeki en küçük dengesizlikler nöronlara zarar verebilir (Kasote, Hegde ve ark. 2013). Fosfodiesteraz 2 (PDE2) inhibisyonunun, farelerde oksidatif strese bağlı anksiyeteyi önleyebildiği bulunmuştur (Masood, Huang ve ark. 2009).

Dantrolenin linoleik asit peroksidasyonunda inhibisyon yaparak oksidatif stresi azalttığı bulunmuştur (Büyükokuroğlu, Gülçin ve ark. 2001). Yine dantrolen uygulamasının, lipid peroksidasyonunu önlediği, malondialdehit seviyesini azaltarak antioksidan enzimlerden glutatyon peroksidazı arttırarak antioksidan aktiviteyi arttırdığı tespit edilmiştir (Büyükokuroğlu, Cemek ve ark. 2008). Antioksidan terimi geniş bir kavramı temsil etmekle birlikte dantrolenin anksiyolitik etkisinin oluşumunda oksijen radikallerini azaltması ve/veya antioksidan enzim düzeylerini arttırması mekanizmalarıyla katkı yapması kuvvetle olasıdır.

Nöroanatomik alanlar ve dokularla ilgili yapılan çalışmalar raphe çekirdekleri, hipokampus ve amigdalanın anksiyete oluşumunun nörolojik merkezleri olduğunu düşündürmektedir (Nunes-de-Souza, Canto-de-Souza ve ark. 2002). Bu alanlarda sitokinlerin, özellikle de IL-2 etkisinin anksiyete ve benzeri davranışların oluşumunda kritik bir yere sahip olduğu dile getirilmiştir (Pawlak, Schwarting ve ark. 2005, Karrenbauer, Ho ve ark. 2009). Dantrolen sodyumun anksiyolitik etkisi sözü edilen nöroanatomik yapılar üzerindeki nöroplastisite üzerine etkisi ve sitokinler üzerine yapılacak daha detaylı çalışmalarla aydınlatılması muhtemeldir.

Öğrenme, Amerikan Psikoloji Derneği'nin tanımına göre beceri ve bilginin edinilmesi iken, bellek edindiğimiz şeyin ifadesidir. Bugüne kadar oldukça fazla sayıda çalışma öğrenme ve belleğin mekanizmasını aydınlatmak amacıyla yapılmıştır. Şüphesiz bu çalışmalardan en önemlilerinden biri Ivan Pavlov tarafından yapılmıştır. Yemek verilmeden önce zil sesiyle uyarılan köpeklerin daha sonra yemek ile zil sesi arasındaki ilişkiyi öğrenerek salya salgılamaya başlamaları klasik koşullanma deneyi olarak adlandırılmıştır. Edward Thorndike tarafından ise edimsel koşullanmanın ilk tanımı yapılmıştır (Thorndike 2017). Daha sonra ise yazarın kendi adıyla anılan 'Skinner Kutusu' ile edimsel koşullanmanın ilkeleri belirlenmiştir (McLeod 2015). Öğrenmenin sadece gözlemlerle de olabileceği ödül mekanizmasından bağımsız olarak gerçekleşebileceği ise Albert Bandura tarafından gösterilmiştir (Bandura 2017). Tarihsel bu süreçte birçok teori ve farklı mekanizma ortaya atılmakla birlikte öğrenme asosiyatif ve nonasosiyatif olarak ana iki başlığa bölünmüştür. Bellek ise kısa süreli ve uzun süreli bellek olarak iki temel bölümde ele alınmıştır.

Gerçekten tehdit edici uyaranlara veya durumlara karşı sakinme korkunun temel bir özelliğidir. Aynı zamanda, gerçek tehdit yokluğunda aşırı derecede sakinme, bireylerin yaşam kalitelerini ciddi şekilde bozabilir ve anksiyeteye yol açabilir (Barlow 2004). Bu gibi durumlarda, kaçınma adaptasyon değerini kaybeder ve tepkiye dönüşebilir. Sakınmada adaptif bozukluk olması geniş bir zihinsel hastalık yelpazesinin merkezi bir özelliğidir (Amir, Kuckertz ve ark. 2013). Örneğin, Obsesif Kompulsif Bozukluğu olan kişiler, kirletici maddelerle temas potansiyelinin yüksek olduğu durumlardan sakinme eğilimindedir, Travma Sonrası Stres Bozukluğu hastaları ise tekrarlayan anılarından sakınmakta ve sosyal fobikler grup toplantılarına katılmaktan kendilerini sakınmaktadırlar (Schneier, Rodebaugh ve ark. 2011). Zihinsel

bozuklukların teşhis kitabının en son baskısı (DSM-5; Amerikan Psikiyatri Birliği, 2013), daha önce sadece korku ile ilgili olan birçok tanı kriterinde sakınmayı da koymuştur. Son yıllarda davranışsal sinirbilim araştırmaları, sakınma ile öğrenmenin sinirsel bağıntıları hakkındaki görüşümüzü büyük ölçüde genişletmiştir. Örneğin, insanlarda bu şekilde öğrenmenin amigdala aktivasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Phelps ve LeDoux 2005). Kemirgen çalışmalarında, amigdala, infralimbik prefrontal korteks ve prefrontal striatal devrelerin sakınma ile öğrenmede rol oynadığı gösterilmiştir (Moscarello ve LeDoux 2013, Bravo-Rivera, Roman-Ortiz ve ark. 2014). Bu gibi bulgular Pavlov benzeri öğrenme süreçlerinin sakınma davranışını nasıl şekillendirdiği konusundaki anlayışımızı daha da arttırmaya yardımcı olmaktadır. Bizim de uyguladığımız Pasif sakınma testi iki bölmeli deney mekanizmasında farenin aydınlık bölgeden karanlık bölmeye geçmeyi tercih etmesi, akabinde ayak şoku almasıyla sonuçlanır. Yirmi dört saat sonra tekrar açık bölmeye konulan farelerin karanlık alana geçmekten sakınmayı öğrenmesi beklenir. Test edilen ilaç veya madde, skopolaminle oluşturulan amneziyi hafifletiyorsa yaşlanmaya bağlı demanstaki bilişsel fonksiyonları iyileştirebileceği düşünülmektedir (Misane ve Ögren 2003). Skopolamin, kan-beyin bariyerini aşarak SSS'ne girer ve muskarinik sinapslarda salıverilen asetilkoline karşı, muskarinik reseptörler için yarışır (Farmakoloji 2002). Skopolamin, aynı zamanda presinaptik otoreseptör olarak görev yapan M<sub>2</sub> reseptörünü de bloklar. M<sub>2</sub> reseptörü blokajı, ACh'nin sinaptik aralığa salıverilmesini artırır. Skopolaminin sıçanlarda, EEG'de yavaş delta ve teta dalgalarını güçlendirdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Delta ve teta dalgalarının artışı, yaşlılık ve Alzheimer hastalığında görülmektedir (Ebert ve Kirch 1998).

Çalışmamızda hem pasif sakınma hem de Morris su labirenti testinde bu sebeplerle belleği bozmak için skopolamin kullandık. Morris su labirenti testi sakınma ile öğrenmekten farklı bir mekanizmayı mekânsal ve uzaysal öğrenme ve belleği irdelemektedir. Morris su labirenti hipokampal sinaptik plastisite ve NMDA reseptör fonksiyonu ile güçlü bir şekilde ilişkili olan sağlam ve güvenilir bir testtir (Vorhees ve Williams 2006). Tüm yöntemlerde olduğu gibi, bu testin de güçlü ve zayıf yönleri vardır. Ancak, algılanan zayıflıklarının çoğu, çok küçük labirentlerin kullanılmasından, deney protokol hatalarından, mekânsal faktörlerden ve hayvanlarının özelliklerinden (cinsiyet, tür, yaş, beslenme durumu, strese maruz kalma

veya enfeksiyon gibi) kaynaklanmaktadır. Çalışmalar farelerin, su tankının duvarından açılma ve mesafeyi kullanarak konumlarının yerini öğrenebildiklerini göstermiştir (Maurer ve Derivaz 2000). Sıklıkla nörobilişsel bozukluklar için kemirgen modellerinin onaylanmasında ve olası nörobilişsel tedavilerin değerlendirilmesinde kullanılmıştır (D'Hooge ve De Deyn 2001). Bu veriler, uygun bir şekilde yapılandırıldığında ve kullanıldığında, uygun kontrol prosedürlerinin dahil edilmesiyle Morris su labirentinin mekansal ve uzaysal öğrenme belleğin araştırılması için güçlü bir teknik olduğunu göstermektedir.

Pasif sakınma deneyinin sonuçları bize skopolaminin belleği bozduğunu birkez daha gösterirken skopolaminle birlikte dantrolen 9 mg/kg uygulanan grubun kontrol grubundan bir farkının olmadığını gösterdi ancak kontrol grubuna kıyasla dantrolen 1, 3, 9 mg/kg verilen gruplarda da anlamlı fark oluşturmadığını göstermiştir. Öğrenme ve belleği değerlendirmek amacıyla kullanılan en yaygın fare deneyi olan Morris su labirentinin sonuçları da pasif sakınma deneyiyle örtüşmekte olup kaçış platformunun olduğu kadranda harcanan zaman bulgularına göre skopolaminle bozulan bellek dantrolen 9 mg/kg dozu ile düzeltilmiş olduğunu tespit ettik. Bu sonuçlar bize dantrolenin mevcut öğrenme ve bellek kapasitesini arttırmaya bile bozulmuş olan belleği geri getirme amacıyla kullanılabilir etkili bir ajan olduğunu düşündürmüştür. Morris su labirenti ve pasif sakınma testlerinin, koşullu sakınma ile öğrenme ve uzaysal ve mekânsal öğrenme gibi iki farklı mekanizmayla öğrenme ve belleği test ettiği de göz önüne alınırsa dantrolen bu amaçla kullanılabilir geniş etkili bir ilaç olma potansiyeli taşımaktadır. Dantrolenin bozulmuş belleği düzeltici etkisi daha önce yapılan çalışmalar göz önüne alınarak ilacın nöroplastisite üzerine olumlu etkileri ve nöroprotektif etkilerine bağlı olduğunu düşündürmüştür. Son dönem dantrolen ile yapılan çalışmalar da bu etkileri ve bu etki mekanizmaları üzerinden Alzheimer, Parkinson ve benzeri hastalıklar üzerinde kullanılabilirliği yönündedir.

Ölümcül ilerleyici bir hastalık ve en yaygın demans türü olan Alzheimer hastalığı dünya çapında yaklaşık 35 milyon kişiyi tehdit etmektedir (Kantarci 2014). Bu hastalığın, ilerleyen yaşla birlikte oranı artmakta ve 65 yaşın üzerindeki nüfusun %6'sını etkilediği tahmin edilmektedir. Hastalar hafıza kaybı ve bilişsel işlevlerin azalmasından muzdariptir ve ortalama tanıdan dokuz yıl sonra ölümler (Joseph, Peng

ve ark. 2014). Alzheimer oluşumunda amiloid kaskadı hipotezi hastalığın patogenezi çalışmalarında en önemli fikir olarak kabul görmüştür. Amiloid beta (A $\beta$ ) peptidi adı verilen bir amiloid öncü protein (APP) metabolizmasının bir ürününü içeren senil plakların birikmesi ile karakterize edilir (Pimplikar 2009). A $\beta$  nöronal disfonksiyon ve ölümü tetikleyen başlangıç olayıdır. Histopatolojik ve genetik kanıtlar, bu birikimi belirten amiloid kaskadı hipotezinin temelini oluşturur. Şimdiye dek, alzheimer alanındaki araştırma odağı, A $\beta$  peptidi oluşumu ve etki mekanizmaları üzerine olmuştur ancak peptidin birikimini neyin tetikleyip neyin tetiklenmediği net değildir. Bununla birlikte, amiloid kaskadı hipotezi hala alzheimer tedavileri araştırmasına hâkim durumdadır. Ne yazık ki, geçen on yıllara rağmen amiloid plağı hedefleyen moleküllerin hiçbiri başarılı olamamıştır.

Nöroinflamasyon ve katekolaminerjik beyin sapı çekirdeklerinin dejenerasyonu, Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda erken yaşta ortaya çıkar. Nöroinflamasyon, L tipi gerilime bağlı kalsiyum kanalları (L VDCC'ler) ve ryanodin reseptörleri (RyR'ler) yoluyla nöronal kalsiyum homeostazını değiştirebilen proinflamatuvar sitokinlerin ve reaktif oksijen türlerinin seviyelerini artırır. Substantia nigra (SN) ve locus coeruleus (LC)'deki kalsiyum kanal aktivitesindeki değişiklikler, bu alanlarda dejenerasyona neden olarak davranışsal eksikliklere neden olabilir.

LC dejenerasyonu, Parkinson hastalığında ve Alzheimer hastalığında temel olarak nigra pars compacta (SNpc) ve hipokampal hasardan önce ortaya çıkmaktadır (Simic, Stanic ve ark. 2009). Kronik nöroinflamasyon alzheimer ve parkinson hastalıklarının erken döneminde mikroglia aktivasyonunun artışına bağlı olarak görünür (Iannaccone, Cerami ve ark. 2013). SNpc ve LC nöroinflamasyona açıktır. Major histo-uyumluluk kompleksi I (MHC-I), santral sinir sisteminde çok düşük seviyelerde eksprese edilir, bununla birlikte, nöroinflamasyon SN ve LC nöronlarının varlığında, MHC-I'yi spesifik olarak artırır.

Kalsiyum, sinir sistemindeki en önemli ikinci habercilerden biridir. Öğrenme ve hafıza, sinaptik aktivite ve nörotransmitter etkisi, eksitotoksisite ve hücre ölümü dahil olmak üzere çok çeşitli hücre fonksiyonlarda önemli bir rol oynar (Berridge 2010). Nöronal kalsiyum akımı, gerilime bağlı kalsiyum iyonu kanalları (VDCC), dahil olmak üzere farklı kalsiyum kanalları tarafından düzenlenir. Kalsiyum endoplazmik



retikulumun primer hücre içi depolarından da salınabilir. Nöronlar, hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarındaki değişikliklere karşı oldukça hassastır. Yetersiz hücre içi kalsiyum içeriği nöronların anormal şekilde çalışmasına yol açarken, aşırı kalsiyum seviyeleri hücre ölümüne neden olur. Bu nedenle, kalsiyum seviyesinde küçük dalgalanmalar bile hücrelerin fizyolojik işlevlerini önemli ölçüde değiştirebilir (Popugaeva ve Bezprozvanny 2014). 1987 yılında, Dr. Zaven Khachaturian, Alzheimer kalsiyum hipotezini; hücre içi Ca homeostazındaki bozulmanın, Alzheimer için nihai ortak sonuca yol açtığını öne sürdü (Khachaturian 1987). Alzheimer kalsiyum hipotezinin temeli; hücre içi Ca uyarılması ile homeostazın bozulmasının sonucu olarak hem hafızadaki progresif gerilemeye hem de nöronal hücre apoptosisindeki artışa katkıda bulunmasıdır (Verkhatsky ve Toescu 1998). Ayrıca, Ca seviyeleri normal fizyolojik aralığı aştığında kalsiyum kaynaklı sinyal sistemi, yaşlanan sinir sisteminde değişen nöronal işlevsellik ve/veya hücre ölümü görülür. Alzheimerdaki kalsiyum düzensizliğinden sorumlu olarak önerilen mekanizmalar ryanodin reseptörlerinin ve İnositol-1,4,5-trisfosfat reseptörleri (InsP3R)'nin aşırı aktive edilmesini içerir (Daschil, Obermair ve ark. 2013).

Ailesel Alzheimer ile ilişkili presenilin-1 (PS1) ve presenilin-2 (PS2) 'deki mutasyonlar RYR'lerin ekspresyonunu ve aktivasyonunu ve ayrıca InsP3R'lerin aktivasyonunu önemli ölçüde artırır, ER'den aşırı kalsiyum salınmasına ve anormal sitozolik  $Ca^{+2}$  konsantrasyonuna yol açar (Supnet ve Bezprozvanny 2011). RYR1, serebellar purkinje hücrelerinden eksprese edilir (Bruno, Huang ve ark. 2012). RYR2, koku alma sinir tabakasında, dentat gyrus, serebral korteks, serebellar granül hücreler, fasiyal çekirdek ve motor trigeminal çekirdekte bulunur (Hwang, Nitu ve ark. 2014). RYR3 ise hipokampal piramidal hücre katmanı, dorsal talamus ve kaudat putamende yüksek oranda eksprese edilir (Liu, Supnet ve ark. 2014). Beyinde RYR'lerin aşırı çoğalması ve ER'den aşırı  $Ca^{+2}$  salınımı, alzheimerda erken patojenik faktörler olarak kabul edilen presinaptik boşluklardan, nöronal ölümden, nörodejenerasyondan ve glutamat salınımından sorumludur. Bu nedenle, RYR'lerin inhibisyonu yoluyla aşırı kalsiyum salınımının azaltılması, hastalığın patolojisini hafifletmek ve bellek ve bilişsel problemleri iyileştirmek için makul bir yoldur (Goussakov, Chakroborty ve ark. 2011).

Dantrolenin birçok yan etkisi merkezi sinir sisteminde ortaya çıkmasına rağmen, merkezi sinir sistemindeki oluşturabileceği pozitif etkiler yeterince araştırılmamıştır. Son yıllarda RYR'ler üzerine etki ederek dantrolenin Alzheimer patolojisinde yararlı etkilerine değinilmiştir. Bu konuda transgenik Alzheimer fare modeliyle yapılan çalışmada (3xTg-A) dantrolenin etiyoloji ve patoloji üzerindeki terapötik etkisi araştırılmış kontrol grubu ve 2 ila 13 aylık 3xTg-A farelerine sürekli dantrolen uygulanmış. Kontrole kıyasla, dantrolen ile muamele edilmiş 3xTg-A fareleri hafıza tutma ve çalışma hafızasında önemli bir gelişme sergilemiş ve dantrolen ile muamele edilmiş 3xTg-A fareleri, kontrol fareleri ile aynı hafızayı ve öğrenme yeteneğini gerçekleştirmiştir. Ayrıca, motor fonksiyonlarında tüm gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır (Peng, Liang ve ark. 2012). Dantrolen ile muamele edilmiş 3xTg-A farelerinde hipokampustaki amiloid plakları, karşılık gelen kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azalmıştır. Sonuçlar amiloid patolojisinin başlamasından önce erken ve kronik dantrolen tedavisinin, hipokampustaki amiloid plak yükünü ve 3xTg-A farelerinde bellek eksikliklerini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir.

Diğer bir çalışmada subkronik (4 hafta) olarak dantrolen verilen 3xTg-A farelerde RYR2 seviyeleri ve IP3R aracılı  $Ca^{+2}$  salımının dantrolen tedavisi ile normal seviyelere geldiği görülmüştür (Chakroborty, Briggs ve ark. 2012). Benzer bir çalışmada yaşlı 3xTg-A farelerinde dantrolen ile uzun süreli tedavi uygulaması sonucu, hipokampal bölgede hücre içi amiloid, kontrol grubuna kıyasla %76'ya kadar önemli ölçüde azalmış farelerin hiçbirinde intraneuronal amiloid tespit edilmemiş ve herhangi bir deney grubundaki farelerin hipokampusunda tanımlanabilir hücre dışı amiloid plakları bulunmamış (Wu, Yang ve ark. 2015). Bununla birlikte, bu etkilerin, amiloid üretiminde bir inhibisyondan mı yoksa artmış amiloid klirensinden mi kaynaklandığı açık değildir.

Hücre dışı amiloid plaklarının, bilişsel işlev bozukluğunun veya alzheimerda bir yan ürünün ana nedeni olup olmadığı tartışmalıdır. Alzheimer hastalarındaki plakların sayısı bilişsel performansla ilişkili görünmemektedir. Buna karşın, toplam amiloid yükü, daha iyi bir belirteç olarak görünmektedir (Cummings ve Cotman 1995).

RYR'lerin sayısının ve işlevinin, yalnızca alzheimer modelindeki farelerin farklı beyin bölgelerinde değil, aynı zamanda hastalarda da anormal bir şekilde arttığı

gösterilmiştir. Bu nedenle, RYR'lerin aşırı çoğalmasının tersine çevrilmesi, Alzheimer hastalığının tedavisi için yeni bir terapötik hedef olabilir.

Dantrolen'in çeşitli nörodejeneratif hastalıkların hayvan modellerinde nöroprotektif olduğu gösterilmiştir (Chen, Tang ve ark. 2008, Chen, Wu ve ark. 2011, Oulès, Del Prete ve ark. 2012). Bu nedenle, dantrolen teorik olarak Alzheimerdeki kalsiyum disregülasyonunu ve nöropatolojiyi tersine çeviren ve bilişsel işlev bozukluğunu geri kazandıran potansiyel bir ilaçtır. Dantrolenin bu nöroprotektif etkileri in vitro ve in vivo modellerde doza bağımlı olduğu görülmüştür (Wei, Leeds ve ark. 2000, Inan ve Wei 2010). Dantrolenin kan beyin bariyerinden kolayca geçip geçmeyeceği konusu tartışılmakla birlikte sınırlı bir dereceye kadar geçtiği öne sürülmüştür (Peng, Liang ve ark. 2012). Bu nedenle, gelecekte Alzheimer tedavisi için dantrolen geliştirmek adına önemli bir strateji, beyindeki etkilerini en üst düzeye çıkarmak ve herhangi bir yan etkiyi en aza indirmek için periferdeki konsantrasyonunu düşürürken beyindeki konsantrasyonunu artırmak olacaktır. Alzheimer için yeni ilaç tedavisi geliştirmek adına bir başka strateji de önemli çevresel yan etkiler olmaksızın, ryanodin reseptörlerini seçici olarak inhibe eden ve beyne kolayca giren yeni ilaçlar geliştirmek olacaktır.

Nöroinflamasyon ve katekolaminerjik beyin sapı çekirdeklerinin dejenerasyonu, Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda erken yaşta ortaya çıkar. Nöroinflamasyon, L tipi gerilime bağlı kalsiyum kanalları (L-VDCC'ler) ve ryanodin reseptörleri (RyR'ler) vasıtasıyla nöronal kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) homeostazını değiştirebilen proinflamatuvar sitokinlerin ve reaktif oksijen türlerinin seviyelerini artırır.

Hipoksi ve iskemi esnasında aşırı presinaptik glutamat salınımı meydana gelir (Katchman ve Hershkowitz 1993). Serebral iskemi, uyarıcı amino asitlerin hücre dışı konsantrasyonunu önemli ölçüde artırabilir ve hücre dışı alandan kalsiyumun hücre içine akmasıyla sonuçlanan nöronal zar depolarizasyonuna neden olabilir (Benveniste, Jørgensen ve ark. 1988). Dantrolen hücre içi depolardan kalsiyum mobilizasyonunun yarısını azaltmaktadır. Dantrolen intraserebroventriküler enjeksiyon ile iskemik olarak enjekte edildiği fare beynindeki ortak karotid arterin iki taraflı tıkanmasının neden olan nöronal ölümü geciktirdiğini bildirilmiştir (Mitani, Yanase ve ark. 1993). Hipotalamik nöron hücrelerinin dantrolen ile ön tedavi edilmesinin sitozolik kalsiyumdaki artışı ve

bu hücrelerin ER Ca<sup>2+</sup>-ATPase enzimine maruz kalmasından sonra gözlemlenen nöronal ölümü önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (Wei ve Perry 1996).

Dantrolen, sıçanlarda hipoksiye ve glukoz yoksunluğuna maruz kalan nöronal hücre hatlarında geçici iskemiyle indüklenen nöronal hücre ölümünü iyileştirmiştir (Wang, Nguyen ve ark. 2002). Ayrıca, iskemiden sonra enfarktüs boyutu, erişkinlerde ve neonatal sıçanlarda reperfüzyon sırasında dantrolen enjeksiyonu ile azaltılmıştır (Gwak, Park ve ark. 2008). Dantrolenin, tavşanlarda aort iskemisi/reperfüzyon (aort cerrahi müdahalesi sonrasında spinal kord hasarını taklit eden) modeliyle nöronal hasara karşı koruyucu olup olmadığı araştırılmış ve ameliyattan 30 dakika önce intraperitoneal olarak uygulanıp omurilik bölümlerinde damarsal proliferasyon, kanama, ödem ve nöron kaybını azalttığı görülmüştür (Kocogullari, Emmiler ve ark. 2008). Dantrolen'in, farelerin izole serebral arterlerinde serotonin kaynaklı vazokonstriksiyona karşı gerilime bağlı bir L-tipi Ca kanal blokleri olan nimodipin ile sinerjistik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Salomone, Soydan ve ark. 2009). Dantrolen kainik asit ile indüklenen nöronal hücre ölümünü serebellar granül hücre kültürlerinde önlediği gösterilmiştir (Popescu, Oprica ve ark. 2002). Gine domuzlarında intravitreal dantrolen ve nimodipin uygulaması retina ganglion hücrelerini retina hasarına karşı korumuştur (Kaya, Tunç ve ark. 2003).

Kalsiyum akışı, epileptik nöronal olayların ilk aşaması için gereklidir. Epilepsi hayvan modellerinden elde edilen sonuçlar kalsiyum antagonistlerinin yeni bir antikonvülsan ajan sınıfı olabileceği ihtimalini ortaya koymuştur (Ku<sup>3</sup>ak, Sobaniec ve ark. 2004). Bir metabotropik reseptör agonisti, 1S, 3R-ACPD tarafından indüklenen nöbetler, yüksek doz dantrolen ile tamamen yok edilmiş ayrıca beyin hacminde artışı önemli ölçüde azaltmıştır (McDonald, Fix ve ark. 1993). Dantrolenin elektro şok ile indüklenmiş status epileptikustan sadece 30 dakika sonra tatbik edildiğinde, tüm hipokampusa, koruyucu olduğu bildirilmiştir (McDonald, Fix ve ark. 1993). Dantrolen hipokampal bölgede de nöbet kaynaklı hücre ölümünü önlemiş bu sonuçlar ER depolarından kalsiyum salımının da nöbet kaynaklı hücre ölümüne katkıda bulunduğunu göstermiştir (Pelletier, Wadia ve ark. 1999). Ayrıca, dantrolen, konvülsif nöbetlere duyarlı bir mutant suşu olan EL faresinde nöbet aktivitesini önemli ölçüde azaltmıştır (Nagatomo, Hashiguchi ve ark. 2001).

Oksidatif stres, nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde iyi bilinen bir başka nedensel faktördür (Jomova, Vondrakova ve ark. 2010). Kanıtlar, reaktif oksijen ve azot radikallerinin aşırı üretilmesinin, nörodejeneratif bozuklukları olan hastalarda proteinlere, lipidlere ve nükleik asitlere zarar verdiğini gösterir. Beyin dokusu, yüksek oksijen tüketimi, demir içeriği, çoklu doymamış yağ asitleri ve düşük antioksidan kapasitesi nedeniyle oksidatif strese karşı oldukça hassastır. Ayrıca, hipokampus ve amigdala oksidatif hasara karşı daha hassastır ve aşırı oksidatif stres, hipokampal sinaptik plastisitesini azaltarak hafıza eksikliğine yol açabilir (Serrano ve Klann 2004). Morris su labirentinin sorguladığı mekânsal öğrenmenin antioksidan aktivite ile ilişkili olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (Shen, Wei ve ark. 2001). Ayrıca belleği bozma amacıyla kullandığımız skopolamin de hipokampus dokusunda serbest oksijen radikallerini arttırmaktadır (Lee, Kim ve ark. 2015). Dantrolenin bilinen antioksidan etkisinin; skopolaminle bozulan belleği düzeltmede ve nöroplastisite üzerine olumlu katkılarından sorumlu olması olasıdır. Dantrolenin hipokampus ve beyin dokusundaki oksijen ve azot radikalleri üzerine etkisi, sinir sistemindeki antioksidan aktivitesi konularında çalışmalar yapılması bahsedilen etkisini açıklamada faydalı olacaktır.

Nöroinflamasyon da bilişsel bozulmaya ve nörodejeneratif hastalıklara katkıda bulunan önemli bir faktördür (Allison ve Ditor 2014). Akut nöroinflamasyon vücutta koruyucu bir rol oynamasına rağmen, kronik nöroinflamasyon sinir dokusuna ve nöronlara zarar verir. Farelerde lipopolisakkarit tarafından indüklenen nöroinflamasyonun Morris su labirenti testinde ve pasif sakınma testinde mekânsal öğrenmeyi azalttığı bulunmuştur (Zhao, Bi ve ark. 2019). Diğer bir çalışmada antiinflamatuvar olan deksametazonun sevofluranın farelerde yol açtığı kısa ve uzun süreli hafıza bozukluğunu Morris su labirentinde düzelttiği bulunmuştur (Karaman, Karaman ve ark. 2017). Hipokampus kesisinden in vivo olarak yapılan çalışmada nöroinflamasyonun, hipokampustaki presinaptik protein olan sinaptofizini azaltarak mikrogliaların anahtar rol oynadığı mekânsal öğrenme kaybına yol açtığı sonucuna varılmıştır (Sheppard, Coleman ve ark. 2018). Dantrolen sodyumun antiinflamatuvar etkisinin olabileceğine dair hayvan çalışmaları mevcuttur (Büyükokuroğlu 2002). Aynı zamanda dantrolenin oligodendrosit ölümünü azalttığına dair kanıtlar da vardır (Alberdi, Sánchez-Gómez ve ark. 2005). Bu veriler göz önüne alındığında dantrolenin

bozulmuş belleği düzeltici etkisinde santral sinir sisteminde nöroinflamasyonu önlemesinin de kısmen payı olabilir.

Sonuç olarak dantrolen sodyumun riyanodin reseptörleri üzerinden kas gevşetici etkisi bilinmektedir. Bununla birlikte yaptığımız çalışmada dantrolenin santral sinir sistemi üzerindeki etkilerini aydınlatmaya çalıştık. Davranış deneylerinin sonucu olarak anksiyolitik etkinliği olduğunu ve bozulmuş belleği düzelttiğini tespit ettik. Bu sonucumuz yapılan güncel çalışmalarla uyum sağlamaktadır. Dantrolenin bu etkinliği nöroprotektif ve sitoprotektif etkilerini beyinde de gösterdiğini düşündürmüştür. Ayrıca temel etki yeri olan riyanodin reseptörlerinin kalsiyum metabolizması üzerine olan etkisi de bu olumlu sonuçlara yol açtığı kanaatindeyiz. Dantrolen sodyumun 30 kat daha hidrofilik formu olan azumolen yeni bir molekül olarak üretilmiş ve aynı farmakodinamik etkiye sahip olduğu görülmüştür (Sudo, Carmo ve ark. 2008). Dantrolen sodyumun göstermiş olduğu etkilerinin yanında santral sisteme daha spesifik formlarının üretilmesi çağımız için çok önemli olan Alzheimer, Parkinson, ALS gibi hastalıkların tedavisinde ve anksiyetenin yol açtığı psikiyatrik bozuklukların düzeltilmesinde fayda sağlayacağı düşüncesindeyiz. Bu sebeplerle ileride bu konuda daha detaylı çalışmalar yapılması faydalı olacaktır.

## KAYNAKÇALAR

- Ago, Y., K. Takahashi, S. Nakamura, H. Hashimoto, A. Baba and T. Matsuda (2007). "Anxiety-like and exploratory behaviors of isolation-reared mice in the staircase test." *Journal of pharmacological sciences*: 0705300006-0705300006.
- Alberdi, E., M. V. Sánchez-Gómez and C. Matute (2005). "Calcium and glial cell death." *Cell calcium* 38(3-4): 417-425.
- Allen, G. C., C. B. Cattran, R. G. Peterson and M. Lalande (1988). "Plasma levels of dantrolene following oral administration in malignant hyperthermia-susceptible patients." *Anesthesiology* 69(6): 900-904.
- Allison, D. J. and D. S. Ditor (2014). "The common inflammatory etiology of depression and cognitive impairment: a therapeutic target." *Journal of neuroinflammation* 11(1): 151.
- Amano, T., T. Fukami, T. Ogiso, D. Hirose, J. P. Jones, T. Taniguchi and M. Nakajima (2018). "Identification of enzymes responsible for dantrolene metabolism in the human liver: a clue to uncover the cause of liver injury." *Biochemical pharmacology* 151: 69-78.
- Amir, N., J. M. Kuckertz and S. Najmi (2013). "The effect of modifying automatic action tendencies on overt avoidance behaviors." *Emotion* 13(3): 478.
- Anderson, I. and E. Jones (1976). "Porcine malignant hyperthermia: effect of dantrolene sodium on in-vitro halothane-induced contraction of susceptible muscle." *Anesthesiology* 44(1): 57-61.
- Andersson, D. C., M. J. Betzenhauser, S. Reiken, A. Umanskaya, T. Shiomi and A. R. Marks (2012). "Stress-induced increase in skeletal muscle force requires protein kinase A phosphorylation of the ryanodine receptor." *The Journal of physiology* 590(24): 6381-6387.
- André, N., M. Boyer, C. Coze, J. Delorme, A. Rome, J. C. Gentet and J. L. Bernard (2006). "Can dantrolene contribute to methotrexate toxicity?" *Annals of Pharmacotherapy* 40(9): 1695-1696.
- Andrews, L., A. Muzumdar and A. Pinkerton (1975). "Hallucinations associated with dantrolene sodium therapy." *Canadian Medical Association Journal* 112(2): 148.
- Arantes, R., J. Tejada, G. G. Bosco, S. Morato and A. C. Roque (2013). "Mathematical methods to model rodent behavior in the elevated plus-maze." *Journal of neuroscience methods* 220(2): 141-148.
- Ashton, J. C. (2011). "Emerging treatment options for spasticity in multiple sclerosis—clinical utility of cannabinoids." *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease* 1: 15.
- Aslan, A., M. Cemek, M. E. Buyukokuroglu, K. Altunbas, O. Bas, Y. Yurumez and M. Cosar (2009). "Dantrolene can reduce secondary damage after spinal cord injury." *European Spine Journal* 18(10): 1442-1451.
- Azari, L. M., V. S. Sheehan, J. C. Sachdev and T. S. Jones (2012). "Dantrolene sodium for the treatment of aldesleukin-induced rigors in a melanoma patient." *Annals of Pharmacotherapy* 46(5): e11.
- Baddeley, A. (2012). "Working memory: theories, models, and controversies." *Annual review of psychology* 63: 1-29.
- Bandura, A. (2017). *Psychological modeling: Conflicting theories*, Transaction Publishers.
- Bannister, R. A. (2012). "Dantrolene-Induced Inhibition of Skeletal L-Type Current Requires RyR1 Expression." *BioMed research international* 2013.
- Bannister, R. A. (2013). "Dantrolene-Induced Inhibition of Skeletal L-Type Ca<sup>2+</sup>." *BioMed research international* 2013.
- Barlow, D. H. (2004). *Anxiety and its disorders: The nature and treatment of anxiety and panic*, Guilford press.

Barr, A. M., A. P. Zis and A. G. Phillips (2002). "Repeated electroconvulsive shock attenuates the depressive-like effects of d-amphetamine withdrawal on brain reward function in rats." *Psychopharmacology* 159(2): 196-202.

Başar, K. and A. Ertuğrul (2005). "Depresyon araştırmalarında kullanılan hayvan modelleri." *Klinik Psikiyatri Dergisi* 8(3): 123-134.

Benveniste, H., M. Jørgensen, N. Diemer and A. Hansen (1988). "Calcium accumulation by glutamate receptor activation is involved in hippocampal cell damage after ischemia." *Acta neurologica Scandinavica* 78(6): 529-536.

Berridge, M. J. (2010). "Calcium hypothesis of Alzheimer's disease." *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 459(3): 441-449.

Bibancos, T., D. Jardim, I. Aneas and S. Chiavegatto (2007). "Social isolation and expression of serotonergic neurotransmission-related genes in several brain areas of male mice." *Genes, Brain and Behavior* 6(6): 529-539.

Blanchard, R. J., M. Yang, C.-I. Li, A. Gervacio and D. C. Blanchard (2001). "Cue and context conditioning of defensive behaviors to cat odor stimuli." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 25(7-8): 587-595.

Bomberg, H., M. Glas, V. Groesdonk, M. Bellgardt, J. Schwarz, T. Volk and A. Meiser (2014). "A novel device for target controlled administration and reflection of desflurane—the Mirus™." *Anaesthesia* 69(11): 1241-1250.

Borsini, F. and A. Meli (1988). "Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity?" *Psychopharmacology* 94(2): 147-160.

Borsini, F., J. Podhorna and D. Marazziti (2002). "Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants?" *Psychopharmacology* 163(2): 121-141.

Bourin, M. (2015). "Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective." *Dialogues in clinical neuroscience* 17(3): 295.

Braestrup, C. and M. Nielsen (1980). "Multiple benzodiazepine receptors." *Trends in Neurosciences* 3(12): 301-303.

Brandom, B. and M. Larach (2002). "The North American Malignant Hyperthermia Registry." Reassessment of the safety and efficacy of Dantrolene. *Anesthesiology* 96: A1199.

Brandom, B. W., M. G. Larach, M.-S. A. Chen and M. C. Young (2011). "Complications associated with the administration of dantrolene 1987 to 2006: a report from the North American Malignant Hyperthermia Registry of the Malignant Hyperthermia Association of the United States." *Anesthesia and analgesia* 112(5): 1115.

Bravo-Rivera, C., C. Roman-Ortiz, E. Brignoni-Perez, F. Sotres-Bayon and G. J. Quirk (2014). "Neural structures mediating expression and extinction of platform-mediated avoidance." *Journal of Neuroscience* 34(29): 9736-9742.

Brick, J. and C. K. Erickson (1998). *Drugs, the brain, and behavior: The pharmacology of abuse and dependence*, Haworth Medical Press.

Bruno, A. M., J. Y. Huang, D. A. Bennett, R. A. Marr, M. L. Hastings and G. E. Stutzmann (2012). "Altered ryanodine receptor expression in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease." *Neurobiology of aging* 33(5): 1001. e1001-1001. e1006.

Bulos, E. M., R. L. H. Pobbe and H. Zangrossi Jr (2015). "Behavioral consequences of predator stress in the rat elevated T-maze." *Physiology & behavior* 146: 28-35.

Buyukokuroglu, M. E., S. Taysi, M. Buyukavci, R. Memisogullari, F. Ozabacigil and E. Bakan (2007). "Dantrolene: in doxorubicin toxicity." *Asian Journal of Chemistry* 19(5): 4035.

Büyükokuroğlu, M., I. Gülçin, M. Oktay and O. Küfrevioğlu (2001). "In vitro antioxidant properties of dantrolene sodium." *Pharmacological Research* 44(6): 491-494.

Büyükokuroğlu, M. E. (2002). "Anti-inflammatory and antinociceptive properties of dantrolene sodium in rats and mice." *Pharmacological research* 45(6): 455-460.



Büyükokuroğlu, M. E., M. Cemek, M. Tosun, Y. Yürümez, O. Baş and Y. Yavuz (2008). "Dantrolene may prevent organophosphate-induced oxidative stress and muscle injury." *Pesticide biochemistry and physiology* 92(3): 156-163.

Büyükokuroğlu, M. E., S. Taysi, M. Buyukavci and E. Bakan (2004). "Prevention of acute adriamycin cardiotoxicity by dantrolene in rats." *Human & experimental toxicology* 23(5): 251-256.

Büyükokuroğlu, M. E., S. Taysi, F. Polat and F. Göçer (2002). "Mechanism of the beneficial effects of dantrolene sodium on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats." *Pharmacological research* 45(5): 421-425.

Campos, A. C., M. V. Fogaca, D. C. Aguiar and F. S. Guimaraes (2013). "Animal models of anxiety disorders and stress." *Brazilian Journal of Psychiatry* 35: S101-S111.

Chakraborty, S., C. Briggs, M. B. Miller, I. Goussakov, C. Schneider, J. Kim, J. Wicks, J. C. Richardson, V. Conklin and B. G. Cameransi (2012). "Stabilizing ER Ca<sup>2+</sup> channel function as an early preventative strategy for Alzheimer's disease." *PloS one* 7(12): e52056.

Checketts, M. and R. White (1993). "Avoidance of intermittent positive pressure ventilation in tetanus with dantrolene therapy." *Anaesthesia* 48(11): 969-971.

Chen, K. H., L. Y. Chuah, S. K. Sim and M. W. Chee (2010). "Hippocampal region-specific contributions to memory performance in normal elderly." *Brain and cognition* 72(3): 400-407.

Chen, X., T.-S. Tang, H. Tu, O. Nelson, M. Pook, R. Hammer, N. Nukina and I. Bezprozvanny (2008). "Deranged calcium signaling and neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 3." *Journal of Neuroscience* 28(48): 12713-12724.

Chen, X., J. Wu, S. Lvovskaya, E. Herndon, C. Supnet and I. Bezprozvanny (2011). "Dantrolene is neuroprotective in Huntington's disease transgenic mouse model." *Molecular neurodegeneration* 6(1): 81.

Chung, C.-Y., C.-L. Chen and A. M.-K. Wong (2011). "Pharmacotherapy of spasticity in children with cerebral palsy." *Journal of the Formosan Medical Association* 110(4): 215-222.

Craft, J. J., N. H. Goldberg, M. Lim, E. Landsberger, P. Mazel, F. P. Abramson, A. L. Stolte, J. M. Braswell and J. P. Farina (1988). "Cardiovascular effects and placental passage of dantrolene in the maternal-fetal sheep model." *Anesthesiology* 68(1): 68-72.

Cryan, J. F., A. Markou and I. Lucki (2002). "Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs." *Trends in pharmacological sciences* 23(5): 238-245.

Cummings, B. J. and C. W. Cotman (1995). "Image analysis of  $\beta$ -amyloid load in Alzheimer's disease and relation to dementia severity." *The Lancet* 346(8989): 1524-1528.

D'Hooge, R. and P. P. De Deyn (2001). "Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory." *Brain research reviews* 36(1): 60-90.

Daschil, N., G. J. Obermair, B. E. Flucher, N. Stefanova, B. Hutter-Paier, M. Windisch, C. Humpel and J. Marksteiner (2013). "Ca V1. 2 Calcium Channel Expression in Reactive Astrocytes is associated with the Formation of Amyloid- $\beta$  Plaques in an Alzheimer's Disease Mouse Model." *Journal of Alzheimer's Disease* 37(2): 439-451.

de Carvalho Correia, A. C., P. C. B. Silva and B. A. da Silva (2012). "Malignant hyperthermia: clinical and molecular aspects." *Brazilian Journal of Anesthesiology* 62(6): 820-837.

Depue, R. A. and M. F. Lenzenweger (2005). "A neurobehavioral dimensional model of personality disturbance." *Major theories of personality disorder* 2: 391-453.

Dykes, M. H. (1975). "Evaluation of a muscle relaxant: dantrolene sodium (Dantrium)." *Jama* 231(8): 862-864.

Dziubina, A., K. Szmyd, M. Zygmunt, J. Sapa, M. Dudek, B. Filipek, A. Drabczyńska, M. Załuski, K. Pytka and K. Kieć-Kononowicz (2016). "Evaluation of antidepressant-like and

anxiolytic-like activity of purinedione-derivatives with affinity for adenosine A2A receptors in mice." *Pharmacological Reports* 68(6): 1285-1292.

Ebert, U. and W. Kirch (1998). "Scopolamine model of dementia: electroencephalogram findings and cognitive performance." *European journal of clinical investigation* 28(11): 944-949.

Ekstrom, A. D. and C. Ranganath (2018). "Space, time, and episodic memory: The hippocampus is all over the cognitive map." *Hippocampus* 28(9): 680-687.

El Yacoubi, M., S. Bouali, D. Popa, L. Naudon, I. Leroux-Nicollet, M. Hamon, J. Costentin, J. Adrien and J.-M. Vaugeois (2003). "Behavioral, neurochemical, and electrophysiological characterization of a genetic mouse model of depression." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(10): 6227-6232.

Ellis, K. and J. Carpenter (1974). "Mechanism of control of skeletal-muscle contraction by dantrolene sodium." *Archives of physical medicine and rehabilitation* 55(8): 362-369.

Ellis, K. and F. Wessels (1978). "Muscle relaxant properties of the identified metabolites of dantrolene." *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 301(3): 237-240.

Emin Büyükkuroğlu, M., S. Taysi, M. Koç and N. Bakan (2003). "Dantrolene protects erythrocytes against oxidative stress during whole-body irradiation in rats." *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease* 21(2): 127-131.

F Dulhunty, A., M. G Casarotto and N. A Beard (2011). "The ryanodine receptor: a pivotal Ca<sup>2+</sup> regulatory protein and potential therapeutic drug target." *Current drug targets* 12(5): 709-723.

Farmakoloji, K. O. T. (2002). "10. baskı." Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık: 916-994.

Fernandes, C., D. Azevedo, J. Gomes, B. Gonçalves, G. Coelho, J. Vasconcelos and J. Garcia (2007). Malignant hyperthermia in a liver transplant patient: a case report. *Transplantation proceedings*, Elsevier.

Flewellen, E. and T. Nelson (1985). "Intravenous dantrolene pharmacokinetics in malignant hyperthermia suspect patients." *Anesthesiology* 63(3): A300.

Fricker, R. M., K. H. Hoerauf, J. Drewe and H. G. Kress (1998). "Secretion of dantrolene into breast milk after acute therapy of a suspected malignant hyperthermia crisis during cesarean section." *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 89(4): 1023-1025.

Frye, C. A., S. M. Petralia and M. E. Rhodes (2000). "Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ -THP." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 67(3): 587-596.

Gallagher, M., R. Burwell and M. Burchinal (2015). "Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze." *Frontiers in behavioral neuroscience* 8: 92.

Gangarossa, G., S. Laffray, E. Bourinet and E. Valjent (2014). "T-type calcium channel Cav3.2 deficient mice show elevated anxiety, impaired memory and reduced sensitivity to psychostimulants." *Frontiers in behavioral neuroscience* 8: 92.

Gawel, K., K. Labuz, E. Gibula-Bruzda, M. Jenda, M. Marszalek-Grabska, J. Filarowska, J. Silberring and J. H. Kotlinska (2016). "Cholinesterase inhibitors, donepezil and rivastigmine, attenuate spatial memory and cognitive flexibility impairment induced by acute ethanol in the Barnes maze task in rats." *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 389(10): 1059-1071.

Gelenberg, A. J. and D. C. Poskanzer (1973). "The effect of dantrolene sodium on spasticity in multiple sclerosis." *Neurology* 23(12): 1313-1313.

Geller, I. and J. Seifter (1960). "The effects of meprobamate, barbiturates, d-amphetamine and promazine on experimentally induced conflict in the rat." *Psychopharmacologia* 1(6): 482-492.

Gepdi' remen, A., M. E. n. Büyükokuroğlu and S. Düzenli (2009). "Dantrolene Exerts Protective Activity in Double and Triple Combination with Nimodipine, Ruthenium Red and Basilene Blue in Bilirubin-Induced Neurotoxicity in Cell Culture of Rats." *International Journal of Neuroscience* 119(10): 1602-1614.

Geyer, M. A. and A. Markou (1995). "Animal models of psychiatric disorders." *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*: 787-798.

Ghafouri, S., Y. Fathollahi, M. Javan, A. Shojaei, A. Asgari and J. Mirnajafi-Zadeh (2016). "Effect of low frequency stimulation on impaired spontaneous alternation behavior of kindled rats in Y-maze test." *Epilepsy research* 126: 37-44.

Glass, A. and A. Hannah (1974). "A comparison of dantrolene sodium and diazepam in the treatment of spasticity." *Spinal Cord* 12(3): 170.

Golini, L., C. Chouabe, C. Berthier, V. Cusimano, M. Fornaro, R. Bonvallet, L. Formoso, E. Giacomello, V. Jacquemond and V. Sorrentino (2011). "Junctophilin 1 and 2 proteins interact with the L-type Ca<sup>2+</sup> channel dihydropyridine receptors (DHPs) in skeletal muscle." *Journal of biological chemistry* 286(51): 43717-43725.

Gonsalves, S. G., D. Ng, J. J. Johnston, J. K. Teer, P. D. Stenson, D. N. Cooper, J. C. Mullikin and L. G. Biesecker (2013). "Using exome data to identify malignant hyperthermia susceptibility mutations." *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 119(5): 1043-1053.

Goussakov, I., S. Chakroborty and G. E. Stutzmann (2011). "Generation of dendritic Ca<sup>2+</sup> oscillations as a consequence of altered ryanodine receptor function in AD neurons." *Channels* 5(1): 9-13.

Grippo, A. J., T. G. Beltz and A. K. Johnson (2003). "Behavioral and cardiovascular changes in the chronic mild stress model of depression." *Physiology & behavior* 78(4-5): 703-710.

Grunau, B. E., M. O. Wiens and J. R. Brubacher (2010). "Dantrolene in the treatment of MDMA-related hyperpyrexia: a systematic review." *Canadian Journal of Emergency Medicine* 12(5): 435-442.

Gurrera, R. J. (2002). "Is neuroleptic malignant syndrome a neurogenic form of malignant hyperthermia?" *Clinical neuropharmacology* 25(4): 183-193.

Gwak, M., P. Park, K. Kim, K. Lim, S. Jeong, C. Baek and J. Lee (2008). "The effects of dantrolene on hypoxic-ischemic injury in the neonatal rat brain." *Anesthesia & Analgesia* 106(1): 227-233.

Halliwel, B. (2007). *Biochemistry of oxidative stress*, Portland Press Limited.

HARRISON, G. G. (1975). "Control of the malignant hyperpyrexia syndrome in MHS swine by dantrolene sodium." *British journal of anaesthesia* 47(1): 62-65.

Haslam, R. H., J. Walcher, P. Lietman, C. Kallman and E. Mellits (1974). "Dantrolene sodium in children with spasticity." *Archives of physical medicine and rehabilitation* 55(8): 384-388.

Henn, F. A. and B. Vollmayr (2005). "Stress models of depression: forming genetically vulnerable strains." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 29(4-5): 799-804.

Herman, R., N. Mayer and S. A. Mecomber (1972). "Clinical pharmacology-physiology of dantrolene sodium." *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation* 51(6): 296-311.

Holmes, P. V. (2003). "Rodent models of depression: reexamining validity without anthropomorphic inference." *Critical Reviews™ in Neurobiology* 15(2).

Hopkins, P. (2011). "Malignant hyperthermia: pharmacology of triggering." *British journal of anaesthesia* 107(1): 48-56.

Hopp, S. C., H. M. D'Angelo, S. E. Royer, R. M. Kaercher, L. Adzovic and G. L. Wenk (2014). "Differential rescue of spatial memory deficits in aged rats by L-type voltage-dependent calcium channel and ryanodine receptor antagonism." *Neuroscience* 280: 10-18.

Höschl, C. and J. í. Kožený (1989). "Verapamil in affective disorders: a controlled, double-blind study." *Biological psychiatry* 25(2): 128-140.

Hunter, J. (1987). "Adverse effects of neuromuscular blocking drugs." *BJA: British Journal of Anaesthesia* 59(1): 46-60.

Hwang, H. S., F. R. Nitu, Y. Yang, K. Walweel, L. Pereira, C. N. Johnson, M. Faggioni, W. J. Chazin, D. Laver and A. L. George Jr (2014). "Divergent regulation of ryanodine receptor 2 calcium release channels by arrhythmogenic human calmodulin missense mutants." *Circulation research* 114(7): 1114-1124.

Inan, S. and H. Wei (2010). "The cytoprotective effects of dantrolene: a ryanodine receptor antagonist." *Anesthesia & Analgesia* 111(6): 1400-1410.

Javed, M. and A. Bogdanov (2010). "Oral dantrolene and severe respiratory failure in a patient with chronic spinal cord injury." *Anaesthesia* 65(8): 855-856.

Jeon, J., S. Song, M.-C. Kim, K.-M. Kim and S. Lee (2014). "The effect of long-term oral dantrolene on the neuromuscular action of rocuronium: a case report." *Korean journal of anesthesiology* 66(2): 153.

Jiang, D., W. Chen, J. Xiao, R. Wang, H. Kong, P. P. Jones, L. Zhang, B. Fruen and S. W. Chen (2008). "Reduced threshold for luminal Ca<sup>2+</sup> activation of RyR1 underlies a causal mechanism of porcine malignant hyperthermia." *Journal of Biological Chemistry* 283(30): 20813-20820.

Jomova, K., D. Vondrakova, M. Lawson and M. Valko (2010). "Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders." *Molecular and cellular biochemistry* 345(1-2): 91-104.

Joseph, J. D., Y. Peng, D.-O. D. Mak, K.-H. Cheung, H. Vais, J. K. Foskett and H. Wei (2014). "General anesthetic isoflurane modulates inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor calcium channel opening." *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 121(3): 528-537.

Kambayashi, A. and J. B. Dressman (2013). "An in vitro–in silico–in vivo approach to predicting the oral pharmacokinetic profile of salts of weak acids: case example dantrolene." *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals* 84(1): 200-207.

Kantarci, K. (2014). "Molecular imaging of Alzheimer disease pathology." *American Journal of Neuroradiology* 35(6 suppl): S12-S17.

Kaplan, R. F., N. G. Feinglass, W. Webster and S. Mudra (1986). "Phenelzine overdose treated with dantrolene sodium." *JAMA* 255(5): 642-644.

Karakilic, A., S. Kizildag, S. Kandis, G. Guvendi, B. Koc, G. B. Camsari, U. M. Camsari, M. Ates, S. G. Arda and N. Uysal (2018). "The effects of acute foot shock stress on empathy levels in rats." *Behavioural brain research* 349: 31-36.

Karaman, T., S. Karaman, S. Doğru, H. Tapar, A. Şahin and M. Süren (2017). "Short-term and long-term effects of dexamethasone on cognitive dysfunction induced by sevoflurane in adult rats." *Turkish journal of anaesthesiology and reanimation* 45(3): 158.

Karrenbauer, B. D., Y.-J. Ho, V. Ludwig, J. Löhn, R. Spanagel, R. K. Schwarting and C. R. Pawlak (2009). "Time-dependent effects of striatal interleukin-2 on open field behaviour in rats." *Journal of neuroimmunology* 208(1-2): 10-18.

Kasote, D. M., M. V. Hegde and S. S. Katyare (2013). "Mitochondrial dysfunction in psychiatric and neurological diseases: cause (s), consequence (s), and implications of antioxidant therapy." *Biofactors* 39(4): 392-406.

Katchman, A. N. and N. Hershkowitz (1993). "Early anoxia-induced vesicular glutamate release results from mobilization of calcium from intracellular stores." *Journal of neurophysiology* 70(1): 1-7.

Kaya, M., M. Tunç, T. Özdemir and İ. Altuntaş (2003). "Calcium antagonists in N-methyl d-aspartate-induced retinal injury." *Graefes's archive for clinical and experimental ophthalmology* 241(5): 418-422.

Kessler, R. C., P. Berglund, O. Demler, R. Jin, K. R. Merikangas and E. E. Walters (2005). "Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication." *Archives of general psychiatry* 62(6): 593-602.

Khachaturian, Z. S. (1987). "Hypothesis on the regulation of cytosol calcium concentration and the aging brain." *Neurobiology of aging* 8(4): 345-346.

Kheder, A. and K. P. S. Nair (2012). "Spasticity: pathophysiology, evaluation and management." *Practical neurology* 12(5): 289-298.

Kim, J. Y., S. Chun, M. S. Bang, H.-I. Shin and S.-U. Lee (2011). "Safety of low-dose oral dantrolene sodium on hepatic function." *Archives of physical medicine and rehabilitation* 92(9): 1359-1363.

Kocogullari, C., M. Emmiler, M. Cemek, O. Sahin, A. Aslan, E. Ayva, L. Tur, M. Buyukokuroglu, I. Demirkan and A. Cekirdekci (2008). "Can dantrolene protect spinal cord against ischemia/reperfusion injury? An experimental study." *The Thoracic and cardiovascular surgeon* 56(07): 406-411.

Kokras, N., K. Antoniou, H. G. Mikail, V. Kafetzopoulos, Z. Papadopoulou-Daifoti and C. Dalla (2015). "Forced swim test: what about females?" *Neuropharmacology* 99: 408-421.

Kolb, M. E., M. Horne and R. Martz (1982). "Dantrolene in human malignant hyperthermia." *Anesthesiology* 56(4): 254-262.

Kraeuter, A.-K., P. C. Guest and Z. Sarnyai (2019). *The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. Pre-Clinical Models*, Springer: 99-103.

Krause, T., M. Gerbershagen, M. Fiege, R. Weisshorn and F. Wappler (2004). "Dantrolene—a review of its pharmacology, therapeutic use and new developments." *Anaesthesia* 59(4): 364-373.

Krishna, H. G., K. Kumar and K. Karanth (2001). "The anxiolytic activity of calcium channel antagonists in experimental models of anxiety in rats." *Indian Journal of Pharmacology* 33(4): 267-271.

Ku<sup>3</sup>ak, W., W. Sobaniec, K. Wojtal and S. a. J. Czuczwar (2004). "Calcium modulation in epilepsy." *Pol J Pharmacol* 56: 29-41.

Larach, M. G., G. A. Gronert, G. C. Allen, B. W. Brandom and E. B. Lehman (2010). "Clinical presentation, treatment, and complications of malignant hyperthermia in North America from 1987 to 2006." *Anesthesia & Analgesia* 110(2): 498-507.

Lê-Quang, B., P. Calmels, E. Valayer-Chaléat, I. Fayolle-Minon and V. Gautheron (2004). "Dantrolene and pleural effusion: case report and review of literature." *Spinal cord* 42(5): 317.

Leão, A. H., A. J. Sarmiento-Silva, J. R. Santos, A. M. Ribeiro and R. H. Silva (2015). "Molecular, Neurochemical, and Behavioral Hallmarks of Reserpine as a Model for Parkinson's Disease: New Perspectives to a Long-Standing Model." *Brain Pathology* 25(4): 377-390.

Lee, A., S. Ra, A. M. Rajadhyaksha, J. Britt, H. De Jesus-Cortes, K. Gonzales, A. Lee, S. Moosmang, F. Hofmann and A. Pieper (2012). "Forebrain elimination of cacna1c mediates anxiety-like behavior in mice." *Molecular psychiatry* 17(11): 1054.

Lee, J.-S., H.-G. Kim, H.-W. Lee, J.-M. Han, S.-K. Lee, D.-W. Kim, A. Saravanakumar and C.-G. Son (2015). "Hippocampal memory enhancing activity of pine needle extract against scopolamine-induced amnesia in a mouse model." *Scientific reports* 5: 9651.

Levinson, D. F. (2006). "The genetics of depression: a review." *Biological psychiatry* 60(2): 84-92.

Liang, L. and H. Wei (2015). "Dantrolene, A Treatment for Alzheimer's Disease?" *Alzheimer disease and associated disorders* 29(1): 1.

Linck, V. d. M., A. L. da Silva, M. Figueiró, E. B. Caramao, P. R. H. Moreno and E. Elisabetsky (2010). "Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice." *Phytomedicine* 17(8-9): 679-683.

Liu, J., C. Supnet, S. Sun, H. Zhang, L. Good, E. Popugaeva and I. Bezprozvanny (2014). "The role of ryanodine receptor type 3 in a mouse model of Alzheimer disease." *Channels* 8(3): 230-242.

Locatelli, F., M. Pozzi, P. Avantiaggiato, M. Lanfranchi, L. Tufarulo, V. Amorelli, G. Rizzi, S. Radice, S. Galbiati and E. Clementi (2014). "Pharyngeal spasticity due to dantrolene." *Journal of clinical pharmacy and therapeutics* 39(4): 449-451.

Loomer, H. P., J. C. Saunders and N. S. Kline (1957). "A clinical and pharmacodynamic evaluation of iproniazid as a psychic energizer." *Psychiatric research reports*.

Lovinger, D. M. (2010). "Neurotransmitter roles in synaptic modulation, plasticity and learning in the dorsal striatum." *Neuropharmacology* 58(7): 951-961.

Majidi, S., M. Grigoryan, W. G. Tekle and A. I. Qureshi (2012). "Intra-arterial dantrolene for refractory cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage." *Neurocritical care* 17(2): 245-249.

Masood, A., Y. Huang, H. Hajjhussein, L. Xiao, H. Li, W. Wang, A. Hamza, C.-G. Zhan and J. M. O'Donnell (2009). "Anxiolytic effects of phosphodiesterase-2 inhibitors associated with increased cGMP signaling." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 331(2): 690-699.

Maurer, R. and V. Derivaz (2000). "Rats in a transparent morris water maze use elemental and configural geometry of landmarks as well as distance to the pool wall." *Spatial Cognition and Computation* 2(2): 135-156.

McDonald, J. W., A. S. Fix, J. P. Tizzano and D. D. Schoepp (1993). "Seizures and brain injury in neonatal rats induced by 1S, 3R-ACPD, a metabotropic glutamate receptor agonist." *Journal of Neuroscience* 13(10): 4445-4455.

McLeod, S. (2015). "Skinner-operant conditioning." Retrieved from.

Misane, I. and S. O. Ögren (2003). "Selective 5-HT 1A antagonists WAY 100635 and NAD-299 attenuate the impairment of passive avoidance caused by scopolamine in the rat." *Neuropsychopharmacology* 28(2): 253.

Mitani, A., H. Yanase, K. Sakai, Y. Wake and K. Kataoka (1993). "Origin of intracellular Ca<sup>2+</sup> elevation induced by in vitro ischemia-like condition in hippocampal slices." *Brain research* 601(1-2): 103-110.

Moscarello, J. M. and J. E. LeDoux (2013). "Active avoidance learning requires prefrontal suppression of amygdala-mediated defensive reactions." *Journal of Neuroscience* 33(9): 3815-3823.

Mowbray, M., S. Sinclair and S. Allan (2009). "Severe acneiform eruption exacerbated by dantrolene sodium." *Clinical and Experimental Dermatology: Viewpoints in dermatology* 34(2): 248-249.

Muehlschlegel, S., R. Carandang, W. Hall, N. Kini, S. Izzy, B. Garland, C. Ouillette, I. M. van der Bom, T. F. Flood and M. J. Gounis (2015). "Dantrolene for cerebral vasospasm after subarachnoid haemorrhage: a randomised double blind placebo-controlled safety trial." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 86(9): 1029-1035.

Muehlschlegel, S., G. Rordorf, M. Bodock and J. R. Sims (2009). "Dantrolene mediates vasorelaxation in cerebral vasoconstriction: a case series." *Neurocritical care* 10(1): 116.

Muehlschlegel, S. and J. R. Sims (2009). "Dantrolene: mechanisms of neuroprotection and possible clinical applications in the neurointensive care unit." *Neurocritical care* 10(1): 103-115.

Nagatomo, I., W. Hashiguchi, M. Tominaga, Y. Akasaki, M. Uchida and M. Takigawa (2001). "Effects of MK-801, dantrolene, and FK506 on convulsive seizures and brain nitric oxide production in seizure-susceptible EL mice." *Brain research* 888(2): 306-310.

Nestler, E. J. and S. E. Hyman (2010). "Animal models of neuropsychiatric disorders." *Nature neuroscience* 13(10): 1161.

Nowak, G., B. Szewczyk, J. M. Wieronska, P. Branski, A. Palucha, A. Pilc, K. Sadlik and W. Piekoszewski (2003). "Antidepressant-like effects of acute and chronic treatment with zinc in forced swim test and olfactory bulbectomy model in rats." *Brain research bulletin* 61(2): 159-164.

Nunes-de-Souza, R. L., A. Canto-de-Souza and R. J. Rodgers (2002). "Effects of intra-hippocampal infusion of WAY-100635 on plus-maze behavior in mice: Influence of site of injection and prior test experience." *Brain research* 927(1): 87-96.

O'Neil, M. F. and N. A. Moore (2003). "Animal models of depression: are there any?" *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental* 18(4): 239-254.

Ochi, G., K.-i. Watanabe, H. Tokuoka, S. Hatakenaka and T. Arai (1995). "Neuroleptic malignant-like syndrome: a complication of acute organophosphate poisoning." *Canadian journal of anaesthesia* 42(11): 1027-1030.

Olsen, R. W. (1982). "Drug interactions at the GABA receptor-ionophore complex." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 22(1): 245-277.

Oshiro, W., T. Beasley, K. McDaniel, P. Evansky, S. Martin, V. Moser, M. Gilbert and P. Bushnell (2015). "Prenatal exposure to vapors of gasoline-ethanol blends causes few cognitive deficits in adult rats." *Neurotoxicology and teratology* 49: 59-73.

Otero-Romero, S., J. Sastre-Garriga, G. Comi, H.-P. Hartung, P. Soelberg Sørensen, A. J. Thompson, P. Vermersch, R. Gold and X. Montalban (2016). "Pharmacological management of spasticity in multiple sclerosis: systematic review and consensus paper." *Multiple Sclerosis Journal* 22(11): 1386-1396.

Oulès, B., D. Del Prete, B. Greco, X. Zhang, I. Lauritzen, J. Sevalle, S. Moreno, P. Paterlini-Bréchet, M. Trebak and F. Checler (2012). "Ryanodine receptor blockade reduces amyloid- $\beta$  load and memory impairments in Tg2576 mouse model of Alzheimer disease." *Journal of Neuroscience* 32(34): 11820-11834.

Palnitkar, S. S., J. R. Mickelson, C. F. Louis and J. Parness (1997). "Pharmacological distinction between dantrolene and ryanodine binding sites: evidence from normal and malignant hyperthermia-susceptible porcine skeletal muscle." *Biochemical Journal* 326(3): 847-852.

Pandyan, A., M. Gregoric, M. Barnes, D. Wood, F. v. Wijck, J. Burridge, H. Hermens and G. Johnson (2005). "Spasticity: clinical perceptions, neurological realities and meaningful measurement." *Disability and rehabilitation* 27(1-2): 2-6.

Parr, M. and S. Willatts (1991). "Fatal theophylline poisoning with rhabdomyolysis: a potential role for dantrolene treatment." *Anaesthesia* 46(7): 557-559.

Paul-Pletzer, K., S. S. Palnitkar, L. S. Jimenez, H. Morimoto and J. Parness (2001). "The skeletal muscle ryanodine receptor identified as a molecular target of [ $^3$ H] azidodantrolene by photoaffinity labeling." *Biochemistry* 40(2): 531-542.

Paul-Pletzer, K., T. Yamamoto, M. B. Bhat, J. Ma, N. Ikemoto, L. S. Jimenez, H. Morimoto, P. G. Williams and J. Parness (2002). "Identification of a dantrolene-binding sequence on the skeletal muscle ryanodine receptor." *Journal of Biological Chemistry* 277(38): 34918-34923.

Pawlak, C. R., R. K. Schwarting and A. Bauhofer (2005). "Cytokine mRNA levels in brain and peripheral tissues of the rat: relationships with plus-maze behavior." *Molecular brain research* 137(1-2): 159-165.

Pelletier, M. R., J. S. Wadia, L. R. Mills and P. L. Carlen (1999). "Seizure-induced cell death produced by repeated tetanic stimulation in vitro: possible role of endoplasmic reticulum calcium stores." *Journal of neurophysiology* 81(6): 3054-3064.

Peng, J., G. Liang, S. Inan, Z. Wu, D. J. Joseph, Q. Meng, Y. Peng, M. F. Eckenhoff and H. Wei (2012). "Dantrolene ameliorates cognitive decline and neuropathology in Alzheimer triple transgenic mice." *Neuroscience letters* 516(2): 274-279.

Pennati, A., E. Sacchetti and A. Calzeroni (1991). "Dantrolene in lethal catatonia." *The American journal of psychiatry*.

Phelps, E. A. and J. E. LeDoux (2005). "Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior." *Neuron* 48(2): 175-187.

Pimplikar, S. W. (2009). "Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease." *The international journal of biochemistry & cell biology* 41(6): 1261-1268.

Podranski, T., T. Bouillon, P. M. Schumacher, A. Taguchi, D. I. Sessler and A. Kurz (2005). "Compartmental pharmacokinetics of dantrolene in adults: do malignant hyperthermia association dosing guidelines work?" *Anesthesia & Analgesia* 101(6): 1695-1699.

Popescu, B., M. Oprica, M. Sajin, C. L. Stanciu, O. Bajenaru, A. Predescu, C. Vidulescu and L. Popescu (2002). "Dantrolene protects neurons against kainic acid induced apoptosis in vitro and in vivo." *Journal of cellular and molecular medicine* 6(4): 555-569.

Popugaeva, E. and I. Bezprozvanny (2013). "Role of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> signaling in the pathogenesis of Alzheimer disease." *Frontiers in molecular neuroscience* 6: 29.

Popugaeva, E. and I. Bezprozvanny (2014). "Can the calcium hypothesis explain synaptic loss in Alzheimer's disease?" *Neurodegenerative Diseases* 13(2-3): 139-141.

Porsolt, R. D., G. Anton, N. Blavet and M. Jalfre (1978). "Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments." *European journal of pharmacology* 47(4): 379-391.

Pritchard, T. J. and E. G. Kranias (2009). "Junctin and the histidine-rich Ca<sup>2+</sup> binding protein: potential roles in heart failure and arrhythmogenesis." *The Journal of physiology* 587(13): 3125-3133.

Protasi, F. (2002). "Structural interaction between RYRs and DHPRs in calcium release units of cardiac and skeletal muscle cells." *Front Biosci* 7(1-3): d650.

Riazi, S., N. Kraeva and P. M. Hopkins (2018). "Updated guide for the management of malignant hyperthermia." *Canadian Journal of Anesthesia/Journal canadien d'anesthésie* 65(6): 709-721.

Riazi, S., M. G. Larach, C. Hu, D. Wijesundera, C. Massey and N. Kraeva (2014). "Malignant hyperthermia in Canada: characteristics of index anesthetics in 129 malignant hyperthermia susceptible probands." *Anesthesia & Analgesia* 118(2): 381-387.

Rubin, A. S. and A. D. Zablocki (1987). "Hyperkalemia, verapamil, and dantrolene." *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 66(2): 246-248.

Russell, C. S., C. Lang, M. McCambridge and B. Calhoun (2001). "Neuroleptic malignant syndrome in pregnancy." *Obstetrics & Gynecology* 98(5): 906-908.

Ryan, P. J. (1983). "Preliminary report: experience with the use of dantrolene sodium in the treatment of bites by the black widow spider *Latrodectus hesperus*." *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* 21(4-5): 487-489.

Rybnikova, E., V. Mironova, S. Pivina, E. Tulkova, N. Ordyan, L. Vataeva, E. Vershinina, E. Abritalin, A. Kolchev and N. Nalivaeva (2007). "Antidepressant-like effects of mild hypoxia preconditioning in the learned helplessness model in rats." *Neuroscience letters* 417(3): 234-239.

Saki, K., M. Bahmani and M. Rafieian-Kopaei (2014). "The effect of most important medicinal plants on two important psychiatric disorders (anxiety and depression)-a review." *Asian Pacific journal of tropical medicine* 7: S34-S42.



Salomone, S., G. Soydan, M. A. Moskowitz and J. R. Sims (2009). "Inhibition of cerebral vasoconstriction by dantrolene and nimodipine." *Neurocritical care* 10(1): 93.

Saltzman, L. S., R. A. Kates, B. C. Corke, E. A. Norfleet and K. R. Heath (1984). "Hyperkalemia and cardiovascular collapse after verapamil and dantrolene administration in swine." *Anesthesia and analgesia* 63(5): 473-478.

Sambuughin, N., T. E. Nelson, J. Jankovic, C. Xin, G. Meissner, M. Mullakandov, J. Ji, H. Rosenberg, K. Sivakumar and L. G. Goldfarb (2001). "Identification and functional characterization of a novel ryanodine receptor mutation causing malignant hyperthermia in North American and South American families." *Neuromuscular Disorders* 11(6-7): 530-537.

Sánchez, C., K. P. Bøgesø, B. Ebert, E. H. Reines and C. Braestrup (2004). "Escitalopram versus citalopram: the surprising role of the R-enantiomer." *Psychopharmacology* 174(2): 163-176.

Scalco, R. S., N. C. Voermans, R. Piercy, H. Jungbluth and R. Quinlivan (2016). "Dantrolene as a possible prophylactic treatment for RYR1-related rhabdomyolysis." *European journal of neurology* 23(8): e56-e57.

Schneier, F. R., T. L. Rodebaugh, C. Blanco, H. Lewin and M. R. Liebowitz (2011). "Fear and avoidance of eye contact in social anxiety disorder." *Comprehensive Psychiatry* 52(1): 81-87.

Sena, L. g. M., C. n. Bueno, R. L. Pobbe, T. G. Andrade, H. Zangrossi Jr and M. B. Viana (2003). "The dorsal raphe nucleus exerts opposed control on generalized anxiety and panic-related defensive responses in rats." *Behavioural brain research* 142(1-2): 125-133.

Serrano, F. and E. Klann (2004). "Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus." *Ageing research reviews* 3(4): 431-443.

Sessler, D. I. (2008). "Temperature monitoring and perioperative thermoregulation." *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 109(2): 318-338.

Shabani, M., N. Dahmardeh, M. Asadi-Shekaari, S. Arjmand and M. Haghani (2018). "Fingolimod attenuates harmaline-induced passive avoidance memory and motor impairments in a rat model of essential tremor." *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* 81(6).

Shen, Y., W. Wei, G. Zhang, J. Yang, C. Liu, C. Dong and S. Xu (2001). Improvement of melatonin on the learning and memory impairment induced by amyloid beta-peptide 25-35 in elderly rat via a inflammatory-immune mechanism. *FUNDAMENTAL & CLINICAL PHARMACOLOGY, WILEY-BLACKWELL COMMERCE PLACE, 350 MAIN ST, MALDEN 02148, MA USA*.

Sheppard, O., M. P. Coleman and C. S. Durrant (2018). "Microglia-dependent presynaptic disruption in an organotypic hippocampal slice culture model of neuroinflammation." *bioRxiv*: 502559.

Shoji, H., K. Takao, S. Hattori and T. Miyakawa (2014). "Contextual and cued fear conditioning test using a video analyzing system in mice." *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(85): e50871.

Snyder, H. R., C. S. Davis, R. K. Bickerton and R. P. Halliday (1967). "1-[5-Arylfurfurylidene) amino] hydantoin. A New Class of Muscle Relaxants." *Journal of medicinal chemistry* 10(5): 807-810.

Stevenson, V. and D. Playford (2012). "Neurological rehabilitation and the management of spasticity." *Medicine* 40(9): 513-517.

Sudo, R. T., P. L. d. Carmo, M. M. Trachez and G. Zapata-Sudo (2008). "Effects of azumolene on normal and malignant hyperthermia-susceptible skeletal muscle." *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 102(3): 308-316.

Supnet, C. and I. Bezprozvanny (2011). "Presenilins function in ER calcium leak and Alzheimer's disease pathogenesis." *Cell calcium* 50(3): 303-309.

Szentesi, P., C. Collet, S. Sárközi, C. Szegedi, I. Jona, V. Jacquemond, L. Kovács and L. Csernoch (2001). "Effects of dantrolene on steps of excitation-contraction coupling in mammalian skeletal muscle fibers." *The Journal of general physiology* 118(4): 355-376.

Ten Holter, J. and R. Schellens (1988). "Dantrolene sodium for treatment of carbon monoxide poisoning." *British medical journal (Clinical research ed.)* 296(6639): 1772.

Thorndike, E. (2017). *Animal intelligence: Experimental studies*, Routledge.

Tilgen, N., F. Zorzato, B. Halliger-Keller, F. Muntoni, C. Sewry, L. M. Palmucci, C. Schneider, E. Hauser, F. Lehmann-Horn and C. R. Müller (2001). "Identification of four novel mutations in the C-terminal membrane spanning domain of the ryanodine receptor 1: association with central core disease and alteration of calcium homeostasis." *Human molecular genetics* 10(25): 2879-2887.

TSUTSUMI, Y., K. YAMAMOTO, S. MATSUURA, S. HATA, M. SAKAI and K. SHIRAKURA (1998). "The treatment of neuroleptic malignant syndrome using dantrolene sodium." *Psychiatry and clinical neurosciences* 52(4): 433-438.

Ucuncu, H., S. Taysi, B. Aktan, M. Buyukokuroglu and M. Elmastas (2005). "Effect of dantrolene on lipid peroxidation, glutathione and glutathione-dependent enzyme activities in experimental otitis media with effusion in guinea pigs." *Human & experimental toxicology* 24(11): 567-571.

Vallner, J., J. Perrin and S. Wold (1976). "Comparison of graphical and computerized methods for calculating binding parameters for two strongly bound drugs to human serum albumin." *Journal of pharmaceutical sciences* 65(8): 1182-1187.

van Gaalen, M. M. and T. Steckler (2000). "Behavioural analysis of four mouse strains in an anxiety test battery." *Behavioural brain research* 115(1): 95-106.

Vander, T., H. Odi, V. Bluvstein, J. Ronen and A. Catz (2005). "Carbamazepine toxicity following oxybutynin and dantrolene administration: a case report." *Spinal cord* 43(4): 252.

Verkhatsky, A. and E. C. Toescu (1998). "Calcium and neuronal ageing." *Trends in neurosciences* 21(1): 2-7.

Vogel-Ciernia, A. and M. A. Wood (2014). "Examining object location and object recognition memory in mice." *Current protocols in neuroscience* 69(1): 8.31. 31-38.31. 17.

Vorhees, C. V. and M. T. Williams (2006). "Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory." *Nature protocols* 1(2): 848.

Wang, C., H. N. Nguyen, J. L. Maguire and D. C. Perry (2002). "Role of intracellular calcium stores in cell death from oxygen-glucose deprivation in a neuronal cell line." *Journal of cerebral blood flow & metabolism* 22(2): 206-214.

Wang, R., X. Zhong, X. Meng, A. Koop, X. Tian, P. P. Jones, B. R. Fruen, T. Wagenknecht, Z. Liu and S. W. Chen (2011). "Localization of the dantrolene-binding sequence near the FK506-binding protein-binding site in the three-dimensional structure of the ryanodine receptor." *Journal of Biological Chemistry* 286(14): 12202-12212.

Wei, H., P. Leeds, R. W. Chen, W. Wei, Y. Leng, D. E. Bredesen and D. M. Chuang (2000). "Neuronal apoptosis induced by pharmacological concentrations of 3-hydroxykynurenine: characterization and protection by dantrolene and Bcl-2 overexpression." *Journal of neurochemistry* 75(1): 81-90.

Wei, H. and D. C. Perry (1996). "Dantrolene is cytoprotective in two models of neuronal cell death." *Journal of neurochemistry* 67(6): 2390-2398.

Wensel, T. M., K. W. Powe and M. E. Cates (2012). "Pregabalin for the treatment of generalized anxiety disorder." *Annals of Pharmacotherapy* 46(3): 424-429.

Wilkinson, S., B. Portmann and R. Williams (1979). "Hepatitis from dantrolene sodium." *Gut* 20(1): 33-36.

Wu, Z., B. Yang, C. Liu, G. Liang, M. F. Eckenhoff, W. Liu, S. Pickup, Q. Meng, Y. Tian and S. Li (2015). "Long Term Dantrolene Treatment Reduced Intraneuronal Amyloid in Aged Alzheimer Triple Transgenic Mice." *Alzheimer disease and associated disorders* 29(3): 184.

Yamagishi, F., T. Komoda, K. Ohnishi and S. Itoh (1993). "Protective effect of dantrolene sodium on carbon tetrachloride induced liver injury in the rat." *Research communications in chemical pathology and pharmacology* 82(2): 237-240.

Zhao, J., W. Bi, S. Xiao, X. Lan, X. Cheng, J. Zhang, D. Lu, W. Wei, Y. Wang and H. Li (2019). "Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice." *Scientific reports* 9(1): 5790.

Zhao, X., N. Weisleder, X. Han, Z. Pan, J. Parness, M. Brotto and J. Ma (2006). "Azumolene inhibits a component of store-operated calcium entry coupled to the skeletal muscle ryanodine receptor." *Journal of Biological Chemistry* 281(44): 33477-33486.

