



**DEXKETOPROFEN
TROMETAMOL'ÜN GENOTOKSİK
ETKİLERİNİN İNSAN LENFOSİT
HÜCRELERİNDE *İN VİTRO*
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

**Merve KILIÇ
Eskişehir, 2018**

**DEXKETOPROFEN TROMETAMOLÜN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN
İNSAN LENFOSİT HÜCRELERİNDE *İN VİTRO* YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

Merve KILIÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Berrin Ayaz TÜYLÜ

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

NİSAN, 2018

***Bu tez çalışması 214Z263 no'lu TÜBİTAK 3001- Başlangıç Ar-Ge
programı tarafından desteklenmiştir.***

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Merve KILIÇ 'ın “Dexketoprofen Trometamol’ün Genotoksik Etkilerinin İnsan Lenfosit Hücrelerinde *İn Vitro* Yöntemlerle Araştırılması ” başlıklı tezi 06 / 04 /2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, **Biyoloji** Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Unvanı Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı)

: Doç. Dr. Berrin AYAZ TÜYLÜ

.....

Üye

: Prof. Dr. Pınar ÖZTOPÇU VATAN

.....

Üye

: Doç. Dr. Emel ERGENE

.....

Prof.Dr. Ersin YÜCEL

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DEKETOPIROFEN TROMETAMOLÜN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN İNSAN LENFOSİT HÜCRELERİNDE *İN VİTRO* OLARAK ARAŞTIRILMASI

Merve KILIÇ

Biyoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2018

Danışman: Doç.Dr. Berrin Ayaz TÜYLÜ

NSAİD(non-steroid anti-enflamatuar ilaçlar)'lar analjezik, antipiretik, antienflamatuar etkili ilaçlardır. Dexketoprofenler de NSAİD ailesi üyesinden olup, kas-iskelet, dismenore, baş ve diş ağrılarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, ağrı kesici ilaçlarda etken madde olarak kullanılan dexketoprofen trometamol'ün, sağlıklı insan lenfosit hücreleri üzerindeki henüz çok iyi bilinmeyen genotoksik etkileri *in vitro* tekniklerle araştırılmıştır. Bu amaçla, Sitokinez Bloklama Mikronukleus (CBMN) tekniği, Comet yöntemi ve Gerçek Zamanlı Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyon Panel Sistemi (RT²- PCR Assay) uygulanmıştır.

Elde edilen bulgulara; ilaç etken maddesi Dexketoprofen trometamol, 750,1000 µg/mL ve daha yüksek dozlarda sağlıklı insan lenfosit hücreleri üzerinde toksik etkiler oluşturmuş, 750 ve 500 µg/ml'lik maruziyetlerde ise mikronukleus oluşumunu indükleyerek, klastojenik bir aktivite göstermiştir. Etken madde, aynı zamanda 1000,500,250 ve 100 µg /mL doz aralığında, Comet parametrelerinden; DNA kuyruk uzunluğu ve yoğunluğu değerlerini, spontan değerlere göre istatistiksel olarak oldukça anlamlı düzeyde yükselterek, iplik kırılmaları şeklinde DNA hasarlarına yol açmıştır. Diğer yandan 750 ve 100 µg/mL dexketoprofen trometamol uygulanan insan lenfosit hücrelerinde, DNA hasar sinyal yolağı plakasında yer alan XPC, XRCC6 ve PNKP genlerinin ifade düzeylerinin önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. Sözü edilen deney bulgularına göre, dexketoprofen trometamol'ün, sağlıklı insan lenfosit hücreleri üzerinde, *in vitro* koşullarda, doza ve süreye bağlı olarak; sitotoksik, sitostatik ve genotoksik etkilere sahip olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu sonucun benzer ya da daha ileri çalışmalarla desteklenmesi öngörülmektedir.

Anahtar Sözcükler: İnsan lenfositleri, CBMN yöntemi, Comet testi, Realtime-PCR, Dexketoprofen trometamol.

ABSTRACT

Master of Science Thesis

INVESTIGATION OF GENOTOXIC EFFECTS OF DEXKETOPROFEN TROMETAMOL, ON HUMAN CELLS, *IN VITRO*

Merve KILIÇ

Department of Biology

Anadolu University, Institute of Science and Technology, 2018

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Berrin Ayaz TÜYLÜ

Non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects. Dexketoprofen belongs to NSAIDs family, which is widely used in musculoskeletal pain, dysmenorrhea, headache and toothache. In this study, we investigated poorly known genotoxic effects of dexketoprofen trometamol, used as drug substance in analgesic drugs, on healthy human lymphocytes in vitro. Cytokinesis block micronucleus (CBMN) assay, Comet assay and real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay were employed. In the study, dexketoprofen trometamol exerted toxic effects on healthy human lymphocytes at the doses of 750 µg/mL, 1000 µg/mL and >1000 µg/mL and showed clastogenic activity at exposures to 750 µg/mL and 500 µg/mL by inducing micro-nucleus formation. In Comet parameters, drug substance also led DNA damage in the form of strand break by significantly increasing tail length and density of DNA at the dose range of 1000, 500, 250 and 100 µg/mL compared to spontaneous values. On the other hand, it was also found that expressions of XPC, XRCC6 and PNKP genes located on the plate of DNA damage signaling pathway were markedly increased in human lymphocytes treated with 750 and 100 µg/mL dexketoprofen trometamol. Based on the experimental results, it was concluded that dexketoprofen trometamol may have dose- and time-dependent cytotoxic, cytostatic and genotoxic effects on healthy human lymphocytes in vitro. We think that these findings should be supported similar or further studies.

Keywords: Human lymphocytes, CBMN Assay, Comet assay, Realtime-PCR, Dexketoprofen trometamol.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan, sabırla desteğini, anlayışını ve sevgisini hiç esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Berrin Ayaz TÜYLÜ'ye,

Laboratuvar çalışmalarım boyunca benden yardımlarını esirgemeyen ve daima yanımda olan Dr. Devrim GÜZEL BAYÜLKEN, Dr. Gülsüm Handan SİNAN, Reyhan VAROL, Oğuzhan KARAOSMANOĞLU, Emine ERDAĞ'a

Bu çalışmalar o olmasaydı bitmezdi dediğim, laboratuvar da beraber sabahladığım, her daim yanımda olan, asla desteğini esirgemeyen, hep yüzümü güldüren canım arkadaşım Müslime YAVUZ'a

Tezimin sürdürülebilmesinde büyük katkılarını ve desteğini gördüğüm Murat KAYA'a

Tüm çalışmalarım boyunca desteklerini ve bilgilerini asla esirgemeyen, daima anılarımda güzel hatırlanacak olan sevgili laboratuvar arkadaşlarıma,

Bu tezin bitmesini en çok isteyen ve bekleyen, her koşulda beni hep destekleyen, hakkını asla ödeyemeyeceğim canım babaannem merhume Sariye ŞAHİNER'e

Ve son olarak eğitimim boyunca maddi ve manevi her türlü destek olan, evlatları olmaktan büyük gurur ve mutluluk duyduğum ANNEM ve BABAMA, tüm bu zahmetli süreç boyunca her türlü sabırla bana yardımcı olan ve motive eden sevgili eşim Recai Özgür KILIÇ'a

En içten teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunuyorum.

MERVE KILIÇ

06/04/2018

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 ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu 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 sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Merve KILIÇ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Ağrının Tanımı.....	4
2.2. Ağrının Sınıflandırılması	4
2.2.1. Süresine göre ağrı sınıflandırılması	4
2.2.2. Kaynaklandığı bölgeye göre ağrı sınıflandırılması	5
2.2.3. Mekanizmalarına göre ağrı sınıflandırılması	5
2.3. Ağrı Nörofizyolojisi	6
2.4. Non-Steroidaİ Antiinflatuar İlaçlar.....	7
2.4.1. NSAİİ(Non-Steroidaİ Antiinflatuar ilaç)'lerin etki mekanizması.....	7
2.4.2. NSAİİ'lerin sınıflandırılması	9
2.4.3. Dexketoprofen.....	10
2.4.4. Dexketoprofen trometamol	11
2.4.5. Dexketoprofen trometamol ile ilgili çalışmalar	12
2.5. Çalışmada Kullanılan Genotoksisite Testleri.....	14
2.5.1. Sitokinez Bloklama mikronukleus yöntemi (CBMN)	14
2.5.2. COMET yöntemi.....	15
2.5.3. Real time PCR.....	17
3. MATERYAL VE METOT	18
3.1. Materyal	18

3.2. CBMN Testi	18
3.2.1. CBMN yönteminde kullanılan deney ekipmanları ve kimyasallar	18
3.2.2. Test maddesinin ve dozların hazırlanması	19
3.2.3. Lenfosit kültürü	19
3.2.4. Test maddesinin uygulanması	19
3.2.5. Lenfosit izolasyonu	19
3.2.6. Preperatların hazırlanması	20
3.2.7. Preperatların boyanması	20
3.2.8. CBPI(Hücre proliferasyon indeksi) saptanması	21
3.2.9. Mikronukleus sayımı	21
3.3. COMET Testi	21
3.3.1. Comet testinde kullanılan ekipmanlar ve kimyasallar	21
3.3.2. Comet testi için dozların belirlenmesi	22
3.3.3. Lenfosit izolasyonu	22
3.3.4. Tripan mavisi ile canlılık testi	23
3.3.5. Mikroskop lamalarının hazırlanması	23
3.3.6. Solüsyonların hazırlanması	24
3.3.7. Lizis	24
3.3.8. Elektroforez	25
3.3.9. Nötralizasyon	25
3.3.10. DNA'nın boyanması ve cometlerin görüntülenmesi	25
3.3.11. İstatistiksel analiz	25
3.4. Real Time PCR Testi	25
3.4.1. Real time PCR'da kullanılan ekipman, kimyasal ve ticari kitler	26
3.4.2. Lenfosit izolasyonu	26
3.4.3. Madde maruziyeti	27

3.4.4.	RNA izolasyonu	27
3.4.5.	c DNA sentezi ve gerçek zamanlı PCR.....	28
3.4.6.	Real time PCR analizi	29
4.	BULGULAR	31
4.1.	Dexketoprofen Trometamolün Mikronukleus Oluşumu ve Hücre Proliferasyon Üzerine Etkisi	31
4.2.	Dexketoprofen Trometamolün DNA Hasarı Üzerine Etkisi.....	39
4.3.	Dexketoprofen Trometamolün DNA Hasar Yoloğıyla İlgili Genlerde Anlatımının Gerçek Zamanlı RT-PCR İle Analizi.....	44
5.	TARTIŞMA SONUÇ	48
	KAYNAKÇA	
	EK	
	ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Ağrı oluşum süreçleri.....	6
Şekil 2.2. COX-1 ve COX-2 enzimlerinin bulundukları dokular ve fonksiyonları ...	9
Şekil 2.3. Dexketoprofenin açık kimyasal formülü	11
Şekil 2.4. Dexketoprofen trometamolün kimyasal yapısı	11
Şekil 3.1. Gerçek zamanlı RT-PCR termal profili	30
Şekil 4.1. Mikronukleus bi nukleat hücre (40x).....	32
Şekil 4.2. Tek mikronukleuslu çok çekirdekli hücre (40x).....	32
Şekil 4.3. Tek çekirdekli, iki çekirdekli ve çok çekirdekli hücre (40x)	33
Şekil 4.4. Dexketoprofen trometamolün ortalama MN sayısı üzerine etkisi	39
Şekil 4.5. Dexketoprofen trometamolün ortalama CBPI değerleri üzerine etkisi.....	39
Şekil 4.6. Farklı dozlarda dexketoprofen trometamol ile 1 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerindeki DNA hasarının kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğunun kontrol ile karşılaştırılması	41
Şekil 4.7. Kontrol grubunda değerlendirmeye alınan hücreler (40x).....	42
Şekil 4.8. Dexketoprofen trometamolün 1000 µg/mL dozunda 1 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde DNA hasarında değerlendirmeye alınan hücreler (40x).....	42
Şekil 4.9. Dexketoprofen trometamolün 500 µg/mL dozunda 1 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde DNA hasarında değerlendirmeye alınan hücreler (40x).....	42
Şekil 4.10. Dexketoprofen trometamolün 250 µg/mL dozunda 1 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde DNA hasarında değerlendirmeye alınan hücreler (40x).....	43
Şekil 4.11. Dexketoprofen trometamolün 100 µg/mL dozunda 1 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde DNA hasarında değerlendirmeye alınan hücreler (40x).....	43

Şekil 4.12.	Dexketoprofen trometamolün H ₂ O ₂ ile 1 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde DNA hasarında değerlendirmeye alınan hücreler	43
Şekil 4.13.	DNA hasar yolağında yer alan genlerin plakadaki yerleri	44
Şekil 4.14.	Birinci donörün lenfosit hücrelerine uygulanan 750 µg/mL etken maddenin gen seviyelerinde meydana getirdiği etki.....	45
Şekil 4.15.	İkinci donörün lenfosit hücrelerine uygulanan 750 µg/mL etken maddenin gen seviyelerinde meydana getirdiği etki.....	45
Şekil 4.16.	Birinci donörün lenfosit hücrelerine uygulanan 100 µg/mL etken maddenin gen seviyelerinde meydana getirdiği etki.....	46
Şekil 4.17.	İkinci donörün lenfosit hücrelerine uygulanan 100 µg/mL etken maddenin gen seviyelerinde meydana getirdiği etki.....	46

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Ağrının sınıflandırılması.....	4
Tablo 2.2. NSAİİ'lerin yarılanma ömürlerine göre sınıflandırılması	9
Tablo 2.3. NSAİİ'lerin COX seçiciliğine göre sınıflandırılması	9
Tablo 2.4. NSAİİ'lerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması	10
Tablo 4.1. Birinci donörden sağlanan lenfosit hücrelerinin, dexketoprofen trometamol ile 24 ve 48 saat muamelesi sonucu elde edilen MN ve CPI değerleri	34
Tablo 4.2. İkinci donörden sağlanan lenfosit hücrelerinin, dexketoprofen trometamol ile 24 ve 48 saat muamelesi sonucu elde edilen MN ve CPI değerleri	35
Tablo 4.3. Üçüncü donörden sağlanan lenfosit hücrelerinin, dexketoprofen trometamol ile 24 ve 48 saat muamelesi sonucu elde edilen MN ve CPI değerleri	36
Tablo 4.4. Dördüncü donörden sağlanan lenfosit hücrelerinin, dexketoprofen trometamol ile 24 ve 48 saat muamelesi sonucu elde edilen MN ve CPI değerleri	37
Tablo 4.5. İnsan lenfosit hücrelerinde, dexketoprofen trometamolün 24 ve 48 saat muamelesi sonucu elde edilen ortalama MN ve CPI değerleri.....	38
Tablo 4.6. Dexketoprofen trometamolün tüm dozlarında 1 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde DNA hasarı.....	40

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DMSO	: Dimetilsülfoksit
MN	: Mikronükleus
NSAİ	: Non-Steroid anti-inflamatuar
NSAİD	: Non-Steroid anti-inflamatuar ilaç
CBMN	: Sitokinez Bloklama Mikronukleus
IASP	: Uluslararası Ağrı Çalışma Birliği
MSS	: Merkezi sinir sistemi
COX	: Siklooksijenaz
Cyt-B	: Sitokalsin
HNO₃	: Nitrik asit
KCl	: Potasyum klorür
ANOVA	: Varyans analizi
CBPI	: Hücre Proliferasyon İndeksi
RT²- PCR	: Gerçek Zamanlı Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyon Panel Sistemi
SMART	: Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi
PCR	: Polimolimeraz zincir reaksiyonu
RAPD	: Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
µg	: Mikrogram
mL	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
LD₅₀	: %50 Letal Doz

1. GİRİŞ

Ağrı, latince ceza, intikam, işkence anlamındaki *poena* sözcüğünden köken alan ve tanımı oldukça güç olan bir kavramdır. Uluslararası Ağrı Çalışmaları Birliği (International Association for the Study of Pain, IASP) ağrıyı vücudun herhangi bölgesinde hissedilen, organik bir nedene bağlı olan veya olmayan, kişinin geçmişteki deneyimleri ile ilgili, duysal, emosyonel, hoş olmayan bir duygu deneyimi ve davranış şekli olarak tanımlamıştır (Aydınlı, 2005). Günümüzde ağrı, vücut sıcaklığı, nabız, solunum ve kan basıncına ek olarak beşinci vital bulgu olarak kabul edilmektedir (Keskin, 2014).

Ağrı her zaman için öznedir. Bu nedenle algılanması kişiden kişiye büyük farklılıklar gösterebilir. Objektif uyaranların yanı sıra bireysel özellikleri bireyin ağrıya yanıtında önemli rol oynar. Bu yüzden ağrılı bir uyarana karşı yanıtta kişiden kişiye farklılıklar görülür. Ağrı çok boyutlu bir deneyimdir; nörofizyolojik, psikolojik, biyokimyasal, etnokültürel, dinsel, bilişsel, ruhsal ve çevresel bir durumdur (Özyalçın vd. 2005).

Ağrı olayı; ağrının duyulması (duysal), algılanması (kognitif) ve ağrıya yanıt (efektif) komponentlerini içerir. Ağrının kaba şekilde algılanması hipotalamusta, tam algılanması ise parietal kortekste olur. Ağrı duyulduğunda, her biri koruyucu amaçlı istemli veya istemsiz motor yanıtlar oluşur (Dikici vd. 2012).

Günümüzde çok çeşitli ağrı olduğu gibi buna uygulanan tedavi yöntemleri de çeşitlilik göstermektedir. Bu amaçla ağrıyı dindirmek için lokal anestezikler, opioidler, nonsteroid antiinflatuarlar gibi pek çok ilaç kullanılmaktadır (Hacıbeyoğlu, 2013).

Beyaz söğüt (*Salix alba*) ağacının kabuklarından elde edilen ekstrat halk tarafından ağrıyı azaltmak ve ateşi düşürmek amacı ile yüzyıllar boyunca kullanılmıştır. Daha sonra 1828'de Fransız farmakolog Henri Leroux ve İtalyan kimyager Raffaele Piria söğüt ağacından elde edilen bu ekstreye "salisin" adını vermiştir. Piria'nın salisini oksidasyon işlemine tabi tutmasıyla da "salisilik asit" meydana gelmiştir. Ancak salisilik asitin çoğu zaman tolere edilemeyen yan etkileri araştırmacıları yeni arayışlara yöneltmiştir. 1897'de, Bayer araştırmacıları Arthur Eichengrun ve Felix Hoffmann, salisilik asitin hidroksil gruplarından birini asetillemek suretiyle asetilsalisilik asiti (aspirin) elde etmişlerdir. Salisilik asitin yan etkilerini büyük oranda azaltan bu ilaç ilk sentetik ilaç olmuş, aynı zamanda farmasötik endüstriyi de başlatmıştır (Payan ve Katzung 1995).

Dünya'da ilaç kullanımı periyodik bir artış göstermektedir. Özellikle son 10 yılda

yapılan araştırmalar ilaç kullanımıının üç kat daha arttığını ortaya çıkarmıştır. Bu bilinçsiz tüketim, yan etki vb. Çeşitli sorunları da beraberinde getirerek, insan sağlığını tehlikeye sokmaktadır. İnsanların bilinçsiz olarak tükettiği ilaçların başında ağrı kesiciler gelmektedir. Ağrıların farklı sebepleri ve mekanizmaları nedeniyle kullanılan ağrı kesici ilaçların da çeşitliliği artmıştır.

NSAİD (non-steroid anti-enflamatuar)'ler dünya çapında en çok kullanılan ağrı kesici ilaçlardan biridir (Singh, 1988). NSAİD grubu ilaçlar, farklı mekanizmalara etki edebildikleri için birçok farklı ağrı tipinde rutin olarak ve yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar (Hanna vd. 2003). NSAİD'lerin çoğu organik asit yapısında olan ve yapısal olarak genellikle heterojen olmalarına rağmen benzer terapötik etki ve yan etki gösteren ilaç gruplarıdır. NSAİD'ler ortak antipiretik, analjezik ve antiinflamatuar etkileri paylaşan heterojen bir maddeler grubudur (Öztürk, 2010). NSAİD'ler plazma membranına yüksek oranlarda (%95-98) bağlanarak, analjezik, antipiretik ve anti-inflamatuar etki gösterirler (Stovitz vd. 2003; Kawai vd. 2005). Semptomatik iyileşme sağlayan bu ilaçlar halen dünyada en çok reçete edilen ilaçların başında gelmektedir. NSAİD'ler kimyasal yapılarına, ömürlerine ve Cox enzim inhibisyon oranlarına göre sınıflandırılabilirler (Altuğ, 2013).

NSAİ (non-steroid anti-inflamatuar) ilaçların kısa tarihçesine bakıldığında ilk kez 1820' de kolisin, 1860'da salisilik asit tanımlanmış ve bugün günümüzde çok tüketilen aspirin tablet Felix Hoffman tarafından sentezlenmiştir. Non-steroid antiinflamatuar ilaç isminin 1949 yılında ilk kullanılışı, fenilbutazon'un sentezlenmesi ile eř zamanlıdır (Vane, 1971; Ardoin ve Sundy 2006). Non-steroid anti-inflamatuar ilaçların (NSAİİ) oğu organik asit yapısında olup, kimyasal yapıları farmakolojik ve tedavi edici etkileri farklı heterojen bir gruptan oluşur (Kadıoğlu vd. 2013).

Deksketoprofen, nonsteroidal bir ilaç olup ketoprofenin aktif enantiomeridir (Moore ve Barden, 2008). Deksketoprofen trometamol, NSAİİ grubundan, analjezik, antiinflamatuar ve antipiretik etkinliğe sahip rasemik ketoprofenin, aktif S-enantiomeri olan aril-propiyonik asit grubundan, non selektif bir ilaçtır (Mauleón D. vd 1996; Mazario J. vd. 1999).

Deksketopropene trometamol eklenmesiyle ilaç çözünürlüğü artırılarak, daha hızlı absorbsiyon ile kısa sürede uygun plazma konsantrasyonuna ulaşması sağlanmıştır (Moore ve Barden, 2008).

Ağrı kesiciler içerisinde yer alan etken maddeler bu şekilde daha hızlı etki etme

özelliğine kavuşabilmektedir ancak bunların insan hücrelerinde meydana getirdiği sitotoksik ve genotoksik etkiler henüz çok net bilinmemektedir. Mutasyonlar, kromozomal anormallikler, DNA zincir kırıkları gibi DNA hasarları ve genomik belirsizlikler genotoksisite değerlendirmesi en sık kullanılan parametrelerdir. Genotoksik hasarın etkisini araştırmak amacıyla gerek *in vivo* gerekse *in vitro* çok fazla test sistemleri geliştirilmiştir (Şekeroğlu Z. ve Şekeroğlu V. 2011). Genotoksisite tespitinde bir testin tek başına yeterli olmadığı, en az iki test olmak üzere bir seri test sisteminin kullanılmasının daha faydalı olacağı bildirilmiştir. Sıklıkla kullanılan genotoksisite testleri *Salmonella* testi (Ames testi), mikronükleus testi (MN), kardeş kromatid değişimi testi (KKD), kromozom anormalliği testi, somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART), comet, RAPD-PCR, Real-time-PCR yöntemleridir (Sinan, 2017).

Bu amaçla sağlıklı insan lenfositlerindeki sitotoksik hasarın belirlenmesi ve toksik olmayan konsantrasyonların genotoksik potansiyel yönünden sınanması gerekliliği bulunmaktadır.

Bu çalışmada, dexketoprofen trometamol'un sağlıklı insan lenfosit hücrelerindeki klastojenik aktivitesi Sitokinez Bloklama Mikronukleus (CBMN) yöntemi ile, DNA tek ve çift ipliği üzerindeki genotoksik etkileri Comet testi ile, DNA onarım genlerinin ifade düzeyleri ise Gerçek Zamanlı Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyon Panel Sistemi (RT²- PCR Assay) ile araştırılmıştır. Uygulanacak olan testler ile, insanlarda çeşitli amaçlarla ağrı kesici olarak kullanılan dexketoprofen trometamol maddesinin klastojenik etkiyle yaratabileceği kromozomal hasarlar, DNA iplik kırılmalarıyla oluşturabileceği mutajenik etkiler ve DNA onarımıyla ilişkili gen ifade düzeylerinde meydana gelebilecek değişimler, sağlıklı insan hücreleri üzerinde *in vitro* olarak saptanmıştır. NSAİD (non-steroid anti-enflamatuar) grubu ağrı kesici ilaçlarda etken madde olarak kullanılan dexketoprofen trometamol'un insan lenfosit hücreleri üzerindeki sitotoksik etkili dozları ile sitotoksik olmayan dozlarının insan genomu üzerinde meydana getirebileceği *in vitro* genotoksik etkilerin kromozom, DNA molekülü ve gen düzeyinde araştırılması ve elde edilen sonuçların insan sağlığı bakımından karşılaştırmalı olarak yorumlanıp değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ağrının Tanımı

Patolojik bir durum belirtisi olarak algılanan ağrı, Uluslararası Ağrı Çalışma Derneği (IASP) tarafından “hoş olmayan gerçek ve potansiyel doku hasarı veya tehdidi ile birlikte bulunan, duyuşsal ve hissi deneyimler ” olarak tanımlanmaktadır (Raj 2000, Hacıoğlu 2013). Ağrı duyusu, olası hasarla karşılaşıldığında vücudumuzu uyarmak ve sinir sisteminin sinyal üreterek hayati fonksiyonların devam etmesi için gerekli olan önemli fonksiyonlardan biridir. Ağrı organizmada görme, işitme, tat alma gibi fonksiyonların önemine eşdeğerdir (Merskey vd. 1994, Heavner vd. 2003)

2.2. Ağrının Sınıflandırılması

Ağrı çok boyutlu bir kavram olduğundan sınıflandırmak güçtür. Pek çok sınıflandırma sistemi kullanılmış ancak hiç biri sürekli ve sabit olamamıştır. En sık kullanılan sınıflandırma aşağıdaki Tablo 2.1 ‘de gösterilmektedir.

Tablo 2.1. Ağrının sınıflandırılması (Raj, 2000 ve Çöçelli Pirbudak vd. 2008)

Ağrının süresine göre sınıflandırma	Kaynaklandığı bölgeye göre sınıflandırma	Mekanizmasına göre sınıflandırma	Etyolojisine göre sınıflandırma	Duyu şekillerine göre sınıflandırma	Bölgesel sınıflandırma
Akut ağrı Kronik ağrı	Somatik ağrı Visseral ağrı Sempatik ağrı	Nosiseptif ağrı Nöropatik ağrı Reaktif ağrı Deafferantasyon ağrı Psikosomatik ağrı	Kanser ağrısı Postherpetik nevralji Orak hücre anemisine bağlı ağrı Artrit ağrısı	Sızlama şeklinde ağrı Yanıcı ağrı Baticı ağrı Kolik şeklinde ağrı	Baş ağrısı Yüz ağrısı Bel ağrısı Pelvik ağrı

2.2.1. Süresine göre ağrı sınıflandırılması

Akut Ağrı: Bir yaralanma, hastalık süreci ya da kas veya iç organların anormal işlevleri sonucunda ortaya çıkan duyuşsal, algısal, deneyimlere verilen otomatik, psikolojik davranışsal cevapları içerir. Genellikle nosiseptif karakterlidir (Erdine 2003, Saka 2016).

Kronik Ağrı: Akut bir hastalığın olağan sürecinin ya da doku iyileşmesi için beklenen zamanın ötesinde devam eden ağrı olarak tanımlanmaktadır. Akut ağrıya göre etki süresi daha uzun olmakla beraber 1-6 ay arasında değişkenlik göstermektedir (Toker, 2007).

2.2.2. Kaynaklandığı bölgeye göre ağrı sınıflandırılması

Somatik Ağrı: Somatik sinir lifleriyle taşınan, ani başlayan, iyi lokalize edilen ağrı tipidir. Yaralanma, zedelenme, kırık, çıkık gibi durumlarda görülen ağrı somatik ağrı olarak nitelendirilmektedir (Emir, 2008). Yüzeysel somatik ağrılar ve derin somatik ağrılar şeklinde iki alt gruba ayrılmaktadır. Yüzeysel somatik ağrı cilt, müköz membrandan, derin somatik ağrı kaslar, tendon, eklemler, kemiklerden kaynaklanmaktadır (Morgan, 2008).

Visseral Ağrı: İç organlar ve onları örten kılıfların hastalığı veya fonksiyon bozukluğu sonucunda ortaya çıkan ağrıdır. Visseral ağrı yaygın, sızlama, kesin lokaliz edilemeyen ve sıklıkla da yansıyan özelliktedir (Zanoveli vd. 2004).

Sempatik Ağrı: Sempatik sinir sisteminin devreye girdiği ve diğer ağrı çeşitlerinden daha farklı olarak yanma hissinin yaşandığı ağrılardır (Emir, 2008).

2.2.3. Mekanizmalarına göre ağrı sınıflandırılması

Nosiseptik Ağrı: Nosiseptörler aracılığıyla doku yaralaması sonucunda oluşmuş uyarının alınıp, SSS (santral sinir sistemi) 'ye götürülmesi, tehdidin algılanması, buna karşılık fizyolojik, biyolojik, psikolojik önlemler alınması sürecini kapsayan ağrı çeşididir (Zengin, 2008).

Nöropatik Ağrı: 1994 yılından beri IASP tarafından “sinir sistemindeki primer bir lezyon ya da disfonksiyon sonucu ortaya çıkan ağrı” olarak tanımlanmaktaydı ancak 2008 yılında IASP, nöropatik ağrının “somatoduyusal sistemi etkileyen bir lezyon ya da hastalığın direkt sonucu olarak ortaya çıkan ağrı” şeklinde tanımlanmasını uygun görmüştür. Nöropatik ağrıya yol açan etkenler direkt olarak meydana gelebileceği gibi, sekonder olarak da meydana gelebilir (Nemutlu, 2016).

Reaktif Ağrı: Vücudun çeşitli olaylara karşı bir reaksiyonu olarak, motor ve sempatik efferentlerin refleks aktivasyonu sonucu olarak nosiseptörlerin uyarılması sonucu ortaya çıkan ağrıdır (Toker, 2007).

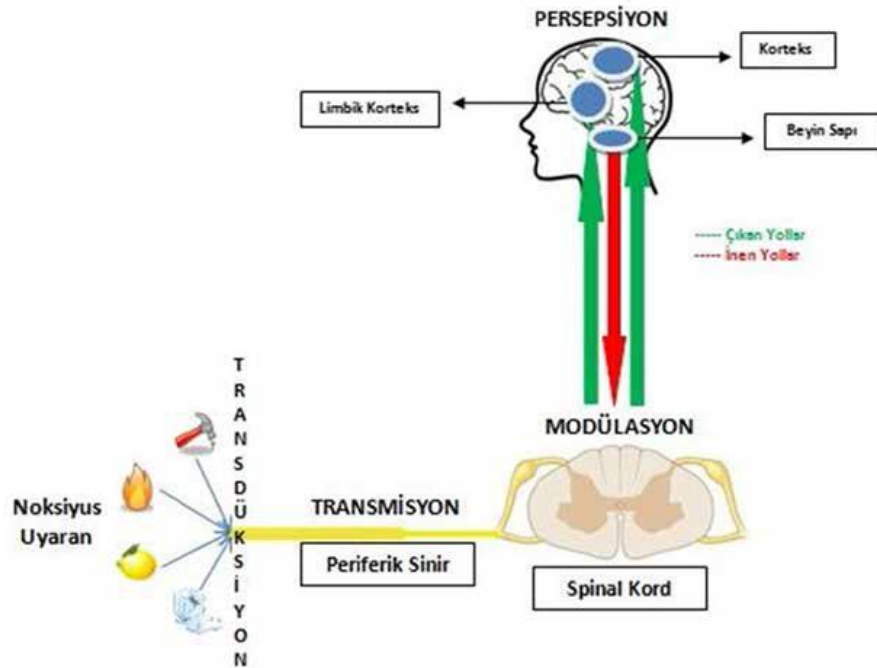
Deafferantasyon Ağrı: Periferik ve merkezi sinir sisteminde (MSS) meydana gelen lezyonlara bağlı olarak somatosensoriyel uyarıların MSS'deki iletiminin kesilmesine bağlı olarak ortaya çıkar. Yanıcı özelliktedir. Ağrı hemen tedavi edilmezse kronik ağrıya dönüşebilir (Toker, 2007 ve Emir 2008).

Psikosomatik Ağrı: Hastanın psişik ya da psikososyal sorunlarını ağrı olarak ifade etmesi durumudur (Toker, 2007 ve Emir, 2008).

2.3. Ağrı Nörofizyolojisi

Ağrı olayı, ağrının duyulması, algılanması ve ağrıya yanıt komponentlerinin oluşması süreçlerini içermektedir. Ağrının kaba şekilde algılanması uyarı ağrı reseptörleriyle hipotalamusa geldiğinde, tam algılanması ise uyarının parietal kortekse ulaşmasıyla mümkündür (Topçu 2008, Kaya 2015). Ağrı reseptörleri olan nosiseptörler, vücutta ağrı yapacak herhangi bir madde salgılandığında bu salgılanan maddeler tarafından uyarılırlar. Bu uyarılma sonrası uyarı 4 aşamada üst merkezlere doğru yol almaktadır.

1. **Transdüksiyon:** Doku hasarına takiben oluşan uyarının, serbest sinir uçlarında sinir son uçlarında elektriksel aktiviteye dönüşümü ve spinal korda iletilmesi olayına denir.
2. **Transmisyon:** Ağrılı uyarının daha üst merkez olan kortekse iletilmesi olayına denir
3. **Modülasyon:** Nosiseptif transmisyonun nöral etkenlerle modifiye olmasıdır.
4. **Persepsiyon:** Nosiseptif transmisyonun nöral etkenlerle modifiye olmasıdır. Persepsiyon ise bireyin psikolojisi ile etkileşimi ve subjektif emosyonel deneyimleri sonucu gelişen, uyarının algılandığı son aşamadır (Uyar ve Köken, 2017).



Şekil 2.1. Ağrı oluşum süreçleri (Uyar ve Köken, 2017)

2.4. Non-Steroidal Antiinflatuar İlaçlar

Narkotik olmayan analjezik ilaçlar dışında kalan, farmakolojik etki profiline uygun olan ilaçlara NSAİİ veya “antiinflatuar analjezikler” denilmektedir. İlaç bağımlılığı yaratmadığından, bilinç kaybı oluşturmadığından hafif ve orta şiddetli ağrılarının tedavisinde tercihen kullanılır (Meek vd. 2010).

NSAİİ’ler çoğunlukla analjezik, antipiretik, antiinflatuar etkileri nedeni ile kullanılmaktadırlar. Bu etkileri nedeniyle akut ağrılı, ateşli ve inflamasyonlu durumlarda kullanıldıkları gibi, kronik ağrılı durumlarda da analjezik ve antiinflatuar özelliklerinden faydalanılır. Bazıları daha çok analjezik, bazıları antiinflatuar, bazıları da hem analjezik hem de antiinflatuar özellikler gösterir (Yentür, 2006).

NSAID’lerin kısa tarihçesine bir göz atıldığında ilk kez 1820’de kolşisin, 1860’da salisilik asidin tanımlandığı ve ilk Aspirin tabletinin 1898’de sentezlendiği dikkati çeker. 1971’de bu süreç Dr. John Wyane’ in etki mekanizmaları konusunda yaptığı çalışmalar ve ilk siklooksijenaz emilimini tanımlaması ile yeni bir boyut kazanmıştır. 1976’da ise prostaglandinden doperoksitsentetaz (siklooksijenaz: COX) enzimi elde edilmiş; NSAID’lerin etki mekanizmaları, yan etkileri ve güvenlik profili üzerine olan çalışmalar hızlanmıştır. Bu konuda son gelişme 1990’ların başında COX’un tek bir molekül olmadığı ve birden fazla izomerlerinin farklı işlevlerinin olduğunun gösterilmesi olmuş ve böylece klinik çalışmalarda yeni bir boyut kazanmıştır. Günümüzde kullanılan ağrı kesici ilaçlar arasında opioid ilaçlar, güçlü etkinliklerine karşın, istenmeyen etkilerinin fazlalığı ve etkilerine tolerans gelişmesi nedeniyle etkin bir şekilde kullanılmamaktadırlar. Bu nedenlerden dolayı, non-steroidal antiinflatuar ilaçlar (NSAID) özellikle şiddetli olmayan ağrılarda çok daha fazla tercih edilmektedirler. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda NSAID’lerinin analjezik etkilerine karşı da tolerans gelişebildiği gösterilmiştir (Kaya, 2015).

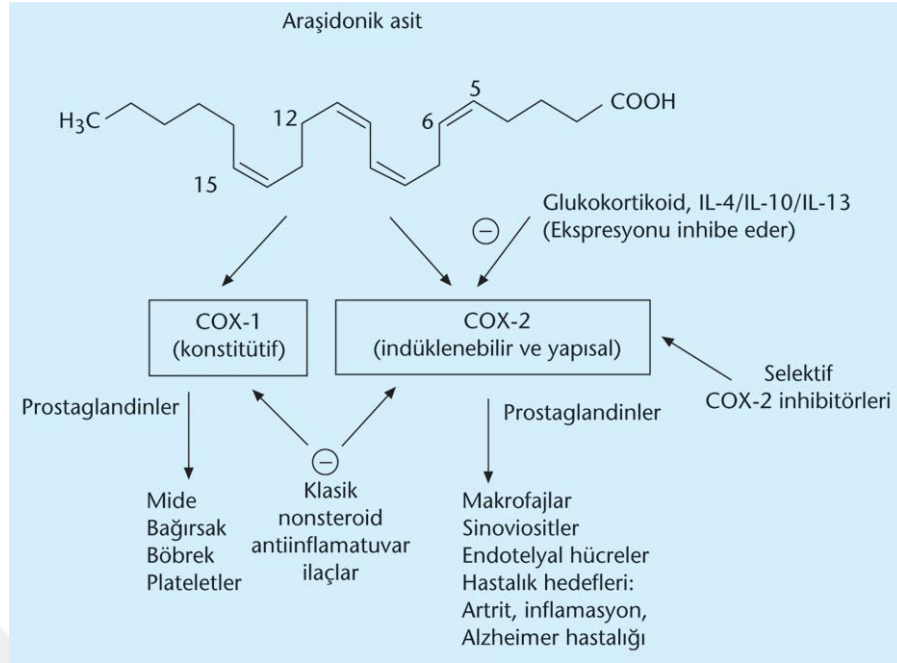
2.4.1. NSAİİ (Non-Steroid Anti-İnflatuar İlaçlar)’lerin etki mekanizması

Akut periferel ağrı temel olarak artan prostaglandin sentezinden kaynaklanmaktadır. Prostaglandin sentezi, siklooksijenaz (COX) tarafından katalize edilir (Von Graffenried vd 1980; Crossley vd 1983; Cooper vd 1989; Habib vd 1990; Mehlisch vd 1990; Dionne ve Gordon 1994). NSAİİ’ler COX enzim inhibisyonu ile prostaglandin sentezini bloke ederler. İnflamasyonda COX ve lipoksijenaz olmak üzere iki enzim yolağı aktive olmaktadır. COX enzim aktivitesi ile prostaglandin sentezine giden yol kontrol edilmekte

olup bu enzimin NSAİİ ile inhibisyonu yoluyla prostaglandin sentezi, lipoksijenaz yoluyla lökotrienlerin sentezi inhibe edilmektedir (Özbudak vd. 2016).

Prostaglandinlerin temel iki alt tipi vardır; çoğu dokuda bulunan ve gastrik mukoza, renal fonksiyonlar ile koagülasyon gibi proseslere katkıda bulunan normal prostaglandinler ile yangı, ateş ve ağrıya sebep olan patolojik prostaglandinlerdir. Normal prostaglandinlerin sentezi COX; patolojik prostaglandinlerin sentezi ise COX-2 enzimleri tarafından kataliz edilir. Yangıda prostaglandin sentezi özellikle COX-2 ye bağımlıdır. NSAİD’lerin çoğu enzimin her iki formunu da inhibe ederler (Kaya, 2015).

Prostaglandinler, insanda sadece trombositlerde, mast ve SSS hücrelerinde bulunur (Kaya, 2015 ve Kayaalp, 2002). COX enzimin iki formu bulunmaktadır; bunlar “yapısal” olarak adlandırılan “COX-1” ve “indüklenbilir” olarak bilinen “COX-2” dir. COX-1 damar endoteli, gastrik mukoza, trombositler ve renal tubuluslar gibi pek çok hücrede bulunmaktadır. Fizyolojik koşullarda COX-1 aktif durumdadır ve vasküler hemostazis, gastrik lezyonlar, trombosit aktivitesi ve renal fonksiyonlar gibi fizyolojik yanıtları düzenleyen prostaglandinlerin üretimini sağlar. Ancak herhangi bir enflamasyon durumunda dokularda indüklenir, enflamasyona yanıt olarak ortaya çıkar. COX-2 enflamasyon, ağrı ve ateş oluşturan prostoglandinlerin üretiminde rol oynar. NSAİİ’ler etkilerini ve yan etkilerini bu enzimlerin inhibisyonu yoluyla gösterirler. NSAİİ’lerin çoğu çeşitli derecelerde hem COX-1 hem de COX-2’yi inhibe ederler. Böylece hem istenen etkiler hem de yan etkiler farklı düzeylerde ortaya çıkar. Selektif COX-2 inhibitörleri, COX-2’yi COX-1’e göre daha fazla inhibe etmekte fakat yüksek dozlarda COX-1 inhibisyonu artmaktadır. COX-1 inhibisyonuna bağlı yan etkilerden kaçınabilmek için son yıllarda 15 spesifik COX-2 inhibitörleri geliştirilmiştir. COX-2 inhibitörlerinin geliştirilmesindeki amaç, ağrı ve hiperaljezi ile ilgili prostaglandinlerin oluşunun engellenmesi ve böylelikle gastrointestinal sistem mukozası, böbrekler ve damarlardaki prostaglandin formasyonlarını etkilememek ve normal fonksiyonlarının korunmasını sağlamaktır (Yentür, 2006).



Şekil 2.2. COX-1 ve COX-2 enzimlerinin bulundukları dokular ve fonksiyonları (Ak vd. 2013)

2.4.2. NSAİİ 'lerin sınıflandırılması

NSAİİ'lar kimyasal yapılarına, yarılanma ömürlerine ve COX seçiciliğine göre 3 gruba ayrılır.

Tablo 2.2. NSAİİ'ların yarılanma ömürlerine göre sınıflandırılması (Kayaalp, 2002)

Kısa Yarı Ömürlüler	Aspirin, diklofenak, etodolak, ibuprofen, flurbiprofen, indometazin, ketoprofen, tolmetin, mefenamik asit, flufenamik asit, meklofenomat, fenoprofen, asetaminofen
Uzun Yarı Ömürlüler	Diflusal, nabumeton, naproksen, piroksikam, oksaprozin, tenoksikam, tenidap, fenilbutazon, azapropazon, sulindak

Tablo 2.3. NSAİİ'ların COX seçiciliğine göre sınıflandırılması (Kayaalp, 2002)

Spesifik Cox-2 İnhibitörleri	Selekoksib, Rofekoksib, Valdekoksib, Etorikoksib
Selektif Cox-2 İnhibitörleri	Meloksikam, Etodolak, Nimesulid
Selektif Cox-1 İnhibitörleri	İndometazin, Piroksikam, Sulindak, Asetilsalisilik Asit, Tolmetin
Cox-1 Ve Cox-2'yi Aynı Derecede İnhibe Edenler	Naproksen, ibuprofen, flurbiprofen, diklofenak, nabumeton

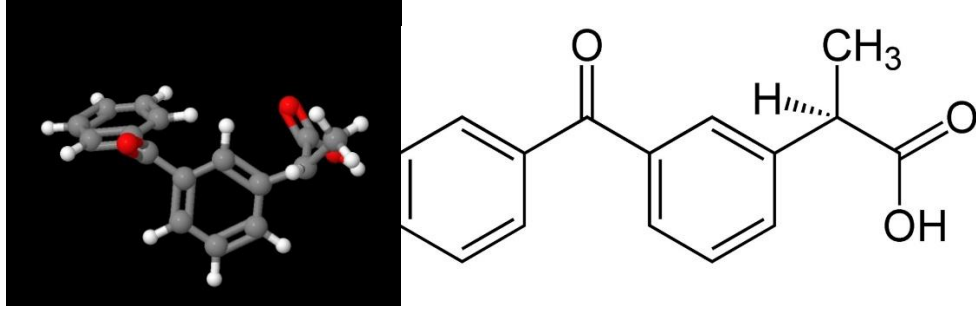
Tablo 2.4. NSAİİ'lerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması (Kayaalp, 2002)

Salisilatlar	Aspirin, Diflunisal, Mg Trisalisilat, Sodyum Salisilat, Salsalat, Benarilat, Metil, Salisilat, Sulfasalasin, Olsalazin
Asetik Asitler	İndometazin, Tolmetin, Asetmetazin, Sulindak (Prodrug), Diklofenak, Fenklofenak, Alklofenak, Etodolak, Nabumeton (Prodrug)
Para-Aminofenol Türevleri	Asetaminofen
Heteroaril Asetik Asit Türevleri	Ketorolak Trometamol
Propionik Asitler	İbuprofen, Ketoprofen, Naproksen, Flurbiprofen, Tiaprofenik Asit, Fenbufen, Fenoprofen, Oksaprozin
Fenamik Asit Türevleri	Mefenamik Asit, Flufenamik Asit, Meklofenamik Asit, Niflumik Asit, Etofenamat
Enolik Asitler	Piroksikam, Sudoksikam, Oksikam, Tenoksikam, Lornoksikam, Fenilbutazon, Oksifenbutazon, Azapropazon, Metamizol Propifenazon
Nonasidik Türevler	Nabumeton, Prokuazon, Tinoridin, Fluprokuazon

2.4.3. Deksetopfen

Deksetopfenin farmakolojik açılımı; 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propanediol(ler)-3-benzoil-alfa-metilbenzeneasetat; (L Ketoprofen trometamol) Deksetopfen trometamol [S (+)-2-(3-benzoilfenil) propiyonik asidin trometamin tuzu], rasemik ketoprofenin aktif S-enantiomeri olan suda çözünebilen tuzudur (Şekil 2) (Tuncer vd. 2010). Rasemik ketoprofen analjezik, antiinflamatuvar ve antipiretik bir ajandır ve prostaglandin sentezini *in vitro* şartlarda inhibe etme potansiyeli çok yüksek ajanlardan biridir. (R)-(-) enantiomerinin böyle etkisi olmadığından analjezik ve antiinflamatuvar etkiler (S)-(+) enantiomerinden (deksetopfen) kaynaklanmaktadır (İnan vd. 2009 ve Aykaç, 2010).

Deksetopfen ülkemizde yeni kullanıma giren nonselektif bir NSAİİ'tir ve ketopropene göre daha lipofilik olması ve yapısına katılan trometamol sayesinde daha hızlı etki sağlayabilmektedir (Lohom vd. 2002; Öner, 2010; Tuncer vd. 2003).

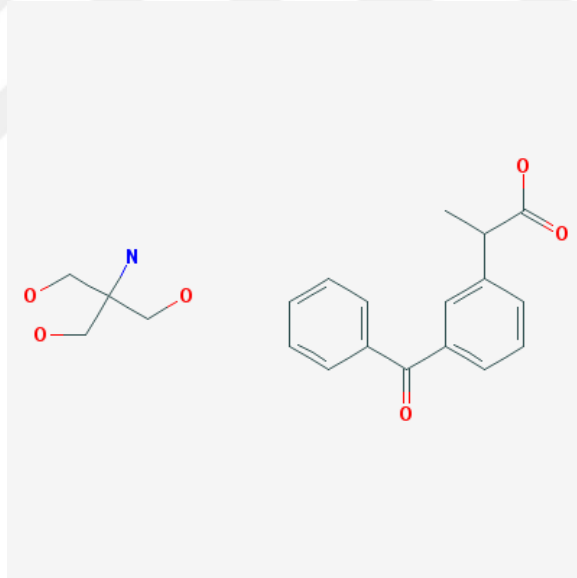


Şekil 2.3. Dexketoprofenin açık kimyasal formülü (Aykaç, 2010 ve <http-1>)

2.4.4. Dexketoprofen Trometamol

Deksketoprofen trometamol S (+)-2-(3-benzoilfenil) propiyonik asidin trometamin tuzu olup, NSAİ ilaçlardan ketoprofenin suda çözünabilen aktif optik izomeridir. Aril propionik grubundan olup parenteral formu nonselektif bir nonsteroid ilaçtır.

Farmakolojik açılımı ise “2-amino-2- (hidroksimetil)-1,3-propanediol(ler)-3-benzoil-alfa-methylbenzeneacetat” dır (Tajyuan, 2007) (Bkz Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Dexketoprofen trometamolün kimyasal yapısı (<http-2>)

Rasemik ketoprofen analjezik ve antiinflamatuvar bir ajandır ve prostaglandin sentezini *in vitro* şartlarda inhibe etme potansiyeli çok yüksek ajanlardan biridir. R(-) enantiomerinin böyle bir etkisi olmadığından analjezik ve antiinflamatuvar etkiler S(+) enantiomerinden (deksetoprofen) kaynaklanmaktadır (Barbanoj, 2001).

Deksetoprofen trometamol hem periferik hem de santral etkili bir NSAİ olup

periferik etkisi lokal olarak salınan prostaglandinlerin tetiklediği ağrı reseptörlerinin sensitizasyonunu inhibe etmesine, santral etkileri ise COX aktivitesini inhibe ederek ağrıyı ortaya çıkaran uyarının üst sinir merkezlerine aktarımını bloke etmesine bağlı olarak ortaya çıkar (Aykaç vd. 2012). Özellikle araşidonik asidin PGE1, PGE2, PGE2 alfa ve PGD2 prostaglandinleri ve PGI2 prostasiklin ve tromboksanları üreten siklik endoperoksitler PGG2 ve PGH2 ye dönüşümü inhibe olur. Ayrıca prostaglandin sentezinin inhibisyonu, kinin gibi diğer inflamasyon mediyatörlerini de etkileyerek, direk etkiye ek endirekt bir etkiye neden olur. Deksketoprofenin hayvan ve insanlar üzerindeki deneylerde COX-1 ve COX-2 aktivitelerinin inhibitör olduğunu gösterilmiştir (Kaya, 2015).

2.4.5. Dexketoprofen Trometamol ile ilgili çalışmalar

Hanna ve ark. (2003), major ortopedik cerrahi sonrası ağrı tedavisinde, intramuskuler deksetoprofen trometamolun, analjezik etkinliğini ve morfin gereksinimini azaltıcı etkisini ketoprofen ve plaseboyla karşılaştırmışlardır. Major ortopedik cerrahi sonrası 50 mg deksetoprofen trometamol uygulamasının, gerek opioid gereksinimini azaltıcı etkisi, gerekse ağrı kontrolü açısından iyi bir analjezik olduğu gösterilmiştir. Deksetoprofen trometamol ile tedavi edilen hastalarda kümülatif morfin tüketimi miktarı en düşük bulunmuş ve plasebo alanlarla karşılaştırıldığında, morfin gereksiniminin yaklaşık olarak üçte birine düştüğü gözlenmiştir.

Kayaaltı (2014)'nın yapmış olduğu çalışmada, abdominal histerektomi uygulanacak hastalarda postoperatif ağrı tedavisinde, deksetorofen trometamol ile deksmedetomidinin analjezik etkileri karşılaştırılmış ve analjezik etkileri benzer bulunmuştur. Aynı zamanda yan etki açısından da deksetoprofen trometamol ile deksmedetomidin arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

Aykaç ve ark. (2012) yapmış olduğu çalışmada, sezaryanla doğum sonrası ağrıda dexkeoprofen trometamol'ün analjezik etkisinin lornoksikam ve plasebo ile karşılaştırılması amaçlanmış ve sonuç olarak dexketoprofenin trometamol'ün daha etkili olduğu bulunmuştur.

Kadioğlu ve ark. (2013), elektif laparotomi uygulanacak olgularda, preemptif olarak uygulanan intravenöz 50 mg dexketoprofenin ağrı skoru, analjezi memnuniyeti, gelişen yan etkiler gibi parametrelerinin araştırılmasını amaçlayarak yaptığı çalışmada, dexketoprofen trometamol'ün etkin bir analjezik olduğu saptanmıştır.

Sağır ve ark. (2013), kontrollü gruplar oluşturarak farelerin sağ ve sol bacaklarının diz eklemünde yer alan kıkırdak dokuları ve synoviumlarına bir bacağına dexketoprofen trometamol ve diğer bacağına serum fizyolojik uygulayarak (1:1 oranında) *in vitro* ve *in vivo* olası toksik etkilerini araştırmışlardır. Sıçan diz eklemlerine uygulanan dexketoprofen trometamol, eklem içi uygulamalarda önemli histopatolojik değişikliklere neden olmadığı, ancak birincil kondrosit kültüründe *in vitro* uygulamada anlamlı sitotoksositeye neden olduğu bulunmuştur. Bu çalışmanın devamı olarak, dexketoprofen'in sitotoksik etkilerinin, farklı konsantrasyonlarda sıçan ve insan kondrosit kültüründe, araştırılmaya devam edilebileceği öngörülmüştür.

Luna – Bertos ve ark. (2015), farklı dozlarda kullanılan dexketoprofen, ketorolac ve metamizol gibi NSAİD'lerin osteoblast MG63 hücre hattındaki büyümesi üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve sonuç olarak uygulanan farklı dozlardaki NSAİD'lerin osteoblast benzeri hücrelerdeki apoptotik ve nekrotik hücre sayısını artırdıklarını saptamışlardır.

Tekeli ve ark. (2017) dexketoprofen trometamol ilaç uygulamasının artan dozlarına bağlı olarak özellikle paransimal dokuların aktivasyonunu artırarak, karaciğer dokusunda dejenerasyona sebep verdiğini saptamışlardır.

Sav ve ark. (2012), 70 yaşında bir hastada gribal enfeksiyon nedeni ile kullanılan tek doz oral deksketoprofenin yapmış olduğu masif rabdomiyoliz nedeni ile gelişen akut böbrek hasarı olgusu bildirmişlerdir. Zabala ve ark.(2008), 35 yaşında sağlıklı bir bayanda deksketoprofen trometamol kullanımına bağlı nötropeni, trombositopeni ve karaciğer hasarı bildirmişlerdir.

Yağmurdur ve ark. (2012) tarafından yapılan RA tedavisinde deksketoprofen trometamolün etkisini araştıran çalışmada ise 32 adet rat çalışmaya dahil edilmiş. Sağ diz eklemlerine (çalışma grubu) 0.25 mL deksketoprofen trometamol, sol diz eklemlerine (kontrol grubu) aynı miktarda SF enjekte edilerek 24.saat, 48.saat, 5. gün ve 7.günde alınan örneklerde immünohistokimyasal inceleme yapılmış. Sinoviyal hücrelerde immünohistokimyasal yöntemle endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), apoptoz proteaz aktive edici faktör-1 (APAF-1) ve proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA) çalışılmış. Kontrol gruplarında iNOS, eNOS, APAF-1 ve PCNA ifadeleri bakılan tüm zamanlarda hafif düzey olarak bulunmuş. Deksketoprofen grubunda 24. ve 48. saatlerde iNOS ve APAF-1 ifadeleri orta-yüksek düzey bulunurken en şiddetli değişiklikler enjeksiyondan 7 gün sonra tespit edilmiş. Deksketoprofen

grubunda tüm zamanlarda PCNA açısından proliferasyonda anlamlı olarak azalma tespit edilmiş ve sonuç olarak antiinflamatuvar etkili deksketoprofenin iNOS aktivitesindeki indüklenme sayesinde hücresel apoptozda artış ve proliferasyonda azalma ile RA tedavisinde etkili olabileceği deneysel olarak ortaya konmuştur.

2.5. Çalışmada Kullanılan Genotoksisite Testleri

2.5.1. Sitokinez Bloklama Mikronukleus yöntemi (CBMN)

Mikronukleuslar (MN) hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olamayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlar olup; kromatid kırıklarından ve bir ya da birkaç kromozom ya da kromatidin anafazda geri kalmasından dolayı, telofazda esas nükleusun dışındakalan küçük nükleuslardır. Mikronukleus metodu, genotoksisite ve sitotoksisite çalışmalarında; kromozom kırığı, kromozom kaybı, kromozomların farklı şekillenmesi (nükleoplasmik köprüler), hücre bölünmesinin inhibe edilmesi, gen amplifikasyonu, nekrosis ve apoptosisin basit morfolojik ölçütler kullanılarak değerlendirilmesini sağlar (Fenech, 2000).

Mikronukleus tekniği (MN); (Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay=CBMN Assay); çeşitli kimyasal maddelerin ve fiziksel ajanların, memelilerde klastojenik ve anöjenik aktivitelerinin belirlenmesinde yaygın kullanılan bir test tekniğidir (Kirsch-Volders vd. 2011). Mikronukleus (MN) yöntemi ilk olarak 1886 yılında anemik kedilerin kırmızı kan hücrelerinde Howell'ın gözlemleriyle ortaya çıkmıştır. Bu yüzden mikronukleuslar, hematolojide Howell-Jolly cisimleri olarak bilinirler (Çakmak, 2000).

CBMN testi, kültüre edilen insan hücrelerinde MN sayımı için tercih edilen bir metottur. Bu metodta mikronukleus sayımı, ilk bölünmesini geçiren hücrelerde gerçekleştirilir. Kromozom düzeyinde meydana gelen DNA hasarlarının araştırılmasında güvenilir sonuçlar veren CBMN (Sitokinez Bloklama Mikronukleus) tekniği temel prensip olarak sitoplazma bölünmesinin Sitokinasin-B (Cyt-B) ile engellendiği kültür koşullarında çekirdek bölünmesini tamamlamış ve bir test maddesi ile muamele edilmiş hücrelerin içerdiği mikronukleus (MN) miktarının belirlenmesine dayanmaktadır. Sitokinezin durdurulduğu mikronukleus yönteminde kullanılan Cyt B, aktin polimeraz inhibitörü olan bir maddedir. Bu özelliği ile nükleer bölünmeyi durdurmadan, mitotik sitokinezi yani sitoplazmanın bölünmesini durdurur. Cyt B etkisiyle, hücre çekirdeği bölünürken, sitoplazma bölünmesi (sitokinez) durur ve binükleer hücreler ortaya çıkar.

Sayım için sitoplazmaları korunmuş olan 1000 binükleat hücre/doz kullanılır (Fenech, 2006).

Mikronükleuslar, spontan olarak ya da genotoksik ajanlara maruziyet sonucunda, asentrik kromozomal fragmentlerin ya da tüm kromozomların hücre bölünmesi sırasında, ana çekirdek dışında yavru çekirdek şeklinde kalmasından oluşmaktadır (Fenech, 2007; Kirsch-Volders vd. 2011). Eğer MN oluşuma kromozomlardan kopan asentrik bir kromozom parçası neden olmuşsa, bu klastojenik bir olayın sonucu iken; eğer oluşuma neden olan olgu anafazda geri kalma ya da iğ ipliklerinin hasarından dolayı tüm bir kromozomsa bu duruma anöjenik bir ajanın neden olduğu belirtilmektedir (Fenech vd. 2003; Terradas vd. 2010; Cervantes-Rios vd. 2012).

Günümüzde mikronükleus metodu; genotoksisite ve sitotoksisite çalışmalarında; kromozom kırığı, kromozom kaybı, kromozom ayrılmaması (nondisjunction), kromozomların farklı şekillenmesi (nükleoplasmik köprüler), hücre bölünmesinin inhibe edilmesi, gen amplifikasyonu, nekrosis ve apoptozisin basit morfolojik ölçütler kullanılarak değerlendirilmesine yardımcı olmaktadır (Fenech, 2007). MN, hücre siklusu kontrol noktaları bozulmuş hücrelerde, DNA tamir mekanizması zarar görmüş hücrelerde ve tümör hücrelerinde yüksek bulunmuştur (Terrades vd. 2010).

Karsinojenlere maruz kalan sağlıklı bireylerde meydana gelen hasarın belirlenmesinde MN testi uygulanabilmektedir. CBMN tekniği ile sağlıklı insan lenfositleri hücre bölünmesi ile uyarıldıktan sonra ilk çekirdek bölünmesini geçiren hücrelere, 44. Saatte sitokalsin B ilave edilmiş ve böylece sitokinez engellenmiştir. Ortamda oluşan iki çekirdekli hücreler mikronükleus olarak adlandırılır (Demirel ve Zamani, 2002). Oluşan binükleuslar kolaylıkla tanılıp sayılabilmekte ve MN bulunduran hücrelerin oranları saptanabilmektedir (Güven vd. 2006).

2.5.2 Comet yöntemi

Son yıllarda geliştirilen ve sıklıkla kullanılan comet testi yada tek hücre jel elektroforezi (Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE) primer DNA hasarını belirlemekte kullanılan hızlı, güvenilir, basit ve yaygın kullanılan yöntemdir (Martin vd.1993; Sinan, 2017). DNA kırıklarının belirlenmesi ilk olarak 1978 yılında hücrelerin lam üzerinde agar gömülmesi ve DNA açılımını sağlamak için hafif alkali şartlarda liziz edilmesi ile olmuştur. Daha sonra 1984'te Ostling ve Johnson agarozda gömülen hücreleri lam üzerine yayarak yüksek tuz ve deterjanla liziz etmişler ve ardından elektroforeze tabi

tutmuşlardır. Akridin oranj, etidyum bromid gibi DNA bağlayıcı floresan boyasıyla boyanmışlardır (Ostling ve Johnson 1984). Floresan mikroskop altında lamalar incelendiğinde hasarın şiddetine göre DNA'lar dairesel şekilden kuyruklu yıldız benzer şekile kadar çeşitli derecelerde görüntüler oluşturdıklarından yöntemine İngilizce "kuyruklu yıldız" anlamına gelen "Comet Assay" adı verilmiştir (Singh vd. 1988).

DNA'da genotoksik etki ortaya çıkaran çeşitli kimyasal ajanların, bu etkilerini belirlemek için hızlı duyarlı ve rutin kullanıma uygun test yöntemleri geliştirilmeye çalışılmıştır. Comet testi, DNA hasarını ölçmede çok yaygın bir kullanım alanına sahiptir (Kassie vd. 2000).

Bu tekniğin az sayıda hücre gerektirmesi, değişik hücre ve dokulara uygulanabilmesi, hızlı, hassas ve güvenilir olması genotoksisite araştırmaları için sıklıkla tercih edilmesine neden olmaktadır. Comet tekniğinin ayrıca, DNA hasarını ve tamirini belirlemek için de kullanılabilmesi çok önemlidir. Teknik, DNA tek veya çift zincir kırıkları ile tamamlanmamış DNA onarım bölgelerine sahip olan hücrelerde, DNA'nın elektroforetik ortamda hücre çekirdeğinden göç ederek kuyruklu yıldız benzeri bir görüntü oluşturması prensibine dayanır. DNA'daki göç miktarı, DNA'daki kırık sayısı ile doğru orantılıdır. Hücrelere elektrik akım uygulanmasıyla, kırılmış veya hafiflemiş DNA fragmanlarının çekirdekten pozitif elektrot tarafına doğru hızla göçünü sağlar. Bunun sonucunda da floresan boyama ile gözlenebilen kuyruklu yıldız benzeri görüntüler meydana gelir ve bu görüntüler floresan mikroskop ile bağlantılı olan özel bir bilgisayar programı ile değerlendirilir (Speit ve Hartmann. 2006).

Comet analizinin temel prensibi kimyasal ve fiziksel nedenlerle oluşan genotoksik ve sitotoksik ajanların canlı hücreler üzerindeki etkilerini hücre DNA'larını tek tek inceleyerek saptamaktır (Dikilitaş vd. 2010). DNA'da oluşan düşük hasarlar seviyesinde göçten çok yayılma gözlenirken, hasar artması ile DNA parçaları kuyruğa doğru göç etmeye başlar ve çok hasarlı hücrelerde (apoptotik) baş ve kuyruk tamamen ayrı gözlenir (Fairbairn vd. 1995). Comet tekniğinde hasarlı hücrelerde çekirdek parlaktır ve floresan şiddeti baş tarafta yoğunudur ancak DNA'da kırıklar meydana geldiğinde floresan şiddeti çekirdekten kuyruğa doğru şiddetlenir. Bu test sisteminde hasarlı hücrelerde baş kısmından kuyruğa geçiş olduğundan, DNA hasarının kantitatif olarak tayin edilmesinde kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu önemli parametrelerdir (McKelvey-Martin vd. 1993).

2.5.3. Gerçek zamanlı ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyon panel sistemi (RT²- PCR)

Standart PCR’den farklı olarak gerçek zamanlı ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT²-PCR, Real-time PCR), PCR çoğaltımını görünür kılan ve monitorize edebilen floresan işaretli problemlerin ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile orantılı olarak arttığı bir çoğalma metodudur. Birçok isimlendirilme yapılan bu teknoloji yabancı yayınlarda “kinetik PCR”, “homojen PCR”, “kantitatif Real-time PCR” gibi çeşitli adlarla da isimlendirilmektedir (Bustin, 2006).

Biyolojik örneklerden elde edilen DNA’nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA’nın ekspresyon seviyesini sayısal olarak belirleyebilme bu metodun tercih edilmesini ve kullanılabilirliğini artırmaktadır. Bunun yanı sıra Real time PCR’ın tek nokta mutasyonlarını belirleme, patojen belirleme, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, SNP analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi kullanım alanları da mevcuttur (Kubista vd. 2006).

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

Tez çalışmamızda, ağrı kesici etken maddesi olarak kullanılan dexketoprofen trometamol'ün kromozom kırıklarına yol açan klastojenik aktivitesi sitokinez bloklayıcı yöntemiyle (CBMN), DNA'nın tek ve çift iğliğindeki kırılmaları tespit etmek amacıyla meydana getirdiği genotoksik etkileri Comet testiyle, DNA hasar tespitinden sorumlu olan genlerin ifadeleri üzerine yaratacağı olumsuz etkiler ise Real-time PCR yöntemiyle belirlenmiştir.

Ticari olarak satın aldığımız ilaç etken maddesi dexketoprofen trometamol'ün (SantaCruz sc-357330) genotoksik etkilerini incelemek amacıyla yapılan bu *in vitro* çalışmada insan periferik kan kültürü ve izole lenfositler kullanılmıştır. Kullanılan periferik kan, alkol, sigara ve sürekli ilaç kullanmayan, sağlıklı dört donörden temin edilmiştir.

3.2. CBMN Testi

Fenech ve Morley tarafından, küf mantarlarının metabolitlerinden olan sitokalsin-B (Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanan ve bir hücre siklusunu tamamlayan hücrelerin binükleer görünümüyle ayırt edilmesine olanak sağlayan modifiye bir teknik geliştirilmiştir (Fenech ve Morley 1985). Mikronükleus sayısını saptamak için Fenech (2000) ve Kirsch-Volders ve ark. (2003) tarafından geliştirilen metod geliştirilip, değiştirilerek kullanılmıştır.

3.2.1. CBMN yönteminde kullanılan deney ekipmanları ve kimyasallar

Santrifüj, floresan mikroskop, inkübatör, pH metre, su banyosu, flow kabin, buzdolabı, hassas terazi, tartı, falcon tüp, pasteur pipeti, mikropipet, mikropipet uçları, enjektör, lam, lamel, erlen, manyetik balık, beher, yatay ve dikey şale, 1.5 mL ependorf tüpü.

Dexketoprofen trometamol (SantaCruz), Kromozom medyum (Biochrom), Sitokalsin B (Applichem), Giemsa (Merck), HNO₃ (Merck), KCL (Merck), Acetic acid (Merck), Metanol, Trypan Blues (Applichem), KH₂PO₄, Na₂HPO₄

3.2.2. Test maddesinin ve dozların hazırlanması

İlaç etken maddesi olan dexketoprofen trometamol'un sağlıklı lenfosit hücrelerindeki sitotoksik ya da sitostatik etki düzeyini ve *in vitro* klastojenik aktivitesini belirlemek amacıyla CBMN tekniği uygulanmıştır. Dexketoprofen trometamol ile ilgili literatür taramalarına göre söz konusu test maddesinin insan hücreleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkisini gösteren bir çalışma bulunamamıştır. Test maddesinin lenfositler üzerine uygulanacak dozlarının belirlenmesinde, hücreler için sitotoksik olabileceği düşünülen yüksek dozlar denenmiş ve gözlenen sitotoksik etkiler nedeniyle, 1000 µg /mL'lik konsantrasyondan başlanarak, 750 - 100 µg / mL doz aralığındaki 5 doz (1000,750,500,250,100 µg /mL) seçilmiştir.

3.2.3. Lenfosit kültürü

Sağlıklı, düzenli olarak ilaç kullanmayan ve sigara içmeyen, 25-30 yaş arası 2 erkek ve 2 bayan bireyden steril koşullarda alınan kan, içinde 2,5 mL Kromozom Medyum-B bulunan tüplere 0,2 mL ilave edilmiş (6 damla) ve %5 lik CO₂ inkübatöründe 37 °C de toplam 72 saat inkübasyona alınmıştır. Tüm bu işlemler steril kabinde yapılarak ortamdan kaynaklanacak kontaminasyon riski en aza indirgenmiştir.

3.2.4. Test maddelerinin uygulanması

İlaç etken maddesi olan dexketoprofen trometamol daha önceden belirlenmiş dozlarda hazırlanmıştır. Her doz için 24 saat ve 48 saat uygulaması yapılmıştır. Dozlar, 24. ve 48. saatlerde kültüre eklenmiştir. 72 saat sonuna kadar inkübasyona devam edilmiştir. Kültür süresinin başlangıcından sonraki 44. saatte her tüpe 6µg/mL sitokinezi bloke edici madde olan sitokalsin B ilave edilmiştir.

3.2.5. Lenfosit izolasyonu

72 saatin bitiminde tüpler 1200 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş, santrifüjden çıktıktan sonra süpernatant kısımlar atılmıştır. Tüplerin dibinde kalan hücreler homojen hale gelecek şekilde karıştırılmıştır. Deney süresinin bitiminden 2 saat önce hazırlanan ve 37 °C de bekleyen hipotonik solüsyon (%0,4 KCl) damla damla ilave edilip, oda sıcaklığında 15 dakika beklenmiştir. Süre bitiminde kültür tüpleri, 1200 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırılmıştır. Tüpün dibinde kalan 0,7 ml'lik kısım pastör pipeti ile homojen hale getirildikten sonra, deneyden 2 saat önce hazırlanan

ve 4 °C’de bekleyen metanol glasiyel asetik asit karışımı damla damla ilave edilip, karıştırılarak 20 dakika oda sıcaklığında beklenilmiştir. Süre bitimi ardından tüpler tekrar santrifüje alınarak 1200 rpm’de ayrıştırılmıştır. Santrifüj bitiminde süpernatant atılmış dipte kalan çökelti homojen hale getirilmiş ve yine fiksatif ilavesi yapılmıştır. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Son fiksatif uygulamasından sonra santrifüjden çıkan tüplerdeki içerik, dipte 0,7 mL sıvı kalacak şekilde atılmış, böylece kalan hücreler preperat haline getirilme işlemine hazırlanmıştır.

3.2.6. Preperatların hazırlanması

Deney gününden önce lamalar 1N HNO₃ ile 24 saat muamele edilmiş, sonrasında yarım saat akan musluk altında yıkanmıştır. Yıkama işlemi bittikten sonra 3 kez distile sudan geçirilip, temizlenip buzdolabına kaldırılmıştır. Saf su içinde buzdolabında bekletilen lamaların üzerine 0,7 mL olarak tüpte kalan hücreler belirli bir yükseklikten (20 cm) her biri farklı bir alana denk gelecek şekilde 6 damla olmak üzere damlatılmıştır. Her bir doz için 3 adet preperat hazırlanmış ve oda ısısında kurumaya bırakılmıştır.

3.2.7. Preperatların boyanması

Lamalar hazırlanmış olan %5’lik Giemsa boyasında 15-20 dakika bekletilerek boyanmış ve distile su ile yıkanarak kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preperatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir.

% 5’lik Giemsa’nın Hazırlanması: 5 mL tampon A, 5 mL tampon B ve 5 mL Giemsa karıştırılarak üzerleri 100 mL oluncaya kadar saf su ile tamamlanmıştır (pH=6,8).

Tampon A Solüsyonu

4,536 g KH₂PO₄ tartılıp, 100 mL distile su içerisine karıştırılarak hazırlanır.

Tampon B solüsyonu

5,932 g Na₂HPO₄ tartılıp, 100 mL distile su içerisine karıştırılarak hazırlanır.

Sonra bu boya eriyiği filtre kâğıdı ile dik bir şaleye süzölmüştür. Hazırlanmış olan preparatlar şalelerdeki boyaların içerisine konularak boyanmaları sağlanmıştır. 12 dakikalık boyama süresinin bitiminde preparatlar boyadan çıkarılıp içerisinde distile su bulunan 3 ayrı beherden geçirilerek fazla boyanın lamlardan akması sağlanmış, preparatlar dik bir şekilde yerleştirilerek kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar

entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir. Entellan kuruduktan sonra (en az iki gün) bu daimi preparatlarda mikroskopik incelemeler yapılmıştır

3.2.8. CBPI (Hücre Proliferasyon İndeksi) saptanması

CBMN tekniğine göre hazırlanan preparatlarda, lenfosit hücrelerinin sitoplazma bölünmeleri engellendiği için, bölünmekte olan hücrelere ait nukleuslar aynı sitoplazma içinde kalmaktadır. CPI hesaplanmasında, her bir uygulama için; bir, iki, üç, dört ve daha fazla nukleusa sahip hücrelerin tamamını içeren toplam 1000 adet hücre sayılarak kaydedilmiştir. Elde edilen verilerden aşağıdaki formül yardımıyla CPI değerleri hesaplanmıştır.

$$CPI = 1 \times MI + 2 \times MII + 3 \times MIII + 4 \times MIV / N$$

(MI: Bir nukleuslu hücreler, MII: İki nukleuslu hücreler, MIII: Üç nukleuslu hücreler, MIV: Dört ve daha fazla nukleuslu hücreler ve N: Toplam hücre sayısı=1000)

Uygulanan her doz ve süre için CPI değerinin hesaplanmış, bu değeri kontrole göre yarıya düşüren dozlar için **LD₅₀**, daha fazla düşüren dozlar için ise **toksik**, nitelemesi yapılmıştır.

3.2.9. Mikronukleus sayımı

Dexketoprofen trometamol'ün olası klatojenik(genotoksik) etkisini belirleyebilmek için, LD₅₀ değeri altındaki; 750, 500, 250 ve 100 µg /ml'lik dozları 24 saat, 500, 250 ve 100 µg /ml'lik dozları ise 48 saat süre ile lenfosit kültürüne uygulanmış ve CBMN yöntemine göre hazırlanmış olan preparatlarda, 1000'er adet iki nukleuslu hücre incelenerek, içerdikleri mikronukleuslar sayılıp kaydedilmiştir (Şekil 4.1-4.3).

Mikroskopik incelemelerdeki sayımlardan elde edilen, her bir vericiye ait değerler ayrı tablolar halinde, tablo 4.1-4.5.'de sunulmuştur.

3.3. Comet Testi

3.3.1. Comet testinde kullanılan ekipmanlar ve kimyasallar

Santrifüj, floresan mikroskop, inkübatör, pH metre, su banyosu, flow kabin, buzdolabı, hassas terazi, falcon tüp, mikropipet, enjektör, lam, lamel, erlen, beher, yatay ve dikey şale, elektroforez tankı, 1,5 mL ependorf tüpü, jel görüntüle sistemi, mikrodalga

fırın, nano-drop spektrometre.

Dexketoprofen trometamol (SantaCruz), Kromozom medyum (Biochrom), Histopaque 1077 (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), DMSO, NaCl, KCl, NaOH, , Etidyum Bromide, Triton-X 100, EDTA, Trizma Base (Sigma), HMA (Sigma), LMA (Sigma), Fosfat tampon (PBS) tabletleri, fenol-kloroform, SDS, proteinaz K, etanol (saf), borik asit, trypan blue (Applichem) H₂O₂, EMS, dNTP mix, (sigma), MgCl₂ (sigma), 10 X Taq Polimeraz (sigma), 6X Loading Dye Solution (Fermentas), Oligonükleotid primerler (Biolegio, Research Genetics).

3.3.2. Comet testi için dozların belirlenmesi

Comet testinde uygulanacak dozlar belirlenirken, CBMN testinde kullanılan dozlar (1000-500-250-100 µg /mL) referans alınmıştır. Comet testinde, bir ajanla muamele gören hücrelerde, canlılık oranının en az %80 değerinde olması istenmektedir. Bu doğrultuda başlangıç dozu olarak, CBMN deneylerinde kullanılan en yüksek konsantrasyon (1000 µg/ mL) ile canlılık testi yapıldığında, canlılık oranının %80 olduğu görülmüştür. Bu sonuçtan yola çıkarak Comet deneylerinde, Dexketoprofen trometamol'ün 1000-500-250 ve 100 µg/mL'lik dozlarının kullanılması uygun görülmüştür.

Test maddesi dozları ile 37 °C de 1 saat inkübe edilen lenfosit hücreleri, Tripan mavisi ile boyanarak, thoma lamında sayılmış ve Comet testi için gerekli olan %80 canlılık oranı elde edilmiştir.

3.3.3. Lenfositlerin izolasyonu

Sağlıklı, gönüllü, ilaç kullanmayan, sigara içmeyen 4 kişiden heparinle alınan periferik kandan Histopaque 1077 yöntemi ile lenfosit izole edilmiştir. İzolasyona başlamadan yaklaşık bir saat evvel histopaque oda ısısında, RPMI 37° C'de bekletilmiştir. Her gönüllüden 10 mL kan alınıp içinde histopaque (10 mL) bulunan tüpün içine yavaşça damla damla ilave edilmiştir. 400 g.de 30 dakika santrifüj işlemi ile tabakalaşan lenfositler başka bir steril falcona alınmıştır. Lenfositlerin üzerine 10 mL PBS solüsyonu eklenerek 250 g. de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant çekilerek dipteki pelletin üzerine 5 mL PBS çözeltisi eklenip 250 g.'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır (Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır). Santrifüj işlemleri sonrasında süpernatant atılıp pelletin üzerine RPMI 1640 ilave edilmiştir.

Yapılan literatür araştırması sonucu test maddelerinin denenecek doz aralığı 100 µg/mL ile 1000 µg/mL olarak belirlenmiştir. Dexketoprofen trometamol distile suda çözülmüştür. Dolayısıyla çalışmamızda spontan ve 50 µM'lık H₂O₂ pozitif kontrol dışında distile su kontrolü de bulunmaktadır. Madde maruziyeti için 1ml'lik ependorf tüplere ;

150 µl RMPI 1640 içinde dilüe edilen lenfosit,

95 µl RPMI 1640,

5 µl madde

eklenerek 37° C'de 1 saatlik inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon sonrası lenfositlerde canlılık tespiti için tripan mavisi testi yapılmıştır.

3.3.4. Tripan mavisi ile canlılık testi

Lenfosit hücrelerinde canlılık tespitinde yaygın olarak kullanılan negatif yüklü bir boya olan tripan mavisi hücre membranı zarar görmüş canlı olmayan hücreler tarafından absorblanır ve mikroskop altındaki incelemede ölü hücreler mavi ile boyanmış olarak canlı hücrelerden kolaylıkla ayırt edilirler.

Hücre süspansiyonu 1:1 oranında %0, 4'lük tripan mavisi boyası ile seyreltilip ve bu seyreltilen süspansiyondan alınıp thoma lamına yayılmış ve ışık mikroskopu altında hücreler sayılmıştır. Canlı hücre yüzdesi aşağıda gösterilen şekilde hesaplanmıştır.

$$\text{Canlı Hücre (\%)} = (\text{Canlı Hücre} / \text{Toplam Hücre}) \times 100$$

Her test maddesi için 1 saatlik maruziyet sonrası %80'den fazla canlılığın olduğu en yüksek doz ilk doz kabul edilip diğer üç doz bir öncekinin yarısı olacak şekilde hesaplanmıştır.

3.3.5. Mikroskop lamalarının hazırlanması

Yüksek erime ısıllı agaroz 100 mL dH₂O'da çözülüp, lamalar rodajlı kısmının yarısına kadar agarozla batırılmıştır. Altları silinerek kurutulduktan sonra numaralandırma yapılarak çalışma öncesinde hazır hale getirilmiştir.

3.3.6. Solüsyonların hazırlanması

Çalışmada kullanılan solüsyonlar aşağıda belirtilği şekilde, soğuk olarak (+4°C) ve tercihen deneyden 1 gün önce hazırlanmıştır.

Fosfat Tamponu (PBS)

1 adet PBS tableti 200 mL distile suda çözülür ve +4°C’ de saklanır.

Lizis Solüsyonu

5M, (146,1 g), NaCl, 100 mM (37,2 g) EDTA, 100mM (1,2 g) Tris, 900 mL distile suda çözülür ve pH 10 olacak şekilde ayarlanır.

Hazırlanan stok lizis tercihen koyu renkli şişelerde +4°C’ de saklanır.

Deneyden 30 dk önce her 100 mL çözelti için 1 ml Triton X çözeltisinden, ve 10 mL DMSO çözeltisinden eklenerek lizis buffer hazırlanmış olur.

Nötralizasyon Buffer

4,8456 gr Tris tartılarak 100 mL distile suda çözülür. pH’ı 7,5’e ayarlamak için HCl ile seyreltme yapılır.

Running Buffer (Elektroforez tamponu)

2lt distile su içerisinde 0,747gr Na₂EDTA ve 24gr NaOH çözülerek, pH 13’e ayarlanır ve +4°C’de saklanır.

Low melting agar hazırlanışı

0,07 gr low melting-gelling agar ile 10 mL PBS ile karıştırılıp mikrodalgada ısıtılır. Bu agar deney günü hazırlanıp kullanılmalıdır. 250 mL düşük erime ısıları agar lenfositlerle karıştırılıp, önceden yüksek erime ısıları agar ile kaplanan lamaların üzerine 100 mL olacak şekilde damlatılıp ve lamel ile kapatılır. Bu halde preparatlar 15 dakika buzdolabında bekletilir.

3.3.7. Lizis

Dolaptan çıkarılan lamalar üzerindeki lameller kaldırılarak, içinde lizis buffer bulunan alüminyum folyo ile sarılı şalelere yerleştirilmiş ve +4°C’de bir gece lizise bırakılmıştır.

3.3.8. Elektroforez

Lamlar elektroforez tankına yerleştirilip, DNA'nın açılabilmesi (unwinding) için güç kaynağı çalıştırılmadan önce running buffer içerisinde 20 dakika bekletilmiştir. Unwinding süresi bitiminde elektroforez tankına bağlı güç kaynağı 25V; 300Amper; ve 25 dakikaya ayarlanarak çalıştırılmıştır.

3.3.9. Nötralizasyon

Yürütmenin ardından lamlar 5 dakika karanlıkta nötralizasyon sıvısı içerisinde bekletildikten sonra soğuk dH₂O ile yıkanıp kurutulmuştur.

3.3.10. DNA'nın boyanması ve cometlerin görüntülenmesi

Hücre çekirdeklerini boyamak için, EtBr gibi floresan mikroskopta incelemeye uygun flouresan ışımaya yapan bir boya kullanılmıştır. Kuruyan lamların üzerine 50 µl EtBr (etidyum bromid) yayılarak, üzeri lamelle kapatılmış ve +4 °C'de 10-15 dakika bekletilmiştir. Son olarak, hücreler Flouresan mikroskopta (546 nm eksitasyon ve 590 nm bariyer filtrede 40 X büyütmede) incelenmiş ve her bir uygulama yani doz ve süre için en az 50 adet hücre görüntüsü kaydedilmiştir. Görüntü analizi ve comet sayımı her bir doz için bir donörden 50'şer comet olmak üzere % kuyruk uzunluğu ve % kuyruk yoğunluğu cinsinden Comet IV yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.3.11. İstatistiksel analiz

CBMN ve Comet yöntemleri ile yapılan deneysel çalışmalara ait veriler, spontan ve pozitif kontrol değerleriyle, SPSS programında paired-Student's t-testi ile analiz edilerek ortalama değerler (ort.±SS) ile anlamlılık değerleri (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$) hesaplanmıştır.

3.4. Real Time PCR (RT²-PCR)

Gen anlatımını incelemek için gerçek zamanlı RT²-PCR uygulanmıştır. Bunun için ilk olarak periferik kandan Histopaque1077 ile yoğunluk gradiyenti uygulanarak lenfosit izole edilmiştir. Hücre canlılığı belirlemek için thoma lamı ve hücre sayım cihazı olan Cedex ile sayılarak %80 canlılık tespit edilmiştir. İzolasyon sonrası lenfositler besi ortamına alınmıştır. CBMN yönteminde belirlenen ve en yüksek doz olan 750 µg/mL ile en düşük doz olan 100 µg/mL dexketoprofen trometamol ile lenfositler 1 saat süreyle

maruz bırakılmıştır. Maruziyet sonrası RNA blood mini kit kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA'lar izole edildikten sonra nanodropta ölçüm yapılmış ve yeterli miktarda RNA izole edildikten sonra RT2 First Strand Kiti ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu cDNA'lar DNA hasar yolağındaki genlerin anlatımının değiştiğini belirlemek için RT² profiler PCR arraylerinden PAHS-029Z kullanılmıştır.

3.4.1. Real time PCR'da kullanılan ekipman, kimyasal ve ticari kitle

Santrifüj, floresan mikroskop, inkübatör, pH metre, su banyosu, flow kabin, buzdolabı, hassas terazi, steril kabin, otoklav, cedex cihazı, cedex cihaz lamı, tartı, distile su cihazı, Real Time QPCR sistem cihazı, PCR mikro santrifüj tüpleri, PCR tüpleri, filtreli steril uçlar, falcon tüp, mikropipet, enjektör, 1,5 mL ependorf tüpü, nano-drop Real PCR için rezervuar.

Kromozom medyum (Biochrom), Histopaque 1077 (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), Trizma Base (Sigma), Fosfat tampon (PBS) tabletleri, Tripan Blue (Applichem), Dexketoprofen trometamol (SantaCruz), agaroz (Sigma), MOPS (Applichem), Formaldehit (Merck), Formamid (Merck), DEPC (Sigma), B-Merkaptoetanol (Sigma), QIAampRNA Blood Mini Kit (Qiagen), RNase-Free DNase Set (Qiagen), QIAshredder (Qiagen), RT2 First Strand Kit 12'li (SABiosciences), RT2 SYBR Green qPCR Master Mix (SABiosciences), RT2 profiler PCR Human DNA damage signaling pathway (PAHS-029A).

3.4.2. Lenfosit izolasyonu

Sağlıklı, gönüllü, ilaç kullanmayan, sigara içmeyen 2 kişiden heparinle alınan periferik kandan Histopaque 1077 yöntemi ile lenfosit izole edilmiştir. İzolasyona başlamadan yaklaşık bir saat önce histopaque oda ısısında, RPMI 37° C'de bekletilmiştir. Her gönüllüden 10 mL kan alınıp içinde histopaque (10 mL) bulunan tüpün içine yavaşça damla damla ilave edilmiş ve 400 g.de 30 dakika santrifüj edilerek izole edilmiştir. Lenfositlerin üzerine 10 mL PBS solüsyonu eklenerek 250 g. de 10 dakika santrifüj yapılmış ve süpernatant çekilerek dipteki pelletin üzerine 5 mL PBS çözeltisi eklenip 250 g.de 10 dakika santrifüj yapılmıştır (Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır). Santrifüj işlemleri sonrasında süpernatant atılıp pelletin üzerine RPMI 1640 ilave edilmiştir.

3.4.3. Madde maruziyeti

Histopaque 1077 kullanılarak izole edilen lenfositler uygulanacak maddenin belirlenen çeşitli dozlarıyla son hacim 250 µl olacak şekilde ependorflara dağıtılmıştır.

150 µl RMPI 1640 içindeki hücre + 95 µl RPMI 1640 + 5 µl etken madde

Ependorflardaki hücreler, Dexketoprofen trometamol'ün diğer yöntemlerde uyguladığımız en yüksek (750 µg/mL) ve en düşük (100 µg/mL) dozu kullanılarak 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitiminde ependorflar 3000 rpm'de 5 dak. santrifüj edilerek lenfositler izole edilmiştir.

3.4.4. RNA izolasyonu

RNA izolasyonu, RNA Blood Mini kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kitin protokolünde çalışması için önerilen hücreler lökosit olarak belirlenmiştir. Histopaque 1077 yöntemi ile izole edilerek, 1 saatlik etken madde maruziyetine bırakılan lenfositler elde edilmiştir. Bu aşamadan sonra sırasıyla;

- ✓ Lenfositlerin üzerine Buffer RLT plus ve Beta merkaptotanol karışımı konularak yavaş yavaş pipetaj yapılır. Pelletin RLT'de tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Bu karışım genomik DNA'yı tutan kolonlara konularak 10 000 rpm'de 2 dk. Santrifüj edilir.
- ✓ Santrifüj sonucu elde edilen toplama tüpündeki lizatın hacmine eşit hacimde 350 µl %70'lik etanol eklenmiştir. Etanolle muamele edilmiş lizatta herhangi bir çökeltme oluştuysa bu çökeltiyi de içeren en fazla 700 µl'lik sıvı RNeasy spin kolona aktarılmıştır. 12.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilerek, filtre yeni kolana alınarak DNAase uygulaması yapılmıştır.
- ✓ Kolon üzerine 350 µl RW1 tamponu eklenerek 15 saniye en yüksek devirde santrifüj edilmiş ve sıvı dökülmüştür.
- ✓ 80 µl'lik DNaz tamponu kolon membranına eklenip ve 20-30 °C 'de 15 dk. bekletilmiştir. Sonra kolon üzerine 350 µl RW1 tamponu eklenerek 12.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
- ✓ Kolonların üzerine 500 µl RPE eklenerek 15 sn. 12.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

- ✓ Ardından kolona 500 µl RPE eklendikten sonra 2 dakika 12.000 rpm’de santrifüj edilmiştir.
- ✓ Son olarak RNeasy spin kolonu yeni bir 1.5’lik mikrosantrifüj tüpe alınmıştır. Tüpe 30 µl RNazsız su ilave edilerek 12.000 rpm’de 1dk. santrifüjlenip RNA’lar 30 µl RNazsız suda toplanmıştır. Realtime PCR için işlem yapılana kadar -80 °C’de saklanmıştır.
- ✓ RNA’nın miktar ve saflığını belilemek amacıyla izole edilen RNA, nanodropta cihazında spektrofotometrik olarak ölçülmüş 1 Ngr DNA’ya ulaşılacak şekilde DNase, RNase free su ile seyreltilmiştir.

3.4.5. cDNA sentezi ve gerçek zamanlı PCR

RNA örneklerinden cDNA sentezi RT2 First Strand Kit ile gerçekleştirilmiştir. RNA örnekleri RNazsız suda 500 ng/8 µl olacak şekilde hazırlanarak ve üzerine 2 µl GE ilave edilmiştir. 42°C’de 5 dk. bekletildikten sonra buz üzerine alınarak ve en az 1 dk bekletilerek RT kokteyli hazırlanmıştır. RT kokteyli, tek reaksiyon için 5x’lik revers transkripsiyon reaksiyonu tamponu, RNazsız su, primer ve eksternal kontrol karışımı ve revers transkriptaz enzim karışımından oluşturulmuştur. Buzla muamele edilmiş 10 µl GE’li RNA örneğine 10 µl RT kokteyli eklendikten sonra 42°C’de 15 dk. daha sonra 95°C’de 5 dk. inkübasyon ile cDNA sentezlenmiştir. Reaksiyon sonucu, 91 µl su, 1350 µl master mix, 102 µl dilue cDNA ve 1248 µl RNazsız ve DNazsız su rezervuarda birleştirilmiştir. Bu karışım her kuyuya 25 µl olacak şekilde pipet ucu sürekli değiştirilerek DNA hasarı sinyalizasyon PCR array’i plakasına yüklenmiştir. Kuyulardaki baloncukları gidermek amacıyla plaka 25000 rpm’de 1 dk. santrifüjlenerek, MxPro programında ROX ve SYBR green filtreleri seçilmiştir.

İnsan için tasarlanmış 96 kuyulu PCR array plakası DNA hasarı sinyalizasyon paneli kuyucuklarında DNA hasarı ile ilgili 84 gen barındırmaktadır. Bu genler; ATM/ATR sinyalizasyonu, DNA tamiri, apoptoz, hücre siklusunda yer alan genlerdir ve işlevlerine göre aşağıda liste halinde verilmiştir.

ATM/ATR Signaling: ATM, ATR, ATRIP, BARD1, BRCA1, CDC25A, CHEK1, CHEK2 (RAD53), CSNK2A2, FANCD2, H2AFX, HUS1, MDC1, PARP1 (ADPRT1), RAD1, RAD17, RAD50, RAD9A, RBBP8, RNF168, RNF8, SMC1A, TOPBP1, TP53.

DNA Repair:

Nucleotide Excision Repair: CDK7, DDB1, DDB2, ERCC1, ERCC2 (XPD),
LIG1, NTHL1, OGG1, PCNA, PNKP, RPA1, SIRT1, TP53, XPA, XPC.

Base-Excision Repair: APEX1, FEN1, LIG1, MBD4, MPG, NTHL1, OGG1,
PARP1 (ADPRT1), PCNA, TP53, UNG, XRCC1.

Mismatch Repair: ABL1, EXO1, MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, PCNA, PMS1,
PMS2,

Double Strand Break Repair: ATM, BLM, BRCA1, CHEK1, H2AFX, HUS1,
LIG1, MDC1, MLH1, MRE11A, NBN (NBS1), PRKDC, RAD50, RAD51, RPA1,
TP53BP1, XRCC2, XRCC6 (G22P1).

Other Genes: ATR, ATRIP, ATRX, BARD1, BRIP1, CHEK2 (RAD53), CIB1,
CRY1, FANCA, FANCD2, FANCG, GADD45A, GADD45G, RAD1, RAD17, RAD18,
RAD21, RAD51B, RAD9A, RBBP8, REV1, RNF168, RNF8, SMC1A, SUMO1,
TOPBP1, XRCC3.

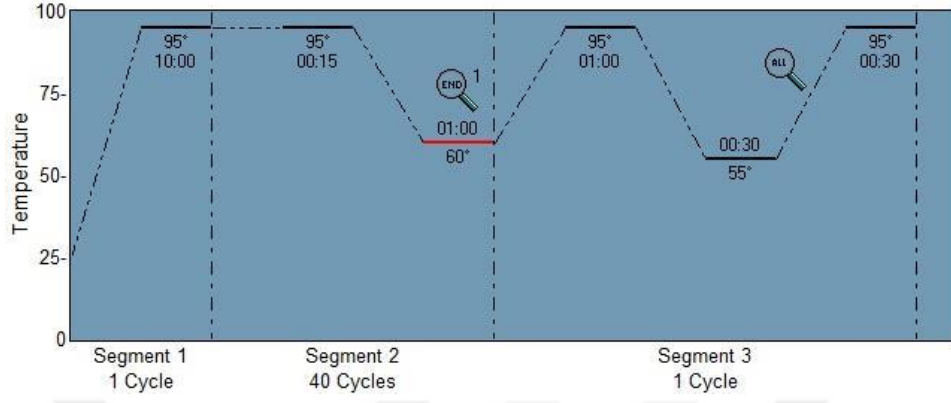
Apoptosis: ABL1, ATM, BARD1, BAX, BBC3, BRCA1, CDKN1A
(p21CIP1/WAF1), CHEK2 (RAD53), CIB1, CSNK2A2, PPP1R15A (GADD34),
PRKDC, RAD21, RAD9A, SIRT1, TP53.

Cell Cycle: ATM, ATR, ATRIP, CDC25A, CDC25C, CDK7, CDKN1A
(p21CIP1/WAF1), CHEK1, CHEK2 (RAD53), DDIT3 (GADD153/CHOP), MAPK12,
MCPH1, MDC1, PPM1D (http-3).

3.4.6. Real time PCR analiz

- ✓ cDNA sentezinden sonra PCR tüpleri soğuk bloğa alınmıştır.
- ✓ Başka bir PCR tüpünün içerisine 90 µl RNase-DNase free water konur ve üzerine 10 µl cDNA eklenir.
- ✓ cDNA'lar 1/10 oranında dilüe edilir.
- ✓ Real time PCR miksi hazırlanır (Primer prob 1 µl, master miks 10 µl, H2O 4 µl).
- ✓ Real time PCR miksinden 15 µl, dilüe edilmiş cDNA'lardan 5 µl toplamda 20 µl hacime sahip karışım her bir gen için hazırlanmıştır.
- ✓ Bu karışım her kuyuya 20 µl, olacak şekilde pipet ucu sürekli değiştirilerek RT2 profiler PCR arrayi plakasına yüklendi.
- ✓ Kuyulardaki baloncukları gidermek amacıyla plaka 25000 rpm'de 1 dk. santrifüjlendi.
- ✓ Örnekler cihaza yüklenmiş ve real time pcr başlatılmıştır.

- ✓ MxPro programda ROX ve SYBR green filtreleri seçilerek termal profil Şekil 3.1’te belirtildiği gibi ayarlandı.

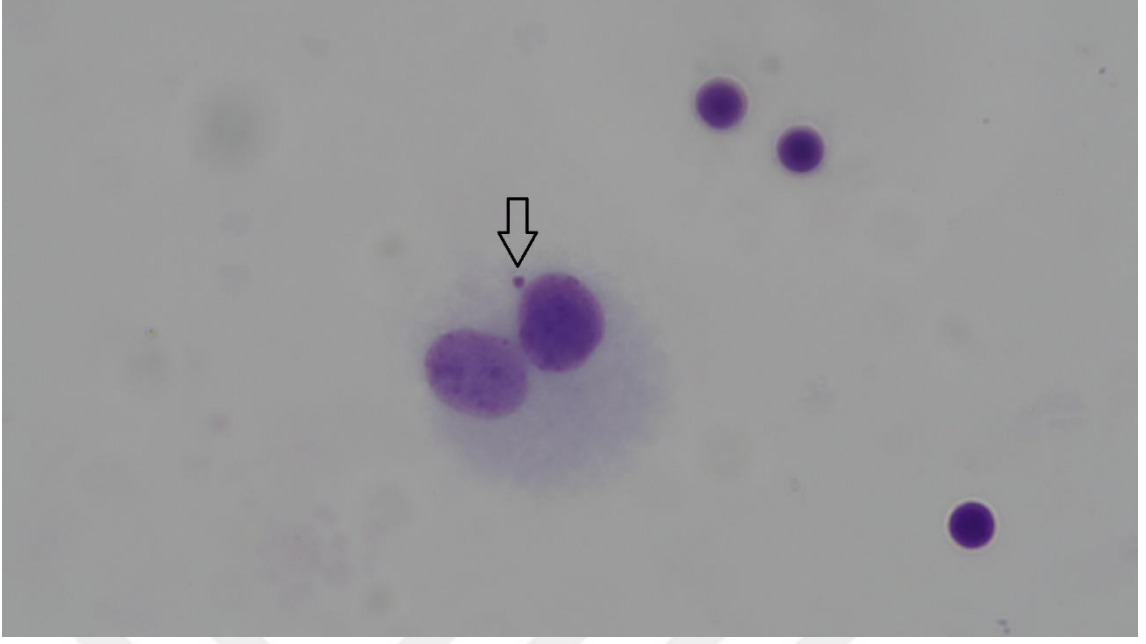


Şekil 3.1. Gerçek zamanlı RT-PCR termal profili

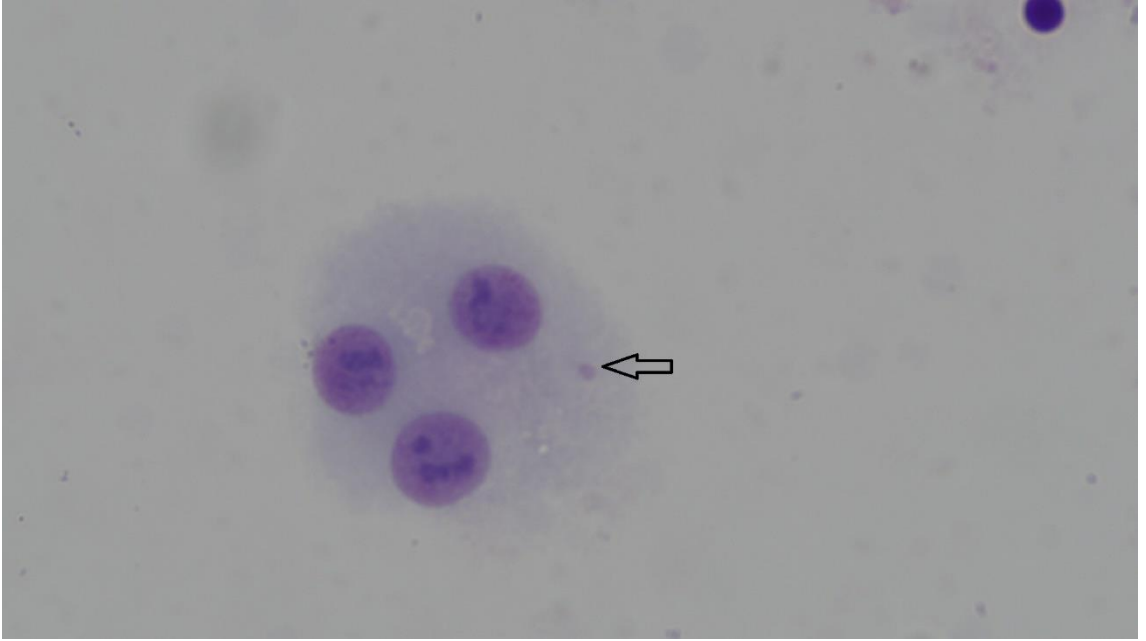
4. BULGULAR

4.1. Dexketoprofen Trometamolün Mikronukleus Oluşumu ve Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

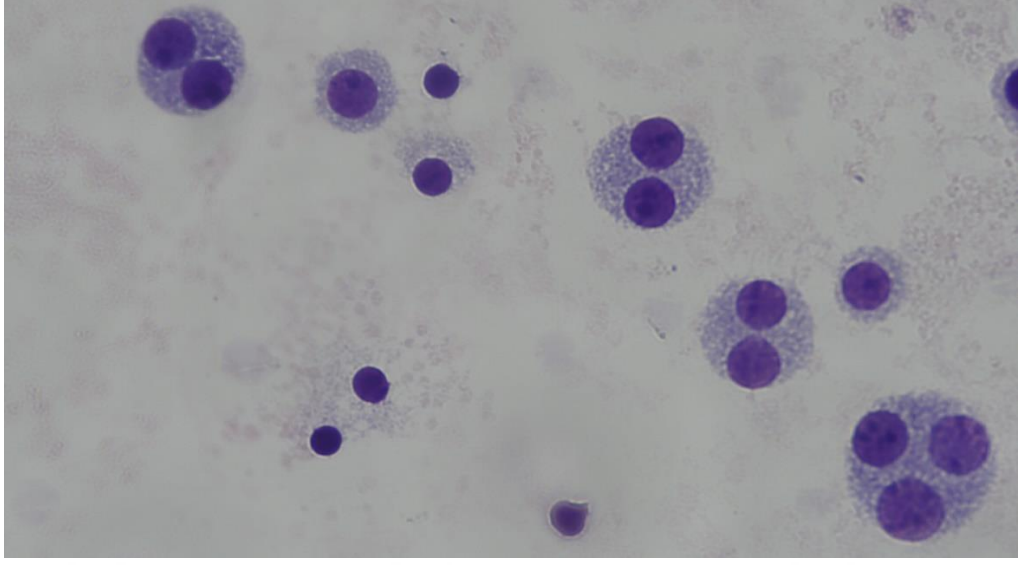
- Dexketoprofen trometamol'ün 1000,750,500,250 ve 100 µg /mL'lik dozlarına, 24 ve 48 saat maruz kalan insan lenfosit hücrelerinde, 1000 µg /mL'lik dozun her iki maruziyet süresi için de toksik etki gösterdiği ve 24 saatlik maruziyette LD₅₀ sınırını oluşturduğu saptanmıştır.
- Bunun yanı sıra 24 saatlik maruziyette toksik etki göstermeyen 750 µg /mL'lik konsantrasyonun, 48 saatlik uygulama süresi sonunda, hücreleri nekrotik bir sürece götürerek LD₅₀ özelliğine sahip olduğu tespit edilmiştir.
- Genotoksik etkiyi belirlemeye yönelik çalışmaların, toksik olmayan dozlarla yapılması gerektiği için, 1000 µg /mL'lik konsantrasyon hücre yapısını bozduğu ve bölünmeyi durdurduğu için, CPI ve MN sayımlarında değerlendirmeye alınamamıştır.
- Aynı etki, 750 µg /mL'lik dozun 48 saat uygulanması ile ortaya çıktığı için, yine CPI ve MN sayımlarında herhangi bir değer kaydedilememiştir.
- Bu veriler, Dexketoprofen trometamol'ün 1000 µg /mL'lik dozunun her iki sürede, 750 µg /mL'lik dozunun ise sadece 48 saatlik muamelede, insan lenfosit hücreleri üzerinde sitotoksik ve sitostatik etkilere sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 4.4-4.5).
- Buna rağmen, daha düşük olan dozların (500µg /mL, 250µg /mL, 100µg/ mL) lenfosit hücrelerinin yaşamsal faaliyetlerine ve çoğalma döngülerine herhangi bir etkisi olmadığı, CPI değerlerinin kontrole göre anlamlı bir fark göstermemesiyle ortaya çıkmıştır (Tablo 4.1-4.5 ve Şekil 4.4-4.5).
- Dexketoprofen trometamol'ün kromozomal hasar oluşturmak suretiyle, mikronukleus yapısını meydana getirme potansiyeli değerlendirilecek olursa, 24 saatlik maruziyet süresinde, 750 ve 500 µg /mL'lik konsantrasyonların, 48 saatlik maruziyet süresi sonunda ise 500 µg /mL'lik dozun zayıf bir klastojenik aktiviteye sahip olduğu söylenebilir (Tablo 4.1-4.5 ve Şekil 4.4-4.5).
- Zira bu uygulamalar sonrasında elde edilen verilerin spontan kontrol değerleriyle karşılaştırılması sonucunda, istatistiksel olarak, * $P \leq 0.05$ anlamlılık değeri bulunmuştur. Pozitif kontrol uygulamasından elde edilen sonuçların anlamlılık derecesi ise ** $P \leq 0.01$, ve *** $P \leq 0.001$ düzeyinde olmuştur (Tablo 4.1-4.5).



Şekil 4.1. *Mikronukleuslu binükleat hücre (40x)*



Şekil 4.2. *Tek mikronukleuslu çok çekirdekli hücre (40x)*



Şekil 4.3. Tek çekirdekli, iki çekirdekli ve üç çekirdekli hücreler (40x)

Tablo 4.1. Birinci donörden sağlanan lenfosit hücrelerinin, Dexketoprofen trometamol ile 24 ve 48 saat muamelesi sonucu elde edilen MN ve CPI değerleri

Süre	24 saat						
Madde	Doz (µg/ml)	Sayılan hücre s.	Tek N. hücre s.	İki N. hücre s.	Çok N. hücre s.	MN sayısı	CPI
Spontan	-	1000	711	240	49	2	1.338
Pozitif kont. (MMC)	0.3	1000	882	116	2	14	1.120
Dexketo profen trometamol	750	1000	801	198	-	8	1.200
	500	1000	713	283	4	5	1.291
	250	1000	672	315	13	4	1.341
	100	1000	640	330	30	6	1.390
Süre	48 saat						
Madde	Doz (µg/ml)	Sayılan hücre s.	Tek N. hücre s.	İki N. hücre s.	Çok N. hücre	MN sayısı	CPI
Spontan	-	1000	711	240	49	3	1.279
Pozitif kont. (MMC)	0.3	1000	992	8	-	25	1.002
Dexketo profen trometamol	750	-	-	-	-	-	-
	500	1000	866	130	4	5	1.138
	250	1000	847	152	1	6	1.154
	100	1000	702	276	22	7	1.320

Tablo 4.2 İkinci donörden sağlanan lenfosit hücrelerinin, Dexketoprofen trometamol ile 24 ve 48 saat muamelesi sonucu elde edilen MN ve CPI değerleri

Süre	24 saat						
Madde	Doz (µg/ml)	Sayılan hücre s.	Tek N. hücre s.	İki N. hücre s.	Çok N. hücre s.	MN sayısı	CPI
Spontan	-	1000	755	220	25	5	1.270
Pozitif kont. (MMC)	0.3	1000	895	105	-	22	1.105
Dexketo profen trometamol	750	1000	968	32	-	13	1.032
	500	1000	898	102	-	7	1.102
	250	1000	882	115	3	3	1.121
	100	1000	851	144	5	3	1.154
Süre	48 saat						
Madde	Doz (µg/ml)	Sayılan hücre s.	Tek N. hücre s.	İki N. hücre s.	Çok N. hücre	MN sayısı	CPI
Spontan	-	1000	788	195	17	6	1.229
Pozitif kont (MMC)	0.3	1000	983	17	-	31	1.017
Dexketo profen trometamol	750	-	-	-	-	-	-
	500	1000	969	31	-	8	1.031
	250	1000	846	152	2	7	1.156
	100	1000	804	185	11	5	1.207

Tablo 4.3. Üçüncü donörden sağlanan lenfosit hücrelerinin, Dexketoprofen trometamol ile 24 ve 48 saat muamelesi sonucu elde edilen MN ve CPI değerleri

Süre	24 saat						
Madde	Doz (µg/ml)	Sayılan hücre s.	Tek N. hücre s.	İki N. hücre s.	Çok N. hücre s.	MN sayısı	CPI
Spontan	-	1000	780	205	15	5	1.235
Pozitif kont. (MMC)	0.3	1000	900	100	2	20	1.104
Dexketo profen trometamol	750	1000	604	395	1	9	1.397
	500	1000	585	378	37	6	1.452
	250	1000	585	395	20	5	1.435
	100	1000	693	277	30	5	1.337
Süre	48 saat						
Madde	Doz (µg/ml)	Sayılan hücre s.	Tek N. hücre s.	İki N. hücre s.	Çok N. hücre	MN sayısı	CPI
Spontan	-	1000	755	203	42	5	1.287
Pozitif kont (MMC)	0.3	1000	990	10	-	34	1.010
Dexketo profen trometamol	750	-	-	-	-	-	-
	500	1000	910	90	-	7	1.090
	250	1000	670	314	16	6	1.346
	100	1000	747	238	15	6	1.268

Tablo 4.4. Dördüncü donörden sağlanan lenfosit hücrelerinin, Dexketoprofen trometamol ile 24 ve 48 saat muamelesi sonucu elde edilen MN ve CPI değerleri

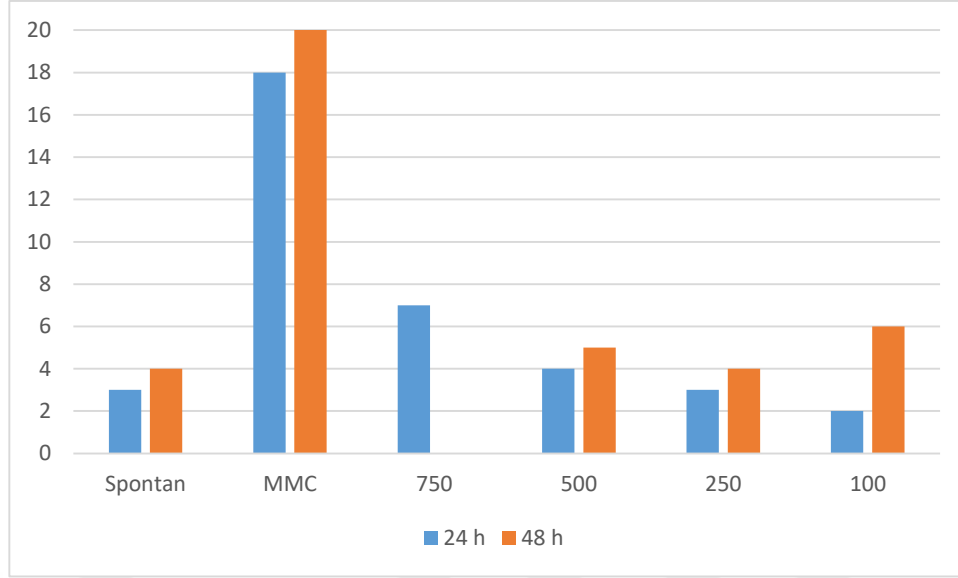
Süre	24 saat						
Madde	Doz (µg/ml)	Sayılan hücre s.	Tek N. hücre s.	İki N. hücre s.	Çok N. hücre s.	MN sayısı	CPI
Spontan	-	1000	795	185	20	3	1.225
Pozitif kont (MMC)	0.3	1000	888	112	-	18	1.112
Dexketo profen trometamol	750	1000	883	117	-	7	1.117
	500	1000	778	218	4	4	1.226
	250	1000	666	325	9	3	1.343
	100	1000	691	274	35	2	1.344
Süre	48 saat						
Madde	Doz (µg/ml)	Sayılan hücre s.	Tek N. hücre s.	İki N. hücre s.	Çok N. hücre	MN sayısı	CPI
Spontan	-	1000	800	178	22	4	1.222
Pozitif kont (MMC)	0.3	1000	975	25	-	29	1.025
Dexketo profen trometamol	750	-	-	-	-	-	-
	500	1000	777	222	1	5	1.224
	250	1000	725	258	17	4	1.292
	100	1000	679	270	51	6	1.372

Tablo 4.5. İnsan lenfosit hücrelerinin, Dexketoprofen trometamol ile 24 ve 48 saat muamelesi sonucu elde edilen ortalama MN ve CPI değerleri

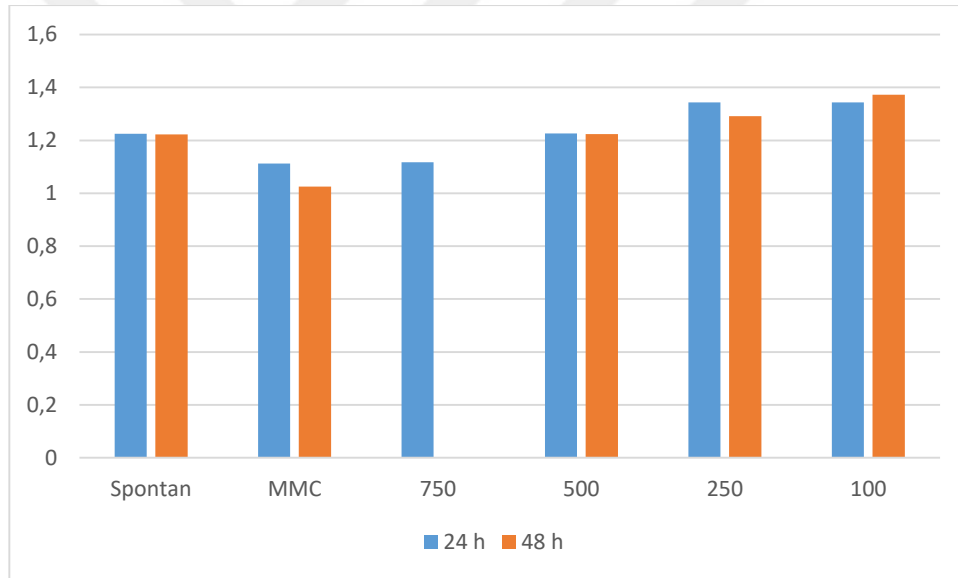
24 saat				
Madde	Doz (µg/ml)	İncelenen hücre s.	ort.MN (±SS)	ort. CPI (±SS)
Spontan	-	4000	3.75±1.50	1.26±0.04
Pozitif kont (MMC)	0.3	4000	18.50±3.41***	1.10±0.00**
Dexketo profen trometamol	750	4000	9.25±2.62*	1.18±0.15
	500	4000	5.50±1.29*	1.26±0.14
	250	4000	3.75±0.95	1.29±0.13
	100	4000	4.00±1.82	1.30±0.10
48 saat				
Madde	Doz (µg/ml)	İncelenen hücre s.	ort.MN (±SS)	ort. CPI (±SS)
Spontan	-	4000	4.5±1.29	1.24±0.03
Pozitif kont (MMC)	0.3	4000	29.75±3.77***	1.01±0.00***
Dexketo profen trometamol	750	toksik	-	-
	500	4000	6.25±1.50*	1.11±0.07
	250	4000	5.75±2.06	1.23±0.09
	100	4000	6.00±0.81	1.28±0.07

MN: Mikronukleus, MMC: Mitomisin-c, CPI: Hücre Proliferasyon İndeksi
± SS: Standart sapma değerleri

* P ≤ 0.05, ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0.001 (Paired sample-Student's t- test)



Şekil 4.4. Dexketoprofen trometamolün ortalama MN sayısı üzerine etkisi



Şekil4.5. Dexketoprofen trometamolün ortalama CBPI değerleri üzerine etkisi

4.2. Dexketoprofen Trometamolün DNA Hasarı Üzerine Etkisi

Dexketoprofen trometamol ile muamele edilen insan periferik lenfosit hücrelerindeki DNA hasarı, Comet yöntemi ile değerlendirilmiştir. Etken maddenin farklı dozları (1000,500,250 ve 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ile 1 saat muamele edilen hücrelerde DNA kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu değerleri, spontan kontrol değerlerine göre çok anlamlı ölçüde artış göstermiştir. Dexketoprofen trometamol'ün Comet parametreleri her bir doz için 200 adet hücrede incelenmiş ve analiz edilmiş daha sonra aynı sayıda kontrol verisi ile karşılaştırılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler

sırasıyla, Comet ortalaması (Comet mean), kuyruk uzunluğu (tail length), kuyruk yoğunluğu (tail intensity) için yapılmıştır. Belirlenen bu parametreler için yapılan istatistiksel analizlerde kontrol grubu ile madde uygulanmış gruplar arasında istatistiksel olarak önemli farkların (***) $P \leq 0.001$ bulunduğu tespit edilmiştir. Kuyruk uzunluğu ve yoğunluğundaki artış, DNA ipliğinde tek ya da çift zincir kırılmalarıyla gerçekleşen DNA hasarının göstergesidir. İnsan periferik lenfosit hücrelerinde dexketoprofen trometamol maruziyetiyle ortaya çıkan bu etkinin, uygulanan tüm dozlarda (1000-500-250 ve 100 µg /mL) oldukça yüksek düzeyde (***) $P \leq 0.001$ olması dikkat çekicidir.

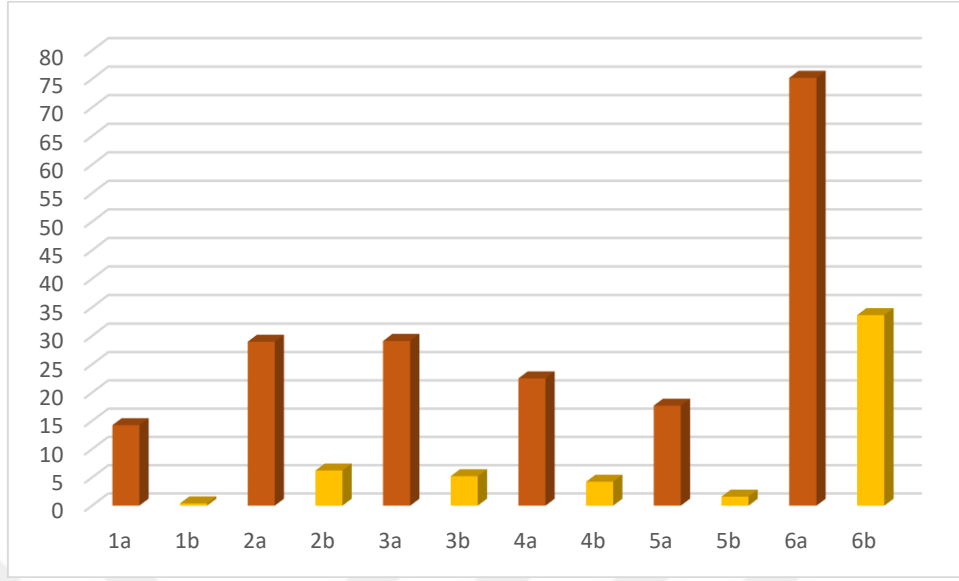
Tablo 4.6 Dexketoprofen trometamolün tüm dozlarının 1 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde DNA hasarı

Dozlar (µH/ml) N: hücre sayısı	Kuyruk Uzunluğu		Kuyruk Yoğunluğu	
	MEAN±SD değeri	P	MEAN ± SD değeri	P
DEX 1000 N:200	28.97 ± 26.03	***	6.21±12.17	***
DEX 500 N:200	29.10 ±27.17	***	5.20 ±10.42	***
DEX 250 N:200	2.51 ± 22.30	***	0.41 ± 1.47	***
DEX 100 N:200	17.69 ±13.38	***	1.59 ± 4.35	***
H₂O₂ N:50	75.19 ±8.88	***	3.63 ± 9.16	***
SPONTAN N:200	14.23 ± 5.65		0.41± 1.47	

DEX: Dexketoprofen trometamol,

H₂O₂: Hidrojen Peroksit, N: Hücre sayısı, Mean: ortalama

SD: Standart sapma değerleri * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ (Independent samples –two tail- Student’s t- test)



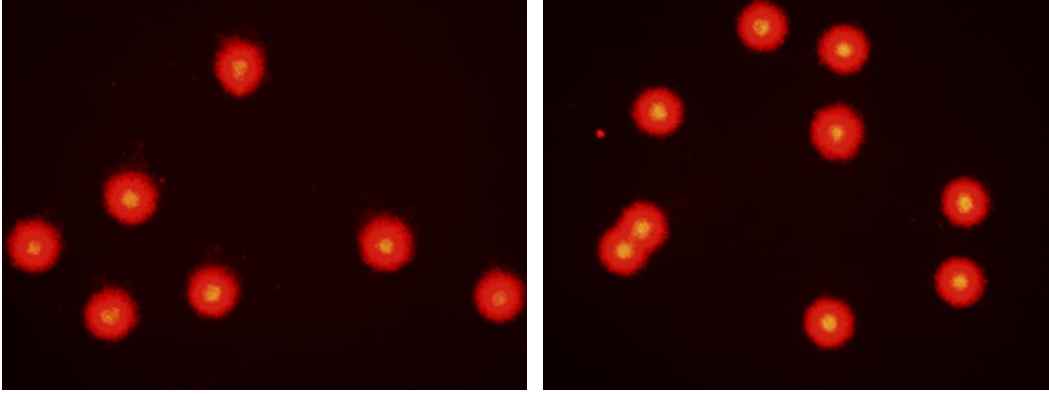
- 1a. Kontrol: kuyruk uzunluğu ortalaması
 1b. Kontrol: kuyruk yoğunluğu ortalaması
 2a. dexketoprofen trometamol 1000µg/ml: kuyruk uzunluğu ortalaması
 2b. Dexketoprofen trometamol 1000µg/ml: kuyruk yoğunluğu ortalaması
 3a. dexketoprofen trometamol 500µg/ml: kuyruk uzunluğu ortalaması
 3b. dexketoprofen trometamol 500µg/ml: kuyruk yoğunluğu ortalaması
 4a. dexketoprofen trometamol 2500µg/ml: kuyruk uzunluğu ortalaması
 4b. dexketoprofen trometamol 250µg/ml: kuyruk yoğunluğu ortalaması
 5a. dexketoprofen trometamol 100µg/ml: kuyruk uzunluğu ortalaması
 5b. dexketoprofen trometamol 100µg/ml: kuyruk yoğunluğu ortalaması
 6a. H₂O₂: kuyruk uzunluğu ortalaması
 6b. H₂O₂: kuyruk yoğunluğu ortalaması

Şekil 4.6. Farklı dozlarda Dexketoprofen trometamol ile 1 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerindeki DNA hasarının kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğunun kontrol ile karşılaştırılması

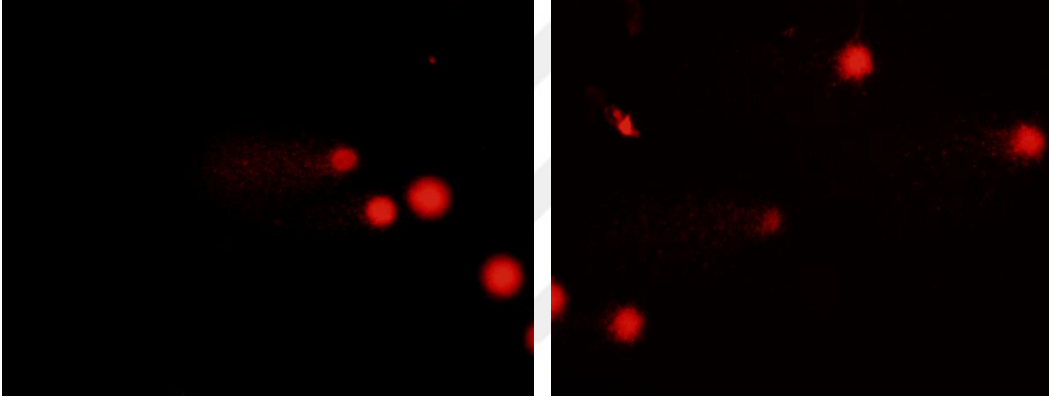
Dexketoprofen trometamol her kişinin her muamele grubu ve kontrol grupları toplam 200 olacak şekilde hücreler incelenmiş ve cometler tespit edilmiştir. Dört donörle yapılan deneyler sonucunda, her doz ve madde için 50 hücre sayılmış, hücredeki cometlerin sayısı spontan ve pozitif kontrolle karşılaştırılarak 1 saatlik sürelerdeki kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunlukları arasında anlamlılık değerleri, standart sapmalara bağlı olarak değerlendirilmiştir.

Comet parametreleri arasında belirleyici özelliğe sahip olan kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu ortalamaları için çizelgeler ve şekil hazırlanmıştır (Şekil 4.6). Çizelgelerde görüldüğü gibi tüm dozlarda kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu spontan kontrole göre ciddi şekilde artırmış hücredeki DNA'nın yapısını bozduğunu ve hasar oluşturduğunu göstermiştir. Hasarın tespiti için floresan bir boya olan EtBr kullanılmış ve flüoresans mikroskopunda inceleme yapılarak fotoğraflanmış ve Comet Görüntü

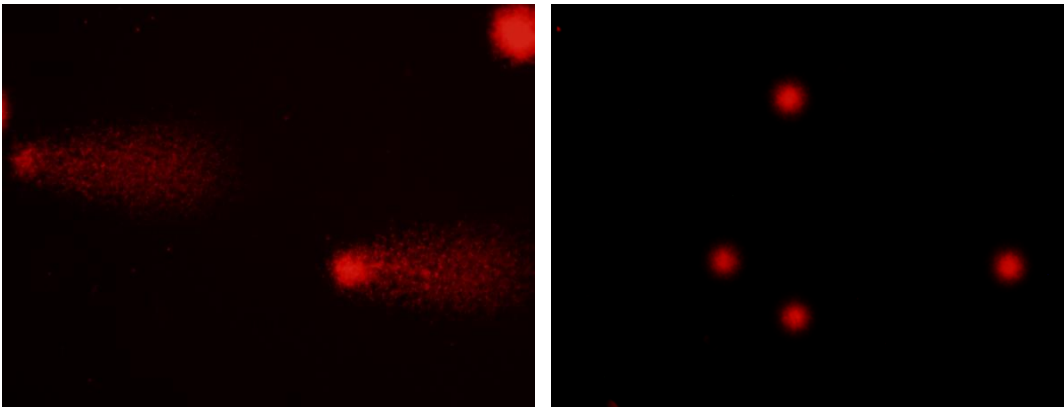
İşleme ve Analiz Programı Sistemi Programı (Comet IV) kullanılarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.7-4.12).



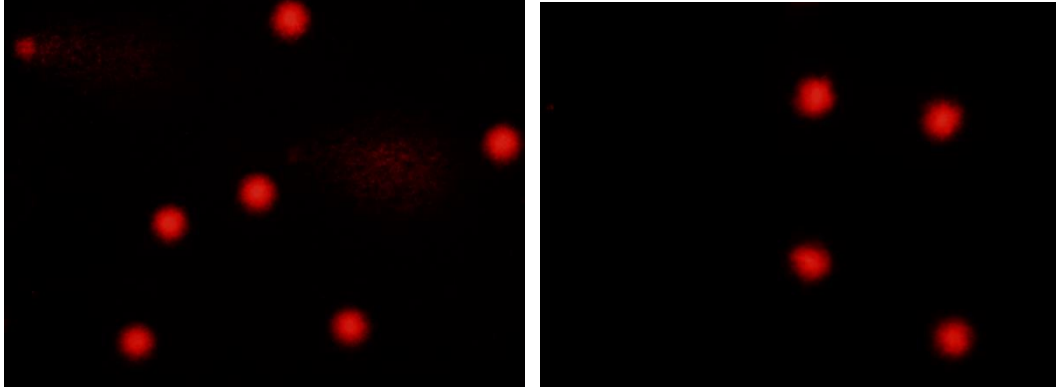
Şekil 4.7. Kontrol grubunda değerlendirmeye alınan hücreler (40X)



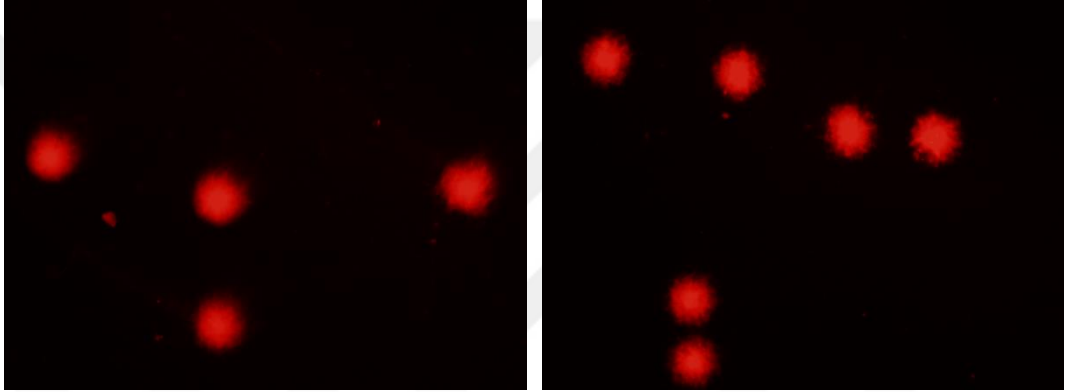
Şekil 4.8. Dextetopropfen trometamolün 1000 µg/mL dozunda 1 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde DNA hasarında değerlendirmeye alınan hücreler (40X)



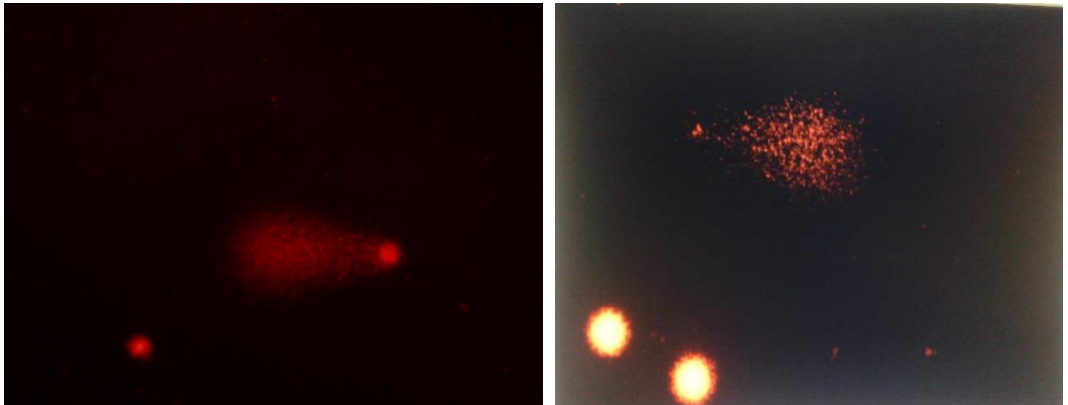
Şekil 4.9. Dextetopropfen trometamolün 500 µg/mL dozunda 1 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde DNA hasarında değerlendirmeye alınan hücreler (40X)



Şekil 4.10. Dextropropofen trometamolün 250 µg/mL dozunda 1 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde DNA hasarında değerlendirmeye alınan hücreler (40X)



Şekil 4.11. Dextropropofen trometamolün 100 µg/mL dozunda 1 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde DNA hasarında değerlendirmeye alınan hücreler (40X)



Şekil 4.12. Dextropropofen trometamolün H₂O₂ ile 1 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde DNA hasarında değerlendirmeye alınan hücreler (40X)

Tüm veriler Comet IV analiz programı ile değerlendirilerek, hasarlı hücrelerin, kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu gibi comet parametreleri ölçülmüş, elde edilen değerler kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak istatistiksel veriler elde edilmiştir. İstatistiksel

değerlendirmede SPSS programında yer alan, two-tail Student t-test (independent samples test) kullanılmıştır. Dexketoprofen trometamol'ün tüm dozlarının 1 saatlik maruziyetlerinin spontan kontrol grubu değerleriyle karşılaştırılması sonucunda, DNA kuyruk uzunluğu ve yoğunluğu parametrelerinde istatistiksel olarak çok anlamlı farklar bulunmuştur.

4.3 Dexketoprofen trometamol'ün DNA Hasar Yolağıyla İlgili Genlerde Anlatımın Gerçek Zamanlı RT-PCR İle Analizi

Dexketoprofen trometamol ile muamele edilen lenfosit hücrelerinde DNA hasar yolağında iş gören genlerin isimleri, 96 kuyulu plakada bulunduğu yerleri Şekil 4.13'te verilmektedir.

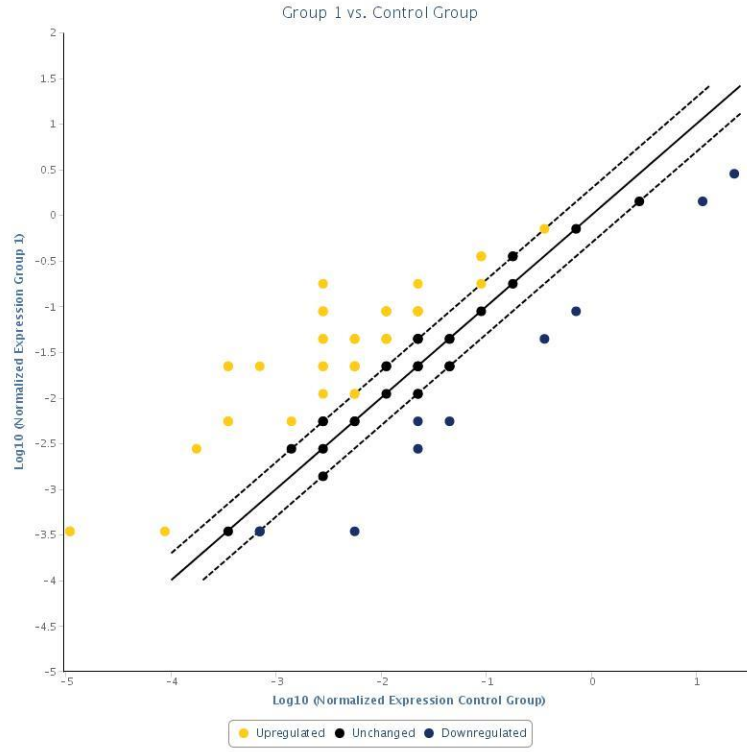
ABL1 A01	ANKRD17 A02	APEX1 A03	ATM A04	ATR A05	ATR A06	BRCA1 A07	BTG2 A08	CCNH A09	CDK7 A10	CHEK1 A11	CHEK2 A12
CIB1 B01	CIDEA B02	CRY1 B03	DDIT3 B04	DDIT3 B05	DMC1 B06	ERCC1 B07	ERCC2 B08	EXO1 B09	FANCG B10	FEN1 B11	XRCC8 B12
GADD45A C01	GADD45G C02	GML C03	GTF2H1 C04	GTF2H2 C05	GTSE1 C06	HUS1 C07	IGHMBP2 C08	IP6K3 C09	XRCC8BP1 C10	LIG1 C11	MAP2K6 C12
MAPK12 D01	MBD4 D02	MLH1 D03	MLH3 D04	MNAT1 D05	MPG D06	MRE11A D07	MSH2 D08	MSH3 D09	MUTYH D10	N4BP2 D11	NBN D12
INTL1 E01	OGG1 E02	PCBP4 E03	PCNA E04	AIFM1 E05	PMS1 E06	PMS2 E07	PMS2P3 E08	PNKP E09	PPP1R15A E10	PRKDC E11	RAD1 E12
RAD17 F01	RAD18 F02	RAD21 F03	RAD50 F04	RAD51 F05	RAD51B F06	RAD9A F07	RBBP8 F08	REV1 F09	RPA1 F10	SEMA4A F11	SESN1 F12
SMC1A G01	SUMO1 G02	TP53 G03	TP73 G04	TREX1 G05	UNG G06	XPA G07	XPC G08	XRCC1 G09	XRCC2 G10	XRCC3 G11	ZAK G12
B2M H01	HPRT1 H02	RPL13A H03	GAPDH H04	ACTB H05	HGDC H06	RTC H07	RTC H08	RTC H09	PPC H10	PPC H11	PPC H12

Şekil 4.13. DNA hasar yolağında yer alan genlerin plakadaki yerleri (http-4)

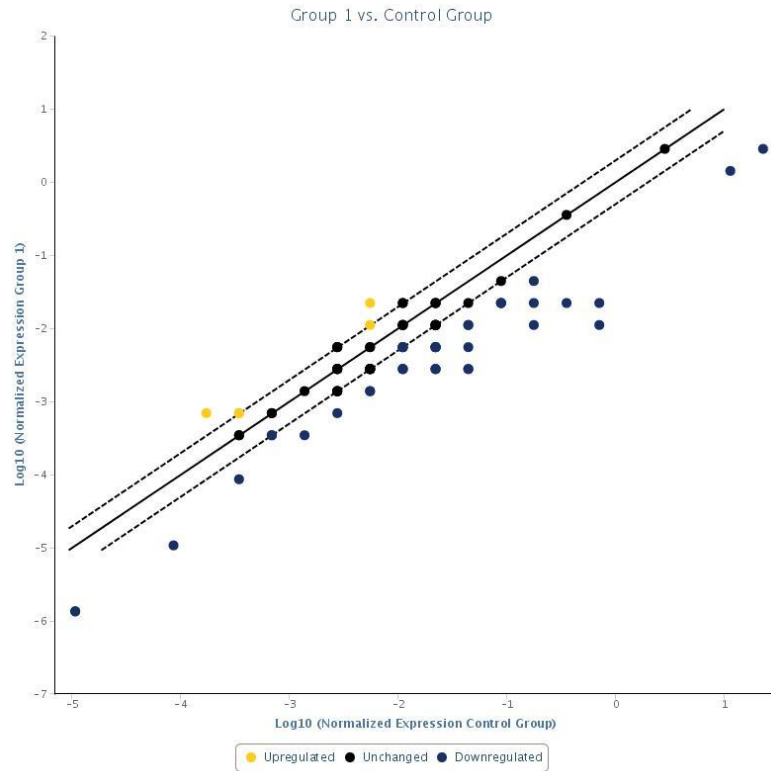
Bu deney için uygulanan ve lenfositler üzerindeki etkisi araştırılan dexketoprofen trometamolün en yüksek 750 µg/mL ve en düşük 100µg/mL dozları seçilerek 1 saatlik etken maddeye maruz kalmasıyla DNA hasar yolağındaki genlerde meydana getirdiği hasar belirlenmiştir. 2 donörün olduğu deneyde 2,5 kat ve üzerinin eşik değeri olarak belirlendiği upregule/down regule olan genler plot/plot grafiğiyle elde edilmiştir.

Şekil 4.14 ve şekil 4.15' te biri erkek biri bayan olan sağlıklı donörlere 750 µg/mL etken madde uygulaması sonunda genlerin seviyelerinde meydana getirdiği grafikler verilmiştir.

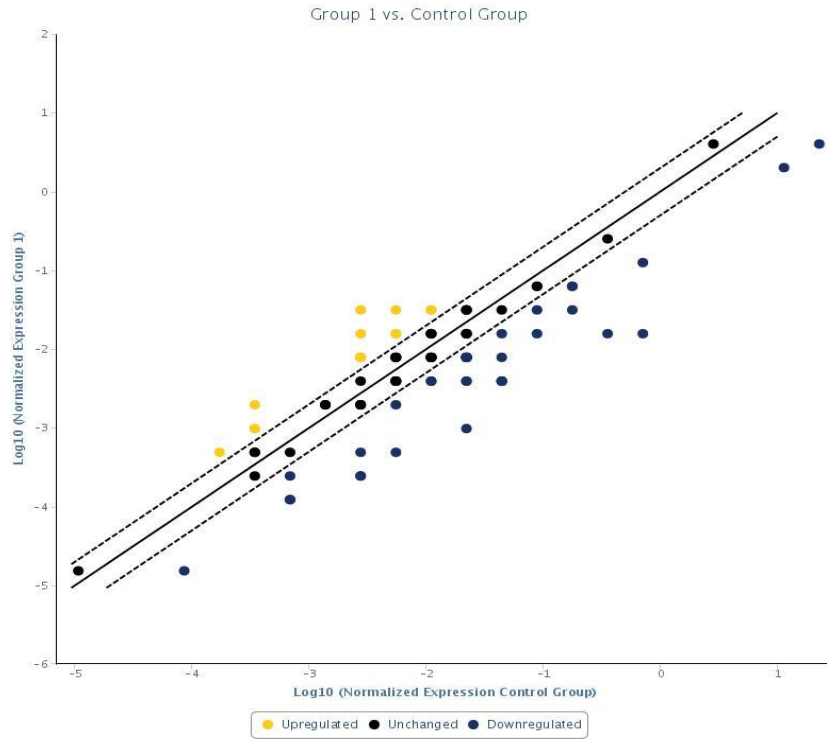
Şekil 4.16 ve şekil 4.17 de biri erkek biri bayan olan sağlıklı donörlere 100 µg/mL etken madde uygulaması sonunda genlerin seviyelerinde meydana getirdiği grafikler verilmiştir.



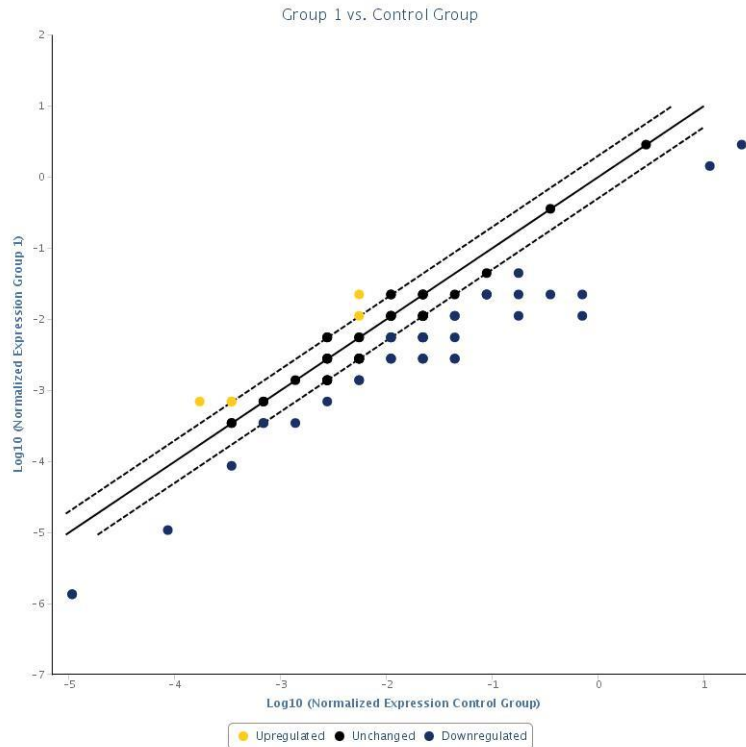
Şekil 4.14. Birinci donörün lenfosit hücrelerine uygulanan 750 µg/mL etken maddenin gen seviyelerinde meydana getirdiği etki



Şekil 4. 15. İkinci donörün lenfosit hücrelerine uygulanan 750 µg/mL etken maddenin gen seviyelerinde meydana getirdiği etki



Şekil 4.16. Birinci donörün lenfosit hücrelerine uygulanan 100 µg/mL etken maddenin gen seviyelerinde meydana getirdiği etki



Şekil 4.17. İkinci donörün lenfosit hücrelerine uygulanan 100 µg/mL etken maddenin gen seviyelerinde meydana getirdiği etki

750 µg/mL dexketoprofen trometol uygulaması sonucunda elde edilen verilerde DNA hasar sinyal yolağı plakasında yer alan ve ortak olarak seviyesini artıran genler XPC, XRCC6, PNKP olarak belirlenmiş, gen anlatımını azaltan ortak genlerin RBBP8, PRKDC, NBN, MCPHI, MCPH1, CDKN1A, DDIT3, PPP1R15A olduğu saptanmıştır. 100 µg/mL dexketoprofen trometamol uygulaması sonucunda elde edilen verilerde DNA hasar sinyal yolağı plakasında yer alan ve ortak olarak seviyesini artıran genler XPC, XRCC6 olarak belirlenmiştir. İkinci donörden bağımsız olarak düşünüldüğünde bazı genlerin anlatımını aşırı artırdığı da gözlenmiştir. Bu genler GADD45G, PNKP genleridir.

Gen anlatımını azaltan ortak genlerin DDIT3, FEN1, NBN, UNG, B2M, RPLP0 olduğu saptanmıştır. İkinci dönordan elde edilen veriler tek başına değerlendirildiğinde CDKN1A, MCPH1, NBN, PRKDC, DDIT3, PPP1R15A gibi genlerin ifadelerinde yüksek oranlarda azalma görülmüştür.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünya’da ilaç kullanımı periyodik bir artış göstermektedir. Bu bilinçsiz tüketim, yan etki vb. çeşitli sorunları da beraberinde getirerek, insan sağlığını tehlikeye sokmaktadır. İnsanların bilinçsiz olarak tükettiği ilaçların başında ağrı kesiciler gelmektedir. Ağrıların farklı sebepleri ve mekanizmaları nedeniyle kullanılan ağrı kesici ilaçların da çeşitliliği artmıştır. NSAİ (Non steroid anti inflamatuvar) ilaçlar dünya çapında en çok kullanılan ağrı kesici ilaçlardan biridir. NSAİ grubu ilaçlar, farklı mekanizmalara etki edebildikleri için birçok farklı ağrı tipinde rutin olarak ve yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar (Hanna vd. 2003). Deksketoprofen, nonsteroidal bir ilaç olup ketoprofenin aktif enantiomeridir. Deksketopropene trometamol eklenmesiyle ilaç çözünürlüğü artırılarak, daha hızlı absorpsiyon ile kısa sürede uygun plazma konsantrasyonuna ulaşması sağlanmıştır (Moore ve Barden, 2008). Ağrı kesiciler içerisinde yer alan etken maddeler bu şekilde daha hızlı etki etme özelliğine kavuşabilmektedir. Ancak bunların insan hücrelerinde meydana getirebileceği sitotoksik ve genotoksik etkiler henüz çok iyi bilinmemektedir.

Yapılan literatür araştırmalarında, nonsteroidal ilaçların geneli de dahil olmak üzere Deksketoprofen ve türevlerinin hücreler üzerindeki toksisitesini ya da genotoksik potansiyelini ortaya koyan herhangi bir çalışmaya ulaşılamamıştır. Bu konudaki literatür bilgisi açığı oldukça büyüktür. İnsan kullanımında rutin olarak yer almış ilaç etken maddelerinin insan hücreleri üzerindeki sitotoksik etki düzeylerinin belirlenmesi ve sitotoksik olmayan konsantrasyonlarının ise genotoksik potansiyel yönünden sınanması gerekliliği bulunmaktadır.

Bu çalışmada, dexketoprofen trometomal’ün sağlıklı insan lenfosit hücrelerindeki klastojenik aktivitesi Sitokinez Bloklama Mikronuklues (CBMN) yöntemi ile, DNA tek ve çift ipliği üzerindeki genotoksik etkileri Comet testi ile, DNA onarım genlerinin ifade düzeyleri üzerine etkileri ise Gerçek Zamanlı Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyon Panel Sistemi (RT²- PCR Assay) ile araştırılmıştır.

Elde edilen bulgular ışığında, Dexketoprofen trometamol’ün 750,1000 µg /mL ve daha yüksek dozlarının *in vitro* koşullarda, sağlıklı insan lenfosit hücreleri üzerinde toksik etkiler oluşturabildiği, 750 ve 500 µg /mL’lik dozlarının ise MN oluşumunu düşük düzeyde de olsa yükselterek, kromozomal düzeyde (klastojenik) bir aktiviteye sahip olabildiği görülmüştür. Aynı zamanda, uygulanan Comet testi sonucunda, etken maddenin 1000,500,250 ve 100 µg /mL konsantrasyonlarda uygulandığı hücrelerde,

DNA kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu gibi Comet parametre değerlerini spontan kontrol değerlerine göre oldukça anlamlı ölçüde arttırmak suretiyle DNA'da iplik kırılması tipinde genetik hasar oluşturabildiği de saptanmıştır.

Diğer yandan DNA hasarlarının onarımı ile ilgili olan bir grup genin (ATM/ATR sinyal yolağı genleri, DNA tamir genleri, nükleotid tamir genleri, baz tamir genleri, yanlış eşleşme tamir genleri, çift zincir kırıklarını tamir genleri, apoptoz genleri, hücre siklusu genleri) ifadesindeki değişimler mRNA seviyesinde incelendiğinde ise, dexketoprofen trometamol maruziyetinin paneldeki genlerin birçoğunda ifade değişikliğine neden olduğu tespit edilmiştir.

Her iki vericiden sağlanan hücrelerde, uygulanan 750 ve 100 µg/mL dexketoprofen trometamol konsantrasyonlarının, ortak olarak, DNA hasar sinyal yolağı plakasında yer alan XPC, XRCC6 ve PNKP genlerinin ifade düzeylerini önemli ölçüde arttırmış olması, çalışmamızda bu genlerin diğer genler arasından ön plana çıkmasına neden olmuştur. Söz konusu genlerden XRCC6 geni, DNA çift zincir kırıkları onarım yolunda, XPC ve PNKP ise Nükleotit Kesip-Çıkarma Onarım yolunda görev yapmaktadır. Nükleotid Kesip-Çıkarma onarımı (NER), oldukça sıkı korunmuş, çok yönlü ve güçlü DNA onarım yoludur. Memeli NER'in moleküler mekanizması oldukça komplekstir ve bu mekanizmada farklı fonksiyonlara sahip birçok gen ve protein rol oynamaktadır (Koç, 2010).

Bu tez çalışmasına sağlık sektörü tarafından tedavi amaçlı olarak insan kullanımına sunulmuş olan bir ilaç etken maddesinin insan sağlığı açısından sorgulanması gerekliliğinden yola çıkılarak başlanmıştır. Piyasada satışı ve kullanımı, ilgili kuruluşlarca onaylanmış pek çok ilacın prospektüsünde bulunma zorunluluğu olmayan genotoksik etkilere ait veriler göz ardı edilmektedir.

Tez çalışmasında uygulanmış olan testler ile insanlarda çeşitli amaçlarla ve yaygın biçimde ağrı kesici ilaç etken maddesi olarak kullanılan dexketoprofen trometamol'ün sağlıklı insan hücreleri üzerinde, klastojenik ya da anöjenik etkiyle kromozomal hasarlar yaratabileceği, DNA iplik kırılmalarıyla çeşitli mutajenik etkiler oluşturabileceği ve DNA onarımıyla ilişkili gen ifade düzeylerinde meydana getirdiği değişimler ile genotoksik bir potansiyel taşıyabileceği bulgularına ulaşılmıştır.

İlerleyen süreçte, bu bilimsel verilerden oluşturulacak araştırma ürünlerinin, bu konuda eksikliği görülen ulusal ve uluslararası literatür bilgisine katkı sağlayacağı ve ilaç

kullanımında gözardı edilen genotoksik hasarlanma konusunda oluşturulması gereken toplumsal bilince de önemli bir vurgu yapacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmadan elde edilen veriler sayesinde, günlük hayatta sıkça tüketilen ağrı kesicilerden birine ait etken maddenin, insan genomu üzerinde meydana getirebileceği genotoksik riskler konusunda farklı bir bilinçlenme sağlanmış olacaktır.

Bu çalışma ile elde edilen sonuçların benzer ya da daha ileri çalışmalarla desteklenmesi ile yetersiz olan bilimsel verilerin ve bu yöndeki bilinçlenmenin artması temenni edilmektedir.



KAYNAKÇA

- Ak Ö, Gençer S. (2013) İnfeksiyon Hastalıklarında Antipiretik Kullanımı, *İç Hastalıkları Dergisi*; 20:1-11.
- Altuğ CÖ (2013). *Nonsteroidal Antiinflamatuar İlaçların Ağrı Kesici Olarak Etkinlikleri*, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anesteziyoloji Ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Bitirme Tezi, İzmir.
- Ardoin SP, Sundry JS.(2006). Update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Curr Opin Rheumatol*;18:221-26. 3.
- Aydınlı I.(2005). Ağrının Patofizyolojisi ; 26(özel ek B):8-13.
- Aykaç E. (2010). *Spinal Anestezi Altındaki Elektif Sezaryen Olgularında İv Deksketoprofen Trometamolün Postoperatif Analjezik Etkinliğinin Lornoksikam Ve Plasebo İle Karşılaştırılması*, Uzmanlık Tezi, Kırıkkale, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi.
- Aykaç E, Büyükkoçak Ü, Köse E.A., Sağsöz N (2012). Sezaryen İle Doğum Sonrası Ağrıda Deksketoprofen Trometamolün Analjezik Etkisinin Lornoksikam Ve Plasebo İle Karşılaştırılması, *Journal Of Anesthesia*; 20(2):80-85.
- Barbanoj MJ, Antonijoan RM, Gich I.(2001). Clinical pharmacokinetics of dexketoprofen. *Clin Pharmacokinet*;40(4):245-62.
- Bustin S.A., Mueller R. (2006). Real-time reverse transcription PCR and the detection of occult disease in colorectal cancer, *Molecular Aspects of Medicine*, 27,192–223.
- Cervantes-Ríos, E., Ortiz-Muniz, R., Martínez-Hernández, A.L., Cabrera-Rojó, L., Graniel-Guerrero, J., Rodríguez-Cruz, L., (2012). “Malnutrition and infection influence the peripheral blood reticulocyte micronuclei frequency in children”, *Mutat. Res.*, 731: 68-74.
- Cooper SA, Schachtel BP, Goldman E, Gelb S, Cohn P (1989). Ibuprofen and acetaminophen in the relief of acute pain: a randomized, double-blind, placebo-controlled study, *J Clin Pharmacol*, 29, 1026–1030.
- Crossley HL, Bergman SA, Wynn RL (1983). Nonsteroidal antiinflammatory agents in relieving dental pain: a review, *J Am Dent Assoc*, 106, 61–64.
- Çakmak, G. (2000), “Trafik Polisi ve taksi sürücülerini hava kirliliği maruziyetine yönelik idrarda 1-hidroksipiren değerlerinin, periferik lenfositlerde kromozomal aberasyon ve MÇ sıklığının araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 28-107.

- Çöçelli Pirbudak L., Bacaksız BD, Ovayolu N., (2008). Ağrı tedavisinde hemşirenin rolü, *Gaziantep Tıp Dergisi*, 14:53-58.
- Demirel S. ve Zamani AG. (2002). Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları, *Genel Tıp Dergisi* 12(3), 123-127.
- Dikici S., Baltacı D., Yılmaz A., Sayı S., Kara İH., (2012). İlk Basamak Sağlık Merkezine Başvuran Hastalarda Baş Ağrısının Özellikleri Ve Etkili Olabilecek Etmenlerin Belirlenmesi, *Dicle Tıp Dergisi*, 39(1): 35-41.
- Dikilitaş M, Koçyiğit A. (2010). Canlılarda “tek hücre jel elektroforez” yöntemi ile DNA hasar analizi (teknik not): comet analiz yöntemi., *HR. Ü.Z.F. Dergisi*; 14: 77- 89.
- Dionne RA, Gordon SM (1994) Nonsteroidal antiinflammatory drugs for acute paincontrol, *Dent Clin N Am*, 38, 645–667.
- Emir E. (2008). *Spinal vertable cerrahi sonrası hasta kontrollü analjezi yöntemi ile tromadol ve düşük doz tramodal-parasetamol kombinasyonunun karşılaştırılması*, Uzmanlık tezi, Denizli, Pamukkale Üniversitesi.
- Erdine S (2003). Ağrının Tanımı, Ed; Erdine S. Ağrı Sendromları ve Tedavisi 2: 1-6
- Fairbairn D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L., (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.*, 339: 37–59.
- Fenech M, (2000). “The *in vitro* micronucleus technique”, *Mutat. Res.*, 455 (1-2): 81-95.
- Fenech M., (2006). ‘Cytokinesis-Blok Mivronukleus Assay Evolves Into A ‘Cytoma’ Assay of chromosomal instability, Mitotic Dysfunction And Cell Death’, *Mutat. Res.*, 600:58-66.
- Fenech, M., (2007) “Cytokinesis-block micronucleus cytome assay”, *Nat. Protoc.*, 2(5):1084-1104.
- Fenech M ve Morley AA (1985). Measurent of micronuclei in lymphocytes, *Mutation research*, 147(1-2), 29-36.
- Güven G.S., Cuna T, Birinci N, Güven M , Onaran İ., Hacıhanefioğlu S. , Ulutin T., (2006). 17- β Estradiol ile indüklenen insan Lenfositlerindeki Mikronükleus Sıklığının incelenmesi, Araştırma, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* ; 37: 10 – 13.
- Habib S, Matthews RW, Scully C, Levers BG, Shepherd JP (1990) A study of the comparative efficacy of four common analgesics in the control of postsurgical dental pain, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 70, 559–563.

- Hacıbeyoğlu G. (2013). Tavşan Diz Eklemine Enjekte Edilen Deksketoprofen Trometamolün Histopatolojik Ve Biyokimyasal Etkilerinin Araştırılması,Uzmanlık tezi, Konya, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi.
- Hanna MH, Elliot KM, Stuart-Taylor ME, Roberts DR, Buggy D, Arthurs GJ (2003). Comparative study of analgesic efficacy and morphine-sparing effect of intramuscular dexketoprofen trometamol with ketoprofen or placebo after major orthopaedic surgery, *Br J Clin Pharmacol*, 55:126-133.
- Heavner JE, Wills WD. (2003). Pain Pathways: Anatomy and Physiology. In: Raj PP, Editor. *Pain Medicine*. 2nd Ed. St. Luis: Mosby, p. 10-15.
- Iohom G, Walsh M, Higgins G, Shorten G. (2002). Effect of perioperative administration of dexketoprofen on opioid requirements and inflammatory response following elective hip arthroplasty. *Br J Anaesth*;88(4):520-6.
- İnan N, Takmaz SA, iltar S, Yazıcı I, Başar H. (2009). Total Kalça Protezi Operasyonlarında İki Multimodal Analjezi Yönteminin Etkinliği. *Ağrı* ; 21(2): 69-74.
- Kadioğlu Aslı G., Türker G., Gurbet A., Demircii A., Hülagü İ. (2013). Elektif Laparotomi Sonrası Postoperatif Ağrı Tedavisinde Preemptif Deksketoprofenin Analjezik Etkinliği, *Türk Anaesth Reanim*,41:75-9.
- Kassie, F., Parzefall, W., Knasmuller, S., (2000). Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 463: 13–31.
- Kaya Ü., (2015). *Akut ağrıda dexketoprofen ve metamizolun sinerjistik etkileşimi*, Yüksek lisans tezi, Van, Yüzüncü Yıl Üniversitesi.
- Kayaalp O., (2002). *Tıbbi Farmakoloji*, Onuncu Baskı, Hacettepe Taş Yayınevi, Ankara.
- Kayaaltı S. (2014). *Abdominal Histerektomi Uygulanan Hastalarda Deksketoprofen Trometamol İle Deksmetomidin'in Preemptif Analjezik Etkilerinin Karşılaştırılması*. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji Ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Kayseri.
- Kawai S, Kojima F, Kusunoki N. (2005). Recent Advances in Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, [Allergology International](#), [Volume 54, Issue 2](#), Pages 209-215.
- Keskin A., (2014), *Operatif Stratejide Ağrının Rolü*;16,:42-43.

- Kirsch-Volders, M., Gina, P., Elhajouji, A., Lukamowicz, M., Gonzalez, L., Looock, K.V., Decordier, I.,(2011). “The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance”, *Arch. Toxicol.*, 85 (8): 873-899 .
- Koç E., (2010). *Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanserlerinde ‘Excision Repair Cross-Complementing Group 1’ (Erccl) Geni T19007c Ve C8092a Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin Klinikopatolojik Parametrelerle İlişkilerinin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Denizli, Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al (2006). The real-time polymerase chain reaction, *Mol Aspects Med* ;27:95-125.
- Luna-Bertos E, Ramos-torrecillas J., Manzano-Moreno FJ., Garcia-Martinez O., Ruiz C., (2015). Effect on growth of human osteoblast-like cells of three nonsteroidal anti-inflammatory drugs: metamizole, dexketoprofen and ketorolac, *Biological research for nursing*,17(1); 62-67.
- Mauleón D, Artigas R, García ML, Carganico G (1996). Preclinical and clinical development of dexketoprofen, *Drugs*; 52: 24-46.
- Mazario J, Roza C, Herrero JF., (1999). The NSAID dexketoprofen trometamol is as potent as mu-opioids in the depression of wind-up and spinal cord nociceptive reflexes in normal rats. *Brain Res* ; 816: 512-7.
- McKelvey-Martin, V. J., Green, M. H. L, Schmezer, P., Pool-Zobel, B. L., De Meo, M. P., Collins, A., (1993). “The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a european review”, *Mutat. Res.*, 288: 47–63.
- Meek IL, Mart AF, Vonkeman HE. ,(2010). Non-Steroidal antiinflammatory drugs: an overview of cardiovascular risks. *Pharmaceuticals*, 3:2146-62.
- Mehlich DR, Sollecito WA, Helfrick JF, Leibold DG, Markowitz R, Schow CE Jr, et al (1990) Multicenter clinical trial of ibuprofen and acetaminophen in the treatment of postoperative dental pain, *J Am Dent Assoc*, 121, 257–263.
- Merskey H, Bugduk N. (1994). Classification of Chronic Pain, *Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definition of Pain Terms*. 2nd Ed. Seattle: IASP Press.
- Moore RA ,Barden J (2008).Systematic review of dexketoprofen in acute and chronic pain. *BMC Clin Pharmacol*; Oct 31;8:11. doi: 10.1186/1472-6904-8-11.

- Morgan GE, Barden J (2008). Systematic review of dexketoprofen in acute and chronic pain, *BMC Clinical Pharmacology*, 8:11-21.
- Nemutlu D., (2016). *Valnoksamid; Nöropatik ağrının hafifletilmesi üzerine etkinliği ve olası mekanizmaları*. Yüksek lisans tezi, Eskişehir, Anadolu Üniversitesi.
- Ostling, O., Johanson, K. J., (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123:291–298.
- Öner SF. (2010). *Ortopedik Alt Ekstremité Cerrahisinde, Postoperatif Analjezi İçin İntravenöz Verilen Deksketoprofen Trometamol'ın Optimal Dozunun Araştırılması*. Uzmanlık Tezi, Elazığ, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji Ve Reanimasyon Anabilim Dalı.
- Özbudak H, Ünal Z, Sabuncuoğlu S. (2016), Gebelikte Non-Steroidall Antiinflatuvar İlaçların Kullanımın Değerlendirilmesi, *Marmara Pharmaceutical Journal* 20:64-71.
- Öztürk M. (2010). Nonsteroid Analjezik Antiinflatuvar İlaçlar, Baş ağrısının Abortif Tedavisinde Kullanılan Diğer İlaçlar ve İlaçlara İkincil Baş ağrıları, *Türkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics* ;3(1):86-91.
- Özyalçın SN, Koltka K, Uyar M. (2005). *Akut ağrı genel bilgiler*. Editör: Özyalçın SN. Akut ağrı. Ankara: Güneş Kitabevi; s.1-24.
- Payan DG, Katzung BG (1995). Non-steroidal anti-inflammatory drugs; nonopoid analgesics; drugs used in gout, In: Katzung BG(ed), *Basic and clinical pharmacology*, 6 th ed. Appleton and Lange, USA, pp. 536-560.
- Raj PP (2000). Ağrı taksonomisi, S Erdine (Ed) Ağrı, İstanbul, Alemdar Ofset, s.12-18.
- Saka E., (2016). *Alt ekstremité amputasyonu sonrası kronik ağrı insidansı ve perioperatif analjezi yöntemiyle ilişkisi*, Doktora tezi, İstanbul, İstanbul Üniversitesi.
- Sağır Ö., Sunay F.B., Yildirim H, Aksoz E., Ozaslan S, Koroglu A, Aydemir T, Ulusal A.E.,Kockar F, (2013). Evaluation of the effects of dexketoprofen trometamol on knee joint: an in vivo & in vitro study, , Balıkesir, Turkey ,*Indian J Med Res* 138, pp 912-918.
- Sav T, Unal A, Erden A, Gunal AI.(2012). Single-dose-dexketoprofen-induced acute kidney injury due to massive rhabdomyolysis. *Int Urol Nephrol.*; 44(5):1581-3.

- Sinan GH. (2017). *Paraben ve türevlerinin insan lenfosit DNA'sı üzerindeki genotoksik etkilerinin RADP-PCR ve COMET teknikleri ile araştırılması*, Doktora tezi, Eskişehir, Anadolu Üniversitesi.
- Singh N., McCoy M, Tice R., Schneider E. (1988). Technique for quantitation damage in individual of low levels of DNA cells, *Exp. Cell Res.* 175 :184–191.
- [Speit G, Hartmann A.](#) (2006). The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol* ;314:275-86.
- Stovitz SD, Johnson RJ. (2003). NSAIDs and musculoskeletal treatment: what is the clinical evidence? *The Physician and Sportsmedicine*;31(1):35-52.
- Şekeroğlu ZA, Şekeroğlu V. (2011). Genetik Toksisite Testleri ,*Tübbas Bilim Dergisi*, Cilt:4, Sayı:3, Sayfa:221-229, Ordu.
- Tajyuan RHF CO (2007). Chemical Book Erişim: www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB4854902.htm.
- [Tekeli AE., Yağmurdur H., Öngen E., Tekeli A., Take G., Erdoğan D., Dikmen B \(2017\). Histological and electron microscopic examination of the effect of dexketoprofen trometamol on liver in rats, Medical Science, 21\(88\), November-December.](#)
- Terradas, M., Martin, M., Tusell, L., Genesca, A., (2010). Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell, , *Mutat. Res.*, 705: 60-67.
- Toker HT (2007). *Laparoskopik kolesistektomi vakalarında perioperatif 1 gram ve 2 gram intravenöz parasetamol infüzyonlarının postoperatif opioid tüketimine etkilerinin araştırılması*, Tıpta uzmanlık tezi, Ankara, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Tıp Fakültesi, Ankara.
- Topçu SY (2008), *Üst Abdominal Cerrahi Girişim Uygulanan Hastalarda Hemşireler Tarafından Öğretilen Gevşeme Tekniklerinin Ağrı Kontrolü Üzerine Etkisi*, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Hemşirelik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Edirne.
- Tuncer S, Pirbudak L, Balat O, Capar M (2003). Adding ketoprofen to intravenous patient controlled analgesia with tramadol after major gynecological cancer surgery: a double-blinded, randomized, placebo-controlled clinical trial, *Eur J Gynaecol Oncol*, 24,181-184.
- Uyar M., Köken İ., (2017). Kronik ağrı nörofizyolojisi, *Türk ortopedi ve travmatoloji birliği derneği dergisi*, 16:70-76.

- Vane JR. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biology*; 231: 235-37.
- Von Graffenried B, Nuesch E, Maeglin B, Hagler W, Kuhn M (1980) Assessment of analgesics in dental surgery outpatients, *Eur J Clin Pharmacol*, 18, 479–482.
- Yagmurdu H., Tezer E., Bilimgut B., Astarci H.M., Dikmen B., (2012). *İntraartiküler Deksketoprofenin Rat Diz Eklemine Kartilaj Ve Sinovya Üzerine Etkileri Poster TARK*. Kırıs, <http://www.tard.org.tr/tark2012/cd/?uID=D3F61705-95D8-47A6-8F9FD31E3254C46D&id=1197>.
- Yentür EA., (2006). Nonsteroid antienflamatuar ilaçlar. *I. Ağrı Bülten /I*.
- Zabala S, Calpe MJ, Pérez G, Lerín FJ, Mouronval L. (2008). Neutropenia, thrombocytopenia and hepatic injury associated with dexketoprofen trometamol therapy in a previously healthy 35-year-old woman, *J Clin Pharm Ther*;33(1):79-81.
- Zanoveli JM, Netto CF, Guimaraes FS, Zangrossi H., (2004). Systemic and Intradorsal Periaqueductal Gray Injections of Cholecystokinin Sulfated Actapeptide (CCK8S) Induce a Panic-like Response in Rats Submitted to the Elevated T-maze. *Peptides* ; 25: 1935-1941.
- Zengin ZA (2008). *Ratlarda tramadol ve nitrik asitin akut inflammatuar ağrı üzerine etkileri*, Uzmanlık tezi, Aydın, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi.
- <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?mode=3d&id=580922> (Son Erişim Tarihi 06.04.2018)
- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/fl.html?sid=318020773&deposited=t&version=1> (Son Erişim Tarihi 06.04.2018)
- http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-029Z.html (Son Erişim Tarihi 06.04.2018)
- <http://www.sabiosciences.com/genetable.php?pcatn=PAHS-029A> (Son Erişim Tarihi 06.04.2018)

ÖZGEÇMİŞ

Adı- Soyadı: Merve KILIÇ

Yabancı Dil: İngilizce

Doğum yeri ve Yılı: Çankaya / 1989

E-Posta : mersah06@gmail.com

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- 2011, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
- 2016- Devam ediyor, İzmir Kavram Meslek Yüksekokulu, Patoloji Laboratuvar Teknikleri Programı, Öğretim Görevlisi

Yayınlar ve Bilimsel/ Sanatsal Faaliyetler

- 2014, Poster Sunumu, 1. Uluslararası Adli Toksikoloji Kongresi ve Çalıştayı, Ankara Üniversitesi