ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ahmet İLHAN

TAMIFLU'NUN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE IN VITRO GENOTOKSİK VE SİTOTOKSİK ETKİLERİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2009

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TAMIFLU'NUN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE IN VITRO GENETOKSİK VE SİTOTOKSİK ETKİLERİ

Ahmet İLHAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 25/09/2009 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.

İmza…….	İmza……..…..…….	İmza…….……..……
Doç.Dr. Hasan Basri İLA	Prof.Dr. Mehmet TOPAKTAŞ	Prof.Dr.Rüştü HATİPOĞLU
Danışman	Üye	Üye

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No

Prof.Dr.Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

Bu Çalışma Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi TarafındanDesteklenmiştir**.**
Proje No: FEF2008YL3

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TAMİFLU'NUN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE IN VITRO GENOTOKSİK VE SİTOTOKSİK ETKİLERİ

Ahmet İLHAN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Doç. Dr. Hasan Basri İLA
Yıl : 2009**, Sayfa:** 89
Jüri : Doç. Dr. Hasan Basri İLA
Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ
Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU

Bu çalışmanın amacı, özellikle influenza (grip) tedavisinde kullanılan oseltamivir antiviral ajanının ticari formu olan Tamiflu'nun genotoksik ve sitotoksik etkiye sahip olup olmadığını insan peripheral lenfositlerinde, kromozom aberasyonu (KA), mikronukleus (MN) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) testleri ile belirlemektir. Hücreler Tamiflu kapsülü içindeki oseltamivirin 0.5, 1 ve 2 µg/ml konsantrasyonlarıyla 24 veya 48 saat boyunca metabolik aktivasyon olmayan ortamda ya da metabolik aktivasyonun 3 saat boyunca uygulanmasıyla muamele edilmiştir. Bu çalışmada Tamiflu insan peripheral kan lenfositlerinde doza bağlı belirgin bir genotoksik etki göstermemiş ancak zayıf bir sitotoksisite göstermiştir. Bununla birlikte Tamiflu'nun bazı konsantrasyonları (1 µg/ml, 24 saat ve 2 µg/ml, 48 saat) KKD'yi uyarmış ve mitotik indeks (MI)'i ise düşürmüştür ($P<0.05$). Bu çalışmada bütün bulgular göz önüne alındığında Tamiflu insan periferal lenfositlerinde genotoksik değildir, ancak zayıf bir sitostatik etki mevcuttur ve bu zayıf etki de metabolik aktivator varlığında ortadan kalkmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Tamiflu, Oseltamivir, İnsan Periferal Kan Lenfositi, Genotokisisite, Sitotoksisite

ABSTRACT

MSc THESIS

IN VITRO GENOTOXIC AND CYTOTOXIC EFFECTS OF TAMIFLU ON HUMAN PERIPHERAL LYMPHOCYTES

Ahmet İLHAN

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Hasan Basri İLA

Year : 2009, **Pages:** 89
Jury : Assoc. Prof. Dr. Hasan Basri İLA
Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ
Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU

The aim of the present study was to investigate the genotoxic and cytotoxic effects of Tamiflu, commercial form of the oseltamivir antiviral and most frequntly prescribed for the treatment of influenza infections, on human peripheral lymphocytes by using sister chromatid exchange (SCE), chromosomal aberration (CA) and micronucleus (MN) tests. Cells were treated with 0.5, 1, 2 µg/ml oseltamivir in one Tamiflu capsule for 24 or 48 hours in the absence of a metabolic activation system or 0.5, 1, 2 µg/ml oseltamivir for 3 hours in the presence of a metabolic activation system. Tamiflu did not demonstrate clear dose-dependently genotoxic effect but it showed a weak cytotoxicity on human peripheral blood lymphocytes in this study. On the other hand, some concentrations of Tamiflu (1 µg/ml during 24 hour and 2 µg/ml during 48 hour) induced SCE and also decreased the mitotic Index (MI) ($P<0.05$). Considering the all findings, Tamiflu is nongenotoxic in vitro peripheral blood lymphocytes, but there is a weak cytostatic effect and also these weak effects disappeared in presence of the exogenous metabolic activator.

Key words: Tamiflu, Oseltamivir, Human Peripheral Blood Lymphocytes, Genotoxicity, Cytotoxicity

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bana her açıdan destek olan, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve kişisel gelişimimde sonsuz sabır gösteren danışman hocam sayın Doç. Dr. Hasan Basri İLA'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında, her konuda çok büyük yardımlarını gördüğüm sayın hocalarım Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ ve Doç. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI'na teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez deneylerim sırasında yine çok büyük yardımlarını gördüğüm, Uzman Biyolog Arş. Gör. Erman S. İSTİFLİ'ye, Biyolog Dr. Semir CANIMOĞLU'na, Uzman Biyolog Mehmet BÜYÜKLEYLA'ya, Biyolog A. Mine YILDIZ'a ve Biyolog Handan ERBOĞA'ya teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında maddi ve manevi açıdan bana her zaman destek olan annem Hatun İLHAN'a, babam Mustafa Rıfkı İLHAN'a, eşim Kevser İLHAN'a ve kızım Eylül Hatun İLHAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, bu yüksek lisans çalışmasını maddi yönden destekleyen Ç.Ü. Araştırma Fonu ile Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ ……..…….....I
ABSTRACT.....II
TEŞEKKÜR.....III
İÇİNDEKİLER......IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....X
SİMGELER VE KISALTMALAR.....XII
1.GİRİŞ.....1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....9
2.1.Herpesviruslar Grubuna Etki Eden Antiviral İlaçlar
İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları…….....9
2.1.1. 5-(2-Kloroetil)-2'-deoksiuridin (CEDU)…….....9
2.1.2. 5-substituted 2'-deoxyuridine (dUrd) analogları…….……9
2.1.3. Asiklovir…….....10
2.1.4. Famsiklovir……..……..……..…….11
2.1.5. FIAC ve FMAU…….……..…….11
2.1.6. Gansiklovir…….....12
2.1.7. HMUdR, F3TdR, MMdUrd ve EtUdR….....…….13
2.1.8. IDU, TFT ve BVDU……..…….……..13
2.1.9. Maribavir (1263W94)……..…….....14
2.1.10. Pensiklovir…...……..…….....14
2.1.11. Sidofovir……..…….....15
2.1.12. Valasiklovir……..……...16
2.2. İmmün Yetmezlik Virüslerine Etki Eden Antiviral İlaçlar
İle Yapılan Genotoksisit Çalışmalar…….……..16
2.2.1. Ters (Reverse) Transkriptaz İnhibitörleri İle Yapılan
Genotoksisite Çalışmaları……..……..16
2.2.1.1. Didanozin…..…….....…….……...16
2.2.1.2. Dideoksinükleositler (Azidotimidin

Dideksisitidin Dideoksiadenozin ve Dideoksiinosin)……..17
2.2.1.3. KP-1212……..…….……17
2.2.1.4. Lamivudin……..…….....18
2.2.1.5. Stavudin……..…….....18
2.2.1.6. Zalsitabin……..…….……19
2.2.1.7. Zidovudin…….....20
2.3. Influenza Virüsüne Etkili Sentetik İlaçlar İle Yapılan
Gentoksisite Çalışmaları…….……21
2.3.1. Ribavirin……..…….....21
2.3.2. Oseltamivir……...…….....23
2.4. Diğer Virüs Gruplarına Etki Eden Antiviral İlaçlar
İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....23
2.4.1. 4'-Hydroxy-3-methoxyflavonlar….....23
2.4.2. Beta-L-adenosine…….…….....24
2.4.3. Iodoantipyrine…….....24
2.4.4. Telbivudine…….……...…….....24
2.4.5. Antiviral Özellikleri Olan Çeşitli Nükleosit Analogları…….....25
3. MATERYAL VE METOD…….……26
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları……..…….....26
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler……...…….....26
3.1.1.1. Tamiflu…….…….....26
3.1.1.1.(1). Tamiflu'nun aktif metabolite dönüşümü
ve virüslere etkisi……..……....……...……..26
3.1.1.1.(2). Tamiflu'nun kullanım şekli.....27
3.1.1.2. Mitomycin C (MMC) (Sigma)…….……..28
3.1.1.3. Cyclophosphamide monohydrate.....29
3.1.1.4. Dimethyl Sulfoxide (DMSO).....29
3.1.1.5. Kromozom Mediumu.....30
3.1.1.6. Kolkisin (Sigma).....30
3.1.1.7. Hipotonik Eriyik.....31
3.1.1.8. Fiksatif.....31

3.1.1.9. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd) (Sigma).....31
3.1.1.10. Sorensen Tamponu.....32
3.1.1.11. Standart Saline Citrate (SSC) Eriyiği…….....32
3.1.1.12. Giemsa (Merck)…….…….……33
3.1.1.13. Entellan (Merck)…….…….……...33
3.1.1.14. Nitrik Asit (HNO_3)…….……33
3.1.1.15. Cytochalasin B (Sigma)……..…….…….……..33
3.1.1.16. Standart S9 mix (Memeli Karaciğer Fraksiyonu [S9])'nun hazırlanması…….……..…...34
3.1.1.16.(1). Sıçan Karaciğer Enzimlerinin İndüklenmesi…….34
3.1.1.16.(2) Karaciğerin Alınması.....35
3.1.1.16.(3) Karaciğer Homojenat S9 Fraksiyonlarının İşlenmesi.....35
3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları…….....……..……...37
3.1.2.1. Hassas Terazi…….....37
3.1.2.2. Santrifüj.....37
3.1.2.3. Mikroskop.....37
3.1.2.4. İnkübatör.....37
3.1.2.5. Flow Kabin (Steril Kabin).....37
3.1.2.6. Su Banyosu.....38
3.2. Lamların Temizlenmesi.....38
3.3. Sterilizasyon.....38
3.3.1. BrdUrd Eriyiğinin Sterilizasyonu.....38
3.3.2. Cyclophosphamide monohydrate'nin Sterilizasyonu.....38
3.3.3. Saf Suyun Sterilizasyonu.....39
3.4. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) (Sister Chromatid Exchange) ve Kromozom Anormalliklerini (KA) (Chromosome Aberration=CA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması.....39
3.4.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması (S9 mix'siz test).....39
3.4.2. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

(S9 mix'li test).....41
3.4.3. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması.....41
3.5. Daimi Preparatlarda Mikroskobik İnceleme.....42
3.5.1. KKD Sayısının ve Proliferasyon İndeksinin (PI) (Replikasyon İndeksi=RI) Saptanması.....43
3.5.1.1. KKD Sayısının Saptanması.....43
3.5.1.2. Proliferasyon İndeksinin (PI) (Replikasyon indeksi=RI) Saptanması…….....44
3.5.2. Kromozom Anormallikleri (KA) ve Mitotik İndeksin (MI) Saptanması…….....49
3.5.2.1. Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması.....49
3.5.2.2. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması.....49
3.6. Mikronukleus (MN) Testi İçin Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması.....50
3.6.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması (S9 mix'siz test).....50
3.6.2. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması (S9 mix'li test).....51
3.6.3. Preparatların Boyanması.....51
3.7. Mikronukleus Testi İçin Hazırlanan Preparatlarda Mikroskobik İnceleme.....52
3.7.1. Mikronukleus Sayısı ve Nukleus Bölünme İndeksinin (NBI) Saptanması.....52
3.8. Mikroskopta Fotoğraf Çekme.....55
3.9. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi.....55
4. BULGULAR.....56
4.1. Tamiflu'nun Eksojen Metabolik Aktivatör Bulunmayan Ortamda İnsan Periferal Kan Lenfositlerindeki Genotoksik Etkileri.....56

4.1.1. Tamiflu'nun Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerindeki Etkileri.....56
4.1.2. Tamiflu'nun Kromozom Anormalliklerinin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri.....57
4.1.3. Tamiflu'nunn Mikronukleus (MN) Oluşumu Üzerindeki Etkileri.....60
4.1.4. Tamiflu'nun DNA replikasyonu, Mitoz Bölünme ve Nukleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri (sitotoksisite).....62
4.2. Tamiflu'nun Eksojen Metabolik Aktivatör (S9 mix) Bulunan Ortamda İnsan Periferal Kan Lenfositlerindeki Genotoksik tkileri.....63
4.2.1. Tamiflu'nun Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerindeki Etkileri.....63
4.2.2. Tamiflu'nun Kromozom Anormalliklerinin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri.....64
4.2.3. Tamiflu'nun Mikronukleus (MN) oluşumu Üzerindeki Etkileri.....69
4.2.4. Tamiflu'nun DNA Replikasyonu, Mitoz Bölünme ve Nukleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri (sitotoksitesi).....70
5. TARTIŞMA.....72
5.1. Tamiflu'nun Kardeş Kromatid Değişimleri (KKD) ve Kromozom Aberasyonları (KA) Üzerindeki Etkileri.....72
5.2. Tamiflu'nun Mikronukleus (MN) Oluşumları Üzerindeki Etkileri.....74
5.3. Tamiflu'nun Hücre Proliferasyonu, Mitoz Bölünme ve Nukleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri (sitotoksisitesi).....76
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....78
KAYNAKLAR.....79
ÖZGEÇMİŞ.....89

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 4.1. Tamiflu ile Muamele Edilmiş İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Hücre Başına Düşen Ortalama KKD Sayısı……... 56

Çizelge. 4.2. Tamiflu ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde kromozom anormallikleri (KA), KA'lı hücre oranı ve KA/hücre… 57

Çizelge 4.3. Tamiflu ile Muamele Edilmiş İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde MN İçeren İki Nukleuslu Hücre %'si, Hücre Başına Düşen Ortalama MN Sayısı ve Nukleus Bölünme Indeksi (NBI)…….. 61

Çizelge 4.4. Tamiflu ile Muamele Edilmiş İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Proliferasyon Indeksi (PI), Mitotik Indeks (MI) ve Nukleus Bölünme Indeksi (NBI)……..…. 63

Çizelge 4.5. Eksojen Metabolik Aktivatör Bulunan Ortamda (S9 mix) Tamiflu ile Muamele Edilmiş İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Hücre Başına Düşen Ortalama KKD Sayısı ……... 64

Çizelge. 4.6. Eksojen metabolik aktivatör bulunan ortamda (S9mix) Tamiflu ile muamele edilen insan periferal kan lenfositlerinde kromozom anormallikleri KA, KA'lı hücre oranı ve KA/hücre…… 65

Çizelge 4.7. Eksojen metabolik aktivatör bulunan ortamda (S9mix) Tamiflu ile muamele edilmiş insan periferal kan lenfositlerinde MN İçeren İki Nukleuslu Hücre %'si, Hücre Başına Düşen Ortalama MN Sayısı ve Nukleus Bölünme Indeksi (NBI)……. 70

Çizelge 4.8. Eksojen Metabolik Aktivatör Bulunan Ortamda (S9mix) Değişik Dozlarda Tamiflu ile Muamele Edilmiş İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Proliferasyon İndeksi (PI), Mitotik İndeks (MI) ve Nükleus Bölünme İndeksi (NBI)…… 71

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 3.1. Kardeş Kromatid Değişimi'nin Olduğu ve Olmadığı Durumun Şematik Olarak Gösterilmesi (Topaktaş ve Speit, 1990).....43
Şekil 3.2. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin (dU)'in kimyasal yapıları.....44
Şekil 3.3. BrdUrd'nin DNA Yapısına Girmesi ile Birinci, İkinci ve Üçüncü Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Ayırt Edilmesinin Şematik Olarak Açıklanması (During, 1985: Topaktaş ve Speit, 1990'dan).....46
Şekil 3.4. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000).....47
Şekil 3.5. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000).....48
Şekil 3.6. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000).....48
Şekil 3.7. Bir nukleuslu hücre (X1000).....53
Şekil 3.8. İki nukleuslu hücre (X1000).....54
Şekil 3.9. Üç nukleuslu hücre (X1000).....54
Şekil 3.10. Dört nukleuslu hücre (X1000).....55
Şekil 4.1. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (0,5 µg/ml Tamiflu, 48 saatlik muamele, ♂). X1000……...…58
Şekil 4.2. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (0,5 µg/ml Tamiflu, 48 saatlik muamele, ♂). X1000……58
Şekil 4.3. Kromozom kırığı (B") bulunan metafaz plağı (2 µg/ml Tamiflu, 48 saatlik muamele, ♀). X1000…….…….59
Şekil 4.4. Fragment (F) bulunan metafaz plağı (2 µg/ml Tamiflu, 24 saatlik muamele, ♀). X1000…….59

Şekil 4.5. Poliploid hücre (0,5 µg/ml Tamiflu, 24 saatlik muamele, ♀). X1000……60

Şekil 4.6. Mikronukleus içeren iki nukleuslu hücre
(2 µg/ml Tamiflu, 24 saatlik muamele, ♀). X1000…….61
Şekil 4.7. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı
(1 µg/ml Tamiflu + S9 mix, 3 saatlik muamele, ♂). X1000.....65
Şekil 4.8. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı
(2 µg/ml Amoxicillin + S9 mix, 3 saatlik muamele, ♂). X1000.....66
Şekil 4.9. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı
(0,5 µg/ml Tamiflu + S9 mix, 3 saatlik muamele, ♀). X1000……..66
Şekil 4.10. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı
(0,5 µg/ml Tamiflu + S9 mix, 3 saatlik muamele, ♂). X1000……...67
Şekil 4.11. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı
(0,5 µg/ml Tamiflu + S9 mix, 3 saatlik muamele, ♂). X1000……...67
Şekil 4.12. Kromatid değişimi (KD) bulunan metafaz plağı
(2 µg/ml Tamiflu + S9 mix, 3 saatlik muamele, ♀). X1000……..68
Şekil 4.13. Poliploid hücre (0,5 µg/ml Tamiflu + S9 mix, 3 saatlik muamele, ♂).
X1000……..68
Şekil 4.14. Mikronukleus içeren iki nukleuslu hücre
(1 µg/ml Tamiflu + S9 mix, 3 saatlik muamele, ♂). X1000……..…69

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADRs : Adverse Drug Reactions
AGS : İnsan Adenokarsinoma Hücreleri
AZT : Azidotimidin
B' : Kromatid Kırığı
B" : Kromozom Kırığı
BALB/cJ: Bagg albino/color locus
BKÇ : Baz-kesip Çıkarma Onarım Yolu
BrdUrd : 5'-bromo-2'-deoxyuridine
CA : Chromosome Aberration
CBMN : Sitokinezi-Bloklayan Mikronukleus Testi
CBPI : Cytokinesis Block Proliferation Index
CD : Sprague Dawley
CDC : Centers for Disease Control and Prevention
CFW : Swiss Webster
CHO : Chinese Hamster Ovary
CHL : Chinese Hamster Lung Cells
CPFX : Ciprofloxacin
Cyp : Cyclophosphamide monohydrate
Cyt-B : Cytochalasin-B
DDI : Didanozin
DMSO : Dimethyl Sulfoxide
DNA : De(z)oksiribonukleik asit
DS : Disentrik Kromozom
dT : Deoxytimidin
dU : Deoxyuridine
EK : Eritici kontrol
ENX : Enoxacin
F : Fragment
G-6-P : Glukoz-6-fosfat
GLP : Good Laboratory Practices

GSA : Green Screen Assay

HIV : Human Influenza Virus

HPRT : Hypoxantin guanine phosphoribocyl transferase

IPCS : International Programme on Chemical Safety

i.m : İntramüsküler

i.p. : İntraperitonal

KA : Kromozomal Anormallik

KCl : Potasyum klorür

KD : Kromatid Değişimi

KKB : Kardeş Kromatid Birleşmesi

KKD : Kardeş Kromatid Değişimi

KKKA :Kırım-Kongo kanamalı ateşi

MD : Menkes Disease

MGA : Minimal Glukoz Agar

$MgCl_2$: Magnezyum Klorür

MI : Mitotik İndeks

MMC : Mitomycin C

MN : Mikronukleus

MNBC : Micronucleated binucleated cell

MNBN : Mikronukleuslu binukleer hücre

MNPCE : Mikronukleuslu polikromatik eritrosit

MTD : Maximum tolerated dose

NA : Nalidixic acid

NaCl : Sodyum klorür

NADP : Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NAM : N-Asetilmuramik asit

NAG : N-Asetilglukozamin

NBI : Nukleus Bölünme İndeksi

NFLX : Norfloxacin

NIH : National Institutes of Health

NKÇ : Nukleotid kesip-çıkarma onarım yolu

NTP : National Toxicology Program

OECD : Organisation for Economic Co-operation and Development

OFLX : Ofloxacin

P : Poliploidi

PA : Piromidic acid

PARP : Poly [ADP-riboz] polimeraz

PI : Proliferasyon İndeksi

PK : Pozitif kontrol

PPA : Pipedimic acid

PRI : Proliferative Rate Index

RI : Replikasyon İndeksi

RMP : Rifampicin

RPM : Rotation per minute

RPMI : Roswell Park Memorial Institute mediumu

ROS : Reactive Oxygen Species

RS : Solunum Sinsityal

S9 mix : Memeli Karaciğer Fraksiyonu [S9]

SCD : Sister Chromatid Differentiation

SCE : Sister Chromatid Exchange

SMV : Sitomegalovirüs

SSB : Single Strand Breaks

SSC : Standard Saline Citrate

T : Translokasyon

TK : Timidin Kinaz

UDS : Unscheduled DNA synthesis

UV : Ultraviyole

WD : Wilson Disease

WHO : World Health Organization

VC : Vitamin C

VE : Vitamin E

ZDV : Zidovudin

1. GİRİŞ

Influenza (grip) çok eski yıllardan beri bilinmektedir. Bilinen ilk pandemi[1] 1510 yılına aittir. Bilinen en büyük pandemi ise 1918-1919 yıllarında görülen, yaklaşık 20 milyon insanın ölümüne yol açan, İspanyol gribi (Influenza A H1N1) olarak adlandırılan salgındır. Bu pandeminin dışında 20. yüzyılda 1957-1958 yıllarında Asya gribi (Influenza A H2N2), 1968-1970'te Hong Kong gribi (Influenza A H3N2) ve 1977-1978 yıllarında Rus gribi (Influenza A) olarak adlandırılan pandemiler yaşanmıştır. Bu pandemilerin dördü de Çin'den başlayıp tüm dünyaya yayılmıştır. Influenza salgınlarında hayvanların önemli rol oynadıkları düşünülmektedir. Örneğin 18. ve 19. yüzyıllarda atlarda görülen solunum yolu enfeksiyonlarının insanlarla bağlantılı olduğu görülmüştür. Günümüzdeki influenza salgınlarında ise domuzların etkin rol oynadığı düşünülmektedir (Ustaçelebi ve ark., 2004).

Tipik bir influenza döneminde dünya popülâsyonunun %10'undan fazlasının (yaklaşık 600 milyon) gribe yakalandığı tahmin edilmektedir. Bireysel grip virüsü enfeksiyonu diğer solunum sistemi virüslerinden kaynaklanan enfeksiyonlardan klinik olarak ayırt edilmez. Solunum sistemi virüsleri arasında influenza özellikle dikkat çekmektedir. Çünkü sıklıkla hem bütün yaş gruplarında yüksek ateşli solunum hastalığının salgın olarak ortaya çıkması hem de genel popülasyonda yüksek ölüm oranına sahip olmasıyla önem taşımaktadır. Diğer solunum virüsü enfeksiyonlarından farklı olarak influenza; aşı ve antiviral ajanların kullanımıyla önlenebilir.

Orthomyxovirdae (ortomiksovirüs) ailesinde yer alan influenza virüsleri zarflı ve tek zincirli RNA virüsleridir.

Influenza A, B ve C olmak üzere üç temel türe ayrılır: Influenza A yaygın ve tehlikeli olanıdır. Hastalığın esas yatağı ördekler ve su kuşları arasında olmasına rağmen, insanlar ve diğer kuş ile memeli cinslerine de bulaşmanın erken safhaları yaşanmaktadır. Diğer insan patojenlerine kıyasla rekor bir hızla evrime

[1] Kıta, hatta tüm dünya yüzeyi gibi çok geniş bir alanda yayılan ve etkisini gösteren salgın hastalıklara verilen genel addır.

uğramaktadır. Influenza B özellikle çocukların kış aylarında yakalandıkları klasik gribe yol açar. Influenza C ise yaygın olarak görülen soğuk algınlığının sebebidir (Ustaçelebi ve ark., 2004).

Influenza A virüsleri, virüsün yüzeyinde bulunan hemaglutinin (HA) ve nöraminidaz (NA) yüzey glikoproteinlerine göre alt tiplere ayrılır. Birbirinden farklı 15 farklı hemaglutinin ve 9 farklı nöraminidaz alt tipi_vardır (Ustaçelebi ve ark., 2004).

İnsanlar arasında genellikle üç hemaglutinin (H1, H2 ve H3) ve iki nöraminidaz'lı (N1 ve N2) alt tipleri hastalığa neden olur. Kuşlarda tüm alt tipler bulunabilir. Bazı alt tipleri ise türe spesifik olarak hayvanlarda hastalığa yol açar (örneğin: H7N7 ve H3N8 virüsleri atlarda hastalığa neden olur). İnfluenza B ve C virüslerinin alt tiplerine göre sınıflandırması yapılmamaktadır (Ustaçelebi ve ark., 2004).

Mevsimsel grip, influenza (Tip B) adı verilen bir virüs tarafından oluşturulan, ani olarak 39°C üzerinde ateş, şiddetli kas ve eklem ağrıları, halsizlik, bitkinlik, titreme, baş ağrısı ve kuru öksürük gibi belirtiler ile başlayan bir enfeksiyon hastalığıdır. Daha sonra hastalık tablosuna boğaz ağrısı, burun akıntısı, hapşırma, gözlerin akması ve kanlanması gibi belirtiler eklenir ve bazı vakalarda da karın ağrısı, bulantı, kusma görülebilir. Ateşin 39°C'nin üzerinde olması, şiddetli kas ağrıları ve halsizlik nedeniyle hastalığı ayakta geçirmek olanaksızlaşmakta ve hastaları mutlaka 3-7 gün yatağa mahkûm etmektedir. Yaklaşık bir hafta içinde belirtiler kaybolmakta ancak halsizlik belirtilerin kaybolmasından sonra da devam etmekte, hatta 2 hafta kadar sürebilmektedir. Özellikle çocuklarda, yaşlılarda ve kalp hastalığı, akciğer hastalığı, böbrek hastalığı, şeker hastalığı gibi kronik hastalığı olan kişilerde çok daha ağır seyretmekte ve ölüme kadar varabilen ciddi sonuçlara yol açmaktadır. Bu kadar ciddi tablolara yol açabilen grip halk arasında çok sık olarak soğuk algınlığı ile karıştırılmaktadır. Soğuk algınlığı ateş yükselmeden, hafif kırgınlık, burun akıntısı, hapşırma gibi belirtiler ile kendini gösteren, halsizliğe yol açmadığı için yatak istirahatı gerektirmeyen bir hastalıktır ve grip ile kesinlikle karıştırılmamalıdır. Ayrıca grip, özellikle çocuklar ve yaşlılarda ikincil enfeksiyonlara zemin hazırlamakta ve orta kulak iltihabı, zatürre, beyin zarı ve beyin

dokusu enfeksiyonları gibi komplikasyonlara neden olmaktadır. (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2009).

Mevsimsel gripten başka bir grip türü olan kuş gribi de yine insanları (sağlık ve ekonomik yönden) son derece olumsuz etkilemektedir. Hastalık Avian influenza ve tavuk vebası olarak da adlandırılmaktadır. Avian influenza virüslerinin (H5N1 tipi) sebep olduğu kanatlı hayvanların çok bulaşıcı ve öldürücü bir hastalığıdır. Kuş gribi, kümes hayvanlarını daha çok etkilemekle birlikte, bütün kanatlı hayvanlarda ve domuzlarda görülür. Hastalık ayrıca domuzlara, atlara, balina ve fok balığına da bulaşabilir (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2009).

Influenza, son olarak ve çok ciddi bir şekilde domuz (Swine) gribi formunda karşımıza çıkmıştır. Domuz gribi, A (H1N1) tipi virüsten kaynaklanan, insanlarda hastalığa yol açan viral bir hastalıktır. Hastalık ilk kez Meksika ve ABD'de görülmüş ve daha sonra birçok ülkeye yayılmıştır. Bu virüse "domuz gribi" denmesinin sebebi, domuzlar arasında görülen grip virüslerine çok benzediğinin gösterilmiş olmasıdır. Bu yeni virüs insan, domuz ve kuş virüslerinin bir karışımıdır. Domuz gribinin belirtileri, insanlarda görülen grip belirtilerine benzerdir. Bunlar: Ateş, öksürük, boğaz ağrısı, yaygın vücut ağrısı, baş ağrısı, üşüme ve yorgunluk gibi belirtileri içermektedir. Bazı vakalarda kusma ve ishal de görülebilmektedir (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2009).

ABD'de yapılan bir çalışmada 1957-1985 yılları arasında 28 yıllık periyot boyunca 18 influenza epidemisinin (salgın) her birinde 10.000'den fazla ölüm rapor edilmiştir (Gross, 1991). Bir başka araştırmada dokuz yıllık bir periyotta influenza ile bağlantılı altı epidemide ortalama 30.000 ölüm oranı bulunmuştur, bu ölümlerin %80-%90'ı 65 yaş ve üstüdür (Lui ve Kendal, 1987). Bütün yoğun ölümlerin yaklaşık dörtte birlik kısmından pnömoni (zatürre) ve influenza ölümleri sorumludur. ABD'de her bir epidemi de ortalama 170.000'e kadar yoğun hastaneye yatış gözlenmektedir ve bu hastaların yarısından fazlası 65 yaş ve üstüdür (Barker 1986). Büyük bir çocuk grubuyla (1968-69, 1972-73 yıllarında) yapılan başka bir çalışmada influenza A epidemisi sırasında ölüm oranları incelenmiştir. Influenzadan kaynaklanan hastaneye yatmanın başlıca nedeninin pnömoni ve bronşit olduğu

bulunmuştur. Hastaneye yatış oranlarındaki en yüksek rölatif artış 5-14 yaş grubu çocuklarda saptanmıştır (Mullooly ve Barker, 1982).

Gribin önlenebilmesi için uygulanan yaklaşımlardan biri olan antiviral ajan kullanımı ve bunların genotoksik etkileri bizim tez çalışmasının temelini oluşturmaktadır. Tedavide yaklaşık olarak 4-5 çeşit antiviral ajan kullanılmaktadır. Bunlar; ribavirin (pürin nükleosit analogu), amantadine (M2 iyon kanalı inhibitörü, ticari adı; Symmetrel), rimantadine (M2 iyon kanalı inhibitörü, ticari adı; Flumadine), zanamivir (nöraminidaz inhibitörü, ticari adı; Relenza) ve oseltamivir (nöraminidaz inhibitörü, ticari adı; Tamiflu)'dir. Bu ajanlardan ribavirin influenza tedavisinde kullanılıyor olsa da tedavide diğer dördü kadar yaygın bir kullanım alanı bulamamıştır. Bunlardan oseltamivir influenzanın önlenmesinde oldukça bilinen bir üne sahip olanı olup bu çalışmada test maddesidir.

Gribe yönelik bir oral antiviral olan Tamiflu (Oseltamivir), nöraminidaz inhibitörleri (NAI) diye adlandırılan bir ilaç sınıfında yer almaktadır. Bu ilaç grip virüsünün vücut içerisinde yayılmasını engeller ve çalışma sisteminden dolayı, klinik açıdan ilgili olan bütün grip suşlarına aktif olacak şekilde tasarlanmıştır. Tamiflu hastalıktan korunmak ve gribi tedavi etmek üzere kullanılabilir (Roche,2009).

Virüs nöraminidazlarının aktivitesi, influenza virüsünün replikasyonu için çok temel bir koşuldur. Virüs kapsülünün yapıtaşı olan nöraminidaz, siyalikasit bağlarını parçalamak suretiyle virüsün solunum sisteminde yayılmasını sağlar. Nöraminidazın inhibisyonu, grip hastalığının erken tedavisinde etkilidir (Simon ve Stille 2008).

Kromozom mutasyonları ve ilgili genetik değişimler birçok insan genetik hastalıklarının sebebidir ve somatik hücrelerin onkogen ya da tümör supressör genlerinde değişimlere sebep olan kromozom mutasyonları ve ilgili olayların insanlarda ve deney hayvanlarında kanserin uyarılmasında rol aldığına dair birçok kanıt bulunmaktadır (OECD TG 473. 1997). Bundan dolayı ilaç ve kimyasalların potansiyel zararlı etkileri göz önüne alındığında, yeni ilaçların yaygın kullanımlarına bağlı olarak genotoksik etkilerinin test edilmesi önem arz etmektedir (Jaju, 1984).

Mutajen ve kanserojenlerin genotoksik risklerini belirlemede kullanılan en hassas yöntemlerden biri, periferal kan lenfositlerindeki kromozom anormalliği (KA)

frekansının değerlendirilmesidir (Carrano ve Natarajan, 1988; Hagmar ve ark. 1994). Kromozom anormallikleri DNA düzeyindeki zararın bir sonucu olarak ortaya çıkar. Örneğin, kromozom kırıkları DNA'daki onarılmamış çift zincir kırıklarından ve yeni yapıya sahip kromozomların meydana gelmesi de, DNA'daki zincir kırıklarının yanlış onarılmasından kaynaklanabilir (Savage, 1993). KA oluşum mekanizmasının farklı dokularda benzer olmasından dolayı, lenfositlerdeki anormallik seviyesinin, kansere eğilimli dokulardaki anormallik seviyesini gösterdiği ve böylece kanser riskinin de göstergesi olduğu düşünülmektedir (Albertini ve ark. 2000; Bonassi ve ark. 2000; 2004; 2005; 2007). Yüksek KA frekansı (gap hariç), KA artışını başlatan sebebe bakmaksızın yüksek kanser riski olduğunu önceden gösterebilir. Hem kromatid tipi hem de kromozom tipi KA'ları kanser riskinin göstergesidir. Fakat kromozom tipi KA'ların kromatid tipi KA'larına göre daha iyi bir belirleyici olduğuna dair kanıtlar vardır (Norppa, 2004; Norppa ve ark. 2006; Boffetta, 2006).

Genotoksik riski belirlemede kullanılan diğer yöntemlerden biri, periferal kan lenfositlerindeki kardeş kromatid değişimi (KKD) frekansının belirlenmesidir (Tucker ve ark. 1993). Kardeş kromatid değişimleri, DNA çift zincir kırıklarının homolog rekombinasyon yoluyla onarılmasını gösteren kardeş kromatidlerin homolog lokusları arasında DNA replikasyon ürünlerinin değişimidir (Sonoda ve ark. 1999; Helleday, 2003). Mutajen ve kanserojen olduğu bilinen maddelere maruz kalan insan ve hayvanların hücrelerinde KKD frekansının arttığı bulunmuştur (Perry ve Evans, 1975; Albertini ve ark. 2000). Ayrıca, tek-gen mutasyonlarının artışı ile KKD frekansı arasında lineer bir ilişki olduğu da saptanmıştır (Carrano ve ark, 1978). Benzer bir ilişkinin KKD'nin artışıyla *in vivo* tümörlerin oluşumu arasında da olduğu Cheng ve ark. (1981) tarafından bildirilmiştir. KA'nin aksine KKD tek başına genotoksik riski belirlemede yetersizdir. Fakat, KKD deneysel çalışmalarda indikatör test olarak insanlarda genotoksik etkileri göstermede uygun bir yöntem olarak kullanılmaya devam etmektedir (Norppa ve ark. 2006).

Genotoksisite ve kanserojenitenin belirlenmesinde kullanılan sitogenetik metodlardan bir diğeri ise mikronukleus (MN) testidir (Heddle ve ark. 1991; Fenech, 2002). Bonassi ve ark. (2007)'na göre periferal kan lenfositlerindeki yüksek MN frekansı insanlarda kanser riskini göstermektedir. Periferal kan lenfositlerinde

kromozom hasarı olarak MN'un kullanılması ilk kez 1976 yılında Contryman ve Heddle tarafından öne sürülmüştür (Bonassi ve ark. 2001). Daha sonra sitokinez-bloklama mikronukleus metodunun Fenech ve Morley (1985) tarafından geliştirilmesiyle, nukleus bölünmesini tamamlamış hücrelerdeki MN'lar incelenmeye başlanmıştır. MN asentrik kromozom ya da kromatid kırıklarından ve tüm kromozomlar ya da kromatidlerin anafazda geri kalmasından dolayı (kalgın kromozom) telofazda oluşan kardeş nukleusun dışında rastlanan küçük nukleuslardır (Surrallés ve ark. 1995). Ayrıca multipolar anafaz ve telofaz da MN oluşumuna sebep olmaktadır (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 1995). MN oluşumuna neden olabilen kromozom kaybı ya da kromozomların ayrılamaması (non-disjunction) kanser ve yaşlanmada gözlenen önemli olaylardan biridir. Bu durum, muhtemelen iğ iplikçiklerinde, sentromerde bozulma ya da metafazdan önce kromozom yapısının yoğunlaşması sonucu oluşmaktadır (Dellarco ve ark. 1985). Böylece, MN testi ile hem klastojenik hem de anöjenik etkiler belirlenebilmektedir (Kirsch-Volders ve ark. 1997; Norppa ve Falck, 2003). Yapılan çalışmalarda, kanser hastalarından alınan periferal kan lenfositlerindeki MN frekansında belirlenen artış, kanser oluşan hedef dokudaki MN frekansı kadar bulunmuştur (Cheng ve ark. 1996). Ayrıca, Fenech ve ark. (1999)'nın, uluslararası işbirliği ile yaptıkları insan mikronukleus projesindeki bulguları, MN ile kanser arasındaki ilişkiyi açıkça desteklemiştir.

Yapılan literatür taramasında; antiviral ajanların genotoksik ve sitotoksik etkilerini araştıran onlarca çalışmaya ulaşılmasına rağmen influenzaya karşı kullanılanlarla ilgili yapılmış genotoksisite ve sitotoksisite çalışmaları sadece ribavirin ile ilgili olanlardır. Bu çalışmalara aşağıda kısaca değinilmiştir.

Hoffmann ve ark. (1987) sentetik bir antiviral ajan olan ribavirinin (1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) dominant letal etkisini CD sıçanlarda çalışmışlardır. İlaç sıçanlara 50, 100 ve 2000 mg/kg/gün konsantrasyonlarında 5 gün boyunca intraperitonal (ip) yolla verilmiştir. Erkek sıçanlar dişi sıçan kümeleriyle ardışık 8 hafta çiftleştirilmiştir. Çalışma sonunda ribavirinin sıçanlarda dominant letal deneylerinde gösterilebilir herhangi bir mutajenik potansiyelden yoksun olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada ribavirinin etkinliği *in vitro* tam kan kültüründe sitokinez bloklama yöntemiyle mikronukleus deneyi sayesinde

değerlendirilmiştir, sonuç olarak ribavirinin mikronukleusu indüklemede oldukça düşük bir gücünün olduğu, ancak hücresel proliferasyonu geciktirdiği belirtilmiştir (Joksić ve ark. 2000). İlk çalışmaya benzer bir çalışmada ribavirin erkek Wistar sıçanlarının spermlerinde baş ve kuyruk anomalisini indüklemiş ve sıçan germ hücrelerinde mutajenik olduğu rapor edilmiştir (Narayana ve ark. 2002a). Başka bir çalışmada ribavirin ile sıçan kemik iliğinde mikronukleus çalışmasında bu antiviralin genotoksik ve sitotoksik olduğunu saptanmıştır (Narayana ve ark. 2002b). Yine Joksić ve ark. (2006) vitamin B12'nin ribavirinin indüklediği; nükleotidlerin de novo (yeni baştan) senteziyle ilgili olarak ortaya çıkan genotoksisiteyi azalttığını bildirmişlerdir. Tatar ve ark. (2005) ise Kırım-Kongo kanamalı ateşi olan 3 hastada ribavirinin *in vivo* genotoksisitesini incelemişlerdir. Hastalardan kan örnekleri tedavi esnasında alınmış ve mikronukleus ve kardeş kromatid değişimi testi yapılmıştır. Terapi esnasında elde edilen sonuçlarla terapiden bir ay sonraki sonuçlar karşılaştırıldığında, terapi sırasındaki MN ve KKD'lerin sonrakilere oranla daha yüksek bulunduğu belirtilmiş ve bu sonuçlara göre ribavirinin reversibl *in vivo* genotoksik etkiye sahip olduğu vurgulanmıştır. Chevaliez ve ark. (2007) daha önceden kabul edilen; ribavirinin viral genomlarda mutasyon birikimini hızlandırması hipotezini sorgulamışlar ve ribavirin monoterapisinin (tek başına kullanımı) konsensüs sekansta (uyuşma sıraları) varyasyon oranını artırmadığını ve muamele öncesi periyota göre nükleotid değişimlerinin artmadığını bildirmişlerdir. Dolayısıyla ribavirinin hepatit C virüsünde *in vivo* şartlarda mutajen olduğu hipotezini hemen hemen çürütmüşlerdir.

Yukarıdaki bilgiler dikkate alındığında influenza artık günümüzün vebası olarak da değerlendirilebilecek bir nitelik kazanmıştır. Ancak influenza tedavisinde çok sık kullanılan antiviral ajanlarla ilgili genotoksisite çalışması yok denecek kadar azdır. Sadece ribavirin ile ilgili az sayıda makale mevcut olup, onlara da yukarıda atıfta bulunulmuştur. Öte yandan M2 iyon kanalı inhibitörü antiviraller (Amantadine ve Rimantadine) ve özellikle son zamanlarda hayli gündemde olan nöraminidaz inhibitörü tipi antivirallerle (Zanamivir ve Oseltamivir) ilgili genotoksisite, mutajenite ve sitotoksisite çalışmalarının olmaması oldukça ilginçtir. Çünkü son zamanlarda bu ilaçlara özellikle de oseltamivire bir kurtarıcı olarak bakılmaktadır.

Bu durum göz önüne alındığında oseltamivirin ticari formu olan Tamiflu ile *in vitro* periferal insan lenfositleri ile yaptığımız genotoksisite ve sitotoksisite çalışmalarının burada önemli bir boşluğu dolduracağını düşünmekteyiz.

İşte bu çalışmanın amacı Tamiflu'nun insan periferal kan lenfositlerinde metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda genotoksik etkiye sahip olup olmadığını in vitro KKD (kardeş kromatid değişimi), KA (kromozomal aberasyon) ve MN (mikronukleus) testleriyle araştırmak ve ayrıca sitotoksik etkiyi belirlemek için de M1 (mitotik indeks), P1 (proliferasyon indeksi) ve NBI (nukleer bölünme indeksi)'sini saptamaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan Tamiflu antiviral ilacı, viral nöraminidaz inhibitörü grubuna girmektedir. Ancak genel antiviraller ve bunlarla yapılan genotoksisite ve sitotoksisite çalışmaları şu şekilde özetlenebilir.

2.1. Herpesvirüsler Grubuna Etki Eden Antiviral İlaçlar İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

2.1.1. 5-(2-Kloroetil)-2'-deoksiuridin (CEDU)

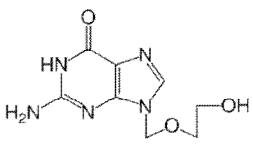
Bir primidin nükleosit anoloğu olan CEDU herpes simpleks virüs enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Staedtler ve ark. (2004) bu bileşiğin fare spot testinde açıkça mutajenik olduğunu ancak Salmonella revers mutasyon testinde zayıf bir aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. CEDU'nun beta-galaktozit (LacZ) transgenik farelerde (muta Mouse) oral olarak beş gün süresince uygulanması sonucunda dalak, akciğer ve kemik iliğinde lacZ mutant frekanslarını açıkça artırdığı bilinmektedir. Bununla birlikte araştırıcıların lacZ mutantlarıyla yaptıkları çalışmada, CEDU'nun A:T→G:C transisyonunu belirgin bir şekilde indüklediği bulunmuştur.

2.1.2. 5-substituted 2'-deoxyuridine (dUrd) analogları

Cassiman ve ark. (1983) dUrd analoglarının insan fibroblast ve lenfositlerinde KKD indükleme yeteneğini araştırmışlardır. Çalışma sonunda, (E)-5-(2-bromovinyl)-dUrd, (E)-5-(2-chlorovinyl)-dUrd, (E)-5-(2-iodovinyl)-dUrd, (E)-5-(3,3,3-trifluoro-1-propenyl)-dUrd ve (E)-5-(1-propenyl)-dUrd'nin herpes virüs replikasyonunu inhibe etmek için gerekli olan konsantrasyonun 1000-5000 katı seviyesine çıkmadığı sürece KKD'yi indüklemediği bulunmuştur. Öteki dUrd analogları (5-vinyl-dUrd, 5-ethynyl-dUrd, 5-formyl-dUrd, 5-hydroxymethyl-dUrd ve 5-trifluoromethyl-dUrd) ya virüs replikasyonu ya da tümör hücre gelişimi için gerekli olan konsantrasyonlarda KKD'yi indüklemişlerdir.

2.1.3. Asiklovir

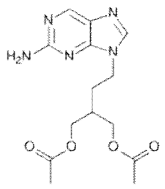
Nükleozit analoğu (bir asiklik yan zincir içeren guanin türevi) olup sadece herpes virüslere etkilidir. Asiklovir, belirgin antiviral etkinliği yanında, konakçı hücreleri üzerinde minimum toksik etki gösteren ve halen var olanlar içinde herpes virüslere etkili en seçici ilaçtır. Hem lokal ve hem de sistemik (oral ve i.v.) uygulanabilir. Asiklovir trifosfat, viral DNA polimerazı inhibe eder. Sonuçta viral DNA sentezi inhibe edilir (Simon ve Stille, 2008). Clive ve ark. (1983) oral ve genital Herpes enfeksiyonlarının tedavisinde aktif antiviral ilaç olarak kullanılan asiklovirin mutajenik ve karsinojenik potansiyelini *in vitro* ve *in vivo* kısa süreli test grubu ile değerlendirmişlerdir. *In vitro* Ames Salmonella testinde negatif sonuçlar bulunmuştur. Ayrıca fare dominant letal testinde ve sıçan ve Chinese hamster kemik iliği sitogenetik incelemelerinde herhangi bir etki bulunmamıştır. Sıra dışı klastojenik bulgular maksimum tolaresyon dozunun (MTD) 5 katı kullanılan Chinese hamsterlarda bulunmuş olup, bütün pozitif etkilerin ya yüksek konsantrasyonlardan ya da uzatılmış muamele sürelerinden (72 saat) kaynaklandığı bildirilmiştir. Benzer bir çalışmada Pizer ve ark. (1987) asiklovirin, viral timidin kinaz (TK) eksprese edilen 51-D3 hücre hattında bir dereceye kadar sitotoksik olduğunu bulmuşlardır. Başka bir çalışmada Haynes ve ark. (1996) asiklovirin *in vivo* genotoksisitesini fare kemik iliğinde mikronukleus çalışmasıyla değerlendirmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda asiklovir mikronukleuslu polikromatik eritrosit indüksiyonunu aritmetik olarak artırdığı bulunmuştur. Thust ve ark. (1996) asiklovirin Chinese hamster V79 hücrelerinde kronik uygulamasında ilacın doza bağlı olarak mitotik indeksi düşürdüğü ve hücre döngüsünde gecikmeyi artırdığını bildirmişlerdir. Yine Thust ve ark. (2000a) asiklovirin muameleden hemen sonra KKD ve kromozom aberasyonlarını indüklediğini bildirmişlerdir. Asiklovirin direkt genotoksik aktivitesi onun zorunlu zincir terminasyon aktivitesi ile açıklanmaktadır.



Asiklovir

2.1.4. Famsiklovir

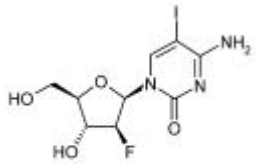
Famsiklovir, pensiklovirin diasetilesteridir; pensiklovirin ağızda alınmasından sonra bağırsak duvarında deasetilizasyon ve oksidasyonu ile oluşur. Famsiklovirin (bir prodrog) antiviral etkinliği yoktur. Pensiklovir bir viral timidinkinaz aracılığı ile fosforilizasyon yoluyla monofosfata ve hücreye özgü kinazlar aracılığı ile trifosfata dönüşüp infekte hücrelerdeki Herpes simpleks virüs (HSV) tip1 ve tip 2 ve ayrıca varisella-zoster virüs (VZV)'ün DNA sentezini inhibe eder. Böylelikle viral DNA polimerazın rekabetçi inhibitörü olarak etki gösterir (Simon ve Stille, 2008). Thust ve ark. (1996) famsiklovirin Chinese hamster V79 hücrelerinde kronik uygulamasında çalışılan klastogenik etki, KKD oluşturma etkisi, mitotik indeks ve hücre döngüsü geciktirme etkilerinin dahil olduğu dört parametrede negatif etki gösterdiğini bulmuşlardır. Araştırıcılar bu negatif etkinin muhtemelen famsiklovirin hedef hücrede metabolize olamamasından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir.



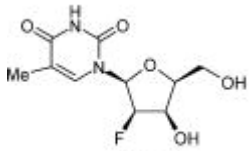
Famsiklovir

2.1.5. FIAC ve FMAU

Son zamanlarda geliştirilen pirimidin nükleositlerinden FIAC (2'-fluoro-5-iodo-1-beta-D-arabinofuranosylcytosine) ve FMAU (2'-fluoro-1-beta-D-arabinofuranosyl-5-methyluracil) doku kültürlerinde, laboratuar hayvanlarında ve insanlarda potansiyel anti-herpes virüs aktivitesi göstermektedir. Bakterial mutagenezis (Salmonella mikrozom) testinde FIAC ve FMAU'nun inaktif olduğu rapor edilmiştir. İlaveten her iki ajan da Wistar sıçanlarının *in vitro* hepatositlerinde programsız DNA sentezini indüklememiştir (Marquardt ve ark. 1982).



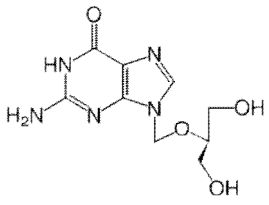
FIAC



FMAU

2.1.6. Gansiklovir

Gansiklovir de asiklovir gibi asiklik guanin nukleozid analoğudur. Sitomegalovirus üzerinde *in vitro* etkinliği, asiklovirinkine göre yaklaşık 50 kez daha güçlüdür. AIDS'li hastalar ve immünosüpresif tedavi uygulanan kemik iliği veya solid organ transplantasyonu yapılmış hastalar gibi immün yetmezliği olan kimselerde önemli bir hastalık ve ölüm nedeni olan sitomegalovirus (SMV) enfeksiyonlarının bazı şekillerinde etkilidir (Simon ve Stille, 2008). Haynes ve ark. (1996) Bir anti-herpes nükleosit analoğu olan gansiklovirin *in vivo* genotoksisitesini fare kemik iliğinde mikronukleus çalışmasıyla değerlendirmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda gansiklovir mikronukleuslu polikromatik eritrosit indüksiyonunu aritmetik olarak artırmıştır. Thust ve ark. (1996) gansiklovirin Chinese hamster V79 hücrelerinde kronik uygulamasında klastojenik ve KKD indükleme aktivitesi yönünden çok güçlü bir genotoksin olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada gansiklovirin rekombinogenik ve klastojenik aktiviteleri, Chinese hamster ovaryum (CHO) hücrelerinde incelenmiştir. Bu çalışmada gansiklovirin oldukça güçlü bir KKD indükleyici ve kromozom kırığı oluşturucu etkisi tespit edilmiş olup hedef hücrelerin proliferatif aktivitesinde karışıklıklar ve apoptozisi tetiklediği gözlenmiştir (Thust ve ark. 2000b). Yine benzer bir çalışmada Thust ve ark. (2000a) tarafından gansiklovirin genotoksik ve apoptosis indükleme potansiyeli, herpes simplex virüs-1 timidin kinaz geniyle transfekte edilmiş CHO hücrelerinde araştırılmıştır. Çalışma sonunda gansiklovirin hayli güçlü kromozom aberasyon indükleyici olup zayıf KKD uyarıcısı olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca bu ajanla hücre ölümünün ana yolunun apoptosis olduğu da gösterilmiştir.



Gansiklovir

2.1.7. HMUdR, F3TdR, MMdUrd ve EtUdR

Bilimoria ve Gupta (1986) Herpes simplex virüse karşı viral aktiviteye sahip olan dört antiviral ilacın (5-hydroxymethyldeoxyuridine (HMUdR), 5-trifluorothymidine (F3TdR), 5-methoxymethyldeoxyuridine (MMUdR) ve 5-ethyldeoxyuridine (EtUdR)) mutajenik aktivitesini Ames Salmonella/mikrozom testi ile değerlendirmişlerdir. Çalışma sonunda; F3TdR ve HMUdR antiviralleri TA100 suşunda doza bağlı mutajenite göstermişlerdir. Ayrıca F3TdR'nin, TA1535 suşunda da mutajenik etkisi gözlenmiştir. Başka bir çalışmada, MMdUrd ilacının Çin altın hamsterları ile yapılan bir çalışmada toksik etkileri incelenmiştir. MMdUrd'nin 6000 mg/kg'lık tek doz halinde intraperitonal (ip) yolla uygulanması sonucunda mitotik figürlerde artma ve nükleer ebatta farklılıklar bulunmuştur. Yüksek konsantrasyonlarda MMdUrd (1024 μg/ml) kullanımını takiben KKD sayısında bir artış gözlenmiştir (Ayisi ve ark. 1986).

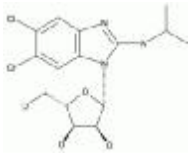
2.1.8. IDU, TFT ve BVDU

Cassiman ve ark. (1981) bazı anti-herpes ajanların potansiyel mutajenitelerini değerlendirebilmek için KKD indükleme oranını ölçmüşlerdir. 5-iodo-deoxyuridine (IDU), 5-trifluoromethyl-deoxyuridine (TFT), ve [E]-5-(2-bromovinyl)-deoxyuridine (BVDU) ajanları insan lenfosit ve fibroblastlarıyla çeşitli konsantrasyonlarda inkübe edilmiştir. Lenfosit ve fibroblastlarda BVDU ve IDU 50 mg/l konsantrasyon hariç KKD'yi indüklememiştir, halbuki TFT 0.5 mg/l'lik bir konsantrasyonda KKD oranını artırmıştır. Bir başka çalışmada BVDU ((E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine) herpes simplex virüs tip 1 (HSV-1) ve varicella-zoster virüs (VZV) enfeksiyonlarında oldukça güçlü ve seçici bir inhibitördür (De Clercq, 2005). BVDU ile yapılan mutasyon çalışmalarında ilacın 10 dan 5000 μg/petri dozlarına kadar,

Salmonella typhimurium'un TA1535, TA1537, TA1538, TA98, ve TA100 suşlarında S9 varlığında ya da yokluğunda negatif sonuç bulunmuştur. Ayrıca BVDU'nun 750 ve 1000 µg/ml'lik konsantrasyonu *in vitro* sıçan hepatosit hücrelerindeki programsız DNA sentezini artırmadığı da tespit edilmiştir. Bunun aksine BVDU L5178Y TK+/- fare lenfoma hücrelerinde S9 aktivasyon yokluğunda positif bulgular vermiştir. BVDU, CHO/hipoksantin guanin fosforibozil transferaz geninde S9 bulunmayan ortamda yine negatif sonuçlar ortaya çıkarmıştır Bununla birlikte BVDU tarafından oluşturulan mikronukleus oluşumunun uyarılması 500 ile 1750 µg/ml konsantrasyonları arasında ve S9 yokluğunda belirlenmiştir (Oshiro ve ark. 1992).

2.1.9. Maribavir (1263W94)

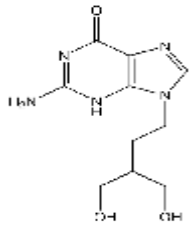
Maribavir, insan sitomegalovirus enfeksiyonlarının tedavisi için geliştirilen yeni nesil bir benzimidazol bileşiğidir. Yapılan bir çalışmada maribavir Ames veya mikronukleus deneyinde negatif sonuç vermiştir. Fare lenfoma deneyinde ise sıçan karaciğer S9 metabolik aktivasyon sistemi yokluğunda gen mutasyonuna neden olduğu zira S9 mix varlığında ise iki anlamada gelen sonuçlar elde edilmiştir. (Koszalka ve ark. 2002).


Maribavir

2.1.10. Pensiklovir

Haynes ve ark. (1996) pensiklovirin *in vivo* genotoksisitesini fare kemik iliğinde mikronukleus çalışmasıyla değerlendirmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda pensiklovir mikronukleuslu polikromatik eritrosit indüksiyonunu aritmetik olarak artırmıştır. Başka bir çalışmada Thust ve ark. (1996) pensiklovirin Chinese hamster V79 hücrelerinde kronik uygulamasında yalnızca mitotik indeksi azalttığını ve hücre döngü gecikmelerini artırdığını gözlemlemişlerdir. Yine Thust ve ark. (2000a) bir anti-herpes nükleosit anoloğu olan pensiklovirin temel olarak genotoksik aktiviteden

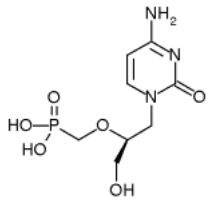
yoksun olduğunu bulmuşlardır. İlaveten pensiklovirin sadece sitotoksik/apoptotik konsantrasyonlarda KKD'yi indüklediğini ve onun zayıf genotoksik bir etkiye sahip olup prematüre kromozom kondensasyonuna yol açtığını rapor etmişlerdir. Benzer başka bir çalışmada pensiklovirin oldukça yüksek ve etkili bir şekilde apoptosisi indüklediği saptanmıştır (Thust ve ark. 2000b).



Pensiklovir

2.1.11. Sidofovir

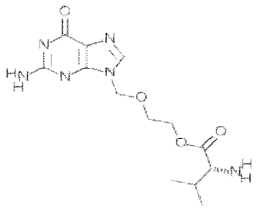
Bir dezoksisitidin nükleozit olan sidofovir nükleosit analoğu olarak etki gösterir. Enfekte ve enfekte olmayan insan hücrelerine ilişkin enzimler tarafından sidofovir monofosfat ve daha sonra etkin şekli olan sidofovir difosfata dönüştürülür. Sidofovir difosfat viral DNA polimerazı ve DNA sentezini inhibe eder. Ayrıca alternatif substrat olarak (dezoksisitidin trifosfat ile rekabete girerek) gelişmekte olan DNA zincirine yerleşip zincirin yıkımına neden olur. Sidofovir *in vitro* sitomegalovirüs (CMV)'e gansiklovirden 5 kat daha etkili olup asiklovire dirençli Herpes simpleks ve varisella-zoster virüslerine ve ayrıca Epstein-Barr virüs ve insan herpes virüs tip 6'ya da antiviral etki gösterir. Azidotimidin ve sidofovir CMV'ye karşı sinerjik etki gösterirler. Gansiklovir düşük yoğunluklarda sidofovir ile birlikte CMV'ye sinerjist, yüksek yoğunluklarda ise antagonist eki gösterir (Simon ve Stille, 2008). Wutzler ve Thust (2001) sidofovirin de dahil olduğu bir çok nükleosit analoğunun fare ve sıçanlarda kromozom aberasyonunu indüklediği ancak gen mutasyon deneylerinde ise inaktif olduğunu belirtmişlerdir. Yine kanserojenite bulguları fareler ve sıçanlarda değişken olarak bildirilmiştir.



Sidofovir

2.1.12. Valasiklovir

Valasiklovir, asiklovirin bir resorpsiyon esteri (L-valilester) olup bağırsak duvarı ve karaciğerde hızla ve tümüyle L-valin ve asiklovire parçalanır (Simon ve Stille, 2008). Thust ve ark. (1996) aynen pensiklovirde olduğu gibi valasiklovirin de Chinese hamster V79 hücrelerinde kronik uygulamasında yalnızca mitotik indeksi düşürdüğü ve hücre döngü gecikmelerini artırdığını gözlemlemişlerdir.



Valasiklovir

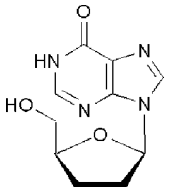
2.2. İmmün Yetmezlik Virüslerine Etki Eden Antiviral İlaçlar İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

2.2.1. Ters (Reverse) Transkriptaz İnhibitörleri İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

2.2.1.1. Didanozin

Purin nukleozid analogudur. HIV enfeksiyonlu hastalarda Zidovudinin alternatifidir. Zidovudine üstünlüğü, ona refrakter (inatçı) olan ve dayanıksızlık gösteren AIDS'li hastalarda etkili olması ve daha az myelosupresyon yapmasıdır. En ciddi ve doz-kısıtlayan yan tesiri reversibl pankreatit yapmasıdır (Simon ve Stille, 2008). Yapılan bir çalışmada didanozinin, hücre sağ kalımı ve iki reporter gendeki (HPRT ve TK) mutajenitesine olan etkisini incelemek için yapılan hücre klonlama çalışmasında 0, 33, 100 ve 300 μmol'luk konsantrasyonlardaki didanozin HPRT

(Hipoksantin fosforibozil transferaz) ve mutasyon deneylerinde pozitif sonuç alınmıştır (Carter ve ark. 2007).



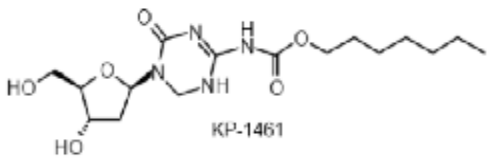
Didanozin

2.2.1.2. Dideoksinükleositler (Azidotimidin Dideoksisitidin Dideoksiadenozin ve Dideoksiinosin)

Bu anti-AIDS ilaçlarının insanda kullanılan klinik dozları fare kemik iliği mikronukleus denemesi ile değerlendirilmiştir. Fare kemik iliği hücrelerindeki sitolojik analizler dideoksinükleositlerin önemli derecede mikronukleus oluşturmadığını ve dideoksiinosinin toplam beş dozundan en yüksek konsantrasyon hariç hiç birisinin sitotoksik olmadığı bildirilmiştir (Motimaya ve ark. 1994).

2.2.1.3. KP-1212

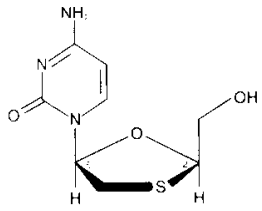
HIV'e karşı kullanılan yeni nesil bir nükleosit analoğu olan KP-1212 bir zincir terminatörü değildir. Ancak antiviral aktivitesini viral genom mutagenezi yoluyla göstermektedir. Seri HIV pasajlarında, ortamda KP-1212 bulunması virüs genomu mutasyon oranlarında bir artışa yol açmıştır. Ayrıca KP-1212 ile muamele edilen virüslerde artmış bir hassasiyet görülmüştür, bu muamele sonucunda virüslerin sadece KP-1212'ye değil diğer nükleosit revers transkriptaz inhibitörlerine hassasiyet gösterdiği bulunmuştur. Çoklu çalışmalarda KP-1212'nin diğer nükleositlerle karşılaştırıldığında oldukça düşük bir genotoksik profile sahip olduğu zikredilmiştir. İlaveten KP-1212, ne mitokondriye karşı toksiktir ne de mitokondrial DNA sentezinde herhangi bir inhibitör etkiye sahiptir (Harris ve ark. 2005).



KP-1212

2.2.1.4. Lamivudin

Lamivudin ise zalsitabinin kükürtlü analoğudur. HIV, çabuk direnç kazandığı için tek başına kullanılması tavsiye edilmez. Hepatit B virusuna karşı da etkili olduğundan kronik hepatit B'nin tedavisinde de kullanılır; interferon alfanın aksine dekompanse dönemdeki olgularda etkilidir (Simon ve Stille, 2008).



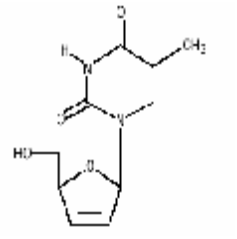
Lamivudin

Carter ve ark. (2007) lamivudinin, hücre sağ kalımı ve iki reporter gendeki (HPRT ve TK) mutajenitesini incelemek için yaptıkları hücre klonlama çalışmasında 0, 33, 100 ve 300 μmol'luk konsantrasyonlardaki ilacın HPRT ve TK mutant frekanslarında artışa neden olduğunu bulmuşlardır. Sonraki bir çalışmada (Bayram ve Topaktaş, 2008) çeşitli dozlardaki (75, 100, 125 ve 150 μg/ml) lamivudinin *in vitro* insan periferal lenfositlerinde KKD, KA ve MN oluşturma potansiyeli araştırılmıştır. En yüksek konsantrasyondaki (150 μg/ml) lamivudin 24 saatlik uygulama periyodunda KKD'yi indüklemiş, yine 125 ve 150 μg/ml konsantrasyonlarında 48 saatte KKD indüklenmiştir. Lamivudin yapısal kromozom aberasyonunu her iki uygulama periyotunda da 100, 125 ve 150 μg/ml konsantrasyonlarında önemli düzeyde artırmıştır. Bunun yanında lamivudin proliferasyon indeksini ve mitotik indeksi bütün konsantrasyonlarda ve muamele sürelerinde azaltmıştır. Mitotik indeksteki düşüş doza bağlı tarzda olmuştur. İlacın MN oluşturma etkisi ise zayıf fakat anlamlı olarak bulunmuştur. Sonuç olarak lamivudinin insan periferal lenfositlerinde zayıf bir genotoksik etkiye sahip olduğu vurgulanmıştır.

2.2.1.5. Stavudin

HIV-1'e karşı etkili pirimidin nükleozit analoğudur. Stavudin hücrelere özgü kinazlar tarafından stavudin trifosfata dönüştürülür ve bu şekilde HIV'in reverse

transkriptazını ve ayrıca zincir yapımında gerekli olan 3'-hidroksil grubunun bulunmayışı nedeniyle viral DNA sentezini de inhibe eder. Hücre DNA polimerazları ise ilaçtan az etkilenirler. Stavudin *in vitro* didanozin ile kombine edildiğinde aditif etki, ancak azidotimidin ile birlikte kısmen aditif, kısmen antagonist etki gösterir (Simon ve Stille, 2008).

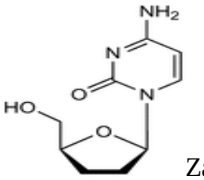


Stavudin

Carter ve ark. (2007) 100 μmol stavudin yada stavudin-lamivudin muamelesinin HPRT mutantlarında önemli bir yükselişe yol açtığını tespit etmişlerdir.

2.2.1.6. Zalsitabin

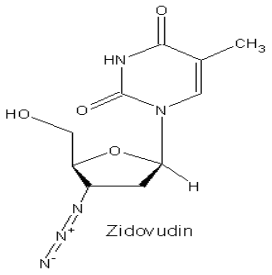
Bir sitozin (pirimidin) nukleozid analoğudur. Hücre içinde aktif trifosfat metabolitine dönüştürülerek etkinlik kazanır; bu şekilde endojen deoksisitidin trifosfat'ın, retrovirus DNA'sına katılmasını engeller ve sonuçta HIV'in replikasyonunu inhibe eder. *In vitro* testlerde en güçlü nukleosit analoğu antiretroviral ilaçlardan biridir (Simon ve Stille, 2008). Wutzler ve Thust (2001) zalsitabin ve bir çok nükleosit analoğunun kromozom aberasyonunu indüklediği ancak gen mutasyon deneylerinde ise inaktif olduğunu belirtmişlerdir. Yine aynı çalışmada bir kısım nükleosit analoğunun kanserojenite bulguları fareler ve sıçanlarda değişken olduğu bildirilmişse de zalsitabin için belirgin pozitif bulgular elde edilmiştir.



Zalsitabin

2.2.1.7. Zidovudin

Zidovudin (ZDV) ve diğer nukleozid analoglarına, tedavi süresi uzadıkça HIV'in resistans kazanma olasılığı artar. Bu nedenle iki nukleozid analogunun veya bir nukleozid analogu ile bir proteaz inhibitörünün ya da nevirapinin kombine edilmesine giderek artan bir şekilde başvurulmaktadır. Halen en yerleşmiş olan bir kombinasyon tek müstahzar (kullanıma hazır hale gelmiş ürün) halinde kombine edilmiş olan zidovudin ve lamivudin, kombinasyonudur (Combivir) (Simon ve Stille, 2008).



Zidovudin

Ayers (1988) zidovudinin (azidotimidin) toksikolojik potansiyelini incelemek için yaptığı çalışmada bir çok tür kullanmıştır. Araştırıcı gebelik esnasında ilaç verilen sıçan ve tavşanlarda herhangi bir teratojenite bulgusuna rastlamamıştır. İlaveten ilaç bakteriyel mutajenite deneyinde negatif sonuç vermiştir. Fakat memeli hücrelerinde 1000 ve 5000 µg/ml konsantrasyonlarda zayıf mutajenik olduğu bulunmuştur. Ayrıca zidovudin kültüre edilmiş insan lenfositlerinde 3 µg/ml ve daha yüksek konsantrasyonları kromozom aberasyonlarına yol açmıştır. Yine sıçanlara intravenöz yolla verilen 300 mg/kg'lık zidovudin kemik iliğinde kromozom alterasyonlarını (değişimlerini) oluşturmadığı not edilmiştir. Başka bir çalışmada Ayers ve ark. (1996) tazı köpeklerinde oral yolla verilen 62.5 dan 250 mg/kg'ye kadar ki ZDV dozları bazı dokularda sitostatik etki yaptığını not etmişlerdir. Greene ve ark. (1996) ana organogenez periyotu boyunca 250 mg/kg ZDV uygulanan sıçan ve tavşanlarda ilacın teratojenik bir etkiye sahip olmadığını açıklamışlardır. Başka bir çalışmada zidovudinin mutajenik ve karsinojenik potansiyeli fare ve sıçanlarda *in vitro* ve *in vivo* şartlarda kısa süreli testlerde çalışılmıştır. L5178Y fare lenfoma hücrelerinde (timidin kinaz (tk) +/- lokus) sadece en yüksek dozda (4000 ve 5000 µg/ml) ve metabolik aktivasyon yokluğunda zayıf pozitif sonuç bulunmuştur.

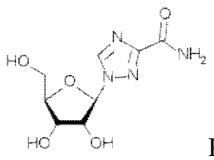
Metabolik aktivasyon mevcudiyetinde 1000 μg/ml ve daha yüksek dozlarda zayıf mutajenik olduğu bulunmuştur. Metabolik aktivasyon yokluğunda lenfosit kültürlerinin ZDV ile 24 saatlik muamelesi sonucunda 600 μg/ml doz ve üzerinde kısmen mutajenik olup doza bağlı yapısal kromozom alterasyonları 3 μg/ml ve yüksek konsantrasyonlarda gözlenmiştir. Ames Salmonella testinde (0.01 den 10 μg/ml doza kadar ki konsantrasyonlarda) herhangi bir etki gözlenmemiştir. Multidoz mikronukleus çalışmasında farelerde 7 gün boyunca 100 den 1000 mg/kg/gün doza kadarki konsantrasyonlarda mikronukleuslu eritrosit artışı görülmüştür. Benzer sonuçlara sıçan ve farelerde 500 mg/kg/günlük dozunda 4-7 günlük muamele sonunda ulaşılmıştır. Erkek fare ve sıçanlarda karsinojenitesi ile ilgili herhangi bir kanıt bulunmamıştır. Dişi farelerde 7 gün boyunca 40 mg/kg/gün verilen hayvanlarda beş kötü huylu iki iyi huylu vajinal epitelyal neoplazi oluşmuştur (Ayers ve ark. 1996).

2.3. Influenza Virüsüne Etkili Sentetik İlaçlar İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

2.3.1. Ribavirin

Ribavirin bir pürin nükleozit anoloğudur. Oldukça geniş etki alanlı olup doku kültürlerinde hem DNA hem de RNA virüslerini inhibe eder, ancak H1 virüslerine karşı etkinlik göstermez. Klinik açıdan önemi; RS virüs (solunum sinsityal virüs), hepatit C virüsü ve arenavirüslere (Lassa Ateşi etkeni) karşı etkinlik göstermesidir. Ribavirin hücrelere alındıktan sonra fosforilize olup guanozin trifosfat sentezi için gerekli bir viral enzimi (inozin-monofosfat-dehidrogenaz) inhibe eder. Bunun sonucu olarak hücre içi nukleotit havuzu fakirleşir. Ayrıca fosforilize ribavirin transkripsiyon sonucu virüs çoğalması sırasında modifiye bir guanozin molekülünün yeni oluşan mRNA ile birleşmesini önler. Viral RNA'nın bu şekilde önlenmesi ile viral proteinlerin yapımı da önlenerek virüstatik etki ortaya çıkar. Virüsteki bu duruma karşılık, insan m RNA'sı çok az etkilenir (Simon ve Stille, 2008). Hoffman ve ark. (1987) Erkek CD sıçanlarında ribavirinin dominant letal etkisini incelemişlerdir. İlaç 50, 100 ve 200 mg/kg/gün konsantrasyonlarında beş gün

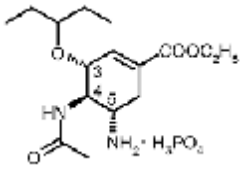
boyunca sıçanlara intraperitonal yolla verilmiştir. Çalışmanın sonunda ribavirinin bu uygulamasının sıçan dominant letal denemesinde gösterilebilir bir mutajenik potansiyelden yoksun olduğunu saptamışlardır. Başka bir çalışmada Joksić ve ark. (2000) *in vitro* periferik kan kültüründe sitokinez bloklama metoduyla yaptıkları gözlemlerde ribavirinin 0.05 ve 0.65 μmol/ml konsantrasyonlarda mikronukleus frekansını oldukça düşük seviyelerde indüklediğini bununla birlikte hücresel proliferasyonda belirli bir gecikmeyi uyardığını da tespit etmişlerdir. Narayana ve ark. (2002a) ribavirinin mutajenitesini erkek Wistar sıçanlarında sperm morfolojisi incelemesiyle belirlemeye çalışmışlardır. Deney grubunda ribavirinin indüklediği sperm baş ve kuyruk anomalilerini tespit etmişlerdir. Araştırıcılar bu sonuca göre ribavirinin sıçan germ hücrelerinde mutajenik olduğunu bildirmişlerdir. Yine Narayana ve ark. (2002b) aynı yıldaki başka bir araştırmada ribavirin antiviral ilacının genotoksik ve sitotoksik etkilerini sıçan kemik iliği hücrelerinde mikronukleus testi ile incelemişlerdir. Araştırıcılar ribavirinin 10, 15, 20, 30, 50, 75, 100 ve 200 mg/kg dozlarını sınamışlardır. İnceleme sonucunda ribavirinin sıçan kemik iliği hücreleri için genotoksik ve sitotoksik bir ajan olduğunu belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada ribavirin kullanılan Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığına yakalanmış hastaların kanlarında olası genotoksik etkiyi mikronukleus ve KKD testleriyle değerlendirmişlerdir. Bu çalışmadaki kısa süreli genotoksisite testleri önce tedavi esnasında yapılmış ardından bir ay sonra aynı testler tekrarlanmıştır. KKD ve MN oranları, tedavi sırasındaki kanda tedaviden bir ay sonraki kana göre daha yüksek bulunmuştur. Araştırıcılar bu sonuca göre, ribavirinin insanlarda reversibl *in vivo* genotoksik etkili olduğunu ortaya koymuşlardır (Tatar ve ark. 2005). Benzer bir çalışmada Joksić ve ark. (2006) nükleotidlerin de novo senteziyle ilgili ribavirinin indüklediği genotoksisitenin B12 vitaminiyle azaltıldığını bulmuşlardır. Chevaliez ve ark. (2007) ribavirinin hepatit C virüslerinin genomlarında mutasyon birikimini uyarmadığını bulmuşlardır.



Ribavirin

2.3.2. Oseltamivir

Oseltamivir (Tamiflu) Gilead Sciences (ABD) firmasına ait GS 4104 ile aynıdır. Bu ilaç prodrog (etilester) olarak ağızdan verildiğinde iyi emilir. Organizmada enzimatik etki ile etkin madde olan Ro 64-0802 (GS 4071)'e dönüşür. Bu madde, influenza A ve B nöraminidazın kompetatif inhibitörü (bir sialik asit analoğu) olup tüm insan influenza virüs suşlarına etkilidir (Simon ve Stille, 2008). Hurt ve ark. (2009) H274Y nöraminidaz mutasyonunun oseltamivirin etkinliğini azalttığını (yabani tip ile karşılaştırıldığında 900 ila 2500 kat) belirtmişlerdir. Bununla birlikte çift H274Y/I222M nöraminidaz mutasyonunun direnç üzerine daha fazla bir etkisi olduğunu açıklamışlardır, buradaki hassasiyet azalması yabani tip ile karşılaştırıldığında 8000 kata kadar çıkabileceğini rapor etmişlerdir. Bu çalışmayla neredeyse eş zamanlı olarak "Amerikan Hastalık kontrol ve koruma merkezi" (Centers for Disease Control and Prevention (CDC)) 2009 verilerine göre oseltamivirle tedavi edilen ileri seviyede immunosupresyona sahip H1N1'li iki hastada antiviral tedaviye karşı bir direnç gelişimi olduğu bildirilmiştir. Her iki hastadan elde edilen viral RNA'sının sekuenslenmesi sonucunda nöraminidazlarının 275. pozisyonunda (H275Y) histidin→tirozin değişim mutasyonu tespit edilmiştir.



Oseltamivir

2.4. Diğer Virüs Gruplarına Etki Eden Antiviral İlaçlar İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

2.4.1. 4'-Hydroxy-3-methoxyflavonlar

4'-Hydroxy-3-methoxyflavonlar poliomiyelit ve rinovirüsler gibi pikornovirüslere karşı bilinen antiviral aktivite gösteren doğal bileşiklerdir. Yapılan

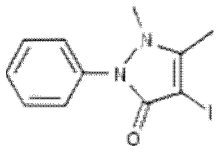
çalışmalar sonucunda bu bileşiklerin 2.5 mg konsantrasyonlarda ve daha üstünde Ames testinde mutajenik olmadığı görülmüştür (De Meyer ve ark. 1991).

2.4.2. Beta-L-adenosine

Bir anti-hepatit B analoğu olan beta-L-adenozin bileşikleri (beta-L-2'-deoxyadenosine (beta-L-dA), beta-L-2',3'-dideoxyadenosine (beta-L-ddA) ve onun iki bis (S-acyl-2-thioethyl; SATE) fosfotriester türevi, beta-L-2',3'-dideoxyadenosine-5'-monophosphate-bis(MeSATE) ve beta-L-2',3'-dideoxy-adenosine-5'-monophosphate-bis(tButylSATE) *in vitro* şartlarda güçlü ve seçici anti-hepatit B etkisi daha önceden gösterilmiştir. Bu çalışmada Ames testi ile yukarıda adları yazılı dört bileşiğin hiçbiri 100 µg konsantrasyonda mutajenik değildir. Ayrıca insan lenfositleriyle yapılan komet deneyi çalışmasında yine bu bileşiklerin metabolik aktivasyon varlığında ya da yokluğunda DNA iplik kırıklarına yol açmadığını bulmuşlardır (Placidi ve ark. 2001).

2.4.3. Iodoantipyrine

Saratikov ve ark. (1998) bir nonsteroit inflamasyon preparatı olarak kullanılan ve yeni nesil bir antiviral olarak da kabul edilen iodoantipyrine[1] ile sıçan ve köpeklerde yaptıkları çalışmalarda bu ilacın 50, 100 ve 250 mg/kg'lık konsantrasyonlarının mutajenik ve allerjenik özelliklere sahip olmadığını ve üreme fonksiyonlarını etkilemediğini saptamışlardır.



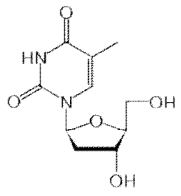
Iodoantipyrine

2.4.4. Telbivudine

Bridges ve ark. (2008) yeni nesil nukleosit türevi ve kronik hepatit B'li hastalar için önerilmekte olan telbivudinin genotoksik ve karsinojenik potansiyelini

[1] Coxsackievirus B3 (CVB3) ile enfekte olmuş farelerde terapötik ve profilaktik etkisi vardır. Coxsackievirus B3 akut ve kronik miyokarditin ana patojenidir.

sıçan ve maymunlarda araştırmışlardır. Sonuç olarak ilacın herhangi bir genotoksisitesi veya karsinojenik etkisi bulunmamıştır.



Telbivudin

2.4.5. Antiviral Özellikleri Olan Çeşitli Nükleosit Anologları

El Tarras ve ark. (1989) antiviral özellikleri olan beş nükleobaz analoğunun (6-azathymine, 5-azadihydrouracil, 6-Azauracil, 5-azauracil, ve 5-azadihydro-1,3-diacetyluracil) mutajenitesini test etmek için S. typimurium'un TA1535, TA1537, TA1538, TA98 ve TA100 mutant suşlarını metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda test etmişlerdir. Bir bakteri suşunda 6-azathymine metabolik aktivasyon yokluğunda revertant sayısını artırdığını ve aynı bileşiğin S9 mix varlığında öteki test suşlarında mutajenik olduğunu bulmuşlardır. Çeşitli nukleosit analogları HTLV-III/LAV virüsü ile enfekte olmuş insan hücrelerinde viral replikasyonu inhibe eden terapötik ilaçlar olarak kullanılmaktadır. Phillips ve ark. (1991)'nın yaptıkları bir çalışmada yedi nükleosit analoğu (6-thioguanine, Cytarabine HCl, 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT), Ribavirin, 2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine, 2',3'-dideoxyadenosine, 2',3'-dideoxycytidine) ve iki analoğun bir kombinasyonu (AZT)/2',3'-dideoxycytidine) fare kemik iliği mikronukleus testi ile değerlendirmiştir. Ardı ardına üç gün boyunca test kimyasalları ile muamele edilen erkek B6C3F1 farelerinde hemen hemen bütün kimyasalların mikronukleuslu polikromatik eritrosit sayısını önemli seviyede artırdığını bulmuşlardır.

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada materyal olarak sağlıklı ve sigara içmeyen aynı yaşlarda (24 yaş) bir bayan ve bir erkekten alınan periferik kan ve test maddesi olarak da bir nöraminidaz inhibitörü tipi antiviral ajanı olan oseltamivirin ticari formu Tamiflu antiviral ilacı kullanılmıştır.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.1.1.1.Tamiflu

Roche 1996 yılında, Gilead firmasından bu ilacı geliştirmek ve pazarlamak için bütün haklarını satın almıştır. Tamiflu 1999/2000 yıllarında Kuzey Amerika'da (ABD ve Kanada'da) ve İsviçre'de eczanelerde satılmaya başlanmıştır. Bütün kilit Avrupa pazarlarında 2002/2003'te sunulmuştur. Otuz üç milyondan fazla hasta, Amerika birleşik devletleri, Japonya, Kanada, Avustralya, AB, İsviçre, ve Latin Amerika dâhil olmak üzere, dünyanın dört bir yanında yaklaşık 80 ülkede Tamiflu ile tedavi edilmiştir (Roche, 2009).

Tamiflu üretim sürecinin başlangıç malzemesi olan şikimik asit, yıldız anasondan elde edilmektedir. Anasondan elde edilen özün yanı sıra, Roche ayrıca şikimik asit üretmek üzere bir fermantasyon sürecide geliştirmiştir. Tamiflu'nun üretimi karmaşıktır ve bazıları komplike olarak nitelendirebilecek 10 ana adımdan oluşmaktadır. Bütün maddeler temin edildiği zaman üretim yaklaşık 6-8 ay sürer, ancak işe sıfırdan başlayan herhangi bir taraf için Tamiflu üretilmesi 2-3 yıl sürebilir (Roche, 2009).

3.1.1.1.(1) Tamiflu'nun aktif metabolite dönüşümü ve virüslere etkisi

Tamiflu'nun etken maddesi oseltamivir fosfatın oral uygulanmasından sonra, mide ve barsak kanalından hızla emilir ve çoğunlukla karaciğerde bulunan hepatik esterazlarla aktif metabolit olan oseltamivir karboksilata dönüştürülür. Uygulanan

doz sonrası aktif metabolitin plazma konsantrasyonları 30 dakika içinde ölçülebilir düzeye, 2-3 saat içinde ise yaklaşık maksimum düzeye ulaşır. Oral dozun en az % 75'i aktif metabolit olarak dolaşım sistemine girer. Aktif metabolit ileri metabolizasyona uğramaz ve idrarla elimine edilir. Oseltamivir fosfat, influenza virüsünün nöraminidaz enzimlerinin etkili ve selektif bir inhibitörü olan oseltamivir karboksilatın (OK) ön ilacıdır. Viral nöraminidaz enzimi, hem enfekte olmamış hücrelere viral giriş için hem de yeni oluşmuş virüs partiküllerinin enfekte olmuş hücrelerden salınımı ve bulaşıcı virüsün vücutta daha fazla yayılmasında önemlidir. Oseltamivir karboksilat, influenza A ve B virüslerinin nöraminidaz enzimlerini bloke eder (Roche, 2009).

3.1.1.1.(2). Tamiflu'nun kullanım şekli

Influenza tedavisi için standart doz influenza semptomlarının görüldüğü ilk veya ikinci günde tedaviye başlanmalıdır.

Yetişkinler ve adolesanlar (ergenlik çağında olan bireyler): Yetişkinler ve ≥13 yaşındaki adolesanlarda tavsiye edilen doz, 5 gün boyunca günde iki kez 75 mg kapsüldür. Çocuklar, tavsiye edilen Tamiflu süspansiyon dozlarına alternatif olarak kapsül yutmada zorluk çekmeyen >40 kg ağırlığındaki veya ≥8 yaşındaki çocuklar da, günde iki kez 75 mg kapsül ile tedavi edilebilirler. ≥1 yaşındaki çocuklar için 5 gün süre ile tavsiye edilen oral Tamiflu süspansiyon dozu: ≤15 kg için günde iki kez 30 mg, >15 - 23 kg için günde iki kez 45 mg, 23 - 40 kg için günde iki kez 60 mg, >40 kg için günde iki kez 75 mg.

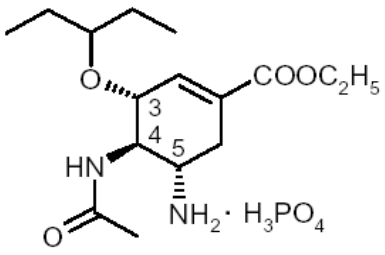
Influenzanın önlenmesi için standart doz - Yetişkinler ve adolesanlara, enfekte kişilerle yakın teması takiben, influenzanın önlenmesi için tavsiye edilen oral Tamiflu dozu on gün boyunca, günde bir kez 75 mg'dır. Yakın temas sonrası iki gün içinde tedaviye başlanmalıdır. İnfluenza salgını sırasında influenza etkisini önlemek için tavsiye edilen doz günlük 75 mg'dır. Altı haftalık süre içerisinde Tamiflu'nun güvenilirlik ve etkinliği kanıtlanmıştır. Çocuklar, tavsiye edilen Tamiflu süspansiyon dozlarına alternatif olarak kapsül yutmada zorluk çekmeyen >40 kg ağırlığındaki çocuklar, profilaktik (tedavi edici) olarak on gün boyunca, günde bir kez 75 mg kapsül alabilirler. ≥1 yaşındaki çocukların tedavi edici olarak kullanılabilecekleri

Tamiflu süspansiyon dozu*:* ≤15 kg için günde bir kez 30 mg, >15 - 23 kg için günde bir kez 45 mg, 23 - 40 kg için günde bir kez 60 mg, >40 kg için günde bir kez 75 mg'dırCD (Roche, 2009).

Ruhsat Numarası: 18.09.2003-114/70

Üretim yeri: F. Hoffman-La Roche Ltd., Basel,İsviçre

Açık formülü:



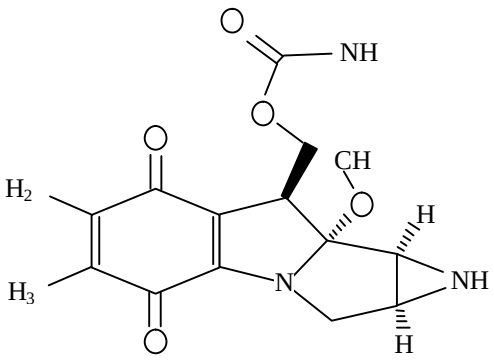
Kimyasal Adı: (3R,4R,5S)-4-Asetilamino-5-amino-3-(1-etilpropoksi)-1-siklohekzene-1-karboksilik asid etil ester

CAS No: 204255-11-8

3.1.1.2. Mitomycin C (MMC) (Sigma)

Mitomycin C, bu çalışmanın S9mix'siz bölümünün 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Açık formülü:



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: >360 °C

CAS No: 50-07-7

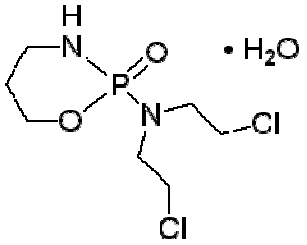
3.1.1.3. Cyclophosphamide monohydrate (Sigma)

Cyclophosphamide monohydrate bu çalışmanın S9 mix'li bölümünde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Kimyasal adı: *N*,*N*-bis(2-chloroethyl)-1,3,2-oxazaphosphinan-2-amine 2-oxide

Kapalı formülü: $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P*H_2O$

Açık formülü:



Molekül ağırlığı: 279.1 g/mol

Erime noktası: 49-51 °C

CAS No: 6055-19-2

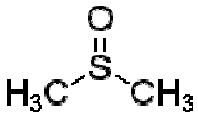
3.1.1.4. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma

DMSO, bu çalışmada Tamiflu'nun eriticisi olarak kullanılmıştır.

Kimyasal adı: Dimethyl Sulfoxide

Kapalı formülü: C_2H_6SO yahut $(CH_3)_2SO$

Açık formülü:



Molekül ağırlığı: 78.13

Yoğunluğu: 1.1 g/cm^3

Kaynama noktası: 189 °C

Erime noktası: 16-19 °C

Saflık düzeyi: ≥ %99.9

CAS No: 67-68-5

3.1.1.5. Kromozom Mediumu

Biochrom firmasının ürettiği Chromosome Medium B (Cat No. F 5023), hücre kültürü yapmak için kullanılmıştır. Chromosome Medium B'nin her litresinde aşağıdaki bileşikler belirtilen miktarlarda bulunmaktadır:

MEM JOKLIK with

Non essential Amino Acids……. 850 ml

Heparin…..... 25.000 E

Penicillin G, Sodium Salt……..... 75.000 E

Streptomycin Sulphate…… 50 mg

Phytohemagglutinin L…… .2.5 mg

Bu medyum her tüpte 2.5 ml olacak şekilde steril kültür tüplerine steril şartlarda paylaştırılmış ve bu şekilde kullanılmıştır. Kültür tüpleri steril olarak temin edilmiştir.

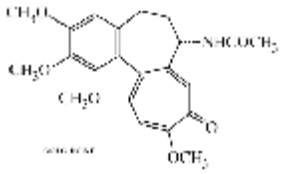
3.1.1.6. Kolkisin (Sigma)

Kolkisin (Colchicine), preparatların hazırlanmasında mitotik zehir olarak kullanılmıştır. Kolkisin eriyiği steril saf su içerisinde hazırlanmış ve kromozom medyumunun her mililitresinde 0.06µg olacak şekilde (0.06 µg/ml) 2.5 ml'lik kromozom medyumuna ilave edilmiştir. Kolkisine ait özellikler aşağıda verilmiştir.

Kimyasal adı: Colchicine

Kapalı formülü: $C_{22}H_{25}NO_6$

Açık formülü:



Molekül ağırlığı: 399.4

Etil asetat içeriği: %3.4

Kloroform içeriği: < %0.1

Sigma No: C-9754

3.1.1.7. Hipotonik Eriyik

% 0.4'lük KCI (Merck) hipotonik eriyik olarak kullanılmıştır. Eriyik bidistile su içerisinde stok halinde hazırlanıp, ağzı kapalı cam kap içerisinde buzdolabında (+4°C) saklanmıştır. Her preparasyondan yaklaşık bir saat önce yeterli miktarda hipotonik eriyik alınmış, 37ºC'deki inkübatörde ısıtılarak kullanılmıştır.

3.1.1.8. Fiksatif

KKD ve KA deneylerinde 1 hacim asetik asit'in 3 hacim metanol ile karıştırılması sonucu hazırlanan fiksatif kullanılmıştır.

MN deneyleri için birinci fiksatif, 1 hacim glasiyal asetik asit: 5 hacim metanol ve 6 hacim % 0.9 NaCI (1/5/6 glasiyal asetik asit/metanol/% 0.9'luk NaCI) karıştırılarak hazırlanmıştır. Diğer iki fiksatif ise 1 hacim glasiyal asetik asit ve 5 hacim metanol'ün (1/5 glasiyal asetik asit/metanol) karıştırılması ile hazırlanmıştır. Fiksatifler, her preparasyonda kullanılmadan iki saat önce hazırlanarak buzdolabında saklanmıştır.

3.1.1.9. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd) (Sigma)

BrdUrd kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını belirleyebilmek amacıyla kullanılmıştır. BrdUrd eriyiği steril saf su içerisinde hazırlanmıştır. Bu eriyikten 50

µl alınarak kültür tüplerine ilave edildiğinde kültür, son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde BrdUrd içermiştir.

Kimyasal adı: 5'-Bromo-2'-deoxyuridine
Kapalı formülü: $C_9H_{11}BrN_2O_5$
Molekül ağırlığı: 307.10 g/mol
Erime noktası: 191-194 °C
CAS No: 59-14-3
Sigma No: B 5002

3.1.1.10. Sorensen Tamponu

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

Hazırlanışı

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

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

KKD'yi incelemek amacıyla preparat yapımı sırasında preparatlar Sorensen tamponu içerisinde UV lambası ile ışınlandırılmıştır. Ayrıca bu tampon % 5'lik Giemsa boyası hazırlanmasında da kullanılmıştır.

3.1.1.11. Standart Saline Citrate (SSC) Eriyiği

11.05 gr tri sodyum sitrat ($C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$) tartılarak bir miktar saf su içerisinde eritilmiştir. Daha sonra 21.9 gr NaCI tartılarak yine saf su içerisinde ancak ayrı bir kapta eritilmiştir. İki eriyik, bir şişeye dökülerek iyice karıştırılmış ve üzerine 500 ml oluncaya kadar saf su ilave edilmiştir. Hazırlanan bu stok eriyik 5 x SSC'dir

ve bu eriyik buzdolabında saklanmıştır. KKD'yi incelemek için deney yapılırken bu stoktan 20 ml alınarak üzeri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlanmış ve elde edilen 1 x SSC eriyiği kullanılmıştır.

3.1.1.12. Giemsa (Merck)

Giemsa boyası Merck firmasından (Cat. No. 9204) temin edilmiş olup, deneylerimizde Sorensen tamponu içinde hazırlanmış % 5'lik boya eriyiği kromozomları ve MN testinde nukleusları boyamak için kullanılmıştır.

3.1.1.13. Entellan (Merck)

Hazırlanan preparatları daimi hale getirmek amacıyla lam ile lameli birbirine yapıştırmak için kullanılan şeffaf yapışkan sıvıdır (Cat. No. 7961).

3.1.1.14. Nitrik Asit (HNO_3)

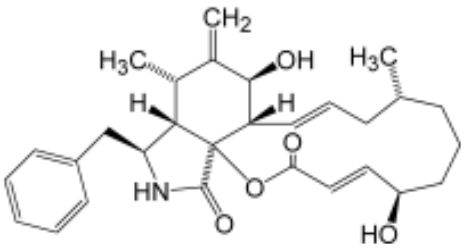
Lamları temizlemek amacıyla 1N HNO_3 çözeltisi kullanılmıştır. Plastik şişede saklanarak her defasında tekrar takrar kullanılmıştır.

3.1.1.15. Cytochalasin B (Sigma)

Mikronukleus (MN) testinde, hücre bölünmesi sırasında sitokinezi engellemek ve iki nukleuslu hücreler oluşturmak amacıyla kullanılmıştır.

Kimyasal adı: Cytochalasin B
Kapalı formülü: $C_{29}H_{37}NO_5$
Molekül ağırlığı: 479.61 g/mol
Erime noktası: 218-223 $^{\circ}$C
Kaynama noktası: 218-223 $^{\circ}$C
Saflık düzeyi: %98
CAS No: 14930-96

Açık formülü:



Sigma No: C-6762

3.1.1.16. Standart S9mix (Memeli Karaciğer Fraksiyonu [S9])'nun Hazırlanması

Bu deneyin 2. bölümünde test maddesinin indirekt mutajenik etkiye sahip olup olmadığını belirlemek amacıyla sıçan karaciğerinden elde edilen enzimler ile magnezyum-potasyum tuzları ve sodyum fosfat tamponunun kombinasyonundan oluşan S9mix kullanılmıştır.

3.1.1.16.(1) Sıçan Karaciğer Enzimlerinin İndüklenmesi

3-Metilkolantren ml'ye 64 mg olacak şekilde mısır yağında eritilmiş ve 80 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde 0.5 ml i.p. olarak erkek sıçanlara uygulanmıştır. Sıçanlar bununla 5 gün boyunca muamele edilmiştir. Bu süre içerisinde sıçanlar normal besin ile beslenmiştir. Öldürülmeden 12 saat önce sıçanlara sadece su verilmiş, yemek verilmemiştir. Süre sonunda sıçanlar boyunları kırılarak öldürülmüştür.

Karaciğer enzimleri için diğer türlerin bir çok dokusu kullanılabilmesine rağmen genel olarak enzimlerin aktivasyonu açısından en iyisi sıçan karaciğeridir. Karaciğer enzimlerine S9 adı verilir. Metabolik aktivasyona ihtiyaç duyan (indirekt mutajenler ve kanserojenlerin araştırılmasında en etkili yol indüklenmiş hayvanlardan hazırlanacak S9'un kullanılmasıdır.

Karaciğer enzimlerini indükleyen maddeler içerisinde en iyisi Aroclor 1254 olmasına rağmen, phenoborbitol ve 3-metilkolantren de bu amaç için rahatlıkla kullanılabilir.

3.1.1.16.(2) Karaciğerin Alınması

Temiz S9 preparasyonu elde etmek için karaciğer steril şartlarda alınmıştır.

Yöntem: Servikal dislokasyon ile öldürülen hayvanların göğüs bölgesi tıraş edilmiştir. Tıraş edilen bölge %70'lik etanol ile silinmiştir. Tüyler kesilmeyecekse göğüs bölgesi iyice steril edilir. Steril aletlerle göğüs bölgesindeki deri açılmış ve iyice gerdirilmiş, tekrar alkol ile temizlendikten sonra göğüs bölgesi steril makas ile açılmıştır. Kontaminasyonu engellemek için göğüs kafesi açılırken özofagus ve bağırsakların yırtılmamasına dikkat edilmiştir. Daha sonra karaciğer alınmıştır.

3.1.1.16.(3) Karaciğer Homojenat S9 Fraksiyonlarının İşlenmesi

Karaciğer S9 fraksiyonlarının hazırlanması Garner ve ark.'nın (1972) metoduna göre yapılmaktadır. Çalışmanın bütün aşamaları 0-4ºC'de steril ortamda ve steril ekipmanlarla yapılmıştır. Çıkarılan taze karaciğer darası alınmış petri kabına konulmuş, tartılmış ve her bir gramına 1 ml olacak şekilde soğuk 0.15 M KCl ilave edilmiştir. Sıçan karaciğeri yaklaşık 10-15 g civarındadır. Karaciğer soğuk KCl ile birkaç defa yıkanmıştır. KCl ile yapılan yıkama, steril doku eldesi ve hemoglobinin uzaklaştırılması için gereklidir. Hemoglobin, sitokrom P450 enzimlerinin aktivitelerini yok edebilir. Yıkanan karaciğer, 3 ml/gr olacak şekilde 0.15 M KCl içeren bir kaba aktarılmış, steril makas ile dilimlenmiş ve homojenize edilmiştir. Homojenat 9000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant (S9 fraksiyonu) başka bir tüpe alınmıştır. Steriliteden şüphelenilmesi durumunda sterilite kontrolü yapılabilir. Sterilite kontrolü için histidin-biyotin içeren MGA besiyerine ekim yapılır. 1 ml'lik S9 fraksiyonu yaklaşık 250 mg karaciğer mikrozom fraksiyonu içerir. Bu S9 fraksiyonunun protein miktarı da yaklaşık 40 mg/ml'dir. Taze S9 fraksiyonları 1 ml olacak şekilde ependorf tüplerine paylaştırılmıştır. -20ºC'de dondurulmuş ve -80ºC'de saklanmıştır. Mutajenik çalışmalar için S9 fraksiyonu

gerekli olduğunda, donmuş S9 fraksiyonu oda ısısında çözülür ve kuru buz üzerinde korunur. S9 mix ise, S9 çözüldüğü anda hazırlanmalıdır. S9mix'in sterilitesi de denenebilir. Kontaminasyon olması durumunda S9 mix 0.45 µm'lik membran filtre ile steril edilebilir. Fakat filtre ile sterilizasyonda enzimlerin kaybolma riski vardır ve zorunlu olmadıkça uygulanmamalıdır. Zaten yukarıda da belirtildiği gibi aseptik şartlarda çalışılması durumunda kontaminasyon olması son derece zayıf bir ihtimaldir.

Sıçan karaciğeri dışında sıçanların akciğeri, fare ve hamster karaciğeri ve hatta insan otopsi karaciğeri bile S9 fraksiyonu elde etmek için kullanılabilir. İşlemler yukarıda belirtilen şekilde yapılmasına rağmen akciğer dokusunu homojenize etmek zordur. Çünkü akciğerde bulunan fibröz tabaka onun homojenizasyonunu zorlaştırır. Ayrıca, karaciğer steril olmasına rağmen akciğer bakteri florası içerebilir.

Eğer sterilizasyon gerekiyorsa, S9 fraksiyonu mix ile karıştırıldıktan sonra filtre edilmelidir, aksi takdirde filtreyi tıkar. Vakum ile yapılan filtrasyon S9 enzimlerini denatüre edebilmektedir. Bunun yerine, basınç ile filtrasyon daha yararlıdır.

Standart S9mix hazırlanması	20 ml için	100 ml için
Sıçan karaciğer S9 fraksiyonu	2ml	10 ml
$MgCl_2$ – KCl tuzları	0.25 ml	1.25 ml
1M G-6-P	0.04 g	0.2 g
0.1 M NADP	0.102 g	0.510 g
0.2 M fosfat buffer	6.25 ml	32.25 ml
Steril saf su	20 ml'ye tamamlanır	100 ml'ye tamamlanır

3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları

3.1.2.1. Hassas Terazi

Hava akımlarına karşı özel cam paravanlarla korunan ve 0.0001 gr hassasiyetindeki GEC AVERY marka terazi kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.

3.1.2.2. Santrifüj

Çalışmalarda rotor çapı 18 cm, 4000 rpm'e kadar yükselebilen devir hızı, 99 dakikalık zaman ayarlayıcı ve 28 tüp kapasiteli HETTICH UNIVERSAL marka santrifüj kullanılmıştır.

3.1.2.3. Mikroskop

Koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan OLYMPOS CX21 marka ışık mikroskobu preparatları incelemek için kullanılmıştır.

3.1.2.4. İnkübatör

Hücre kültürünün yapılmasında ve bazı eriyiklerin 37ºC'ye kadar ısıtılmasında INCUCELL marka $0^{\circ}C$ –$100^{\circ}C$ ayarlanabilir inkübatör kullanılmıştır.

3.1.2.5. Flow Kabin (Steril Kabin)

Hücre kültürü tüplerine kromozom mediumu konulması, kan ekiminin yapılması, test eriyikleri ve S9mix'in hazırlanması 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 ampülü olan LABORMED marka flow kabin kullanılmıştır.

3.1.2.6. Su Banyosu

Hücre kültürü preparatları hazırlandıktan sonra, kardeş kromatidlerin farklı boyanmasında kullanılan SSC eriyiğinin 58-60 °C'de sabit kalmasını sağlamak amacıyla BM 302 NÜVE marka 0–60 °C ayarlanabilir, zaman ayarlı su banyosu kullanılmıştır.

3.2. Lamların Temizlenmesi

Kültür süresinin bitiminden iki gün önce, etiketli olan lamlar dik şaleye dizilmiş ve şale, lamların üzeri iyice örtülecek şekilde 1 N HNO_3 çözeltisi ile doldurulmuştur. Şalenin ağzı kapatılarak 24 saat bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda lamlar, yarım saat boyunca akan çeşme suyunda iyice yıkanmıştır. 3-4 defa saf sudan geçirildikten sonra şale saf su ile doldurularak buzdolabında saklanmıştır.

3.3. Sterilizasyon

3.3.1. BrdUrd Eriyiğinin Sterilizasyonu

BrdUrd eriyiği steril bir erlen içinde bulunan ve steril olan saf su içinde 5'-bromo-2'-deoxyuridine maddesinin eritilmesiyle hazırlanmıştır. Bu eriyik Flow kabini sayesinde sağlanan steril şartlarda por çapı 0.2 µm olan bakteri filtresinden (Sartorius, membran filtre) geçirilerek steril edilmiştir. Sonra vida kapaklı steril cam kültür tüplerine konulan bu eriyik, etrafı alüminyum folyo ile kapatılarak buzdolabında saklanmıştır.

3.3.2. Cyclophosphamide monohydrate'nin Sterilizasyonu

270 mg (0.27 g) cyclophosphamide monohydrate, içinde 30 ml destile su bulunan bir beherde eritildikten sonra millipore sterilizasyon aygıtı kullanılarak por çapı 0.2 µm olan bakteri filtresinden (Sartorius, membran filtre) geçirilerek steril edilmiştir.

3.3.3. Saf Suyun Sterilizasyonu

Temiz bir vida kapaklı 100 ml'lik kültür şişesine saf su doldurularak şişenin ağzı pamukla iyice kapatılmıştır. Sterilizasyon esnasında otoklavdaki buhardan pamuğun ıslanmaması için üzeri alüminyum folyo ile örtülmüştür. Şişedeki saf su otoklavda 1.2 atm buhar basıncında ve 120 °C'de 20 dakika steril edilmiştir.

3.4. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) (Sister Chromatid Exchange= SCE) ve Kromozom Anormalliklerini (KA) (Chromosomal Aberration=CA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması

3.4.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması (S9 mix'siz test)

Sağlıklı ve sigara içmeyen bir bayan (24 yaşında) ve bir erkekten (24 yaşında) alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş periferik kan örneklerinden 6 damla (0.2 ml) steril şartlarda 2.5 ml'lik kromozom medyumuna ekilmiştir (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991). Yine steril şartlarda daha önceden hazırladığımız BrdUrd eriyiğinden her tüpe son konsantrasyonu 10 µg BrdUrd/ml medium olacak şekilde ilave edilerek iyice karıştırılmış ve hücre kültürü 37±1ºC'de 72 saat boyunca inkübe edilmiştir.

Tamiflu'nun etkisini incelemek amacıyla kültür bitiminden 24 ve 48 saat önce 0.5, 1 ve 2 µg/ml eriticide (DMSO) çözülen Tamiflu kültür tüplerine ilave edilmiştir. Ayrıca her deneyin bir kontrolü, DMSO ilave edilmiş bir eritici kontrolü ve MMC ilave edilmiş pozitif kontrolü vardır. Eritici kontrolde, kültür tüpüne 3.7 µl DMSO/ml olacak şekilde DMSO konmuştur. Pozitif kontrolde, kültür tüpüne MMC son konsantrasyonu 0.25 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiştir.

Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (kültürün 70. saatinde) her tüpe hazırlanan kolkisin eriyiğinden 30 µl (0.06 µg/ml) ilave edilmiş ve tüpler hafifçe sallanarak karıştırılmıştır.

Kültür süresinin sonunda (72. saatin bitiminde) kültür tüpleri 2000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri içeren 0.5-0.7 ml'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, inkübatörde 37ºC'ye kadar ısıtılan hipotonik eriyik ilave edilmiştir. Bu eriyiğin ilavesi damla damla ve karıştırarak yapılmıştır ve hücre süspansiyonu pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Aksi halde hücrelerde kümeleşme olmakta ve amaca uygun preparatlar hazırlanamamaktadır. Her tüpe 10 ml hipotonik eriyik (%0.4 KCI) ilave edildikten sonra ağzı kapatılan tüpler inkübatöre konmuştur. Hücreler 37ºC de 5 dk. boyunca hipotonik eriyik ile muamele edilmiştir. Sürenin sonunda tüpler 1200 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda süpernatant atılmıştır.

Daha sonra hipotonik eriyik ilavesinde olduğu gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 10 ml olacak şekilde soğuk fiksatif (1/3=Glasial asetik asit/Metil alkol) ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 20 dk. fiksatif ile muamele edilen hücreler 1200 rpm' de 10 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem üç kere tekrarlanmıştır. Üçüncü kez fiksatifle muamelenin sonunda tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görülmüştür. Son santrifüjden sonra dipte 0.5-0.7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atılmış ve preparat yapma işlemine geçilmiştir.

Tüpün dibinde kalan hücreler pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Pasteur pipetine 4-5 damla olacak şekilde hücre süspansiyonundan çekilmiştir. Özel olarak hazırlanmış düzeneğe tutturulan pasteur pipetinden daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanan lamın üzerine 70 cm yükseklikten farklı alanlara birer damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerine yayılması sağlanmıştır. Hücre süspansiyonunun lamlara dağıtılması esnasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edilmiştir.

Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.

3.4.2. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması (S9 mix'li test)

Tamiflu'nun indirekt genotoksik etkisini araştırmak amacıyla kültürün bitiminden 24 saat önce 0.5, 1 ve 2 µg/ml Tamiflu 0.5 ml S9 mix ile birlikte tüplere ilave edilmiştir. Yine her deneyin bir kontrolü, DMSO ilave edilmiş bir eritici kontrolü ve S9 mix'siz deneyden farklı olarak cyclophosphamide ilave edilmiş bir pozitif kontrolü vardır. Eritici kontrolde, kültür tüpüne 3.7 µl DMSO/ml olacak şekilde DMSO konmuştur. Pozitif kontrolde, kültür tüpüne cyclophosphamide son konsantrasyonu 28 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Kontrol, eritici kontrol ve pozitif kontrol tüplerine de 0.5 ml S9 mix ilave edilmiştir. 3 saat 37ºC'de inkübasyonun ardından (hücre kültürünün 51. saati) tüpler 2500 rpm'de 4 dakika santrifüj edilmiş, süpernatant atılmış ve böylece ortamdaki S9 mix'in de uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Daha sonra hücreleri yıkamak için her bir tüpe 2 ml RPMI 1640 medyumu (37ºC) ilave edilmiş ve tüpler 2500 rpm'de 4 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant atılmış ve ikinci defa 2 ml RPMI 1640 uygulaması yapılmıştır. Yine 2500 rpm'de 4 dakika santrifüjün ardından süpernatant atılmış ve tüplere bu defa 2 ml Chromosom medium B (37ºC) ve son konsantrasyonu 10 µg/ml olan BrdUrd eriyiği ilave edilerek 72. saatin sonuna kadar 37ºC'de inkübasyona devam edilmiştir.

Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (kültürün 70. saatinde) her tüpe hazırlanan kolkisin eriyiğinden 30 µl (0.06 µg/ml) ilave edilmiş ve tüpler hafifçe sallanarak karıştırılmıştır.

Bu aşamadan sonra yapılan işlemler deneyin S9 mix'siz bölümü ile aynıdır.

3.4.3. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması

Bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını (Sister Chromatid Differentiation = SCD) sağlamak amacıyla Speit (1984) ve Speit ve Haupter'in (1985) geliştirdikleri metod modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla bir günlük preparatlar ışınlama kabına konarak üzeri bir film şeklinde Sorensen

tamponu ile örtülecek şekilde kapatılmıştır. Işınlama eriyiği 5 ml Sorensen Tampon A, 5 ml Sorensen Tampon B alınıp bu karışımın destile su ile 100 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır (pH=6.8). Işınlama eriyiğinin az ya da fazla olmasının kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını önemli derecede etkilediği görülmüştür.

Bu şekilde ince bir tabaka halinde ışınlama eriyiği ile örtülen preparatlar, karanlıkta 15 cm yükseklikten 30 W'lık 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen tek ultraviole lambası ile 30 dk. ışınlandırılmıştır.

Işınlama bittikten sonra preparatlar 1 x SSC eriyiği içerisinde 60 ºC (± 0,2 ºC)'de 60 dk. inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresi bitmeden 15 dk. önce % 5'lik Giemsa boya eriyiği hazırlanmıştır.

% 5'lik Giemsa boyasının hazırlanması: 4 ml tampon A, 4 ml tampon B ve 4 ml Giemsa karıştırılarak üzerine 80 ml oluncaya kadar saf su ilave edilmiştir (pH=6.72). Sonra bu boya dik bir şale içerisine filtre kâğıdı yardımıyla süzülmüştür.

İnkübasyon süresinin sonunda preparatlar 1xSSC eriyiğinden alınarak doğrudan boya içerisine konmuş ve yaklaşık olarak 30 dk. boya içerisinde bekletilmiştir (Kardeş kromatidler arasındaki en iyi kontrast farkı bu sürenin sonunda elde edilmiştir). Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarılmış ve üç ayrı kaptaki saf sudan geçirilerek preparatların üzerindeki fazla boyanın akması sağlanmıştır. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette kurumaya bırakılmıştır.

Boyanmış preparatlar kuruduktan sonra entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir.

3.5. Daimi Preparatlarda Mikroskobik İnceleme

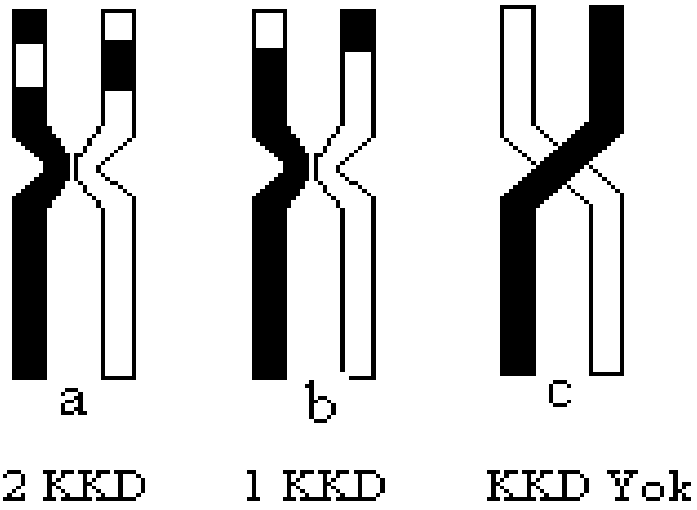
Hazırlanmış olan daimi preparatlar OLYMPUS CX21 marka ışık mikroskobunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir (10 x 100 = 1000 büyütmede). Bu incelemeler sırasında kardeş kromatid değişimi sayısı (KKD) ve kromozomal anormallikler belirlenmiştir. Aynı preparatlarda birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin sayısı ve toplam hücre içerisinde mitoz bölünmeyi

geçiren hücrelerin sayısı saptanmıştır. Bu incelemeler sonucunda proliferasyon indeksi (PI) ve mitotik indeks (MI) saptanmıştır.

3.5.1. KKD Sayısının ve Proliferasyon İndeksinin (PI) (Replikasyon İndeksi=RI) Saptanması

3.5.1.1. KKD Sayısının Saptanması

KKD sayısı, her kişinin kan kültürüne ait preparatlardan iyi dağılmış ve ikinci mitozu geçiren 25 hücrede (iki kişiden toplam 50 hücre) saptanmıştır. KKD sayısı bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla belirlenmiştir. Ortadan bir parça değişimi olmuş ise bu iki KKD olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.1.a). Uçtan parça değişimi olmuş ise bu da bir KKD olarak sayılmıştır (Şekil 3.1.b). Ancak bu incelemeler esnasında kromatidlerin primer boğum bölgelerinden dönüm yapıp yapmadıklarına dikkat etmek gerekir. Bu durumda kromozomlarda KKD yoktur (Şekil 3.1.c).



Şekil 3.1. Kardeş Kromatid Değişiminin Olduğu ve Olmadığı Durumun Şematik olarak gösterilmesi (Topaktaş ve Speit, 1990)

3.5.1.2. Proliferasyon Indeksi (PI) (Replikasyon Indeksi=RI) Saptanması

Tamiflu'nun DNA replikasyonu üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla PI bulunmuştur. Her kişinin kan kültüründen yapılan preparatlardan tesadüfî seçilmiş 100 hücrenin incelenmesiyle PI belirlenmiştir. Bu incelemeler sırasında gözlenen birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreler sayılmıştır. Bu verilerden yola çıkılarak her bir kişinin kan kültüründeki PI şu şekilde hesaplanmıştır:

$$PI = \frac{1 \times (M1) + 2 \times (M2) + 3 \times (M3)}{100}$$

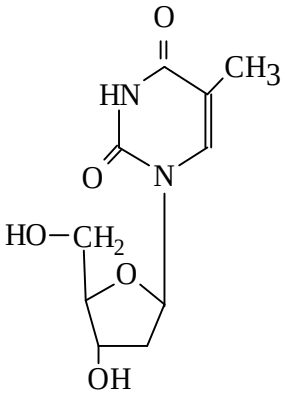
M1: Birinci mitozu geçiren hücrelerin sayısı

M2: İkinci mitozu geçiren hücrelerin sayısı

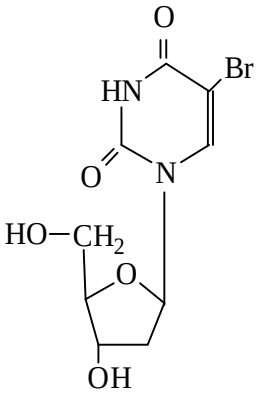
M3: Üçüncü mitozu geçiren hücrelerin sayısı

Birinci, ikinci ve üçüncü metafaz plakları şu şekilde ayırt edilmiştir (Topaktaş ve Speit. 1990):

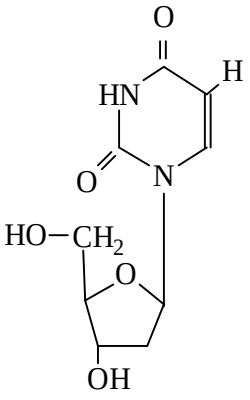
BrdUrd, deoxytimidin (dT) ve deoxyuridin (dU) birbirlerinin anoloğu olan bileşiklerdir. BrdUrd, dT ve dU arasındaki tek fark taşıdıkları heterosiklik benzen halkasındaki beşinci C atomuna bağlanan grupların farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Beşinci C atomuna bağlanan grup dT'de CH_3, BrdUrd'de Br ve dU'de H atomudur (Şekil 3.2).



Deoxytimidin (dT)



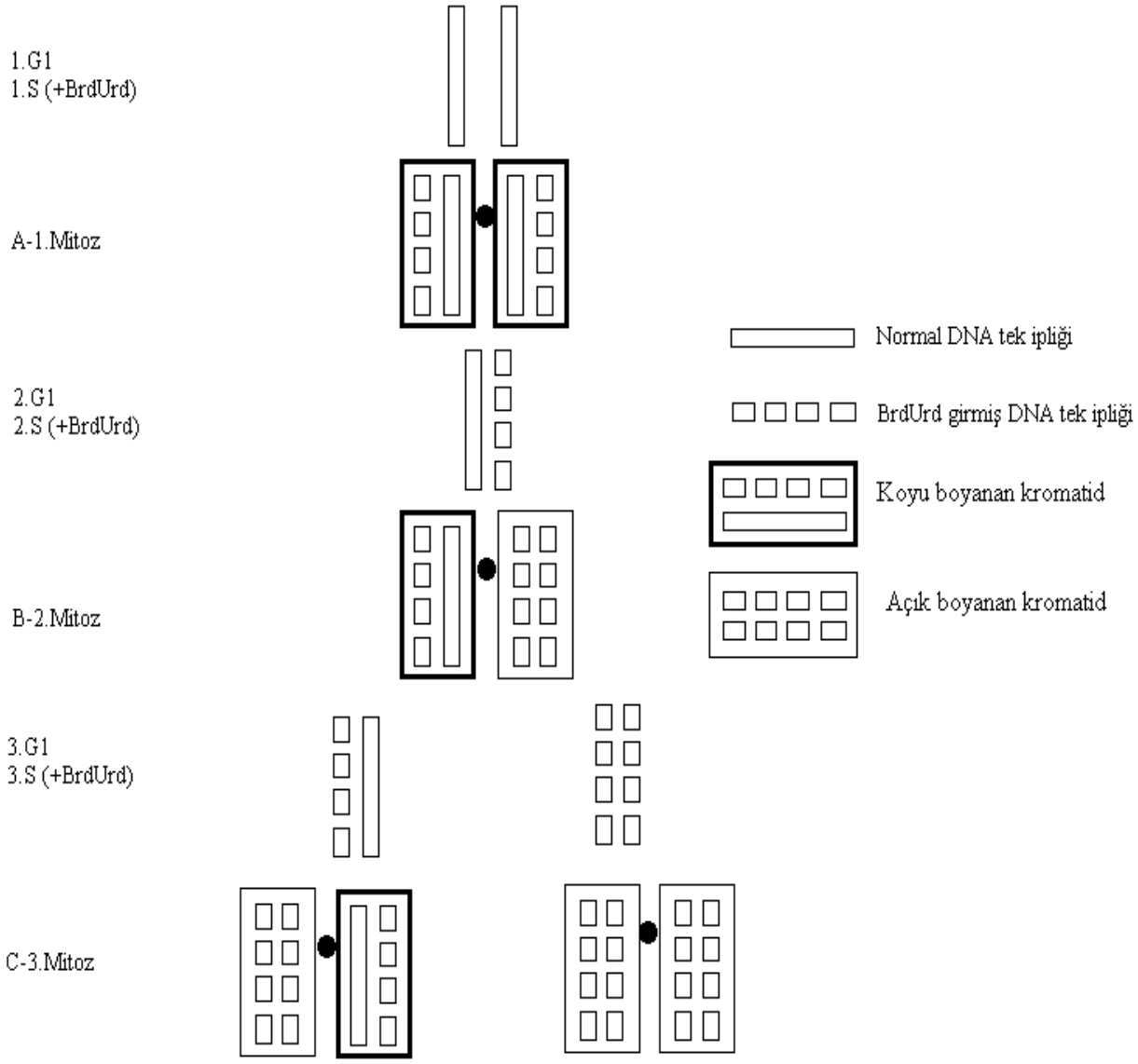
Bromodeoxyuridin (BrdUrd)



Deoxyuridin (dU)

Şekil 3.2. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin(dU)'in kimyasal yapıları.

BrdUrd, DNA'nın yapısında bulunan timin bazlarının anoloğu olduğundan kültür ortamına BrdUrd eklendiğinde hücreler DNA'larını replike ettikleri esnada (birinci S fazında) yeni sentezlenen polinükleotid ipliği içine timinin yerine ortamda bulunan BrdUrd geçecektir. Böyle hücrelerin kromozomları boyandığında bir kromozomun her iki kromatidi de (dT/BrdUrd : dT/BrdUrd) homojen koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.3 A ve Şekil 3.4). Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerden meydana gelen yavru hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd' li ortamda ikinci S fazı) timin içeren polinükleotid ipliğine komplementer olarak sentezlenen yeni DNA ipliğinde BrdUrd yer alacaktır. Bu iki polinükleotid ipliği bir kromozomun koyu boyanan kromatidini (dT/BrdUrd) oluşturacaktır. BrdUrd içeren ipliğe komplementer olarak sentezlenen yeni ipliğe de BrdUrd girecektir ve bir kromatidi oluşturan iki polinükleotid ipliği de BrdUrd içereceğinden (BrdUrd/BrdUrd) bu kromatid, aynı kromozomun açık boyanan kromatidini oluşturacaktır. İşte bu hücrenin metafaz devresinde kromozomlar boyandığında tüm kromozomların kromatidlerinden birisi koyu diğeri açık renkte boyanacaktır (dT/BrdUrd : BrdUrd/BrdUrd). Bunlarda ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.3 B ve Şekil 3.5). Bu hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd'li ortamda üçüncü S fazı) ikinci mitozda açık boyanan kromatidden tüm polinükleotid ipliklerine BrdUrd girmiş olan bir kromozom meydana gelecektir ve bu kromozomun her iki kromatidi de açık boyanacaktır. (BrdUrd/BrdUrd:BrdUrd/BrdUrd). İkinci mitozda koyu boyanan kromatidden ise, bir kromatidin her iki ipliği BrdUrd'li ve diğer kromatidinin bir ipliği BrdUrd'li diğer ipliği timinli olan bir kromozom oluşacaktır. Bu kromozom da boyandığında bir kromatidi koyu renkte (BrdUrd/dT), diğer kromatidi açık renkte (BrdUrd/BrdUrd) olacaktır.

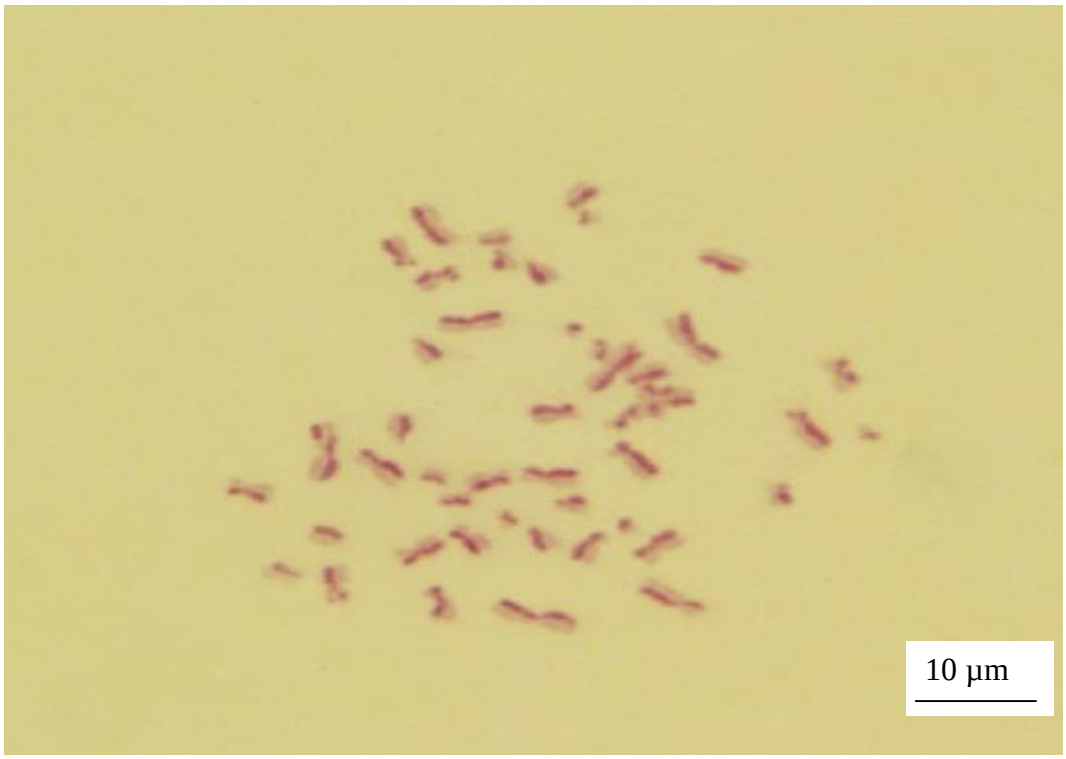


Şekil 3.3. BrdUrd'nin DNA Yapısına Girmesi ile Birinci, İkinci ve Üçüncü Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Ayırt Edilmesinin Şematik Olarak Açıklanması (During, 1985: Topaktaş ve Speit, 1990'dan).

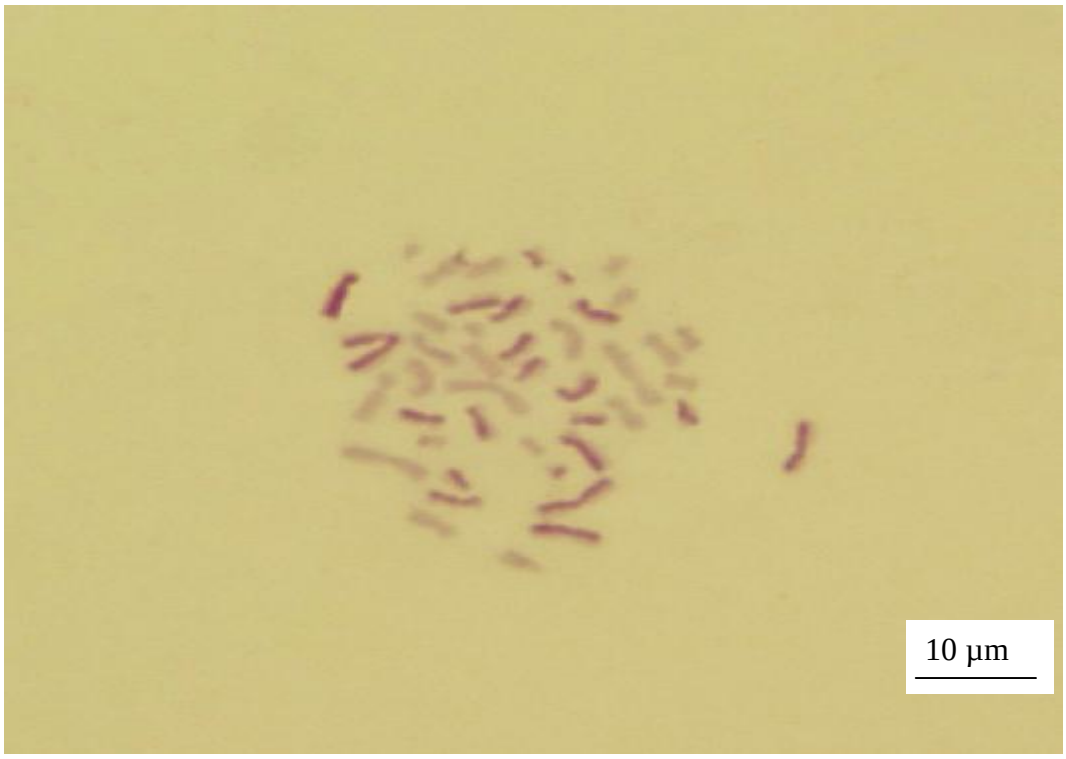


Şekil 3.4. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000).

İşte böyle hücrenin metafaz devresinde preparat yapıldığında bazı kromozomların her iki kromatidi açık renkte, bazı kromozomların bir kromatidi açık diğer kromatidi koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler de üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.3 C ve Şekil 3.6). İşte bu şekilde birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreler ayırt edilmiş, 100 hücre içinde bu hücrelerin sayısı saptanmış ve elde edilen veriler kullanılarak yukarıdaki formüle göre PI hesaplanmıştır.



Şekil 3.5. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000).



Şekil 3.6. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000).

3.5.2. Kromozom Anormallikleri (KA) ve Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

3.5.2.1. Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması

Her bir kişiden hazırlanan preparatlardan iyi dağılmış kromozomlara sahip toplam 100 hücre (iki kişiden toplam 200 hücre) KA'yı saptamak amacıyla incelenmiştir. Bu hücrelerde gözlenen yapı ve sayı anormallikleri kaydedilmiştir. İncelenen bu 100 hücre içinde anormallik taşıyan hücrelerin yüzdesi ile toplam KA sayısı hesaplanmıştır. Toplam KA sayısı incelenen hücre sayısına bölünerek hücre başına düşen KA sayısı (KA/Hücre) saptanmıştır. Bu çalışmada gap'lar anormallik olarak değerlendirilmemiştir (Mace ve ark.1978). Gap'lar ile kromatid ve kromozom tipi kırıkları arasındaki farklar şu şekilde ayırt edilmiştir: (Preston, 1987; Kauderer ve ark. 1991'den) Gap'larda, kromatidin birinde (kromatid tipi gap) veya kromatidin her ikisinde (kromozom tipi gap) görülen boyanmamış bölge bir kromatidin genişliğinden daha azdır. Kırıklarda bir kromatiddeki (kromatid tipi kırık) veya her iki kromatiddeki (kromozom tipi kırık) boyanmamış bölge bir kromatidin genişliğinden daha fazladır. İşte bu ölçülere göre gap ve kromatid kırıkları birbirinden ayırt edilmiştir.

Hazırlanan preparatlardan yapısal KA'yı saptamak amacıyla gözlenen kromatid tipi yapı anormallikleri B' (kromatid kırığı), CE (kromatid değişimi) ve F (fragment)'dir. Kromozom tipi yapı anormallikleri ise B" (kromozom kırığı), F (fragment), SU (kardeş kromatid birleşmesi), DS (disentrik kromozom), T (translokasyon) varlığı incelenir. Ayrıca sayısal KA'yı saptamak amacıyla da kromozom sayı anormallikleri değerlendirilir.

3.5.2.2. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

Tamiflu'nun mitoz bölünme üzerine etkilerini belirlemek amacıyla MI saptanmıştır. MI'i belirlemek için her bir kişiye ait preparatlarda toplam 3 bin hücre incelenmiş ve bunlar arasında mitoz bölünme geçiren hücrelerin sayısı kaydedilmiştir. 3 bin hücre içinde mitoz bölünme geçiren hücrelerin oranı yüzde cinsinden hesaplanarak MI saptanmıştır.

3.6. Mikronukleus (MN) Testi İçin Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması

3.6.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması (S9 mix'siz test)

In vitro mikronukleus testinde Rothfuss ve ark. (2000)'nın geliştirdikleri yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu yönteme göre, sağlıklı insanlardan alınan periferik kanın 0.2 ml'si, 2.5 ml kromozom medyumuna ekilmiş ve hücreler 37±1ºC'de 68 saat inkübe edilmiştir. Çalışmada kullanılan antiviralin etkisini belirlemek için 0.5, 1 ve 2 µg/ml konsantrasyonlarındaki Tamiflu kültür ortamına, kültürün başlangıcından 20 ve 44 saat sonra ilave edilmiştir. Ayrıca her deneyin bir kontrolü, DMSO ilave edilmiş bir eritici kontrolü ve bir pozitif kontrolü vardır. İnkübasyonun başlangıcından 44 saat sonra her tüpe konsantrasyonu 6 µg/ml olacak şekilde sitokalasin-B maddesi ilave edilmiş ve böylece bölünen hücrelerde sitokinez engellenmiştir. İnkübasyonun sonunda, kültür tüpleri 2000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve hücrelerin bulunduğu tüplere hipotonik eriyik (%0.4 KCI) ilave edildikten sonra tüpler inkübasyon yapmaksızın direkt olarak santrifüje alınmıştır. Hipotonik eriyik, kültüre yavaş yavaş ve pipetaj yapılarak ilave edilmiştir. Kültür tüpleri 1200 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atılarak birinci fiksatif (1/5/6=glasiyal asetik asit/metanol/%0.9 NaCI) ilave edilmiş ve hücreler bu fiksatif ile muamele edilmiştir. Birinci fiksatif ile oda sıcaklığında 20 dakika muameleden sonra 1200 rpm'de 10 dk. daha santrifüj edilen tüplere iki kez glasiyal asetik asit/ metanol (1/5) ilavesi yapılarak 20 dakika oda sıcaklığında fiksatif muamelesi yapılmıştır. Sonra santrifüj yapılarak süpernatant atılmış ve kültür tüplerinin dibinde toplanmış olan hücreler resüspanse edilmiştir. Daha sonra, hücre süspansiyonu soğuk ve temiz lamlar üzerine 10 cm yükseklikten damlatılarak preparatlar hazırlanmıştır.

3.6.2. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması (S9 mix'li test)

Tamiflu'nun indirekt genotoksik etkisininin olup olmadığını araştırmak amacıyla kültürün bitiminden 24 (kültürün başlangıcından 44 saat sonra) saat önce 0.5, 1 ve 2 µg/ml Tamiflu 0.5 ml S9mix ile birlikte tüplere ilave edilmiştir. Yine her deneyin bir kontrolü, DMSO ilave edilmiş bir eritici kontrolü ve S9 mix'siz deneyden farklı olarak cyclophosphamide ilave edilmiş bir pozitif kontrolü vardır. Eritici kontrolde, kültür tüpüne 3.7 µl DMSO/ml konmuştur. Pozitif kontrolde, kültür tüpüne cyclophosphamide son konsantrasyonu 28 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Kontrol, eritici kontrol ve pozitif kontrol tüplerine de 0.5 ml S9mix ilave edilmiştir. 3 saat 37ºC'de inkübasyonun ardından (hücre kültürünün 47. saati) tüpler 2500 rpm'de 4 dakika santrifüj edilmiş, süpernatant atılmış ve böylece ortamdaki S9 mix'in de uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Daha sonra hücreleri yıkamak için her bir tüpe 2 ml RPMI 1640 medyumu (37ºC) ilave edilmiş ve tüpler 2500 rpm'de 4 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant atılmış ve ikinci defa 2 ml RPMI 1640 uygulaması yapılmıştır. Yine 2500 rpm'de 4 dakika santrifüjün ardından süpernatant atılmış ve tüplere bu defa 2 ml Chromosom medium B (37ºC) ve son konsantrasyonu 6 µg/ml olan sitokalasin-B eriyiği ilave edilerek 68. saatin sonuna kadar 37ºC'de inkübasyona devam edilmiştir.

Bu aşamadan sonra yapılan işlemler deneyin S9 mix'siz bölümü ile aynıdır.

3.6.3. Preparatların Boyanması

Hazırlanan preparatlar bir gün sonra Sorensen tamponunda hazırlanmış %5'lik Giemsa boyası ile 13-15 dk. boyanmış ve üç ayrı kapta bulunan saf sudan geçirilerek kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işleminden sonra preparatlar entellan ile kapatılarak incelemeye hazır hale getirilmiştir.

3.7. Mikronukleus Testi İçin Hazırlanan Preparatlarda Mikroskobik İnceleme

Hazırlanan daimi preparatlar OLYMPUS marka ışık mikroskobunda 10X40=400 büyütmede incelenmiştir.

3.7.1. Mikronukleus Sayısı ve Nukleus Bölünme Indeksinin (NBI) Saptanması

Mikronukleus sayısını belirlemek amacıyla her bir kişiye ait daimi preparatlarda her kişinin, her muamele grubu ve kontrollerinde iki nukleusa sahip (binukleer) toplam 1000 hücre incelenmiş ve bu binukleer hücreler içerisinden mikronukleuslu olanlar saptanmıştır. Ayrıca incelenen hücrelerde toplam mikronukleus sayısı belirlenmiştir. Mikronukleus taşıyan iki nukleuslu hücrelerin toplam hücre sayısına oranlaması ile mikronukleuslu hücre oranı, toplam mikronukleus sayısının incelenen iki nukleuslu hücre sayısına bölünmesiyle ise hücre başına düşen mikronukleus sayısı (MN/hücre) hesaplanmıştır. Bundan da MN ‰'si belirlenmiştir.

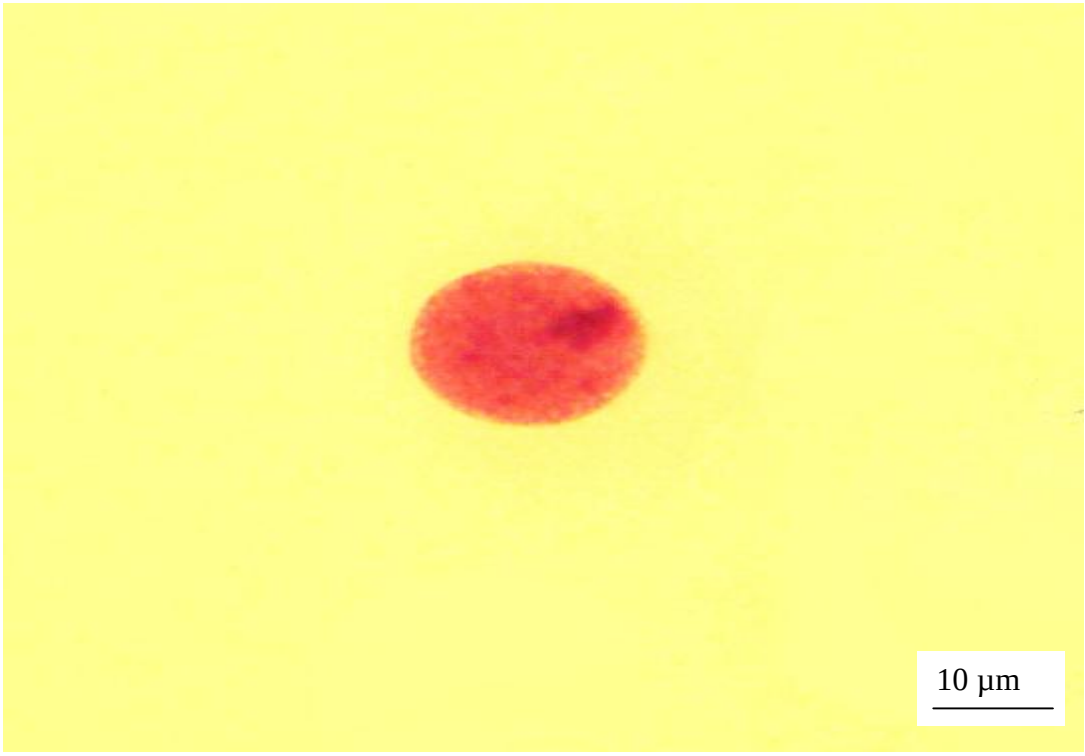
Binukleer hücre ve mikronukleus ayırımı Fenech (2000)'e göre yapılmıştır: (1) Hücreler belirgin sitoplazmasıyla yuvarlak ya da oval görünüme sahip olmalıdır; (2) Benzer olarak, nukleuslar belirgin nukleus zarıyla çevrili yuvarlak ya da oval olmalıdır; (3) İçerisinde MN sayılan hücreler sadece bir nukleus bölünmesi geçiren hücrelerdir; (4) MN'lar sadece ana nukleusun 1/3'ü ya da daha küçük olduklarında hesaba katılmalıdır; (5) MN'lar ana nukleus gibi boyanmalıdır; (6) MN'lar ana nukleustan açık bir şekilde ayrılmış olmalıdır.

Sitokinez bloklama yönteminin en önemli yararı, bölünen hücre populasyonunda nukleus bölünmesinin ilerleyişini ve çoğalmasını ölçebilmesidir. Bu durum, sitokalasin B ilavesinin ardından oluşan bir nukleuslu, iki nukleuslu, multinukleuslu (>2) hücrelerin sayılmasıyla yapılır. Nukleus bölünme indeksi (NBI) Eastmond ve Tucker (1989) tarafından önerilen formüle göre hesaplanmıştır.

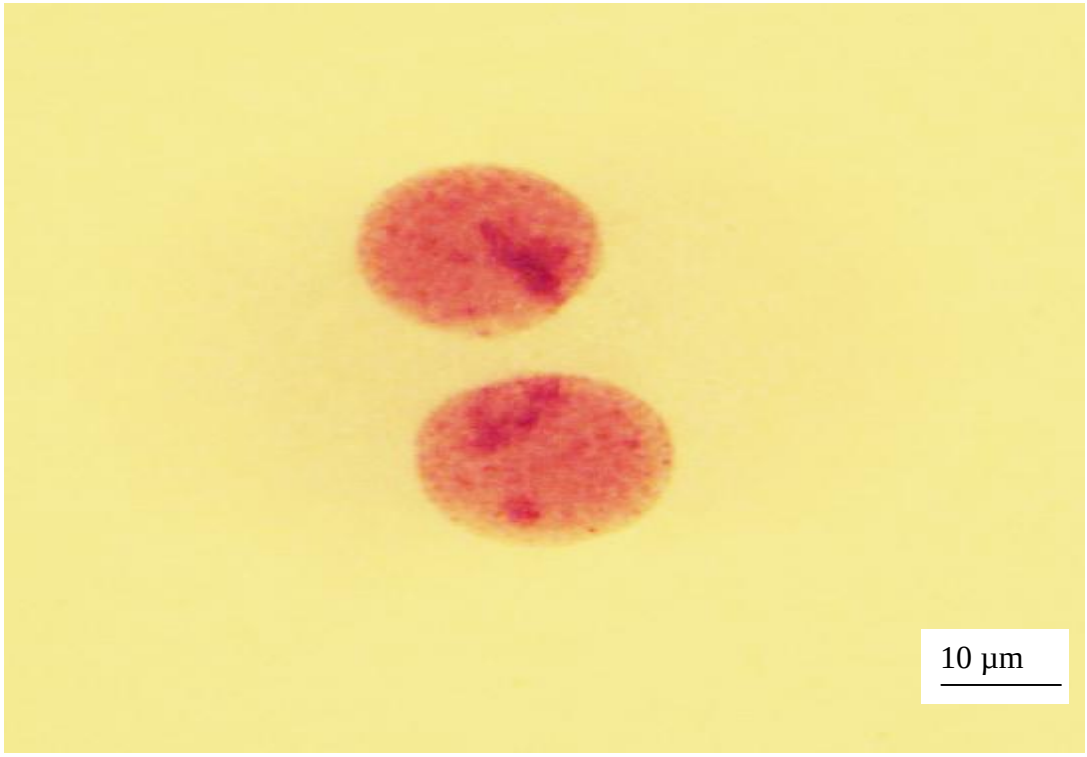
$$NBI = (MI + 2xMII + 3xMIII + 4xMIV) / N$$

Formüle göre, *MI* bir nukleuslu (Şekil 3.7), *MII* iki nukleuslu (Şekil 3.8); *MIII* üç nukleuslu (Şekil 3.9), *MIV* dört nukleuslu (Şekil 3.10) hücrelerin sayısını, *N*

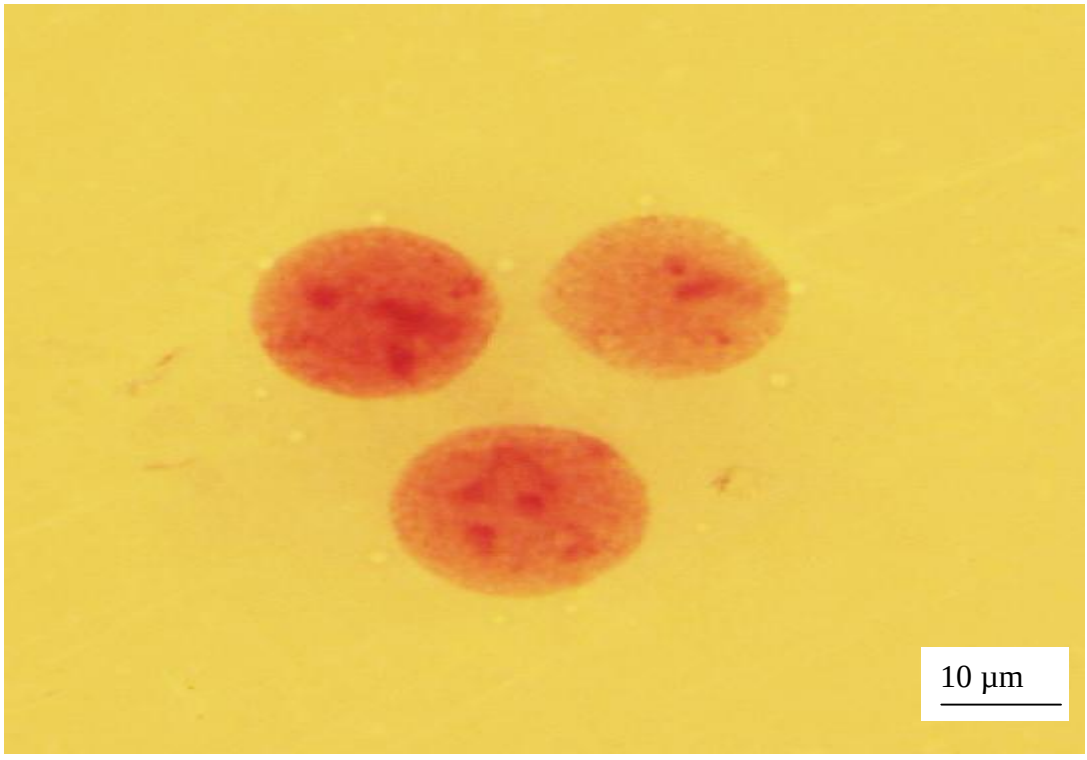
ise toplam hücre sayısını göstermektedir. NBI'nin hesaplanması kimyasal veya fiziksel bir maddenin sitotoksik etkisini göstermede önemli bilgiler sağlar (Fenech, 1997). Bu nedenle, MN bakımından incelenen preparatlar daha sonra nukleus bölünme indeksini (NBI) belirlemek için tekrar incelenmiştir. NBI için, her bir kişinin preparatlarından tesadüfi seçilmiş alanlarda toplam 500 hücre (2 kişi 1000 hücre) incelenmiştir.



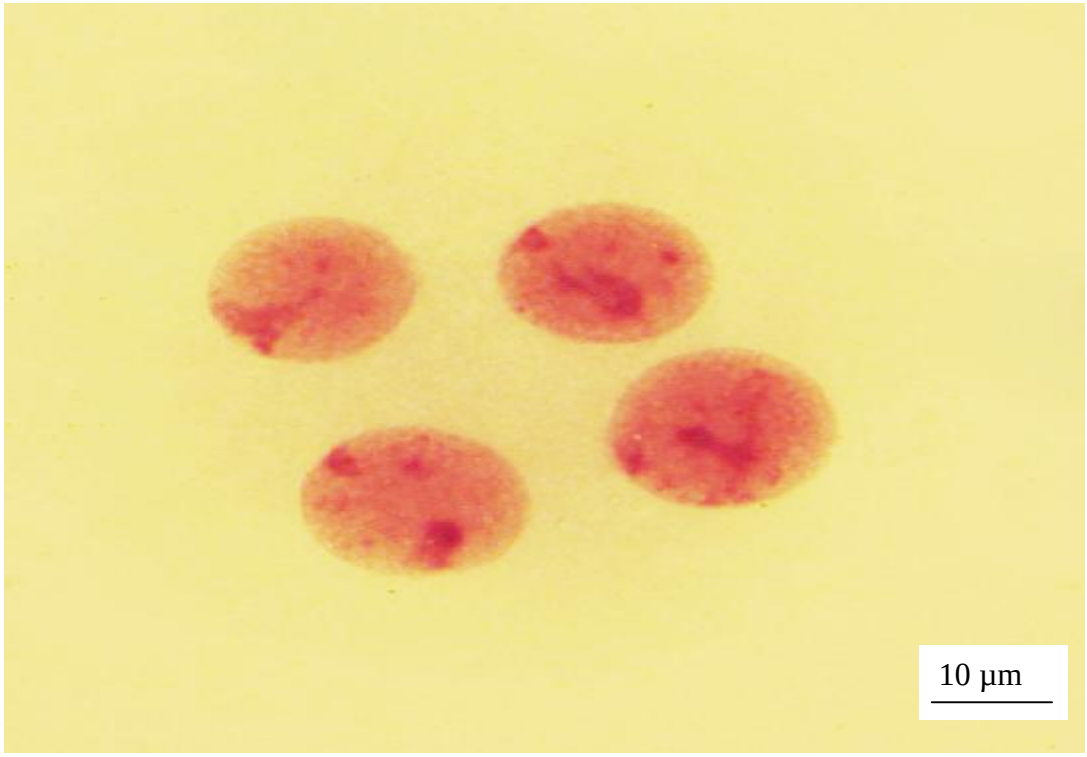
Şekil 3.7. Bir nukleuslu hücre (X1000).



Şekil 3.8. İki nukleuslu hücre (X1000).



Şekil 3.9. Üç nukleuslu hücre (X1000).



Şekil 3.10. Dört nukleuslu hücre (X1000).

3.8. Mikroskopta Fotoğraf Çekme

Fotoğraf çekme işlemi OLYMPUS marka trinoküler mikroskoba bağlı dijital fotoğraf makinasında 1000 büyütmede yapılmıştır (Olympus CX31RTSF, 7.1 Megapixel). 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin, sık rastlanan ve ilginç olan KA'ların, mikronukleuslu binükleer hücreler ile 1, 2, 3, 4 nukleuslu hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir.

3.9. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Mikroskobik inceleme sonucunda elde edilen KA, KKD, MI, PI, MN ve NBI parametrelerine ait veriler için önce her bir grubun ortalamaları arasındaki farkın önemli olup olmadığı tek yönlü varyans analiz metodu ile belirlenmiş, farkın önemli olduğu gruplarda ise, muameleli gruplardan elde edilen sonuçlar ile onların kontrolleri (kontrol, eritici kontrol ve pozitif kontrol) arasındaki farkın önemli olup olmadığı *t*-testi ile karşılaştırılmıştır. Mikroskobik incelemeler sonucunda elde edilen bulgular çizelge halinde verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Tamiflu'nun Eksojen Metabolik Aktivatör Bulunmayan Ortamda İnsan Periferal Kan Lenfositlerindeki Genotoksik Etkileri

4.1.1. Tamiflu'nun Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerindeki Etkileri

Tamiflu KKD'yi sadece 24 saatte 1 μg/ml ve 48 saatte 1 ve 2 μg/ml konsantrasyonda KKD'yi önemli seviyede artırmıştır. (Çizelge 4.1). Ayrıca Tamiflu ile 24 ve 48 saat muamele edilen kültürlerdeki hücre başına düşen KKD sayısının pozitif kontroldekinden önemli derecede düşük olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Tamiflu ile Muamele Edilmiş İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Hücre Başına Düşen Ortalama KKD Sayısı

Test maddesi	Muamele periyotu (Saat)	Kons. (μg/ml)	Min.-Max. KKD	KKD/Hücre±SH
Kontrol	-	-	1-9	2.48±0.28
DMSO	24	3.7μl/ml	1-8	3.46±0.06
MMC	24	0.25	26-86	45.58±4.38
Tamiflu	24	0.5	1-10	3.38±0.18c_2
Tamiflu	24	1	2-11	3.74±0.06a_1c_3
Tamiflu	24	2	1-8	3.98±0.54c_2
DMSO[x]	48	3.7μl/ml	1-9	3.17±0.11
MMC[y]	48	0.25	14-83	39.7±10.9
Tamiflu[z]	48	0.5	1-7	2.99±0.09c_2
Tamiflu	48	1	1-7	3.64±0.04a_1c_3
Tamiflu	48	2	1-10	3.76±0.04$a_1b_1c_3$

[x]: Toplam 183 adet birinci, ikinci ve üçüncü mitoz sayılabilmiştir; [y]: Toplam 168 adet birinci ikinci ve üçüncü mitoz sayılabilmiştir; [z]: Toplam 186 adet birinci ikinci ve üçüncü mitoz sayılabilmiştir.
a: Kontrol ile; b: Eritici Kontrol ile; c: Pozitif Kontrol ile aradaki fark önemlidir.
$a_1b_1c_1$: P≤0.05 $a_2b_2c_2$: P≤0.01 $a_3b_3c_3$: P≤0.001

4.1.2. Tamiflu'nun Kromozom Anormalliklerinin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

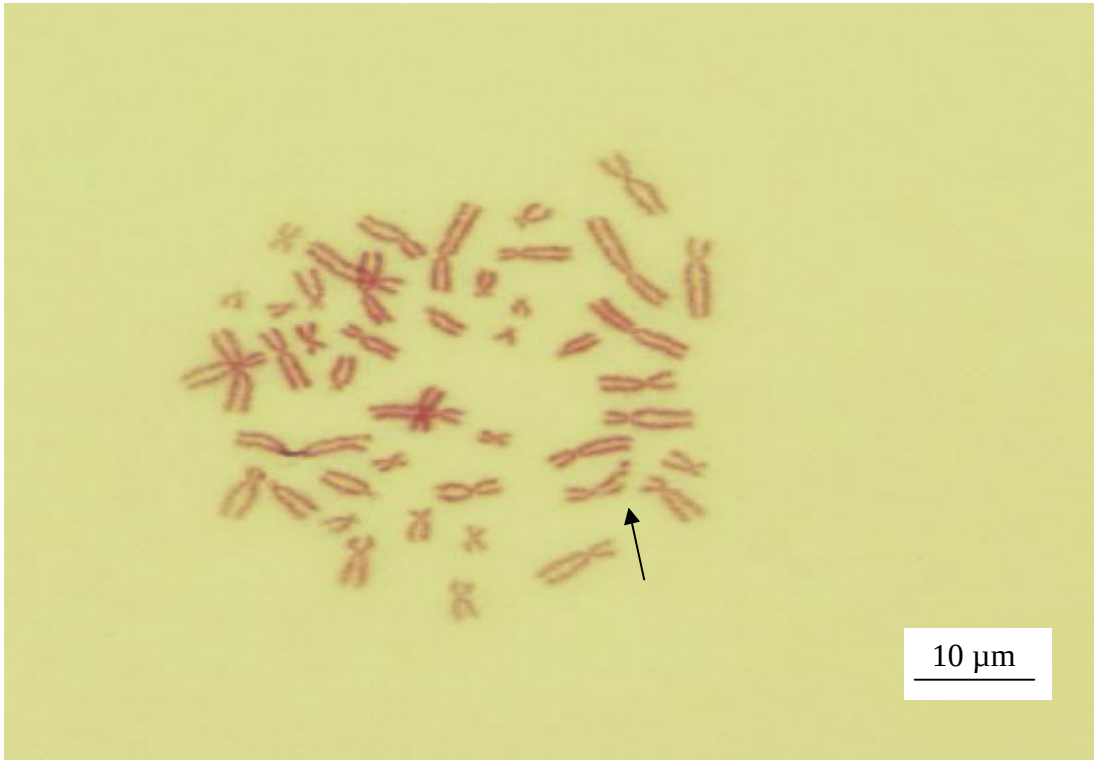
Tamiflu hem 24 saat hem de 48 saatlik muamele sürelerinde insan periferal kan lenfositlerinde KA'yı uyarmamıştır. Çünkü muameleli kültürlerdeki KA'lı anormal hücre %'si ve hücre başına düşen KA sayısının (KA/hücre) hem kontrol hem de eritici kontrollerdekinden istatistiki anlamda farklı olmadığı bulunmuştur (Çizelge 4.2). Ayrıca muameleli kültürlerdeki anormal hücre %'si ve hücre başına düşen KA sayısı pozitif kontroldekinden önemli düzeyde düşüktür (Çizelge 4.2).

Tamiflu insan periferal lenfositlerinde kromatid kırığı (Şekil 4.1, Şekil 4.2), kromozom kırığı (Şekil 4.3), fragment (Şekil 4.4) ve poliploidi (Şekil 4.5) gibi kromozom anormalliklerine neden olmuştur.

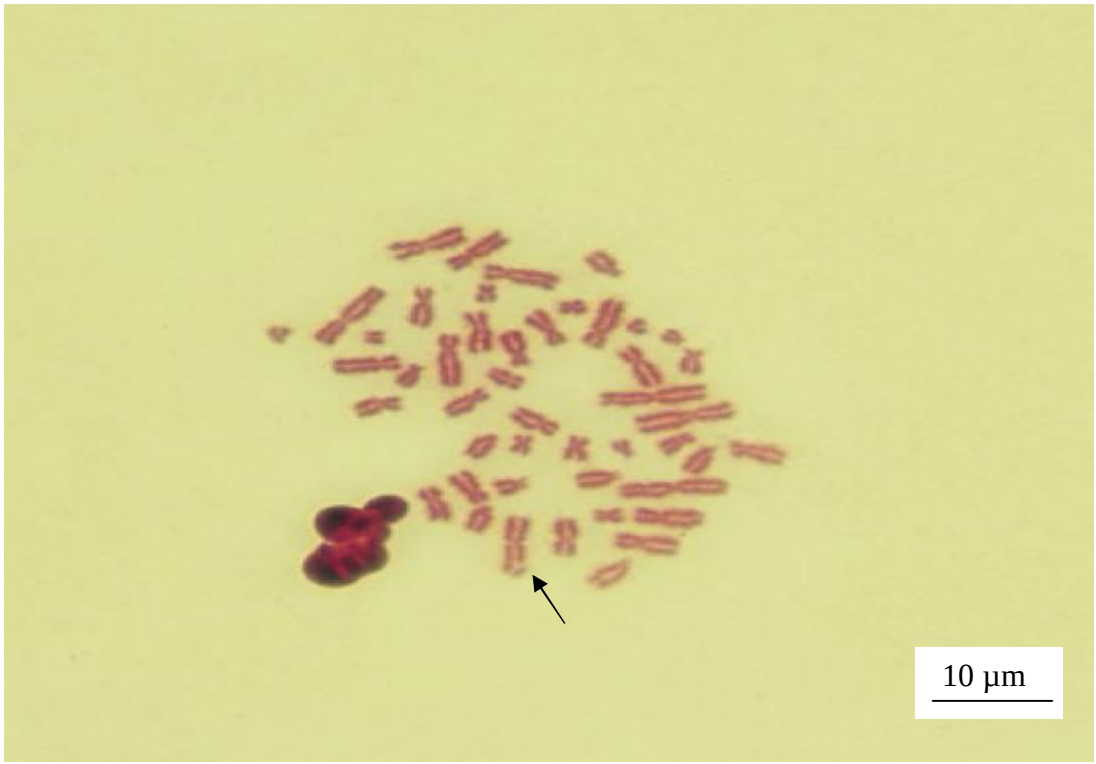
Çizelge. 4.2. Tamiflu ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde kromozom anormallikleri (KA), KA'lı hücre oranı ve KA/hücre.

Test Mad.	Muamele Periy. (Saat)	Kons. (µg/ml)	Anormallik çeşitleri Yapısal KA Kromatid Tipi	Yapısal KA Kromozom Tipi	Sayısal KA	Anormal ±SH (%)	Hücre ±SH
Kontrol	-	-	12	2	-	6.50±0.50	0.070±0.005
DMSO	24	3.7µl/ml	14	2	-	8.00±1.00	0.080±0.010
MMC	24	0.25	96	53	-	51.00±2.00	0.745±0.105
Tamiflu	24	0.5	12	1	1	6.50±0.50c_2	0.070±0.010c_2
Tamiflu	24	1	16	-	-	9.00±1.00c_2	0.095±0.005c_2
Tamiflu	24	2	15	4	-	6.50±0.50c_2	0.80±0.010c_2
DMSO	48	3.7µl/ml	11	4	-	7.50±0.50	0.075±0.005
MMC	48	0.25	51	12	-	26.50±7.50	0.315±0.065
Tamiflu	48	0.5	9	4	2	7.50±0.50c_1	0.075±0.005c_1
Tamiflu	48	1	15	-	-	6.50±0.50c_1	0.075±0.005c_1
Tamiflu	48	2	14	1	-	7.50±0.50c_1	0.075±0.005c_1

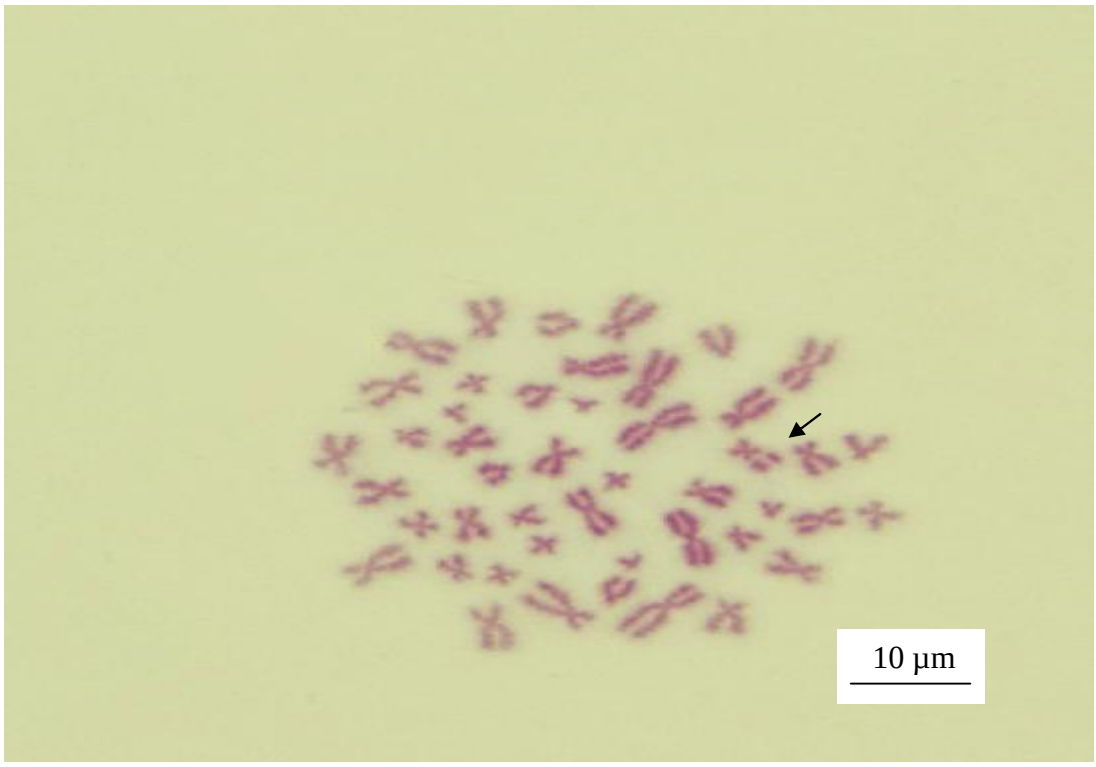
a: Kontrol ile; b: Eritici Kontrol ile; c: Pozitif Kontrol ile aradaki fark önemlidir.
$a_1b_1c_1$: P≤0.05 $a_2b_2c_2$: P≤0.01 $a_3b_3c_3$: P≤0.00



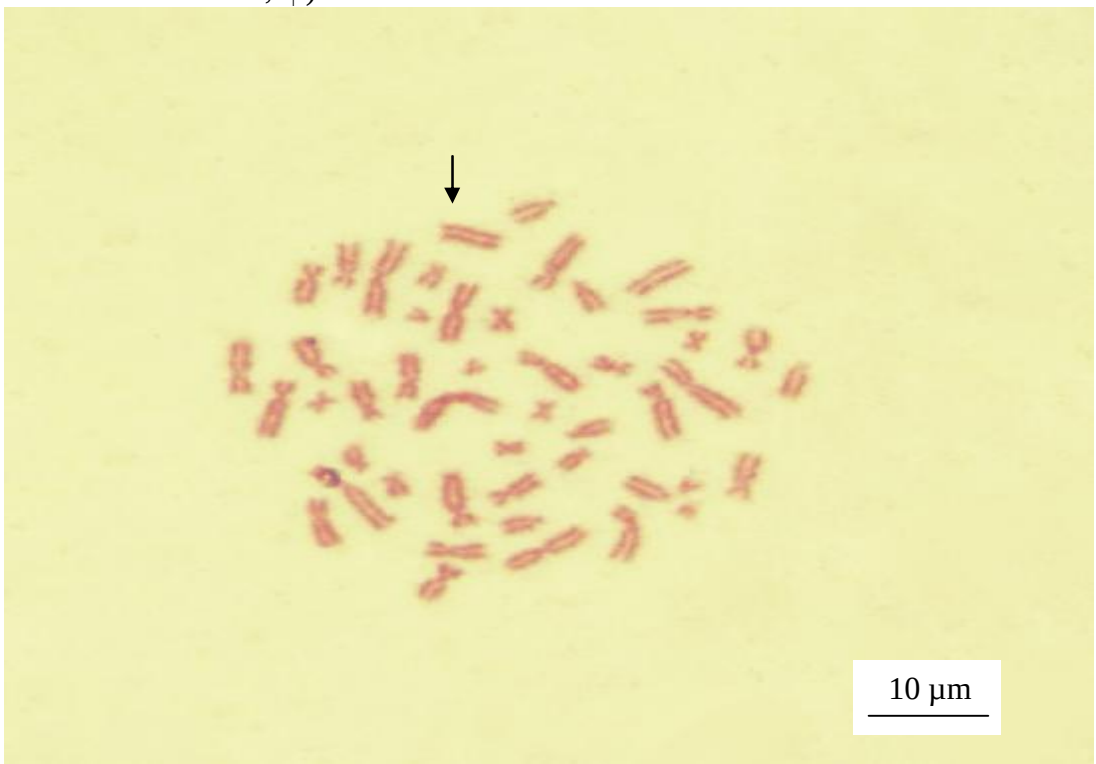
Şekil 4.1. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (0.5 µg/ml Tamiflu, 48 saatlik muamele, ♂).



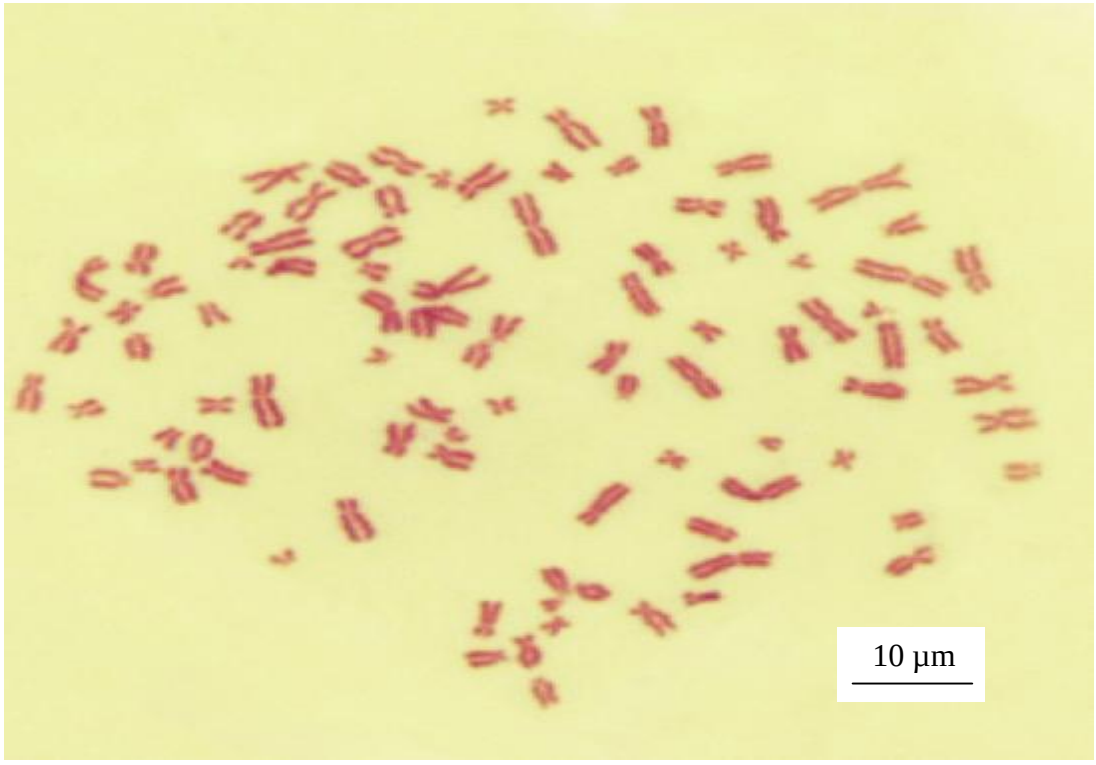
Şekil 4.2. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (0,5 µg/ml Tamiflu, 48 saatlik muamele, ♂). X1000



Şekil 4.3. Kromozom kırığı (B") bulunan metafaz plağı (2 µg/ml Tamiflu, 48 saatlik muamele, ♀). X1000



Şekil 4.4. Fragment (F) bulunan metafaz plağı (2 µg/ml Tamiflu, 24 saatlik muamele, ♀). X1000



Şekil 4.5. Poliploid hücre (0.5 µg/ml Tamiflu, 24 saatlik muamele, ♀). X1000

4.1.3 Tamiflu'nun Mikronukleus (MN) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

Tamiflu'nun 24 ve 48 saatlik uygulamalarında MN içeren iki nukleuslu hücrelerin oranında (‰MNBN) kontrol ve eritici kontrole göre artış saptanmamıştır. (Çizelge 4.3). Yine Tamiflu, 24 ve 48 saatlik uygulamalarda MN içeren iki nukleuslu hücrelerin yüzdesini pozitif kontroldekinden önemli derecede düşüktür.

Tamiflu ile muamele edilen kültürlerdeki toplam MN ‰'sindeki artış genel olarak MN'li iki nukleuslu hücrelerin oranına benzer bir durum göstermektedir. Yani 24 ve 48 saatlik uygulamalarda Tamiflu MN ‰'sini kontrol ve eritici kontrole göre önemli derecede artırmamış ve pozitif kontrol ile aradaki fark da önemlidir (Çizelge 4.3).

Tamiflu, insan periferal kan lenfositlerinde iki nukleuslu hücrelerde mikronukleus (Şekil 4.6) oluşumlarına da neden olmuştur.

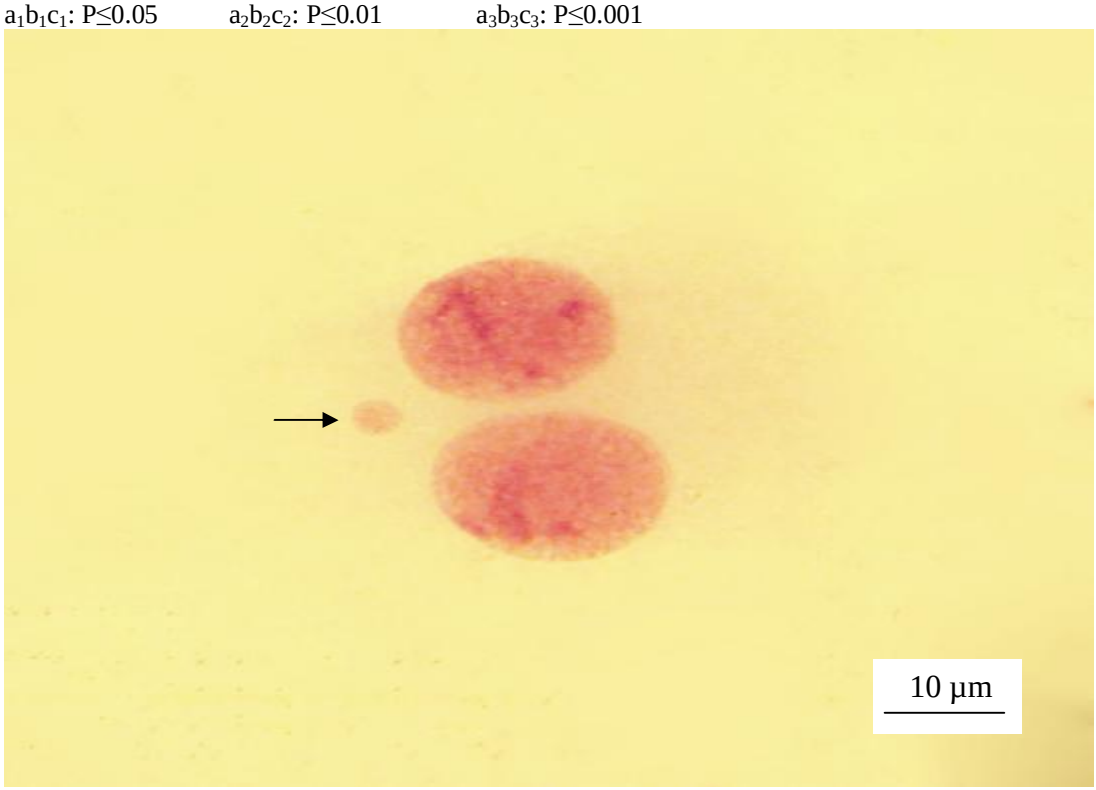
Çizelge 4.3. Tamiflu ile Muamele Edilmiş İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde MN İçeren İki Nukleuslu Hücre %'si, Hücre Başına Düşen Ortalama MN Sayısı ve Nukleus Bölünme Indeksi (NBI)*.

	Muamele		MN Sayısına Göre İki Nukleuslu Hücre Sayısı						
	Periyot (Saat)	Kons. (µg/ml)	0	1	2	3	>3	MNBN ‰'si	Toplam ‰ MN
Kontrol	-	-	1989	11				5.5±0.50	5.50±0.50
DMSO	24	3.7µl/ml	1987	13				6.5±0.50	6.50±0.50
MMC	24	0.25	1925	71	4			37.5±8.50	39.50±9.50
Tamiflu	24	0.5	1989	10	1			5.5±0.50c_2	6.00±1.00c_1
Tamiflu	24	1	1987	13				6.5±0.50c_2	6.50±0.50c_2
Tamiflu	24	2	1987	12	1			6.5±0.50c_2	7.00±1.00c_1
DMSO	48	3.7µl/ml	1987	11	2			6.5±0.50	7.50±1.50
MMC	48	0.25	1786	182	24	8		107.0±10.0	127.0±9.00
Tamiflu	48	0.5	1985	14	1			7.5±0.50c_2	8.00±1.00c_2
Tamiflu	48	1	1983	17				8.5±0.50c_2	8.50±0.50c_2
Tamiflu	48	2	1985	13	2			7.5±0.50c_2	8.50±0.50c_2

* Mikronukleus 2000 adet binukleer hücre içinde değerlendirilmiştir, NBI'ler ise toplam 1000 hücre içindedeğerlendirilmiştir.

a: Kontrol ile; b: Eritici Kontrol ile; c: Pozitif Kontrol ile aradaki fark önemlidir.

$a_1b_1c_1$: P≤0.05 $a_2b_2c_2$: P≤0.01 $a_3b_3c_3$: P≤0.001



Şekil. 4.6. Mikronukleus içeren iki nukleuslu hücre (2 µg/ml Tamiflu, 24 saatlik muamele, ♀). X1000

4.1.4. Tamiflu'nun DNA Replikasyonu, Mitoz Bölünme ve Nukleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri (Sitotoksisite)

Proliferasyon indeksi (PI), Tamiflu'nun DNA replikasyonu üzerine etkisini, mitotik indeks (MI) mitoz bölünme üzerine etkisini, nükleus bölünme indeksi (NBI) ise çekirdeğin bölünmesi üzerine etkisini göstermektedir. 24 saatlik Tamiflu uygulamasında PI'de, uygulanan konsantrasyonlarda doza bağlı bir düşüş gözlenmekle beraber hiçbirisinde kontrol, eritici kontrol ve pozitif kontrole göre önemli derecede farklar bulunamamıştır (Çizelge 4.4). Tamiflu 48 saat muamele edilen kültürlerde de PI, 24 saatlik muameleli kültürlerdekine benzer durum göstermekle beraber sadece 1 µg/ml'lık konsantrasyonda kontrol ve eritici konrole göre anlamlı seviyede düşük bulunmuştur. Yine bu muamele peryotunda 1 µg/ml'lık konsantrasyon hariç diğerlerinde pozitif kontrol ile aralarında önemli bir fark bulunmamıştır. (Çizelge 4.4).

24 ve 48 saatlik muameleli kültürlerde MI'nın genel olarak kontrole göre daha düşük olduğu bulunmuş ve bu düşüşün doza bağlı tarzda olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte düşüşün sadece 1 ve 2 µg/ml'lik konsantrasyonda kontrole göre önemli olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Tamiflu ile Muamele Edilmiş İnsan Periferal KanLenfositlerinde Proliferasyon Indeksi (PI), Mitotik Indeks (MI) ve Nukleus Bölünme Indeksi (NBI).

Test Maddesi	Muamele Periyot (Saat)	Muamele Kons. (µg/ml)	PI±SH	MI±SH	NBI±SH
Kontrol	-	-	2.21±0.05	3.06±0.30	1.428±0.016
DMSO	24	3.7µl/ml	1.91±0.03	2.05±0.05	1.313±0.039
MMC	24	0.25	1.85±0.26	1.31±0.48	1.245±0.075
Tamiflu	24	0.5	2.27±0.10	2.43±0.13	1.359±0.059
Tamiflu	24	1	2.15±0.05	2.28±0.02a_1c_1	1.251±0.001a_2b_2
Tamiflu	24	2	1.87±0.24	1.83±0.10a_1	1.227±0.023
DMSO	48	3.7µl/ml	2.13±0.12	2.61±0.08	1.359±0.035
MMC	48	0.25	1.53±0.01	1.46±0.06	1.165±0.001
Tamiflu	48	0.5	2.09±0.09	2.58±0.22	1.314±0.044
Tamiflu	48	1	1.95±0.01$a_1b_1c_2$	2.35±0.05a_1c_1	1.417±0.101
Tamiflu	48	2	1.84±0.14	2.26±0.03a_1c_1	1.656±0.042

a: Kontrol ile; b: Eritici Kontrol ile; c: Pozitif Kontrol ile aradaki fark önemlidir.
$a_1b_1c_1$: P≤0.05 $a_2b_2c_2$: P≤0.01 $a_3b_3c_3$: P≤0.001

Tamiflu NBI'nın sadece 24 saatlik muamelesinin 1 µg/ml'lik konsantrasyonda kontrole ve eritici kontrole göre önemli derecede düşmesine neden olmuştur, diğer 24 saatlik ve 48 saatlik bütün konsantrasyonlarda kontrollere göre herhangi bir önemli düşüş kaydedilmemiştir. Bu sonuçlara göre Tamiflu'nun nukleus bölünmesini genellikle etkilemediği gözlenmiştir. Muameleli kültürler ile pozitif kontrol arasında da NBI bakımından önemli bir fark bulunmamıştır (Çizelge 4.4).

Sonuç olarak Tamiflu genellikle PI ve NBI'de belirgin ve anlamlı etkilenmelere neden olmamıştır. Ancak MI'de doza bağlı bir azalma olmuştur.

4.2. Tamiflu'nun Eksojen Metabolik Aktivatör (S9mix) Bulunan Ortamda İnsan Periferal Kan Lenfositlerindeki Genotoksik Etkileri

4.2.1. Tamiflu'nun Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerindeki Etkileri

Tamiflu KKD testinde, uygulanan konsantrasyonlardan sadece 1 µg/ml'lik olanında KKD sayısını kontrol ve eritici kontrole göre istatistiksel olarak önemli

derecede artırmıştır. Buna ilaveten, Tamiflu KKD'yi pozitif kontrol düzeyinde de indüklememiştir. (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Eksojen Metabolik Aktivatör Bulunan Ortamda (S9 mix) Tamiflu ile Muamele Edilmiş İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Hücre Başına Düşen Ortalama KKD Sayısı

	Muamele			
Test maddesi	Periyot (Saat)	Kons (µg/ml)	Min.-Max KKD	KKD/Hücre ±SH
Kontrol[x]+S9mix	-	-	1-7	3.45±0.40
DMSO+S9mix	3	3.7µl/ml	1-9	3.76±0.44
Cyp[y]+S9mix	3	28	6-57	17.40±4.70
Tamiflu+S9mix	3	0.5	1-15	$3.84\pm0.36c_1$
Tamiflu+S9mix	3	1	1-10	$4.54\pm0.02a_1b_1c_3$
Tamiflu[z]+S9mix	3	2	1-13	$5.03\pm0.73c_1$

[x]: Toplam 166 adet birinci ikinci ve üçüncü mitoz sayılabilmiştir; [y]: Toplam 185 adet birinci ikinci ve üçüncü mitoz sayılabilmiştir; [z]: Toplam 188 adet birinci ikinci ve üçüncü mitoz sayılabilmiştir.

a: Kontrol ile; b: Eritici Kontrol ile; c: Pozitif Kontrol ile aradaki fark önemlidir.

$a_1b_1c_1$: $P\leq0.05$ $a_2b_2c_2$: $P\leq0.01$ $a_3b_3c_3$: $P\leq0.001$

4.2.2. Tamiflu'nun Kromozom Anormalliklerinin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

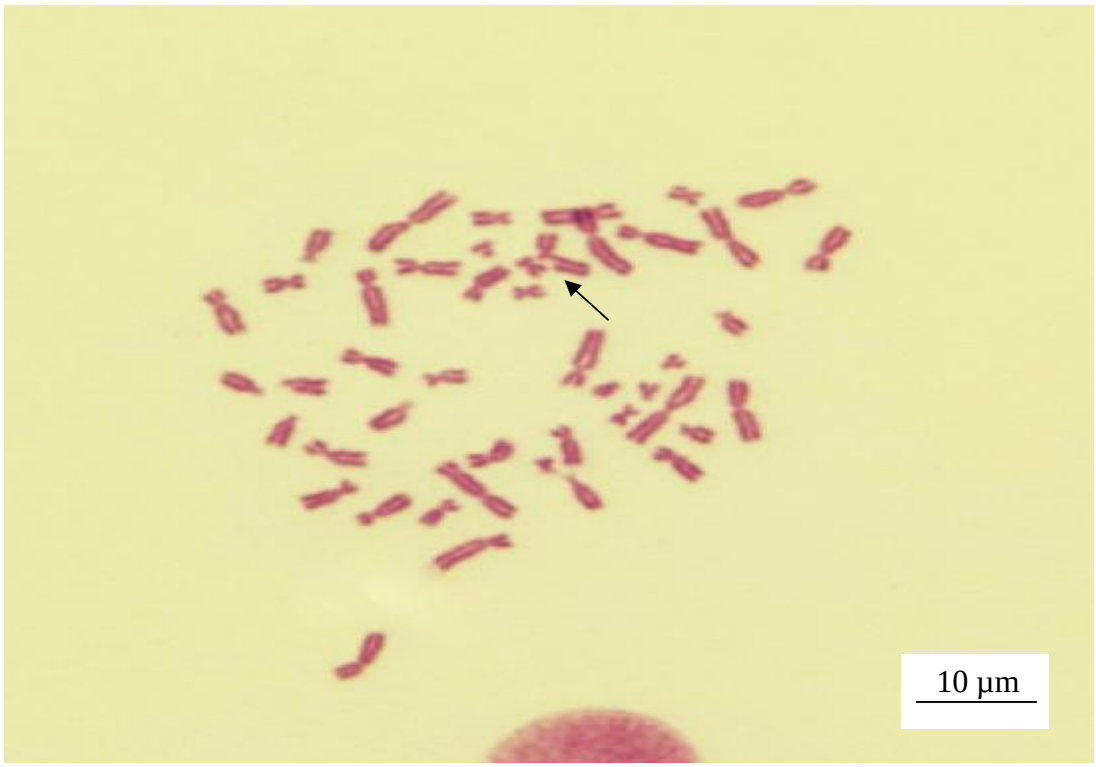
İnsan periferal kan lenfositlerinde eksojen metabolik aktivatörün (S9 mix) varlığında en yüksek konsantrasyonda (2 µg/ml) kontrollerdekine nazaran KA'da önemli olmayan bir artış gözlenmiştir. Çünkü bu konsantrasyonda anormal hücre %'si ve hücre başına düşen KA sayısı kontrol ve eritici kontroldekinden daha yüksektir (Çizelge 4.6). Benzer şekilde anormal hücre ve hücre başına düşen toplam KA değerleri yönünden ilgili çizelge incelendiğinde Tamiflu'nun 2 µg/ml'de anormal hücre sayısı ve bazı konsantrasyonlarda (0.5 ve 2 µg/ml) hücre başına düşen KA sayılarını pozitif kontrole yakın seviyede artırdığı bulunmuştur.

Tamiflu insan periferal lenfositlerinde eksojen metabolik aktivatör varlığında kromatid kırığı (Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11), kromatid değişimi (Şekil 4.12), poliploidi (Şekil 4.13).

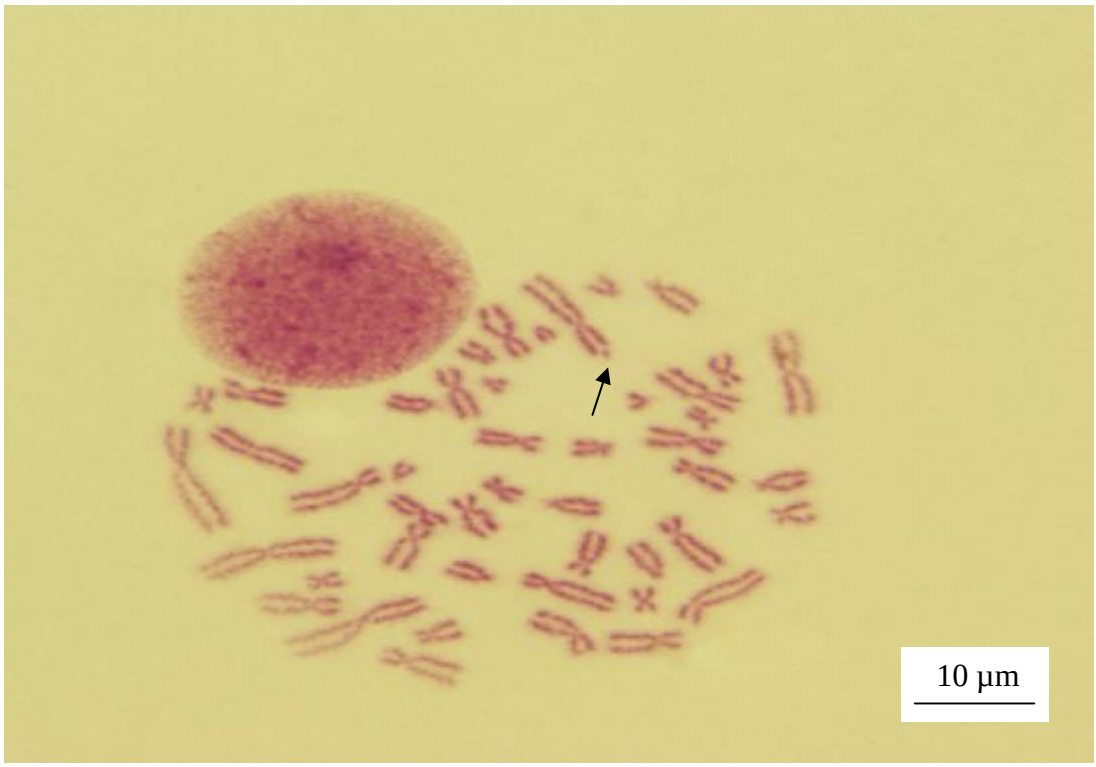
Çizelge. 4.6. Eksojen metabolik aktivatör bulunan ortamda (S9mix) Tamiflu ile muamele edilen insan periferal kan lenfositlerinde kromozom anormallikleri KA, KA'lı hücre oranı ve KA/hücre.

	Muamele		Anormallik Çeşitleri			Anormal	
			Yapısal KA		Sayısal	Hücre	KA/Hücre
Test Maddesi	Periyot (Saat)	Kons. µg/ml	Kromatid	Kromozom	KA	±SH (%)	±SH (%)
Kontrol+ S9mix	-	-	13	2	-	6.50±0.50	0.075±0.005
DMSO+S9mix	3	3.7µl/ml	17	3	-	8.50±0.50	0.100±0.010
Cyp+S9mix	3	28	23	8	-	14.00±1.00	0.155±0.015
Tamiflu+S9mix	3	0.5	14	1	1	7.50±0.50c_1	0.080±0.010
Tamiflu+S9mix	3	1	15	-	-	7.50±0.50c_1	0.075±0.005c_1
Tamiflu+9mix	3	2	20	4	-	12.00±1.00	0.12±0.010

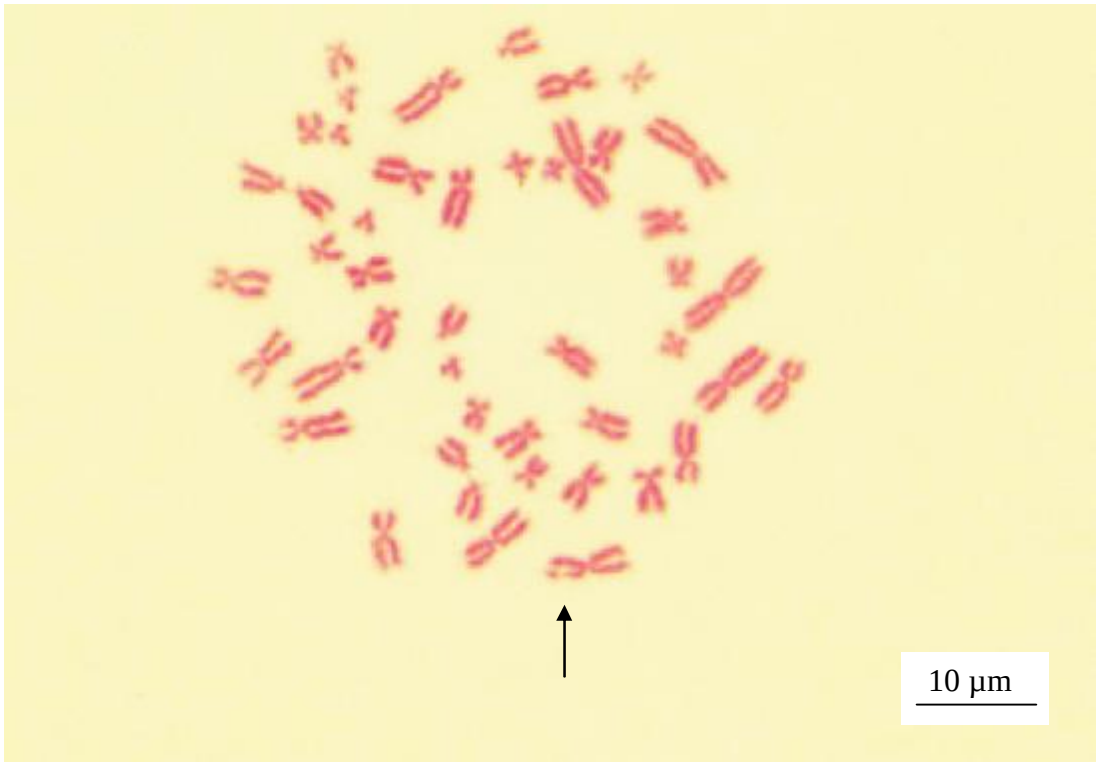
a: Kontrol ile; b: Eritici Kontrol ile; c: Pozitif Kontrol ile aradaki fark önemlidir.
$a_1b_1c_1$: P≤0.05 $a_2b_2c_2$: P≤0.01 $a_3b_3c_3$: P≤0.001



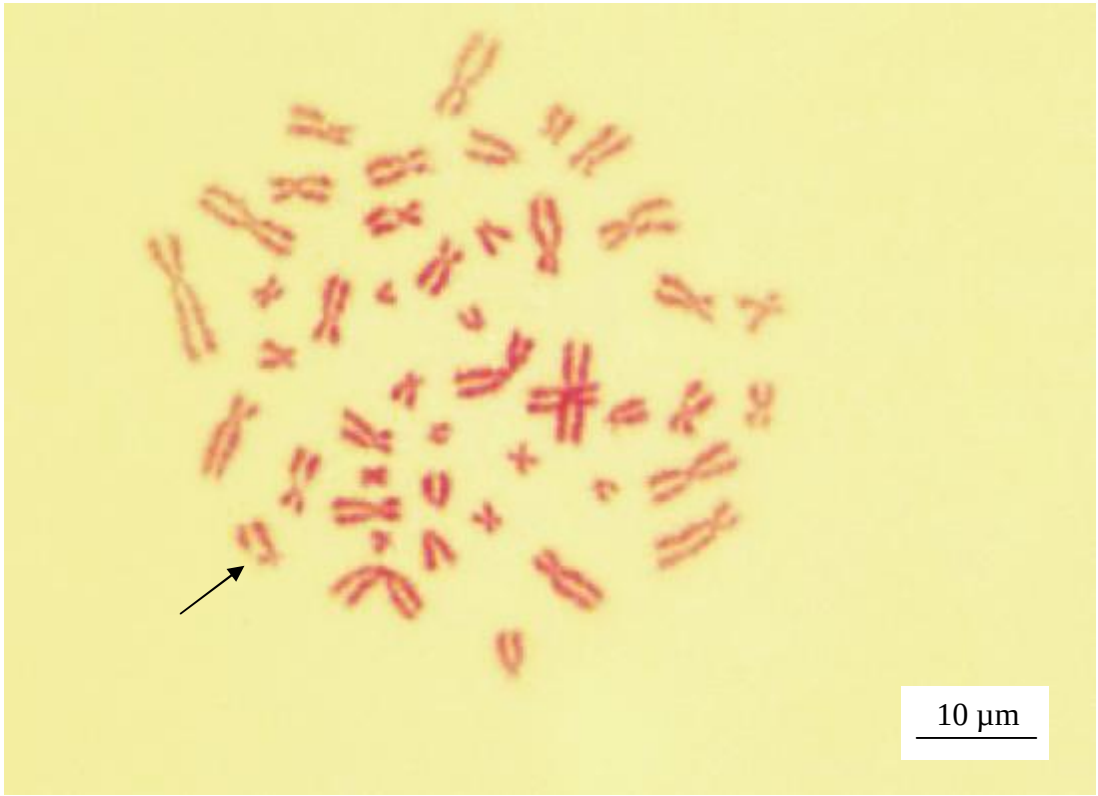
Şekil 4.7. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (1 µg/ml Tamiflu+S9 mix, 3 saatlik muamele, ♂). X1000



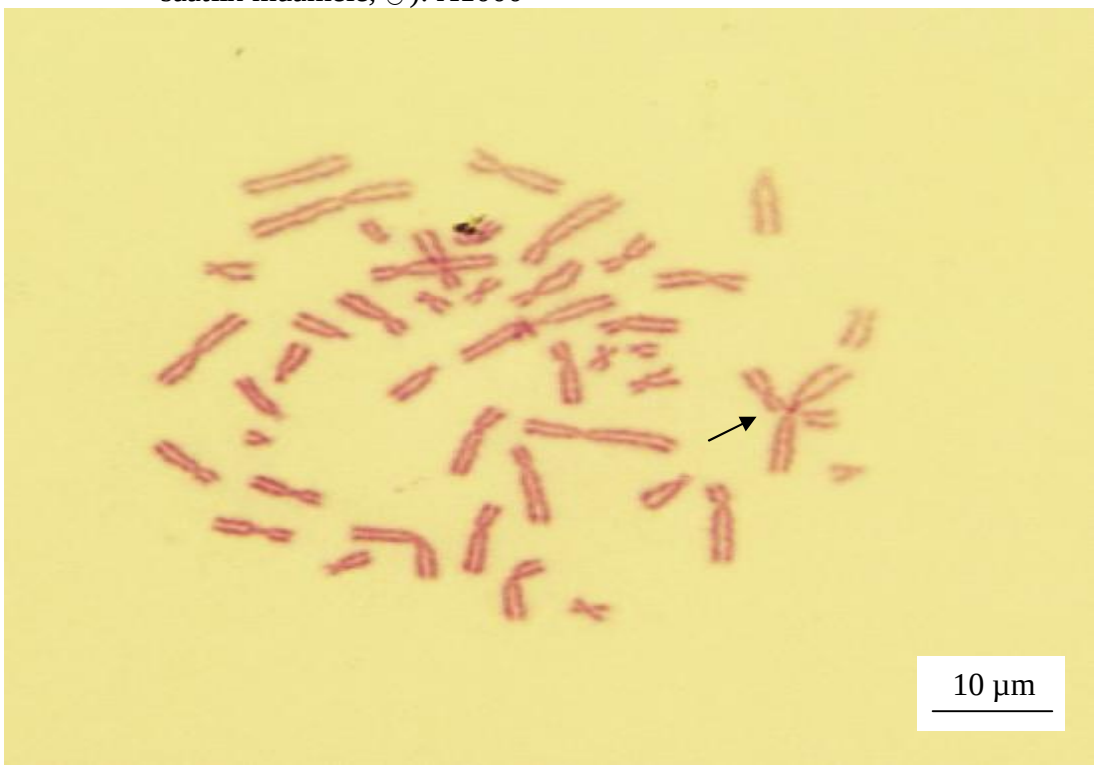
Şekil 4.8. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (2 µg/ml Tamiflu+S9 mix, 3 saatlik muamele, ♂). X1000



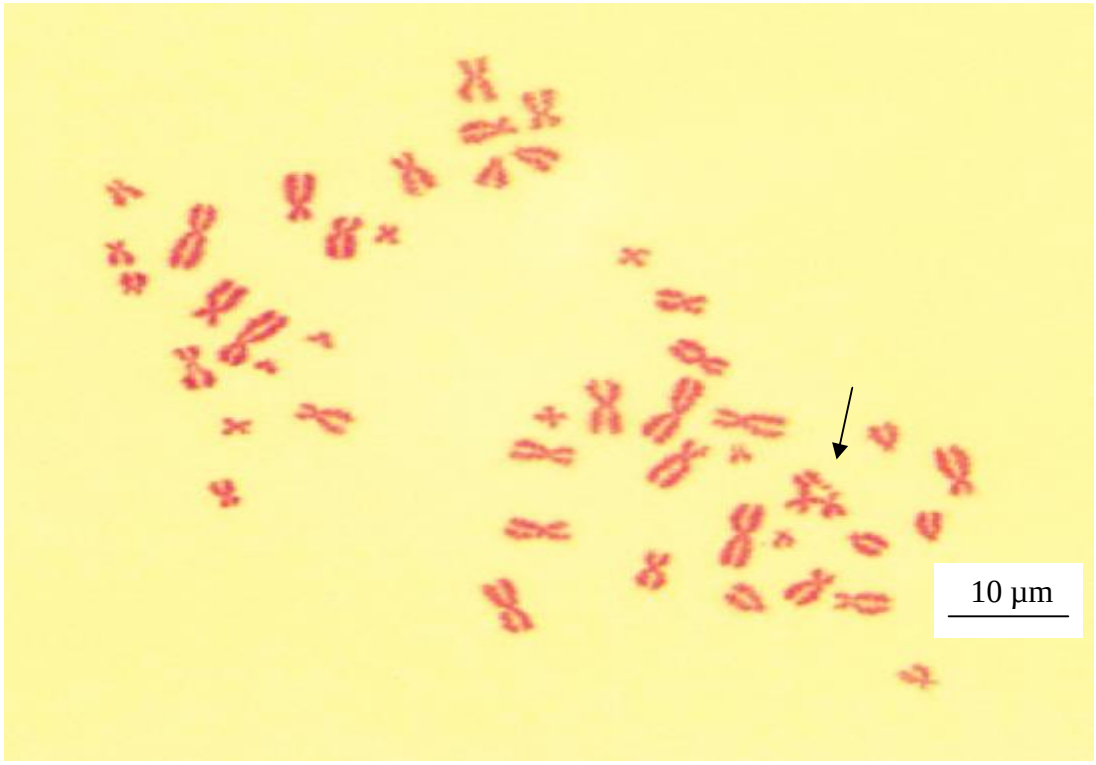
Şekil 4.9. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (0,5 µg/ml Tamiflu+S9 mix, 3 saatlik muamele, ♀). X1000



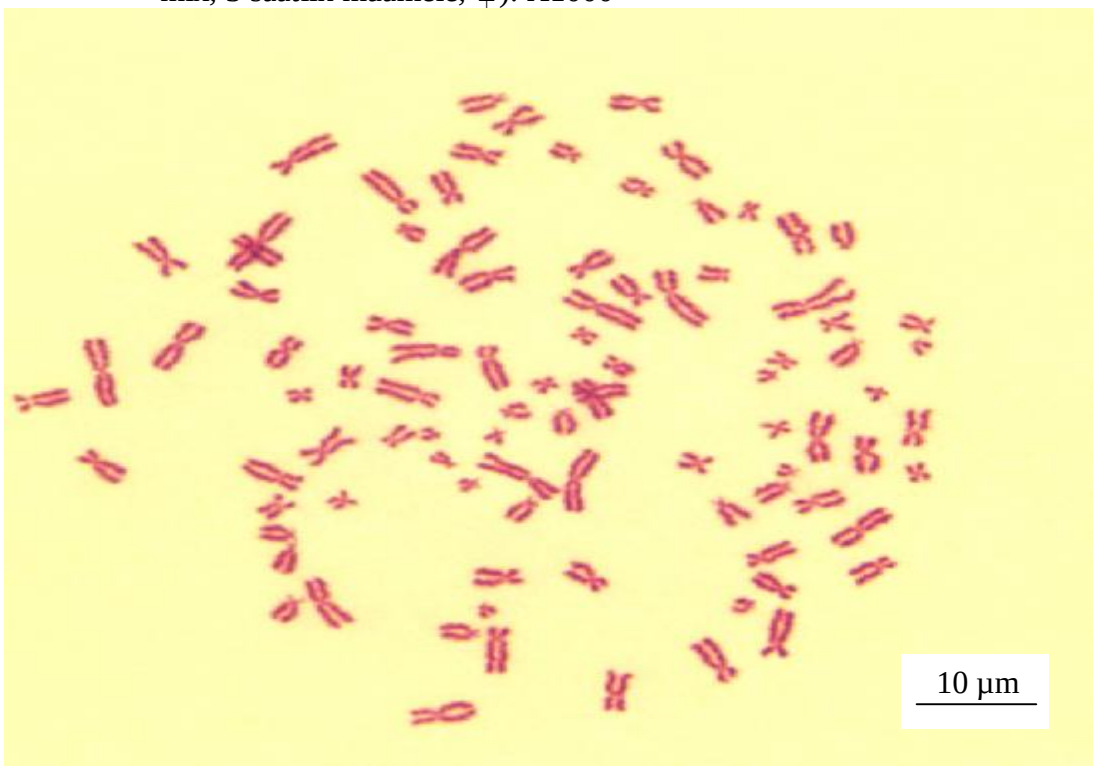
Şekil 4.10. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (0,5 µg/ml Tamiflu+S9 mix, 3 saatlik muamele, ♂). X1000



Şekil 4.11. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (0,5 µg/ml Tamiflu+S9 mix, 3 saatlik muamele, ♂). X1000



Şekil 4.12. Kromatid değişimi (KD) bulunan metafaz plağı (2 µg/ml Tamiflu+S9 mix, 3 saatlik muamele, ♀). X1000

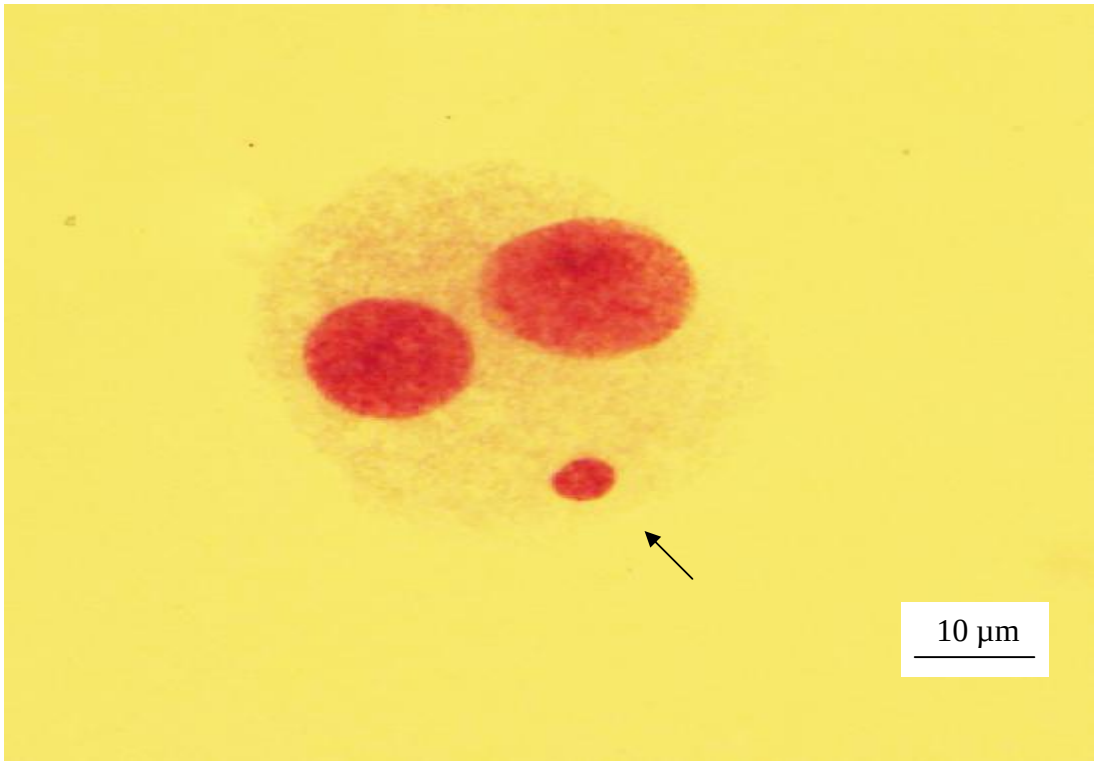


Şekil 4.13. Poliploid hücre (0.5 µg/ml Tamiflu+S9 mix, 3 saatlik muamele, ♂). X1000

4.2.3. Tamiflu'nun Mikronukleus (MN) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

Tamiflu ile metabolik aktivasyon bulunan ortamda muamele edilen kültürlerdeki mikronukleus içeren iki nukleuslu hücre oranını (‰MNBN) ve MN‰'sindeki artış kontrol ve eritici kontrol ile kıyaslandığında önemli bulunmamıştır. Tamiflu'nun bütün konsantrasyonlarda oluşturduğu MN içeren iki nukleuslu hücre oranı bir konsantrasyon (2 µg/ml) ve toplam MN‰'si, pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak bir fark kaydedilmemiştir (Çizelge 4.7).

Tamiflu ile muamele edilen insan periferal kan lenfositlerinde iki nukleuslu hücrelerde mikronukleus oluşumları'da gözlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil. 4.14. Mikronukleus içeren iki nukleuslu hücre (1µg/ml Tamiflu + S9 mix, 3 saatlik muamele, ♂). X1000

Çizelge 4.7. Eksojen metabolik aktivatör bulunan ortamda (S9mix) Tamiflu ile muamele edilmiş insan periferal kan lenfositlerinde MN İçeren İki Nukleuslu Hücre %'si, Hücre Başına Düşen Ortalama MN Sayısı ve Nukleus Bölünme Indeksi (NBI).

	Muamele		MN Sayısına Göre İki Nukleuslu Hücre Sayısı					MN İçeren İki Nukleuslu Hücre	
	Periyot (Saat)	Kons. (µg/ml)	0	1	2	3	>3	‰'si	‰ MN
Kontrol+S9mix	-	-	1989	11				5.5±0.50	5.50±0.50
DMSO+S9mix	3	3.7µl/ml	1987	12		1		6.5±0.50	7.50±1.50
Cyp+S9mix	3	28	1970	29	1			15.0±1.00	15.50±0.50
Tamiflu+S9mix	3	0.5	1987	12	1			6.5±0.50c_1	7.00±1.00
Tamiflu+S9mix	3	1	1985	14	1			7.5±0.50c_1	8.00±1.00
Tamiflu+S9mix	3	2	1982	18				9.0±1.00	9.00±2.00

* Mikronukleus 2000 adet binukleer hücre içinde değerlendirilmiştir, NBI'ler ise toplam 1000 hücre içindedeğerlendirilmiştir.

a: Kontrol ile; b: Eritici Kontrol ile; c: Pozitif Kontrol ile aradaki fark önemlidir.

$a_1b_1c_1$: P≤0.05 $a_2b_2c_2$: P≤0.01 $a_3b_3c_3$: P≤0.001

4.2.4. Tamiflu'nun DNA Replikasyonu, Mitoz Bölünme ve Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri (Sitotoksitesi)

Tamiflu'nun DNA replikasyonu üzerine etkisi proliferasyon indeksinin (PI), mitoz bölünme üzerinde etkisi mitotik indeksin (MI) ve çekirdek bölünmesi üzerine olan etkisini ise nükleus bölünme indeksinin (NBI) hesaplanması yoluyla saptanmıştır.

Tamiflu, eksojen metabolik aktivatör ile muamele edilmiş kültürlerde PI'yı kontrol ve eritici kontrole göre önemli derecede düşürmemiştir. 0.5, 1 ve 2 µg/ml konsantrasyonlardaki üç saatlik Tamiflu uygulaması sonucu elde edilen PI değerleri kontrol ve eritici kontroldeki PI değerlerine benzemektedir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Eksojen Metabolik Aktivatör Bulunan Ortamda (S9mix) Değişik Dozlarda Tamiflu ile Muamele Edilmiş İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Proliferasyon İndeksi (PI), Mitotik İndeks (MI) ve Nükleus Bölünme İndeksi (NBI).

Test Maddesi	Muamele Periyot (Saat)	Muamele Kons. (µg/ml)	PI±SH	MI±SH	NBI±SH
Kontrol+ S9mix	-	-	1.42±0.12	1.79±0.16	1.098±0.014
DMSO+S9mix	3	3.7µl/ml	1.69±0.10	1.65±0.05	1.183±0.109
Cyp+S9mix	3	28	1.54±0.13	1.35±0.05	1.116±0.046
Tamiflu+S9mix	3	0.5	1.83±0.11	1.74±0.21	1.227±0.137
Tamiflu+S9mix	3	1	1.53±0.04	1.46±0.23	1.193±0.039
Tamiflu+9mix	3	2	1.66±0.09	1.83±0.03c_1	1.223±0.055

a: Kontrol ile; b: Eritici Kontrol ile; c: Pozitif Kontrol ile aradaki fark önemlidir.
$a_1b_1c_1$: P≤0.05 $a_2b_2c_2$: P≤0.01 $a_3b_3c_3$: P≤0.001

Tamiflu ile muamele edilen insan periferal kan lenfositlerindeki MI değerleri de kontrol ve eritici kontrole göre önemli derecede düşüş göstermemiştir (Çizelge 4.8).

Tamiflu NBI'yı kontrol ve eritici kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde düşürmemiştir (Çizelge 4.8).

5. TARTIŞMA

Bu çalışma, influenza virüsünün neden olduğu grip enfeksiyonlarının tedavisinde ve önlenmesinde kullanılan Tamiflu antiviralinin genotoksik ve sitotoksik etkiye sahip olup olmadığını insan periferal kan lenfositlerinde eksojen metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom aberasyonu (KA) ve mikronukleus (MN) testleriyle araştırmak için yapılmıştır. Bu amaçla insan periferal kan lenfositleri metabolik aktivatör yokluğunda *in vitro* olarak 0.5, 1 ve 2 µg/ml konsantrasyonlardaki Tamiflu ile 24 veya 48 saat, metabolik aktivatör varlığında ise 3 saat metabolik aktivatör ile birlikte olmak üzere yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda Tamiflu ile muamele edilmiş ve çalışmadan elde edilen sonuçlar diğer araştırıcıların yaptıkları çalışmaların sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

5.1. Tamiflu'nun Kardeş Kromatid Değişimleri (KKD) ve Kromozom Aberasyonları (KA) Üzerindeki Etkileri

Test maddemiz olan Tamiflu insan periferal kan lenfositlerinde metabolik aktivatör bulunmayan ortamda KKD'yi doza bağlı olarak artırmış, ancak bu artış sadece üç muamelede (24 saatte 1 µg/ml ve 48 saatte 1 ve 2 µg/ml) istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Bir kimyasalın metabolik aktivatör varlığında mutajenitesinin artması, o kimyasalın olası *in vivo* mutajenitesi ya da promutajenitesi (indirekt mutajenite) için bir belirteçtir. Metabolik aktivatör bulunan ortamda ise yine doza bağlı bir artış gözlenmiş, ancak bir konsantrasyonda (1 µg/ml) istatistiksel olarak önemli artış bulunmuştur. Tamiflu ile muameleden sonra insan periferal lenfositlerinde bulunan KA'lı anormal hücre oranı ve hücre başına düşen KA sayısı kontrol ve çözücü kontrole göre artmamıştır. Ayrıca, Tamiflu anormallikleri pozitif kontrol kadar uyarmamıştır. Metabolik aktivatör bulunan ortamda ise Tamiflu anormal hücre oranlarını kontrol ve eritici kontrole göre değiştirmemişken, en yüksek konsantrasyonda (2 µg/ml) pozitif kontrole yakın bir seviyede yükseltmiştir. Yine KA/hücre oranını ise 2 µg/ml'lik konsantrasyonlarda pozitif kontrole yakın seviyede artırmıştır.

Literatürde Tamiflu bir yana, mevcut diğer anti-influenza antiviralleriyle (amantadin, rimantadin ve zanamivir) bile (metabolik aktivatörün olduğu ya da olmadığı ortamda, *in vitro* ve *in vivo* genotoksik, mutajenik, teratojenik ve sitotoksik etkileri ile ilgili) herhangi bir genotoksisite çalışması bulunmamaktadır. Bununla birlikte, antiviraller grubuna giren çeşitli ajanların *in vivo* veya *in vitro* genotoksik etkileri çeşitli çalışmalarla değerlendirilmiştir. Bu gibi testlerde kullanılan kimyasalların konsantrasyonları; ya tedavide kullanılan dozlar ile alt ve üst katları ya da LD_{50} dozu ve alt katları denenmektedir. Yaptığımız çalışmaya benzer çalışmalarda test maddesi olarak kullanılan bazı antivirallerlerin kardeş kromatid değişimini indükleme potansiyelleri incelenmiştir. Bu çalışmaların bir kısmında kullanılan test maddeleri KKD sayısını artırmışken bir kısmı ise artırmamıştır. Bu çalışmalardan, Cassiman ve ark. (1981)'nın *in vitro* insan fibroblast ve lenfositleri ile ilgili yaptıkları bir çalışmada test maddesi olarak anti-herpes ajanları olan -5-iodo-deoxyuridine (IDU), 5-trifluoromethyl-deoxyuridine (TFT), ve [E]-5-(2-bromovinyl)-deoxyuridine (BVDU) maddelerini kullanmışlardır. Araştırıcılar sonuç olarak TFT'nin KKD oranını artırdığını, BVDU'nun ise terapötik konsantrasyonlarda KKD değişimini indüklemediğini saptamışlardır. Bu sonuçlar bizim elde ettiğimiz sonuçları kısmen destekler niteliktedir. Çünkü bizim çalışmada, metabolik aktivasyon içermeyen uygulamalarda yüksek konsantrasyonlarda KKD artışı tespit edilmiştir. Bu KKD artışı DNA ipliğinde oluşan hasar ve tamirin muhtemel göstergesidir. Başka bir çalışmada (Cassiman ve ark. 1983) antiviral özelliği olan 2'-deoxyuridine (dUrd) analoglarının bazıları (5-fluoro-dUrd and 5-nitro-dUrd (5'-monophosphate)) KKD'yi uyarmıştır. Yine bir anti-herpes antiviral ajanı olan 5-methoxymethyl-2'-deoxyuridine (MMdUrd)'nın Chinese golden hamster ile yapılan in vivo bir çalışma sonucunda ajan ip yolla verilmiş olup en yüksek konsantrasyonda (1024 μg/kg) KKD'yi uyardığı saptanmıştır. tespit edilmiştir (Ayisi ve ark. 1986). Thust ve ark. (1996)'nın Chinese hamster V79-E hücreleri ile yaptıkları çalışmada test maddesi olarak pürin asiklik nükleosit analogları olan (asiklovir (ACV), valasiklovir (VACV), pensiklovir (PCV), famsiklovir (FCV) ve gansiklovir (GCV)) antivirallerini kullanmışlardır. GCV dışındaki antivirallerin KKD dâhil kısa süreli genotoksisite çalışmalarında hedef hücreye karşı herhangi bir genotoksik

potansiyellerinin olmadığı bulunmuştur. Thust ve ark. (2000b)'nın CHO hücreleri ile yaptıkları bir çalışmada ise önceki çalışmayı destekler nitelikte GCV'nin oldukça güçlü bir KA ve KKD indükleyicisi olduğunu doğrulamışlardır. Bu çalışmanın paralelinde yapılan başka bir çalışmada yine Thust ve ark. (2000a) CHO hücrelerinde asiklovir ve gansiklovirin KA ve KKD indükleyicisi olduğunu bulmalarına karşılık pensiklovirin genotoksik aktiviteden yoksun olduğunu bulmuşlardır. Tatar ve ark. (2005)'nın Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA) hastalarının kanlarından tedavi sırasında yaptıkları kısa süreli testlerden KKD ve MN miktarlarının tedaviden bir ay sonraki miktarından oldukça yüksek olduğunu bulmuşlardır. Son olarak Bayram ve Topaktaş (2008) lamivudinin, kültüre edilmiş insan periferal lenfositlerindeki KKD'yi 24 saatte en yüksek konsantrasyonda (150 μg/ml) ve 48 saatte 125 ve 150 μg/ml'de önemli seviyede artırdığını saptamışlardır. Bu sonuçlar bizim sonuçlara güçlü benzerlikler göstermektedir. Ancak bizim bulgularımızdan farklı olarak; 100, 125 ve 150 μg/ml lamivudinin yapısal kromozomal aberasyonları artırdığı bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada araştırıcılar bizim bulgulardan farklı olarak 24 saatte önemli MN artışlarını saptamışlardır Bu çalışmayla bizim sonuçlarımız arasında kısmen örtüşen noktalar mevcuttur.

Asiklovir ile yapılan *in vivo* fare dominant letal çalışmasında (sıçan ve Chinese hamster kemik iliği hücrelerinde) maksimum tolere edilen doz ile herhangi bir etki saptanmamış olup, Chinese hamsterlardaki sıra dışı klastojenik etki maksimum tolere edici dozun beş katı ile bulunmuştur (Clive ve ark. 1983). Ayers (1988) zidovudin ile yaptığı *in vivo* (sıçan ve fare) ve *in vitro* (kültüre edilmiş insan lenfositleri) testlerde ilacın (3 μg/ml) kültüre edilmiş insan periferal lenfositlerinde bizim sonuçlardan farklı olarak KA'lara yol açtığını ancak sıçan kemik iliği hücrelerinde 100 mg/kg'lık konsantrasyonda KA'lara yol açmadığını bulmuştur.

5.2. Tamiflu'nun Mikronukleus (MN) Oluşumları Üzerindeki Etkileri

Yaptığımız çalışmada Tamiflu metabolik aktivatör yokluğunda 24 ve 48 saatlik uygulamalarda MN içeren iki nukleuslu hücrelerin oranını (‰MNBN) ve toplam mikronukleus oranını (‰MN) hafifçe artırmış, ancak bunlar istatistiki önemi olmayan artışlar olarak kaydedilmiştir. Çalışmamızın metabolik aktivatör

içeren kısmında da yine Tamiflu ‰MNBN'i ve toplam ‰MN'i istatistiki olarak önemi düzeyde artırmamıştır. Bu uygulamada Tamiflu'nun en yüksek konsantrasyonu ile (2 µg/ml) pozitif kontrol arasında farkın bulunmamış olması yine Tamiflu'nun promutajenitesini düşündürmektedir. Tamiflu dışındaki bir takım antiviralle yapılmış MN testi mevcuttur. Bunlardan bazısında MN artışı bulunmuş olup bazısında ise MN artışı bulunmamıştır. Bunlardan Phillips ve ark. (1991)'nın fare kemik iliği hücrelerinde çeşitli nükleosit analogları ile yaptıkları çalışmada, mikronukleuslu polikromatik eritrosit (MNPCE) sayısının arttığını bulmuşlardır. Başka bir çalışmada Motimaya ve ark. (1994) fare kemik iliği hücrelerinde anti-AIDS (dideoksinükleosit) ilaçları ile yaptığı çalışmada, mikronükleus oluşumunun kontrole göre önemli olmadığını bulmuşlardır. Yine benzer bir çalışmada Haynes ve ark. (1996) PCV, ACV ve GCV'nin *in vivo* genotoksisitesi için fare kemik iliği hücrelerinde yaptıkları mikronükleus çalışmasında antivirallerin, MNPCE indüksiyonunu aritmetik olarak artırdığını bildirmişlerdir. Zidovudin antivirali ile yapılan kapsamlı bir çalışmada (Ayers ve ark. 1996) *in vivo* ve *in vitro* deneylerde ise metabolik aktivasyon varlığında ya da yokluğunda MN oluşumu araştırılmıştır. Çalışma sonucunda zidovudinin fare ve sıçanların kemik iliğinde farklı dozlarda mikronukleuslu eritrosit oranını artırdığı bildirilmiştir. Çalışmanın *in vitro* kısmında ise zidovudin metabolik aktivasyon bulunmayan ortamda kültüre edilmiş insan lenfositlerinde 3 µg/ml ve daha yüksek dozlarda MN'ye ilaveten doza bağlı olarak kromozom aberasyonlarını indüklemiştir. Joksić ve ark (2000)'nın ribavirinle tam kan kültüründe yaptıkları *in vitro* CBMN testinde düşük seviyede MN indüklendiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmadaki bulgular bizim bulgularımızla oldukça paraleldir. Başka bir çalışmada (Koszalka ve ark. 2002) 1264W94 adlı antiviralin fare lenfoma testinde metabolik aktivasyonsuz şartlarda mutajenik olduğu belirtilmiştir. Narayana ve ark. (2002a)'nın ribavirin ile sıçan kemik iliği hücrelerinde yaptıkları bir çalışmada ilacın eritrositlerdeki mikronukleus sıklığını artırdığını ve sonuç olarak ribavirinin sıçan kemik iliğinde genotoksik olduğunu bildirmişlerdir. Oshiro ve ark. (1992)'nın BVDU ile CHO ve L5178Y hücreleriyle yaptıkları testlerde metabolik aktivasyonsuz ortamda 500 ve 1750 µg/ml konsantrasyonlardaki ajan kullanımının mikronükleusu indüklediği tespit edilmiştir.

Başka bir çalışmada (Placidi ve ark 2001) anti-herpes B aktivitesi gösteren bir grup antiviralin (beta-L-2'-deoxyadenosine (beta-L-dA), beta-L-2',3'-dideoxyadenosine (beta-L-ddA) ve onun iki bis(S-acyl-2-thioethyl; SATE) phosphotriester türevi, beta-L-2',3'-dideoxyadenosine-5'-monophosphate-bis (MeSATE) ve beta-L-2',3'-dideoxyadenosine-5'-monophosphate-bis(tButylSATE) etkisinin *Salmonella typhimurium*'un çeşitli suşlarıyla ve insan lenfositlerinde comet deneyi ile belirlenmesi hedeflenmiştir. Sonuç olarak metabolik aktivasyonun olup olmamasına bakılmaksızın her iki deneyde de bu bileşikler mutajeniteyi ve kromozom kırıklarını indüklememişlerdir.

Görüldüğü gibi burada atfedilen antivirallerin büyük bir kısmı *in vivo* ya da *in vitro* test sistemlerinde MN oluşumunu uyarmışlardır. Ancak bir kısmının da böyle bir etkisinden bahsetmek söz konusu değilidir.

5.3. Tamiflu'nun Hücre Proliferasyonu, Mitoz Bölünme ve Nukleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri (sitotoksisitesi)

Bu çalışmada Tamiflu'nun insan periferal kan lenfositlerinde DNA replikasyonu üzerindeki etkisi replikasyon indeksinin (RI) (Proliferasyon indeksi=PI), hücre bölünmesi üzerindeki etkisi mitotik indeksin (MI) ve Nükleus bölünmesi üzerine olan etkisi ise nükleer bölünme indeksinin (NBI) saptanması yoluyla belirlenmiştir. Çalışmamızda Tamiflu 24 ve 48 saatlik muamele periyotlarında ve eksojen metabolik aktivatör yokluğunda PI'yı düşürmüş olup, bu düşüş sadece bir konsantrasyon hariç (1 μg/ml 48 saat) istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. Aynı çerçevede MI'ler incelendiğinde yine düşüşler bulunmuştur. Çeşitli konsantrasyonlarda (1 ve 2 μg/ml 24 saat yine 1 ve 2 μg/ml 48 saat) kontrole göre önemli düşüşler tespit edilmiştir. NBI'de ise sadece bir konsantrasyonda (1 μg/ml 24 saat) kontrol ve eritici kontrole göre önemli bir düşüş saptanmıştır. Benzer çalışmalardan birisi olan Narayana ve ark. (2002a)'nın sıçan kemik iliği hücrelerinde ribavirinin çeşitli konsantrasyonları (10, 15, 20, 30, 50, 75, 100 ve 200 mg/kg) ile yaptıkları bir *in vivo* çalışmada 75 mg/kg ve üstü konsantrasyonlarda PCE oranının azaldığı saptanmıştır. Sitotoksisitenin bir sonucu olan bu düşüşün eritropoezin engellenmesinden ya da hücre hasarından kaynaklandığını, dolayısıyla ribavirinin

sıçan kemik iliğinde sitotoksik olduğunu rapor etmişlerdir. Başka bir çalışmada (Motimaya ve ark. 1994) AIDS'e karşı kullanılan dideoksinükleosit antivirallerinin (azidothymidine, dideoxycytidine, dideoxyadenosine ve dideoxyinosine) fare kemik iliğinde test edilen dozlarının sitotoksik olmadığı saptanmıştır. Pizer ve ark (1987)'nın bazı anti-herpetik nükleosit analogları (ACV, FIAC ve FMAU) ile CHO 51-11 gly hücrelerinde yaptıkları çalışma sonunda ACV'nin 51-D3 hücre hattında oldukça sitotoksik, FIAC'ın 51-11 ve 51-D3 hattında hafif sitotoksik olduğu ve FMAU'nun ise her iki hücre hattında da sitotoksisitesinin olduğu vurgulanmıştır. Bu çalışmanın sonucu bizim elde ettiğimiz sonuçlarla çelişmektedir. Joksić ve ark. (2000)'nın tam kan kültüründe ribavirinin sitotoksisistesi için yaptıkları çalışmada antiviralin 0.05-0.65 μmol/ml'lik konsantrasyonlarında muameleli lenfositlerin proliferasyon potansiyelinde azalmalar bulunmuş olup bu azalmanın metafaza girişin duraklatılmasından kaynaklandığı bildirilmiştir. Bu çalışmada sonuç olarak ribavirinin test edilen konsantrasyonlarının hücresel proliferasyon geciktirdiği vurgulanmıştır. Genel anlamda Joksić ve ark. (2000)'nın bulguları bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgularla oldukça benzerlikler göstermektedir. Bayram ve Topaktaş (2008)'ın lamivudin ile insan periferal lenfositlerinde yaptıkları bir *in vitro* çalışmada lamivudinin bütün konsantrasyonlarda (75, 100, 125 ve 150 μg/ml) ve iki muamele periyotunda (24 ve 48 saat) PI ve MI'yı önemli seviyede düşürdüğü bulunmuştur. Bu çalışmaya paralel olarak bizim incelemelerimizde genel ve istatistiki olarak önemli düşüşler (PI ve MI değerlerinde) bulunmuştur. Benzer şekilde Ayers ve ark. (1996)'nın zidovudin ile kemirgen, köpek ve maymunlarla yaptıkları *in vivo* çalışmada, 62.5-250 mg/kg oral yolla verilen zidovudinin tazı köpeklerinde sitotoksik etkileri not edilmiştir.

Çalışmanın diğer ayağı olarak eksojen metabolik aktivatör bulunan ortamda Tamiflu, hücre proliferasyonunu (PI), mitoz bölünmeyi (MI) ve nukleus bölünmesini (NBI) istatistikî olarak etkilememiştir. Bu sonuca göre test edilen Tamiflu'nun dolaylı ya da dolaysız olarak hücre bölünmesine herhangi bir etkisinin olmadığı görülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Tamiflu'nun, kültüre edilmiş insan periferal kan lenfositlerinde eksojen metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda, KKD'yi, sadece yüksek konsantrasyonlarda artırdığı, KA'yı ve MN'yi önemli derecede uyarmadığı belirlenmiştir.

Sitotoksisite açısından baktığımızda ise Tamiflu eksojen metabolik aktivatör yokluğunda 24 ve 48 saatlik muamele periyotlarında PI'i düşürmüş, ancak bu düşüşler önemli olmayan düzeylerde kalmıştır. MI ise yine yüksek konsantrasyonlarda kontrole göre genel olarak düşüş sergilemiştir. Tamiflu eksojen metabolik aktivatör varlığında ise hücre proliferasyonu ve mitoz bölünmeyi etkilememiştir. Sitotoksisitenin bir göstergesi olan NBI'deki bulgular ise, metabolik aktivasyon varlığında ya da yokluğunda önemsiz dalgalanmalar şeklinde karşımıza çıkmıştır.

Sonuçlarımızın tekrar bir özetleyecek olursak; elde ettiğimiz sonuçlar, test maddemizin zayıf sitostatik bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte bu etkilerin metabolik aktivatör varlığında daha da zayıfladığı saptanmıştır. Ancak bizim çalışmamızda elde edilen bu etkiler; Tamiflu'daki oseltamivir tarafından mı yoksa yardımcı maddeler tarafından mı kaynaklandığı belirsizliğini korumaktadır.

Bu sonuçlara göre Tamiflu'nun in vitro şartlarda kuvvetli genotoksik ve sitotoksik bir etkiye sahip olmadığını değerlendirmekteyiz. Ancak her ne kadar bu sonuçlar elde edilmiş olsa bile başka test sistemleri ile de Tamiflu'nun olası etkilerinin sınanması oldukça önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

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.

AYERS, K.M., 1988. Preclinical toxicology of zidovudine. An overview. Am. J. Med., 85(2A):186-8.

———, CLIVE, D., TUCKER, W.E. Jr., HAJIAN, G. and DE MIRANDA, P.,1996. Nonclinical toxicology studies with zidovudine: genetic toxicity tests and carcinogenicity bioassays in mice and rats. Fundam. Appl. Toxicol.,32(2):148-58.

AYISI, N.K., GUPTA, V.S., STUART, A.L. and DOIGE, C.E., 1986. Toxicity of 5-methoxymethyl-2'-deoxyuridine in hamsters and evaluation of its mutagenicity by sister chromatid exchanges and hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase assays. Toxicol. Appl. Pharmacol., 86(2):180-8.

BARKER, W. H., 1986. Excess pneumonia and influenza associated hospitalization during influenza epidemics in the United States, 1970-78. Am. J. Public. Health ., 76(7):761-5

BAYRAM, S. ve TOPAKTAŞ, M., 2008. Confirmation of the chromosome damaging effects of lamivudine in in vitro human peripheral blood lymphocytes. Environ Mol Mutagen., 49(4):323-33

BILIMORIA, M.H. and GUPTA, S.V., 1986. Comparison of the mutagenic activity of 5-hydroxymethyldeoxyuridine with 5-substituted 2'-deoxyuridine analogs in the Ames Salmonella/microsome test. Mutat. Res., 169(3):123-7.

BOFFETTA, P., VAN DER HEL, O., NORPPA, H., FABIONOVA, E., FUCIC, A., GUNDY, S., LAZUTKA, J., CEBULSKA-WASILEWSKA, A., PUSKAILEROVA, D., ZNAOR, A., KELECSENYI, Z., JUOZAS, K., 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.

BONASSI, S., HAGMAR, L., STROMBERG, U., MONTAGUD, A. H., TINNERBERG, H., FORNI, A., HEIKKILÄ, P., WANDERS, S., WILHARDT, P., HANSTEEN, I. L., KNUDSEN, L. E. and NORPPA, H., 2000. Chromosomal Aberrations in Lymphocytes Predict Human Cancer Independently of Exposure to Carcinogens. Cancer Res., 60:1619-1625.

———, FENECH, M., LANDO, C., LIN, Y. P., CEPPI, M., CHANG, W. P., HOLLAND, N., KIRSCH-VOLDERS, M., ZEIGER, E., BAN, S., BARALE, R., BIGATTI, M. P., BOLOGNESI, C., JIA, C., Di GIORGIA, M., FREGUSON, L. R., FUCIC, A., LIMA, O. G., HRELIA, P., KRISHNAJA, A. P., LEE, T. K., MIGLIORE, L., MIKHALEVICH, L., MIRKOVA, E., MOSESSO, P., MULLER, W. U., ODAGIRI, Y., SCARFI, M. R., SZABOVA, E., VOROBTSOVA, I., VRAL, A. and ZIJNO, A., 2001. Human Micronucleus Project: International Database Comparison for Results With the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay in Human Lymphocytes: I. Effect of Laboratory Protocol, Scoring Criteria and Host Factors on the Frequency of Micronuclei. Environ. and Mol. Mutagen., 37:31-45.

———, ZNAOR, A., NORPPA, H. and HAGMAR, L., 2004. Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective. Cytogenet. Genome Res. 104:376-382.

———, UGOLINI, D, KIRSCH-VOLDERS, M., STROMBERG, U., VERMEULEN, R., TUCKER, J. D., 2005. Human Population With Cytogenetic Biomarkers: Review of the Literature and Future Prospectives. Environ. and Mol. Mutagen., 45:258-270.

———, ZNAOR, A., CEPPI, M., LANDO, C., CHANG, W. P., HOLLAND, N., KIRSCH-VOLDERS, M., ZEIGER, E., BAN, S., BARALE, R., BIGATTI, M. P., BOLOGNESI, C., CEBULSKA-WASILEWSKA, A., FABIANOVA, E., FUCIC, A., HAGMAR, L., JOKSIĆ, G., MARTELLI, A., MIGLIORE, L., MIRKOVA, E., SCARFI, M. R., ZIJNO, A., NORPPA, H., FENECH, M.,

2007. An Increased Micronucleus Frequency in Peripheral Blood Lymphocytes Predicts the Risk of Cancer in Humans. Carcinogenesis, 28:625-631.

BRIDGES, E.G., SELDEN, J.R. and LUO, S.,2008. Nonclinical safety profile of telbivudine, a novel potent antiviral agent for treatment of hepatitis B. Antimicrob. Agents Chemother., 52(7): 2521-8.

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.

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

CARTER, M.M., TORRES, S.M., COOK, D.L.Jr., MCCASH, C.L., YU, M., WALKER, V.E. and WALKER, D.M., 2007. Relative mutagenic potencies of several nucleoside analogs, alone or in drug pairs, at the HPRT and TK loci of human TK6 lymphoblastoid cells. Environ. Mol. Mutagen., 48(3-4):239-47.

CASSIMAN, J.J., DE CLERCG, E., JONES, A.S., WALKER, R.T. and VAN DEN BERGHE, H., 1981. Sister chromatid exchange induced by anti-herpes drugs. Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)., 283(6295):817-8

——— , DE CLERCG, E. and VAN DEN BERGHE, H., 1983. Induction of sister-chromatid exchange by 5-substituted 2'-deoxyuridines. Mutat. Res., 117(3-4):317-27.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) 2009. Oseltamivir-resistant novel influenza A (H1N1) virus infection in two immunosuppressed patients - Seattle, Washington. MMWR Morb Mortal Wkly Rep., 58(32):893-6.

CHENG, M., CONNER, M. K. and ALARIA, Y., 1981. Potency of Some Carbamates as Multiple Tissue Sister Chromatid Exchanges in Bloom's Syndrome Lymphocytes. Cancer Res., 71:4508-4512.

———, T. J., CHRISTIANI, D. C., XU, X., WAIN, J. C., WIENCKE, J. K. and KELSEY, K. T., 1996. Increased Micronucleus Frequency in Lymphocytes from Smokers with Lung Cancer. Mutat. Res., 349:43-50.

CHEVALIEZ, S., BRILLET, R., LAZARO, E., HEZODE, C. and PAWLOTSKY, J.M., 2007. Analysis of ribavirin mutagenicity in human hepatitis C virus infection. J. Virol., 81(14):7732-41.

CLIVE, D., TURNER, N.T., HOZIER, J., BATSON, A.G. and TUCKER, W.E.Jr., 1983. Preclinical toxicology studies with acyclovir: genetic toxicity tests. Fundam. Appl. Toxicol., 3(6):587-602.

DE CLERCQ, E., (2005). (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU). Medicinal Research Reviews 25(1): 1-20.

DE MEYER, N., HAEMARS, A., MISHRA, L., PANDEY, H.K., PIETERS L. A., VANDEN BERGHE, D.A. and VLIETINCK, A.J., 1991. 4'-Hydroxy-3-methoxyflavones with potent antipicornavirus activity. J. Med. Chem., 34(2):736-46.

DELLARCO, V. L., MAVOURNIN, K. H. and TICE, R. R., 1985. Aneuploidy and Health Risk Assessment: Current Status and Future Directions, Environ. Mutagen., 7:405-424.

EASTMOND, D. A. and TUCKER, J. D., 1989. Identification of Aneuploidy-Inducing Agents Using Cytokinesis-Blocked Human Lymphocytes and an Anti-Kinetochore Antibody. Environ. Mol. Mutagen., 13:34-43.

EL-TARRAS, A., BRAUN. R., STENZ, E. and SCHUSTER, G., 1989. Mutagenicity of antiviral substances of nucleobase analogue type in Salmonella typhimurium employing metabolic activation by mouse liver homogenate or cell-free plant extracts. Zentralbl. Mikrobiol., 144(39):191-6.

FENECH, M. and MORLEY, A. A., 1985. Measurement of Micronuclei in Lymphocytes. Mutat. Res., 147:29-36.

———, M., 1997. The Advantages and Disadvantages of the Cytokinesis-Block Micronucleus Method. Mutat. Res., 392: 11-18.

———, HOLLAND, N., CHANG, W. P., ZEIGER, E. and BONASSI, S., 1999. The Human Micronucleus Project-An International Collaborative Study on the

Use of the Micronucleus Technique for Measuring DNA Damage in Humans. Mutat. Res., 428:271-283.

———, 2000. The in vitro Micronucleus Technique. Mutat. Res., 455:81-95.

———, 2002. Biomarkers of Genetic Damage for Cancer Epidemiology. Toxicology, 181-182: 411-416.

GARNER, R.C., MILLER, E.C. and MILLER, J.A., 1972. Liver microsomal metabolism of aflatoxin B_1 to a reactive Liver microsomal metabolism of aflatoxin B_1 to a reactive derivative toxic to Salmonella typhimurium TA 1530. Cancer Res., 32:2058-2066.

GREENE, J.A., AYERS , K.M., TUCKER, W.E.Jr. and MIRANDA, P., 1996. Nonclinical toxicology studies with zidovudine : reproductive toxicity studies in rats and rabbits. Fundam Appl Toxicol., 32(2):140-7.

GROSS, P.A., 1991. Current recommendations for the prevention and treatment of influenza in the older population. Drugs aging., 1(6):431-9.

HAGMAR, L., BRØGGER, A., HANSTEEN, I.-L., HEIM, S., HÖGSTEDT, B., KNUDAEN, L., LAMBERT, B., LINNAINMAA, K., MITELMAN, F., NORDENSON, I., REUTERWALL, C., SALOMAA, S., SKERFVING. S. and SORSA, M., 1994. Cancer Risk in Human Predicted by Increased Levels of Chromosomal Aberrations in Lymphocytes: Nordic Study Group on the Health Risk of Chromosome Damage. Cancer Res., 54:2919-2922.

HARRIS KS, BRABANT W, STYRCHAK S, GALL A, DAIFUKU R., 2005. KP-1212/1461, a nucleoside designed for the treatment of HIV by viral mutagenesis. Antiviral Res. 67(1):1-9.

HAYNES, P., LAMBERT, T.R. and MITCHELL, I.D., 1996. Comparative in-vivo genotoxicity of antiviral nucleoside analogues; penciclovir, acyclovir, ganciclovir and the xanthine analogue, caffeine, in the mouse bone marrow micronucleus assay. Mutat. Res., 369(1-2):65-74.

HEDDLE, J. A., CIMINO, M. C., HAYASHI, M., ROMAGNA, F., SHELBY, M. D., TUCKER, J. D., VANPARYS, Ph. and MacGREGOR, J. T., 1991.

Micronuclei as an Index of Cytogenetic Damage: Past, Present, and Future. Environ. and Mol. Mutagen., 18:277-291.

HELLEDAY, T., 2003. Pathways for Mitotic Homologous Recombination in Mammalian Cells. Mutat. Res., 532:103-115.

HOFFMANN, S.H., WADE, M.J., STAFFA, J.A., MCGREGOR, D.B., HOLMSTROM, M. and DAYAN, A.D., 1987. Dominant lethal study of ribavirin in male rats. Mutat. Res., 188(1):29-34.

HURT, A.C., HOLIEN, J.K. and BARR, I.G., 2009. In vitro generation of neuraminidase inhibitor resistance in A(H1N1) influenza viruses. Antimicrob Agents Chemother (Epub ahead of print).

JAJU, M., 1984. Evaluation of genotoxicity of ampicillin and carbenicillin on human lymphocytes in vitro: chromosome aberrations, mitotic index, cell cycle kinetics, satellite associations of acrocentric chromosomes and sister chromatid exchanges. Hum. Toxicol., 3(3):173-91.

JOKSIĆ, G., STANKOVIĆ, M., VASIC, V., CAKAR, M. and JOKANOVIC, M., 2000. Influence of ribavirin on the micronucleus formation and in vitro proliferation of human lymphocytes. Neoplasma., 47(5):283-7

JOKSIĆ, I., LESKOVAC, A., PETROVIĆ, S. and JOKSIĆ, G., 2006. Vitamin B12 reduces ribavirin-induced in phytohemaglutinin-stimulated human leymphocytes. Tohoku J. Exp. Med., 209(4):347-54.

KAUDERER, B., ZAMITH, H., PAUMGARTEN, F. J. and SPEIT, G., 1991. Evaluation of the Mutagenicity of Beta-Myrcene in Mammalian Cells In Vitro. Environ. Mol. Mutagen., 18 (1):28-34.

KIRSCH-VOLDERS, M., ELHAJOUJI, A., CUNDARI, E. and VAN HUMMELEN, P., 1997. The In Vitro Micronucleus Test: A Multi-endpoint Assay to Detect Simultaneously Mitotic Delay, Apoptosis, Chromosome Breakage, Chromosome Loss and Non-disjunction. Mutat. Res., 392 (1-2):19-30.

KOSZALKA, G.W., JOHNSON, N.W., GOOD, S.S., BOYD, L., CHAMBERLAIN, S.C., TOWNSEND, L.B., DRACH, J.C. and BIRON, K.K., 2002. Preclinical and toxicology studies of 1263W94, a potent and selective

inhibitor of human cytomegalovirus replication. Antimicrob. Agents Chemother., 46(8):2373-80.

LUI, K. J. and KENDAL, A. P., 1987. Impact of influenza epidemics on mortality in the United States from October 1972 to May 1985. Am. J. Public Health., 77(6):712-6.

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

MARQUARDT, H., WESTENDORF, J. and MARQUARDT, H., 1982. Potent antiviral 2'-fluoro-arabinosyl pyrimidine nucleosides. Lack of mutagenic activity. Carcinogenesis., 3(5):593-6.

MOTIMAYA, A.M., SUBRAMANYA K.S., CURRY, P.T. and KITCHIN, R.M., 1994. Evaluation of the genotoxic potential of selected anti-AIDS treatment drugs at clinical doses in vivo in mice. Toxicol Lett., 70(2):171-83.

MULLOOLY, J. P. and BARKER, W. H., 1982. Impact of type A influenza on children: a retrospective study. Am. J. Public Health., 72(9):1008-16.

NARAYANA, K., D'SOUZA, U.J. and SEETHARAMA RAO, K.P., 2002a. Ribavirin-induced sperm shape abnormalities in Wistar rat. Mutat. Res., 513(1-2):193-6.

_____,K., D'SOUZA, U. J. and SEETHARAMA RAO, K.P.,2002b. The genotoxic and cytotoxic effects of ribavirin in rat bone marrow. Mutat. Res., 521(1-2):179-85.

NORPPA, H. and FALCK, G. C-M., 2003. What Do Human Micronuclei Contain? Mutagenesis, 18 (3):221-233.

———, 2004. Cytogenetic Biomarkers and Genetic Polymorphism. Toxicology Letters, 149:309-334.

———, 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 TG 473, 1997. In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test.

OSHIRO, Y., PIPER, C.E., SOELTER, S.G., BALWIERZ, P.S. and GARRIOTT, M.L., 1992. Genotoxic properties of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU). Fundam. Appl. Toxicol., 18(4):491-8.

PERRY, P. and EVANS, H. J., 1975. Cytological Detection of Mutagen-Carcinogen Exposure by Sister Chromatid Exchange. Nature, 258:121-125.

PHILLIPS, M.D., NASCIMBENI, B., TICE, R.R. and SHELBY, M.D., 1991. Induction of micronuclei in mouse bone marrow cells: an evaluation of nucleoside analogues used in the treatment of AIDS. Environ. Mol. Mutagen., 18(3):168-83.

PIZER, L.I., MITCHELL, D.H., BENTELE, B. and BETZ, J.L., 1987. A mammalian cell line designed to test the mutagenic activity of anti-herpes nucleosides. Int. J. Cancer., 40(1):114-21.

PLACIDI, L., DE MEO, M., GOSSELIN, G., IMBACH, JL., BRYANT, M.L., DUMENIL, G. and SOMMADOSSI, J.P., 2001. Evaluation of the mutagenic and genotoxic activities of anti-hepatitis B analogs of beta-L-adenosine by the Ames test and the Comet assay. Antiviral Res., 50(2): 139-45.

RENCÜZOĞULLARI, E. and TOPAKTAŞ, M., 1991. The Relationship Between Quantities of Bromodeoxyuridine and Human Peripheral Blood with Determination of the Best Differantial Staining of Sister Chromatids Using Chromosome Medium-B. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, (5), 19-24.

ROCHE, 2009. http://www.roche.com.tr/roche/content/index/index.asp.

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., 60:390-394.

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

SARATIKOV, A.S., NOVOZHEEVA, T.P., LIVSHITS, N.S., BURCHENKOVA, F.I., KADYCHAGOVA, N.G., AKHMEDZHANOV, R.R., BASHIROVA, L.V., EREMINA, A.A. and POTAPOVA G.V., 1998. A preclinical trial of iodoantipyrine safety. Eksp. Klin. Farmakol., 61(2):57-9.

SIMON and STILLE, 2008. Hastanede ve Muayenehane Hekimliğinde ANTİBİYOTİK TEDAVİSİ. (Ö. Anğ editör) (10. Baskı)Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 718s.

SONODA, E., SASAKI, M. S., MORRISON, C., YAMAGUCHI-IWAI, Y., TAKATA, M. and TAKEDA, S., 1999. Sister Chromatid Exchanges Are Mediated by Homologous Recombination in Vertebrate Cells. Molecular and Cellular Biology, 19 (7):5166-5169.

SPEIT, G., 1984. Considerations on the Mechanism of Differantial Giemsa Staining of Bromodeoxyuridine-Substituted Chromosomes. Hum. Genet., 67:264-269.

——— and HAUPTER, S., 1985. On the Mechanism of Differential Giemsa Staining of BrdU-Substituted Chromosomes. Hum. Genet.,70:126-129.

STAEDTLER, F., SUTER, W. and MARTUS, H.J. 2004. Induction of A:T to G:C transition mutations by 5-(2-chloroethyl)-2'-deoxyuridine (CEDU), an antiviral pyrimidine nucleoside analogue, in the bone marrow of Muta Mouse. Mutat. Res. 568 (2): 211-20.

SURRALLÉS, J., XAMENA, N., CREUS, A. and MARCOS, R., 1995. The Suitability of the Micronucleus Assay in Human Lymphocytes as a New Biomarker of Excision Repair. Mutat. Res., 342:43-59.

TATAR, A., OZKURT, Z. and KIKI, I., 2005. Genotoxic effect of ribavirin in patients with crimean-Congo hemorrhagic fever. Jpn. J. Infect. Dis., 58(5):313-5.

T.C. Sağlık Bakanlığı, 2009 http://www.grip.saglik.gov.tr.

THUST, R., SCHACKE, M. and WUTZLER, P., 1996. Cytogenetic genotoxicity of antiherpes virostatics in Chinese hamster V79-E cells. I. Purine nucleoside analogues. Antiviral Res., 31(1-2):105-13.

———, TOMICIC, M., KLÖCKING, R., WUTZLER, P. and KAINA, B., 2000a. Cytogenetic genotoxicicty of anti-herpes purine nucleoside analogues in cho cells expressing thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1: comparison of ganciclovir, penciclovir and aciclovir. Mutagenesis., 15(2): 177-84

———, TOMICIC, M., KLÖCKING, R., VOUTILAINEN, N., WUTZLER, P. and KAINA, B., 2000b. Comparison of the genotoxic and apoptosis-inducing properties of ganciclovir and penciclovir in Chinese hamster ovary cells transfected with the thymidine kinase gene of herpes simplex virus-1: implications for gene therapeutic approaches. Cancer Gene Ther., 7(1): 107-17.

TOPAKTAŞ, M. ve SPEIT, G., 1990. Sister Chromatid Exchange (SCE) Testinin Mutajenite ve Kanserojenitenin Belirlenmesinde Kullanılması. Ç. Ü. Sağlık Bil. Der., 5 (1, 2, 3), 73-84.

———, RENCÜZOĞULLARI, E., 1995. Sitogenetik. Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü. 182 s.

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.

USTAÇELEBİ, Ş., 2004. Moleküler, Klinik ve Tanısal VIROLOJİ. Güneş Basım, Ankara, 389s.

WUTZLER, P. and THRUST, R., 2001. Genetic risks of antiviral nucleoside analogues –a survey. Antiviral Res., 49(2):55-74.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Ceyhan'da doğdum. İlk ve ortaokulu Tatarlı Çataklı Bakırlı İlköğretim okulunda, liseyi Ceyhan Endüstri Meslek Lisesi'nde okudum. 1998 yılında ÖSS'yi kazanarak İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde öğrenime başladım. 2002 yılında Biyolog unvanı alarak mezun oldum. 2002 yılında İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Öğretmenliği Programında Tezsiz Yüksek Lisans eğitimime başladım ve eğitimimi 2004 yılında tamamladım. 2005 yılında Askerlik hizmetini Erzurum'da yaptım. 2006 yılında İçişleri Bakanlığında devlet memuru olarak göreve başladım. 2007 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda yüksek Lisans öğrenimine başladım. Halen öğrenimimi sürdürmekteyim.