

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TAKROLİMUS'UN GENOTOKSİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Elçin Latife KURTOĞLU
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Şengül YÜKSEL

MALATYA- 2010

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TAKROLİMUS'UN GENOTOKSİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Elçin Latife KURTOĞLU

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Şengül YÜKSEL

**Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından 2008/69 proje numarası ile desteklenmiştir.**

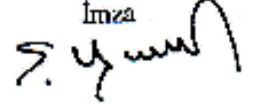
MALATYA-2010

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

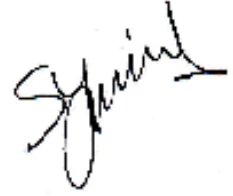
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Elif YEŞİLADA

İmza


Danışman

Yrd. Doç. Dr.Şengül YÜKSEL



Üye

Doç. Dr. Başak KAYHAN



ONAY :

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu...../...../2010 tarih ve 2010/.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ali OTLU
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bana rehber olan, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen tez danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Şengül YÜKSEL'e teşekkür ederim.

Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Elif YEŞİLADA'ya, Anabilim Dalımızın diğer değerli hocaları; Sayın Doç. Dr. Başak KAYHAN'a ve Sayın Dr.Serap SAVACI'ya yüksek lisans eğitimim boyunca yaptıkları bilimsel ve akademik katkıdan dolayı teşekkür ederim.

Deney sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Saim YOLOĞLU'na teşekkür ederim.

Ayrıca bu çalışmayı 2008/69 numaralı projeyle destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

ÖZET

Takrolimus (FK-506), immünsüpressif tedavinin temel ilacı olmakla birlikte nefrotoksisite, nörotoksisite ve deri kanseri ile lenfoma gibi malign tümör oluşumunu içeren ciddi yan etkilere sahiptir. Bu çalışmada, Takrolimus'un olası genotoksik etkileri, insan lenfosit kromozomlarında, kromozom aberasyonları (KA), kardeş kromatid değişimleri (KKD), mikronükleus (MN) ve hücre büyüme kinetiği parametreleri kullanılarak araştırıldı. Lenfositler Takrolimus'un dört farklı konsantrasyonuna (5, 25, 50,100 ng/ml) ve iki farklı uygulama süresine (24 ve 48 saat) maruz bırakıldı. Takrolimus 24 ve 48 saatte tüm konsantrasyonlarda KA'larını indükledi. Benzer şekilde uygulama gruplarında toplam MN frekansında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı. Ayrıca, KKD 24 saatlik uygulamada en yüksek konsantrasyonda (100 ng/ml) ve 48 saatlik uygulamada 25 ve 100 ng/ml'lik konsantrasyonda indüklendi. Takrolimus, 24 ve 48 saatte 5 ng/ml hariç tüm konsantrasyonlarda mitotik indeksi (MI) azalttı. Replikasyon indeksi (RI) 48 saatte tüm konsantrasyonlarda, 24 saatte ise 50 ve 100 ng/ml'lik konsantrasyonlarda azaldı. Sonuç olarak, Takrolimus güçlü mutajeniteye sahip olup malignansiye yol açabilecek genetik hasarlara neden olabilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Takrolimus, kardeş kromatid değişimi, kromozom aberasyonları, mikronükleus, hücre büyüme kinetikleri, genotoksisite

ABSTRACT

Tacrolimus, although fundamental drug of immunosuppressive treatment, have serious side effects including nephrotoxicity, neurotoxicity, and malignant tumor formation such as skin cancer and lymphoma. In this study, possible genotoxic effects of Tacrolimus were evaluated on human lymphocyte chromosomes using chromosome aberrations (CA), sister chromatide exchanges (SCE), micronucleus (MN) and cell growth kinetics as parameters. The lymphocytes were exposed to four different concentrations of the Tacrolimus (5, 25, 50,100 ng/ml) for two different durations (24 and 48 h). Tacrolimus induced CAs at all concentrations for 24 and 48 h. Similary there was a significant increase in the frequency of total micronuclei in exposed groups as compared to control group. In additon, it induced the SCE at highest concantration (100 ng/ml) for 24 h and at 25 and 100 ng/ml for 48 h. Tacrolimus decreased mitotic index (MI) at all concentrations except 5 ng/ml for 24 and 48 h. It inhibited lymphocyte proliferation (RI) at all concentrations for 48 h and only 50 and 100 ng/ml for 24 h. It was concluded that Tacrolimus has potent mutagenity and it can cause genetic damage leading to a malignancy.

Key Words: Tacrolimus, sister chromatide exchange, chromosome aberration, micronucleus, cell growth kinetics, genotoxicity

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İmmünesüpresif İlaçlar.....	3
2.1.1. İmmünesüpresif İlaçların Tarihçesi.....	3
2.1.2. İmmünesüpresif İlaçların Sınıflandırılması.....	4
2.1.3. İmmünesüpresif İlaçların Yan Etkileri.....	5
2.2. Takrolimus.....	6
2.2.1. Takrolimus'un Yan Etkileri.....	7
2.3. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD).....	8
2.3.1. Kardeş Kromatid Değişimi Analiz Yöntemleri.....	9
2.3.2. Kardeş Kromatid Değişimi Yöntemini Etkileyen Faktörler.....	11
2.4. Replikasyon İndeksi (RI).....	13
2.5. Kromozom Aberasyonları (KA).....	15
2.6. Mitotik İndeks (MI).....	17
2.7. Mikronükleus (MN).....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları.....	20
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	20
3.1.1.1. Takrolimus.....	20
3.1.1.2. Siklofosfamid (Cyclophosphamide).....	20
3.1.1.3. Dimethyl Sulfoxide (DMSO).....	21
3.1.1.4. Kromozom Medyumu.....	21
3.1.1.5. Kolşisin.....	21

3.1.1.6. Hipotonik.....	21
3.1.1.7. Fiksatif.....	21
3.1.1.8. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU).....	21
3.1.1.9. Sorensen Tamponu.....	22
3.1.1.10. SSC (Standart Saline Sitrat) Eriyiği	22
3.1.1.11. PBS (Phosphate Buffered Saline).....	22
3.1.1.12. Giemsa.....	22
3.1.1.13. Entellan.....	23
3.1.1.14. Cytochalasin B.....	23
3.1.1.15. Tripsin.....	23
3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları.....	23
3.1.2.1. Hassas Terazı.....	23
3.1.2.2. Santrifüj.....	23
3.1.2.3. Mikroskop.....	23
3.1.2.4. İnkübatör.....	23
3.1.2.5. Flow Kabin (Steril Kabin).....	24
3.1.2.6. Su Banyosu.....	24
3.1.2.7. pH Metre.....	24
3.1.2.8. Vorteks.....	24
3.2. Takrolimus Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	24
3.3. Çalışma Planı	24
3.4. Kardeş Kromatid Değişimini (KKD) ve Kromozom Aberasyonlarını (KA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İncelemeler.....	25
3.4.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması.....	25
3.4.2. KKD Preparatlarının Boyanması.....	26
3.4.3. KA Preparatlarının Boyanması.....	27
3.4.4. Mikroskopik İnceleme.....	28
3.4.4.1. KKD ve Replikasyon İndeksi (RI)'nin Saptanması.....	28
3.4.4.1.1. KKD Sayısının Saptanması.....	28
3.4.4.1.2. Replikasyon İndeksi (RI)'nin Saptanması.....	29
3.4.4.2. Kromozom Aberasyonlarının ve Mitotik İndeksin Saptanması.....	31

3.4.4.2.1. Kromozom Aberasyonlarının Saptanması.....	31
3.4.4.2.2. Mitotik İndeks (MI)'in Saptanması.....	31
3.5. Mikronükleus Sıklığını Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İncelemeler.....	31
3.5.1. Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması.....	31
3.5.2. Preparatların Boyanması.....	32
3.5.3. Mikroskopik İnceleme.....	32
3.5.3.1. Mikronükleus Sayısı ve Nükleus Bölünme İndeksi (NBI)'nin Saptanması..	33
3.6. İstatistiksel Analiz.....	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. Takrolimus'un Kardeş Kromatid Değişimi Üzerindeki Etkileri.....	37
4.2. Takrolimus'un Kromozom Aberasyonları Oluşumu Üzerindeki Etkileri.....	40
4.3. Takrolimus'un Mikronükleus Sıklığı Üzerindeki Etkileri.....	45
4.4. Takrolimus'un DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkileri.....	47
5. TARTIŞMA.....	48
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR.....	56
ÖZGEÇMİŞ.....	65

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BrdU	: 5-Bromo-2 deoxyuridine
CBER	: İlaç Değerlendirme ve Araştırma
CBER	: Biyolojik Ürünler Değerlendirme ve Araştırma
CTTR	: Cincinnati Transplant Tumor Registry
Cyt-B	: Cytochalasin B
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
ICH	: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
IL	: İnterlökin
KA	: Kromozom Aberasyonu
KKD	: Kardeş Kromatid Değişimi
MI	: Mitotik İndeks
MMF	: Mikofenolat Mofetil
MN	: Mikronükleus
NBI	: Nükleer Bölünme İndeksi
NF-AT	: Nuclear factor of activated T-cells
RI	: Replikasyon İndeksi
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
UDS	: Programlanmamış DNA Sentezi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Takrolimus'un Etki Mekanizması.....	7
Şekil 2.2. Taylor ve arkadaşlarına göre radyoaktif timidin varlığında DNA replikasyonu.....	9
Şekil 2.3. Deoxytimidin ve Bromodeoxyuridin'in halkasal yapıları.....	10
Şekil 2.4. BrdU'nun DNA yapısına girmesi ile 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması.....	15
Şekil 2.5. Mikronükleus oluşumu.....	19
Şekil 3.1. Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi.....	28
Şekil 3.2. Birinci Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Metafaz Kromozomlar.....	29
Şekil 3.3. İkinci Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Metafaz Kromozomları.....	30
Şekil 3.4. Üçüncü Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Metafaz Kromozomları.....	30
Şekil 3.5. Bir nükleuslu hücre.....	34
Şekil 3.6. İki nükleuslu hücre.....	34
Şekil 3.7. Üç nükleuslu hücre.....	35
Şekil 3.8. Dört nükleuslu hücre.....	35
Şekil 4.1. 5 ng/ml Takrolimus ile 24 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde KKD.....	38
Şekil 4.2. 25 ng/ml Takrolimus ile 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde KKD.....	38
Şekil 4.3. 50 ng/ml Takrolimus ile 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde KKD.....	39
Şekil 4.4. 100 ng/ml Takrolimus ile 24 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde KKD.....	39
Şekil 4.5. 50 ng/ml Takrolimus ile 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde kromatid kırığı.....	41
Şekil 4.6. 100 ng/ml Takrolimus ile 24 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde kromatid kırığı.....	41
Şekil 4.7. 50 ng/ml Takrolimus ile 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde kromozom kırığı.....	42

Şekil 4.8. 100 ng/ml Takrolimus ile 24 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde kromozom kırığı.....	42
Şekil 4.9. 100 ng/ml Takrolimus ile 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde kromozom kırığı.....	43
Şekil 4.10. 25 ng/ml Takrolimus ile 48 muamele edilen insan periferal lenfositlerinde kromatid değişimi.....	43
Şekil 4.11. 5 ng/ml Takrolimus ile 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde endoreduplikasyon.....	44
Şekil 4.12. 25 ng/ml Takrolimus ile 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde poliploidi.....	44
Şekil 4.13. 50 ng/ml Takrolimus ile 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde Mikronükleus içeren binükleer hücre.....	46
Şekil 4.14. 100 ng/ml Takrolimus ile 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde iki MN içeren binükleer hücre.....	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. İmmünsüpresif İlaçların Sınıflandırılması.....	5
Çizelge 3.1. Çalışma Planı.....	25
Çizelge 4.1. Değişik dozlarda Takrolimus ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde hücre başına düşen Ortalama KKD Sayısı.....	37
Çizelge 4.2. Değişik dozlarda Takrolimus ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde KA yüzdesi.....	40
Çizelge 4.3. Değişik Dozlarda Takrolimus ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde MN'li binükleer hücre yüzdesi ve nükleer bölünme indeksi	45
Çizelge 4.4. Değişik Dozlarda Takrolimus ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferel Lenfositlerinde RI ve MI.....	48

1. GİRİŞ

Çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan bazı farmakolojik ajanların mutajenik ve kanserojenik aktiviteyi arttırdığı bilinmektedir (1, 2). Bu sebeple, kimyasalların ve ilaçların geliştirilme aşamalarında toksikolojik olarak tanımlanabilmeleri amacıyla genotoksisite testleri rutin olarak kullanılmaya başlanmıştır (3). Pek çok ülke, ilaçların genotoksisitesinin belirlenmesi için özel yönergeler çıkarmıştır. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), İlaç ve Biyolojik Ürünler Değerlendirme ve Araştırma Merkezlerine (CDER VE CBER) tüm yeni ilaçlar için genotoksisite testi yapılmasını önermektedir. Ayrıca, Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH), ilaçların geliştirilme aşamasında standart genotoksisite test dizilerini ve nasıl yapılacağını içeren bir klavuz yayınlamıştır (1).

Genotoksisite testleri, etki mekanizmalarına göre *in vivo* veya *in vitro* olarak çalışılabilmektedir (4, 5). Genotoksisite testleri moleküler ve kromozom düzeyinde olabilmektedir. Moleküler düzeyde yapılan genotoksisite araştırmalarında; DNA hasarının direkt belirlenmesi amacıyla yapılan Komet testi, tamir edilebilir DNA hasarının belirlenmesi amacıyla Programlanmamış DNA Sentezi (UDS), Ames testi ve *Drosophila* testleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Kromozom düzeyinde genotoksisite araştırmalarında ise sitogenetik testler olan kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom aberasyonları (KA) ve mikronükleus (MN) analiz yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. KKD, DNA çift zincir kırıklarının homolog rekombinasyon yoluyla onarılmasını gösteren, kardeş kromatidlerin homolog lokusları arasında DNA replikasyon ürünlerinin değişimidir (6). Kromozom aberasyonları, DNA düzeyindeki bir zarar sonucunda ortaya çıkar ve DNA'daki çift zincir kırıklarının onarılamaması ya da yanlış onarılmasından kaynaklanabilir (7). MN oluşum sıklığı, genetik materyalde oluşan hasarın bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir. MN'ler, hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, sentrik veya asentrik kromozom fragmentlerinden köken alan oluşumlardır (8, 9).

Organ ve doku nakillerini takiben, doku veya organ reddini önlemek amacıyla uygulanan immünsüpresif tedavi ile birçok hastanın hayatı kurtarılabilirken, yan etki ve komplikasyonlar nedeniyle maalesef birçok hasta

kaybedilebilmektedir. İmmünsüpresif ajanlardaki gelişmeler daha etkili, daha güvenli ve hedefe yönelik bir tedavi protokolü hazırlanabilmesine olanak sağlamakta; bu da transplantasyondaki başarının artışına katkıda bulunmaktadır (10). Transplant hastalarının yararı ve güvenliği için kapsamlı klinik denemelerle, son elli yılda birçok immünsüpresif ilaç geliştirilmiştir (11). Rutinde kullanılan ve kalsinörin inhibitörleri grubunda yer alan, en etkili immünsüpresif ilaçlardan biri de Takrolimus (FK-506)'dur (12). Takrolimus sitokin sentezini bloke ederek, T hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir. Takrolimus, organ transplantasyonlarından sonra doku reddini önlemek için, son yıllarda ise atopik dermatit ve psoriasis gibi inflamatuvar deri hastalıklarının tedavisinde topikal olarak kullanılmaktadır (13).

Biz de bu çalışmada Takrolimus ilacının insan periferal lenfositlerine olası genotoksik etkilerini, *in vitro* şartlarda, kardeş kromatid değişimi, mikronükleus, kromozom aberasyonları, mitotik indeks, nükleer bölünme indeksi ve replikasyon indeksi gibi sitogenetik parametreleri kullanarak araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İmmünsüpresif İlaçlar

Organ nakli ile ömrün uzatılması ve hastaların yaşam kalitesinin artırılması uzun zaman tıp hekimlerinin bir rüyası olmuştur (14). Son yıllarda yeni cerrahi teknikler, yeni immünsüpresif ilaçlar ve immünsüpresif protokolün modifikasyonu gibi klinik immünolojideki ilerlemeler sayesinde organ transplantasyonunda gelişmiş sonuçlar almak mümkün hale gelmiştir (15).

İmmünsüpresif ilaçlar, immün sistemin aktivitesini önlemek ya da inhibe etmekte kullanılmaktadır. Organ ya da doku transplantasyonu reddini önlemede, otoimmün kaynaklı bazı hastalıkların tedavisinde (romatoid artrit, multiple skleroz, myastenia gravis, sistemik lupus eritematosuz ve crohn hastalığı) ve otoimmün olmayan diğer bazı inflamator hastalıkların (örneğin; uzun dönemli alerjik astım) tedavisinde bu ilaçlardan faydalanılmaktadır (16).

2.1.1. İmmünsüpresif İlaçların Tarihçesi

İmmünsüpresyon 1950'lerde John Loutit tarafından total vücut radyasyonu ile farelerde denenmiş, 1958'de de Murray ve Hamburger tarafından insanlara uygulanmıştır (17). 1949 yılında romatoid artrit tedavisinde kullanılan kortizon dikkati çekmiştir. Bu tarihten itibaren, otoimmün hastalıkların tedavisinde ve allogreft rejeksiyonu önlemede kortikosteroidler kullanılmaktadır. 1959'da kemik iliği transplantasyonunda kullanılmak ve antikorların oluşumunu baskılamak üzere Siklofosamid kullanıma sunulmuştur. Aynı yıl içerisinde tavşanlarda immün cevabı baskılamakta 6-Merkaptopurin (6-MP)'in kullanıldığı rapor edilmiştir (14). 6-Merkaptopürin (purinethol)'in geliştirilmesini 1960'ların başında, böbrek transplantasyonu sonrasında rejeksiyonu baskılamakta kullanılan ve organ greft rejeksiyonunu erteleyen Azatiyoprin (AZA)'in keşfi izlemiş ve farmakolojik immünsüpresan bakımı standart hale gelmiştir. 1962 ve 1964 yılları arasında Denver de Colorado'da transplantasyonun ilk başlangıç başarılı serisinden sonra Steroidler ve Azatiyoprin'in kombinasyonu yaygın olarak kullanılmaya başlanmış ve gelecek 20 yılda temel immünsüpresif bakımın parçası haline gelmiştir. İmmün sistem

bilgisini geliştirmek, spesifik immün dñzenleyici bölgeleri hedefleyen tedaviyi mümkün kılmıştır. İlk Poliklonal Antilenfosit Globulin 1967'de kullanılmıştır ve diğer monoklonal ve poliklonal antikorların geliştirilmesi sağlanmıştır. 1969 yılında kobaylarda hipersensitiviteyi geciktirmenin geliştirilmesi ve antikor oluşumunu inhibe etmek için Metotreksat bulunmuştur. 1980'de bir kalsinörin inhibitörü olan Siklosporin'in kullanıma sunulmasıyla birlikte doku sağkalımında heyecan verici bir gelişme yaşanmıştır. Siklosporin allogreft transplantasyonunda rejeksiyonu önlemek için Steroid/AZA kombinasyonuna eklenmiştir. Mikofenolat Mofetil (MMF) (bir inozin 5'-monofosfat dehidrojenaz (IMPDH) inhibitörü)'in geliştirilmesine 1982'de başlanmıştır ve 1994'de Mikofenolat'ın kullanıma sunulmasıyla immünsüpresyonda önemli bir ilerleme gerçekleşmiştir. 1987'de lenfosit proliferasyonu ve interlökin (IL)-2 üretimini inhibe etmekte kullanılmak üzere Takrolimus (FK506) sunulmuştur. Takrolimus'un (kalsinörin inhibitörü) kullanılmasını, kalsinörin inhibitörlerinin üstünlüklerinin tartışılması izlemiştir. Birçok merkezde Siklosporin yerine Takrolimus kullanımı tercih edilmektedir. Son dönemlerde ise bir makrolid antibiyotik olan Sirolimus (Rapamune) geliştirilmiş ve piyasaya sürülmüştür. Ancak kesin rolü hala tanımlanamamıştır (18).

2.1.2. İmmünsüpresif İlaçların Sınıflandırılması

Günümüzde immünsüpresif tedavide kullanılan en önemli immünsüpresif ajanlar dört grupta incelenmektedir (Çizelge 2.1) (14).

Çizelge 2.1. İmmünsüpresif ilaçların sınıflandırılması (12).

İmmünsüpresif Ajanlar	İlaçlar
Glikokortikoidler	Prednizon, Prednizolon, Hidrokortizon
Kalsinörin inhibitörleri	Takrolimus ve Siklosporin
Antiproliferatif ve Antimetabolik Ajanlar	Sirolimus, Azatiyoprin, Mikofenolat Mofetil
Antikorlar	Poliklonal ve Monoklonal Antikorlar

2.1.3. İmmünsüpresif İlaçların Yan Etkileri

Tüm ilaçlar gibi immünsüpresifler de yan etkilere sebep olan bir potansiyele sahiptirler. Yan etkiler immünsüpresif ilaç kullanımına bağlı olarak küçük farklılıklar göstermekle birlikte tüm immünsüpresiflerin değişik genel toksisiteleri vardır (19). İmmünsüpresif tedavi ile yaşam boyu ilaç kullanılması ve bu nedenle de bağışıklık sisteminin tamamının seçicilik göstermeden baskılanması, hastaları geliştirebilecek enfeksiyonlar ve kanser bakımından riske sokabilmektedir (12). İmmünsüpresif tedavi alan hastalarda görülen yaygın enfeksiyonlar herpeszoster, pnömoni ve idrar yolu ya da kan enfeksiyonlarını kapsamaktadır (19).

Transplant hastalarında kanserin ortaya çıkması ölüm nedenleri arasında ilk sırayı almaktadır. Bu hastalardaki başlıca kanser tiplerini deri ve dudak kanseri, lenfomalar ve kaposi sarkomu oluşturmaktadır (20). Cincinnati Transplant Tumor Registry (CTTR) Merkezi posttransplant hastalarından, 9032 renal allograft alıcısında 9688 kanser tipinin geliştiği bildirilmiştir (21). Buna göre, genel popülasyonda en sık görülen kanserler (akciğer, meme, prostat, kolon ve invaziv uterus serviks karsinomu) artma ya da azalma göstermemektedir (22).

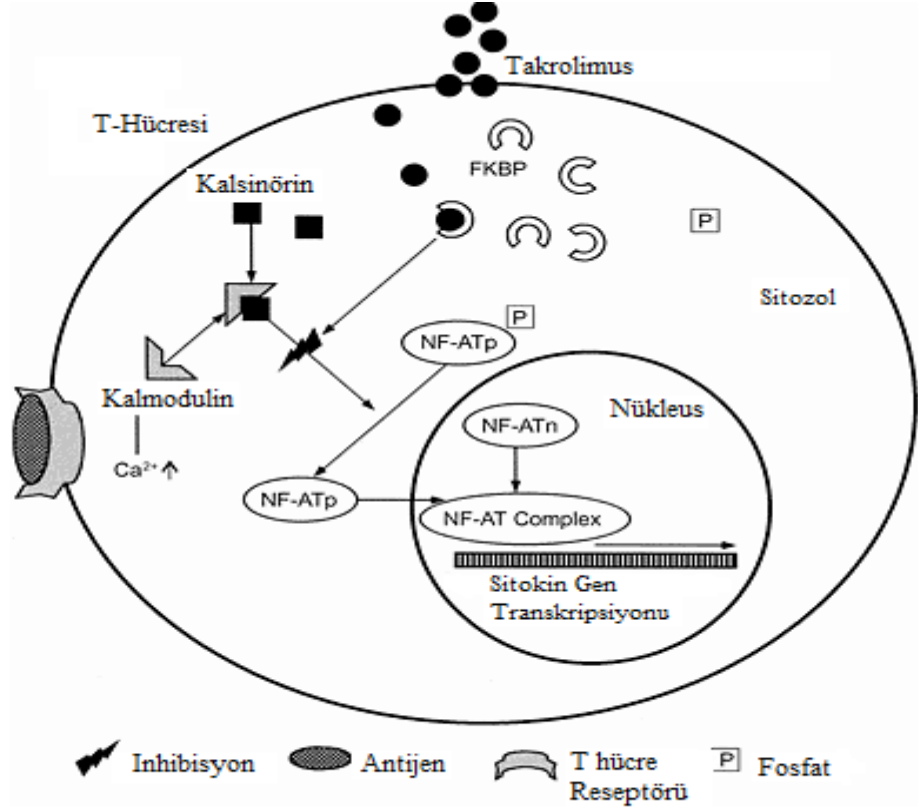
2.2. Takrolimus

Takrolimus 1985 yılında *Streptomyces tsukubaensis* fungusundan orjinal olarak izole edilmiş etkili bir makrolid lakton immünsüpresandır ve ilk olarak solid organ transplantasyonunda alıcılarda rejeksiyonu önlemek için klinik denemelerle kullanılmıştır. Günümüzde ise böbrek, karaciğer ve kalp transplantasyonunda yaygın olarak kullanılmakla birlikte, son yıllarda ülseratif kolit, atopik dermatit ve egzama tedavisinde topikal olarak kullanılmaktadır (23, 24).

Takrolimus'un immünsüpresif etkisini nasıl gösterdiği kesin olarak bilinmemekle birlikte, kalsinörin inhibisyonu yaparak, antijen spesifik T hücre aktivasyonunu ve başta IL-2 olmak üzere IL-4, IL-5 gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımını inhibe ettiği düşünülmektedir. Kalsinörin, hedef proteinlerden fosfat gruplarını ayıran, kalsiyum aktivasyonu yapan bir enzimdir. Sitokin inhibisyonu, immünsüpresyonda önemli bir hedefdir. Takrolimus sitokinlerin transkripsiyonunu engelleyerek immünsüpresyonu gerçekleştirir (25). Takrolimus hücre zarından içeri girdikten sonra hücre içi reseptörü olan FK-bağlayıcı proteinlere (FKBP12) bağlanır (26, 27). FKBP12, T lenfositlerde yaygın olarak bulunan sitozolik bir proteindir. Bu kompleks kalsiyum ve kalmodüline bağımlı fosfataz olan kalsinörinin transkripsiyon faktörü ile etkileşimine fiziksel olarak engel olur ve defosforilasyonu önler (25). Bunun sonucunda *in vivo* olarak NF-AT (Aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörü) ye bağımlı gen transkripsiyonu ve bağışıklık baskılanır (Şekil 2.1). IL-2 transkripsiyonunu inhibe etmesine ek olarak Takrolimus diğer kalsiyum bağımlı olayları da inhibe etmektedir (nitrik oksit sentetaz aktivasyonu, hücre degranülasyonu ve apoptozis). Takrolimus ayrıca mast hücrelerinde hem degranülasyonu hem de IL-3 ve IL-5 gibi sitokinlerin transkripsiyonel aktivasyonunu bloke etmektedir. Sonuç olarak IL-3, IL-4, IL-5, interferon (IF)- γ , tümör nekroz faktör (TNF)- α ve granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktörler (GM-CSF) gibi diğer sitokinlerin üretimi de azalmış olur (26, 27, 28).

Klinik olarak iki mevcut kalsinörin inhibitörü, Takrolimus ve Siklosporin'dir (29). Kimyasal yapı olarak benzerlik göstermemekle birlikte, hücre içinde bağlandıkları sitozolik reseptörler de farklıdır. Siklosporin sitoplazmik reseptörü

siklofilin ile, Takrolimus da FK-bağlayıcı protein (FKBP12) ile birleşerek kalsinörini inhibe eder (30). Yapılan *in vivo* ve *in vitro* araştırmalarda Takrolimus'un immünsüpresif gücünün Siklosporin'e göre 10-100 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (29).



Şekil 2.1. Takrolimus'un etki mekanizması (31).

2.2.1. Takrolimus'un Yan Etkileri

Takrolimus'un çok yüksek dozda kullanımı nefrotoksisite ve nörotoksisite (tremor, baş ağrısı, motor bozukluk, nöbet)'ye neden olmaktadır. Takrolimus'un kullanımı sırasında gastrointestinal şikayetler, hipertansiyon, hiperglisemi, hiperkalemi ve diabet ortaya çıkabilir (12). Takrolimus ayrıca lenfoma ve deri tümörlerini içeren malignansi oranlarını artırmaktadır. İmmünyetmezlikli fareler ve sıçan örneklerinde yapılan çalışmalarla Takrolimus'un metastaz, anjiyogenezis ve DNA tamir inhibisyonuna katkıda bulunduğu ve doza bağımlı tümör başlatıcı etkisi olduğu saptanmıştır (32, 33). Ayrıca FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi), topikal

olarak kullanılan kalsinörin inhibitörlerinden Takrolimus ile Pimekrolimus'un kansere yakalanma riski oluşturabileceğine dair uyarıda bulunmuştur (34).

2.3. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD)

Genotoksik ajanların *in vivo* ve *in vitro* koşullar altında DNA'da oluşturduğu hasarı kromozom düzeyinde saptamayı sağlayan doğrudan metodlardan birisi kardeş kromatid değişimi (KKD) analizidir (35). Kardeş kromatidler, bölünmekte olan hücrelerde, interfaz safhasında, DNA replikasyonu sonucu iki katına çıkan genetik materyalin sentromer bölgeleri ile birbirlerine tutunarak oluşturdukları, genetik olarak identik olan kromatidlerdir (36). KKD'nin moleküler mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır fakat DNA'daki her kromatidde aynı bölgede kırıkların meydana gelebildiği, DNA zincirinde değişimin olduğu ve bu kırıkların hemen onarımı şeklinde olayın devam ettiği bilinmektedir. Bu olaylar hücre siklusunun S fazında meydana gelmektedir. KKD çoğalmakta olan hücrelerde spontan olarak meydana gelir. Çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenler ise KKD sıklığını arttırmaktadır (37).

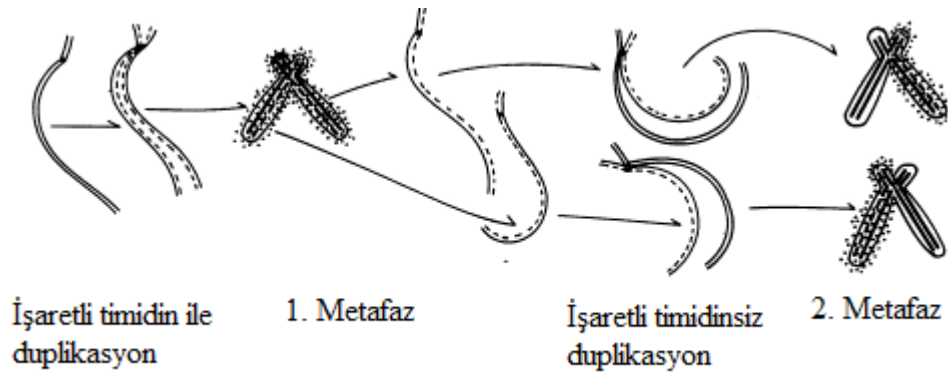
KKD, mutasyon oranı, doku tipi, ajanların doz oranı ve diğer birçok faktörle farklılık gösteren, pek çok mutajen ve karsinojenlerin genotoksik etkisinin belirlenmesinde basit, duyarlı ve kısa zamanda sonuç veren bir yöntem olarak farklı alanlarda kullanılmaktadır (35, 38, 39).

Her DNA hasarı KKD'ye neden olmamaktadır. KKD'yi arttıran etkenler çoğunlukla DNA ile kovalent bağlantılar yapan veya DNA tamir mekanizmalarını etkileyen maddelerdir. KKD, genotoksik olduğu bilinen veya tahmin edilen kimyasal ajanların çalışılmasında etkili bir yöntemdir. Bu yöntem hem laboratuvar hayvanlarında hem de insan popülasyonlarında çalışılabilir (40). Kromozom instabilitesi sendromlarından bloom sendromu ve xeroderma pigmentosum başta olmak üzere birtakım hastalıklarda sıklığı artan KKD, ayırıcı tanı olarak değerlendirilmektedir (38). Birçok araştırmacı tarafından bazı kanser hastalarının lenfositlerindeki spontan KKD oranının sağlıklı insanlara göre daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (39).

2.3.1. Kardeş Kromatid Değişimi Analiz Yöntemleri

Çeşitli genotoksik ajanların DNA’da meydana getirdiği değişiklikler sonucu gözlenen KKD’lerin nasıl oluştuğu henüz kesinlik kazanmamıştır. Ancak birçok araştırmacı tarafından olayın mekanizmasını açıklayan modeller öne sürülmüştür (37, 41).

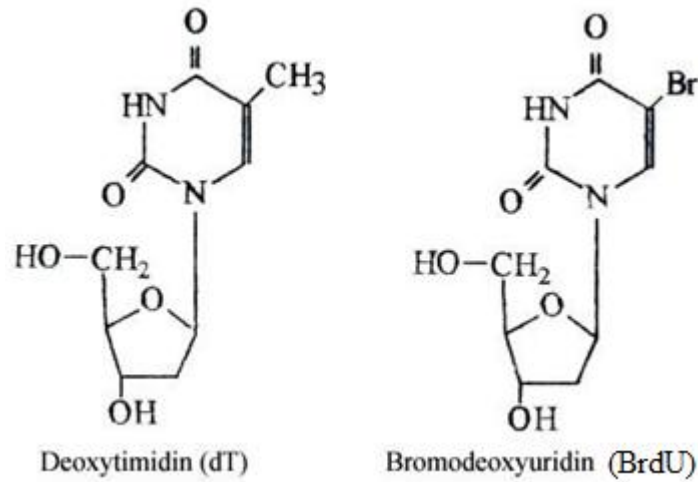
Kardeş kromatid değişimi alanında ilk çalışan araştırmacı Taylor ve arkadaşları olmuştur (41). Taylor ve arkadaşları, 1957 yılında, bitki mitotik kromozomlarında yaptığı otoradyografik çalışmalarda KKD’yi gözlemlemeyi başarmıştır. Bitki hücrelerine ait kromozomların radyoaktif timidin (3H-deoksi-Timidin) varlığında birinci mitozda replikasyonuna izin verilmiş, ikinci replikasyon ise izotopsuz ortamda gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.2). DNA’nın semikonservatif replikasyonuna bağlı olarak otoradyografik yöntemle her kromozomun bir kromatidi işaretlenerek, kromozomların uzunlukları boyunca radyoaktif işaretlerin yer değiştirdikleri gözlenmiş ve bu değişimler Taylor ve arkadaşları tarafından ‘kardeş kromatid değişimi’ olarak adlandırılmıştır (41).



Şekil 2.2. Taylor ve arkadaşlarına göre radyoaktif timidin varlığında DNA replikasyonu (41).

Otoradyografi yöntemi kullanımıyla, çeşitli kimyasal ve fiziksel ajanların KKD görülme sıklığını arttırabildiği gözlenmiştir. Fakat bu yöntem, duyarlılığın az olması ve zaman alan bir işlem olması nedeniyle KKD oluşumunu etkileyen ajanları

belirlemede diğer araştışıcılar tarafından yaygın olarak kullanılan bir yöntem olmamıştır. Taylor ve arkadaşlarından sonra 1972 yılında Zakharov ve Egolina, Çin Hamster hücre kültürlerine, timidin analogu olan 5-Bromo-2 deoxyuridine (BrdU) ilave etmişler ve elde ettikleri preparatları giemsa ile boyayarak kardeş kromatidlerin farklı boyandığını göstermişlerdir (şekil 2.3). BrdU'nun yeni sentez edilen DNA'ya girmesi, uygulanışını takip eden ilk S fazı sırasında olmaktadır. Replikasyon sırasında timidin yerine BrdU'yu alan zincir parlak boyanırken, diğer kardeş kromatid daha koyu boyanmaktadır (42).



şekil 2.3. Deoxytimidin ve Bromodeoxyuridin'in halkasal yapıları (43).

KKD alanında çalışan diğer bir araştışıcı olan Latt 1973 yılında, kültür ortamına BrdU eklemiş ve floresan boya bisbenzamid (Hoechst 33258) ile kromatidlerin farklı boyandığını göstererek, bisbenzamid boyasının floresansı azalttığını rapor etmiştir. Hoechst 33258 boyası normalde deoksi adenin-deoksi timin baz çiftine (dA-dT) bağlandığında şiddetli floresan verirken, dA-BrdU ile bağlandığında boyanın floresanı söner. Boyece iki tane BrdU zincir içeren kromatid açık renk, biri timin ve diğer BrdU içeren kromatid koyu renk olarak gözlenir (42).

1974'te Perry ve Wolff, DNA'nın yapısına giren BrdU'nun, Giemsa boyasının kromatinlere olan etkisini azalttığını öne sürmüştür. Bu bulgular ışığında günümüzde de tercih edilen Floresans Plus Giemsa (FPG) yöntemi geliştirilmiştir (42).

Kromozomlarda KKD dağılımı genellikle rastgele olmaktadır. Bunun nedeni bilinmemektedir. İnsan kromozomundaki KKD bölgeleri, G bandı alan ve almayan bölge sınırında veya G bandı almayan bölgelerde yer almaktadır. KKD dağılımı kromozom gruplarında farklılık göstermektedir. A, B, C ve D grubu kromozomlarındaki KKD dağılımı E, F, G grubu kromozomlarından daha fazladır. En az KKD, G grubu kromozomlarında gözlenmektedir. KKD'nin kromozom uzunluğu ile arttığı da belirtilmektedir (44).

2.3.2. Kardeş Kromatid Değişimi Yöntemini Etkileyen Faktörler

Esas olarak iki kategoriye ayrılır (45).

1. Kültür Koşulları İle İlgili Faktörler: *İn vitro* koşullarda lenfositlerin büyümesi ve çoğalması ile birlikte olan kültür faktörleridir ve bu faktörlerin kontrol altına alınması mümkün olmaktadır (46).

a. Besiyeri: Farklı besiyerlerinde üretilen insan lenfositlerinde farklı KKD sıklığı gözlenmiştir (46).

b. Mitoz Uyarıcı: *İn vitro* koşullarda mitotik ajanlar kullanılarak mitoz artırılabilir. Günümüzde kullanılan mitotik ajanlar; TPP (tüberkülin pürifiye protein), konkanavalin A, PWM (Pokeweed mitojen) ve PHA (Fitohemaglutinin) olup en çok kullanılan PHA'dır (45).

c. Serum: Besiyerine eklenen serumun konsantrasyonu KKD oluşumunu etkiler (46).

d. BrdU Konsantrasyonu: Memeli kromozomlarına BrdU'nun girmesi kromozom kırıklarına ve yeniden düzenlenmelerine yol açar. BrdU'nun kendisi de bir KKD indükleyicisidir. BrdU, toksik sınırlar dışında yüksek dozda hücre kültürüne eklenirse, mitotik indekste azalmalara ve KKD frekansında umulandan daha fazla artışlara neden olmaktadır. Bu nedenle kullanılacak BrdU dozunun minimum olması önerilmiştir. BrdU konsantrasyonu %10 arttırıldığında KKD frekansının %50 kadar arttığı gösterilmiştir (47).

e. Kültür Ortamının Sıcaklığı: En ideal ısı 37 °C olup 36-38 °C aralığına tahammül edilir. 39 °C'nin üzerindeki ısılarda kültürdeki hücreler ölür. Sıcaklığın geçici düşmesi hücreleri öldürmez ise de kültürleri duraklatarak harvest zamanında yeterli mitotik indeks eldesini önler ve preparatların kalitesini düşürür (46, 48).

f. Karanlık Ortam: Hücrelerin kültüre edildiği sürece florasan ışığa maruz kalmaları BrdU içeren DNA'nın fotolizine neden olarak hareketli alkali grupların oluşumuna neden olur. Bu oluşum guanin ile reaksiyona girerek DNA'nın depurine olmasına ve dolayısıyla tek sarmalda kırılmalara neden olarak KKD oluşumunu indükler. Bu nedenle de KKD analizi için kullanılacak kültürlerin ışıktan korunması gerekmektedir (45).

g. Kolçisin Konsantrasyonu: Kolçisin mitotik mekik inhibitörüdür ve kromozomların metafaz evresinde kalmalarını sağlar. Kolçisinde bırakma süresi ile metafaz indeksinin sayısı birbiri ile orantılıdır. Fakat uzun süre bırakmalarda kromozom boylarında kısalma gözlenir. Bu nedenle süre iyi ayarlanmalıdır (49).

h. Hipotonik Çözelti: Hipotonik çözeltilerde tuz yoğunluğu sitoplazmik tuz yoğunluğundan daha düşük olduğundan çözelti içindeki su hücre zarını aşip hücreye girer, hücreyi şişirir ve eritrositlerin çoğunu patlatır. Hipotonik uygulanması kritik bir zamanlama gerektirir. Kromozomlarda en az hasar yaptığından en çok kullanılan hipotonik çözelti KCI'dir (49).

i. Fiksasyon: Kromozom preparatlarında fiksasyon amacı ile taze hazırlanmış 3:1 oranında alkol ve glacial asetik asit kullanılır. Oranın değişmesi kromozom morfolojisini olumsuz yönde etkiler. Asetik asitin bu orandan fazla olması erken hücre zarı yırtılmasına neden olur. Bu da kromozom kayıplarına yol açar. Tam kan kültürlerini ilk fiksasyon sırasında sürekli karıştırmak gerekir. İlk fiksasyonla ortamda geriye kalan eritrositler hemoliz olur. Kırmızı renkli hemoglobinin koyu kahve renkli hematine döner. Yeterli karıştırma yapılmamışsa, koyukahve renkli çökeltiler gözlenirken mitotik indeks düşer ve kalitesiz preparatlar elde edilir (49).

2. Biyolojik Faktörler: Bireylerin genotipleriyle birlikte, genel sağlık durumları veya yaşam tarzı ile ilgilidir (46).

a. Sigara Kullanımı: KKD sıklığını büyük oranda etkiler. Sigara içenlerde KKD sıklığının arttığı kanıtlanmıştır (50).

b. Cinsiyet: Cinsiyete göre KKD frekansının değiştiği konusunda genelde araştırmacılar aynı görüşte olup dişilerde daha yüksek olduğunu gözlemişlerdir. Özellikle 10-14 yaşlarında dişilerde gözlenen KKD frekansındaki fazlalığın o dönemde salgılanan hormonlardan kaynaklanabileceğini bildirilmiştir. Ayrıca kadınlarda KKD'nin mensturasyon sonunda maksimuma ulaştığı, ovulasyon süresince en aza indiği gözlenmiştir (45).

c. Yaş: KKD sıklığının yaşla ilişkisini araştıran çalışmalardan elde edilen bulgular birbirleriyle uyumlu bulunmamıştır. KKD sıklığına yaşın bir etkisi olmadığı şeklinde çalışmalar yanında, çocuklarda KKD sıklığının yetişkinlere göre daha az olduğunu gösteren çalışmalar da yapılmıştır (44, 45).

d. Genetik Faktörler: İnsanlar arasındaki farklılıkların genetik faktörlere bağlı olup olmadığını belirlemek için birçok araştırmacı monozigotik ve dizigotik ikizlerde lenfosit kültürlerinde KKD düzeylerini araştırmışlardır. Pedersen ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada genetik faktörlerin KKD sıklığı ve kromozomlara dağılımı üzerine önemli rol oynamadığını göstermişlerdir (51).

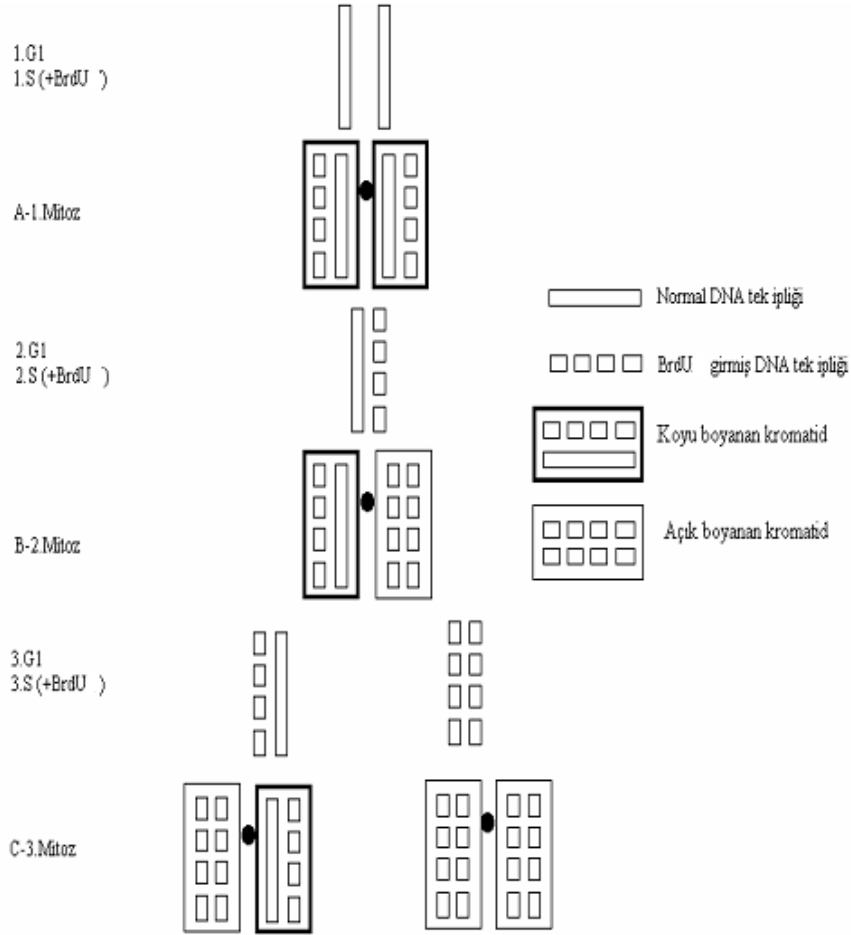
e. İlaç Kullanımı: Pek çok ilaç KKD sıklığını tetiklemektedir (46).

2.4. Replikasyon İndeksi (RI)

Replikasyon indeksi veya proliferasyon indeksi, metafaz hücreleri tarafından tamamlanan replikasyon sayısıdır. RI hesaplamaları KKD preparatları kullanılarak yapılır. Bu incelemeler sırasında gözlenen birinci, ikinci ve üçüncü metafaz devresindeki hücrelerin sayısı saptanır (52, 53).

Birinci, ikinci ve üçüncü metafaz plakları şu şekilde ayırt edilir: BrdU, deoxytimidin (dT) ve deoxyuridin (dU) birbirlerinin analogu olan bileşiklerdir. BrdU, dT ve dU arasındaki tek fark taşıdıkları heterosiklik benzen halkasındaki beşinci C atomuna bağlanan grupların farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Beşinci C atomuna bağlanan grup dT'de CH₃, BrdU'de Br ve dU'de H atomudur.

BrdU, DNA'nın yapısında bulunan timin bazlarının analogu olduğundan kültür ortamına BrdU eklendiğinde hücreler DNA'larını replike ettikleri esnada (birinci S fazında) yeni sentezlenen polinükleotid ipliği içine timinin yerine ortamda bulunan BrdU geçecektir. Böyle hücrelerin kromozomları boyandığında bir kromozomun her iki kromatidi de (dT/BrdU:dT/BrdU) homojen koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 2.4A). Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerden meydana gelen yavru hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdU'lu ortamda ikinci S fazı) timin içeren polinükleotid ipliğine komplementer olarak sentezlenen yeni DNA ipliğinde BrdU yer alacaktır. Bu iki polinükleotid ipliği bir kromozomun koyu boyanan kromatidini (dT/BrdU) oluşturacaktır. BrdU içeren ipliğe komplementer olarak sentezlenen yeni ipliğe de BrdU girecektir ve bir kromatidi oluşturan iki polinükleotid ipliği de BrdU içereceğinden (BrdU/BrdU) bu kromatid, aynı kromozomun açık boyanan kromatidini oluşturacaktır. İşte bu hücrenin metafaz devresinde kromozomlar boyandığında tüm kromozomların kromatidlerinden birisi koyu diğeri açık renkte boyanacaktır (dT/BrdU:BrdU/BrdU). Bunlarda ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 2.4B). Bu hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdU'lu ortamda üçüncü S fazı) ikinci mitozda açık boyanan kromatidden tüm polinükleotid ipliklerine BrdU girmiş olan bir kromozom meydana gelecektir ve bu kromozomun her iki kromatidi de açık boyanacaktır (BrdU/BrdU: BrdU/BrdU). İkinci mitozda koyu boyanan kromatidden ise, bir kromatidin her iki ipliği BrdU'lu ve diğeri kromatidinin bir ipliği BrdU'lu diğeri ipliği timinli olan bir kromozom oluşacaktır. Bu kromozomda boyandığında bir kromatidi koyu renkte, diğeri kromatidi açık renkte olacaktır (dT/BrdU:BrdU/BrdU). İşte böyle hücrenin metafaz devresinde preparat yapıldığında bazı kromozomların her iki kromatidi açık renkte, bazı kromozomların bir kromatidi açık diğeri kromatidi koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler de üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 2.4C) (43, 54).



Şekil 2.4. BrdU'nun DNA yapısına girmesi ile 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması (43).

2.5. Kromozom Aberasyonları (KA)

Kromozom aberasyonları, hücre bölünmesi sırasında kendiliğinden veya indüklenerek meydana gelen hatalar sonucu ortaya çıkabilmektedir. Mutajen ve karsinojenlerin kromozom aberasyonlarını indüklediği belirlenmiş ve aberasyon frekansının kanser riski taşıyan grupların tanımlanmasında da önemli olduğu görülmüştür (55). Yöntemde hücre bölünmesinin metafaz safhasında kalmış kromozomlar sayısal ve yapısal aberasyon yönünden değerlendirilmektedir. Gözlemler sırasında aşağıda belirtilen kromozomal aberasyonlara rastlanmaktadır (43).

- 1) **Kromozom Kırığı:** Bir kromozomun her iki kromatidinde aynı noktada kırılma olur. Bu durumda hücrelerin her ikisi de defisiyensli kromozom bulundurur (56).
- 2) **Kromatid Kırığı:** Bir kromozomun iki kromatidinden yalnızca birinde kırılmanın meydana gelmesi sonucu oluşmaktadır (43).
- 3) **Fragment:** Kopmuş olan kromozom parçalarıdır. Metafaz plağında kopmuş olduğu kromozomdan ayrı yerlerde bulunurlar (43).
- 4) **Disentrik Kromozom:** İki kromozomda, uç kısmından kromozom kırığı tipinde bir kırılma ile sentrik fragmentlerin kopuk olan uçlarının birbirleriyle birleşmesi sonucu meydana gelir (43).
- 5) **İzokromozom:** Primer boğumda oluşan kromozomal bir kopma sonucu, kardeş kromatidlerin birleşmesidir. Böylece her iki kolu da birbirinin aynısı olan kromozomlar meydana gelir (57).
- 6) **Kromatid Değişimi:** Triradyal (üçlü), quadriradyal (dörtlü) şekillerde büyük ve küçük submetasentrik kromozom kollarının yan yana gelmesiyle ve kromatidlerin birbiriyle değişmesiyle oluşur (43).
- 7) **Kardeş Kromatidlerin Birleşmesi:** Kromozom kırıklarının olduğu durumlarda iki hasarlı kardeş kromatidlerin kırık olan uçlarının birleşmesidir. Mitozun anafazında bu kromatidler zıt kutuplara çekilirken kromozom köprüsü oluştururlar (43).
- 8) **Translokasyon:** Kromozomal bir kopma sonucu, kopuk olan bir uca homolog olmayan kromozomlardan başka bir kopuk parçanın yapışmasıdır. Translokasyona neden olan kromozom parçası yer değişimleri, tek taraflı veya karşılıklı (resiprokal) olabilir (57).
- 9) **İnversiyon:** Bir kromozomun içinden kopan parçanın 180° ters dönerek tekrar aynı yere yapışmasıdır. İnverson sonucunda kromozomdaki genlerin diziliş sırasında değişme meydana gelir (58).

10) Halka kromozomu: Bir kromozomun iki ucunda da meydana gelen kromozomal kopma sonucu oluşan kırık uçların birleşmesi ile halka ya da yüzük kromozomlar oluşur. (58).

11) Endoreduplikasyon: Bazı durumlarda bölünmeyen hücrelerin DNA'sı tekrar replike olur ve bunun sonucunda önceki kromozomun her bir kromatidinden iki kromatidli birer kromozom meydana gelir. Fakat bu kromozomlar birbirinden ayrılmayıp bir arada kalırlar. Metafaz plağında ise iki kromozom ve dört kromatitden oluşmuş olarak görülen bu yapılara endoreduplikasyon adı verilir (59).

12) Poliploidi: Bir hücrenin ikiden fazla kromozom takımı bulundurmasıdır (59).

Kromozom aberasyonları bantlama, floresans, otoradyografi ve FISH gibi yöntemlerle kolaylıkla saptanabilmektedir (59).

2.6. Mitotik İndeks (MI)

İncelenen toplam hücre içerisinde mitoz bölünmeyi geçiren, yani metafazdaki hücrelerin toplam hücreye yüzde cinsinden oranına mitotik indeks denir. MI, hücre kültürüne ilave edilen test maddesinin, hücre bölünmesi üzerindeki etkisini belirlemede kullanılır (43).

2.7. Mikronükleus (MN)

Genotoksisite ve kanserojenitenin belirlenmesinde kullanılan sitogenetik metodlardan biri de mikronükleus (MN) testidir (9). MN yöntemi ilk kez 1976 yılında, X ışınlarının neden olduğu genotoksisiteyi araştırmak için Countryman ve Heddle tarafından öne sürülmüştür (60). Daha sonra sitokinez-bloklama MN metodunun, Fenech ve Morley tarafından geliştirilmesiyle, nükleus bölünmesini tamamlamış hücrelerdeki MN'lar incelenmeye başlanmıştır (61). MN, hücre sitoplazması içinde ana nükleusdan ayrı, onunla aynı şekil, yapı ve boyanma özelliği gösteren küçük küresel bir yapıdır. Bu yapılar anafaz evresinde geri kalan kromozomlar, asentrik kromozom fragmentleri veya yavru nükleusa girmeyen kromozomların yoğunlaşmasıyla oluşmaktadır. Bu nedenle MN, kromozomal fragment veya tüm bir kromozom içerebilmektedir (62, 63). Geleneksel MN

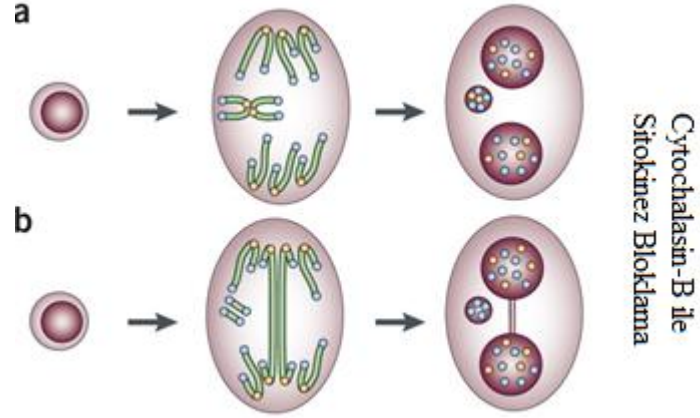
tekniğinde, MN içeren hücreler diğer hücrelerden ayıramamakta ve genetik hasar hakkında kesin olmayan bilgiler vermektedir. Bu sorunu aşmak için “Sitokinez-Blok” MN (Cytokinesis-Block Micronucleus Technique; CBMN) tekniği geliştirilmiştir (64). Bu metot, küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan Cytochalasin-B (Cyt-B) ile bir nükleer bölünmeyi tamamlayan hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanmaktadır. Cyt-B, sitokinez esnasında kardeş nükleuslar arasındaki sitoplazmayı daraltan mikofilament halkanın oluşması için gerekli olan aktin polimerizasyonun bir inhibitörüdür. Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cyt-B ilavesiyle, çekirdek bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte ve MN bulunduran hücrelerin oranı saptanabilmektedir (Şekil 2.5) (8). Başlangıçta bu yöntem kültüre edilen insan lenfositleri için geliştirilmiştir. Ancak günümüzde solid tümör ve kemik iliği hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerine de uygulanabilir bir yöntemdir (65).

MN testi sitogenetik harabiyetin tespitinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi avantajı sağlamasıyla yaygın kullanım alanı bulan bir teknik olarak belirtilmiştir (8).

MN oluşumuna neden olabilen kromozom kaybı ya da kromozomların ayıramaması (non-disjunction), kanser ve yaşlanmada gözlenen önemli olaylardan biridir. Bu durum, muhtemelen iğ iplikçiklerinde, sentromerde bozulma ya da metafazdan önce kromozom yapısının yoğunlaşması sonucu oluşmaktadır. Böylece, MN testi ile hem klastojenik hem de anöjenik etkiler belirlenebilmektedir. Bonassi ve arkadaşları'na göre periferik kan lenfositlerindeki yüksek MN frekansı insanlarda kanser riskini göstermektedir. Fenech ve arkadaşları'nın, uluslararası işbirliği ile yaptıkları insan mikronükleus projesindeki bulguları, MN ile kanser arasındaki ilişkiyi açıkça desteklemiştir (65).

MN oluşumunda, mitotik asentrik fragmentlerin kaybı, kromozomal kırık ve değişimlerin mekanik sonuçlarındaki çeşitlilik, mitoz sırasındaki mitotik iğ ipliklerindeki hatadan veya anafazdaki kompleks konfigürasyonlardan dolayı bütün

kromozomun kaybı ve apoptozis olmak üzere tanımlanmış dört mekanizma vardır (64).



Şekil 2.5. Mikronükleus oluşumu a) Anafazda geri kalan kromozomların oluşturduğu MN b) Asentrik kromozom fragmentlerinden köken alan MN, ve sentromerleri ile hücrenin karşı kutuplarına çekilen disentrik kromozomlardan nükleoplazmik köprü oluşumu (65).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

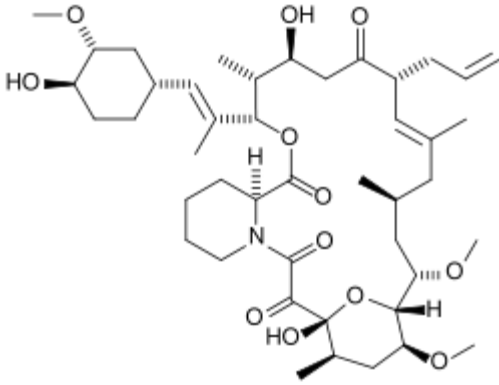
Bu çalışmada 25-30 yaşlarında, sigara içmeyen, kronik, metabolik ve genetik hastalığı olmayan sağlıklı dört erkek donörden 5'er ml periferik kan örneği alınmış ve tam kan hücre kültürü yapılmıştır. Kültür ortamına Takrolimus değişik doz ve zamanlarda uygulanarak olası genotoksik etkileri araştırılmıştır.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.1.1.1. Takrolimus

Açık Formülü:



Bilinen adları : FK-506, Prograf, Protopic, Fujimycin

Kapalı formülü : C₄₄H₆₉NO₁₂

Molekül ağırlığı : 804.018 g/mol

Safılığı : >99%

CAS No: 104987-11-3

3.1.1.2. Siklofosfamid (Cyclophosphamide)

Siklofosfamid bu çalışmada pozitif kontrol olarak kullanıldı. Kültür tüplerinde 160 ng/ml'lik dozda kullanılacak şekilde steril saf suda hazırlandı ve + 4 °C'de saklandı.

3.1.1.3. Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

DMSO (Fluka, 41640), bu çalışmada Takrolimus'un eriticisi olarak, kültür içerisinde bulunma miktarı %1' i geçmeyecek şekilde kullanıldı.

3.1.1.4. Kromozom Medyumu

Bu çalışmada Peripheral Blood Karyotyping Complete Medium (Bio.İnd., 01-201-1B), hücre kültürü için kullanıldı. Bu medyum her tüpe 5 ml olacak şekilde paylaştırıldı ve bu miktarlarda kullanıldı. Kültür tüpleri steril olarak temin edildi.

3.1.1.5. Kolşisin

Kromozom preparatlarının hazırlanmasında mitotik iplik inhibitörü olarak kolşisin (Sigma, C9754) kullanıldı.

3.1.1.6. Hipotonik

Hipotonik olarak 0,075 M'lık KCl kullanıldı. Her preparasyondan yaklaşık 2 saat önce yeteri kadar miktar hazırlanıp kullanım amacına göre 37 °C'deki inkübatörde ya da +4 °C'de bekletildi.

3.1.1.7. Fiksatif

KKD ve KA için kullanılan fiksatif, 1 kısım glacial asetik asitin 3 kısım metanol ile karıştırılması sonucu hazırlandı. MN için ise iki farklı fiksatif kullanıldı. İlk fiksatif 1 kısım glacial asetik asitin 5 kısım metanol ile karıştırıldıktan sonra 1/1 oranında %0,9 NaCl ile seyreltilmesiyle hazırlandı. Diğer fiksatifler ise NaCl ilave edilmeden kullanıldı. Fiksatif, her seferinde preparat yapım işleminden iki saat önce hazırlanıp +4 °C'de saklandı.

3.1.1.8. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)

BrdU (sigma, B 5002) eriyiği steril distile su içerisinde hazırlandı, daha sonra 0.2 µm çapındaki membran filtre ile steril edildi. Bu eriyikten KKD kültür tüpleri

içerisindeki kromozom medyumuna son konsantrasyon 10 µg/ml olacak şekilde ilave edildi.

3.1.1.9. Sorensen Tamponu

KKD'yi incelemek amacıyla preparat yapımı sırasında preparatlar Sorensen tamponu içerisinde UV lambası ile ışınlandırıldı. Ayrıca bu tampon %5'lik Giemsa boyası hazırlanmasında da kullanıldı. Bu tampon eriyik tampon A ve tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlandı ve bu çözeltiler çalışmanın amacına uygun olarak birbirleriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanıldı.

Hazırlanışı:

Tampon A: 11,34 gr KH_2PO_4 250 ml saf su içinde eritildi (pH=4, 8).

Tampon B: 14,83 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 250 ml saf su içinde eritildi (pH=9,3).

3.1.1.10. SSC (Standart Saline Sitrát) Eriyiği

Bu eriyik ışınlamadan sonra kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını artırmak amacıyla kullanıldı. SSC eriyiğini hazırlamak için 11,05 gr trisodyum sitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ve 21, 9 gr NaCl kullanıldı. Bu iki madde ayrı ayrı kaplarda bir miktar saf su içerisinde çözüldü, daha sonra aynı kaba aktarılarak birbirleriyle karıştırılıp, üzerlerine 500 ml oluncaya kadar saf su ilave edildi. Hazırladığımız bu stok eriyik 5xSSC buzdolabında saklandı. Deneyimizde, bu stoktan 20 ml alıp üzeri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlanarak elde edilen 1x SSC kullanıldı.

3.1.1.11. PBS (Phosphate Buffered Saline)

KA preparatlarının boyanması sırasında tripsinin etkisini nötralize etmek amacı ile kullanıldı.

Hazırlanışı:

8 gr NaCl, 0,2 gr KCl, 0,92 gr Na_2HPO_4 ve 0,2 gr KH_2PO_4 1 lt distile su içinde eritilerek stok halinde hazırlandı.

3.1.1.12. Giemsa

Giemsa boyası (Merck, 9204) distile su içinde %5'lik boya eriyiği olarak hazırlandı ve preparatların boyanmasında kullanıldı.

3.1.1.13. Entellan

Preparat kapatma solüsyonudur (Merck, 7961). Preparatlar daimi hale getirilirken lam ve lamelin birbirlerine yapıştırılmasında kullanıldı.

3.1.1.14. Cytochalasin B

Cytochalasin B (Serva,18015) MN testinde, hücre bölünmesi sırasında sitokinezi engellemek ve iki nükleuslu hücreler oluşturmak amacıyla kullanıldı. Kültür tüplerinde 6 µg/ml olacak şekilde distile su içerisinde hazırlandı.

3.1.1.15. Tripsin

KA preparatlarının boyanması sırasında kullanılan tripsin solüsyonu histon dışı ve kromozomal proteinlerin denatüre edilmesi ve kromozomların daha net görünmesi amacıyla kullanıldı. %0,12'lik eriyik halinde hazırlandı.

3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları

3.1.2.1. Hassas Terazi

0,001 gr hassasiyetindeki terazi (Precisa) kimyasalların tartılmasında kullanıldı.

3.1.2.2. Santrifüj

Rotor çapı 21 cm olan ve 4000 rpm'e kadar yükselebilen devir hızı, 99dk'lık zaman ayarlayıcı ve 28 tüp kapasiteli santrifüj (Hettich Universal) çalışmalarda kullanıldı.

3.1.2.3. Mikroskop

Koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan binoküler ışık mikroskobu (Olympus) preparat incelemeleri sırasında kullanıldı.

3.1.2.4. İnkübatör

Hücrelerin 37 °C’de inkübe edilmesi için inkübatör (Nüve EN500) kullanıldı.

3.1.2.5. Flow Kabin (Steril Kabin)

Hücre kültürü tüplerine kan ekiminin yapılması, test solüsyonlarının hazırlanması ve kültür tüplerine ilave edilmesi sırasında steril bir ortam olarak, % 99,9 partikül tutma özellikli filtreye sahip, UV ve floresan ışığı olan flow kabin (Labormed) kullanıldı.

3.1.2.6. Su Banyosu

Hücre kültürü preparatları hazırlandıktan sonra, kardeş kromatidlerin farklı boyanmasında kullanılan SSC eriyiğinin 58-60 °C’de sabit kalmasını sağlamak amacıyla 0-60 °C’ye ayarlanabilir su banyosu (Memmert) kullanıldı.

3.1.2.7. pH Metre

Kimyasalların pH değerlerini saptamak için pH metre (Hanna Phep) kullanıldı.

3.1.2.8. Vorteks

Vorteks harvest işleminde hipotonik ve fiksatif aşamasında kullanıldı.

3.2. Takrolimus Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Takrolimus dozunun belirlenmesinde bu etken madde ile ilgili daha önce Oliveira ve arkadaşları tarafından yapılmış olan *in vitro* çalışmada kullanılan 5, 20 ve 40 ng/ml’lik konsantrasyonlar referans olarak alındı (20). Ayrıca, hastaların çoğunluğunda 20 ng/ml’nin altındaki Takrolimus kan derişimleri sağlandığında başarı ile tedavi edilebildiğini gösteren klinik çalışmalar referans olarak alındı (66). Çalışmamızda *in vitro* lenfosit kültürlerine uyguladığımız dozlar; minimum, maksimum tedavi dozları ve maksimum tedavi dozlarının üzerinde olacak şekilde belirlendi. Bu çalışmada kültürdeki memeli hücrelerinin hücre siklusu yaklaşık 24 saat olduğu için, ikinci ve üçüncü mitozların gözlenebilmesi amacıyla KKD ve KA testleri için inkübasyon süresi 72 saat, MN testi için ise 68 saat olarak belirlendi.

Belirlenen konsantrasyonlar ile insan lenfosit kültürleri 24 ve 48 saat boyunca muamele edildi. Ayrıca çalışmalarda hiçbir kimyasal uygulanmamış negatif bir kontrol grubu ve Siklofosfamid eklenmiş 24 ve 48 saatlik pozitif kontrol grupları da kullanıldı.

3.3. Çalışma Planı

Çalışmamızda çeşitli genotoksik parametrelerin kullanıldığı toplam üç grup oluşturuldu. Hiçbir kimyasal madde uygulaması yapılmayan bir negatif kontrol grubunun yanı sıra pozitif kontrol olarak kullanılan Siklofosfamid'in 24 ve 48 saatlik uygulamaları yapıldı. Deney grubu olarak Takrolimus'un 5, 25, 50 ve 100 ng/ml'lik dozları yine 24 ve 48 saatlik uygulamalarda çalışıldı.

Çizelge 3.1. Çalışma Planı

Genotoksisite Parametreleri	Gruplar	Süre (saat)	Doz (ng/ml)
KKD KA MN	Negatif Kontrol	-	-
	Pozitif Kontrol	24	160
48			
RI NBI	Takrolimus	24	5
			25
		48	50
			100

3.4. Kardeş Kromatid Değişimini ve Kromozom Aberasyonlarını Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İncelemeler

3.4.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Sağlıklı ve sigara içmeyen 25-30 yaş arası gönüllü dört erkek donörden alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örneklerinden 5'er ml'lik kromozom medyumlarına steril şartlarda 0,4 ml ekildi. Ekim sırasında, KA çalışılacak tüplere

herhangi bir kimyasal madde uygulaması yapılmazken KKD çalışılacak kültür tüplerinin her birine daha önce hazırladığımız BrdU eriyiğinden her tüpe son konsantrasyon 10 µg/ml olacak şekilde ilave edilerek iyice karıştırıldı ve hücre kültürü inkübatörde 37 °C’de 72 saat için inkübasyona bırakıldı (67).

Takrolimus’un etkisini incelemek için kültür süresinin bitimine 24 ve 48 saat kala Takrolimus’un daha önce belirlenmiş konsantrasyonları olan 5, 25, 50 ve 100 ng/ml’lik miktarları kültür tüplerine ilave edildi. Ayrıca 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde pozitif kontrol olarak Siklofosamid kullanıldı. Siklofosamid tüplere 160 ng/ml olacak şekilde verildi. 72 saatlik kültür sonunda KKD ve KA için aynı harvest işlemleri uygulanarak preparatlar boyanmaya hazır hale getirildi. Kültür süresinin bitiminden 1 saat önce (kültürün 71. saatinde) her tüpe hazırlanan kolçisin eriyiğinden ilave edildi (0,04 ml) ve tüpler hafifçe sallanarak iyice karıştırıldı. Hücreler 1 saat süresince 37 °C’de kolçisin ile muamele edildi. Kültür süresi olan 72. saatin bitiminde kültür tüpleri 1600 rpm’de 10 dk santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden 0,5-0,7 ml’lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, etüvde 37 °C’de tutulan hipotonik eriyik ilave edildi. Bu eriyiğin ilavesi damla damla ve vorteks ile karıştırılarak yapıldı. Her tüpe 8 ml hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler, ağzı kapatılarak 20 dk oda ısısında bekletildi. Sürenin sonunda tüpler 10 dk 1600 rpm’de santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Hipotonik eriyik ilavesi gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 6 ml soğuk fiksatif ilave edildi. Hücreler 1600 rpm’de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edildi. Bu işlem 3 kere tekrarlandı. 3. fiksatif muamelesinin sonunda tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görüldü. Eğer sıvı berraklaşmamışsa tekrar fiksatif muamelesine devam etmek gerekir. Her fiksatif ilavesinden sonra tüpler santrifüj edilerek üstteki sıvı atıldı. Son santrifüjden sonra dipte 0,5-0,7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra preparat yapma işlemine geçildi. Tüpün dibinde toplanan hücreler pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirildi. Pasteur pipetine 4-5 damla olacak şekilde bu hücre süspansiyonundan çekildi. Pasteur pipetinden, daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanmış lamaların üzerine 50-75 cm yükseklikten farklı alanlara 1’er damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak (her lama 3-4 damla) hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerinde yayılması sağlandı.

Hücre süspansiyonunun lamlara damlatılması esnasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edildi. Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda ısısında bekletildi (67).

3.4.2. KKD Preparatlarının Boyanması

Bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını sağlamak amacıyla bir günlük preparatlar ışınlama kabına konarak üzeri bir film gibi örtülecek şekilde Sorensen tamponu ile kapatıldı. Işınlama eriyiği, 5 ml tampon A, 5 ml tampon B'den alınıp bu karışımın distile su ile 100 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlandı (pH=6,8). Işınlama eriyiğinin fazla veya az olması kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını önemli derecede etkilediği görüldü. Bu şekilde ince bir tabaka halinde ışınlama eriyiği ile örtülen preparatlar, karanlıkta 15 cm yükseklikten 30W'lık 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen ultraviyole lambası ile 30 dk ışınlandı. Işınlama bittikten sonra preparatlar 1xSSC eriyiği içerisinde 58-60 °C arasındaki sıcaklıklarda 60 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi bitmeden 15 dk önce %5'lik Giemsa boya eriyiği hazırlandı (42, 68).

% 5'lik Giemsa'nın Hazırlanması: 5 ml tampon A, 5 ml tampon B ve 5 ml Giemsa karıştırılarak üzerleri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlandı (pH=6,8). Sonra bu boya dik bir şale içine filtre kâğıtları ile süzüldü. İnkübasyon süresinin sonunda preparatlar 1xSSC solüsyonundan alınarak direkt olarak boya içerisine konuldu ve yaklaşık olarak 25 dk boya içerisinde bekletildi (kardeş kromatidler arasındaki en iyi kontrast farkı bu sürede sağlanmıştır). Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarıldı, üç ayrı kaptaki saf su içinden geçirilerek preparatlar üzerindeki fazla boyanın akması sağlandı. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette konularak kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirildi. Entellan kuruduktan sonra bu daimi preparatlarda mikroskopik incelemeler yapıldı (43, 68).

3.4.3. KA Preparatlarının Boyanması

KA preparatlarının boyanmasında GTG (Giemsa-Tripsin-Giemsa) bantlama yöntemi kullanıldı. Bunun için, içinde sırasıyla tripsin (%0,12), PBS tamponu ve

%5'lik giemsa boya solüsyonları bulunan üç şale hazırlandı. 24 saat oda ısısında bekletilmiş olan preparatlar 2-3 saniye tripsin ile muamele edildikten sonra tampondan geçirildi. Tripsinden geçirme preparatın yaşlanma süresi ile ilişkilidir. Uzun süre yaşlandırılan preparatların tripsin ile daha uzun süre temas ettirilmesi gerekebilir. Preparatlar tampondan geçirildikten sonra 5 dakika %5'lik giemsa boyasında bekletildi. Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarıldı, üç ayrı kaptaki saf su içinden geçirilerek preparatlar üzerindeki fazla boyanın akması sağlandı. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette konularak kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirildi. Entellan kuruduktan sonra bu daimi preparatlarda mikroskobik incelemeler yapıldı.

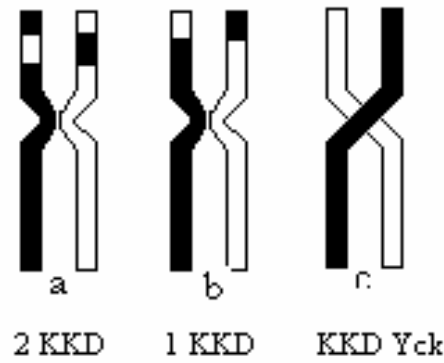
3.4.4. Mikroskobik İnceleme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar binoküler ışık mikroskobunda immersiyon objektifi ile incelendi.

3.4.4.1. KKD ve Replikasyon İndeksi (RI)'nin Saptanması

3.4.4.1.1. KKD Sayısının Saptanması

KKD sayısı, her bireyin kan kültürüne ait preparatlardan iyi dağılmış ve ikinci mitozu geçiren 25 hücrede (4 kişiden toplam 100 hücrede) saptandı. KKD sayısı bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla belirlendi. Ortadan bir parça değişimi olmuş ise bu iki KKD olarak değerlendirildi, uçtan parça değişimi olmuş ise bu da bir KKD olarak sayıldı. Ancak bu incelemeler esnasında kromatidlerin primer boğum bölgelerinden dönüm yapıp yapmadıklarına dikkat etmek gerekir. Bu durumdaki kromozomlarda KKD yoktur (Şekil 3.1) (43).



Şekil 3.1. Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi (43).

3.4.4.1.2. Replikasyon İndeksi (RI)'nin Saptanması

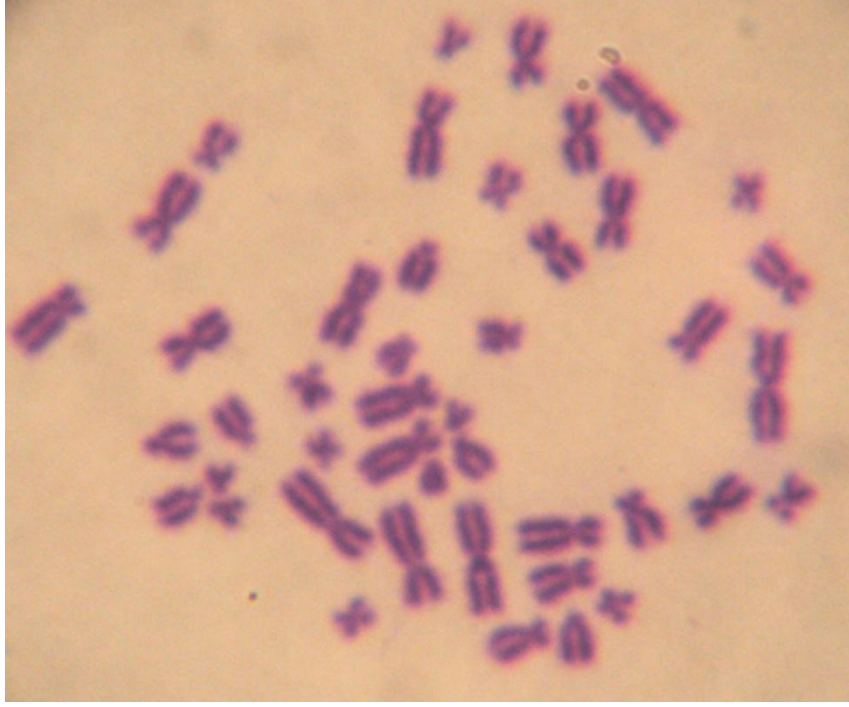
Takrolimus'un DNA replikasyonu üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile RI hesaplandı. Bunun için KKD preparatlarında tesadüfi seçilmiş 100 hücre incelendi. Bu incelemeler sırasında gözlenen birinci (Şekil 3.3), ikinci (Şekil 3.4) ve üçüncü (Şekil 3.5) metafaz devresindeki hücrelerin sayısı saptandı. Bu verilerden yola çıkarak RI şu şekilde hesaplandı (53):

$$RI = \frac{1 \times M1 + 2 \times M2 + 3 \times M3}{100}$$

M1: 1. Mitozdaki hücre sayısı

M2: 2. Mitozdaki hücre sayısı

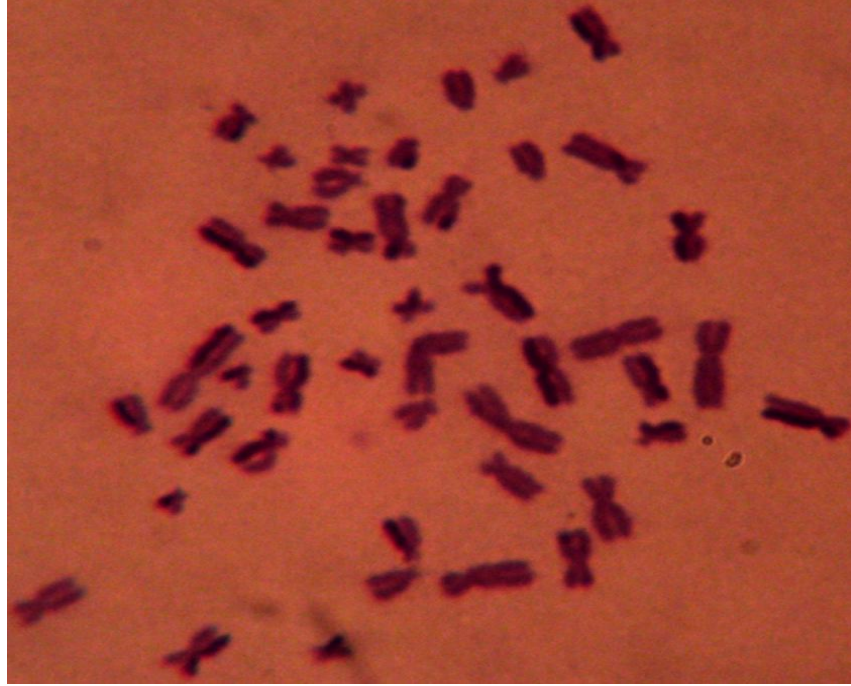
M3: 3. Mitozdaki hücre sayısı



Şekil 3.2. Birinci Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Metafaz Kromozomları (x1000).



Şekil 3.3. İkinci Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Metafaz Kromozomları (x1000).



Şekil 3.4. Üçüncü Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Metafaz Kromozomları (x1000).

3.4.4.2. Kromozom Aberasyonlarının ve Mitotik İndeksin Saptanması

3.4.4.2.1. Kromozom Aberasyonlarının Saptanması

Dört donörden hazırlanan preparatlarda iyi dağılmış kromozomlara sahip 100 metafaz alanı (4 kişiden toplam 400 metafaz) KA'yı saptamak amacıyla incelendi. İnceleme sırasında, bu hücrelerde gözlenen kromozomal ve kromatid tipi yapısal aberasyonlar ile sayısal kromozom düzensizlikleri ISCN 2009'a (56) göre analiz edilerek kaydedildi. Saptanmış olan kromozom aberasyonlarından hücre başına düşen belirlenerek, anormal hücre yüzdesi hesaplandı.

3.4.4.2.2. Mitotik İndeks (MI)'in Saptanması

Takrolimus'un mitoz bölünme üzerindeki etkilerini belirlemek amacı ile her bir bireye ait KA için hazırlanmış preparatlarda toplam üç bin hücre incelendi ve bunlar arasında mitoz bölünme geçiren hücrelerin sayısı kaydedildi. 3000 hücre

içinde mitoz geçiren hücrelerin oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanarak yüzde cinsinden MI belirlendi (43).

$$MI = \frac{\text{Metafazdaki hücre sayısı (M)} \times 100}{N}$$

N: Toplam hücre sayısı

3.5. Mikronükleus (MN) Sıklığını Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İncelemeler

3.5.1. Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması

MN sıklığını saptamak için, sağlıklı ve sigara içmeyen 25-30 yaş arası dört erkek donörden alınan, 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örneklerinden kromozom medyumlarına steril şartlarda 0,2 ml ekildi. Hücre kültürü 37 °C'de 68 saat için inkübe edildi. Takrolimus'un etkisini incelemek için, daha önce belirlenmiş olan konsantrasyonlar (5, 25, 50 ve 100 ng/ml) kültür bitimine 24 ve 48 saat kala kültür tüplerine ilave edildi ve hücrelerin 24 ve 48 saat boyunca Takrolimus ile muamele edilmeleri sağlandı. İki nükleuslu hücre oluşumunu sağlamak için de kültürün bitimine 24 saat kala (44. saatte) bütün tüplere son konsantrasyonu 6 µg/ml olacak şekilde sitokalsin B ilave edildi. Ayrıca 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde pozitif kontrol olarak Siklofosfamid kullanıldı. Siklofosfamid tüplere 160 ng/ml olacak şekilde verildi. Kültür süresi olan 68. saatin bitiminde kültür tüpleri 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden 0,5-0,7 ml'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, +4 °C'de tutulan soğuk hipotonik ilave edildi. Bu eriyiğin ilavesi damla damla ve vorteks ile karıştırarak yapıldı. Hücreler 5 dk hipotonik eriyikte +4 °C'de muamele edildi. Sürenin sonunda tüpler 10 dk 1000 rpm'de santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Hipotonik eriyik ilavesi gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 6 ml olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edildi. İlk fiksatif 1 kısım asetik asit 5 kısım metil alkol karışımınının 1/1 oranında %0,9 NaCl ile seyreltilmesiyle hazırlandı. Oda sıcaklığında 15 dk fiksatif ile muamele edilen hücreler 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldıktan

sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edildi. Bu işlem 2 kere tekrarlandı ve ilk fiksatiften farklı karışımlar kullanıldı (1 kısım asetik asit 5 kısım metil alkol). Son santrifüjden sonra dipte 0,5-0,7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra preparat yapma işlemine geçildi. Tüpün dibinde toplanan hücreler pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirildi. Daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanan lamaların üzerine farklı alanlara 1'er damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak (her lama 4-5 damla) hücrelerin lam üzerinde yayılması sağlandı. Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda ısısında bekletildi (69).

3.5.2. Preparatların Boyanması

Hazırlanan preparatlar %5'lik giemsa boyası ile 10 dakika boyunca boyandı.

%5'lik Giemsa'nın Hazırlanması: 5 ml Giemsa 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlandı.

3.5.3. Mikroskopik İnceleme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar binoküler ışık mikroskopunda 40'lık objektif ile incelendi (x400). Bu incelemeler sırasında her bir bireyden hazırlanan preparatlardan 2000 binükleer hücre sayıldı, bu iki nükleuslu hücreler içerisinde mikronükleuslu olanlar saptandı. Bu verilerden MN %'si belirlendi (65).

3.5.3.1. MN Sayısının ve Nükleus Bölünme İndeksi (NBI)'nin Saptanması

MN ayırımı Fenech (70) tarafından belirlenen kriterlere göre yapıldı. Bu kriterlere göre;

- 1) Ana nükleus ve MN, nükleus zarıyla çevrili yuvarlak ya da oval olmalıdır,
- 2) MN'ler ana nükleusun 1/3'ünden küçük ve 1/16'sından büyük olduklarında değerlendirilmelidir,
- 3) MN'ler ana nükleus gibi boyanmalıdır,
- 4) MN'ler ana nükleustan açık bir şekilde ayrılmış olmalıdır.

Sitokinez bloklama yönteminin en önemli yararı, bölünen hücre popülasyonunda nükleus bölünmesinin ilerleyişini ve çoğalmasını ölçebilmesidir. Bu

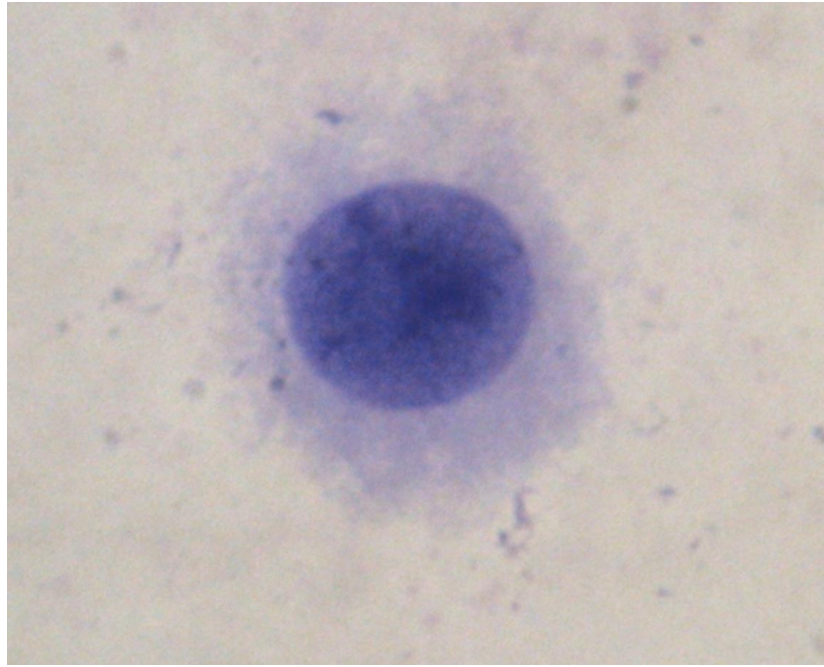
durum, Cyt-B ilavesinin ardından oluşan bir nükleuslu, iki nükleuslu, multinükleuslu (>2) hücrelerin sayılmasıyla yapılır.

Nükleus bölünme indeksi (NBI) Fenech tarafından önerilen formüle göre hesaplandı (65, 71).

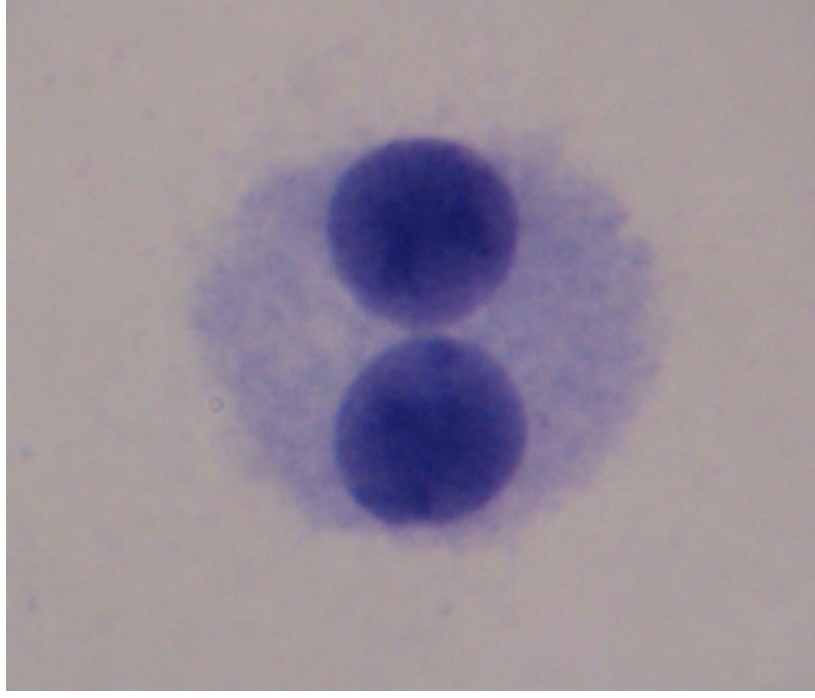
$$NBI = \frac{(1 \times N1 + 2 \times N2 + 3 \times N3 + 4 \times N4)}{\text{Toplam Hücre Sayısı}}$$

N1: bir nükleuslu (Şekil 3.5), N2: iki nükleuslu (Şekil 3.6), N3: üç nükleuslu (Şekil 3.7), N4: dört nükleuslu (Şekil 3.8) hücrelerin sayısını göstermektedir.

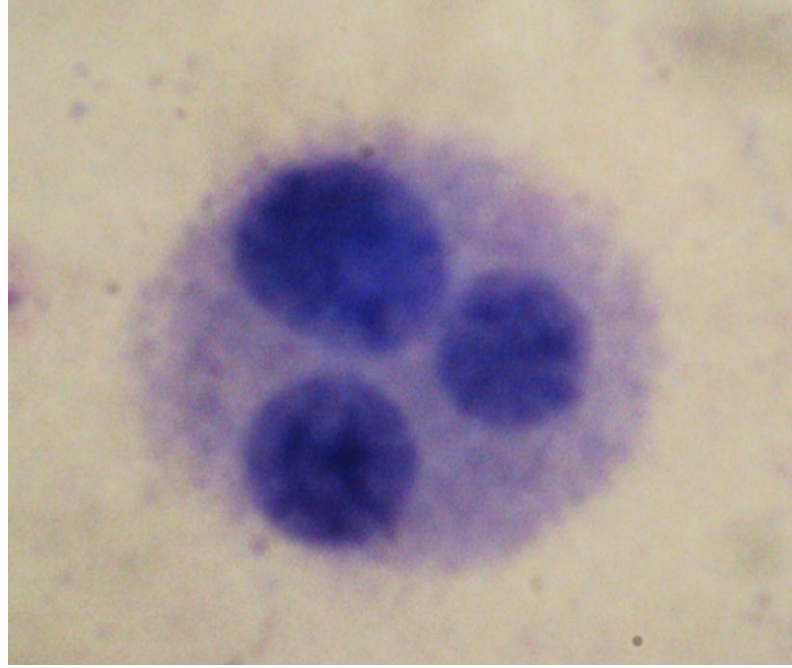
NBI'nin hesaplanması kimyasal veya fiziksel bir maddenin sitotoksik etkisini göstermede önemli bilgiler sağlar (70). Bu nedenle, MN bakımından incelenen preparatlar daha sonra nükleus bölünme indeksini (NBI) belirlemek için tekrar incelendi. NBI için her preparatta toplam 1000 hücre (4 kişi 4000 hücre) sayıldı.



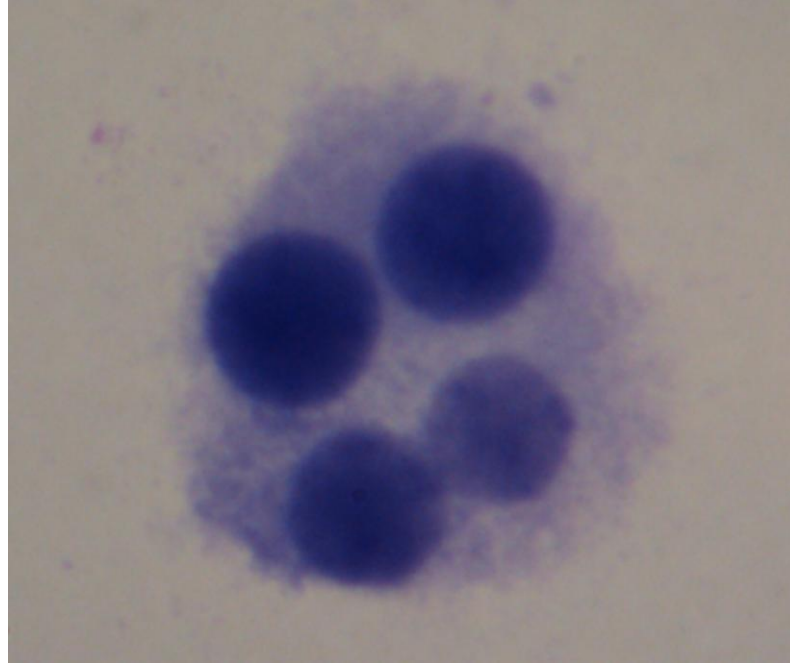
Şekil 3.5. Bir nükleuslu hücre (x1000).



Şekil 3.6. İki nükleuslu hücre (x1000).



Şekil 3.7. Üç nükleuslu hücre (x1000).



Şekil 3.8. Dört nükleuslu hücre (x1000).

3.6. İstatistiksel Analiz

Mikroskopik inceleme sonucunda elde edilen KKD, KA, MI, RI, NBI ve MN parametrelerine ait verilerin istatistiksel değerlendirmelerinde Windows for SPSS Version 16.0 yazılım programı kullanıldı. Ölçülebilir veriler ortalama (\bar{X}) \pm standart sapma (SD) ile sunuldu. Shapiro Wilk normallik testi ile değişkenlerin normal dağılım göstermediği saptandı ($p < 0.05$). Her bir grubun ortalamaları arasındaki farkın önemli olup olmadığı Kruskal-Wallis varyans analizi ve Mann-Whitney U testi (72) ile test edildi. $P \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Takrolimus'un Kardeş Kromatid Değişimi Üzerindeki Etkileri

Takrolimus, 24 saatlik muamele süresinde kullanılan tüm konsantrasyonlarda KKD'yi genel olarak kontrole göre arttırdı (Çizelge 4. 1). Ancak KKD'de görülen bu artış, sadece en yüksek konsantrasyon (100 ng/ml) için istatistiksel olarak önemli bulundu (Çizelge 4.1).

48 saatlik muamelelerde Takrolimus KKD'yi genel olarak kontrole nazaran arttırdı, ancak bu artış sadece 25 ng/ml ve en yüksek konsantrasyonda (100 ng/ml) kontrole göre önemli bulundu (Çizelge 4.1).

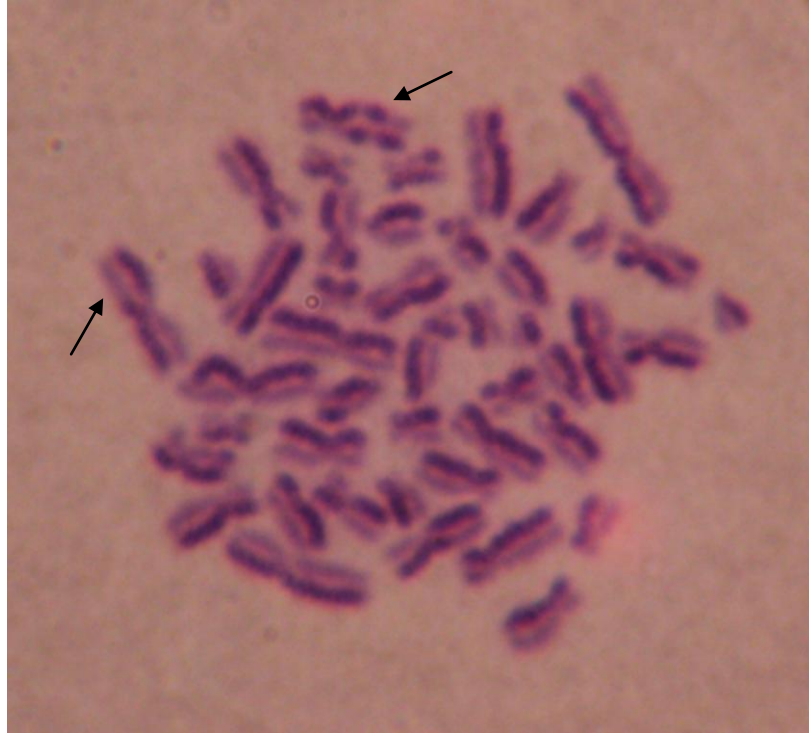
Çizelge 4.1. Değişik dozlarda Takrolimus ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde hücre başına düşen ortalama KKD sayısı.

Gruplar	Süre (saat)	Konsantrasyon (ng/ml)	Min-max KKD	KKD/Hücre* X± SD
Kontrol	-	-	1-10	4,97 ± 0,85
Pozitif kontrol (Siklofosfamid)	24	160	4-18	8,86 ± 0,75 a
Takrolimus	24	5	1-11	5,51 ± 0,18
		25	3-11	6,09 ± 0,42
		50	3-12	5,42 ± 0,37
		100	3-15	6,83 ± 0,45 a
Pozitif kontrol (Siklofosfamid)	48	160	8-24	13,05 ± 0,48 a
Takrolimus	48	5	2-12	5,45 ± 0,25
		25	3-14	6,59 ± 0,44 a
		50	2-13	6,04 ± 0,68
		100	4-14	7,15 ± 0,46 a

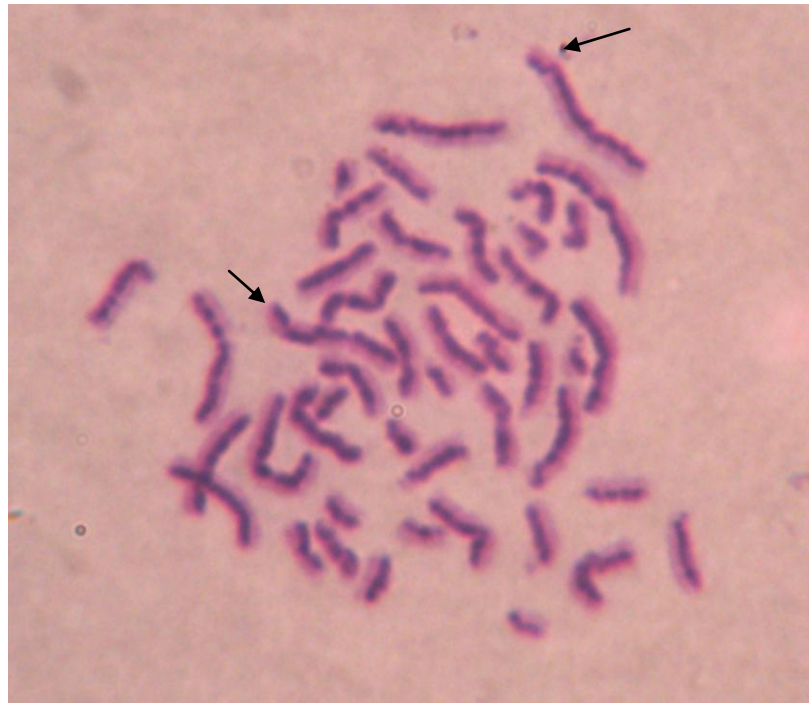
a: Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli. $P \leq 0,05$

*:Toplam 100 hücre

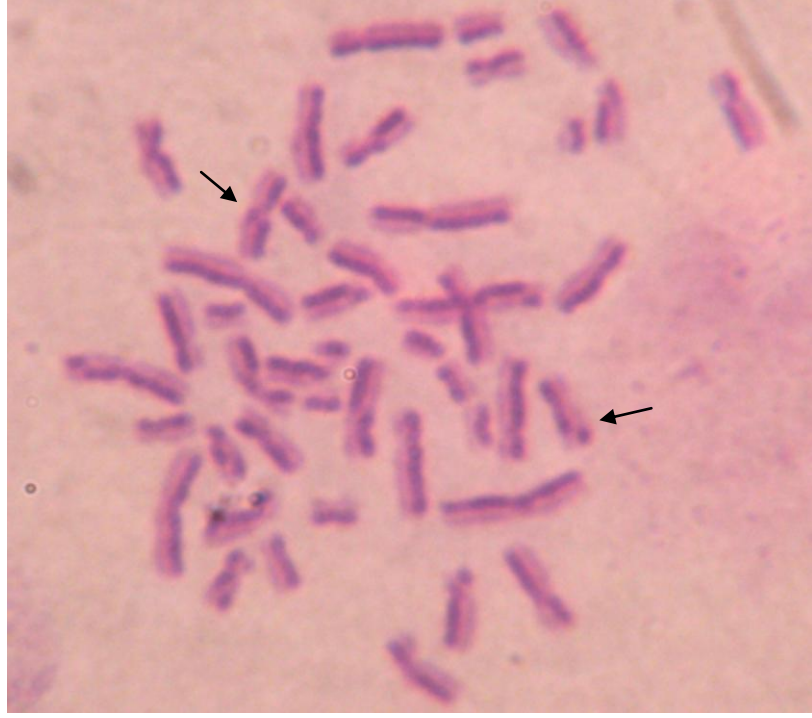
1KKD ve 2KKD'li oluşumlar şekilde gösterildi (Şekil 4.1) (Şekil 4.2) (Şekil 4.3) (Şekil 4.4).



Şekil 4.1. 5 ng/ml Takrolimus ile 24 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde 1 KKD ve 2 KKD



Şekil 4.2. 25 ng/ml Takrolimus ile 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde 1 KKD ve 2 KKD



Şekil 4.3. 50 ng/ml Takrolimus ile 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde 1 KKD ve 2 KKD



Şekil 4.4. 100 ng/ml Takrolimus ile 24 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde KKD

4.2. Takrolimus'un Kromozom Aberasyonları Oluşumu Üzerindeki Etkileri

Takrolimus ile 24 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde kromozom aberasyonlu hücre oranının tüm konsantrasyonlarda kontrole göre önemli derecede yüksek olduğu saptandı (Çizelge 4.2).

48 saatlik muamelelerde Takrolimus KA'yı genel olarak negatif kontrole göre arttırdı, bu artış tüm konsantrasyonlarda kontrole göre önemli bulundu (Çizelge 4.2).

Takrolimus'un insan periferal lenfositlerinde kromozom aberasyonları arasında en çok kromatid kırığı (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6), kromozom kırığı (Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9), kardeş kromatid birleşmesi, kromatid değişimi (Şekil 4.10), endoreduplikasyon (Şekil 4.11) ve poliploidi (Şekil 4.12)'ye neden olduğu gözlemlendi.

Çizelge 4.2. Değişik dozlarda Takrolimus ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde* KA yüzdesi.

Gruplar	Süre (saat)	Konsantrasyon (ng/ml)	Anormal Hücre(%) X±SD
Kontrol	-	-	2,25± 0,50
Pozitif kontrol (Siklofosfamid)	24	160	7,00 ± 0,00a
Takrolimus	24	5	3,75 ±0,50a
		25	6,00 ± 0,82a
		50	5,00 ± 0,82a
		100	6,75 ± 0,50a
Pozitif kontrol (Siklofosfamid)	48	160	9,5 ± 0,58a
Takrolimus	48	5	4,50 ± 0,58a
		25	4,00 ± 0,82a
		50	4,50 ± 0,58a
		100	7,25 ± 0,50a

a: Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli. P≤0,05

*:Toplam 400 hücre



Şekil 4.5. 50 ng/ml Takrolimus ile 48 muamele edilen insan periferel lenfositlerinde kromatid kırığı (x1000)



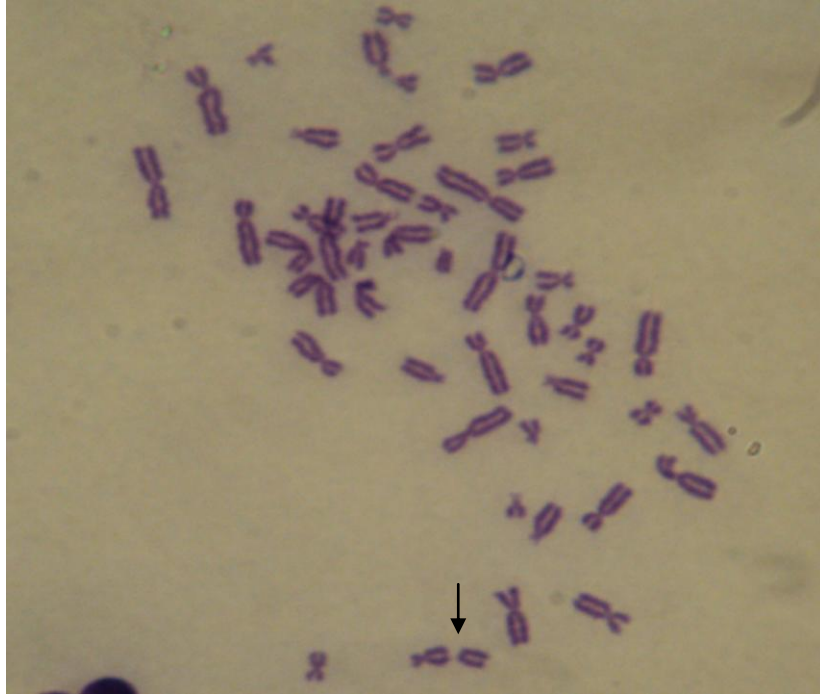
Şekil 4.6. 100 ng/ml Takrolimus ile 24 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde kromatid kırığı (x1000)



Şekil 4.7. 50 ng/ml Takrolimus ile 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde kromozom kırığı (x1000)



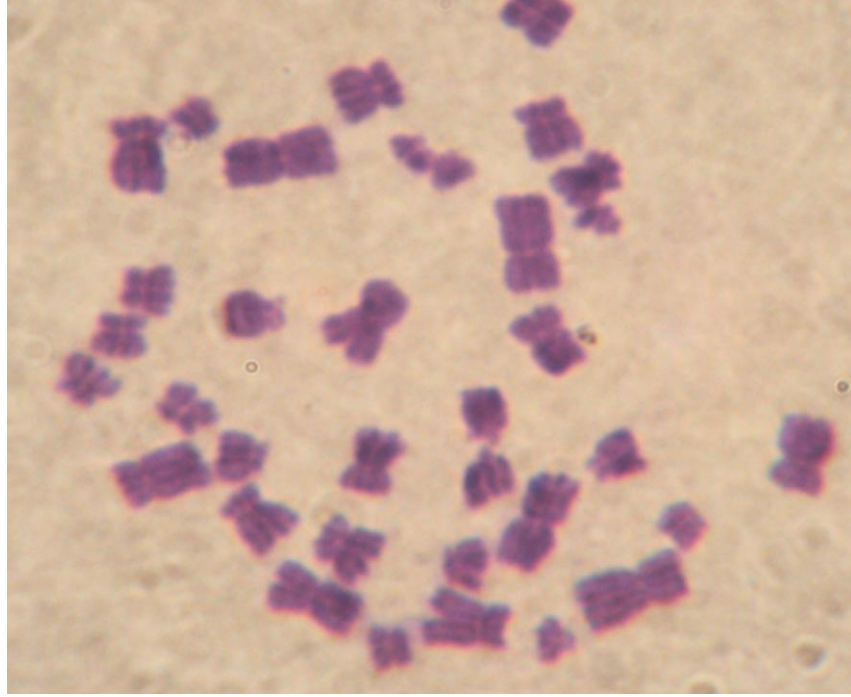
Şekil 4.8. 100 ng/ml Takrolimus ile 24 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde kromozom kırığı (x1000)



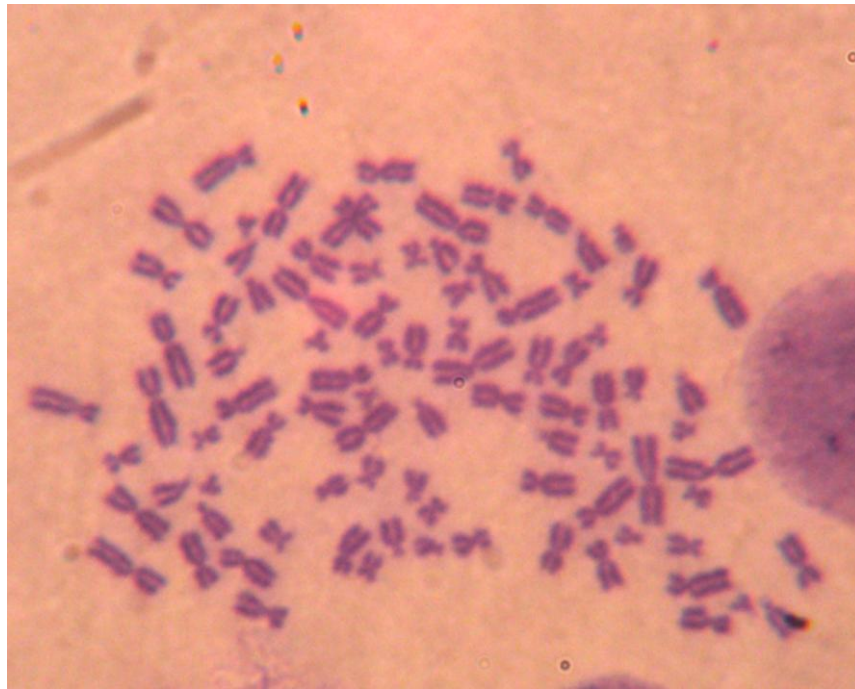
Şekil 4.9. 100 ng/ml Takrolimus ile 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde kromozom kırığı (x1000)



Şekil 4.10. 25 ng/ml Takrolimus ile 48 muamele edilen insan periferel lenfositlerinde kromatid değişimi (x1000)



Şekil 4.11. 5 ng/ml Takrolimus ile 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde endoreduplikasyon (x1000)



Şekil 4.12. 25 ng/ml Takrolimus ile 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde poliploidi (x1000)

4. 3. Takrolimus'un Mikronükleus Sıklığı Üzerindeki Etkileri

Takrolimus, 24 ve 48 saatlik muamele süresinde tüm konsantrasyonlarda, insan periferik lenfositlerinde MN'li binükleer hücre yüzdesini kontrole nazaran arttırdı (Çizelge 4.3). Bu artış tüm dozlar için istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Yapılan mikroskopik incelemelerde bir mikronükleuslu (Şekil 4.13) binükleer hücrelerin yanı sıra iki mikronükleuslu binükleer hücrelere de rastlandı (Şekil 4.14).

Çizelge 4.3. Değişik dozlarda Takrolimus ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde MN'li binükleer hücre* yüzdesi ve nükleer bölünme indeksi*.

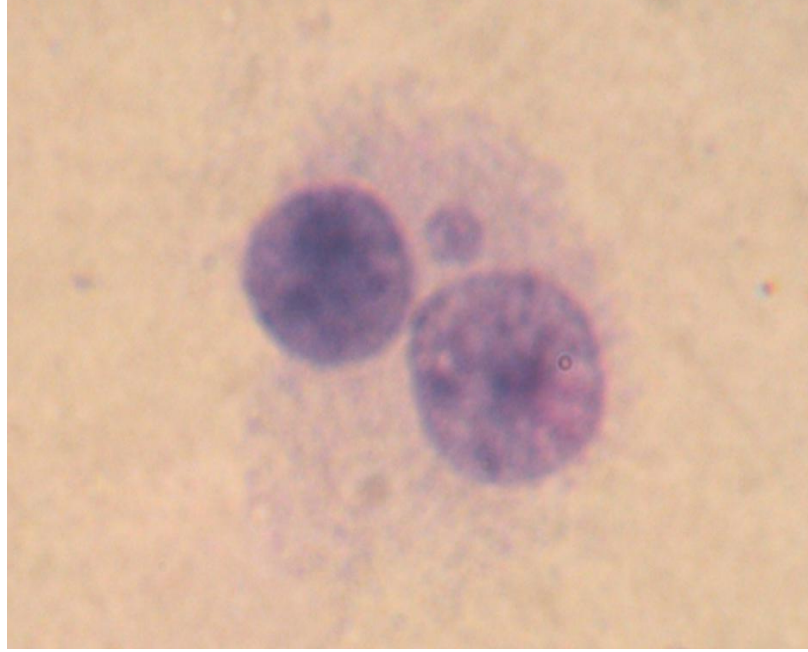
Gruplar	Süre (saat)	Konsantrasyon (ng/ml)	MN X±SD	NBI X±SD
Kontrol	-	-	0,34 ± 0,06	1,20 ± 0,04
Pozitif kontrol (Siklofosamid)	24	160	1,10 ± 0,13a	1,15 ± 0,01a
Takrolimus	24	5	0,91 ± 0,08a	1,17 ± 0,06
		25	0,93 ± 0,17a	1,19 ± 0,02
		50	0,74 ± 0,08a	1,18 ± 0,01
		100	0,95 ± 0,32a	1,11 ± 0,02a
Pozitif kontrol (Siklofosamid)	48	160	2,24 ± 0,10a	1,09 ± 0,01a
Takrolimus	48	5	0,93 ± 0,12a	1,17 ± 0,02
		25	0,90 ± 0,29a	1,17 ± 0,02
		50	0,86 ± 0,08a	1,17 ± 0,01
		100	0,96 ± 0,40a	1,09 ± 0,01a

a : Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli. $P \leq 0,05$

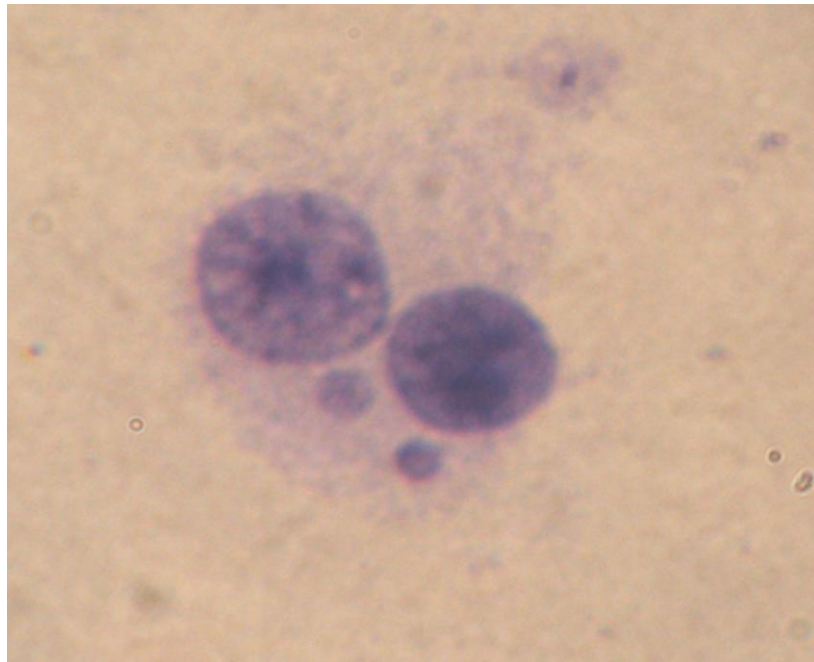
*: Toplam 8000 BN hücre

** : Toplam 4000 hücre

Hem 24 hem de 48 saatlik muamele sürelerinde Takrolimus'un nükleer bölünme indeksini (NBI) kontrol grubuna göre özellikle en yüksek dozda (100ng/ml) önemli ölçüde düşürdüğü saptandı (Çizelge 4.3).



Şekil 4.13. 50 ng/ml Takrolimus ile 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde Mikronükleus içeren binükleer hücre (x1000).



Şekil 4.14. 100 ng/ml Takrolimus ile 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde iki MN içeren binükleer hücre (x1000).

4. 4. Takrolimus'un DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkileri

Takrolimus'un DNA replikasyonu üzerindeki etkisi RI'nin, mitoz bölünme üzerindeki etkisi ise MI'in bulunması yoluyla saptandı. Takrolimus, 24 saatlik muamele süresinde RI'ni kontrole göre genel olarak düşürdü, fakat bu düşüş 50 ve 100 ng/ml konsantrasyonları için istatistiksel olarak önemli bulundu (Çizelge 4.4). 48 saatlik muamele süresinde ise Takrolimus'un, RI'yı kontrole göre tüm konsantrasyonlarda düşürdüğü saptandı.

Takrolimus mitotik indeksi 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde en düşük doz dışında anlamlı olarak düşürdüğü görüldü. Bu düşüşün doza bağlı olarak gerçekleştiği görüldü.

Çizelge 4.4. Değişik dozlarda Takrolimus ile 24 ve 48 Saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde RI ve MI.

Gruplar	Süre (saat)	Konsantrasyon (ng/ml)	RI* X±SD	MI** X±SD
Kontrol	-	-	2,36 ± 0,22	2,14 ± 0,14
Pozitif kontrol (Siklofosfamid)	24	160	2,28 ± 0,88a	1,34 ± 0,29a
Takrolimus	24	5	2,19 ± 0,15	1,90 ± 0,57
		25	2,13 ± 0,05	1,70 ± 0,36a
		50	1,77 ± 0,33a	1,27 ± 0,40a
		100	1,84 ± 0,19a	1,16 ± 0,23a
Pozitif kontrol (Siklofosfamid)	48	160	1,97 ± 0,32a	0,94 ± 0,04a
Takrolimus	48	5	1,93 ± 0,11a	1,71 ± 0,65
		25	1,76 ± 0,05a	1,35 ± 0,08a
		50	1,54 ± 0,29a	1,11 ± 0,15a
		100	1,86 ± 0,05a	0,93 ± 0,03a

a: Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli. $P \leq 0,05$

*:Toplam 400 hücre

** :Toplam 12000 hücre

5. TARTIŞMA

İmmünsüpresif bir ilaç olan Takrolimus bir kalsinörün inhibitörüdür ve *Streptomyces tsukubaensis* fungusundan izole edilmiş bir makrolid laktondur (73). İmmünsüpresif ilaçlar immünolojik rejeksiyonu önlemek amacıyla transplantasyon tıbbında etkili olarak kullanılmaktadır. İmmünsüpresif tedavi alan hastalarda görülen en önemli komplikasyonlardan biri *de novo* kanserin gelişmesi ve tümör oluşma riskinin artmasıdır (20).

Takrolimus, organ naklinden hemen önce ve nakil sonrasında hastalarda, süresi hekim tarafından belirlenerek, hastanın durumuna göre diğer immünsüpresif ilaçlarla birlikte veya tek olarak kullanılmaktadır. Bu çalışma, uzun süreli kullanılan Takrolimus'un genotoksik etkiye sahip olup olmadığının insan periferik lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom aberasyonları (KA) ve mikronükleus (MN) testleri ile araştırılması amacıyla yapılmıştır.

İlaçların ve kimyasalların olası genotoksik etkilerini sitogenetik parametrelerle saptamak amacıyla yapılan araştırmalarda, söz konusu kimyasalın muamele süresi hücre siklusu dikkate alınarak 24, 48 veya 72 saat olarak belirlenir (74). Bu çalışmada kültürdeki memeli hücrelerinin hücre siklusu yaklaşık 24 saat olduğundan, ikinci ve üçüncü mitozların gözlenebilmesi amacıyla KKD ve KA testleri için inkübasyon süresi 72 saat, MN testi için ise 68 saat olarak belirlendi. Çalışmamızda hiçbir kimyasal uygulanmamış negatif bir kontrol grubu ve Siklofosfamid eklenmiş 24 ve 48 saatlik pozitif kontrol grupları kullanıldı.

Pozitif kontrol Siklofosfamid bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ve immünsüpresif bir ajandır. Siklofosfamid'in insanlarda ve hayvanlarda karsinojenik etkiye sahip olduğunu gösteren birçok çalışma rapor edilmiştir. Akrolein ve Fosforamid Siklofosfamid'in aktif bileşenleridir (75). Bu aktif bileşenler, DNA'ya kovalent olarak bağlanarak DNA sentezi için gerekli proteinleri inaktive etmekte ve hücrelerin gelişimini yavaşlatmaktadır (75, 76).

Siklofosfamid'in genotoksik etkileri birçok araştırıcı tarafından *in vitro* ve *in vivo* olarak farklı test sistemleri ile kapsamlı bir şekilde test edilmiş ve birbiriyle uyumlu olan pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Siklofosfamid ve diğer bazı kemoterapotik ajanlarla yapılan birçok kanser tedavisinden sonra, bu ajanların somatik hücrelerde gen mutasyonlarına, kromozom aberasyonlarına ve anöploidilere sebep olduğu gösterilmiştir (75).

Çalışmamızda, insan periferal lenfositleri *in vitro* olarak 5, 25, 50 ve 100 ng/ml konsantrasyonlarındaki Takrolimus ile 24 ve 48 saat muamele edildi ve çalışmadan elde edilen sonuçlar diğer araştışıcıların sonuçlarıyla karşılaştırıldı.

KKD'nin beklenenden yüksek sıklıkta olması, kimyasal ajanların klastojenik potansiyelinin belirlenmesinde hassas bir göstergedir. KKD, yeni eşleşmiş kromatid ve bunun kardeş kromatidi arasında karşılıklı değişimlerle sonuçlanan S fazıyla ilişkili bir tamir işlemidir. KKD'nin moleküler mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, DNA'daki hataların ve hatalı DNA onarımlarının KKD'ye neden olduğu düşünölmektedir. Bir kimyasalın KKD frekansında artışa neden olması, onun replikasyon mekanizmasını etkileyerek DNA hasarı oluşturabildiğinin göstergesidir (37).

Çalışmamızda KKD'nin saptanması için 2. mitoz (M2) bölünmeyi geçiren toplam 100 hücre incelenmiştir. 24 saatlik 100 ng/ml Takrolimus uygulamasının KKD'de anlamlı artış meydana getirdiği saptanmıştır. Ayrıca Takrolimus 48 saatlik muamele süresinde 25 ve 100 ng/ml konsantrasyonlarında KKD değerini kontrole göre önemli ölçüde arttırmıştır. Takrolimus 24 ve 48 saatlik muamelelerinde KKD/hücre sayısında doza bağlı olarak artışlara neden olmuştur.

Öztürk ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada kalsinörin inhibitörleri olan Takrolimus ve Siklosporin A (CsA)'nın renal transplant hastalarında KKD üzerine olan genotoksik etkilerini araştırmışlardır. Günlük 125-300 mg CsA alan 20 hasta ile günlük 3-12 mg Takrolimus alan 17 hastanın immünsüpresif tedavideki son 3 ayı incelenmiş ve CsA'nın KKD frekansını önemli ölçüde arttırdığı, Takrolimus'un ise KKD frekansında belli bir artışa neden olmadığı bildirilmiştir (77). Bu çalışmada Takrolimus'un genotoksik etkisi, tedavi gören hastalarda *in vivo* şartlarda araştırılmış

ve verilen tedavi dozu ayrıca metabolize olduktan sonra lenfosit hücrelerinin içine girebilmiştir. Biz ise çalışmamızda Takrolimus'u *in vitro* şartlarda doğrudan hücrelere uyguladığımız için ilacın etkinliği farklılık gösterecektir.

Takrolimus ile ilgili bir başka çalışma 1991 yılında Japon FK-506 Çalışma Grubu tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada Takrolimus'un supratherapotik dozlarda, *in vitro* koşullarda, insan kan lenfositlerindeki KKD frekansını arttırdığı rapor edilmiştir (78). Takrolimus'un doza bağlı olarak KKD oluşumunda artışa neden olduğunu gösteren bir başka çalışma da 1993 yılında Yu ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (79).

Diğer immünsüpresif ilaçlarla yapılan KKD oranı ile ilgili çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin; renal transplantasyonlu hastalarda Takrolimus ile aynı etki mekanizmasına sahip olan CsA ile yapılan *in vivo* genotoksisite çalışmasında, hastalarda ilaç alımından 3 ay sonrasına göre KKD oranında önemli artış gözlenmiştir. Bu artışta yaş ve ilaç seviyesi ile ilişki saptanmamıştır (80). CsA ile yapılan bir başka çalışmada 1-5 mg/ml CsA ile muamele edilen lenfositlerdeki KKD frekansının pozitif kontrol olarak kullanılan Mitomycin C (MMC)'ye göre önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir. KKD oranındaki bu artışın CsA konsantrasyonuna bağlı olduğu belirtilmiştir (81). İmmün baskılamanın kansere ve kanserle ilişkili olarak kromozomal hasara yatkınlığa sebep olduğunu gösteren bir çalışma Avustralya'da yapılmıştır. Kırk beş sağlıklı bireyden ve kırk sekizi kanser tanısı konmamış ve sekizi deri kanseri olan, Azatiyoprin ve Prednizolon tedavisi alan toplam 56 post-transplant hastasından elde edilen lenfosit kültürlerindeki KKD frekansları karşılaştırılmıştır. Bu çalışmaya göre immünsüpresif terapinin ve transplantasyonla ilişkili çevresel faktörlerin hastalarda KKD frekansını etkileyici bir rol oynadığı sonucuna varılmıştır (82). Başka bir çalışmada immünsüpresif tedavi kapsamında posttransplantasyon hastalarında sıklıkla kullanılan Prednizolon'un KKD frekansında belli bir artışa neden olmadığı gösterilmiştir (83).

İlaçların genotoksisite potansiyelinin belirlenmesinde sıkça kullanılan diğer bir metod, kromozom aberasyonları metodudur. Kromozom aberasyonlarının analizi, kromozom veya kromatid kırıklarının, değişimlerinin, yeniden düzenlenmelerinin,

translokasyon, inversiyon ve köprülerin frekansını belirler. Kromozom aberasyonlarındaki artış, klastojenitenin bir göstergesi olup, bu da genetik hastalıkları ve kanser riskini artırır. Epidemiyolojik çalışmalar, yüksek frekanstaki kromozomal anormallikler ile kanser riski arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermektedir (55). Mitoz bölünmenin metafaz aşaması, kromozomlardaki kırılmaların ve yeniden düzenlenmelerin gözlemlendiği safhadır. Yapılan bu çalışmada Takrolimus'un tüm dozları hem 24 ve hem de 48 saatlik uygulamalarda, kontrole göre, KA/hücre yüzdesinde artışa neden olmuştur. Takrolimus uygulaması sonucunda kromatid kırığı, kardeş kromatidlerde birleşme ve kromozom kırığı olmak üzere üç tip yapısal aberasyon ile poliploidi ve endoreduplikasyon olmak üzere iki tip sayısal aberasyon gözlemlenmiştir.

Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon yöntemi (CHA)'nin kullanıldığı bir çalışmada Takrolimus'un da içinde bulunduğu birçok immünsüpresif ilacın kromozom aberasyonlarına etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmaya göre Takrolimus ile tedavi edilen farelerde yüksek miktarda genomik değişim gözlemlenmiştir (84). Bir başka çalışmada Takrolimus'un V79 Chinese hamster akciğer hücrelerinde kromozomal aberasyonlarını indüklediği, gösterilmiştir. Takrolimus'un fare kemik iliği hücreleri üzerinde kromozomal aberasyonların oluşumu üzerine etkisi araştırılmış ve Takrolimus'un kromozomal hasarı indüklediği görülmüştür (85). Görüldüğü gibi Takrolimus ile yapılan *in vitro* çalışmalara rastlanılmamıştır ve yapılan *in vivo* KA testlerinden de birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. KKD ve kromozomal aberasyonları, birbirinden farklı mekanizmalarla oluşan farklı DNA kırıkları oluşumu neticesinde meydana gelmektedir. Kromozom aberasyonları, sentez sırasında tek zincir kırıkları, geç sentez veya G2 fazına etki edilmesi neticesinde oluşur. Kromozom kırıklarının DNA'nın fosfodiester omurgasındaki kırılmalarından dolayı oluştuğu bildirilmiştir (7). Takrolimus'un kromozom aberasyonu oluşturma mekanizması henüz tanımlanamamıştır. Ancak Takrolimus ile aynı etki mekanizmasına sahip CsA ile yapılan bir çalışmada ise CsA'nın, DNA polimeraz β'nin protein ekspresyonunu ve transkripsiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. CsA'nın, bu etkisi ile CsA tedavisi alan hastalarda tümör oluşma sıklığının artmasına katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır (86). Bir başka çalışmada Azatiyoprin'in *in vitro* koşullarda, fizyolojik ve fizyolojik olmayan dozlarda kromozom

abersasyonlarını indüklediği (87), diğer bir çalışmada ise özellikle 5q31 ve 7q31 delesyonlarını içeren kromozom abersasyonlu myelodisplastik sendromuna neden olduğu görülmüştür (88).

Bu araştırmada kullanılan bir başka genotoksisite yöntemi de mikronükleus testidir. MN, hem klastojenik hem de anojenik mekanizmalar sonucu oluşabilmektedir. Bu metotta, Cyt-B (Cytochalasin B) kullanılarak tek mitoz geçiren hücreler binükleer yapıda elde edilmekte, bu hücrelerde mikronükleus sayıları değerlendirilmektedir (60).

Bu çalışmada, Takrolimus 24 ve 48 saatlik muamele süresinde tüm konsantrasyonlarda, insan periferik lenfositlerinde MN' li binükleer hücre yüzdesini kontrole göre arttırmıştır. Hücrelerde bir veya iki MN'li oluşumlar gözlenmiştir. Nükleer bölünme indeksinin 24 ve 48 saatlik muamelede en yüksek doz uygulamasında kontrole kıyasla önemli oranda azaldığı saptanmıştır.

İmmünsüpresif ilaçların mutajenik ve sitotoksik etkilerini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, transplant hastaları ve sağlıklı kişi lenfositlerinde Mikofenolat Mofetil, Sirolimus, Takrolimus ve CsA'nın MN oluşumu üzerine etkileri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmaya göre 5, 20 ve 40 ng/ml konsantrasyonlarındaki Takrolimus insan periferik lenfositlerine *in vitro* olarak uygulanmıştır. Çalışmanın sonucuna göre, Takrolimus ve Mikofenolat Mofetil'in CsA ve Sirolimus'a göre daha fazla MN oluşumuna neden olarak mutajenik etki gösterdiği belirlenmiştir. İmmünsüpresif tedavi gören böbrek transplant hastaları sağlıklı kişilerle kıyaslandığında ise MN oluşumunda önemli bir artma ve sitokinez-blok proliferasyon indeksinde genel bir azalma gözlenmiştir (20).

Bir diğer çalışma da, immünsüpresif ilaçların *in vivo* MN oluşumu üzerine etkisini incelemek amacıyla yapılmıştır. Toplam 79 hastanın böbrek nakli öncesi ve sonrasında MN frekansları karşılaştırılmıştır. İmmünsüpresif terapiden 3 hafta sonra MN frekansında önemli bir artış ve hücre proliferasyonunda önemli bir azalma görülmüş ve renal transplantasyon hastalarında immünsüpresif terapinin genotoksik hasarı indüklediği anlaşılmıştır (89). Görüldüğü gibi Takrolimus'un MN üzerindeki

etkilerini araştırmak amacıyla yapılan diğer iki çalışmadan elde edilen sonuçlar bizim çalışmamızdan elde edilen sonuçları desteklemektedir.

Bu alışmada, Takrolimus'un insan periferal lenfositlerinde DNA replikasyonu üzerindeki etkisi replikasyon indeksinin, mitoz bölünme üzerindeki etkisi ise mitotik indeksin saptanması yoluyla belirlenmiştir. RI, Takrolimus' un 24 saatlik muamele süresinde 50 ve 100 ng/ml' lik uygulamalarda azalmıştır. 48 saatlik muamele süresinde ise tüm konsantrasyonlarda azalma görölmüştür. Takrolimus mitotik indeksi 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde en düşük doz (5 ng/ml) dışında anlamlı olarak düşürmüştür ve bu düşüş doza bağlı olarak gerçekleşmiştir.

Yapılan bir çalışmada, Takrolimus'un V79 Chinese hamster akciğer hücrelerinde S9 karışımı varlığında ya da yokluğunda doza bağlı olarak mitotik indeksi azalttığı gösterilmiştir (85).

Azatiyoprin'in fare ve ratlardaki genotoksik etkileri MN test yöntemi ile araştırılmış ve MN sayısında doza bağlı olarak anlamlı artışlar gözlenmiştir. Böbrek transplantasyonundan sonra uzun dönem Azatiyoprin tedavisi alan çocukların lenfosit kültürleri yapısal kromozom aberasyonları yönünden değerlendirilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (90). Çok yaygın olarak kullanılan bir Glukokortikoid ilaç olan Hidrokortizon'un fare kemik iliği ve insan lenfosit hücreleri üzerindeki genotoksik etkileri KKD ve MN testleriyle araştırılmış ve Hidrokortizon'un çok güçlü klastojenik etkiye sahip olduğu görölmüştür (91). Seçici bir inozin monofosfat dehidrojenaz inhibitörü olan Mikofenolat Mofetil (MMF) ile yapılan in vitro çalışmalarda MMF'nin çok düşük konsantrasyonlarda bile MN frekansında önemli bir artışa ve NBI'de ise önemli azalmalara neden olduğu görölmüştür (92).

Takrolimus'un ve birçok immünsüpresif ilacın kanser oluşumunda kanserojenite özelliğinin, kanser başlatıcı aktivitesi, tümör geliştirici ve ilerletici potansiyelinin olabileceği birçok çalışmada gösterilmiştir (21, 93, 94). Takrolimus'un topikal olarak kullanımının kanserle olan ilişkisinin araştırıldığı 2001 ve 2004 yılları arasında toplam 953.064 vakayı kapsayan bir çalışmada,

Takrolimus'un artmış T hücreli lenfoma riskiyle ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır (95).

Bu literatür bilgileri ve yaptığımız çalışmanın sonuçları ışığında Takrolimus'un genetik hasar yapabilme ve bu yolla da kansere neden olabilme potansiyelinin olabileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada 24 ve 48 saatlik süreler ile Takrolimus'un farklı dozlarına maruz kalmış insan periferik lenfositlerinde olası genetik hasarları belirlemek için birbirinden bağımsız oldukça hassas pek çok sitogenetik test kullanıldı. Bu şekilde ilacın genotoksik etkileri çok yönlü çalışıldı ve çalışmanın güvenilirliği artırıldı. Çalışma sonuçları, birbirleriyle uyumlu olacak şekilde, her parametrede doz artışına bağlı olarak Takrolimus'un mutajenik potansiyele sahip olduğunu gösterdi.

Sonuç olarak, Takrolimus'un çalışılan dozlarda insan periferik lenfosit kültür hücrelerinde *in vitro* olarak genotoksik ve sitotoksik etkileri olduğu çeşitli sitogenetik genotoksisite tarama testleri kullanılarak belirlendi.

Görüldüğü gibi gerek bizim gerekse birçok araştırmacının çalışmalarında Takrolimus'un genotoksik ve sitotoksik risk taşıma ihtimali yüksek olduğu belirlenmiştir. Genotoksik etkisi olabilecek bir ajanın aynı zamanda kanserojenite riskide yüksek olacaktır. Ancak Takrolimus'un genotoksisitesi hakkında kesin sonuca varılabilmesi için farklı dozlarda *in vitro* çalışmaların yanı sıra *in vivo* genotoksisite testlerine de ihtiyaç vardır.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, Takrolimus'un transplant hastaları için genotoksik riske sahip olma ihtimalinin olduğunu söyleyebiliriz.

KAYNAKLAR

1. Hayes, A.W., (2008). Principles and methods of toxicology [Elektronik Sürüm]. Taylor and Francis: Boston: *CRC Press*, 354-355.
2. Brambilla, G., Mattioli, F., Robbiano, L., Martelli, A. (2010). Genotoxicity and carcinogenicity testing of pharmaceuticals: correlations between induction of DNA lesions and carcinogenic activity. *Mutat Res*.
3. Choy, W.N. (2001). Genetic toxicology and cancer risk assessment [Elektronik Sürüm]. *Informa Healthcare*, 34-35.
4. Jena, G.B., Kaul, C.L., Ramarao, P. (2001). Genotoxicity testing, a regulatory requirement for drug discovery and development: impact of ICH guidelines. *Indian Journal of Pharmacology*, 34: 86-99.
5. ICH S2A. (1995). Genetic toxicity studies: Guidance on specific aspects of regulatory tests for pharmaceuticals. Available at: www.ich.org.
6. Klaassen, C.D. (Ed.). (2001) *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons* (6th ed). New York, McGraw-Hill.
7. Iliakis, G., Wang, H., Perrault, A.R., Boecker, W., Rosidi, B., Windhofer, Wu, W., Guan, J., Terzoudi, G., Pantelias, G. (2004). Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation, *Cytogenet Genome Res*, 104:14
8. Demirel, S., Zamani, A.G.(2002). Mikronükleus Tekniği ve Kullanım Alanları. *Genel Tıp Dergisi*, 12(3):123-127.
9. Norppa, H., Falck, GC.(2003). What do human micronuclei contain? *Mutagenesis vol.18 no.3 pp.221–233*.
10. Çarin, M., Gürtekin, M., Tozkır, H., Çiftçi, H.Ş., Ayna, K.T. (2009). İmmünsüpresif İlaçların Etki Mekanizmaları. *Gaziantep Tıp Dergisi*, 15(3):42-47.
11. Morris, R.E. (1995). Mechanisms of action of new immunosuppressive drugs. *Ther Drug Monit.* 17(6):564-9.
12. Süzer, Ö. (Ed). (2009). Goodman & Gilman, *Tedavinin Farmakolojik Temeli*. İstanbul: Nobel Tıp.
13. Ruzicka, T., Assmann, T., Homey, B.(1999). Tacrolimus: the drug for the turn of the millennium? *Arch Dermatol.*,135(5):574-80.
14. Bethany, P.,(2007).İmmunosuppression.
<http://emedicine.medscape.com/article/432316-overview>.

15. Baczkowska, T., Durlík, M. (2009). Calcineurininhibitor sparing immunosuppressive regimens in kidney allograft recipients. *Pol Arch Med Wewn.* 119(5):318-25.
16. Moore, E. (2007). Immunosuppressant Drugs: The Effects of Slowing Down the Immune System.
http://autoimmunedisease.suite101.com/article.cfm/immunosuppressant_drugs
17. Smith, S. (2002). Historical Perspective of Transplantation: The Past.
<http://www.medscape.com/viewarticle/436532>
18. Prescilla, R. P. (2009), Immunosuppression.
<http://emedicine.medscape.com/article/1013392-overview>
19. Klippel J.H. Immunosuppressive and Cytotoxic Drugs in the Management of Lupus. http://www.lupusmd.org/docs/treatment-immunosuppressive_drugs.html
20. Oliveira, V.D., Zankl, H., Rath, T. (2004). Mutagenic and Cytotoxic Effects of Immunosuppressive Drugs on Human Lymphocyte Cultures. *Exp Clin Transplant.* 2(2):273-9.
21. Penn, I. (2000). Cancers in renal transplant recipients. *Adv Ren Replace Ther.* 7(2):147-56.
22. Titiz, İ.(Ed). (2004). *Renal Transplantasyona Pratik Yaklaşım*, Geliştirilmiş 2. Basım, İstanbul: 327-328.
23. Hiraoka, A., Ohashi, Y., Okamoto, S., Moriyama Y., Nagao T., Kodera Y., Kanamaru, A., Dohy, H., Masaoka, T., Japanese FK506 BMT (Bone Marrow Transplantation) Study Group. (2001). Phase III study comparing tacrolimus (FK506) with cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 28(2):181-5.
24. Niwa, Y., Terashima, T., Sumi, H. (2003). Topical application of the immunosuppressant tacrolimus accelerates carcinogenesis in mouse skin. *Br J Dermatol.* 149(5):960-7.
25. Aydın, F., Şentürk, N., Cantürk, T., Turanlı, A.Y. (2002). Takrolimus ve Dermatolojide Kullanımı. *Türkderm.* 36: 152-156.
26. Mok, C.C., Tong, K.H., To, C.H., Siu, Y.P., Au, T.C. (2005). Tacrolimus for induction therapy of diffuse proliferative lupus nephritis: An open-labeled pilot study. *Kidney International, Vol. 68 , pp. 813–817*

27. Yarosh, D.B., Pena, A.V., Nay, S.L., Canning, M.T., Brown, D.A. (2005). Calcineurin inhibitors decrease DNA repair and apoptosis in human keratinocytes following ultraviolet B irradiation. *J Invest Dermatol.* 125(5):1020-5.
28. Henderson, D.J., Naya, I., Bundick, R.V., Smith, G.M., Schmidt, J.A. (1991) Comparison of the effects of FK-506, cyclosporin A and rapamycin on IL-2 production. *Immunology.* 73(3):316-21.
29. Cather, J.C., Abramovits, W., Menter, A. (2001). Cyclosporine and tacrolimus in dermatology. *Dermatol Clin.* 19(1):119-137.
30. Rovira, P., Mascarell L., Truffa-Bachi P. The Impact of Immunosuppressive Drugs on the Analysis of T-Cell Activation. *Current Medicinal Chemistry*, 2000, 7, 673-692
31. http://journals.prous.com/journals/dot/20023801/html/dt380007/images/Lazarus_f2.gif
32. Dworkin, A.M., Tober, K.L., Duncan, F.J., Yu, L., VanBuskirk, A.M., Oberyszyn, T.M., Toland, A.E. (2009). Chromosomal Aberrations in UVB-Induced Tumors of Immunosuppressed Genes. *Chromosomes Cancer.* 48(6):490-501.
33. Durando, B., Reichel, J. (2005). The relative effects of different systemic immunosuppressives on skin cancer development in organ transplant patients. *Dermatol Ther.* 18:1-11.
34. Hui, R.L., Lide, W., Chan, J., Schottinger, J., Yoshinaga, M., Millares, M. (2009). Association between exposure to topical tacrolimus or pimecrolimus and cancers. *Ann Pharmacother.* 43(12):1956-63.
35. Nakanishi, Y., Schneider, E.L. (1979). In vivo sister-chromatid exchange: a sensitive measure of DNA damage. *Mutat Res.* 60(3):329-37.
36. Kadyk, L., Hartwell, L. (1992). Sister chromatids are preferred over homologs as substrates for recombinational repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 132 (2): 387-402.
37. Sasaki, MS. (1980). Chromosome aberration formation and sister chromatid exchange in relation to DNA repair in human cells. *Basic Life Sci.* 15:285-313.
38. Latt, S.A., Schreck, R.R. (1980). Sister Chromatid Exchange Analysis. *Am J Hum Genet* 32:297-313.

39. Gadhia, P.K., Vaniawala, S., Pithawala, M. (2005). Some Observations on Spontaneous Sister Chromatid Exchange Frequencies and Cell Cycle Progression in Stimulated Lymphocytes of Patients With Different Malignancies. *Int J Hum Genet*, 5(3): 187-191
40. Wilson, D.M., Thompson L.H. (2007). Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutat Res.* 1;616(1-2):11-23.
41. Taylor, J.H., Woods, R.S., Hughes, W.L. (1957). The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labelled thymidine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 43: 122-127.
42. Gerster, J.L. (1988). A Cytogenetic Study of Factors Affecting Sister Chromatid Differentiation in *Vicia faba* and *Hordeum vulgare*. Master of Science, McGill University Montreal.
43. Topaktaş, M., Rencüzoğulları, E. (2010). *Sitogenetik* (2.bs). Ankara: Nobel Yayın Dağıtım.
44. Atmaca, M. (2002). Çırçır Fabrikası işçilerinde kardeş kromatid değişimi. Yüksek Lisans Tezi. Pamukkale Üniversitesi. Denizli
45. Ocak, T. (2008). Karbon Monoksitle Zehirlenme Olgularının Lenfosit Hücrelerinde Kardeş Kromatid Değişimi Sıklığının Belirlenmesi. Uzmanlık Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
46. Barale, R., Chelotti, L., Davini, T., Del R.S., Andreassi, M.G., Ballardini, M., Bulleri, M., He, J., Baldacci, S., Di Pede, F., Gemignani, F., Landi, S. (1998). Sister chromatid Exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age, and lifestyle. *Environ Mol Mutagen*; 31: 228-242.
47. Krishnaja, A.P., Sharma, N.K. (2003). Ascorbic acid potentiates mitomycin c-induced micronuclei and sister chromatid exchanges in human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis Supplement*; 1: 99–112.
48. Surrallas, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H., Marcos, R. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated lymphocyte cultures. *Mutation Research*; 341: 169-184.
49. Evans, H.J. (1983). Cytogenetic methods for detection effects of chemical mutagens. *Annals New York Academy of Sciences*; 83: 131-140.

50. Gulten, T., Tokyay, N., Demiray, M., Gulten, M., Ercan, I., Evke, E., Sardas, S., Karakaya, A.E. (2002). The role of triple therapy, age, gender and smoking on the genotoxic effects of Helicobacter pylori infection. *J Int Med Res.*; 30: 380-385.
51. Slapsite, G., Jankauskiene, A., Mierauskiene, J., Lazutka, J.R. (2000). Cytogenetic analysis of children under long-term antibacterial therapy with nitroheterocyclic compound furagin. *Mutation Research* 2000; 491: 25-30.
52. Lazutka, J.R. (1991). Replication index in cultured human lymphocytes: methods for statistical analysis and possible role in genetic toxicology. *Environ Mol Mutagen.* 17(3):188-95.
53. Krishna G., Nath J., Ong T. (1986). Inhibition of Cyclophosphamide and Mitomycin C-induced Sister Chromatid Exchanges in Mice by Vitamin C. *Cancer Research.* 46, 2670-2674.
54. Alves, P., Jonasson, J. (1978). New Staining Method For The detection of Sister-Chromatid Exchanges in BrdU-Labelled Chromosomes *J. CM Set.* 33, 185-195.
55. Natarajan, A.T. (2002). Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutation Research* 504;3-16.
56. Shaffer, L.G., Slovak, M., Campbell, L.J. (2009). *International system for human cytogenetic nomenclature.* Cytogenetics and Genome Research, Karger
57. Kasap, H., Kasap, M., Demirhan, O., Alptekin, D., Lüleyap, Ü., Pazarbaşı, A., Güzel, İ.A. (2009). *Tıbbi Biyoloji ve Genetik.* Nobel Kitabevi, Adana.
58. Rooney, D. E.(Ed), (2001). *Human Cytogenetics constitutional analysis.* Third Edition, Oxford University Press
59. Başaran, N., (1999). *Tıbbi Genetik* . İstanbul: Güneş-Nobel Tıp Kitabevi.
60. Countryman, P.I, Heddle, J.A. (1976). The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res.* 41(2-3):321-32.
61. Slowinski, J., Bierzynska-Macyszyn, G., Mazurek, U., Widel, M., Stomal, M., Snietura, M., Mrowka, R. (2004). Cytokinesis-Block Micronucleus Assay in Human Glioma Cells Exposed to Radiation. *Image anal stereol,* 23: 159-65.
62. Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E.G., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A.

- (2000). IPCS Guidelines for the Monitoring of Genotoxic Effects of Carcinogens in Humans. *Mutation Research*, 463: 111- 172.
63. Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a Validation of The Micronucleus Test. *Mutation Research*, 392:1-4.
64. Yıldırım, İ.H. (2004). Bazı Kanser Hastalarında Mikronükleus Sıklığının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.
65. Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 2, 1084 – 1104.
66. Buck, M.L. (2003). Immunosuppression With Tacrolimus After Solid Organ Transplantation in Children. *Pediatr Pharmacology*. 9(5).
67. Lüleci G., Sakızlı M. (Ed). (2009). *Renkli Genetik Atlası*. Nobel Tıp Kitabevleri; İstanbul.
68. Speit, G.,Haupter, S., (1985). On the Mechanism of Differential Giemsa Staining of Bromodeoxyuridine Substitued Chromosomes. II. Differences Between the Demonstration of Sister Chromatid Differentiation and Replication Patterns. *Hum. Genet.*, 70, 126-129.
69. 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.
70. Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch, M.,Holland, H., Bonassi, S., Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research* 534,65–75
71. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*. 2000 Nov 20;455(1-2):81-95.
72. Sümbüllüoğlu, K., Sümbüllüoğlu, V.D. (1993). *Bioistatistik*. Özdemir Yayıncılık. Ankara.
73. Kino, T., Hatanaka, H., Hashimoto, M. (1987). FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *Thejournal Antibiotics* 40(9):1249-55.

74. Henderson, L., Jones, E., Brooks, T., Chetelat, A., Ciliutti, P., Freemantle, M., Howard, C.A., Mackay, J., Phillips, B., Riley, S., Roberts, C., Wotton, A.K., Waart, E.J. (1997). Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies. *Mutagenesis* vol.12 no.3 pp.163-167.
75. Lakshmi Sowjanya, B., Rudrama Devi K., Madhavi D. (2007). Modulatory effects of garlic extract against the cyclophosphamide induced genotoxicity in human lymphocytes in vitro. *Journal of Environmental Biology*. 30(5) 663-666
76. Wilmer, J.L., Erexson, G.L., Kligerman, A.D. (1990). Effect of Acrolein on Phosphoramidate Mustard-induced Sister Chromatid Exchanges in Cultured Human Lymphocytes. *Cancer Research*. 50, 4635-4638.
77. Öztürk, Ş., Ayna, T.K., Çefle, K., Palanduz, Ş., Çiftçi, H.S., Kaya, S.A., Diler, A.S., Türkmen, A., Gürtekin, M., Sever, M.Ş., Çarın, M. (2008). Effect of cyclosporin A and tacrolimus on sister chromatid exchange frequency in renal transplant patients. *Genet Test*. 12(3):427-30.
78. Japanese FK 506 Study Group. (1991). Japanese study of FK 506 on kidney transplantation: the benefit of monitoring the whole blood FK 506 concentration. *Transplant Proc*, 23(6):3085-8.
79. Yu, Y., Yuzawa, K., Otsuka, M., Fukao, K. (1993). Mutagenicity of the new immunosuppressive drugs, FK506, and spargualin. *Transplant Proc*. 25: 2116-2118
80. Palanduz, Ş., Sever, M.Ş., Öztürk, Ş., Taşçıoğlu, C., Karan, M.A., Sönmez, G., Çefle, K., Güler, K. (1999). *Cell Biology and Toxicology*. 15: 13-17.
81. Yuzawa, K., Kondo, I., Fukao, K., Iwasaki, Y, Hamaguchi H. (1986). Mutagenicity of Cyclosporine: Induction of Sister Chromatid Exchange in Human Cells. *Transplantation*. Vol. 42, Issue 1.
82. Kelly, G.E., Sheil, A.G. (1983). Sister chromatid exchange in lymphocytes from renal transplant recipients with and without cancer. *Br J Cancer*. 48(6): 797-801.
83. Bajnóczky, K., Meggyessy, V., Méhes, K. (1980). Cytogenetic investigations in prednisolone-treated infants. *Acta Paediatr Acad Sci Hung.*, 21(2-3):139-43.

84. Dworkin, A.M., Tober, K.L., Duncan, J., Yu, L., VanBuskirk, A.M., Oberyszyn, T.M., Toland, A.E. (2009). Chromosomal Aberrations in UVB-Induced Tumors of Immunosuppressed Mice. *Genes, Chromosomes & Cancer* 48:490–501.
85. European Medicines Agency Evaluation of Medicines for Human Use. Assessment Report for Modigraf International Nonproprietary Name: Tacrolimus. Emea/306253/2009 <http://www.ema.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/modigraf/H-954-en6.pdf>
86. Ahlers, C., Kreideweiss, S., Nordheim, A., Rühlmann, A. (1999). Cyclosporin A inhibits Ca²⁺-mediated upregulation of the DNA repair enzyme DNA polymerase beta in human peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Biochem.* 264(3):952-9.
87. Voogd, C.E. (1989). Azathioprine, a genotoxic agent to be considered non-genotoxic in man. *Mutat Res.* 221(2):133-52.
88. Möllmann, S.W., Wilkens, L., Schlegelberger, B., Kaiser, U. (2004). Azathioprine-associated myelodysplastic syndrome with cytogenetic abnormalities. *Dtsch med Wochenschr.* 129(22): 1246-1248.
89. Thomas, R., Vilma, O., Frick. (2009). Mutagenicity of Immunosuppressive Medications among Renal Transplant Recipients. *Am J Nephrol.* 30:514–520
90. Van Went, G.F. (1979). Investigation into the mutagenic activity of azathioprine (Imuran) in different test systems. *Mutation Research/Genetic Toxicology Volume* 68, Issue 2
91. Bali, D., Singh, J.R., Singh, H., Sandhu, D. (1990). In vitro and in vivo genotoxicity evaluation of hormonal drugs. I. Hydrocortisone. *Environ Mol Mutagen.* 1990;16(4):250-4.
92. Adams E, Todd G, Gibson W. (1975). Long-term toxicity study of mycophenolic acid in rabbits. *Toxicol Appl Pharmacol.* 34: 509-512.
93. Penn, I. (1983). Lymphomas complicating organ transplantation. *Transplant. Proc.* Vol. 15, no. 4 supp.1.
94. Suzuki, T., Ikezumi, Y., Okubo, S., Uchiyama, M., Takahashi, K., Shiraga, H., Hattori, M. (2007). Epstein-Barr virus DNA load and seroconversion in pediatric renal transplantation with tacrolimus immunosuppression. *Pediatr Transplant.* 11(7):749-54.

95. Hui, R.L., Lide, W., Chan, J., Schottinger, J., Yoshinaga, M., Millares, M. (2009). Association between exposure to topical tacrolimus or pimecrolimus and cancers. *The Annals of Pharmacotherapy*: Vol. 43, No. 12, pp.

ÖZGEÇMİŞ

Malatya doğumlu. 2002 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Giresun Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. 2007 yılında İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı.