

157739

OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI'NA BAĞLI  
TIBBİ GENETİK BİLİM DALI

FLUOKSETİN'İN KROMOZOMLAR VE MİTOTİK İNDEKS  
ÜZERİNE IN VITRO VE IN VIVO ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

DERYA ÜSTÜNER

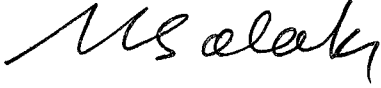
DANIŞMAN  
YRD. DOÇ. DR. MUHSİN ÖZDEMİR

HAZİRAN 2004

**KABUL VE ONAY SAYFASI**

Derya ÜSTÖNER'in Doktora Tezi olarak hazırladığı "**Fluoksetin'in kromozomlar ve mitotik indeks üzerine in vitro ve in vivo etkilerinin incelenmesi**" başlıklı bu çalışma, jürimiz Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

30/06/2004



Prof.Dr. Mustafa SOLAK  
ÜYE



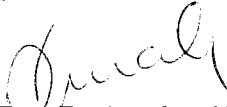
Prof.Dr. Sevilhan ARTAN  
ÜYE



Yrd.Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR  
ÜYE

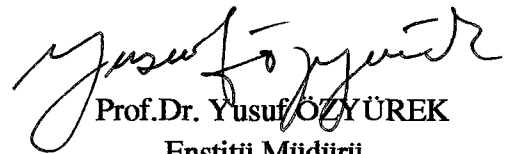


Yrd.Doç.Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU  
ÜYE



Yrd.Doç.Dr. Beyhan DURAK  
ÜYE

Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 08.07.2004  
gün ve 609/1742 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof.Dr. Yusuf ÖZYÜREK  
Enstitü Müdürü

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	i
<b>ÖZET</b> .....	v
<b>SUMMARY</b> .....	vi
<b>ŞEKİL DİZİNİ</b> .....	vii
<b>TABLO DİZİNİ</b> .....	viii
<b>GRAFİK DİZİNİ</b> .....	x
<b>RESİM DİZİNİ</b> .....	xi
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xii
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1. Antidepresan İlaçlar .....	3
2.1.1. Antidepresan İlaçların Sınıflandırılması .....	4
2.1.2. Antidepresan İlaçların Etki Mekanizmaları .....	4
2.2. Fluoksetin .....	5
2.2.1. Fluoksetin'in Etki Mekanizması .....	6
2.3 İlaç Metabolizmasında Genetiğin Rolü .....	7
2.3.1. Sitokrom P450'ye Bağımlı Enzim Sistemi .....	9
2.3.1.1. Sitokrom P450 İzozimi ve Genetik Polimorfizm .....	11
2.4. Kromozomun Yapısı .....	11

2.4.1.Kromozom Gruplarının Sınıflandırılması .....	12
2.4.2. Kromozomlarda Sayısal ve Yapısal Kromozom Düzensizliği .....	14
2.4.2.1. Sayısal Kromozom Düzensizlikleri .....	14
2.4.2.2. Yapısal Kromozom Düzensizlikleri .....	15
2.4.3. Kromozom Kırıkları .....	15
2.5. Hücre Siklusu ve Apoptoz .....	18
2.5.1.Hücre Siklusu .....	18
2.5.2.Apoptoz Mekanizması .....	18
2.6. Mikronukleus Oluşum Mekanizması ve Kriterleri .....	20
2.6.1. Mikronukleus Tanımı .....	20
2.6.2. Mikronukleus Hesaplama Kriterleri .....	22
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER .....</b>	<b>26</b>
3.1. Gereçler .....	26
3.1.1. In vitro Araştırma Grubu Bireyleri .....	26
3.1.2. In vivo Araştırma Grubu Deney Hayvanları .....	26
3.1.3. Kullanılan Araçlar .....	27
3.1.3.1. Kullanılan Aygıtlar .....	27
3.1.3.2. Cam Malzeme .....	28
3.1.3.3. Kimyasal Maddeler .....	28
3.2. Yöntemler .....	31
3.2.1. In vitro Bireyleri ve Doz-Süre Kombinasyonları .....	31
3.2.1.1. In vitro Kromozom ve MI (Mitotik İndeks) Analizi .....	33

3.2.1.2. In vitro CBMN (Cytokinesis Blocked Micro Nucleus) Analizi .....	34
3.2.2. In vivo Deney Grupları ve Doz Miktarları .....	35
3.2.2.1. In vivo Kromozom ve MI Analizi .....	36
3.2.2.2. In vivo CBMN Analizi .....	37
3.2.3. Preparatların Boyanması .....	39
3.2.3.1. GTG-Tripsin Bantlama .....	39
3.2.3.2. Solid Bantlama .....	39
3.2.4. Mikroskopta İnceleme, Görüntüleme Aşaması ve Kullanılan İstatistik Yöntemler .....	40
3.2.5. Kullanılan Stok Solüsyonlar .....	40
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>43</b>
4.1. Fluoksetinin In vitrodaki Mitotik İndeks ve CBMN Hesaplamaları .....	43
4.1.1. Fluoksetinin Mitotik İndeks Hesaplamaları .....	43
4.1.2. Fluoksetinin In vitro Olarak Sayısal ve Yapısal Kromozom Anomalisi Açısından İncelenmesi .....	50
4.1.3. Farklı Dozlardaki Fluoksetinin CBMN Hesaplamaları .....	54
4.2. Fluoksetinin In vivo'daki Mitotik Aktivite ve CBMN Sayıları .....	61
4.2.1. Fluoksetinin MI değerleri .....	61
4.2.2. Fluoksetinin In vivo'daki Sayısal ve Yapısal Kromozom Anomalisi Açısından İncelenmesi .....	63
4.2.3. Farklı Dozlardaki Fluoksetinin CBMN Sayıları .....	65

<b>5. TARTIŞMA</b> .....	72
5.1. In vitro Olarak Farklı Dozlardaki Fluoksetinin Periferik Kanda MI ve CBMN Değerlerinin Tartışılması .....	72
5.1.1 Farklı Dozlardaki Fluoksetinin Mitotik Aktivite Değerleri .....	72
5.1.2. Farklı Dozlardaki Fluoksetinin CBMN Değerleri .....	73
5.2. In vivodaki Farklı Fluoksetin Dozlarının Mitotik Aktivite ve CBMN Üzerine Olan Etkisinin Tartışılması .....	75
5.2.1. Farklı Dozlardaki Fluoksetinin Mitotik Aktivite Değerleri .....	75
5.2.2. Farklı Dozlardaki Fluoksetinin CBMN Değerleri .....	76
<b>6. SONUÇ</b> .....	79
<b>7. KAYNAKLAR</b> .....	82
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	

## ÖZET

Depresyon beyindeki biyokimyasal değişikliklerden kaynaklanan bir hastalık olup toplumdaki en yaygın psikiyatrik durumlardan biridir. Son yıllarda dünyada yaygın olarak kullanılan bir antidepresan preparatın etken maddesi olan fluoksetinin, mitotik aktivite ve kromozom düzeyindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için fluoksetinin in vivo ve in vitro şartlardaki etkilerini belirlemek üzere çalışma iki kısımda düzenlenmiştir.

In vitro çalışmada, 25-35 yaş arasındaki 8 erkek ve 8 kadın bireyden alınan periferik kan örnekleri, farklı doz ( $10^{-5}M$ ,  $10^{-6}M$ ,  $10^{-7}M$ ) ve sürelerde (24 saat, 48 saat) fluoksetin muamelesi sonucunda MI (Mitotik İndeks), sayısal ve yapısal kromozom düzensizliği, CBMN (Cytokinesis Blocked Micro Nucleus) açısından değerlendirilmiştir.

İn vivo çalışmada ise, 64 adet 225-250 gram ağırlığındaki 3 aylık Spraque dawley erkek sıçana 21 gün boyunca intraperitoneal olarak 5mg/kg, 7.5mg/kg, 10mg/kg'lık fluoksetin enjeksiyonu yapılmıştır. Sıçan kemik iliği hücrelerinden hazırlanan preparatlar mitotik indeks, sayısal ve yapısal kromozom düzensizliği, CBMN ve apoptotik hücre açısından değerlendirilmiştir.

İn vitro ve in vivo değerlerimiz birbiriyle uyumlu bulunmuştur. Fluoksetin antidepresanlar içerisinde büyük bir keşif olarak görünmesine rağmen yüksek dozlarında, DNA onarımının engellenmesi protein sentezini etkilemektedir. Bu da mitotik indeksde, CBMN'de, apoptoza giden hücrelerde, kromozomlarda düzensizliğe neden olmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Fluoksetin, kromozom, T hücresi, in vivo, in vitro, CBMN, apoptoz.

## SUMMARY

Biochemical changes in the brain are the main source for depression in the majority of total cases classed as psychiatric status. In recent years on throughout the world to use an antidepressant preparation called fluoxetine, it has been the aim to determination of effects on mitotic activity and chromosomes. To this aim, studies have been carried out by classifying the use of fluoxetine into two groups; that administered in vivo and that in vitro.

For the study carried out on the in vitro group, peripheral blood samples from 8 males and 8 females aged between 25-35 years were taken. The effects of different dosages ( $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M), as well as incubation periods (24 hours, 48 hours) of the drug fluoxetine were evaluated by the results of MI (Mitotic Index), numerical and structural chromosomes irregularities and CBMN (Cytokinesis Blocked Micro Nucleus).

For the study carried out on the in vivo groups, 64 Sprague dawley rats used. The rats were all three months old, male and weighed between 225 – 250 grams. All rats were injected with fluoxetine dosages of 5 mg/kg, 7.5 mg/kg, 10 mg/kg intraperitoneally for a 21 day period. From bone marrow cells prepared irregularities of the mitotic index, numerical and structural chromosome, CBMN and apoptotic cells were evaluated.

The evaluations for in vitro and in vivo evaluations were found to be in accordance. One big discovery in the antidepressant fluoxetine provides appears to be the link with high dosages, and causing obstacles to DNA repair protein synthesis. This is the reason why irregularities occur in the mitotic index, CBMN, apoptosis bound cells and the chromosomes.

Key words : Fluoxetine, chromosome, T cells, in vivo, in vitro, CBMN, apoptosis



## ŞEKİL DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Fluoksetinin kimyasal yapısı .....	5
Şekil 2.2. Genetik farklılıklardan dolayı ilaca karşı oluşturulan cevap .....	9
Şekil 2.3. İlaç metabolizmasındaki başlıca sitokrom P450 enzimleri .....	10
Şekil 2.4. İnsan kromozomları .....	13
Şekil 2.5. Sıçan kromozomları .....	14
Şekil 2.6. Hücre siklusu boyunca mitoz ve apoptoz .....	20
Şekil 2.7. CBMN dağılımı .....	24
Şekil 2.8. Sitotoksik ajanın etkisindeki hücrelerin olası durumları .....	25

## TABLO DİZİNİ

<b><u>Tablo</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Tablo 3.1.</b> Farklı fluoksetin dozlarıyla periferik kan örneklerinin 24 saatlik muamelesi yöntemi .....	31
<b>Tablo 3.2.</b> Farklı fluoksetin dozlarıyla periferik kan örneklerinin 48 saatlik muamelesi yöntemi .....	32
<b>Tablo 3.3.</b> Farklı fluoksetin dozlarında CBMN hesaplama yöntemi .....	32
<b>Tablo 3.4.</b> Farklı dozlardaki fluoksetin enjeksiyonu sonrasında sıçan metafaz kromozomlarını hazırlama yöntemi .....	35
<b>Tablo 3.5.</b> Farklı dozlardaki fluoksetin enjeksiyonu sonrasında CBMN analizi yöntemi .....	36
<b>Tablo 4.1.</b> Erkek ve kadın bireylerdeki fluoksetinin farklı doz-süre kombinasyonlarındaki % MI .....	44
<b>Tablo 4.2.</b> Erkek bireylerdeki grupların %MI açısından karşılaştırılması .....	46
<b>Tablo 4.3.</b> Kadınlarda grupların %MI açısından karşılaştırılması .....	47
<b>Tablo 4.4.</b> In vitrodaki erkek ve kadın bireylerin %MI açısından karşılaştırılması .....	48
<b>Tablo 4.5.</b> Grupların % MI açısından karşılaştırılması .....	49
<b>Tablo 4.6.</b> Erkek ve kadın bireylerde fluoksetinin farklı doz ve sürelerindeki anöploidi oranları .....	51
<b>Tablo 4.7.</b> Fluoksetinin farklı doz ve sürelerindeki anöploidi oranları .....	52
<b>Tablo 4.8.</b> Grupların anöploidi açısından karşılaştırılması .....	53
<b>Tablo 4.9.</b> Kadın bireylerde fluoksetinin farklı dozlarındaki CBMN sayıları	56
<b>Tablo 4.10.</b> Erkek bireylerde fluoksetinin farklı dozlarındaki CBMN sayıları	57

<b>Tablo 4.11.</b> Erkek ve kadın bireylerin CBMN açısından karşılaştırılması .....	58
<b>Tablo 4.12.</b> Fluoksetinin farklı konsantrasyonlarındaki CBMN tipleri .....	59
<b>Tablo 4.13.</b> Grupların CBMN açısından karşılaştırılması .....	60
<b>Tablo 4.14.</b> In vivodaki fluoksetinin farklı dozlarındaki %MI değerleri .....	62
<b>Tablo 4.15.</b> Grupların % MI açısından karşılaştırılması .....	63
<b>Tablo 4.16.</b> In vivoda farklı dozlardaki fluoksetinin anöploidi oranları .....	64
<b>Tablo 4. 17.</b> Anöploidi açısından grupların karşılaştırılması .....	65
<b>Tablo 4.18.</b> In vivodaki farklı dozlardaki CBMN tipleri .....	65
<b>Tablo 4.19.</b> Farklı fluoksetin dozlarındaki CBMN değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması .....	68
<b>Tablo 4.20.</b> Fluoksetinin farklı dozlarındaki apoptotik hücreler .....	69
<b>Tablo 4.21.</b> Grupların apoptotik hücre açısından karşılaştırılması .....	70

## GRAFİK DİZİNİ

<b><u>Grafik</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Grafik 4.1.</b> Erkek ve kadın bireylerin %MI açısından karşılaştırılması .....	48
<b>Grafik 4.2.</b> Erkek ve kadın bireylerin % anöploidi açısından karşılaştırılması .....	52
<b>Grafik 4.3.</b> Kadın bireylerdeki farklı fluoksetin dozlarındaki CBMN değerlerinin karşılaştırılması .....	57
<b>Grafik 4.4.</b> Erkek bireylerdeki farklı fluoksetin dozlarındaki CBMN değerlerinin karşılaştırılması .....	58
<b>Grafik 4.5.</b> Erkek ve kadın bireylerin farklı fluoksetin dozlarındaki CBMN değerlerinin karşılaştırılması .....	59
<b>Grafik 4.6.</b> In vitrodaki fluoksetinin farklı dozlarında oluşan CBMN değerleri .....	60
<b>Grafik 4.7.</b> In vivodaki farklı fluoksetin dozlarındaki %MI değerlerinin karşılaştırılması .....	62
<b>Grafik 4.8.</b> In vivoda farklı dozlardaki fluoksetin gruplarındaki anöploidi oranları .....	64
<b>Grafik 4.9.</b> In vivodaki farklı fluoksetin dozlarındaki CBMN dağılımı .....	66
<b>Grafik 4.10.</b> Farklı fluoksetin dozlarındaki apoptotik hücrelerin karşılaştırılması .....	70

## RESİM DİZİNİ

<u>Resim</u>	<u>Sayfa</u>
<b>Resim 4.1.</b> 10 <sup>6</sup> luk büyütmedeki mitoz görüntüsü .....	44
<b>Resim 4.2.</b> 100'lük büyütmedeki metafaz kromozomları .....	45
<b>Resim 4.3.</b> 10 <sup>-6</sup> M'lık fluoksetinin periferik kan örneğiyle 24 saatlik muamelesi sonucunda oluşan kromatid tipi kırık .....	50
<b>Resim 4.4</b> 10 <sup>-6</sup> M fluoksetinin periferik kan örneğiyle 48 saatlik muamelesi sonucunda oluşan kromatid tipi kırık .....	51
<b>Resim 4.5.</b> 10 <sup>-6</sup> M fluoksetinin periferik kan örneğiyle 48 saatlik muamelesi sonucundaki anöplodik metafaz kromozomları .....	53
<b>Resim 4.6.</b> 10 'luk büyütmedeki BN hücreler .....	54
<b>Resim 4.7.</b> 100'lük büyütmedeki BN hücreler .....	55
<b>Resim 4.8.</b> BN'daki 1'li MN .....	55
<b>Resim 4.9.</b> BN'daki 2'li MN .....	56
<b>Resim 4.10.</b> 100'lük büyütmedeki sıçan metafaz kromozomları .....	61
<b>Resim 4.11.</b> 2. gruba (7.5mg/kg Fluoksetin) ait kromatid tipi kırığı olan sıçan metafaz kromozomları.....	63
<b>Resim 4.12.</b> Hücreler ayrılırken MN oluşumu .....	66
<b>Resim 4.13.</b> BN hücredeki 1'li köprü .....	67
<b>Resim 4.14.</b> BN hücredeki 1'li MN ve köprü oluşumu .....	67
<b>Resim 4.15.</b> 100'lük büyütmedeki fluoksetinin yüksek dozundaki (10 mg/kg Fluoksetin) apoptotik hücreler .....	69
<b>Resim 4.16.</b> BN daki MN kabul edilmeyen gen amplifikasyonları .....	71
<b>Resim 4.17.</b> MN kriterlerine uymayan gen amplifikasyonları .....	71

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
%	Yüzde
$\beta$	Beta
$\alpha$	Alfa
$\mu$ l	Mikrolitre
5HT <sub>1A</sub>	5-Hidroksi triptamin
5HT <sub>2</sub>	5-Hidroksi indolasetik asit
BN	Binukleus
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
cAMP	Siklik Adenin Mono Fosfat
CBMN	Cytokinesis Blocked Micro Nucleus
CCD Kamera	Cooled Charged Camera
CDI	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör
Con A	Concavalin A
CYP	Sitokrom P450
Cyt-B	Sitokalaşin B
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
FDA	Food Drug Administration
FISH	Fluoresan In Situ Hybridization
g	Gram
GTG	Giemsa- Tripsin –Giemsa Bantlama

HLA	Human Leukocytes Antigen
HUMN	Human Micro Nucleus
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature
i.p.	İntraperitoneal
$K_2S_2O_4$	Potasyum disülfüt
KCl	Potasyum klorür
kg	Kilogram
MAO	Mono Amin Oksidaz
ml	Mililitre
MN	Mikro Nucleus
$NaHCO_3$	Sodyum bikarbonat
NDCI	Nuclear Division Cytotoxicity Index
NDI	Nuclear Division Index
nm	Nonometre
NPB	Nükleoplazmik köprü
PHA	Phytohemagglutinin
rpm	Rotation per minute
s	Saat
SSC	$NaCl_7$ Trisodium Citrate
SSRI	Selektif Serotonin Reuptake İnhibitörleri
TCA	Trisiklik Antidepresan

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsanlarda en sık rastlanan hastalıklardan biri olan depresyon, önemli düzeyde intihardan kaynaklanan morbidite ile ilişkilidir. Çünkü her yedi depresyon hastasından biri genellikle depresyon tedavisi için kendilerine verilen ilaçları yüksek dozda alarak intihar girişiminde bulunmaktadır. Bu nedenle özellikle antidepresan ilaçların yüksek dozda güvenilirliği çok önemlidir (94, 105).

Depresyona karşı kullanılan antidepresan ilaç grubundan SSRI'lar, mutluluk duygusu veren serotonin hormon seviyesinin artmasına neden olur. 1987 yılında FDA (Food Drug Administration) onayı ile piyasaya sunulan fluoksetin 1988 yılından itibaren klinikte depresyon tedavisinde en çok reçete edilen antidepresan olmuştur (94). Fakat mutluluk hapi olarak, kozmetik farmakolojiye hizmet ettirilerek kullanılan fluoksetin, ilaç kullanımında suistimale uğramıştır (113).

Modern toplum ürünlerinden biri olarak tanımlanan depresyon, günümüzde ilaçlarla, uyuşturucularla karşılıklı ilişki içindedir. Depresyondaki kişi ilaçlara yönelmekte ve ilaçlar da depresyonu bir taraftan tedavi ederken bir taraftan da besleyip yeniden üretmektedir (113).

Son yıllarda artan fluoksetin kullanımına bağlı olarak bu ilacın yüksek dozlardaki güvenilirliği önem kazanmıştır. Özellikle T hücre proliferasyonu (artışı) üzerine olan etkisi incelenmeye başlanmıştır. T hücre proliferasyonundaki etki, somatik hücre bölünme defektleri ile birlikte farklı kromozom anomalilerine neden olma riskini de beraberinde getirmektedir (9, 22, 23, 24, 37). Bunun için, in vivo ve in vitro koşullarda fluoksetinin mitotik aktivite ve kromozom düzeyindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla planlanan çalışma iki kısımda düzenlenmiştir.

In vitro kısımda;

1. Farklı dozlardaki fluoksetinin ( $10^{-5}M$ ,  $10^{-6}M$ ,  $10^{-7}M$ ) farklı sürelerde (24 ve 48 saat) periferik kan örnekleriyle muamelesi sonrasındaki mitotik



aktivite ve kromozomlara olan etkisi incelenmiş; erkek ve kadın bireylerde karşılaştırılmaları yapılmıştır.

2. Farklı dozlardaki fluoksetinin neden olduğu CBMN (Cytokinesis Blocked Micro Nucleus) sayısı belirlenmiş; erkek ve kadın bireylerde karşılaştırılmaları yapılmıştır.

In vivo kısımda ise;

1. Sıçan kemik iliği hücrelerinde farklı dozlardaki (5mg/kg, 7.5mg/kg, 10mg/kg) fluoksetinin mitotik aktiviteyi ve kromozomları nasıl etkilediği incelenmiştir.
2. Fluoksetinin farklı dozlarındaki enjeksiyonu sonrasında sıçan kemik iliği hücrelerinde oluşan CBMN ve apoptotik hücre sayıları belirlenmiştir.

Yukarıda ifade edilen amaçlar standart sitogenetik yöntemler uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Depresyon dünya çapında oldukça ciddi bir sağlık problemi oluşturmaktadır. Normal günlük yaşam ve iş anında yeti yitimine neden olan önemli bir etkidir (94, 105). Depresyon ekonomik olarak aktif olan genç erişkinlerde örneğin; 18-44 yaş arasındakilerde sık görülmektedir. Tekrarlama oranı %78-96 arasında değişmektedir (105).

Yapılan çalışmalarda en fazla antidepresan reçetelenen ülkenin İngiltere ve daha sonra da Almanya olduğu belirtilmiştir. Türkiye’de ise antidepresan ilaç olarak en fazla pazarlanan Prozac veya Dista ticari adıyla fluoksetin’dir (94).

### 2.1. Antidepresan İlaçlar

Antidepresan ilaçlar duygu durum hastalıkları (afektif hastalıklar) grubuna giren depresif bozuklukların ve manik bozukluğun (bipolar bozukluğun) tedavisinde kullanılır. Bu ilaçlara ortak bir adla duygu durumu stabilize edici ilaçlar denilir. MAO (Mono Amin Oksidaz) inhibitörleri hariç antidepresan ilaçlar normal kimselerde ruhsal etkinlikte artma yapmazlar (52).

Antidepresan ilaçların terapötik tesirlerinin mekanizması, afektif hastalıkların patogenezi gibi, tam olarak henüz aydınlatılmamıştır. Hepsinin ortak yanları, santral sinir sisteminde katekolaminler (noradrenalin, dopamin) ve/veya bir indolamin olan serotonin gibi nöromediyatör monoaminlerin sinapslardaki kinetiği ile ilgili olayları ve bazende onların reseptörlerini etkilemeleridir (52).

Bir antidepresanın güvenilirliğini etkileyen faktörler arasında; akut terapötik endeks (aşırı doz alımındaki güvenilirlik), uzun süreli güvenilirlik, farmakokinetik etkileşimler ve farmakodinamik etkileşimler sayılabilir. Tolerabiliteyi etkileyen faktörler ise akut tolerabilite endeksi ve geç dönemdeki tolerabilitedir. Güvenilirlik ve tolerabilite; özellikle de çocuk, ergenler, yaşlılar, medikal hastalığı bulunanlar, madde bağımlıları, serebral yetersizliği olan örneğin; epilepsi, mental retardasyon, psikoz ve demans gibi bazı özel hasta popülasyonları açısından önem taşımaktadır (8, 80, 86, 94).

### **2.1.1. Antidepresan İlaçların Sınıflandırılması**

Afektif hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçlar etki mekanizmaları, farmakolojik etki profilleri ve kimyasal yapıları bakımından beş gruba ayrılırlar:

- i) Trisiklik antidepresanlar.
- ii) Non-trisiklik antidepresanlar
- iii) Monoamin Oksidaz İnhibitörleri (MAO)
- iv) Lityum
- v) Diğer ilaçlar

İlk üç gruptaki ilaçlar major depresyonun (unipolar depresyonun) tedavisi için, lityum ise bipolar hastalığın önlenmesi ve tedavisi için kullanılır (52).

### **2.1.2. Antidepresan İlaçların Etki Mekanizmaları**

Trisiklik olsun veya olmasın ilaçların çoğu noradrenerjik ve/veya serotonerjik sinapslarda nörotransmitter re-uptake'ini inhibe ederler. Böylece aşırımı güçlendirirler ve nörotransmitter metabolizmasını yavaşlatırlar. Geri alımın inhibisyonu hemen başladığı halde, antidepresan ilaçların depresyon belirtilerinde yaptıkları düzelme 2-3 haftalık bir latent sürenin sonunda başlar (49, 52).

Antidepresan ilaçların sinaps düzeyindeki akut etkilerinin sonucu olarak en az birkaç haftalık bir sürede ortaya çıkan, nörotransmitter salıverilmesindeki, reseptörlerin duyarlılığındaki ve reseptörden gelen sinyalin nöron içindeki transdüksiyonundaki değişikliklerin, antidepresan etkinin sorumlu olduğu ileri sürülmektedir (52).

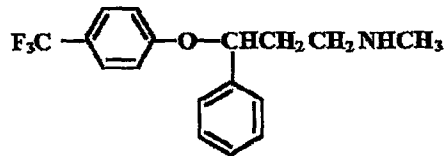
Trisiklik ilaçlar karaciğerde biyotransformasyon suretiyle elimine edilirler. Belirli bir trisiklik antidepresanı aynı dozda alan kişilerde, kararlı durumdaki plazma konsantrasyonu bireyler arasında fazla değişkenlik gösterir. Bu durum biyo yararlanımlarının ve eliminasyon yarılanma ömürlerinin bireyler arasında fazla değişkenlik göstermesine bağlıdır. Eliminasyon hızı değişkenliğinin temeli, bu ilaçları metabolize eden CYP2D6 enziminin genetik polimorfizm göstermesidir. Türkiye'de

yavaş metabolize edenlerin oranı % 3.4 olarak bulunmuştur. Bunlar ilacın terapötik ve toksik etkisine, normal ya da hızlı metabolize edenlerden daha duyarlıdırlar. Çok az sayıda kişinin trisiklik antidepresanları çok hızlı metabolize ettikleri belirlenmiştir. Bunlar, trisiklik ilaçların terapötik etkilerine dayanıklıdırlar. Trisiklik ilaçlarla tedavi edilen hastalarda, ilacın bir süre alınması sonucu oluşan plazma konsantrasyonları arasında 50 kata varabilen bireysel farklılıklar bulunmuştur (52, 114).

Trisiklik ilaçları karaciğerde metabolize eden CYP2D6 enzimi, kinidin ve selektif serotonin re-uptake inhibitörü (SSRI) ilaçlar olan paroksetin, fluoksetin ve onun aktif metaboliti olan norfluoksetin tarafından inhibe edilir. Böylece, adı geçen enzim bakımından hızlı metabolizör olan bireyler bu ilaçları aldıkları sürede yavaş metabolizör durumuna geçerler ve onlarda trisiklik antidepresanların biyotransformasyonu yavaşlayabilir. Genetik bakımından yavaş metabolizör olan bireylerde adı geçen ilaçlar enzim etkinliğini daha da azaltmaz. Fluoksetin ile trisiklik ilaçlar birlikte kullanılmalıdır. Aksi takdirde fluoksetin trisiklik ilaçların plazma düzeyini belirgin derecede attırır ve bu etkileşme sonucu kardiyak aritmilerle kendini gösteren trisiklik ilaç zehirlenmelerine neden olabilir. Fluoksetinin aktif metabolitinin yarılanma ömrü uzun olduğu için, fluoksetin kesildikten sonra CYP2D6 enzimidaki inhibisyon bir süre daha devam eder (42, 62, 66).

## **2.2. Fluoksetin**

Fluoksetin, Prozac ve Dista ticari adıyla pazarlanan yeni trisiklik olmayan serotonin reuptake inhibitörü olan antidepresan, özellikle karaciğerde metabolize olur. N-methyl-3-phenyl-3-[( $\alpha$ - $\alpha$ -trifluoro-p-tolyl)oxy] propylamine şeklindedir ve  $C_{17}H_{18}F_3NO$  HC empirik formundadır (Şekil 2.1).



**Şekil 2.1.** Fluoksetinin kimyasal yapısı

Not : Bu şekil [www.sarafem.com](http://www.sarafem.com)'dan modifiye edilerek alınmıştır.

Fluoksetinin moleküler ağırlığı 345,79'dur. 14mg/ml'de distile su veya serum fizyolojik ile maksimum çözünme sağlar. Fluoksetin bir phenyl ve bir toyl grubu ile ikinci amin grubundandır, yani fenilpropilamin türevidir. Yapıca amfetaminlere benzer (40, 41, 47).

Fluoksetin bir seçici serotonin geri alım inhibitörüdür, diğer nörotransmitterler üzerinde çok az etkisi bulunmaktadır. Ağız yoluyla alındıktan sonra emilimi iyidir ve en yüksek plazma düzeyine 6-8 saat içinde ulaşır. Fluoksetin 4-6 günlük bir yarılanma ömrüne sahipken, aktif metaboliti olan norfluoksetin 7-10 günlük yarılanma ömrüne sahiptir. Bu uzun yarılanma ömrü sporadik olarak ilaç kullanımına uyumsuzluk gösteren hastalarda koruyucu olmakta ve ilaç kesme fenomeninin ortaya çıkmasını önlemektedir. İlaç kullanımından 2-8 hafta içinde iyileşme başlamaktadır (73).

Fluoksetinin önerilen başlangıç ve sürdürüm dozu 20mg/gün'dür. Bu doz hastaların çoğu için yeterli olmakla birlikte günlük doz maksimum 80 mg/gün olabilir. Tedavide 2-3 hafta içinde bir ilerleme kaydedilmediyse 20mg/gün'lük bir artış düşünülebilir (94).

En sık rastlanan yan etkiler anksiyete, sinirlilik, insomnia, sersemlik, halsizlik, asteni veya tremor gibi merkez sinir sistemi belirtileri; iştahsızlık, bulantı ve diyare gibi gastrointestinal sistem belirtileri ve cinsel disfonksiyondur. Fluoksetin psikotik olmayan depresif hastalarda ve distimide trisiklik ilaçlar kadar etkilidir. TCA tedavisine yanıtızsız kronik hastalarda da atipik depresyon yani uyku, iştah artışı, kişiler arası aşırı duyarlılık, ekstremitelerde kurşunsu ağırlıktan yakındıkları bir depresyon türünde özellikle etkilidir (8, 46, 91).

### **2.2.1. Fluoksetin'in Etki Mekanizması**

İntihar girişiminde bulunan depresif hastaların postmortem BOS ve beyin dokularında serotoninin başlıca metaboliti olan 5-hidroksiindolasetik asit konsantrasyonunun azalmasının gösterilmesi üzerine, depresyonun serotonin 5-hidroksitriptaminin fonksiyonel eksikliğiyle ilintili olduğu belirtilmiştir. Bu bulguya ek olarak pek çok diğer nörotransmitter reseptörü ile ilgili çeşitli işlev bozukluklarından

söz edilmektedir. Günümüze dek memeli beyinde 14 serotonin reseptör alt tipi tanımlanmıştır. Fakat dikkatler daha çok tüm antidepresanlara duyarlı olan 5-HT<sub>1A</sub> ve 5-HT<sub>2A</sub> üzerinde yoğunlaşmıştır. Depresif hastaların trombositlerinde de serotonin iletiminin ve 5-HT<sub>2A</sub> reseptör aktivitesinin bozulduğu ve etkili bir tedavi ile tekrar düzeldiği bilinmektedir (18, 79, 88).

Fluoksetin, merkezi sinir sisteminde presinaptik olarak salınan serotoninin güçlü bir inhibitörüdür. Klinik olarak geçerli dozlarda uygulandığında insan trombositlerinde de serotonin geri alımını önlemektedir. 11 hafta süreyle 20mg/gün fluoksetin alan depresif hastalarda trombosit 5-HT düzeylerinin azalmış olduğu saptanmıştır.

Fluoksetin, SSRI'lar içinde en uzun yarılanma ömrüne sahiptir. SSRI'lar yağda çözünebildiklerinden kan-beyin bariyerini kolayca geçerler. Proteine yüksek oranda bağlanmasının dezavantajı, proteine yüksek oranda bağlanan diğer ilaçlarla örneğin warfarin ile birlikte alındıklarında diğer ilacın serbest hale geçmesiyle yan etkiler görülebilmektedir. Bu nedenle bu tip ilaçlar ile birlikte SSRI'ların kullanımına dikkat edilmelidir (46).

### **2.3 İlaç Metabolizmasında Genetiğin Rolü**

Her bireyin ilaç metabolize etme kapasitesi farklıdır. İlaçlar farklı bireylerde farklı sürelerde yıkılırlar. Farklı aleli olan genlerden kodlanan enzimler farklı katabolik etkinliğe sahip olabilirler ve nihayet ilaçlara karşı tepkide genetik olarak belirlenmiş bir değişkenlik ortaya çıkar.

Bir ilaca yanıtta genlerin etkisi farmakogenetik araştırmalarla sürmektedir. Bu yanıtlar bir ilaca aşırı fizyolojik yanıt veya ilacın etkilerine direnç ya da yan etkilerin sıklığında artma şeklinde olabilir. Bazı durumlarda farmakolojik ajanlar birikebilir ve belli genetik hastalıklar için tetik çekici olabilir. İlaçlara yanıtı etkileyen diğer faktörler, etnik köken ve HLA 'dır (7, 114).

Genetik farklılıklar, sitokrom P450 nin indüksiyonu, sitokrom P450'nin inhibisyonu, hastalık, yaş ve ırk gibi faktörler ilaç metabolizmasını etkilemektedir (114).

Genelde belli genler ilaçların metabolizmasında etkili olabilir, bazı genetik hastalıkların ortaya çıkmasına ya da belli yan etkilerin sıklığının artmasına neden olurlar.

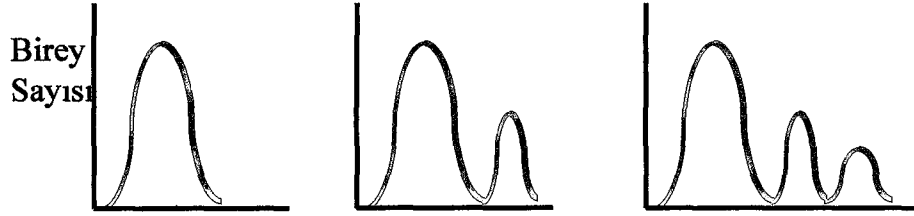
Genotipik değişikliklere bağlı olarak bazı kişilerde ilaç metabolizmasının etkisi kalıtsal olarak ana babadan dominant veya resesif bir karakter şeklinde sonraki kuşağa geçer. Son yıllarda ilaçlara karşı kişinin verdiği cevabın kalıtsal olarak değişmesi ve buna bağlı olarak ilaç etkinliğinin etnik gruplar arası değişimi incelenmektedir.

Biyotransformasyonda rol oynayan enzimlerin hücrelerde yapımının veya ilaçlarla ilgili diğer hücresel yapı ve olayların genetik kontrolü monogenik veya poligenik şekilde yapılmaktadır.

Belirli bazı ilaçlara karşı oluşturulan bireysel cevap oranları arasında önemli varyasyonlar bulunmakta ve ilaca cevaptaki bu farklılık kesiksiz ya da kesikli bir dağılım gösterebilmektedir. Eğer ilaca karşı oluşturulan cevabın ölçülmesine ilişkin test büyük sayıdaki örnekler üzerinde yapılacak olursa o zaman bireysel ilaç cevaplarında kesiksiz dağılımda çan eğrisi ya da unimodal dağılım görülürken, kesikli dağılımda bimodal ve bazen de trimodal eğri elde edilecektir (7).

Unimodal dağılım, incelenen ilaç metabolizmasının çok sayıda genin kontrolü altında olduğunun (poligenik) ya da genetik ve çevresel faktörlerin bir kombinasyonu olduğunu (multifaktöriyel kalıtım) gösterir ki; bu tür genetik faktörlerin analizi oldukça karmaşıktır. Fakat monogenik kontrol altında olan ve kesikli dağılım gösteren ilaç cevaplarını incelemek daha kolaydır. Örneğin; eğer normal ilaç metabolizması dominant D geni tarafından kontrol ediliyorsa, toplumun bir bölümü d resesif geni için homozigot (dd) olacağı için ilacı metabolize edemeyecek ve dolayısıyla toplum üç genotipik sınıf içerisinde toplanacaktır : DD, Dd, dd. Ancak DD ve Dd genotipli bireyler arasında ilaca cevap farkı gözlenemeyecek olursa, bimodal dağılım ortaya çıkacaktır. Fakat DD ve Dd genotipli bireylerin ilaca cevapları arasında bir farklılık olursa bu durumda dağılım trimodal durum alacak ve her eğri (pik) fenotipi gösterecektir (Şekil 2.2). Sonuç olarak, ilaç metabolize edici enzimlerin toplumdaki

bimodal ya da trimodal dağılımı, bu enzimlerin polimorfik loküsteki genler tarafından kontrol edildiğini göstermektedir (7).



İlaca karşı oluşturulan cevap

**Şekil 2.2.** Genetik farklılıklardan dolayı ilaca karşı oluşturulan cevap  
Not : Başaran, N. Tıbbi Genetik kitabından modifiye edilerek alınmıştır.

### **2.3.1. Sitokrom P450'ye bağımlı enzim sistemi**

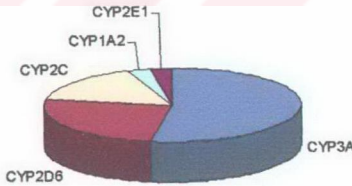
İlaç ya da bitki toksinleri gibi kimyasal bileşikler karaciğer hücreleri endoplazmik retikulumunda bulunan bir oksidasyon sistemi tarafından yıkılır. Bu enzimler topluca sitokrom P450 olarak bilinir. Işığı 450 nm de en yüksek düzeyde absorbe ederler. Sitokrom P450, karaciğer mikrozomlarında ve adrenal korteks mitokondrilerinde temel elektron transport zincirindeki en son enzimdir. Memelilerde, evrimsel olarak ilişkili genler sistemi farklı P450 proteinlerini kodlar. Detoksifikasyonun (toksik maddelerin uzaklaştırılması) ilk fazını oluştururlar. Substrat atmosferik oksijeni kullanarak oksitlenir ve su yan ürün olarak ortaya çıkar. P450 enzimlerinin karakteristik özelliği tek bir kimyasal substratın bir çok P450 enzimi tarafından yıkılabilmesi ve tek bir P450 proteinin yapısal olarak farklı bir çok kimyasal maddeyi okside edebilmesidir. Çok geniş bir seri kimyasal maddeyi metabolize ve detoksifiye etme kapasiteleri önemlidir (114).

Memelilerde sitokrom P450 genleri CYP genleri olarak belirtilir. Bunlar ekson/intron yapısıyla birbirine benzeyen ve benzer gen ürünlerini kodlayan bir süper aile oluştururlar. cDNA dizilerinin kıyaslanmasına dayanan evrimsel pedigri türemiş ve



bu pedigrkiye göre CYP gen ailesi son 1,5-2 milyar yılda ortaya çıkmıştır. Özellikle CYP-2 ailesinin, hayvan organizmaları tarafından detoksifiye edilmesi gereken bitki toksinlerine yanıt olarak geliştiği sanılmaktadır. CYP genlerinin inanılmaz çeşitliliğinde en az 30 gen dublikasyonu rol oynamıştır. Bu proteinlerin kodlanması için bilinen 481 gen 74 aileye bölünmekte ve en azından % 40 oranında gen varyasyonlarıyla birbirinden ayrılmaktadır (77, 114).

Aile ismi sayıyla gösterilmektedir. Örneğin CYP3 gibi. Memelilerde 77 ailenin sadece 14' ü bulunmaktadır. 20' ye yakın alt aile vardır ve bunlar rakamın önüne harf konularak ifade edilir. Örneğin CYP3A gibi . Kişisel enzimler, alt aileyi gösteren harfi takiben konan yine bir numara ile gösterilir. Örneğin CYP3A4 gibi. Çoğu ilaç, kendi metabolizmaları için P450 enzimlerini substrat olarak kullanır ve ilaç etkileşimleri için büyük bir potansiyeli vardır. İlaç metabolizmasındaki başlıca sitokrom P450 enzimleri CYP 3A, CYP 2D6, CYP 2C, CYP 1A2, CYP 2E1'dir (Şekil 2.3). İlaçlar diğer ilaçların metabolizmalarını inhibe edebilir veya indükleyebilir ve aynı zamanda bu ilaçlar mevcut P450 enzim substratları ile metabolizma için yarışabilirler (77, 114).



**Şekil 2. 3.** İlaç metabolizmasındaki başlıca sitokrom P450 enzimleri  
Not : Hardman J.G.: The Pharmacological Basis of Therapeutics kitabından modifiye edilerek alınmıştır.

### **2.3.1.1. Sitokrom P450 izozimi ve genetik polimorfizm**

CYP450 metabolizması sırasında ilaç etkileşimlerini karmaşıklaştıran bir diğer faktör genetik polimorfizmdir. Beyazların, Meksika kökenli Amerikalıların, zencilerin ve Asya kökenlilerin yalnızca % 10'luk küçük bir bölümünün CYP450 2D6 enzim miktarları düşüktür. CYP450 2D6 enziminin göreceli olarak eksikliği otozomal resesif bir bozukluk sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu polimorfizmin klinik anlamı, yavaş metabolize eden kişilerin, CYP450 2D6 tarafından metabolize edilen bir ilacı aldıklarında ilacın birikerek toksisite riskinin artmasıdır (47, 94).

CYP450 2D6'yı güçlü olarak inhibe eden ilaçlar, CYP450 2D6 tarafından yaygın olarak metabolize edilen bir ilaçla birlikte verildiğinde genetik olarak iyi metabolize edici kişiler bile fenotipik olarak kötü metabolize edici kişilere dönüşebilmektedir. SSRI grubundan ilaçların, özellikle yüksek dozlarda bir arada kullanılması sırasında bu durum görülebilmektedir.

CYP450 2D6 izozimleri aktivitesi açısından kişiler arasında 4-20 kat gibi oldukça büyük farklılıklar bulunmuştur. Yoğun metabolize edici kişilerde bu soruna rastlanmamıştır (46, 52, 94).

### **2.4. Kromozomun Yapısı**

İnsan kromozomları ilk defa 1874'te Arnold ve 1881'de Fleming tarafından gözlenmiştir. 1956'da Tjio ve Levan, insanda 46 kromozom olduğunu göstermiştir (4).

Yunanca chroma (renk) ve soma (vücut) kelimelerinden gelen kromozom kelimesi, ökaryotik organizmalarda, üzerinde genlerin sıralandığı DNA-protein kompleksi olup hücre çekirdeğinin bölünmesi sırasında kalınlaşmış ve oldukça kondanse olmuş ve kendine özgü boyanma potansiyeline sahip kromatin materyalidir.

Tüm genetik materyalin pratik çalışmalarla görülebilen birimi nükleustur ve hücrede bulunur. İnsan vücudundaki hücrelerin çoğunluğu özel hücre tiplerine farklılaşır ki bunlar bölünmez. Sadece aktif replikasyon siklusunda ki hücrelerle uygun birçok araştırma ile tüm kromozomlar görülebilir. Bir doku tipine ait böyle hücreleri doğal olarak bölünebilen aktif popülasyonlardan, in vivo olarak bölünebilen hücre kültürlerinden elde edebiliriz. Kültür içindeki hücrelerin replikasyon süresi 12-48 saat

arasındadır ve çoğunlukla bu zamanda nükleus interfaz safhasındadır. Gelişi güzel farklılaşan hücelere benzeyen interfaz nükleuslarının çoğu sitogenetik araştırma için uygun değildir (81).

İnsanların normal hücre çekirdekleri 46 kromozom (23 çift) içermektedir. Her bir kromozom çiftinden biri paternal, diğeri de maternal orjinlidir. Dişi ve erkekten gelen ve aynı olan 22 çift kromozom grubu otozomlar olarak adlandırılır. Kadınlar için, XX erkekler için XY kromozomları cinsiyet kromozomlarıdır.

Her hücre siklusu boyunca kromozomların içindeki DNA kendi kendine dublike olur ve her hücrede aynı iki kardeş kromozom olduğunda hücre bölünür. DNA replikasyonu interfazın ortasında yer almaktadır ve bu periyot S (sentez) fazı olarak bilinir.

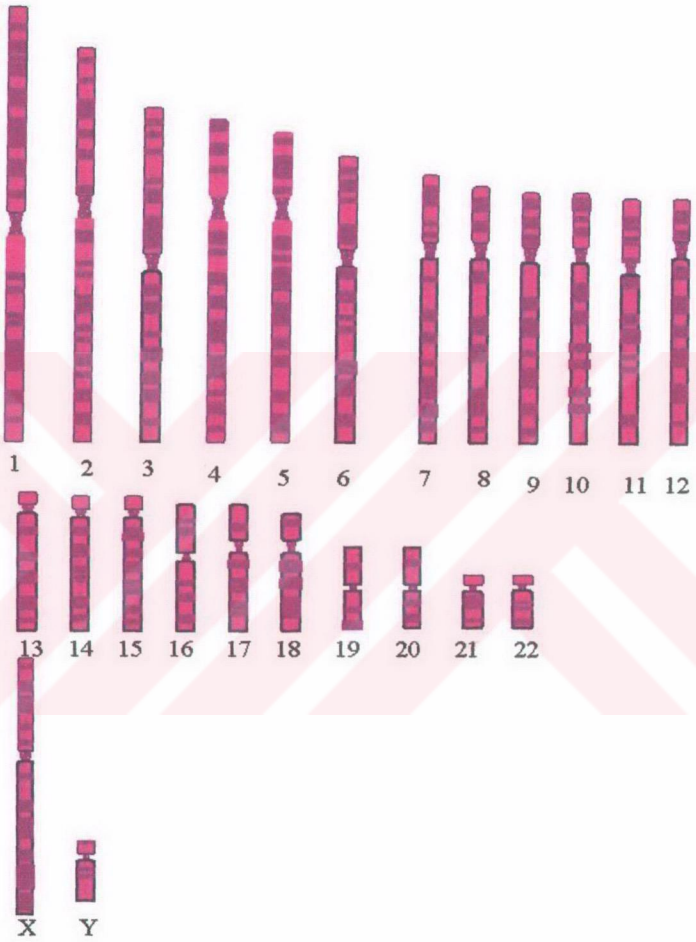
Hücrede hemen  $G_1$  fazının başlaması ile hücre bölünmesi yenilenir veya  $G_0$  olarak bilinen evreye girilir. Burada, hücreler hücre siklusunun uyarılara yeniden cevap vermesine kadar geçici bir süre durdurularak bu durumda kalabilir (16, 36, 56, 70, 77, 81, 99, 107).

#### **2.4.1.Kromozom Gruplarının Sınıflandırılması**

Normal insan karyotipinde 3 genel kromozom şekli bulunur.

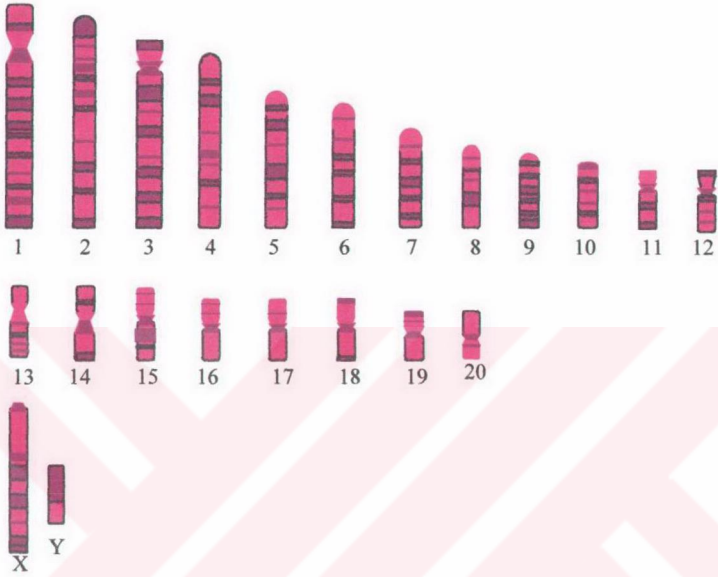
- Metasentrik, kromozomların sentromerleri ortadadır.
- Submetasentrik, kromozomların sentromeri uca yaklaşarak median görünümü bozar.
- Akrosentrik, kromozomların sentromerleri bir uca daha yakındır. Bunlarda kısa kol oldukça kısadır ve genellikle uca satelit yapısı görülür (**Şekil 2.4**). Birde kısa kolu hiç olmayan telosentrik kromozom tipi vardır. Bu grup insanlarda görülmez sıçanlarda görülen kromozom tipidir (**Şekil 2.5**).

İnsan kromozomlarının sınıflandırılması ve tüm sitogenetik adlandırmalar için ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature) kesin referanstır. Kromozomlar uzunluk, sentromer pozisyonu ve bant alma özelliklerine göre gruplandırılır (16, 37, 56, 70, 81, 107).



**Şekil 2.4. İnsan kromozomları**

Not : Conner, J. M.: Essential Medical Genetics kitabından modifiye edilerek alınmıştır.



**Şekil 2.5.** Sıçan kromozomları

Not : Levan G. : The Gene Map of the Norway Rat and Comparative Mapping with Mouse and Man'den modifiye edilerek alınmıştır.

### **2.4.2. Kromozomlarda Sayısal ve Yapısal Kromozom Düzensizliği**

Kromozom düzensizliği kromozomlarda gözlenebilen tüm normalden sapmaları ifade etmekte olup iki ana grupta toplanmaktadır.

#### **2.4.2.1. Sayısal Kromozom Düzensizlikleri**

Sayısal düzensizlikler, standart kromozom sayısındaki sapmalardır.

İki grupta incelenir:

1.Öploid: Temel haploid kromozom sayısının ( $n=23$ ) katları kadar artışları ifade eder. Triploidi ( $3n=69$ ), tetraploidi ( $4n=92$ ) bu gruba örnek olarak verilebilir.

2. Anöploid: Temel kromozom sayısının katları kadar olmayan artma ya da eksilmelerdir. Trizomi ve monozomi bu grubun örneklerindedir (7,16, 27, 37, 56, 70, 81, 107).

#### **2.4.2.2. Yapısal Kromozom Düzensizlikleri**

Bir ya da daha fazla kromozomun bir bölümünde çıkma, ilave ya da yer değiştirme ile oluşan değişiklikler kromozomda yapısal bozuklukları tanımlar.

Yapısal değişikliklerin çoğu, genetik materyalin kaybı ya da yer değiştirmesi sonucu ortaya çıkan bir ya da daha fazla sayıda kromozom kırıklarından kaynaklanır. Kromozomlar normal şartlarda da kırılabilirler, ancak kimyasallar ve radyasyon gibi etkenlere maruz kalan hücrelerde kromozom kırıklarının çok fazla olduğu görülmüştür. Sadece kırılma sonucu ortaya çıkan yapışkan uçlar diğer kırık uçlarla birleşebilir. Kırılma ve tekrar birleşme, orjinal kromozom bütünlüğünü sağlayamazsa ve değişik eşey hücrelerinde meydana gelmişse, gametler bu yeni yapılanmayı taşır ve bu kromozomal bozukluk, kalıtımla aktarılır.

Kromozomlarda yapısal bozukluklar hücrenin geçirdiği mayoz ya da mitoz bölünmeler sırasındaki kusurlardan meydana gelir.

Yapısal kromozom anomalileri translokasyon, delesyon, duplikasyon, inversiyon, izokromozom ve ring kromozom aberasyonlarından oluşur (7, 16, 36, 56, 77, 81, 99, 107).

#### **2.4.3. Kromozom Kırıkları**

Kromozom kırıkları; ya kendiliğinden ya da mutajenik ajanlar; iyonize radyasyon veya DNA hasarına neden olan kimyasallardan köken alır. Genellikle, kırılmış uçlar yeniden birleşir ve kırık onarılır. Ancak, bazı durumlarda bir kırık kromozomlarda delesyona yol açabilir veya bir hücrede birden fazla kırık meydana gelmişse kromozomların yeniden düzenlenmeleri mümkün olabilir (81).

Kromozom kırıkları hücre siklusunun G<sub>1</sub>, S ve G<sub>2</sub> evrelerinde mitoz ve mayoz süresince oluşabilir. Aynı organizmada, değişik hücre tipi ve evrelerinde kromozom kırıcı ajanlara çok farklı cevaplar oluşabilir.

Kromozom kırık çalışmaları, gen mutasyonlarında yapılan araştırmalar ile bağlantılıdır, çünkü pek çok mutajen hem kromozom kırıklarını hem de gen mutasyonlarını indükler. Bazı ajanlar aynı zamanda karsinojeniktir.

Kromozom kırıklarında kırılan uçlar ya yeniden kırıldığı noktaya bağlanır, ya da çeşitli yollarla farklı uçlar birbirine bağlanıp bir sonraki metafazda sapmalara neden olabilirler. Ancak bu durum meydana gelmeden önce, prosesde rolü bilinmeyen bir seri mekanizma gerçekleşmektedir.

DNA'nın bir kolunda kırık oluşma nedenlerini řu şekilde sıralayabiliriz :

- 1) Pirimidin dimerlerinin oluşması (kısa dalga boylu UV)
- 2) Baz alkilasyonu (alkilleyici ajanlar)
- 3) İplikçikler arasında çapraz bağlantı (uzun dalga boylu UV, çok fonksiyonlu alkilleyici ajanlar)
- 4) DNA çift sarmalının arasına mutajen girmesi (acriflavin, proflavin vb.)

Kendiliğinden olan kromozom kırılmaları ve yeniden düzenlenmeleri bütün insan ve hücre kültürlerinde gözlenebilir. Kültürden kültüre, insandan insana bunların frekansı değişir.

Radyasyonun neden olduğu kırıklar; UV ve özellikle değişik tipte iyonize radyasyon mitotik döngünün birkaç evresinde ya da mayoz sırasında kromozom kırılmalarına neden olur (36, 81).

Kromozom kırıklarına neden olan kimyasallar; alkilleyici ajanlar, pürin ve pirimidin türevleri, aromatik aminler, ağır metaller, büyük moleküler ağırlıklı çeşitli maddeler olarak sıralanabilir.

Kimyasalların çoğu G<sub>2</sub> fazında kırıklara neden olur. Kimyasalların neden olduğu bütün kırıklar G-light (G band da açık boyanan bölgeler) ya da Q-dark (Q band da koyu boyanan bölgeler) bölgelerde oluşmaktadır.

Virtüslerin neden olduğu kırıklar, radyasyona ve kimyasal ajanlara göre daha azdır. Viral kromozom kırıklarının tamiri mümkün değildir. Bazı viral enfeksiyonlar; çeşitli tek kromozom ya da kromatid tipi kırık oluşumuna ve bunların yeniden

düzenlenmesine veya kromozom parçasının küçük parçalara ayrılması gibi kromozom zararlarına neden olur. İnsanlarda kendiliğinden olan kromozom kırılmalarında virüslerin etkili olduğu bilinmektedir.

1988 yılında Bryant ve arkadaşları, enzimlerin neden olduğu kırıkları belirlemek için restriksiyon endonükleazlarla çalışarak kromozomlar üzerinde etkilerini araştırmıştır. Restriksiyon endonükleazların kırıklar oluşturduğunu ve kromozom hasarlarına, mutasyonlara, hücre ölümlerine neden olduğunu belirtmişlerdir.

Kromozomlarda yapısal olarak iki tip kırık vardır:

- 1- Kromozom tipi kırık
- 2- Kromatid tipi kırık

Bir ajanın kromozom ya da kromatid tipi kırıklara neden olması, o hücre siklusunun hangi fazında etkili olduğuna bağlıdır. Eğer ajan mitoz bölünmenin  $G_0$  ya da  $G_1$  fazında etkiliyse kromozom tipi kırıklara, S ya da  $G_2$  fazında etkili ise kromatid tipi kırıklara neden olur.

Kromozom kırıkları, eğer  $G_1$  fazında yalnız bir kromatid de bir kırık meydana gelir ve S fazı boyunca devam ederse, metafazdan sonra her iki kromatid de kırık oluşur ve böylece kromozom tipi kırık meydana gelir. Bu kırık tekrar birleşmez ise, bir delesyonlu kromozom ve bir asentrik fragment meydana gelir. Kromozom kırılması sonucu oluşan asentrik parçalar ya metafazda kaybolmakta ya da anafazda mikronükleusları oluşturmaktadır (7, 16, 36, 81).

Doğal bir şekilde iki kromozom arasında değişiklik olması için ön şart, her iki kromozomda da kırık oluşmasıdır. Kırık uçların birbirleri ile kaynaşabilmeleri için pozisyonlarının yakın olmaları gerekmektedir. Periyot boyunca kırık uçların bağlanabilme yetenekleri sınırlıdır.

Kromatid kırıkları,  $G_2$  fazı boyunca, iki kromatidden yalnız birinde meydana gelen kırık ile oluşur. Bir tek kırık oluşumu ile asentrik fragment ve delesyonlu kromatid gözlenir (81).



## **2.5.Hücre Siklusu ve Apoptoz**

### **2.5.1 Hücre Siklusu**

Hücre siklusu, proliferere olmak üzere uyarılmış bir dizi geçici biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreçtir. Bir sıklusa giren hücre, morfolojik ve genetik olarak birbirine tıpa tıp benzeyen iki hücre oluşumuyla döngüyü tamamlar (44). Hücre proliferasyonu hücre siklusu içinde yer alan bazı kontrol noktaları tarafından düzenli olarak kontrol edilir. Hücre siklusu proliferasyon, farklılaşma ve apoptozis gibi temel hücresel fonksiyonları düzenler. Bu düzenleme özelliğinin olması organizmadaki hemen hemen her tür fizyolojik (doku hemostazisi gibi) ve patolojik durumlarda tümör oluşumu gibi hücre siklusunun ne denli kritik bir öneme sahip olduğunu göstermektedir. Nitekim, kanserlerde hücre siklusunun regülatör proteinleri olan siklinler veya CDI (siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri) 'nin düzeylerinde anormallikler saptanmıştır. Örneğin, siklin D meme ve skuamöz hücre tümörlerinde aşırı eksprese olmaktadır (26).

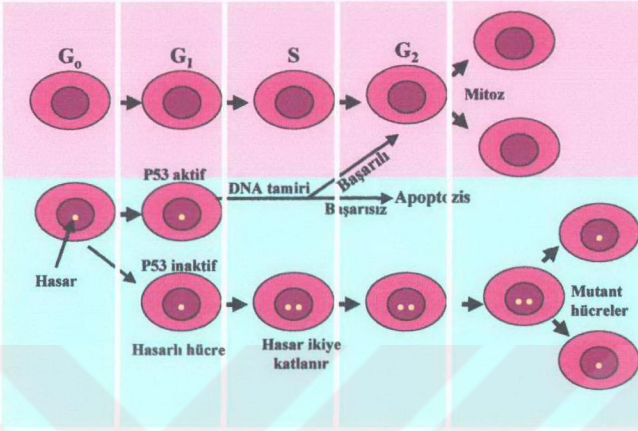
Bir hücrenin canlılığının göstergesi olan anahtar noktalardan biri onun birbirine tıpa tıp benzeyen iki hücreye bölünmesidir. Genel olarak, hücreler bir bölünme sinyali almadıkları zaman hücre siklusunun aktif ( $G_1$ , S,  $G_2$  ve M) fazlarına girmezler ve istirahat fazı denilen  $G_0$  fazında beklerler. Hücrelerin bölünmesi mitoz veya gonadlarda mayozla gerçekleşir. Hücreyi bölünmeye sevk eden sinyaller büyüme faktörleri, sitokinler veya mitojenler çok çeşitlidir. Hücre bölünme sinyalini aldığı anda sinyal ileti kaskad mekanizması ya transkripsiyonu, hücre siklusunu veya hücre iskeletini kontrol eden bir substratı fosforlar ya da nükleusa ulaşıp doğrudan transkripsiyonu modüle eder. Böylece, hücre sıklusa sokularak bölünmeye sevk edilmiş olur (50, 51, 75, 96).

### **2.5.2.Apoptoz Mekanizması**

Apoptozis klasik hücre ölüm şekli olarak bilinen nekrozdan birçok özelliği açısından oldukça farklı olan bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Biyolojik bilimler literatüründe apoptozis terimi, ilk defa İskoçyalı araştırmacılar olan Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmalarından

sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır. Apoptozis veya, daha genel anlamda söylemek gerekirse, hücre ölümü uzun süre araştırmacıların çok ilgilenmedikleri bir alan olarak kalmıştır. Fakat apoptozisin gelişim biyolojisinde, normal doku ve immün sistem hücrelerinin sitotoksik fonksiyonları gibi bazı önemli fizyolojik süreçlerdeki rolü ortaya çıktıkça önemi de hızla artmıştır.

Apoptozis morfolojik olarak özgündür. Nekrozda hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken, apoptotik hücre tam tersine küçülür. Nekrozda kromatin patterni hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerdir ama apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranını çevresinde toplanır ve kondanase olur. Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir. Nekrotik hücre lizise uğrar ama apoptotik hücre küçük cisimciklere "apoptotik bodies" parçalanır. Apoptotik cisimcikler membranla kaplıdır değişen miktarlarda nükleus, veya diğer hücre içi yapılar içerirler. Nekrozda hücre içeriği dış ortama salıverildiğinden inflamasyon reaksiyonu uyarılır ama apoptozisde apoptotik hücre veya cisimcikler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden inflamasyon oluşmaz. Apoptozis ve hücre siklusu birbirleriyle kompleks ve yakın ilişki içinde çalışırlar. Örneğin apoptozisde rol alan bir protein olan p53 aynı zamanda hücre siklusunu durduran ve hücreye DNA'sındaki hasarları onarması için zaman kazandıran bir işlev görür (Şekil 2.6.) (3). Apoptozis organizmada bir çok dokuda deri, ince bağırsak ve kanda proliferasyonla doğal denge halindedir. Homeostazisi yani yeniden yapım (mitoz) ve yıkımın (apoptozis) bir harmoni içinde oluşu apoptozis ve proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır. Son yıllarda, bu dengenin bozulmasının birçok önemli hastalığın patogenezinde rol aldığı gözlenmiştir. Örneğin, bu dengenin apoptozisin hızlanmasına yol açacak biçimde bozulmasının Alzheimer hastalığı gibi bazı nörodejeneratif hastalıkların veya AIDS'in patogenezinde, apoptozisin baskılanmasına yol açacak şekilde bozulmasının ise karsinogenezde rol aldığı düşünülmektedir (26, 104,112).



**Şekil.2.6.** Hücre siklusu boyunca mitoz ve apoptoz

Not : Passarge E., Color Atlas of Genetics kitabından modifiye edilerek alınmıştır.

## **2.6. Mikronukleus Oluşum Mekanizması ve Kriterleri**

### **2.6.1. Mikronukleus Tanımı**

Mikronukleus (MN) oluşumu ilk olarak 1891’de HOWELL ve arkadaşları tarafından eritrositlerde saptanmıştır. Jolly tarafından tanımlanmıştır. Bu nedenle Howell-Jolly cisimciği adı verilir. Mikronukleus, hücre bölünmesi sırasında serbest kalan kromozom fragmentinin ya da kromozomların ortamda varlığını sürdürmesidir. Bir nükleoplazma ile sarılarak sitoplazma içerisinde ana nükleusun yanında yer alan bir nüklear materyaldir. MN oluşumunun temelini, DNA hasarı oluşturur. Organizmanın çeşitli mutajenik, klastojenik ve karsinojenik ajanlara maruz kalması sonucunda DNA’da harabiyet meydana gelir (41, 42, 43, 45,47, 82). Genetik hasar için MN testinin toksikolojide, diyetle, ilaç sanayide, kanser riski oluşumu şüphesinde, radyoterapide önemi anlaşılmıştır. DNA hasar oranının karşılaştırılması durumunda, lenfositlerde in vivo ve in vitro olarak en ekonomik ve pratik tekniklerden birinin MN olduğu kabul görmektedir (55, 61, 68, 69, 71, 90, 92).

MN tekniği, insan periferik kan lenfositlerinde daha sonra kemik iliğinde ve yanak mukozu hücresinde kimyasal ajanların genotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (15, 20, 39, 63, 78, 108). Tekniğin basit oluğu, kısa zamanda sonuca ulaşılması ve DNA harabiyeti konusunda güvenilir bilgi vermesi tekniği önemli hale getirmiştir.

Buđun, pek çok kanser tipi ile spesifik kromozom dűzensizlikleri arasında bađlantı olduđu bilinmektedir. Bu amaçla kanserli olgularda mikronukleus testi yapılmakta ve anlamlı sonuçlar elde edilmektedir (12, 83, 93). MN testi ile ölçűlen genotoksiste ve iyonize radyasyonla tedavi sırasında sitotoksik iliřki incelenmiřtir. Elde edilen sonuçlara göre MN testi, gerek kanser gerekse tedavi sırasında kullanılabilen bir test haline gelmiřtir.

MN testinin geniş bir araştırma ortamı bulduğu diğer bir alanda yaşlanmadır. Yaş artışıyla anöploidi sıklığı arasında yakın bir ilişki vardır. Bireyin yaşam içerisinde maruz kaldığı çevresel ajanların etkisiyle kromozomların normal bölünmeden saptığı bilinmektedir (13, 25, 61, 97, 102, 106). Her hücrenin mitotik aktivitesi yaş ilerledikçe yavaşlamakta ve mitoz bölünmede iđ iplikçiklerinde katalizör görevi yapan enzimlerde dejenerasyon oluşmaktadır (38).

CBMN analizleri sırasında Cyt-B'nin hücre bölünmesini sitokinez evresinde durdurması özelliğini ilk olarak Fenech ve Morley MN testlerinde göstermiştir (29, 30, 31). Cyt-B, Helmin dematiodeumdan elde edilen bir ekstraktır. Cyt-B hücre bölünmesini sitokinez evresinde aktin filamentlerini etkileyerek durdurur. Bu etkisini de aktin filamentlerin ucuna bağlanarak, aktinin polimerize olmasını önleyerek gerçekteştir (61, 69, 87, 100, 106).

CBMN çalışmalarında, Maluf ve arkadaşları 2001 yılında, Down sendromlu ve Fanconi anemili hastalarda MN frekanslarının yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Down sendromlu bireylerin malign hastalıklar için yüksek riske sahip hastalık grubundan olduğunu belirterek, bu hücrelerin çeşitli mutajen, radyasyon, virűs ve kimyasallara karşı fazlaca hassas olduğu için periferik kanlarında MN frekansının yükseldiğini göstermişlerdir (65).

Bisht ve arkadaşları 1994 yılında, doza bağlı olarak artan MN dağılımından 1'li MN oranının fazla oluşunun asentrik fragment kaynaklı olduğunu belirtmişlerdir (11).

Mikronukleuslardaki kromozom orijinlerini belirleyebilmek için, MN'un orijinin tüm kromozomdan mı (sentromer pozitif MN) yoksa asentrik kromozom parçasından mı kaynaklandığını (sentromer negatif MN) anlayabilmek için FISH tekniğine başvurulmaktadır (19, 33, 67).

Fenech ve arkadaşları 2002 yılında, NPB oluşumlarının anafazda kromozom sentromerlerin zıt kutuplara çekilmesi sırasında gerçekleştiğini ve bir yada daha fazla NPB'lerin yanındaki 1'li veya 2'li MN'ların % 60'ından daha fazlasının asentrik kromozom parçasından orijin aldığını belirtmişlerdir. 17 yıldır bu oluşumların moleküler mekanizması tam olarak ortaya konamamıştır ama gelecekteki bu yönlü çalışmalarla moleküler mekanizma çözülecektir (28).

### **2.6.2. Mikronukleus Hesaplama Kriterleri**

İnsan lenfositlerinin sitokinezinde bloklanan mikronukleus için detaylı hesaplama yöntemleri 1999 yılında Washington'da Genotoksitesi International Work Shop'la tüm dünyaya bildirilmiştir (32).

Buna göre; CBMN analizlerinde öncelikle hücre tipleri belirlenmelidir. Hücreler, mononucleus, binucleus, multinucleus, hücre tipinde ya da apoptotik veya nekrotik hücre tipinde olabilirler.

Mononucleuslu hücreler küçük sitoplazma, büyük nükleus şeklindedir. Binucleuslu hücreler ise aynadaki görüntü kadar eş büyüklükteki iki hücre tipindedir. Bu tip hücreler nükleoplazmik köprüyle (NPB) beraber olabilir. Nükleuslar birbirine dokunabilir veya üst üste olabilir. Multinucleuslu hücreler üç veya dörtlü halde, farklı büyüklükteki hücre formundadır. Bu tip hücreler pek çok MN içerebilir. Apoptotik hücrelerde, sitoplazma bozulmamıştır. Kromatin yoğunluğu artmıştır. Nüklear sınırlar ya erken ya da geç apoptotik formundadır. Nekrotik hücrelerde, sitoplazmik sınırlar daha az tanımlıdır ve vakuoller vardır. Çok sayıdaki vakuoller sitoplazmadadır.

Sitoplazmik membranın hasara uğrayıp nükleusun çok az bozulduğu kısım erken nekrotik hücre fazıdır, geç nekrotik hücrede sitoplazma kaybolmuştur.

Sitokinezde bloke edilmiş hücreler CBMN frekansı için hesaplanırken aşağıdaki özellikleriyle karakterizedir.

- MN sayımları BN'da yapılmalıdır.
- MN'ların çapı ana nükleus yarı çapının 1/16 ile 1/3 arasındaki değerlerde olmalıdır.
- MN'ın alanı ana nükleusun alanının 1/256 ile 1/9'u arasında olmalıdır.
- MN'lar ana nükleusa bağlı olmamalıdır.
- MN'ların çoğu nükleusların arasındadır, aynı zamanda hücrelerin kutuplarındadır.
- MN'ların yapıları küçük nükleuslara benzer. Fakat kabarcıklar, noktalar MN olarak alınmamalıdır (**Şekil 2.7**) (13, 32, 59).

Klastojenlere maruz kalmış BN hücrelerde nükleoplazmik köprüler gözlemlenir. Bu köprüler iki nükleusu birleştirir. NPB'lerin anafaz boyunca sentromerlerin zıt kutuplara çekilerek disentrik kromozom oluşumu nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Bu köprü kalınlığı BN hücrelerdeki nükleus çapının 1/3 - 1/25 arasında değişmektedir (28, 32).

Sensitif nükleer bölünme frekansını hesaplamak için nekroza ve apoptoza uğramış hücreleri de saymak gerekmektedir. Toplam hücre sayısında eğer nekroza ve apoptoza uğramış hücrelerde varsa daha duyarlı formüle ihtiyaç duyulmuştur. Hücrelerin büyük bölümü yüksek toksik dozlu kimyasallarda ölmektedir. Bu nedenle hücre bölünme kinetiği kullanılarak modifiye edilen eşitlikte aşağıda belirtilen NDI ve NDCI hesaplanarak lenfositlerin mitojenik cevapları karşılaştırılabilir (32, 98).

$$NDI=[M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)]/N$$

$$NDCI=[Ap+Nec+M1+2(M2)+3(M3)+4(M4)]/N^*$$

M1 : Bir nükleuslu hücre,

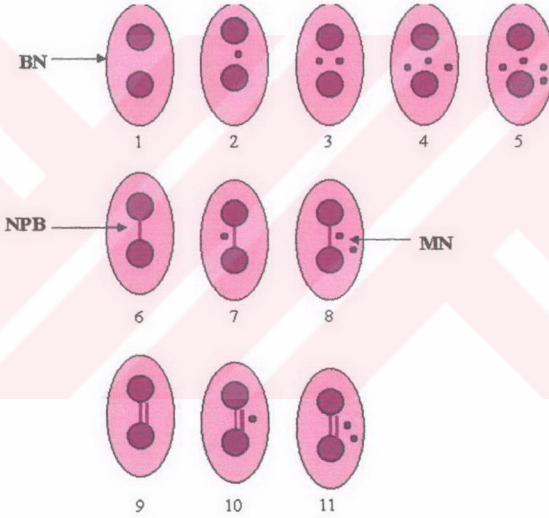
M2 : İki nükleuslu hücre,

M3 : Üç nükleuslu hücre,

M4 : Dört nükleuslu hücre,

N: Toplam yaşayan hücre,

N\* : Toplam hücre (Yaşayan hücre + Apoptotik hücre + Nekrotik hücre)



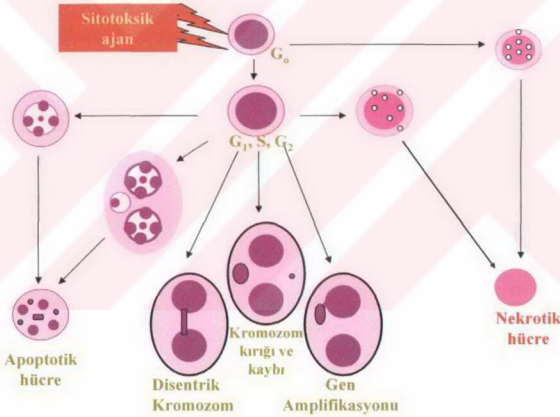
**Şekil. 2.7.** CBMN Dağılımı;

1. Binucleuslu hücre, 2. Bir MN 'lu BN hücre, 3. İki MN 'lu BN hücre, 4. Üç MN 'lu BN hücre, 5. Dört MN 'lu BN hücre, 6. NPB'li BN hücre, 7. Bir nukleoplazmik köprü ve bir MN 'lu BN hücre, 8. Bir nukleoplazmik köprü ve iki MN 'lu BN hücre, 9. İki nukleoplazmik köprü, 10. İki nukleoplazmik köprü ve bir MN 'lu BN hücre, 11. İki nukleoplazmik köprü ve iki MN 'lu BN hücre

Not : Fenech M.: The in Micronucleus Technique'den modifiye edilerek alınmıştır.

Son yıllardaki çalışmalar göstermiştir ki; nükleer oluşumlar güçlü gen amplifikasyon ölçümleridir ve bu oluşumlar MN artışıyla beraber görülmektedir (**Şekil 2.8**).

Thomas ve arkadaşları 2003 yılında, yaptığı çalışmalarda farklı maddelerdeki sitotoksik etkiyi belirlemek amacıyla yapılan CBMN analizlerine farklı boyutlar kazandırmıştır. Binükleus hücelere yapışık olan oluşumlar DNA amplifikasyonu olarak değerlendirilmeye başlanmış ve tıpkı CBMN sayımındaki gibi BN hücrelerin yanındaki oluşumlar sayılarak sitotoksik kontrolü için ayrı birer biyolojik marker olduğu belirlenmiştir (98).



**Şekil 2.8.** Sitotoksik ajanın etkisindeki hücrelerin olası durumları

Not : Fenech M.: Micronuclei, NPB & nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes CBMN assay'den modifiye edilerek alınmıştır.



### **3. GEREÇ ve YÖNTEMLER**

İnsan ve diğer canlıların kromozomlarını inceleyebilmek için aranan ilk koşul hücrelerin bölünme döneminde olmasıdır. Bu özellikteki hücreler, in vivo ve in vitro olmak üzere başlıca iki yoldan elde edilir. In vivo yöntemde dış uyarana gerek kalmaksızın sürekli bölünen hücreler; örneğin, kemik iliği hücreleri kullanılır. In vitro yöntemde ise vücuttan alınan, örneğin lenfositler önce yapay uyarıcılarla mitoz bölünmeye sokulur ve ondan sonra kullanılır (7, 81).

#### **3.1. Gereçler**

##### **3.1.1. In vitro Araştırma Grubu Bireyleri**

Genetik polikliniğimize gelen sitogenetik açıdan normal kabul ettiğimiz 25-35 yaş arasındaki 8 erkek ve 8 kadından alınan periferik kan örneklerinde, saf fluoksetinin farklı doz ve sürelerdeki etkileri mitotik indeks, sayısal ve yapısal kromozom anomalisi, CBMN açısından incelendi. Bu çalışma 2002-2004 tarihleri arasında Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Bilim Dalı ve GENTAM laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

##### **3.1.2. In vivo Araştırma Grubu Denev Hayvanları**

Çalışmada, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi (TICAM)'nden sağlanan 64 adet 225-250 gram ağırlığındaki 3 aylık Sprague dawley erkek sıçanlar kullanıldı. Hayvanlara 3 hafta boyunca fare yemi ve taze su verildi.

### **3.1.3. Kullanılan Araçlar**

#### **3.1.3.1. Kullanılan Ayrıtlar**

Bek

Ben Mari (Heto-DT Hetoterm)

Binoküler araştırma mikroskobu (Olympus CH-2)

Buzdolabı (Arçelik 415)

Cam Kalemi

CCD Kamera (Photometrics)

Deep-Freeze (Heraeus)

Elektronik Terazi (Seuter, Ainworth-AA-250, Setra-M2000L)

Enjektör

Etüv (Friocell MMM Med Center)

Floresan mikroskop (Zeiss).

Hayvan Kafesi

Image Analyser (Oncor)

Insight color olympus (CH40RF200)

Kronometre

Lamin Air Flow (Heraeus ELB2448)

Mikropipet (Eppendorf)

Operasyon Takımı

PH Metre (Nel PH890)

Pipet Uçları

Soğutmalı Santrifüj (Heraeus Biofuge Stratos)

Vial

Vortex (Janke and Kunzel, UF-2)

Zaman Ayarlı Santrifüj (Heraeus)

### **3.1.3.2. Cam Malzeme**

Beher (500 ml, 1000 ml)

Cam Fanus

Erlenmayer (500 ml, 1000 ml)

Lam

Lamel

Mezür

Santrifüj Tüpü

Yatay ve Dikey Şale

### **3.1.3.3. Kimyasal Maddeler**

Absolü etanol

Chang Medium MF ( Irvine Scientific)

Cytochalasin B (Sigma)

Demecolcine Solution (Sigma)

Distile Su

DMSO (Sigma)

Entellan

Ether

Fluoksetin (Eczacıbaşı)

Formaldehit (Merck)

Giemsa (Merck)

Glacial acetic acid (Merck)

HCl (Merck)

İmmersiyon yağı (Merck)

KCl (Merck)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck)

Ksilol (Merck)

Methanol (Merck)

Na Citrat (Merck)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck)

NaCl (Merck)

Nevparin (Mustafa Nevzat)

Parafilm

Penicillin (Gibco)

Phytohemagglutinin (Biochrom AG)

Serum Fizyolojik

Trypsin (Gibco)

Zefiran



## **3.2. Yöntemler**

### **3.2.1. In vitro Bireyler ve Doz-Süre Kombinasyonları**

25-35 yaş arasındaki 8 erkek ve 8 kadından alınan periferik kan örnekleri farklı doz ( $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M ve  $10^{-7}$  M) ve sürelerde (24 saat, 48 saat) fluoksetin ile muamele edilmiştir (**Tablo 3.1**, **Tablo 3.2**). Rutin kromozom analizindeki metafaz kromozomları elde edilerek, her bir preparatta mitotik indeks saptanmıştır. Yine kromozom anomalisi açısından preparatlar incelenmiştir. Sitotoksite kontrolü içinde CBMN sıklığı belirlenmiştir (**Tablo 3.3**).

**Tablo 3.1.**Farklı fluoksetin dozlarıyla periferik kan örneklerinin 24 saatlik muamelesi yöntemi

$10^{-5}$ M'lık, fluoksetinin 24 saatlik inkübasyonu	$10^{-6}$ M'lık, fluoksetinin 24 saatlik inkübasyonu	$10^{-7}$ M'lık, fluoksetinin 24 saatlik inkübasyonu	Kontrol Grubu
Kültürün 48.saatinde $10^{-5}$ M'lık stok fluoksetin solüsyonundan 0.5ml 4.5 ml'lik besiyerine eklendi. 72. saate kadar 24 saat kültüre edildi.*	Kültürün 48.saatinde $10^{-6}$ M'lık stok fluoksetin solüsyonundan 0.5ml 4.5 ml'lik besiyerine eklendi. 72. saate kadar 24 saat kültüre edildi.*	Kültürün 48.saatinde $10^{-7}$ M'lık stok fluoksetin solüsyonundan 0.5ml 4.5 ml'lik besiyerine eklendi. 72. saate kadar 24 saat kültüre edildi.*	Kültüre fluoksetin ilavesi olmadan 72 saatlik inkübasyon sonrası konvansiyonel sitogenetik analiz şeklinde çalışıldı.*

\* Her bir doz-süre kombinasyonu için 2'şer kültür tüpü çalışıldı.

**Tablo 3.2.** Farklı fluoksetin dozlarıyla periferik kan örneklerinin 48 saatlik muamelesi yöntemi

10 <sup>-5</sup> M'lük fluoksetinin, 48 saatlik inkübasyonu	10 <sup>-6</sup> M'lük fluoksetinin, 48 saatlik inkübasyonu	10 <sup>-7</sup> M'lük fluoksetinin, 48 saatlik inkübasyonu	Kontrol Grubu
Kültürün 24. saatinde 10 <sup>-5</sup> M'lük stok fluoksetin solüsyonundan 0.5 ml, 4.5 ml'lik besiyerine eklendi. 72. saate kadar 48 saat kültüre edildi.*	Kültürün 24. saatinde 10 <sup>-6</sup> M'lük stok fluoksetin solüsyonundan 0.5 ml, 4.5 ml'lik besiyerine eklendi. 72. saate kadar 48 saat kültüre edildi.*	Kültürün 24. saatinde 10 <sup>-7</sup> M'lük stok fluoksetin solüsyonundan 0.5 ml, 4.5 ml'lik besiyerine eklendi. 72. saate kadar 48 saat kültüre edildi.*	Fluoksetin ilavesi olmadan 72 saatlik inkübasyon sonrası konvansiyonel sitogenetik analiz gibi çalışıldı.*

**Tablo 3.3.** Farklı fluoksetin dozlarında CBMN hesaplama yöntemi

10 <sup>-5</sup> M'lük Fluoksetin	10 <sup>-6</sup> M'lük Fluoksetin	10 <sup>-7</sup> M'lük Fluoksetin	Kontrol Grubu
Kültürün 24. saatinde 10 <sup>-5</sup> M'lük stok fluoksetin solüsyonundan 0.5 ml, 4.5 ml'lik besiyerine eklendi. Kültürün 44. saatinde 15 µl Cyt B ilave edildi. 72 saatlik inkübasyon sonrası konvansiyonel sitogenetik analiz gibi çalışıldı.*	Kültürün 24. saatinde 10 <sup>-6</sup> M'lük stok fluoksetin solüsyonundan 0.5 ml, 4.5 ml'lik besiyerine eklendi. Kültürün 44. saatinde 15 µl Cyt B ilave edildi. 72 saatlik inkübasyon sonrası konvansiyonel sitogenetik analiz gibi çalışıldı.*	Kültürün 24. saatinde 10 <sup>-7</sup> M'lük stok fluoksetin solüsyonundan 0.5 ml, 4.5 ml'lik besiyerine eklendi. Kültürün 44. saatinde 15 µl Cyt B ilave edildi. 72 saatlik inkübasyon sonrası konvansiyonel sitogenetik analiz gibi çalışıldı.*	Fluoksetin ilavesi olmadan 44. saatte 15 µl Cyt B ilave edildi. 72. saatlik inkübasyon sonrası konvansiyonel sitogenetik analiz gibi çalışıldı.*

\*Her bir farklı fluoksetin dozu için 2'şer kültür tüpü çalışıldı.

### **3.2.1.1. In vitro Kromozom ve MI Analizi**

In vitro yöntemde periferik kandan kromozom analizi için Moorhead ve arkadaşlarının geliştirmiş olduğu mikro kültür tekniği kullanıldı (75).

- Aseptik koşullarda 5-6 damla heparinize kan %2 fitohemaglutinin içeren 4,5 ml'lik besi ortamına eklendi.
- Tüpler birkaç kez ters çevrilerek karıştırıldı ve 37°C'lik etüve kondu.
- Inkübasyonun 24. ve 48. saatlerinde 0.5 ml  $10^{-5}$ M,  $10^{-6}$ M,  $10^{-7}$  M fluoksetin stok solusyonundan ilave edilerek 72 saate kadar 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı (**Tablo 3.1, Tablo 3.2**).
- 72. saatin dolmasından 45 dakika önce tüplere 0,1 ml (10µg/ml)'lik kolsemid ilavesi yapıldı.
- 45 dakika daha etüvde bekleyen tüpler süre bitiminde 1300 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- Önceden 37°C'ye getirilmiş hipotonik (0,075 M'lık KC1) solüsyonundan vortekste karıştırılarak, tüplere 5'er ml eklendi.
- Tüpler 37°C'lik etüvde 30 dakika bekletildi.
- Etüvden çıkan tüplerin üstüne 3-5 damla Carnoy's fiksatif (3:1 methanol/glacial acetic acid) ilave edilerek prefiksasyon işlemi yapıldı.
- 1300 rpm'de 8 dakikalık santrifüj sonrasında süpernatant atıldı.
- Tüplere vorteks üstünde 5 ml Carnoy's fiksatif eklendi ve santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve bu işlem iki kez daha tekrarlandı.



- Supernatant atıldıktan sonra pelet süspansiyon haline getirilerek önceden temizlenmiş lamlara 20-25 cm yükseklikten 45° açı ile yayma işlemi yapıldı.
- Preparatların bir kısmına solid bantlama bir kısmına ise GTG tripsin bantlama uygulandı.

### **3.2.1.2. In vitro CBMN Analizi**

- %2 fitohemaglutininin içeren 4,5 ml'lik besiyerine aseptik şartlarda ekim yapıldıktan sonra 37° de inkübasyona bırakıldı.
- Inkübasyonun 24. saatinde 0,5 ml stok solüsyonu olan 10<sup>-5</sup> M, 10<sup>-6</sup> M ve 10<sup>-7</sup> M'lik fluoksetin ilavesi yapıldı. 37° lik etüvde inkübasyona devam edildi (**Tablo 3.3**).
- Inkübasyonun 44. saatinde 15 µl (3 µg/ml) Cytochalasin B eklenip karıştırıldı ve inkübasyona devam edildi.
- 37° C'lik etüvde kalan tüpler, süre sonunda 1300 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi.
- Üstte oluşan supernatant atıldı.
- Tüplere vorteks üzerinde 5 ml 0,075 M'lik KCl solüsyonundan eklendi ve 30 dakika 37° C'lik etüvde bekletildi.
- Etüvden çıkan tüplere 3-5 damla taze hazırlanmış fiksatiften damlatıldı ve santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası Carnoy's fiksatifleriyle yıkama işlemi 2 kez daha tekrar edildi.
- Tüpler bir gece buzdolabında bekledikten sonra önceden temizlenmiş lamlara yayma işlemi yapıldı (13).

### **3.2.2. In vivo Deneş Grurları ve Doş Miktarları**

Çalışmada 64 adet 3 aylık 225-250 gram ağırlığında Spraque dawley erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar her grupta 8 adet olacak şekilde 8 gruba ayrıldı. Farklı dozlardaki fluoksetin, sıçanların ağırlıklarına göre intraperitoneal olarak 21 gün boyunca verildi (Tablo 3.4, Tablo 3.5).

**Tablo 3.4.** Farklı dozlardaki fluoksetin enjeksiyonu sonrasında sıçan metafaz kromozomları hazırlama yöntemi

1.Grup (5mg/kg'lık Fluoksetin )	2.Grup (7.5mg/kg'lık Fluoksetin)	3.Grup (10mg/kg'lık Fluoksetin)	Kontrol
21 gün, boyunca 5 mg/kg'lık fluoksetin stok solüsyonundan sıçanın ağırlığına göre 0.2-0.5 ml i.p. olarak enjeksiyon yapıldı. Kesimden 2 saat önce 4 mg/kg kolsemid i.p. enjeksiyonu yapılmıştır. Kesim sonrasında alınan kemik ilikleri besiyerine ekilmeden hemen çalışıldı.*	21 gün, boyunca 7.5 mg/kg'lık fluoksetin stok solüsyonundan sıçanın ağırlığına göre 0.2-0.5 ml i.p. olarak enjeksiyon yapıldı. Kesimden 2 saat önce 4 mg/kg kolsemid i.p. enjeksiyonu yapılmıştır. Kesim sonrasında alınan kemik ilikleri besiyerine ekilmeden hemen çalışıldı.*	21 gün, boyunca 10 mg/kg'lık fluoksetin stok solüsyonundan sıçanın ağırlığına göre 0.2-0.5 ml i.p. olarak enjeksiyon yapıldı. Kesimden 2 saat önce 4 mg/kg kolsemid i.p. enjeksiyonu yapılmıştır. Kesim sonrasında alınan kemik ilikleri besiyerine ekilmeden hemen çalışıldı.*	21 gün distile su i.p. olarak sıçanlara enjeksiyon yapıldı. Kesimden 2 saat önce kolsemid enjeksiyonu yapıldı. Kesim sonrasında alınan kemik ilikleri besiyerine ekilmeden hemen çalışıldı.*

\*Her gruptaki hayvana ait 2'şer kültür tüpü çalışıldı.

**Tablo 3.5.** Farklı dozlardaki fluoksetin enjeksiyonu sonrasında CBMN analizi yöntemi

4.Grup (5 mg/kg'lık Fluoksetin)	5.Grup (7,5 mg/kg'lık Fluoksetin)	6.Grup (10 mg/kg'lık Fluoksetin)	Kontrol
21 gün, boyunca 5 mg/kg lık fluoksetin stok solüsyonundan sıçan ağırlığına göre 0.2- 0.5 ml i.p. olarak enjeksiyon yapıldı. Kesim sonrasında alınan kemik ilikleri 72 saat boyunca kültüre edildi. Kültürün 44. saatinde 15µl cyt B ilavesi yapıldı ve rutin sitogenetik analiz şeklinde çalışıldı.*	21 gün, boyunca 7.5 mg/kg lık fluoksetin stok solüsyonundan sıçan ağırlığına göre 0.2- 0.5 ml i.p. olarak enjeksiyon yapıldı. Kesim sonrasında alınan kemik ilikleri 72 saat boyunca kültüre edildi. Kültürün 44. saatinde 15µl cyt B ilavesi yapıldı ve rutin sitogenetik analiz şeklinde çalışıldı.*	21 gün, boyunca 10 mg/kg lık fluoksetin stok solüsyonundan sıçan ağırlığına göre 0.2- 0.5 ml i.p. olarak enjeksiyon yapıldı. Kesim sonrasında alınan kemik ilikleri 72 saat boyunca kültüre edildi. Kültürün 44. saatinde 15µl cyt B ilavesi yapıldı ve rutin sitogenetik analiz şeklinde çalışıldı.*	21 gün distile su i.p. olarak enjeksiyon yapıldı. Kesim sonrasında alınan kemik ilikleri 72 saat boyunca kültüre edildi. Kültürün 44.saatinde 15µl cyt B ilavesi yapıldı ve rutin sitogenetik analiz şeklinde çalışıldı.*

\*Her gruptaki hayvana ait 2'şer kültür tüpü çalışıldı.

### **3.2.2.1. In vivo Kromozom ve MI Analizi**

Sıçan kemik iliği hücrelerinden metafaz kromozom preparatı hazırlandı. Levan ve arkadaşlarının hazırladığı sıçan kromozom haritası baz alınarak sayısal ve yapısal kromozom anomalileri değerlendirildi (17, 60).

- Sıçanlara, eter anestezi altında kesmeden 2 saat önce 4 mg/kg kolsemid enjeksiyonu yapıldı.
- Kemik iliği almak için sıçanların tibia ve pelvisi kesilerek femur kemikleri çıkarıldı ve proksimal ucu ilik kanalı görülebilecek şekilde kesildi.
- 3 ml transport medyum bulunan enjektöre alınabilen tüm kemik iliği çekildi.

- Transport medyumlu kemik iliği santrifüj tüpüne aktarıldı ve 1300 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant bir pastör pipeti yardımıyla atıldı.
- Tüpte kalan hücre peletinin üstüne 5 ml. 0,075 M KC1 yavaş ayarlı vorteks üzerinde damla damla ilave edildi ve 30 dakika 37°C'lik etüvde bekletildi.
- Süre sonunda taze hazırlanmış Cornay's Fiksatifinden tüplere 3-5 damla damlatıldı ve 1300 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve hücre peleti üzerine 5 ml Cornay's Fiksatif vorteks üzerinde ilave edildi.
- Tekrar tüpler 1300 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi.
- Fiksatifle yıkama işlemi 2 kez daha tekrarlandı.
- En son olarak santrifüj edilmiş ve süpernatantı alınmış hücre peleti pipetaj işleminden sonra temizlenmiş lamlara 20-25 cm yükseklikten 45°'lik açıyla yayma işlemi yapıldı.

### **3.2.2.2. In vivo CBMN Analizi**

Sıçan kemik iliği hücrelerinde CBMN hesaplamalarında, Fenech kriterleri kullanıldı (13, 28, 29, 30, 31, 32).

- Sıçanlardan eter anestezi altında alınan kemik iliği, 3 ml'lik transport medyuma çekildi ve santrifüj tüpüne boşaltıldı. 1300 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. 5-6 damla kemik iliği 5 ml'lik fitohemaglutinsiz besiyerine ekildi.
- Ekim tüpleri 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

- Ekim anından 44 saat sonra 15 µl (3 µg/ml) Cyt-B ilave edildi.
- Tekrar 37°C'de inkübasyona devam edildi.
- Süre sonunda tüpler 1300 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatant atıldı ve kalan hücre peletinin üstüne 5 ml'ye kadar 0,075 M'lik KCl solüsyonundan konuldu.
- Tüpler 37°C'lik etüvde yarım saat bekletildi.
- Süre sonunda tüplere 3-5 damla taze hazırlanmış Cornay's Fiksatifinden vorteks üzerinde karıştırılarak damlatıldı.
- Tüpler 1300 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası supernatant atıldı ve hücreler iki kez daha Cornay's Fiksatifile muamele edildi.
- En son olarak supernatant atılmış tüpün dibinde kalan hücre peletine pipetaj işlemi yapıldı ve önceden temizlenmiş lamlara yayma işlemi yapıldı.

### **3.2.3. Preperatların Boyanması**

#### **3.2.3.1. GTG-Tripsin Bantlama**

Bu boyama yöntemi uygulanmadan önce preparatlar 2 gün 37°C'lik etüvde bekletilerek yaşlandırıldı.

- Yaşlandırılmış preparatlar bir gece öncesinden 2xSSC solüsyonunda bekletildi.
- Daha sonra sırası ile %0,9 NaCl solüsyonunda 10 dakika, %70'lik alkolde 2 dakika, %96'lık alkolde 2 dakika ve %100'lük alkolde 2 dakika tutuldu.
- Oda ısısında kuruyan preparatlar 15°C'lik tripsin solüsyonunda 60-95 saniye arasında bekletildi.
- Bu işlemi takiben %0,9 NaCl solüsyonunda 1 dakika, Giemsa solüsyonunda 4 dakika ve buffer solüsyonu bulunan iki şalede birer dakika tutuldu.
- Boyanmış olan preparatlar oda ısısında kurutularak ksilolden geçirilip entellan ile kapatıldı.
- Boyası yapılıp kapatılan preperatlar incelenmek üzere mikroskoba alındı.

#### **3.2.3.2. Solid Bantlama**

Direkt boyama ya da solid bantlama 1970'li yıllara kadar rutin olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu tip boyama ile kromozomların büyük bir kısmını tanımlamak mümkün değildir. Günümüzde, kromozom kırık noktalarını saptamada, kromozomları saymada ya da mikronukleus analizlerinde kullanılmaktadır (81).

- Preparatlar %5'lik Giemsa solüsyonunda 3-5 dakika tutuldu.
- Distile sudan geçirildi ve kurumaya bırakıldı.

### **3.2.4. Mikroskopta İnceleme, Görüntüleme Aşaması ve Kullanılan İstatistiksel Yöntemler**

In vitro olarak, preparatları değerlendirilebilecek tesadüfi 30 bölge seçildi. Doz-süre kombinasyonlarına ait kültürlerden MI için 1000 hücre, kromozom düzensizliği için 200 adet metafaz plağı sayısal ve yapısal açıdan incelendi. CBMN sıklığını bulabilmek için de 1000 BN hücredeki MN'ler olympus-BX mikroskobunda değerlendirildi.

In vivo olarak ise preparatları değerlendirirken her hayvana ait MI değeri için 1000 hücre, kromozom düzensizliği için 200 metafaz hücresi, CBMN sıklığı içinse 1000 BN hücredeki MN sayıldı.

Preparatlardaki görüntüler, insight color Olympus CH-40 CCD kamera aracılığıyla alındı.

Elde edilen değerlerin sıklığının anlamlı olup olmadığını belirleyebilmek için SPSS70 paket programında t test, tek yönlü ANOVA, Wilcoxon Signed Rank, Mann Whitney testleri gibi istatistiksel testler kullanıldı.

### **3.2.5. Kullanılan Stok Solüsyonlar**

- $10^{-5}$ M Fluoksetin Stok Solüsyonu	
Fluoksetin	17.3 mg
Distile su	5ml
- $10^{-6}$ M Fluoksetin Stok Solüsyonu	
$10^{-5}$ M Fluoksetin Stok Solüsyonu	1 ml
Distile su	9 ml
- $10^{-7}$ M Fluoksetin Stok Solüsyonu	
$10^{-6}$ M Fluoksetin Stok Solüsyonu	1 ml
Distile su	9 ml

- Cyt-B Stok Solüsyonu	
Cyt-B	10 mg
DMSO	10 ml
- 5mg/kg Fluoksetin Stok Solusyonu	
Fluoksetin	40 mg
Distile su	10 ml
- 7.5mg/kg Fluoksetin Stok Solusyonu	
Fluoksetin	60 mg
Distile su	10 ml
- 10 mg/kg Fluoksetin Stok Solusyonu	
Fluoksetin	80 mg
Distile su	10 ml
- Tespit Solüsyonu (Cornay's Fiksatif)	
Glacial asetic acid	20 ml
Methanol	60 ml
- Hipotonik (0,075 M KCl) solüsyonu	
KCl	1.398 g
Distile su	250 ml.
- 2xSSC solüsyonu	
Sodyum Klorür (NaCl)	17.53 g
Tri Sodyum Sitrat (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> , 2H <sub>2</sub> O)	8.82 g
Distile su	1000 ml



- Buffer solüsyonları (PH = 6.8)	
A solüsyonu	50, 8 ml
B solüsyonu	49.2 ml
- A solüsyonu	
Potasyum fosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	4.539 g
Distile su	500 ml
- B solüsyonu	
Sodyum Fosfat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O)	5.938 g
Distile su	500 ml
- Trypsin solüsyonu	
Trypsin	3,5 ml
Distile su	80 ml
- Giemsa solüsyonu	
Giemsa	15 ml
Buffer (PH = 6.8)	60 ml
- Solid Bantlama solüsyonu	
Giemsa	5 ml
Distile su	95 ml
- Transport Medyum	
Besiyeri	100 ml
Penisilin	1 ml
Heparin	1 ml

#### 4. BULGULAR

Bu çalışma da in vitro olarak 25-35 yaş arasındaki 8 erkek ve 8 kadın bireyden alınan periferik kan örnekleri ve in vivo olarak da 3 aylık 225-250 gramlık Spraque dawley erkek sıçan kemik iliği hücreleri kullanılmıştır. Bu yüzden çalışmanın bulguları in vivo ve in vitro olmak üzere iki kısımda incelenecektir.

##### **4.1.Fluoksetinin İn vitrodaki Mitotik İndeks ve CBMN Hesaplamaları**

Farklı dozlardaki fluoksetinin ( $10^{-5}M$ ,  $10^{-6}M$ ,  $10^{-7}M$ ) periferik kan örnekleriyle 24 ve 48 saatlik muamelesi sonrasında 1000 hücrede MI, 200 metafaz hücresinde ise sayısal ve yapısal kromozom anomalisi açısından değerlendirilmiştir. Yine farklı dozlardaki fluoksetinin periferik kan örnekleriyle muamelesi sonucunda 1000 BN hücredeki mikronukleuslar sayılmıştır.

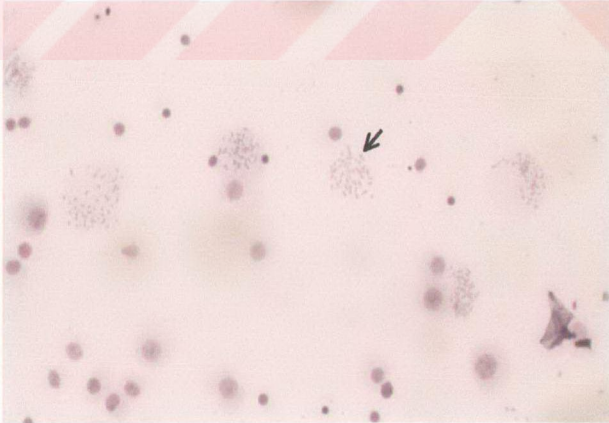
##### **4.1.1. Fluoksetinin Mitotik İndeks Hesaplamaları**

Farklı dozlardaki fluoksetinin ( $10^{-5}M$ ,  $10^{-6}M$ ,  $10^{-7}M$ ) periferik kanda 24 saatlik ve 48 saatlik muamelesi sonucundaki mitotik indeks değerleri belirlenmiştir. Her 1000 hücreden mitoza giren hücre sayılmak suretiyle mitotik indeks sıklığı belirlenmiştir (**Tablo 4.1, Resim 4.1, Resim 4.2**).

Toplam 16 kişinin periferik kanlarında,  $10^{-5}M$ 'lik fluoksetinin 24 ve 48 saatlik muamelesi sonucunda hücrelerin çok azaldığı ve mitoza giren hiç hücrenin olmadığı görülmüştür. Fluoksetinin diğer doz-süre kombinasyonlarındaki % MI değerleri de belirlenmiştir.

**Tablo 4.1.** Erkek ve kadın bireylerdeki fluoksetinin farklı doz-süre kombinasyonlarındaki % MI

Gruplar	MI	Erkek (n=8)	Kadın (n=8)	Toplam (n=16)	Ortalama % MI
Kontrol	Mitoza Giren Hücre	353	282	635	3.968±0.353
	% MI	4.412	3.525	3.968	
10 <sup>-7</sup> M, 24 s	Mitoza Giren Hücre	308	264	572	3.575±0.439
	% MI	3.850	3.300	3.575	
10 <sup>-7</sup> M, 48 s	Mitoza Giren Hücre	235	248	483	3.187±0.259
	% MI	2.937	3.100	3.187	
10 <sup>-6</sup> M, 24 s	Mitoza Giren Hücre	256	207	463	2.893±0.489
	% MI	3.200	2.587	2.893	
10 <sup>-6</sup> M, 48 s	Mitoza Giren Hücre	191	162	353	2.200±0.383
	% MI	2.350	2.025	2.200	
10 <sup>-5</sup> M, 24 s	Mitoza Giren Hücre	0	0	0	0
	% MI	0	0	0	
10 <sup>-5</sup> M, 48 s	Mitoza Giren Hücre	0	0	0	0
	% MI	0	0	0	



**Resim 4.1.** 10<sup>7</sup>luk büyütmadaki mitoz görüntüsü



**Resim 4.2.** 100'lük büyütmedeki metafaz kromozomları

Çalışmamızın in vitrodaki kısmında, erkeklerdeki fluoksetinin farklı doz ve sürelerindeki % MI değerleri gruplar arasında t test ile yapılan karşılaştırmada anlamlı bulunmuştur ( $p<0.001^{***}$ ) (Tablo 4.2).

Erkek bireylerde  $10^{-7}$  M ve  $10^{-6}$  M'lık fluoksetinin periferik kanla 24 saatlik muamelesi sonucunda % MI değerleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında aradaki fark anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05^{ns}$ ).

**Tablo 4.2.** Erkek bireylerdeki grupların % MI açısından Karşılaştırılması (n=8)

Karşılaştırılan Gruplar		p
Kontrol	$10^{-5}$ M, 24s	0.001 <sup>***</sup>
Kontrol	$10^{-6}$ M, 24s	0.080 <sup>ns</sup>
Kontrol	$10^{-7}$ M, 24s	0.262 <sup>ns</sup>
Kontrol	$10^{-5}$ M, 48s	0.001 <sup>***</sup>
Kontrol	$10^{-6}$ M, 48s	0.007 <sup>**</sup>
Kontrol	$10^{-7}$ M, 48s	0.013 <sup>*</sup>
$10^{-5}$ M, 24s	$10^{-6}$ M, 24s	0.005 <sup>**</sup>
$10^{-5}$ M, 24s	$10^{-7}$ M, 24s	0.002 <sup>**</sup>
$10^{-6}$ M, 24s	$10^{-7}$ M, 24s	0.266 <sup>ns</sup>
$10^{-5}$ M, 48s	$10^{-6}$ M, 48s	0.002 <sup>***</sup>
$10^{-5}$ M, 48s	$10^{-7}$ M, 48s	0.010 <sup>**</sup>
$10^{-6}$ M, 48s	$10^{-7}$ M, 48s	0.300 <sup>ns</sup>

\*\*\*:  $p<0.001$ , \*\*:  $p<0.01$ , \*:  $p<0.05$ , ns:  $p>0.05$

Kadınlarda  $10^{-7}$  M'lık fluoksetin inkübasyon süresine bağlı olmaksızın periferik kanla muamelesi sonucunda elde edilen %MI değerleri ile kontrol grubu arasındaki fark t test ile anlamlı bulunmamıştır ( $p > 0.05^{ns}$ ) (Tablo 4.3).

**Tablo 4.3.** Kadınlarda grupların %MI açısından karşılaştırılması (n=8)

Karşılaştırılan Gruplar		p
Kontrol	$10^{-5}$ M, 24s	0.001***
Kontrol	$10^{-6}$ M, 24s	0.145 <sup>ns</sup>
Kontrol	$10^{-7}$ M, 24s	0.456 <sup>ns</sup>
Kontrol	$10^{-5}$ M, 48s	0.001***
Kontrol	$10^{-6}$ M, 48s	0.014*
Kontrol	$10^{-7}$ M, 48s	0.319 <sup>ns</sup>
$10^{-5}$ M, 24s	$10^{-6}$ M, 24s	0.004*
$10^{-5}$ M, 24s	$10^{-7}$ M, 24s	0.001***
$10^{-6}$ M, 24s	$10^{-7}$ M, 24s	0.113 <sup>ns</sup>
$10^{-5}$ M, 48s	$10^{-6}$ M, 48s	0.013*
$10^{-5}$ M, 48s	$10^{-7}$ M, 48s	0.001***
$10^{-6}$ M, 48s	$10^{-7}$ M, 48s	0.048*

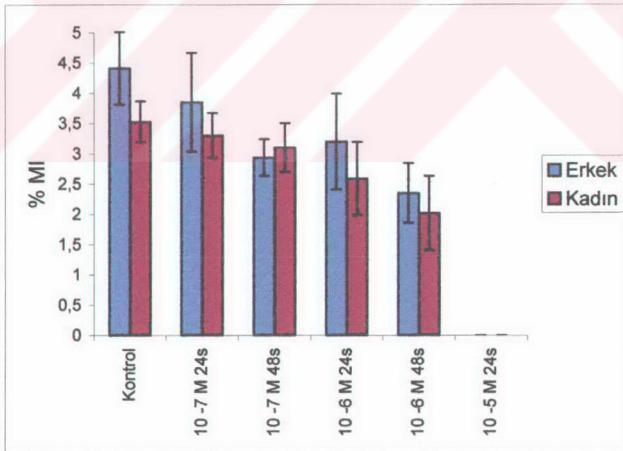
\*\*\* :  $p < 0.001$ , \*\* :  $p < 0.01$ , # :  $p < 0.05$ , ns:  $p > 0.05$

8 erkek ve 8 kadın ayrı ayrı incelendiğinde fluoksetinin farklı doz ve sürelerindeki mitotik indeks değerleri karşılaştırılmıştır (**Tablo 4.4, Grafik 4.1**).

**Tablo 4.4.** In vitrodaki erkek ve kadın bireylerin %MI açısından karşılaştırılması

Gruplar	Erkek (n=8)	Kadın (n=8)	p
Kontrol	4.412±0.601	3.525±0.341	0.220 <sup>ns</sup>
10 <sup>-7</sup> M, 24 s	3.850±0.817	3.300±0.372	0.550 <sup>ns</sup>
10 <sup>-7</sup> M, 48 s	2.937±0.305	3.100±0.440	0.766 <sup>ns</sup>
10 <sup>-6</sup> M, 24 s	3.200±0.793	2.587±0.606	0.550 <sup>ns</sup>
10 <sup>-6</sup> M, 48 s	2.350±0.494	2.025±0.614	0.687 <sup>ns</sup>
10 <sup>-5</sup> M, 24 s	0	0	1.000 <sup>ns</sup>
10 <sup>-5</sup> M, 48 s	0	0	1.000 <sup>ns</sup>

\*\*\* : p<0.001, \*\* : p<0.01, \* : p<0.05, ns: p>0.05



**Grafik 4.1.** Erkek ve kadın bireylerin %MI açısından karşılaştırılması

Mitotik indeks açısından kadın ve erkek bireylerin doz-süre kombinasyonları t-testi ile karşılaştırılmış ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05^{ns}$ ) (**Tablo 4.4**).

16 kişinin farklı doz-süre kombinasyonlarından elde edilen mitotik indeks değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak yapılan t-test ile de anlamlı bulunmuştur ( $p<0.001^{***}$ ) (**Tablo 4.5**).

**Tablo 4.5.** Grupların % MI açısından karşılaştırılması (n=16)

Karşılaştırılan Gruplar		p
Kontrol	$10^{-5}$ M, 24s	0.001***
Kontrol	$10^{-6}$ M, 24s	0.017*
Kontrol	$10^{-7}$ M, 24s	0.159 <sup>ns</sup>
Kontrol	$10^{-5}$ M, 48s	0.001***
Kontrol	$10^{-6}$ M, 48s	0.001***
Kontrol	$10^{-7}$ M, 48s	0.009**
$10^{-5}$ M, 24s	$10^{-6}$ M, 24s	0.001***
$10^{-5}$ M, 24s	$10^{-7}$ M, 24s	0.001***
$10^{-6}$ M, 24s	$10^{-7}$ M, 24s	0.052 <sup>ns</sup>
$10^{-5}$ M, 48s	$10^{-6}$ M, 48s	0.001***
$10^{-5}$ M, 48s	$10^{-7}$ M, 48s	0.001***
$10^{-6}$ M, 48s	$10^{-7}$ M, 48s	0.027*

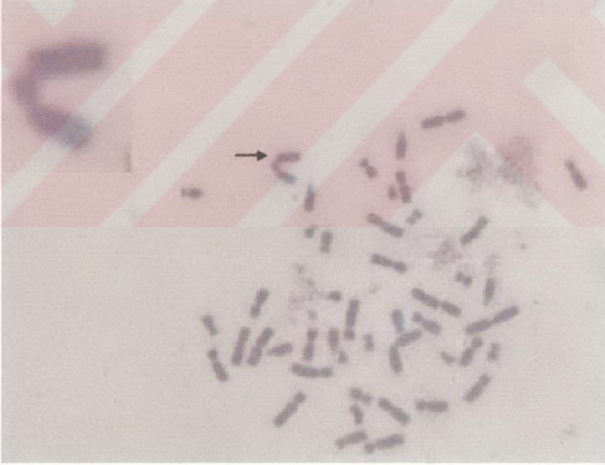
\*\*\* :  $p<0.001$ , \*\* :  $p<0.01$ , \* :  $p<0.05$ , ns:  $p>0.05$



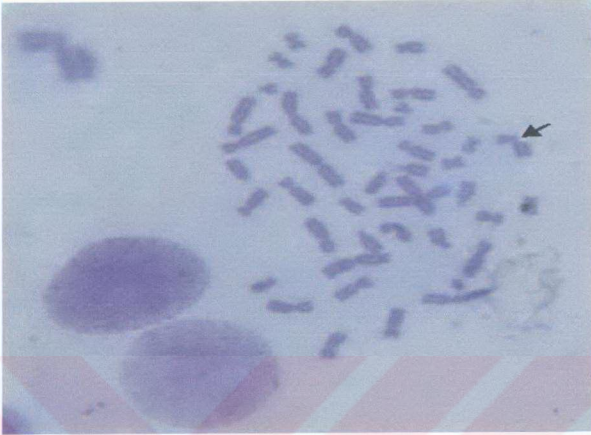
#### 4.1.2. Fluoksetinin In vitro Olarak Sayısal ve Yapısal Kromozom Anomalisi Açısından İncelenmesi

In vitro analizlerimizdeki 8 erkek ve 8 kadından alınan periferik kan örnekleri fluoksetinin farklı doz ve süre kombinasyonlarındaki 200 metafaz kromozomunda sayısal ve yapısal kromozom anomalisi açısından değerlendirilmiştir.

Yapısal kromozom anomalisi açısından toplam 16 kişinin 2' sinde tekrarlamayan kromatid tipi 4 adet kırığa rastlanmıştır. Kırıklar  $10^{-6}M'$  lık fluoksetinin periferik kanla 24 ve 48 saatlik muamelesi sonucunda görülmüştür (**Resim 4.3 ve Resim 4.4**). Bunun dışında fluoksetinin diğer doz-süre kombinasyonlarında herhangi bir yapısal kromozom anomalisine rastlanmamıştır.



**Resim 4.3.**  $10^{-6}M'$  lık fluoksetinin periferik kan örneğiyle 24 saatlik muamelesi sonucunda oluşan kromatid tipi kırık

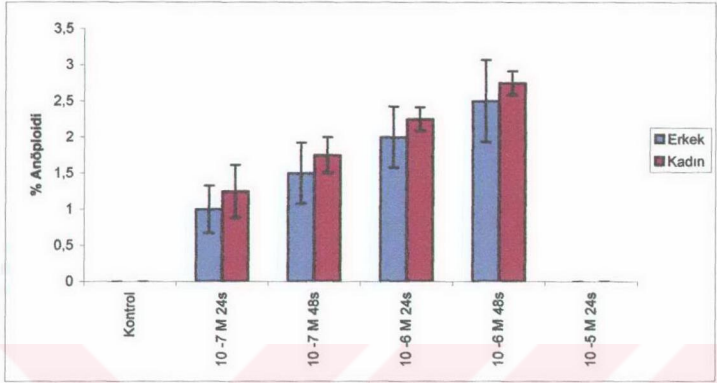


**Resim 4.4.**  $10^{-6}$  M fluoksetinin periferik kan örneğiyle 48 saatlik muamelesi sonucunda oluşan kromatid tipi kırık

Erkek ve kadın bireylerin periferik kanlarındaki fluoksetinin farklı doz ve sürelerindeki anöploidi oranları karşılaştırılmış ve kadın bireylerdeki artan anoplöidi oranları Mann Whitney testi ile anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05^{ns}$ ) (Tablo 4.6, Grafik 4.2).

**Tablo 4.6.** Erkek ve kadın bireylerde fluoksetinin farklı doz ve sürelerindeki % anöploidi oranları

Gruplar	Erkek (n=8)	Kadın (n=8)	p
Kontrol	0	0	1.000 <sup>ns</sup>
$10^{-7}$ M,24s	1.000±0.327	1.250±0.366	0.660 <sup>ns</sup>
$10^{-7}$ M,48s	1.500±0.423	1.750±0.250	0.660 <sup>ns</sup>
$10^{-6}$ M,24s	2.000±0.423	2.250±0.164	0.545 <sup>ns</sup>
$10^{-6}$ M,48s	2.500±0.567	2.750±0.164	0.651 <sup>ns</sup>
$10^{-5}$ M,24s	0	0	1.000 <sup>ns</sup>
$10^{-5}$ M,48s	0	0	1.000 <sup>ns</sup>



**Grafik 4.2.** Erkek ve kadın bireylerin % anöploidi açısından karşılaştırılması

Farklı doz ve sürelerdeki anöploidi oranları karşılaştırılmış ve bu farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.001^{***}$ ). Anöploidik açıdan kontrol grubuyla  $10^{-7}M$  ve  $10^{-6}M$  'lık fluoksetinin 24 ve 48 saatlik inkübasyonları arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.001^{***5}$ ) (Tablo 4.7, Tablo 4.8, Resim 4.5).

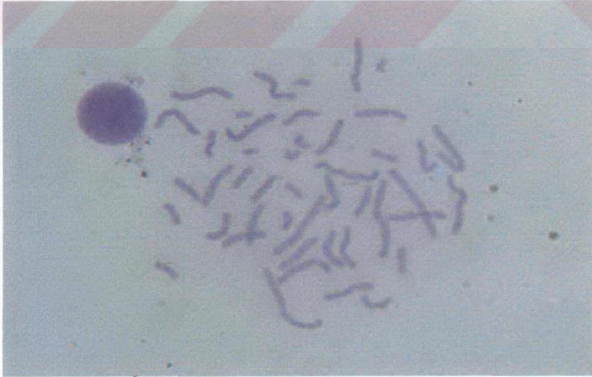
**Tablo 4.7.** Fluoksetinin farklı doz ve sürelerindeki anöploidi oranları (n=16)

Gruplar	% Anöploidi
Kontrol	0
$10^{-7}M, 24s$	$1.125 \pm 0.239$
$10^{-7}M, 48s$	$1.625 \pm 0.239$
$10^{-6}M, 24 s$	$2.125 \pm 0.221$
$10^{-6}M, 48 s$	$2.625 \pm 0.287$
$10^{-5}M, 24 s$	0
$10^{-5}M, 48 s$	0

**Tablo 4.8.** Grupların anöplöidi açısından karşılaştırılması (n=16)

Karşılaştırılan Gruplar		P
Kontrol	$10^{-5}$ M, 24s	1.0 <sup>ns</sup>
Kontrol	$10^{-5}$ M, 48s	1.0 <sup>ns</sup>
Kontrol	$10^{-6}$ M, 24s	0.001***
Kontrol	$10^{-6}$ M, 48s	0.001***
Kontrol	$10^{-7}$ M, 24s	0.003**
Kontrol	$10^{-7}$ M, 48s	0.001***
$10^{-5}$ M, 24s	$10^{-5}$ M, 48s	1.000 <sup>ns</sup>
$10^{-5}$ M, 24s	$10^{-6}$ M, 24s	0.001***
$10^{-5}$ M, 24s	$10^{-6}$ M, 48s	0.001***
$10^{-5}$ M, 24s	$10^{-7}$ M, 24s	0.003***
$10^{-5}$ M, 24s	$10^{-7}$ M, 48s	0.001***
$10^{-6}$ M, 24s	$10^{-6}$ M, 48s	0.224 <sup>ns</sup>
$10^{-6}$ M, 24s	$10^{-7}$ M, 24s	0.005**
$10^{-6}$ M, 24s	$10^{-7}$ M, 48s	0.07 <sup>ns</sup>
$10^{-7}$ M, 24s	$10^{-7}$ M, 48s	0.156 <sup>ns</sup>
$10^{-5}$ M, 48s	$10^{-6}$ M, 24s	0.001***
$10^{-5}$ M, 48s	$10^{-6}$ M, 48s	0.001***
$10^{-5}$ M, 48s	$10^{-7}$ M, 24s	0.003**
$10^{-5}$ M, 48s	$10^{-7}$ M, 48s	0.001***
$10^{-6}$ M, 48s	$10^{-7}$ M, 24s	0.002**
$10^{-6}$ M, 48s	$10^{-7}$ M, 48s	0.006**

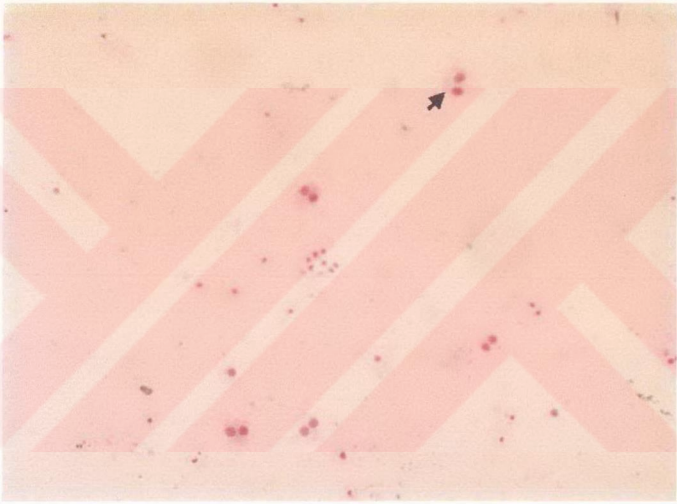
\*\*\* : p<0.001, \*\* : p<0.01, \* : p<0.05, ns: p>0.05



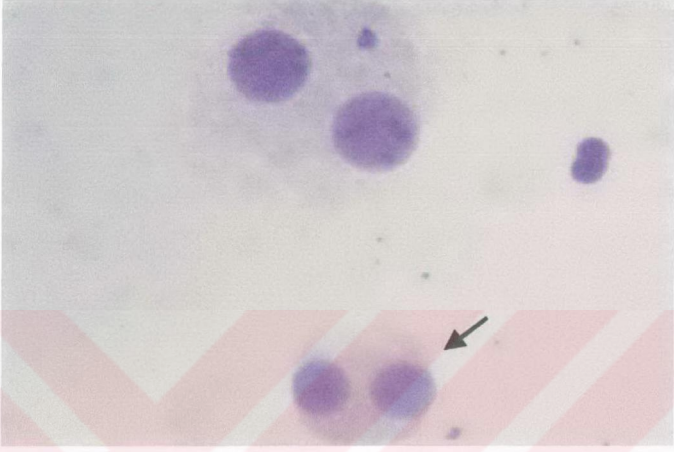
**Resim 4.5.**  $10^{-6}$  M fluoksetinin periferik kan örneğiyle 48 saatlik muamelesi sonucundaki anöplöidik metafaz kromozomları

#### **4.1.3. Farklı Dozlardaki Fluoksetinin CBMN Hesaplamaları**

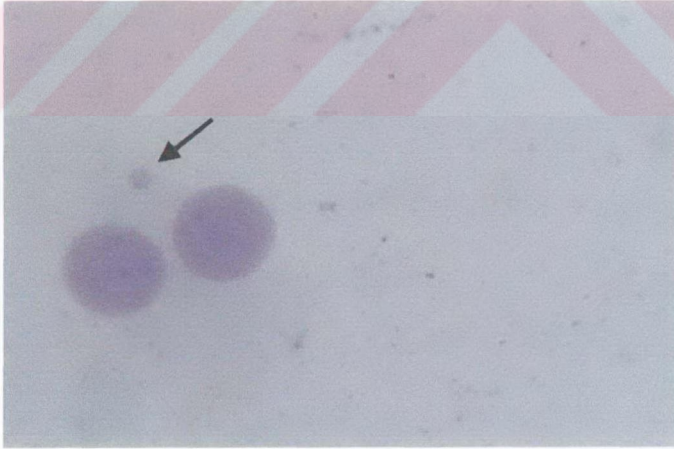
8 erkek ve 8 kadından alınan periferik kanlardaki  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M ve  $10^{-7}$  M'lık fluoksetin ile muamele sonucunda 1000 BN'daki MN'lar sayılmak suretiyle CBMN sayıları belirlenmiştir (Resim 4.6, Resim 4.7, Resim 4.8, Resim 4.9 ).



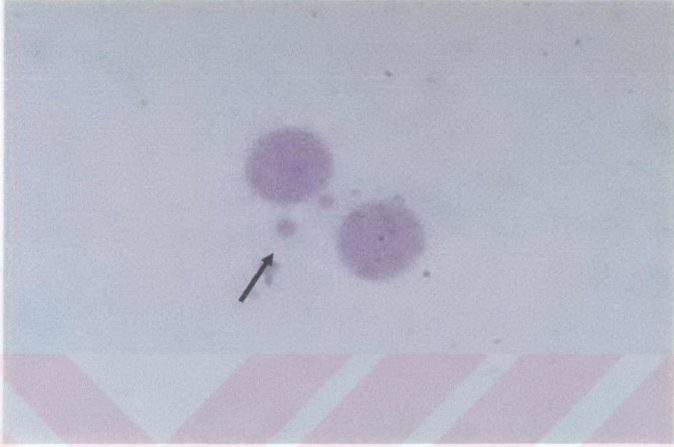
**Resim 4.6.**  $10^3$ luk büyütmedeki BN hücreler



**Resim 4.7.** 100'lük büyütmedeki BN hücreler



**Resim 4.8.** BN'daki 1'li MN

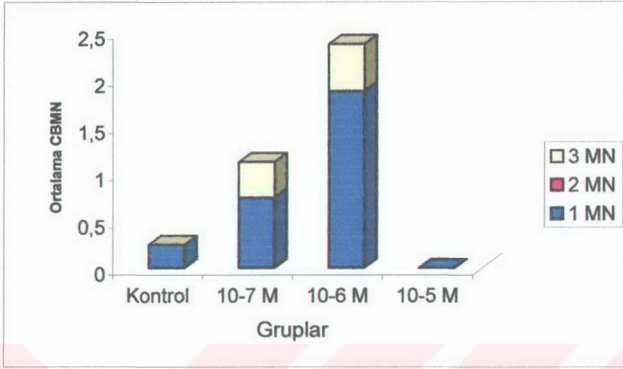


**Resim 4.9.** BN'daki 2'li MN

8 kadındaki fluoksetinin farklı dozlarındaki CBMN dağılımları belirlenmiştir (Tablo 4.9, Grafik 4.3).

**Tablo 4.9.** Kadın bireylerde fluoksetinin farklı dozlarındaki CBMN sayıları (n=8)

Gruplar	1'li MN	2'li MN	3'lü MN	Toplam CBMN	Ortalama CBMN	% CBMN
Kontrol	2	0	0	2	0.250±0.163	0.025
10 <sup>-7</sup> M	6	0	3	9	1.125±0.475	0.112
10 <sup>-6</sup> M	15	0	4	19	2.375±0.705	0.237
10 <sup>-5</sup> M	0	0	0	0	0	0



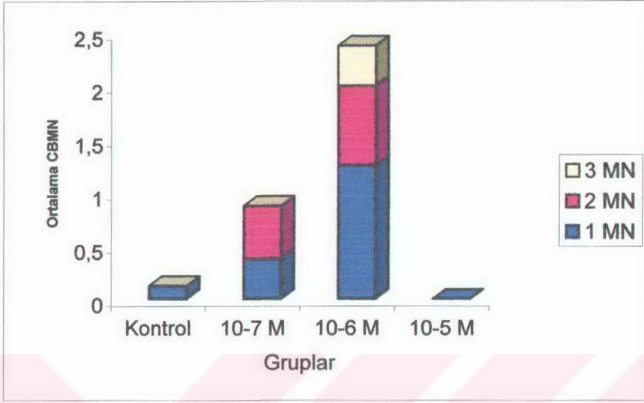
**Grafik 4.3.** Kadın bireylerdeki farklı fluoksetin dozlarındaki CBMN değerlerinin karşılaştırılması

8 erkekteki fluoksetinin farklı dozlarındaki CBMN dağılımı belirlenmiştir (Tablo 4.10, Grafik 4.4).

**Tablo 4.10.** Erkek bireylerde fluoksetinin farklı dozlarındaki CBMN sayıları (n=8)

Gruplar	1'li MN	2'li MN	3'lü MN	Toplam CBMN	Ortalama CBMN	% CBMN
Kontrol	1	0	0	1	0.125±0.001	0.012
10 <sup>-7</sup> M	3	4	0	7	0.875±0.616	0.087
10 <sup>-6</sup> M	10	6	3	19	2.375±1.252	0.237
10 <sup>-5</sup> M	0	0	0	0	0	0



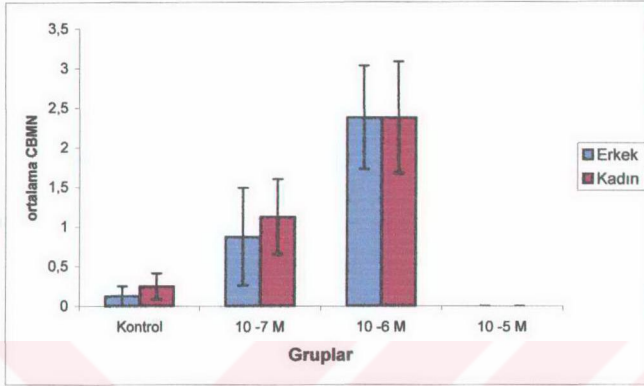


**Grafik 4.4.** Erkek bireylerdeki farklı fluoksetin dozlarındaki CBMN değerlerinin karşılaştırılması

Erkek ve kadın bireylerin periferik kanlarının  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M'lık fluoksetin muamelesi sonucunda oluşan CBMN değerleri belirlenmiştir. CBMN değerlerinin kadın bireylerde artış göstermesine rağmen bu fark Mann Whitney testi ile anlamlı bulunmamıştır ( $p < 0.05^{ns}$ ) (Tablo 4.11, Grafik 4.5).

**Tablo 4.11.** Erkek ve kadın bireylerin CBMN açısından karşılaştırılması

Gruplar	Erkek (n=8)	Kadın (n=8)	p
Kontrol	0.125±0.125	0.250±0.163	1.000 <sup>ns</sup>
$10^{-7}$ M	0.875±0.616	1.125±0.475	0.561 <sup>ns</sup>
$10^{-6}$ M	2.375±1.252	2.375±0.705	0.505 <sup>ns</sup>
$10^{-5}$ M	0	0	1.000 <sup>ns</sup>

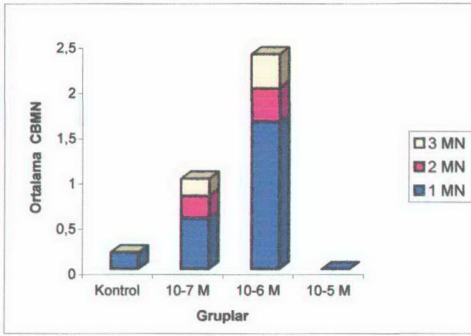


**Grafik 4.5.** Erkek ve kadın bireylerin farklı fluoksetin dozlarındaki CBMN değerlerinin karşılaştırılması

Farklı fluoksetin konsantrasyonlarında oluşan CBMN tiplerinin dağılımı belirlenmiştir (Tablo 4.12 ve Grafik 4.4). Gruplar arasındaki farklılık Wilcoxon Signed test ile anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.01^{**}$ ). Kontrol grubu ve  $10^{-5}M$ 'lik fluoksetinin periferik kan muamelesinde oluşan MN 'lar karşılaştırıldığında fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ( $p > 0.05^{ns}$ ) (Tablo 4.13).

**Tablo 4.12.** Fluoksetinin farklı konsantrasyonlarındaki CBMN tipleri (n=16)

Gruplar	1'li MN	2'li MN	3'lü MN	Toplam CBMN	Ortalama CBMN	% CBMN
Kontrol	3	0	0	3	0.187±0.010	0.018
10 <sup>-7</sup> M	9	4	3	16	1.000±0.341	0.100
10 <sup>-6</sup> M	26	6	6	38	2.375±0.694	0.237
10 <sup>-5</sup> M	0	0	0	0	0	0



**Grafik 4.6.** In vitrodaki fluoksetinin farklı dozlarında oluşan CBMN değerleri

**Tablo 4.13.** Grupların CBMN açısından karşılaştırılması (n=16)

Karşılaştırılan Gruplar		p
Kontrol	$10^{-5}$ M	0.250 <sup>ns</sup>
Kontrol	$10^{-6}$ M	0.002**
Kontrol	$10^{-7}$ M	0.016**
$10^{-5}$ M	$10^{-6}$ M	0.002**
$10^{-5}$ M	$10^{-7}$ M	0.008**
$10^{-6}$ M	$10^{-7}$ M	0.016**

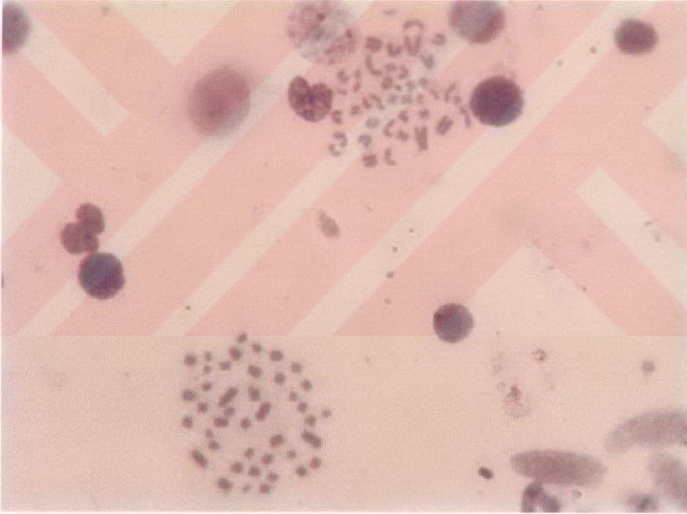
\*\*\* : p<0.001, \*\* : p<0.01, \* : p<0.05, ns: p>0.05

#### **4.2. Fluoksetinin In vivodaki Mitotik Aktivite ve CBMN Sayıları**

In vivo çalışmada 3 aylık Spraque dawley 64 adet erkek sıçana farklı dozlardaki (5 mg/kg, 7.5 mg/kg, 10 mg/kg'lık) fluoksetinle 21 gün boyunca enjeksiyon yapılmıştır. Daha sonra sıçanların kemik iliği hücrelerinde mitotik indeks, sayısal ve yapısal kromozom anomalisi ve CBMN değerleri belirlenmiştir.

##### **4.2.1. Fluoksetinin MI Değerleri**

1.grup (5 mg/kg), 2.grup (7.5 mg/kg), 3.grup (10 mg/kg) ve kontrol grupları mitotik aktivite açısından değerlendirilmiştir (**Resim 4.10**).

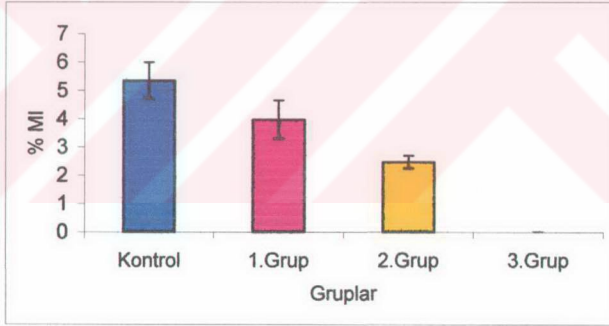


**Resim 4.10.** 100'lük büyütmedeki sıçan metafaz kromozomları

1.grupla kontrol grubu arasında ve 1.grupla 2. grup arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05^{ns}$ ). Kontrola göre 2. grup ve 3. grup arasındaki fark Anova testi ile anlamlı bulunmuştur ( $p<0.001^{***}$ ) (Tablo 4.14, Tablo 4.15, Grafik 4.7).

**Tablo 4.14.** In vivodaki fluoksetinin farklı dozlarındaki %MI değerleri

Grup	n	Mitoza Giren Hücre	Ortalama MI	% MI
Kontrol	8	428	53.500	5.350
1	8	318	39.750	3.975
2	8	198	24.750	2.475
3	8	0	0	0



**Grafik 4.7.** In vivodaki farklı fluoksetin dozlarındaki % MI değerlerinin karşılaştırılması

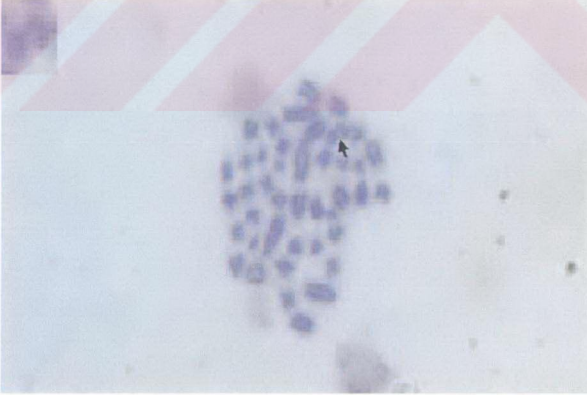
**Tablo 4.15.** Grupların % MI açısından karşılaştırılması

Karşılaştırılan Gruplar		p
Kontrol	1.Grup	0.209 <sup>ns</sup>
Kontrol	2.Grup	0.001***
Kontrol	3.Grup	0.001***
1.Grup	2.Grup	0.150 <sup>ns</sup>
1.Grup	3.Grup	0.001***
2.Grup	3.Grup	0.006**

\*\*\* : p<0.001, \*\* : p<0.01, \* : p<0.05, ns: p>0.05

#### **4.2.2 Fluoksetinin In vivodaki Sayısal ve Yapısal Kromozom Anomalisi Açısından İncelenmesi**

In vivoda sayısal ve yapısal kromozom anomalisini belirleyebilmek için her hayvana ait 200 metafaz kromozomu incelenirken 2. grupta (7.5mg/kg fluoksetin) 8 sıçandan 1'inde tekrarlamayan 2 adet kromatid tipi kırığa rastlanmıştır (**Resim 4.11**).



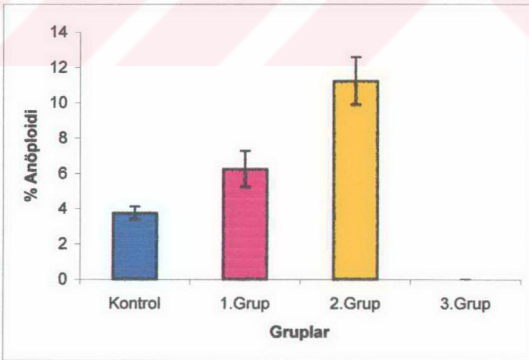
**Resim 4.11.** 2. gruba (7.5mg/kg Fluoksetin) ait kromatid tipi kırığı olan sıçan metafaz kromozomları

Fakat diğer metafaz kromozomlarında bu anomali tekrar etmediği için bu bulgu anlamlı kabul edilmemiştir. Sayısal kromozom anomalisi açısından metafaz kromozomları incelendiğinde gruplar arasında anöploidli oranlarının farklılığı ortaya konmuştur (**Tablo 4.16 ve Grafik 4.8**).

Her hayvana ait 200 metafaz hücresinde kromozomlarda artan fluoksetin dozuna karşılık kromozomal anöploidli tipindeki sayısal düzensizlikler tek yön Anova testi ile de doğrulanmıştır.

**Tablo 4.16.** In vivoda farklı dozlardaki fluoksetinin anöploidli oranları

Gruplar	% Anöploidli
Kontrol	3.750±0.365
1.Grup	6.250±1.030
2.Grup	11.250±1.359
3.Grup	0



**Grafik 4.8.** In vivoda farklı dozlardaki fluoksetin gruplarındaki anöploidli oranları

**Tablo 4.17.**Anöploidi açısından grupların karşılaştırılması

Gruplar		p
Kontrol	1.Grup	0.203 <sup>ns</sup>
Kontrol	2.Grup	0.001***
Kontrol	3.Grup	0.025**
1.Grup	2.Grup	0.002**
1.Grup	3.Grup	0.001***
2.Grup	3.Grup	0.001***

\*\*\* : p<0.001, \*\*: p<0.01, \* : p<0.05, ns: p>0.05

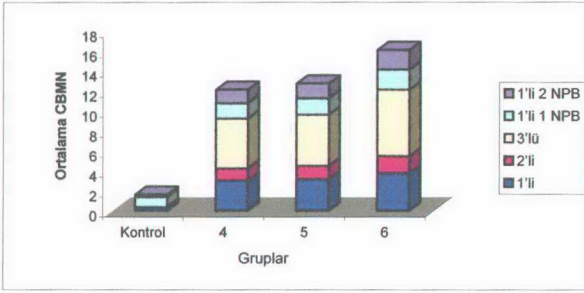
#### **4.2.3. Farklı Dozlardaki Fluoksetinin CBMN Sayıları**

4.grup (5 mg/kg), 5.grup (7.5 mg/kg), 6.grup (10 mg/kg) ve kontrol grubuna ait CBMN değerleri belirlenmiştir (**Tablo 4.18, Grafik 4.9, Resim 4.12, Resim 4.13, Resim 4.14**). Sitotoksite kontrolü için CBMN tiplerinde MN'larla beraber NPB (Nuklear Plazmik Bridge) köprülerde sayılmıştır.

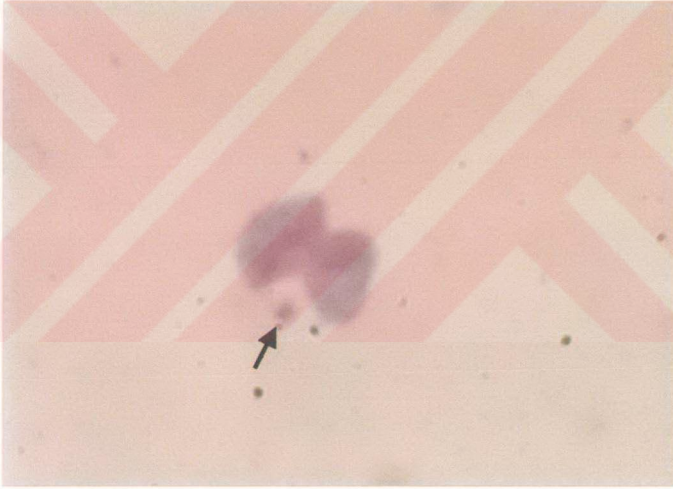
**Tablo 4.18.** In vivodaki farklı dozlardaki CBMN tipleri

Gruplar	n	CBMN Tipleri					Toplam	Ortalama CBMN	CBMN %
		1'li MN	2'li MN	3'lü MN	1'li MN 1 köprü	1'li MN 2 köprü			
Kontrol	8	3	0	0	8	2	13	1.625	0.162
4	8	24	10	40	12	11	97	12.125	1.212
5	8	25	11	41	13	12	102	12.750	1.275
6	8	30	14	53	16	16	129	16.125	1.612

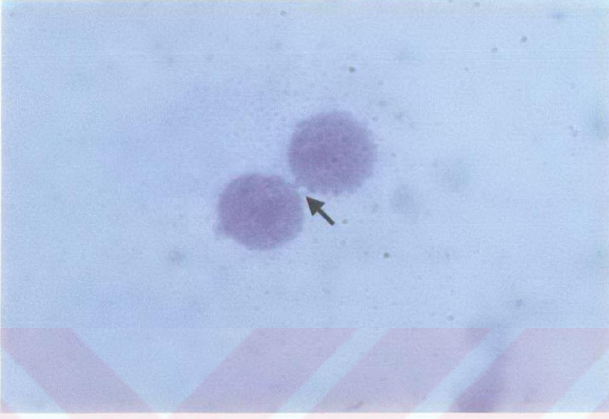




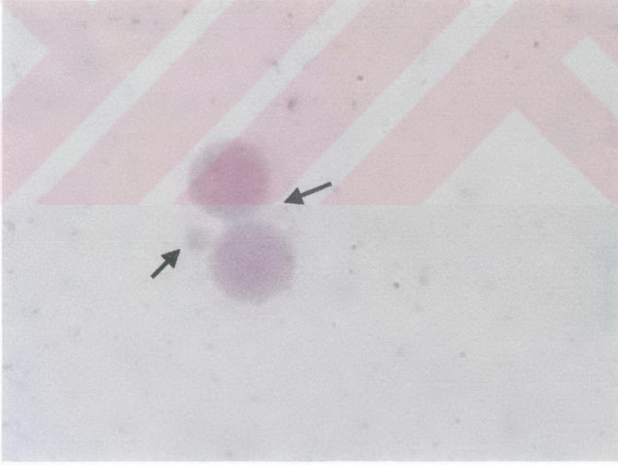
**Grafik 4.9.** In vivodaki farklı fluoksetin dozlarındaki CBMN dağılımı



**Resim 4.12.** Hücreler ayrılırken MN oluşumu



**Resim 4.13.** BN hücredeki I'li köprü



**Resim 4.14.** BN hücredeki I'li MN ve köprü oluşumu

In vivo olarak 4.grup, 5.grup, 6.grup ve kontrol grubunu CBMN değerleri açısından karşılaştırdığımızda, 4.grubun CBMN değerleri 5.gruba göre daha düşük olduğu halde tek yönlü Anova testine göre fark anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05^{ns}$ ).

4.grupla 6.grup karşılaştırıldığında ise artan CBMN değerleri de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05^{ns}$ ).

4.grupla kontrol grubu karşılaştırıldığında, CBMN değerlerinin 4.grupta kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu bulundu. Bu bulgu istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0.01^{**}$ ). 5.grup ve 6.grupla kontrol grubu CBMN değerleri açısından karşılaştırıldığında Anova testine göre aradaki fark anlamlı bulunmuştur ( $p<0.01^{**}$ ) (Tablo 4.19).

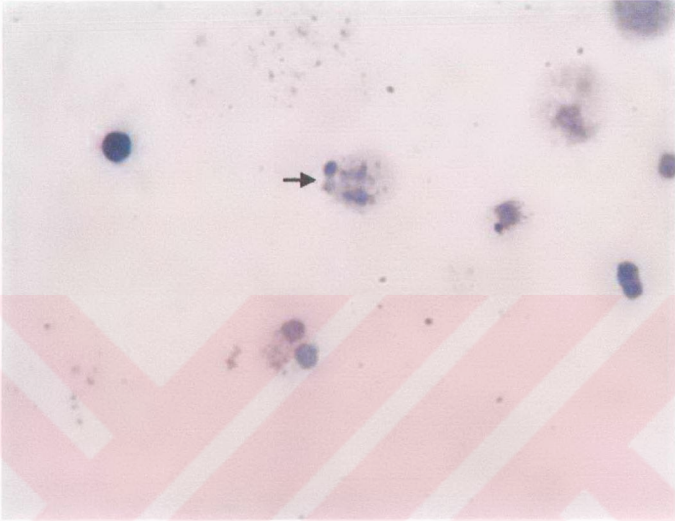
**Tablo 4.19.** Farklı fluoksetin dozlarındaki CBMN değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması

Gruplar		p
Kontrol	4.Grup	0.010**
Kontrol	5.Grup	0.010**
Kontrol	6.Grup	0.001**
4.Grup	5.Grup	0.997 <sup>ns</sup>
4.Grup	6.Grup	0.621 <sup>ns</sup>
5.Grup	6.Grup	0.735 <sup>ns</sup>

\*\*\* :  $p<0.001$ , \*\* :  $p<0.01$ , \* :  $p<0.05$ , ns:  $p>0.05$

CBMN değerleri için 1000 BN hücreleri sayılırken apoptotik hücreler görünmüş ve 4., 5. ve 6. grupta 1000 hücredeki apoptotik hücreler belirlenmiştir (Resim 4.15).

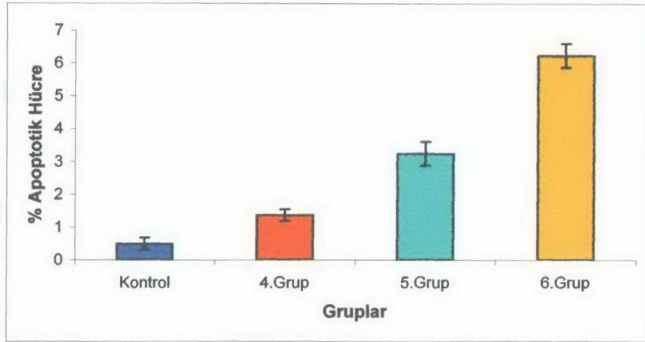
Fluoksetinin artan dozundaki apoptotik hücre artışı ve gruplar arası karşılaştırmalar yapılmıştır (Tablo 4.20, Grafik 4.10). Gruplar arası farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.001^{***}$ ) (Tablo 4.21).



**Resim 4.15.** 100'lük büyütmedeki fluoksetinin yüksek dozundaki (10 mg/kg'lık fluoksetin) apoptotik hücreler

**Tablo 4.20.** Fluoksetinin farklı dozlarındaki apoptotik hücreler

Grup	n	Apoptotik Hücre	Ortalama Apoptotik Hücre	% Apoptotik hücre
Kontrol	8	40	5.000±1.880	0.500
4	8	110	13.750±1.830	1.375
5	8	260	32.500±3.660	3.250
6	8	500	62.500±3.660	6.250



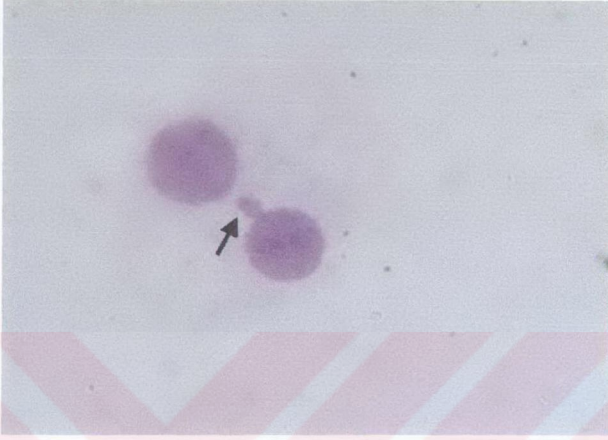
**Grafik 4.10.** Farklı fluoksetin dozlarındaki apoptotik hücrelerin karşılaştırılması

**Tablo 4.21.** Grupların apoptotik hücre açısından karşılaştırılması

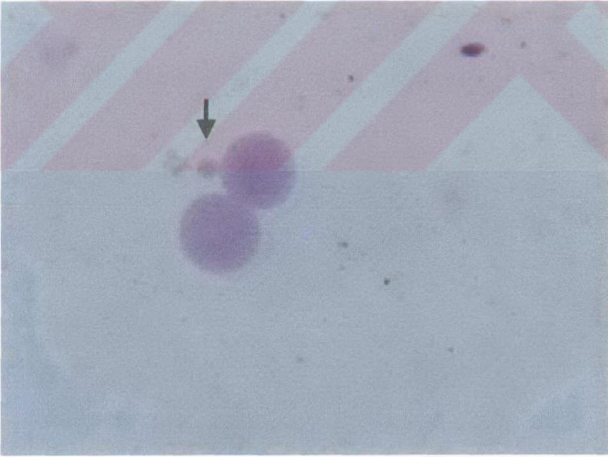
Gruplar		p
Kontrol	4.Grup	0.168 <sup>ns</sup>
Kontrol	5.Grup	0.001***
Kontrol	6.Grup	0.001***
4.Grup	5.Grup	0.001***
4.Grup	6.Grup	0.001***
5.Grup	6.Grup	0.001***

\*\*\* : p<0.001, \*\* : p<0.01, \* : p<0.05, ns: p>0.05

Preparatlar CBMN açısından incelenirken, MN kriterlerine uymayan fakat yeni sitotoksik marker olarak kabul gören oluşumlar **Resim 4.16** ve **Resim 4.17**'de belirtilmiştir.



**Resim 4.16.** BN'daki MN kabul edilmeyen gen amplifikasyonları



**Resim 4.17.** MN kriterlerine uymayan gen amplifikasyonları

## 5. TARTIŞMA

Fluoksetinin mitotik aktivite ve kromozomlar üzerine olan etkisi in vitro ve in vivo olarak iki kısımda tartışılmıştır.

### **5.1. In vitro Olarak Farklı Dozlardaki Fluoksetinin Periferik Kanda MI ve CBMN Değerlerinin Tartışılması**

#### **5.1.1.Farklı Dozlardaki Fluoksetinin Mitotik Aktivite Değerleri**

Tez çalışmamızın in vitro kısmında 25-35 yaş arasındaki 8 erkek ve 8 kadın bireye ait periferik kan örnekleri kullanılmıştır. Moorehead ve arkadaşları tarafından geliştirilen konvansiyonel sitogenetik kültür yönteminden yararlanılmıştır.

Bertran ve arkadaşları 1997 yılında, fitohemaglutinini ve Concovalin A'yı karşılaştırarak periferik kandaki T hücre proliferasyonu üzerine olan etkisini inceleyerek, T hücrelerinin proliferasyonu edici etkisini, 1-5 µg/ml'lik PHA'da ve Con A'da tespit etmişlerdir (10). 1999 yılında Edgar ve arkadaşları da, Concovalin A'ya bağlı olarak fluoksetinin T hücre proliferasyonu üzerine etkisini incelemişler ve Concovalin A konsantrasyonu arttıkça fluoksetinin T hücre proliferasyonunu baskıladığını, Concovalin A konsantrasyonu azalırken, T hücre proliferasyonunu arttırdığını göstermişlerdir (24). Çalışmamızda ise mitojen olarak fitohemaglutinin kullandık. Sabit fitohemaglutinin miktarına karşılık farklı fluoksetin dozlarındaki mitotik aktiviteyi değerlendirdik. Fluoksetinin farklı doz ve inkübasyon sürelerindeki mitotik indeks değerleri, yüksek doz ve uzun inkübasyon sürelerinde azalırken, en yüksek doz olan  $10^{-5}$ M'lık fluoksetinin periferik kanla muamelesinde inkübasyon sürelerine de bağlı olmaksızın mitoz gerçekleşmemiştir.

Hücre siklusunun gecikmesi, önemli oranda DNA hasar tamiri olduğunu göstermektedir. Mitotik aktivite düşük ya da hiç yoksa DNA tamir mekanizmasında meydana gelen yetersizlikler, hasarlı DNA birikimine bağlı olarak protein sentezini etkilemektedir (1, 2, 5, 6, 57). Bölünmeyen ya da yavaş bölünen hücrelerde DNA hasarı birikimi vardır (48, 76, 89). Fluoksetin, yüksek dozda periferik kanla muamelesinde toksik madde gibi görev yaparak normal hücre bölünmesi için gerekli proteinlerin

sentezini engellemiştir ve bu şekilde mitotik gecikmelere neden olmuştur. Gerçektende yüksek dozda ilaçla zehir arasındaki farkın izafi olduğu bilinmektedir (52).

Berkeley ve arkadaşları da 1994 yılında, fluoksetinin lenfosit proliferasyonu üzerine inhibe edici etkisinin olduğunu belirlemişlerdir. (9). Biz de fluoksetinin farklı dozlarında ( $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M) periferik kanla 48 saatlik muamelesi sonucunda 24 saate göre mitotik aktiviteyi azaltıcı etkisini belirledik. En yüksek doz uygulaması olan  $10^{-5}$  M'lık fluoksetinde ise inkübasyon süresine de bağlı olmaksızın lenfosit proliferasyonunu inhibe edici etkisi belirlenmiştir.

Fluoksetinin  $10^{-6}$ M'lık dozunun periferik kanla muamelesi sonucunda kromatid tipi kırık belirlenmiştir. Kromozomlardaki en küçük değişikliğin bile oldukça büyük riskler ortaya çıkarabileceği bilinen bir gerçektir. Fakat bizim çalışmamızda kırıklar tekrarlamadığı için çok sayıda incelediğimiz metafaz kromozomlarının yanında, bu kadar az sayıdaki kromatid tipi kırık ihmal edilmiştir. Fluoksetinin artan dozlarında, anöploidi sıklığının kontrole göre arttığını çalışmamızda belirledik. Doz yüksekliğine bağlı olarak DNA onarımının engellenmesi protein sentezini etkileyerek kromozomlarda sayısal düzensizliğe neden olarak anöploidi sayısını artırmakta olduğu belirlenmiştir.

### **5.1.2. Farklı Dozlardaki Fluoksetinin CBMN Değerleri**

Volders ve arkadaşları 2001 yılında, MN artış ve azalışlarının, artış ve azalıştaki hata oranını ortadan kaldırmak için MN sayılarının in vivo ve in vitro olarak verilmesi gerektiğini belirtmişlerdir (110). Bizde fluoksetinin farklı dozlarındaki MN oranlarını in vivo ve in vitro şartlarda belirledik.

Bonassi ve arkadaşları 2001 yılında, 16 ülkedeki 25 laboratuvarın mikronukleus hesaplama kriterlerini belirlemişlerdir. Bizim çalışmamız bu kriterler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mikronukleus değerlerini etkileyen faktörler arasında cinsiyet ve yaş faktörünü belirtmişlerdir. Biz de çalışmamızın in vitro kısmında 25-35 yaş arasındaki kadın ve erkeklerin periferik kanlarıyla çalıştık. Erkek ve kadın bireylerin farklı fluoksetin dozlarındaki uygulamaları sonucunda CBMN sayılarını ayrı ayrı hesapladık Bonassi ve arkadaşlarının farklı laboratuvarlardan elde ettikleri



sonuçlara göre, CBMN sayıları 19 yaşına kadar cinsiyet farkı gözetmezken, 40 yaşından sonra kadınlarda CBMN sayılarının arttığını belirtmişlerdir (13). Hormon konsantrasyonundaki fizyolojik varyasyonlar kadınlarda ilerleyen yaşla birlikte anöploidi oranlarını artırabilmektedir. Yine kadınlarda ilerleyen yaşla birlikte östrojen ve progesteron dengesinde lenfosit proliferasyonunu etkilemektedir (13, 25, 38, 61, 97, 102, 106).

Çalışmamızda da farklı fluoksetin dozlarına ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  M) karşılık erkek bireylere göre kadın bireylerde CBMN artışı görülmüş fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Fluoksetinin  $10^{-5}$ M'lık dozunu periferik kana eklememizden sonra mitozun inhibe olmasıyla, CBMN analizi için gerekli olan BN hücrelerini göremedik ve dolayısıyla çalışmamızın in vitro kısmında periferik kana uyguladığımız  $10^{-5}$ M'lık fluoksetinde mikronukleus sayılarını belirleyemedik. Bu bulgu bizi hücrelerin apoptotik hücrelere ya da nekrotik hücrelere dönüşüp hücre ölümünün gerçekleşebileceğini veya hasarlı hücre nedeniyle mitotik gecikmelere neden olabileceği sonucuna götürmüştür.

$10^{-6}$ M ve  $10^{-7}$ M'lık fluoksetinin periferik kanla muamelesi ile oluşan mikronukleuslar kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Fluoksetinle ilgili kromozom ve mikronukleus üzerine çalışma olmadığı için değerlerimiz karşılaştırılamamıştır.

## **5.2. In vivodaki Farklı Fluoksetin Dozlarının Mitotik Aktivite ve CBMN**

### **Üzerine Olan Etkisinin Tartışılması**

#### **5.2.1. Farklı Dozlardaki Fluoksetinin Mitotik Aktivite Değerleri**

Çalışmamızda, 5mg/kg, 7.5mg/kg ve en yüksek doz olarak da 10mg/kg'lık fluoksetin dozunu sıçana 21 gün boyunca uyguladık. Fluoksetinin uygulama dozu yükseldikçe; örneğin, 7.5mg/kg'da mitotik aktivite azalırken, en yüksek uygulama dozu olan 10mg/kg'lık fluoksetinin mitozu inhibe edici etkisi belirlenmiştir. En düşük doz olan 5 mg/kg'lık fluoksetinin kontrol grubuyla mitotik aktivite açısından karşılaştırıldığında farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

Raep ve arkadaşları 1999 yılında, 0.3-1 mg/kg'lık fluoksetin enjeksiyonlarının insanlardaki günlük 20-60 mg'lık normal fluoksetin kullanımıyla eş olduğunu belirtmişlerdir (79). Çalışmamızda da sıçanlara 21 gün boyunca uyguladığımız fluoksetin dozları 5mg/kg, 7.5mg/kg ve 10mg/kg'dır. Bu uygulamalar sırasıyla insanlardaki 100-300 mg/kg, 150-450 mg/kg ve 200-600 mg/kg'lık fluoksetin alımlarına denk gelmektedir.

Bizim bulgularımız gösteriyor ki; insanlardaki günlük alımın 7.5 katına kadar olan dozlarda, mitotik aktivite açısından kontrol grubuna göre çok büyük oranda fark bulunmazken, fluoksetinin 10 katlık alımlarında hücre bölünmesi inhibe olmaktadır. Bu da fluoksetinin farklı doz ve sürelerde hücre bölünmesini önemli derecede baskıladığını, doz zaman artışına bağlı olarak kromozom anomalilerine sebep olabileceğini ve mitotik indeksi yani hücre bölünme frekansını azalttığını göstermiştir.

Kırkland ve arkadaşları 1998 yılında, sitotoksik kontrol için kromozomlarda belirlenemeyen sayısal ve yapısal kromozom düzensizliğinin mikronukleus çalışmalarıyla ortaya koymanın mümkün olduğunu belirtmişlerdir (54). Çalışmamızın in vivo kısmında da kromozomlarda kromatid tipi kırık ihmal edilecek kadar az belirlenirken, mikronukleus ve apoptotik hücre artışları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde belirlenmiştir.

### **5.2.2. Farklı Dozlardaki Fluoksetinin CBMN Değerleri**

Endojenik ve eksojenik ajanların etkisiyle DNA'da hasar meydana gelebildiği ve bunu takiben mitotik bölünme hataları oluşarak mikronukleus adı verilen yapıların oluştuğu bilinmektedir. DNA'daki hasarın kromozom kırıklarına, MN artışına, tamamlanamayan mitozla neden olduğu ve eğer toksik madde birikirse DNA tamirinin mümkün olmadığını bunun sonucunda da hücrelerin apoptotik hücrelere dönüşerek hücre ölümünü gerçekleştirdiği belirtilmiştir (3, 26, 104, 109, 112).

Krishna ve arkadaşları 1991 yılında, sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada sayısal ve yapısal kromozom anomalilerinin cinsiyet farkı gözetmediğini belirtmişlerdir. Yine aynı çalışmada mikronukleus açısından erkek sıçanların tercih edildiği belirtilmiştir (58). Çünkü erkek sıçanlar, dişilerdeki gibi hormon konsantrasyonlarındaki östrojen ve progesteron dengesindeki değişikliklerden dolayı lenfosit proliferasyonunu ve MN oluşumlarını etkilememektedir. Bizde çalışmamızın, in vivo kısmında erkek sıçan kemik iliği hücrelerinde 5mg/kg, 7.5mg/kg ve 10mg/kg fluoksetin dozları uygulamalarında MN artışlarını belirledik.

Çalışmamızın in vivo kısmında, kontrol ile diğer gruplar CBMN açısından karşılaştırıldığında aradaki fark anlamlı bulunurken ( $p < 0.01^{**}$ ), gruplar (5mg/kg, 7.5mg/kg ve 10mg/kg fluoksetin) arası karşılaştırmada CBMN değerleri açısından fark anlamsız bulunmuştur ( $p > 0.05^{ns}$ ). En yüksek fluoksetin dozu uygulaması sonucu apoptoza giden hücrelerin artışı bizi diğer gruplardaki apoptoza giden hücre sayılarını belirlemeye yöneltmiştir. Yüksek fluoksetin dozlarındaki CBMN artışlarının belirlenememesi, bu dozlardaki hücrelerin apoptoza gitmesi nedeniyledir.

Macluskey ve arkadaşları 2000 yılında, akciğer kanserinde yüksek apoptotik hücre seviyesini belirlemeye çalışmışlardır. Bunun için üç tip apoptotik hücre sayımı tanımlanmıştır. AI-tc (Apoptotic index-total cell) de toplam hücredeki apoptotik hücreleri, AI-pc (Apoptotic index-point counting) toplam epitel hücrelerdeki apoptotik hücreleri, AI-area (Apoptotic index-area)  $mm^2$  deki apoptotik hücreleri tanımlamışlardır (64). Biz de apoptotik hücre belirlerken AI-tc sayım metodunu kullanarak 1000 hücredeki apoptotik hücre sayısını belirledik.

Santus ve arkadaşları 2001 yılında, DNA tamir mekanizmalarının eksikliği sonucunda kromozom aberasyon artışı ve apoptotik hücre artışı belirtmişlerdir (84). Tovil ve arkadaşları da 2002 yılında, kronik düşük seviyede iyonize radyasyonun DNA hasarını belirlemede biyolojik marker olduğunu ve CBMN'nin hücre bölünmesi sırasında hasarlı hücrelerin ölümünün apoptozis ile gerçekleştiğini göstermişlerdir (101). Kerr ve arkadaşlarının 1994 yılında, Dunn ve arkadaşlarının ise 1997 yılında yaptıkları çalışmalarda kemoterapik ilaçların çoğunun hasarlı hücreyi apoptoza uğratarak kanser hücrelerini öldürdüğünü belirtmişler ve apoptoz mekanizmasının kanser için önemini vurgulamışlardır (21, 53, 95). Bizde çalışmamızda, fluoksetinin yüksek dozunda (7.5mg/kg, 10 mg/kg fluoksetin) hasarlı hücrenin apoptotik hücreye dönüştüğünü belirledik.

Bazen yüksek dozda hücreler apoptoza gittiği için binükleus azalmalarına neden olabilmektedir (72). Bizde sıçanlara uyguladığımız farklı dozdaki (5mg/kg, 7.5mg/kg ve 10mg/kg) fluoksetin sonucunda kemik iliği hücrelerinde azalan binükleus hücreye karşılık apoptotik hücre artışı belirledik.

Frank ve arkadaşları 1999 yılında, yaptıkları in vivo çalışmada, depresyonun immün sistemi bozarak, viral enfeksiyonlara, koroner kalp hastalıklarına ve kansere neden olabileceğini ve fluoksetinin immün sistemi pozitif yönde etkileyerek antitümör terapide kullanılabileceğini belirtmişlerdir (34, 115).

Garabal ve arkadaşları 1998 yılında, akciğer kanseri olan hastalarda depresyonun etkisiyle immün sistemin baskılandığını ve kanser gelişiminde metastazın arttığını belirtmişlerdir. Sıçanlarla yaptıkları çalışmada ise 5 mg/kg'lık fluoksetin enjeksiyonu ile immün sistemin düzeldiğini vurgulamışlardır (35).

Abdul ve arkadaşları 1995 yılında sıçanlarda yaptıkları çalışmada, prostat karsinomunda fluoksetin hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir (35).

Tutton ve arkadaşları 1982 yılında, SSRI grubundan iki ilacın, citalopram ve fluoksetinin koleraktal karsinomda serotonin alımını engelleyerek hücre proliferasyonu inhibe edici etkisini ve antineoplastik ajan olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir

(103). Bendele ve arkadaşları 1992 yılında, fluoksetinin 25 katına kadar olan kullanımında kanserojenik cevap oluşmadığını belirtmişlerdir (111).

American Hospital Formulary Drug Information'ın sıçanlarda yaptıkları çalışmada, fluoksetinin insanlardaki klinik kullanımının 5-9 kez fazlasının 24 aylık kullanımında karsinogenezi indüklediğini göstermişlerdir. Toksikolojik çalışmalarda fluoksetinin 10 katına kadar olan dozlarında Ames testine göre de DNA kırığının oluşmadığını belirtmişlerdir (14, 94).

Biz de çalışmamızın in vivo kısmında fluoksetinin klinik kullanımında 5 katlık dozuna kadar hücre bölünmesini engellemediği fakat 10 katlık fluoksetin dozunda hücre bölünme frekansını düşürerek mitozu inhibe ettiğini ve apoptotik hücre artışına neden olduğunu belirledik.

In vitro ve in vivo çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular, birbirleriyle uyumlu bulunmuştur. Fluoksetin antidepresanlar içerisinde büyük bir keşif olarak görünmesine rağmen yüksek dozlarında, DNA onarımının engellenmesi protein sentezini etkilemekte ve böylece mitotik aktivitede azalmalara, CBMN'de ve apoptotik hücrelerde artışa neden olarak normal hücre bölünmesindeki mitoz ve apoptoz dengesini bozmakta olduğu belirlenmiştir.

## 6. SONUÇ

In vitro çalışmada, 25-35 yaş arasındaki 8 erkek ve 8 kadın bireyden alınan periferik kan örnekleri, farklı doz ( $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M) ve sürelerdeki (24 saat, 48 saat) fluoksetin muamelesi sonucunda MI, sayısal ve yapısal kromozom anomalileri, CBMN açısından değerlendirilmiştir.

Araştırma bulguları in vitro olarak değerlendirildiğinde;

1.  $10^{-5}$ M'lık fluoksetin muamelesi sonrasında, periferik kandaki hücrelerin inhibe olduğu belirlenmiştir. Fluoksetinin doz ve muamele süresinin artmasıyla beraber mitotik aktiviteyi azaltıcı etkisi olduğu görülmüştür. Mitotik indeks, açısından farklı doz ve süreler kontrol grubuyla karşılaştırıldığında değerlerimiz istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.001^{***}$ ).
2. Fluoksetinin  $10^{-7}$  M'lık en düşük doz uygulamasının 24 saatlik periferik kanla muamelesinde, kontrol grubuyla MI açısından karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken ( $p>0.05^{ns}$ )  $10^{-7}$  M'lık fluoksetinin periferik kanla 48 saatlik muamelesi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında aradaki fark anlamlı bulunmuştur ( $p<0.01^{**}$ ).
3.  $10^{-6}$  M'lık fluoksetin inkübasyon süresine bağlı olmaksızın periferik kanla muamelesi sonrasında 16 kişinin 2'sinde 4 adet tekrarlamayan kromatid tipi kırığa rastlanmıştır. Diğer doz zaman kombinasyonlarında kromozomal yapısal bir anomali görülmemiştir.
4. Fluoksetinin farklı doz ve sürelerindeki anöploidi oranları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında fark anlamlı bulunurken ( $p<0.001^{***}$ ) fluoksetinin  $10^{-5}$  M'lık doz uygulamalarının 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonucundaki anöploidi oranları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında fark anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05^{ns}$ ).
5. Farklı konsantrasyonlardaki CBMN değerleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ( $p<0.01^{**}$ )

$10^{-5}$  M'lık fluoksetin uygulaması sonucunda hücreler mitoza giremediği için CBMN sayıları olmadığından kontrol grubuyla karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ( $p>0.05^{ns}$ ).

6. Mitotik indeks, anöploidi ve CBMN açısından kadın ve erkek bireyler karşılaştırılmış ve fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p<0.05^{ns}$ ).

İn vivo çalışmada ise, 64 adet 225-250 gram ağırlığındaki 3 aylık Spraque dawley türü erkek sıçana 21 gün boyunca i.p. olarak 5mg/kg, 7.5mg/kg, 10mg/kg'lık fluoksetin enjeksiyonu yapılmıştır. Sıçan kemik iliği hücrelerinden hazırlanan preparatlar mitotik indeks, sayısal ve yapısal kromozom anomalisi, CBMN, apoptotik hücre açısından değerlendirilmiştir.

Araştırma bulguları in vivo olarak değerlendirildiğinde;

1. 10mg/kg'lık fluoksetin enjeksiyonu sonucunda mitoza giren hücre görülmemiştir. 5mg/kg'lık grup ile kontrol grubu mitotik aktivite açısından karşılaştırıldığında fark anlamlı bulunmazken ( $p>0.05^{ns}$ ), gruplar (7.5mg/kg ve 10mg/kg fluoksetin) birbirleriyle ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında fark anlamlı bulunmuştur ( $p<0.001^{***}$ ).
2. 7.5mg/kg'lık grupta 8 sıçandan 1'inde tekrarlamayan 2 adet kromatid tipi kırık görülmüştür. Gruplar arasında 1.grup (5 mg/kg) hariç anöploidik sayısal kromozom anomalisi açısından fark anlamlı bulunmuştur ( $p<0.001^{***}$ ).
3. CBMN açısından gruplar arasında fark yokken ( $p>0.05^{ns}$ ), gruplar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında fark anlamlı bulunmuştur ( $p<0.01^{**}$ ).
4. En yüksek dozda hücrelerin apoptoza uğradığı görülmüş ve diğer gruplarla karşılaştırılmıştır. 5mg/kg'lık en düşük doz ile kontrol grubu arasında apoptotik hücre sayıları bakımından fark bulunmazken ( $p>0.05^{ns}$ ), gruplar arasındaki apoptoza uğrayan hücre sayıları açısından fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ( $p<0.001^{***}$ ).

İn vitro ve in vivo değerlerimiz birbiriyle uyumlu bulunmuştur. Fluoksetinin, yüksek dozlarına bağlı olarak mitotik aktivitede azalış, CBMN'de, anöploidide ve

apoptotik hücrelerde artışa neden olup normal hücre bölünmesindeki mitoz ve apoptoz dengesini bozduğu belirlenmiştir.





## 7. KAYNAKLAR

1. AKBAŞ, E., BUDAK, T.: Sigara İçen Radyoloji Teknisyenlerinde Trimethoprimin Kromozomal Düzensizlikler Üzerine Etkileri. Tr. J. Of Biology, 22: 99-109, (1998).
2. AKDAĞ, Z.M., SERT, C., ÇELİK, S.M., ERDAL, E.M., KETANI, A.M.: 9450 MHz Mikrodalga Radyasyonun *in vivo* olarak kromozomlar üzerine etkisi. Tr. J. Of Biology, 22: 53-60, (1998).
3. ASMUB, M., MULLENDERS, L. H.F., HARTWG, A.: Interference by toxic metal compounds with isolated zinc fing DNA repair proteins. Toxicology Letters, 112-113: 227-231, (2000).
4. AYDINLI, K.: Prenatal tanı ve Tedavi. Perspektiv Yayın ve Reklam Hizmetleri, Birinci Baskı, İstanbul, (1992).
5. BAŞARAN, A., AÇIKALIN, E., EROL, K., ÖZDEMİR, M., GÜNEŞ, V.H., DEĞİRMENCİ, İ., ÇAKMAK, A.E., TOMATIR, G.A., GÜN H.: Ordinazol'un sıçan idrar kompozisyonu serum enzimleri, kromozom ve karaciğer, böbrek üzerine etkileri. The Journal of Medical Faculty Osmangazi University, 17: (15-24), (1995).
6. BAŞARAN, A., GÜNEŞ, V.H., ÇAKMAK, A.E., DEĞİRMENCİ, İ., TOMATIR, G.A., BAŞARAN, N., YILMAZER, S.: Effects of Cyclosporin a on Chromosomes and Some Serum Enzymes in Rats. Tr. J. of Medical Sciences, 24: 181-184, (1995).
7. BAŞARAN, N.: Tıbbi Genetik. 7. Baskı, Güneş ve Nobel Tıp Kitabevi, Bursa, (1999).
8. BEASLEY, J.M.C., NILSSON, M.E., KOKE, S.C., GONZALES, J.S.: Efficacy, adverse events, and treatment discontinuations in fluoxetine clinical studies of

major depression: A meta analysis of the 20-mg/day dose. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 61: 722-732, (2000).

9. BERKELEY, B.M., DAUSSIN, S., HERNANDEZ, C.M., BAYER, B.M.: *In Vitro* Effects of Cocaine, Lidocaine and Monoamine Uptake Inhibitors on Lymphocyte Proliferative Responses. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 16: 165-178, (1994).
10. BERTRAN, E. M., JILBERT, A. R., KOTCARSKI, I. :Optimization of an In Vitro Assay Which Measures The proliferation of Duck t Lymphocytes from Peripheral Blood in response to Stimulation with PHA and Con A Developmental A Comparative Immunology, Vol 21, No: 3. pp: 199-310, (1997).
11. BISHT, S.K., DEVI, U.P.: Dose dependent increase in the frequency of micronuclei and chromosomal aberrations by misonidazole in mouse bone marrow. *Mutation Research*, 325: 57-63, (1994).
12. BOLOGNESI, C., FILIBERTI, R., NERI, M., PERRONE, E., LANDINI, E., CANESSA, P.A., SIMONASSI, C., CERRANO, P.G., MUTTI, L., PUNTONI, R.: High Frequency of Micronuclei in Peripheral Blood Lymphocytes as Index of Susceptibility to Plevral Malignant Mesothelioma. *Cancer Research*, 62: 5418-5419, (2002).
13. BONASSI, S., FENECH, M., LANDO, C., LIN, Y.P., CEPPI, M., CHANG, W.P., HOLLAND, N., VOLDERS, M.K., ZEIGER, E., BAN, S., BARALE, R., BIGATTI, M.P., BOLOGNESI, C., TIA, C., GIORGIO, D.M., FERGUSON, L.R., FUCIC, A., LIMA, O.G., HRELIA, P., KRISHNAJA, A.P., LEE, T.K., MIGLIORE, L., MIKHALEVICH, L., MIRKOVA, E., MOLESSO, P., MULLER, W.U., ODAGIRI, Y., SCARFI, M.R., SZABOVA, E., VOROBTSOVA, I., VRAL, A., ZIJNO, A.: Human Micronucleus Project: International Database Comparison for Results With the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay in Human Lymphocytes: I. Effect of Laboratory Protocol,

Scoring Criteria, and Host Factors on the Frequency of Micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 37: 31-45, (2001).

14. BRANDES, J.L., ARRON, J.R., BOGDANOVIC, R.P., TONG, J., ZABORNIAK, F.L.C., HOGG, R.G., WARRINGTON, C.R., FANG, W., LABELLA, S.F.: Stimulation of Malignant Growth in Rodents by Antidepressant Drugs at Clinically Relevant Doses. *Cancer Research*, 52: 3796-3800, (1992).
15. CHORVATOVICOVA, D., NAVAROVA, J.: Suppressing effects of glucan on micronuclei induced by cyclophosphamide in mice. *Mutation research*, 282: 147-150, (1992).
16. CONNER, J.M., SMITH, F. M.A.: *Essential Medical Genetics*, Blackwell Scientific Publications, Fourth ed., (1993).
17. ÇAKMAK, A.E., BAŞARAN, N., DEĞİRMENCİ, I., GÜNEŞ, V.H., GÜN, H., CİNGİ, I.M., BAŞARAN, A., KALKANDELEN, G.: The Effects of Lindane (8-Benzene Hexachloride) on the Abnormalities in Rat Bone Marrow Cells. *J. Health Sci*, 7: 13-19, (1995).
18. DAWSON, L.A., NGUYEN, H.Q., SMITH, D.I., SCHECHTER, L.E.: Effects of chronic fluoxetine treatment in the presence and absence of (I) pindolol: a microdialysis study *British Journal of Pharmacology*, 130: 797-804, (2000).
19. DÍGUE, L., ORSIERE, T., MEO, D.M., MATTEI, G.M., DEPETRIS, D., DUFFAUD, F., FAVRE, R., BOTTA, A.: Evaluation of the Genotoxic Activity of Parlitaxel by the in Vitro Micronucleus Test in Combination With Fluorescent in Situ Hybridization of a DNA Centromeric Probe and the Alkaline Single Cell Gel Electrophoresis Technique (Comet Assay) in Human T-Lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 34: 269-278, (1999).
20. DİKMEN, M., BAŞARAN, A., GÜNEŞ, V.H., DEĞİRMENCİ, I., COŞAN, D., KURT, H., ÜSTÜNER, C.M., AÇIKALIN, E.: The effects of cyclophosphamide

on the frequency of micronucleus, biochemical, parameters, ovarian and uterine histology in rats. The Medical Journal of Kocatepe, 3: 51-56, (2002).

21. DUNN, S. E., HARDMAN, R. A., KARI, F. W., BARRET, J. C. : Insulin-Like Growth factor 1 (IGF-1) Alters Drug Sensitivity of HBL 100 Human Breast Cancer of Apoptosis Induced by Diverse Anticancer Drugs, Cancer Research, 57, 2687-2693, (1997).
22. EDGAR, V.A., GENARO, A.M., CREMASCHI, G., STERIN-BORDA, L.: Fluoxetine Action on Murine T-Lymphocyte Proliferation: Participation of PKC Activation and Calcium Mobilisation. Cell Signal, 10: 721-726, (1998).
23. EDGAR, V.A., GENARO, A.M., CREMASCHI, G.A., BORDA, S.L.: Fluoxetine action upon human T lymphocyte proliferation. Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam, 48: 191-197, (1998).
24. EDGAR, V.A., STERIN-BORDA, L., CREMASCHI, G.A., GENARO, A.M.: Role of protein kinase C and cAMP in fluoxetine effects on human T-cell proliferation. European Journal of Pharmacology, 372: 65-73, (1999).
25. ELHAJOUJÍ, A., TIBALDÍ, F., VOLDERS, K.M.: Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors *in vitro* in human Lymphocytes. Mutagenesis, 12:133-140, (1997).
26. ERGİN; M.: Apoptozis, Arşiv, 11: 495, Adana, (2002).
27. FATIMA, S.K., PRABHAVATHÍ, P.A., PADMAVATHÍ, P., REDDY, P.P.: Analysis of chromosomal aberrations in men occupationally exposed to cement dust. Mutation Research, 490: 179-186, (2001).
28. FENECH, M., CROTT, W.J.: Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. Mutation Research, 504: 131-136, (2002).

29. 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).
30. FENECH, M.: A mathematical model of the *in vitro* micronucleus assay predicts false negative results if micronuclei are not specifically scored in binucleated cells or in cells that have completed one nuclear division. *Mutagenesis*, 15: 329-336, (2000).
31. FENECH, M.: The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation Research*, 392: 11-18, (1997).
32. FENECH, M.: The in micronucleus technique. *Mutation Research*, 455: 81-95, (2000).
33. FOMINA, J., DARROUDI, F., BOEL, J.J. W.A., NATARAJAN, T.: Discrimination between complete and incomplete chromosome exchanges in X-irradiated human lymphocytes using FISH with pan-centromeric and chromosome specific DNA probes in combination with telomeric PNA Probe. *Int. J. Radiat. Biol.* 76: 807-813, (2000).
34. FRANK, G.M., HENDRICKS, E.S., JOHNSON, R.D., WIESELER, L.J., BURKE, J.W.: Antidepressants Augment Natural Killer Cell Activity: In vivo and in vitro. *Neuropsychobiology*, 39: 18-24, (1999).
35. GARABAL-FREIRE, M., NUNEZ, J.M., PEREIRO, D., RIVEIRO, P., LOSADA, C., RIAL-FERNANDEZ, J.C., IGLESIAS-GARCIA, E., PRIZMIC, J., MAYAN, J.M., MENDEZ-REY, M.: Effects of Fluoxetine on the Development of Lung Metastases Induced by Operative Stress in Rats. *Life Sciences*, 63: 31-38, (1998).
36. GARDNER, R. J. M. K., SUTHERLAND, G. R. : *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*, New York, Oxford University Press, (1996).

37. GENARO, A.M., EDGAR, V.A., STERIN-BORDA, L.: Differential Effects of Fluoxetine on Murine B-cell Proliferation Depending on the Biochemical Pathways Triggered by Distinct Mitogens. *Biochemical Pharmacology*, 60: 1279-1283, (2000).
38. GÖMÜRGEN, N.A.: Cytological Effect of the Herbicide 2,4-D isooctylester 48% on Root Mitosis of *Allium Cepa*. *Cytologia*, 65: 383-388, (2000).
39. GUDÍ, R. SANDHU, S.S., ATHWAL, R.S.: Kinetochore identification in micronuclei in mouse bone-marrow erythrocytes: An assay for the detection of aneuploidy-inducing agents. *Mutation Research*, 234: 263-268, (1990).
40. HARDMAN, J.G. , LIMBIRD, L. E. : Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, The Mc GrawHill Companies Inc, USA, (1996).
41. <http://www.cdfc.rug.ac.be/HealthRisk/genotoxicitytests/micronucleus-test.htm>.
42. [http://www.ehs.sph.berkeley.edu/holland/humn/\\_documents/i](http://www.ehs.sph.berkeley.edu/holland/humn/_documents/i).
43. <http://www.ehs.sph.berkeley.edu/holland/humn/publications/inpreparation/planForAtlas.html>.
44. <http://www.genetikbilimi.com/gen/hücre döngüsü.htm>
45. <http://www.litronlabs.com>.
46. <http://www.sarafem.com>
47. <http://www.uni-kl.de/FB-Biologie/AG-Zankl/mikrokerne.htm>.
48. INCEER, H., BEYAZOĞLU, O.: Bakır Klorür'ün *Vicia hirsuta* (L.) S.F. Gray Kök Ucu Hücreleri Üzerine Sitogenetik Etkileri. *Türk. J. Biol*, 24: 553-559, (2000).
49. JACOBS, L. S. : Farmokoloji. Saray Tıp Kitabevleri, İzmir, (1992).

50. KANG, Y.J., ENGER, M.D.: Cadmium cytotoxicity correlates with the changes in glutathione content that occur during the logarithmic growth phase of A549-T27 cells. *Toxicology Letters*, 51: 23-28, (1990).
51. KASUBA, V., ROZGAT, R.: Micronucleus distribution in human peripheral blood lymphocytes treated in vitro with cadmium chloride in G<sub>0</sub> and S phase of the cell cycle. *Chemosphere*, 49: 91-95, (2002).
52. KAYAALP, O.: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 10. Baskı, Hacettepe Taş, (2002).
53. KERR, J. F. R., WINTERFORD, C.M., HARMON, B. V.: Apoptosis Its Significance in Cancer Therapy, *Cancer*, Volume :73, No:8, (1994).
54. KIRKLAND, D.: Chromosome aberration testing in genetic toxicology-past, present and future. *Mutation Research*, 404: 173-185, (1998).
55. KLES, V., HYRIEN, O., POUL, J.M., SANDERS, P.: Application of Pharmacokinetic /Pharmacodynamic and Stochastic Modelling to G-Mercaptopurine Micronucleus Induction in Mouse Bone Marrow Erythrocytes. *Journal of Applied Toxicology*, 23: 59-70, (2003).
56. KLUG, S.W. CUMMINGS, M.R.: *Concepts of Genetics*. 6.th edition, Prentice Hall, (2000).
57. KORKMAZ, M., ÇOLAK, A.: N-Nitrosopirrolidin (NPYR)'in Farelerde Sitogenetik Etkileri. *Turk. J. Biol*, 24: 1-12, (2000).
58. KRISHNA, G., KROPKO, M.L., CIARAVINO, V., THEISS, T.C.: Simultaneous micronucleus and chromosome aberration assessment in the rat. *Mutation Research*, 264: 29-35, (1991).
59. KRYSCIO, A., ULRICH MULLER, W.U., WOJCIK, A., KOTSCHY, N., GROBELNY, S., STREFFER, C.: A cytogenetic analysis of the long-term effect

- of uranium mining on peripheral lymphocytes using the micronucleus-centromere assay. *Int. J. Radiat. Biol.* 77: 1087-1093, (2001).
60. LEVAN, G., SZPIRER, J., SZPIRER, C., KLINGA, K., HANSON, C., ISLAM, Q.M.: The Gene Map of the Norway Rat (*Rattus norvegicus*) and Comparative Mapping with Mouse and Man. *Genomics*, 10: 699-718, (1991).
61. LINDHOLM, C., NORPPA, H., HAYASHI, M., SORSA, M.: Induction of micronuclei and anaphase aberrations by cytochalasin B in human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 260: 369-375, (1991).
62. LISTON, L.H., VANE, D.L., BOULTON, W.D., RISCH, C.S., MARKOWITZ, S.J., GOLDMAN, J.: Differential Time Course of Cytochrome P450 2D6 Enzyme Inhibition by Fluoxetine, Sertraline, and Paroxetine in Healthy Volunteers. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 22: 169-173, (2002).
63. MACGREGOR, J.T., HEDDLE, J.A., HITE, M., MARGOLIN, B.H., RAMEL, C., SALAMONE, M.F., TICE, R.R., WILD, D.: Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes: *Mutation Research*, 189: 103-112, (1987).
64. MACLUSKEY, M., BAILLIE, R., CHANDRACHUD, L. M., PENDLETON, N., SCHOR, A. M. : High Levels of Apoptosis are Associated with Improved Survival in Non-Small cell Lung Cancer, *Anticancer Research*, 20 : 2123-2128, (2000).
65. MALUF, S.W., ERDTMANN, B.: Genomic instability in Down Syndrome and Fanconi anemia assessed by micronucleus analysis and single-cell gel electrophoresis. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 124: 71-75, (2001).
66. MEYER, A.U.: Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *The Lancet*, 356: 1667-1671, (2000).



67. MIGLIORE, L., COCCHI, L., NESTI, C., SABBIONI, E.: Micronuclei Assay and FISH Analysis in Human Lymphocytes Treated With Six Metal Salts. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 34: 279-284, (1999).
68. MIGLIORE, L., NIERI, M., AMODIO, S., LOPRIENO, N.: The human lymphocyte micronucleus assay: a comparison between whole blood and seperated-lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 227: 167-172, (1989).
69. MINISSI, S., GUSTAVINO, B., DEGRASSI, F., TANZARELLA, C., RIZZONI, M.: Effect of cytochalasin B on the induction of chromosome missegregation by colchicine at low concentrations in human Lymphocytes. *Mutagenesis*, 14: 43-49, (1999).
70. MISILLER, R. F., YOUNG, I. D. : *Emergy's Elements of Medical Genetics.*, Ninth Edition, Churchill Livingstone, Singapore, (1995).
71. MONFARED, A.S., MOZDARANI, H.: Synergistic Effects of Laserthermia and Bleomycin-Sulfate on Micronucleus Formation in Cytokinesis-Blocked HeLa Cells. *Im. J. Med Sci*, 24:87-91, (1999).
72. MOORE, F.R., URDA, G.A., KRISHNA, G., THEISS, T.C.: An in vivo/in vitro method for assessing micronucleus and chromosome aberration induction in rat bone marrow and spleen 1. Studies with cyclophosphamide. *Mutation Research*, 335: 191-199, (1995).
73. NIERENBERG, A.A., FARABAUGH, A.H., ALPERT, J.E., GORDON, J., WORTHINGTON, J.J., ROSENBAUM, J.F., FAVA, M.: Timing of Onset of Antidepressant Response With Fluoxetine Treatment. *Am J. Psychiatry*, 157: 1423-1428, (2000).
74. OLIVEIRA, C.L.D., SALES, J.A., BEL D.A.E., SILVEIRA, L.C.M., GUÍMARAES, F.S.: Effects of acude and chronic fluoxetine treatments on restraint stress-induced Fos expression. *Brain Research Bulletin*, 55: 747-754, (2001).

75. ÖNER, M.: Genel Mikrobiyoloji. 3. baskı, İzmir, (1986).
76. PALA, F.S., MOQUET, J.E., EDWARDS, A.A., LLOYD, D. C.: In vitro transmission of chromosomal aberrations through mitosis in human lymphocytes. *Mutation Research*, 474: 139-146, (2001).
77. PASSARGE, E.: Color Atlas of Genetics, George Thieme Verlag, Stuttgart, (1995).
78. PROUDLOCK, R.T., STATHAM, J., HOWARD, W.: Evaluation of the rat bone marrow and peripheral blood micronucleus test using monocrotaline. *Mutation Research*, 392: 243-249, (1997).
79. RAEP, K.D., EVANS, S., GARCIA, F.L.Q., MUMA, A.N., WOLF, A.W., BATTAGLIA, G.W., VAN DE KAR, D.L.: Daily Injections of Fluoxetine Induce Dose-Dependent Desensitization of Hypothalamic 5-HT<sub>1A</sub> Receptors: Reductions in Neuroendocrine Responses to 8-OH-DPAT and in Levels of G<sub>z</sub> and G<sub>i</sub> proteins. *Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 288: 98-106, (1999).
80. RAMACHANDRAN, A., WILLIAMS, L. : Pharmacology recall, The Science of Review, USA, (2000).
81. ROONEY, D.E., CZEPULKOWSKI, B.H.: Human Cytogenetics. Second Edition, Oxford University Press, New York, (1992).
82. ROSSI, M.A., ZACCARO, L., ROSELLI, F., QUATTRONE, C.: Clastogenic effects induced in mice and rats by 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]-benzene, a phenobarbital-like enzyme inducer and liver tumour promoter. *Carcinogenesis*, 9: 1147-1151, (1988).
83. ROTHFUB, A., SCHÜTZ, P., BOCHUM, S., VOLM, T., EBERHARDT, E., KREIENBERG, R., VOGEL, W.: Induced Micronucleus Frequencies in

Peripheral Lymphocytes as a Screening Test for Carriers of a BRCA1 Mutation in Breast Cancer Families. *Cancer Research*, 60: 390-394, (2000).

84. SANTUS, D.P.L., GARCIA, L.C., BALAJEE, S.A., CALVO, B.T.G., BASSI, L.P.F.: Transcription coupled repair deficiency results in increased chromosomal aberrations and apoptotic death in the UVG1 cell line, the Chinese hamster homologue of Cockayne's syndrome B. *Mutation Research*, 485: 121-132, (2001).
85. SARTO, F., TOMANIN, R., GIACOMELLI, L., CANOVA, A., RAIMONDI, F., GHIOTTO, C., FIORENTINO, M.V.: Evaluation of chromosomal aberrations in lymphocytes and micronuclei in lymphocytes, oral mucosa and hair root cells of patients under antineoplastic therapy. *Mutation Research*, 228: 157-169, (1990).
86. SCHMIDT, M.E., FAVA, M., ROBINSON, J.M., JUDGE, R.: The efficacy, and safety of a new enteric-coated formulation of fluoxetine given once weekly during the continuation treatment of major depressive disorder. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 61: 851-861, (2000).
87. SEOANE, A.I., DULOUT, F.N.: Genotoxic ability of cadmium, chromium and nickel salts studied by kinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay. *Mutation Research*, 490: 99-106, (2001).
88. SERAFEIM, A., GRAFTON, G., CHAMBA, A., GREGORY, D.C., BLAKELY, D.R., BOWERY, G.N., BARNES, M.N., TOHN, G.: 5-Hydroxytryptamine drives apoptosis in biopsylike Burkitt lymphoma cells: reversal by selective serotonin reuptake inhibitors, *blood*. 99: 2545-2553, (2002).
89. SHARMA, B.S. : Effects of Cyclophosphamide on in vitro human lymphocyte culture and mitogenic stimulation. *Transplantation*, 35: 165-168,(1983).

90. SHI, X.C., KRISHNA, G., ONG, T.: Induction of Micronuclei in Rat Bone Marrow by Four Model Compounds. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 11: 251-258, (1992).
91. SITTER, V.J.N., BOOGAARD, P.J., NATARAJAN, A.T., TATES, A.D., EHRENBERG, L.G., TÖRNOVIST, M.A.: Formation of DNA adducts and induction of mutagenic effects in rats following 4 weeks inhalation exposure to ethylene oxide as a basis for cancer risk assessment. *Mutation Research*, 447: 27-48, (2000).
92. SLAVUTSKY, I., KNUUTILA, S.: Micronucleus formation in different lymphocyte subpopulations in peplomycin-treated and control cultures. *Mutation Research*, 219: 257-261, (1989).
93. SMİMİZU, N., SHIMURA, T., TANAKA, T.: Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutation Research*, 448: 81-90, (2000) .
94. STOKES, P.E., HOLTZ, A.: *Clinical Therapeutics*. 19 (5), Excerpta Medica, (1997).
95. SURETTE, M.E., FONTEH, A.N., BERNATCHEZ, C., CHILTON, H.F.: Perturbations in the control of cellular arachidonic acid levels block cell growth and induce apoptosis in HL-60 cells. *Carcinogenesis*, 20: 757-763, (1999).
96. ŞAPLAKOĞLU, U., İŞCAN, M.: Sister Chromatid exchanges in human lymphocytes treated in vitro with cadmium in G<sub>0</sub> and S phase of their cell cycles. *Mutation Research*, 412: 109-114, (1998).
97. TAWN, E.J., WHITEHOUSE, C.A.: Frequencies of chromosome aberrations in a control population determined by G banding. *Mutation Research*, 490: 171-177, (2001).

98. THOMAS, P., UMEGAKI, K., FENECH, M.: Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis- block micronucleus assay. *Mutagenesis*, 18: 187-194, (2003).
99. THOMPSON, M.W., MCLNNE, R.R., WILLARD, H.F.: *Genetics in Medicine*, W. B. Saunders Company, Fifth ed., (1991).
100. TOKSİ, G., STANKOVI, M., RADOVANOVI, S., DRAGI, M.: The use of cytochalasin block (CB) micronucleus test to identify clastogenic and antiproliferative action. *Archi ve of Oncology*, 9: 47-48, (2001).
101. TOVIL, N., AKA, P.V., BUCHET, J.P., THIERENS, H., VOLDERS, M.K.: Assessment of genotoxic effects related to chronic low level exposure to ionizing radiation using biomarkers for DNA damage and repair. *Mutagenesis*, 17: 223-232, (2002).
102. TUTGUN, S.: Kadın ve erkeklerde yaşlanmayla birlikte artan Mikronükleus oranının saptanması, Yüksek Lisans tezi, Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik Bilim Dalı, Eskişehir, (1996).
103. TUTTON, M.J.P., BARKLA, H.D.: Influence of Inhibitors of Serotonin uptake on Intestinal Epithelium and Colorectal Carcinomas. *Br. J. Cancer*, 46: 260-265, (1982).
104. Türk Klinik Biyokimya Derneği: *Kanser ve Apoptosis İlişkisi*, Klinik Biyokimya ve Kanser Sempozyumu, Bursa, (2002).
105. TYLEE, A., GASTPAR, M., LEPINE, J.P., MENDLEWICZ, J.: *Depres II (Avrupa Toplumunda Depresyon Araştırması II): Toplumdaki Depresyon Semptomları, Yeti Yitimi ve Güncel Yaklaşımlarla İlgili Bir Hasta İncelemesi*. *Int. Clin. Psychopharmacol*, 14: 139-151, (1999).
106. UMEGAKI, K., FENECH, M.: Cytokinesis-block micronucleus assay in WILZ-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by

- reactive oxygen species and activated human neutrophils. *Mutagenesis*, 15: 261-269, (2000).
- 107.VERMA, R.S., BABU, A.: *Human Chromosomes Manual of Basic Techniques*, First Ed., USA, (1989).
- 108.VIAN, L., BICHET, N., GOUY, D.: The in vitro micronucleus test on isolated human lymphocytes. *Mutation Research*, 291: 93-102, (1993).
- 109.VOLDERS, M.K., ELHAJOUJİ, A., CUNDARİ, E., HUMMELEN, P.V.:The in vitro micronucleus test: a multi end point assay to defect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome brekage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutation Research*, 392: 19-30, (1997).
- 110.VOLDERS, M.K., FENECH, M.: Inclusion of micronuclei in non- divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis*, 16: 51-58, (2001).
- 111.WAKEFIELD, T., COLLS, I.: Do Antidepressants Promote Tumor Growth?. *Am J Psychiatry*, 153: 3, (1996).
- 112.WANI, M.A., ZHU, Q.Z., MAHDY, M.E., WANI, A.A.: Influence of P53 tumor suppressor protein on bias of DNA repair and apoptotic response in human cells. *Carcinogenesis*, 20: 765-772, (1999).
- 113.WURTZEL, E., *Prozac Toplumu, İletişim Yayınları, Mefkure Bayatlı, (2000).*
- 114.YÜKSEL, N. : Sitokrom p450 Enzim Sistemi ve İlaç Etkileşimleri Klinik Psikiyatri 1: 5-16, (2001).
- 115.ZAHARIA, D.M., RAVINDRAN, V.A., GRIFFITHS, J., MERALI, Z., ANISMAN, H.: Lymphocyte proliferation among major depressive and dysthymic patients with typical or atypical features. *Journal of Affective Disorder*, 58: 1-10, (2000).

## ÖZGEÇMİŞ

1967 yılında İzmir Ödemiş’de doğdu. İlk öğrenimini Antalya Barbaros ilkokulu, orta öğrenimini ise Antalya Atatürk Ortaokulu ve Antalya Lisesinde tamamladı. 1985 senesinde Ankara Orta Doğu Teknik Üniversitesinin Gıda Mühendisliği bölümünü kazandı. 1991 yılında mezun oldu. 1992 yılında Burdur Süt Fabrikasında (SEK) çalıştı. 1993 yılında Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.B.D. ‘na bağlı Tıbbi Genetik B.D.’na Araştırma Görevlisi olarak atandı. 1997 yılında Yüksek Lisans eğitimini tamamladı. Halen Tıbbi Genetik Bilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmalarına devam etmektedir. Evli ve iki çocuk annesidir.

