

**ERZİNCAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***DROSOPHILA* SOMATİK MUTASYON ve REKOMBİNASYON
TESTİ (SMART) YÖNTEMİYLE BAZI ANESTEZİK
AJANLARIN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Pakize Müge KÖKSAL

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**ERZİNCAN
2015**

Her Hakkı Saklıdır

Yrd. Doç. Dr. Mehmet GÜRBÜZEL danışmanlığında, Pakize Müge KÖKSAL tarafından hazırlanan bu çalışma 16.01.2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Salih DOĞAN

İmza: 

Üye : Doç. Dr. Ali SÜLÜN

İmza: 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mehmet GÜRBÜZEL

İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylım.


Doç. Dr. Ali SÜLÜN
Enstitü Müdürü

16.01.2015

ÖZET

Yüksek Lisans

***DROSOPHILA* SOMATİK MUTASYON ve REKOMBİNASYON TESTİ (SMART) YÖNTEMİYLE BAZI ANESTEZİK AJANLARIN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Pakize Müge KÖKSAL
Erzincan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mehmet GÜRBÜZEL

Bu çalışmada, *Drosophila* somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile günümüzde anestezi uygulamalarında sıklıkla kullanılan ketamin ve rokuronyum bromürün genotoksik etkileri araştırıldı. Bu amaçla *Drosophila melanogaster*'in *mwh/flr³* ve *mwh/TM3* genotiplerine sahip normal ve yüksek metabolik aktivasyona sahip üçüncü larva evresindeki (72±4 saatlik) trans-heterozigot larvalar kullanıldı. Kullanılan anestetik ajanların genotoksik etkileri, ergin sineklerin kanat kıllarını oluşturacak imajinal disk hücrelerinde meydana gelen ayrılmama, delesyon, kararsız translokasyon, kromozom kaybı, mutasyon, mitotik rekombinasyon sonucu oluşan genetik değişimlerin etkisiyle ortaya çıkan mutant trikomlara göre değerlendirildi. Mutant klonlar küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz, toplam *mwh* ve toplam klonlar şeklinde sınıflandırılarak kayıt altına alındı.

Çalışmada her iki anestetik ajan için normal aktivasyonlu (standart) ve yüksek aktivasyonlu olmak üzere iki çaprazlama yapıldı. Yapılan çaprazlamalar sonucu elde edilen 72±4 saatlik trans-heterozigot larvalar, ketamin ve rokuronyum bromür'ün farklı konsantrasyonları (100, 250, 500 ve 1000 µg/mL) ile muamele edildi. Ayrıca ketamin ve rokuronyum bromür distile suda çözüldüğü için distile su negatif kontrol olarak kullanıldı. Bu larvalardan gelişen ergin bireylerin kanat preparatları yapıldı ve bu preparatlar mikroskop altında incelendi.

Mikroskopik incelemelerden elde edilen verilerde, ketaminin, normal aktivasyonlu bireylerde 250 µg/mL ve üzerindeki dozlarda genellikle mitotik rekombinasyon kaynaklı genotoksisiteye neden olduğu anlaşıldı. Ancak rokuronyum bromür standart çaprazlamada herhangi bir mutajenik ve/veya rekombinojenik etki göstermediği tespit edildi. Yüksek aktivasyonlu çaprazlamada, ketamin en yüksek uygulama konsantrasyonu olan 1000 µg/mL'de, rokuronyum bromür ise 250 µg/mL konsantrasyonu dışındaki diğer konsantrasyonlarda yine özellikle mitotik rekombinasyon kaynaklı genotoksisiteye neden olduğu belirlendi.

2015, 66 sayfa

Anahtar Kelimeler: Genetik, Genetik Toksikoloji, *Drosophila melanogaster*, Anestezi, Ketamin, Rokuronyum bromür

ABSTRACT

Master of Science

**EVALUATION OF THE GENOTOXIC EFFECTS OF SOME ANESTHETIC AGENTS
USING THE SOMATIC MUTATION AND RECOMBINATION TEST IN *Drosophila
melanogaster***

Pakize Müge Köksal
Erzincan University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Mehmet GÜRBÜZEL

In this study, the somatic mutation and recombination test (SMART) was used to examine the genotoxic effects of ketamine and rocuronium bromide, which are often used in the present-day application of anesthesia. With this purpose, trans-heterozygous larvae (72 ± 4 hours) were used at the level of the third larvae with normal and high metabolic activation, including *Drosophila melanogaster*'s *mwh/flr³* and *mwh/TM3* genotypes. The genotoxic effects of the anesthetic agents that we used were evaluated according to mutant trichome, which shows genetic changes as a result of the non-disjunction, deletion, unstable translocation, chromosome loss, mutation and mitotic recombination that occur in the imaginal disc cells that make up the wing hairs of the adult flies. Mutant clones were registered by classifying them according to the categories of small single spot, large single spot, twin spots, total *mwh* spots, and total spots.

In our study, two crosses—normal activation (standard) and high activation—were carried out for both anesthetic agents. The trans-heterozygous larvae we obtained as a result of the crosses were processed with different ketamine and rocuronium bromide concentrations (100, 250, 500, and 1000 ug/mL). In addition, distilled water was used as a negative control because ketamine and rocuronium bromide dissolve in distilled water. Wing preparates of adult individuals developing from these larvae were done, and these were screened using light microscopy.

In the data that we obtained from microscope examinations, it was found that ketamine generally leads to genotoxicity as a result of mitotic recombination in the normal activation in individuals with a dose of 250 ug/mL or over. On the other hand, rocuronium bromide did not show any mutagenic or recombinogenic effects in the standard cross. In high activation crosses, ketamine (at 1,000 ug/mL, the highest implemented concentration) and rocuronium bromide (except for the 250 ug/mL concentration) again led to particular genotoxicity as a result of mitotic recombination.

2015, 66 pages

Keywords: Genetics, Genetic Toxicology, *Drosophila melanogaster*, Anesthesia, Ketamine, Rocuronium bromide

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Erzincan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde, 11.02.12 numaralı Erzincan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi'nin kısmi desteğiyle yapılmıştır.

Tez çalışmamın her aşamasında büyük bir titizlik, sabır ve özveriyle bana destek olan, bilgi ve tecrübesini paylaşan Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet Gürbüz'e, tez çalışmam esnasında yardımlarını gördüğüm, deneyim ve birikimlerinden yararlandığım değerli bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Salih Doğan'a, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda kullandığım *Drosophila melanogaster* hatlarının temininde yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Bülent Kaya (Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü) ve Sayın Prof. Dr. Rabia Sarıkaya'ya (Gazi Üniversitesi, Gazi Eğitim Fakültesi, İlköğretim Bölümü) teşekkür ederim.

Ayrıca, tez çalışmam esnasında benimle birlikte olup cesaret veren, bana inanıp maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve beni asla yalnız bırakmayan, hayatımdaki en değerli varlığım olan aileme şükranlarımı sunarım.

Pakize Müge Köksal

Ocak, 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1.Genetik Toksikoloji.....	1
1.2.Anestezi.....	2
1.2.1. Ketamin.....	5
1.2.2. Rokuronyum Bromür.....	6
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	9
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	17
3.1. Materyal.....	17
3.1.1. Kullanılan organizma ile ilgili genel bilgiler.....	17
3.1.2. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in genetik çalışmalardaki önemi.....	18
3.1.3. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in sistematığı.....	19
3.1.4. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in hayat döngüsü.....	21
3.1.5. <i>Drosophila melanogaster</i> mutant stokları ve kullanılan hatların genetik yapısı.....	22
3.1.6. Kullanılan kimyasal maddeler.....	29
3.1.7. Standart <i>Drosophila</i> besiyerinin hazırlanışı.....	29
3.1.8. Faure Çözeltisinin Hazırlanışı.....	30
3.2. Yöntem.....	31
3.2.1. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART).....	31
3.2.2. Transheterozigot larvaların elde edilmesi.....	33
3.2.3. Anestezik ilaçların larvalara uygulanması.....	33
3.2.4. Ergin bireylerin toplanması ve kanat preparatlarının hazırlanması..	34
3.2.5. Kanat preparatlarının mikroskopik analizi.....	35
3.2.6. Klon İndüksiyon Frekansının Hesaplanması.....	38
3.2.7. Verilerin Değerlendirilmesi.....	38
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	41
5. SONUÇ.....	56
KAYNAKLAR.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....	66

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

α	Alfa
Bd^S	<i>Beaded Serrate</i>
β	Beta
$^{\circ}C$	Santigrat derece
dk	Dakika
flr^3	<i>flare</i>
g	Gram
cc	Kübik santimetre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
μg	Mikrogram
<i>mwh</i>	Çoklu kanat trikomu geni
<i>TM3</i>	Dengeleyici kromozom
♂	Erkek
♀	Dişi
%	Yüzde

Kısaltmalar

ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz
CuSO ₄	Bakır sülfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
DXR	Doksorubisin

EC	Etil karbamat
EEG	Elektroensefalografi
EMS	Etil metan sülfonat
FeSO ₄	Demir sülfat
HB	Yüksek metabolik aktivite
K ₂ Cr ₂ O ₇	Potasyum dikromat
MMS	Metil metansülfonat
NMBA	Neuromuscular blocking agent
NMDA	N-methyl-D-aspartat
PCHE	Psödokolinesteraz
PDR	The Physicians' Desk Reference
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
SCE	Kardeş kromatid değişimi testi
SMART	Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi
TAM	Tamoksifen
VBL	Vinblastin
VCR	Vinkristin
VNR	Vinorelbin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Ketamin'in kimyasal yapısı	6
Şekil 1.2.	Rokuronuyum bromür'ün kimyasal yapısı	8
Şekil 3.1.	<i>Drosophila melanogaster</i> 'in hayat döngüsü	22
Şekil 3.2.	Belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki dizilişleri.....	24
Şekil 3.3.	<i>Drosophila melanogaster</i> 'de normal kanat (<i>mwh/flr³</i> genotipine ait) görünümü.....	25
Şekil 3.4.	<i>Drosophila melanogaster</i> 'de serrat kanat (<i>mwh/TM3</i> genotipine ait) görünümü.....	25
Şekil 3.5.	Mutasyon ve rekombinasyon oluşum mekanizmaları.....	27
Şekil 3.6.	<i>Drosophila</i> kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi uygulama özeti.....	28
Şekil 3.7.	Kanat bölümlerinin normal kanat üzerindeki görünümü	36
Şekil 3.8.	Kanatlardaki farklı tip trikomlar.....	36
Şekil 4.1.	Normal genetik özelliğe sahip bireyde gözlenen kanat trikomları (1)...	42
Şekil 4.2.	Normal genetik özelliğe sahip bireyde gözlenen kanat trikomları (2)...	42
Şekil 4.3.	Mutant <i>mwh/mwh</i> hattına sahip bireyde gözlenen kanat trikomları.....	43
Şekil 4.4.	Mutant küçük tek tip <i>mwh</i> klonların görünümü.....	43
Şekil 4.5.	Mutant büyük tek tip <i>mwh</i> klonların görünümü (1).....	44
Şekil 4.6.	Mutant büyük tek tip <i>mwh</i> klonların görünümü (2).....	44
Şekil 4.7.	Mutant ikiz klonların görünümü (1).....	45
Şekil 4.8.	Mutant ikiz klonların görünümü (2).....	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Faure çözeltisinin içeriği.....	30
Çizelge 3.2. Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi.....	40
Çizelge 4.1. Ketamin uygulanmasıyla normal metabolik aktivasyona sahip <i>mwh/flr³</i> ve <i>mwh/TM3 Drosophila</i> hatlarında oluşan etkiler.....	47
Çizelge 4.2. Ketamin uygulanmasıyla yüksek metabolik aktivasyona sahip <i>mwh/flr³</i> ve <i>mwh/TM3 Drosophila</i> hatlarında oluşan etkiler.....	48
Çizelge 4.3. Rokuronyum bromür uygulanmasıyla normal metabolik aktivasyona sahip <i>mwh/flr³ Drosophila</i> hattında oluşan etkiler.....	52
Çizelge 4.4. Rokuronyum bromür uygulanmasıyla yüksek metabolik aktivasyona sahip <i>mwh/flr³</i> ve <i>mwh/TM3 Drosophila</i> hatlarında oluşan etkiler.....	53

1. GİRİŞ

1.1. Genetik Toksikoloji

Günümüzde teknolojik gelişmelere paralel olarak endüstri, tarım ve hayvancılık, gıda ve tıp gibi temel alanlarda kullanılan birçok biyolojik, fiziksel ve kimyasal madde mevcuttur. Bu maddelerin sayısı ve üretim miktarı gün geçtikçe artmaktadır. Bu maddeler kullanıma sunulmadan önce ve sonra canlı organizmalardaki zararsızlık düzeyleri belirlenmektedir. Toksikoloji; biyolojik, fiziksel ve kimyasal ajanların canlı organizmalarda oluşturdukları zararlı etkileri belirleyen bir bilim dalıdır. Ayrıca toksikoloji, deneysel olarak toksik maddelerin oluşumu, mekanizması ve risk düzeylerinin belirlenmesiyle de ilgilenir. Bu bilim dalında toksik maddelerin oluşturduğu etkiler geniş bir biyolojik ve fizyolojik spektrumda incelenir. Bu etkiler tahriş gibi basit bir oluşum olabilirken, bazen de akut ve tedavi edilebilir karaciğer veya böbrek hasarı gibi kısmen daha ciddi sağlık problemlerine neden olabilir. Bazı toksik maddeler ise siroz veya karaciğer kanseri gibi çok daha ağır ve kalıcı etki göstermektedir (Robert *et al.*, 2000).

Karsinojenite, anormal hücre poliferasyonunun görülme sıklığını temsil eder. Karsinojen, yeni tümörün frekansını artıran herhangi bir kimyasal veya viral kaynaklı ajandır. Çoğu kimyasal kaynaklı karsinojen, karsinojenik etkilerinin ortaya çıkması için metabolik aktivasyona ihtiyaç duyarlar. Karsinojenik süreç, normal hücrelerin genetik materyalinde oluşan herhangi bir mutasyona yanıtıdır ve kontrolsüz hücre çoğalması ile sonuçlanır. Aniden ortaya çıkan ve hızlı bir şekilde gelişen hücre poliferasyonu, benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) tümör şeklinde sınıflandırılır. Benign tümörler metastaz oluşturmadıkları gibi bir organın belirli bir bölgesinde sınırlandırılmış bir şekilde bulunur. Bu tümörler terapötik müdahalelere cevap verebilir. Malign tümörler ise metastaz yoluyla doğrudan veya kan-lenf damarları aracılığıyla başka dokulara taşınır ve genellikle teröpotik müdahalelere

cevap vermez. Mutagenesis ise herhangi bir hücrenin genetik sekansının fiziksel, kimyasal veya biyolojik bir ajanın etkisi ile değişmesidir (Barile, 2008).

Genotoksisite yine fiziksel, kimyasal ve biyolojik bir ajan aracılığı ile somatik hücrelerde homeostatik kontrolü sağlayan genlerdeki kalıtsal değişikliklerdir. Genetik toksikoloji organizmaların kalıtım mekanizmaları üzerinde bu ajanların etkilerini inceleyen genetiğin/toksikolojinin bir alt bilim dalıdır. Kalıtsal anormallikler ya da DNA inaktivasyonu ile sonuçlanan, nükleik asitlerin yapısında değişikliklere neden olan maddelere genotoksik madde denir. Genotoksik maddeler geni oluşturan DNA'nın yapı ve bütünlüğünde değişikliklere neden olur. Genotoksik maddeler, doğrudan DNA'ya bağlandıkları gibi DNA sekansını da değiştirerek kalıcı hasarlara neden olurlar. Her genotoksik madde karsinojenik olmayabilir. Bu değişiklikler genetik anormallikler, konjenital bozukluklar veya kanser gibi oluşumlarla sonuçlanır (Barile, 2008; Brusick, 1980).

Genetik bilimindeki gelişmelere paralel olarak yeni bir bilim dalı olan genetik toksikoloji hızlı bir gelişim göstermiştir. Genetik toksikolojide kullanılmak üzere birçok test yöntemi geliştirilmiştir. Bu test yöntemleri; bakteri, bakteriyofaj, bitki, böcek ve diğer hayvanlar, *in vitro* şartlarda memeli hücresi, maya ve virüslerde geliştirilmiş ve uygulanmıştır (Ames *et al.*, 1975; Weigle, 1953; Sparow *et al.*, 1972; Graf *et al.*, 1984; Russell *et al.*, 1981; Chu and Malling, 1968; Zimmermann and Schwaier, 1967; Seidman, 1989). Müller'in (1927) *Drosophila*'da radyasyonun genetik etkisini belirlemek için yapmış olduğu çalışma, genetik toksikoloji alanında yapılan ilk değerlendirmelerden biridir. Kimyasal maddelerin genetik materyalde mutasyon oluşturup oluşturmadığını konu alan ilk çalışma, Auerbach ve ark. (1947) tarafından yapılmıştır.

1.2. Anestezi

Anestezi, herhangi bir cerrahi operasyondan önce veya sonra geri dönüşümlü olarak vücudun tümünün veya belirli bir kısmının ağrıya ve tüm dış uyarılara karşı

duyarsızlaştırılması anlamına gelmektedir. Anestezi oluşturmak için kullanılan kimyasal maddelere anestezi denilmektedir. Anesteziyoloji (Anestezi bilimi); özelleşmiş tekniklerin, donanımların, ilaçların ve bunlarla ilgili bilgilerin bir araya getirilerek oluşturulduğu bir uzmanlık alanıdır (Morgan *et al.*, 2004). 19. yüzyılın başlarından itibaren hızlı bir gelişim gösteren anestezi, başlangıçta inhalasyon yoluyla cerrahi anestezi düzeyindeyken; zamanla lokal, algoloji ve yoğun bakım anestezi düzeyine gelişim göstermiştir (Miller, 2011).

Antik medeniyetler döneminde cerrahlar ameliyatların ağrısız geçmesi için afyon haşhaşı, koka yaprakları, kankurutan kökü ve alkol gibi maddeler ve flebetomi gibi uygulamalardan yararlanmışlardır. Örnek vermek gerekirse eski Mısırlılar afyon haşhaşı (morfin) ve hyoscyamus (hyoscyamine ve skopolamin) birleşimini kullanmışlardır. Günümüzde morfin ve skopolamin, premedikasyonlarda parental olarak uygulanmaktadır. Antik çağlarda rejyonel anestezi, sinir gövdelerinin sıkıştırılması (sinir iskemisi) veya soğuk uygulaması (kriyoanaljezi) ile sağlanmaktaydı. İnkalar döneminde, cerrahlar koka yapraklarını çiğneyip tükürüklerini yaraya sürerek lokal anestezi oluşturmaya çalışmışlardır. Modern cerrahi inhalasyon anesteziği, akabinde lokal ve rejyonel anestezi ve son olarak intravenöz anestezi ile gelişim göstermiştir (Morgan *et al.*, 2004).

Eter, kloroform, nitroz oksit inhalasyon anesteziğinde kullanılan ilk maddelerdir. Ancak hastalara kloroformun uygulanmasıyla kardiyak aritmiler, solunum depresyonu ve hepatotoksite bildirimlerinin artmasıyla kloroform kullanımı zamanla sınırlanmıştır. Daha sonraki yıllarda geliştirilen ve halen daha günümüzde kullanılan inhalasyon anesteziği; etilen, etilenklorür, divinil eter, siklopropan, trikloretilen, fluroksen ve halotan, metoksifluran, enfluran ve izofluran gibi florlu hidrokarbonlardır (Morgan *et al.*, 2004).

Alexandar Wood (1855) tarafından hipodermik şırınga ve iğnenin bulunmasından sonra kloralhidrat, kloroform ve eter ile morfin ve skopolamin birleşimi intravenöz anesteziği olarak uygulanmıştır. Fischer ve von Mering (1903) tarafından barbitüratların sentezi ile dietilbarbitürik asit (barbital) intravenöz anesteziği olarak

kullanılmıştır. Tiyopental ve metoheksital sonradan geliştirilen ve intravenöz anestezi olarak kullanılan ajanlardır. Ayrıca diazepam, lorazepam ve midazolam gibi benzodiazepinler, ketamin, etomidat, propofol, diizoprofilfenol günümüzde sıklıkla kullanılan intravenöz ajanlardır (Morgan *et al.*, 2004).

Harold Griffith ve Enid Johnson (1942) kürarı kas gevşetici olarak kullanmışlar ve bu maddenin endotrakeal entübasyonunu kolaylaştırdığını ve azemi derecede kas gevşemesi sağladığını görmüşlerdir. Daha sonraki yıllarda alkuronyum, dekametonyum, gallamin, metokürin ve pankuronyum gibi nöromusküler bloke edici ajanlar kas gevşetici olarak kullanılmıştır. Nöromusküler bloke edici ajanların belirgin yan etkileri göz önüne alındığında atrakuryum, doksakuryum, pipekuronyum ve vekuronyum öne çıkmış ajanlardır. 1949'da Bovet tarafından sentezlenen süksinilkolin, endotrakeal entübasyonu kolaylaştırdığından sıklıkla kullanılan bir ajan olmuştur. Mivakuryum, çok az yan etkilere sahip olmasına karşın kısa sürede etkili nondepolarizan bir kas gevşeticidir. Ancak süksinilkolinle karşılaştırıldığında etkisi daha yavaş başlamakta ve daha uzun sürmektedir. Rokuronyum, süksinilkoline yakın etki başlama süresine sahip bir kas gevşeticidir (Morgan *et al.*, 2004).

Rapakuronyum en yeni kas gevşeticilerden olup hızlı başlama süresi, kısa etki süresine sahip ve diğer ajanlara göre daha güvenilir bir kas gevşetici olduğu düşünülmektedir. Birkaç bronkospazm nedeni ile gerçekleşen ölüm vakaları rapakuronyumun üretici firması tarafından bu ajanın piyasadan geri çekilmesine neden olmuştur (Morgan *et al.*, 2004).

Sertürner (1805) tarafından afyondan elde edilen morfin intravenöz anestezi olarak kullanılmış, ancak yüksek dozlarda morbidite ve mortaliteye neden olması anestezi işlemlerde opioidlerden ziyade inhalasyon anesteziplerinin kullanımını yaygınlaştırmıştır. Buna rağmen 1939'da meperidinin sentezlenmesiyle opioidler yeniden anestezi olarak kullanılmıştır. Lowenstein (1969) tam anestezinin gerçekleşmesi için yüksek dozda opioid kullanımını öne sürmüştür. Bu amaçla başta morfin, daha sonra alfentanilin, fentalin ve sufentanil kullanılmıştır. Remifentanil en yeni nesil opioidlerden biridir (Morgan *et al.*, 2004).

1.2.1. Ketamin

NMDA (N-methyl-D-aspartat) reseptörlerinin bir nonkompetitif antagonisti olan ketamin, dissosiyatif anestezi bir ajandır.

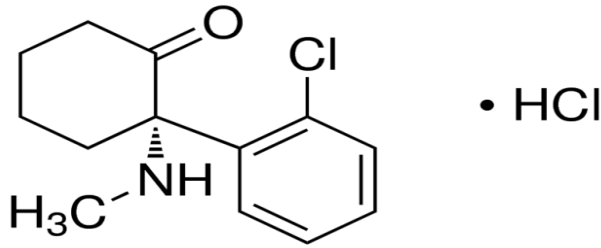
Bu ajanın dissosiyatif anestezi özelliği merkezi sinir sisteminde jeneralize depresyona değil elektroensefalografide (EEG) talamokortikal ve limbik sistem arasında dissosiyatif etki oluşturmaktan dolayıdır (Keçik, 2013). Yapı olarak fensiklidine benzeyen bu madde, arylcyclohexylamine ailesinin bir üyesidir. Stevens tarafından geliştirilen bu ilaç 1970'li yıllardan beri sedatif, anestezi ve analjezik özelliği nedeniyle klinik çalışmalarda kullanılmaktadır (Schmid *et al.*, 1999). Bu maddenin kuvvetli analjezik etkisi, ayrıca solunum ve kardiyovasküler sistemi baskılamamasından dolayı diğer indükleyici ajanlardan farklıdır. Merkezi sinir sisteminde sempatik aktiviteyi etkileyerek kardiyovasküler sistemini uyarır ve bu kan basıncı kalp hızı ve kardiyak debide artışla sonuçlanır. Bu nedenden dolayı ketamin; hipertansiyon, iskemik kalp hastalığı veya kalp rahatsızlığı veya kardiyak dekompanzasyonu ve vasküler anevrizmalı hastalarda genellikle kullanılmaz (Keçik, 2013).

Ketamin ayrıca muskarinik, nikotinik, opioid reseptörler ve voltaj bağımlı sodyum kanalları ve L-tipi kalsiyum kanalları ile etkileşime geçer (Jensen *et al.*, 2008; Keçik, 2013). Bu madde sinir sisteminde nöronların sodyum kanalları ile etkileşime girmesi sonucu az miktarda lokal anestezi etki meydana getirir. Ayrıca kalsiyum kanallarını bloke ederek serebral vazodilatasyon oluşturur (Keçik, 2013).

İlk çalışmalar ketaminin kanser ağrısı, nöropatik ağrı, orofikal ağrı, kompleks bölge ağrı sendromu ve fantom uzuv ağrısı gibi değişik ağrıları düşürdüğünü göstermiştir (Eide *et al.*, 1995; Mathisen *et al.*, 1995; Mercadante *et al.*, 2000; Okon, 2007; Eichenberger *et al.*, 2008; Kiefer *et al.*, 2008). Ayrıca ketaminin antidepresif etkileri rapor edilmiştir (Berman *et al.*, 2000). Ketamin reaksiyonel ilaç olarak illegal olarak kullanılır ve Schedule II'de narkotik olarak listelenir (Jansen and Darracot-Cankovic,

2000; Lim, 2003; Moore *et al.*, 2001). Ketamin; amnezi, yargılama bozukluğu ve dissosiyatif bozukluklara neden olmaktadır (Hsu *et al.*, 2009). Ketamin, karaciğerde demetilasyon ve hidrosilasyon yoluyla metabolize edilerek idrarla vücuttan atılır. Bu madde demetilasyon ile norketamine dönüştürülür. Norketamin, ketamine göre %20-30 oranında etkiye sahiptir (Keçik, 2013).

Diğer anestezi ajanlarından farklı olarak tek doz ketamin uygulanmış hasta kataleptik bir görünüme sahip olur. Hasta amnestiktir ve derin bir aneljezik etki altındadır. Hastanın gözleri açık, pupiller orta derecede geniş istemsiz göz hareketleri mevcut, gözyaşı ve tükürük salgısı yaygındır. İskelet kasının kasılmasıyla bacak, baş, gövde ve kol hareketleri görülür. Oluşan bu anestezi etkiye dissosiyatif anestezi denir (Keçik, 2013).



Şekil 1.1. Ketamin'in kimyasal yapısı

1.2.2. Rokuronyum Bromür

Rokuronyum bromür (Rocuronium bromide - Esmeron) bir nöromusküler bloke edici, yani kas gevşeticidir (neuromuscular blocking agent – NMBA). Genel anestezide sıklıkla kullanılan kas gevşeticiler; bilinçsizlik, amnezi ve aneljezi oluşturmadıklarından dolayı genellikle tek başlarına kullanılmaz (Keçik, 2013). Nöromusküler bloke edici ilaçlar, operasyon esnasında kas gevşeticisi olarak kasların hareketini engeller ve uzun süren kompleks operasyonlarda solunum

fonksiyonlarının sürdürülmesini sağlar. Ayrıca sedasyon ve analjezinin yetersiz olduğu durumlarda mekanik ventilasyonu kolaylaştırır (Hunter, 1995).

Nondepolarizan kas gevşeticiler, asetilkolinin (ACh) kompetitif antagonisti olarak, postsinaptik ve presinaptik reseptörlere bağlanmak için ACh ile yarışır. Alfa alt birimine geri dönüşümlü bir biçimde bağlanırlar. Reseptörde bir değişiklik olmadan iyon kanalının açılmaması sağlanır ve böylece depolarizasyon gerçekleşmez. Kas gevşeticinin miktarı artırıldığında reseptörlerin ACh ile aktive olma olasılığı azalacağından depolarize olmayacak duruma gelir. Böylelikle nondepolarizan blok gelişir. Bloğun ortadan kalkması için, ilaç miktarının azalması ya da ACh miktarının artması gerekir. ACh miktarının artması için, kendisini yıkan enzim olan asetilkolinesterazın inhibe edilmesi gerekir (Keçik, 2013). Nondepolarizan kas gevşeticiler genel olarak asetilkolinesteraz veya psödokolinesteraz enzimleri ile tam metabolize edilmezler. Bu ajanların oluşturdukları blokların ortadan kalkması için, asetilkolinesterazın inhibe edilmesini sağlayan ajanların kullanılmasının yanında; redistribüsyon, maddenin zamanla metabolize olması ve vücuttan atılması gerekmektedir (Morgan *et al.*, 2004).

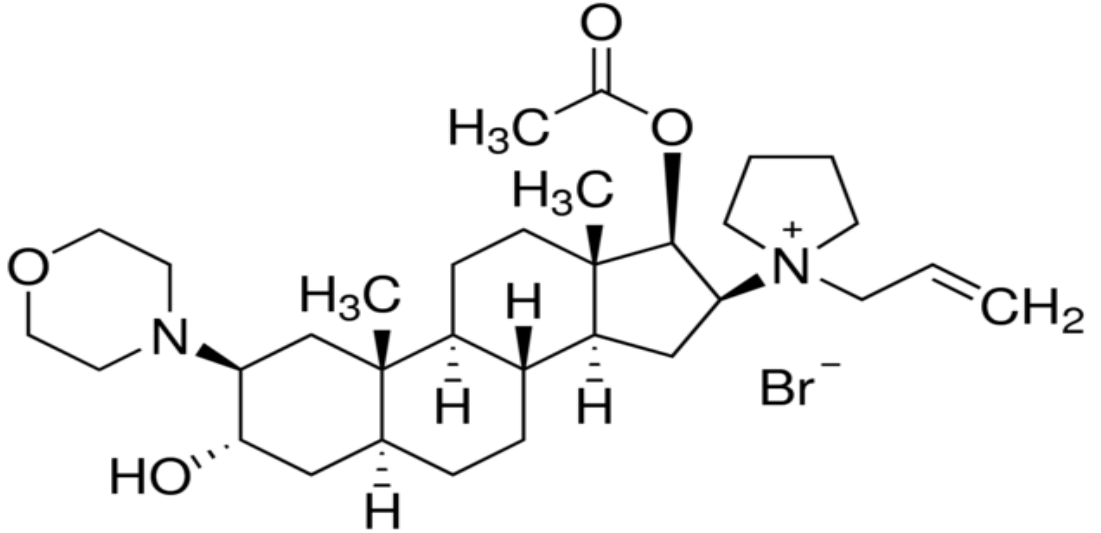
Depolarizan kas gevşeticiler ise ACh reseptörlerine bağlanarak kanalların açılmasını sağlar ve böylece depolarizasyon gerçekleşir. Bu ajanların temel işlevi reseptöre bağlı kalarak, reseptörün uyarılara cevap vermemesini sağlamaktır. Depolarizan kas gevşeticiler bifazik etki göstererek, önce kontraksiyon oluşturur, daha sonra ise etki süresine göre bir gevşemeye neden olur (Keçik, 2013).

Depolarizasyon kas gevşeticileri asetilkolinesteraz (AChE) tarafından metabolize edilmedikleri için, sinir kas kavşağından difüzyon yoluyla uzaklaştırılır ve karaciğer ve plazmada psödokolinesteraz (PCHE) enzimi ile hidrolize edilir (Morgan *et al.*, 2004).

Rokuronyum, yaygın bir şekilde ameliyat öncesinde nondepolarizan kas gevşeticisi olarak kullanılmaktadır (Suy *et al.*, 2007). Moleküler yapısı vekuronyum ile benzerlik gösterir ve diğer kas gevşeticilerle karşılaştırıldığında etkinin hızlı bir

şekilde ortaya çıkması ve düşük etki süresine sahiptir (Xue *et al.*, 1998). Bu ajan yüksek dozlarda bile uygulandığında kardiyovasküler yan etkiler göstermez, histamin salınımını indüklemez veya histamin salınımını uyarmaz (Keçik, 2013).

Rokuronyum; metabolize olmadan, karaciğer ve böbreklerden elemine edilir. Karaciğer yetmezliği olan hastalarda, karaciğer kütlesi azalmış olan yaşlılarda ve hamilelerde bu ajanın etki süresinin uzadığı bilinmektedir. Aktif metabolitlerinin bulunmamasından dolayı rokuronyum, uzun süreli infüzyonlar için vekuronyuma göre daha avantajlı olabilir (Morgan *et al.*, 2004).



Şekil 1.2. Rokuronyum bromür'ün kimyasal yapısı

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Drosophila melanogaster, son yüzyılda gerek genetik gerekse de genetik toksikoloji çalışmalarında sıklıkla kullanılan model organizmalardan birisidir. *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (Wing spot test) bu organizma kullanılarak ve daha önce bu organizmanın belirlenmiş özellikleri göz önüne alınarak Graf ve ark. (1984) tarafından geliştirilmiştir. Bu test yöntemi kullanılarak günümüze kadar birçok maddenin genotoksik (mutajenik ve/veya rekombinojenik) veya antigenotoksik etkileri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar bu test yönteminin mikroorganizmal *in vitro* ve memeli *in vivo* genotoksisite testleri arasında bir bağlantı yani bir köprü görevi gördüğü bildirilmiştir (Frei and Würzler, 1996).

Günümüzde uygulanan başta tek hücre jel elektroforezi (Commet Assay), ames, kromozom anormallikleri, kardeş kromatid testi ve mikronükleus test yöntemleri olmak üzere birçok genotoksisite testi olmasına rağmen, herhangi bir maddenin antigenotoksik etkilerini belirlemek için kullanılan çok az test yöntemi mevcuttur (Karekar *et al.*, 2000). *Drosophila* kanat SMART yöntemi maddelerin antigenotoksik etkilerini belirlemede kullanılan başarılı bir test sistemidir (Graf *et al.*, 1998).

1984 yılından itibaren *Drosophila* kanat SMART yöntemi kullanılarak zirai mücadelede kullanılan ajanlar, gıda, tekstil ve mobilya sanayi gibi güncel uygulamalarda kullanılan kimyasal maddeler, sanayi ve çevresel atıklar ve tıbbi ilaçlar gibi maddelerin genotoksisitelerini belirlemek için yapılan birçok çalışma mevcuttur. Çoğunluğu 2000 yılından sonra yapılan bu çalışmaların bazıları aşağıda derlenmiştir:

Kaya ve ark. (2000) yapmış oldukları çalışmada dört farklı herbisit (propanil, maleik hidrazid, 2,4,5-triklorofenoksi asetik asid (2,4,5-T) ve glifosat) genotoksik etkisini belirlemeye çalışmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre Maleik hidrazid ve glifosat göre standart çaprazlamada diğer iki herbisite, propanil ise yüksek

aktivasyonlu çaprazlamada diğer  herbisite göre daha fazla genotoksik etki göstermiştir. 2,4,5-T ise sadece standart çaprazlamada kk tek tip klon artışına neden olmuştur.

Kaya ve ark. (2000) başka bir çalışmada, yine farklı beş herbisitini (amitrol, metribuzin, prometrin, terbutrin ve dikuat dibromid) genotoksisitesini belirlemeye çalışmışlardır. Elde edilen sonuçlarda sadece amitrole standart çaprazlamada hem *mwh/flr*³ hem de *mwh/TM3* genotiplerinde klon oluşumunu indüklemiştir. Böylece SMART yöntemi kullanılarak amitroln hem mutajenik hem de rekombinojenik özelliklerinin varlığı belirlenmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada 4 farklı kimyasal maddenin genotoksik etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Potasyum kromat ve siklofosfamid hem standart hem de yüksek aktivasyonlu çaprazlamada genotoksik etki gösterirken, *p*-dimethylaminoazobenzene standart çaprazlamada genotoksisite açısından negatif, yüksek aktivasyonlu çaprazlamada ise pozitif etki göstermiştir. 9,10-Dimethylantracene yüksek aktivasyonlu çaprazlamada zayıf pozitif etki göstermiştir. Çalışmalardaki sonuçlar dört maddenin de rekombinojenik etkilerinin olduğunu göstermiştir (Span *et al.*, 2001).

Başka bir çalışmada dört farklı herbisitini (bentazon, molinat, tiobenkarb ve trifluralin) genotoksik aktiviteleri belirlenmeye çalışılmıştır. Bentazon her ne kadar diğer çalışmalarda mutajenik etki göstermemişse de, yüksek aktivasyonlu çaprazlamada pozitif sonuçlar vermiştir. Molinat ve trifluralin her iki çaprazlamada da pozitif etki gösterirken; tiobenkarb sadece standart çaprazlamada yüksek konsantrasyonlarda genotoksik etki göstermiştir (Kaya *et al.*, 2004).

Farklı bir çalışmada  farklı antiseptik gargaranın genotoksik etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre perigard ve plax hem standart hem de yüksek aktivasyonlu çaprazlamada negatif sonuçlar verirken; cepacol özellikle mitotik rekombinasyonun indüksiyonu ile her iki çaprazlamada da genotoksik etki göstermiştir (Rodrigues *et al.*, 2007).

Yemeklik yağlar üzerine yapılmış bir çalışmada; keten yağı kuvvetli olmak üzere, susam, buğday tohumu ve soya yağları genotoksik etkiler göstermiştir. Ayçiçeği ve düşük dereceli zeytinyağı anlamsız sonuçlar verirken, süzme zeytinyağı açık bir şekilde negatif sonuçlar vermiştir. Araştırmacılar yağlarda gözlenen genotoksik etkinin yağ asidi birleşiklerinden kaynaklanıyor olabileceğini belirtmişlerdir (Rojas-Molina *et al.*, 2005).

Sarıkaya ve Çakır (2005) gıda koruyucusu olarak kullanılan sodyum nitrit, potasyum nitrit, sodyum nitrat ve potasyum nitrat'ın genotoksik etkilerini araştırmış ve elde ettikleri sonuçlara göre bu maddeler genotoksik ve toksik etki göstermiştir. Bu maddeler beraber uygulandığında toplam klon frekansının arttığını gözlemişlerdir.

Carmona ve ark. (2008) iki civa birleşiminin (civa klorür ve metil civa klorür) SMART yöntemi kullanarak mutajenik ve rekombinojenik etkilerini belirlemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre her iki birleşik de herhangi bir genotoksik etki göstermemiştir.

Benzil türevleri gıda ürünlerinde koruyucu ve tatlandırıcı olarak kullanıldığı gibi ilaç, kozmetik, kimya sanayinde sıklıkla kullanılan birleşiklerdir. Yapılan bir çalışmada SMART yöntemi kullanılarak dört farklı benzil türevinin (benzaldehit, benzil asetat, benzil alkol ve benzoik asit) genotoksitesileri araştırılmıştır. Bu maddeler genotoksik etki göstermiştir ve indüklenen etkinin derecesine göre sıralama benzaldehit, benzil asetat, benzil alkol ve benzoik asit şeklinde gerçekleşmiştir (Demir *et al.*, 2008).

Meme kanserinde kullanılan bir anti-östrojen olan tamoksifen (TAM), standart çaprazlamada zayıf genotoksik etki gösterirken, yüksek aktivasyonlu çaprazlamada ise negatif sonuçlar vermiştir (Heres-Pulido *et al.*, 2004).

Başka bir çalışmada iki farklı kemoterapik ajanın (dosetaksiel ve paklitaksiel) genotoksitesi standart ve yüksek aktivasyon çalışmaları kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Dosetaksiel standart çaprazlamada genotoksik etki gösterirken; yüksek

aktivasyonlu çaprazlamada sitokrom P450 enzimlerinin detoksifikasyon kapasitesine bağlı olarak herhangi bir genotoksik etki göstermemiştir. Paklitaksel her iki çaprazlamada da herhangi bir genotoksik etki göstermemiştir (Cunha *et al.*, 2001).

Farklı bir çalışmada dolmalık biber (*Capsicum annuum*) ve karabiberin (*Piper nigrum*) metil metansülfonat (MMS) ve etil karbamat'ın (EC) oluşturmuş olduğu genotoksositeye karşı antigenotoksik etkileri araştırılmıştır. Çalışmadan çıkarılan sonuçlara göre, dolmalık biber her iki ajanın oluşturmuş oldukları mutasyonları indirgerken, karabiber sadece EC'ye karşı etki göstermiştir (Hamms *et al.*, 2003).

Kanser tedavisinde kullanılan antineoplastik vinka alkaloidleri olan vinkristin (VCR), vinblastin (VBL) and vinorelbin (VNR) SMART yöntemi kullanılarak mutajenik ve rekombinojenik etkiler göstermiştir (Tiburi *et al.*, 2002).

Gürbüz el ve ark. (2012) iki antidepresanın (sitalopram ve sertralin) genotoksik etkilerini belirlemek için yapmış oldukları çalışmada, sitalopramın normal aktivasyonlu bireylerde, hem *mwh/flr³* hem de *mwh/TM3* genotipinde klon oluşumuna neden olduğunu böylece bu maddenin rekombinojenik ve mutajenik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Sertralin ise *mwh/flr³* genotipinde klon artışında doza bağlı olmayan bir artışa neden olduğunu, bu durum her ne kadar somatik rekombinasyonun varlığına işaret olsa da, yeterli bir çıkarım olmadığı sonucuna varmışlardır (Gürbüz el *et al.*, 2012).

SMART yöntemi kullanılarak yapılan başka bir çalışmada bakır sülfat (CuSO₄) mutajenik ve rekombinojenik etki gösterirken, demir sülfat (FeSO₄) sadece somatik rekombinasyona neden olarak klon oluşumunu tetiklemiştir (Gürbüz el ve Kızılet, 2010).

Yapılan başka bir çalışmada iki antidiyabetik ajanın (glimepiride ve glipizide) genotoksik etkileri araştırılmış ve elde edilen bulgularda her iki ajanın da özellikle mitotik rekombinasyon oluşturarak, genotoksik etki gösterdikleri görülmüştür (Gürbüz el *et al.*, 2012).

Bunun yanında yine bu test yöntemi kullanılarak başta bitkisel kaynaklı maddeler olmak üzere birçok maddenin de muhtemel antigenotoksik etkileri araştırılmıştır.

Yapılan bir çalışmada antioksidan özellikleri bilinen E vitamini, kafeik asit ve glutatyon aflatoksin B₁'in oluşturmuş olduğu mutajenik etkiyi giderip gidermedikleri araştırılmış ve kafeik asit ve glutatyonun bu maddenin oluşturmuş olduğu mutajeniteyi gidermede etkili olduğu görülmüştür (Karekar *et al.*, 2000).

Kaya ve ark. (2002) yapmış oldukları çalışmada askorbik asid'in antigenotoksik etkisini belirlemeye çalışmışlardır. Askorbik asit tek başına uygulandığında mutant klon frekansında bir artışa neden olmazken; potasyum dikromat (K₂Cr₂O₇) ile beraber uygulandığında bu maddenin indüklediği klon indüksiyon frekansının düştüğü gözlenmiştir.

Rizki ve ark. (2001) yapmış oldukları çalışmada sodyum selenitin antigenotoksik etkilerini araştırmışlardır ve bu maddenin potasyum dikromat'ın oluşturmuş olduğu genotoksik etkiyi giderdiğini göstermişlerdir.

Bitkilerden elde edilen antioksidan maddelerin mutajenik, karsinojenik ve rekombinojenik aktiviteleri engellediği bilinmektedir. Patenkovic ve ark. (2009) yapmış oldukları çalışmada adaçayının (*Salvia officinalis*) kuvvetli bir genotoksik madde olan metil metansülfonatın (MMS) indüksiyonu ile oluşan genotoksisiteyi giderdiğini göstermişlerdir.

Bir çalışmada dünya genelinde sıklıkla tüketilen altı bitkisel çayın antigenotoksiteleri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla genotoksik ve oksidatif özellikleri bilinen hidrojen peroksit kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar bu bitkilerin hidrojen peroksit'e ait olan klon indüksiyon frekansını büyük ölçüde düşürdüğünü göstermiştir. Araştırmacılar bu bitkilerin antigenotoksik etkisinin hidrojen peroksitin ürettiği reaktif oksijen radikalleri için iyi bir süpürücü olan fenolik içeriklerinden kaynaklandığını belirtmişlerdir (Romero-Jiménez *et al.*, 2005).

Doksorubisin (DXR) serbest radikal oluşumuna neden olan kemoterapide kullanılan bir ajandır. Yapılan bir çalışmada antioksidan özelliklere sahip vitaminler (C, E ve β -karoten) ve bakır, çinko ve selenyum içeren Vitergan® Zinc Plus birlikte uygulanarak genotoksik etkileri Doksorubisin etkisine karşı antigenotoksik etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre Doksorubisinin genotoksik etkisinin büyük ölçüde giderildiği görülmüştür (Costa and Nepomuceno, 2006).

Ketamin, özellikle pediatrik anesteziye sıklıkla kullanılan anestezi ve analjezik etkileri bilinen bir ajandır. Midede metabolize edildiğinde nitrozo bileşiklerini oluşturduğundan ve bu bileşiklerin toksik ve genotoksik etkileri bilindiğinden dolayı, genel olarak enjeksiyonla uygulanan bir analjezik ve anestezi ajandır (Toyama *et al.*, 2006). Dünyanın hemen hemen her yerinde keyif verici madde olarak da alınan ketaminin genotoksik etkisini belirleyen az sayıda çalışma mevcuttur ve bunlar araştırma bulguları kısmında işlenmiştir (Pal *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2011; Ramo *et al.*, 2010; Bruno *et al.*, 2012; Morgan and Curran, 2012). Literatür incelendiğinde ketaminin, başta beyin hücreleri olmak üzere, apoptotik etkisinin belirlenmeye çalışıldığı görülmektedir. Bunlardan bazıları aşağıda verilmiştir:

Young ve ark. (2005) yapmış oldukları çalışmada, düşük oranda ketamin uygulanan gelişim gösteren yavru farelerde, beyin hücrelerinde apoptosis oluşumu gözlenmiştir.

Wang ve ark. (2005) rat ön beyin hücre kültüründe yaptıkları çalışmada, ketaminin önemli derecede DNA parçalanmasına ve apoptosize neden olduğunu, nörotoksik dozda Bax ve NR1 protein seviyelerinin arttığını gözlemişlerdir.

Başka bir çalışmada ise ketaminin gelişmekte olan maymun beyin frontal korteksinde önemli derecede hücre ölümüne neden olduğu görülmüştür (Zou *et al.*, 2009).

Yapılan bir çalışmada ketaminin etkileri insan üroepitelial hücreleri olan VHUC-1 hücre kültürü kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla hücreler ketaminin değişik konsantrasyonlarıyla muamele edilmiş ve oluşan apoptosis gözlenmiştir.

Ayrıca Bax, Bcl-2, pro-kaspaz-3 ve bölünmüş kaspaz-3 seviyeleri western blotlama tekniği yardımıyla belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, ketaminin apoptosise neden olduğu görülmüştür. Ayrıca Bax ekspresyonu artarken, Bcl-2 ekspresyonu azalmıştır. Bax/Bcl-2 oranı önemli derecede artmıştır. Pro-kaspaz-3 protein seviyesi düşerken, bölünmüş kaspaz-3 seviyesi kontrol grubuna göre önemli derecede artmıştır. Bu sonuçlar ketaminin beyin hücrelerinde olduğu gibi, üroepitelial hücrelerinde de apoptosise neden olduğunu göstermektedir (Liang *et al.*, 2014).

Kunming farelerinin oosit hücreleri ve erken embriyoları üzerinde yapılan bir çalışmada, ketaminin anormal oosit, blastosit ve morula oluşumuna neden olduğu ve ovülasyonun olumsuz biçimde etkilendiği görülmüştür (Zhou *et al.*, 2008).

Rokuronyum bromide (Esmeron), genel anestezi uygulamalarında iskelet kası gevşemesini ve endotrakeal entübasyonu sağlamak için sıklıkla kullanılan bir kas gevşeticidir. Böylece vücut boşluklarındaki operasyonlar kas hareketi olmaksızın gerçekleştirilir. Ayrıca uzun süren kompleks operasyonlarda solunum fonksiyonlarının sağlanmasında etkilidir. Bu ajanın sedasyon ve aneljezinin yetersiz olduğu durumlarda mekanik ventilasyonun uygulanmasını kolaylaştırdığı da bilinmektedir (Hunter, 1995). Rokuronyumun genotoksisitesini belirlemek amacıyla yapılmış olan çok nadir çalışma mevcuttur ve bu çalışmaların çoğu araştırma bulguları kısmında verilmiştir.

The Physicians' Desk Reference (PDR) çeşitli ilaçların monografilerini içeren ve yıllık olarak güncellenen bir yayımdır. Bu yayımda rokuronyumun Ames, *in vivo* ve *in vitro* sitogenetik test çalışmalarında genotoksisite açısından negatif sonuçlar verdiği belirtilmiştir (Synder and Green , 2001; Synder *et al.*, 2004; Synder, 2009).

Karabulut ve ark. (2004) yapmış oldukları çalışmada, nondepolarizan kas gevşeticisi ajanların rat embriyoları üzerindeki embriyonik gelişime etkilerini araştırmışlardır. Elde edilen sonuçlar, bu ajanların kliniksel dozdan daha yukarı derecelerinin doza bağlı olarak rat embriyolarında toksik etkilere neden olduğunu, ancak yine de

rokuronyum ve mivakuryumun diğer ajanlara gore organogenez esnasında toksisite açısından daha düşük potansiyele sahip olduğu seklindedir.

Farklı bir *in vitro* alışmada, 3 farklı nondepolarizan kas gevşetici ajanın (atrakuryum, sisatrakuryum ve mivakuryum) hepatom HepG2 ve insan gobek veni endotel hucresinin poliferasyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgulara gore, atrakuryum ve sisatrakuryum insan huce hatlarının poliferasyonunu engellerken; mivakuryum bu etkiyi gostermemiştir. Atrakuryum ve sisatrakuryumun gosterdiği bu etki reaktif akrilat metabolitlerinden kaynaklandığı düşnlmektedir (Amann *et al.*, 2001). Rieder ve ark. (2005) yapmış oldukları çalışma ile sisatrakuryumun metabolik ürünleri olan akrilat esterlerin oksidatif strese neden olduğunu ve boyece apoptosis oluşumunu teşvik ettiğini doğrulamıştır.

Literatürü incelediğimizde ketamin ve rokuronyum bromürün toksik etkilerini belirlemek amacıyla yapılmış birçok çalışma mevcut iken; her iki ajanın genotoksik etkilerinin belirlenmesi için yapılmış çok az çalışma mevcuttur. Anestezik ajanlar, sağlık sektrnde sıklıkla kullanılan kimyasal maddelerdir. Bu maddelerin insan sağlığı açısından toksik/genotoksik etkilerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada, genotoksik etkileri tam olarak bilinmeyen ve sağlık sektrnde sıklıkla kullanılan ketamin ve rokuronyum bromürün, olası mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan organizma ile ilgili genel bilgiler

Drosophila melanogaster; Diptera takımına ait, tam başkalaşım (holometabol başkalaşım) geçiren ve halk arasında meyve sineği veya sirke sineği olarak da adlandırılan ökaryotik bir canlıdır (Çakır ve Sarıkaya, 2004; Gürbüz, 2011). Bu organizma, sahip olduğu birçok avantajla genetik çalışmalarda sık sık kullanılır. Kültürünün kolay yapılması, deney hayvanları için optimum sıcaklık olan 21⁰C’de yumurtanın ergin bireye kadar iki hafta gibi kısa sürede erişmesi, hızlı üremesi, dev kromozomlara sahip olması ve ihtiyaç duyduğu besin maddelerinin ucuzluğu bu avantajlardan bazılarıdır (Flagg, 2005). Bu organizma ilk olarak 1910 yılında, Amerikalı bir araştırmacı “Thomas Hunt Morgan” tarafından genetik çalışmalarda kullanılmaya başlanmış olup, günümüzde genetik alanında sıklıkla kullanılan organizmalardan biridir. Kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART); Graf ve ark. (1984) tarafından fiziksel, kimyasal ve biyolojik maddelerin mutajenik ve rekombinojenik etkilerini belirlemek amacıyla geliştirilmiştir. Bu test yöntemi kullanılarak yapılan ilk çalışmada; aflatoksin B1, bleomisin, etil metan sülfonat (EMS) gibi maddelerin genotoksitesisi SMART kullanılarak belirlenmiş ve bu test yönteminin güvenilirliği ispatlanmaya çalışılmıştır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda *D. melanogaster*’in insan hastalıklarının araştırılmasında önemli bir model olabileceği düşünülmektedir. *D. melanogaster* genomunun sekanslarının belirlenmesinden sonra, insanlardaki genetiksel hastalıklarla ilişkilendirilen genlerin %60’ından fazlasının *D. melanogaster* genomunda ortolog gen olarak benzer sekanslarla bulunduğu görülmüştür. Amplifikasyon, delesyon veya mutasyon sonucu dizilişi değişen ve insan hastalıklarıyla ilişkilendirilen 287 genin 178’inin (%62) ortolog geni *D. melanogaster*’de bulunmaktadır. Bu genler kanser, nörolojik rahatsızlıklar, malformasyon sendromları, metabolizma bozuklukları ve renal hastalıklarla ilgili

genlerdir (Bernards and Hariharan, 2001). *D. melanogaster* ve insan genom sekanslarındaki bu benzerlikler sonucu, insan genetiksel hastalıklarının veri tabanı olan “Online Mendelian Inheritance in Man” (OMIM)’dan derlenen ve hastalığa neden olan bir genin, *D. melanogaster* genomik sekansı ile karşılaştırılmasıyla bu gen hakkında bilgi edinmeyi amaçlayan “homophila” bir veritabanı kurulmuştur (Chien *et al.*, 2002).

3.1.2. *Drosophila melanogaster*’in genetik çalışmalardaki önemi

1. Genetik çalışmalarda kullanılacak olan organizma, sahip olduğu özellikler bakımından varyasyon (farklılık) göstermelidir. Organizma ilgilenilen özellik bakımından ne kadar farklı varyasyon gösterirse ve bu varyasyonlar kolay bir şekilde birbirinden ayırt edilebiliyorsa bu organizmanın genetik çalışmalar için uygun model olduğuna işaret etmektedir. *D. melanogaster* birçok doğal ya da yapay varyasyona sahip bir organizmadır. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testleri bu organizmanın farklı göz, kanat ve kıl tiplerini temel almaktadır.
2. İlgilenilen özelliklerin nasıl kalıtıldığını gözlemlemek için, ebeveynlerde dağılmış olan özelliklerin bir bireyde (yavruda) bir araya gelmesi (rekombinasyon) ya da bir arada olanların daha sonraki nesillerde birbirinden ayrılması gerekir. Rekombinasyon, eşeyli üreme aracılığıyla ebeveynlere ait gametlerin birleşmesi ile gerçekleşir. Çalışmamızda kullandığımız *D. melanogaster* eşeyli üreme göstermektedir.
3. Kontrollü çaprazlama, araştırmacının gözetimi altında istenilen özellikleri taşıyan organizmaların çaprazlanmasıdır. Uygulamalar esnasında araştırmacı, koşullardan birisini değişken, diğerlerini sabit tutarak deney ve kontrol grupları oluşturur ve bu şekilde hedef özelliklerin nesiller boyu nasıl aktarıldığı gözlemlenir. *D. melanogaster*, kontrollü çaprazlama yapılabilen en ideal canlılardan biridir.

4. İlgilenilen özelliklerin ebeveynlerden yavrulara nasıl aktarıldığını gözlemleyebilmek için, genetiksel çalışmalarda kullanılan canlının hayat döngüsünün kısa olması gerekir. *Drosophila melanogaster*'de hayat devri çok kısadır. $25^{\circ}\text{C}\pm 1$ ortam sıcaklığında yaklaşık 9-10 günde erginleşen birey, yeniden üremeye başlamaktadır.
5. Genetik çalışmalarda kullanılacak organizma, çok fazla sayıda yavru verebilmelidir. Böylece kalıtımla ilgili daha sağlıklı ve güvenilir bilgi edinilebilir. Dişi bir *Drosophila melanogaster*, günde takriben 50 yumurta vermektedir (Bahçeci, 2010).
6. Ayrıca *Drosophila*, deney hayvanı olarak seçilen organizmada olması gereken diğer birçok avantaja da sahiptir. Kolay yetiştirilmesi ve yaşamını sürdürmesi için gerekli olan besin, kimyasal madde ve saf malzemenin temin edilebilirliği ve ucuz olması da önemlidir. Ayrıca bu organizma herhangi bir uygulamadan önce eterle kolay bir şekilde bayıltılarak, üzerinde istenilen işlemler yapılabilmektedir.

3.1.3. *Drosophila melanogaster*'in sistematigi

Phylum (Şube): Arthropoda (Eklembacaklılar). Eklembacaklılarda vücut ilkel bir baş (acron), değişik sayıda segmentlerden meydana gelen bir gövde ve kuyruk (pijidyum) kısımlarından meydana gelir. Vücudun her segmenti bir çift üye taşır. Bu şubenin üyeleri birbirine ve vücuda eklemli bir biçimde bağlanan parçalardan meydana geldiği için eklembacaklı olarak isimlendirilmiştir. Epidermis tarafından salgılanan kitinli bir dış iskelete sahiptir.

Subphylum (Alt Şube): Mandibulata. Bu alt şubenin üyeleri besinleri çiğnemek için başın üçüncü segmenti üzerindeki eklemli üyelere sahiptir. Bir veya iki çift antenleri bulunmaktadır.

Superclassis (Üst Sınıf): Hexapoda - Insecta (Altı bacaklılar - Böcekler). Böcekler, altı bacaklı eklembacaklılar olup hayvanlar aleminin en zengin gurubunu oluştururlar. Vücut; baş (cephalon), göğüs (thoraks) ve karın (abdomen) olmak üzere üç bölümden oluşmuştur. Vücutları embriyo döneminde 20 segmentli olup, ergin böcekte altı tanesi kaynaşmak suretiyle baş kapsülünü, üç tanesi göğüs bölgesini, geri kalan 11 segment ise karın bölgesini oluşturur. Başta bir çift birleşik göz ve hareket yeteneğine sahip olan bir çift anten bulunur. Göğüs segmentlerinin her biri bir çift bacak taşır.

Classis (Sınıf): Pterygota (Kanatlı böcekler). Genel olarak kanatlı böcekleri içerir.

Ordo (Takım): Diptera (İkikanatlılar). Göğüs bölgesinden çıkan bir çift kanadı bulunan bu takım, arka kanatlarının halter adı verilen tokmak şeklinde bir denge organı dönüşmesiyle diğer böceklerden rahatlıkla ayırt edilebilir.

Subordo (Alt Takım): Brachycera (Kısa antenliler). Farklı büyüklüklerde olan 3 segmentten oluşan antenleri bulunmaktadır. En büyük segment üçüncü segmenttir ve bu segment arista adı verilen kıl şeklinde bir çıkıntı taşır. Ergin bireyler karada yaşar. Larvaları kurtçuk şeklindedir ve baş kapsülü küçülmüş veya kaybolmuştur.

Familia (Familya): Drosophilidae (Sirke sinekleri – Meyve sinekleri). Genellikle boyları 3-4 mm olan bu familya, çürümekte olan bitki ve meyvelerin çevresinde gelişirler.

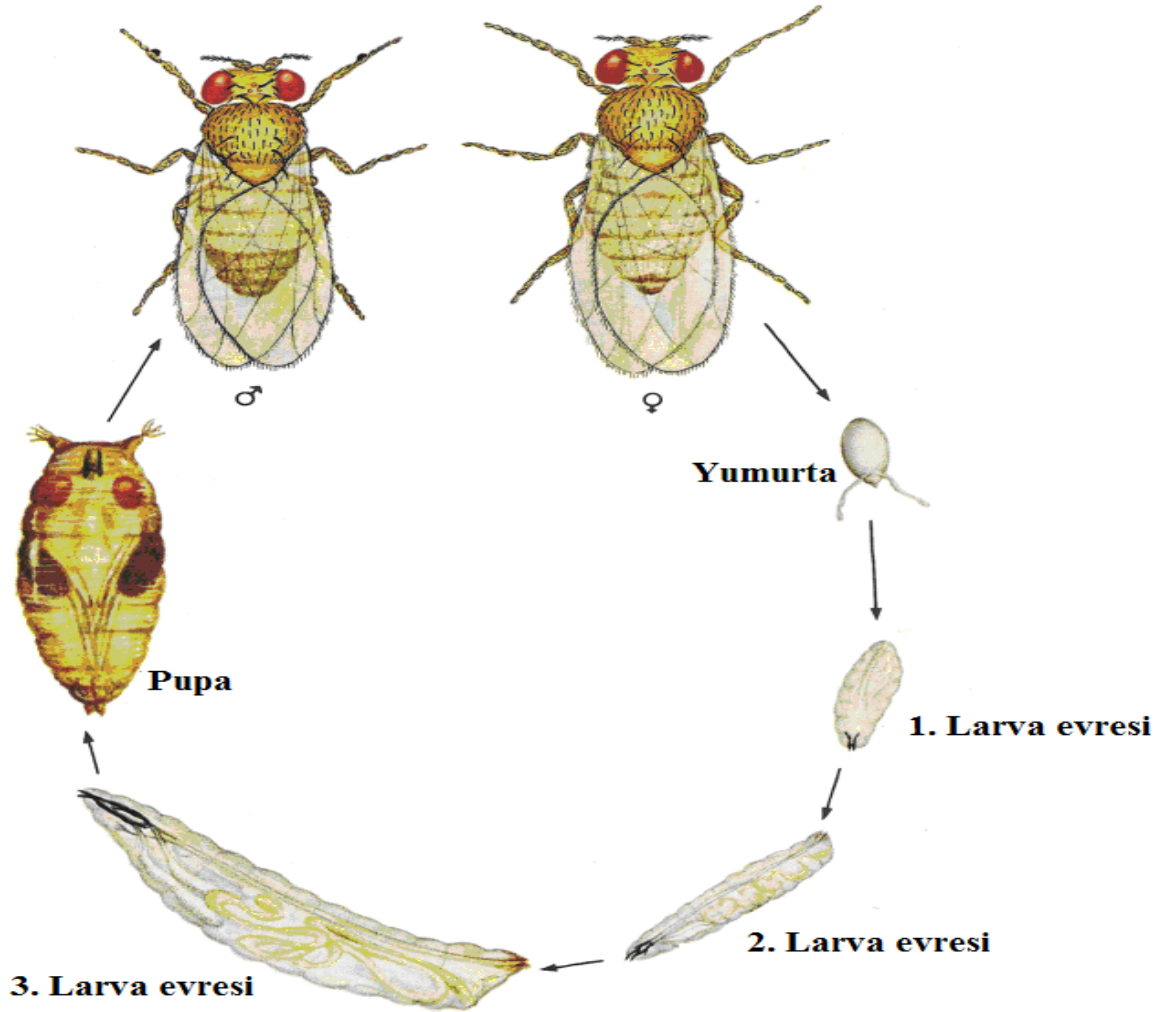
Genus (Cins): *Drosophila*. Yaklaşık 1500 tür içerir (Salman, 2004; Pechenik, 2013).

Species (Tür): *Drosophila melanogaster*.

3.1.4. *Drosophila melanogaster*'in hayat döngüsü

Laboratuvarında *Drosophila melanogaster* stokları, $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de ve %60 bağıl nem şartlarında kültür odasında bulunmaktadır. Bu şartlarda döllenmiş bir *D. melanogaster* yumurtasından yaklaşık olarak 22-24 saat sonra 1. evre larva oluşmaktadır. Hayat döngüsü 2. evre larva, 3. evre larva, prepupa, pupa ve nihayet 9. günün sonunda ergin birey şeklinde seyretmektedir. Ancak beslenme, ışık, nem, kontaminasyon, radyasyon, sıcaklık gibi çevresel faktörlerin gelişim süresinde değişikliğe neden olabildiği bilinmektedir (Clark and Rockstein, 1964). Yüksek sıcaklıklarda *D. melanogaster*'in hayat döngüsü kısa olmasına rağmen, kültür ortamı genellikle $21-25^{\circ}\text{C}$ aralığında tutulur. Çünkü yüksek sıcaklıklar erkek bireyin infertilite olmasına neden olduğu gibi kültür ortamında akar, bakteri ve mantar oluşumuna da neden olabilir. Düşük sıcaklıklarda ise genellikle yaşam döngüsü uzamaktadır (Flagg, 2005). Örnek vermek gerekirse hayat döngüsü 28°C 'de 7 günde tamamlanırken, 31°C 'de ise erkek bireylerde kısırlık ve hatta ölüm gerçekleşebilmektedir. 12°C gibi daha düşük sıcaklıklarda ise hayat döngüsü 50-55 güne kadar uzayabilmektedir (Gürbüz, 2011). *Drosophila melanogaster*'in hayat döngüsü Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

Çalışmada transheterozigot 3. evre larvalar kullanılmış olup, kimyasal maddelere maruz bırakılan bu larvaların yaşı 72 ± 4 saattir.



Şekil 3.1. *Drosophila melanogaster*' in hayat döngüsü (Flagg, 2005)

3.1.5. *Drosophila melanogaster* mutant stokları ve kullanılan hatların genetik yapısı

Çalışmamızda, *D. melanogaster*'in normal (Standard, ST) ve yüksek metabolik aktiviteye (High-bioactivation, HB) sahip multiple wing hair (*mwh*) ve *flare* (*flr³*; *flr³/In(3LR)TM3*, *Bd^S*) hatları kullanılmıştır. Bu hatlar değişik zamanlarda Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü ve Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi Sınıf Öğretmenliği bölümlerinden temin edilmiş ve bölümümüzde bulunan Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda ideal yaşam koşullarında ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve %60 bağıl nem) standart Lewis besiyeri (Lewis and Bacher, 1968) kullanarak kültüre alınmıştır.

Normal metabolik aktiviteye sahip olan hatların genetik yapısı aşağıda verilmiştir:

- *mwh / mwh*
- *flr³ / In (3LR) TM3, ri p^p sep bx^{34e} e^s Bd^S*. Bu mutant ırkın genotipi kısaca *flr³/TM3, Bd^S* şeklinde gösterilmektedir.

Yüksek metabolik aktiviteye sahip olan hatların genetik yapısı ise şu şekildedir:

- *NORR/NORR; mwh/mwh*
- *NORR/NORR; flr³ / In (3LR) TM3, ri p^p sep bx^{34e} e^s Bd^S*. Bu mutant ırkın genotipi kısaca *NORR/NORR; flr³/TM3, Bd^S* şeklinde gösterilmektedir (Lindsley and Zimm, 1992).

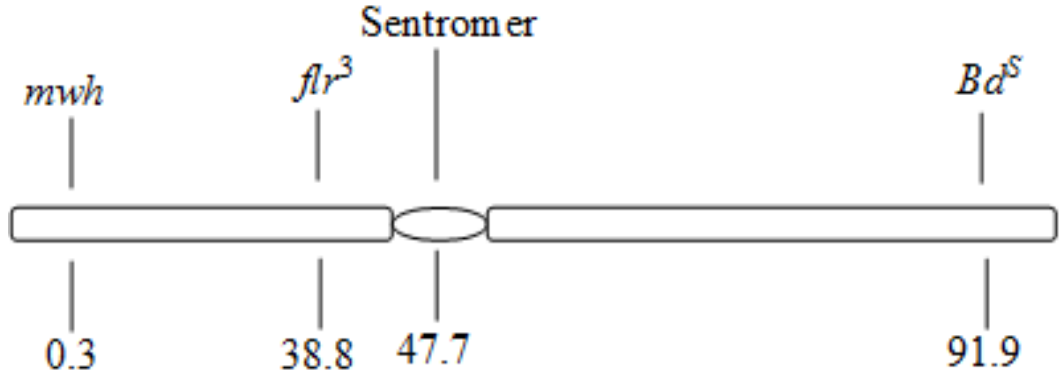
mwh geni; resesif bir gen olup, 3. kromozomun sol kolunda, telomere yakın bir bölümde yer alır (3–0.3). Bu gen somatik hücrelerde homozigot durumda (*mwh/mwh*) bir kanat trikomu yerine, çoklu kanat trikomlarının oluşmasına neden olur (Frei and Würzler, 1996). Trans-heterozigot kanatlarda bazen iki trikumlu oluşumlarda gözlenebilir. Bunlar ikiz klon ve *mwh* klonun hesaplanmasında göz ardı edilir. Ancak çoklu kanat trikomları ile beraber gözlendiğinde, mutant klonun büyüklüğünün belirlenmesi amacıyla hesaba katılmaktadır (Graf *et al.*, 1984).

flare (flr³) geni ise sentromere daha yakın olacak şekilde, yine 3. kromozomun sol kolunda bulunan resesif bir gendir (3–38.8). Bu gen *Drosophila*'nın kanatlarındaki normal trikomlar yerine, kısalmış ve koyulaşmış, körelmiş veya balon şeklindeki amorfik trikomların oluşumuna neden olmaktadır (Graf *et al.*, 1984). *flare* geninin üç mutant alleli de embriyonik evrede letal etki göstermektedir. Bu nedenle ergin birey oluşumu gözlenmemektedir. Ancak bu gen açısından heterozigot olan bir bireyin, imajinal disk hücrelerinden gelişen ve fenotipik olarak *flare* geninin

özelliğini taşıyan kanat kılları gözlemlenebilir. Bu nedenle bireyler, *flare* geninin embriyonik letal etkisinden kurtulmak ve rekombinasyonu baskılamak amacıyla *TM3* dengeleyici kromozomunu taşımaktadır. *TM3* dengeleyici kromozomu, letal etki gösteren genin bulunduğu homolog kromozomlardan birinde yer almaktadır (Frei and Würgler, 1996; Guzmán-Rincon and Graf, 1995; Graf *et al.*, 1998).

Bd^S (beaded-serrat) geni dominant bir gen olup *TM3* dengeleyici kromozom üzerinde yer almaktadır ve homozigot durumda letal etki göstermektedir. Normal bir *D. melanogaster* bireyinde kanatlar düzgün kenarlı iken (Şekil 3.3) *Bd^S* genini taşıyan bireylerde ise kanat testere ağzı (Şekil 3.4) şeklindedir (Graf and Würgler, 1996). Bu geninin ortaya çıkarttığı fenotipik farklılık, bireyin *TM3* dengeleyici kromozomu taşıyıp taşımadığına işaret etmektedir (Lindsley and Zimm, 1992).

mwh, *flr³* ve *Bd^S* belirleyici genlerinin *D. melanogaster*'in 3. kromozomu üzerindeki dizilişleri Şekil 3.2'de verilmiştir (Kaya *et al.*, 2000).



Şekil 3.2. Belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki dizilişleri (Graf *et al.*, 1984)



Şekil 3.3. *Drosophila melanogaster*'de normal kanat (*mwh/flr³* genotipine ait) görünümü



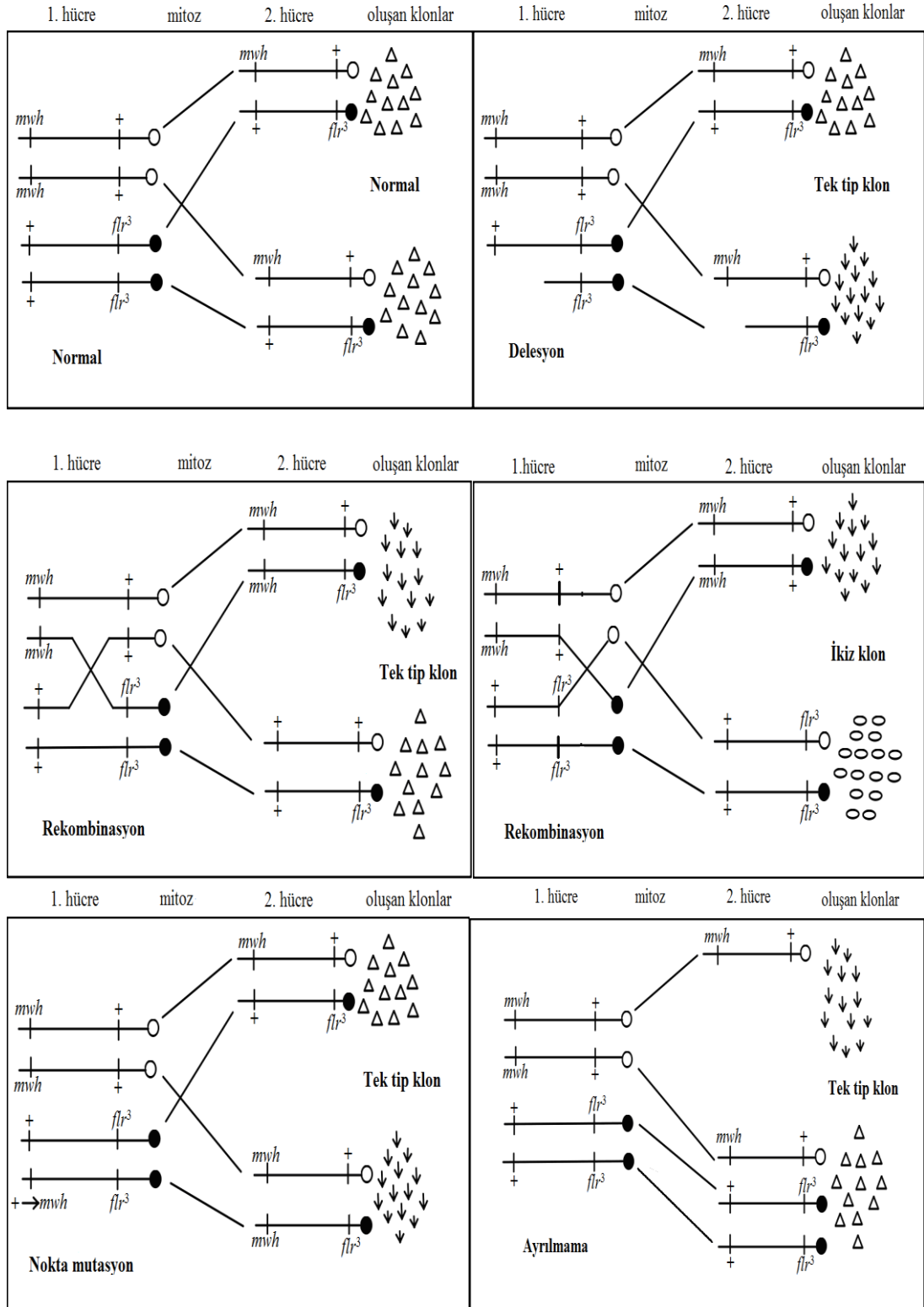
Şekil 3.4. *Drosophila melanogaster*'de serrat kanat (*mwh/TM3* genotipine ait) görünümü

Heterozigotluğun herhangi bir maddenin indüksiyonu sonucunda oluşan mutasyonlar aracılığıyla kaybedilmesi, yabancı fenotip yerine mutant fenotipin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Graf *et al.*, 1984; Guzmán-Rincón and Graf, 1995). Mutant fenotip farklı tip mutant klonlarından oluşmaktadır (Şekil 3.5). Tek tip klon, *mwh* veya *flr³* fenotipinde hücrelerden oluşmaktadır. İkiz klon ise komşu *mwh* ve *flr³* fenotipli hücre gruplarından oluşmaktadır. 1-2 hücreli *mwh* fenotipli tek tip klonlar küçük tek tip klon, üç ve daha fazla sayıda hücre taşıyanlar ise büyük tek tip klon olarak sınıflandırılmaktadır. Küçük tek tip klonlar yalnızca *mwh* fenotipli hücrelerden oluşmaktadır. Dört hücreden az sayıda *flr³* fenotipli hücreler baskılanmanın sonucunda oluşmakta ve gözardı edilmektedir. Bu nedenle dört veya daha fazla sayıdaki *flr³* fenotipli hücreler büyük tek tip klon olarak kabul edilmiştir (Graf *et al.*, 1984; Szabad *et al.*, 1983).

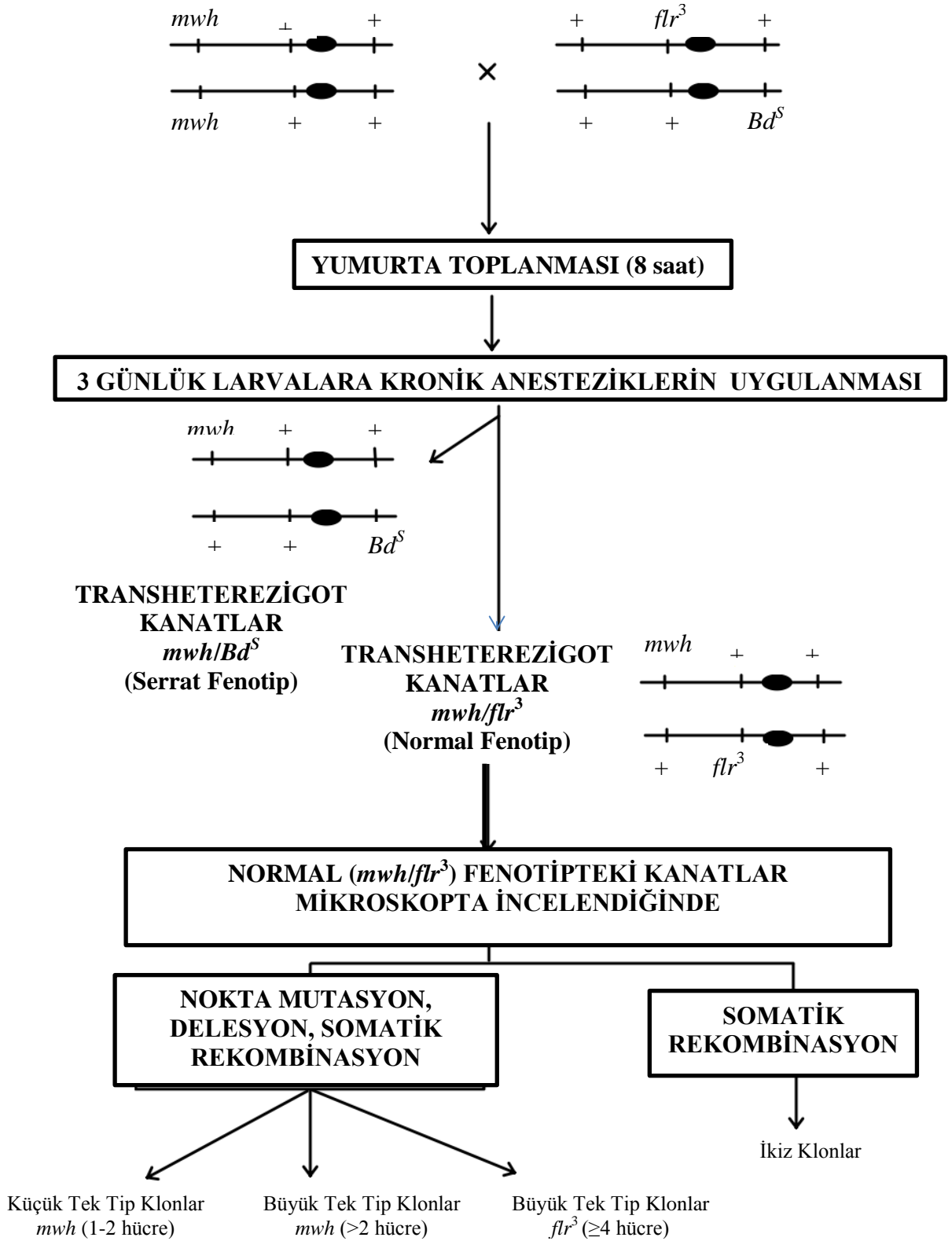
Mutant klonların oluşumu farklı genetik mekanizmalardan kaynaklanmaktadır. *mwh* ve *flr³* genleri arasındaki mitotik rekombinasyon, ayrılmama, nokta mutasyonları ve delesyonlar tek tip klonların oluşumuna neden olmaktadır. İkiz klonlar ise *flr³* geni ile üçüncü kromozomun sentromeri arasındaki rekombinasyon sonucu oluşmaktadır. Serrat kanatlı (*mwh/TM3*) bireylerde, *TM3* kromozomunun baskılayıcı etkisinden dolayı mitotik rekombinasyon gerçekleşmemektedir. Bu nedenle *mwh/flr³* genotipli bireylerin kanatlarında klonlar mitotik rekombinasyon ya da mutasyon sonucu oluşurken; *mwh/TM3* genotipli bireylerin kanatlarında ise sadece mutasyon sonucunda klonlar oluşmaktadır (Kaya *et al.*, 2004; Frei and Würzler, 1996; Spanó *et al.*, 2001).

Çaprazlamalar *flr³ / TM3, Bd^S* hatlarının dişi bireylerinin yüksek yumurta verimi göz önüne alınarak şu şekilde tasarlanmıştır:

- 1) Standart çaprazlama: ♀ *flr³ / In (3LR), TM3 Bd^S* X ♂ *mwh/mwh*
- 2) Yüksek bioaktivasyon çaprazlama: ♀ *NORR/NORR; flr³/In (3LR), TM3 Bd^S* X ♂ *NORR/NORR; mwh/mwh*



Şekil 3.5. Mutasyon ve rekombinasyon oluşum mekanizmaları (Graf *et al.*, 1984)



Şekil 3.6. *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi uygulama özeti (Graf *et al.*, 1984)

Transheterozigot larvaların elde edilebilmesi için yapılan çaprazlamalar Şekil 3.6 'da özetlenmiştir.

3.1.6. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan ketamin (Ketamine, CAS: 33795-24-3, S-(+)-Ketamine hydrochloride, C₁₃H₁₆ClNO.HCl) ve rokuronyum bromür (rocuronium bromide, CAS: 119302-91-9, C₃₂H₅₃BrN₂O₄) Sigma Şirketi'nden (St Louis, Missouri, USA), *Drosophila* besini (*Drosophila* Instant Medium, Formula 4–24) ise Carolina Biological Supply (Burlington, NC, ABD) şirketinden temin edilmiştir.

3.1.7. Standart *Drosophila* besiyerinin hazırlanışı

Bir beher içerisinde 440 cc distile su kaynatıldıktan sonra içerisine 7 g agar azar azar ilave edilir. Agar, kaynayan suda tamamen çözüldükten sonra üzerine 60 g toz şeker ilave edilip cam bir baget yardımıyla karıştırılır. Başka bir beher içerisinde 125 cc distile suya 19 g bira mayası ve 50 g mısır unu katılır ve karıştırma işlemi homojen bir çözelti oluşuncaya kadar sürdürülür. Bu karışım kısık ateşte kaynayan agar-şeker çözeltisine eklenir ve karıştırılmaya devam edilir. Karıştırma işlemi besiyeri uygun kıvama gelene kadar sürdürülmelidir. Oluşturulan besiyerinin katılığı çok önemlidir. Oluşturulan karışım çok sıvı olursa besiyeri soğutulduktan sonra çok katılaşmayacaktır. Bu durum sineklerin besiyerine yapışmasına neden olacaktır. Besiyeri çok katı olduğunda ise şişelere dökme işlemi zorlaşacak ve sineklerin beslenmesi güçleşecektir. İstenilen katılığa ulaşan besiyeri kısık ateşten indirilir ve yaklaşık 5 dk. soğumaya bırakılır. Daha sonra içerisine 3-3,5 cc propionik asit eklenir ve asidin çözeltide homojen bir şekilde dağılması için iyice karıştırılır. Propionik asit, küf inhibitörü olarak kullanılmaktadır. Besiyeri katılaşmadan, etüvde steril hale getirilen her bir cam şişeye 50 cc besiyeri şişelerin ağzına ve kenarlarına bulaşmayacak şekilde dökülür. Bir araya getirilen şişelerin üzeri kurutma kağıdı ile

kapatılarak oda sıcaklığında bekletilir. 1 gün sonra içerisindeki su buharının tamamen çekildiği görülen kültür şişelerinin ağızları, tülbentle sarılmış olan steril pamuk tıkaçlarla tıkanarak buzdolabında saklanır.

3.1.8. Faure Çözeltisinin Hazırlanışı

Çalışmamızın kanat preparatlarının hazırlanması aşamasında kullanılan faure çözeltisi, Graf *et al.*'ın (1984) çalışmasındaki prosedüre uygun olarak hazırlanmıştır. Faure çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan madde ve madde miktarları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Faure çözeltisinin içeriği

MADDE	MADDE MİKTARI
Distile su	50 mL
Gum arabic	30 g
Gliserol	20 mL
Kloral hidrat	50 g

Isıtmalı manyetik karıştırıcı üzerine konulan bir beher içerisine, 10 mL gliserol ve 25 g kloral hidrat eklenir. 40⁰C'de manyetik balık döndürme işlemine devam ederken, çözeltinin üzerine yaklaşık 15 g gum arabic azar azar eklenir. Katılaşmanın gerçekleşmemesi için 25 mL distile su katılarak karıştırma işlemine devam edilir. Karışıma yeniden 10 mL gliserol, 25 g kloral hidrat ve akabinde 15 g gum arabic katılır. Karışım, 25 mL distile su katıldıktan sonra yaklaşık 6 saat manyetik karıştırıcıda tutularak çözünmenin tamamen gerçekleşmesi sağlanır. Çözelti 1 gün süreyle süzgeç kağıdı kullanarak süzildikten sonra kanat preparatlarının hazırlanmasında kullanılabilir durumdadır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART)

Genotoksik maddeler tarafından oluşturulan kromozom yapısı ve sayısındaki değişiklikler ve gen mutasyonlarını belirlemek amacıyla bugüne kadar birçok *in vivo* ve *in vitro* test sistemi geliştirilmiştir (Barile, 2008). Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) günümüzde bu amaçla kullanılan güncel bir yöntemdir. Graf ve ark. (1984) tarafından geliştirilmiş olan kanat SMART yöntemi; günümüzde fiziksel, kimyasal ve biyolojik maddelerin mutajenik ve rekombinojenik etkilerini saptamak amacıyla kullanılmaktadır. Daha geniş bir ifade ile SMART; bu gibi maddelerin indüklediği kromozom kaybı, delesyon, kararsız translokasyon, mutasyon, mitotik rekombinasyon ve ayrılmama gibi kromozomal aberasyonları belirler. Hızlı, güvenilir ve ekonomik olması, genotoksik hasarı belirlemek için yalnızca bir jenerasyona ihtiyaç duyulması bu test yönteminin en büyük avantajlarıdır (Graf *et al.*, 1984). Bu test yöntemi embriyonik gelişim dönemindeki mitoz bölünme ile çoğalan imajinal disk hücrelerinin ayrılmasından temel almaktadır. Eğer imajinal diskteki bu hücrelerde herhangi bir genetik değişiklik olursa, değişim geçirmiş genetik materyal yavru hücrelere aktarılacaktır. Bu genetik değişiklik sonucunda oluşan farklı fenotipik özelliğe sahip mutant hücre grupları (mutant klonlar), metamorfozla ergin bireyin değişik vücut yapılarında (göz, kanat vb.) gözlemlenir. Bu test yöntemi maddelerin genotoksik etkilerinin ortaya çıkarmasının yanında, aynı zamanda genotoksik etkileri bilinen maddeler üzerine, değişik maddelerin antigenotoksik etkilerinin belirlenmesini de sağlamaktadır (Graf *et al.*, 1998).

Frei ve Würzler (1996), *in vivo* test yöntemi olan SMART'ın mikroorganizmal *in vitro* ve memeli *in vivo* test yöntemleri arasında bağlantı görevi üstlenen bir test tekniği olduğunu belirtmişlerdir. SMART, göz spot testi ve kanat spot testi olarak ikiye ayrılmaktadır. Bu test yöntemi, *D. melanogaster*'in gözlerinde veya kanatlarında saptanabilir fenotipik baskılanmayı ortaya çıkaran, uygun genlerin

heterozigotluk kaybının belirlenmesini amaçlamaktadır. Herhangi bir maddenin etkisiyle *Drosophila*'nın trans-heterozigot larvalarında mutasyon oluştuğunda, heterozigotluk kaybindan dolayı, yabancı fenotip yerine mutant fenotipin oluşumu gerçekleşmektedir (Graf *et al.*, 1984; Guzmán-Rincón and Graf, 1995; Graf *et al.*, 1998).

SMART yönteminin birçok maddenin genotoksitesinin belirlenmesinde kullanılmasından sonra, Frölich ve Würzler (1989) tarafından geliştirilen yeni mutant ırklarla maddelerin ayrıca degradasyon ürünlerinin promutajenik aktiviteye sahip olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Bu yeni ırklar, (ORR) DDT resistant Oregon R (OR-R) ırkından, 1. ve 2. kromozomu taşımaktadır. 2. kromozom üzerinde yer alan *Rst(2)DDT* (*Resistance(2)DDT*, *RI*) geni, yüksek sitokrom P450 enzim seviyesine sahiptir (Dapkus and Merrell, 1977; Hällström *et al.*, 1984). Ancak yapılan çalışmalarda bu yeni ırkların bazı dezavantajlarının olduğu görülmüştür. Bu dezavantajların en önemlisi kanatta düzensiz oluşumlardan dolayı klon sayımının zorlaşması ve objektif bir değerlendirmenin yapılamamasıydı (Graf and van Schaik, 1992). *paisley* (*ply*) geni; resesif bir gen olup, 2. kromozomun 90. pozisyonunda yer almakta ve bu düzensiz oluşumlara neden olmaktadır. Bu gen, yüksek biyo-aktivasyondan sorumlu olan *RI* genine bağlıdır. Pacella (1993) tarafından geliştirilen NORR (New ORR) ırkları, ORR ırklarına benzer şekilde promutajen ve prokarsinojenlerin genotoksitesini belirlemekle beraber; *ply* geni taşımamaktadırlar. Bu yeni ırklar, *RI* geni açısından homozigot olmasına karşın, *ply* geni *RI* geninden ayrıldığından dolayı kanatlarda düzensiz oluşumlar gözlenmemektedir. Ayrıca ORR ırklarıyla karşılaştırıldığında daha fazla biyo-aktivasyon kapasitesine sahiptirler (Pacella *et al.*, 1996).

SMART, diğer test yöntemleri ile karşılaştırıldığında araştırmacıya birçok avantaj sunmaktadır (Graf and Würzler, 1996). Bu avantajlar şu şekilde özetlenebilir:

- a) Bir maddenin SMART yöntemi kullanılarak genotoksik veya antigenotoksik etkisinin belirlenmesi için sadece bir jenerasyona ihtiyaç vardır.

- b) Genotoksik veya antigenotoksik etki; kanat ve göz gibi somatik dokulardaki hücreleri etkilediğinden, çok sayıda hücrenin analizini yapmak mümkündür.
- c) Belirleyici genlerin özellikleri bilindiğinden dolayı, herhangi bir maddenin oluşturduğu indüksiyon kolay bir şekilde fark edilebilir.
- d) SMART yöntemi kullanılarak bugüne kadar yapılmış olan çalışmalar, bu testin güvenilir, hızlı ve ekonomik bir yöntem olduğunu göstermiştir (Gürbüz, 2011).

3.2.2. Transheterozigot larvaların elde edilmesi

Hem normal hem de yüksek metabolik aktiviteye sahip transheterozigot larva elde edebilmek için maksimum 8 saat aralıklarla *flare* kültüründen virjin dişi sinekler ayrı bir besiyerinde toplanmıştır. Çalışmamızda genç bireylerin üreme verimliliği dikkate alınarak 2-8 günlük bireyler kullanılmıştır. Larvaların elde edilmesi için 40 *flr*³ dişi, 40 *mwh* erkek çaprazlaması yapılmıştır. Transheterozigot larvaların aynı yaşta olması çalışmanın objektifliği açısından önemli olduğundan çaprazlamada kullanılan bireyler 8 saat aralıklarla yeni bir besiyerine alınarak burada da yumurta bırakmaları sağlanmıştır. Böylece çaprazlamada kullanılan bireyler transheterozigot larva elde etmek amacıyla defalarca kullanılmıştır. 72±4 saat sonra elde edilen 3. larva evresine ait bireyler, ince gözenekli süzgeç kullanılarak çeşme suyu altında yıkanarak besiyerinden ayrılmıştır. Larvaların elde edilmesi için yapılmış olan çaprazlama Şekil 3.6 'da özetlenmiştir (Graf *et al.*, 1984).

3.2.3. Anestezik ilaçların larvalara uygulanması

Genotoksik çalışmaya başlamadan önce ketamin ve rokuronyum bromürün larvalar üzerinde göstereceği toksik etkiler, standart LD50 testi kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre her iki ajanın da 1000 µg/mL

konsantrasyonundan sonra larvalar üzerinde toksik etki gösterdiği ve larval yaşam yüzdesini ciddi oranda düşürdüğü görülmüştür. Bu nedenle en yüksek konsantrasyon 1000 µg/mL olmak üzere, 100, 250, 500 ve 1000 µg/mL şeklinde dört konsantrasyon hazırlanmıştır.

Süzgeç yardımıyla besiyerinden ayrılan larvalar (yaklaşık 100 larva), uygulama ortamı olan cam tüpler içerisine alınmıştır. Bu tüplerin içerisinde anestezi ajanlarının değişik konsantrasyonlarına ait 7 mL test solüsyonu ile sulandırılmış 4.5 g hazır *Drosophila* besini (*Drosophila* Instant Medium) bulunmaktadır. Larvalar yumuşak bir fırça yardımıyla cam tüplerdeki besiyeri yüzeyine dağıtıldıktan sonra cam tüplerin ağızları tıkaçlarla kapatılmıştır. Cam tüpler, inkübatöre alınarak larvalar erginleşene kadar bu ortamda tutulmuş ve her bir ergin bireyin larval dönemde yaklaşık 48 saat test solüsyonlarına maruz kalmaları sağlanmıştır.

3.2.4. Ergin bireylerin toplanması ve kanat preparatlarının hazırlanması

Anestezi ilaçların uygulanmasından sonra farklılaşarak pupadan çıkan ergin bireyler eterizasyon işleminden geçirilmiş ve %70'lik etil alkol içerisine alınarak +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Eppendorf tüplerinde -%70'lik etil alkol içerisinde muhafaza edilen bireyler kanat oluşumları dikkate alınarak normal kanatlı (transheterozigot *mwh/flr³* genotipli) ve serrat kanatlı (dengelenmiş heterozigot - *mwh/TM3*, *Bd^S* genotipli) olmak üzere, iki gruba ayrılmıştır. Ayırma işleminde *Bd^S* geninin oluşturmuş olduğu fenotipik özellik göz önüne alınmıştır. Normal kanatlı bireylerde kanatlar düz iken, serrat kanatlı bireylerde kanat testere ağzı şeklindedir. Normal kanatlı bireyler, mutasyon ve mitotik rekombinasyon sonucu oluşan mutant klonları görülebilir. Serrat kanatlı bireyler ise, *TM3* dengeleyici kromozomun mitotik rekombinasyonu baskılamasından dolayı sadece mutasyon sonucu oluşan mutant klonlar gözlemlenebilir. Böylece aynı konsantrasyon uygulanmış normal kanatlı bireylerin serrat kanatlı bireylerle karşılaştırılması sonucu, uygulanan maddenin oluşturmuş

olduğu genotoksisitenin mutajenik ve/veya rekombinojenik k3kenli olduğu sonucuna varılabilir. Bu amaçla her iki fenotipteki kanatların preparatları hazırlanmıştır.

Kanat preparatları hazırlanmadan 3nce, etil alkolden çıkarılan bireyler kanat morfolojilerine g3re ayrılarak distile su içerisine alınmıştır. Çukur lam 3zerine 1-2 damla faure sol3syonu damlatılmış ve ince uçlu pens yardımıyla kanatları alınacak birey, faure sol3syonu ortamına alınmıştır. Rastgele seçilmiş bireylerin kanatları, ince uçlu pens ve iğne yardımıyla stereo mikroskop (Leica EZ4) altında v3cutlarından dikkatli bir şekilde alınmıştır.

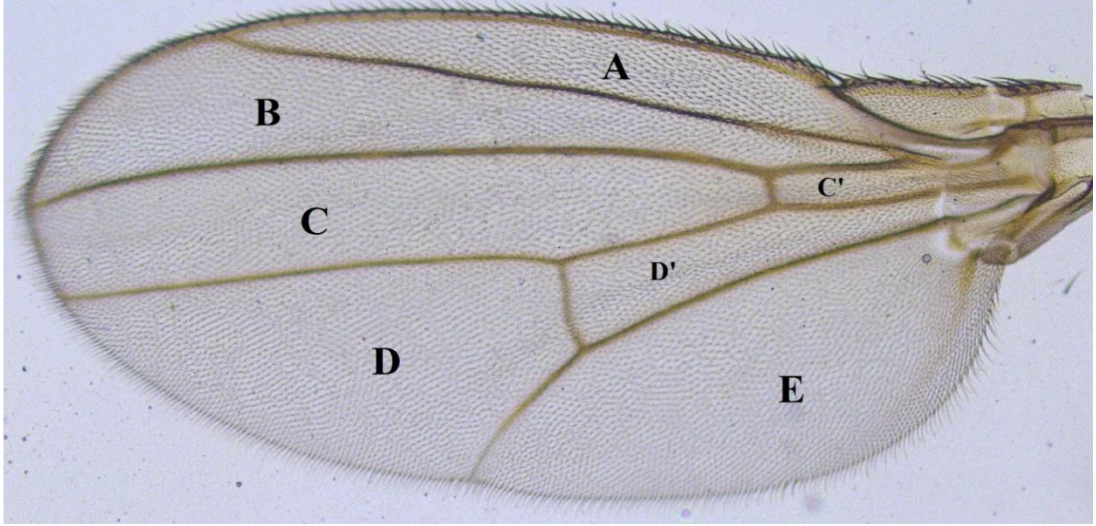
Bu işlem yapılırken, kanatların v3cuda bağlandığı yerden tutularak kanada ve kanadın 3zerinde bulunan trikomlara zarar verilmemeye çalışılmıştır. Kanatlar lam 3zerine yerleştirilirken, bir bireyin herhangi bir kanadı işlem esnasında zarar g3rm3şse diğer kanat da kullanılmamıştır. Aynı bireye ait kanatlar yan yana olmak 3zere, kanatlar lam 3zerinde her sırada 8 kanat çifti 3 sıra halinde dizilmiştir. Hazırlanan preparatlar bir g3n boyunca petri kabı içerisinde bekletilerek kurumaları sağlanmıştır. Daha sonra lamlara entellan damlatılarak, hava kabarcığı kalmayacak şekilde lamel (24X60 mm) ile kapatılmıştır. Kapatma işleminden kısa s3re sonra preparatların dış y3zeyleri, ksilen ile ıslatılmış t3lbent yardımıyla temizlenerek mikroskopik inceleme için hazır hale getirilmiştir.

3.2.5. Kanat preparatlarının mikroskopik analizi

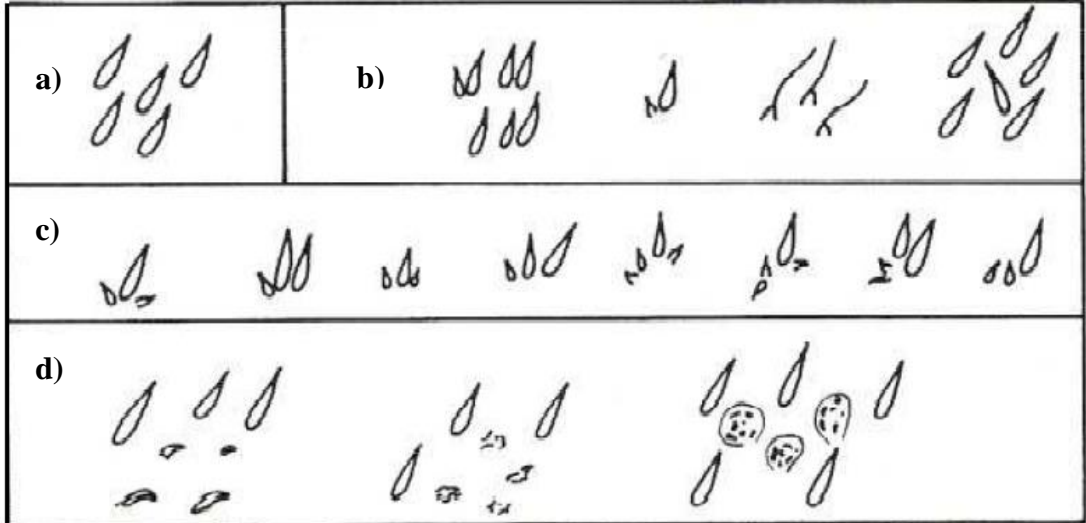
Mikroskopik analizlerde kanat trikomlarının fenotipini belirleyen 3. kromozomun 3zerinde yer alan *mwh* ve *flr*³ genlerindeki değişimler dikkate alınmış ve değişimler kaydedilmiştir. Kanatlarda oluşan mutasyonlar, genotoksik etkisi incelenen maddenin 3zelliğine bağlı ortaya çıkmaktadır.

Hazırlanan kanat preparatları işik mikroskopunda (Leica DM500) 40X10 b3y3tmeli objektif ile incelenmiş ve kanatların hem dorsal hem de ventral y3zeylerinde ortalama 24.400 trikom bulunduğundan, tek tek dikkatlice analiz edilmiştir. İncelemede kolaylık sağlaması amacıyla kanat 3zerinde sayım yapılacak alanlar A,

B, C, C', D, D', E şeklinde bölgelere ayrılmıştır (Şekil 3.7). Bölgeler ve klon tipleri kullanılarak çizelge hazırlanmış, çıkan klonlar kayıt altına alınmıştır. Kanatlarda gözlenen klon tipleri şekil 3.8 'de gösterilmiştir.



Şekil 3.7. Kanat bölümlerinin normal kanat üzerindeki görünümü



Şekil 3.8. Kanatlardaki farklı tip trikomlar (Graf *et al.*, 1984) *

* a) Normal kanat trikomları b) *mwh* veya *flr³* fenotipi olarak kabul edilmeyen yapısal bozukluklar c) *mwh* geninin etkisiyle oluşan trikomlar d) *flr³* geninin etkisiyle oluşan trikomlar

Çizelgede kayıt altına alınan mutant klonlar şu şekilde sınıflandırılmıştır:

- Küçük tek tip klon (1-2 *mwh* hücre)
- Büyük tek tip klon (≥ 3 *mwh* veya *flr*³ hücre): 4 hücreden az sayıda oluşan *flr*³ fenotipli klonlar baskılanmamanın sonucunda oluştuğundan dolayı göz ardı edilmektedir (Szabad *et al.*, 1983). Fakat, Graf ve ark. (1984) klonları 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17-32 hücre grupları şeklinde sınıflandırmıştır. Çalışmamızda bu uygulamaya riayet edilerek 3 ve daha fazla sayıdaki *flr*³ fenotipli klonlar büyük tek tip klon olarak kaydedilmiştir.
- İkiz klon: *mwh* ve *flr*³ fenotipine sahip trikomların genellikle yan yana iki ayrı klon halinde gelmesiyle veya bazen de bu fenotiplere sahip trikomların karışık bir şekilde klon oluşturmasıyla meydana gelmektedir. Her iki fenotipe ait trikomlar birbirileri ile bitişik şekilde iki ayrı bölge oluşturmuşlarsa aralarında yabancı (normal) tip trikomların sayısının üçü geçmemesi gerekmektedir. Yabancı tip trikom sayısının üçü geçtiği durumlarda her iki bölge ayrı ayrı klon olarak kaydedilmiştir.

İmajinal diskler, larval gelişim esnasında yüksek mitotik bölünme yeteneği olan ve bireyin değişik vücut bölgelerindeki hücrelerin köken aldığı hücrelerdir. Bireylerde hücre farklılaşmasının görüldüğü ve metamorfoz geçirdiği pupal döneme (yaklaşık 120 saat) kadar bu hücreler sürekli mitoz bölünme ile çoğalmaktadır. Somatik hücrelerdeki genetik değişikliklerin indüksiyon zamanı ve klonların büyüklüğü arasında pozitif bir kolerasyon bulunmaktadır. Eğer mutasyon hücre bölünmesinin yoğun olduğu erken embriyonik dönemde meydana gelirse mutasyonun indüklemesiyle oluşan mutant hücrenin mitoz bölünme ile çoğalmasıyla oluşan klonlar çok fazla sayıda trikom içerecektir. Genotoksisitesi belirlenmeye çalışılan herhangi bir madde geç larval dönemdeki bireylere uygulandığında, klon büyüklüğü erken dönemdeki larvalara göre küçük ancak klon sayısı nispeten daha fazladır. Ayrıca erken dönem larvalarda ikiz klon oluşumları neredeyse görülmemektedir (Graf *et al.*, 1995). Bu nedenlerden dolayı çalışmamızda anestezi ajanlarının

mutajenik ve/veya rekombinojenik özelliklerinin var olup olmadığını belirlemek için 3. larval döneme ait bireyler (72±4 saat) kullanılmıştır.

3.2.6. Klon İndüksiyon Frekansının Hesaplanması

Herhangi bir maddenin genotoksitesinin belirlenmesi için gerçekleştirilen SMART uygulamasında, 10^5 hücre başına düşen klon frekansı aşağıda verilen denkleme göre hesaplanmaktadır (Szabad *et al.*, 1983).

$$f = \frac{n}{N.C} \times 10^5$$

Denklemden sadece *mwh* fenotipli klonlar göz önüne alındığında; “f” *mwh* klonlarının indüksiyon ortalama frekansı, “n” gözlenmiş olan toplam *mwh* klon sayısı, “N” analiz edilmiş olan kanat sayısı ve “C” bir kanat üzerindeki incelenebilecek hücre sayısını göstermektedir. Bir kanat üzerinde incelenebilecek hücre sayısı ortalama 24.400 olarak tahmin edilmektedir (Würgler and Vogel, 1986; Frei and Würgler, 1996).

3.2.7. Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışma sonucunda elde edilen veriler değerlendirilirken, orijinal (null) hipotezde (H_0) test uygulamaları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark olmadığı varsayılmıştır. Alternatif hipotezde (H_a) ise uygulama gruplarında gözlenen mutasyon oranının kontrol grubundan m defa daha fazla olduğu varsayılmıştır. Orijinal ve alternatif hipotezlerin kabul veya red edilmesine karar verilirken Kastenbaum ve Bowman’ın (1970) geliştirdiği Şartlı Binomial Test kullanılmış hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar: pozitif (+), önemsiz fark (i) ve negatif (-) olarak gösterilmiştir. Bir sonucun pozitif, önemsiz fark veya negatif olduğuna karar

verebilmek için Frei ve Würger (1988) tarafından geliştirilen “the multiple-decision procedure” kullanılmıştır (Çizelge 3.2).

Hipotezlerin kurulması sırasında yapılan hesaplamalarda kullanılan parametreler şunlardır:

N_c = Kontrol grubunda incelenen kanat sayısı

N_t = Uygulama grubunda incelenen kanat sayısı

n_c = Kontrol grubunda gözlenen klon sayısı

n_t = Uygulama grubunda gözlenen klon sayısı

n = n_t+n_c = toplam klonların sayısı

P_o = Kontrol grubunda beklenen klon frekansı, orijinal hipotez (H_o) için $P_o = N_c / (N_c+N_t)$

q_o = Uygulama grubunda beklenen klon frekansı, orijinal hipotez (H_o) için $q_o = N_t / (N_c+ N_t)$

P_A = Kontrol grubunda beklenen klon frekansı, alternatif hipotez (H_a) için $P_A = N_c / (N_c+ mN_t)$

q_A = Uygulama grubunda beklenen klon frekansı, alternatif hipotez (H_a) için $q_A = (mN_c+mN_t)$

P_{on} = Kontrol grubunda beklenen klon sayısı, orijinal hipotez (H_o) için

q_{on} = Uygulama grubunda beklenen klon sayısı, orijinal hipotez (H_o) için

P_{An} = Kontrol grubunda beklenen klon sayısı, alternatif hipotez (H_a) için

q_{An} = Uygulama grubunda beklenen klon sayısı, alternatif hipotez (H_a) için

M = Çarpım sabit

Yukarıda verilen parametreler, SMART çalışmalarında sıklıkla kullanılan Microsta bilgisayar programı ile hesaplanmıştır. Uygulama grubundaki (nt) klon sayısı çizelge değerine eşit veya çizelge değerinden büyük olduğunda orijinal hipotez; kontrol grubundaki (nc) klon sayısı çizelge değerine eşit veya çizelge değerinden büyük olduğunda alternatif hipotez red edilmiştir. Orijinal ve alternatif hipotezin kabul veya red edilmesiyle sonuçlar pozitif, önemsiz fark veya negatif olarak Çizelge 3.2. kullanılarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.2. Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi

HİPOTEZLER		HA (ALTERNATİF)	
		KABUL (1-β)	RED (β)
H0 (Null)	KABUL (1-α)	ÖNEMSİZ FARK $P = (1-\alpha)(1-\beta) = 1-\alpha-\beta+\alpha\beta$	NEGATİF $P = (1-\alpha)\beta = \beta-\alpha\beta$
	RED (α)	POZİTİF $P = \alpha(1-\beta) = \alpha-\alpha\beta$	-

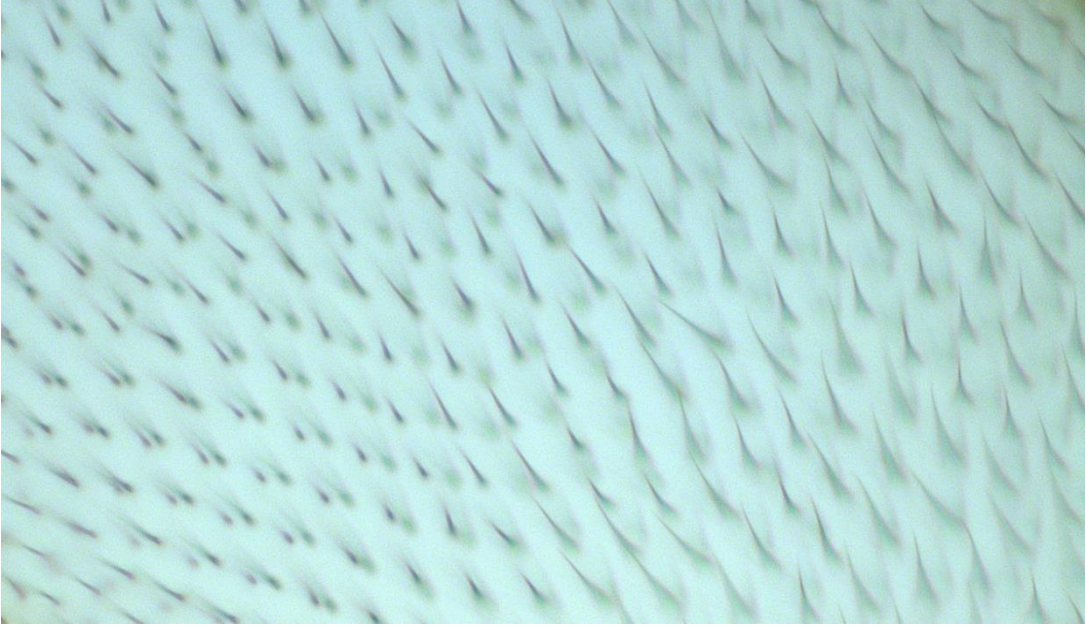
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Bu çalışmada günümüzde anestezi uygulamasında sıklıkla uygulanan ketamin ve rokuronyum bromürün, mutajenik ve rekombinojenik özelliklere sahip olup olmadığı *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile araştırılmıştır. Ayrıca bu anestezi ajanların degradasyon ürünlerinin de muhtemel genotoksik etkileri, sitokrom P450 enzim aktivasyonuna sahip yüksek biyoaktivasyonlu *mwh* ve *flr³* ırkları kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. 3. bölümde anlatılan deney aşamalarının başında her iki anestezi ajanının LD50 değerleri belirlenmiştir. Elde edilen ilk sonuçlara göre her iki maddenin 1000 µg/mL konsantrasyondan sonra larval gelişim üzerine ciddi toksik etkilere neden olduğu görülmüştür. Bu nedenle uygulama konsantrasyonlarının en yüksek dozu 1000 µg/mL olarak kabul edilmiş ve her madde için 4 farklı konsantrasyon hazırlanarak 3. larvaların besleneceği besiyerine eklenmiştir.

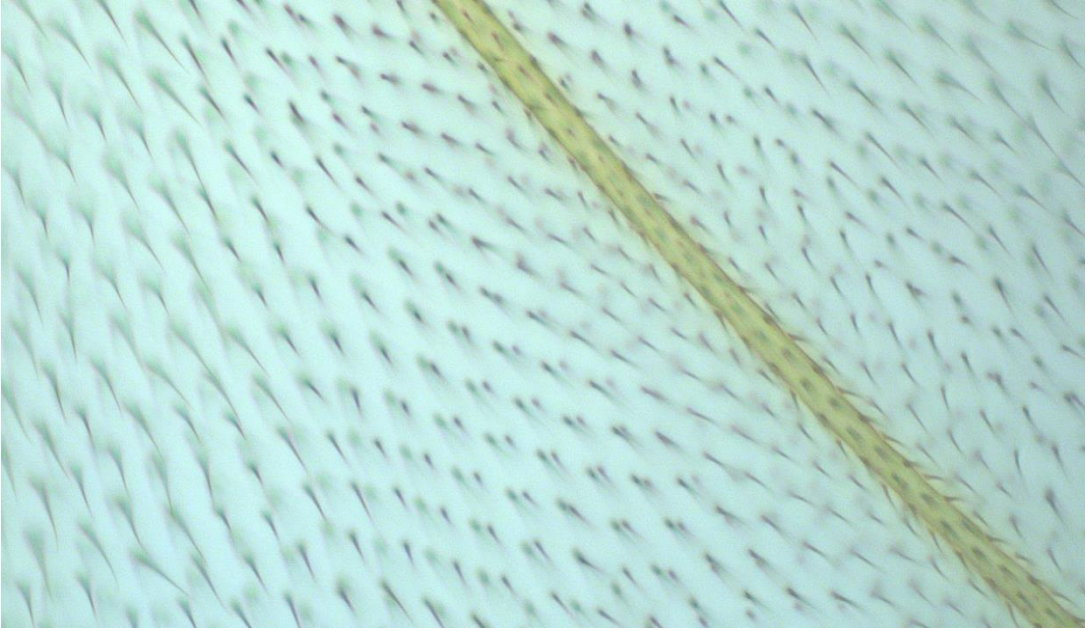
Ergine gelişen trans-heterozigot bireylerin kanatları *TM3* dengeleyici kromozom taşıyan ve taşımayan bireyler şeklinde ikiye ayrılmıştır:

- Normal kanatlı bireyler (*mwh/flr³* genotipli)
- Serrat kanatlı bireyler (*mwh/TM3* genotipli)

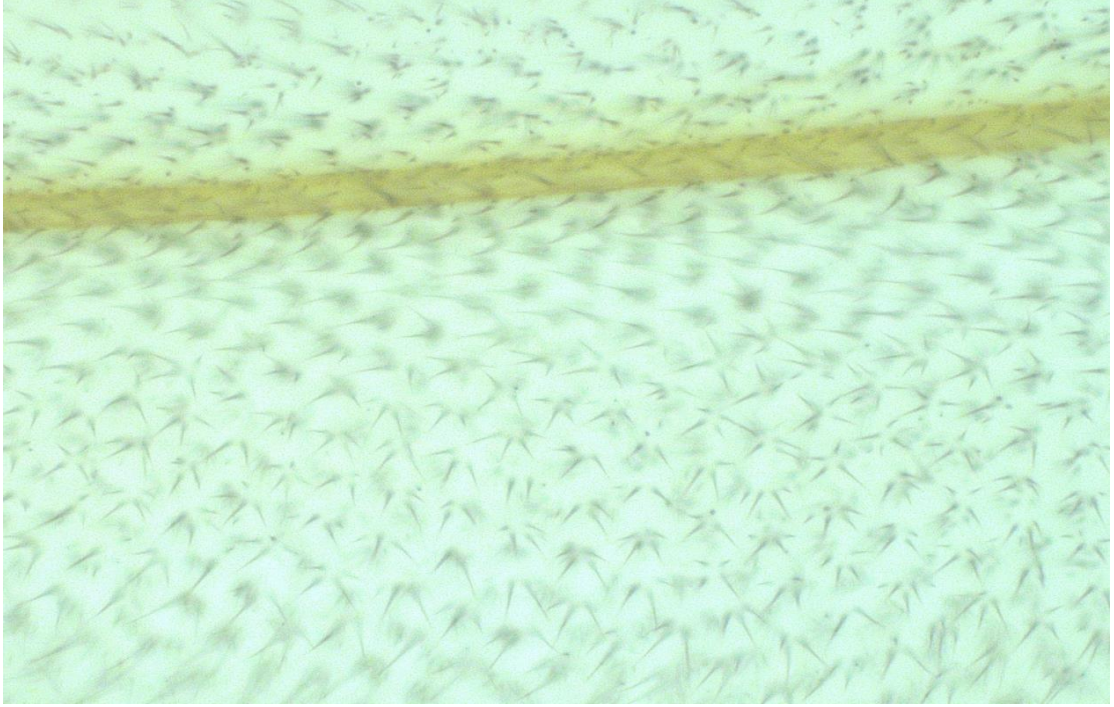
TM3 kromozomunun üzerinde dominant olan ve homozigot halde letal etki gösteren *Bd^S* geni bulunmaktadır. Bu geni taşıyan bireylerde kanatlar yabancı ırkta olduğu gibi düzgün kenarlı olmayıp testere ağzı şeklindedir (Graf ve Würgler, 1996). Çalışmada kanat preparatların hazırlanmasında stereo mikroskop (Leica EZ4), kanatların üzerindeki klonların taranması için ışık mikroskobu (Leica DM500) kullanılmıştır. Hazırlanan çeşitli preparatlardaki küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz klonların fotoğrafları ışık mikroskobu (Leica DM 4000B) ile çekilmiştir. Şekil 4.1-8'de gösterilmiştir.



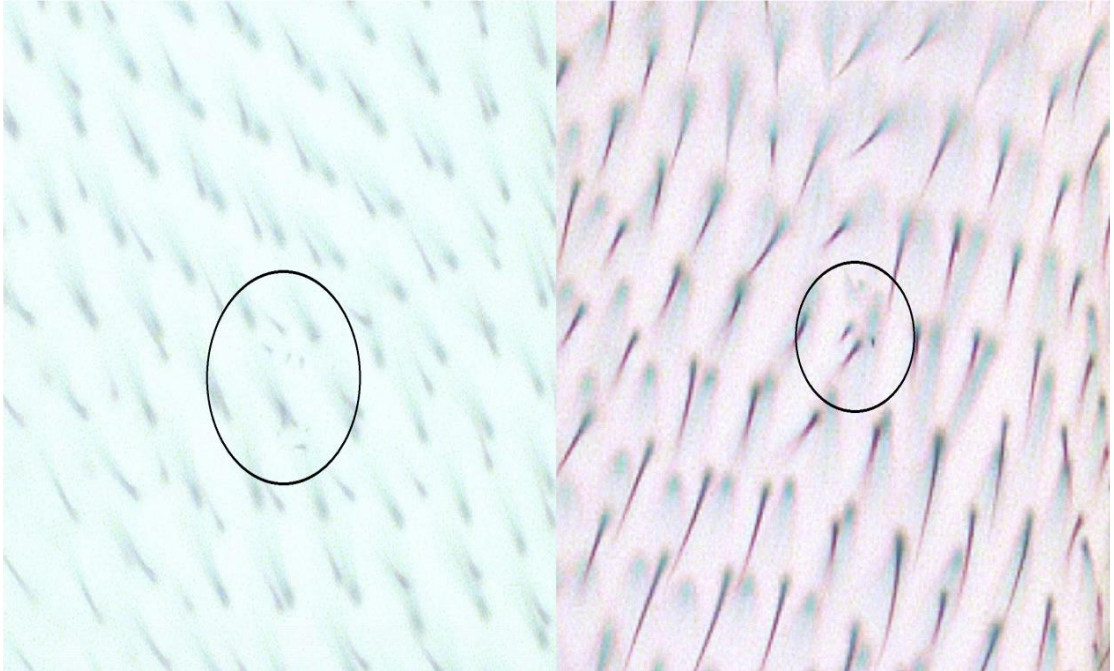
Şekil 4.1. Normal genetik özelliğe sahip bireyde gözlenen kanat trikومları (1) (10X40)



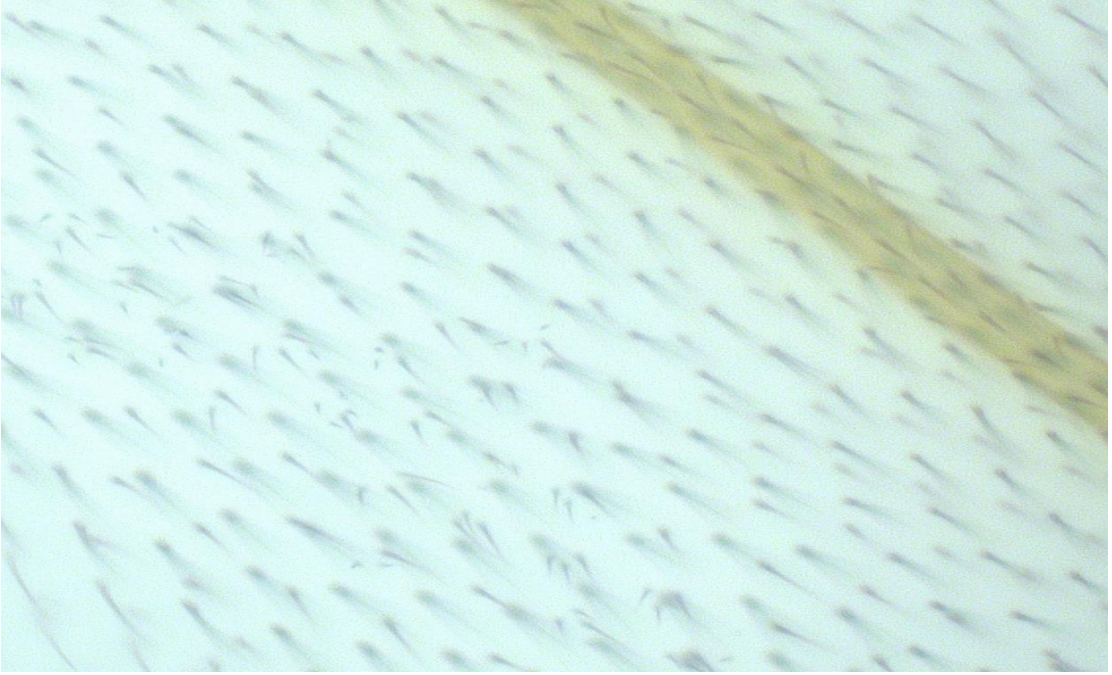
Şekil 4.2. Normal genetik özelliğe sahip bireyde gözlenen kanat trikومları (2) (10 X 40)



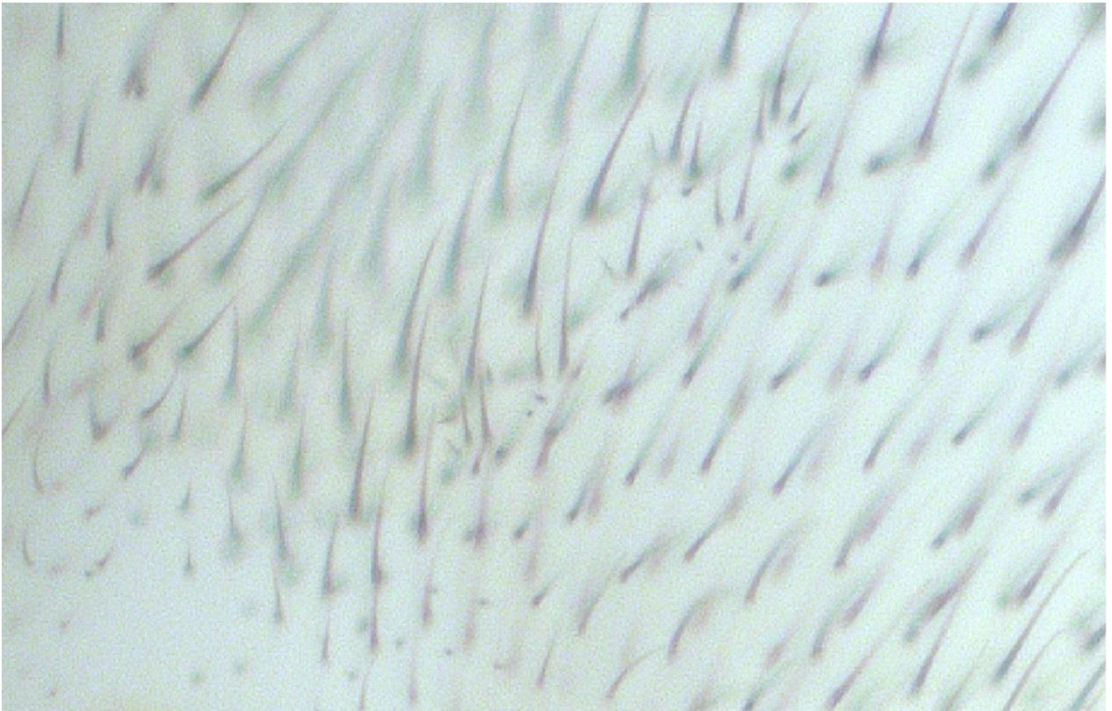
Şekil 4.3. Mutant *mwh/mwh* hattına sahip bireyde gözlenen kanat trikomları (10 X 40)



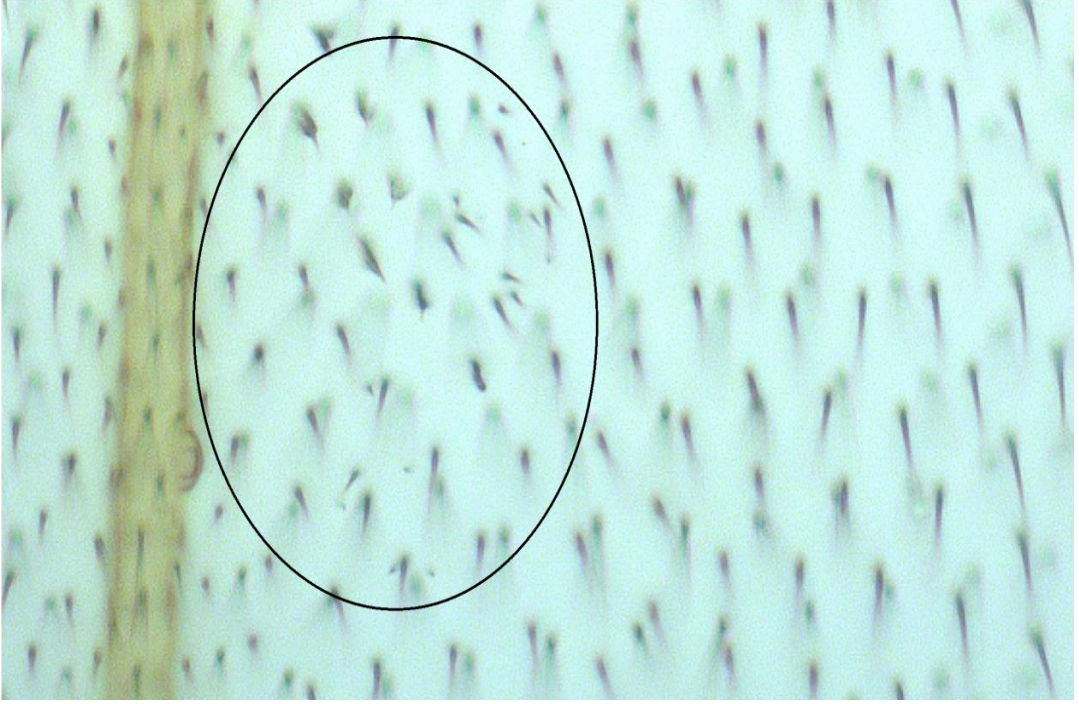
Şekil 4.4. Mutant küçük tek tip *mwh* klonların görünümü (10 X 40)



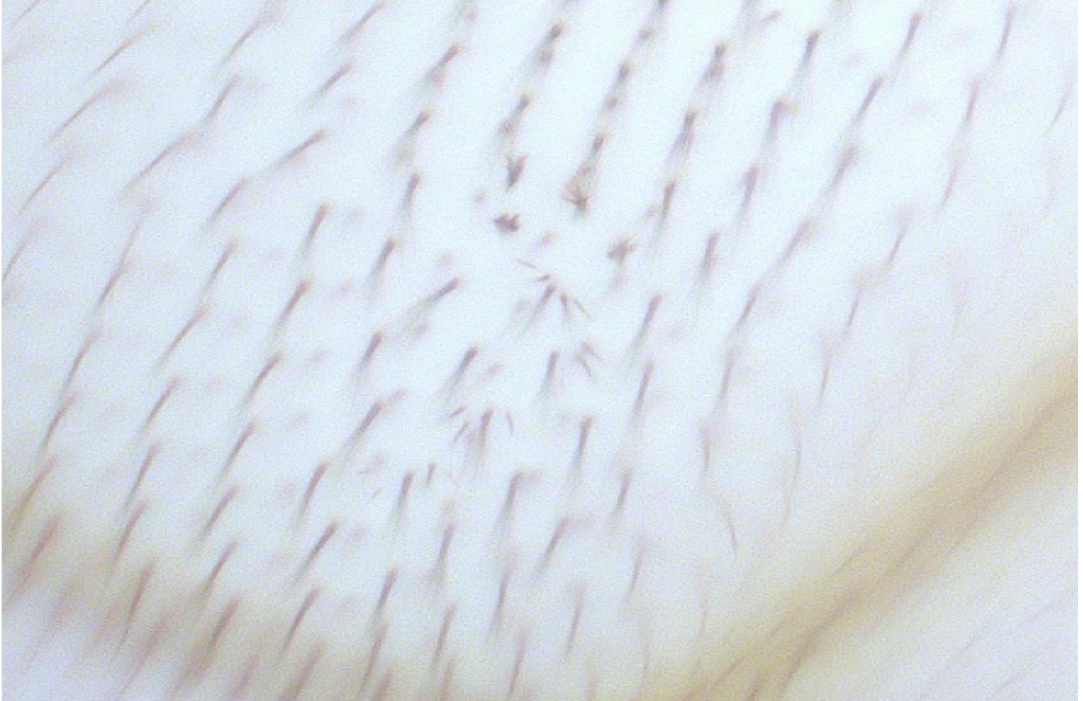
Şekil 4.5. Mutant büyük tek tip *mwh* klonların görünümü (1) (10 X 40)



Şekil 4.6. Mutant büyük tek tip *mwh* klonların görünümü (2) (10 X 40)



Şekil 4.7. Mutant ikiz klonların görünümü (1) (10 X 40)



Şekil 4.8. Mutant ikiz klonların görünümü (2) (10 X 40)

Ketamin ve rokuronyum bromür distile suda çözülmüştür. Bu nedenle distile su negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Laboratuvarımızda kullanılan mutant ırkların genetik özellikleri haftalık rutin kontrolden geçtiğinden dolayı pozitif kontrol kullanımına gerek duyulmamıştır.

Toplam klon, çoğu küçük tek tip klon olmak üzere az miktarda büyük tek tip klon ve ikiz klondan oluşmaktadır. Aynı zamanda toplam klonların tamamının *mwh* fenotipinden köken aldığı da görülmektedir (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2).

Çizelge 4.1 ve 4.2'de distile suyun normal ve yüksek aktivasyona sahip *mwh/flr³* ve *mwh/TM3* genotipli bireylerde spontan (kendiliğinden oluşan) klonlar gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre distile su için klon indüksiyon frekansı normal metabolik aktivasyona sahip *mwh/flr³* genotipli bireylerde 0.51 iken *mwh/TM3* genotipli bireyler için 0.10'dur. Yüksek aktivasyona sahip *mwh/flr³* genotipli bireylerde gözlenen klon indüksiyon frekansı 0.26 iken *mwh/TM3* genotipli bireylerde ise 0.31'dir.

Yüksek aktivasyonlu bireylerle yapılan çaprazlamalarda gözlenen spontan klonların normal aktivasyonlu bireyler kullanılarak yapılan çaprazlamalarda gözlenenlere göre daha fazla olması beklenmektedir (Graf and van Schaik, 1992). Yüksek aktivasyonlu *mwh/TM3* genotipli bireylerde gözlenen spontan klonlar, normal aktivasyonlu *mwh/TM3* genotipli bireylerde gözlenen spontan klonlardan daha fazladır. Ancak çalışmada normal aktivasyonlu *mwh/flr³* genotipli bireylerde gözlenen spontan klonlar, yüksek aktivasyonlu *mwh/flr³* genotipli bireylerde gözlenenlerden daha fazla çıkmıştır. *mwh/TM3* genotipli bireylerde ikiz klon *TM3* dengeleyici kromozomun mitotik rekombinasyonu baskılamasından dolayı görülmemektedir. Bilindiği gibi ikiz klonlar *flr³* geni ile 3. kromozomun sentrozomu arasındaki mitotik rekombinasyon sonucu oluşmaktadır (Graf *et al.*, 1984).

Çizelge 4.1. Ketamin uygulanmasıyla normal metabolik aktivasyona sahip mwh/flr^3 ve $mwh/TM3$ *Drosophila* hatlarında oluşan etkiler

Test konsantrasyonları ($\mu\text{g/mL}$)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klon (1-2 hücre) ($m = 2$)			Büyük tek tip klon (>2 hücre) ($m = 5$)			İkiz klon ($m = 5$)			Toplam mwh klon ($m = 2$)			Toplam klon ($m = 2$)			10^5 hücre başına düşen klon indüksiyon frekansı
		No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	
Normal kanat (mwh/flr^3)																	
Distile su	80	10	0.13		0	0.00		0	0.00		10	0.13		10	0.13		0.51
100	40	7	0.18	i	2	0.05	i	1	0.03	i	10	0.25	i	10	0.25	i	1.03
250	40	12	0.30	+	0	0.00	i	0	0.00	i	12	0.30	+	12	0.30	+	1.23
500	40	9	0.23	i	4	0.10	+	0	0.00	i	13	0.33	+	13	0.33	+	1.33
1000	40	13	0.33	+	2	0.05	i	0	0.00	i	15	0.38	+	15	0.38	+	1.54
Serrat kanat ($mwh/TM3$)																	
Distile su	80	2	0.03		0	0.00					2	0.03		2	0.03		0.10
100	40	0	0.00	-	0	0.00	i				0	0.00	-	0	0.00	-	0.00
250	40	2	0.05	i	0	0.00	i				2	0.05	i	2	0.05	i	0.21
500	40	2	0.05	i	0	0.00	i				2	0.05	i	2	0.05	i	0.21
1000	40	3	0.08	i	0	0.00	i				3	0.08	i	3	0.08	i	0.31

No: Klon sayısı, Fr: Frekans, *D*: Frei and Würigler (1988) prosedürüne göre istatistiksel değerlendirme, +: pozitif, -: negatif, i: önemsiz fark, m: çarpım faktörü, olasılık düzeyi $\alpha = \beta = 0.05$.

Çizelge 4.2. Ketamin uygulanmasıyla yüksek metabolik aktivasyona sahip mwh/flr^3 ve $mwh/TM3$ *Drosophila* hatlarında oluşan etkiler

Test konsantrasyonları ($\mu\text{g/mL}$)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klon (1-2 hücre) ($m = 2$)			Büyük tek tip klon (>2 hücre) ($m = 5$)			İkiz klon ($m = 5$)			Toplam mwh klon ($m = 2$)			Toplam klon ($m = 2$)			10^5 hücre başına düşen klon indüksiyon frekansı
		No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	
Normal kanat (mwh/flr^3)																	
Distile su	80	5	0.06		0	0.00		0	0.00		5	0.06		5	0.06		0.26
100	40	7	0.18	i	0	0.00	i	0	0.00	i	7	0.18	i	7	0.18	i	0.72
250	40	3	0.08	i	0	0.00	i	0	0.00	i	3	0.08	i	3	0.08	i	0.31
500	40	6	0.15	i	1	0.03	i	0	0.00	i	7	0.18	i	7	0.18	i	0.72
1000	40	8	0.20	+	2	0.05	i	0	0.00	i	10	0.25	+	10	0.25	+	1.03
Serrat kanat ($mwh/TM3$)																	
Distile su	80	6	0.08		0	0.00					6	0.08		6	0.08		0.31
100	40	2	0.05	i	0	0.00	i				2	0.05	i	2	0.05	i	0.21
250	40	2	0.05	i	0	0.00	i				2	0.05	i	2	0.05	i	0.21
500	40	4	0.10	i	0	0.00	i				4	0.10	i	4	0.10	i	0.41
1000	40	4	0.10	i	0	0.00	i				4	0.10	i	4	0.10	i	0.41

No: Klon sayısı, Fr: Frekans, D: Frei and Würzler (1988) prosedürüne göre istatistiksel değerlendirme, +: pozitif, -: negatif, i: önemsiz fark, m: çarpım faktörü, olasılık düzeyi $\alpha = \beta = 0.05$.

Çalışmada genotoksik etkileri belirlenmeye çalışılan ilk madde NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptörlerinin bir nonkompetitif antagonisti bir dissosiyatif anestezi ajan olan ketamini. Daha önceki kısımlarda anlatıldığı gibi ketamin için çözücü olarak distile su kullanılmış (Son and Yang, 2009; Fahringer *et al.*, 1974) ve dört farklı konsantrasyon (100, 250, 500 ve 1000 µg/mL) halinde *Drosophila* Instant Medium'a katılarak üçüncü larva evresindeki bireylere (72±4 saat) kronik olarak uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre normal aktivasyonlu *mwh/flr³* genotipli bireylerde küçük tek tip klon açısından 100 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarda çıkan sonuç anlamsız, 250 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarda ise pozitifdir. Büyük tek tip klon 100, 250 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlar için anlamsız, 500 µg/mL konsantrasyonunda ise pozitifdir. İkiz klon bütün konsantrasyonlarda anlamsızdır. Toplam *mwh* klon ve toplam klonlarda 100 µg/mL konsantrasyonunda çıkan sonuç anlamsız iken; 250, 500 ve 1000 µg/mL de ise sonuç pozitifdir.

Normal aktivasyonlu *mwh/TM3* genotipli bireylerde küçük tek tip klon 100 µg/mL'de negatif iken; 250, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarında ise anlamsızdır. Büyük tek tip klon için bütün konsantrasyonlarda çıkan sonuçlar anlamsızdır. Toplam *mwh* ve toplam klonlar ise 100 µg/mL de negatif; 250, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarda ise anlamsızdır. Normal aktivasyonlu *mwh/flr³* ve *mwh/TM3* genotipli bireylerin kanatlarında çıkan toplam klonlar karşılaştırıldığında, ketaminin 250 µg/mL ve üzeri konsantrasyonlarda genotoksik etkilere neden olduğu ve bu etkinin özellikle mitotik rekombinasyondan kaynaklandığı görülmektedir (Çizelge 4.1).

Yüksek metabolik aktivasyona sahip *mwh/flr³* genotipli bireylerde küçük tek tip klon 100, 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarda anlamsız iken; 1000 µg/mL'de ise pozitifdir. Büyük tek tip klon ve ikiz klon bütün konsantrasyonlarda anlamsızdır. Toplam *mwh* ve toplam klonlarda 100, 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarda çıkan sonuçlar anlamsız iken; 1000 µg/mL' de ise pozitifdir.

Yüksek metabolik aktivasyonlu *mwh/TM3* genotipli bireylerde küçük tek tip, büyük tek tip, toplam *mwh* ve toplam klonlar bütün konsantrasyonlarda anlamsız sonuçlar göstermiştir. Yüksek metabolik aktivasyonlu *mwh/flr³* ve *mwh/TM3* genotipli bireylerin kanatlarında çıkan toplam klonlar karşılaştırıldığında, 1000 µg/mL konsantrasyonlarda ketaminin degradasyon ürünleri özellikle mitotik rekombinasyon orjinli genotoksisite göstermiştir (Çizelge 4.2).

Ketaminin genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla yapılmış çok az çalışma mevcuttur. Elde edilen bu sonuçlar daha önce yapılmış olan çalışmalarla büyük benzerlik göstermektedir. Mikronukleus testi kullanılarak yapılmış bir çalışmada kısa süreli bir uygulamadan sonra ketamin ve N-ketamin (ketaminin bir nitro birleşigi) Çin hamsteri ovaryum hücrelerinde hem S9 metabolik aktivasyon sistemi varlığında hem de yokluğunda genotoksik etki göstermiştir. Ancak bu maddelerden biriyle yapılan sürekli muameleden sonra mikronukleus frekansında bir değişiklik olmamıştır (Toyama *et al.*, 2006). Benzer bir etki yine Çin hamsteri ovaryum hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada görülmüştür. Kardeş kromatid değişimi (SCE assay) testi kullanılarak, bu maddenin *in vitro* şartlarda genotoksik etki gösterdiği görülmüştür (Adhvaryu *et al.*, 1986).

Daha önce yapılmış bazı çalışmalarda ise S(+)-ketaminin apoptotik etkisi araştırılmıştır. Bir çalışmada *in vitro* koşullarda ketamin insan hepatom HepG2 hücrelerine uygulanmış ve ketaminin apoptosise neden olduğu görülmüştür (Lee *et al.*, 2009). Başka bir çalışmada S(+)-ketamin ve rasemik ketamin 24 saatlik bir süre için (1) antiapoptotik B-hücre lenfoma 2 proteininin aşırı ekspresyonunu gerçekleştiren insan jurkat T lenfoma hücreleri, (2) kaspas-8, kaspas-9 ya da fas protein açısından fakir hücreler ve (3) nöroblastom hücreleri (SHEP) kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre ketamin doza bağlı olarak lenfosit ve nöroblastom hücre hatlarında apoptosise neden olmuştur. Ayrıca S(+)-ketamin ve rasemik ketamin jurkat hücrelerinde benzer oranlarda hücre ölümünü indüklerken; S(+)-ketamin nöroblastom hücrelerinde hafif toksik etkiye neden olmuştur (Braun *et al.*, 2010).

Yeni doğmuş sıçanların ön beyinlerinden alınan nöronlar üzerinde yapılmış bir *in vitro* çalışmada, uzun süre ketamine maruz bırakılan hücrelerde NMDA reseptör ekspresyonunun arttığı; ketamin ortamdaki uzaklaştırıldığında yüksek oranda toksik kalsiyum girişinin oluşumuna neden olduğu ve böylece serbest oksijen radikallerinin artışı ve nöron hücrelerinin ölümünün gerçekleştiği görülmüştür (Liu *et al.*, 2013). Yenidoğan ratlarda ketaminin hücre ölümlerine neden olduğu başka çalışmalarda da görülmüştür (Ikonomidou *et al.*, 1999). Scallet ve ark. (2004) yapmış oldukları çalışmada Fluoro-Jade B (Nörodejenerasyon için seçici olan bir yeşil floresan boya) ve DAPI (mavi bir DNA boyası) kullanarak ketamin uygulanmış yenidoğan ratlarda nöronal apoptosise neden olduğunu teyit etmişlerdir. Başka çalışmalarda pediatriye sıklıkla kullanılan ketaminin, Rhesus maymunlarında yine erken gelişim döneminde nöron hücrelerinin ölümüne neden olduğu görülmüştür (Slikker *et al.*, 2007; Zou *et al.*, 2009).

Yapılan bazı çalışmalarda ketaminin sitokrom enzimlerinin aktiviteleri üzerinde de ciddi olumsuz etkilerinin olduğu görülmüştür. Meneguz ve ark. (1999) Sprague Dawley ırkı erkek ratları üzerinde yapmış oldukları bir *in vivo* çalışmada ketaminin sitokrom CYP 1A, CYP 2B, CYP 2E1 ve CYP 3A enzimleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Ketamin her ne kadar CYP 1A, 2B, 2E1 enzim seviyeleri üzerinde etki göstermese de, CYP 3A enzim seviyesini düşürdüğü görülmüştür.

Çalışmamızda genotoksik etkilerini belirlemeye çalıştığımız bir diğer madde kas gevşetici olarak günümüzde sıklıkla kullanılan rokuronyum bromürdür. Ketamin gibi rokuronyum bromür için de çözücü olarak distile su kullanılmış (Zeng *et al.*, 2011) ve dört farklı konsantrasyon (100, 250, 500 ve 1000 µg/mL) halinde *Drosophila* Instant Medium'a katılarak üçüncü larva evresindeki bireylere (72±4 saat) kronik olarak uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3 ve 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Rokuronyum bromür uygulanmasıyla normal metabolik aktivasyona sahip mwh/flr^3 *Drosophila* hattında oluşan etkiler

Test konsantrasyonları ($\mu\text{g/mL}$)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klon (1–2 hücre) ($m = 2$)			Büyük tek tip klon (>2 hücre) ($m = 5$)			İkiz klon ($m = 5$)			Toplam mwh klon ($m = 2$)			Toplam klon ($m = 2$)			10^5 hücre başına düşen klon indüksiyon frekansı
		No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	
Normal kanat (mwh/flr^3)																	
Distile su	80	10	0.13		0	0.00		0	0.00		10	0.13		10	0.13		0.51
100	40	3	0.08	-	0	0.00	i	0	0.00	i	3	0.08	-	3	0.08	-	0.31
250	40	6	0.15	i	1	0.03	i	0	0.00	i	7	0.18	i	7	0.18	i	0.72
500	40	4	0.10	i	0	0.00	i	0	0.00	i	4	0.10	i	4	0.10	i	0.41
1000	40	4	0.10	i	1	0.10	i	0	0.00	i	5	0.13	i	5	0.13	i	0.51

No: Klon sayısı, Fr: Frekans, *D*: Frei and Würzler (1988) prosedürüne göre istatistiksel değerlendirme, +: pozitif, -: negatif, i: önemsiz fark, m: çarpım faktörü, düzeyi $\alpha = \beta = 0.05$.

Çizelge 4.4. Rokuronyum bromür uygulanmasıyla yüksek metabolik aktivasyona sahip mwh/flr^3 ve $mwh/TM3$ *Drosophila* hatlarında oluşan etkiler

Test konsantrasyonları ($\mu\text{g/mL}$)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klon (1-2 hücre) ($m = 2$)			Büyük tek tip klon (>2 hücre) ($m = 5$)			İkiz klon ($m = 5$)			Toplam mwh klon ($m = 2$)			Toplam klon ($m = 2$)			10^5 hücre başına düşen klon induksiyon frekansı
		No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	
Normal kanat (mwh/flr^3)																	
Distile su	80	5	0.06		0	0.00		0	0.00		5	0.06		5	0.06		0.26
100	40	8	0.20	+	0	0.00	i	0	0.00	i	8	0.20	+	8	0.20	+	0.82
250	40	6	0.15	i	0	0.00	i	1	0.03	i	7	0.18	i	7	0.18	i	0.72
500	40	6	0.15	i	2	0.05	i	0	0.00	i	8	0.20	+	8	0.20	+	0.82
1000	40	17	0.43	+	2	0.05	i	0	0.00	i	19	0.48	+	19	0.48	+	1.95
Serrat kanat ($mwh/TM3$)																	
Distile su	80	6	0.08		0	0.00					6	0.08		6	0.08		0.31
100	40	5	0.13	i	0	0.00	i				5	0.13	i	5	0.13	i	0.51
250	40	0	0.00	-	0	0.00	i				0	0.00	-	0	0.00	-	0.00
500	40	0	0.00	-	0	0.00	i				0	0.00	-	0	0.00	-	0.00
1000	40	3	0.08	i	0	0.00	i				3	0.08	i	3	0.08	i	0.31

No: Klon sayısı, Fr: Frekans, *D*: Frei and Würgler (1988) prosedürüne göre istatistiksel değerlendirme, +: pozitif, -: negatif, i: önemsiz fark, m: çarpım faktörü, olasılık düzeyi $\alpha = \beta = 0.05$.

Rokuronyum bromür uygulanmış normal aktivasyonlu *mwh/flr³* genotipine sahip bireylerde klon tipleri genellikle anlamsız sonuçlar göstermiştir. Büyük tek tip ve ikiz klon bütün uygulama konsantrasyonlarında anlamsız sonuçlar vermiştir. Küçük tek tip, toplam *mwh* ve toplam klonlarda 100 µg/mL konsantrasyonunda sonuçlar negatif iken; 250, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarda sonuçlar anlamsızdır. Rokuronyum bromür normal aktivasyonlu *mwh/flr³* genotipinde herhangi bir genotoksik etki meydana getirmediğinden dolayı, bu maddenin *mwh/TM3* genotipinde oluşturmuş olduğu etki incelenmemiştir. Elde edilen verilere dayanarak bu maddenin larval dönem üzerinde oluşturduğu toksik etkinin eşik değere kadar genotoksik etkiye neden olmadığı sonucuna varılmıştır (Çizelge 4.3).

Rokuronyum bromür ile muamele edilmiş yüksek metabolik aktivasyonlu *mwh/flr³* genotipine sahip bireylerde büyük tek tip ve ikiz klon bütün konsantrasyonlarda anlamsız sonuçlar vermiştir. Buna rağmen küçük tek tip klon 100 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarında pozitif, diğer iki konsantrasyonda anlamsız sonuç vermiştir. Toplam *mwh* ve toplam klon parametrelerine bakıldığında ise sonuçlar 250 µg/mL konsantrasyonunda anlamsız iken, diğer üç konsantrasyonda pozitifdir. *mwh/TM3* genotipinde ise elde edilen sonuçlar ya anlamsız ya da negatiftir (Çizelge 4.4). Bu sonuçlara göre rokuronyum bromür *Drosophila melanogaster*'in transheterozigot larvalarında 1000 µg/mL konsantrasyonuna kadar her ne kadar genotoksik etki göstermese de, P450 enzim sistemi aracılığıyla oluşturulan degradasyon ürünlerinin aynı konsantrasyonlarda özellikle somatik rekombinasyon orjinli genotoksisiteye neden olduğu görülmüştür. Ayrıca tablolara bakıldığında en yüksek klon indüksiyon frekansı değeri 1000 µg/mL konsantrasyonunda rokuronyum uygulanmış yüksek metabolik aktivasyonlu *mwh/flr³* genotipine sahip bireylerde görülmektedir (1.95) (Çizelge 4.4). 10^5 hücre başına düşen klon indüksiyon frekansı 2.0'dan yüksek olduğunda bu genotoksik aktiviteleri belirlenmeye çalışılan maddenin mutajenik ve/veya rekombinojenik özelliklere sahip olduğunun bir işareti olarak kabul edilmektedir (Graf *et al.*, 1994). Çalışmamızda elde edilen sonuçlara bakıldığında her ne kadar genotoksik etki açısından pozitif parametreler bulunsa da, klon indüksiyon frekansı 2.0'dan yüksek bir değer göstermemiştir.

Rokuronyum bromür ile alakalı literatür incelendiğinde, bu maddenin genotoksik etkilerinin belirlenmeye çalışıldığı çok az çalışmanın mevcut olduğu görülmektedir. Zan ve ark. (2011) yapmış oldukları çalışmada, insan periferal kan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi (sister chromatid exchange – SCE) ve kromozom aberasyonu (chromosome aberration – CA) ve mikronükleus (micronucleus – MN) analizlerini kullanarak rokuronyumun genotoksik etkilerini belirlemeye çalışmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre, rokuronyum kromozom aberasyonlarının frekansını artırırken; kardeş kromatid değişimi frekansında herhangi bir artışa neden olmamıştır. Ayrıca poliferasyon indeksi ve mitotik indeksi düşürmemiştir. Buna göre rokuronyum her ne kadar çekirdek bölünme indeksini düşürmemişse de, mikronükleus frekansında artışa neden olmuştur. Çalışmadan bu maddenin klastojen etkili olduğunu, ancak insan periferal kan lenfositlerinde sitotoksik etki göstermediği sonucuna varılmıştır. Ayrıca bu maddenin mutajenitesi Ames, *E. coli*'de tersinir mutasyon, Çin hamsteri V79 hücrelerinde *in vitro* memeli hücre mutasyonu, insan lenfositlerinde *in vitro* kromozom aberasyonu ve rat kemik iliğinde *in vivo* mikronükleus test yöntemleriyle araştırılmış ve elde edilen sonuçlar bu maddenin herhangi bir mutajenik etkiye neden olmadığını göstermiştir (Merc, 2014). Çalışmamızda normal aktivasyonlu bireylerden elde edilen veriler bu sonuçlarla benzerlik gösterirken; yüksek aktivasyonlu bireylerden elde edilen sonuçlar şaşırtıcı bir biçimde pozitif çıkmıştır. Bu sonuçlar rokuronyumun P450 enzim mekanizması sonucu tamamen detoksifiye olmadığını göstermektedir. Her ne kadar literatürde rokuronyum ile ilgili yeterli genotoksik çalışma bulunmasa da; diğer nondepolarizan kas gevşeticiler olan atrakyum ve sisatrakyumun metabolizma ürünleri olan reaktif akrilat metabolitlerinden oksidatif strese neden olduğu çeşitli çalışmalarda gözlenmiştir. Oksidatif stresin apoptosis oluşumunda potansiyel bir etken olduğu göz önüne alındığında, bu metabolitler sonucunda hepatom HepG2 ve insan göbek veni endotel hücrelerinin poliferasyonunda inhibisyon ve insan göbek veni endotel hücrelerinde apoptosis oluşumuna neden olduğu sonucuna varılabilir (Amann *et al.*, 2001; Rieder *et al.*, 2005). Rokuronyumun memeli metabolizmasındaki metabolitlerinin 17-desacetyl ve *N*-desallyl olduğu bildirilmişse de, bu maddeler hakkında literatürde toksik/genotoksik çalışma mevcut değildir (Proost *et al.*, 2000).

5. SONUÇ

Günümüzde genetik toksikolojide kullanılan birçok test yöntemi mevcuttur. Bir genotoksisite test yönteminin geçerli olması için birçok avantaja sahip olması beklenmektedir. Test yönteminin uygulanabilirliği, kullanılan malzemelerin kolay temini ve ucuz maliyetli olması, deneyde kullanılan organizmanın çok sayıda yavru vermesi, birçok varyasyona sahip ve kısa ömürlü olması gibi birçok avantajın sağlanmasıyla belirlenmektedir. Günümüzde ayrıca ulusal ve uluslararası etik kurullarının almış olduğu kararların da test yönteminin seçiminde dikkate alınması gerekmektedir. Herhangi bir farmakolojik ajanın, genotoksisitesinin belirlenmesinde memeli *in vivo* test yöntemleri kullanılmadan önce ilk olarak mikroorganizmaların kullanıldığı test yöntemleriyle başlamanın daha sağlıklı sonuçlar doğuracağını düşünmekteyiz. Frei ve Würzler (1996) tarafından SMART yönteminin, mikroorganizmal *in vitro* ve memeli *in vivo* test yöntemleri arasında bağlantı görevi gördüğü belirtilmiştir.

Anestezik ajanlar, tıp veya veterinerlikte sıklıkla herhangi bir cerrahi müdahaleden önce veya sonra operasyon bölgesinin veya vücudun tümünün oluşan ağrıya karşı duyarsızlaştırılması amacıyla kullanılmaktadır. Genel olarak bu ajanlar yüksek dozda istenmeyen olumsuz etkilere neden olduğu gibi ölümcül de olabilmektedir. Ketamin gibi Schedule II narkotik listesinde olan bazı anesteziklerin ise toplumda keyif verici madde olarak kullanıldığı göz önüne alındığında bu maddelerin toksik, mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin belirlenmesi hayati önem taşımaktadır. Ayrıca, bu maddelerin metabolize edilmesi sonucu oluşabilecek metabolitlerinin de promutajen özelliğe sahip olabileceği gözardı edilmemelidir. Metabolitlerin muhtemel etkisi, ajanın hangi yolla vücuda alınacağını belirlemede büyük önem taşımaktadır. Literatür incelendiğinde bu maddeler üzerinde yapılan genotoksik çalışmaların sınırlı olduğu görülmektedir. Bu nedenle çalışmamızda SMART yöntemini kullanarak üzerinde çok sınırlı çalışma olan ketamin ve rokuronyum bromürün genotoksisiteleri belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmamız ayrıca anestezik ajanların genotoksik etkilerinin belirlenmesinde SMART yönteminin uygulanabilir bir test metodu olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

Adhvaryu, S. G., Trivedi, A. H., Jani, K. H., Vyas, R. C. and Dave, B. J., “Genotoxic effects of ketamine on CHO cells”, *Archives Toxicology*, 59: 124-125 (1986).

Amann, A., Rieder, J., Fleischer, M., Niedermüller, P., Hoffmann, G., Amberger, A., Marth, C., Nigrovic, V. and Pühringer, F., “The influence of atracurium, cisatracurium, and mivacurium on the proliferation of two human cell lines in vitro”, *Anesthesia & Analgesia*, 93 (3): 690-696 (2001).

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

Auerbach, C., Robson, J. M., Carr, J. G., “The chemical production of mutations”, *Science*, 105 : 243-247 (1947).

Bahçeci, Z., “Genetik 3. Baskı”, *Öğrenci Kitabevi Yayınları*, Kırşehir, 8-10 (2010).

Barile, F., “Principles of toxicology testing”, *CRC Press, Taylor & Francis Group*, Boca Raton, FL, (2008).

Berman, R. M., Cappiello, A., Anand, A., Oren, D. A., Heninger, G. R., Charney, D. S. and Krystal, J. H., “Antidepressant effects of ketamine in depressed patients”, *Biological Psychiatry*, 47: 351-354 (2000).

Bernards, A. and Hariharan, I. K., “Of flies and men—studying human disease in *Drosophila*”, *Current Opinion in Genetics Development*, 11 (3): 274-278 (2001).

Braun, S., Gaza, N., Werdehausen, R., Hermanns, H., Bauer, I., Durieux, M. E., Hollmann, M. W. and Stevens, M. F., “Ketamine induces apoptosis via the mitochondrial pathway in human lymphocytes and neuronal cells”, *British Journal of Anaesthesia*, 105: 347-354 (2010).

Bruno, R., Matthews, A. J., Dunn, M., Alati, R., McIlwraith, F., Hickey, S., Burns, L. and Sindicich, N., “Emerging psychoactive substance use among regular ecstasy users in Australia”, *Drug and Alcohol Dependence*, 124: 19-25 (2012).

Brusick, D. J., “Fundamentals of Genetic Toxicology, in: Principles of Genetic Toxicology”, *Plenum Press*, New York, 11-44 (1980).

Carmona, E. R., Kossatz, E., Creus, A. and Marcos, R., “Genotoxic evaluation of two mercury compounds in the *Drosophila* wing spot test”, *Chemosphere*, 70: 1910-1914 (2008).

Chien, S., Reiter, L. T., Bier, E. and Gribskov, M., “Homophila: human disease gene cognates in *Drosophila*”, *Nucleic Acids Research*, 30 (1): 149-151 (2002).

Chu, E. H. and Malling, H. V., "Mammalian cell genetics, II. Chemical induction of specific locus mutations in Chinese hamster cells *in vitro*", ***Proceedings National Academy Science***, 61: 1306-1312 (1968).

Costa, W. F. and Nepomuceno, J. C., "Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and minerals on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*", ***Environmental and Molecular Mutagenesis***, 47: 18-24 (2006).

Cunha, K. S., Reguly, M. L., Graf, U. and de Andrade, H. H. R., "Taxanes: the genetic toxicity of paclitaxel and docetaxel in somatic cells of *Drosophila melanogaster*", ***Mutagenesis***, 16 (1): 79-84 (2001).

Dapkus, D. and Merrell, D. J., "Chromosomal analysis of DDT resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*", ***Genetics***, 87:685-697 (1977).

Demir, E., Kocaoğlu, S. and Kaya, B., "Genotoxicity testing of four benzyl derivatives in the *Drosophila* wing spot test", ***Food and Chemical Toxicology***, 46: 1034-1041 (2008).

Eichenberger, U., Neff, F., Svetcic, G., Björger, S., Petersen-Felix, S., Arendt-Nielsen, L. and Curatolo, M., "Chronic phantom limb pain: the effects of calcitonin, ketamine, and their combination on pain and sensory thresholds", ***Anesthesia Analgesia***, 106: 1265-1273 (2008).

Eide, P. K., Stubhaug, A., Oye, I. and Breivik, H., "Continuous subcutaneous administration of the N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor antagonist ketamine in the treatment of post-herpetic neuralgia", ***Pain***, 61: 221-228 (1995).

El Hamms, R., Idaomar, M., Alonso-Moraga, A. and Serrano, A. M., "Antimutagenic properties of bell and black peppers", ***Food and Chemical Toxicology***, 41: 41-47 (2003).

Fahringer, E. E., Foley, E. L. and Redgate, E. S., "Pituitary Adrenal Response to Ketamine and the Inhibition of the Response by Catecholaminergic Blockade", ***Neuroendocrinology***, 14: 151-164 (1974).

Flagg, R. O., "Carolina *Drosophila* Manual", Carolina Biological Supply Company, Burlington, (2005).

Frei, H. and Würgler, F. E., "Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*", ***Mutagenesis***, 11: 315-325 (1996).

Frölich A., Würigler F. E., “New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test”, ***Mutation Research***, 216 (3):179-187 (1989).

Graf, U., Würigler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B. and Kale, P. G., “Somatic mutation test in *Drosophila melanogaster*”, ***Environmental and Molecular Mutagenesis***, 6: 153-188 (1984).

Graf, U. and van Schaik, N., “Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*”, ***Mutation Research***, 271: 59-67 (1992).

Graf, U., Moraga, A. A., Castro, R. and Carrillo, E. D., “Genotoxicity testing of different types of beverages in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test”, ***Food and Chemical Toxicology***, 32: 423-430 (1994).

Graf, U., “Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*”, ***Experientia***, 51: 168-173 (1995).

Graf, U., Abraham, S. K., Guzmán-Rincón, J. and Würigler, F. E., “Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*”, ***Mutation Research***, 402: 203-209 (1998).

Guzmán-Rincón, J. and Graf, U., “*Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. Biomonitor and biomarkers as indicators of environmental change”, Eds: F.M. Butterworth, L.D. Corkum ve J. Guzmán-Rincón, ***Plenum Press***, New York, NY, 169-181 (1995).

Gürbüz, M. and Kızılet, H., “Evaluation of genotoxicity of two sulphate compounds using the somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*”, ***Fresenius Environmental Bulletin***, 19: 1695-1700 (2010).

Gürbüz, M., Çapoglu, I., Kızılet, H., Halici, Z., Özçiçek, F. and Demirtas, L., “Genotoxic evaluation of two oral antidiabetic agents in the *Drosophila* wing spot test”, ***Toxicology Industrial Health***, 30: 376-383 (2012).

Gürbüz, M., Oral, E., Kızılet, H., Halici, Z. and Gulec, M., “Genotoxic evaluation of selective serotonin-reuptake inhibitors by use of the somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*”, ***Mutation Research***, 748: 17- 20 (2012).

Hällström, I., Blanck, A. and Atuma, S., “Genetic variation in cytochrome P-450 and xenobiotic metabolism in *Drosophila melanogaster*”, ***Biochemical Pharmacology***, 33: 13-20 (1984).

Heres-Pulido, M. E., Duenas-Garcia, I., Castarieda-Partida, L., Sanchez-Garcia, A., Contreras-Sousa, M., Duran-Diaz, A. and Graf, U., "Genotoxicity of tamoxifen citrate and 4-nitroquinoline-1-oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*", *Mutagenesis*, 19: 187-193 (2004).

Hsu, H. R., Mei, Y. Y., Wu, C. Y., Chiu, P. H. and Chen, H. H., "Behavioural and toxic interaction profile of ketamine in combination with caffeine", *Basic Clinical Pharmacology Toxicology*, 104: 379-383 (2009).

Huang, L., Tang, Z., Li, D., Wang, G., Huang, K., Zhou, J., Li, Y., Gao, B. and Chen, J., "Ketamine induces apoptosis of human uroepithelial SV-HUC-1 cells", *Medical Science*, 39 (7): 703-707 (2014).

Hunter, J. M., "New neuromuscular blocking drugs", *New England Journal of Medicine*, 332: 1691-1699 (1995).

Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T. I., Stefovska, V., Turski, L. and Olney, J. W., "Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain", *Science*, 283 (5398): 70-74 (1999).

James, R. C., Roberts, S. M. and Williams, P. L., "General Principles of Toxicology in: principles of toxicology", Phillip L. Williams, Robert C. James, stephen m. roberts, (eds), 2nd ed., *John Wiley and Sons*, New york, 3-34 (2000).

Jan, A., "Pechenik Eklembacaklılar", Sözen, M., Kandemir, İ., Hasbenli, A., Matur, F., *Nobel Yayıncılık*, Ankara, 341-419 (2013).

Jansen, K. L. R. and Darracot-Cankovic, R., "The nonmedical use of ketamine, part two: a review of problent use and dependence", *Journal of Psychoactive Drugs*, 33: 151-158 (2001).

Jensen, L. L., Handberg, G., Helbo-Hansen, H. S., Skaarup, I., Lohse, T., Munk, T. and Lund, N., "No morphine sparing effect of ketamine added to morphine for patient-controlled intravenous analgesia after uterine artery embolization", *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 52: 479-486 (2008).

Karabulut, A. K., Reisli, R., Uysal, I. I., Celik, J. B. and Ziylan, T., "An investigation of non depolarizing muscle relaxants on embryonic development in cultured rat embryos", *European Journal of Anaesthesiology*, 21 (09): 715-724 (2004).

Karekar, V., Joshi, S. and Shinde, S. L., "Antimutagenic profile of three antioxidants in the Ames assay and the *Drosophila* wing spot test", *Mutation Research*, 468: 183-194 (2000).

- Kaya, B., Creus, A., Yanikoğlu, A., Cabré, O. and Marcos, R., "Use of the *Drosophila* wing spot test in the genotoxicity testing of different herbicides", *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 36: 40-46 (2000).
- Kaya, B., Yanikoğlu, A., Creus, A. and Marcos, R., "Genotoxicity testing of five herbicides in the *Drosophila* wing spot test", *Mutation Research*, 465: 77-84 (2000).
- Kaya, B., Creus, A., Velázquez, A., Yanikoğlu, A. and Marcos, R., "Genotoxicity is modulated by ascorbic acid: Studies using the wing spot test in *Drosophila*", *Mutation Research*, 520: 93-101 (2002).
- Kaya, B., Marcos, R., Yanikoğlu, A. and Creus, A., "Evaluation of the genotoxicity of four herbicides in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* using two different strains", *Mutation Research*, 557: 53-62 (2004).
- Keçik, Y., "Temel Anestezi El Kitabı", *Güneş Kitabevi*, İstanbul, 76-103 (2013).
- Kiefer, R. T., Rohr, P., Ploppa, A., Dieterich, H. J., Grothusen, J., Koffler, S., Altemeyer, K. H., Unertl, K. and Schwartzman, R. J., "Efficacy of ketamine in anesthetic dosage for the treatment of refractory complex regional pain syndrome: an open-label phase II study", *Pain Medicine*, 9: 1173-1201 (2008).
- Lee, S. T., Wu, T. T., Yu, P. Y. and Chen, R. M., "Apoptotic insults to human HepG2 cells induced by S-(+)-ketamine occurs through activation of a Bax-mitochondria-caspase protease pathway", *British Journal of Anaesthesia*, 102: 80-89 (2009).
- Lewis, E. B. and Bacher, F., "Methods of feeding ethylmethanesulfonate (EMS) to *Drosophila* males", *Drosophila Information Service*, 43: 193 (1968).
- Li, J. H., Vicknasingam, B., Cheung, Y. W., Zhou, W., Nurhidayat, A. W., Des Jarlais, D. C. and Schottenfeld, R., "To use or not to use: an update on licit and illicit ketamine use", *Substance Abuse and Rehabilitation*, 2: 11-20 (2011).
- Lim, D. K., "Ketamine associated psychedelic effects and dependence", *Singapore Medical Journal*, 44: 31-34 (2003).
- Lindsley, D. L. and Zimm, G. G., "The genome of *Drosophila melanogaster*", *Academic Press*, 1133 p, San Diego, CA (1992).
- Liu, F., Patterson, T. A., Sadovova, N., Zhang, X., Liu, S., Zou, X., Hanig, J. P., Paule, M. G., Jr Slikker, W. and Wang, C., "Ketamine-induced neuronal damage and altered N-methyl-daspartate receptor function in rat primary forebrain culture", *Toxicological Sciences*, 131: 548-557 (2013).

Mathisen, L. C., Skjelbred, P., Skoglund, L. A. and Oye, I., “Effect of ketamine, an NMDA receptor inhibitor, in acute and chronic orofacial pain”, *Pain*, 61: 215-220 (1995).

Mercadante, S., Arcuri, E., Tirelli, W. and Casuccio, A., “Analgesic effect of intravenous ketamine in cancer patients on morphine therapy: a randomized, controlled, double-blind, crossover, double-dose study”, *Journal of Pain and Symptom Management*, 20: 246-252 (2000).

Miller, R. D. and Sdrales, L., “Miller's Anesthesia Review”, *Saunders*, 2nd Edition , (2011).

Moore, K. A., Sklerov, J., Levine, B. and Jacobs A. J., “Urine concentrations of ketamine and norketamine following illegal consumption”, *Journal of Analytical Toxicology*, 25: 583-588 (2001).

Morgan, G. E., Mikhail, M. S., Murray, M. J. and Larson, C. P., “ Klinik Anesteziyoloji, 3. Baskı” , Tulunay, M., Cuhruk, H., *Güneş Kitabevi*, Ankara, 178-198 (2004).

Morgan, C. J. A. and Curran, H.V., “Ketamine use: a review”, *Addiction*, 107: 27–38 (2012).

Muller, H. J., “Artificial transmutation of the gene.”, *Science*, 66: 84-87 (1927).

Okon, T., “Ketamine: an introduction for the pain and palliative medicine physician”, *Pain Physician*, 10: 493-500 (2007).

Pacella, R. E., “Genotoxicity of mycotoxins in an improved *Drosophila* wing spot test and other short-term tests”, PhD thesis, *Witwatersrand University*, Johannesburg, (1993).

Pacella R. E., Norman, van Schaik, N. and Graf, U., “New ‘high bioactivation’ cross for the SMART wing assay”, *Drosophila Information Service*, 77 152-153 (1996).

Pal, H. R., Berry, N., Kumar, R. and Ray, R., “Ketamine dependence”, *Anaesthesia and Intensive Care*, 30 (3): 382-384 (2002).

Patenkovic, A., Stamenkovic-Radak, M., Banjanac, T. and Andjelkovic, M., “Antimutagenic effect of sage tea in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*”, *Food and Chemical Toxicology*, 47: 180-183 (2009).

Proost, J. H., Eriksson, L. I., Mirakhur, R. K., Roest, G. and Wierda, J. M. K. H., “Urinary, biliary and faecal excretion of rocuronium in humans”, *British Journal of Anaesthesia*, 85 (5): 717-723 (2000).

Ramo, D. E., Grov, C., Delucchi, K., Kelly, B. C. and Parsons, J. T., “Typology of club drug use among young adults recruited using time-space sampling”, *Drug and Alcohol Dependence*, 107: 119-127 (2010).

Rieder, J., Lirk, P., Bodrogi, F., Sawires, M., Gruber, G. and Hoffmann, G., “Cisatracurium, but not mivacurium, induces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells in vitro”, *European Journal of Anaesthesiology*, 22 (01): 16-19 (2005).

Rizki, M., Amrani, S., Creus, A., Xamena, N. and Marcos, R., “Antigenotoxic properties of selenium: Studies in the wing spot test in *Drosophila*”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 37: 70-75 (2001).

Robert, C. James, Stephen M. Roberts and Phillip L. Williams, “General Principles of Toxicology”, 2nd ed., *John Wiley and Sons*, New York, 3-34 (2000).

Rodrigues, F., Lehmann, M., do Amaral, V. S., Reguly, M. L. and de Andrade, H. H. R., “Genotoxicity of three mouthwash products, Cepacol®, Periogard®, and Plax®, in the *Drosophila* wing-spot test”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 48: 644-649 (2007).

Rojas-Molina, M., Campos-Sánchez J., Analla, M., Muñoz-Serrano, A. and Alonso-Moraga, Á., “Genotoxicity of vegetable cooking oils in the *Drosophila* wing spot test”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 45: 90-95 (2005).

Romero-Jiménez, M., Campos-Sánchez, J., Analla, M., Muñoz-Serrano, A. and Alonso-Moraga, Á., “Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs”, *Mutation Research*, 585: 147-155 (2005).

Russell, L. B., Selby, P. B., von Halle, E., Sheridan, W. and Valcovic, L., “Use of the mouse spot test in chemical mutagenesis: interpretation of past data and recommendations for future work”, *Mutation Research*, 86 (3): 355-379 (1981).

Salman, S., “Omurgasız Hayvanlar Biyolojisi”, *Palme Yayıncılık*, Arthropoda, Ankara, 177-350 (2004).

Sarikaya, R., Çakır, Ş., “Genotoxicity testing of four food preservatives and their combinations in the *Drosophila* wing spot test”, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20: 424-430 (2005).

Scallet, A. C., Schmued, L. C., Slikker, W., Grunberg, N., Faustino, P. J., Davis, H., Lester, D., Pine, P. S., Sistare, F. and Hanig, J. P., “Developmental neurotoxicity of

ketamine: morphometric confirmation, exposure parameters, and multiple fluorescent labeling of apoptotic neurons”, *Toxicological Sciences*, 81 (2): 364-370 (2004).

Schmid, R. L., Sandler, A. N. and Katz, J., “Use and efficacy of low-dose ketamine in the management of acute postoperative pain: a review of current techniques and outcomes”, *Pain*, 82: 111-125 (1999).

Seidman, M., “The development of transient SV40 based shuttle vectors for mutagenesis studies: problems and solutions”, *Mutation Research*, 220 (2-3): 55–60 (1989).

Slikker, W., Zou, X., Hotchkiss, C. E., Divine, R. L., Sadovova, N., Twaddle, N. C., Doerge, D. R., Scallet, A. C., Patterson, T. A., Hanig, J. P., Paule, M. G. and Wang, C., “Ketamine-induced neuronal cell death in the perinatal rhesus monkey”, *Toxicological Sciences*, 98 (1): 145-158 (2007).

Snyder, R. D. and Gren, J. W., “A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals”, *Mutation Research*, 488 (2): 151-69 (2001).

Snyder, R. D., Pearl, G. S., Mandakas, G., Choy, W. N., Goodsaid, F. and Rosenblum, I. Y., “Assessment of the sensitivity of the computational programs DEREK, TOPKAT, and MCASE in the prediction of the genotoxicity of pharmaceutical molecules”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 43 (3): 143-58 (2004).

Snyder, R. D., “An update on the genotoxicity and carcinogenicity of marketed pharmaceuticals with reference to in silico predictivity”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50 (6): 435-50 (2009).

Son, K. A., Kang, J. H. and Yang, M. P., “Ketamine inhibits the phagocytic responses of canine peripheral blood polymorphonuclear cells through the upregulation of prostaglandin E2 in peripheral blood mononuclear cells in vitro”, *Research in Veterinary Science*, 87 (1): 41-46 (2009).

Spanó, M. A., Frei, H., Würgler, F. E. and Graf, U., “Recombinogenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test”, *Mutagenesis*, 16 (5): 385-394 (2001).

Sparrow, A. H., Underbrink, A. G. and Rossi, H. H., “Mutations induced in *Tradescantia* by small doses of X-rays and neutrons: analysis of dose–response curves”, *Science*, 176: 916–918 (1972).

Suy, K., Morias, K., Cammu, G., Hans, P., van Duijnhoven, W. G., Heeringa, M. and Demeyer, I., “Effective reversal of moderate rocuronium- or vecuronium-induced neuromuscular block with sugammadex, a selective relaxant binding agent”, *Anesthesiology*, 106: 283-288 (2007).

Tiburi M, Reguly, M. L., Schwartzmann G., Cunha K. S., Lehmann M. and de Andrade H. H. R., “Comparative genotoxic effect of vincristine, vinblastine, and vinorelbine in somatic cells of *Drosophila melanogaster*”, *Mutation Research*, 519: 141-149 (2002).

Toyama, Y., Shimizu, H., Suzuki, Y., Miyakoshi, Y. and Yoshioka, H., “Genotoxic effects of N-nitrosoketamine and ketamine as assessed by in vitro micronucleus test in Chinese hamster lung fibroblast cell line”, *Environmental Health Preventive Medicine*, 11:120-127 (2006).

Wang, C., Sadovova, N., Fu, X., Schmued, L., Scallet, A., Hanig, J. and Slikker, W., “The Role of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor in Ketamine-Induced Apoptosis in Rat Forebrain Culture”, *Neuroscience*, 132 (4): 967-977 (2005).

Weigle, J. J., “Induction of mutation in a bacterial virus”, *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, 38: 628-636 (1953).

Xue, F. S., Liao, X., Tong, S. Y., Liu, J. H., An, G. and Luo, L. K., “Dose response and time course of the effect of rocuronium bromide during sevoflurane anaesthesia”, *Anaesthesia*, 53: 25-30 (1998).

Young, C., Jevtovic-Todorovic, V., Qin, Y. Q., Tenkova, T., Wang, H., Labruyere, J. and Olney, J. W., “Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain”, *British Journal of Pharmacology*, 146 (2): 189-197 (2005).

Zan, U., Topaktas, M. and Istifli, E. S., “In vitro genotoxicity of rocuronium bromide in human peripheral lymphocytes”, *Cytotechnology*, 63 (3): 239-245 (2011).

Zeng, Z., Wang, P., Zhang, W. and Zhang, X., “Method for purifying rocuronium bromide”, *U.S. Patent Application* 14/122,679 (2011).

Zhou, J. L., Zheng, H. P. and Zhu, J., “Effect of Variety Anaesthesia with Ketamine-HCl on Oocytes and Early Embryos in Kunming Mice”, *Chinese Journal of Animal Science*, 44 (1): 13 (2008).

Zimmermann, F. K., Schwaier, R., “Induction of mitotic gene conversion with nitrous acid, 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine and other alkylating agents in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Molecular and General Genetics*, 100: 63-76 (1967).

Zou, X., Patterson, T. A., Divine, R. L., Sadovova, N., Zhang, X., Hanig, J. P., Paule, M. G., Slikker, W. and Wang, C., “Prolonged exposure to ketamine increases neurodegeneration in the developing monkey brain”, *International Journal of Developmental Neuroscience*, 27 (7): 727-731 (2009).

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Amasya'da doğdu. İlkokulu Kars/Sarıkamış'ta, ortaokulu Sakarya'da, lise öğrenimini ise Ankara'da tamamladı. 2007 yılında Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimine başladı ve 2011 yılında mezun oldu. 2012 yılında Erzincan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı. Halen Erzincan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.