



**ANESTEZİK ETKİLİ BAZI İLAÇLARIN
İNSAN HÜCRELERİNDEKİ GENOTOKSİK
AKTİVİTESİNİN *İN VİTRO* SİTOGENETİK
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Bahar KÖKLÜ

Eskişehir 2024

**ANESTEZİK ETKİLİ BAZI İLAÇLARIN İNSAN HÜCRELERİNDEKİ
GENOTOKSİK AKTİVİTESİNİN *İN VİTRO* SİTOGENETİK YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

Bahar KÖKLÜ

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Berrin AYAZ TÜYLÜ

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kasım 2024

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Bahar KÖKLÜ'nün ANESTEZİK ETKİLİ BAZI İLAÇLARIN İNSAN HÜCRELERİNDEKİ GENOTOKSİK AKTİVİTESİNİN *İN VİTRO* SİTOGENETİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI başlıklı çalışması 06/11/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Unvan Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı)

: Prof. Dr. Berrin AYAZ TÜYLÜ

Üye

: Prof. Dr. Pınar ÖZTOPÇU VATAN

Üye

: Doç. Dr. Volkan KILIÇ

Prof. Dr. Semra KURAMA
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

DANIşMAN ONAYI

Danişmanlığını yürüttüğüm Yüksek Lisans ğrencisi Bahar KÖKLÜ, ANESTEZİK ETKİLİ BAZI İLAÇLARIN İNSAN HÜCRELERİNDEKİ GENOTOKSİK AKTİVİTESİNİN *İN VİTRO* SİTOGENETİK YÖNTEMLERLE ARAşTIRILMASI başlıklı tez çalışmasını tamamlamıştır. Hazırlamış olduğu tez tarafımca incelenmiş ve öğrencinin tez savunma sınavına alınması bilimsel ve etik açıdan uygun görülmüştür.

Tez Danişmanı

Prof. Dr. Berrin AYAZ TÜYLÜ

ÖZET

Anestezik Etkili Bazı İlaçların İnsan Hücrelerindeki Genotoksik Aktivitesinin *In Vitro* Sitogenetik Yöntemlerle Araştırılması

Bahar KÖKLÜ

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Kasım 2024

Danışman: Prof. Dr. Berrin AYZ TÜYLÜ

Genotoksisite, genlerin toksik ajanlar ile etkileşmesi sonucu hücrelerin genetik materyalinde hasar meydana gelmesidir. Bu hasar, DNA zincirinde kırılmalara, mutasyonlara ve kromozomal anormalliklere yol açabilir, bu da hücresel işlevlerin bozulmasına ve hastalık riskinin artmasına neden olabilir. Bu tez çalışmasında klinikte yaygın olarak kullanılan ve benzodiazepin sınıfına ait Midazolam (100, 200, 300, 400 µg/mL) ile bir opioid olan Meperidin Hidroklorür'ün (250, 500, 750, 1000 µg/mL) çeşitli dozlarda insan lenfosit hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarı değerlendirilmiştir. Araştırma yöntemi olarak klastojenik etkilerinin belirlenmesi için Sitokinez Bloklanmış Mikronükleus testi (CBMN), genetik kodun bulunduğu DNA'da oluşturduğu hasarın ve iplik kırılmalarının belirlenmesi için ise Comet testi uygulanmıştır. Elde edilen bulgular kapsamında her iki etken madde için doz bağımlı olarak mikronükleus oluşumunun ve DNA hasarının arttığı gözlenmiş ve yüksek dozlarda anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Midazolam'ın Meperidin HCl'den daha belirgin DNA hasarına yol açtığı ve genotoksik etkisinin bulunduğu belirlenmiştir. Özetle, bu araştırma, Midazolam ve Meperidin HCl'in sağlıklı insan lenfositleri üzerinde sitotoksik, sitostatik ve genotoksik etkiler gösterebileceğini, bu etkilerin şiddetinin maruz kalınan konsantrasyona bağlı olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçların sonraki çalışmalar ile desteklenmesi önerilmektedir.

Anahtar sözcükler: Genotoksisite, Midazolam, Meperidin, Mikronükleus, Tek hücre jel elektroforezi.

ABSTRACT

Investigation of the Genotoxic Activity of Some Anesthetic Drugs in Human Cells Using *In Vitro* Cytogenetic Methods

Bahar KÖKLÜ

Department of Biology

Programme in Molecular Biology

Eskisehir Technical University, Institute of Graduate Programs, November 2024

Supervisor: Prof. Dr. Berrin AYAZ TÜYLÜ

Genotoxicity is the damage to the genetic material of cells due to interactions with toxic agents. This damage can lead to DNA strand breaks, mutations, and chromosomal abnormalities, which may result in impaired cellular functions and an increased risk of disease. This thesis evaluates the DNA damage induced by various doses of the benzodiazepine Midazolam (100, 200, 300, 400 µg/mL) and the opioid Meperidin Hydrochloride (250, 500, 750, 1000 µg/mL) in human lymphocyte cells. The study utilized the Cytokinesis-Blocked Micronucleus (CBMN) test to determine clastogenic effects and the Comet assay to assess the damage and strand breaks in the genetic code-bearing DNA. The findings indicated that both substances caused dose-dependent increases in micronucleus formation and DNA damage, with significant results observed at higher doses. Midazolam was found to cause more pronounced DNA damage and exhibited stronger genotoxic effects compared to Meperidin HCl. In summary, this research suggests that both Midazolam and Meperidin HCl can exhibit cytotoxic, cytostatic, and genotoxic effects on healthy human lymphocytes, with the severity of these effects being dependent on the concentration of exposure. These results should be supported by further research.

Keywords: Genototoxicity, Midazolam, Meperidine, Micronucleus, Single cell gel electrophoresis.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansım süresince her türlü desteğini, tecrübesini ve emeğini esirgemeyen, her an yardımcı olan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Berrin AYAZ TÜYLÜ başta olmak üzere, çalışmalarım ve hayatımda bana destek olup ufkumu genişleten çok kıymetli Dr. Öge ARTAGAN'a,

Yüksek lisans eğitimim süresince bana imkân sağlayan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı'na (BİDEB), 2210/A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı ile destek olan Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu'na,

Hayatımdaki her türlü yardımları için aileme ve ailem olanlara, yüksek lisansımı güzelleştiren, derslerde eğlendiren, öğreten sevgili Arş. Gör. Merve KESKİNOĞLU İNCE'ye, laboratuvar çalışmalarım boyunca öğreten, yardım eden, eğlendiren laboratuvar arkadaşlarım Nuray GÖNCÜ, Neslihan AK, Fatima MİRZALİYEVA'ya, hayatımın bu döneminde işimi güzelleştiren, beni korumuş ve hep desteklemiş olan sevgili Aysu SALİH'e, uzakta olsa da beni bilen, hissedilen, her an yardıma koşan, lisanstan beri bu yolda beraber yürüdüğümüz canım arkadaşım Zeynep Yağmur KARAGÜLLEOĞLU'na,

Kendi ruhumu tanımaya başladığımdan beri benimle olan, benimle büyüyen, hayatımı paylaşan, sevmeyi öğreten, hem akademi hem hayat yolunda beraber yürüdüğümüz dünyanın en güzel gözlerine, sevgili Mehmet GÜLÇİMEN'e varlığı ve katkıları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bahar KÖKLÜ

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Bahar KÖKLÜ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
DANIŞMAN ONAYI.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR	vi
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
GÖRSELLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Anestezik İlaçlar	3
2.1.1. Anestezik ilaçların yan etkileri	3
2.2. Midazolam ve Meperidin Hidroklorür	4
2.2.1. Midazolam: Kimyasal yapısı ve farmakokinetik özellikleri	4
2.2.2. Meperidin Hidroklorür: Kimyasal yapısı ve farmakokinetik özellikleri	8
2.2.3. Midazolam'ın klinik kullanım alanları ve yan etkileri	12
2.2.4. Meperidin Hidroklörür'ün klinik kullanım alanları ve yan etkileri.....	13
2.3. Genotoksisite	14
2.3.1. Tanımı ve önemi.....	14

2.3.2. Genotoksik etkilerin mekanizmaları.....	15
2.3.3. Sitogenetik etkiler	16
2.4. Lenfositler ve İmmün Sistem Üzerindeki Etkiler	17
2.4.1. Lenfositlerin biyolojik önemi.....	17
2.4.2. Midazolam ve Meperidin Hidroklorür'ün immün sistem üzerindeki potansiyel etkileri	18
2.5. Comet Testi (Tek Hücreli Jel Elektrophorezi).....	19
2.6. Sitokinez Bloklanmış Mikronükleus Testi (CBMN).....	21
2.7. Tezin Amacı.....	23
3. MATERYAL VE METOD.....	24
3.1. CBMN Testi.....	24
3.1.1. CBMN testinde kullanılan çalışma çözeltileri ve materyaller	24
3.1.2. Kullanılan ilaç dozlarının hazırlanışı.....	24
3.1.3. Lenfositlerin kandan eldesi ve kültüre edilmesi	25
3.1.4. İlaç dozlarının lenfositlere verilmesi	25
3.1.5. Lenfositlerin izole edilmesi.....	25
3.1.6. Lenfositlerin fiksasyonu ve boyanması.....	26
3.1.7. CPI değerinin belirlenmesi	26
3.1.8. Mikronükleus hesaplanması	26
3.1.9. İstatistiksel analiz.....	26
3.2. Comet Testi.....	27
3.2.1. Comet testinde kullanılan çalışma çözeltileri ve materyaller	27
3.2.2. Comet testinde kullanılan ilaç dozlarının hazırlanışı.....	28
3.2.3. Lamların kaplanması	28
3.2.4. Lenfositlerin kandan izolasyonu	28
3.2.5. Lenfositlerin canlılık testi.....	29
3.2.6. Hücrelerin lizisi	29
3.2.7. Elektrophorez.....	30
3.2.8. Hücrelerin nötralizasyonu	30
3.2.9. Boyama ve görüntüleme.....	30

3.2.10. İstatistiksel analiz.....	31
4. BULGULAR.....	32
4.1. Midazolam'ın Hücre Proliferasyonu ve Mikronükleus Oluşumuna Etkisi	32
4.2. Midazolam'ın DNA Hasarına Olan Etkisi.....	36
4. 3. Meperidin Hidroklorür'ün Hücre Proliferasyonu ve Mikronükleus Oluşumuna Etkisi	41
4.4. Meperidin Hidroklorür'ün DNA Hasarına Olan Etkisi	45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	51
KAYNAKÇA	55
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Bazı anesteziik ilaçların listesi, türü ve piyasaya sürölme tarihleri.	4
Tablo 4.1. Midazolam'ın 24 ve 48 saat maruziyet sonrası ortalama MN ve CPI değerleri.....	32
Tablo 4.2. Midazolam'ın Comet testi sonucu kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti verileri.....	36
Tablo 4.3. Meperidin HCl'in 24 ve 48 saat maruziyet sonrası ortalama MN ve CPI değerleri.....	43
Tablo 4.4. Meperidin HCl'in Comet testi sonucu kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti verileri.	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Midazolamın kimyasal formülü.....	6
Şekil 2.2. Meperidin HCl'in kimyasal formülü	10
Şekil 2.3. Opioid signaling pathway (KEGG Pathway: hsa04062)	11
Şekil 2.4. Işık mikroskobunda mikronükleus görüntüsü	22
Şekil 4.1. Tek çekirdekli lenfosit hücreleri (40X)	34
Şekil 4.2. Üç çekirdekli lenfosit hücresi (40X).....	34
Şekil 4.3. İki çekirdekli lenfosit hücreleri (40X)	35
Şekil 4.4. Midazolam maddesinin 24 ve 48 saat maruziyet sonrası CPI değerleri	35
Şekil 4.5. Midazolam maddesinin 24 ve 48 saat maruziyet sonrası MN değerleri	36
Şekil 4.6. Midazolam dozları ile 1 saat muamele edilen periferik lenfosit hücrelerindeki kuyruk uzunluk değerleri.....	40
Şekil 4.7. Midazolam dozları ile 1 saat muamele edilen periferik lenfosit hücrelerindeki kuyruk yoğunluk değerleri	41
Şekil 4.8. Midazolam dozları ile 1 saat muamele edilen periferik lenfosit hücrelerindeki kuyruk momenti değerleri	41
Şekil 4.9. İki çekirdekli mikronükleus içeren lenfosit hücresi (40X)	44
Şekil 4.10. Meperidin HCl maddesinin 24 ve 48 saat maruziyet sonrası CPI değerleri.....	44
Şekil 4.11. Meperidin HCl maddesinin 24 ve 48 saat maruziyet sonrası MN değerleri.....	45
Şekil 4.12. Meperidin HCl dozları ile 1 saat muamele edilen periferik lenfosit hücrelerindeki kuyruk uzunluk değerleri	50
Şekil 4.13. Meperidin HCl dozları ile 1 saat muamele edilen periferik lenfosit hücrelerindeki kuyruk yoğunluk değerleri	50
Şekil 4.14. Meperidin HCl dozları ile 1 saat muamele edilen periferik lenfosit hücrelerindeki kuyruk momenti değerleri	51

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 4.1. 1 saat boyunca 50 μM H_2O_2 dozu ile muamele edilen insan periferik lenfosit hücreleri (40X)	39
Görsel 4.2. 1 saat boyunca 300 μM Midazolam dozu ile muamele edilen insan periferik lenfosit hücreleri (40X)	39
Görsel 4.3. 1 saat boyunca 400 μM Midazolam dozu ile muamele edilen insan periferik lenfosit hücreleri (40X)	40
Görsel 4.4. Negatif kontrol insan periferik lenfosit hücreleri (40X)	48
Görsel 4.5. 1 saat boyunca 250 μM Meperidin HCl dozu ile muamele edilen insan periferik lenfosit hücreleri (40X)	49
Görsel 4.6. 1 saat boyunca 500 μM Meperidin HCl dozu ile muamele edilen insan periferik lenfosit hücreleri (40X)	49

SİMGELER VE KISALTMA DİZİNİ

CBMN	: Sitokinez bloklanmış mikronükleus testi
CPI	: Hücre proliferasyon indeksi
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DSB	: Çift zincir kırıkları
EtBr	: Etidyum bromür
g	: Göreceli merkezkaç kuvveti
GABA	: γ -aminobütirik asit
gr	: Gram
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidroklorik asit
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
MMC	: Mitomisin C
NK	: Doğal katil hücreler
NMA	: Yüksek erime sıcaklığına sahip agaroz
MN	: Mikronükleus
NMDA	: N-metil-D-asparat
PAH	: Poliaromatik hidrokarbon
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SCGE	: Tek hücreli jel elektroforezi
SD	: Standart sapma

SSB	: Tek zincir kırıkları
TNF	: Tümör nekroz faktörü
V	: Volt
W	: Watt
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar



1. GİRİŞ

Modern genel anestezinin keşfedilmesiyle beraber, her yaş grubuna mensup hastalarda karmaşık cerrahi ve tanı prosedürleri ilerlemiştir. Anestezik ve sedatif (yatıştırıcı) reaktifler, nörotransmitterler ile etkileşime girer ve farklı beyin bölgeleri arasındaki nöronal entegrasyonu çözerek merkezi sinir sistemini etkiler (Liu vd., 2020). Anestezik ilaçlar, geçici olarak uykuya benzer bir durum oluştan kimyasallardır. Acısız veya ağrısız operasyonu mümkün kılmaktadırlar. Genel anestezi, diğer bir deyişle narkoz sırasında; bilinç, ağrı duyarlılığı, savunma refleksleri ve kas refleksleri büyük ölçüde baskılanır. Omurilik soğanı tarafından yönetilen solunum ve dolaşım gibi hayati sistemler anestezik ilaçlardan nispeten etkilenmezler (Wollweber vd., 2000). Günümüzde yaygın olarak kullanılan anestezik ilaçlar, izofluranlar gibi γ -aminobütirik asit (GABA) reseptörleri veya ketamin gibi N-metil-D-asparat (NMDA) reseptörlerini kullanarak iki ana mekanizma ile hareket ederler (Jevtovic-Todorovic vd., 2003). Genel anesteziklerin sitotoksik ve nörotoksik etkisinin moleküler mekanizmaları kapsamlı olarak araştırılmıştır.

Meperidin hidroklorür geniş terapötik kullanım elde edilen ilk sentetik analjezik ilaç olan bir fenilpiperidin türevidir. Morfin ile benzer farmakolojik etkiye sahiptir, 70-100 mg Meperidin HCl, 10 mg morfine eşdeğer gelmektedir (Huang vd., 2017). Meperidin HCl, beyindeki ve omurilikteki spesifik opioid reseptörlere bağlanır ve polisinaptik yollar boyunca impulsların iletilmesini engeller. Kan basıncının azalmasına ve kalp atış hızının artmasına yol açar (Laycock & Bantel., 2019). Uzun süreli kötüye kullanım, yanlışlıkla vücuda girmesi gibi durumlar bu maddenin bağımlılığına, merkezi sinir sisteminin zarar görmesine hatta ölüme yol açabilmektedir. Günümüzde küresel ölçekte, Meperidin HCl üretimi yapan birçok ilaç fabrikası bulunmaktadır ve bu maddeyi içeren atık suları çevreye karışmaktadır (Tamimi vd., 2011).

Sedasyon sağlamak için yaygın olarak kullanılan bir ilaçlardan biri de midazolamdır. İntravenöz, oral ve nazal olarak uygulanabilirken hızlı bir etki ile başlamaktadır. Oral olarak uygulanan dozun yalnızca %50'si sistemik dolaşıma ulaşabilmektedir. Midazolam, sitokrom P450 enzim sistemi tarafından çeşitli metabolitlere metabolize edilmektedir. Bazı sitokrom P450 inhibitörleri, midazolam metabolizmasını önemli derecede azaltabilir (Nordt vd., 1997). Bu molekül her yaştaki

hastalarda solunum depresyonu riski taşıırken özellikle yaşlı hastalarda opioid ile kombinasyon halinde kullanıldığında kalp durması gerçekleştiği görülmüştür (Taylor vd., 1990).

Canlılar kendileri için en uygun genetik yapıya sahip olacak şekilde evrimleşmişlerdir. Bu genomda oluşan genetik değişikliklere mutasyon adı verilmektedir. Mutasyonlar eğer DNA onarım mekanizmaları ile tamir edilmez ise genellikle canlılar için zararlı olabilecek veya hayati tehlike doğuracak sonuçlar ortaya çıkarabilir. Genlerin toksik ajanlar ile etkileşmesi sonucu genetik yapıda hasar meydana gelmesine genotoksisite denir. Diğer bir deyişle bir etken maddenin gen, kromozom ve genom mutasyonuna neden olma yeteneğidir (Feretti vd., 2007). Genotoksisiteye sebep olan maddelere ise genotoksik madde veya mutajen denilmektedir. Tüm ilaçlar, pestisitler, kozmetik ürünler gibi kimyasallar toksik potansiyele sahiptir ve bu toksik potansiyellerin değerlendirilmesi gerekir. Bunun için çeşitli genotoksisite testleri geliştirilmiştir (Saygı., 2002).

Buradan hareketle, tez kapsamında, Meperidin HCl ve Midazolam maddelerinin, en yaygın kullanılan genotoksisite yöntemlerinden olan Sitokinez Bloklanmış Mikronükleus (CBMN) ve Comet testlerinin yapılması, gen ve kromozom düzeylerinde insan lenfosit hücrelerinde oluşan hasarın karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Anestezi

Modern genel anestezinin keşfedilmesiyle beraber, her yaş grubuna mensup hastalarda karmaşık cerrahi ve tanı prosedürleri ilerlemiştir. Anestezik ve sedatif (yatıştırıcı) reaktifler, nörotransmitterler ile etkileşime girer ve farklı beyin bölgeleri arasındaki nöronal entegrasyonu çözerek merkezi sinir sistemini etkiler (Liu vd., 2020).

2.1.1. Anestezik ilaçların etki mekanizması

Anestezik ilaçlar, geçici olarak uykuya benzer bir durum oluştan kimyasallardır. Acısız veya ağrısız operasyonu mümkün kılmaktadırlar. Genel anestezi, diğer bir deyişle narkoz sırasında; bilinç, ağrı duyarlılığı, savunma refleksleri ve kas refleksleri büyük ölçüde baskılanır. Omurilik soğanı (medulla oblongata) tarafından yönetilen solunum ve dolaşım gibi hayati sistemler anestezik ilaçlardan nispeten etkilenmezler (Wollweber vd., 2000).

Günümüzde yaygın olarak kullanılan anestezik ilaçlar, benzodiazepinler, izofluranlar gibi γ -aminobütirik asit (GABA) reseptörleri (Vutskits vd., 2005) veya ketamin, ksenon gibi N-metil-D-asparat (NMDA) reseptörlerini kullanarak iki ana mekanizma ile hareket ederler (Jevtovic-Todorovic vd., 2003). Genel anesteziklerin sitotoksik ve nörotoksik etkisinin moleküler mekanizmaları kapsamlı olarak araştırılmıştır. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile anesteziklerin iki olası yolla apoptozu indüklediği keşfedilmiştir. Ekstrinsik yol, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptörleri aracılığı ile aktive edilir. Hücre içinden gelen sinyallere yanıt olarak da intrinsik yol başlatılır. Bu yol, anti-apoptotik Bcl-2/pro-apoptotik Bax genlerinin oranını azaltır, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oranını ise artırır. Sitokrom C'nin mitokondriden salınmasını ve kaspaz-3 bölünmesini teşvik eder. Genel anestezikler GABA reseptörünün uyarıcı olduğu dönemde apoptoz sürecini indükler. GABA reseptörünün inhibitör olduğu dönemde ise daha az nörodejenerasyona sebep olur (Creeley vd., 2013). Bazı anestezik ilaçlar ve türleri ve piyasaya sürülme tarihleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Bazı anesteziik ilaçların listesi, türü ve piyasaya s r lme tarihleri.

İlaç Adı	Türü	Piyasaya S�r�lme Tarihi
Eter (Dietil Eter)	Genel Anesteziik	1846 (Sneyd, 2016)
Klorofom	Genel Anesteziik	1847 (Sneyd, 2016)
Nitröz Oksit (Gülme Gazı)	Genel Anesteziik	1772 (Eger vd., 2017)
Prokain (Novokain)	Lokal Anesteziik	1905 (Miller, 2014)
Tetrakain	Lokal Anesteziik	1930'lar (Morgan vd., 2013)
Halotan	Genel Anesteziik	1956 (Miller, 2014)
Lidokain	Lokal Anesteziik	1948 (Miller, 2014)
Fentanil	Opioid Anesteziik	1960 (Smith & Peppin, 2018)
Ketamin	Dissosiyatif Anesteziik	1962 (Miller, 2014)
Sevofluran	Genel Anesteziik	1990 (Miller, 2014)
Propofol	Genel Anesteziik	1989 (Morgan ve ark, 2013)
Midazolam	Benzodiazepin	1985 (Miller, 2014)
Desfluran	Genel Anesteziik	1992 (Miller, 2014)
Isofluran	Genel Anesteziik	1981 (Miller, 2014)
Meperidin Hidroklorür	Opioid Anesteziik	1939 (Smith & Peppin, 2018)

2.2. Midazolam ve Meperidin Hidroklorür

2.2.1. Midazolam: Kimyasal yapısı ve farmakokinetik özellikleri

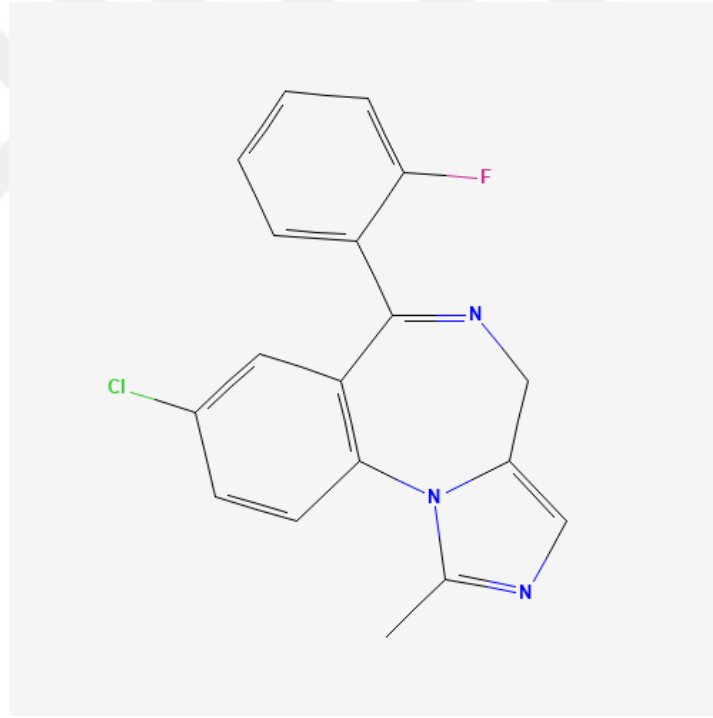
Midazolam, benzodiazepin sınıfına ait bir ilaç olup, kimyasal olarak 8-kloro-6-(2-florofenil)-1-metil-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepin-4-on olarak adlandırılır ( ekil 2.1). Bu yapının merkezinde bulunan imidazo halkası, midazolamın farmakolojik etkilerinde kilit rol oynar ve bu halka, benzodiazepinlerin klasik yapısından farklı olarak,

ilacın farmakokinetik özelliklerini belirgin şekilde etkiler. Benzodiazepinlerin ortak özelliklerini taşımakla birlikte, midazolamın imidazo halkasına sahip olması, ilacın suda çözünübilirliğini artırır ve bu da intravenöz uygulama için elverişli olmasını sağlar. Midazolamın farmakokinetik özellikleri, ilacın vücutta dağılımı, metabolizması ve eliminasyonunu kapsar. Hughes ve arkadaşları (2021), midazolamın intravenöz uygulama sonrası hızlı bir şekilde etkisini gösterdiğini ve biyoyararlanımının %100 olduğunu bildirmiştir (Hughes vd., 2021). Ayrıca, midazolamın, kısa yarı ömrü nedeniyle hızlı bir şekilde elimine edildiği ve bu durumun ilacın cerrahi ve tanısal prosedürler sırasında kullanımını kolaylaştırdığı belirtilmiştir (Greenblatt vd., 2020).

Midazolam, intravenöz yolla uygulandığında hızla plazma seviyelerine ulaşır ve etkilerini dakikalar içinde göstermeye başlar. İlacın dağılım hacmi yaklaşık 1-3 L/kg olup, bu geniş dağılım hacmi, midazolamın dokulara kolayca penetre olmasını sağlar. Plazma proteinlerine bağlanma oranı yaklaşık %96'dır, bu da ilacın serbest fraksiyonunun düşük olduğunu ve farmakokinetik profilinin büyük ölçüde protein bağlanmasına bağımlı olduğunu gösterir. Midazolam, karaciğerde sitokrom P450 enzimleri (özellikle CYP3A4) tarafından büyük oranda metabolize edilir ve bu nedenle CYP3A4 inhibitörleri veya indükleyicileri ile birlikte kullanıldığında dikkatli olunmalıdır. Midazolamın ana metaboliti olan α -hidroksimidazolam, farmakolojik olarak aktif olup, böbrekler yoluyla atılır. İlacın yarı ömrü genellikle 1,5-3 saat arasında değişir, ancak yoğun bakım ünitelerinde uzun süreli kullanımda bu süre uzayabilir (Greenblatt vd., 2020). Metabolizmanın ana ürünü, farmakolojik olarak aktif olan 1-hidroksi-midazolam'dır. Bu metabolit, midazolamın etkilerinin süresini uzatabilir ve özellikle karaciğer fonksiyonu bozulmuş hastalarda klinik olarak önemli olabilir. GABA A reseptör kompleksine bağlanarak GABA'nın inhibitör etkisini artırır. Bu bağlanma, klor iyon kanallarının açılma olasılığını artırır ve hücre içi klor iyon konsantrasyonunun artmasına neden olur, böylece hücre membranının hiperpolarize olmasına ve nöronal uyarılabilirliğin azalmasına yol açar. Bu mekanizma, midazolamın sedatif, hipnotik, anksiyolitik ve antikonvülsan etkilerinin temelini oluşturur (Hughes vd., 2021).

Midazolamın kısa etkili olması, cerrahi ve tıbbi prosedürlerde hızlı bir şekilde sedasyon sağlamasına olanak tanır. İlacın amnestik etkisi, hastaların prosedür sırasında yaşadıkları deneyimleri hatırlamamalarını sağlar, bu da özellikle invaziv işlemler sırasında hasta konforunu artırır (Schifilliti vd., 2021).

Midazolamın eliminasyonu hem böbrekler hem de safra yoluyla gerçekleşir. İlacın yarı ömrü genellikle 1,5 ila 2,5 saat arasında değişir, ancak bu süre, yaş, karaciğer fonksiyonu ve diğer bireysel faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Özellikle yaşlı hastalarda ve karaciğer fonksiyonu bozulmuş bireylerde eliminasyon yarı ömrü uzayabilir, bu da doz ayarlamalarının yapılmasını gerektirebilir. Midazolam, cerrahi müdahaleler öncesinde premedikasyon olarak, sedasyon için ve anestezi indüksiyonu sırasında yaygın olarak kullanılır. İlacın hızlı etkisi ve kısa yarı ömrü, cerrahi ve tanısal prosedürler sırasında tercih edilmesini sağlar. Ancak, midazolam kullanımı bazı yan etkilere de neden olabilir. Bunlar arasında solunum depresyonu, hipotansiyon ve paradoksik reaksiyonlar (örneğin, ajitasyon ve halüsinasyonlar) bulunur (Murthy & Patel, 2020).



Şekil 2.1. Midazolamın kimyasal formülü (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4192>, 6 Haziran 2024 tarihinde erişildi.)

Midazolamın kullanımına bağlı olarak çeşitli yan etkiler rapor edilmiştir. Solunum depresyonu, hipotansiyon ve paradoksik reaksiyonlar (örneğin, ajitasyon ve halüsinasyonlar) bu yan etkiler arasında yer almaktadır (Murthy & Patel, 2020). Ayrıca, Schifilliti ve arkadaşları (2021), midazolamın uzun süreli kullanımının nörolojik yan

etkilerle ilişkili olabileceğini ve bu durumun özellikle yaşlı hastalar ve karaciğer fonksiyonu bozulmuş bireyler için önemli olduğunu vurgulamışlardır.

Midazolam, pediatrik hastalarda da yaygın olarak kullanılmaktadır. Brown ve arkadaşları (2019), midazolamın pediatrik anestezi indüksiyonu sırasında güvenli ve etkili olduğunu ve çocuklarda hızlı bir sedasyon sağladığını bildirmiştir. Bununla birlikte, pediatrik hastalarda doz ayarlamalarının dikkatli bir şekilde yapılması gerektiği belirtilmiştir (Brown vd., 2019). Akut anksiyete ve ajitasyon tedavisinde de etkili bir ajan olarak kullanılmaktadır. Hughes ve arkadaşları (2021), midazolamın psikiyatrik acil durumlarda hızlı bir sedasyon sağladığını ve hastaların tedaviye uyumunu artırdığını belirtmişlerdir. Ayrıca, midazolamın kısa etki süresi, hastaların hızlı bir şekilde normale dönmesini sağlamak ve bu durum klinik kullanım açısından büyük avantaj sunmaktadır (Hughes vd., 2021).

Bu anestezi ilacın etki ettiği bazı genler ve hücresel yollar incelendiğinde;

- ABRA1 (Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Alpha1):

Midazolam, GABA_A reseptörlerine bağlanarak bu reseptörlerin aktivasyonunu artırır. GABRA1, bu reseptörlerin alfa alt birimini kodlayan gendir. Midazolam'ın bu reseptör üzerindeki etkisi, anksiyolitik ve sedatif etkilerinin temelini oluşturur (Olsen & Sieghart, 2008).

- GABRB2 (Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Beta2):

GABRB2, GABA_A reseptörlerinin beta alt birimini kodlar ve midazolam, bu alt birime bağlanarak reseptör aktivitesini artırır. Bu etkileşim, midazolamın nöromodülatör etkilerinin bir parçasıdır ve nörotransmisyonu etkiler (Olsen & Sieghart, 2008).

- GABAergic Synapse Pathway (KEGG Pathway: hsa04727):

Midazolam, GABAergic sinapslar yoluyla etkilerini gösterir. Bu yolla, GABA'nın sinaptik iletimini düzenler ve midazolam, GABA_A reseptörlerine bağlanarak inhibe edici nörotransmisyonu artırır. Bu yolla, midazolamın sedatif, anksiyolitik ve antikonvülzan etkilerinden sorumludur (Sieghart, 2015).

- Neuroactive Ligand-Receptor Interaction Pathway (KEGG Pathway: hsa04080):

Bu yolak, midazolamın GABA_A reseptörleri ile etkileşimlerini içerir. Midazolam, bu reseptörlerin aktivasyonunu artırarak merkezi sinir sistemi üzerindeki etkilerini gösterir. Bu etkileşim, ilaçların nörolojik etkilerini anlamak açısından kritik öneme sahiptir (Sieghart, 2015).

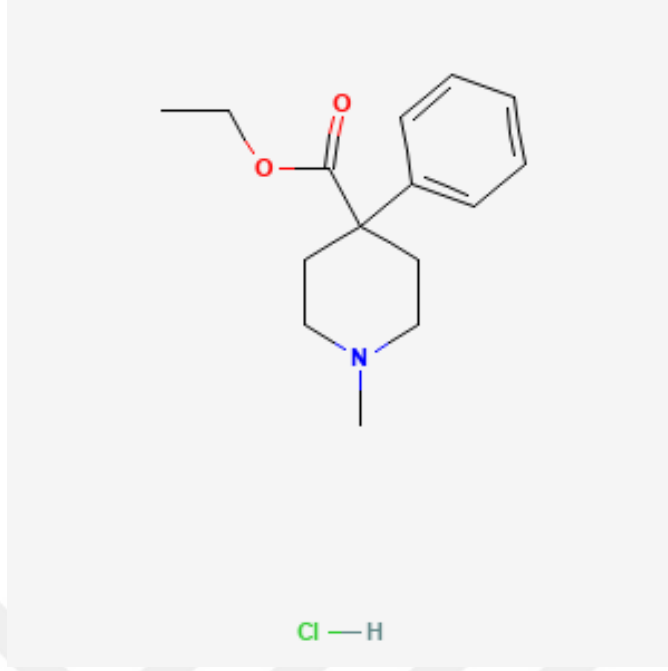
2.2.2. Meperidin Hidroklorür: Kimyasal yapısı ve farmakokinetik özellikleri

Meperidin hidroklorür, opioid analjezikler sınıfına ait bir ilaç olup, akut ağrı yönetiminde sıkça kullanılmaktadır. İlk kez 1939'da sentezlenen meperidin, morfin ve diğer opioidlerden kimyasal olarak farklılık göstermesine rağmen benzer farmakolojik etkiler sunmaktadır (Şekil 2.2). İlacın intravenöz uygulama sonrası hızlı etkisi ve kısa etki süresi, cerrahi ve tanısal prosedürlerde tercih edilmesini sağlamaktadır (Schug vd., 2019; Rawal vd., 2020). Farmakokinetik olarak, meperidin plazma proteinlerine yaklaşık %60 oranında bağlanmakta ve karaciğerde sitokrom P450 enzimleri tarafından metabolize edilerek normeperidin gibi aktif metabolitlere dönüşmektedir (Wu vd., 2018; Smith vd., 2021). İlacın yan etkileri arasında solunum depresyonu, bulantı, kusma ve merkezi sinir sistemi üzerinde paradoksik reaksiyonlar yer almakta olup, uzun süreli kullanımı nörotoksik etkilerle ilişkilendirilmektedir (Katzung, 2020; Arndt & Kanitz, 2019). Meperidin pediatrik hastalarda da kullanılsa da, doz ayarlamalarının dikkatle yapılması gerekmektedir (Yeh vd., 2020). Ayrıca, akut anksiyete ve ajitasyon tedavisinde de etkili olan meperidin, hızlı sedasyon sağlayarak hastaların tedaviye uyumunu artırmaktadır (Nelson vd., 2019).

Meperidin hidroklorürün farmakokinetik özellikleri, ilacın emilimi, dağılımı, metabolizması ve eliminasyonunu içerir. Meperidin HCl, oral, intramüsküler ve intravenöz uygulama yoluyla verilebilir ve her bir uygulama yöntemi ilacın biyoyararlanımını ve farmakokinetik profilini etkiler. Meperidin HCl, intramüsküler ve intravenöz yolla uygulandığında hızlı bir şekilde emilir ve etkilerini hızla gösterir. İlacın biyoyararlanımı, intravenöz uygulamada %100, intramüsküler uygulamada ise %50-60 arasındadır (Plummer & Owen, (1997). Plazma proteinlerine bağlanma oranı yaklaşık %60'tır. Dağılım hacmi yaklaşık 4-5 L/kg olup, bu da ilacın vücut dokularına geniş bir şekilde dağıldığını gösterir (Kharasch & Hoffer, 2006). Meperidin HCl, karaciğerde büyük ölçüde metabolize edilir. Metabolizmasında ana rolü sitokrom P450 enzim sistemi (özellikle CYP3A4) oynar. İlacın ana metaboliti normeperidin olup, bu metabolit meperidin kadar analjezik etki göstermemekle birlikte, nörotoksik etkileri ile bilinir. Bu

nedenle, normeperidin birikimi, özellikle böbrek fonksiyonu bozulmuş hastalarda klinik açıdan önemli olabilir. Meperidin HCl, büyük ölçüde böbrekler yoluyla atılır ve eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 2-4 saat arasında değişir. Ancak, bu süre yaş, karaciğer ve böbrek fonksiyonlarına bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Normeperidin metabolitinin yarı ömrü ise daha uzundur ve bu da kronik kullanımda nörotoksik yan etkilerin artmasına neden olabilir. Total vücut klerensi yaklaşık 8-12 L/saattir (Kaiko, 1986). Meperidin HCl, özellikle akut şiddetli ağrının tedavisinde ve ameliyat sonrası ağrının yönetiminde yaygın olarak kullanılır. İlacın hızlı etki başlangıcı ve güçlü analjezik etkileri, doğum ağrısı ve cerrahi sonrası ağrı kontrolünde tercih edilmesini sağlar. Ancak, Meperidin HCl kullanımı bazı yan etkilerle ilişkilidir. En yaygın yan etkiler arasında bulantı, kusma, baş dönmesi, sedasyon ve solunum depresyonu bulunur. Ayrıca, normeperidin birikimi sonucu nörotoksik etkiler, özellikle uzun süreli kullanımda önemli bir risk faktörüdür. Meperidin HCl, merkezi sinir sistemi üzerindeki etkilerini, opioid reseptörlerine (özellikle μ -opioid reseptörleri) bağlanarak gösterir. Bu bağlanma, adenilat siklaz aktivitesini inhibe eder, kalsiyum girişini azaltır ve potasyum çıkışını artırarak hücre membranının hiperpolarize olmasına yol açar. Sonuç olarak, nöronal uyarılabilirlik azalır ve analjezi sağlanır (Anderson & Hiller, 2013).

Meperidin HCl'in analjezik etkisi, genellikle 2-4 saat sürer. İlacın hızlı etkisi, akut ağrı yönetiminde tercih edilmesine olanak tanır. Ayrıca, meperidinin kas gevşetici özellikleri, özellikle doğum sırasında kullanılmasını sağlar. Ancak, ilacın nörotoksik metaboliti normeperidin, uzun süreli kullanımda ciddi yan etkilere neden olabilir. Bu nedenle, Meperidin HCl'in uzun süreli veya yüksek dozlarda kullanımı genellikle önerilmemektedir (Weinbroum, 2001).



Şekil 2.2. Meperidin HCl'in kimyasal formülü (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5750>. 6 Haziran 2024 tarihinde erişildi.)

Bu anestezi ilacının etki ettiği bazı genler ve yollar incelendiğinde;

- OPRM1 (Opioid Receptor Mu 1):

Meperidin HCl, OPRM1 geni tarafından kodlanan mu-opioid reseptörüne yüksek afinitesi ile bilinir. Bu reseptör, merkezi sinir sisteminde ağrı algısını azaltan bir G-protein bağlı reseptördür. Meperidin hidroklorürün analjezik etkisi, bu reseptör aracılığıyla gerçekleşir (Sora vd., 2010).

- OPRK1 (Opioid Receptor Kappa 1):

Meperidin HCl, kappa-opioid reseptörüne (OPRK1) de bağlanabilir, bu da ilacın analjezik etkilerine katkıda bulunur. Kappa-opioid reseptörleri, ağrı ve stres cevabında önemli rol oynar (Bruchas vd., 2010).

- OPRD1 (Opioid Receptor Delta 1):

Meperidin HCl, delta-opioid reseptörüne (OPRD1) daha düşük afinitesi ile bağlanabilir. Delta-opioid reseptörleri, ağrı modülasyonu ve nöroproteksiyonla ilişkilidir (Gaveriaux-Ruff & Kieffer, 2011).

- Opioid Signaling Pathway (KEGG Pathway: hsa04062) (Şekil 2.3):

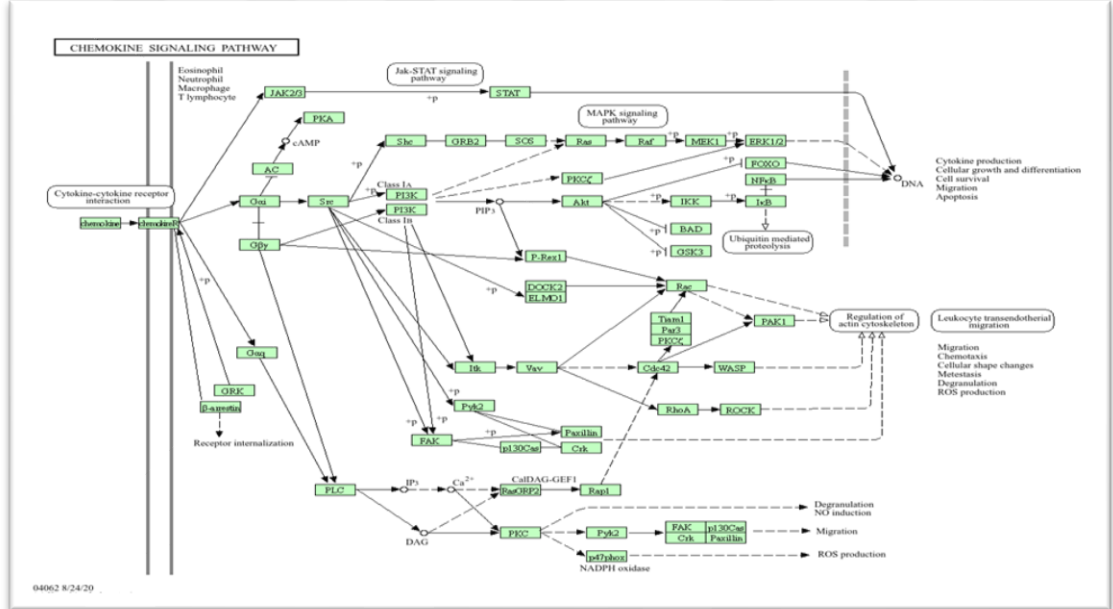
Etken madde, bu yolak aracılığıyla analjezik etkilerini gösterir. Opioid reseptörlerine bağlanarak, adenilat siklaz aktivitesini inhibe eder ve siklik AMP (cAMP) düzeylerini düşürür. Bu mekanizma, nörotransmitter salınımını azaltır ve ağrı iletimini inhibe eder (Law vd., 2000).

- Neuroactive Ligand-Receptor Interaction Pathway (KEGG Pathway: hsa04080):

Bu yolak, meperidin hidroklorürün opioid reseptörler üzerindeki etkilerini içerir. Opioid reseptörlerinin aktivasyonu, G-proteinlerin ve ikincil haberci sistemlerin düzenlenmesi yoluyla sinaptik iletimi modüle eder (Katritch vd., 2013).

- GABAergic Synapse Pathway (KEGG Pathway: hsa04727):

Meperidin hidroklorür, dolaylı olarak GABAergic sinapsları etkileyebilir. Opioid reseptörlerinin aktivasyonu, GABA salgısını artırarak inhibe edici nörotransmisyonu güçlendirebilir. Bu etki, meperidin hidroklorürün sedatif ve anksiyolitik özelliklerine katkıda bulunur (Chieng vd., 2012).



Şekil 2.3. Opioid signaling pathway (KEGG Pathway: hsa04062)

2.2.3. Midazolam'ın klinik kullanım alanları ve yan etkileri

Midazolamın en yaygın kullanım alanlarından biri, cerrahi müdahaleler ve tıbbi prosedürler sırasında sedasyon sağlamaktır. Özellikle endoskopi, diş cerrahisi ve kardiyoversiyon gibi kısa süreli müdahalelerde hastaların konforunu artırmak ve anksiyete seviyelerini düşürmek amacıyla tercih edilir. Midazolam, intravenöz, intramüsküler ve oral yollarla uygulanabilir ve hızlı etki başlangıcı ile bilinir (Greenblatt & Shader, 1974).

Midazolam, akut nöbet yönetiminde de etkilidir. Özellikle status epileptikus gibi acil durumlarda, intravenöz veya intramüsküler yolla uygulanan midazolam, nöbetlerin hızlı bir şekilde kontrol altına alınmasını sağlar. Bu bağlamda, benzodiazepinlerin epilepsi yönetimindeki önemi vurgulanmıştır. Yoğun bakım ünitelerinde, midazolam sıkça kullanılır. Uzun süreli mekanik ventilasyon gerektiren hastalarda, sedasyon sağlamak için midazolam kullanımı yaygındır. Midazolamın hızlı etkisi ve kolay titre edilebilirliği, yoğun bakım ortamlarında tercih edilmesinin başlıca nedenleridir. Aynı zamanda, preoperatif anksiyetenin giderilmesi ve amnezi sağlanması amacıyla premedikasyon olarak da kullanılır (Dundee vd., 1984). Midazolam, etkili bir sedatif ve anksiyolitik olmasına rağmen, birçok yan etki ile de ilişkilidir. En yaygın yan etkiler arasında uyku hali, baş dönmesi, solunum depresyonu ve paradoksik reaksiyonlar yer alır. Özellikle yüksek dozlarda veya hızlı intravenöz uygulamalarda, solunum depresyonu ciddi bir risk oluşturabilir (Bailey vd., 1990). Midazolamın paradoksik reaksiyonları, anksiyete artışı, ajitasyon ve agresyon gibi beklenmedik yan etkilerdir. Bu tür reaksiyonlar, özellikle yaşlı hastalarda veya önceden psikiyatrik bozuklukları olan bireylerde daha yaygındır. Bu nedenle, midazolam kullanımında dikkatli hasta değerlendirmesi ve izleme önemlidir (Jacobi vd., 2002).

Uzun süreli midazolam kullanımı, özellikle yoğun bakım ünitelerinde, ilaca tolerans gelişimine ve fiziksel bağımlılığa yol açabilir. Midazolamın kesilmesi sonrası yoksunluk belirtileri ortaya çıkabilir ve bu durum, ilacın kullanım süresinin ve dozunun dikkatli bir şekilde yönetilmesini gerektirir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, midazolamın uzun süreli kullanımının kognitif işlevler üzerindeki etkilerine dikkat çekmiştir. Özellikle yaşlı hastalarda, uzun süreli benzodiazepin kullanımının demans gelişimi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle, midazolam ve diğer benzodiazepinlerin uzun süreli kullanımı konusunda dikkatli olunması gerektiği bilinmektedir (Dundee vd., 1984).

2.2.4. Meperidin Hidroklorür'ün klinik kullanım alanları ve yan etkileri

Meperidin HCl, morfin benzeri etkileri nedeniyle özellikle akut ve şiddetli ağrıların yönetiminde yaygın olarak kullanılan bir opioid analjeziktir. İlk olarak 1939'da Eisleb ve Schaumann tarafından sentezlenen meperidin, savaş sonrası dönemde hızlı bir şekilde klinik kullanım alanına girmiştir. Bugün, doğum ağrısı, ameliyat sonrası ağrı ve çeşitli akut ağrı durumlarının yönetiminde tercih edilmektedir. Meperidin HCl'in en yaygın kullanım alanlarından biri doğum ağrısının yönetimidir. Doğum sırasında verilen meperidin, etkisini hızla göstererek anında rahatlama sağlar ve genellikle annenin ağrı algısını azaltmak için kullanılır. Aynı zamanda, meperidin kas gevşetici özellikleri doğum sürecine yardımcı olabilir. Ameliyat sonrası ağrı yönetiminde, Meperidin HCl'in hızlı etki göstermesi ve analjezik gücü, cerrahi müdahalelerden sonra hastaların konforunu artırmak için kullanılmasını sağlar. İntravenöz ve intramüsküler yolla uygulanabilmesi, hastanın durumuna ve ameliyat türüne bağlı olarak esneklik sağlar. Ayrıca, kısa yarı ömrü sayesinde hızlı bir etki başlatıp çabuk bir şekilde metabolize edilmesi, özellikle kısa süreli ağrı yönetiminde avantaj sağlamaktadır (Smith, 2009).

Meperidin HCl, aynı zamanda bazı kronik ağrı durumlarında da kullanılmıştır. Ancak, uzun süreli kullanımı nörotoksik metabolit normeperidinin birikimine neden olabileceği için dikkatli izlem gerektirir. Özellikle kanser ağrısı gibi sürekli analjezi gerektiren durumlarda, meperidin yerine daha güvenli ve uzun etkili opioidler tercih edilmektedir. Meperidin HCl, güçlü analjezik etkilerine rağmen, bir dizi potansiyel yan etki ile ilişkilidir. En yaygın yan etkiler arasında bulantı, kusma, baş dönmesi, sedasyon ve solunum depresyonu bulunur. Bu yan etkiler, ilacın merkezi sinir sistemi üzerindeki depresan etkilerinden kaynaklanır ve genellikle doz bağımlıdır (Prommer, 2007).

Meperidin HCl'ün önemli bir yan etkisi, nörotoksik metabolit normeperidinin birikimi nedeniyle ortaya çıkan nörolojik yan etkilerdir. Normeperidin, Meperidin HCl'in karaciğerde metabolize edilmesi sonucu oluşur ve özellikle böbrek fonksiyonu bozulmuş hastalarda birikebilir. Bu birikim, tremor, kas seğirmeleri ve nadiren nöbetlere neden olabilir. Bu nedenle, Meperidin HCl'in uzun süreli veya yüksek dozlarda kullanımı genellikle önerilmez (Weinbroum, 2001). Ayrıca, Meperidin HCl, diğer opioid analjezikler gibi, bağımlılık ve tolerans gelişimi riski taşır. Uzun süreli kullanımda, ilacın analjezik etkilerini sürdürebilmek için dozun artırılması gerekebilir, bu da yan etki riskini artırır. Meperidin HCl'ün bağımlılık potansiyeli, ilacın reçete edilmesi ve kullanımı

konusunda dikkatli olunmasını gerektirir. Meperidin HCl'in başka bir önemli yan etkisi, serotonerjik sendrom olarak bilinen potansiyel olarak ölümcül bir durumdur. Bu durum, Meperidin HCl'in serotonerjik ilaçlarla (örneğin, SSRIs, SNRIs) etkileşimi sonucu ortaya çıkabilir ve aşırı serotonerjik aktivite ile karakterizedir. Serotonin sendromu, mental durum değişiklikleri, otonomik instabilite ve nöromusküler anormalliklerle kendini gösterir ve acil müdahale gerektirir ((Kharasch & Hoffer,2006).

Midazolam ve Meperidin HCl, farklı farmakolojik sınıflara ait olmalarına rağmen, her ikisi de tıbbi ve cerrahi prosedürler sırasında sıkça kullanılır. Midazolam, benzodiazepin sınıfına ait olup, sedatif, anksiyolitik ve amnestik etkileri ile öne çıkar. Özellikle kısa süreli sedasyon gerektiren işlemlerde tercih edilir. Meperidin HCl ise, opioid analjezik olup, akut ve şiddetli ağrıların yönetiminde kullanılır. Her iki ilaç da hızlı etki başlatıcı özellikleri nedeniyle acil durumlarda veya hızlı rahatlama gerektiren durumlarda tercih edilir. Midazolam, GABA A reseptörleri üzerinden etki gösterirken, Meperidin HCl opioid reseptörlerine bağlanarak etkisini gösterir. Bu temel farklılık, ilaçların farmakodinamik ve farmakokinetik profillerini belirler. Midazolam, genellikle daha kısa yarı ömre sahip olup, hızlı metabolize edilirken, Meperidin HCl'in metaboliti olan normeperidin, daha uzun yarı ömre sahiptir ve birikime neden olabilir. Midazolamın yaygın yan etkileri arasında solunum depresyonu, baş dönmesi ve paradoksik reaksiyonlar bulunurken, Meperidin HCl'in yan etkileri arasında nörotoksisite, solunum depresyonu ve bağımlılık riski yer alır. Her iki ilaç da dikkatli izlem gerektirir ve özellikle uzun süreli kullanımlarda yan etki riskleri nedeniyle sınırlamalar getirir (Bachmann vd., 2009).

2.3. Genotoksisite

2.3.1. Tanımı ve önemi

Canlılar kendileri için en uygun genetik yapıya sahip olacak şekilde evrimleşmişlerdir. Bu genomda oluşan genetik değişikliklere mutasyon adı verilmektedir. Mutasyonlar eğer DNA onarım mekanizmaları ile tamir edilmez ise genellikle canlılar için zararlı olabilecek veya hayati tehlike doğuracak sonuçlar ortaya çıkarabilir. Günümüzde insanların da dahil olduğu çevredeki canlıların çoğu özellikle endüstriyel faaliyetler ile açığa çıkan kimyasal kirlilikten yüksek derecede etkilenmektedir. Her canlı bu kimyasal maddelerde farklı şekilde zarar görmektedirler. Yapılan birçok çalışmada

suyun, toprağın, havanın ve tüketilen yiyeceklerin çeşitli mutajenlerin ile kontamine olduğunu göstermektedir (Dhtevre vd., 2014).

Genlerin toksik ajanlar ile etkileşmesi sonucu genetik yapıda hasar meydana gelmesine genotoksisite denir. Diğer bir deyişle bir etken maddenin gen, kromozom ve genom mutasyonuna neden olma yeteneğidir. Genotoksisiteye sebep olan maddelere ise genotoksik madde veya mutajen denilmektedir. Bunlar; kozmetik maddeleri, besin katkı maddeleri, tüm ilaçlar, pestisitler gibi canlıların maruz kalabileceği toksik potansiyele maddelerdir. Kullanıma sunulmadan önce genotoksisitelerinin değerlendirilmeleri gerekir. Genotoksisite testleri, bir maddenin DNA'ya zarar verip vermediğini ve bu zararın kanserojenik potansiyele dönüşüp dönüşmeyeceğini belirlemek için kullanılır. Bu testler, ilaç geliştirme, kimyasal güvenlik değerlendirmesi ve çevresel risk analizi gibi çeşitli alanlarda hayati öneme sahiptir. Genotoksik maddelerin erken tespiti, insan sağlığını korumak için kritik bir adımdır ve bu nedenle genotoksisite testleri, regülasyon otoriteleri tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir (Feretti vd., 2007).

2.3.2. Genotoksik etkilerin mekanizmaları

Genotoksik etkiler, DNA'nın yapısında ve fonksiyonunda değişikliklere yol açan bir dizi mekanizma ile meydana gelebilir. Bu mekanizmalar arasında DNA adduct oluşumu, oksidatif stres, doğrudan DNA kırıkları, DNA replikasyonunun ve tamirinin inhibisyonu ve epigenetik değişiklikler bulunur.

DNA Adduct Oluşumu: DNA adductları, genotoksik kimyasalların doğrudan DNA bazları ile kovalent bağlar oluşturması sonucu meydana gelir. Bu adductlar, DNA'nın replikasyonunu ve transkripsiyonunu bozarak mutasyonlara ve genetik anormalliklere yol açar. Örneğin, poliaromatik hidrokarbonlar (PAH'lar) ve bazı kimyasal karsinojenler, DNA adduct oluşumuna neden olabilir (Phillips, 2005).

Oksidatif Stres: Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) hücrelerde birikmesi sonucu meydana gelir ve bu türler DNA'ya zarar verebilir. ROS, DNA bazlarını oksitleyebilir, DNA zincirlerinde kırıklara neden olabilir ve hücrel antioksidan savunma mekanizmalarını bozabilir. Genotoksik maddeler, hücrel oksidatif stres seviyelerini artırarak DNA hasarına yol açabilir (Beckman & Ames, 1998; Valko vd., 2006).

Doğrudan DNA Kırıkları: Bazı genotoksik ajanlar, DNA çift zincir kırıkları (DSB) ve tek zincir kırıkları (SSB) gibi doğrudan fiziksel hasarlara yol açabilir. Bu kırıklar, hücre döngüsünün durmasına, apoptotik hücre ölümüne veya hatalı DNA tamiri sonucu mutasyonlara neden olabilir. İyonize radyasyon ve bazı kemoterapötik ajanlar, doğrudan DNA kırıkları oluşturarak genotoksik etki gösterir (Curtin, 2012).

DNA Replikasyonu ve Tamirinin İnhibisyonu: Genotoksik maddeler, DNA polimerazlar gibi DNA replikasyonu ve tamirinde görev alan enzimleri inhibe edebilir. Bu inhibitör etkiler, hatalı DNA sentezine, replikasyon stresine ve genomik instabiliteye yol açar. Örneğin, bazı antimetabolitler ve alkilleyici ajanlar, DNA replikasyonunu inhibe ederek genotoksik etki gösterir (Kaina, 2003).

Epigenetik Değişiklikler: Genotoksik maddeler, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve diğer epigenetik mekanizmalar üzerinden de genetik materyale zarar verebilir. Bu değişiklikler, gen ekspresyonunu düzenleyen epigenetik profilleri değiştirerek kanser ve diğer hastalıkların gelişimine katkıda bulunabilir (Herceg & Vaissiere, 2011).

2.3.3. Sitogenetik etkiler

Sitogenetik incelemeler, hücrelerin genetik materyalinde meydana gelen değişiklikleri ve bu değişikliklerin olası etkilerini inceleyen bir bilim dalıdır. Bu tür incelemeler, genotoksik maddelerin etkilerini belirlemek, kanserojen potansiyellerini değerlendirmek ve genetik hastalıkların tanısını koymak için kritik öneme sahiptir. Sitogenetik analizler, hücre bölünmesi sırasında kromozomların yapısını ve sayısını inceleyerek, hücrel genetik materyalde meydana gelen mikroskobik düzeydeki değişiklikleri tespit etmeye yarar (Savage, 1976). Sitogenetik incelemelerin önemi, özellikle çevresel ve kimyasal maddelerin insan sağlığı üzerindeki potansiyel zararlı etkilerini değerlendirmede ortaya çıkar. Çeşitli kimyasal ajanlar, radyasyon ve biyolojik faktörler, DNA'da mutasyonlara, kromozom kırıklarına ve anöploidiye yol açabilir. Bu tür genotoksik etkiler, kanser ve diğer genetik hastalıkların gelişiminde rol oynayabilir. Bu bağlamda, sitogenetik testler, genotoksik maddelerin belirlenmesi ve insan sağlığının korunması açısından önemli bir araçtır. Sitogenetik testlerin bir diğer önemli uygulama alanı, kanser tedavisi ve araştırmalarında görülmektedir. Kanser hücrelerinde sıklıkla kromozomal anormallikler bulunur ve bu anormalliklerin tespiti, kanserin tipi, evresi ve

tedaviye yanıtı hakkında bilgi sağlayabilir. Örneğin, kronik miyeloid lösemide (KML) Philadelphia kromozomu adı verilen spesifik bir kromozom translokasyonu, hastalığın tanı ve tedavisinde kritik bir belirteçtir. Sitogenetik incelemeler, aynı zamanda, genetik hastalıkların prenatal ve postnatal tanısında kullanılır. Karyotip analizi, Down sendromu gibi kromozom sayısal bozukluklarının teşhisinde yaygın olarak kullanılır. Ayrıca, subtelomerik bölge incelemeleri ve mikrodizi analizleri gibi ileri teknikler, daha küçük kromozom anomalilerini tespit etmek için geliştirilmiştir (Shaffer vd., 2001).

Midazolam ve Meperidin HCl gibi yaygın olarak kullanılan ilaçların genotoksik potansiyelleri üzerine yapılan çalışmalar sınırlıdır. Ancak, mevcut veriler bu ilaçların genotoksik etkilerini anlamak açısından önemlidir. Midazolam, genellikle sedatif ve anksiyolitik olarak kullanılır ve genotoksik potansiyeli üzerine yapılan çalışmalar sınırlıdır. Bazı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, midazolamın yüksek dozlarda genotoksik hasara yol açabileceği belirtilmiştir. Örneğin, bir çalışmada midazolamın fare lenfositlerinde mikronükleus oluşumunu artırdığı gözlemlenmiştir (Viana vd., 1998). Meperidin HCl, opioid analjezik olarak kullanılır ve genotoksik etkileri üzerine yapılan çalışmalar da sınırlıdır. Meperidin HCl'ün metaboliti olan normeperidin, nörotoksik etkileri ile bilinir ve bazı çalışmalarda kromozom hasarına yol açabileceği öne sürülmüştür. Ancak, bu etkilerin insan sağlığı üzerindeki potansiyel riskleri hakkında daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir (Kharasch, 2001).

2.4. Lenfositler ve İmmün Sistem Üzerindeki Etkiler

2.4.1. Lenfositlerin biyolojik önemi

Lenfositler, immün sistemin kritik bileşenleri olup, vücudun patojenlere ve yabancı maddelere karşı savunmasında önemli rol oynayan beyaz kan hücreleridir. Lenfositler, temel olarak üç ana türe ayrılır: T lenfositler, B lenfositler ve doğal öldürücü (NK) hücreler. Bu hücreler, adaptif ve doğal bağışıklık yanıtlarında görev alır ve her biri spesifik fonksiyonlara sahiptir (Vivier vd., 2008).

T Lenfositler: T lenfositler (T hücreleri), kemik iliğinde üretilip timusta olgunlaşan hücrelerdir. Bu hücreler, patojenlere karşı hücresel bağışıklık yanıtında önemli rol oynar. T lenfositler, sitotoksik T hücreleri (CD8+), yardımcı T hücreleri (CD4+) ve düzenleyici T hücreleri gibi alt gruplara ayrılır. Sitotoksik T hücreleri, enfekte hücreleri doğrudan öldürürken, yardımcı T hücreleri bağışıklık yanıtını düzenler ve diğer immün hücreleri

aktive eder. Düzenleyici T hücreleri ise bağışıklık yanıtını kontrol eder ve otoimmün hastalıkları önler (Vivier vd., 2008).

B Lenfositler: B lenfositler (B hücreleri), kemik iliğinde üretilir ve olgunlaşır. Bu hücreler, patojenlere karşı humoral bağışıklık yanıtında görev alır. B hücreleri, antijenlere karşı spesifik antikorlar üretir ve bu antikorlar, patojenleri nötralize eder veya immün sistemin diğer bileşenleri tarafından tanınmasını sağlar. B hücreleri, aynı zamanda bellek B hücrelerine farklılaşarak, tekrar karşılaşılan antijenlere karşı hızlı ve güçlü bir yanıt sağlar (Vivier vd., 2008).

Doğal Katil (NK) Hücreler: NK hücreler, doğuştan gelen bağışıklık yanıtının önemli bileşenleridir. Bu hücreler, tümör hücrelerini ve virüsle enfekte hücreleri tanıyıp yok edebilir. NK hücreler, hedef hücreleri sitotoksik granüller aracılığıyla doğrudan öldürür ve ayrıca sitokinler salgılayarak bağışıklık yanıtını modüle eder (Beilin vd., 1996).

Lenfositlerin işlevleri, immün sistemin etkin çalışması ve vücudun patojenlere karşı korunması için hayati öneme sahiptir. Lenfositlerin fonksiyonel bozuklukları, enfeksiyonlara karşı duyarlılığı artırabilir ve otoimmün hastalıklara yol açabilir. Bu nedenle, lenfositlerin biyolojik önemi, immünoloji ve tıp alanında çeşitli çalışmalar yapılmaktadır.

2.4.2. Midazolam ve Meperidin HCl'ün immün sistem üzerindeki potansiyel etkileri

Midazolamın immün sistem üzerindeki etkileri, hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda incelenmiştir. Bu çalışmalar, midazolamın lenfosit fonksiyonları ve sitokin üretimi üzerinde çeşitli etkileri olduğunu göstermektedir. Midazolamın immün yanıtı modüle etme potansiyeli, T lenfosit aktivasyonu ve proliferasyonu üzerindeki etkileriyle ilişkilidir. Örneğin, bazı çalışmalarda midazolamın, T hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği ve IL-2 üretimini azalttığı gösterilmiştir. Bu etkiler, midazolamın immünosupresif özelliklere sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, midazolamın immün sistem üzerindeki etkileri, doza ve maruz kalma süresine bağlı olarak değişebilir. Düşük dozlarda ve kısa süreli kullanımda immün yanıt üzerinde minimal etkiler gözlemlenirken, yüksek dozlarda ve uzun süreli kullanımda daha belirgin immünosupresif etkiler rapor edilmiştir. Opioidlerin immün sistem üzerindeki etkileri, genellikle immünosupresif özellikler ile ilişkilendirilir (McAuley vd., 2011).

Meperidin HCl'in immün hücre fonksiyonları ve sitokin üretimi üzerindeki etkileri de bu bağlamda incelendiğinde, NK hücre aktivitesi ve T hücre fonksiyonları üzerindeki etkileriyle ilişkilidir. Bazı  alışmalar, Meperidin HCl'in NK hücrelerinin sitotoksik aktivitesini azalttığını ve T hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. Bu etkiler, Meperidin HCl'in immünosupresif özelliklere sahip olduğunu ve enfeksiyon riskini artırabileceğini düşündürmektedir (Ho vd., 2013).

Ayrıca, Meperidin HCl'in makrofajlar ve dendritik hücreler gibi diğer immün hücreler üzerindeki etkileri de incelenmiştir. Meperidin HCl, makrofajların fagositik aktivitesini ve dendritik hücrelerin antijen sunum kapasitesini azaltabilir. Bu etkiler, Meperidin HCl'in immün yanıtın genel olarak baskılanmasına katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Midazolam ve Meperidin HCl gibi anestezi ilaçlarının immün sistem üzerindeki potansiyel etkileri, özellikle cerrahi hastalarda ve yoğun bakım ünitelerinde önemlidir. Cerrahi stres ve anestezi, immün sistemi zaten baskılayabilir ve bu ilaçların ek immünosupresif etkileri, postoperatif enfeksiyon riskini artırabilir. Bu nedenle, bu ilaçların kullanımı sırasında immün yanıtın dikkatle izlenmesi ve uygun önlemlerin alınması önemlidir (Ho vd., 2013). Sonuç olarak, midazolam ve Meperidin HCl gibi ilaçların immün sistem üzerindeki etkileri karmaşıktır ve bu etkilerin klinik kullanımda dikkate alınması gerekmektedir. İmmünosupresif etkiler, ilaçların dozajı, uygulama süresi ve hastanın genel sağlık durumu gibi faktörlere bağlı olarak değişebilir (Benyamin vd., 2008).

2.5. Comet Testi (Tek Hücreli Jel Elektrofrez)

Comet testi, diğer adıyla tek hücre jel elektrofrez (SCGE), DNA hasarını tespit etmek için kullanılan hassas ve hızlı bir yöntemdir. İlk olarak 1984 yılında  stling ve Johanson tarafından tanıtılmış ve 1988'de Singh ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem, tek hücre seviyesinde DNA kırıklarının tespit edebilme kapasitesi ile genotoksisite araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Östling & Johanson, 1984).

Comet testinin temel prensibi, hücrelerin alkali veya nötral bir ortamda jel matrikse yerleştirilmesi ve elektrofrez uygulanmasıdır. Bu işlem sonucunda, DNA hasarına uğramış hücreler, kuyruk şeklinde bir görünüm alır ve bu yapı mikroskop altında incelenir. Kuyruk uzunluğu ve yoğunluğu, DNA kırıklarının miktarını ve tipini

belirlemeye yardımcı olur. Bu yöntemin avantajları arasında, az sayıda hücre ile çalışabilme, hızlı sonuç elde edebilme ve çeşitli hücre tiplerinde uygulanabilirlik yer almaktadır. Ayrıca, Comet yöntemi hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamlarda kullanılabilen esnek bir testtir. Bu test, genotoksisite değerlendirmelerinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Genotoksisite, genetik materyalin yapısını ve işlevini bozabilecek kimyasal veya fiziksel ajanların etkilerini inceleyen bir bilim dalıdır. Genotoksik maddeler, DNA'da tek veya çift sarmal kırıkları, baz değişiklikleri ve DNA-protein çapraz bağları gibi hasarlara yol açabilir (Tice vd., 2000).

Comet yöntemi, bu tür DNA hasarlarını tespit edebilmek için ideal bir yöntemdir. DNA hasarının derecesi, kuyruk momenti, kuyruk uzunluğu ve kuyruk DNA yüzdesi gibi parametreler kullanılarak değerlendirilir. Bu parametreler, hücredeki DNA kırıklarının miktarını ve dağılımını gösterir ve böylece genotoksik etkilerin kapsamını ortaya koyar. Çevresel toksikoloji, ilaç geliştirme, kanser araştırmaları ve radyobiyojoloji gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Örneğin, çevresel toksikolojide, su ve hava kirliliği gibi çevresel ajanların genotoksik etkileri bu test ile değerlendirilmektedir (Collins, 2004). Midazolam ve Meperidin HCl gibi ilaçların genotoksik etkilerini incelemek için bu yöntem sıklıkla kullanılmıştır. Midazolam ile yapılan Comet testi çalışmalarında, bu ilacın DNA hasarına yol açabileceği gösterilmiştir. Örneğin, bazı araştırmalarda midazolamın, lenfositlerde DNA kırıklarına neden olduğu ve hücrel DNA onarım mekanizmalarını etkilediği bildirilmiştir. Bu etkiler, midazolamın yüksek dozlarda veya uzun süreli kullanımında genotoksik potansiyel taşıyabileceğini düşünülmüştür (Ersson & Möler, 2011).

Meperidin HCl'in genotoksik etkileri üzerine yapılan Comet testi çalışmaları da benzer sonuçlar ortaya koymuştur. Genotoksik potansiyel taşıyabileceğini düşünülmüştür. Meperidin HCl'in hücrelerde DNA hasarına yol açabileceği ve bu hasarın elektroforetik analizlerle tespit edilebileceği gösterilmiştir. Örneğin, bir çalışmada genotoksik potansiyel taşıyabileceğini düşünülmüştür. Meperidin HCl maruziyetinin lenfositlerde belirgin DNA hasarına neden olduğu ve bu hasarın Comet Assay ile tespit edildiği rapor edilmiştir (Singh ve vd., 1988).

Bu test, hücrelerin DNA'larının elektriksel alan altında bir jel üzerinde hareket etmesine dayanır. Hücrelerin hasar görmüş DNA'ları bir kuyruk oluşturur ve bu kuyruk çeşitli parametrelerle ölçülür:

Kuyruk Uzunluğu: Hücredeki DNA'nın elektriksel alan altında jelde hareket eden kısmının uzunluğudur. DNA kırıkları ve hasarlarının miktarını gösterir. Kuyruk ne kadar uzun olursa, DNA hasarı o kadar fazladır.

Kuyruk Yoğunluğu: Kuyruktaki DNA yoğunluğunun miktarıdır. DNA'nın ne kadarının hasar gördüğünü ve kuyrukta toplandığını gösterir. Daha yüksek yoğunluk, daha fazla DNA hasarına işaret eder.

Kuyruk Momenti: Kuyruğun uzunluğu ile yoğunluğunun çarpımının bir ölçüsüdür. Hem kuyruk uzunluğunu hem de yoğunluğunu birleştirerek genel DNA hasarını değerlendiren bir parametredir. Kuyruk momentini yüksekse, DNA hasarının hem yaygın hem de şiddetli olduğunu gösterir (Olive & Banath, 2006).

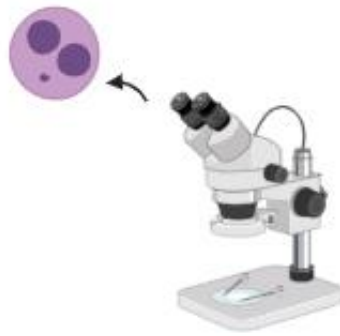
2.6. Sitokinez Bloklanmış Mikronükleus Testi (CBMN)

Mikronükleus testi, hücrelerin genotoksik ajanlara maruz kaldığında DNA hasarını ve kromozomal anormallikleri tespit etmek için kullanılan hassas bir yöntemdir. Bu test, hücre bölünmesi sırasında kromozom kırıkları veya anafaz gecikmesi nedeniyle oluşan küçük, ek nükleus yapılarını (mikronükleuslar) tespit eder. İlk olarak 1970'lerde Schmid tarafından tanıtılmış ve o zamandan beri geniş bir kullanım alanı bulmuştur (Schmid, 1975). Mikronükleus testi, hücre kültürlerinde veya hayvan modellerinde uygulanabilir. Bu yöntemde, test edilen hücreler belirli bir süre boyunca genotoksik ajana maruz bırakılır ve daha sonra sitokinezin bloke edilmesi yoluyla hücre bölünmesi durdurulur. Hücreler, mikroskop altında incelenerek mikronükleus oluşumu değerlendirilir. Mikronükleusların varlığı, hücrelerdeki genetik materyalin hasar gördüğünü ve bu hasarın düzgün bir şekilde onarılmadığını gösterir. Mikronükleus testi, genotoksik ajanların DNA'ya verdiği zararı ve kromozomal anormallikleri değerlendirmek için yaygın olarak kullanılır. Genotoksik maddeler, DNA'nın yapısını bozarak veya kromozomların düzgün bir şekilde ayrılmasını engelleyerek hücrelerde kalıcı hasara yol açabilir. Bu hasar, kanser gibi ciddi sağlık sorunlarına yol açabilir (Fenech, 2000).

Mikronükleus testi, genotoksisite değerlendirmelerinde birkaç avantaja sahiptir. Öncelikle, bu testin uygulanması nispeten basit ve hızlıdır. Ayrıca, mikronükleuslar kolayca gözlemlenebilir ve sayılabilir, bu da kantitatif analizler yapılmasına olanak tanır. Mikronükleus testi hem kimyasal maddelerin hem de fiziksel ajanların genotoksik

potansiyelini değerlendirmek için kullanılabilir. Çevresel toksikolojide, ilaç geliştirme süreçlerinde ve işyeri güvenliği araştırmalarında yaygın olarak uygulanmaktadır. Bu test, ayrıca radyobiyoloji alanında da önemli bir rol oynar. Radyasyonun neden olduğu DNA hasarı ve kromozomal anormallikler, bu test ile tespit edilebilir ve değerlendirilebilir. Radyasyon tedavisi gören hastalarda veya radyasyona maruz kalan işçilerde genetik hasarın izlenmesi için de kullanılmaktadır (Goulart vd., 2005). Midazolam ile yapılan mikronükleus testi çalışmaları, bu ilacın genotoksik etkileri olabileceğini göstermiştir. Örneğin, bazı araştırmalarda midazolamın lenfositlerde mikronükleus oluşumunu artırdığı ve bu durumun DNA hasarını işaret ettiği bildirilmiştir. Bu bulgular, midazolamın yüksek dozlarda veya uzun süreli kullanımında genetik materyale zarar verebileceğini düşündürmektedir (Ghandi vd., 2013).

Meperidin HCl'in genotoksik etkileri üzerine yapılan mikronükleus testi çalışmaları da benzer sonuçlar ortaya koymuştur. Meperidin HCl, hücrelerde mikronükleus oluşumuna yol açarak DNA hasarını ve kromozomal anormallikleri artırabilir. Bir alışmada, Meperidin HCl maruziyetinin lenfositlerde belirgin mikronükleus artışına neden olduğu ve bu durumun genotoksik bir etkiyi işaret ettiği rapor edilmiştir (Moura ve ark., 2018).



şekil 2.4. *Işık mikroskobunda mikronklues görüntüsü*

2.7. Tezin Amacı

Bu tez, Midazolam ve Meperidin Hidroklorür gibi yaygın olarak kullanılan iki anesteziik ilacın lenfositler üzerindeki *in vitro* sitogenetik etkilerini araştırmayı amaçlamaktadır. Özellikle, bu ilaçların genotoksik potansiyelini değerlendirmek için Comet testi ve mikronükleus testi gibi sitogenetik analiz yöntemleri kullanılacaktır. Midazolam, benzodiazepin sınıfına ait olup sedatif, anksiyolitik ve antikonvülzan özelliklere sahip bir ilaçtır. Meperidin Hidroklorür ise bir opioid analjezik olup, genellikle akut ve şiddetli ağrıların tedavisinde kullanılır. Bu ilaçların geniş klinik kullanımları göz önüne alındığında, genotoksik etkilerinin anlaşılması, güvenli ve etkili kullanım stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunacağı düşünölmektedir.

Çalışmanın bir diğer amacı ise midazolam ve Meperidin Hidroklorür'ün lenfositler üzerindeki etkilerinin doz-cevap ilişkisini incelemektir. Her iki ilaç için farklı konsantrasyonlar kullanılarak, hücrelerde meydana gelen DNA hasarının düzeyi ve mikronükleus oluşumu değerlendirilecektir. Elde edilen bulgular, bu ilaçların potansiyel genotoksik etkilerini anlamamıza yardımcı olacak ve bu bilgilerin klinik uygulamalarda nasıl kullanılabileceğine dair önemli bilgiler sağlayacaktır. Ayrıca, bu çalışma, anesteziik ilaçların güvenli doz aralıklarının belirlenmesine katkıda bulunarak, olası yan etkilerin önlenmesi için gerekli önlemlerin alınmasına yardımcı olması hedeflenmektedir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. CBMN Testi

3.1.1. CBMN testinde kullanılan çalışma çözeltileri ve materyaller

Sarf malzemeler ve cihazlar: Duran şişeler, pastör pipeti, mikropipet, pipet uçları manyetik balık, falkon tüpler, tüplük, lam, şırınga, dikey şale, beher, spatül, kurutma kağıdı, mezür, inkübatör, biyogüvenlik kabini, hassas terazi, manyetik karıştırıcı, otoklav, santrifüj, mikroskop. Deney öncesinde spatüller, manyetik balıklar, beherler, şişeler ve distile su otoklavlanmıştır.

Kimyasallar: Meperidin HCl, Midazolam, Heparin, Kromozom medyum (Gibco), Metanol (Sigma), Sitokalsin-B (Sigma), Mitomisin-C (Sigma), HNO₃ (Sigma), KH₂PO₄ (Merck), distile su, NaCl (Sigma), KCl (Merck), ultra saf su, Asetik asit (Riedel-de Haën), Giemsa boyası (Sigma), H₂NaO₄P.2H₂O (Merck).

Çözeltiler: Çözeltiler hazırlanırken otoklavlanmış su kullanılmıştır.

i. KCl: 0,4 g KCl hassas terazide tartılır ve 100 mL distile suda çözündürülür. 37°C’de saklanır.

ii. Fiksatif-1: 50 mL asetik asit üzerine 250 mL metanol eklenerek hazırlanır. 4°C’de saklanır.

iii. Fiksatif-2: 0,9 g NaCl 100 mL distile suda çözündürülür. Bu çözeltiden 50 mL alınarak üzerine 50 mL fiksatif-1 eklenir. 4°C’de saklanır.

iv. Giemsa Boyası: 0,9 g KH₂PO₄ tartılır ve 20 mL ultra saf suda çözündürülür. 1,18 g H₂NaO₄P.2H₂O tartılır ve 20 mL ultra saf suda çözündürülür. Hazırlanan bu iki çözeltiden 15’er mL üzerine 15 mL Giemsa boyası eklenir. Ultra saf su ile 300 mL’ye tamamlanır. Kurutma kâğıdı yardımıyla süzülür.

v. HNO₃: 18 mL HNO₃ 300 mL’ye tamamlanır. 4°C’de saklanır.

3.1.2. Kullanılan ilaç dozlarının hazırlanışı

CBMN deneyi kapsamında kullanılan Meperidin HCl ve Midazolam ilaçlarının doz belirlenmesi için yapılan literatür taraması yapılmıştır. İçeriğinde 5 mg/mL midazolam etken maddesi bulunduran ilaç için 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL, 400 µg/mL olmak üzere dört doz belirlenmiştir. İçeriğinde 50 mg/mL Meperidin HCl etken maddesi bulunduran ilaç için ise 250 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL ve 1000 µg/mL olacak şekilde dört konsantrasyonda dozlar belirlenmiştir. Belirlenen dozlar, lenfositler 2,5 mL

kromozom medyumunda kültüre edileceği için bu miktarın 1 mL'sine göre hesaplanmıştır.

3.1.3. Lenfositlerin kandan eldesi ve kültüre edilmesi

CBMN testi için 25-30 yaş arası, herhangi bir hastalığı bulunmayan, sigara ve alkol kullanmayan, sağlıklı bir kadın ve bir erkek denekten steril koşullarda birer tüp kan alınmıştır. Bir gece öncesinden 37°C'de ısıtılan kromozom medyumunu her falkon tüpte 2,5 mL olacak şekilde 12 tüpe bölünmüştür. Ardından kanın pıhtılaşmasını önlemek için her tüpe 12,5 µL heparin ilavesi yapılmıştır. Kan alındıktan sonra yine her falkon tüpe 6 damla eklenmiştir. Bu işlemler kontaminasyonun önlenmesi için biyogüvenlik kabiniinde gerçekleştirilmiştir. Yavaşça karıştırıldıktan sonra CO₂ dengesini sağlamak için kapaklar biraz açık olacak şekilde 37°C inkübatöre konulmuştur. 72 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

3.1.4. İlaç dozlarının lenfositlere verilmesi

İnkübasyonun 24. ve 48. saatlerinde önceden belirlenen ve hazırlanmış olan dozlar etiketlenmiş tüplere 100 µL eklenmiştir. Kan alımından 44 saat sonra sitokinez bölünmesinin durdurulması için her tüpe 50 µL Sitokalsin B (Cyt B) eklenmiştir. Madde eklemeleri steril koşulların sağlanması için biyogüvenlik kabiniinde yapılmıştır. Spontan negatif kontroldür ve o tüpe kromozom medyumunu, heparin, kan haricinde sadece Cyt B maddesi eklenmiştir. Tüpler inkübatöre kaldırılmış ve toplam 72 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İzolasyondan 48 saat önce 1N HNO₃ çözeltisi hazırlanmıştır ve dikey şalelere dizilen lamaların üzerine eklenip 1 gece 4°C'de bekletilmiştir. Ardından şaleler 15 dk çeşme suyu altında ve 3 kez 5 dk distile suda yıkanmıştır. Şalelere distile su eklenmiş ve tekrar 4°C'ye kaldırılmıştır.

3.1.5. Lenfositlerin izole edilmesi

72 saat inkübasyon sonunda lenfositlerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun için gerekli KCl, fiksatif-1 ve fiksatif-2 çözeltileri izolasyondan 2 saat önce hazırlanmış ve KCl 37°C'ye fiksatifler ise 4°C'ye kaldırılmıştır. İnkübasyon süresi bitince tüpler 1200 rpm hızda 30 dakika (dk) santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında pastör pipet ile süpernatant 1 mL kalana kadar atılmıştır. Tüplerin üzerine 37°C sıcaklığındaki KCl'den 6 mL eklenip 10 dk bekletilerek hücrelerin şişirilmesi sağlanmıştır. Tüpler 1200 rpm

hızda 15 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant 1 mL kalıncaya kadar atılmış ve tüplere 4°C olan fiksatif-1'den 6 mL eklenip 15 dk bekletilmiştir. Tüpler 15 dk 1200 rpm hızda santrifüj edilmiştir. Süpernatant 1 mL kalıncaya kadar atılmış ve tüplere 4°C olan fiksatif-1'den 6 mL eklenip 15 dk bekletilmiştir. 1200 rpm hızda 15 dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem 2 kez gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonunda her tüpte 0,5-1 mL kalıncaya kadar atılmıştır.

3.1.6. Lenfositlerin fiksasyonu ve boyanması

4°C'de bekletilen lamalar alınmış ve her doz için 3 lam olmak üzere pastör pipeti yardımıyla her lama 10 santimetre (cm) yükseklikten 5 damla lenfosit damlatılarak fiksasyon gerçekleştirilmiştir. Lamlar bir gece kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan lamalar tekrardan dikey şalelere dizilmiştir. Daha önceden belirtilen miktarda Giemsa boyası hazırlanmış ve süzölmüştür. Lamlar dizilen şalelere boya eklenerek 9 dk bekletilmiştir. Süre sonunda Giemsa atığına boya dökülmüştür ve boyanan lamalar 3 ayrı behere eklenen distile sudan geçirilip tekrar kurumaya bırakılmıştır.

3.1.7. CPI değerinin belirlenmesi

Lamlar kuruduktan sonra Olympus marka ışık mikroskobu altında 40X büyütülerek çekirdek sayısı, bir, iki, üç, dört ve daha fazla olan hücreler her doz için toplam 1000 tane olacak şekilde sayılmış ve CPI değeri hesaplanmıştır. Mikronükleus içeren hücreler ise ayrıca sayılmıştır. Sayılan hücreler yardımıyla aşağıda belirtilen formül kullanılarak her dozun CPI değerleri hesaplanmıştır.

$$CPI = \frac{1'li\ hücreler + [2x(2'li\ hücreler)] + [3x(3'lü\ hücreler)] + [4x(4'lü\ hücreler)]}{1000}$$

3.1.8. Mikronükleus hesaplaması

Midazolam ve Meperidin HCl maddelerinin klastojenik etkilerinin belirlenmesi amacıyla CBMN testinde hazırlanan preparatlarda 1000 adet iki çekirdek içeren lenfosit hücreleri incelenmiş ve bunlar arasında bulunan mikronükleus sayısı belirlenmiştir.

3.1.9. İstatistiksel analiz

CPI değerleri her bir doz için hesaplanmıştır ve Graphpad Prism 8 programında One Way ANOVA testi ile tablo ve grafik haline getirilerek analiz edilmiş ve klastojenik

etki yorumlanmıştır. Programda CPI değerlerinin ortalaması (ort. $\pm$ SS) ile anlamlılık değerleri (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$) hesaplanmıştır.

3.2. Comet Testi

3.2.1. Comet testinde kullanılan çalışma çözeltileri ve materyaller

Sarf malzemeler ve cihazlar: Duran şişeler, erlenmayer, pastör pipeti, mikropipet, pipet uçları manyetik balık, falkon tüpler, tüplük, lam, lamel, şırınga, yatay şale, beher, spatül, kurutma kâğıdı, mezür, inkübatör, hassas terazi, manyetik karıştırıcı, otoklav, santrifüj, su banyosu, elektroforez güç kaynağı ve Comet elektroforez tankı, floresan mikroskop. Deney öncesinde spatüller, manyetik balıklar, beherler, şişeler ve distile su otoklavlanmıştır.

Kimyasallar: Midazolam, Meperidin HCl, Histopaque 1077, normal erime sıcaklığına sahip agaroz (NMA) (Sigma), düşük erime sıcaklığına sahip agaroz (LMA) (Sigma), RPMI 1640, Triton-X (BioChemica), DMSO (%30), Fosfat Buffer Saline (PBS), NaCl, Na₂EDTA (Sigma), NaHCO₃, Tris-Baz, NaOH, Tris-HCl, Etidyum Bromür (EtBr), Tripan mavisi.

Çözeltiler: Çözeltiler hazırlanırken otoklavlanmış su ve PBS kullanılmıştır.

i. RPMI 1640: 0,26 g RMPI 1640 ve 0,08 g NaHCO₃ tartılır ve 25 mL distile suda çözündürülür. pH ayarlaması için oldukça az miktarda HCl eklenmiştir. 37°C'ye steril inkübatöre kaldırılır.

ii. Lizis Buffer: 29,22 g NaCl, 7,44 g Na₂EDTA, 0,242 g Tris-Baz tartılır. 150 mL distile suda çözündürülür. NaOH yardımıyla ve pHmetre kullanılarak çözelti pH'ı 10'a ayarlanır. Distile su ile 200 mL'ye tamamlanır. Bu çözelti karanlık şişeye hazırlanır ve 4°C'ye kaldırılır. Bu çözeltiye deney sırasında kullanılmadan 30 dk önce 2 mL TritonX-100 ve 20 mL DMSO eklenir.

iii. Nötralizasyon Buffer: 1 g Tris-Baz ve 8,69 g Tris-HCl 150 mL distile suda çözündürülür. 3 molar (M) HCl yardımıyla ve pHmetre kullanılarak çözelti pH'ı 7,5'a ayarlanır. Distile su ile 200 mL'ye tamamlanır. Bu çözelti karanlık şişeye hazırlanır ve 4°C'ye kaldırılır.

iv. Running Buffer: 12 g NaOH ve 0,373 g Na₂EDTA tartılır. pH'ı 13 ve üzeri olacak şekilde 1 litre (L)'ye tamamlanır. Bu çözelti karanlık şişeye hazırlanır ve 4°C'ye kaldırılır.

v. PBS: 1 adet PBS tableti 200 mL distile suda çözündürülür. Otoklavlanır ve oda sıcaklığında muhafaza edilir.

vi. Tripan Mavisi: 0,04 g toz Tripan mavisi tartılır ve %0,4 olması için 10 mL PBS'te çözündürülür. Filtreden geçirilir ve 4°C'ye kaldırılır.

3.2.2. Comet testinde kullanılan ilaç dozlarının hazırlanışı

Comet testi için CBMN deneyi kapsamında kullanılan Meperidin HCl ve Midazolam maddelerinin dozları referans alınarak hazırlanmıştır. Midazolam için 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL ve 400 µg/mL olmak üzere dört doz hazırlanmıştır. Meperidin HCl ilacı için ise 250 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL ve 1000 µg/mL şekilde dört konsantrasyonda dozlar hazırlanmıştır. İlaç seyreltilirken distile su kullanılmıştır.

3.2.3. Lamaların kaplanması

Bu deney kapsamında her doz için 2 lam olmak üzere toplam 20 tane lam kullanılmıştır. Lamalar etiketlenmiş ve oje yardımıyla etiketler sabitlenmiştir. Deneyden bir gece önce bir erlene 0,375 g NMA tartılıp 50 mL distile suda eklenmiştir. Suyun buharlaşmaması için erlenin ağzı kurutma kâğıdı ile kapatılıp yaklaşık 40 saniye (sn) kadar mikrodalgada eritilmiştir. Agarozun donmaması için manyetik karıştırıcı üzerinde 100°C'de kullanılmıştır. Pastör pipeti yardımıyla önceden etiketlenmiş tüm lamaların yüzeyine agaroz dökülmüştür. Lamaların altı kurularak kurumaya bırakılmıştır.

3.2.4. Lenfositlerin kandan izolasyonu

Comet testi için 25-30 yaş arası, herhangi bir hastalığı bulunmayan, sigara ve alkol kullanmayan, sağlıklı bir kadın ve bir erkek denekten steril koşullarda birer tüp kan alınmıştır. Oda sıcaklığında bekletilen ve alüminyum folyo ile kaplanmış falkon tüpte bulunan 3 mL Histopaque 1077 üzerine 3 mL kan damla damla karışmayacak şekilde eklenmiştir. 400 xg hızda 30 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda tüpün en üstünde sarı renkli serum, ortasında şeffaf renkli lenfositler ve en altında kırmızı renkli eritrositler bulunmaktadır. Pastör pipeti yardımıyla alınan lenfositler alüminyum folyo ile kaplanmış temiz falkon tüpe aktarılmıştır. Alınan miktarın 2 katı kadar önceden otoklavlanmış PBS eklenmiş ve köpürterek pipetaj yapılmıştır. 250 xg hızda 10 dk santrifüj edilir. Santrifüj

sonrasında süpernatant 1 mL kalıncaya kadar atılır 3 mL PBS eklenmiş ve 250 xg hızda 10 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında süpernatant 1 mL kalıncaya kadar atılır 3 mL PBS eklenmiş ve 250 xg hızda 10 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında süpernatant 0,5-1 mL kalıncaya kadar atılır. Üzerine 37 °C sıcaklığında olan RPMI 1640 besiyeri eklenir ve canlılık testi için 37 °C’lik inkübatöre kaldırılır.

3.2.5. Lenfositlerin canlılık testi

İzole edilen lenfosit hücreler ile deneye devam etmeden önce canlılık testi gerçekleştirilir. Bunun için bir Thoma lamı alkol ile temizlenir. 20 µL Tripan mavisini ile 20 µL RPMI 1640’lı hücre karıştırılır. Thoma lamına yapıştırılan lamel ile lam arasına, lamın iki tarafına da 10 µL bu karışımdan eklenir. Olympus marka ışık mikroskopunda 40X büyütmede kareler üzerindeki ölü ve canlı hücreler sayılır. Tripan mavisini, vital olmayan bir boyadır ve canlı hücrelerin içine giremez. Membran bütünlüğü bozulmuş olan ölü hücrelere girerek mavi renk verir. Canlı hücreler şeffaf iken ölü hücreler mikroskop altında mavi renkli gözüktür. Aşağıda verilen formül kullanılarak canlılık miktarı hesaplanmıştır. Deneye devam edebilmek için %80 üzerinde canlılık olması gerekmektedir. Bu deney sonucunda canlılık oranı %86 çıkmıştır.

$$\text{Canlılık} = (\text{Canlı hücre} / \text{Toplam hücre}) \times 100$$

Canlılık testi sonrasında 6 adet eppendorf hazırlanmıştır. Daha önce belirlenmiş ve hazırlanmış olan ilaç dozlarından etiketlenen eppendorflara 5’er µL, 95 µL RPMI 1640 besiyeri ve 150 µL RPMI 1640’lı hücre eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak 150 µM H₂O₂, çözücü olarak distile su, negatif kontrol olarak ise spontana sadece 150 µL RPMI 1640’lı hücre ve 100 µL RPMI 1640 besiyeri eklenmiştir. Daha sonra eppendorflar 37°C’de 1 saat madde maruziyetine bırakılmıştır.

3.2.6. Hücrelerin lizisi

İnkübasyon sonunda yapılan tüm işlemler karanlıkta gerçekleştirilmiştir. 0,07 g LMA 10 mL PBS’e eklenmiştir ve bir erlenmayerde yaklaşık 40 sn mikrodalgada eritilmiştir. Su banyosu 37°C’ye ayarlanmıştır ve eppendorflar yüzme mantarında su banyosuna konulmuştur. Ayrıca LMA’da erimemesi için su banyosuna konulmuştur. Eppendorflar 300 rpm hızda 5 dk santrifüj edilmiştir. Üzerinden 100 µL atılmış ve 100

μ L RPMI 1640 besiyeri eklenerek pipetaj yapılmıştır. Bu sayede hücrelerin besiyeri yenilenmiştir.

Daha önceden NMA ile kaplanan lamalar buz üstünde duran bir tepsiye dizilmiştir. Her eppendorfa 250 μ L LMA eklenip pipetaj yapılmıştır ve o eppendorfa ait lama 100 μ L yayarak damlatılmıştır. Üzerine yan yana 2 tane lamel kapatılmıştır. Tüm eppendorflar bittikten sonra tepsi 15 dk 4°C’de bekletilmiştir.

Bekletilen lamalar alınarak üzerindeki lameller atılır. 2 tane yatay şale ve kapakları deney öncesinde alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Lamalar bu şalelere birbirlerine yapışmaması için çapraz şekilde dizilmiştir. Lamalar üzerine, içine 20 mL DMSO ve 2 mL TritonX-100 eklenen Lizis Buffer 100’er mL dökülür. 2 saat 4°C’de inkübe edilmiştir (OECD, 2016).

3.2.7. Elektroforez

2 saat Lizis Buffer’da bekletilen lamalar Comet elektroforez tankına karşılıklı olarak dizilmiştir. Lamalar dizildikten sonra 4°C’de bekletilen Running Buffer yanlardan yavaşça eklenmiştir. Tankın kapağı kapatılarak etrafına buz ile kaplanmıştır. Lamalar 20 dk Running Buffer’da bekletilmiştir. Daha sonra güç kaynağı 25 Volt, 300 miliamper ve 300 Watt’a ayarlanarak 25 dk yürütülmüştür.

3.2.8. Hücrelerin nötralizasyonu

Elektroforez işlemi bittikten sonra lamalar alüminyum folyo ile kaplanmış yatay şalelere dizilmiştir. Üzerine Nötralizasyon Buffer eklenir ve 4°C’de 5 dk bekletilmiştir. Daha sonra deney öncesinde 4°C’de bekletilen 1L distile bir behere konulmuştur. Nötralizasyon Buffer uzaklaştırılmıştır ve lamalar tek tek distile sudan geçirilerek bir kutuya dizilmiştir. Kurumaya bırakılmıştır. Tüm bu işlemler karanlıkta gerçekleştirilmiştir.

3.2.9. Boyama ve görüntüleme

Karanlıkta kuruyan lamalar üzerine 10 μ L EtBr eklenerek üzerine yan yana 2 adet lamel kapatılmıştır. Olympus marka floresan mikroskop altında 40X büyütmede her bir doz için 50 adet hücrenin görüntüsü kaydedilmiştir. Görüntüleri kaydedilen hücrelerin kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk yoğunluğu parametreleri Comet Assay IV programında analiz edilmiştir.

3.2.10. İstatistiksel analiz

Comet testi sonucunda elde edilen kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametreleri Graphpad Prism 8 programına girilerek One Way ANOVA-Dunnett testi ile kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak ortalama değerler ve anlamlılık değerleri (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$) hesaplanmıştır.



4. BULGULAR

Midazolam ve Meperidin hidroklorür'ün hücre proliferasyonu ve MN oluşumuna etkilerinin incelenmesi amacıyla bir erkek ve bir kadın donörden kan alınmış ve lenfosit izolasyonu gerçekleştirilerek CBMN testi uygulanmıştır. Test sonrası her bir madde için 2000 hücre sayılmış, CPI değerleri hesaplanmış ve Tukey testi ile istatistiksel analiz gerçekleştirilmiştir. Bu maddelerin DNA hasarına etkisini incelemek amacıyla ise bir erkek ve bir kadın donörden izole edilen kan ile lenfositler üzerinde Comet testi uygulanmıştır. Her madde için 100 adet hücre incelenmiş ve One Way ANOVA-Dunnett testi ile istatistiksel analizleri yapılmıştır. Bu kapsamda elde edilen bulgular sunulmuştur.

4.1. Midazolam'ın Hücre Proliferasyonuna ve Mikronükleus Oluşumuna Etkisi

Tablo 4.1. Midazolam'ın 24 ve 48 saat maruziyet sonrası ortalama MN ve CPI değerleri.

24 Saat				
Madde	Doz	İncelenen Hücre Sayısı	Ort. MN ($\pm$ SD)	Ort. CPI ($\pm$ SD)
Spontan	-	2000	2 $\pm$ 0,81	1,4320 $\pm$ 0,00
MMC	0,3 μ g/mL	2000	15,66 $\pm$ 2,62***	1,1861 $\pm$ 0,02***
Midazolam	100 μ g/mL	2000	3 $\pm$ 0,81	1,2996 $\pm$ 0,04***
	200 μ g/mL	2000	4,33 $\pm$ 0,94	1,3500 $\pm$ 0,02*
	300 μ g/mL	2000	6,66 $\pm$ 0,94*	1,3533 $\pm$ 0,09*
	400 μ g/mL	2000	6,66 $\pm$ 2,05*	1,2650 $\pm$ 0,01***
48 Saat				
Madde	Doz	İncelenen Hücre Sayısı	Ort. MN ($\pm$ SD)	Ort. CPI ($\pm$ SD)
Spontan	-	2000	4 $\pm$ 0,81	1,3074 $\pm$ 0,01
MMC	0,3 μ g/mL	2000	26,66 $\pm$ 1,69***	1,1397 $\pm$ 0,00***

Tablo 4.1 (Devamı) Midazolam'ın 24 ve 48 saat maruziyeti sonrası ortalama MN ve CPI değerleri

Midazolam	100 µg/mL	2000	5±0,81	1,3723±0,01**
	200 µg/mL	2000	5±0,81	1,3590±0,01*
	300 µg/mL	2000	6,63±0,47*	1,2736±0,01
	400 µg/mL	2000	7,33±0,47**	1,2463±0,01**

MN: Mikronükleus, MMC: Mitomisin-C, CPI: Hücre Proliferasyon İndeksi
± SD: Standart sapma değerleri, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ (Tukey testi)
24 saat sonuçlarına bakıldığında Tablo 4.1'e göre:

Spontan grup: Negatif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Bu grupta ortalama MN değeri 2 ± 0.81 , CPI değeri ise 14320 ± 000 olarak bulunmuştur.

MMC (Mitomisin-C, 0.3 µg/mL): Pozitif kontrol olarak kullanılmıştır ve MN değeri $15.66 \pm 2.62^{***}$, CPI değeri ise $11861 \pm 002^{***}$ bulunmuştur ($P \leq 0.001$).

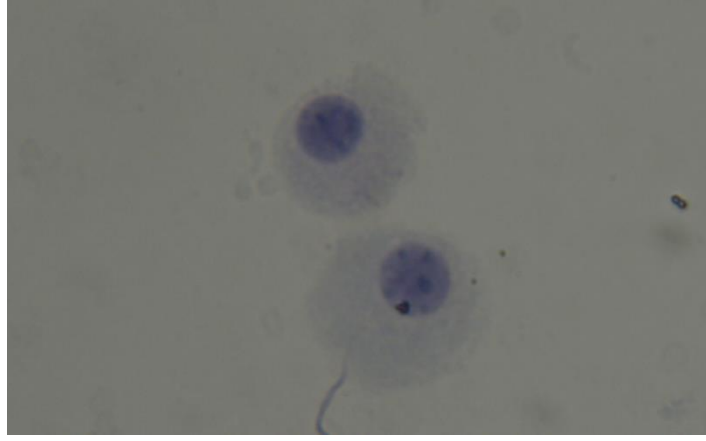
Midazolam farklı dozlarda incelenmiştir ve sonuçlar, Midazolam'ın doz miktarına bağlı olarak MN oluşumunun arttığını ve hücre proliferasyonunun (CPI) azaldığını göstermektedir. En düşük doz olan 100 µg/mL, MN bakımından anlamlı fark göstermezken, CPI değeri bakımından anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. En yüksek doz olan 400 µg/mL ise hem MN hem de CPI değerleri bakımından anlamlı fark yaratmıştır.

48 Saat maruziyet sonuçlarına bakıldığında

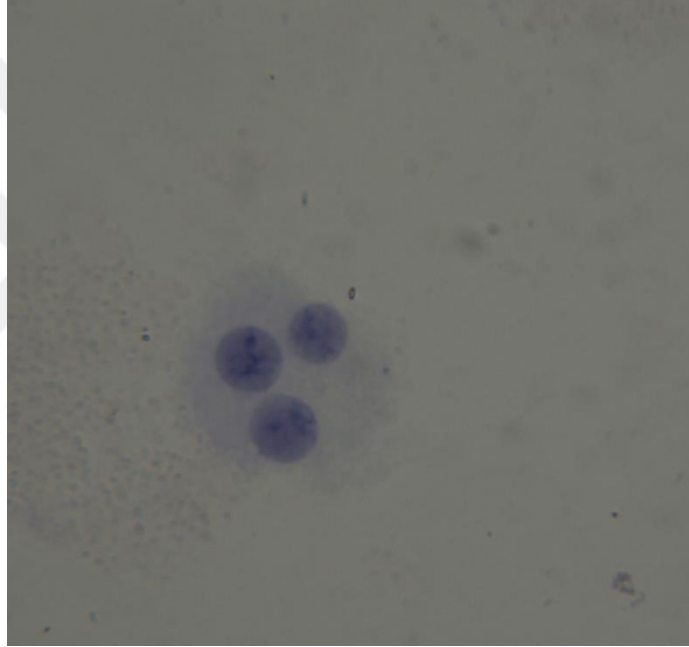
Spontan grup: Negatif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. MN değeri 4 ± 0.81 , CPI değeri 13074 ± 001 olarak bulunmuştur.

MMC (0.3 µg/mL): MN değeri $26.66 \pm 1.69^{***}$, CPI değeri $11397 \pm 000^{***}$ ($P \leq 0.001$) olarak bulunmuştur.

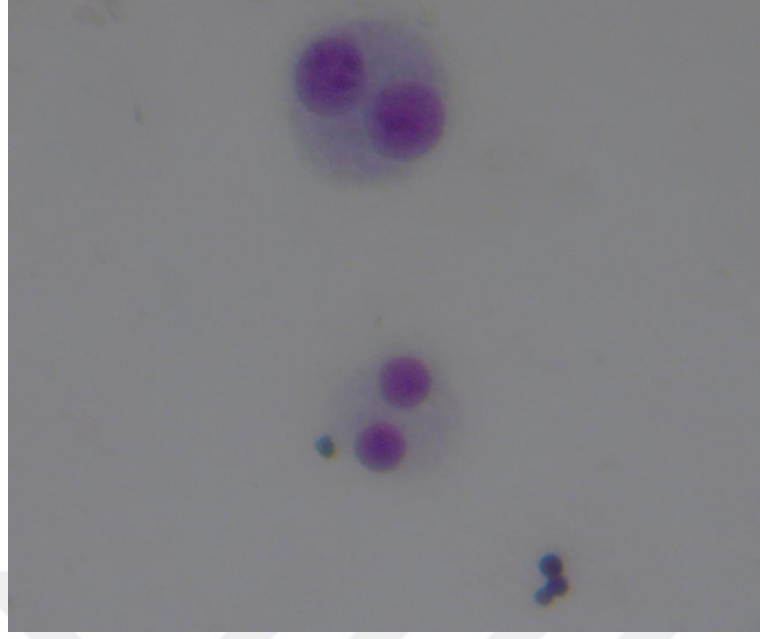
48 saat maruziyette Midazolam'ın MN oluşumunu arttırdığı ve CPI değerini azalttığı gözlemlenmiştir. 100 µg/mL ve 400 µg/mL dozlarında CPI değeri bakımından anlamlı farklar bulunmuştur. MN değerleri bakımından ise 300 µg/mL ve 400 µg/mL dozları anlamlı fark yaratmıştır.



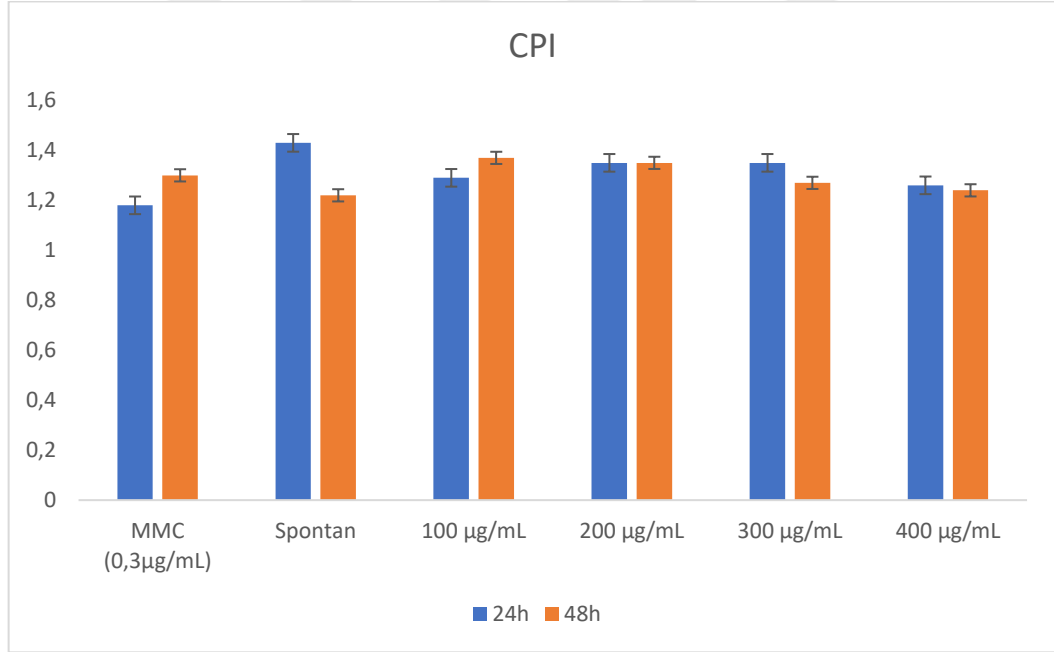
Şekil 4.1. *Tek çekirdekli lenfosit hücreleri (40X)*



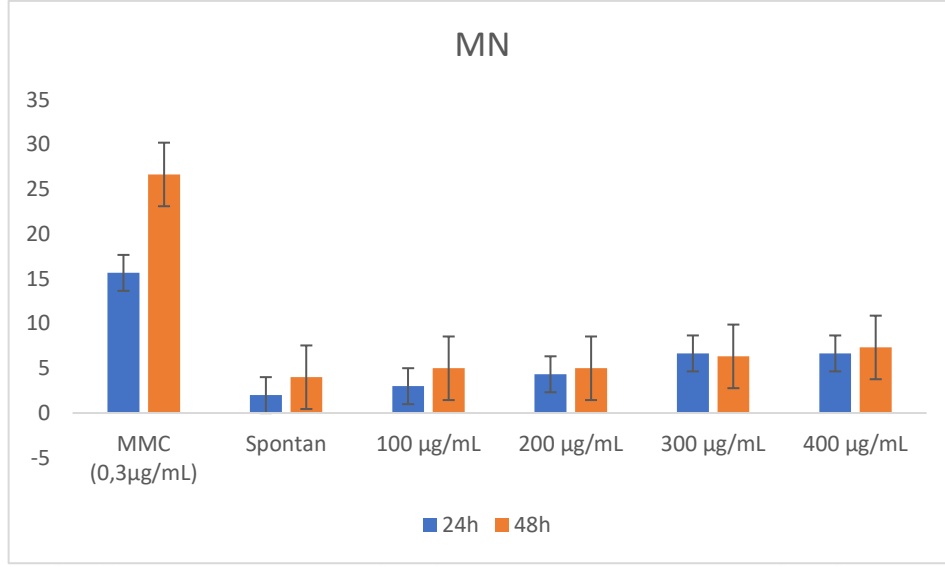
Şekil 4.2. *Üç çekirdekli lenfosit hücresi (40X)*



Şekil 4.3. İki çekirdekli lenfosit hücreleri (40X)



Şekil 4.4. Midazolam maddesinin 24 ve 48 saat maruziyet sonrası CPI değerleri



Şekil 4.5. Midazolam maddesinin 24 ve 48 saat maruziyet sonrası MN değerleri

Şekil 4.4 ve Şekil 4.5, Midazolam'ın farklı dozlarının 24 ve 48 saat maruziyet sonrası CPI ve MN değerlerini göstermektedir. Şekiller, doz artışıyla birlikte CPI değerinin düştüğünü ve MN değerinin arttığını göstermektedir. 24 saat için; Midazolam'ın doz miktarına bağlı olarak MN oluşumunun arttığı görülmüştür. En düşük doz olan 100 µg/mL'lik doz, MN bakımından spontanla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ancak CPI değeri bakımından anlamlı fark bulunmuştur ($P \leq 0.001$). En yüksek doz olan 400 µg/mL'lik dozu spontanla CPI değerine göre karşılaştırıldığında $P \leq 0.001$ düzeyinde; MN değerine göre karşılaştırıldığında $P \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı bir fark bulunmuştur (Tablo 4.1)

48 saat için; Midazolam'ın doz miktarına bağlı olarak MN oluşumunun arttığı ve CPI değerinin azaldığı görülmüştür. 100 µg/mL ve 400 µg/mL dozlarında spontanla CPI değerine göre karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmuştur ($P \leq 0.01$). Tüm dozlar MN değerleri bakımından spontan ile karşılaştırıldığında 300 µg/mL dozunda anlamlı bir fark ($P \leq 0.05$) ve 400 µg/mL dozunda anlamlı bir fark ($P \leq 0.01$) görülmüştür. 100 µg/mL ve 200 µg/mL dozları MN değeri için spontan ile kıyaslandığında ise herhangi bir anlamlı fark görülmemiştir (Tablo 4.1.)

4.2. Midazolam'ın DNA Hasarına Olan Etkisi

Tablo 4.2. Midazolam'ın Comet testi sonucu kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti verileri.

	Uygulama	Kuyruk Uzunluğu (μM)	Kuyruk Yoğunluğu (%)	Kuyruk Momenti
	Konsantrasyon (μg/mL)	Ortalama ± SD	Ortalama ± SD	Ortalama ± SD
Spontan Kontrol		69,00±4,629	10,93±2,221	9,91±4,177
H ₂ O ₂	50 μM	414,9±12,71***	63,71±4,864***	134,7±11,49***
Midazolam	100 μg/mL	197,2±7,828	14,72±1,092	24,15±3,94
	200 μg/mL	264,3±16,369***	25,71±4,081***	40,19±5,50***
	300 μg/mL	326,2±19,630***	47,65±3,385***	77,78±6,12***
	400 μg/mL	364,3±15,96***	59,51±2,279***	100,6±7,99***

H₂O₂: Hidrojen Peroksit (Pozitif Kontrol), ±SD: Standart sapma değerleri, (One Way ANOVA-Dunnett), *** P≤ 0.001

Tablo 4.2'de verilen veriler, Midazolam'ın farklı dozlarının DNA hasarı üzerindeki etkilerini göstermektedir.

Kuyruk uzunluğu için bakıldığında;

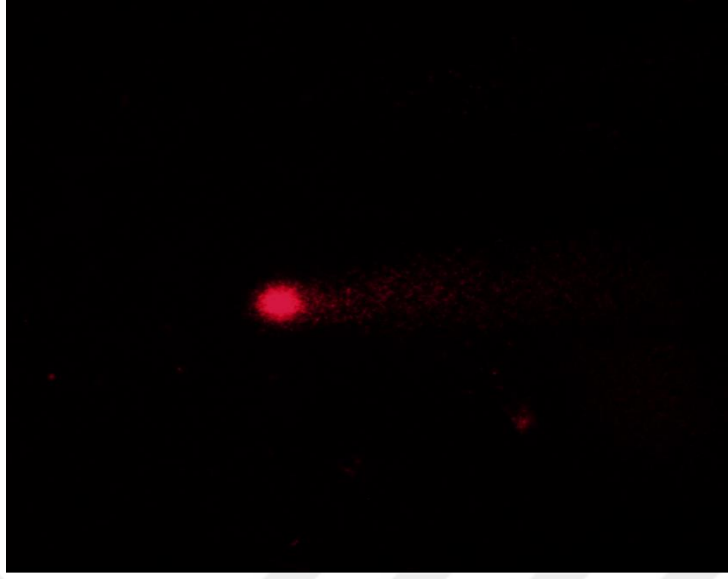
- H₂O₂, pozitif kontrol olarak kullanıldığında kuyruk uzunluğunda anlamlı bir artış göstermiştir (P≤0.001), bu da yaygın DNA hasarını gösterir.
- Midazolam'ın 100 μg/mL dozunda anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir, ancak 200, 300 ve 400 μg/mL dozlarında kuyruk uzunluğunda anlamlı artışlar gözlemlenmiştir (P≤0.001). Bu, daha yüksek dozların daha fazla DNA hasarına neden olduğunu gösterir.

Kuyruk yoğunluğu için bakıldığında;

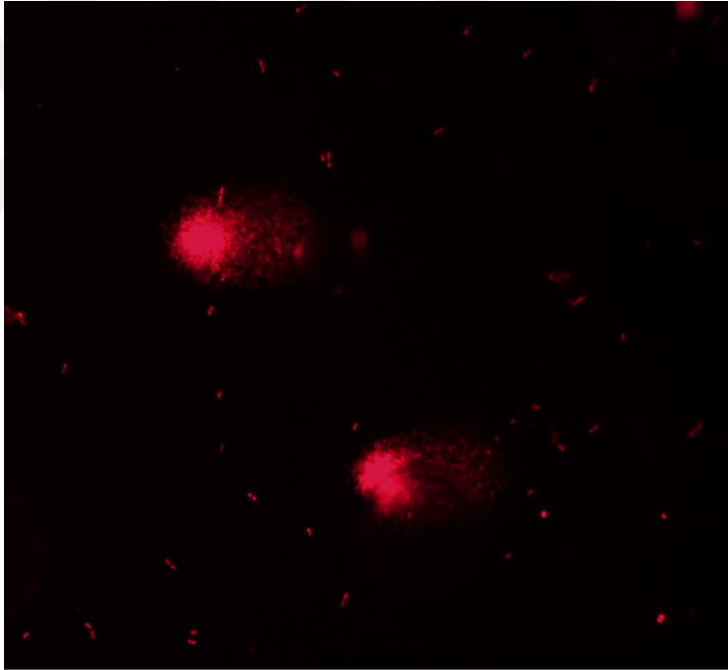
- H_2O_2 , kuyruk yoğunluğunda belirgin bir artış göstermiştir ($P \leq 0.001$).
- Midazolam'ın 100 $\mu g/mL$ dozunda anlamlı bir fark gözlemlenmemişken, 200, 300 ve 400 $\mu g/mL$ dozlarında kuyruk yoğunluğunda anlamlı artışlar gözlemlenmiştir ($P \leq 0.001$). Bu, daha yüksek dozların DNA'nın büyük bir kısmının kuyrukta toplandığını ve daha fazla DNA hasarına neden olduğunu gösterir.

Kuyruk momenti için bakıldığında;

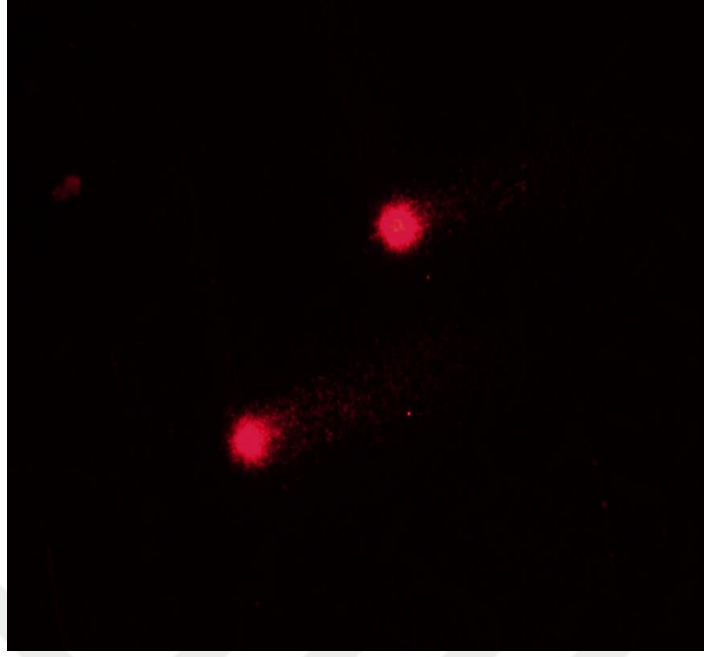
- H_2O_2 , kuyruk momentinde anlamlı bir artış göstermiştir ($P \leq 0.001$).
- Midazolam'ın 100 $\mu g/mL$ dozunda anlamlı bir fark gözlemlenmemişken, 200, 300 ve 400 $\mu g/mL$ dozlarında kuyruk momentinde anlamlı artışlar gözlemlenmiştir ($P \leq 0.001$). Bu, DNA hasarının hem yaygın hem de şiddetli olduğunu ve daha yüksek dozların DNA üzerinde daha ciddi hasarlara neden olduğunu gösterir.
- Doz arttıkça kuyruk uzunluğunda belirgin bir artış görülmektedir. Kontrol gruplarına göre karşılaştırıldığında bu sonuçlar, Midazolam'ın doz miktarına bağlı olarak DNA hasarını arttırdığını göstermektedir. Düşük dozlarda (100 $\mu g/mL$) DNA hasarına anlamlı bir etki göstermezken, daha yüksek dozlarda (200, 300 ve 400 $\mu g/mL$) DNA hasarında anlamlı artışlar gözlemlenmiştir. DNA hasarının üç ana parametresi (kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti) Midazolam'ın yüksek dozlarının DNA hasarını önemli ölçüde artırdığını ve bu etkinin doz bağımlı olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, Midazolam'ın genotoksik potansiyelini ortaya koymakta ve yüksek dozlarının hücrelerin genetik materyallerinde bir hasara yol açabileceğini göstermektedir.



Görsel 4.1. 1 saat boyunca 50 µM H₂O₂ dozu ile muamele edilen insan periferik lenfosit hücreleri (40X)

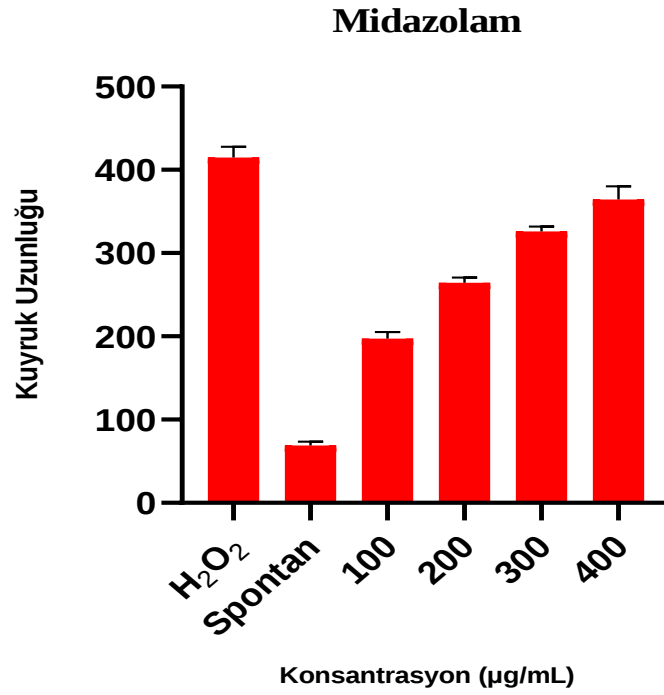


Görsel 4.2. 1 saat boyunca 300 µM Midazolam dozu ile muamele edilen insan periferik lenfosit hücreleri (40X)

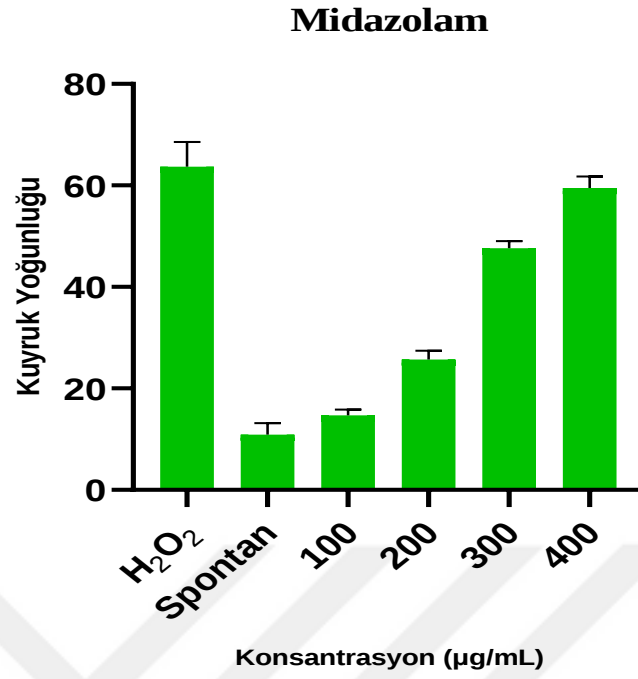


Görsel 4.3. 1 saat boyunca 400 µM Midazolam dozu ile muamele edilen insan periferik lenfosit hücreleri (40X)

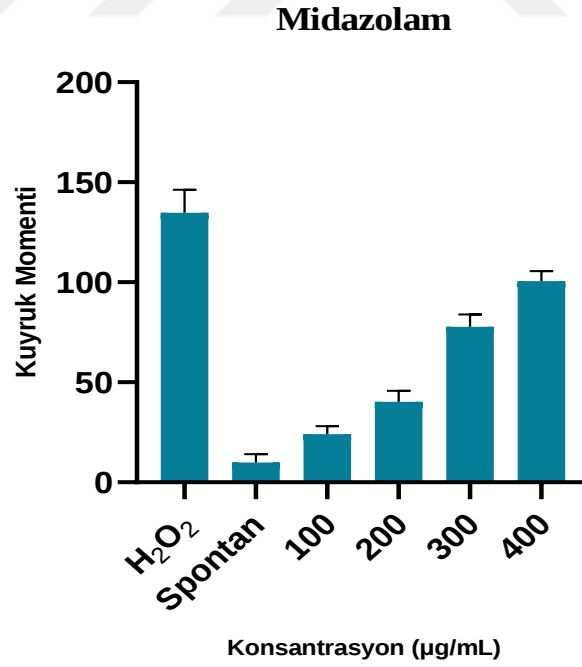
Görsel 4.1, 4.2 ve 4.3'te insan periferik lenfosit hücrelerinin 1 saat Midazolam ile muamele sonrası floresan mikroskopundaki Comet görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.6. Midazolam dozları ile 1 saat muamele edilen periferik lenfosit hücrelerindeki kuyruk uzunluk değerleri



Şekil 4.7. Midazolam dozları ile 1 saat muamele edilen periferik lenfosit hücrelerindeki kuyruk yoğunluk değerleri



Şekil 4.8. Midazolam dozları ile 1 saat muamele edilen periferik lenfosit hücrelerindeki kuyruk momenti değerleri

Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8: Midazolam'ın Comet testi sonuçlarına göre DNA hasarı üzerindeki etkilerini göstermektedir. Kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti değerleri, doz artışıyla birlikte anlamlı derecede artmaktadır.

Midazolam'ın hücre proliferasyonu ve mikronükleus oluşumu üzerindeki etkileri doz ve maruziyet süresine bağlı olarak değişmektedir. Düşük dozlarda (100 µg/mL) MN oluşumu bakımından anlamlı bir fark görülmezken, hücre proliferasyonunu önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir. Yüksek dozlarda (300-400 µg/mL) ise hem MN oluşumu hem de CPI değerlerinde anlamlı değişiklikler olmuştur. DNA hasarı açısından ise, Midazolam'ın tüm dozlarının DNA hasarını arttırdığı görülmüştür. Özellikle 200 µg/mL ve üzeri dozlarda, DNA hasarı önemli ölçüde artmıştır. Bu sonuçlar, Midazolam'ın hücre proliferasyonu ve DNA hasarı üzerindeki olası yan etkilerini göstermektedir.

4.3. Meperidin Hidroklorür'ün Hücre Proliferasyonuna ve Mikronükleus Oluşumuna Etkisi

24 saat maruziyet sonrası; spontan kontrol, çok düşük MN ve yüksek CPI değerleri, hücrelerin normal proliferasyon yeteneğini ve düşük genotoksosite seviyesini gösterir. MMC, yüksek MN ve düşük CPI değerleri, MMC'nin güçlü genotoksik ve sitotoksik etkisini ortaya koyar. Meperidin HCl; 250 µg/mL: MN değerinde hafif artış ve CPI değerinde hafif düşüş gözlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. 500 µg/mL: MN değerinde belirgin bir artış (*p < 0.05) ve CPI değerinde anlamlı düşüş (**p < 0.01) gözlenmiştir. 750 µg/mL: MN değerinde çok yüksek artış (***p < 0.001) ve CPI değerinde anlamlı düşüş (*p < 0.01) gözlenmiştir. 1000 µg/mL: MN ve CPI değerlerinde en yüksek değişiklikler (**p < 0.01 ve ***p < 0.001) gözlenmiştir.

48 saat maruziyet sonrası; spontan, kontrol grubu olarak bazal seviyede MN ve CPI değerleri gözlenir. MMC, pozitif kontrol grubu olarak çok yüksek MN ve düşük CPI değerleri gözlenmiştir. Meperidin HCl; 250 µg/mL: MN değerinde hafif artış (*p < 0.05) ve CPI değerinde hafif düşüş (**p < 0.01) gözlenmiştir. 500 µg/mL: MN değerinde belirgin artış (*p < 0.01) ve CPI değerinde anlamlı düşüş gözlenmiştir. 750 µg/mL: MN değerinde yüksek artış (***p < 0.001) ve CPI değerinde anlamlı düşüş (*p < 0.05) gözlenmiştir. 1000 µg/mL: MN ve CPI değerlerinde en yüksek değişiklikler (**p < 0.01 ve ***p < 0.001) gözlenmiştir.

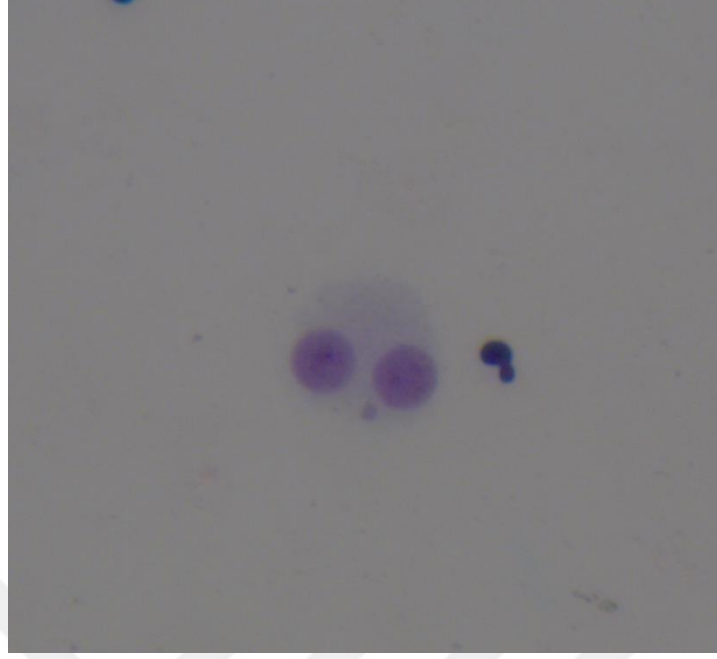
Meperidin HCl'in doza bağımlı olarak genotoksik ve sitotoksik etkiler gösterdiği görülmektedir. Artan dozlarla birlikte MN değerlerinde anlamlı artış ve CPI değerlerinde anlamlı düşüşler gözlenmiştir. Anlamlılık düzeyleri (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) meperidin HCl'in genotoksik ve sitotoksik etkilerini vurgulamaktadır. Yüksek dozlarda (750 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$) MN artışı ve CPI düşüşü istatistiksel olarak oldukça anlamlıdır. Bu bulgular, Meperidin HCl'in genotoksik potansiyelini göstermektedir ve bu nedenle yüksek dozlarda veya uzun süreli kullanımda dikkatli olunması gerektiğinin dikkat çekmektedir. Hücre proliferasyonunun baskılanması ve mikronükleus oluşumunun artması, ilacın genetik materyale zarar verebileceğini ve hücre döngüsünü negatif yönde etkileyebileceğini göstermektedir.

Tablo 4.3. Meperidin HCl'in 24 ve 48 saat maruziyet sonrası ortalama MN ve CPI değerleri.

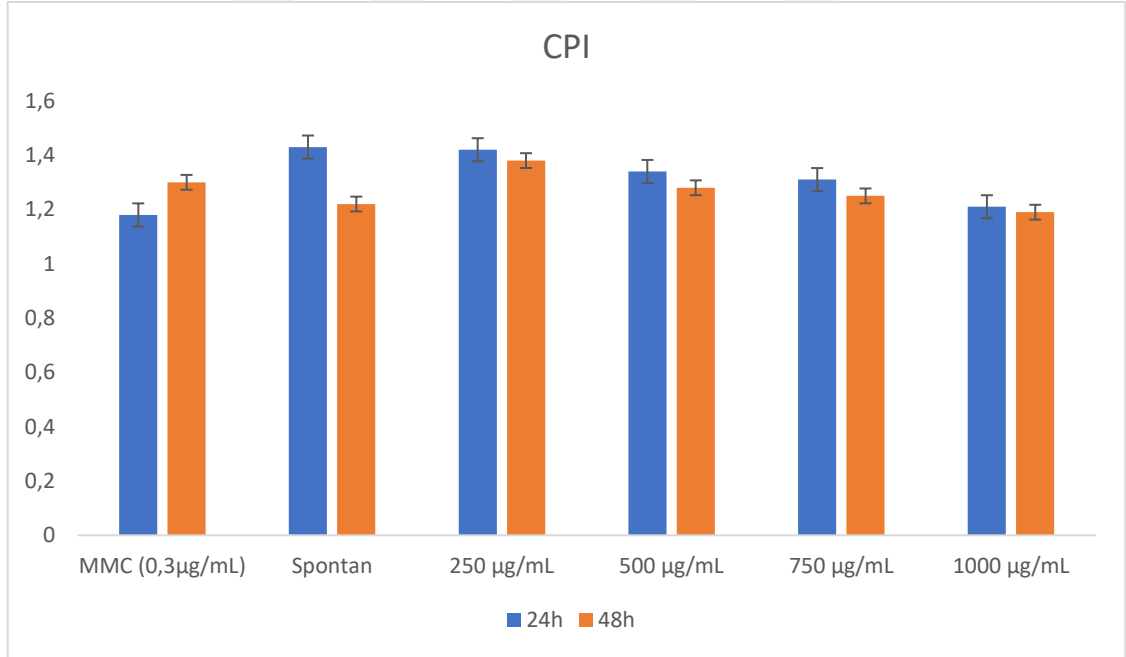
24 Saat				
Madde	Doz	İncelenen Hücre Sayısı	Ort. MN ($\pm$ SD)	Ort. CPI ($\pm$ SD)
Spontan	-	2000	2 $\pm$ 0,81	1,4320 $\pm$ 0,00
MMC	0,3 $\mu\text{g/mL}$	2000	15,66 $\pm$ 2,62***	1,1861 $\pm$ 0,02***
Meperidin HCl	250 $\mu\text{g/mL}$	2000	6,33 $\pm$ 1,24	14204 $\pm$ 0,01
	500 $\mu\text{g/mL}$	2000	8 $\pm$ 1,41*	1,3417 $\pm$ 0,01**
	750 $\mu\text{g/mL}$	2000	13,33 $\pm$ 1,24***	1,3102 $\pm$ 0,01***
	1000 $\mu\text{g/mL}$	2000	15,66 $\pm$ 1,24***	1,2148 $\pm$ 0,005***
48 Saat				
Madde	Doz	İncelenen Hücre Sayısı	Ort. MN ($\pm$ SD)	Ort. CPI ($\pm$ SD)
Spontan	-	2000	4 $\pm$ 0,81	1,3074 $\pm$ 0,01
MMC	0,3 $\mu\text{g/mL}$	2000	26,66 $\pm$ 1,69***	1,1397 $\pm$ 0,00***
Meperidin HCl	250 $\mu\text{g/mL}$	2000	8,66 $\pm$ 0,47*	1,3877 $\pm$ 0,01**
	500 $\mu\text{g/mL}$	2000	11 $\pm$ 0,81***	1,32897 $\pm$ 0,01
	750 $\mu\text{g/mL}$	2000	15,33 $\pm$ 1,24***	1,2554 $\pm$ 0,01*
	1000 $\mu\text{g/mL}$	2000	17 $\pm$ 0,81***	1,1926 $\pm$ 0,01***

MN: Mikronükleus, MMC: Mitomisin-C, CPI: Hücre Proliferasyon İndeksi

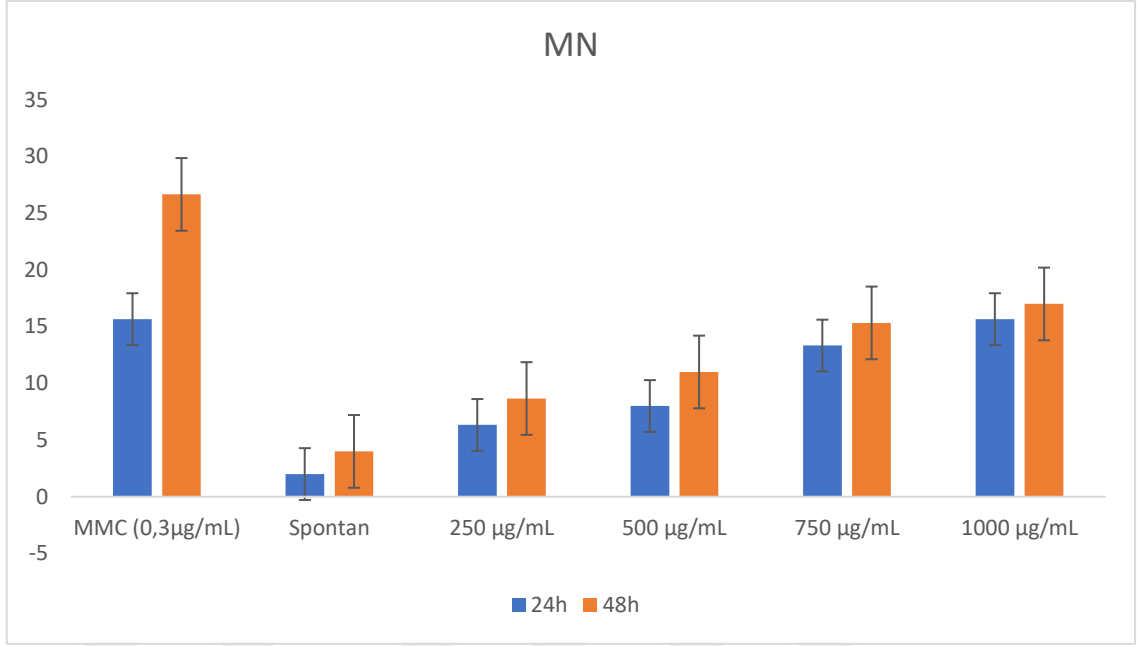
$\pm$ SD: Standart sapma değerleri, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ (Tukey testi)



Şekil 4.9. İki çekirdekli mikronükleus içeren lenfosit hücresi (40X)



Şekil 4.10. Meperidin HCl maddesinin 24 ve 48 saat maruziyet sonrası CPI değerleri



Şekil 4.11. Meperidin HCl maddesinin 24 ve 48 saat maruziyet sonrası MN değerleri

Şekiller 4.10 ve Şekil 4.11'de meperidin HCl'in farklı dozlarda 24 ve 48 saat maruziyet sonrası hücreler üzerindeki etkilerini daha net bir şekilde ortaya koymaktadır. Bu veriler, ilacın güvenlik profili ve potansiyel yan etkileri hakkında bilgi sağlamaktadır.

4.4. Meperidin Hidroklorür'ün DNA Hasarına Olan Etkisi

Tablo 4.4. Meperidin HCl'in Comet testi sonucu kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti verileri.

	Uygulama	Kuyruk Uzunluğu (µM)	Kuyruk Yoğunluğu (%)	Kuyruk Momenti
	Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama ± SD	Ortalama ± SD	Ortalama ± SD
Spontan		69,00±4,629	10,93±2,221	9,91±4,177
H ₂ O ₂	50 µM	418,9±14,67***	63,88±5,216***	134,7±11,49***
Meperidin HCl	250 µg/mL	105,3±4,256	28,59±7,098	32,05±4,301*
	500 µg/mL	199,9±20,42**	54,75±5,721**	49,82±6,566*
	750 µg/mL	233,3±8,002***	57,75±6,422**	42,29±5,399***
	1000 µg/mL	272,3±7,542***	59,36±4,4582**	86,67±6,892***

H₂O₂: Hidrojen Peroksit (Pozitif Kontrol), ±SD: Standart sapma değerleri, (One Way ANOVA-Dunnett), *** P≤ 0.001

Kuyruk uzunluğu için bakıldığında;

- H₂O₂, pozitif kontrol olarak kuyruk uzunluğunda anlamlı bir artış (P≤0.001) göstermiştir.
- Meperidin HCl'in 250 µg/mL dozunda kuyruk uzunluğunda anlamlı bir fark gözlemlenmezken, 500 µg/mL ve üzeri dozlarda istatistiki olarak anlamlı farklar gözlemlenmiştir (** P≤0.01, *** P≤0.001).
- Doz arttıkça kuyruk uzunluğunda belirgin bir artış görülmektedir.

Kuyruk uzunluğu, DNA kırıklarının sayısını ve DNA'nın ne kadar hasar gördüğünü gösterir. H₂O₂ pozitif kontrol olarak kullanıldığında kuyruk uzunluğunda belirgin bir artış göstermiştir, bu da yaygın DNA hasarını gösterir. Meperidin HCl'in 250 µg/mL dozunda kuyruk uzunluğunda anlamlı bir artış gözlemlenmemiştir, ancak 500 µg/mL ve üzeri

dozlarda anlamlı artışlar gözlemlenmiştir. Bu, daha yüksek dozların daha fazla DNA hasarına neden olduğunu göstermektedir.

Kuyruk yoğunluğu için bakıldığında;

- H_2O_2 pozitif kontrol olarak kuyruk yoğunluğunda anlamlı bir artış ($P \leq 0.001$) göstermiştir.
- Meperidin HCl'in 250 $\mu g/mL$ dozunda kuyruk yoğunluğunda anlamlı bir fark gözlemlenmezken, 500 $\mu g/mL$ ve üzeri dozlarda istatistiki olarak anlamlı farklar gözlemlenmiştir (** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$).
- Doz arttıkça kuyruk yoğunluğunda belirgin bir artış görülmektedir.

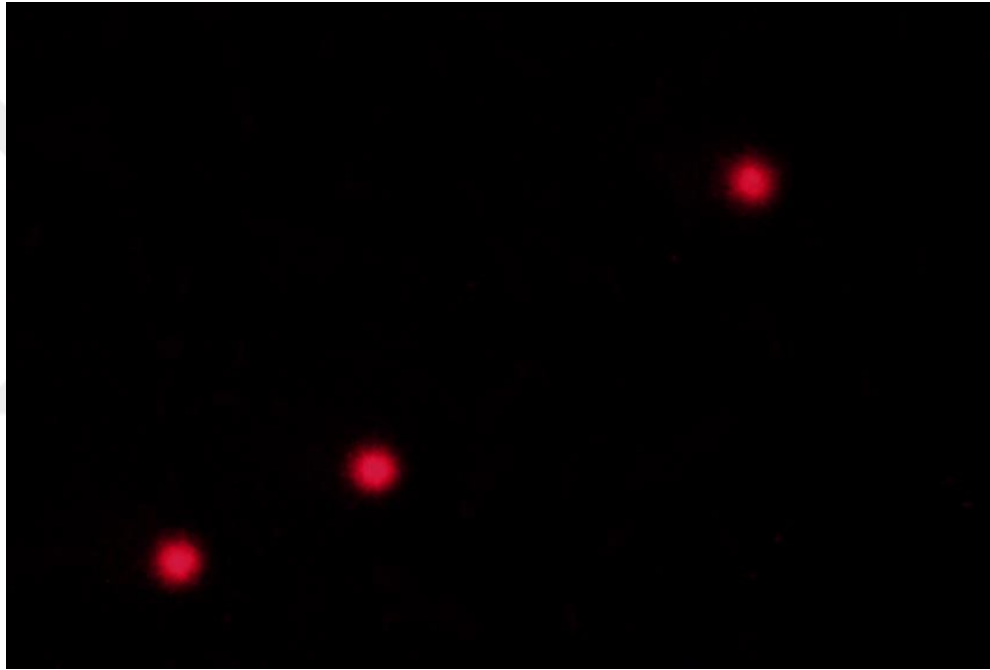
Kuyruk yoğunluğu, DNA'nın ne kadarının hasar gördüğünü ve kuyrukta toplandığını gösterir. H_2O_2 pozitif kontrol olarak kuyruk yoğunluğunda belirgin bir artış göstermiştir. Meperidin HCl'in 250 $\mu g/mL$ dozunda anlamlı bir fark gözlemlenmemişken, 500 $\mu g/mL$ ve üzeri dozlarda anlamlı artışlar gözlemlenmiştir. Bu, daha yüksek dozların daha fazla DNA hasarına neden olduğunu ve DNA'nın büyük bir kısmının kuyrukta toplandığını gösterir.

Kuyruk momenti için bakıldığında;

- H_2O_2 pozitif kontrol olarak kuyruk momentinde anlamlı bir artış ($P \leq 0.001$) göstermiştir.
- Meperidin HCl'in 250 $\mu g/mL$ dozunda kuyruk momentinde anlamlı bir fark gözlemlenmezken (* $P \leq 0.05$), 500 $\mu g/mL$ ve üzeri dozlarda anlamlı farklar gözlemlenmiştir (* $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$).
- Doz arttıkça kuyruk momentinde belirgin bir artış görülmektedir.

Kuyruk momenti, hem kuyruk uzunluğunu hem de yoğunluğunu birleştirerek genel DNA hasarını değerlendirir. H_2O_2 pozitif kontrol olarak kuyruk momentinde belirgin bir artış göstermiştir. Meperidin HCl'in 250 $\mu g/mL$ dozunda kuyruk momentinde anlamlı bir fark gözlemlenmemişken, 500 $\mu g/mL$ ve üzeri dozlarda anlamlı artışlar gözlemlenmiştir. Bu, DNA hasarının hem yaygın hem de şiddetli olduğunu ve daha yüksek dozların DNA üzerinde daha ciddi hasarlara neden olduğunu gösterir.

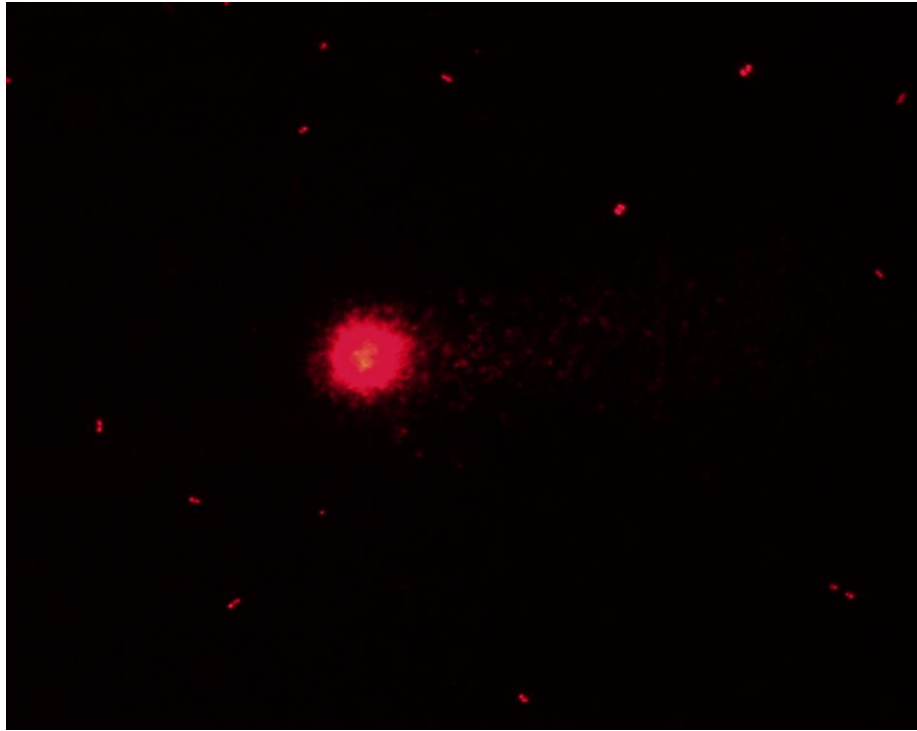
Meperidin HCl'in 250 µg/mL dozunda kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu parametreleri açısından spontan ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlemlenmezken, kuyruk momentinde anlamlı fark gözlemlenmiştir. Meperidin HCl'in 500 µg/mL ve üzeri dozlarında kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti değerlerinde anlamlı artışlar gözlemlenmiştir. Bu parametrelerdeki artışlar, DNA'nın yapısal bütünlüğünün bozulduğunu ve hücrelerin genetik materyallerinde ciddi hasar meydana geldiğini göstermektedir. Doz arttıkça DNA hasarını gösteren bu parametrelerde belirgin artışlar gözlemlenmektedir, bu da Meperidin HCl'in DNA hasarını artırma potansiyelini göstermektedir.



Görsel 4.4. Negatif kontrol insan periferik lenfosit hücreleri (40X)



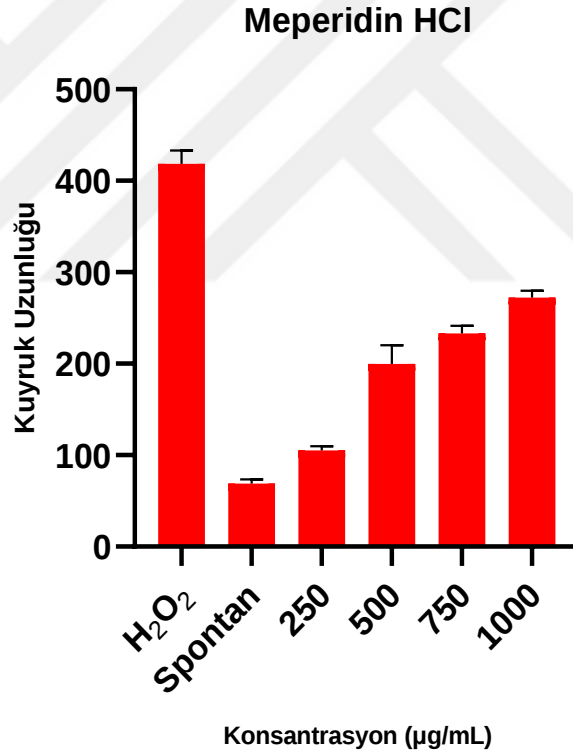
Görsel 4.5. 1 saat boyunca 250 μ M Meperidin HCl dozu ile muamele edilen insan periferik lenfosit hücreleri (40X)



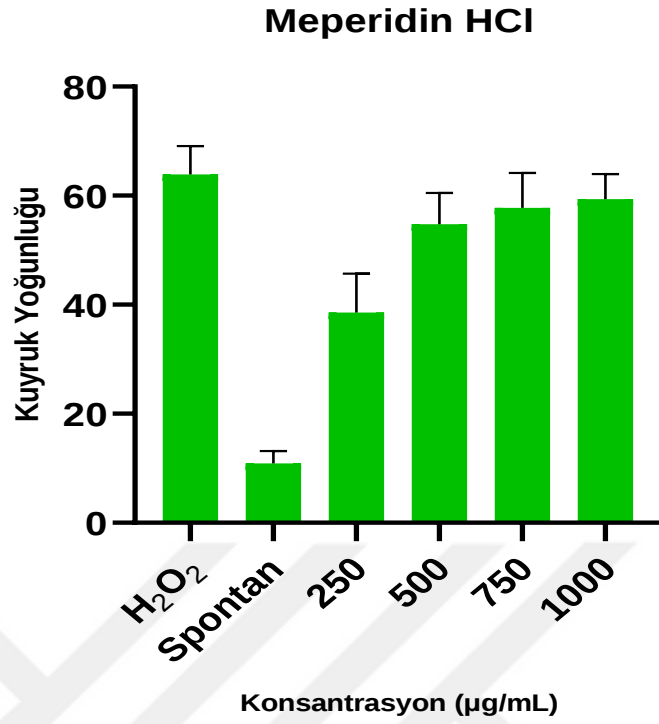
Görsel 4.6. 1 saat boyunca 500 μ M Meperidin HCl dozu ile muamele edilen insan periferik lenfosit hücreleri (40X)

Görsel 4.4 ve Görsel 4.5'te Negatif kontrol ve 250 μ M Meperidin HCl dozu ile muamele edilen hücrelerde minimal DNA hasarı gözlemlenmektedir. Görsel 4.6'da ise 500 μ M Meperidin HCl dozu ile muamele edilen hücrelerde daha belirgin DNA hasarı gözlemlenmektedir.

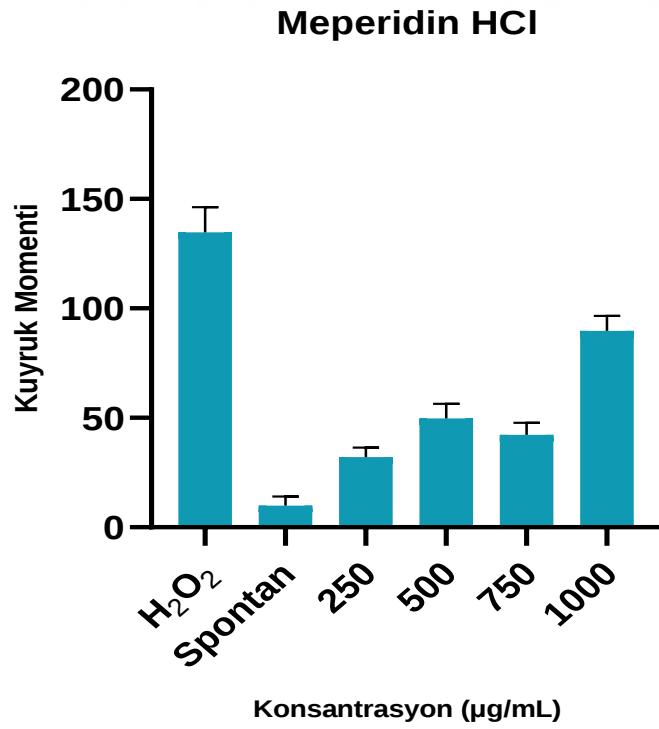
Şekil 4.12, 4.13, 4.14'e bakıldığında; Meperidin HCl dozları ile muamele edilen hücrelerde kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti değerleri doz arttıkça artış göstermektedir. Bu sonuçlar, Meperidin HCl'in DNA hasarına neden olabileceğini ve bu etkinin doz bağımlı olduğunu göstermektedir. Özellikle 500 μ g/mL ve üzeri dozlarda, DNA hasarı önemli ölçüde artmaktadır.



Şekil 4.12. Meperidin HCl dozları ile 1 saat muamele edilen periferik lenfosit hücrelerindeki kuyruk uzunluk değerleri



Şekil 4.13. Meperidin HCl dozları ile 1 saat muamele edilen periferik lenfosit hücrelerindeki kuyruk yoğunluk değerleri



Şekil 4.14. Meperidin HCl dozları ile 1 saat muamele edilen periferik lenfosit hücrelerindeki kuyruk momenti değerleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Midazolam ve Meperidin HCl, klinik uygulamalarda yaygın olarak kullanılan iki farklı anesteziik ilaç olup, midazolam benzodiazepin sınıfına ait sedatif, anksiyolitik ve antikonvülzan etkileri ile, Meperidin ise bir opioid analjezik olarak ağrı kesici özellikleri ile bilinir. Bu çalışmada, Midazolam ve Meperidin'in genotoksik etkileri insan periferik lenfosit hücrelerinde mikronükleus ve Comet testleri ile değerlendirilmiştir. Midazolam (100, 200, 300 ve 400 µg/mL) ve Meperidin HCl'in de farklı konsantrasyonlarda (250, 500, 750 ve 1000 µg/mL) uygulanması sonrası, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda yapılan mikronükleus ve Comet testlerinde kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametreleri analiz edilmiştir. Meperidin'in 500 µg/mL ve üzeri dozlarında kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momentinde anlamlı artışlar (**P≤0.01, ***P≤0.001) gözlemlenmiş olup, bu DNA kırıklarının ve hasarın belirgin bir göstergesi olarak ortaya çıkmaktadır. Midazolam'da da benzer dozlarda genotoksik etkiler gözlenmiş ancak Meperidin HCl'in daha düşük dozlarda bile genotoksik etki göstermesi, bu ilacın DNA üzerindeki potansiyel zararlı etkilerinin midazolamdan daha belirgin olabileceğini düşündürmüştür. Literatürde Midazolam'ın sedatif ve anksiyolitik etkileri cerrahi öncesi anksiyetenin azaltılmasında, Meperidin HCl'in ise analjezik özellikleri postoperatif ağrı yönetiminde önemli bir rol oynamaktadır (Brown vd., 2019). Ancak, Meperidin HCl'in düşük dozlarda bile genotoksik etki göstermesi, klinik kullanımda potansiyel genotoksik risklerinin dikkate alınması gerektiğini vurgulamaktadır. Midazolam ise genotoksik etkilere neden olsa da bu etkilerin daha yüksek dozlarda ortaya çıkması, ilacın daha güvenli bir profil sunduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, her iki ilacın da yüksek dozlarda genotoksik etki gösterebildiğini ancak meperidin'in daha düşük dozlarda bile bu etkilere neden olabileceğini göstermektedir. Klinik uygulamalarda hastanın genel durumu ve ihtiyaçları doğrultusunda ilaç seçimi yapılırken, bu genotoksik risklerin de değerlendirilmesi önemlidir. Literatüre göre Midazolam ve Meperidin HCl'in anesteziik etkilerinin yanı sıra genotoksik profilleri, ilaç seçimi ve doz ayarlamaları açısından dikkate alınması gereken önemli faktörlerdir (Murthy & Patel, 2020; Creeley vd., 2013). Literatürde Midazolam'ın sitotoksik etkisi, HSC-2 ve HSC-4 oral skuamöz hücre karsinomu hücre hatlarında doz-bağımlı olarak incelenmiştir. Midazolam, hücrelerde nekroz benzeri bir hücre ölümüne neden olmuş, ancak apoptotik özellikler göstermemiştir. Kullanılan midazolam dozları; 60 µM, 120 µM, 240 µM

dozlarında incelenmiştir. 75 µM, mitokondri şişmesi başlamış; daha yüksek konsantrasyonlarda (150 ve 300 µM) mitokondriyal hasar ve plazma membran bozulması gibi daha şiddetli hücrel hasarlar gözlenmiştir. Sonuç olarak, benzodiazepinler özellikle midazolam ve benzadiazepam, tiopental ve tiyamilal ile karşılaştırıldığında belirgin şekilde daha yüksek sitotoksikite sergilemiştir (Ohno vd., 2012).

Haller ve arkadaşlarının (2024) yapmış olduğu bir çalışmada, yoğun bakım ünitelerinde sık kullanılan sedatif ve opioid ilaçların, özellikle midazolam, propofol, s- ketamin, tiopental, fentanyl, remifentanil ve sufentanil gibi ilaçların hepatotoksik etkilerini incelemektedir. Hepatotoksikite, kritik hastalarda özellikle yüksek dozda ve uzun süreli kullanımda artan bir risk oluşturabilir. Midazolam'ın hepatotoksik etkileri, HepG2/C3A hücre hattı üzerinde in vitro olarak incelenmiştir. Midazolam, klinik olarak anlamlı maksimum plazma konsantrasyonu (C_{max}: 300 ng/mL), 5 kat C_{max} (1500 ng/mL) ve 10 kat C_{max} (3000 ng/mL) dozlarında uygulanmıştır. Midazolam, mitokondriyal enzim aktivitesinde azalmaya neden olarak hepatositlerin mitokondriyal fonksiyonunu olumsuz etkilemiştir. Bununla birlikte, midazolamın hücre sayısı, LDH salınımı veya albümin sentezi üzerinde belirgin bir toksik etki göstermediği bulunmuştur. Midazolam, CYP1A2 enzim aktivitesini düşürmüştü, ancak plazmada yapılan testlerde mitokondriyal fonksiyon ve hücre canlılığında anlamlı bir bozulma gözlenmemiştir. Sonuç olarak, midazolamın yüksek dozlarda bile belirgin bir hepatotoksikite göstermediği, ancak mitokondriyal fonksiyon üzerinde olumsuz etkiler yapabileceği, bu nedenle özellikle uzun süreli veya yüksek doz kullanımında dikkatle izlenmesi gerektiği belirtilmektedir (Haller vd., 2024). Bir başka çalışmada ise meme cerrahisi geçiren yüksek riskli kadın hastalarda, midazolamın antiemetik etkisi incelenmiştir. Deksametazon (4 mg) ve ondansetron (4 mg) ile düşük doz midazolam (0.04 mg/kg, maksimum 2 mg) kombinasyonu kullanılmış ve bu protokol, yüksek doz deksametazon (8 mg) ve ondansetron ikilisiyle karşılaştırılmıştır. Sonuçlara göre, midazolam eklenmesiyle ameliyat sonrası bulantı ve kusma (PONV) insidansı ilk 24 saatte %35'ten %22'ye düşmüştür. Ancak, midazolam grubunda erken postoperatif dönemde daha yüksek sedasyon seviyeleri ve göz açma ile ekstübasyon süresinde uzama gözlenmiştir (Mingvoramethakul vd., 2024).

Bu çalışmada, Midazolam ve Meperidin'in genotoksik etkileri, hücre proliferasyonu ve mikronükleus oluşumu üzerindeki etkileri de detaylı bir şekilde karşılaştırılmıştır. Her

iki ilacın da doz bağımlı olarak DNA hasarını artırdığı görülmüştür. Midazolam'ın düşük dozlarda (100 µg/mL) MN oluşumu üzerinde anlamlı bir etkisi gözlemlenmezken, hücre proliferasyonunu önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. Ancak, daha yüksek dozlarda (200-400 µg/mL) hem MN oluşumu hem de hücre proliferasyon indeksi (CPI) değerlerinde anlamlı değişiklikler meydana gelmiştir. Özellikle 200 µg/mL ve üzeri dozlarda DNA hasarının önemli ölçüde arttığı görülmüştür. Elde edilen bu veriler, Midazolam'ın yüksek dozlarda genetik materyalde hasara neden olabileceğini ve bu etkinin doz bağımlı olduğunu göstermektedir. Meperidin HCl'in 250 µg/mL dozunda, DNA hasar parametrelerinden kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu açısından anlamlı bir fark gözlemlenmezken, kuyruk momenti parametresinde anlamlı bir fark bulunmuştur. 500 µg/mL ve üzeri dozlarda, tüm DNA hasar parametrelerinde (kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti) anlamlı artışlar gözlemlenmiştir. Bu, Meperidin'in daha yüksek dozlarda DNA'nın yapısal bütünlüğünü bozarak ciddi hasarlara neden olduğunu göstermektedir. Literatürde, Midazolam ve Meperidin'in genotoksik etkileri üzerine yapılan çalışmalar bu bulgularla uyumludur. Liu ve arkadaşları (2020), genel anesteziklerin nörotransmitterlerle etkileşime girerek merkezi sinir sistemini etkilediğini ve genotoksik etkilerinin olabileceğini belirtmiştir (Liu vd., 2020). Ayrıca, Vutskits ve arkadaşları (2005), genel anesteziklerin GABA reseptörleri aracılığıyla genotoksik etkilere neden olabileceğini vurgulamıştır (Vutskits vd., 2005). Bu bulgular, Midazolam ve Meperidin HCl'in yüksek dozlarda genotoksik potansiyele sahip olduğunu ve bu etkinin klinik kullanımda dikkate alınması gerektiğini göstermektedir. Özellikle cerrahi ve tıbbi prosedürlerde bu ilaçların doz ayarlamalarına dikkat edilmesi, genotoksik etkilerin minimuma indirilmesi açısından önem kazanmaktadır.

Literatürde ise yapılmış bir çalışmada Midazolam'ın intranazal uygulamasının sıçanlarda burun mukozası üzerindeki sitotoksik etkileri detaylı olarak incelenmiştir. Deneyde 40 sıçan beş gruba ayrılmıştır: kontrol grubu, intranazal salin alan grup, intranazal midazolam alan grup, intraperitoneal salin alan grup ve intraperitoneal midazolam alan grup. İntranazal ve intraperitoneal midazolam gruplarına 200 mg/kg dozunda midazolam uygulanmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre, intranazal midazolam uygulanan grupta hücre proliferasyonunu gösteren apoptoz belirteci olarak kullanılan p53 değeri, kontrol ve salin gruplarına kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu, intranazal midazolamın burun mukozasında hücre çoğalmasını ve apoptozu artırdığını

göstermektedir. Aynı grupta, mukozal inflamasyon seviyesi de diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Öte yandan, subepitelyal ödem ve siliyum kaybı açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Ozbay vd., 2008).

Midazolam, yüksek dozlarda kuyruk uzunluğunda belirgin bir artışa neden olmuştur. Bu durum, ilacın DNA kırıklarına yol açarak hücrel hasarı artırdığını göstermektedir. Kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti değerleri de midazolamın genotoksik potansiyelini desteklemektedir. Bu bulgular, literatürde de yer almaktadır. Örneğin, Schifilliti ve arkadaşları (2021) midazolamın uzun süreli kullanımının nörolojik yan etkilerle ilişkili olabileceğini vurgulamışlardır. Ayrıca, Midazolam'ın GABA A reseptör kompleksi aracılığıyla hücrel hasarı artırdığı ve bu mekanizmanın ilacın genotoksik etkilerinde rol oynadığı belirtilmiştir (Hughes vd., 2021).

Meperidin HCl ise Midazolam'dan farklı olarak hem kuyruk uzunluğunda hem de kuyruk yoğunluğunda artışa yol açmıştır. Bu durum, meperidinin DNA hasarına neden olduğunu ve bu hasarın hücrel düzeyde önemli olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, meperidinin DNA hasarına yol açabileceğini ve bu durumun ilacın yüksek dozlarda veya uzun süreli kullanımında önemli olabileceğini göstermektedir. Her iki ilacın karşılaştırmalı analizi, Midazolam'ın genotoksik etkilerinin özellikle yüksek dozlarda belirgin olduğunu, Meperidin HCl'in ise genotoksik etkilerinin hem doz bağımlı hem de hücrel düzeyde önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Midazolam'ın kısa yarı ömrü ve hızlı etkisi, cerrahi ve tanısal prosedürlerde tercih edilmesini sağlarken, Meperidin HCl'in genotoksik etkileri, ilacın kullanımında dikkatli olunması gerektiğini göstermektedir.

KAYNAKÇA

- Anderson, B.J., & Palmer, G.M. (2006). Recent Developments in Opioid Pharmacokinetics. *Paediatric Anaesthesia*, 16(1), 5-10.
- Anderson, R., & Hiller, A. (2013). Meperidine (Pethidine) and the Risk of Seizures. *Journal of Pain & Palliative Care Pharmacotherapy*, 27(2), 151-153.
- Bachmann, K., Kinzig, M., & Burhenne, J. (2009). Drug Interactions: Benzodiazepines. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 191, 577-593.
- Bailey, P.L., Pace, N.L., Ashburn, M.A., Moll, J.W., East, K.A., Stanley, T.H. (1990). Frequent Hypoxemia and Apnea After Sedation with Midazolam and Fentanyl. *Anesthesia & Analgesia*, 71(6), 536-542.
- Beckman, K. B., & Ames, B. N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, 78(2), 547-581.
- Beilin, B., Shavit, Y., Hart, J., Mordashov, B., Cohn, S., & Notti, I. (1996). Effects of anesthesia based on midazolam versus thiopental on natural killer cell cytotoxicity in surgical patients. *Anesthesiology*, 84(3), 531-536.
- Benyamin, R., Trescot, A. M., Datta, S., Buenaventura, R., Adlaka, R., Sehgal, N., Glaser, S. E., & Vallejo, R. (2008). Opioid complications and side effects. *Pain Physician*, 11(2), S105-S120.
- Brown, K. A., Patel, V., & Smith, T. (2019). Safety and efficacy of midazolam for pediatric anesthesia induction: A review. *Pediatric Anesthesia*, 29(3), 225-232.
- Bruchas, M. R., Land, B. B., & Chavkin, C. (2010). The dynorphin/kappa opioid system as a modulator of stress-induced and pro-addictive behaviors. *Brain Research*, 1314, 44-55.
- Chieng, B., Azriel, Y., & Christie, M. J. (2012). μ -Opioid receptor function in subpopulations of dorsal horn neurons. *Journal of Neuroscience*, 32(5), 1752-1759.
- Creeley, C. E., Olney, J. W., & Zorumski, C. F. (2013). Anesthetic-induced neurotoxicity: What can we do to prevent it? *Acta Anaesthesiologica Taiwanica*, 51(3), 109-116.
- Curtin, N. J. (2012). DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nature Reviews Cancer*, 12(12), 801-817.
- Dundee, J.W., Halliday, N.J., Harper, K.W.M., & Brogden, R.N. (1984). Midazolam: A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Use. *Drugs*, 28(6), 519-543.
- Eger, E. I., Saidman, L. J., & Westhorpe, R. N. (2017). *The Wondrous Story of Anesthesia*. Springer.
- Ersson, C., & Möller, L. (2011). The comet assay in toxicology. *Methods in Molecular Biology*, 682, 195-207.
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 81-

- Feretti, D., Zerbini, I., Zani, C., Ceretti, E., Moretti, M., & Monarca, S. (2007). Allium cepa chromosome aberration and micronucleus tests applied to study genotoxicity of extracts from pesticide-treated vegetables and grapes. *Food Additives and Contaminants*, 24(6), 561–572.
- Gandhi, R., Mittal, P., & Goswami, T. (2013). Assessment of genotoxic effects of midazolam in human lymphocytes using micronucleus assay. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 1(4), 500-505.
- Gaveriaux-Ruff, C., & Kieffer, B. L. (2011). Opioid receptors: drivers to addiction? *Nature Reviews Neuroscience*, 12(4), 212-219.
- Goulart, M., Batoreu, C., Rodrigues, A. S., et al. (2005). The comet assay and the micronucleus test: a comparative study in a population exposed to metal pollution. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 582(1-2), 77-87.
- Greenblatt, D. J., Harmatz, J. S., & Shader, R. I. (2020). Pharmacokinetics of midazolam: Impact of age, disease, and gender. *Clinical Pharmacokinetics*, 59(3), 193-202.
- Greenblatt, D.J., & Shader, R.I. (1974). Benzodiazepines: The Clinical Pharmacology and Therapeutic Uses. *New England Journal of Medicine*, 291(19), 1011-1015.
- Haller, K., Doss, S., Sauer, M., Linhart, K., Kleeff, J., Zimmermann, R., & Hoehn, R. (2024). Hepatotoxicity of sedatives and opioids in intensive care medicine: Effects on hepatocyte viability and function. *Current Issues in Molecular Biology*, 46, 3027-3038.
- Herceg, Z., & Vaissiere, T. (2011). Epigenetic mechanisms and cancer: An interface between the environment and the genome. *Epigenetics*, 6(7), 804-819.
- Ho, K. M., Ismail, H., & Lee, K. Y. (2013). Use of midazolam infusion during mechanical ventilation and outcome in intensive care unit. *Annals of Intensive Care*, 3(1), 33.
- Hughes, C. G., Girard, T. D., & Pandharipande, P. P. (2021). Use of midazolam in the management of acute anxiety and agitation in psychiatric emergencies. *Psychiatric Clinics of North America*, 44(2), 273-285.
- Jacobi, J., Fraser, G.L., Coursin, D.B., et al. (2002). Clinical Practice Guidelines for the Sustained Use of Sedatives and Analgesics in the Critically Ill Adult. *Critical Care Medicine*, 30(1), 119-141.
- Jevtovic-Todorovic, V., Hartman, R. E., Izumi, Y., Benshoff, N. D., Dikranian, K., Zorumski, C. F., ... & Wozniak, D. F. (2003). Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *Journal of Neuroscience*, 23(3), 876-882.
- Kaiko, R.F. (1986). Clinical Pharmacokinetics of Meperidine. *Clinical Pharmacokinetics*, 11(3), 202-222.
- Kaina, B. (2003). DNA damage-triggered apoptosis: Critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. *Biochemical Pharmacology*, 66(8), 1547-1554.

- Katritch, V., Cherezov, V., & Stevens, R. C. (2013). Structure-function of the G protein–coupled receptor superfamily. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53, 531-556.
- Kharasch, E. D. (2001). Meperidine: A critical review. *Mayo Clinic Proceedings*, 76(11), 1111-1115.
- Kharasch, E.D., & Hoffer, C. (2006). Pharmacogenetics of Opioid Metabolism: Clinical Implications. *Anesthesia & Analgesia*, 103(1), 157-162
- Law, P. Y., Loh, H. H., & Wei, L. N. (2000). Insights into the receptor signaling and trafficking mechanisms of μ -opioid receptors. *Journal of Neurobiology*, 44(2),
- Laycock, H., & Bantel, C. (2019). Opioid mechanisms and opioid drugs. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. 20(8):450-455.173-186.
- Liu, H., Xue, Z., & Mao, Y. (2020). Mechanisms of general anesthetic action and neurotoxicity: An updated review. *Journal of Anesthesia*, 34(2), 317-326.
- McAuley, D. F., Ware, L. B., & Parsons, P. E. (2011). Bench-to-bedside review: Inhibiting lung injury – A role for hypercapnic acidosis? *Critical Care*, 11(1), 213.
- Miller, R. D. (2014). *Miller's Anesthesia* (8th ed.). Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Mingvoramethakul, K., Kampitak, W., Anusornanawat, R., Charoenraj, P., Songborassamee, N., & Wongsupha, P. (2024). Effects of adding intravenous midazolam to a dual postoperative nausea and vomiting regimen in patients undergoing breast surgery: A pragmatic randomized controlled trial. *Saudi Journal of Anesthesia*, 18(4), 471-481.
- Morgan, G. E., Mikhail, M. S., & Murray, M. J. (2013). *Clinical Anesthesiology* (5th ed.). McGraw-Hill Education.
- Moura, L., Ribeiro, D., & Andrade, M. (2018). Evaluation of the genotoxicity of petidin hidroklorür in cultured human lymphocytes. *Journal of Applied Toxicology*, 38(5), 715-723.
- Murthy, H., & Patel, R. (2020). Midazolam and its potential side effects in clinical settings. *Journal of Anesthesia and Clinical Research*, 11(2), 152-160.
- Nordt, S. P., & Clark, R. F. (1997). Midazolam: A review of therapeutic uses and toxicity. *The Journal of Emergency Medicine*, 15(3), 357–365.
- OECD, 2016.Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264885-en>
- Ohno, S., Kobayashi, K., Uchida, S., Amano, O., Sakagami, H., & Nagasaka, H. (2012). Cytotoxicity and type of cell death induced by midazolam in human oral normal and tumor cells. *Anticancer Research*, 32(10), 4737-4748.
- Olive, P. L., & Banáth, J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 1(1), 23-29.
- Olsen, R. W., & Sieghart, W. (2008). International Union of Pharmacology. LXX.

- Subtypes of γ -Aminobutyric Acid_A Receptors: Classification on the Basis of Subunit Composition, Pharmacology, and Function. *Pharmacological Reviews*, 60(3), 243-260.
- Ozbay, I., Kucur, C., Değer, A., Ital, I., Cayci, M. K., & Oghan, F. (2015). Cytotoxic effects of intranasal midazolam on nasal mucosal tissue. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 26(6), 2008-2011.
- Östling, O., & Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), 291-298.
- Phillips, D. H. (2005). DNA adducts as markers of exposure and risk. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 577(1-2), 284-292.
- Plummer, J.L., & Owen, H. (1997). Metabolism of Meperidine. *Clinical Pharmacokinetics*, 33(6), 416-428.
- Prommer, E.E. (2007). Meperidine: Does it Still Have a Role in Clinical Practice? *Pain Medicine*, 8(4), 383-393.
- Savage, J. R. (1976). Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *Journal of Medical Genetics*, 13(2), 103-122.
- Saygı, Ş. (2003). Deneysel toksikolojide toksisite testleri ve test sonuçlarının önemi. *Gülhane Tıp Dergisi*, 45(3), 291-298.
- Schifilliti, D., Mondello, S., D'Arrigo, M. G., & Majorana, M. (2021). Neurotoxic effects of prolonged use of midazolam: A focus on elderly patients and individuals with liver dysfunction. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 109(1), 108-118.
- Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research*, 31(1), 9-15.
- Shaffer, L. G., McCaskill, C., & Velagaleti, G. V. N. (2001). Prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidy using subtelomeric probes. *American Journal of Human Genetics*, 68(4), 936-938.
- Sieghart, W. (2015). Allosteric Modulation of GABAA Receptors via Multiple Drug-Binding Sites. *Advances in Pharmacology*, 72, 53-96.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184-191.
- Smith, H. S., & Peppin, J. F. (2018). Historical Review of the Development of Opioid Analgesics. *Journal of Opioid Management*, 14(2), 103-114.
- Smith, H.S. (2009). Opioid Metabolism. *Mayo Clinic Proceedings*, 84(7), 613-624.
- Sneyd, J. R. (2016). A History of Anaesthesia: The Role of Chemists. *Anaesthesia*, 71, 3-12.
- Sora, I., Takahashi, N., Funada, M., Ujike, H., Revay, R., et al. (2010). Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and

- morphine-induced analgesia. *PNAS*, 94(4), 1544-1549.
- Taylor, J. W., et al. (1990). Possible intramuscular midazolam-associated cardiorespiratory arrest and death. *DICP*.
- Taylor, J. W., Laha, T. J., Muto, J. J., & Foster, T. S. (1990). Possible intramuscular midazolam-associated cardiorespiratory arrest and death. *DICP: The Annals of Pharmacotherapy*, 24(11), 1093–1096.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., & Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 206-221.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2006). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84.
- Viana, M. B., Bentes, E. S., Pinto, L. P., & Mendonça, E. F. (1998). Effect of preemptive analgesia with pethidine and midazolam in dental surgeries. *Brazilian Dental Journal*, 9(2), 99-102.
- Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., Yokoyama, W. M., & Ugolini, S. (2008). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*, 331(6013), 44-49.
- Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., Yokoyama, W. M., & Ugolini, S. (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*, 331(6013), 44–49.

- Vutskits, L., Gascon, E., Potter, G., & Kiss, J. Z. (2005). GABAergic signaling mediates the effects of general anesthetics on neural precursor cell proliferation. *Journal of Neuroscience*, 25(18), 4678-4687.
- Weinbroum, A.A. (2001). A Single Dose of Meperidine Provides Relief from Postoperative Pain. *Pain Research & Management*, 6(1), 33-39.
- Wollweber, B., Kurtz, P., & Beck, H. (2000). Anesthesia in ambulatory surgery: new developments. *European Journal of Anaesthesiology*, 17(12), 720-725.



ÖZGEÇMİŞ

ORCID NO: 0009-0007-0316-6769

Adı Soyadı : Bahar KÖKLÜ

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- 2017-2021, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik
- 2020, Stajyer, Bugamed Biyoteknoloji San. ve Tic. A.Ş.
- 2020-2021, Ar-Ge Personeli, Bugamed Biyoteknoloji San. ve Tic. A.Ş.
- 2021-2024, Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Bilim Dalı
- 2024, İlaç Hazırlama Personeli, ESOGÜ Onkoloji Merkezi, Kemoterapi Ünitesi.