

T.C.

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**GEMFİBROZİL'İN KARDEŞ KROMATİD DEĞİŞİM (KKD=SCE) ORANINA
ETKİLERİNİN İNSAN PERİFERAL LENFOSİT KÜLTÜRÜNDE
İNCELENMESİ**

Evren ULUDAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Süleyman GÜL

OCAK-2013

KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans öğrencisi Evren ULUDAŞ'ın Doç. Dr Süleyman Gül danışmanlığında yüksek lisans tezi olarak hazırladığı “**Gemfibrozil'in Kardeş Kromatid Değişim (KKD=SCE) Oranına Etkilerinin İnsan Periferal Lenfosit Kültüründe İncelenmesi**” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy **birliği** ile kabul edilmiştir.

09/01/2013

Adı ve Soyadı

İmza

Başkan: Doç .Dr. Süleyman GÜL

Üye: Doç .Dr. Fikret AKDENİZ

Üye: Doç .Dr. Hasan ORAL

.....
.....
.....

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/...../20.. gün ve/.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.....

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji anabilim dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Bu çalışmanın tez konusu olarak seçiminde, yürütülmesinde yol gösteren, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen, gerekli laboratuvar olanaklarını sunan, sayın hocam, Doç. Dr. Süleyman GÜL'e, laboratuvar çalışmalarımda her zaman yanımda olan yüksek lisans öğrencisi Duygu DEMİRCİ'ye, Arş. Gör. Pınar AKSU'ya, Arş.Gör. Duygu TANRIKULU'na teşekkürlerimi bir borç bilirim. Ayrıca bana her zaman destek olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kars, 2013

Evren ULUDAŞ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER VE TABLOLAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kromozomlar Hakkında Genel Bilgi	6
2.2. Mutasyon	9
2.2.1. Genom Mutasyonları	9
2.2.2. Kromozom Mutasyonları	9
2.2.3. Gen Mutasyonları	10
2.3. Fibratlar Hakkında Genel Bilgi	11
2.4. Gemfibrozil	11
2.4.1. Farmakolojik Özellikleri	12
2.4.1.1. Farmasötik Bilgi	12
2.4.1.2. Etkileri	13
2.4.1.3. Klinikte Farmakoloji ve Farmakokinetiği	13

2.5. Genotoksisite	14
2.5.1. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD=SCE) Hakkında Genel Bilgi	14
3. MATERYAL VE METOT	16
3.1. Mitomisin-C (MMC)	16
3.1.1. Mitomisin-C (MMC)' nin Özellikleri	16
3.1.2. Mitomisin-C (MMC)'nin Kullanım Alanları	16
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddelerin Çözeltilerinin Hazırlanması	17
3.2.1. Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	17
3.2.2. Gemfibrozil'in Hazırlanması	18
3.2.3. Mitomisin- C (MMC) Çözeltisinin Hazırlanması	18
3.2.4. Sorensen Tamponunun (Sorensen Buffer) Hazırlanması	18
3.2.5. Boyanın Hazırlanışı	19
3.2.6. Kromozom Medyumu	19
3.2.7. Kolsişin	20
3.2.8. Hipotonik Çözelti	20
3.2.9. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)	20
3.2.10. Fiksatif	20
3.2.11. Giemsa	21
3.3. Kullanılan Deney Ekipmanları	21
3.3.1. Hassas Terazi	21

3.3.2. Santrifüj	21
3.3.3. Mikroskop	21
3.3.4. Etüv	21
3.3.5. Deney Ekipmanları	21
3.3.6. Sarf Malzemeler	22
3.4. Kardeş Kromatid Değişimini (KKD) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması ve Boyanması	23
3.4.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması	23
3.4.2. Preparatların Boyanması	24
3.4.3. Mikroskopik İnceleme	25
3.4.4. KKD ve Replikasyon İndeksinin (RI) Saptanması ve KKD Sayısının Saptanması	25
3.4.5. Replikasyon İndeksinin (RI) Saptanması	26
3.5. İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi	29
4. BULGULAR	30
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	40
6. KAYNAKLAR	43
7. ÖZGEÇMİŞ	49

ÖZET

Bu çalışmanın amacı gemfibrozil'in kardeş kromatid değişim oranına etkilerinin, insan periferik lenfosit kültüründe in vitro olarak araştırılmasıdır. İnsan kan lenfosit hücreleri, lenfosit kültüründe gemfibrozil'in 50 µl, 100 µl, 125 µl ve 150 µl 'lik dozları ile 24 saat etkileşime bırakılmıştır. Gemfibrozil uygulanmış deneme grupları negatif kontrol ve pozitif kontrol ile kıyaslandığında, uygulanan gemfibrozil dozlarının kardeş kromatid değişim oranında artışa yol açtığı belirlenmiştir. Ayrıca gemfibrozil konsantrasyonlarının artışı ile hücre replikasyon indeksinin düştüğü, KKD'nin arttığı ve KKD-replikasyon indeksi arasında negatif bir korelasyon ($r = -0.97$) olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Gemfibrozil, lenfosit kültürü, kardeş kromatid değişimi, replikasyon indeksi

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of gemfibrozil on sister chromatid exchange rate in human peripheral lymphocyte culture in vitro. Human peripheral blood lymphocyte cells were treated with 50,100,125 and 150 µg /ml concentrations of Gemfibrozil for 24 h. A significant increase was observed for induction of sister chromatid exchange rate in all treatments of Gemfibrozil concentrations for 24 h comparing with the negative control and mitomycin C (MMC, 0.3 µg/ml) which was used as positive control. It is also observed that Gemfibrozil decreased the replication index (RI) in all the concentrations when compared with control and solvent control. and there was a negative correlation ($r=-0.97$) between SCE and replication index.

Keywords: Gemfibrozil, lymphocyte culture, sister chromatid exchange, mitotic index

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μM	Mikromolar
μl	Mikrolitre
μg	Mikrogram
MMC	Mitomisin-C
DMSO	Dimetil sülfoksit
Rpm	Devir Sayısı
KKD	Kardeş kromatid değişimi
BrdU	5'-Bromo-2'-deoxyuridine

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. İnsan kromozomu'nun elektron mikroskobu görüntüsü ve kısımları	4
Şekil 2.1.1. Normal insan karyotipi	7
Şekil 2.1.2. Sentromerin yerine göre kromozom şekilleri	8
Şekil 2.3.1. Fibratlar ve foto ürünlerinin yapıları	11
Şekil 2.4.1.1. Gemfibrozil'in moleküler formülü	12
Şekil 3.4.4.1. Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi	26
Şekil 3.4.5.1. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdU) ve Deoxyuridine (dU)'in kimyasal yapıları.	27
Şekil 3.4.5.2. BrdU'nin DNA yapısına girmesi ile 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması	29

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa No
Resim 4.1. Sağlıklı bir bireye ait metafaz plağı	30
Resim 4.2. 3. Mitoz evresindeki metafaz plağı	30
Resim 4.3. KKD'nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı	31
Resim 4.4. KKD'nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı	31
Resim 4.5. 3 KKD'nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı	32
Resim 4.6. 2 KKD'nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı	32
Resim 4.7. 2 KKD'nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı	33
Resim 4.8. 3 KKD'nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı	33
Resim 4.9. 2 KKD'nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı	34

ÇİZELGELER VE TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 4.1. Gemfibrozil'in farklı dozlarıyla etkileşime giren insan lenfosit kültüründeki KKD oranları	37
Çizelge 4.2. Gemfibrozil'in farklı dozlarıyla etkileşime giren insan lenfosit kültüründeki replikasyon indeksi oranları	38
Çizelge 4.3. Gemfibrozil'in farklı dozlarıyla replikasyon indeksi (RI) arasındaki regresyon ($r = -0,97$) çizelgesi	39
Tablo 4.1. Kontrol ve Deney Grubu Maddelerinin, İnsan Lenfosit Hücrelerinde Meydana Getirdiği KKD Değişimi (%)	35
Tablo 4.2. Kontrol ve Deney Grubu Maddelerinin, İnsan Lenfosit Hücreleri Replikasyon İndeksi Oranına Etkileri	36

1.GİRİŞ

Teknolojinin gelişmesi ile beraber, üretilen yeni ilaçlar, kimyasallar, tarım ilaçları, gıda katkı maddeleri ve bunların atıkları, canlıların genetik yapısında mutasyon oluşturma ihtimali taşımaktadırlar [1]. Günümüzde kullanılan ilaçların tümü, Farmakokinetik çalışmalardan geçmelerine rağmen bu ilaçların metabolitlerinin canlılar ve çevre üzerindeki uzun vadede oluşturdukları etkiler hakkında yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır [2].

Atık su arıtma tesisleri, ilaç atıklarını tamamen ortadan kaldıramadıklarından dolayı bu ilaç atıkları yer altı, yüzey ve içme sularında bulunabilir [3]. Günümüzde, farmakolojik olarak aktif olan hormon, antibiyotik, steroid ve fibrat gibi maddelerin çevreyle olan etkileşimleri hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır [4,5].

Kandaki trigliserid düzeyini düşüren ilaç grubunu ifade eden fibratlar, bu etkilerini kanda trigliserid taşıyan partikül (VLDL) düzeyini düşürerek ve kandan trigliseridin uzaklaştırılmasını hızlandırarak gösterirler. Atık sularda ve yüzey sularında en çok tespit edilen farmasötik gruplar içerisinde yer alan fibratların en önemlileri, gemfibrozil, klofibrat asit, benzafibrat ve fenofibrattır [6-9].

Fibrat asidin türevlerinden iri olan gemfibrozil, klinik amaçlı olarak, yüksek koroner kalp hastalığı riski taşıyan hastalarda 1980'li yılların başından itibaren kullanılan farmasötik bir üründür. İyi bir lipid düzenleyici ilaç olan gemfibrozil'in fototransformasyonu sonucu oluşan ürünlerin mutajenik ve genotoksik etkiler göstermesinden dolayı bu durum, gemfibrozil'in fototransformasyonu sonucu oluşan ürünlerin, çevresel açıdan risk potansiyeli olan ilaç grubunda olduğu yönündeki düşünceleri desteklemiştir [10,11].

1970 yılından sonra geliştirilen, en hassas ve en çok kabul gören, kısa süreli kanserojenite ve mutajenite testi olan Kardeş Kromatid Değişimi (KKD=SCE=Sister Chromatid Exchange) yöntemi, bir kromozomdaki kardeş kromatidler arasındaki simetrik segment değişimini ifade eder [12-14].

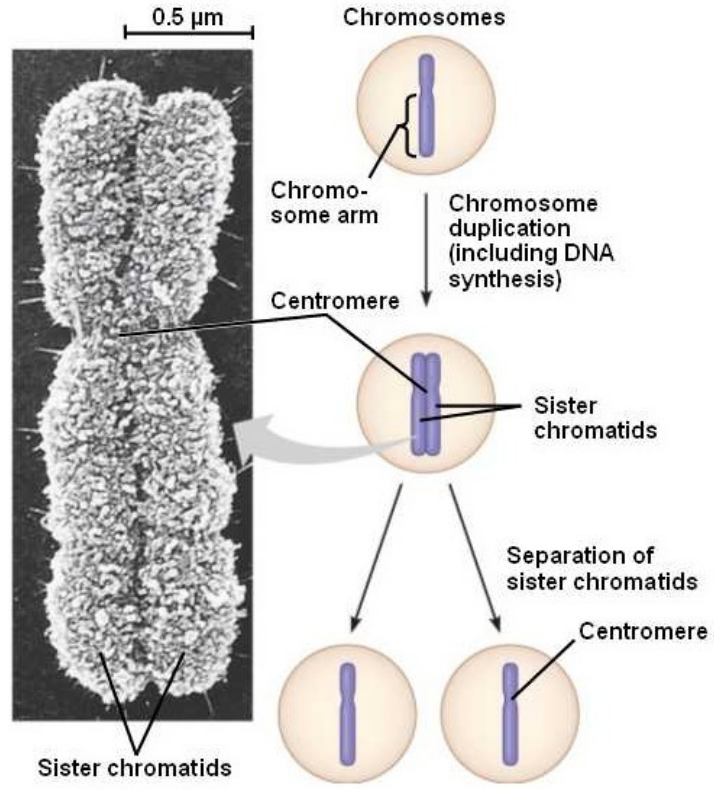
Genetik hastalıkların teşhisinde son derece hassas sonuç veren KKD (=SCE) yöntemi, aynı zamanda in vitro ve in vivo deneyler ile bir çok kimyasal maddenin yanı sıra virüslerin ve radyasyonun çok sayıda etkilerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır [13-19].

Bu çalışmanın amacı, farklı konsantrasyonlardaki Gemfibrozil'in, insan periferik lenfosit kültürüne uygulanarak Kardeş Kromatid Değişim (SCE=KKD) Oranına etkilerinin gözlemlenmesidir.

2.GENEL BİLGİLER

Varlığı, ilk kez 1869 yılında Friedrich Miescher tarafından tespit edilen genetik materyal, gerek canlı organizmaların üreme, gelişme, protein sentezi, adaptasyon ve diğer hücreyel olaylarının gerçekleşmesinden, gerek ise bütün bu fonksiyonların devamı için gerekli olan genetik bilginin depolanması, bir sonraki kuşağa aktarımı ve kullanılmasından sorumludur. Hücrelerde ki genetik materyal DNA molekülüdür (bazı RNA virüsleri hariç).

Genetik yapısı, 1953 yılında James Watson ve Francis Crick tarafından açıklanan DNA molekülü, beş karbonlu bir şeker olan deoksiriboz, azotça zengin olan pürin (Adenin: A, Guanin: G) ve pirimidin (Timin: T, Sitozin: C) bazlarına ek olarak fosfat grubundan oluşan polimerik bir makro moleküldür. DNA molekülü, double helix de denilen, 5¹ ucundan 3¹ ucuna doğru şeker-fosfat omurgasından oluşan iki zincirin, anti paralel bir şekilde sarılması ile meydana gelmiş çift sarmal bir yapıdır. Nadiren sola dönümlü Z-DNA formunda bulunan DNA zinciri, normal fizyolojik şartlara sahip hücrelerde genellikle sağa dönümlü B-DNA formundadır. DNA'nın arjinin ve lizince zengin olan bazik histon proteinleri ile bağlanması sonucu ise kromatin denilen yapı oluşur ve interfaz safhasında görülür. Kromatinler mitoz ve mayoz bölünme esnasında ise kromozom denilen yapıya dönüşürler. Bir haploid memeli hücresi, 3×10^9 nükleotid çiftinden oluşan 23 çift kromozomdan oluşur. Bu 23 çift kromozomdan 22 çifti otozomal kromozomları, son çift ise eşey (X, Y) kromozomlarıdır [20-23].



Şekil 2.1 İnsan Kromozomu'nun elektron mikroskobu görüntüsü ve kısımları [25].

Kromozom	Gen sayısı	Baz sayısı	Tanımlanmış bazlar ^[1]
1	3,148	247,200,000	224,999,719
2	902	242,750,000	237,712,649
3	1,436	199,450,000	194,704,827
4	453	191,260,000	187,297,063
5	609	180,840,000	177,702,766
6	1,585	170,900,000	167,273,992
7	1,824	158,820,000	154,952,424
8	781	146,270,000	142,612,826
9	1,229	140,440,000	120,312,298
10	1,312	135,370,000	131,624,737
11	405	134,450,000	131,130,853
12	1,330	132,290,000	130,303,534
13	623	114,130,000	95,559,980
14	886	106,360,000	88,290,585
15	676	100,340,000	81,341,915
16	898	88,820,000	78,884,754
17	1,367	78,650,000	77,800,220
18	365	76,120,000	74,656,155
19	1,553	63,810,000	55,785,651
20	816	62,440,000	59,505,254
21	446	46,940,000	34,171,998
22	595	49,530,000	34,893,953
X Kromozomu	1,093	154,910,000	151,058,754
Y Kromozomu	125	57,740,000	22,429,293

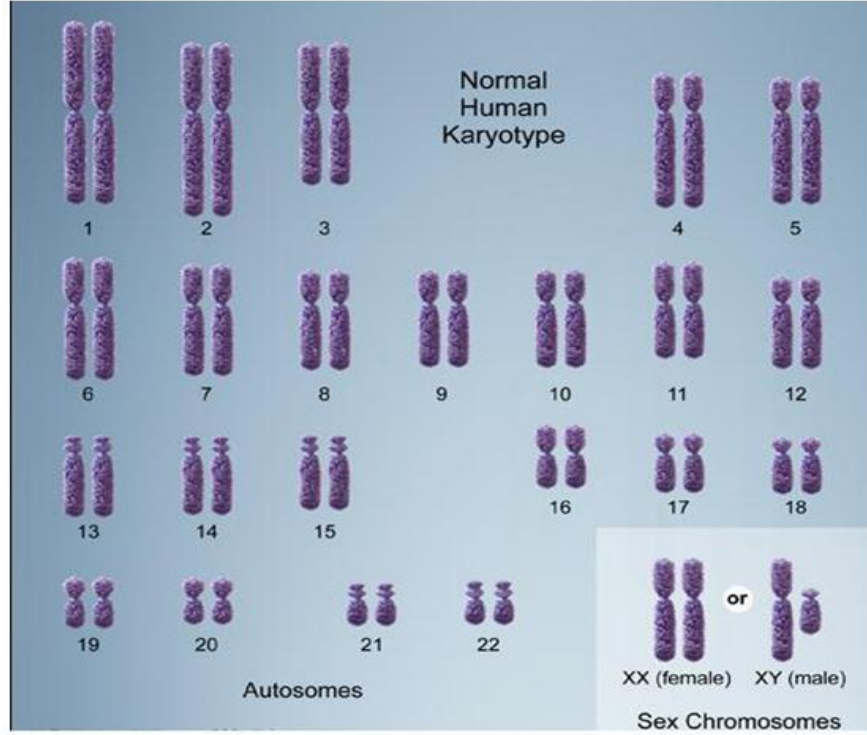
Tablo 2.1.İnsanda bulunan 23 çift kromozom'un içerdikleri gen ve baz sayısı [25].

2.1. Kromozomların Yapısı Ve Morfolojisi Hakkında Genel Bilgi

‘Colored Thread’ olarak bilinen, yunanca bir kelimedenden köken alan ‘Kromozom’ terimi, 1888 yılında W. Waldeyer tarafından tanıtılmıştır. Kromozomlar, organize gen topluluklarının oluşturduğu birimlerdir. T.J. O, Levan, Ford ve Hamerton tarafından 1956 yılında yapılan çalışmalar sonucu, bu bilim adamları insanların 46 kromozoma sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Birbirlerinden, sentromer pozisyonu, uzunluk, büyüklük ve ‘Banding pattern’ diye adlandırılan açık ve koyu bantların düzenlenme biçimine göre ayrılan kromozomlar, en iyi metafaz yada prometafaz safhasında analiz edilir.

Bir türün, bir bireyin veya bir hücrenin kromozomal toplamına ‘karyotip’ denilmektedir ve karyotip her tür için karakteristiktir. Karyotip aynı zamanda, metafazdaki kromozomların morfolojilerine göre, ışık mikroskopundaki görüntülerini ifade etmektedir. Tüm kromozomların, homolog kromozomlar halinde gösterilmesini ise ‘karyogram’ ifade eder. Karyogramda görülen homolog kromozom çiftlerinin biri dişi bireyden, diğeri erkek bireyden gelir ve bu kromozomlar, göreceli uzunluklarına ve sentromer pozisyonlarına göre düzenlenmişlerdir. İnsanlarda bulunan 23 çift kromozomdan ilk 22 çift otozomal kromozom, son çift ise eşey kromozomlarıdır. Son çift, dişilerde iki X kromozomu şeklinde, erkeklerde ise bir X ve bir Y kromozomu şeklindedir. Dişilerin karyotip gösterimi 46, XX, erkeklerin karyotip gösterimi ise 46, XY şeklindedir. Bu gösterimde, virgül öncesi kısım toplam kromozom sayısını, virgül sonrası kısım ise eşey kromozomlarını ifade etmektedir [26].



Şekil 2.1.1 Normal insan karyotipi [27].

Kromozomları Oluşturan Özel Bölgeler

Sentromer: Kromozomu p ve q olarak adlandırılan iki kola ayıran sentromer, görünürlüğü sitogenetik olarak belirleyici olan primer boğum şeklinde tanımlanmıştır ve spesifik proteinlerin bağlandığı DNA dizilerinden oluştuğu bilinmektedir.

Kromatid: Kromozomun kolları gibi görünen kromatidler, kromatinlerin protein iskelete sarılması ile oluşurlar ve ortada konumlanmış olan sentromere göre kromozom kolu olarak adlandırılırlar. Sentromer, kromatidleri uzun (p) ve kısa (q) kollara ayırır.

Telomerler: Kromozomların, diğer kromozomlar ile yapışmasını ve kendi üzerine katlanmasını engelleyen telomerler, hücre bütünlüğünde büyük rol oynarlar. Kromozomların uç kısımlarında bulunan özel DNA dizilerinden oluşan telomerler, yaşlanmaya bağlı olarak kısaltmaya başlarlar fakat buna rağmen kanser hücrelerinin telomerik dizileri bu durumdan etkilenmezler [21].

Replikasyon Başlangıç Noktası (ORI): Kromozomlarda DNA sentezinin başladığı bölgeyi ifade eder. Bu bölge ışık mikroskopunda tespit edilememesine rağmen bütün kromozomlarda en az bir tane olmak kaydıyla bulunmaktadır [28].

Kromozom Şekilleri

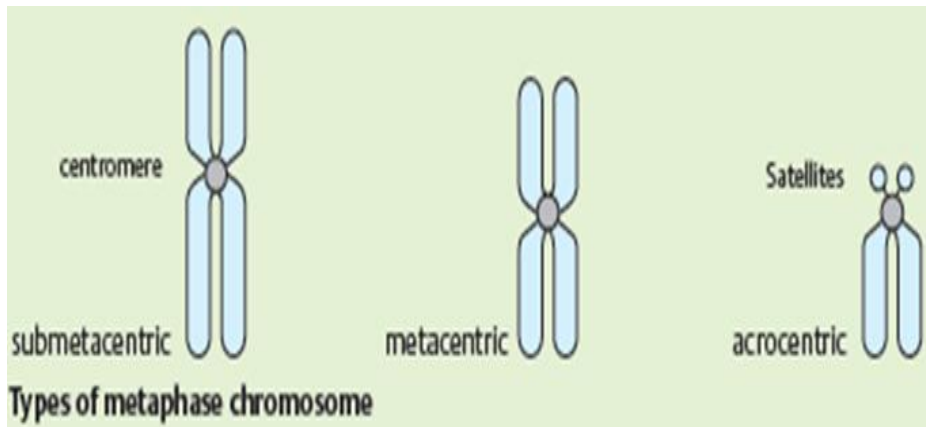
Kromozom şekilleri, 'Denver' klasifikasyonuna göre aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır.

1-Metasentrik (Median) Kromozom: sentromer kromozomun merkezindedir ve kromozom kolları birbirine eşittir.

2-Submetasentrik (Submedian) Kromozom: Sentromer, kromozomun tam merkezinde olmakla beraber, kromozom kol (Telomer) boyları birbirine eşit değildir.

3-Akrosentrik Kromozom: Kromozom kollarının uzunluk farkının en fazla olduğu sentromer konumlanmasıdır. kromozomun uç kısmına çok yakın bir bölgededir sentromer.

4-Telosentrik Kromozom: Sentromerin, kromozomun en uç kısmında bulunduğu durumdaki kromozomdur.İnsanda rastlanmayan bu kromozom tipinde, kromozomun yalnızca uzun kolları vardır.



Şekil 2.1.2 Sentromerin yerine göre Kromozom şekilleri [26].

Birbirinden farklı iki insanın DNA dizileri arasındaki fark yaklaşık olarak % 0,5 dir. DNA dizileri arasındaki bu küçük fark genetik çeşitliliği sağlamaktadır. Canlı DNA'sında ki nükleotid dizilerinde meydana gelen değişimler eğer canlının fenotipini

etkiliyor ise mutasyon, canlının yalnızca genetik çeşitliliğine yol açıyor ise polimorfizm adını alır [21].

2.2. Mutasyon

Bir canlı türünün kendine has genetik olan genetik bilgisinde, gen rekombinasyonunun dışındaki bir takım sebeplerden dolayı oluşan ani kalıtsal değişimlere 'mutasyon' denilir. Doğada spontan bir şekilde meydana gelebilen mutasyonlar, mutajen olarak adlandırılan fiziksel ve kimyasal etkenler tarafından da oluşturulabilir. DNA molekülünde çeşitli hasarlara yol açan mutajenlerin oluşturdukları bu hasarlar, DNA'nın kendi tamir mekanizması tarafından onarılmaya çalışılsa da bazı durumlarda DNA'nın tamir mekanizmasını kontrol eden genlerde meydana gelen mutasyonlardan dolayı onarım yapılamayabilir. Fakat bütün mutasyonlar olumsuz olarak değerlendirilmemelidir. Mutasyonlar, temel fonksiyonları yürüten genlerde bulunmasına rağmen uzaklaştırılmamaları halinde hücrenin ölümüne yol açabileceği gibi, organizmanın gelişiminde, evriminde ve canlılar arası çeşitlilikte önemli rol oynamaktadırlar [29].

Meydana geliş mekanizmalarına göre üç grupta toplanan mutasyonlardan genom mutasyonları, kromozom sayısında meydana gelen değişiklikleri, kromozom mutasyonları, kromozomların yapısında meydana gelen değişiklikleri, gen mutasyonları ise DNA'nın yapısını oluşturan nükleotidlerde ki değişiklikleri ifade etmektedir [21,22].

2.2.1. Genom Mutasyonları

Homolog kromozomların, mitoz veya mayoz bölünme esnasında hatalı ayrılması sonucu meydana gelen kromozom sayısının değişmesiyle oluşur. Kromozom sayısı değişikliğine yol açan mekanizmalar 'anafaz lagging' yani anafazda geri kalma veya kaybolma ve 'nondisjunction' diğer bir deyimle ayrılmama durumudur [21,22].

2.2.2. Kromozom Mutasyonları

Kromozom mutasyonlarına yol açan yapısal değişiklikler kendiliğinden oluşabileceği gibi bir takım viral enfeksiyonlar, iyonize radyasyon ve bazı kimyasalların indüksiyonu ile de oluşabilmektedir. Oluşma sıklığı 6×10^4 / hücre bölünmesi olan kromozom

mutasyonları, insersiyon, inversiyon, duplikasyon, delesyon ve translokasyonlar ile ifade edilir.

İnsersiyonlar: Nadiren görülen bu mutasyon, kopan bir kromozom parçasının başka bir kromozoma katılması durumudur.

İnversiyonlar: Bir kromozomda oluşan iki kırık arasındaki kromozom parçasının ters dönerek aynı yere bağlanmasıdır. İki farklı şekilde gerçekleşebilir. Eğer oluşan kromozom kırıklarının her ikisinde aynı kromozom kolu üzerinde ise 'parasentrik inversiyon', kırıkların her biri kromozomun bir kolunda ise 'perisentrik inversiyon' olarak adlandırılır. inversiyonlar gelecek kuşaklar için anormal gamet oluşturma riski taşımalarına karşın taşıyıcının fenotipinde herhangi bir anormallik oluşturmazlar.

Duplikasyonlar: İnversiyon veya bir translokasyon taşıyıcısında, mayoz bölünme esnasında anormal segragasyon yada eşit olmayan 'krossing-over' sonucu oluşmaktadır. Örnek olarak Rett sendromu ve Blood sendromu gösterilebilir.

Delesyonlar: Kromozom dengesizliğiyle sonuçlanan bu mutasyonun sebebi, kromozomun bir kısmının kaybedilmesidir. Yaklaşık olarak 7000 canlı doğumda bir görülen bu mutasyonda ortaya çıkan bulgular, delesyona uğrayan bölgede ki genlerin sayısına, işlevine ve bu bölgenin büyüklüğüne bağlıdır.

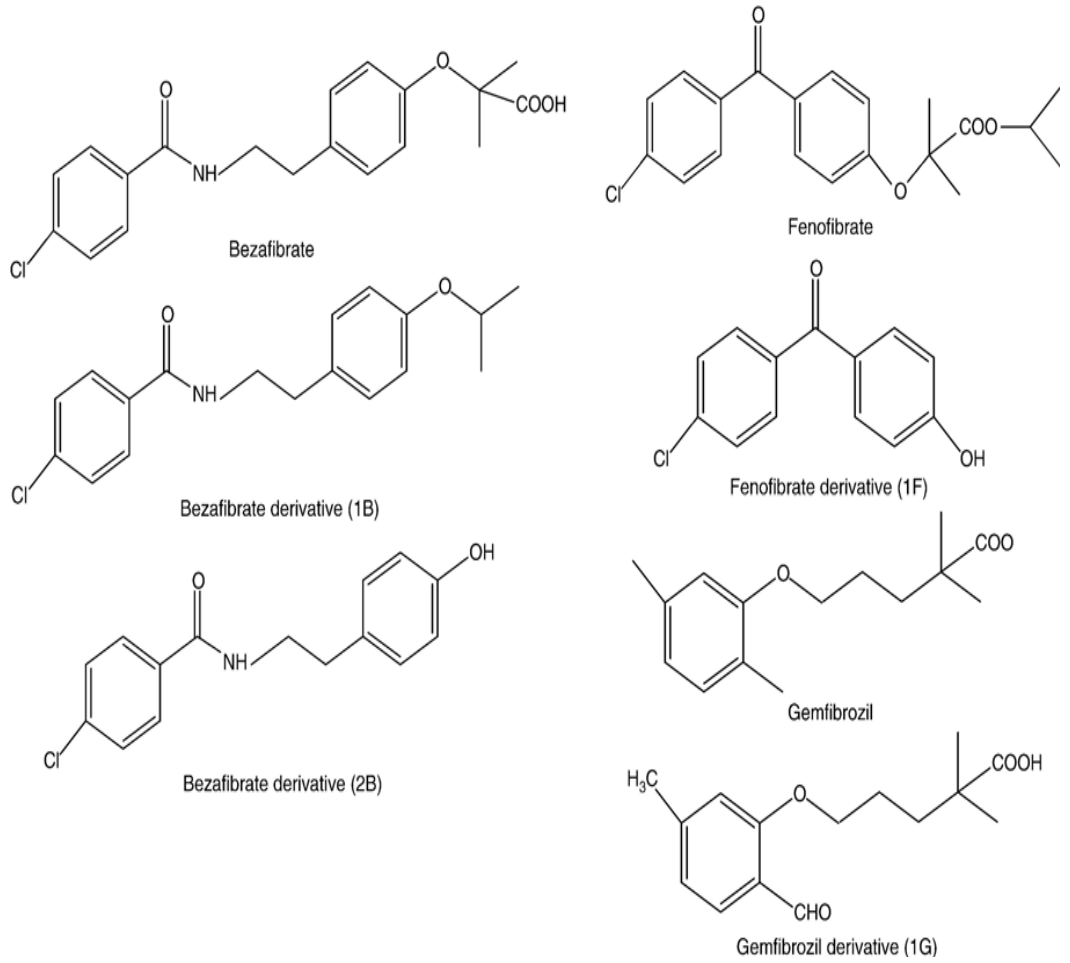
Translokasyonlar: İki şekilde gerçekleşen translokasyonlar, genellikle iki kromozomla kısıtlı olup kardeş olmayan kromozomlar arasındaki parça değişimi şeklinde olur. Bu şekilde gerçekleşen translokasyonlara 'Resiprokal translokasyon' denilir. İkinci translokasyon şekli olan 'Robertsonian translokasyon' u ise kısa kollarını kaybetmiş akrosentrik iki kromozomun, sentromer bölgelerinden birbirine bağlanması sonucu oluşmaktadır [21,22].

2.2.3. Gen Mutasyonları

Gen mutasyonları, insersiyon, delesyon ya da DNA yapısındaki nükleotid çiftlerinin yer değiştirmesi ile meydana gelirler ve herhangi bir mutajen tarafından indüklenmeye bağlı olarak yada DNA replikasyonu sırasında ortaya çıkarlar[21,22].

2.3. Fibratlar Hakkında Genel Bilgi

Hipertrigliserideyi içeren dislipdemi'nin klinik tedavisinde kullanılan fibrik asit türevlerinin hipotrigliseridemik etki mekanizmaları tam olarak bilinmemesiyle beraber, hepatik lipaz ve/veya lipoprotein lipaz'ın aktivitelerini artırarak ve hepatik ApoC-III sentezini azaltarak etki gösterdiği düşünülmektedir. Gemfibrozil, bezafibrat, fenofibrat ve ciprofibrat, klinik tedavilerde kullanılan en önemli fibratlardır [30-31].



Şekil 2.3.1 Fibratlar ve foto ürünlerinin yapıları [32].

2.4. Gemfibrozil

Gemfibrozil, FDA tarafından 1982 yılında verilen onay ile lipid düzenleyici ilaç olarak hiperkolesterolemi ve hipertrigliseridemi'nin tedavisinde etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Gemfibrozil ile yapılan iki klinik deney sonucu, gemfibrozil'in, koroner kalp hastalığının kontrolü için tedavi edici etkisi olan önemli bir ajan olduğu

kabul görmüştür. Gemfibrozil hipolipidemik etkisini, HDL (Yüksek Dansiteli Lipoprotein) konsantrasyonunu yükseltip LDL, (Düşük Dansiteli Lipoprotein Kolesterol) ve trigliserid konsantrasyonunu düşürerek gösterir [11,33,34].

Kemirgenlerde peroksizom proliferatörü olan gemfibrozil ve diğer fibrat türevleri, hepatic peroksizom (sayıca ve büyüklük olarak genişlemiş olan) ile alakası olan karaciğer genişlemesini de kapsayan bir sendromu tetikler. Aynı zamanda birtakım enzimleri (Açıl COA oksidaz, sitokrom P450 4A, karnitin, asetiltransferaz ve peroksizomal, mikrozomal yağ asidi oksitleyici) de indükler [35-38]. Yapılan çalışmalarda, gemfibrozil, di (2-ethylhexyl) phthalate, Wy-14,643 ([4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio]), asetik asit, kolifibrat'ı içeren bazı fibratların kemirgenler üzerinde ki karsinojenitik etkileri gösterilmiştir [39-44].

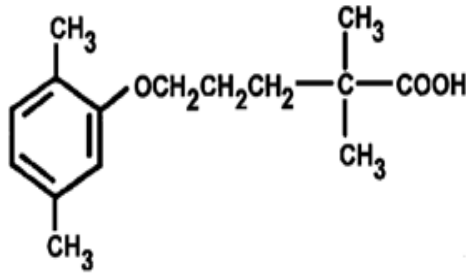
2.4.1.Farmakolojik Özellikleri

Farmasötik Bilgi :

İsim : Gemfibrozil

Kimyasal İsim : 5-(2,5-dimethylphenoxy)-2,2-dimethylpentanoic acid

Kimyasal Yapı :



Şekil 2.4.1.1 Moleküler Formül : C₁₅H₂₂O₃

Farmakolojik Özellikleri

Farmakoterapötik Grubu: Serum lipid düşürücü ajan.

Kimyasal olarak halojensiz fenoksisipentanoik asit olan gemfibrozil, oral yoldan kullanılan bir lipid düzenleyicisidir [45].

2.4.1.2. Etkileri

HDL (Yüksek Dansiteli Lipoprotein Kolesterol) düzeyini yükselten, serum total kolesterol ve trigliserid düzeylerini düşüren gemfibrozil, lipid düzenleyici rol oynayan bir etken maddedir. Gemfibrozil bu lipid düşürücü etkisini ilk önce ve en fazla VLDL (Düşük Dansiteli Lipoprotein) üzerinde, daha az oranda ise LDL (Kolesterolce Zengin Düşük Dansiteli Lipoprotein) üzerinde meydana gelir [32].

İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, gemfibrozil'in periferik lipolizi inhibe ederek yağ asitlerinin hepatik ekstraksiyonunu azaltıp buna bağlı olarak da hepatik trigliserid üretimini azalttığı gösterilmiştir. Aynı zamanda gemfibrozil buna ek olarak VLDL taşıyıcı apolipoprotein B'nin sentezini inhibe etmesi sonucu serum VLDL düzeyinde düşmeye yol açar.

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda ise gemfibrozil'in, kolesterolün karaciğerden uzaklaştırılması, HDL seviyesini yükseltme, kolesterolün feçes ile atılımını hızlandırma, yeni üretilen trigliseridlere uzun zincirli yağ asidi eklenmesini azaltma ve karaciğerde kolesterolün turn-over ' ini hızlandırma gibi etkileri belirtilmiştir [45].

2.4.1.3. Klinikte Farmakoloji ve Farmakokinetiği

Hayvanlarda feçes ve idrar ile atılan gemfibrozil' in insanlarda verilen dozunun yaklaşık % 70' i primer olarak idrar ile glukoronid konjugatı şeklinde, % 6' sı feçes, %2' den daha az bir kısmı ise gemfibrozil olarak atılır. Tek bir dozunun plazma düzeyi en yüksek seviyeye ulaşması 1 veya 2 saat içinde olur. Yarılma süresi multiple dozlarda 1.3 saat, tek dozlarda ise 1.5 saattir [45].

Aynı tedavi döneminde kullanılan antidiabetikler, antikoagülanlar ve hipokolesterolemik ajanların fibratlar ile farmakokinetik ve/veya farmakodinamik etkileşimleri bildirilmiştir [46-47].

2.5. Genotoksisite

Genetik materyaldeki kimyasal veya fiziksel ajanlara bağlı olarak hasar oluşumuna genotoksisite denilmektedir. Tamir edilemeyen genetik materyal hasarı kromozomal aberasyona, DNA sekans değişikliklerine sebep olabilen bir veya daha fazla n¼kleotid değişikliğine bağlı olarak mutasyon, rekombinasyon, yaşlanma, kanser ve doku hasarı oluşumuna sebep olabilmektedir [48].

2.5.1. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD=SCE) Hakkında Genel Bilgi

Geçmişi 1938'lere dayanan KKD (SCE) çalışmaları ilk defa Mc Clintock tarafından somatik mısır hücreleri üzerinde yapılmış ve kardeş kromatidler arasındaki değişimlerden söz edilmiştir [49].

J.H. Taylor ve arkadaşları tarafından 1957 yılında yapılan çalışmada, *Vicia faba* (bakla) kromozomlarını replikasyonun ilk basamağı boyunca 3H-Timidin etkisine bırakarak ikinci metafazda her bir kromozoma ait kardeş kromatidlerinden birinin işaretlendiğini göstermişlerdir.

1972 yılında Zakharov ve Egolina, çim hamster hücrelerini Brdu (5'-Bromo-2'-deoxyuridine)' lu ortamda iki d¼ng¼ boyunca k¼lt¼re edip ardından giemsa boyası ile boyamaları sonucu, boyanın kromatidin tek ipliğine girmesi ile koyu boyandığını, her iki ipliğe girmesiyle de açık boyandığını tespit etmişlerdir [9].

Bir timin analog¼ olan Brdu (5'-Bromo-2'-deoxyuridine), k¼lt¼r ortamında çoğalan DNA' da ki timidin' in yerine geçer. K¼lt¼r ortamında ki hücreler in vitro çalışmalarda bir veya iki replikasyon siklusu, in vivo çalışmalarda bir replikasyon siklusu boyunca BrdU' ya maruz bırakılarak boyanırlar [50].

KKD (SCE)' nin krossing-over olayından farkı, KKD' nin bir kromozomun kardeş kromatidleri arasında parça değiş tokuşu yapmasıdır. Krossing-over ise kardeş olmayan kromozomların kromatidleri arasında parça değiş tokuşu yapmasıdır [51]. KKD kromozom morfolojisinde değişikliğe sebep olmaz [52].

H¼cre siklusunun S fazında meydana gelen KKD' nin molek¼ler mekanizması tam olarak anlaşılamamasına rağmen DNA da ki her kromatidin aynı b¼lgesinde kırklar

oluşturduğu ve DNA zincirinde, değişim olduktan sonra kırıkların hemen onarımı şeklinde olayın devam ettiği bilinmektedir [52,53].

KKD yöntemi, günümüzde kalıtsal hastalıların teşhisinde de kullanılmaktadır. İnsan popülasyonunda %1-2 oranında heterozigot şekilde bulunan, otozomal resesif şekilde etki gösteren Bloom' s sendromu, Fanconi' s anemi, Xeroderma pigmentosum ve Ataxia telangiectasia gibi hastalıklar, bazı özel mutajen maddeler verilerek KKD' de ki artış ya da azalışına göre teşhis edilebilmektedir [54].

3.MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada sigara içmeyen, birbirine yakın yaşlardaki 10 bayan (22 ve 25 yaşlarında) ve 10 erkekten (22 ve 25 yaşlarında) alınan periferik kan materyal olarak, gemfibrozil test maddesi olarak , Mitomisin-C (MMC) pozitif kontrol olarak, DMSO (Dimetil sülfoksit) ise test kontrolü olarak kullanılmıştır [55].

3.1. Mitomisin-C (MMC) 2 mg (Sigma, M 0503)

3.1.1. Mitomisin-C (MMC)' nin Özellikleri

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan Mitomisin-C (MMC) , antineoplastik ve geniş spekturumlu bir sitostatik (hücre bölünmesini durduran) ajandır. Işıktan korunduğu takdirde 5°C altındaki buzdolabında yedi gün özelliğini koruyabilen MMC, suda çözünebilen (pH=6-9), mavi-menekşe renkte, kristal şeklinde bir maddedir. Mitomisin-C 2 mg ve 10 mg'lık amber renkli şişelerde toz şeklinde bulunur [56].

3.1.2. Mitomisin-C (MMC)'nin Kullanım Alanları

Mitomisin-C (MMC), antineoplastik ilaçlar grubuna girmektedir. Bu grupta daunamycin, Mitomisin-C, cyclophosphamide, uracil mustard ve streptozotocin bulunmaktadır.

Alkilleyici bir ajan olan MMC, aşağıdaki kanser türlerinin tedavisinde kullanılmaktadır.

- Mide kanseri
- Göğüs kanseri
- Pankreas kanseri
- Anüs ve kalın bağırsak kanserleri
- Küçük hücreli akciğer kanseri
- Baş ve boyun kanserleri
- Küçük mesane papillomaları

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddelerin Çözeltilerinin Hazırlanması

3.2.1 Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

1. Etanol (C_2H_5OH), (Merck, K35091886 537)

2. Gemfibrozil (Sigma, G9518- 5G)

3. Potasyum di-hidrojen fosfat (KH_2PO_4), (Merck, A651773 524)

4. Sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), (Merck, K34623780 516)

5. Mitomisin C (MMC) 2 mg (Sigma, M 0503)

6. Giemsa (Merck, HX694620)

Fosfat Tampon Çözeltisi: Potasyum di-hidrojen fosfat (KH_2PO_4)' dan 9.1 gr. alınır ve 1000 ml. bidistile suya tamamlanır. Başka bir balon jøjeye de sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)'dan 11,9 gr alınır ve 1000 ml. bidistile suya tamamlanır ve stok çözeltiler hazırlanmış olur [32].

Sorenson Fosfat Tampon Çözeltisi: KH_2PO_4 çözeltisinden 60 ml. ve Na_2HPO_4 çözeltisinden 30 ml. alınarak şaleye konulur ve üzerine 10 ml. giemsa boyası eklenmesi suretiyle %10 luk giemsa-sorenson fosfat tampon çözeltimiz hazırlanmış olur. Sorenson fosfat tampon çözeltisi çeşitli pH değerlerine ayarlanabilir, bu işlem için her iki çözeltinin değişik miktarları kullanılarak pH istenilen değere ayarlanır [32].

Çözelti 1:

KH_2PO_4 9.1 gr.

Bidistile su.....1000 ml.

Çözelti 2:

Na_2HPO_411.9 gr.

Standart Saline Citrate (SSC) Çözeltisi

Bu çözelti ışınlamadan sonra kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını artırmak amacıyla kullanılmıştır. SSC çözeltisini hazırlamak için 11.05 gr trisodyum sitrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) ve 21.9 gr NaCl kullanıldı. Bu iki madde ayrı ayrı kaplarda bir miktar saf su içerisinde çözdürüldü, daha sonra aynı kaba aktarılarak birbirleriyle karıştırıldı. Karışımın üzerine 500 ml oluncaya kadar saf su ilave edildi. Hazırlanan bu stok çözelti 5 x SSC'dir. Çözelti buzdolabında saklandı. Deneyde, bu stoktan 20 ml alıp, üzeri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlandı (elde edilen 1 x SSC kullanıldı).

Bidistile su.....1000 ml.

pH _{5,6} için: Çözelti 2 den 5 ml. ve çözelti 1 den 100 ml.

pH _{6,0} için: Çözelti 2 den 12.3 ml. ve çözelti 1 den 100 ml.

pH _{6,5} için: Çözelti 2 den 30 ml. ve çözelti 1 den 100 ml.

pH _{6,8} için: Çözelti 2 den 50 ml. ve çözelti 1 den 100 ml.

pH _{7,2} için: Çözelti 2 den 70 ml. ve çözelti 1 den 100 ml.

3.2.2. Gemfibrozil'in Hazırlanması

Yapılan hesaplamalarda 10 mg Gemfibrozil alınarak 1ml DMSO (Dimetil sulfoksit)'de çözülmüştür. 50, 100, 125 ve 150 μM 'lık dozlar kullanılarak çalışma yapılmıştır.

3.2.3. Mitomisin- C (MMC) Çözeltisinin Hazırlanması

2 mg Mitomisin-C bulunan ortama 2 ml steril bidistile su ilave edilerek MMC çözdürülmüştür. Sonra bu çözültiden 5 ml'lik kültür ortamına ilave edilerek son konsantrasyondaki MMC oranı 0.3 $\mu g/ml$ olan çözültüler hazırlanmıştır. Yukarıda belirtilen konsantrasyonlardaki MMC ile hücreler 24 saat muamele edilmiştir.

3.2.4. Sorensen Tamponunun (Sorensen Buffer) Hazırlanması

KKD'yi incelemek amacıyla hazırlanan preparat Sorensen tamponu içerisinde UV lambası ile ışınlandırıldı. Sorensen tamponu % 10'luk Giemsa boyasının

hazırlanmasında da kullanıldı. Bu tampon çözelti tampon A ve tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanmış olup, 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 çözdürülmüştür (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 çözdürülmüştür (pH=9.3).

3.2.5 Boyanın Hazırlanışı

Tampon A: 11.34 gr KH_2PO_4 250 ml saf su içinde çözdürülmüştür (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 çözdürülmüştür.

3.2.6. Kromozom Medyumu (Besi Yeri)

Bu çalışmada Biochrom firmasının ürettiği Chromosome Medium B (Cat. no. F5023), hücre kültürü olarak kullanılmıştır. Chromosome Medium B'nin her litresinde aşağıdaki maddeler bulunmaktadır:

Non essential Amino Acids.....	850 ml
Fetal Calf Serum	150 ml
Heparin.....	25.000 E
Penicillin G, Sodium Salt.....	75.000 E
Streptomycin Sulphate.....	50 mg
Phytohemagglutinin M.....	2.5 mg

Bu medyum her tüpe 5 ml olacak şekilde paylaştırılmış ve bu miktarlarda kullanılmıştır. Kültür tüpleri steril olarak temin edilmiştir.

3.2.7. Kolsişin

Kromozom preparatlarının hazırlanmasında mitotik zehir olarak Colchicine (Kolsişin) (Sigma) kullanılmıştır. Kolsişin çözeltisi steril saf su içerisinde hazırlanmış ve kromozom medyumunun her ml'sinde 0.06 µg olacak şekilde (0.06 µg/ml) 5 ml'lik kromozom medyumuna ilave edilmiştir. Kolsişin'in bazı özellikleri aşağıdadır.

Kapalı formülü: C₂₂H₂₅N₀₆

Molekül ağırlığı: 399.4

Etil asetat içeriği: %3.4

Kloroform içeriği: < %0.1

3.2.8. Hipotonik Çözelti

Hipotonik çözelti olarak % 0,4'lük KCl (Merck) kullanılmıştır. Çözelti bidistile su içinde stok halinde hazırlanıp, ağzı kapalı bir cam kaptaki buzdolabında (+4 °C) saklandı. Her preparasyondan yaklaşık 2 saat önce yeteri kadar miktar alınıp, 37 °C'deki etüvde ısıtılarak kullanıldı.

3.2.9. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)

BrdU, Sigma firmasından (Cat. No. B 5002) temin edildi. BrdU'dan 5 mg alınarak 10 ml Chromosome Medium B'de çözdürüldü (50 µg/100 µl medium). Bu çözeltiden SCE çalışmasında besi yerine 10 µg/ml gelecek şekilde ilave edildi (100 µl).

3.2.10. Fiksatif

Preparatların hazırlanmasında kullanılan fiksatif, 1 kısım glacial asetik asit' in 3 kısım metanol (1/3 : glacial asetik asit/metil alkol) ile karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Fiksatif kullanılmadan iki saat önce hazırlanmış ve buzdolabında saklanmıştır. Her seferinde preparat yapım işleminden iki saat önce taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır.

3.2.11. Giemsa

Giemsa boyası Merck firmasından (Cat. No. 9204) temin edilmiş olup, deneyde Sorensen tamponu içinde hazırlanmış olan % 10'luk ve % 5'lik çözeltileri preparatların boyanmasında kullanıldı.

3.3. Kullanılan Deney Ekipmanları

3.3.1. Hassas Terazi

Tartım işlemlerinde 0,0001 gr hassasiyetindeki PRECİSA XB 220 A marka terazi kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.

3.3.2. Santrifüj

5000 rpm'e kadar yükselebilen devir hızı, 15 dk.'lık zaman ayarlayıcı ve 8 tüp kapasiteli ELEKTRO-MAG marka santrifüj çalışmalarda kullanılmıştır.

3.3.3. Mikroskop

Koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan OLYMPUS marka binoküler ışık mikroskobu preparat incelemeleri sırasında kullanılmıştır.

3.3.4. Etüv

Elektro-mag M 420 Bp marka 0 °C - 100 °C ayarlanabilir etüv deneyde hücre kültürünün yapımında ve bazı eriyiklerin 37 °C'ye ısıtılmasında kullanılmıştır.

3.3.5. Deney Ekipmanları

- 1.Etüv (Elektro-mag M420 Bp)
- 2.Vorteks (Yellowline)
- 3.Mikroskop (Olympus model CHK)
- 4.Santrifüj (Elektro-mag)

5.Derin dondurucu

6.Buzdolabı

7.Otomatik pipet

8.Fotomikroskop (Olympus BH-2,Nikon Coolpix 8800)

3.3.6. Sarf Malzemeler

1. Heparin (Roche)

2. Giemsa (Merck, 5400512)

3. KH_2P_0_4 (Merck, 9021622)

4. $\text{Na}_2\text{HP}_0_4\text{H}_2\text{O}$ (Merck, K1 690176)

5. Glasial asetik asit (Merck, 247K18855556)

6. Metanol (Merck, 502K05275408)

7. İmmersiyon yağı (Merck, 09403569)

8. KCL (Merck, 340TA611835)

9. Alkol (Merck)

10. Distile su

11. Tüplük

12. Çeşitli cam malzemeler

13. Konik tabanlı 10ml'lik steril kültür tüpü

14. Enjektör

15. Çeşitli ebatlarda puarlar

16. Pastör pipeti

17. Lam

18. Lamel

3.4. Kardeş Kromatid Değişimini (KKD) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması ve Boyanması

3.4.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Speit ve Haupter (1985)'in geliştirdikleri metod modifiye edilerek bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını (sister chromatid differentiation=SCD) sağlamak amacıyla kullanılmıştır (57). Sigara içmeyen, sağlıklı ve yaşları birbirine yakın on bayan ve on erkekten alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri steril şartlarda kromozom medyumlarına (5 ml) 12 damla ekildi. Daha önce steril şartlarda hazırlanan BrdU çözeltisinden her tüpe 10 µg/ml olacak şekilde (hazırlanan BrdU solüsyonundan 100 µl) yine steril şartlarda ve ilave edilerek iyice karıştırıldı (50 µg BrdU/100 µl besi yeri) ve hücre kültürü etüvde 37 °C'de 72 saat için inkübe edildi. Kültür süresinin bitimine 24 saat kala gemfibrozil'in insan kromozomları üzerine etkisini incelemek için son konsantrasyon kültür tüplerine ilave edilmiştir.

MMC, pozitif kontrol olarak kullanmak amacıyla steril bidistile suda çözülmüştür. Kültür bitimine 24 saat kala MMC'nin insan kromozomları üzerine etkisini incelemek için son konsantrasyonu 0.3 µg/ml MMC kültür tüplerine ilave edilmiştir. Negatif kontrol olarak ise distile su (%1), test kontrolü olarakta DMSO (Dimetil sülfoksit) kullanılmıştır [58].

Kültürün 70. saatinde (yani kültür süresinin bitiminden 2 saat önce) hazırlanan kolşisin çözeltisinden her tüpe ilave edildi (0.06 µg/ml) ve iyice karıştırmak amacı ile tüpler hafifçe sallandı. Hücreler 2 saat süresince (37 °C'de) kolşisin ile ön muameleye tabi tutulmuştur. Kültür tüpleri, kültür süresi olan 72. saatin bitiminde 10 dk. 2000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Hücreleri ihtiva eden ve tüpün dibinde kalan 0.5-0.7 ml'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra etüvde 37 °C'de tutulan hipotonik çözelti tüplere ilave edildi. Bu işlem sırasında hücrelerde kümeleşme olmaması için çözelti tüplere damla damla ve karıştırılarak ilave edildi. Hipotonik çözelti her tüpe 5 ml olacak

şekilde ilave edildikten sonra ağızları kapatılarak etüve konuldu. 37 °C’de 30 dk etüvde bekletilen hipotonik ilave edilmiş tüpler, sürenin sonunda 10 dk. 2000 rpm’de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Soğuk fiksatif, her tüpe 5 ml olacak şekilde hipotonik çözelti ilavesindeki gibi yavaş yavaş ve karıştırarak, ilave edildi. Fiksatif ile muamele edilen hücreler 2000 rpm’de 10 dk. santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Bu işlem 3 kere tekrarlandı ve İşlem sonrası tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görüldü. Son santrifüjden sonra dipte 0.5-0.7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldı. Tüpte kalan 0.5-0.7 ml’lik kültür sıvısı ile preparatlar hazırlandı. Bu işlem yapılırken tüpün dibinde toplanan hücreler pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirildi ve Pasteur pipetine 4-5 damla bu hücre süspansiyonundan çekildi ve bu süspansiyon daha önce temizlenmiş lamaların üzerine yaklaşık olarak 50 cm yükseklikten ve farklı alanlara 1’er damla damlatıldı (her lama 3-4 damla). Bu işlem yapılırken damlaların üst üste düşmemesine dikkat edilerek hücrelerin lam üzerine yayılmaları sağlandı ve yayma işleminden sonra preparatlar kurumak üzere 24 saat oda ısısında bekletildi.

3.4.2. Preparatların Boyanması

Speit ve Haupter (1985)’in geliştirdikleri metot modifiye edilerek, bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını (sister chromatid differentiation=SCD) sağlamak amacıyla kullanıldı [57]. Bu amaçla bir gün kurutulmuş preparatlar ışınlama kabına konarak üzeri bir film gibi örtülecek şekilde Sorensen tamponu ile kapatıldı. Işınlama çözeltisi, 5 ml tampon A, 5 ml tampon B’den alınıp bu karışımın distile su ile 100 ml’ye tamamlanmasıyla hazırlandı (pH=6.8). Işınlama çözeltisinin fazla veya az olması kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını önemli derecede etkilediği görülmüştür. Bu nedenle preparatların üzeri ince bir tabaka halinde ışınlama çözeltisi ile örtülmüştür. Örtülmüş preparatlar, karanlıkta 15 cm yükseklikten 30W’lık 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen tek ultraviyole lamba 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 çözeltisi hazırlandı. % 5’lik Giemsa boyası, 5 ml tampon A, 5 ml tampon B ve 5 ml Giemsa’nın karıştırılarak üzeri 85 ml saf su ile tamamlanmasıyla hazırlandı (pH=6.8). Sonra bu boya dik bir şale içine filtre kâğıdından süzüldü. İnkübasyon süresinin sonunda preparatlar 1xSSC solüsyonundan alınarak direkt olarak boya içerisine konuldu ve

yaklaşık olarak 20 dk. beklendi (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 kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirildi. Entellan kuruduktan sonra bu daimi preparatlar mikroskop altında incelendi.

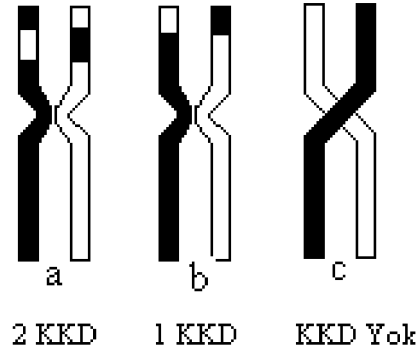
3.4.3. Mikroskobik inceleme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar Olympus marka binoküler ışık mikroskobunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir (10x100=1000 büyütmede).

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

KKD Sayısının Saptanması

Bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılması esasına dayanarak, kan kültürüne ait preparatlardan iyi dağılmış ve ikinci mitozu geçiren 100 metefazda KKD sayısı belirlendi [59]. Kromozom kollarının orta kısmında bir parça değişimi olmuş ise bu iki KKD olarak, sadece kromozom kollarının uç kısmında parça değişimi olmuş ise bu da bir KKD olarak sayıldı. Ancak bu incelemeler esnasında kromatidlerin primer boğum bölgelerinden dönüm yapıp yapmadıklarına dikkat etmek gerekmektedir. Bu durumdaki kromozomlarda KKD yoktur (Şekil 2.1).



Şekil 3.4.4.1 Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi [59].

3.4.5. Replikasyon İndeksinin (RI) (Proliferasyon İndeksi=PI) Saptanması

Gemfibrozil'in DNA replikasyonu üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile RI hesaplanmıştır. Bunun için tesadüfen seçilmiş 100 hücre incelendi. Bu incelemeler sırasında gözlenen birinci, ikinci ve üçüncü metafaz evresindeki hücreler sayıldı. Bu verilerden yola çıkarak RI aşağıdaki formülle hesaplandı.

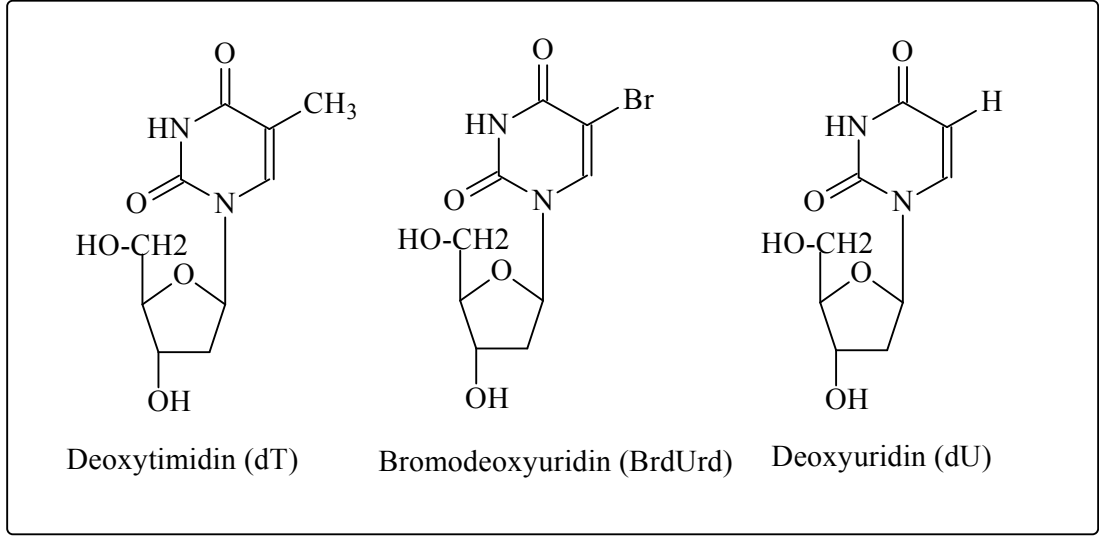
$$RI = (1 \times M1 + 2 \times M2 + 3 \times M3) / 100$$

M1: 1. Mitozdaki hücre sayısı

M2: 2. Mitozdaki hücre sayısı

M3: 3. Mitozdaki hücre sayısı

Birinci, ikinci ve üçüncü metafazlar şu şekilde ayırt edilmiştir [60]: BrdU, deoxytimidin (dT) ve deoxyuridin (dU) birbirlerinin analoğu olan bileşiklerdir. BrdU, dT ve dU arasındaki tek fark taşıdıkları benzen halkasındaki 5.C atomuna dT'de CH₃, BrdU'de Br ve dU'de H atomunun bağlı olmasından kaynaklanmaktadır.

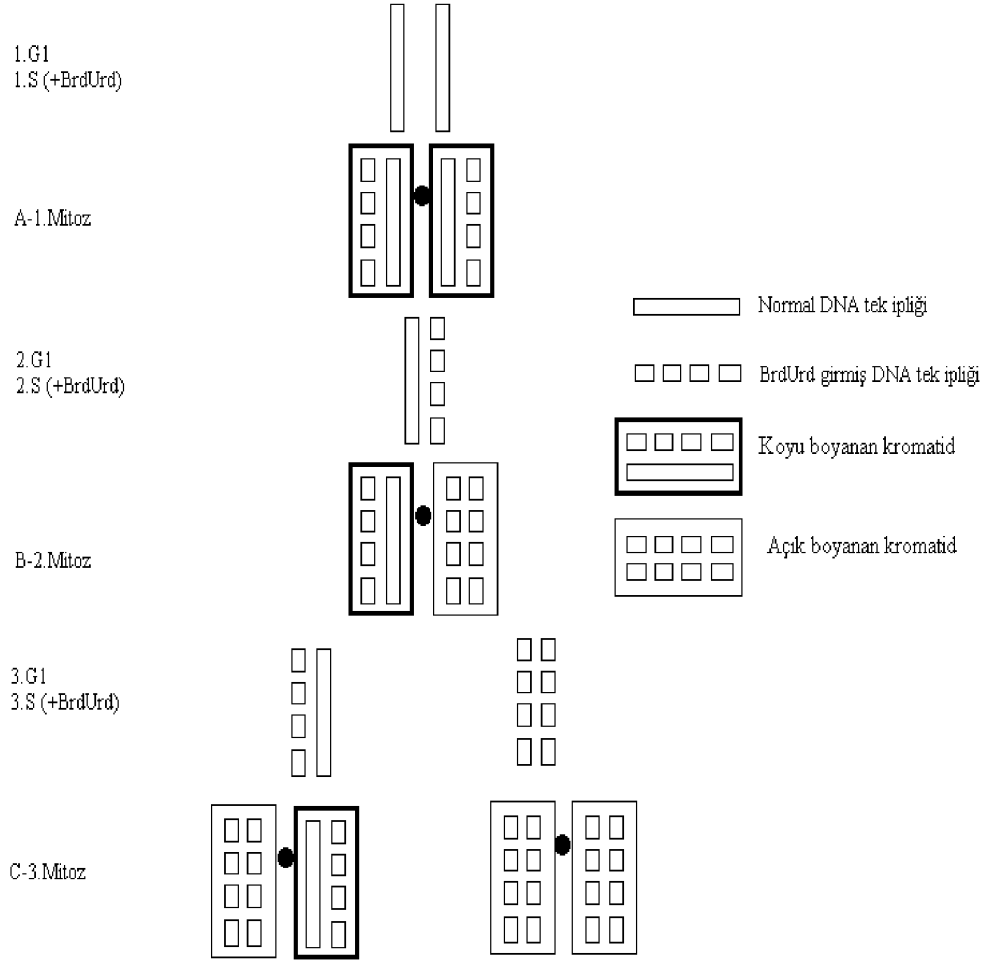


Şekil 3.4.5.1 Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdU) ve Deoxyuridin (dU)'in kimyasal yapıları.

Kültür ortamına BrdU koyulduğunda, hücre DNA'sını replike ettiği sırada (1.S fazında) yeni sentezlenen DNA dallarından birinin (polinükleotid ipliği) içine dT'in yerine BrdU geçmektedir. Böyle hücreler 1. Mitoza uğradıklarında meydana gelen yeni hücrelere ait kromozomların her iki kromatidinde koyu renkte boyanmaktadır. Bu hücreler S (2. S fazı) fazına girdiğinde DNA ipliğinin birisi BrdU diğeri dT taşıdığından, DNA replike olduğunda tekrar ortamda bulunan BrdU'yi yapılarına almaktadırlar. Bu hücreler 2. Mitoza uğradıklarında yavru hücrelerin kromozomlarının kromatidlerinden biri koyu boyanırken diğeri açık boyanmaktadır. Çünkü, kromatidlerden koyu boyananda DNA ipliğinin biri dT taşırken, diğeri BrdU taşımaktadır. Diğer kromatidi oluşturan DNA ipliğinin ikisi de BrdU taşımaktadır (açık boyanan). Böyle yavru hücreler tekrar BrdU bulunan ortamda S fazına (3. S fazı) girdiklerinde ortamdaki BrdU'yi yapılarına alırlar. Bu hücrelerin kromzomlarından birini oluşturan DNA ipliğinden biri BrdU'yi, diğeri dT'i taşıdığından 3. mitozu girdiğinde yavru hücrelerin kromatidlerinden biri koyu diğeri açık boyanmaktadır. Açık boyanan kromatidleri taşıyan hücreler ise 3. Mitoza uğradıklarında kromatidleri oluşturan DNA ipliklerinin her ikisi de BrdU taşıdığından yeni yavru hücrelerin kromozomlarını oluşturan kromatidlerin her ikisi de açık boyanmaktadır. Bu nedenle yeni yavru hücrelerin (3. Mitoz sonucu oluşan) bazılarının her iki kromatidi açık boyanırken, bazılarının kromatidlerinden biri açık diğeri koyu

boyanmaktadır. Özetleyecek olursak, BrdU'li ortamda bulunan hücrelerin kromozomlarını oluşturan kromatidlerin her ikisi, birinci mitoz sonucu oluşan yavru hücrelerde koyu boyanır. İkinci mitoz sonucu oluşan yavru hücrelerde kromatidlerin biri koyu diğeri açık boyanır. Üçüncü mitoz sonucu oluşan hücrelerde ise hücrelerin bir kısmında kromatidlerin biri açık, diğeri koyu boyanırken, diğeri bir kısmında ise kromatidlerin ikisi de açık boyanmaktadır. Şekil 3.4.5.2'de şematik olarak gösterilmiştir.

Bu boyanma şeklinde hücrelerin kaçınıcı mitozda olduğu anlaşılabilir. Bu şekilde görüntülenen metafaz plaklarında bazı kromozomların her iki kromatidi açık renkte, bazı kromozomların bir kromatidi açık, diğeri kromatidi de koyu renkte boyanmaktadır ve bu durum hücreleri 3. mitoz bölünmeyi geçirdiğini göstermektedir. Taranan preparatlarda metafaz esnasında bulunan 100 hücre incelenerek kaçınıcı mitoz evresinde oldukları belirlendi. Bu sonuca göre formülle replikasyon indeksi (RI) hesaplandı.

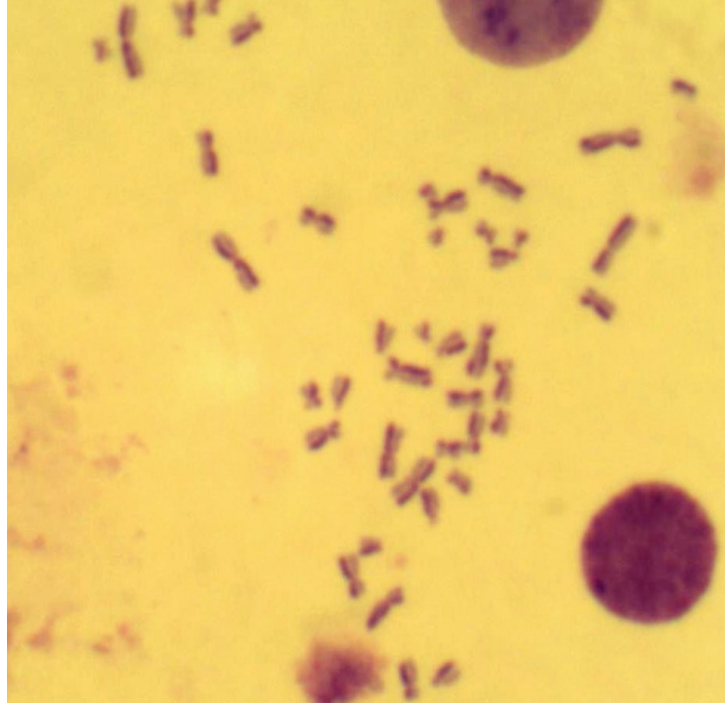


Şekil 3.4.5.2 BrdU'nin DNA yapısına girmesi ile 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması [59].

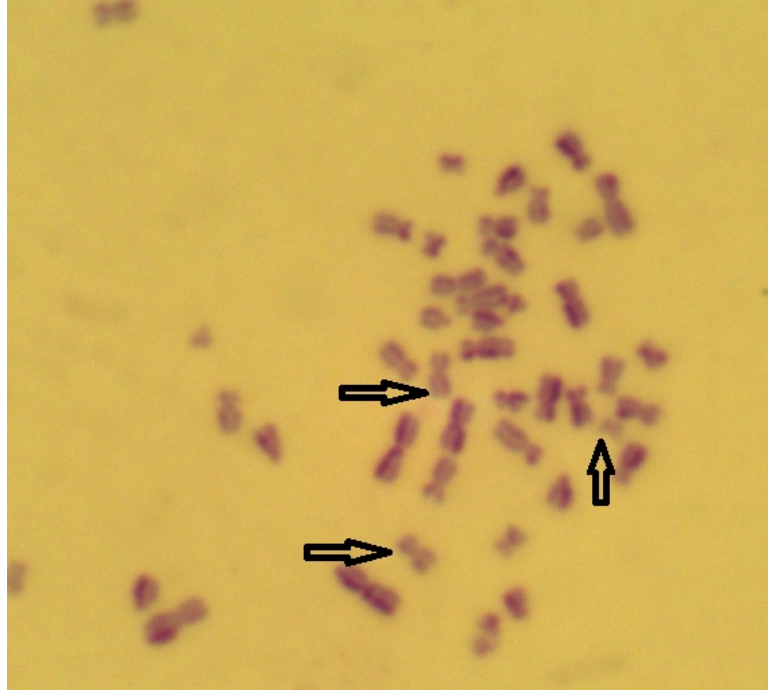
3.5. İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Tüm istatistiksel analizler Windows 95 GraphPad InStat 3.05 (GraphPad Software, San Diego California USA) kullanılarak yapılmıştır. Kimyasallarla muameleli gruplar ve negatif kontroller arasında farklılığın tespiti için Dunnett t testi kullanılmıştır. Doz-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla regresyon ve korelasyon analizleri yapıldı, regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı (r) bulundu ve regresyon doğrusu çizildi.

4.BULGULAR

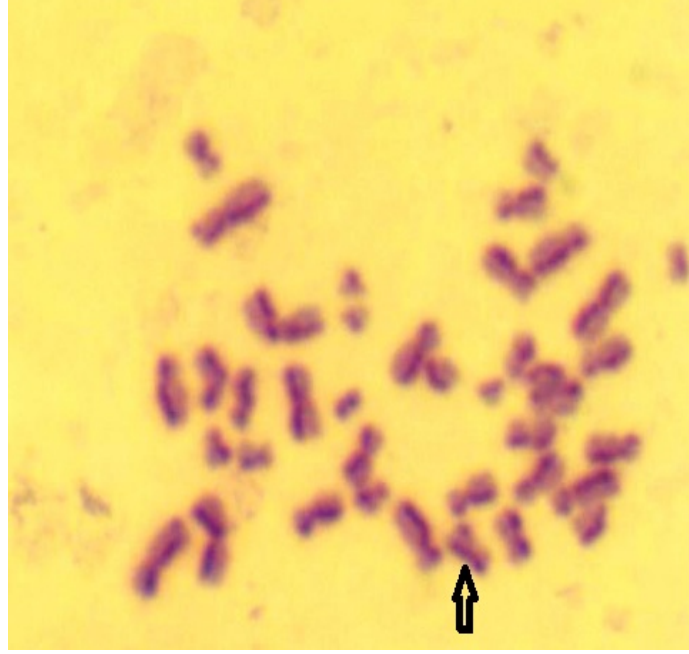


Resim 4.1 Sağlıklı bir bireye ait metafaz plağı (normal kromozom görüntüsü)



Resim 4.2 3. mitoz evresindeki metafaz plağı

Farklı dozlarda Gemfibrozil ile muamele edilmiş insan periferik lenfosit hücre kültüründen elde edilen kromozomlara ait metafaz plağı görüntüleri aşağıda yer almaktadır.



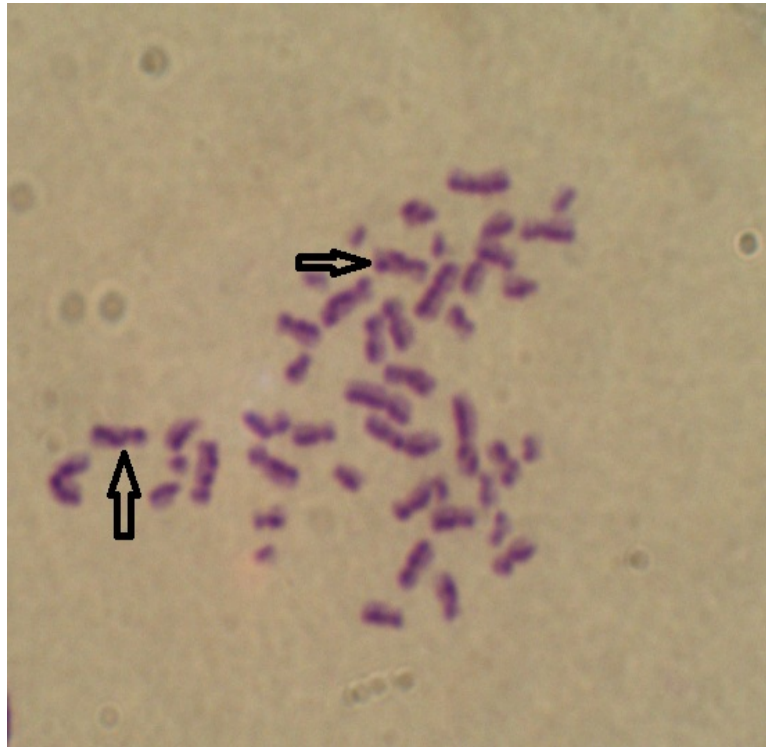
Resim 4.3 KKD'nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı



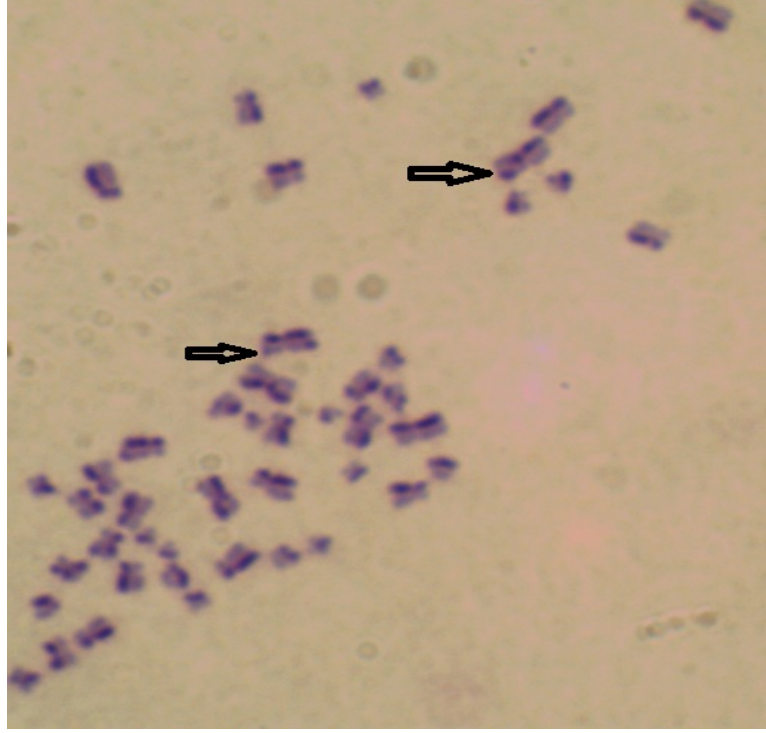
Resim 4.4 4 KKD'nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı



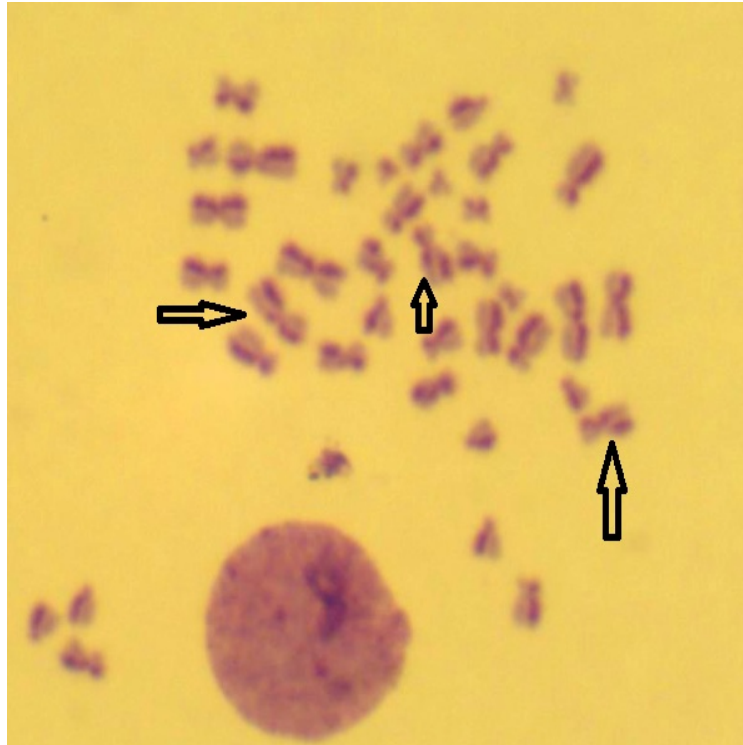
Resim 4.5 3 KKD'nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı



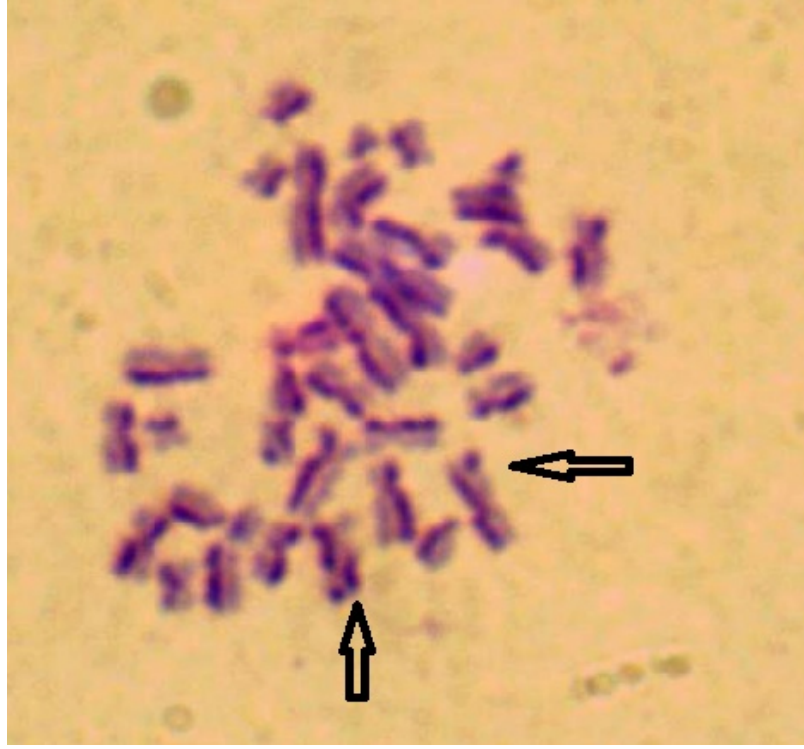
Resim 4.6 2 KKD'nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı



Resim 4.7 2 KKD'nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı



Resim 4.8 3 KKD'nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı



Resim 4.9 2 KKD'nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı

Tablo 4.1 Kontrol ve Deney Grubu Maddelerinin, İnsan Lenfosit Hücrelerinde Meydana Getirdiği Kardeş Kromatid Değişimi (%)

Gruplar	Muamele süresi	Toplam hücre sayısı	Toplam KKD sayısı	KKD sayısı (ort.)	±SEM (%)
Negatif kontrol	24 hr	500	45	9	±0,08
DMSO	24 hr	500	50	10	±0,17
Pozitif kontrol MMC (03 µg/ml)	24 hr	500	325	65	±0,44
Gemfibrozil (0.050 mg/ml)	24 hr	500	74	14,8 *	±0,08
Gemfibrozil (0.100 mg/ml)	24 hr	500	99	19,8 *	±0,22
Gemfibrozil (0.125 mg/ml)	24 hr	500	105	21 *	±0,17
Gemfibrozil (0.150 mg/ml)	24 hr	500	152	30,4 *	±0,22

*p<0,01 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fark önemli (Fisher's Exact Test) kontrol (%1 distilled water).

KKD: Kardeş Kromatid Değişimi

DMSO: Dimetil sülfoksit

MMC: Mitomisin-C

Tablo 4.2 Kontrol ve Deney Grubu Maddelerinin, İnsan Lenfosit Hücreleri Replikasyon İndeksi Oranına Etkileri (%)

Gruplar	Muamele süresi	Toplam hücre sayısı	M1	M2	M3	SD ±SEM	Toplam RI oranı 24 saat (%)	KKD ±SEM (%)
Negatif kontrol	24	500	35	45	420	±0,4	2,77	±0,08
DMSO	24	500	65	100	335	±0,5	2,54	±0,17
Pozitif kontrol MMC (03 µg/ml)	24	500	455	20	25	±0,4	1,14	±0,44
Gemfibrozil (0.050 mg/ml)	24	500	83	118	299	±0,2	2,43*	±0,08
Gemfibrozil (0.100 mg/ml)	24	500	87	127	287	±0,5	2,40*	±0,022
Gemfibrozil (0.125 mg/ml)	24	500	86	131	283	±0,4	2,39*	±0,17
Gemfibrozil (0.150 mg/ml)	24	500	81	132	293	±0,5	2,34*	±0,22

*p<0,01 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fark önemli (Dunnet testi).
kontrol (%1 distilled water).

KKD: Kardeş Kromatid Değişimi

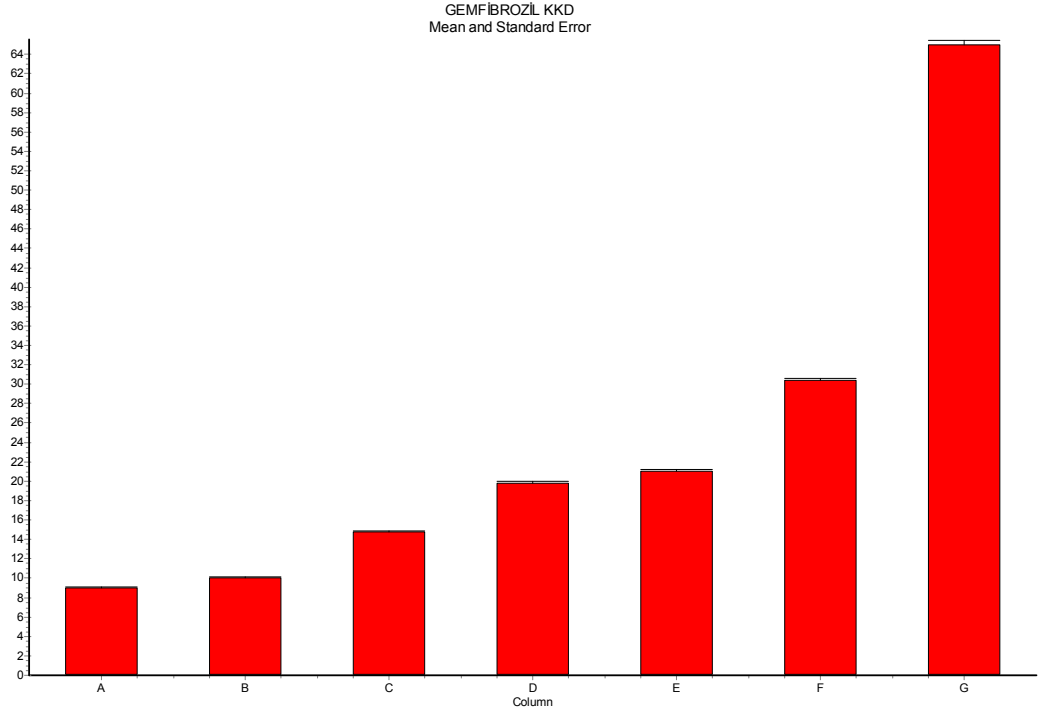
RI: Replikasyon İndeksi

M1: Mitoz 1

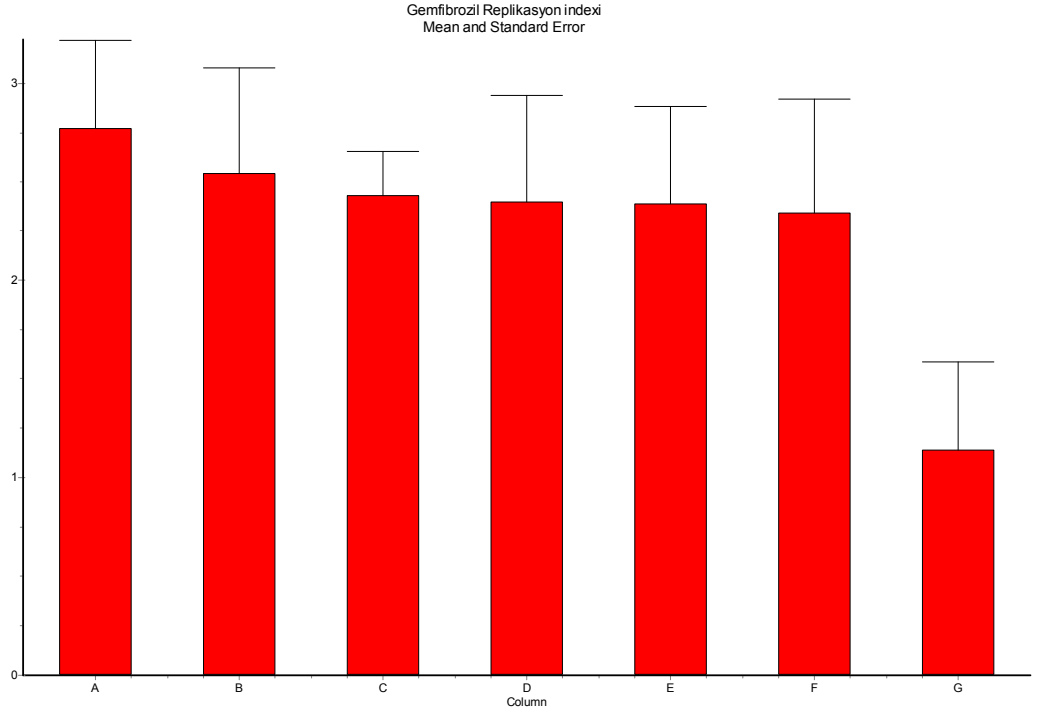
M2: Mitoz 2

M3: Mitoz 3

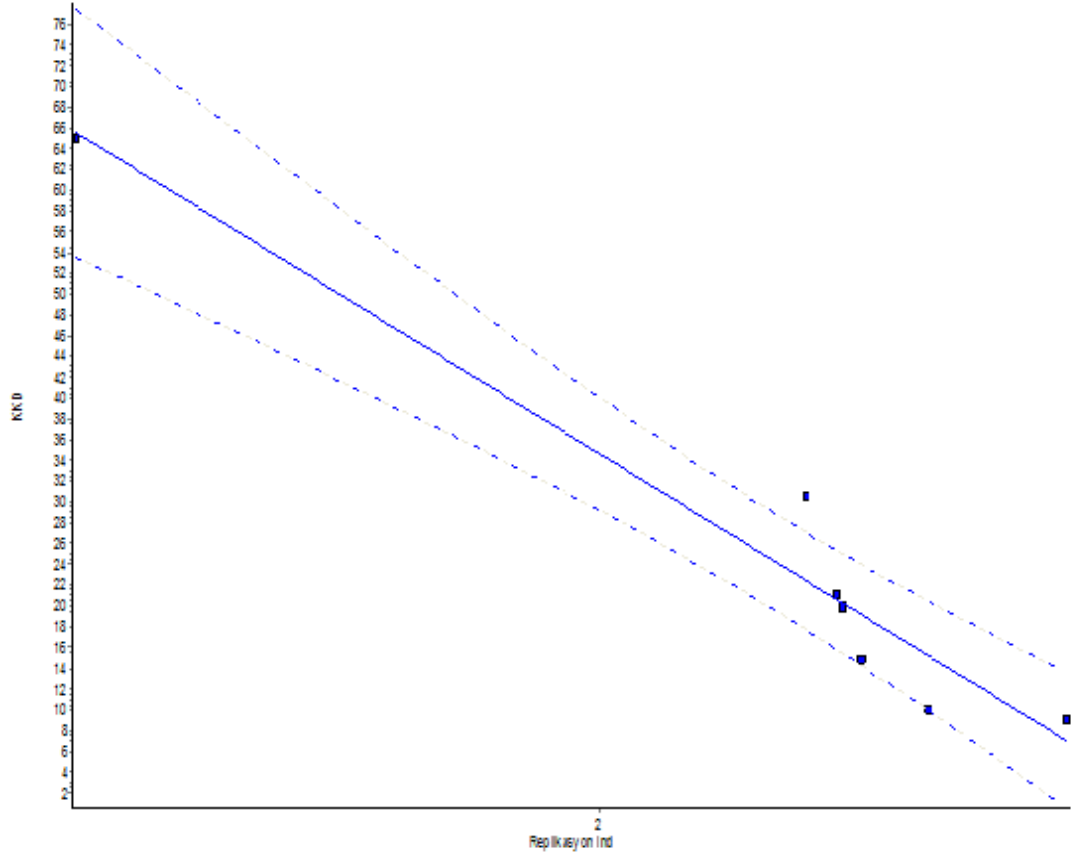
MMC: Mitomisin-C



Çizelge 4.1 Gemfibrozil'in farklı dozlarıyla etkileşime giren insan lenfosit kültüründeki KKD oranları (A: negatif kontrol, B: DMSO, C: 50 µl gemfibrozil, D:100 µl gemfibrozil, E: 125 µl gemfibrozil, F: 150 µl gemfibrozil, G: pozitif kontrol MMC)



Çizelge 4.2 Gemfibrozil'in farklı dozlarıyla etkileşime giren insan lenfosit kültüründeki replikasyon indeksi (RI)oranları (A: negatif kontrol, B: DMSO, C: 50 µl gemfibrozil, D:100 µl gemfibrozil, E: 125 µl gemfibrozil, F: 150 µl gemfibrozil, G: pozitif kontrol MMC)



Çizelge 4.3 Gemfibrozil'in farklı dozlarıyla replikasyon indeksi (RI) arasındaki regresyon ($r = -0,97$) çizelgesi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Lipid düzenleyici ajan olarak kullanılan gemfibrozil, serum trigliserid ve kolesterol düzeylerini düşürür, düşük dansiteli lipoprotein (LDL) seviyesini azaltırken yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) seviyesini yükseltir [32].

Ratlar üzerindeki gemfibrozil ile yapılan in vitro çalışmalarda ratlarda ki hepatik mikrozomal yağ asidi zincirlerinin uzama sürecindeki hız sınırlayıcı basamağı inhibe ederek, zincir uzamasını etkili bir şekilde durdurduğu gözlemlenmiştir [60].

Gemfibrozil'in hepatokarsinojenik mekanizmalarını araştırmak amacıyla, National Toxicology Programı tarafından rat, fare ve hamster türleri üzerinde yapılan 3 aylık çalışma sonuçlarına göre, peroksizomal enzim aktivitesindeki en fazla artış ratlarda, orta seviyede farelerde ve en düşük seviyede ise hamsterlarda görülmüştür. Bu durum gemfibrozil'in peroksizom proliferatörü ile aktive edilmiş alfa reseptör (PPAR alfa) aktivasyonu ile kemirgenlerde, hepatokarsinojenik ve hepatoksik etkileri ile ilişkilendirilmiştir [61].

PPAR alfa'ya bağlanarak aktive etmeleri sonucu 50'den fazla genin yazılımında değişikliğe neden olan fibratlar(gemfibrozil, benzafibrat, fenofibrat, vb.), aynı zamanda LDL'nin ana unsurlarından olan apolipoprotein A1 ve A2 ekspresyonu ile lipoprotein lipaz ekspresyonunu azaltırken, apo CIII, fibrinojen ve plazminojen -aktivatör-inhibitör-1(PAI-1) ekspresyonlarını azaltırlar. Fibratların etkisine bağlı olarak lipolizin artması sonucu karaciğerde TG yapımı azalır ve HDL-K yapımı artar. Bununla beraber küçük, yoğun LDL partiküllerinin sayısını azaltmaları fibratların en önemli etkilerinden biridir [62,63].

Fibratlar, hiperlipidemi tedavisinde kullanılan statin grubu ilaçlar ile eş zamanlı kullanılmaları durumunda Rabdomiyoliz geliştirme riskini arttırmaktadırlar [64].

Fibratlar ile yapılan çeşitli canlı grubu (bakteri, kabuklular, alg, vb.) üzerindeki çalışmalar sonucu, gemfibrozil ve bezafibratı da içeren fibrat grubu farmasötiklerin ve yan ürünlerinin, mutajenik ve genotoksik bakımdan dikkate alınması gereken çevresel risk oluşturma potansiyellerinin olduğu sonucuna varılmıştır [61].

Klastojen ve mutajen maddelerin kromozomlar üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde ve kalıtsal hastalıkların teşhisinde son derece duyarlı olan Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) diğer bir adıyla Sister Chromatid Exchange (SCE) yöntemi günümüzde lenfosit hücrelerinde başarıyla kullanılmaktadır [65].

DNA onarımı sırasında meydana gelen defektlerden kaynak alan; Bloom's sendromu, Fanconi's Anemi, Xeroderma Pigmentosum ve Ataxia Telangiectasia gibi genetik hastalıklar bir takım özel mutajen maddeler verilerek KKD artış ve azalışına bakılarak teşhis edilmektedir [66].

Yapılan bir çalışmada, tarım alanında yaygın bir şekilde insektisid olarak kullanılan acetamiprid (Acm) ve alpha-cypermethrin (A-cyp)'in tek başına ve karışım halinde kullanıldıklarında insanlar için genotoksik risk oluşturup oluşturmadıklarını, in vitro olarak insan periferik lenfosit kültüründe KKD (Kardeş Kromatid Değişimi), kromozom anomalisi (KA) ve mikronükleus (MN) testleri ile araştırmıştır. Hücreler, 5, 10, 15, 20 µg/ml A-cyp ile 25, 30, 35 ve 40 µg/ml Acm ile önce tek başlarına ve bu konsantrasyonların yarısı kadar konsantrasyonlarda ise bir araya getirilerek karışım (A-cyp + Acm) halinde 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. Bu çalışma sonucunda Acm'nin bütün süre ve dozlarda KKD'ni, KA'u, yüksek üç dozda MN oluşumunu istatistiksel olarak önemli derecede arttırdığı; mitotik indeksi (MI), nükleus bölünme indeksini (NBI), bütün süre ve dozlarda, proliferasyon indeksini (PI) ise 35, 40 µg/ml de 24 saatlik muamele için, 40 µg/ml de 48 saatlik muamele için önemli derecede düşürdüğü saptanmıştır. A-cyp'nin bütün süre ve dozlarında KKD'ni ve KA'u ve düşük iki dozda MN oluşumunu önemli derecede arttırdığı; tüm konsantrasyonlarda MI'i, NBI'ni ve yüksek üç konsantrasyonda PI'ni önemli derecede düşürdüğü saptanmıştır. Acm, A-cyp insektisitlerinin, konsantrasyonlarının yarısı kadar konsantrasyonlarda bile bir araya geldiklerinde en az tek başlarına kullanıldıklarındaki kadar yada daha fazla genotoksik etki gösterdikleri bulunmuştur [67].

Yapılan başka bir çalışmada ise Akrilamidin (AA) etkilerini araştırmak amacıyla kromozom aberasyonu (CA), mikronükleus (MN) ve Kardeş kromatid değişimi (KKD) testleri kullanılmıştır. Akrilamid'in sitotoksik etkilerini belirlemek için ise mitotik indeks (MI) ve replikasyon indeksi (RI) değerlerinden yararlanılmıştır. Ayrıca AA'nın genotoksitesine karşı pelargonidin (PG) ve gallik asit (GA)'in antigenotoksik etkileri

araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda ise AA'nın in vitro ve in vivo klastojenik etkileri saptanmış ve bu etkilerinin doza bağlı olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen bu bilgiler AA'nın sitotoksik ve genotoksik bir bileşik olduğunu göstermektedir. Bu çalışmadan elde edilen in vivo ve in vitro test sonuçlarına göre gallik asit'in, AA'nın neden olduğu genotoksisite farekansında önemli derecede düşüşe neden olduğu ve GA'in pelargonidin (PG)'den daha güçlü bir anti mutajenik etkisinin olduğu, PG'in herhangi bir genotoksik ve sitotoksik etkisinin bulunmadığı gözlemlenmiştir [68].

Bir fibrat türevi olan gemfibrozil, diğer bütün fibratlar gibi peroksizom proliferatörü olmalarından ötürü büyüklük ve sayıca artmış hepatik peroksizomlara sebep oldukları hatta peroksizom sayısını arttırarak ratlarda karaciğer kanserine sebep oldukları bilinmektedir. Yaptığımız in vitro çalışmamız sonucunda gemfibrozil'in genotoksik ve sitotoksik etkilerini gösterdik. Bu madde ile ilgili daha detaylı verilerin elde edilmesi için in vivo çalışmaların yapılmasını öneriyoruz.

Sonuç olarak yaptığımız bu çalışma ile Gemfibrozil'in insan periferal lenfosit kültüründe, dört farklı dozunun (50µg/ml, 100 µg/ml, 125 µg/ml, 150 µg/ml) 24 saat muamele edilmesi ile Gemfizrozil'in;

- a) Replikasyon indeksini düşürdüğü ve gemfibrozil'in farklı konsantrasyonları ile replikasyon indeksi arasında negatif korelasyon ($r=-0,97$) olduğu,
- b) Negatif kontrolde 2,77 olan mitotik indeksin, gemfibrozil'in en üst dozunda 2,34'e düştüğü, dolayısıyla hücre bölünmesini baskıladığı,
- c) Negatif kontrolle karşılaştırıldığında doza bağlı olarak KKD'yi arttırdığı saptanmıştır.

6. KAYNAKLAR

- [1] Stich, H.F., Dunn, B.P., "Relationship between cellular levels of beta-carotene and sensitivity to genotoxic agents." *Int J Cancer* 38:713-717, 1986.
- [2] Stumpf, M., Temes, T.A., Wilken, R.D., Roodrigues, S.U., Baumann, W., "Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil," *Sci Total Environ* 225: 135-41, 1999.
- [3] Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., "Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in Northern Italy." *Environ Sci Technol* 37: 1241-8, 2003.
- [4] Tixier, C., Singer, H.P., Oeller, S., Müller, S.R., "Occurrence and fate of carbamazepine, ibuprofen, ketoprofen and naproxen in surface waters." *Environ Sci Technol* 37 (6): 1061-8, 2003.
- [5] Isidori, M., Nardelli, A., Parrella, A., Pascarella, L., Previtiera, L., "A multispecies study to assess the toxic and genotoxic effect of pharmaceuticals: furosemide and its photoproduct." *Chemosphere* 63: 785-93, 2006.
- [6] Andreozzi, R., Marotta, R., Paxeus, N., "Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment." *Chemosphere* 50: 1319-30, 2003.
- [7] Fent, K., Weston, A.A., Caminada D. "Ecotoxicology of human pharmaceuticals." *Aquat. Toxicol.* 76: 122-159, 2006.
- [8] Metcalfe, C.D., Koeonig, B.G., Bennie, D.T., Servos, M., Ternes, T.A., Hirsch, R., "Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants." *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2872-2880, 2003.
- [9] Togola, A., Budzinski, H., "Analytical development for analysis of pharmaceuticals in water samples by SPE and GC-MS." *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 627-635, 2007.
- [10] Isidori, M., Nardelli, A., Pascarella, L., Rubino, M., Parrella, A., "Toxic and genotoxic impact of fibrates and their photoproducts on non-target organisms." *Environment International* 33, 635-641, 2007.
- [11] Holden, P. R., Tugwood, J. D., "Peroxisome proliferatoractivated receptor alpha: Role in rodent liver cancer and species differences," *Journal of Molecular Endocrinology*, vol.22,no.1, 1-8,1999.

- [12] Jonasson, J.A., “Analysis and interpretation of human chromosoma preparations.” Roonay, D.E., Czepulkowski, B.H., (Ed) Human Cytogenetics. Oir press Oxford-Washington DC.,1986.
- [13] Perry, P., Evans, HJ., “Cytological detection of mutagen- carcinogen exposure by sister chromatid exchange.” Nature Vol. 258: 121-124, 1975.
- [14] Wolff, S., Sister chromatid exchange. Annual Review of Genetics 11:183-201, 1977.
- [15] German, J., Genes which increase chromosomal instability in somatic cells and predisposa to cancer. Prog. Med. Genet 8:61- 101, 1972.
- [16] Knuutila, S., Maki-Paakkanen, J., Kahkonen, M., and Hookanen, G., An increased frequency of chromosomal changes and SCEs in cultured blood lymphocytes of 12 subjects vaccinated against smallpox. Hum. Genet 41:89-96, 1978.
- [17] Kurvink, K., Bloomfield, C.D., and Cervenka, J., “Sister chromatid exchange in patients with viral disease.” Exp. Cell. Res. 113:450, 1978.
- [18] Nichols, W.W., Bradt, C.I., Toji, L.H., Godley, M., and Sagawa, M., “Induction of sister chromatid exchanges by transformation with simian virus 40.” Cancer Res. 38:906-964, 1978.
- [19] Nilsson, K., and Ponten, J., “Clasification and biological nature of established human hematopoietic cell lines.” Int. J. Cancer 15:321-341, 1975.
- [20] Teksen, F., “Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ders Kitabı” Ankara Üniversitesi Sağlık Eğitim Fakültesi Yayınları No:4 2. Baskı,2006.
- [21] Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A., “Concepts of Genetics”, Palme Yayıncılık, Ankara, 2011.
- [22] Başaran, N., “Tıbbi Genetik”, Bilim Teknik Yayınevi, 1985.
- [23] Mc Ghee, J.D., Felsenfeld, G., Nucleosome structure. Annu. Rev. Biochem 49:1115,1980.
- [24] http://bio1151.nicerweb.com/Locked/media/ch12/12_04ChromosomeDuplicat.jpg
(Erişim tarihi: Kasım 2012)
- [25] http://tr.wikipedia.org/wiki/Kromozom#.C4.B0nsan_Kromozomlar.C4.B1
(Erişim tarihi: Kasım 2012)
- [26] Passarge, E., Color Atlas of Genetics, 3rd edition 2007 Thieme.

- [27] <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/normalkaryotype.jpg>
(Erişim tarihi: Kasım 2012)
- [28] Connor, J. M., Ferguson-Smith, M. A., Essential Medical Genetics. Blackwell Scientific Puplication, 1993.
- [29] Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B., “Moleküler Biyoloji, Protein Sentezi ve Yıkımı”, Nobel Yayın Dağıtım, 2007.
- [30] Rader, D. J. and Haffner ,S. M., “Roles of fibrates in the management of Hypertriglyceridemia.” Am. J. Cardiol. 83: 30F-35F, 1999.
- [31] Prueksaritanont, T., Richards, K. M., Qiu, Y., Strong-Basalyga, K., Miller, A., Li, C., Eisenhandler, R. And Carlini, E.J., “Comparative Effects of Fibrates on Drug Metabolizing Enzymes in Human Hepatocytes.” Pharmaceutical Research, Vol.22, No.1, 2005.
- [32] Frick, M.H., Elo, O., Haapa, K., Heinonen,O.P., Heinsalmi P., Helo P., Engl N., “Helsinki Heart Study: Primary-Prevention Trial with Gemfibrozil in Middle-Aged Men with Dyslipidemia” J. Med. 317: 1237-1245, 1987.
- [33] Lake, B. G., “Species differences in the hepatic effects of inducers of CYP2B and CYP4A subfamily forms: relationship to rodent liver tumour formation,” Xenobiotica, vol. 39, no. 8, pp. 582–596, 2009.
- [34] Mahley, R. W. and Bernot, T. P., “Drug therapy for hypercholesterolemia and dyslipidemia,” in Goodman and Gilman’s the Pharmacological Basis of Therapeutics, Hardman, J. G., Limbird,L. E. and Gilman, A. G., Eds., pp. 971–1002, McGraw Hill,New York, NY, USA, 10th edition, 2001.
- [35] Warren ,J. R., Lalwani, N. D., and Reddy, J. K., “Phthalate esters as peroxisome proliferator carcinogens,” Environmental Health Perspectives, vol. 45, pp. 35–40, 1982.
- [36] Reddy, J. K. And Lalwai, N. D., “Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to humans,” Critical Reviews in Toxicology, vol. 12, no. 1, pp. 1–58, 1983.
- [37] Cerutti, P. A., “Prooxidant states and tumor promotion,” Science, vol. 227, no. 4685, pp. 375-381,1985.

- [38] Lake, B. G., “Mechanisms of hepatocarcinogenicity of peroxisome-proliferating drugs and chemicals,” *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 35, pp. 483–507, 1995
- [39] Reddy, J. K., Sambasiva Rao, M., Azarnoff, D. L., and Sell, S., “Mitogenic and carcinogenic effects of a hypolipidemic peroxisome proliferator, [4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio]acetic acid (Wy-14,643), in rat and Mouse liver,” *Cancer Research*, vol. 39, no. 1, pp. 152–161, 1979.
- [40] National Toxicology Program (NTP), “Carcinogenesis Bioassay of Di(2-ethylhexyl)phthalate (CAS No. 117-81-7) in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Feed Study,” Technical Report Series no. 217. NIH Publication no. 82-1773, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Research Triangle Park, NC, USA, and Bethesda, MD, USA, 1982.
- [41] Cattley, R. C., Marsman, D. S., and Popp, J. A., “Age-related susceptibility to the carcinogenic effect of the peroxisome proliferator WY-14,643 in rat liver,” *Carcinogenesis*, vol. 12, no. 3, pp. 469–473, 1991.
- [42] Fitzgerald, J. E., Sanyer, J. L., and Schardein, J. L., “Carcinogen bioassay and mutagenicity studies with the hypolipidemic agent gemfibrozil,” *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 67, no. 5, pp. 1105–1116, 1981.
- [43] Reddy, J. K. and Qureshi, S. A., “Tumorigenicity of the hypolipidaemic peroxisome proliferator ethyl- α -P-chlorophenoxyisobutyrate (clofibrate) in rats,” *British Journal of Cancer*, vol. 40, no. 3, pp. 476–482, 1979.
- [44] Svoboda, D. J. and Azarnoff, D. L., “Tumors in male rats fed ethyl chlorophenoxyisobutyrate, a hypolipidemic drug,” *Cancer Research*, vol. 39, no. 9, pp. 3419–3428, 1979.
- [45] www.pfizer.com/files/products/uspi_lopid.pdf
(Erişim tarihi: Ekim 2012)
- [46] Lozada, A. and Dujovne, C. A., “Drug interactions with fibric acids. *Pharmacol. Ther.* 63: 163-176, 1994.
- [47] Miller, D. B. and Spence, J. D. “Clinical Pharmacokinetics of fibric acid derivatives (Fibrates).” *Clin. Pharmacokinet.* 34: 155-162, 1998.
- [48] Kramer, P.J., *Genetic Toxicology. J. Pharm Pharmacol* 50: 395-405, 1998.

- [49] McClintock, B., "The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes." *Genetics* 23:315,1938.
- [50] Barch, J.M., "The act cytogenetic laboratory manual. Gustashow KM. Chromosome stains." Second edition. Raven Press, Ltd. 1185 avenue of the America, New York, 1991.
- [51] Lavappa, K.S., and Yerganian, G., "Spermatogonial and meiotic chromosomes of the Armenian hamster *Cricetulus migratius*." *Exp. Cell. Res.* 61:159-172, 1970.
- [52] Rooney, D.E., Czepulkowski, B.H., Human Cytogenetic Constitutional Analysis Volume 1. Tawn, E.J., Holdsworth, D., "Mutagen induced chromosomes damage in human lymphocytes." Oxford University Press, New York, 1992.
- [53] Latt, S.A., Schreck, R., Loveday, K., Shuler, C., "In vitro and in vivo analysis of sister chromatid exchange." *Pharmacol Rev*; 30(4): 501-535, 1978.
- [54] Latt, S.A., Stetten, G., Juergens, L.A., Buchanan, G.R. and Gerald, P.S., "Induction by alkylating agents of sister chromatid exchanges and chromatid breaks in Fanconi's anemia." *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 72:4066, 1975.
- [55] Uzun, S., "Sodyum Hipoklorite maruz kalmış kişilerin lenfositlerindeki mikronükleus sıklığının araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim dalı, Kayseri, 2007.
- [56] Rencüzoğulları, E. And Topaktaş, M., "The relationship between Quantities of Bromodeoxyuridine and Human Peripheral Blood with Determination of the Best Differential Staining of Sister Chromatids Using Chromosome Medium-B". *Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 5(3), 19-24, 1991.
- [57] Speit, G., Haupter, S., On the mechanism of differential giemsa staining of bromodeoxyuridine substituted chromosomes. II. Differences Between the demonstration of sister chromatid differentiation and replication patterns. *J. Hum. Genet.* 70, 126-129, 1985.
- [58] Kertsen, S., Desvergne, B., and Wahli, W., "Roles of PPARS in health and disease" *Nature* May 25; 405(6785):421-4, 2000.
- [59] Titenko-Holland, N., Ahlborn, T., Lowe, X., Shang, N., Smith, M.T., Wyrobek, A.J., "Micronuclei and developmental abnormalities in 4-day Mouse embryos after

- paternal treatment with acrylamide”. J. Environ. Mol. Mutagen. 31:206-217, 1998.
- [60] Sanchez, R.M., Vinals, M., Alegret, M., Vazquez, M., Adzet, T., Merlos, M., Laguna, J.C., “Inhibition of rat liver microsomal fatty acid chain elongation by gemfibrozil in vitro” Federation of European Biochemical Societies Volume 300, number 1.89-92, 1992.
- [61] Cunningham, M.L., Collins, B.J., Hejtmancik, M.R., Herbert, R.A., Travlos, G.S., Vallant, M.K., Stout, M.D., “Effects of the PPAR α Agonist and Widely Used Antihyperlipidemic Drug Gemfibrozil on Hepatic Toxicity and Lipid Metabolism” Hindawi Publishing Corporation PPAR Research Volume , Article ID 681963, 14 pages, 2010.
- [62] Staels, B., Dallongeville, J., Auwerx, J., Schoonjans, K., Leitersdorf, E., Fruchart, J.C., "Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism." Circulation 1998;98:2088-93.
- [63] Fruchart, J.C., Staels, B., Duriez, P., " The role of fibric acids in atherosclerosis." Curr Atheroscler Rep 2001;3:83-92.
- [64] Graham, D.J., Staffa, J.A., Shatin, D., et al. "Incidence of hospitalized rhabdomyolysis in patients treated with lipid-lowering drugs." JAMA 2004; 292:2585-2590.
- [65] Huang, C.C., " Induction of a high incidence of damage to the X chromosomes of Rattus (Mastomys) natalensis by base analogues viruses and carcinogens." Chromosoma 23:162, 1967.
- [66] Lambert, B., Hansson, K., Lindsen, J., Sten, M. , and Werellus, B., "BrdU-induced sister chromatid exchanges in human lymphocytes." Hereditas 83:163-174, 1976.
- [67] Yavuz Kocaman, A., “Acetamiprid ve alpha-cypermethrin pestisidlerinin tek başına ve karışım halinde kullanıldıkları zaman insan periferal lenfositlerindeki in vitro genotoksik etkileri”, Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Adana, (2007).
- [68] Aksu, P., "Akrilamidin in vivo ve in vitro genotoksitesisi üzerine fenolik bileşiklerden pelargonidin ve gallik asidin etkileri." Doktora tezi, Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Kars, (2012).

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Evren ULUDAŞ

Doğum Yeri : Susuz/KARS

Doğum Tarihi : 12.08.1981

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Kars Cumhuriyet Lisesi / 1999

Lisans : Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü / 2007

Yüksek Lisans : Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı
(Moleküler Biyoloji) / 2013

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Özel Şamilhan Polikliniği / 2007

Özel Öz Yaşam Tıp Merkezi / 2010

Yayınları (SCI ve diğer)

Diğer konular