

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇAN AMİTRİPTİLİN ZEHİRLENME
MODELİNDE OLUŞAN KARDİYOASKÜLER
BULGULAR ÜZERİNE 2-HİDROKSİPROPİL-
BETA-SİKLODEKSTRİNİN ETKİSİ**

DR. BURÇ AYDIN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. ŞULE KALKAN

İZMİR - 2015

(Bu araştırma, Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2013.KB.SAG.022 numaralı proje ile desteklenmiştir.)

ÖNSÖZ

Tıpta uzmanlık tezimi olan bu çalışmanın gerçekleşmesinde büyük emekleri olan Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden danışmanım Prof. Dr. Şule Kalkan'a ve Doç. Dr. Nil Hoccoğlu Aksay'a, aynı fakültenin Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Bekir Uğur Ergür ve Dr. Serap Cilaker Mıcılı'ya teşekkür ederim.

Tıpta uzmanlık öğrenimim boyunca eğitimime katkıları olan ve bana her türlü desteği veren Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel farmakoloji eğitimimde büyük katkısı olan Prof. Dr. Rüştü Onur'a ve ekibine şükranlarımı sunarım.

Son olarak, deneyisel farmakolojiyi mümkün kılan ve katkıları çoğu kez hayatlarına mal olan deney hayvanlarının bilimsel önemini vurgulamak isterim.

Dr. Burç Aydın
İzmir, 2015

İÇİNDEKİLER

I.	Tablo, Şekil ve Resim Dizini.....	4
II.	Kısaltmalar.....	6
III.	Türkçe Özet.....	7
IV.	Summary (İngilizce Özet).....	10
V.	Giriş ve Amaç.....	13
VI.	Genel Bilgiler	
	VI.A. Trisiklik Antidepresanlar.....	16
	VI.B. Amitriptilin.....	16
	VI.C. Siklodekstrinler.....	21
	VI.D. 2-Hidroksipropil-Beta-Siklodekstrin (HPBCD).....	23
VII.	Gereç ve Yöntem	
	VII.A. Deney Hayvanları ve Barınma Koşulları.....	26
	VII.B. Cerrahi İşlemler.....	26
	VII.C. Kardiyak Parametrelerin Kaydı.....	27
	VII.D. Deneyde Kullanılan İlaçlar.....	27
	VII.E. Deney Protokolleri.....	29
	VII.F. Histolojik İnceleme.....	32
	VII.G. İstatistiksel Analiz.....	36
VIII.	Bulgular	
	VIII.A. Birinci Protokol: HPBCD'nin Kardiyovasküler Etkisi.....	38
	VIII.B. İkinci Protokol: Amitriptilin Zehirlenmesi Modelinde Oluşan Kardiyovasküler Bulgular Üzerine HPBCD'nin Etkisi.....	44
IX.	Tartışma.....	55
X.	Kaynaklar.....	62

I. TABLO, ŞEKİL VE RESİM DİZİNİ

I.A. TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Doku takip protokolü.

Tablo 2: Hematoksilen-eozin boyama protokolü.

Tablo 3: Masson trikrom boyama protokolü.

Tablo 4. Deney protokolü 1: 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrininkardiyovasküler parametreler üzerine etkisi.

Tablo 5. Deney protokolü 2: Amitriptilini takiben infüze edilen 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrinin kardiyovasküler parametreler üzerine etkisi.

I.B. ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Amitriptilinin kimyasal yapısı.

Şekil 2. Alfa, beta ve gama siklodekstrinin kimyasal yapısı.

Şekil 3. Sugammadexin kimyasal yapısı ve sugammadex-roküronyum inklüzyon kompleksinin şematik gösterimi.

Şekil 4. Birinci protokol için akış şeması.

Şekil 5. İkinci protokol için akış şeması.

Şekil 6. Deney protokolü 1: 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrinin ortalama arteriyel kan basıncı üzerine etkisi.

Şekil 7. Deney protokolü 1: 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrinin kalp atım hızı üzerine etkisi.

Şekil 8. Deney protokolü 1: 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrinin QRS süresi üzerine etkisi.

Şekil 9. Deney protokolü 1: 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrinin QT aralığı üzerine etkisi.

Şekil 10. Deney protokolü 2: Amitriptilini takiben infüze edilen 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrinin ortalama arteriyel kan basıncı üzerine etkisi.

Şekil 11. Deney protokolü 2: Amitriptilini takiben infüze edilen 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrinin kalp atım hızı üzerine etkisi.

Şekil 12. Deney protokolü 2: Amitriptilini takiben infüze edilen 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrinin QRS süresi üzerine etkisi.

Şekil 13. Deney protokolü 2: Amitriptilini takiben infüze edilen 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrinin QT aralığı üzerine etkisi.

I.C. RESİM DİZİNİ

Resim 1. Trakea, karotis arteri ile juguler ve femoral ven kanülasyonu sonrası bir sıçanın görünümü.

Resim 2. Basınç transdüseri, veri kayıt sistemi ve infüzyon pompasının görünümü.

Resim 3. Deney protokolü 1: Dekstroz ve 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin grubuna ait kalp dokusu histolojik kesitleri.

Resim 4. Deney protokolü 2: Dekstroz, HPBCD 1:1 ve HPBCD 1:4 gruplarına ait kalp dokusu histolojik kesitleri. Hematoksilen-eozin boyaması.

Resim 5. Deney protokolü 2: Dekstroz, HPBCD 1:1 ve HPBCD 1:4 gruplarına ait kalp dokusu histolojik kesitleri. Masson trikrom boyaması.

Resim 6. Deney protokolü 2: Dekstroz, HPBCD 1:1 ve HPBCD 1:4 gruplarına ait kalp dokusu histolojik kesitleri. Aktive kaspaz-3 boyaması.

II. KISALTMALAR

EKG: Elektrokardiyogram

HPBCD: 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin

KAH: Kalp atım hızı

OAB: Ortalama arteriyel kan basıncı

SAB: Sistolik arteriyel kan basıncı

SBE-CD: Sülfobutileter-beta-siklodekstrin

TSA: Trisiklik antidepresan

III. TÜRKÇE ÖZET

Sıçan Amitriptilin Zehirlenme Modelinde Oluşan Kardiyovasküler Bulgular Üzerine 2-Hidroksipropil-Beta-Siklodekstrinin Etkisi

Dr. Burç Aydın

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı,

İnciraltı/Balçova, 35340, İzmir

Amaç: Bu çalışmanın amacı, sıçan amitriptilin zehirlenme modelinde görülen kardiyovasküler toksik etkilerin tedavisinde 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrinin (HPBCD) antidot olarak etkililiğinin değerlendirilmesidir.

Yöntem: Deneylerde 33 adet Wistar albino soyu erkek sıçan (324.0 ± 4.1 g) kullanıldı. HPBCD'nin tek başına kardiyovasküler etkilerini değerlendirmek için sıçanlara juguler ven yoluyla 15 dakika boyunca dekstroz (5%, n=7) ya da HPBCD (16.76 mg/kg/dk, n=6) infüzyonu yapıldı. Karotis arteri kanülasyonu ile kan basıncı ve elektrokardiyografi verileri 60 dakika boyunca kaydedildi. Ortalama arteriyel kan basıncı (OAB), kalp atım hızı (KAH), QRS süresi ve QT aralığı değerleri başlangıçta, dekstroz veya HPBCD infüzyonu sonunda ve izlem sonunda (60 dakika) ölçüldü. Zehirlenme modelinde OAB'de başlangıca göre %50 düşüş gözlenene kadar juguler ven yoluyla amitriptilin HCL (0.94 mg/kg/dk) infüzyonu yapıldı. Amitriptilin infüzyonu sonrasında dekstroz (5%, n=6), düşük doz HPBCD (4.19 mg/kg/dk, 1:1 molar oran, n=7) ya da yüksek doz HPBCD (16.76 mg/kg/dk, 1:4 molar oran, n=7), amitriptilin infüzyonu ile aynı süre boyunca

femoral ven yoluyla infüze edildi. OAB, KAH, QRS süresi ve QT aralığı başlangıçta, amitriptilin infüzyonu sonunda, dekstroz veya HPBCD infüzyonu sonunda ve izlem sonunda (60 dakika) kaydedildi. İzlem sonunda kalpler çıkarıldı ve doku hasarının değerlendirilmesi için hematoksilen-eozin ve Masson trikrom boyamalarıyla, kardiyomiyositlerde apoptozun değerlendirilmesi içinse aktive kaspaz-3 immünohistokimyasıyla incelendi ve skorlandı.

Bulgular: Başlangıç OAB, KAH, QRS süresi ve QT aralığı tüm gruplarda benzerdi (tüm değerler için $p>0.05$). Yalnız HPBCD infüzyonu ile dekstroz infüzyonu karşılaştırıldığında, OAB, KAH, QRS süresi, QT aralığı ve doku hasarı ile apoptoz skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (tüm değerler için $p>0.05$). Amitriptilin zehirlenme modelinde, amitriptilin infüzyonu sonrasında OAB ve KAH değerlerinde anlamlı azalma görülürken QRS süresi ve QT aralığında anlamlı uzama görüldü (tüm gruplarda tüm değerler için $p<0.0167$). Dekstroz, düşük doz HPBCD ve yüksek doz HPBCD infüzyonları, izlem sonu OAB, KAH, QRS süresi ve QT aralığını benzer şekilde düzeltti(düşük doz HPBCD grubunda OAB değeri haricinde $p<0.0167$) ve gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (tüm değerler için $p>0.05$). Doku hasarı ve apoptoz skorları karşılaştırıldığında, dekstroz, düşük doz HPBCD ve yüksek doz HPBCD grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (her iki değerlendirme için $p>0.05$). Dekstroz ve yüksek doz HPBCD gruplarında birer sıçan, dekstroz veya HPBCD infüzyonu tamamlandıktan sonra öldü.

Sonuç: Bulgularımıza göre HPBCD, kardiyovasküler toksik etki oluşturmamıştır. HPBCD, sıçan amitriptilin zehirlenmesi modelindeki kardiyovasküler toksik etkilerin tedavi edilmesinde dekstrozdandaha etkili olmamıştır.

Anahtar kelimeler: Amitriptilin, 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin, HPBCD, zehirlenme, kardiyovasküler, toksisite

IV. SUMMARY (İNGİLİZCE ÖZET)

Effects of 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on Cardiovascular Signs of Amitriptyline Poisoning in a Rat Model

Burc Aydın, MD

Dokuz Eylül University, School of Medicine, Department of Medical Pharmacology,
Inciraltı/Balcova, 35340, Izmir, Turkey

Objective: The aim of this study is to investigate the efficacy of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HPBCD) as an antidotal treatment modality for the cardiovascular toxic effects of amitriptyline poisoning in a rat model.

Methods: Experiments were carried out on 33 male Wistar rats (324.0 ± 4.1 g). To evaluate cardiovascular effects of HPBCD alone, rats were infused with dextrose (5%, $n=7$) or HPBCD (16.76 mg/kg/min, $n=6$) via a jugular vein for 15 minutes. Arterial pressure via a carotid artery cannulation and electrocardiography data were recorded for 60 minutes. Mean arterial blood pressure (MAP), heart rate (HR), QRS duration, and QT interval values were measured for baseline, end-dextrose or -HPBCD infusion, and end-experiment timepoints (60 min). In the poisoning model, amitriptyline HCl (0.94 mg/kg/min) was infused via a jugular vein until the MAP dropped to the 50% of the baseline. Following amitriptyline infusion, dextrose (5%, $n=6$), low-dose HPBCD (4.19 mg/kg/min, 1:1 molar ratio, $n=7$), or high-dose HPBCD (16.76 mg/kg/min, 1:4 molar ratio, $n=7$) was infused via femoral vein for the same amount of time of amitriptyline

infusion. MAP, HR, QRS duration, and QT interval were measured for baseline, end-amitriptyline infusion, end-dextrose or -HPBCD infusion, and end-experiment timepoints (60 min). Hearts were excised at the end-experiment timepoint and examined with hematoxylin-eosin and Masson's trichrome stainings and activated caspase-3 immunohistochemistry for determination and scoring of tissue damage and apoptosis of cardiomyocytes, respectively.

Results: Baseline MAP, HR, QRS duration, and QT interval were similar in all groups ($p>0.05$, for all parameters). HPBCD infusion alone did not yield statistically significant difference for MAP, HR, QRS duration, QT interval, and histological scores for tissue damage and apoptosis when compared to dextrose in either group ($p>0.05$, for all parameters). In the amitriptyline poisoning model, MAP and HR values decreased while QRS duration and QT interval prolonged significantly following the amitriptyline infusion ($p<0.0167$, for all parameters in all groups). Dextrose, low-dose HPBCD, and high-dose HPBCD infusion similarly corrected MAP, HR, QRS, and QT values to the baseline at the end-experiment timepoint ($p<0.0167$, except for MAP value in low-dose HPBCD group) without significant difference between groups ($p>0.05$, for all parameters). Histological scores for tissue damage and apoptosis showed no statistically significant difference in dextrose, low-dose HPBCD, and high-dose HPBCD groups ($p>0.05$, for both comparisons). One rat in dextrose group and one in high-dose HPBCD group died after the end of dextrose or HPBCD infusion.

Conclusion:Based on our results, HPBCD did not show cardiovascular toxicity while it was no more effective than dextrose for the treatment of cardiovascular toxic effects of amitriptyline poisoning in rats.

Keywords: Amitriptyline, 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin, HPBCD, poisoning, cardiovascular, toxicity

V. GİRİŞ VE AMAC

Trisiklik antidepresanlar (TSA'lar), depresyon ve diğer bazı hastalıkların tedavisi için insanlarda kullanılan bir ilaç grubudur. Yanlış kullanım veya intihar amacıyla fazla miktarda alındıklarında, ölümcül olabilen zehirlenmelere yol açmaktadır. Amerikan Zehir Kontrol Merkezleri Birliği 2013 yılı raporunda tüm maddelerle zehirlenmelerde en sık karşılaşılan etkenler arasında antidepresanların beşinci sırada (%4.2) yer aldığı bildirilmektedir. Aynı yıl içinde ölümle sonuçlanan antidepresan nedenli zehirlenmelerde en sık karşılaşılan (34 vaka, %25.6) etken maddenin amitriptilin olduğu rapor edilmiştir (1). Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Acil Servisi'ne antidepresan zehirlenmesi ile başvuran hastalarda en sık kullanılan antidepresan grubu da TSA'lar (özellikle opipramol ve amitriptilin) olarak bulunmuştur (2).

TSA zehirlenmelerinde görülen belirti ve bulgular üç başlıkta toplanabilir:

a) kardiyovasküler sistem etkileri, b) merkezi sinir sistemi etkileri, c) antikolinergik etkiler. Kardiyovasküler sistem toksisitesinde ise taşikardi, elektrokardiyogram (EKG) değişiklikleri (PR ve QT aralığı ile QRS süresinin uzaması), aritmiler, hipotansiyon ve şok ile kalp durmasıdır (3). TSA'larla zehirlenmelerde solunum ve kardiyovasküler fonksiyonların desteklenmesi ve korunması esastır. Dekontaminasyon yöntemleri olan mide lavajı ve aktif kömür uygulaması, hastanın alımdan sonraki geliş süresine göre uygulanabilir. TSA zehirlenmesinin özgül bir tedavisi veya antidotu bulunmamaktadır. Tedavide belirti ve bulgulara yönelik bir yaklaşım izlenmektedir. EKG'de QRS süresi 0,1 saniyeden uzunsa, hipotansiyon ve ventriküler aritmi varsa sodyum bikarbonat infüzyonu uygulanır. TSA zehirlenmelerinde hemodiyaliz ve hemoperfüzyon etkili değildir (3, 4).

TSA'ların yağda çözünürlükleri ve kandaki proteinlere bağlanma oranları fazladır. Vücuttaki sanal dağılım hacimleri yüksektir ve enterohepatik döngüye girerler. Eldeki tedavi imkanlarının tümünün uygulanmasına rağmen hayatı tehdit edici belirti ve bulguları devam eden hastalar için çeşitli yöntemler geliştirilmeye çalışılmıştır. Bazıları yalnızca hayvanlarda denenilen bu yöntemler, plazma değişimi (5), vücut dışında arındırma (6), ilaca özgül antikolar (6-8), yağ emülsiyonu (9), nano boyutlu veziküller (10) ve kardiyopulmoner bypasstır (11).

Siklodekstrinler, altı, yedi veya sekiz (sırasıyla alfa, beta ve gama siklodekstrin) α -D-glukopiranoz biriminden meydana gelen hidrofilik siklik oligosakkaridlerdir. Hidrofilik yapı içinde hidrofobik bir merkez içerirler. Amerika'da kullanımı sınırlı olsa da Avrupa ve Japonya'da uzun yıllardır gıdalarda ve ilaçlarda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Hidrofobik ilaç moleküllerinin, çember şeklindeki siklodekstrin molekülünün ortasına bağlandığı ve bağlanmanın 1:1 eşleşme ile gerçekleştiği bilinmektedir (12). Yedi glukopiranoz biriminden meydana gelen beta siklodekstrinin amitriptilini bağlayabildiği ve bu bağlanmanın 1:1 eşleşme ile gerçekleştiği de analitik kimya çalışmaları ile gösterilmiştir (13, 14). Toksikolojik hayvan çalışmalarında beta siklodekstrinin hemoliz, apoptotik hücre ölümü ve geri dönüşsüz böbrek hasarı yaratabildiğini ortaya konmuştur (12). Beta siklodekstrinin toksikolojik etkilerini azaltmak ve suda çözünürlüğünü arttırmak için çeşitli beta siklodekstrin türevleri geliştirilmiştir. Bunlardan biri, 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin (HPBCD)'dir. HPBCD'nin amitriptilini bağlayabildiği ve bu bağlanmanın da 1:1 eşleşme ile gerçekleştiği analitik kimya çalışmaları ile gösterilmiştir (15). Toksikolojik hayvan çalışmalarında 200 mg/kg ve üzeri dozlarda intravenöz yolla uygulanan HPBCD, geri dönüşlü akciğer, karaciğer ve böbrek

değişiklikleri yapmaktadır. İnsanlardaki intravenöz HPBCD çalışmalarında herhangi bir advers etki bildirilmemiştir (16).

Bu çalışmanın amacı, anestezi altındaki sıçanlarda bir trisiklik antidepresan olan amitriptilin ile oluşturulan kardiyovasküler toksik etkilerin geri döndürülmesinde HPBCD'nin etkililiğinin araştırılmasıdır. Çalışmanın hipotezi, bağlayıcı ajan olarak intravenöz HPBCD uygulamasının sıçanlardaki amitriptilin zehirlenmesinde gözlenen kardiyovasküler toksik etkileri düzelterektedir.

VI. GENEL BİLGİLER

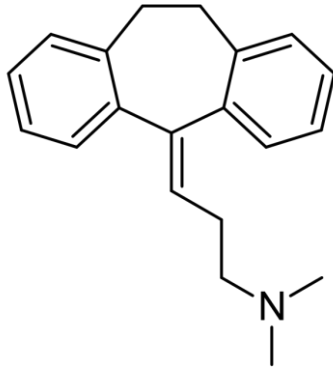
VI.A. TRİSİKLIK ANTİDEPRESANLAR

Amitriptilinin de dahil olduğu trisiklik antidepresanlar, 1956 yılında imipraminin antidepresan özelliğinin gösterilmesi ile ortaya çıkmış bir ilaç grubudur (17). Kimyasal yapılarına göre isimlendirilmişlerdir. Majör depresif bozukluk, bipolar bozukluğun depresif dönemi, agorofobili panik bozukluğu, obsesif kompulsif bozukluk, yaygın anksiyete bozukluğu, anoreksia nervoza ve bulimia nervoza tedavisi için kullanılmaktadırlar (18).

VI.B. AMİTRİPTİLİN

VI.B.1. Kimyasal yapısı

Amitriptilin, kimyasal formülü $C_{20}H_{23}N$ olan dibenzosiklohepten türevi bir trisiklik antidepresandır (Şekil 1). Oktanol-su partisyon katsayısı (logP) 4.92'dir (19).



Şekil 1. Amitriptilinin kimyasal yapısı. (Wikimedia Commons'tan alınmıştır.)

VI.B.2. Amitriptilinin Farmakolojik Özellikleri

VI.B.2.a. Farmakodinamik özellikleri

Amitriptilin, plazma zarındaki noradrenalin ve serotonin taşıyıcılarına bağlanır ve bu taşıyıcıları bloke ederek sinir uçlarına amin gerilimini engeller. Amin taşıyıcıları yanında muskarinik asetilkolin, H₁ histamin, α_1 adrenerjik ve 5-HT₆ ile 5-HT₇ serotonin reseptörlerine de bağlanır ve bu reseptörleri antagonize eder (20).

VI.B.2.b. Farmakokinetik özellikleri

Emilim: Amitriptilin, gastrointestinal sistemden yavaş ve tamamen emilir. Tepe plazma konsantrasyonuna 4-8 saatte ulaşılır. Sistemik biyoyararlanımı %31-61 arasındadır (21, 22).

Dağılım: Oldukça lipofilik bir molekül olan amitriptilin tüm vücutta dağılır ve doku proteinlerine bağlanır. Sanal dağılım hacmi 5-10 L/kg'dır. Kanda %82-96 oranında proteinlere bağlanır (21, 22).

Metabolizma: Amitriptilin temel olarak karaciğerde N-demetilasyon, hidroksilasyon ve glukuronidasyon ile metabolize edilir. N-metilasyon reaksiyonuna en fazla katkı yapan enzim CYP2C19'dur ve bu reaksiyon sonunda biyolojik olarak aktif olan nortriptilin ortaya çıkar. Hidroksilasyon reaksiyonunda en fazla katkıyı ise CYP2D6 enzimi yapar. Yarılanma ömrü 31-46 saat arasındadır. Oral alımında ilk geçiş eliminasyonuna uğrar (22-24).

Atılım: Amitriptilinin yaklaşık üçte biri-yarısı 24 saat içinde konjüge inaktif moleküller şeklinde idrarla atılır (21).

VI.B.3. Amitriptilinin Toksik Dozu

Türkiye'deki ulusal rehberler, trisiklik antidepresanların yaşamı tehdit eden dozlarının 10-20 mg/kg olduğunu, ancak daha düşük dozlarda da ciddi zehirlenme gelişebileceğini

belirtmektedir (4). Çocuklarda akut alımda ciddi zehirlenme ile ilişkilendirilen en düşük amitriptilin dozu 6.8 mg/kg, ölümlle ilişkilendirilen en düşük doz ise 15 mg/kg'dır. Erişkinde akut alımda ciddi zehirlenme ile ilişkilendirilen en düşük doz 300 mg'dır (25, 26).

VI.B.4. Amitriptilinin Toksik Etki Mekanizması

Amitriptilinin toksik etki mekanizmasında noradrenalin gerilim inhibisyonu, α adrenerjik reseptör blokajı ve muskarinik reseptör antagonizmasına bağlı antikolinergik etki rol almaktadır (3). Bunlar yanında amitriptilin, kardiyak sodyum kanalı (hH1) akımını lokal anesteziyelere benzer biçimde inhibe eder ve kalp kasında depolarizasyonu yavaşlatır (27). Amitriptilinin, repolarizasyonda rol alan kardiyak potasyum kanalı (HERG) akımını da inhibe ettiği gösterilmiştir (28).

VI.B.5. Amitriptilin Zehirlenmesinde Klinik Belirti ve Bulgular

Kardiyovasküler belirti ve bulgular: En sık gözlenen kardiyovasküler bulgu, noradrenalin gerilim inhibisyonuna ve muskarinik reseptör antagonizmasına bağlı sinüs taşikardisidir. Depolarizasyonun yavaşlamasına bağlı olarak iletim süresi uzar ve EKG'de PR ve QT aralıklarında uzama, QRS süresinde artma görülebilir. EKG'de görülebilecek diğer bulgular sağ dal bloğu, atriyoventriküler blok, Brugada dalgası, torsade de pointes ve özgül olmayan ST aralığı ve T dalgası değişiklikleridir. Aritmiler genelde ilaç alımını takiben ilk 24 saat içinde ortaya çıkar ve supraventriküler (atriyal fibrilasyon) ya da ventriküler (ventriküler taşikardi, ventriküler fibrilasyon) biçimde olabilir. Hipotansiyon, noradrenalin azlığına, α_1 adrenerjik reseptör blokajına ve kardiyak kontraktilitede azalmaya bağlı olarak görülebilir ve kardiyojenik şok gelişebilir (3, 29).

Merkezi sinir sistemi belirti ve bulguları: Amitriptilin zehirlenmesinde en sık gözlenen merkezi sinir sistemi bulguları letarji, koma, nöbet ve deliryumdur. Komanın (Glasgow Koma Skalası skoru <8) varlığı, nöbet ve hemodinamiyi tehdit edici aritmi gelişimi açısından bir risk faktörüdür (3, 30).

Antikolinerjik belirti ve bulgular: Amitriptilin zehirlenmesinde görülen antikolinerjik belirti ve bulgular özgül olmayıp ağız kuruluğu, görme bulanıklığı, midriyazis, idrar ve gayta retansiyonu ve vücut sıcaklığının artması biçiminde ortaya çıkabilir (3).

VI.B.6. Amitriptilin Zehirlenmesinde Tanı

Amitriptilin zehirlenmesinde tanı çoğu kez öykü, belirti/bulgular ve EKG sonuçları ile konur. QRS süresinin uzadığı (>0.1 saniye), hipotansiyonun geliştiği, bilinç değişikliği ile antikolinerjik bulguların görüldüğü durumlarda amitriptilin zehirlenmesi akla gelmelidir (4). Amitriptilin kan düzeylerinin niteliksel veya niceliksel olarak saptanması, ciddi zehirlenmeler için risk faktörü değildir ve tedaviye yardımcı olmamaktadır (4, 31).

VI.B.7. Amitriptilin Zehirlenmesinde Tedavi

VI.B.7.a. Acil ve destek tedavi

Amitriptilin zehirlenmesinde temel yaklaşım, diğer zehirlenmelerde olduğu gibi, havayolu, solunum ve dolaşımın değerlendirmesi ile başlamalıdır. QRS süresi uzamış (>0.1 saniye), hipotansiyon gelişmiş veya aritmi mevcutsa sodyum bikarbonat tedavisi (1 mEq/kg intravenöz infüzyon) başlanmalıdır, gerektiğinde tekrar edilebilir. Hipotansiyon tedavisi için intravenöz serum fizyolojik infüzyonu yapılmalıdır. Serum fizyolojik uygulaması ile düzelmeyen hipotansiyonda vazopresörler kullanılmalıdır. Sodyum bikarbonat tedavisine cevap vermeyen aritmilerde, ventriküler taşikardi ve erken ventriküler ektopik atımlar için

lidokain (1-1.5 mg/kg intravenöz bolus, 1-4 mg/dk intravenöz infüzyon), ventriküler taşikardi, ventriküler fibrilasyon ve torsade de pointes için magnezyum sülfat (1 g intravenöz bolus) uygulanabilir (4, 32). Amitriptiline bağlı nöbetlerde benzodiazepinler (diazepam 5 mg intravenöz, lorazepam 2 mg intravenöz) kullanılabilir (4). Trisiklik antidepresan zehirlenmelerinde asistol ile ilişkilendirildiğinden antikolinerjik belirti ve bulguların tedavisinde fizostigmin kullanılmamalıdır (33).

VI.B.7.b. Dekontaminasyon

Trisiklik antidepresan zehirlenmelerinde dekontaminasyon uygulamalarını değerlendiren bir derlemenin sonuçlarına göre mide lavajı, tüm barsak yıkaması ve tekrarlayan aktif kömür uygulaması, rutin tedavide önerilmemiştir (6). Türkiye'deki ulusal rehberlere göre ilaç alımını takip eden 6 saat içinde ve yüksek dozlarda(>10 mg/kg) alımlarda mide lavajı yapılmalıdır. Ciddi zehirlenmelerde ise tekrarlayan aktif kömür uygulanabilir (4). Ekstrakorporeal tedavilerden yarar gören hastalara dair vaka raporları bildirilmiş olsa da trisiklik antidepresanların farmakokinetik özellikleri nedeniyle rutin uygulamada etkili olmadıkları düşünülmektedir (6, 34).

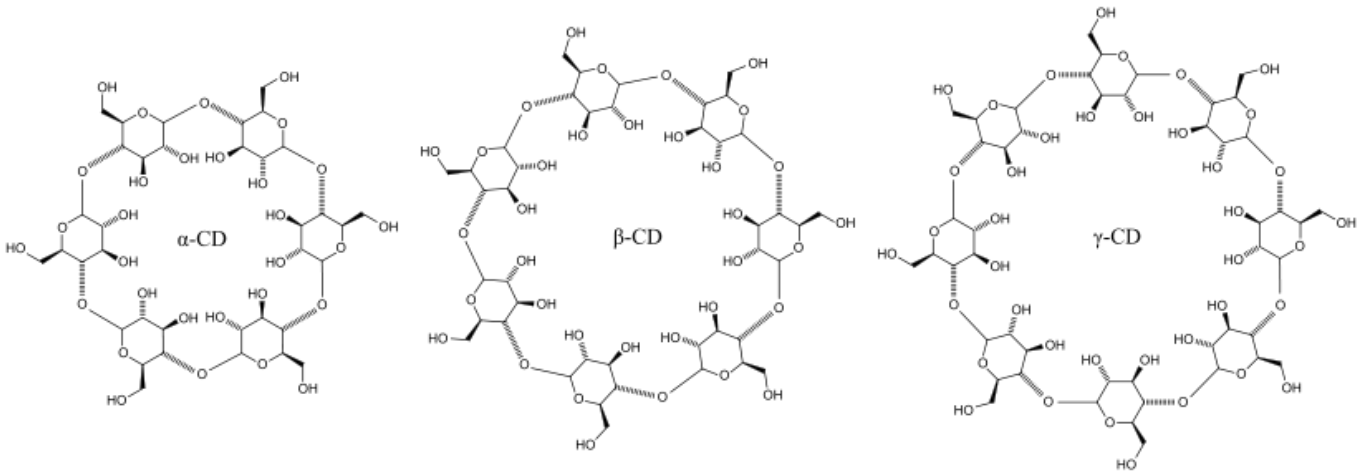
VI.B.7.c. Özgül antidotlar ve diğer tedavi seçenekleri

Trisiklik antidepresanlara özgül antikorlar (ovine antibody) ile insanlarda amitriptilin zehirlenmesi tedavisi bir vaka bildirimi ve bir vaka serisi ile denenmiştir. Bu çalışmalarda, özgül antikorların total serum amitriptilin düzeyini artırırken serbest amitriptilin düzeyini azalttığı bulunmuş ve sınırlı hastada klinik düzeltme yaratabileceği belirtilmiştir (35, 36). Tedaviye cevapsız hipotansiyonu ve QRS süresi uzaması olan hastalarda hipertonic serum fizyolojik infüzyonunun yararlı olabileceği vaka raporları ile bildirilmiştir (37). Benzer

biçimde, ciddi amitriptilin zehirlenmesi olan ve destek tedaviye cevap vermeyen hastalarda plazma değişimi (5) veya intravenöz lipid tedavisi uygulanabileceği bildirilmiştir (9, 38, 39). İntravenöz lipid tedavisi farklı vakalarda yararlı, etkisiz ya da advers etki ile ilişkili olarak değerlendirilmiştir (9, 38, 39).

VI.C. SIKLODEKSTRİNLER

Siklodekstrinler, ilk kez 1891 yılında tanımlanmış siklik glukoz oligomerleri olup 6, 7 veya 8 α -D-glukopiranoz alt biriminden oluşurlar ve içerdikleri glukopiranoz alt birimi sayısına göre sırasıyla α , β veya γ siklodekstrin olarak adlandırılırlar (Şekil 2). Gıda, kozmetik ve ilaç sektörlerinde çoğunlukla stabilizatör, çözücü veya lokal iritasyonu azaltıcı olarak kullanılmaktadırlar ve siklodekstrin içeren farmasötik ürünler halihazırda kullanıma sunulmuştur. (40).



Şekil 2. Alfa, beta ve gama siklodekstrinin kimyasal yapısı. (Wikimedia Commons'tan alınmıştır.)

Siklodekstrinler, suda çözünen moleküller olup kesik koni biçimli bir konformasyona sahiptirler. Suda çözündüklerinde merkezdeki boşluk görelî olarak çözeltiliye göre daha lipofildir. Uygun büyüklüğe sahip lipofilik moleküller, bu boşluğa kovalent olmayan bağlar ile yerleşerek inklüzyon kompleksleri oluşturabilirler (41, 42). Inklüzyon kompleksleri genellikle bir siklodekstrin molekülüne bir adet lipofilik molekülün tersinir olarak bağlanması (1:1 inklüzyon kompleksi) ile meydana gelmektedir (12).

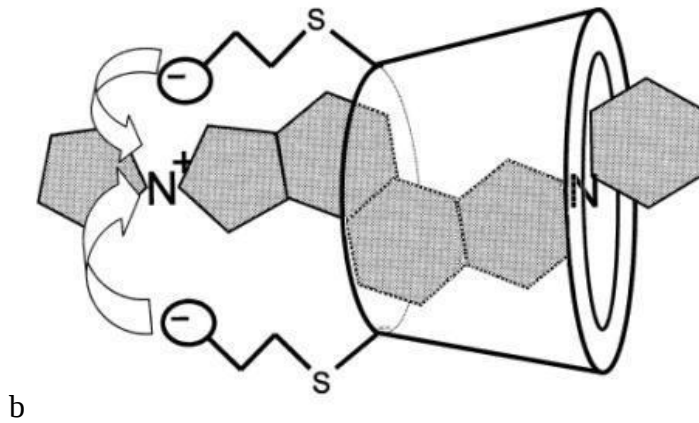
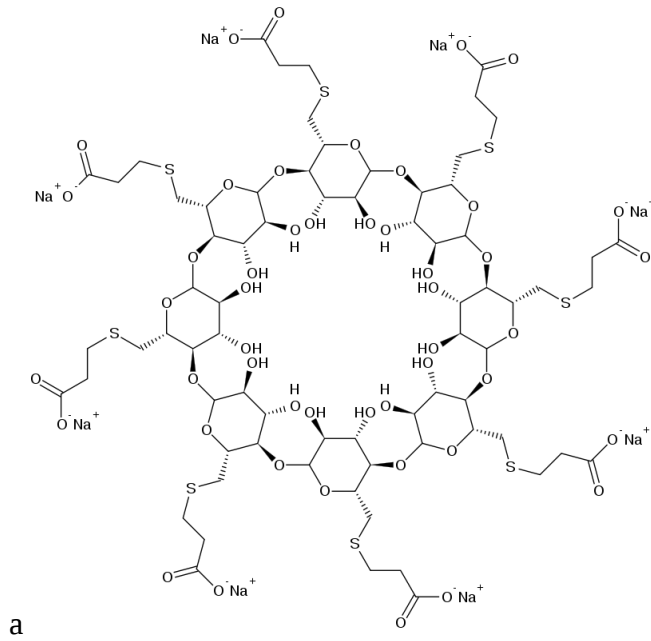
Siklodekstrinlerin ilaç molekülü bağlayıcı ajan olarak kullanıma giren ilk ve tek üyesi olan sugammadeks, roküroniyum için çözücü bir ajan araştırılması sırasında bulunmuştur. Sugammadeks, modifiye edilmiş bir gama siklodekstrin olup roküroniyuma yüksek afinite ($K_a=1.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) ve özgülük ile 1:1 molar oran ile bağlanmaktadır (43) (Şekil 3). İntravenöz olarak uygulanan sugammadeks, plazmadaki serbest roküroniyumu bağlayarak konsantrasyon farkı yaratmakta ve kas-sinir kavşağına geçmiş roküroniyum moleküllerinin de plazmaya dönmesini sağlamaktadır. Plazmaya dönen roküroniyum molekülleri de sugammadeks tarafından bağlanmaktadır (43, 44). Klinik yanıt, roküroniyum ile ortaya çıkan nöromüsküler blokajın sugammadeks tarafından hızla ortadan kaldırılması olarak gözlenmektedir (45).

Amitriptilini 1:1 molar oran ile bağlayabildiği kimyasal olarak gösterilmiş olan siklodekstrinler, alfa siklodekstrin ($K_a=113 \text{ M}^{-1}$), beta siklodekstrin ($K_a=3185 \text{ M}^{-1}$) ve 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrindir ($K_a=1030 \text{ M}^{-1}$)(14, 15, 46-48). Beta siklodekstrin, geri dönüşsüz böbrek hasarı ve böbrekte hücre ölümü ile ilişkili olduğundan (12) çalışmamızda bağlayıcı ajan olarak 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin kullanılmıştır.

VI.D. 2-HİDROKSİPROPİL-β-SİKLODEKSTRİN (HPBCD)

VI.D.1. Kimyasal Yapısı

HPBCD, kimyasal formülü $(C_6H_9O_5)_7(C_3H_7O)_{4.5}$ olan bir β siklodekstrin türevidir. β siklodekstrindeki her glukopiranoz birimine ortalama 0.67 hidroksipropil grubu eklenmesi ile meydana gelmektedir. Ortalama moleköl ağırlığı 1396'dır. Oldukça hidrofiliktir (çözünürlük: 45 g/100 ml) (49).



Şekil 3. Sugammadexin kimyasal yapısı (a) ve sugammadex-roküronyum inklüzyon kompleksinin şematik gösterimi (b). (Wikimedia Commons'tan alınmıştır.)

VI.D.2. HPBCD'nin Farmakolojik ve Toksikolojik Özellikleri

VI.D.2.a. Farmakokinetik özellikleri

Emilim: HPBCD, oral uygulama sonrası sıçanda %3, insanda %0.5-3.3 oranında emilir (12, 41).

Dağılım: HPBCD'nin dağılım hacmi sıçanda 194 ml/kg (50), insanda 222-253 ml/kg'dır (12, 51). Bu değerlere göre, büyük ve hidrofilik bir molekül olan HPBCD yalnızca hücre dışı sıvılarda dağılmaktadır.

Metabolizma ve atılım: Oral yolla uygulanan HPBCD sistemik olarak çok az emilir ve oral dozun %50-65'i değişmeden, kalanı ise intestinal flora tarafından metabolize edilerek gayta ile atılır (41). İntravenöz olarak uygulanan HPBCD'nin vücutta metabolize edilmediği düşünülmektedir. Uygulanan dozun yaklaşık olarak tamamı 24 saat içinde değişmeden glomerüler filtrasyon yoluyla idrarda atılır (50). HPBCD'nin plazma yarılanma ömrü sıçanda 23.9 dakika, insanda 102-114 dakika arasındadır (12).

VI.D.2.b. İntravenöz yolla uygulanan HPBCD'nin toksikolojik özellikleri

Akut toksisite testlerinde maymunda 10000 mg/kg dozu ve farede 2000 mg/kg dozu ölüme sebep olmamıştır. Sıçanda 2250 mg/kg dozu, hareketlerde azalmaya, solunum düzensizliğine ve ölüme sebep olmuştur. Sıçanda 1000 mg/kg dozu ise advers etki veya ölüme sebep olmamıştır. Sıçanlara 4-7 gün boyunca 225, 2400 veya 7200 mg/kg/gün dozuyla uygulanan HPBCD'nin akciğerde köpüksü makrofaj infiltrasyonu, böbrek proksimal tübüllerinde vakuolizasyon ve böbrek ağırlığında artış ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Sıçanlara ve köpeklere 3 ay boyunca sırasıyla 50 veya 100 mg/kg/gün dozuyla HPBCD uygulandığında advers etki görülmezken her iki türe de 400 mg/kg/gün dozuyla uygulanan HPBCD, akciğerde köpüksü hücre infiltrasyonu ile plazma aminotransferaz ve bilirübin düzeylerinde

artış ile ilişkili bulunmuştur. Bir aylık süre sonunda bu bulguların büyük kısmı gerilemiştir (12, 16). Köpeklerle toplam yaklaşık 200 veya 400 mg/kg dozuyla uygulanan HPBCD, kan basıncı, kalp atım hızı, QRS süresi ve QT aralığı değerlerinde serum fizyolojiğe kıyasla anlamlı farklılık oluşturmamıştır (52). Köpeklerde yapılan bir başka çalışmada 800 mg/kg dozuyla uygulanan HPBCD, yalnızca dişilerin ortalama arteriyel kan basıncında artış yaratırken dişi ve erkeklerin kalp atım hızını azaltmıştır. Kalp atım hızına göre düzeltilmiş QT aralıklarında ise anlamlı bir farklılık görülmemiştir (53). Sıçanlara 14 ve 91 gün, maymunlara ise 91 gün içinde günde 200 mg/kg dozuyla uygulanan HPBCD, vücut ağırlığı, besin tüketimi, tam kan sayımı ve biyokimya değerleri ile organ ağırlıkları ve histolojik özellikleri üzerinde advers etki göstermemiştir (54). Seksen gün içinde haftada iki kez 1 g/kg ya da 20 gün boyunca 2 g/kg/gün dozuyla HPBCD uygulanan tavşanların böbrek proksimal tübül hücrelerinde geri dönüşlü vakuolizasyon görülmüş, nekroz saptanmamıştır (55). Domuzlara 1 g/kg dozunda uygulanan HPBCD, kalp hızında artışa ve kan basıncında düşüşe neden olmuş, 2 hafta içinde 5 kez 0.25-0.5 g/kg dozuyla uygulandığında ise karaciğerde yağlı değişiklik ile akciğerde inflamatuvar değişiklikler ve erken fibrozis görülmüştür (56). Sağlıklı insanlara bir kez uygulanan 1 g HPBCD advers etkiye neden olmamış, 3 g dozunda uygulandığında böbrek işlevleri üzerinde advers etki görülmemiştir (16). Hipervitaminozis A tanısı olan bir hastaya 470 mg/kg/gün dozuyla 4 gün HPBCD uygulandığında advers etki görülmemiştir (57). Niemann-Pick tanısı bulunan bir hastaya 23 ay boyunca haftada 3 kez 2.5 g/kg HPBCD uygulanmış ve bir pnömoni epizodu sırasında HPBCD infüzyonunu takiben akciğer grafisinde geri dönüşlü yaygın opasite artışı gözlenmiştir (58). HPBCD'nin müstahzarlarda çözücü olarak 16 g/gün dozunda kullanılması onaylanmıştır (41).

VII. GEREÇ VE YÖNTEM

VII.A. DENEY HAYVANLARI VE BARINMA KOŞULLARI

Çalışma için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı (Protokol No: 86/2012) alındı ve tüm deneyler, Helsinki Bildirgesi, Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmelik ve laboratuvar hayvanı kullanımı ile ilgili uluslararası mevzuata uygun olarak Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Çalışmada, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilen toplam 33 adet Wistar albino soyu erkek sıçan (324.0 ± 4.1 g) kullanıldı. Sıçanlar, konvansiyonel kafeslerde, oda sıcaklığında, 12'şer saatlik aydınlık-karanlık döngüsünde, standart pelet sıçan yemi ile beslendi ve suya serbestçe ulaşabilmeleri sağlandı. Sıçanlar, deneylerden 12 saat önce aç bırakıldı, ancak su içmelerine izin verildi.

VII.B. CERRAHİ İŞLEMLER

Sıçanlara üretan / α -kloraloiz (500 mg/kg / 50 mg/kg) ile intraperitoneal olarak anestezi verildi. Hava yolunun kontrolü için trakeostomi ile trakea kanüle edildi ve nazal kanül ile oksijen (2 L/dk) uygulandı. Kan basıncı ölçümü için sağ karotis arteri, ilaç infüzyonu için sol femoral ven ve/veya sol eksternal juguler ven, heparinize (100 ünite /mL) %5 dekstroz solüsyonu içeren polietilen kanül (OD: 0.96 mm, ID: 0.58 mm, Smiths Medical, Kent, UK) aracılığı ile kanüle edildi (Resim 1). Cerrahi işlemler tamamlandıktan sonra sıçanların stabilizasyonu için en az 15 dakika beklendi. Stabilizasyon sonrası sistolik arteriyel kan

basıncı (SAB) 100 mmHg'nın altında olan sıçanlar deneye alınmadı. Deney boyunca sıçanlar ısıtıcı bir lamba altında tutularak vücut sıcaklığının 37°C'de tutulması sağlandı (59).

VII.C. KARDİYAK PARAMETRELERİN KAYDI

Arteriyel kan basıncı, bir basınç transdüseri (MLT844, ADInstruments, New South Wales, Australia) ile ölçüldü. Elektrokardiyogram, subkütanöz elektrotlar ile bipolar birinci derivasyon kullanılarak elde edildi. Veri kaydı, PowerLab/8SP sistemi (ADInstruments, New South Wales, Australia) ile her 15 saniyede bir gerçekleştirildi (Resim 2). Veri analizi için Chart 5.0 yazılımı (ADInstruments, New South Wales, Australia) kullanıldı ve deney protokollerinde belirtilen anlar için ortalama arteriyel kan basıncı ($OAB = \frac{\text{Sistolik basınç} + (\text{Diastolik basınç} \times 2)}{3}$), kalp atım hızı (KAH), QRS süresi ve QT aralığı kaydedildi. QRS süresi ve QT aralığı hesaplaması için elektrokardiyogramda ardışık üç kalp atımındaki değerlerin ortalaması alındı. Deneyde sıçanların yaşam süresi kaydedildi. Solunumun durması, EKG'de asistol görülmesi ya da OAB'nin 20 mm Hg'nın altına düşmesi halinde ölümün gerçekleştiği kabul edildi.

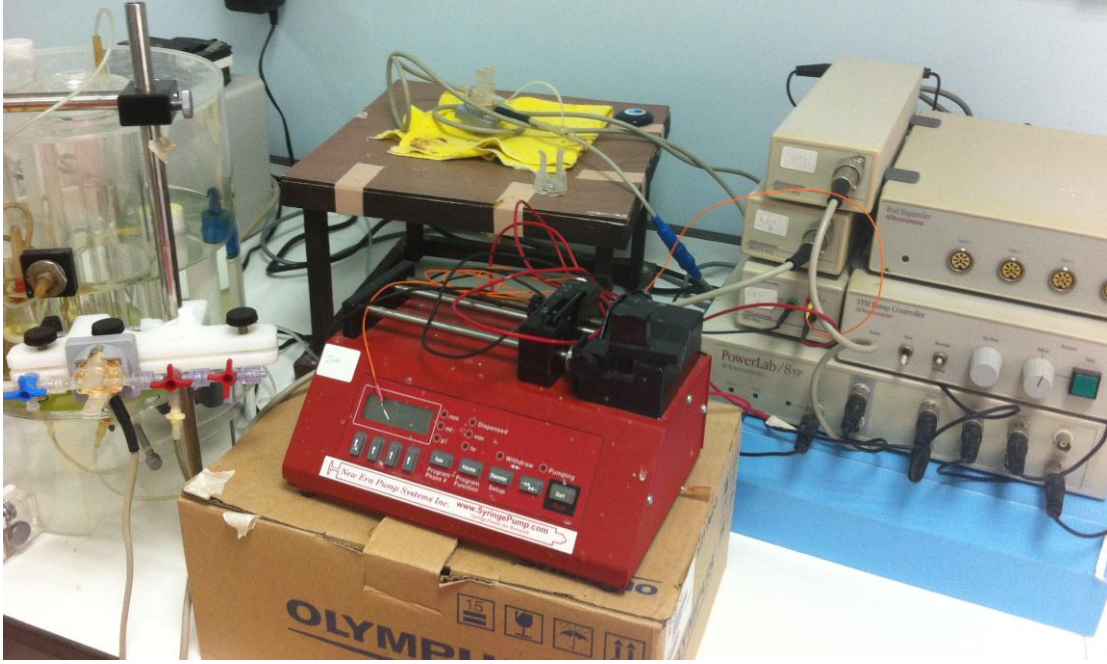
VII.D. DENEYDE KULLANILAN İLAÇLAR

Üretan, amitriptilin HCl ve 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin(HPBCD), Sigma-Aldrich'ten (MO, ABD), α -kloraloz ise Alfa Aesar'dan (MA, ABD) satın alındı. İlaçların stok solüsyonları (üretan 300 mg/ml, α -kloraloz 40 mg/ml, amitriptilin HCl 30 mg/ml, HPBCD 400 mg/ml) distile suda hazırlandı. Amitriptilin ve HPBCD solüsyonları, son konsantrasyonlarına %5 dekstrozu solüsyonu ile dilüe edilerek getirildi. Tüm amitriptilin ve HPBCD solüsyonları, infüzyon pompası (NE-1000, New Era Pump Systems, NY, ABD) ile

0.05 ml/kg/dk infüzyon hızıyla sol femoral ven ve/veya sol eksternal juguler ven içine uygulandı (Resim 2).



Resim 1. Trakea, karotis arteri ile juguler ve femoral ven kanülasyonu sonrası bir sıçanın görünümü.



Resim 2. Basınç transdüseri, veri kayıt sistemi ve infüzyon pompasının görünümü.

VII.E. DENEY PROTOKOLLERİ

Çalışmamızda iki ayrı *in vivo* deney protokolü uygulandı. Birinci protokolde amitriptilin uygulanmayan sıçanlarda HPBCD'nin kardiyak parametrelere etkisi değerlendirildi. İkinci protokolde, amitriptilin zehirlenmesi modelinde oluşan kardiyovasküler toksik etkiler üzerine HPBCD'nin etkisi değerlendirildi. Sıçanlar deney gruplarına rasgele atandı. *In vivo* deney protokolleri tek bir araştırmacı tarafından açık etiketli olarak gerçekleştirildi.

VII.E.1. Birinci Protokol: HPBCD'nin Kardiyak Parametrelere Etkisi

Bu protokol ile HPBCD'nin kardiyak parametrelere tek başına etkisi araştırıldı. Bunun için, amitriptilin zehirlenmesi modelinde uygulanması planlanan en yüksek HPBCD dozu (16.76 mg/kg/dk) kullanıldı. Toplam 13 adet sıçan iki gruba ayrılarak cerrahi işlem uygulandı (ilaç infüzyonu için yalnızca sol eksternal juguler ven kanüle edildi) ve stabilizasyondan sonra

sıçanlara %5 dekstroz (n=7) ya da HPBCD solüsyonu (n=6), beklenen en uzun amitriptilin infüzyon süresi olan 15 dakika boyunca infüze edildi. HPBCD veya dekstroz infüzyonu kesildikten sonra, infüzyonun başlangıcından itibaren toplam süre 60 dakika olacak şekilde izleme devam edildi (Şekil 4). Stabilizasyon sonunda (başlangıç), dekstroz veya HPBCD infüzyonu sonunda ve izlem sonunda OAB, KAH, QRS süresi ve QT aralığı kaydedildi.

10 dakika	15 dakika	15 dakika	45 dakika
Cerrahi İşlemler	Stabilizasyon	Grup 1: Dekstroz infüzyonu (%5, 0.05 ml/kg/dk; n=7)	İzlem
		Grup 2: HPBCD infüzyonu (16.76 mg/kg/dk, 0.05 ml/kg/dk; n=6)	
		< ----- 60 dakika----- >	

Şekil 4. Birinci protokol için akış şeması. HPBCD, 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin.

VII.E.2. İkinci Protokol: Amitriptilin Zehirlenmesi Modelinde Oluşan Kardiyovasküler Bulgular Üzerine HPBCD'nin Etkisi

Bu protokol ile HPBCD'nin amitriptilin zehirlenmesi modelinde oluşan kardiyovasküler toksik etkiler üzerine etkisi araştırıldı. Daha önceki *in vivo* araştırmalarda, amitriptilin HCl'nin ortalama 10-15 dakika içinde OAB'de %50 düşme yapan infüzyon dozu 0.94 mg/kg/dk olarak bulunmuştur (59). Bu çalışmada da amitriptilin zehirlenme modeli oluşturmak için aynı doz kullanıldı. HPBCD dozu, amitriptilin HCl dozuna göre 1:1 (her amitriptilin molekülü için bir HPBCD molekülü) ve 1:4 (her amitriptilin molekülü için dört HPBCD molekülü) molar orana karşılık gelecek şekilde sırasıyla 4.19 ve 16.76 mg/kg/dk olarak belirlendi. Sıçanlara uygulanan infüzyon hacminin yüksek olmaması için kullanılan en yüksek HPBCD dozu, amitriptilin HCl dozuna göre 1:4 molar orana karşılık gelecek şekilde sınırlandırıldı.

Toplam 20 adet sıçan üç gruba ayrılarak cerrahi işlem uygulandı (amitriptilin infüzyonu için sol eksternal juguler ven, dekstroz ya da HPBCD infüzyonu için sol femoral ven kanüle edildi) ve stabilizasyondan sonra sıçanlara 0.94 mg/kg/dk infüzyon dozunda amitriptilin uygulandı. Başlangıç OAB'de yaklaşık %50 düşme görüldüğünde amitriptilin infüzyonu kesildi ve hemen ardından %5 dekstroz (n=6), düşük doz HPBCD (HPBCD 1:1 grubu, 4.19 mg/kg/dk; n=7) ya da yüksek doz HPBCD (HPBCD 1:4 grubu, 16.76 mg/kg/dk; n=7) infüzyonu başlanarak amitriptilin infüzyonu süresi ile aynı süre boyunca infüzyona devam edildi. Amitriptilin infüzyonu başlangıcından itibaren toplam süre 60 dakika olacak şekilde izleme devam edildi (Şekil 5). Stabilizasyon sonunda (başlangıç), amitriptilin infüzyonu sonunda, dekstroz veya HPBCD infüzyonu sonunda ve izlem sonunda OAB, KAH, QRS süresi ve QT aralığı kaydedildi.

10 dakika	15 dakika	10-15 dakika*	10-15 dakika*	30-40 dakika
Cerrahi İşlemler	Stabilizasyon	Amitriptilin infüzyonu (0.94 mg/kg/dk, 0.05 ml/kg/dk)	Grup 1: Dekstroz infüzyonu (%5, 0.05 ml/kg/dk; n=6)	İzlem
			Grup 2: HPBCD infüzyonu (4.19 mg/kg/dk, 0.05 ml/kg/dk; n=7)	
			Grup 3: HPBCD infüzyonu (16.76 mg/kg/dk, 0.05 ml/kg/dk; n=7)	
		< ----- 60 dakika ----- >		

Şekil 5. İkinci protokol için akış şeması. *Eşit süre boyunca. HPBCD, 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin.

VII.F. HİSTOLOJİK İNCELEME

Deney esnasında ölen ya da izlem süresinin tamamlanmasından sonra hala genel anestezi altındaki sıçanların toraksları açılarak kalpleri çıkarıldı ve histokimyasal incelemeler için %10'luk formolde 24–48 saat bekletilerek fikse edildi. Daha sonra fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandı. Dehidratasyon amacıyla sırasıyla %70, %80 ve %96'lık etil alkol serilerinde 20'şer dakika; ardından 4 farklı aseton serisinde 20'şer dakika tutuldu. Şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki farklı ksilene tabi tutuldu. 1'er saatlik 2 kez yumuşak parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular sert parafin bloklar içerisine gömüldü. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 5µm kalınlığında kesitler alındı (Tablo 1).

Tablo 1: Doku takip protokolü.

İşlem	Uygulama	Süre
Fiksasyon	%10'luk formol	24-48 saat
Fiksatiften Uzaklaştırma	Akarsu	1 gece
Dehidratasyon	%70-80-96'lık alkol	20'şer dakika
Post Fiksasyon	Aseton 1-2-3-4	20'şer dakika
Şeffaflandırma	Ksilen 1-2	30'ar dakika
	Yumuşak parafin 1-2	1'er saat
Bloklama	Sert parafin	

VII.F.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde tutuldu. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra dehidratasyon işlemi için 5 değişim azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika hematoksilen (01562E, Surgipath, Cambridgeshire, İngiltere) ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika

akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin (01602E, Surgipath, Cambridgeshire, İngiltere) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70,%80, %96 ve 2 seri absölü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20’şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı (Tablo 2).

Tablo 2: Hematoksilen-Eozin boyama protokolü.

İşlem	Uygulama	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda ısısında)	10 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda ısısında)	10 dakika
Rehidratasyon	%100’lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%100’lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96’lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80’lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70’lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Hematoksilen	10 dakika
Yıkama	Akarsu	10 dakika
Boyama	Eozin	2 dakika
Yıkama	%70-80-96-100-100’lük alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 dakika
Kapama	Entellan	

VII.F.2. Masson Trikrom Boyaması

Deparafinizasyon için 1 gece 60°C'lik etüvde bekletilen kesitler üç farklı ksilende tutuldu. Daha sonra azalan alkol serilerinden geçirildi. Distile suda çalkalandıktan sonra Masson trikrom boyama seti (2049 GBL, İstanbul, Türkiye) içerisinde dokular üzerine 4 damla weigert hematoksilen boyası ile 4 damla ferrik klorür çözeltisi damlatıldı ve 10 dakika bekletildi. Distile su ile yıkandıktan sonra kesitlere uygulanan 2 damla asit-alkol çözeltisi 4 dakika sonra uzaklaştırıldı. Ardından 2 damla ponceau asit fuksin azofloksin çözeltisi dokunun üzerini tamamen kaplayacak şekilde uygulandı. Dört dakika bekletilen kesitler distile su ile yıkandı. Daha sonra 2 damla fosfomolibdik asit turuncu G boyası ile 10 dakika muamele edildikten sonra uzaklaştırıldı ve 8 damla açık yeşil boya ile 5 dakika boyandı. Boyamanın ardından distile su ile yıkanan kesitler artan alkol serilerinden geçirildi. Ksilen ile şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 3).

VII.F.3. Aktive Kaspaz-3 Boyaması

Alınan kesitler öncelikle 60 °C'lik etüvde 1 gece bekletildi. Daha sonra şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Azalan alkol serilerinden geçirilip distile suda çalkalandı. Suyu uzaklaştırılan dokuların etrafı pappen ile çizildi. Ardından dokular 15 dakika 37°C de tripsin ile muamele edildi. 3 kez fosfat tamponlu salin ile yıkanan kesitler 10 dakika hidrojen peroksit ile oda ısısında muamele edildi. Tekrar fosfat tamponlu salin ile yıkama yapıldı ve 1 saat bloklama solüsyonu (TA125-UB, Lab Vision, CA, ABD) ile bekletildi. Primer antikör olan rat spesifik anti-aktive kaspaz-3antikoru (1:100; Bios, 1932R,Rb aVit) ile + 4 °C' de 1 gece bekletildi. Ertesi gün fosfat tamponlu salin ile yapılan yıkamadan sonra biotin-streptavidin hidrojenperoksidad ikincil antikoru (85-9043 Zymed

Tablo 3: Masson trikrom boyama protokolü.

İşlem	Uygulama	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda ısısında)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda ısısında)	20 dakika
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	No:1 + No:2 solüsyonu	10 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	No:3	4 dakika
Boyama	No:4	4 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	No:5	10 dakika
Boyama	No:6	5 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Dehidratasyon	%70-80-96-100-100'lük alkoller	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 dakika
Kapama	Entellan	

Histostain Kit, San Francisco, ABD) ile 30 dakika bekletildi. Yine fosfat tamponlu salin ile yıkanan kesitler oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonu saptamak amacıyla diaminobenzidin ile muamele edildi. Distile su ile yıkanan kesitlere Mayer hematoksilen ile

artalan boyaması sağlandıktan sonra akarsu ile yıkandı. Artan alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı.

VII.F.4. Kalp Dokusunun Histomorfolojik Değerlendirmesi

Boyanan kalp dokusu kesitleri, deney gruplarına kr iki histolog tarafından değerlendirildi. Işıık mikroskobu (BX-50, Olympus, Japonya) ile her kalp için en az 30 adet alan incelendi ve yüksek çözünürlüklü fotoğraflar alındı (DP-71, Olympus, Japonya). Fotoğraflar, digital görüntü analiz programı (Image tool v3.0, UTSCSA, ABD) ile analiz edildi. Hematoksilen-eozin ve Masson trikrom boyamalarında kalp dokusundaki yapısal değişıiklikler, miyofibril düzenlenmesindeki bozukluklar, vakuolizasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu, vazodilatasyon, eritrosit ekstravazasyonu, interstisyel alandaki yapısal değişıiklikler değerlendirildi ve alanlar hasar yönünden semikantitatif olarak skorlandı (0=hi hasar yok, 1= az derecede hasar var, 2= orta derecede hasar var, 3= yoğun olarak hasar var) (60).Aktive kaspaz-3 boyamasında kalp dokusunun üç farklı bölgesinde en az 10 ayrı alanda semikantitatif olarak skarlama yapıldı (0= pozitif boyanma yok, 1= çok az pozitif boyanma var, 2= 1 ve 3 arası pozitif boyanma var, 3= görüntünün genelinde güçlü pozitif boyanma var).

VII.G. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Kardiyak parametrelerin istatistiksel analizinde başılangı anı için ölçüm değerleri, diğer anlar için başılangıca göre yüzde değerler kullanıldı. Grup içi karşılaşıtırmalarda Bonferroni düzeltmeli, bağımlı grupta Student'ın t testi, iki grup arasındaki karşılaşıtırmalarda bağımsız gruplarda Student'ın t testi, üç grup arasındaki karşılaşıtırmalarda varyans analizi (ANOVA) ve anlamlılık görülmesi durumunda Tukey-Kramer oklu karşılaşıtırma testleri kullanıldı.

Yaşam sürelerinin karşılaştırılması için Kaplan-Meier prosedürü ve log-rank testi kullanıldı. Histolojik verilerin istatistiksel analizinde iki grup arasındaki karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi, üç grup arasındaki karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis testi ve anlamlılık görülmesi durumunda Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. Analizler, GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, ABD) programı ile yapıldı. Tüm veriler ortalama±standart hata olarak gösterildi. Çalışmada istatistiksel anlamlılık düzeyi Bonferroni düzeltmeli testlerde birinci protokol için $p<0.025$, ikinci protokol için $p<0.0167$, diğer testler için $p<0.05$ kabul edildi.

VIII. BULGULAR

Araştırmada kullanılan sıçanların ağırlıkları 324.0 ± 4.1 g idi. Her iki deney protokolünde gruplardaki sıçan ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0.05$).

VIII.A. BİRİNCİ PROTOKOL: HPBCD'NİN KARDİYOVASKÜLER ETKİSİ

VIII.A.1. Grupların Başlangıç Değerleri

Grupların başlangıç ortalama arteriyel kan basıncı (OAB), kalp atım hızı (KAH), QRS süresi ve QT aralığı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$) (Tablo 4).

VIII.A.2. Ortalama Arteriyel Kan Basıncı Değişimleri

Dekstroz uygulanan grubun infüzyon sonu ve izlem sonu OAB'sinde başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ($p > 0.025$). 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin (HPBCD) uygulanan grubun yalnız izlem sonu OAB'sinde başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı ($p < 0.01$). Dekstroz ve HPBCD infüzyonlarının OAB üzerine etkileri karşılaştırıldığında deney boyunca gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ($p > 0.05$) (Tablo 4, Şekil 6).

VIII.A.3. Kalp Atım Hızı Değişimleri

Dekstroz uygulanan grubun yalnız izlem sonu KAH'sinde başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı ($p < 0.01$). HPBCD uygulanan grubun yalnız infüzyon sonu KAH'sinde başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı ($p < 0.025$). Dekstroz

ve HPBCD infüzyonlarının KAH üzerine etkileri karşılaştırıldığında deney boyunca gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0.05$) (Tablo 4, Şekil 7).

VIII.A.4. QRS Süresi Değişimleri

Dekstroz ve HPBCD gruplarının QRS süresi, deney boyunca grup içi ve gruplararası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermedi (sırasıyla $p>0.025$ ve $p>0.05$) (Tablo 4, Şekil 8).

VIII.A.5. QT Aralığı Değişimleri

Dekstroz ve HPBCD gruplarının QT aralığı, deney boyunca grup içi ve gruplararası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermedi (sırasıyla $p>0.025$ ve $p>0.05$) (Tablo 4, Şekil 9).

VIII.A.6. Sağkalım

İki gruptaki tüm sıçanlar izlem sonuna kadar yaşadı.

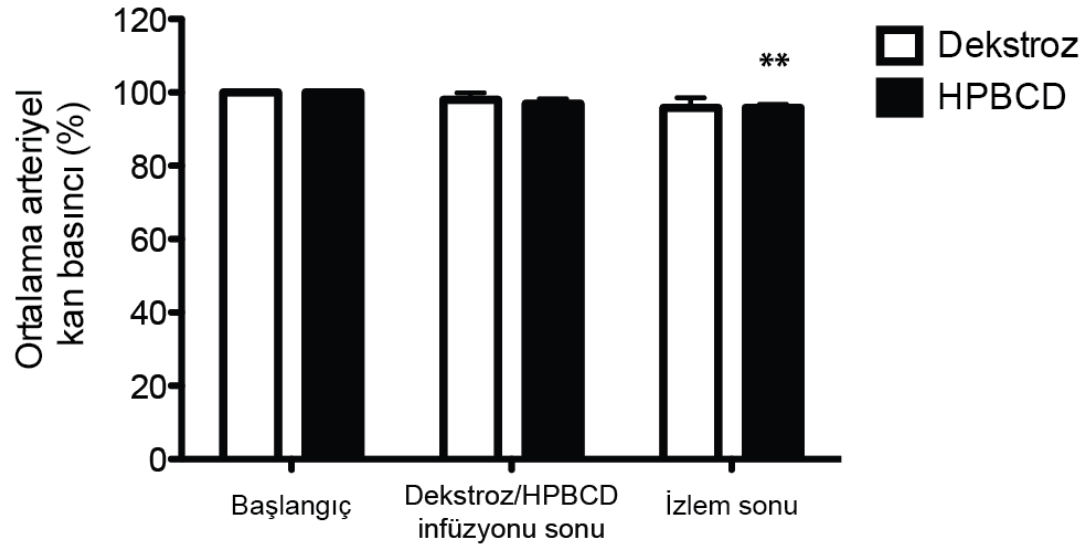
VIII.A.7. Histolojik Değişimler

Dekstroz ve HPBCD gruplarına ait hematoksilin-eozin ve Masson trikrom ile boyanmış kalp kesitlerinde, miyofibril düzenlenmesinde bozukluk, miyofibril hasarı, vazodilatasyon, eritrosit ekstravazasyonu, interstisyel alandaki yapısal değişiklikler ve kollajen miktarında artış olmadığı gözlemlendi. Hematoksilin-eozin ve aktive kaspaz-3 boyamalarında dekstroz grubunun ($n=7$) skorları sırasıyla 0.3 ± 0.2 ve 1.0 ± 0.0 , HPBCD grubunun ($n=6$) skorları ise sırasıyla 0.5 ± 0.2 ve 1.0 ± 0.0 olarak ölçüldü. Her iki boyamada da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi (her iki karşılaştırma için $p>0.05$) (Resim 3).

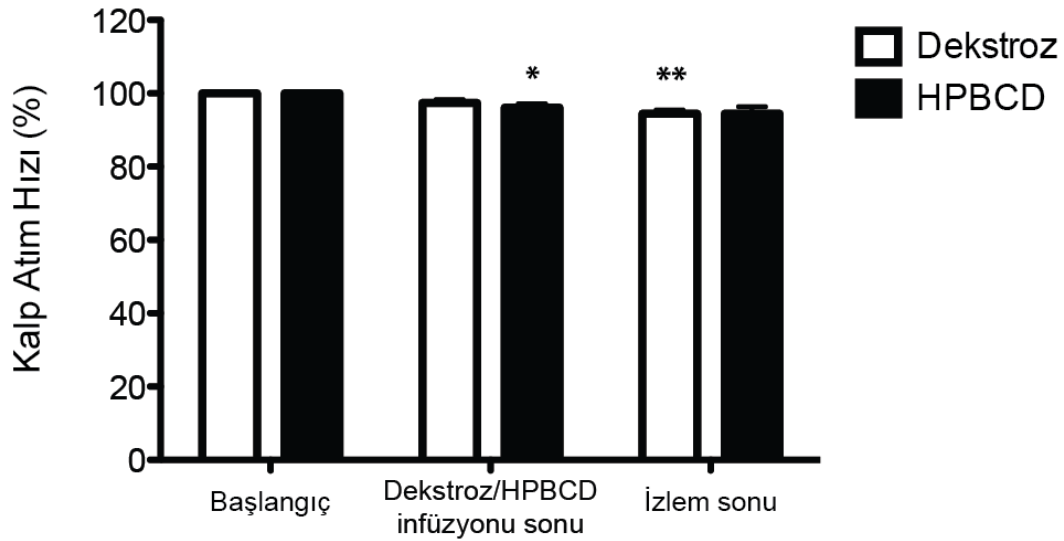
Tablo 4. Deney protokolü 1: 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrinin kardiyovasküler parametreler üzerine etkisi.

	Başlangıç	% Cevap	Dekstroz/HPBCD infüzyonu sonu	% Cevap	İzlem sonu	% Cevap
OAB (mmHg)						
Dekstroz grubu	118.1±4.9	100.0	115.6±4.7	98.0±1.9	112.6±3.0	95.8±2.7
HPBCD grubu	129.4±1.6	100.0	125.5±2.9	97.0±1.3	124.0±2.1	95.9±0.92**
KAH (atım/dk)						
Dekstroz grubu	400.3±9.7	100.0	389.7±8.2	97.4±0.9	378.6±12.1	94.5±1.0**
HPBCD grubu	397.8±6.7	100.0	382.3±7.2	96.1±1.0*	375.8±10.1	94.5±1.9
QRS süresi (ms)						
Dekstroz grubu	15.6±0.4	100.0	15.3±0.2	98.5±3.2	15.8±0.3	101.2±3.3
HPBCD grubu	16.4±0.5	100.0	16.3±0.2	99.7±3.8	16.0±0.2	98.1±3.1
QT aralığı (ms)						
Dekstroz grubu	24.7±0.5	100.0	24.1±0.3	97.8±1.6	24.6±0.4	99.6±1.2
HPBCD grubu	24.3±0.6	100.0	24.3±0.2	100.3±2.6	24.1±0.4	99.2±2.4

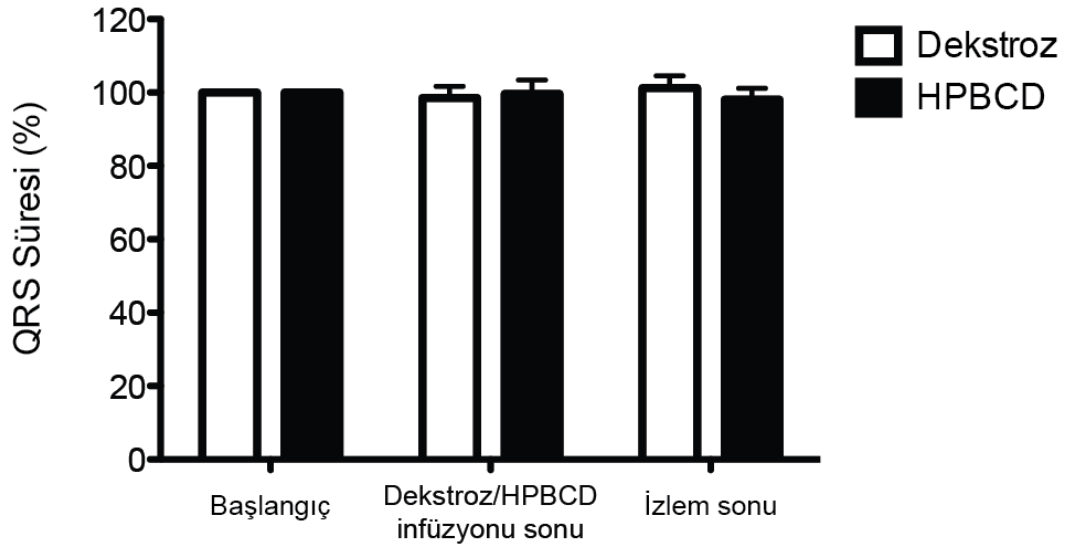
*p<0.025, **p<0.01; Bonferroni düzeltmeli Student'ın t testi ile başlangıca göre grup içi değerlerin karşılaştırılmasında anlamlılığı gösteriyor. Tüm ölçümler için dekstroz grubu n=7, HPBCD grubu n=6. OAB: ortalama arteriyel kan basıncı; KAH: kalp atım hızı; HPBCD: 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin.



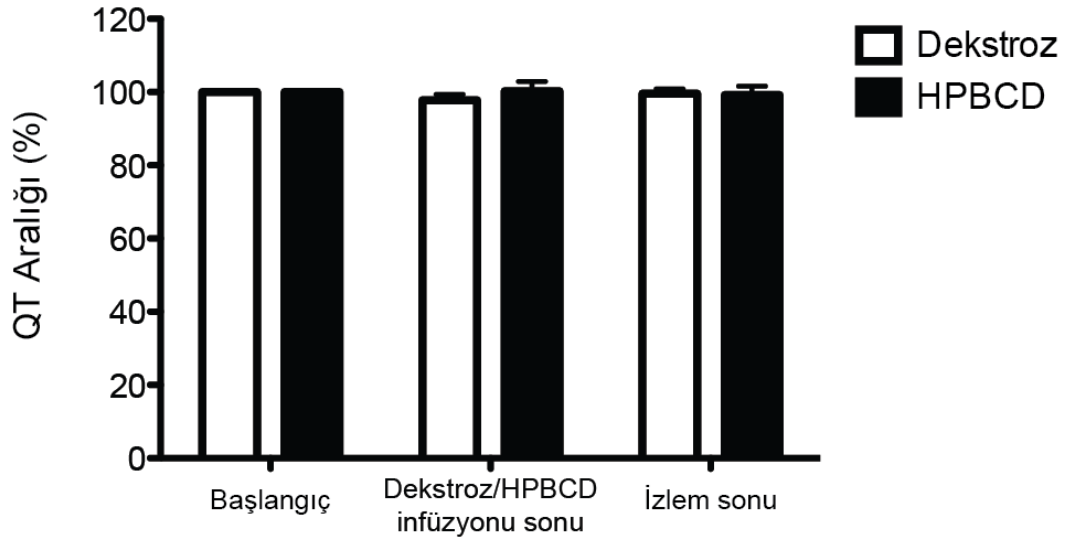
Şekil 6. Deney protokolü 1: 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrinin ortalama arteriyel kan basıncı üzerine etkisi. Tüm ölçümler için dekstroz grubu n=7, HPBCD grubu n=6. **p<0.01; Bonferroni düzeltilmeli Student'ın t testi ile başlangıca göre grup içi karşılaştırmada anlamlılığı gösteriyor. HPBCD: 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin.



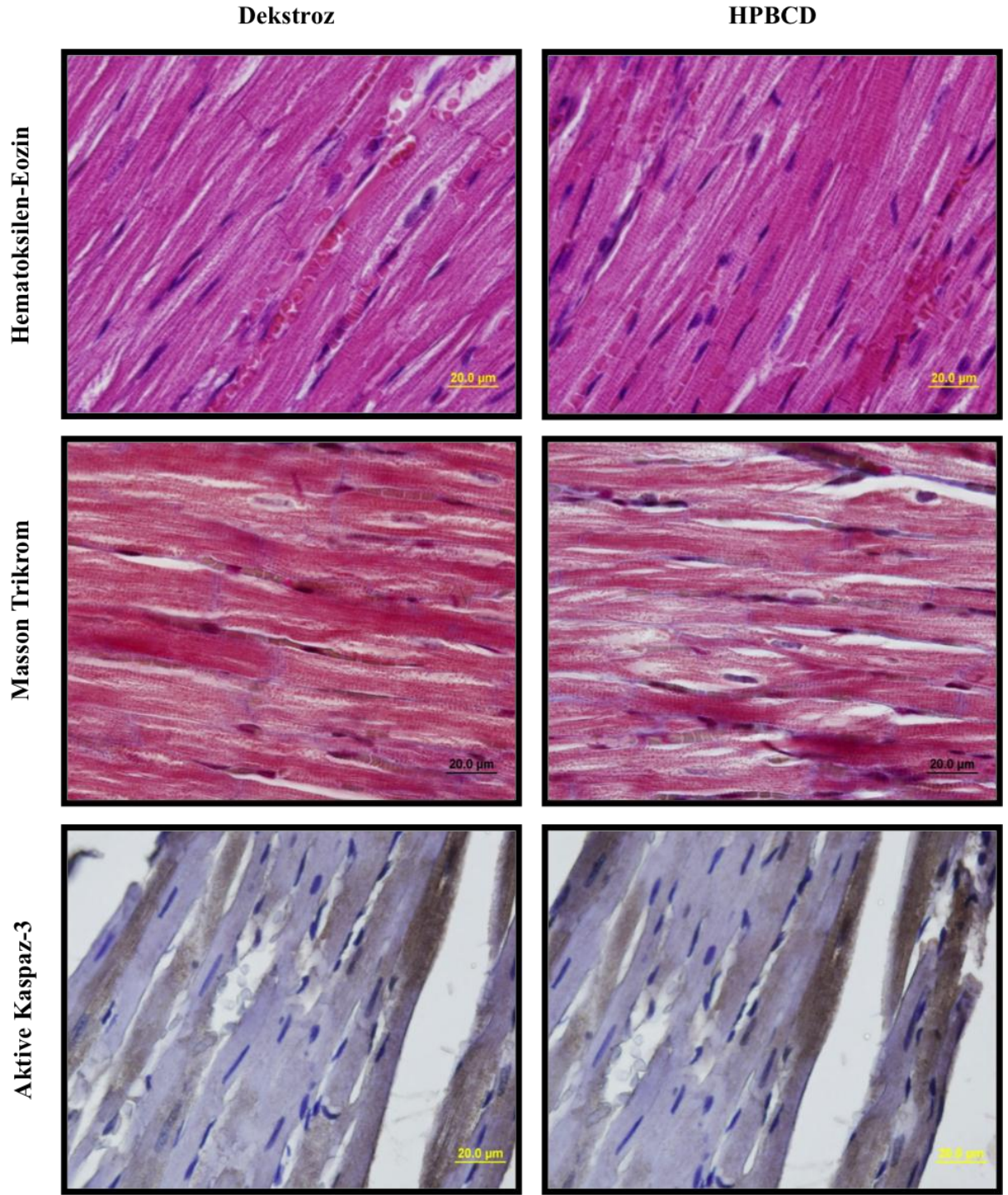
Şekil 7. Deney protokolü 1: 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrinin kalp atım hızı üzerine etkisi. Tüm ölçümler için dekstroz grubu n=7, HPBCD grubu n=6. *p<0.025, **p<0.01; Bonferroni düzeltilmeli Student'ın t testi ile başlangıca göre grup içi karşılaştırmada anlamlılığı gösteriyor. HPBCD: 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin.



Şekil 8. Deney protokolü 1: 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrinin QRS süresi üzerine etkisi. Tüm ölçümler için dekstroz grubu n=7, HPBCD grubu n=6. HPBCD: 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin.



Şekil 9. Deney protokolü 1: 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrinin QT aralığı üzerine etkisi. Tüm ölçümler için dekstroz grubu n=7, HPBCD grubu n=6. HPBCD: 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin.



Resim 3. Deney protokolü 1: Dekstroz ve 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin grubuna ait kalp dokusu histolojik kesitleri. x100 büyütme. Bar, 20 µm.

VIII.B. İKİNCİ PROTOKOL: AMİTRİPTİLİN ZEHİRLENMESİ MODELİNDE OLUŞAN KARDİYOVASKÜLER BULGULAR ÜZERİNE HPBCD'NİN ETKİSİ

VIII.B.1. Grupların Başlangıç Değerleri, Amitriptilin İnfüzyon Süreleri

Grupların başlangıç OAB, KAH, QRS süresi ve QT aralığı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 5). Başlangıç OAB'de yaklaşık %50 düşüş görülene dek uygulanan amitriptilin infüzyonu süresi dekstroz, HPBCD 1:1 ve HPBCD 1:4 gruplarında sırasıyla 8.4 ± 1.8 , 8.1 ± 1.6 ve 9.1 ± 1.4 dakikaydı. Grupların amitriptilin infüzyonu sürelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0.05$).

VIII.B.2. Ortalama Arteriyel Kan Basıncı Değişimleri

Amitriptilin infüzyonu, tüm gruplarda OAB'de başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı azalma oluşturdu (tüm gruplarda $p<0.001$) (Tablo 5). Amitriptilin infüzyonu sonrası OAB'de oluşan azalmada gruplararası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0.05$) (Tablo 5 ve Şekil 10).

Amitriptilin infüzyonundan sonra başlanan dekstroz, HPBCD 1:1 ya da HPBCD 1:4 infüzyonları sonunda OAB'de başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı (sırasıyla $p<0.01$, $p<0.001$ ve $p<0.001$) (Tablo 5). İzlem sonunda OAB'de, dekstroz ve HPBCD 1:4 grubunda başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmezken, HPBCD 1:1 grubunda başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı (sırasıyla $p>0.0167$, $p>0.0167$ ve $p<0.0167$) (Tablo 5 ve Şekil 10).

Amitriptilin infüzyonundan sonra başlanan dekstroz, HPBCD 1:1 ya da HPBCD 1:4 infüzyonlarının OAB üzerine etkileri karşılaştırıldığında deney boyunca gruplararası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0.05$) (Tablo 5 ve Şekil 10).

VIII.B.3. Kalp Atım Hızı Değişimleri

Amitriptilin infüzyonu, tüm gruplarda KAH'de başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı azalma oluşturdu (sırasıyla $p<0.0167$, $p<0.01$ ve $p<0.0167$) (Tablo 5). Amitriptilin infüzyonu sonrası KAH'de oluşan azalmada, gruplararası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0.05$) (Tablo 5 ve Şekil 11).

Amitriptilin infüzyonundan sonra başlanan dekstroz, HPBCD 1:1 ya da HPBCD 1:4 infüzyonları sonunda KAH'de başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı (tüm gruplarda $p<0.01$) (Tablo 5). İzlem sonunda KAH değerlerinde başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi (tüm gruplarda $p>0.0167$) (Tablo 5 ve Şekil 11).

Amitriptilin infüzyonundan sonra başlanan dekstroz, HPBCD 1:1 ya da HPBCD 1:4 infüzyonlarının KAH üzerine etkileri karşılaştırıldığında deney boyunca gruplararası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0.05$) (Tablo 5 ve Şekil 11).

VIII.B.4. QRS Süresi Değişimleri

Amitriptilin infüzyonu, tüm gruplarda QRS süresinde başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı uzama oluşturdu (sırasıyla $p<0.0167$, $p<0.0167$ ve $p<0.01$) (Tablo 5). Amitriptilin infüzyonu sonrası QRS süresinde oluşan uzamada, gruplararası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0.05$) (Tablo 5 ve Şekil 12).

Amitriptilin infüzyonundan sonra başlanan dekstroze ve HPBCD 1:1 infüzyonları sonunda QRS süresinde başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmezken HPBCD 1:4 infüzyonu sonunda QRS süresinde başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı bir uzama saptandı (sırasıyla $p>0.0167$, $p>0.0167$ ve $p<0.0167$) (Tablo 5). Grupların izlem sonu QRS sürelerinde başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi (tüm gruplarda $p>0.0167$) (Tablo 5 ve Şekil 12).

Amitriptilin infüzyonundan sonra başlanan dekstroze, HPBCD 1:1 ya da HPBCD 1:4 infüzyonlarının QRS süresi üzerine etkileri karşılaştırıldığında deney boyunca gruplararası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0.05$) (Tablo 5 ve Şekil 12).

VIII.B.5. QT Aralığı Değişimleri

Amitriptilin infüzyonu, tüm grupların QT aralığında başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı uzama oluşturdu (tüm gruplarda $p<0.0167$) (Tablo 5). Amitriptilin infüzyonu sonrası QT aralığında oluşan uzamada, gruplararası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0.05$) (Tablo 5 ve Şekil 13).

Amitriptilin infüzyonundan sonra başlanan dekstroz, HPBCD 1:1 ve HPBCD 1:4 infüzyonları sonu ve izlem sonu QT aralığında başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi (tüm gruplarda $p>0.0167$) (Tablo 5 ve Şekil 13).

Amitriptilin infüzyonundan sonra başlanan dekstroz, HPBCD 1:1 ya da HPBCD 1:4 infüzyonlarının QT aralığı üzerine etkileri karşılaştırıldığında deney boyunca gruplararası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0.05$) (Tablo 5 ve Şekil 13).

VIII.B.6. Sağkalım

Dekstroz grubunda 1 sıçan (%16.7) amitriptilin infüzyonu başlangıcından 31.0 dakika sonra, HPBCD 1:4 grubunda 1 sıçan (%14.3) ise amitriptilin infüzyonu başlangıcından 54.3 dakika sonra öldü. HPBCD 1:1 grubundaki tüm sıçanlar izlem sonuna kadar yaşadı. Grupların sağkalım oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ($p>0.05$).

VIII.B.7. Histolojik Değişimler

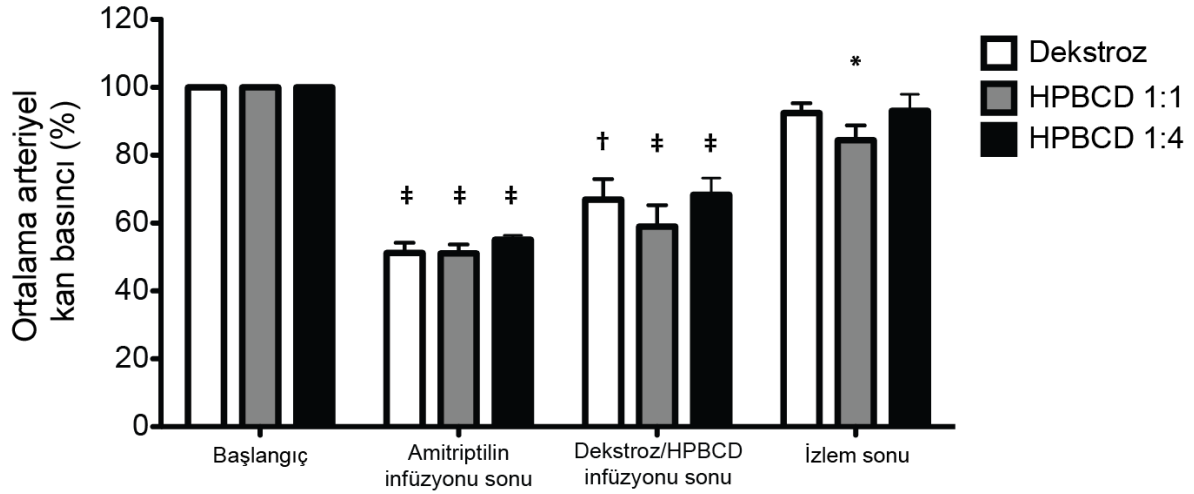
Dekstroz ve HPBCD 1:1 gruplarına ait hematoksilen-eozin ve Masson trikrom ile boyanmış kalp kesitlerinde, bazı bölgelerde az miktarda miyofibril düzenlenmesinde bozukluk, miyofibril hasarı ve az oranda mononükleer hücre infiltrasyonu görüldü. HPBCD 1:4 grubunda ise az miktarda miyofibril düzenlenmesinde bozukluk ve az oranda mononükleer hücre infiltrasyonu izlendi. Vazodilatasyon, eritrosit ekstrasvazasyonu, interstisyel alandaki yapısal değişiklikler ve kollajen miktarında artış olmadığı gözlemlendi (Resim 4-6). Hematoksilen-eozin ve aktive kaspaz-3 boyamalarında dekstroz grubunun ($n=5$) skorları sırasıyla 1.0 ± 0.0 ve 1.4 ± 0.2 , HPBCD 1:1 grubunun ($n=7$) skorları sırasıyla 1.0 ± 0.0 ve 1.3 ± 0.5 , HPBCD 1:4 grubunun skorları ise sırasıyla 1.0 ± 0.0 ve 1.3 ± 0.2 olarak ölçüldü. Her

iki boyamada da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi (her iki karşılaştırma için $p>0.05$) (Resim 4-6). Birinci protokolde yalnızca dekstrozu uygulanan grup ile karşılaştırıldığında, amitriptilin zehirlenmesi modelinde miyofibril düzenlenmesinde bozukluk ve miyofibril hasarı gelişimi yönünde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir trend saptandı ($p>0.05$). Aktive kaspaz-3 boyanma skorlarında ise farklılık açısından benzer bir trend saptanmadı.

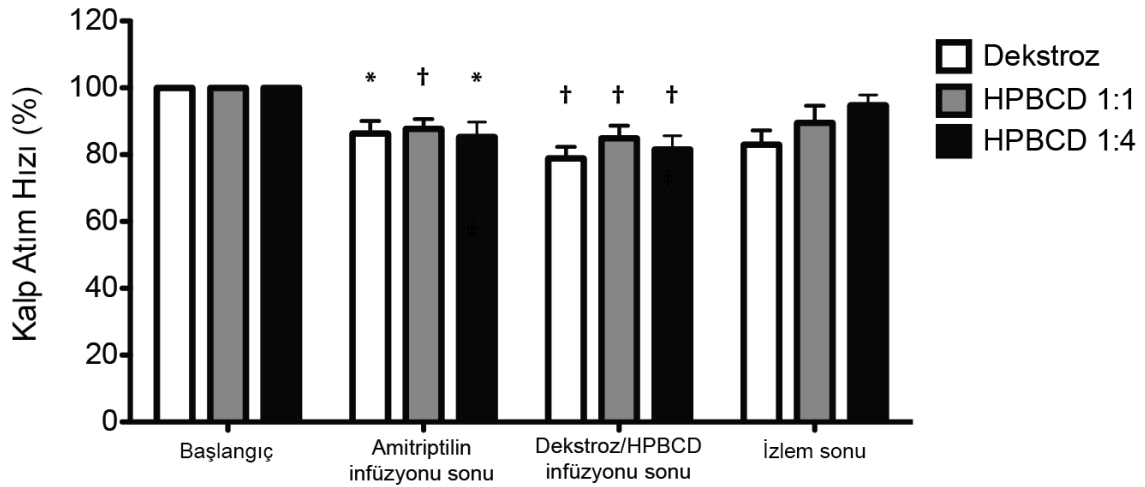
Tablo 5. Deney protokolü 2: Amitriptilini takiben infüze edilen 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrinin kardiyovasküler parametreler üzerine etkisi.

	Başlangıç	% Cevap	Amitriptilin infüzyonu sonu	% Cevap	Dekstroz/HPBCD infüzyonu sonu	% Cevap	İzlem sonu	% Cevap
OAB (mmHg)								
Dekstroz grubu	105.7±5.7	100.0	54.3±4.6	51.2±3.0***	71.8±7.3	66.9±6.0**	99.6±3.70	92.5±2.9
HPBCD 1:1 grubu	116.2±7.7	100.0	59.5±5.5	51.1±2.6***	69.3±9.4	59.0±6.2***	97.1±6.0	84.4±4.4*
HPBCD 1:4 grubu	110.2±5.7	100.0	60.8±3.8	55.1±1.3***	75.4±6.5	68.4±4.9***	100.7±5.9	93.1±4.8
KAH (atım/dk)								
Dekstroz grubu	413.0±18.0	100.0	353.2±5.1	86.3±3.8*	327.8±26.5	78.9±3.5**	341.2±33.1	82.9±4.3
HPBCD 1:1 grubu	417.3±12.8	100.0	364.7±16.8	87.7±2.9**	352.7±14.3	84.9±3.8**	373.6±25.6	89.5±5.1
HPBCD 1:4 grubu	393.6±14.3	100.0	334.4±27.3	85.2±4.5*	322.7±24.8	81.6±4.1**	378.2±21.4	94.8±3.1
QRS süresi (ms)								
Dekstroz grubu	14.2±0.6	100.0	17.1±0.6	120.9±5.7*	14.6±0.8	103.2±6.3	14.1±0.6	101.9±7.0
HPBCD 1:1 grubu	15.5±0.4	100.0	17.4±0.6	113.2±3.7*	15.0±0.4	96.7±3.0	14.1±1.0	91.2±6.5
HPBCD 1:4 grubu	16.1±0.4	100.0	17.4±0.5	109.2±2.3**	17.4±0.5	108.2±2.4*	15.6±0.8	96.9±5.3
QT aralığı (ms)								
Dekstroz grubu	23.9±1.3	100.0	26.0±1.2	108.1±2.3*	24.1±0.6	102.6±7.1	22.7±0.9	97.7±5.8
HPBCD 1:1 grubu	27.0±0.9	100.0	29.1±0.9	107.8±2.3*	26.3±1.5	97.3±4.7	25.4±1.0	94.9±5.5
HPBCD 1:4 grubu	26.8±0.4	100.0	30.1±1.3	112.0±3.6*	27.8±1.5	103.8±5.2	26.2±0.7	97.8±3.4

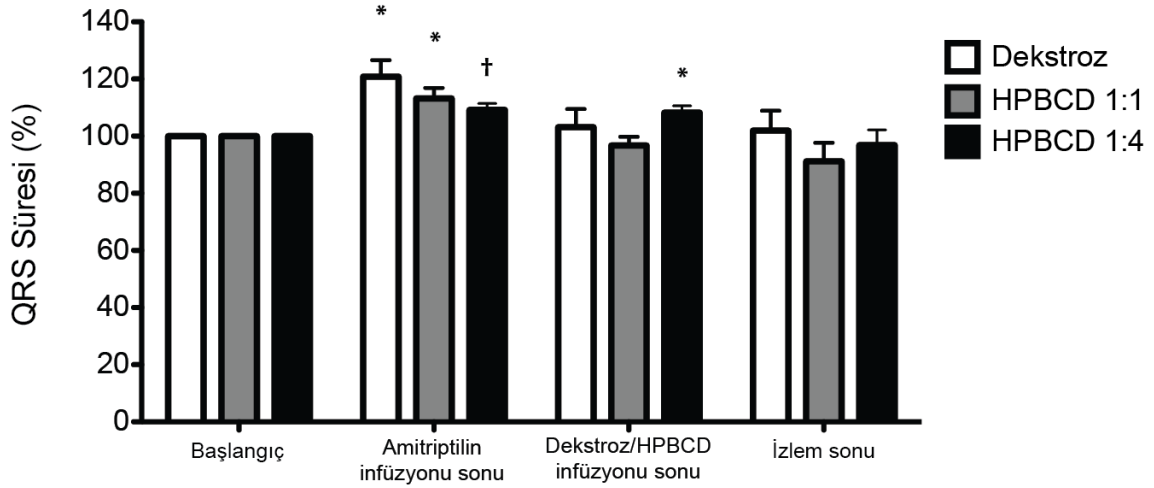
* p<0.0167, ** p<0.01, *** p<0.001; Bonferroni düzeltilmeli Student'ın t testi ile başlangıca göre grup içi karşılaştırmada anlamlılığı gösteriyor. Dekstroz grubu n=6 (izlem sonu n=5), HPBCD 1:1 grubu n=7; HPBCD 1:4 grubu n=7 (izlem sonu n=6). OAB: ortalama arteriyel kan basıncı; KAH: kalp atım hızı; HPBCD: 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin.



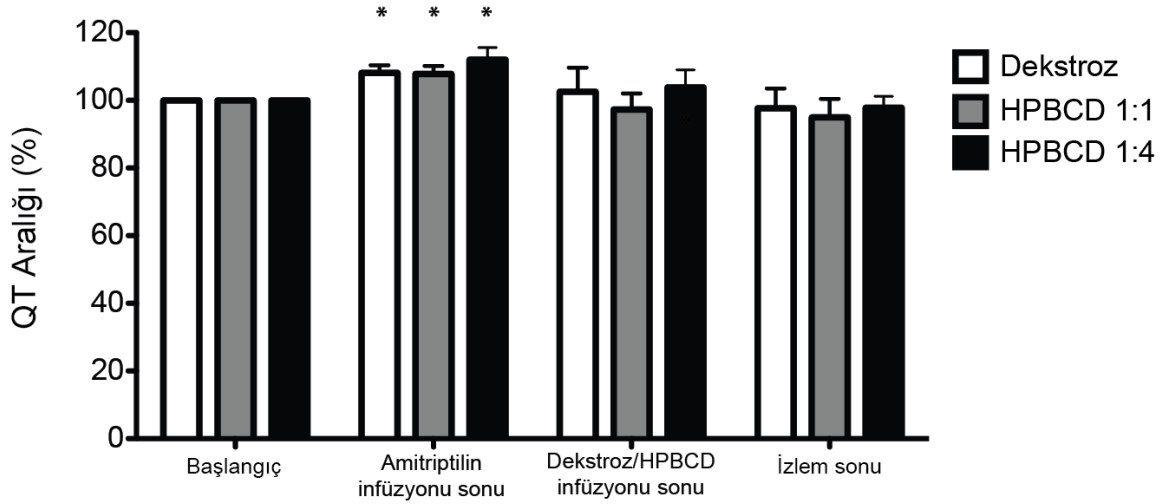
Şekil 10. Deney protokolü 2: Amitriptilini takiben infüze edilen 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrinin ortalama arteriyel kan basıncı üzerine etkisi. * $p<0.0167$, † $p<0.01$, ‡ $p<0.001$; Bonferroni düzeltilmeli Student'ın t testi ile grup içi karşılaştırmada anlamlılığı gösteriyor. Dekstroz grubu $n=6$ (izlem sonu $n=5$), HPBCD 1:1 grubu $n=7$; HPBCD 1:4 grubu $n=7$ (izlem sonu $n=6$). HPBCD: 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin.



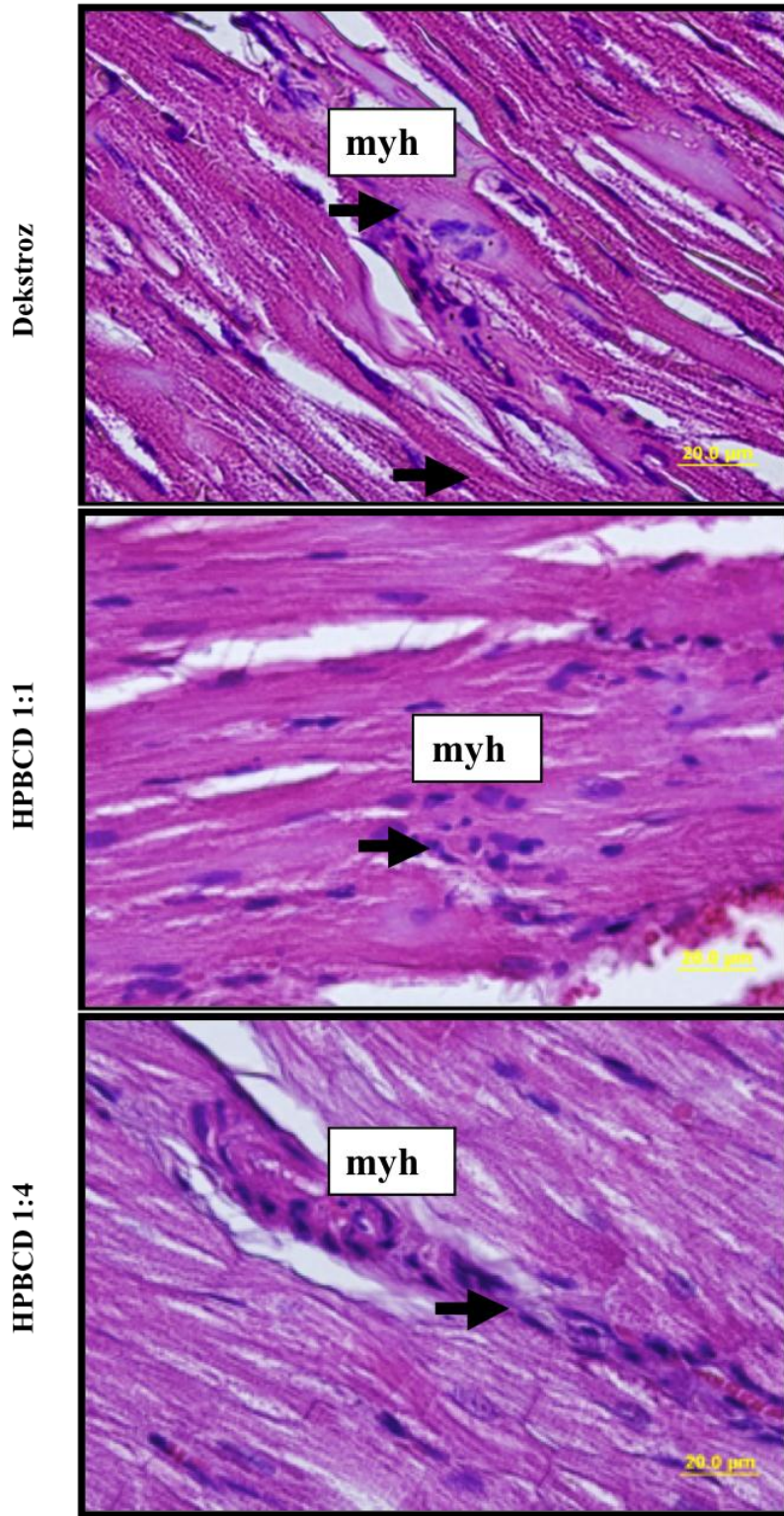
Şekil 11. Deney protokolü 2: Amitriptilini takiben infüze edilen 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrinin kalp atım hızı üzerine etkisi. * $p<0.0167$, † $p<0.01$; Bonferroni düzeltilmeli Student'ın t testi ile grup içi karşılaştırmada anlamlılığı gösteriyor. Dekstroz grubu $n=6$ (izlem sonu $n=5$), HPBCD 1:1 grubu $n=7$; HPBCD 1:4 grubu $n=7$ (izlem sonu $n=6$). HPBCD: 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin.



Şekil 12. Deney protokolü 2: Amitriptilini takiben infüze edilen 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrinin QRS süresi üzerine etkisi. * $p<0.0167$, † $p<0.01$; Bonferroni düzeltilmeli Student'ın t testi ile grup içi karşılaştırmada anlamlılığı gösteriyor. Dekstroz grubu $n=6$ (izlem sonu $n=5$), HPBCD 1:1 grubu $n=7$; HPBCD 1:4 grubu $n=7$ (izlem sonu $n=6$). HPBCD: 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin.

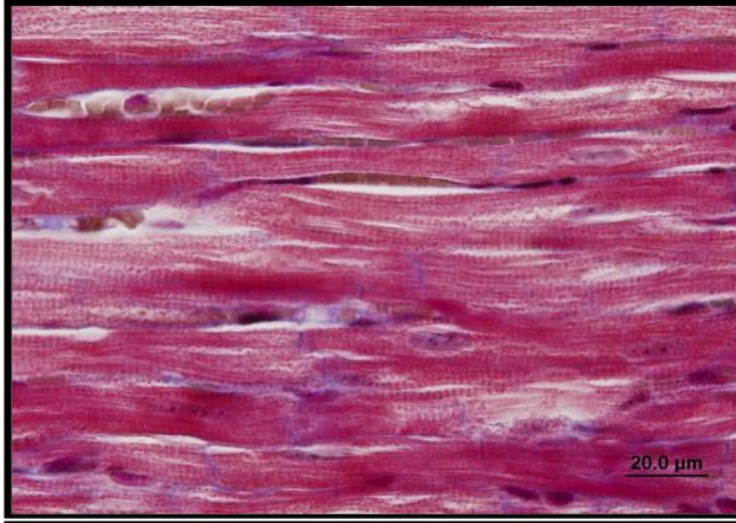


Şekil 13. Deney protokolü 2: Amitriptilini takiben infüze edilen 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrinin QT aralığı üzerine etkisi. * $p<0.0167$; Bonferroni düzeltilmeli Student'ın t testi ile grup içi karşılaştırmada anlamlılığı gösteriyor. Dekstroz grubu $n=6$ (izlem sonu $n=5$), HPBCD 1:1 grubu $n=7$; HPBCD 1:4 grubu $n=7$ (izlem sonu $n=6$). HPBCD: 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin.

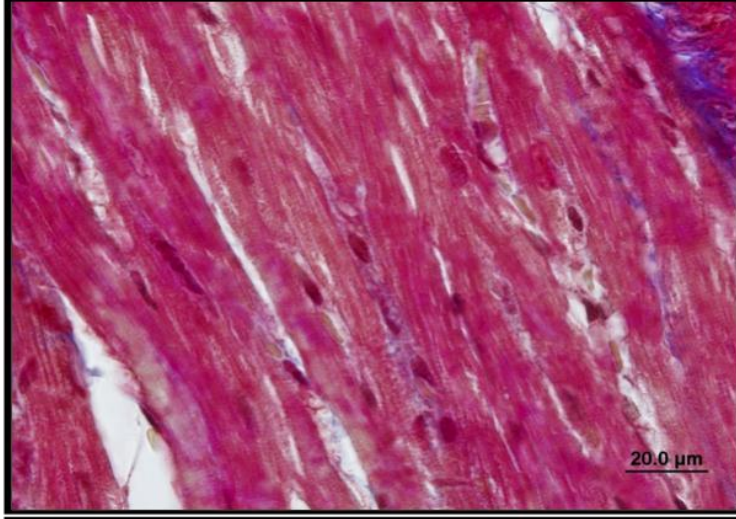


Resim 4. Deney protokolü 2: Dekstroz, HPBCD 1:1 ve HPBCD 1:4 gruplarına ait kalp dokusu histolojik kesitleri. Hematoksilen-eozin boyaması. Oklar: mononükleer hücre infiltrasyonu, myh: miyofibril hasarı, HPBCD: 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin. x100 büyütme. Bar, 20 µm.

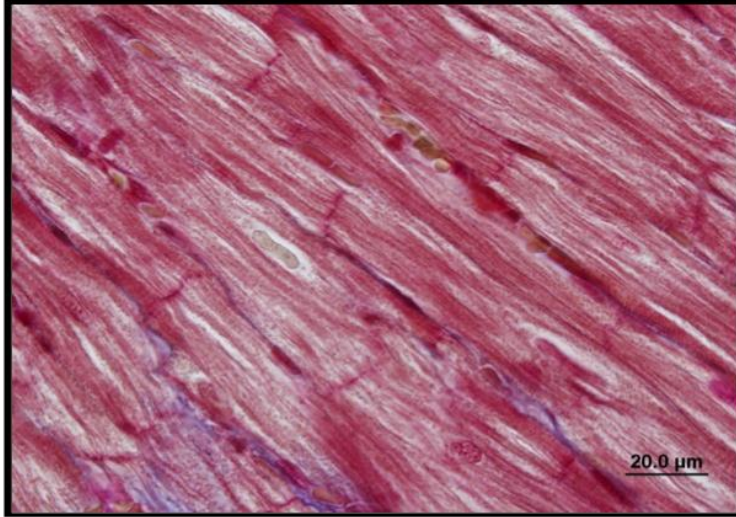
Dekstroz



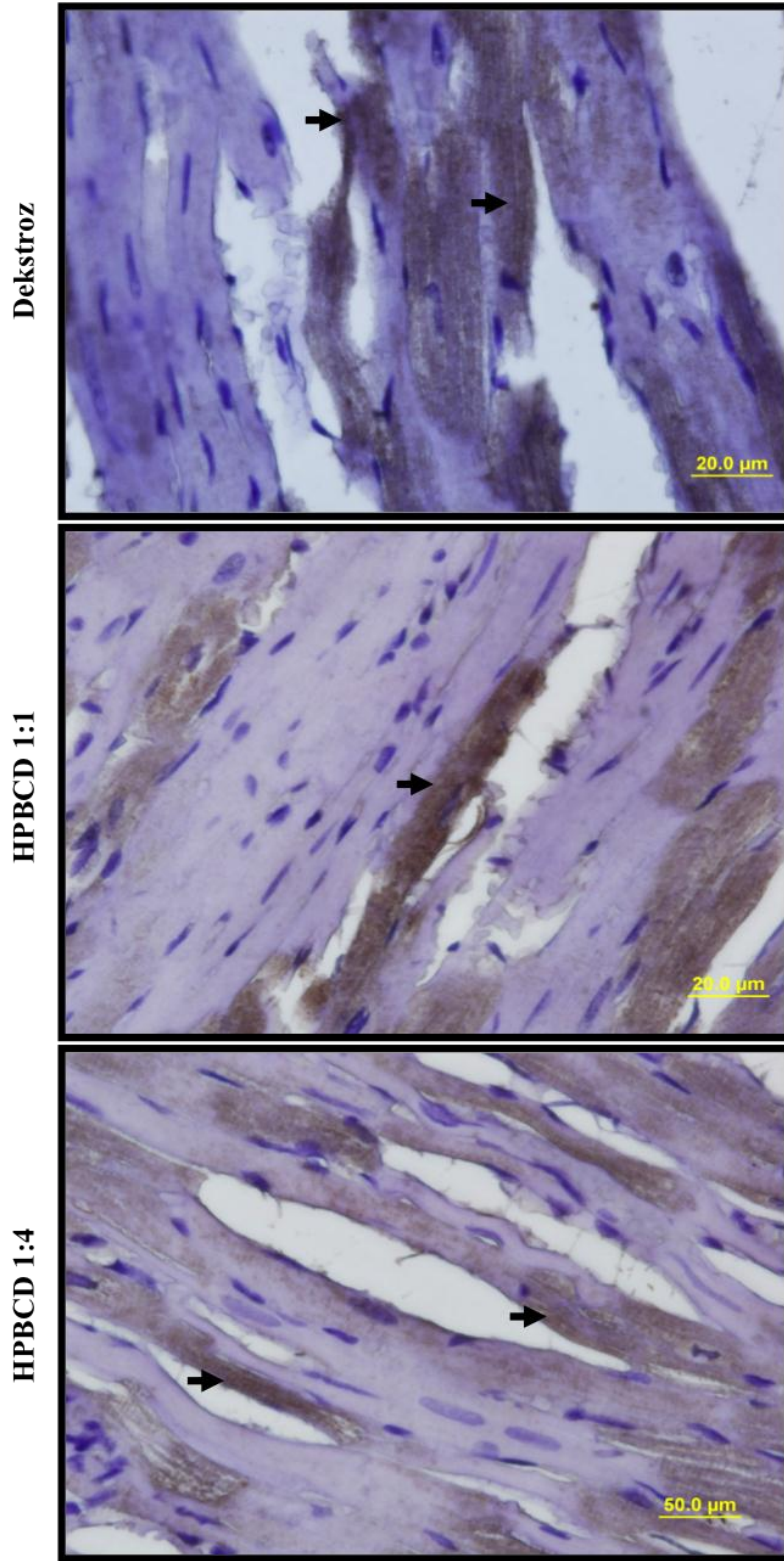
HPBCD 1:1



HPBCD 1:4



Resim 5. Deney protokolü 2: Dekstroz, HPBCD 1:1 ve HPBCD 1:4 gruplarına ait kalp dokusu histolojik kesitleri. Masson trikrom boyaması. Bağ dokusunda artış ya da fibrozis görülmemektedir. HPBCD: 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin. x100 büyütme. Bar, 20 µm.



Resim 6. Deney protokolü 2: Dekstroz, HPBCD 1:1 ve HPBCD 1:4 gruplarına ait kalp dokusu histolojik kesitleri. Aktive kaspaz-3 boyaması. Oklar: Anti-aktive kaspaz-3 ile immunohistokimyasal olarak boyanan kardiyomiyositler, HPBCD: 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrin. x100 büyütme. Bar, 20 µm.

IX. TARTIŞMA

Çalışmamızın amacı, sıçanlarda amitriptilin ile oluşturulan kardiyovasküler toksik etkilerin geri döndürülmesinde 2-hidroksipropil-beta-siklodekstrinin (HPBCD) etkililiğinin araştırılmasıdır. HPBCD'nin kardiyovasküler etkileri birinci protokolde sağlıklı sıçanlarda, ikinci protokolde ise amitriptilin zehirlenmesi oluşturulan sıçan modelinde değerlendirildi.

Birinci protokolde sağlıklı sıçanlara uygulanan HPBCD, ortalama arteriyel kan basıncında (OAB), kalp atım hızında (KAH), QRS süresinde ve QT aralığında dekstroza kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadi. Kalp dokuları incelendiğinde, HPBCD ve dekstroz gruplarında, istatistiksel olarak anlamlı fark göstermeyen çok az miktarda hasar ve aktive kaspaz-3 boyanması saptandı.

İntravenöz olarak uygulanan HPBCD'nin kardiyovasküler toksik etkilerinin değerlendirildiği çalışmalar incelendiğinde, sıçanlarda yapılan tek çalışmada kronik olarak 200 mg/gün dozuyla gūnaşırı uygulanan HPBCD'nin kalp histolojisinde değişiklik oluşturmadiğı gösterilmiştir (54). Bizim çalışmamızda da klinik açıdan anlamlı olduğu düşünölen kalp dokusu hasarı ya da kardiyomiyositlerde apoptoz gelişimi görölmemiştir. Sıçanlara uygulanan HPBCD'nin ortalama arteriyel kan basıncı, kalp atım hızı, QRS süresi ve QT aralığı değerlerine etkisini inceleyen bir çalışma bulunamadığından antidot olarak kullanmayı planladığımız en yüksek HPBCD dozu (16.76 mg/kg/dk), tahmin edilen en uzun infüzyon süresi (15 dakika) boyunca sağlıklı sıçanlara uygulandı (toplam doz: 251.4 mg/kg). HPBCD, dekstroza kıyasla OAB'de, KAH'de, QRS süresinde ve QT

aralığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadi ve kardiyovasküler toksik etki görülmedi.

HPBCD'nin sıçan dışı türlerdeki kardiyovasküler parametrelere etkisini inceleyen çalışmalarda 800 mg/kg dozuyla uygulanan HPBCD'nin dişi köpeklerde ortalama arteriyel kan basıncında artış yaratırken dişi ve erkeklerin kalp atım hızını azalttığı, QT aralığını ise değıştirmediği gösterilmiştir (53). Domuzlara 1 g/kg dozunda uygulanan HPBCD ise kalp atım hızında artışa ve kan basıncında düşüşe neden olmuştur (56). İnsanlara uygulanan HPBCD ile ilişkili kardiyovasküler advers etki bildirilmemiştir (16, 57, 58). Bu bulgularla birlikte değeriendirildiğinde, HPBCD'nin istenmeyen kardiyovasküler etkilerinin doza, türe ve cinsiyete göre değışebildiğı düşünölmüştür.

İkinci protokolde uygulanan amitriptilin infüzyonu sonunda tüm gruplarda OAB ve KAH'de istatistiksel olarak anlamlı azalma görölürken QRS süresi ve QT aralığı istatistiksel olarak anlamlı şekilde uzadı. HPBCD'nin amitriptilin zehirlenmesi modelinde oluşın OAB ve KAH azalması ile QRS süresi ve QT aralığı uzaması üzerine etkisi, dekstroza kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermedi. Kalp dokuları incelendiğinde tüm gruplarda, istatistiksel olarak anlamlı fark göstermeyen az miktarda hasar ve aktive kaspaz-3 boyanması geliştiğı saptandı.

Önceki araştırmalarda Wistar sıçanlarda ortalama 10-15 dakika içinde OAB'de %50 düşme yapan amitriptilin HCl infüzyon dozu 0.94 mg/kg/dk olarak belirlenmiştir (59, 61-63). Bu çalışmalardan birinde OAB düşüşüne KAH'da istatistiksel olarak anlamlı azalma ve QRS süresinde istatistiksel olarak anlamlı uzama eşlik ederken (61) diğeri çalışmalarda

yalnız QRS süresinde istatistiksel olarak anlamlı uzama görülmüştür (59, 62, 63). Bizim çalışmamızda da OAB düşüşüne KAH'de istatistiksel olarak anlamlı azalma ile QRS süresinde ve QT aralığında istatistiksel olarak anlamlı uzama eşlik etti. OAB'de %50 düşme görülmesi için gereken ortalama amitriptilin infüzyon süresi ise tüm gruplarımızda 10 dakikanın altında idi. Aynı sıçan modelinin kullanıldığı amitriptilin zehirlenmesi çalışmalarında karşılaşılan bu farkların, deneylerde kullanılan sıçanların cevaplarının dağılımındaki değişkenliğe bağlı olduğu söylenebilir.

Amitriptilin zehirlenmesi hayvan modelinde kalp dokusundaki değişimleri değerlendiren tek çalışmada, sıçanlara tüm hayvanların %50'sini öldüren (LD50) amitriptilin dozu intraperitoneal olarak uygulanmış ve amitriptilin uygulamasından 2 saat sonra çıkarılan kalplerin histolojik incelemesinde kapiller dilatasyon, hemorajik alanlar ve kalplerin %30'unda küçük miyokardiyal nekroz alanları görülmüştür (64). Bizim çalışmamızda da 1 saatlik amitriptilin zehirlenmesi sonrası kalp dokusunda miyofibril düzenlenmesinde bozukluk ve miyofibril hasarı lehine bulgular saptanmıştır. Bu sonuçlara göre sıçanlarda ciddi amitriptilin zehirlenmesinde 1 ya da 2 saat içinde kalp dokusunda hasar gelişmesi beklenmektedir. Amitriptilin zehirlenmesi hayvan modelinde kardiyomiyositlerde apoptoz gelişimini inceleyen bir çalışma bulunamamıştır. Nöron, fibroblast ve kardiyomiyosit hücre kültüründe yapılan sitotoksikite çalışmalarında hücreler toksik amitriptilin konsantrasyonları (50 ya da 100 μ M) ile inkübe edilmiştir. Nöronlarda 4 saatlik (65), fibroblastlarda ise 24 saatlik (66) amitriptilin inkübasyonu sonunda hücrelerde apoptoz gelişimi kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır. Kardiyomiyositlerde 4 saatlik amitriptilin inkübasyonu sonunda ise hücre canlılığı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır (67). Çalışmamızda 1 saatlik

amitriptilin zehirlenmesi sonrası kardiyomiyositlerde az miktarda aktive kaspaz-3 boyanması saptanmış olup boyanma skorları, yalnızca dekstroz uygulanan gruptaki aktive kaspaz-3 boyanma skorlarına oldukça yakındır ve skorlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur. Bu nedenle, kullandığımız modelde amitriptilin zehirlenmesine bağlı olarak kardiyomiyositlerde apoptoz artışı gelişmediği düşünülmüştür. Bu durum, hayvan modelimizdeki amitriptilin zehirlenmesi süresinin kısa oluşuna bağlanabilir.

Çalışmamızda HPBCD'nin amitriptilin zehirlenmesi modelindeki kardiyovasküler etkisi dekstroza kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermedi ve bu nedenle HPBCD uygulamasının sıçanlardaki amitriptilin zehirlenmesinde gözlenen kardiyovasküler toksik etkileri düzeltereği hipotezimiz doğrulanamadı. Farklı sıcaklıklarda sulu çözeltilerde iletkenliğin ölçüldüğü kondüktometrik bir çalışmada HPBCD'nin, trisiklik antidepressanlardan aromatik yapıli amitriptilin ve imipramini 1:1 oranında bağlayabildiği gösterilmiştir (15, 68). Bu durum, beta siklodekstrinlerin kavite çapları ve kavite hacimleri değerlendirildiğinde aromatik ve heterosiklik molekülleri bağlayabileceği fikrini doğrulamaktadır (69). Ancak HPBCD'nin amitriptiline afinitesi, bir gama siklodekstrin olan sugammadexin roküronyuma afinitesine göre yaklaşık 10^4 kat daha azdır (15, 43). Kobaylarda roküronyum (12-19 nmol/kg/dakika) ile oluşan nöromüsküler blokaj, yaklaşık 1:1.7 molar orana karşılık gelen sugammadex dozu (50 nmol/kg/dakika) uygulandığında bir saat sonunda ortadan kalkmış ve eşzamanlı plazma roküronyum düzeyi istatistiksel olarak anlamlı biçimde yükselmiştir (70). Maymunlara uygulanan yaklaşık 1:0.5 ve 1:1.2 molar orana karşılık gelen sugammadex dozları (sırasıyla 1.0 mg/kg ve 2.5 mg/kg), roküronyuma (500 µg/kg) bağlı gelişen nöromüsküler blokajı serum fizyolojiğe göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha hızlı ortadan

kaldırmıştır. Bu bulgunun, sugammadexin roküronyumu özgül biçimde ve yüksek afinite ile bağlamasına bağlı olduğu belirtilmiştir(71). Buna göre, HPBCD'nin amitriptiline afinitesinin ve çalışmamızda kullanılan HPBCD dozlarının, *in vivo* koşullarda yeterli bağlayıcı etki ve kompleks oluşumu için düşük kaldığı söylenebilir. Amitriptilin zehirlenmesinin OAB, KAH, QRS süresi ve QT aralığı üzerindeki toksik etkilerinin gruplar arasında benzer biçimde düzelmesi, intravenöz dekstroz ve HPBCD infüzyonlarının damar içi sıvı hacmini artırıcı etkisine bağlandı.

Siklodekstrinlerin tunikamisin (72), aldikarb (73) ve verapamil (74, 75) zehirlenmelerinde zehirlenme sonrası antidot olarak denendiği çalışmalar bulunmaktadır. Tunikamisin zehirlenmesi modelinde, subkütanöz yolla tunikamisin uygulanan koyunlara ikinci günden itibaren üç gün boyunca günde iki kez intraperitoneal yolla HPBCD (100 mg/kg) verilmiş ve sağkalım oranları değerlendirilmiştir. HPBCD verilen ve verilmeyen koyunların sağkalım oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (72). Bir karbamatlı insektisid olan aldikarb zehirlenmesi modelinde, oral yolla ölümcül dozda aldikarb uygulanan sıçanlara intravenöz yolla HPBCD (200 mg/kg) verilmiş ve sağkalım süreleri ölçülmüştür. Yalnızca aldikarb uygulanan sıçanlar, aldikarb uygulamasından sonra HPBCD verilen sıçanlara göre daha uzun süre hayatta kalmışlardır (73). Verapamil zehirlenmesi modelinde, intravenöz yolla verapamil uygulanan sıçanlarda aynı yolla uygulanan sülfobutileter-beta-siklodekstrinin (SBE-CD, 2.25 g/kg) kalp atım hızı, solunum hızı, apne ve asistoli gelişme süresi üzerine etkisi değerlendirilmiştir. SBE-CD uygulanan sıçanlarda solunum hızı ve apne gelişme süresinin serum fizyolojik uygulanan kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha kısa olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak verapamil kardiyotoksitesinde SBE-CD'nin antidot olarak yetersiz olduğu

rapor edilmiştir (74). Verapamil zehirlenmesi modeli kullanılan bir başka çalışmada intravenöz yolla verapamil uygulanan sıçanlarda, aynı yolla uygulanan sugammadexsin (16, 100 veya 1000 mg/kg) kalp atım hızı, solunum hızı ve asistoli gelişme süresi üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Serum fizyolojik uygulanan kontrol grubuna göre asistoli gelişme süresi, 16 mg/kg sugammadexs uygulanan sıçanlarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha uzun bulunurken 1000 mg/kg sugammadexs uygulanan sıçanlarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha kısa bulunmuştur. Sugammadexsin farklı dozlarında görülen zıt etkinin, verapamil ve sugammadexs molekülleri arasındaki mekanik faktörlere bağlı olabileceği belirtilmiştir (75). Amitriptilin zehirlenmesi hayvan modelinde siklodekstrinlerin antidot olarak denendiği bir çalışma bulunamamıştır. Bu bulgulara göre siklodekstrinlerin zehirlenme modellerinde sağkalım üzerine etkileri, olasılıkla zehirlenme etkenine, hayvan türüne, siklodekstrin çeşidine, uygulama yoluna ve dozuna bağlı olarak değişebilmektedir. Çalışmamızın bazı kısıtlılıkları mevcuttur. Çalışmamızda, HPBCD'nin sağkalım üzerine etkisi dekstroza kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermedi. Bu durum, kullandığımız amitriptilin zehirlenmesi modelinde sağkalım oranının yüksek olması ile açıklanabilir. Amitriptilin LD50 dozu bulunarak planlanacak bir toksisite modelinde HPBCD'nin sağkalım süresine etkisi daha açık şekilde değerlendirilebilir. Kullanılan HPBCD dozu, amitriptilin HCl dozuna göre molar oranı daha yüksek olacak şekilde artırılabilir. Amitriptilin zehirlenmesi modelindeki hayvanlardan deney sırasında ve/veya deney sonunda kan, idrar ve doku örnekleri alınarak amitriptilin düzeylerinin ölçümü ile HPBCD'nin amitriptilinin vücuttaki dağılımına ve atılımına etkisi değerlendirilebilir.

Sonuç olarak çalışmamızda bir beta siklodekstrin türevi olan HPBCD, sıçanlarda kardiyovasküler toksik bir etki oluşturmadı ve amitriptilin zehirlenmesi modelinde oluşan kardiyovasküler toksik etkileri, dekstroza göre daha iyi biçimde dzeltmedi. HPBCD'nin amitriptilin zehirlenmesindeki etkilerini daha iyi değerlendirebilmek için daha yüksek dozda HPBCD'nin etkisinin araştırılmasına, sağkalım modellerine ve farmakokinetik çalışmalara gereksinim vardır.

X. KAYNAKLAR

- (1) Mowry JB, Spyker DA, Cantilena LR, Jr., McMillan N, Ford M. 2013 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 31st Annual Report. Clin Toxicol (Phila) 2014;52:1032-283.
- (2) Unverir P, Atilla R, Karcioğlu O, Topacoglu H, Demiral Y, Tuncok Y. A retrospective analysis of antidepressant poisonings in the emergency department: 11-year experience. Hum Exp Toxicol 2006;25:605-12.
- (3) Kerr GW, McGuffie AC, Wilkie S. Tricyclic antidepressant overdose: a review. Emerg Med J 2001;18:236-41.
- (4) T.C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı Hıfzısıhha Mektebi Müdürlüğü. Birinci basamağa yönelik zehirlenmeler tanı ve tedavi rehberleri. 2007, yayın no: 712.
- (5) Sari I, Turkcuer I, Erurker T, Serinken M, Seyit M, Keskin A. Therapeutic plasma exchange in amitriptyline intoxication: case report and review of the literature. Transfus Apher Sci 2011;45:183-5.
- (6) Dargan PI, Colbridge MG, Jones AL. The management of tricyclic antidepressant poisoning : the role of gut decontamination, extracorporeal procedures and fab antibody fragments. Toxicol Rev 2005;24:187-94.
- (7) Brunn GJ, Keyler DE, Pond SM, Pentel PR. Reversal of desipramine toxicity in rats using drug-specific antibody Fab' fragment: effects on hypotension and interaction with sodium bicarbonate. J Pharmacol Exp Ther 1992;260:1392-9.
- (8) Pentel PR, Scarlett W, Ross CA, Landon J, Sidki A, Keyler DE. Reduction of desipramine cardiotoxicity and prolongation of survival in rats with the use of polyclonal drug-specific antibody Fab fragments. Ann Emerg Med 1995;26:334-41.
- (9) Engels PT, Davidow JS. Intravenous fat emulsion to reverse haemodynamic instability from intentional amitriptyline overdose. Resuscitation 2010;81:1037-9.
- (10) Dhanikula AB, Lamontagne D, Leroux JC. Rescue of amitriptyline-intoxicated hearts with nanosized vesicles. Cardiovasc Res 2007;74:480-6.
- (11) Larkin GL, Graeber GM, Hollingsed MJ. Experimental amitriptyline poisoning: treatment of severe cardiovascular toxicity with cardiopulmonary bypass. Ann Emerg Med 1994;23:480-6.
- (12) Stella VJ, He Q. Cyclodextrins. Toxicol Pathol 2008;36:30-42.
- (13) Ali MS, Rub MA, Khan F, Al-Lohedan HA, Kabir-ud-Din. Interaction of amphiphilic drug amitriptyline hydrochloride with beta-cyclodextrin as studied by conductometry, surface tensiometry and viscometry. J Mol Liq 2012;167:115-8.
- (14) Junquera E, Romero JC, Aicart E. Behavior of tricyclic antidepressants in aqueous solution: Self-aggregation and association with beta-cyclodextrin. Langmuir 2001;17:1826-32.
- (15) Cano J, Rodriguez A, Aicart E, Junquera E. Temperature effect on the complex formation between tricyclic antidepressant drugs (amitriptyline or imipramine) and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in water. J Incl Phenom Macrocycl Chem 2007;59:279-85.
- (16) Gould S, Scott RC. 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-beta-CD): A toxicology review. Food and Chem Toxicol 2005;43:1451-59.
- (17) Cahn C. Roland Kuhn, 1912–2005. Neuropsychopharmacology 2006;31:1096.
- (18) Ceylan ME, Efe MS. Trisiklik ve tetrasiklik antidepresanlar. In: Yüksel N. Temel Psikofarmakoloji. 1. baskı. Ankara, Tuna Matbaacılık; 2010:603-15.

- (19) Law V, Knox C, Djoumbou Y, Jewison T, Guo AC, Liu Y, Maciejewski A, Arndt D, Wilson M, Neveu V, Tang A, Gabriel G, Ly C, Adamjee S, Dame ZT, Han B, Zhou Y, Wishart DS. DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism. *Nucleic Acids Res* 2014;42:1091-7.
- (20) Nestler EJ, Hyman SE, Malenka RC. Molecular neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience. 2. Baskı. McGraw-Hill Medical, New York, 2009;163,166,349.
- (21) Gupta SK, Shah JC, Hwang SS. Pharmacokinetic and pharmacodynamic characterization of OROS and immediate-release amitriptyline. *Br J Clin Pharmacol* 1999;48:71-8.
- (22) Katzung BG. Basic and clinical pharmacology. 10. baskı. McGraw-Hill Medical, New York, 2007;479.
- (23) Breyer-Pfaff U. The metabolic fate of amitriptyline, nortriptyline and amitriptylinoxide in man. *Drug Metab Rev* 2004;36:723-46.
- (24) Bae SK, Yang KH, Aryal DK, Kim YG, Lee MG. Pharmacokinetics of amitriptyline and one of its metabolites, nortriptyline, in rats: little contribution of considerable hepatic first-pass effect to low bioavailability of amitriptyline due to great intestinal first-pass effect. *J Pharm Sci* 2009;98:1587-601.
- (25) Spiller HA, Baker SD, Krenzelok EP, Cutino L. Use of dosage as a triage guideline for unintentional cyclic antidepressant (UCA) ingestions in children. *Am J Emerg Med* 2003;21:422-4.
- (26) Woolf AD, Erdman AR, Nelson LS, Caravati EM, Cobaugh DJ, Booze LL, Wax PM, Manoguerra AS, Scharman EJ, Olson KR, Chyka PA, Christianson G, Troutman WG. Tricyclic antidepressant poisoning: an evidence-based consensus guideline for out-of-hospital management. *Clin Toxicol (Phila)* 2007;45:203-33.
- (27) Nau C, Seaver M, Wang SY, Wang GK. Block of human heart hH1 sodium channels by amitriptyline. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;292:1015-23.
- (28) Teschemacher AG, Seward EP, Hancox JC, Witchel HJ. Inhibition of the current of heterologously expressed HERG potassium channels by imipramine and amitriptyline. *Br J Pharmacol* 1999;128:479-85.
- (29) Thanacoody HK, Thomas SH. Tricyclic antidepressant poisoning : cardiovascular toxicity. *Toxicol Rev* 2005;24:205-14.
- (30) Bateman DN. Tricyclic antidepressant poisoning : central nervous system effects and management. *Toxicol Rev* 2005;24:181-6.
- (31) Boehnert MT, Lovejoy FH, Jr. Value of the QRS duration versus the serum drug level in predicting seizures and ventricular arrhythmias after an acute overdose of tricyclic antidepressants. *N Engl J Med* 1985;313:474-9.
- (32) Bradberry SM, Thanacoody HK, Watt BE, Thomas SH, Vale JA. Management of the cardiovascular complications of tricyclic antidepressant poisoning : role of sodium bicarbonate. *Toxicol Rev* 2005;24:195-204.
- (33) Pentel P, Peterson CD. Asystole complicating physostigmine treatment of tricyclic antidepressant overdose. *Ann Emerg Med* 1980;9:588-90.
- (34) Yates C, Galvao T, Sowinski KM, Mardini K, Botnaru T, Gosselin S, Hoffman RS, Nolin TD, Lavergne V, Ghannoum M, workgroup E. Extracorporeal treatment for tricyclic antidepressant poisoning: recommendations from the EXTRIP Workgroup. *Semin Dial* 2014;27:381-9.
- (35) Heard K, O'Malley GF, Dart RC. Treatment of amitriptyline poisoning with ovine antibody to tricyclic antidepressants. *Lancet* 1999;354:1614-5.

- (36) Heard K, Dart RC, Bogdan G, O'Malley GF, Burkhart KK, Donovan JW, Ward SB. A preliminary study of tricyclic antidepressant (TCA) ovine FAB for TCA toxicity. *Clin Toxicol (Phila)* 2006;44:275-81.
- (37) Eken C. Hypertonic saline: an alternative therapy in TCA overdoses failed to respond sodium bicarbonate. *Clin Toxicol (Phila)* 2008;46:488.
- (38) Kiberd MB, Minor SF. Lipid therapy for the treatment of a refractory amitriptyline overdose. *CJEM* 2012;14:193-7.
- (39) Levine M, Brooks DE, Franken A, Graham R. Delayed-onset seizure and cardiac arrest after amitriptyline overdose, treated with intravenous lipid emulsion therapy. *Pediatrics* 2012;130:432-8.
- (40) Loftsson T, Duchene D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm* 2007;329:1-11.
- (41) Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:645-66.
- (42) Pitha J, Milecki J, Fales H, Pannell L, Uekama K. Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin - preparation and characterization - effects on solubility of drugs. *Int J Pharm* 1986;29:73-82.
- (43) Welliver M, McDonough J, Kalynych N, Redfern R. Discovery, development, and clinical application of sugammadex sodium, a selective relaxant binding agent. *Drug Des Devel Ther* 2009;2:49-59.
- (44) Naguib M, Brull SJ. Sugammadex: a novel selective relaxant binding agent. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2009;2:37-53.
- (45) Abrishami A, Ho J, Wong J, Yin L, Chung F. Sugammadex, a selective reversal medication for preventing postoperative residual neuromuscular blockade. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;Oct 7:CD007362.
- (46) Rekharsky MV, Inoue Y. Complexation thermodynamics of cyclodextrins. *Chem Rev* 1998;98:1875-917.
- (47) Khramov AN, Stenken JA. Enhanced microdialysis recovery of some tricyclic antidepressants and structurally related drugs by cyclodextrin-mediated transport. *Analyst* 1999;124:1027-33.
- (48) Georgiou ME, Georgiou CA, Koupparis MA. Rapid automated spectrophotometric competitive complexation studies of drugs with cyclodextrins using the flow injection gradient technique: tricyclic antidepressant drugs with alpha-cyclodextrin. *Analyst* 1999;124:391-6.
- (49) Sigma-Aldrich. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (Cat. No. H-107) product information. <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/2/h107dat.pdf> [erişim: 25.11.2014].
- (50) Frijlink HW, Visser J, Hefting NR, Oosting R, Meijer DKF, Lerk CF. The pharmacokinetics of beta-cyclodextrin and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in the rat. *Pharm Res* 1990;7:1248-52.
- (51) Zhou HH, Goldman M, Wu J, Woestenborghs R, Hassell AE, Lee P, Baruch A, Pescio-Koplowitz L, Borum J, Wheat LJ. A pharmacokinetic study of intravenous itraconazole followed by oral administration of itraconazole capsules in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *J Clin Pharmacol* 1998;38:593-602.
- (52) Van Deuren B, Van Ammel K, Somers Y, Cools F, Straetmans R, van der Linde HJ, Gallacher DJ. The fentanyl/etomidate-anaesthetised beagle (FEAB) dog: a versatile in

- vivo model in cardiovascular safety research. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2009;60:11-23.
- (53) Rosseels ML, Delaunois AG, Hanon E, Guillaume PJ, Martin FD, van den Dobbelen DJ. Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin impacts renal and systemic hemodynamics in the anesthetized dog. *Regul Toxicol Pharmacol* 2013;67:351-9.
 - (54) Brewster ME, Estes KS, Bodor N. An intravenous toxicity study of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin, a useful drug solubilizer, in rats and monkeys. *Int J Pharm* 1990;59:231-43.
 - (55) Irie T, Fukunaga K, Garwood MK, Carpenter TO, Pitha J, Pitha J. Hydroxypropylcyclodextrins in parenteral use. 2. Effects on transport and disposition of lipids in rabbit and humans. *J Pharm Sci* 1992;81:524-8.
 - (56) Chien YH, Shieh YD, Yang CY, Lee NC, Hwu WL. Lung toxicity of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin infusion. *Mol Genet Metab* 2013;109:231-2.
 - (57) Carpenter TO, Pettifor JM, Russell RM, Pitha J, Mobarhan S, Ossip MS, Wainer S, Anast CS. Severe hypervitaminosis A in siblings - evidence of variable tolerance to retinol intake. *J Pediatr* 1987;111:507-12.
 - (58) Matsuo M, Togawa M, Hirabaru K, Mochinaga S, Narita A, Adachi M, Egashira M, Irie T, Ohno K. Effects of cyclodextrin in two patients with Niemann-Pick Type C disease. *Mol Genet Metab* 2013;108:76-81.
 - (59) Kalkan S, Aygoren O, Akgun A, Gidener S, Guven H, Tuncok Y. Do adenosine receptors play a role in amitriptyline-induced cardiovascular toxicity in rats? *J Toxicol Clin Toxicol* 2004;42:945-54.
 - (60) Cecen E, Dost T, Culhaci N, Karul A, Ergur B, Birincioglu M. Protective effects of silymarin against doxorubicin-induced toxicity. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011;12:2697-704.
 - (61) Arici MAA, Buyukdeligoz M, Kalkan S, Tuncok Y. Effects of BQ-788 on amitriptyline-induced cardiovascular toxicity. *Hum Exp Toxicol* 2013;32:316-22.
 - (62) Kaplan YC, Hocaoglu N, Oransay K, Kalkan S, Tuncok Y. Effect of glucagon on amitriptyline-induced cardiovascular toxicity in rats. *Hum Exp Toxicol* 2008;27:321-5.
 - (63) Oransay K, Kalkan S, Hocaoglu N, Arici A, Tuncok Y. An alternative antidote therapy in amitriptyline-induced rat toxicity model: theophylline. *Drug Chem Toxicol* 2011;34:53-60.
 - (64) Sorodoc V, Sorodoc L, Ungureanu D, Sava A, Jaba IM. Cardiac troponin T and NT-proBNP as biomarkers of early myocardial damage in amitriptyline-induced cardiovascular toxicity in rats. *Int J Toxicol* 2013;32:351-7.
 - (65) Lirk P, Haller I, Hausott B, Ingorokva S, Deibl M, Gerner P, Klimaschewski L. The neurotoxic effects of amitriptyline are mediated by apoptosis and are effectively blocked by inhibition of caspase activity. *Anesth Analg* 2006;102:1728-33.
 - (66) Cordero MD, Moreno-Fernandez AM, Gomez-Skarmeta JL, de Miguel M, Garrido-Maraver J, Oropesa-Avila M, Rodriguez-Hernandez A, Navas P, Sanchez-Alcazar JA. Coenzyme Q10 and alpha-tocopherol protect against amitriptyline toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;235:329-37.
 - (67) Acosta D, Ramos K. Cardiotoxicity of tricyclic antidepressants in primary cultures of rat myocardial cells. *J Toxicol Environ Health* 1984;14:137-43.
 - (68) Casarotto MG, Craik DJ. Ring flexibility within tricyclic antidepressant drugs. *J Pharm Sci* 2001;90:713-21.

- (69) Del Valle EMM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry* 2004;39:1033-46.
- (70) Epemolu O, Bom A, Hope F, Mason R. Reversal of neuromuscular blockade and simultaneous increase in plasma rocuronium concentration after the intravenous infusion of the novel reversal agent Org 25969. *Anesthesiology* 2003;99:632-7.
- (71) de Boer HD, van Egmond J, van de Pol F, Bom A, Booij LHDJ. Reversal of profound rocuronium neuromuscular blockade by sugammadex in anesthetized rhesus monkeys. *Anesthesiology* 2006;104:718-23.
- (72) May C, Stewart PL. Development of a toxin-binding agent as a treatment for tunicamyluracil toxicity: protection against tunicamycin poisoning of sheep. *Aust Vet J* 1998;76:752-6.
- (73) Verster RS, Botha CJ. Evaluation of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in the treatment of aldicarb poisoning in rats. *J S Afr Vet Assoc* 2004;75:182-5.
- (74) Mottram AR, Bryant SM, Aks SE. Effect of cyclodextrin infusion in a rat model of verapamil toxicity. *Am J Ther* 2011;18:371-4.
- (75) Ozbilgin S, Ozbilgin M, Kucukoztas B, Kamaci G, Unek T, Yurtlu BS, Guneli ME, Hanci V, Gunerli A. Evaluation of the effectiveness of sugammadex for verapamil intoxication. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2013;113:280-5.