

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

TAMİFLU'NUN
İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE
KROMOZOMAL DÜZENSİZLİKLERE ETKİSİ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

İlyas YÜCEL

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Diclehan ORAL
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

DİYARBAKIR-2011

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

***TAMİFLU*'NUN**
İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE
KROMOZOMAL DÜZENSİZLİKLERE ETKİSİ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

İlyas YÜCEL

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Diclehan ORAL
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

DİYARBAKIR-2011

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRLÜĞÜ

“*Tamiflu*’nun İnsan Periferal Lenfositlerinde Kromozomal Düzensizliklere Etkisi” isimli Yüksek Lisans Tezi 24.08.2011 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Diclehan ORAL
Tezi Teslim Eden : İlyas YÜCEL

Jüri Üyesinin

	Ünvanı	Adı Soyadı
Başkan	:Prof. Dr. Nezahat ÖZERDEM AKPOLAT (Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı)	
Üye	:Yrd. Doç. Dr. M. Nail ALP (Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı)	
Üye	:Yrd. Doç. Dr. Diclehan ORAL (Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı)	

Yukarıdaki imzalar tasdik olunur.

24/08/2011

Prof. Dr. Salih HOŞOĞLU
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam esnasında bana her konuda destek olan ve yardımlarını hiç esirgemeyerek yol gösteren, özverili duruőu ile tüm sorunların üstesinden gelmemi sağlayan ve kiőisel geliőimim konusunda sonsuz sabır gösteren çok değerli danıőman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Diclehan ORAL'a

Eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım ve en dar zamanlarda bana yol gösteren ve fikirleri ile yeni ufuklar kazandıran Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Baőkanımız Sayın Prof. Dr. Turgay BUDAK'a

Bir amca őefkati ile her zaman yanımda duran ve çalıőmalarımda büyük emeği olan değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Selahaddin TEKEŞ'e

Bilgi birikimi ile tez yazımım boyunca her konuda görüőlerine baővurduėım hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Hilmi İŐİ'ye

Ders dönemim boyunca yoğun programlarına rağmen bana ders verme nezaketinde bulunan Sayın Prof. Dr. Ali KELLE ve Yrd. Doç. Dr. M. Nail ALP'e

Bölüm olarak yardımlarını ve gleryzlerini hiç esirgemeyen diğer bütün bölüm hocalarım, laborant arkadaőlar ve diğer alıőanlara

Eğitimim boyunca her zaman yanımda duran ve destek olan; başta babam İbrahim YÜCEL olmak üzere tüm aileme teőekkürü bir borç bilirim.

İlyas YÜCEL

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİL DİZİNİ	VI
TABLO VE GRAFİK DİZİNİ	VII
KISALTMALAR	VIII
ÖZET	IX
SUMMARY	X
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	7
2.1.KONUyla İLGİLİ ESKİ ÇALIŞMALAR	7
2.2.OSELTAMİVİR HAKKINDA GENEL BİLGİLER.....	7
2.3.KROMOZOMLAR HAKKINDA GENEL BİLGİLER	8
2.3.1.Kromozomların Morfolojik Özellikleri.....	9
2.3.2.Kromozom Terminolojisi	11
2.3.3.Kromozom Anomalileri	14
A- Sayısal Kromozom Anomalileri.....	14
B-Yapısal Kromozom Anomalileri	14
3.MATERYAL VE METOD	17
3.1.MATERYAL.....	17
3.1.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler Ve Deney Ekipmanları.....	17
3.1.1.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler	17
3.1.1.1.1.Tamiflu	17
A-Tamiflu'nun etki mekanizması	17
B- Tamiflu'nun kullanım şekli	18
C-Tamiflu'nun prospektüs bilgileri.....	19
3.1.1.1.2. Dimethyl Sulfoxide (DMSO).....	25
3.1.1.1.3. Kullanılan diğer kimyasal maddeler.....	26
3.1.1.1.4. Kullanılan solüsyonlar.....	26
3.1.1.1.5. Kültür Ortamı	27
3.1.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları	28
3.2. METOD.....	29
3.2.1. Kullanılan ilaç (Tamiflu) dozlarının elde edilmesi	29
3.2.2. Her kültür tüpüne eklenecek doz ve DMSO miktarlarının belirlenmesi.....	31

3.2.3. Doz gruplarının muamele sürelerine göre düzenlenmeleri	31
3.2.4. Kromozomların elde edilme yöntemi.....	34
3.2.5. Preparatların boyanması	35
3.2.6. Preparatların değerlendirilmesi	35
3.2.6. İstatiksel değerlendirme	36
4. BULGULAR	38
4.1.Kontrol ve doz grupları tüm sonuç tabloları	39
4.2. Düzensizliklerin dozlara göre incelenmesi (süre sabit).....	50
4.3. Düzensizliklerin süreye göre incelenmesi (dozlar sabit).....	52
4.4. A-grubu (24.saat) düzensizlik analiz tablosu	54
4.4. B-grubu (48.saat) düzensizlik analiz tablosu	55
4.5. Kromozom düzensizliklerinin doz –süre ve gruplara göre sonuçları.....	56
I-Süreye bağlı sonuçlar.....	56
A)24.Saat (A Grubu)	56
B)48.Saat (B Grubu)	56
II-Doza bağlı sonuçlar	56
1.Normal kontrol doz grubu	56
2.DMSO kontrol grubu	57
3.Doz-1- grubu	57
4.Doz-2- grubu	57
5.Doz-3- grubu	57
III-Kromozom gruplarına bağlı sonuçlar	57
5.TARTIŞMA	63
5.1.Sayısal kromozom düzensizlikleri	63
5.2.Yapısal kromozom düzensizlikleri.....	63
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	66
KAYNAKÇA	68

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil-1: Oseltamivir'in genel formülü	8
Şekil 2: Denver kalsifikasyonuna göre normal bir erkek kromozom karyotipi	13
Şekil-3: Tamiflu'nun açık ve 3D formülü	24
Şekil-4: Dimethyl Sulfoxide (DMSO) açık ve 3D formülü	25
Şekil-5: Delesyon	58
Şekil-6: İzokromatid kırık	58
Şekil-7: Satelit assosiasyonu	59
Şekil-8: Disentrik kromozom	59
Şekil-9: Asentrik kromozom	60
Şekil-10: Kromatid gap	60
Şekil-11: İzokromatid kırık	61
Şekil-12: Poliploid hücre	61
Şekil-13: Satelit assosiasyonu	62
Şekil-14: Çoklu düzensizlik gösteren hücre	62

TABLO VE GRAFİK DİZİNİ

1. Tablo-1: Süre ve eklenen madde tablosuna göre tüpler	33
2. Tablo-2: İncelenen metafaz kayıt tablosu taslağı örneğı	37
3. Tablo-3: "Normal kontrol düzensizlik grubu" tablosu	39
4. Tablo-4: Kontrol DMSO düzensizlik tablosu	40
5. Tablo 5: A-1 düzensizlik tablosu	41
6. Tablo 6: A-2 düzensizlik tablosu	42
7. Tablo 7: A-3 düzensizlik tablosu	43
8. Tablo 8: Normal kontrol -B- düzensizlik tablosu	44
9. Tablo 9: DMSO kontrol –B- tablosu	45
10. Tablo 10: B-1 düzensizlik tablosu	46
11. Tablo 11: B-2 düzensizlik tablosu	47
12. Tablo 12: B-3 düzensizlik tablosu	48
13. Tablo 13: Düzensizlik-doz tablosu (süre sabit)	50
14. Grafik 1: Doz ve kontrol gruplarının % düzensizlik miktarı (süre sabit)	51
15. Tablo 14: Düzensizlik-süre tablosu(doz sabit)	52
16. Grafik 2: Sürelere bağılı % düzensizlik (doz sabit)	53
17. Grafik 3: Tüm doz gruplarının genel % düzensizlik grafiğı	53
18. Tablo 15: A-grubu (24.saat) düzensizlik analiz tablosu	54
19. Tablo 16: B-grubu (48.saat) düzensizlik analiz tablosu	55

KISALTMALAR

DNA: Deoksiribonükleik asit

A: Adenin

G: Guanin

T: Timin

C: Sitozin

NAI: Nüraminidaz inhibitör

MN: Mikronukleus

KKD: Kardeş kromatid değişimi

RNA: Ribonükleik asit

OK: Oseltamivir Karboksilat

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

PHA : Phytohemaglutinin

KA: Kromozom anomalisi

ÖZET

Tamiflu'nun İnsan Periferal Lenfositlerinde Kromozomal Düzensizliklere Etkisi

Bu çalışmanın asıl amacı; influenza (grip) tedavisinde kullanılan ve etken maddesi 'oseltamivir' olan Tamiflu'nun insan periferal lenfositlerinde kromozomal düzensizliklere etkisinin incelenmesidir.

Bu çalışmada 2 erkek ve 2 bayan toplam 4 sağlıklı bireyden alınan periferik kan kültürü ile in vitro koşullarda çalışılmıştır. Oluşturulan kontrol grupları ve dozlar ilave edilerek sonuçlar sitogenetik açıdan incelenmiş ve değerlendirilmiştir.

Oluşturulan gruplar 0,5µg/ml, 1µg/ml ve 2µg/ml olmak üzere üç doz grubudur. Bu doz gruplarına ek olarak oseltamivirin solventi olan DMSO ve normal kontrol için iki adet kontrol grubu oluşturulmuştur.

Doz grupları 24 saat ve 48 saat olmak üzere iki ayrı süre kombinasyonu ile uygulanmıştır.

Çalışmada toplam 2000 metafaz incelenmiştir. Doz miktarının ve süre uygulamasının artışına bağlı olarak kromozom düzensizliklerinde artış olduğu gözlenmiş ve bunlar kayıt altına alınmıştır.(p<0.01)

Anahtar sözcükler: 1.Tamiflu 2.İnsan periferal kan lenfosit 3.Oseltamivir 4.Kromozomal düzensizlikler

SUMMARY

The Effect of TAMIFLU on Chromosomal Abnormality in Human Peripheral Lymphocytes

The main aim of this study is to examine the effect of 'tamiflu' (of which active ingredient is 'oseltamivir' and used in the treatment of influenza(flu)) on chromosomal abnormality in human peripheral blood lymphocyte.

In this study peripheral blood, received from 2 men and 2 women, in total 4 healthy individuals. Then it was studied with this blood in 'in vitro condition'. Adding the formed control groups and doses groups, results were analyzed and evaluated from the cytogenetic perspective.

The formed groups are 0,5 μ g/ml, 1 μ g/ml and 2 μ g/ml, totaly 3 dose groups. In addition to this dose groups, two control groups were formed for DMSO which is the solvent of oseltamivir and for a normal control group.

Dose groups, were applied with a combination of two separate time including 24 hours and 48 hours.

Totally 2000 metaphases were examined in this study. Depending on the increase in the amount of dose and time application increase was observed in chromosomal abnormality and these were recorded.(p<0.01)

Key Words: 1.Tamiflu 2.Human peripheral blood lymphocyte 3.Oseltamivir 4.Chromosomal abnormality

1.GİRİŞ

Gün geçtikçe değişen çevre koşulları ve bununla beraber bu değişime ayak uydurmaya çalışan bilim dünyası eski çağlardan günümüze sürekli bir rekabet içerisinde. Fen ve sağlık bilimlerindeki yeni buluşlar ve gelişmeler insanoğlunun hayatını daha kolay bir şekilde sürdürmesini sağlamış ve halledilemez gibi görünen birçok sorunun çözümüne yönelik pratik öneriler sunmuştur. Baş edilemez hastalıklar, büyük salgınlar, doğal felaketler ve sosyolojik sorunların çoğu bilimin modern halini alması ile aşılabilmiş ve bunların birçoğu korkulacak felaketler olmaktan çıkmıştır.

Şüphesiz sağlık sektöründeki gelişmeler bu aşılabilir gibi görünen sorunların çözümü konusunda çok büyük ilerlemelerin öncüsü olmuş ve bilimin modern standartlara kavuşması konusunda engellerin ortadan kaldırılmasına çok katkı sunmuştur.

İlaç sanayi ve farmakolojideki gelişmeler birçok hastalığın tedavisinde ilerlemelere öncülük etmiş ve bu hastalıklarla mücadelede etkin çözüm yollarının oluşturulmasına zemin hazırlamıştır. Gelişen ve sürekli yenilenen yöntemler sayesinde kişinin kalıtsal özelliklerine özgü ilaç tedavisi yollarının kapıları aralanmış ve genetik konusunda çığır denilebilecek ilerlemeler yaşanmıştır.

Genetik bilimi geçmiş çağlardan günümüze kadar hep merak konusu olmuş ve birçok bilim adamının ilgisini çekmiştir. Bu çalışmalar ve bulgular çok eski tarihlere kadar dayanmaktadır. Eski mısırdaki hurma ağaçlarının suni döllenenmesine kadar dayanan bu bulgular genetik biliminin önemini ve ne kadar eski olduğunu ortaya koymaktadır.

“**Genetik**” terimi, çok değişik biçimlerde ve anlamlarda kullanılan bir sözcüktür. Ama kalıtım (“heredity”) ve değişimle (“variation”) ilgilenen bilim dalına genetik denir (1).

Genetik kuralları, aslında bugünkü anlamlarında tanımlanmadan çok önceleri kullanılmaya başlanmıştır. Hatta bu kullanımlar **Hipokrates** döneminden çok eskilere dayanmaktadır (1).

Fakat modern genetik; genetiğin babası olarak kabul edilen **Gregor Mendel** (1822-1884) ve çalışmaları sonrasında gerçek hüviyetine kavuşmuş ve tam anlamda gelişim göstermiştir.

Mendel ve diğer pek çok araştırmacının deneyleri, canlıların tüm özelliklerinin kuşaktan kuşağa “**gen**” adı verilen maddelerle taşındığını hiçbir kuşkuya düşmeyecek biçimde göstermiştir. (1)

Yeryüzünde yüzbinlerce canlı türünün birbirinden farklı olmasını sağlayan en önemli faktör, türe özgü kromozom sayısı ve kromozomlar üzerinde bulunan genlerin sayı ve dizilişlerindeki farklılıktır. (2)

Hücre nükleusunda bulunan hayatın ve canlılığın sırrı DNA adı verilen genetik materyalin yapısında yer alan dört bazın (A,G,T,C) milyonlarca değişik dizilişinde ve her dizilişin belirli bir boyutsal anlam ifade edişinde gizlidir. (3)

Tüm bu veriler ışığında genetik alanında devasa ilerlemeler olmuş ve çeşitli proje ve çalışmalarla birçok saklı bilgi açığa kavuşturulmuştur. Modern genetiğin inşası için çok değişik yöntem ve buluşlar geliştirilmiştir.

1990 yılında insan genom projesi için zaman işlemeye başlamıştır. İnsan genom projesinin işlemeye başlaması ile mitokondrial DNA dışında boyutları 80-300 milyon baz çifti arasında değişen 22 otozom ve 2 cinsiyet kromozomlarına dağılmış bulunan 3.3 milyon civarındaki DNA baz haritasının çıkarılması ve gen dizilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. İnsan genomunu oluşturan 100.000 genden 1991 yılı sonuna kadar 5000 gen çözümlenerek arşivlenmiş, 1900 tanesinin bir kromozomla ilgili olduğu varsayılmış ve 600 tanesi de klonlanmış olarak elde edilmiştir. (4)

Genom projesi, insan genomundan 175.000 baz çiftlik parçalar yapay bakteri kromozomlar haline getirip bakterilerde çoğaltılarak gerçekleştirilmiştir. Dizi çözümlenmeleri yapıldıktan sonra, parçaların birbiriyle örtüşen dizileri belirlenmiş ve her parçanın özel enzimlerce kesilme profili kaydedilerek genomdaki yeri saptanmıştır. Bu çalışmalarda otomatik DNA dizi analiz teknikleri ve bilgisayar teknolojilerindeki hızlı gelişmelerin büyük katkısı olmuştur. (5)

Bunun yanında gelişen teknikler sayesinde kromozomlar daha rahat bir şekilde incelenebilmekte ve oluşan aberasyonların tespiti daha kolay bir biçimde yapılabilmektedir. Çeşitli haritalama ve klonlama teknikleri sayesinde kromozomların ayrı bant bölgelerinin incelenmesi ve sonuçların değerlendirilmesi işlemleri basit bir şekilde yapılmaktadır.

Fakat ilk başta da belirttiğim gibi sürekli bir rekabet içerisinde bulunan modern bilim ve doğa dengesi skalaları hep modern bilimden yana olmamıştır. İlerlemeler karşısında doğa ve bunun elemanları olan çevresel, biyolojik ve fiziksel etmenler de bu değişim karşısında tutunabilmek için yeni saldırı ve yok etme metotları geliştirerek değişim geçirmişlerdir. Örneğin mevsimsel bir etki grafiğine sahip İnfluenza (Grip) 21. Yüzyılda insanlığın korkulu rüyası haline gelmiş kuş gribi (H5N1) ve domuz gribi (H1N1) formları ile büyük korku ve paniğin yanında ekonomik olarak da ülkeleri büyük zararlara uğratmıştır.

Gelişen ve değişime uğrayan tehlikeler karşısında insanoğlu alternatif çarelere başvurma yoluna gitmiş ve bunun sonucunda bazen bilinçsiz bir şekilde uyguladığı yöntemleri tüm yönlerini ile değerlendirememiştir. Örneğin aşırı dozda kullanılan ilaçlar çeşitli sorunları beraberinde getirmiştir. Kullanılan bu ilaçlar bir faktörün zararına son verirken vücut dengesi üzerinde olumsuz sonuçlar doğurmuş ve çeşitli harabiyetlere neden olmuşlardır.

Moleküler ve gen düzeyinde gerçekleşen bu zararlar bireyin ileriki yaşamında çeşitli sorunların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Bilinçsiz ve aşırı dozda kullanılması halinde oluşan gen düzeyindeki tahribatlar birçok hastalık ve kalıtsal sorunun başlangıç aşamasını oluşturmaktadır. Bu zararlar kromozom kırıkları, delesyonlar, gaplar, duplikasyonlar ve değişik biçimdeki kromozom aberasyonları şeklinde kendilerini göstermekte ve bireyin gen düzeyindeki yapı ve işleyiş mekanizması üzerinde hasarlara sebep olmaktadır.

Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda genetik bilimi ve farmakolojinin hassas bir denge içerisinde olduğu görülecek ve bu iki bilim dalının birbiri ile olan ince ilişkisi göz önünde bulundurulmadan çalışmaların yürütülmesi durumunda çeşitli sorunların meydana gelebileceği görülecektir.

Influenza (grip) insanoğlunun eski yıllarından beri maruz kaldığı hastalıkların başında gelmektedir. Bilinen ilk pandemi 1510 yılına aittir. Bilinen en büyük pandemi ise 1918-1919 yıllarında görülen yaklaşık 20 milyon insanın ölümüne yol açan İspanyol gribi (İnfluenza A H1N1) olarak adlandırılan salgındır (6).

Tipik bir influenza döneminde dünya popülasyonunun %10'undan fazlasının (yaklaşık 600 milyon) gribe yakalandığı tahmin edilmektedir. Bireysel grip virüsü enfeksiyonu diğer solunum sistemi virüslerinden kaynaklanan enfeksiyonlardan klinik olarak ayırt edilmez. Solunum sistemi virüsleri arasında influenza özellikle dikkat çekmektedir. Çünkü sıklıkla hem bütün yaş gruplarında yüksek ateşli solunum hastalığının salgın olarak ortaya çıkması hem de genel popülasyonda yüksek ölüm oranına sahip olmasıyla önem taşımaktadır. Diğer solunum virüsü enfeksiyonlarından farklı olarak influenza; aşı ve antiviral ajanların kullanımıyla önlenabilir (7).

Influenza A, B ve C olmak üzere üç temel türe ayrılır: Influenza A yaygın ve tehlikeli olanıdır. Hastalığın esas yatağı ördekler ve su kuşları arasında olmasına rağmen, insanlar ve diğer kuş ile memeli cinslerine de bulaşmanın erken safhaları yaşanmaktadır. Diğer insan patojenlerine kıyasla rekor bir hızla evrime uğramaktadır. Influenza B özellikle çocukların kış aylarında yakalandıkları klasik gribe yol açar. Influenza C ise yaygın olarak görülen soğuk algınlığının sebebidir (6).

Mevsimsel gripten başka bir grip türü olan kuş gribi de yine insanları (sağlık ve ekonomik yönden) son derece olumsuz etkilemektedir. Hastalık Avian influenza ve tavuk vebası olarak da adlandırılmaktadır. Avian influenza virüslerinin (H5N1 tipi) sebep olduğu kanatlı hayvanların çok bulaşıcı ve öldürücü bir hastalığıdır. Kuş gribi, kümes hayvanlarını daha çok etkilemekle birlikte, bütün kanatlı hayvanlarda ve domuzlarda görülür. Hastalık ayrıca atlara, balina ve fok balığına da bulaşabilir (8)

Influenza, son olarak ve çok ciddi bir şekilde domuz (Swine) gribi formunda karşımıza çıkmıştır. Domuz gribi, A (H1N1) tipi virüsten kaynaklanan, insanlarda hastalığa yol açan viral bir hastalıktır. Hastalık ilk kez Meksika ve ABD'de görülmüş ve daha sonra birçok ülkeye yayılmıştır. Bu virüse "domuz gribi" denmesinin sebebi, domuzlar arasında görülen grip virüslerine çok benzediğinin gösterilmiş olmasıdır. Bu yeni virüs insan, domuz ve kuş virüslerinin bir karışımıdır. Domuz gribinin belirtileri, insanlarda görülen grip belirtilerine benzerdir. Bunlar: Ateş, öksürük, boğaz ağrısı,

yaygın vücut ağrısı, baş ağrısı, üşüme ve yorgunluk gibi belirtileri içermektedir. Bazı vakalarda kusma ve ishal de görülebilmektedir (8).

Gribin önlenmesi için uygulanan yaklaşımlardan biri olan antiviral ajan kullanımı ve bunların genotoksik etkileri bizim tez çalışmasının temelini oluşturmaktadır. Tedavide yaklaşık olarak 4-5 çeşit antiviral ajan kullanılmaktadır. Bunlar; ribavirin (pürin nükleosit analogu), amantadine (M2 iyon kanalı inhibitörü, ticari adı; Symmetrel), rimantadine (M2 iyon kanalı inhibitörü, ticari adı; Flumadine), zanamivir (nöraminidaz inhibitörü, ticari adı; Relenza) ve oseltamivir (nöraminidaz inhibitörü, ticari adı; Tamiflu)'dir. Bu ajanlardan ribavirin influenza tedavisinde kullanılıyor olsa da tedavide diğer dördü kadar yaygın bir kullanım alanı bulamamıştır. Bunlardan oseltamivir influenza'nın önlenmesinde oldukça bilinen bir üne sahip olanı olup bu çalışmada test maddesidir (7).

Gribe yönelik bir oral antiviral olan Tamiflu (Oseltamivir), nöraminidaz inhibitörleri (NAI) diye adlandırılan bir ilaç sınıfında yer almaktadır. Bu ilaç grip virüsünün vücut içerisinde yayılmasını engeller ve çalışma sisteminden dolayı, klinik açıdan ilgili olan bütün grip suşlarına aktif olacak şekilde tasarlanmıştır. Tamiflu hastalıktan korunmak ve gribi tedavi etmek üzere kullanılabilir (9).

İşte tüm bu bilgilere dayanarak Influenza günümüzde değişik mutasyonlar geçirerek tüm dünya için önemli bir tehlike arz etmektedir. Virüsün etkilerine karşı kullanılan ilaçların dikkatli bir şekilde kullanılması bu yüzden üstünde durulması gereken bir konudur. İlacın yan etkileri ve kromozomlar üzerindeki hasarlarının tespit edilmesi bu noktada devreye girmekte ve çok önem arz etmektedir. Fakat bunun aksine ilacın yan etkilerini (özellikle kromozom ve gen düzeyinde) araştıran fazla çalışma bulunmamaktadır.

Halbuki kromozom aberasyonları bireyin birçok sağlık sorunları ile karşılaşmasına ve bunun ötesinde doğacak nesillerin de bu sorunlardan etkilenmesine sebebiyet vermektedir. Tüm bu nedenlerden dolayı piyasada bu tür aberasyonlara sebep olan ilaçların etkileri iyi araştırılmalı ve gerekli önlemler alınmalıdır.

Bu çalışmanın genel amacı grip (influenza) hastalığında kullanılan oseltamivirin ticari formu olan “TAMIFLU” ilacının kromozom aberasyonu üzerindeki etkisinin araştırılmasıdır. Yaygın olarak kullanılan ilacın kromozom düzensizlikleri üzerindeki etki derecesi incelenerek, oluşabilecek olası kusur ve hasarlar saptanacaktır. Araştırmanın asıl amacı bu etkilerin tespiti ve özöme yönelik sonuçların ortaya konmasına yardımcı olmaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.KONUyla İLGİLİ ESKİ ÇALIŞMALAR

Bu çalışmada kullanılan oseltamivirin etken maddesi olduğu Tamiflu viral nöraminidaz inhibitörü grubuna girmektedir. Influenza vakalarında sıklıkla kullanılan etken maddenin diğer eşdeğerleri (ribavirin, amantadine, rimantadine, zanamivir) hakkında çalışmalar mevcutken oseltamivirin etkilerini inceleyen araştırma sayısı çok az hatta yok denecek sayıdadır.

Yapılan literatür taramasında; antiviral ajanların genotoksik ve sitotoksik etkilerini araştıran onlarca çalışmaya ulaşılmına rağmen influenzaya karşı kullanılanlarla ilgili yapılmış genotoksisite ve sitotoksisite çalışmaları sadece ribavirin ile ilgili olanlardır (7).

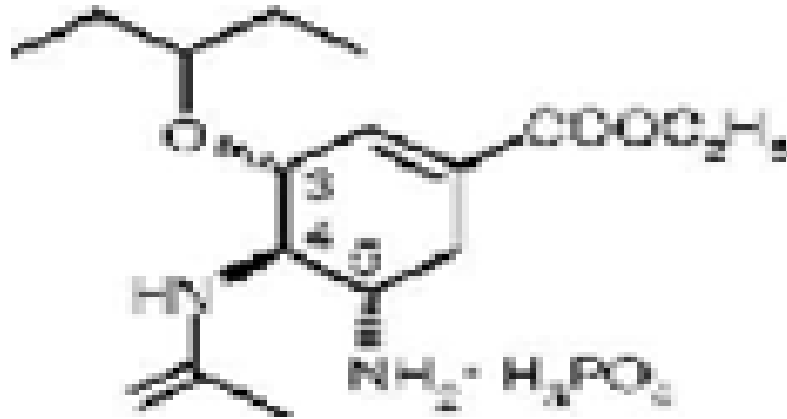
Oseltamivir ile ilgili en kapsamlı çalışmanın "Tamiflu'nun insan periferik lenfositlerinde *in vitro* genotoksik ve sitotoksik etkileri" (7) konulu tez olduğu görülmüştür. Bu çalışma oseltamivir maddesinin etkilerini biraz daha açığa kavuşturmuştur. Oseltamivirin ticari formu olan Tamiflu ile *in vitro* periferik insan lenfositleri ile yapılan çalışma genotoksisite ve sitotoksisite çalışmaları konusunda önemli bir boşluğu doldurmuştur.

2.2.OSELTAMİVİR HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Oseltamivir (Tamiflu) Gilead Sciences (ABD) firmasına ait GS 4104 ile aynıdır. Bu ilaç prodrug (etilester) olarak ağızdan verildiğinde iyi emilir. Organizmada enzimatik etki ile etkin madde olan Ro 64-0802 (GS 4071)'e dönüşür. Bu madde, influenza A ve B nöraminidazın kompetatif inhibitörü (bir sialik asit analogu) olup tüm insan influenza virüs suşlarına etkilidir (10).

Hurt ve ark. (2009) H274Y nöraminidaz mutasyonunun oseltamivirin etkinliğini azalttığını (yabani tip ile karşılaştırıldığında 900 ila 2500 kat) belirtmişlerdir. Bununla birlikte çift H274Y/I222M nöraminidaz mutasyonunun direnç üzerine daha fazla bir etkisi olduğunu açıklamışlardır, buradaki hassasiyet azalması yabani tip ile karşılaştırıldığında 8000 kata kadar çıkabileceğini rapor etmişlerdir. Bu çalışmayla neredeyse eş zamanlı olarak "Amerikan Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi" (Centers for Disease Control and Prevention (CDC)) 2009 verilerine göre

oseltamivirle tedavi edilen ileri seviyede immunosupresyona sahip H1N1'li iki hastada antiviral tedaviye karşı bir direnç gelişimi olduğu bildirilmiştir. Her iki hastadan elde edilen viral RNA'sının dizilenmesi sonucunda nöraminidazlarının 275. pozisyonunda (H275Y) histidin-tirozin değişim mutasyonu tespit edilmiştir (11).



Şekil-1: Oseltamivir'in genel formülü.

2.3.KROMOZOMLAR HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Bir kuşaktan diğerine aktarılan kalıtsal birimlere gen adı verilir. Genler DNA sarmalı boyunca sıralanmıştır. DNA proteini matriksle birleşerek nükleoprotein biçimini alır ve hücre çekirdeğinde kendine özgü bir boyanma yapısı kazanır ki buna **kromozom** adı verilir (1).

1877'de Walter Fleming hücre çekirdeği içinde kromozomları tanımlamış ve 1903'de Sutton ve Boveri Mendel'in söz ettiği "kalıtsal öğeler"in -bugünkü bilgilerimizle genlerin- kromozomlar üzerinde yer aldığını göstermişlerdir (12).

1905'de insanda cinsiyet kromozomları ayırt edilmiş ama tüm bu gelişmelere karşın 1956'ya dek insan kromozom sayısının 48 olduğuna inanılmıştır. 1956'da Tjio ve Levan'ın bu sayıyı 46 olarak belirlemesi, insan sitogenetiğinde önemli bir dönüm noktası olmuştur (13).

Tijo ve Levan'ın 1956 yılında insan kromozomlarının tam sayısını($2n=46$) ortaya koymasından sonra tanımlanan kromozom hastalıklarının sayısında belirgin bir artma görülmüştür. 1971'de Paris'te yapılan toplantılarda kabul edilen ilkelere göre Denver Klasifikasyonu geliştirilmiş ve insan kromozomları standardizasyona tabi tutularak ortak adlandırma sistemi kabul edilmiştir (14)

Kromozomlar bulunması ve sonrasında meydana gelen genetik ilerlemeler sayesinde kalıtsal verilerin kuşaktan kuşağa aktarılması konusu dengeli bir düzeye oturtulmuş ve daha sistemli bir bilim dalının oluşturulması sağlanmıştır.

2.3.1.Kromozomların Morfolojik Özellikleri

Bilindiği gibi, insanda 46 tane kromozom bulunmaktadır. Bunlardan 44 tanesi otozomal kromozomlar ve bunların üzerindeki genler de otozomal genlerdir. Kadında (XX), erkekte (XY) biçiminde bulunan diğer 2 kromozoma, cinsiyet (seks) kromozomları ya da gonozom, bunlarda bulunan genlere de gonozomal genler adı verilir (15).

Kromozomlar, ışık mikroskobu kullanılarak mitoz bölünmenin metafaz evresinde incelenirler. İnsan somatik hücrelerinde bulunan 46 kromozom 23 çiftten oluşur. Bu 23 çiftin 22'si erkeklerde de kadınlarda da benzerdir ve bu kromozomlar, otozomal kromozom olarak isimlendirilirler. Her bir kromozom çiftinin üyeleri, homolog olarak adlandırılır ve birbirlerine uyan genetik şifre taşırlar (16)

Bir genomun moleküler diseksiyonu belirli bir koordinat sistemine uygun olarak geliştirilmiş işaretler arası ilişkiyi belirleyen haritalarla DNA organizasyonunu gösteren haritaların yapımını kapsar. DNA'nın organizasyonunu gösteren üç tip harita vardır (Sitogenetik, Fiziksel ve Genetik haritalar) (17).

Sitogenetik haritalar: Sitogenetik haritalar kromozoma mikroskopla bakıldığında görülen görüntülerdir. Her biri 1 ile 5 milyon baz çifti içeren ve kromozoma özgü görüntü veren, değişik tonda boyanan bölgelerin (bantlar) görünümünü özellikle önemlidir(17,18,19)

Bu haritalama tipinde ağırlıklı olarak G-bantlama tipi yapılmaktadır. Tripsin ile ön muamele edilmiş lam üzerine yayılı kromozomlar giemsa ile boyanmaktadır. Bu bantlama yönteminde üç önemli faktör göz önünde bulundurulmaktadır. Bunlar

kromozom uzunluğu, sentromer konumu ve bant bölgelerinin dağılımıdır. Bunların dışında R-bantlama kinakrin boya ve floresan mikroskopi yöntemi ile yapılırken, G-bantlama yoluyla boyanmayan bölgeler gözlemlenebilmektedir.

Fiziksel haritalar: DNA moleküllerinin kendilerine özgü restriksiyon enzimleri sayesinde belirli bölgelerden kesilmesi ile oluşturulan DNA haritalarıdır. Spesifik restriksiyon enzimleri sayesinde belirli ve istenilen bölgelerden kesilen dizilerin eldesi sağlanmakta ve saflaştırılmaktadır. En çok kullanıldığı alan rekombinant DNA teknolojileridir. Her bir DNA kısmını kendine özgü noktalardan kesen yüzlerce restriksiyon enziminin varlığı bu haritalanma tipinin işleyişini kolaylaştırmaktadır.

Genetik haritalar: Bağlantı haritaları olarak da bilinen genetik haritalar belirli bir DNA aralığında genetik işaretlerin konumlarını yansıtır. İşaretlerin aralıkları fiziksel uzaklıklardan çok kalıtsal özelliklere dayandığından fiziksel ve sitogenetik haritalara göre daha soyuttur. İşaretler arası mesafe fiziksel uzaklıktan çok kalıtsal özelliklere dayanır. İki homolog kromozom parçasının birbirinden ayırt edilmesinde ve bir kuşaktan sonraki kuşağa aktarılmasını izlemekte kullanılır (14,17,19,20).

Her kromozom çiftinin bir üyesi babadan, diğeri ise anneden gelir. Bilinen bir insan hücresinin kromozomları en iyi, mitozun metafaz ve prometafaz evresinde analiz edilirler. Bu dönemlerde mikroskop altındaki kromozomlar, sentromerde birleşmiş 2 kromatidden oluşmuş olarak görülürler. Her kromatid çift sarmallı bir DNA içermektedir (1).

Normal bir kromozomda gözlenen morfolojik yapılar şunlardır.

1. Sentromer: Boyalarla muamele edildiğinde en soluk boya alan kesimdir. Bölünme sırasında iğ ipliklerine tutunmayı sağlayan bu yapılar her kromozomda bir adettir. Kromozomlar sentromer konumlarına göre 3 gruba (insanlarda) ayrılırlar. Bunun dışında diğeri canlılarda bir şekli daha (telosentrik) mevcut olup diğeri şeklindeki konumları normal sayılmamaktadır.

a) Metasentrik (Median) Kromozom: Sentromeri ortada ve iki kolu birbirine eşit olan kromozomlar.

b) Submetasentrik (Submedian) Kromozom: Sentromerleri merkezden uzak ve iki kolu birbirine eşit olmayan kromozomlar.

c) Akrosentrik Kromozom: Sentromeri kromozomun bir ucuna çok yakın olan kromozomlar.

2. Satelit (Uydu): Belirli kimi kromozomların kısa kollarına ince bir sap ile bağlanan yuvarlak düğme biçimindeki kromatin materyalidir. D (13 - 15) ve G (21 - 22) grubu kromozomlarının tümünün kısa kollarında bir satelit bulunur. Nukleolus ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

3. Sekonder Darlık: Sentromerin aksine tüm kromozomlarda görülmeyen bir oluşumdur. Özellikle 1, 3, 9 ve 16 numaralı kromozomlarda görülür. Bazen sık olmamakla birlikte 6 ve 11 nolu kromozomlarda da görülebilmektedir. Sentromerden daha açık boyanırlar. Kromozomların uzun kolunda olup sentromere bitişiktirler ve uzunlukları farklılıklar göstermektedir.

2.3.2.Kromozom Terminolojisi

Hücrelerdeki kromozomların homologları ile eşleştirilip bir araya getirilmesi ve sıralanması işlemine karyotip denir. Karyotipler türlere özgü olup değişik türler arasında farklılık göstermektedir.

İnsan kromozom sayısının $2n=46$ olduğu kesin olarak ortaya konduktan sonra yayınların karışıklığını gidermek için kromozomların belirli bir sıra ve sisteme göre düzenlenmesi zorunlu hale gelmiştir.

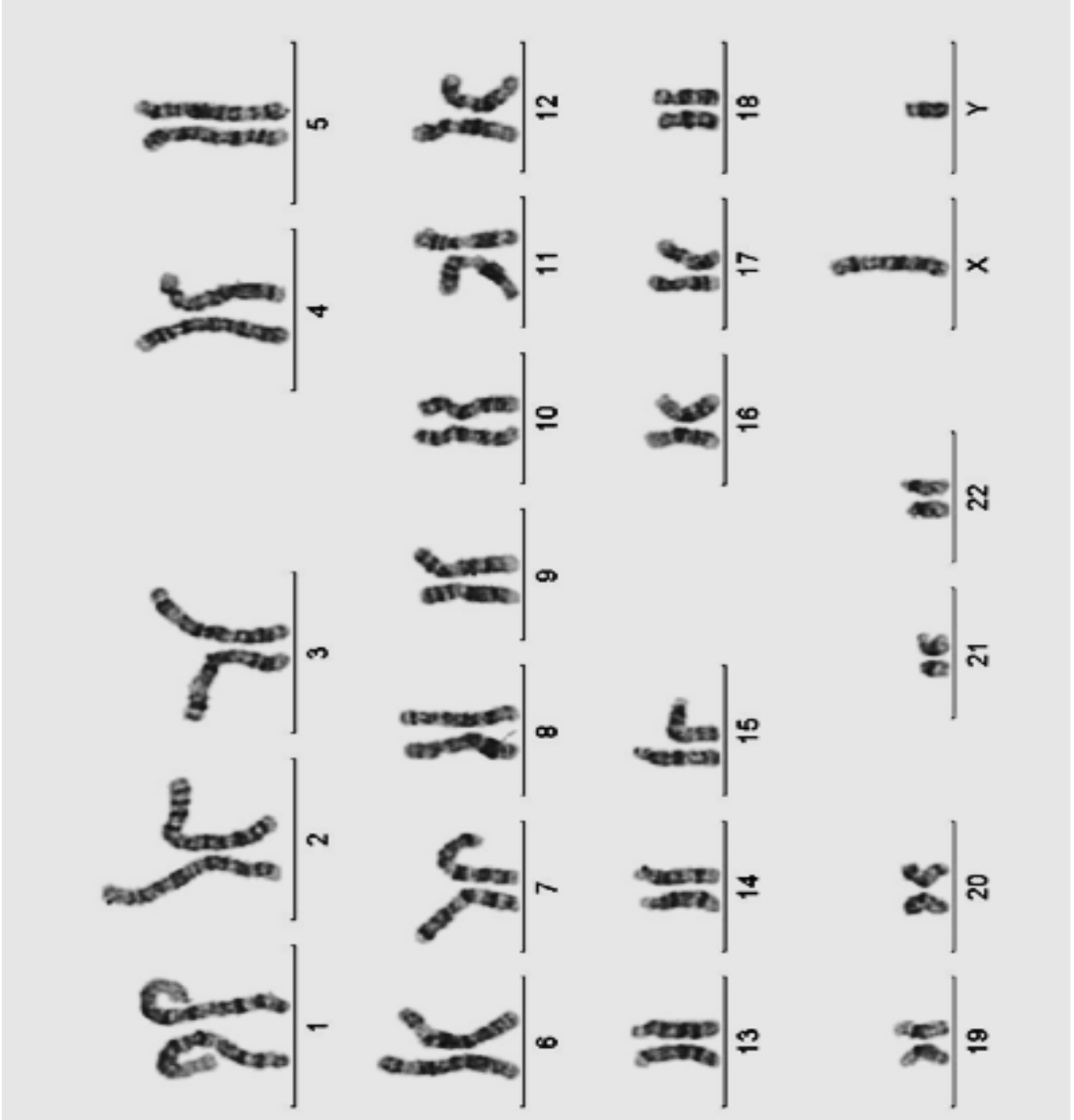
Bundan dolayı bulguları standartlaştırmak ve belli ilkeleri saptamak için 1960 yılında Denver'de (A.B.D) genetikçilerin ilk uluslararası toplantısı yapılmıştır. Bu toplantıda kabul edilen sisteme "Denver Sistemi" ya da "Denver Klasifikasyonu" denmiştir. Daha sonraki yıllarda yapılan toplantılarla bu klasifikasyon geliştirilmiştir (21).

Daha sonraları belirli aralıklarla uluslararası toplantılar (1963-Londra, 1968-Chicago, 1971-Paris) yapılmış ve bu konuda birçok karara varılmıştır.

Bütün bu toplantılar sonrasında Denver klasifikasyonu geliştirilerek standart bir karyotip ortaya konmuştur. Bugün kullandığımız sistem ise son şeklini "An International System for Human Cytogenetic Nomenclature" adıyla 1995 yılında almıştır.

Buna göre insanda 22 çift otozomal kromozom; dişide iki tane X kromozom erkekte ise bir X ve bir de Y kromozomu bulunur. Karyotip yazılırken virgülden önce kromozom sayısı, virgülden sonra cinsiyet ve yapısal değişiklikler belirtilir (46,XX veya 46,XY gibi). Karyotipte cinsiyet kromozomlarının yeri, 22 çift otozomal kromozomdan sonradır (22).

22 çift otozom kromozomları yedi gruba ayrılmaktadır (A, B, C, D, E, F, G). Cinsiyet kromozomları dışındaki kromozomlar en büyükten başlamak üzere 1 - 22 arasında numaralandırılmaktadır. Grup A'da sentromerleri ortaya yakın en büyük üç metasentrik kromozom çifti, Grup B'de sentromer uca hafif yaklaşmış en büyük iki submetasentrik, grup C'de daha küçük yedi çift submetasentrik kromozom, Grup D'de sentromeri uca iyice yaklaşmış üç çift akrosentrik kromozom, Grup E'de biri küçük metasentrik, diğer iki çifti küçük submetasentrik üç çift kromozom, Grup F'de iki çift küçük metasentrik kromozom ve Grup G'de ise çok küçük iki çift akrosentrik kromozom bulunur. X kromozomu C grubu kromozomlarına benzer, Y ise G grubu kromozomlarına benzer (1).



Şekil 2: Denver kalsifikasyonuna göre normal bir erkek birey kromozom karyotipi (16)

2.3.3.Kromozom Anomalileri

A- Sayısal Kromozom Anomalileri

I. **Öploidi (Euploidy):** Hücrelerdeki kromozom sayısının ($n = 23$) tam katı kadar artış veya azalmalardır.

a) **Triploidi:** Mevcut temel kromozom sayısının üç kat oranında artmasıdır ($3n = 69$).

b) **Tetraploidi:** Temel kromozom sayısının dört kat oranında artmasıdır.

c) **Endoredüplikasyon:** Sitoplazma bölünmesinin gerçekleşmemesi nedeniyle kendi katı kadar artmış kromozomların ikişer kromatidli kromozom çiftleri halinde olmasıdır.

d) **Yüksek Poliploidiler:** Karyotipte $4n$ 'den daha fazla kromozom bulunmasıdır.

II. **Anöploidi:** Temel kromozom sayısının katları kadar olmayan artma ya da eksilmelerdir. Anöploidi, poliploidiye göre daha sık ortaya çıkar ve kromozomal sendromların büyük bir bölümünde gözlenen düzensizliktir.

a) **Hiperploidi:** $2n + 1$ ve $2n + 2$ gibi kromozom sayısındaki artmalardır.

b) **Hipoploidi:** $2n - 1$ ve $2n - 2$ şeklindeki kromozom sayısındaki azalmalardır.

B-Yapısal Kromozom Anomalileri

Yapısal anlamda meydana gelen anomaliler çeşitli sebeplerden kaynaklı olabilmektedir. In vitro çalışmalar, iyonize radyasyonun, viral enfeksiyonların ve mutajenik kimyasal ajanların kromozom kırıklarına neden olduklarını göstermiştir. Meydana gelen bu düzensizlikler kromozomun yapısıyla ilgili olup kalıtsal materyalin korunup korunmamasına göre dengeli veya dengesiz olabilmektedir.

- 1) **Artma (Duplikasyon):** Homolog olan ya da olmayan iki kromozomdan birinden kopan bir parçanın diğer kromozoma eklenmesidir.
- 2) **İnversiyon (Ters dönme):** Bir kromozomun çeşitli nedenlerden dolayı iki yerinden darbe alması ve darbe alan bu parçanın kaybolmadan 180 derece dönerek eski yerinde tutunması durumudur.
- 3) **Gap (Aralık):** Kromozomun herhangi bir bölgesinde, kromatidin enini geçmeyen ve kromozom ekseninden sapmış, boya almayan bir bölgenin görülmesidir.
 - a) **Kromatid gap:** Gap'ın kromozomun bir kromatidinde görülmesidir.
 - b) **İzokromatid gap:** Gap'ın kromozomun her iki kromatidinde görülmesidir.
 - c) **Sentromerik gap:** Gap'ın sentromer bölgesinde görülmesidir (23).
- 4) **Sentromersiz kromozom:** (asentrik kromozom, asentrik fragment) Birbirine paralel duran, sentromerleri görünmeyen ya da bulunmayan kromozomlardır.
- 5) **Kırık:** Kromozomun herhangi bir bölgesinde, bir kromatid enini aşan ve kromozom ekseninden sapan boyanmamış bölgelere denir.
 - a) **Kromatid kırığı:** Kırık olarak değerlendirilen düzensizliğin kromozomun bir kromatidinde görülmesidir.
 - b) **İzokromatid kırık:** Kırık olarak belirtilen bozukluğun, kromozomun her iki kromatidinde ve eş kesimlerinde görülmesidir.
- 6) **İki sentromerli kromozom (disentrik):** Kromozomda bir yerine iki sentromerin bulunmasıdır.
- 7) **Yer Değiştirme (Translokasyon):** Kromozom materyalinin, kromozomlar arasındaki değişimidir. Her iki kromozomda kırıkların oluşması

ve genellikle normalin dışında yeniden bir düzenleme sonucu tamir edilmesi ile oluşurlar.

8) **Pulverizasyon:** Metafaz plağındaki kromozomların birçoğunun parçalanıp, bireysel olarak tanınmaz hale gelmesi (23).

9) **Eksilme (Delesyon):** Bir kırılma veya kopma sonucu kromozomun küçük bir parçasının ayrılmasıdır.

10) **Haç kromozomu (Quadriradial):** Büyük ve küçük submetasentrik kromozomların, kollarının yan yana gelerek haç şeklini almasıdır.

11) **Fragment:** Kopmuş kromatid parçalarıdır.

12) **Minik kromozom (minute):** Sentromersiz kromozomlardan daha küçük kromatid çiftleridir. Görünüşlerinden dolayı kromozom ya da kromatin damlacığı olarak tanımlanırlar.

13) **Halka kromozom (yüzük, ring):** Kromozomun iki ucunun birleşerek yüzük görünümü oluşturmasıdır.

14) **Yapışkanlık:** Kromozomların yığın haline gelmesidir. Genellikle topaklanma şeklinde kendini gösterir.

15) **Satellit assosiasyonu:** Büyük ve küçük akrosentrik kromozomların metafaz plaklarında beklenenden daha sık olmak üzere kısa kollarındaki uyduları birbirine çevirmiş biçimde bir araya gelerek rozet biçiminde toplanmalarıdır. Oluşan yapı yonca yaprağını andırır.

16) **İri satellitler:** D ve G. Grubu kromozomlardaki satellitlerin normalden büyük görülmeleridir.

17) **Sentromer bölünmesinde asenkroni:** Sentromerlerin aynı zamanda bölünmemesidir(1,22,23).

3.MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada 25 yaşında iki erkek ile iki bayan bireyden alınan periferik kanlar değerlendirilmiştir. Lenfosit kültürü için alınan kan örnekleri alınmadan önce bireylerin son altı ay içerisinde ilaç almadığı ve sigara kullanmadığına dikkat edilmiştir. Bireyler kromozomal yönden hiçbir kusura sahip olmayıp tamamen sağlıklı bireylerdir.

3.1.MATERYAL

3.1.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler Ve Deney Ekipmanları

3.1.1.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.1.1.1.1.Tamiflu

Roche 1996 yılında, Gilead firmasından bu ilacı geliştirmek ve pazarlamak için bütün haklarını satın almıştır. Tamiflu 1999/2000 yıllarında Kuzey Amerika'da (ABD ve Kanada'da) ve İsviçre'de eczanelerde satılmaya başlanmıştır. Bütün kilit Avrupa pazarlarında 2002/2003'te sunulmuştur. Otuz üç milyondan fazla hasta, Amerika Birleşik Devletleri, Japonya, Kanada, Avustralya, AB, İsviçre ve Latin Amerika dâhil olmak üzere, dünyanın dört bir yanında yaklaşık 80 ülkede Tamiflu ile tedavi edilmiştir (9).

Tamiflu üretim sürecinin başlangıç malzemesi olan şikimik asit, yıldız anasondan elde edilmektedir. Anasondan elde edilen özün yanı sıra, Roche ayrıca şikimik asit üretmek üzere bir fermantasyon süreci de geliştirmiştir. Tamiflu'nun üretimi karmaşıktır ve bazıları komplike olarak nitelendirilebilecek 10 ana adımdan oluşmaktadır. Bütün maddeler temin edildiği zaman üretim yaklaşık 6-8 ay sürer, ancak işe sıfırdan başlayan herhangi bir taraf için Tamiflu üretilmesi 2-3 yıl sürebilir (9).

A-Tamiflu'nun etki mekanizması

Tamiflu'nun etken maddesi oseltamivir fosfatın oral uygulanmasından sonra, mide ve barsak kanalından hızla emilir ve çoğunlukla karaciğerde

bulunan hepatik esterazlarla aktif metabolit olan oseltamivir karboksilata dönüştürülür. Uygulanan doz sonrası aktif metabolitin plazma konsantrasyonları 30 dakika içinde ölçülebilir düzeye, 2-3 saat içinde ise yaklaşık maksimum düzeye ulaşır. Oral dozun en az % 75'i aktif metabolit olarak dolaşım sistemine girer. Aktif metabolit ileri metabolizasyona uğramaz ve idrarla elimine edilir. Oseltamivir fosfat, influenza virüsünün nöraminidaz enzimlerinin etkili ve selektif bir inhibitörü olan oseltamivir karboksilatın (OK) ön ilacıdır. Viral nöraminidaz enzimi, hem enfekte olmamış hücrelere viral giriş için hem de yeni oluşmuş virüs partiküllerinin enfekte olmuş hücrelerden salınımı ve bulaşıcı virüsün vücutta daha fazla yayılmasında önemlidir. Oseltamivir karboksilat, influenza A ve B virüslerinin nöraminidaz enzimlerini bloke eder (9).

B- Tamiflu'nun kullanım şekli

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

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

Influenzanın önlenmesi için standart doz: Yetişkinler ve adolesanlara, enfekte kişilerle yakın teması takiben, influenzanın önlenmesi için tavsiye edilen oral Tamiflu dozu on gün boyunca, günde bir kez 75 mg'dır. Yakın temas sonrası iki gün içinde tedaviye başlanmalıdır. İnfluenza salgını sırasında influenza etkisini önlemek için tavsiye edilen doz günlük 75 mg'dır. Altı haftalık süre içerisinde Tamiflu'nun güvenilirlik ve etkinliği kanıtlanmıştır. Çocuklar, tavsiye edilen Tamiflu süspansiyon dozlarına alternatif olarak

kapsül yutmada zorluk çekmeyen >40 kg ağırlığındaki çocuklar, profilaktik (tedavi edici) olarak on gün boyunca, günde bir kez 75 mg kapsül alabilirler. >1 yaşındaki çocukların tedavi edici olarak kullanılacakları

Tamiflu süspansiyon dozu: <15 kg için günde bir kez 30 mg, >15 - 23 kg için günde bir kez 45 mg, 23 - 40 kg için günde bir kez 60 mg, >40 kg için günde bir kez 75 mg'dır (9).

C-Tamiflu'nun prospektüs bilgileri

Bir kapsül, 75 mg oseltamivire eşdeğer miktarda 98.5 mg oseltamivir fosfat içerir.

Farmakolojik Özellikleri:

Farmakodinamik özellikler Oseltamivir fosfat, aktif metabolitin ön ilacıdır. Oseltamivir fosfat, enfekte olmuş hücrelerden virüsün salınımını inhibe ederek influenza A ve B virüslerinin vücuda yayılımını azaltır.

Yetişkinlerde influenza tedavisi:

Tamiflu alan influenza hastalarında hastalığın şiddeti plaseboya göre %38 azalmıştır. Ayrıca Tamiflu sağlıklı genç yetişkinlerde antibiyotik tedavisi gerektiren influenzaya bağlı komplikasyonların (bronşit, pnömoni, sinüzit ve otitis media) görülme sıklığını %50 oranında azaltmıştır.

Çocuklarda influenza tedavisi:

Tamiflu alan çocuklarda akut otitis media gelişme oranı %40 azalmıştır ve Tamiflu alan çocuklar plasebo alanlara göre 2 gün önce normal sağlık ve aktivitelerine dönmüşlerdir.

Yetişkin ve adolesanlarda influenza profilaksisi ile ilgili alışmalar:

Yetişkin ve adolesanlarda aile içinde temas sonucu oluşan influenzada semptomların ortaya çıkmasından sonraki 2 gün içinde Tamiflu başlanmış ve 7 gün boyunca devam edilmiştir. Bu alışma sonucunda, temasa bağlı olarak oluşan influenza hastalığının görülme sıklığı %92 oranında azalmıştır.

Farmakokinetik zellikler:

Emilim:

Oseltamivir fosfat, oral uygulamadan sonra, mide-barsak kanalından hızla emilir ve çoğunlukla hepatik esterazlarla aktif metabolite dönüştürülür. Oral dozun en az %75'i, aktif metabolit olarak sistemik dolaşıma girer.

Eliminasyon:

Çoğu vakada aktif metabolitin plazmadaki yarılanma süresi 6-10 saattir. Aktif madde renal yolla tamamen (>%99) elimine edilir.

Özel Popülasyonlarda Farmakokinetik:

Kreatinin klerensi 10-30 mL/dak olan hastalarda, Tamiflu dozunun 5 gün boyunca günde bir kez 75 mg'a düşürülmesi önerilmektedir. Karaciğer bozukluğu olan hastalar ve yaşlı hastalarda doz ayarlamasına gerek yoktur. 2 mg/kg'lık doz verilen çocuklarda 75 mg'lık (yaklaşık 1 mg/kg) tek kapsül alan yetişkinlerle karşılaştırılabilir oseltamivir karboksilat konsantrasyonları gözlenmiştir. 12 yaşın üstündeki çocuklarda oseltamivirin farmakokinetiği, yetişkinlerde gözlenen ile benzerdir. 1 yaşın altındaki ocuklarda, Tamiflu'nun güvenilirliği ve etkinliği saptanmamıştır.

Endikasyonları;

- * Tamiflu, yetişkinlerde ve 1 yaşındaki çocuklarda influenza tedavisinde endikedir.
- * Tamiflu, yetişkinlerde ve 13 yaşındaki adolesanlarda influenza profilaksisinde endikedir

Kontrendikasyonları:

Oseltamivir fosfat veya ilacın içerdiği maddelerin herhangi birine karşı aşırı duyarlılığı olduğu bilinen kişilerde kontrendikedir.

Uyarılar/Önlemler:

Tamiflu'nun influenza A ve B virüsleri dışında, diğer ajanların neden olduğu hastalıklarda etkili olduğuna dair bir veri bulunmamaktadır. İnflüenzanın tedavisi ve profilaksisi sırasında doz ayarlaması, kreatinin klerensi 30 mL/dak olan hastalar için önerilmektedir. Rutin hemodiyaliz ve sürekli peritoneal diyaliz tedavisi gören, son evre renal hastalığı olan kişiler ve kreatinin klerensi 10 mL/dak olan hastalar için tavsiye edilen bir doz yoktur

Gebelik ve Emzirme Döneminde Kullanımı:

Tamiflu gebelik ve emzirme döneminde, ilacın gebe kadına veya emziren anneye sağlayacağı potansiyel yararın, fetüs veya bebek üzerindeki potansiyel riskten fazla olduğu durumlarda kullanılmalıdır.

Yan Etkiler / Advers Etkiler:

En sık bildirilen yan etkiler bulantı ve kusmadır. Bu etkiler geçicidir. Yetişkinlerde yapılan faz III çalışmalarda, Tamiflu alan hastalarda, plasebo alan hastalara göre nedene bağlı olmaksızın daha sık meydana gelen advers olaylar; bulantı, kusma, bronşit, uykusuzluk ve baş dönmesidir.

İlaç Etkileşmeleri:

Farmakolojik ve farmakokinetik çalışmalardan edinilen bilgilere göre, oseltamivir fosfatla klinik olarak anlamlı ilaç etkileşimleri görülme olasılığı azdır.

Kullanım Şekli ve Dozu:

Tamiflu tek başına veya yiyeceklerle birlikte alınabilir, ancak yiyeceklerle birlikte alınması bazı hastalarda toleransı artırabilir. Doktor tarafından başka şekilde tavsiye edilmediği takdirde; İnfluenza tedavisi için standart doz: İnfluenza semptomlarının görüldüğü ilk veya ikinci günde tedaviye başlanmalıdır.

- Yetişkinler ve adolesanlar: Yetişkinler ve 13 yaşındaki adolesanlarda tavsiye edilen doz, 5 gün boyunca günde iki kez 75 mg kapsüldür.

- Çocuklar: Kapsül yutmada zorluk çekmeyen 40 kg ağırlığındaki veya 8 yaşındaki çocuklar, günde iki kez 75 mg kapsül ile tedavi edilebilirler.

- İnfluenza profilaksisi için standart doz:

Enfekte kişilerle yakın teması takiben iki gün içinde tedaviye başlanmalıdır.

İnfluenzanın profilaksisi için tavsiye edilen oral Tamiflu dozu; en az yedi gün boyunca, günde bir kez 75 mg'dır. Toplumda görülen influenza salgını sırasında profilaksi için tavsiye edilen doz günlük 75 mg'dır. Altı haftalık süre içerisinde Tamiflu'nun güvenilirlik ve etkinliği kanıtlanmıştır.

Doz Aşımı:

Akut doz aşımında kusma veya kusma olmadan bulantı görülebilir. Tamiflu'nun tek doz şeklinde 1000 mg'a kadar verilen dozlarının, bulantı ve/veya kusma görülmeksizin iyi tolere edildiği görülmüştür.

Ticari Şekli:

Tamiflu 75 mg kapsül, 10 adet, blisterde. KDV dahil perakende satış fiyatı 30 TL.(Haziran 2011)® Tescilli marka.

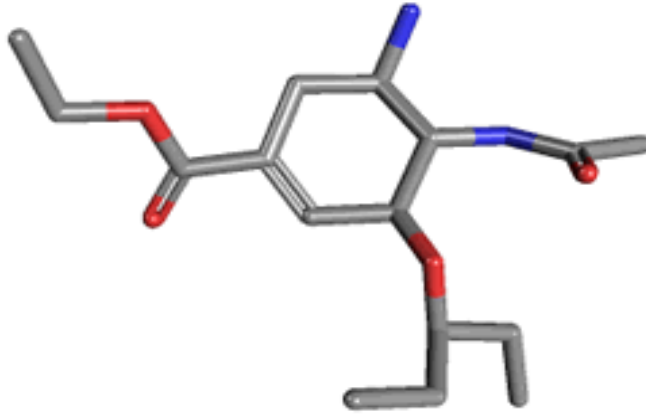
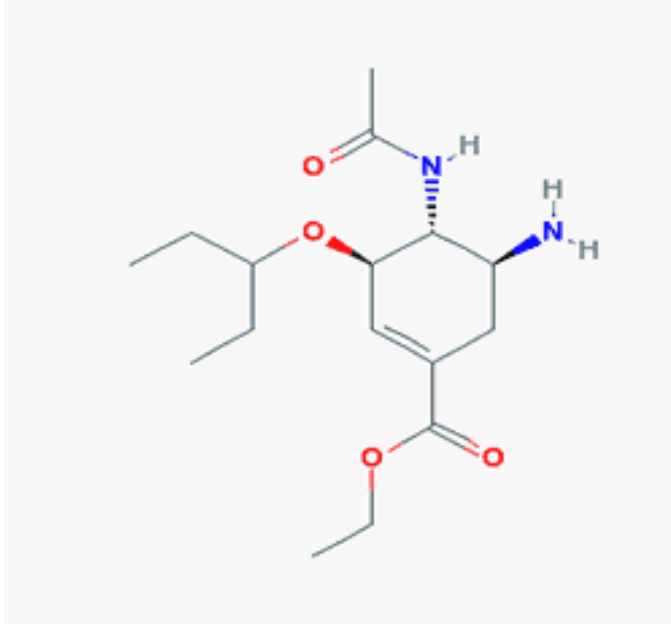
Ruhsat Sahibinin İsim ve Adresi: Roche Müstahzarları Sanayi Anonim Şirketi, Levent, İstanbul

Üretim Yeri: F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, İsviçre

Ruhsat Tarihi ve Numarası: 18.09.2003-114/70 Reçete ile satılır (9)

Ruhsat Numarası: 18.09.2003-114/70

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



Şekil-3: Tamiflu'nun açık ve 3D formülü

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

CAS No: 204255-11-8

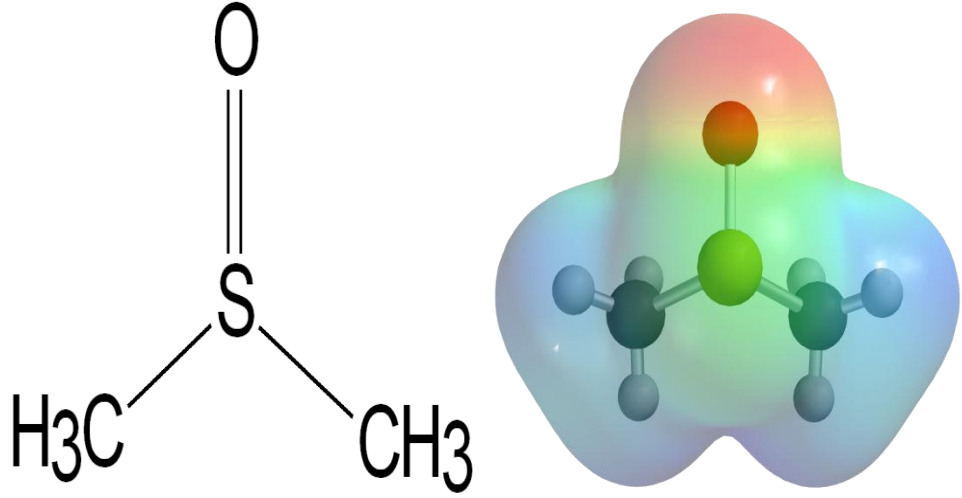
3.1.1.1.2. Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

Bu çalışmada DMSO Tamiflu'nun solventi olarak kullanılmıştır. DMSO moleküler ve kromozomal analizlerde daha önceki çalışmalarda da kullanılmakta olup hiçbir toksik etkisi saptanmamıştır. (24).

Kimyasal adı: Dimethyl Sulfoxide

Kapalı formülü: C₂H₆SO veya (CH₃)₂SO

Açık formülü:



Şekil-4: Dimethyl Sulfoxide (DMSO) açık ve 3D formülü.

Molekül ağırlığı: 78.13

Yoğunluğu: 1,1 g/cm³

Kaynama noktası: 189 °C

Erime noktası: 16-19 C

Saflik düzeyi: > %99,9

CAS No: 67-68-5

3.1.1.1.3. Kullanılan diğler kimyasal maddeler

- A.** BIO - AMF - 2 (Biological Industries 812589) (Contains L-Glutamine &Antibiotics)
- B.** F 10 (HAM) Nutrient Mixture (Biological Industries 752348) (With L-Glutamine)
- C.** Fetal Bovin Serum (Gibco 41G957P)
- D.** PHA-M (Phythaemagglutinin M) (Biological Industries 816646)
- E.** Colcemide Solution (Biological Industries 810568)
- F.** Acetic Acid (Glacial) (Riedel-de Haen)
- G.** Methanol (Riedel-de Haen)
- H.** Xylol (Merck)
- İ.** Giemsa Stain (Sigma)
- J.** Heparin (Mustafa Nevzat)
- K.** Etil alkol
- L.** Penicillin - Streptomycin Solution (Biological Industries 722867)
- M.** Ethanol absolut (Riedel-de Haen)
- N.** İzotonik (Eczacıbaşı)
- O.** Trypsin - EDTA Solution C (Biological Industries 814619)
- P.** Sodium Phosphate dibasic anhydrous ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- Q.** Tamiflu (Roche)
- R.** Potassium Phosphate monobasic ($\text{K H}_2\text{PO}_4$)
- S.** L - Glutamin Solution(Biological Industries 746245)
- T.** KCl (Potassium chloride) (Merck)
- U.** Distile su

3.1.1.1.4. Kullanılan solüsyonlar

- a) Kolşisin (Colchicine) solüsyonu
40 mg colchicine + 100 ml distile su
- b) Hipotonik Solüsyonu (0.075 M KCl)
1000ml Distile su + 5.6gr KCl

c) Tespit Solüsyonu (Fiksatif Solüsyonu)

3 Kisim Methanol + 1 Kisim Glacial Acetic Acid

d) Streptomisine solüsyonu

1 gr streptomisine + 10 ml steril distile su

e) Penicilline solüsyonu

1.000.000 U penicilline-G potassium + 10 ml distile su

f) Fitohemaglutinin Solüsyonu

PHA-M - L 5 mg + 5 ml Distile su

g) Sörsan Tampon (Fosfat) Solüsyonu

a-11.88 g Na₂ HPO₄ + 1000 ml Distile Su

b-9.08 g K H₂PO₄ + 1000 ml Distile Su

(pH 6,8 olarak a ile b karıştırılır.)

h) Giemsa boya tamponu (Düz Boyama için)

5 ml Giemsa Stain Stock Solution + 95 ml Distile Su

ı) Tamiflu stok solüsyon

Kapsül halindeki Tamiflu DMSO içerisinde çözünerek gerekli seyreltmelerden sonra gereken üç doz da elde edilmiştir.

3.1.1.1.5. Kültür Ortamı

Periferik kan kültürü için uygun görülen solüsyonlar miktarları ile aşağıdaki gibidir.

1. Besi ortamı (F 10 (HAM) Nutrient Mixture)	80 ml
2. Fetal calf serum	15 ml
3. PHA (phytohemaglutinin)	3,4 ml
4. Penicillin solüsyonu	0,1 ml
5. Streptomisine solüsyonu	0,1 ml

Değerler yukarıda belirtilen miktarlarda uygulanmaktadır (25).

3.1.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları

- 1) Mikroskop [Işık (Olympus)]
- 2) Mikroskop kromozom görüntüleme sistemi
- 3) Steril Pasteur Pipetleri
- 4) Zaman ayarlı santrifüj
- 5) Kuru Hava Sterilizatörü
- 6) Etüv
- 7) Değişik çapta enjektörler
- 8) Dikey Şaleler
- 9) Değişik Ebatlarda Steril Plastik Santrifüj Tüpleri
- 10) Mezürler
- 11) Lam ve lameller
- 12) pH Metre (Consort P - 107)
- 13) Vortex
- 14) Hassas terazi
- 15) Mikropipetler
- 16) Plastik eldiven
- 17) Değişik çapta pipetler
- 18) Laboratuvar saati
- 19) Buzdolabı

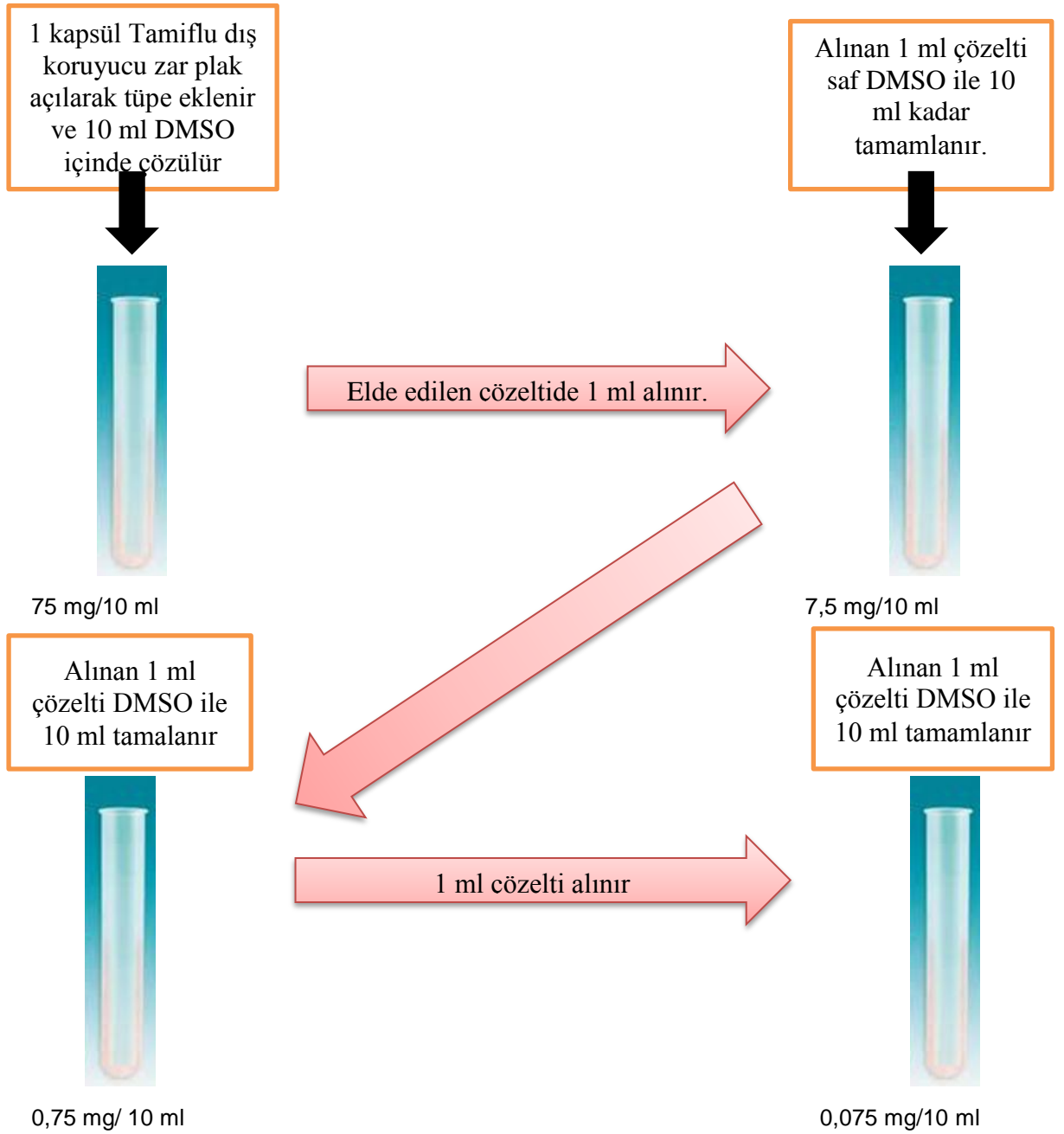
Bunların dışında laboratuvar ortamında mevcut olan değişik malzeme ve gereçlerden yararlanılmış ve gerekli ortam koşulları sağlanmıştır.

3.2. METOD

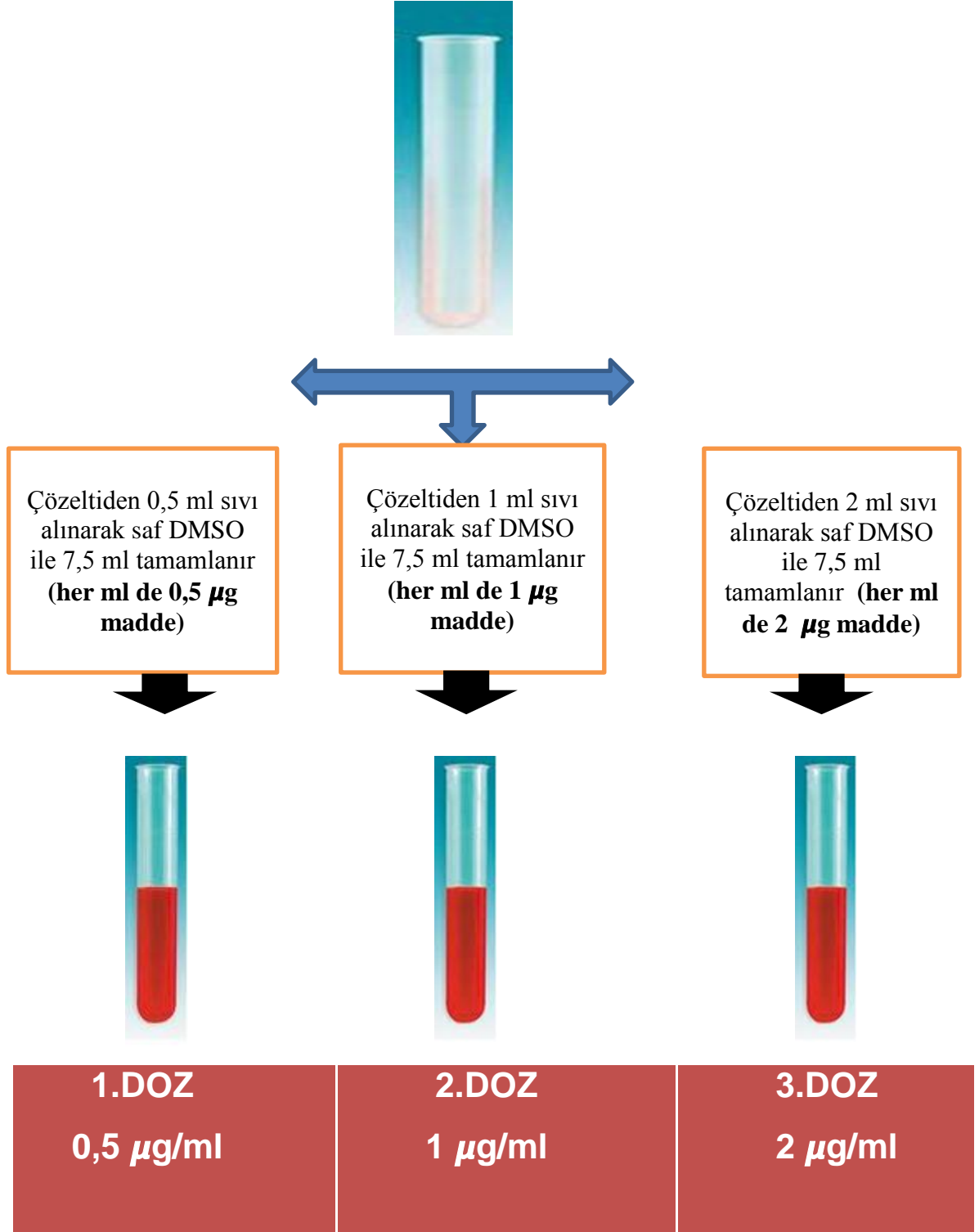
3.2.1. Kullanılan ilaç (Tamiflu) dozlarının elde edilmesi

Kapsül olarak mevcut olan tamiflu ilacı solventi olan DMSO içerisinde çözünerek aşağıdaki gibi seyreltme işlemlerinden geçirilmiştir.

Her tamiflu kapsülünde 75 mg'a (75.000 μg) eşdeğer oseltamivir bulunmaktadır.



75 µg/10 ml sıvı çözelti (Her 1 ml sıvıdaki madde miktarı = 7,5 µg)



Yukarda açık bir şekilde belirtildiği gibi kapsül halindeki Tamiflu solventi olan DMSO'da çözünerek 3 farklı doz (0.5, 1 ve 2 µg/ml) elde edilmiştir.

3.2.2. Her kültür tüpüne eklenecek doz ve DMSO miktarlarının belirlenmesi

Daha önceden yapılmış çalışmalar ve ilacın prospektüs ve kullanım şekli göz önünde bulundurularak hazırlanan dozlar stoklarda ve oda koşullarında muhafaza edilmiştir.

Kültüre alınan tüplerin içindeki toplam madde miktarı hesaplanarak 1ml başına 3,7 μ l hazırlanan dozlardan eklenmiştir. Aynı şekilde kontrol gruplarına da doz yerine DMSO eklenmiştir(7,26).

Buna göre;

Kullanılan çözelti ve maddeler

Besiyeri	5 ml
Kan	0,25 ml
Fitohemaglutinin	0,10 ml
Toplam:	5,35 ml

Buna göre kullanılan madde miktarı; $3,7 \times 5,35 = 20 \mu$ l olarak hesaplanmıştır. Bulunan miktar öngörülen zamanlarda dozlardan kültür tüplerine ilave edilmiştir. Ayrıca bu miktar aynı zamanda DMSO ve HAM-sefon olarak kontrol gruplarına da eklenmiştir.

3.2.3. Doz gruplarının muamele sürelerine göre düzenlenmeleri

Gereken dozlarda hazırlanan stok solüsyonlar ile kültür tüplerine belirli sürelerden sonra muamele edilmiştir. Muamele süreleri ekimden itibaren 24 saat sonra (A) ve 48 saat sonra (B) olmak üzere iki şekilde belirlenmiştir.

Buna göre;

A (24. saat / 48 saat muamele)

Normal ekim yapıldıktan 24 saat sonra 5 tane tüpe belirtilen maddeler eklenerek muamele edilmiştir. Tüplerin isimleri ve eklenen maddeler şöyledir.

<u>TÜP</u>	<u>EKLENEN MADDE</u>	<u>MİKTAR(μl)</u>
1. Normal kontrol	: HAM besiyeri	20
2. DMSO kontrol	: DMSO	20
3. A-1	: 1.Doç	20
4. A-2	: 2.Doç	20
5. A-3	: 3.Doç	20

B (48. Saat / 24 saat muamele)

Normal ekim yapıldıktan 48 saat sonra 5 tane tüpe belirtilen maddeler eklenerek muamele edilmiştir. Tüplerin isimleri ve eklenen maddeler şöyledir.

<u>TÜP</u>	<u>EKLENEN MADDE</u>	<u>MİKTAR(μl)</u>
1. Normal kontrol	: HAM besiyeri	20
2. DMSO kontrol	: DMSO	20
3. B-1	: 1.Doç	20
4. B-2	: 2.Doç	20
5. B-3	: 3.Doç	20

SÜRE →	24. SAAT	48.SAAT
EKLENEN MADDE↓	-A-	-B-
HAM BESİYERİ (NUTRİEN MIXTURE)	NORMAL KONTROL -A-	NORMAL KONTROL -B-
DMSO	DMSO KONTROL -A-	DMSO KONTROL -B-
1.DOZ (0,5 µg)	A-1	B-1
2.DOZ (1 µg)	A-2	B-2
3.DOZ (2 µg)	A-3	B-3

Tablo-1:Süre ve eklenen madde tablosuna göre tüpler

Kültür edilen ve oluşturulan tüplerin isimleri ve eklenen maddelerin tablosu yukarıdaki gibidir. Her bireye karşılık 10 adet tüp olup mevcut toplam tüp sayısı 40'tır.

3.2.4. Kromozomların elde edilme yöntemi

Bu çalışmada kromozomların elde edilmesi için makrokültür tekniğinin modifiye edilmiş şekli olan ve "mikrokültür" ya da "tüm kan tekniği" olarak bilinen lenfosit doku kültürü yöntemi uygulanmıştır(1,25). Çalışmanın uygulama aşamaları sırayla aşağıdaki gibidir.

- 1- Steril koşullarda hazırlanmış ve buzdolabında muhafaza edilmiş olan stok kültür solüsyonu kullanılacağı zaman buzdolabından çıkarıldı ve her bir kültür tüpüne steril ortamda 5 ml aktarıldı.
- 2- Heparinlenmiş, steril enjektör ile hastadan alınan venöz kandan kültür tüplerine 5 damla kan eklendi.
- 3- 2 damla fitohemaglutinin eklendikten sonra tüpün ağzı alevden geçirilerek kapatıldı ve 72 saatlik inkübasyon için etüve bırakıldı.
- 4- İnkübasyonun 70.45 saatinde kültüre iki damla (0.1 ml) colcemid eklendi ve tekrar etüve kondu.
- 5- 72. saatte etüvden çıkarılan kültür vortekslendikten sonra 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- 6- Süpernatant atıldıktan sonra pelet, vorteksle karıştırılarak üzerine 10 ml hipotonik solüsyon eklendi ve 10 dakika etüvde bekletildi
- 7- Tüpler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant atıldıktan sonra pelet vorteks yardımıyla karıştırılarak üzerine pastör pipetiyle 10 ml fiksatif eklendi.
- 8- Fiksatifle yıkama işlemi 3 defa tekrarlandı.
- 9- Son santrifüj işleminden sonra tüplerde yaklaşık 0,5 cc pelet bırakıldı.

10-Dip materyal pipetle iyice karıştırılır. Alkolde bekletilip temizlenmiş lamlara yaklaşık 30 cm yükseklikten 2-3 damla damlatılarak yayıldı.

11-Kurumaya bırakılmış preparatlar 3 gün etüvde 37 °C' de bekletilerek yaşlandırıldı(1,25).

Yukarda sıralanan işlemlere ek olarak hazırlanan dozlardaki çözeltiler ve kontrol grupları için eklenen diğer solüsyonlar belirtilen saatlerde (24. saat, 48.saat) belirtilen miktarda (20 μ l) mikropipet yardımıyla eklenmiştir. Maddelerin eklenmesi esnasında kültür tüpleri vortekslenerek iyice karışması sağlanmıştır.

3.2.5. Preparatların boyanması

Boyama yöntemi olarak giemsa düz boyama yöntemi kullanılmıştır. Düz boya için 95 ml distile suya 5 ml giemsa lösing eklenerek boya tamponu hazırlanmış ve 5 dakika boya tamponunda bekletilen preparatlar sudan geçirilerek kurumaya bırakılmışlardır.

3.2.6. Preparatların değerlendirilmesi

Mikroskop altında incelenen preparatlar ilk olarak daha önceden hazırlanmış forma işlenmiş ve kayıt altına alınmışlardır. İlk olarak (10X) büyütme objektif ile başlanarak olumlu metafazlar tespit edilmişlerdir. Daha sonra immersiyon objektifi (100X) ile incelenen metafazlar hazır durumdaki forma işlenmiş ve incelenmişlerdir. Gerekli değerlendirmeler yapılarak bulgular kayıt altına alınmıştır. Her bir doz için 50 metafaz olmak üzere toplamda 2000 metafaz incelenmiştir.

3.2.6. İstatiksel değerlendirme

Oluşturulan normal kontrol ve DMSO kontrol gruplarının sonuçları karşılaştırılmış ve elde edilen sonuçlar Student's t testine göre değerlendirilmiş ve anlamlı bulunmuştur. ($p<0.01$)

Ayrıca araştırma grubu sonuçları ile kontrol grubu sonuçlarının karşılaştırılmasında; iki bağımsız grubun oranını karşılaştıran t testi uygulanmış ve sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.01$)

Süre doz grupları elde edilen sonuçlarına göre değerlendirilmiş ve bu sonuçlar t testine göre anlamlı ve pozitif bulunmuştur. ($p<0.01$)

İSİM:

Uygulanan Kimyasal:

Kimyasalın Derişimi:

AŞAMA:

Denek No:

Uygulama Süresi:

Metafaz no	ŞARYO NUMARASI	İncelenen metafaz	Kromatid gap	izokromatid gap	Kromatid kırık	izokromatid kırık	Delesyon	Duplikasyon	Fragment	Endomitoz	Enderoduplikasyon	Assosiyon	Disentrik kromozom	Diğer düzensizlik
1														
2														
3														
4														
5														
6														
7														
8														
9														
10														
11														
12														
13														
14														
15														
16														
17														
18														
19														
20														
21														
22														
23														
24														
25														
TOPLAM														
Toplam metafaz														
Normal metafaz														
Düzensizlik içeren metafaz sayısı														
Mitotik indeks														

Tablo-2:İncelenen metafaz kayıt tablosu taslağı örneğı

4. BULGULAR

Araştırmada Tamiflu'nun kromozomlar üzerindeki etkilerini incelemek amacı ile 2 erkek ve 2 bayan hasta olmak üzere toplam 4 hastadan alınan venöz kan kùltüre edilerek kromozomlar elde edilmiş ve analizleri yapılmıştır.

Çalışmada 3 farklı doz kullanılmıştır bu dozlar;

1.DOZ: 0,5 $\mu\text{g/ml}$

2.DOZ: 1 $\mu\text{g/ml}$

3.DOZ: 2 $\mu\text{g/ml}$

Kullanılan bu dozlar belirlenen sürelerde kùltüre edilen kan tüplerine eklenerek uygulanmıştır bu uygulama süreleri;

24. Saat (48. Saatlik muamele) **-A-**

48. Saat (24. Saatlik muamele) **-B-**

Preparatların boyama yöntemi olarak Giemsa düz boya metodu kullanılmıştır. 5 dakikalık sürelerle hazırlanan Giemsa düz boya ile muamele edilen preparatlar sudan geçirilerek kurumaya bırakılmış ve ışık mikroskobu ile incelenerek daha önceden hazırlanan tabloya işlenmiştir.

Hazırlanan üç doza ek olarak solvent olarak kullanılan DMSO için ve normal kontrol için HAM besiyeri (Nutrien mixture) tüpleri hazırlanmıştır. Toplam tüp sayısı kontrol tüpleri ile 5 adettir. 24 ve 48 saatlik sürelerle beraber tüp sayısı 10'dur. Alınan 4 hastanın toplamı tüp sayısı 40'tır (4x10).

Her bir doz sayısı ve kontrol grubu için incelenen metafaz sayısı 200 adettir. 4 hasta için incelenen toplam metafaz sayısı 2000(10x200) adettir.

İncelemeler sayısal ve yapısal olarak yapılmıştır. Metafazlarda incelenen bulgular tek tek kayıt edilmiş ve oluşturulan tabloya işlenmiştir.

4.1.Kontrol ve doz grupları tüm sonuç tabloları

NORMAL KONTROL –A-			
	Sayı	%	Düzensiz kromozom çeşidi
Kromatid gap	2	1	2A
İzokromatid gap	-	-	
Kromatid kırık	12	6	8A-2B-2C
İzokromatid kırık	6	3	2A-2B-2C
Delesyon	-	-	-
Duplikasyon	-	-	-
Fragment	-	-	-
Endomitoz	-	-	-
Enderoduplikasyon	-	-	-
Satelit assosiyonu	8	4	
Disentrik krom.	2	1	2A
Diğer düzensizlikler	2	1	
Normal metafaz sayısı	168	84	
Düzensiz metafaz sayısı	32	16	
Toplam	200	100	

Tablo-3:"Normal kontrol düzensizlik grubu" tablosu.

KONTROL DMSO –A-			
	Sayı	%	Düzensiz kromozom çeşidi
Kromatid gap	-	-	
İzokromatid gap	4	2	4C
Kromatid kırık	16	8	4A-2B-10C
İzokromatid kırık	4	2	2B-2C
Delesyon	-	-	
Duplikasyon	-	-	
Fragment	-		
Endomitoz	-	-	
Enderoduplikasyon	-	-	
Satelit assosiyonu	10	5	
Disentrik krom.	2	1	2A
Diğer düzensizlikler	4	2	
Normal metafaz sayısı	160	80	
Düzensiz metafaz sayısı	40	20	
Toplam	200	100	

Tablo-4: Kontrol DMSO düzensizlik tablosu

-A- 1			
	Sayı	%	Düzensiz kromozom çeşidi
Kromatid gap	8	4	4C-4B
İzokromatid gap	2	1	2C
Kromatid kırık	26	13	18C-4B-4A
İzokromatid kırık	-	-	
Delesyon	2	1	2C
Duplikasyon	-	-	
Fragment	-	-	
Endomitoz	-	-	
Enderoduplikasyon	-	-	
Satelit assosiyonu	10	5	
Disentrik krom.	2	1	1A-1B
Diğer düzensizlikler	6	3	
Normal metafaz sayısı	144	72	
Düzensiz metafaz sayısı	56	28	
Toplam	200	100	

Tablo 5:A-1 düzensizlik tablosu

-A- 2			
	Sayı	%	Düzensiz kromozom çeşidi
Kromatid gap	12	6	10B-2A
İzokromatid gap	-	-	
Kromatid kırık	18	9	8A-2B-8C
İzokromatid kırık	2	1	2B
Delesyon	10	5	6C-4B
Duplikasyon	-	-	
Fragment	-	-	
Endomitoz	-	-	
Enderoduplikasyon	-	-	
Satelit assosiyonu	10	5	
Disentrik krom.	-	-	
Diğer düzensizlikler	12	6	
Normal metafaz sayısı	136	68	
Düzensiz metafaz sayısı	64	32	
Toplam	200	100	

Tablo 6: A-2 düzensizlik tablosu

-A- 3			
	Sayı	%	Düzensiz kromozom çeşidi
Kromatid gap	2	1	2C
İzokromatid gap	2	1	2C
Kromatid kırık	30	15	16A-12C-2B
İzokromatid kırık	12	6	4A-4B-2C-2X
Delesyon	4	2	2B-2C
Duplikasyon	2	1	2A
Fragment	-	-	
Endomitoz	2	1	
Enderoduplikasyon	-	-	
Satelit assosiyonu	20	10	
Disentrik krom.	-	-	
Diğer düzensizlikler	6	3	
Normal metafaz sayısı	120	60	
Düzensiz metafaz sayısı	80	40	
Toplam	200	100	

Tablo 7: A-3 düzensizlik tablosu

NORMAL KONTROL -B-			
	Sayı	%	Düzensiz kromozom çeşidi
Kromatid gap	-	-	
İzokromatid gap	-	-	
Kromatid kırık	14	7	6B-6C-2A
İzokromatid kırık	4	2	4A
Delesyon	-	-	
Duplikasyon	-	-	
Fragment	-	-	
Endomitoz	-	-	
Enderoduplikasyon	-	-	
Satelit assosiyonu	6	3	
Disentrik krom.	2	1	2C
Diğer düzensizlikler	2	1	
Normal metafaz sayısı	172	86	
Düzensiz metafaz sayısı	28	14	
Toplam	200	100	

Tablo 8: Normal kontrol -B- düzensizlik tablosu

DMSO KONROL-B-			
	Sayı	%	Düzensiz kromozom çeşidi
Kromatid gap	8	4	6C-2B
İzokromatid gap	-	-	
Kromatid kırık	8	4	2A-6C
İzokromatid kırık	4	2	2A-2B
Delesyon	-	-	
Duplikasyon	-	-	
Fragment	-	-	
Endomitoz	-	-	
Enderoduplikasyon	-	-	
Satelit assosiyonu	10	5	
Disentrik krom.	2	1	2A
Diğer düzensizlikler	6	3	
Normal metafaz sayısı	162	81	
Düzensiz metafaz sayısı	38	19	
Toplam	200	100	

Tablo 9: DMSO kontrol –B- tablosu

B -1-			
	Sayı	%	Düzensiz kromozom çeşidi
Kromatid gap	4	2	2C-2B
İzokromatid gap	-	-	
Kromatid kırık	26	13	10B-6A-10C
İzokromatid kırık	2	1	2C
Delesyon	2	1	2C
Duplikasyon	-	-	
Fragment	-	-	
Endomitoz	-	-	
Enderoduplikasyon	-	-	
Satelit assosiyonu	4	2	
Disentrik krom.	2	1	2B
Diğer düzensizlikler	4	2	
Normal metafaz sayısı	166	83	
Düzensiz metafaz sayısı	44	22	
Toplam	200	100	

Tablo 10: B-1 düzensizlik tablosu

B -2-			
	Sayı	%	Düzensiz kromozom çeşidi
Kromatid gap	2	1	2B
İzokromatid gap	-	-	
Kromatid kırık	22	11	14C-4A-4B
İzokromatid kırık	-	-	
Delesyon	2	1	2B
Duplikasyon	-	-	
Fragment	-	-	
Endomitoz	-	-	
Enderoduplikasyon	-	-	
Satelit assosiyonu	6	3	
Disentrik krom.	10	5	4C-4B-2A
Diğer düzensizlikler	10	5	
Normal metafaz sayısı	148	74	
Düzensiz metafaz sayısı	52	26	
Toplam	200	100	

Tablo 11: B-2 düzensizlik tablosu

B -3-			
	Sayı	%	Düzensiz kromozom çeşidi
Kromatid gap	-	-	
İzokromatid gap	-	-	
Kromatid kırık	26	13	16C-10B
İzokromatid kırık	4	2	4A
Delesyon	6	3	2C-2A-2B
Duplikasyon	-	-	
Fragment	-	-	
Endomitoz	-	-	
Enderoduplikasyon	-	-	
Satelit assosiyonu	2	1	
Disentrik krom.	8	4	6B-2C
Diğer düzensizlikler	16	8	
Normal metafaz sayısı	138	69	
Düzensiz metafaz sayısı	62	31	
Toplam	200	100	

Tablo 12: B-3 düzensizlik tablosu

Yukarda verilen tablolar kontrol ve doz gruplarının düzensizliğini ve tespit edilen düzensizlik çeşitlerini göstermektedir.

Düzensizlik tipleri ve düzensizliklerin yüzde oranları tablolarda verilmiştir.

Diğer kromozom kırıkları adı altında verilen düzensizlikleri çoklu kırıklar, çoklu gaplar ve tabloda belirtilmemiş olan diğer kromozom aberasyonları oluşturmaktadır.

Kromozom kırıklarının ve gapların genel dağılımı fazla olmakla birlikte doz ve muamele saati ile doğru orantı gözlenmiştir.

Düzensizlik içeren kromozom grupları genellikle A-B ve C grupları olup bu düzensizliklerin tespiti kromozom boyutlarının büyük olması ve düzensizlik nedenlerinin net olmasından dolayı kolay bir şekilde yapılabilmektedir.

Düzensizlik çeşitlerinin çoğu kırık ve gap tipi düzensizliktir. Ayrıca delesyon tipi düzensizlikler de tespit edilmiş fakat yüzde olarak fazla yüksek olmadığı saptanmıştır.

Düzensizlik tipleri genellikle yapısal düzeyde olup sayısal düzensizlik tipi de mevcuttur. Fakat bu sayısal düzensizlik tiplerinin göz ardı edilecek kadar az olduğu görülmüştür.

4.2. Düzensizliklerin dozlara göre incelenmesi (süre sabit)

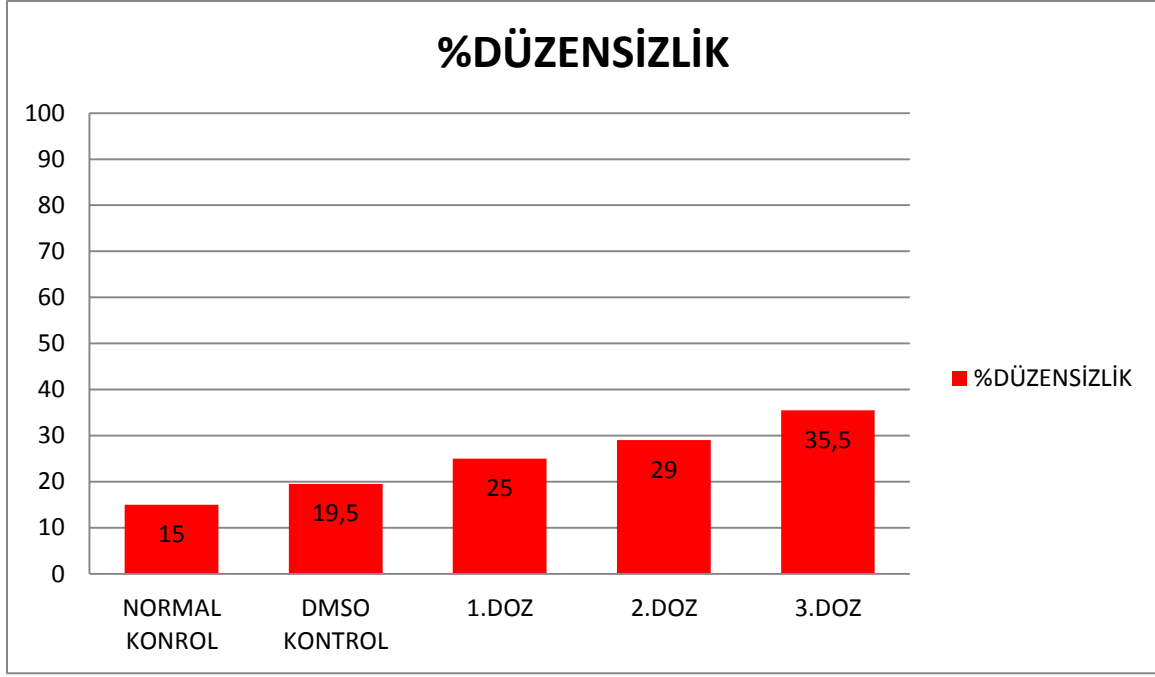
Çalışmada üç doz kullanılmış ve bunlara ek olarak kontrol dozları oluşturulmuştur. Bu dozlar sırası ile 0,5-1ve 2 $\mu\text{g/ml}$ 'dir. Bu dozlara ait düzensizlik tipleri ve % miktarları aşağıdaki gibidir.

	Normal kontrol	DMSO kontrol	1.DOZ(0,5)	2.DOZ(1)	3.DOZ(2)
İncelenen metafaz sayısı	400	400	400	400	400
Normal metafaz sayısı	340	322	300	284	258
Düzensizlik içeren metafaz sayısı	60	78	100	116	142
Düzensiz metafaz %	15	19,5	25	29	35,5

Tablo 13: Düzensizlik-doz tablosu (süre sabit)

Doz gruplarındaki düzensizliklerin dağılımı yukarıda verilmiştir. Buna göre doz miktarı artıkça düzensizlik sayısında paralel bir artış gözlenmiştir. Buna bağlı olarak düzensiz metafaz sayısında da bir artış gözlenmiştir. Kontrol gruplarındaki düzensiz metafaz sayısı en düşük doz grubundan daha düşükken en yüksek doz grubundaki düzensizlik sayısı ileri derecelerde ve fazla miktarda tespit edilmiştir (%35'in daha üstünde).

Sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda doz iki katına çıkarıldığı takdirde kromozom düzensizlikleri de bu artıştan %5 civarında bir artışla etkilendiği tespit edilmiştir. Doz gruplarına ait grafik aşağıda verilmiştir;



Grafik 1: Doz ve kontrol gruplarının % düzensizlik miktarı (süre sabit)

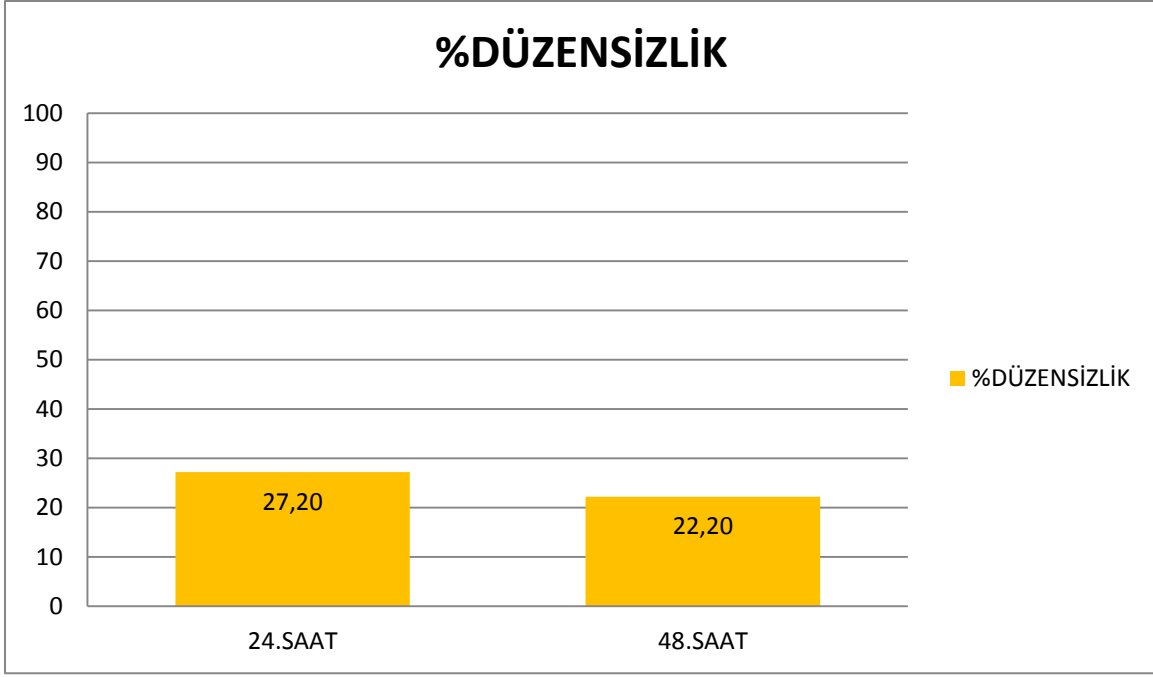
4.3. Düzensizliklerin süreye göre incelenmesi (dozlar sabit)

Çalışmada belirlenen süreler 24. Saat ve 48. Saat olmak üzere iki tanedir. Hazırlanan dozlar ve kontrol dozları belirlenen iki süre diliminde çalışmaya uygulanmıştır. Veri tablosu aşağıdaki gibidir.

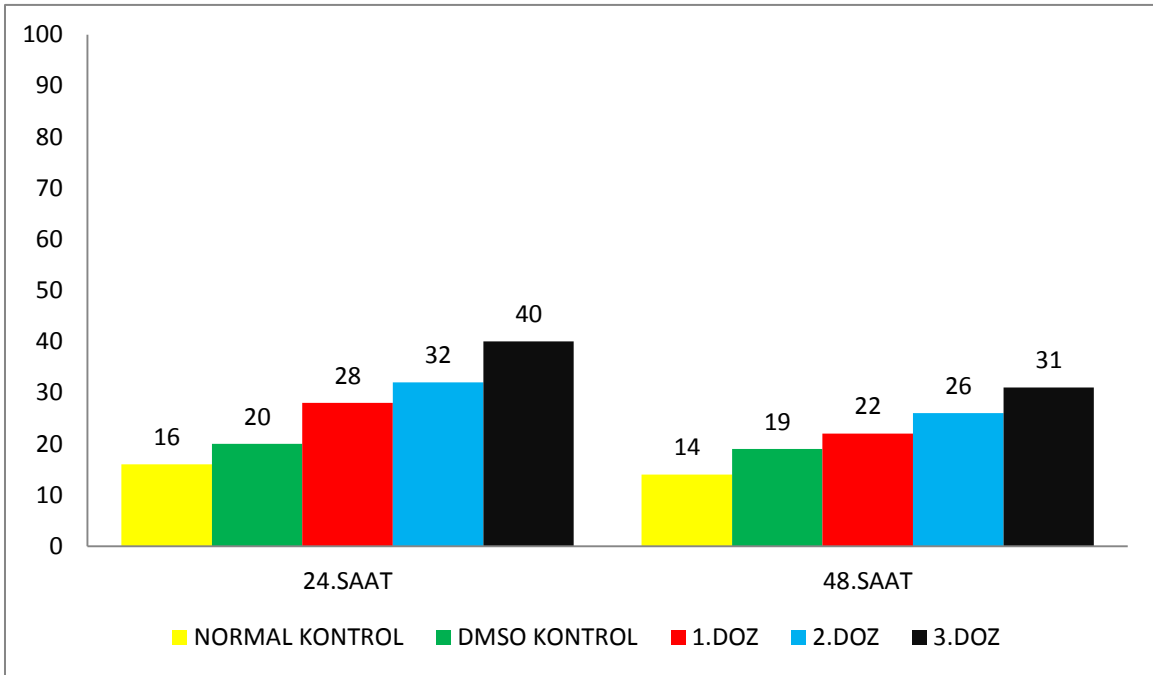
	24.SAAT	48.SAAT
İncelenen metafaz sayısı	1000	1000
Normal metafaz sayısı	728	778
Düzensizlik içeren metafaz sayısı	272	222
Düzensizlik içeren metafaz %	27,2	22,2

Tablo 14: Düzensizlik-süre tablosu(doz sabit)

Yukardaki tabloya göre doz ve kontrol gruplarının uygulama sürelerine bağlı olarak düzensizlik sayısında da bir artış belirlenmiştir. 48 saat muamele gören metafazlardan 272 tanesinde düzensizlik saptanırken, 24 saat muamele gören metafazlarda bu sayı 222'ye düşmüştür. Net düşüş %5 olarak hesaplanmıştır.



Grafik 2: Sürelere bağlı % düzensizlik (doz sabit)



Grafik 3: Tüm doz gruplarının genel (zaman faktörüne bağlı) % düzensizlik grafiği

Grafiklerde de görüldüğü gibi doz miktarları-süre ve % düzensizlik arasında doğru orantılı bir periyodik artış tespit edilmiştir.

4.4. A-grubu (24.saat) düzensizlik analiz tablosu

	Sayı	%
Kromatid gap	24	2,4
İzokromatid gap	8	0,8
Kromatid kırık	102	10,2
İzokromatid kırık	24	2,4
Delesyon	16	1,6
Duplikasyon	2	0,2
Fragment	-	-
Endomitoz	2	0,2
Enderoduplikasyon	-	-
Satelit assosiyonu	58	5,8
Disentrik krom.	6	0,6
Diğer düzensizlikler	30	3
Normal metafaz sayısı	728	72,8
Düzensiz metafaz sayısı	272	27,2
Toplam	1000	100

Tablo 15: A-grubu (24.saat) düzensizlik analiz tablosu

4.4. B-grubu (48.saat) düzensizlik analiz tablosu

	Sayı	%
Kromatid gap	14	1,4
İzokromatid gap	-	-
Kromatid kırık	96	9,6
İzokromatid kırık	14	1,4
Delesyon	10	1
Duplikasyon	-	-
Fragment	-	-
Endomitoz	-	-
Enderoduplikasyon	-	-
Satelit assosiyonu	28	2,8
Disentrik krom.	24	2,4
Diğer düzensizlikler	38	3,8
Normal metafaz sayısı	766	76,6
Düzensiz metafaz sayısı	224	22,4
Toplam	1000	100

Tablo 16: B-grubu (48.saat) düzensizlik analiz tablosu

Düzensizliklerin dozlar sabit tutularak sürelerle göre dağılımı veren tablolar yukardadır. Tablolara göre kırık sayısı ve gap'lar çok gözlenirken, duplikasyonlar yok denecek kadar az miktarda saptanmıştır.(Yapısal düzensizlikler çok görülürken sayısal düzensizlik yok denecek kadar düşük miktarda.)

Satelit assosiasyonu miktarı da önemli derecede ve yüksek miktarda tespit edilmiştir. Görülen kırık ve gap tipleri genellikle A-B ve C gruplarına ait olup X kromozomuna ait olanlara da rastlanmaktadır.

4.5. Kromozom düzensizliklerinin doz –süre ve gruplara göre sonuçları

I-Süreye bağlı sonuçlar

A)24.Saat (A Grubu)

Bu doz süresinde uygulanan maddeler ve dozlar kültürden sonra 24.saat itibarı ile eklenmiş ve kromozomlar 48 saat etken madde ve kontrol dozlarına maruz bırakılmıştır.

A süresi olarak adlandırılan bu süre grubunda düzensizliklerin yüzdesi %27.20'dir.

B)48.Saat (B Grubu)

Bu doz süresinin uygulama süresi kültür başlangıcından itibaren 48.saat olarak tespit edilmiştir. Kromozomlar doz ve kontrol maddelerine 24 saat maruz bırakılmıştır.

B süresindeki düzensizlik yüzdesi %22.20'dir

Bütün bu bulgular göz önüne alındığında etken madde ve kontrol maddelerinin muamele süreleri artıkça düzensizlik sayısında da bir artış gözlenmiştir.

II-Doza bağlı sonuçlar

1.Normal kontrol doz grubu

Normal kontrol doz grubunda eklenen ilaç ve DMSO etkilerini incelemek amacıyla aynı sürede HAM besiyeri (Nutrient mixture) katılmış ve sonuçları kontrollü bir şekilde kayıt altına alınmıştır. Düzensizlikler %15 olup bu düzensizliklerin genellikle kırık ve gap şeklindeki düzensizliklerden oluştuğu gözlenmiştir.

2.DMSO kontrol grubu

Bu kontrol grubu tamiflunun solventi olan DMSO etkisini incelemek amacı ile oluşturulmuştur. Bu gruptaki düzensizlik oranı %19,5 olup normal doz ve 1.Doiz arasındadır. Diğer gruplarda gözlenen kromozomal anomaliler bu gruptaki ile aynı olmakla beraber satelit assosiasyonu artışı gözlenmiştir.

3.Doiz-1- grubu

Tamiflunun ilk doz grubudur. Bu miktar 0,5 μ g/ml olarak uygulanmıştır. İlk ve düşük doz olmasına rağmen kontrol gruplarına nazaran daha yüksek sayıda düzensizlik saptanmıştır. Toplam düzensizlik yüzdesi %25 olarak hesaplanmıştır.

4.Doiz-2- grubu

İkinci doz grubunun doz miktarı 1 μ g/ml'dir. Bu doz grubunun kromozom düzensizlik yüzdesi %29 olarak saptanmıştır. Delesyon ve çoklu kırık yüzdelerinin artış tespit edilmiştir.

5.Doiz-3- grubu

Son olarak uygulanan doz grubunun etken madde miktarı 2 μ g/ml'dir. Saptanan düzensizlik sayılarının en yüksek olduğu gruptur. Düzensizlikler %35,5 ile en yüksek değerine ulaşmışlardır. Delesyon ve çoklu kırık artışının yüksek olarak gözleendiği gruptur.

III-Kromozom gruplarına bağlı sonuçlar

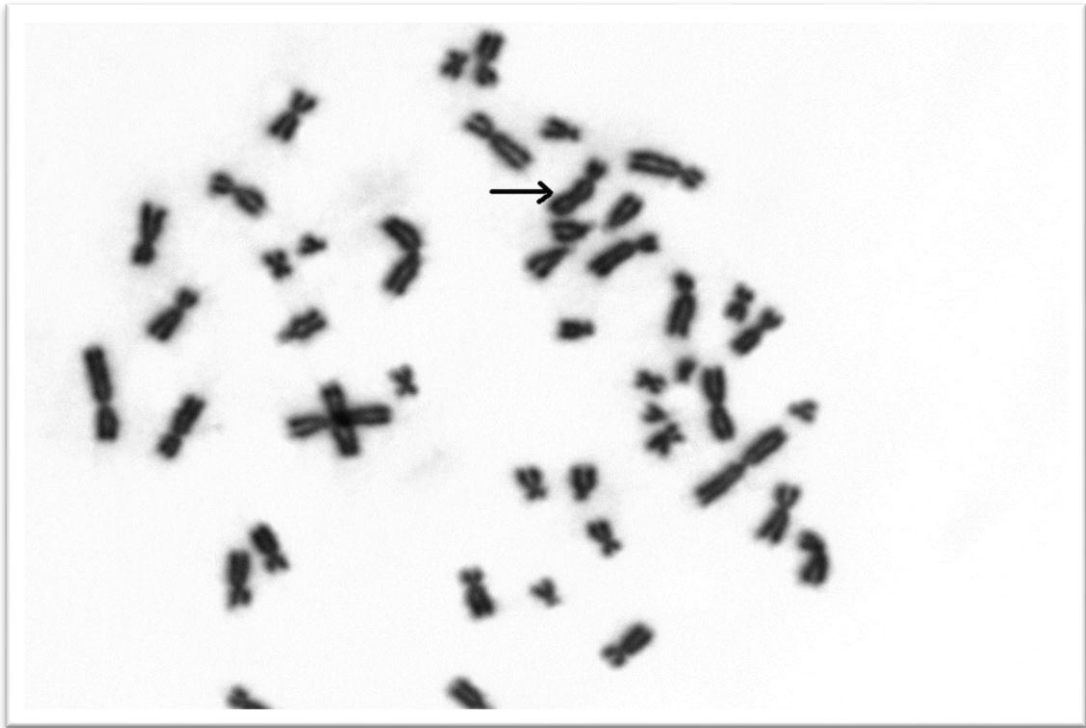
Doiz gruplarında tespit edilen düzensizliklerin geneli daha uzun boydaki kromozomlarda tespit edilmiştir. Bu kromozomların boylarının daha uzun olması düzensizlik tespitini kolaylaştıran bir etkidir.

Düzensizlikler genellikle A-B ve C grubu kromozomlarında görülmüştür. Ayrıca buna ek olarak ender de olsa X kromozomunda da düzensizliklere rastlanmıştır.

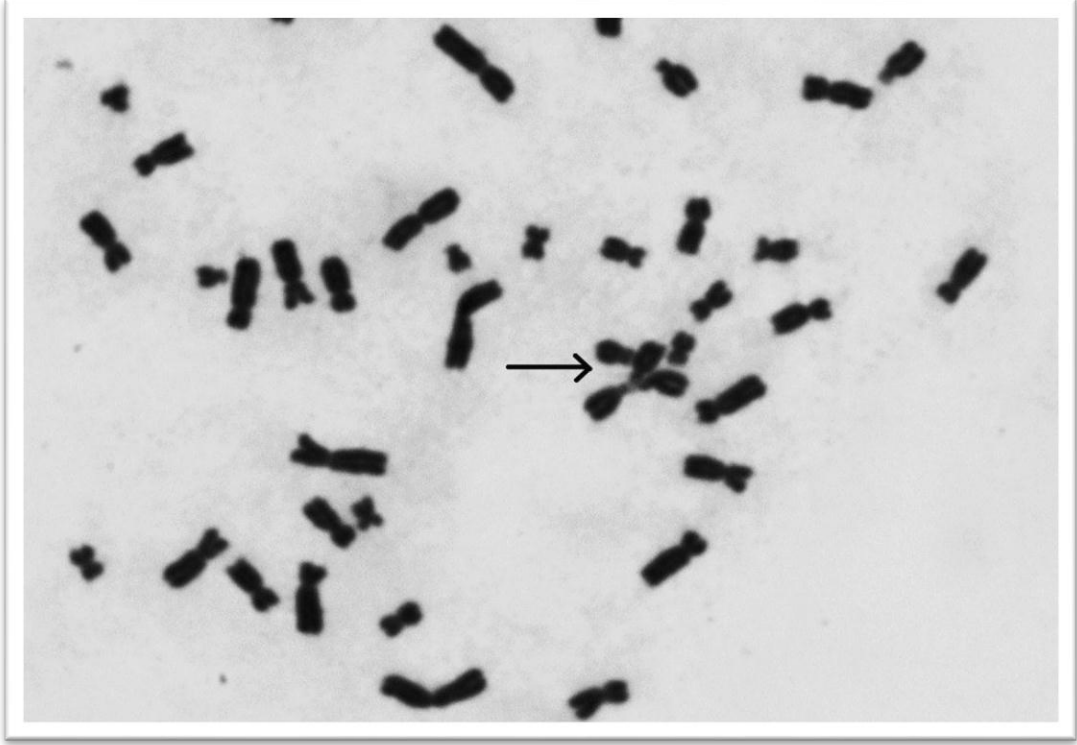
Görülen düzensizliklerin bazıları aşağıda resimlerde gösterilmektedir.



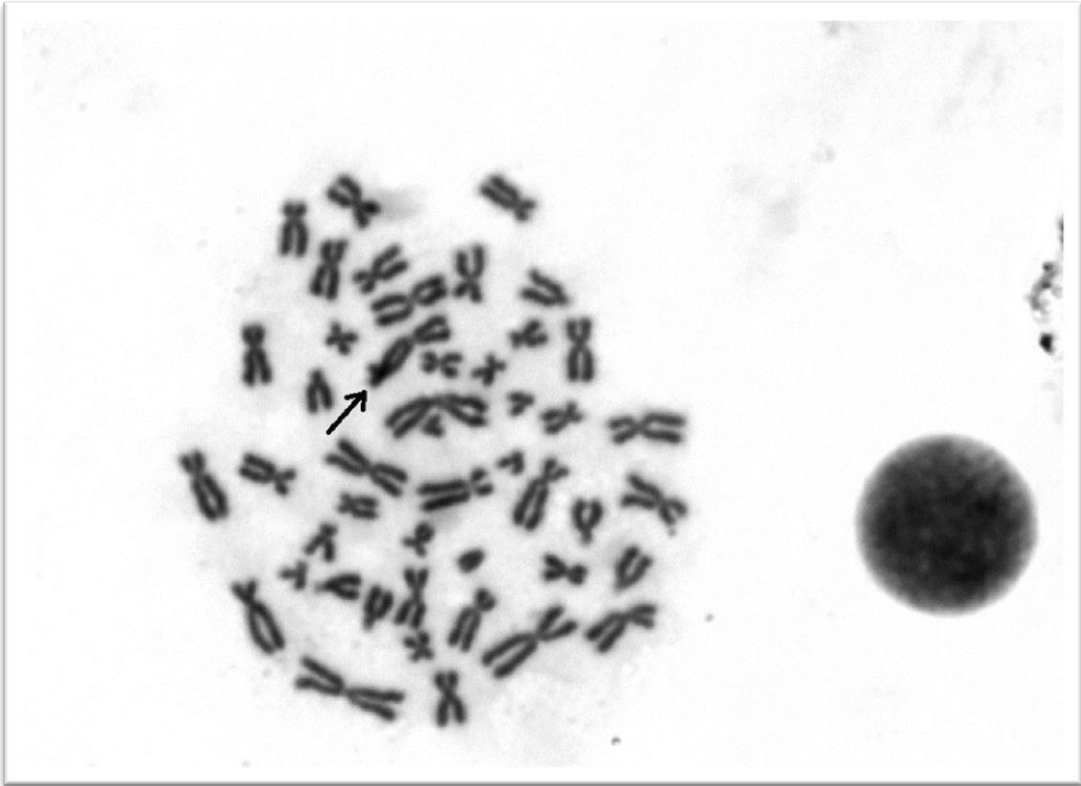
Şekil-5:Delesyon



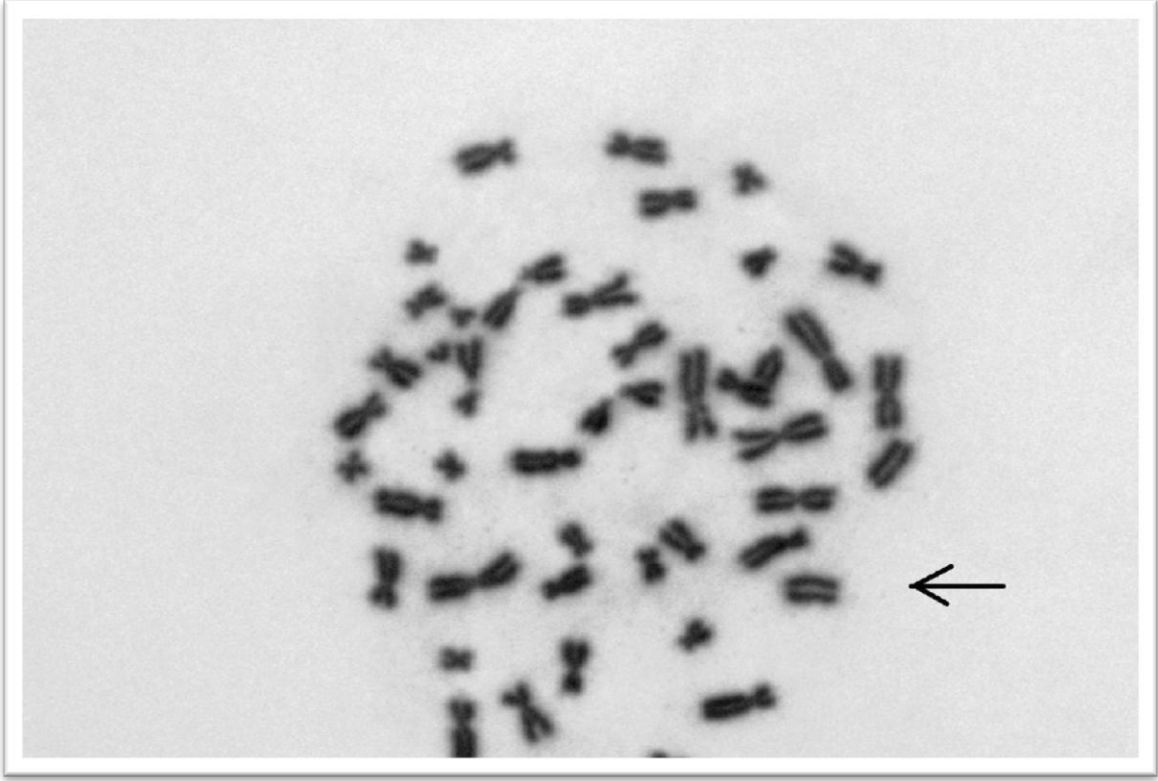
Şekil-6:İzokromatid kırık



Şekil-7:Satelit assosiasyonu



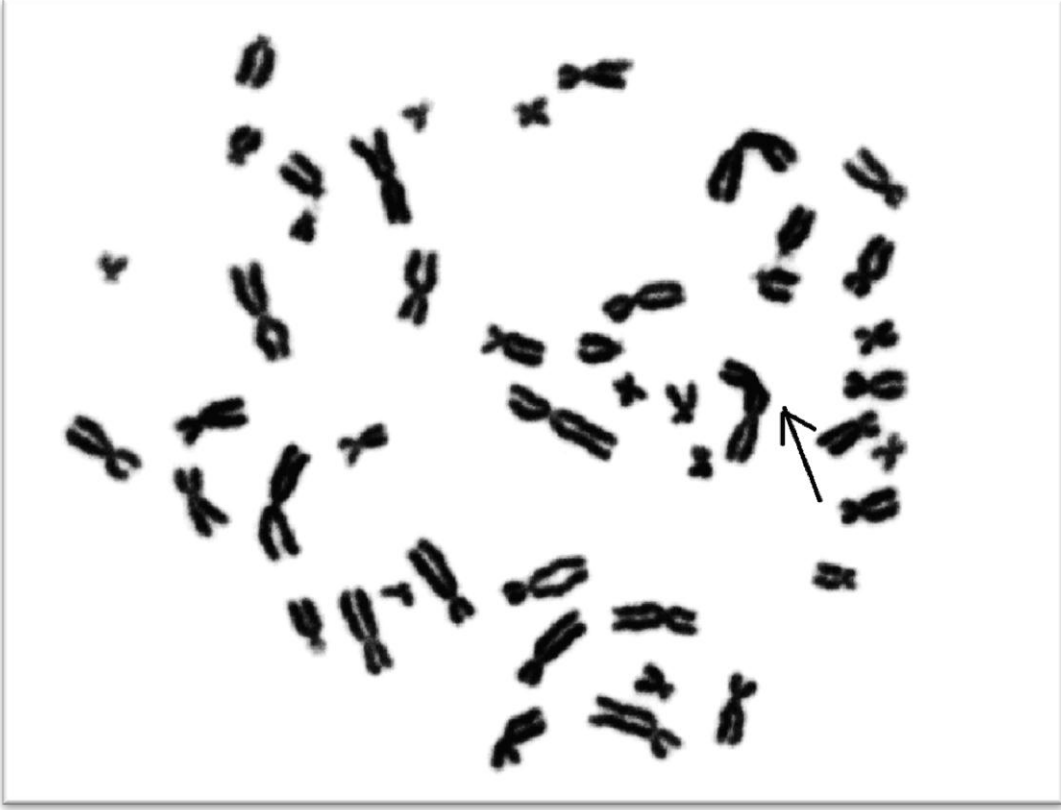
Şekil-8:Disentrik kromozom



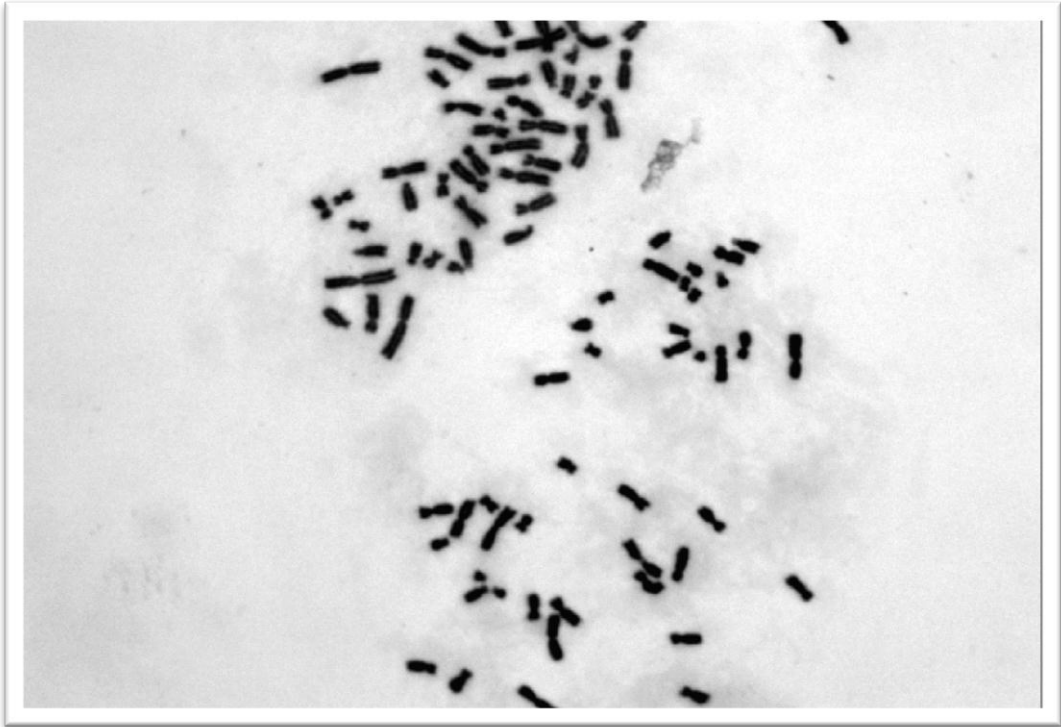
Şekil-9: Asentrik kromozom



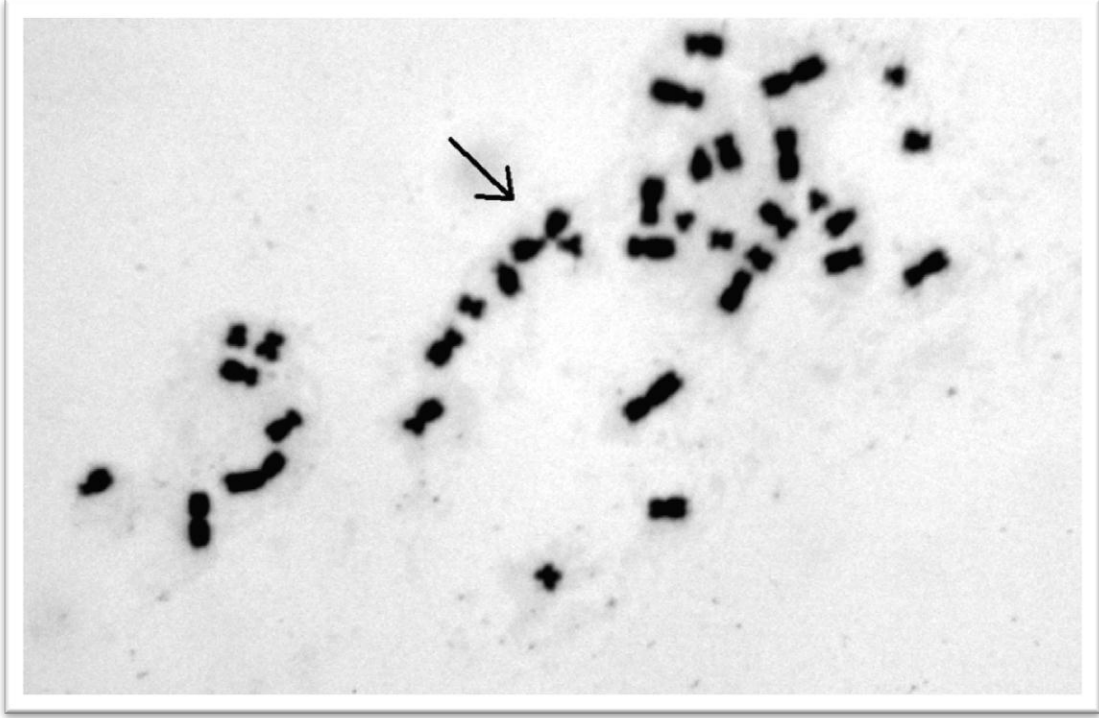
Şekil-10: Kromatid Gap



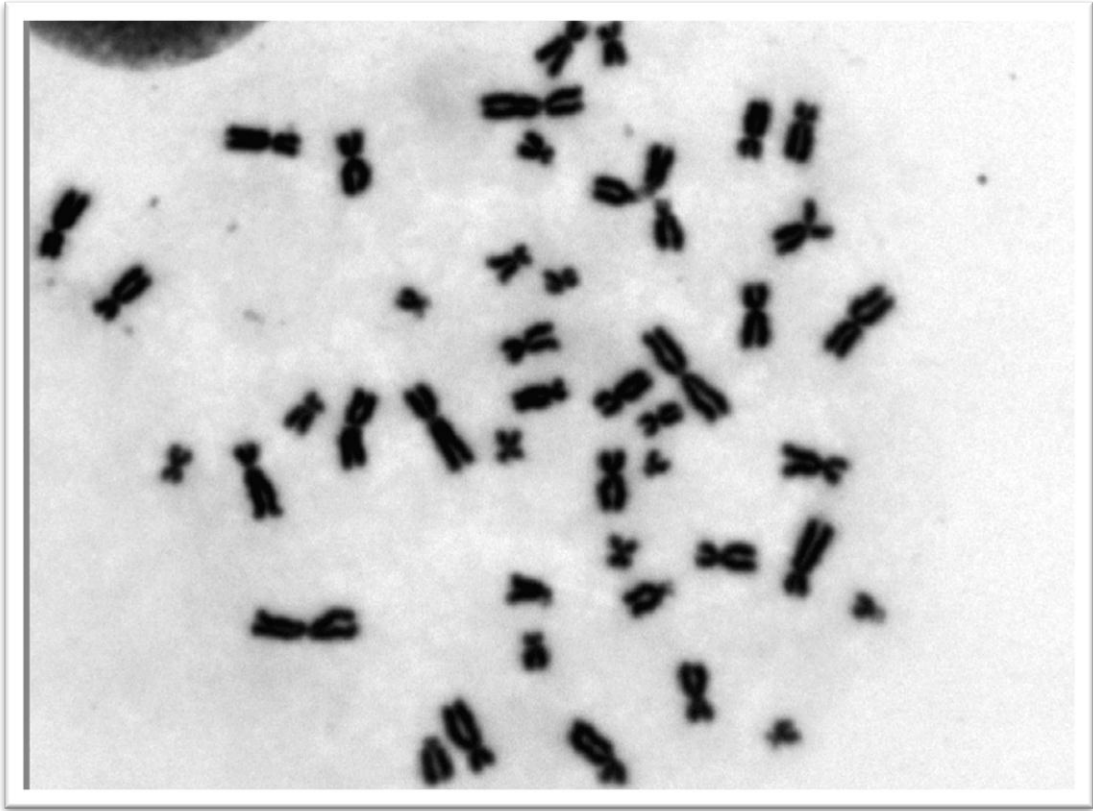
Şekil-11: İzokromatid Kırık



Şekil-12: Poliploid Hücre



Şekil-13: Satelit assosiasyonu



Şekil-14: Çoklu düzensizlik gösteren hücre

5.TARTIŞMA

Çalışmada oluşturulan 3 farklı doz 2 farklı süre kombinasyonu ile mevcut olan istatistik ve literatür kuralları çerçevesinde değerlendirilmiş ve sonuçları kayıt altına alınmıştır.

5.1.Sayısal kromozom düzensizlikleri

Yapılan çalışmalarda tespit edilen bütün kromozom aberasyonları oluşturulan tablolara titizlikle işlenmiş ve kayıt altına alınmıştır.

Buna göre sayısal kromozom düzensizlikleri göz ardı edilecek kadar düşük seviyelerde tespit edilmiştir. Oluşturulan doz grupları süre kombinasyonları ile karşılaştırılarak göz önünde bulundurulduğunda tespit edilen endomitoz sayısı 2'dir.

Diğer kromozom düzensizlikleri adı altında kaydedilen düzensizlikler dikkate alındığında bu sayı %1 civarındadır.

Daha önce diğer bir antiviral olan Asiklovir ile yapılan *in vivo* fare dominant letal çalışmasında (sıçan ve Chinese hamster kemik iliği hücrelerinde) maksimum tolere edilen doz ile herhangi sayısal aberasyon saptanmamış (27) olup bu sonuçlar çalışmamızı kısmen desteklemektedir.

5.2.Yapısal kromozom düzensizlikleri

Sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda yapısal kromozom düzensizlikleri % olarak yüksek seviyelerde tespit edilmiştir.

Kontrol grubundaki düzensizlik oranı normal kontrol grubunda %15, DMSO kontrol grubunda ise %19,5 tir. Bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda DMSO düzensizlik üzerinde artırıcı bir etkisi olduğu gözlenmiştir.

Elde edilen bu sonuçlar bir antiviral ajan olan oseltamivir ile önceden yapılmış çalışmalarla kıyaslandığında kısmen birebir ve örtüşen sonuçlar ve bulgular elde edilmiş olup aşağıdaki çıkarımlara varılmıştır.

Daha önce Tamiflu'nun kardeş kromatid değişimi (KDD) ve kromozom anomalileri (KA) üzerine etkilerini inceleyen çalışmalarda doz gruplarının bu faktörlerin yanında genotoksik ve sitotoksik etkisinin de olduğu tespit edilmiştir. (7)

Test maddemiz olan Tamiflu insan periferal kan lenfositlerinde metabolik aktivatör bulunmayan ortamda KKD'yi doza bağlı olarak artırmış, ancak bu artış sadece üç muamelede istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Bir kimyasalın metabolik aktivatör varlığında mutajenitesinin artması, o kimyasalın olası *in vivo* mutajenitesi ya da promutajenitesi (indirekt mutajenite) için bir belirteçtir. Metabolik aktivatör bulunan ortamda ise yine doza bağlı bir artış gözlenmiş, ancak bir konsantrasyonda istatistiksel olarak önemli artış bulunmuştur. (7)

Bunun yanında oseltamivir ile ilgili çalışma sayısının azlığı literatür karşılaştırmasını zorlaştırmaktadır. Fakat diğer antiviral ajanlar ile yapılan çalışmalar ile ilgili çalışmalar ve sonuçları kısmen aşağıdaki gibidir.

Sentetik bir antiviral ajan olan ribavirinin (1-beta-D- ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) dominant letal etkisini sıçanlarda çalışılmıştır. İlaç sıçanlara 50, 100 ve 2000 mg/kg/gün konsantrasyonlarında 5 gün boyunca intraperitoneal yolla verilmiştir. Erkek sıçanlar dişi sıçan kümeleriyle ardışık 8 hafta iftleştirilmiştir. Çalışma sonunda ribavirinin sıçanlarda dominant letal deneylerinde gösterilebilir herhangi bir mutajenik potansiyelden yoksun olduğunu bildirmişlerdir (28).

Başka bir çalışmada ribavirinin etkinliği *in vitro* tam kan kültüründe sitokinez bloklama yöntemiyle mikronukleus deneyi sayesinde değerlendirilmiştir, sonuç olarak ribavirinin mikronukleusu indüklemeye oldukça düşük bir gücünün olduğu, ancak hücrel proliferasyonu geciktirdiği belirtilmiştir (29).

Benzer bir çalışmada ribavirin erkek wistar sıçanlarının spermelerinde baş ve kuyruk anomalisini indüklemiş ve sıçan germ hücrelerinde mutajenik olduğu rapor edilmiştir (30).

Başka bir çalışmada ribavirin ile sıçan kemik iliğinde mikronukleus çalışmasında bu antiviralin genotoksik ve sitotoksik olduğunu saptanmıştır (30).

Yine Joksic ve ark. vitamin B12'nin ribavirinin indüklediği; nükleotidlerin de novo (yeni baştan) senteziyle ilgili olarak ortaya çıkan genotoksisiteyi azalttığını bildirmişlerdir (29).

Tatar ve ark. (2005) ise Kırım-Kongo kanamalı ateşi olan 3 hastada ribavirinin *in vivo* genotoksisitesini incelemişlerdir. Hastalardan kan örnekleri tedavi esnasında alınmış ve mikronukleus ve kardeş kromatid değişimi testi yapılmıştır. Terapi esnasında elde edilen sonuçlarla terapiden bir ay sonraki sonuçlar karşılaştırıldığında, terapi sırasındaki MN ve KKD'lerin sonrakilere oranla daha yüksek bulunduğu belirtilmiş ve bu sonuçlara göre ribavirinin reversibl *in vivo* genotoksik etkiye sahip olduğu vurgulanmıştır (31).

Thust ve ark. fare ovaryum hücrelerinde asiklovir ve gansiklovirin KA ve KKD indükleyicisi olduğunu bulmalarına karşılık pensiklovirin genotoksik aktiviteden yoksun olduğunu bulmuşlardır (32).

Ayers zidovudin ile yaptığı *in vivo* (sıçan ve fare) ve *in vitro* (kültüre edilmiş insan lenfositleri) testlerde ilacın (3 µg/ml) kültüre edilmiş insan periferik lenfositlerinde KA'lara yol açtığını ancak sıçan kemik iliği hücrelerinde 100 mg/kg'lık konsantrasyonda KA'lara yol açmadığını bulmuştur (33).

Bayram ve Topaktaş tarafından lamivudinin, kültüre edilmiş insan periferik lenfositlerindeki KKD'yi 24 saatte en yüksek konsantrasyonda ve 48 saatte 125 ve 150 µg/ml'de önemli seviyede artırdığını saptamışlardır ayrıca 100, 125 ve 150 µg/ml lamivudinin yapısal kromozomal aberasyonları artırdığı bildirilmiştir. Bu sonuçlar bizim sonuçlara güçlü benzerlikler göstermektedir (34).

Çalışmada kromozom düzensizlikleri sayısal ve yapısal olarak incelenmiş ve literatür bilgileri ışığında değerlendirilmiştir. Mevcut antiviral ajanlar içerisindeki çalışmalar dikkate alındığında tamiflunun etken maddesi olan oseltamivir ile ilgili çalışma sayısının azlığı karşılaştırmayı zorlaştırmıştır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmanın genel amacı Tamiflu ilacının etken maddesi olan “Oseltamivir’in” kromozomal düzensizliklere olan etkisinin araştırılmasına yöneliktir.

Çalışmada uygulanan etken maddelerin kontrolüne yönelik kontrol grupları oluşturulmuş ve bu kontrol gruplarının süre etkileşimi de göz önünde bulundurulmuştur.

Çalışmadaki düzensizlik yüzdelerinin hem doz grupları hem de süre grupları için önemli olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara bağlı olarak doz miktarının artırılmasının düzensizlik üzerinde pozitif bir etkiye sebep olarak aberasyon miktarını artırdığı gözlenmiştir($p<0.01$).

Süre gruplarının sonuçlarına bağlı olarak etken madde uygulama süresinin artırılmasına paralel olarak yine aberasyon miktarında bir artış görülmüştür ($p<0.01$).

Yapılan istatistiksel incelemelerde doz grupları ve süre gruplarına bağlı olarak artış gösteren düzensizlik miktarının anlamlı olduğu hesaplanmıştır. ($p<0.01$)

Tamiflu'nun solventi olan DMSO ile oluşturulan kontrol grubu ve normal kontrol grubu arasındaki düzensizlik farkının istatistiksel sonucu da anlamlı olarak hesaplanmış ve DMSO maddesinin düzensizlik miktarını artırdığı görülmüştür. ($p<0.01$).

Metafaz sayısında herhangi bir artma veya azalma gözlenmemiştir. Bu sonuç süre periyotlarına bağlı ilave edilen doz gruplarının mitotik indeks üzerinde pozitif veya negatif bir etkisinin olmadığı kanısını güçlendirmiştir.

Doz miktarının artırılmasına bağlı olarak kromozomal düzensizlik sayısında bir artış gözlenmiştir.

Muamele süresine uzunluğuna bağlı bir düzensizlik artışı söz konusudur. Bu düzensizliklerin genel etki mekanizmaları A-B-C ve X grubu kromozomları olarak tespit edilmiştir.

Tüm bu değerlendirme ve bulguların ışığında Tamiflu'nun uzun süreli ve yüksek dozlarda kullanılmasının kromozomlar üzerinde negatif bir etkiye sebep olduğu ve çeşitli kromozom aberasyonlarının oluşumunu tetiklediği gözlemlenmiştir. Bunun

yanında oluşan kromozom düzensizliklerinin süre ve doz miktarının yanında diğer etmenlerden kaynaklanıp kaynaklanmadığı gerçeği, belirsizliğini korumaktadır.

KAYNAKÇA

1. **Başaran, N.** *Tıbbi Genetik*. İstanbul : 8.Baskı. Nobel Tıp Kitabevi, 1999.
2. **Oral, D.** *Sigara Tiryakilerinde Bleomycin'nin Kromozomal Düzensizliklere Etkisi (Yüksek Lisans Tezi)*. Diyarbakır : Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1997.
3. **Gözükara, E.** *Biyokimya, 426-502,*. Ankara : s.n., 1990.
4. **Tümer, Ö.** *Gen kehaneti ile belirlenen insanın kaderi*. s.l. : Cumhuriyet Bilim Teknik, 1993.
5. *Genom Ne Söylüyor.* **Çırakoğlu, B.** Mayıs, İstanbul : Tübitak yayınları, 2001.
6. **Ustaçelebi, Ş.** *Moleküler, klinik ve tanısal Viroloji*. Ankara : Güneş Basım, 2004. 389.
7. **İlhan, A.** *Tamiflu'nun insan periferel lenfositlerinde in vitro genotoksik ve sitotoksik etkileri(yüksek lisans tezi)*. Adana : Çukurova Üni. Fen Bil. Enst., 2009.
8. *T.C Sağlık Bakanlığı. [Çevrimiçi] T.C Sağlık Bakanlığı,2011. www. grip. saglik. gov.tr..*
9. Roche. [Çevrimiçi] Roche,2011.
<http://www.roche.com.tr/roche/content/index/index.asp..>
10. **Simon and Stille.** *Hastanede ve muayahane hekimliğinde antibiyotik tedavisi*. İstanbul : Nobel tıp yayınları 10. baskı, 1999. s. 718.
11. **Hurt, A C, Holien, J K ve Barr, I G.** In vitro generation of neuraminidase inhibitor resistance in A(H1N1) influenza viruses. [yazan] A C Hurt. s.l. : Antimicrob agents chemotor, 2009.
12. **Motulsky, A G.** *Human genetic aspect*. new york : nora, 1982. s. 89-95.
13. **Tijo, J H ve Levan, A.** *The cromosome number of man*. s.l. : hereditas, 1965.
14. **İsi, H.** *Kronik olarak radyasyona maruz kalmış bireylerde bleomycin'in kromozomal düzensizliklere etkisi*. Diyarbakır : Dicle üni. sağlık bil. ens. Yüksek lisans tezi, 1994.

15. **Alp, M N.** *Malignite ile tek gen mutasyonları ve kromozom düzensizliklerinin ilişkisi üzerine araştırma.* Diyarbakır-Doktora tezi : Dicle üni. sağlık bil. ens., 1983.
16. **Şimşek, S.** *Fetal patolojik ultrasound bulusu olan hamileliklerde genetik araştırmalar.* Diyarbakır-Doktora tezi : Dicle üni. sağlık bil. ens., 2009.
17. **Green, E ve Waterson , R H.** *İnsan genom projesi.* s.l. : JAMA, 1992. Cilt 5(9).
18. **Brown , T, Dawson, A A ve McDonalds, I A.** Chromosome damges and sister chromosome exchanges in lymphocytes culture from patients with two primary cancer. *Cancer genetic and cytogenetics.* 1985.
19. **Hughes, M R.** *Tıbbi genetik.* s.l. : JAMA, 1992. Cilt 5.
20. **Zylke, J W.** *Yaşamın (Gen) kodunu incelemek.* s.l. : JAMA, 1992. Cilt 5.
21. **Şaylı, B S.** *Medikal genetik 3. Teorik ve klinik sitogenetik.* Ankara : Ankara üni. basımevi, 1975.
22. **Nussabaum, R L.** *Thompson and thompson gentic in medicine.* s.l. : WB.Saunders Company, 2001.
23. **Budak, T.** *Güneydoğu Anadolu Bölgesinde sıklıkla kullanılan insektisitlerden Malathion ve Lindane'nin fare kromozomları üzerine in vivo etkilerinin araştırılması.* Diyarbakır-Doçentlik Tezi : Dicle Üni. Tıp Fak., 1981.
24. **Tekeş, S.** *Sitokrom P450 2C9 (CYP2C9) geninde polimorfizm analizi.* Diyarbakır-Doktora tezi : Dicle üni. sağlık bil. ens., 2001.
25. **Lüleci, G, et al.** *Sitogenetik uygulama yöntemleri.* Ankara : Meteksan, 1990.
26. **Rencüzoğulları, E ve Topaktaş, M.** *The Relationship Between Quantities of Bromodeoxyuridine and Human Peripheral Blood with Determination of the Best Differantial Staining of Sister Chromatids Using Chromosome Medium.* s.l. : Fen bilimleri mühendislik dergisi, 1991.

27. **Clive, D, et al.** *Preclinical toxicology studies with acyclovir: genetic toxicity test.* s.l. : Fundam appl. toxicol, 1983.
28. **Hoffman, S H.** *Dominant lethal study of ribavirin in male rats.* 1987.
29. **Joksic, G, et al.** Influence of ribavirin on the micronucleus formation and in vitropoliferation of human lymphocyte. [yazan] G Joksic. *Influence of ribavirin on the micronucleus formation and in vitropoliferation of human lymphocyte.* s.l. : Neoplasma, 2000.
30. **K, Narayana; U, J, D'souza; K, P, Seetharama.** Ribavirin induced sperm shape abnormalities in wistar rat. [yazan] K Narayana. s.l. : Mutat. res, 2002.
31. **Tatar, A, Ozkurt, Z ve Kiki, I.** Genotoxic effect of ribavirin in patients vith crimean-congo hemorrhagic fever. [yazan] A Tatar. *J. infect dis.* Jpn. : s.n., 2005.
32. **Thust, R, Schacke, M ve Wutzler, P.** *Cytogenetic genotoxicity of antiherpes virostatics in Chinese hamster V79-E cells I.pürin nucleoside analogues.* 1996 : Antiviral Res.
33. **Ayers, K M.** *Preclinical toxicology of zidovudine. An overwiev.* 85; 186 : American journal of medicine, 1988.
34. **Bayram, S ve Topaktaş, M.** *Confirmation of the chromosome damaging effect of lamivudine in in vitro human peripheral blood lymphocytes.* s.l. : Environ mol mutagen., 2008.