

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**TERBİNAFİN'İN İNSAN LENFOSİT KÜLTÜRLERİNDEKİ
ETKİLERİNİN KARDEŞ KROMATİD DEĞİŞİMİ
(SISTER CHROMATID EXCHANGE)
YÖNTEMİ İLE İN VİTRO ARAŞTIRILMASI**

Dr.İhsan BAYEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Doç. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ

MERSİN-2006

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**TERBİNAFİN'İN İNSAN LENFOSİT KÜLTÜRLERİNDEKİ
ETKİLERİNİN KARDEŞ KROMATİD DEĞİŞİMİ
(SISTER CHROMATID EXCHANGE)
YÖNTEMİ İLE İN VİTRO ARAŞTIRILMASI**

Dr.İhsan BAYEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Doç. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ

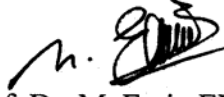
Tez No:.....

MERSİN-2006

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Terbinafin’in İnsan Lenfosit Hücre Kültürlerindeki Etkilerinin Kardeş Kromatid Değişimi (Sister Chromatid Exchange) Yöntemi İle İn Vitro Araştırılması” adlı çalışma, jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 26/7/2006

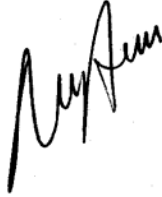


Prof. Dr. M. Emin ERDAL

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Jüri Başkanı



Doç. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi



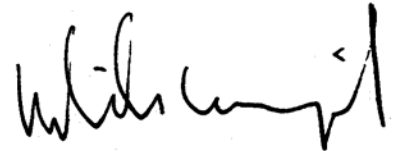
Doç. Dr. Ayla ÇELİK

Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi

Biyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 16.08.2006.....tarih ve 2006/07 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Murat DİKMENGİL

TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince değerli yardım ve katkılarını esirgemeyen tez danışmanım Sn. Doç. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ'e teşekkür ederim.

Anabilim Dalı Başkanımız Sn. Prof. Dr. M. Emin ERDAL'a, anabilim dalımızın diğer değerli hocaları; Sn. Yrd. Doç. Dr. Etem AKBAŞ'a ve Sn. Yrd. Doç. Dr. İ. Ömer BARLAS'a yüksek lisans eğitimim boyunca yaptıkları bilimsel ve akademik katkıdan dolayı teşekkür ederim.

Çalışmam sırasında özellikle deney gruplarının oluşturulması ve metodun uygulanmasındaki desteklerinden dolayı Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sn. Doç. Dr. Ayla ÇELİK'e teşekkür ederim.

Tezimin istatistikleri ve bulguların değerlendirilmesi konusundaki yardımlarından dolayı Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sn. Doç. Dr. Handan ANKARALI'ya teşekkür ederim.

Çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Sn. Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca, her türlü desteğini esirgemeyen, laboratuarda birlikte çalıştığım ve diğer Anabilim dallarındaki çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ÖZET.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Antifungal İlaçlar.....	3
2.1.1. Antifungal İlaçların Tarihçesi.....	3
2.1.2. Antifungal İlaçların Sınıflandırılması.....	4
2.2. Terbinafin.....	4
2.2.1. Terbinafin'in Farmakodinamik Özellikleri.....	4
2.2.2. Terbinafin'in Farmakokinetik Özellikleri.....	5
2.2.3. Terbinafin'in Metabolitleri.....	7
2.2.4. Terbinafin'in Klinik Etkinliği.....	7
2.2.5. Terbinafin'in İlaç Etkileşimleri ve Diğer Etkileşimler.....	8
2.2.5.1. Terbinafin'in Apoptozis ve DNA Sentezine Etkisi.....	8
2.3. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD).....	9
2.3.1. KKD'nin Tarihçesi.....	9
2.3.2. KKD'nin Oluş Modelleri.....	11
2.3.2.1. Replikasyon Bypass Modeli.....	12
2.3.2.2. Holiday Modeli.....	14
2.4. Mutajen ve Kromozom İlişkisi.....	19
2.4.1. Kimyasal Ajanlar.....	19
2.4.1.1. KKD ve Kromozom Anomalileri Meydana Getiren Ajanlar.....	20
2.4.1.2. Klastojen Olmayan ve KKD Meydana Getiren Ajanlar.....	20

2.4.1.3. Klastojen Özelliği Gösteren Çok Az Değerde KKD'yi Arttıran veya KKD Değerini Değiştirmeyen Ajanlar.....	20
2.4.2. Ko-klastojenler.....	21
2.4.3. Antiklastojenler.....	21
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	24
3.1. Gereçler.....	24
3.1.1. Tamponların Hazırlanması.....	24
3.1.2. Solüsyonların Hazırlanması.....	24
3.1.3. İlaçların Hazırlanması.....	24
3.2. Yöntem.....	25
3.2.1. Periferik Kandan Lenfosit Hücre Kültürlerinin Hazırlanması.....	25
3.2.2. Kromozomların Elde Edilmesi.....	25
3.2.3. KKD Analiz Yöntemi.....	26
3.2.4. KKD İçeren Kromozomların Değerlendirilmesi.....	26
3.2.5. Hücre Proliferasyon Kinetiği (CPK) ve Mitotik İndeks Değerlendirmesi.....	27
4. BULGULAR.....	29
5. TARTIşMA.....	35
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	39
7. KAYNAKLAR.....	40
8. ÖZGEÇMİş.....	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Terbinafin molekülü.....	3
Şekil 2.2: Terbinafin'in etki basamağı ve ergosterol.....	5
Şekil 2.3: Genel KKD oluş mekanizması: Tetraploid hücrelerde (4n) çift KKD meydana gelmektedir.....	12
Şekil 2.4: Replikasyon Bypass Modeli'ne göre KKD oluş mekanizması: Tetraploid hücrelerde (4n) tek KKD meydana gelmektedir.....	14
Şekil 2.5: Holiday modeline göre KKD oluş mekanizması.....	15
Şekil 2.6: Kardeş kromatid değişimi.....	18
Şekil 3.1: Kardeş kromatid değişiminin (KKD) değerlendirilmesi.....	27
Resim 4.1: Birinci mitoz aşamasındaki metafaz plağı.....	33
Resim 4.2: Üçüncü mitoz aşamasındaki metafaz plağı.....	33
Resim 4.3: İkinci mitoz aşamasındaki metafaz plağı.....	34

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 2.1: Antifungal ilaçların etki mekanizmalarına göre sınıflandırılması.....	4
Tablo 4.1: Terbinafin'in gruplar arasındaki KKD değerleri.....	30
Tablo 4.2: Terbinafin'in gruplar arasındaki RI değerleri.....	30
Tablo 4.3: Terbinafin'in gruplar arasındaki MI değerleri.....	30
Tablo 4.4: Terbinafin'in gruplar arasındaki KKD değerleri bakımından karşılaştırılmasına ait grafik.....	31
Tablo 4.5: Terbinafin'in gruplar arasındaki RI değerleri bakımından karşılaştırılmasına ait grafik	31
Tablo 4.6: Terbinafin'in gruplar arasındaki MI değerleri bakımından karşılaştırılmasına ait grafik	32

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAAF	Asetoksiasetilaminofloren
Act D	Aktinomisin D
ACV	Asiklovir
ADM	Doksorubisin
AET	β -aminoetilsotiüre
Ara-C	Sitorabin
ASE	Aza Steroidal Ester
BCNU	Biskloroetinilnitrosüre
BrdU	5-bromo-2-deoksiüridin
BUS	Busulfan
CCDP	Sisplatin
CMF	Siklofosfamid Metotreksat 5-florourasil
CP	Siklofosfamid
CPK	Hücre Proliferasyon Kinetiği
CPT	Kamptotesinin

DES	Dietilstilbestrol
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dUrd	5-konumuna Bağlanmış-2'-deoksiüridin
EAA	Eğri Altındaki Alan
EBV	Ebstein-Barr Virüsü
EKG	Elektrokardiyografi
FCV	Famsiklovir
FEC	5-florourasil Epirubisin Siklofosfamid
FPG	Fluorecence Plus Giemsa
GCV	Gansiklovir
HAAF	Hidroksiasetilaminofloren
HUVEC	Human Umbilical Ven Endotel Cell
KKD	Kardeş Kromatid Değişimi
M	Metafaz
MI	Mitotik İndeks
MIK	Minimal İnhibitör Konsantrasyon

MMC	Mitomisin C
MMS	Metilmetanosülfanat
MN	Mikronükleus
MPN	Melfalan
MTX	Metotreksat
9-NC	9-nitrokamptotesin
NTB	Nitrotetroblue
PCV	Pensiklovir
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
RI	Replikasyon İndeksi
SV40	Simian Virüs 40
SCE	Sister Chromatid Exchange
UV	Ultraviyole
VACV	Valasiklovir
XP	Kseroderma pigmentozum

ÖZET

Terbinafin'in İnsan Lenfosit Kültürlerindeki Etkilerinin Kardeş Kromatid Değişimi (Sister Chromatid Exchange) Yöntemi İle İn Vitro Araştırılması

Fungal hastalıkların tedavisinin zaman alması nedeniyle, tedavinin planlanmasında, etkenin ve hastanın immün durumunun iyi bilinmesi gerekmektedir. Bu nedenle enfeksiyon hastalıklarında önemli bir grubu içermektedir. Bu hastalıkların tedavisi ile ilgili 1950'li yıllardan günümüze kadar geçen sürede çeşitli ilaçlar geliştirilmiştir.

Terbinafin ise allilamin grubunda bulunan bir antifungal ilaçtır. Bu ilacın farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri tercih nedeni olmaktadır.

Genotoksik ajanlar, deoksiribonükleik asit (DNA) hasarı potansiyeline sahiptirler. Kardeş kromatid değişimi (KKD) genetik hasarın göstergesi olarak kullanılmaktadır. KKD testi, mutajenler hakkında önemli sonuçlar ortaya çıkarmaktadır ve homolog kromozomların gen lokusları arasında DNA replikasyon ürünlerinin değişimini test etmektedir.

Replikasyon indeksi (RI) ve mitotik indeks (MI), sitotoksiteyi tanımlamak için kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, terbinafinin 3 ayrı konsantrasyon düzeyi kullanılarak KKD, RI ve MI karşılaştırılmıştır. Bu amaçla 5 bireyden alınan kan örneklerinde kromozom kültürleri yapılmıştır. KKD analiz yöntemi uygulanarak KKD,RI ve MI oranları incelenmiştir. Çalışmanın sonunda terbinafinin genotoksik özelliği tespit edilmemiştir.

Anahtar Sözcükler: Terbinafin, KKD, DNA, MI, RI.

ABSTRACT

The Effects of the Terbinafine on the Human Lymphocyte Cultures by Sister Chromatid Exchange (SCE) in vitro

It takes long time to treat fungal illnesses. So it is very important to know the patient's immunisation system and the reason of disease. For this reason it contains the big part among these kind of illnesses. Some medicens which are related to this illness have been found since 1950's up to now.

Terbinafine is an antifungal medicine in the group of allilamin. This medicine is the most preferable because of pharmacocinetics and pharmacodynamics peculiarities.

Genotoxic agents have the potentials of deoxyribonucleic acid (DNA) damage. In the test of sister chromatid exchange (SCE) we come up with some valuable results about mutagens. SCE testes the changing of the replication products found amount the homolog chromosomes.

Replication index (RI) and mitotic index (MI) are used to determine cytotoxicity.

On this study SCE, RI and MI are compare by using three different terbinafine consantration level. With the aim of this; some chromosome cultures were made on the blood sample which were taken from five different person. SCE, RI and MI rates are searched by using SCE analysing method. At the end of the studying the genotoxic of terbinafine has not been found yet.

Key Words: Terbinafine, SCE, DNA, MI, RI.

1. GİRİŞ

Yaşadığımız ortamda fiziksel ve kimyasal mutajenlerin sayısı sürekli artış göstermektedir. Bu ajanların in vitro ve in vivo koşullarda etki mekanizmalarının ve özelliklerinin saptanması gerekmektedir (1).

Günümüzde çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan farmakolojik ajanların da mutajenik aktiviteyi arttırdığı düşünülmektedir (1). Fungal hastalıkların tedavisinin zaman alması ve sabır istemesinin yanı sıra, tedavinin planlanmasında etkenin ve hastanın immün durumunun da iyi bilinmesi gerekir (2). Son 10 yılda çeşitli topikal ve sistemik antifungal ilaçlar üretilmiştir. Antifungal ilaçlardan allilamin grubunda en son satışa sunulan terbinafindir (3,4). Mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan terbinafin, skualen epoksidaz inhibitörü olarak işlev görerek ergosterol sentezini inhibe etmekte ve mantar hücre zarının işlevini bozmaktadır (2,3,4).

Terbinafin'in diğer antifungal ilaçlara oranla tedavi süresinin kısa ve iyi klinik kür sağlaması, bu ilacın tercih edilmesini sağlamaktadır. Son dozdan 56 ve 90 gün sonra saç ve sebumda ölçülebilir düzeyde konsantrasyonunun bulunması, antifungal etkinliğini arttırmaktadır (5). Diğer farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerinin yanı sıra, terbinafinin apoptozisi aktive ve deoksiribonükleik asit (DNA) sentezini inhibe ederek in vitro ve in vivo ortamlarda çeşitli kanser kültürlerinde proliferasyonu baskıladığı gösterilmiştir (6).

Kimyasalların mutajenik ve karsinojenik etkilerini belirlemek için kardeş kromatid değişim (KKD) yöntemi son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır (1). KKD testi, çevredeki atıkların etkisini araştırmak için 1957 yılında Taylor ve arkadaşları tarafından geliştirilen kısa süreli mutajenite ve kanserojenite testlerinden biri olarak en hassas ve en fazla kabul edilen bir yöntem olarak bildirilmiştir (7,8).

KKD analiz yöntemi, 5-bromo-2-deoksiüridin (BrdU) varlığında homolog kromozomlarda DNA parçalarının karşılıklı değişimini göstermektedir (9,10,11). KKD'nin ortaya çıkması, mutajenlerin özelliklerine bağlıdır. Ajanların hücre DNA'sını etkilemesi sonucunda KKD değerleri değişebilmektedir. Kimyasal ve fiziksel etkenler in vitro koşullarda hücrelerde kromozom yapılarının değişmesine, KKD'ye ve kırıklara neden olmaktadır. KKD'nin oluşumu, etkileyen maddenin özelliklerine bağlıdır.

Mutajenik, karsinojenik ve klastojenik özellik gösteren kimyasalların KKD değerlerini arttırdığı veya azalttığı saptanmıştır (10,11).

Kimyasal ve fiziksel ajanların mutajenite özellikleri her test sisteminde saptanamamaktadır. KKD analiz yöntemi ile bir maddenin çok düşük konsantrasyonlarda bile zayıf mutajenik özellik gösteren etkileri kromozom düzeyinde incelenebilmektedir (1).

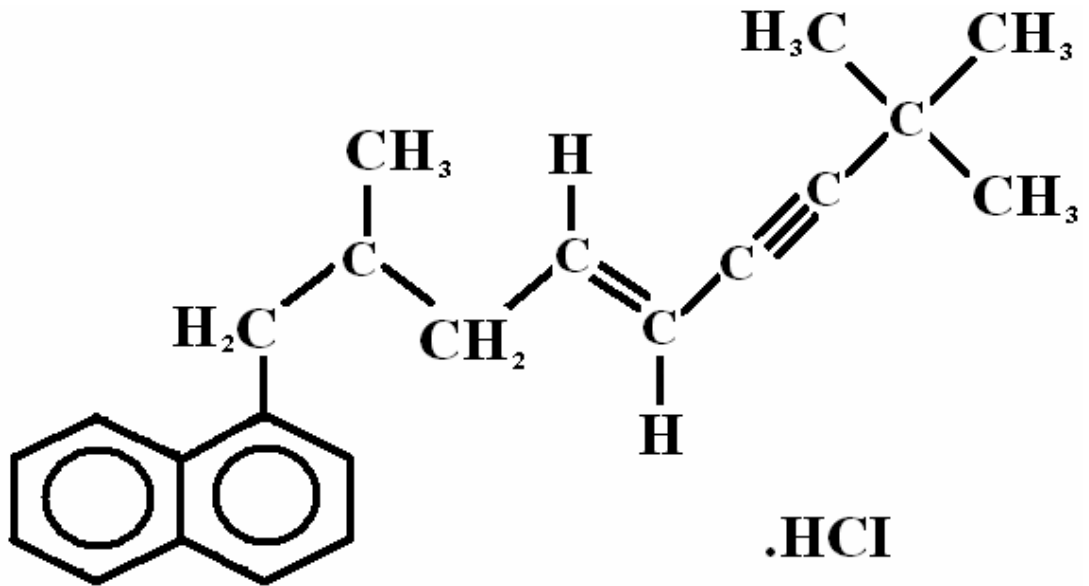
KKD analiz yönteminin, kimyasal maddelerin ve ilaçların karsinojenik etkilerinin belirlenmesinde en güvenilir yöntemlerinden biri olduğu düşünülerek, terbinafinin etkilerini araştırmak amacıyla bu analiz yöntemi uygulanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ANTİFUNGAL İLAÇLAR

2.1.1. Antifungal İlaçların Tarihçesi

Fungal hastalıkların tedavisinin zaman alması ve sabır istemesinin yanı sıra tedavinin planlanmasında da etkenin ve hastanın immün durumunun iyi bilinmesi gerekmektedir. 1950'li yıllara kadar iyot, fenol türevleri, salisilik asit ve türevleri ile benzoik asit gibi karbonik asitler kullanılmıştır. 1951 yılında, hem oral, hem de topikal etkili polyen antibiyotik nistatin bulunmuş olup, 1956'da polyen bir antibiyotik olan amfoterasin B'nin bulunması sistemik antifungal tedavide dönüm noktası olmuştur. 1957 yılında, sitostatik madde olarak üretilen flusitozin, fungal hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. 1958'de, yüzeysel mikozların tedavisinde kullanılabilen oral antifungal olan griseofulvin bulunmuştur. 1969 yılında, imidazol türevlerinden klotrimazol ve mikanozol, 1977'de ketakonazol ve 1980'li yıllarda geniş etki alanına sahip flukanazol ve itrakonazol piyasaya sürülmüştür (2). Son 10 yılda çeşitli topikal ve sistemik antifungal ilaçlar üretilmiştir. Allilamin grubunda en son üretilen ilaç terbinafindir (Şekil 2.1) (Tablo 2.1) (3).



Şekil 2.1: Terbinafin molekülü (12)

2.1.2. Antifungal İlaçların Sınıflandırılması

Tablo 2.1: Antifungal ilaçların etki mekanizmalarına göre sınıflandırılması (2)

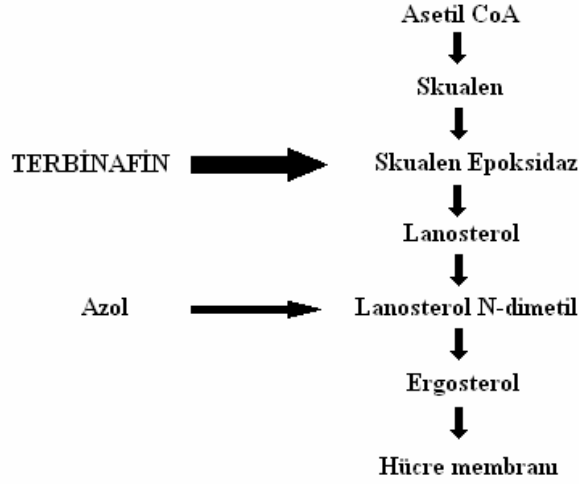
Etki	İlaçlar
Nükleik asit sentezini inhibe edenler	5-florositozin
Nükleus bölünmesini etkileyenler	Griseofulvin
Fungusların sterol halkasına bağlanıp membran özelliğini bozanlar	Polyenler
Ergosterol sentezi inhibitörleri skualen epoksidaz inhibitörleri	ALLİLAMİNLER
14 α demetilaza bağımlı sitokrom P450 yi inhibe edenler	İmidazol ve Triazololler

2.2. TERBİNAFİN

2.2.1. Terbinafin'in Farmakodinamik Özellikleri

Terbinafin, geniş spektrumlu allilamin grubuna ait bir antifungaldir. Yapısal olarak azol polyen ve morfolin gruplarına benzemez. Bazı yüzeysel mikozlarda klinik seyri kısalttığı gösterilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda dermatofitlere, küf mantarlarına ve dimorfik mantarlara karşı fungisidal etki gösterir. Maya mantarlarına karşı etkinlik, mantarın türüne göre fungisidal veya fungistatik özelliktedir (2,12,13,14). Aspergillus türleri in vitro olarak duyarlı iken, in vivo olarak dirençlidir. Sonuç olarak, ilacın kullanımı dermatofitozlar ile sınırlanmıştır (2).

Terbinafin, fungusların sterol biyosentezini erken dönemde spesifik olarak engeller. Mantar hücre membranında, skualen epoksidaz enzimi inhibisyonu yolu ile etki gösterir. Bu durum, ergosterol yetmezliğine ve intrasellüler skualen birikimine yol açarak mantar hücrelerinin ölümü ile sonuçlanır (2,3,4). Ergosterol, fungal membranların temel sterolüdür. Skualen epoksidaz enzimi ise ergosterol sentezinde gerekli olan bir enzim olup sitokrom P450 enzim sistemi ile bir bağlantısı yoktur (Şekil 2.2) (3,15).



Şekil 2.2: Terbinafin'in etki basamağı ve ergosterol (15)

Terbinafin, hormonların ve başka ilaçların metabolizmasını etkilememektedir (15).

2.2.2. Terbinafin'in Farmakokinetik Özellikleri

Terbinafin'in topikal kullanımı için kremi, sistemik kullanımı için oral tableti mevcuttur (2,12,13,15,16). Topikal tedavinin etkisiz kaldığı durumlarda oral tablet günde tek doz olarak 250 mg verilir ve 2-6 hafta süre ile kullanılır. Terbinafin, topikal olarak uygulandığında dozun % 5'i emilir (2,15). Oral verildiğinde ise dozun % 79'u gastrointestinal sistemden emilir ve iyi tolere edilir (2,15,17). Günlük 250 mg'lık tedavilerde yan etki azdır ancak doz arttırıldığında mide yakınmaları, hastaların % 1-2'sinde raş, ürtiker gibi deri reaksiyonları gözlenir (2,15).

250 mg'lık tek doz oral terbinafin, 1µg/ml'lik plazma zirve konsantrasyonuna 2 saatte ulaşır (5,15). Absorpsiyon yarılanma ömrü 0.8 saat (48 dakika) ve dağılım yarılanma ömrü 4.6 saatir (4 saat 36 dakika). Kararlı durum plazma konsantrasyonuna 10-14 günde ulaşmaktadır (15).

Terbinafin'in biyoyararlanımı yiyeceklerden orta düzeyde etkilenmekle birlikte, bu etkilenme doz ayarlamasını gerektirmemektedir (15).

Terbinafin, plazma proteinlerine güçlü olarak (%99) bağlanır. Deriye hızla diffüze olup lipofilik stratum korneumda konsantre olur. Terbinafin ayrıca yağ bezlerinden de salınır. Böylelikle kıl foliküllerinde, saç ve yağdan zengin deri bölgelerinde yüksek konsantrasyonlar oluşturur. Ayrıca terbinafinin tedavinin ilk birkaç haftasından itibaren tırnak yatağına dağılma özelliği de vardır (15). Sonuç olarak terbinafin, deri, saç ve tırnaklarda fungusidal aktivite oluşturacak düzeyde konsantre olur (5,15).

Biyotransformasyon sonucunda, başlıca üriner yoldan atılan ve antifungal etkisi olmayan metabolitler oluşur. Eliminasyon yarılanma ömrü 17 saattir. Birikim oluşması söz konusu değildir. Terbinafin'in kararlı durum plazma konsantrasyonlarında yaşa bağlı farmakokinetik değişiklikler gözlenmemiştir. Ancak böbrek veya karaciğer bozukluğu olan hastalarda, terbinafinin yüksek kan düzeylerine çıkması ile sonuçlanan eliminasyon yavaşlaması olabilir. Terbinafin multipl, doz alımından sonra iyi tolere edilebilir. İlaça bağımlı elektrokardiyografi (EKG) ve kimyasal değerlerde değişiklik gösterilmemiştir. Ayrıca terbinafin, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (Platelet-Derived Growth Factor=PDGF) nin potent inhibitörüdür (15).

Terbinafin'in en yüksek konsantrasyonu, sebum ve saç örneklerinde bulunmuştur (5,15). Konsantrasyonu, son dozdan 56 gün sonra saçta, 90 gün sonra da sebumda ölçülebilir düzeydedir. Sebum ve saç örneklerinde plazmadan birkaç kat daha fazla bulunmaktadır (15). Terbinafin seviyesi, stratum korneumda 1µg/ml ölçülmüştür. Daha önceki çalışmalarda ise 10µg/ml bulunmuştur. Terbinafin'in, periferik vücut sıvılarında ve dokularda yaygın bir şekilde dağıldığı gösterilmiştir. Dokularda in vitro minimal inhibitör konsantrasyon (MIK) değerleri, dermatofikozlarda 0.001-0.01 µg/ml, aspergillus için 0.05-1.56µg/ml, dimorfik funguslar içinse ≤ 0.05 -2.0µg/ml olarak bulunmuştur. Yeniden dağılım yarı ömrü, sebum için 14.5±8.5, saç için ise 15.0±5.5 gündür (5).

2.2.3. Terbinafin'in Metabolitleri

Terbinafin'in 15 metaboliti tespit edilmiştir. Fakat hiçbirisinin metabolik aktivitesi yoktur. Kanda 3 major metabolit ölçülebilmektedir ancak idrarda ihmal edilebilir düzeyde bulunmuştur (5).

Bu major metabolitler; SDZ 286-621 (N demetil formu), SDZ 280-027 (karboksi butil formu) ve SDZ 280-047 (N demetil karboksibutil formu) dir (5).

Predominant metaboliti, SDZ 280-027'dir. En son dozdan sonra plazma düzeyinin eğrisinin altındaki alanda (EAA) SDZ 286-621, SDZ 280-027 ve SDZ 280-047'nin dozları sırasıyla 1.25, 1.38 ve 1.08 olarak ölçülmüştür. Böbrek yolu ile en az atılım, SDZ 280-047'de görülmüştür (5).

2.2.4. Terbinafin'in Klinik Etkinliği

Fungusidal konsantrasyon, plazma ve dokularda en son dozdan sonra uzunca bir süre, haftalar ve aylarca devam eder. Bu farmakokinetik özellik, onikomikoz ve dermatomikozda tedavi süresinin kısa olmasını ve iyi klinik kür sağlamasını açıklamaktadır (5,15).

Terbinafin'in in vitro karşılaştırmaları, Aspergillus'lara karşı azol ve griseofulvinden daha etkili olduğunu göstermiştir. Oral terbinafinin onikomikoz ve dermatofit deri enfeksiyonlarındaki (tinea corporis, tinea cruris ve tinea pedis) mikolojik kür (semptomların kalmaması) oranı, klinik çalışmalarda %90 olarak bulunmuştur (2,15).

Onikomikozda 250 mg/gün tek doz kullanılmasıyla, diğer antifungallerin kullanılmasına göre 12 ay süren tedavi süresini 3-6 aya indirmiştir. Dermatomikozlarda önerilen tedavi, oral 250 mg/gün tek doz olup, tinea pediste 2-6, tinea corporiste, tinea cruris ve kutanöz kandidiaziste ise 2-4 haftadır (5,15).

Antifungal tedavinin amaçlarından biri, antiinflamatuvar aktivite ile antimikotik özelliğin birleştirilmesidir. Böylece semptom ve tedavi hızlanmaktadır. Terbinafin'in serbest radikalleri uzaklaştırıcı özelliği araştırılmıştır. Bunun için nitrotetroblue (NTB) redüksiyonu, ultraviyole (UV) ile süperoksit anyonların indüklenmesi ve doymamış lipidlerin kimyasal yolla peroksidasyonu hedeflenmiştir. Sonuçta, tedavi dozlarında in

vitro ortamda serbest radikallerin oluşumunu önlediği ve ayrıca in vivo olarak hafif derecede antiinflamatuvar aktiviteye sahip olduğu ortaya konmuştur (18).

2.2.5. Terbinafin'in İlaç Etkileşimleri ve Diğer Etkileşimler

Sağlıklı gönüllülerde yapılan in vitro araştırmalar, terbinafinin sitokrom P450 sistemi yoluyla metabolize olan ilaçların (örneğin; siklosporin, tolbutamid, oral kontraseptifler) klirensini arttırmak veya azaltmak üzerine etkisinin ihmal edilebilir düzeyde olduğunu göstermiştir (15).

Oral kontraseptiflerle birlikte terbinafin alan hastaların bazılarında menstruasyon bozuklukları bildirilmekle beraber, bu tür düzensizliklerin insidansı tek başına oral kontraseptifleri kullananlardaki kadar olmaktadır (15).

Öte yandan terbinafinin plazma klirensi, metabolizmayı uyaran ilaçlarla (örneğin; simetidin) inhibe edilebilir. Bu tür ilaçlarla birlikte kullanım gerekli olduğunda, terbinafin dozu uygun biçimde düzenlenmelidir (15).

2.2.5.1. Terbinafin'in Apoptozis ve DNA Sentezine Etkisi

Terbinafin'in, apoptozisi aktive ve DNA sentezini inhibe ederek in vitro ve in vivo ortamlarda çeşitli kanser kültürlerinde proliferasyonu baskıladığı gösterilmiştir (6,19). Bu bulgularla, terbinafinin ilk kez anjiogenezisi ve vasküler endotelial hücrelerin gelişimini inhibe ettiği belirlenmiştir. Antiproliferatif etkisinin olması, terbinafinin ilerde kanser tedavisinde kullanılabileceğini göstermiştir (6).

İnsan umbilikal venlerinden elde edilen endotel hücreler, (Human Umbilical Ven Endotel Cell=HUVEC) terbinafinle muamele edildiklerinde, bu hücrelerde p21 ve p53 seviyelerinde yükselmeye, siklin A, B, D1, D3, E, CDK2 ve CDK4 protein seviyelerinde ise düşmeye neden olur. Terbinafin'e bağlı G₀/G₁ fazının inhibisyonun, siklin A'nın düşmesiyle ve major rolünün p21 seviyesinin yükselmesiyle gerçekleştiği gösterilmiştir (6).

Bazı çalışmalarda terbinafine bağlı p27 proteininin upregülasyonunun, kanser hücrelerinde apoptoziste rol aldığı gösterilmiştir. Bu hipotez, son çalışmalarda terbinafin (0-120µM) ile etkileşen HUVEC'te gösterilmiştir (6).

Terbinafin, birçok dermatofit ve fungusa karşı ayak tırnaklarında uzun süre MIK seviyesinin üstünde kalır. Plazma seviyesinde antimikotik etkisi, antianjiogenik etkisinden daha düşüktür. Antianjiogenik etki için daha yüksek terbinafin tedavi rejimi gereklidir. Terbinafin'in, HUVEC'i G₀/G₁ fazında 24 saatte inhibe etmesi için en az 60µM olması gerektiği gösterilmiştir. İn vivo çalışmalarda, terbinafinin 50mg/kg'lık dozunun vital organlarda sitotoksik olmadığı gösterilmiştir. Terbinafin'e bağlı hücre proliferasyonunun inhibisyonu geriye dönüşümlüdür (6).

2.3. KARDEŞ KROMATİD DEĞİŞİMİ (KKD)

2.3.1. KKD'nin Tarihçesi

KKD testi, çevredeki atıkların etkisini araştırmak için 1957 yılında Taylor ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olup, kısa süreli mutajenite ve karsinojenite testleri arasında en hassas ve en fazla kabul edilen yöntem haline gelmiştir (8). Mikronükleus (MN) ve KKD, genetik hasarın göstergesi olarak kullanılmaktadır (20,21). KKD analiz yöntemi; duyarlı ve hızla işleyen, kırılma ve yeniden birleşmeyle sonlanan sitogenetik bir analizdir. Homolog kromozomlarının gen lokusları arasındaki, DNA replikasyon ürünlerinin değişimini test etmektedir (11,22,23).

Tek bir kromozomun iki kromatidinde, DNA homolog bölgelerindeki kırılma ve yeniden birleşme olaylarının sonuçları KKD olarak adlandırılır (24). DNA replikasyonu geçiren hücrelerin timidin varlığında otoradyografik yöntem kullanılarak işaretlenmesi, "Gümüş Tane Modeli" olarak adlandırılmaktadır (24,25).

KKD'nin oluşumu için en az iki replikasyon siklusu gereklidir. BrdU, bir primidin analogudur. BrdU, Hoechst 33258 florochrom floresans boyası ile baskılanmaktadır. Replikasyon siklusunda BrdU, her bir kromozomun bir uzun bir kısa kolunda görülür. Her kromatid BrdU'lu timin taşır, ancak bu tek iplik şeklindedir. İlk mitozda değişiklik meydana gelmemektedir. Bir sonraki mitozda her bir kromatid iki ayrı hücrede yer alır. Bu yer değişimi BrdU ile gerçekleşmektedir. BrdU varlığında DNA sentezi süresince bu olay devam eder. Sonuç olarak kromatid ikili durumdan tekli duruma geçer ve kromatid siyah renkli görülür (26).

İnsektisitlerin, in vitro çalışmalar sonucunda, prokaryot ve ökaryot hücrelere genotoksik etkisi olduğu bilinmektedir. İnsektisitler, akut zehirlenme yaptıkları gibi genotoksik olarak da etkili olmaktadır. Tarım veya halk sağlığı alanında kullanılan organofosfatlı ve karbamatlı insektisitlerin, özellikle insan lenfosit hücreleri ile yapılan çalışmalarda, kromozomların kardeş kromatidleri arasında simetrik segment değişimine neden olduğu tespit edilmiştir. İnsanda oluşan KKD'ye, insektisitlerin yanısıra kimyasal maddeler, radyasyon ve virüsler de neden olabilmektedir. Günümüzde sanayi atıkları, nükleer denemeler sırasında oluşan atıklar ve zirai mücadele ilaçlarının çevreye verilmesi sonucu, bu atıklar insanlarda genetik değişikliklere neden olmakta ve çeşitli hastalıklar ortaya çıkmaktadır (8,27,28).

Genotoksik ajanlar, DNA'da hasar oluşturma potansiyeline sahiptirler. KKD, proliferasyon gösteren hücrelerde spontan oluşabilir. Bu olay, gen hasarının göstergesidir. Kimyasal ajanlar sonucu oluşan mutajenitenin ve sitogenetik cevabın gösterilmesinde, sıklıkla KKD testi kullanılmaktadır. Çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalarda, kimyasal ajanların doz bağımlı ilişkileri gösterilmiştir (29). Sitotoksikite için mitotik indeks, proliferasyon kinetiği için replikasyon indeksi ve mutajenite için KKD testi yapılmıştır (30).

Pestiside maruz kalan insanlarda görülen KKD oranında, pestiside maruz kalmayan insanlara göre önemli ölçüde artış gözlenmiştir. Ayrıca, yapısal ve sayısal kromozom düzensizliklerinin de sıklıkla görüldüğü tespit edilmiştir. Belirli kimyasal maddeler üzerine yapılan in vitro çalışmalar, bu kimyasalların KKD artışına neden olduğunu ve karışım olarak uygulandığı zaman, etkilerinde bir artış meydana geldiğini göstermiştir (31).

Vijayalexmi ve Evans, KKD oranının sigara içenlerde, sigara içmeyenlere oranla daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir (32). Bazı östrojenler ve progestinler karsinojenik ve genotoksik potansiyele sahiptir (33).

Genetik görüntüleme yöntemleri; genetik hastalıklar, kanserler, mutasyon ve karsinojenler için erken tanı olarak kullanılmaktadır. Kromozomal değişimler ve KKD, çevresel genotoksik ajanların etkisini göstermektedir (29).

KKD analiz yöntemi, ilk kez timidin (³H) varlığında, otoradyografik yöntem kullanılarak, kromozomlardaki kardeş kromatidlerin farklı boyandığını gösterilmiştir (23). Son yıllarda otoradyografik çalışmalarının yerine, timidin analogu olan BrdU

kullanılması, KKD sıklığını daha kolay ve çabuk değerlendirme olanağı vermektedir. KKD analiz yöntemi, BrdU kullanımı ve yeni boyama metodlarının geliştirilmesi ile daha da önem kazanmaktadır (9).

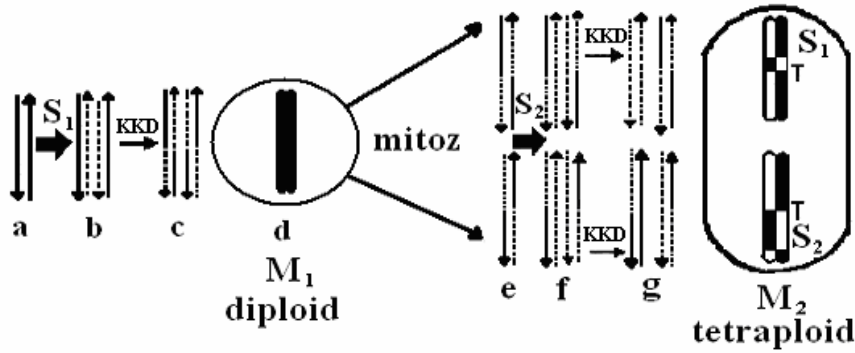
Zakharov ve Egolina, Çin hamster hücrelerinde BrdU varlığında Fluorecence Plus Giemsa (FPG) boyama yöntemini kullanarak, kardeş kromatidlerin farklı boyandıklarını gözlemişler ve bu görünüm için hücrelerin mutlaka iki replikasyon zamanı geçirmesi gerektiğini belirtmişlerdir (34). FPG boyama yöntemi sonunda, kromatiddeki DNA ipliklerinin her ikisinin de BrdU içermesi açık renk, tek bir ipliğin BrdU içermesi ise koyu renk boyanmasına neden olmaktadır (11,34).

2.3.2. KKD'nin Oluş Modelleri

KKD oluş mekanizması üzerine çeşitli modeller ileri sürülmüştür (9). KKD oluş mekanizmasını incelemek için tetraploid hücreler kullanılmıştır. Tetraploid hücreler, ilk replikasyonun sonunda kolşisin ekleyerek iki DNA replikasyonu arasındaki bölünme durdurularak elde edilmektedir. Bu hücrelerin BrdU ile iki replikasyon zamanını geçirmesi gereklidir. Genel KKD mekanizması Şekil 2.3'de olduğu gibi açıklanabilmektedir (35).

- a. Diploid hücre ($2n$) interfaz G_1 kromozomu (Kalıp DNA “düz çizgi” ile gösterilmektedir).
- b. S_1 evresinde DNA sentezi başlamaktadır. Ortamda bulunan BrdU yeni sentez edilen DNA'da timin yerine geçmektedir (şekilde BrdU içeren DNA (-----) şeklinde gösterilmektedir).
- c. DNA'da kırılma ve kromatidler arasında değişim meydana gelmektedir.
- d. Birinci mitozda (M_1) yeni sentez edilen kardeş kromatidlerin sadece birinde BrdU olması nedeniyle, FPG boyama tekniği ile koyu boyanmaktadır. M_1 diploid hücrelere ($2n$) kolşisin ilave edilerek tetraploid hücreler ($4n$) elde edilmektedir.
- e. Tetraploid hücre ($4n$) interfaz G_2 kromozomu.
- f. Semikonservatif DNA sentezi başlamaktadır. Ortamda bulunan BrdU, yeni sentez edilen DNA'nın yapısına girmektedir (S_2 evresi).
- g. DNA'da kırılma meydana gelmekte ve kromatidler arasında KKD oluşmaktadır.

Tetraploid hücrelerde ($4n$), M_2 mitoz sonunda kardeş kromatidlerin sadece birinde meydana gelen değişim “tek KKD” olarak değerlendirilmektedir. “Tek KKD” nin, homolog kromozomların ayrı lokuslarında meydana geldiği ileri sürülmektedir. M_2 mitoz sonunda, kardeş kromatid çiftinin her ikisinde meydana gelen değişim “çift KKD” olarak değerlendirilmektedir. “Çift KKD” homolog kromozomların aynı lokuslarında meydana gelmektedir (35).



Şekil 2.3: Genel KKD oluş mekanizması: Tetraploid hücrelerde ($4n$) çift KKD meydana gelmektedir.(1)

2.3.2.1. Replikasyon Bypass Modeli

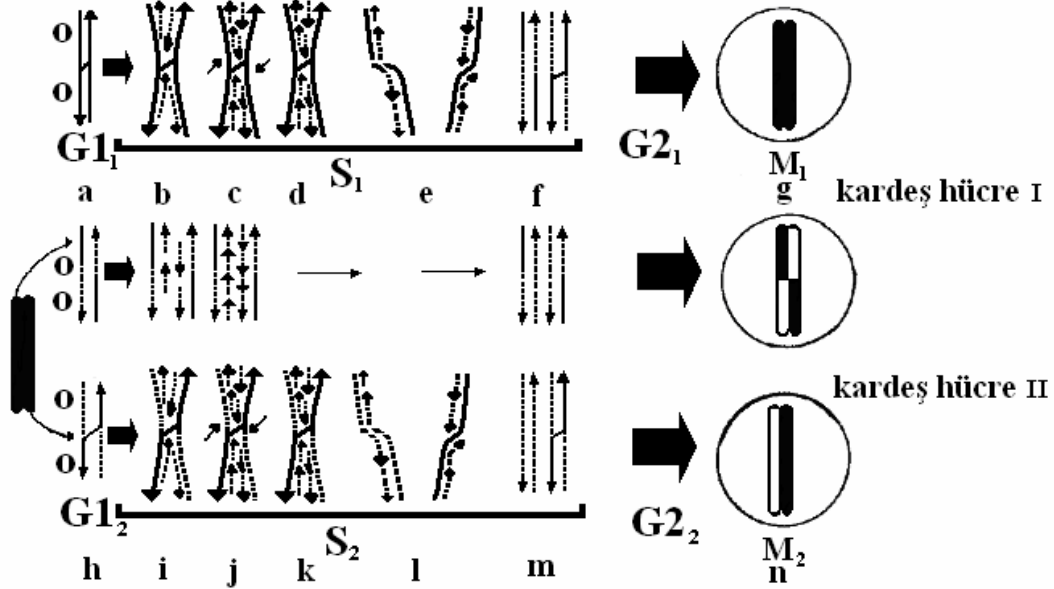
KKD oluş mekanizmasını açıklayan bir diğer model “Replikasyon Bypass Modeli”dir. Bu model, DNA ile çapraz bağlanma yapabilen kimyasal ajanların meydana getirdiği KKD’nin oluş mekanizmasını açıklamaktadır. “Replikasyon Bypass Modeli” Şekil 2.4’te açıklanmaktadır (35).

a. Diploid hücre ($2n$) interfaz G_1 kromozomu (kalıp DNA düz çizgi şeklinde gösterilmektedir). Kimyasal ajan, DNA ile çapraz bağlanma meydana getirmektedir. İki replikasyon orjini “O” şeklinde gösterilmektedir.

b. BrdU varlığında ilk S_1 evresinde iki yönlü semikonservatif DNA sentezi başlamaktadır. (Yeni sentez edilen ve BrdU içeren DNA (-----) şeklinde gösterilmektedir).

- c. Çapraz bağlantı olan bölgede DNA sentezi meydana gelmemektedir. Sentez Okazaki fragmentleri şeklinde devam etmektedir.
- d. Kromatidlerde çapraz bağlantı noktalarından kırılma meydana gelmektedir.
- e. DNA'da kırılma noktalarında kardeş kromatidler arasında değişim meydana gelmektedir.
- f. Yeni sentez edilen DNA parçalarının araları tamamlanır ve çift zincirli DNA yapısı meydana gelir. Çapraz bağlanma, uzaklaştırılmaması nedeniyle bir çift kromatidin yapısına girmektedir.
- g. Birinci mitozda (M_1), yeni sentez edilen kardeş kromatidlerin sadece birinde BrdU olması nedeniyle, FPG boyama yöntemi ile koyu boyanmaktadır.
- h. İkinci mitozda (M_2) kardeş kromatidlerin herbiri kardeş hücrelere ayrılır. Kardeş kromatidlerin bir tanesi çapraz bağlanmayı içermektedir.
- i. BrdU varlığında S_2 evresinde iki yönlü semikonservatif DNA sentezi başlar.
- j. Birinci kardeş hücrede kromatid çapraz bağlantı içermediği için, replikasyon başlama noktasından DNA sentezi devam etmektedir. İkinci kardeş hücre de kromatid çapraz bağlanma içermektedir. DNA sentezi iki yönlü Okazaki fragmentleri şeklinde devam eder. Çapraz bağlanma bölgesinde DNA sentezi meydana gelmemektedir.
- k. İkinci kardeş hücrede çapraz bağlanma noktalarından kırılma meydana gelir.
- l. DNA kırılma noktalarında, kromatidler arasında değişim meydana gelmektedir.
- m. İkinci kardeş hücrede ve birinci kardeş hücrede yeni sentez edilen DNA parçalarının araları tamamlanır ve yeni kromatid yapısı meydana gelir. İkinci kardeş hücrede, çapraz bağlanma uzaklaştırılmadığı için yeni oluşan kromatid yapısına girmektedir.
- n. İkinci mitozda FPG boyama yöntemi ile birinci kardeş hücrede tek DNA zincirinin BrdU içermesi koyu renk, her iki DNA zincirinin BrdU içermesi açık renk boyanmasına neden olmaktadır ve KKD gözlenebilmektedir. İkinci kardeş hücrede, "Replikasyon Bypass Modeli" ne göre, çapraz bağlanma içeren kardeş kromatidlerde sadece bir DNA zinciri bulunmaktadır ve koyu renk boyanmaktadır. Diğer kromatid yapısını oluşturan her iki DNA zinciri BrdU içermekte ve açık renk boyanmaktadır. Bu nedenle oluşan kromozom yapısının bir tarafı koyu renk boyanmaktadır ve kromatid değişimi gözlenmemektedir. Bu modele göre sadece birinci kardeş hücrede KKD gözlenmektedir (35).

“Replikasyon Bypass Modeli”, DNA ile çapraz bağlanma yapabilen kimyasal ajanların “Tek KKD” oluş mekanizmasını açıklamaktadır. “Çift KKD” oluş mekanizması bu modelle açıklanamamaktadır (35).



Şekil 2.4: Replikasyon Bypass Modeli’ne göre KKD oluş mekanizması: Tetraploid hücrelerde (4n) tek KKD meydana gelmektedir. (1)

2.3.2.2. Holiday Modeli

Hücrede DNA parçaları aralarındaki değişimi ve KKD oluş mekanizmasını açıklayan diğer bir yaklaşım, “Holiday Modeli” dir. Bu modele göre, hücrelerin BrdU varlığında bir mitoz geçirmeleri yeterlidir. Holiday modeli şekil 2.5’te gösterilmiştir (11).

- Birbirini tamamlayan atasal DNA zincirleri kalın çizgi (ağır) şeklinde gösterilmektedir.
- BrdU varlığında yeni DNA sentezi yapılır. BrdU içeren iplik ince çizgiyle gösterilmektedir.

c. Her bir çift zincirli DNA yapısında kırılma meydana gelmektedir. Crossing-over olayı bu zincirler arasında meydana gelmekte ve zincirler arasında rekombinasyon ile heterodubleks yapı oluşmaktadır.

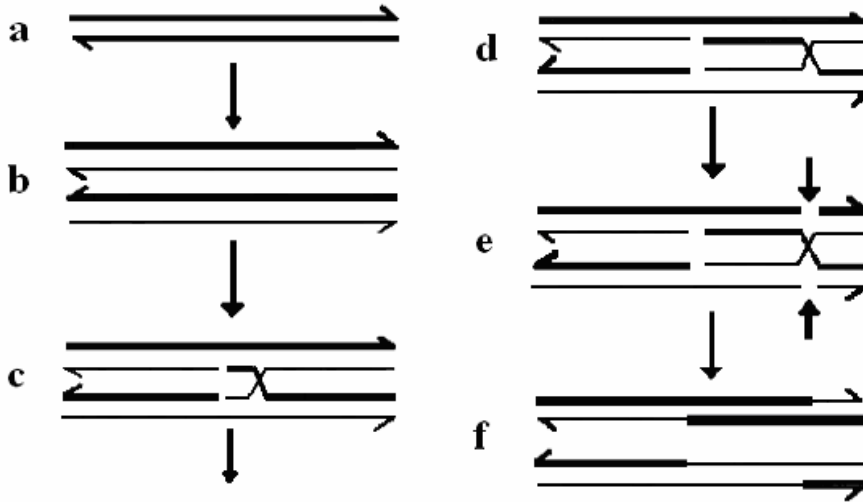
d. Rekombinasyon olayı zincirler arasında tekrarlanır.

e. Kırılmaların dış taraftaki ağır ve hafif DNA zincirlerinde meydana gelmesi, rekombinant DNA moleküllerinin oluşmasına neden olmaktadır ve iki DNA molekülü birbirinden ayrılmaktadır.

f. Son olarak oluşan rekombinant DNA molekülleri

ağır-ağır-hafif hafif-hafif-ağır
hafif-ağır-ağır ve ağır-hafif-hafif

şeklinde heterodubleks yapılar içermektedir. Bu DNA molekülünde ağır/ağır bölge koyu renk, hafif/hafif bölge açık renk ile boyanmaktadır. Böylece KKD oluşumu meydana gelmektedir (11).



Şekil 2.5: Holiday modeline göre KKD oluş mekanizması (1)

Zakharov ve Egolina, FPG boyama yöntemi ile açık renkte boyanan kromatidlerin, koyu boyanan kromatidlerden daha uzun olduğunu saptamışlardır (35). Kromatidlerdeki bu uzunluk farkı, protein ile BrdU içeren DNA arasındaki etkileşimin farklı olması nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Proteinler, kromozomların

kondensasyonunda ve spiralizasyonunda etkili olmaktadır. Proteinler BrdU içeren DNA'ya, BrdU içermeyen DNA'dan daha sıkı bağlanmakta ve kromozomların spiralizasyonunu ve kondensasyonunu zorlaştırmaktadır. Araştırmacılar, BrdU'nun kromozomlardaki esas etkisinin paketlenme esnasında olabileceğini açıklamışlardır. BrdU, büyük kromozomal yapıyı oluşturan 25nm çapındaki liflerin paketlenmesi sırasında etkili olmaktadır (23).

Açık boyanan her iki kromatidde de daha gevşek dönmeler meydana gelmekte ve kondensasyonda değişimler ortaya çıkmaktadır (23). Kromatidlerin farklı boyanmasının, proteinlerin DNA'ya farklı bağlanması nedeniyle meydana geldiği ileri sürülmektedir (36). Kromozomlarda KKD genellikle gelişigüzel dağılım göstermektedir. Dağılımın gelişigüzel olmasının nedeni bilinmemektedir. İnsan kromozomlarındaki KKD bölgeleri, G bandı alan ve almayan kromozom bölgelerinin sınırında veya G bandı almayan bölgelerde yer almaktadır (37).

Asya geyiği (muntjac), kangroo rat ve hamster kromozomlarında yapılan çalışmalarda KKD'nin heterokromatin ve ökromatin bölgeleri sınırında meydana geldiği gözlenmiştir. Drosophila'da yapılan çalışmalarda, KKD'nin kromozomların heterokromatin bölgesinde meydana geldiği gözlenmiştir (38).

Lin ve Alfı, BrdU ve BrdU+Mitomisin C (MMC) ile oluşturulan KKD'nin, sıklıkla kromozomların sentrik heterokromatin bölgesinde meydana geldiğini belirtmişlerdir (39). Schubert ve ark. Vicia hücrelerinde alkilleyici ajanların ilavesi ile oluşan KKD'nin, kromozomların heterokromatin bölgesinin hemen yanında yer alan "hot spot" bölgesinde meydana geldiğini açıklamışlardır (40). G-bantlama yöntemi ile yapılan çalışmada, KKD'nin G-bantlama bölgelerinde meydana geldiği saptanmıştır. G-bant bölgesinde geç replikasyonun meydana gelmesi ve heterokromatin yönünden zengin olması, KKD'nin meydana gelmesine neden olmaktadır (11,23).

Çin hamster ve kangroo rat kromozom çalışmalarında, sentromer bölgesinde KKD oluşumunun yüksek olduğu gözlenmiştir (41). Aynı gözlemler fare ve insan kromozomlarının sentromer bölgelerinde de saptanmıştır (42). İnsan kromozomlarında yapılan diğer bir çalışmada, sentromer bölgesinde KKD oluşumunun azaldığı ileri sürülmüştür. Deneysel sistemlerde farklı değerlerin ortaya çıkmasının, sentromerdeki heterokromatin bölgesinin özelliği ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (23).

KKD'nin meydana gelmesi, kromozomu oluşturan DNA'nın içeriği ve kromozomun oluşumu sırasında, DNA'nın katlanması (scaffolding) ile ilgili olabilmektedir (43). Razin ve ark. restriksiyon endonükleaz enzimi kullanarak yaptıkları çalışmada, KKD'nin meydana geldiği bölgenin, DNA içeriğinin orta sıklıkta tekrarlanan dizilerinden (moderately repeated sequence) oluştuğunu gözlemişlerdir (44).

KKD dağılımı, kromozom gruplarında da farklılık göstermektedir. İnsanda A ve B grubundaki kromozomlardaki KKD dağılımı, E, F ve G grubundaki kromozomlara göre daha fazla olmaktadır. Özellikle 1 nolu kromozomun sentromerik bölgesinin Adenin-Timin bazları yönünden zengin olması BrdU ile etkileşimi arttırmakta ve daha fazla KKD oluşumuna neden olmaktadır. G grubu kromozomlarda ise çok az sayıda KKD gözlenmektedir. Kromozomların uzunluğu ile KKD değerinin arttığı belirtilmektedir (45).

KKD analiz yöntemi, DNA tamir mekanizması bozuk ve kromozom kırıkları içeren genetik hastalıkların moleküler sitogenetik açıdan incelenmesinde de önem kazanmaktadır. Kromozom kırıkları içeren ve DNA tamir mekanizması bozuk olan otozomal resesif hastalıklar; Bloom Sendromu, Fanconi Anemisi ve ataksi telenjiyektazi'dir (46).

Fanconi Anemisi ve ataksi telenjiyektazi hastalarının lenfosit hücre kromozomlarında KKD değerinin, kontrol olarak kullanılan sağlıklı kişilerin KKD değerinden daha farklı olmadığı saptanmıştır. Fanconi Anemisi olan kişilerin DNA tamir sisteminin bozuk olması nedeniyle, iki fonksiyonlu (KKD ve kromozom kırığı meydana getiren) alkilleyici ajanlar hücre DNA'sını etkilemekte ve kromozom kırıkları meydana getirmektedir. Bu hastalığa sahip kişilerin lenfosit hücre kültürlerine iki fonksiyonlu alkilleyici ajan olan MMC'nin eklenmesi sonucunda, kromozom kırıkları artmakta, ancak KKD değeri, normal KKD değerine göre çok az değişmektedir. Kromozom kırıklarının artması ve KKD değerinin çok az değişmesi, kromozomlardaki kırılmayı ve KKD'yi meydana getiren mekanizmanın farklı olduğunu göstermektedir (47,48). Bloom Sendromu olan kişilerin, kromozom kırıkları ve KKD değerleri, normal KKD değerine göre 10-13 kat daha fazla olmaktadır (49,50). Bloom Sendromlu kişilerin lenfosit hücre kültürlerine, etil metil sülfonat gibi alkilleyici ajanın eklenmesi sonucunda KKD değerinin arttığı gözlenmiştir. Bloom sendromu olan hastaların hücrelerinin, Çin hamster hücreleri veya normal fibroblast hücreleri ile füzyona girmesi

sonucu, yüksek KKD değerinin normal KKD değerine yaklaştığı saptanmıştır. Bloom sendromlu hastaların hücresinde, yüksek KKD değerini normal KKD değerine dūřüren kimyasal faktörlerin izolasyonu ve belirlenmesi, bu olayın açıklanmasında önemli yer tutmaktadır (50).



şekil 2.6: Kardeş kromatid değişimi (51)

Xeroderma pigmentozum (XP), replikasyon sonrası tamir mekanizması bozukluğu ile seyreden, otozomal bir hastalıktır. XP hastalığı olan kişilerin KKD değeri ile normal bireylerin KKD değeri arasında bir fark saptanmamıştır (52). XP hastalığı olan kişilerin hücrelerinin ultraviyole, X ışınları ve alkilleyici ajanlarla karşılaşması sonucu, KKD değerinin arttığı gözlenmiştir (53). DNA yapısında oluşan bozuklukların, DNA tamir mekanizması tarafından düzeltilemediği ve bu nedenle KKD değerinin arttığı ileri sürülmektedir. Down Sendrom'u ve Cockayne Sendrom'lu kişilerin KKD değerinin, normal ve sağlıklı kişilerin değerinden farklı olmadığı saptanmıştır (54).

KKD analiz yöntemi, in vitro ve in vivo koşullarda çeşitli ajanların mutajenik ve karsinojenik etkilerini, DNA seviyesinde araştırmak yönünden çok önemli bir yer tutmaktadır. İn vitro koşullarda, çeşitli test sistemlerinde, ultraviyole (UV) ve görülebilen ışığın, KKD ve kromatid düzensizliklerini arttırdığı saptanmıştır. UV, floresan ışığı ve diğer ışınlar, kültür ortamlarında fotoürünler oluşurmaktadır. Bu tip uyarıcılarla oluşan KKD ve yapısal anomalilerin aynı ölçüde artış göstermedikleri kaydedilmiştir. 400R doz, kendiliğinden oluşan kromozom kırığına 100 kat arttırdığı

halde, KKD'yi 2 kat arttırmıştır (55). Liebeskind ve ark. ultrason uyarıcısı ile yaptıkları çalışmada, insan lenfosit hücrelerine, uyarıcının 5 mN/cm² olacak şekilde uygulanması halinde, KKD değerinin, normal değere göre çok az arttığını gözlemişlerdir (56).

2.4. Mutajen ve Kromozom İlişkisi

İn vitro koşullarda kimyasal mutajenler, hücre kromozomlarında kardeş kromatidlerdeki parça değişimi olayından başka, kromozom yapı ve sayısında değişime de neden olmaktadır (55).

Kimyasal mutajenler, DNA'da fosfodiester bağını kırmakta ve S evresinde hatalı DNA replikasyonuna neden olmaktadır. Bu nedenle birçok kimyasal mutajen, kromozom yapı değişiminden daha fazla kromatid anomalileri meydana getirmektedir. Kromatide meydana gelen anomaliler, hücrenin bölünme döngüsünün geç G₁ ve erken S evresinde meydana gelmektedir. Hücrede DNA'nın kimyasal mutajenlerle etkilenmesi ve replikasyon arasındaki zamanın çok kısa olması nedeniyle, DNA tamir mekanizması yeni oluşan anomalileri uzaklaştıramamaktadır (55,57).

2.4.1. Kimyasal Ajanlar

Kimyasal ajanların veya mutajenlerin, hücrede KKD değerini arttırdığı, birçok araştırmacı tarafından saptanmıştır. Kimyasal ajanların ve mutajenlerin çok çeşitli olması nedeniyle, KKD ve kromozom anomalilerinin daha kolay değerlendirilebilmesi için kimyasal ajanlar ve mutajenler üç gruba ayrılmaktadır (55).

1. KKD ve kromozom kırıkları meydana getiren ajanlar (iki fonksiyonlu kimyasallar), (55)
2. Klastojen (kromozom kırığı meydana getiren) olmayan ve KKD meydana getiren ajanlar (tek fonksiyonlu kimyasallar), (55)
3. Klastojen özelliği gösteren, çok az değerinde KKD'yi artıran veya etkilemeyen ajanlar (55).

2.4.1.1. KKD ve Kromozom Anomalileri Meydana Getiren Ajanlar

Bu grupta bulunanlar; alkilleyici ajanlar, nitroz bileşikleri, sitostatik antibiyotikler ve karsinojenlerdir. Alkilleyici ajanlar, belirli konsantrasyonlarda KKD'yi arttırırken kromozom kırığı meydana getirmemektedir. Hücrede KKD'den daha fazla kromozom kırığı meydana getiren ajanlar; adriyamisin, aminokunilon oksit, benzopirenantidiyolepoksit, benzopiren-4,5-oksit, bromometilbenzantrasen, busulfan, potasyum kromat, dimetilnitrozamin, metilazoksümetanol-asetat, 4 nitrokinolin-1-oksit ve trenimondur (triazikin) (55).

Golloway ve Wolff, KKD ve kromozom kırığı meydana getiren ajanlarla yaptıkları çalışmada, 915 kromozom kırığının % 25'inde KKD gözlemişlerdir. Bu oranın düşük olması, kırılma ve KKD'nin birbirinden bağımsız bir mekanizma ile ortaya çıktığı şeklinde yorumlanmıştır (58).

2.4.1.2. Klastojen Olmayan ve KKD Meydana Getiren Ajanlar

Bu ajanlar; asetaldehit, dekarbomilmitomisin C, asetoksiasetilaminofloren (AAAF), hidroksiasetilaminofloren (HAAF), metilkolantren, anilin hidroklorit ve floresan brightener No.24, glutatyon, metoksipsoralen+UV, trimetilpsoralen+UV, kellin+UV dir. Bu grupta bulunan ajanlar, KKD oluşumunu arttırmaktadırlar. Hücrede kromozom kırıkları meydana getirme oranları ise azdır (59).

2.4.1.3. Klastojen Özelliği Gösteren Çok Az Değerde KKD'yi Arttıran veya KKD Değerini Değiştirmeyen Ajanlar

Bu ajanlar; benzopirensindiyolepoksit, bleomisin, bredinin, sitozin, arabinosit, fluorodeoksiuridin, florourasil, neokarsinostatin hidroksikunolin sulfat ve kuersetin'dir. Bu grupta bulunan ajanlar, normal hücredeki kromozom kırık değerinden en az sekiz kat daha fazla kromozom kırığı meydana getirirler (60).

2.4.2. Ko-klastojen

Hücrede klastojen özellik gösteren ajanların meydana getirdiği, KKD ve kromozom kırıklarını arttıran ajanlara ko-klastojen adı verilmektedir. İn vitro koşullarda mutajenlerin meydana getirdiği KKD'yi ve kromozom kırıklarını arttıran ajanlardan biri kafeindir. Kihlman, kafeinin replikasyon sonrası tamir sırasında, boşlukları doldurma (gap filling) mekanizmasını durdurduğunu açıklamıştır. Kafeine bu etkisi ve hücre döngüsünde S evresinde meydana gelmesi nedeniyle, "S bağımlı ajan" adı verilmektedir(60). Popescu ve ark. KKD'nin kafein tarafından farklı etkilenmesini, KKD'nin oluşumu ile ilgili replikasyon sonrası tamir mekanizması arasında bir ilginin olmadığı şeklinde açıklamışlardır (60,61). Palitti ve Becchetti, kafeinin 4 nitrokinolen-1-okisit, MMC, etilmethansulfonat ve tiyotepa gibi klastojenlerin oluşturduğu KKD'yi artırıcı bir özelliği olmadığı halde, kromozom kırıklarını artırdığını saptamışlardır (62). Shiraishi ve arkadaşları, Bloom Sendromu ve normal hücrelerde, MMC ile meydana gelen KKD ve kromozom kırıklarının, kafeinin etkisiyle arttığını gözlemişlerdir (63). Ishii ve Bender, hücrede kafeinin etkisinin, replikasyon öncesi tamir mekanizmasında ve özellikle de "eksizyon" (kesip-çıkarma) olayı üzerine olabileceğini açıklamışlardır (64).

Bynum ve ark. Çin hamster akciğer fibroblast hücrelerinde dehidroepiandrosteron ve testosteron gibi hormonların klastojen özellik gösterdiğini saptamışlardır (65).

2.4.3. Antiklastojenler

Hücrede klastojenlerin meydana getirdiği KKD ve kromozom kırıklarının azaltan ajanlara, anti klastojen adı verilmektedir. Anti klastojen özellik gösteren bazı sülfidril bileşikler, aminoasitler ve diğer ajanların KKD ve kromozom kırıklarının nasıl etkilediği çalışılmıştır. İnsan lenfosit hücre kromozomlarında yapılan çalışmada, l-sistein, β -aminoetilsotiüre (AET) d,l-homosistein tiyoklakton gibi antiklastojen ajanların, KKD değerini çok az değiştirdiği ve kromozom kırıklarının azalttığı saptanmıştır. Anti klastojenlerin kromozom üzerindeki etki bölgeleri ile KKD'nin meydana geldiği bölgelerin birbirinden farklı olduğu ileri sürülmektedir (66).

KKD analiz yöntemi, çok zayıf karsinojenik etkileri olan veya karsinojen olduğu düşünülen maddelerin kromozom üzerindeki etkilerini belirlemede de kullanılabilir. Örneğin sakkarin, çok zayıf karsinojenik özellik göstermektedir. İn vivo şartlarda, sıçanlarda yüksek dozda sakkarin uygulandığı zaman, mide kanseri eğilimini arttırdığı gözlenmiştir. Sakkarinin, Çin hamsteri yumurtası ve insan lenfosit hücre kromozomlarında, KKD değerini doza bağımlı olarak arttırdığı saptanmıştır (67). Mutajenite testi olarak bilinen AMES testi ile, mutajenite özelliği saptanamayan dietilstilbestrol (DES)'un, insan fibroblast hücre kromozomlarındaki, KKD değerini arttırdığı saptanmıştır. Kadınlarda adenokarsinomu arttırdığı belirtilen DES'in, sentetik östrojen hormonunun insan fibroblast hücre kromozomlarında KKD değerini arttırdığı gözlemlenmiştir (68).

İN vivo koşullarda alkilleyici ajanların, KKD oluşumu üzerine etkileri, fare kemik iliği ile spermatogoniyada incelenmiştir. Alkilleyici ajanların bu grubunun, KKD oluşumu üzerine etkili olabilmesi için aktive olması gerekmektedir. Bu nedenle, in vivo ve in vitro koşulların birarada çalışılması gereksinimi ortaya çıkmaktadır. Bu tür ajanlar, in vivo karaciğer mikrozomal sistemi ile aktive edildikten sonra, in vitro hücre kültürlerine ilave edilerek KKD değeri gözlemlenmiştir (69).

İN vivo koşullarda KKD analiz yöntemi çalışmalarının, in vitro koşullara göre daha zor yönleri bulunmaktadır. İn vivo koşullarda kullanılan canlı sisteme birden fazla BrdU enjeksiyonu gereksinimi vardır. BrdU konakçıda çok hızlı yıkıma uğramaktadır. Bu nedenle salınma kinetikleri bilinen BrdU tabletleri deri altına yerleştirilmekte ve KKD değerleri saptanmaktadır. İn vivo koşullarda KKD analiz yöntemi, Çin hamsteri yanak mukozası hücrelerinde uygulanmıştır. Bu sistem, özellikle karsinojenik özelliği zayıf ajanlar için çok uygundur. Örneğin 8-metoksipsoralenin kısa süre uyarımından sonra bu sistemde KKD değerini arttırdığı gözlenmiştir (70).

KKD ve kromozom kırıklıklarını artırıcı etkenlerin, sadece çeşitli kimyasal ajanlar olmadığı günümüzde bilinmektedir. Virüslerin, hücre sistemlerinde kuvvetli klastojen gibi davrandığı gözlenmektedir. İnsan diploid fibroblast hücre kültürlerinin "S evresinin" başlangıcında Herpes simpleks virüsü ile karşılaşması sonucu KKD değerinde artma meydana geldiği gözlemlenmiştir (71).

Onkojenik virüslerin, Rous sarcoma virus, Simian virus 40 (SV40) ve Adenovirus'ün, Çin hamsteri hücrelerinde KKD değerini arttırdığı saptanmıştır.

Epstein-Barr virüsü (EBV) ile transforme olan insan lenfoblastik hücre hatlarında KKD değerinin normal KKD değerine göre çok az artma gösterdiği gözlenmiştir. Adenovirus Tip 2 nin Çin hamster hücrelerinde KKD oranını arttırdığı belirlenmiştir (66).

Kanseri oluşturan etkenlerin çok çeşitli olması nedeniyle, kanser hücrelerinde kromozom anomalilerinin değerlendirilmesi ayrı bir önem kazanmaktadır. KKD analiz yöntemi, çeşitli kromozom anomalileri içeren kanser hücrelerine de uygulanmaktadır. Lösemi hücrelerindeki KKD değerinin düşüklüğünün hücre büyüme hızı ile ilgili olabileceği ileri sürülmektedir (72).

Kanser tedavisinde kullanılan MMC, Metotreksat (MTX), Siklofosfamid (CP), Aktinomisin D (Act D), Melfalan (MPN), Busulfan (BUS) Doksorubisin (ADM), Sitorabin (Ara-C) gibi ilaçların, insan lenfosit hücre kromozomlarında KKD değerini artırdığı saptanmıştır (73).

İnsan lenfosit hücre kromozomlarında DNA ile çapraz bağlanmalar meydana getiren ve kanser tedavisinde kullanılan MMC'nin, KKD değerini arttırdığı gözlenmiştir. MMC, DNA'yı alkilemekte ve birbirini tamamlayan polinükleotid zincir ile çapraz bağlanmalar meydana getirmektedir. DNA'da meydana gelen çapraz bağlanmalar DNA tamir mekanizması tarafından uzaklaştırılmadığı için KKD değerini ve kromozom anomalileri sayısını artırmaktadır (74).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. GEREÇLER

3.1.1 Tamponların Hazırlanması

2XSSC Tamponu: 1.5730 gr NaCl, 100 ml distile suda ve 0.8823 gr Na sitrat 100 ml distile suda çözdürülüp daha sonra bu iki karışım birleştirilmiştir.

Söranson Tamponu: 11.88 gr Na₂HPO₄, 1000ml distile suda çözüldü. Buna 9.08 gr KH₂PO₄'ün 1000 ml distile sudaki solüsyonu eklenmiştir.

3.1.2. Solüsyonların Hazırlanması

Kromozom ortamı: 100 ml RPMI 1640 (Biochrom AG) (FG 1383), 25 ml Fetal Calf Serum (BI) (Cat 04001 IB), 3 ml L-Glutamin (BI) (Cat 03020 IB), 3.5 ml Fitohemaglutinin (Biochrom AG) (M 5030), 1.5 ml Streptomisin Penisilin (Biochrom AG)

Kolşisin Solüsyonu: 30µl (Biochrom AG) (L 6221)

Hipotonik Solüsyonu: 0.5592 mg KCl 100 ml distile suda çözülmüştür.

Fiksatif Solüsyonu: 3:1 metanol: gliseal asetik asit

5-Bromo-2'-deoksiüridin (BrdU) Solüsyonu: 1.7mg BrdU 3.264 ml RPMI besiyerinde çözülmüştür.

%5 lik Giemsa Boya Solüsyonu: 95 ml sörenson solusyonuna 5 ml Giemsa Boyası (Merck) eklenerek hazırlanmıştır (9,75).

3.1.3. İlaçların Hazırlanması

Terbinafin (Novartis) için 3 ayrı konsantrasyon düzeyi belirlenmiştir. Bunlar kültür ortamında sırasıyla plazma pik seviyesi olan 1µg/ml, 0.1µg/ml, 10µg/ml distile sudaki solüsyonları hazırlanmıştır. Pozitif kontrol grubuna, kültür ortamında 2µg/ml Mitomisin-C (MMC) olacak şekilde distile sudaki solüsyonları hazırlanmıştır.

Terbinafin ve MMC solüsyonlarından kültür ortamlarına 100µl eklendi. Negatif kontrol grubuna ise 100µl steril distile su ilave edilmiştir.

3.2. YÖNTEM

3.2.1 Periferik Kandan Lenfosit Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

20-25 yaşları arasında, belirli bir hastalığı olmayan, sigara ve alkol kullanmayan sağlıklı kişilerden heparinli kan alınmıştır. Alınan kan daha önceden hazırlanmış, 5 ml kültür vasatı içeren tüplere 0.3-0.5 ml olacak şekilde damlatılmıştır. Bu ortama son konsantrasyonu 10µg/ml olacak şekilde BrdU ilave edilmiştir. Kullanma anında hazırlanan terbinafin, MMC ve distile su solüsyonları kültür ortamlarındaki gruplarına göre eklenmiştir. Kültür tüpleri BrdU almış hücreleri ışıktan korumak amacıyla alüminyum folyo sarılarak 72 saat inkübasyon için 37°C inkübatöre kaldırılmıştır (9,75).

3.2.2. Kromozomların Elde Edilmesi

Lenfoblast hücre kültürlerinin son 1 saatinde, son konsantrasyonu 1 µg/ml olacak şekilde kolşisin ilave edilmiştir. Bir saat inkübasyondan sonra 2000 rpm de 10 dakika santrifüj yapılmıştır.

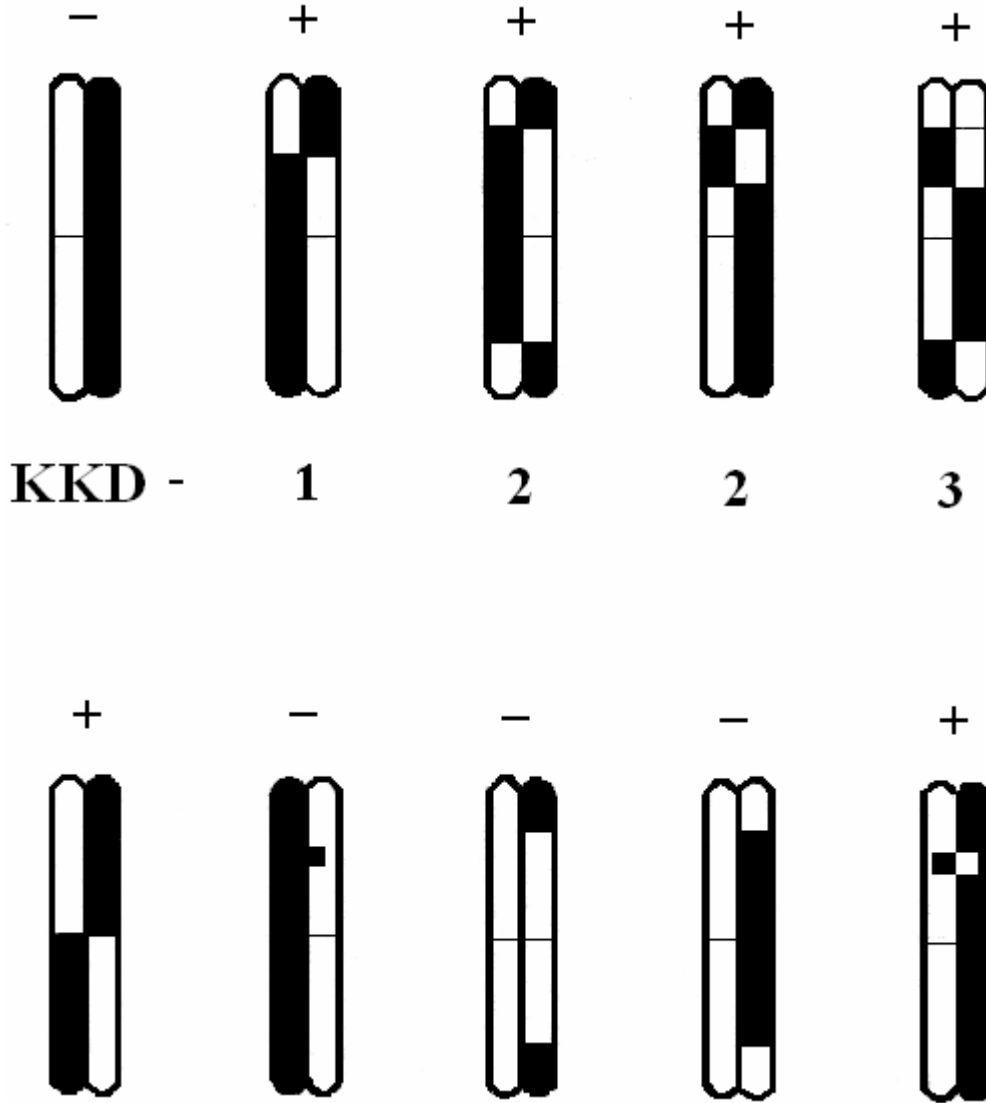
Santrifüj ile elde edilen çökelti üzerine hücrelerin şişmesini sağlamak üzere 10 ml hipotonik solüsyon (0.075 M KCl) ilave edilmiştir. Pastör pipeti ile çok yavaş bir şekilde hücrelerin dağılımı sağlandıktan sonra, 20 dakika 37°C inkübatörde bekletilmiştir. 1500 rpm ve 10 dakika santrifüjden sonra çökelti üzerine 5 ml fiksatif ilave edilmiştir. Santrifüj işleminin tekrarlanmasını takiben süpernatant atılarak, çökelti üzerine fiksatif ilave edilmiş ve berrak bir görünüm sağlanana kadar yıkama işlemi sürdürülmüştür. Bütün santrifüjler aynı devir ve hızda yapılmıştır. Son santrifüjden sonra çökelti üzerindeki hücre miktarına göre fiksatif bırakılarak fazlası atılmıştır. Hücreler süspansiyon haline getirildikten sonra temizlenmiş ıslak lam üzerine pastör pipeti ile damlatılmış ve kurutulmuştur (9,75).

3.2.3. KKD Analiz Yöntemi

Yaklaşık 24 saat oda ısısında bekletildikten sonra geniş petri kabına yerleştirilmiş preparatların üzerini bir film tabakası gibi örtecek şekilde söranson tampon solüsyonu konmuş ve petri kabı 254 nm dalga boyundaki UV lambası altında 30 dakika ışınlandırılmaya bırakılmıştır. Işınlandırılan preparatlar, 58-60°C de 45 dakika 2XSSC solüsyonu içerisinde bekletilmişler ve söranson tampon solüsyonu ile hazırlanmış %5 lik Giemsa boyasıyla boyanmıştır. Kuruyan preparatlar 10-15 saniyelik süreler ile xylolden geçirilmiştir. Entellan damlatılarak lamel ile kapatılmış ve böylece düz boyanmış daimi preparatlar elde edilmiştir (75).

3.2.4. KKD İçeren Kromozomların Değerlendirilmesi

Boyanmış preparatlarda ikinci mitozda bulunan metafaz plaklarından KKD oranı sayılarak elde edilmiştir. BrdU'dan dolayı ikinci mitozun metafaz aşamasındaki hücrelerin kromozomlarında kromatidler farklı boyanacaktır. Koyu boyanan kromatidde açık, açık boyanan kromatidde koyu renk olarak görünen kısımlar KKD değerlerini yansıtmaktadır (Şekil 3.1). KKD için hazırlanan preparatlardan her tüp için 25 adet metafaz plağı değerlendirilmiştir. Bütün lamalar numaralandırılmış ve 1000 lik büyültme altında immersiyon yağı ile incelenmiştir (75).



Şekil 3.1: Kardeş kromatid değişiminin (KKD) değerlendirilmesi (1)

3.2.5. Hücre Proliferasyon Kinetiği (CPK) ve Mitotik İndeks Değerlendirilmesi

Mitotik indeks (MI) toplam 1000 hücre popülasyonundaki metafaz oranıdır. Her birey için hazırlanan preparatlar Olympus BX-50 mikroskopunda $40 \times 10 = 400$ büyütmede taranıp 1000 tane hücre sayılarak bunların içinde mitoz aşamasında olanların miktarı saptanmıştır (76,77).

Hücre replikasyon indeksi (RI) için 1. metafaz M_1 (her iki kardeş kromatid için de aynı boyanır), 2. metafaz M_2 (kardeş kromatid için farklı boyanır) ve 3. metafaz M_3

(nonuniform boyanır) sayılmıştır. Rastgele 100 metafaz plağı incelenmiş, $RI=1x(M_1\%)+2x(M_2\%)+3x(\text{Takip eden } M_3)/100$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır (76,77).

4. BULGULAR

Bu çalışma; mantar hastalıklarının tedavisinde kullanılan allilamin grubundaki terbinafin etken maddesinin değişik konsantrasyonlarının, in vitro koşullarda insan lenfosit hücre kromozomlarındaki KKD sıklığına etkilerini belirlemek ve karşılaştırmak amacıyla planlanmıştır.

Çalışma için gönüllü, akraba olmayan, sigara, alkol ve ilaç kullanmayan sağlıklı 20-25 yaşlarında 5 erkek birey seçilmiştir.

Çalışmamızda terbinafin etken maddesinin yanında pozitif kontrol grubu için MMC, negatif kontrol grubu için distile su kullanılmıştır. Daha önce KKD oranı üzerindeki arttırıcı etkisi çeşitli çalışmalarla gösterilmiş olan ve bu açıdan en etkin madde kabul edilen MMC'yi deney sistemimizin doğruluğunu belirleyebilmek için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Terbinafin ve MMC için eritici olarak distile su kullanılmıştır. Terbinafin için kültür ortamında son konsantrasyonları sırasıyla plazma pik seviyesi olan 1µg/ml, 0.1µg/ml ve 10µg/ml olacak şekilde distile su ile çözülmüştür. MMC için kültür ortamında son konsantrasyonu 2µg/ml olacak şekilde distile suda çözülmüştür.

Gruplar A negatif, B pozitif kontrol, C terbinafinin plazma pik konsantrasyonunu (1µg/ml), D plazma pik konsantrasyonunun alt (0.1µg/ml), E plazma pik konsantrasyonunun üstündeki (10µg/ml) seviyeleri içermiştir.

Her konsantrasyon ve kontrol gruplarının değerlendirilmesi için KKD içeren 25 adet 2. mitoz metafaz plağı değerlendirmeye alınmıştır. RI için her konsantrasyon ve kontrol grupları için rasgele 100 metafaz plağı içerisindeki 1. metafaz, 2. metafaz ve 3. metafaz oranları incelenmiştir (Resim 4.1-4.3). MI için her konsantrasyon ve kontrol grupları için 1000 hücre çekirdeği arasındaki metafaz plağı sayılmıştır.

Bu sonuçlar tek faktörlü tekrarlanan ölçümlü varyans analizi ile değerlendirilmiştir.

KKD sayısı bakımından ortamlar arasında istatistik olarak anlamlı fark bulunmuştur ($P \leq 0.05$). Bu sonuca göre farklı olan ortamlar incelendiğinde A-B, B-C ve B-D farklarının anlamlı olduğu ($P \leq 0.05$), diğer farkların istatistiksel olarak anlamlı

olmadığı sonucuna varılmıştır ($P>0.05$). Pozitif kontrol grubunda daha yüksek sonuçlar bulunmuştur (Tablo 4.1,4.4).

RI ortamları arasında istatistik olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($P>0.05$) (Tablo 4.2,4.5).

MI için ortamlardaki standart sapma farklılık gösterdiği için ortamların karşılaştırılmasında için Friedman testi uygulanmış; bu testin sonucuna göre pozitif kontrol grubundaki MI ortalamasının diğer ortamlara göre anlamlı düzeyde düşük olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$) (Tablo 4.3,4.6).

Tablo 4.1: Terbinafinin gruplar arasındaki KKD değerleri.

	1	2	3	4	5	ORTALAMA ± STANDART SAPMA
	KKD/M	KKD/M	KKD/M	KKD/M	KKD/M	KKD/M
A	2.23	2.75	2.85	1.80	3.18	2.56±0.55
B	4.25	3.40	4.20	2.80	4.80	3.89±0.79
C	3.15	2.90	3.00	1.40	3.55	2.80±0.82
D	3.56	2.20	2.89	2.35	3.40	2.88±0.61
E	2.65	2.80	2.70	2.45	2.61	2.64±0.13

Tablo 4.2: Terbinafinin gruplar arasındaki RI değerleri.

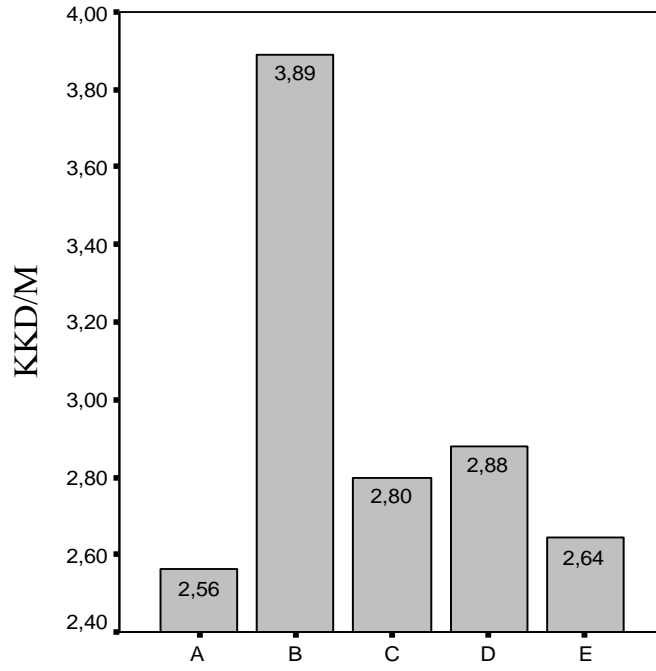
	1	2	3	4	5	ORTALAMA ± STANDART SAPMA
	RI(%)	RI(%)	RI(%)	RI(%)	RI(%)	RI(%)
A	2.63	2.74	2.77	2.74	2.77	2.73±0.06
B	2.75	3.13	2.77	2.82	2.83	2.86±0.15
C	2.80	2.80	2.81	2.86	2.81	2.82±0.03
D	2.79	2.82	2.78	2.75	2.84	2.80±0.04
E	2.79	2.77	2.72	2.84	2.76	2.78±0.04

Tablo 4.3: Terbinafinin gruplar arasındaki MI değerleri

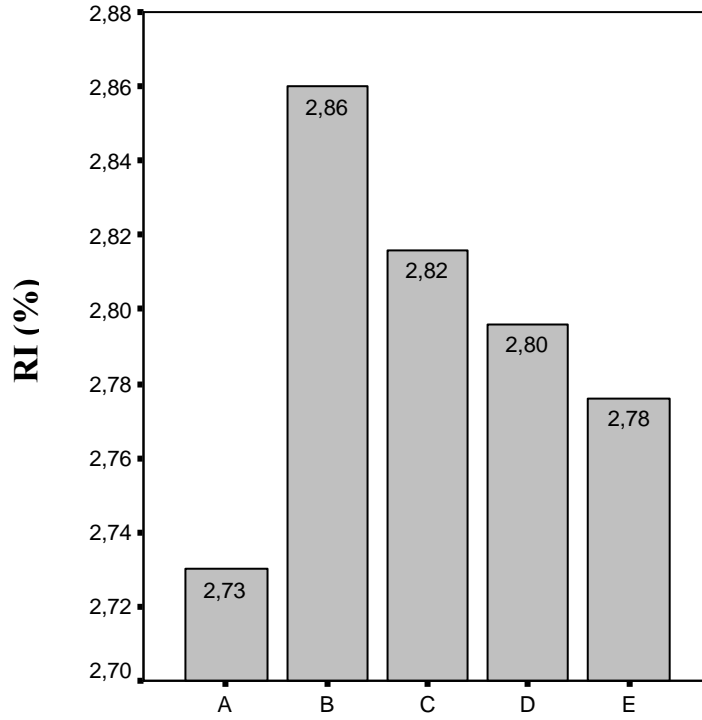
	1	2	3	4	5	ORTALAMA ± STANDART SAPMA
	MI(‰)	MI(‰)	MI(‰)	MI(‰)	MI(‰)	MI(‰)
A	11	9	7	14	8	9.80±2.77
B	5	3	4	4	2	3.60±1.14
C	23	5	11	27	9	15.00±9.49
D	20	7	9	29	16	16.20±8.87
E	12	9	8	17	23	13.80±6.22

A: Negatif kontrol grubu, B: Pozitif kontrol grubu, C: Terbinafinin plazma konsantrasyonu (1µg/ml), D: Terbinafinin 0.1µg/ml konsantrasyonu, E: Terbinafinin 10µg/ml konsantrasyonu, M: 2. Metafaz Aşaması KKD: Kardeş Kromatid Değişimi, MI: Mitotik İndeks, RI: Replikasyon İndeksi

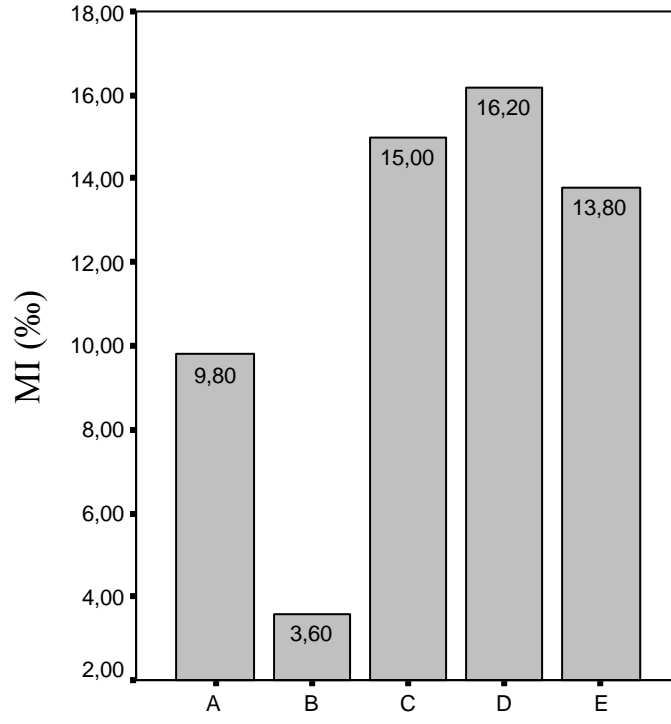
Tablo 4.4: Terbinafin'in gruplar arasındaki KKD değerleri bakımından karşılaştırılmasına ait grafik



Tablo 4.5: Terbinafin'in gruplar arasındaki RI değerleri bakımından karşılaştırılmasına ait grafik

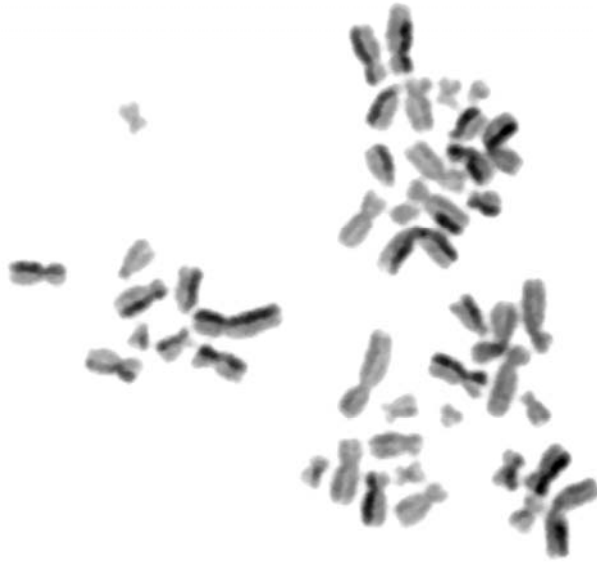


Tablo 4.6: Terbinafin'in gruplar arasındaki MI değerleri bakımından karşılaştırılmasına ait grafik





Resim 4.1: Birinci mitoz aşamasındaki metafaz plağı



Resim 4.2: Üçüncü mitoz aşamasındaki metafaz plağı



Resim 4.3: İkinci mitoz aşamasındaki metafaz plağı

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, bir antifungal ajan olan allilamin grubundaki terbinafinin in vitro koşullarda insan lenfosit kromozomlarındaki KKD oranına etkilerinin araştırılması planlanmıştır.

Terbinafinin antineoplastik ilaçlarla aynı grupta yer alan antifungallerden, apoptozisi aktive ve DNA sentezini inhibe ederek in vitro ve in vivo ortamlarda çeşitli kanser kültürlerinde proliferasyonu süprese ettiği gösterilmiştir (6,19). MMC'nin hücreler üzerindeki etkin sitotoksik özelliği bilinmekte olup DNA'nın polinükleotid zincirleri arasında çapraz bağlantı yapmaktadır (74).

Hastalık etkeni olan organizmalar çok çeşitli oldukları için (helminthler, amip, plazmodia, leishmania ve diğer protozoonlar, bakteriler, funguslar, riketsiyalar ve virüsler gibi), kemoterapide kullanılan kimyasal maddeler de o oranda çeşitlilik gösterirler. Vücut için malignite göstermesi, çabuk çoğalması ve normal vücut hücresinden ayrı biyokimyasal özelliklere sahip olması bakımından neoplastik hücreler de bakteri ve diğer patojen organizmalara benzetilebilirler. Bu noktadan hareketle farmakolojide kanser ve diğer neoplazilerin kemoterapisinden de söz edilir. Kemoterapide kullanılan ilaçlar genellikle kullanıldığı patojen etkenin cinsine göre sınıflara ayrılırlar. Bunlar; antihelmintik, antimalaryal, antiamibik, antibakteriyel, antifungal, antiviral ve antineoplastik ilaçlardır (78).

Çeşitli kanser türlerinde kullanılan dietilstilbestrolün (DES), insan lenfositleri üzerine doza bağımlı genotoksik etkisi araştırılmıştır. Burada 20µM'lük dozun, KKD oranını arttırdığı bulunmuştur (79).

Antineoplastik ajan olan 3β-hidroksi-13α-amino-13,17-seco-5α-androstan-17-oic-13,17-laktam-p-bis amino fenilasetat (Aza Steroidal Ester=ASE) ile psoriasis tedavisinde kullanılan asitretinin antigenotoksik etkisi araştırılmıştır. Burada asitretin tek başına KKD oranını etkilemediği, ASE'nin ise KKD oranını arttırdığı görülmüştür. Asitretinin her iki dozunda da (0.05 ve 0.1mM), ASE (0.5µg/ml) ile birlikte uygulandığında KKD frekansını önemli ölçüde düşürdüğü bulunmuştur. Asitretinin RI'ya etkisi görülmemiştir (80).

Benzer bir çalışmada, 60µM metilmetanosülfanat (MMS) ile 1, 5, 10, 20µM allisinin (*Allium sativum*) antigenotoksik etkisi araştırılmıştır. KKD oranının, allisinin antigenotoksik aktivitesiyle azaldığı saptanmıştır (81).

Sisplatinin (CCDP) 0.5, 1, 2 ve 5µM ve biskloroetinin (BCNU) 5, 10 ve 20µM konsantrasyonlarında KKD oranını arttığı gösterilmiştir (82).

Askorbik asitle birlikte MMC'nin KKD oranını arttırdığı in vitro çalışmada gösterilmiştir. Burada askorbik asit için 200µg/ml, MMC için 0.1 ve 0.2µg/ml dozu kullanılmıştır (83).

Yeni sentezlenen steroid esteri olan [*p*-metil-*m*-*N,N*-bis (2-kloroetil) amino benzoik asit ve klorombusil esterleri] antitümör ilaçların, KKD oranını artırırken, RI'ni düşürdüğü saptanmıştır (84).

Göğüs kanseri hastalarında iki değişik kemoterapi protokolü uygulanarak yapılan araştırmada; birinci ilaç protokolü olarak 5-florourasil, epirubisin, siklofosfamid (FEC) ve ikinci ilaç protokolü olarak siklofosfamid, metotreksat, 5-florourasil (CMF) kullanılmıştır. Altı ilaç kürü arasında KKD oranında azalma tespit edilmiştir (85).

Antitümör ajan olan epirubisin ve melfelanın 9-nitrokamptotesinin (9-NC) birlikte uygulanmış ve in vitro ve in vivo genotoksik etkileri karşılaştırılmıştır. Melfelanın in vitro ve in vivo 9-NC ile uygulandığında KKD değerlerinde artış görülmüştür (86).

Farelerde kamptotesinin (CPT) KKD oranına etkisinin araştırıldığı çalışmada bu antineoplastik ajanın KKD oranını arttırdığı gösterilmiştir (87).

Hastanede koruyucu önlem almadan çalışan hemşirelerde antineoplastik ilaçlara maruz kalmaya bağlı olarak KKD değerlerinde artış olduğu tespit edilmiştir (88).

Antibakteriyel gruptan metronidazolün MI ve RI'yı önemli ölçüde düşürdüğü, KKD'yi ise yükselttiği gösterilmiştir (30). Başka bir antibakteriyel ajan olan sulfametaksazolun, zayıf genotoksik etkisinin olduğu gösterilmiştir (89).

Helikobakter pilori enfeksiyonunun tedavisinde antibiyotik olarak amoksisilin, klaritromisin ve proton pompa inhibitörü olarak omeprazol kullanılan bir çalışmada, KKD oranında önemli azalma sağladığı saptanmıştır. Tedavi öncesi yaşla birlikte KKD oranında artış gözlenmiştir. Tedavi sonrası sigara içen kadın hastalarda, sigara içen erkek hastalara oranla daha fazla KKD oranı gözlenmiştir (90).

Antibakteriyel ve antiprotozoal ilaçlar olan metronidazol ve ornidazolün sitogenetik etkisi araştırılmıştır. Burada KKD ve MI oranında anlamlı artışlar gözlenmiştir. RI oranında ise herhangi bir etki gözlenmemiştir. Bu çalışmada metronidazol ve ornidazolün genotoksik ve sitotoksik etkisi olduğu sonucuna varılmıştır (91).

Benzatin penisilinin genotoksik özelliğinin araştırıldığı çalışmada, gruplar arasında doza bağımlı KKD oranında artış sağlanmadığı gözlenmiştir (92).

Çocuklarda nitroheterosiklik bileşik olan furagin ile yapılan çalışmada KKD oranında artış görülmüştür (93).

Akut romatizmal ateş hastalığı olan kişilerde profilaksi amacıyla verilen benzatin penisilinin, KKD analiz yöntemiyle genotoksik özelliği araştırılmıştır. Buna göre benzatin penisilin ile yapılan profilakside KKD oranının arttığı tespit edilmiştir (94).

Renal transplantasyonlu hastalarda bağışıklığı baskılayıcı ilaç olan siklosporin A ile yapılan in vivo çalışmada, ilaç alımından 3 ay sonrasına göre KKD oranında önemli artış gözlenmiştir. Bu artışta yaş ve ilaç seviyesi ile ilişki saptanmamıştır. Buda lenfositler üzerinde siklosporin A'nın genotoksik özelliğini göstermiştir (95).

Antiviral gruptan herpes virüse etkili ilaçların mutajenik etkisi de araştırılmıştır. Asiklovir, bromovinildeoksiuridin ve karbosisiklik bromovinildeoksiuridin KKD oranını arttırmadığı saptanmıştır. Fluoroiyodoarasitidin ve dihidroksipropoksimetilguaninin, KKD değerini etkilediği görülmüştür (96).

Antiviral ve antitümör özelliği olan 5-konumuna bağlanmış-2'-deoksiüridin (dUrd) analoglarının KKD yapma oranına etkisinin araştırıldığı çalışmada, sadece 5-floro-dUrd ve 5-nitro-dUrd (5'-monofosfat) ın KKD'yi artırma özelliği görülmüştür (97).

Antiherpes ilaçlardan asiklovir (ACV), valasiklovir (VACV), pensiklovir (PCV), famsiklovir (FCV) ve gansiklovir (GCV) nin, KKD özelliği Çin hamster V79-E hücrelerinde incelenmiştir. ACV sınırda sitogenetik etki ederken, MI'da doza bağımlı düşüklük olmuştur. VACV ve PCV'de sadece MI'da düşüklük görülmüştür. GCV'nin genotoksik olduğu gösterilmiştir. FCV'nin ise genotoksik olmadığı saptanmıştır (98).

Kırım-Kongo kanamalı ateşi olan 3 hastada yüksek doz antiviral ilaç olan ribavarin kullanılmıştır. Bu hastalarda in vivo KKD ve MN testi ile genotoksisite

araştırılmıştır. Tedavi sırasında ve tedaviden 1 ay sonrasında KKD ve MN miktarları yüksek bulunmuştur (99).

Genel olarak kemoterapötikler içinde yer alan ilaçların KKD oranına değişik etkilerde bulunduğunu ve çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların sonradan yapılacak in vitro ve in vivo çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

KKD analiz yönteminin, kimyasal maddelerin karsinojenik etkilerinin belirlenmesinde en güvenilir yöntemlerden biri olduğu göz önüne alınırsa, sıklıkla kullanılan kimyasal maddelerin bu kimyasal analiz yönteminden geçirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz .

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kimyasal ajanların hücrelerin kromozomlarında genotoksik etki yapabildiği bilgisi ve kemoterapötiklerden antifungal ilaçlar içinde yer alan terbinafinin olası genotoksik etkisinin belirlenmesi temel hipotezimizi oluşturmuştur. Ayrıca bu ilacın apoptozisi aktive ve DNA sentezini inhibe edici etkisinin olması, bu ajan için KKD analiz yöntemi uygulayabileceğimizi düşündürmüştür.

Antifungal ilaçların da içinde bulunduğu kemoterapötiklerde yapılmış çalışmalarda, KKD analiz yöntemiyle değişik sonuçlar bulunmuştur. Bizim çalışmamızda terbinafinin genotoksik özelliğinin olmadığı tespit edilmiştir. Fakat plazma pik konsantrasyonu üzerindeki seviyelerde etkisinin net olarak belirlenebilmesi ve bizim bulduğumuz diğer sonuçların in vitro ve in vivo diğer testlerle desteklenmesi gerekliliğini düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. **Emre S.** Antikanser ilaçların ve karsinojen maddelerin insan kromozomları üzerine etkilerinin in vitro sistemde kardeş kromatid değişimi (Sister Chromatid Exchange, SCE) analiz yöntemi ile belirlenmesi. Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **1989**.
2. **Saniç A.** Antifungal İlaçlar. *İnfeksiyon*, **2001**; 233-236. Erişim: <http://www.omu.edu.tr/~hakan/ders/36ANFUN2001.pdf> Erişim Tarihi: 15.5.2006.
3. **Petranyi G, Ryder NS, Stutz A.** Allylamine derivatives: new class of synthetic antifungal agents inhibiting fungal squalene epoxidase. *Science*, **1989**; 224: 1239–1241.
4. **Ryder NS.** Biochemical mode of action of terbinafine. İn: Rippon JW, Fromtling RA, Eds. *Cutaneous antifungal LAS agents: selected compounds in clinical practice and development*. New York: Marcel Dekker Inc, **1993**; 127–136.
5. **Kovarik JM, Mueller EA, Zehender H, Denouel J, Caplain H, Millerioux L.** Multiple-dose pharmacokinetics and distribution in tissue of terbinafine and metabolites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1995**; Dec: 2738-2741.
6. **Ho PY, Liang YC, Ho YS, Chen CT, Lee WS.** İnhibition of human vascular endothelial cells proliferation by terbinafine. *Int. J.Cancer*, **2004**; 111: 51-59.
7. **Milnikov NN.** Chemistry of pesticides. *Residue Rev*, **1971**; 36: 1-480.
8. **Taylor JH, Woods PS, Hughes ML.** The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proc Natl Acad Sci*, **1957**; 43: 122.
9. **Perry P, Wolff S.** New giemsa method for differential staining of sister chromatids. *Nature*, **1974**; 261: 156-158.
10. **Wolff S.** Sister chromatid Exchange. *Adv.Hum. Genet*, **1980**; 10: 183-201.
11. **Latt SA, Sehrek RR, Loveday KS, Dougherty CP, Schuler CF.** Sister chromatid Exchange. *Adv. Hum. Genet*, **1980**; 10: 267-331.
12. **Balfour, JA, Faulds D.** Terbinafine: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in superficial mycoses. *Drugs*, **1992**; 43: 259–284.
13. **Fromtling RA.** Terbinafine (lamisil). *Drugs Today*, **1992**; 28: 501–508.

- 14. Petranyi G, Meingassner JG, Mieth H.** Antifungal activity of the allylamine derivative terbinafine in vitro. *Antimicrob Agents Chemothe*, **1987**; 31: 1365–1368.
- 15. Balfour JA, Faulds D.** Terbinafine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in superficial mycoses. *Drugs*, **1992**; 43 (2): 259-284.
- 16. Gupta AK, Shear NH.** Terbinafine: an update. *J Am Acad Dermatol*, **1997**; 37: 979–988.
- 17. McClellan KJ, Wiseman LR, Markham A.** Terbinafine. an update of its use in superficial mycoses. *Drugs*, **1999**; Jul 58(1): 179-202.
- 18. Camera E, Cannitraci C, Briganti S, Colombo D, Picardo M.** Scavenging effects of terbinafine on free raadicals in vitro. *British Journal of Dermatolog*, **1999**; 140: 640-644.
- 19. Lee WS, Chen RJ, Wang YJ, Tseng H, Jeng JH, Lin SY, Liang YC, Chen CH, Lin CH, Lin JK, Ho PY, Chu JS, Ho WL, Chen LC, Ho YS.** In vitro and in vivo studies of the anticancer action of terbinafine in human cancer cell lines:Go/G₁ P53-associated cell cycle arrest. *Int. J. Cancer*, **2003**; 106: 125-137.
- 20. Borroto JIG, Creus A, Marcos R.** Genotoxic evaluation of the furylethylene derivative 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene in cultured human lymphocytes.*Mutation Research*, **2002**; 519: 179-185.
- 21. Eisha AA, Marcos R, Creus A.** Genotoxicity studies on the antimicrobial drug sulfamethoxazole in cultured human lymphocytes. *Mutation Research*, **2004**; 564: 51-56.
- 22. Sardaş S, Karakaya AE.** Clastogenicity test; sister chromatid Exchange. *J. Fac. Pharm Gazi*, **1990**; 7 (2) 91-104.
- 23. Wolff S.** Sister chromatid exchange. *Ann. Rev. Genet*, **1977**; 11: 183-201
- 24. Kato H.** Possible role of DNA synthesis in formation of sister chromatid exchanges. *Nature*, **1974**; 252: 739–741.
- 25. Tsui YC, Creasy MR, Hulten MA.** The effect of the male contraseptive agent gossypol on human lymphocytes in vitro: traditional chromosome breakage micronüklei SCE and cell kinetics. *Journal of Medical Genetics*, **1988**; 20: 81-85.
- 26. Vernole P, Caporossi D.** Sister chromatid exchange in human lymphocytes exposed to benzoic acid potassium salt. *Mutation Research*, **1988**; 208: 233-236.
- 27. Garret NE, Stack HF and Waters MD.** Evaluation of the genetic activity profile of 65 pesticides. *Mutat Res*, **1986**; 168: 301-325.

- 28. Gary VF, Nelson RL, Griffith J, Harkins M.** Preparation for human study of pesticide applicators: sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in cultured human lymphocytes exposed to selected fumigants. *Teratog Carcinog Mutagen*, **1990**; 10: 1, 21-29.
- 29. Bal F, Şahin FI, Yirmibeş M, Balcı A, Menevşe S.** The in vitro effect of β carotene and mitomycin c on SCE frequency in Down's Syndrome lymphocyte cultures. *Tohoku J. Exp. Med*, **1998**; 184: 295–300.
- 30. Çelik A, Ateş NA.** The frequency of sister chromatid exchanges in cultured human peripheral blood lymphocyte treated with metronidazole in vitro. *Drug and Chemical Toxicology*, **2006**; 1: 85-94.
- 31. Soyöz M, Özçelik N.** Zırai mücadelede kullanılan pestisidlerin sitogenetik etkileri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **2003**; 10(1): 6-9.
- 32. Vijayalexmi Evans, H.J.** In vivo and invitro effects of cigarette smoke on chromosomal damage and SCE in human peripheral blood lymphocytes. *Mut. Res*, **1982**; 92: 321-325.
- 33. Dhillon VS, Dhillon IK.** Genotoxicity evaluation of norethisterone acetate. *Mutat Res*, **1996**; 3: 67–110.
- 34. Zakharov AF, Egolina NA.** Differential spirilisation along mammalian mitotic chromosomes. 1-BudR-revealed differentiation in Chinese hamster chromosomes. *Chromosoma*, **1972**; 38: 341-365.
- 35. Shafer DA.** Replication bypass model of sister chromatid exchanges and implications for Bloom's Syndrome and Fanconi's Anemia. *Hum. Genet*, **1977**; 39: 177-190.
- 36. Ikushima T, Wolff S.** Sister chromatid exchanges induced by light flashes to 5-bromodeoxyuridine and 5-iododeoxyuridine substituted Chinese hamster chromosomes. *Exp. Cell. Res*, **1974**; 87: 15-19.
- 37. Latt SA.** Localization of sister chromatid exchanges in human chromosomes. *Science*, **1974**; 185: 74-76.
- 38. Bostock CJ, Christie S.** Analysis of the frequency of sister chromatid exchange in different regions of chromosomes of the kangaroo rat. *Chromosoma*, **1976**; 56: 275-287.
- 39. Lin NS, Alfi OS.** Detection of sister chromatid exchanges by 4'-6-diamidino-2-phenylindole fluorescence. *Chromosoma*, **1976**; 58: 219-225.
- 40. Schubert I, Sturelid S, Dobel P, Rieger R.** Intra chromosomal distribution patterns of mutagen-induced SCEs and chromatin aberrations in reconstructed karyotypes of *Vicia faba*. *Mutat. Res*, **1979**; 59: 27-38.
- 41. Gibson DA, Prescott DM.** Induction of sister chromatid exchanges in chromosomes of rat kangaroo cells by tritium incorporated into DNA. *Exp. Cell. Res*, **1972**; 74: 397-402.

42. Tice R, Chailet J, Schneider EL. Evidence derived from sister chromatid exchanges of restricted rejoining of chromatid subunits. *Nature*, 1975; 256: 642-644.
43. Adolph K, Cheng SM, Paulson JR, Leemli JK. Isolation of a protein scaffold from mitotic HeLa cell chromosomes. *Proc.Natl.Acad. Sci*, 1977; 74: 4937-4941.
44. Razin SV, Mantieva VL, Georgiev GA. DNA adjacent to attachment points of deoxyribonucleoprotein fibril to chromosomal axial structure is enriched in reiterated base sequences. *Nuc. Acids. Res*, 1978; 5: 4737- 4751.
45. Evans HJ, Gooden JR, Mitchell RR; Buckland RA. Location of human satellite DNAs on the Y chromosome. *Nature* 1974; 251 346-347.
46. Swift M, Sholman L, Perry M, Chase C. Malignant neoplasms in the families of patients with ataxia telangiectasis. *Cancer Res*, 1976; 36: 209-216.
47. Latt SA, Stetten G, Juergens LA, Buchanan GR, Gerald PS. Induction by alkylating agents of sister chromatid exchanges and chromatid breaks in Fanconi's Anemia. *Proc.Natl.Acad. Sci*, 72: 1975; 4066-4070.
48. Auerbach AD, Wolman SR. Susceptibility of Fanconi's Anemia fibroblasts to chromosome damage by carcinogens. *Nature*, 1976; 261: 494- 496.
49. German J, Ellis NA, Proytcheva M. Bloom's Syndrome Xix. Cytogenetic and population evidence for genetic heterogeneity. *Clin. Genet*, 1996; 49: 223-231.
50. Changati RSK, Schonberg S, German J. A manyfold increase in sister chromatid exchanges in Bloom's Syndrome lymphocytes. *Proc.Natl.Acad. Sci*, 1974; 71: 4508-4512
51. Rowland A. Erişim: www.fluoridealert.org/health/cancer/mutagen.html Erişim Tarihi: 15.5.2006.
52. Bohr VA, Wassermann K. DNA repair at the level of the gene. *TIBS*, 1988; 13 429-433.
53. Cheng WS, Tarone RF, Andrews AD, Whang-Peng JS, Robbins JH. Ultraviolet light-induced sister chromatid exchanges xeroderma pigmentosum and in Cockayne's Syndrome lymphocyte cell. *Lines Cancer Res*, 1978; 38: 1601-1609.
54. Yu CW, Borgaonkar DS. Normal rate of sister chromatid exchange in Down Syndrome. *Clin. Genet*, 1977; 11: 397-401.
55. Perry P, Evans HJ. Cytological detection of mutagen carcinogens exposure by sister chromatid exchange. *Nature*, 1975; 258: 121-125.
56. Liebeskind D, Bases R, Mendez F, Elequin F. Sister chromatid exchanges in human lymphocytes after exposure to diagnostic ultrasound. *Science*, 205: 1979; 1273-1275.

- 57. Evans HJ.** Cytogenetic methods for detection effects of chemical mutagens. *Annals New York Academy of Sciences*, **1983**; 83: 131-140.
- 58. Galloway SM, Wolff S.** The relation between chemically induced sister chromatid exchanges and chromatid breaks. *Mut. Res*, **1979**; 61: 297-307.
- 59. Gebhart E.** Sister chromatid exchange (SCE) and structural chromosome aberration in mutagenicity testing. *Hum. Genet*, **1981**; 58: 235-254.
- 60. Kihlma BA, Sturelid S, Palitti F, Becchetti A.** Effects of caffeine, an inhibitor of post-replication repair in mammalian cells on the frequency of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges induced by mutagenic agents. *Mutat. Res*, **1977**; 46: 130-131.
- 61. Popescu NC, Amsbough SC, Di Paolo JA.** The relevance of caffeine post-treatment to SCE incidence induced in Chinese hamster. *Cells Mutat. Res*, **1979**; 60: 313-320.
- 62. Palitti F, Becchetti A.** Effect of caffeine on sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations induced by mutagens Chinese hamster. *Cells Mutat. Res*, **1977**; 45: 157-159.
- 63. Shiraishi Y, Sandberg AA.** Effects of caffeine induced defective DNA replication on SCE and chromosome aberrations produced by alkylating agents. *Mutat. Res*, **1980**; 72: 251-256.
- 64. Ishii Y, Bender MA.** Caffeine inhibition of prereplication repair of mitomycin c induced DNA damage in human peripheral lymphocytes. *Mutat. Res*, **1978**; 51: 419-425.
- 65. Bynum G, Kram D, Dean R, Hadley E, Monticone R, Bickings C, Scheider EL.** Steroid modulation of sister chromatid exchanges induction by mitomycin c and UV light. *Environ Mutag*, **1978**; 2: 247.
- 66. Gebhart E, Kapphuf H.** Bleomycin and sister chromatid exchange in human lymphocyte chromosomes. *Mutat. Res*, **1978**; 58: 121-124.
- 67. Wolff S, Rodin B.** Saccharin-induced sister chromatid exchange Chinese hamster and human cells. *Science*, **1978**; 20: 543-545.
- 68. Hill A, Wolff S.** Increased induction of sister chromatid exchange by diethylstilbestrol in lymphocytes from pregnant and premenopausal women. *Cancer Res*, **1982**; 42: 893-896.
- 69. Stetka DG, Wolff S.** Sister chromatid exchange as an assay for genetic damage induced by mutagenic carcinogens. *Mutat. Res*, **1976**; 41: 343-350.
- 70. Shuler CF, Latt SA.** Sister chromatid exchange induced resulting from systemic and topical presentations of carcinogens. *Cancer Res*. **1979**; 30: 2510-2514.

- 71. Kato H, Sanberg AA.** Effects of herpes simplex virus on sister chromatid exchange chromosome abnormalities in human diploid fibroblasts. *Exp. Cell. Res*, **1977**; 109: 423-427.
- 72. Mc Donald MA, Fitzgerald PH.** Sister chromatid exchanges and cell cycle progression in cultured lymphocytes from patients with chronic lymphatic leukemia. *JNCI*, **1979**; 62: 1169-1171.
- 73. Pinedo HM, Chabner BA.** Cancer chemotherapy/6 the EORTC. *Cancer Chemotherapy Annual*, **1988**; 22(2): 141-146.
- 74. Latt S.** Sister chromatid exchanges indices of human chromosomal damage and repair detection by fluorescence and induction by mitomycin c. *Proc.Natl.Acad. Sci*, **1974**; 71: 3162-3166.
- 75. Moorhead PS, Nowell WJ, Mellmann DM, Batlips D, Hungerford A.** Chromosome preparations of leucocytes from peripheral blood. *Exp. Cell. Res*, **1960**; 23: 137-142.
- 76. Surrallés J, Xamena N, Creus A, Catalán J, Norppa H, Marcos R.** Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* **1995**; 341: 169-184.
- 77. Ribas G, Surrallés J, Carbonell E, Creus A, Xamena N, Marcos R.** Lack of genotoxicity of the herbicide atrazine in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.* **1998**; 416: 93-99.
- 78. Kayaalp O.** *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. 4. Baskı, Ankara: Toraman ve Ulucan Matbaası, **1987**: 503.
- 79. Konac E, Ekmekçi A, Barkar V, Yilmaz A, Erbaş D.** Effects of diethylstilbestrol in human lymphocytes in vitro: A dose and time-dependent study on genotoxic, cytotoxic and apoptotic effects. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **2005**; 276: 45-53.
- 80. Stephanou G, Andrianoulos C, Tyrakis M, Konti M, Demopoulos NA, Tsambaos D.** In vitro antigenotoxic potential of acitretin in human lymphocytes treated with the antineoplastic alkylating agent ASE (NSC-71964). *Toxicology in Vitro*, **2004**; 18: 609-616.
- 81. Siddique YH, Afzal M.** Antigenotoxic effect of allicin against SCEs induced by methyl methanesulphonate in cultured mammalian cells. *Indian J Exp Biol*, **2004**; 42(4): 437-438.
- 82. Trenz K, Lugowski S, Jahrsdörfer U, Jainta S, Vogel W, Speit G.** Enhanced sensitivity of peripheral blood lymphocytes from women carrying a BRCA1 mutation towards the mutagenic effects of various cytostatics. *Mutation Research*, **2003**; 544: 279-288.
- 83. Krishnaja AP, Sharma NK.** Ascorbic acid potentiates mitomycin c-induced micronuclei and sister chromatid exchanges in human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis Supplement*, **2003**; 1: 99-112.

- 84. Karayianni V, Mioglou E, Iakovidou Z, Mourelatos D, Fousteris M, Koutsourea A, Arsenou E, Nikolaropoulos S.** A new approach for evaluating in vivo anti-leukemic activity using the SCE assay An application on three newly synthesised anti-tumour steroidal esters. *Mutation Research*, **2003**; 535: 79–86.
- 85. Silva LM, Takahashi CS, Carrara HH.** Study of chromosome damage in patients with breast cancer treated by two antineoplastic treatments. *Terato Carcinog Mutagen*, **2002**; 22(4): 257-269.
- 86. Karaberis E, Mourelatos D.** Enhanced cytogenetic and antitumor effects by 9-nitrocamptothecin and antineoplastics. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, **2000**; 20: 141–146.
- 87. Pichierri P, Franchitto A, Piergentili R, Colussi C, Palitti F.** Hypersensitivity to camptothecin in MSH2 protein in recombinational repair. *Carcinogenesis*, **2001**; 22: 1781-1787.
- 88. Jakab MG, Major J, Tompa A.** Follow-up genotoxicological monitoring of nurses handling antineoplastic drugs. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, **2001**; 62: 307–318.
- 89. Abou-Eisha A, Marcos R, Creus A.** Genotoxicity studies on the antimicrobial drug sulfamethoxazole in cultured human lymphocytes. *Mutat Res*, **2004**; 564(1): 51-56.
- 90. Gulen T, Tokyay N, Demiray M, Gulen M, Ercan I, Evke E, Sardas S, Karakaya AE.** The role of triple therapy, age, gender and smoking on the genotoxic effects of Helicobacter pylori infection. *J Int Med Res*, **2002**; 30(4): 380-385.
- 91. Nigro MML, Palermo AM, Mudry MD, Carballo MA.** Cytogenetic evaluation of two nitroimidazole derivatives. *Toxicology in Vitro*, **2003**; 17: 35–40.
- 92. Köseoğlu V, Kismet E, Soysal Y, Ulucan H, DüNDARÖZ R, İmirzahoğlu N, Gökçay E.** Investigation of DNA damage in lymphocytes exposed to benzathine penicillin G. *Pediatrics İnternational*, **2004**; 46: 415-418.
- 93. Slapšytė G, Jankauskienė A, Mierauskienė J, Lazutka JR.** Cytogenetic analysis of children under long-term antibacterial therapy with nitroheterocyclic compound furagin. *Mutation Research*, **2000**; 491: 25–30.
- 94. Dundaroz R, Ozisik T, Baltaci V, Karapinar K, Aydin HI, Denli M.** Sister-chromatid exchange analysis on long-term benzathine penicillin for secondary prophylaxis of rheumatic fever. *Indian J Pediatr*, **2001**; 68(2): 121-122.
- 95. Palanduz Ş, Sever MŞ, Öztür Ş, Taşcıoğlu C, Karan MA, Sönmez G, Çefle K, Güler K.** Genotoxic potential of cyclosporin A in patients with renal transplantation. *Cell Biology and Toxicology*, **1999**; 15: 13-17.
- 96. De Clercq E, Cassimann JJ.** Mutagenic potential of anti-herpes agents. *Life Sci*, **1986**; 38(3):281-289.

- 97. Cassiman JJ, De Clercq E, Van den Berghe H.** Induction of sister-chromatid exchange by 5-substituted 2'-deoxyuridines. *Mutat Res*, **1983**; 117(3-4): 317-327.
- 98. Thust R, Schacke M, Wutzler P.** Cytogenetic genotoxicity of antiherpes virostatics in Chinese hamster V79-E cells. I. Purine nucleoside analogues. *Antiviral Res*, **1996**; 31(1-2): 105-113.
- 99. Tatar A, Ozkurt Z, Kiki I.** Genotoxic effect of ribevarin in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Jpn.J. Infect. Dis*, **2005**; 58: 313-315.

8.ÖZGEÇMİŞ

1967 yılında Gaziantep’te doğdu. İlk, orta ve lise eğitimimi bitirdikten sonra Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesinden 1992 yılında mezun oldu. Daha sonra sırasıyla Kütahya Domaniç Çarşamba Sağlık Ocağı’nda, Gaziantep Karkamış İlçe Sağlık Grup Başkanlığı’nda sağlık grup başkanı, Gaziantep İl Emniyet Müdürlüğü, Gaziantep Büyükşehir Belediye Başkanlığı’nda kurum doktoru olarak görev yaptı. Askerlik görevini Ağrı Doğubeyazıt’ta yedek subay olarak yaptı. Halen Mersin 112 Acil Yardım ve Kurtarma Merkezinde doktor olarak görev yapmaktadır.

2003 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Halen burada yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.