ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Reza VALIPOUR

ANTİDEPRESAN ESCİTALOPRAMIN MOLEKÜLER MODELLEMESİ, DNA ETKİLEŞİM ÖZELLİKLERİ, SİTOTOKSİSİTESİ VE GENOTOKSİSİTESİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2019

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTİDEPRESAN ESCİTALOPRAMIN MOLEKÜLER MODELLEMESİ, DNA ETKİLEŞİM ÖZELLİKLERİ, SİTOTOKSİSİTESİ VE GENOTOKSİSİTESİ

Reza VALIPOUR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 07/02/2019 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....	.....	.....
Doç. Dr. M. Bertan YILMAZ	Prof. Dr. Ayla ÇELİK	Doç. Dr. Işıl ÖCAL
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir
Proje No: FYL-2017-9464

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANTİDEPRESAN ESCİTALOPRAMIN MOLEKÜLER MODELLEMESİ, DNA ETKİLEŞİM ÖZELLİKLERİ, SİTOTOKSİSİTESİ VE GENOTOKSİSİTESİ

Reza VALIPOUR

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Doç. Dr. M. Bertan YILMAZ
Yıl: 2019, Sayfa: 65
Jüri : Doç. Dr. M. Bertan YILMAZ
: Prof. Dr. Ayla Çelik
: Doç. Dr. IŞIL ÖCAL

Escitalopram Oksalat (EO), Türkiye ve çeşitli Avrupa ülkelerde en çok reçete edilen antidepresanlardan biridir, fakat hücre seviyesinde etkisini gösteren yeterli çalışma mevcut değildir, bu nedenle burada Escitalopram Oksalat'ın DNA ve hücre düzeyindeki etkilerinin incelemesi amaçlanmıştır. Escitalopram Oksalat (EO)'ın moleküler etkileşim modellemesi ve DNA etkileşimi autodock analizi ile araştırılmıştır. EO'ın sitotoksik etkisi Metiltiyazolil Diphenyl-tetrazolium bromür (MTT) testi, Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBC) ve Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİC) yöntemleri ile belirlenmiştir. Escitalopram Oksalat'ın DNA düzeyindeki genotoksik etkisi ise UV-Vis spektrofotometre ve agaroz jel elektroforezi teknikleri ile araştırılmıştır.

Autodock analizinde EO'nun kovalent olmayan bağlar ile DNA'nın minor yarığı ile etkileşime girdiği gözlenmiştir. MTT sonucunda EO 50 µM konsantrasyonunda NIH 3T3 hücrelerinde sitotoksik etki göstermiştir. *E.coli* ve *Bacillus subtilis* için ilacın MİK değeri 0.185mM ve 0.55mM olarak belirlenmiştir. Escitalopram Oksalat 5, 15 ve 45 mM konsantrasyonlarında *E.coli*'yi öldürürürken, *Bacillus subtilis*'i öldürmemiştir. EO'nun UV-Vis spektrofotometre çözeltisinin 238 nm'deki absorpsiyon değeri, DNA'nın eklenmesi ile artarak hiperkromik etki göstermiş olup DNA bağlanma değeri (Kb) 0.035 M^{-1}'dir. DNA ve EO karışımına $CuCl_2$ ve $2H_2O$ ilave edilerek kontrol DNA'sı ile karşılaştırıldığında çift iplikli DNA'da herhangi bir kırık gözlenmemiştir. Ayrıca, EO DNA'yı hidroksil serbest radikaline karşı korumuştur.

Anahtar kelimeler: Genotoksik , Sitotoksik , Escitalopram , Modelleme

ABSTRACT

MSc THESIS

MOLECULAR MODELING, DNA INTERACTION FEATURES, CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY OF THE ANTIDEPRESSANT ESCITALOPRAM OXALATE.

Reza VALIPOUR

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. M. Bertan YILMAZ
Year: 2019, Pages: 65
Jury : Assoc. Prof. Dr. M. Bertan YILMAZ
: Prof. Dr. Ayla Çelik
: Assoc. Prof. Dr. IŞIL ÖCAL

Escitalopram Oxalate is considered as the most prescribed antidepressant drug in Turkey and some other countries, therefore this research will be aimed to study cytotoxic and DNA interaction of the drug. In order to study cytotoxic effect, at first, the effect of Escitalopram Oxalatae (EO) on the eukaryotic cell will be analyzed by MTT method and molecular autodock analysis. Then its effect on the bacterial cell will be evaluated by Broth dilution method to determine both Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Inhibition Concentration (MIC). The interaction of the drug with DNA was investigated by UV-Vis spectrophotometry and agarose gell electrophoresis. The absorption value of the drug solution at 238 nm was increased when DNA was added gradually to it and it showed hyperchromism effect. The value obtained for DNA binding constant (Kb) was 0.035 M− 1. When we added the CuCl2 2H2O to the mixture, any breakage was not shown in double strand DNA in comparison with control DNA. In addition low concentration of EO couldn't protect DNA (0.5273 μmole bp) against Hydroxyl free radical although it could protect the DNA when it was at the same or higher concentrations than the DNA concentration.

The MTT assay showed that 50μM of the drug killed the NIH 3T3 cells. The molecular autodock analysis showed that the drug had cytotoxic effect. MIC of the drug for *E.coli* and *Bacillus subtilis* was almost 0.185mM and 0.55mM respectively. The *E.coli* strain was killed at concentrations 45, 15, 5mM while the *Bacillus subtilis* was stable against all of the concentrations.

Key words: Genotoxic, Cytotoxic, Escitalopram, modeling

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Depresyon (majör depresif bozukluk) nasıl hissettiğinizi, nasıl düşündüğünüzü ve nasıl davrandığınızı olumsuz etkileyen yaygın ve ciddi bir tıbbi hastalıktır ve ayni zaman'da tedavi edilebilir. Depresyon, üzüntü duymalarına ve zevk alınan faaliyetlere olan ilginin kaybolmasına neden olur. Çeşitli duygusal ve fiziksel sorunlara yol açabilir ve kişinin işte ve evde çalışma verimini ve yeteneğini azaltabilir.

Antidepresanlar, depresyon ve diğer akıl sağlığı durumlarının tedavisinde kullanılan bir çok ilaç olup en yaygın olarak reçetelenen bazıları: seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI'lar), atipik antidepresanlar, trisiklik antidepresanlar (TCA'lar) ve monoamin oksidaz inhibitörleridir (MAOI'ler). Antidepresan ilaçlar, beyindeki duygudurum ve duyguları etkileyen kimyasalları (nörotransmiterler) dengelemek için tasarlanmış olup acı ve ızdırap çeken herkese çabuk ve basit bir rahatlama vaat etmektedirler.

Seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI'lar) en sık reçete edilen antidepresanlardır. Orta ve şiddetli depresyon semptomlarını hafifletebilir, nispeten güvenlidir ve tipik olarak diğer antidepresan tiplerinden daha az yan etkilere sahiptirler.

Escitalopram Oksalat, seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI) olarak bilinen ilaç sınıfına aittir. EO depresyon ve anksiyeteyi tedavi etmek için kullanılır. Beyinde doğal olarak bulunan serotonin dengesini yeniden sağlamaya yardımcı olarak çalışır. Enerji seviyesini, esenlik duygularınızı artırabilir ve sinirliliği azaltabilir.

Sakka ve ark. (2017), EO nöroblastoma hücre dizileri üzerindeki sitotoksik etkisini nötral kırmızı analiz yöntemiyle, gen ekspresyon profillerini ise kantitatif gerçek zamanlı PCR'yi (qPCR) kullanarak araştırdığında, Escitalopramın sitotoksik etkisi ile ilgili herhangi bir bulguya rastlamamıştır. Bu nedenle, EO'nun sitotoksik etkisinin, NIH İsviçre fareleri embriyosu (NIH 3T3) hücrelerinin büyümesi

üzerinde araştırmak uygun görünmüştür. Hekimler ilaç reçete ederken genotoksisite ve sitotoksisite verilerini göz önünde bulundurmalı ve mümkün olduğunca genotoksik ve sitotoksik ilacları reçete etmekten kaçınmalıdır.

Bu çalışmada antidepresan ilaçlardan , EO'nun sitotoksik ve genotoksik etkileri ile EO ve DNA arasındakı etkileşimler incelendi. Daha sonra bir bakteri hücresi üzerinde, hem MBC (Minimum Bakterisidal Konsantrasyon) hem de MIC (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) etkisini belirlemek için Agar disk difüzyon ve Broth dilüsyon yöntemi kullanıldı. Fizyolojik tamponda (pH 7.4) plazmid DNA ile ilacın etkileşimi UV-Vis spektrofotometrisi ile incelenmiştir. ilaveten, DNA potansiyel aktivitesi ve ilacın DNA'yla bağlanması elektroforez ile incelenmiştir.

Silico moleküler yerleştirme çalışmalarında, EO-protein kompleksinin bağlanma modu ve benzer şekilde bağlanma enerjisi de tahmin edilmektedir. Dolayısıyla, bu çalışmalar EO ile proteinin moleküler düzeyde etkileştiğini göstermektedir.

Bu çalışmada sonuç olarak moleküler etkileşim, EO'nun DNA varlığında absorbans spektrumlarında hiperkromizme olmasına neden oldu. EO, interkalasyon yoluyla değil, elektrostatik etkileşim gibi dış bağlanma yoluyla DNA'ya bağlanır. Ek olarak, düşük konsantrasyonlu EO, DNA'yı, DNA konsantrasyonundan aynı veya daha yüksek konsantrasyonda olduğu zaman koruyabilmesine rağmen, Hidroksil serbest radikaline karşı koruyamadı.

MTT sonucunda EO 50 µM konsantrasyonunda NIH 3T3 hücrelerinde sitotoksik etki göstermiştir. E.coli ve Bacillus subtilis için ilacın MİK değeri 0.185mM ve 0.55mM olarak belirlenmiştir. Escitalopram Oksalat 5, 15 ve 45 mM konsantrasyonlarında E.coli'yi öldürürürken, Bacillus subtilis'i öldürmemiştir. EO'nun UV-Vis spektrofotometre çözeltisinin 238 nm'deki absorpsiyon değeri, DNA'nın eklenmesi ile artarak hiperkromik etki göstermiş olup DNA bağlanma değeri (Kb) 0.035 M−1'dir. DNA ve EO karışımına $CuCl_2$ ve 2H2O ilave edilerek kontrol DNA'sı ile karşılaştırıldığında çift iplikli DNA'da herhangi bir kırık gözlenmemiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalısmamın alt yapısını ve planlamasını oluşturarak bu çalısmaların uygulamaları süresince her türlü yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen, yüksek lisans egitimim süresince yetişmemde azami gayret sarfeden değerli hocam Doç.Dr.Mehmet Bertan Yilmaz'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyu her zaman yanımda olan ve yardıma ihtiyacım olduğu zamanlar bana her türlü destek sağlayan, Hocam ve Abim Dr.Ebrahim VALIPOUR'a teşekkur ederim.

Proje çalışmamın yazımında katkıda bulunan Dr. Mostafa Nourizadeh Tazekend'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez aşamam sırasında daima yanımda hissettiğim, maddi manevi desteklerini esirgemeyen Annem ve Babam'a teşekkür ederim.

Ayrıca, bu yüksek lisans çalışmasını maddi yönden destekleyen Ç.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi yöneticilerine de teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER VII
ÇİZELGELER DİZİNİ XI
ŞEKİLLER DİZİNİ XIII
SİMGELER VE KISALTMALAR XV
1. GİRİŞ 1
1.1. Depresyon 1
1.1.1. Depresyonun tarihçesi 1
1.1.2. Depresyonun Yaygın Tipleri 1
1.1.2.1. Majör Depresif Bozukluk (MDB) 1
1.1.2.2. Persistan Depresif Bozukluk 2
1.1.2.3. Doğum Sonrası Depresyon 2
1.1.2.4. Mevsimsel Duygusal Bozukluk (MDB) 2
1.1.2.5. Premenstrüel Disforik Bozukluk (PMDB) 3
1.1.2.6. Atipik Depresyon 3
1.1.3. Depresyonun Patofizyolojisi 4
1.2. Antidepresanlar 4
1.2.1. Antidepresanların Sınıflandırılması 6
1.2.2. Seçici Serotonin Geri Alım Inhibitörleri (SSRI'lar) 6
1.2.3. SSRI' ların Tarihçesi 8
1.2.4. SSRI'ların Etki Mekanizması 9
1.2.5. Hamilelik Sırasında SSRI Kullanımı 12
1.2.6. SSRI'ların Gastrointestinal Etkisi 12

1.3. Escitalopram Oksalat 13
1.3.1. Escitalopram Oksalat'ın Dozaj Formları 14
1.3.2. Escitalopram Oksalat'ın Farmakolojisi 14
1.4. Küçük Moleküllerin DNA Ile Etkileşim Yolları 15
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 19
3. MATERYAL VE METOD 23
3.1. Kullanılan Maddeler Ve Laboratuvar Cihazları: 23
3.2. Metodlar 24
3.2.1. Escitalopram Oksalatın Absorpsiyon Titrasyonu Ile DNA'ya Bağlanma Aktivitesi 24
3.2.2. Essitalopram Oksalatın DNA Üzerinde Etkisi 25
3.2.3. Escitalopram Oksalatın Çift Iplikli DNA Hasarına Yol Açan Fenton'a Karşı Koruyucu Etkisi 25
3.2.4. Essitalopram Oksalatın Bakteri Üremesi Üzerindeki Etkisi 26
3.2.5. Escitalopram Oksalat'ın Sitotoksik Etkisinin 3-[4,5-Dimethylthiazole-2-Yl]-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide Thiazolyl Blue (MTT) Testi Ile Belirlenmesi 27
3.2.6. Moleküler Auto Dock Analizi 28
3.2.6.1. Escitalopram Oksalat'ın Sitotoksik Etkişiminin Moleküler Autodock Programı Ile Analizi 29
3.2.6.2. Escitalopram Oksalat'ın DNA Ile Etkileşiminin Autodock Programı Kullanarak Analiz Edilmesi 32
4. BULGULAR VE TARTIŞMALAR 35
4.1. Bulgular 35
4.1.1. Escitalopram Oksalatın Hazırlanması 35
4.1.2. Plazmit DNA'nın Hazırlanması 35
4.1.3. UV-Görünür Spektrum Ölçümleri 36
4.1.4. Escitalopram Oksalat'ın DNA Üzerindeki Etkisi 38

4.1.5. Escitalopram oksalatın fenton'un oluşturduğu DNA hasarına karşı koruyucu etkisi....38
4.1.6. Escitalopram oksalat' ın Autodock pogramı kullanarak DNA etkileşim analizi....39
4.1.7. Escitalopram Oksalatın Bakteriyel Gelişim Üzerine Etkisi....40
4.1.8. Escitalopram Oksalat'ın Sitotoksik Etkisinin MTT Testi Ile Belirlenmesi....41
4.1.9. Escitalopram Oksalat'ın Sitotoksik Etkişiminin Moleküler Autodock Ile Analizi....44
4.2. Tartışma....46
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER....51
KAYNAKLAR....53
ÖZGEÇMİŞ....65

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 4.1. Escıtalopram oksaltın'ın NIH fare hücreleri embriyosu (NIH 3T3) hücrelerinde sitotoksisitesi (DMEM tamponu)..... 43

Çizelge 4.2. AutoDock programını kullanarak tubulin alfa beta ve EO'nun yerleştirme sonuçları Lamarckian Genetic Algorithm kullanılarak farklı ligand konformasyonu üretti. Bu değerler minimum enerjiyi gösterir ve tabloda kalın yazılmıştır..... 45

Çizelge 4.3. AutoDock programını kullanarak tubulin alfa beta ve Kolşisinin yerleştirme sonuçları Lamarckian Genetic Algoritmasını kullanarak farklı ligand konformasyonu üretti. Bu değerler minimum enerjiyi gösterir ve tabloda kalın yazılmıştır..... 45

Çizelge 4.4. Escitalopram oksalat'ın Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu, PBS ve DMEM tamponlarında (24 ve 48 saat) 46

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. 12 yaş ve üstü kişiler arasında antidepresan kullanımındaki eğilim cinsiyete göre: ABD, 1999–2014 5

Şekil 1.2. SSRI antidepresan grubunun yıllara göre kullanımlarının değişimi 7

Şekil 1.3. Escitalopram oksalat'ın 2D yapısı Moleküler formülü 13

Şekil 1.4. DNA etkileşim türleri 16

Şekil 4.1. pET22b vektörüne ait agaroz jel elektroforez görüntüsü 36

Şekil 4.2. Absorbans titrasiyonunun grafiği 37

Şekil 4.3. DNA 'ya karşı (A0/A – A0) grafiği. Koşullar: CEO = 0.048 olmol/L 37

Şekil 4.4. Plazmid DNA'nın (0.5273 µmol bp) EO ve EO artı CuCl2 2H2O (0.5273 µmol) ile muamelesi ve agaroz jel (%1) elektroforez analizi. Toplam 14 ul hacim, E1, E2, E3, E4, E5, E6, C1 ve C2 kuyularına ve EC1, EC2, EC3, EC4 ve EC5 kuyucularına 17,5 ul yüklenmiştir. a, b, c, d, e ve f sırasıyla 52.73, 5.273, 0.5273, 0.05273, 0.005273 ve 0.0005272 µmol'ü temsil eder. Artı veya eksi işareti varlığı veya yokluğu gösterir 38

Şekil 4.5. İlacın H_20_2'den radikal OH üretme kabiliyetini analiz etmek için, plazmid DNA (0.5273 µmol bp) 0.12 µmol H_20_2 ile karıştırıldı ve 2. kuyucuğa yüklendi. İlacın radikal OH'yi inhibe etme kabiliyetini analiz etmek için Plazmid DNA (0.5273 µmol bp) 0.12 µmol H_20_2, 0.03 µmol $FeSO_47H_2O$ ve farklı EO konsantrasyonu ile karıştırıldı. a, b, c, d ve e, sırasıyla 0.005273, 0.05273, 0.5273, 5.273 ve 52.73 µmol'ü temsil eder. Toplam 18 ul hacim kuyucuklara yüklenmiştir 39

Şekil 4.6. EO'nun DNAýa bağlanması 40

Şekil 4.7. Çeşitli Escitalopram oksalat konsantrasyonları içeren besiyerinde E. coli ve Bacillus subtilis'in nispi büyümesi..... 41
Şekil 4.8. (a) EO'nun MBC analizi. E ve B sırasıyla *E.coli* ve *Bacillus subtilis*'i temsil eder, ayrıca 1'den 9'a sayısı sırasıyla 45, 15, 5, 1.66, 0.55, 0.18 0.06, 0.02 milimolar EO'yu temsil eder; (b) Farklı EO konsantrasyonlarında *E.coli'*nin gelişimi; (c) EO'nun farklı konsantrasyonlarında *Bacillus* Subtilis'in gelişimi 41
Şekil 4.9. 24 ve 48 saat'lik muameleden sonra, Escıtalopram oksaltın'ın NIH fareleri embriyosu (NIH 3T3) hücrelerinde sitotoksisitesi..... 43
Şekil 4.10. (a) kolşisin ve (b) EO'nun tübülin ile mühtemel etkileşimleri (2D ve 3D)..... 44

SİMGELER VE KISALTMALAR

5-HT	: 5-hidroksitriptamin
AT	:Adenin ve timin
CaMKII	: kalsiyum-kalmodulin bağımlı protein kinaz II
CBMN	: sitokinez - blok mikronükleus
CNS	: merkezi sinir sistemi
DA	: dopamin
DMEM	: Dulbecco's Modifiye Eagle's Mediyumu
DMSO	: dimetil sülfoksit
DNA	: deoksiribonükleik asit
EO	: Escitalopram Oksalat
GABA	: gamma-aminobütirik asit
GDP	: guanozin difosfat
GTP	: guanozin trifosfat
HDDÖ	: Hamilton Depresyon Değerlendirme Ölçeği
MAOI	:Monoamin oksidaz inhibitörleri
MBC	: Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
MDB	: Major Depresif Bozukluk
MIC	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MN	: mikronükleus
NADPH	: Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NCHS	: Ulusal Sağlık İstatistikleri Merkezi
NE	:norepinefrin
OKB	:obsesif kompulsif bozukluk
PBL	: periferik kan lenfositlerinde
PDB	: Protein Data Bank
PKC	:protein kinaz C
PMDB	: Premenstrüel Disforik Bozukluk

PMS : Premenstrüel sendromun

SERT : Serotonin transporter

SGL : subpial granular layer

SNRI :Serotonin-norepinefrin geri alım inhibitörü

SSRI :seçici serotonin geri alım inhibitörüdür

TCA : Trisiklik antidepresanlar

TSSB : travma sonrası stres bozukluğu

VEGF : Vasküler endotelyal büyüme faktörü

1. GİRİŞ

1.1. Depresyon

Depresyon, mutsuzluk veya hayal kırıklığı duyguları ile insanların üçte birini etkileyen çok yaygın bir hastalıktır. Bununla birlikte, bu duygular, yaygın ve günlük hayatın normal işleyişine müdahale ettiğinde patolojik depresyon olarak kabul edilir. Bilişsel depresyon modelleri, depresyonun gelişiminde ve sürdürülmesinde benlik, dünya ve gelecek hakkında olumsuz düşünceler olarak öne çıkan önyargılı bilgi işlemenin rolünü vurgulamaktadır (Disner ve ark. 2011). ayrıca, depresyon artmış ruminasyon ve kendi kendine işlenmeyle ilişkilidir ve dış çevreye odaklanmada zorluklara yol açar. Bu kendi kendine odaklanma genellikle suçluluk, kendini suçlama ve düşük benlik saygısı ile sonuçlanan olumsuz duyguları içermektedir (Northoff 2007).

1.1.1. Depresyonun tarihçesi

Yaklaşık 2500 yıl boyunca, duygu bozuklukları insanlığın en yaygın hastalıklarından biri olarak tanımlanmıştır. Daha önce melancholia olarak bilinen ve günümüzde klinik depresyon, majör depresyon ya da basit depresyon olarak tanımlanmaktadır.

1.1.2. Depresyonun Yaygın Tipleri

1.1.2.1. Majör Depresif Bozukluk (MDB)

İnsanlar klinik depresyon terimini kullandıklarında, genellikle majör depresif bozukluğa (MDB) ifade ederler. Majör depresif bozukluk, bir dizi temel özellik ile karakterize edilen bir duygudurum bozukluğudur:

a) Depresyon hali
b) Normal etkinliklere karşı ilgi eksikliği
c) Vücut ağırlığındakı değişiklikler

d) Uyku değişiklikleri
e) Yorgunluk
f) Değersizlik ve suçluluk duygusu
g) Konsantrasyon zorluğu
h) Ölüm ve intihar düşünceleri

Bir kişi bu semptomların çoğunu iki haftadan daha uzun bir süre boyunca taşıyorsa, sıklıkla MDB tanısı konulur.

1.1.2.2. Persistan Depresif Bozukluk

Günümüzde kalıcı bir depresif bozukluk olarak bilinen distimi, iki yıldan daha fazla süre mevcut olan kronik depresyonu işaret eder. Hafif, orta veya şiddetli olabilir.

1.1.2.3. Doğum Sonrası Depresyon

Hamilelik sıklıkla bir kadının ruh halini etkileyebilecek önemli hormonal kaymalar meydana getirebilir. Depresyon hamilelik sırasında başlayabilir veya bir çocuğun doğumunu izleyebilir.

1.1.2.4. Mevsimsel Duygusal Bozukluk (MDB)

MDB' nin vücudun normal sirkadiyen ritminde bir rahatsızlık tarafından tetiklendiğine inanılmaktadır. Gözlere giren ışık, bu ritmi etkiler ve gece/gündüz patinindeki mevsimsel değişimler, depresyona yol açan bir bozukluğa neden olabilir. MDB, yer yüzünde, kuzey veya güney bölgelerinde daha yaygındır ve gün ışığındaki mevsimsel kayıpları dengelemek için ışık terapisi tedavileri yapılmaktadır.

1.1.2.5. Premenstrüel Disforik Bozukluk (PMDB)

Premenstrüel sendromun (PMS) en sık görülen semptomları arasında sinirlilik, yorgunluk, anksiyete, duygudurum, şişkinlik, iştah artışı, yemek isteği, ağrı ve meme hassasiyeti gelir. Premenstrüel disforik bozukluk (PDB) Premenstrüel sendromun'a benzer semptomlar görülür, ancak duygudurum ile ilgili olanlar daha belirgindir. Şunları içerebilir:

a) Aşırı yorgunluk
b) Hüzünlü, umutsuz veya kendini eleştiren ruh hali
c) Stres veya anksiyetenin şiddetli duyguları
d) ağlama nöbetleri
e) Sinirlilik
f) Konsantre olamama
g) Artan iştah

1.1.2.6. Atipik Depresyon

Yukarıdan bahsi geçen semptomlara dayanarak, bozukluğun "tipik" sunumu olarak düşünülen durumu izlenmediği bir depresyon türü atipik depresyon olarak tanımlana bilir. Atipik depresyon, aşağıdakiler ile karakterizedir:

a) Aşırı yeme veya kilo alma
b) Aşırı uyku
c) Yorgunluk ve halsizlik
d) Gergin ruh hali

Diğer depresyon biçimlerinin aksine, atipik depresyonlu kişiler, bir monoamin oksidaz inhibitörü (MAO) olarak bilinen bir antidepresan türüne daha iyi yanıt verirler (American Psychiatric Association 2013).

1.1.3. Depresyonun Patofizyolojisi

Yaşam boyunca depresyonun patofizyolojisini ve anormalliklerini belirlemek veya görüntülemek için yararlı teknikler yoktur. Mevcut ilaçların çoğunluğu deneysel olarak keşfedilmiştir. En güncel teoriler "amin hipotezi"ne dayanmaktadır (Standaert 2005). Duygudurum bozukluğunun en önemli hipotezi, biyogenik amin düzeylerindeki değişimlerle ilgilidir (Bunney ve Davis 1965; Schildkraut 1965). Depresyonun meydana gelmesinin, norepinefrin (NE), dopamin (DA) ve epinefrin, indolamin, serotonin, 5-hidroksitriptamin (5-HT) ve iki katekolamin gibi beyindeki biyogenik aminlerin seviyelerindeki değişikliklerle ilgili olduğu bulunmuştur.

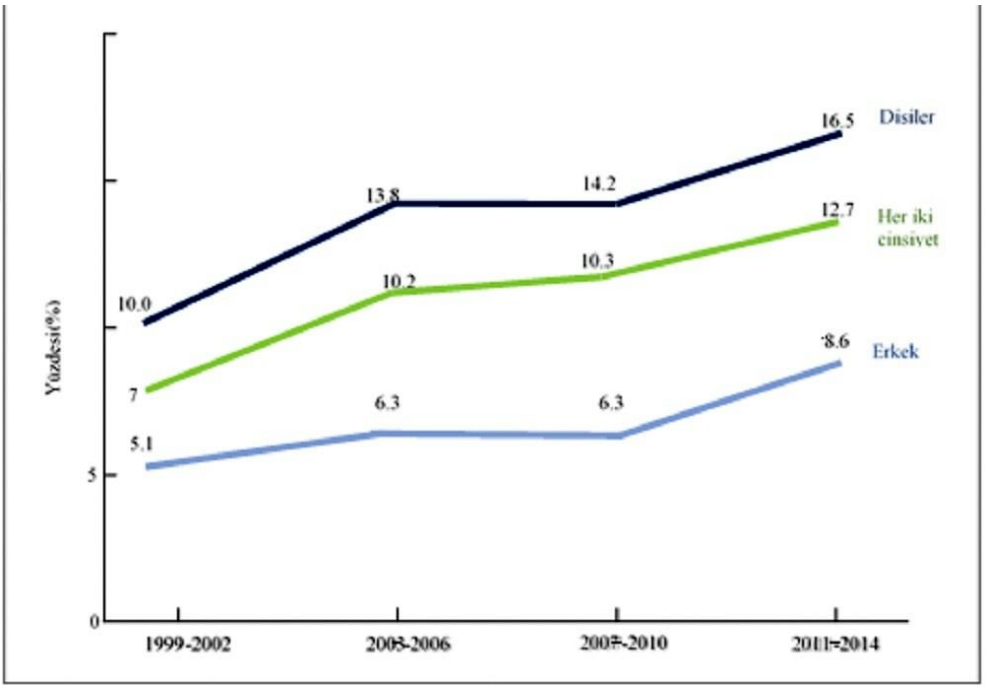
1.2. Antidepresanlar

Antidepresanlar, beyindeki nörotransmiterlerin kimyasal dengesizliklerini düzenleyerek, depresif bozuklukların semptomlarındaki azalmaya yardımcı olan ilaçlardır. Duygudurum ve davranış değişikliği kimyasal dengesizliğe bağlıdır. Nörotransmitterler, beyindeki nöronlar arasındaki iletişim bağlantısıdır. Nörotransmitterler sinir hücrelerindeki keseciklerde bulunur. Serotonin, dopamin ve noradrenalin veya norepinefrin gibi nörotransmitterler, bir sinyalin akson ucu tarafından serbest bırakılır ve diğeri tarafından alınır; geri alma olarak adlandırılan fenomen. Antidepresanlar, seçici reseptörler aracılığıyla nörotransmiterlerin geri alımını inhibe eder ve böylece beyindeki sinirler etrafında spesifik nörotransmiter konsantrasyonunu arttırır. Bu antidepresanlardan biri, beyin serotonin seviyesini etkileyen seçici serotonin geri alım inhibitörüdür (SSRI).

Ulusal Sağlık İstatistikleri Merkezi (NCHS) tarafından yayınlanan 2017 tarihli bir rapora göre, 12 yaş ve üstü Amerikalıların yaklaşık yüzde 13'ü ruh halini düzenleyen belirli beyin kimyasalları üzerinde etki eden antidepresanları ilaçları alıyor (Pratt, LA. Brody ve Gu 2017).

Antidepresan kullanımı 1999 ve 2014 yılları arasında yaklaşık yüzde 65 oranında artmıştır. NCHS' nin bulduğu sonuca göre antidepresanların kullanımı

erkekler tarafından yüzde 8.6 olduğunda, kadınların tarafından kullanılan antidepresanlar yüzde 16.5 olmuştur, kadınların ilaç kullanımı erkeklere göre neredeyse iki kat daha olasıdır. 12 yaş ve üstü kişiler arasında antidepresan kullanımındaki eğilim cinsiyete göre şekil 1.2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. 12 yaş ve üstü kişiler arasında antidepresan kullanımındaki eğilim cinsiyete göre: ABD, 1999–2014 (pratt, la. Brody ve gu, 2017)

Antidepresanların çoğu güvenlidir, ancak bazı insanlar özellikle çocuklar, gençler ve 25 yaşın altındaki genç yetişkinler özellikle tedavinin ilk birkaç haftasında intihar düşüncelerinde artış yaşayabilirler.

Antidepresanlar depresyon belirtilerini düzeltebilir, ancak bazı yan etkiler de gösterebilirler. Sadece depresyon, anksiyete bozukluğu, sinirlilik, manik-depresif bozukluklar, çocuklukta yatak ıslatma, majör depresif bozukluk, diyabetik periferik nöropatik ağrı, sosyal çekingenlik, travma sonrası stres gibi bir takım belirtilerin tedavisinde kullanılmaktadır.

1.2.1. Antidepresanların Sınıflandırılması

İmipramin, antidepresan rejimi olarak 1958'de keşfedilmiştir. Antidepresanlar beş gruba ayrılmıştır:

a) Trisiklik antidepresanlar (TCA'lar),
b) Seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI'lar),
c) Monoamin oksidaz inhibitörleri (MAOI),
d) Serotonin-norepinefrin geri alım inhibitörleri (SNRI)
e) TCA dışı antidepresanlar.

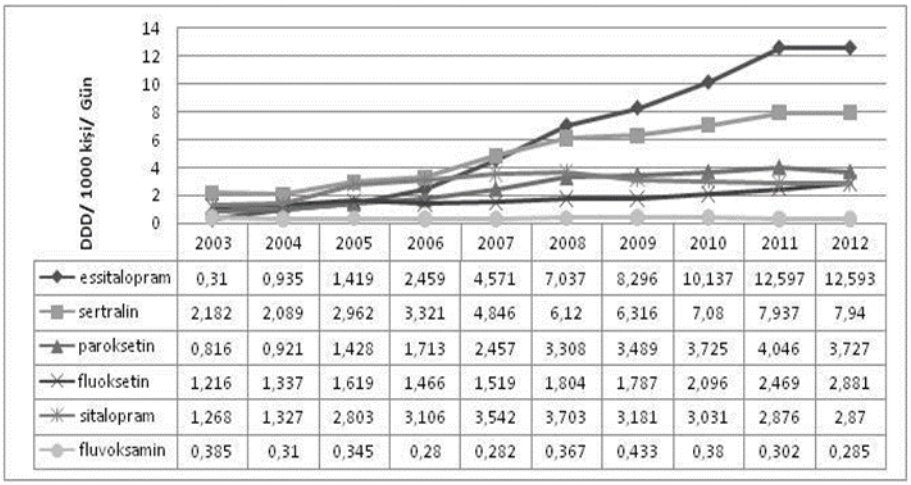
TCA'lar norepinefrin (NE) ve serotoninin (5HT) geri alımını bloke etmektedir. Antidepresanların başlıca mekanizması olan bu olgu, nöro reseptörlerin fizyolojik davranışında değişikliklere sebep olur. TCA'ların muskarinik, alfa1 adrenerjik ve histaminik reseptörlerini de bloke ettiği bildirilmiştir.

Mourilhe (Mourilhe ve Stokes 1998), Seçici serotonin geri alım inhibitörlerinin (SSRI'lar) 5HT geri alımını engelleyebileceğini ve sinaptik 5HT iletimini artırabildiğini bildirmişlerdir. SSRI' ların, diğer nörotransmiterlerin geri kazanımı üzerinde çok az veya önemsiz bir etkisi vardır. SSRI'ların muskarinik ve histaminerjik reseptörlerde herhangi bir aktivite göstermediği gözlenmiştir; bu da muhtemelen bir dakika içerisinde anti-kolinerjik ve sedatif etkilere neden olur.

1.2.2. Seçici Serotonin Geri Alım Inhibitörleri (SSRI'lar)

SSRI'ların serotonin taşınmasını seçici olarak inhibe ettiği bilinmektedir. SSRI' lardan bazıları fluoksetin (Prozac, Selfemra), paroksetin (Paxil, Pexeva), sertralin (Zoloft), sitalopram (Celexa) ve Escitalopram oksalat (Lexapro) 'dır. SSRI'ların bu hareketi, somatodendritik serotonin-1A otoreseptörlerinin duyarsızlaşmasına neden olan srotonel-serotonerjik nöronal alandaki serotoninde ani artışa neden olur(Blıer, de Montıgny, ve Chaput 1987; Richelson 1982). Sonuç olarak, nöronal dürtü akışı artar(Blıer, de Montıgny, ve Chaput 1987). SSRI' ların

farmakolojik analizi, bu ajanların, merkezi sinir sisteminde (CNS) 5-HT nörotransmisyonunun güçlü fakat yavaş disinhibisyonuna neden olabileceğini düşündürmektedir. Bu durumda, antidepresanların hareketleri, orta beyin tomurcuğundan prefrontal kortekse doğru bir yolla sağlanır (Baxter ve ark. 1989; Foote ve Morrison 1987). SSRI' lar tarafından ortaya çıkan yan etkiler anksiyete, uyku bozuklukları, cinsel işlev bozukluğu (libido azalması, memnuniyetsizliğin artması ve uyarılmada azalma) ve gastrointestinal rahatsızlıklardır (Stahl 1998). Belirli serotonerjik yolakların 5-HT2 ve 5-HT3 reseptörlerinin toksisitesinin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Serotonin ve dopamin arasında karşılıklı bir ilişki vardır. Beyin omurilikten aşağı doğru giden serotonin yolunun, çeşitli spinal reflekslere aracılık eden spinal nöronlara doğru gelişen cinsel işlev bozukluğundan sorumlu olduğuna inanılmaktadır. Bu yol boyunca gelişmiş serotonerjik akışın cinsel işlevleri engellediği bildirilmiştir. Serotoninin cinsel işlevsellik üzerindeki olumsuz etkileri, 5-HT2 reseptörleri aracılığıyla gerçekleşir. Bu nedenle 5-HT2 antagonistleri, SSRI'lara bağlı cinsel işlev bozukluğunu tersine çevirebilirler (Bersani ve ark. 1990; D. J. Stein ve Hollander 1994).



	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
essitalopram	0,31	0,935	1,419	2,459	4,571	7,037	8,296	10,137	12,597	12,593
sertralin	2,182	2,089	2,962	3,321	4,846	6,12	6,316	7,08	7,937	7,94
paroksetin	0,816	0,921	1,428	1,713	2,457	3,308	3,489	3,725	4,046	3,727
fluoksetin	1,216	1,337	1,619	1,466	1,519	1,804	1,787	2,096	2,469	2,881
sitalopram	1,268	1,327	2,803	3,106	3,542	3,703	3,181	3,031	2,876	2,87
fluvoksamin	0,385	0,31	0,345	0,28	0,282	0,367	0,433	0,38	0,302	0,285

Şekil 1.2. SSRI antidepresan grubunun yıllara göre kullanımlarının değişimi (Keziban ADAM BASKI 2014)

IMS Health Türkiye verdiği rapora güre SSRI gurubuna ait olan antidepresan ilaçların kullanımının ve tüketiminin hacmi ve yapısı değişmiştir. 2012 yılında SSRI gurubundan sadece Escitalopram, Sertralin ve Paroksetin maddeleri tüm antidepressan ilaç kullanımının %64.4' ünü oluşturmuştur. SSRI Antidepressan ilaçların kullanımı 2003 yılında %66'den, 2012'de %80.4'e artmıştır. (Keziban ADAM BASKI 2014). SSRI antidepresan grubunun yıllara göre kullanımlarının değişimi şekil 1.2.2.1'de gösterilmiştir.

1.2.3. SSRI' ların Tarihçesi

İlk seçici serotonin geri alım inhibitörü (SSRI), fluoksetin, 1988 yılında Amerikan pazarına tanıtıldı (DeVane 1998). Diğer SSRI' lar, sertralin, paroksetin ve fluvoksamin, serotinini yakından takip etti. Avrupa' da bir süredir yaygın olarak kullanılmasına rağmen, 1990'ların sonuna kadar, başka bir SSRI, sitalopram, Amerikan klinisyenlerinin kullanımına sunulmuştu ve daha sonra bunun, enantiomeri, Escitalopram, tanıtıldı. 1990'ların başlarında, SSRI'lar klinik pratikte ilk basamak antidepresanlar haline gelmiş ve tüm antidepresan reçetelerinin yarısından fazlasını oluşturmuştur (Ban 2001). Popüler edebiyat ve haberlerde büyük bir etki yaratmışlardır ve ilk olarak halihazırda var olan antidepresan ilaçlara göre üstün oldukları düşünülüyordu. Gerçekten de, SSRI bileşikleri daha uygun bir yan etki profiline, daha basit dozlama stratejilerine, daha iyi tolere edilebilirliğe ve dolayısıyla eski antidepresanlara göre daha iyi etkiye sahiptir. Doz aşımı, minimal kardiyovasküler etkiler ve daha az antikolinerjik aktivite gibi göreceli güvenliği, onları özellikle birinci basamak ajanlar olarak çekici kılmaktadır.

SSRI' larla klinik deneyim arttıkça olumsuz etkilerine sahip oldukları ortaya çıkmıştır. Ayrıca, SSRI' ların, TCA' lara karşı etkinliğinin değerlendirilmesi halen tartışılmaktadır. Bu kaygılara rağmen, SSRI'lar yaygın olarak kullanılmakta olup anksiyete bozuklukları, obsesif kompulsif bozukluk (OKB), panik bozukluk, bulimiya nervoza, sosyal fobi, travma sonrası stres bozukluğu (TSSB) gibi

depresyon dışındaki pek çok psikiyatrik bozuklukta etkilidir. SSRI' lar Amerika'da ve dünya çapında en çok reçete edilen antidepresanlardır (Feighner 1999).

ABD' de altı SSRI ilacı mevcuttur: sitalopram (Celexa), Escitalopram (Lexapro), fluoksetin (Prozac), fluvoksamin (Luvox), paroksetin (Paxil) ve sertralin (Zoloft). Fluvoksamin dışındakilerin tümü, ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından depresyonda kullanılmak üzere onaylanmıştır; fluvoksamin depresyonun değil OKB'nin tedavisi için FDA onaylıdır, (S.M. 2001). Bununla birlikte, Avrupa'da, fluvoksamin yıllarca antidepresan olarak kullanılmıştır (Goldberg 2000).

1.2.4. SSRI'ların Etki Mekanizması

Tüm SSRI' lar yapısal olarak farklılık gösterse de, aynı etki mekanizmalarına sahiptir: adından da anlaşılacağı gibi, bu bileşikler serotonin taşıyıcısını seçici olarak inhibe ederler (Goodwin 1996).

Seçicilik derecesi kullanılan *in vitro* modele bağlı olarak değişirken, tüm maddeler serotonin geri alım taşıyıcısının güçlü inhibitörleridir. Ek olarak, paroksetin, norepinefrin taşıyıcıda nispeten daha büyük bir inhibitör potansiyeline ve *in vitro* çalışmalara dayanan dopamin taşıyıcısındaki sertraline sahip olabilir ve fluoksetin bir 5-HT agonisti olabilir, ancak bu farklılıkların klinik etkileri belirlenmemiştir (Gilmor, Owens, ve Nemeroff 2002).

SSRI' ların akut uygulaması, presinaptik serotonin nöronunun 5-HT geri alım pompasını inhibe ederek, nöronun somatodendritik alanı etrafında artan serotonin konsantrasyonuna neden olur (Blıer, de Montıgny, ve Chaput 1987). Serotonin üzerindeki erken etkiler muhtemelen yan etkilere neden olurken, terapötik eylemler sonraki nöronal olaylara bağlıdır. Sürekli SSRI uygulamasının (genellikle iki hafta veya daha fazla), nöronun somatodendritik alanındaki yüksek 5-HT konsantrasyonları, 5-HT'in inhibisyonundan sorumlu olan somatodendritik 5-HT otoreseptörlerinin duyarsızlaşmasına neden olur. Ek olarak, çeşitli SSRI' lar ve diğer antidepresanlar serotonin reseptör alt tiplerinde farklı aktivitelere sahiptir.

Serotonin reseptör izoformlarının varlığı' da, bu ilaçların antidepresan etkilerini nasıl kullandıklarına dair anlayışımızı daha da karmaşık hale getirmektedir. Sinyal transdüksiyonunu ve gen ekspresyonunu etkileyen eylemler, gerçek terapötik etki ve gecikmiş başlangıçtan sorumludur ve aminerjik aktivite değişikliklerin, beyin kaynaklı nörotrofik faktörün ve diğer nöronal büyüme faktörlerinin sentezi gibi diğer mekanizmalara bağlanmasıyla sonuçlanır. Dolayısıyla, SSRI' nın etki mekanizması glukokortikoid reseptörlerinin aktivitesini normalleştirmek olabilir. Glukokortikoid ve / veya mineraokortikoid reseptörlerinin işlevlerindeki azalma, hipokampusta düşük 5-HT protein seviyelerine, frontal bölgelerde 5-HT reseptör bağlanmasına ve frontal korteksin düşük serotonerjik innervasyonları ile ilişkilendirilebilir. Serotonin reseptör alt tiplerinin rolü belirsizdir, ancak birkaç alt tipin aktivitesi limbik bölgede nörogenez ile ilişkilidir. Örneğin, 5-HT1A heteroreseptörünün agonistleri ve sublentiküler bölgedeki ve dentat girusun subgranüler zonundaki nörogenezi artıran 5-HT'nın agonistleri daha seçicidir. Başka bir çalışma, 5-HT aktivasyonunun hipokampustaki büyüme faktörü VEGF (Vasküler endotelyal büyüme faktörü)' yi desteklediğini ve fluoksetin kaynaklı nörogenezin 5-HT antagonistleri tarafından bloke edilebildiğini bulmuştur (Greene ve ark. 2009).

Bazı kanıtlar, SERT (Serotonin transporter) bağlama bölgelerinin kaybının uzun süreli SSRI uygulaması ile gerçekleştiğini göstermektedir (Benmansour ve ark. 2002). 10–15 gün süren ilaç kullanılmasından sonra, antidepresan etkinin geliştiğini ifade etmektedir. Böyle bir modelde, antidepresanların, fosforilasyonu katalize eden protein kinaz C (PKC) aktivitesini düşürdüğüne inanılır, böylece SERT ve / veya serotonin reseptörleri doğrudan etkileyebilir. Diğer çalışmalar, protein kinaz A ve kalsiyum-kalmodulin bağımlı protein kinaz II' nin (CaMKII) (Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II) aktivasyonu için önemli rol oynamaktadır. PKA aracılı fosforilasyon, nörotransmisyon ve gen ekspresyonundaki değişikliklere neden olur. CaMKII, ayrıca fosforilasyon süreci boyunca, nörotransmitter aktivitesini kolaylaştırabilir.

Presinaptik 5-HT1A reseptörünün (otoreseptör) rolü hakkında evrensel bir fikir birliği olmamasına rağmen, bir veya iki hafta SSRI uygulamasından sonra bu reseptörün desensitizasyonunun serotonin salınımının geri besleme inhibisyonunu kapatmak için cereyan etmesi gerektiğine inanılmaktadır. SSRI antidepresan yanıtını hızlandırma veya büyütme girişimleri pindolol ile yapılan çalışmalarda incelenmiştir. 5-HT1A otoreseptörünü de antagonize eden bir beta-adrenerjik blokör olan pindolol, muhtemel bir SSRI takviye stratejisi olarak kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır (Artigas, Perez, ve Alvarez 1994; Berman ve ark. 1997; P. Blier ve Bergeron 1995; Maes ve ark. 1999; Pérez ve ark. 1997; M. B. Stein ve ark. 2001). SSRI' lerle eşzamanlı olarak kullanılan pindololun, dorsal raphe nükleusundaki presinaptik somatodendritik 5-HT1A otoreseptörlerini tek başına bir SSRI' dan daha hızlı bloke ettiği hipotezi öne sürülmüştür.

Diğer alt tiplerin fonksiyonları belirsizlğini korumasına rağmen, reseptör alt tipleri aynı zamanda 5-HT3'den mide-bağırsak rahatsızlığına, örneğin ters etkilere katkıda bulunur. Genel olarak, *in vitro* çalışmalar SSRI'ların alfa, histaminik ve muskarinik reseptörler gibi olumsuz etki profilleri ile tutarlı olan diğer nöro detektörler için çok düşük afiniteye sahip olduklarını göstermektedir (DeVane 1998; Goodwin 1996).

Paroksetin, norepinefrin alımını inhibe ettiği görülen tek SSRI antidepresandır. Desipramin veya paroksetin verilen hastalardan alınan serumdaki insan transporter transfekte edilmiş hücrelerde norepinefrin ve serotonin taşıyıcı fonksiyonunu karşılaştıran bir çalışmada, her iki ilacın özellikle serotonin / norepinefrin gerialım inhibitörleri olarak, özellikle 40 mg veya daha yüksek paroksetin dozlarında etkin olduğu bulunmuştur. Sertralin, *in vitro* modellerde dopamin geri alım inhibisyonunu gösteren tek SSRI' dır. Bu veriler aynı zamanda SSRI' ların etki mekanizmalarında homojen olmadıkları fikrini de desteklemektedir.

1.2.5. Hamilelik Sırasında SSRI Kullanımı

Perinatal depresyonu tedavi etmek için çok çeşitli ilaçlar mevcuttur bunlar; birinci nesil trisiklik antidepresanlar (TCA' lar), monoamin oksidaz inhibitörleri (MAOI'ler), serotonin-norepinefrin geri alım inhibitörleri (SNIR'ler), seçici norepinefrin geri alım inhibitörleri (NRI' ler) norepinefrin ve dopamin geri alım inhibitörleridir (NDRI' ler) (Rahola 2001). Bununla birlikte erişkinlerde birinci kuşak antidepresanlara göre etkinlik ve güvenirliğinin bir sonucu olarak (Caley ve Kando 2002; Fitzgerald ve Bronstein 2013), Fluoksetin (Prozac), sertralin (Zoloft), paroksetin içeren Seçici Serotonin Geri Alma İnhibitörleri (SSRI) Gebe ve postpartum kadınlarda fluvoksamin (Luvox) ve sitalopram (Celexa) ilk basamak tedavi olarak önerilmektedir (Moses-Kolko ve Roth 2004; Pirraglia, Stafford, ve Singer 2003). Epidemiyolojik veriler, tüm kadınların % 50'den fazlasının gebelikte reçeteli ilaç kullanacağını ve en sık kullanılan madde sınıfının SSRI olduğunu göstermektedir (Mitchell ve ark. 2011).

1.2.6. SSRI'ların Gastrointestinal Etkisi

Hastaların en sık karşılaştığı SSRI'ların gastrointestinal yan etkileri, bulantı, tüm hastaların % 15-35'inde görülür (Frazer 1997; Rickels ve Schweizer 1990). Bazı hastalar da kusma veya ishal yaşanabilir (S.M. 2001). Bunlar, çoğu durumda birkaç haftalık tedaviden sonra zamanla azalma eğilimindedir. Bu durumlarda, dozun düşürülmesi başarısız olursa, spesifik tedaviye yönledirilir. Ondansetron veya diğer 5-HT3 blokerleri (mirtazapin) bulantı için çok etkilidir. Ranitidin dispepsi için yararlı olabilir; ishali azaltmakta Loperamid kullanılabilir. Bazen, bir ilaç değişimi gereklidir. Örneğin, ishal problemli ise, ilacı Paroksetin ile değiştirmek yardımcı olabilir.

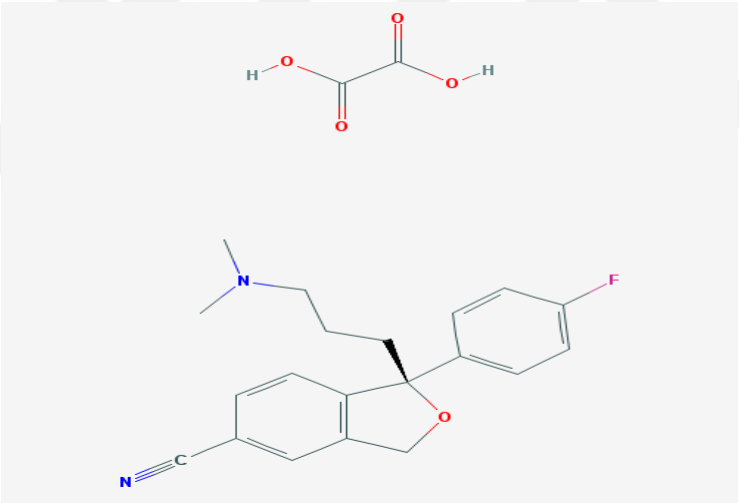
Kolestatik veya hepatosellüler hasar şeklinde çok nadir görülen hepatotoksisite vakaları Fluoksetin, Sertralin ve Paroksetin ile bildirilmiştir (Cai ve ark. 1999; Carvajal García-Pando ve ark. 2002). Bu tür vakaların insidansı oldukça

düşüktür. Örneğin, Sertralin 100,000 hastada yıl başına 1.28 vakada hepatotoksisite ile ilişkilendirilmiştir (Carvajal García-Pando ve ark. 2002).

1.3. Escitalopram Oksalat

Escitalopram Oksalat, Cipralex ve Lexapro isimleri ile satılmaktadır. Lexapro (escitalopram oksalat) oral yolla uygulanan selektif serotonin geri alım inhibitörüdür (SSRI). Escitalopram, rasemik bisiklik ftalat türevi sitalopramın saf S-enantiomeridir (tek izomeri). Escitalopram oksalat, aşağıdaki yapısal formüle sahip S- (+) - 1- [3- (dimetil-amino) propil] -1- (p-florofenil) -5-fitalat karbonitril oksalat olarak adlandırılır:

C22H23FN2O5 ve moleküler ağırlığı 414.433'tür.



Şekil 1.3. Escitalopram oksalat'ın 2D yapısı Moleküler formülü

Escitalopram oksalat ince, beyaz ve hafif sarı bir toz halinde olup metanol ve dimetil sülfoksit (DMSO) ve İzotonik salin solüsyonunda çözünür. Su, etanol ve Etil asetat' da az çözünür, heptan'da ise çözünmez.

Piyasada Lexapro (escitalopram oksalat) tablet olarak veya oral bir çözelti olarak mevcuttur.

1.3.1. Escitalopram Oksalat'ın Dozaj Formları

Oral uygulamadan sonra, EO hızla ve neredeyse tamamen emilir. Lexapro tabletleri, film kaplı, 5 mg, 10 mg ve 20 mg Escitalopram oksalat içeren yuvarlak tabletlerdir. 10 ve 20 mg tabletler ayrıca talk, kroskarmeloz sodyum, mikrokristal selüloz/kolloidal silikon dioksit ve magnezyum stearat bileşenleri içerdiği gibi film kaplaması hipromelloz, titanyum dioksit ve polietilen glikol içerir.

Depresyon tedavisinde Escitalopram Oksalat' ın başlangıç dozu günlük 10 mg iken (günlük bir adet),bu doz 20 mg'e arttırılabilir. Escitalopram hidroklorür ise oral yolundan uygulanamadığı durumlarda benzer dozlarda intravenöz infüzyon ile de verilebilir. Agorafobi olan veya olmayan panik bozukluğun tedavisinde, ilk EO dozu günlük olarak 10 mg iken, bir hafta sonra günde 20 mg'a çıkar (Forest Laboratories 2012).

1.3.2. Escitalopram Oksalat'ın Farmakolojisi

Beyin interneuronal sinapslarında seçici serotonin geri alım inhibisyonu, EO'nuntemel etki mekanizmasıdır. Sıçan'ın beyin sinaptozomlarında EO, serotoninin yeniden emilmesini sitalopramdan daha etkili şekilde bloke eder (Sanchez, Bogeso, Ebert, Reines, & Braestrup, 2004). EO, noradrenalin ve dopaminin geri alımını doğrudan etkilemez (Sanchez ve Ark., 2004).

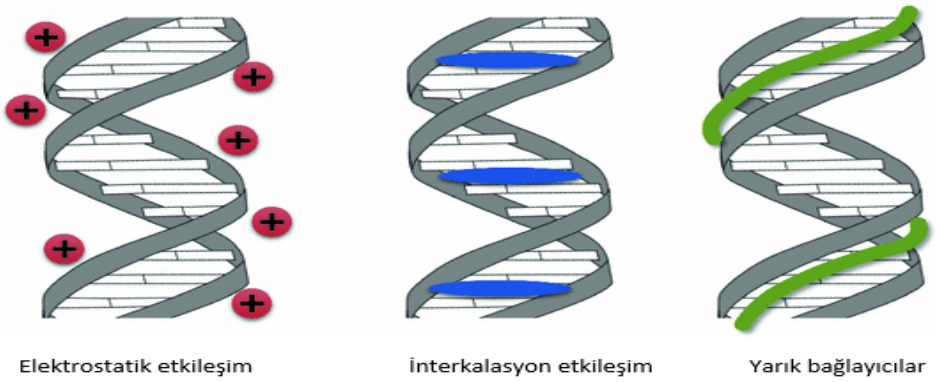
Owens ve ark. hücre zarı kullanarak insan serotonin, noradrenalin ve dopamin taşıyıcılarının çeşitli selektif serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI' lar) tarafından inhibisyonunu doğrudan ölçmüştür (Owens, Knight, ve Nemeroff 2001). Ayrıca bu paradigmada, EO serotonin taşıyıcısı için yüksek bir afinite (reseptör afinitesi [Ki]: 1.1 nM) ve diğer iki taşıyıcı için düşük afinite (sırasıyla Ki: 7841 ve 27,410 nM) uygulanmıştır. Test edilen tüm SSRI' lardan EO en seçici özellikte olanıdır. Ancak en güçlü inhibitörler paroksetin (Ki:0.1nM) ve sertralin (Ki:1.1nM) olarak belirlenmiştir. Paroksetin'de noradrenalin ve dopaminin geri alımını inhibe etmiştir. *In vivo* olarak, escitalopram sıçan beynindeki hücre dışı serotonin konsantrasyonunu sitaloprama göre daha yüksek bir düzeye çıkarırken, R

sitalopramın bu açıdan hiç veya minimal bir etki göstermemiştir. Diğer araştırmalar R-sitalopram, escitalopramın hücre dışı serotonin seviyelerini arttırmak için kapasitesini azalttığını göstermiştir. Ayrıca davranışsal çalışmalar'da R-sitalopramın, escitalopram (antidepresant ve anksiyolitik benzeri etkiler) ile mücadele etmede etkili olduğunu göstermiştir (Mørk, Kreilgaard, ve Sánchez 2003). Escitalopramın R-sitalopram tarafından antagonizması; iki enantiyomer arasındaki doğrudan etkileşimin, serotonin taşıyıcının belirli bir yerinde meydana gelebileceği varsayılmaktadır. Sonuçlar, R-sitalopramın, sadece serotonin geri alım inhibisyonunun aktif bölgesi için ligandın afinitesini düzenleyen taşıyıcının allosterik bölgesi için önemli bir afiniteye sahip olduğunu göstermiştir (Jacquot ve ark. 2007).

1.4. Küçük Moleküllerin DNA Ile Etkileşim Yolları

Küçük moleküller DNA ile kovalent bağ ve kovalent olmayan bağlarla etkileşimde bulunurlar. Bu kovalent olmayan bağların türleri aşağıdakı gibi sıralanmaktadır:

a) Elektrostatik etkileşimler
b) İnterkalasyon etkileşimler
c) Yarık bağlayıcılar (Groove Binders)



Şekil 1.4. DNA etkileşim türleri

Moleküllerin geometrisi ve kimyasal yapısı gibi özelliklerine bağlı olarak,moleküllerin DNA ile etkileşimleri farklılık göstermektedir. Moleküllerin DNA ile etkileşim türlerinin aşağıdaki şekillerde olabilmektedir:

1) Elektrostatik Etkileşim

DNA'nın dış yüzeyinde bulunan guruplarla yapılan etkileşimlerin neredeyse tamamı bu etkileşim tipine dahil olmaktadır. Diğer etkileşimlerden zayıf olmasına rağmen ilaçların biyolojik aktivitelerinde önemli rol oynamaktadır.

2) İnterkalasyon etkileşim

Klasik interkalatörler kendilerini DNA baz çiftleri arasına yerleştirilen çok halkalı aromatik halkalardır. Aromatik interkalatörlerle DNA'nın iç kısmında bulunan yapıların hidrofobik çekme kuvvetleri bu sistemlerin kararlılığını belirlemektedir. İnterkalasyon esnasında küçük bir ligand DNA baz çiftleri arasına yerleşerek sabit bir sandviç benzeri yapı oluşturur.

3) Yarık Bağlayıcılar (Groove Binders)

İlaçlar son yıllarda saptanan ve güçlü bir etkileşim olan yarık bağlama yoluyla da DNA ile kovalent olmayan bağlar yaparlar. DNA boşluklarına bağlanan ilaçlar gibi küçük moleküller genelde minör yarık üzerinden etkileşime girerken protein ve oligonükleotit gibi daha uzun moleküllerin major yarık yoluyla DNA'ya bağlandıkları görülmüştür.

Küçük oluk bağlayıcılar sıklıkla güçlü AT seçiciliği gösterir. AT bölgelerindeki küçük olukların boyutları GC konumlarından daha dar ve daha derindir. Aynı zamanda, AT bölgelerindeki topoloji, daha kolay doldurma ve daha büyük van der Waals'ın küçük moleküller ile temas etmesine izin verirken, GC konumlarındaki G amino grubu oluk içine yapışır, böylece AT bölgelerine göre,GC konumlarında van der Waals'ın olmadığı gösterilmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Dusman ve ark. *Allium cepa* hücreleri ve Wistar sıçan kemik iliği hücrelerinde Fluoksetin'nin sitotoksik ve mutajenik aktivitesini araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda Fluoksetin'nin sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır ve bu ilacın tedavide A veya C vitamini ile eşzamanlı kullanılması önerilmiştir (Dusman ve ark. 2014).

Arimochi ve Morita (2006) farklı antidepresanların insan HT29 kolon hücrelerinde sitotoksik etkisini araştırmışlardır. Yapılan bu araştırmadan elde edilen sonuçlara göre Imipramin, Desipramin ve Amitriptilin gibi bir trisiklik antidepresan ilaçlara maruz kaldığında hücre canlılığının azaldığını göstermiştir (Arimochi ve Morita 2006).

Gil-Ad ve ark. (2008) SSRI'lar grubundaki antidepresanların sitotoksik etkisini insan kolorektal karsinoma hücre (HT29) hücrelerinde incelemişler. Sonuçta Paroksetin ve Sertralinin hücre proliferasyonunu doza bağlı inhibe ettiği saptanmıştır (Gil-Ad ve ark. 2008).

Çobanoğlu ve ark (2018) Doksepin ve Escitalopram'ın dört farklı konsantrasyonda (1, 2.5, 5 ve 10 mg / mL) insan periferal lenfositlerine 24 saat'lik etkisini araştırmışlardır. Her iki ilacın test edilen tüm konsantrasyonlarda mitotik inhibitör etki göstermediğini bulmuşlardır. Ayrıca bu araştırmadan elde edilen sonuçlar DNA hasarında ve mikronükleus (MN) oluşumunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmezken, 5 ve 10 mg / mL escitalopramın neden olduğu kardeş kromatid değişimi artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca, MN oluşumunda Doksepin kaynaklı artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 10 mg/mL Doksepinin kardeş kromatid oluşumunu önemli derecede arttırdığı gösterilmiştir. Bu bulgular, incelenen Escitalopram ve Doksepin konsantrasyonlarının sitotoksik olmadığını, ancak daha yüksek konsantrasyonlarda genotoksik olduğunu saptamışlardır (Cobanoglu ve ark. 2018).

Shoman ve ark. (2004), Cipralex'in majör organogenez boyunca sitogenetik ve gelişimsel etkilerini değerlendirmek için farelere, 1-18 gün boyunca 0.06, 0.12 ve 0.24 mg / kg / gün konsantrasyonlarda gavaj yoluyla Cipralex vermiş. Bu çalışmanın sonuçlarına göre Cipralex farklı dozlarda üreme parametrelerinde önemli toksik etkiler yaratmıştır. Test edilen doz seviyelerinde toplam implantasyon sayısı ile gösterildiği üzere cipralexin embriyo üzerine fetotoksik etkileri gözlemlenmiştir. İmplantasyon kaybı ve embriyo malformasyonları, Cipralex ile tedavi edilen hem maternal hem de embriyonik hücrelerde mikronükleus ve kromozomal aberasyonların sıklığında artışlar olmuştur. Bu artışlar doza bağlı şeklinde olmuştur. Bu sonuçlar, Cipralex'in hamilelik sırasında uygulandığında sitogenetik ve embriyotoksik ilaç olarak kabul edildiğini göstermektedir (Shoman 2004).

Battal ve ark. (2013) sertralin ile muamele edilen Wistar albino sıçanların periferik kan lenfositlerinde sertralinin genotoksisite potansiyelini araştırmak için komet analizi ve sitokinez - blok mikronükleus (CBMN) testi kullanmışlardır. Erkek Wistar albino sıçanlara (n = 48), uygulanan ilacın genotoksisitesini araştırmak için gavaj yöntemini kullanarak akut ve kronik tedavi için düşük, orta ve yüksek dozlarda sertralin (10, 40, 80 mg / kg) verilmiştir. sonuçlar (kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti) analiz edilmiş ve sertralin ile muamele edilen gruplar ile negatif kontrol grubu arasında DNA hasarı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ortaya konmuştur ($p > 0.05$). Ancak, akut sertralin uygulamasının kronik tedavi ile karşılaştırıldığında çok daha fazla DNA hasarı oluşturduğu gözlenmiştir ($p < 0.05$). CBMN testinden elde edilen verilere göre, kronik ve yüksek dozda akut sertralin tedavisinde mikronükleus (MN) sıklığında artış tespit edilmiştir. komet analizinin sonucuna göre, istatistiksel olarak önemsiz DNA hasarının saptanması, sertralinin DNA'ya zarar vermemesinden kaynaklanabilir. Ayrıca, kronik sertralin tedavisinde MN sıklığında artış, kronik sertralin uygulamasının bazı hücre bölünme mekanizmalarını etkileyebileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, depresyonlu

hastalarda doz ayarlaması, hastalıkların daha fazla prognozunu önlemeye yardımcı olabileceğinden, anlamlı görüntülenmiştir (Battal ve ark. 2013).

Ilgin ve ark. (2017) Sitalopram hidrobromürü 28 gün boyunca gavaj yoluyla 5, 10 ve 20 mg /kg konsantrasyonlarında sıçanlara uygulamışlardır. Daha sonra sıçanlarda sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi bilgisayar destekli bir sperm analiz sistemi kullanılarak araştırılmış ve Komet testi kullanılarak sperm DNA hasarı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, Sitalopram uygulanan gruplarda sperm konsantrasyonu azalmış, anormal sperm morfolojisi ve sperm DNA hasarının arttığını göstermiştir (Ilgin ve ark. 2017).

Pereira ve ark.(2009) Komet testi ile Duloksetin'in genotoksik etkisini beyin dokusu ve kan DNA'sı üzerinde araştırmışlardır ve sonuç olarak Duloksetin'in genotoksik etkisinin olmadığını belirtmişlerdir.

Bendele ve ark. (1992), *in vivo* bir çalışmada Fluoksetin hidroklorid ilacının kanseronerjik etkisini incelemişler ve sonuç olarak Fluoksetin'in tümör ve neoplazma oluşumunda bir etkisi olmadığını tespit etmişlerdir.

Davies ve Kluwe (1998), Sertrali 'nin farelerin üremesinde etkisini, *in vivo* bir çalışmada araştırmışlar ve sonuç olarak yeni doğan yavruların sayıları ve büyüme hızlarının azalması arasında bir ilişki olduğunu ortaya çıkarmışlardır.

Chou ve ark. (2008) Paroksetin'in osteosarkoma (kemik kanseri) hücrelerinde sitotoksik etkisini araştırmışlar ve bu çalışmada sonuç olarak Paroksetin hücrenin yaşam süresini konsantrasyon ve zamana bağlı olarak azalttığını göstermişlerdir. Ayrıca propidium iodid boyama yöntemi ile Paroksetin'in apoptoza sebep olup olmayacağını araştırmışlar ve sonuçte ilacın apoptoza neden olduğu ve kaspaz-3 aktivitesini artırdığını ortaya çıkarmışlardır.

Belowski ve ark. (2004), *in vitro* ve *in vivo* testlerle yapılmış olan bir çalışmada Fluoksetin'in sıçanların makrofajları üzerinde sitotoksik etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonunda Fluoksetin'in makrofajlara karşı sitotoksik etkiye sahip olduğunu belirlemişler

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Maddeler Ve Laboratuvar Cihazları:

1. UV-vis spektrofotometre (OptiZen, UV-1800)
2. Sterilizatör (Fırın) Nuve, FN 120)
3. Otoklav (Nüve, buharlı sterilizatör)
4. Mikrodalga fırın (Altus, Almd 17B)
5. İnkübatör (THERMO SCIENTIFIC, 866-9-termal)
6. Çalkalamalı inkübatör (Edmund Buhler, KS15A)
7. Elektroforez cihazları (yatay) (Thermo)
8. -20ºC ve 4ºC buzdolabı (Altus)
9. Hassas tartım makinesi (Radwag, AS 220.R2)
10. Jel görüntüleme cihazı (VILBER, E-BOX-VX2)
11. Laminar Akış Kabini (Core, LN 090)
12. Mikroplaka okuyucu, Thermo Fisher
13. CO_2 İnkübatörler, Thermo Fisher Scientific
14. Pall® Acrodisc® cam elyaf şırınga filtreleri Z260479-1PAK
15. Pipet uçları 10 ul
16. Pipet uçları 200 ul
17. Pipet uçları 1000 ul
18. Mikrosantrifüj tüpleri 1.5 ml
19. 100 bp DNA
20. Plazmid DNA, *E.coli* BL21DE3
21. Dimetil Sülfoksit (DMSO) 5 ml
22. MikroPlaka
23. Flask
24. RPMI medium 1L
25. NIH İsviçre fareleri embriyosu(NIH 3T3) hücre hattı

26. Agaroz (Sigma, A9539)
27. MTT(Metiltiyazolil Diphenyl-tetrazolium bromür)
28. Vorteks
29. Mikroskop
30. Metanol
31. Whatman filtre kağıdı
32. mikrofiltrasyon (0.2 µm)
33. Tris-HCl tamponu
34. Etidyum bromür

3.2. Metodlar

3.2.1. Escitalopram Oksalatın Absorpsiyon Titrasyonu Ile DNA'ya Bağlanma Aktivitesi

Tüm ölçümler, bir Tris-HCl tamponu (5 mM) kullanılarak pH 7.4'te yapıldı. EO çözeltisinin emilimi, plazmidin artışlarının olduğu sabit bir madde konsantrasyonu (0.048 uM) kullanılarak gerçekleştirildi. DNA stok çözeltisi (50 µg / ml) eklenmiş ve her DNA eklenmesinden sonra emiciliği (238 nm'de) kaydeden UV-Vis ile analiz edilmiştir. İlaç-DNA çözeltileri, absorpsiyon spektrumları kaydedilmeden önce her seferinde 10 dakika boyunca kuluçkaya bırakılmıştır. inkübe edildi(Coban & Yildiz, 2014; Sharma ve ark., 2010).

EO'nun Kb'ye bağlanma sabiti, Wolfe-Shimer denklemi ile hesaplandı:

$A_0/A-A_0 = \varepsilon_0/\varepsilon-\varepsilon_0 + \varepsilon_0/\varepsilon-\varepsilon_0(1/K[DNA])$

[DNA], baz çiftleri ölçeğinde DNA konsantrasyonudur. A_0 ve A, sırasıyla DNA'nın yokluğunda ve varlığında EO'nun emilimleridir ve ε0 ve ε kendi emilim katsayılarıdır. Kb denge bağlanma sabitidir (Sohrabi, 2015).

3.2.2. Essitalopram Oksalatın DNA Üzerinde Etkisi

EO' nun DNA üzerinde genotokosik risk oluşturup oluşturmadığı pET22b plazmid DNA (Novagen) üzerinde denenmiştir. Bu amaçla 0.5273 µmol pET22 plazmid DNA 37 ° C'de 1 saat boyunca farklı miktarlarda Escitalopram (52.73, 5.273, 0.5273, 0.05273, 0.005273 µmole) ile muamele edildi. Bu araştırmada, muamelesiz kontroller (pET22b plazmid DNA) da kullanılmıştır. İnkübasyondan sonra, reaksiyon karışımı 120 volt'ta 50 dakika % 1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Elektroforez işleminden sonra jel boyanmıştır ve analiz edilmiştir (Tazehkand ve ark., 2016). İlacın DNA' da hasar oluşturma özelliğini anlamak için $CuCl_2$ varlığında pET22b DNA bir saat boyunca farklı miktarda Escitalopram (52.73, 5.273, 0.5273, 0.05273, 0.005273 µmole) ile muamele edilmiştir sonrasında 0.003 µmol CuCl2, $2H_20$ içeren 0.5273 µmol pET22 plazmit DNA'sı ile muamele edilerek % 1 agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur. Aynı miktarda DNA içeren ve $CuCl_2$ ile $2H_2O$ içermeyen numuneler ile Escitalopram kontrol olarak kullanılmıştır (Tan Jun, 2007).

3.2.3. Escitalopram Oksalatın Çift Iplikli DNA Hasarına Yol Açan Fenton'a Karşı Koruyucu Etkisi

EO'nun OH radikaline karşı koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmak için 1 saat boyunca farklı miktarlarda EO (52.73, 5.273, 0.5273, 0.05273, 0.005273 µmole) 0.5273 µmol pET22 plazmid DNA ve 0.12 µmol H_20_2 ile muamelesi sağlanmıştır ve muamele edilen örnekler % 1 agaroz jel elektroforez analizine tabi tutulmuştur (Lee ve ark., 2017).

EO'nun DNA üzerindeki oksidatif maddeye karşı koruyucu etkilerini incelemek için Ul-Haq ve arkadaşlarının kullandığı prosedür takip edilmiştir (Haq Ihsan ve ark., 2012). Farklı miktarda EO (52.73, 5.273, 0.5273, 0.05273, 0.005273 µmole)0.5273 µmol pET22 plazmid DNA, 0.003 µmol FeSo47H_20, 0.12 mol H_20_2 muamele edilmiştir. Ayrıca negatif kontrol (EO dışında tüm bileşenleri içermektedir) ve pozitif kontrol (sadece pET22b DNA) kullanılarak. hazırlanan

örnekler 37 °C'de 10 dakika inkübe edilerek % 1 agaroz jel elektroforezine tabii tutuldu.

3.2.4. Essitalopram Oksalatın Bakteri Üremesi Üzerindeki Etkisi

Çalışmamızda gram pozitif bakteri olarak *Bacillus subtilis* gram negatif bakteri olarak *E.coli* kullanmıştır. Minimum inhibitör konsantrasyon (MIC), büyümeyi inhibe eden en düşük konsantrasyon olarak ifade edilmektedir. Bakteriler normal besyerinde bir gece kültüre edildikten sonra farklı Escitalopram oksalat konsantrasyonu içeren Mueller Hinton besiyerinde başlangıç konsantrasyonu 45 mM olacak şekilde üç kez seyreltirelek içerisine bakteriler (0.5 McFarland yoğınluğunda hazırlanmış bakteriler) ekildi. Kültürler 12 saat 37 ° C'de 150 rpm'de inkübe edildi. Süre bitiminden sonra UV- spektrofotometrik (Shımadzu; 1 cm olarak ışık yolu uzunluğunda) ve CFU (koloni oluşturan birimler) sayımı kullanılarak 600 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçüldü. Çalışmanın bu bölümünde bakteri içermeyen ortam ve EO içermeyen ortam kontrol numunesi olarak kullanıldı ve bu testler üç defa tekrarlandı (Bär, Bäde-Schumann, Krebs, & Cromme, 2009).

İlacın Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu (MBC), bakterilerin CFU'sunun % 90'ını öldürebilen minimum ilaç konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Bu amaçla, *E.coli* ve *Bacillus subtilis* 24 saat boyunca farklı EO konsantrasyonlarıyla (45, 15, 5, 1.66, 0.55, 0.18 0.06, 0.02 mM) muamele edildikten sonra sıvı besiyerindeki bakteriler Mueller Hinton Agar besiyerine ekilerek 24 saat boyunca 37 ° C'de inkubasyonları gerçekleştirilmiştir (Wiegand, Hilpert, & Hancock, 2008).

3.2.5. Escitalopram Oksalat'ın Sitotoksik Etkisinin 3-[4,5-Dimethylthiazole-2-Yl]-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide Thiazolyl Blue (MTT) Testi Ile Belirlenmesi

MTT yöntemi ile hücrenin canlılığı ve proliferasyonu belirlenebilir. Hücrelerin mitokondriyal aktivitesini ölçmek için kullanılan genel bir yöntemdir. MTT reaktifi, hücre yokluğunda düşük arka plan absorbansı değerleri verir. MTT tahlilinde, metabolik olarak aktif hücreler ve üretilen renk arasındaki doğrusal ilişki kurulur, böylece hücre ölümü veya çoğalma hızındaki değişikliklerin doğru bir şekilde ölçülmesi sağlanır (van de Loosdrecht ve ark. 1994). MTT, ilaçların hücre canlılığına etkisi ve sitotoksisitenin değerlendirilmesi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. MTT'nin (sarı renkli) ve diğer tetrazolyum boyaların indirgenmesine dayanan MTT deneyi, NAD (P) H'ye bağlı selüler oksidoredüktaz enzimlerine bağlı hücresel metabolik faaliyetlere dayanır (Berridge, Herst, ve Tan 2005). Sağlıklı ve hızla büyüyen hücreler, ölü hücrelerin ya da inaktif hücrelerin yapamadığı durumlarda MTT'nin formazana indirgenmesini sağlar. Formazan MTT indirgemesinin son ürünü olup, DMSO içinde kolayca çözülebilen mor renkli bir bileşiktir. MTT testinde canlılık, 540 nm'de formazanın, enzim aktivitesi dolayısıyla canlı hücre sayısı ile doğrusal bir şekilde ilişkili miktarın belirlenmesini amaçlar. Mor renk yoğunluğundaki azalma, hücre sayısını ve dolayısıyla verilen maddenin sitotoksisitesini mor renk yoğunluğu yüksek hücre canlılığını belirtir. MTT testi, araştırmacıların test bileşiklerinden herhangi birinin hücre toksisitesine veya proliferatif aktiviteye sahip olup olmadığını belirlemelerine yardımcı olur (Mosmann 1983). MTT, suda PBS ve besiyerinde çözünürdür. MTT'nin indirgeme ürünü, kalorimetrik ölçüm için

çözülmesi gereken suda çözünmeyen mavi renkli formazan kristalleridir. Etanol, propanol, asit-izopropanol, asit-izopropanol artı % 10 Triton X-100, mineral yağ veya DMSO formazanın çözülmesi için önerilirken en yaygın olarak kullanılan DMSO'dur (Morgan n.d.).

Bu çalışmada EO'nun sitotoksik etkisini araştırmak için NIH fare embriyosu (NIH3T3)(Sigma)hücre hattı kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan NIH3T3 hücreleri % 10 sığır serumu, 100 U / ml penisilin ve 100 mg / ml streptomisin, % 2 FBS, 100 U / ml penisilin G ile desteklenmiş DMEM ile hazırlanmış besiyerine ekilmiştir ve 37 ° C'de % 95'lık nem ve % 5'lık $C0_2$''de inkübe edilmiştir.

İnkübasyon işleminden sonra kuyucuklardaki medium steril koşullarda atılmıştır ve EO beş farklı konsantrasyonda (50,100,200,400,800 µg/mL) 90 µl DMEM mediumunda eritilerek hücreler ile 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. Yapılmış olan bu araştırmada bir grup negatif kontrol (hücre konulmamıştır) ve bir grup ise pozitif kontrol (hücre konulmuştur ama EO yerine H_2O_2 konulmuştur) olarak kullanılmıştır. 24 ve 48 saatlik muamelelerin bitiminde hücreler inkübatörden çıkarılmıştır. Her kuyucuğa 10 µl MTT solüsyonu 5 mg/mL olacak şekilde PBS içinde çözülüp membran filtrede (Minisart, 0.20 µm) steril edilmiştir ve 4 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kuyucuklar'dakı uzaklaştırarak yerine 100'er µl DMSO eklenerek MTT indirgenmesi ile oluşan formazon kristallerini çözmek için 10 dakika 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Süre bitiminin sonunda mikroplate'ler mikroplate okuyucu cihazında 570 nm' de absorbans değerleri okunup kaydedilmiştir.

3.2.6. Moleküler Auto Dock Analizi

Biyolojik moleküller arasındaki moleküler tanıma biyolojik işlemlerin sinyal iletiminde merkezi bir rol oynar. Moleküler modellemede; kenetlenme, ligandların en iyi etkileşim yolunu öngören ve bir reseptörün birbirine

bağlandığında etkileşime gireceği bir hesaplama simülasyonudur (Kishimoto, Akira, ve Taga 1992).

İki popüler moleküler yerleştirme yaklaşımı vardır: geometrik eşleştirme ve yerleştirme simülasyonu. Geometrik eşleştirme yaklaşımı, bir dizi özellik açısından ligand ve proteini tamamlayıcı yüzeyler olarak tanımlanır. Bu özellikler, alıcının çözücüyle erişilebilir yüzeyini veya küresel moleküler yüzeyi ve ligand yüzey tanımlayıcısını içerir. Bu yaklaşımla, kenetlenme ligandın ve hedef proteinin serbest pozunu bulmak için şekil eşleşmesi haline gelir (Sousa, Fernandes, ve Ramos 2006). Şekil içermeyen yöntemler tipik olarak hızlı olsa da ligand/protein konformasyonunun dinamik değişikliklerini veya hareketlerini doğru şekilde simüle edememektedirler. Buna karşın, yerleştirme simülasyonu yöntemi bir robot gibi hareket eden ligandın protein enerji alanını araştırdığı ve konformasyon alanındaki belirli sayıda proteinin aktif bölgesine optimum pozu bulduğu gerçek yerleştirme işlemini simüle eder. Konformasyonel arama alanı ligandın farklı formlarını, oryantasyonları ve burulma rotasyonları ile tanımlanır. AutoDock, GOLD ve FlexX en popüler yerleştirme simülasyon programlarından bazılarıdır (Metropolis ve ark. 1953).

Yapılmış olan bu araştırmada AutoDock programı kullanarak EO'nun αβ tübülin ile olan etkileşimi araştırılmıştır.

3.2.6.1. Escitalopram Oksalat'ın Sitotoksik Etkişiminin Moleküler Autodock Programı Ile Analizi

Mikrotübüller, hücre bölünmesi ve morfogenezi gibi çeşitli hücresel fonksiyonlarda gerekli olan αβ tübülin heterodimerlerinin sito-iskelet polimerleridir. Mikrotübüllerin dinamiği, dinamik kararsızlık açısından tanımlanmaktadır (Mitchison ve Kirschner 1984). Mikrotübüller, hücresel iskeletin önemli bileşenleridir ve hareket, bölünme, farklılaşma, hücre içi iletimler ve sinyalleşme gibi birçok önemli hücresel süreçte rol oynarlar. Tubulin, bir hücre sitoplazmasında çözünebilen bir heterodimerdir ve bir alfa-tubulin alt kümesi ve bir

tubulin alt kümesi içerir. Son zamanlarda altı tip alfa-tubulin izoformu ve yedi tip β-tubulin izoformu tanımlanmıştır. Polimerizasyon işlemi sırasında ilk önce heterodimerler birbirleri ile birleşir sonrasında bu dimerler bir araya getirilir ve prototubulini oluştururlar. Bu prototubulin on üç tanesi boş bir silindir oluşturacak şekilde bir araya gelir ve mikrotübülün ana yapısını oluştururlar. Serbest tübülin heterodimerleri pozitif uçtan mikrotübül yapıya sürekli olarak ilave edilir veya diğer uçtan ayrılırak (negatif uç) çevreye salınırlar. Bu denge, mikrotübüllerle ilişkili proteinler dahil olmak üzere çeşitli faktörlerle kontrol edilir (Attard ve ark. 2006).

Mikro-kabarcıklar, büyüme ve azalma aşamaları arasında sürekli dalgalanan dinamik polimerlerdir. Mikrotübüllerin dinamiği guanozin trifosfatın hidrolizi ile düzenlenir. Bu dengesiz mikrotübül dinamizmi, farklı kimyasal maddeler ile karıştırılabilir ve hücre bölünmesi gücünün kaybına neden olabilir. Mikrobiyal instabilite ajanları polimerleşmelerini önler. Tubulin heterodimerlerini birleştirerek bu bileşikler mikrotübüllere polimerleşmelerini önler. Bu kimyasal maddelerden birisi kolşisindir (Stanton ve ark. 2011). Son on yılda, moleküler modelleme hesaplama yöntemlerinin bazı hastalıklar ve özellikle kanser için tedavi bulmakta kullanılması maliyet tasarrufu, zaman kısaltma ve kanser karşıtı özelliklere sahip yeni bileşiklere hızlı erişimde etkili olmuştur (Mahboobi, Sellmer, ve Beckers 2006). Yerleştirme molekülü, makromoleküllerin kovalen olmayan bağlanmasını veya çoğu durumda, bir makromolekül (reseptör) ile küçük bir molekül (ligand) arasındaki etkili bağlanmayı tahmin etmeyi amaçlayan hesaplamalı bir yöntemdir. Yerleştirme işlemi genellikle x-ışını kristalografisi veya NMR yöntemi kullanılarak elde edilen ve nadiren homoloji modellemesi üreten yapılara dayanır ve daha sonra dinamik moleküler simülasyonla dengelenir. Son olarak amaç, reseptöre çeşitli ligand bağlanma konfigürasyonlarını tahmin etmektir.

Yapılan bu araştırmada AutoDock programı kullanarak Escitalopram Oksalat'ın sitotoksik etkiye sahip olup olmadığı araştırılmıştır.

a) Protein (reseptör) ve ligandların Hazırlamanması:

Tubulinin (PDB id: 3ut5) kristalografik yapısı, protein veritabanından alınmıştır. Tüm su molekülleri, magnezyum iyonları, GDP, GTP ve diğer moleküller proteinden uzaklaştırılmıştır. C ve D Zincirleri seçilmiştir. Daha sonra protein yapısına hidrojen atomları ilave edildi ve elektrik yükü Kollman yükü kullanılarak belirlenmiştir. Daha sonra iyonlaştırılmamış hidrojenler birleştirilmiştir. Ligand olarak kolşisin ve EO'nun 3D yapıları Protein veritabanın'dan SDF formatında alındı ve DS Visualizer programı ile PDB formatına dönüştürülmüştür.

b) Moleküler yerleştirme

Bu çalışmada AutoGrid 4 ve AutoDock 4 içeren MGL 1.5.4 programı, alfa-beta tübül dimerleri ile EO ve kolşisin'in (kontrol olarak) arasında yerleştirme hesaplamaları oluşturmak için kullanıldı. X-ışını kristallografisi ile elde edilen serbest alfa-beta tubulin dimerlerinin (PDB id: 3DU7) yapısı bir şablon olarak kullanılmıştır. Alfa ve Beta Tubulin, x y z yönünde birkaç grid noktası, 60×60×60 ve 0,375 A grid aralığı ve merkez grid kutusu x y z merkezleri sırasıyla 36.13 , 54.813 , -6.097 A olan bir kutu içine yerleştirildi. Diğer tüm parametreler varsayılan ayarlardır. Her yerleştirme vakası için Autodock puanlama işlevine göre en düşük enerjili yerleştirilmiş konformasyon seçilmiştir. Autodock' dan çıkan sonuçlar DS Visualizer V 2017 ile değerlendirildi.

AutoDock'ta, belirli bir ligand molekülünün aktif bölgesinde genel yerleştirme enerjisi aşağıdaki şekilde ifade edilir:

$$\Delta G = \Delta G_{vdw} \sum_{ij} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^{6}} \right) + \Delta G_{hbond} \sum_{ij} \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} + E_{hbond} \right) + \Delta G_{elec} \sum_{ij} \frac{q_i - q_j}{\varepsilon(r_{ij}) r_{ij}} + \Delta G_{tor} N_{tor} + \Delta G_{sol} \sum_{ij} S_i V_j e^{\left(-r_{ij}^2 / 2\sigma^2\right)}$$

ΔG_{vdw}, ΔG_{hbond}, ΔG_{elec}, ΔG_{tor} ve ΔG_{sol}, simgeleri sırasıyla van der Waals, hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler, torsiyonu, ve protein-ligand kompleksinin çözülme enerjisi serbest enerji katsayılarına karşılık gelmektedir. rij, Aij, Bij, Cij ve Dij sırasıyla iki atom arasındaki mesafeleriyi, enerji derinliğini ve denge mesafelerini temsil eder. İlk üç terim, moleküller arası etkileşimler için güç sağlayan enerjileridir. Dördüncü terim ise ligand molekülünün iç enerjisini oluşturur. AutoDock tarafından kullanılan ve belirlenen enerjiler ayırt edilmelidir, çünkü moleküller arası etkileşim enerjilerini içeren kenetlenmiş enerjiler vardır ve kenetlenme sırasında serbest enerjileri öngörmek için kullanılır. Moleküller arası enerji ve serbest enerjisi bir yerleştirme işleminin sonunda rapor edilir (Ali ve ark. 2010).

3.2.6.2. Escitalopram Oksalat'ın DNA Ile Etkileşiminin Autodock Programı Kullanarak Analiz Edilmesi

AutoGrid4 ve AutoDock4 ile MGL Tools 1.5.4, farklı kimyasaller ve DNA arasında kenetlenme hesaplamaları kurmak ve uygulamak için kullanıldı. Protein Veri Bankasından (PDB ID: 1BNA) elde edilen DNA dizisi (CGCGAATTCGCG)2, kenetleme çalışmaları için kullanılmıştır. Escitalopram ilacının yapısı da aynı şekilde protein veri bankasın'dan (PDB ID:68P) elde edilerek kullanıldı. Reseptör (DNA) ve ligand (ilaç) AutoDock programı kullanılarak biraraya getirildi. İlk olarak su molekülleri de olmak üzere

heteroatomlar silinerek DNA x , y , z yönlerinde 52 × 52 × 104'de ve 0.375 A'lık bir grid aralığındaki bir dizi grid noktasına sahip bir kutu içine konulmuştur. Lamelckian genetik algoritmalar, AutoDock'ta yapıldığı gibi yerleştirme hesaplamaları gerçekleştirmek için kullanıldı. Diğer tüm parametreler varsayılan ayarlardır. Yerleştirme durumlarının her biri için, Autodock skorlama işlevine göre en düşük enerji yerleştirilmiş konformasyon bağlanma modu olarak seçilmiştir. Yerleştirme pozunun görselleştirilmesi, Discovery Studio 2017 ve MGL Tools programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMALAR

4.1. Bulgular

4.1.1. Escitalopram Oksalatın Hazırlanması

20 mg EO tableti ince bir toz haline getirildikten sonra metanol ve su ile 8: 2 oranında çözüldü. Daha sonra çözeltiler önce Whatman filtre kağıdından, ardından mikrofiltre (0.2 µm por çapında) kullanılarak filtre edildi. İlaç konsantrasyonunu doğrulamak için filtre edilen çözelti Beer-Lambert kuralına göre spektrofotometre analizine tabi tutuldu.

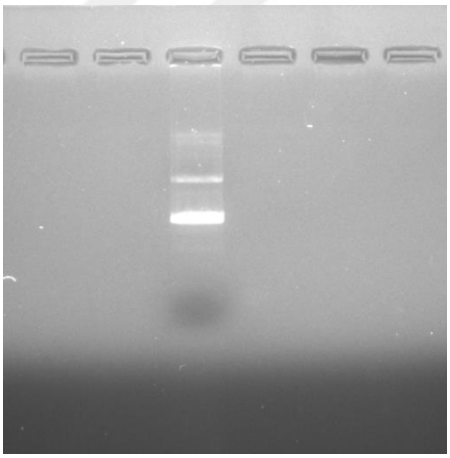
4.1.2. Plazmit DNA'nın Hazırlanması

Plazmid DNA *E.coli* BL21DE3'ten bakterisinden Wizard®Plus SV Minipreps DNA izolasyon kiti (Promega) kullanılarak saflaştırıldı.

1. Bakteri LB besiyerine ekildikten sonra 37°C'deki çalkalayıcılı inkübatörde bir gece inkübe edildi.
2. 1-5 mL gecelik taze kültür 10.000 g'de 5 dk santrifüj edilip ve supernatant atıldı.
3. Bakteri pelletinin üzerine 250 µL hücre süspansiyon çözeltisi ilave edilmiştir ve vorteks ile karıştırıldı.
4. 250 µl hücre lizis tamponu ilave edildikten sonra 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
5. 10 µl alkali proteaz çözeltisi ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.
6. Daha sonra 350 µl nötralizasyon çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı.
7. Tüpler 14.000 g'de 10 dk santrifüj edilip, supernatant toplama tüpünün içine yerleştirilmiş olan minikolona aktarıldı.
8. 14.000 g'de oda sıcaklığında 1 dk santrifüj edildi.

9. Minikolondan toplama tüpüne geçen sıvı atılıp, minikolona 750 µL kolon yıkama çözeltisi ilave edildi.
10. 14.000 g'de 1 dk santrifüj edilip ve toplama tüpüne geçen sıvı atıldı.
11. Minikolona 250 µl kolon yıkama çözeltisi ilave edilip ve 14.000 g'de 2 dk santrifüj edildi.
12. Minikolon temiz bir 1.5 ml'lık eppendorf tüpüne yerleştirip ve içine 100 µl nükleazsız su ilave edildi.
13. Eppendorflar 14.000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
14. İzole edilen pazmid DNA -20 °C'ye konuldu.

İzolasyon işleminden sonra Plazmid DNA'lar agaroz jel elektroforezi ve UV spektroskopisi ile kontrol edildi. DNA konsantrasyonu 260 nm dalga boyundaki absorbansa göre hesaplandı (50 µg / mL için A260 = 1.0)(Valipour, Moosavi, Amani, & Nazarian, 2014).

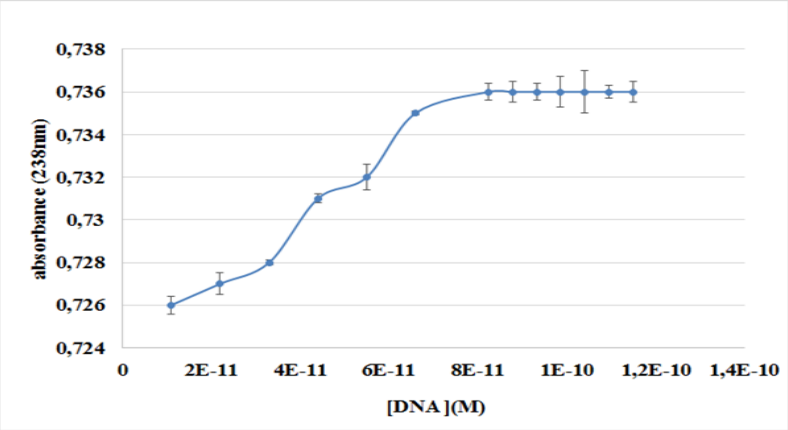


Şekil 4.1. pET22b vektörüne ait agaroz jel elektroforez görüntüsü

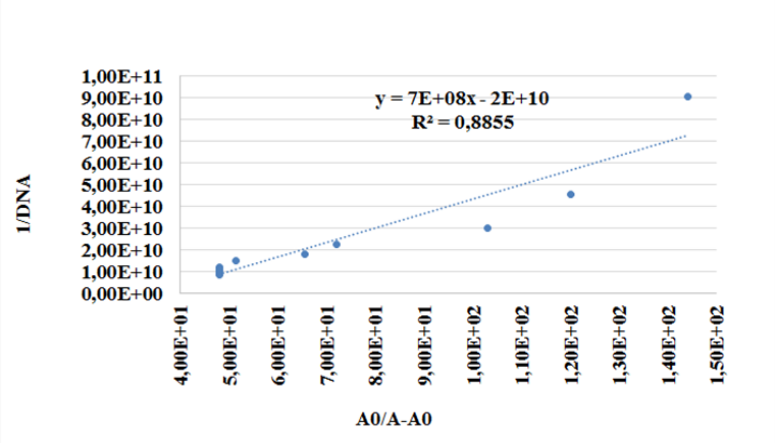
4.1.3. UV-Görünür Spektrum Ölçümleri

DNA çözeltisi (50 µg/ml) EO çözeltisinin üzerine kademeli olarak eklendiğinde (0.048 µg/mL) çözeltinin abzorbans değeri 238 nm dalga boyunda

yeni oluşan DNA konsantrasyonu neredeyse 6×10^{-7} Molar'a ulaştığı gösterildi. Bu artış Escitalopram ve DNA arasında bir hiperkromik etkileşim olduğunu göstermektedir. İlaveten, spektroskopik titrasyondan elde edilen absorbans değerlerine dayanarak DNA'ya bağlama sabiti (Kb) hesaplandı. Kb için elde edilen değer 0.035 M^{-1} olmuştur. Elde edilen değer EO'nun DNA'ya bağlanmasını göstermiştir.



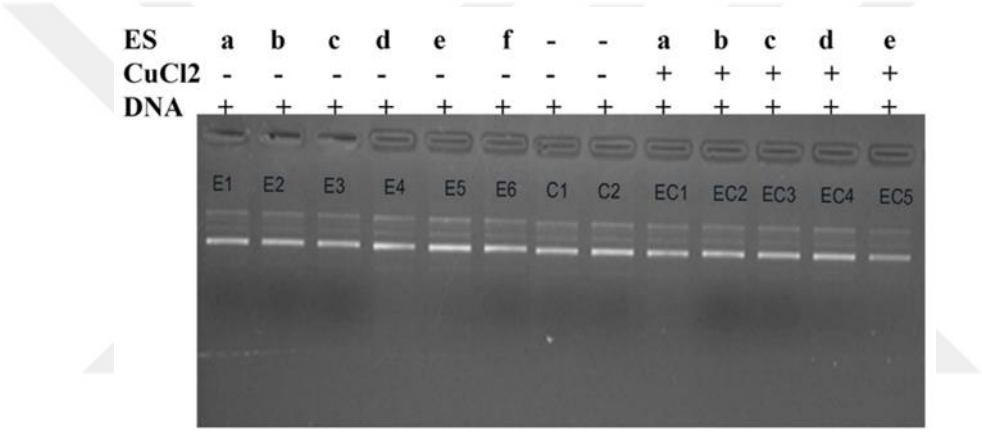
Şekil 4.2. Absorbans titrasiyonunun grafiği



Şekil 4.3. DNA 'ya karşı (A0/A – A0) grafiği. Koşullar: CEO = 0.048 olmol/L

4.1.4. Escitalopram Oksalat'ın DNA Üzerindeki Etkisi

Agaroz jel elektroforezinde farklı EO konsantrasyonlarında (52.73, 5.273, 0.5273, 0.05273, 0.005273 µmole) çift zincirli DNA'da herhangi bir kırılma görülmemiştir. Farklı EO kosantrasyonları ile muamele edilmiş DNA ile kontrol DNA'sı arasında herhangi bir fark göstermemiştir. Ek olarak, karışıma $CuCl_2 2H_20$ eklendiğinde, kontrol DNA'sı ile karşılaştırıldığında çift sarmallı DNA'da herhangi bir kırılma ortaya çıkmamıştır.

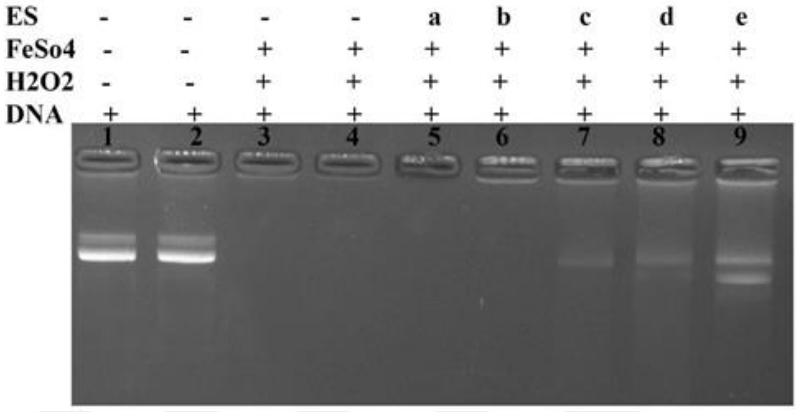


Şekil 4.4. Plazmid DNA'nın (0.5273 µmol bp) EO ve EO artı CuCl2 2H2O (0.5273 µmol) ile muamelesi ve agaroz jel (%1) elektroforez analizi. Toplam 14 ul hacim, E1, E2, E3, E4, E5, E6, C1 ve C2 kuyularına ve EC1, EC2, EC3, EC4 ve EC5 kuyucularına 17,5 ul yüklenmiştir. a, b, c, d, e ve f sırasıyla 52.73, 5.273, 0.5273, 0.05273, 0.005273 ve 0.0005272 µmol'ü temsil eder. Artı veya eksi işareti varlığı veya yokluğu gösterir

4.1.5. Escitalopram oksalatın fenton'un oluşturduğu DNA hasarına karşı koruyucu etkisi

EO ve H_20_2 karışımı çift zincirli DNA'da herhangi bir hasara sebep olmamıştır. Ayrıca DNA, hidrojen peroksit artı Cu (II) ile muamele edilmiş ve bu reaksiyon agaroz jel elektroforezi ile incelenmiştir. Elektroforez sonucunda hidrojen peroksit +Cu, pET22b plazmit DNA'nın parçalanmasına neden olduğu ortaya çıkmıştır ama yüksek konsantrasyondaki EO (0.5273, 5.273 ve 52.73 µmol)

DNA'yı hidrojen peroksit+ Cu'ya karşı korumuş olup bu konsantrasyonlarda DNA'da herhangi bir kırık gözlenmemiştir.

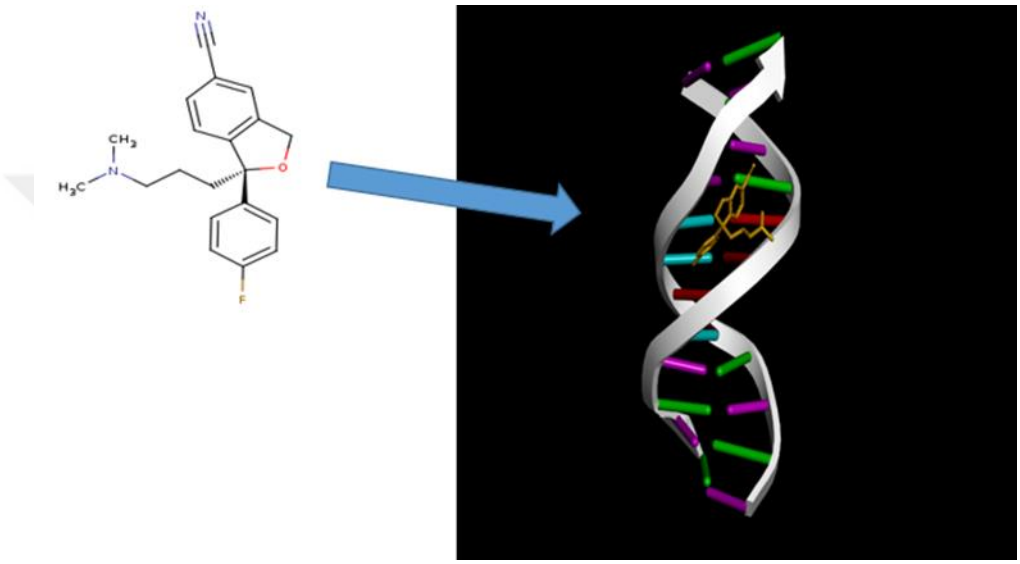


Şekil 4.5. İlacın H_20_2'den radikal OH üretme kabiliyetini analiz etmek için, plazmid DNA (0.5273 µmol bp) 0.12 µmol H_20_2 ile karıştırıldı ve 2. kuyucuğa yüklendi. İlacın radikal OH'yi inhibe etme kabiliyetini analiz etmek için Plazmid DNA (0.5273 µmol bp) 0.12 µmol H_20_2, 0.03 µmol $FeSO_47H_2O$ ve farklı EO konsantrasyonu ile karıştırıldı. a, b, c, d ve e, sırasıyla 0.005273, 0.05273, 0.5273, 5.273 ve 52.73 µmol'ü temsil eder. Toplam 18 ul hacim kuyucuklara yüklenmiştir

4.1.6. Escitalopram oksalat' ın Autodock pogramı kullanarak DNA etkileşim analizi

Moleküler yerleştirme tekniği rasyonel ilaç tasarımı ve keşfi için ilaç-DNA etkileşimlerini anlamak için önemli bir yaklaşımdır ve ayrıca mekanik bir çalışmada, DNA'nın hedef spesifik bölgesinin bağlayıcı bölgesine kovalen olmayan bir şekilde küçük bir molekül yerleştirerek ligand bağlanma sayısı ve doğruluğunu ve afinitelerini tahmin etmek için de kullanılır (Haq ve Ladbury 2000). Moleküllerin farklı yapısal özellikleri farklı bağlanma modlarına yol açar. Aslında bağlanma modunu düzenleyen en önemli faktörlerden biri molekülün şeklidir (Proudfoot, Mackay, ve Karuso 2001). Bu çalışmada EO seçilen bağlanma bölgesini DNA içinde tercih edilen oryantasyonuyla birlikte tahmin etmek

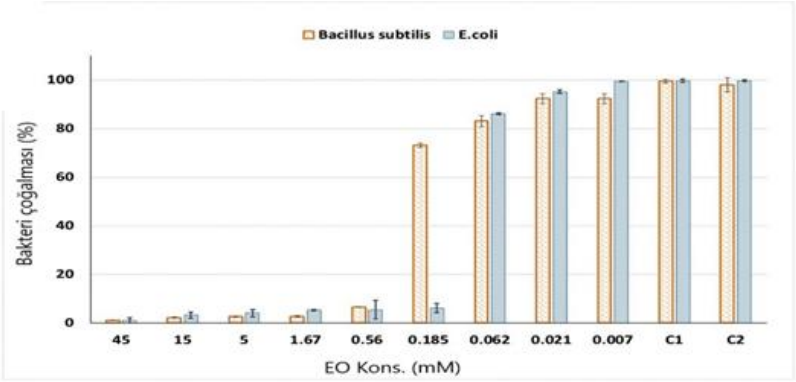
amacıyla ard arda dizilmiş (CGCGAATTCGCG) 2 dodecamer (PDB ID: 1BNA) DNA sarmalına yerleştirildi. Yerleşik pozun enerjik olarak en uygun şekli (Şekil 4.1.6.1), EO'nun DNA kanalına bağlandığını ortaya koydu. İlacın DNA'ya hangi bölgeden bağlandığı aşağıda gösterilmiştir.



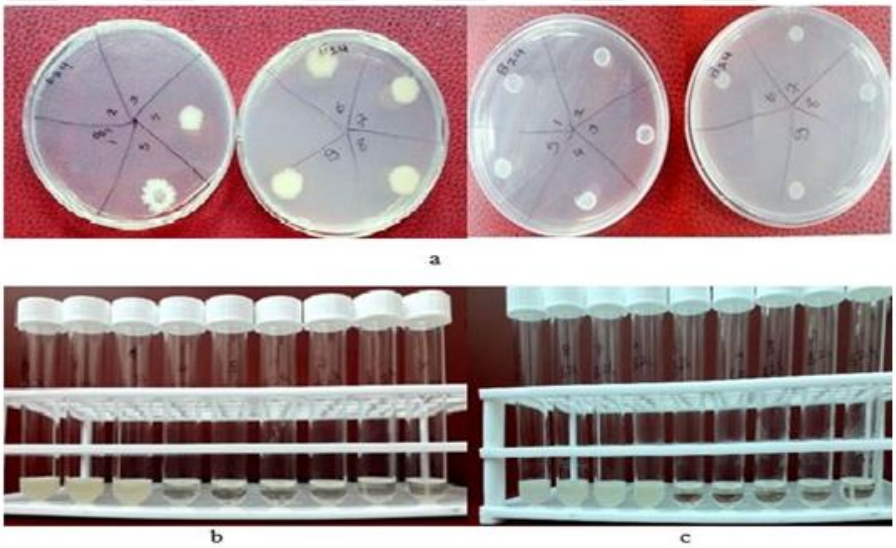
Şekil 4.6. EO'nun DNAýa bağlanması

4.1.7. Escitalopram Oksalatın Bakteriyel Gelişim Üzerine Etkisi

E.coli ve *Bacillus subtilis* için ilacın MIC değeri sırasıyla 0.185 mM ve 0.55 mM olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1.7.1). Ek olarak, bu testin sonucu EO 0.55 mM ve üzeri konsantrasyonlarda *Bacillus subtilis*'in büyümesini inhibe etmesine rağmen tüm konsantrasyonlarda *Bacillus subtilis*'i öldürmemiştir. EO 45, 15, 5 mM konsantrasyonlarında *E.coli* ' yi öldürülmüştür (Şekil 4.1.7.2).



Şekil 4.7. Çeşitli Escitalopram oksalat konsantrasyonları içeren besiyerinde E. coli ve Bacillus subtilis'in nispi büyümesi



Şekil 4.8. (a) EO'nun MBC analizi. E ve B sırasıyla *E.coli* ve *Bacillus subtilis*'i temsil eder, ayrıca 1'den 9'a sayısı sırasıyla 45, 15, 5, 1.66, 0.55, 0.18 0.06, 0.02 milimolar EO'yu temsil eder; (b) Farklı EO konsantrasyonlarında *E.coli*'nin gelişimi; (c) EO'nun farklı konsantrasyonlarında *Bacillus* Subtilis'in gelişimi

4.1.8. Escitalopram Oksalat'ın Sitotoksik Etkisinin MTT Testi Ile Belirlenmesi

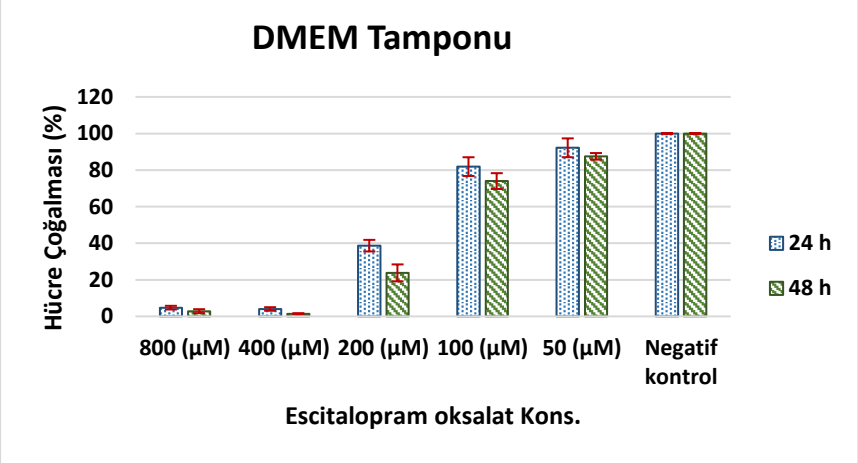
EO'nun sitotoksik etkisinin belirlenmesi için hücreler hazırlandıktan sonra, 20 mg Escitalopram oksalat DMEM tamponunda vortekslenerek

suspansiyon haline getirilmiştir. Sonrasında selluloz filtresi ile içeriğindeki çözülmeyen solutlar ayrılmış ve 0.2 µm por çapında ikinci bir filtreden geçirilerek saflaştırılmıştır ve steril EO 8mM olarak stoklanmıştır. EO'nun sitotoksik etkisi 800, 400, 200, 100 ve 50 µM konsantrasyonlarında denenmiştir. Sitotoksik etkisinin belirlemesinde her konsantrasyondan 4 tekrar hazırlanmıştır ve deney iki muamele süresinde (24 ve 48 saat) yapılmıştır. 24 ve 48 saatlık muamele süresinin sonunda 90 µl besiyerindeki hücrelere 10µL MTT solusyonu ilave edilmiştir ve 4 saat 37 ºC'de inkübe edilmiştir. MTT solüsyonu 5 mg/mL olacak şekilde PBS içinde çözülüp ve 0.2 µm'lık filtere ile steril edilmiştir. Daha sonra MTT'ile oluşan formazan kristallerini çözmek için mediyumlar uzaklaştırıldıktan sonra her bir kuyucuğa 100 µL DMSO ekleyerek 10 dakika 37 ºC'de inkübasyona bırakılmıştır. Sürenin sonunda plateler mikroplaka okuyucu cihazında 570 nm' de absorbans değerleri okunup ve kayıt edilmiştir. Mikroplakada belirlenen rakamlarla denklem 1'den faydalanarak hücre çoğalmasını elde edip ve ilacın sitotoksik etkisini her konsantrasyon ve tampona göre belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar çizelge 4.1.8.1 'de gösterilmektedir. İki deneyden elde edilen farklı sonuçlara göre, ilacın sitotoksik etkisinin solventine bağlı olabileceği bulgusu tespit edilmiştir.

(1) Hücre Çoğalması(%)= $\frac{A_{570\text{ nm}}\,(EO) - A_{570nm}(PK)}{A_{570\text{ nm}}\,(NK) - A_{570nm}(PK)} \times 100$

Çizelge 4.1. Escıtalopram oksaltın'ın NIH fare hücreleri embriyosu (NIH 3T3) hücrelerinde sitotoksisitesi (DMEM tamponu)

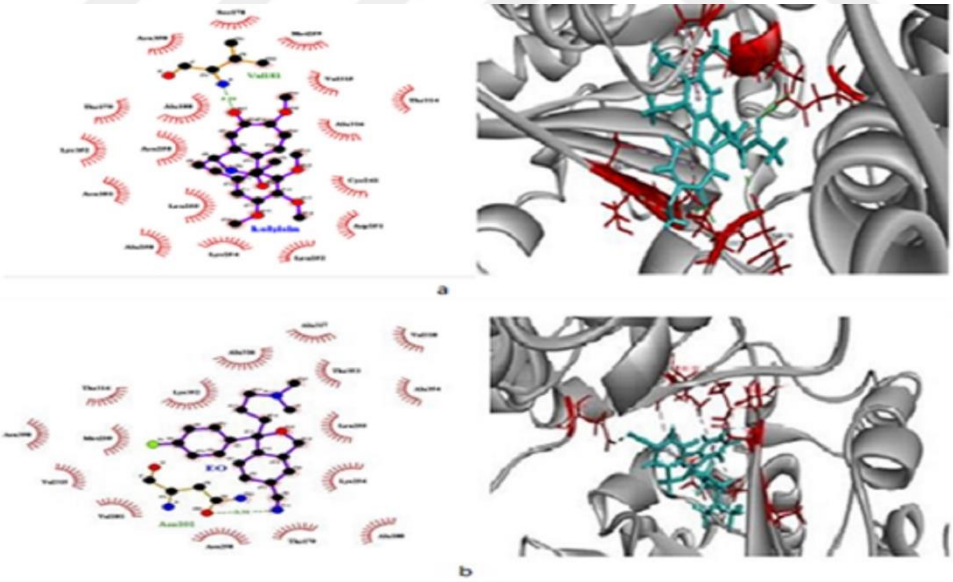
Test Maddesi	**Muamele**		**Sitotoksite %'si ± SE**
	Süre (saat)	**Kons.(µg/ml)**	
Escitalopram oksalat	24	800 400 200 100 50	4.77±1 4.03±0.98 38.67±3.16 81.88±5.12 92.17±5.14
Escitalopram oksalat	48	800 400 200 100 50	2.84±1.08 1.4±0.35 23.79±4.62 73.97±4.32 87.5±1.8



Şekil 4.9. 24 ve 48 saat'lik muameleden sonra, Escıtalopram oksaltın'ın NIH fareleri embriyosu (NIH 3T3) hücrelerinde sitotoksisitesi

4.1.9. Escitalopram Oksalat'ın Sitotoksik Etkişiminin Moleküler Autodock Ile Analizi

Bir ilacın terapötik bir ajan olarak etkinliğini anlamak için, o ilacın bağlanma bölgesinin proteinlerle olan ilişkisini araştırmak gerekir. Escitalopram Oksalatın (PDB ID : 68P) tübülin etkileşim analizi için protein kristallografik yapısındaki ligand olarak kullanılan ve sitotoksik etkiye sahip kolşisin (ID : LOC) ile serbest enerji ve bağ kurma potansiyeli açısından kıyaslanmıştır. Bu amaçla, kolşisin ligandı tübülin (PDB ID: 3ut5) kristalografik yapısı, protein veritabanına, kendi yerine tekrar yerleştirilmiş olup ve ligand-reseptör etkileşiminin doğruluğu açısından değerlendirilmiştir. Kolşisin ve EO ile reseptörün kenetlenmesinin sonuçlarının DS Visualizer V 2017 ile değerlendirilmesinde her iki ilacında mikrotübülle tek hidrojen bağı ve birçok hidrofobik bağ aracılığıyla etkileştiği gözlenmiştir (şekil 4.1.9.1).



Şekil 4.10. (a) kolşisin ve (b) EO'nun tübülin ile mühtemel etkileşimleri (2D ve 3D)

Çizelge 4.2. AutoDock programını kullanarak tubulin alfa beta ve EO'nun yerleştirme sonuçları Lamarckian Genetic Algorithm kullanılarak farklı ligand konformasyonu üretti. Bu değerler minimum enerjiyi gösterir ve tabloda kalın yazılmıştır

Rank	Run	ΔG (kcal/mol)	$E_{inter-mol}$ (kcal/mol	E_{vdw} (kcal/mol)	E_{elec} (kcal/mol)	E_{total} (kcal/mol)	$E_{torsional}$ (kcal/mol)
1	82	-9.04	-10.53	-9.90	-0.62	-0.74	1.49
2	19	-9.03	-10.52	-9.91	-0.61	-0.72	1.49
3	24	-9.01	-10.50	-9.90	-0.60	-0.76	1.49
4	40	-9.04	-10.53	-9.92	-0.61	-0.71	1.49
5	48	-8.48	-9.98	-9.48	-0.49	-1.01	1.49
6	96	-8.95	-10.44	-9.82	-0.63	-0.77	1.49
7	80	-9.05	-10.54	-9.91	-0.62	-0.79	1.49

Çizelge 4.3. AutoDock programını kullanarak tubulin alfa beta ve Kolşisinin yerleştirme sonuçları Lamarckian Genetic Algoritmasını kullanarak farklı ligand konformasyonu üretti. Bu değerler minimum enerjiyi gösterir ve tabloda kalın yazılmıştır

Rank	Run	ΔG (kcal/mol)	$E_{inter-mol}$ (kcal/mol	E_{vdw} (kcal/mol)	E_{elec} (kcal/mol)	E_{total} (kcal/mol)	$E_{torsional}$ (kcal/mol)
1	16	-9.78	-11.27	-11.00	-0.28	-1.14	1.49
2	78	-9.85	-11.34	-11.06	-0.28	-1.12	1.49
3	25	-9.86	-11.35	-11.08	-0.27	-1.14	1.49
4	55	-9.80	-11.30	-11.04	-0.26	-1.16	1.49
5	48	-9.74	-11.23	-10.96	-0.27	-1.14	1.49
6	96	-7.38	-8.88	-8.79	-0.08	-1.05	1.49
7	90	-9.83	-11.32	-11.04	-0.28	-1.12	1.49

Bağlanma serbest enerji(ΔG) kompleksin toplam enerjisi (E_{total}), elektrostatik etkileşimler (E_{elec}) ve van der Waals enerjileri (E_{vdw}), EO ve Kolşisin izomerleri arasındaki kuvvet alanı enerjisi hesaplamalarına dayanarak belirlenmiş ve çizelge 4.1.9.1 ile çizelge 4.1.9.2'de listelenmiştir. Çizelge 4.1.9.1, Çizelge 4.1.9.2 ve Şekil 4.1.9.1'de sunulan moleküler modelleme, EO ve Kolşisinin αβ

tübülün ile bağlanma parametreleri ve bağlanma bölgeleri arasından bir farklılık göstermediği gibi ve iki ilacın benzer etkileşime sahip olduğunu göstermiştir.

4.2. Tartışma

Yapılan bu çalışmada NIH3T3 hücre hatında EO'nun 24 ve 48 saat'lik muamelelerinde elde edilen sonuçlara göre; EO 50 µg/ml düzeyinde uygulandığında hücrelerin yaklaşık %10'unun ölümüne sebep olmuştur ve bu ölüm miktarı konsantrasyona bağlı artış göstermiştir. 400µg/ml konsantrasyonda yaklaşık %90 civarında hücre ölümüne sebep olmuştur. Ayrıca, bu deney için IC_{50} değeri hesaplanmıştır ve sonuçlar Çizelge 4.2.1'de gösterilmektedir. IC_{50}, hücre canlılığının % 50 inhibisyonuna neden olan ilaç konsantrasyonudur.

Mirzaei ve arkadaşlarının yaptıkları bir araştırmada Chalcon maddesi ve Etoposid ilacını kontrol olarak kullanarak A549, MCF7, SKOV3 ve HepG2 kanser hücre hatları ve NIH3T3 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar Etoposid'in düşük düzeyde sitotoksik etkiye sahip olduğunu, IC_{50}'sinin yaklaşık 118±0.1 olduğunu göstermektedir (Mirzaei, Shokrzadeh, ve Emami 2017). Bu nedenle EO'nun da aynı tamponda çözülerek NIH3T3 hücrelerinde 48 saat muamelesinde $IC_{50} \geq 72.27$ µg/ml olduğu baz alınarak normal hücreler üzerinde EO'nun sitotoksik etkisinin Etoposid ilacına göre daha fazla olabileceğini düşündürmektedir.

Çizelge 4.4. Escitalopram oksalat'ın Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu, PBS ve DMEM tamponlarında (24 ve 48 saat)

	24 saat	48 saat
DMEM	187.978835 µM	72.274412 µM

Etki mekanizmalarından bağımsız olarak, antidepresanlar hücrelerde proliferasyonunu durdurmak ve kemoterapiye dirençli hücrelerini kemoterapiye duyarlı hale getirmek için hasara neden olurlar (Arimochi ve Morita 2006).

Sonuçlarımıza benzer şekilde insan periferik kan lenfositleri ve insan lenfoblastoid hücrelerinde yapılan çalışmalar imipramin, klomipramin ve sitalopramın (3 farklı antidepresan ilaç) neden olduğu sitotoksik etkiler araştırmacılar tarafından belirlenmiştir. Ayrıca, burada kullanılan antidepresanların insan akut miyeloid lösemi HL-60 hücrelerinde reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunu arttırdığını ve DNA fragmantasyonunun ortaya çıkması dolayısıyla bir etkisi olduğu gösterilmiştir (Xia ve ark. 1999). Başka bir çalışmada, imipramin, desipramin, amitriptilin ve fluoksetin'in HT29 kolon karsinom hücrelerinde sitotoksik etkilere neden olduğu gösterilmiştir (Arimochi ve Morita 2006).

"Hiperkromik" etki ve "hipokromik" etki DNA'nın çift sarmal yapısı dolaylı ve spektrum aracılı özellikleridir. Spektral değişim süreci, DNA'daki uygunluk ve DNA'ya bağlanan ilaçtan sonra, yapılardaki ilgili değişiklikleri yansıtır. Hipokromizm, DNA'nın sarmal eksenindeki kasılmasının yanı sıra, DNA üzerindeki konformasyondaki değişiklikten kaynaklanır. Buna karşılık, hiperkromizm, DNA çift sarmal yapısına verilen hasardan kaynaklanmaktadır(Cheng-Yong, Xiao-Li, ve Pin 2007). OS-DNA'nın Kb değeri (0.035 M^{-1}), tipik klasik birleştiriciler için gözlemlenen değerlerden daha düşüktür; Etidyum bromid DNA kompleksi için Kb, 7 x 10^7 M^{-1}'ye eşittir (Li ve ark. 1996). EO, fluoksetinden (FLX) daha düşük Kb gösterdi, 6700'ü gösteren aynı antidepresan grubuna (SSRI) aitti. Kashanian ve ark. (2012)'nın raporlarına göre, FLX-DNA oluşumu interkalativ bağlanma modu değildi. Sonuçlarımıze göre EO'nun, DNA'ya bağlanma aracılığıyla değil, elektrostatik etkileşim gibi dış bağlanma yoluyla bağlandığı ihtimalini düşündürmektedir. Hücresel DNA'daki hasar, mutajenezde ve kanserin gelişiminde rol oynamaktadır. Bir insan hücresindeki DNA hem harici (eksojen) hem de iç metabolik (endojen) etkenler tarafından üretilen günde birkaç yüz ile milyon'a kadar zararlı olaya maruz

kalmaktadır (Friedberg, McDaniel, ve Schultz 2004). Çalışmamız , EO'nun çift iplikli DNA üzerinde herhangi bir kırılma etkisini göstermemektedir. Aksine, Roshdy ve ark. (2010), Wellbutrin'in (SSRI ilaçlarından biri) erkek albino farelerde sperm ve kemik iliği hücrelerinde, sperm başı anormallikleri ve kromozomal anormalliklere neden olduğunu bildirmişlerdir. Escitalopram Oxalate'e yapısal ve işlevsel olarak çok benzer olan sitalopram'ın, Drosophila'nın somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)'de genotoksik bir etkiye sahip olduğu ispatlanmıştır (Gürbüzel ve ark. 2012). Çalışmamızda elde edilen sonuçlar, selektif serotonin geri alım inhibitörlerinin (SSRI) kolorektal kanser insidansının artması ile ilişkili olmadığını gösteren önceki bir çalışma ile benzerlik göstermektedir (Lee ve ark. 2017) . EO'nun, insan periferal lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi (SCE), DNA hasarı ve mikronükleus (MN) oluşumu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir (Cobanoglu ve ark. 2018). Zayıf mutajenik olan ve mutajenik olmayan kanserojenlerin çoğunluğunun metal kaynaklı oksidatif DNA hasarı yoluyla kanserojenliği uyardığı görülmektedir. Bakır, demir (endojen metal iyonları) ve hidrojen peroksit arasındaki reaksiyon nedeniyle hidroksil serbest radikal üretilmektedir. Hidroksil serbest radikali oksidatif DNA hasarına neden olan reaktiftir (Galaris ve Evangelou 2002). Bakır, reaktif Cu (II)-hidroperokso kompleksi oluşturmak üzere H_20_2'yi aktive ederek oksidatif DNA hasarını indükleyebilir (Tan Jun 2007). Çalışmamızda H_2O_2 ile muamele edilen EO çift sarmallı DNA'ya hasar vermemiştir. Bu bulgu, EO'nun H_2O_2'den hidroksil serbest radikal üretemediği anlamına gelebilir. Ek olarak düşük konsantrasyonlu EO, DNA'yı (0.5273 µmol bp) Hidroksil serbest radikaline (0.12 µmole) karşı koruyamamış, ancak daha yüksek konsantrasyonlarda (0.5273, 5.273 ve 252.73 µmol) DNA'yı koruya bileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, bu koruyucu etki, Hidroksil serbest radikalinin DNA'ya erişimini engellemek için EO'nun DNA'ya zayıf bağlanması ve kaplamasından kaynaklanabileceğini düşünürmektedir.

İnsan gastrointestinal sistemi konakçı üzerinde önemli bir etkiye sahip olan ve fizyolojik koşullar altında dinamik bir dengeyi koruyan karmaşık ve dinamik bir

mikroorganizma popülasyonu içerir. Mikrobiyota konakçıya bağırsak bütünlüğünün güçlendirilmesi veya bağırsak epitelinin şekillendirilmesi, enerji toplanması, patojenlere karşı korunma ve konakçının bağışıklığının düzenlenmesi gibi birçok fayda sunar. Mikrobial bileşimdeki herhangi bir değişikliğin insan sağlığı üzerinde doğrudan bir etkisi vardır (Canny ve McCormick 2008). Antidepresanlar, depresif hastalara oral yoldan verildiğinden dolayı bu ilaçların gastrointestinal sistemde uzun süre doğrudan mikrobiyota ile temas edebileceği düşünülebilir. Bu araştırmada Escitalopram oksalat özellikle gram-negatif bakterilere karşı antibakteriyel etki göstermiştir.

Spektroskopik tekniklerin ve moleküler yerleştirmenin sonuçları etkili olan ilaçların rasyonel tasarımları için ve ayrıca bu ilaçların moleküler seviyedeki mekanizmalarını anlamak için değerli olan ilaç-DNA etkileşimi hakkında faydalı bilgiler sağlar.

Moleküler AutoDock analizi sonuçlarına göre EO ve Kolşisin'in serbest bağlanma enerjilerinde büyük bir fark bulunmamıştır. Kolşisin, mikrütübüllerin polimerizasyonunu engelleyen faktörlerinden biridir (Stanton ve ark. 2011). Analiz sonuçları doğrultusunda serbest bağlanma enerjileri miktarı neredeyse aynı olduğu için, çalışmamızda EO'nun sitotoksik etkisini gözlenmedik.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada antidepresan olarak Escitalopram Oksalat (EO) ‘ın DNA’ya bağlanma özelliği spektrofotometrik teknikleri ile incelenmiştir. EO'nun DNA varlığında absorbansı spektrumlarında hiperkromizme neden olmuştur ve bu sonuç EO’nun DNA ile moleküler etkileşimi olduğunu ortaya koymaktadır. EO interroslasyon yoluyla değil belki de elektrostatik etkileşim gibi dış bağlanma yoluyla DNA'ya bağlanmaktadır. Ayrıca , EO düşük konsantrasyonlarda DNA’yı koruma özelliğine sahip olmasına rağmen yüksek konsantrasyonlarda Hidroksil serbest radikaline karşı DNA’yı koruyamamıştır. Escitalopram oksalat dysbiosis ile insan sağlığını etkileyebilir. Ayrıca EO’nun sitotoksik etkiye sahip olup olmadığı MTT testi ile incelenmiş ve 50µM konsantrasyonda hücre ölümüne sebep olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle ilacın kullanım dozu klinikte göz önünde bulundurulabilir, zira yüksek dozlarda hücrelerde sitotoksik etki gösterme riski vardır.

KAYNAKLAR

Ali, Hamed I., Takayuki Fujita, Eiichi Akaho, and Tomohisa Nagamatsu. 2010. "A Comparative Study of AutoDock and PMF Scoring Performances, and SAR of 2-Substituted Pyrazolotriazolopyrimidines and 4-Substituted Pyrazolopyrimidines as Potent Xanthine Oxidase Inhibitors." *Journal of Computer-Aided Molecular Design*.

American Psychiatric Association. 2013. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*.

Ames, B. N., M. K. Shigenaga, and T. M. Hagen. 1993. "Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging." *Proceedings of the National Academy of Sciences*.

Arimochi, H, and K Morita. 2006. "Characterization of Cytotoxic Actions of Tricyclic Antidepressants on Human HT29 Colon Carcinoma Cells." *European journal of pharmacology* 541(1–2): 17–23. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16753142.

Arjmand, Farukh, and A. Jamsheera. 2011. "DNA Binding Studies of New Valine Derived Chiral Complexes of Tin(IV) and Zirconium(IV)." *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*.

Artigas, F, V Perez, and E Alvarez. 1994. "PIndolol Induces a Rapid Improvement of Depressed Patients Treated with Serotonin Reuptake Inhibitors." *Archives of General Psychiatry* 51(3): 248–51. http://dx.doi.org/10.1001/archpsyc.1994.03950030084009.

Attard, Gerhardt, Alastair Greystoke, Stan Kaye, and Johann De Bono. 2006. "Update on Tubulin-Binding Agents." *Pathologie Biologie*.

Ban, T. A. 2001. "Pharmacotherapy of Depression: A Historical Analysis." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 25(4): 709–27.

Battal, Dilek et al. 2013. "*In Vivo* Genotoxicity Assessment of Sertraline by Using Alkaline Comet Assay and the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay." *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 113(5): 339–46.

Baxter, Lewis R. et al. 1989. "Reduction of Prefrontal Cortex Glucose Metabolism Common to Three Types of Depression." *Archives of General Psychiatry* 46(3): 243–50.

Benmansour, S et al. 2002. "Serotonin Clearance *in Vivo* Is Altered to a Greater Extent by Antidepressant-Induced Downregulation of the Serotonin Transporter than by Acute Blockade of This Transporter ." *J Neurosci* 22(1529–2401 (Electronic)): 6766–72.

Berman, Robert M. et al. 1997. "Effect of Pindolol in Hastening Response to Fluoxetine in the Treatment of Major Depression: A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial." *American Journal of Psychiatry* 154(1): 37–43.

Berridge, Michael V., Patries M. Herst, and An S. Tan. 2005. "Tetrazolium Dyes as Tools in Cell Biology: New Insights into Their Cellular Reduction." *Biotechnology Annual Review*.

Bersani, G. et al. 1990. "5-HT2antagonist Ritanserin in Neuroleptic-Induced Parkinsonism: A Double-Blind Comparison with Orphenadrine and Placebo." *Clinical Neuropharmacology* 13(6): 500–506.

Blier, P., and R. Bergeron. 1995. "Effectiveness of Pindolol with Selected Antidepressant Drugs in the Treatment of Major Depression." *Journal of Clinical Psychopharmacology* 15(3): 217–22.

Blier, Pierre, and Richard Bergeron. 1998. "The Use of Pindolol to Potentiate Antidepressant Medication." *Journal of Clinical Psychiatry* 59(SUPPL. 5): 16–25.

BLIER, PIERRE, CLAUDE de MONTIGNY, and YVES CHAPUT. 1987. "Modifications of the Serotonin System by Antidepressant Treatments." *Journal of Clinical Psychopharmacology* 7(Supplement 6): 36S. http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage

&an=00004714-198712001-00003.

Bunney, William E., and John M. Davis. 1965. “Norepinephrine in Depressive Reactions.” *Archives of General Psychiatry* 13(6): 483. http://archpsyc.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archpsyc.1965.01730060001001.

Cai, Qiang et al. 1999. “Acute Hepatitis Due to Fluoxetine Therapy.” *Mayo Clinic Proceedings* 74(7): 692–94.

Caley, C F, and J C Kando. 2002. “SSRI Efficacy-Finding the Right Dose.” *J Psychiatr Pract* 8(1): 33–40. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15985852.

Canny, Geraldine O., and Beth A. McCormick. 2008. “Bacteria in the Intestine, Helpful Residents or Enemies from Within?” *Infection and Immunity*.

Carvajal García-Pando, Alfonso et al. 2002. “Hepatotoxicity Associated with the New Antidepressants.” *Journal of Clinical Psychiatry* 63(2): 135–37.

Cheng-Yong, Zhou, Xi Xiao-Li, and Yang Pin. 2007. “Studies on DNA Binding to Metal Complexes of Sal2trien.” *Biochemistry. Biokhimiia* 72(1): 37–43.

Coban, Burak, and Ufuk Yildiz. 2014. “DNA-Binding Studies and Antitumor Evaluation of Novel Water Soluble Organic Pip and Hpip Analogs.” *Applied Biochemistry and Biotechnology*.

Cobanoglu, Hayal, Mahmut Coskun, Akin Çayir, and Munevver Coskun. 2018a. “*In Vitro* Genotoxic and Cytotoxic Effects of Doxepin and Escitalopram on Human Peripheral Lymphocytes.” *Drug and Chemical Toxicology* 41(2): 238–44.

DeVane, C. Lindsay. 1998. “Differential Pharmacology of Newer Antidepressants.” In *Journal of Clinical Psychiatry, ,* 85–93.

Disner, Seth, Christopher Beevers, Emily Haigh, and Aaron Beck. 2011. “Neural Mechanisms of the Cognitive Model of Depression.” *Nature reviews. Neuroscience* 12(8): 467–77. citeulike-article-id:9578412%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1038/nrn3027.

Draz, Eman I et al. 2009. "(Fluoxetine , Sertraline and Clomipramine) By." *Mansoura* XVII(2): 63–78.

Düsman, E. et al. 2014. "Cytotoxicity and Mutagenicity of Fluoxetine Hydrochloride (Prozac), with or without Vitamins A and C, in Plant and Animal Model Systems." *Genetics and Molecular Research* 13(1): 578–89.

Feighner, John P. 1999. "Mechanism of Action of Antidepressant Medications." *Assessing Antidepressant Efficacy: A Reexamination., Jan, 1998, Phoenix, AZ, US*. http://psycnet.apa.org/psycinfo/1999-10926-001.

Fitzgerald, Kevin T., and Alvin C. Bronstein. 2013. "Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Exposure." *Topics in Companion Animal Medicine* 28(1): 13–17.

Foote, Stephen L., and John H. Morrison. 1987. "Development of the Noradrenergic, Serotonergic, and Dopaminergic Innervation of Neocortex." *Current Topics in Developmental Biology* 21(C): 391–423.

Forest Laboratories. 2012. "2012 Annual Report."

Frazer, A. 1997. "Antidepressants." *Journal of Clinical Psychiatry* 58: 9–25.

Friedberg, Errol C, Lisa D McDaniel, and Roger A Schultz. 2004. "The Role of Endogenous and Exogenous DNA Damage and Mutagenesis." *Current Opinion in Genetics & Development*.

Galaris, Dimitrios, and Angelos Evangelou. 2002. "The Role of Oxidative Stress in Mechanisms of Metal-Induced Carcinogenesis." *Critical Reviews in Oncology/Hematology*.

Gil-Ad, Irit et al. 2008. "Evaluation of the Potential Anti-Cancer Activity of the Antidepressant Sertraline in Human Colon Cancer Cell Lines and in Colorectal Cancer-Xenografted Mice." *International Journal of Oncology* 33(2): 277–86.

Gilmor, Michelle L., Michael J. Owens, and Charles B. Nemeroff. 2002. "Inhibition of Norepinephrine Uptake in Patients with Major Depression Treated with Paroxetine." *American Journal of Psychiatry* 159(10): 1702–10.

Goldberg, Joseph F. 2000. “New Drugs in Psychiatry.” *Emergency Medicine Clinics of North America* 18(2): 211–31.

Goodwin, G M. 1996. “How Do Antidepressants Affect Serotonin Receptors? The Role of Serotonin Receptors in the Therapeutic and Side Effect Profile of the SSRIs.” *J Clin Psychiatry* 57 Suppl 4: 9–13.

Greene, Joshua et al. 2009. “Vascular Endothelial Growth Factor Signaling Is Required for the Behavioral Actions of Antidepressant Treatment: Pharmacological and Cellular Characterization.” *Neuropsychopharmacology* 34(11): 2459–68.

Hajian, R., E. Ekhlasi, and R. Daneshvar. 2012. “Spectroscopic and Electrochemical Studies on the Interaction of Epirubicin with Fish Sperm DNA.” *E-Journal of Chemistry*.

Hajian, Reza, Nafiseh Shams, and Afsaneh Parvin. 2009. “DNA-Binding Studies of Daunorubicin in the Presence of Methylene Blue by Spectroscopy and Voltammetry Techniques.” *Chinese Journal of Chemistry*.

Hassanane, Mohamed S., Naglaa Hafiz, Walaa Radwan, and Akmal A. El-Ghor. 2012. “Genotoxic Evaluation for the Tricyclic Antidepressant Drug, Amitriptyline.” *Drug and Chemical Toxicology* 35(4): 450–55.

Hawton, Keith et al. 2010. “Toxicity of Antidepressants: Rates of Suicide Relative to Prescribing and Non-Fatal Overdose.” *British Journal of Psychiatry* 196(5): 354–58.

Ilgin, Sinem et al. 2017. “Citalopram Induces Reproductive Toxicity in Male Rats.” *Birth Defects Research* 109(7): 475–85.

Isaac, Michael T, and Maria B Tome. 1997. “Pindolol-Paroxetine Combination.” *The American journal of psychiatry* (12): 1790.

Jacquot, C, D J David, A M Gardier, and C Sánchez. 2007. “[Escitalopram and Citalopram: The Unexpected Role of the R-Enantiomer].” *L’Encéphale* 33(2): 179–87. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17675913.

Jun, Tan, Zhu Liancai, and Wang Bochu. 2007. “Effects of Quercetin on DNA Damage Induced by Copper Ion.” *International Journal of Pharmacology*.

Kakde, R B, and D D Satone. 2009. “Spectrophotometric Method for Simultaneous Estimation of Escitalopram Oxalate and Clonazepam in Tablet Dosage Form.” *Indian journal of pharmaceutical sciences* 71(6): 702–5.

Kashanian, Soheila et al. 2012. “Fluorometric Study of Fluoxetine DNA Binding.” *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*.

Keziban ADAM BASKI. 2014. “2003 - 2012 YILLARI ARASINDA TÜRKİYE’DE ANTİDEPRESAN İLAÇ KULLANIMI VE TÜKETİMİNE RETROSPEKTİF BİR BAKIŞ.”

Kishimoto, Tadamitsu, Shizuo Akira, and Tetsuya Taga. 1992. “Interleukin-6 and Its Receptor: A Paradigm for Cytokines.” *Science*.

Lee, Hsiu Chiung et al. 2017. “Antidepressants and Colorectal Cancer: A Population-Based Nested Case-Control Study.” *Journal of Affective Disorders*.

Lin, Jennifer D Davis and Shiaw-Yih. 2011. “DNA Damage and Breast Cancer Risk.” *Carcinogenesis* 24(5): 883–89.

Liu, Jie et al. 2002. “DNA-Binding and Cleavage Studies of Macrocyclic Copper(II) Complexes.” In *Journal of Inorganic Biochemistry*,.

van de Loosdrecht, A. A. et al. 1994. “A Tetrazolium-Based Colorimetric MTT Assay to Quantitate Human Monocyte Mediated Cytotoxicity against Leukemic Cells from Cell Lines and Patients with Acute Myeloid Leukemia.” *Journal of Immunological Methods*.

M. Yousef, Jehad, and Enas N. Danial. 2012. “*In Vitro* Antibacterial Activity and Minimum Inhibitory Concentration of Zinc Oxide and Nano-Particle Zinc Oxide Against Pathogenic Strains.” *International JOURNAL OF HEALTH SCIENCE* 2(4): 38–42. https://www.researchgate.net/publication/258959756_In_Vitro_Antibacterial_Activity_and_Minimum_Inhibitory_Concentration_of_Zinc_Oxide_and

_Nano-particle_Zinc_oxide_Against_Pathogenic_Strains.

Maes, Michael et al. 1999. “Pindolol and Mianserin Augment the Antidepressant Activity of Fluoxetine in Hospitalized Major Depressed Patients, Including Those with Treatment Resistance.” *Journal of Clinical Psychopharmacology* 19(2): 177–82.

Mahboobi, S., A. Sellmer, and T. Beckers. 2006. “Development of Tubulin Inhibitors as Antimitotic Agents for Cancer Therapy.” *Studies in Natural Products Chemistry*.

Mandroli, Praveenkumar S., and Kishor Bhat. 2013. “An In-Vitro Evaluation of Antibacterial Activity of Curcumin against Common Endodontic Bacteria.” *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 3(10): 106–8.

Metropolis, Nicholas et al. 1953. “Equation of State Calculations by Fast Computing Machines.” *The Journal of Chemical Physics*.

Mirzaei, Hassan, Mohammad Shokrzadeh, and Saeed Emami. 2017. “Synthesis, Cytotoxic Activity and Docking Study of Two Indole-Chalcone Derivatives.” *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*.

Mitchell, Allen A. et al. 2011. “Medication Use during Pregnancy, with Particular Focus on Prescription Drugs: 1976-2008.” *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 205(1).

Mitchison, Timothy J, and M Kirschner. 1984. “© 1984 Nature Publishing Group.” *Nature Publishing Group* 312(5991): 237–42.

Morgan, David M. L. “Tetrazolium (MTT) Assay for Cellular Viability and Activity.” *Polyamine Protocols* 79(4): 179–84. http://link.springer.com/10.1385/0-89603-448-8:179.

Mørk, A., M. Kreilgaard, and C. Sánchez. 2003. “The R-Enantiomer of Citalopram Counteracts Escitalopram-Induced Increase in Extracellular 5-HT in the Frontal Cortex of Freely Moving Rats.” *Neuropharmacology* 45(2): 167–73.

Moses-Kolko, Eydie L, and Erika Kraus Roth. 2004. “Antepartum and Postpartum Depression: Healthy Mom, Healthy Baby.” *Journal of the American Medical Women’s Association (1972)* 59(3): 181–91.

Mosmann, Tim. 1983. “Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays.” *Journal of Immunological Methods*.

Mourilhe, P, and P E Stokes. 1998. “Risks and Benefits of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors in the Treatment of Depression.” *Drug Safety* 18(1): 57–82. http://ezproxy.spu.edu/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip&db=aph&AN=9526531&site=ehost-live.

Murray, C J L, and A D Lopez. 1997. “Global Mortality, Disability, and the Contribution of Risk Factors: Global Burden of Disease Study.” *Lancet* 349(9063): 1436–42.

Nishiguchi, N et al. 2002. “Lack of an Association between 5-HT1A Receptor Gene Structural Polymorphisms and Suicide Victims.” *American journal of medical genetics* 114(4): 423–25. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11992564.

Northoff, Georg. 2007. “Psychopathology and Pathophysiology of the Self in Depression - Neuropsychiatric Hypothesis.” *Journal of Affective Disorders* 104(1–3): 1–14.

Owens, Michael J., David L. Knight, and Charles B. Nemeroff. 2001. “Second-Generation SSRIs: Human Monoamine Transporter Binding Profile of Escitalopram and R-Fluoxetine.” *Biological Psychiatry* 50(5): 345–50.

Pérez, Victor et al. 1997. “Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Pindolol in Combination with Fluoxetine Antidepressant Treatment.” *Lancet* 349(9065): 1594–97.

Pinna, Graziano, Erminio Costa, and Alessandro Guidotti. 2009. "SSRIs Act as Selective Brain Steroidogenic Stimulants (SBSSs) at Low Doses That Are Inactive on 5-HT Reuptake." *Current Opinion in Pharmacology* 9(1): 24–30.

Pirraglia, Paul A., Randall S. Stafford, and Daniel E. Singer. 2003. "Trends in Prescribing of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors and Other Newer Antidepressant Agents in Adult Primary Care." *Primary care companion to the Journal of clinical psychiatry* 5(4): 153–57. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=419384&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Pratt, LA. Brody, DJ., and Qiuping Gu. 2017. "Antidepressant Use among Persons Aged 12 and over: United States, 2011–2014." *NCHS Data Breif* (283): 1–8. https://www.cdc.gov/nchs/data/databriefs/db283.pdf%0Ahttp://www.cdc.gov/nchs/data/databriefs/db76.htm.

Rabiner, E. A. et al. 2001. "Pindolol Augmentation of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors: PET Evidence That the Dose Used in Clinical Trials Is Too Low." *American Journal of Psychiatry* 158(12): 2080–82.

Rahola, J.G. 2001. "Antidepressants: Pharmacological Profile and Clinical Consequences."

Regis, Bordet, Thomas Pierre, and Dupuis Bernard. 1998. "Effect of Pindolol on Onset of Action of Paroxetine in the Treatment of Major Depression: Intermediate Analysis of a Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. Reseau de Recherche et d'Experimentation Psychopharmacologique." *American journal of psychiatry* 155(10): 1346–51. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9766765%5Cnhttp://onlinelibrary.wiley.com/o/cochrane/clcentral/articles/479/CN-00155479/frame.html.

Rehman, Zia ur et al. 2009. “Synthesis, Spectroscopic Characterization, X-Ray Structure and Evaluation of Binding Parameters of New Triorganotin(IV) Dithiocarboxylates with DNA.” *European Journal of Medicinal Chemistry*.

Richelson, E. 1982. “Pharmacology of Antidepressants in Use in the United States.” *Journal of Clinical Psychiatry* 43(11 II): 4–13.

Rickels, K., and E. Schweizer. 1990. “Clinical Overview of Serotonin Reuptake Inhibitors.” In *Journal of Clinical Psychiatry*, , 9–12.

Roshdy, H.M., and A. A. Fyiad. 2010. “Cytogenetic and Biochemical Effects of Antidepression Drug (Wellbutrin) on Male Mice.” *New York Science Journal* 3(6): 121–26.

S.M., Sampson. 2001. “Treating Depression with Selective Serotonin Reuptake Inhibitors: A Practical Approach.” *Mayo Clinic Proceedings* 76(7): 739–44. http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L32595425%0Ahttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=00256196&id=doi:&atitle=Treating+depression+with+selective+serotonin+reuptake+inhibitors%3A+A+practical+approach&stitle=M.

Schildkraut, J. J. 1965. “The Catecholamine Hypothesis of Affective Disorders: A Review of Supporting Evidence.” *The American journal of psychiatry* 122(5): 509–22.

Sharma, S et al. 2010. “Zero Order Spectrophotometric Method for Estimation of Escitalopram Oxalate in Tablet Formulations.” *Journal of young pharmacists : JYP* 2(4): 420–23.

Shoman, Hanaa M. Roshdy & Thanaa M.T. 2004. “Cytogenetic and Developmental Effects of Antidepression Drug (Cipralex) on Female Mice and Embryos.”

Singh, Shilpa, and Mitasha Purohit. 2016. “Role of Repair Enzymes - Damage Control of DNA From Ageing Pans.” 4(3): 22–29.

Sirajuddin, Muhammad et al. 2012. “Synthesis, Characterization, Biological Screenings and Interaction with Calf Thymus DNA of a Novel Azomethine 3-((3,5-Dimethylphenylimino)Methyl) Benzene-1,2-Diol.” *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*.

Sohrabi, Nasrin. 2015. “Binding and UV/Vis Spectral Investigation of Interaction of Ni(II) Piroxicam Complex with Calf Thymus Deoxyribonucleic Acid (Ct-DNA): A Thermodynamic Approach.” *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 7(8): 533–37.

Sousa, Sérgio Filipe, Pedro Alexandrino Fernandes, and Maria João Ramos. 2006. “Protein-Ligand Docking: Current Status and Future Challenges.” *Proteins: Structure, Function and Genetics*.

Stahl, Stephen M. 1998. “Basic Psychopharmacology of Antidepressants, Part 1: Antidepressants Have Seven Distinct Mechanisms of Action.” *Journal of Clinical Psychiatry* 59(SUPPL.4): 5–14.

Standaert, David G. 2005. “ ‹ Dopamine Norepinephrine Ser Otonin.” *Biogenic Amines* (March): 1–8.

Stanton, Richard A., Kim M. Gernert, James H. Nettles, and Ritu Aneja. 2011. “Drugs That Target Dynamic Microtubules: A New Molecular Perspective.” *Medicinal Research Reviews*.

Stein, D.J., and E. Hollander. 1994. “Sexual Dysfunction Associated with the Drug Treatment of Psychiatric Disorders: Incidence and Treatment.” *CNS Drugs* 2(1): 78–79.

Stein, M B, J Sareen, S Hami, and J Chao. 2001. “Pindolol Potentiation of Paroxetine for Generalized Social Phobia: A Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Study.” *The American journal of psychiatry* 158(10): 1725–27.

S�nchez, Connie et al. 2004. “Escitalopram versus Citalopram: The Surprising Role of the R-Enantiomer.” *Psychopharmacology* 174(2). http://link.springer.com/10.1007/s00213-004-1865-z.

Tan Jun, Zhu Liancai and Wang Bochu. 2007. “Effects of Quercetin on DNA Damage Induced by Copper Ion.” *science alert*.

Tazehkand, M., et al. 2016. “The Effects of 4-MEI on Cell Proliferation, DNA Breaking and DNA Fragmentation.” *Bratislava Medical Journal* 117: 371–75.

Valipour, E., M.-L. Moosavi, J. Amani, and S. Nazarian. 2014. “High Level Expression, Purification and Immunogenicity Analysis of a Protective Recombinant Protein against Botulinum Neurotoxin Type E.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(6).

Wu, S., and D. E. Comings. 1999. “A Common C-1018G Polymorphism in the Human 5-HT(1A) Receptor Gene.” *Psychiatric Genetics* 9(2): 105–6.

Xia, Zhenlei et al. 1999. “Changes in the Generation of Reactive Oxygen Species and in Mitochondrial Membrane Potential during Apoptosis Induced by the Antidepressants Imipramine, Clomipramine, and Citalopram and the Effects on These Changes by Bcl-2 and Bcl-X(L).” *Biochemical Pharmacology*.

ÖZGEÇMİŞ

Reza VALIPOUR 1987 yılında İran'ın Ahar şehrinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Hourand'ıda tamamladı. 2009 yılında başladığı Rabe Rashidi enstitüsü, Biyoteknoloji Bölümünden 2013 yılında mezun oldu ve 2015 yılında Türkiye'de Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başlamıştır.