

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZİ

**ANTİDEPRESAN OLARAK KULLANILAN ESSITALOPRAM
ETKEN MADDELİ CIPRALEX VE DOXEPİN ETKEN MADDELİ
SINEQUAN İLAÇLARININ İNSAN PERİFERAL
LENFOSİTLERİNDE *IN VITRO* GENOTOKSİK ETKİLERİ**

Hayal TOK

Biyoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 13/03/2015

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Mahmut COŞKUN

ÇANAKKALE

Hayal TOK tarafından Prof. Dr. Mahmut COŞKUN yönetiminde hazırlanan ve 13/03/2015 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Antidepresan Olarak Kullanılan Essitalopram Etken Maddeli Cipraleks ve Doxepin Etken Maddeli Sinequan İlaçlarının İnsan Periferik Lenfositlerinde *in vitro* Genotoksik Etkileri**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**’nda **DOKTORA TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Prof. Dr. Mahmut COŞKUN

Başkan

Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR

Üye

Prof. Dr. Figen ERKOÇ

Üye

Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

Üye

Doç. Dr. Sibel HAYRETDAG

Üye

Sıra No:

Bu tez çalışması BAP tarafından 101 numaralı projeden desteklenmiştir.

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Hayal TOK

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamın baőından sonuna kadar bana her konuda destek olan, bilgi ve birikimini esirgemeyen, saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Mahmut COŞKUN'a sonsuz teőekkürlerimi sunarım. Tez çalışmasında kullanılan yöntemlerin geliştirilmesinde, uygulanmasında büyük katkıları olan ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan değerli hocalarım Doç. Dr. Akın ÇAYIR ve Öğr. Gör. Münevver COŞKUN'a sonsuz teőekkürlerimi sunarım. Tez çalışmasının yapılmasını maddi olarak destekleyen Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na teőekkürlerimi sunarım.

Hayal TOK
anakkale, Őubat 2015

SİMGELER VE KISALTMALAR

LMA	Düşük Erime Noktalı Agar
NMA	Normal Erime Noktalı Agar
DMSO	Di Metil Sülfoksit
CBMN	Sitokinezi Bloke Edilmiş Mikronükleus
MN	Mikronükleus
Nbud	Nüklear Bud
NPB	Nükleoplazmik köprü
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
KKD	Kardeş Kromatid Değişimi
MMC	Mitomisin C
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
MI	Mitotik İndeks
PI	Proliferasyon İndeksi
V	Volt
mA	Miliamper
BrdU	Bromodeoksiüridin
EtBr	Etidyum Bromür
FPG	Floresan Artı Gimsa
NDI	Çekirdek Bölünme İndeksi
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development (Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü)
EPA	US Environmental Protection Agency (US Çevre Koruma Ajansı)
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
S9	Metabolik Aktivasyon Sistemi
KA	Kromozom Aberasyonu
CBPI	Sitokinez-Bloklama Proliferasyon İndeksi
PBS	Fosfat Buffer Solüsyonu
SSC	Salin Sodyum Sitrat

PHA-M	Phytohaemagglutinin
ITRC	Industrial Toxicology Research Centre
AU	Arbitrary Unit
APA	Amerikan Psikiyatri Birliği

ÖZET

ANTİDEPRESAN OLARAK KULLANILAN ESSITALOPRAM ETKEN MADDELİ CIPRALEX VE DOXEPIN ETKEN MADDELİ SINEQUAN İLAÇLARININ İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE *IN VITRO* GENOTOKSİK ETKİLERİ

Hayal TOK

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Mahmut COŞKUN

13/03/2015, 105

Çalışma, CBMN, KKD ve Komet teknikleri kullanılarak Doxepin etken maddeli Sinequan ve Essitalopram etken maddeli Cipralex ilaçlarının olası genotoksik ve sitotoksik etkilerini ortaya koymak amacıyla yapılmıştır. Deneyler *in vitro* şartlarda gerçekleştirilmiştir. İnsan periferel kan lenfositleri, ilaçların 1, 2.5, 5 ve 10 µg/ml'lik konsantrasyonları ile 24 saat süreyle muamele edilmişlerdir.

Sinequan ve Cipralex'in her üç yönteme ait, çalışılan konsantrasyonlara bağlı oluşan gruplar arası sitotoksosite ve genotoksosite değerleri Kruskal Wallis H testiyle, pozitif kontrol ve negatif kontrol karşılaştırılması ise Mann-Whitney U testiyle yapılmıştır. Doz cevap ilişkisine çoklu lineer regresyon analizi uygulanmıştır. Cipralex ve Sinequan, % mikronükleus (MNL) oluşturması bakımından değerlendirilmiş ve konsantrasyonlar arası medyan değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Konsantrasyon artışı ile % MNL artışı arasındaki ilişki regresyon analizi ile incelenmiş ve her iki ilçta da aralarında pozitif korelasyon bulunmuştur (Cipralex; $p<0.05$, $r= 0.97$ Sinequan; $p<0.05$, $r= 0.96$). Cipralex DNA hasarı (AU) oluşturması bakımından değerlendirilmiş ve konsantrasyonlar arası medyan değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Sinequan AU oluşturması bakımından değerlendirilmiş ve konsantrasyonlar arası medyan değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Her iki ilacın da konsantrasyon artışı ile AU

artışı arasındaki ilişkisi regresyon analizi ile incelenmiş ve aralarında pozitif korelasyon bulunmuştur (Cipralext; $p<0.05$, $r=0.92$ Sinequan; $p<0.001$, $r= 0.99$). Her iki ilaç KKD/M oluşturması bakımından değerlendirilmiş ve konsantrasyonlar arası medyan değerleri bakımından istatistiksel olarak oldukça anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.01$). İki ilacın da konsantrasyon artışı ile KKD/M artışı aralarında pozitif korelasyon bulunmuştur (Cipralext; $p<0.0001$, $r=0.99$ Sinequan; $p<0.000$, $r=0.99$).

Test edilen konsantrasyonlarda her iki ilacın da sitotoksik ve mitotik inhibisyon etkilerinin olmadığı görülmüştür. Ancak Sinequan'ın KKD/M ve AU oluşturması bakımından, Cipralext'in ise KKD/M oluşturması bakımından istatistiksel olarak anlamlı bulunması ilaçlarının, *in vitro* şartlarda insan periferik lenfositlerinde 24 saatlik etkisi sonucu genotoksik potansiyelleri olduğunu göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Antidepresan, Genotoksisite, Kardeş Kromatid Değişimi, Mikronukleus, Komet Assay, Sinequan, Cipralext.

ABSTRACT

***IN VITRO* GENOTOXIC EFFECTS OF ANTIDEPRESSANT DRUGS CIPRALEX AND SINEQUAN CONTAINING THE ACTIVE INGREDIENTS ESSITALOPRAM AND DOXEPIN RESPECTIVELY ON HUMAN LYMPHOCYTES**

Hayal TOK

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Doctoral Dissertation in Biology

Advisor: Prof. Dr. Mahmut COŞKUN

13/03/2015, 105

The aim of this study is to investigate the possible genotoxic and cytotoxic effects of the antidepressant drugs Cipralelex and Sinequan containing the active ingredients Essitalopram and Doxepin respectively by using CBMN, KKD and Comet techniques. Experiments were performed in *in vitro* conditions. Human peripheral lymphocytes were treated with 1, 2.5, 5 and 10µg/ml concentrations of drugs for 24 hours.

Interfactual cytotoxic and genotoxic values depending on the studied doses belonging to the three methods of Sinequan and Cipralelex have been done through Kruskal-Wallis H test, and positive control and negative control test comparison has been done through Mann-Whitney U test. Multiple linear regression Analysis has been applied on dose-response relation. Both drugs have been assessed in terms of % Micronucleus (MNL) formation and no any statistically significant differences have been found between the concentrations in terms of median values ($p>0.05$). The relation between increasing concentrations and increasing % MNL has been assessed through Regression analysis, and the relation was statistically significant in both drugs (Cipralelex; $p<0.05$, $r= 0.97$ Sinequan; $p<0.05$, $R^2= 0.93$). Cipralelex has been assessed for causing DNA damage (AU), and no statistical significant differences have been found among the concentrations ($p>0.05$). Sinequan has been assessed in terms forming AU and a statistically significant difference has been found among the concentrations ($p<0.05$). The relation between increasing concentrations and the increasing AU has been evaluated through regression analysis, and a positive correlation has been found between them (Cipralelex; $p<0.05$, $r= 0.92$ Sinequan; $p<0.001$, $r= 0.99$). Both

drugs have been evaluated for creating KKD and a statistically highly significant difference among the concentrations in terms of median values has been detected ($p < 0.01$). A positive correlation has been found between the increasing concentrations of both drugs and increasing KKD (Cipralext; $p < 0.0001$, $r = 0.99$ Sinequan; $p < 0.000$, $r = 0.99$).

It has been seen in the concentrations tested that both drugs do not have cytotoxic and mytotic activity inhibition effect. However, it also shows that, in view of the fact that Sinequan's forming KKD/M and AU, and Cipralext forming KKD/M have been found strategically logical, the drugs have genotoxic potentials on human peripheral lymphocytes as a result of a 24-hour exposure under *in vitro* conditions.

Keywords: Antidepressant, Genotoxicity, Sister Chromatid Exchange, Micronucleus, Komet Assay, Sinequan, Cipralext.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEZ SINAV SONUÇ FORMU	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xx
BÖLÜM 1 – GİRİŞ.....	1
1.1. Antidepresan Kullanımı ve Kanser Riski İlişkisi.....	3
1.2. Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi (Komet Yöntemi).....	5
1.2.1. Komet tekniğinde işlem basamakları.....	6
1.2.1.1. Lamların hazırlanması.....	6
1.2.1.2. Hücrelerin hazırlanması.....	7
1.2.1.3. Hücrelerin agar kaplı lama gömülmesi.....	7
1.2.1.4. Liziz aşaması.....	7
1.2.1.5. Hücrelerin alkali elektroforez çözeltisi ile inkübasyonu.....	7
1.2.1.6. Elektroforez.....	7
1.2.1.7. Nötralizasyon.....	8
1.2.1.8. Komet değerlendirme.....	8
1.2.1.8.1. Görsel analiz.....	8
1.2.1.8.2. Bilgisayarlı görüntü analizi.....	9
1.3. CBMN Tekniği.....	10
1.3.1. CBMN tekniği avantaj ve dezavantajları.....	13
1.3.2. MN oluşum mekanizmaları.....	14
1.3.3. BN hücre değerlendirme kriterleri.....	17
1.3.4. MN değerlendirme kriterleri.....	17
1.4. KKD Tekniği.....	18
1.4.1. Genel KKD mekanizması.....	20
BÖLÜM 2 – ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	22
2.1. Çeşitli Antidepresan İlaçlarla Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları.....	22

2.2. Çeşitli Materyal ve Sitogenetik Yöntemlerle yapılmış Genotoksisite Çalışmaları.....	23
BÖLÜM 3 – MATERYAL VE YÖNTEM	30
3.1. KKD, CBMN ve Komet Testlerinde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltilerin Hazırlanması.....	30
3.1.1. Cipralex	30
3.1.2. Sinequan	30
3.1.3. Mitomisin C (MMC)	30
3.1.4. Sitokalasin B.....	30
3.1.5. Fitohemaglutinin (PHA-M)	31
3.1.6. Dimetil sulfoksit (DMSO).....	31
3.1.7. Kolşisin.....	31
3.1.8. Serum.....	32
3.1.9. Medyum.....	32
3.1.10. Giemsa	32
3.1.11. 5-Bromo-2-deoxyuridine (5- BrdU)	32
3.1.12. Etidyum bromür (EtBr)	32
3.1.13. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂).....	32
3.1.14. Entellan	32
3.1.15. Hipotonik çözelti	32
3.1.16. Fiksatif	32
3.1.17. Sorenson tamponun hazırlanması	33
3.1.18. Lizing çözeltisi	33
3.1.19. Nötralize çözeltisi	33
3.1.20. Elektroforez çözeltisi	33
3.1.21. Normal erime noktalı agar	33
3.1.22. Düşük erime noktalı agar.....	33
3.2. Lamların Temizlenmesi.....	34
3.3. Deneylerde Kullanılan Ekipman	34
3.4. Metod.....	35
3.4.1. Hücre kültürü tekrarı	35
3.4.2. Sitotoksisite ve konsantrasyonların belirlenmesi	36
3.4.3. CBPI'nin belirlenmesi	37
3.5. CBMN (Sitokinezi Bloke Edilmiş Mikronükleus Tekniği)	37

3.5.1. Çözücü ve pozitif kontrollerin belirlenmesi	38
3.5.2. MN sıklığının belirlenmesi	38
3.6. KKD (Kardeş Kromatid Değişimi)	40
3.6.1. Mitotik indeksin (MI) belirlenmesi	41
3.6.2. Proliferasyon indeksinin (PI) saptanması	41
3.6.3. KKD sayısının belirlenmesi.....	42
3.7. Komet (Alkali Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi)	44
3.7.1. Sitotoksitenin belirlenmesi.....	45
3.7.2. Pozitif kontrol	45
3.7.3. Mikroskopik değerlendirme	45
3.8. İstatistiksel Analiz	46
BÖLÜM 4 – ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	48
4.1. Bulgular	48
4.1.1. İnsan periferik lenfositlerinde cbmn tekniği ile elde edilen bulgular	48
4.1.1.1. Cipralext.....	48
4.1.1.2. Sinequan.....	54
4.1.2. İnsan periferik lenfositlerinde kkd tekniği ile elde edilen bulgular	61
4.1.2.1. Cipralext.....	61
4.1.2.2. Sinequan	69
4.1.3. İnsan periferik lenfositlerinde komet tekniği ile elde edilen bulgular	76
4.1.3.1. Cipralext.....	76
4.1.3.4. Sinequan.....	81
4.2. Tartışma.....	89
BÖLÜM 5 – SONUÇ VE ÖNERİLER	92
KAYNAKLAR	95
EKLER.....	I
ÖZGEÇMİŞ.....	II

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1.	Essitalopram.....	3
Şekil 1.2.	Doxepin.....	3
Şekil 1.3.	Çeşitli derecelerde yürümüş kometler	9
Şekil1.4.	Komet metrik analizi.....	10
Şekil 1.5.	Mikronukleuslu iki çekirdekli hücreler.....	12
Şekil1.6.	Npb'li iki çekirdekli hücreler	12
Şekil 1.7	nbud'lu çift çekirdekli hücreler.....	13
Şekil 1.8.	Nekrotik ve apoptatik hücreler.....	14
Şekil 1.9.	Asentrik kromozom/kromatid parçaları ile MN oluşum mekanizması.....	16
Şekil 1.10.	Kutuplara çekilemeyen tam kromozom/kromatid ile MN oluşum mekanizması	16
Şekil 1.11.	NPB'in kırılması ile MN oluşum mekanizması.....	17
Şekil 1.12.	KKD oluşum mekanizması ve metafaz plakları	19
Şekil 1.13.	KKD genel oluşum mekanizması	21
Şekil 3.1.	Mitomisin C	30
Şekil 3.2.	Sitokalsin B	31
Şekil 3.3.	Dimetil Sulfoksit.....	31
Şekil 3.4.	CBMN tekniği deney şeması	36
Şekil 3.5.	Komet tekniği deney şeması	36
Şekil 3.6.	KKD tekniği deney şeması	36
Şekil 3.7.	CBMN tekniği şeması.....	38
Şekil 3.8.	MN'lu çift çekirdekli lenfositler	39
Şekil 3.9.	1, 2, 3 ve 4 çekirdekli lenfositler.....	40
Şekil 3.10.	KKD sayımının şematik görünümü	43
Şekil 3.11.	M1 aşamasındaki metafaz.....	43
Şekil 3.12.	M2 aşamasındaki metafaz.....	44
Şekil 3.13.	M3 aşamasındaki metafaz.....	44
Şekil 4.1.	Cipraleks NK ve PK medyan değerleri Mann Whitney U testi.....	52
Şekil 4.2.	Cipraleks NK ve PK sitotoksosite Mann Whitney U test	52
Şekil 4.3.	Cipraleks konsantrasyon ve CBPI Kruskal Wallis H testi	49

Şekil 4.4. Cipralex konsantrasyon ve CBPI arası regresyon analizi	53
Şekil 4.5. Cipralex MN konsantrasyon ilişkisi.....	51
Şekil 4.6. Cipralex, MN konsantrasyon arasındaki regresyon analizi	55
Şekil 4.7. Sinequan, NK ve PK, MN medyan değerleri Mann Whitney U test	59
Şekil 4.8. Sinequan NK ve PK, CBPI medyan değerleri Mann Whitney U testi.....	59
Şekil 4.9. Sinequan konsantrasyon CBPI arasındaki Kruskal Wallis H test.....	60
Şekil 4.10. Sinequan, konsantrasyon CBPI regresyon analizi	61
Şekil 4.11. Sinequan, konsantrasyon MN ilişkisi	62
Şekil 4.12. Sinequan konsantrasyon MN regresyon analizi.....	62
Şekil 4.13. Cipralex, KKD/M negatif kontrol ve pozitif kontrol medyan değerleri Mann Whitney U testi.....	64
Şekil 4.14. Cipralex NK ve PK PI medyan değerleri Mann Whitney U testi.....	65
Şekil 4.15. Cipralex konsantrasyon PI ilişkisi	65
Şekil 4.16. Cipralex konsantrasyon PI regresyon analizi.....	66
Şekil 4.17. Cipralex MI, NK PK medyan değerleri Mann Whitney U testi	67
Şekil 4.18. Cipralex konsantrasyon MI Kruskal Wallis H testi	68
Şekil 4.19. Cipralex konsantrasyon MI regresyon analizi	68
Şekil 4.20. Cipralex konsantrasyon KKD/M Kruskal Wallis H testi.....	69
Şekil 4.21. Cipralex'in konsantrasyon KKD/M regresyon analizi	70
Şekil 4.22. Sinequan KKD/M, NK PK Mann Whitney U testi.....	72
Şekil 4.23. Sinequan PI, NK PK medyan değerleri Mann Whitney U testi.....	72
Şekil 4.24. Sinequan Konsantrasyon PI Kruskal Wallis H testi	73
Şekil 4.25. Sinequan Konsantrasyon PI regresyon analizi.....	73
Şekil 4.26. Sinequan'ın NK PK, konsantrasyon MI Kruskal Wallis H testi.....	73
Şekil 4.27. Sinequan konsantrasyon MI Kruskal Wallis H testi	74
Şekil 4.28. Sinequan Konsantrasyon KKD/M regresyon analizi.....	75
Şekil 4.29. Sinequan konsantrasyon KKD/M Kruskal Wallis H testi.....	76
Şekil 4.30. Sinequan, konsantrasyon KKD/M regresyon analizi.....	77
Şekil 4.31. Sinequan, kontrol gurubuna ait M2 metafaz plağı.....	76
Şekil 4.32. Cipralex AU, NK PK medyan değerleri Mann Whitney U testi.....	79
Şekil 4.33. Cipralex, konsantrasyon AU regresyon analizi	80
Şekil 4.34. Cipralex konsantrasyon AU Kruskal Wallis H testi	81
Şekil 4.35. Cipralex, konsantrasyon sitotoksisite regresyon analizi	81
Şekil 4.36. Cipralex konsantrasyon sitotoksisite Kruskal Wallis H testi.....	82

Şekil 4.37. Sinequan AU NK ve PK medyan değerleri Mann Whitney U testi.....	84
Şekil 4.38. Sinequan konsantrasyon AU regresyon analizi	85
Şekil 4.39. Sinequan konsantrasyon AU Kruskal Wallis H testi	85
Şekil 4.40. Sinequan konsantrasyon sitotoksisite Kruskal Wallis H testi.....	86
Şekil 4.41. Sinequan konsantrasyon sitotoksisite regresyon analizi	87
Şekil 4.42. (a) hasarsız lenfosit, (b, c, d, e) 1., 2., 3., 4., dereceden hasarlı hücreler	90

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 4.1. Cipralex'in kadın periferel kan lenfositlerinde oluşturduğu %MNL, BNMN, frekansları ile CBPI ve % sitotoksisite değerleri	49
Çizelge 4.2. Cipralex'in erkek periferel kan lenfositlerinde oluşturduğu % MNL, BNMN, frekansları ile CBPI ve %sitotoksisite değerleri	50
Çizelge 4.3. Cipralex'in her iki donöre ait periferel lenfositlerde oluşturduğu ortalama % MNL, BNMN, frekansları ile CBPI ve % sitotoksisite değerleri.....	51
Çizelge 4.4. Cipralex konsantrasyon ve CBPI Kruskal Wallis H testi sayısal verileri	53
Çizelge 4.5. Cipralex MN konsantrasyon ilişkisi Kruskal-Wallis testi sayısal verileri	54
Çizelge 4.6. Sinequan'ın kadın periferel kan lenfositlerinde oluşturduğu % MNL, BNMN, frekansları ile CBPI ve % sitotoksisite değerleri	56
Çizelge 4.7. Sinequan erkek periferel kan lenfositlerinde oluşturduğu % MNL, BNMN, frekansları ile CBPI ve % sitotoksisite değerleri	57
Çizelge 4.8. Sinequan'ın her iki donöre ait periferel lenfositlerde oluşturduğu % MNL, BNMN, frekansları ile CBPI ve % sitotoksisite değerleri	58
Çizelge 4.9. Sinequan konsantrasyon CBPI arasındaki Kruskal Wallis H testi sayısal verileri	60
Çizelge 4.10. Sinequan, konsantrasyon MN ilişkisi Kruskal Wallis H testi sayısal verileri	61
Çizelge 4.11. Cipralex'in periferel kan örneklerinde (kadın) oluşturduğu KKD/M, PI, MI değerler	63
Çizelge4.12. Cipralex ilacının erkek donörden alınan periferel kan örneklerinde oluşturduğu KKD/M, PI, MI değerleri.....	63
Çizelge 4.13. Cipralex ilacının her iki donöre ait periferel kan örneklerinde oluşturduğu KKD/M, PI, MI değerler	64
Çizelge 4.14. Cipralex konsantrasyon PI ilişkisi Kruskal Wallis H testi sayısal verileri	65
Çizelge 4.15. Cipralex konsantrasyon MI Kruskal Wallis H testi sayısal verileri.....	69

Çizelge 4.16. Cipraleks konsantrasyon KKD/M Kruskal Wallis H testi sayısal verileri	68
Çizelge 4.17. Sinequan'ın kadın periferel kan örneklerinde oluşturduğu KKD/M, PI, MI değerleri	70
Çizelge 4.18. Sinequan erkek periferel kan örneklerinde oluşturduğu Min/MaxKKD, KKD/M, PI, MI değerleri	71
Çizelge 4.19. Sinequan'ın her iki donöre ait periferel kan örneklerinde oluşturduğu KKD/M, PI, MI değerleri.....	71
Çizelge 4.20. Sinequan konsantrasyon PI Kruskal Wallis H testi sayısal verileri	73
Çizelge 4.21. Sinequan konsantrasyon MI Kruskal Wallis H testi sayısal verileri.....	74
Çizelge 4.22. Sinequan konsantrasyon KKD/M Kruskal Wallis H testi sayısal verileri	76
Çizelge 4.23. Cipraleks'in kadın periferel kan örneklerinde oluşturduğu, hasarsız, 1., 2., 3. ve 4. dereceden yürümüş hücre, AU ve sitotoksisite değerleri.....	78
Çizelge 4.24. Cipraleks'in erkek periferel kan örneklerinde oluşturduğu, hasarsız, 1., 2., 3. ve 4. dereceden yürümüş hücre, AU ve sitotoksisite değerleri.....	79
Çizelge 4.25. Cipraleks'in her iki donörden alınan periferel kan örneklerinde oluşturduğu, hasarsız, 1., 2., 3. ve 4. dereceden yürümüş hücre, AU ve sitotoksisite değerleri.....	79
Çizelge 4.26. Cipraleks konsantrasyon AU Kruskal Wallis H testi sayısal verileri	81
Çizelge 4.27. Cipraleks konsantrasyon sitotoksisite Kruskal Wallis H testi sayısal verileri	82
Çizelge 4.28. Sinequan'ın kadın periferel kan örneklerinde oluşturduğu, hasarsız, 1., 2., 3. ve 4. dereceden yürümüş hücre, AU ve sitotoksisite değerleri.....	83
Çizelge 4.29. Sinequan periferel kan örneklerinde (erkek) oluşturduğu, hasarsız, 1., 2. 3. ve 4. dereceden yürümüş hücre, AU ve sitotoksisite değerleri.....	83
Çizelge 4.30. Sinequan ilacının her iki donöre ait kan örneklerinde oluşturduğu, hasarsız, 1. 2. 3. ve 4. dereceden yürümüş hücre, AU ve sitotoksisite değerleri	84
Çizelge 4.31. Sinequan konsantrasyon AU Kruskal Wallis H testi sayısal verileri	85

Çizelge 4.32. Sinequan konsantrasyon sitotoksisite Kruskal Wallis H testi sayısal verileri	86
--	----

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Depresyon, ilgi ve istek kaybı, enerji azalması, konsantrasyon azalması, uyku düzeninin bozulması ve iştah artması gibi belirtilerin eşlik ettiği yaygın olarak rastlanan ruhsal bir bozukluktur (WHO, 2012). Depresyon denildiğinde sadece bir hastalıktan değil, pek çok alt başlıktan oluşan hastalıklar topluluğundan bahsedilir. Psikiyatrik hastalıkların pek çok sınıflandırma sistemi vardır ancak en çok kabul gören sınıflandırma Amerikan Psikiyatri Birliği (APA) sınıflandırma sistemidir. Bu sisteme göre depresyon şu alt gruplara ayrılmaktadır;

Majör depresif bozukluk

Distimik bozukluk

Bipolar bozukluktaki depresyon

Genel bir tıbbi duruma bağlı depresyon

Depresyonlu uyum bozukluğu

Başka türlü adlandırılmayan depresif bozukluk (Savrun, 1999)

Depresif bozukluklar içerisinde en çok araştırılan Majör depresif bozukluktur ve bu hastalığa yakalanma yaşam boyu erkeklerde %5-12, kadınlarda %10-25 oranındadır. Dünya genelinde yapılmış çalışmaların hemen hemen tamamı depresyonun kadınlarda erkeklerden 2 kat daha fazla görüldüğünü göstermektedir (Savrun, 1999). Ayrıca WHO 2008'e göre depresyon, hem yüksek gelirli hem de orta ve düşük gelirli tüm ülkelerde, kadınlarda erkeklerden %50 oranında daha fazla görülen bir hastalıktır (WHO, 2012). Depresyonun kadınlarda 35-45 yaş arasında, erkeklerde ise 55-70 yaş aralığında en yüksek orana ulaştığı bilinmektedir (Savrun, 1999).

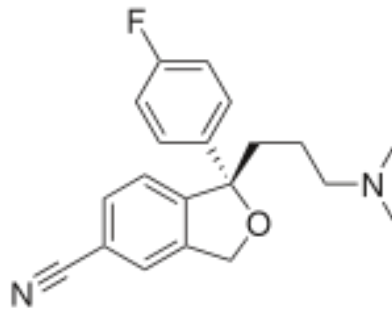
Küey ve Güleç (1993)'e göre Türkiye'de toplum içinde klinik düzeyde depresyon prevalansı %10 dolayındadır ve hastaların yaklaşık üçte birinde hastalık kronikleşmiştir (Savrun, 1999).

Dünya'da yaklaşık 350 milyon insanın depresyon hastalığından etkilendiği tahmin edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü, Mental Sağlık ve Maddelerin Kötüye Kullanımı Bölümü'nce 17 ülkede yapılan bir araştırmada ortalama 20 kişiden 1'inde depresyon vakasının tespit edildiği bildirilmiştir (WHO, 2012).

Antidepresanlar depresyon tedavilerinde 1950'lerden bu yana kullanılmakta olan ilaçlardır. Yaklaşık olarak 30 farklı çeşidi bulunan antidepresanlar 4 ana gruba ayrılmışlardır;

- 1- Trisiklik Antidepresanlar (TCA)
- 2- Monoamin Oksidaz İnhibitörleri (MAOI)
- 3- Özgül Serotonin Geri Alım İnhibitörleri (ÖSGE)
- 4- Norepinefrin Geri Alım İnhibitörleri (SNRI) (Draz, 2009)

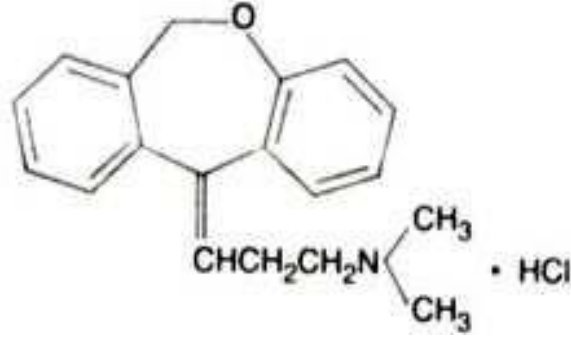
Cipraleks (Essitalopram etken maddeli) Özgül Serotonin Geri Alım Engelleyicileri (ÖSGE) grubuna dahil olan bir ilaçtır (Isık ve Candansayar,1993). Diğer antidepresanlar kadar etkili ve onlardan daha güvenli olan ÖSGE grubu antidepresanlar, içinde depresyonun da bulunduğu panik atak, obsesif bozukluklar gibi pek çok psikiyatrik hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlardır (Draz ve ark., 2009). Bu grup antidepresanlar merkezi sinir sisteminde sinaps aralığına salınan serotoninin perisinaptik bölgeye geri alınımını engellerler. Serotoninin beyindeki normal davranışı şu şekilde gerçekleşir; serotonin mesajının gönderilmesi ile serotonin sinaptik bölgeye salınır ve sinyali gönderen reseptörlere bağlanır. Ortamda kullanılmayan serotonin ise serotonini salan hücre tarafından geri alınır. ÖSGE grubu ilaçlar sinaptik bölgede fazladan bulunan serotoninin geri alınımını sağlayan kanalları bloke ederler ve serotoninin geri alınımını engellerler böylece sinaptik bölgede serotonin derişimi artar (Tarhan, 2006). Deney hayvanlarında bu grup antidepresanlarla yapılan klinik öncesi çalışmalar ÖSGE grubu ilaçlarının genotoksik olmadığını söylemektedir ancak insan hücre sisteminde yapılan in vitro çalışmalar son derece azdır (Draz ve ark., 2009).



Şekil 1.1. Essitalopram

Sinequan (doxepin etken maddeli) ise Trisiklik grubuna dahil bir ilaçtır (Dalgıç ve Papak, 2003). Trisiklik gruplarına dahil antidepresanlar depresyon tedavisinde kullanılan

etkili ilaçlardır. (Arimochi ve Morita, 2006). Trisiklik grubu ilaçlar ayrıca migren, kanser ağrıları ve bazı romatizmal hastalıklarda da analjezik özelliklerinden dolayı kullanılmakta ve etkin sonuçlar alınmaktadır. Bazı araştırmacılar bu grup ilaçların nöropatik ağrı tedavisinde ilk sırada yer alan ilaçlar olduğunu söylemektedirler (Dalgıç ve Papak, 2003).



Şekil 1.2. Doxepin

1.1. Antidepresan Kullanımı ve Kanser Riski İlişkisi

Antidepresan kullanımı ve kanser riskindeki artış arasında bir ilişki olduğunu gösteren kanıtlar vardır ancak bu konudaki klinik öncesi ve epidemiyolojik çalışmalar farklılık göstermektedir (Cosgrove ve ark., 2011), ve aralarındaki ilişki son derece tartışmalıdır (Toh ve ark., 2007). Hayvanlarla yapılan deneysel çalışmalar, bazı antidepresanların tümör gelişimini uyardığı, özellikle ÖSGE grubuna dahil olan antidepresanların sitokrom P450 enzim sistemini inhibe ettiğini göstermektedir (Cosgrove ve ark., 2011). Chien ve arkadaşları (2006) yaptıkları çalışmada TCA ve ÖSGE gurubu antidepresanlar ile meme kanseri gelişimi arasında bir ilişki bulunmadığını rapor etmişlerdir. Benzer bir sonucu Wernli ve arkadaşları (2009)'da yaptıkları çalışmada elde etmişlerdir. Bu çalışmada yaygın olarak kullanılan 5 farklı antidepresan (Fluoxetin, Sertalin, Paroxetin, Velafaxin ve Bupropion) kullanımı ve meme kanseri arasındaki ilişki çalışmış ve aradaki ilişkinin anlamsız olduğunu bildirmiştir (Wernli ve ark., 2009). Antidepresan kullanımı ve meme kanseri arasındaki ilişkide benzer sonuçlar pek çok çalışmada rapor edilmiştir (Kelly ve ark., 1999; Wang ve ark., 2001). Bu sonuçların aksine, Cotterchio ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları çalışmada, 2 yıldan fazla süreyle sürekli TCA kullanımının meme kanseri riskini 2 kat, ÖSGE gurubuna dahil paroxetin ilacının ise meme kanseri riskini 7 kat arttırabileceği bildirilmiştir.

Bazı indekslerde 2010 yılına kadar yayınlanmış olan antidepresan kullanımı ve meme kanseri ile ovaryum kanseri arasındaki ilişkiyi değerlendiren 61 çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan 20 tanesi (%33) meme ve ovaryum kanseri ile antidepresan kullanımı arasında pozitif bir ilişki belirlemiştir. Bu 20 çalışmanın tamamı ilaç endüstrisinden bağımsız çalışmalardır, geri kalan 41 tane çalışma (%67) meme ve ovaryum kanseri ile antidepresan kullanımı arasında ilişkinin negatif olduğunu rapor etmişlerdir. 41 Çalışmanın 15 tanesi ilaç endüstrisi ile bağlantılı, 26 tanesi ise ilaç endüstrisinden bağımsız çalışmalardır (Cosgrove ve ark., 2011).

Tedavi sürecinde bir antidepresan ilacın etkili olup olmadığının 4-6 hafta arasında anlaşıldığı, eğer ilaç ile tedaviye cevap alınmış ise 6-12 ay tedaviye devam edildiği, tedavi sonunda ilaçların aylar içinde azaltılarak kesildiği bilinmektedir (Örsel, 2004). Sonuç olarak depresyon tedavisinde ilaçların uzun süreli kullanımları söz konusudur.

- Toplumda depresyon insidansının yüksek olması,
- ilaçların tedavide uzun süreli olarak kullanılmaları,
- başka etkileri (örn: ağrı kesici etkileri) için bu ilaçlardan yararlanılmaları antidepresanların toplum içinde yaygın olarak kullanıldıklarını ve çok sayıda insanın uzun süreli olarak antidepresan ilaçların toksisitesine maruz kaldıklarını düşündürmektedir. Ayrıca son yıllarda kanser, infertilite, alzheimer ile parkinson gibi önemli pek çok hastalığın, genomik kararsızlıkla ilişkili olduğunu ortaya koyan çok sayıda makale vardır (El Zein ve ark., 2011; Fenech, 2011; Miglore ve ark., 2011).

Genomik kararsızlık, fiziksel ve/veya kimyasal ajanların genotoksik etkileri sonucu oluşmaktadır. Dolayısı ile genotoksik olan her ajanı, genomik kararsızlıkla ilişkili olduğu düşünülen ve bazıları yukarıda belirtilen hastalıkların oluşumundaki riskleri arttıran birer faktör olarak değerlendirmek mümkündür. Bu açıdan, insanların sıklıkla maruz kaldıkları tüm fiziksel ve kimyasal ajanların özellikle yaygın kullanımı olan ilaçların genotoksisitesinin araştırılmasının önemi büyüktür. Çeşitli yöntemlerle yapılan bu genotoksisite çalışmaları ile kimyasal ajanların hangilerinin hangi konsantrasyonda ve ne kadar sürede genom üzerinde toksik etki oluşturduğu ortaya konulmaya çalışılmaktadır.

In vitro yöntemleri de kapsayan, *in vivo* çalışmalara alternatif olabilecek modellerin kullanımı öncelikli hale gelmektedir. Yaklaşık 50 yıl önce geliştirilen 3R (Replacement,

Reduction, Refinement) prensibi günümüzde akademik ve endüstriyel çalışmalarda gittikçe artan bir çerçeve olarak görülmektedir. Araştırmacıların mümkün olduğunca az sayıda hayvan kullanımını etkinleştirmeyi öneren 3R prensibi, içinde gönüllü insanlardan temin edilen doku ve hücreler ile yapılacak çalışmaların da yer aldığı alternatif yöntemleri önerilmektedir (Efpia, nd; National centre, nd).

Depresyon tedavinde kullanılan ancak *in vitro* ve *in vivo* şartlarda genotoksik etkileri konusunda literatür eksikliği olan Ciprex ve Sinequan adlı ilaçların genotoksik etkilerinin olup olmadığının ortaya konulması, hem halk sağlığının korunmasına hem de bu konudaki literatür eksikliklerinin giderilmesine katkı sağlayacaktır. Bu amaca yönelik genotoksik hasarın tipine bağlı olarak çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

1.2. Tek Hücre Jel Elektrophorez Yöntemi (Komet Yöntemi)

Tek hücre jel elektrophorez diğer bir adıyla komet yöntemi, radyasyon, oksidatif stres ve kimyasallar gibi farklı pek çok genotoksik ajanlara maruz kalan populasyonlarda genetik hasarı tespit etmede kullanılan bir yöntemdir (Dusinska ve Collins, 2008). DNA hasarının belirlenmesinde hızlı ve duyarlı bir teknik olan komet az sayıda hücre ile çalışabilme imkanı da sağlar (Rojas ve ark., 2000). Tek bir hücre düzeyinde DNA hasarını tespit edebilen mikrojel elektrophorez tekniğini ilk olarak Östling ve Johanson (1984) bulmuşlardır. Östling ve Johanson geliştirdikleri bu metotta; hücreleri agar içine gömdükten sonra yüksek oranda tuz içeren lizing çözeltisi ile lizis etmişler ve sonraki elektrophorez aşamasını nötrale yakın bir pH'da gerçekleştirmişlerdir (Tice ve ark., 2000). Ancak nötral elektrophorez çift zincir kırıklarını tespit etmeye olanak sağlarken tek zincir kırıklarının belirlenmesini engellemiştir, dolayısıyla elektrophorezde nötrale yakın pH, yöntemi sınırlayan bir faktör olmuştur (Dinçer ve Kankaya, 2010). Singh ve arkadaşları (1988), Östling ve Johanson'ın kullandığı yöntemi alkali ortamda (pH>13'de) gerçekleştirmiş ve böylece tek zincir kırıklarını, tek zincir kırıkları ile ilişkili henüz tamamlanmamış kesip çıkarma tamir bölgelerini ve alkilenmiş bölgeleri de tanımlayabilen alkali teknik ortaya çıkmıştır. Hemen hemen tüm genotoksik ajanların çift zincir kırıklarından daha çok tek zincir kırıkları ve alkilenmiş bölgeler oluşturduğu düşünüldüğünde alkali komet yöntemi genotoksik ajanların belirlenmesinde nötral komet tekniğine göre çok daha hassas bir yöntem dönüşmüştür (Tice ve ark., 2000).

Teorik olarak, komet tekniğinde herhangi bir ökaryot hücre kullanılabilir. Genetik toksikolojide amaca yönelik olarak primer hücreler ve hücre hatları tercih edilmektedir. Standard hücre hatları; fare lenfoması L5178Y, CHO (Chinese hamster ovary), ve CHL'dir (Chinese hamster lung). Primer hücre olarak insan lenfositleri ve kemirici (Rodentia) hepatosit hücreleri kullanılmaktadır (Tice ve ark., 2000). Ancak insanlarla ilgili yapılan çalışmalarda büyük çoğunlukla lenfositler tercih edilmektedir (Szeto ve ark., 2005). Lenfositlerin yanı sıra çeşitli hücre tipleri ile örneğin; burun, yanak içi, gastrik ve gözyaşı kanalı epitel hücreleri (Rojas ve ark., 2000) ve sperm hücreleri ile yapılmış çalışmalar da vardır (Anderson ve ark., 1997; Duty ve ark., 2003; Migliore ve ark., 2006).

1.2.1. Komet tekniğinde işlem basamakları

1. Lamlarının agar kaplanarak hazırlanması
2. Hücrelerin hazırlanması
3. Hücrelerin agar kaplı lamlara gömülmesi
4. Liziz
5. Hücrelerin alkali elektroforez çözeltisi ile inkübasyonu
6. Alkali elektroforez
7. Nötralizasyon
8. Fiksasyon
9. Floresan boyama
10. Mikroskopi

1.2.1.1. Lamların hazırlanması

Deneylerden önce lamlar %1-1.5'lük Normal Erime Noktalı agaroz jel ile kaplanır. Birkaç gün oda sıcaklığında veya 40-50°C'de kurumaya bırakılır (Tice ve ark., 2000).

1.2.1.2.Hücrelerin hazırlanması

Sağlıklı donörlerden alınan tam kan örneklerinden izole edilen lenfositler uygun besiyerinde 37°C’de inkübe edilir (Tice ve ark., 2000).

1.2.1.3. Hücrelerin agar kaplı lama gömülmesi

Bu aşamada izole edilen hücreler, düşük erime noktalı agaroz jel (low melting agar; LMA) ile muamele edilerek ön kaplama yapılmış lamların üzerine yayılır. Hücre yoğunluğu mikroskoptaki her görüş alanında birkaç hücreden fazla olmamalıdır. Yüksek yoğunluklu hücre özellikle yürüyen hasarlı DNA’ların üst üste düşmelerine ve yanlış değerlendirmelere neden olabilir. Yüksek jel konsantrasyonu ise DNA göç miktarını etkileyebilir (Tice ve ark., 2000).

1.2.1.4. Liziz aşaması

Yüksek tuz konsantrasyonunda deterjan içeren lizing çözeltisi ile muamele sonucu hücre membranları parçalanır. Hücre zarları, çözünen hücre içerikleri ve histonlar uzaklaştırılırken DNA süperkoil yapıda ve nükleer matrikse bağlı olarak serbest kalır (Dusinska ve Collins, 2008). Bu şekile DNA’nın serbest hale gelebilmesi için hücreler en az 1 saat lizing çözeltisi içinde bekletilmelidir (Tice ve ark., 2000). Lizing çözeltisi ilk olarak Singh ve arkadaşlarının 1988 geliştirdiği protokole göre kullanılmaktaydı. Bu protokole göre çözelti; 100 mM EDTA, 2.5 M sodyum klorür, %1 lauroylsarcosine, 10 mM tris bazı içerir. Kullanımdan hemen önce %1’lik Triton X-100 eklenip ve pH 10’a ayarlanarak kullanılmaktaydı (Singh ve ark, 1988). Tice (1991)’e göre, lizis solüsyonuna kullanımdan hemen önce %1’lik Tritona X-100’e ek olarak %10 DMSO eklenmiş ve eklenen DMSO eritrositlerin lizisi sırasında açığa çıkan demiri bağlayarak radikallerin neden olduğu ekstra DNA hasarı engellemiştir (Tice ve ark., 1991).

1.2.1.5. Hücrelerin alkali elektroforez çözeltisi ile inkübasyonu

Elektroforezden önce lamlar yüksek alkali özellikteki (pH >13) elektroforez çözeltisi içinde 20 dakika bekletilir. Böylece çift iplikli DNA tek iplikli forma dönüşür (Tice ve ark., 2000).

1.2.1.6. Elektroforez

Bir önceki aşamada alkali ortamdaki inkübasyon sayesinde tek iplikli hale gelen DNA yine aynı alkali elektroforez çözeltisi içinde komet oluşumu için Singh ve arkadaşları

(1988) tarafından geliştirilen koşullarda elektroforeze tabi tutulur. 25V, 300 mA'lık elektrik alan içersinde 20 dakika süren elektroforez aşamasından sonra nötralizasyon aşamasına geçilir (Tice ve ark., 2000).

1.2.1.7. Nötralizasyon

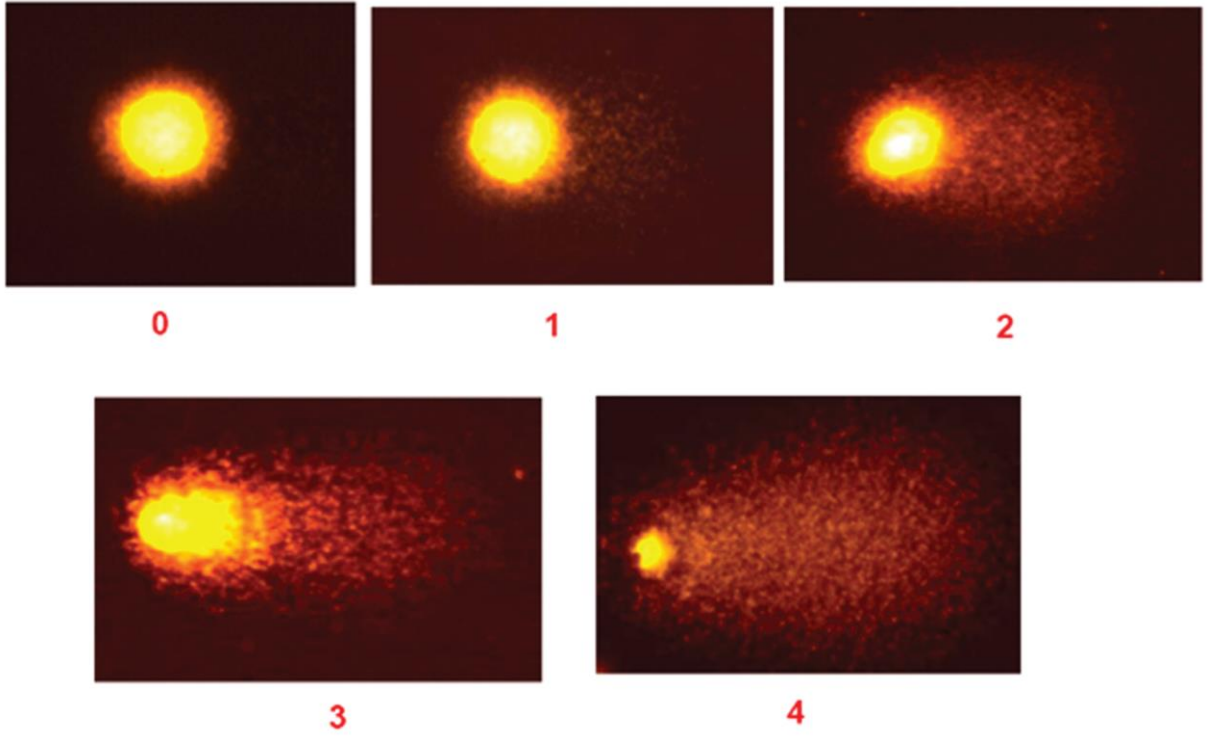
Elektroforez aşamasından sonra alkali durumdaki lamlar pH 7.5 nötralizasyon çözeltisi içinde 3 kez 5'er dakika toplam 15 dakika yıkanarak nötralize edilir. Bu aşamadan sonra preparatlar sıklıkla kullanılan etidyum bromür gibi DNA'ya bağlanan spesifik boyalarla boyanır ve mikroskopi aşamasına geçilebilir (Tice ve ark, 2000) veya preparatlar uzun süre sonra incelenmek istenirse lamlar absolut metanol veya etanol içinde 20 dakika bekletilerek fikse edilebilirler (Dhawn ve ark., nd).

1.2.1.8. Komet değerlendirme

Kometlerin değerlendirilmesi 2 türlü yapılmaktadır; görsel analiz ve bilgisayarlı görüntü analizi.

1.2.1.8.1. Görsel analiz

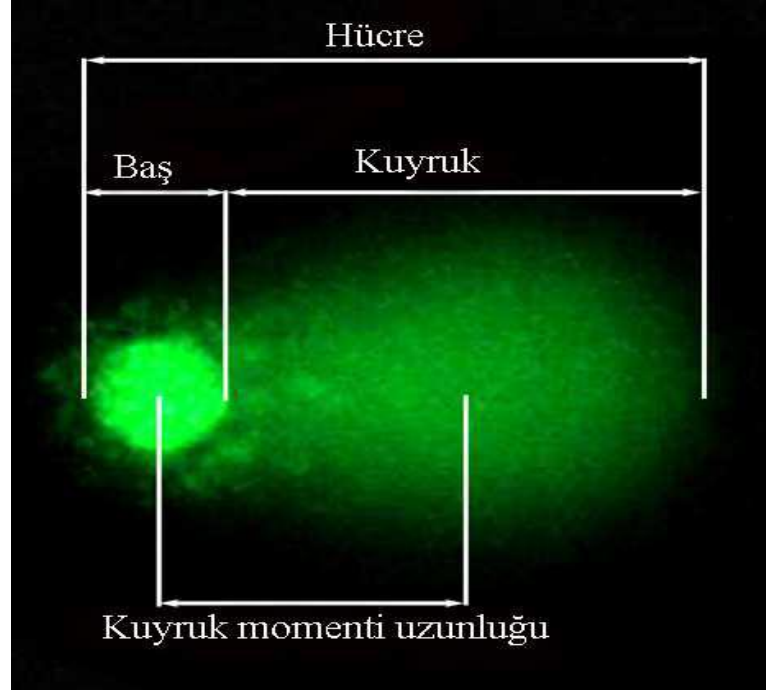
En sık kullanılan değerlendirme görsel değerlendirmedir (Dusinska ve Collins, 2008). Kontroller dahil bütün preparatlara birer kod verilerek bu kodların hangi konsantrasyona denk düştüğü bilinmeksizin (coded blind) sayım yapılmalıdır (Tice ve ark., 2000). Görsel değerlendirmeye göre ‘‘Komet’’ler DNA göç uzunluğuna göre 5 sınıfa (0, 1, 2, 3, 4) ayrılır (Dusinska ve Collins, 2008). İki tekrarın her birinden en az 25 toplam 50 hücre değerlendirilmelidir (Tice ve ark., 2000).



Şekil 1.3. Çeşitli Derecelerde Yürümüş Kometler. 0: hasarsız hücre, 1-4 yürüyen kırıkların derecelendirildiği hasarlı hücreler (Dinçer ve Kankaya, 2010).

1.2.1.8.2. Bilgisayarlı görüntü analizi

Dijital kameralar ile kometlerin metrik analizleri yapılır. Bu analizler için üretilmiş pek çok ticari program bulunmaktadır. Bu programlar komet başını kuyruktan ayırt ederek baş ve kuyruktaki DNA yoğunluğunu ayırt edebilmektedir (Dinçer ve Kankaya, 2010).



Şekil 1.4. Komet metrik analizi (Yavuz, 2013)

1.3. CBMN Tekniği (Sitokinezi Bloke Edilmiş Mikronükleus Tekniği)

Mikronükleus (MN), genetik bozukluklar, patolojik değişimler, folik asit gibi temel besin eksiklikleri ve reaktif oksijen türleri gibi zararlı metabolik ürünleri içeren iç faktörler ile radyasyon, kimyasal ajanlar ve mikroorganizmalar gibi dış faktörlerin neden olduğu zarar görmüş genetik materyalin göstergesi kabul edilen bir oluşumdur. MN ayrıca kromozomal kararsızlık ve genotoksik etkilerin değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan sitogenetik bir belirteçtir (Huang ve ark., 2011).

MN'lar ilk kez yaklaşık yüz yıl kadar önce Howell tarafından eritrosit sitoplazmasında görülmüş ve bu yapılar "nüklear materyal fragmenti" olarak tanımlanmıştır. Bu yapılar 1900'lü yılların başlarında Jolly terminolojisinde "intraglobuler korpusküller" olarak tanımlanmıştır. Hücre içinde tespit edilen bu oluşumlar hematologlar tarafından "Howell-Jolly cisimcikleri" olarak bilinmektedir. Benzer yapılar 1937'de Brenneke tarafından fare, sıçan embriyolarında ve 1951'de Thoday tarafından *Vicia faba*'da da görülmüş ve nükleus parçaları veya mikronükleus olarak isimlendirilmiştir (Kirsch-Volders ve ark., 2003). 1950'lerde bitki hücrelerinde, 1970'lerde hayvan hücrelerinde ve en son olarak kültürdeki insan hücrelerinde kanserojen kimyasalların belirlenmesi için kullanılmış bir tekniktir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011). Daha sonraları

1985 ve 1986 yıllarında Fenech ve Morley tarafından sitokinezi-bloke edilmiş Mikronükleus (CBMN) metodu olarak geliştirilmiş (Fenech, 1985) ve metod genetik toksikolojide standard bir sitogenetik yöntem haline gelmiştir (Fenech, 2006).

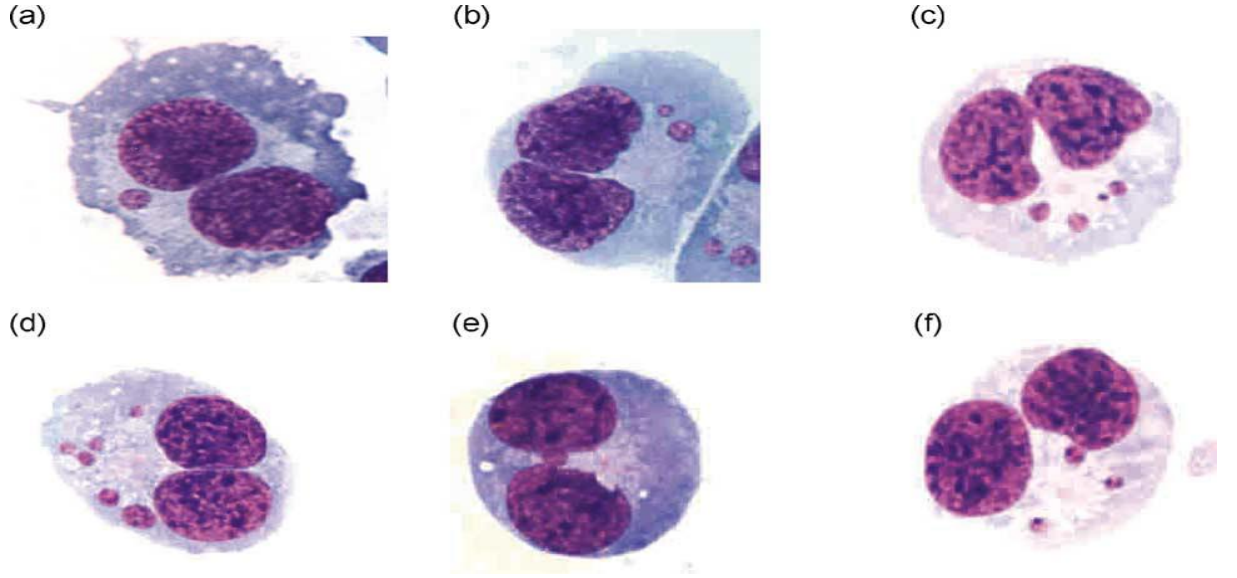
CBMN tekniğinde bir çekirdek bölünmesini tamamlayan hücrelerde sitoplazma bölünmesi (sitokinez), bir aktin inhibitörü olan sitokalsin-B kullanılarak bloke edilir. Bu aşamada sitokinezi durdurulmuş hücreler çift çekirdekli olarak gözlemlenirler ve hücre popülasyonlarında hücrelerin büyük bir çoğunluğu çift çekirdekli olarak birikir (Fenech, 2000). CBMN tekniği yalnızca bölünebilen ökaryotik hücrelere uygulanmaktadır yani, bölünmeyen, bölünme kinetiği bilinmeyen hücre popülasyonlarında etkili bir şekilde kullanılamamaktadır (Fenech, 2000). Periferal kan örneklerinde MN sıklığının belirlenmesi insanlarda kromozomal DNA hasarının ölçülmesi için en iyi sitogenetik yöntemlerden birisidir (El Zein ve ark., 2011) ve MN sayısındaki artış vücut hücrelerindeki genomik kararsızlığı ifade etmektedir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

CBMN tekniği sadece kromozom kırık ve kayıplarından doğan MN'leri değil, apoptoz, nekroz ve non-disjunction'ı kapsamlı olarak ölçebilen bir tekniktir. Ayrıca DNA yanlış tamiri ve telomer uçlarının erimesinden kaynaklanan disentrik kromozomların indikatörü olan Nükleoplazmik köprülerin (NPB) ve gen amplifikasyonlarının indikatörü olan Nüklear budların (Nbud) tespitine de olanak sağlamaktadır (Fenech, 2007).

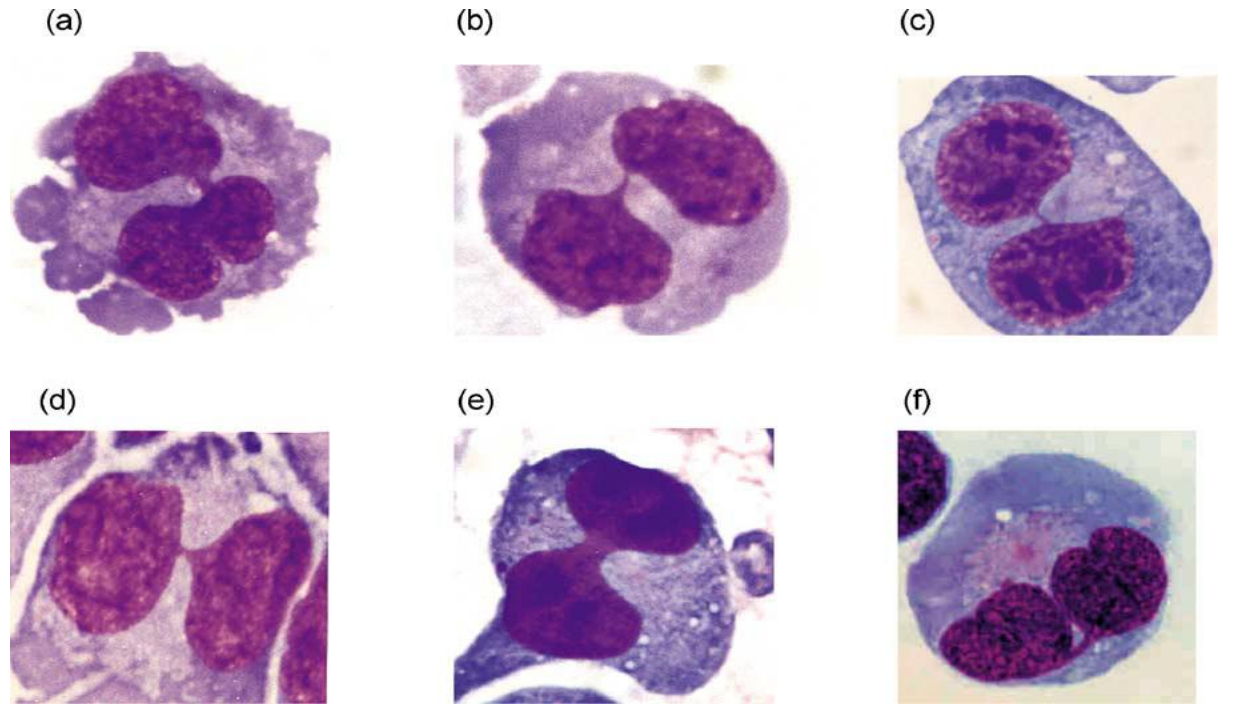
CBMN tekniği, yeni ilaçların potansiyel genotoksisitesinin araştırılması ve genotoksik olmayanların belirlenip tedavilerde bu ilaçların kullanımı ile ilgili çalışmalarda kullanılan bir tekniktir (Andrighetti-Fröhner ve ark., 2006). Teknik genotoksik etkinin yanı sıra kromozomal kararsızlığın değerlendirilmesinde de yaygın olarak kullanılan sitogenetik bir yöntemdir (Huang ve ark., 2011). Bunlara ek olarak, kanser risk değerlendirmelerinde de kullanılmakta ve bu konuda umut vaat etmektedir, ayrıca basit duyarlı ve hızlı bir teknik olması nedeni ile klinik ve epidemiyolojik çalışmalarda değerli bir yöntem olarak kabul edilmektedir (El Zein ve ark., 2011).

CBMN tekniğinde, MN sıklığının tespiti için çoğunlukla insan periferal lenfositleri kullanılmaktadır (Lindberg ve ark., 2007; Chung ve ark., 2002; İla ve İlhan, 2012). Lenfositlerin dışında ağız, burun, bronş ve ureteryal eksfoliyatif hücrelerde ve sperm hücrelerinde CBMN tekniği kullanılarak genotoksisite, infertilite ve kanser risklerinin değerlendirildiği çalışmalar mevcuttur (Holland ve ark., 2008; Burgaz ve ark., 2011;

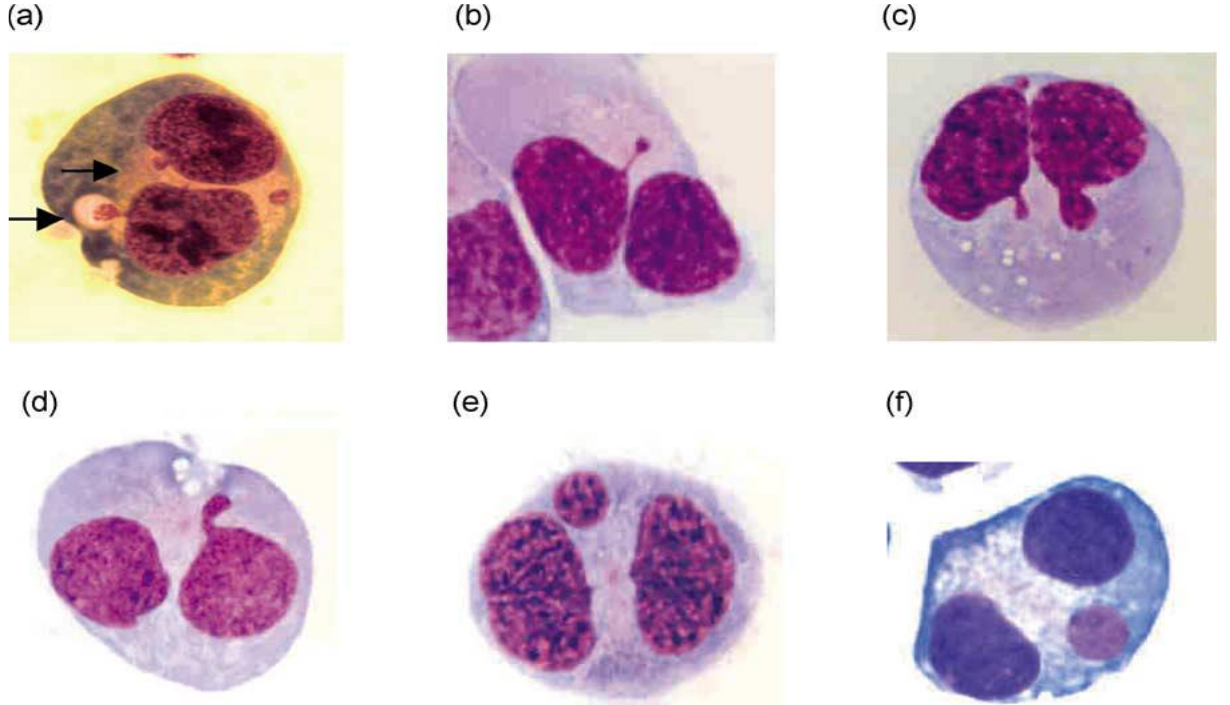
Nersesyan ve ark., 2006; Fenech, 2011; Holland ve ark., 1996; Michel ve ark., 1996; Lindberg ve ark., 2009).



Şekil 1.5. Mikronükleuslu iki çekirdekli hücreler (a-f) bir ve birden fazla MN bulunan tipik çift çekirdekli hücreler (Fenech ve ark., 2003)



Şekil 1.6. (a-f) NPB'li tipik iki çekirdekli hücreler (Fenech ve ark., 2003)



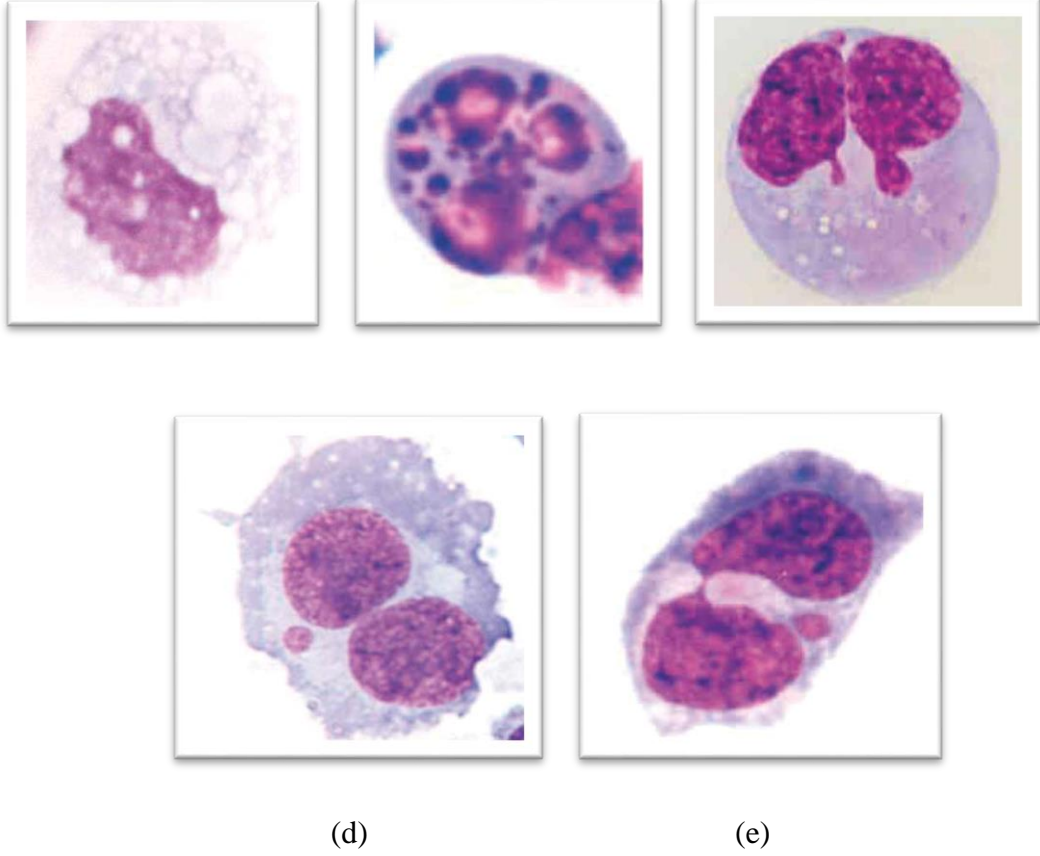
Şekil 1.7. (a) 2 Nbud 1MN'li çift çekirdekli hücre, (b-d) Nbud içeren tipik çift çekirdekli hücreler, (e-f) 3 çekirdekli hücreler, küçük çekirdekler MN'ye benzer ancak ana nükleusların çapının 1/3'ünden büyük oldukları için MN olarak değerlendirilmez (Fenech ve ark., 2003)

1.3.1. CBMN tekniği avantaj ve dezavantajları

Kromozom kırıkları, tam kromozom kayıpları, kromozom ayrılmama, nekroz, apoptoz, hücre gelişmesinin durdurulması, NPB ve Nbud gibi pek çok hasarın tespitine imkan sağlaması tekniğin önemli avantajlarıdır (Fenech, 2006). Diğer önemli avantajları arasında klastojenik ve anöjenik kromozom hasarlarının her ikisinin de aynı anda değerlendirilebilme olanağı sağlaması, kolay, hızlı, hassas ve ucuz bir teknik olması sayılabilir (Mateuca ve ark., 2006). Fiziksel veya kimyasal ajanların sitotoksik özellikleri hakkında önemli bilgiler sağlayan bölünen hücre popülasyonu içinde, nuklear bölünme indeksinin (Nuclear Division Index-NDI) ölçülebilir olması (Fenech, 1997), diğer tekniklerle karşılaştırıldığında değerlendirilen hücre sayısının fazla olması nedeni ile istatistiksel olarak daha anlamlı sonuçların eldesine olanak sağlaması (Mateuca ve ark., 2006) ve doz-cevap ilişkisinin net olması tekniğin diğer önemli avantajları arasında sayılabilir (Kirsch-Volders ve ark., 2003).

Yukarıda belirtilen avantajların yanı sıra CBMN tekniğinin çeşitli dezavantajları da bulunmaktadır. Yöntemin uygulanması sırasında kullanılan sitokalasin-B'nin MN oluşumunu uyarması en önemli dezavantajıdır. Yapılan çalışmalar sonucunda 1-6 µg/ml

aralığındaki sitokalsin-B'nin doza bağlı olarak MN frekansında bir artışa neden olmadığı bildirilmiştir. Tekniğin bir diğer dezavantajı dengeli translokasyon gibi tespiti daha zor olan değişimlerin ölçümünü sağlayamamasıdır. Bu nedenle metafaz analizleri ile detaylı kromozom analizi yapan diğer yöntemlerin yerini alabileceği söylenemez (Fenech, 1997).



Şekil 1.8. (a) Nekrotik hücre (b) Apoptotik hücre (c) Nbud'lu BN hücre (d) 1 MN'lu BN hücre (e) NPB ve MN'lu BN hücre (Fenech, 2007)

1.3.2. MN oluşum mekanizmaları

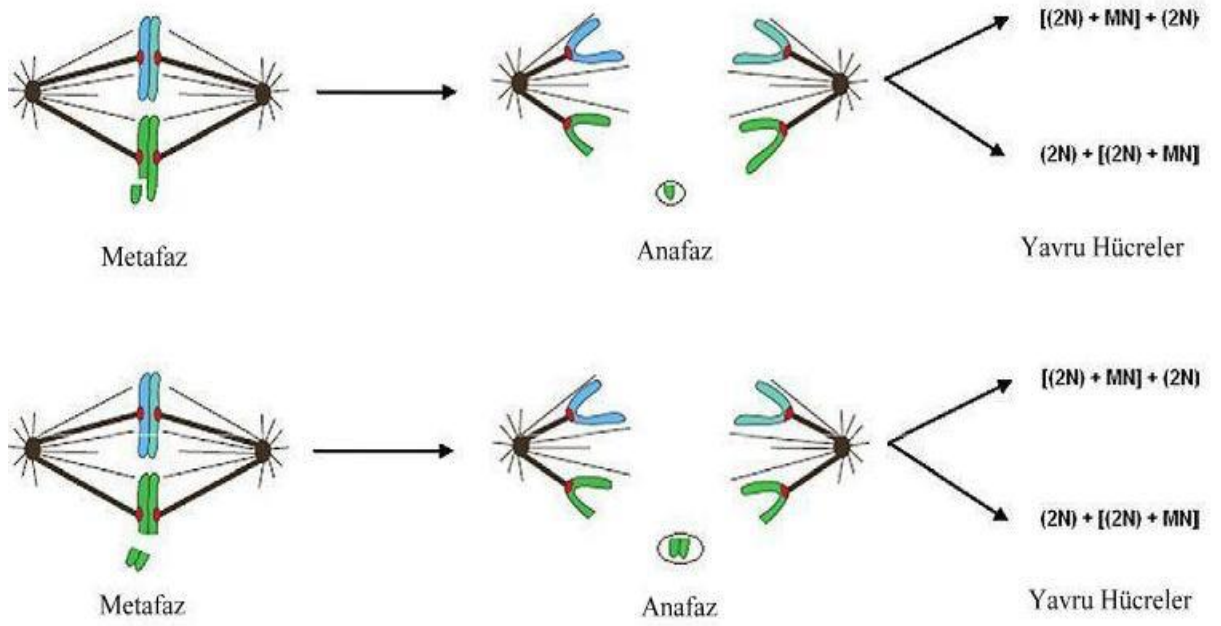
MN oluşumunun DNA hipometilasyonu sonucu olduğu bildirilmiştir. DNA metilasyonu inhibitörü olan 5-azacytidinenin 1, 9, 15, 16 ve Y kromozomların heterokromatin bölgelerinde kondensasyona neden olduğu ve bu kromozomlarda meydana gelen kayıpların MN'yi oluşturduğu bildirilmiştir (Fenech, 2006).

MN, asentrik kromozom veya kromatid parçalarından meydana gelebilmektedir. Bu oluşum farklı mekanizmalar aracılığı ile gerçekleşmektedir. Bu mekanizmalardan ilki; pek çok radyasyon biyolojisi çalışmaları ile gösterilmiş olan yanlış tamir edilmiş DNA çift zincir kırıklarıdır. Diğer mekanizma ise; DNA hasarının DNA tamir kapasitesini aştığı özel

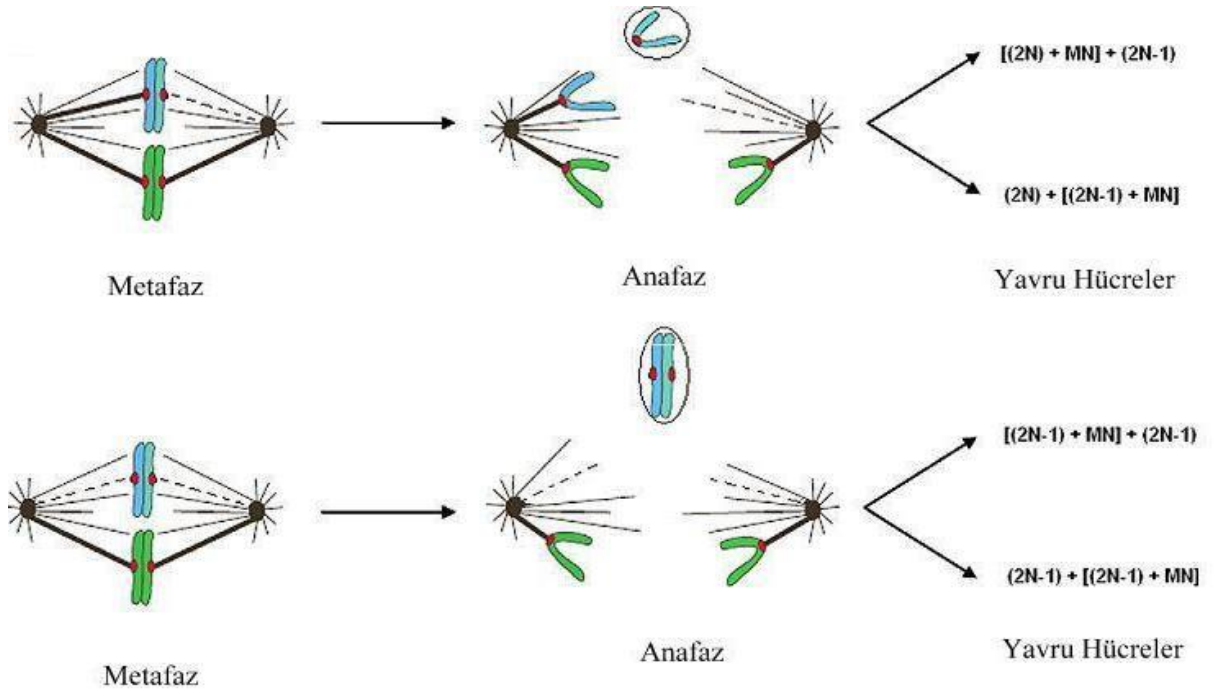
zamanlarda oluşan tamir edilememiş DNA çift zincir kırıklarıdır. Asentrik parçalardan MN oluşturan bir diğer mekanizma ise; yanlış eşleşmiş veya hasar görmüş bazların bulunduğu DNA ipliğinin kesip çıkartılması ile gerçekleştirilen tamir mekanizmasıdır (Fenech ve ark., 2011). Asentrik parçalar olarak ifade edilen sentromersiz MN'lar klastojenik ajanlar tarafından uyarılmaktadır (Lindberg ve ark., 2007). Test edilen ajana klastojeniktir diyebilmek için kinetokor taşıyan MN'ların düşük oranda (%0-30) olması gerekir (Stopper ve Müller, 1997).

MN, hücre bölünmesinin anafaz safhasında kutuplara çekilemeyen tam kromozomlardan meydana gelebilirler. Bu şekilde MN oluşumunun birkaç mekanizması vardır. Bu mekanizmalardan biri; sentromerik ve perisentromerik bölgedeki tekrar dizilerindeki sitozinlerin hipometilasyonudur. Bir diğer mekanizma; kinetokor proteinleri ve mikrotübül etkileşim dinamiklerinde hatalara neden olacak mutasyonlardır. Anafazda kromozom kaybı ile oluşan MN nedeni olan bir diğer mekanizma da mitotik iğ ipliklerinde ve mitoz kontrol noktalarındaki hatalardır (Fenech ve ark., 2011). Bu mekanizmalar sonucu oluşan sentromerli MN'lar anojenik ajanlar tarafından üretilirler (Lindberg ve ark., 2007). Test edilen ajanın anojenik olup olmadığı kinetokor taşıyan MN'ların oranına bağlıdır. Kinetokor taşıyan MN'lar %70-100 arasında ise bu bileşik için anojenik denilebilir. (Stopper ve Müller, 1997). Sentromerli ve sentromersiz MN oranı donörlerin yaş ve cinsiyetine bağlıdır. Sentromersiz MN'ler genç ve erkeklerde, sentromerli MN'ler ise yaşlılarda ve kadınlarda dominanttır. Yaş ve cinsiyetin MN oluşumuna etkisi öncelikli olarak cinsiyet kromozomlarında meydana gelmektedir (Lindberg ve ark., 2007). Ayrıca yapılan *in vitro* çalışmalar, NPB'lerin birden fazla noktadan kırılabilirdiğini ve bazı MN'ların kırılan bu anafaz köprülerinden orjinlendiğini göstermiştir (Fenech, 2007).

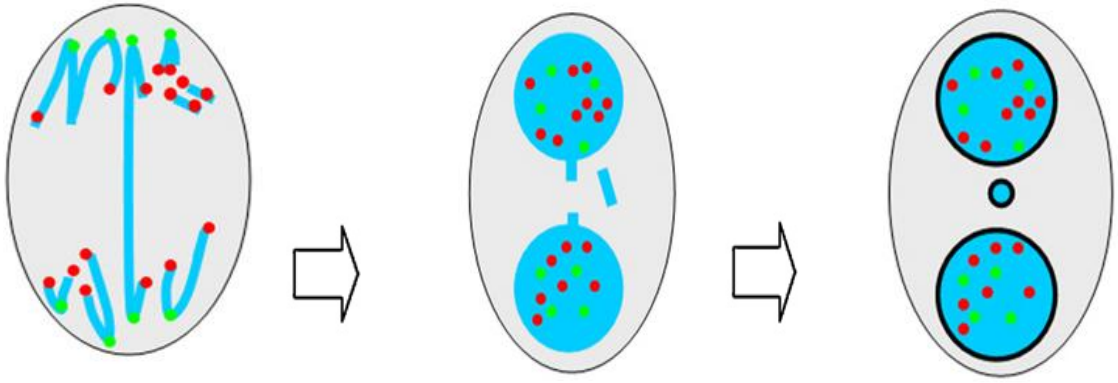
Yukarıda özetlenen MN oluşum mekanizmalarının; oksidatif stres, ve DNA metabolizması için gerekli olan ko-faktörlerin eksikliği gibi nedenlerle uyarılabilecekleri bildirilmiştir (Bonassi ve ark., 2007).



Şekil 1.9. Asentrik kromozom/kromatid parçaları ile MN oluşum mekanizması (Mateuca ve ark., 2006)



Şekil 1.10. Kutuplara çekilemeyen tam kromozom/kromatid ile MN oluşum mekanizması (Mateuca ve ark., 2006)



Şekil 1.11. NPB'in kırılması ile MN oluşum mekanizması (Lindberg ve ark., 2007)

1.3.3. BN hücre değerlendirme kriterleri

1. Sayımı yapılan hücreler çift çekirdekli olmalıdır,
2. Çift çekirdekli hücre içindeki çekirdekler bozulmamış ve aynı sitoplazmik sınır içerisinde olmalıdır,
3. Çift çekirdekli hücre içindeki her iki çekirdek benzer büyüklükte ve boyanma yoğunluğunda olmalıdır,
4. Çift çekirdekli hücre içindeki her iki çekirdek birbirine değebilir ya da iç içe geçmiş olabilir ancak bu gibi durumlarda hücrenin değerlendirilebilmesi için her bir çekirdeğin nükleer sınırlarının açık bir şekilde ayırt edilebiliyor olması gerekir,
6. Birbirine bitişik olan çift çekirdekli hücrelerin değerlendirilebilmesi için bu hücrelerin sitoplazmik sınırlarının birbirinden net bir şekilde ayırt edilebilmesi gerekir (Fenech, 2000).

1.3.4. MN değerlendirme kriterleri

- 1- Mikrokuleusun çapı, ana nükleusun ortalama çapının $1/16$ 'sı ile $1/3$ 'ü arasında olmalıdır. Görüntü alanı bakımından bir mikrokuleus, bir ana çekirdek alanının $1/256$ 'sı ile $1/9$ 'u arasında bir alana sahip olmalıdır,
- 2- MN ışığı geri yansıtıcı olmamalıdır,
- 3- MN ana çekirdeklere bağlı olmamalıdır,

4- MN ana çekirdeğe bir noktada değebilir ancak ana çekirdeğin üstüne düşmemelidir ve sınırları ana çekirdeğin sınırlarından ayırt edilebilmelidir,

5- MN bazen daha koyu boyanmakla beraber genellikle ana çekirdek ile aynı renkte boyanır (Fenech, 2000).

1.4. KKD Tekniği (Kardeş Kromatid Değişimi, SCE)

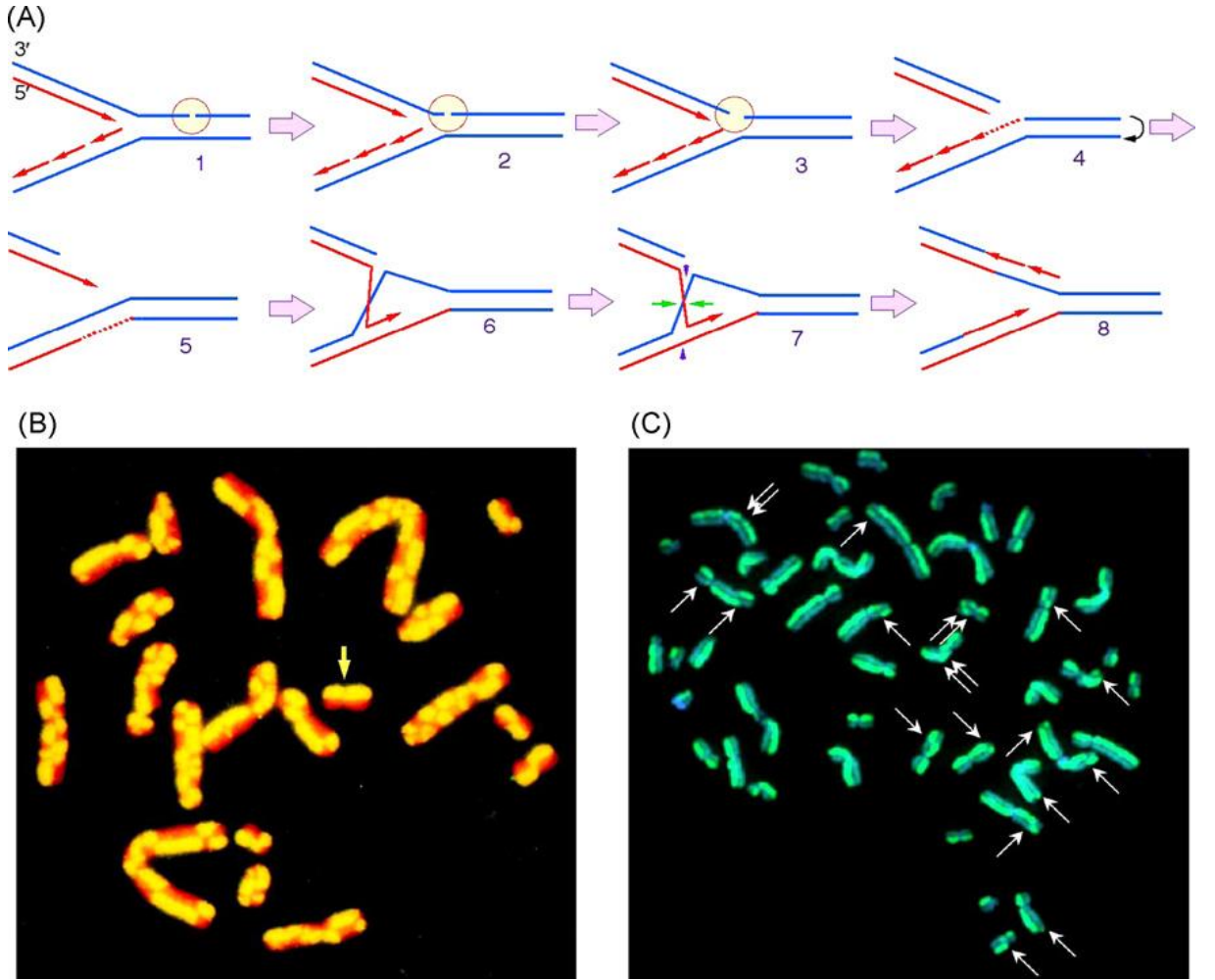
DNA replikasyonu boyunca iki kardeş kromatidin homolog bölgelerinde kırık oluşması ve kırılan bölgelerin yer değiştirip yeniden birleşmesi sonucunda oluşan KKD'nin (Wilson III ve Thompson, 2007) çeşitli genotoksik ajanlara maruziyet ile arttığı ve homolog rekombinasyon yolu ile DNA hasarının tamirini yansıttığı düşünülmektedir (Norppa ve ark., 2006). KKD, kimyasal maruziyet durumlarında sitogenetik sonuçların değerlendirilmesinde çokça başvuru alan ve pek çok kimyasal için doz cevap ilişkisinin değerlendirilmesinde *in vitro* ve *in vivo* deneylerde kullanılan bir yöntemdir (Tucker ve Preston, 1996). Ayrıca mutajenik ve karsinojenik ajanlara maruziyet ile genotoksik risk arasındaki ilişkiyi değerlendirmede duyarlı bir yöntemdir (Piterque ve ark., 1997). Bir başka deyişle genotoksik cevabın biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Norppa ve ark., 2006). Mutagenез ve karsinogenез ile KKD arasındaki ilişki tam olarak anlaşılammış olsa da KKD'nin bu tür maruziyetlerle doza bağlı olarak arttığı bilinmektedir (Pinkel ve ark., 1985).

KKD'nin ilk görüntülenmesi, otoradyografi yöntemi ile trityum kullanılarak bitki hücrelerinde Taylor tarafından gerçekleştirilmiş (Taylor ve ark., 1957), daha sonra Latt (1974), KKD'yi görüntüleyebilmek için BrdU ve Hoechst boyasını kullanarak florasan tekniğini geliştirmiştir. Son olarak Perry ve Wolff (1974) FPG metodu olarak da bilinen ve giemsa boyası ile Hoechst'ün kullanıldığı yöntemi geliştirmişlerdir (Asakawa ve Gotoh, 1997).

KKD oranı genelde düşüktür fakat kimyasalların yanı sıra enfektif ajanlar ve fizyolojik bozukluklar da artan KKD'ne neden olmaktadır. Örneğin insanlarda Bloom sendromlu hastalarda KKD oranının kontrol gruba göre aşırı derecede arttığı bilinmektedir (Berardino ve Shoffner, 1979). Brown ve Crossen (1976)'a göre Rauscher lösemi virüsü tarafından enfekte edilmiş fare embriyo fibroblastlarında KKD'nin yükseldiğini bulmuştur. KKD'nin, sadece mutajen ve karsinojenlerin neden olduğu genetik hasarın belirlenmesinde

değil bunun yanı sıra patolojik durumların belirlenmesine de hizmet eden yararlı bir yöntem olduğu belirtilmiştir (Berardino ve Shoffner, 1979).

Doğru tamire olanak sağlayan ve tek zincir kırıkları ile homolog rekombinasyon bölgelerindeki replikasyon çatalı ile tamir edilmemiş tek ve çift zincir kırıklarının oluşumu KKD sıklığını arttırmaktadır. Dolayısı ile XRCC1, PARP-1 ve DNA LIG3 gibi tek zincir kırıklarının oluşumuna aracılık eden proteinlerdeki hatalar, artmış KKD sıklığı ile ilişkilidir (Wilson III ve Thompson, 2007).



Şekil 1.12. (A) Kalıp DNA ipliğinde replikasyon çatalı tek zincir kırığı ile karşılaştığı zamanki KKD oluşum mekanizması(B) Propidyum iyodür ile boyanmış metafaz plağı, (C) Dapi ile boyanmış metafaz plağı (Wilson III ve Thompson, 2007)

KKD oluşumunda dolaylı rol oynayan tek zincir kırıklarının yanı sıra homolog rekombinasyonu düzenleyen proteinlerdeki hatalar da KKD sıklığına etki etmektedir. Otozomal resesif bir hastalık olan Bloom Sendromlu hastalarda da Homolog

rekombinasyondaki bu hatalardan kaynaklandığı düşünölen yüksek oranda KKD oluşumu görölmektedir. Klinik olarak da, bu hastalığın teşhisinde önemli derecede yükselmiş KKD bir belirteç olarak kullanılmaktadır (Wilson III ve Thompson, 2007).

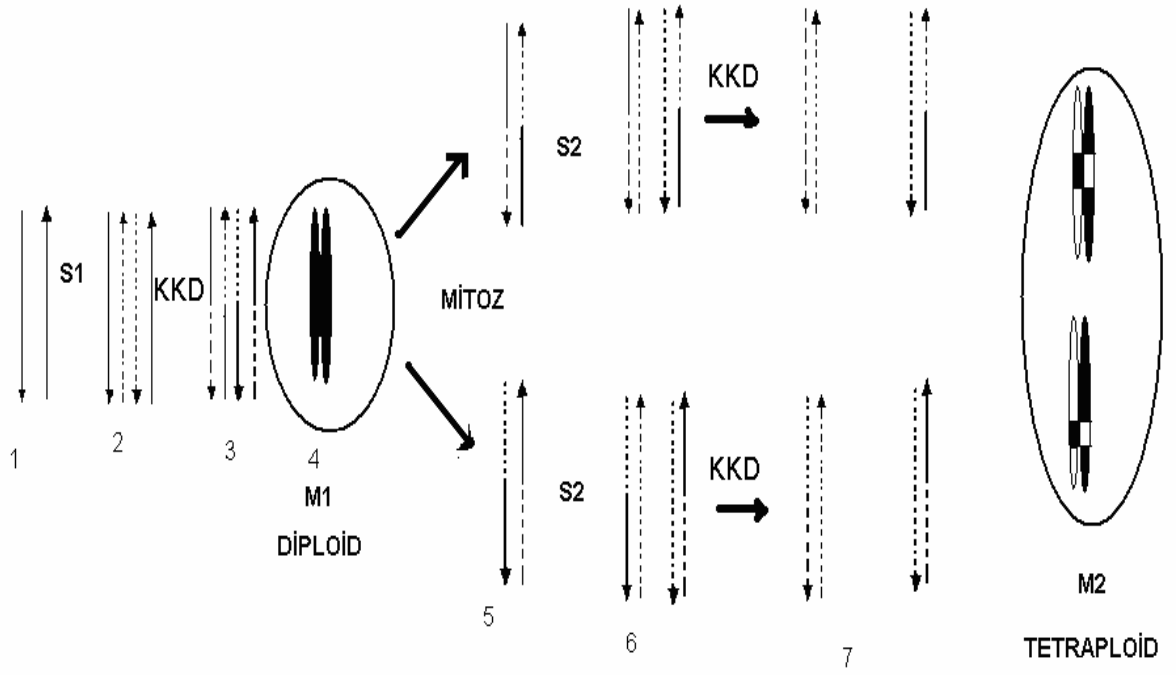
BrdU, timin azotlu bazına çok benzer yapıda olup DNA'nın semikonservatif özelliğinden dolayı replikasyon boyunca DNA yapısına etkili bir şekilde katılabilmektedir. Bu nedenle hücreler BrdU varlığında kültüre edilmekte ve BrdU yeni oluşan DNA ipliğine katılabilmektedir (Wilson III ve Thompson, 2007).

KKD oluşumu BrdU'nun timin yerine adenin ile eşleşmesi esasına dayanır. Kültür ortamında Timin sentezinde kullanılan ya da sentezi uyaracak endojen kaynakların bulunmaması gerekmektedir. Bu yüzden kültür ortamında kullanılacak besiyerinin önemi büyüktür. RPIM 1640 ve Dulbecco's MEM besiyerlerinin içeriğinde timin yoktur ayrıca timin sentezini uyaran folik asit miktarı da son derece azdır (Dilmeç, 1993).

KKD'nin gözlenebilmesi için kullanılması şart olan BrdU'nun kendisi de bir KKD uyarandır, dolayısı ile kimyasalların etkisini gözlemede minimum düzeyde kullanılması gerekmektedir (Asakawa ve Gotoh, 1997). Dutrillaux (1974), kültür ortamında BrdU konsantrasyonunun 0.03 ile 200 µg/ml aralığında optimum olduğunu bildirmiştir. Morgan (1981), ortalama 10 µg/ml BrdU'nun hem farklı boyanmaya cevap verdiği hem de KKD'nde bir artışa neden olmadığını belirtmiştir (Dilmeç, 1993).

1.4.1. Genel KKD mekanizması

DNA'nın kendini eşlemesi semikonservatif özellikte olduğu için yeni sentezlenen DNA ipliğinde timin yerine BrdU katılımı gerçekleşir. Eğer hücreler bir DNA sentezi boyunca BrdU'lu ortamda tutulurlarsa DNA sentez mekanizmasına göre DNA'nın sadece bir ipliğinde BrdU olacağından KKD gözlenemez. Hücreler iki mitoz süresince BrdU'lu ortamda tutulursa kardeş kromatidlerden birisi normal DNA diğeri ise BrdU'lu DNA taşıyacağından iki kromatidin farklılığı gözlenir. Eğer kromatidler arasında bir değişim olmuş ise bu sayede KKD değerlendirilebilir (Wilson III ve Thompson, 2007).



Şekil 1.13. KKD Genel oluşum mekanizması (Eke, 2007)

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Çeşitli Antidepresan İlaçlarla Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları

Yapılan bir çalışmada, tirisiklik antidepresanlara dahil imipramin ve desimipramin antidepresanların genotoksisitesini KKD tekniği ile fare kemik iliği hücrelerinde *in vivo* olarak çalışmışlardır. İmipramin ile 7, 20, 60 mg/kg dozları, desimipramin ile 2, 20, 60 mg/kg dozları çalışılmıştır. Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında düşük dozda KKD’de yükselme gözlenmezken yüksek iki konsantrasyonda genotoksik etki gözlenmiştir (Perez ve ark., 2002).

Draz ve ark. (2009), anksiyete ve majör depresyon hastası olan tirisiklik ve SSRI grubu ilaç kullanan 38 hasta (Fluoxetin kullanan 7 erkek 10 kadın, sertalin kullanan 5 erkek 5 kadın ve colimipramin kullanan 6 erkek 5 kadın) ile sağlıklı 5 erkek ve 5 kadından oluşan kontrol grubu ile yaptıkları çalışmada DNA jel elektroforez yöntemi ile total genomik hasarı tespit etmişlerdir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm gruplarda artan DNA hasarı görülmüştür. İlaçlar kendi aralarında karşılaştırıldığında Fluoxetin’in en çok, Sertalin’in orta düzeyde Colimipramin’in ise en az düzeyde DNA hasarına neden olduğu görülmüştür.

Roshdy ve Shoman (2002), Cipraleks adlı ilacın genotoksisitesini, gebe farelerle *in vivo* olarak yaptıkları çalışmada KA ve MN tekniklerini kullanarak araştırmışlardır. Çalışmada 0.06, 0.12 ve 0.24 mg/kg/gün dozları denenmiştir. Hem anne hem de embriyoda MN sıklığının en yüksek doz olan 0.24 mg’lık dozda artış gösterdiği tespit edilmiştir. KA tekniği sonuçları ise; annede hem sayısal hem de yapısal hasarların kontrol grubuna göre doza bağlı olarak artış gösterdiği görülmüştür. En sık gözlenen yapısal hasarlar ise sentrik halkalar, kromatid kırıkları ve delesyonlar olarak tespit edilmiştir. Embryodaki sonuçlar ise, yapısal ve sayısal hasarların kontrol grubuna göre önemli derecede arttığını ve en sık raslanan hasarların kromatid kırıkları, delesyon, anöploidi ve poliploidi olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak 0.06’lık dozda ilacın zayıf mutajenik ve toksik etkileri olduğu ancak 0.12 ve 0.24 mg’lık dozlarda ise hem anne hem de embriyoda toksik ve mutajenik etkilerde anlamlı derecede yükselme olduğu tespit edilmiştir.

SSRI’lar pek çok psikolojik hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Bozkurt ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada SSRI grubunu temsilen Sertalin’i seçmişler.

Çalışmayı, 18 sağlıklı gönüllü (13 kadın, 5 erkek), benzer teşhis konulmuş ancak ilaç tedavisine başlanmamış 18 hasta (14 kadın, 4 erkek), ve günde 50 mg Sertalin ile bir yıldır tedavi gören 10 hasta (9 Kadın, 1 Erkek) ile planlamışlardır. KKD sıklığının ilaçla tedavi gören ve görmeyen 2 hasta grubunda da, sağlıklı kontrol grubuna oranla dikkate değer bir artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu artışın muhtemel bir genotoksisiteyi gösterdiği belirtilmiştir. Ancak ilaç tedavisi altındaki hasta grubu ile ilaç tedavisine başlanmamış hasta grubu kendi aralarında karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu nedenle artışın, sebebinin hastaların içinde buldukları stres ile açıklanabileceği belirtilmiştir. KA sıklığında ise hasta ve sağlıklı gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Bozkurt ve ark., 2004).

2.2. Çeşitli Materyal ve Sitogenetik Yöntemlerle Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları

Methylphenidate hidroklorür, dikkat eksikliği ve hiperaktivite tedavisinde 1950'lerden beri kullanılan bir ilaçtır. El Zein ve arkadaşları, hiperaktivite teşhisi konulan 12 çocukla ilacın genotoksisitesi ile ilgili yaptıkları çalışmada, periferik lenfositlerde KA (Kromozom Aberasyonu, CA), KKD (Kardeş Kromatid Değişimi, SCE) ve MN (Mikronukleus) frekanslarını araştırmışlardır. Oniki hasta çocuk ile yürütülen çalışmada, deneyler ilaç tedavisine başlanmadan önce ve ilaç tedavisine başladıktan 3 ay sonra olarak planlanmış ve ilaç kullanımı ile KA frekansında 3 kat, KKD frekansında 4.3 kat ve MN frekansında 2,4 kat artış tespit edilmiştir. El Zein ve arkadaşları bu bulguların, insan sağlığı açısından Methylphenidate hidroklorür'ün daha ileri derecede araştırılmasını gerekli kıldığını vurgulamışlardır (El Zein ve ark., 2005).

Apitol, arı yetiştiriciliğinde maytlara karşı kullanılan ektoparazitlere karşı bir ilaçtır. Stanimirovic ve arkadaşları, bu ilacın kültüre edilmiş insan periferik lenfositlerinde genotoksisitesini değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında mitotik indeks, hücre poliferasyon indeksi ve KKD parametreleri 3 farklı konsantrasyonda (0.001, 0.01 ve 0.1 mg/ml) değerlendirilmiş ve tüm konsantrasyonlarda 3 parametrenin de artış gösterdiği tespit edilmiş, ilacın genotoksik potansiyelinin olduğu sonucuna varılmış, ayrıca arı yetiştiricilerinin tüketici güvenliği açısından, apitol adlı bu ilacın kullanımı ile ilgili eğitilmelerinin gerekliliğine vurgu yapılmıştır (Stanimirovic ve ark., 2005).

Antimikrobiyal bir ilaç olan Sulfamethoxazole'ün, Abou-Eisha ve arkadaşları tarafından insan periferik lenfositlerinde genotoksitesisi değerlendirilmiştir. Çalışmada KKD ve MN sıklığı sağlıklı 2 donörden alınan kan örnekleri ile 4 farklı konsantrasyonda (10, 50, 100, 500 µg/ml) test edilmiş ve ilacın en yüksek 2 konsantrasyonda (100, 500 µg/ml) her 2 parametrede de belli belirsiz bir artışa neden olduğu saptanmıştır. Bu yüzden ilacın zayıf genotoksik etkiye sahip olabileceği belirtilmiştir (Abou-Eisha ve ark., 2004).

Antibiyotik olarak kullanılan Violacein adlı ilacın genotoksitesisi, çeşitli memeli hücre kültürlerinde *in vitro* Komet ve CBMN teknikleri ile çalışılmış ve ilacın genotoksik olduğu tespit edilmiştir (Andrighetti-Fröhner ve ark., 2006).

Chung ve arkadaşları benzen metaboliti olan 1,2,4-benzenetriol'ün (BT) genotoksitesinin araştırıldığı çalışmada *in vitro* CBMN tekniği FISH tekniği ile birlikte kullanmışlar. Periferik kan örnekleri ile yapılan çalışmada 7. ve 8. kromozomlara spesifik sentromerik prob kullanılmıştır. CBMN sonuçlarına göre; kontrol grubunda 1000'de 4.5 olan MN sıklığı, 10 µM'lık konsantrasyonda 9.5, 25 µM'lık konsantrasyonda 14, 50 µM'lık konsantrasyonda 28, ve 100 µM'lık konsantrasyonda 40 MN sıklığına ulaşmış ve kimyasalın MN sıklığını doza bağlı arttırdığı tespit edilmiştir. Kromozom 7 ve 8'e ait pozitif sinyalli MN'lar değerlendirildiğinde; 8. kromozoma ait pozitif sinyal içeren MN'un 7. Kromozomu içeren MN'dan daha fazla olduğu tespit edilmiş ve bu kimyasala karşı 8. kromozomun daha duyarlı olduğu vurgulanmıştır (Chung ve ark., 2002).

Ündeğer ve Başaran (2005), yaptıkları çalışmada, insan periferik lenfositlerinde komet tekniğini kullanarak, dimetoat, metil paration, propoxur, pirimicarb, cypermethrin ve permethrin kimyasallarının genotoksik etkilerini değerlendirmişlerdir. On, 50, 100, 200 µg/ml lik konsantrasyonlarda yapılan çalışmada, dimetoat ve metil paration ile 100 ve 200 µg/ml'de, propoxur kimyasalında 50, 100, 200 µg/ml'de, pirimicarb, cypermethrin ve permethrin kimyasallarında ise 200 µg/ml'de yükselmiş DNA hasarına neden oldukları tespit edilmiştir.

Ila ve Ilhan (2012), yaptıkları bir çalışmada Tamiflu adlı ilacın *in vitro* genotoksitesini CBMN, KA ve KKD sitogenetik yöntemleri ile çalışmışlardır. 0,5 µg/ml, 1 µg/ml ve 2 µg/ml'lik konsantrasyonlar ile S9'lu ve S9'suz olarak planlanan çalışmada KA ve CBMN tekniklerinde S9'lu ve S9'uz ortamlarda bir artış gözlenmezken, KKD

tekniginde zayıf bir artış olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak ilacın genotoksik etkiye sahip olmadığı bildirilmiştir.

Borroto ve ark. (2002), 2-furylethylene türevi 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene adlı kimyasalın genotoksitesini 2 farklı sitogenetik yöntem (MN, KKD) ile S9'lu ve S9'suz olarak çalışmışlardır. Dört farklı konsantrasyon (0.5, 1, 5, 10 µg/ml) ile yapılan çalışmada sağlıklı sigara içmeyen iki erkek donörden alınan periferik kan örnekleri 3 saat S9'lu ve S9'suz muameleye tabi tutulmuştur. S9'lu ve S9'suz muamelede MN açısından istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmemiştir. S9'suz muamelede KKD'de zayıf bir artış gözlemlenirken, S9'lu uygulamada herhangi bir artış olmadığı belirtilmiştir.

Kloral hidrat (CH) çocuklarda, MR, tomografi gibi teşhis prosedürlerinden önce yatıştırıcı olarak yaygın şekilde yıllardır kullanılmakta olan bir ilaçtır. Bu çalışmada İkbal ve arkadaşları CH'nin sakinleştirici olarak verildiği çocuklarda KKD ve MN tekniklerini kullanarak ilacın genotoksitesini değerlendirmişlerdir. İlaç verildikten sonra ve verilmeden önce KKD ve MN sıklıklarına bakılmış, ilaç uygulandıktan sonraki KKD ve MN sıklığının önemli ölçüde arttığı belirlenmiş ve ilacın çocuklarda genotoksik potansiyeli olduğu sonucuna varılmıştır (İkbal ve ark., 2004).

Bigatti ve arkadaşları, antianksiyete, antimanik ve antipsikotik ilaçlarla çoklu tedavi gören hastaların periferik kan örneklerinde KA ve KKD tekniklerini kullanarak sitogenetik sonuçları değerlendirmişlerdir. Otuzaltı hastayla yapılan bu çalışmada 18 hastadan oluşan bir grup uzun zamandır Lityum karbonat, benzodiazepinler (BD) ve antipsikotik ajanlarla tedavi görmekte (grup A), 18 kişiden oluşan diğer bir grup ise BD ve antipsikotik ajanlarla tedavi görmekte olan hastalardan oluşturulmuş (grup B), ikinci hasta grubunun içinde 7 kişi ilaç tedavisine başlayalı bir ay olmuş hastalardan oluşmakta ve bu 7 kişi de üçüncü grubu oluşturmaktadır (Grup B1). Uzun süredir ilaç tedavisi gören grupta (grup A, B) kontrol grubuna göre hem KA'da hem de KKD'de önemli derecede artış ortaya çıkmıştır. Bir ay tedavi gören grupta (Grup B1) ise kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gösteren sitogenetik hasar tespit edilememiştir (Bigatti ve ark., 1998).

Öztürk ve arkadaşları, miyelodisplastik sendromlu (MDS) hastaların periferik lenfositlerinde KKD sıklığı ile genotoksitesini belirlemeye çalışmışlardır. On erkek 6 kadın toplam 16 kişilik hasta grubu çalışma popülasyonu olarak belirlenmiştir. Hasta grubunda KKD sıklığı kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir. Bu çalışmada KKD olarak

ifade olan DNA hasarında MDS hastalığının etiopatolojisinin rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Öztürk ve ark., 2005).

Villarini ve ark. (1998), tarımda yaygın olarak kullanılan deltamethrin insektisitinin potansiyel genotoksik aktivitesini komet, MN ve KKD teknikleri ile periferal lenfositlerde *in vitro* olarak çalışmışlar ve çalışma her 3 teknikte de S9'lu ve S9'suz olarak yürütülmüştür. Kontrol gruplarına göre hem S9'lu hem de S9'suz deneylerde MN ve KKD sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilememiştir. Komet sonuçları ise S9'lu deneylerde konsantrasyona bağlı artış görülmüştür. Sonuç olarak her 3 tekniğe ait veriler arasında uyum bulunamamış ve ilacın zayıf bir genotoksik potansiyele sahip olduğu ileri sürülmüştür.

Thimerosal özellikle aşılarda yaygın olarak kullanılan koruyucu bir maddedir. Götz ve arkadaşları bu kimyasalın genotoksitesini araştırarakları çalışmalarını, CBMN tekniği ile 6 sağlıklı donörden alınacak periferal kan ile ve her donör için birbirinden bağımsız 2 deney yapılacak şekilde planlamışlar. Sonuç olarak, 0.05-0.5 µg/ml aralığında MN oluşumunda önemli uyarılma görülmüştür ancak toksisite ve toksisiteye bağlı MN oluşumu 0.6 µg/ml üzerindeki konsantrasyonlarda gerçekleştiği tespit edilmiştir (Götz ve ark., 2003).

Melathion, yaygın olarak kullanılan organik fosforlu bir pestisitir. Yapılan çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda, genotoksitesini ile ilgili çelişkili veriler bulunması nedeni ile Blasiak ve arkadaşları Melathion ve ana metaboliti Malaoxon ile izomeri Isomalathion kimyasallarının genotoksik potansiyellerinin netleşmesi için komet tekniğini ile bir çalışma planlamışlar. Çalışmada periferal kandan izole edilen lenfositler 25, 75 ve 200 µM'lık konsantrasyonlarda 1 saat muamele edilmiş ve sonuç olarak Malathion ile dikkate değer bir DNA hasarı tespit edilememiştir. Metaboliti Malaoxon ve izomeri Isomalathion'un ise doza bağlı DNA hasarında artışa neden oldukları tespit edilmiştir (Blasiak ve ark., 1999).

Jaloszynski ve ark. (1999), inhalasyon anestetik olan Halothane ve Isoflurane ilaçlarının genotoksik özelliklerini komet tekniği ile çalışmışlardır. Sağlıklı 2 erkek donörden alınan periferal kan örnekleri ile 0.1, 1 ve 10 mM konsantrasyonlarda 10 ve 30 dakikalık muamele çalışılmış ve analiz edilen her 2 ilacın her 2 muamele süresinde de doza bağlı olarak DNA hasarını arttırdığı belirlenmiştir.

Krause ve ark. (2003), yaptıkları çalışmada Sevoflurane adlı anestezi ilacının genotoksisitesini KKD tekniği ile değerlendirmişlerdir. Araştırmada küçük cerrahi operasyonlara Sevoflurane ile anesteziye giden 40 çocuktan operasyon öncesinde ve sonrasında alınan kan örnekleri ile çalışılmış ve sonuç olarak anestezi uygulandıktan önce ve sonra alınan kan örneklerindeki KKD verilerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu sonuçlar ışığında Sevoflurane'in lenfositlerde KKD'yi uyarmadığı ve genotoksik bir etkiye sahip olmadığı belirtilmiştir.

Karabıyık ve ark. (2001), yaptıkları çalışmada, sevoflurane (SVF) ve isofluran (ISF) anestezi ilaçlarının genotoksisitesini komet tekniği ile çalışmışlar. Çalışmada anestezi öncesi, anestezi sırasında (60 ve 120 dakika) ve anestezi sonrasında (1., 3. ve 5. günlerde) 24 hastadan alınan periferik kan örnekleri, hiç anestezi uygulanmayan 12 kişilik kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Anestezi sırasında yapılan örneklemelerdeki 60 dakikalık, 120 dakikalık ve anestezi sonrasındaki birinci günde komet değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı ve benzer artışlar görülmüştür. Ancak anestezi sonrası 3. güne ait sonuçlarda azalma 5. güne ait sonuçlarda daha da azalma görülmüş ve bu durum DNA hasarının tamir edildiği şeklinde yorumlanmıştır.

Eke ve Çelik (2008), yılında yaptıkları çalışmada grip aşısında kullanılan Thimerosal adlı kimyasalın genotoksisitesini KKD tekniği ile *in vitro* olarak çalışmışlardır. Çalışmayı, sağlıklı sigara içmeyen 3 erkek donörden aldıkları periferik kan örnekleri ile 3 farklı konsantrasyonda (0.2, 0.4 ve 0.6 µg/ml) S9'lu ve S9'suz olarak planlamışlar. KKD, hem S9'lu hem de S9'suz deneylerde kontrol grubuna göre her üç konsantrasyonda da istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiş, poliferasyon indeksi ve mitotik indekste ise anlamlı bir düşüş tespit edilmiştir. Sonuçlar ışığında Thimerosal adlı kimyasalın S9'lu ve S9'suz ortamda çalışılan bu 3 konsantrasyonda hem genotoksik hem de sitotoksik etkiye sahip olduğu belirtilmiştir.

Ahmad ve ark. (2000), yaptıkları çalışmada, hormonal steroid olan ve doğum kontrolü haplarında, endometriyoz, ağrılı menstürasyon ve menopoz sonrası osteoporoz gibi hastalıkların tedavilerinde kullanılan ilaçlarda bulunan Estradiol-17β'nın insan periferik lenfositlerinde sitogenetik etkilerini araştırmışlar. KA ve KKD tekniklerini kullandıkları çalışmada sağlıklı 2 donörden aldıkları periferik kan örneklerinde 3 farklı konsantrasyonda (10, 25, 50 µg/ml) S9'lu ve S9'suz ortamda deneyler yapılmış ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. KA deneylerinde S9'suz ortamda 25 ve 50 µg/ml'lik

konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür, S9'lu ortamda ise tüm konsantrasyonlarda anlamlı bir artış tespit edilmiştir. KKD deneylerinde ise 50 µg/ml'lik konsantrasyonda S9'lu ve S9'suz ortamlarda normal kontrole göre anlamlı bir artış görülmüştür. Bu veriler ışığında Ahmad ve arkadaşları tarafından, Estradiol-17β'nin kendisinin veya metabolitlerinin mutajen potansiyeli göz önünde bulundurulduğunda, özellikle bu ilaçları sürekli kullanan kişilerin ilaçların potansiyel zararları konusunda dikkatli ve farkında olmaları gerektiğini vurgulamışlardır.

Ahmad ve ark. (2003), sentetik androjen olan Oxymetholone'un genotoksitesini KKD tekniğini kullanarak insan periferal lenfositlerinde *in vitro* bir çalışma ile değerlendirmişlerdir. S9 varlığında ve yokluğunda 3 farklı konsantrasyonda (25, 50, 100 µg/ml) gerçekleştirilen deneylerde her 3 konsantrasyonda da KKD'de anlamlı bir artış olmamıştır. S9'suz ortamda 100 µg/ml'de S9'lu ortamda ise 50 µg/ml'lik konsantrasyonda en yüksek KKD'ye ulaşılmış ancak bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Marques ve ark. (2002), acı biberden izole edilen ve pek çok lokal ağrı kesicide aktif madde olarak kullanılan bir bileşik olan Capsaicin adlı maddenin genotoksik potansiyelini 2 farklı sitogenetik yöntemle (KKD ve CBMN) metabolik aktivasyonlu ve metabolik aktivasyonsuz ortamda analiz etmiştir. Capsaicin'in metabolik aktivasyonsuz ortamda daha fazla olmakla beraber MN artışında doza bağlı artışa neden olduğu görülmüştür. Aynı şekilde KKD'de de artışa neden olduğu, bileşiğin genotoksik olduğu ve bu kimyasal için CBMN tekniğinin KKD tekniğine göre daha hassas olduğuna vurgu yapılmıştır .

Shabad ve ark. (2006), tarafından pek çok tedavide kullanılan ve steroid bir ilaç olan Fludrocortisone adlı ilacın sitogenetik etkileri KKD ve KA teknikleri ile çalışılmıştır. 25, 50 ve 100 µg/ml'lik 3 farklı konsantrasyonda ve 24, 48, 72 saatlik 3 farklı muamele sürelerinin denendiği çalışma metabolik aktivasyon sistemi (S9'un) varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilmiştir. İlacın, KA ve KKD tekniğinde elde edilen verileri normal kontrol ile kıyaslandığında her 3 konsantrasyonda ve muamele süresinde S9'lu ve S9'suz ortamda istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olmadığı görülmüştür.

Segura ve ark. (2012), genotoksik ve sitotoksik etkileri bilinmeyen Neonikotinoit insektisitlerin bu etkilerini komet tekniği ile çalışmışlardır. Neonikotonod gruba dahil 4 ticari insektisit (Calypso, Poncho, Gauch, Jade) ile insan periferal lenfositlerinde gerçekleştirilen çalışmada tüm ilaçların konsantrasyona bağlı olarak DNA hasarını

arttırdığı görülmüş ilaçlar arasında Jade'nin en genotoksik olduğu sonucuna varılmıştır. Trypan blue ile gerçekleştirilen sitotoksikite değerlendirilmesinde ise 4 ilacın da sitotoksik olduğu görülmüştür. Sonuç olarak ticari neonikotinoid insektisitlerin insan periferik lenfositlerinde hem genotoksik hem de sitotoksik etkiye sahip oldukları vurgulanmıştır.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. KKD, CBMN ve Komet Testlerinde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltilerin Hazırlanması

3.1.1. Cipralelex

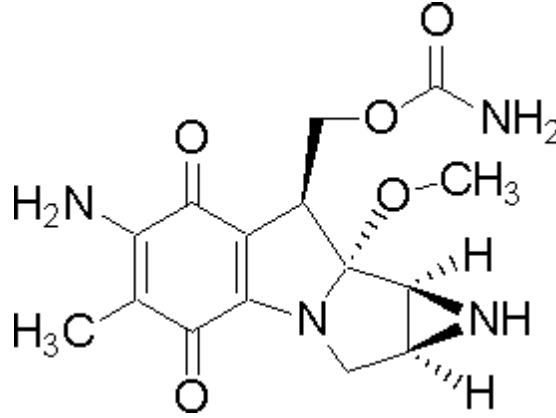
SSRI grubuna dahil yeni dönem ilaçlardandır, depresyon tedavisinde yaygın olarak kullanılmakta ve essitalopram etken maddelidir. Çalışma için piyasadan temin edilmiştir.

3.1.2. Sinequan

Tirisiklik gruba dahil bir antidepresandır, etken maddesi doxepin'dir. Depresyonunda dahil olduğu pek çok psikolojik hastalıkta kullanılmaktadır. Çalışma için piyasadan temin edilmiştir.

3.1.3. Mitomisin C (Mitomycine-MMC - Sigma: M4287)

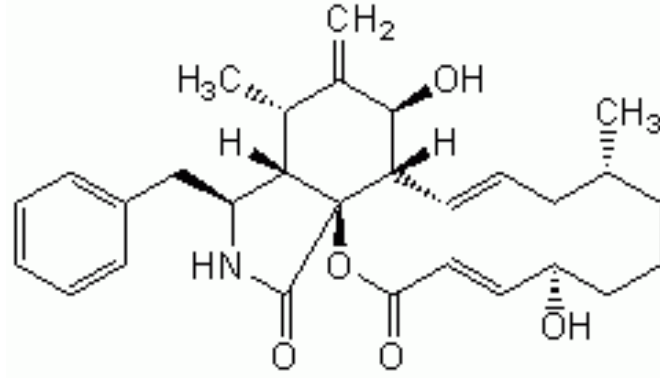
Mitomisin C, KKD ve CBMN tekniklerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Mitomisin C (MMC)

3.1.4. Sitokalsin B (Cytochalasin B – Sigma: C6762)

Sitokalsin-B, CBMN tekniğinde mitoz sırasında çekirdek bölünmesinden sonra sitoplazma bölünmesini durdurmak amacı ile kullanılmıştır. Bu çalışmada CBMN tekniğinde sitokalsin B kültür konsantrasyonu 6 µg/ml olarak çalışılmıştır. Deneylede Sitokalsin B DMSO ile çözülmüş besiyeri (RPMI 1640) ile sulandırılmıştır.



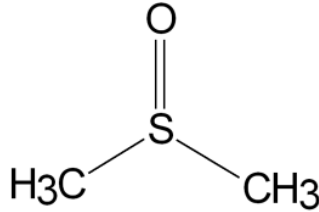
Şekil 3.2. Sitokalsin B

3.1.5. Fitohemaglutinin (Phytohaemagglutinin-PHA-M - Biological Industries: 1046898)

PHA-M mitojen olarak hücreleri mitoz bölünmeye sevk etmek (indüksiyon) için kullanılmıştır. Ana stok PHA-M 5 ml besiyeri (RPMI 1640) ile çözünmüş, CBMN ve KKD tekniklerinde her kültür ortamına 0.2 ml eklenmiştir.

3.1.6. Dimetil sulfoksit (DMSO - Sigma: D2650)

Dimetil sülfoksit, komet testinde lizing çözeltisinin hazırlanmasında ve CBMN tekniğinde sitokalsin B'nin çözülmesinde kullanılmıştır.



Şekil 3.3. Dimetil Sülfoksit

3.1.7. Kolşisin (Sigma: C-9754)

Kolşisin (Colchicine), KKD tekniğinde metafaz plaklarının eldesi için kültür sonlandırılmadan 2 saat önce her bir kültür tüpünde 0.06 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiştir.

3.1.8. Serum (Sigma: N4637)

Yeni doğan dana serumu, kültür ortamını zenginleştirmek için, KKD ve CBMN tekniklerinde her bir kültür ortamına 1 ml eklenmiştir.

3.1.9. Medyum (RPMI 1640, Sigma: R8758)

CBMN ve KKD tekniklerinde kültür ortamında besiyeri olarak kullanılmıştır.

3.1.10. Giemsa (Merck)

KKD ve CBMN tekniklerinde kullanılmak üzere Merck marka temin edilmiştir. Her iki teknikte de uygun tampon çözeltiler ile %5'lik hazırlanıp kullanılmıştır.

3.1.11. 5-Bromo-2-deoksiüridin (BrdU -Sigma: B 5002)

KKD tekniğinde BrdUrd kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını sağlamak amacıyla kullanılmıştır. BrdU her bir kültür tüpüne 10 µg/ml olacak şekilde eklenmiştir.

3.1.12. Etidyum bromür (EtBr)

Komet tekniğinde hücrelerin boyanması için 20 µg/ml olarak dH₂O ile hazırlanmıştır.

3.1.13. Hidrojen peroksit (H₂O₂)

Komet tekniğinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.1.14. Entellan (Merck Cat. No. 7961)

Hazırlanan preparatları daimi hale getirmek amacıyla lam ile lameli birbirlerine yapıştırmak için kullanılan yapıştırıcıdır.

3.1.15. Hipotonik çözelti

dH₂O ile hazırlanan 0.075 M potasyum klorür (KCl) hipotonik çözelti olarak kullanılmıştır. CBMN tekniğinde kültürün sonlandırılmasından 1-2 saat önce taze olarak hazırlanan çözelti buzdolabında +4°C'da bekletilmiş ve deney sırasında soğuk olarak kullanılmıştır. KKD tekniğinde ise aynı şekilde hazırlanan KCl kültürü sonlandırmadan 1-2 saat önce 37°C'da ısıtılıp kullanılmıştır.

3.1.16. Fiksatif

Fiksatif olarak CBMN tekniğinde 7/1 oranında metanol/glasiyal asetik asit karışımı +4°C'da soğuk olarak kullanılmıştır. Bu aşamasında kullanılan karışım her deneyden önce

taze olarak hazırlanmıştır. KKD tekniğinde ise 3/1 oranında etanol/glasiyal asetik asit karışımı oda ısısında ve yine her deney için taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır.

3.1.17. Sorenson tamponun hazırlanması

Yüz ml distile su içerisine 0.2 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ile 0.1 gr KH_2PO_4 kullanılarak hazırlanmıştır (pH = 6,8). Hem KKD hem de CBMN tekniğinde Sorenson tamponu, %5'lik Giemsa boyanın hazırlanması için kullanılmıştır.

3.1.18. Lizing çözeltisi (1L için)

Komet tekniğinde hücreleri lizis etmek için, lamalar 1 saat süreyle soğuk lizing çözeltisi içinde bekletilmiştir. Çözelti; 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10 gr Lauril Sarkosinat ile hazırlanmıştır. Stok olarak hazırlanan bu çözelti içine kullanılacağı gün %1 Triton X-100 ve %10 DMSO eklenmiştir.

3.1.19. Nötralize çözeltisi (1L için)

Elektroforezden sonra jel pH'sının nötralize edilmesi için lamalar 15 dakika süre ile bu çözelti içinde bekletilmiştir. Çözelti 0.4 M Tris 1L dH_2O içinde çözülerek hazırlanmış ve pH 7.5 olarak ayarlanmıştır.

3.1.20. Elektroforez çözeltisi (1L için)

Hücreler 25 dakika süre ile 25V, 300 mA akımda, hazırlanan soğuk elektroforez çözeltisi içinde komet oluşumu için yürütülmüştür. Çözelti; 10 N NaOH ve 200 mM EDTA ile stok olarak hazırlanmıştır. Bu stoktan 30 ml NaOH ve 5 ml EDTA alınıp dH_2O ile 1 litreye tamamlanmıştır.

3.1.21. Normal erime noktalı agar (İnvitrogen 16500-500)

Yüzde 1'lik olarak dH_2O ile hazırlanan çözelti, ısıtma tablasında sıcak iken lamalar içine daldırılıp alt yüzü ıslak peçete ile silinir ve 1 gece kurumaya bırakılır. Lam kutularına yerleştirilen lamalar uzun süre saklanabilir.

3.1.22. Düşük erime noktalı agar (İnvitrogen 16520-100)

Yüzde 1'lik olarak PBS ile hazırlanmıştır. Küçük ependorf tüplerine konularak $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanmış ve kullanılacağı zaman mikrodalga fırında eritilip 37°C 'da su banyosuna alınmıştır.

3.2. Lamların Hazırlanması

KKD ve CBMN tekniklerinde kullanılacak Lamlar, %2'lik HCl asit çözeltisinde 20 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda önce musluk suyu ile sonra da 3-4 kez distile su ile durulanan lamlar etüvde kurutularak kullanılacağı güne kadar -20°C'da şalelerin içinde bekletilmiştir. Komet tekniğinde kullanılacak lamlar ise, önce %100'lük etanole daldırılmış, kuruduktan sonra NMA ile kaplanarak kullanılmıştır.

3.3. DeneYlerde Kullanılan Ekipman

Laminarflow kabin

Mikropipet

Etüv

Santirfuj

Su banyosu

Soğutmalı santrifuj

Işık mikroskobu (Zeiss)

Floresan mikroskop (Zeiss)

pH metre

Otoklav

Hassas terazi

-20°C derin dondurucu

Steril kültür tüpleri

Yatay elektroforez tankı

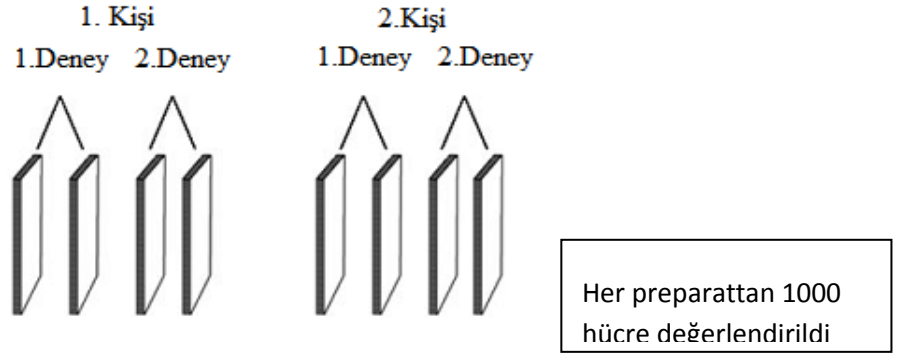
Vorteks

3.4. Metod

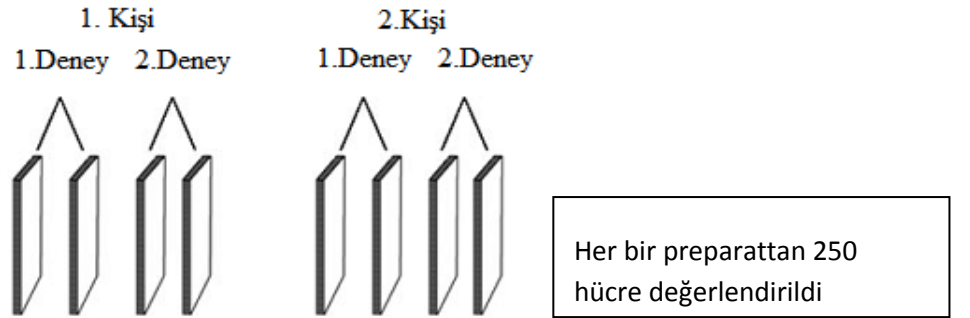
Tez çalışması Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından onaylanan belge çerçevesinde yürütülmüştür. Periferal lenfositlerin kullanıldığı *in vitro* çalışmalarda her bir deney için sağlıklı 35 yaş altı, sigara içmeyen iki farklı donörün kullanılması önerilmiştir (Kirsch-Volders ve ark., 2003). Bu çalışmada sağlıklı, sigara içmeyen bir kadın (29 yaşında) ve bir erkekten (30 yaşında) alınan periferal kan örnekleri kullanılmıştır. Çalışmada genotoksik etkileri araştırılacak olan Cipralex ve Sinequan adlı ilaçlar test maddeleri olarak kullanılmışlardır.

3.4.1. Hücre kültürü tekrarı

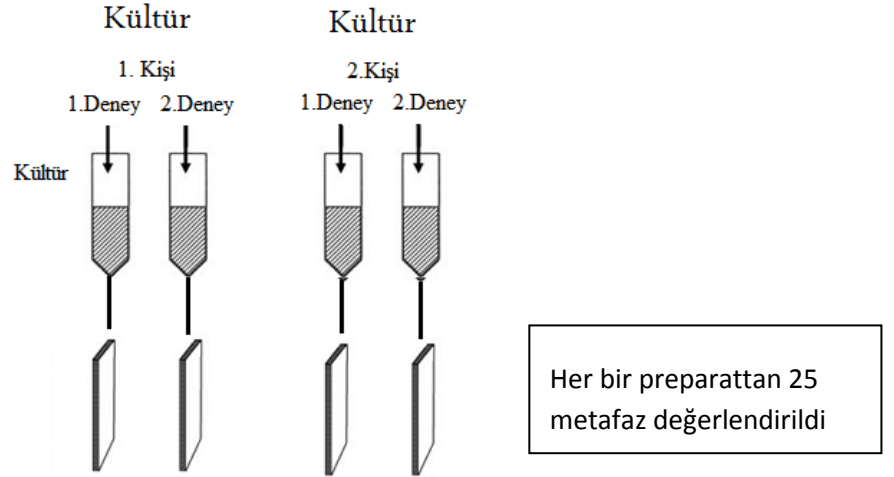
Her üç teknik içinde, her donör ve konsantrasyon için birbirinin tekrarı olan iki deney hazırlanmıştır. Her üç tekniğe ait gerçekleştirilen deneyler şematik olarak aşağıda özetlenmiştir.



Şekil 3.4. CBMN tekniğinin deney şeması



Şekil 3.5. Komet tekniğinin deney şeması



Şekil 3.6. KKD tekniğinin deney şeması

3.4.2. Sitotoksisite ve konsantrasyonların belirlenmesi

Kirsch-Volders ve ark. (2003), sitokalsin-B'nin kullanıldığı çalışmalarda sitotoksisitenin CBPI (sitokinezi bloklanmış proliferasyon indeksi) kullanılarak belirlenmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Bu doğrultuda çalışmada tüm kültürlerden elde edilen CBPI sonuçları göz önüne alınarak sitotoksisiteleri hesaplanmıştır. Kirsch-Volders (2003)'a göre %50-60 düzeyinde sitotoksisite seçilebilecek en yüksek konsantrasyondur, çalışılacak konsantrasyonların bunun altında, en az 3 konsantrasyon olması ve iki konsantrasyon arasında en fazla $\sqrt{10}$ kat fark bulunabileceği bildirmiştir.

Sitotoksisite için yapılan ön denemelerde 5, 10, 25, 50 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlar çalışıldı. Cipraleş için 25 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonda %35 olan sitotoksisite 50 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonda %80 bulunmuştur. Sinequan için 25 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonda %20 olan sitotoksisite, 50 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonda %79 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar ışığında ilaçların her ikisinin de 25-50 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlar arasında sitotoksik olduğu ve çalışılacak konsantrasyonların 25 $\mu\text{g/ml}$ 'nin altında olması gerektiğine karar verilmiştir. Sitotoksisite Lorge (2008)'ye göre aşağıdaki formül ile belirlenmiştir.

$$\text{Sitotoksisite} = 100 - 100 \left[\frac{(\text{CBPI}_{\text{test}} - 1)}{(\text{CBPI}_{\text{kontrol}} - 1)} \right]$$

Ayrıca, CBMN tekniğine göre yukarıda özetlendiği şekli ile belirlenen konsantrasyonların KKD ve Komet teknikleri için de kendi sitotoksisite testleri yapılmıştır.

3.4.3. CBPI'nin belirlenmesi

Kirsch-Volders ve ark. (2003), sitokalsin-B'nin kullanıldığı *in vitro* çalışmalarda belirlenecek olan CBPI için 500 hücrenin sayılmasını önermiştir öneri doğrultusunda çalışmada her bir konsantrasyon değeri için 500 hücre değerlendirilerek CBPI belirlenmiştir. CBPI, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Fenech, 2000).

$$CBPI=[M1*1+M2*2+M3*3+M4*4]/500$$

M1: tek çekirdekli hücre sayısı, M2: İki çekirdekli hücre sayısı, M3: Üç çekirdekli hücre sayısı, M4: Dört çekirdekli hücre sayısı.

3.5. CBMN (Sitokinezi Bloke Edilmiş Mikronükleus Tekniği)

In vitro koşullarda hazırlanan periferik lenfosit kültürü Fenech ve Morley (1985) tarafından geliştirilen yöntemin küçük değişikliklerle mevcut laboratuvar şartlarına uygun hale getirilerek uygulanmıştır. Gönüllü donörlerden steril tek kullanımlık enjektörlerle alınan kan örnekleri heparinli tüplere aktarılmıştır. Kültürün kurulacağı steril kabin çalışmaya başlamadan önce çalışma yüzeyi %70'lik alkol ile silinmiş ve 1-2 saat önce UV lambaları açılarak çalışmaya hazır hale getirilmiştir. Çalışmada değerlendirilen iki ilaca ait deney ve tekrarları için; steril kültür tüplerine 0.5 ml kan örneği, 4 ml besiyeri (RPMI 1640) ve 1 ml serum ve 0.2 ml PHA eklenmiştir. Yirmidört saatlik etkisi denenecek olan ilaçlar, belirlenen konsantrasyonlarda 48. saatte kültüre eklenmiştir. Kültürün 44. saatinde kültür ortamındaki konsantrasyonu 6 µg/ml olacak şekilde sitokalsin-B eklenmiştir. Yetmişikinci saatin sonunda kültür 7 dakika 1200 rpm'de santrifüj edilerek sonlandırılmıştır ve süpernatantları atılmıştır. +4°C'da soğutulmuş KCl'den her kültür tüpüne 7 ml damlatılmış ve 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edilmiş ve sonrasında süpernatantları atılmıştır. Hipotonik muameleden sonra 7/1 soğuk metanol-glyasial asetik asit karışımından damla damla tüplere 7'er ml eklenmiş ve hücreler 1200 rpm'de 7 dakika santrifüj edilmişlerdir. Bu yıkama işlemi 3 defa tekrarlanmış ve her seferinde üstteki süpernatant atılmış ve en son aşamada tüpün dibinde kalan lenfositler pipetaj yapılarak soğuk lamaların üzerine damlatılmışlardır. Oda sıcaklığında kurumaya bırakılan preparatlar her deney için taze olarak hazırlanan %5'lik Giemsa boyası ile 5 dakika süreyle boyanmışlardır. Boyama işleminden sonra preparatlar oda sıcaklığında kurutulup, entellan ile kapatılmış ve daimi hale getirilmişlerdir.



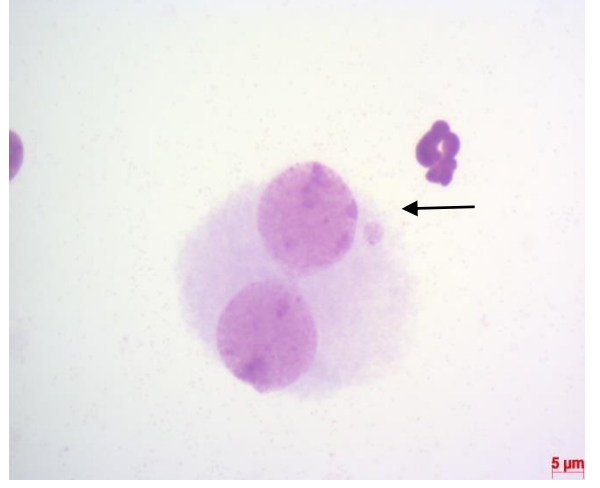
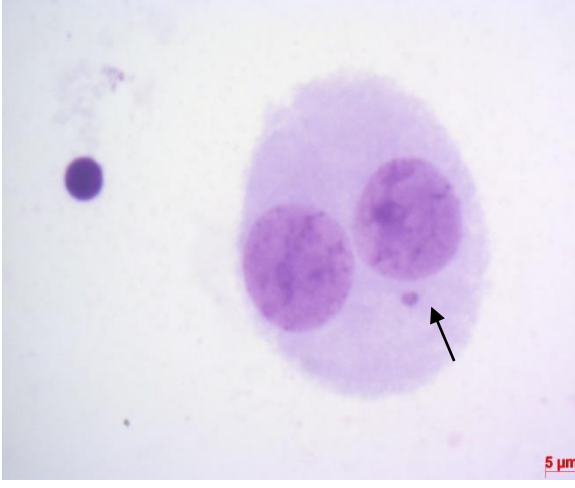
Şekil 3.7. CBMN tekniği şeması (Mateuca, 2006).

3.5.1. Çözücü ve pozitif kontrollerin belirlenmesi

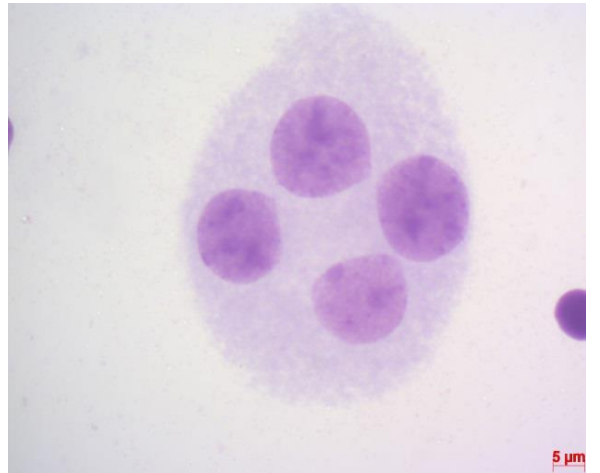
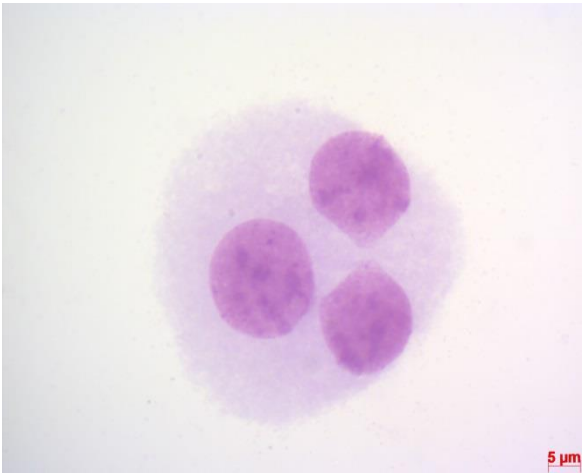
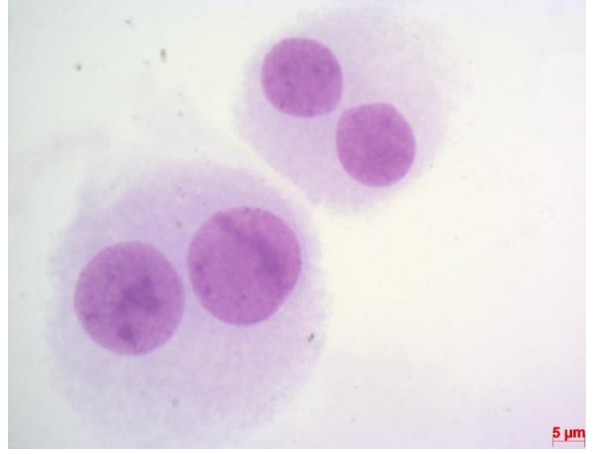
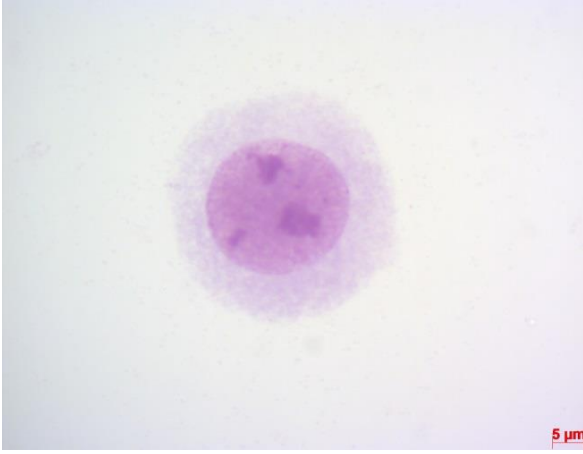
Genotoksik potansiyelini araştırdığımız ilaçlardan Ciprallex sıvı formda temin edilmiş dolayısı ile herhangi bir çözücü kullanılmamıştır. Ciprallex ile yapılan tüm deneylerde negatif kontrole hiçbir ekleme yapılmamıştır. Sinequan ise dH₂O ile çözülmüş ve Sinequan'ın denendiği tüm deneylerde negatif kontrole çözücü olan dH₂O eklenmiştir. Tüm deneylerde pozitif kontrol olarak MMC kullanılmıştır. Yapılan ön denemelerde 1 µg/ml'lik MMC'nin anlamlı derecede MN oluşturduğu görülmüş ve tüm deneylerde 1 µg/ml MMC pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.5.2. MN sıklığının belirlenmesi

Entellan ile kapatılarak daimi hale getirilen preparatların değerlendirilmesi Zeiss marka binoküler ışık mikroskopunda 1000X büyütme ile yapılmıştır. Farklı kişilerin incelemelerinden doğacak hataları ortadan kaldırmak için bütün preparatlar aynı kişi tarafından sayılmıştır. Kirsch-Volders ve ark. (2003)'a göre çalışmada her bir ilacın denenen konsantrasyonları iki sefer kültüre edilmiştir. Her konsantrasyon ve tekrarından 4000 iki çekirdekli hücre değerlendirilmiş sonuç olarak bir kişiye ait kan örneklerinde, bir konsantrasyon için 8000 iki çekirdekli hücre değerlendirilmiştir.



Şekil 3.8. MN'li binükleat lenfositler, MN: →



Şekil 3.9. 1, 2, 3, ve 4 çekirdekli lenfositler

3.6. KKD (Kardeş Kromatid Değişimi)

Tez çalışmasında KKD tekniğinde lenfosit kültürü Moorhead ve ark. (1960)'a göre küçük değişiklikler uygulanarak yapılmıştır. Gönüllü donörlerden alınan kan örnekleri heparinli tüplere aktarılmıştır. Kültürün kurulacağı steril kabin çalışmaya başlamadan önce %70'lik alkol ile silinmiş ve 1-2 saat önce UV lambaları açılarak çalışmaya hazır hale getirilmiştir. Çalışmada değerlendirilen iki ilaç ve tüm konsantrasyonlar için hazırlanan deneyler ve deney tekrarları için; steril kültür tüplerine 0,5 ml kan örneği, 4 ml besiyeri ve 1 ml serum, 0.2 ml PHA ve 10 µg/ml BrdU eklenmiştir. Kültür tüpleri alüminyum folyo ile kaplandıktan sonra karanlık ortamda 37°C'da inkübasyona bırakılmıştır. Yirmidört saatlik etkisi denenecek olan ilaçlar belirlenen konsantrasyonlarda 48. saatte kültüre eklenmiştir. Yetmişinci saatte 0.06 µg/ml kolsişin eklenmiş ve 72. saatin sonunda kültür sonlandırılmıştır. Hücreler 7 dakika 1200 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatantları ayrı pastör pipetleri kullanılarak atılmıştır. +37°C'de 1-2 saat ısıtılmış KCl'den her kültür tüpüne 7 ml damlatılmış ve 37°C'de 8 dakika bekletilmiştir (hipotonik çözelti içerisinde 8, 10 ve 12 dakika bekletme denenmiş ve en iyi sonuç 8 dakikada alınmıştır). Daha sonra 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edilmişlerdir. Bu aşamadan sonra süpernatantları atılmış ve oda sıcaklığında 3/1 metanol-glasial asetik asit karışımından damla damla tüplere eklenmiş ve hücreler 1200 rpm'de 7 dakika santrifüj edilmişlerdir. Bu aşama 3 defa tekrarlanmış ve en son aşamada tüpün dibinde kalan lenfositler pipetaj yapılarak buz soğukundaki lamaların üzerine 30 cm yüksekten damlatılıp preparatlar 1-2 gün oda ısısında eskitilmiştir (boyama işleminin 1-2 günlük eskitmeden hemen sonra yapılması kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkı açısından en iyi sonucu vermiştir). Daha sonra preparatlar Perry ve Wolf (1974)'a göre EPA (1996)'nın da önerdiği FPG tekniği ile boyanmıştır. Kuruyan preparatlar ışınlama kabına konarak üzeri bir film şeklinde Sorensen tamponu (pH 6.8) ile örtülecek şekilde kapatılmıştır. Preparatlar, karanlıkta Sorensen tamponu içinde 15 cm mesafeden 30 W'lık 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen ultraviyole lambası ile 30 dakika ışınlanmıştır. Işınlama bittikten sonra preparatlar 1 X SSC eriyiği içerisinde 58-60 °C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda preparatlar taze hazırlanmış %5'lik Giemsa boyası ile 5 dakika boyanmıştır (Giemsa boyama %5, 2 ve 10'luk Giemsa ile 5 ve 10 dakikalık sürelerde denenmiş ve en iyi sonuç %5'lik Giemsa ile 5 dakikada alınmıştır).

3.6.1. Mitotik indeksin (MI) belirlenmesi

Mitotik indeksin tespit edilmesi amacıyla bütün uygulamalar için kadın ve erkek bireye ait preparatların her birinden 1000'er hücre incelenmiş ve bu hücreler içinde metafaz evresindeki hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı yüzde cinsinden hesaplanmıştır.

3.6.2. Proliferasyon indeksinin (PI) saptanması

PI'nin belirlenmesi için 100 hücre değerlendirilmiş ve M1, M2, M3 evresindeki metafazlar sayılarak aşağıdaki formül ile hesaplaması yapılmıştır.

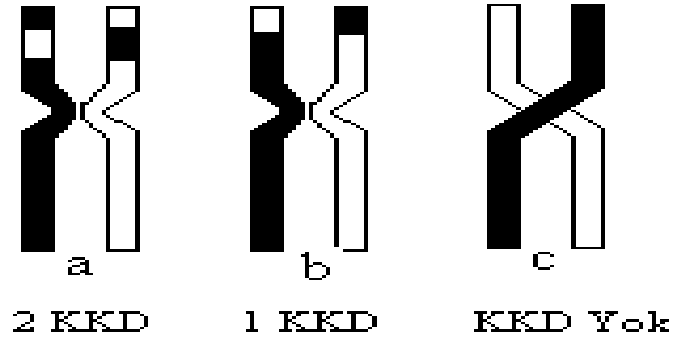
$$PI=M1*1+M2*2+M3*3/N$$

M1: Birinci mitozu geçiren hücrelerin sayısı, M2: İkinci mitozu geçiren hücrelerin sayısı, M3: Üçüncü mitozu geçiren hücrelerin sayısı. N: Değerlendirilen hücre sayısı

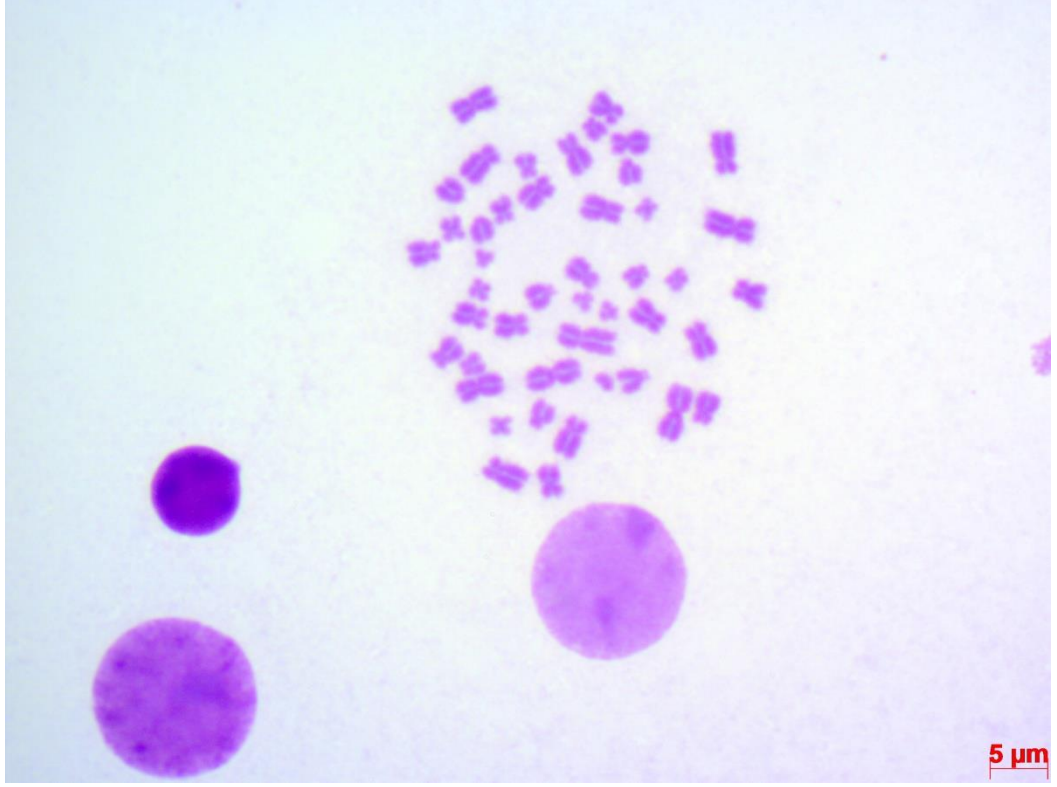
Birinci, ikinci ve üçüncü metafaz plakları, Topaktaş ve Speit (1990)'e göre ayırt edilmiştir. Timin analogu olan 5-BrdU, kültür ortamına eklendiğinde, DNA replikasyonu sırasında (birinci S fazında) yeni sentezlenen DNA ipliği içine timin yerine ortamda bulunan 5-BrdU geçer. Tek bir DNA ipliği 5-BrdU aldığından kromozomların her iki kolu koyu renkte boyanır. Bu hücreler birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (M1). Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerden meydana gelen yavru hücreler tekrar S fazına girdiklerinde (5-BrdU'li ortamda ikinci S fazı) timin içeren DNA ipliğine eş olarak sentezlenen yeni DNA ipliğinde 5-BrdU yer alır. Bu iki polinükleotid ipliği bir kromozomun koyu boyanan kromatidini oluşturur. 5-BrdU içeren ipliğe eş olarak sentezlenen yeni ipliğe de 5-BrdU girer ve bir kromatidi oluşturan iki polinükleotid ipliği de 5-BrdU içereceğinden bu kromatid, aynı kromozomun açık boyanan kromatidini oluşturur. İşte bu hücrenin metafaz devresinde kromozomlarının kromatidlerinden birisi koyu diğeri açık renkte boyanır. Bunlar da ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (M2). Bu hücreler de tekrar S fazına girdiğinde (5-BrdU'lu ortamda üçüncü S fazı) açık boyalı kromatitten her iki kolu da açık boyanmış kromozom, koyu boyalı kromatitten ise bir kolu açık diğeri koyu boyanan kromozomlar meydana gelir. Sonuç olarak üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren (M3) bu hücrelerin metafaz plağında hem her iki kolu açık boyanmış hem de bir kolu açık bir kolu koyu boyanmış kromozomlar görünür. M1, M2 ve M3 bu şekilde ayırt edilerek PI hesaplanmıştır.

3.6.3. KKD sayısının belirlenmesi

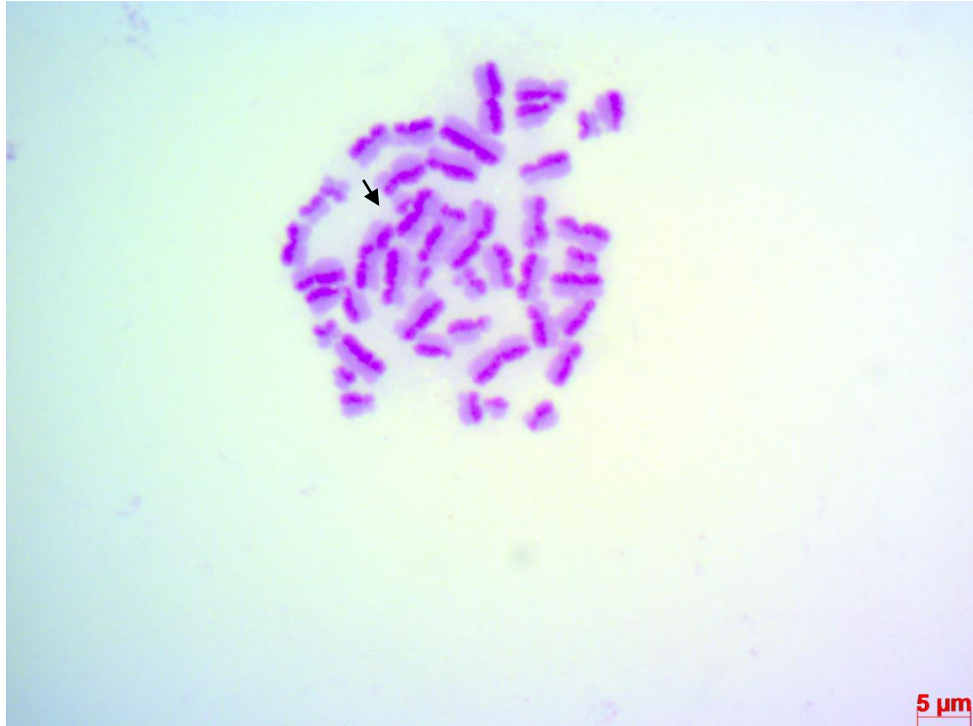
Hücre sayımları 1000X büyütme ile yapılmıştır. Çalışmada Zeiss marka binoküler ışık mikroskop kullanılmıştır. Güvenilir veriler elde edebilmek için tüm mikroskobik değerlendirme aynı kişi tarafından yapılmıştır. KKD sayısını belirlemek için, iyi dağılmış ve ± 2 kromozom içeren 46 sentromerli 25 metafaz her bir donör ve deney için değerlendirilmiştir (OECD, 1986). Toplamda paralel deneyler ile beraber her bir donör ve konsantrasyon için 50 metafaz değerlendirilmiştir. KKD sayısı Topaktaş ve Speit (1990)'e göre farklı boyanmış kromozom kollarındaki değişimlerin sayılmasıyla belirlenmiştir. Uçtan parça değişimi olmuş ise 1 KKD olarak sayılmıştır, ortadan gerçekleşen değişimler 2 KKD olarak sayılmıştır. Ancak bu incelemeler esnasında kromatidlerin primer boğum bölgelerinden dönüm yapıp yapmadıklarına dikkat edilmiştir. Bu gibi durumlar KKD olarak değerlendirilmemiştir.



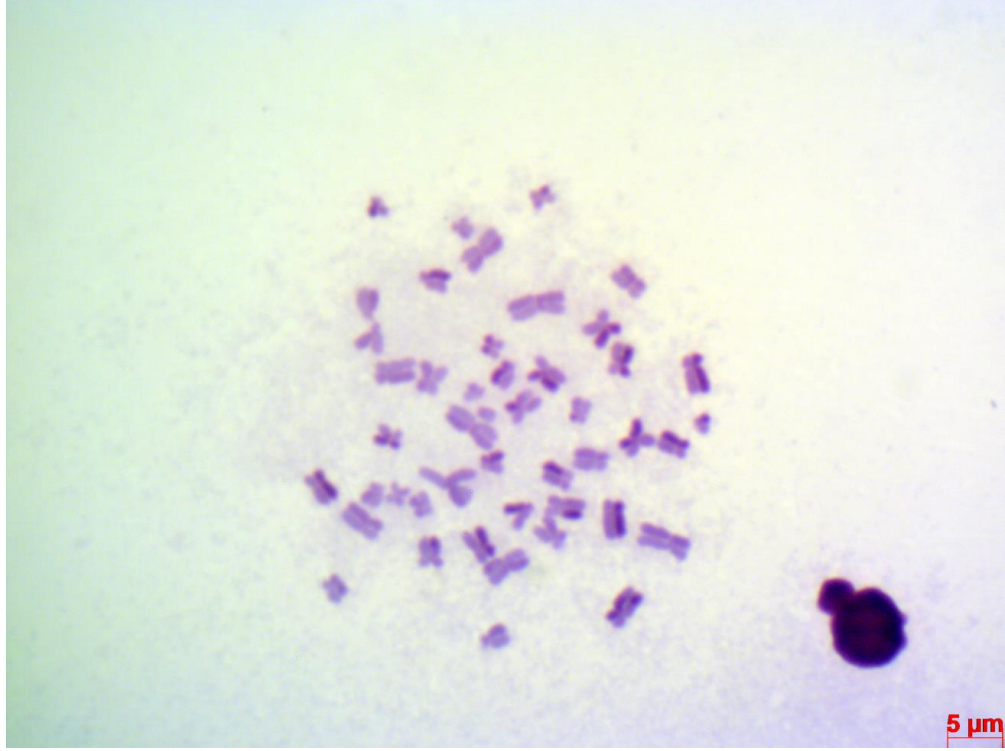
Şekil 3.10. KKD sayımının şematik görünümü (Topaktaş ve Speit,1990)



Şekil 3.11. M1 aşamasındaki metafaz plağı



Şekil 3.12. M2 aşamasındaki metafaz plağı, KKD: ➔



Şekil 3.13. M3 aşamasındaki metafaz plağı

3.7. KOMET (Tek Hücre Alkali Jel Elektrophorez Yöntemi)

Tez çalışmasında komet tekniğı, ITRC'nin (Industrial Toxicology Research Centre) komet protokolü mevcut laboratuvar koşullarına göre küçük değışikliklerle uygulanmıştır (Dhawan ve ark., nd). Gönüllü donörlerden alınan kan örnekleri heparinli tüplere aktarılmıştır. Histopaque ile izole edilen lenfositlerin thoma lamında sayım yapılarak hücre ana stoğundaki hücre miktarı belirlenmiştir. Test edilecek kimyasalların her bir konsantrasyonu için hazırlanacak kültürün ml'sinde 10^6 hücre olacak şekilde ana stoktan kültüre eklenecek hücre miktarı belirlenmiştir. Hücrelerle birlikte test edilecek kimyasallar 1 saat 37°C 'de inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol için hücreler $100 \mu\text{M}$ hidrojen peroksit (H_2O_2) ile 5 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. 1saatin sonunda pozitif kontrol ve diğer hücreler soğutmalı mikrosantirfüjde $+4^{\circ}\text{C}$ 'da 2500 rpm'de 3 kez 5'er dakika soğuk PBS ile yıkanmıştır. Önceden agar kaplanıp hazırlanmış lamaların üzerine, LMA ve hücre karışımı damlatılmış ve üzeri lamel ile kapatılmıştır. $+4^{\circ}\text{C}$ 'da agar donana kadar 5-10 dakika beklenmiştir, bu aşamadan sonra tamamen karanlık ortamda çalışılmıştır. Agar donduktan sonra üzerindeki lameller kaldırılmış ve lamalar şaleler içinde soğutulan lizing çözeltisi içine konularak 1 saat beklenmiştir. Lizing aşamasından sonra önceden hazırlanmış ve soğutulmuş elektrophorez çözeltisi içinde 20 dakika yine karanlıkta beklenmiş ardından

elektroforez aşamasına geçilmiştir. Çözelti içinden alınan lamlar yatay elektroforez tankına yerleştirilmiş buz soğukunda elektroforez çözeltisi içinde ve karanlıkta 20 dakika 300 mA ve 25V'ta yürütülmüştür. Elektroforez aşamasından sonra karanlıkta çalışma zorunluluğu kalmamıştır. Bu aşamadan sonra nötralize çözeltisine alınan lamlar 15 dakika bekletilmiş ardından 15 dakika absölu etanolde bekletilen lamlar oda sıcaklığında kurutulmuştur. Yirmi µg/ml EtBr ile 5 dakika boyanıp Zeiss marka floresan mikroskopta değerlendirmeler yapılmıştır.

3.7.1. Sitotoksitenin belirlenmesi

Test maddesi ile hücrelerin 1 saatlik inkübasyonu sonunda, 10^6 hücre/ml olan kültür tüplerinden 10 µl hücre alınıp, 5 µl trypan blue karıştırılmış ve üzerine lamel kapatılıp 2 dakika beklenmiştir. Daha sonra ışık mikroskopunda 100 tane hücre değerlendirilmiş mavi boya alanlar ölü, boya almayanlar ise canlı olarak değerlendirilerek canlılık yüzdesi tespit edilmiştir. Andersan (1998)'a göre sitotoksiteden doğacak yanlış kometlerin önüne geçebilmek için trypan blue ile yapılan sitotoksite değerlendirilmesinde canlılık %75 ve üzerinde olmalıdır. Çalışmada denenecek konsantrasyonların sitotoksiteleri ayrı ayrı yapılmış ve tüm konsantrasyonlarda %75 ve üzeri canlılık olduğu görülmüştür.

3.7.2. Pozitif kontrol

Hidrojen peroksit (100µM) komet tekniğinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Hücreler buz üzerinde 5 dakika hidrojen peroksit ile muamele edildikten sonra soğutmalı mikrosantirfüjde 2500 rpm'de soğuk PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra diğer hücrelerle beraber lamlara gömme işlemine geçilmiştir.

3.7.3. Mikroskobik değerlendirme

Kişiyeye bağlı sayım farklılıklarını elimine etmek için tüm mikroskobik değerlendirme aynı kişi tarafından yapılmıştır. Görsel analiz ile gerçekleştirilen sayımlarda, kometler DNA göç uzunluğuna göre 5 kategoride (0-4) belirlenmiştir. İki tekrarlı gerçekleştirilen deneylerden her konsantrasyon için her tekrardan 500 hücre toplam 1000 hücre değerlendirilmiştir. Her konsantrasyon için arbitrary unit aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Collins, 2004).

$$AU=0xA+1xB+2xC+3xD+4xE/N$$

A: Hasarsız hücre, B: Birinci dereceden yürümüş hücre sayısı, C: İkinci dereceden yürümüş hücre sayısı, D: Üçüncü dereceden yürümüş hücre sayısı, E: Dördüncü dereceden yürümüş hücre sayısı, N: Toplam değerlendirilen hücre sayısı.

Hiç yürümenin olmadığı parlak başlı yapılar olarak görülen sağlam çekirdekler 0 kategorisinde değerlendirilmiştir. Çok küçükbaşlı uzun kuyruklu çekirdekler ise 4. dereceden hasar olarak değerlendirilmiştir. 0 ile 4. derece yürüme arasında kalan kuyruk uzunlukları, 1-2-3 olarak derecelendirilip değerlendirilmiştir (Daulias ve ark., 2001).

3.8. İstatistiksel Analiz

Çalışmadan elde edilen veriler normal dağılım göstermediği için nonparametrik test olan Kruskal Wallis H testi uygulanarak konsantrasyonlar arası genotoksisite ve sitotoksisite medyan değerleri karşılaştırılmıştır. Negatif ve pozitif kontrol değerleri Mann-Whitney U testi uygulanarak karşılaştırılmıştır. Uygulanan ilaç konsantrasyonları ile genotoksisite ve sitotoksisite değerleri arasındaki ilişki çoklu lineer regresyon analizi uygulanarak değerlendirilmiştir.

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. İnsan periferal lenfositlerinde CBMN tekniği ile elde Edilen bulgular

4.1.1.1. Cipralex

Cipralex'in, kadın donörden alınan periferal kan lenfositlerinde oluşturduğu %MNL (mikronukleus sayısı), BNMN (Mikronukleus içeren binukleat hücre sayısı) frekansları CBPI ve sitotoksisteyi gösteren oranlar çizelge 4.1'de verilmiştir. Değerlendirilen tüm konsantrasyonlarda oluşan %MNL frekanslarının negatif kontrole göre arttığı görülmüştür. İlaç aynı şekilde erkek donörden alınan periferal kan lenfositlerinde de MN oluşumuna neden olmuştur tüm konsantrasyonlarda oluşan % MNL frekanslarının negatif kontrole göre arttığı görülmüştür. Erkek donöre ait elde edilen veriler Çizelge 4.2'de sunulmuştur. Tedavi amacı ile kullanılan Cipralex'in, insan periferal kan lenfositlerinde genotoksik bir potansiyele sahip olup olmadığının değerlendirilmesi için her iki donörden her konsantrasyon için toplam 8000 BN hücre sayılmış ve incelenen parametrelere ilişkin elde edilen veriler çizelge 4.3'de verilmiştir. Cipralex'in çalışılan her bir konsantrasyonun neden olduğu % MNL frekansları negatif kontrolden daha yüksek bulunmuştur.

Çizelge 4.1. Cipralax'ın kadın periferal kan lenfositlerinde oluşturduğu % MNL, BNMN, frekansları ile CBPI ve % sitotoksosite değerleri

Konsantrasyon	BN Hücrelerde MN dağılımı					%o			Toplam		%o	
	1	2	3	4	5	MNL	MNL±SS	BNMN	BNMN	Binukleat		CBPI
NK	29	4	0	0	0	37	9.25±3.09	33	8.25	4000	1.82	-
MMC	151	27	1	1	0	212	53.0	180	45.0	4000	-	-
1 µg/ml	32	4	0	0	0	40	10.0±1.41	36	9.00	4000	1.80	2.50
2.5 µg/ml	42	1	1	0	0	47	11.7±3.30	44	11.0	4000	1.70	15.0
5 µg/ml	39	4	0	0	0	47	11.7±2.63	43	10.7	4000	1.70	15.0
10 µg/ml	42	3	0	0	0	48	12.0±5.09	45	11.2	4000	1.67	18.0

MNL: Toplam mikronukleus sayısı, BNMN: Mikronukleus içeren binukleat hücre sayısı, CBPI: Sitokinez-bloklama proliferasyon indeksi, SS: Standard sapma, MMC: Mitomisin C, NK: Negatif kontrol

Çizelge 4.2. Ciprallex'in erkek periferal kan lenfositlerinde oluşturduğu ‰ MNL, BNMN, frekansları ile CBPI ve ‰ sitotoksosite değerleri

Konsantrasyon	BN Hücrelerde MN dağılımlı					‰				Toplam		‰
	1	2	3	4	5	MNL	MNL±SS	BNMN	BNMN	Binukleat	CBPI	
NK	46	4	0	0	0	54	13.5±4.12	50	12.50	4000	1.63	-
MMC	143	39	6	0	0	239	59.7	188	47.00	4000	-	-
1 µg/ml	60	0	0	0	0	60	15.0±2.82	60	15.00	4000	1.60	5
2.5 µg/ml	54	6	0	0	0	66	16.5±4.72	60	15.00	4000	1.47	25
5 µg/ml	48	9	0	0	0	66	16.5±4.12	57	14.25	4000	1.50	21
10 µg/ml	63	5	1	0	0	76	19.0±4.39	69	17.25	4000	1.40	37

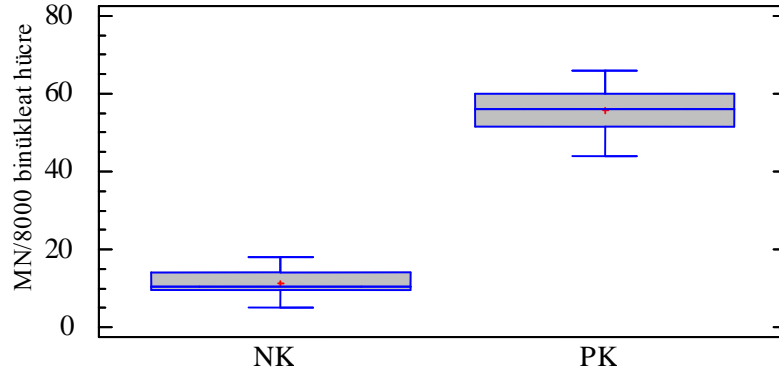
MNL: Toplam mikronukleus sayısı, BNMN: Mikronukleus içeren binukleat hücre sayısı, CBPI: Sitokinez-bloklama proliferasyon indeksi, SS: Standard sapma, MMC: Mitomisin C, NK: Negatif kontrol

Çizelge 4. 3. Ciprallex'in her iki donöre ait periferal lenfositlerde oluşturduğu ortalama % MNL, BNMN, frekansları ile CBPI ve % sitotoksisite değerleri

Konsantrasyon	BN Hücrelerde MN dağılımı					%				Toplam		Sitotoksisite %
	1	2	3	4	5	MNL	MNL±SS	BNMN	BNMN	Binukleat	CBPI±SS	
NK	75	8	0	0	0	91	11.3±4.06	83	10.3	8000	1.82±0.13	-
MMC	294	66	7	1	0	451	56.3	368	46.0	8000	-	-
1 µg/ml	92	4	0	0	0	100	12.5±3.38	96	12.0	8000	1.70±0.28	14.6
2.5 µg/ml	96	7	1	0	0	113	14.1±4.54	104	13.0	8000	1.59±0.16	28.0
5 µg/ml	87	13	0	0	0	113	14.1±4.08	100	12.5	8000	1.60±0.14	26.8
10 µg/ml	105	8	1	0	0	124	15.5±5.78	114	14.2	8000	1.54±0.12	34.1

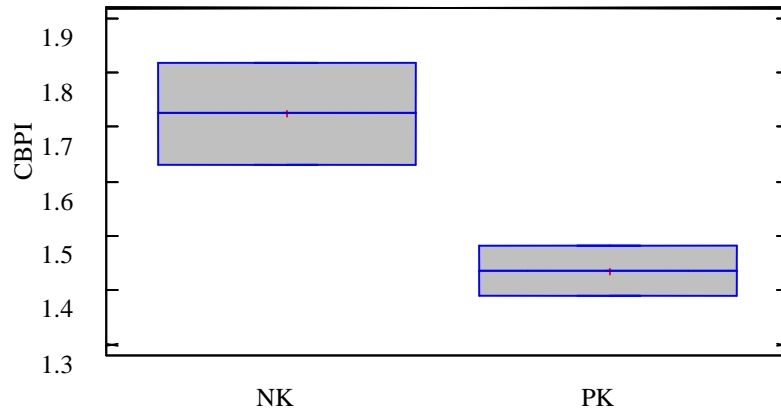
MNL: Toplam mikronukleus sayısı, BNMN: Mikronukleus içeren binukleat hücre sayısı, CBPI: Sitokinez-bloklama proliferasyon indeksi, SS: Standard sapma, MMC: Mitomisin C, NK: Negatif kontrol

Cipraleks'e ait, negatif kontrol ve pozitif kontrol MN verileri Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmış ve her iki grup medyan değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p < 0.000$).



Şekil 4.1. Cipraleks NK ve PK medyan değerleri Mann Whitney U testi. NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol (MMC), MN: mikronükleus

Negatif kontrole ve MMC'ye ait CBPI medyan değerleri Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p > 0.05$).



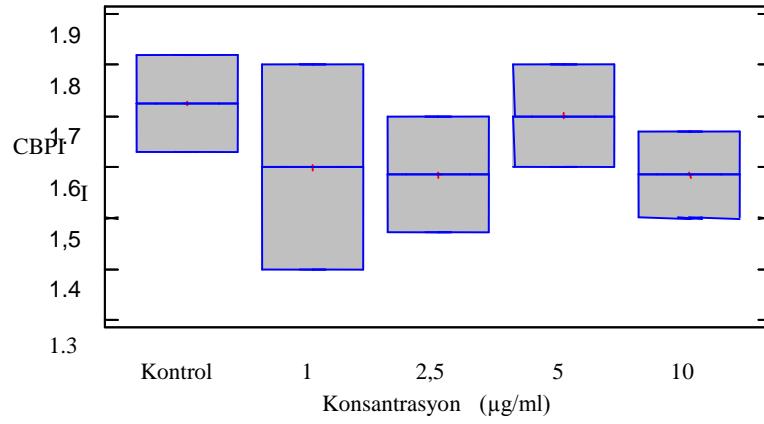
Şekil 4.2. Cipraleks NK ve PK sitotoksosite Mann Whitney U testi. NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol (MMC), CBPI: sitokinezi bloklanmış proliferasyon indeksi

İlacın çalışılan konsantrasyonlarda oluşturduğu sitotoksosite ve kontrol grubu Kruskal-Wallis H testi ile karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p > 0.05$).

Çizelge 4.4. Cipraleks konsantrasyon ve CBPI Kruskal Wallis H testi sayısal verileri

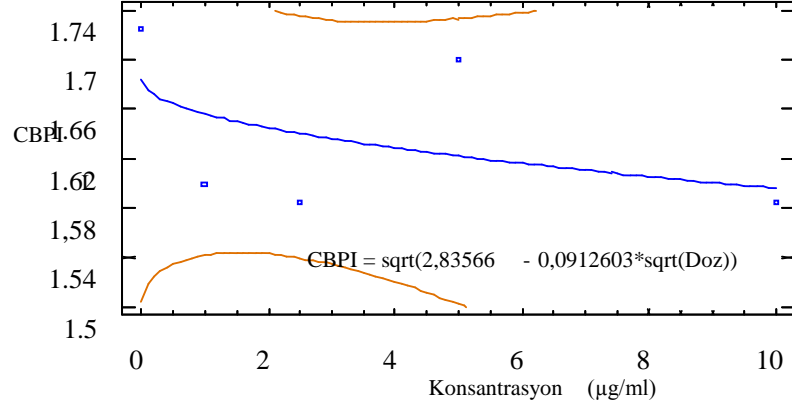
Konsantrasyon (µg/ml)	Örnek hacmi	Ortalama Değişme
NK	2	7.50
1	2	4.75
2.5	2	4.50
5	2	6.25
10	2	4.50

P = 0.81



Şekil 4.3. Cipraleks konsantrasyon ve CBPI Kruskal Wallis H testi. CBPI: Sitokinezi bloklanmış proliferasyon indeksi

Konsantrasyon artışı ile CBPI değerlerindeki azalma arasındaki ilişki çoklu lineer regresyon analizi ile çalışılmış ve aralarında korelasyon bulunmamıştır ($r=0.48$, $p>0.05$).



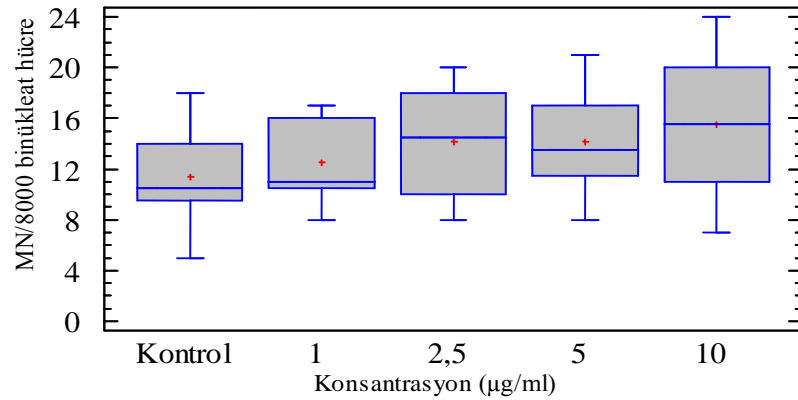
Şekil 4.4. Ciprofloxacin doz ve CBPI arası regresyon analizi. CBPI: Sitokinezi bloklanmış proliferasyon indeksi

Yapılan Kruskal-Wallis H testi sonuçlarına göre konsantrasyon artışlarının % MNL değerinde oluşturdukları artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Çizelge 4.5. Ciprofloxacin MN konsantrasyon ilişkisi Kruskal-Wallis H testi sayısal verileri

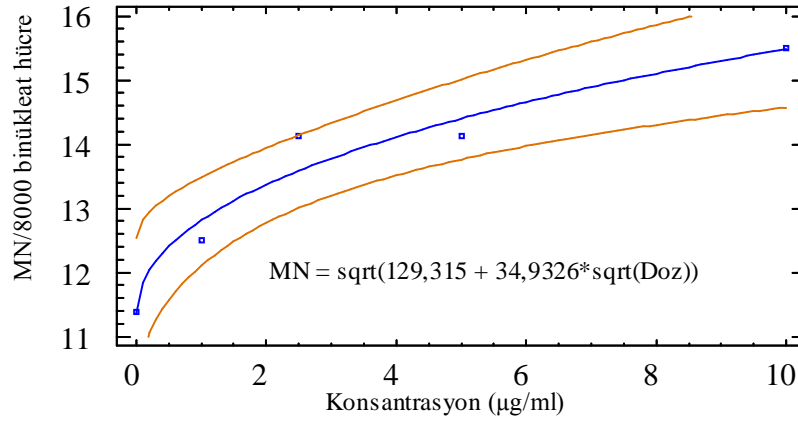
Konsantrasyon (µg/ml)	Örnek Hacmi	Ortalama değişme
Kontrol	8	15.1
1	8	18.2
2.5	8	21.5
5	8	22.8
10	8	24.7

P-Value = 0.49



Şekil 4.5. Ciprofloxacin MN konsantrasyon ilişkisi. MN: mikronükleus

Konsantrasyon artışı ile MN artışı arasındaki ilişki, regresyon analizi ile incelenmiş ve aralarında pozitif korelasyon bulunmuştur ($r=0.97$, $p<0.05$).



Şekil 4.6. Cipralex, MN konsantrasyon arasındaki regresyon analizi. MN: mikronükleus

4.1.1.2. Sinequan

Sinequan'ın, kadın donörden alınan periferal kan lenfositlerinde oluşturduğu % MNL (mikronükleus sayısı), BNMN (Mikronükleus içeren binükleat hücre sayısı) frekansları CBPI ve sitotoksisiteyi gösteren oranlar çizelge 4.6'da verilmiştir. Değerlendirilen tüm konsantrasyonlarda oluşan % MNL frekanslarının negatif kontrole göre arttığı görülmüştür. İlaç aynı şekilde erkek donörden alınan periferal kan lenfositlerinde de MN oluşumuna neden olmuştur ve tüm konsantrasyonlarda oluşan % MNL frekanslarının negatif kontrole göre arttığı görülmüştür. Erkek donöre ait elde edilen veriler Çizelge 4.7'de sunulmuştur. Sinequan'ın, insan periferal kan lenfositlerinde genotoksik potansiyelinin ortaya konulması için her iki donörden her bir konsantrasyon için toplam 8000 BN hücre sayılmış ve incelenen parametrelere ilişkin elde edilen veriler çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Sinequan'ın kadın periferal kan lenfositlerinde oluşturduğu % MNL, BNMN, frekansları ile CBPI ve % sitotoksosite değerleri

Konsantrasyon	BN Hücrelerde MN dağılımı					%			Toplam		% Sitotoksisite	
	1	2	3	4	5	MNL	MNL±SS	BNMN	BNMN	Binukleat		CBPI
NK	37	1	0	0	0	39	9.75±3.30	38	9.50	4000	1.91	-
MMC	216	13	0	0	0	242	60.5	229	57.2	4000	-	-
1 µg/ml	42	4	0	0	0	50	12.5±2.38	46	11.5	4000	1.85	7
2.5 µg/ml	35	6	2	0	0	53	13.2±2.06	43	10.7	4000	1.87	4
5 µg/ml	49	5	0	0	0	59	14.7±3.46	54	13.5	4000	1.82	10
10 µg/ml	55	3	0	0	0	61	15,2±2.21	58	14.5	4000	1.80	12

MNL: Toplam mikronukleus sayısı, BNMN: Mikronukleus içeren binukleat hücre sayısı, CBPI: Sitokinez-bloklama proliferasyon indeksi. SS: Standard sapma, NK: Negatif kontrol, MMC: Mitomisin C

Çizelge 4.7. Sinequan'ın erkek periferik kan lenfositlerinde oluşturduğu % MNL, BNMN, frekansları ile CBPI ve % sitotoksisite değerleri

Konsantrasyon	BN Hücrelerde MN dağılımı					% MNL		% BNMN		Toplam		Sitotoksisite %
	1	2	3	4	5	MNL	MNL±SS	BNMN	BNMN	Binukleat	CBPI	
NK	48	3	0	0	0	54	13.5±3.41	51	12.7	4000	1.63	-
MMC	144	28	3	0	0	209	52.2	175	43.7	4000	-	-
1 µg/ml	44	7	1	0	0	61	15.2±3.16	52	13.0	4000	1.57	10
2.5 µg/ml	52	4	0	0	0	60	15.0±0.85	56	14.0	4000	1.52	17
5 µg/ml	49	4	2	0	0	63	15.7±2.06	55	13.7	4000	1.51	19
10 µg/ml	48	6	0	1	0	64	16.0±4.32	55	13.7	4000	1.53	16

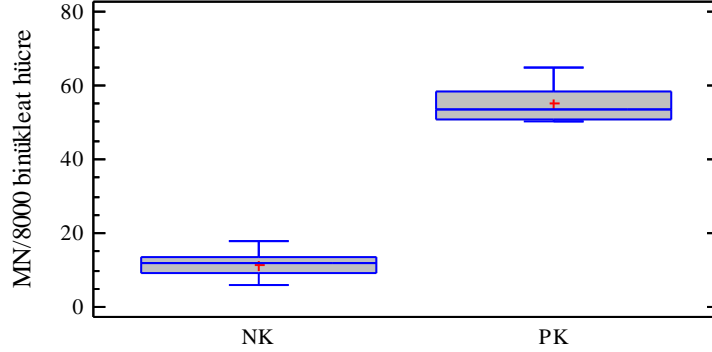
MNL: Toplam mikronukleus sayısı, BNMN: Mikronukleus içeren binukleat hücre sayısı, CBPI: Sitokinez-bloklama proliferasyon indeksi, SS: Standard sapma, MMC: Mitomisin C, NK: Negatif kontrol

Çizelge 4.8. Sinequan'ın her iki donöre ait periferik lenfositlerde oluşturduğu % MNL, BNMN, frekansları ile CBPI ve % sitotoksisite değerleri

Konsantrasyon	BN Hücrelerde MN dağılımı					%			Toplam		% Sitotoksisite	
	1	2	3	4	5	MNL	MNL±SS	BNMN	BNMN	Binukleat		CBPI±SS
NK	85	4	0	0	0	93	11.6±3.70	89	11.13	8000	1.77±0.19	-
MMC	360	41	3	1	0	455	56.8	405	50.63	8000	-	-
1 µg/ml	86	11	1	0	0	111	13.8±2.91	98	12.25	8000	1.71±0.27	7.80
2.5 µg/ml	87	10	2	0	0	113	14.1±1.72	99	12.38	8000	1.70±0.24	9.10
5 µg/ml	98	9	2	0	0	122	15.2±2.66	109	13.63	8000	1.67±0.17	13.0
10 µg/ml	103	9	0	0	0	121	15.1±3.20	112	14.00	8000	1.67±0.19	13.0

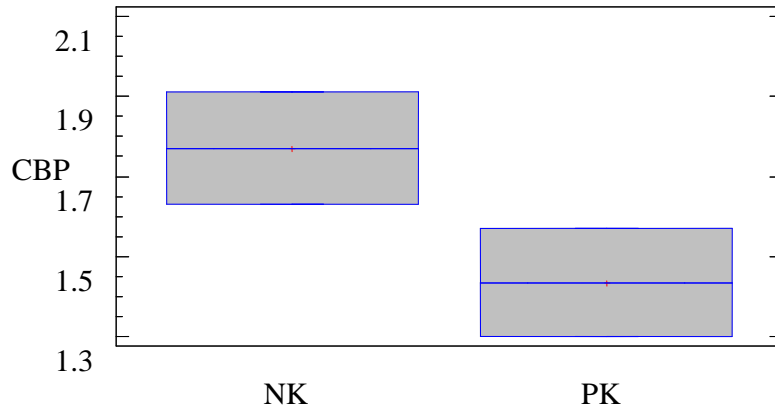
MNL: Toplam mikronukleus sayısı, BNMN: Mikronukleus içeren binukleat hücre sayısı, CBPI: Sitokinez-bloklama proliferasyon indeksi. SS: Standard sapma, MMC: Mitomisin C, NK: Negatif kontrol

Sinequan negatif kontrol ve pozitif kontrole MN medyan değerleri Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmış ve ortalama değerler arasındaki fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bulunmuştur ($p < 0.000$).



Şekil 4.7. Sinequan, NK ve PK, MN medyan değerleri Mann Whitney U testi. NK:Negatif kontrol, PK: Pozitif kontrol (MMC), MN: mikronüleus

Negatif kontrol ve pozitif kontrole ait CBPI medyan değerleri Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p > 0.05$).



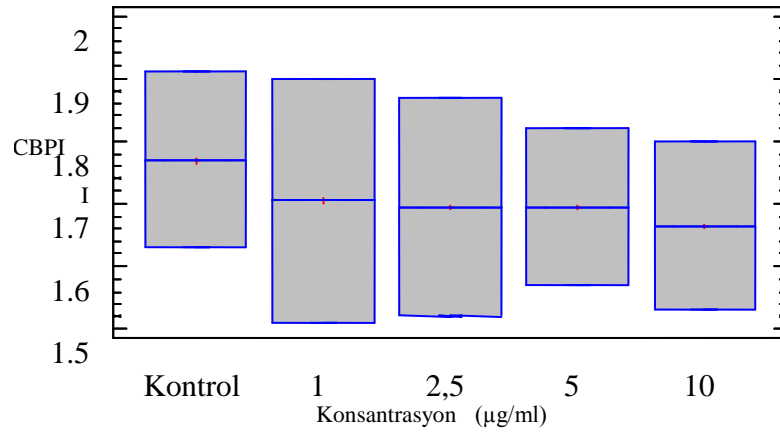
Şekil 4.8. Sinequan NK ve PK, CBPI medyan değerleri Mann Whitney U testi. NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol (MMC), CBPI: sitokinezi bloklanmış proliferasyon indeksi

İlacın çalışılan konsantrasyonlarda oluşturduğu sitotoksosite Kruskal Wallis H testi ile test edilmiş ve konsantrasyonlar arası sitotoksosite bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p > 0.05$).

Çizelge 4.9. Sinequan konsantrasyon CBPI arasındaki Kruskal Wallis H testi sayısal verileri

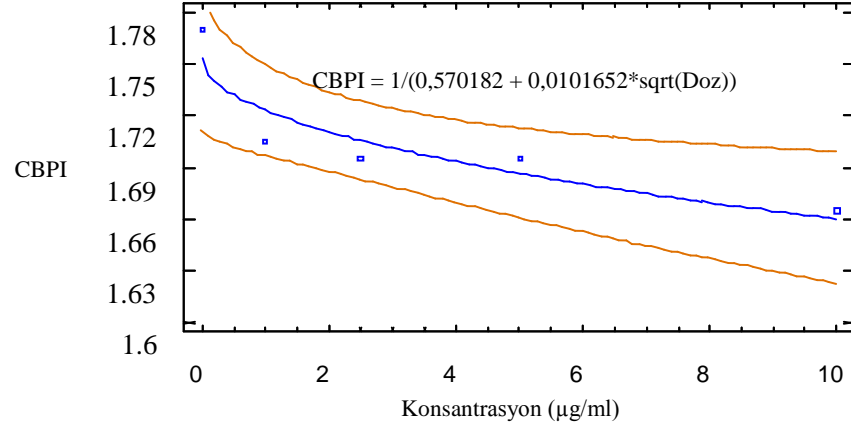
Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Örnek Hacmi	Ortalama Değişme
Kontrol	2	7.5
1	2	5.0
2.5	2	5.0
5	2	5.5
10	2	4.5

P = 0.87



Şekil 4.9. Sinequan konsantrasyon CBPI arasındaki Kruskal-Wallis H testi. CBPI: Sitokinezi bloklanmış proliferasyon indeksi

Konsantrasyon artışı ile CBPI değerlerindeki azalma arasındaki ilişki çoklu lineer regresyon analizi ile çalışılmış ve aralarında negatif korelasyon bulunmuştur ($r = -0.93$, $p < 0.05$).



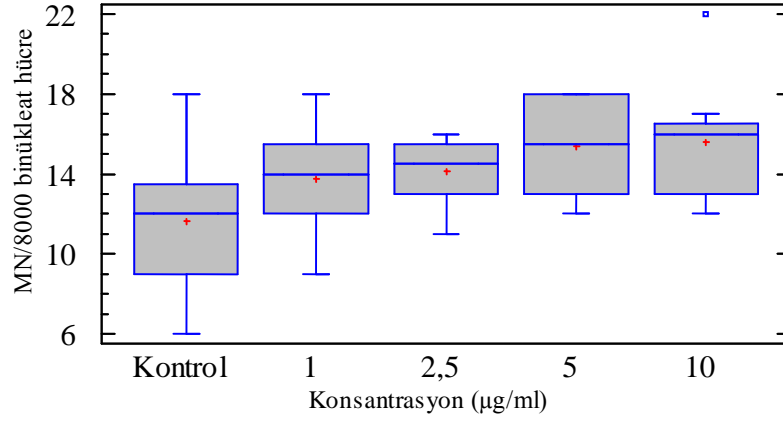
Şekil 4.10.Sinequan, Konsantrasyon CBPI regresyon analizi

Sinequan'ın her bir konsantrasyonunun neden olduğu % MNL frekansları negatif kontrolden daha yüksek bulunmuştur. Ancak yapılan Kruskal Wallis H testi sonuçlarına göre konsantrasyon artışlarının % MNL değerinde oluşturdukları artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$), buna karşın regresyon analizi ile incelenen konsantrasyon artışı ile MN artışı arasında pozitif korelasyon bulunmuştur ($r=0.96$, $p<0.01$).

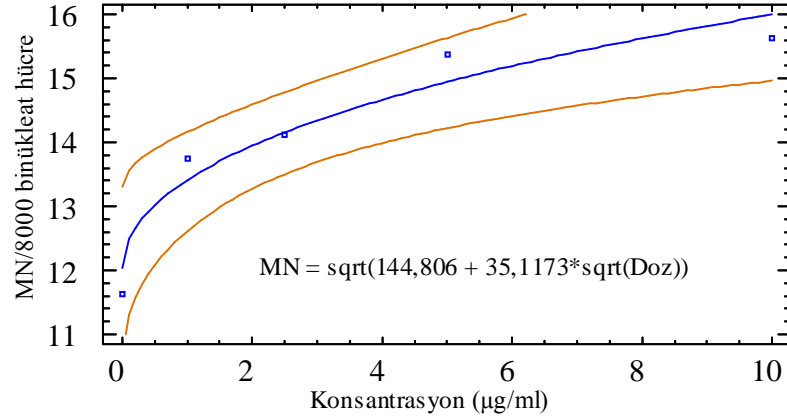
Çizelge 4.10. Sinequan, konsantrasyon MN ilişkisi Kruskal Wallis H testi sayısal verileri

Konsantrasyon (µg/ml)	Örnek Hacmi	Ortalama Değişme
Kontrol	8	12.2
1	8	19.3
2.5	8	20.5
5	8	25.5
10	8	24.9

P-Value = 0.14



Şekil 4.11. Sinequan, konsantrasyon MN ilişkisi. MN: mikronükleus



Şekil 4.12. Sinequan konsantrasyon MN regresyon analizi

4.1.2. İnsan periferel lenfositlerinde KKD tekniği ile elde edilen bulgular

4.1.2.1. Cipralex

Kadın donöre ait PI, MI ve KKD/M verileri çizelge 4.11’de, erkek donöre ait tüm veriler ise çizelge 4.12’de sunulmuştur. Hem erkek hem de kadın donörden alınan periferel kan lenfositlerinde, ilacın bütün konsantrasyonlarında metafaz başına düşen KKD sayısında negatif kontrole göre konsantrasyona bağlı artış gözlenmiştir. Cipralex’in, KKD tekniği ile insan periferel kan lenfositlerinde genotoksik potansiyelinin ortaya konulması için 100 metafaz sayılmış ve incelenen parametrelere ilişkin elde edilen veriler çizelge 4.13’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Cipraleks'in kadın periferel kan örneklerinde oluşturduğu KKD/M, PI, MI değerleri

Konsantrasyon	Min/Max KKD	Toplam Metafaz	Top KKD	KKD/M±SS	M1	M2	M3	PI	MI
MMC	13-40	50	1320	26.4	29	66	6	1.80	4.67
NK	0-5	50	125	2.50±0.14	20	81	4	1.80	4.71
1 µg/ml	0-6	50	116	2.32±0.28	34	62	6	1.70	4.72
2,5 µg/ml	0-8	50	139	2.78±0.36	32	67	5	1.70	4.62
5 µg/ml	1-6	50	148	2.96±0.33	27	69	6	1.80	4.80
10 µg/ml	1-8	50	154	3.08±0.33	35	67	4	1.70	4.63

MI: Mitotik indeks, PI: Proliferasyon indeksi, KKD/M: Metafaz başına kardeş kromatid sayısı, M1:1. Mitoz, M2: 2. Mitoz, M3: 3. Mitoz,MMC: Mitomisin C, NK, Negatif kontrol, SS: standard

Çizelge 4.12. Cipraleks'in erkek donörden alınan periferel kan örneklerinde oluşturduğu KKD/M, PI, MI değerleri

Konsantrasyon	Min/Max KKD	Toplam Metafaz	Top KKD	KKD/M±SS	M1	M2	M3	PI	MI
MMC	10-41	50	965	19.3	46	55	4	1.68	4.00
NK	0-5	50	95	1.90±0.14	52	42	8	1.62	6.02
1 µg/ml	0-7	50	135	2.70±0.14	35	60	5	1.70	5.56
2.5 µg/ml	1-8	50	147	2.94±0.19	42	50	8	1.66	5.79
5 µg/ml	0-7	50	153	3.06±0.25	49	52	9	1.62	5.14
10 µg/ml	0-7	50	180	3.60±0.05	32	55	14	1.82	4.58

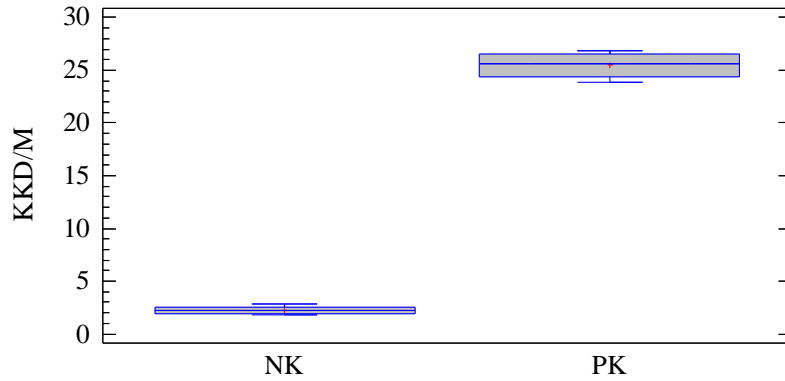
MI: Mitotik indeks, PI: Proliferasyon indeksi, KKD/M: Metafaz başına kardeş kromatid sayısı, M1:1. Mitoz, M2: 2. Mitoz, M3: 3. Mitoz, NK: Negatif kontrol, MMC: Mitomisin C, SS: standard sapma

Çizelge 4.13. Cipralex'in her iki donöre ait periferal kan örneklerinde oluşturduğu KKD/M, PI, MI değerleri

Konsatrasyonlar	1. Deney KKD/M	2. Deney KKD/M	Ortalama KKD/M±SS	PI	MI
MMC	23.52	22.3	22.9	1.74	4.34
NK	2.30	2.10	2.20±0.36	1.70	5.40
1 µg/ml	2.46	2.56	2.51±0.28	1.70	5.10
2.5 µg/ml	3.06	2.66	2.86±0.25	1.70	5.20
5 µg/ml	3.22	2.80	3.01±0.25	1.70	5.00
10 µg/ml	3.20	3.48	3.34±0.36	1.80	4.60

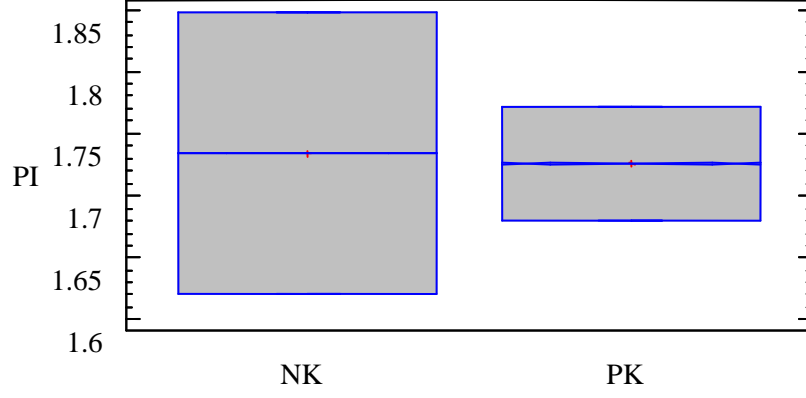
MI: Mitotik indeks, PI: Proliferasyon indeksi, KKD/M: Metafaz başına ortalama kardeş kromatid sayısı, NK: Negatif kontrol, MMC: Mitomisin C

Pozitif kontrolün (MMC) oluşturduğu metafaz başına düşen KKD sayısı medyan değerleri, Mann Withney U testi ile negatif kontrolle karşılaştırılmış ve artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).



Şekil 4.13. Cipralex, KKD/M NK ve PK medyan değerleri Mann Withney U testi. NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol, KKD/M: metafaz başına KKD sayısı

Negatif kontrole ve MMC'ye ait PI medyan değerleri Mann Withney U testi ile karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$)



Şekil 4.14. Cipraleks'in NK ve PK PI medyan değerleri Mann Withney U testi. NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol, PI: proliferasyon indeksi

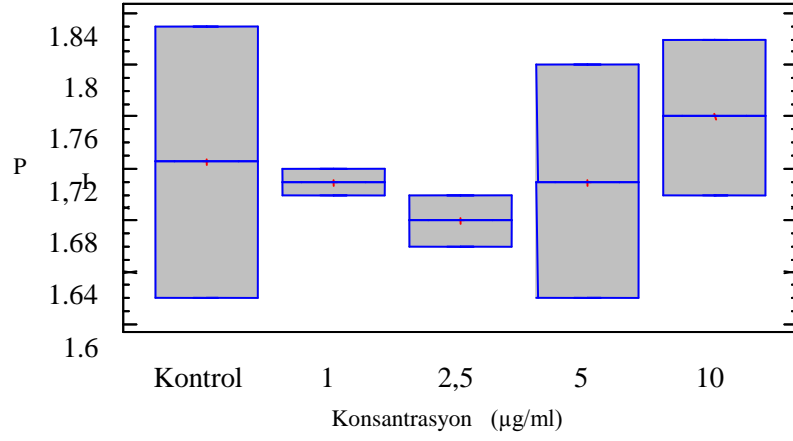
İlacın çalışılan konsantrasyonlarda oluşturduğu sitotoksisite ve kontrol gurubu Kruskal Wallis H testi ile karşılaştırılmış ve konsantrasyonlar arası medyan değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksisite tespit edilmemiştir ($p>0.05$).

Çizelge 4.14. Cipraleks'in konsantrasyon PI ilişkisi Kruskal-Wallis H testi sayısal verileri

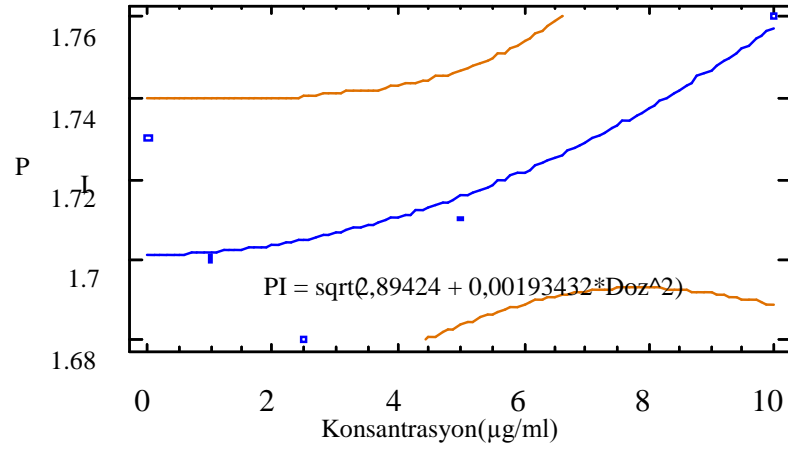
Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Örnek Hacmi	Ortalama Değişme
Kontrol	2	5.75
1	2	6.00
2.5	2	4.00
5	2	4.75
10	2	7.00

$P = 0.87$

Konsantrasyon artışı ile sitotoksisite arasındaki ilişki çoklu lineer regresyon analizi ile çalışılmış ve aralarında korelasyon tespit edilememiştir ($p>0.05$, $r=0.78$).

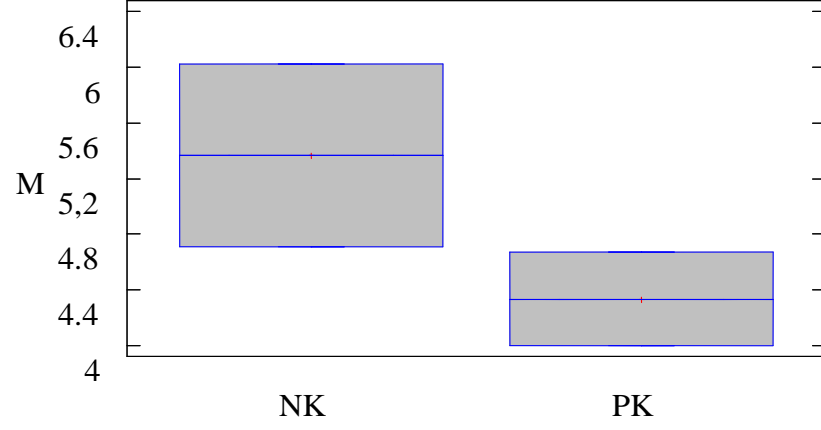


Şekil 4.15. Ciprofloxacin'in konsantrasyon PI ilişkisi PI: proliferasyon indeksi



Şekil 4.16. Ciprofloxacin'in konsantrasyon PI regresyon analizi. PI: proliferasyon indeksi

Negatif kontrol ve pozitif kontrol (MMC) MI (mitotik indeks) medyan değerleri Mann Whithney U testi ile karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir (p>0.05)



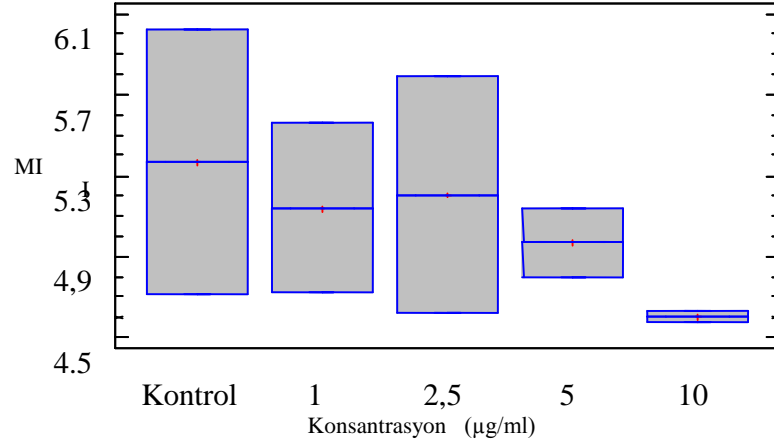
Şekil 4.17. Cipraleks MI, NK PK medyan değerleri Mann Withney U testi. NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol, MI: mitotik indeks

MI bakımından çalışılan dozların medyan değerleri Kruskal Wallis H testi ile test edilmiş konsantrasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$).

Çizelge 4.15. Cipraleks konsantrasyon MI Kruskal Wallis H testi sayısal verileri

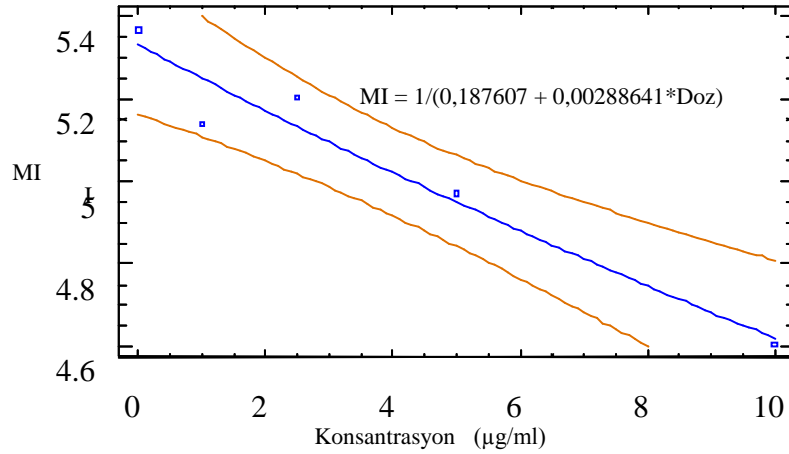
Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	rnek Hacmi	Ortalama Değişme
Kontrol	2	7.00
1	2	6.50
2.5	2	5.50
5	2	6.50
10	2	2.00

P-Value = 0.46



Şekil 4.18. Cipralex konsantrasyon MI Kruskal Wallis H testi. MI: mitotik indeks

Konsantrasyon artışı ile MI arasındaki ilişki çoklu lineer regresyon analizi ile değerlendirilmiş ve aralarında istatistiksel olarak oldukça anlamlı negatif bir ilişki bulunmuştur ($p < 0.01$, $r = -0.97$).



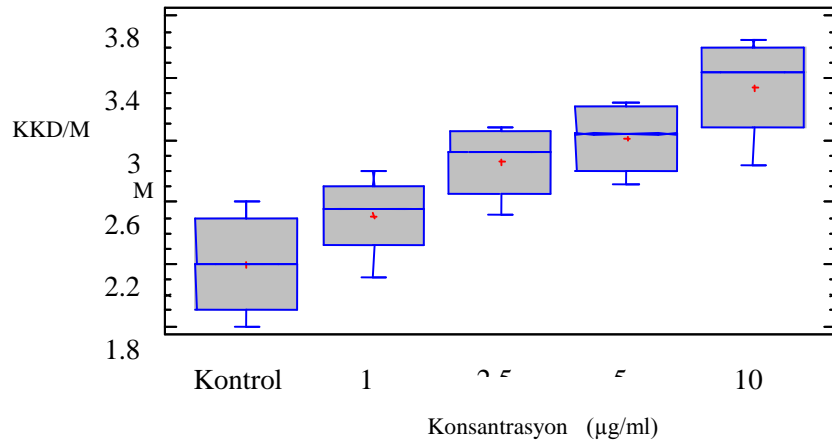
Şekil 4.19. Cipralex'in konsantrasyon MI regresyon analizi. MI: mitotik indeksi

Cipralex ilacının metafaz başına düşen KKD sayısında meydana getirdiği artış, Kruskal Wallis H grup değerlendirmesine göre konsantrasyonlar arasında medyan değerleri bakımından istatistiksel olarak oldukça anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$)

Çizelge 4.16. Cipraleks'in konsantrasyon KKD/M Kruskal Wallis H testi sayısal verileri

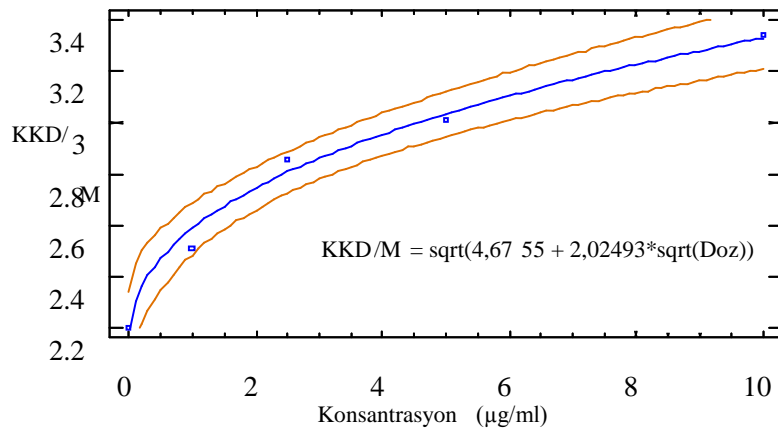
Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Örnek Hacmi	Ortalama Değişme
Kontrol	4	3.62
1	4	6.62
2.5	4	11.2
5	4	13.7
10	4	17.2

P = 0,008



Şekil 4.20. Cipraleks konsantrasyon- KKD/M Kruskal Wallis H testi

Konsantrasyon artışı ile KKD/M arasındaki ilişki çoklu lineer regresyon analizi ile çalışılmış ve aralarında pozitif korelasyon bulunmuştur ($p < 0.001$, $r = 0.99$).



Şekil 4.21. Cipraleks'in konsantrasyon -KKD/M regresyon analizi. KKD/M: metafaz başına KKD sayısı

4.1.2.2. Sinequan

Çizelge 4.17. Sinequan'ın kadın donör periferal kan örneklerinde oluşturduğu KKD/M, PI,MI değerleri

Konsantrasyon	Min/Max KKD	Toplam Metafaz	Top KKD	KKD/M±SS	M1	M2	M3	PI	MI
MMC	13-42	50	1265	25.3	33	63	4	1.70	4.30
NK	0-5	50	106	2.12±0.02	37	62	5	1.70	5.66
1 µg/ml	0-5	50	113	2.26±0.02	49	50	6	1.60	4.76
2,5 µg/ml	0-7	50	132	2.64±0.00	45	58	5	1.60	4.67
5 µg/ml	0-10	50	169	3.38±0.36	45	63	7	1.70	4.40
10 µg/ml	0-6	50	185	3.70±0.08	27	70	13	1.90	4.67

MI: Mitotik indeks, PI: Proliferasyon indeksi, KKD/M: Metafaz başına kardeş kromatid sayısı, M1:1. Mitoz, M2: 2. Mitoz, M3: 3. Mitoz, SS: Standard sapma, NK: Negatif kontrol, MMC: Mitomisin

Çizelge 4.18. Sinequan'ın erkek donör periferel kan örneklerinde oluşturduğu Min/Max KKD, KKD/M, PI,MI değerleri

Konsantrasyon	Min/Max KKD	Toplam Metafaz	Top KKD	KKD/M±SS	M1	M2	M3	PI	MI
MMC	10-42	50	1280	25.6	18	75	9	1.91	5.17
NK	0-7	50	103	2.06±0.42	15	50	35	2.20	6.80
1 µg/ml	0-6	50	114	2.28±0.16	35	63	5	1.70	6.47
2,5 µg/ml	0-6	50	133	2.66±0.98	37	70	7	1.73	7.06
5 µg/ml	0-9	50	139	2.78±0.31	35	60	5	1.70	6.55
10 µg/ml	1-14	50	201	4.02±0.10	13	70	20	1.77	5.80

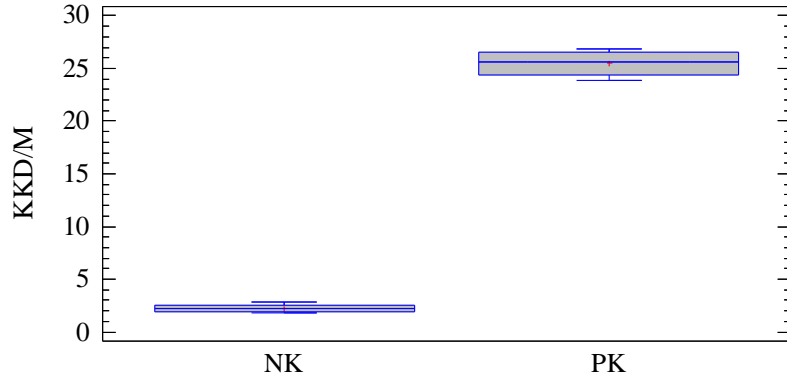
MI: Mitotik indeks, PI: Proliferasyon indeksi, KKD/M: Metafaz başına kardeş kromatid sayısı, M1:1. Mitoz, M2: 2. Mitoz, M3: 3. Mitoz, SS: Standard sapma, NK: Negatif kontrol, MMC: Mitomisin

Çizelge 4.19. Sinequan'ın her iki donöre ait periferel kan örneklerinde oluşturduğu KKD/M, PI,MI değerleri

Konsantrasyonlar	1.Deney KKD/M	2.Deney KKD/M	Ortalama KKD/M±SS	PI±SS	MI±SS
MMC	25.1	25.84	25.47	1.81	4.74
Kontrol	1.92	2.24	2.08±0.24	1.90±0.35	6.20±0.80
1 µg/ml	2.34	2.20	2.27±0.10	1.70±0.07	5.60±1.20
2,5 µg/ml	2.30	3.00	2.65±0.57	1.70±0.09	5.90±1.69
5 µg/ml	3.06	3.10	3.08±0.44	1.70±0.00	5.50±1.52
10 µg/ml	4.22	3.50	3.86±0.66	1.80±0.09	5.20±0.79

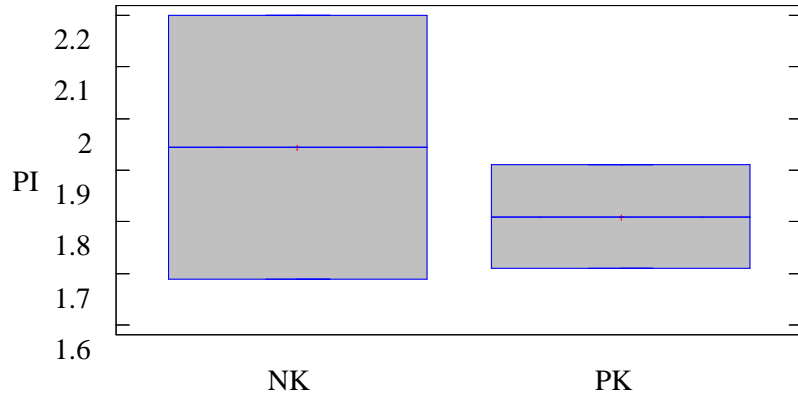
MI: Mitotik indeks, PI: Proliferasyon indeksi, KKD/M: Metafaz başına ortalama kardeş kromatid sayısı, SS: Standard Sapma, NK: Negatif kontrol, MMC: Mitomisin C

Pozitif kontrolün ve negatif kontrolün KKD/M medyan değerleri, Mann Withney U testi ile karşılaştırılmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).



Şekil 4.22. Sinequan KKD/M, NK PK Mann Withney U testi. NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol, KKD/M: metafaz başına KKD sayısı

Negatif kontrol ve pozitif kontrole ait sitotoksisite medyan değerleri Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmış ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p > 0.05$).



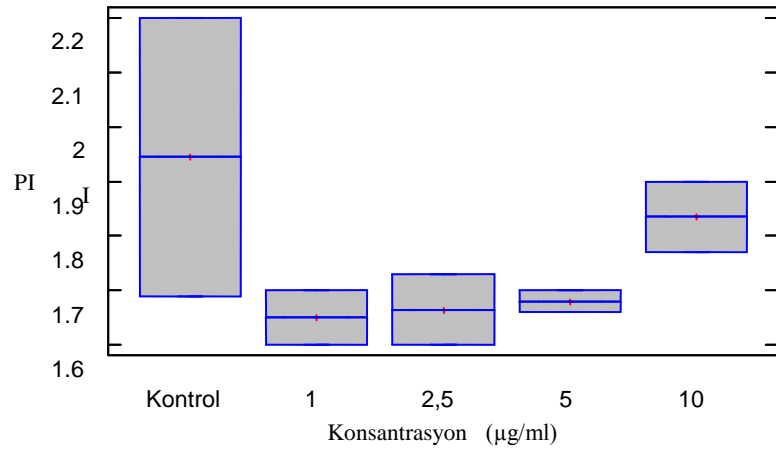
Şekil 4.23. Sinequan KKD tekniği, PI, NK PK medyan değerleri Mann Whitney U testi. NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol, PI: proliferasyon indeksi

Çalışılan konsantrasyonlara bağlı olarak oluşan sitotoksisite değerleri arasındaki ilişki Kruskal Wallis H testi ile çalışılmış ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$). Konsantrasyon artışı ile PI azalması arasındaki regresyon analizine göre anlamlı bir negatif korelasyon bulunamamıştır ($p > 0.05$, $r = 0.05$).

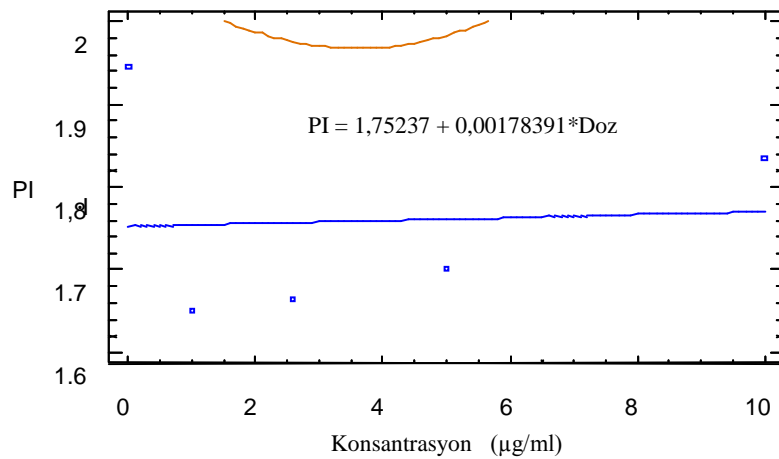
Çizelge 4.20. Sinequan Konsantrasyon PI Kruskal Wallis H testi sayısal verileri

Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Örnek Hacmi	Ortalama değışme
Kontrol	2	7.00
1	2	3.50
2.5	2	4.25
5	2	4.25
10	2	8.50

P = 0.39

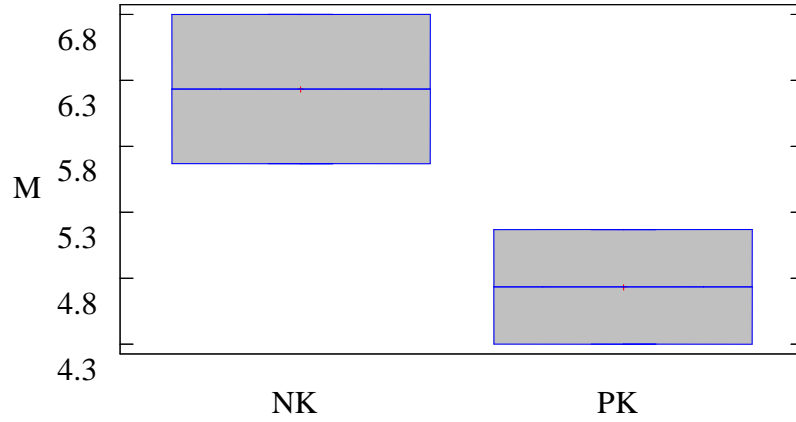


Şekil 4.24. Sinequan'ın KKD tekniğinde, konsantrasyon PI Kruskal Wallis H testi. PI: proliferasyon indeksi



Şekil 4.25. Sinequan'ın KKD tekniğinde, konsantrasyon PI regresyon analizi. PI: proliferasyon indeksi

Negatif kontrol ve pozitif kontrole ait MI medyan değerleri Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmış ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).



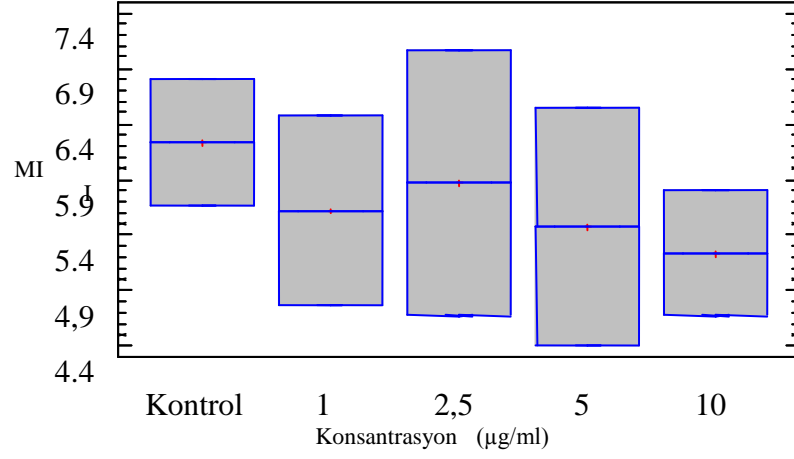
Şekil 4.26. Sinequan KKD tekniğinde, MI, NK PK medyan değerleri Mann Whitney U testi. NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol, MI: mitotik indeksi

Çalışılan konsantrasyonlara bağlı olarak oluşan MI değerleri arasındaki ilişki Kruskal Wallis H testi ile analiz edilmiş ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$).

Çizelge 4.21. Sinequan'ın konsantrasyon MI Kruskal Wallis H testi sayısal verileri

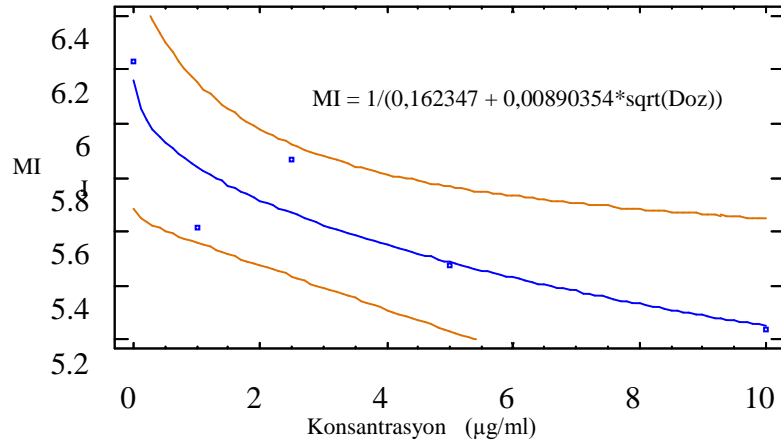
Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Örnek Hacmi	Ortalama Değişim
Kontrol	2	7.00
1	2	5.50
2.5	2	6.25
5	2	4.50
10	2	4.25

P = 0.88



Şekil 4.27. Sinequan'ın KKD tekniğinde, konsantrasyon MI Kruskal Wallis H testi

Konsantrasyon artışı ile MI arasındaki ilişki çoklu lineer regresyon analizi ile değerlendirilmiş ve aralarında negatif korelasyon bulunmuştur ($p < 0.05$, $r = -0.91$).



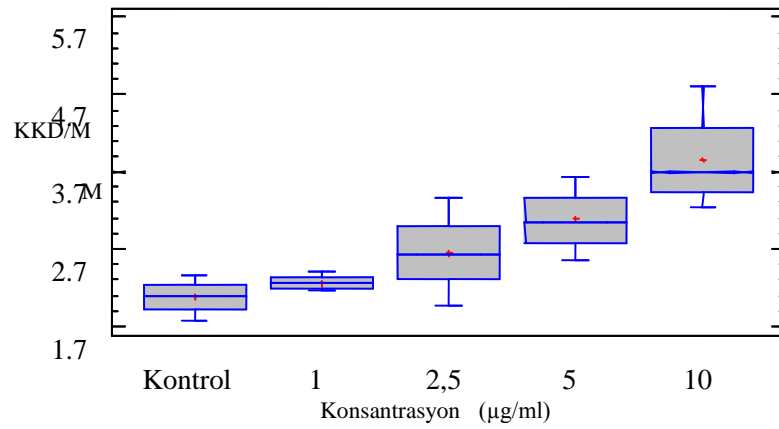
Şekil 4.28. Sinequan KKD tekniğinde, konsantrasyon MI regresyon analizi. MI: mitotik indeks

Sinequan'ın KKD oluşturma etkisi, Kruskal Wallis H grup değerlendirmesi ile incelenmiş ve konsantrasyonlar arası medyan değerleri bakımından istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0.01$)

Çizelge 4.22. Sinequan'ın konsantrasyon KKD/M Kruskal Wallis H testi sayısal verileri

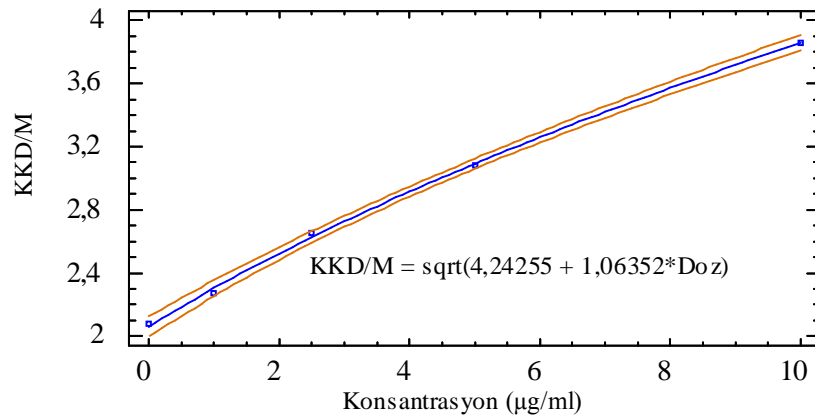
Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Örnek Hacmi	Ortalama Değişme
Kontrol	4	4.00
1	4	6.75
2.5	4	10.2
5	4	13.6
10	4	17.8

P = 0.007

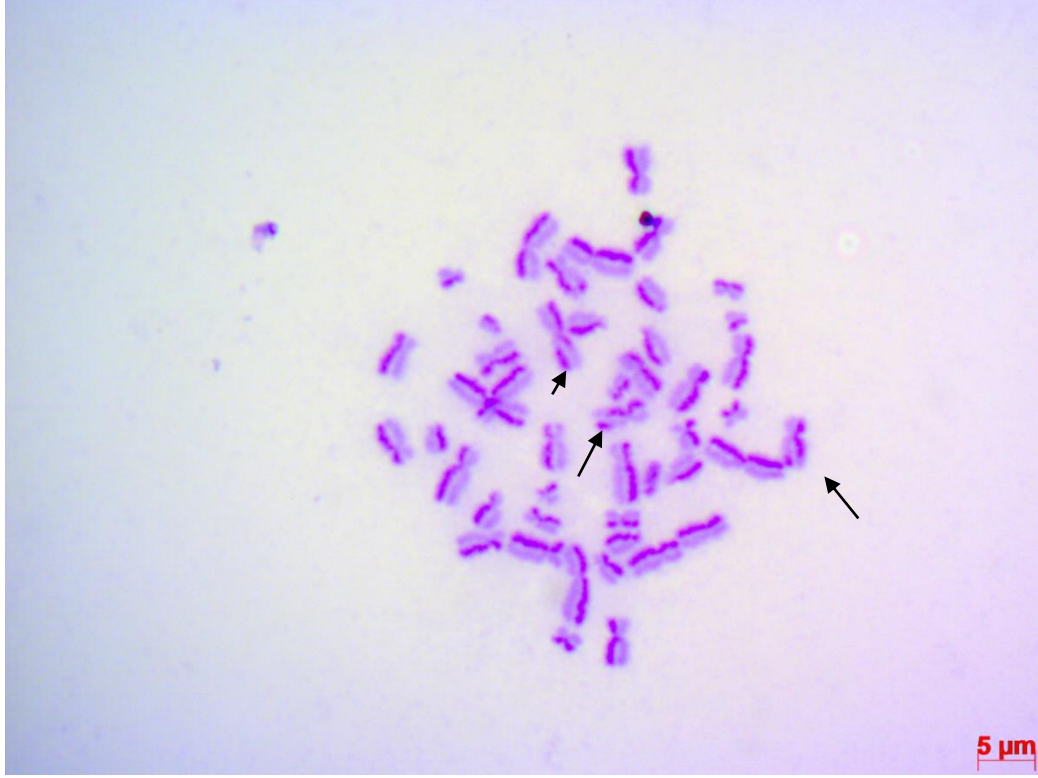


Şekil 4.29. Sinequan'ın konsantrasyon KKD/M Kruskal Wallis H testi

Konsantrasyon artışı ile KKD sayısındaki artış arasındaki korelasyon çoklu lineer regresyon analizi ile değerlendirilmiş ve aralarında yüksek oranda pozitif korelasyon bulunmuştur ($p < 0.000$, $r = 0.99$).



Şekil 4.30. Sinequan'ın KKD tekniğinde, konsantrasyon KKD/M çoklu lineer regresyon analizi



Şekil 4.31. Sinequan, kontrol gurubuna ait M2 metafaz plağı, KKD: →

4.1.3. İnsan periferel lenfositlerinde komet tekniğı ile elde edilen bulgular

4.1.3.1. Cipralex

Cipralex ilacının kadın donörden alınan periferel kan örnekleri ile gerçekleştirilen komet deneyleri sonucunda hasarsız 0, 1., 2., 3. ve 4. dereceden hasarlı hücre sayıları belirlenmiş her bir konsantrasyona ait AU değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca her bir konsantrasyonun sitotoksitesisi belirlenmiş ve tüm bu veriler çizelge 4.23’de sunulmuştur. Erkek donöre ait veriler çizelge 4.24’da sunulmuştur.

Çizelge 4.23. Cipralex'in kadın periferel kan örneklerinde oluşturduğu, hasarsız, 1., 2., 3. ve 4. dereceden yürümüş hücre, AU ve sitotoksosite değerleri

Konsantrasyon (µg/ml)	Hasar Dağılımı					AU±SS	Toplam Hücre	% Sitotoksosite
	0	1	2	3	4			
H ₂ O ₂	284	66	56	137	622	264	1165	-
NK	996	22	4	2	1	3.90±1.49	1025	6.00
1	997	19	7	5	0	4.70±1.35	1028	6.40
2.5	980	25	4	5	3	5.90±1.34	1017	8.00
5	983	27	9	5	4	7.40±2.43	1028	13.6
10	975	22	9	6	2	6.50±1.53	1014	16.8

AU: Arbitrary Unit, SS: Standard sapma, NK: Negatif kontrol, H₂O₂: Hidrojen peroksit

Çizelge 4.24. Cipralex'in erkek periferel kan örneklerinde oluşturduğu, hasarsız, 1., 2., 3. ve 4. dereceden yürümüş hücre, AU ve sitotoksosite değerleri

Konsantrasyon (µg/ml)	Hasar Dağılımı					AU±SS	Toplam Hücre	% Sitotoksosite
	0	1	2	3	4			
H ₂ O ₂	213	117	75	56	523	256	984	-
NK	1043	23	9	6	4	6.90±1.01	1085	6.80
1	1023	33	9	4	4	7.40±3.23	1073	7.20
2.5	992	33	8	5	3	7.30±4.31	1041	11.2
5	1015	39	11	8	4	9.40±3.82	1077	14.0
10	948	41	10	5	5	9.50±1.17	1009	18.0

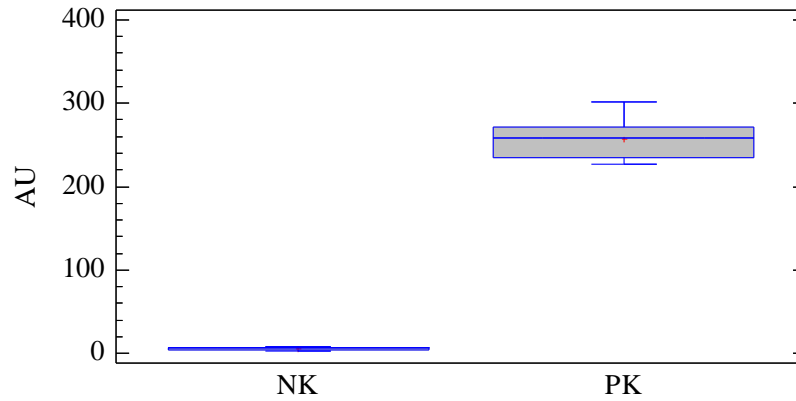
AU: Arbitrary Unit, SS: Standard Sapma, NK: Negatif kontrol, H₂O₂: Hidrojen peroksit

Çizelge 4.25. Cipralex'in her iki donörden alınan periferel kan örneklerinde oluşturduğu, hasarsız, 1., 2., 3. ve 4. dereceden yürümüş hücre, AU ve sitotoksosite değerleri

Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Hasar Dağılımı					AU \pm SS	% Sitotoksosite \pm SS
	0	1	2	3	4		
H ₂ O ₂	248	91.5	65.5	96.5	572	260	-
NK	1019	23	6.50	4.00	2.50	5.50 \pm 1.98	6.40 \pm 0.56
1	1010	26	8.00	4.50	2.00	6.10 \pm 2.71	6.80 \pm 0.56
2.5	986	29	6.00	5.00	3.00	6.60 \pm 3.03	9.60 \pm 2.26
5	999	33	10.00	6.50	4.00	8.40 \pm 3.13	13.8 \pm 0.28
10	961	32	9.50	5.50	3.50	8.00 \pm 2.04	17.4 \pm 0.84

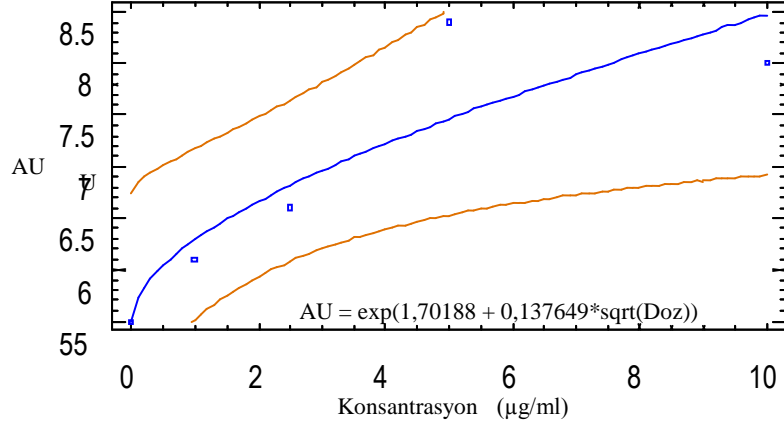
AU: Arbitrary Unit, SS: Standard sapma, NK: Negatif kontrol H₂O₂: Hidrojen peroksit

Cipralex'e ait, negatif kontrol ve pozitif kontrol AU medyan değerleri Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmış ve her iki grup arasındaki farkın istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olduğu bulunmuştur ($p < 0.000$).



Şekil 4.32. Cipralex'in komet tekniğinde AU, NK PK medyan değerleri Mann Whitney U testi

Konsantrasyon artışı ile AU artışı arasındaki korelasyon çoklu lineer regresyon analizi ile incelenmiş ve aralarında pozitif korelasyon tespit edilmiştir ($p < 0.05$, $r = 0.92$).



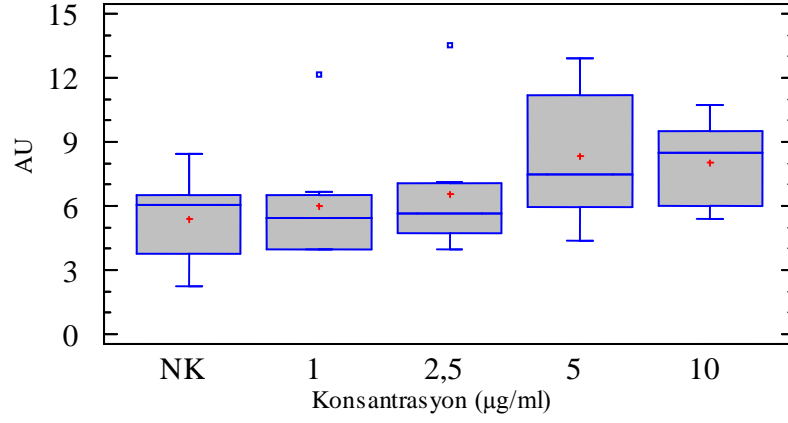
Şekil 4.33. Cipralex'in komet tekniğinde, konsantrasyon AU regresyon analizi

Cipralex AU oluşturması balımından, Kruskal Wallis H testi ile değerlendirilmiştir. konsantrasyonlar arasındaki medyan değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p > 0.05$)

Çizelge 4.26. Cipralex konsantrasyon AU Kruskal Wallis H testi sayısal verileri

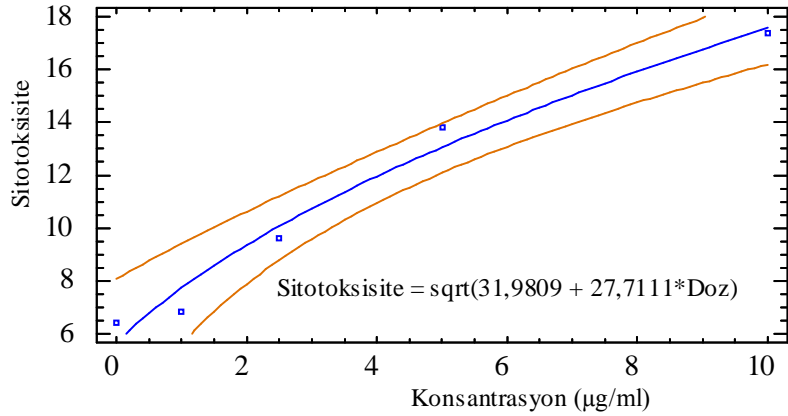
Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Örnek Hacmi	Ortalama Değişme
Kontrol	8	15.2
1	8	16.0
2.5	8	18.4
5	8	26.1
10	8	26.5

P = 0.13



Şekil 4.34. Cipralex'in komet tekniğinde konsantrasyon AU Kruskal Wallis H testi. AU: arbitrary unit

Konsantrasyon artışı ile sitotoksosite arasındaki çoklu lineer regresyon analizine göre güçlü pozitif bir korelasyon bulunmuştur ($p < 0.001$, $r = 0.99$).



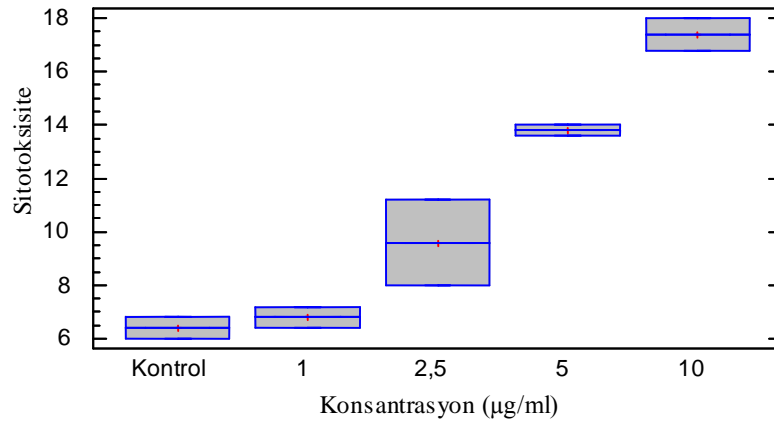
Şekil 4.35. Cipralex'in komet tekniğinde, konsantrasyon-sitotoksosite regresyon analizi

Çalışılan konsantrasyonlara bağlı olarak oluşan sitotoksosite değerleri arasındaki ilişki Kruskal Wallis H testi ile çalışılmış ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$)

Çizelge 4.27. Cipraleks konsantrasyon sitotoksisite Kruskal Wallis H testi sayısal verileri

Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Örnek Hacmi	Ortalama Değişme
Kontrol	2	2.00
1	2	3.00
2.5	2	5.50
5	2	7.50
10	2	9.50

P = 0.07



Şekil 4.36. Cipraleks'in komet tekniğinde konsantrasyon sitotoksisite Kruskal Wallis H testi

4.1.3.4. Sinequan

Sinequan'ın kadın donör ile gerçekleştirilen komet deneyleri sonucunda hasarsız (0), 1., 2., 3. ve 4. dereceden hasarlı hücre sayıları belirlenmiş her bir konsantrasyona ait AU değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca her bir konsantrasyonun sitotoksisitesi belirlenmiş ve tüm bu veriler çizelge 4.28'de sunulmuştur. Erkek donöre ait veriler ise 4.29'da verilmiştir. Sinequan'ın insan periferik kan lenfositlerinde oluşturduğu muhtemel genotoksitenin değerlendirilmesi için her iki donörden her konsantrasyon için toplam 2000 hücre sayılmış ve değerlendirilen parametrelere ilişkin elde edilen veriler çizelge 4.30'da verilmiştir.

Çizelge 4.28. Sinequan'ın kadın donör periferal kan örneklerinde oluşturduğu, hasarsız, 1., 2., 3. ve 4. dereceden yürümüş hücre, AU ve sitotoksosite değerleri

Konsantrasyon	Hasar Dağılımı					AU±SS	Toplam	
	0	1	2	3	4		Hücre	% Sitotoksosite
H ₂ O ₂	284	97	59	47	536	244	1023	-
NK	1008	20	8	4	5	6.50±3.46	1045	4.40
1 µg/ml	998	18	8	4	5	6.40±3.31	1033	4.00
2.5 µg/ml	983	21	7	5	4	6.50±0.71	1020	6.80
5 µg/ml	946	38	6	4	6	8.60±2.05	1000	8.80
10 µg/ml	927	40	11	11	9	13.1±0.72	998	12.0

AU: Arbitrary Unit, SS: Standard sapma, NK: Negatif kontrol, H₂O₂: Hidrojen peroksit

Çizelge 4.29. Sinequan'ın erkek donör periferal kan örneklerinde oluşturduğu, hasarsız, 1., 2. 3. ve 4. dereceden yürümüş hücre, AU ve sitotoksosite değerleri

Konsantrasyon	Hasar Dağılımı					AU±SS	Toplam	
	0	1	2	3	4		Hücre	% Sitotoksosite
H ₂ O ₂	277	31	46	74	649	273	1077	-
NK	994	24	5	4	2	5.20±5.40	1029	6.40
1 µg/ml	1026	28	5	1	1	4.20±3.31	1061	5.20
2.5 µg/ml	1001	39	9	0	2	6.20±3.59	1051	8.80
5 µg/ml	981	45	9	4	8	10.2±9.55	1047	13.6
10 µg/ml	998	52	23	15	9	16.3±7.46	1097	18.0

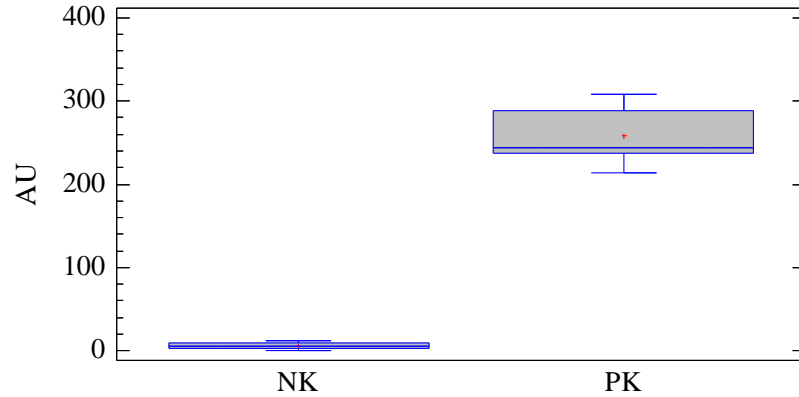
AU: Arbitrary Unit, NK: Negatif kontrol, SS: Standard sapma, H₂O₂: Hidrojen peroksit

Çizelge 4.30. Sinequan'ın her iki donöre ait kan örneklerinde oluşturduğu, hasarsız, 1. 2. 3. ve 4. dereceden yürümüş hücre, AU ve sitotoksosite değerleri

Konsantrasyon	Hasar Dağılımı					AU±SS	% Sitotoksosite
	0	1	2	3	4		
H ₂ O ₂	280	64	52.5	60,5	592	258,7	-
NK	1001	22	6.50	4.00	3.50	5.90±4.26	5.40±1.41
1 µg/ml	1012	23	6.50	2,50	3.00	5.30±3.28	4.60±0.84
2.5 µg/ml	992	30	8.00	2,50	3.00	6.30±2.40	7.80±1.41
5 µg/ml	963	41.5	7,50	4.00	7.00	9.40±6.44	11.2±3.39
10 µg/ml	962	46	17.0	13.0	9.00	14.7±5.16	15.0±4.24

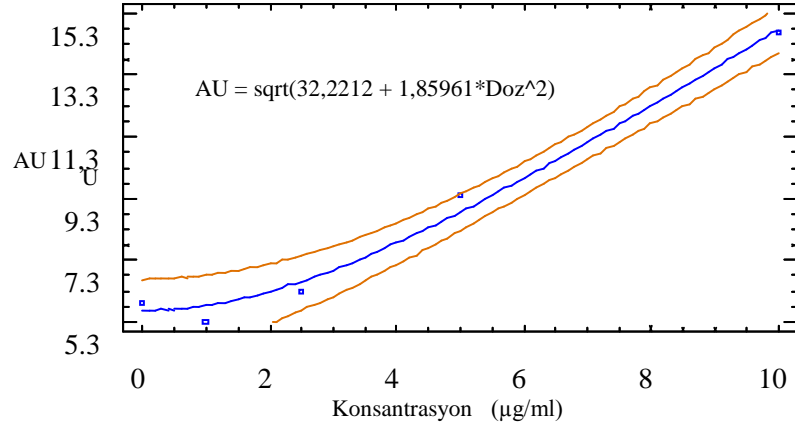
AU: Arbitrary Unit, NK: Negatif kontrol, SS: Standard sapma, H₂O₂: Hidrojen peroksit

Sinequan'a ait, negatif kontrol ve pozitif kontrol AU (komet) verileri Mann Whithney U testi ile karşılaştırılmış ve her iki konsantrasyon medyan değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.000$).



Şekil 4.37. Sinequan'ın komet tekniğinde AU (komet) ile NK ve PK medyan değerleri Mann Whithney U testi

Sinequan'ın konsantrasyon artışı ile AU artışı arasındaki ilişki çoklu lineer regresyon analizi ile çalışılmış ve aralarında güçlü bir pozitif korelasyon bulunmuştur ($p<0.001$, $r=0.92$).



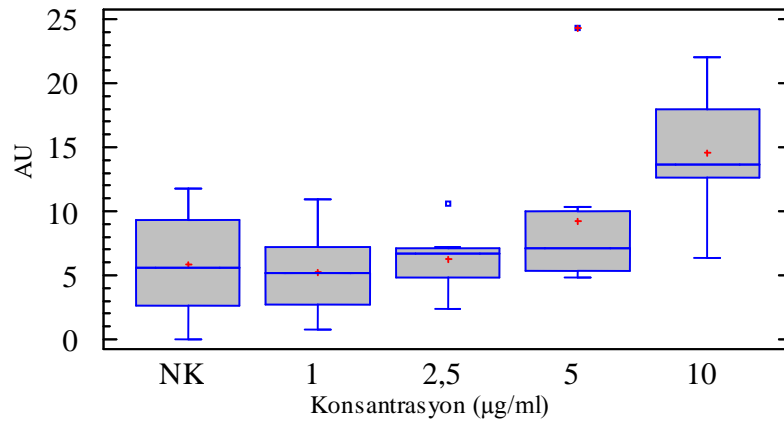
Şekil 4.38. Sinequan komet tekniğinde, konstrasyon AU regresyon analizi. AU: arbitrary unit

Çalışılan konstrasyonlarla AU parametresi arasındaki ilişki Kruskal Wallis H testi ile çalışılmış ve konstrasyonlar arasındaki medyan değerleri bakımından istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p < 0.01$).

Çizelge 4.31. Sinequan konstrasyon AU KruskalWallis H testi sayısal verileri

Konstrasyon (µg/ml)	Örnek Hacmi	Ortalama Değişme
NK	8	15.8
1	8	13.5
2.5	8	17.6
5	8	21.6
10	8	33.7

$P = 0.004$



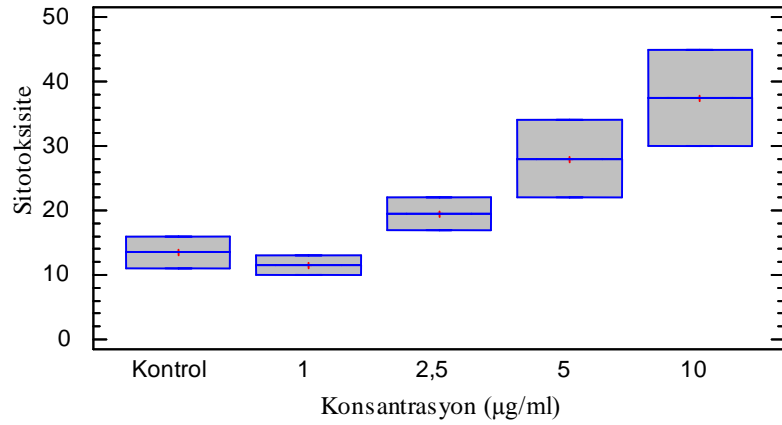
Şekil 4.39. Sinequan komet tekniğinde, konstrasyon AU Kruskal Wallis H testi

İlacın çalışılan konsantrasyonları ile sitotoksisite arasındaki ilişki Kruskal Wallis H testi ile çalışılmış ve gruplar arasındaki medyan değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$).

Çizelge 4.32. Sinequan konsantrasyon sitotoksisite Kruskal Wallis H testi sayısal verileri

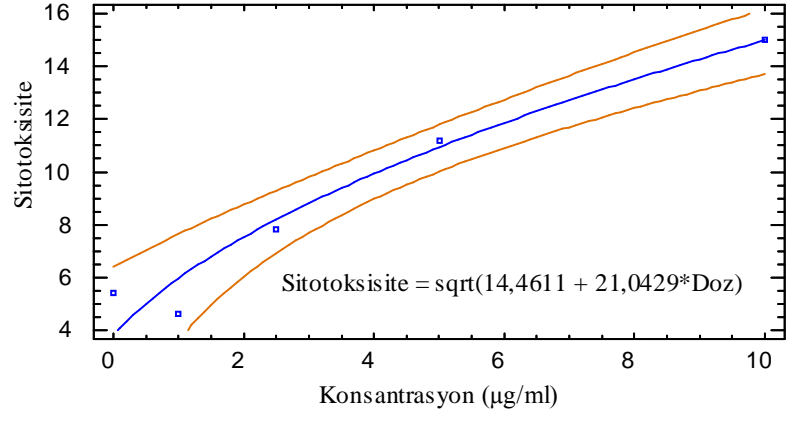
Konsantrasyon	Örnek hacmi	Ortalama Değişme
Kontrol	2	3.00
1	2	2.00
2.5	2	5.75
5	2	7.75
10	2	9.00

P = 0.09



Şekil 4.40. Sinequan komet tekniğinde, konsantrasyon sitotoksisite Kruskal Wallis H testi

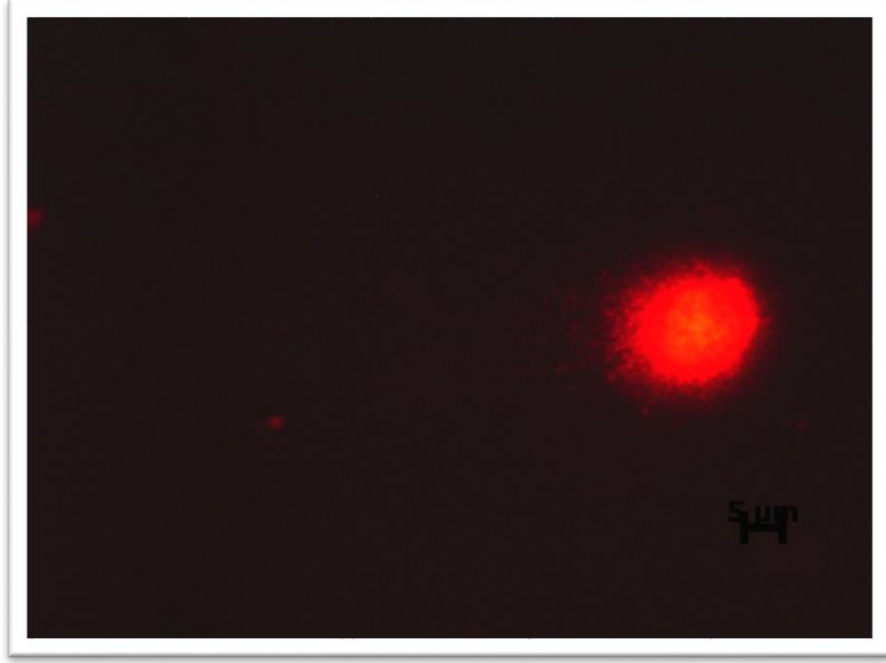
Sinequan ilacına ait trypan blue ile gerçekleştirilen sitotoksisite testlerine ait değerlerinin konsantrasyon artışı ile arasındaki ilişki çoklu lineer regresyon analizi ile çalışılmış ve aralarında güçlü pozitif bir korelasyon bulunmuştur ($p<0.001$, $r= 0.99$).



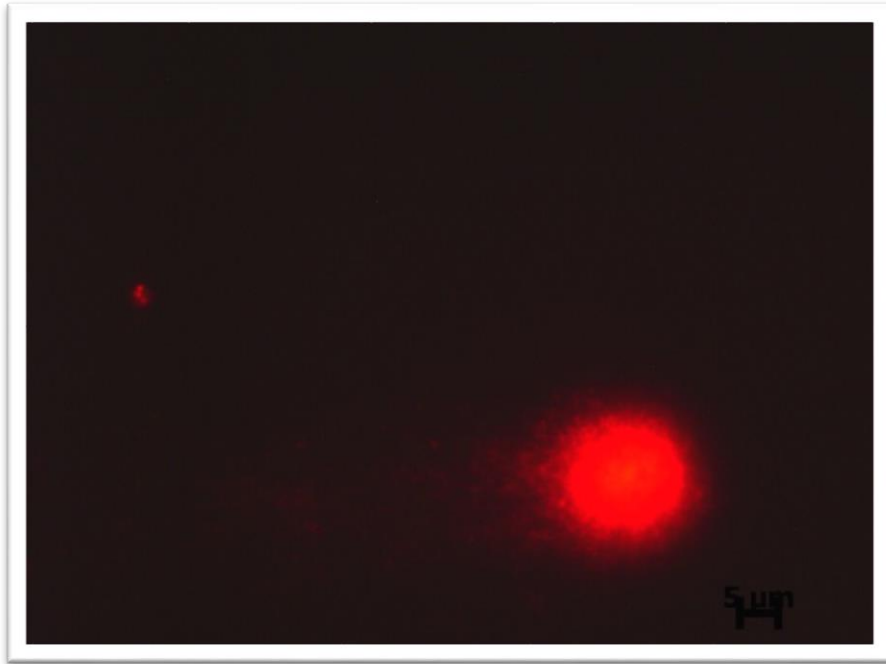
Şekil 4.41. Sinequan'ın komet tekniğinde konsantrasyon sitotoksosite regresyon analizi



Şekil 4.42. (a) hasarsız lenfosit

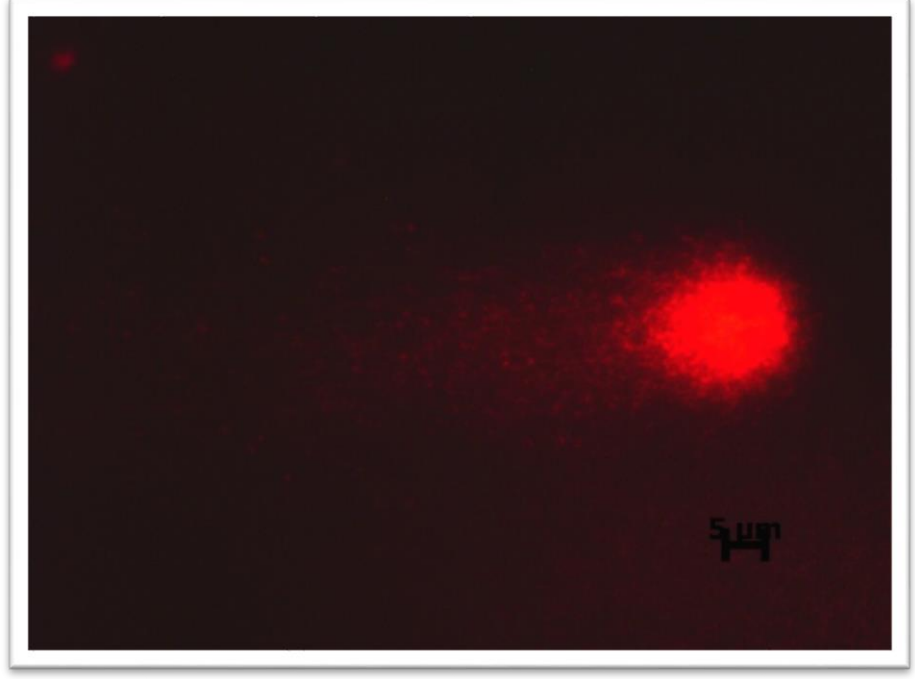


(b)

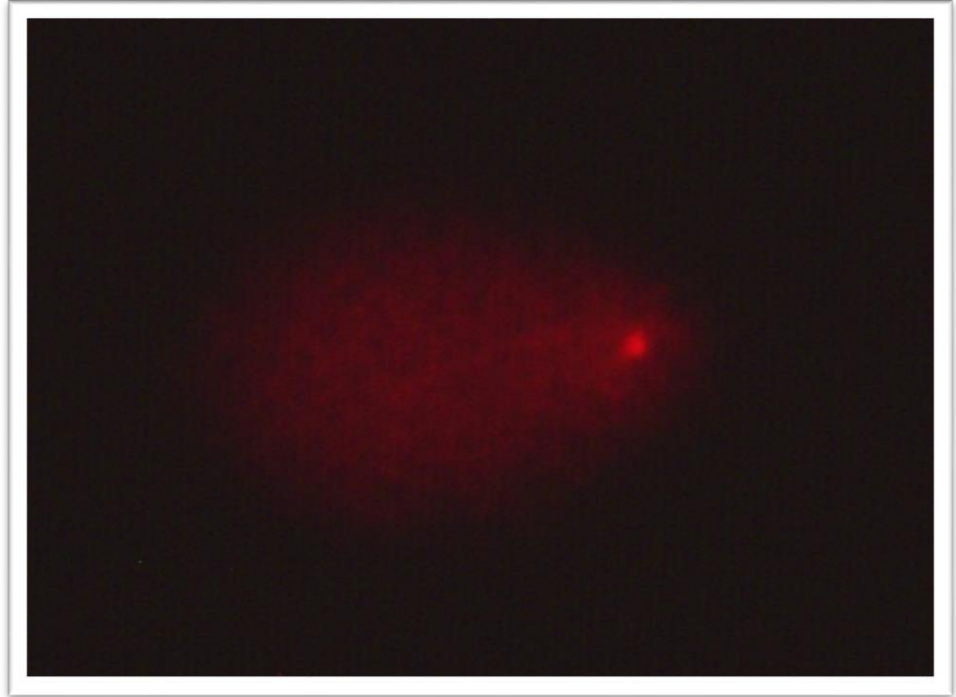


(c)

Şekil 4.42. Devam (b, c) 1., 2. dereceden hasarlı hücreler



(d)



(e)

Şekil 4.42. Devam. (d, e) 3., 4. deuceden dereceden hasarlı hücreler

4.2. Tartışma

Tez çalışmasında kullanılan üç teknikten biri olan CBMN tekniği insanlarda genomik kararsızlık ve kromozomal hasarın göstergesi olarak sıklıkla kullanılan sitogenetik bir yöntemdir (Bonassi ve ark., 2007). Çalışmada kullanılan bir diğer teknik olan Komet tekniği de memeli hücrelerinde çok düşük miktarda DNA hasarlarını tespit edebilen hızlı ve duyarlı bir tekniktir (Sasaki ve ark., 2007). Çalışmada kullanılan üçüncü teknik ise KKD tekniğidir. Bu teknikte diğer teknikler gibi DNA hasarını uyaran kimyasal maruziyetin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Tucker ve Preston, 1996).

Sinequan ilacının sağlıklı insan periferal lenfositlerinde hem KKD hem de Komet tekniklerinde; çalışılan dozların hem AU hem de KKD oluşturması bakımından Kruskal Wallis H testi ile değerlendirilmiş ve konsantrasyonlar arası medyan değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Ancak çalışılan konsantrasyonlar arası medyan değerleri, MN oluşturması bakımından istatistiksel olarak anlamlı sonuç vermemiştir. Literatürde Sinequan ilacına ait KKD, MN ve AU oluşturma özellikleri ile ilgili *in vitro* ve *in vivo* çalışmaya raslanmamıştır, dolayısıyla bu çalışmadan elde edilen bulguların birebir karşılaştırılabileceği başka veriler yoktur. Ancak, Perez ve ark (2002), yaptıkları çalışmada Sinequan ilacının da dahil olduğu trisiklik guruba dahil İmipramin ve Desimipramin antidepresanlarının KKD sitogenetik yöntemi ile genotoksitesini farelerle *in vivo* olarak çalışmışlardır. KKD/metafaz parametresinde en düşük konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmezken yüksek iki konsantrasyonda hücre başına düşen KKD sayısında istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur. Perez ve arkadaşlarının elde ettikleri bu veriler aynı guruba dahil Sinequan ilacı ile *in vitro* gerçekleştirilen bu çalışmada elde edilen verilerle uyumludur. Aynı çalışmada PI'nin kimyasallardan etkilenmediği yani sitotoksitesinin olmadığı, MI'in ise en yüksek konsantrasyonda zayıf bir şekilde azaldığı görülmüştür. Sitotoksitesite ve mitotik inhibisyona ilişkin bu veriler de bu çalışmada elde edilen bulgularla uyumludur.

Draz ve ark (2009) yaptıkları çalışmada, anksiyete ve majör depresyon hastası olan trisiklik ve SSRI grubu ilaç kullanan 38 hasta (Fluoksetin kullanan 7 erkek 10 kadın, sertalin kullanan 5 erkek 5 kadın ve colimipramin kullanan 6 erkek 5 kadın) ile sağlıklı 5 erkek ve 5 kadından oluşan kontrol grubu ile yaptıkları çalışmada DNA jel elektroforezis yöntemi ile total genomik hasarı tespit etmişlerdir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

tüm gruplarda artan DNA hasarı görülmüştür. İlaçlar kendi araların karşılaştırıldığında SSRI gurubu ilaçların tirisiklik gurubu ilaçlardan daha fazla DNA hasarına neden oldukları görülmüştür. Draz ve arkadaşları elde ettikleri bu bulguları her üç ilacın da DNA hasarını uyarabilir oldukları şeklinde yorumlamıştır. Çalışmamızda kullandığımız tekniklerden birisi alkali elektroforez yöntemi ile DNA hasarını ölçen komet tekniğidir. Elde edilen bulgular; tirisiklik guruba dahil Sinequan'ın çalışılan konsantrasyonlarda DNA hasarını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı ancak SSRI gurubuna dahil Ciprex'in DNA hasarını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmadığı şeklindedir. Sinequan'a ait bu veriler Draz ve ark (2009) ile örtüşürken Ciprex'e ait veriler aynı çalışma ile çelişmektedir. Draz ve ark (2009) çalışmasının ilaçları kullanan bireylerle yapılan *in vivo* bir çalışma olduğu düşünüldüğünde bu çelişki Ciprex ilacının sekonder metabolitlerinin genotoksik potansiyelinin olabileceği şeklinde açıklanabilir.

Yapılan literatür taramasında Essitalopram etken maddeli Ciprex ilacı ile yapılmış *in vivo* bir çalışma bulunmuştur. Roshdy ve ark (2002) yaptıkları bu çalışmada Ciprex'in genotoksitesini, hamile farelerle *in vivo* olarak KA ve MN tekniklerini kullanarak araştırmışlardır. Çalışmada 0.06, 0.12 ve 0.24 mg/kg/gün dozları denenmiştir. Hem anne hem de embriyoda MN sıklığının doz artışına bağlı artış gösterdiği ancak bu artışın en yüksek doz olan 0.24 mg'lık dozda istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ve ilacın zayıf mutajenik etkisi olduğu belirtilmiştir. (Roshdy ve Shoman, 2002). Bu çalışmada yapılan çoklu lineer regresyon analizinde konsantrasyon artışı ile oluşan MN sıklığındaki artış arasındaki ilişkinin pozitif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Bu bulgu Roshdy (2002) ile uyum göstermektedir. Ancak, bu çalışmada Ciprex'in MN oluşturması ile ilgili, konsantrasyonlar arası medyan değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır, bu bulgu Roshdy (2002) ile çelişmektedir. Farelerle yapılan bu *in vivo* çalışmanın sonuçları, Draz ve ark (2009)'nın SSRI gurubu başka ilaçları kullanan bireylerle yaptıkları *in vivo* çalışmanın sonuçları ve bu çalışmada elde edilen bulgular, Ciprex'in de dahil olduğu SSRI gurubu ilaçların sekonder metabolitlerinin genotoksik potansiyelinin olabileceğine işaret etmektedir.

Ciprex ilacı ile yapılmış başka bir çalışma bulunmamakla birlikte Ciprex ilacının dahil olduğu SSRI gurubuna dahil başka ilaçlarla yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Bozkurt ve ark (2014) yaptıkları çalışmada SSRI grubunu temsilen Sertalin'i seçmişlerdir. Çalışmayı, 18 sağlıklı gönüllü (13 kadın, 5 Erkek), benzer teşhis konulmuş ancak ilaç

tedavisine başlanmamış 18 hasta (14 Kadın, 4 Erkek), ve günde 50 mg Sertalin ile bir yıldır tedavi gören 10 hasta (9 Kadın, 1 Erkek) ile planlamışlardır. KKD sıklığının ilaçla tedavi gören ve görmeyen 2 hasta grubunda da, sağlıklı kontrol grubuna oranla dikkate değer bir artış gösterdiği belirlenmiş. Ancak ilaç tedavisi altındaki hasta grubu ile ilaç tedavisine başlanmamış hasta grubu kendi aralarında karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bozkurt ve arkadaşları, kontrol gurubu ile hasta gurubu arasındaki anlamlı farkın, ilaç genotoksitesisi ile değil hastaların içinde buldukları stres ile açıklanabileceği şeklinde yorumlamışlardır (Bozkurt ve ark, 2004). Draz ve ark (2009) yaptıkları çalışmada SSRI gurubuna dahil Sertalin ilacını kullanan hastalarda DNA hasarının kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığını tespit etmişler ve elde edilen bu sonucu, Sertalin ilacı DNA hasarını uyarabilir şeklinde yorumlamışlardır. Bu sonuç Bozkurt ve arkadaşları (2004) ile çelişmektedir.

Bu çalışmada her iki ilaç için üç tekniğin sitotoksitate testleri yapılmıştır. CBMN tekniğine ait CBPI ve KKD tekniğine ait PI değerlerinin doz artışına bağlı olarak azaldığı yani sitotoksitenin arttığı görülmüştür. Komet tekniğine ait trypan blue yöntemi ile elde edilen sitotoksitate değerlerinin de doz artışı ile arttığı tespit edilmiştir. Ancak her üç teknik için de çalışılan dört farklı dozdan hiç birisinde istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksitate tespit edilememiştir. Bu bulgular bize her iki ilacın da çalışılan dozlarda sitotoksik etkilerinin olmadığını göstermektedir.

KKD tekniği ile elde edilen parametrelerden birisi de MI değeridir. Her iki ilaca ait MI değerlerinde, çalışılan dört konsantrasyon için de istatistiksel olarak anlamlı bir değişim bulunamamıştır. Bu bulgular her iki ilacın da mitotik inhibisyon etkisinin olmadığını göstermektedir.

Çalışılan Sinequan ilacı KKD ve komet tekniklerinde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlara neden olmuştur. Cipralelex ilacı ise sadece KKD tekniğinde anlamlı artışlara neden olmuştur, CBMN tekniğinde anlamlı bir MN arştı olmasa da doz artışı ile oluşan MN arasında ki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tüm bu veriler çalışılan her iki ilacın da genotoksik potansiyelinin olabileceğini göstermektedir.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada antidepresan olarak kullanılan ve ticari olarak satılan Sinequan ve Cipraleks ilaçlarının genotoksitesisi üç farklı sitogenetik yöntem ile insan periferik lenfositlerinde *in vitro* olarak çalışılmıştır.

Cipraleks ve Sinequan, % MNL oluşturması bakımından Kruskal Wallis H testi ile değerlendirilmiş ve konsantrasyonlar arası medyan değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Cipraleks'in doz artışı ile % MNL artışı arasındaki ilişki çoklu lineer regresyon analizi ile incelenmiş ve aralarında pozitif korelasyon olduğu bulunmuştur ($p<0.05$, $r=0.97$). Aynı şekilde Sinequan'ın da konsantrasyon artışı ile % MNL artışı arasında pozitif korelasyon bulunmuştur ($p<0.05$, $r=0.96$).

Her iki ilaç da KKD oluşturması bakımından Kruskal Wallis H testi ile değerlendirilmiş ve konsantrasyonlar arası medyan değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.01$). İlaçların konsantrasyon artışı ile KKD/M artışı arasındaki ilişki çoklu lineer regresyon analizi ile incelenmiş ve her iki ilaç için de istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon bulunmuştur (Cipraleks; $p<0.0001$, $r=0.99$ Sinequan; $p<0.000$, $r=0.99$).

Sinequan DNA hasarı (AU) oluşturması bakımından Kruskal Wallis H testi ile değerlendirilmiş ve konsantrasyonlar arası medyan değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$). Cipraleks'in AU oluşturması bakımından yapılan değerlendirmede ise konsantrasyonlar arası medyan değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Ancak her iki ilacın konsantrasyon artışı ve AU artışı arasında pozitif korelasyon bulunmuştur (Cipraleks; $p<0.05$, $r=0.92$ Sinequan; $p<0.001$, $r=0.99$).

Sinequan ve Cipraleks'in her üç tekniğe ait, çalışılan konsantrasyonlara bağlı oluşan sitotoksitesite değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Yapılan çoklu lineer regresyon analizlerinde, Cipraleks'in KKD tekniğinde konsantrasyon artışı ile PI arasında negatif bir korelasyon tespit edilememiştir ($p>0.05$,

$R^2=0.78$). Aynı şekilde CBMN tekniğinde konsantrasyon artışı ile CBPI arasında anlamlı negatif korelasyon bulunmamıştır ($p>0.05$, $r=0.48$). Ancak komet tekniğinde konsantrasyon artışı ile % ölü hücre sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon tespit edilmiştir ($p<0.001$, $r=0.99$).

Sinequan için de gerçekleştirilen regresyon analizleri sonuçlarına göre; CBMN tekniğinde konsantrasyon artışı ile CBPI azalması arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir korelasyon tespit edilmiştir ($p<0.05$, $r=0.93$). Komet tekniğinde konsantrasyon artışı ile yüzde ölü hücre sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon tespit edilmiştir ($p<0.001$, $r=0.99$). Ancak KKD tekniğinde konsantrasyon artışı ile PI azalması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir negatif korelasyon tespit edilememiştir ($p>0.05$, $r=0.05$).

Çalışılan konsantrasyonlarda her iki ilaçta da MI değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmemiştir ($p>0.05$). Ancak her iki ilaç için de çoklu lineer regresyon analizinde doz artışı ile MI azalması arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir korelasyon görülmüştür (Cipralax; $P<0.01$, $r=0.97$ Sinequan; $P<0.05$, $r=0.91$).

Çalışmadan elde edilen bu sonuçlarından yola çıkarak, her iki ilaçta da çalışılan konsantrasyonlarda sitotoksik olmadıkları ve mitotik inhibisyona neden olmadıkları söylenebilir. Sinequan'ın KKD ve komet tekniklerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar vermesi ve Cipralax'ın KKD tekniğinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar vermesi her iki ilacın da çalışılan konsantrasyonlar için genotoksik potansiyelleri olduğunu göstermektedir.

Çalışmada kullanılan her üç tekniğin de test edilen ilaçlar bakımından, sitotoksik ve genotoksik değerlendirmeler için gerekli oldukları anlaşılmaktadır. KKD tekniğinin, her iki ilaç için de diğer iki teknikten daha hassas bir teknik olduğu görülmüştür.

Cipralax ile yapılan *in vivo* çalışmanın sonuçları, dahil olduğu guruba ait başka ilaçlarla yapılan *in vivo* çalışmaların sonuçları ve bu çalışmada elde edilen veriler ışığında ilacın hem kendisinin hem de sekonder metabolitlerinin genotoksik bir potansiyelinin olabileceği söylenebilir.

Bu çalışmada her iki ilacın da KKD tekniğinde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar vermesi nedeni ile ilaçların klastojenik nitelikte olabileceği yönünde kanı oluşmuştur ancak

bu konunun netliğe kavuşturulması için ilaçlarla yapılacak sonraki çalışmaların FISH boyama tekniği ile çalışılmasının yararlı olacağı dūřunūlmektedir.

Özellikle Sinequan'ın genotoksisitesine ait başka hiçbir verinin bulunmamasından, Cipralext'e ait verilerin de son derece az olmasından ve SSRI gurubuna dahil başka illarla yapılan çalışmaların sonuçlarının uyumlu olmamasından dolayı her iki ilacın da *in vitro* ve/veya *in vivo* alışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır. Böylece genotoksik potansiyellerini çalıştığımız ilaçlara ait verilerin daha kesinlik kazanacağı dūřunūlmektedir.

KAYNAKLAR

- Abou-Eishaa A., Marcosb R., Creusb A., 2004. Genotoxicity Studies on the Antimicrobial Drug Sulfamethoxazolein Cultured Human Lymphocytes. *Mutation Research*, 564: 51–56.
- Ahmad M. E., Shadab G.G.H.A., Hoda A., Afzal M., 2000. Genotoxic Effects of Estradiol-17b on Human Lymphocyte Chromosomes. *Mutation Research*, 466: 109–115.
- Ahmad M. E., Shadab G.G.H.A., Azfer M. A., 2003. Effect of Oxymetholone on SCE Frequency in Human Lymphocyte Chromosomes In Vitro. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*,1: 267–272.
- Andrighetti-Frohner C. R., Kratz J. M., Antonio R. V., Creczynski-Pasa T. B., Barardi C. R. M., Simoes C. M. O., 2006. In Vitro Testing for Genotoxicity of Violacein Assessed by Komet and Micronucleus Assays. *Mutation Research*, 603: 97–103
- Anderson D., Dobrzynska M., Basaran N., 1997. Effect of Various Genotoxins and Reproductive Toxins in Human Lymphocytes and Sperm in the Comet Assay. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 17: 29–43.
- Anderson D., Yu T.W., McGregor D.B., 1998. Comet Assay Responses as Indicators of Carcinogen Exposure. *Mutagenesis*, 13 (6) : 539-555.
- Andrighetti-Frohner C.R., Kratz J.M., Antonio R.V., Tania B., Pasa C., Barardi C.R.M., Simoes C.M.O., 2006. In Vitro Testing for Genotoxicity of Violacein Assessed by Comet and Micronucleus Assays. *Mutation Research*, 603 97–103
- Arimochi H., Morita K., 2006. Characterization of Cytotoxic Actions of Tricyclic Antidepressants on Human HT29 Colon Carcinoma Cells. *European Journal of Pharmacology*, 541: 17–23.
- Asakawa Y., Gotoh E., 1997. A Method for Detecting Sister Chromatid Exchanges Using Prematurely Condensed Chromosomes and Immunogold-Silver Staining. *Mutagenesis*, 12: 175-177.
- Berardino D., Shoffner R.N., 1979. Sister Chromatid Exchange in Chromosomes of Cattle. *J Dairy Sci*, 62: 627-632.
- Bigatti M. P., Corona D., Munizza C., 1998. Increased Sister Chromatid Exchange and Chromosomal Aberration Frequencies in Psychiatric Patients Receiving Psychopharmacological Therapy. *Mutation Research*, 413: 169–175.

- Błasiak J., Jałoszynski P., Trzeciak A., Szyfter K., 1999. In Vitro Studies on the Genotoxicity of the Organophosphorus Insecticide Malathion and Its Two Analogues. *Mutation Research*, 445: 275–283.
- Borroto J. I. G., Creus A., Marcos R., 2002. Genotoxic Evaluation of the Furylethylene Derivative 1-(5-bromofur-2-yl)-2-Nitroethene in Cultured Human Lymphocytes. *Mutation Research*, 519: 179–185.
- Bonassi S., Znaor A., Ceppi M., Lando C., Chang W.P., Holland N., Kirsch-Volders M., Zeiger E., Ban S., Barale R., Bigatti M.P., Bolognesi C., Cebulka-Wasilewska A., Eleonora F., Fucic A., Hagmar L., Joksic G., Martelli A., Migliore L., Mirkova E., Scarfi M.R., Zijno A., Norppa H., Fenech M., 2007. An Increased Micronucleus Frequency in Peripheral Blood Lymphocytes Predicts the Risk of Cancer in Humans. *Carcinogenesis*, 28: 625–631.
- Bozkurt G., Abay E., Ates I., Karabogaz G., Ture M., Savran F. O., Palanduz S., Temocin K., Algunes C., 2004. Clastogenicity of Selective Serotonin-Reuptake Inhibitors. *Mutation Research*, 558: 137–144.
- Brown R. L., Crossen P. E., 1984. Increased Incidence of Sister Chromatid Exchange in Rauscher Leukaemia Virus Infected Mouse Embryo Fibroblasts. *Microbiology and Immunology*, 28(8): 893-901.
- Burgaz S., Coskun E., Demircigil G.C., Kocabas N. A., Cetindag F., Sunter O., Edinsel H., 2011. Micronucleus Frequencies in Lymphocytes and Buccal Epithelial Cells from Patient Shaving Head and Neck Cancer and Their First-Degree Relatives. *Mutagenesis*, 26: 351–356.
- Chien C., Li C., Heckbert S.R., Malone K.E., Boudreau D.M., Daling J.R., 2006. Antidepressant Use and Breast Cancer Risk. *Breast Cancer Research and Treatment*, 95: 131–140.
- Chung H.W., Kang S.J., Kim S.Y., 2002. A Combination of the Micronucleus Assay and a FISH Technique for Evaluation of the Genotoxicity of 1,2,4-Benzenetriol. *Mutation Research*, 516: 49–56.
- Collins A.R., Oscoz A.A., Brunborg G., Gaivao I., Giovannelli L., Kruszewski M., Smith C.C., Stetina R., 2008. The Comet Assay: Topical Issues. *Mutagenesis*, 23 (3): 143–151.
- Collins A.R., 2004. The Comet Assay for DNA Damage and Repair. *Molecular Biotechnology*, 26: 249-261.

- Cosgrove L., Shi L., Creasey D.E., Anaya-McKivergan M., Myers Krista J.A., Huybrechts F., 2011. Antidepressants and Breast and Ovarian Cancer Risk: A Review of the Literature and Researchers' Financial Associations with Industry. *Plosone*, 4(6): 18-21.
- Cotterchio M., Kreiger N., Darlington G., Steingart A., 2000. Antidepressant Medication Use and Breast Cancer Risk. *American Journal of Epidemiology*, 151(10): 951-957.
- Dalgıç H., Papak Ö., 2003. Trisiklik Antidepresanların Analjezik/Antinosiseptif Etki Mekanizmaları. *Erciyes Tıp Dergisi (Erciyes Medical Journal)*, 25(2): 98-103.
- Demirel S., Zamani A., 2002. Mikronükleus Tekniği ve Kullanım Alanları. *Genel Tıp Der*, 12(3): 123-127.
- Dhawan A., Bajpayee M., Pandey A K., Parmar D., nd. Protocol for the Single Cell Gel Electrophoresis / Comet Assay for Rapid Genotoxicity Assessment. From <http://www.cometassayindia.org/protocol>
- Dilmeç F., 1993. Viral Hastalıkların İnsan Kromozomlarında Yaptığı Hasarın Sister Chromatid Exchange (SCE) Yöntemi ile Araştırılması. Bilim Uzmanlığı Tezi. Çukurova Üniversitesi, Türkiye.
- Diñer Y., Kankaya S., 2010. DNA Hasarının Belirlenmesinde Komet Assay. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 30(4): 1365-73.
- Doulias P.T., Barboutı A., Galarıs D., Ischiropoulos H., 2001. Sın-1-Induced DNA Damage in Isolated Human Peripheral Blood Lymphocytes as Assessed by Single Cell Gel Electrophoresis (Comet Assay). *Free Radical Biology & Medicine*, 30(6): 679–685.
- Draz E.I., Emara A.M., Saad K.M., Badaway A., El-Nabi S. E.H., Abd –Elgelil H., 2009. Genotoxicity of Some Commonly used Antidepressants (Fluoxetine, Sertraline and Clomipramine). *Mansoura J. Forensic Med. Clin. Toxicol*, 17(2): 63-78.
- Dusinska M., Collins A.R., 2008. The Comet Assay in Human Biomonitoring: Gene–Environment Interactions. *Mutagenesis*, 23 (3): 191–205.
- Dutrillaux B., Fosse A.M., Prieur M., LeJeune J., 1974. Analysis Des Exchanges de Chromatides Dans Les Cellules Somatiques Humaines Traitement au BrdU et Fluorescence bi Color Par I' acridine Orange. *Chromosoma*, 48: 327.

- Duty S M., Singh N.P., Silva M.J., Barr D.B., Brock J.W., Ryan L, Herrick R.F., Christiani D.C., Hauser R., 2003. The Relationship between Environmental Exposures to Phthalates and DNA Damage in Human Sperm Using the Neutral Comet Assay. *Environmental Health Perspectives*, 111(9): 1164-1169.
- Efpia (European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations). <http://www.efpia.eu/documents/41/90/Animal-welfare-3R-39-s-Replace-Refine-Reduce>.
- Eke D., 2007. Thimerosal'in İnsan Lenfosit Hücre Kültürlerinde Genotoksik, Mutajenik ve Toksik Etkilerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Mersin Üniversitesi, Türkiye.
- Eke D., Çelik A., 2008. Genotoxicity of Thimerosal in Cultured Human Lymphocytes with and Without Metabolic Activation Sister Chromatid Exchange Analysis Proliferation Index and Mitotic Index. *Toxicology in Vitro*, 22: 927–934.
- El-Zein R., Vral A., Etzel C.J., 2011. Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay and Cancer Risk Assessment. *Mutagenesis*, 26 (1): 101–106.
- El-Zein R. A., Abdel-Rahman S. Z., Hay M. J., Lopez M. S., Bondy M. L., Morrisb D. L., Legatorb M. S., 2005. Cytogenetic Effects in Children Treated with Methylphenidate. *Cancer Letters*, 230: 284–291.
- Environmental Protection Agency (EPA). 1996. In Vitro Sister Chromatid Exchange Assay.
- Fenech M., 1997. The Advantages and Disadvantages of the Cytokinesis-Block Micronucleus Method. *Mutation Research*, 392: 11-18.
- Fenech M., Holland N., Chang W.P., Zeiger E., Bonassi S., 1999. The Human Micronucleus Project—An International Collaborative Study on the Use of the Micronucleus Technique for Measuring DNA Damage in Humans. *Mutation Research*, 428: 271-283.
- Fenech M., Morley A.A., 1985. Measurement of Micronuclei in Lymphocytes. *Mutat. Res*, 147: 29–36
- Fenech M., 2000. The In Vitro Micronucleus Technique. *Mutation Research*, 455: 81-95.
- Fenech M., ChangW.P., Kirsch-VoldersM., HollandN., Bonassi S., Zeiger E., 2003. Humn Project: Detailed Description of the Scoring Criteria for the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Using Isolated Human Lymphocyte Cultures. *Mutation Research*, 534: 65-75.

- Fenech M., Baghurst P., Luderer W., Turner J., Record S., Ceppi M., Bonassi S., 2005. Low Intake of Calcium, Folate, Nicotinic Acid, Vitamin E, Retinol, b-Carotene and High Intake of Pantothenic Acid, Aiotin and Riboflavin are Significantly Associated with Increased Genome Instability—Results From a Dietary Intake and Micronucleusindex Survey in South Australia. *Carcinogenesis*, 26(5): 991-999.
- Fenech M., 2006. Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Evolves into a “Cytome” Assay of Chromosomal Instability, Mitotic Dysfunction and Cell Death. *Mutation Research*, 600: 58-66.
- Fenech M., 2007. Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay. *Nature Protocols*, 2(5): 1084-1104.
- Fenech M., 2011. Micronuclei and Their Association with Sperm Abnormalities, Infertility, Pregnancy Loss, Pre-eclampsia and Intra-uterine Growth Restriction in Humans. *Mutagenesis*, 26(1): 63–67.
- Fenech M., Kirsch-Volders M., Natarajan A. T., Surralles J., Crott J. W., Parry,y J., Norppa H., Eastmond D. A.,.. Tucker J. D., Thomas P., 2011. Molecular Mechanisms of Micronucleus, Nucleoplasmic Bridge and Nuclear bud Formation in Mammalian and Human Cells. *Mutagenesis*, 26(1): 125–132.
- Franco Claudine´ ia C S., Castro-Prado J., Rosada L. J., R Sant’Anna J., Castro-Prado M. A. A., 2010. Mitotic Recombination: a Genotoxic Effect of the Antidepressant Citalopram in *Aspergillus Nidulans*. *Experimental Biology and Medicine*, 235: 1257–1262.
- Gotz A., Asgari W. S., Thomas G., Bungler S. J., Hallier M. M. E., 2003. Thimerosal Induces Micronuclei in the Cytochalasin B Block Micronucleus Test with Human Lymphocytes. *Arch Toxicol*, 77: 50–55.
- Holland N. T., A. Levine J., Smith M.T., Quintana P. J.E., Boeniger M., Hayes R., Suruda A., Schulte P., 1996. Quantification of Epithelial Cell Micronuclei by Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) in Mortuary Science Students Exposed to Formaldehyde. *Mutation Research*, 371: 237-248.
- Holland N., Bolognesi C., Kirsch-Volders M., Bonassi S., Zeiger E., Knasmueller S., Fenech M., 2008. The Micronucleus Assay in Human Buccal Cells As a Tool for Biomonitoring DNA Damage: The HUMN Project Perspective on Current Status and Knowledge Gaps. *Mutation Research*, 659: 93–108.

- Huang Y., Fenech M., Shi Q., 2011. Micronucleus Formation Detected by Live-Cell Imaging. *Mutagenesis*, 26(1): 133–138.
- İkbal M., Tastekin A., Dogan H., Pirim I., Ors R., 2004. The Assessment of Genotoxic Effects in Lymphocyte Cultures of Infants Treated with Chloral Hydrate. *Mutation Research*, 564: 159–164.
- İla H.B., İlhan A., 2012. In Vitro Genotoxic Perspective of Tamiflu. *Cytotechnology*, 64: 443–449.
- İşık E., Candansayar S., 1993. Özgül Serotonin Geri Alım Engelleyicilerinin Yan Etkileri ve İlaç Etkileşimleri. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*, 3: 1-2.
- Jałozynski P., Kujawski M., Wasowicz M., Szulc R., Szyfter K., 1999. Genotoxicity of Inhalation Anesthetics Halothane and Isoflurane in Human Lymphocytes Studied In Vitro Using the Comet Assay. *Mutation Research*, 439: 199–206.
- Karabıyık L., Sarda S., Polat U., Kocabaş N.A., Karakaya A.E., 2001. Comparison of Genotoxicity of Sevoflurane and Isoflurane in Human Lymphocytes Studied In Vivo Using the Comet Assay. *Mutation Research*, 492: 99–107.
- Kelly J.P., Rosenberg L., Palmer J.R., Rao R.S., Strom B.L., Stolley P.D., Zauber A.G., Shapiro S., 1999. Risk of Breast Cancer According to Use of Antidepressants, Phenothiazines, and Antihistamines. *American Journal of Epidemiology*, 150(8): 861-868.
- Kirsch-Volders M., Sofuni T., Aardemac M., Albertini S., Eastmond D., Fenech M., Ishidate M., Kirchner S., Lorge E., Morita T., Norppa H., Surrallés J., Vanhauwaert A., Wakata A., 2003. Report from The In Vitro Micronucleus Assay Working Group. *Mutation Research*, 540: 153–163.
- Klaude M., Eriksson S., Nygren J., Ahnstrijm G., 1996. The Comet Assay: Mechanisms and Technical Considerations. *Mutation Research*, 363: 89-96.
- Krause T., Scholz J., Jansen L., Boettcher H., Koch C., Wappler F., Esch J. S., 2003. Sevourane Anaesthesia Does Not Induce the Formation of Sister Chromatid Exchanges in Peripheral Blood Lymphocytes of Children. *British Journal of Anaesthesia*, 90 (2): 233-235.
- Küey L., Güleç C., 1993. Depresyonun Epidemiyolojisi. Depresyon Monografaları Serisi, Hekimler Yayın Birliği, Ankara.

- Latt S.A., 1974. Sister Chromatid Exchanges, Indices of Human Chromosome Damage and Repair: Detection by Fluorescence and Induction by Mitomycin C. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 71: 3162-3166.
- Lindberg H. K., Wang X., Jarventaus H., Falck G.C.M., Norppa H., Fenech M., 2007. Origin of Nuclear Buds and Micronuclei in Normal and Folate-Deprived Human Lymphocytes. *Mutation Research*, 617: 33–45.
- Lindberg H. K., Falcka G. C. M., Suhonena S., Vippolab M., Vanhalab E., Catalána J., Savolainena K., Norppaa H., 2009. Genotoxicity of Nanomaterials: DNA Damage and Micronuclei Induced by Carbon Nanotubes and Graphite Nanofibres in Human Bronchial Epithelial Cells *In Vitro*. *Toxicology Letters*, 186: 166–173.
- Lorge E., Hayashib M., Albertini S., Kirkland D., 2008. Comparison of Different Methods for an Accurate Assessment of Cytotoxicity in the *In Vitro* Micronucleus Test I. Theoretical Aspects. *Mutation Research*, 655: 1–3.
- Lehucher-Michel M.P., Amara-Mokrane Y.A., Devictor B., Catilina P., Botta A., 1996. Micronuclei Kinetics of Exfoliated Urothelial Cells. *Mutation Research*, 354: 1-7.
- Marques S., Oliveira N.G., Chaveca T., Rueff J., 2002. Micronuclei and Sister Chromatid Exchanges Induced by Capsaicin in Human Lymphocytes. *Mutation Research*, 517: 39–46.
- Mateuca R., Lombaert N., Aka P.V., Decordier I., Kirsch-Volders M., 2006. Chromosomal Changes: Induction, Detection Methods and Applicability in Human Biomonitoring. *Biochimie*, 88: 1515–1531.
- Michel M.P.L., Mokrane Y.A.A., Devictor B., Catilina P., Botta A., 1996. Micronuclei Kinetics of Exfoliated Urothelial Cells. *Mutation Research*, 354:1-7.
- Migliore L., Colognato R., Naccarati A., Bergamaschi E., 2006. Relationship Between Genotoxicity Biomarkers in Somatic and Germ Cells: Findings from a Biomonitoring Study. *Mutagenesis*, 21(2): 149–152.
- Migliore L., Coppede F., Fenech M., Thomas P., 2011. Association of Micronucleus Frequency with Neurodegenerative Diseases. *Mutagenesis*, 26(1): 85–92.
- Morgan W.F., Crossen P.E., 1981. Factors Influencing Sister Chromatid Exchange Rate in Cultured Human Lymphocytes. *Mutat Res*, 81: 395p.
- Moorhead P.S., Novell W.J., Wellman D.M., Batlips D., Hungerford A., 1960. Chromosome Preparations of Leucocytes Cultured from Peripheral Blood. *Experimental Cell Research*, 20: 613–616.

- National Centre For the Replacement, Refinement, Reduction of Animals in Research.
<http://www.nc3rs.org.uk/the-3rs>
- Nersesyan A., Kundi M., Atefie K., Schulte-Hermann R., Knasmuller S., 2006. Effect of Staining Procedures on the Results of Micronucleus Assays with Exfoliated Oral Mucosa Cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15(10): 1835-1840.
- Norppa H., Bonassi S., Hansteen I.L., Hagmard L., Stromberg U., Rossner P., Boffetta P., Lindholm C., Gundy S., Lazutka J., Cebulska-Wasilewska A., Fabianova E., Sram R.J., Knudsen L.E., Barale R., Fucic A., 2006. Chromosomal Aberrations and SCEs as Biomarkers of Cancer Risk. *Mutation Research*, 600: 37–45.
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development), 1986. Genetic Toxicology: *In vitro* Sister Chromatid Exchange Assay in Mammalian Cells.
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development), 2006. Guideline for the Testing of Chemicals Draft Proposal for a New Guideline 487: In-Vitro Micronucleus Test.
- Örsel S., 2004. Depresyonda Tedavi: Genel İkelere ve Kullanılan Antidepresan İlaçlar. *Klinik Psikiyatri*, 4: 17-24.
- Öztürk S., Palandüz S., Çefle K., Tutkuna G., Uçur A., Dinçol G., Nalçacı M., Aktan M., Yavuz S., Küçükkaya R.D., 2005. Genotoxicity and Sister Chromatid Exchange in Patients with Myelodysplastic Disorders. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 159: 148–150.
- Östling O., Johanson K.J. 1984. Microelectrophoretic Study of Radiationinduced DNA Damages in Individual Mammalian Cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 123: 291–298.
- Paniagua-Perez R., Madrigal-Bujaidar E., Reyes C.S., Perez G.J., Velasco M.O., Molina D., 2002. Sister Chromatid Exchanges Produced by Imipramine and Desipramine in Mouse bone Marrow Cells Treated in Vivo. *Toxicology Letters*, 132: 123–129.
- Pinkel D., Thompson L.H., Gray J.W., Vanderlaan M., 1985. Measurement of Sister Chromatid Exchanges at Very Low Bromodeoxyuridine Substitution Levels Using a Monoclonal Antibody in Chinese Hamster Ovary Cells. *Cancer Research*, 45: 5795-5798.
- Perry P., Wolff S., 1974. New Giemsa Method for the Differential Staining of Sister Chromatids. *Nature*, 251: 156-158.


- Pitarque M., Carbonell E., Lapen N., Mars M., Valbuena A., Creus A., Marcos R., 1997. SCE Analysis in Peripheral Blood Lymphocytes of a Group of Filling Station Attendants. *Mutation Research*, 390: 153–159.
- Rojas E., Valverde M., Lopez M.C., Naufal I., Sanchez I., Bizarro P., Lopez I., Fortoul T.I., Ostrosky-Wegman P., 2000. Evaluation of DNA Damage in Exfoliated Tear Duct Epithelial Cells from Individuals Exposed to Air Pollution Assessed by Single Cell Gel Electrophoresis Assay. *Mutation Research*, 468: 11–17.
- Roshdy H. M., Shoman T. M.T., 2004. Cytogenetic and Developmental Effects of Antidepressant Drug (Cipralext) on Female Mice and Embryos. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 17: 63 – 69.
- Sasaki Y. F., Nakamura T., Kawaguchi S., 2007. What is the Better Experimental Design for In Vitro Comet Assay to Detect Chemical Genotoxicity?. 6th World Congress on Alternatives Animal Use in the Life Sciences, Japan. 499-504.
- Shadab G.G.H.A., Ahmad M.E., Azfer M.A., 2006. Cytogenetic Evaluation of Hormonal Drug Fludrocortisone in Human Lymphocyte Chromosomes In Vitro. *Journal of Environmental Biology*, 27(2): 257-261.
- Segura M.E.C., Gomez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R., Martinez-Valenzuela C., Carbajal-Lopez Y., Ezquerro M.C.C., Eslava J.C., Martinez R. G., Ramirez D. F., Romero M.I.R., Perez P.M., Ruiz E.B., 2012. Evaluation of Genotoxic and Cytotoxic Effects in Human Peripheral Blood Lymphocytes Exposed In Vitro to Neonicotinoid Insecticides News. *Journal of Toxicology*, 2012: 1-11.
- Savrun B. M., 1999. Depresyonun Tanımı ve Epidemiyolojisi. *Depresyon, Somatizasyon ve Psikiyatrik Aciller Sempozyumu*, 11-17.
- Singh NP., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L., 1988. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Exp Cell Res*, 175: 184 –191.
- Stopper H., Muller S.O., 1997. Micronuclei as a Biological Endpoint for Genotoxicity: a Minireview. *Toxicology In Vitro*, 11: 661-667.
- Szeto Y.T., Benzie I.F.F., Collins A.R., Choi S.W., Chenga C.Y., Yowa C.M.N., Tse M.M.Y. 2005. A Buccal Cell Model Komet Assay: Development and Evaluation for Human Biomonitoring and Nutritional Studies. *Mutation Research*, 578: 371–381.

- Stanimirovic Z., Stevanovic J., Jovanovic S., Andjelkovic M., 2005. Evaluation of Genotoxic Effects of Apitol (cymiazole hydrochloride) In Vitro by Measurement of Sister Chromatid Exchange. *Mutation Research*, 588: 152–157.
- Şekeroğlu V., Şekeroğlu Z. A., Genotoksik Hasarın Belirlenmesinde Mikronükleus Testi. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 68(4): 241 – 252.
- Tanrıverdi N., 1991. Kardeş Kromatid Değişimi (SCE). Bilim Uzmanlığı Tezi. Çukurova Üniversitesi, Türkiye.
- Tarhan H., 2006. Antidepresan Olarak Kullanılan Prozac ve Paxil İlaçlarının İnsan Lenfosit Kültüründeki Genotoksik Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Türkiye.
- Taylor J. H., 1957. *Sister Chromatid Exchanges in Tritium-Labeled Chromosomes*. Department of Botany, Columbia University.
- Taylor J.H., Woods P.S., Hughes W.L., 1957. The Organization and Duplication of Chromosomes as Revealed by Autoradiography Studies Using Tritium-Labeled Thymidine. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 43: 122-127.
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki Y. F., 2000. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 206-221.
- Tice RR., Andrews P.W., Hirai O., Singh NP., 1991. *The Single Cell Gel (SCG) Assay: an Electrophoretic Technique for the Detection of DNA Damage in Individual Cells*. New York: Plenum Press, 157–164.
- Toh S., Garcia Rodriguez L. A., Hernandez-Diaz S., 2007. Use of Antidepressants and Risk of Lung Cancer. *Cancer Causes Control*, 18: 1055–1064.
- Topaktaş M., Speit G., 1990. Sister Chromatid Exchange (SCE) Testinin Mutajenite ve Kanserojenitenin Belirlenmesinde Kullanılması. *Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5: 73-84
- Tucker J. D., Preston R. J., 1996. Chromosome Aberrations, Micronuclei, Aneuploidy, Sister Chromatid Exchanges, and Cancer Risk Assessment. *Mutation Research*, 365: 147-159.
- Ündeğer Ü., Başaran N., 2005. Effects of Pesticides on Human Peripheral Lymphocytes In Vitro: Induction of DNA Damage. *Arch Toxicol*, 79: 169–176.

- Villarini M., Moretti M., Pasquini R., Sforzolini G.S., Fatigoni C., Marcarelli M., Monarca S., Rodriguez A.V., 1998. In Vitro Genotoxic Effects of the Insecticide Deltamethrin in Human Peripheral Blood Leukocytes: DNA Damage ('comet' assay) in Relation to the Induction of Sister-Chromatid Exchanges and Micronuclei. *Toxicology*, 130: 129–139.
- Wernli K.J., Hampton J. M., Dietz A.T., Newcomb P. A., 2009. Antidepressant Medication Use and Breast Cancer Risk. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 18(4): 284–290.
- Wang P.S., Walkerb A.M., Tsuang M.T., Oravc E.J, Levina R., Avorna J., 2001. Antidepressant Use and the Risk of Breast Cancer: A Non-Association. *Journal of Clinical Epidemiology*, 54: 728–734.
- Waters D.J., Shen S., Xu H., Kengeri S.S., Cooley D.M., Chiang E.C., Chen Y., Schlittler D., Oteham C., Combs G.F., Glickman L.T., Morris J.S, Bostwick D.G., 2007. Noninvasive Prediction of Prostatic DNA Damage by Oxidative Stress Challenge of Peripheral Blood Lymphocytes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16(9): 1906-1910.
- Wernli K. J., Hampton J.M., Trentham-Dietz A., Newcomb P.A., 2009. Antidepressant Medication Use and Breast Cancer Risk. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 18(4): 284–290.
- World Health Organization (WHO)., 2012. Depression A Global Public Health Concern.
- Wilson III D. M., Thompsonb L. H., 2007. Molecular Mechanisms of Sister-Chromatid Exchange. *Mutation Research*, 616: 11–23.
- Yavuz İ., 2013. Kurşuna Maruz Kalan Bireylerde Lenfosit DNA Hasarının Belirlenmesi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Türkiye.

EKLER

Ek 1. Klinik Araştırmalar Etik Kurul Belgesi

 T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

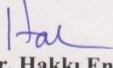
Sayı : KLİ.ARŞ.ETİK.KURUL.BŞK./050.99-79
Konu : Başvuru İncelemesi

27.05/2012

Sayın Prof. Dr. Mahmut COŞKUN

“ Antidepresan Olarak Kullanılan Essitalopram Etken Maddeli Cipraleks ve Doxepin Etken maddeli Sinequan İlaçlarının İnsan Periferik Lenfositlerinde *in Vitro* Genotoksik Etkileri.” başlıklı çalışmanızda Klinik Araştırmalar Etik Kurulu, etik kurallara aykırı bir husus bulunmadığına karar vermiştir.

Bilgilerinize rica ederim.


Prof. Dr. Hakkı Engin AKSULU
Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Hayal Tok

Doğum Yeri : İzmir

Doğum Tarihi : 07/09/1974

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi: ÇOMÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI -Diğer

- 1- Tok, H., Sevil, N., Özensoy Töz, S., Ertabaklar, H., Balcıoğlu, İ. C., Demir, S., Özbel, Y., Coşkun, M., 2009. Çanakkale İli Ayvacık Bölgesinde Zoonotik Visseral Leishmaniasisin Serolojik ve Entomolojik Olarak Araştırılması. *Türkiye parazitoloji Derg*,33 (2): 109-113.
- 2- Coşkun, M., Çayır, A., Coşkun, M., Tok, H., 2013. Evaluation of Background DNA Damage in a Turkish Population Measured by Means of the Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay. *Mutation Research*, 757: 23-27

b) Katıldığı Projeler

Pestisitlere Maruz Kalan Sera Çiftçilerinde Olası Sitogenetik Hasarın Periferal Kan Lenfositleri ve Ağız Mukoza Epitel Hücrelerinde Mikronukleus Frekansı ile Belirlenmesi, COMÜ-BAP

Antidepresan Olarak Kullanılan Essitalopram Etkin Maddeli Cipraleks ve Doxepin Etkin maddeli Sinequan İlaçlarının İnsan Periferal Lenfositlerinde *in Vitro* Genotoksik Etkileri, ÇOMÜ-BAP

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : 2009 yılından bu yana Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesinde çalışmakta.

İLETİŞİM

E-posta Adresi : hayaltok@gmail.com