

**T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GEMFİBROZİL'İN GENOTOKSİK VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN
İNSAN PERİFERAL LENFOSİT KÜLTÜRÜNDE İNCELENMESİ**

**Emine GÜZEL
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Süleyman GÜL**

**OCAK - 2012
KARS**

Bu tez çalışması 2011 FEF 18 numaralı proje ile Kafkas Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

**T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GEMFİBROZİL'İN GENOTOKSİK VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN
İNSAN PERİFERAL LENFOSİT KÜLTÜRÜNDE İNCELENMESİ**

**Emine GÜZEL
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Süleyman GÜL**

**OCAK-2012
KARS**

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Emine Güzel'in Doç. Dr. Süleyman Gül danışmanlığında yüksek lisans tezi olarak hazırladığı "**Gemfibrozil'in Genotoksik ve Sitotoksik Etkilerinin İnsan Periferik Lenfosit Kültüründe İncelenmesi**" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy ...*5/2/12*... ile kabul edilmiştir.

17/01/2012

Adı ve Soyadı

İmza

Başkan : Doç. Dr. Süleyman GÜL

Üye : Prof. Dr. Abdullah DOĞAN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Muhammet ŞAKİROĞLU

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

Doç.Dr. Muzaffer ALKAN

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, gerekli laboratuvar olanaklarını sunan, yol gösteren, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam, Doç.Dr. Süleyman GÜL'e, laboratuvar çalışmalarımnda ve tezimin yorumlanmasında desteği ve yardımları ile her zaman yanımda olan Arş. Gör. Pınar AKSU'ya, laboratuvar çalışmalarımnda yardımcı olan yüksek lisans öğrencileri Evren ULUDAŞ ve Duygu DEMİRCİ'ye teşekkürlerimi bir borç bilirim. Ayrıca bana her zaman destek olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kars, 2012

Emine Güzel

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
RESİMLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kromozomlar Hakkında Genel Bilgi	4
2.2. Mutasyon	7
2.2.1. Genom Mutasyonları	7
2.2.2. Kromozom Mutasyonları	8
2.2.3. Gen Mutasyonları	8
2.3. Fibratlar Hakkında Genel Bilgi	9
2.4. Gemfibrozil	10
2.4.1. Farmakolojik Özellikleri	10
2.5. Genotoksisite	12
2.5.1. Kromozom Aberasyonları	13

3. MATERYAL VE METOT	17
3.1. Mitomisin-C (MMC)	17
3.1.1. Mitomisin-C (MMC)' nin Özellikleri	17
3.1.2. Mitomisin-C (MMC)'nin Kullanım Alanları	17
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddelerin Eriyiklerinin Hazırlanması	18
3.2.1 Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler.....	18
3.2.2. Gemfibrozil'in Hazırlanması	19
3.2.3. Mitomisin- C (MMC) Eriyiğinin Hazırlanması	19
3.2.4. Sorensen Tamponunun (Sorensen Buffer) Hazırlanması.....	19
3.2.5 Boyanın Hazırlanışı	19
3.2.6. Kromozom Medyumu	19
3.2.7. Kolsişin	20
3.2.8. Hipotonik Eriyik	20
3.2.9. Fiksatif	20
3.2.10. Giemsa	20
3.3. Kullanılan Deney Ekipmanları.....	21
3.3.1. Hassas Terazî	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. Kromozom Anomalilerini (KA) (Chromosomal Aberration=CA) Saptamak İçin Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması	23
3.4.1 Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması	23
3.5. Mikroskobik inceleme.....	24
3.5.1. Kromozom Anomalilerinin Saptanması.....	24
3.6. İstatistiksel Analizler.....	24

4. BULGULAR.....	26
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	36
6. KAYNAKLAR	38
7. ÖZGEÇMİŞ.....	44

ÖZET

Bu çalışmanın amacı kanda kolesterol ve trigliserid seviyelerini düşüren gemfibrozilin genotoksik ve sitotoksik etkilerinin insan periferal lenfosit kültüründe in vitro olarak araştırılmasıdır. İnsan kan lenfosit hücreleri, gemfibrozilin 50, 100, 125 ve 150 µg/ml 'lik dozları ile 24 saat etkileşime bırakılmıştır. Gemfibrozil uygulanmış tüm deneme grupları negatif kontrol ve pozitif kontrol mitomisin-C(MMC, 0.3 µg/ml) ile kıyaslandığında, uygulanmış gemfibrozil dozları kromozom aberasyon sıklığında artışa yol açmıştır. Kromozom ve kromatid kırıkları, kromatid birleşmeleri, fragment ve kromatid değişiklikleri tüm doz uygulamalarında gözlenmiştir. Negatif kontrol ve çözücü kontrol ile kıyaslandığında gemfibrozil tüm konsantrasyonlarda hücre bölünme indeksini düşürmüştür. Çalışma sonuçları gemfibrozilin insan lenfosit kromozomlarında in vitro klastojenik potansiyeli olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler : Gemfibrozil, mitomisin-C(MMC), lenfosit kültürleri, insan kromozomları, kromozomal aberasyonlar.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the genotoxic and cytotoxic effects of Gemfibrozil which helps reduce cholesterol and triglycerides in the blood. 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 chromosomal aberration frequency 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. Chromatid and chromosome breaks, sister chromatid union, fragment and chromatid exchange were observed in all treatment concentrations. Gemfibrozil decreased the mitotic index (MI) in all the concentrations when compared with control and solvent control. Our results suggest that Gemfibrozil has clastogenic potential for human lymphocytes chromosomes in-vitro.

Key words: Gemfibrozil, mitomycin C (MMC), lymphocyte cultures, human chromosomes, chromosome aberrations.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µg	Mikrogram
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
MMC	Mitomisin-C
MI	Mitotik İndeks
VLDL	Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein
KA	Kromozom Anomalileri
ORI	Replikasyon Başlangıç Noktası
HDL	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
CYP2C8	Sitokrom P ₄₅₀ 2C8
CYP2C9	Sitokrom P ₄₅₀ 2C9
MN	Mikronükleus
DMSO	Dimetil sülfoksit
Rpm	Devir Sayısı
KKB	Kardeş kromatid birleşmeleri
DSK	Disentrik kromozom
KK	Kromozom kırığı
Kk	Kromatid kırığı
F	Fragment

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa no
Şekil 2.3.1. Fibratlar ve foto ürünlerinin yapıları	9
Şekil 2.5.1.1. G1 fazında yapılan ışınlamalar sonucu meydana gelebilecek kromozom tipi aberasyonlar ile bunların çeşitli yapışma olasılıkları ve S fazını izleyen mitozda saptanan görüntüleri	13
Şekil 2.5.1.2. Kromozom eşleşmesi tamamlandıktan sonra G2 fazında yapılan ışınlamalar sonucunda meydana gelebilecek kromatid tipi aberasyonlar ile bunların çeşitli yapışma olasılıkları ve sonraki mitozda saptanan görüntüleri	14
Şekil 3.4.1.1. Kromozom Analizinin Aşamaları	25
Şekil 4.1. Gemfibrozil'in farklı konsantrasyonları ile mitotik indeks arasındaki regresyon ($r = -0.97$) çizelgesi	33
Şekil 4.2. Gemfibrozil'in farklı konsantrasyonları ile kromozom aberasyonu arasındaki regresyon ($r = 0.98$) çizelgesi.	35

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa no
Resim 2.1.1. Çeşitli kromozom görüntüleri	6
Resim 4.1. Sağlıklı bir bireye ait insan lenfosit kromozom görüntüsü	26
Resim 4.2. Mitomisin-C'nin insan kromozomlarına etkisi	27
Resim 4.3. Gemfibrozil uygulanan grupta KKB görüntüsü	27
Resim 4.4. Gemfibrozil uygulanan grupta DSK görüntüsü	28
Resim 4.5. Gemfibrozil uygulanan grupta Fragment görüntüsü	28
Resim 4.6. Gemfibrozil uygulanan grupta KK görüntüsü	29
Resim 4.7. Gemfibrozil uygulanan grupta Kk görüntüsü	29

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa no
Çizelge 4.1. Negatif Kontrol Grubu Mitotik Aktivite Oranları	30
Çizelge 4.2. 50 µg/ml Gemfibrozil Uygulanan Grupta Mitotik Aktivite Oranları	30
Çizelge 4.3. 100 µg/ml Gemfibrozil Uygulanan Grupta Mitotik Aktivite Oranları	31
Çizelge 4.4. 125 µg/ml Gemfibrozil Uygulanan Grupta Mitotik Aktivite Oranları	31
Çizelge 4.5. 150 µg/ml Gemfibrozil Uygulanan Grupta Mitotik Aktivite Oranları	32
Çizelge 4.6. Gemfibrozil'in değişik dozları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültürü kromozomlarında kromozom aberasyonu sıklığı	34

1. GİRİŞ

Modern tıp ve veteriner hekimliğin vazgeçilmez bir parçası olan ilaçların tümü farmakokinetik çalışmalara katılmasına rağmen, metabolize edilip dışarı atıldıktan sonra çevre ve canlılar üzerinde uzun vadede oluşturdukları etkiler hakkında yeterli çalışma bulunmamaktadır[1]. Bir ilacın neden olduğu çeşitli yan etkiler arasında genotoksik-kanserojen etkiler göz ardı edilmemelidir. 1977 yılında, 25000 hasta ile yapılan bir anket çalışmasında, bu çalışmada tesbit edilen kanserlerin %1'inden daha az bir kısmının herhangi bir ilacın düzenli kullanılmasından kaynaklandığı muhtemel olarak gösterilmiştir[2]. 56 primer kanser bölgesi ve bu bölgelerin kombinasyonuna ilişkin yaygın kullanılan 95 ilaç ve ilaç gruplarının kanserojenite tesbiti için yapılan ilk kanserojenite taraması Friedman ve Ury tarafından yapılmıştır, bu çalışma neticesinde 41 ilaç veya ilaç grubu 18 olguda 7.4'den 25.7'ye değişen morbidite oranları ile en az bir bölgede istatistiksel olarak anlamlı pozitif ilişkiler göstermiştir[3]. Aynı ilaç ve ilaç grupları için tarama analizleri tekrar edildiğinde[4] bazı ilaç kanser ilişkilerinde artış veya azalış görülmüştür, böyle bir ilişki 20 ilaç veya ilaç grubunda tesbit edilmiştir, ayrıca daha az kullanılan 120 ilaç için yapılan taramada 43 pozitif ilaç kanser ilişkisi gösterilmiştir.

İlaç artıkları, atık su arıtma tesislerinden geçerken tamamen ortadan kaldırılamaz ve böylece su ortamına karıştığında atık, yüzey, yer altı ve içme suyunda bulunabilir[5]. Hormon, steroid, antibiyotik, fibrat vb. farmakolojik olarak aktif maddelerin çevrede bulunmaları, bozulmaları ve sucul organizmalar ile olası etkileşimleri hakkındaki bilgiler kısıtlıdır[6,7]. Terapötik ilaçların sucul organizmalar üzerindeki potansiyel risklerini değerlendirmek için idrar atılımı ile oluşan metabolitler, kirli su arıtma tesislerindeki mikrobiyal transformasyonlar, hidroliz ve fotoliz gibi abiyotik bozulmalar sonucu oluşan ana ürünlerden daha zararlı yan ürün oluşumu dikkate değerdir[8-11].

Fibratlar kan trigliserid düzeylerini düşüren bir ilaç grubudur. Bu etkilerini karaciğerde VLDL (çok düşük dansiteli lipoprotein,kanda trigliserid taşıyıcı partikül) düzeyini düşürme ve kandan trigliserid uzaklaştırılmasını hızlandırarak yaparlar. Amerika ve Avrupada öngörülmüş olan fibrat örnekleri gemfibrozil, fenofibrat, bezafibrat ve klofibrat asidi içermektedir. Fibratlar yüzey sularında ve atık sularda en çok tesbit edilebilen farmasötik gruplar içerisinde yer almaktadır[8, 12-14] ki bu durum

fibratların kalıcı kirleticiler olarak uzun süreli etki gösterme potansiyeli ile sonuçlanabilir, çünkü bu gruptaki ilaçların dönüşümleri ve ortamdan kaldırılma oranları sürekli çevre girişi ile dengelenmiştir[12]. Canlıların yaşam alanlarında ısrarlı bir şekilde bulunan bu grup farmasötikler için DNA kaçınılmaz bir hedef iken, olası zararların ve etkilerin tesbit edilebilmesi önemli ve gereklidir.

Bir fibratik asit türevi olan Gemfibrozil, 1980'li yılların başından itibaren koroner kalp hastalığı riski yüksek hastalarda klinik amaçlı kullanılan farmasötik bir üründür. Diyet, egzersiz ve kilo kontrolünü içeren komple tedavi programının bir parçası olarak yaygın kullanım alanına sahiptir. Gemfibrozil 'in fototransformasyonu sonucu oluşan ürünler (photoproduct) genotoksik ve mutajenik etkiler göstermiştir ki bu durum gemfibrozil yan ürünlerinin çevresel risk oluşturma potansiyeli olan ilaç grubunda olma düşüncesini desteklemiştir[15].

Fiziksel ve kimyasal maddelerin DNA üzerindeki etkilerinin gözlenmesi amacıyla in vivo ve in vitro testler kullanılmaktadır[16].

Bu çalışma ile gemfibrozilin farklı konsantrasyonları insan periferik lenfosit kültürüne uygulanarak olası genotoksik ve sitotoksik etkilerin kromozom aberasyonları (KA) ile araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Canlı organizmaların üreme, gelişme, adaptasyon, protein sentezi ve diğer hücresel yapılarının yapımı gibi fonksiyonlarının sürdürülmesi için gerekli genetik bilginin depolanması, kullanılması ve bir sonraki kuşağa aktarılması hassas bir mekanizma ile gerçekleştirilmektedir. Kuşaklar arasında genetik bilgi akışı genler ile sağlanır ve bazı RNA virüsleri hariç genler daima DNA molekülleridir. Bir organizmanın DNA'sında bulunan genetik bilgi o organizmanın genomudur. Bir haploid memeli genomu 3×10^9 nükleotid çiftinden oluşur ve bu genom 24 farklı kromozom halinde hücre çekirdeğinde yer alır. 24 çift kromozomun 22 tanesi otozom kromozomları, 2 tanesi (X ve Y) eşey kromozomlarıdır.

Genetik materyalin varlığı ilk kez 1869 yılında Friedrich Miescher tarafından irindeki akyuvarlarda saptanmıştır. Avery ve arkadaşları 1944 yılında DNA'nın kalıttan sorumlu genetik materyal olduğunu bildirmişlerdir. DNA molekülünün genetik yapısının açıklanması ise 1953 yılında James Watson ve Francis Crick tarafından gerçekleştirilmiştir.

DNA molekülü beş karbonlu bir şeker(deoksiriboz), fosfat grubu ve azotça zengin pürin (A: adenin, G: guanin) ve pirimidin (T: timin, C: sitozin) bazlarından oluşan polimerik bir makromoleküldür. DNA molekülleri 5' ucundan 3' ucuna doğru şeker fosfat omurgasından oluşan iki zincirin antiparalel sarılması ile meydana gelmiş çift sarmal yapıdır. Bu yapıya double helix yapısı denir. DNA zinciri normal fizyolojik şartlardaki hücrelerde genelde sağa doğru dönümlü B-DNA formunda , nadiren sola doğru dönümlü Z-DNA formunda bulunur.

DNA'nın hücre çekirdeği içerisinde paketlenirken ilk basamağı nükleozom oluşumudur. DNA'nın lizin ve arjinince zengin bazik histon proteinleri ile bağlanması sonucu kromatin yapısı oluşur. Nükleozomlar, kromatinin tekrar eden alt birimleridir ve yaklaşık 146 baz çifti uzunluğundaki DNA zincirinin histon etrafına sarılması ile oluşmaktadırlar[17,18].

2.1. Kromozomlar Hakkında Genel Bilgi :

Kromozomlar genlerin organize olduğu birimlerdir. Ökaryotik hücrelerde her bir kromozom DNA çift sarmalı ve ilişkili proteinlerin oluşturduğu ipliksi parçalardır. Kromozom terimi 1888 yılında W. Waldeyer tarafından tanıtılmış olup ‘colored thread’ olarak bilinen Yunanca bir kelimedenden gelmektedir. Prokaryotlarda tek bir kromozom genelde halkasal yapıya sahip iken ökaryotlarda kromozomlar nükleusta belli bölgelerde yerleşmiş olarak bulunur. İlk kez 1879 yılında Flemming tarafından kaydedildiği üzere kromozomlar mitoz sırasında ayrılmış olarak ışık mikroskobunda gözlenebilir. Her bir organizma farklı morfolojik görüntüleri ile belli sayıda kromozoma sahiptir. Tjio, Levan, Ford ve Hamerton tarafından 1956 yılında insanların 46 kromozoma sahip olduğu belirtilmiştir.

Kromozomlar birbirinden uzunluk, sentromerin pozisyonu, büyüklük ve ‘banding pattern’ denilen açık ve koyu bantların düzenlenme biçimine göre ayrılırlar. Bölünen insan hücre kromozomları en kolay metafaz veya prometafazda analiz edilir.

Kromozomlar sentromerin pozisyonuna göre submetasentrik, metasentrik veya akrosentrik olarak sınıflandırılır. Sentromer, submetasentrik bir kromozomu kısa kol(p kolu, Fransızca petit kelimesinden gelmektedir.) ve uzun kol (q kolu, p harfinden sonra geldiği için) olarak ayırır. Metasentrik kromozomlarda kısa ve uzun kollar hemen hemen aynı boydadır. Akrosentrik kromozomlarda ise kısa kol çok küçük olup, uç kısmında satellit olarak isimlendirilen (satellit DNA ile karıştırılmamalı) yoğun bir yapı bulunur.

Karyotip, bir hücrenin, bir türün veya bir bireyin kromozomal toplamıdır. Her tür için karakteristiktir. Karyotip, morfolojilerine göre metafazdaki kromozomların ışık mikroskobundaki görüntülerini ifade eder. Karyogram homolog çiftler halinde tüm kromozomları gösterir, biri anneden diğeri babadan gelen bu kromozomlar sentromer pozisyonu ve göreceli uzunluklarına göre düzenlenmişlerdir. İnsanlarda 23 çift kromozom vardır, 1’den 22’ye kadar olan çiftler otozomdur, diğeri 1 çift eşey kromozomudur. Dişilerde iki X kromozomu, erkeklerde bir X ve bir Y kromozomu eşey kromozomlarıdır. Karyotip dişilerde 46,XX ve erkeklerde 46,XY şeklinde gösterilir. Virgül önündeki kısım toplam kromozom sayısını gösterirken, virgülden sonra eşey kromozomları yer alır[19].

Kromozomlar özel bazı bölgelerden oluşmaktadır ;

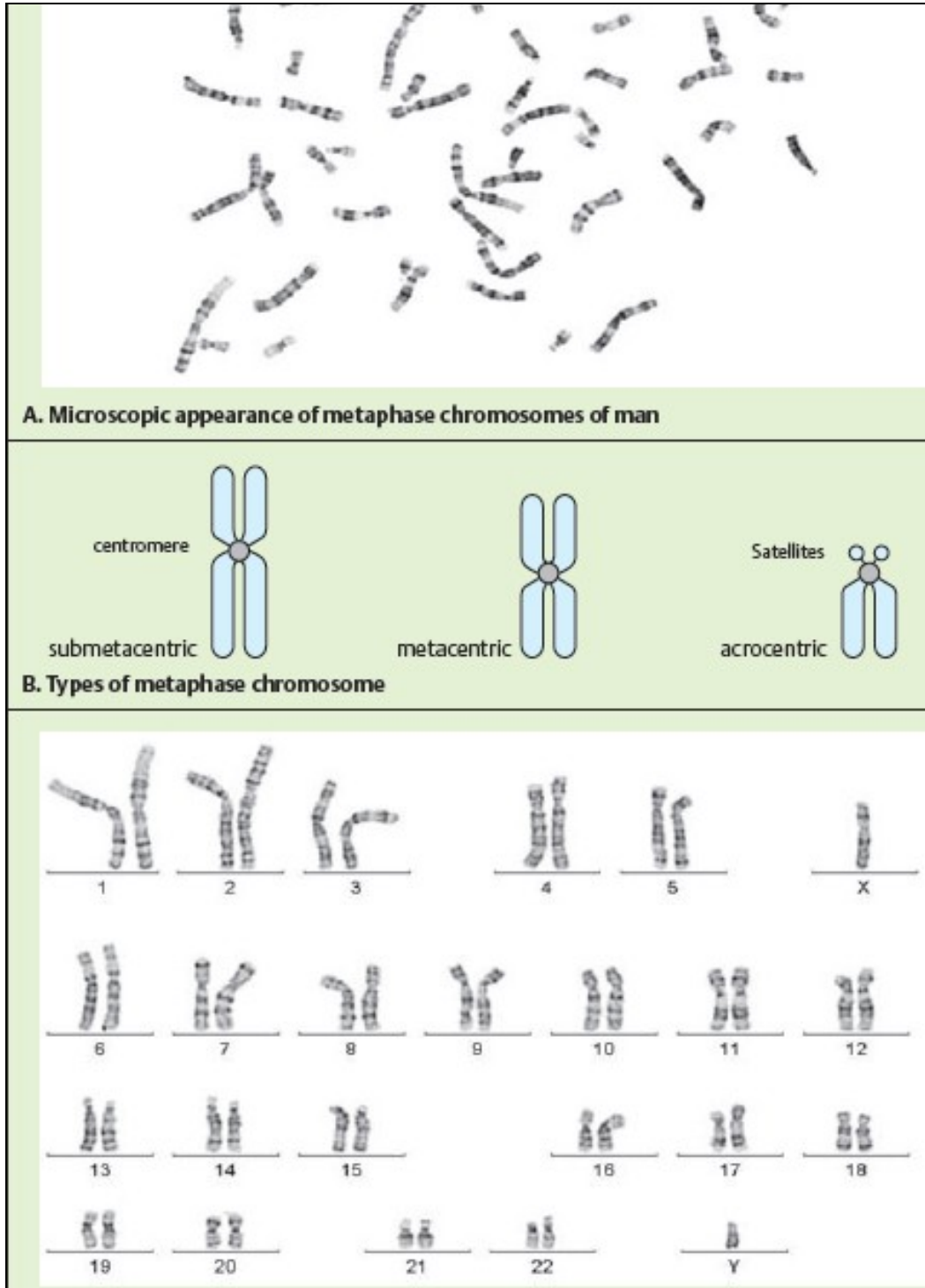
Kromatid: Kromatinlerin protein iskelete sarılması ile ortaya çıkan yapılardır ve kromozomun kolları gibi görünürler. Sentromerin her iki tarafındaki kromatidler kromozom kolu olarak adlandırılır; kısa kolu (p kolu) ve uzun kolu (q kolu). Kardeş kromatidler birbiriyle tamamen aynı genetik bilgiyi taşırlar (Mayoz I'de krossingover'a kadar).

Sentromer: Sentromerler, spesifik proteinlerin bağlandığı DNA dizileridir. Sentromer, kromozomu p ve q olarak iki kola ayıran ve sitogenetik bir belirleyici olarak görünen primer boğum şeklinde tanımlanmıştır.

Telomerler: Kromozomların uç kısımlarında bulunan özel DNA dizileridir. Kromozomun kendi üzerine katlanmasını ve diğer kromozomlara yapışmasını engelleyerek kromozom bütünlüğünde büyük rol oynar. Yaşlanma ile birlikte telomerik DNA dizileri kısalmaya başlar. Kanser hücrelerinin telomerik dizilerinde kısalma gözlenmez .

Replikasyon Başlangıç Noktası (Origins of Replication, ORI): Işık mikroskobu ile görülememesine rağmen, bütün kromozomlarda en az bir tane DNA sentezinin başladığı bölge bulunur. Ökaryotik kromozomlarda ise birden fazla ORI bölgesi bulunur[20].

İki insanın DNA dizisi yaklaşık % 99.5 oranında aynıdır. DNA dizileri arasındaki küçük farklılıklar insanlar arasındaki genetik çeşitliliği sağlamaktadır. DNA 'da nükleotid dizisinde meydana gelen değişiklikler bazen fenotipi etkilemez iken bazen etkilemektedir. DNA yapısındaki bu değişiklikler fertlerin anatomik, fizyolojik, ilaçlara olumlu veya olumsuz yanıtları, kanser , enfeksiyon gibi hastalıklara olan yatkınlığından ve genetik olarak belirlenen fenotipik çeşitlilikten sorumludur. DNA 'daki nükleotid değişiklikleri veya yeniden düzenlemeler fenotipi etkiliyorsa mutasyon, fenotipi etkilemeyip sadece genetik çeşitlilik sağlıyorsa polimorfizmdir[18].



Resim 2.1.1. Çeşitli kromozom görüntüleri[19]

2.2. Mutasyon :

Her canlı türünün kendine özgü genetik bilgisinde gen rekombinasyonundan başka sebeplerle ve ani olarak meydana gelen kalıtsal değişmelere mutasyon denir. Mutasyonlar doğada kendiliğinden meydana geldiği gibi mutagen adı verilen fiziksel ve kimyasal etkenler tarafından da meydana getirilebilirler. Mutagenler DNA molekülünde çeşitli hasarlar oluştururlar. Bu hasarlar hücrede DNA onarım mekanizmaları tarafından onarılmaya çalışılır. Bazen hasar mecburen yanlış olarak onarılır ya da onarım mekanizmalarının çalışmasını kontrol eden genlerin mutasyona uğraması ile veya çevre şartlarının etkisi ile onarılmadan kalabilir. Mutasyon genetik materyalde değişimlere neden olduğu için ilk bakışta olumsuz bir durum olarak değerlendirilse de, aslında canlılar arasında çeşitlilik oluşturan, organizmaların gelişmesine ve evrimine olanak sağlayan önemli bir olgudur. Buna karşılık, bazı mutasyonların temel fonksiyonları sağlayan bir veya birkaç gende bulunması ve uzaklaştırılamaması hücrelerin ölümüne sebep olabilir[21].

Mutasyonlar meydana geliş mekanizmasına göre 3 gruba ayrılmaktadır. Hücrede kromozom sayılarında meydana gelen değişiklikler genom mutasyonları, kromozom yapısında meydana gelen değişiklikler kromozom mutasyonları, DNA' nın yapısındaki nükleotidlerde meydana gelen değişiklikler ise gen mutasyonları olarak adlandırılır[17,18].

2.2.1. Genom Mutasyonları :

Mayoz veya mitoz bölünme sırasında homolog kromozomların hatalı ayrılması sonucu oluşan kromozom sayılarının değişmesidir. Kromozom sayısında meydana gelen değişiklikler 'nondisjunction' (ayrılmama) veya 'anafaz lagging'(anafazda geri kalma veya kaybolma) mekanizmaları ile oluşmaktadır. Tüm bir kromozomun trizomisi ile görülen iyi tanımlanmış üç genom mutasyon hastalığı vardır; Trizomi 21(Down sendromu), Trizomi 18 ve Trizomi 13. Bu trizomilere zeka geriliği, büyüme geriliği ve konjenital anomaliler eşlik eder. Bu bozukluklar fazladan bulunan kromozom üzerindeki belirli genlerin artmış etkisi ile ortaya çıkmaktadır. Sıklığı 10^{-2} / hücre bölünmesidir.

2.2.2. Kromozom Mutasyonları :

Kromozom yapısında duplikasyon, delesyon, insersiyon, inversiyon veya translokasyon şeklinde oluşan yapısal değişikliklerdir. Kromozomlardaki parça değişimi kendiliğinden oluşabileceği gibi iyonize radyasyon, bazı viral enfeksiyonlar ve bazı kimyasallar ile indüksiyon sonucu da oluşabilir. Sıklığı 6×10^4 / hücre bölünmesidir.

Delesyonlar ; kromozomun bir kısmının kaybedilmesi sonucu oluşur ve kromozom dengesizliğine neden olur. Ortaya çıkan klinik bulgular delesyona uğrayan bölgenin büyüklüğüne, içerdiği genlerin sayısına ve işlevine bağlıdır. Sitogenetik olarak görülebilen otozomal delesyonlar yaklaşık 7000 canlı doğumda bir görülür.

Duplikasyonlar ; eşit olmayan 'crossing-over' ile veya bir translokasyon veya inversiyon taşıyıcısında mayoz bölünme sırasında anormal segregasyon ile oluşmaktadır. Bloom sendromu ve Rett sendromu örnek olarak gösterilebilir.

İnversiyonlar ; bir kromozom üzerinde iki kırık arasındaki kromozom parçasının ters dönerek aynı yere bağlanmasıdır. İki tip inversiyon bulunmaktadır. Her iki kırık aynı kromozom kolu üzerinde ise parasentrik inversiyon, her iki kromozom kolu üzerinde bir kırık varsa perisentrik inversiyon adını alır. İnversiyonlar taşıyıcıda anormal bir fenotip ortaya çıkarmaz. İnversiyonlar dengeli bir yeniden düzenlemedir. Ancak gelecek kuşaklar için anormal gamet oluşturma riski taşırlar.

Translokasyonlar ; genellikle kardeş olmayan kromozomlar arasındaki parça değişimidir. Resiprokal translokasyon, kardeş olmayan kromozomlar arasında parça değişimi olup yalnız iki kromozomla sınırlıdır, toplam kromozom sayısında ve genomda bir değişiklik olmaz. Robertsonian translokasyon, kısa kollarını kaybetmiş iki akrosentrik kromozomun sentromerlerinden birbirlerine bağlanması ile oluşmaktadır.

İnsersiyonlar ; bir kromozoma ait bir parçanın koparak diğer bir kromozoma katılması durumudur, nadiren görülür.

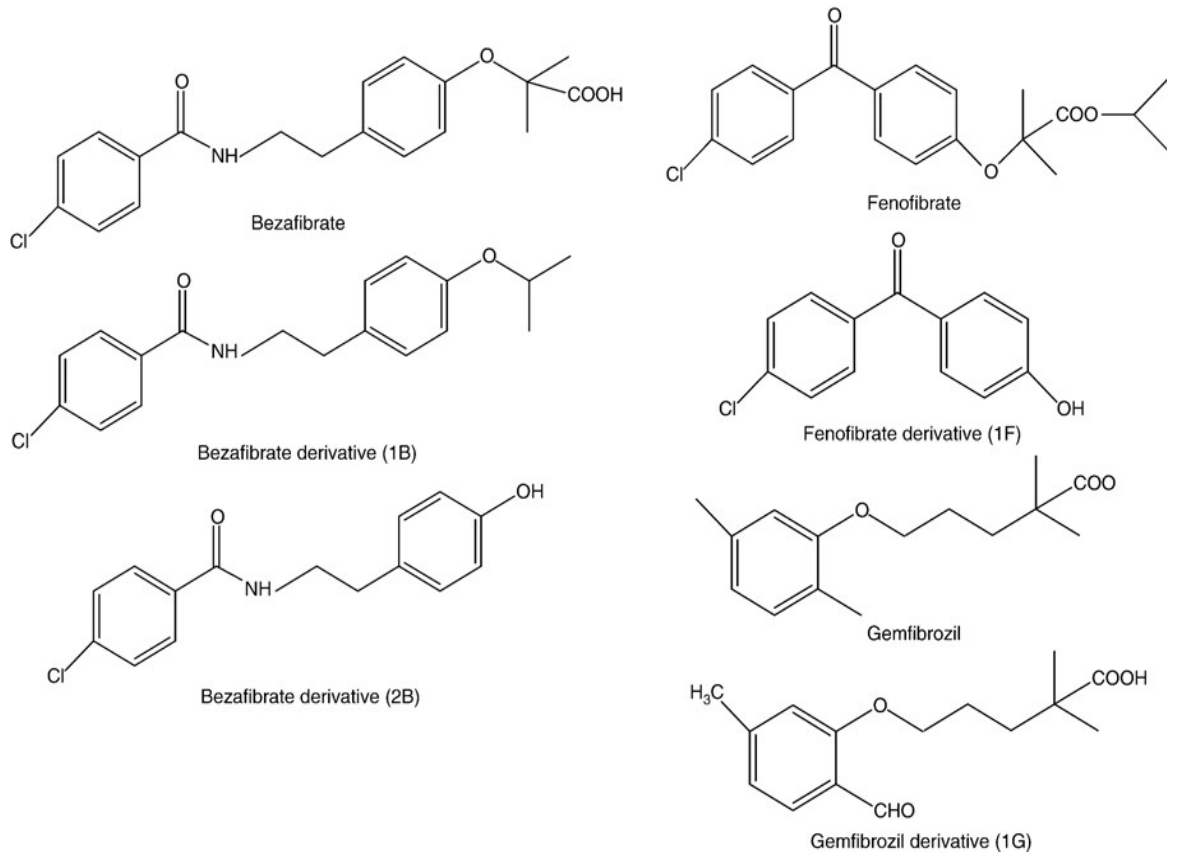
2.2.3.Gen Mutasyonları :

DNA yapısındaki nükleotid çiftlerinin yer değiştirmesi, bir veya birkaç nükleotidin DNA'nın yapısına katılması (insersiyon) veya DNA'nın yapısından çıkması

(delesyon) şeklinde meydana gelmektedir. Bu tip mutasyonlar iki şekilde ortaya çıkar; DNA replikasyonu sırasında veya herhangi bir mutajen tarafından indüklenerek.

2.3. Fibratlar Hakkında Genel Bilgi :

Fibrik asit türevleri klinikte hipertrigliseridemiyi içeren dislipidemi tedavisinde kullanılmaktadır. Fibratların hipotrigliseridemik aktivite mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte, bu durumun hepatik ApoC-III sentezini azaltmanın yanı sıra lipoprotein lipaz ve/veya hepatik lipaz aktivite/ifade artırımını ile gerçekleştirildiği düşünülmektedir. Clofibrat öngörölmüş olan ilk fibrattır. Gemfibrozil, fenofibrat, bezafibrat ve ciprofibrat raflarda mevcut olan başlıca fibratlardır[22,23].



Şekil 2.3.1. Fibratlar ve foto ürünlerinin yapıları[49]

2.4. Gemfibrozil :

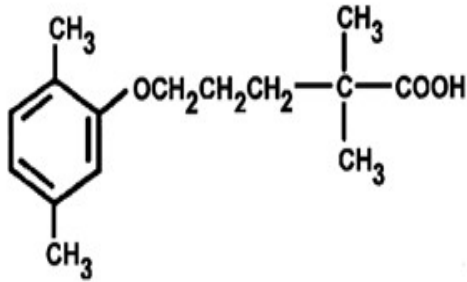
1982 yılında FDA onayından sonra yaygın lipid düzenleyici ilaç olarak kullanılan Gemfibrozil, hipertrigliseridemi ve hiperkolesterolemi tedavisinde etkili bir şekilde kullanılmaktadır. İki klinik deney sonucunda gemfibrozil koroner kalp hastalıklarının kontrolünde önemli bir tedavi edici ajan olarak kabul edilmiştir[24,25]. Gemfibrozil düşük dansiteli lipoprotein kolesterol(kötü kolesterol)[26] ve trigliserid konsantrasyonunu azaltarak[25] ve yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol(iyi kolesterol) konsantrasyonunu yükselterek[25,26] hipolipidemik etkilerini gösterir.

Kemirgenlerde gemfibrozil ve diğer fibratlar peroksizom proliferatörüdür, büyüklük ve sayıca genişlemiş hepatik peroksizom ile ilişkili genişlemiş karaciğeri içeren bir sendromu indükler. Ayrıca açıl CoA oksidaz , karnitin asetiltransferaz ve sitokrom P450 4A enzimlerini içeren peroksizomal ve mikrozomal yağ asidi oksitleyici enzimleri de indükler[27-30]. Wy-14,643 ([4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio] asetik asit; öncül peroksizom proliferatörü, di(2- ethylhexyl) phthalate, gemfibrozil ve klofibrati içeren bazı fibratlar ile yapılan çalışmalarda bu maddelerin kemirgenlerde karsinojenitesi gösterilmiştir[31-36].

2.4.1.Farmakolojik Özellikleri :

Farmasötik Bilgi :

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



Moleküler Formül : C₁₅H₂₂O₃

Moleküler Ağırlık : 250.35

Farmakolojik Özellikleri

Farmakoterapötik Grubu : Serum lipid düşürücü ajan

Gemfibrozil oral yoldan kullanılan bir lipid düzenleyicisidir. Kimyasal olarak halojensiz fenoksipentanoik asittir[37].

Etkileri :

Gemfibrozil, serum trigliserid ve total kolesterol düzeylerini düşüren, yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol (HDL) düzeyini ise yükselten lipid düzenleyici bir etken maddedir. Lipid düşürücü etki öncelikle trigliserid içeriği zengin çok düşük dansiteli lipoproteinlerde(VLDL), daha az oranda ise kolesterolce zengin düşük dansiteli lipoproteinlerde(LDL) meydana gelir.

Tip IV hiperlipoproteinemi kaynaklı trigliseridi yüksek hastalarda gemfibrozil ile tedavi LDL- kolesterol yükselmesine yol açabilir. Bunun yanı sıra bu hastalarda HDL-kolesterol, HDL₂ , HDL₃, apolipoprotein A₁ ve A₂ artar.

Epidemiyolojik çalışmalarda düşük HDL-kolesterol ve yüksek LDL-kolesterol koroner kalp hastalıkları için bağımsız risk faktörleri olarak belirtilmiştir.

Hiperlipidemi türüne bağlı olarak gemfibrozilin farmakolojik kullanımı HDL-kolesterolü yükseltip LDL-kolesterolü düşürürken bu durum Helsinki kalp çalışmasında,5 yıllık primer koruma faz IV klinik çalışma, koroner kalp hastalığında morbiditeyi düşürme yönünde bir sonuç şeklinde belirtilmiştir[38].

İnsanlarda gemfibrozilin periferik lipolizi inhibe ettiği ve serbest yağ asitlerinin hepatik ekstraksiyonunu azalttığı böylece hepatik trigliserid üretimini azalttığı gösterilmiştir. Gemfibrozil ayrıca VLDL taşıyıcısı apolipoprotein B klerensini artırıp sentezini inhibe ederek VLDL düzeyinde düşme sağlar.

Hayvanlarda yapılan çalışmalar ile gemfibrozilin HDL-kolesterolü yükseltmenin yanı sıra yeni üretilen trigliseridlere uzun zincirli yağ asidi eklenmesini azaltabileceği, karaciğerden kolesterolün uzaklaştırılmasını ve turnoverını hızlandırabilme, feçes ile de kolesterol atımını hızlandırabileceği belirtilmiştir[37].

Klinikte Farmakoloji ve Farmakokinetiği :

Gemfibrozil hayvanlarda idrar ve feçes, rat ve köpeklerde ise major olarak feçes ile atılır. İnsanlarda verilen dozun yaklaşık %70'i primer olarak glukuronid konjugatı şeklinde idrar ile atılır. %2'den daha azı gemfibrozil olarak , %6'sı feçes ile atılır. Tek bir dozu takiben 1 veya 2 saat içinde plazma düzeyi en yüksek seviyeye ulaşır. Tek doz uygulamasından sonra yarı ömrü yaklaşık 1.5 saat iken, multiple dozlardan sonra 1.3 saattir[37].

Gemfibrozile ilişkin 3 metabolik yol tanımlanmıştır. Birincisi gemfibrozil ve metabolitlerinin konjugasyonudur. İkincisi ve esas olanı gemfibrozil meta-metil grubunun hidroksilasyonu olup benzil alkol(metabolit II) üretir ve bu metabolit benzoik asit metaboliti(metabolit III, major metabolit) ile hızlı oksidasyona uğrar. Üçüncü yol aromatik halkanın bir fenole(metabolit I) hidroksilasyonudur, bu fenol ise karboksilik asit fonksiyonu bozulmamış fakat doğada fenolik olan bir bileşiğe dönüşür[37].

Fibratlar ve eşlik eden tıbbi tedavide kullanılan antikoagülanlar, antidiabetikler ve hipokolesterolemik ajanlar arasında farmakokinetik ve/veya farmakodinamik etkileşimler bildirilmiştir[39,40]. Gemfibrozilin CYP2C8 inhibisyonu amiodaron, verapamil, warfarin gibi kardiovasküler ilaçların ve tolbutamidin metabolizmasını etkileyebilir. Ayrıca CYP2C9 aktivitesini inhibe edici etkisi carvedilol, losartan, phenytom ve diazepam gibi ilaçların da metabolizmasını etkileyebilir[37].

Gemfibrozil yüksek oranda plazma proteinlerine bağlandığı için diğer ilaçlarla yer değiştirme potansiyeli vardır[37].

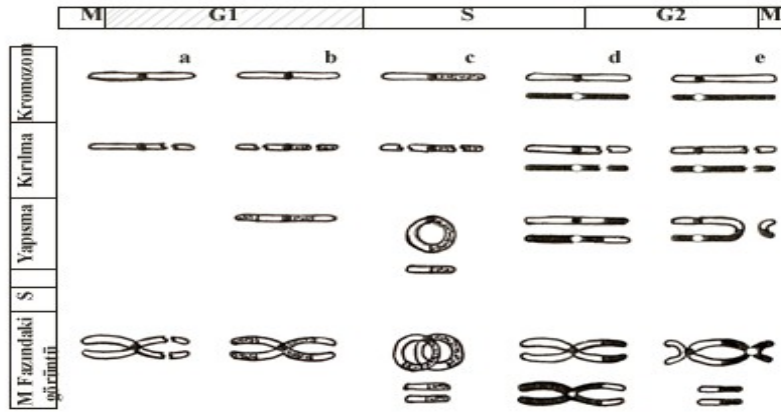
2.5. Genotoksisite :

Genotoksisite, fiziksel veya kimyasal ajanlar tarafından genetik materyalde hasar oluşumudur. Genetik materyalde oluşan hasar tamir edilemez ise DNA sekans değişiklikleri, kromozom aberasyonları ile sonuçlanabilen tek veya birden fazla nükleotid değişiklikleri ve bunların sonucunda rekombinasyon, mutasyon, doku hasarı, yaşlanma, kanser ortaya çıkabilmektedir[41].

2.5.1. Kromozom Aberasyonları :

Kromozom aberasyonları kromozom sayı ve yapısındaki değişimler ile ortaya çıkmaktadır. Hücre döngüsünün G1 ve G2 fazında kromozomal aberasyon oluşumu DNA çift zincir kırıklarının esas lezyonlarıdır.

Yapısal kromozom aberasyonları, kromozomun bir kromatidinde veya her iki kromatidinde görülmesine bağlı olarak ikiye ayrılır. Eğer aberasyon tek kromatidde görülüyor ise kromatid tip, her iki kromatidde görülüyor ise kromozom tip aberasyondur. Bu aberasyon tipleri mutajen uygulamasının yapıldığı hücre siklusu safhasına ve kullanılan mutajenik ajanın tipine bağlıdır. İyonize ışınlar gibi ajanlar hücre G1 safhasında iken etki ediyorsa kromozom tip aberasyonlar meydana gelir, eğer hücre G2 safhasında iken etki ederse kromatid tip aberasyonlar ve S safhasında iken etki ederse her iki tipte aberasyonlar meydana gelebilir[16]. Şekil 2.5.1.1. ve 2.5.1.2.'de sırasıyla G1 ve G2 fazında yapılan ışınlama sonucu oluşan KA'lar görülmektedir[42]. Şekil 2.5.1.1.'de görülen terminal delesyon, kromozomun tek bir kolunda kırılma olması ile oluşmuştur. Kırılan parça ilk mitozda asentrik fragment şeklinde görülür. Asimetrik parça değişimi, aynı kromozomun iki kolunda kırılma olması ve kromozomun kırılan iki kolunun birbirine, kırılan iki parçanın da birbirine yapışması ile oluşur; mitozda halka kromozom ve fragment şeklinde görülür.



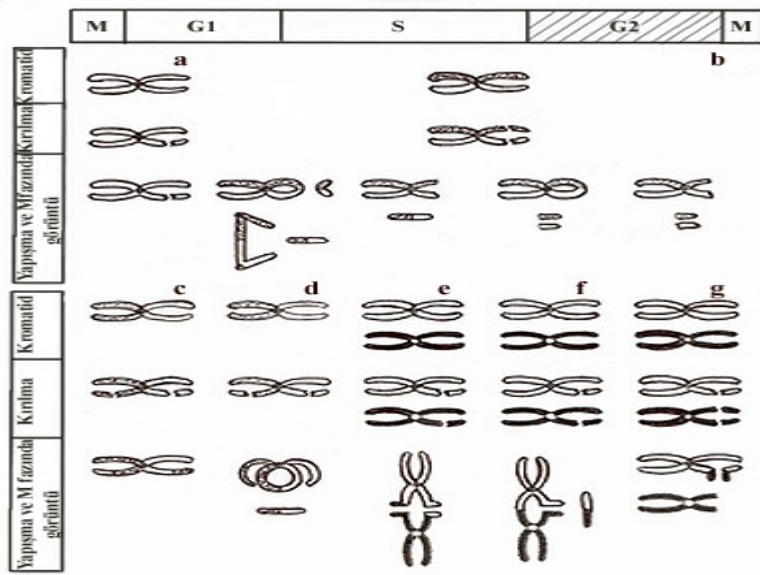
Şekil 2.5.1.1. G1 fazında yapılan ışınlamalar sonucu meydana gelebilecek kromozom tipi aberasyonlar ile bunların çeşitli yapışma olasılıkları ve S fazını izleyen mitozda saptanan görüntüleri[42]

a)Terminal delesyon,

- b) Aynı kromozomda simetrik parça değişikliği,
- c) Aynı kromozomda asimetrik parça değişikliği,
- d) Farklı kromozomlar arasında simetrik parça değişikliği,
- e) Farklı kromozomlar arasında asimetrik parça değişikliği.

Homolog olmayan kromozomlar arasında olan karşılıklı parça değişimine translokasyon denir. Farklı kromozomlar arasında simetrik parça değişiminde, sonraki mitozda görülebilir bir değişiklik olmazken, asimetrik parça değişiminde sonraki mitozda bir disentrik kromozom ve iki asentrik fragment görülür.

Şekil 2.5.1.2.'de G2 safhasında; ışınlama sonucu meydana gelen, kromatid aberasyonlar, terminal delesyon, izokromatid delesyon, aynı veya farklı kromozomlar arasında simetrik ve asimetrik parça değişiklikleri ve triradialler görülmektedir.



Şekil 2.5.1.2. Kromozom eşleşmesi tamamlandıktan sonra, G2 fazında yapılan ışınlamalar sonucunda meydana gelebilecek kromatid tipi aberasyonlar ile bunların çeşitli yapışma olasılıkları ve sonraki mitozda saptanan görüntüleri[42]

- a) Terminal delesyon,
- b) İzokromatid delesyon
- c) Aynı kromozomda simetrik parça değişikliği,
- d) Aynı kromozomda asimetrik parça değişikliği,
- e) Farklı kromozomlar arasında simetrik parça değişikliği,

- f)Farklı kromozomlar arasında asimetrik parça değişikliği,
g)Triradial aberasyon.

Şekildeki terminal delesyon, sonraki mitozda terminal kromatid delesyon ve asentrik fragment şeklinde görülür. İzokromatid delesyonlar, bir kromozomun iki kardeş kromatidinde aynı hizada kırılma sonucu oluşmaktadır. Bunun sonucunda mitoz anafazında köprü ve asentrik fragment oluşabilir. Diğer bir olasılık ise fragmentler birbirine yapışır, metafazda bir fragment şeklinde görülür. Üçüncü bir olasılık ise kırılan kromozomun iki kromatidinin sadece uçları yapışır ve kırılan parçalar yapışmaz. Başka bir olasılık ise hiçbir yapışmanın olmamasıdır.

Bir kromozomun aynı kromatidinde kırılma meydana gelmesi ve kırılan parçaların karşılıklı yer değiştirilmesi ile simetrik parça değişikliği oluşur, mitozda görülebilir bir değişiklik yoktur. Eğer kromatidlerin kırık uçları birbirine, kırılan iki asentrik parça birbirine yapışır ise asimetrik parça değişikliği olur. Bunu izleyen mitozda kardeş kromatidlerden birisi normal diğeri halka kromozom ile asentrik fragment şeklinde gözlenir. Farklı kromozomlar arasında simetrik ve asimetrik parça değişiklikleri sözkonusudur. Simetrik parça değişikliğinde iki ayrı kromozomun birer kromatidinden kopan parçalar karşılıklı yer değiştirir(Şekil 2.5.1.2. e), mitozda ise görülebilir bir değişiklik yoktur. Eğer kırılan parçalar birbirlerine ve kromatidlerin de kırılan uçları birbirlerine yapışırsa (Şekil 2.5.1.2. f), takip eden mitozda bir disentrik kromozom ve asentrik fragment görülür. Triradial aberasyonlar, bir kromozomun tek kromatidinde, diğer kromozomun iki kromatidinde (izokromatid) kırılma olması ve izokromatid kırılma sonucu oluşan asentrik parçaların, tek kromatid kırılması ile oluşan kırık uçlara yapışması ile meydana gelir, mitozda 3 kollu bir kromozom ve izokromatid delesyon şeklinde izlenir.

İnversiyonlar, bir kromozomun kopan bir parçasının 180° dönüp tekrar aynı kromozoma yapışmasıyla oluşan bir kromozom aberasyonudur. İzokromozomlar ise kromozomun sentromer bölgesinden kromozom tipi enine bir kopma sonucu oluşur ve kromatidlerdeki genetik bilgileri aynı olan yeni bir kromozom meydana gelir.

Gap, kromatid kalınlığına eşit ya da ondan daha dar boyanmamış (akromatik) bölgelere verilen isimdir. Kromozomdaki boyanmamış bölge kromatid kalınlığından fazla ise kromatid kırık olarak kabul edilir[43]. Gaplar kırıklarda olduğu gibi

izokromatid veya kromatid gap şeklinde olabilir. Her iki kromatidde gap bulunuyorsa izokromatid gap, tek bir kromatidde gap varsa kromatid gap şeklinde isimlendirilir. Özellikle DNA sentezini inhibe eden bazı kimyasallar, yüksek sıklıkla gaplara neden olmaktadır[16].

Spiral çözülmesi, kromozomda soluk boyanan bölgelerdir ve daha geniş bir alanı kapsar. Kromozomların kontrole göre boylarının çok kısılması ve kalınlığının artmasına kromozom kontraksiyonu denir, bu olay kimyasal maddenin histon proteinlerine etki ettiğini gösterir[43].

Mutajenik ajanlara maruz kalan insan popülasyonlarını izlemek için periferik kan lenfositlerinde sıklıkla KA (kromozom aberasyonu) ve MN(mikronükleus)'lar kullanılmaktadır. Hagmar vd. 1998'de insan popülasyonlarında kendiliğinden oluşan KA ile sonradan oluşan kanser sıklığı arasında pozitif bir ilişkinin olduğunu belirlemişlerdir[44].

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada materyal olarak sigara içmeyen, yakın yaşlardaki 10 erkek (22 ve 25 yaşlarında) ve 10 bayandan (22 ve 25 yaşlarında) alınan periferik kan, test maddesi olarak gemfibrozil, pozitif kontrol olarak mitomisin-C(MMC) test kontrolü olarakta DMSO(Dimetil sülfoksit) kullanılmıştır[45].

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) mavi-menekşe renkte, kristal şeklinde ve suda çözünebilen bir maddedir. Suda çözünen (pH=6-9) eriyik, ışıktan korunduğu ve 5°C altındaki buzdolabında saklandığı zaman yedi gün özelliğini korumaktadır. Mitomisin-C 2 mg ve 10 mg'lik şişelerde toz şeklinde bulunur. MMC antineoplastik ve geniş spektrumlu bir sitostatik (hücre bölünmesini durduran) ajandır[46].

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

MMC, antineoplastik ilaçlar grubunda yer alan ve çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılan alkilleyici bir ajandır. MMC'nin kullanıldığı kanser türleri aşağıda verilmiştir.

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

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddelerin Eriyiklerinin Hazırlanması

3.2.1 Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

1. Etanol (C₂H₅OH), (Merck, K35091886 537)
2. Gemfibrozil (Sigma, G9518- 5G)
3. Potasyum di-hidrojen fosfat (KH₂PO₄), (Merck, A651773 524)
4. Sodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄), (Merck, K34623780 516)
5. Mitomisin C (MMC) 2 mg (Sigma, M 0503)
6. Giemsa (Merck, HX694620)

Fosfat Tampon Çözeltisi: Potasyum di-hidrojen fosfat (KH₂PO₄)' dan 9.1 gr. alınır ve 1000 ml. bidistile suya tamamlanır. Başka bir balon jøjeye sodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄)'dan 11,9 gr alınır ve 1000 ml. bidistile suya tamamlanır ve stok çözeltiler hazırlanmış olur[47].

Sorenson Fosfat Tampon Çözeltisi: KH₂PO₄ çözeltisinden 60 ml. ve Na₂HPO₄ çözeltisinden 30 ml. alınarak şaleye konulur ve üzerine 10 ml. giemsa boyası eklenerek %10 luk giemsa-sorenson fosfat tampon çözeltisi hazırlanır. Sorenson fosfat tampon çözeltisi çeşitli pH değerlerine ayarlanabilir, bu işlem için her iki çözeltinin değişik miktarları kullanılarak pH istenilen değere ayarlanır[47].

Çözelti 1:

KH₂PO₄..... 9.1 gr.
Bidistile su.....1000 ml.

Çözelti 2:

Na₂HPO₄.....11.9 gr.
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)'da çözülmüştür. 50, 100, 125 ve 150 µg/ml'lik dozlar kullanılarak çalışma yapılmıştır.

3.2.3. Mitomisin- C (MMC) Eriyiğinin Hazırlanması

2 mg mitomisin-C bulunan ortama 2 ml steril bidistile su ilave edilerek MMC eritilmiştir. Sonra bu eriyikten 5 ml'lik kültür ortamına ilave edilerek son konsantrasyondaki MMC oranı 0.3 µg/ml olan çözeltiler hazırlanmıştır. Yukarıda belirtilen konsantrasyonlardaki MMC ile hücreler 24 saat muamele edilmiştir.

3.2.4. Sorensen Tamponunun (Sorensen Buffer) Hazırlanması

Sorensen tamponu, tampon A ve tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanmış olup bu çözeltiler çalışmanın amacına uygun olarak birbirleriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanılmıştır.

3.2.5 Boyanın Hazırlanışı :

Tampon A: 11.34 gr KH_2PO_4 250 ml saf su içinde eritilmiştir (pH=4.8).

Tampon B: 14.83gr $\text{Na}_2\text{HP0}_4.12 \text{H}_2\text{0}$ 250 ml saf su içinde eritilmiştir.

3.2.6. Kromozom Medyumu

Biochrome firmasının ürettiği kromozom medyumu, hücre kültürü için kullanılmıştır. Besiyeri içinde non essential amino acids, fetal calf serum, heparin, penicillin G, sodium salt, streptomycin sulphate, phytohemagglutinin M bulunmaktadır. Tüpler 5ml'lik ve hazır olarak satışa sunulmuştur.

3.2.7. Kolsişin

Kromozom preparatlarının hazırlanmasında mitotik zehir olarak colchicine (kolsişin) (Sigma) kullanılmıştır. Kolsişin eriyiği 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 Eriyik

Hipotonik eriyik olarak % 0, 4' lük KCl(Merck) kullanılmıştır. Bidistile su içinde stok halinde hazırlanan eriyik ağzı kapalı cam bir kaptaki buzdolabında (+4 °C) saklanmıştır. Her preparasyondan yaklaşık 1 saat önce yeterli miktarda alınıp 37°C'deki inkübatörde ısıtılıp kullanılmıştır.

3.2.9. Fiksatif

Preparatların hazırlanmasında kullanılan fiksatif, 1 kısım glacial asetik asitin 3 kısım metanol (1/3 : glacial asetik asit/metil alkol) ile karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Fiksatif preparat yapım işleminden iki saat önce hazırlanmış ve buzdolabında saklanmıştır.

3.2.10. Giemsa

Giemsa boyası Merck firmasından(Cat. No. 9204) temin edilmiş olup, deneylerimizde Sorensen tamponu içinde hazırlanmış, %5'lik boya eriyiği kullanılmıştır.

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 yükslebilen 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_2PO_4 (merck, 9021622)
4. $\text{Na}_2\text{HP0}_4\text{H}_2\text{O}$ (Merck, K1 690176)
5. Glasial asetik asit (Merck, 247K18855556)
6. Metanol (Merck, 502K05275408)
7. Ksilol (Merck, 207K037553)
8. İmmersiyon yağı (Merck, 09403569)
9. KCI (Merck, 340TA611835)
10. Alkol (Merck)
11. Distile su
12. Tüplük
13. Çeşitli cam malzemeler
14. Konik tabanlı 10ml'lik steril kültür tüpü
15. Enjektör
16. Çeşitli ebatlarda puarlar
17. Pastör pipeti
18. Lam
19. Lamel

3.4. Kromozom Anomalilerini (KA) (Chromosomal Aberration=CA) Saptamak İçin Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması

3.4.1 Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Sağlıklı ve sigara içmeyen yaşı 22-25 olan kişilerden alınan, heparinize edilmiş kan örnekleri kromozom medyumlarına(5 ml) steril şartlarda 13-14 damla(0.4 ml) ekilmiştir. Hücre kültürü inkübatörde 37 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Gemfibrozilin insan kromozomları üzerine etkisini incelemek için kültür süresinin bitimine 24 saat kala son konsantrasyon kültür tüplerine ilave edilmiştir.

Pozitif kontrol amacıyla kullanılan MMC steril bidistile suda çözülmüştür. MMC'nin insan kromozomları üzerine etkisini incelemek için kültür bitimine 24 saat kala 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[56]. Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (yani kültürün 70. saatinde) her tüpe hazırlanan kolsişin eriyiğinden 35 µl (0.06 µg kolsişin/ml) ilave edilmiş ve tüpler hafifçe sallanarak iyice karıştırılmıştır. Hücreler 2 saat süresince (37°C'de) kolsişin ile muameleye tabi tutulmuştur. Kültür süresi olan 72. saatin bitiminde kültür tüpleri, 2000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden 0.5-0.7 ml'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, etüvde 37 °C'de tutulan hipotonik eriyik ilave edilmiştir. Bu eriyiğin ilavesi damla damla ve karıştırılarak yapılmış olup hücre süspansiyonu pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Her tüpe 7 ml hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler, ağzı kapatılarak inkübatöre konmuştur. Hücreler 30 dk. hipotonik eriyikte 37°C'de muamele edilmiştir. Sürenin sonunda tüpler 10 dk. 2000 rpm'de santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. Hipotonik çözelti ilavesi gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 5 ml olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 20 dk. fiksatif ile muamele edilen hücreler 2000 rpm'de (170 x g) 10 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem 3 kere tekrarlanmıştır. 3. fiksatifle muamelenin sonunda tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görülmüştür. Her fiksatif ilavesinden sonra tüpler santrifüj edilerek üstteki sıvı atılmıştır. Son santrifüjden sonra dipte 0, 5 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra yayma yapılmıştır. Tüpün

dibinde toplanan hücreler pastör pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Pastör pipetine 4-5 damla olacak şekilde bu hücre süspansiyonundan çekilmiştir. Özel olarak hazırlanmış düzeneğe tutturulan pastör pipetinden daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanan lamlara farklı alanlara 1'er damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak (her lama 3-4 damla), hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerinde yayılması sağlanmıştır. Hücre süspansiyonunun lamlara damlatılması esnasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edilmiştir [19]. Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.

3.5. Mikroskobik inceleme

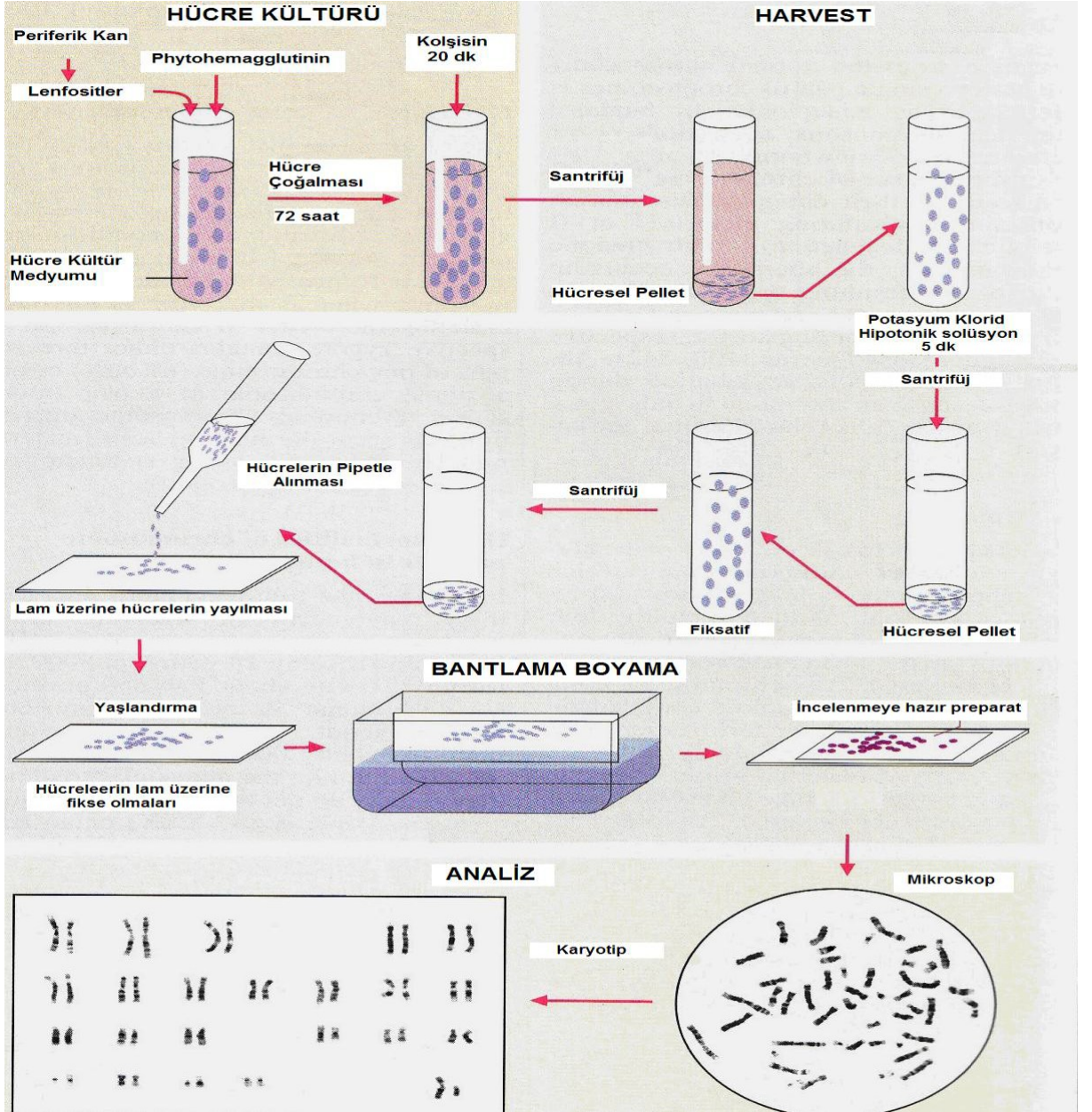
Hazırlanmış olan daimi preparatlar Olympus marka binoküler ışık mikroskobunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir (10x100=1000 büyütmede).

3.5.1. Kromozom Anomalilerinin Saptanması

Muamele edilmiş ve kontrol kültürlerde her bir kişiden hazırlanan, iyi dağılmış kromozomlara sahip preparatlardan, her bir doz için 100 metafaz incelenerek kırık ve diğer anomaliler sayılmıştır. Bu hücreler içinde gözlediğimiz kromozom yapı anormallikleri değerlendirilmiştir.

3.6. İstatistiksel Analizler

Tüm istatistiksel analizler Windows 95 GraphPad InStat 3.05 (GraphPad Software, San Diego California USA) kullanılarak yapılmıştır. Kromozomal aberasyon frekansı Fisher exact testi ile analiz edilmiştir. İlaç muamelesi yapılmış gruplar ve negatif kontrol arasında farklılığın tesbiti için Dunnett t-testi kullanılmıştır[48].

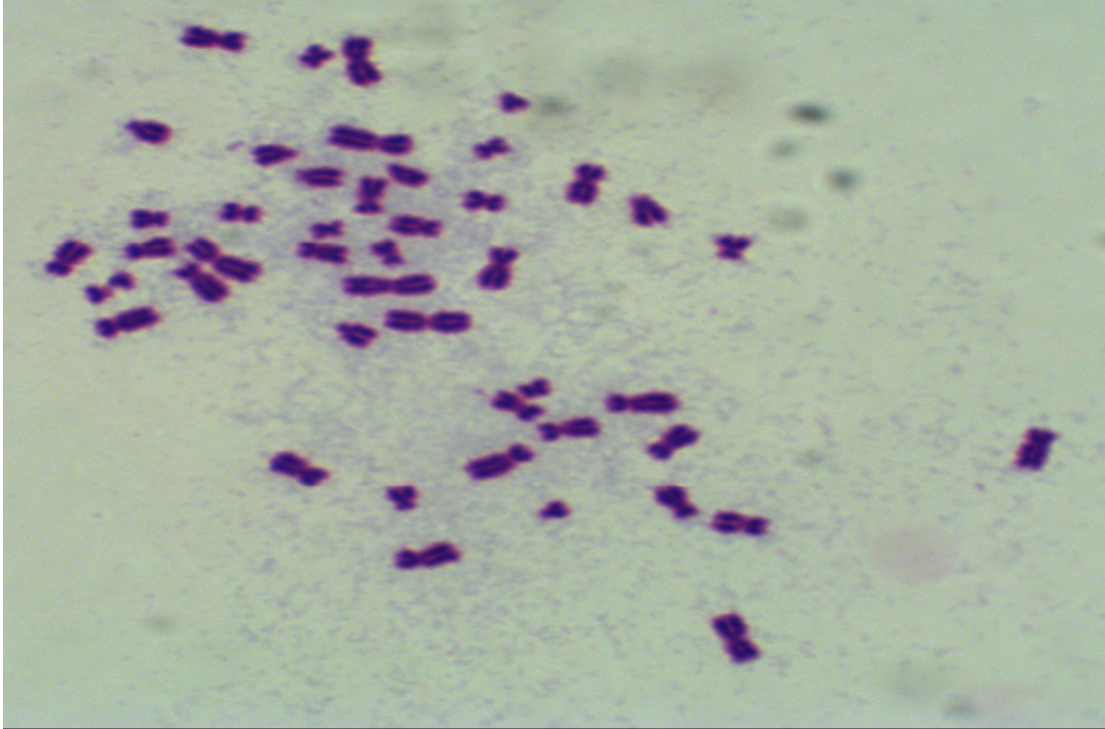


Şekil 3.4.1.1 Kromozom Analizinin Aşamaları[19]

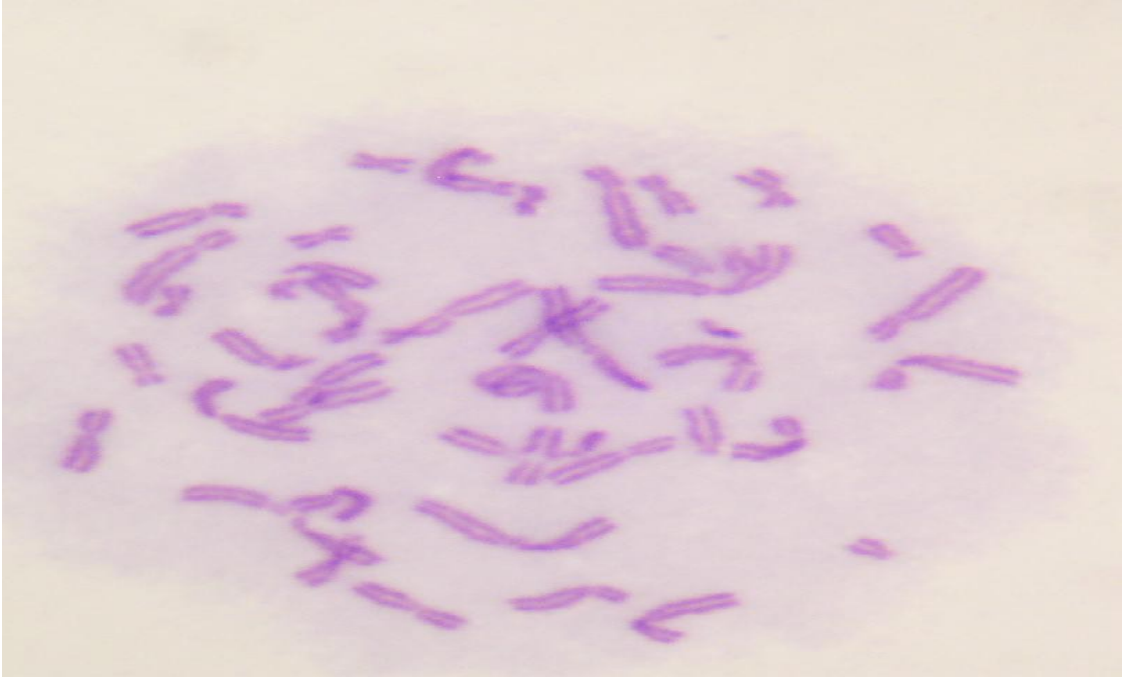
4. BULGULAR

Normal sağlıklı bir bireye ait kromozom görüntüsü resim 4.1.'de verilmiştir. Kromozomlar öncelikle pozitif kontrol olarak kullanılan MMC ile etkileşime bırakılmıştır (0.3 µg/ml). Mitomycin-C'in kromozomlarda kromozom kırıkları, kromatid kırıkları, poliploidi kromatid birleşimi gibi hasarlara neden olduğu gözlenmiştir(Resim 4.2).

Gemfibrozil uygulanmış tüm deneme grupları negatif kontrol ve pozitif kontrol mitomisin-C(MMC, 0.3 µg/ml) ile kıyaslandığında, uygulanan gemfibrozil dozları kromozom aberasyon sıklığında artışa yol açmıştır(Resim 4.3-7). Kromozom ve kromatid kırıkları, kromatid birleşmeleri, fragment ve kromatid değişiklikleri tüm doz uygulamalarında gözlenmiştir. Negatif ve çözücü kontrol ile kıyaslandığında gemfibrozil tüm konsantrasyonlarda hücre bölünme indeksini düşürmüştür(Çizelge 4.1-5). Çalışma sonuçları gemfibrozil'in insan lenfosit kromozomlarında in-vitro klastojenik potansiyeli olduğunu göstermektedir.

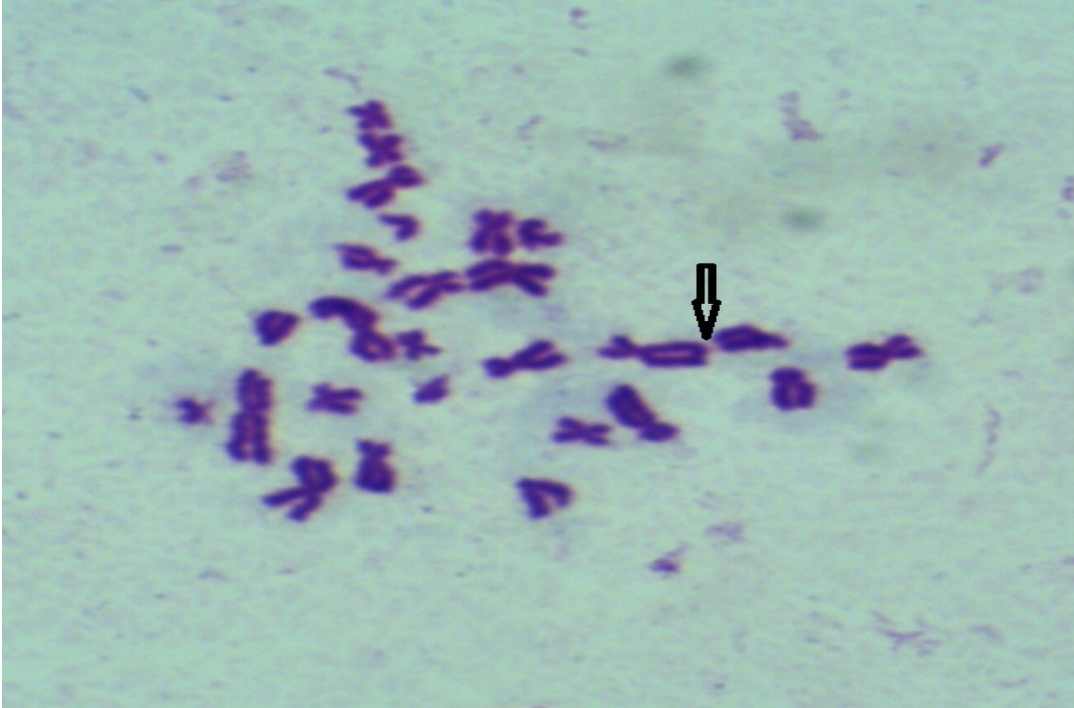


Resim 4.1. Sağlıklı bir bireye ait insan lenfosit kromozom görüntüsü

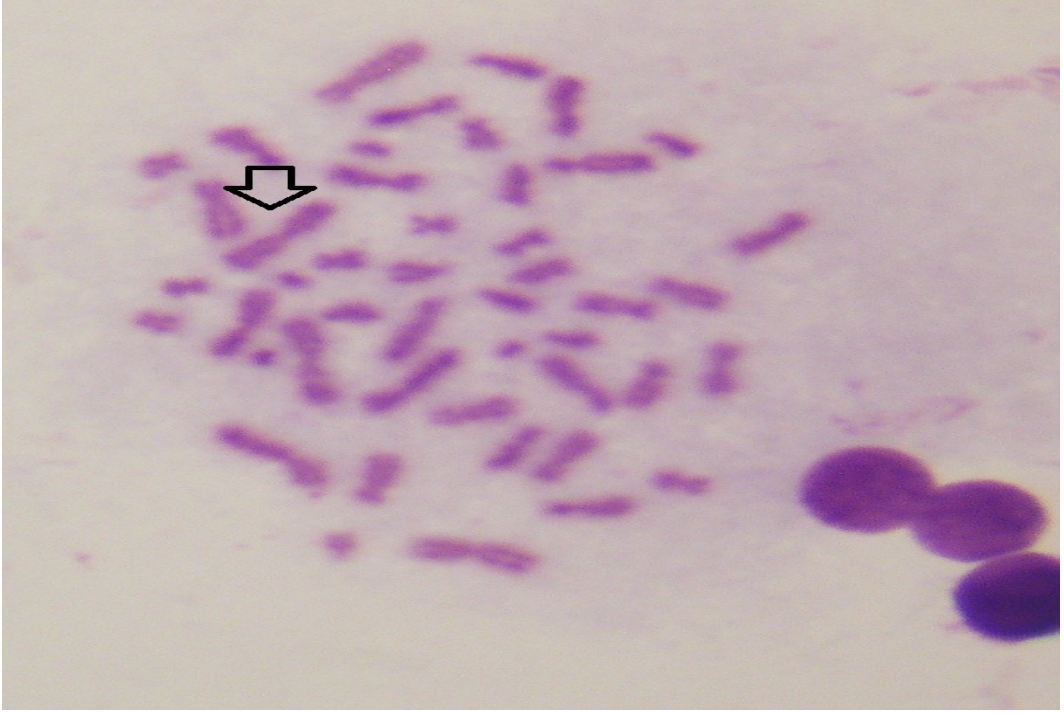


Resim 4.2. Mitomisin-C'nin insan kromozomlarına etkisi

Gemfibrozil'in farklı dozları ile muamele edilmiş insan lenfosit hücre kültüründen elde edilen kromozomlara ait görüntüler resim 4.3., resim 4.4., resim 4.5., resim 4.6 ve resim 4.7 de gösterilmektedir.



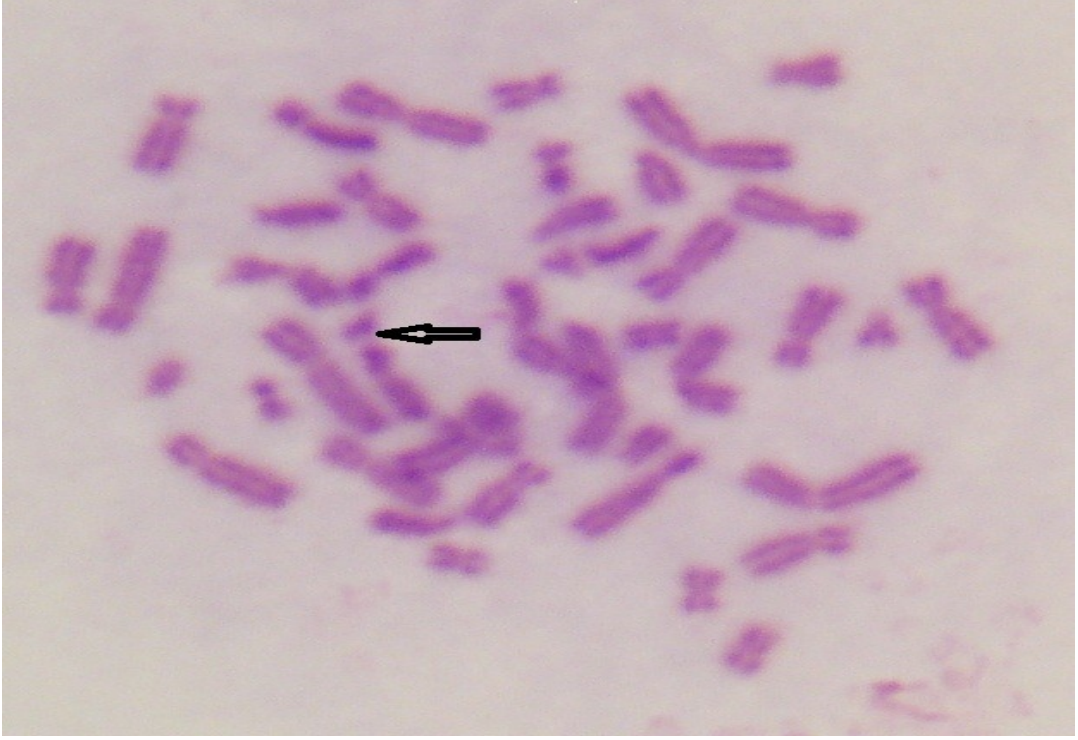
Resim 4.3. Gemfibrozil uygulanan grupta KKB görüntüsü



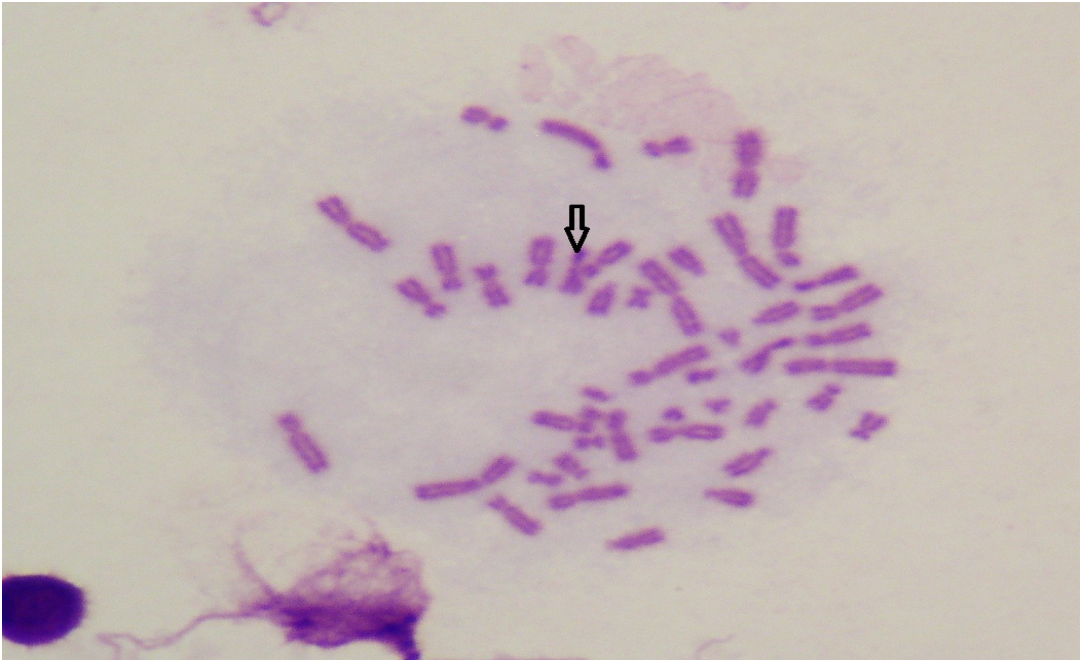
Resim 4.4. Gemfibrozil uygulanan grupta Disentrik Kromozom (DSK) görüntüsü



Resim 4.5. Gemfibrozil uygulanan grupta Fragment (F) görüntüsü



Resim 4.6. Gemfibrozil uygulanan grupta kromozom kırığı (KK) görüntüsü



Resim 4.7. Gemfibrozil uygulanan grupta kromatid kırığı (Kk) görüntüsü

Çizelge 4.1, çizelge 4.2, çizelge 4.3, çizelge 4.4 ve çizelge 4.5 farklı gemfibrozil dozları ile mitotik indeks arasındaki ilişkiyi göstermektedir.

Çizelge 4.1. Negatif Kontrol Grubu Mitotik Aktivite Oranları

NEGATİF KONTROL GRUBU				
Örnek No	Toplam Hücre Sayısı	İnterfaz Hücre Sayısı	Metafaz Hücre Sayısı	Metafaz Hücre Oranı (%)
1	3000	2783	217	7,2
2	3000	2793	207	6,9
3	3000	2777	223	7,4
4	3000	2788	212	7
5	3000	2790	210	7
Grup Ortalaması			213,8	7,1

Çizelge 4.2. 50 µg/ml Gemfibrozil Uygulanan Grupta Mitotik Aktivite Oranları

50 µg/ml Gemfibrozil uygulanan I. Deney Grubu				
Örnek No	Toplam Hücre Sayısı	İnterfaz Hücre Sayısı	Metafaz Hücre Sayısı	Metafaz Hücre Oranı (%)
1	3000	2911	89	2,9
2	3000	2920	80	2,6
3	3000	2915	85	2,8
4	3000	2910	90	3
5	3000	2919	81	2,7
Grup Ortalaması			85	2,8

Çizelge 4.3. 100 µg/ml Gemfibrozil Uygulanan Grupta Mitotik Aktivite Oranları

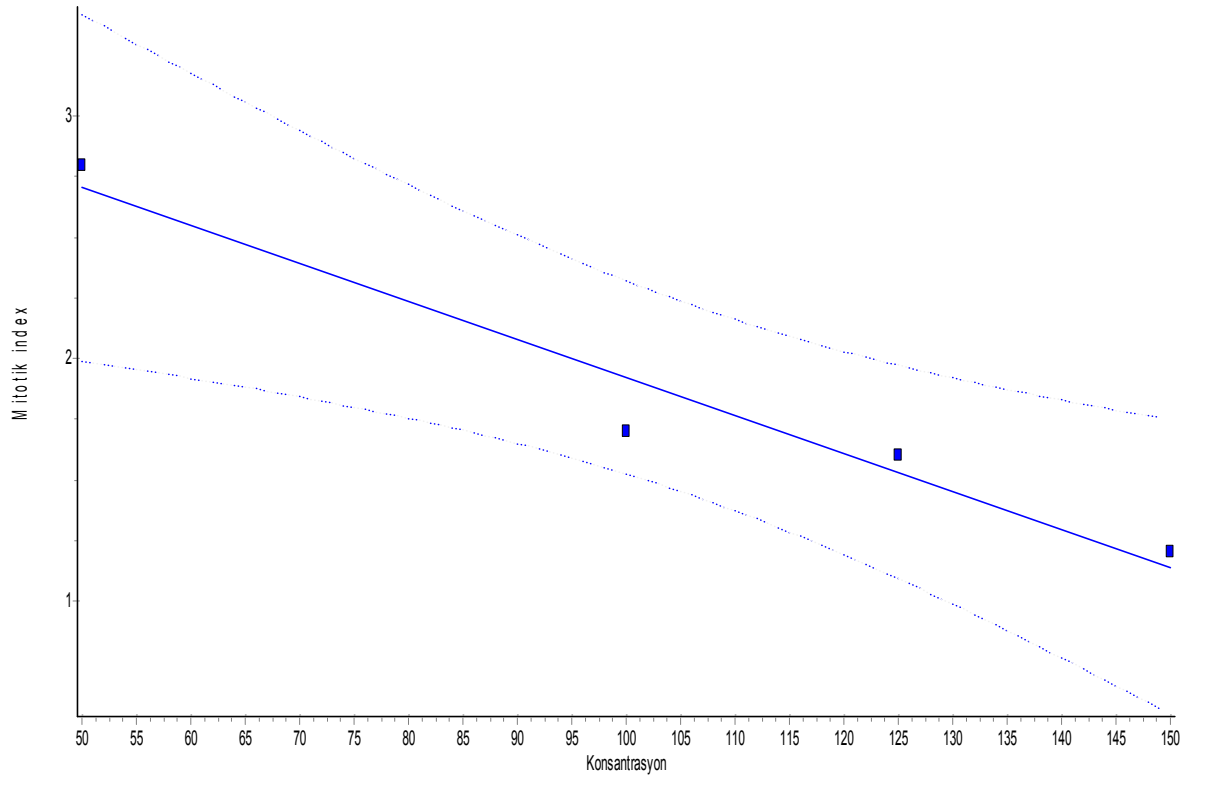
100 µg/ml Gemfibrozil uygulanan II. Deney Grubu				
Örnek No	Toplam Hücre Sayısı	İnterfaz Hücre Sayısı	Metafaz Hücre Sayısı	Metafaz Hücre Oranı (%)
1	3000	2952	48	1,6
2	3000	2946	54	1,8
3	3000	2949	51	1,7
4	3000	2945	55	1,8
5	3000	2940	60	2
Grup Ortalaması			53,6	1,7

Çizelge 4.4. 125 µg/ml Gemfibrozil Uygulanan Grupta Mitotik Aktivite Oranları

125 µg/ml Gemfibrozil uygulanan III. Deney Grubu				
Örnek No	Toplam Hücre Sayısı	İnterfaz Hücre Sayısı	Metafaz Hücre Sayısı	Metafaz Hücre Oranı (%)
1	3000	2950	50	1,6
2	3000	2948	52	1,7
3	3000	2955	45	1,5
4	3000	2943	57	1,9
5	3000	2947	53	1,7
Grup Ortalaması			51,4	1,6

Çizelge 4.5. 150 µg/ml Gemfibrozil Uygulanan Grupta Mitotik Aktivite Oranları

150 µg/ml Gemfibrozil uygulanan IV. Deney Grubu				
Örnek No	Toplam Hücre Sayısı	İnterfaz Hücre Sayısı	Metafaz Hücre Sayısı	Metafaz Hücre Oranı (%)
1	3000	2958	42	1,4
2	3000	2962	38	1,2
3	3000	2960	40	1,3
4	3000	2965	35	1,1
5	3000	2963	37	1,2
Grup Ortalaması			38,4	1,2



Şekil 4.1. Gemfibrozil'in farklı konsantrasyonları ile mitotik indeks arasındaki regresyon ($r = -0.97$)

Çizelge 4.6. Gemfibrozil'in değişik dozları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültürü kromozomlarında kromozom aberasyonu sıklığı

Test maddesi	Uygulama		Yapısal kromozom bozuklukları					Kromozom bozukluklarının sıklığı/hücre±SH(%)
	Süre (s)	Dozlar (µg /ml)	KK	Kk	f	KKB	DSK	
NK	24	1	6	17	2	1	-	5.22± 3.11
Çözücü kontrol	24	20	-	16	1	2	-	3.84± 3.06
MMC	24	0.3	112	190	12	5	3	64.4± 37.47*
Gemfibrozil	24	50	9	18	3	7	-	7.42± 3.06*
		100	17	21	5	16	1	12± 3.82*
		125	24	32	4	28	2	18± 6.26*
		150	33	45	7	10	2	19.4± 8.32*

KK : Kromozom kırığı,

Kk : Kromatid kırığı

F : Fragment

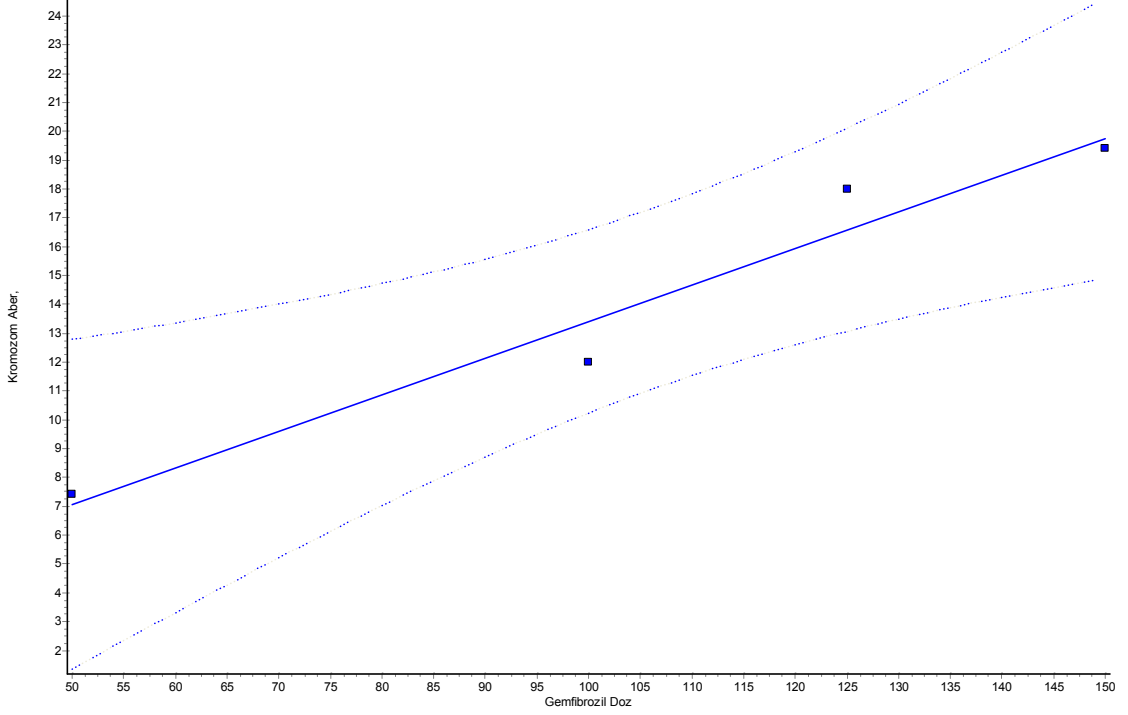
KKB : Kardeş kromatidlerin birleşmesi

DSK : Disentrik kromozom

kontrol (%1 distilled water), MMC: (0.3 µg/ml mitomycine-C (24 saat).

* p < 0.05 kontrolle karşılaştırıldı. (Fisher's Exact Test)

Tablo ve şekillerden de görülebileceği gibi doz arttıkça kromozom kırığı ve diğer aberasyonların oranı artmaktadır ($r = 0.98$).



Şekil 4.2. Gemfibrozil'in farklı konsantrasyonları ile kromozom aberasyonu arasındaki regresyon ($r = 0.98$)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gemfibrozil, lipid düzenleyici bir ajandır, serum kolesterol ve trigliserid düzeylerini düşürür, LDL'yi azaltırken HDL seviyesini yükseltir [49]. HMG CoA redüktaz inhibitörlerinden farklı olarak Gemfibrozil yükselmiş trigliserid düzeyleri gösteren hiperlipidemilerin tedavisinde kullanılabilir ve koroner kalp hastalıklarının insidansını azaltmakta etkilidir(% 34 gibi bir oranda)[49].

Esasen hipertrigliseridemik durumlarda kullanılan Gemfibrozil, in vitro olarak rat hepatik mikrosomal yağ asidi zincir uzamasını güçlü bir şekilde inhibe etmektedir. Ayrıca uzama sürecindeki hız sınırlayıcı basamağı inhibe ederek bu etkiyi gösterdiği gözlenmiştir[50].

Bezafibrate, Ciprofibrate, Clofibrate, Fenofibrate ve Gemfibrozil fibrik asit türevleri(fibratlar) olarak bilinen terapötik ajanlar sınıfında yer alan ilaçlardır(Miller ve Spence,1998; Remick et al.,2008). Fibratlar peroksizom proliferatör reseptör alfayı (PPARalfa) stimüle ederek anormal lipid metabolizmalarının tedavisinde yaygın olarak kullanılırlar. Gemfibrozil'in doğrudan düz kas üzerinde gevşetici etkilerinin gözlemlendiği bir çalışma neticesinde fibratların hipertansiyon üzerindeki etkilerine yeni bir ilgi ve gastrointestinal yan etkilerine yeni bir anlayış getirilmiştir[51].

Gemfibrozil benzeri fibratlar diabetik dislipidemilerde yaygın olarak kullanılır ve Gemfibrozil'in CYP2C8'i inhibe ettiği bulunmuştur[52,53]. Gemfibrozil tek başına ve İtraconazole ile birlikte Repaglinid'in kan glukoz seviyesini düşürücü etkisini geliştirip uzatabilir[54].

National Toxicology Programı(NTP) tarafından hepatokarsinojenite mekanizmalarını araştırmak için Gemfibrozil üç ay süresince rat, fare ve hamster türlerine verilmiştir. Artmış peroksizomal enzim aktivitesi en fazla ratlarda, orta seviyede farelerde,en düşük seviyede hamsterlarda görülmüştür. Bu sonuçlar peroksizom proliferatör ile aktive edilmiş alfa reseptör (PPARalfa) aktivasyonu ile Gemfibrozil'in kemirgenlerde hepatotoksik ve hepatokarsinojenik etkileriyle ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte yaygın olarak insanlarda PPARalfa aktivasyonunun lipid metabolizmasında görev alan genlerin ekspresyonu ile ilgili sonuçlar ortaya çıkardığı fakat hepatocellular proliferasyon ile ilgili olmadığı düşünülmektedir[55].

İnsanlarda Gemfibrozil'i de kapsayan fibratlar, PPARalfa'ya yüksek afinite ile bağlanır, plazma trigliserid ve artmış HDL konsantrasyonlarını düşürür. Bu etkilerin insanlarda apoCIII ekspresyonunun azaltılması ve apolipoprotein-AI ve AII ekspresyonunun artırılması ile gerçekleştiği düşünülmektedir[56].

Çeşitli canlı grupları (bakteri,alg,kabuklular) üzerinde yapılan çalışmalar ile fibrat grubu farmasötiklerin(bezafibrat,gemfibrozil) ve yan ürünlerinin genotoksik ve mutajenik etkiler bakımından çevresel risk oluşturabilme potansiyellerinin dikkate alınması gerektiği ortaya konulmuştur[57].

Klofibrin asit ve Gemfibrozil açıl glukuronidlerinin, genotoksiksite değerlendirilmesi amacıyla yapılan bir çalışmada gözlenen genotoksik etkilerin DNA'nın nükleofilik merkezinde gerçekleşen reaksiyonları içerdiği ileri sürülmüştür. Klofibrin asit ve gemfibrozil glukuronidleri endojen glikozilasyon yapan glukoz 6-fosfatın on katı kadar reaktivite göstermişlerdir[58].

Yaptığımız çalışma sonuçlarına göre; gemfibrozil uygulanmış deneme grupları negatif kontrol ile kıyaslandığında, uygulanan gemfibrozil dozları kromozom aberasyon sıklığında artışa yol açmıştır. Kromozom ve kromatid kırıkları, kromatid birleşmeleri, fragment ve disentrik kromozom gözlenmiş olan kromozomal aberasyonlardır. Ayrıca gemfibrozil konsantrasyon artışı ile hücre bölünme indeksinin düştüğü ve doz-mitotik indeks arasında yapılan istatistiksel çalışma ile negatif bir korelasyon($r = -0.97$) olduğu görülmüştür. Yapılan çalışma in vitro bir çalışma olduğundan gemfibrozilin etkisinin tam anlamıyla anlaşılabilmesi için in vivo çalışmaların yapılması da gerekli olacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Stumpf M, Temes TA, Wilken RD, Roodrigues SU, 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.
2. P. G. Smith, H. Jick Regular drug use and cancer *J. Natl. Cancer Inst.* (Update on genotoxicity and carcinogenicity testing of 472 marketed pharmaceuticals),59; 1387-1391, 1977.
3. G.D. Friedman, H.K. Ury, Initial screening for carcinogenicity of commonly used drugs, *J. Natl. Cancer Ins.* 65 ,723-733, 1980.
4. G.D. Friedman, H.K. Ury, Screening for possible drug carcinogenicity : second report of findings *J. Natl. Cancer Inst.* 71, 1165-1175, 1983.
5. 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.
6. Tixier C, Singer HP, Oeller S, Müller SR. Occurrence and fate of carbamazepine, ibuprofen, ketoprofen and naproxen in surface waters *Environ Sci Technol* 37 (6): 1061-8, 2003.
7. 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.
8. Andreozzi R, Marotta R, Paxeus N. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* 50: 1319-30, 2003.
9. Boree AN, Arnold WA, McNeill K. Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: a review. *Aquat Sci* 65: 320-41, 2003.
10. Isidori M, Lavorgna M, Nardelli A, Pascarella L, Parrella A. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non target organisms. *Sci Total Environ* 348 (1-3): 93-101, 2005.
11. Isidori M, Nardelli A, Parrella A, Pascarella L. A multispecies study to assess the toxic and genotoxic effect of pharmaceuticals: furosemide and its photoproduct. *Chemosphere* 63: 785-93, 2006.

12. Fent K, Weston A.A., Caminada D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76: 122-159, 2006.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Natarajan A. T., Obe G., Mutagenicity testing with cultured mammalian cells: Cytogenetic Assays. In: Heddle JA(ed) *Mutagenicity. New Horizons in Genetic Toxicology.* Academic Pres, New York, 1-213, 1982.
17. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ders Kitabı Prof. Dr. Fulya TEKŞEN Ankara Üniversitesi Sağlık Eğitim Fakültesi Yayınları No:4 2. Baskı, 2006.
18. www.thd.org.tr/doc/kurs-pdf/molhem-01.pdf
19. Passarge E., *Color Atlas of Genetics*, 3rd edition 2007 Thieme.
20. Connor J. M., Ferguson-Smith M. A. *Essential Medical Genetics.* Blackwell Scientific Puplication, 1993.
21. Moleküler Biyoloji, Protein Sentezi ve Yıkımı, Yıldırım A., Bardakçı F., Karataş M., Tanyolaç B. Nobel Yayın Dağıtım, 2007.
22. D. J. Rader and S. M. Haffner. Roles of fibrates in the management of Hypertriglyceridemia. *Am. J. Cardiol.* 83: 30F-35F, 1999.
23. 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.
24. P. R. Holden and J. D. Tugwood. Peroxisome proliferatoractivated receptor alpha: Role in rodent liver cancer and species differences. *Journal of Molecular Endocrinology*, vol.22,no.1, 1-8, 1999.

25. B. G. Lake. 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.
26. R. W. Mahley and T. P. Bernot. Drug therapy for hypercholesterolemia and dyslipidemia in Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, J. G. Hardman, L. E. Limbird, and A. G. Gilman, Eds., pp. 971–1002, McGraw Hill, New York, NY, USA, 10th edition, 2001.
27. J. R. Warren, N. D. Lalwani, and J. K. Reddy, Phthalate esters as peroxisome proliferator carcinogens. *Environmental Health Perspectives*, vol. 45, pp. 35–40, 1982.
28. J. K. Reddy and N. D. Lalwai. 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.
29. P. A. Cerutti. Prooxidant states and tumor promotion. *Science*, vol. 227, no. 4685, pp. 375-381, 1985.
30. B. G. Lake. Mechanisms of hepatocarcinogenicity of peroxisome-proliferating drugs and chemicals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 35, pp. 483–507, 1995
31. J. K. Reddy, M. Sambasiva Rao, D. L. Azarnoff, and S. Sell. 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.
32. 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.
33. R. C. Cattley, D. S. Marsman, and J. A. Popp. 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.

34. J. E. Fitzgerald, J. L. Sanyer, and J. L. Schardein. Carcinogen bioassay and mutagenicity studies with the hypolipidemic agent gemfibrozil. *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 67, no. 5, pp. 1105–1116, 1981.
35. J. K. Reddy and S. A. Qureshi. 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.
36. D. J. Svoboda and D. L. Azarnoff. Tumors in male rats fed ethyl chlorophenoxyisobutyrate, a hypolipidemic drug. *Cancer Research*, vol. 39, no. 9, pp. 3419–3428, 1979.
37. www.pfizer.ca/en/our-products/products/monograph/190
38. Frick M, Elo O, Hapala K, et al. Helsinki Heart Study: Primary-prevention trial with gemfibrozil in middle aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med* 317(20) : 1237-1245, 1987.
39. A. Lozada and C. A. Dujovne. Drug interactions with fibric acids. *Pharmacol. Ther.* 63: 163-176, 1994.
40. D. B. Miller and J. D. Spence. Clinical Pharmacokinetics of fibric acid derivatives (Fibrates) . *Clin. Pharmacokinet.* 34: 155-162 ,1998.
41. Kramer PJ. Genetic Toxicology. *J. Pharm Pharmacol* 50: 395-405, 1998.
42. Özalpın A., Temel Radyobioloji, T.C. Haliç Üniversitesi Yay. No: 3001, 1. Basım, 67-74, 2001.
43. Topaktaş M., Rencüzoğulları E., Sitogenetik Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Böl., 1995.
44. Natarajan A.T. Chromosome aberrations : past, present and future. *Mutation Research*, 504, 3-16, 2002.
45. 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.
46. 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.

47. Ulupınar M., Alaş A. Balık sitogenetiği ve Laboratuar Teknikleri kitabı, 1. baskı, 10, 2002.
48. GraphPad Software, InStat guide to choosing and interpreting statistical tests, GraphPad Software, Inc., San Diego California USA, www.graphpad.com, 1998.
49. M.H. Frick, O. Elo, K. Haapa, O.P. Heinonen, P. Heinsalmi, P. Helo, N. Engl, Helsinki Heart Study: Primary-Prevention Trial with Gemfibrozil in Middle-Aged Men with Dyslipidemia. *J. Med.* 317: 1237-1245, 1987.
50. Sanchez RM, Vinals M, Alegret M, Vazquez M, Adzet T, Merlos M, Laguna JC 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.
51. Laura E. Phelps ve Jacob D. Peuler. Evidence of direct smooth muscle relaxant effects of the fibrate gemfibrozil. *J. Smooth Muscle Res.* 46(3): 125-142, 2010.
52. Wang JS, Neuvonen M, Wen X, Backman JT, Neuvonen PJ. Gemfibrozil inhibits CYP2C8-mediated cerivastatin metabolism in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 30: 1352-1356, 2002.
53. Backman JT, Kyrklund C, Neuvonen M, Neuvonen PJ. Gemfibrozil greatly increases plasma concentrations of cerivastatin. *Clin. Pharmacol. Ther.* 72:685-691, 2002.
54. Niemi M, Backman JT, Neuvonen M, Neuvonen JT. Effects of gemfibrozil, itraconazole, and their combination on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of repaglinide : potentially hazardous interaction between gemfibrozil and repaglinide. *Diabetologia*, 46:347–351, 2003.
55. Cunningham ML, Collins BJ, Hejtmancik MR, Herbert RA, Travlos GS, Vallant MK, Stout MD. 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.
56. S. Kersten, B. Desvergne, and W. Wahli. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* May 25; 405(6785):421-4, 2000.

57. Isidori M, Nardelli A, Pascarella L, Rubino M, Parrella A. Toxic and genotoxic impact of fibrates and their photoproducts on non-target organisms. *Environ Int.* July; 33(5): 635-41, 2007.
58. Sallustio BC, Harkin LA, Mann MC, Krivickas SJ, Burcham PC. Genotoxicity of acyl glucuronide metabolites formed from clofibric acid and gemfibrozil: a novel role for phase-II-mediated bioactivation in the hepatocarcinogenicity of the parent aglycones. *Toxicol Appl Pharmacol.* Dec; 147(2):459-64, 1997.

7. ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini İstanbul'da tamamladı. 2004 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. Özel ve MEB' na bağlı çeşitli eğitim kurumlarında biyoloji öğretmenliği yaptı. 2009 yılında Eskişehir Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji anabilim dalında yüksek lisansa başladı. Ağustos 2009'da Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde Biolog olarak çalışmaya başladı. 2010 yılında Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji dalında yüksek lisansa başladı. Halen Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde çalışmakta olup yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.