

**DOKSİSİKLİNİN İNSAN PERİFERAL
LENFOSİTLERİNDE *IN VITRO*
GENOTOKSİK ETKİLERİ
FERİDUN AFAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

T.C.
ORDU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKSİSİKLİNİN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE *IN VITRO*
GENOTOKSİK ETKİLERİ

FERİDUN AFAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AKADEMİK DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Zülal ATLI ŞEKEROĞLU

ORDU – 2011

T.C.
ORDU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından 14/06/2011 tarihinde yapılan sınav ile BİYOLOJİ Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Zülal A. ŞEKEROĞLU



Üye : Yrd. Doç. Dr. Vedat ŞEKEROĞLU



Üye : Yrd. Doç. Dr. Cem Tolga GÜRKANLI



ONAY :

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../2011

Doç. Dr. Latif KELEBEKLİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOKSİSİKLİNİN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE *IN VITRO* GENOTOKSİK ETKİLERİ

ÖZ

Bu çalışmada, antimikrobiyal ve antiinflamatuar etkiye sahip ve pek çok enfeksiyonun tedavisinde yaygın olarak kullanılan doksisisiklin (DOX) etken maddesinin insan periferal lenfosit hücrelerindeki *in vitro* genotoksik etkileri, kromozom anormallığı (KA) ve mikronükleus (MN) testleri kullanılarak araştırılmıştır. Ayrıca test maddesinin hücre bölünmesi üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek için, mitotik indeks (MI) ve nükleer bölünme indeksi (NBI) hesaplanmıştır. Hücre kültürleri DOX'in 2, 4 ve 6 µg/ml'lik konsantrasyonlara 48 saatlik süreyle maruz bırakılmıştır.

DOX'in kullanılan tüm dozlarının doz artışına bağlı olarak negatif kontrole göre MI'ı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşürdüğü belirlenmiştir. Ayrıca DOX, iki yüksek doz olan 4 ve 6 µg/ml'lik konsantrasyonlarda doz artışına bağlı olarak negatif kontrole karşılaştırıldığında NBI'ni de istatistiksel olarak önemli derecede düşürmüştür. Fakat DOX'in test edilen tüm konsantrasyonlarında KA ve MN oluşumunda ortaya çıkan artışların negatif kontrole göre istatistiksel açıdan önemli olmamıştır. Bu çalışmanın sonuçları DOX'in insan periferal lenfositleri üzerine genotoksik etki göstermediğini fakat doz artışına bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiğini ortaya çıkarmıştır.

Anahtar sözcükler: Doksisisiklin, *in vitro* genotoksisite, kromozomal anormallikleri, mikronükleus

**IN VITRO GENOTOXIC EFFECTS OF DOXYCYCLINE ON HUMAN
PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES**

ABSTRACT

In this study, *in vitro* genotoxic effects of doxycycline (DOX), which has antimicrobial and antiinflammatory effects, and it has been widely used to treat many infections were investigated in peripheral human lymphocytes by using chromosomal aberrations (CA) and micronucleus (MN) tests. In addition to these methods, mitotic index (MI) and nuclear division index (NDI) were also calculated to determine the cytotoxic effect of test substance for cell division. The cell cultures were treated with 2, 4 and 6 µg/ml concentrations of DOX for 48 hours.

It was stated that all used concentrations for 48 hours treatments of DOX, significantly decreased the MI in a concentration-dependent manner as compared with the negative control. Furthermore, DOX also significantly decreased the NDI at the two highest concentrations (4 and 6 µg/ml) in a concentration-dependent manner as compared with the negative control. However, the increases of CA and MN formation at all DOX concentrations tested were not statistically significant as compared with the negative control. The results of this study suggest that DOX has a cytotoxic effect in a concentration-dependent manner but not genotoxic effect on human peripheral blood lymphocyte cultures.

Key words: Doxycycline, *in vitro* genotoxicity, chromosomal aberration, micronucleus

TEŞEKKÜR

Tez konusunun seçiminde yardımcı olan, çalışmanın hazırlanmasında daima yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm Ordu Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyesi saygıdeğer hocam Yrd. Doç. Dr. Zülal Atlı ŞEKEROĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca tez çalışması boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Ordu Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyesi değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Vedat ŞEKEROĞLU ve Araştırma Görevlisi Ceren Börçek KASURKA'ya teşekkür ederim. Tez çalışmam boyunca her konuda destek olan çalışma arkadaşlarım Seval KONTAŞ ve Muhammed AKSOY'a teşekkür ederim.

Öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen annem Aysel AFAN ve babam Kenan AFAN'a yürekten teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Antibiyotikler	4
2.1.1. Antibiyotiklerin Etki Güçlerine Göre Sınıflandırılmaları.....	4
2.1.2. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılmaları	4
2.2. Tetrasiklinler	5
2.2.1. Tetrasiklinlerin Sınıflandırılmaları	5
2.2.2. Tetrasiklinlerin Etki Mekanizması	6
2.3. Doksisisiklin	6
2.3.1. Doksisisiklinin Farmakokinetik Özellikleri.....	8
2.3.1.1. Absorbsiyon ve Biyoyararlanımı.....	8
2.3.1.2. Dağılımı.....	8
2.3.1.3. Metabolizması ve Atılımı.....	9
2.4. Genetik Toksikoloji	9
2.4.1. Genetik Toksikoloji Testleri.....	10
2.4.1.1. In vitro Kromozom Anormallikleri (KA) Testi.....	10
2.4.1.2. In vitro Mikronukleus (MN) Testi.....	11
2.5. Tetrasiklinler İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	15
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	15
3.1.1.1. Doksisisiklin (Doksisisiklin hiklat)	15
3.1.1.2. Kromozom Medyumu	16
3.1.1.3. Mitomycin C (MMC).....	16

3.1.1.4. Cytochalasin B (Sigma)	17
3.1.1.5. Kolsemid (Colcemid).....	17
3.1.1.6. Hipotonik Eriyik	17
3.1.1.7. Fiksatif	17
3.1.1.8. Sorensen Tamponu	18
3.1.1.9. Giemsa	18
3.1.1.10. Entellan	18
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	18
3.1.2.1. Hassas Terazî.....	18
3.1.2.2. Biyogüvenlik Kabini.....	18
3.1.2.3. İnkübatör	18
3.1.2.4. Santrifüj.....	19
3.1.2.5. Vorteks	19
3.1.2.6. Mikroskop	19
3.2. Kromozom Anormalliklerini (KA) ve Mitotik İndeksi (MI) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması.....	19
3.2.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması	19
3.2.2. Preparatların Boyanması ve Daimî Preparatların Hazırlanması	21
3.2.3. Mitotik İndeks (MI) ve Kromozom Anormalliklerinin (KA) Saptanması.....	21
3.2.3.1. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması.....	21
3.2.3.2. Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması	21
3.3. Mikronükleus (MN) Testi İçin Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması.....	22
3.3.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması	22
3.3.2. Preparatların Boyanması ve Daimî Preparatların Hazırlanması	23
3.3.3. Mikronükleus Sayısı ve Nükleus Bölünme İndeksinin (NBI) Saptanması.....	24
3.4. Mikroskopik İncelemeler ve Mikroskopta Fotoğraf Çekme.....	26
3.5. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi	26
4. BULGULAR	28
4.1. Doksisiklinin Mitotik İndeks (MI) ve Kromozom Anormalliklerinin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri	28
4.2. Doksisiklinin Nükleus Bölünme İndeksi (NBI) ve Mikronükleus (MN) Oluşumu Üzerindeki Etkileri	38

4.3. Doksisisiklin Dozlarına Bağlı Olarak MI ile NBI ve KA ile MN Arasındaki İlişki...	43
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	49
7. KAYNAKLAR	51
ÖZ GEÇMİŞ	63

SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

Ames Testi	: Salmonella/Mikrozom Mutajenite Testi
BN	: Binükleat hücre
Comet Testi	: Tek hücre jel elektroforezi
Cyt-B	: Cytochalasin-B (Sitokalsin-B)
DOX	: Doksisisiklin
F	: Fragment
EMA	: European Medicines Agency (Avrupa İlaç Ajansı)
FDA	: U.S. Food and Drug Administration (Amerika Gıda ve İlaç Yönetimi)
K'	: Kromatid kırığı
K''	: Kromozom kırığı
KA	: Kromozom Anormallikleri
KD	: Kromatid değişimi
KKB	: Kardeş Kromatid Birleşmesi
KKD	: Kardeş Kromatid Değişimi (Sister Chromatid Exchange: SCE)
MI	: Mitotik İndeks
MN	: Mikronükleus
MNBN	: Mikronükleuslu binükleat hücre
NBI	: Nükleer bölünme indeksi
P	: Poliploidi
PDR	: Physicians' Desk Reference (Hekimin El Kitabı)
WHO	: World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1. Normal metafaz plağı(x1000)	22
Şekil 3.2. Binükleat hücre (x400)	24
Şekil 3.3. Bir mikronükleus bulunduran binükleat hücre (x 400).....	24
Şekil 3.4. a- mononükleat, b- binükleat ,c- trinükleat, d- tetranükleat hücre (x 400)	26
Şekil 4.1. Doksisisiklinin test edilen dozları ile MI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı.....	28
Şekil 4.2. Kromatid kırığı (2 µg/ml'lik uygulama) x1000	29
Şekil 4.3. Kromatid kırığı (4 µg/ml'lik uygulama) x1000	29
Şekil 4.4. Kromozom kırıkları (2 µg/ml'lik uygulama) x1000.....	30
Şekil 4.5. Kromozom kırığı (4 µg/ml'lik uygulama) x1000.....	30
Şekil 4.6. Kromozom kırıkları (6 µg/ml'lik uygulama) x1000.....	31
Şekil 4.7. Fragment (2 µg/ml'lik uygulama) x1000.....	31
Şekil 4.8. Fragment (4 µg/ml'lik uygulama) x1000.....	32
Şekil 4.9. Kromatid kırığı ve fragment (2 µg/ml'lik uygulama) x1000	32
Şekil 4.10. Kromatid kırığı, kromatid değişimi ve fragment (4 µg/ml'lik uygulama) x1000	33
Şekil 4.11. Kromatid kırığı ve fragment (6 µg/ml'lik uygulama) x1000	33
Şekil 4.12. Kardeş kromatid birleşmesi (2 µg/ml'lik uygulama) x1000	34
Şekil 4.13. Kardeş kromatid birleşmesi (6 µg/ml'lik uygulama) x1000	34
Şekil 4.14. Kardeş kromatid birleşmesi ve fragmentler (4 µg/ml'lik uygulama) x1000	35
Şekil 4.15. Poliploidi (2 µg/ml'lik uygulama) x400	35
Şekil 4.16. Poliploidi (4 µg/ml'lik uygulama) x1000	36

Şekil 4.17. Poliploidi (6 µg/ml'lik uygulama) x1000	36
Şekil 4.18. Doksisisiklinin test edilen dozları ile KA ve AHO arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı.....	38
Şekil 4.19. Bir mikronükleus içeren binükleat hücre (2 µg/ml'lik uygulama) x400	39
Şekil 4.20. Bir mikronükleus içeren binükleat hücre (4 µg/ml'lik uygulama) x400	39
Şekil 4.21. Bir mikronükleus içeren binükleat hücre (6 µg/ml'lik uygulama) x400	39
Şekil 4.22. İki mikronükleus içeren binükleat hücre (2 µg/ml'lik uygulama) x400.....	40
Şekil 4.23. İki mikronükleus içeren binükleat hücre (4 µg/ml'lik uygulama) x400.....	40
Şekil 4.24. İki mikronükleus içeren binükleat hücre (6 µg/ml'lik uygulama) x400.....	40
Şekil 4.25. Doksisisiklinin test edilen dozları ile NBI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı.....	42
Şekil 4.26. Doksisisiklinin test edilen dozları ile %MNBN arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı.....	43
Şekil 4.27. Doksisisiklin muamelesi sonucu MI ile NBI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı.....	43
Şekil 4.28. Doksisisiklin muamelesi sonucu KA ile MN arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı.....	44

ÇİZELGELER LİSTESİ

- Çizelge 4.1. Doksisiklin ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde MI, KA tipleri, toplam KA, KA ve AH yüzdesi.....37
- Çizelge 4.2. Doksisiklin ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde hücrelerin nükleus sayısına göre dağılımı, binükleat hücrelerin MN sayısına göre dağılımı, MN yüzdesi ve NBI.....41

1. GİRİŞ

Enfeksiyonlar tarih boyunca insan hayatını etkileyen ve çoğu zaman insan hayatını sonlandıran en önemli etkenlerden biri olmuştur. Bu nedenle enfeksiyon etkeni olan mikroorganizmalara karşı etkin bir mücadele yapılması eski çağlardan beri tıbbın en önemli amaçlarından biri olmuş, koruyucu ve tedavi edici hekimlikteki ilerlemelere rağmen güncelliğini kaybetmemiştir (Baştürk, 2005; Altay, 2008). İnsanlık tarihi boyunca toplumlar, tüberküloz, veba, kolera gibi bulaşıcı hastalıklarla mücadele etmiştir ve günümüzde de çeşitli enfeksiyon hastalıkları ile bu mücadelesini devam ettirmektedir. Tüm dünyada görülen ölümlerin en önemli sebeplerinden biri enfeksiyon hastalıkları olmuştur. Dünya Sağlık Örgütü istatistiklerine göre, 2004 yılında dünyada her beş ölümden biri enfeksiyöz ya da paraziter sebeplerle oluşmuştur. Afrika'da ölümlerin %53'ü, Amerika'da %7'si, Avrupa'da ise %2'si enfeksiyonlarla ilişkilidir (Altay, 2008).

İlk ve orta çağlarda mikroorganizmaların neden oldukları enfeksiyon hastalıklarının tedavileri için otlar, ağaç kabukları, baharatlar ve diğer karışımlar kullanılmıştır. Bu durum 1908' de Alman bakteriyolog Paul Ehrlich'in bazı bakteriler üzerine kesin olarak zararlı, konak hücreye ise daha az zararlı bazı kimyasal maddeleri bilimsel metodlarla araştırıp ortaya koymasına kadar sürmüştür. 1935'te Alman farmakolog Dogmagk'ın ilk sülfonamidleri tedaviye sokması ile bu sahada esaslı ilerlemeler olmuştur. 19. yüzyılın ortalarında Louis Pasteur'ün bazı mikroorganizmaların diğerlerini öldürdüğü şeklindeki gözleminden sonra, 1924 yılında ilk defa İskoç bilim adamı Alexander Fleming tarafından *Penicillium notatum*'dan izole edilen penisilinin keşfi antibiyotik çağını başlatmış ve enfeksiyonlarla mücadelede bugüne kadar geliştirilecek olan pek çok antibiyotiğe ilham kaynağı olmuştur. Penisilin ve sülfonamidlerden sonra özellikle 1930-1960'lı yıllar arasında, başta daha geniş spektrumlu penisilinler olmak üzere hızla yeni antibiyotikler geliştirilerek insan ve hayvanlarda birçok enfeksiyon başarıyla tedavi edilmeye başlanmıştır. En ufak bir enfeksiyondan çok daha ciddi rahatsızlıklara kadar çok geniş bir alanda kullanılan ve yaşam karşıtı ilaçları ifade eden antibiyotikler, yarım yüzyılı aşkın bir süredir zararlı mikroorganizmaların hayatta kalmalarını önleyerek milyonlarca hayat kurtarmıştır (Baştürk, 2005; Sarmah ve ark., 2006; Yalap, 2008; <http://antibiyotikler.com>, 25.09.2010).

Antibiyotikler tüm dünyada en sık kullanılan ilaç grubudur. Ülkemizde de tüm dünyada olduğu gibi en fazla tüketilen ilaçlar arasında antibiyotikler yer almaktadır. Ayrıca, kontrolsüz ve uygunsuz kullanılan ilaçlar içerisinde yine ilk sıralarda bulunmaktadır (Bayındır, 2003; Devrim ve ark., 2009). Mikroorganizmalar, yaygın antibiyotik kullanımının başlamasından bu yana, antibiyotiklerin seçici etkisi ve antibiyotik direnç genlerinin varlığı sayesinde antibiyotikleri tolere etme ve bu bileşiklere karşı direnç geliştirme yeteneklerinden sorumlu farklı mekanizmalar kazanmışlardır (Cohen ve Tartasky, 1997). Antibiyotik kullanımının her geçen gün artmasından dolayı enfeksiyon hastalıkları açısından en önemli sorun olan antibiyotik direnci de giderek artmaktadır. Antibiyotiklerin gereksiz ve uygun olmayan kullanımı, hastalarda yan etki sıklığında artışa ve antibakteriyel direncin artmasına bağlı olarak tedavide başarısızlığına neden olmaktadır ve bu durum sürekli yeni antibiyotik çeşitlerinin piyasaya sürülmesine yol açmaktadır (Bartlett ve Froggatt, 1995; Wise ve ark., 1998; Durupınar, 2001; Aktürk, 2009; Devrim ve ark., 2009).

İlaçlar bir hastalığın teşhisini, iyileştirilmesini veya semptomlarının azaltılması amacıyla tedavisini veya bir hastalıktan korunmayı mümkün kılan, canlılara değişik uygulama yöntemleri ile verilen doğal, yarı sentetik veya sentetik kimyasal preparatlardır (WHO, 1969). İnsan sağlığını ve hayat kalitesini artırmak amacıyla sürekli yeni etken maddeler içeren yeni ilaçlar üretilmektedir. Yapılan tüm klinik öncesi ve klinik testlere rağmen ilâçların insanlarda kullanım emniyeti tam olarak belirlenememektedir ve ilaçlar bazen istenmeyen yan etkiler ve sağlık problemleri ortaya çıkarmaktadır. Hatta bazı ilaçların DNA moleküllerinde mutasyona yol açabildiği ve bu tip mutajenik (mutasyona yol açan) ilaçların çoğunun karsinojenik (kansere yol açan) ve teratojenik (doğumsal anomalilere neden olan) potansiyele de sahip olduğu belirtilmektedir. Yapılan pek çok çalışma ile bazı ilaçların genotoksik etkiye yol açtığı açıkça gösterilmiştir ve bu tip ilaçların listesi her geçen gün uzamaktadır (Snyder ve Green, 2001; Saygı, 2003; Vural, 2005; Brambilla ve Mortelli, 2009). Piyasada bulunan 838 ilacın genotoksisite ve karsinojenitesinin değerlendirildiği bir çalışmada, değerlendirilen ilaçların %56,3'ünün (472 ilaç) yapılan çeşitli genotoksisite ve karsinojenite testlerinden en az birine pozitif cevap verdiği belirtilmiştir (Brambilla ve Martelli, 2009). Bu nedenle yeni ilaç gruplarının etkinlik ve güvenilirlik açısından titizlikle değerlendirilmesi ve insanlarda emniyetli kullanımı için toksisite testleri giderek daha büyük önem kazanmaktadır (Saygı, 2003).

Özellikle son yıllarda etki profilleri daha iyi olan yeni antibiyotik sınıfları geliştirilmiş olup, pek çoğu çeşitli infeksiyonların tedavisinde kullanılmak üzere onay almıştır. Fakat bu ilaçlar pazara sunulduktan kısa süre sonra ciddi ve istenmeyen etkileri nedeni ile piyasadan çekilmek zorunda kalmıştır (25.09.2010 <http://antibiyotikler.com>). Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile antibiyotik olarak kullanılan bazı ilaçların sitotoksik ve genotoksik etkilerinin de olabileceği gösterilmiştir (Snyder ve Green, 2001; Snyder ve ark., 2006; Brambilla ve Martelli, 2009).

Doksisiklin birçok hücrel fonksiyonu etkilemesi ve oldukça geniş bir etki spektrumuna sahip olması nedeniyle araştırmacılar tarafından birçok alanda kullanılmaktadır. Ancak literatürde doksisiklinin insan periferal lenfositleri üzerine sitotoksik ve genotoksik etkisi ile ilgili çok fazla çalışma yoktur. Bu nedenle bu çalışmadaki amacımız; yaygın bir şekilde kullanılan bir antibiyotik etken maddesi olan doksisiklinin, insan lenfosit kültürlerinde *in vitro* sitotoksik etkisini mitotik indeks, nükleer bölünme indeksi parametreleri ile, genotoksik etkisini ise mikronükleus testi ve kromozom anormallikleri yöntemleriyle araştırarak, bu ilacın insanda sitotoksik ve genotoksik potansiyelinin bulunup bulunmadığını ortaya çıkarabilmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Antibiyotikler

Antibiyotikler, bazı bakteriler ve çoğunlukla mantarlar tarafından üreme ortamlarında oluşturulan ve düşük konsantrasyonlarda bile diğer mikroorganizmaların üremelerinin engellenmesi ya da bu mikroorganizmaların öldürülmesi amacıyla kullanılan kemoterapötik ajanlardır. Uzun yıllardır enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotikler, bugün için en önemli ilaç grubunu oluşturmaktadır. Daha önceden sadece mikroorganizmalar tarafından üretilen antibiyotiklerin çoğu günümüzde sentetik ya da semisentetik yollarla da elde edilebilmektedir (Chrintensen, 1998; Bilgehan, 1994; Erdem 2004; Yalap, 2008; Aktürk, 2009). Enfeksiyonun tedavi edilmesi, enfeksiyon periyodunun kısaltılması, enfeksiyonun anatomik boşluklara yayılımının ve sistemik bulguların ortaya çıkmasının önlenmesi açısından antibiyotiklerin kullanımları gereklidir (Abbott, 2000; Epstein ve ark., 2000).

2.1.1. Antibiyotiklerin Etki Güçlerine Göre Sınıflandırılmaları

Antibiyotikler, mikroorganizmalar üzerindeki etki derecelerine göre iki gruba ayrılırlar (Kayaalp, 1991; Akkan,1997; Aktürk, 2009).

2.1.1.1. Bakteriostatikler: Bunlar bakteri hücrelerinin gelişmesini veya üremesini önlerler. Gelişmesi ve üremesi duran bakteriler, vücudun savunma mekanizmaları tarafından kolaylıkla yok edilirler. Amfenikoller, linkozamidler, makrolidler, sülfonamidler ve tetrasiklinler bakteriostatik etkiye sahip antibiyotiklere örnektir.

2.1.1.2. Bakterisidler: Bunlar bakterileri doğrudan yok ederler. Aminoglikozidler, Beta-laktamlar, florokinolonlar, penisilinler, polipeptidler, sefalosporinler, ve basitrasin bakterisid etkiye sahip antibiyotiklere örnektir.

2.1.2. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılmaları

Antibiyotiklerin etkili olabilmeleri için, bakteri hücresi içine girerek metabolize veya inaktive olmadan bakterinin belli bir fonksiyonunu inhibe etmeleri gerekmektedir. Antibiyotikler bu etkilerini belirli bir hedefi etkileyerek gösterirler. Antibiyotikler genel olarak beş temel hedef üzerinden etki göstermektedirler:

1.Hücre duvarı sentezinin inhibisyonu (örneğin; β -laktamlar ve glikopeptidler),

- 2.Hücre membranının yapı ve fonksiyonunun bozulması (örneğin; polimiksinler),
- 3.Protein sentezinin inhibisyonu (örneğin; aminoglikozidler, tetrasiklinler, linkozamidler ve makrolidler),
- 4.Nükleik asit sentezinin inhibisyonu (örneğin; kinolonlar, rifamisinler, aktinomisinler ve mitomisinler),
- 5.Antimetabolik etki (örneğin; sülfonamidler) (Burns, 1995; Fraimow ve Abrutyn, 1995; Akkan,1997; Durupınar, 2001; Baştürk, 2005; Gangle, 2005; Aktürk, 2009).

Türkiye’de en sık kullanılan antibiyotikler penisillin (%45), sefalosporinler (%20), makrolidler (%17.5), kinolonlar (%17) ve tetrasiklinler (%4)’dir (Karabay ve Hoşoğlu, 2008; Yalap, 2008).

2.2. Tetrasiklinler

Bir grup antibiyotiğe verilen genel bir isim olan tetrasiklinler, yapıca birbirine çok benzeyen ve tetrasiklik bir bileşik olan naftasenkarboksamidden türeyen geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. *Streptomyces aureofaciens*’den 1948’de izole edilen tetrasiklinler grubundan ilk antibiyotik olan klortetrasiklinin bulunmasından sonra, 1953’de klortetrasiklinin dehalojenizasyonu ile tetrasiklinler izole edilerek tedaviye sokulmuştur. Diğer *Streptomyces* türlerinden izolasyonla ya da yarı sentetik yolla değişik tetrasiklin türevleri elde edilmiştir (Kayaalp, 2005; Ünal, 2007).

Tetrasiklinler, insanlarda ve hayvanlarda, bakteriyel enfeksiyonların kontrol edilmesinde ve gerektiğinde koruyucu tedavide sıklıkla kullanılan bakteriyostatik aktiviteli ve en geniş antibakteriyel spektrumlu antibiyotiklerdir. Gram pozitif, gram negatif, aerobik, anaerobik bakterilere, spiroketlere, mikoplazma, klamidya, brusella, leptospira, riketsiya ve bazı protozoolara etkilidirler. Ayrıca toplanmış meyve ve sebzelerin korunmasında da uygulamaları bulunmaktadır (Hallworth, 1993; Kayaalp, 2005; Blanchflower ve ark., 1997; Posyniak ve ark., 1998; Hernandez ve ark., 2003; Erdem, 2004; Ünal, 2007; Tuygun, 2008).

2.2.1. Tetrasiklinlerin Sınıflandırılmaları

Tetrasiklinler bugün bir grup antibiyotiğe verilen genel bir isimdir. Dört halkalı hidronaftasen çekirdeğine eklenen yan grupların oluşturduğu değişik farmakolojik özelliklerine göre üç gruba ayrılırlar:

1. Kısa Süre Etkili Tetrasiklinler:

- a. Klortetrasiklin
- b. Tetrasiklin
- c. Oksitetrasiklin

2. Orta Süre Etkili Tetrasiklinler:

- a. Dimetilklortetrasiklin (Demeklosiklin)
- b. Metasiklin

3. Uzun Süre Etkili Tetrasiklinler:

- a. Doksisiklin
- b. Minosiklin

Tedavi dozlarında bakteriyostatik olan bu antibiyotiklerin, antimikrobiyal spektrumları benzerdir (Akkan,1997, Kayaalp, 2005; Tuygun, 2008).

2.2.2. Tetrasiklinlerin Etki Mekanizması

Tetrasiklinler bakteri çeperinden porinlerden pasif difüzyon yoluyla, sitoplazmik zardan ise aktif transport yoluyla geçerler. Hücre içinde birikerek etkili yoğunluğa ulaşırlar. Tetrasiklinler bakteriyostatik etkili maddelerdir. Bakteriyostatik etkilerini bakteri hücreesindeki ribozomların 30 S alt ünitelerine geri dönüşümlü olarak bağlanarak, mRNA-ribozom kompleksinin akseptör bölgesine aminoasil transfer RNA'nın bağlanmasını bloke ederek ve peptid zincirine aminoasit eklenmesini olanaksız duruma getirerek gösterirler. Tetrasiklinler protein sentezini inhibe eden antibiyotikler içinde en az seçici olan gruptur (Bendeck ve ark., 2002; Kayaalp, 2005; Ünal, 2007; Tuygun, 2008). Memeli hücresinde de özellikle mitokondrial ribozomlarda protein sentezini engelleyebilen tetrasiklinler için bu olay toksik sınırlarda değildir (Kayaalp, 2005; Tuygun, 2008).

2.3. Doksisiklin

Doksisiklin; bakteriyostatik etkili olup, antimikrobiyal etkisini mikroorganizmaların protein sentezini inhibe etmek suretiyle gösterir. Pek çok gram-pozitif ve gram-negatif mikroorganizmalara karşı geniş spektrumlu antimikrobial aktiviteye sahip, yarı sentetik, uzun etkili, ikinci jenerasyon tetrasiklin grubu bir antibiyotiktir. Oksitetrasiklinden sentetik olarak türetilmiştir ve genellikle monohidrat

ve hiklat formu olmak üzere iki kimyasal formül halinde kullanılmaktadır (Saivin ve Houin,1988; Joshi ve Miller, 1997; Nelson, 1998; Özdemir, 2007).

Doksisiklin, duyarlı mikroorganizmaların etken olduğu ürogenital sistem, solunum sistemi, gastrointestinal sistem, deri ve yumuşak doku, dental, kemik ve eklem, oftalmik, akne, belsoğukluğu, rosacea ve riketsiyal enfeksiyonlar gibi çok çeşitli enfeksiyonların tedavisinde kullanılır (Saivin ve Houin, 1988; Joshi ve Miller, 1997; Dimitrijevic ve ark., 2006). Doksisiklin, tetrasiklinler içerisinde yağda en fazla çözünen yapıda olması, günde iki doz kullanım kolaylığı, kan-beyin bariyerini en iyi geçebilen tetrasiklin grubu olması ve lökositler içine daha fazla nüfuz edebilmesi gibi özellikleri sayesinde sıklıkla tercih edilen bir antibiyotiktir (Gotuzzo ve Cellillo, 1992; Altay 2008).

Son yıllarda tetrasiklin grubu bir antibiyotik olan doksisiklinin sadece antimikrobiyal etkisinin olmadığı, bunun yanında antiinflamatuvar ve bazı biyolojik özellikleri olduğu da ortaya konmuştur. Doksisiklinin antibiyotik etkisinin yanında antiinflamatuvar etkisinin olduğu gösteren çalışmaların artmasının ardından, eş zamanlı yapılan birçok çalışmada, doksisiklinin; önemli bir inflamasyon medyatörü olduğu, yara iyileşmesi üzerine etkili olduğu, lökosit akışını azaltarak doku hasarını azalttığı, aortik anevrizma, periodontal hastalık ve artritte doku yıkımını azalttığı, matriks metalloproteinazları inhibe ettiği, hücrelerin proliferasyonunu önlediği ve apoptozisi indüklediği, tümör kaynaklı angienezisi önlediği, polimorfik nötrofillerden oksijen radikal salınımını baskıladığı da vurgulanmıştır. Deneysel ve klinik çalışmalar doksisiklinin romatoid artrit ve diğer inflamatuvar hastalıkların tedavisinde yararlı olabileceğini ve doksisiklinin submikrobiyal dozlarda kullanımı ile reperfüzyon hasarını azaltıcı etkiye sahip olabileceğini göstermiştir (Greenwald ve ark., 1987; Fife ve Sledge, 1995; Rose ve ark., 1997; Curci ve ark., 1998; Golub ve ark., 1998; Nelson, 1998; TeKoppele ve ark., 1998; Nagase ve Woessner, 1999; Bettany ve ark., 2000; Bazerra ve ark., 2002; Bendeck ve ark., 2002; Iwasaki ve ark., 2002; Visse ve Nagase, 2003; Konukoğlu ve Turhan, 2005; Özdemir, 2007).

2.3.1. Doksisisiklinin Farmakokinetik Özellikleri

2.3.1.1. Absorbsiyon ve Biyoyararlanımı

Tetrasiklinler içinde en iyi emilime sahip olan antibiyotik doksisisiklidir. Erişkinler için günlük doz, 12 saatte bir 100 mg olmak üzere 200 mg'dır. Oral uygulamadan sonra hemen hemen tümüyle absorbe edilir. Oral verilişlerinden sonra sindirim kanalından genellikle %90-100 oranında bir absorpsiyona uğrar ve biyoyararlılığı %90-%100 arasında değişir. Sindirim kanalından başlıca absorbe olduğu yerler, mide ve ince barsaklardır. Doksisisiklinin emilimi mide içeriğinden etkilenmez, absorpsiyonu en iyi oniki parmak barsağında gerçekleşir ve %93-95 oranında absorbe olur (Campistron ve ark., 1986; Saivin ve Houin, 1988; Jack, 1992; Agwuh ve MacGowan, 2006; Brunton ve ark., 2006; Jantratid ve ark., 2010).

Diğer tetrasiklinlerin aksine, günlük alınan besinlerin doksisisiklinin ortalama plazma konsantrasyonu ve zamanını hafifçe azaltmalarına rağmen, çok da fazla etkilemedikleri belirlenmiştir. Fakat süt ve yoğurt gibi besinler, antasidler ve antiemetik ilaçlardaki alüminyum, kalsiyum, magnezyum, demir ve çinko gibi metaller doksisisiklinin absorpsiyonunu az da olsa olumsuz yönde etkilediklerinden, doksisisiklin ile birlikte kullanılmamaları tavsiye edilmektedir (Campistron ve ark., 1986; Kshirsagar ve Ankalesaria, 1987; Saivin ve Houin, 1988; Nguyen ve ark., 1989; Agwuh ve MacGowan, 2006; Jantratid ve ark., 2010). Ayrıca doksisisiklini de kapsayan tüm tetrasiklin antibiyotiklerinin, 8 yaş altı çocuklarda, hamilelikte ve emzirme süresince kullanılması önerilmemektedir (Dimitrijevic ve ark., 2006).

2.3.1.2. Dağılımı

Doksisisiklin lipofilik bir tetrasiklin olup, tüm vücut dokuları ve sıvılarına dağılımları iyidir. Ayrıca lipofilik olması, bakterilerin çift katlı tabakasından kolaylıkla geçmesini ve daha kısa sürede etkili olmasını sağlar. Doksisisiklin; karaciğer, böbrekler ve sindirim sistemi organları başta olmak üzere, etkili bir şekilde tüm vücuda dağılır. Absorpsiyonunu takiben konsantrasyonunun en yüksek olduğu organlar; karaciğer, böbrekler ve sindirim sistemi ile ilgili alanlardır. Fakat diğer tetrasiklinler gibi doksisisiklin de, kemik oluşumunu sağlayan bölgelerde tutulabilir ve diş gelişiminde kalsifikasyonları bozabilir. Hızla emildiği için uygulandıktan yaklaşık 15 dakika sonra kana geçtiği belirlenmiştir (Saux ve ark., 1981). Yaklaşık 2-3 saat içinde zirve serum

değerlerine ulaşır ve 24 saat süreyle serumda terapötik etkinliği olan konsantrasyonlarda bulunur. Maksimum plazma konsantrasyonu doza bağlı olarak değişir, fakat 200 mg.'lık oral uygulamadan 2-3.5 saat sonra plazmadaki en yüksek değerinin yaklaşık 2.6 mg/ml olduğu belirtilmiştir. Serum yarı ömrü 18-22 saat arasındadır. Doksisisiklini bağlayan plazma proteinlerinin oranı %80 ile %95 oranında değişmektedir ve bu oran, diğer tetrasiklinlere göre oldukça yüksektir (Saivin ve Houin, 1988; Agwuh ve MacGowan, 2006; Jantratid ve ark., 2010).

2.3.1.3. Metabolizması ve Atılımı

İnsanda doksisisiklin karaciğerde metabolize olur, fakat çok önemli metabolitlerinin olmadığı belirtilmiştir. İdrar ve feçesle vücuttan uzaklaştırılır. Vücuttan atılım süresi 12 saat ile 25 saat arasında değişir. Başlıca eliminasyon yolları böbreklerdir. Normal böbrek fonksiyonlarına sahip insanlarda idrar yoluyla 72 saatte %40'ı atılır. Geriye kalan miktarı, kısmen safra kesesi yoluyla, kısmen intestinal kanal boyunca difüzyonla ve kısmen de Ca ve Mg gibi metal iyonları ile şelasyon yoluyla sindirim kanalı ve feçesle vücuttan uzaklaştırılır (Saivin ve Houin, 1988; Nguyen ve ark., 1989; Agwuh ve MacGowan, 2006; Gschwend ve ark., 2007; Jantratid ve ark., 2010).

2.4. Genetik Toksikoloji

Genetik toksikoloji; organizmanın normal biyolojik işleyişi sırasında veya kimyasal, fiziksel ve biyolojik etkenlere bağlı olarak hücrelerin kromozom ve DNA moleküllerinde meydana gelen değişiklikleri (DNA kırıklarını, gen mutasyonlarını, kromozom anormalliklerini, klastojenite ve anöploidi gibi) inceleyen bir bilimdir. Özellikle yeni bileşiklerin ve ilaçların toksikolojik açıdan değerlendirilmesinde önemli bir yere sahiptir (Young, 2002; Mortelmans ve Rupa, 2004; Zeiger, 2004; Üstün, 2007).

Son yıllarda gelişen teknoloji ile birlikte sürekli yeni kimyasallar, ilaçlar, gıda katkı maddeleri ve tarım ilaçları üretilerek piyasaya sürülmektedir. Bu durum, insanların günlük yaşamlarında, doğal maddelerin yerini alan, biyolojik etkileri tam olarak bilinmeyen ve kullanımları her geçen gün hızla artan bu yeni kimyasal maddelere maruz kalmalarına yol açmıştır. Bu maddelerin pek çoğu beraberinde istenmeyen yan etkiler ve sağlık problemleri ortaya çıkarmıştır. Hatta bu maddeler canlıların genetik yapısında mutasyon oluşumuna yol açarak mutajenik, karsinojenik ve teratojenik

etkilere neden olabilmekte, kanser oluşumu ve ölümler ortaya çıkarabilmektedir. Bu durum kimyasal maddelerin karsinojenik ya da mutajenik potansiyelleri yönünden test edilmeleri gereğini ortaya çıkardığı için genetik toksikolojinin önemini her geçen gün artırmıştır (Purchase ve ark., 1978; Stich ve Dunn, 1986; Choy, 2001).

Kimyasal maddelerin mutajenik etkileri ile karsinojenik potansiyelleri arasında oldukça kuvvetli bir ilişki bulunmaktadır. Çünkü mutajenik olan birçok maddenin aynı zamanda karsinojenik olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle genotoksisite testleri, pek çok kurum ve kuruluş tarafından kimyasal maddelerin karsinojenik risklerinin araştırılmasında biyogösterge testleri olarak kullanılmaktadır (Purchase ve ark., 1978; Choy, 2001; Zeiger, 2004; Vural, 2005; Üstün, 2007).

2.4.1. Genetik Toksikoloji Testleri

Genetik toksikoloji testleri, çeşitli mekanizmalarla direkt veya indirekt olarak genetik materyalde hasara neden olan bileşikler saptamak amacıyla geliştirilmiş *in vitro* ve *in vivo* testlerden oluşurlar. Mutajenik ve genotoksik olan maddelerin karsinojenik potansiyellerini ölçebilmek için birçok *in vivo* ve *in vitro* genotoksisite testi geliştirilmiştir. Bu testler, başlıca kanser araştırmalarında, çevresel etkenlerin ve endüstriyel kimyasalların etkilerinin araştırılmasında, ilaçların piyasaya sürülmeden önce toksik etkilerinin ve bu sayede güvenilirliklerinin araştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Choy, 2001; Bedir ve ark., 2004; Zeiger, 2004; Üstün, 2007).

Genotoksik hasarın ölçülmesi ve bu sayede kimyasal maddelerin mutajenik ve karsinojenik potansiyelleri arasında ilişki kurulmasını sağlayan ve en yaygın olarak kullanılan *in vitro* genotoksisite testleri; Salmonella / mikrozom (Ames) testi, kromozom anormallikleri (KA) testi, mikronukleus (MN) testi, kardeş kromatid değişimi (KKD) testi, fare lenfoma testi ve comet testidir. Çalışmamızda bu testlerden *in vitro* kromozom anormallikleri ve mikronukleus testleri kullanıldığı için, bu testler hakkında kısa bilgiler verilecektir.

2.4.1.1. *In vitro* Kromozom Anormallikleri (KA) Testi

In vitro kromozom anormallikleri (KA) testi, genotoksik ajanların oluşturduğu hasarın kromozom düzeyinde tespit edilmesini sağlayan ve bu ajanlar tarafından indüklenen yapısal ve sayısal kromozom anormalliklerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan en hassas yöntemlerden biridir. Genotoksisiteye yol açan madde veya maddelerin insanlarda meydana getirebileceği hasarları gösterebilmesi açısından, bu test

için genellikle periferik kan lenfosit hücre kültürlerinin kullanılmaktadır. KA oluşum mekanizması farklı dokularda benzer olduğundan, lenfositlerdeki anormallik seviyesinin kansere eğilimli dokulardaki anormallik seviyesini ve kanser riskini önceden gösterebileceği belirlenmiştir (Savage, 1993; Anderson, 1988; Carrano ve Natarajan, 1988; Albertini ve ark., 2000; Norppa ve ark., 2006; Yavuz Kocaman, 2007).

In vitro KA testinde, periferik kan lenfositleri, hücrelerin mitoz bölünme geçirmesini sağlayan kromozom medyumlarında inkübasyona bırakılır. Kültürlere bırakılan hücreler inkübasyonun belirli zamanlarında kimyasal ajan veya ajanlara maruz bırakılır. Kültür süresi tamamlanmasına 2 saat kala, tübülün polimerizasyon inhibitörü olan ve hücre bölünmesini metafaz aşamasında durduran kolşisin uygulanır. Kültürü yapılan hücrelerden daha önceden belirlenmiş protokollere uygun olarak metafaz kromozom preparatları hazırlanır ve mikroskop altında yapısal ve sayısal kromozom anormallikleri açısından incelenir (EPA, 1998; Choy, 2001).

2.4.1.2. *In vitro* Mikronukleus (MN) Testi

Mikronukleus hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan ve tüm kromozomlar ya da kromatidlerin anafazda geri kalmasından dolayı telofazda oluşan kardeş nükleusun dışında rastlanan oluşumlardır. MN'lar hem kromozom kırılması hem de kromozom kaybının uygun ve güvenilir ölçümünü sağlamaktadır. Hücrelerde MN sayısında artış saptanması somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın ve dolayısıyla kanserin göstergesidir (Vanparys ve ark., 1990; Surrallés ve ark., 1995; Cheng ve ark., 1996; Duffaud ve ark., 1997; Kirsch-Volders ve ark., 1997; Fenech 2000; Choy, 2001; Demirel ve Zamani, 2002).

MN testi, çeşitli bileşikler tarafından oluşturulan kromozomal hasarların değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan standart genotoksisite testlerinden biridir. Kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi gibi avantajlara sahip olmasından dolayı oldukça yaygın bir kullanıma sahiptir (Schmid, 1975; Garewal ve ark., 1993; Stopper ve Müller, 1997; Fenech, 2000; Krishna ve Hayashi, 2000; Widel ve ark., 2001; Demirel ve Zamani, 2002). Fenech ve Morley (1986) tarafından, küf mantarlarının metabolitlerinden olan Sitokalsin-B (Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanarak ve bir hücre siklusunu tamamlayan hücrelerin

binükleer hücrelerin elde edilmesine olanak sağlayan modifiye bir tekniğin geliştirilmesi sayesinde, bazı kinetik problemler ortadan kalkmış ve *in vitro* MN tekniğinin uygulanmasındaki güvenilirlik artmıştır (Fenech, 2000; Aardema ve Kirsch-Volders, 2001; Choy, 2001; Demirel ve Zamani, 2002).

In vitro MN testinde, periferik kan lenfositleri, hücrelerin mitoz bölünme geçirmesini sağlayan hücre kültürü ortamlarında inkübasyona bırakılır ve kültürler belirlenen zamanlarında kimyasal ajan veya ajanlara maruz bırakılır. Kültürün yaklaşık 44. saatinde sitokinezi engelleyerek binükleer hücre elde etmek amacıyla kültürler Cyt-B eklenir. İnkübasyon süresi tamamlandığında kültürler protokollere uygun şekilde hasat edilir ve preparatlar hazırlanır. Preparatlardaki mikronükleus taşıyan binükleer hücreler mikroskop altında incelenir (OECD, 2006).

2.5. Tetrasiklinler İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Literatür taraması sonucunda tetrasiklinler grubundaki antibiyotiklerden; tetrasiklin, oksitetrasiklin ve doksisisikline ait genotoksisite ya da mutajenite araştırmaları elde edilebilmiştir.

Tsutsui ve ark. (1976) tetrasiklinin fare meme karsinom FM3A hücre serisinde klastojenik ve mutajenik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Zeiger ve Haworth (1985) tetrasiklinin mutajenitesinin Ames testi ile araştırılması sonucu, bu ilacın mutajenik etkiye sahip olmadığını belirtmişlerdir. Suzuki (1987) Suriye hamster embriyo hücrelerinde morfolojik transformasyon ve programsız DNA sentezine yol açmadığını belirtmişlerdir. Anderson ve ark. (1990) tetrasiklinin, Çin hamster ovaryum hücrelerinde KA ve kardeş kromatid değişimi frekansını arttırmadığını bulmuşlardır. Myhr ve ark. (1990) tetrasiklinin fare lenfoma testi sonucu şüpheli sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. Foureman ve ark. (1994) tetrasikline maruz bırakılan erkek *Drosophila melanogaster* bireylerinde cinsiyete bağlı resesif letal mutasyonların oluşumunun gözlenmediğini ifade etmişlerdir. Hagiwara ve ark. (2006) 60, 200, 600 µM dozlarında tetrasiklinin Suriye hamster embriyo hücrelerine uygulanması sonucu doz artışına bağlı olarak MI'de azalma ve KA'nde artma görülmesine rağmen, bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığını belirtmişlerdir. Aynı çalışmada aynı dozlardaki tetrasiklinin klastojenik etkisinin bulunup bulunmadığı eksogenus metabolik aktivasyon varlığında aynı hücreler üzerinde test edilmiş ve benzer şekilde MI ve KA'nde meydana gelen değişimler istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Çelik ve Eke (2011)

tetrasikilinin 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2 µg/ml konsantrasyonlarındaki dozlarının insan periferik lenfositlerine uygulanması sonucu, negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında tetrasiklinin, doz artışına bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde MI, NBI ve Proliferasyon indeksini (PI) düşürdüğünü ve kardeş kromatid değişimi frekansını arttırdığı tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bu sonuçlara dayanarak tetrasiklinin *in vitro* koşullarda insan periferik lenfositlerinde sitostatik, sitotoksik ve genotoksik etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

Blitek ve ark. (1983) fare kemik iliği hücrelerinde oksitetrasiklinin klastojenitesini araştırmışlar ve kemik iliğindeki polikromatik eritrositlerdeki MN sıklığının önemli ölçüde arttığını bulmuşlardır. Oksitetrasiklinin Ames testi sonucu mutajenik olmadığı (Andrews ve ark., 1980; Mortelmans ve ark., 1986), Çin hamster ovaryum hücrelerinde KA ve kardeş kromatid değişimi oluşumunu arttırmadığı (Anderson ve ark., 1990), *Drosophila melanogaster* bireylerinde cinsiyete bağlı resesif letal mutasyonların oluşumuna yol açmadığı belirtilmiştir (Fouremans ve ark., 1994). Fakat L5178Y fare lenfoma hücrelerinde mutasyon oluşumunu arttırdığı tespit edilmiştir (Myhr ve ark., 1990; McGregor ve ark., 1991). Oksitetrasiklinin 0.05, 0.50, 4.96, 49.6 ve 496 µg/ml konsantrasyonlardaki genotoksik etkisi Çin hamster V79 hücrelerinde foto-MN testi ile araştırılmış ve oksitetrasiklinin UV ile indüklenmiş MN frekansını arttırmadığı ve proliferasyon indeksini düşürmediği, yani fotositotoksik ve fotogenotoksik etki göstermediği belirtilmiştir (Kersten ve ark., 1999). 0.3125 ile 100 mg/L arasındaki konsantrasyonlarda oksitetrasiklinin genotoksik etkisinin Ames testi ile araştırıldığı bir çalışmada, test edilen tüm oksitetrasiklin dozlarında oksitetrasiklinin mutajenik olmadığı rapor edilmiştir (Isidori ve ark., 2005).

DOX'in insandaki genotoksitesisiyle ilgili bilgi içeren çok fazla sayıda çalışma bulunmamaktadır. Genotoksite çalışmaları çoğunlukla ilacın sponsor firmasının yaptığı çalışmalarla sınırlı olup, literatürde de genellikle EMEA, FDA ve PDR'nin yayınlanmamış raporları referans edilmektedir. EMEA'nın raporlarına göre DOX'in genotoksik potansiyele sahip olmadığı belirtilmiştir (EMEA, 1997). Çin hamster ovaryum hücrelerinde metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda 350 µg/ml konsantrasyona kadar denenen dozlardaki DOX'in KA'ne yol açıp açmadığı incelenmiş ve DOX'in KA bakımından doza bağlı olmayan artışlar gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucunda DOX'in zayıf klastojenik etki gösterdiği belirtilmiştir. 15 dişi ve 15 erkek CD-1 farelerinde 500, 800 ve 1250 mg/kg dozlarındaki DOX'in, kemik iliği

polikromatik eritrositlerindeki MN oluşumunun incelendiği başka bir çalışmada, test edilen dozlardaki DOX'in MN frekansını istatistiksel olarak önemli olacak kadar artırmadığı ve bu nedenle DOX'in test edilen dozlarda genotoksik ve/veya klastojenik etki göstermediği belirlenmiştir (FDA, 1997; PDR, 2005). DOX'in 0.05, 0.46, 4.62, 46.2 ve 462 µg/ml konsantrasyonlarının Çin hamster V79 hücrelerine uygulanarak genotoksik etkisinin foto-MN testi ile araştırıldığı bir çalışmada, DOX'in, UV ile indüklenmiş MN frekansını artırmadığı, fakat UV varlığında proliferasyon indeksini düşürdüğü belirtilmiştir (Kersten ve ark., 1999). Bu sonuçlara dayanarak araştırmacılar DOX'in fotogenotoksik olmadığı, fakat fotositotoksik olduğu sonucuna varmışlardır. DOX'in prostat, göğüs, böbrek ve kemikte oluşan çeşitli tümör hücreleri için sitostatik ve sitotoksik etkisinin olduğu bildirilmiştir (Saikali ve Singh, 2003). 75 ve 100 mg DOX dozlarının *in vitro* Çin hamster akciğer hücrelerinde fare lenfoma testi sonucu genotoksik etki bakımından pozitif sonuçlar verdiği ifade edilmiştir (FDA, 2004). Deri yoluyla 40, 80 ve 160 mg/kg DOX'in verildiği farelerde; bu ilacın kan, karaciğer, akciğer, böbrek, dalak ve kalp üzerindeki genotoksik etkilerinin Comet testi ile araştırıldığı bir çalışmada, tüm dokularda DOX dozunun artışına bağlı olarak DNA hasarının arttığı ve özellikle yüksek dozlarda DOX'in genotoksik olduğu bildirilmiştir (Arshad ve ark., 2005). Genital *Chlamydia trachomatis* enfeksiyon tanısı konmuş 38 bayan hastada DOX kullanımının periferik lenfositler üzerindeki genotoksik etkisi sitokinezi bloklanmış MN yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Tedavi amacıyla hastalar 10 gün boyunca günlük 200 mg, daha sonraki 10 günlük periyotta ise günlük 100 mg DOX'i oral yolla kullanmışlardır. DOX tedavisinden önce ve tedavi tamamlandıktan 6-8 gün sonra hastalardan kan örnekleri alınarak periferik lenfositlerdeki MN sıklığı belirlenmiştir. 20 günlük DOX kullanımı sonucu BN hücrelerde gözlenen MN frekansının, tedaviden önce belirlenen MN frekansına göre önemli ölçüde artış gösterdiği belirlenmiştir (Dimitrijevic ve ark., 2006).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada test maddesi olarak doksisisiklin ve materyal olarak sigara içmeyen, geçirilmiş herhangi bir ciddi hastalığı olmayan, rutin bir şekilde herhangi bir ilaç kullanmayan ve 20-24 yaşları arasında olan sağlıklı iki erkek ve iki bayandan alınan periferik kanlar kullanılmıştır. Çalışmamızın yapılabilmesi amacıyla Samsun Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 10.11.2009 tarihinde 121 sayı numarası ile izin alınmıştır.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.1.1.1. Doksisisiklin (Doksisisiklin hiklat)

Bu çalışmada test maddesi olarak kullandığımız doksisisiklin hiklat (Sigma), geniş spektrumlu bir tetrasiklin antibiyotikidir.

Sinonimleri: Doksisisiklin hidroklorid, Doksisisiklin monohidrat, Doksitetrasiklin, Doksisisiklin hidroklorid hemietanolat hemihidrat.

Ticari Adları: Adoxa, Alodox, Atridox, Avidoxy, Doksin, Doryx, Doxoral, Doxyhexal, Doxylin, Microdox, Monodox, Oracea, Oraxyl, Periostat, Tetradox, Vibramycin, Vibra-Tabs, Vibrox.

Kimyasal Adı: Doxycycline hyclate (DOX), (4S,4aR,5S, 5aR,6R,12aS)-4-(dimethylamino)-3,5,10,12,12a-penta hydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6, 11, 12a-octahydrotetracene-2-carboxamide mono hydro chloride, compound with ethyl alcohol (2:1), monohydrate.

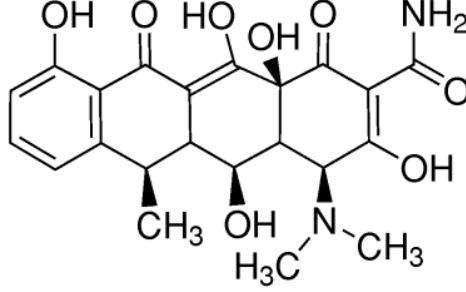
CAS no: 24390-14-5

Molekül Ağırlığı: 512.94 g/mol

Safılık düzeyi: \geq %98

Erime Sıcaklığı: 201°C

Kapalı Formülü: $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl \cdot \frac{1}{2} H_2O \cdot \frac{1}{2} C_2H_6OH$

Açık Formülü:

- HCl
- $\frac{1}{2}$ H₂O
- $\frac{1}{2}$ CH₃CH₂OH

3.1.1.2. Kromozom Medyumu

Hücre kültürleri için Biological Industries firmasının ürettiği RPMI 1640 (01-106-1) medyumu kullanılmıştır. RPMI 1640 Medyumu'nun 100 ml' sine aşağıdaki bileşikler belirtilen miktarlarda eklenmiştir.

RPMI 1640 (Biological Industries)	100 ml
Fetal Bovine Serum (Biological Industries)	20 ml
Penicillin/Streptomycin/Amphotericin (PSA) (Biological Industries)	1 ml
Phytohemagglutinin M (PHA-M) (Biological Industries)	1.2 ml
L-Glutamin (Merck)	2 ml

Bu karışımdan steril olan her bir kültür tüpüne 2.5 ml konulmuştur ve hücre kültürlerinde kullanılmıştır.

3.1.1.3. Mitomisin C (Mitomycin C, MMC)

Bu çalışmada Mitomisin C pozitif kontrol olarak kullanılmıştır ve Serva firmasından sağlanmıştır.

Kimyasal adı: Mitomisin C

Molekül ağırlığı: 334.327 g/mol

Erime noktası: 360°C

CAS No: 50-07-7

Safılık düzeyi: %99

Kapalı formülü: C₁₅H₁₈N₄O₅

3.1.1.4. Sitokalsin B (Cytochalasin B)

Mikronükleus testinde, hücrelerin sitokinezini engellemek ve iki nükleuslu hücreler oluşturmak amacıyla kullanılmıştır ve Sigma'dan sağlanmıştır.

Kimyasal adı: Sitokalsin B

Molekül ağırlığı: 479.61 g/mol

Safılık düzeyi: \geq %98

CAS No: 14930-96-2

Kapalı formülü: $C_{29}H_{37}NO_5$

3.1.1.5. Kolsemid (Colcemid)

Kültürü yapılan hücreleri metafaz safhasında durdurmak için kullanılmıştır ve Biological Industries firmasından sağlanmıştır. Kolsemid (Kolşisin) eriyiği kromozom medyumunun her ml'sinde 0.06 μ g olacak şekilde (0.06 μ g/ml) kromozom medyumuna ilave edilmiştir.

Kimyasal adı: Kolsemid, N-Deasetil-N-metil kolşisin

Cat. No: 12-004-1

Molekül ağırlığı: 399.4

Kapalı formülü: $C_{22}H_{25}NO_6$

3.1.1.6. Hipotonik Eriyik

Hipotonik eriyik olarak %0,4'lük KCl (Merck) kullanılmıştır. Uygulamadan yaklaşık bir gün önce bidistile su içinde hazırlanan hipotonik eriyik, preparasyonlardan önce 37°C'deki inkübatörde ısıtılarak kullanılmıştır.

3.1.1.7. Fiksatif

KA deneylerinde 1 hacim asetik asit'in (Sigma) 3 hacim metanol (Sigma) ile karıştırılması sonucu hazırlanan fiksatif kullanılmıştır. MN deneylerinde birinci fiksatif; 1 hacim glasiyal asetik asit, 5 hacim metanol ve 6 hacim %0.9 NaCl (1/5/6 glasiyal asetik asit/metanol/%0.9'luk NaCl) karıştırılarak hazırlanırken, ikinci fiksatif 1 hacim glasiyal asetik asit ve 5 hacim metanol'ün (1/5 glasiyal asetik asit/metanol) karıştırılması ile elde edilmiştir. Fiksatifler, taze hazırlanmıştır ve buzdolabında saklanmıştır.

3.1.1.8. Sorensen Tamponu

Bu eriyik, iki stok çözelti halinde hazırlanmıştır ve bu çözeltiler çalışmanın amacına uygun olarak pH=6.8 olacak şekilde birbirleriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanılmıştır.

Hazırlanışı

-11.88 gr. Na₂HPO₄ (Sigma) 1000 ml distile suda çözülmüştür.

-9.08 gr. KH₂PO₄ (Merck) 1000 ml distile suda çözülmüştür.

KH₂PO₄ çözeltisi, Na₂HPO₄ çözeltisinin üzerine ilave edilmiştir.

3.1.1.9. Giemsa

Giemsa boyası Merck firmasından temin edilmiş olup, % 5'lik Giemsa-Tampon (Sorensen) boya eriyiği şeklinde hazırlanmıştır ve kromozomları ve nükleusları boyamak için kullanılmıştır.

3.1.1.10. Entellan

Hazırlanan preparatları daimi hale getirmek amacıyla lam ile lameli birbirlerine yapıştırmak için kullanılmıştır ve Merck'den temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

3.1.2.1. Hassas Terazi

Çalışmamızda kullanılan kimyasalların tartılması amacıyla, hava akımlarına karşı özel cam paravanlarla korunan ve 0.0001 gr hassasiyetindeki Precisa marka terazi kullanılmıştır.

3.1.2.2. Biyogüvenlik Kabini

In vitro kromozom anormallikleri ve mikronükleus testlerinin çeşitli basamaklarının steril şartlarda gerçekleşebilmesi için, ESCO marka Class-II biyogüvenlik kabini kullanılmıştır.

3.1.2.3. İnkübatör

Hücre kültürünün yapılmasında ve bazı eriyiklerin ısıtılmasında Binder marka inkübatör kullanılmıştır.

3.1.2.4. Santrifüj

Çalışmamızda kültür tüplerindeki hücreleri çöktürmek amacıyla Eppendorf marka santrifüj kullanılmıştır.

3.1.2.5. Vorteks

Kültür tüplerini dairesel hareketler ile homojen bir şekilde karıştırmak amacıyla Velp marka vorteks kullanılmıştır.

3.1.2.6. Mikroskop

Preparatları incelemek amacıyla Leica marka ışık mikroskobu ve görüntü analiz sistemi kullanılmıştır.

3.2. Kromozom Anormalliklerini (KA) ve Mitotik İndeksi (MI) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması

3.2.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Periferik kan örneklerinden KA'ni saptamak amacıyla hücre kültürünün yapılması ve preparatların hazırlanmasında Evans (1984)'ın tekniği modifiye edilerek kullanılmıştır. Sigara içmeyen, geçirilmiş herhangi bir ciddi hastalığı olmayan, rutin bir şekilde herhangi bir ilaç kullanmayan ve 20-24 yaşları arasında sağlıklı iki erkek ve iki bayandan 1/10 oranında heparinize edilerek kan örnekleri alınmıştır. Alınan periferik kan örnekleri steril şartlarda içerisinde 2.5 ml'lik kromozom medyumunu bulunan steril tüplere 300 µl'lik konsantrasyonlarda ilave edilmiştir ve hücre kültürü $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 72 saat için inkübe edilmek üzere inkübatöre yerleştirilmiştir.

Çalışmamızda negatif kontrol, pozitif kontrol ve test maddemiz olan doksisisikline ait deney grupları oluşturulmuştur. Negatif kontrol grubuna ait tüplere herhangi bir madde eklenmeksizin inkübasyona bırakılmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan Mitomycin C, kültür tüplerine 0.16 µg/ml olacak şekilde kültürlerin 24. saatinde ilave edilmiş ve kültürler 48 saat boyunca Mitomycin C ile muamele edilmiştir. Test maddemiz olan doksisisiklin bidistile suda çözülerek hazırlanmış ve kültürlere 2, 4 ve 6 µg/ml'lik konsantrasyonlarda ilave edilmiştir. Doksisisiklin ile ilgili literatürde sitotoksikite verisi olmadığı için, doksisisiklin konsantrasyonlarının belirlenebilmesi için bir seri hücre kültürü hazırlanmış ve bu kültürlere 0-300 µg/ml arasındaki değişik

dozlarda doksisisiklin eklenerek sitotoksisteyi belirleyebilmek amacıyla bir ön çalışma yapılmıştır. Hücre kültürleri 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda doksisisiklin ile muamale edilmiş ve kültürlerden elde edilen preparatlar mitotik indeks bakımından incelenmiştir. Doksisisiklinin çalışılan konsantrasyonlarından, 6 µg/ml dozun hücre proliferasyonunda yani mitotik indekste yaklaşık % 50 oranında azalmaya neden olmasından dolayı inhibitör konsantrasyon yani, IC50 değeri 6 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu nedenle çalışmamızda en yüksek doksisisiklin dozu 6 µg/ml olarak seçilmiştir. Ayrıca, yapılan ön çalışmada 6 µg/ml'den daha yüksek dozlarda doz artışına paralel olarak mitotik indeksin azaldığı ve sitotoksistenin önemli oranda artış gösterdiği saptanmıştır. Çalışmamızda en düşük doksisisiklin dozu olarak IC50 değerinin 1/3'ü olan 2 µg/ml'lik konsantrasyon ve en düşük doz ile en yüksek doz arasındaki 4 µg/ml'lik konsantrasyon ise ara doz olarak kullanılmıştır.

Tüm tüplere kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (kültürün 70. saatinde) kolşisin eriyiğinden 0.06 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiş ve hücreler 2 saat süresince kolşisin ile muameleye bırakılmıştır. Kültür süresinin bitiminde tüpler 1200 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiş ve altta biriken hücrelere zarar vermeden üstte biriken süpernatant su trompu yardımıyla atılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden yaklaşık 1 ml'lik sıvı karıştırıldıktan sonra tüplere, daha önceden 37°C'de ısıtılmış olan %0.4'lük KCl hipotonik solüsyonundan yavaş yavaş damlalar halinde 10 ml. ilave edilmiştir. Hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler, ağzı kapatılarak inkübatöre konulmuştur ve 37°C'de 20-30 dakika hipotonik eriyikle muamele edilmiştir. Muamele süresinin sonunda tüpler 15 dk. 1200 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır.

Hücrelerin fikse edilmesi için tüplere, 3:1 oranında hazırlanan soğuk tespit (fiksatif) çözeltisi (metil alkol: glisial asetik asit), 10 ml. olacak şekilde damlalar halinde yavaş yavaş tüplere ilave edilmiştir. Yaklaşık 20 dakika oda sıcaklığında fiksatif ile muamele edilen hücreler 1200 rpm'de 15 dk. santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış ve tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görülünceye kadar bu işlem yaklaşık 3 kez daha tekrarlanmıştır. Son santrifüj işleminden sonra tüplerde yaklaşık 1 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atılarak işleme son verilmiştir.

Tüpteki süspansiyon pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirildikten sonra, daha önceden temizlenmiş ve buzdolabında saklanan soğuk lamlar üzerine

damlatılarak hücrelerin lam üzerinde yayılması sağlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiştir.

3.2.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması

Sorensen tamponu ile hazırlanmış olan % 5'lik Giemsa eriyiği filtre kağıdı ile dik bir şaleye süzümüştür ve preparatlar Giemsa-Tampon boya eriyiğinde yaklaşık 4-5 dakika boyanmıştır. Preparatlar boyadan çıkarıldıktan sonra farklı kaplardaki distile sulardan geçirilerek fazla boyanın akması sağlanmış ve preparatlar dik bir şekilde kurumaya bırakılmıştır. Boyanan preparatlar en az 1 gece kurutulduktan sonra, entellan yardımıyla kapatılarak daimi hale getirilmiştir. Entellan kuruduktan sonra daimi preparatlarda mikroskopik incelemeler yapılmıştır.

3.2.3. Mitotik İndeks (MI) ve Kromozom Anormalliklerinin (KA) Saptanması

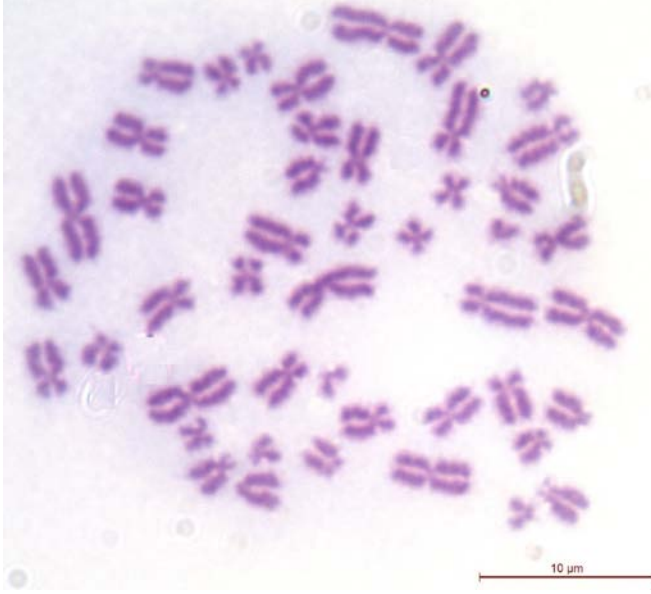
3.2.3.1. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

Test maddelerinin mitoz bölünme üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile her kişiye ait preparatlardan toplam 2000 bin hücre incelenmiş ve bunlar arasında metafaz devresinde olan hücreler saptanarak kaydedilmiştir. Her bir kişinin incelenen 2000 hücresi içinde bölünme halindeki hücrelerin oranı yüzde cinsinden hesaplanarak mitotik indeks saptanmıştır.

3.2.3.2. Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması

Kromozom anormalliklerinin belirlenmesi için, her bir çalışma grubu ve konsantrasyon için, her bir kişiden hazırlanan preparatlarda kromozomları iyi dağılmış 100 metafaz plağı (4 kişiden toplam 400 hücre) incelenerek normal (Şekil 3.1) ve yapısal ve sayısal kromozom anormallikleri taşıyan metafaz plakları tespit edilmiştir. Gözlenen kromozom yapı ve sayı anormallikleri Uluslararası İnsan Sitogenetik Adlandırma Sistemine (ISCN= International System for Human Cytogenetic Nomenclature) uygun olarak değerlendirilmiş ve adlandırılmıştır (Paz-y-Mino ve ark., 2002). Her bir muamele grubunda gözlenen kromozom anormallikleri tipleri ve sayıları, toplam kromozom anormalliği ve kromozom anormallikleri içeren anormal hücre yüzdesi hesaplanmıştır.

Mace ve ark. (1978) elektron mikroskobu çalışması ile gap bölgelerinde DNA ipliğinde kırık veya kırıklar olmadığını belirtmişlerdir. Bu nedenle pek çok çalışmada gaplar kromozom anormalliği olarak değerlendirilmemektedir (Yavuz Kocaman ve Topaktaş, 2007) Benzer olarak bu çalışmada da gaplar, kromozom anormalliği olarak değerlendirilmemiştir.



Şekil 3.1. Normal metafaz plağı (x1000)

3.3. Mikronükleus (MN) Testi İçin Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması

3.3.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Çalışmamızda *in vitro* mikronükleus testinin uygulanmasında Fenech (2000), Rothfuss ve ark. (2000) ve Kirsch-Volders ve ark. (2003)'ün kullandıkları tekniklerden yararlanılmıştır. Sigara içmeyen, geçirilmiş herhangi bir ciddi hastalığı olmayan, rutin bir şekilde herhangi bir ilaç kullanmayan ve 20-24 yaşları arasında olan sağlıklı iki erkek ve iki bayandan 1/10 oranında heparinize edilerek kan alınmıştır. İçerisinde 2.5 ml'lik kromozom medyumunu bulunan steril tüplere, alınan periferik kan örneklerinden 300 µl steril şartlarda ekilmiştir ve hücre kültürü $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 68 saat için inkübasyona bırakılmıştır.

Mikronükleus testi için negatif kontrol, pozitif kontrol ve doksisisiklinin grupları bulunmaktadır ve bu gruplara uygulanan tüm test maddeleri, kromozom anormallikleri

testinde uygulanan konsantrasyon ve muamele sürelerindeki gibi kullanılmıştır. Yani mikronükleus testi için de hazırlanan kültürler; herhangi bir maddenin ilave edilmediği bir negatif kontrol grubu, Mitomycin C'nin kullanıldığı pozitif kontrol grubu ve test maddemiz olan doksisiklinin bidistile suda çözülerek hazırlandığı 2, 4 ve 6 µg/ml'lik konsantrasyonlarının 48 saat boyunca muamelelerinin yapıldığı deney gruplarından oluşmaktadır.

Sitokinezi engelleyerek iki nükleuslu hücre oluşumunu sağlamak için kültür süresinin bitimine 24 saat kala (inkübasyonun başlangıcından 44 saat sonra) tüm kültür tüplerine 8 µg/ml olacak şekilde sitokalsin B ilave edilmiştir. Kültür süresinin bitiminde tüpler 1200 rpm'de 15 dk. santrifüjlenerek süpernatant atılmıştır. Tüpte kalan sıvı karıştırıldıktan sonra tüplere, daha önceden 37°C'de ısıtılmış olan hipotonik eriyikten (%0.4 KCl) 5 ml olacak şekilde yavaş yavaş ilave edilmiştir. Hipotonik eriyik ilave edilen tüpler, 37°C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda tüpler 1200 rpm'de 15 dk. santrifüjlenerek süpernatant kısmı atılmıştır. Daha sonra glasiyal asetik asit/metanol/%0.9 NaCl (1/5/6 oranlarında) karışımından oluşan 5 ml soğuk fiksatif, yavaş yavaş ve damlalar halinde tüpteki sıvının üzerine ilave edilmiştir. Fiksatif ile oda sıcaklığında 20 dk. muamele edildikten sonra tüpler tekrar 1200 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Bu defa tüplere 1 kısım asetik asit ve 5 kısım metil alkolden (1/5) oluşan ikinci fiksatif 5 ml olacak şekilde ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 20 dk. muamele edilmiştir. Bu işlem tüpte kalan sıvının berraklaştığı görülünceye kadar 2-3 kez tekrarlanmıştır. Son santrifüjden sonra tüplerde yaklaşık 1 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atılmıştır ve tüplerdeki sıvı pasteur pipeti ile karıştırılarak resüspanse edilmiştir. Daha önceden temizlenmiş ve alkol içerisinde buzdolabında saklanan soğuk lamaların üzerine hücre süspansiyonu damlatılarak preparatlar hazırlanmıştır ve kurumaları için kapalı bir yerde 24 saat oda ısısında bekletilmiştir.

3.3.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması

Sorensen tamponu ile hazırlanmış olan % 5'lik Giemsa eriyiği filtre kağıdı ile dik bir şaleye süzülmüştür. Mikronükleusların boyanması için preparatlar Giemsa-Tampon boya eriyiğinde 15 dakika boyanmıştır. Preparatlar boyadan çıkarıldıktan sonra farklı kaplardaki distile sulardan geçirilerek fazla boyanın akması sağlanmış ve preparatlar dik bir şekilde kurumaya bırakılmıştır. Boyanan preparatlar bir gece

kurutulduktan sonra entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir ve entellan kuruduktan sonra mikroskopik incelemeler yapılmıştır.

3.3.3. Mikronükleus Sayısı ve Nükleus Bölünme İndeksinin (NBI) Saptanması

Mikronükleus sayısını belirlemek amacıyla daimi preparatlarda her kişi için, her muamele grubu ve kontrollerinde iki nükleusa sahip (Şekil 3.2) toplam 2000 hücre incelenmiş ve bu binükleat hücreler içerisinde mikronükleus taşıyanlar (Şekil 3.3) belirlenmiştir. Ayrıca incelenen binükleat hücrelerde toplam mikronükleus sayısı saptanarak, mikronükleus taşıyan iki nükleuslu hücrelerin oranı ve toplam mikronükleus sayısının incelenen iki nükleuslu hücre sayısına bölünmesiyle hücre başına düşen mikronükleus sayısı (MN/Hücre) ve % MN hesaplanmıştır.



Şekil 3.2. Binükleat hücre (x400)



Şekil 3.3. Bir mikronükleus bulunduran binükleat hücre (x400)

Binükleer hücre ve mikronükleus ayrımı Titenko-Holland ve ark. (1997) ve Fenech (2000)'e göre yapılmıştır:

(1) Hücreler belirgin sitoplazmasıyla yuvarlak ya da oval görünüme sahip olmalıdır.

(2) Benzer olarak, nükleuslar belirgin nükleus zarıyla çevrili yuvarlak ya da oval olmalıdır.

(3) İçerisinde MN sayılan hücreler sadece bir nükleus bölünmesi geçiren hücrelerdir.

(4) MN'lar sadece ana nükleusun 1/3'ü ya da daha küçük olduklarında hesaba katılmalıdır.

(5) MN'lar ana nükleus gibi boyanmalıdır.

(6) MN'lar ana nükleustan açık bir şekilde ayrılmış olmalıdır (Yavuz Kocaman, 2007).

Her bir kişiden hazırlanan her bir preparattan 1000 hücre sayılarak, bu hücreler arasından bir nükleuslu, iki nükleuslu, üç nükleuslu ve dört nükleuslu (Şekil 3.4) olanların oranı saptanmıştır. Bu orandan yola çıkarak Eastmond ve Tucker (1989) tarafından önerilmiş olan formüle göre, kimyasal veya fiziksel bir maddenin sitotoksik etkisini göstermede önemli bir parametre olan Nükleer Bölünme İndeksi (NBI) (Nuclear Division Index = NDI) hesaplanmıştır (Yavuz Kocaman ve Topaktaş, 2007).

$$\text{NBI} = (\text{MI} + 2 \times \text{MII} + 3 \times \text{MIII} + 4 \times \text{MIV}) / \text{N}$$

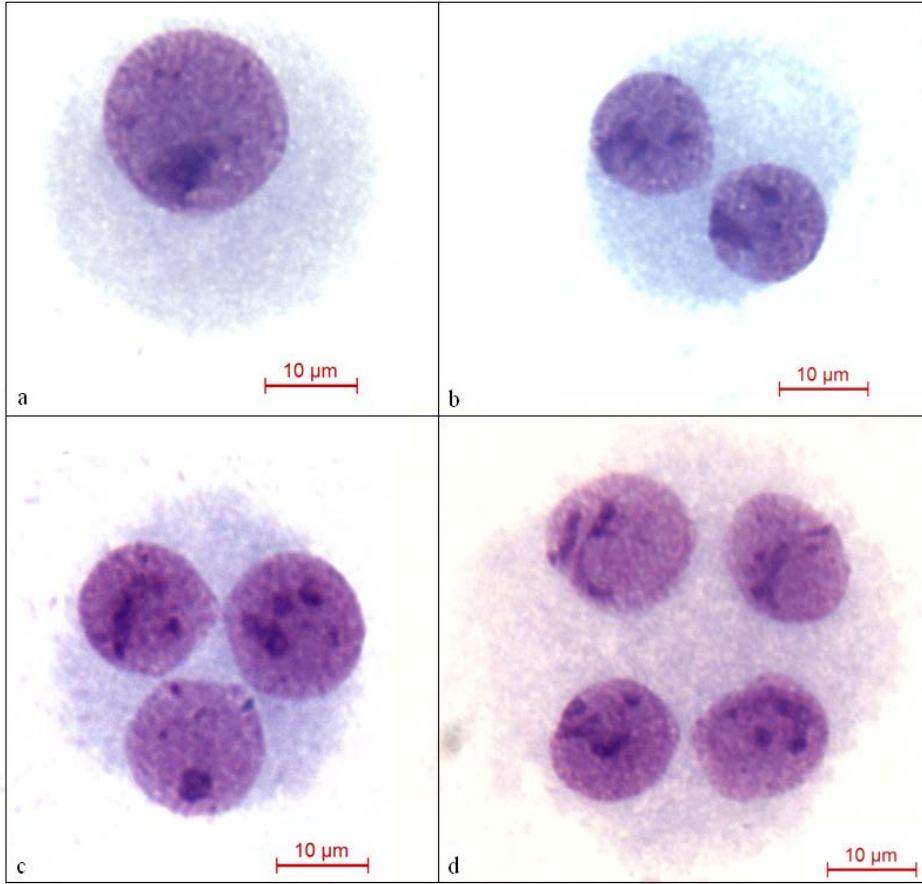
MI: Bir nükleuslu hücreler

MII: İki nükleuslu hücreler

MIII: Üç nükleuslu hücreler

MIV: Dört nükleuslu hücreler

N: Toplam hücre sayısı



Şekil 3.4. a- mononükleat, b- binükleat ,c- trinükleat, d- tetranükleat hücre (x 400)

3.4. Mikroskopik İncelemeler ve Mikroskopta Fotoğraf Çekme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar görüntü analiz sistemli Leica marka ışık mikroskobu ile incelenmiştir. İncelenen preparatlarda MI, KA, mononükleat (bir nükleuslu), binükleat (iki nükleuslu), trinükleat (üç nükleuslu) ve tetranükleat (dört nükleuslu) hücreler ile MN'li binükleat hücreler tespit edilmiştir. Elde edilen bazı görüntüler X40 ve X100 büyütmede fotoğraflanarak bilgisayara aktarılmıştır.

3.5. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Mikroskopik inceleme sonucunda elde edilen KA, MI, NBI ve MN parametrelerine ait verilerin hem kendi aralarında, hem de negatif ve pozitif kontrol grupları ile arasındaki farkın önemli olup olmadığı SPSS istatistik programı kullanılarak Tukey testi-Post-Hoc analizi ile karşılaştırılmıştır. Doz-etki ilişkisini belirlemek amacıyla regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı (r) bulunmuş ve regresyon doğrusu çizilmiştir. Ayrıca KA ile MN oluşumu ve MI ile NBI arasında ilişki olup

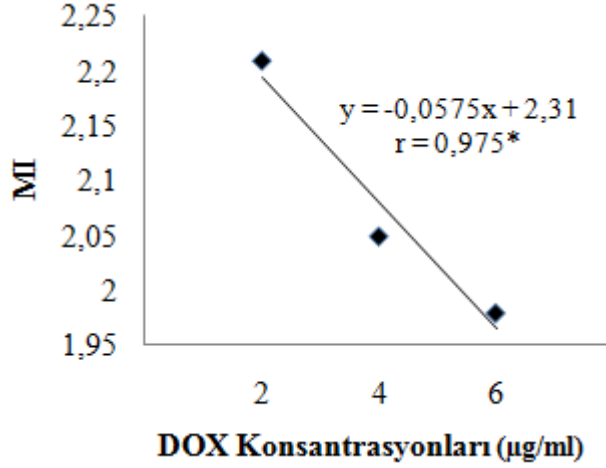
olmadığı korelasyon-regresyon analizi ile araştırılmıştır. Tüm analizler 4 bireyden elde edilen verilerin ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Tüm analizlerde; p değeri (güven aralığı) 0,05 olarak alınmıştır.

Mikroskobik incelemeler sonucunda elde edilen görüntüler şekiller halinde, istatistiksel bulgular ise çizelgeler ve grafikler halinde verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Doksisisiklinin Mitotik İndeks (MI) ve Kromozom Anormalliklerinin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

2, 4 ve 6 µg/ml dozlarındaki Doksisisiklin (DOX)'in insan periferik lenfositlerine 48 saat muamelesi sonucu, DOX dozunun artışına bağlı olarak MI'in düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.1). En yüksek DOX dozu olan 6 µg/ml konsantrasyonda MI en düşük değerde bulunmuştur. Tüm DOX dozlarındaki MI değerleri, negatif kontrole göre istatistiksel anlamda farklı olarak bulunmuştur ($p < 0.05$). Fakat MI'deki bu düşüşler istatistiksel anlamda pozitif kontrol kadar etkili olmamıştır. (Çizelge 4.1).



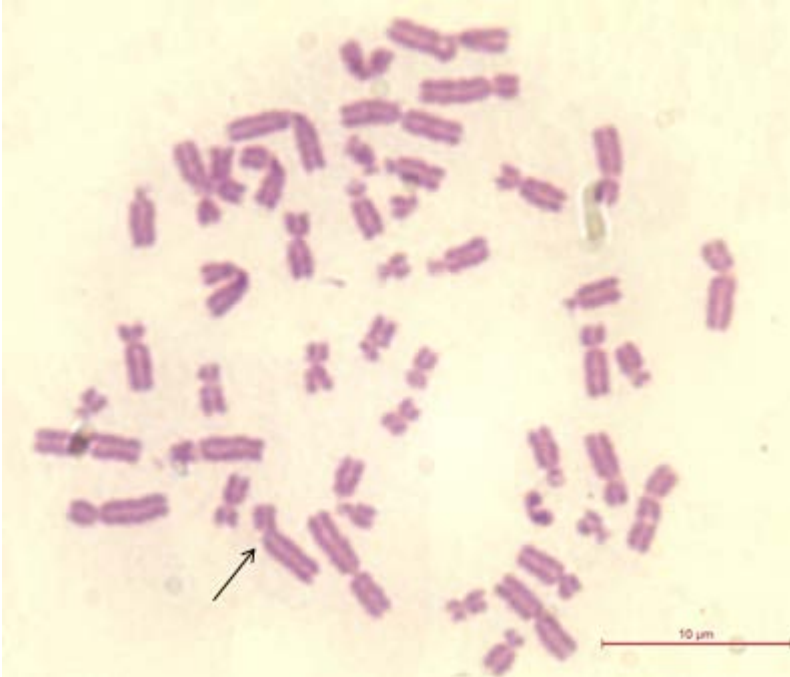
*: $P < 0,05$

Şekil 4.1. Doksisisiklinin test edilen dozları ile MI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı

DOX'in insan periferik lenfositlerine 48 saat muamelesi sonucu; kromatid kırığı (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11), kromozom kırığı (Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6), fragment (Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.14), kardeş kromatid birleşmesi (Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14), kromatid değişimi (Şekil 4.10) ve poliploidi (Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17) gibi kromozom anormallikleri meydana geldiği belirlenmiştir (Çizelge 4.1). DOX'in 2 ve 6 µg/ml dozlarında kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, kardeş kromatid birleşmesi ve poliploidi gibi kromozom anormallikleri gözlenmiştir. 4 µg/ml dozda ise kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, kardeş kromatid birleşmesi, kromatid değişimi ve poliploidi saptanmıştır.



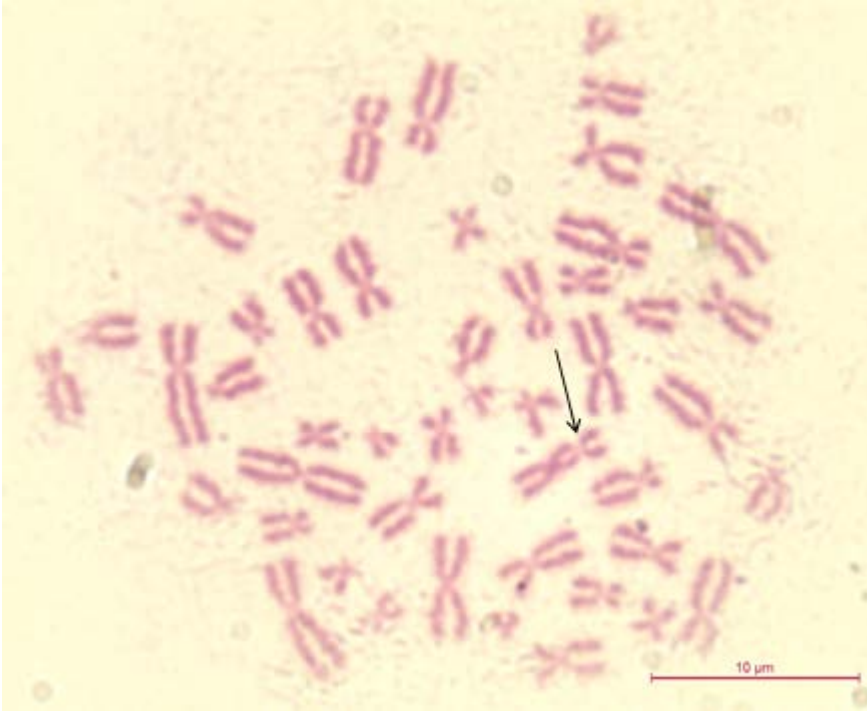
Şekil 4.2. Kromatid kırığı (2 µg/ml'lik uygulama) x1000



Şekil 4.3. Kromatid kırığı (4 µg/ml'lik uygulama) x1000



Şekil 4.4. Kromozom kırıkları (2 µg/ml'lik uygulama) x1000



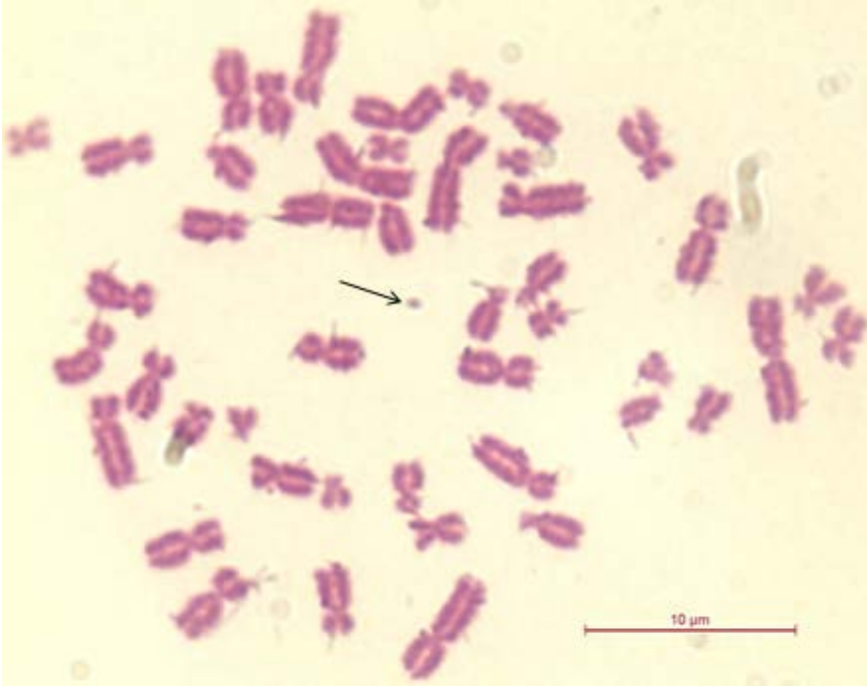
Şekil 4.5. Kromozom kırığı (4 µg/ml'lik uygulama) x1000



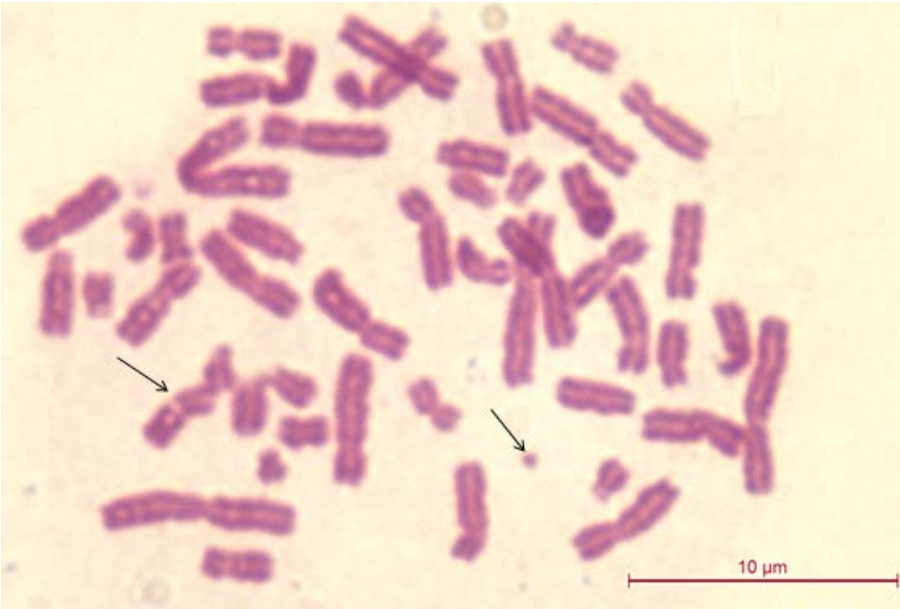
Şekil 4.6. Kromozom kırıkları (6 µg/ml'lik uygulama) x1000



Şekil 4.7. Fragment (2 µg/ml'lik uygulama) x1000



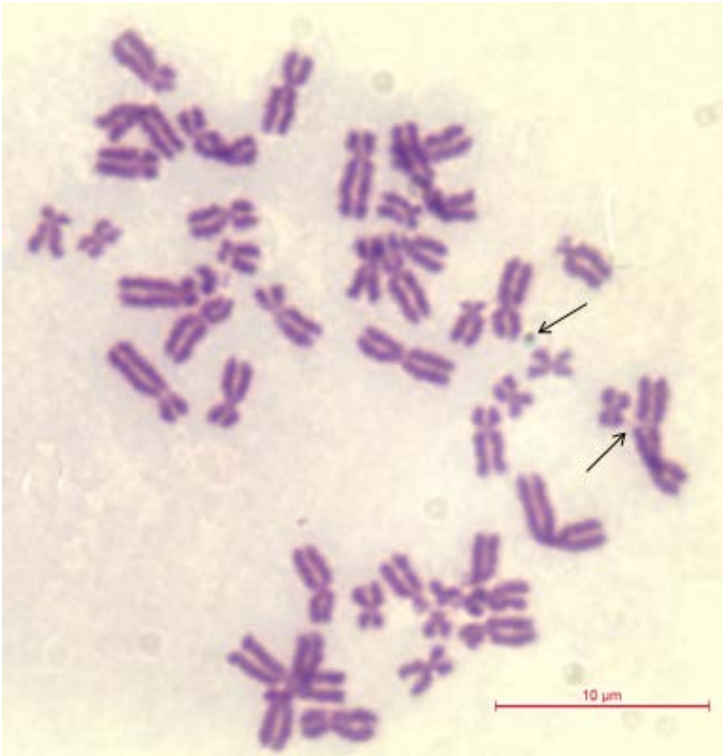
Şekil 4.8. Fragment (4 $\mu\text{g/ml}$ 'lik uygulama) x1000



Şekil 4.9. Kromatid kırığı ve fragment (2 $\mu\text{g/ml}$ 'lik uygulama) x1000



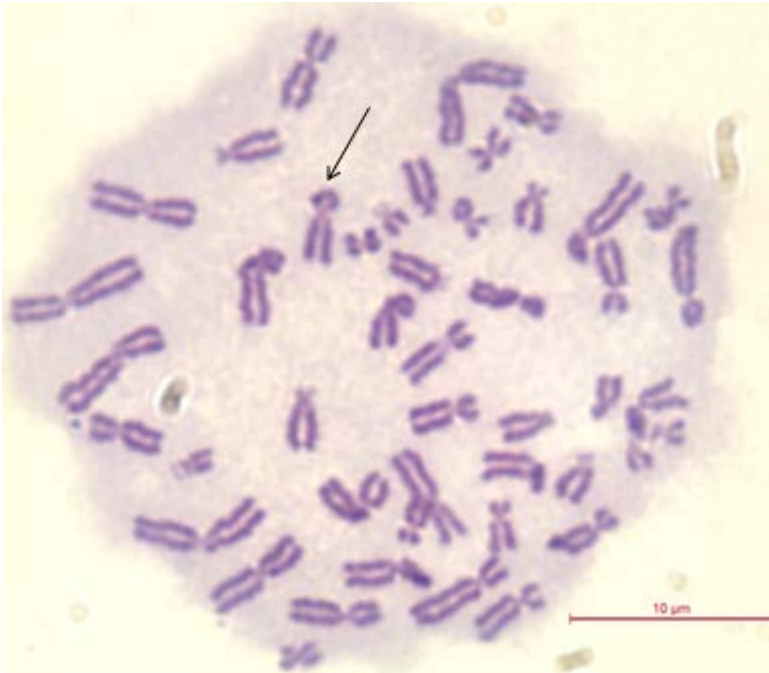
Şekil 4.10. Kromatid kırığı, kromatid değişimi ve fragment (4 µg/ml'lik uygulama) x1000



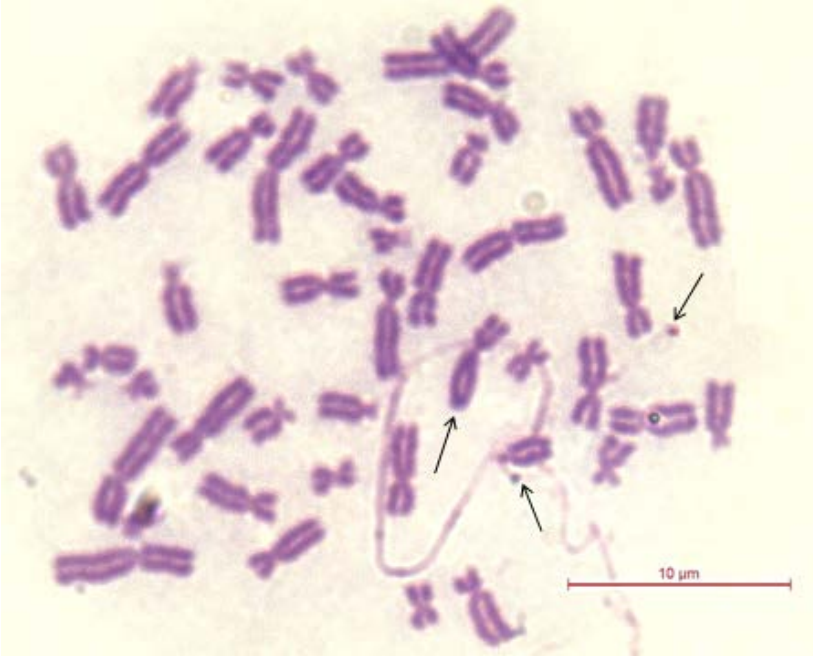
Şekil 4.11. Kromatid kırığı ve fragment (6 µg/ml'lik uygulama) x1000



Şekil 4.12. Kardeş kromatid birleşmesi (2 µg/ml'lik uygulama) x1000



Şekil 4.13. Kardeş kromatid birleşmesi (6 µg/ml'lik uygulama) x1000



Şekil 4.14. Kardeş kromatid birleşmesi ve fragmentler (4 µg/ml'lik uygulama) x1000



Şekil 4.15. Poliploidi (2 µg/ml'lik uygulama) x400



Şekil 4.16. Poliploidi (4 µg/ml'lik uygulama) x1000



Şekil 4.17. Poliploidi (6 µg/ml'lik uygulama) x1000

Çizelge 4.1. Doksisiklin ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde MI, KA tipleri, toplam KA, KA ve AH yüzdesi

Anormallik Tipleri												
Test Maddesi	Konsantrasyon	MI (%) ± SE	K'	K''	F	KKB	KD	P	Toplam KA	%KA ± SE	AH (%) ± SE	
Negatif Kontrol	-	4.03±0.06	8	2	6	1	1	1	19	4.75±1.79	4.75±1.79	
Pozitif Kontrol	0.16 µg/ml	0.65±0.10	74	24	94	2	3	2	199	49.75±4.32	46.75±3.72	
(MMC)												
Doksisiklin	2 µg/ml	2.21±0.33 ^{ab}	14	4	10	6	-	2	36	9.00±0.91 ^b	8.50±0.95 ^b	
	4 µg/ml	2.05±0.04 ^{ab}	9	1	16	4	2	5	37	9.25±3.42 ^b	8.75±3.32 ^b	
	6 µg/ml	1.98±0.23 ^{ab}	23	11	24	5	-	1	64	16.00±4.41 ^b	15.50±4.48 ^b	

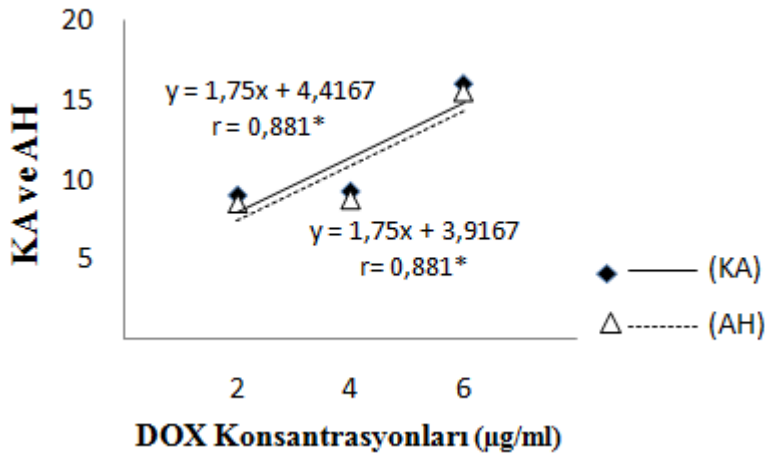
KA: Kromozom anormallikleri, AH: Kromozom anormallikleri içeren anormal hücreler, MI: Mitotik indeks, K': Kromatid kırığı,

K'': Kromozom kırığı, F: Fragment, KKB: Kardeş kromatid birleşmesi, KD: Kromatid değişimi, P: Poliploidi

a: Negatif kontrol ile; b: Pozitif kontrol ile aradaki fark önemlidir.

(P < 0.05)

DOX'in test edilen tüm dozlarında toplam KA, % KA ve KA içeren anormal hücre (AH) yüzdesinin, DOX dozundaki artışa paralel olarak arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.18). Toplam KA, % KA ve AH yüzdesi bakımından en yüksek değer, en yüksek DOX dozu olan 6 µg/ml konsantrasyonda bulunmuştur. Fakat negatif kontrole göre kıyaslandığında test edilen tüm DOX dozlarında gözlenen bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca DOX'in tüm doz ve muamele sürelerinde gözlenen bu artışlar pozitif kontrol kadar etkili olmamıştır ($p < 0.05$) (Çizelge 4.1).



*: $P < 0,05$

Şekil 4.18. Doksisisiklinin test edilen dozları ile KA ve AH arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı

4.2. Doksisisiklinin Nükleus Bölünme İndeksi (NBI) ve Mikronükleus (MN) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

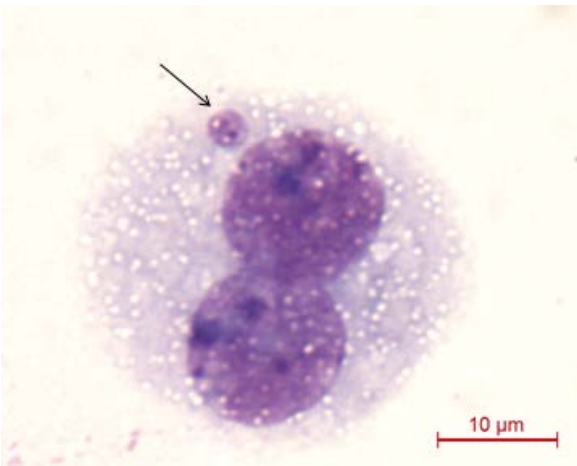
DOX'in insan periferal lenfositlerine 2, 4 ve 6 µg/ml dozlarının 48 saat muamelesi sonucu oluşan MNBN'ler Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24' da, nükleus sayısına göre hücrelerin dağılımı, NBI, MN sayısına göre BN hücrelerin dağılımı ve binükleat hücrelerdeki %MN değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.19. Bir mikronükleus içeren binükleat hücre (2 µg/ml'lik uygulama) x400



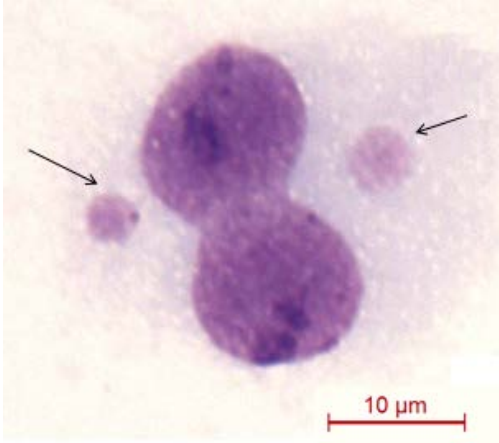
Şekil 4.20. Bir mikronükleus içeren binükleat hücre (4 µg/ml'lik uygulama) x400



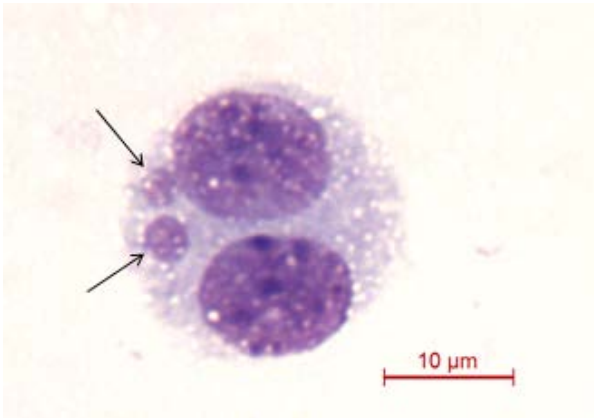
Şekil 4.21. Bir mikronükleus içeren binükleat hücre (6 µg/ml'lik uygulama) x400



Şekil 4.22. İki mikronükleus içeren binükleat hücre (2 µg/ml'lik uygulama) x400



Şekil 4.23. İki mikronükleus içeren binükleat hücre (4 µg/ml'lik uygulama) x400



Şekil 4.24. İki mikronükleus içeren binükleat hücre (6 µg/ml'lik uygulama) x400

Çizelge 4.2. Doksisiklin ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde hücrelerin nükleus sayısına göre dağılımı, binükleat hücrelerin MN sayısına göre dağılımı, MN yüzdesi ve NBI

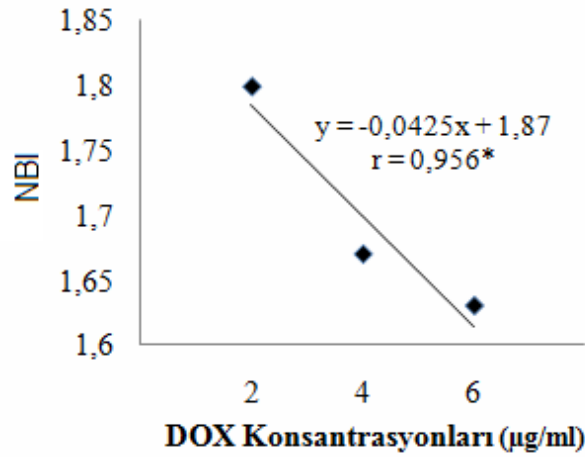
Test Maddesi	Konsantrasyon	MN Sayısına Göre BN Hücrelerin Dağılımı				%MN±SE	Nükleus Sayısına Göre Hücrelerin Dağılımı				NBI±SE	
		0	1	2	3		>3	1	2	3		4
Negatif Kontrol	-	7990	10				0.12±0.01	684	3083	117	116	1.91±0.02
Pozitif Kontrol	0.16 µg/ml	7521	433	33	11	2	5.98±0.31	2911	1054	21	14	1.28±0.07
(MIMC)												
Doksisiklin	2 µg/ml	7987	14	-	-	-	0.17±0.01 ^b	922	2968	54	56	1.80±0.01 ^b
	4 µg/ml	7984	16	-	-	-	0.20±0.02 ^b	1295	2696	5	4	1.67±0.01 ^{ab}
	6 µg/ml	7976	23	1	-	-	0.30±0.07 ^b	1485	2496	13	6	1.63±0.02 ^{ab}

BN: Binükleat, MN: Mikronükleus, NBI: Nükleer bölünme indeksi

a: Negatif kontrol ile; b: Pozitif kontrol ile aradaki fark önemlidir.

($P < 0.05$)

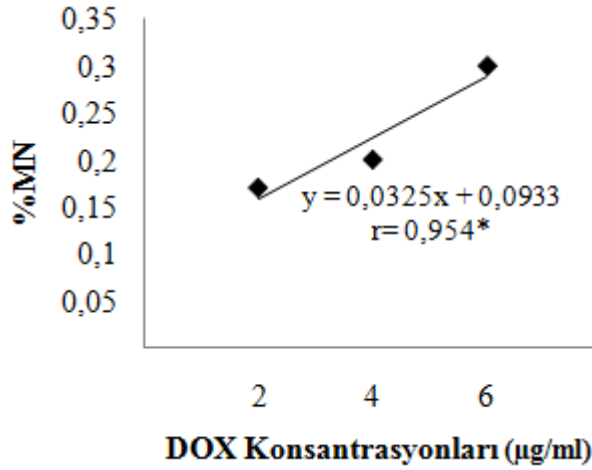
DOX dozunun artışına bağlı olarak BN hücrelerin sayısının ve NBI değerlerinin düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.25) ve en yüksek DOX dozu olan 6 µg/ml konsantrasyonda hem BN hücrelerin sayısının hem de NBI'nin en düşük değerde olduğu belirlenmiştir. DOX'in test edilen en düşük konsantrasyonu olan 2 µg/ml dozunda NBI'ndeki değer negatif kontrole göre istatistiksel anlamda farklılık göstermemesine rağmen, DOX'in 4 ve 6 µg/ml dozlarındaki NBI değerlerindeki düşüşler negatif kontrole göre istatistiksel anlamda farklı olarak bulunmuştur ($p < 0.05$). Fakat NBI'nde azalmalara yol açan tüm DOX konsantrasyonlarında bu düşüşler istatistiksel anlamda pozitif kontrol kadar etkili olmamıştır. (Çizelge 4.2).



*: $P < 0,05$

Şekil 4.25. Doksisisiklinin test edilen dozları ile NBI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı

MN bulunduran BN hücrelerin sayısının ve MN bulunduran BN (MNBN) hücre yüzdesinin, DOX dozunun artışına bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.26). MN bulunduran BN hücre sayısı ve % MNBN sıklığının en yüksek değerleri, DOX'in test edilen en yüksek dozu olan 6 µg/ml konsantrasyonda tespit edilmiştir. DOX dozunun artışı, % MNBN'ni artırmış olmasına rağmen bu artışlar negatif kontrollere göre kıyaslandığında aralarında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p < 0.05$). Ayrıca DOX uygulaması sonucu elde edilen değerlerin pozitif kontroller kadar etkili olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

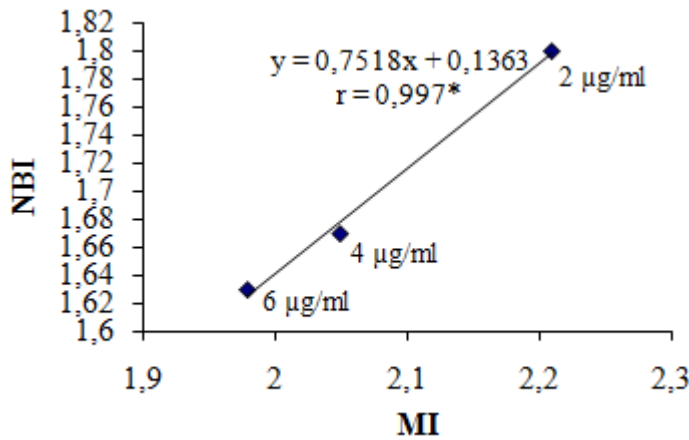


*: $P < 0,05$

Şekil 4.26. Doksisisiklinin test edilen dozları ile %MNBN arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı

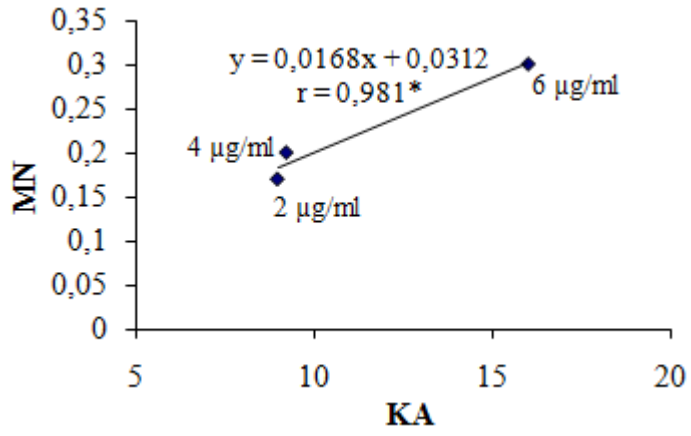
4.3. Doksisisiklin Dozlarına Bağlı Olarak MI ile NBI ve KA ile MN Arasındaki İlişki

DOX ile 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde test maddesinin doz artışına bağlı olarak MI ve NBI değerlerini istatistiksel olarak önemli ölçüde düşürdüğü ve DOX dozlarına bağlı olarak MI ve NBI değerleri arasında paralel bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.27). Ayrıca DOX konsantrasyonu arttıkça % KA ve % MN'nin de artış gösterdiği ve bu artışlar arasında istatistiksel bakımdan anlamlı bir ilişkinin olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.28).



*: $P < 0,05$

Şekil 4.27. Doksisisiklin muamelesi sonucu MI ile NBI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı



*: $P < 0,05$

Şekil 4.28. Doksiklin muamelesi sonucu KA ile MN arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, pek çok mikroorganizmanın yol açtığı çeşitli enfeksiyonun kontrol edilmesinde ve gerektiğinde koruyucu tedavisinde sıklıkla kullanılan ve pek çok mikroorganizma üzerinde geniş etki spektrumlu olan DOX'in *in vitro* sitotoksik ve genotoksik etkileri incelenmiştir. Sağlıklı bireylerden alınan periferik kan lenfositleri 48 saat boyunca DOX ile muamele edilmiştir. Sitotoksik etkiyi belirlemek için MI ve NBI parametreleri, genotoksik etkiyi belirlemek için ise KA ve MN testleri uygulanmıştır. Ayrıca DOX'in KA, MI, MN ve NBI üzerine etkileri ve bu parametrelerin birbirleri ile olan ilişkileri araştırılmıştır.

MI ve NBI, hücre proliferasyonu, sitostatik etki ve sitotoksisiteyi göstermek için kullanılan indikatörlerdir. Sitotoksisite doğrudan karsinojeniteyi göstermemesine rağmen, sitotoksisite ve tümör gelişimi arasındaki ilişki pek çok çalışmada gösterilmiştir. Çünkü sitotoksisite büyük oranda DNA'daki bazların modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklara yol açar. Azalmış MI ve NBI, hücre siklusu ilerlemesinde inhibisyonu ve/veya proliferatif kapasitedeki kaybı göstermektedir. Bu parametreler ayrıca bazı ilaçların *in vitro* etki mekanizmaları hakkında bilgiler vermektedir (Rojas ve ark., 1993; Anderson ve ark., 1988; Albert and Magee, 2000; Lo'pez Nigro ve ark., 2003; Seligmann ve ark., 2003; Gökalp Muranlı, 2006). NBI'ndeki anlamlı azalma, yeni bir DNA replikasyon sürecinden önce indüklenen genotoksik hasarın onarılması için onarım sistemlerine izin veren hücre siklusu gecikmesini göstermektedir (Laffon ve ark., 2001). MI'deki düşme ise, hücre döngüsünün G2 fazının engellenmesi sebebiyle hücrenin mitozu geçememesinden kaynaklanabilmektedir. ATP seviyesinin düşmesi ve enerji üretim merkezinin zorlanması da bu düşüşe neden olabilir. Maddelerin antimitotik aktivitesi, hücre döngüsüne özgü proteinlerin/enzimlerin inhibisyonu ile DNA sentezinin inhibisyonu veya ipliklerinin oluşum, toplanma veya oryantasyonun inhibisyonundan da kaynaklanabilir (Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006).

KA ve MN testleri, DNA'da hasara yol açan ajanların sitogenetik etkilerinin belirlenebilmesi için yaygın bir şekilde kullanılan indikatör testlerdir. Özellikle periferik lenfositlerdeki artmış KA ve MN frekansının, insanda klastojenitenin bir göstergesi olduğu, artmış kanser riskini ve genetik kararsızlığı gösterdiği belirtilmiştir (Carrano ve Natarajan, 1988; Albertini ve ark., 2000; Norppa ve ark., 2006; Bonassi ve ark., 2007)

İnsan periferel lenfositlerinin 2, 4 ve 6 µg/ml dozlarındaki DOX ile 48 saatlik muamelesi sonucu, DOX dozunun artışına paralel olarak MI ve NBI'nin azaldığı tespit edilmiştir. Test edilen tüm DOX konsantrasyonlarında doza bağlı olarak azalan MI değerleri negatif kontrole göre istatistiki olarak önemli bulunurken, NBI değerleri incelendiğinde, 4 ve 6 µg/ml dozlarındaki uygulamaların ortaya çıkardığı değerlerin negatif kontrolden istatistiksel açıdan farklı olduğu tespit edilmiştir. Fakat hem MI hem de NBI'ndeki bu düşüşler istatistiksel olarak pozitif kontrol kadar etkili olmamıştır (Çizelge 4.1). Bu sonuçlar uygulanan DOX dozunun artırılmasının MI ve NBI üzerinde olumsuz etki ortaya çıkardığını göstermektedir. Çünkü uygulanan bir kimyasalın toksisitesindeki artışın bölünme indeksi değerini gittikçe düşürdüğü belirtilmiştir (Eke, 2007). Bizim çalışmamızda da, MI ve NBI'nin DOX dozundaki artışa bağlı olarak azalması, bu etken maddenin doza bağlı sitostatik ve sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

İnsan periferel lenfositleri üzerine 48 saat boyunca uygulanan tüm DOX dozları ortaya çıkan değerlerin toplam KA, % KA ve KA içeren AHO bakımından negatif kontrolden yüksek olmasına rağmen, bu artışların istatistiksel anlamda önemli olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.2). MN testinde ise artan DOX dozlarına bağlı olarak MN sıklığı ve % MN değerlerinin arttığı, fakat bu artışların istatistiksel açıdan negatif kontrolden farklı olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca tüm DOX dozlarının uygulaması sonucu oluşan KA ve MN değerlerinin pozitif kontrolden elde edilen değerlerden düşük olduğu ve istatistiksel anlamda pozitif kontrol kadar etkili olmadığı bulunmuştur (Çizelge 4.5). Bu sonuçlar DOX'in, insan periferel lenfositleri üzerinde test edilen tüm dozlarda KA ve MN oluşumu üzerinde çok fazla olumsuz etkisinin olmadığı, yani genotoksik etkisinin bulunmadığı sonucunu ortaya çıkmaktadır.

EMEA, FDA ve PDR'nin, DOX'in genotoksisite bilgilerini içeren yayınlanmamış raporlara göre DOX'in bazı hücreler için genotoksik etkisinin bulunduğu belirtilirken, bazı genetik toksikoloji testlerinde bazı hücreler için genotoksisite bakımından negatif sonuçlar rapor edilmiştir. EMEA (1997)'nin raporlarına göre DOX'in genotoksik etki göstermezken, FDA (1997) ve PDR (2005)'nin raporlarında genotoksisite bakımından DOX'in hem negatif hem de zayıf pozitif sonuçlar verdiği ifade edilmiştir. 500, 800 ve 1250 mg/kg dozlarındaki DOX'in CD-1 farelerinin kemik iliği polikromatik eritrositlerindeki MN frekansını istatistiksel olarak artırmadığı ve bu nedenle DOX'in test edilen dozlarda genotoksik etki

göstermediği belirlenmiştir. Çin hamster ovaryum hücrelerinde ise, metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda 350 µg/ml konsantrasyona kadar denenen dozlardaki DOX'in KA bakımından doza bağlı olmayan artışlar gösterdiği ve bu nedenle DOX'in zayıf klastojenik etki gösterdiği belirtilmiştir (FDA, 1997; PDR, 2005). 75 ve 100 mg DOX dozlarının *in vitro* Çin hamster akciğer hücrelerinde ve fare lenfoma testinde genotoksik etki bakımından pozitif sonuçlar verdiği ifade edilmiştir (FDA, 2004). Bizim çalışmamızda insan periferal lenfositlerinde DOX, KA ve MN frekansını istatistiksel olarak önemli ölçüde artırmadığından genotoksik olmadığı sonucuna varılmıştır. Çalışmalar arasında farklı sonuçların ortaya çıkması, hem çalışılan canlı ve hücre gruplarının hem de kullanılan DOX dozlarının farklı olmasından kaynaklanabilir.

DOX'in 0.05, 0.46, 4.62, 46.2 ve 462 µg/ml konsantrasyonlarının Çin hamster V79 hücrelerine uygulanarak genotoksik etkisinin foto-MN testi ile araştırıldığı çalışmada, DOX'in, UV ile indüklenmiş MN frekansını artırmadığını, fakat UV varlığında proliferasyon indeksini düşürdüğünü belirtilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak DOX'in fotogenotoksik olmadığı, fakat fotositotoksik olduğu sonucuna varılmıştır (Kersten ve ark., 1999). Bu çalışma ile bizim çalışmamız arasında kullanılan hücre çeşiti ve DOX dozları farklı olmasına rağmen benzer sonuçlar elde edilmiştir. Çünkü bizim çalışmamızda da DOX, MN testinde genotoksik etki göstermezken, MI ve NBI'ni istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşürdüğü için sitotoksik etki göstermiştir.

DOX'in prostat, göğüs, böbrek ve kemikte oluşan çeşitli tümör hücreleri için sitostatik ve sitotoksik etkisinin olduğu bildirilmiştir (Saikali ve Singh, 2003). Bizim çalışmamızda bu çalışmada kullanılan hücrelerden farklı bir hücre tipi kullanılmış olmasına rağmen DOX'in sitotoksik etkiye sahip olduğu bulunmuştur.

40, 80 ve 160 mg/kg DOX'in deri yoluyla verildiği farelerde; bu ilacın kan, karaciğer, akciğer, böbrek, dalak ve kalp üzerindeki genotoksik etkilerinin Comet testi ile araştırıldığı bir çalışmada, tüm dokularda DOX dozunun artışına bağlı olarak DNA hasarının arttığı ve özellikle yüksek dozlarda DOX'in genotoksik olduğu bildirilmiştir (Arshad ve ark, 2005). Bizim çalışmamızda test edilen konsantrasyonlarda DOX'in MN ve KA oluşumunu artırmasına rağmen bu artışların negatif kontrol ile kıyaslandığında istatistiki olarak anlamlı olmadığı ve bu nedenle DOX'in genotoksik olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Her iki çalışmanın sonuçları arasındaki farklılık; DOX'in genotoksisitesinin

test edildiği yöntem farklılığı, kullanılan DOX dozlarının ve hücre ve canlı gruplarının farklılığından kaynaklanabilir.

Genital *Chlamydia trachomatis* enfeksiyon tanısı konmuş ve 10 gün boyunca günlük 200 mg, daha sonraki 10 gün ise günlük 100 mg DOX'i oral yolla kullanan 38 bayan hastada, DOX kullanımının periferik lenfositler üzerindeki genotoksik etkisinin, sitokinezi bloklanmış MN yöntemi kullanılarak incelendiği çalışmada, 20 günlük DOX kullanımı sonucu BN hücrelerdeki MN frekansının, tedaviden önce belirlenen MN frekansına göre önemli ölçüde artış gösterdiği belirlenmiştir (Dimitrijevic ve ark., 2006). Bizim çalışmamızda DOX uygulanmış kültürlerde BN hücrelerin MN frekansındaki artış negatif kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Bizim çalışmamızın aksine bu araştırmacıların periferik lenfositlerdeki MN frekansında önemli artışlar tespit etmesi, kullanılan DOX dozu ve maruz kalma süresi ile DOX'in vücuttaki metabolizmasının sonuçları bağlı olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tüm dünyada en çok kullanılan ilaç gruplarından olan antibiyotiklerden bazıları piyasaya sunulduktan sonra istenmeyen ciddi etkileri nedeniyle piyasadan çekilmektedir. Bu nedenle çoğu yüksek maliyetli olan yeni ilaç gruplarının etkinlik ve güvenilirlik açısından daha titizlikle değerlendirilmesi gerekmektedir. Direnç sorununun önüne geçebilmek, ilaç etkileşimlerini ve istenmeyen yan etkileri en aza indirmek ve özellikle genetik materyalde hasar meydana getirmeyecek antibiyotiklerin geliştirilebilmesi amacıyla, yeni hedeflerin saptanması, yeni mekanizmaların belirlenmesi ve bunlara yönelik güvenli antibiyotiklerin geliştirilmesi gerekmektedir. Çünkü tamir edilemeyen DNA hasarı ve bu hasarda rol alan kilit moleküllerde ve yollardaki bozukluklar; doku hasarı, yaşlanma, kanser, infertilite ve genetik ve multifaktoryal hastalıklara yol açmaktadır. İlaç seçiminde yaş, cinsiyet ve immün sistem farklılıkları gibi değişkenlerin yanı sıra genetik polimorfizmler de ilaç etkinliğini ve toleransını etkilemektedir. Tüm bu faktörlerin yanı sıra ilacın muhtemel genotoksik ve sitotoksik etkileri de düşünülürse tedavi için belirlenecek doz-maruziyet ilişkisinin sağlam temellere dayandırılması gerekir. Bu nedenle yeni antibiyotikler piyasaya sürülmeden önce özellikle DNA molekülünde hasar meydana getirip getirmediğini tespit etmek amacıyla mutlaka uygun bir genetik toksikoloji testi ile ilacın genotoksisite bakımından güvenilirliği belirlenmelidir. Bunun için akademik ve biyoteknolojik kuruluşlar, ilaç endüstrisi ve sağlık hizmeti sunan kurumlar işbirliği içinde çalışmalıdır.

Çalışmamızın sonuçları, pek çok mikroorganizmanın yol açtığı enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla reçete edilen DOX etken maddesinin insan periferik lenfositlerinde KA ve MN oluşumuna yol açtığını, fakat negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında KA ve MN oluşumundaki artışların istatistiksel anlamda önemli olmadığını göstermiştir. Bu sonuçlar test edilen dozlarda DOX'in genotoksik etkisinin bulunmadığını göstermektedir. Fakat MI ve NBI'ne ait sonuçlarımız, DOX dozundaki artışa bağlı olarak MI ve NBI değerlerinin istatistiksel açıdan önemli ölçüde düştüğünü ve bu nedenle DOX'in doza bağlı olarak sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Sadece çalışmamızın sonuçlarına dayanarak DOX'in klastojenik etkisinin olmadığını söylemek yetersizdir. Doza bağlı olarak artan sitotoksik etki, klastojenik etki için potansiyel bir zemin hazırlamaktadır. Çünkü ağır enfeksiyon durumlarında uzun

süre ilaçla tedavi gören hastalarda ilaç dozunun artırılması ve ilaca maruz kalınan srenin uzaması, insanda bu antibiyotiğin risk oranının da gözden geçirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca çeşitli tümör hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinden dolayı DOX'in, doğrudan tümör gelişimini durdurmasa bile bölünmeyi engellemesi özelliğinden dolayı, uygun doz ve muamele sürelerinde antitümöral olarak kullanımı ile ilgili çalışmalar yapılmasının faydalı olacağı düşüncesindeyiz.

Sonuç olarak DOX'in genotoksisitesi ve karsinojenitesi hakkında kesin yargıya varabilmek için diğer *in vitro* ve *in vivo* genotoksisite tekniklerinin de kullanıldığı daha detaylı çalışmalar yapılması, bu maddenin genotoksisite ve karsinojenitesi hakkında daha çok bilgi sahibi olmamızı sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Aardema, J.M., Kirsch-Volders, M., 2001. The *in vitro* micronucleus assay. Choy, W.N. (Ed.), Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment. New York: Marcel Dekker, Inc. 163-186.
- Abbott, P.V., 2000. Selective and intelligent use of antibiotics in endodontics. Aust. Endod. J., 26 (1), 30-39.
- Agwuh, K.N., MacGowan, A., 2006. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines. J. Antimicrob. Chemother., 58 (2), 256-265.
- Akkan, G., 1997. Antibiyotiklerin sınıflandırılmaları. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Pratikte Antibiyotik Kullanımı Simpozyumu 2-3 Mayıs 1997, İstanbul, s: 53-62.
- Aktürk, S., 2009. Adana-Tufanbeyli yol hattındaki çeşme sularının mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 83 s.
- Albert, R.E., Magee, P.S., 2000. The tumorigenicity of mutagenic contact sensitizing chemicals. Risk Analysis 20 (3), 317–325.
- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R, Hugmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T, Norppa, H.,Suhaker, D.E.G., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A., 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. Mutation Research, 463, 11-172.
- Altay, G., 2008. Kültür Pozitif 70 Bruselloz Hastasının Klinik Ve Laboratuvar Verilerinin Değerlendirilmesi & Antibiyotik Duyarlılıklarının E-Test Yöntemi İle İncelenmesi. Uzmanlık Tezi, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, 53 s.
- Anderson, D., 1988. Human Biomonitoring. Mutation Research, 204, 353-541.
- Anderson, D., Jenkinson, P.C., Dewdeney, R.S., Franis, A.J., Godbert, P., Butterworth, K.R., 1988. Chromosome aberrations, mitogen-induced blastogenesis and proliferative rate index in peripheral lymphocytes from 106 control individuals of U.K. population. Mutation Research, 204, 407–420.

- Anderson, B.E., Zeiger, E., Shelby, M.D., Resnick, M.A., Gulati, D.K., Ivett, J.L., Loveday, K.S. 1990. Chromosome aberration and sister chromatid exchange test results with 42 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, 16 (18), 55-137.
- Andrews, A.W., Fornwald, J.A., Lijinsky, W. 1980. Nitrosation and mutagenicity of some amine drugs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 52, 237-244.
- Antibiyotikler, 2010. Antibiyotik nedir? Antibiyotiklerin tarihçesi, antibiyotik grupları. <http://antibiyotikler.com> (25.09.2010).
- Arshad, M., Khan, Q.M., Iqbal, T., Mukhtar, K. 2005. Assessment of genotoxic effects of Doxycycline in mice by the comet assay. *The Journal of the Pakistan Medical Association*, 30 (2), 85-87.
- Bartlett, J.G., Froggatt, J.W., 1995. Antibiotic resistance. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*, 121, 392-396.
- Baştürk, S., 2005. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarında çeşitli kinolon grubu antibiyotiklerin duyarlılıklarının araştırılması. Uzmanlık Tezi, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, 61 s.
- Bayındır, Y., 2003. Dental infeksiyonlarda doğru antibiyotik kullanımı. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 10 (4), 213-216.
- Bazerra, M.M., Brito, G.A., Ribeiro, R.A., Rocha, F.A., 2002. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 35 (5), 613-616.
- Bedir, A., Bilgici, B., Yurdakul, Z., Gürsel, B.Ş., Alvur, M., 2004. DNA Hasarı Analizinde μ -Fadu ve Comet Yöntemlerinin Karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2 (3), 97-103.
- Bendeck, M.P., Conte, M., Zhang, M., Nili, N., Strauss, B.H., Farwell, S.M., 2002. Doxycycline modulates smooth muscle cell growth, migration, and matrix remodeling after arterial injury. *Am. J. Pathol.*, 160 (3), 1089-95.
- Bettany, J.T., Peet, N.M., Wolowacz, R.G., Skerry, T.M., Grabowski, P.S., 2000. Tetracyclines induce apoptosis in osteoclasts. *Bone*, 27, 75-80.
- Bilgehan, H., 1994. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, 589 s, İzmir.
- Blanchflower, W.J., McCracken, R.J., Haggan, A.S., Kennedy, D.G. 1997. Confirmatory assay for the determination of tetracycline, oxytetracycline,

- chlortetracycline and its isomers in muscle and kidney using liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.*, 692, 351-360.
- Blitek, D., Pienkowska, K., Gajcy, H., Kozirowska, J. 1983. Mutagenicity of oxytetracycline. *Mutation Research*, 117, 193-199.
- Bonassi, S., 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., Joksic, 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 (3), 625–631.
- Brambilla G., Martelli A., 2009. Update on genotoxicity and carcinogenicity testing of 472 marketed pharmaceuticals. *Mutation Research*, 681, 209–229.
- Brunton L, Lazo J, Parker K. 2006. Goodman & Gilman's. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th edition. New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division.
- Burns, J.L., 1995. Mechanisms of bacterial resistance. *Pediatr. Clin. North. Am.*, 42, 497-507.
- Campistron, G., Coulais, Y., Caillard, C., Mosser, J., Pontagnier, H., Houin, G., 1986. Pharmacokinetics and bioavailability of doxycycline in humans. *Arzneimittelforschung*, 36, 1705–7.
- Carrano, A.V., Natarajan, A.T., 1988. Consideration for Population Monitoring Using Cytogenetic Techniques. *Mutation Research*, 204, 379-406.
- Cheng, T.J., Christiani, D.C., Xu, X., Wain, J.C., Wiencke, J.K., Kelsey, K.T., 1996. Increased Micronucleus Frequency in Lymphocytes from Smokers with Lung Cancer. *Mutation Research*, 349, 43-50.
- Choy, W.N., 2001. *Genetic toxicology and Cancer Risk Assessment*. Marcel Dekker Inc., 390 p., New York, USA.
- Christensen, F.M., 1998. Pharmaceuticals in the Environment—A Human Risk? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 28, 212-221.
- Cohen, F.L., Tartasky, D., 1997. Microbial resistance to drug therapy: a review. *Am. J. Infect Control*, 25, 51-64.

- Curci, J.A., Petrincec, D., Liao, S., 1998. Pharmacologic suppression of experimental abdominal aortic aneurysms: A comparison of doxycycline and four chemically modified tetracyclines. *J. Vasc. Surg.*, 28, 1082-1093.
- Çelik, A., Eke, D. 2011. The Assessment of Cytotoxicity and Genotoxicity of Tetracycline Antibiotic in Human Blood Lymphocytes Using CBMN and SCE Analysis, *in Vitro. Int. J. Hum. Genet.*, 11 (1), 23-29.
- Demirel S., Zamani A., 2002. Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi*, 12 (3), 123-127.
- Devrim, İ., Gülfidan, G., Tavlı, V., Dizdärer, C., Yaşar, N., Oruç, Y., Sorguç, Y., Ayhan, F.Y., 2009. Dr. Behçet Uz Çocuk Hastanesinde antibiyotik kullanımına ilişkin nokta prevelans çalışması. *Çocuk Enf. Derg.*, 3, 11-13.
- Dimitrijevic, A., Milosevic-Djordjevic, O., Grujicic, D., Arsenijevic, S., 2006. Micronucleus frequency in women with genital *Chlamydia trachomatis* infection before and after therapy. *Mutation Research*, 608, 43–48.
- Duffaud, F., Orsiere, T., Villani, P., Pelissier, A.L., Volot, F., Favre, R., Botta, A., 1997. Comparison Between Micronucleated Lymphocytes Rates Observed in Healthy Subject and Cancer Patients. *Mutagenesis*, 12, 227-231.
- Durupınar, B., 2001. Antibiyotiklere Dirençte Yeni Eğilimler. *Klimik Dergisi*, 14 (2), 47-56.
- Eastmond, D.A., 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.
- Eke, D., 2007. Thimerosal'in insan lenfosit hücre kültürlerinde genotoksik, mutajenik ve toksik etkilerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin, 91 s.
- EMEA, 1997. Committee for veterinary medicinal products, Doxycycline Summary report 2.
- EPA, 1998. *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test. Health Effects Test Guidelines.
- Epstein, J.B., Chong, S., Le, N.D., 2000. A survey of antibiotic use in dentistry. *J. Am. Dent. Assoc.*, 131 (11), 1600-1609.
- Erdem, M., 2004. Sütte doksisisiklinin sıvı kromatografik tayini. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 73 s.

- Evans, H.J., 1984. Handbook of Mutagenicity Test Procedures. In: Human peripheral blood 63 lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests (Eds., Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C.), pp. 405-427, Second edition, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- FDA, 1997. Center for drug evaluation and research, Pharmacology reviews. Application number: NDA 50 744.
- FDA, 2004. Center for drug evaluation and research, Pharmacology reviews. Application number: NDA 50 795.
- Fenech, M., Morley, A.A., 1986. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of *in vivo* ageing and dose X-irradiation. Mutation Research, 161, 193-198.
- Fenech, M., 2000. The *in vitro* micronucleus technique. Mutation Research, 455, 81-95.
- Fife, R.S., Sledge, Jr G.W., 1995. Effects of doxycycline on *in vitro* growth, migration, and gelatinase activity of breast carcinoma cells. J. Lab. Clin. Med., 125, 407-411.
- Foureman, P., Mason, J.M., Valencia, R., Zimmering, S. 1994. Chemical mutagenesis testing in *Drosophila* X. Results of 70 coded compounds tested for the National Toxicology Program. Environ. Mol. Mutagen., 23, 208-227.
- Fraimow, H.S., Abrutyn, E., 1995. Pathogens resistant to antimicrobial agents. Infect Dis. Clin. North Am., 9, 497-530.
- Gangle, B.J., 2005. Sources and occurrence of antibiotic in the environment. Master of Science, University of Maryland, Baltimore, USA.
- Garewal, H. S., Ramsey, L., Kaugars, G., Boyle, J., 1993. Clinical experience with the micronucleus assay. Cellular Biochem, 17, 206-212.
- Greenwald, R.A., Golub, L.M., Laviertes, B., Ramamurthy, N.S., Gruber, B., Laskin, R.S., McNamara, T.F., 1987. Tetracyclines inhibits human synovial collagenase *in vivo* and *in vitro*. J. Rheumatol., 14, 28-32.
- Golub, L.M., Lee, H.M., Ryan, M.E., 1998. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. Adv. Dent. Res., 12, 12-26.
- Gotuzzo, E., Cellillo, C., 1992. Brucella. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR (eds). Infectious Diseases. 2nd Edition. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1513-1521.

- Gökalp Muranlı, F.D., 2006. Kültürü Yapılan İnsan Lenfositlerinde Triasulfuron'un Genotoksik Etkileri. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, 98 s.
- Gschwend, M.H., Martin, W., Erenmemisoglu, A., Scherm, M., Dilger, C., Tamur, U., Kanzik, I., Hincal, A.A., 2007. Pharmacokinetics and bioequivalence study of doxycycline capsules in healthy male subjects. *Arzneimittelforschung*, 57, 347–351.
- Hagiwara, M., Watanabe, E., Barrett, J.C., Tsutsui, T. 2006. Assessment of genotoxicity of 14 chemical agents used in dental practice: Ability to induce chromosome aberrations in Syrian hamster embryo cells. *Mutation Research*, 603, 111-120.
- Hallworth, M., 1993. Therapeutic Drug Monitoring and clinical Biochemistry. Association of Clinical Biochemist, 178s. London.
- Hernandez, M., Borrull, F., Calull, M., 2003. Analysis of antibiotics in biological samples by capillary electrophoresis. *Trends in Analytical Chemistry*, 22, 416-438.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L., Parrella, A. 2005. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Science of the Total Environment*, 346, 87- 98.
- Iwasaki, H., Inoue, H., Mitsuke, Y., Bardan, A., Ikegaya, S., 2002. Doxycycline induces apoptosis by way of caspase-3 activation with inhibition of matrix metalloproteinase in human T-lymphoblastic leukemia CCRF-CEM cells. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 140, 382-386.
- Jack, D.B., 1992. Handbook of clinical pharmacokinetic data, 1st edition. Basingstoke, the United Kingdom: Macmillan Publishers Ltd.
- Jantratid, E., Strauch, S., Becker, C., Dressman, J.B., Amidon, G.L., Junginger, H.E., Kopp, S., Midha, K.K., Shah, V.P., Stavchansky, S., Barends, D.M., 2010. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Doxycycline Hyclate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99, 1639–1653.
- Joshi, N., Miller, D.Q., 1997. Doxycycline revisited. *Arch Intern Med.*, 157, 1421–1428.
- Karabay, O., Hoşoğlu, S., 2008. Increased antimicrobial consumption following reimbursement reform in Turkey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61, 1169–1171.

- Kayaalp, O., 1991. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 6. Baskı. s: 826-863, Feryal Matbaacılık, Ankara.
- Kayaalp, O., 2005. Rasyonel tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji 11.baskı, Hacettepe Taş Kitapçılık, 209-213.
- Kersten, B., Zhang, J., Brendler-Schwaab, S.Y., Kasper, P., Müller, L. 1999. The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research*, 445, 55–71.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E., 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. *Mutation Research*, 392 (1-2), 19-30.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardemac, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, J.R.M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A., 2003. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research*, 540, 153–163.
- Konukoğlu, D., Turhan, M.S., 2005. Anjiogenezin temel moleküler mekanizmaları ve tümör anjiogenezini. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 36,42-48.
- Krishna, G., Hayashi, M., 2000. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research*, 455, 155-166.
- Kshirsagar, N.A., Ankalesaria, P.S., 1987. Effect of food on doxycycline absorption. *J. Postgrad. Med.*, 33, 117–119.
- Laffon, B., Pasaro, E., Mendez, J., 2001. Genotoxic effects of styrene-7,8-oxide in human white blood cells: comet assay in relation to the induction of sister-chromatid exchanges and micronuclei. *Mutation Research*, 491, 163-172.
- Lo´pez Nigro, M.M., Palermo, A.M., Mudry, M.D., Carballo, M.A., 2003. Cytogenetic evaluation of two nitroimidazole derivatives. *Toxicology in Vitro*, 17, 35–40.
- Mace, M.L.J., Daskal, Y., Wray, W., 1978. Scanning electron microscopy of chromosome aberrations. *Mutation Research*, 52, 199–206.
- McGregor, D.B., Brown, A.G., Howgate, S., McBride, D., Riach, C., Caspary, W. 1991. Responses of the L5178Y mouse lymphoma cell forward mutation assay V: 27 coded chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, 17, 196-219.
- Mortelmans, K., Rupa, S.D., 2004. Current Issues in Genetic Toxicology Testing for Microbiologists. *Advances in Applied Microbiology*, 56, 379-401.

- Mortelmans, K., Haworth, S., Lawlor, T., Speck, W., Tainer, B., Zeiger, E. 1986. Salmonella mutagenicity tests II. Results from the testing of 270 chemicals. Environ. Mutagen., 8 (7), 1-119.
- Myhr, B.C., McGregor, D., Bowers, L., Riach, C., Brown, A., Edwards, I., McBride, D., Martin, R., Caspary, W.J. 1990. L5178Y mouse lymphoma cell mutation assay results with 41 compounds. Environ. Mol. Mutagen., 16 (18), 138-167.
- Nagase, H., Woessner, J.F., 1999. Matrix metalloproteinases. J. Biol. Chem., 274 (31), 491-494.
- Nelson, M.W., 1998. Chemical and biological dynamics of tetracyclines. Adv. Dent. Res., 12, 5-11.
- Nguyen, V.X., Nix, D.E., Gillikin, S., Schentag, J.J., 1989. Effect of oral antacid administration of the pharmacokinetics of intravenous doxycycline. Antimicrob. Agents Chemother., 33, 434-436.
- Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I-L., Hagmar, L., Strömberg, U., Rössner, P., Boffetta, P., Lindholm, C., Gundy, S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Sram, R. J., Kunudsen, L.E., Barale, R., Fucic, A., 2006. Chromosomal Aberrations and SCE as Biomarkers of Cancer Risk. Mutation Research, 600 (1-2), 37-45.
- OECD, 2006. *In vitro* Micronucleus Test. OECD Guideline For Testing of Chemicals Draft Proposal For A New Guideline.
- Özdemir, R., 2007. Abdominal kompartman oluşturulan ratlarda submikrobiyal dozda doksisisiklinin intestinal iskemi reperfüzyon hasarı üzerine etkisi. Uzmanlık Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Eskişehir, 101 s.
- Paz-y-Mino, C., Bustamante, G., Sanchez, M.E., Leone, P.E., 2002. Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in Ecuador. Environ. Health Perspective, 110, 1077-1080.
- PDR, 2005. Physicians' Desk Reference (PDR), 59th ed., Thomson PDR, Montvale, NJ, USA.
- Posyniak, A., Zmudzki, J., Semeniuk, S., Niedzielska, J., Ellis, R., 1998. Determination of Tetracycline Residues in Animal Tissues by Liquid Chromatography. Biomed. Chromatogr., 12; 294-299.

- Purchase, I.F.H., Longstaff, E., Ashby, J., Styles, J.A., Anderson, D., Lefevre, P.A., Westwood, F.R., 1978. An evaluation of 6 short-term tests for detecting organic chemical carcinogens. *British Journal of Cancer*, 37, 873–959.
- Rojas, E., Herrera, L.A., Sordo, M., Gonsebatt, M.E., Montero, R., Rodríguez, R., Ostrosky-Wegman, P., 1993. Mitotic index and cell proliferation kinetics for the identification of antineoplastic activity. *Anti-Cancer Drugs*, 4, 637–640.
- Rose, S.F., Bruce, T.R., Carmen, P., George, Jr. W.S., 1997. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by doxycycline in cultured human osteosarcoma cells. *J. Lab. Clin. Med.*, 130, 530-534.
- Rothfuss, A., Schutz, P., Bochum, S., Volm, T., Eberhardt, E., Kreienberg, R., Vogel, W., Speit, G., 2000. Induced Micronucleus Frequencies in Peripheral Lymphocytes as a Screening Test for Carriers of a BRCA1 Mutation in Breast Cancer Families. *Cancer Research*, 60, 390-394.
- Saikali, Z., Sing, G. 2003. Doxycycline and other tetracyclines in the treatment of bone metastasis. *Anti-Cancer Drugs*, 14, 773–778.
- Saivin, S., Houin, G., 1988. Clinical pharmacokinetics of doxycycline and minocycline. *Clinical Pharmacokinetics*, 15, 355-366.
- Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B.A., 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. *Chemosphere*, 65, 725–759.
- Saux, M.C., Mosser, J., Pontagnier, H., Leng, B., 1981. Pharmacokinetic study of doxycycline polyphosphate (PPD), hydrochloride (CHD) and base (DB). *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 6, 3–10.
- Savage, J.R.K., 1993. Update on Target Theory as Applied to Chromosomal Aberrations. *Env. Mol. Mutagen.*, 22, 198-207.
- Saygı, Ş., 2003. Deneysel toksikolojide toksisite testleri ve test sonuçlarının önemi. *Gülhane Tıp Dergisi*, 45 (3), 291–298.
- Schmid, W., 1975. The micronucleus test. *Mutation Research*, 31, 9-15.
- Seligmann, I.C., Lima, P.D., Cardoso, P.C., Khayat, A.S., Bahia, M.O., Buchi, D.F., Cabral, I.R., Burbano, R.R., 2003. The anticancer homeopathic composite “Canova Method” is not genotoxic for human lymphocytes *in vitro*. *Genetics and Molecular Research* 2, (2), 223–228.

- Snyder, R.D., Green, J.W. 2001. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. *Mutation Research*, 488, 151–169.
- Snyder, R.D, Ewing, D., Hendry L.B., 2006. DNA intercalative potential of marketed drugs testing positive in invitro cytogenetics assays. *Mutation Research*, 609, 47–59.
- Stich, H.F., Dunn, B.P., 1986. Relationship between cellular levels of beta-carotene and sensitivity to genotoxic agents. *Int. J. Cancer.*, 38, 713-717.
- Stopper, H., Müller, O.S., 1997. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A Minireview. *Toxicology In Vitro*, 11, 661-667.
- Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H., Marcos, R., 1995. Induction of Micronuclei by Five Pyrethroid Insecticides in Whole-Blood and Isolated Human Lymphocyte Cultures. *Mutation Research.*, 341, 169-184.
- Suzuki, H., 1987. Assessment of the carcinogenic hazard of 6 substances used in dental practice. Part II. Morphological transformation, DNA damage and sister chromatid exchanges in cultured Syrian hamster embryo cells induced by formocresol, iodoform, zinc oxide, chloroform, chloramphenicol, and tetracycline hydrochloride. *Odontology*, 74, 1385-1403 (text in Japanese with English abstract).
- TeKoppele, J.M., Beekman, B., Verzijl, N., Kopman, J.L., DeOroot, J., Bank, R.A., 1998. Doxycycline inhibits collagen synthesis by differentiated articular chondrocytes. *Adv. Dent. Res.*, 12, 63-67.
- Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., Reinisch, F., Parvatham, S., Osorio, A.M., Smith, M.T., 1997. Genotoxicity of Malathion in Human Lymphocytes Assessed Using the Micronucleus Assay *In Vitro* and *In Vivo*: A Study of Malathion-Exposed Workers. *Mutation Research*, 388 (1), 85-95.
- Tsutsui, T., Umeda, M., Sou, M., Maizumi, H., 1976. Effect of tetracycline on cultured mouse cells. *Mutation Research*, 40, 261-268.
- Tuygun, O., 2008. Kronik pelvik ağrı sendromlu erkeklerde seminal plazmadaki sitokin, hs-crp düzeylerinin ve lenfosit subgruplarının ölçümü, hastalığın otoimmünite ile ilişkisi ve iki ayrı ilaç (levofloksasin, levofloksasin+doksisiklin) tedavisine yanıtlarının incelenmesi. Uzmanlık Tezi, Fırat Üniversitesi Üroloji Anabilim Dalı, Elazığ, 48 s.

- Ünal, Y., 2007. Doksorubisin ekstravazasyonunda doksisisiklinin etkisi. Uzmanlık Tezi, Trakya Üniversitesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, Edirne, 43 s.
- Üstün, F., 2007. Albendazol'ün olası genotoksisitesi üzerine askorbik asitin etkisi. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 100 s.
- Vanparys, P., Vermeiren, F., Sysmans, M., Temmerman, R., 1990. The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. *Mutation Research*, 244, 95-103.
- Visse, R., Nagase, H., 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Circ. Res.*, 92, 827-39.
- Vural, N., 2005. Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 73, Ankara.
- WHO, 1969. WHO Expert Committee on Drug Dependence. Sixteenth report. Technical report series, No. 407, Geneva.
- Widel, M., Kolosza, Z., Jedrus, S., Lukaszczyk, B., Raczek-Zwierzycka, K., Swierniak, A., 2001. Micronucleus assay *in vivo* provides significant prognostic information in human cervical carcinoma: The updated analysis. *International Journal of Radiation Biology*, 77, 631-636.
- Wise, R., Hart, T., Cars, O., Streulens, M., Helmuth, R., Huovinen, P., Sprenger, M., 1998. Antimicrobial resistance. Is a major threat to public health. *Br Med J.*, 317, 609-610.
- Yalap, S.K., 2008. Effects of water components on the photocatalytic and ozone oxidation of oxytetracycline antibiotic. Thesis of Master of Science, Boğaziçi University Institute of Environmental Sciences, İstanbul, 89 s.
- Yavuz Kocaman, A., 2007. Acetamiprid ve Alpha-Cypermethrin Pestisidlerinin Tek Başına ve Karışım Halinde Kullanıldıkları Zaman İnsan Periferik Lenfositlerindeki *In vitro* Genotoksik Etkileri. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 207 s.
- Yavuz Kocaman, A., Topaktaş, M., 2007. *In Vitro* Evaluation of the Genotoxicity of Acetamiprid in Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 48, 483-490.
- Young, R.R., 2002. Genetic toxicology. *Toxicology*, 173, 103-121.

- Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F., Aksoy, H., 2006. Clastogenicity of fungicide afugan in cultured human lymphocytes. *Mutation Research*, 604, 53–59.
- Zeiger, E., 2004. History and rationale of genetic toxicology testing: an impersonal, and sometimes personal, view. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44, 363-371. *Breast Cancer Research and Treatment*, 34 (1), 63-69.
- Zeiger, E., Haworth, S., 1985. Tests with a preincubation modification of the *Salmonella* microsome assay, in: J. Ashby, F. deSerres, M. Draper, M.J. Ishidate, B. Margolin, B. Matter, M. Shelby (Eds.), *Evaluation of Short-Term Test for Carcinogens*, Elsevier, New York, pp. 187-199.

ÖZ GEÇMİŞ

Adı Soyadı : Feridun AFAN

Doğum Yeri : ORDU

Doğum Tarihi : 16.08.1985

Medeni Hali : Bekar

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Hadımköy İbrahim Özyayın Çok programlı Lisesi, 2003

Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ordu Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji
Bölümü, 2007

İletişim Bilgileri

Email : feridunafan@hotmail.com