ANTİDEPRESAN İLAÇ ETKEN MADDELERİ OLAN TRAZODONE VE MILNACIPRAN'IN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Ece AVULOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HAZİRAN 2012
ANKARA

Ece AVULOĞLU tarafından hazırlanan ANTİDEPRESAN İLAÇ ETKEN MADDELERİ OLAN TRAZODONE VE MILNACIPRAN'IN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ adlı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

DOÇ.DR. DENİZ YÜZBAŞIOĞLU …….

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Fatma ÜNAL ……...
Biyoloji, Gazi Üniveristesi

Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU …….
Biyoloji, Gazi Üniveristesi

Doç. Dr. Serkan YILMAZ …….
Sağlık Bilimleri, Ankara Üniveristesi

Tarih: 13/06/2012

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Bilal TOKLU ……
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

ECE AVULOĞLU

ANTİDEPRESAN İLAÇ ETKEN MADDELERİ OLAN TRAZODONE VE MILNACIPRAN'IN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Ece AVULOĞLU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2012

ÖZET

Trazodone ve Milnacipran psikiyatrik bozuklukların tedavisinde kullanılan iki antidepresan ilaç etken maddesidir. Bu çalışmada Trazodone ve Milnacipran'ın *in vitro* genotoksik etkileri, insan periferal kan lenfositlerinde, kromozom anormalliği (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve komet testleri kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca, Trazodone ve Milnacipran'ın mitotik indeks (Mİ), replikasyon indeksi (Rİ) ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) üzerine etkileri de incelenmiştir. Trazodone'un 3,13; 6,25; 12,50; 25,00; 50,00 ve 75,00 µg/ml'lik, Milnacipran'ın 2,5; 5,00; 10,00; 20,00; 30,00 ve 40,00 µg/ml'lik konsantrasyonları kullanılmıştır. Trazodone kromozomal anormallik ve kardeş kromatid değişimi frekansını negatif ve çözücü kontrole göre önemli düzeyde artırmıştır. Diğer bir antidepresan ilaç etken maddesi olan Milnacipran kromozomal anormallik ve kardeş kromatid değişimi frekansını negatif kontrole göre artırmıştır. Trazodone MN frekansını tüm konsantrasyonlarda artırmıştır fakat bu artış negatif kontrole göre en yüksek üç konsantrasyonda (25,00; 50,00 ve 75,00 µg/ml) istatistiksel olarak önemlidir. Çözücü kontrole göre ise hiçbir konsantrasyonda anlamlılık yoktur. Milnacipran mikronükleus frekansını tüm konsantrasyonlarda (2,5 µg/ml hariç) doza bağlı olarak önemli derecede artırmıştır. Tüm

uygulamalarda mitotik indeks anlamlı oranda düşmüştür, fakat bu düşüş doza bağlı değildir (Trazodone'un 24 saatlik uygulaması hariç). Tüm uygulamalarda replikasyon ve nükleer bölünme indeksleri etkilenmemiştir. Komet testi sonuçlarına göre Trazodone üç konsantrasyonda (6,25; 12,50 ve 25,00 µg/ml) kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentini negatif ve çözücü kontrole göre önemli oranda artırmıştır (kuyruk uzunluğu için çözücü kontrole kıyasla 6,25 µg/ml hariç). Bununla birlikte Trazodone'un en yüksek iki konsantrasyonu komet testinde toksiktir. Milnacipran ise tüm konsantrasyonlarında kuyruk uzunluğunu, kuyruk yoğunluğunu ve kuyruk momentini kontrole göre artırmıştır. Trazodone ve Milnacipran'ın *in vitro* insan lenfositlerinde klastojenik, mutajenik, anöjenik ve sitotoksik etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Bilim Kodu : **203.1.048**
Anahtar Kelimeler : **Trazodone, Milnacipran, Kromozomal anormallik (KA), Kardeş kromatid değişimi (KKD), Mikronükleus testi (MN), Komet testi**
Sayfa Adedi : **97**
Tez Yöneticisi : **Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU**

GENOTOXIC EVALUATION OF THE ACTIVE INGREDIENTS OF ANTIDEPRESSANT DRUGS, TRAZODONE AND MILNACIPRAN IN HUMAN PERIPHERAL LYMPHOCYTES
(M.Sc. Thesis)

Ece AVULOĞLU

GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
June 2012

ABSTRACT

Trazodone and Milnacipran are two active ingredients in antidepressant drugs which are used in the treatment of psychiatric disorders. In this study, the *in vitro* genotoxic effects of Trazodone and Milnacipran have been determined in human peripheral blood lymphocytes by using chromosome aberrations (CAs), sister chromatid exchanges (SCEs), micronuclei (MN) and comet assays. The effects of Trazodone and Milnacipran on mitotic index (MI), replication index (RI) and nuclear division index were also investigated. 3,13; 6,25; 12,50; 25,00; 50,00 and 75,00 µg/ml concentrations of Trazodone and 2,5; 5,00; 10,00; 20,00; 30,00 and 40,00 µg/ml concentrations of Milnacipran were used. Trazodone significantly increased the frequency of chromosome aberrations and sister chromatid exchanges compared with the negative and solvent control. The other active ingredient Milnacipran raised the chromosome aberrations and sister chromatid exchanges frequencies compared to negative control. Trazodone increased the MN frequency in all concentrations but this increase was statistically significant at the three highest concentrations (25,00; 50,00 and 75,00 µg/ml) compared to negative control. Compared to solvent control, this increase was not significant in all concentrations. Milnacipran significantly increased the frequency of micronuclei in all concentrations (except to 2,5 µg/ml) in a dose dependent manner. Mitotic index was significantly decreased at

all treatments but this decrease is not dose dependent (except treatment of Trazodone for 24 h). Replication and nuclear division indices were not effected at all treatments. According to the comet assay results Trazodone statistically increased mean comet tail intensity, tail length and tail moment at three concentrations (6,25; 12,50 and 25,00 µg/ml; but 6,25 µg/ml for tail lenght compared with solvent control) compared with negative and solvent control. Two highest concentrations (50 and 75 µg/ml) of Trazodone were toxic in comet assay. Milnacipran increased the comet tail intensity, tail length and tail moment at all concentrations. It is concluded that Trazodone and Milnacipran have clastogenic, mutagenic, aneugenic and cytotoxic effects on human lymphocytes *in vitro*.

Science Code : 203.1.048
Key Words :Trazodone, Milnacipran, Chromosomal aberration (CA) assay, Sister chromatid exchange (SCE) assay, Micronucleus (MN) assay, Comet assay
Page Number: 97
Adviser : Assoc. Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında her konuda beni destekleyen, tecrübesi, bilgileri ve önerileri ile yönlendiren, saygıdeğer hocam Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na; Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgi ve görüşlerinden her zaman yararlandığım hocam Prof. Dr. Fatma ÜNAL'a; benden yardımlarını esirgemeyen laboratuvardaki tüm Yüksek Lisans ve Doktora öğrencisi arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca eğitimim boyunca destekleri ile her zaman yanımda hissettiğim annem Semahat AVULOĞLU'na ve babam Turan AVULOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın bir bölümü, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 05/2010-44 No'lu projesiyle desteklenmiştir. Maddi katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi Rektörlüğü'ne de teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT vi

TEŞEKKÜR viii

İÇİNDEKİLER ix

ÇİZELGELERİN LİSTESİ xi

ŞEKİLLERİN LİSTESİ xii

RESİMLERİN LİSTESİ xiii

SİMGELER VE KISALTMALAR xiv

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Depresyon 3

2.2. Depresyonun Mekanizmaları 4

2.2.1. Stres ve depresyon 7

2.3. Antidepresanlar 8

2.3.1. Trazodone 11

2.3.2. Milnacipran 12

2.4. Genotoksisite Testleri 14

2.4.1. Kromozomal anormallik (KA) testi 16

2.4.2. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi 18

2.4.3. Mikronükleus (MN) testi 19

2.4.4. Komet testi 20

2.5. Antidepresan İlaçlarla Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları 22

3. MATERYAL VE METOT 27

3.1. Materyal 27

Sayfa

3.1.1. Kromozom incelemesi için materyal 27

3.1.2. Test materyali 27

3.2. Metot 29

3.2.1. Kültüre alınmış insan lenfositlerindeki çalışmalar 29

3.2.2. İzole edilmiş insan lenfositlerindeki çalışmalar..... 33

4. ARAŞTIRMA BULGULARI 35

4.1.Trazodone Uygulaması..... 35

4.2. Milnacipran Uygulaması 46

5.TARTIŞMA VE SONUÇ 56

KAYNAKLAR 81

ÖZGEÇMİŞ 96

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.1. Trazodone uygulaması ile insan periferal lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları…….....36

Çizelge 4.2. Trazodone'nun insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi.....40

Çizelge 4.3. Trazodone'nun insan lenfositlerinde mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi.....43

Çizelge 4.4. Trazodone ile insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı.....45

Çizelge 4.5. Milnacipran uygulaması ile insan periferal lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları.....47

Çizelge 4.6. Milnacipran'ın insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi.....50

Çizelge 4.7. Milnacipran'ın insan lenfositlerinde mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi.....52

Çizelge 4.8. Milnacipran ile insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı.....54

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 3.1. Trazodone'nin moleküler yapısı.....28

Şekil 3.2. Milnacipran'ın moleküler yapısı.....28

Şekil 4.1. Trazodone ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki anormal hücre frekansı.....37

Şekil 4.2. Trazodone ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki kardeş kromatit değişimi frekansı.....41

Şekil 4.3. Trazodone ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki mitotik indeks frekansı.....41

Şekil 4.4. Trazodone ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki mikronükleus frekansı.....43

Şekil 4.5. Trazodone ile muamele edilmiş insan lenfositlerinde oluşan komet kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti.....45

Şekil 4.6. Milnacipran ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki anormal hücre frekansı.....48

Şekil 4.7. Milnacipran ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki kardeş kromatit değişimi frekansı.....51

Şekil 4.8. Milnacipran ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki mitotik indeks frekansı.....51

Şekil 4.9. Milnacipran ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki mikronükleus frekansı.....53

Şekil 4.10. Milnacipran ile muamele edilmiş insan lenfositlerinde oluşan komet kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti.....54

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 4.1. Trazodone ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri.....37

Resim 4.2. Trazodone ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimleri.....42

Resim 4.3. Trazodone ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen mikronükleuslu binukleat hücreler.....44

Resim 4.4. Trazodone ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının komet testi ile görünümü.....46

Resim 4.5. Milnacipran ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri.....48

Resim 4.6. Milnacipran ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimleri.....52

Resim 4.7. Milnacipran ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen mikronükleuslu binukleat hücreler.....53

Resim 4.8. Milnacipran ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının komet testi ile görünümü.....55

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	**Açıklama**
%	Yüzde
µl	Mikrolitre
°C	Santigrat derece
µg/ml	Mikrogram/ Mililitre
mg/kg	Miligram/kilogram
µmol/litre	Mikromolar/litre
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
mg	Miligram
rpm	Devir sayısı
V	Volt
mA	Miliamper

Kısaltmalar	**Açıklama**
5-HT	Serotonin
BNDF	Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
BrdU	Bromodeoksiüridin
CHL	Çin hamsteri akciğer hücreleri
CHO	Çin hamsteri ovaryum hücreleri
Cyt-B	Sitokalasin-B
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleikasit
DPX	Depex
EDTA	Etilendiaminotetra asetik asit

Kısaltmalar	Açıklama
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromotografisi
KA	Kromozoamal anormallik
KCl	Potasyum klorür
KKD	Kardeş kromatid değişimi
MAO	Monoamin oksidaz
Mİ	Mitotik indeks
MMC	Mitomycin-C
MN	Mikronükleus
NA	Noradrenalin
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NBİ	Nükleer bölünme indeksi
NRI	Seçici norepinefrin geri alım inhibitörü
PBS	Fosfat Tamponu
Rİ	Replikasyon indeksi
SNRI	Serotonin norepinefrin geri alım inhibitörü
SSC	Salin sitrat tamponu
SSRI	Seçici serotonin geri alım inhibitörü
TCA	Trisiklik antidepresan

1. GİRİŞ

Dünyada gittikçe artış gösteren sağlık sorunlarından biri olan depresyon, kompleks psikolojik bir rahatsızlıktır. Bu rahatsızlığa sahip bireylerde tipik olarak aşırı alınganlık, sıkıntı, bitkinlik, uykusuzluk, psikomotor değişimler, suçluluk duygusu, kendine güvensizlik, konsantrasyon bozukluğu ve öğrenme güçlüğü ile ölüm ve intiharı düşünme gibi belirtiler gözlenir. Bu hastalık, diğer birçok hastalıkta olduğu gibi iç veya dış faktörlerden kaynaklanabilir (Corcos ve ark., 2000).

Dünya Sağlık Örgütü, 2020 yılında depresyonun, stres ve kardiyovasküler sistem ile ilişkili komplikasyonlar nedeniyle, ölüme yol açan hastalıkların arasında ikinci sırada olacağını öngörmektedir (Kotan ve ark., 2009). Yine Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre depresyon tüm dünyada dördüncü hastalık yükü nedenidir. Bu hesaplama, kişisel, sosyal ve ekonomik rahatsızlık fonksiyon ve üreticilik kaybı ve yardım gereksinimi niteliklerine dayanarak yapılmaktadır. Depresyon tedavisinde farmakolojik yöntemlerin ve psikoterapilerin etkinliği kanıtlanmıştır. Ancak tüm dünyada gerek depresyonun yaygınlığı ve gerekse hasta sayısının fazlalığına karşı psikoterapi yapabilecek personelin sayıca yeterli olmaması ve ekonomik nedenlerden dolayı, depresyon tedavisinde en çok kullanılan yöntem antidepresan ilaçların reçete edilmesidir (Çetin ve Açıkel, 2009).

Antidepresan ilaçların kullanılmasındaki amaç, hastanın günlük yaşamını en az bozan etkiyle, en iyi sonucu elde etmektir (Freeling ve Tylee, 1992). İlaç geliştirme alanında bir ilacın faydalı etkileri ile toksik özellikleri arasında denge olmasına dikkat edilir. Bir ilacın yan etkilerinin belirlenmesi amacıyla klinik öncesi toksisite değerlendirmesi yapılır. Bu değerlendirme hem akut ve kronik toksisitenin belirlenmesini hem de genotoksik ve karsinojenik etkinin belirlenmesini içerir. Genotoksik potansiyelin belirlenmesi, klinik öncesi ilaç geliştirilmesinde aday bileşiklerin toksisitesinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Genotoksisite testlerinde pozitif sonuçların bulunması ilaç geliştirme çalışmalarında genellikle bileşiğin sentezinin durdurulmasına yol açar (Joosten ve ark., 2004; Dorn ve ark., 2007). Dünyada hala pek çok ilaç etken maddesinin genotoksik etkili olup olmadığı

bilinmemekte ve bu ilaçların dikkatsiz bir şekilde kullanımına devam edilmektedir. Bu nedenle bilim adamları, çeşitli ilaç etken maddelerinin olası klastojenik, mutajenik ve genotoksik etkilerini *in vivo* ve *in vitro* test yöntemleriyle belirlemeye çalışmışlardır. Yapılan çalışmalar sonucunda, pek çok ilaç etken maddesinin mutajenik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Ryan ve ark., 2001; McPherson, 2003; Steingart ve ark., 2003; El-Zein ve ark., 2005; Brambilla ve ark., 2009; Madrigal-Bujaidar ve ark., 2010; Hassanane ve ark., 2012).

Son yıllarda çeşitli kimyasal maddelerin insan genomunda hasara sebep olup olmadıklarının ortaya çıkarılmasında, kısa süreli genotoksisite testleri olan kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) testleri insan lenfosit kültüründe yaygın olarak kullanılmaktadır. Kimyasalların primer DNA hasarını indükleyip indüklemediği ise, komet testi kullanılarak belirlenmektedir.

Bu çalışmanın amacı, yaygın kullanımlarına rağmen genetik etki yönünden az sayıda çalışma bulunan antidepresan etken maddeleri olan Trazodone ve Milnacipran'ın genotoksik etkilerini, *in vitro* koşullarda, insan lenfositlerinde kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatit değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve komet testi ile araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Depresyon

İnsanlık tarihi kadar eski olan depresif bozukluğun etiyolojisini açıklamaya yönelik görüşler Hippocrates'a (M.Ö. 460-357) kadar uzanır. Depresyonla ilgili çalışmalar günümüzde özellikle moleküler biyoloji ve beyin görüntüleme tekniklerindeki gelişmeler sayesinde oldukça yol katetmiştir. Binlerce yıldır bilinen depresyonla ilgili bilgiler arttıkça, etiyolojisi ile ilgili çeşitli görüşler ortaya çıkmış, çok çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Bunların amacı depresyonun patogenezini aydınlatmak, klinik belirtilerle aralarında bağ kurmak, depresyonun tedavisi için yeni imkanlar ortaya koymaktır (Balcıoğlu, 1999).

Normal bir duygu, bir semptom ve sendrom grubu olarak ele alınabilecek olan depresyon, psikolojide bilişsel, algısal ve/veya motor performansta azalmayı anlatmak için kullanılır. Klinik psikiyatride ise normal duygu oynamalarından melankoliye (psikotik) kadar uzanan geniş bir yelpazedeki değişiklikleri içerir. Bir sendrom olarak depresyonda, değersizlik ve suçluluk duyguları, ümitsizlik, çaresizlik, ilgisizlik, isteksizlik, intihar düşünceleri, anksiyete gibi belirtilerin yanı sıra iştahsızlık, kilo değişiklikleri, kabızlık, psikomotor retardasyon ya da ajitasyon, başağrısı ve diğer bedensel belirtilerle giden bir tablo ortaya çıkar (Tunçer, 1999).

Depresyon, sık görülen ve genellikle tekrarlamalarla seyreden bir ruhsal hastalıktır. Bu özellikleri ile yeti yitiminin de önde gelen nedenlerinden birisi olmaktadır. Yaşam boyu sıklığının ortalama % 15-17 arasında olduğu tahmin edilmektedir (Özyüksel ve Uluğ, 2007).

Ruh sağlığı alanındaki çalışmalara göre psikotik bozukluklar için en önemli risk etkenleri arasında ebeveyn ve/veya kardeşlerdeki psikiyatrik bozukluklar, çocukluk çağı olumsuz yaşam olayları ve erkek cinsiyet saptanmıştır. Farklı ülkelerde yapılan yaygınlık araştırmalarında cinsiyetler arasında fark saptanmasa da, sıklık araştırmaları erkeklerin şizofreni geliştirme riskinin kadınlara göre daha fazla

olduğunu işaret etmektedir. Kısa psikotik bozukluk tanısını ise kadınlar erkeklere göre daha fazla almaktadır (Binbay ve ark., 2011).

Türkiye'deki epidemiyolojik çalışmaların sonuçlarına göre toplum içinde klinik düzeyde depresyon prevalansı %10 dolayındadır ve hastaların yaklaşık üçte birinde ise depresyon kronikleşmiştir. Dünya nüfusunun ise yaklaşık %21' i depresyondan etkilenmiştir (Kotan ve ark., 2009).

2.2. Depresyonun Mekanizmaları

Psikiyatrik bozuklukların ortaya çıkmasında genetik etkilerin rol oynadığı uzun zamandır bilinmektedir. Özellikle monozigotik ikizlerde psikiyatrik tabloya daha sık rastlanması; aile prevalansının, populasyon prevalansından daha yüksek değerler göstermesi bu düşünceyi desteklemektedir. Psikiyatrik bozukluklardan sorumlu olan genlerin belirlenmesi için bağlantı çalışmaları yapılmış ve bu çalışmalar sonucunda psikiyatrik bozuklukların Mendelyan kalıtım şekli göstermediği ortaya çıkmıştır. Bağlantı çalışmaları sonucunda tek bir mutasyonun sorumlu olmadığı anlaşılınca, hasta kontrol çalışmaları önem kazanmıştır. Diyabet, hipertansiyon gibi hastalıklarda olduğu gibi psikiyatrik hastalıklarda da genetik geçiş komplekstir ve birçok gen hastalığın oluşumuna katkıda bulunabilir yani poligeniktir (Tarhan ve Çetin, 1993; Balcıoğlu, 1999).

Depresyonun tedavisinde, ilaçlar, psikoterapi, diyetin düzenlenmesi, egzersiz ve uykunun düzenlenmesi gibi yöntemler kullanılır. Klinikte kullanılan antidepresan ilaçlar doğrudan veya dolaylı olarak dopamin, noradrenalin veya serotoninin beyindeki etkilerini artırarak işlev gösterirler (Stahl, 2003).

Depresyonun biyolojik nedenleri hakkındaki ilk kuram 1970'li yıllarda geliştirilen depresyonun başta noradrenalin (NA) ve serotonin (5 HT) olmak üzere monoamin nörotransmiterlerin yetersizliğine bağlı olduğunu ileri süren "Monoamin Hipotezi" ne dayanmaktadır. Bu nörotransmiterleri tüketen belirli ilaçlar depresyona yol

açabilmektedirler. O dönemde bilinen antidepresanların (trisiklik antidepresanlar ve monoamin oksidaz (MAO) inhibitörleri) her ikisinin de bu nörotransmiterleri güçlendiren farmakolojik etkileri vardır. Dolayısıyla, düşünülen monoamin nörotransmiterlerin "normal" miktarının, belki bilinmeyen bir hastalık süreci, stres veya ilaçlarla bir şekilde tükendiği ve bu şekilde depresyon belirtilerine yol açtığı yönündedir. Monoamin hipotezi, depresyon için aşırı basit bir hipotez olsa da dikkatleri noradrenalin, dopamin ve serotonin monoamin nörotransmiterlerine çekmesi nedeniyle önemlidir (Stahl, 2003). Ayrıca bilinen antidepresanların bu üç monoamin nörotransmiter sisteminden biri veya daha fazlasında nörotransmisyonu arttırıcı yönde etkili olmasını sağlayan mekanizmaların daha iyi anlaşılmasını sağlaması nedeniyle çok faydalı olmuştur. Serotonin, noradrenalin ve dopamin dışında asetilkolin, gama amino-bütirik asit ve glutamat da depresyon patogenezinde rol alan nöral ileticilerdendir (Kotan ve ark., 2009).

Depresyonun monoamin teorisi, hastalığı basite indirgemektedir çünkü antidepresan ilaçların nörotransmitterlerin sinir hücresine alımı dışında pek çok başka biyolojik sistemi de etkiledikleri bilinmektedir (Tümkaya ve ark., 2005). Klinik uygulamada da ortaya çıkan bazı sorunlar monoamin hipotezinin geliştirilmesi ihtiyacını ortaya çıkarmıştır.

Bu hipotezin açıklamada yetersiz kaldığı noktalar şu şekilde özetlenebilir:

1. Antidepresan ilaçlar verildikten sonra birkaç saat içinde sinaptik aralıkta ve sinaps öncesi nöron içindeki kimyasal iletici miktarları artar. Oysa klinik düzelmenin ortaya çıkması için 1–4 hafta süre geçmesi gerekir.
2. Mianserin ve iprindol gibi monoaminlerin geri alınmasına etkili olmayan birçok bileşik antidepresan özelliklere sahiptir.
3. Monoaminlerin geri alınmasını inhibe eden amfetaminler ve kokain gibi bileşiklerin antidepresan özellikleri yoktur (Kırlı, 2002).

Bu veriler antidepresan etkinin mekanizmasının sadece sinaptik aralıktaki monoamin miktarlarının artırılmasıyla açıklanamayacağını göstermektedir. Bu yüzden teorik düşünceler ve araştırmalar monoamin miktarlarından, antidepresanların uzun süreli kullanımı sonrası ortaya çıkan ikincil reseptör değişikliklerine yönelmiştir.

“Nörotransmiter Reseptörü Hipotezi” bu çalışmaların sonucunda oluşmuştur. Bu hipoteze göre monoamin nörotransmitterlere ait reseptörlerin anormalliği depresyona yol açar. Nörotransmitter reseptörlerindeki böyle bir bozukluk, monoamin nörotransmitterlerin azalmasına, reseptörlerin kendilerindeki anormalliklere veya nörotransmitterin mesajının reseptörden daha sonraki olaylara iletilmesindeki sinyal iletim problemlerine bağlı olabilir (Kotan ve ark., 2009).

Gen regülasyonunu kontrol eden intraselüler transkripsiyon faktörlerinin oluşumuna yol açan ikinci haberci sistemler, monoamin sistemlerinin yetersiz çalışmasını açıklayabilirler. Bu durum “Gen Ekspresyonunun Monoamin Hipotezi”nin oluşmasına yol açmıştır. Bu hipoteze göre, monoamin düzeylerinin ve monoamin reseptörü sayılarının görüntüde normal olmalarına karşın, monoaminlerin kendilerinde ve reseptörlerinde moleküler kaynaklı bir yetersizlik nedeniyle depresyon oluşmaktadır. Monoamin reseptörlerinden sinyal iletimindeki olası bir bozukluğun yeri olarak önerilen bir aday mekanizma, beyin kaynaklı nörotrofik faktörün (BNDF) hedef genidir (Stahl, 2003).

Depresyonu tekrarlayan ve dirençli hastalarda, tek uçlu depresyonda ve uzun süre depresyon geçiren hastalarda yapılmış bazı çalışmalarda hipokampus hacminde azalma gözlenmiştir. Buna karşın genç, daha az depresyon atağı geçirmiş ve hastalık süresi kısa olanlarda hipokampus hacminde bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Bu veriler depresyonun doğrudan monoaminler gibi nörokimyasalların sinaptik etkinliklerindeki değişmeler kadar, hipokampus gibi önemli santral bölgelerde yapısal değişiklikler ve dejenerasyonlarla da ilişkili olabileceği gerçeğine işaret etmektedir (Sala ve ark., 2004). Bu gözlemlerden hareketle 1990’ların ikinci yarısından itibaren depresyonun etki düzeneği nöroplastisitede değişiklik ile açıklanmaya çalışılmış ve ‘Depresyonda Nöroplastisite Hipotezi’ ileri sürülmüştür. Bu hipotez depresyonu sinaptik aralığa salıverilen nörotansmitterlerin miktarı, metabolizması ve postsinaptik bölgeyi reseptörler aracılığıyla veya başka yollarla etkilemelerinden daha çok beyindeki bazı yapısal değişikliklerle açıklar. Bu yapısal değişiklikler sonucu hipokampus gibi bazı kritik bölgelerde yeniden şekillenme gözlenir. Bu yeniden şekillenme beyin nöroplastisitesinde değişmenin bir sonucu

olarak ortaya çıkmaktadır. Antidepresan tedavi, depresyon sırasında bozulan monoaminerjik dengeyi sağlamasının yanı sıra öncelikli olarak yeniden şekillenmeyi eski konumuna getirir. Nöroplastisite hipotezi depresyonun ortaya çıkışı ile ilgili olarak günümüzde geçerli olan hipotezdir. Ancak depresyonun altında yatan nörobiyolojik değişiklikler hakkında halen çok az şey bilinmektedir (Fuchs ve ark., 2004).

2.2.1. Stres ve depresyon

Stresin çok çeşitli tanımları yapılmıştır. En genel anlamıyla stres kişiye güç gelen, baskı ve engellenme yaratan, çıkmaza sokan, çaresizliğe sürükleyen, acı veren, bunaltı ve üzüntü verici yaşam olaylarıdır. Stresin en kapsamlı tanımı ise Folkman ve Lazarus tarafından ortaya konmuştur. Folkman ve Lazarus'a göre stres "kişi-çevre etkileşiminde, kişinin uyumunu tehlikeye sokan ve mevcut kaynakları zorlayan ya da aşan çevre talepleridir" (Tuğrul, 2000).

Depresyonun başlaması ve sürmesinde stresin önemli bir rolünün olduğu bilinmektedir. Ancak çevresel stresörlerin depresyondaki etkisi de genetik yatkınlıktan etkilenir. Çünkü genetik yatkınlık, sadece depresyona eğilimli oluşu değil, aynı zamanda bireyin strese cevabının doğasını ve hatta stresli olaylara maruz kalma ihtimalini bile değiştirebilir. Depresyon ataklarından önce birçok kez şiddetli bir stresörün olduğu ve erken çocukluk döneminde yaşanan olumsuz deneyimlerin erişkin hayatta depresyon riskini arttırdığı bilinmektedir. Genetik ve genetik olmayan (erken yaşam olayları gibi) faktörlerin birbirlerini tamamlayıcı biçimde, perinatal periyottan peripubertal periyoda kadar uzanan bir gelişimsel dönem boyunca etkileşerek, bireyin depresyona yatkınlığını veya çevresel stresörlere karşı kırılganlığını arttırdıkları düşünülmektedir. Hatta annenin gebeliği süresince yaşadığı stres ve anksiyetenin bile çocuğun beyin gelişimini etkileyebileceği ve ileride depresyon ve diğer psikiyatrik hastalıklara yatkınlık oluşturabileceği öne sürülmektedir (Eşel, 2002).

2.3. Antidepresanlar

Antidepresanlar depresyon ya da distimi gibi rahatsızlıkların tedavisinde bir çok hastaya uygulanan ve uzun süreli kullanılan ilaçlardır (Brambilla ve ark., 2009). Antidepresan ilaçlar enzim ya da reseptör inhibitörleri ve geri alım engelleyicileri olarak etkilerini gösterirler. Antidepresanlar, ilacın kimyasal yapısı ve oluşturduğu duygu durumuna bağlı olarak birçok şekilde sınıflandırılabilir (Hassanane ve ark., 2012). Bu amaçla kullanılan antidepresanlar sekiz grup altında toplanabilir (Richard ve Shelton, 2003; Örsel, 2004);

1. Trisiklik antidepresanlar (TCA)

    - Amitriptilin
    - Amoksapin
    - Desipramin
    - Doksepin
    - İmipramin
    - Maprotilin
    - Nortriptilin
    - Protriptilin
    - Trimipramin
    - Opipramol
    - Klomipramin

2. Monoamin oksidaz inhibitörleri (MAO)

    - İzokarboksazid
    - Fenelzin
    - Tranilsipromin
    - Moklobemid

3. Seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI)

- Fluoksetin
- Paroksetin
- Sertralin
- Fluvoksamin
- Essitalopram
- Sitalopram

4. Serotonin-norepinefrin geri alım inhibitörleri (SNRI)

   - Venlafaksin
   - Milnacipran
   - Duloksetin

5. Dopamin-norepinefrin geri alım inhibitörleri
   - Bupropion

6. Serotonerjik antidepresanlar (serotonin geri alım inhibitörleri)

   - Nefazodone
   - Tianeptine
   - Trazodone
   - Gepirone

7. Noradrenerjik ve serotonerjik antidepresanlar (Alfa 2 adrenoreseptör antagonistleri, NaSSA)

   - Mianserin
   - Mirtazapin

8. Seçici norepinefrin geri alım inhibitörleri (NRI)

- Reboksetine
- Maprotilin

Trisiklik antidepresanlar (TCA) monoamin taşıyıcı pompalarını bloke ederek sinaptik aralıkta monoamin nörotransmiterlerini arttırma yolu ile depresyonun iyileşmesini sağlarlar (Kotan ve ark., 2009).

Monoamin oksidaz (MAO) inhibitörleri ise monoamin nörotransmiterleri parçalayan MAO (monoaminoksidaz) enzimini inhibe ederek hastalığın düzelmesini sağlarlar (Kotan ve ark., 2009).

Seçici serotonin geri alım engelleyicileri (SSRI) grubu antidepresanlar etkilerini, merkezi sinir sisteminde sinaps aralığına salıverilerek nörondan nörona impuls iletimini gerçekleştiren nörotransmitterlerden serotoninin (5-hidroksitriptamin;5-HT) perisinaptik hücreye geri alımını engelleyerek gösterirler (Preskorn, 1996).

Bu gruptaki antidepresan ilaçların etki mekanizması şöyledir:

1. Serotonin mesajlarının gönderilmesiyle, serotonin paketleri hücreden salıverilir.
2. Serotonin sinaps aralığına geçer ve sinyal gönderen reseptörlere bağlanır.
3. Sinyal gönderildikten sonra orijinal hücre kullanılmayan serotonini geri absorbe ederek temizler (Preskorn, 1996).

Serotonin-norepinefrin geri alım inhibitörleri (SNRI) serotonin ve noradrenalinin geri alımını iki yönlü ve selektif olarak inhibe ederler (Morishita ve Arita, 2003; Akpınar, 2009).

Dopamin-norepinefrin geri alım inhibitörleri grubunun tek örneği olan bupropion, antidepresan olarak kullanımından çok sigara bırakma tedavisinde etkilidir. Bupropion dahil olduğu grubun adından da anlaşılacağı üzere dopamin ve norepinefrinin sinaptik boşluktan geri alımını engelleyerek işlev görür (Evren, 2001; Örsel, 2004).

Serotonerjik antidepresanlar hem serotonin reseptörlerini hem de serotonin geri alımını inhibe ederler (Örsel, 2004).

Noradrenerjik ve serotonerjik antidepresanlar diğer antidepresanlardan farklı olarak monoaminleri veya monoamin geri alım pompalarını inhibe etmeden serotonin ve noradrenalin düzeylerini arttırırlar (Örsel, 2004).

Seçici norepinefrin geri alım inhibitörleri (NRI) sinaptik boşluktaki noradrenalin geri emilimini çok güçlü olarak inhibe ederken serotonin geri alımı üzerine çok az etkiye sahiptir. Daha ötesi dopamin veya asetilkolin gibi pek çok reseptöre afiniteleri çok azdır (Tural, 2002).

2.3.1. Trazodone

Trazodone serotonerjik antidepresanlar grubunda yer alan bir selektif triazolopridin türevidir. Ancak 5-hidroksitriptaminin (5-HT = serotonin) geri alımını zayıf bir şekilde inhibe eder ve hem presinaptik hem de postsinaptik reseptörler için bir alfa-adenoreseptör antagonistidir (Riblet ve Taylor, 1981). Bu nedenle trisiklik antidepresanlardan (TCA) ve selektif serotonin geri alım inhibitörlerinden (SSRI) farklıdır (Davis, 2007; Jarema ve ark., 2011).

Düşük dozlarda verilen Trazodone 5-HT_{2A} ve 5-HT_{2C} olarak adlandırılan postsinaptik serotonin reseptörlerini bloke eder. Yüksek dozlarda ise sinaptik serotonini arttıran serotonin geri alım inhibitörü olarak davranır (Davis 2007). Trazodone'nin bu etkilerinin altında yatan farmakalojik mekanizma net olarak bilinmemektedir (Kraus ve ark., 2007; Jarema ve ark., 2011).

HPLC (high performance liquid chromatography; yüksek performanslı sıvı kromotagrafisi) metodu kullanılarak yapılan bir çalışmanın sonucuna göre Trazodone ratların frontal korteksinde ekstraselüler serotonin artışına neden olmuştur (Pazzagli ve ark., 1999).

Trazodone'nin major depresyonda ve depresif bozuklukların diğer alt tiplerinde etkin olduğu görülmüştür. Ancak genellikle uykusuzluk ve anksiyete ile ilişkili semptomların giderilmesinde daha yararlı olduğu bildirilmiştir. SSRI'lar ve MAO inhibitörleri gibi diğer antidepresanların aksine sedatif bir etkiye sahiptir ve uyku sürekliliğini arttırır. Ayrıca Trazodone şizofrenik hastalarda görülen semptomları ağırlaştırmaz (Kandagal ve ark., 2007; Kraus ve ark., 2007).

Trazodone en yüksek plazma konsantrasyonuna 0.5- 2 saatte ulaşarak çok hızlı bir şekilde absorbe edilir. İlacın ve metabolitlerinin yarı ömrü 13 saattir. Trazodone kapsamlı bir şekilde metabolize edilir ve esas olarak böbrekler yoluyla atılır.

Trazodone'un karsinojenitesinin incelendiği yalnızca bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaya göre Trazodone'un ratlarda karsinojenik olmadığı açıklanmıştır (Brambilla ve ark., 2009). Trazodone'un karsinojenitesi veya genotoksisitesi ile ilgili başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma Trazodone'un insan lenfositlerinde genotoksik etkilerinin incelendiği ilk çalışmadır.

2.3.2. Milnacipran

Milnacipran serotonin ve noradrenalin geri alımını selektif ve iki yönlü olarak inhibe eden yeni kuşak antidepresanlardandır (Morishita ve Arita, 2003; Akpınar, 2009). Serotonin ve noradrenalin reseptörlerine etkisinden dolayı tedavideki etkileri trisiklik antidepresanlara benzemektedir. Buna karşın diğer reseptörlere etki etmemesi ile belirgin düşük yan etki profili bulunmaktadır. En sık görülen yan etkileri; bulantı, konstipasyon, ağız kuruluğu, insomnia, baş dönmesi ve terlemedir (Stahl ve ark., 2005; Akpınar, 2009).

Erişkinlerde majör depresyon ataklarının tedavisinde kullanılır. Milnacipran oral uygulamayı takiben hızla emilir ve yarı ömrü 8 saattir. Biyoyararlanımı yaklaşık %85'dir. Milnacipran esas olarak glukronik asit ile konjugasyon yoluyla metabolize olur. Sitokrom P 450 enzimleri ile etkileşimi bulunmamaktadır. Klinik etkinliği

olmayan çok az miktarda aktif metabolit teşhis edilmiştir (Stahl ve ark., 2005; Akpınar, 2009; EMEA, 2010).

Milnacipran'ın doz ve etkinliği arasındaki ilişki ile bu ilaca yanıtın belirleyicilerinin incelendiği bir çalışmada hastalara verilen günlük 50 ve 100 mg'lık dozlar arasında bir farklılık görülmemiştir. Ancak 100 mg'lık dozda ilacın etkinliğinin başlaması daha hızlı olmuştur. Yaş ve hastalık öyküsünün Milnacipran için belirleyici olduğu görülmüştür (Morishita ve Arita, 2003).

Milnacipran'ın diğer antidepresan ilaçlarla karşılaştıran bir meta-analiz çalışmasında randomize kontrollü deneyler dikkate alınmış, toplam 2277 vakanın ele alındığı 16 çalışma değerlendirilmiştir. Klinik düzelme ve genel kabul edilebilirlik açısından Milnacipran ve diğer antidepresanlar arasında fark bulunamamıştır. Bununla birlikte, yan etkiler nedeniyle tedaviyi bırakma açısından Milnacipran'ın TCA'lara göre daha üstün olduğu bildirilmiştir (Nakagawa ve ark., 2008; Çetin ve Açıkel; 2009).

Milnacipran'ın tek doz toksisitesi ile ilgili bir rapora göre yaklaşık lethal dozlar 140-215 mg/kg olup, bu değer fare ve ratlarda benzer görünmektedir (EMEA, 2010).

Milnacipran'ın tekrarlayan doz toksisitesi çalışmaları rat ve maymunlara oral uygulama ile (140-215 mg/kg) yapılmış, sözkonusu tüm hayvan türlerinde, baskın olarak erkeklerde Milnacipran'ın karaciğer üzerine toksik etkisi gözlenmiştir. Erkek ratlarla yapılan bir tekrarlayan doz çalışmasında karaciğere etkileri reversibilite (geri çevrilebilirlik) göstermiş ancak, incelenen dişi rat ve diğer hayvan türlerinde karaciğer reversibilitesi ile ilgili kesin bir sonuç çıkmamıştır (EMEA, 2010).

Milnacipran'ın genotoksisitesiyle ilgili insan lenfositlerinde yapılan çalışma bulunmamaktadır. Ancak bu ilaçla ilgili EMEA'nın 2010 yılında yayınladığı bir raporda Milnacipran'ın standart bir genotoksisite testiyle incelendiği ve genotoksik potansiyeli ile ilgili herhangi bir kanıt saptanmadığı bildirilmiştir. Fakat söz konusu genotoksisite testinin içeriği ile ilgili herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Yine aynı rapora göre fare ve ratlarda Milnacipran'la yaşam süresince yapılan karsinojenite

çalışmalarında ise karaciğer ağırlığında artış ve sentrilobüler hipertrofi gözlenmiştir. Fakat tümör insidansında kontrol gruplarına göre bir artış belirlenmemiştir. Transgenik Tg.rasH2 farelerinde yapılan çalışmada yalnızca dişilerde, farklı dokularda hematanjiyosarkom oluşumu kontrollere göre hafif bir artış göstermiştir (EMEA, 2010).

2.4. Genotoksisite Testleri

Günümüzde kimyasal madde kullanımının her alanda hızla artması sonucunda bu kimyasal maddelerin insan genomunda olumsuz etkileri olup olmadığının bilinmesi son derece önem kazanmıştır. Söz konusu hasarlar hem bireyin kendisini, hem de ileriki jenerasyonları etkileyebilecek anormallikler ortaya çıkarabilir. Bunun için kimyasal maddelerin genotoksik etkilerinin araştırılmasında farklı canlı gruplarını kapsayan çeşitli test metotları geliştirilmiştir. Kısa süreli mutajenite ve kanserojenite testleri olarak bilinen bu metotlar, bir kimyasalın potansiyel mutajen ve kanserojen olup olmadığının belirlenmesinde kullanılmaktadır (Cavallo ve ark., 2005).

Genetik toksikoloji testleri çeşitli maddelerin mutasyonlara, kromozom anormalliklerine veya DNA hasarlarına neden olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılmaktadır. Bu testler 1970'lerin sonundan beri kimyasalların güvenirliğinin değerlendirilmesinde temel noktayı oluşturmaktadır (Zeiger, 2010). Çünkü genotoksisite testleri çeşitli mekanizmalarla insan genomuna hasar veren maddelerin tespit edilmesini sağlar (Speit ve Henderson, 2005).

İlaçların genotoksisite testleri ile ilgili mevcut kurallar bazı standart testlerin yapılmasını zorunlu kılmaktadır. Bunlar;

- Bakterilerde gen mutasyon testi
- Memeli hücrelerinde *in vitro* kromozomal hasarın sitogenetik değerlendirmesi veya *in vitro* memeli hücrelerinde gen mutasyonu testi
- Rodent hematopoietik hücreleri kullanılarak *in vivo* kromozomal hasar testi

İlaçların karsinojenite testleri ile ilgili mevcut kurallar rodentlerde uzun süreli karsinojenite çalışmalarının tüm ilaçlar için yapılması gerektiğini belirtmektedir (Brambilla ve ark., 2009). Bu nedenle diğer birçok kimyasal madde gibi antidepresan ilaçların da potansiyel genotoksik, mutajenik, kanserojenik ve teratojenik etkilerinin olup olmadığının belirlenmesi için çeşitli testler yapılmaktadır.

Birçok mikroorganizma ve maya hücresi gen mutasyonlarını belirlemek için uygundur. Bu amaçla en çok kullanılan yöntemlerden biri Ames testidir. Deneme organizması olarak, histidine bağımlı *Salmonella* veya triptofana bağımlı *E.coli* soyları kullanılır. Sözkonusu aminoasitler hücrenin büyümesi ve yaşaması için elzemdir. Eğer hücre bu aminoasiti sentezleyebiliyorsa minimal besi ortamında yaşayabilir. Fakat hücre bu aminositler için mutant ise sadece besi ortamına bu maddeler eklenince yaşamını sürdürebilir. Buradan yola çıkarak önce bakterilerin onarım mekanizması etkisiz hale getirilerek bir aminoaside bağımlı hale getirilir. Daha sonra da bakteriler kimyasal bir maddeye maruz bırakılarak mutajenitenin varlığı belirlenir. Bakteriyel denemeler kimyasalların çok farklı dozları için uygulama imkanı verir ve uygulanması fazla masraflı değildir (Ames ve ark., 1975; Zeiger, 2010).

Mayalar fizyolojik açıdan dayanıklı organizmalar olup, ökaryot oldukları ve yüksek yapılı organizmaların hücre yapılarına benzerlik gösterdikleri için çok fazla kullanılan gruplardan birisidir. *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces pompe* en fazla kullanılan türlerdir. *Saccharomyces pompe*'nin sadece haploid formlarında, *Saccharomyces cerevisiae*'nin ise hem diploid hem de haploid formlarında gen mutasyonları için genotoksisite testleri yapılmaktadır (Buschini ve ark., 2003).

Kısa süreli genotoksisite testlerinden bir diğeri de *Allium* testidir. *Allium* testi, çeşitli maddelerin sitotoksik ve/veya genotoksik etkilerinin belirlenmesi için sıklıkla kullanılmaktadır. Yüksek yapılı bitkiler kromozomlarının boyutlarından dolayı sitolojik analizler için uygundur (Fiskesjö, 1985). *Allium* testinde *Allium sativum, Allium cepa* ve *Vicia faba* en çok kullanılan bitkilerdendir (Duhova, 1993; Helvacı, 2003). *Allium* testini ilk kez 1938 yılında Levan kullanmış ilerleyen yıllarda da bu

metot geliştirilerek değişik kimyasalların toksisitesinin belirlenmesinde standart bir yöntem olarak kullanılmaya başlanmıştır (Fiskesjö, 1985; Rank ve Nielson, 1993). *Allium* testi uygulanması kolay ve ucuz bir testtir ve özellikle memeli test sistemleriyle iyi bir korelasyon göstermektedir (El-Shabhaby ve ark., 2003).

In vivo mutajenite testlerinde, mutajenik etkisi araştırılacak madde deney hayvanlarına belli dozlarda verilmektedir. Bu testlerde genellikle böcek ve memeliler yaygın olarak kullanılır. En yaygın böcek deneme sistemi genetik yapısı en iyi bilinen *Drosophila* ile yapılan testlerdir. *Drosophila*'da en çok uygulanan test eşeye bağlı letalite testidir. Bu testte üreme hücrelerinde görülen anormallikler incelenmektedir. Aynı zamanda eşey hücreleri ile aynı populasyonda *in vivo* mutasyonlar, kromozom anormallikleri gözlenebilmektedir (Kilbey ve ark., 1984; Sarıkaya, 2005). *Drosophila* ırkları ile gerçekleştirilen bir diğer mutajenite metodu Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART)'dir. SMART'ın avantajı, mutasyon etkilerini fenotipte göstererek mitotik rekombinasyon içermesidir. İşaret genlerinin trans-heterozigot sineklerde bulunması ve kullanılması genotoksik denemede bu özelliklerin gözlenmesi, çalışmanın yöntem olarak kolay ve ucuz bir yol olduğunu gösterir (Frolich ve Würgler, 1990; Sarıkaya, 2005).

Yapılan araştırmalar maruz kalınan pek çok kimyasal maddenin immünotoksik, genotoksik, mutajenik, kanserojenik ve teratojenik olduğu gerçeğini ortaya koymaktadır. Kimyasalların söz konusu bu etkilerinin ortaya çıkarılmasında *in vivo* testlerle beraber *in vitro* testler de uygulanmalıdır. Yaygın olarak kullanılan *in vitro* mutajenite testleri; kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve komet testleridir.

2.4.1. Kromozomal anormallik (KA) testi

Kromozomal anormallik (KA) testi, 1975 yılında bilinen mutajen ve kanserojenlerin Çin Hamsteri Ovaryum (CHO) hücrelerinde kromozomal anormallik ve kardeş kromatid değişimini uyardığı tespit edildikten sonra sıklıkla kullanılmaya başlanmış bir tekniktir (Perry ve Evans, 1975). Teknik normal bir kromozom bileşimi ve sabit

bir kromozom sayısı olan herhangi bir hücre tipine uygulanabilir. Ancak bu test için genellikle kültüre edilmiş Çin hamsteri ovaryum (CHO) veya Çin hamsteri akciğer (CHL) hücreleri ile insan lenfositleri tercih edilmektedir (OECD, 2008).

Hücredeki toksisitenin artmasıyla birlikte kromozomal aberasyonlarında arttığı kabul edilmektedir. Yapısal kromozom mutasyonları insanlardaki bir genetik hastalığın veya kanser ile ilişkili genlerdeki bozuklukların göstergesi olabilir (Speit ve Henderson, 2005; Zeiger, 2010).

Kromozomal anormallikler, kromozomlarda mikroskobik düzeyde gözlenebilen genetik değişiklerdir. Kromozomal anormalliklerin çoğu hasar görmüş olan kromozomların tamir edilememesi veya yanlış tamiri ya da hücre bölünmesi esnasında kutuplara göçte oluşan anormalliklerden kaynaklanmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalarda, insanlarda kromozomal anormallik frekansındaki artış ile kanser oluşumu arasında pozitif bir korelasyon olduğu belirlenmiştir (Hagmar ve ark., 1998; Ji ve ark, 2001; Bolognesi, 2003; Doak ve ark., 2012).

Kullanılan fiziksel ve kimyasal ajanların etkisine göre kromozom sayısında ve yapısında değişimler meydana gelmektedir. Bunlar kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom, halka kromozom, kardeş kromatidlerde birleşme, translokasyon, inversiyon ve izokromozomlar gibi yapısal ve poliploidi gibi sayısal kromozom anormallikleridir (Mateuca ve ark., 2006; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2008; Doak ve ark., 2012).

Kromozomun her iki kolunda DNA çift zincirinde kırılma varsa kromozom kırığından; kromozomun bir kolunda kırık oluşmuşsa kromatid kırığından bahsedilir. Eğer kimyasala maruziyet G_1 evresinde olursa kromozom tipi anormallikler, G_2 evresinde olursa kromatid tipi anormallikler, S evresinde olursa da her iki tip anormallik ortaya çıkmaktadır (Natarajan ve Obe, 1982).

DNA'daki çift zincir kırıkları kromozomal aberasyonların sebebi olarak gösterilmektedir. Sözkonusu kırıkların uçları, bu hasarı indükleyen ajana bağlı olarak

farklı moleküler yapıya sahiptir. Restrüksiyon endonükleaz, DNAz I ve benzon nükleaz, 3'OH ve 5'fosfat uçlarında kolayca tamir edilebilir çift zincir kırıkları oluşturur. Fakat çeşitli kimyasal ajanlarla oluşan çift zincir kırıklarının uçları kimyasal olarak modifiye olmuştur. Her iki tip çift zincir kırığı, benzer sayı ve dağılımda KA'ya neden olmaktadır (Obe ve ark., 2010).

2.4.2. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi

Kimyasal mutajenlerin ve kanserojenlerin genotoksik etkisinin araştırılmasında kullanılan testlerden bir diğeri kardeş kromatit değişimi (KKD) metodudur (Bağcı ve ark., 2005). Kardeş kromatit değişimi 1938'de McClintock'un mısırdaki halka kromozomlar üzerinde yaptığı çalışmalarla keşfedilmiş, DNA replikasyonunun semikonservatif (yarı saklı) dublikasyonunu tanımlayan Taylor ve arkadaşları tarafından da (1957) klasik deneyler kullanılarak gösterilmiştir (Raposo ve ark., 2004).

Kardeş kromatid değişimi, bir kromozomun iki kromatidinin homolog bölgelerinden kırılarak, kırılan parçaların yer değiştirdikten sonra kırılma noktaları ile yeniden birleşmesi sonucunda oluşmaktadır (Soysal ve ark., 2008). Herhangi bir maddenin KKD frekansında artışa neden olması, o maddenin replikasyon mekanizmasını etkilediğinin ve DNA hasarı oluşturabildiğinin göstergesidir. Klastojenlerin ve klastojenik aktivitenin belirlenmesinde KKD testi hassas bir metot olarak kullanılmaktadır (Santoro ve ark., 2008; Beg ve ark., 2009; Montoro ve ark., 2012).

Kardeş kromatit değişimi intrakromozomal rekombinasyon sonucu oluşmaktadır. Hücrede DNA hasarının indüklenmesinden sonra KKD'lerin olşumu kuvvetle artmaktadır. Geçmişte KKD testi DNA'ya hasar veren kimyasalların tespit edilmesinde daha sık kullanılırken, KKD indüklenmesinin biyolojik öneminin belirsiz oluşu bu teste olan ilgiyi azaltmıştır (Speit ve Henderson, 2005).

Kardeş kromatid değişimlerinin frekansında meydana gelen artışlar, genotoksisitenin değerlendirilmesinde ve DNA hasarına neden olan ajanların erken biyolojik

etkilerinin belirlenmesinde oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Bolognesi, 2003). Ancak artmış KKD frekansı ile kanser riski arasında bir ilişki olmadığı düşünülmektedir. Çünkü bugüne kadar artmış KKD frekansı ile olumsuz sağlık etkisi arasında bir ilişki gösterilmemiştir. Bu nedenle KKD frekansındaki artış olumsuz bir sağlık koşuluna değil, genotoksik bir kimyasala maruz kalmanın biyolojik bir göstergesi olarak kabul edilmelidir (Preston ve ark., 2010).

2.4.3. Mikronükleus (MN) testi

Kimyasal ve fiziksel ajanların klastojenik ve anöjenik etkilerini değerlendirmek için uygulanan yöntemlerden biri de Sitokinezi Bloklanmış Mikronükleus (Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay=CBMN Assay) metodudur. Mikronükleus yönteminde sitokinezi durdurmak amacıyla bir aktin polimeraz inhibitörü olan sitokalasin B (Cyt B) kullanılmakta ve bu sayede ilk bölünmesini geçirmiş mitotik hücrelerin binükleer görüntüleri elde edilmektedir (Fenech, 2007).

Mikronükleuslar, spontan ya da indüklenmiş olarak, asentrik kromozomal fragmentlerinin ya da bütün kromozomların hücre bölünmesi sırasında ana çekirdek dışında kalmasıyla ayrı bir yavru çekirdek şeklinde oluşmaktadır (Fenech, 2007; Poletta ve ark., 2008). Mikronükleus testi, mutajenik ve/veya anöjenik etkilerin saptanmasında hızlı ve güvenilir bir test olarak kabul görmektedir (Fenech, 2000). Bu nedenle insanlarda genotoksik kimyasallara maruziyetin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Cho ve ark., 2009).

Epidemiyolojik çalışmalara ve bazı kimyasalların genotoksisitenin araştırıldığı çalışmalara göre insan periferal lenfositlerinde artmış MN frekansı ile kanser insidansı arasında önemli bir korelasyon vardır (Bonassi ve ark., 2007; Parry ve Kirsch-Volders, 2010; Preston ve ark., 2010).

Mikronükleus oluşumunu indükleyen her ajan klastojen olmayabilir. Mikronükleus oluşumuna iğ ipliklerinin inhibisyonu ve apoptozis gibi diğer etkenlerde yol açabilmektedir. Eğer oluşuma kromozomlardan kopan asentrik bir kromozom parçası

neden olmuşsa, bu klastojenik bir olayın sonucu iken eğer oluşuma neden olan olgu anafazda geri kalma ya da iğ ipliklerinin hasarından dolayı tüm bir kromozomsa bu duruma anojenik bir ajanın neden olduğu belirtilmektedir (Fenech ve ark., 2003; Terradas ve ark., 2010; Cervantes-Rios ve ark., 2012).

Günümüzde mikronükleus metodu; genotoksisite ve sitotoksisite çalışmalarında; kromozom kırığı, DNA yanlış tamiri, kromozom kaybı, kromozom ayrılmaması (nondisjunction), kromozomların farklı şekillenmesi (nükleoplasmik köprüler), hücre bölünmesinin inhibe edilmesi, gen ampilifikasyonu, nekrosis, apoptosisin ve sitostazisin basit morfolojik ölçütler kullanılarak değerlendirilmesini sağlayan kapsamlı bir yöntem haline gelmiştir (Fenech, 2000; 2006 ve 2007).

Ayrıca *in vitro* MN testinin toksikolojiyle ilgili, klastojeni ve anöjeniyi kapsayan hassas bir genotoksisite testi ve insanlar dahil *in vivo* genotoksisite için fikir verebilir olması bu testin güvenilir hale gelmesine yardımcı olmuştur (Parry ve Kirsch-Volders, 2010).

2.4.4. Komet testi

Son yıllarda geliştirilen komet testi (tek hücre jel elektroforezi) DNA hasar oranı ve tamirini incelemede kullanılan hassas, güvenilir ve hızlı bir metotur (Garry ve ark., 2003; Poletta ve ark., 2008; Azqueta ve ark., 2009; Hoelzl ve ark., 2009). Bu nedenle insanlarda kanserli hücrelerdeki DNA hasarını belirlemek için komet tekniği kullanılabilir (Kryston ve ark., 2011).

Daha önceleri DNA'daki lezyonlar, bu lezyonlara spesifik tamir endonüklezlarının uygulanmasıyla ölçülüyordu. Örneğin endonüklez III okside pirimidinleri belirlemek için kullanılıyordu. Daha sonraları bu yöntem kültürdeki hücrelerden (örneğin lenfositler) izole edilmiş ekstraktlarda DNA tamir aktivitesini *in vitro* olarak ölçebilmek için genişletilmiştir (Azqueta ve ark., 2009).

Canlı hücrelerde DNA tek sarmal kırılmalarının tespiti ilk kez Rygberg ve Johanson (1978) tarafından gerçekleştirilmiştir. DNA'nın ayrılmasına izin veren hafif alkali şartlar altında, lam üzerindeki agarozda gömülmüş olan hücreleri lize ederek proteinlerinden ayırmışlardır. Daha sonra nötralize edip, akridin oranj kullanarak DNA'yı boyamışlar ve kırmızı florasanla (tek sarmal) yeşilin (çift sarmal) oranını saptamışlardır. Fakat bu teknik çok yaygın olarak kullanılmamıştır (Ünal, 1998). Çünkü nötral şartlar altında yapılan lize ve elektroforezis uygulamaları DNA çift sarmal kırıklarının tespitine izin verirken, DNA tek sarmal kırıklarının tespitine izin vermemektedir. Ancak birçok ajan DNA'nın çift sarmal kırığından daha çok DNA tek sarmalında kırıklar meydana getirmektedir. Bu nedenle teknik, Singh ve arkadaşları tarafından lysing ve elektroforezis işlemleri alkali koşullarda yapılarak modifiye edilmiştir. Böylece sadece DNA çift sarmal kırıklarının tayini değil, aynı zamanda alkali şartlarda tayin edilebilen hasarların (alkali labile sites), DNA çapraz bağlarının ve tamamlanamamış eksizyon tamir bölgelerinin tayinine de olanak sağlanmıştır (Singh ve ark., 1988).

Komet metoduna göre, DNA ipliğinde meydana gelen kırıklar sonucu oluşan küçük DNA parçaları, bir elektrik alanında, yapısı bozulmamış ve bütün haldeki DNA moleküllerine göre daha hızlı hareket etmektedir. Hücreler bir agaroz jele gömülüp daha sonra proteinleri uzaklaştırmak için lize edildiğinde, küçük DNA molekülleri, ana çekirdeği geride bırakarak ileri doğru hareket eder (Singh ve ark., 1988; Shaposhnikov ve ark., 2009). DNA, floresan bir boya (örneğin, etidium bromür, propidium iodür veya DAPI) ile boyanıp, floresan mikroskop altında incelendiğinde, gözlenen objeler, baş kısmında hasar görmemiş DNA ve kuyruk kısmında kırık DNA'ları taşıyan bir kuyruklu yıldıza benzemektedir. Bu nedenle teknik 'komet = kuyruklu yıldız' olarak adlandırılmıştır. İleriye gidebilen DNA miktarı ve göçün mesafesi, bu hücrede bulunan DNA ipliğindeki kırıkların sayısı ile orantılıdır. DNA hasarı yüksek olan hücrelerde, kromozomal DNA, hücre çekirdeğinden anoda doğru büyük göç göstermektedir (Singh ve ark., 1988).

Komet testinin en önemli avantajları, çok düşük düzeydeki DNA hasarlarını bile ayırt edebilmesi, her uygulama grubu için az sayıda hücreye ihtiyaç göstermesi,

değişik hücre ve dokulara uygulanabilir olması, hızlı sonuç elde edilebilmesi ve hücrelerdeki DNA kırıklarının görsel olarak belirlenebilmesidir (Tice ve ark., 2000; Piperakis, 2009; McArt ve ark., 2010).

Komet testi ile farklı hücre örneklerindeki DNA hasar veya tamir düzeyleri karşılaştırılabilir. Tek bir hücredeki DNA zincir kırıklarının belirlenmesini sağlayan komet testi hücresel seviyede DNA hasarının gözlenebilmesini ve bir örnek içindeki heterojenitenin belirlenebilmesini sağlar (McArt ve ark., 2010).

2.5. Antidepresan İlaçlarla Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları

Farklı gruplara dahil olan antidepresan ilaçlarla ilgili genotoksisite çalışmaları mevcuttur.

Bozkurt ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada özgül serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI) grubuna ait olan sertralin antidepresan ilacını kullanan hastalarda, bu ilacın klastojenik etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla KKD ve KA testleri kullanılmıştır. Bu araştırmada, depresyon tedavisi için sertralin kullanan 10 kişi, bu hastalarla aynı psikolojik şikayeti olan ama tedavi görmeyen 18 hasta ve 18 sağlıklı bireye ait periferal kan örnekleri incelenmiştir. Sağlıklı kontrollerle, ilaç kullanan hastalar ve depresyon hastalığı olup ilaç kullanmayan bireyler karşılaştırıldığında KKD frekansında anlamlı bir artış görülmüş ancak ilaçla tedavi edilen ve ilaç tedavisi almayan hastalar karşılaştırıldığında ise KKD frekansında fark görülmemiştir. Yine benzer şekilde kromozom anormalliklerinde de gruplar arasında istatistiksel bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre artan KKD frekansının sertralin'e bağlı olmadığı yorumu yapılmıştır (Bozkurt ve ark., 2004).

Trisiklik antidepresan grubundan desipramin (2, 20 ve 60 mg/kg) ve imipramin **(**7, 20 ve 60 mg/kg) ilaçları kullanılarak fare kemik iliğinde *in vivo* olarak KKD testi uygulanmıştır. Her iki ilacın da doza bağlı olarak KKD frekansını anlamlı düzeyde artırdığı belirlenmiş ve bu ilaçların genotoksik olduğu vurgulanmıştır (Perez ve

ark.,2002). Yine bu iki ilaçla yapılan bir çalışmada (imipramin için 7; 20 ve 60 mg/kg, desipramin için 2; 20 ve 60 mg/kg) fare kemik iliği hücrelerinde *in vivo* olarak KA testi gerçekleştirilmiştir. Sonuçta her iki antidepresan ilaç etken maddesinin de kromozom hasarını önemli derecede artırdığı ve bu artışın doza bağlı olduğu gözlenmiştir (Madrigal-Bujaidar ve ark., 2010).

Psikiyatri bölümünde 18'i lityum karbonat ve 18'i de benzodiazepin ilaçları ile tedavi gören 36 hasta ile yapılan bir çalışmada her iki grupta da kromozom aberasyon oranında artış olduğu, en sık görülen anormalliklerin disentrik kromozom ve kromatid değişimi olduğu belirlenmiştir. Hücre başına düşen KKD frekansında da anlamlı oranda artış olduğu, ancak her iki grup arasındaki aberasyon ve KKD/hücre frekansı arasında bir farklılık olmadığı saptanmıştır (Bigatti ve ark., 1998).

Hiperaktivite ve dikkat dağınıklığı tedavisinde kullanılan bir ilaç olan metilfenidat tedavisi gören 12 çocukta, bu ilacın mutajenite ya da kanserojenite ile bağlantısının olup olmadığı araştırılmıştır. Sonuçta, kromozom anormallikleri, KKD ve MN frekanslarında önemli oranda artış gözlenmiştir. Araştırmacılar, artan kanser riski ile kromozom aberasyon sıklığı arasındaki ilişkiden dolayı bu ilacın insan sağlığı üzerindeki etkileriyle ilgili çok daha fazla çalışma yapılması gerektiği sonucuna varmışlardır (El-Zein ve ark., 2005).

Fluoksetin en sık reçete edilen selektif serotonin geri alım inhibitörlerinden biridir. Fluoksetinin hamile farelerde kemik iliği hücreleri üzerindeki genotoksik etkileri araştırılmış, 80 adet fareye gebeliğin belli dönemlerinde farklı dozlarda (günde 0,052; 0,104 ve 0,208 mg) fluoksetin verilmiştir. Mitotik indeksteki düşüş tüm dozlarda anlamlı olduğundan ilacın, kemik iliği hücrelerinde sitotoksik etkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca kromozomal anormalliklerden kırık, disentrik oluşumlar, halka oluşumu ve poliploidi gözlenmiş bunların sayısı da kontrollerle karşılaştırıldığında doza bağlı ve anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (Ali ve ark., 2001).

Başka bir çalışmada fluoksetinin karsinojenitesi Fisher ratları ve C57BL/6 x C3H F1 farelerinde, kontrollü çalışmalar ile test edilmiştir. Fluoksetin hayvanlara 24 ay

boyunca beslenme yoluyla (ratlara 0,5; 2 ve 10 mg/kg, farelere 1; 5 ve 10 mg/kg) verilmiştir. Fare ve ratlarda meydana gelen kendiliğinden tümör oluşum oranında herhangi bir artış belirlenmemiş ve fluoksetinin kanserojen olmadığı açıklanmıştır. Burada elde edilen verilerin fluoksetinin bir karsinojen ya da bir tümör tetikleyicisi olamayacağı yönünde inandırıcı kanıtlar sağlamadığı düşünülmüştür (Bendele ve ark., 1992).

Antidepressan ilaçlardan fluoksetin (20 µmol/litre), clomipramin (30 µmol/litre), amitriptilin (40 µmol/litre), imipramin (60 µmol/litre) ve citalopram'ın (120 µmol/litre) insan lenfositlerinde mitojen sitümülasyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada fluoksetin ve clomipramin'in % 50-60 mitojen stümülasyonuna neden olduğu diğer ilaçların ise böyle bir etkiye sahip olmadıkları bulunmuştur. Mitojen stimülasyonunun ileride kanser oluşumuna neden olabileceği vurgulanmıştır (Martensson ve Nassberger, 1993).

Antidepresan olarak kullanılan Prozac ve Paxil ilaçlarının insan lenfosit kültüründeki genotoksik etkilerini inceleyen bir çalışmada, hem Prozac hem de etken maddesi olan fluoksetin, kromozom anormalliklerinde doza bağlı bir artış meydana getirmiş, KKD oluşumunu da önemli düzeyde uyarmıştır. Benzer şekilde, iki madde de MN frekansında doza bağlı artışa neden olmuştur. Bu çalışmanın ikinci kısmında Prozac ve Paxil kullanan hastalardan elde edilen periferik kanlar kullanılmış ve kromozom anormalliklerinde artış meydana geldiği görülmüştür. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. MN oluşumunda Prozac ve Paxil kullanan hastalarda kontrole göre önemli bir fark yoktur. Ancak tüm hastalarda KKD/hücre sayısı önemli derecede artış göstermiştir (Tarhan, 2006).

Antidepresan kullanımı ve meme kanseri ilişkisi ile ilgili deney hayvanlarıyla yapılan araştırmalar, doğum sonrasındaki bir aylık dönemde antidepresanlara maruz kalındığında bu ilaçların meme tümörü gelişimini tetiklediği ve ratlarda kolon kanseri oluşumuna neden olabildiği yönünde sonuç vermiştir (McPherson, 2003). Steingart ve ark. (2003), insanlarda ve hayvanlarda tıbbi tedavide antidepresan kullanımı ile meme kanseri arasında az da olsa bir ilişki olduğunu rapor etmişlerdir.

Selektif serotonin geri alım engelleyicilerinden olan paroksetinle ilgili yapılan bir çalışmada akut toksisite rodent modeli geliştirilmiş ve tek doz (dört farklı gruptaki hayvanlara sırasıyla 120, 180, 240 ve 300 mg/kg) uygulanmıştır. Paroksetine maruz kalan grupta vücut ağırlığı, gıda ve su tüketimi gibi parametreler dikkate alınmış ve 7 gün sonunda kırmızı kan hücrelerinde ve hemoglobinde doza bağlı olarak artış görülmüştür. Kullanılan deney hayvanlarının karaciğerlerinin ağırlığında yüksek dozda artış görülmüştür. İlacın tek yüksek doz uygulanması birçok parametre ile incelenmiş ve yüksek dozlarının toksisiteye neden olabileceği sonucuna varılmıştır (Ryan ve ark., 2001).

Kim ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir araştırmada, panik bozukluğu olan 3 ay boyunca paroksetin tedavisi gören 26 hasta ve aynı sayıdaki kontrol gruplarıyla çalışılmış ve ilaç tedavisinden sonra T lenfosit sayısında belirgin bir artış görülürken B lenfosit sayısında da azalma görülmüştür. Bu bulgular panik bozukluklarda ilaç tedavisinin bağışıklık sistemini etkilediğini göstermiştir (Kim ve ark., 2004).

Swiss albino farelerin soma (kemik iliği) ve eşey (spermatosit) hücrelerinde trisiklik bir antidepresan olan amitriptilinin genotoksisitesi düşük, orta ve yüksek doz grupları kullanılarak değerlendirilmiştir. İlaç, düşük doz uygulanan gruptaki farelere bir ay boyunca günde 1mg/kg olacak şekilde oral yoldan verilmiştir. Orta doz grubundaki hayvanlara 15 gün boyunca günde 1mg/kg, bunu takip eden 15 günde de 2 mg/kg ilaç oral olarak uygulanmıştır. Yüksek doz grubundaki farelere ise 10 gün boyunca 1 mg/kg, takiben gelen 10 gün boyunca 2 mg/kg ve diğer 10 günlük sürede de 4 mg/kg olacak şekilde yine oral yoldan ilaç uygulaması yapılmıştır. Sonuçta her üç grupta da amitriptilinin hem somatik hem de eşey hücrelerinde yapısal ve sayısal kromozom anormaliklerini indüklediği ve mitotik indekste önemli derecede düşüşe neden olduğu görülmüştür. Ayrıca sperm hücrelerinin baş ve kuyruk morfolojisindeki anormalliklerin insidansında da önemli artış tespit edilmiştir (Hassanane ve ark., 2012).

Son veriler göz önüne alındığında piyasadaki 33 antidepresan etken maddesinin genotoksik ve/veya karsinojenik etkileriyle ilgili bilgiler mevcuttur. Bunlardan sadece sekiz tanesinin (sitalopram, duloksetin, fluoksetin, fluvoksamin, mirtazapin, nefazodone, paroksetin ve venlafaksin) genotoksisite ve karsinojenite testlerinin mevcut kurallar göz önüne alınarak tamamlandığı söylenebilir. Sitalopram, hem genotoksisite hem de karsinojenite testlerine pozitif cevap vermiştir. Duloksetin, mirtazapin ve paroksetin genotoksisite testlerinde negatif sonuç vermiş fakat uzun süreli karsinojenite testlerinde pozitif sonuç vermiştir. Fluoksetin, fluvoksamin nefazodone ve venlafaksin ise tüm genotoksisite testlerine negatif cevap vermiş ve rodentlerde karsinojenik olmadığı görülmüştür (Brambilla ve ark., 2009).

Moklobemid, bupropion, klomipramin, sertalin ve fenelzin karsinojenite açısından sınırlı ölçüde test edilmiştir. Moklobemid hem genotoksisite hem de karsinojenite testlerine negatif cevap verirken, fenelzin hem genotoksisite hem de karsinojenite testlerine pozitif yanıt vermiştir. Bupropion ve clomipramine genotoksisite testlerinde pozitif; karsinojenite testlerinde negatif sonuç vermiştir. Sertalin ise genotoksisite testlerinde negatif sonuç vermiştir fakat onun da karsinojenik olduğu tespit edilmiştir (Brambilla ve ark., 2009).

On sekiz antidepresan etken maddesinin yalnızca genotoksisite sonuçları mevcut olup bunlardan dokuzu (amitriptilin, dosulepin, doksepin, maprotilin, nortriptilin, protriptilin, tranilsipromin, trimipramine, viloksazin) negatif veya yetersiz sonuçlar vermiştir. Kalan dokuz ilaç olan benaktizin, desipramin, hiperisin, imipramin, iproniazid, izokarboksazid, lityum, lofepramin ve mianserin bir veya birden fazla pozitif yanıt vermiştir (Brambilla ve ark., 2009).

İki antidepresan etken maddesinin ise yalnızca karsinojenite test sonuçları elde edilmiştir. Bunlardan Trazodone'un karsinojenik olmadığı, amoksapinin ise ratlarda karsinojenik olduğu tespit edilmiştir (Brambilla ve ark., 2009).

Çalışmamızda genotoksik etkileri incelenen Trazodone ve Milnacipran ile ilgili insan lenfositlerinde yapılmış bir genotoksisite testine rastlanmamıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

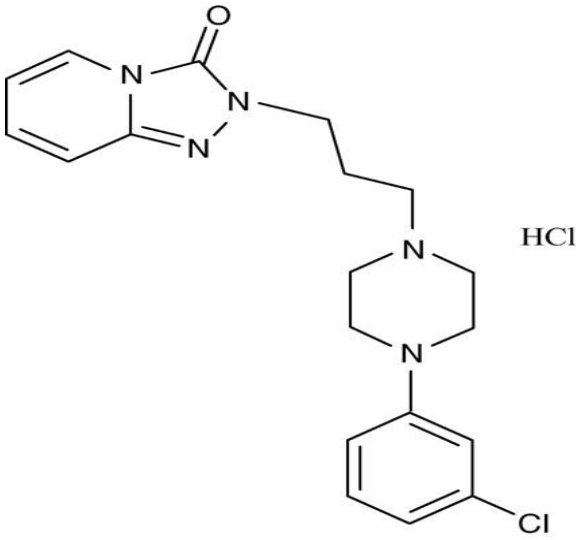
3.1.1. Kromozom incelemesi için materyal

Bu çalışmada antidepresan ilaç etken maddelerinden Trazodone ve Milnacipran'ın olası genotoksik etkilerini incelemek amacıyla kültüre edilmiş insan periferal lenfositleri ve izole lenfositler kullanılmıştır. Periferik kan, sigara, alkol ve ilaç kullanmayan, herhangi bir hastalığı saptanmamış ve genotoksik ajanlara maruz kalma öyküsü olmayan 23-24 yaşlarında bir bayan ve bir erkek donörden temin edilmiştir.

3.1.2. Test materyali

Trazodone

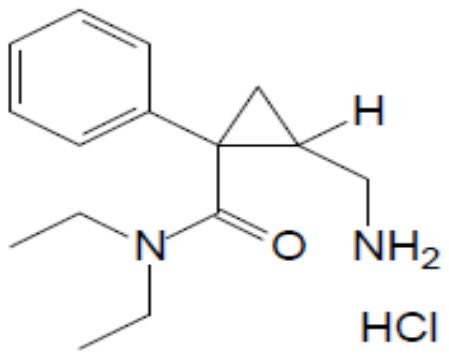
Bu araştırmada kullanılan antidepresan ilaç etken maddelerinden Trazodone'un kimyasal adı 8-[3-[4-(3-klorofenil)piperazin-1-yl]propil]-6,8,9-triazabisiklo[4.3.0]nona-2,4,9-trien-7-one şeklindedir (Kandagal ve ark., 2007). CAS NO: 25332-39-2, moleküler ağırlığı 408,3 olup kimyasal formülü $C_{19}H_{22}ClN_5O$'dur. Şekil 3.1'de Trazodone'nin moleküler yapısı verilmiştir.



Şekil 3.1. Trazodone'nin moleküler yapısı (Kandagal ve ark., 2007).

Milnacipran

Milnacipran bu çalışmada kullanılan bir diğer antidepresan ilaç etken maddesidir. Kimyasal adı (1R, 2S) -2 - (aminometil)-N, N-dietil-1-fenilsiklopropan-1-karboksamid'dir. CAS NO: 101152-94-7, moleküler ağırlığı 282,8 olup kimyasal formülü $C_{15}H_{23}ClN_2O$'dur. Milnacipran'ın moleküler yapısı şekil 3.2'de verilmiştir (EMEA, 2010).



Şekil 3.2. Milnacipran'ın moleküler yapısı (EMEA, 2010).

3.2. Metot

3.2.1. Kültüre alınmış insan lenfositlerindeki çalışmalar

Kromozom anormalliği (KA) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) testleri

İnsan periferal lenfositlerinde kromozomal anormallik (KA) testi Evans ve arkadaşlarının (1984) metoduna göre bazı değişikliklerle (Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006), Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Testi ise Perry ve Wolff'un (1974) yöntemine göre bazı modifikasyonlarla (Speit ve Haupter, 1985) uygulanmıştır. Buna göre lenfositlerin elde edilmesi için 1/10 oranında heparinize edilmiş periferik kanın 0,2 ml'si steril şartlarda, 2,5 ml'lik kromozom ortamına (Chromosome medium B) ekilmiştir. Bu ortama, daha önceden sartorius membran filtre ile steril edilerek hazırlanan BrdU (5-Bromo-2-deoksiuridin=Bromodeoksiüridin) solüsyonundan 10 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Ardından kültür tüpleri 37ºC'deki inkübatörde 72 saat inkübasyona alınmıştır. Kültür süresinin başlangıcından 24 ve 48 saat sonra Trazodone'un 3,13; 6,25; 12,50; 25,00; 50,00 ve 75,00 µg/ml'lik, Milnacipran'ın 2,50; 5,00; 10,00; 20,00; 30;00 ve 40,00 µg/ml'lik konsantrasyonları kültür tüplerine ilave edilmiştir. Ayrıca her bir kimyasal için bir negatif kontrol bir de pozitif kontrol (MMC, 0,20 µg/ml) kullanılmış, bunun yanı sıra Trazodone için 3:1 oranında metanol:su karışımı çözücü kontrol olarak kullanılmıştır. Kültür süresi bitiminden 2 saat önce (kültürün 70. saatinde) her tüpe kolkisin çözeltisinden 0,06 µg/mL olacak şekilde eklenmiştir. Bu şekilde hücreler 2 saat boyunca 37°C'deki inkübatörde kolkisin ile ön işleme tabi tutulmuştur.

72. saatte kültür tüpleri etüvden çıkarılarak 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Tüpün dibinde kalan 0,5-0,7 ml'lik kısma 0,075M KCl çözeltisinden 5 ml ilave edilmiştir. Kültür tüpleri 37ºC'de 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra, 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Tüplere, soğuk 3:1 metanol:asetik asitten, 5 ml ilave edilmiş ve takiben, buzdolabında +4ºC'de, 45 dakika tespit işlemi uygulanmıştır. Tespit işlemi 2 kez daha tekrarlandıktan sonra, süpernatant atılmıştır. Pipetaj yapılarak homojen hale getirilen tüpün dibindeki hücre süspansiyonu, önceden temizlenmiş lamlar üzerine

farklı alanlara gelecek şekilde damlatılmıştır. Hazırlanan preparatlar, oda sıcaklığında 24 saat kurumaya bırakılmıştır.

Mikronükleus testi

Mikronukleus (MN) testinin uygulanmasında Fenech ve arkadaşlarının (2000) metodu bazı değişikliklerle (Palus ve ark. 2003) kullanılmıştır. Buna göre 1/10 oranında heparinize edilmiş periferik kanın 0,2 ml'si, içerisinde 2,5 ml'lik kromozom medyumu bulunan (Chromosome Medium B) tüplere ekilmiştir. Bu tüpler 37°C sıcaklıktaki etüvde 72 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Kültürdeki hücreler Trazodone'un 3,13; 6,25; 12,50; 25,00; 50,00 ve 75,00 µg/ml'lik ve Milnacipran'ın ise 2,50; 5,00; 10,00; 20,00; 30;00 ve 40,00 µg/ml'lik konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiştir. Kültür süresi başlangıcından 24 saat sonra tüplere belirtilen konsantrasyonlarda ilaç ilavesi yapılırken, her bir antidepresan ilaç etken maddesi için bir negatif bir de pozitif kontrol (MMC, 0,20 µg/mL) kullanılmıştır. Ayrıca Trazodone için 3:1 oranında metanol:su karışımı çözücü kontrol olarak kullanılmıştır. Sitokinezi engellemek için 44. saatte 5,2 µg/ml Cytochalasin-B eklenmiştir. Kültür süresi dolduğunda tüpler, 10 dakika boyunca 1000 rpm'de santrifüj edilmiş, ardından süpernatant atılmıştır. Geriye kalan 0,5-0,7 ml'lik kısma 0,075 M KCl solüsyonundan 5 ml ilave edilmiş ve buzdolabında bekletilmiştir. Ardından tüpler, 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant atılmış ve 3:1 metanol: asetik asitten oluşan soğuk fiksatiften ilave edilmiştir. Tüpler buzdolabında 15 dakika bekletilmiştir. Bu işlem 2 kez tekrarlandıktan sonra 3. fiksatife son konsantrasyon 0,01 olacak şekilde formaldehit ilave edilmiş ve son kez santrifüj edilmiştir. Tüplerdeki süpernatant atılmış, geriye kalan hücre süspansiyonu pipetle homojenize edilmiştir. Daha önceden temizlenmiş lamlar üzerine, farklı alanlara birer damla damlatılarak süspansiyonun yayılması sağlanmıştır. Preparatlar kuruması için 24 saat oda sıcaklığında bırakılmıştır.

Preparatların boyanması

Hazırlanan preparatlar, kromozomal anormalliklerin, mikronükleusların ve mitotik indeksin belirlenmesi amacıyla, % 5'lik Giemsada (pH=6,8) 20-25 dakika boyanmıştır. Kardeş kromatit değişimlerinin gözlenmesi için, floresan+Giemsa boyaması, Speit ve Haupter'in (1985) geliştirdikleri metotta bazı modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır (Speit ve Haupter, 1985). Bu uygulamaya göre bir gün boyunca kurutulan preparatlar düz bir tepsiye konularak üzerleri ince bir tabaka halinde fosfat tamponu (pH 6.8) ile kaplanıp 254 nm dalga boyunda 13 dakika ışınlanmıştır. Preparatlar, 60ºC sıcaklığa getirilen 1xSSC (Sodyum klorür+Tri-Sodyum sitrat) solüsyonunda 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından preparatlar, % 5'lik Giemsa ile (pH= 6,8) 25 dakika boyanmıştır. Saf suda yıkanan preparatlar, oda sıcaklığında kurutulmuş ve DPX ile daimi hale getirilerek mikroskobik incelemeye alınmıştır.

Kromozom anormalliklerinin ve mitotik indeksin saptanması

Kromozomal anormalliklerin belirlenmesi için her bir uygulama grubunda, kadın ve erkek bireye ait preparatlarda kromozomları iyi dağılmış olan 100'er metafaz (toplam 200 metafaz) incelenmiştir. İncelenen toplam hücre sayısı içindeki anormal hücrelerin yüzdesi ve hücre başına düşen kromozom anormalliği sayısı belirlenmiştir. Mitotik indeksin (Mİ) saptanmasında ise; tüm uygulamalar için hazırlanan preparatlardan 1000'er hücre (dişi ve erkek toplam 2000 hücre) değerlendirilmiştir. Mitotik indeks, bölünen hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı yüzde cinsinden hesaplanarak belirlenmiştir.

Kardeş kromatid değişiminin ve replikasyon indeksinin saptanması

Kardeş kromatid değişimi (KKD) sayısının belirlenmesinde, dişi ve erkek bireye ait preparatların her birisinde, kromozomları iyi dağılmış ve ikinci mitoz bölünme geçiren 25'er hücre (toplam 50 hücre) incelenmiştir. Kardeş kromatid değişiminin saptanabilmesi için kültür ortamına, DNA'nın yapısında bulunan timin bazlarının

analoğu olan BrdU ilave edilmiştir. Burada, hücre DNA'sını replike ettiği sırada yeni sentezlenen polinükleotid ipliği içine timinin yerine ortamda bulunan BrdU geçmiştir. Ve BrdU'yu içine almış DNA ışınlanmaya maruz bırakıldığında, boyama sonucunda bu bölgeler açık renkli gözlenmiştir. Bu boyanma farkıyla da DNA'da kardeş kromatidler arasındaki değişimler belirlenmiştir. Kardeş kromatid değişimi sayısı, bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla, oluşan kırılma sayısına göre birli, ikili ve üçlü değişimler olarak değerlendirilmiştir. Replikasyon indeksini hesaplamak için, dişi ve erkek bireyden hazırlanan preparatların her birinden 100 hücre (toplam 200 hücre) incelenmiştir. İncelenen hücreler arasında birinci (M_1), ikinci (M_2) ve üçüncü (M_3) mitoz evresindeki hücreler sayılmış ve replikasyon indeksi (Rİ) = $[1x(M_1)+ 2x(M_2)+ 3x(M_3)]/N$ (N= incelenen toplam hücre sayısı) formülüyle hesaplanmıştır.

Mikronükleus (MN) frekansının ve nükleer bölünme indeksinin (NBI) saptanması

Mikronükleus frekansının saptanmasında; çekirdek bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli (binükleat) hücreler değerlendirilir. Çünkü bu hücreler, test edilen materyalin ilavesinden sonra bölünen hücrelerdir. Binükleat hücreleri elde etmek için, kültüre 44. saatte sitokalasin-B ilave edilmektedir. Bu çalışmada erkek ve dişi bireye ait her bir preparattan 1000 tane, toplam 2000 tane iki çekirdekli hücre, mikronükleus içerip içermediği yönünden incelenmiştir. Mikronükleus içeren hücreler 1 mikronükleuslu, 2 mikronükleuslu, 3 mikronükleuslu olmak üzere sayılmış ve [1x(1MN)+2x(2MN)+3x(3MN+4MN)]/N (N incelenen toplam hücre sayısı) formülü kullanılarak hücre başına düşen MN sayısı (MN/hücre) belirlenmiştir. Nükleer bölünme indeksi belirlenirken her bir uygulama grubunda (bayan ve erkek donörden 500'er adet) toplam 1000 hücre değerlendirilmiştir. Hücreler 1 çekirdekli (1N), 2 çekirdekli (2N), 3 çekirdekli (3N) ve 4 çekirdekli (4N) şeklinde sayılmış, nükleer bölünme indeksi [1x(1N)+2x(2N)+3x(3N+4N)]/n (n incelenen toplam hücre sayısı) formülünden yararlanılarak hesaplanmıştır.

3.2.2. İzole edilmiş insan lenfositlerindeki çalışmalar

Komet testi

Komet tekniğinde Singh ve arkadaşlarının (1988) kullandıkları metot bazı modifikasyonlarla uygulanmıştır. Donörlerden alınan kandan biocoll kullanılarak lenfositler izole edilmiştir. İzole lenfositlerde hücre canlılığı trypan blue kullanılarak ≥ % 97 olarak belirlenmiştir. Lenfositler test maddelerinin konsantrasyonları ile (Trazodone'un 3,13; 6,25; 12,50; 25,00; 50,00 ve 75,00 µg/ml ve Milnacipran'ın 2,50; 5,00; 10,00; 20,00; 30;00 ve 40,00 µg/ml) bir saat 37°C'de inkübasyona alınmıştır. Her iki uygulamada da bir pozitif (100 µM H_2O_2) ve bir de negatif kontrol kullanılmıştır. Ayrıca Trazodone için 3:1 oranında metanol:su karışımı çözücü kontrol olarak kullanılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde santrifüj işlemi ile süpernatant uzaklaştırılmış ve PBS ile resüspanse edilmiştir. Lenfositler düşük erime ısılı agar ile karıştırılmış ve yüksek erime ısılı agar ile kaplanmış lamlar üzerine yayılmıştır. Lamelle kapatılan preparatlar buzdolabında bekletildikten sonra lameller kaldırılarak lysing solüsyonuna alınmıştır. Daha sonra elektroforez tamponunda bekletilmiş ve 25 V, 300 mA'de 20 dakika elektroforeze tabi tutulmuştur. Ardından nötralizasyon tamponunda (0.4 M Tris, pH=7.5) bekletilen lamlar EtBr ile boyanarak incelemeye alınmıştır. Her bir konsantrasyon için 200 hücre (100 hücre erkekten 100 hücre bayandan) floresan mikroskopta "Comet Assay IV", Perceptive Instruments Ltd., UK analiz sistemi kullanılarak incelenmiştir. Hücrelerin hasar dereceleri % kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti cinsinden değerlendirilmiştir.

İstatistiksel analizler

Bu çalışmada, mitotik indeks, replikasyon indeksi, KKD/Hücre sayısı, anormal hücre frekansı, KA/Hücre sayısı, MN/Hücre sayısı, nükleer bölünme indeksi, % kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti için doz-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla SPSS 13.0 bilgisayar programıyla regresyon analizi uygulanmıştır. Uygulama ve kontrol gruplarından elde edilen mitotik indeks (MI), replikasyon

indeksi (RI), anormal hücre frekansı, hücre başına düşen kromozom anormalliği ve mikronükleus frekansı sonuçları z-testi ile, kardeş kromatid değişimi ve komet testi sonuçları t-testi ile analiz edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1.Trazodone Uygulaması

Trazodone uygulaması ile insan lenfosit kültürlerinde beş tip yapısal anormalliğe rastlanmıştır. Bunlar, kromatid (%53,66) ve kromozom kırıkları (%31,72), disentrik kromozomlar (%6,96), kromatid değişimi (%5,31) ve kardeş kromatidlerde birleşme (%2,35)'dir (Çizelge 4.1, Resim 4.1). Trazodone'nun 24 ve 48 saatlik muamelesi sonucunda anormal hücre yüzdesinin ve hücre başına düşen kromozomal anormallik sayısının doz artışına bağlı olarak arttığı gözlenmiştir (anormal hücre yüzdesi 24 saatlik uygulamada r=0,95, 48 saatlik uygulamada r=0,97; hücre başına düşen anormallik sayısı 24 ve 48 saatlik uygulamada r=0,96).

Trazodone'nun 24 saatlik uygulamasında anormal hücre yüzdesi kontrole göre en yüksek dört konsantrasyonda (12,50-75,00 µg/ml), çözücü kontrole göre ise en yüksek üç konsantrasyonda (25,00-75,00 µg/ml) istatistiksel açıdan önemli düzeyde artmıştır (Çizelge 4.1, Şekil 4.1). Hücre başına düşen anormallik sayısının kontrole göre tüm konsantrasyonlarda, çözücü kontrole göre ise en düşük iki doz hariç (3,13 ve 6,25 µg/ml) diğer tüm konsantrasyonlarda önemli oranda arttığı görülmüştür (Çizelge 4.1).

Trazodone'un 48 saatlik muamelesinde anormal hücre yüzdesi ve hücre başına düşen anormallik sayısında, hem kontrole hem de çözücü kontrole göre 12,50; 25,00; 50,00 ve 75,00 µg/ml'lik konsantrasyonlarda önemli oranda artış tespit edilmişir (Çizelge 4.1, Şekil 4.1).

Çizelge 4.1. Trazodone uygulaması ile insan periferal lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları

Test maddesi	Uygulama		Anormallikler					Anormal hücre ± SH (%)	KA/Hücre ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/ml)	ktk	kzk	kkb	ktd	ds		
Kontrol	24	0,00	14	7	-	-	2	11,50±2,25	0,12±0,02
Çözücü kontrol	24	21,66	20	8	-	-	1	14,50±2,49	0,15±0,03
MMC	24	0,20	47	30	-	8	5	39,00±3,45	0,45±0,04
Trazodone	24	3,13	22	9	1	1	4	17,50±2,69	0,19±0,03*
		6,25	27	10	-	-	2	16,50±2,62	0,20±0,03*
		12,50	29	13	-	-	2	19,50±2,80*	0,22±0,03**$\mathbf{a_1}$
		25,00	34	21	-	-	3	27,00±3,14***$\mathbf{a_1}$	0,30±0,03***$\mathbf{a_3}$
		50,00	33	29	-	-	6	29,50±3,22***$\mathbf{a_3}$	0,34±0,03***$\mathbf{a_3}$
		75,00	58	27	-	-	2	35,50±3,38***$\mathbf{a_3}$	0,44±0,04***$\mathbf{a_3}$
Kontrol	48	0,00	6	1	-	-	1	4,00±1,39	0,04±0,01
Çözücü kontrol	48	21,66	2	2	1	-	4	4,50±1,47	0,05±0,01
MMC	48	0,20	31	42	24	8	5	43,00±3,50	0,55±0,04
Trazodone	48	3,13	9	2	2	-	1	7,00±1,80	0,07±0,02
		6,25	8	2	6	-	-	8,00±1,92	0,08±0,02
		12,50	13	2	5	-	-	10,00±2,12*$\mathbf{a_1}$	0,11±0,02*$\mathbf{a_1}$
		25,00	22	20	8	1	1	21,50±2,90***$\mathbf{a_3}$	0,26±0,03***$\mathbf{a_3}$
		50,00	29	15	9	2	3	26,00±3,10***$\mathbf{a_3}$	0,29±0,03***$\mathbf{a_3}$
		75,00	51	29	2	-	3	33,50±3,34***$\mathbf{a_3}$	0,43±0,04***$\mathbf{a_3}$
Kromozomal anormallik yüzdesi			53,66	31,72	2,35	5,31	6,96		

ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, kkb: kardeş kromatidlerde birleşme, ktd: kromatid değişimi, ds: disentrik kromozom

* Kontrole göre P< 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

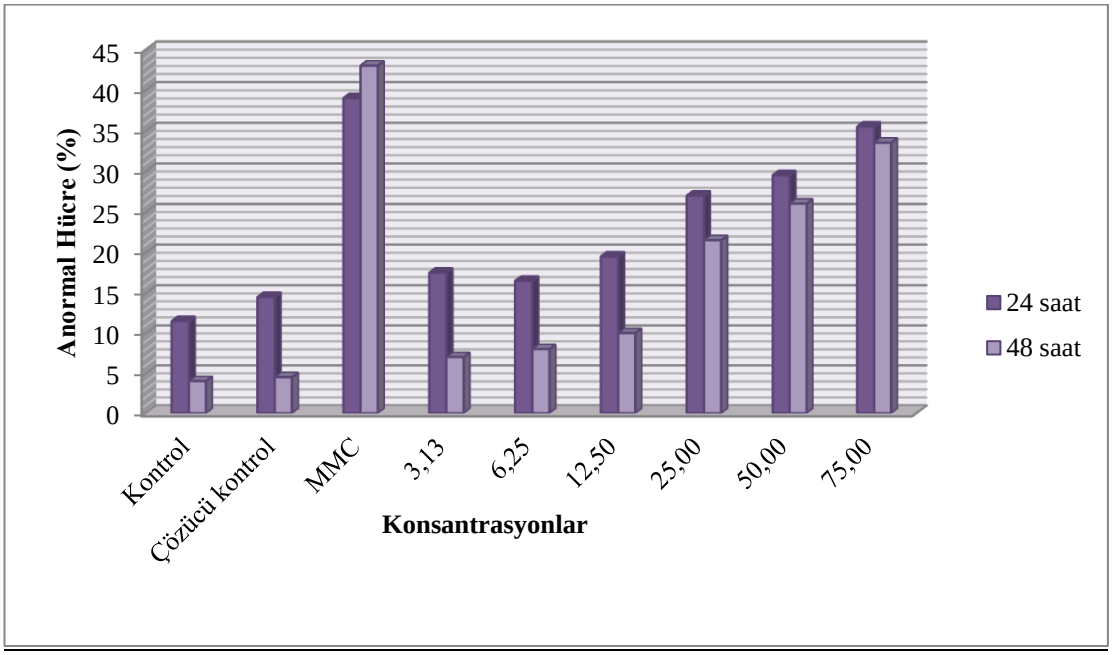
** Kontrole göre P< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)

*** Kontrole göre P< 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)

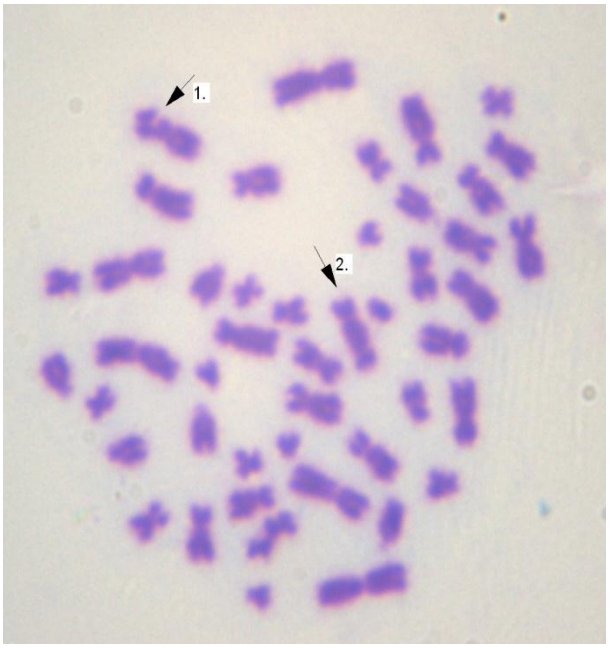
a_1 Çözücü kontrole göre P< 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

a_2 Çözücü kontrole göre P< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)

a_3 Çözücü kontrole göre P< 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)

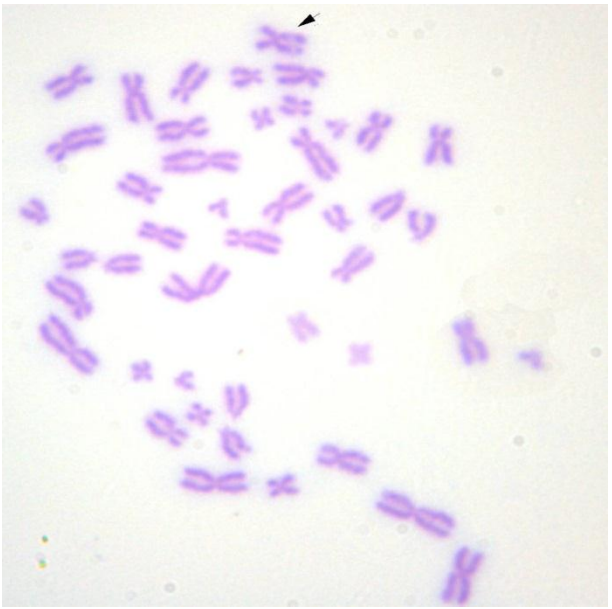


Şekil 4.1. Trazodone ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki anormal hücre frekansı

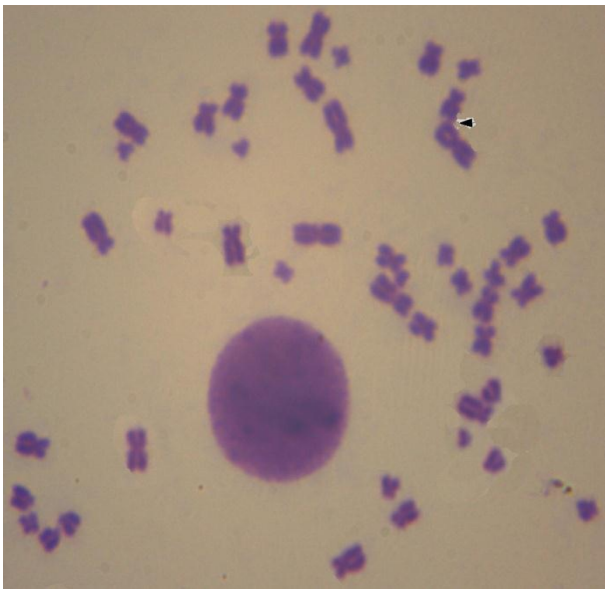


(a)

Resim 4.1. Trazodone ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri a) 1. kromatid kırığı ve 2. disentrik kromozom b) kromozom kırığı c) kardeş kromatidlerde birleşme d) kromatid değişimi

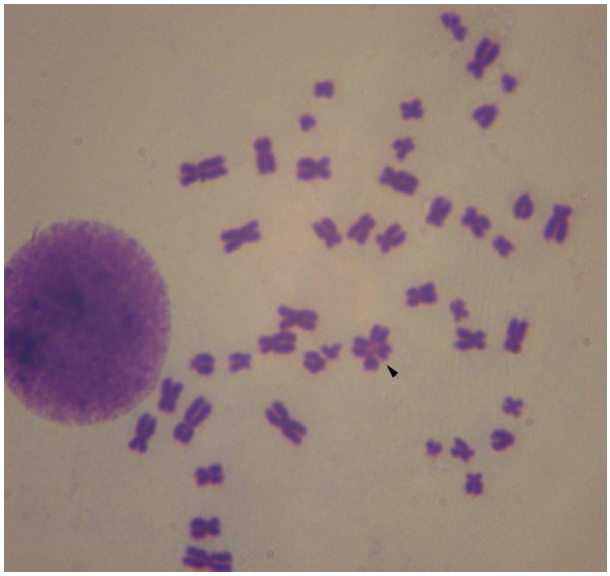


(b)



(c)

Resim 4.1. (Devam) Trazodone ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri a) 1. kromatid kırığı ve 2. disentrik kromozom b) kromozom kırığı c)kardeş kromatidlerde birleşme d) kromatid değişimi



(d)

Resim 4.1. (Devam) Trazodone ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri a) 1. kromatid kırığı ve 2. disentrik kromozom b) kromozom kırığı c)kardeş kromatidlerde birleşme d) kromatid değişimi

Trazodone'nun KKD üzerine etkileri incelendiğinde, 24 saatlik uygulamada 3,13 µg/ml'lik doz hariç, diğer tüm dozlarda KKD oluşumu hem kontrole hem de çözücü kontrole göre istatiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. 48 saatlik uygulamada ise tüm konsantrasyonların hem kontrol hem de çözücü kontrol ile kıyaslandığında KKD oluşumunu önemli düzeyde artırdığı gözlenmiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.2, Resim 4.2). Her iki muamele süresinde de gözlenen artışlar konsantrasyona bağlıdır (24 saatlik uygulamada r=0,90, 48 saatlik uygulamada r=0,87). Çizelge 4.2'de en düşük ve en yüksek sayıdaki KKD'ler ve hücre başına düşen KKD sayısı gösterilmiştir. Trazodone muamelesi sonucu en az KKD sayısı 3, en çok KKD sayısı ise 16 olarak gözlenmiştir. Mitotik indeks 24 saatlik sürede tüm konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı düşüş göstermiş olup, bu düşüş konsantrasyona bağlı olarak gerçekleşmiştir (r=-0,85). Çözücü kontrolle kıyaslandığında ise en yüksek üç konsantrasyonda (25-75 µg/ml) istatistiksel olarak önemli bir azalma tespit edilmiştir. 48 saatlik sürede mitotik indeks, en düşük konsantrasyon dışında diğer tüm konsantrasyonlarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş göstermiştir, ancak bu düşüş konsantrasyona bağlı değildir. Çözücü kontrole göre yapılan kıyaslamada ise mitotik indekste en yüksek dört konsantrasyonda (12,50-75,00

µg/ml), anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.3). Ayrıca yapılan çalışmalarda Trazodone'un replikasyon indeksini etkilemediği belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

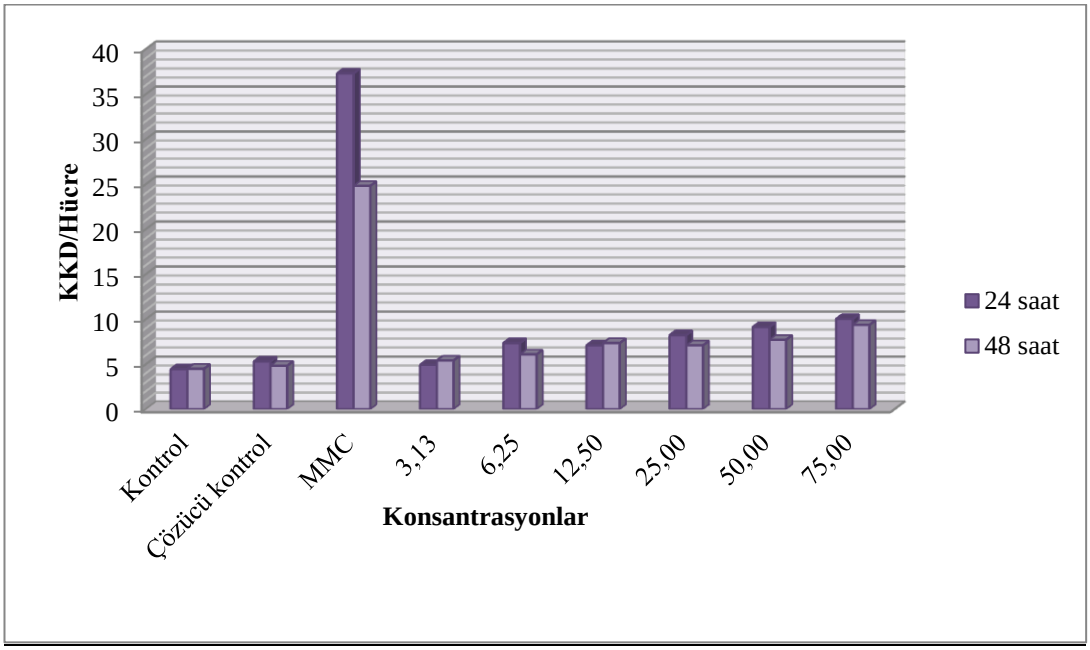
Çizelge 4.2. Trazodone'nun insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi

Test maddesi	Uygulama		Min-max KKD	KKD/hücre ± SH	M_1	M_2	M_3	Rİ ± SH	Mİ ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/ml)							
Kontrol	24	0,00	2-12	4,44±0,29	37	37	126	1,74±0,12	8,00±0,61
Çözücü kontrol	24	21,66	2-10	5,30±0,26	39	50	111	1,80±0,13	6,15±0,54
MMC	24	0,20	24-62	37,30±1,15	58	57	85	1,56±0,11	3,80±0,43
Trazodone	24	3,13	3-10	4,92±0,23	42	41	117	1,81±0,12	5,70±0,52**
		6,25	4-15	7,34±0,30+ ¡	53	50	97	1,65±0,11	5,25±0,49***
		12,50	4-11	7,08±0,22+ ¡	43	47	110	1,77±0,12	4,80±0,48***
		25,00	5-13	8,22±0,29+ ¡	42	45	113	1,79±0,13	2,80±0,37*** **a_2**
		50,00	6-13	9,12±0,27+ ¡	31	48	121	1,89±0,13	2,80±0,37*** **a_2**
		75,00	7-16	10,02±0,30+ ¡	54	64	82	1,56±0,11	2,00±0,31*** **a_2**
Kontrol	48	0,00	1-10	4,48±0,30	58	50	92	1,59±0,11	7,20±0,57
Çözücü kontrol	48	21,66	2-12	4,82±0,34	54	50	96	1,64±0,11	5,85±0,52
MMC	48	0,20	18-44	24,80±1,43	129	63	8	0,82±0,06	3,65±0,42
Trazodone	48	3,13	3-13	5,40±0,31+ ¡	45	50	105	1,73±0,12	5,70±0,52
		6,25	5-11	6,08±0,32+ ¡	39	50	111	1,79±0,12	5,55±0,51*
		12,50	6-13	7,34±0,30+ ¡	53	50	97	1,65±0,12	3,70±0,42*** **a_1**
		25,00	6-13	7,08±0,28+ ¡	63	80	57	1,38±0,09	3,10±0,39*** **a_2**
		50,00	7-13	7,70±0,29+ ¡	68	74	58	1,36±0,09	2,90±0,37*** **a_2**
		75,00	7-14	9,36±0,29+ ¡	82	61	57	1,28±0,09	2,35±0,33*** **a_2**

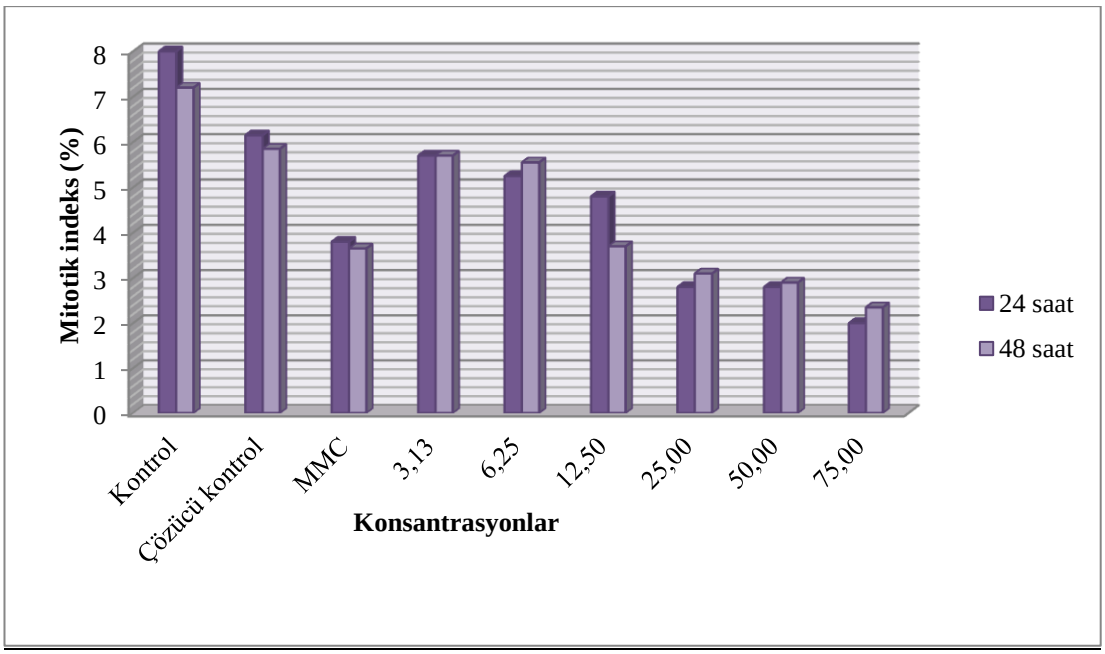
\+ Kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (t-testi)
¡ Çözücü kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (t-testi)

* Kontrole göre P< 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)
** Kontrole göre P< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)
*** Kontrole göre P< 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)

a_1 Çözücü kontrole göre P< 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)
a_2 Çözücü kontrole göre P< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)
a_3 Çözücü kontrole göre P< 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.2. Trazodone ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki kardeş kromatit değişimi frekansı



Şekil 4.3. Trazodone ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki mitotik indeks frekansı



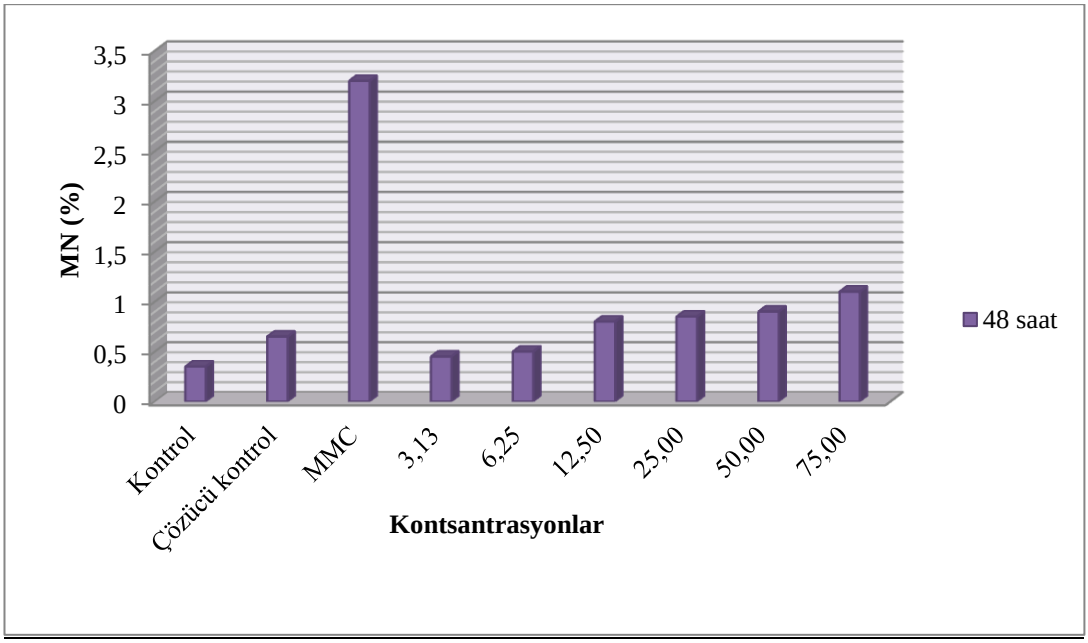
Resim 4.2. Trazodone ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimleri

Trazodone uygulamasıyla, mikronükleus taşıyan binükleat hücrelerin frekansında da konsanrasyona bağlı bir artış meydana gelmiştir (r=0,95). Ancak bu artış kontrole göre 25,00; 50,00 ve 75,00 µg/ml'lik konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı iken çözücü kontrole göre ise hiçbir konsantrasyonda anlamlı değildir (Çizelge 4.3, Şekil 4.4). Trazodone ile muamele edilmiş insan lenfositlerinde bir, iki ve üç mikroçekirdekli binükleatlara rastlanmıştır (Resim 4.3). Trazodone uygulamasının nükleer bölünme indeksi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.3).

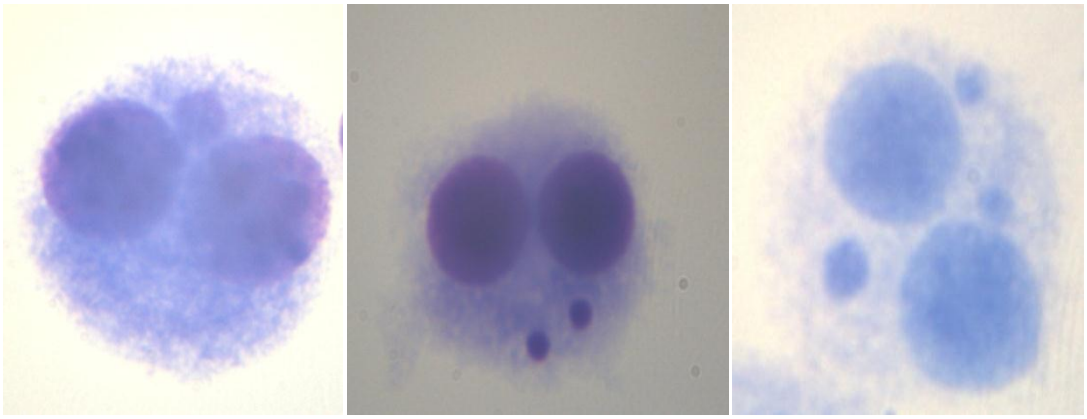
Çizelge 4.3. Trazodone'nun insan lenfositlerinde mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi

Test maddesi	Uygulama		Sayılan	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları			MN ± SH	Nükleer Bölünme
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/ml)	binükleat hücre sayısı	(1)	(2)	(3)	(%)	İndeksi (NBI) ± SH
Kontrol	48	0,00	2000	7	-	-	0,35 ± 0,13	1,68 ± 0,41
Çözücü kontrol	48	21,66	2000	13	-	-	0,65 ± 0,18	1,33 ± 0,36
MMC	48	0,20	2000	56	4	-	3,20± 0,39	1,39 ± 0,37
Trazodone	48	3,13	2000	9	-	-	0,45± 0,15	1,63 ± 0,40
		6,25	2000	10	-	-	0,50 ± 0,16	1,59 ± 0,40
		12,50	2000	13	-	3	0,80 ± 0,20	1,57 ± 0,39
		25,00	2000	17	-	-	0,85 ± 0,21*	1,52 ± 0,39
		50,00	2000	18	-	-	0,90 ± 0,21*	1,30 ± 0,36
		75,00	2000	22	-	-	1,10 ± 0,23**	1,24 ± 0,35

*Kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)
**Kontrole göre p<0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)
***Kontrole göre p<0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.4. Trazodone ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki mikronükleus frekansı



(a) (b) (c)

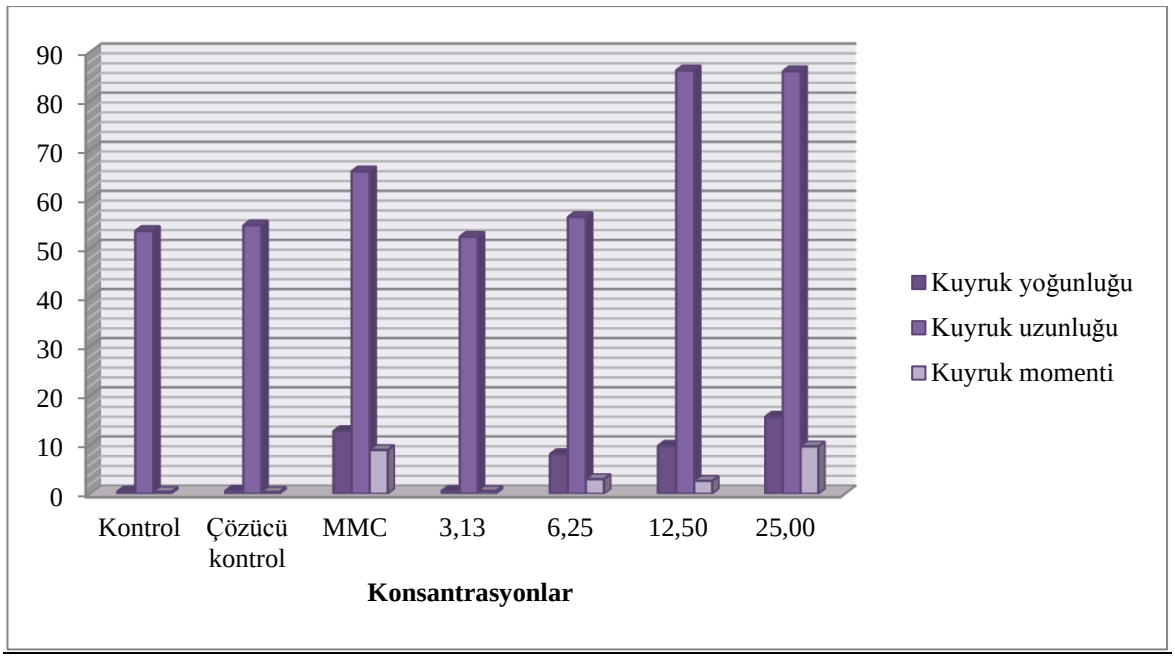
Resim 4.3. Trazodone ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen mikronükleuslu binukleat hücreler a) bir mikronükleuslu binükleat b) iki mikronükleuslu binükleat c) üç mikronükleuslu binükleat

Trazodone ile yapılan komet testi sonuçlarına göre en yüksek iki konsantrasyonun (50,00 ve 75,00µg/ml) toksik olduğu gözlenmiştir. Kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti hem kontrole hem de çözücü kontrole göre 6,25 µg/ml'lik konsantrasyondan itibaren istatistiksel olarak önemlidir. Diğer yandan kuyruk uzunluğu kontrole göre 6,25 µg/ml'lik konsantrasyondan, çözücü kontrole göre ise 12,00 µg/ml'lik konsantrasyondan itibaren anlamlı bir artış göstermiştir (Çizelge 4.4, Şekil 4.5, Resim 4.4). Bunların yanı sıra, kuyruk yoğunluğu (r=0,97), kuyruk uzunluğu (r=0,92) ve kuyruk momentindeki (r=0,88) artışların konsantrasyona bağlı olduğu görülmüştür.

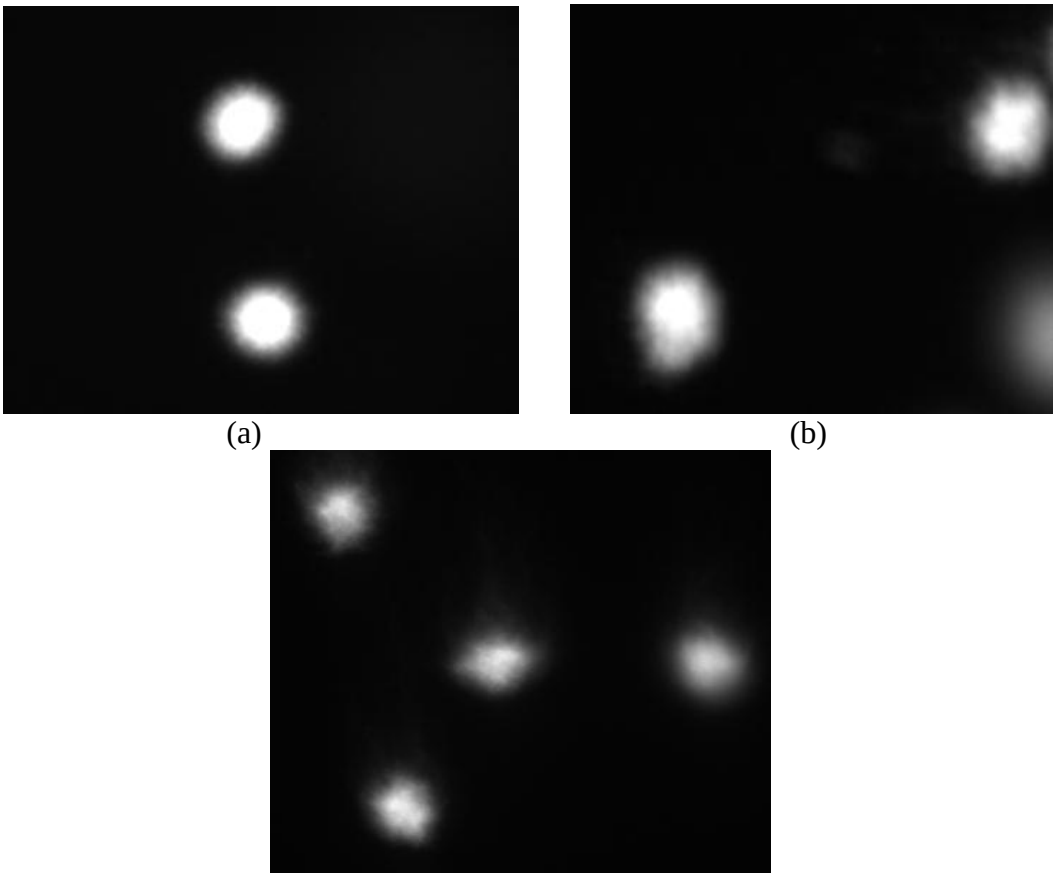
Çizelge 4.4. Trazodone ile insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı

Test Maddesi	Uygulama		Kuyruk Yoğunluğu	Kuyruk Uzunluğu	Kuyruk Momenti
	Süre (saat)	Konsantrasyon			
Negatif Kontrol	1	0,0 µg/ml	0,46 ± 0,60	53,48 ± 0,61	0,40 ± 0,44
Pozitif Kontrol (H_2O_2)	1	100 µM	12,76 ± 1,35	65,62 ± 1,22	8,90 ± 4,00
Çözücü Kontrol	1	21,66 µg/ml	0,63 ± 0,10	54,64 ± 0,78	0,36 ± 0,47
Trazodone	1	3,13 µg/ml	0,60 ± 0,84	52,32 ± 0,86	0,55 ± 0,07
		6,25 µg/ml	8,06 ± 1,02* **a_1**	56,33 ± 0,88*	3,00 ± 0,64* **a_1**
		12,50 µg/ml	9,78 ± 0,84* **a_1**	86,18 ± 2,70* **a_1**	2,62 ± 0,28* **a_1**
		25,00 µg/ml	15,68 ±1,98* **a_1**	86,04 ± 3,80* **a_1**	9,64 ± 1,40* **a_1**
		50,00 µg/ml	toksik	toksik	toksik
		75,00 µg/ml	toksik	toksik	toksik

* Kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (t-testi)
a_1 Çözücü kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (t-testi)



Şekil 4.5. Trazodone ile muamele edilmiş insan lenfositlerinde oluşan komet kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti



(a) (b)

(c)

Resim 4.4. Trazodone ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının komet testi ile görünümü a) hasarsız DNA b) orta hasarlı DNA c) çok hasarlı DNA

4.2. Milnacipran Uygulaması

Milnacipran uygulaması ile insan lenfosit kültürlerinde dört tip yapısal anormalliğe rastlanmıştır. Bunlar, kromatid (%51,74) ve kromozom kırıkları (%38,48), disentrik kromozomlar (%6,74) ve kardeş kromatidlerde birleşme (%3,04)'dir (Çizelge 4.5, Resim 4.5). Bu anormalliklerden en sık görülenleri kromatid ve kromozom kırıklarıdır. Yapılan analizler sonucunda, Milnacipran'ın anormal hücre frekansı ve hücre başına düşen anormallik oranı için tüm uygulama sürelerinde kontrole göre en düşük iki konsantrasyon hariç (2,50 ve 5,00 µg/ml) diğer tüm konsantrasyonlarda önemli artışa neden olduğu görülmüştür. Diğer yandan bu artışlar konsantrasyona bağlıdır (anormal hücre yüzdesi 24 saatlik uygulamada r=0,92, 48 saatlik

uygulamada r=0,96; hücre başına düşen anormallik sayısı 24 saatlik uygulamada r=0,93, 48 saatlik uygulamada r=0,96) (Çizelge 4.5, Şekil 4.6).

Çizelge 4.5. Milnacipran uygulaması ile insan periferal lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları

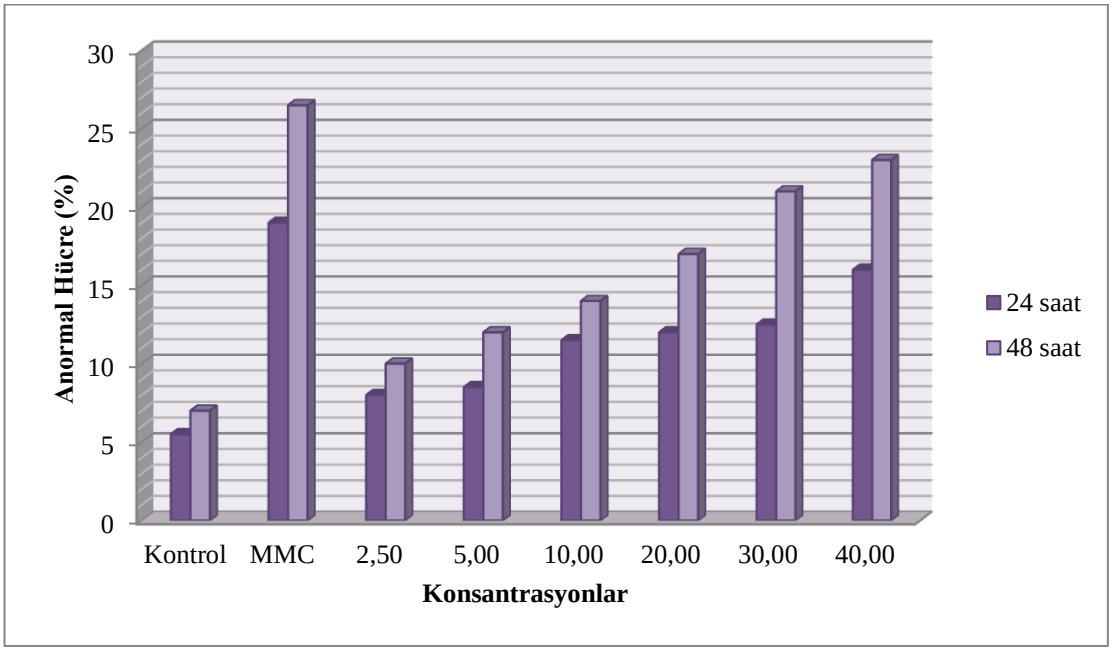
Test maddesi	Uygulama		Anormallikler				Anormal hücre ± SH (%)	KA/Hücre ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/ml)	ktk	kzk	kkb	ds		
Kontrol	24	0,00	7	4	-	-	5,50±1,61	0,06±0,02
MMC	24	0,20	24	11	2	2	19,00±2,77	0,20±0,03
Milnacipran	24	2,50	9	3	1	3	8,00±1,92	0,08±0,02
		5,00	11	6	-	-	8,50±1,97	0,09±0,02
		10,00	15	6	-	2	11,50±2,26*	0,12±0,02*
		20,00	15	6	-	3	12,00±2,30*	0,12±0,03*
		30,00	15	8	1	1	12,50±2,34*	0,13±0,03*
		40,00	18	11	-	4	16,00±2,59***	0,17±0,03***
Kontrol	48	0,00	9	4	1	1	7,00±1,80	0,08±0,02
MMC	48	0,20	31	24	1	2	26,50±3,12	0,29±0,03
Milnacipran	48	2,50	9	8	1	2	10,00±2,12	0,10±0,02
		5,00	14	7	1	3	12,00±2,30	0,13±0,02
		10,00	10	16	1	1	14,00±2,45*	0,14±0,03*
		20,00	12	19	-	3	17,00±2,66**	0,17±0,03**
		30,00	17	22	2	3	21,00±2,88***	0,22±0,03***
		40,00	22	22	3	1	23,00±2,98***	0,24±0,03***
Kromozomal anormallik yüzdesi			51,74	38,48	3,04	6,74		

ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, kkb: kardeş kromatidlerde birleşme, ds: disentrik kromozom

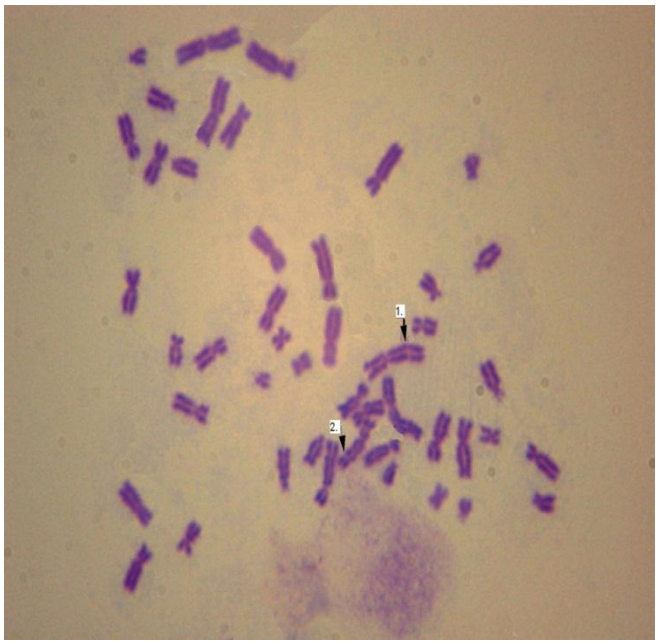
* Kontrole göre P< 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

** Kontrole göre P< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)

*** Kontrole göre P< 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)

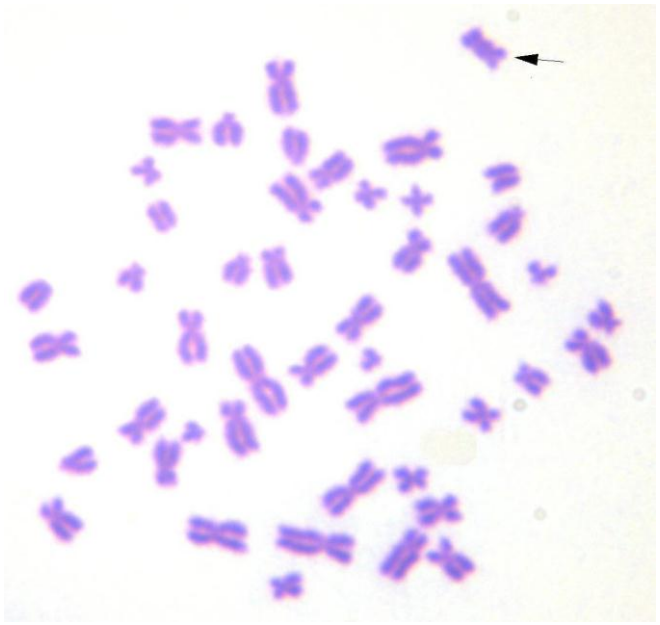


Şekil 4.6. Milnacipran ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki anormal hücre frekansı

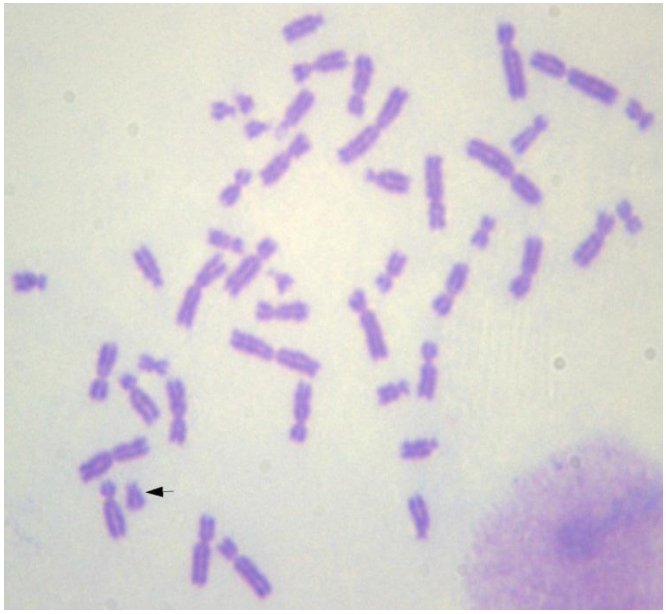


(a)

Resim 4.5. Milnacipran ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri a) 1. kromozom kırığı ve 2. kromatid kırığı b) disentrik kromozom c) kardeş kromatidlerde birleşme



(b)



(c)

Resim 4.5. (Devam) Milnacipran ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri a) 1. kromozom kırığı ve 2. kromatid kırığı b) disentrik kromozom c) kardeş kromatidlerde birleşme

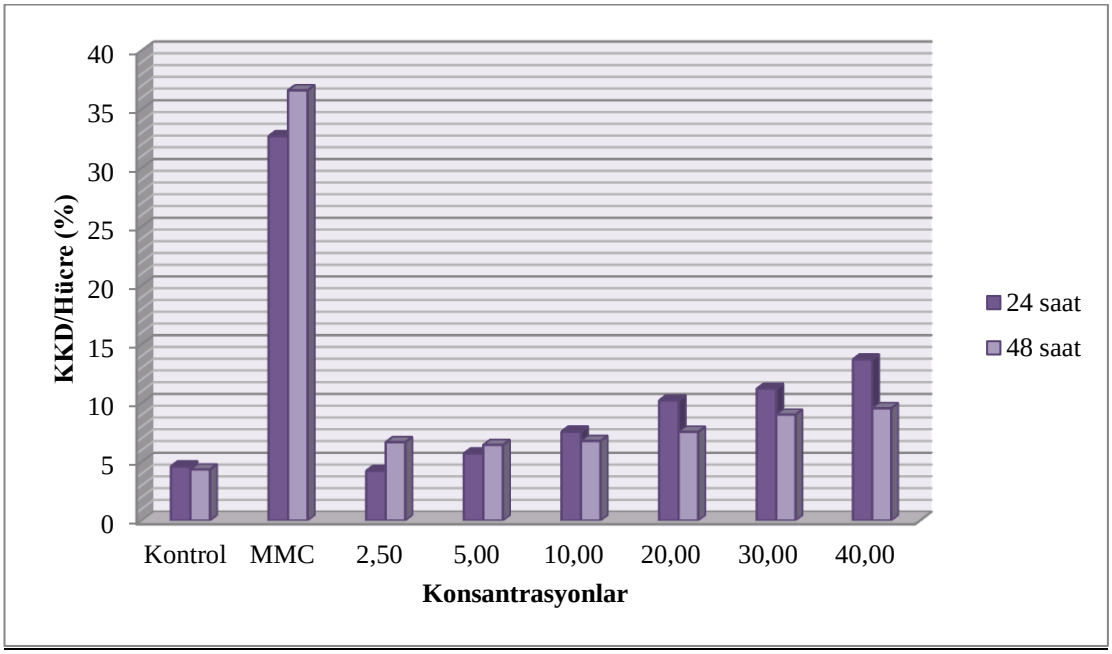
Milnacipran'ın KKD testi sonuçlarına göre, bu ilacın 24 saatlik uygulaması, 2,50 µg/ml'lik konsantrasyon hariç, diğer tüm konsantrasyonlarda KKD oluşumu kontrole göre önemli oranda ve konsantrasyona bağlı olarak arttırmıştır (r=0,99). 48 saatlik uygulamasında ise tüm konsantrasyonlar kontrol ile kıyaslandığında KKD

oluşumunu konsantrasyona bağlı olarak anlamlı düzeyde artırmıştır (r=0,85) (Çizelge 4.6, Şekil 4.7, Resim 4.6). Milnacipran uygulaması ile oluşan en az KKD sayısı 2, en fazla KKD sayısı ise 22'dir. Mitotik indeks 24 saatlik sürede, tüm konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı düşüş göstermiştir fakat bu düşüş konsantrasyona bağlı değildir (r=-0,25). 48 saatlik uygulamada 5, 20, 30 ve 40 µg/ml'lik konsantrasyonlar mitotik indeksi anlamlı oranda azaltmıştır ancak bu azalış konsantrasyona bağlı değildir (r=-0,18) (Çizelge 4.6, Şekil 4.8). Ayrıca yapılan çalışmalarda Milnacipran'ın replikasyon indeksini etkilemediği belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

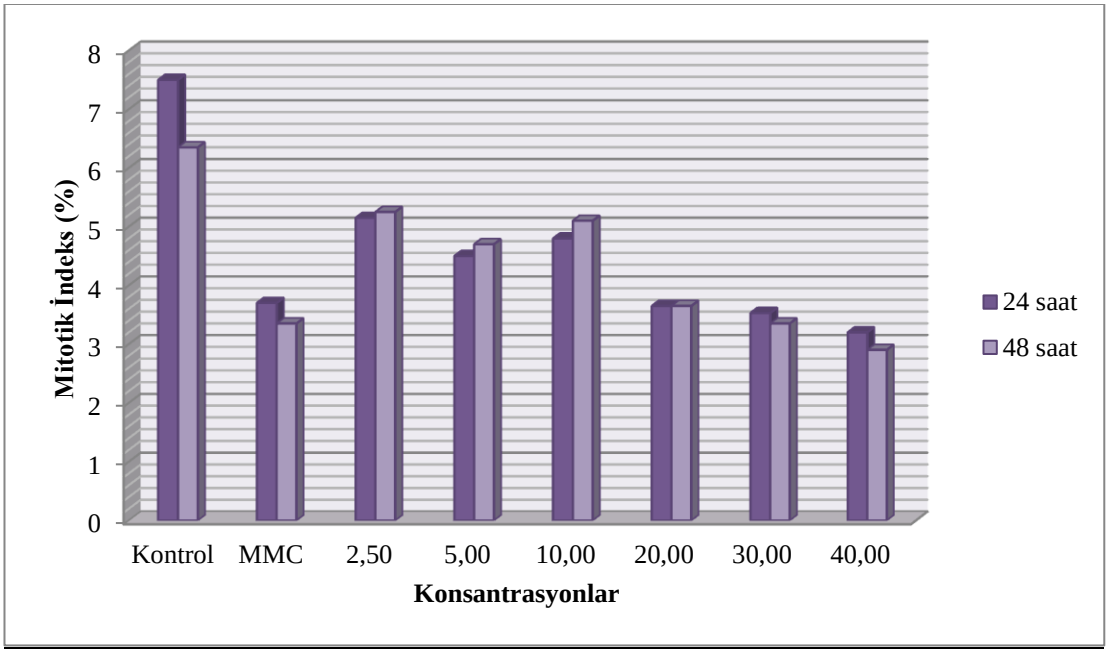
Çizelge 4.6. Milnacipran'ın insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi

Test maddesi	Uygulama		Min-max KKD	KKD/hücre ± SH	M_1	M_2	M_3	Rİ ± SH	Mİ ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/ml)							
Kontrol	24	0,00	2-11	4,60±0,28	58	42	100	2,21±0,06	7,50±0,59
MMC	24	0,20	20-65	32,70±1,50	53	56	91	2,19±0,06	3,70±0,42
Milnacipran	24	2,50	2-8	4,22±0,23	62	50	88	2,13±0,06	5,15±0,49**
		5,00	3-15	5,70±0,37¡	82	46	72	1,95±0,06	4,50±0,46***
		10,00	5-15	7,56±0,28¡	42	60	98	2,28±0,06	4,80±0,48***
		20,00	7-16	10,20±0,30¡	70	47	83	2,07±0,06	3,65±0,42***
		30,00	8-17	11,20±0,29¡	54	48	98	2,22±0,06	3,55±0,41***
		40,00	9-22	13,70±0,44¡	47	63	90	2,22±0,06	3,20±0,39***
Kontrol	48	0,00	2-8	4,34±0,21	73	41	86	2,07±0,06	6,35±0,55
MMC	48	0,20	22-60	36,60±1,35	53	64	83	2,15±0,06	3,35±0,40
Milnacipran	48	2,50	4-14	6,66±0,30¡	47	43	110	2,32±0,06	5,25±0,50
		5,00	4-9	6,42±0,19¡	58	47	95	2,19±0,06	4,70±0,47*
		10,00	4-11	6,76±0,22¡	65	44	91	2,13±0,06	5,10±0,49
		20,00	5-11	7,54±0,23¡	78	43	79	2,01±0,06	3,65±0,42***
		30,00	6-16	9,00±0,30¡	67	43	90	2,12±0,06	3,35±0,40***
		40,00	7-13	9,54±0,21¡	52	45	103	2,26±0,06	2,90±0,38***

¡ Kontrole göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı (t-testi)
*Kontrole göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)
**Kontrole göre $p<0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi)
***Kontrole göre $p<0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.7. Milnacipran ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki kardeş kromatit değişimi frekansı



Şekil 4.8. Milnacipran ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki mitotik indeks frekansı



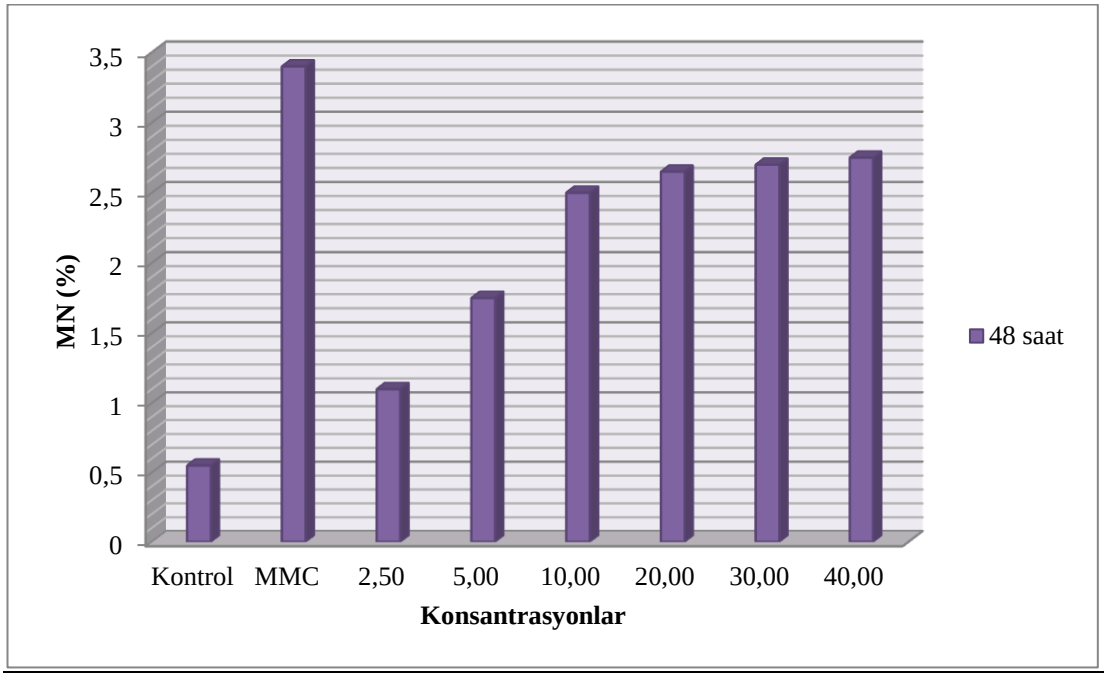
Resim 4.6. Milnacipran ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimleri

Yapılan MN analizi sonucunda, Milnacipran'ın mikronükleus frekansını kontrole göre en düşük konsantrasyon hariç diğer tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı oranda ve konsantrasyona bağlı olarak artırdığı gözlenmiştir (r=0,91) (Çizelge 4.7, Şekil 4.9). İnsan lenfositlerinin Milnacipran ile muamelesi sonucunda bir, iki ve üç mikroçekirdekli binükleatlara rastlanmıştır (Resim 4.7). Ayrıca Milnacipran uygulamasının nükleer bölünme indeksi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.7).

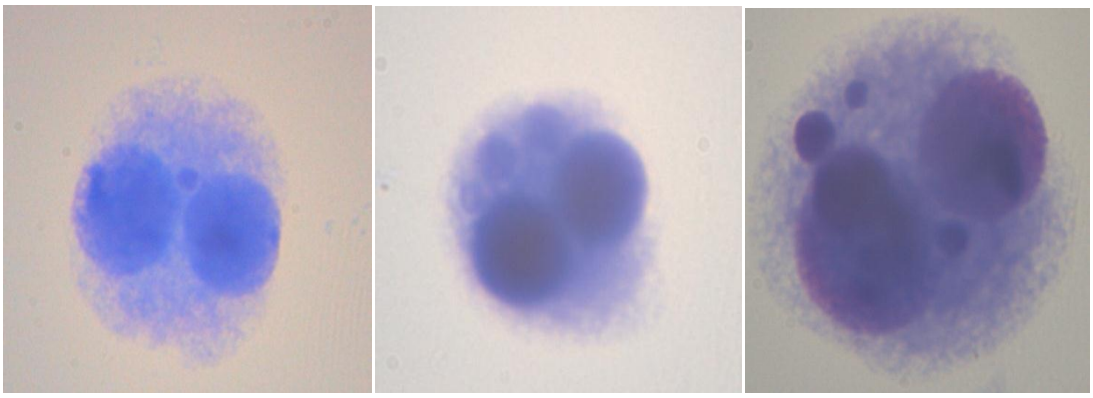
Çizelge 4.7. Milnacipran'ın insan lenfositlerinde mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi

Test maddesi	Uygulama		Sayılan	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları			MN ± SH	Nükleer Bölünme
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/ml)	binükleat hücre sayısı	(1)	(2)	(3)	(%)	İndeksi ± SH (NBI)
Kontrol	48	0,00	2000	11	-	-	0,55 ± 0,17	1,24 ± 0,35
MMC	48	0,20	2000	64	2	-	3,40 ± 0,41	1,34 ± 0,36
Milnacipran	48	2,50	2000	18	2	-	1,10 ± 0,23	1,38 ± 0,37
		5,00	2000	25	3	1	1,75 ± 0,29***	1,47 ± 0,38
		10,00	2000	45	1	1	2,50 ± 0,35***	1,45 ± 0,38
		20,00	2000	47	1	1	2,65 ± 0,36***	1,49 ± 0,38
		30,00	2000	44	5	-	2,70 ± 0,36***	1,41 ± 0,37
		40,00	2000	51	2	-	2,75 ± 0,37***	1,41 ± 0,37

***Kontrole göre p<0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.9. Milnacipran ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki mikronükleus frekansı



(a) (b) (c)

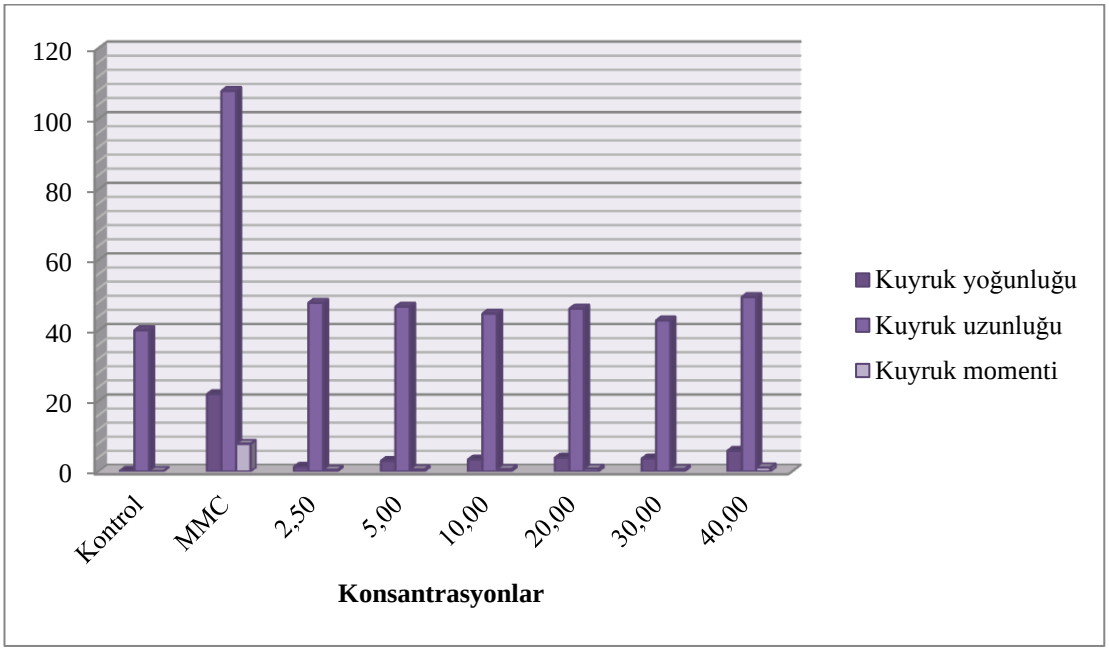
Resim 4.7. Milnacipran ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen mikronükleuslu binukleat hücreler a) bir mikronükleuslu binükleat b) iki mikronükleuslu binükleat c) üç mikronükleuslu binükleat

Komet analiziyle Milnacipran'ın DNA seviyesinde hasar oluşturup oluşturmadığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti uygulanan tüm konsantrasyonlarda kontrole göre önemli düzeyde artmıştır (Çizelge 4.8, Şekil 4.10, Resim 4.8). Ayrıca kuyruk yoğunluğu (r=0,95) ve kuyruk momentindeki (r=0,91) artış konsantrasyona bağlıdır.

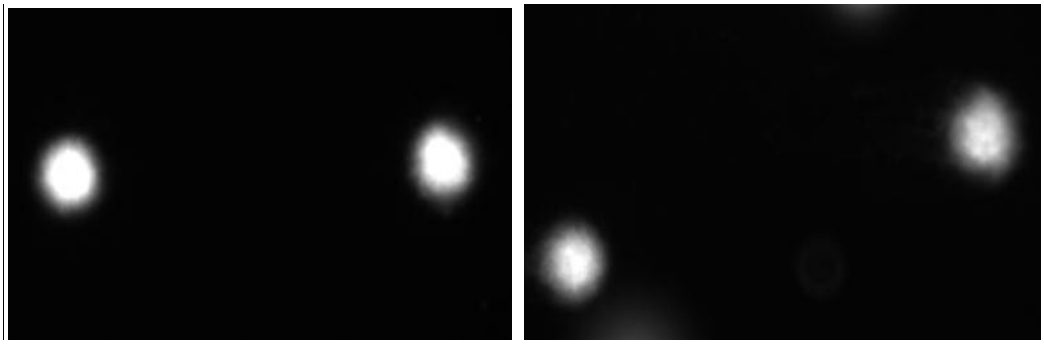
Çizelge 4.8. Milnacipran ile insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı

Test Maddesi	Uygulama		Kuyruk Yoğunluğu	Kuyruk Uzunluğu	Kuyruk Momenti
	Süre (saat)	Konsantrasyon			
Negatif Kontrol	1	0,0 µg/ml	0,19 ± 0,02	40,12 ± 0,30	0,11 ± 0,01
Pozitif Kontrol (H_2O_2)	1	100 µM	21,97 ± 1,35	107,87 ± 2,45	7,84 ± 0,74
Milnacipran	1	2,50 µg/ml	1,34 ± 0,19*	47,88 ± 0,61*	0,44 ± 0,06*
		5,00 µg/ml	3,01 ± 0,33*	46,77 ± 0,54*	0,58 ± 0,06*
		10,00 µg/ml	3,40 ± 0,35*	44,80 ± 0,62*	0,66 ± 0,07*
		20,00 µg/ml	3,92 ± 0,38*	46,21 ± 0,62*	0,77 ± 0,07*
		30,00 µg/ml	3,66 ± 0,39*	42,87 ± 0,56*	0,67 ± 0,07*
		40,00 µg/ml	5,88 ± 0,67*	49,51 ± 1,05*	1,15 ± 0,30*

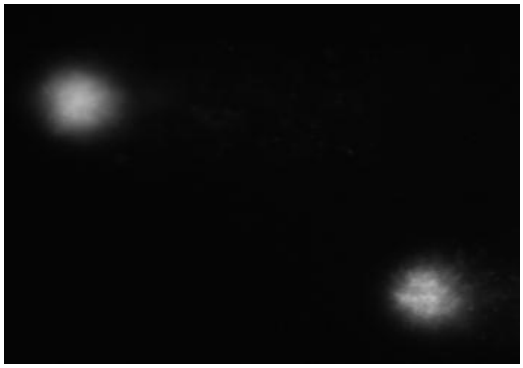
* Kontrole göre p< 0,05 düzeyinde anlamlı



Şekil 4.10. Milnacipran ile muamele edilmiş insan lenfositlerinde oluşan komet kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti



(a) (b)



(c)

Resim 4.8. Milnacipran ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının komet testi ile görünümü a) hasarsız DNA b) orta hasarlı DNA c) çok hasarlı DNA

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Antidepresanlar depresyon başta olmak üzere pek çok psikiyatrik hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlardır. Çoğu ilaç değişik derecelerde ikincil sağlık etkilerine neden olmakta ve bu bazı durumlarda insan sağlığı için ciddi tehlike oluşturabilmektedir. Bu potansiyel zarar özellikle uzun süreli kullanım söz konusu olduğunda kaygı vericidir. Antidepresan ilaçlar 6 ay veya daha fazla sürede veya tedavinin durumuna göre sürekli kulanılan ilaçlardır (Frommer ve ark., 1987; Perez ve ark., 2002). Ayrıca, etkinin geç başlaması, düzelmeyi sağlayan dozda ilaç kullanımına devam edilmesine rağmen hastanın klinik durumunun tekrar kötüleşmesi gibi durumlar söz konusudur. Bu gibi sorunlar nedeniyle antidepresan tedavilerin etkinliğini arttırmaya dönük girişimlere gereksinim duyulmaktadır. Bunun için kullanılagelmekte olan ilacın endikasyonu ile ilgili etkisini arttıran ilaçlar eklenerek güçlendirme tedavisi uygulanmaktadır (Türkçapar ve Ervatan, 2001).

Uzun süreli kullanım ve güçlendirme tedavisi gibi nedenlerle antidepresanların bahsedilen ikincil sağlık etkilerine neden olma olasılıkları yüksektir. Antidepresan ilaçların ağırlıklı olarak kardiyovasküler sistem üzerinde olumsuz etkilerini gösteren raporlar bulunmaktadır (Fasoli ve ark., 1981; Burrows ve Vohra, 1986). Ayrıca miyoklonus (bir tek kasın veya bir grup iskelet kasının, vücudun bir veya birçok bölgesinde fizyolojik veya patolojik nedenlerle belli aralıklarla tik benzeri kasılması ve gevşemesi), eşeysel fonksiyon bozukluğu ve hiponatremiye (kandaki tuz dengesizliği) neden olduğu da bildirilmiştir. Diğer yandan terapotik ilaçların DNA ile doğrudan etkileşime girerek ya da metabolik transformasyonları sonrası genotoksik hasar meydana getirdiği bilinmektedir (Farber, 1987; Perez ve ark., 2002).

Çeşitli kimyasalların karsinojenik özelliklerinin belirlenmesinde genotoksisite çalışmaları çok fazla tercih edilmektedir. DNA'da hasar olarak tanımlanan genetik değişim, kanser başlatıcı bir mekanizma olarak kabul edilmekte, bu nedenle geliştirilen çeşitli yöntemler ile DNA'daki hasarın saptanması kanser riskinin belirlenmesinde yardımcı olabilmektedir (Salama ve ark., 1999; Fahmy ve ark., 2008).

Bakteri, *in vivo* ve *in vitro* memeli hücreleri veya bitkilerin kullanıldığı çeşitli test sistemleriyle, fiziksel ve kimyasal mutajenlerin meydana getirdiği genetik hasarın düzeyi belirlenebilmektedir. Bunlar içinde en yaygın kullanılanlardan biri, insan lenfosit kültürleridir. Bu hücreleri kullanmanın birçok avantajı vardır. İnsan periferal lenfositleri kolayca ve tekrarlanabilir bir şekilde elde edilebilir. Ayrıca çok az bir miktar periferal kanda fazla sayıda lenfosit bulunmaktadır. Kan hücreleri vücut sıvıları yoluyla diğer dokulara kadar ulaştığı için potansiyel olarak çevresel ajanların oluşturduğu yan etkiye diğer dokulardan daha hassastır. Bu nedenle lenfositler çeşitli kimyasalların mutajenik potansiyelinin belirlenmesinde kullanışlı bir hücre grubudur (Lerda ve ark., 2005). İnsan lenfositlerinde en sık kullanılan mutajenite testleri, kromozomal anormallikler, kardeş kromatid değişimi analizleri, mikronükleus ve komet testidir (Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006; Soltani ve ark., 2009; Zengin ve ark., 2011; Doak ve ark., 2012).

Bu çalışmada, yoğun kullanımlarına rağmen daha önce insan lenfositlerinde genotoksisiteleri ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmamış olan Trazodone ve Milnacipran'ın *in vitro* genotoksik etkileri kromozom anormallikleri (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN), ve komet testleri kullanılarak incelenmiştir.

Yapılan analizlerin sonuçlarına göre, kullanılan her iki antidepresan ilaç etken maddesinin de, özellikle yüksek dozlarda, insan periferal lenfositlerinde kromozomal anormallik miktarında önemli artışlara neden olduğu belirlenmiştir. Her iki etken madde tarafından en sık oluşturulan anormallik tipi kromatid kırığıdır. Bunu takiben yoğun olarak kromozom kırıkları tespit edilmiştir.

Trazodone'un 24 saatlik uygulamasında anormal hücre yüzdesi, negatif kontrol ile kıyaslandığında 12,50 µg/ml'lik konsantrasyondan itibaren; çözücü kontrolle kıyaslandığında ise 25,00 µg/ml'lik konsantrasyondan itibaren anlamlı bir artış göstermiştir. Ayrıca bu artış konsantrasyona bağlı olarak gerçekleşmiştir. Hücre başına düşen anormallik sayısındaki artış ise negatif kontrole göre tüm konsantrasyonlarda önemliyken; çözücü kontrole göre 12,50 µg/ml'lik

konsantrasyondan itibaren önemlidir. Diğer yandan bu artış yine konsantrasyona bağlıdır. Trazodone'un 48 saatlik uygulamasında 3,13 ve 6,25 μg/ml'lik konsantrasyonlar hariç diğer konsantrasyonlarda kromozomal anormallik frekansı hem negatif kontrole hem de çözücü kontrole göre önemli derecede artmıştır ve bu artış konsantrasyona bağlıdır.

Kullanılan diğer ilaç etken maddesi olan Milnacipran ise tüm uygulama sürelerinde 2,50 ve 5,00 μg/ml'lik konsantrasyonlar hariç tüm konsantrasyonlarda kromozomal anormallik frekansında konsantrasyona bağlı anlamlı artışlara sebep olmuştur.

Kromozom aberasyon analizi kromozom veya kromatid kırıklarını, yeniden düzenlenmeleri, translokasyonları, inversiyonları veya anafaz köprülerini içeren kromozomal materyal değişimlerini ve kırılmaların frekansını ölçer. Kromozomal aberasyon frekansındaki artış, genetik hastalıkların ve kanser riskini arttıran klastojenitenin bir göstergesidir (Hagmar ve ark., 1998; Ji ve ark, 2001; Bolognesi, 2003; Bozkurt ve ark., 2004; Doak ve ark., 2012).

Dolaylı yoldan etki eden genotoksik ajanlar, genellikle hücre bölünmesinde görev alan bileşenler ve biyomoleküller yoluyla genetik hasara neden olurlar. DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi birçok protein içeren çok faktörlü, karmaşık bir süreçtir. Söz konusu hasar kromozomların mekanik segregasyonu için gerekli proteinlerde (sentrioller, mikrotübüller, kinetokorlar), veya DNA replikasyonu için gerekli enzimlerde (polimeraz, topoizomeraz), veya kromozom segregasyonu ve replikasyonunda görev yapan DNA tamir genlerinde ya da uyarı taşıyıcı hücre döngüsü kontrol noktalarındaki proteinlerde olabilir. Sonuç olarak bu tür bileşenlerdeki hasarlar yapısal veya sayısal kromozom anormalliklerine neden olmaktadır (Doak ve ark., 2012).

İnsanlarda genotoksik ajanlara maruziyetin önemli bir sonucu olan kromozomal anormallikler, DNA'ya hasar veren çeşitli ajanlar tarafından oluşturulabilmektedir (Antunes ve ark., 2005). Kromozomal anormallikler yapısal ya da sayısal anormallikler olarak ortaya çıkarabilmektedir. Kromozomlarda meydana gelen

yapısal anormallikler, DNA'da tek ya da çift zincir kırıkları ile oluşmaktadır. Özellikle çift zincir kırıkları primer DNA lezyonları olarak kabul edilmektedir (Morgan ve ark., 1998). Yapısal anormallikler morfolojik kriterlere göre kromatid ve kromozom tipi anormallikleri olarak iki gruba ayrılmaktadır. Kromatid ve kromozom kırıkları, kromozomlarda tek bir koldaki çift zincir kırıkları veya her iki koldaki kırılmalar olarak gözlenmektedir (Savage, 1975). Kromozom tipi anormallikler, çift zincir kırıklarının yanlış tamir edilmesi veya tamir edilememesi sonucunda, çoğunlukla S fazından bağımsız olan klastojenler tarafından *in vivo* olarak G_0 ve G_1 lenfositlerinde oluşturulmaktadır. DNA replikasyonu ve kromozom duplikasyonundan sonra, G_0 ve G_1'deki anormallikler iki kromatitte de gözlenecek olup metafazda kromozom tipi kırıklar ve kromatid değişimleri ortaya çıkacaktır. Kromatid tipi kırıklar, S fazına bağlı klastojenler tarafından oluşturulan tek zincir kırıkları ve baz modifikasyonlarıyla da oluşmaktadır (Albertini ve ark., 2000; Hagmar ve ark., 2004). Kimyasalların birçoğu tarafından indüklenen yapısal aberasyonlar kromatid tipidir ve bunlar genellikle kimyasal muamelenin ardından, DNA sentezinden sonraki ilk metafazda belirlenir (Satoh ve ark., 2002).

Her iki ilaç etken maddesinin de neden olduğu diğer bir anormallik tipi ise disentrik kromozomdur. Disentrik kromozomlar iki kromozom kolu arasındaki füzyon sonucu oluşan translokasyonlarla meydana gelmektedir. Disentrik kromozomlar, homolog olmayan kromozom kolları arasındaki füzyon veya homolog kromozomların iki kısa ya da iki uzun kolu arasındaki füzyon ile gerçekleşebilmektedir. (Satoh ve ark., 2002; Yılmaz ve ark., 2008).

Bu çalışmada kullanılan ilaç etken maddeleri kardeş kromatidlerde birleşme ve kromatid değişimine de (Trazodone için) sebep olmuşlardır. Kardeş kromatidlerde birleşme, çoğunlukla kromozom uçlarında meydana gelen terminal delesyonlar sonucunda oluşan kromozom kolları arasındaki karşılıklı birleşmedir (Murli, 2003; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006). Kromatid değişimi ise tipik olarak triadiyal veya quadriradyal olarak gözlenmekte olan kromozomlar arası değişimlerdir (Satoh ve ark., 2002; Yılmaz ve ark., 2008).

Genom sürekli olarak DNA'ya hasar veren ekzojen ajanların tehditi altındadır. Buna karşın, endojen süreçler de DNA hasarına neden olabilir. Replikasyon defektleri ise yanlış eşleşmeye neden olmaktadır. Meydana gelen DNA lezyonları genetik bilginin kaybı ya da yanlış geçişini önlemek için onarılmalıdır. Eğer DNA onarımında hata meydana gelirse bu da gelişimsel anomalilere ve tümörigenesise neden olur. Bununla birlikte hangi tamir sisteminin kullanılacağı hem lezyonun tipine hem de hücrenin, hücre döngüsünün hangi evresinde bulunduğuna bağlıdır. S ve G_2 evresinde oluşan DNA çift zincir kırıkları homolog rekombinasyon ile hasar görmemiş kardeş kromatit kullanılarak tamir edilir. Homolog rekombinasyon bu nedenle genomun devamlılığını sağlamak için şarttır. Bu nedenle kromozomal anormalliklerin oluşmasında hücre siklusunun G_2 fazı çok önemlidir. DNA hasarının büyük bir kısmı, hücre siklusunun G_2 fazında tamir edilir. Kromozomal anormalliklerin artması tamir yapılmadığını, yanlış yapıldığını veya engellendiğini göstermektedir (Branzei ve Foiani, 2008; Moynahan ve Jasin, 2010).

Farklı antidepresan ilaç etken maddeleri ile yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar tespit edilmiştir. Tarhan (2006) tarafından özgül serotonin geri alım engelleyicileri (SSRI) grubundan Prozac ve Paxil ilaçlarının genotoksisitesi insan lenfosit hücrelerinde kromozom anormalliği testi ile araştırılmıştır. Hem Prozac hem de etken maddesi olan fluoksetin 1,25; 2,50; 5,00 ve 10,00 μg/ml'lik konsantrasyonlarda uygulanmış ve sonuçta her ikisinin de kromozom anormalliklerinde konsantrasyona bağlı bir artış meydana getirdiği saptanmıştır. Aynı çalışmanın ikinci kısmında Prozac ve Paxil ilaçlarıyla tedavi gören hastalardan alınan kanlar kullanılmış ve yine kromozom anormalliklerinde artış meydana geldiği görülmüştür (Tarhan, 2006).

Psikiyatri bölümünde tedavi gören 18'i benzodiazepin ve diğer 18'i de lityum karbonat kullanan toplam 36 hastadan alınan lenfositlerde bu ilaçların olası genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla kromozomal anormallik testi yapılmıştır. Benzodiazepin kullanan hastalar günde ortalama 6,8 mg ilaç almaktadırlar ve bu hastaların tedavi süresi ortalama 5,5 yıldır. Lityum karbonatla tedavi gören hastalar ise ortalama 3,3 yıldır bu ilacı günde ortalama 841,7 mg olacak şekilde kullanmaktadırlar. Çalışmanın sonuçlarına göre her iki grupta da kromozomal

aberasyon oranı kontrollere göre önemli ölçüde artış göstermiştir. En sık görülen anormalliklerin ise disentrik kromozom ve kromatid değişimi olduğu belirtilmiştir (Bigatti ve ark., 1998).

Metilfenidat dikkat dağınıklığı ve hiperaktivite tedavisinde kullanılan bir ilaç etken maddesidir. Son yıllarda bu rahatsızlıklara sahip olan çocukların tedavisinde metilfenidat kullanımı artmıştır. Bu ilaçla 3 ay boyunca günde 20-54 mg arasında değişen dozlarda tedavi gören 12 çocuktan alınan lenfositlerle kromozom anormalliği testi yapılmıştır. KA için 50 metafaz hücresi iki farklı hücre alım zamanı için (ilaçla tedavi başlamadan önce ve ilaçla tedavi başladıktan 3 ay sonra) analiz edilmiştir. Sonuçta ilaçla tedavinin kromozom anormalliklerinde 3 kat artışa neden olduğu tespit edilmiştir (El-Zein ve ark., 2005). Bu ilacın karsinojenitesini araştırmak için yapılmış bir çalışmada ise 2 yıl boyunca F344 ratlarına beslenme yoluyla 0, 100, 500 ve 1000 μg/ml, B6C3F1 farelerine de 0, 50, 250 ve 500 μg/ml metilfenidat verilmiştir. Sonuçta erkek ve dişi farelerde hepatoselüler tümörlerde önemli bir artış gözlenmiştir (Dunnick ve Hailey, 1995).

Ali ve arkadaşları (2001), en sık reçete edilen özgül serotonin geri alım engelleyicilerinden biri olan fluoksetinin genotoksik etkilerini kromozomal anormallik testiyle analiz etmişlerdir. Bunun için hamile farelerin kemik iliği hücreleri kullanılmış ve 80 adet fareye gebeliğin farklı dönemlerinde günde 0,052; 0,104 ve 0,208 mg olacak şekilde fluoksetin verilmiştir. Sonuçta, yapısal kromozom anormalliklerinden kırık, disentrik kromozom ve halka kromozom; sayısal kromozom anormalliklerinden de poliploidi gözlenmiştir. Bu anormalliklerin sayısında kontrollerle karşılaştırıldığında doza bağlı ve anlamlı oranda artış tespit edilmiştir (Ali ve ark., 2001).

Hassanane ve arkadaşları (2012) tarafından trisiklik bir antidepresan olan amitriptilinin genotoksisitesi Swiss albino farelerin kemik iliği ve spermatosit hücreleri kullanılarak test edilmiştir. Deney hayvanları düşük, orta ve yüksek dozda ilaç verilen gruplara ayrılmış ve ilaç hayvanlara oral yoldan verilmiştir. Düşük doz grubundaki farelere bir ay süresince günde 1 mg/kg ilaç verilmiştir. Orta doz

grubundaki fareler için bir aylık periyot ikiye bölünerek ilk 15 günde 1 mg/kg, takip eden 15 günde ise 2mg/kg ilaç verilmiştir. Benzer şekilde yüksek doz grubundaki fareler için bir aylık periyot üçe bölünerek ilk 10 günde 1mg/kg, sonraki 10 günde 2mg/kg, diğer 10 günde ise 4mg/kg ilaç verilmiştir. Sonuç olarak amitriptilinin her üç doz grubunda da (hem kemik iliği hücrelerinde hem de spermatositlerde) yapısal ve sayısal kromozom anormalliklerini kontrole göre doza bağlı olarak arttırdığı gözlenmiştir. Bu nedenle amitriptilinin hem somatik hem de eşey hücrelerinde genotoksik olabileceği ve bu ilacın kullanımında dikkatli olunması gerektiği vurgulanmıştır (Hassanane ve ark., 2012).

Trisiklik antidepresan grubundan desipramin ve imipramin ilaçları kullanılarak fare kemik iliğinde *in vivo* olarak KA testi uygulanmıştır. Farelere Desipramin'in 2; 20 ve 60 mg/kg'lık, Imipramin'in ise 7, 20 ve 60 mg/kg'lık dozlarıyla 24 saat süreyle muamale edilmiştir. Sonuçta, her iki ilacın da doza bağlı olarak kromozom anormalliklerini anlamlı düzeyde arttırdığı belirlenmiş ve bu ilaçların genotoksik olabileceği açıklanmıştır (Madrigal-Bujaidar ve ark., 2010).

KKD ve kromatid aberasyonu oluşumu temel olarak birbirine benzemektedir. Ancak Ishii ve Watatani (1984) tarafından insan lenfositleri hücre döngüsünün S veya G_2 evresinde, mitomisin-C ve kafeine maruz bırakıldığında KKD ve kromatid aberasyonu frekansında farklılıklar gözlenmiştir. Buna göre KKD oluşumunun S fazında, kromatid aberasyonlarının oluşumunun ise S ve G_2 fazında meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu nedenle bu iki sitogenetik test birbiri için tamamlayıcı özelliktedir (Ishii ve Watatani, 1984; Bozkurt ve ark., 2004; Hagmar ve ark., 2004). Diğer yandan, lenfositlerle çalışılırken bu testlerin sınırlılıkları göz önüne alınarak yorum yapılmalıdır. Çünkü lenfosit çalışmaları hücrelerin ömrü ile sınırlıdır. Ciddi hasar görmüş hücreler kültür süresince bölünmeyebilir veya çok yavaş bölünebilir ya da hasar nedeniyle kaybolabilir (Baker ve Connor, 1996). Alternatif olarak, bazı yazarlara göre yüksek sıklıkta KKD'ye sahip hücreler birkaç yıl boyunca KKD'yi uyaran lezyonlar biriktirmiş, uzun yaşam süreli lenfositlerin bir alt kümesini temsil ediyor olabilir (Ponzanelli ve ark., 1997; Bonassi ve ark., 1999). Bu durumda, yüksek sıklıkta KKD'ye sahip hücrelerin belirlenmesi genotoksinlere uzun süreli

maruziyetin etkisini değerlendirmek için daha kullanışlıdır. Bununla birlikte *in vitro* olarak uyarılan lenfositlerde bazı genotoksik ajanların oluşturduğu lezyonların mitojenlerle etkili bir şekilde tamir edilebileceği dikkate alınması gereken bir konudur. Fakat dolaşımdaki lenfositler için böyle bir durum söz konusu değildir (Bozkurt ve ark., 2004).

Hayvanlarla yapılan çalışmalar psikojenik stresin KKD'de yükselmelere neden olabileceğini göstermiştir (Fischman ve ark., 1996; Fischman ve Kelly, 1999). Fischman ve arkadaşlarının yapığı bir çalışmada ratlarda akut psikojenik stresin hem kromozomal hem de moleküler seviyede genetik hasarı indüklediği tespit edilmiştir. Söz konusu çalışmada strese maruz bırakılan ratların kemik iliği hücrelerinde hem KKD hem de KA frekansı artış göstermiştir (Fischman ve ark., 1996).

Laboratuar koşullarında deney hayvanlarında oluşan strese bağlı sitogenetik hasar ile insanlardaki bulgular benzerlik göstermektedir. Örneğin, Irak savaşı sırasında Kuveyt'te konuşlandırılmış askerlerde KKD düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu artışı petrol yangınları sırasında üretilen hidrokarbonlara ve savaş esnasında oluşan psikojenik strese bağlamaktadırlar (McDiarmid ve ark., 1995). Benzer şekilde depresyon ve anksiyete bozuklukluğu olan insanlarda da büyük psikojenik stres yaşanabilir ve bu durum uzun vadede genotoksik değişikliklere sebep olabilir (Bozkurt ve ark., 2004).

Bu çalışmada kullanılan Trazodone ve Milnacipran antidepresan ilaç etken maddeleri insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi frekansında artışa neden olmuşlardır. Trazodone 24 saatlik uygulamasında en düşük konsantrasyon olan 3,13 µg/ml hariç diğer tüm konsantrasyonlarda; 48 saatlik uygulamasında ise çalışılan tüm konsantrasyonlarda kardeş kromatit değişimi frekansını hem negatif hem de çözücü kontrole göre önemli düzeyde arttırmıştır. Milnacipran da benzer şekilde 24 saatlik uygulamasında çalışılan en düşük konsantrasyon olan 2,50 µg/ml hariç diğer tüm konsantrasyonlarda; 48 saatlik uygulamasında ise tüm konsantrasyonlarda kardeş kromatit değişimi frekansını anlamlı oranda arttırmıştır.

Farklı antidepresan ilaç etken maddeleri ile yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlara rastlanmıştır. Farelerin kemik iliği hücrelerinde *in vivo* olarak iki antidepresanın (desipramin ve imipramin) genotoksisitesi araştırılmıştır. Desipramin 2; 20 ve 60 mg/kg, imipramin ise 7, 20 ve 60 mg/kg olacak şekilde intraperitonal olarak hayvanlara enjekte edilmiştir. Kemik iliği hücreleri ilaç verildikten 24 saat sonra alınmıştır. Sonuçlar ikinci deneme dozundan başlamak üzere her iki bileşiğinde doza bağlı olarak KKD indükleyicisi olduğunu göstermektedir. Ayrıca en yüksek test dozunun KKD seviyesini kontrole göre 4 kat arttırdığı gözlenmiştir (Perez ve ark., 2002).

Bigatti ve arkadaşları 36 psikiyatrik hasta ile yaptıkları bir çalışmada bu bireylerdeki genotoksik etkileri KKD testi kullanarak araştırmışlardır. Bu amaçla hastalar iki gruba ayrılmıştır. İlk gruptaki hastalar benzodiazepinlerle, diğer gruptaki hastalar ise lityum karbonatla tedavi edilmiştir. Birinci gruptaki hastalar ortalama 5,5 yıldır günde 6,8 mg benzodiazepin kullanmaktadır. İkinci gruptaki hastalar ise günde ortalama 841,7 mg ilacı ortalama 3,3 yıldır almaktadır. Ortalama KKD/hücre frekansı ve yüksek sıklıkta KKD'ye sahip hücrelerin yüzdesi her iki grupta da kontrollerle kıyaslandığında önemli derecede artış göstermiştir (Bigatti ve ark., 1998).

Metilfenidatın terapotik dozlarıyla tedavi gören 12 çocukta periferal kan lenfositlerinde kardeş kromatit değişimleri analiz edilmiştir. Bu ilaç çocuklara günde 20-54 mg aralığındaki dozlarda olmak üzere üç ay boyunca verilmiştir. Lenfositler ilaçla tedavi başlamadan önce ve tedavi başlangıcından üç ay sonra olmak üzere iki kere alınmıştır. Sonuçta tüm bireylerde ilaçla tedavinin kardeş kromatit değişimlerini 4,3 kat arttırdığı tespit edilmiştir (El-Zein ve ark., 2005).

Sıklıkla kullanılan bir antidepresan olan sertralinin klastojenitesi Bozkurt ve arkadaşları tarafından periferal lenfositler kullanılarak KKD testi ile araştırılmıştır. Bu amaçla, sertralinle tedavi edilmiş 10 hasta, 18 sağlıklı kontrolle ve ilaç tedavisi almamış fakat aynı psikopatolojileri gösteren 18 hasta ile karşılaştırılmıştır. İlaç kullanan hastalara 10 ay ile 1 yıl arasında değişen sürelerde günde 50 mg sertralin

verilmiştir. Sertralin kullanan bireyler ve ilaç kullanmayan hastalar, sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında her iki grupta da KKD frekansında önemli bir artış saptanmıştır. Fakat sertralin kullanan ve kullanmayan hasta grupları arasında KKD frekansı bakımından bir farklılık görülmemiştir. Bu nedenle artan KKD frekansının sertralin tedavisine bağlı olmadığı yorumu yapılmış, sonuçlar hastalarda oluşan psikojenik stresle ilişkilendirilmiştir (Bozkurt ve ark., 2004).

Prozac ve Paxil ilaçlarının genotoksisitesi insan lenfositlerinde kardeş kromatit değişimi (KKD) testi ile araştırılmıştır. Bu amaçla hem Prozac hem de etken maddesi olan fluoksetinin 1,25; 2,50; 5,00 ve 10,00 μg/ml'lik konsantrasyonları insan lenfosit kültürüne 24 ve 48 saatlik sürelerde uygulanmış ve sonuçta her ikisinin de KKD oluşumunu önemli düzeyde uyardığı saptanmıştır. Bu çalışmada ayrıca Prozac ve Paxil ilaçlarını kullanan hastalardan alınan lenfositler incelenmiş ve tüm hastalarda KKD/hücre sayısında kontrol grubuna göre anlamlı bir artış meydana geldiği görülmüştür (Tarhan, 2006).

Yüksek frekansta KKD'ye sahip hücrelerin belirlenmesi, klastojenik potansiyeli olan mutajenik ve karsinojenik ajanların saptanmasında hassas bir gösterge olarak kabul edilir. KKD, yeni replike olmuş kromatitler ve kardeşleri arasında simetrik değişimler nedeniyle oluşan S fazıyla ilişkili bir tamir sürecidir. KKD'nin kesin moleküler mekanizması bilinmemesine rağmen DNA hasarının ve yanlış DNA tamirinin KKD'ye neden olduğu düşünülmektedir. Bu onarım süreci homolog rekombinasyon (HR) tarafından, homolog olmayan uç tamiri (NHEJ) yolunun katkıları ile yürütülmektedir (Bozkurt ve ark., 2004). Bu ikinci mekanizma, yüksek düzeyde sekans (DNA dizisi) homolojisi gerektirmeden kırık olan komşu DNA uçlarını tamir ederken, homolog rekambinasyon mekanizması, tamir işlemini gerçekleştirebilmek için tam bir homolog sekansa ihtiyaç göstermektedir (Bozkurt ve ark., 2004; Aydemir ve ark., 2005). Ayrıca kardeş kromatid değişimi, çeşitli kimyasal maddelerin genotoksik etkilerinin belirlenmesinde kullanılan sitogenetik bir testtir. Özellikle DNA'da çapraz bağlanmalara yol açan ajanlar, kardeş kromatid değişimi frekansını artırmaktadır. Kardeş kromatid değişiminin oluşum mekanizmasında, DNA tek zincir kırıkları etkin

bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte, DNA tek zincir kırıklarının önlenmesinde görev alan XRCC1, PARP-1 ve DNA LIG3 gibi proteinlerde meydana gelen anormallikler de kardeş kromatid değişimine neden olabilmektedir (Wilson III ve Thompson, 2007).

Çeşitli ilaç etken maddelerinin kromozom düzeyinde meydana getirdikleri hasarlar, ya kromozom anormallikleri testi ya da mikronükleus testi ile değerlendirilmektedir. Sitokinezin bloke edildiği mikronükleus testi (CBMN), insan lenfositlerinde mikronükleus frekansını belirlemek için son yıllarda yaygın şekilde kullanılan bir metottur. Bu test ile ilgili protokol Fenech (2000) tarafından detaylı bir şekilde tanımlanmıştır. Bu araştırmada kullanılan ilaç etken maddelerinin, mikronükleus oluşumunu da tetiklediği belirlenmiştir. Trazodone en yüksek üç konsantrasyonda (25,00; 50,00 ve 75,00 µg/ml) MN frekansını kontrole göre istatiksel olarak anlamlı oranda artırmıştır. Trazodone'un çözücü kontrolle kıyaslandığında MN frekansını etkilemediği görülmüştür. Milnacipran ise en düşük konsantrasyon (2,50 µg/ml) haricinde diğer tüm konsantrasyonlarda MN frekansını kontrole göre önemli oranda arttırmıştır.

Mikronükleuslar, çekirdek bölünmesi sırasında ana çekirdeğe katılmayan kromozom fragmentlerinden ya da bütün kromozomlardan köken almaktadır. Bu yapılar, interfaz sırasında, sitoplazmada küçük ve ekstra çekirdekler şeklinde gözlenirler. Bölünen hücrelerde MN oluşumu, tamir edilmemiş veya yanlış tamir edilmiş DNA hasarlarından veya iğ ipliği, kinetokor, ya da diğer mitotik aparatların fonksiyon kaybından kaynaklanır. Bu tür hasarlar, oksidatif stres, klastojen veya anöjenlere maruziyet sonucunda, hücre bölünmesinde görev yapan genetik kontrol noktalarında ve/veya DNA tamir genlerinde meydana gelen hatalardan dolayı oluşabileceği gibi DNA metabolizması ve kromozom segregasyonu için gerekli kofaktörlerdeki eksiklikten de kaynaklanabilir. Bütün bu olaylar, kromozomlarda yeniden düzenlenmeler, değişmiş gen ekspresyonları veya anöploidi gibi yollarla MN oluştururlar (Fenech, 2000). Bütün bu yapıların, kanser vakalarında görülen kromozom düzensizlikleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Fenech ve ark., 2003; Rajagolpan ve ark., 2004; Bonassi ve ark., 2007).

MN oluşumuna neden olabilen kromozom kaybı ya da kromozomların ayrılamaması (non-disjunction) kanser ve yaşlanmada gözlenen önemli olaylardan biridir. Bu durum, muhtemelen iğ iplikçiklerinde ve sentromerde bozulma ya da metafazdan önce kromozom yapısının yoğunlaşması sonucu oluşmaktadır (Dellarco ve ark., 1985). Böylece, MN testi ile hem klastojenik hem de anöjenik etkiler belirlenebilmektedir (Parry ve Kirsch-Volders, 2010). Ayrıca, Fenech ve arkadaşları (1999) uluslararası işbirliği ile yaptıkları bir araştırmada MN ile kanser arasındaki ilişkiyi açıkça göstermişlerdir. Bu çalışmada MN frekansı ile kanser oluşumu arasındaki ilişki birtakım bulgularla desteklenmiştir. Bu bulgular şöyledir;

1) Kanser hastalarının hedef dokularında ve periferal lenfositlerinde artmış MN frekansı,

2) Bloom sendromu veya ataksia telangiectasia gibi konjenital hastalığa sahip bireylerde anormal derecede yüksek MN frekansı ve artmış kanser riski,

3) İyonize radyasyon, etilen oksit, benzen gibi bazı ajanların insanlarda ve hayvanlarda MN frekansını arttırma özelliği ile bunların karsinojenite ve genotoksisitesi arasında önemli bir korelasyon bulunması,

4) MN frekansının kandaki vitamin ve folat miktarına bağlı olması ve bunların eksikliğinin artmış kanser riskiyle ilişkisinin olmasıdır (Fenech ve ark., 1999).

Bu nedenlerle son yıllarda MN testi yaygın olarak kanser takip ve önleme programlarında biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Bonassi ve ark., 2007; Cardinale ve ark., 2012).

Mikronükleus metodu kullanılarak farklı antidepresan ilaç etken maddeleri ile yapılan çalışma sayısı sınırlıdır. El-Zein ve arkadaşları (2005) dikkat dağınıklığı ve hiperaktivite tedavisinde kullanılan metilfenidatın genotoksik etkilerini insan periferal lenfositlerinde mikronükleus testi ile incelemişlerdir. Bunun için söz konusu ilacı kullanan 12 çocuktan iki farklı zamanda (ilacı kullanmaya başlamadan önce ve ilacı kullandıktan 3 ay sonra) kan alınmıştır. Çalışma sonunda ilaçla tedavinin mikronükleus frekansını 2,4 kat arttırdığı rapor edilmiştir (El-Zein ve ark., 2005). Yine metilfenidatla yapılan başka bir çalışmada ise genç (25 günlük) ve ergin (60 günlük) ratlar kullanılarak total kan

örneklerinde mikronükleus analizi yapılmıştır. Bu amaçla ratlara metilfenidat ile akut ve kronik olmak üzere iki farklı şekilde muamele edilmiştir. Akut muamele için 1, 2 ve 10 mg/kg ilaç her gruptaki hayvana (her grupta beş rat bulunmaktadır) intraperitonal olarak verilmiştir. Kronik muamele için ise genç ratlara doğumdan itibaren 25. günden başlayıp 53. günde bitmek üzere; ergin ratlara da benzer şekilde doğumdan itibaren 60. günden başlayıp 88. günde bitmek üzere, günde bir kez aynı dozlarda ilaç yine intraperitonal olarak verilmiştir. Son enjeksiyondan iki saat sonra ise hayvanlardan hücre eldesi yapılmıştır. Elde edilen kan örnekleri 72 saat boyunca inkübe edilmiş, inkübasyonun başlangıcından sonraki 44. saatte de sitokalasin-B eklenmiştir. Süre sonunda yapılan mikronükleus analizinin sonucunda metilfenidatla ne akut ne de kronik muamelenin genç veya ergin ratlarda mikronükleus frekansını etkilemediği görülmüştür (Andreazza ve ark., 2007a).

Sıklıkla reçete edilen SSRI grubu bir antidepresan olan Prozac ve onun etken maddesi olan fluoksetinin genotoksik etkilerini incelemek amacıyla insan lenfosit kültüründe mikronükleus testi uygulanmıştır. Kültürdeki hücreler 48 saat boyunca hem Prozac hem de fluoksetin'in 1,25; 2,50; 5,00 ve 10,00 μg/ml'lik konsantrasyonlarıyla muamele edilmiştir. Sonuçta her iki maddenin de MN frekansında konsantrasyona bağlı artışa neden olduğu gözlenmiştir (Tarhan, 2006). Ayrıca Prozac ve Paxil antidepresanlarını kullanan hastalardan elde edilen lenfositlerde mikronükleus oluşumu araştırılmıştır. Buna göre, her iki ilacı kullanan hastalarda MN oluşumunda kontrole göre önemli bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir (Tarhan, 2006).

Antidepresan bir ilaç olan Nitroxazepin'in genotoksisitesi fare kemik iliği hücrelerinde mikronükleus testiyle araştırılmıştır. Bu amaçla Nitroxazepin tablet formunda alınmış ve steril distile suda çözülerek hayvanlara 4,5; 9 ve 13,5 mg'lık dozlarda oral yoldan verilmiştir. Her doz grubunda Swiss albino dört fare bulunmaktadır. İlaç bu hayvanlara 24 saat arayla iki eşit doz halinde verilmiştir ve ilk doz verildikten 30 saat sonra hücreler elde edilmiştir. Sonuçta mikronükleus frekansında artış gözlenmiştir. Fakat bu artış yalnızca en yüksek doz olan 13,5 mg

uygulanan grupta kontrole göre önemlidir. Nitroxazepin test edilen diğer dozlarda herhangi bir etkiye neden olmamıştır. Araştırıcılar bu ilacın fare kemik iliği hücrelerinde mutajenik olabileceği yorumunu yapmışlardır (Shaheen ve ark., 1988).

Trisiklik bir antidepresan olan amitriptilin hidroklorürün mutajenik etkileri Swiss albino cinsi erkek farelerin kemik iliği hücrelerinde mikronükleus metoduyla test edilmiştir. Farelere oral yoldan suda çözülerek 70, 140 ve 210 mg/kg dozlarında amitriptilin verilmiştir. Her deneme grubunda ve kontrol grubunda dört hayvan bulunmaktadır. Amitriptilin 24 saat arayla iki eşit dozda verilmiştir ve hücreler son doz verildikten 6 saat sonra alınmıştır. Sonuçta tüm dozlarda mikronükleus frekansında kontrole göre anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bu nedenle çalışmanın sonunda, bu ilacın farelerin soma hücrelerinde mutasyonları indükleme yeteneğinde olduğu yorumu yapılmıştır (Chowdary ve Rao, 1987).

Erkek Wistar ratlarda bir kardiyak glikozit olan oubainin olası genotoksisitesini incelemek amacıyla mikronükleus testi kullanılmıştır. Ouabain, sodyum veya onun enzimatik türevi olan Na^+ K^+ ATPaz'ın aktivitesini kuvvetli ve seçici olarak engelleme yeteneğinde olduğu için hiperaktivite ve manik-depresif bozuklukları uyarıcı bir özelliğe sahiptir. Bunun yanı sıra DNA hasarıyla bipolar bozukluğu ilişkilendiren raporlar bulunmaktadır. Bu amaçla, 250-300 g ağırlığındaki ratların her birine 10^{-3} molarlık ouabainden 5 µl intraserebral olarak enjekte edilmiştir. Bundan yedi gün sonra total kan örnekleri alınmıştır. Yapılan analizlerde mikronükleus frekansında kontrollere kıyasla herhangi bir değişiklik olmadığı görülmüştür (Jornada ve ark., 2010).

E-5842 antipsikotik ilaç olarak geliştirilen bir maddedir. Bu ilacın genotoksik etkilerini araştırmak amacıyla erkek ratların kemik iliği hücrelerinde mikronükleus testi yapılmıştır. Bu amaçla ratlara gavaj yoluyla tek doz olarak 50, 100, 200 ve 400 mg/kg E-5842 verilmiştir. Her doz grubunda dokuz hayvan bulunmaktadır ve bu hayvanların üçünden ilaç verildikten 24 saat sonra, diğer üçünden 48 saat sonra ve kalan üçünden de 72 saat sonra olmak üzere, kemik iliği hücreleri alınmıştır. Sonuçta yalnızca 48 saatlik uygulamanın 200 mg/kg'lık dozunda istatistiksel olarak

önemli bir artış gözlenmiştir. Diğer tüm süre ve dozlarda kontrollere göre önemli bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle araştırıcılar bu bileşiğin DNA üzerinde doğrudan bir etkisinin bulunmayabileceğini belirtmişlerdir (Guzman ve ark., 2004).

Olanzepine, risperidone ve quetiapine, şizofreni ve bipolar bozukluğun tedavisinde sıklıkla kullanılan atipik antispikotik ilaçlardır. Togar ve arkadaşları (2011) bu ilaçların genotoksik potansiyelini insan lenfosit kültüründe mikronükleus testi ile araştırmışlardır. Bu amaçla dört sağlıklı donörden kan örnekleri alınmıştır. Kültürdeki hücreler olanzepine, risperidone ve quetiapine'in 0, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 150, 200, 250 ve 400 mg/L'lik konsantrasyonlarıyla muamele edilmiştir. Sonuçta her üç ilacın da kontrole kıyasla mikronükleus frekansını etkilemediği görülmüştür. Fakat diğer yandan, uygulanan en yüksek konsantrasyonun (400 mg/L) insan lenfosit kültüründeki hücrelerin elimine olmasına yol açtığı tespit edilmiştir. Bu nedenle bu ilaçların genotoksik açıdan, doza bağlı olarak güvenilir olabileceği yorumu yapılmıştır (Togar ve ark., 2011).

In vivo ve *in vitro* koşullarda, kimyasal maruziyete bağlı olarak oluşan en önemli hücresel cevap, hücre siklusunun gecikmesi ya da engellenmesidir. Mitotik indeks, hücre proliferasyonunun ve sitotoksisitenin belirlenmesinde kullanılan önemli göstergelerden biri olup, sitogenetik bir test olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Eroğlu, 2007). Mitotik indeksteki azalmanın, hücrelerin mitoza girmesini sağlayan G_2 safhasının engellenmesinden dolayı ya da ATP seviyesindeki azalmadan ve enerji üretim merkezindeki bozukluktan kaynaklandığı öne sürülmektedir. Mitotik indeksteki düşüşün diğer nedenleri arasında DNA sentezinin engellenmesi, DNA sentezi için gerekli ve iğ oluşumundan sorumlu olan enzimlerin baskılanması ve G_2 periyodunun uzaması da gösterilmektedir (Epel, 1963; Van't Hof, 1968; Jain ve Andsorbhoy, 1988; Hidalgo ve ark., 1989; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006). Mitotik indeksteki bir azalma hücre döngüsündeki bir inhibisyonu ve hücrenin proliferasyon kapasitesindeki bir kaybı yansıtır. Bu test bazı kimyasalların hücrelerdeki etki mekanizması hakkında önemli bilgiler de vermektedir. Ayrıca sitotoksisite ve tümör oluşumu arasındaki ilişki pek çok araştırmada gösterilmiştir (Albert ve Magee, 2000; Lopez ve ark., 2003).

Bu çalışmada kullanılan Trazodone ve Milnacipran ilaç etken maddelerinin sitotoksisitelerinin belirlenmesi amacıyla mitotik indeks (MI) değerleri de hesaplanmıştır. Trazodone 24 saatlik uygulamasında mitotik indeksi kontrole göre tüm konsantrasyonlarda, çözücü kontrole göre ise en yüksek üç konsantrasyonda (25,00; 50,00 ve 75,00 µg/ml) anlamlı olarak düşürmüştür. 48 saatlik uygulamasında kontrole göre 3,13 µg/ml'lik konsantrasyon hariç diğer tüm konsantrasyonlarda, çözücü kontrole göre ise 3,13 ve 6,25 µg/ml'lik konsantrasyonlar hariç diğer tüm konsantrasyonlarda önemli düşüşe sebep olmuştur. Diğer antidepresan ilaç etken maddesi olan Milnacipran ise 24 saatlik uygulamasında tüm konsantrasyonlarda mitotik indeksi istatistiksel olarak anlamlı oranda düşürmüştür. 48 saatlik uygulamasında ise mitotik indeks 2,50 ve 10,00 µg/ml'lik konsantrasyonlar hariç diğer tüm konsantrasyonlarda önemli oranda düşüş göstermiştir.

Antidepresanların genotoksisitesinin incelendiği araştırmalardan birkaçında mitotik indeks değerleri belirlenmiş ancak replikasyon indeksi ve nükleer bölünme indeksi değerleri tespit edilmemiştir. Bu nedenle söz konusu indekslerle ilgili çalışma örnekleri sınırlıdır.

Bazı antidepresan ilaç etken maddelerinin mitotik indeks üzerine etkileri araştırılmıştır. Desipramin (2, 20 ve 60 µg/ml) ve imipraminin (7, 20 ve 60 µg/ml) farelerde 24 saat süreyle *in vivo* uygulanması sonucu, hücre proliferasyon kinetiklerinin kimyasallardan etkilenmediği gözlenmiştir. Ancak, her iki ilaç etken maddesinde de en yüksek dozda (60 µg/ml) mitotik indeks frekansının %20 oranında düştüğü belirlenmiştir (Perez ve ark., 2002).

Amitriptilin trisiklik bir antidepresandır. Swiss albino farelerde bu ilacın *in vivo* sitotoksisitesi hem somatik hücrelerde hem de eşey hücrelerinde araştırılmıştır. Soma hücreleri olarak kemik iliği, eşey hücreleri olarak da spermatositler kullanılmıştır. Bu amaçla deney hayvanları üç gruba ayrılmıştır. Birinci gruba düşük dozda (bir ay boyunca 1mg/kg), ikinci gruba orta dozda (bir aylık sürenin yarısında 1mg/kg, diğer yarısında 2mg/kg), üçüncü gruba yüksek dozda (bir aylık sürenin 1/3'ünde 1mg/kg,

takip eden 1/3'ünde 2mg/kg, kalan 1/3'ünde ise 4mg/kg) ilaç verilmiştir. Sonuçta söz konusu üç grupta da mitotik indeksin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldığı gözlenmiştir (Hassanane ve ark., 2012).

Antidepresan bir ilaç olan fluoksetinin olası sitotoksik etkisi hamile farelerde test edilmiştir. Bu amaçla, deney hayvanlarına hamileliğin çeşitli evrelerinde farklı dozlarda (0,052; 0,104 ve 0,208 mg) fluoksetin verilmiş ve mitotik indeks değerleri belirlenmiştir. Araştırıcılar bu ilacın mitotik indeksi tüm dozlarda anlamlı bir şekilde düşürdüğünü rapor etmişlerdir (Ali ve ark., 2001). Fluoksetin ile yapılan farklı bir çalışmada bu ilacın 1,25; 2,50; 5,00 ve 10,00 μg/ml'lik konsantrasyonları insan periferal lenfositlerine 24 ve 48 saatlik periyotlarda uygulanmıştır. Sonuçta bu ilacın mitotik indeksi doza bağlı olarak düşürdüğü tespit edilmiştir (Tarhan, 2006).

Bu çalışmada kullanılan Trazodone ve Milnacipran antidepresanları, uygulanan tüm konsantrasyonlarda replikasyon indeksini ve nükleer bölünme indeksini herhangi bir şekilde etkilememiştir. Replikasyon indeksinde herhangi bir değişiklik olmaması, bu maddelerin hücre bölünmesinde daha ziyade, sentez safhasından sonra etkili maddeler olduğunu göstermektedir (Soloneski ve ark., 2002, Çelik ve ark., 2004). Nükleer bölünme indeksinin belirlenmesi, genotoksik maruziyete bağlı olarak oluşan immün cevabın belirlenmesinde kullanılan önemli bir biyomarkır olan mitojen cevabın ölçülmesini sağlar (Fenech, 2007).

Mitotik indeks, daha önce belirtildiği gibi, sitotoksisitenin belirlenmesinde kullanılan önemli bir göstergedir. Replikasyon indeksi ise hücre proliferasyon kinetiklerinin analizinde kullanılmaktadır. Diğer yandan nükleer bölünme indeksi de çekirdek bölünmesinin miktarı hakkında fikir vermektedir. Sitokinezi bloklanmış hücreler, bölünme geçirmezse tek çekirdekli (mononükleat) hücreler oluşur. Eğer bu hücreler bir kez bölünürse iki çekirdekli (binükleat) hücreler meydana gelir. Çekirdek sayısı ikiden fazla olan hücreler ise birden fazla bölünme geçirmiştir (Gomez-Arroyo ve ark., 2004, Ionescu ve ark., 2011). Bu bilgilerden yola çıkarak Trazodone ve Milnacipran'ın hücre çoğalması ve hücre proliferasyon kinetikleri üzerine bir

etkisinin olmadığı fakat her iki ilaç etken maddesinin de özellikle yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik olabileceği yorumu yapılabilir.
Martenson ve Nassberger (1993) fluoksetin, clomipramin, amitriptilin, imipramin ve citalopram antidepresanlarının mitojen sitümülasyonu üzerine etkilerini kültüre edilmiş insan lenfositlerinde araştırmışlardır. Bu amaçla sık kullanılan bir mitojen olan fitohemaglutinin kullanılmıştır. Lenfosit kültürü fluoksetinin 20 µmol/litre, clomipraminin 30 µmol/litre, amitriptilinin 40 µmol/litre, imipraminin 60 µmol/litre ve citalopramın 120 µmol/litre'lik konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmiştir. Bunun ardından mitojen sitümülasyonu için fitohemaglutinin eklenmiştir. Sonuçta, amitriptilin, imipramin ve citalopramın mitojen sitümülasyonu etkilemediği, buna karşın fluoksetin ve clomipraminin sırasıyla % 50 ve %60 oranında mitojen sitümülasyonuna neden olduğu gözlenmiştir. Araştırıcılar bu antidepresan ilaç etken maddelerinin blastogenezisi inhibe edebileceği yorumunu yapmışlardır. Ayrıca çalışmada kullanılan ilaç etken maddeleri arasında önemli etki farkı olduğunu belirtmişlerdir (Martenson ve Nassberger, 1993).

Bu çalışmada kullanılan komet testi son yıllarda geliştirilen, oldukça güvenilir bir test yöntemidir. *In vitro* ve *in vivo* koşullarda birçok hücrede çeşitli maddelerin etkisi ile meydana gelen DNA hasarının belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. DNA hasarlarının yanı sıra, kesip çıkarmayla yapılan DNA tamiri esnasında, DNA ipliğinde meydana gelen kırıklardan kaynaklanan migrasyonu ölçmede de kullanılmaktadır (Green ve ark., 1992; Wasson ve ark., 2008).

Bu çalışmada primer DNA hasarını belirlemek için kullanılan komet testinde, Trazodone'un en yüksek iki konsantrasyonu (50 ve 75 µg/ml) toksik etkiye neden olmuştur. Bu konsantrasyonlarda hücre sayımı yapılamamıştır. Öte yandan kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti 3,13 µg/ml'lik konsantrasyon hariç diğer konsantrasyonlarda kontrole göre önemli artış göstermiştir. Çözücü kontrolle kıyaslandığında ise kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti 6,25 µg/ml'lik konsantrasyondan itibaren, kuyruk uzunluğu ise 12,50 µg/ml'lik konsantrasyondan itibaren anlamlıdır. Milnacipran ise uygulanan tüm konsantrasyonlarda kuyruktaki

DNA yoğunluğunda, komet kuyruk uzunluğunda ve momentinde kontrole göre istatistiksel olarak önemli oranda artışa neden olmuştur.

Komet analizinde kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti çok yaygın olarak kullanılan parametrelerdir (Fairbain ve ark., 1995; Olive, 1999; Rojas, 1999; Tice ve ark., 2000; Hartmann ve ark., 2003; Collins, 2004). Daha önceleri kuyruk uzunluğu direkt olarak fragment büyüklüğü ile ilişkilendirilirken, günümüzde bu görüş çok fazla kabul görmemektedir. Çünkü kuyruk uzunluğunun elektroforez şartları, spesifik floresan DNA boyaları, kamera özellikleri ve görüntü analiz programı farklılıkları gibi deney şartlarına hassasiyeti olduğu bilinmektedir. Diğer taraftan, nispeten daha düşük DNA hasarında kuyruk uzunluğunun arttığı, yüksek derecede DNA hasarında ise artmadığı görülmüştür (Olive, 1999; Tice ve ark., 2000; Collins, 2004). Buna karşın diğer bir parametre olan kuyruk yoğunluğunun yüksek DNA hasarında arttığı ve kırık frekansıyla doğrudan ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Kuyruk yoğunluğu deney şartlarından etkilenmemekte ve mümkün olan en geniş aralıktaki DNA hasarının tespitini sağlamaktadır. Ayrıca komet görüntüsü ile ilgili fikir veren açık bir göstergedir ve kuyruk yoğunluğu sonuçları laboratuvarlar arasında önemli bir fark göstermemektedir (Tice ve ark., 2000; Hartmann ve ark., 2003; Collins, 2004). Bu nedenlerle kuyruk yoğunluğu komet analizinde en kullanışlı parametre olarak kabul edilmektedir. Kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğunun arasındaki ilişkiyi veya komet baş ve kuyruk merkezi arasındaki mesafeyi gösteren kuyruk momenti ise göç eden DNA'nın saptanabilen en küçük parçasını ve kırık sayısını ölçebilen bir parametre olmasına rağmen doza bağlı bir ilişki göstermemektedir. Ayrıca komet görünüşü ile ilgili herhangi bir izlenim vermemektedir ve sonuçlar laboratuvarlar arasında önemli farklılık göstermektedir (Olive ve ark.,1990; Fairbain ve ark., 1995; Collins, 2004). Bu nedenle, çalışmamızda her üç parametreye ait sonuçlar belirlenmiştir.

Komet test tekniği son yıllarda geliştirilen bir teknik olması nedeniyle, antidepresan ilaç etken maddelerinin *in vitro* primer DNA hasarının belirlenmesinde çok fazla kullanılmamıştır ve dolayısıyla bu konuda fazla çalışma bulunmamaktadır.

Pereira ve arkadaşları (2009) bir serotonin-noradrenalin geri alım inhibitörü olan duloksetinin genotoksisitesini farelerde *in vivo* olarak incelemek amacıyla komet tekniğini kullanmışlardır. Bunun için farelere 10 ve 20 mg/kg'lık dozlarda 5 gün boyunca subakut olarak duloksetin verilmiştir. DNA hasarını belirlemek amacıyla beyin dokusu ve kan hücreleri kullanılmıştır. Sonuçta duloksetin verilmiş hayvanlarla kontrol grupları arasında önemli bir fark olmadığı tespit edilmiş ve duloksetinin söz konusu dozlarda genoksik etkili olmadığı yorumu yapılmıştır (Pereira ve ark., 2009).

Ouabain bir kardiyak glikozittir. Jornada ve arkadaşlarının (2010) yaptığı bir çalışmada ratlara intraserebral olarak ouabain verilmesi manik-depresif değişikliklere ve hiperaktiviteye neden olmuştur. Ayrıca bipolar bozukluğun DNA hasarı ile ilişkili olduğunu düşündüren veriler bulunmaktadır. Bu bilgilerden yola çıkılarak ratlarda intraserebral ouabain enjeksiyonundan (her bir hayvana 10^{-3} M'lık ouabainden 5 μl) sonra periferal kanda, serebrospinal sıvıda ve hippokampusda DNA hasarını değerlendirmek amacıyla komet testi yapılmıştır. Bu amaçla erkek Wistar ratlar kullanılmış ve ouabain verildikten yedi gün sonra hücreler alınmıştır. Hücrelerde gözlenen kuyruk yoğunluğu 0 ile 4 arasında değişen derecelerde (hasarsızdan-maksimum hasarlı) kodlanarak değerlendirilmiştir. Sonuçta serebrospinal sıvı hücrelerindeki DNA hasarı ile kontrol grubu arasında önemli bir fark görülmemiştir. Fakat, ouabain muamelesinin hipokampus ve kan hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarının kontrollere kıyasla anlamlı oranda arttığı tespit edilmiştir (Jornada ve ark., 2010).

Metilfenidat dikkat eksikliği-hiperaktivite bozukluğu tedavisi için yaygın olarak kullanılan bir psikostimulandır. Andreazza ve arkadaşlarının (2007) yaptığı bir çalışmada bu ilacın akut ve kronik maruziyetten sonra serebral doku hücreleri ve periferal kan hücrelerinde oluşturabileceği DNA hasarı genç (25 günlük) ve ergin ratlar (60 günlük) kullanılarak komet testiyle araştırılmıştır. Metilfenidatın hem akut hem de kronik muamele için 1, 2 ve 10 mg/kg'lık dozları intraperitonal olarak uygulanmıştır. Akut muamele için her gruptaki beş hayvana tek dozda (1, 2 ve 10 mg/kg) ilaç verilmiştir. Kronik muamele için ise genç ve ergin ratlara 28

gün boyunca (genç ratlar için 25. günden başlayarak ergin ratlar için 60. günden başlayarak) günde bir defa metilfenidat verilmiştir. Son ilaç uygulamasından iki saat sonra olası DNA hasarını araştırmak üzere total kan örnekleri ve ayrıca hipokampus ve stratium (bir beyin dokusu, telensefalonun bir parçası olup, bir bazal ganglion çekirdeğidir) dokuları alınmıştır. Sonuçta total kan hücrelerinde genç ratlara yapılan akut ilaç muamelesinin DNA hasarında kontrollere göre herhangi bir değişikliğe neden olmadığı, fakat kronik muamelenin doza bağlı anlamlı bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Ergin ratlara yapılan akut muamele yalnızca 10 mg/kg'lık dozda önemliyken, kronik muamele ise tüm dozlarda önemli bir artışa neden olmuştur. Hipokampus hücrelerinde genç ratlarda akut ve kronik muamele yalnızca en yüksek dozda, ergin ratlarda ise tüm dozlarda anlamlıdır. Son olarak, stratium hücrelerinde ise genç ratlarda akut muamele 1 ve 10 mg/kg'lık dozlarda, kronik muamele ise yalnızca 10 mg/kg'lık dozda önemli bir artışa neden olmuştur. Ergin ratlarda ise akut muamele tüm dozlarda DNA hasarını artırmıştır fakat kronik muamele yalnızca 10 mg/kg'lık dozda anlamlı bir artışa sebep olmuştur. Bu sonuçlara göre metilfenidatın periferal kan ve beyin hücrelerinde erken DNA hasarına neden olabileceği fakat bu erken hasarın tamir edilebileceği yorumu yapılmıştır (Andreazza ve ark., 2007a).

Atipik antipsikotik ilaçlardan olan olanzepine, risperidone ve quetiapine'in *in vitro* genotoksik etkisi primer DNA hasarını belirleyen komet testi ile dokuz farklı konsantrasyon (6,25, 12,5, 25, 50, 100, 150, 200, 250 ve 400 mg/L) kullanılarak araştırılmıştır. Bu amaçla insan periferal lenfositleri kullanılmıştır. Lenfositler dört sağlıklı donörden alınmıştır ve her bireyden 100 hücre sayılarak komet analizi yapılmıştır. Sonuçta her üç antipsikotik ilacında DNA hasarını hiçbir konsantrasyonda indüklemediği görülmüştür. Ancak, quetiapine'in 250 ve 400 mg/L'lik, olanzepine ve risperidone'un ise yalnızca 400 mg/L'lik konsantrasyonlarında sayılmaya yetecek kadar hücre bulunmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle bu ilaçların yüksek dozlarının kullanımına dikkat edilmesi gerektiği vurgulanmıştır (Togar ve ark., 2011).

Bipolar bozukluğun DNA hasarına neden olup olmadığını araştırmak amacıyla 32 hasta ve 32 sağlıklı bireyin periferal lenfositleri kullanılarak komet testi yapılmıştır. Sonuçta kontrollere kıyasla hastalarda bulunan DNA hasarının önemli derecede arttığı tespit edilmiştir. Ancak söz konusu 32 hastanın çalışma yapıldığı sürede ilaç kullandığı göz önüne alınarak, DNA hasarına bu ilaçların neden olup olmadığını belirlemek amacıyla sağlıklı bireylerle *in vitro* olarak bu ilaçların komet testi yapılmıştır. Bu ilaçlar valporate, lityum, amitriptilin, lamotrigine, sertraline, sulpiride, levomepromazine, carbamazepine, fluoksetin, haloperidol, diazepam ve clonazepamdır. Tüm ilaçların tedavi için kullanılan dozlarıyla insan lenfositlerine 30 dakika muamele edilmiştir. *In vitro* komet testi sonuçlarına göre bu ilaçların DNA hasarını indüklemediği tespit edilmiştir. Diğer yandan hasta gruplarında cinsiyet ve yaşın DNA hasar frekansını etkilemediği görülmüştür. Tüm bu veriler göz önüne alınarak DNA hasarındaki bu artış depresif ve manik semptomlarla ilişkilendirilmiştir (Andreazza ve ark., 2007b).

Consiglio ve arkadaşları (2010) tarafından ratlarda akut stres sonrası beyinde DNA hasarının varlığını doğrulamak amacıyla bazı beyin dokularında komet testi yapılmıştır. Bu amaçla ergin erkek Wistar ratlar uygulanan stresöre göre üç gruba (kontrol grubu, zorla suda yüzdürülen grup ve kısıtlanan grup) ayrılmıştır. Kan ve beyin dokusu (prefrontal korteks, amigdala ve hipokampus) örnekleri akut stres uygulandıktan ya hemen sonra, ya da yedi gün sonra olmak üzere toplam iki kez alınmıştır. Ardından bu hücrelerdeki komet kuyruk yoğunluğuna göre analizler yapılmıştır. Sonuçta, kısıtlama ve zorla yüzdürmeden hemen sonra alınan örneklerde amigdala ve hipokampus bölgesinde kontrollere kıyasla önemli DNA hasarı tespit edilmiştir. Prefrontal kortekste ise yalnızca zorla yüzdürmeden sonra kontrollere kıyasla anlamlı bir hasar gözlenmiştir. Fakat kan hücrelerinde kontrole göre herhangi bir fark görülmemiştir. Strese maruziyetten bir hafta sonra alınan hücrelerde ise yalnızca hipokampus bölgesinde her iki stresöre karşı DNA hasarı oluşmuştur. Ancak diğer beyin dokularında ve kan hücrelerinde kontrollere göre önemli bir fark saptanmamıştır. Araştırıcılar tarafından strese neden olan tek bir olayın, bir hafta sonra prefrontal korteks ve amigdala'da geri döndürülebilir bir DNA hasarına neden

olduğu fakat hipokampus bölgesindeki hasarın kalıcı olduğu yorumu yapılmıştır (Consiglio ve ark., 2010).

Martindale- İlaç Referans'a (Martindale-The Complete Drug Reference) (2007) göre piyasada 47 antidepresan ilaç vardır ve bunların büyük bir çoğunluğu dünya çapında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu ilaçların 33'ünün genotoksik ya da karsinojenik etkileriyle ilgili bilgiler mevcuttur. Ancak bunlardan sadece sekizinin genotoksisite ve/veya karsinojenite açısından tam olarak test edildiği söylenebilir. Bu ilaçlardan citalopram Ames testinde ve ratlarda uzun süreli karsinojenite testinde pozitif sonuç vermiştir. Ayrıca Çin Hamsteri akciğer fibroblastlarında kromozomal anormalliklerini indüklemiştir. Duloksetin erkek ratlarda uzun süreli karsinojenite testine negatif yanıt vermişken, dişi ratlarda pozitif yanıt vermiştir. Paroksetin ise tersine dişilerde negatif erkelerde pozitif yanıta neden olmuştur. Fluoksetin Ames testinde, fare ve ratlarda yapılmış uzun süreli karsinojenite testlerinde negatif sonuç vermiş ve Çin Hamsteri kemik iliği hücrelerinde KKD frekansını etkilememiştir. Fluvoksamin, nefazodone ve venlafaksin uygulanan tüm genotoksisite testlerinde negatif sonuç vermiştir. Mirtazapin ise uzun süreli karsinojenite testlerine pozitif, genotoksisite testlerine negatif yanıt vermiştir. Kalan 25 ilacın bir kısmı genotoksisite bir kısmı da karsinojenite açısından test edilmiştir. Ancak bu sonuçların yetersiz olduğu ve diğer test sistemleriyle söz konusu etkilerin araştırılması gerektiği vurgulanmıştır. Bunların yanında bu çalışmada kullanılan Trazodone antidepresanının sadece ratlarda uzun süreli karsinojenite testi yapılmıştır ve negatif sonuç alınmıştır. Yine aynı kaynağa göre Milnacipran'ın genotoksisitesi ile ilgili olarak ulaşılabilir bir veriye rastlanmamıştır (Brambilla ve ark., 2009).

Antidepresanların kimyasal yapısı mutajenik ve karsinojenik etki ile ilgili olan iki tehlikeli bileşen içerir. Bunlar aromatik halka ve nitro gruplarıdır. Nitro grupları metabolizma sonucu alkilleyici bir molekül olan nitroso bileşiklerine dönüşebilir (Perez ve ark., 2002). Bu nedenle Trazodone ve Milnacipran'ın genotoksik etkilerini birer alkilleyici ajan olarak gerçekleştirdiklerini söylemek mümkündür. Alkilleyici ajanlar DNA'nın nükleofilik merkezlerine ataklarda bulunma yeteneğindeki elektrofilik bileşiklerdir (Shibuya ve Morimoto, 1993; Friedberg ve ark., 1995).

Hücrede DNA çift zincirinde birden fazla noktaya kovalent bağla bağlanarak DNA molekülünü alkillerler.

Alkilleyici ajanlar; DNA'da çapraz bağlanmalara, zincir kırıkları gibi kromozomal anormalliklerin oluşmasına neden olurlar (Jenkins ve ark., 2005). Alkilleyici ajanlar en çok N^7G (Guaninin 7. konumundaki azot) ve O^6G (Guaninin 6. konumundaki oksijen) bölgelerini hedef alarak burada GC ve AT mutasyonlarına sebep olurlar (Shibuya ve Morimoto, 1993). O_6-alkilguanin (özellikle O_6-metilguanin) kromozomlarda kardeş kromatid değişimi ve kromozom kırığı gibi mutasyonlara sebep olur (Bean ve ark., 1994; Kaina ve ark., 1997). Alkilleyici ajanların kromozomal hasar mekanizmaları tam olarak açıklanamasa da bunu destekleyen birçok mekanizma mevcuttur. O_6-alkilguanin S fazına girmeden önce uzaklaştırılırsa, lezyondan sonra DNA replikasyonu gerçekleşebilir. Fakat burada C yerine T geçerek yanlış eşleşme olur. Bu da bir sonraki döngüde DNA replikasyonunun engellenmesine yol açar. Replikasyonun engellenmesi çift zincir kırıklarını içeren kromozomal anormalliklerinin oluşmasına neden olur (Galloway ve ark., 1995; Armstrong ve Galloway, 1997). Baz ekzisyon tamiri hasar yapan bazı uzaklaştırırken zincir kırığı oluşturur. Bu da kromozom fragmentasyonuna yol açabilir (Jenkins ve ark., 2005).

Alkilleyici ajanlar çeşitli organizmalarda hem mutajenik hem de karsinojenik etki gösterirler. Bu kimyasalların makromoleküllerle doğrudan reaksiyonu mutajenite mekanizmalarının çalışılmasını kolaylaştırmaktadır. Araştırmalar sonucunda klastojenik DNA lezyonlarının alkilleyici ajanlar ve metilleyici bileşikler tarafından oluşturulduğunu göstermektedir. Bu ajanlar yaygın olarak kullanılan çevresel karsinojenlerdir. N- ve O-alkilasyon lezyonları klastojenik ve rekombinojenik olarak kabul edilmektedir. Bu DNA lezyonları hem KA hem KKD'ye neden olmaktadır (Peto ve ark., 1985, Beranek, 1990; Teicher, 1997; Kaina, 1998).

Bu araştırmada, Trazodone ve Milnacipran ile ilgili olarak elde edilen sonuçlar, bu maddelerin, insan periferal lenfositlerinde klastojenik, mutajenik ve

genotoksik etkili olduğunu göstermektedir. Ancak bu araştırmanın sonuçları *in vivo* genotoksisite çalışmalarıyla da desteklenmelidir. Günümüzde artan stres, ekonomik sebepler, zorlayıcı yaşam ve iş koşulları gibi birçok nedenden dolayı depresyon yaygınlığı fark edilir biçimde artmaktadır. Bu nedenle de antidepresan ilaçların kullanımında gözle görülür bir artış olmuştur. Antidepresan ilaçlara insanların birçok nedenle artan maruziyeti sonucunda, bu maddelerin oluşturduğu risklerin belirlenmesi insan sağlığı açısından önemlidir. Çünkü bu ilaçlar uzun süreli kullanılan ilaçlar olup, bazı durumlarda gerek aynı gruptan gerekse farklı gruptan diğer antidepresanlarla kombine bir şekilde hastalara uygulanmaktadır. Çoğunlukla bu ilaçlarla tedavide, kullanılan doz yükseltilerek etkinlik sağlanmaya çalışılmaktadır. Hem doz artışı hem de maruziyet süresinin uzunluğu insanlarda bu ilaçların risk-yarar oranının dikkatli bir şekilde gözden geçirilmesini gerektirmektedir. İlaçlar, tedavi amacıyla kullanılırken doz artışı ve maruziyet süresine bağlı olarak genotoksik hasarlara da yol açabilirler. Bireyler arasındaki immün sistem farklılıkları, yaş, cinsiyet ve genetik farklılıklar da ilaca duyarlılığı ya da ilacın bireyler üzerinde oluşturacağı etkilerde farklılık yaratabilir. Bu nedenle bu tür ilaçların dikkatli kullanılması gerekmektedir.

Günümüzde hala birçok antidepresan ilaç etken maddesinin genotoksisite testleri tam olarak yapılmamıştır. Bu ilaç etken maddelerinin depresyon ve diğer psikotik rahatsızlığa sahip bireylerde güvenle kullanılabilmeleri için, uzun bir inceleme ve değerlendirme evresinden geçirilip, ilgili kuruluşlarca belirlenen dozlarda kullanımlarına izin verilmeli, insan sağlığı üzerinde olumsuz sonuçlar doğurduğu belirlenen ilaçların kullanımları yasaklanmalıdır. Ayrıca bu tür etken madde çalışmalarının ve epidemiyolojik çalışmaların sayılarının arttırılarak insanda bu kimyasalların uzun dönemli etkilerinin saptanması ile daha güvenilir sonuçlar elde edilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Akpınar, A., "Milnasipran tedavisine bağlı ani gelişen prostatizm: bir olgu sunumu", ***Türk Psikiyatri Dergisi,*** 20(4): 403-405 (2009).

Albert, R.E., Magee, P.S., "The tumorigenicity of mutagenic contact sensitizing chemicals", ***Risk Analysis***, 20(3): 317-325 (2000).

Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A., "IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, International Programme on Chemical Safety", ***Mutation Research,*** 463(2): 111–172 (2000).

Ali, M.O., El-Deen, O.A. S., El-Menshay, O.M., Bakery, S., "Genotoxic effects of fluoxetine on the chromosomes of bone marrow cells of pregnant mice", ***The International Association of Forensic Toxicologists***, August 26-30 (2001).

Ames, B.N. Mccann, J., Yamasaki, E., "Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian microsome mutagenicity test genotoxicity" ***Mutation Research,*** 31: 347-364 (1975).

Andreazza, A.C., Frey, B.N., Valvassori, S.S., Zanotto, C., Gomes, K.M., Comim, C.M., Cassini, C., Stertz, L., Riberio, L.C., Quevedo, J., Kapczinski, F., Berk, M., Gonçalves, C.A., "DNA damage in rats after treatment with methylphenidate", ***Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry,*** 31: 1282–1288 (2007a).

Andreazza, A.C., Frey, B.N., Erdtmann, B., Salvador, M., Rombaldi, F., Santin, A., Gonçalves, C.A., Kapczinski, F., "DNA damage in bipolar disorder", ***Psychiatry Research*** 153: 27–32 (2007b).

Antunes, L.M.G., Pascoal, L.M., Bianchi, M.L.P., Dias, F.L., "Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocyte cultures", ***Mutation Research***, 585(1-2): 113-119 (2005).

Armstrong, M.J., Galloway, S.M., "Mismatch repair provokes chromosome aberrations in hamsters cells treated with methylating agents or 6-thioguanine, but not with ethylating agents", ***Mutatiton Research,*** 373: 167–178 (1997).

Aydemir, N., Çelikler, S., Bilaloğlu, R., "*In vitro* genotoxic effects of the anticancer drug gemcitabine in human lymphocytes", ***Mutation Research,*** 582: 35-41 (2005).

Azqueta, A., Lorenzo, Y., Collins, A.R., "*In vitro* comet assay for DNA repair: a warning concerning application to cultured cells", ***Mutagenesis,*** 24(4): 379-381 (2009).

Bağcı, H., Bağcı, G., Açıkbaş, B., Demir, G., "*In vitro* testing for genotoxicity of 4-CPA sister chromatid exchange in human lymphocytes culture", ***Turkish Journal of Medical Science,*** 35: 75-78 (2005).

Baker, E.S., Connor, T.H., "Monitoring occupational exposure to cancer chemotherapy drugs", ***American Journal Of Health-System Pharmacy***, 53(22): 2713–2723 (1996).

Balcıoğlu, İ., "Depresyonun etyopatogenezi", ***Depresyon, Somatizasyon ve Psikiyatrik Aciller Sempozyumu***, 19-28 (1999).

Bean, C.L., Bradt, C.I., Hill, R., Johnson, T.E., Stallworth, M., Galloway, S.M., "Chromosome aberrations: persistence of alkylation damage by O6-alkylguanine-DNA transferase", ***Mutation Research,*** 307: 67–81 (1994).

Beg, T., Siddique, Y. H., Ara, G., Gupta, M., Afzal, J., " Protective action of EGCG against anticancer drugs MMS and CP", ***The Internet Journal of Pharmacology***, 6(2): 1-7 (2009).

Bendele, R.A., Adams, E.R., Hoffman, W.P., Gries, C.L., Morton, D.M., "Carcinogenicity studies of fluoxetine hydrochlodire in rats and mice" ***Cancer Research***, 52: 6931-6935 (1992).

Beranek D.T., "Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents", ***Mutation Research,*** 231: 11-30 (1990).

Bigatti, M. P., Corona, D., Munizza, C., "Increased sister chromatid exchange and chromosomal aberration frequencies in psychiatric patients receiving psychopharmacological therapy", ***Mutation Research***, 413: 169–175 (1998).

Binbay, T., Ulaş, H., Elbi, H., Alptekin, K., "Türkiye'de Psikoz Epidemiyolojisi: Yaygınlık Tahminleri ve Başvuru Oranları Üzerine Sistematik Bir Gözden Geçirme", ***Türk Psikiyatri Dergisi,*** 22(1): 40-52 (2011).

Bolognesi, C., "Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies", ***Mutation Research,*** 543(3): 251-272 (2003).

Bonassi, S., Fontana, V., Ceppi, M., Barale, R., Biggeri, A., "Analysis of correlated data in human biomonitoring studies, the case of high sister chromatid exchange frequency cells", ***Mutation Research,*** 438: 13–21 (1999).

Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, L., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M.R., Zijno, A., Norppa, H., Fenech, M., "An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans", ***Carcinogenesis,*** 28: 625–631 (2007).

Bozkurt, G., Abay, E., Ateş, İ., Karaboğaz, G., Türe, M., Savran, F.O., Palandüz, S., Temocin, K., Algüneş, Ç., "Clastogenicity of selective serotonin-reuptake inhibitors", ***Mutation Research***, 558: 137-144 (2004).

Brambilla, G., Mattioli, F., Martelli, A., "Genotoxic and carcinogenic effects of antipsychotics and antidepressants", ***Toxicology,*** 261: 77-88 (2009).

Branzei, D., Foiani, M., "Regulation of DNA repair throughout the cell cycle", ***Molecular Cell Biology***, 9: 297-308 (2008).

Burrows, G.A., Vohra, J., "Cardiac effects of different tricyclic antidepressants", ***British Journal Of Psychiatry,*** 129: 335–341 (1986).

Buschini, A., Poli, P., Rossi, C., "*Saccharomyces cerevisiae* as an eukaryotic cell model to assess cytotoxicity and genotoxicity of three anticancer anthraquinones", ***Mutagenesis,*** 18: 25-36 (2003).

Cardinale, F., Bruzzi, P., Bolognesi, C., "Role of micronucleus test in predicting breast cancer susceptibility: a systematic review and meta-analysis", ***British Journal of Cancer***, 106: 780–790 (2012).

Cavallo, D., Ursini, C. L., Perniconi, B., Francesco, A., Giglio, M., Rubino, F.M., Marinaccio, A., Iavicoli, S., "Evaluation of genotoxic effects induced by exposure to antineoplastic drugs in lymphocytes and exfoliated buccal cells of oncology nurses and pharmacy employees", ***Mutation Research,*** 587: 45-51 (2005).

Cervantes-Ríos, E., Ortiz-Muniz, R., Martínez-Hernández, A.L., Cabrera-Rojo, L., Graniel-Guerrero, J., Rodríguez-Cruz, L., "Malnutrition and infection influence the peripheral blood reticulocyte micronuclei frequency in children", ***Mutation Research,*** 731: 68-74 (2012).

Cho, Y.H., Kim, Y.J., An,Y.S., Woo, H.D., Choi, S.Y., Kang, C.M., Chung, H.W., "Micronucleus-centromere assay and DNA repair gene polymorphism in lymphocytes of industrial radiographers", ***Mutation Research,*** 680: 17-24 (2009).

Chowdary, P.S., Rao, M.S., "Cytogenetic effects of amitriptyline hydrochloride in somatic and germ cells of mice", ***Toxicology Letters,*** 39(2-3): 199-204 (1987).

Collins, A.R., "The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, ***Molecular Biotechnology***, 26: 249–261 (2004).

Consiglio, A.R., Ramos, A.L.L.P., Henriques, J.A.P., Picada, J.N., "DNA brain damage after stress in rats", ***Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry***, 34: 652–656 (2010).

Corcos, M., Guilbaud, O., Speranza, M., Paterniti, S., Loas, G., Stephen, P., Jeammet, P., "Alexithymia and depretion in eating disorders", ***Psychiatry Research,*** 93: 263-266 (2000).

Çelik, M., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., Ergün, M.A., Arslan, O., Kasap, R., "*In vitro* effects of karathane LC (dinocap) on human lymphocytes", ***Mutagenesis,*** 20(2): 101-104 (2004).

Çetin, M., Açıkel, C., "Meta-analizler ışığında: bütün antidepresanlar aynı mıdır?", ***Klinik Psikofarmakoloji Bülteni,*** 19: 87-92 (2009).

Davis, M.P., "Does trazodone have a role in palliating symptoms?", ***Support Care Cancer,*** 15: 221-224 (2007).

Dellarco, V.L., Mavournın, K.H., Tice, R.R., "Aneuploidy and health risk assessment: current status and future directions", ***Environmental Mutagenesis,*** 7: 405-424 (1985).

Doak, S.H., Liu, Y., Chen, C., "Genotoxicity and cancer", ***Adverse Effects of Engineered Nanomaterials,*** 14: 243-261 (2012).

Dorn, S.B., Degen, G.H., Müller, T., Bonacker, D., Joosten, H.F., Van der Louw, J., Van Acker, F.A.A., Bolt, H.M., "Proposed criteria for specific and non-specific chromosomal genotoxicity based on hydrophobic interactions" ***Mutation Research,*** 628: 67-75 (2007).

Duhova, V., "Clastogenetic effect of supercypermethrine on *Vicia faba* L. and *Hordeum vulgare* L., Acta Facultates Rerum Naturalium Univercitatis Comenianae", ***Genetica et Biologia-Molecolare,*** 24-25, 67-74 (1993).

Dunnick, J.K., Hailey, J.R., "Experimental studies on the longterm effects of methylphenidate hydrochloride", ***Toxicology***, 103: 77–84 (1995).

El-Shabhaby, O.A., Abdel Migid, H.M., Soliman, M.I, Mashaly, I.A., "Genotoxicity screening of industrial wastewater using the *Allium cepa* chromosome aberration assay", ***Pakistan Journal of Biological Sciences,*** 6: 23-28 (2003).

El-Zein, R. A. , Abdel-Rahmanb, S. Z. , Hayb, M. J. , Lopeza, M. S., Bondya, M. L. , Morrisb, D. L. , Legatorb, M. S., "Cytogenetic effects in children treated with methylphenidate", ***Cancer Letters***, 230: 284–291 (2005).

Epel, D., "The effects of carbon monoxide inhibition of ATP level and the date of mitosis in sea urching egg", ***Journal of Cell Biology***, 17: 315-319 (1963).

Eroğlu, Y., Eroğlu, H.E., Ilbas, A.I., "Gamma ray reduces mitotik index in embriyonic roots of *Hordeum vulgare* L.", ***Advances in Biological Research,*** 1(1-2): 26-28 (2007).

Eşel, E., "Depresyondaki nöroendokrinolojik bulgular", ***Klinik Psikiyatri,*** 4: 35-50 (2002).

European Medicines Agency, "Refusal assessment report for milnacipran pierre fabre medicament", ***EMEA/H/C/001034, London,*** 5-9 (2010).

Evans, HJ., In Kilbey, BJ., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C., eds. "Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests", ***Handbook of Mutagenicity Test Procedures***, Amsterdam, Elsevier Sciences, 2nd ed: 405–427 (1984).

Evren, C.E., "Sigarayı bırakma tedavisinde antidepresanların kullanımı: bu tedavide bupropion'un yeri", ***Klinik Psikofarmakoloji Bülteni,*** 11: 198-211 (2001).

Fahmy, M.A., Hassan, N.H.A., Farghaly, A.A., Hassan, E.E.S., "Studies on the genotoxic effect of beryllium chloride and the possible protective role of selenium/vitamins A, C and E", ***Mutation Research***, 652: 103–111 (2008).

Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L., "The comet assay: a comprehensive review", ***Mutation Research***, 339: 37–59 (1995).

Farber, E., "Possible Etiologic mechanism in chemical carcinogenesis", ***Environmental Health Perspectives,*** 75: 65–70 (1987).

Fasoli, R.A., Glauser, F.L., Bech, P., "Imipramine clinical effects and pharmacokinetic: cardiac arrhytmias and ECG abnormalities in tricyclic antidepressant overdose", ***Clinical Toxicology,*** 18: 155–163 (1981).

Fenech, M.,"The *in vitro* micronucleus technique", ***Mutation Research***, 455 (1-2): 81-95 (2000).

Fenech, M.," Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death", ***Mutation Research***, 600: 58-66 (2006).

Fenech, M., "Cytokinesis-block micronucleus cytome assay", ***Nature Protocols,*** 2(5): 1084-1104 (2007).

Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E., "Human Micronucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures", ***Mutation Research,*** 534(1-2): 65-75 (2003).

Fenech, M., Holland, N., Chang, W.P., Zeiger, E., Bonassi, S., "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 (1999).

Fischman, H.K., Kelly, D.D., "Chromosomes and Stress", ***International Journal Of Neuroscience,*** 99: 201–219 (1999).

Fischman, H.K., Pero, R., Kelly, D.D., "Psychogenic stres reduces chromosomal and DNA damage", ***International Journal Of Neuroscience***, 84: 219–227 (1996).

Fiskesjö, G., "The *Allium* test as a standard in enviromental monitoring", ***Hereditas***, 102: 99-112 (1985).

Freeling, P.R., Tylee, A., Depression in general practice. In Paykel ES (ed.). ***Handbook of Affective Disorders,*** 2nd edn. Edinburgh: Churchill Livingstone, 651-666 (1992).

Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W. (eds), "DNA Repair and Mutagenesis", ***American Society for Microbiology (ASM) Press***, Washington DC, 32–33 (1995).

Frolich, A., Würgler, F.E., "*Drosophila* wing-spot test: improved detectability of genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons", ***Mutation Research,*** 234: 71-80 (1990).

Frommer, D.A., Kulig, K.W., Marx, J.A., Rumack, B., "Tricyclic antidepressant overdose", ***Journal of the American Medical Association,*** 257: 521–526 (1987).

Fuchs, E., Czeh, B., Kole, M.H.P., Michaelis, T., Lucassen, P.L., "Alterations of neuroplasticity in depression: hippocampus and beyond", ***European Neuropsychopharmacology,*** 14: 481-490 (2004).

Galloway, S.M., Greenwood, S.K., Hill, R.B., Bradt, C.I., Bean, C.L., "A role for mismatch repair in production of chromosome aberrations by methylating agents in human cells", ***Mutation Research,*** 346: 231–245 (1995).

Garry, S., Nesslany, F., Aliouat, E., Haguenoer, J.M., Marzin, D., "Assessment of genotoxic effect of benzo[a]pyrene in endotracheally treated rat using the comet assay", ***Mutation Research***, 534(1-2): 33-43 (2003).

Gomez-Arroyo, S.,Melchor-Castro, S., Villalobos-Pietrini, R., Camargo, E.M., Salgado-Zamora, H., Aldrete, M.E.C., "Cytogenetic study of metronidazole and three metronidazole analogues in cultured human lymphocytes with and without metabolic activation", ***Toxicology in Vitro***, 18: 319–324 (2004).

Green, M.H.L., Lowe, J.E., Harcourt, S.A., Akinluyi, P., Rowe, T., Cole, J., Anstey, A.V., Arlett, C.F., "UV-C sensitivity of unstimulated and stimulated human lymphocytes from normal and xeroderma pigmentosum donors in the comet assay: a potential diagnostic technique", ***Mutation Research,*** 273(2): 137-144 (1992).

Guzman, A., Garcia, C., Marin, A., Ruiz, M.T., Tortajada, A., Fernandez de Henestrosa, A.R., "Induction of micronuclei in mouse bone-marrow erythrocytes in association with hypothermia after administration of the sigma receptor ligand E-5842", ***Mutation Research,*** 565: 11-22 (2004).

Hagmar, L., Bonassi, S., Stromberg, U., Brogger, A., Knudsen, L.E., Norppa, H., Reuterwall, C., "Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH)", ***Cancer Research***, 58 (18): 4117-4121 (1998).

Hagmar, L., Stromberg, U., Bonassi, S., Hansteen, I.L., Knudsen, L.E., Lindholm, C., Norppa, H., "Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts", ***Cancer Research,*** 64(6): 2258–2263 (2004).

Hartmann, A., Agurell, E., Beeyers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R., "Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay", ***Mutagenesis***, 18:45–51(2003).

Hassanane, M.S., Hafiz, N., Radwan, W., El-Ghor, A.A., "Genotoxic evaluation for the tricyclic antidepressant drug, amitriptyline", ***Drug and Chemical Toxicology,*** 1-6 (2012).

Helvacı, N.D., "Methidathion insektisitinin *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerinde sitogenetik etkileri", Yüksek Lisans Tezi, ***Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,*** Ankara, 2-25 (2003).

Hidalgo, A., Gonzalez-Reyes, J.A., Navas, P., Garcia-Herdugo, G., "Abnormal mitosis and growth inhibition in Allium cepa roots induced by propham and chlorpropham, ***Cytobios***, 57: 7-14 (1989).

Hoelzl, C., Knasmüller, S., Misic, M., Collins, A., Dusinska, M. Nersesyan, A., "Use of single cell gel electrophoresis assays for the detection of DNA-protective effects of dietary factors in humans: Recent results and trends", ***Mutation Research***, 681: 68-79 (2009).

Ionescu, M.E., Ciocirlan, M., Becheanu, G., Nicolaie, T., Ditescu, C., Teiusanu, A.G., Gologan, S.I., Arbanas, T., Diculescu, M.M, "Nuclear division index may predict neoplastic colorectal lesions", ***Journal of Clinical Medicine,*** 6 (3): 173-178 (2011).

Ishii, Y., Watatani, M., "Cell-stage dependence of formation of SCEs and chromosomal aberrations", ***Basic Life Science,*** 29: 173–180 (1984).

Jain, A.K., Andsorbhoy, R.K., "Cytogenetical studies on the effects of some chlorinated pesticides", ***Cytologia***, 53: 427-436 (1988).

Jarema, M., Dudek, D., Landowski, J., Heitzman, J., Rabe-Jablonska, J., Rybakowski, J., "Trazodone-the antidepressant: mechanism of action and its position in the treatment of depression", ***Psychiatria Polska,*** 45(4): 611-625 (2011).

Jenkins, G.J.S., Doak, S.H., Johnson, G.E., Quick, E., Waters, E.M., Parry, J.M., "Do dose response thresholds exist for genotoxic alkylating agents?", ***Mutagenesis*** 20 (6): 389–398 (2005).

Ji, B.T., Silverman, D.T., Stewart, P.A., Blair, A., Swanson, G.M., Baris, D., Greenberg, R.S., Hayes, R.B., Brown, L.M., Lillemoe, K.D., Schoenberg, J.B., Pottern, L.M., Schwartz, A.G., Hoover R.N., "Occupational exposure to pesticides and pancreatic cancer" ***American Journal of Industrial Medicine,*** 39 (1): 92-99 (2001).

Joosten, H.F., van den Dobbelsteen, D.J., Horbach, G.J., Krajnc, E.I., "Genotoxicity of hormonal steroids", ***Toxicology Letters,*** 151: 113-134 (2004).

Jornada, K.J., Valvassaori, S.S., Arent, C.O., Leffa, D., Damiani, A.A., Hainzenreder, G., Ferreira, C.L., Moretti, M., Andrade, V.M., Quevedo, J., "DNA damage after intracerebroventricular injection of ouabain in rats", ***Neuroscience Letters,*** 471: 6-9 (2010).

Kaina, B., "Critical steps in alkylation-induced aberration formation", ***Mutation Research,*** 404(1-2): 119-124 (1998).

Kaina, B., Ziouta, A., Ochs, K., Coquerelle, T., "Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex^- Mex^+ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models", ***Mutation Research,*** 381: 227–241 (1997).

Kandagal, P.B., Seetharamappa, J., Shaikh, S.M.T., Manjunatha, D.H., "Binding of trazodone hydrochloride with human serum albumin: A spectroscopic study", ***Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry***, 185: 239–244 (2007).

Kırlı, S., "Depresyon", ***Psikiyatri ve Sanat Yayınevi***, Bursa, 26-30 (2002).

Kilbey, B.J., Legotor, M., Nichols, W., Ramel, C.," Handbook of mutagenecity test produres", ***Elsevier Science Publishers***, Amsterdam, 28-29 (1984).

Kim, Y., Park, Q., Yu, B., "Changes in lymphocyte subsets after short-term pharmacotherapy in patients with panic disorder", ***Psychiatry Research,*** 128: 183-190 (2004).

Kotan, Z., Sarandöl, A., Eker, S.S., Akkaya, C., Depresyon, nöroplastisite ve nörotrofik faktörler, ***Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar,*** 1: 22-35 (2009).

Kraus, R.L., Li, Y., Jovanovska, A., Renger, J.J., "Trazodone inhibits T-type calcium channels", ***Neuropharmacology,*** 53: 308-317 (2007).

Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P., Georgakilas, A.G., " Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis", ***Mutation Research,*** 711: 193-201 (2011).

Lerda, D., Biaggi-Bistoni, M., Peralta, N., Ychari, S., Vazquez, M., Bosio, G., "Fumonisins in foods from cordoba (Argentina), presence and genotoxicity", ***Food and Chemical Toxicology***, 43: 691‑698 (2005).

Lopez-Nigro, M.M., Palermo, A.M., Mudry, M.D., Carballo, M.A., "Cytogenetic evaluation of two nitroimidazole derivatives", ***Toxicology In Vitro***, 17: 35-40 (2003).

Madrigal-Bujaidar, E., Garcia, Y.C., Alvarez-Gonzales, I., "Chromosomal aberrations induced by imipramine and desipramine in mouse***", Human and Experimental Toxicology,*** 29(4): 297-302 (2010).

Martensson, U., Nassberger, L., "Influence of antidepressants on mitogen stimulation of human lymphocytes", ***Toxicology In Vitro***, 7: 241-245 (1993).

Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., Kirsch-Volders, M., "Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring", ***Biochimie,*** 88 (11): 1515–1531 (2006).

McArt, D.G., McKerr, G., Saetzler, K., Howard, C.V., Downes, C.N., Wasson, G.R., "Comet sensitivity in assessing DNA damage and repair in different cell cycle stages", ***Mutagenesis,*** 25(3): 299-303 (2010).

McDiarmid, M.A., Jacobson-Kram, D., Koloder, K., Deeter, D.P., Lachiver, R.M., Scott, B., Petrucelli, B.P., Gustavison, D., Putman, D., "Increased frequencies of sister chromatid exchange in soldiers deployed to Kuwait", ***Mutagenesis,*** 10(3): 263–265 (1995).

McPherson, K., "Commentary: Antidepressants and breast cancer risk" ***International Journal of Epidemiology***, 32: 966–967 (2003).

Montoro, A., Soriano, J.M., Barquinero, J.F., Almonacid, M., Montoro, A., Verdu G., Sahuquillo, V., Villaescusa, J.I., Sebastia, N., "Assessment *in vitro* of cytogenetic and genotoxic effects of propolis on human lymphocytes", ***Food and Chemical Toxicology,*** 50: 216-221 (2012).

Morgan, W.F., Corcoran, J., Hartmann, A., Kaplan, M.I., Limoli, C.L., Ponnaiya, B., "DNA double-strand breaks, chromosomal rearrangements, and genomic instability", ***Mutation Research,*** 404(1-2): 125-128 (1998).

Morishita, S., Arita, S., "The clinical use of milnacipran for depression", ***European Psychiatry,*** 18: 34-35 (2003).

Moynahan, M.E., Jasin, M., "Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis", ***Molecular Cell Biology,*** 11: 196-207 (2010).

Murli, H., "Screening assay for chromosomal aberrations in Chinese hamster ovary (CHO) cells with argentyn 23", ***Final Report***, (2003).

Nakagawa, A., Watanabe, N., Omori, I.M., Barbui, C., Cipriani, A., McGuire, H., Churchill, R., Furukawa, T.A., "Efficacy and tolerability of milnacipran in the treatment of major depression in comparison with other antidepressants: a systematic review and meta-analysis", ***CNS Drugs,*** 22: 587- 602 (2008).

Natarajan, A.T., Obe, G., "Mutagenicity testing with cultured mammalian cells: cytogenetic assays" (In: Heddle, J.A., Editor), Mutagenicity: New horizons in genetic toxicology, ***Academic Press***, New York, 171-213 (1982).

Obe, G., Johannes, C., Ritter,S., "The number and not the molecular structure of DNA double-strand breaks is more important for the formation of chromosomal aberrations: a hypothesis", ***Mutation Research,*** 701: 3-11 (2010).

Olive, P.L., "DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology", ***International Journal of Radiation Biology,*** 75: 395–405 (1999).

Olive, P.L., Banath, J.P., Durand, R.E., "Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay", ***Radiation Research***, 122: 86–94 (1990).

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), "OECD Guidelines for the Testing of Chemicals", ***Health Effects,*** 4: 471–486 (2008).

Örsel, S., "Depresyonda tedavi: Genel ilkeler ve kullanılan antidepresan ilaçlar", ***Klinik Psikiyatri,*** Ek 4: 17-24 (2004).

Özyüksel, B., Uluğ, B., "Depresyon Tanısı Alan Hastalarda Kalıntı Belirtilerin yetiyitimi ile İlişkisi: 3 Aylık İzlem Çalışması", ***Türk Psikiyatri Dergisi*** 18(4): 323-332 (2007).

Palus J., Rydzynski K., Dziubaltowska E., Wyszynska K., Natarajan AT., Nilsson R., "Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium" ***Mutation Research,*** 540: 19–28 (2003).

Parry, J.M., Kirsch-Volders, M., "Special issue on *in vitro* MN trial", ***Mutation Research***, 702: 132-134 (2010).

Pazzagli, M., Giovannini, M.G., Pepeu, G., "Trazodone increases extracellular serotonin levels in the frontal cortex of rats", ***European Journal of Pharmacology***, 383: 249–257 (1999).

Pereira, P., Gianesini, J., Barbosa, C.S., Cassol, G.F., borowski, R.G.V., Kahl, V.F.S., Cappelari, S.E., Picada, J.N., "Neurobehavioral and genotoxic parameters of duloxetine in mice using the inhibitory avoidance task and comet assay as experimental models", ***Pharmacological Research,*** 59: 57-61 (2009).

Perez, P.R., Madrigal-Bujaidar, E., Reyes, C.S., Perez, G.J., Velasco, M.O., Molina, D., "Sister chromatid exchanges produces by imipramine and desipramine in mouse bone marrow cells treated *in vivo*", ***Toxicology Letters,*** 132: 123-129 (2002).

Perry, P., Evans, H.J., "Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange", ***Nature***, 258 (5531): 121-125 (1975).

Perry, P.E., Wolff, S., "New giemsa method for the differential staining of sister chromatids", ***Nature***, 251 (5471): 156-158 (1974).

Peto, R., Gray, R., Bantom, P., and Grosso, P., "*N*-nitroso compounds: occurrence, biological effects and relevance to human cancer", ***IARC Scientific Publications,*** 57: 627–655 (1985).

Piperakis, S.M., "Comet assay: A brief history", ***Cell Biology and Toxicology***, 25: 1-3 (2009).

Poletta, G.L., Larriera, A., Kleinsorge, E., Mudry, M.D., "*Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: basal values determination of micronucleus and comet assay", ***Mutation Research***, 650(2): 202-209 (2008).

Ponzanelli, I., Landi, S., Bernacchi, F., Barale, R., "The nature of high frequency sister chromatid exchange cells (HFCs)", ***Mutagenesis***, 12: 329–333 (1997).

Preskorn, S.H., "Clinical pharmacology of selective serotonin reuptake inhibitors", ***Caddo: Professionals Communications,*** Inc. (1996).

Preston, R.J., Skare, J.A., Aardema, M.J., "A review of biomonitoring studies measuring genotoxicity in humans exposed to hair dyes", ***Mutagenesis,*** 25(1): 17-23 (2010).

Rajagolpan, H., Jallepalli, P.V., Rago, C., Velculescu, K.W., Vogelstein, B., Lengauer, C. "Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability", ***Nature***, 428(6978): 77-81 (2004).

Rank, J., Nielson, M.H., "A modified Allium test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures", ***Hereditas***, 118: 49-53 (1993).

Raposo, A., Carvalho, C.R., Otoni, W.C., "Statistical and image analysis of sister chromatid exchange in maize", ***Hereditas,*** 141(3): 318-322 (2004).

Riblet, L.A., Taylor, D.P., "Pharmocology and neurochemistry of trazodone", ***Journal of Clinical Psychopharmacology,*** 1(Suppl): 175 (1981).

Richard, C., Shelton, M.D., "Classification of antidepressants and their clinical implications", ***Primary Care Companion Journal of Clinical Psychiatry,*** 5[suppl 7]: 27–32 (2003).

Rojas, E., Lopez, M.C., Valverde, M., "Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications", ***Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications,*** 722: 225–254 (1999).

Ryan, M. P., Kelly, J.P., Chambers, P.L., Leonard, B.E., "The toxicity profile of a single dose of paroxetine: an alternative approach to acute toxicity testing in the rat'', ***Pharmacology & Toxicology***, 88: 59–66 (2001).

Rydberg, G., Johanson, K.J., "DNA Repair Mechanism", ***Academic Press***, Newyork, 465-468 (1978).

Sala, M., Perez, J., Soloff, P., di Nemi, S.U., Caverzasi, E., Soares, J.C., Brambilla, P., "Stress and hippocampus abnormalites in psychiatric disorders", ***European Neuropsychopharmacology,*** 14: 393-405 (2004).

Salama, S.A., Serrana, M., Au, W.W., "Biomonitoring using accessible human cells for exposure and health risk assessment", ***Mutation Research***, 436: 99-112 (1999).

Santoro, A., Bianco, G., Picerno, P., Aquino, R. P., Autore, G., Marzocco, S., Gazzerro, P., Lioi, M. B., and Bifulco, M., "Verminoside and verbascoside-induced genotoxicity on human lymphocytes: Involvement of PARP-1 and p53 proteins", ***Toxicology Letters***, 178(2): 71-76 (2008).

Sarıkaya, R., "Sodyum nitrit, sodyum nitrat, potasyum nitrit ve potasyum nitrat'ın genotoksik etkisinin somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile araştırılması", Doktora Tezi, ***Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Ankara, 1-110 (2005).

Satoh, T., Hatanaka, M., Yamamoto, K., Kuro-o, M., Sofuni, T., "Application of mFISH for the analysis of chemically-induced chromosomal aberrations: a model for the formation of triradial chromosomes", ***Mutation Research,*** 504(1-2): 57-65 (2002).

Savage J.R.K., "Classification and relationships of induced chromosomal structural changes", ***Journal of Medical Genetics,*** 12: 103–122 (1975).

Shaposhnikov, S., Frengen, E., Collins, A.R., "Increasing the resolution of the comet assay using fluorescent in situ hybridization-a review", ***Mutagenesis,*** 24(5): 383-389 (2009).

Shaheen, S., Rao, K.P., Rao, M.S., "Effect of nitroxazepine on bone marrow cells of mice", ***Toxicology Letters,*** 44(1-2): 215-217 (1988).

Shibuya, T., Morimoto, K., "A review of the genotoxicity of 1-ethyl-1-nitrosourea", ***Mutation Research,*** 297: 3–38 (1993).

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells", ***Experimental Cell Research,*** 175: 184-191 (1988).

Soloneski, S., Gonzales, M., Piaggio, E., Reigosa, M.A., Larramendy, M.L., "Effects of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation, azzurro. III. genotoxic evaluation on Chineese hamster ovary (CHO) cells", ***Mutation Research,*** 514: 201-212 (2002).

Soltani, F., Mosaffa, F., Iranshahi, M., Karimi, G., Malekaneh, M., Haghighi, F., Behravan, J., "Evaluation of antigenotoxicity effects of umbelliprenin on human peripheral lymphocytes exposed to oxidative stres", ***Cell Biological Toxicology***, 25: 291–296 (2009).

Soysal, Y., Şahin, F.İ., Menevşe, S., "İnsan lenfosit hücre kültüründe melatonin ve b-karotenin mitomisin C ile indüklenmiş kardeş kromatid değişimi sıklığı üzerine *in vitro* etkileri", ***Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi***, 15(3): 23-29 (2008).

Speit, G. and Houpter, S., "On the mechanism of differantial Giemsa staining of Bromodeoxyuridine substituted Chromosome, II. Differences between the demonstration of sister chromatid differantiation and replication patterns", ***Human Genetics,*** 70: 126-129 (1985).

Speit, G., Henderson, L., "Review of the *in vivo* genotoxicity tests performed with styrene", ***Mutation Research,*** 589: 67-79 (2005).

Stahl, S.M., "Temel psikofarmakoloji nörobilimsel temeli ve pratik uygulamaları", Taneli, B., Taneli, Y., ***Yelkovan Yayıncılık,*** İstanbul, (2003).

Stahl, S.M., Grady, M.M., Moret, C., Briley, M., "SNRI's: their pharmacology, clinical efficacy, and tolerability in comparison with other classes of antidepressants", ***CNS Spectrums,*** 10(9): 732-747 (2005).

Steingart, A., Cotterchio, M., Kreiger, N., Sloan, M., "Antidepressant medication use and breast cancer risk: a case-control study", ***International Journal of Epidemiology***, 32: 961–966 (2003).

Tarhan, G.H., "Antidepresan olarak kullanılan prozac ve paxil ilaçlarının insan lenfosit kültüründeki genotoksik etkileri", Yüksek Lisans Tezi, ***Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Ankara, (2006).

Tarhan, N., Çetin, M., "Depresyonda biyolojik göstergeler" ***Depresyon Monografları Serisi 4. E. Köroğlu (Ed.) Hekimler Yayın Birliği,*** Ankara; 175-200 (1993).

Teicher, B.A., "Antitumor Alkylating Agents, in: V.T. De Vita, S. Hellman, S.A. Rosenberg (Eds) ", ***Cancer: Principles and Practice of Oncology***, 5th edn., Lippincott-Raven, Philadelphia- New York, pp. 405-417 (1997).

Terradas, M., Martin, M., Tusell, L., Genesca, A., "Genetic activites in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell", ***Mutation Research,*** 705: 60-67 (2010).

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., "Single cell gel/Comet Assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing", ***Enviromental and Molecular Mutagenesis,*** 35: 206-221 (2000).

Togar, B., Türkez, H., Tatar, A., Kırkpınar, İ., Hacımüftüoğlu, A., Geyikoğlu, F., Keleş, M.S., Dirican, E., "The genotoxic potentials of some atypical antipsychotic drugs on human lymphocytes", ***Toxicology and Industrial Health,*** 1-7 (2011).

Tuğrul, D.C., "Stres ve depresyon", ***Psikiyatri Dünyası,*** 4: 12-17 (2000).

Tunçer, Ö., "Depresyon ve somatizasyon", ***Depresyon, Somatizasyon ve Psikiyatrik Aciller Sempozyumu***, 47-52 (1999).

Tural, Ü., "Reboksetinin farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri", ***Psikiyatri Psikoloji Psikofarmakoloji (3P) Dergisi***, 10(Ek 1): 11-16 (2002).

Tümkaya, S., Özdel, O., Değirmenci, T., Oğuzhanoğlu, K.N.,"Bir üniversite hastanesi psikiyatri polikliniği hastalarında psikiyatrik tanı ve tedavi: Bir yıllık geriye dönük araştırma", ***Anadolu Psikiyatri Dergisi*** ; 6: 36-40 (2005).

Türkçapar, M.H., Ervatan, S,Ö., "Antidepresan güçlendirme tedavileri", ***Klinik Psikiyatri,*** 4: 261-267 (2001).

Ünal, Y., "Radyoterapi gören kanserli hastalara ait kan lenfositlerinde DNA hasarının comet assay tekniği ile araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, ***Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,*** Ankara, 1-87 (1998).

Van't Hof, J., "The action of IAA and kinetin on the mitotic cycle of proliferative and stationary phase excised root meristems", ***Experimental Cell Research***, 51 (1): 167-176 (1968).

Wasson, G.R., McKelvey-Martin, V.J., Downes, C.S., "The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer", ***Mutagenesis,*** 1-10 (2008).

Wilson III, D.M., Thompson, L.H., "Molecular mechanism of sister chromatid exchange", ***Mutation Research,*** 616(1-2): 11-23 (2007).

Yılmaz, S., Aksoy, H., Ünal, F., Çelik, M., Yüzbaşıoğlu, D., "Genotoxic action of fungicide Conan 5FL on mammalian cells *in vivo* and *in vitro*", ***Russian Journal of Genetics,*** 44(3): 273-278 (2008).

Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F., Aksoy, H., "Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes", ***Mutation Research,*** 604 (1-2): 53-59 (2006).

Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S., Aksoy, H., Çelik, M., "Genotoxicity testing of fluconazole *in vivo* and *in vitro*", ***Mutation Research,*** 649: 155-160 (2008).

Zeiger, E., "Genetic Toxicology Testing", ***Chapel Hill, NC, USA***, 139-158 (2010).

Zengin, N., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S., Aksoy, H., "The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: sodium benzoate and potassium benzoate", ***Food and Chemical Toxicology***, 49: 763–769 (2011).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı :AVULOĞLU, Ece
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 13.10.1986, Ankara
Medeni hali : Bekar
e-mail : eceavuloglu@gazi.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Gazi Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2009
Lise	Prof. Dr. Rıdvan-Binnaz Ege Anadolu Lisesi	2004

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2011-…	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

A) Özeti Basılmış Uluslar Arası Kongre Tebliğleri

1. Avuloğlu, E., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F. Sister Chromatid Exchanges Produced by Antidepressant Drug Trazodone In Human Peripheral Lymphocytes. The European Environmental Mutagen Society (EEMS), Environmental Mutagenesis in the North, Oslo, Norway (2010).

2. Avuloğlu, E., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F. Assessment of Antidepressant Drug Trazodone Genotoxicity In Human Peripheral Lymphocytes Using Micronucleus Assay. Nanosafety Congress, Kemer, Antalya, Turkey (2012).