ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Saeıd SADIGHAZADI

BEZAFIBRAT'IN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE *IN VITRO* GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI ve HÜCRELERE GEÇİŞ MİKTARININ HPLC TEKNİĞİ İLE BELİRLENMESİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2014

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BEZAFIBRAT'IN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE IN VITRO GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI ve HÜCRELERE GEÇİŞ MİKTARININ HPLC TEKNİĞİ İLE BELİRLENMESİ

Saeid SADIGHAZADI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 18.02.2014 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

…….....	.....	……..….
Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ	Prof. Dr. Ebru KAFKAS	Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU
DANIŞMAN	2. DANIŞMAN	ÜYE

...…….....	**...**……
Prof. Dr. Hakan ÖZKAN	Prof. Dr. Hasan Basri İLA
ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FEF2013YL11

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

BEZAFIBRAT'IN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE *IN VITRO* GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI ve HÜCRELERE GEÇİŞ MİKTARININ HPLC TEKNİĞİ İLE BELİRLENMESİ

Saeid SADIGHAZADI

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman: Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ
İkinci Danışman: Prof. Dr. Ebru KAFKAS
Yıl: 2014, Sayfa: 61
Jüri: Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ
Prof. Dr. Ebru KAFKAS
Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU
Prof. Dr. Hakan ÖZKAN
Prof. Dr. Hasan Basri İLA

Bu çalışmada kolesterol düşürücü ilaçlar gurubuna ait olan Bezafibrat'ın genotoksik etkiye sahip olup olmadığı insan periferal kan lenfositlerinde in vitro olarak kromozom anormalliği (KA) ve mikronukleus (MN) testleri ile, sitotoksik risk taşıyıp taşımadığı ise mitotik indeks (MI) ve nukleus bölünme indeksi (NBI)'nin belirlenmesi yoluyla araştırılmıştır. Ayrıca Bezafibrat'ın hücrelere geçiş miktarı HPLC tekniği ile kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmiştir. Hücreler 24 ve 48 saat süre boyunca 100, 175, 250 ve 325 µg/ml Bezafibrat ile muamele edilmiş ve kültür süresinin sonunda hücreleri çöktürdükten sonra süpernatant Bezafibrat'ın hücreye geçiş miktarını saptamak için alınmıştır.

Bezafibrat'ın, insan periferal kan lenfositlerinde 24 ve 48 saatlik muamele süresinde hücrelere geçiş miktarı kontrole göre önemli olduğu halde Bezafibrat KA'yı ve MN oluşumunu uyarmamıştır. Bezafibrat, yaptığımız testlerin sonucuna göre genotoksik değildir. Ancak Bezafibrat 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde MI ve NBI'nın düşmesine sebep olmuştur. Bu sonuçlara göre Bezafibrat'ın insan periferal lenfositleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz.

Anahtar Kelimeler: Bezafibrat, İnsan Periferal Kan Lenfositi, HPLC, Kromozom Anormalliği, Mikronukleus.

ABSTRACT

MSc THESIS

IN VITRO GENOTOXIC EFFECTS OF BEZAFIBRATE ON HUMAN PERIPHERAL LYMPHOCYTES AND DETERMINATION OF THE DRUG PERMEATION AMOUNT INTO THE CELLS BY HPLC

Saeid SADIGHAZADI

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ
co supervisor : Prof. Dr. Ebru KAFKAS
Year : 2014, Pages: 62
Jury : Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ
Prof. Dr. Ebru KAFKAS
Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU
Prof. Dr. Hakan ÖZKAN
Prof. Dr. Hasan Basri İLA

The present research was aimed to study of genotoxic and cytotoxic effects of cholesterol lowering drug Bezafibrate on human peripheral blood lymphocytes by in vitro tests. In this study we used chromosomal abnormalities (CA) and micronucleus (MN) tests as genotoxicity tests and mitotic index (MI) and nuclear division index (NDI) tests for investigating cytotoxic effects of Bezafibrate. In addition HPLC was used for identification and quantification of the drug permeation amount into the cells. The cells were treated with 100, 175, 250 and 325µg/ml of Bezafibrate for 24 and 48 hours. At the end of the treatment period and after precipitation the cells, supernatant was taken to analyze to determination of Bezafibrate.

In spite of significant permeation of Bezafibrate into the human peripheral blood lymphocytes in 24-h and 48-h treatment periods, Bezafibrate did not increase the CA and MN frequency in human peripheral blood lymphocytes, means that Bezafibrate did not have any genotoxic effects on human peripheral blood lymphocytes. In addition, exposing to the Bezafibrate for 24 and 48 hours caused to decrease MI and NDI in the cells in 24-h and 48-h treatment periods. According to this study Bezafibrate has cytotoxic effects on human peripheral lymphocytes.

Key Words: Bezafibrate, Human Peripheral Blood Lymphocytes, HPLC, Chromosome Aberration, Micronucleus.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bana her açıdan destek olan, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve kişisel gelişimimde sonsuz sabır gösteren danışman hocalarım sayın Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ'a ve Prof. Dr. Ebru KAFKAS'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında her konuda çok büyük yardımlarını gördüğüm Prof. Dr. Salih KAFKAS ve Prof. Dr. Hasan Basri İLA'ya çok teşekkür ederim. Yine çalışmalarım esnasında her konuda yardımcı olan Çukurova Üniversitesi Biyoloji Bölümü Genetik Laboratuvarı ve Bahçe Bitkileri Moleküler Genetik Laboratuvarı'ndaki arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında çok önemli yardımlarını gördüğüm arkadaşlarım Mostafa NORIZADEH TAZEHKAND ve Taygun TİMOÇİN'e çok teşekkür ederim.

Ayrıca, bu yüksek lisans çalışmasını maddi yönden destekleyen Ç.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim (Proje no: FEF2013YL11).

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER IV
ÇİZELGELER DİZİNİ VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....IV
SİMGELER VE KISALTMALAR.....IV
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR..... 7
2.1. Kolesterol Düşürücü İlaçlar İle Yapılan Genotoksisite Ve Sitotoksisite Çalışmaları 8
2.1.1. Atorvastatin İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları..... 8
2.1.2. Bezafibrat İle Yapılan Genotoksisite Çalışması..... 9
2.1.3. Cerivastatin İle Yapılan Genotoksisite Çalışması..... 10
2.1.4. Clofibric Acid İle Yapılan Genotoksisite Ve Sitotoksisite Çalışması……...10
2.1.5. Etofibrat İle Yapılan Genotoksisite Çalışması..... 10
2.1.6. Ezetimib İle Yapılan Kanserojenite Çalışması..... 10
2.1.7. Fenofibrat İle Yapılan Genotoksisite Ve Sitotoksisite Çalışmaları . 11
2.1.8. Fluvastatin İle Yapılan Genotoksisite Çalışması 11
2.1.9. Gemfibrozil İle Yapılan Genotoksisite Ve Sitotoksisite Çalışmaları12
2.1.10. Lovastatin İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları..... 12
2.1.11. Pravastatin İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları..... 13
2.1.12. Rosuvastatin İle Yapılan Genotoksik Çalışması 13
2.1.13. Simvastatin İle Yapılan Genotoksisite Çalışması 13
2.2. Kolesterol Düşürücü İlaçlar İle Yapılan HPLC Çalışmaları..... 14
3. MATERYAL VE METOT 17
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları 17
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 17

3.1.1.1. Bezafibrat 17
3.1.1.2. Dietil eter 18
3.1.1.3. Dimetil sülfoksit (DMSO) 18
3.1.1.4. Entellan 19
3.1.1.5. Fiksatif 19
3.1.1.6. Giemsa 19
3.1.1.7. Hidroklorik asit (HCl) 19
3.1.1.8. Hipotonik Eriyik 20
3.1.1.9. Kolşisin (Kolkisin) (Sigma) 20
3.1.1.10. Kromozom Medyumu 20
3.1.1.11. Nitrik Asit (HNO_3) 21
3.1.1.12. Mitomycin C (MMC) (Sigma) 21
3.1.1.13. Mobil Faz 22
3.1.1.14. Sitokalasin B (Sigma) 22
3.1.1.15. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer) 23
3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları 23
3.1.2.1. Flow Kabin (Steril Kabin) 23
3.1.2.2. Hassas Terazi 24
3.1.2.3. Inertsil ODS-4 Kolonu 24
3.1.2.4. İnkübatör 24
3.1.2.5. Mikroskop 24
3.1.2.6. pH Metre 24
3.1.2.7. Santrifüj 25
3.1.2.8. HPLC Analiz Aleti (Applied Prominence Sil-20A) 25
3.1.2.9. Vorteks 25
3.2. Lamların Temizlenmesi 25
3.3. Kromozom Anormalliklerini (KA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddesinin Kültüre İlave Edilmesi, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskobik İncelemeler 25

3.3.1. Kromozom Aberasyonunu (KA) Saptamak için Hücre Kültürünün Yapılması ve Test Maddesinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması 26
3.3.2. Preparatların Boyanması 27
3.3.3. Mikroskobik İnceleme 28
3.3.3.1. Kromozomal Anormallikler (KA) ve Mitotik İndeksin (MI) Saptanması 28
3.3.3.1.(1). Kromozom Anormalliklerinin (KA) Saptanması 28
3.3.3.1.(2). Mitotik İndeksin (MI) Saptanması 29
3.4. Mikronukleus (MN) Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddesinin Kültüre İlave Edilmesi, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskobik İncelemeler 29
3.4.1. Mikronukleus (MN) Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddesinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması 29
3.4.2. Preparatların Boyanması 30
3.4.3. Mikroskobik İncelemeler 31
3.5. Mikroskopta Fotoğraf Çekme 34
3.6. HPLC Tekniği ile Bezafibrat'ın Kalitatif ve Kantitatif Olarak Belirlenmesi 34
3.6.1. Kültür Ortamından Bezafibrat'ın Ekstre Edilmesi 34
3.6.2. HPLC koşulları 35
3.7. İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi 35
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 37
4.1. Bulgular 37
4.1.1. Bezafibrat'ın, Kromozom Aberasyonu (KA)'nun Oluşumu Üzerindeki Etkisi 37
4.1.2. Bezafibrat'ın Mikronukleus (MN) Oluşumu Üzerindeki Etkisi 40
4.1.3. Bezafibrat'ın Sitotoksik Etkisi 43
4.1.4. HPLC Tekniğinin Analiz Sonuçlarına Göre Bezafibrat'ın Hücrelere Geçiş Miktarı 47

4.2. Tartışma 48
4.2.1. Bezafibrat'ın İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Kromozom Aberasyonu Oluşumu Üzerinde Etkileri 48
4.2.2. Bezafibrat'ın Mikronukleus (MN) Oluşumunda Etkileri 50
4.2.3. Bezafibrat'ın Sitotoksik Etkisi 51
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 53
KAYNAKLAR 55
ÖZGEÇMİŞ 61

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyonlarda Bezafibrat İle 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferal kan lenfositlerinde kromozom anormallik çeşitleri, Anormal Hücre Oranı, KA/ Hücre. 38

Çizelge 4.2. Değişik konsantrasyonlarda Bezafibrat ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferal kan lenfositlerinde mikronukleuslu iki nukleuslu hücre yüzdesi ve MN yüzdesi 41

Çizelge 4.3. Değişik konsantrasyonlarda Bezafibrat ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferal kan lenfositlerinde NBI ve MI..... 44

Çizelge 4.4. KA ve MN Testleri için yapılan hücre kültürlerinde ve kontrolde saptanan Bezafibrat miktarının azalma yüzdesi. 48

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 3.1. Bezafibrat'ın açık formülü 18
Şekil 3.2. Kolşisinin açık formülü 20
Şekil 3.3. Mitomycin C'nin açık formülü 21
Şekil 3.4. Sitokalasin B'nin açık formülü 22
Şekil 3.5. Bir nukleuslu hücre (1000x). 32
Şekil 3.6. İki nukleuslu hücre (1000x). 32
Şekil 3.7. Üç nukleuslu hücre (×1000). 33
Şekil 3.8. Dört nukleuslu hücre (×1000). 33
Şekil 4.1. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (325 µg/ml Bezafibrat, 48 saatlik muamele, ♀), 1000x. 39
Şekil 4.2. Kromozom kırığı (B") bulunan metafaz plağı (250 µg/ml Bezafibrat, 48 saatlik muamele, ♀), 1000x. 39
Şekil 4.3. Kardeş kromatidlerin birleşmesi (sister chromatid union) bulunan metafaz plağı (325 µg/ml Bezafibrat, 24 saatlik muamele, ♀), 1000x. 40
Şekil 4.4. Bir mikronukleus içeren iki nukleuslu hücre (100 µg/ml Bezafibrat, 24 saatlik muamele, ♂), 1000x. 42
Şekil 4.5. İki mikronukleus içeren iki nukleuslu hücre (175 µg/ml Bezafibrat, 48 saatlik muamele, ♀), 1000x. 42
Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda Bezafibrat ile 24 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde MI'nin konsantrasyona bağlı düştüğünü gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P = 0,002). 45
Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda Bezafibrat ile 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde MI'nin konsantrasyona bağlı düştüğünü gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P = 0,004). 45

Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda Bezafibrat ile 24 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde NBI'nin konsantrasyona bağlı düştüğünü gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P = 0,005). 46
Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlarda Bezafibrat ile 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde NBI'nin konsantrasyona bağlı düştüğünü gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P =0,009). 47

SİMGELER VE KISALTMALAR

♂	: Erkek cinsiyet
♀	: Dişi cinsiyet
°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µg/ml	: Mikrogram/mililitre
µg/µl	: Mikrogram/mikrolitre
µm	: Mikrometre
cm	: Santimetre
dk.	: dakika
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FF	: Fenofibrat
g/cm^3	: Gram/Santimetre küp
GC-MS	: Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi
HCl	: Hidroklorik asit
HDL	: High density lipoprotein
Hg	: Civa
HMG- KoA	: 3-hidroksi-3-metil-glutaril-KoA
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
HPLC/UV	: High Performance Liquid Chromatography/Ultraviolet
HPLC-DAD	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile diode-array
KA	: Kromozom aberasyonu
KCL	: Potasyum klorür
KKD	: Kardeş Kromatid Değişimi
LC/MS	: Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi
LDL	: Low density lipoprotein
M	: Molar
m^3/h	: Metreküp/Saat
mg/kg	: Miligram/Kilogram

mg/kg/gün	: Miligram/Kilogram/Gün
mg/L	: Miligram/Litre
mg/ml	: Miligram/mililitre
MI	: Mitotik İndeks
ml/dak	: Mililitre/Dakika
mm	: Milimetre
MMC	: Mitomycin C
mmol/L	: Milimolar/Litre
MN	: Mikronukleus
N	: Normal
NaCl	: Sodyum klorür
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NBI	: Nukleus Bölünme İndeksi
ng/L	: Nanogram/Litre
NIACR1	: Niacin reseptör 1
NIACR2	: Niacin reseptör 2
nm	: Nanometre
PAI-1	: plazminojen-aktivatör-inhibitör-1
PPAR	: Peroksimal farklılaşmayı aktive eden reseptör
RAPD	: Randomly Amplified Polymorfic DNA
rpm	: Revolutions per minute
SH	: Standart hata
TG	: Trigliserid
TiO_2	: Titanyum dioksit
UV	: Ultraviolet
v/v	: volume/volume
VLDL	: Very low density lipoprotein

1. GİRİŞ

Kronik hastalıkların toplum içerisindeki yaygınlığını belirleme çalışmaları, ülkelerin gelişmişlik düzeylerine ve sosyal sınıfların yapısına bakılmaksızın kronik hastalıkların günden güne arttığı konusunda alarm verdiğini göstermektedir. Dünyada her yıl hayatını kaybeden 57 milyon kişiden 33.4 milyonunun ölüm nedeni kronik hastalıklardır (Sağlık Bakanlığı 2008). Kronik hastalıkların en önemlisi kalp ve damar hastalıklarıdır. Bu hastalıkların nedeni ise kanda olan yüksek LDL kolesterol ve trigliserit seviyesidir. Bu seviyeyi düzeltmek için farklı ilaçlar kullanılmaktadır.

Fibrik asitlerin, kolesterol ve trigliseritlerin karaciğerdeki sentezini inhibe ettiği bilinmektedir. Fibrik asitler; Clofibrat, Gemfibrozil, Fenofibrat, Bezafibrat ve Ciprofibrat olarak sınıflandırılmaktadır (Groggel ve ark, 1989). Bezafibratların, düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL) ve trigliseritlerin (TG) konsantrasyonlarını azaltarak yüksek yoğunluklu lipoproteinlerin (HDL) konsantrasyonlarını arttırdıkları bilinmektedir. Bezafibratların esas etkilerini özellikle kalp-damar rahatsızlıkları olan hastalarda ve şeker hastalarında daha iyi gösterdiği bildirilmiştir (Tenenbaum ve ark, 2004).

Statin ve Fibratlar, etki mekanizmaları ve metabolizmaları farklı iki antilipemik (lipit düşürücü ajanlar) ilaç grubudur. Statinler hidroksimetilglutaril koenzim A redüktaz enzim inhibisyonuna neden olarak hem karaciğer hücresi içinde kolesterol yapımını engellerler, hem de hücre yüzeyinde apoB/E (LDL reseptörü) reseptörlerinin ekspresyonuna yol açarak apoB içeren lipoproteinlerin düzeyini artırırlar ve bunun sonucunda, dolaşımdaki LDL-K (LDL-kolesterol) düzeyi azalır (Moghadasian ve ark, 2000). Fibratlar ise etkilerini nükleer transkripsiyon faktörlerini aktive ederek gösterirler. Fibratlar peroksimal farklılaşmayı aktive eden reseptör alfa (PPARα)'ya bağlanarak onu aktive ederler ve 50'den fazla genin transkripsiyonunda değişikliğe neden olurlar. Yine Fibratlar, yüksek yoğunluklu lipoproteinin ana unsurları olan apolipoprotein A1 ve A2 ekspresyonu ile lipoprotein lipaz ekspresyonunu artırırlar, apoC III, fibrinojen ve plazminojen-aktivatör-inhibitör-1

(PAI-1) ekspresyonlarını ise azaltırlar. Fibrat etkisiyle lipoliz artar, karaciğerde TG yapımı azalır, HDL-K yapımı artar. En önemli etkilerinden biri de küçük yoğunlukta LDL partiküllerinin sayısını azaltmalarıdır (Staels ve ark, 1998; Fruchart ve ark, 2001) ve antienflamatuvar (yangı önleyici) ve antitrombotik (pıhtılaşma önleyici) özellikleri vardır (Yüksel, 2005).

Yapılan araştırmalarda Bezafibrat'ın özellikle kalp hastalarında ilaç olarak kullanıldığında LDL kolesterolünün zararlı etkisini azalttığı saptanmıştır. Aynı zamanda söz konusu ilacın kanda trigliserit seviyesini azalttığı, HDL kolesterolünün seviyesini arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca, Bezafibrat kullanımının Hepatit C hastalarında da olumlu etkisinin olduğu, böyle hastalarda insüline dayanıklılığı (insulin resistance) yavaşlattığı ve böylece şeker hastalığının gelişmesini engellediği bildirilmiştir (Yüksel, 2005). Bezafibrat ile tedavi gören hastaların kalp ve damar sağlıklarını olumlu yönde etkilediği de saptanmıştır. İlaç tablet olarak günlük alındığında kan testi sonuçlarına göre LDL kolesterol düzeylerinin düştüğü saptanmıştır. Kardiyovasküler sistemin daha fazla zarar görmesini önlemek için bazı hastaların hayatları boyunca ilaç almaları gerekebilir.

Kromozomlarda ortaya çıkan mutasyonlar ve kromozomların yapısal değişimi, insanlarda genetik hastalıklara sebep olmaktadırlar. Somatik hücrelerin onkogen veya tümör supressör genlerindeki mutasyonların belirlenmesiyle, insanlarda ve deney hayvanlarında kanserin uyarılmasında rol oynadığına dair birçok araştırma yapılmıştır (OECD TG 473, 1997).

Bugün kısa süreli genotoksisite testleri, bir kimyasal maddenin insan genomunda mutasyonlara neden olup olmadığını belirlemekte yaygın olarak kullanılmaktadır. Bir kimyasal maddenin genotoksik ve sitotoksik etkiye sahip olup olmadığının belirlenmesi kısa süreli genotoksisite testleriyle mümkün olabilir. Bu testler; kromozom aberasyonu (KA) (Carrano ve ark., 1978), kardeş kromatid değişimi (KKD) (Tucker ve ark, 1993) ve Mikronukleus (MN) (Fenech, 2000) testleridir.

Kanserojenler ve mutajenlerin genotoksik risklerinin tanımlanmasında en çok kullanılan yöntemlerden biri, periferal lenfositlerindeki kromozom aberasyonu (KA) frekansının saptanmasıdır (Carrano ve Natarajan, 1988). Kromozom anormallikleri

DNA üzerindeki bir hasarın sonucunda ortaya çıkmaktadır. Örnek olarak baktığımızda kromozom kırıkları DNA'daki çift zincir kırıklarından ve yeni yapıya sahip kromozomların meydana gelmesi ise DNA zincirindeki kırıkların yanlış onarılmasından dolayı olabilirler (Savage, 1993). KA oluşma mekanizması farklı dokularda benzer olmasından dolayı, lenfositlerdeki anormallik frekansı, kansere eğilimli dokulardaki anormallik seviyesini gösterdiği ve bu nedenle kanserin riskinin de bir göstergesi olduğu düşünülmektedir (Albertini ve ark, 2000). Hem kromatid tipi kırığı ve hem kromozom tipi kırıklar kanser riskinin göstergesi olabilir, fakat kromozom tipi kırıkların kromatid tipi kırıklara nazaran daha iyi bir belirleyici olduğuna dair kaynaklar bulunmaktadır (Norppa ve ark, 2006; Boffetta ve ark, 2006).

Kolesterol düşürücüler ile yapılan genotoksisite ve sitotoksisite çalışmaları bulunmaktadır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçları şu şekilde özetleyebiliriz:

Fenofibrat ile yapılan bir araştırmada bu ilacın genotoksik etkisi erkek sıçanların karaciğer dokularında comet testi ile araştırılmıştır ve sonuçta Fenofibrat'ın sıçanların karaciğerinde DNA hasarına yol açtığı ve bu ilacın genotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Tawfeeq ve ark, 2010). Isidori ve ark. (2007) yapmış oldukları çalışmada Bezafibrat ilacının genotoksik etkisini Ames testi ile araştırılmışlardır. Bu çalışmada *Salmonella typhimurium* ile *E.coli* kullanılmıştır. Bu araştırmadan alınan sonuçlara göre Bezafibrat'ın genotoksik risk taşıdığı ortaya çıkmıştır. Gajski ve Garaj-Vrhovac (2008), yaptıkları bir araştırmada insan lenfositlerinde Atorvastatin'in genotoksik potansiyelini comet, KA ve KKD testleri ile incelemişlerdir. Bu araştırma sonuçlarına göre Atorvastatin'in KA ve KKD'yi uyardığı ve insan lenfositlerinde DNA hasarına yol açtığı gösterilmiştir. Berber ve ark. (2013), Rosuvastatin ile yaptıkları çalışmada bu ilacın insan periferal lenfositlerinde genotoksik olup olmadığını comet, KA ve MN testleri ile araştırmışlardır ve bu araştırmanın sonucunda bu ilacın genotoksik olduğunu saptamışlardır. Başka bir çalışmada kolesterol düşürücüsü olarak kullanılan Gemfibrozil ve Atorvastatin ilaçlarının genotoksik etkisi zebra balıklarında comet ve RAPD (Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) yöntemleri ile araştırılmış ve Gemfibrozil ve Atorvastatin'in genotoksik risk taşıdıkları ortaya konulmuştur (Rocco ve ark,2010).

Robison ve ark. (1993) Fluvastatin'in etkisini sıçan kemik iliği mikronukleus testi ile araştırmışlardır ve bu ilacın genotoksik etkisinin olmadığı belirlemişlerdir. Ayrıca aynı araştırıcılar Fluvastatin'in genotoksik etkisini *in vitro* olarak da ames testi ile (*Salmonella typhimurium*), *E.coli*'de gen mutasyonu ve Çin hamster V79 hücrelerinde KA testi ile araştırmışlardır. Bu araştırmanın sonucuna göre Fluvastatin'in herhangi bir genotoksik riske sahip olmadığı belirlenmiştir. Yapılan başka bir çalışmada Atorvastatin'in genotoksik etkisini *in vivo* ve *in vitro* olarak KA ve MN testleri ile araştırılmıştır. Bu çalışmada *in vitro* olarak Çin hamsterlerin V79 hücreleri ve *in vivo* olarak da CD-1 fareleri kullanılmıştır. Araştırma sonucunda Atorvastatin KA ve MN'yi uyarmadığı açıklanmıştır (Ciaravino ve ark, 1995). Halleck ve ark. (2009), başka bir kolesterol düşürücüsü olarak kullanılan Ezetimib ilacının herhangi bir genotoksik veya kanserojenik etkiye sahip olup olmadığını mikronukleus testi ile araştırmışlardır. Araştırıcılar, bu deneyler sonucunda Ezetimib'in genotoksik olmadığını belirlemişlerdir. Yukarıda belirtildiği gibi insanda yüksek kolesterol ve trigliseritleri düşürmek amacıyla kullanılan bazı ilaçların genotoksik risk taşıdığı, bazılarının ise genotoksik olmadığı belirlenmiştir.

HPLC yöntemi ile yapılan analizlerde Fibratların kalitatif ve kantitatif tayininde isokratik çalışma yapılmış ve analizlerde C18 kolonu (250 mm × 4.6 mm, 5 um) ve spektrofotometrik detektör kullanılmıştır. Araştırıcılar; HPLC'de analiz aşamasında mobil faz olarak asetonitril : su (70 : 30, v/v), pH 2.5, kolon sıcaklığı:35 ^{o} C ve otomatik örnekleyici sıcaklığı: 25^{o}C, mobil fazın akış hızı: 1.2 ml/dak, enjeksiyon hacminin 10µL, dalga boyunun ise Ciprofibrate ve Gemfibrozil için 233 nm ve 274 nm'de en iyi sonucu aldığını bildirmişlerdir. Araştırmada kullanılan standartların ise; 1.0 mg/ml'lik metanol konsantrasyonunda çözdüklerini belirtmişlerdir. Her iki bileşiğin detektörde alıkonma zamanlarının ise; Ciprofibrate ve Gemfibrozil için sırasıyla 4.0 dakikada ve 6.3 dakikada olarak saptanmıştır (Kublin ve ark, 2010).

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılacak olan Bezafibrat *Salmonella typhhimurium* ve *E.coli*'de gen mutasyonunu uyardığı saptanmıştır (Isidori ve ark, 2007). Fakat Bezafibrat'ın insan lenfositleri için genotoksik risk oluşturup oluşturmadığı araştırılmamıştır. İşte bu çalışmanın amacı, Bezafibrat'ın insan

periferal kan lenfositlerinde genotoksik etkiye sahip olup olmadığını *in vitro* kromozom aberasyonu (KA) ve mikronukleus (MN) testleri ile araştırmaktır. Ayrıca Bezafibrat'ın hücrelere geçiş miktarı, santrifüj işlemiyle dibe çöktürülen hücrelerin süpernatantında Bezafibrat miktarının HPLC tekniğiyle belirlenmesi yoluyla saptanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Kolesterol düşürücü ilaçlar etki mekanizmalarına göre 5 gruba ayrılmaktadırlar. Bunlar:

1. Niacin (Nikotinik asit veya B3 vitamini): Suda çözünür bir vitamindir. Türevleri olan NADH, NADPH, NAD ve NAD+ hücrelerde enerji metabolizması, nükleik asit, protein, yağ ve karbonhidrat metabolizmasında gereksinim duyulan zorunlu bir vitamindir. İlk defa 1955 yılında (Altschul ve ark, 1955) Niacin'in lipit düşürücü özelliğine sahip olduğunu açıklamışlardır. Bu nedenle Niacin en eski lipit düşürücü ilaç sayılmaktadır. Kan kolesterolünü ve trigliserid'ini yan etkisi olmadan düşürebildiği için Niacin doktorlar tarafından bu amaçla sıklıkla kullanılmaktadır. Niacin yağ dokusundaki niacin reseptör 1 (NIACR1) ve niacin reseptör 2 (NIACR2)'ye bağlanarak kan lipidini düşürür.
2. Statinler (veya 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-koA redüktaz inhibitörleri): En güçlü kolesterol düşürücü ilaç grubu olan statinler LDL kolesterolunu %30-55 oranında azaltırlar. Statinler, vücudun kolesterol sentezi için kullandığı HMG-KoA redüktaz enzimini, onunla rekabet ederek engeller (competitive inhibition). Bu enzim, ayrıca karaciğer hücrelerinde LDL reseptör sentezinin artmasına neden olurlar, bu da kandan LDL'nin alınmasını hızlandırır. Bu grupta Atorvastatin, Simvastatin, Serivastatin, Lovastatin, Fluvastatin, Mevastatin, Pravastatin ve Rosuvastatin yer almaktadır (http://tr.wikipedia.org/wiki/Statinler).
3. Fibratlar (amfipatik karboksilik asit): Fibratlar çeşitli metabolik bozuklukların tedavisinde kullanılmakla beraber esas olarak yüksek kolesterol tedavisinde kullanılmasından dolayı lipit düşürücü ilaç olarak sayılmaktadırlar. Fibratlar PPAR (peroksimal farklılaşmayı aktive eden reseptör) reseptörlerini (özellikle de PPARα) aktive ederek kanda LDL kolesterol ve trigliserit seviyesini düşürerek HDL kolesterol seviyesini artırmaktadır. PPAR'lar karbonhidrat, yağ metabolizması ve yağ doku başkalaşımını düzenleyen bir hücre içi reseptör sınıfıdır. PPAR'ların etkinleştirilmesi lipid metabolizmasını kolaylaştıran bir grup

genin transkripsiyonuna neden olur. Bu sınıfta Bezafibrat, Ciprofibrat, Clofibrat, Gemfibrozil ve Fenofibrat yer almaktadır (http://tr.wikipedia.org/wiki/Fibratlar).

4. Safra asidi bağlayıcılar (reçineler): Safra asidi bağlayıcıları olarak bilinen reçineler, LDL'yi düşürmek suretiyle kan kolesterolünü yönetmede kullanılan başka bir ilaç sınıfıdır. Reçineler, kolesterol kullanılarak yapılan safra asitlerine bağlanırlar ve safra asitlerini sindirim sisteminden tamamen geçmeye zorlarlar. Bu da vücudun safra asidi üretmek için daha fazla kolesterol kullanmasına yol açar ve bunun sonucunda kolesterol seviyesi düşer. Bu grubun önemli üyeleri Cholestyramine, Colesevelam ve Colestipol ilaçlarıdır.
5. Ezetimibe: Bunlar vücut tarafından kolesterol miktarını alımını azaltırlar. Bu ilaç bazen diğer kolesterol düşürücü ilaçlar ile birlikte de verilir.

2.1. Kolesterol Düşürücü İlaçlar İle Yapılan Genotoksisite Ve Sitotoksisite Çalışmaları

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan Bezafibrat kolesterol düşürücü olarak kullanılır ve bu sınıflandırmaya göre 3. grupta yer almaktadır.

Kolesterol düşürücüler ile birçok genotoksisite, sitotoksisite ve kanserojenite çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

2.1.1. Atorvastatin İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Yapılan bir çalışmada Atorvastatin'in genotoksik etkisi *in vivo* ve *in vitro* olarak KA ve MN testleri ile araştırılmıştır. Bu çalışmada *in vitro* olarak Çin hamsterlerin V79 hücreleri ve *in vivo* olarak da CD-1 fareleri kullanılmıştır ve araştırmanın sonucunda Atorvastatin'in KA ve MN'yi uyarmadığı açıklanmıştır (Ciaravino ve ark, 1995).

Aynı araştırmada ajanın, *Salmonella typhimurium* ve *E.coli* bakterilerinde S9 mix varlığında ve yokluğunda herhangi bir genotoksik etki göstermediği

belirlenmiştir. Bu araştırmadan alınan sonuçlara göre Atorvastatin herhangi bir genotoksik risk taşımamaktadır.

Atorvastatin'in genotoksik etkiye sahip olup olmadığını Coetsee ve ark. (2008) araştırmışlardır. 5 günlük bir sürede *in vivo* olarak yapılmış olan bu araştırmada farelere 70 mg/kg/gün konsantrasyonunda Atorvastatin verilmiştir. Comet testi ile yapılmış olan bu araştırmanın sonucunda Atorvastatin'in genotoksik olduğu belirlenmiştir.

Gajski ve Garaj-Vrhovac (2008), comet, yapısal kromozom anormalliği (KA) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) testleri ile insan lenfositleri üzerinde Atorvastatin'in genotoksik potansiyelini incelemişlerdir. Kültürdeki lenfositler 30,21 ng/ml'lik bir konsantrasyonda Atorvastatin ile comet deneyi için, hücreler 24 saat, 48 saat ve 72 saat boyunca muamele edilmişlerdir. Hücreler, yapısal KA analizi için 48 saat, KKD analizi için 72 saat kültür edilmiştir. Yapısal KA analizleri için, 3 saat, 20 saat ve 48 saat için Atorvastatin ile muamele edilen hücrelerde, kontrole göre KA frekansının artığı bulunmuştur. KKD analizi sonuçlarında Atorvastatin'in insan lenfositlerinde KKD'yi (Kardeş Kromatid Değişimi=KKD) önemli derecede uyardığı saptanmıştır. Comet testi ile de Atorvastatin'e maruz kalan insan lenfositlerinde DNA hasarının artmış olduğu belirlenmiştir.

Atorvastatin ile yapılan başka bir çalışmada bu ilacın genotoksik etkisi *in vivo* bir deneyde zebra balıklarında araştırılmıştır. Bu araştırmada Atorvastatin 13, 26.25 ve 380 ng/L konsantrasyonlarında balıklara verilmiştir ve Atorvastatin'in etkisi zebra balıklarının eritrositlerinde comet testi ve RAPD testi ile incelenmiştir. Bu araştırmanın sonuçlana göre Atorvastatin'in genotoksik etkiye sahip olduğu saptanmıştır (Rocco ve ark, 2010).

2.1.2. Bezafibrat İle Yapılan Genotoksisite Çalışması

Isidori ve ark. (2007) yapmış oldukları çalışmada, Bezafibrat'ın genotoksik etkisi 5 farklı konsantrasyonda (0.635-1.25-2.5-5-10 mg/L) araştırmışlardır. Çalışmada *Salmonella typhimurium* ile *E.coli* kullanılmıştır. Araştırmadan alınan sonuçlara göre Bezafibrat'ın genotoksik risk taşıdığı ortaya çıkmıştır.

2.1.3. Cerivastatin İle Yapılan Genotoksisite Çalışması

Von Keutz ve Schlüter 1998 yılında Cerivastatin'in genotoksisitesini araştırmışlardır. Bu çalışmada *in vivo* olarak farelere 4 hafta boyunca her gün 300 mg/kg konsantrasyonunda Cerivastatin verilmiş ve mikronukleus testi yapılmıştır. Ayrıca bu çalışmada, *in vitro* olarak *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli* 'de gen mutasyonu ve Çin hamster ovaryum hücrelerinde kromozom aberasyonu testlerinde Cerivastatin'in her hangi bir genotoksik etkiye sahip olmadığı sonucuna varılmıştır.

2.1.4. Clofibric Acid İle Yapılan Genotoksisite Ve Sitotoksisite Çalışması

Clofibric acid ile yapılmış olan bir çalışmada bu ilacın genotoksik etkiye sahip olup olmadığı fare karaciğer hücrelerinde comet testi ile araştırılmıştır. Bu araştırmada Clofibric acid'in genotoksik etkiye sahip olduğu ortaya çıkmıştır (Ghaoui ve ark, 2003).

2.1.5. Etofibrat İle Yapılan Genotoksisite Çalışması

Würsch (2005) *in vitro* olarak Etofibrat'in genotoksik etkisini araştırmıştır. Yapılan Ames testinde Etofibrat'in *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA102 ve TA1538) bakterisinde genotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

2.1.6. Ezetimib İle Yapılan Kanserojenite Çalışması

Halleck ve ark. (2009), Ezetimib ilacının genotoksisite etki gösterip göstermediğini araştırmışlardır. Bu çalışmada *Salmonella typhimurium* (TA1535, TA97a, TA98, TA100 ve TA102) ve *Escherichia coli* (WP2uvrA)'de gen mutasyonu, farede *in vitro* klastojenite ve mikronukleus deneylerinde Ezetimib'in genotoksik etkileri araştırılmıştır. Araştırıcılar, bu deneyler sonucunda genotoksik olmadığını belirlemişlerdir.

2.1.7. Fenofibrat İle Yapılan Genotoksisite Ve Sitotoksisite Çalışmaları

Müller ve ark. (1995), Fenofibrat'ın sitotoksik ve genotoksik etkilerini araştırmışlardır. Araştırıcılar *in vitro* olarak sıçan karaciğerini kültür yaptıktan sonra Fenofibrat ile muamele etmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre Fenofibrat mitotik indeksi düşürmesine rağmen mikronukleus sayısında ciddi bir artışa neden olmamıştır.

Isidori ve ark. (2007) yapmış oldukları çalışmada Fenofibrat ilacının genotoksik etkisini 5 farklı konsantrasyonda (0.635-1.25-2.5-5-10 mg/L) araştırmışlar ve çalışmada *Salmonella typhimurium* ile *E.coli* bakterilerini kullanmışlardır. Bu araştırmadan alınan sonuçlara göre Fenofibrat'ın genotoksik risk taşıdığı ortaya çıkmıştır.

Tawfeeq ve ark. (2010), Fenofibrat (FF)'ın genotoksik potansiyele sahip olup olmadığını belirlemek için, karaciğeri kısmen alınmış (hepatektomi) erkek sıçanlara 2 hafta süreyle 0, 1.000 ve 2.000 mg/kg FF oral yolla vermişlerdir. Sıçanların karaciğer dokusu alınarak comet testi yapılmış ve DNA tamir genlerinin çalışıp çalışmadığı araştırılmıştır. Comet testinde, FF muamelesini takiben 3 saat sonra alınan örnekte pozitif (genotoksik) sonuçlar elde edilmiştir. DNA tamir genleri incelendiğinde de en yüksek FF konsantrasyonu ile muameleyi takiben 3 saat sonra alınan örneklerde Apex1, Ogg1 ve Mlh1 gibi DNA tamir genlerin ekspresyonunda artış tespit edilmiştir. Bu çalışmada, FF'nin sıçanların karaciğerinde DNA hasarına yol açtığı, fakat bazı DNA tamir genlerinin aktivitesinin artması ile tamir edilen DNA hasarı olduğu için FF'nin güçlü bir genotoksik etki göstermediği ortaya çıkmıştır.

2.1.8. Fluvastatin İle Yapılan Genotoksisite Çalışması

testi ile araştırmışlardır. Araştırma sonucunda bu ilacın genotoksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca aynı araştırmacılar Fluvastatin'in genotoksik etkisini *in vitro* olarak da ames testi ile *Salmonella typhimurium, E.coli*'de gen mutasyonu ve

Çin hamster'in V79 hücrelerinde KA testi ile araştırmışlardır. Bu araştırmanın sonucuna göre Fluvastatin herhangi bir genotoksik riske sahip değildir.

2.1.9. Gemfibrozil İle Yapılan Genotoksisite Ve Sitotoksisite Çalışmaları

Gemfibrozil ile yapılan bir çalışmada ames testinden faydalanarak bu ilacın genotoksik etkisi *Salmonella typhimurium* bakterisinde araştırılmış ve bu araştırmadan alınan sonuçlara göre bu ilacın genotoksik olmadığı ortaya çıkmıştır (Fitzgerald ve ark, 1981).

Felix ve Farber. (1982) *in vitro* ve *in vivo* bir çalışmada Gemfibrozil'in genotoksik etkisinin olup olmadığını sıçan kemik iliğinde KKD ve ames testleri ile araştırmışlardır. Bu araştırmanın sonuçlarına göre Gemfibrozil'in genotoksik etkiye sahip olmadığı ortaya çıkmıştır.

Isidori ve ark. (2007) yapmış oldukları çalışmada Gemfibrozil ilacının genotoksik etkisini 5 farklı konsantrasyonda (0.635-1.25-2.5-5-10 mg/L) araştırmışlardır. Bu çalışmada *Salmonella typhimurium* ile *E.coli* kullanılmıştır. Bu araştırmadan alınan sonuçlara göre Gemfibrozil'in genotoksik risk taşıdığı ortaya çıkmıştır.

Başka bir çalışmada kolesterol düşürücüsü olarak kullanılan Gemfibrozil ilacının genotoksik etkisi zebra balıklarında comet ve RAPD yöntemleri ile araştırılmış ve Gemfibrozil'in genotoksik risk taşıdığı ortaya konulmuştur (Rocco ve ark, 2010).

2.1.10. Lovastatin İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Lovastatin ile yapılan bir çalışmada bu ilacın genotoksik olup olmadığı fare lenfositlerinde MN, KA ve KKD testleri ile araştırılmış ve bu ilacın genotoksik etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca bu araştırmada Ames testi de kullanılmış, Lovastatin'in genotoksisitesi araştırılmışt ve Ames testi sonuçlarına göre de bu ilacın genotoksik olmadığı saptanmıştır (Snyder ve Green, 2001).

Lovastatin ilacının genotoksik etkisi Çin hamster V79 hücrelerinde mikronukleus testi ile araştırılmıştır. Bu çalışmada, önceden genotoksik olduğu bilinen Doxorubicin ilacı ile Lovastatin ilacı birlikte V79 hücrelerinin ortamına verilmiştir. Bu araştırmanın sonucunda Doxorubicin'in Lovastatin ile birlikte hücre ortamina verilmesi bu ilacın genotoksik etkisini yükselttiği saptanmıştır (Snyder, 2009).

2.1.11. Pravastatin İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Pravastatin ile yapılan bir çalışmada bu ilacın genotoksik etkiye sahip olup olmadığı *in vitro* bir çalışmada PLHC-1 (zebra balık karaciğer dokusundaki hücreler) ve RTG-2 (gökkuşağı alabalığı yumurtalığı) hücre hatlarında comet testi ile araştırılmıştır. Bu araştırmadan alınan sonuçlara göre bu ilacın genotoksik etkiye sahip olmadığı saptanmıştır (Minagh, 2008).

Pravastatin ile yapılan başka bir çalışmada bu ilacın genotoksik etkisi *in vivo* olarak C57Bl/J6 farelerinde araştırılmıştır. Bu araştırmada Pravastatin 5 gün ve her gün bir kere oral yolu ile 70 mg/kg vücut ağırlığı konsantrasyonunda farelere vererek yapılan comet testinde Pravastatin'in genotoksik olduğu belirtilmiştir (Coetsee, 2008) .

2.1.12. Rosuvastatin İle Yapılan Genotoksik Çalışması

Berber ve ark. (2013), Rosuvastatin ile yaptıkları çalışmada bu ilacın insan periferal lenfositlerinde genotoksik olup olmadığını comet, KA ve MN testleri ile araştırmışlar ve araştırmanın sonucunda bu ilacın genotoksik olduğunu saptamışlardır.

2.1.13. Simvastatin İle Yapılan Genotoksisite Çalışması

In vivo bir çalışmada Coetsee ve ark. (2008), Simvastatin'in genotoksik etkilerini araştırmışlardır. Bu araştırıcılar 5 gün boyunca farelere 70 mg/kg

konsantrasyonunda Simvastatin ilacını uyguladıktan sonra comet testi ile söz konusu olan ilacın genotoksik risk taşıdığını belirlemişlerdir.

2.2. Kolesterol Düşürücü İlaçlar İle Yapılan HPLC Çalışmaları

Fibratların, genellikle düşük HDL kolesterol ve yüksek trigliserit konsantrasyonlarını düzelttiği bilinmektedir (Rubins ve ark, 1999). Bu amaçla, plazmada Bezafibrate ve Fenofibrat konsantrasyonları 5. günde HPLC tekniği ile ultraviyole detektör kullanılarak belirlenmiştir (Masnatta ve ark, 1996).

Kublin ve ark. (2010) Lipit profilinin en önemli parametresinin LDL olduğunu ve LDL'nin en uygun seviyesinin 130 mg / dL'nin altında, optimum konsantrasyonlarının da 100 mg / dL 'nin altında olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırıcılar, bir diğer önemli parametrenin trigliserit konsantrasyonu olduğunu ve Fibratlar'ın VLDL lipoproteinlerin (very low density lipoprotein) sentezini karaciğerde inhibe ettiğini ve bunların katabolizmasını lipoprotein lipaz aktivitesini artırarak hızlandırdığını belirtmişlerdir. Kublin ve ark. (2010), tıbbi ürünlerde kolesterol seviyesini azaltan Fenofibrat, Bezafibrate, Etofibrate, Ciprofibrate ve Gemfibrozil'in belirlenmesinde HPLC tekniğini denemişlerdir.

Kyrklund ve ark. (2001), eş zamanlı Lovastatin ve Fibrat kullanımına bağlı tedavi sırasında miyopati (Miyopati kas liflerinin düzgün çalışmasını engelleyen bir kas hastalığıdır) gelişme riskinin Bezafibrat'da Gemfibrozil'den daha az olduğunu belirlemişlerdir. Lambropoulou ve ark. (2008), bir kişinin kullandığı Bezafibrat'ı Titanyum dioksit (TiO2) kullanarak parçalamışlar ve parçalanma ürünlerini Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi (GC-MS) ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile diode-array (HPLC-DAD), Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi (LC/MS) gibi güçlü analitik teknikleri kullanarak belirlemişlerdir.

HPLC yöntemi ile yapılan analizlerde Fibratların kalitatif ve kantitatif tayininde isokratik çalışma yapılmış ve analizlerde C18 kolonu (250 mm × 4.6 mm, 5 µm) ve spektrofotometrik detektör kullanılmıştır. Wei ve ark. (2008), HPLC'de analiz aşamasında mobil faz olarak asetonitril:su (70 : 30, v/v), pH 2.5, kolon sıcaklığı:35 ^{o}C ve otomatik örnekleyici sıcaklığı: 25oC, mobil fazın akış hızı: 1.2 ml/dak,

enjeksiyon hacminin 10µL, dalga boyunun ise Ciprofibrate ve Gemfibrozil için 233 nm ve 274 nm'de en iyi sonucu aldığını bildirmişlerdir. Araştırmada kullanılan standartların ise; 1.0 mg/ml 'lik metanol konsantrasyonunda çözdüklerini belirtmişlerdir. Her iki bileşiğin detektörde alıkonma zamanlarının ise; Ciprofibrate ve Gemfibrozil için sırasıyla 4.0 dakikada ve 6.3 dakikada olarak saptanmıştır.

Wei ve ark. (2008), duyarlı ve seçiciliği yüksek olarak bilinen HPLC/UV tekniği insan plazmasındaki Bezafibrat bileşiğinin belirlenmesinde kullanmışlardır. Söz konusu araştırıcılar, protein çöktürülmesi perklorik asit : methanol çözeltileri kullanarak (10:90 v/v) sağlamışlardır. Araştırıcılar, analitik çalışmalarını HPLC/UV aletini kullanarak 235 nm dalga boyunda okuma yoluyla yapmışlardır. Kromatografik analizde; C18 kolonu ve asetonitrile : amonyum asetat sulu çözeltisi kullanılmış (10 mmol/L; pH 4.0) (44:56, v/v) akış hızı 1.0 mL/dakikaya ayarlamışlardır. Standart miktarının ise; 0.1-15.0 µg/mL konsantrasyon aralıklarında olduğunu belirtmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada test maddesi olarak yüksek kolesterol ve trigliseride karşı bir ilaç olarak kullanılan Bezafibrat, materyal olarak sigara içmeyen yaşları birbirine yakın sağlıklı iki erkek ve iki bayandan (23 ve 25 yaşlarında 2 bayan, 24 ve 25 yaşlarında 2 erkek) alınan periferik kan kullanılmış ve test maddesinin genotoksik olup olmadığı kromozom anormalliği (KA) ve mikronukleus (MN) testleri ile araştırılmıştır. Ayrıca HPLC tekniği ile kalitatif ve kantitatif olarak ilacın hücrelere ne kadar geçtiği belirlenmiştir.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.1.1.1. Bezafibrat

Bezafibrat, kolesterol düzenleyici ilacı olarak Fibratlar gurubuna girmektedir. Fibratların etkisiyle lipoliz artar, karaciğerde trigliserit yapımı azalır, HDL-K yapımı artar. En önemli etkilerinden biri de küçük yoğunlukta LDL partiküllerinin sayısını azaltmalarıdır. Fibratların çalışma mekanizması ise etkisini, nükleer transkripsiyon faktörlerini aktive ederek gösterir. Fibratlar peroxisomal proliferating activating reseptör alpha'ya (PPARa) bağlanarak, onu aktive ederler ve 50'den fazla genin transkripsiyonunda değişikliğe neden olurlar (Fruchart ve ark 2001, Staels ve ark 1998).

Bu çalışmada test maddesi olarak 98% saflıkta Bezafibrat (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Bezafibrat'ın kimyasal özellikleri aşağıda görülmektedir.

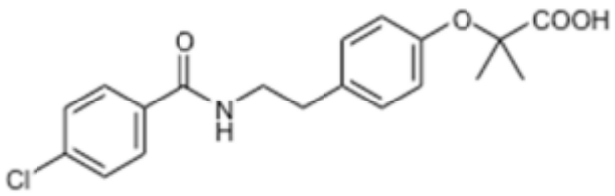
İlacın ticari adı: **:** Bezatrol, Bezalip, BM 15075, Benzofibrate

Kimyasal adı: **:** 2-[4-[2-[(4-chlorobenzoyl)amino]ethyl]phenoxy]-2-methyl-propanoic acid

Kapalı Formülü: **:** $C_{19}H_{20}ClNO_4$

Molekül ağırlığı: **:** 361.819g/mol
Yoğunluğu **:** 1.26 g/cm^3
Erime Sıcaklığı **:** 183-186 °C
Kaynama Sıcaklığı **:** 572.10 °C at 760 mm Hg
Cas No **:** 41859-67-0
Üreten firma **:** Sigma-Aldrich

Açık formülü:



Şekil 3.1. Bezafibrat'ın açık formülü

3.1.1.2. Dietil eter

Dietil eter (CAS numarası: 60-29-7) sıvı-sıvı yöntemi ile Bezafibrat'ı numunelerden ekstraksiyon yapmak için kullanılmıştır. Bu yöntemde Dietil eter iki faz oluşturup bütün hidrofobik kimyasalları kendine absorbe eder. Bezafibrat bir hidrofobik kimyasal olduğu için Dietil eter'in oluşturduğu faza geçiş yapar.

3.1.1.3. Dimetil sülfoksit (DMSO)

Dimetil sülfoksit (CAS numarası: 67-68-5) formülü C_2H_6OS olan organokükürt bileşiğidir. Renksiz ve sıvı halde olan bu bileşik önemli bir polar çözücüdür. Bezafibrat'ı çözmek için kullanılmıştır. Ayrıca bu çalışmada çözücü kontrol olarak insan periferal kan lenfositleri DMSO (Çözücü kontrol) ile 24 ve 48 saat muamele edilmiştir.

3.1.1.4. Entellan

Preparat kapatma solüsyonudur (Merck, Cat. No. 7961). Preparatlar daimi hale getirilirken lam ve lamelin birbirlerine yapıştırılmasında kullanılmıştır.

3.1.1.5. Fiksatif

KA için kullanılan fiksatif, 1 kısım glasial asetik asit'in 3 kısım metanol ile karıştırılması sonucu hazırlanmıştır. MN için ise iki farklı fiksatif kullanılmıştır. İlk fiksatif 1 kısım glasial asetik asit 5 kısım metanol ile karıştırıldıktan sonra 1/1 oranında % 0.9 NaCl ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır (1:5:6). Diğer fiksatifler ise NaCl ilave edilmeden kullanılmıştır.

Fiksatif kullanılmadan iki saat önce hazırlanmış ve buzdolabında saklanmıştır. Her seferinde preparat yapım işleminden iki saat önce taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır.

3.1.1.6. Giemsa

Giemsa boyası Merck firmasından (Cat. No. 9204) temin edilmiş olup deneylerimizde Sorensen tamponu içinde hazırlanmış olan %5'lik boya eriyiği preparatların boyanmasında kullanılmıştır.

3.1.1.7. Hidroklorik asit (HCl)

Hidroklorik asit (CAS numarası: 7647-01-0, Merck), örneklerde Bezafibrat analizi yapmadan önce hazırlanma aşamasında, kan plazmasında ve kültür ortamındaki proteinleri çöktürmek amacıyla kullanılmıştır.

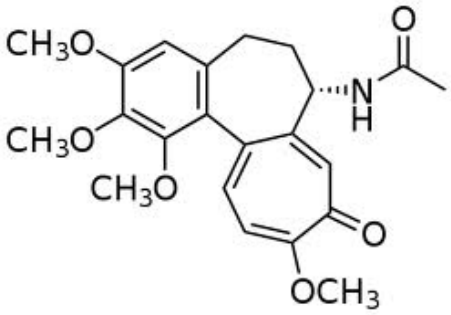
3.1.1.8. Hipotonik Eriyik

Hipotonik eriyik olarak %0.4'lük KCl (Merck) kullanılmıştır. Eriyik bidestile su içinde stok halinde hazırlanıp ağzı kapalı bir cam kapta buzdolabında (+4 ºC) saklanmıştır. Her preparasyondan yaklaşık 2 saat önce yeteri kadar miktar alınıp 37ºC'deki inkübatörde ısıtılıp kullanılmıştır.

3.1.1.9. Kolşisin (Kolkisin) (Sigma)

Kromozom preparatlarının hazırlanmasında mitotik zehir olarak kolşisin (Colchicine) (Sigma Cat. No. C9754) kullanılmıştır. Kolşisin eriyiği saf su içerisinde hazırlanmış ve kromozom medyumunun her ml'sinde 0.06 mg olacak şekilde (0.06 mg/ml) 2.5 ml'lik kromozom medyumuna ilave edilmiştir.

Cas no : 64-86-8
Kapalı formülü: $C_{22}H_{25}NO_6$
Açık formülü:



Şekil 3.2. Kolşisinin açık formülü

3.1.1.10. Kromozom Medyumu

Bu çalışmada Gibco firmasının ürettiği PB Max. Kromozom medyumu (cat. no. 12552-013) hücre kültürü için kullanılmıştır. PB Max medyumu tam medyumdur. Fakat heparin içermemektedir.

Bu medyum her tüpe 2.5ml olacak şekilde pipetle paylaştırılmış ve bu miktarlarda kullanılmıştır. Kültür tüpleri (12 ml'lik vida kapaklı, cellstar) steril olarak temin edilmiştir.

3.1.1.11. Nitrik Asit (HNO_3)

Lamları temizlemek amacıyla 1 N çözelti olarak hazırlanmıştır. Plastik şişede saklanarak her defasında tekrar tekrar kullanılmıştır.

3.1.1.12. Mitomycin C (MMC) (Sigma)

Bilinen bir mutajen olan Mitomycin C, bu çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (0.2 µg/ml). MMC eriyiği, MMC'nin steril saf suda eritilmesiyle hazırlanmıştır. Daha sonra 0.2 µm por çapına sahip membran filtreden (Sartorius) geçirilerek eriyik bakterilerden arındırılmıştır (steril edilmiştir).

Kimyasal adı: 6-Amino-1,1a,2,8,8a,8b-hexahydro-8-(hydroxymethyl)-8a-methoxy-5-methyl-azirino[2',3':3,4] pyrrolo[1,2-a]indole-4,7-dione carbamate (ester)

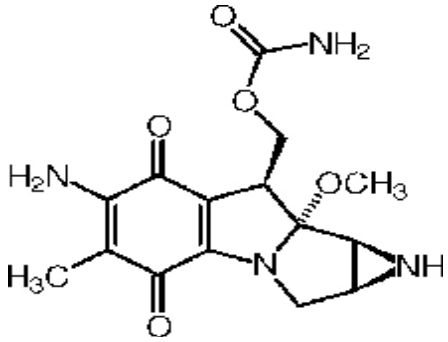
Kapalı formülü: $C_{15}H_{18}N_4O_5$

Molekül ağırlığı: 334.33 g/mol

Erime noktası: >360ºC

CAS No: 50-07-2

Açık formülü:



Şekil 3.3. Mitomycin C'nin açık formülü

3.1.1.13. Mobil Faz

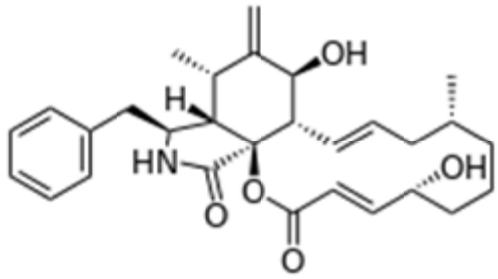
Mobil faz, Bezafibrat analizi esnasında kimyasalları yürütmek ve kolondan geçirmek amacıyla kullanılır. Bu analizde mobil faz olarak 0.01 M fosfat tamponu ve Metanol karışımı 35:65 oranında kullanılmıştır ve fosfat tamponun pH'si fosforik asit ile 3.5'e ayarlanmıştır.

Fosfat tamponu hazırlanması: 0,78 g $NaH_2PO_4.2H_2O$ bir miktar saf suda çözünür. Üzerine derişik % 85'lik H_3PO_4 0,34 ml olarak eklenir ve son hacim 1 litreye tamamlanır.

3.1.1.14. Sitokalasin B (Sigma)

Sitokalasin B, MN testinde aktin polimerizasyonunu inhibe edip sitoplazma bölünmesini engellemek için (sitokinez bloklayıcı) kullanılmıştır. Sitokalasin B, 6 µg/ml konsantrasyonda olacak şekilde kültürün bitimine 24 saat kala kültüre ilave edilmiştir.

Kimyasal adı **:** Cytochalasin B
Kapalı Formülü: **:** $C_{29}H_{37}NO_5$
Molekül ağırlığı: **:** 479.6 g/mol
Yoğunluğu **:** 1.21 g/cm^3
Erime Sıcaklığı **:** 215-223ºC
CAS number **:** 14930-96-2
Açık formülü:



Şekil 3.4. Sitokalasin B'nin açık formülü

3.1.1.15. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer)

Hem KA ve hem MN preparatlarının boyanmasında bu tampon, %5'lik Giemsa boyası hazırlanmasında kullanılmıştır.

Bu tampon eriyik, tampon A ve tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanmış olup bu çözeltiler çalışmanın amacına uygun olarak birbirleriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanılmıştır.

Hazırlanması:

Tampon A: 11.34 gr KH_2PO_4 250 ml saf su içinde eritilmiştir (pH=4.8).

Tampon B: 14.83 gr $Na_2HPO_4.12H_2O$ 250 ml saf su içinde eritilmiştir (pH=9.3).

3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları

3.1.2.1. Flow Kabin (Steril Kabin)

Hücre kültürü tüplerine kromozom mediumu konulması, kan ekiminin yapılması, test eriyiklerinin ve kültür tüplerine ilave edilmesi sırasında steril bir ortam olarak, % 99.9 partikül tutma özellikli filtreye sahip, 1500 m^3/h emiş kapasiteli, UV ve floresan ampulü olan LABORMED marka flow kabin kullanılmıştır.

3.1.2.2. Hassas Terazi

Hava akımlarına karşı özel cam paravanlarla korunan ve 0,0001 gr hassasiyetindeki GEC AVERY marka terazi kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.

3.1.2.3. Inertsil ODS-4 Kolonu

Kolonlar analiz esnasında bir karışımı oluşturan maddelere ayrılmasını sağlarlar. Bu nedenle her kimyasalı analiz yapmak için kolon gerekmektedir. Bu kolon analiz yapılması gereken kimyasalların özelliğine göre değişmektedir. Bezafibrat'ın özelliklerine göre Inertsil ODS-4 seçilmiştir. Bu kolonun boyutu 2.1×50 mm ve gözenek büyüklüğü ise 3 µm'dir (C/N:5020-04012, S/N:0AF50056, GL Sciences/ Japon) .

3.1.2.4. İnkübatör

Hücrelerin 37 ºC'de inkübe edilmesi için INCUCELL marka inkübatör kullanılmıştır.

3.1.2.5. Mikroskop

Koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan OLYMPUS marka binoküler ışık mikroskobu preparat incelemeleri sırasında kullanılmıştır. Fotoğraflar ise yine Olympus marka mikroskopta dijital olarak çekilmiştir.

3.1.2.6. pH Metre

Kimyasalların pH değerlerini saptamak için WTW 315i (Germany) marka pH metre kullanılmıştır.

3.1.2.7. Santrifüj

Rotor çapı 21 cm olan ve 4000 rpm'e kadar yükselebilen devir hızı, 99 dk.'lık zaman ayarlayıcı, açılabilir başlığa sahip ve 28 tüp kapasiteli HETTICH UNIVERSAL marka santrifüj çalışmalarda kullanılmıştır.

3.1.2.8. HPLC Analiz Aleti (Applied Prominence Sil-20A)

Süpernatanttaki Bezafibrat miktarının saptanmasında SHIMADZU marka APPLIED PROMINENCE SIL-20A model HPLC cihazı kullanılmıştır.

3.1.2.9. Vorteks

Bir test tüpü içindeki eriyiğin girdap oluşturacak şekilde ve iyice karıştırılmasını sağlamak amacıyla kullanılmıştır.

3.2. Lamların Temizlenmesi

Kültür süresinin bitiminden iki gün önce etiketli olan lamlar şaleye dizilerek üzerlerini iyice örtecek şekilde 1 N nitrik asit konmuştur. Şalenin ağzı kapatılarak bu şekilde 24 saat bekletilmiştir. Süre bitiminde lamlar yarım saat akan çeşme suyunda iyice yıkanmıştır. Lamlar 3-4 defa saf suyla yıkandıktan sonra şale saf su ile doldurularak buzdolabında saklanmıştır.

3.3. Kromozom Anormalliklerini (KA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddesinin Kültüre İlave Edilmesi, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskobik İncelemeler

Bir kimyasal maddenin insanlar için genotoksik olup olmadığı başta KA ve MN testleri ile belirlenebilmektedir. Bu tür çalışmalar planlanırken, uygulanırken ve

yorumlanırken uluslararası yönergelere uygun hareket edilmesi zorunluluğu bulunmaktadır.

3.3.1. Kromozom Aberasyonunu (KA) Saptamak için Hücre Kültürünün Yapılması ve Test Maddesinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması

Bu çalışmada KA'yı saptamak amacıyla birbirine yaşları yakın, sağlıklı ve sigara içmeyen insanlardan alınan (23 ve 25 yaşlarında 2 bayan, 24 ve 25 yaşlarında 2 erkek) 1/10 heparinize edilmiş periferik kanın 0.2 ml'si (6 damla) steril şartlarda 2.5 ml kromozom medyumuna (PB max, Gibco, cat.no.12552-013) ilave edilmiştir (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991). Kanın ilavesinden hemen sonra 37°C'deki inkübatörde 72 saat inkübe edilmiştir. Ön çalışma sonucu belirlenen konsantrasyonlardaki (100, 175, 250 ve 325 µg/ml) test maddesi DMSO'da çözülerek kültür ortamına kültürün başlangıcından 24 ve 48 saat sonra ilave edilmiş ve hücrelerin test maddesiyle 24 ve 48 saat boyunca muamele edilmeleri sağlanmıştır. Her deneyin bir kontrolü, bir eritici kontrolü (DMSO) ve birde pozitif kontrolü (0.15 µg/ml mitomycin C: MMC) oluşturulmuştur. Ayrıca her deneyin, bekleme sırasında ilaç kayıplarını ve hücrelere geçiş miktarını belirlemek amacıyla, kan ilave edilmeden sadece en yüksek konsantrasyonda test maddesi kültür ortamına eklenmiş olan bir ilaç kontrolü bulunmaktadır.

Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (yani kültürün 70. saatinde) her tüpe hazırlanan kolşisin eriyiğinden ilave edilmiş (0.06 µg/ml) ve tüpler hafifçe sallanarak iyice karıştırılmıştır. Hücreler 2 saat (37 °C'de) kolşisin ile ön muameleye tabi tutulmuştur. Kültür süresi olan 72. saatin bitiminde kültür tüpleri 1200 devir/dk (rpm)'da 15 dk. santrifüj edilmiş, süpernatant Bezafibrat miktarının belirlenmesi analizini yapmak üzere başka steril ve etiketlenmiş tüplere aktarılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden 0.5-0.7 ml'lik sıvı içerisinde hücreler resüspanse edildikten sonra 37°C'lik hipotonik eriyik (% 0.4' lük KCl) tüplere damla damla ilave edilmiştir. Her tüpe 5 ml hipotonik eriyik ilave edilmiş, ağzı kapandıktan sonra inkübatöre konularak hücrelerin 10 dk. hipotonik eriyikte 37°C' de muameleleri

sağlanmıştır. Sürenin sonunda tüpler 15 dk. 1200 devir/dk' da santrifüj edilerek, tüpün üstündeki supernatant alınmış ve tüpün dibinde kalan 0.5-0.7 ml sıvı içerisinde tekrar resüspanse edilen hücreler üzerine damla damla soğuk fiksatif (1 hacim glasial asetik asit / 3 hacim metanol) ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 20 dk. fiksatif ile muamele edilen hücreler 1200 devir/dk 'de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant uzaklaştırılarak tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Fiksatifle muamele 3 defa tekrarlanmıştır. Son santrifüjden sonra dipte 0.5-0.7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra preparat yapma işlemine geçilmiştir.

Tüpün dibinde toplanan hücrelerin pastör pipeti ile homojen hale getirilmeleri sağlanmış, bu hücre süspansiyonundan temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanmış lamların üzerine 75 cm yükseklikten damlatma işlemi yapılmıştır (her lama 3-4 damla). Böylece hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerinde dağılması sağlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.

3.3.2. Preparatların Boyanması

Preparatlar kuruduktan sonra %5 'lik Giemsa boyası, 5 ml tampon A, 5 ml tampon B ve 5 ml Giemsa'nın karıştırılarak üzerleri 85 ml saf su ile tamamlanmasıyla hazırlanmıştır (pH=6.8). Sonra bu boya filtre kâğıtları ile süzülmüştür. Boya hazırlandıktan sonra preparatlar boya içerisine konulmuş ve yaklaşık olarak 20 dk. bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkartıldıktan sonra, üç ayrı kaptaki saf su içerisinden geçirilerek preparatlar üzerindeki fazla boyanın akması sağlanmıştır. Bundan sonra preparatlar kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir. Entellan sertleştikten sonra bu daimi preparatlarda mikroskobik incelemeler yapılmıştır.

3.3.3. Mikroskobik İnceleme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar Olympus marka binoküler ışık mikroskobunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir (10x100=1000 büyütmede).

3.3.3.1. Kromozomal Anormallikler (KA) ve Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

3.3.3.1.(1). Kromozom Anormalliklerinin (KA) Saptanması

KA'yı saptamak amacıyla yapılan daimi preparatlar kullanılmıştır. Her bir kişiden hazırlanan preparatlardan iyi dağılmış kromozomlara sahip toplam 100 hücre (4 kişiden toplam 400 hücre) KA'yı saptamak amacı ile incelenmiştir. Bu hücreler içinde gözlediğimiz kromozom yapı ve sayı anormallikleri Uluslararası İnsan Sitogenetik Adlandırma Sistemine (ISCN= International System for Human Cytogenetic Nomenclature) uygun olarak değerlendirilmiş ve adlandırılmıştır (Paz-y-Mino ve ark, 2002). İncelenen bu 100 hücre içinde hücre başına düşen yapısal kromozom anormalliklerinin (yapısal KA/hücre) sayısı ile anormallik içeren hücrelerin yüzdesi saptanmıştır. Bu çalışmada gap'lar anormallik olarak değerlendirilmemiştir. Gap ile kromatid ve kromozom tipi kırıklar arasındaki fark şu şekilde ayırt edilmiştir (Kauderer ve ark, 1991). Gap'da kromatidin birinde (kromatid tipi gap) veya kromatidin her ikisinde (kromozom tipi gap) görülen boyanmamış bölge bir kromatidin kalınlığından daha azdır. Kırıklarda ise daha fazladır. İşte bu ölçülere göre gap ile kromatid ve kromozom tipi kırıklar birbirinden ayırt edilmiştir. Mace ve ark. (1978) ise gap bölgesinde DNA ipliğinde kırık olmadığını elektron mikroskobu fotoğraflarında göstermişlerdir.

Bu çalışmada kromatid kırığı ve tek kol birleşmesi gibi anormallikler kromatid tipi anormallik olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca kromozom kırığı, kardeş kromatid birleşmesi (sister chromatid union), kromatid değişimi, halka kromozom ve disentrik kromozom oluşumu gibi anormallikler de kromozom tipi anormallikler olarak değerlendirilmiştir.

3.3.3.1.(2). Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

Mitotik indeksin saptanması amacıyla her kişiye ait tesadüfi seçilmiş alanlarda toplam 3000 hücre incelenmiş ve bunların içerisinde metafaz devresindeki hücrenin sayısı belirlenmiştir. Bu verilerden faydalanılarak MI yüzde cinsinden hesaplanmıştır.

3.4. Mikronukleus (MN) Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddesinin Kültüre İlave Edilmesi, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskobik İncelemeler

3.4.1. Mikronukleus (MN) Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddesinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması

In vitro mikronukleus testi için Rothfuss ve ark. (2000)' nin geliştirdikleri yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla MN testi için kişilerden alınan 1/10 heparinize edilmiş kan kromozom medyumlarına steril şartlarda 6 damla (0.2 ml) ekilmiştir (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991). Hücreler inkübatörde 37 ± 1°C'de 68 saat için inkübe edilmiştir. Bezafibrat'ın etkisini incelemek için, KA testinde kullanılan konsantrasyonlardaki test maddesi kültür ortamına kültürün başlangıcından 20 ve 44 saat sonra ilave edilmiş ve hücrelerin test maddesiyle 24 ve 48 saat boyunca muamele edilmeleri sağlanmıştır. Ayrıca deneyin bir kontrolü, bir eritici kontrolü (DMSO) ve bir pozitif kontrolü (MMC) oluşturulmuştur. İki nukleuslu hücre oluşumunu sağlamak için de kültürün 44. saatinde bütün tüplere 6 µg/ml olacak şekilde sitokalasin B ilave edilmiştir. Kültürün 68. saatinde kültür tüpleri 1200 devir/dk.'da 15 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatanttaki Bezafibrat miktarının belirlenmesi analizini yapmak üzere başka steril ve etiketlenmiş tüplere aktarılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden 0.5-0.7 ml'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, 37 °C'de tutulan hipotonik eriyik (% 0.4 'luk KCL) ilave edilmiştir. Bu eriyiğin ilavesi damla damla ve karıştırılarak yapılmıştır. Her

tüpe 5 ml hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler, ağzı kapatılarak inkübatöre konulmuştur. Hücreler 5 dk. hipotonik eriyikte 37 °C'de muamele edilmiştir. Sürenin sonunda tüpler 15 dk. 1200 devir/dk.'da santrifüj edilip, süpernatant atılmıştır. Bu sefer hipotonik eriyik ilavesi gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 5 ml olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edilmiştir. İlk fiksatif 1 hacim glasial asetik asit, 5 hacim metanol karışımının 1/1 oranında % 0.9 NaCl ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır (1/5/6 oranında). Oda sıcaklığında 20 dk. fiksatif ile muamele edilen hücreler 1200 devir/dk.'da 15 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Bu işlemden sonra ilk fiksatiften farklı fiksatif kullanılmıştır (1 kısım asetik asit 5 kısım metil alkol). Bu fiksatifle muamele iki kere tekrarlanmıştır. Her fiksatif ilavesinden sonra santrifüj edilerek üstteki sıvı atılıp en son fiksatif muamelesinden sonra preparat yapma işlemi başlanmıştır.

Tüpün dibinde toplanan hücreler pastör pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Pastör pipetine 4-5 damla olacak şekilde bu hücre süspansiyonundan çekilmiştir. Daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanan lamların üzerine farklı alanlara 1'er damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak (her lama 4-5 damla) (yaklaşık 5 cm yükseklikten) hücrelerin lam üzerinde yayılması sağlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.

3.4.2. Preparatların Boyanması

Hazırlanan preparatlar Sorensen tamponu ile hazırlanan %5'lik Giemsa boyası ile boyanmıştır. 5 ml tampon A, 5 ml tampon B ve 5 ml Giemsa karıştırılmasıyla üzerleri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlanarak %5'lik Giemsa boyası hazırlanmıştır (pH=6.8). Sonra bu boya bir şale içine filtre kâğıtları ile süzülmüştür. Bir günlük preparatlar boya içerisine konulup ve yaklaşık olarak 15 dk. boya içerisinde bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkartılıp ve üç ayrı kaptaki saf su içinden geçirilmiştir. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette konularak kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi

hale getirilmiştir. Entellan kuruduktan sonra bu daimi preparatlarda mikroskobik incelemeler yapılmıştır.

3.4.3. Mikroskobik İncelemeler

Hazırlanmış olan daimi preparatlar ışık mikroskobunda 40'lık objektif ile incelenmiştir (10x40=400 büyütmede). Bu incelemeler sırasında her bir kişiden hazırlanan preparatlardan 1000 iki nukleuslu (binükleer) hücre incelenmiştir. Bu iki nukleuslu hücreler içerisinden mikronukleuslu olanları ve toplam mikronukleus sayısı saptanmıştır. Bu inceleme sonucunda saptanan değerlerden mikronukleuslu binukleer hücre oranı ve mikronukleus yüzdesi hesaplanmıştır. Ayrıca aynı kişiden hazırlanan preparatlardan 1000 hücre incelenmiştir. Bu hücreler arasından bir, iki, üç ve dört nukleuslu olanların (Şekil 3.5 - Şekil 3.8) sayıları saptanmıştır. Bu sayılardan yola çıkarak Nukleus Bölünme Indeksi (NBI) (Nuclear Division Index = NDI) hesaplanmıştır (Fenech, 2000). Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

NBI= (1xN1+2xN2+3xN3+4xN4)/n

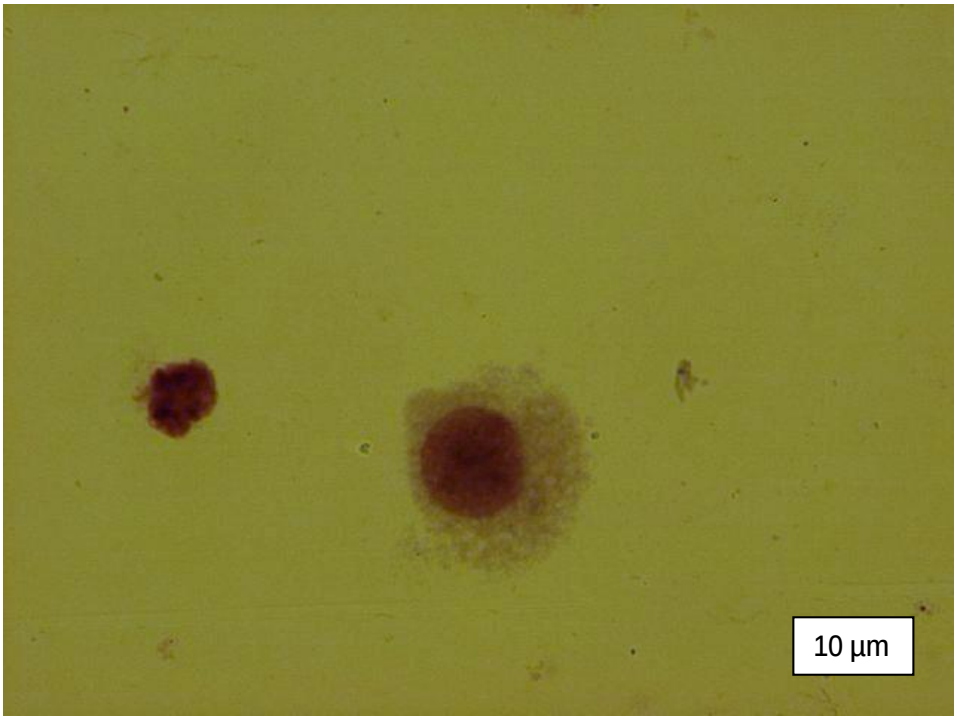
N1: 1 nukleuslu hücre sayısı

N2: 2 nukleuslu hücre sayısı

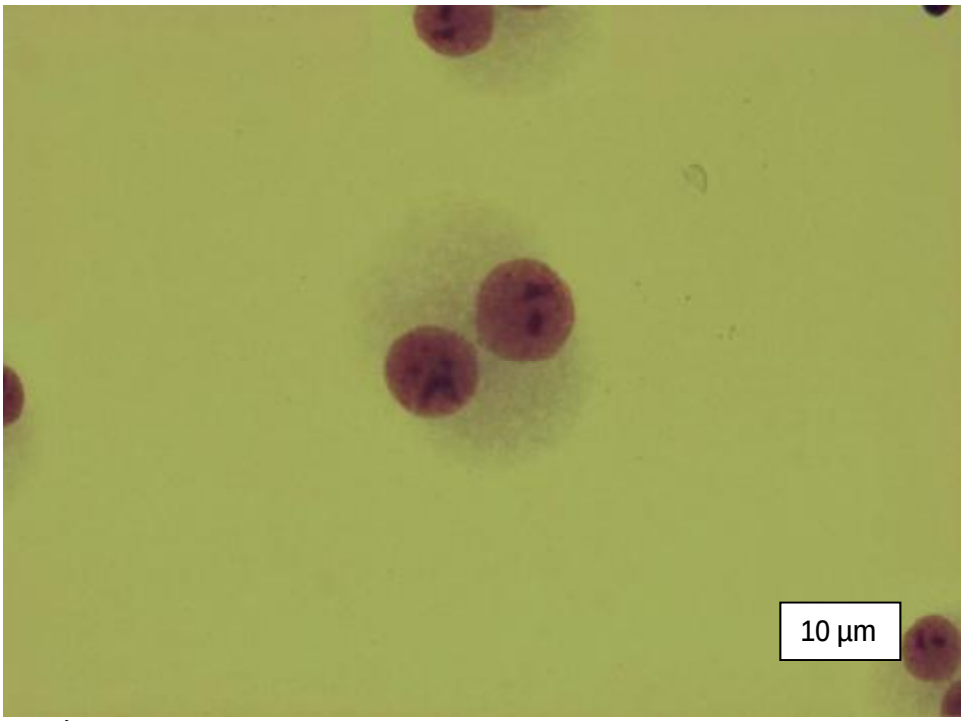
N3: 3 nukleuslu hücre sayısı

N4: 4 nukleuslu hücre sayısı

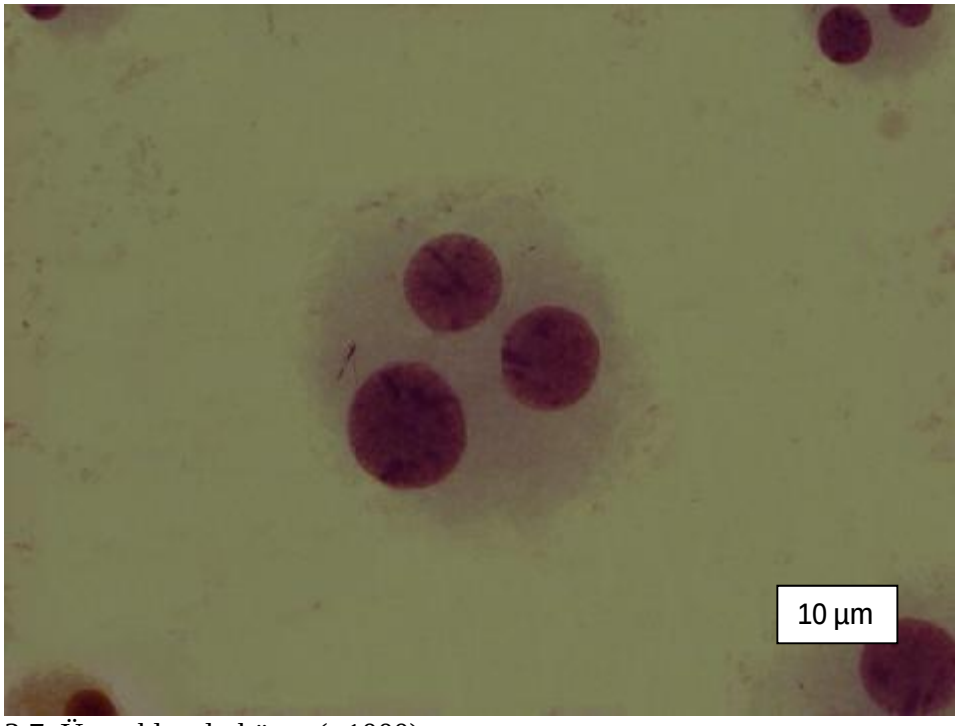
n : İncelenen toplam hücre sayısı



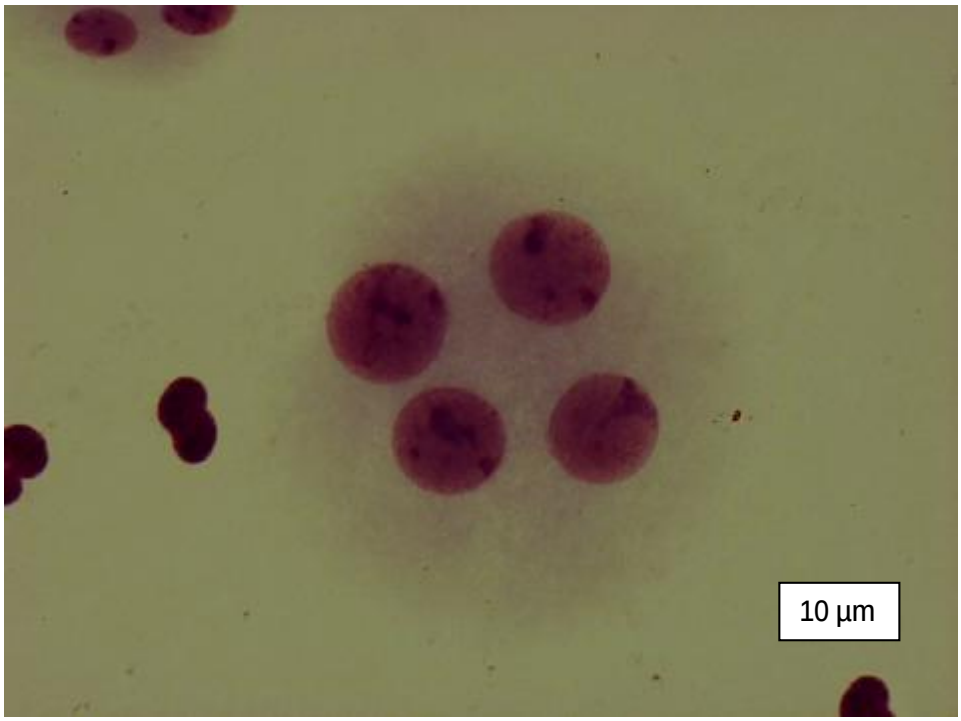
Şekil 3.5. Bir nukleuslu hücre (x1000).



Şekil 3.6. İki nukleuslu hücre (x1000).



Şekil 3.7. Üç nukleuslu hücre (×1000).



Şekil 3.8. Dört nukleuslu hücre (×1000).

3.5. Mikroskopta Fotoğraf Çekme

Fotoğraflar Olympus markalı trinoküler mikroskoba bağlı dijital fotoğraf makinesi (Olympus CX31RTSF; 7,1 Megapixel) ile çekilmiştir. KA'lara ait örneklerin (1000 büyütmede) , iki nukleuslu hücrelerden mikronukleusa sahip olanlar ve bir, iki, üç ve dört nukleuslu hücrelerin bazılarının (1000 büyütmede) fotoğrafları çekilmiştir.

3.6. HPLC Tekniği ile Bezafibrat'ın Kalitatif ve Kantitatif Olarak Belirlenmesi

Kültür süresinin sonunda tüpler santrifüj edilip kültür ortamının üst fazını, etiketlenmiş ve steril başka tüplere aktardıktan sonra numuneler analiz yapılana kadar -20 °C'de dondurulmuştur. Preparat yapma işlemleri bittikten sonra numuneler analiz yapmaya hazırlanmışlardır.

3.6.1. Kültür Ortamından Bezafibrat'ın Ekstre Edilmesi

Elde edilmiş olan örneklerden Bezafibrat miktarını ölçebilmek amacıyla ilk önce Bezafibrat'ın kültürün supernatantın ekstraksiyonu yapılmıştır. Bezafibrat'ın ekstraksiyon yapılması için sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır (Anchisi ve ark, 1998). Her örnekten 1ml alınıp üzerine 20 µl 37 %'lik hidroklorik asit ekledikten sonra bir dakika vorteksle karıştırılmıştır. Daha sonra 8 ml Dietileter eklenip tekrar 3 dakika vorteksle karıştırıldıktan sonra 10 dakika 1500g'de santrifüj yapılmıştır ve üst fazı başka tüpe aktarılmıştır. Dietileter'i uçurmak amacıyla tüpler oda sıcaklığında çeker ocağa bırakılmıştır. Dietileter tamamen uçtuktan sonra tüplerdeki kalıntı 1ml metanol'da çözülmüştür ve HPLC viyallerine aktarılmıştır. Bu aşamadan sonra hazırlanmış örnekler HPLC analizi için cihaza yüklenmiştir (Anchisi ve ark, 1998).

3.6.2. HPLC koşulları

Bezafibrat'ın analizinde Shimadzu HPLC aleti (APPLIED PROMINENCE SIL-20A) ve kolon olarak da Inertsil ODS-4 (boyut: 2.1×50 mm, gözenek büyüklüğü:3µm, C/N:5020-04012, S/N:0AF50056, GL Sciences/ Japon) kullanılmıştır. Bu analizde kullanılan metotta, örnekleyici sıcaklığı 25 ºC'ye, süresi 5 dakikaya, fırın sıcaklığı 25 ºC'ye, enjeksiyon hacmi 20 µl ve akış hızı 1ml/dak'a ayarlanmıştır. Yapılan bu analizde mobil faz olarak 0.01M fosfat tamponu ve Metanol karışımı 35:65 oranında kullanılmıştır ve fosfat tamponun pH'si fosforik asit ile 3.5'e ayarlanmıştır. Bezafibrat'ı saptamak için UV detektör kullanılmış ve dalga boyu 230 nm'ye ayarlanmıştır. Bu koşullarda yapılmış olan analizde Bezafibrat 1.12'inci dakikada (Retention time) tespit edilmiştir. Bu yolla 1ml ortamda bulunan Bezafibrat'ın miktarı belirlenmiştir.

3.7. İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Muameleli kültürlerden elde edilen KA'lı hücre yüzdesi, KA / hücre, MN'lu binukleer hücre yüzdesi, MN yüzdesi, MI ve NBI değerleri ile kontrol, çözücü kontrol ve pozitif kontrolde elde edilen değerlerin arasındaki farkın önemli olup olmadığı *t*-testi ile araştırılmış ve muameleli kültürlerde konsantrasyon etki ilişkisinin olup olmadığı korelasyon kat sayısı bulunarak ve regresyon eğrisi çizilerek saptanmıştır. Ayrıca ilaç kontrol ile kültür ortamındaki Bezafibrat miktarı HPLC ile belirlenmiştir. Bundan da hücrelere geçen test maddesinin yüzdesi hesaplanmıştır. Daha sonra kontroldeki Bezafibrat yüzdesi ile hücrelere geçen Bezafibrat'ın % miktarları arasındaki farkın önemli olup olmadığı t-testi ile saptanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

Bezafibrat'ın insan periferal lenfositlerindeki genotoksik olup olmadığı KA ve MN testleri ile dört farklı konsantrasyonda (100, 175, 250 ve 325µg/ml) 24 ve 48 saatlik muamele süresinde araştırılmış ve bu testler için yapılan çalışmalarda aşağıdaki sonuçlar alınmıştır.

4.1.1. Bezafibrat'ın, Kromozom Aberasyonu (KA)'nun Oluşumu Üzerindeki Etkisi

Dört farklı konsantrasyonda (100, 175, 250 ve 325 µg/ml) Bezafibrat ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferal kan lenfositlerinde oluşan kromozom anormallikleri, kromozom anormalliğine sahip olan hücre %'si ve hücre başına düşen kromozom aberasyonu (KA/Hücre) Çizelge 4.1.'de gösterilmektedir.

Bezafibrat, 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde tüm konsantrasyonlarda, anormal hücre (AH) yüzdesinin kontrole göre artmasına neden olmuştur. Ancak Bezafibrat ile ortaya çıkan anormal hücre yüzdesi 24 saatlik muamelede 250, 325 µg/ml ve 48 saatlik muamelede ise 325 µg/ml konsantrasyonların dışında tüm konsantrasyonlarda kontrole göre istatistiksel bakımdan anlamlı bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçları çözücü kontrol ile karşılaştırdığımızda Bezafibrat ile muamele edilen lenfositlerin anormal hücre yüzdesi ve KA/Hücre sayısı istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemiştir. Yapılan bu araştırmada Bezafibrat çözücü kontrole göre kromozom aberasyonunu uyarmadığı halde pozitif kontrol olarak kullandığımız MMC önemli derecede uyarmıştır. Yani Bezafibrat yaptığımız KA testine göre genotoksik değildir.

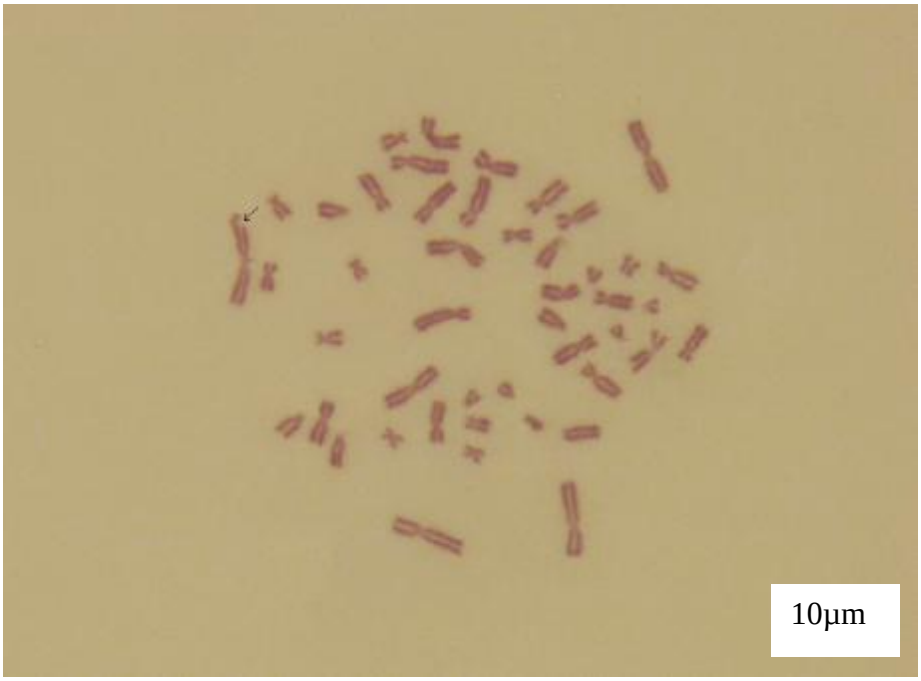
Bezafibrat ile muamele edilen insan periferik kan lenfositlerinde kromozom anormalliklerinden, kromatid kırığı en çok gözlenen anormallik olarak saptanmıştır (Şekil 4.1). Ayrıca kromozom kırığı (Şekil 4.2) ve kardeş kromatidlerin birleşmesi (sister chromatid union) (Şekil 4.3) sık rastlanan anormalliklerdir.

Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyonlarda Bezafibrat ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferal kan lenfositlerinde kromozom anormallik çeşitleri, Anormal Hücre Oranı, KA/ Hücre.

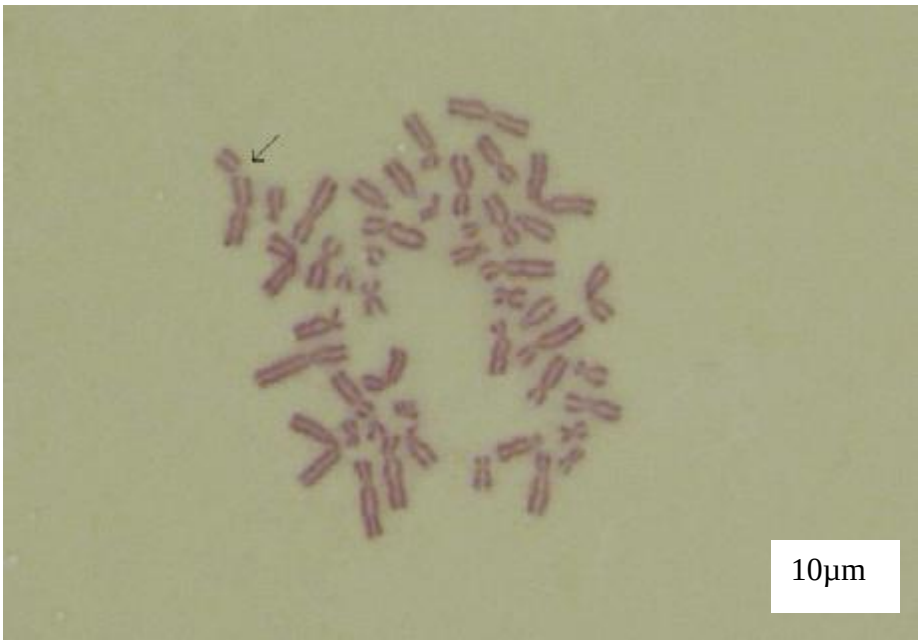
Test Maddesi	Muamele		Anormallik Çeşitleri								Anormal Hücre (%)'si ± SH	KA/Hücre ± SH
	Süre (saat)	Kons. (µg/ml)	B'	B"	F	T	DS	KD	KKB	P		
Kontrol	--	--	6	-	2	-	1	-	3	-	3.00 ± 0.408	0,030 ± 0,00408
DMSO (ÇK)	24	25 µl	5	1	6	-	1	-	5	1	4.50 ± 0.645	0,048 ± 0,00629
MMC (PK)	24	0.20	46	14	15	-	33	-	25	1	25.75 ± 2.020	0,335 ± 0,03590
Bezafibrat	24	100	5	1	2	-	6	-	5	1	4.75 ± 0.479 a_1c_3	0,050 ± 0,00408 a_1c_3
		175	4	-	6	-	6	-	4	-	5.00 ± 0.577 a_1c_3	0,050 ± 0,00577 a_1c_3
		250	7	-	2	-	4	-	4	-	4.25 ± 0.946 c_3	0,043 ± 0,00946 c_3
		325	5	-	2		5	-	7	-	4.75 ± 0.629 c_3	0,048 ± 0,00629 c_3
DMSO (ÇK)	48	25 µl	6	3	-	-	9	-	2	-	4.75 ± 0.479	0,050 ± 0,00408
MMC (PK)	48	0.20	66	29	21	-	50	1	12	-	35.50 ± 1.760	0,448 ± 0,01930
Bezafibrat	48	100	7	-	2	-	3	-	7	-	4.75 ± 0.250 a_2c_3	0,048 ± 0,00250 a_2c_3
		175	5	1	3	-	4	-	6	-	4.75 ± 0.250 a_2c_3	0,048 ± 0,00250 a_2c_3
		250	5	1	4	-	4	-	6	-	5.00 ± 0.408 a_1c_3	0,050 ± 0,00408 a_1c_3
		325	8	-	5	-	2	-	4	-	4.50 ± 0.500 c_3	0,048 ± 0,00750 c_3

B': Kromatid kırığı, B": Kromozom kırığı, F: Fragment, T: Translokasyon, DS: Disentrik kromozom, KD: Kromatid değişimi, KKB: Kardeş kromatid birleşmesi (sister chromatid union), P: Poliploidi.

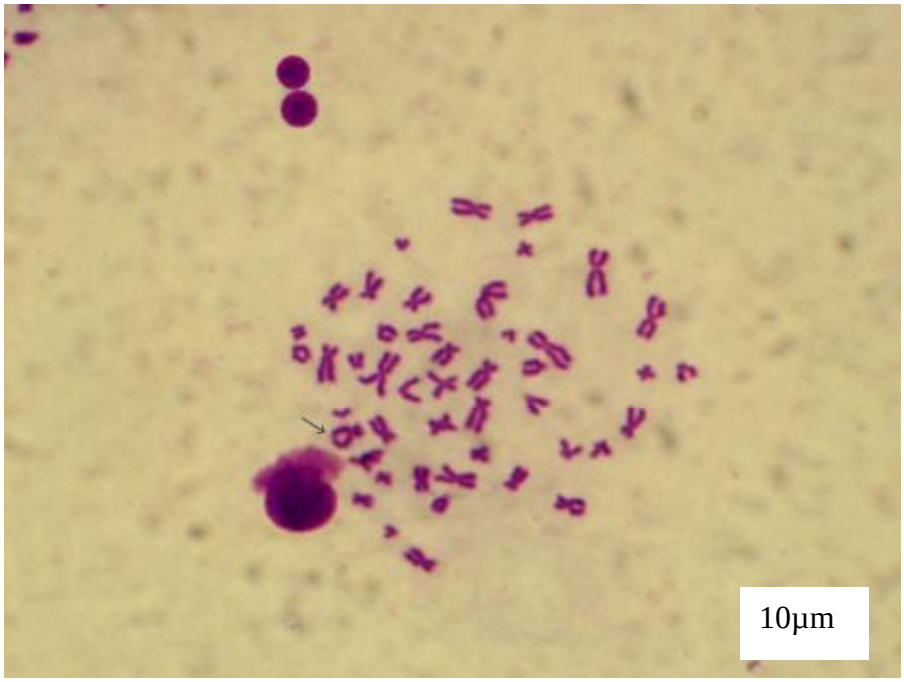
a: Kontrol ile; b: Çözücü kontrol ile c: Pozitif kontrol ile karşılaştırmada fark önemlidir. $a_1b_1c_1$: $P \leq 0.05$; $a_2b_2c_2$: $P \leq 0.01$; $a_3b_3c_3$: $P \leq 0.001$



Şekil 4.1. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (325 µg/ml Bezafibrat, 48 saatlik muamele, ♀), x1000.



Şekil 4.2. Kromozom kırığı (B") bulunan metafaz plağı (250 µg/ml Bezafibrat, 48 saatlik muamele, ♀), x1000.



Şekil 4.3. Kardeş kromatidlerin birleşmesi (sister chromatid union) bulunan metafaz plağı (325 µg/ml Bezafibrat, 24 saatlik muamele, ♀), x1000.

4.1.2. Bezafibrat'ın Mikronukleus (MN) Oluşumu Üzerindeki Etkisi

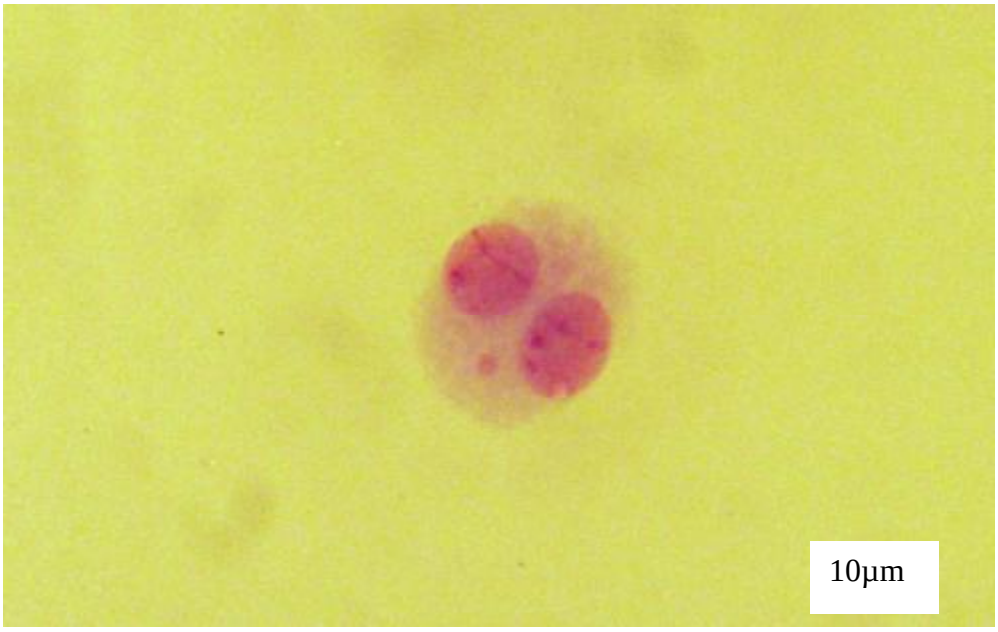
Dört farklı konsantrasyondaki Bezafibrat ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferal kan lenfositlerinde Bezafibrat'ın mikronukleus oluşumu yüzdesi ve mikronukleuslu hücre yüzdesini gösteren sonuçlar Çizelge 4.2'de açıklanmıştır.

Bezafibrat 24 ve 48 saatlik muamelelerde MN oluşumunu uyarmamıştır (Çizelge 4.2). Bezafibrat MN oluşumunu uyarmamasına rağmen Bezafibrat ile muamele edilen lenfositlerin binükleer hücrelerinde değişik sayıda mikronukleus bulunmuştur (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5).

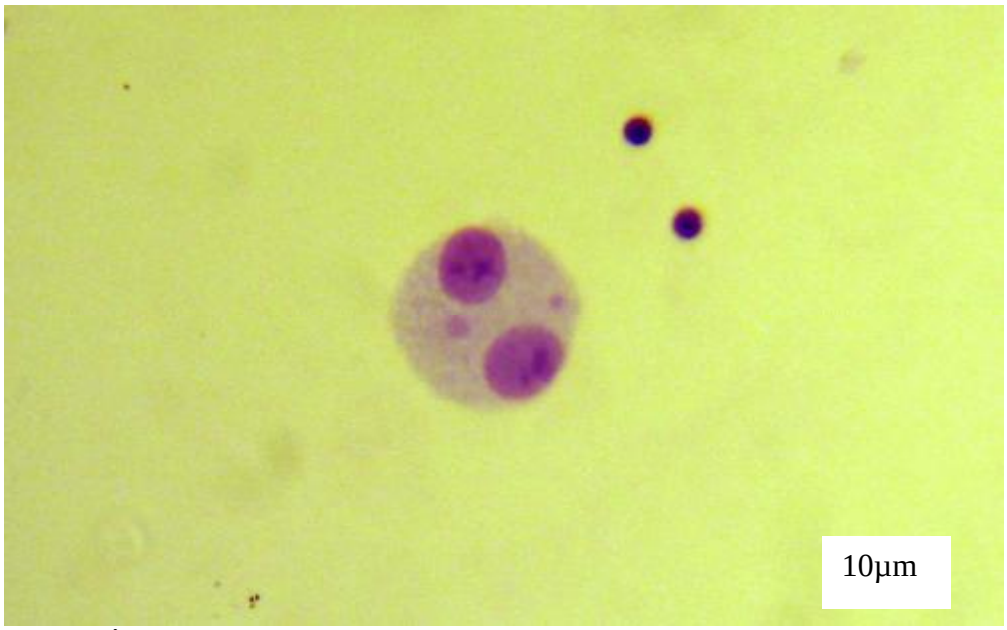
Çizelge 4.2. Değişik konsantrasyonlarda Bezafibrat ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferal kan lenfositlerinde mikronukleuslu iki nukleuslu hücre yüzdesi ve MN yüzdesi

Test Maddesi	Muamele		MN'lu Binukleer Hücre %'si ± SH	% MN ± SH
	Süre (saat)	Kons. (µg/ml)		
Kontrol	--	--	0.125 ± 0.629	0.125 ± 0.629
Ç.K.	24	25 µl	0.125 ± 0.750	0.125 ± 0.750
P.K.	24	0.20	1.675 ± 0.854	1.825 ± 0.479
BEZAFİBRAT	24	100	0.125 ± 0.250 c_3	0.125 ± 0.250 c_3
		175	0.075 ± 0.750 c_3	0.075 ± 0.750 c_3
		250	0.150 ± 0.289 c_3	0.150 ± 0.289 c_3
		325	0.175 ± 0.750 c_3	0.175 ± 0.750 c_3
Ç.K.	48	25 µl	0.275 ± 0.629	0.300 ± 0.707
P.K.	48	0.20	5.275 ± 2.250	5.900 ± 1.580
BEZAFİBRAT	48	100	0.125 ± 0.479 c_3	0.125 ± 0.479 b_1c_3
		175	0.250 ± 0.645 c_3	0.250 ± 0.645 c_3
		250	0.150 ± 0.289 b_1c_3	0.150 ± 0.289 b_1c_3
		325	0.125 ± 0.479 c_3	0.125 ± 0.479 b_1c_3

a: Kontrol ile; b: Çözücü kontrol ile c: Pozitif kontrol ile karşılaştırmada fark önemlidir. $a_1b_1c_1$: $P \leq 0.05$; $a_2b_2c_2$: $P \leq 0.01$; $a_3b_3c_3$: $P \leq 0.001$



Şekil 4.4. Bir mikronukleus içeren iki nukleuslu hücre (100 µg/ml Bezafibrat, 24 saatlik muamele, ♂), x1000.



Şekil 4.5. İki mikronukleus içeren iki nukleuslu hücre (175 µg/ml Bezafibrat, 48 saatlik muamele, ♀), x1000.

4.1.3. Bezafibrat'ın Sitotoksik Etkisi

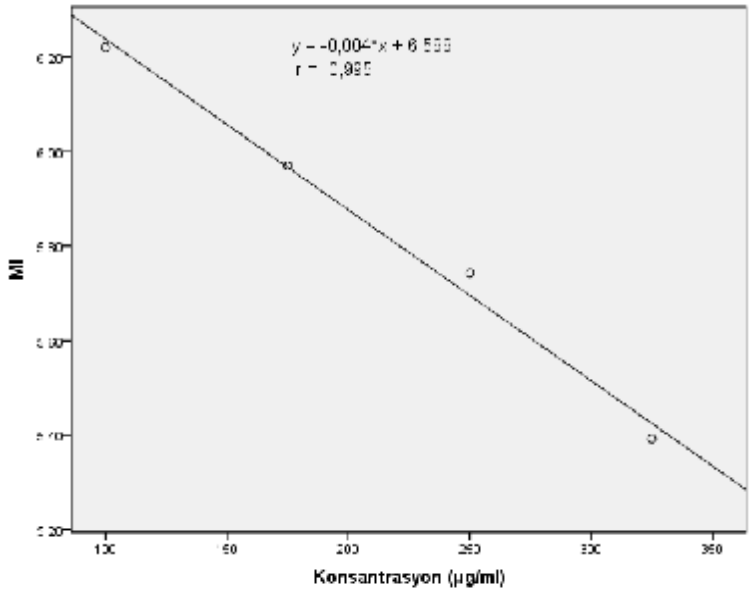
Bezafibrat'ın sitotoksik etkisi MI ve NBI bulunarak saptanmıştır. Kontrollerdeki ve muameleli kültürlerdeki MI ve NBI değerlerinin kontrolleri ile karşılaştırılmasının sonuçları çizelge 4.3'te verilmiştir. Muameleli kültürlerdeki MI, Bezafibrat'ın mitoz bölünme üzerindeki etkisini, NBI ise nukleus bölünmesi üzerindeki etkisini göstermektedir.

Bezafibrat ile 24 saat muamele edilen kültürlerde MI kontrole nazaran düşmüş ancak bu düşüş en düşük iki konsantrasyonda önemli bulunmuştur. Halbuki eritici kontrole nazaran herhangi bir önemlilik yoktur (Çizelge 4.3). 48 saat Bezafibrat ile muamele edilen kültürlerdeki MI düşüşü kontrole nazaran tüm konsantrasyonlarda, eritici kontrole nazaran en yüksek iki konsantrasyonda önemli bulunmuştur (Çizelge 4.3). Bezafibrat hem 24 hem de 48 saat muameleli kültürlerde MI'nın konsantrasyona bağlı olarak düşmesine neden olmuştur (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7).

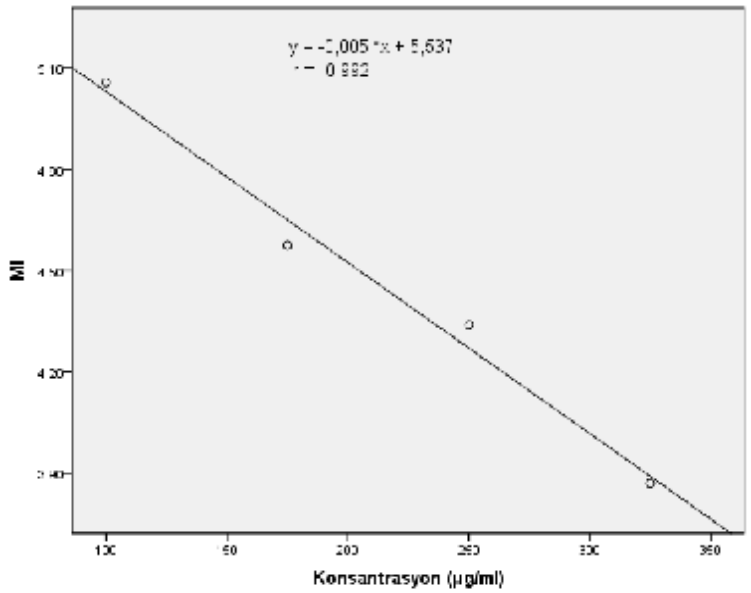
Çizelge 4.3.Değişik konsantrasyonlarda Bezafibrat ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferal kan lenfositlerinde NBI ve MI.

Test Maddesi	Muamele		Nukleus Sayısına Göre Hücrelerin Dağılımı				NBI ± SH	MI ± SH
	Süre (saat)	Kons. (µg/ml)	1	2	3	4		
Kontrol	--	--	1705	2065	116	114	1,66 ± 0,0096	6.840 ± 0.136
DMSO (ÇK)	24	25 µl	1834	1946	119	101	1,62 ± 0,0063	6.455 ± 0.051
MMC (PK)	24	0.20	2938	1013	31	18	1,28 ± 0,0166	3.125 ± 0.139
Bezafibrat	24	100	1800	1982	98	120	1,63 ± 0,0141 c_3	6.220 ± 0.161 a_1c_3
		175	1843	1978	91	88	1,60 ± 0,0111 a_1c_3	5.970 ± 0.249 a_1c_3
		250	1985	1873	72	70	1,56 ± 0,0144 $a_2b_1c_3$	5.5120 ± 0.486 c_1
		325	2144	1712	76	68	1,51 ± 0,0266 $a_1b_1c_2$	5.393 ± 0.475 c_1
DMSO (ÇK)	48	25 µl	1910	1909	93	88	1,59 ± 0,0175	5.460 ± 0.109
MMC (PK)	48	0.20	3506	465	20	9	1,13 ± 0,0180	1.780 ± 0.261
Bezafibrat	48	100	2064	1798	69	69	1,53 ± 0,0125 $a_2b_1c_3$	5.057 ± 0.189 a_2c_3
		175	2132	1776	50	42	1,50 ± 0,0175 $a_2b_1c_3$	4.575 ± 0.310 a_2c_2
		250	2225	1701	43	31	1,47 ± 0,0232 $a_2b_1c_3$	4.340 ± 0.254 $a_2b_1c_2$
		325	2468	1467	39	26	1,40 ± 0,0255 $a_2b_2c_2$	3.870 ± 0.309 $a_2b_1c_2$

a: Kontrol ile; b: Çözücü kontrol ile c: Pozitif kontrol ile karşılaştırmada fark önemlidir.
$a_1b_1c_1$: $P \leq 0.05$; $a_2b_2c_2$: $P \leq 0.01$; $a_3b_3c_3$: $P \leq 0.001$



Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda Bezafibrat ile 24 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde MI'nin konsantrasyona bağlı düştüğünü gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P = 0.002).

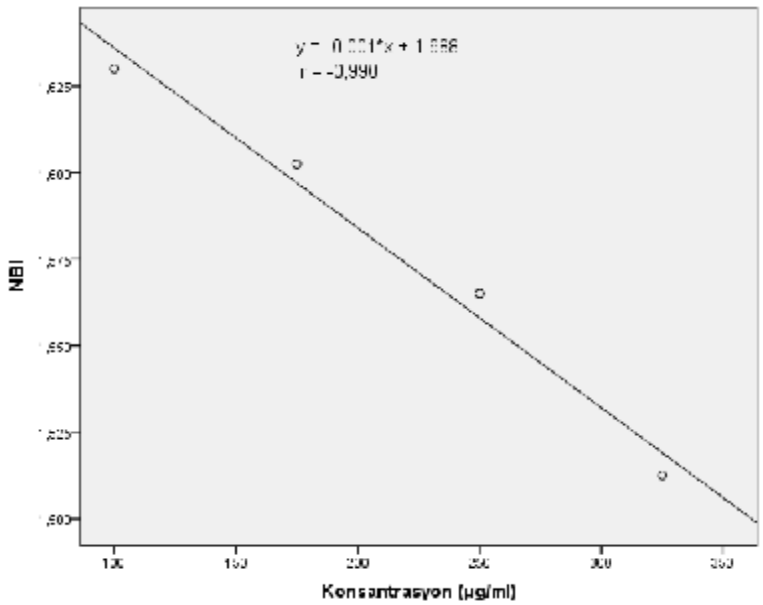


Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda Bezafibrat ile 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde MI'nin konsantrasyona bağlı düştüğünü gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P = 0.004).

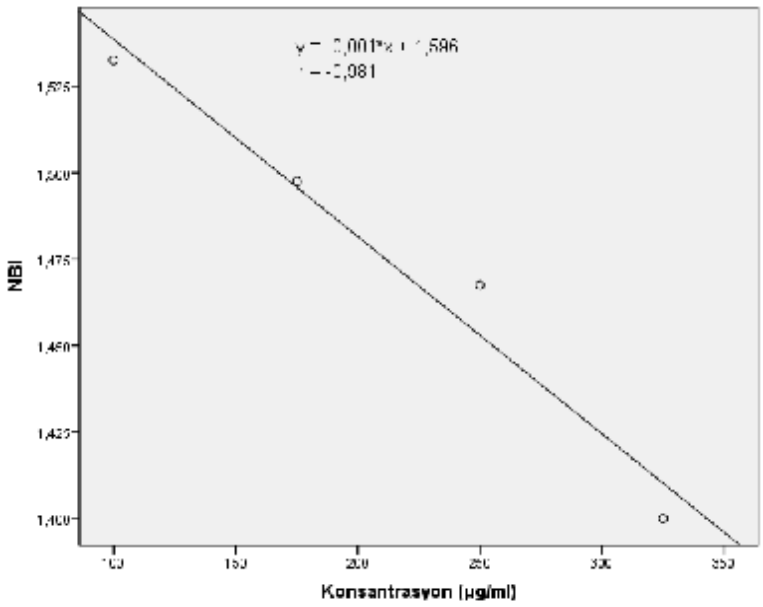
Bezafibrat'ın nukleus bölünmesi üzerindeki etkisi NBI'nin bulunması yoluyla belirlenmiştir. Bezafibrat 24 saatlik muameleli kültürlerde en yüksek üç konsantrasyonda, 48 saatlik muamelenin tüm konsantrasyonlarında kontrole nazaran

NBI'nin düşmesine neden olmuştur (Çizelge 4.3). Muameleli kültürlerdeki NBI değerleri ile çözücü kontroldeki NBI değerleri karşılaştırıldığında 24 saatlik muamele süresinde en yüksek iki konsantrasyonda (250 µg/ml ve 325 µg/ml), 48 saatlik muamele süresinde ise tüm konsantrasyonlarda Bezafibrat nukleus bölünmesini önemli derecede olumsuz etkilemiştir (Çizelge 4.3). NBI'deki bu düşüş, hem 24, hem de 48 saatlik muamelelerde konsantrasyona bağlı durum göstermiştir (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9). Bezafibrat ile muamele edilen kültürlerdeki MI ve NBI'deki düşüş pozitif kontroldeki kadar olmamıştır.

NBI ve MI değerleri birlikte değerlendirilecek olursa Bezafibrat özellikle, 48 saatlik muamelede sitotoksik etki göstermiştir.



Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda Bezafibrat ile 24 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde NBI'nin konsantrasyona bağlı düştüğünü gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P = 0.005).



Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlarda Bezafibrat ile 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde NBI'nin konsantrasyona bağlı düştüğünü gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P =0.009).

4.1.4. HPLC Tekniğinin Analiz Sonuçlarına Göre Bezafibrat'ın Hücrelere Geçiş Miktarı

Bezafibrat'ın hücrelere geçiş miktarını belirlemek için kültür süresinin sonunda santrifüj yapılmış olan tüplerden üst faz aldıktan sonra analiz yapılmıştır. Bezafibrat'ın hücrelere geçiş miktarının yüzdesi Çizelge 4.4'te açıklanmıştır. Analiz sonuçlarına göre Bezafibrat'ın hücrelere geçiş miktarının yüzdesinin kontrol ile karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak önemli olduğu ortaya çıkmıştır.

Çizelge 4.4. KA ve MN Testleri için yapılan hücre kültürlerinde ve kontrolde saptanan Bezafibrat miktarının azalma yüzdesi.

Bezafibrat kon. (µg/ml)	KA ± SH		MN ± SH	
	24 s.	48 s.	24 s.	48 s.
Kontrol	28.00 ± 0.68	28.00 ± 0.68	28.00 ± 0.68	28.00 ± 0.68
100	35.14 ± 1.21 a_2	38.73 ± 1.82 a_1	38.05 ± 1.87 a_1	43.40 ± 0.98 a_3
175	37.32 ± 0.67 a_3	40.00 ± 0.93 a_3	40.45 ± 0.79 a_3	43.21 ± 0.97 a_3
250	36.12 ± 0.43 a_3	42.83 ± 0.72 a_3	41.33 ± 1.23 a_2	44.11 ± 1.73 a_2
325	38.45 ± 1.04 a_2	44.49 ± 2.97 a_2	42.66 ± 2.34 a_2	43.76 ± 1.62 a_2

a: Kontrol ile aradaki fark önemlidir. a_1: P≤0.05 a_2: P≤0.01 a_3: P≤0.001

4.2. Tartışma

4.2.1. Bezafibrat'ın İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Kromozom Aberasyonu Oluşumu Üzerinde Etkileri

Bu araştırmada test maddesi olarak kullanılan Bezafibrat'ın genotoksik etkisinin incelenmesi ile ilgili herhangi bir KA çalışmasına bugüne kadar rastlanmamıştır. Yaptığımız bu çalışmada Bezafibrat insan periferal lenfositlerinde KA'yı uyarmadığı saptanmıştır. Isidori ve ark. 2007 yılında yapmış oldukları çalışmada Bezafibrat ilacının genotoksik etkisini bakteriyal test sistemlerinde 5 konsantrasyonda (0.625-1.25-2.5-5-10 mg/L) araştırmışlardır. Bu çalışmada *Salmonella typhimurium* ve *E.coli* kullanılmıştır. Bu araştırmadan alınan sonuçlara göre Bezafibrat'ın genotoksik risk taşıdığı ortaya çıkmıştır. Bu araştırma ile bizim araştırmaların farklı sonuç gösterme nedeni bu iki araştırmanın farklı yöntemler ile yapılmasından dolayı olabilir. Çünkü gen mutasyonu nükleotid değişimi sonucu ortaya çıktığı halde kromozom aberasyonunun oluşması için DNA'daki fosfodiester bağların kopması gerekir. Hâlbuki Gajski ve Garaj-Vrhovac (2008), yaptıkları bir araştırmada Comet, KA ve kardeş kromatid değişimi (KKD) testleri ile insan lenfositleri üzerinde Atorvastatin'in genotoksik potansiyelini incelemişlerdir. Yapılan bu araştırmanın sonucunda Atorvastatin'in kontrole göre KA frekansını

artığı bulunmuştur. KKD analizi sonuçları da Atorvastatin'in KKD'yi uyardığını ortaya koymuştur. Comet testinde Atorvastatin'e maruz kalan insan lenfositlerinde DNA hasarının artmış olduğu belirlenmiştir. Atorvastatin'in genotoksik etkisi zebra balıklarında comet ve RAPD yöntemleri ile araştırılmış ve bu araştırmada Atorvastatin'in genotoksik risk taşıdığı ortaya konmuştur (Rocco ve ark, 2010). Ciaravino ve ark. (1995), Atorvastatin'in genotoksik etkisini *in vivo* ve *in vitro* olarak KA testi ile araştırmışlardır. Bu çalışmada *in vitro* olarak Çin hamsterlerin V79 hücreleri ve *in vivo* olarak da CD-1 fareleri kullanılmıştır ve bu araştırmanın sonucunda Atorvastatin KA'yı uyarmadığı açıklanmıştır. Ciaravino ve ark. (1995) ve Gajski ve Garaj-Vrhovac. (2008), Rocco ve ark. (2010) Atorvastatin'le yaptıkları çalışmalarından elde ettikleri sonuçlar bizim ve Isidori ve ark. (2007)'nın Bezafibrat ile elde ettikleri sonuca benzerlik göstermektir. Bu durumlar göstermektedir ki kolesterol düşürücü olarak kullanılan aynı ilaçlar farklı test gruplarında farklı sonuçlar vermektedir ve bundan dolayı da test maddelerinin farklı test sistemlerinde genotoksisitelerinin araştırılması gerekir. Başka bir çalışmada ise Snyder ve Green (2001) Lovastatin'in genotoksik olup olmadığını fare lenfositlerinde araştırmış ve bu ilacın genotoksik etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca bu araştırmada ames testi kullanarak Lovastatin'in genotoksisitesi araştırılmış ve ames testi sonuçlarına göre de bu ilacın genotoksik olmadığı saptanmıştır. Robison ve ark. (1993) yaptıkları araştırmada Fluvastatin'in genotoksisitesini *in vitro* olarak Ames testi ile *Salmonella typhimurium, E.coli* ve KA yöntemi ile Çin hamster' in V79 hücrelerinde araştırmışlardır. Bu araştırmanın sonucuna göre Fluvastatin'in herhangi bir genotoksik riske sahip olmadığı belirlenmiştir. Von Keutz ve Schlüter (1998) Cerivastatin'in genotoksik etkisini incelemişlerdir. Yapılan bu *in vivo* çalışmada Cerivastatin'in genotoksik etkisini Çin hamster ovaryum hücrelerinde kromozom aberasyonu yöntemi ile incelemişlerdir ve bu araştırmanın sonucunda Cerivastatin her hangi bir genotoksik etki göstermediği belirlenmiştir. Bu çalışmaların sonuçları ile bizim çalışmaların sonucu aynı yöndedir.

Ayrıca bazı araştırıcılar yaptıkları çalışmalarda kolesterol düşürücü ilaçların genotoksik olduğunu saptamıştır. Örneğin; Berber ve ark. (2013), Rosuvastatin ile yaptıkları çalışmada bu ilacın insan periferal lenfositlerinde genotoksik olup

olmadığını KA testleri ile araştırmışlardır ve bu araştırmanın sonucunda bu ilacın genotoksik olduğunu saptamışlardır. Başka bir çalışmada kolesterol düşürücüsü olarak kullanılan Gemfibrozil'in genotoksik etkisi zebra balığında comet ve RAPD yöntemleri ile araştırılmış ve Gemfibrozil'in genotoksik risk taşıdığı ortaya konulmuştur (Rocco ve ark, 2010). *In vivo* bir çalışmada Coetsee ve ark. (2008) 5 gün boyunca farelere 70 mg/kg konsantrasyonunda Simvastatin ilacını uyguladıktan sonra comet testi ile söz konusu olan ilacın genotoksik risk taşıdığını belirlemişlerdir.

Yüksek kolesterol tedavisi için kullanılan ilaçların farklı testlerde farklı sonuçlar vermesi, bu ilaçların genotoksik olup olmadığına karar verebilmek için farklı genotoksisite testleri ile araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Aynı maddenin farklı test sistemlerinde benzer sonuç vermesi o test maddesinin genotoksik olup olmadığına kesin karar vermeyi sağlar.

4.2.2. Bezafibrat'ın Mikronukleus (MN) Oluşumunda Etkileri

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan Bezafibrat MN oluşumu üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışmaya bugüne kadar rastlanmamıştır. Bezafibrat 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde insan periferal kan lenfositlerinde mikronukleus oluşumunu uyarmamıştır. Yapılan başka bir çalışmada Atorvastatin'in genotoksik etkisini *in vivo* ve *in vitro* olarak MN testleri ile araştırılmıştır. Bu çalışmada *in vitro* olarak Çin hamsterlerin V79 hücreleri ve *in vivo* olarak da CD-1 fareleri kullanılmış ve Atorvastatin MN'yi uyarmadığı açıklanmıştır (Ciaravino ve ark, 1995). Lovastatin ile yapılan bir çalışmada bu ilacın genotoksik olup olmadığı fare lenfositlerinde MN testi ile araştırılmış ve bu ilacın genotoksik etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir (Snyder ve Green, 2001). Von Keutz ve Schlüter (1998) Cerivastatin'in genotoksik olup olmadığını farelerde *in vivo* olarak incelemişlerdir. Bu çalışmadan alınan sonuçlar Cerivastatin'in her hangi bir genotoksik etki göstermediği ortaya koymuştur. Müller ve ark. (1995) Fenofibrat' ın sitotoksik ve genotoksik etkilerini araştırmışlardır. Yapılan bu *in vitro* çalışmalarda Fenofibrat'ın etkisi sıçan karaciğer kültüründe araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre

Fenofibrat mikronukleus oluşumunda bir artışa sebep olmadığı gösterilmiştir. Bu çalışmaların sonuçları bizim çalışmanın sonuçları ile uygunluk göstermektedir.

Berber ve ark. (2013), Rosuvastatin ile yaptıkları çalışmada bu ilacın insan periferal lenfositlerinde genotoksik olup olmadığını comet ve MN testleri ile araştırmışlar ve bu ilacın genotoksik olduğunu saptamışlardır. Bu araştırmanın sonuçları ile bizim araştırmanın sonuçları farklılık göstermektedir. Bu farklı sonuçların sebebi bu iki ilacın farklı guruplara ait olmasından kaynaklanabilir. Yapılan başka bir araştırmada Lovastatin ilacının genotoksik etkisi Çin hamsterlerin V79 hücrelerinde mikronukleus testi ile araştırılmıştır. Bu çalışmada önceden genotoksik olduğu bilinen Doxorubicin ilacı ile Lovastatin ilacı birlikte V79 hücrelerinin bulunduğu ortama verilmiştir. Bu araştırmanın sonucunda Doxorubicin'in Lovastatin ile birlikte hücre ortamına verilmesi ilacın genotoksik etkisini yükselttiği saptanmıştır (Snyder, 2009). Bu araştırma ile bizim araştırmanın farklı sonuçlar gösterme nedeni Lovastatin'in etkisinin Doxorubicin tarafından artırılması, yani ilaçların kombinasyon halinde kullanılmasından kaynaklanmaktadır.

4.2.3. Bezafibrat'ın Sitotoksik Etkisi

Bu çalışmada Bezafibrat'ın sitotoksik etkisi insan periferal kan lenfositlerinde mitotik indeksi (MI) ve nukleus bölünme indeksi (NBI)'nin saptanması ile belirlenmiştir. Bezafibrat 24 ve 48 saatlik muamele süresinde MI'nin konsantrasyona bağlı olarak düşmesine neden olmuştur. Nukleus bölünme indeksindeki (NBI) düşüş de MI'deki düşüşe benzemektedir. Sonuç olarak Bezafibrat insan periferal lenfositleri üzerinde sitotoksik etki göstermiştir. Müller ve ark. (1995) Fenofibrat'ın sıçan karaciğer kültüründe MI'nin düşmesine neden olduğunu belirlemişlerdir. Bizim sonuçlarımıza ve Müller ve ark. (1995)'nın sonuçlarına göre kolesterol düşürücü ilaçların genel olarak sitotoksik etki gösterdiği söylenebilir. Parolini ve ark. (2011)'nın yaptığı çalışmada Gemfibrozil MTT testinde, zebra midyesinin(*Dreissena polymorpha*) hemositleri (omurgasızların fagosite benzer hücreleri), solungaç ve sindirim bezi hücrelerinde sitotoksik etki

göstermiştir. Sallustio ve ark. (2006)'nın fare hepatosit kültürlerinde MTT testi ile yaptığı çalışmada ise Gemfibrozil sitotoksik etki göstermemiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada kolesterol düşürücü ilaçlar gurubuna ait olan Bezafibrat'ın 24 ve 48 saatlik muamelelerde HPLC tekniğini kullanarak hücrelere geçiş miktarının önemli olduğu saptanmış olmasına rağmen KA'yı uyarmadığı ve MN oluşumunu önemli derecede arttırmadığı belirlenmiştir. Hâlbuki Isidori ve ark. (2007) *Salmonella typhimurium* ve *E.coli'*de Bezafibrat'ın gen mutasyonunu uyardığını saptamışlardır. Bu çalışmanın ve bizim çalışmanın sonucu birlikte değerlendirilecek olursa Bezafibrat'ın genotoksik olup olmadığına kesin karar verilebilmesi için başka genotoksisite çalışmalarına da ihtiyaç olduğu görüşündeyiz.

Bizim çalışmamızda Bezafibrat'ın MI ve NBI'yi önemli derecede düşürdüğü saptanmıştır. Bu nedenle Bezafibrat'ın sitotoksik etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz.

Birçok çalışmalardan elde edilen sonuçlara baktığımızda kolesterol düşürücü ilaçlar sitotoksik etki göstermektedirler. Tüm sonuçlar göz önünde bulundurulacak olursa kolesterol düşürücü ilaçların kullanımında dikkatli olunması gerekir. Bunun nedeni de uzun süreli kolesterol düşürücü ilaçların kullanımı (özellikle Statin gurubu ilaçlar) Myopati ve kas ağrılarına, beyin fonksiyonunun düşmesine ve hafıza kaybına neden olmaktadırlar (Abd ve Jacobson, 2011). Ayrıca sitotoksik etkilerinden dolayı kansızlığa da neden olabileceği söylenebilir.

KAYNAKLAR

ABD, T. T., JACOBSON, T. A., 2011. Statin-Induced Myopathy: A Review And Update. Expert Opinion on Drug Safety, Vol. 10, No. 3 , Pages 373-387 doi:10.1517/14740338.2011. 540568

ALBERTINI, R. J., ANDERSON, D., DOUGLAS, G. R., HAGMAR, L., HEMMINKI, K., MERLO, F., NATARAJAN, A. T., NORPPA, H., SHUKER, D. E. G., TICE, R., WATERS, M. D. and AITIO, A., 2000. IPCS Guidelines for The Monitoring of Genotoxic Effects of Carcinogens in Humans. Mutat. Res., 463:111-172.

ALTSCHUL, R., HOFFER, A. ve STEPHEN J. D.,1955. Influence of nicotinic acid on serum cholesterol in man. Archives of Biochemistry and Biophysics , 54 (2):558-9. DOI:10.1016/0003-9861(55)90070-9

ANCHISI, C., FADDA, A. M., MACCIONI, A. M. ve DESSI, S.,1998. Determination of bezafibrate concentration by high performance liquid-chromatography in serum of rats treated with lead nitrate. Farmaco, 53(10-11):690-692.

BERBER, A. A., CELIK, M. and AKSOY, H., 2013. Genotoxicity evaluation of HMG CoA reductase inhibitor rosuvastatin. Drug Chem Toxicol, doi:10.3109/01480545.2013.851692

BOFFETTA, P., VAN DER HEL, O., NORPPA, H., FABIONOVA, E., FUCIC, A.,

CARRANO, A.V. and NATARAJAN A. T., 1988. Consideration for Population Monitoring Using Cytogenetic Techniques. Mutat. Res., 204 : 379-406.

CARRANO, A.V., THOMPSON, LINDL, P.A. and MINKLER, J.L. 1978. Sister Chromatid Exchanges as an Indicator of Mutagenesis. Nature (London), 271: 551-553.

CIARAVINO, V., KROPKO, M. L., ROTHWELL, C. E., HOANDY C. A. and THEISS, J. C., 1995. The genotoxicity profile of atorvastatin, a new drug in the treatment of hypercholesterolemia. Mutat. Res., 343 (2-3) : 95-107.

COETSEE, T. N., PRETORIUS, P. J., TERRE'BLANCHE, G.and BERGH, J. J., 2008. Inandstigating the potential neuroprotectiand effects of statins on DNA damage in mouse striatum. Food Chem Toxicol., 46 (9) : 3186-3192.

FELIX A. and FARBER E., 1982. Hypolipidemics carcinogenicity and extrapolation of experimental results for human safety assessments. Toxicologic Pathology, 10: 152-170.

FENECH, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. Mutat Res 455(1-2): 81-95.

FITZGERALD, J. E., SANYER, J. L., SCHARDEIN, J. L., LAKE, R. S., MCGUIRE, E. J. and DE LA IGLESIA, F. A., 1981. Carcinogen bioassay and mutagenicity studies with the hypolipidemic agent gemfibrozil. J Natl Cancer Inst., 67 (5) : 1105-1116.

FRUCHART, J. C., STAELS, B. and DURIEZ, P., 2001. The role of fibric acids in atherosclerosis. Curr Atheroscler Rep., 3 (1) : 83-92.

GAJSKI, G. and V. GARAJ-VRHOVAC, 2008. Application of cytogenetic endpoints and comet assay on human lymphocytes treated with atorvastatin in vitro. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng., 43 (1) : 78-85.

GHAOUI, R., B. C. SALLUSTIO, P. C. BURCHAM and F. R. FONTAINE, 2003. UDP-glucuronosyltransferase-dependent bioactivation of clofibric acid to a DNA-damaging intermediate in mouse hepatocytes. Chem Biol Interact 145 (2) : 201-211.

GROGGEL, G. C., CHEUNG, A. K., ELLIS-BENIGNI, K.and WILSON, D. E., 1989. Treatment of nephrotic hyperlipoproteinemia with gemfibrozil. Kidney Int., 36 (2) : 266-271.

GUNDY, S., LAZUTKA, J., CEBULSKA-WASILEWSKA, A., PUSKAILEROVA, D., ZNAOR, A., KELECSENYI, Z., JUOZAS, K.,

HALLECK, M., DAVIS, H. R., KIRSCHMEIER, P., LEVITAN, D., SNYDER, R. D., TREINEN, K. and MACDONALD, J. S., 2009. An assessment of the carcinogenic potential of ezetimibe using nonclinical data in a weight-of-evidence approach. Toxicology, 258 (2-3) : 116-130.

ISIDORI, M., NARDELLI, A., PASCARELLA, L., RUBINO, M.and PARRELLA, A., 2007. Toxic and genotoxic impact of fibrates and their photoproducts on non-target organisms. Environ Int., 33 (5) : 635-641.

KAUDERER, B., ZAMITH, H., PAUMGARTEN, F. J. and SPEIT, G., 1991. Evaluation of the Mutagenicity of Beta-Myrcene in Mammalian Cells In

KUBLIN E., KACZMARSKA-GRACZYK B., MALANOWICZ E. P. and MAZUREK A., 2010. Methods of chromatographic determination of medicines decreasing the level of cholesterol. Clin. Pharmacol. Ther., 69:340-5.

KYRKLUND, C., BACKMAN, J. T., KIVISTO, K. T., NEUVONEN, M., LAITILA, J. and NEUVONEN, P. J., 2001. Plasma concentrations of actiand lovastatin acid are markedly increased by gemfibrozil but not by bezafibrate. Clin Pharmacol Ther., 69 (5) : 340-345.

LAMBROPOULOU, D. A., HERNANDO, M. D., KONSTANTINOU, I. K., THURMAN, E. M., FERRER, I., ALBANIS, T. A. and FERNANDEZ-ALBA, A. R., 2008. Identification of photocatalytic degradation products of bezafibrate in TiO(2) aqueous suspensions by liquid and gas chromatography. J Chromatogr A, 1183 (1-2) : 38-48.

MACE, ML JR., DASKAL, Y. and WRAY, W., 1978. Scanning electron microscopy of chromosome aberrations. Mutat. Res., 52:199-206.

MASNATTA, L. D., CUNIBERTI, L. A., REY, R. H. and WERBA, J. P., 1996. Determination of bezafibrate, ciprofibrate and fenofibric acid in human plasma by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr B Biomed Appl., 687 (2) : 437-442.

MINAGH, E., 2008. Ecotoxicological inandstigations of pharmaceutical compounds on a battery of freshwater test species. Masters thesis. Paper 45.

MOGHADASIAN, M. H., MANCINI, G. B. and FROHLICH, J. J., 2000. Pharmacotherapy of hypercholesterolaemia: statins in clinical practice. Expert Opin Pharmacother 1 (4) : 683-695.

MULLER-TEGETHOFF, K., KASPER, P. and MULLER, L., 1995. Evaluation studies on the in vitro rat hepatocyte micronucleus assay. Mutat Res, 335 (3) : 293-307.

NORPPA, H., BONASSI, S., HANSTEEN, I-L., HAGMAR, L., STRÖMBERG, U., RÖSSNER, P., BOFFETTA, P., LINDHOLM, C., GUNDY, S., LAZUTKA, J., CEBULSKA-WASILEWSKA, A., FABIÁNOVÁ, E., ŠRÁM, R. J., KUNUDSEN, L. E., BARALE, R. and FUCIC, A., 2006. Chromosomal Aberrations and SCE as Biomarkers of Cancer Risk. Mutat. Res., 600 (1-2) : 37-45.

OECD Guideline for Testing of Chemicals. No. 473 (1997): In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test.

PAROLINI, M., QUINN, B., BINELLI, A. and PROVINI, A.,2011. Cytotoxicity assessment of four pharmaceutical compounds on the zebra mussel (Dreissena polymorpha) haemocytes, gill and digestive gland primary cell cultures. Chemosphere, 84 (1) : 91-100.

PAZ-Y-MINO, C., G. BUSTAMANTE, M. E. SANCHEZ and P. E. LEONE, 2002. Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in Ecuador. Environ Health Perspect, 110 (11) : 1077-1080.

RACHTAN, J., FORNI, A., VERMEULAN, R. and BONASSI, S., 2006. Chromosomal Aberrations and Cancer Risk: Result of a Cohort Study from Central Europe. American Journal of Epidemiology, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, U. S. A., DOI: 10.1093/aje/kwj367.p 1-10.

RENCÜZOGULLARİ, E. and TOPAKTAS, M., 1991. The relationship between quantities of bromodeoxyuridine and human peripheral blood with determination of the best differential staining of sister chromatids using chromosome medium-B. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 5(3): 19-24.

ROBISON, R. L., SUTER, W. and COX, R. H., 1993. Carcinogenicity and mutagenicity studies with fluvastatin, a new, entirely synthetic HMG-CoA reductase inhibitor. Fundam Appl Toxicol, 23 (1) : 9-20.

ROCCO, L., FRENZILLI, G., ZITO, G., ARCHIMANDRITIS, A., PELUSO, C.and STINGO, V., 2010. Genotoxic effects in fish induced by pharmacological agents present in the sewage of some Italian water-treatment plants. Environ Toxicol, 27 (1) : 18-25.

ROTHFUSS, A., SCHUTZ, P., BOCHUM, S., VOLM, T., EBERHARDT, E., KREIENBERG, R., VOGEL, W.and SPEIT, G., 2000. Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in breast cancer families. Cancer Res., 60 (2) : 390-394.

RUBINS, H. B., ROBINS, S. J., COLLINS, D., L. FYE, C., ANDERSON, J. W., ELAM, M. B., FAAS, F. H., LINARES, E., SCHAEFER, E. J., SCHECTMAN, G., WILT, T. J. and WITTES, J., 1999. Gemfibrozil for the secondary preandntion of coronary heart disease in men with low leandls of high-density lipoprotein cholesterol. Andterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Interandntion Trial Study Group. N Engl J Med., 341 (6) : 410-418.

SAĞLIK BAKANLIĞI, TEMEL SAĞLIK HİZMETLERİ GENEL MÜDÜRLÜĞÜ, 2008. Türkiye kalp ve damar hastalıklarını önleme ve kontrol programı, Yayın No : 743.

SALLUSTIO, B. C., DEGRAAF, Y. C., WEEKLEY, J. S. and BURCHAM, P. C., 2006. Bioactivation of carboxylic acid compounds by UDP-Glucuronosyltransferases to DNA-damaging intermediates: role of glycoxidation and oxidative stress in genotoxicity. Chem Res Toxicol., 19 (5) :683-691.

SAVAGE, J. R. K., 1993. Update on Target Theory as Applied to Chromosomal Aberrations. Env. and Mol. Mutagen., 22 : 198-207.

SNYDER, R. D. and GREEN, J. W., 2001. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. Mutat Res., 488 (2) : 151-169.

SNYDER, R. D., 2009. Lovastatin enhances the genotoxicity of doxorubicin in Chinese hamster V79 cells via noncovalent DNA binding. Drug Chem Toxicol., 32 (1) : 17-20.

STAELS, B., DALLONGEVILLE, J., AUWERX, J., SCHOONJANS, K., LEITERSDORF, E. and FRUCHART, J. C., 1998. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. Circulation, 98 (19) : 2088-2093.

TAWFEEQ, M. M., SUZUKI, T., SHIMAMOTO, K., HAYASHI, H., SHIBUTANI, M.and MITSUMORI, K., 2010. Evaluation of in vivo genotoxic potential of fenofibrate in rats subjected to two-week repeated oral administration. Arch Toxicol., 85 (8) : 1003-1011.

TENENBAUM, A., MOTRO, M., FISMAN, E. Z., SCHWAMMENTHAL, E., ADLER, Y., GOLDENBERG, I., LEOR, J., BOYKO, V., MANDELZWEIG, L.and BEHAR, S., 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor ligand bezafibrate for preandntion of type 2 diabetes mellitus in patients with coronary artery disease. Circulation, 109 (18) : 2197-2202.

TUCKER, J. D., AULETTA, A., CIMINO, M. C., DEARFIELD, K. L., JACOBSON-KRAM, D., TICE, R. R. and CARRANO, A. V., 1993. Sister-Chromatid Exchange: Second Report of the Gene-Tox Program. Mutat. Res., 297:101-180.

Vitro. Environ. and Mol. Mutagen., 18 (1) : 28-34.

VON KEUTZ E. and SCHLÜTER G., 1998. Preclinical safety evaluation of cerivastatin, a novel HMG-CoA reductase inhibitor. Am J Cardiol. 27 ; 82 (4B) : 11-17.

WEI, Z., BING-REN, X., YING, Z., LIYAN, Y., TENG, W. and CAI-YUN, W., 2008. HPLC method for the determination of bezafibrate in human plasma and application to a pharmacokinetic study of bezafibrate dispersible tablet. J Chromatogr Sci., 46 (10) : 844-847.

WÜRSCH A.T., 2005. Wastewaters : occurrence of pharmaceutical substances and genotoxicity. These. 233p.

YÜKSEL H. , 2005. Statin-fibrat kombinasyon tedavisi, Türk Kardiyol Dern Arş. Der. 33:170-176.

http://tr.wikipedia.org/wiki/Fibratlar

http://tr.wikipedia.org/wiki/Statinler

ÖZGEÇMİŞ

04/06/1988 tarihinde, İran, Tabriz'de doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini Tabriz'de tamamladı ve sonra 2006 yılında Tonekabon Azad Üniversitesi, Moleküler ve Hücre Biyoloji Bölümünde okumaya başladı ve 2010 yılında lisans eğitimini bitirip 2011 yılda Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı.