

**ANTİBİYOTİK OLARAK KULLANILAN
OFLOKSASİN'İN İNSAN PERİFERAL
LENFOSİTLERİNDE SİTOTOKSİK VE
GENOTOKSİK ETKİLERİ
MUHAMMET AKSOY
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

T.C.
ORDU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANTİBİYOTİK OLARAK KULLANILAN OFLOKSASİN'İN İNSAN PERİFERAL
LENFOSİTLERİNDE SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİ**

MUHAMMET AKSOY

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AKADEMİK DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Vedat ŞEKEROĞLU

ORDU – 2012

T.C.
ORDU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından 05/07/2012 tarihinde yapılan sınav ile Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Haluk KEFELİOĞLU

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ömer ERTÜRK

Üye : Yrd. Doç. Dr. Vedat ŞEKEROĞLU

ONAY :

02/08/2012

Doç. Dr. M. Fikret BALTA

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdür

ANTİBİYOTİK OLARAK KULLANILAN OFLOKSASİN'İN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİ

ÖZ

Bu çalışmada, kinolon grubu ikinci nesil florokinolon antibiyotiği etken maddesi olan Ofloksasin'in (OFX), insan periferal lenfosit kültürlerinde *in vitro* kromozom anormalliği (KA), mikronükleus (MN) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) test yöntemleri kullanılarak genotoksik ve sitotoksik potansiyeli araştırılmıştır. Kültürler OFX'in 30, 60 ve 120 µg/ml'lik konsantrasyonlarına 48 saatlik süreyle maruz bırakılmıştır. OFX gruplarına ek olarak, negatif kontrol ve pozitif kontrol grupları da oluşturulmuştur.

OFX'in KKD, KA ve MN oluşumu üzerindeki etkileri incelendiğinde, negatif kontrole göre KA'de OFX'in dozlarına bağlı olmayan, KKD ve MN sıklığında ise doza bağlı artışlar gözlenmesine rağmen, bu artışların hiçbiri istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır. OFX'in PI, MI ve NBI değerleri üzerindeki etkileri incelendiğinde, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında bu parametrelerde OFX dozlarına bağlı olarak düşüşler belirlenmiştir. NBI'de, OFX'in 60 ve 120 µg/ml dozlarındaki düşüşler, MI'te 120 µg/ml dozundaki düşüş istatistiksel açıdan önemli bulunmuş, PI'deki düşüşler ile negatif kontrol arasında ise istatistiksel açıdan farklılık tespit edilmemiştir.

Çalışmanın sonuçlarına dayanarak, OFX'in insan periferal lenfositlerinde özellikle belirtilen yüksek dozlarda sitotoksik potansiyeli olduğu, fakat KA, KKD ve MN testlerinin sonuçları göz önüne alındığında genotoksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Ofloksasin, genotoksisite, sitotoksisite, insan periferal lenfosit hücreleri, kardeş kromatid değişimi, kromozomal anormallikleri, mikronükleus

CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF OFLOXACIN AS USED ANTIBIOTIC ON HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

ABSTRACT

The second-generation of quinolones, Ofloxacin (OFX) is a broad-spectrum flouroquinolone antibiotic used in the treatment of various bacterial infections. In this study, the cytotoxic and genotoxic effects of OFX in cultured human peripheral lymphocytes was aimed. The cytotoxicity and the genotoxicity of OFX were assessed by using various parameters: the chromosomal aberration (CA), the micronucleus (MN), the sister chromatid exchange assays, mitotic index (MI), nuclear division index (NDI) and proliferation index (PI). Cultures were treated with three doses of OFX (30, 60 and 120 µg/ml) at 48 h exposure period for all assays. In achieved end-points of the study, while the incidences of MN and frequency of SCE increased slightly depending on increase the OFX's doses, the increases of CA was non-dose-dependent. However, none of these increases were found statistically significant compared with negative control. On the other hand, dose-dependent decreases in NDI, MI and PI parameters were determined. Statistical analysis of these parameters pointed out that the decreases in NDI at 60 and 120 µg/ml doses and in MI at the highest one were significant but in PI.

In conclusion, the results of CA, MN and SCE assays and the analysis of MI, NDI and PI parameters indicated that OFX was non-genotoxic at all the concentrations and in all the test conditions of human peripheral blood lymphocyte cultures but has cytotoxic potential especially at the higher doses and in the same conditions.

Keywords: Ofloxacin; genotoxicity; cytotoxicity; human peripheral lymphocytes; sister chromatid exchange; chromosome aberration; micronucleus

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında değerli yardımlarını, eleştirileri ve sabrı ile büyük katkıda bulunan tez danışmanım Yrd.Doç.Dr. Vedat ŞEKEROĞLU'na,

Çalışmalarım sırasında yardımları ve eleştirileri ile büyük katkıda bulunan saygı değer hocam Yrd. Doç. Dr. Zülal ATLI ŞEKEROĞLU'na,

Yoğun laboratuvar çalışmalarında değerli vakitlerini ayırarak her türlü yardımı esirgemeyen, tüm çalışmalarımnda destek olan yüksek lisans öğrencileri Seval KONTAŞ Tuğçe ÇELİK, Derya KEÇECİ'ye,

Çalışmalarımnda desteklerini esirgemeyen Biyoloji Bölümü değerli hocalarıma,

Tez süresince destek ve yardımlarını esirgemeyen, her türlü manevi destek ile yanımda olan sevgili eşim Pınar AKSOY'a

ve hep yanımda olan güzel insanlara çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZ	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜRLER	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Antibiyotikler	4
2.1.1. Antibiyotiklerin Etki Güçlerine Göre Sınıflandırılmaları.....	4
2.1.2. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılmaları.....	5
2.2. Kinolonlar	5
2.2.1. Kinolonların Sınıflandırılmaları.....	6
2.2.1.1. Birinci kuşak kinolonlar.....	6
2.2.1.2. İkinci kuşak kinolonlar	7
2.2.1.3. Üçüncü kuşak kinolonlar	7
2.2.1.4. Dördüncü kuşak kinolonlar.....	7
2.2.2. Kinolonların Etki Mekanizması.....	8
2.3. Florokinolonlar	10
2.4. Ofloksasin	11
2.4.1. Ofloksasin'in Farmakolojik ve Farmakokinetik Özellikleri.....	13
2.5. Genetik Toksikoloji	14
2.6. Genetik Toksikite Testleri	17
2.6.1. Salmonella / mikrozom (Ames) Testi:.....	18
2.6.2. Memeli Hücre Kültürü Testleri.....	19
2.6.2.1. <i>In vitro</i> Kromozom Anormallikleri (KA) Testi	20
2.6.2.2. <i>In vitro</i> Mikronukleus (MN) Testi	21
2.6.2.3. Fare Lenfoma Testi (Mouse Lymphoma Assay=MLA)	22
2.6.2.4. <i>In vitro</i> Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Testi	23
2.6.2.5. Comet (Single Cell Gel Electrophoresis) Testi.....	24
2.7. Kinolonlarla Yapılan Genotoksikite Çalışmaları	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	30
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar.....	30
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	30
3.1.1.1. Ofloksasin	30
3.1.1.2. Dimethyl Sulfoxide (DMSO).....	31
3.1.1.3. Kromozom Medyumu	31
3.1.1.4. Mitomycin C (MMC).....	32
3.1.1.5. Cytochalasin B (Sigma)	32
3.1.1.6. Colcemid (Kolsemid, Kolşisin)	33
3.1.1.7. Hipotonik Eriyik	34
3.1.1.8. Fiksatif	34
3.1.1.9. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd).....	34
3.1.1.10. Sorensen Tamponu.....	35
3.1.1.11. Standart Saline Citrate (SSC) Eriyiği	35
3.1.1.12. Giemsa	35
3.1.1.13. Entellan	36

3.1.2. Kullanılan Cihazlar	36
3.1.2.1. Hassas Terazı	36
3.1.2.2. Biyogüvenlik Kabini	36
3.1.2.3. İnkübatör	36
3.1.2.4. Santrifüj.....	36
3.1.2.5. Vorteks Karıştırıcı.....	36
3.1.2.6. UV Kabin	36
3.1.2.7. Mikroskop	36
3.2. Kromozom Anormalliklerini (KA) ve Mitotik İndeksi (MI) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması	37
3.2.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması	37
3.2.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması	39
3.2.3. Mikroskopik İncelemeler ve Mikroskopta Fotoğraf Çekme.....	39
3.2.4. Mitotik İndeks (MI) ve Kromozom Anormalliklerinin (KA) Saptanması.....	39
3.2.4.1. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması.....	39
3.2.4.2. Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması	39
3.3. Mikronükleus (MN) Testi İçin Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması	40
3.3.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması	40
3.3.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması	42
3.3.3. Mikroskopik İncelemeler ve Mikroskopta Fotoğraf Çekme.....	42
3.3.4. Mikronükleus Sayısı ve Nükleus Bölünme İndeksinin (NBI) Saptanması.....	42
3.4. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Testi İçin Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması.....	45
3.4.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması	45
3.4.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması	45
3.4.3. Mikroskopik İncelemeler ve Mikroskopta Fotoğraf Çekme.....	46
3.4.4. Proliferasyon İndeksi (PI) ve Kardeş Kromatid Değişiminin (KKD) Saptanması	46
3.4.4.1. Proliferasyon İndeksinin (PI) Saptanması	46
3.4.4.2. Kardeş Kromatid Değişiminin (KKD) Saptanması	50
3.5. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi.....	50
4. BULGULAR.....	51
4.1. Ofloksasin'in Kromozom Anormalliği, Kardeş Kromatid Değişimi ve Mikronükleus Oluşumu Üzerindeki Etkileri.....	51
4.1.1. Ofloksasin'in Kromozom Anormalliklerinin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri.....	51
4.1.2. Ofloksasin'in Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Oluşumu Üzerindeki Etkileri	61
4.2. Ofloksasin Dozlarına Bağlı Olarak KKD, KA ve MN Arasındaki İlişki	72
4.3. Ofloksasin'in DNA Replikasyonu, Mitoz Bölünme ve Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri.....	73
4.3.1. Ofloksasin'in DNA Replikasyonu Üzerindeki Etkileri	73
4.3.2. Ofloksasin'in Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkileri.....	74
4.3.3. Ofloksasin'in Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri	75
4.4. Ofloksasin Dozlarına Bağlı Olarak PI, MI ve NBI Arasındaki İlişki	76
5. TARTIŞMA	78
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	90
7. KAYNAKLAR	93

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Kirolokinin saflaştırılmasıyla nalidiksik asitin elde edilmesi	6
Şekil 2.2. Florokinolonların etki mekanizmaları (Sardohan, 2006)	9
Şekil 2.3. Florokinolonların DNA'ya etkisi (Sardohan, 2006).....	10
Şekil 2.4. DNA replikasyonundaki iki enzimin işleyişi (Sardohan, 2006).....	10
Şekil 2.5. Norfloksasinin elde edilisi (Sardohan,2006).	12
Şekil 2.6. Ofloksasinin elde edilişi (Sardohan,2006)	12
Şekil 2.7. Genotoksinlerin DNA üzerindeki doğrudan ve dolaylı etki mekanizması (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011	15
Şekil 2.8. Genotoksinlerin DNA üzerindeki etki mekanizması ve sonuçları (Kirsch-Volders ve ark., 2003; Mateuca ve ark., 2006; Yırtıcı, 2007)	16
Şekil 3.1. Normal metafaz plağı (x1000).....	40
Şekil 3.2. Binükleat hücre (x400)	43
Şekil 3.3. Bir mikronükleus bulunduran binükleat hücre (x400)	43
Şekil 3.4. Mononükleat, binükleat, trinükleat ve tetranükleat hücreler (x 400)	44
Şekil 3.5. BrdUrd' nin DNA yapısına girmesi ile birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması.....	47
Şekil 3.6a. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomları (x100)...	48
Şekil 3.6b. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomları (x100)	49
Şekil 3.6c. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomları (x100)..	49
Şekil 3.7. Kardeş kromatid değişimi.....	50
Şekil 4.1. Kromatid Kırığı ve Fragment (30 µg/ ml) X1000	52
Şekil 4.2. Kromatid Kırığı (60 µg/ ml) X1000	52
Şekil 4.3. Kromatid Kırığı (120 µg/ ml) X1000	53
Şekil 4.4. Fragment (60 µg/ ml) X1000.....	53
Şekil 4.5. Fragment (120 µg/ ml) X1000.....	54
Şekil 4.6. Kardeş Kromatit Birleşmesi (30 µg/ ml) X1000	54
Şekil 4.7. Kardeş Kromatit Birleşmesi (60 µg/ ml) X1000	55
Şekil 4.8. Kardeş Kromatit Birleşmesi (120 µg/ ml) X1000	55
Şekil 4.9. Disentrik Kromozom ve kromatit kırığı (30 µg/ ml) X1000.....	56
Şekil 4.10. Poliploidi (30 µg/ ml) X1000	56
Şekil 4.11. Kromozom Kırığı ve Fragment (30 µg/ ml) X1000	57
Şekil 4.12. Kromozom Kırığı (60 µg/ ml) X1000	57

Şekil 4.13. Kromozom Kırığı (120 µg/ ml) X1000	58
Şekil 4.14. Poliploidi (120 µg/ ml) X1000	58
Şekil 4.15. Ofloksasin'in test edilen dozları ile KA arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı	59
Şekil 4.16. Ofloksasin'in test edilen dozları ile AHO arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı	59
Şekil 4.17. Ofloksasin'in test edilen dozları ile KKD arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı	61
Şekil 4.18. 30 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler (X1000)	62
Şekil 4.19. 30 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler (X1000)	62
Şekil 4.20. 30 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler (X1000)	63
Şekil 4.21. 60 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler (X1000)	63
Şekil 4.22. 60 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler (X1000)	64
Şekil 4.23. 60 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler (X1000)	64
Şekil 4.24. 120 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler (X1000)	65
Şekil 4.25. 120 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler (X1000)	65
Şekil 4.26. 120 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler (X1000)	66
Şekil 4.27. Ofloksasin'in test edilen dozları ile % MN arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı	68
Şekil 4.28. Ofloksasin'in test edilen dozları ile MN arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı	69
Şekil 4.29. Bir mikronükleus ve iki mikronükleus içeren binükleat hücre (30 µg/ml) X400	69
Şekil 4.30. Bir mikronükleus ve iki mikronükleus içeren binükleat hücre (60 µg/ml) X400.....	69

Şekil 4.31. Bir mikronükleus ve iki mikronükleus içeren binükleat hücre (120 µg/ml) X400.....	70
Şekil 4.32. Ofloksasin'in test edilen dozları ile %KA ve KKD/Hücre arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı.....	72
Şekil 4.33. Ofloksasin'in test edilen dozları ile %MN ve KKD/Hücre arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı.....	72
Şekil 4.34. Ofloksasin'in test edilen dozları ile %MN ve %KA arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı	73
Şekil 4.35. Ofloksasin'in test edilen dozları ile PI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı	74
Şekil 4.36. Ofloksasin'in test edilen dozları ile % MI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı	74
Şekil 4.37. Ofloksasin'in test edilen dozları ile NBI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı	75
Şekil 4.38. Ofloksasinin test edilen dozları ile NBI ve MI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı	76
Şekil 4.39. Ofloksasinin test edilen dozları ile PI ve MI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı	76
Şekil 4.40. Ofloksasinin test edilen dozları ile PI ve NBI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı	77

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 2.1. Kinolonların sınıflandırılması	8
Çizelge 4.1. Ofloksasin'in sebep olduğu kromozomal anormallikler ve % MN, KA ve AHO'sı üzerine etkisi	60
Çizelge 4.2. Ofloksasin'in sebep olduğu kardeş kromatid değişimi ve KKD ve PI değerleri	67
Çizelge 4.3. Hücrelerin nükleus sayısına göre, binükleat hücrelerin MN sayısına göre dağılımları ve % MN ve NBI	71

SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

AHO: Anormal Hücre Ortalaması

AIDS: Acquired Immuno Deficiency Syndrome / Edinilmiş Yetersiz Bağışıklık Sistemi Sendromu

ATP: Adenozintrifosfat

BrdU/ BrdUrd: 5- bromo-2- deoksiüridin

CPFX: Ciprofloksasin

Cyt-B: Cytochalasin- B / Sitokalsin- B

DMSO: Simetil sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

ENX: Enoksasin

GFX: Gatifloksasin

GRFX: Grepafloksasin

HPRT: Hipoksantin guanin fosforibosil transferaz

ISCN: İnsan Sitogenetik adlandırma Sistemi / International System for Human Sitogenetic Nomenclature

KA: Kromozom Anormallikleri

KKD /SCE: Kardeş Kromatid Değişimleri / Sister Chromatid Exchange

LOFX: Leuofloksasin

MI: Miotik indeks

MMC: Mitomycin- C/ mitomisin-C

MN: Mikronükleus

MNBN: Mikronükleuslu Binükleat

NA: Nalidiksik asit

NBI: Nükleer Bölünme İndeksi / Nuclear Division İndeks

NCE: Normokromatik eritrositler

NFLX: Norfloksasin

OA: Oksolinik Asit

OFX: Ofloksasin

PA: Promidik Asit

PCE: Polikromatik eritrosit

PI: Proliferasyon İndeksi

PPA: Pipemidik Asit

PZX: Pazufloksasin

SARS: Şiddetli akut solunum yolu sendromu / Severe acute respiratory syndrome

SFX: Siparfloksasin

SSC: Standart Salin Sitrat

TFX: Temofloksasin

TFT: Triflorotimidin

TK: Timidin Kinaz

TOFX: Tosufloksasin

UDS: Unschudeled DNA Synthesis (Programlanmış DNA Sentezi)

UV: Ultraviyole

XPRT: Ksantin guanin fosforibasil transferaz

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

1.GİRİŞ

Enfeksiyonlar tarih boyunca insan hayatını sonlandırmada en önemli etkenlerden biri olmuştur, koruyucu ve tedavi edici hekimlikteki ilerlemelere rağmen güncelliğini kaybetmemiştir (Baştürk, 2005; Altay, 2008). İnsanlık tarihi boyunca toplumlar, tüberküloz, veba, kolera gibi bulaşıcı hastalıklarla mücadele etmiş ve günümüzde de AIDS, SARS, grip pandemileri gibi enfeksiyon hastalıkları ile bu mücadelesini devam ettirmektedir. İnsanla mikroorganizmalar arasındaki etkileşim hakkındaki bilgimiz, adım adım gerçekleştirilen keşiflerin bir sonucudur. Hastalıkları felsefeden ayıran Hipokrat, mikroskobu bulan Leeuwenhoek, sterilizasyonun önemini fark eden Lister, immünolojinin ilk aşısını yapan Jenner, Pasteur ve antibiyotiklerin babası Fleming enfeksiyon hastalıklarının kilometre taşlarıdır. Enfeksiyon hastalıklarının azalması multifaktöriyel olmasına rağmen üç ana faktör üzerinde durulabilir. Bunlar, artmış sanitasyon ve hijyenik koşullar, aşıların geliştirilmesi ve 1930-1940'lı yıllardan başlayarak güvenli ve etkili antimikrobiyal ajanların keşfi ve üretimidir (Altay, 2008).

Tüm dünyada görülen ölümlerin en önemli sebeplerinden biri enfeksiyon hastalıklarıdır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) istatistiklerine göre, 2004 yılında dünyada her beş ölümden biri enfeksiyöz ya da paraziter sebeplerle oluşmuştur. Bu sonuçlar, çarpıcı olmasına rağmen, aslında enfeksiyon hastalıklarına bağlı ölüm oranlarını gerçek değerlerinden az göstermektedir. Çünkü ölüme yol açan pekçok enfeksiyöz sebep, Dünya Sağlık Örgütü'nün enfeksiyöz ve paraziter hastalıklar kategorisine dahil edilmemiştir. Bunun örnekleri: Enfeksiyon sonucu gelişen kanserler (Hepatit B'ye bağlı hepatoselüler karsinoma, Human papilloma virus enfeksiyonuna bağlı servikal kanser gibi), poststreptokokal romatizmal kalp hastalığına bağlı kardiyovasküler ölümler ve puerperal sepsise bağlı anne ölümleridir. Afrika'da ölümlerin %53'ü, Amerika'da %7'si, Avrupa'da ise %2'si enfeksiyonlarla ilişkilidir (<http://www.who.int/healthinfo/statistics>; Altay, 2008).

İlk ve orta çağlarda mikroorganizmaların neden oldukları enfeksiyon hastalıklarının tedavileri için otlar, ağaç kabukları, baharatlar ve diğer karışımlar kullanılmıştır. Bu durum 1908' de Alman bakteriyolog Paul Ehrlich'in bazı bakteriler üzerine kesin olarak zararlı, konak hücreye ise daha az zararlı bazı kimyasal maddeleri bilimsel metodlarla araştırıp ortaya koymasına kadar sürmüştür. 1935'te Alman farmakolog Dogmagk'ın ilk sülfonamidleri tedaviye sokması ile bu sahada esaslı

ilerlemeler olmuştur. 19. yüzyılın ortalarında Louis Pasteur'ün bazı mikroorganizmaların diğerlerini öldürdüğü şeklindeki gözleminden sonra, 1924 yılında ilk defa İskoç bilim adamı Alexander Fleming tarafından *Penicillium notatum*'dan izole edilen penisilinin keşfi antibiyotik çağını başlatmış ve enfeksiyonlarla mücadelede bugüne kadar geliştirilecek olan pek çok antibiyotiğe ilham kaynağı olmuştur. Penisilin ve Sülfonamidlerden sonra özellikle 1930-1960'lı yıllar arasında, başta daha geniş spektrumlu penisilinler olmak üzere hızla yeni antibiyotikler geliştirilerek insan ve hayvanlarda birçok enfeksiyon başarıyla tedavi edilmeye başlanmıştır. En ufak bir enfeksiyondan çok daha ciddi rahatsızlıklara kadar çok geniş bir alanda kullanılan ve yaşam karşıtı ilaçları ifade eden antibiyotikler, yarım yüzyılı aşkın bir süredir zararlı mikroorganizmaların hayatta kalmalarını önleyerek milyonlarca hayat kurtarmıştır (Baştürk, 2005; Sarmah ve ark., 2006; Yalap, 2008; <http://antibiyotikler.com>, 25.09.2010; Afan, 2011).

Antibiyotik tüm dünyada en sık kullanılan ilaç grubudur. Ülkemizde de tüm dünyada olduğu gibi yatan hastalarda en fazla tüketilen ilaçlar arasında antibiyotikler yer almaktadır (Arda, 2004; Şardan, 2004; Devrim ve ark., 2009). Antibiyotik kullanımının her geçen gün artmasından dolayı enfeksiyon hastalıkları açısından en önemli sorun olan antibiyotik direnci de giderek artmaktadır. Antibiyotiklerin gereksiz ve uygun olmayan kullanımı, hastalarda yan etki sıklığında artışa ve antibakteriyel direncin artmasına bağlı olarak tedavide başarısızlığına neden olmaktadır ve bu durum sürekli yeni antibiyotik çeşitlerinin piyasaya sürülmesine yol açmaktadır (Bartlett ve Froggatt, 1995; Wise ve ark., 1998; Durupınar, 2001; Aktürk, 2009; Devrim ve ark., 2009; Afan, 2011).

İlaçlar bir hastalığın teşhisini, iyileştirilmesini ya da semptomlarının azaltılması amacıyla tedavisini veya bir hastalıktan korunmayı mümkün kılan, canlılara değişik uygulama yöntemleri ile verilen doğal, yarı sentetik veya sentetik kimyasal preparatlardır (WHO, 1969; Afan, 2011). İnsan sağlığını ve hayat kalitesini artırmak amacıyla sürekli yeni etken maddeler içeren yeni ilaçlar üretilmektedir. Yapılan tüm klinik öncesi ve klinik testlere rağmen ilaçların insanlarda kullanım emniyeti tam olarak belirlenmemektedir ve ilaçlar bazen istenmeyen yan etkiler ve sağlık problemleri ortaya çıkarmaktadır. Hatta bazı ilaçların DNA moleküllerinde mutasyona yol açabildiği ve bu tip mutajenik (mutasyona yol açan) ilaçların çoğunun karsinojenik (kansere yol açan) ve teratojenik (doğumsal anomalilere neden olan) potansiyele de sahip olduğu belirtilmektedir. Yapılan pek çok çalışma ile bazı ilaçların genotoksik etkiye yol açtığı açıkça gösterilmiştir ve bu tip ilaçların listesi her geçen gün uzamaktadır (Snyder ve Green, 2001; Saygı, 2003;

Vural, 2005; Brambilla ve Mortelli, 2009; Afan, 2011). Piyasada bulunan 838 ilacın genotoksisite ve karsinojenitesinin değerlendirildiği bir çalışmada, değerlendirilen ilaçların %56,3'ünün (472 ilaç) yapılan çeşitli genotoksisite ve karsinojenite testlerinden en az birine pozitif cevap verdiği belirtilmiştir (Brambilla ve Mortelli, 2009). Bu nedenle yeni ilaç gruplarının etkinlik ve güvenlilik açısından titizlikle değerlendirilmesi ve insanlarda emniyetli kullanımı için toksisite testleri giderek daha büyük önem kazanmaktadır (Saygı, 2003).

Yapılan *in vivo* ve *in vitro* alışmalar ile antibiyotik olarak kullanılan bazı ilaçların sitotoksik ve genotoksik etkilerinin de olabileceği gösterilmiştir (Snyder ve Green, 2001; Snyder ve ark., 2006; Brambilla ve Martelli, 2009; Afan, 2011).

Ofloksasin birçok hücresel fonksiyonu etkilemesi ve oldukça geniş bir etki spektrumuna sahip olması nedeniyle araştırmacılar tarafından birçok alanda kullanılmaktadır. Ancak literatürde ofloksasin'in insan periferal lenfositleri üzerine sitotoksik ve genotoksik etkisi ile ilgili çok fazla çalışma yoktur. Bu nedenle bu çalışmadaki amacımız; yaygın bir şekilde kullanılan bir antibiyotik etken maddesi olan ofloksasin'in, insan lenfosit kültürlerinde *in vitro* sitotoksik etkisini mitotik indeks, nükleer bölünme indeksi, proliferasyon indeksi parametreleri ile genotoksik etkisini ise mikronkleus testi, kromozom anormallikleri ve kardeş kromatit değişimi yöntemleriyle araştırarak, bu ilacın insanda sitotoksik ve genotoksik potansiyelinin bulunup bulunmadığını ortaya çıkarabilmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Antibiyotikler

Sözlüklere göre Yunanca *anti* (karşı) ve *bios* (yaşam) sözcüklerinden türetilen antibiyotik sözcüğü, yine sözlüklerdeki tanımlamasıyla “Bitkilerde, özellikle küf mantarlarında bulunan ya da yapay olarak üretilen, bakteri ve diğer mikroorganizmaların gelişimini durduran ya da onları yok eden maddelerin ortak adıdır” (Aktuğlu, 1997). *Antibiosis* sözcüğü ise, yine sözlüklerdeki tanımlamasına göre, “Mikroorganizmalar arasındaki karşıtlık”tır (Aktuğlu, 1997).

Antibiyotikler, bazı bakteriler ve çoğunlukla mantarlar tarafından üreme ortamlarında oluşturulan ve düşük konsantrasyonlarda bile diğer mikroorganizmaların üremelerinin engellenmesi ya da bu mikroorganizmaların öldürülmesi amacıyla kullanılan kemoterapötik ajanlardır. Uzun yıllardır enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotikler, bugün için en önemli ilaç grubunu oluşturmaktadır. Daha önceden sadece mikroorganizmalar tarafından üretilen antibiyotiklerin çoğu günümüzde sentetik ya da semisentetik yollarla da elde edilebilmektedir (Chrintensen, 1998; Bilgehan, 1994; Erdem, 2004; Yalap, 2008; Aktürk, 2009; Afan, 2011). Enfeksiyonun tedavi edilmesi, enfeksiyon periyodunun kısaltılması, enfeksiyonun anatomik boşluklara yayılımının ve sistemik bulguların ortaya çıkmasının önlenmesi açısından antibiyotiklerin kullanımları gereklidir (Abbott, 2000; Epstein ve ark., 2000; Afan, 2011).

2.1.1. Antibiyotiklerin Etki Güçlerine Göre Sınıflandırılmaları

Antibiyotikler, vücut sıvılarında oluşturdukları konsantrasyonlarda, mikroorganizmalar üzerindeki etki derecelerine göre iki gruba ayrılır (Kayaalp, 1991; Akkan, 1997).

a. Bakteriostatikler: Bunlar bakteri hücrelerinin gelişmesini veya üremesini önlerler. Gelişmesi ve üremesi duran bakteriler, vücudun savunma mekanizmaları tarafından kolaylıkla yok edilirler. Tetrasiklinler, mikonazol, metrodinazol linkozamidler, makrolidler, sülfonamidler ve amfenikoller bakteriostatik etkiye sahip antibiyotiklere örnektir.

b. Bakterisidler: Bunlar bakterileri dolaysız olarak yok ederler. Beta-laktamlar, florokinolonlar, vankomisin, teikoplanin ve rifamisin etkiye sahip antibiyotiklere örnektir.

2.1.2. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılmaları

Antibiyotiklerin etkili olabilmeleri için, bakteri hücresi içine girerek metabolize veya inaktive olmadan bakterinin belli bir fonksiyonunu inhibe etmeleri gerekmektedir. Antibiyotikler bu etkilerini belirli bir hedefi etkileyerek gösterirler. Antibiyotikler genel olarak beş temel hedef üzerinden etki göstermektedirler:

1. Hücre duvarı sentezinin inhibisyonu (örneğin; β -laktamlar, sikloserin)
2. Hücre membranının yapı ve fonksiyonunun bozulması (örneğin; kandisein, polimiksinler)
3. Protein sentezinin inhibisyonu (örneğin; tetrasiklinler, aminoglikozidler, makrolidler ve linkozamidler)
4. Nükleik asit sentezinin inhibisyonu (örneğin; florokinolonlar, rifamisinler, aktinomisinler ve mitomisinler)
5. Antimetabolik etki (örneğin; sülfonamidler, sülfonlar) (Burns, 1995; Fraimow ve Abrutyn, 1995; Akkan,1997; Durupınar, 2001; Baştürk, 2005; Gangle, 2005; Aktürk, 2009).

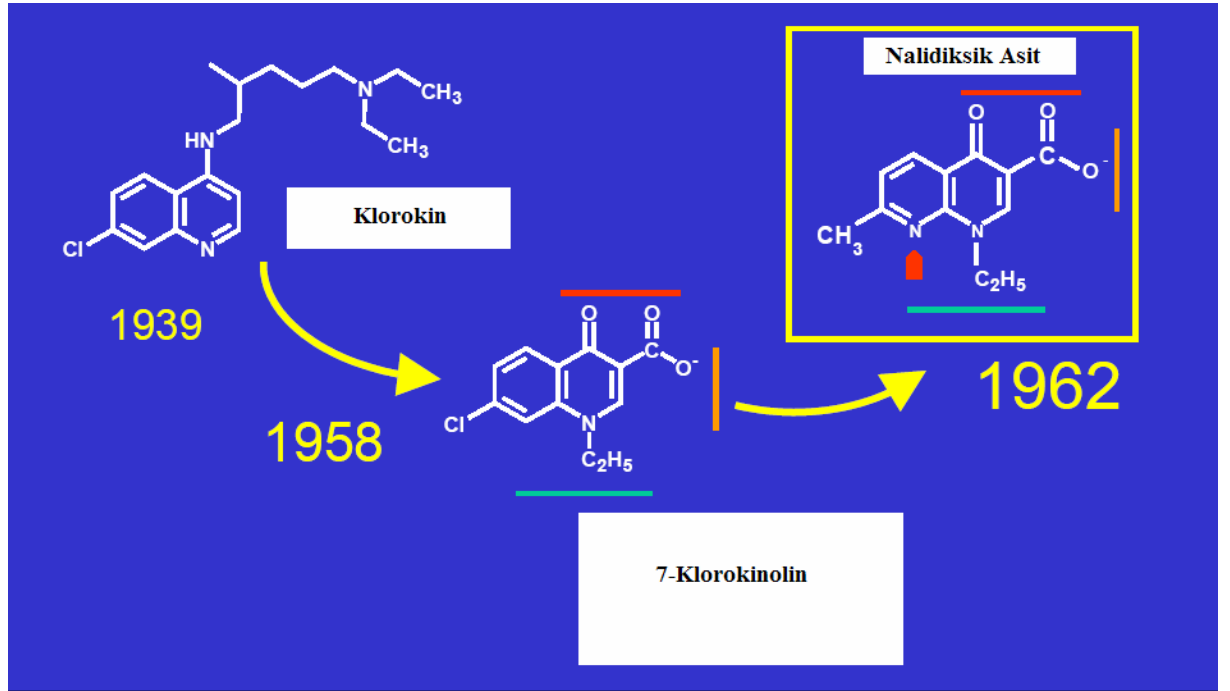
Türkiye’de en sık kullanılan antibiyotikler penisillin (%45), sefalosporinler (%20), makrolidler (%17.5), kinolonlar (%17) ve tetrasiklinler (%4)’dir (Karabay ve Hoşoğlu, 2008; Yalap, 2008; Afan, 2011),.

2.2. Kinolonlar

Kinolonlar, canlı mikroorganizmalardan elde edilen birçok antibiyotikten farklı olarak kimyasal yollarla elde edilen sentetik maddelerdir. Bu nedenle aslında antibiyotik değil, kemoterapötik maddelerdir. Bu özellikleri laboratuvar koşullarında çok sayıda kinolon molekülünün sentezlenebilmesine olanak sağlamaktadır. Leshner ve arkadaşları tarafından 1962 yılında antimalaryal bir ilaç olan klorokinin saflaştırılması sırasında elde edilen bir ara üründen üretilmiştir (şekil 2.1) (Andriole, 2005; Sardohan, 2006; Ulusoy, 2010).

Nalidiksik asit sadece Gram negatif aerobik basillere etkili, dar etki alanlı bir bileşik olup idrarda yüksek yoğunluklara ulaşabildiğinden idrar yolu enfeksiyonlarında kullanılan bir antibakteriyeldir. Gram pozitif bakteriler, *Pseudomonas aeruginosa* ve anaerob bakterilere etkili olmayışı nedeniyle klinik kullanımı sadece üriner sistem enfeksiyonları ile kısıtlı kalmıştır. Ancak daha sonraki yıllarda nalidiksik asite karşı bakterilerin kolay direnç oluşturmaması ve bu bileşiğin özellikle plazmid kökenli dirence duyarsız oluşu dikkatleri tekrar bu grup üzerine toplamıştır. Daha sonra 1980’li yıllarda

floranmış kinolonlar, 4-kinolonlar, kinolon karboksilik asitler de denilen yeni kinolon türevleri klinik kullanıma girmiş ve çeşitli infeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Özalp, 2002; Dökmeci ve ark., 1992; Sardohan, 2006). 6 numaralı karbon atomuna flor veya diğer halojenlerin bağlanması, özellikle stafilkoklara karşı olmak üzere gram pozitif bakteriler üzerinde etkinliğini artırmıştır (Goldstein, 1987; Denizbaşı ve Özüner, 1992). 7 numaralı karbon atomuna piperazin eklenmesiyle *Pseudomonas* cinsine karşı etki sağlamıştır (Fass, 1985; Denizbaşı ve Özüner, 1992). Norfloksasin (NOFX) (1986) bu grubun ilk üyesi olup bunu siprofloksasin (COFX) (1987) ve ofloksasin (OFX) (1988) izlemiştir (Bilgehan, 1995; Mülazımoğlu, 1999; Melli, 2004; Başustaoğlu ve Akova, 1999; Polk, 1989; Andriole, 1993; Baştürk, 2005; Ulusoy, 2010).



Şekil 2.1. Klorokin saflastırılmasıyla nalidiksik asitin elde edilmesi (Sardohan, 2006)

2.2.1. Kinolonların Sınıflandırılmaları

2.2.1.1. Birinci kuşak kinolonlar

Kinolon çekirdeğinde yapılan değişikliklerle elde edilen nalidiksik asit ve ardından sentezlenen oksolinik asit, sinoksasin, piromidik asit, miloksasin, akrosoksasin, pipemidik asit ve flumekin gibi kinolon türevleri Birinci Kuşak Kinolonlar olarak adlandırılmıştır (Alabaz, 2011).

2.2.1.2. İkinci kuşak kinolonlar

Molekülün C-6 pozisyonuna bir flor eklenmesiyle “Florokinolonlar” elde edilmiştir. Geniş etki spektrumlu, iyi farmakokinetik özellikleri olan, direnç gelişiminin daha yavaş olan ve yaygın kullanım alanına sahip ajanlar “İkinci Kuşak Kinolonlar”dır (Alabaz, 2011).

2.2.1.3. Üçüncü kuşak kinolonlar

1990’lı yıllarda ise başta pnömokoklar olmak üzere çok iyi gram-pozitif etkinliklerinin yanı sıra orta derecede anaerop bakterilere de etkinlikleri artırılmış bulunan ‘Üçüncü Kuşak Florokinolonlar’ geliştirmiştir. Kinolon çekirdeğinde C-7 pozisyonunda piperazin grubundaki değişiklik ile antipnömokokal aktivite kazanmışlardır. Levofloksasin (LOFX), grepafloksasin (GRFX), sparfloksasin (SFX), gatifloksasin (GFX), temafloksasin (TFX), tosufloksasin (TOFX) ve pazufloksasin (PZX) bunlar arasındadır. Bu gruptan sadece levofloksasin uzun yıllar sorunsuz ve yaygın olarak kullanılmış ve halen de kullanımına devam edilmektedir (Alabaz, 2011).

2.2.1.4. Dördüncü kuşak kinolonlar

1990’ların sonu ve 2000’li yıllarda ise, trovafloksasin, klinafloksasin, sitafloksasin, moksifloksasin ve gemifloksasinin yer aldığı ‘Dördüncü Kuşak Kinolonlar’ gündeme gelmiştir Bunlar pnömokoklara karşı daha da artmış etkinlik yanında çok güçlü anti-anaerop etkinliğe sahip moleküllerdir. Ancak bunlar içinde de günümüzde sadece moksifloksasin ve gemifloksasin kullanılmakta olup, diğerleri yan etkileri nedeniyle kulanımdan kaldırılmışlardır (Alabaz, 2011).

Çizelge 2.1. Kinolonların sınıflandırılması (Alabaz, 2011)

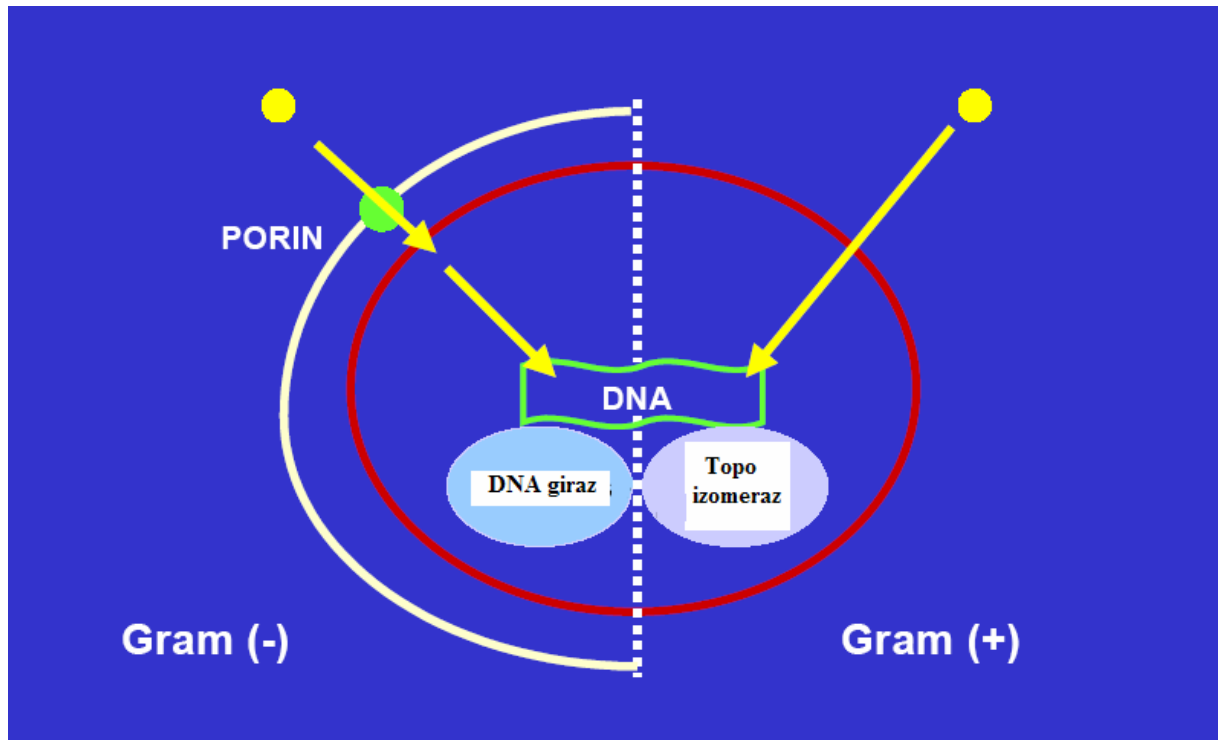
	Birinci kuşak kinolonlar	İkinci kuşak kinolonlar	Üçüncü kuşak kinolonlar	Dördüncü kuşak kinolonlar
	Nalidiksik asit (1962)	Norfloksasin (1986)	Temofloksasin (1992)	Trovafloksasin (1998)
Üye ilaçlar	Oksolinik asit	Siprofloksasin (1987)	Levofloksasin (1997)	Gatifloksasin (1999)
	Piromidik asit	Ofloksasin (1988)	Sparfloksasin (1997)	Moksifloksasin (1999)
	Pipemidik asit	Pefloksasin	Grepafloksasin (1998)	Clinafloksasin (2000)
	Flumekin	Enoksasin (1992)	Tosufloksasin	Gemifloksasin (2000)
	Miloksasin	Lomefloksasin (1992)	Pazufloksasin	Sitafloksasin (2000)
	Akrosoksasin	Fleroksasin		
	Sinoksasin	Rufloksasin		

2.2.2. Kinolonların Etki Mekanizması

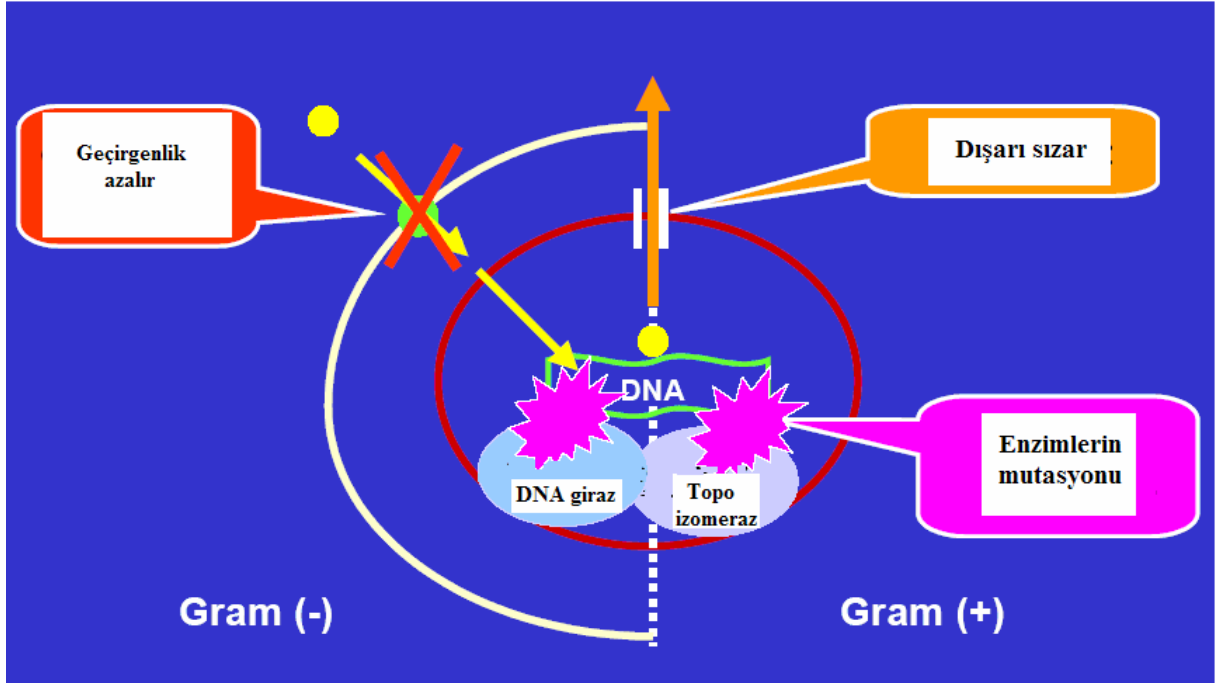
Kinolonlar DNA sentezini direkt olarak inhibe eden tek antimikrobiyal gruptur; etkileri bakterisidaldir. Kinolonların bakteri hücresindeki temel hedefleri DNA giraz (topoizomeraz II) ve topoizomeraz IV enzimidir. Genel olarak gram-negatif bakteriyel aktivite DNA giraz, gram-pozitif bakteriyel aktivite ise topoizomerazların inhibisyonu ile ilişkilidir (Arda ve Ulusoy, 2008; Hooper ve ark., 2010; Alabaz, 2011). DNA giraz enzimi topoizomeraz emzimleri adıyla bilinen ve DNA'nın replikasyon, transkripsiyon işlemleri sırasında DNA'nın topolojik izomerlerinin birbirine dönüşümünü sağlayan enzimlerin bakteri hücrelerinde bulunan bir tipidir (Cozarelli, 1980; Denizbaşı ve Özüner, 1992). Bakteri kromozomu çift sarmallı bir DNA iplikçik olup, bakteri hücresinin 200-300 katı uzunluğundadır. Kromozom kendisinden çok daha küçük olan bakteri hücresinin içine yerleşebilmek için kendi etrafında kıvrımlar oluşturur. Bu olay bile kromozomun bakteri hücresi içine yerleşmesine yetmez ve kıvrımlar bir RNA çekirdeği etrafına ikinci kez ve bu defa ters yönde sıkışmaya uğrar. Bu olaya “supercoiling” adı verilir. Bunun sonunda kromozom ancak bakteri içine yerleşebilir. DNA işlevlerinin devam ettirilebilmesi ve bakterinin yaşamı için “supercoiling” olayı son derece önemlidir. Bakteri hücresinde bu olayı yöneten, kromozom halkalarını önce açıp daha sık kıvrım yapılmasını sağlayan ve sonra açılan uçları yapıştıran enzim DNA giraz enzimidir. Kinolonlar, bakteri hücresinde DNA giraz enzimiyle bağlanarak enzim fonksiyonlarını

inhibe ederler ve “supercoiling” olayı engellenir. Bunun sonucunda bölünemeyen bakteriler anormal şekilde uzayarak ölürler (Arda ve Ulusoy, 2008; Hooper ve ark., 2010; Alabaz, 2011).

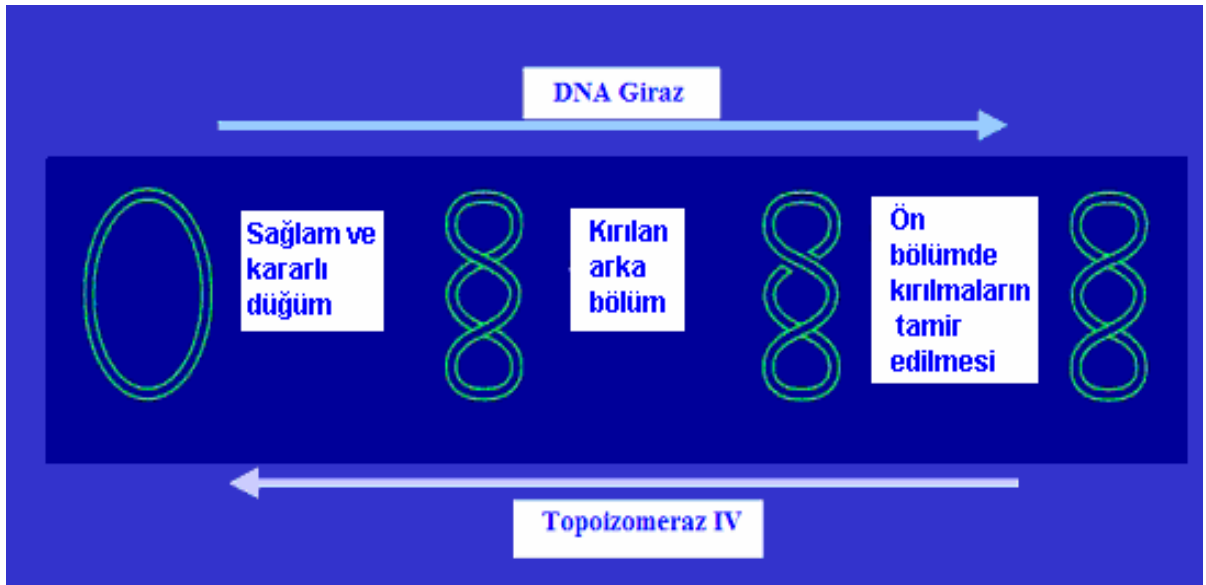
Bakteri DNA’sının fazla kıvrımlı negatif süper sarmal şeklini almasını DNA giraz enzimi sağlar. Kinolonlar ayrıca topoizomeraz IV *gyrA* ve *gyrB*’ye benzeyen *parC* ve *parE* genlerinden oluşur. Nalidiksik asid türevi olan florokinolonlar, DNA’yı negatif süpersarmal hale getiren DNA- giraz (topoizomeraz II) enzimini, alfa- alt birimine bağlanarak inhibe ederler. Böylece bakteriler bölünemezler ve uzayıp ölürler. Novobiosin, DNA- girazın beta- alt birimini etkiler. Siprofloksasin ve ofloksasin ayrıca, bakteri sitoplazma membranını zedeleyerek, diğerlerine göre daha güçlü antibakteriyel etki yaparlar. Geniş spektrumlu ve bakterisid etkilidirler (Özalp, 2002; Dökmeci ve ark., 1992; Kayaalp, 2000; Cross, 2001; Sardohan, 2006).



Şekil 2.2. Florokinolonların etki mekanizmaları (Sardohan, 2006)



Şekil 2.3. Florokinolonların DNA'ya etkisi (Sardohan, 2006)



Şekil 2.4. DNA replikasyonundaki iki enzimin işleyişi (Sardohan, 2006).

2.3. Florokinolonlar

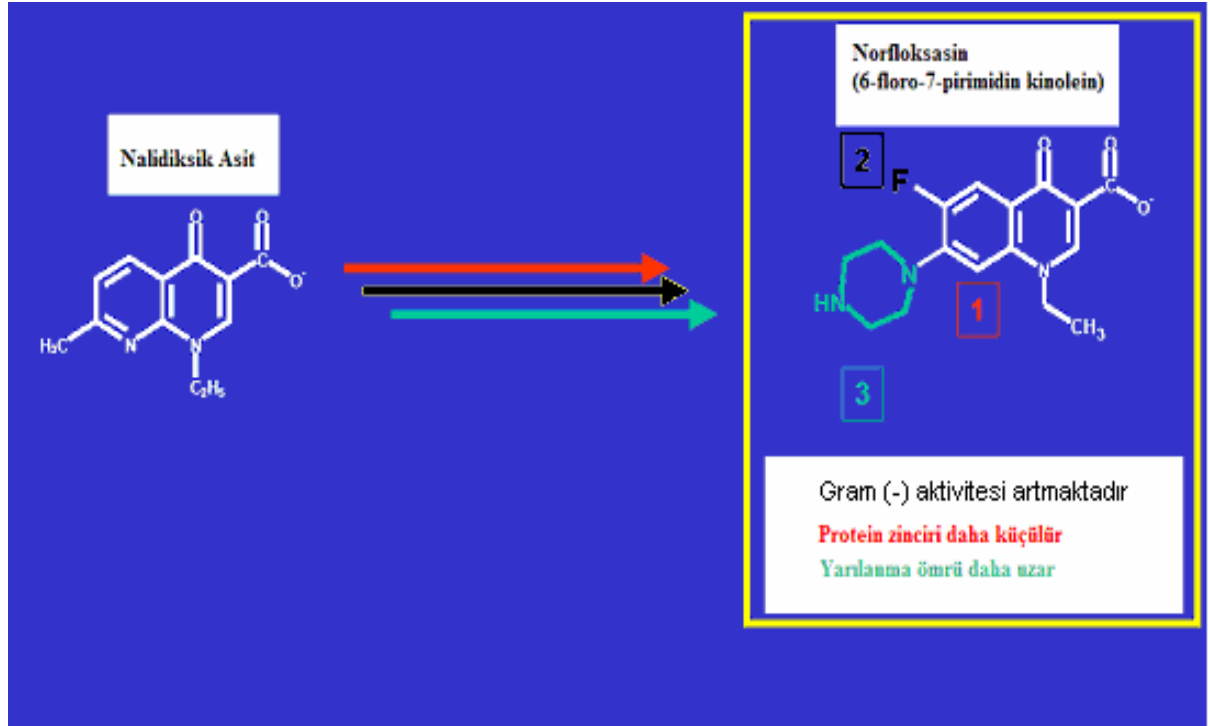
Florokinolonlar, geniş spektrumlu ve bakterisid etkili antimikrobiyal ilaçlardır. Kimyasal olarak diğer antimikrobiklerle ilişkili olmayan bu ilaçlar nalidiksik asidin florlanmış sentetik benzerleridir. Nalidiksik asit 1960'lı yıllarda kinolonların ilk üyesi olarak kullanıma girmiş olmasına karşın sadece üriner sistem enfeksiyonlarında kullanım alanı bulabilmiştir. Nalidiksik asit ve pipemidik asit gibi kinolonlar dokularda yeterli konsantrasyon oluşturamadıkları için sistemik enfeksiyonlarda etkili değildirler.

Spektrumları dardır. Bunlara ek olarak tedavi sırasında çok çabuk direnç gelişir. Bu olumsuzlukların giderilmesi amacıyla nalidiksik asit üzerine yapılan araştırmalar sonucunda 1980'li yıllarda nalidiksik asitin florlanmış analogları olan florokinolonlar sentez edilmiştir (Özalp, 2002; Sardohan, 2006). Florokinolonlar yapıca nalidiksik aside benzeyen 6-floro-4-kinolon karboksilik asit türevleridir. 7 numaralı karbon atomuna bağlanmış bir piperazin halkası içerirler. Esas olarak, 1 numaralı karbon atomuna ve/veya piperazin halkası üzerindeki substituentleri değiştirmek suretiyle birçok florokinolon ilaç türü üretilmiştir. Bunlardan halen en fazla incelenenler siprofloksasin, ofloksasin, norfloksasin, enoksasin, pefloksasin ve fleroksasin'dir. Diğer türevler arasında amifloksasin, lomefloksasin, sparfloksasin, temafloksasin ve florsuz atipik bir türev olan pipemidik asit bulunur (Kayaalp 2000; Barbosa ve ark., 2001; Espinosa-Mansilla ve ark., 2005; Sardohan, 2006). Florokinolonlar, nalidiksik aside göre üstünlük sağlayan özelliklere sahiptirler. Geniş antimikrobik spektrum, üstün antibakteriyal etki, sistemik etki oluşturabilecek konsantrasyon ve yavaş direnç gelişimi gibi özellikleri nedeniyle tedaviye girişlerinden bu yana terapötik değerleri üzerine en fazla çalışılan antimikrobik ilaçlardır. Florokinolonların ilk üyesi ve en az etkili olanı norfloksasindir. Daha sonra siprofloksasin, enoksasin, ofloksasin, amifloksasin, pefloksasin, lomefloksasin, sparfloksasin gibi yeni kinolonlar bu grupta yerlerini almışlardır. Bunların içinde en fazla kullanım alanı bulunanı siprofloksasindir (Özalp, 2002; Sardohan, 2006). Moleküllerinde 8 numaralı atom genel olarak karbon fakat enoksasin ve pipemidik asitte azottur. 6 numaralı pozisyonda flor bulunması gram-pozitif bakterilere karşı etkinlik sağlar. 7 numaralı karbona bağlı piperazin halkası gram-negatif bakterilere karşı etkinliği artırır. Molekülün karboksil grubu ve keto grubu olasılıkla enol şekline geçerek Ca²⁺ ile bağlanma sağlar ve böylece ilacın gram-negatif bakterilerin dış duvarından içeri geçişini kolaylaştırır. Florokinolonlar suda çözünen fazla lipofilik bileşiklerdir. Geniş spektrumlu, hızlı etkili ve bakterisid olmaları en önemli üstünlükleridir (Kayaalp, 2000; Cross, 2001; Sardohan, 2006).

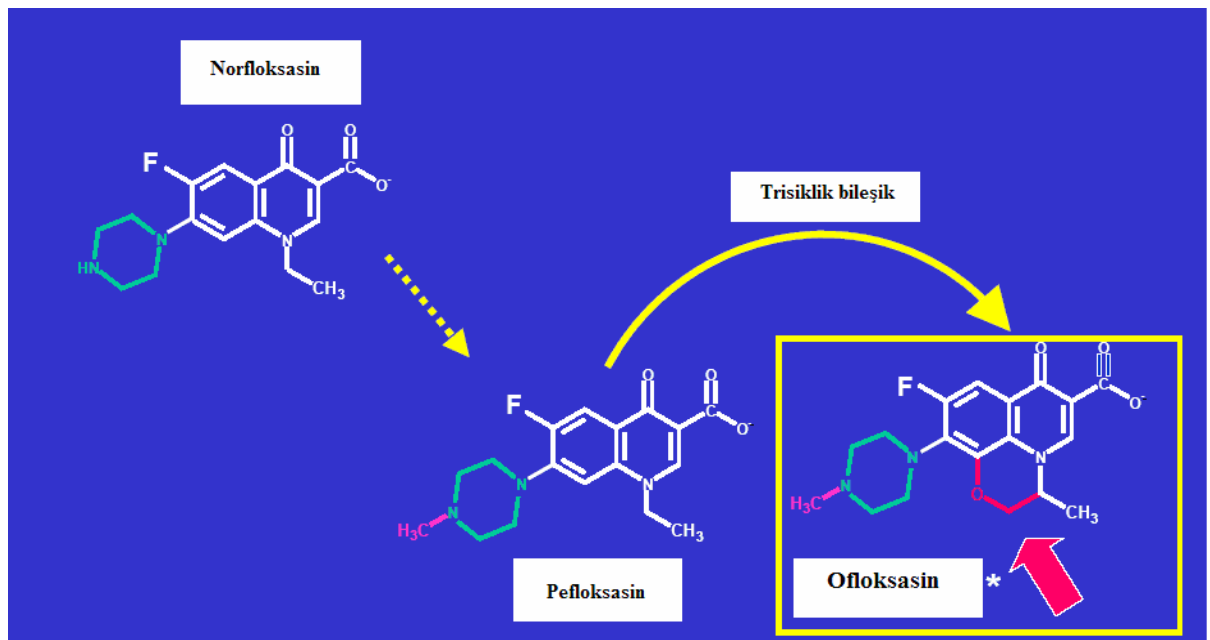
2.4. Ofloksasin

Ofloksasin kimyasal yollarla elde edilen sentetik bir maddedir. Bu nedenle aslında kemoterapötik maddelerdir. Bakterisidal etkili olup, etkilerini DNA sentezini bozarak gösterirler. Ofloksasin bakteri hücreindeki temel hedefli DNA-giraz (Topoizomeraz II) enzimidir. DNA giraz enzimi gyrA tarafından kodlanan A ve gyrB tarafından kodlanan B olmak üzere 2 alt bölümden oluşur. Ofloksasin bu enzimin A alt kısmına bağlanarak etki

gösterir. Ofloksasin ile karşılaşan bakteriler bölünme yeteneğini kaybederler, boyuna uzarlar ve sonuçta ölürler. Kinolon grubu antibiyotiklerin ikinci kuşak yani florokinolon grubu antibiyotiktir. (Andriole, 2005; Sardohan, 2006; Ulusoy, 2010). Üriner sistem infeksiyonları ve sistemik infeksiyon tedavisinde de kullanılmaktadır (Davis, 1996; Leblebicioğlu, 2002).



Şekil 2.5. Norfloksasinin elde edilişi (Sardohan, 2006).



Şekil 2.6. Ofloksasinin elde edilişi (Sardohan, 2006).

2.4.1. Ofloksasin'in Farmakolojik ve Farmakokinetik Özellikleri

Ağız yolu ile alındığında gastrointestinal sistemden iyi emilirler. Oral yoldan alınan Ofloksasin tamamına yakın kısmı emilir. Emilimden sonraki 1-2 saat içerisinde en yüksek plazma konsantrasyonuna ulaşır. Biyoyararlanımı % 85-95 oranındadır. Alüminyum, magnezyum içeren antasidler, sukralfat, demir ve çinko preparatları ile birlikte alınırse selasyon oluştururlar ve biyoyararlanımı azalır. Besinler emilimini geciktirebilir. Plazma proteinlerine bağlanma oranları düşüktür. Vücut sıvıları ve dokulara iyi dağılır. Prostat, kemik, kıkırdak ve böbrek dokusunda, tükürük, gözyaşı salgılarında, idrarda serumdakinden daha yüksek konsantrasyonlara ulaşır. Ofloksasin'in serebrospinal sıvıya geçişleri yeterlidir, diğer kinolonların bu sıvıya geçişleri yetersizdir. Fagositler içinde de yüksek konsantrasyon oluşturur. Değişen oranlarda karaciğerde metabolize edilir. Aktif ya da inaktif metabolitleri böbrekler yoluyla atılır. İdrardaki konsantrasyonları serumdakinin 1-2 kat fazlasına ulaşır. Eliminasyon yarı ömrü uzundur. Böbrek yetmezliğinde ofloksasin'in yarı ömrü uzar, doz ayarlaması gerekir. Ofloksasin çok az metabolize edilir; % 90'ı böbrekten değişmeden atılır (Denizbaşı ve Özüner, 1992; Wise ve Honeybourne, 1999; Kayaalp, 2000; Özalp, 2002; Sardohan, 2006; Chigutsa ve ark., 2011).

Biyoyararlanımı en yüksek olan ofloksasinin oral yolla alındığında hemen tamamı absorbe olur. Sukralfat veya antiasitlerle birlikte alındığında emilimleri azalır. H₂ reseptör blokerlerinden ise etkilenmez. Genel olarak oral alındıktan 70-75 dakika sonra plazmada en yüksek konsantrasyona (C_{max}) ulaşırlar. Ofloksasin gerek küçük molekülü olması, gerekse proteine bağlanma oranının düşük olması nedeniyle serumda, dokuda, vücut sıvılarında ve fagositler içinde oldukça yüksek konsantrasyonlara ulaşır. Akciğer, prostat, safra, idrar, balgam ve kemik dokuda ulaştıkları konsantrasyon çok iyidir. Tükürük, gözyaşı salgısı, nazal mukoza ve bronş epitelyumine geçişleri de iyidir. Serum yarılanma ömrü genelde uzun olduğundan günde bir veya iki kez kullanılır (Wise ve Honeybourne, 1999; Sardohan, 2006; Chigutsa ve ark., 2011).

Ofloksasinin, oral kullanımdan sonra yüksek biyoyararlanım oranları başta olmak üzere çok iyi farmakokinetik özellikleri, geniş antibakteriyel etki alanları, mükemmel doku penetrasyonu ve nispeten düşük ve önemsiz yan etki profili nedeniyle çok değişik infeksiyonların tedavisinde başarı ile kullanılan seçkin ilaç arasındadır. Ofloksasinin oral alımında sindirim kanalından absorpsiyonu son derece iyidir. Ofloksasin, tamamen absorbe olmaktadır. Ofloksasin oral yoldan alındıktan sonra genellikle 1-2 saat sonra serum tepe düzeyine ulaşır. Yaşlılarda ve böbrek yetmezliği olanlarda bu süre uzar.

Ofloksasinin eliminasyon yarı ömürleri ($t_{1/2}$) nispeten uzundur, bu da günde tek doz veya iki kez uygulanabilmelerine olanak verir. Ofloksasin vücut sıvılarına ve dokulara çok iyi dağılır, birçok hücreye kolaylıkla girer. +2 ve +3 yükseltgenme basamağındaki (besinler ve antasidler gibi ilaçlar içindeki) katyonlarla selat yapar. Karacigerde metabolize edilir. Böbreklerden glomerüler filtrasyon ve tübüler sekresyonla atılırlar (Wise ve Honeybourne, 1999; Sardohan, 2006; Chigutsa ve ark., 2011).

2.5. Genetik Toksikoloji

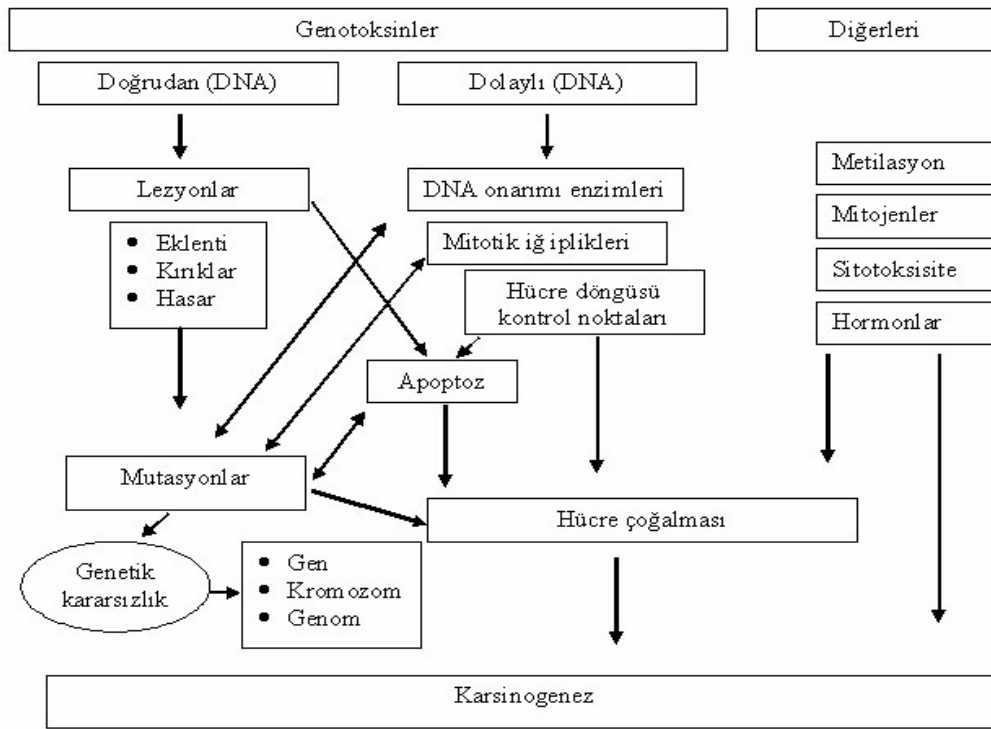
Toksikolojinin bir alt dalı olan genetik toksikoloji, organizmanın normal biyolojik işleyişi sırasında veya kimyasal, fiziksel ve biyolojik etkenlere bağlı olarak hücrelerin DNA moleküllerinde meydana gelen değişiklikleri inceleyen bir bilimdir ve çeşitli ajanların ortaya çıkardığı genetik hasarın değerlendirilmesinde önemli bir yere sahiptir (Choy, 2001; Young, 2002; Mortelmans ve Rupa, 2004; Vural, 2005; Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

Genetik toksisite, çekirdek, kromozom ve DNA yapısında meydana gelen hasarlarını, DNA kırıklarını, gen mutasyonlarını, kromozom anormalliklerini, klastojenite ve anöploid gibi olayları kapsayan genel bir terimdir (Young, 2002; Zeiger, 2004; Üstün, 2007; Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011). DNA veya genomun kopyasının çıkarılmasını sağlayan enzimlerle etkileşime giren ve mutasyona neden olan maddelere genotoksik maddeler adı verilmektedir. Genotoksik maddelerin DNA'da hasar meydana getirmesi veya bazı değişimlere yol açması ise genotoksik etki olarak tanımlanmaktadır (Choy, 2001; Mortelmans ve Rupa, 2004; Üstün, 2007; Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

DNA'nın yapısında meydana gelen kalıcı değişikliklere mutasyon denir. Hücre veya organizma populasyonlarında, mutasyonların ortaya çıkmasına ve artmasına neden olan kimyasal veya fiziksel ajanlar da mutajen veya mutajenik terimleri kullanılarak ifade edilir (Yırtıcı, 2007).

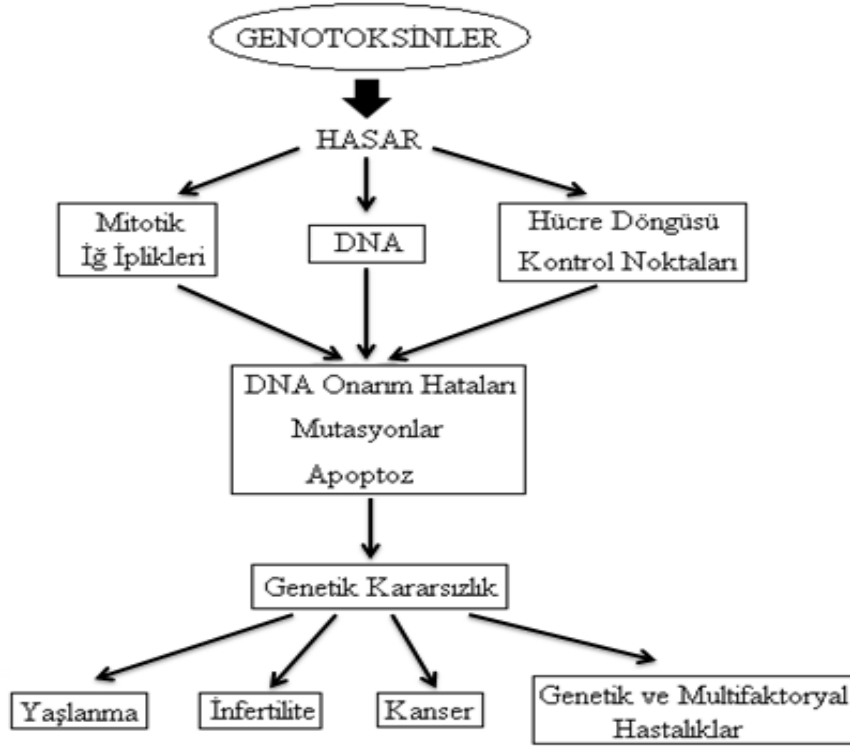
Genotoksinlerin kromozomlarda meydana getirdiği mutasyon, klastogenez adını alır. Mutasyonların vücut hücrelerinde ortaya çıkması ile organizmanın doğrudan kendisi etkilenirken, eşey hücrelerinde ortaya çıkması halinde sonraki nesillere geçebilir. Eşey hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar, zigota aktararak sonraki nesillerde ortaya çıkabilir. Genotoksisite çeşitli mekanizmalarla tamir edilebilir özelliktedir ve her zaman mutasyon olarak ifade edilmez; bu nedenle mutajenisiteden ayrılır (Başaran, 2002; Taner, 2004; Yırtıcı, 2007).

Mutajenlerin genotoksik etkisi, hücresel hedeflerine bağlıdır. Bazı kimyasal maddelerin mutajenik etkisini göstermesi için metabolize edilmesi gerekebilir. Mutajenler, DNA üzerindeki etkilerini ya doğrudan ya da genomik bilgilere göre sentezlenen proteinlere bağlanarak dolaylı yolla gösterebilirler (Şekil 2.7). Örneğin, iyonlaştırıcı radyasyon, DNA’da tek veya çift zincir kırıklarına neden olur. İyonlaştırıcı radyasyonun DNA üzerindeki dolaylı etkisi ise, bir fotonun su molekülleri ile etkileşerek hidrolizine neden olması sonucu oluşan serbest radikallerin daha sonra proteinlerin ve DNA’nın yapısını bozması ile gerçekleşir (Nias, 1998; Kirsch-Volders ve ark., 2003; Yırtıcı, 2007).



Şekil 2.7. Genotoksinlerin DNA üzerindeki doğrudan ve dolaylı etki mekanizması (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011)

DNA’nın hasara yanıtında, DNA hasarında rol alan kilit moleküllerde ve yollardaki bozukluklar; doku hasarı, yaşlanma, kanser, infertilite ve bazı genetik ve multifaktoryal hastalıklara yol açabilir (Şekil 2.8) (Kirsch-Volders ve ark., 2003; Mateuca ve ark., 2006; Yırtıcı, 2007).



Şekil 2.8. Genotoksinlerin DNA üzerindeki etki mekanizması ve sonuçları (Kirsch-Volders ve ark., 2003; Mateuca ve ark., 2006; Yırtıcı, 2007)

Genotoksisite ve karsinojenite arasındaki ilişki pek çok çalışmada incelenmiş ve insanlar için karsinojen olan pek çok bileşik genotoksik bulunmuştur. Ayrıca bir maddenin karsinojenik potansiyelinin mutajenik kapasitesi ile yakından ilgili olduğu belirtilmiştir. Çünkü pek çok karsinojen; gen mutasyonları ve amplifikasyonlarına, kromozomal yeniden düzenlenmelere ve anöploidiye neden olmaktadır. Karsinogenez, tümörü baskılayan genlerin etkisiz hale getirilmesine veya protoonkogenlerin etkinleştirilmesine neden olan kromozomal değişiklikleri veya nokta mutasyonlarını kapsar. Birçok karsinojen, tümörün hedef dokularının DNA'sına kovalent olarak bağlanabilecek elektrofilik ara ürünler oluşturur (Yırtıcı, 2007).

Yapılan araştırmalar, çevremizdeki çeşitli kimyasal maddelerin küçük miktarlarının bile genotoksik, mutajenik veya karsinojenik olabileceği gerçeğini ortaya koymaktadır. Bu etkilere sahip olma potansiyeli taşıyan ilaçların, tedavi edici etkilerinin belirlenmesinin yanında, insan genomunda mutasyonlara sebep olup olmadıklarının ortaya çıkarılması son derece önem taşımaktadır. Genetik toksisite testlerinde alınan pozitif sonuçlar mutajenik olan birçok maddenin karsinojenik de olduğunu göstermektedir. Kimyasal maddelerin mutajenik etkileri ile karsinojenik potansiyelleri arasında böylesine kuvvetli bir ilişkinin olması, mutajenezis testlerinin endüstri

kuruluşları tarafından kimyasal maddelerin karsinogenik risklerinin araştırılmasında biyogösterge testleri olarak kullanılması sonucunu doğurmuştur. Mutajenite testleriyle elde edilen sonuçlara göre bilinen kanserojenlerin yaklaşık %90 kadarının aynı zamanda mutajenik olduğu, buna karşın tüm mutajenlerin potansiyel kanserojen olabileceği bildirilmiştir (Purchase ve ark., 1978; Mavournin ve ark., 1990; Choy, 2001; Zeiger, 2004; Vural, 2005; Üstün, 2007).

2.6. Genetik Toksikite Testleri

Genotoksikite testleri esas olarak kanserden korunmada, her türlü fiziksel ve kimyasal ajanın etkisini araştırmada, ilaçların piyasaya sürülmeden önce toksik etkilerini ve güvenilirliğini araştırmada yaygın olarak kullanılmaktadır. 1970'lerden bu yana mutajenik ve genotoksik olan maddelerin kanserojenik potansiyellerini ölçebilmek için birçok *in vivo* ve *in vitro* genotoksikite testi geliştirilmiştir. Genetik toksikite testleri, çeşitli mekanizmalarla direkt veya indirekt olarak genetik materyalde hasara neden olan bileşikler saptamak amacıyla geliştirilmiş *in vitro* ve *in vivo* testlerden oluşurlar. Bu testlerin kullanımlarının yaygınlaşması sayesinde, örneğin; bir bireyin herhangi bir kimyasal ajana vereceği genetik cevap önceden belirlenebilir, kanser gibi hastalıklar klinik belirti vermeden taranarak yatkın bireyler belirlenebilir ve önlem alınabilir (Choy, 2001; Bedir ve ark., 2004; Zeiger, 2004; Üstün, 2007).

Genotoksikite testlerinin en önemli kullanım alanlarından biri olan kanser genetiğinde hastalığa duyarlılığın tayini, hastalığın tanısının konulması ve takibinin yapılmasında bu testler önemli bir yer tutmaktadırlar. Bu testler kanseri gösterebilen biyomarker olarak değerlendirilebilmekte ve karsinogenlere maruz kalmış bireylerde artmış kanser riskini göstermek amacıyla kullanılabilir. Karsinogeneze ilgili olduğu varsayılan genotoksikitenin etkilerini inceleyebilecek çeşitli kısa süreli test metotları geliştirilmiştir. Kısa-süreli testlerle elde edilen sonuçları, kimyasal bileşiklerin karsinogenisitesi ile karşılaştırmak için kapsamlı incelemeler yapılması gerekir. Fakat genel kanı, genetik etkilerin tamamı hakkında bilgi sağlayabilecek geçerlilikte tek bir testin olmadığı yönündedir; her bir kimyasal madde, birden fazla test kullanılarak değerlendirilmelidir (Zeiger, 1998; Albertini ve ark., 2000; Choy, 2001; Demirel ve Zamani, 2002; Mortelmans ve Rupa, 2004; Yırtıcı, 2007).

2.6.1. Salmonella / mikrozoom (Ames) Testi:

Fiziksel yada kimyasal ajanların DNA'da meydana getirdiği hasar, bakteriyal mutasyonları ölçebilen kısa zamanlı testlerle saptanmaktadır (Gatehouse ve ark., 1990; Börçek Kasurka, 2010). Bu tip testlerden birisi olan Ames testi, Ames (1970) tarafından geliştirilmiş ve bakteriyal mutasyon testleri içinde detayları en iyi bilinen ve karakterize edilen, geçerliliği, uygulanma kolaylığı ve hassaslığı nedeniyle en fazla kabul gören tercih edilen ve günümüzde de sıklıkla kullanılan bir mutajenite testidir (Maron ve Ames, 1983; Gatehouse ve ark., 1990; Jung ve ark., 1992; Jarvis ve ark., 1996; Mortelmans ve Ziger, 2000; Choy, 2001; Börçek Kasurka, 2010). Ames test sistemi aynı zamanda, kimyasalların mutajen veya kanserojen etkilerini ortadan kaldıran, bu kimyasalların DNA ile etkileşimlerini önleyen antimutajenlerin ve antikanserojenlerin tayininde de kullanılmaktadır (Rosin ve Stich, 1979; Özbek, 2006; Börçek Kasurka, 2010).

Salmonella-Mikrozoom testi ile bakteri DNA'sı ile etkileşime girerek mutasyona neden olan ajanların, insan dahil diğer türlerde de muhtemel mutasyonlara yol açma yeteneğinde olabilecekleri varsayılmaktadır (Özbek, 2006; Börçek Kasurka, 2010).

Bu sistem; sitokrom P-450 enzimlerini içeren memeli karaciğer post mitokondriyal süpernatant (S9) varlığında veya yokluğunda, okzotrofik, histidin aminoasitine ihtiyaç duyan, mutant, Salmonella typhimurium test bakterileri kullanılarak yapılmaktadır ve *S. typhimurium*' un genellikle TA 97, TA 98, TA 100, TA 102, TA 1535, TA 1538 suşları kullanılmaktadır. *S. typhimurium* histidin geninde oluşturulan farklı mutasyonlarla gelişmek için histidin gereksinimi duyan değişik tipte oksotrofik mutantlara dönüştürülmüştür. *S. typhimurium*' un histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş his⁻ olan suşlarının test bileşeni ile muamele edildikten sonra ikinci bir mutasyon geçirip his⁺ hale geri dönüşmesine dayanır. Geri dönüşen (revertant) bakteri kolonileri sayılarak değerlendirilir. Fakat normalde de mutajenlere maruz kalmadan spontan olarak geri dönüşebilen bakteriler olmaktadır. Mutajenik etkiden bahsetmek için spontan revertant koloni sayısı sayılması gerekir (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans and Ziger 2000; Choy, 2001; Korkmaz, 2005; Börçek Kasurka, 2010). Bir mutant suş, tek bir baz değişimi şeklinde nokta mutasyona sahip iken, kendiliğinden ya da bir mutajen uyarısıyla yabani tipe dönüştüğünde, transisyon ya da transversiyon şeklinde mutasyon geçirmiş olmaktadır (Korkmaz, 2005; Börçek Kasurka, 2010).

2.6.2. Memeli Hücre Kültürü Testleri

Pek çok araştırmacı, genotoksik etkinin saptanmasında tek bir testin tek başına yeterli olmadığını, bir maddenin genotoksik ya da mutajenik aktivitesinin belirlenmesinde bir seri test sisteminin kullanılması gerektiği belirtmişlerdir (Mortelmans ve Rupa, 2004; Üstün, 2007; Börçek Kasurka, 2010). Son zamanlarda herhangi bir ilacın belli organ veya dokular üzerine zararlı etkileri, kanserojen, mutajen veya teratojen etkilerinin olup olmadığını saptamak amacıyla fare kullanımından vazgeçilerek, daha çok hücre kültürü ile yapılan çalışmalara yoğunluk verilmiştir. İlaçlar başta olmak üzere, yeni geliştirilen ve günlük hayatta yaygın olarak kullanılacak kimyasal maddelerin insanlarda emniyetli kullanımı için toksisite testlerinin önemi büyüktür. İnsan hücre kültürleri kullanılarak ilaçların genotoksik etkileri araştırılabilir. Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü kanser araştırmalarında insan kanser hücre kültürleri üzerinde bağırsak, akciğer, melanoma, böbrek, beyin ve kan kanseri için haftada 300 yeni kimyasal maddenin antikanser etkinliğini araştırabilmekte, hücre kültürlerinden alınan sonuçların daha gerçekçi ve daha spesifik olduğu ifade edilmektedir (Zoli ve ark., 1995; Banerjee ve ark., 1997; Davila ve ark., 1998; Robinson ve ark., 2002; Saygı, 2003; Börçek Kasurka, 2010).

Hücre kültürlerinin kullanım alanları;

- a. İlaç metabolizmasından sorumlu enzim sisteminin saptanması,
 - b. İlaç metabolize eden enzim aktivitesini etkileyebilecek faktörlerin saptanması,
 - c. İlaç metabolitleri ve bu maddelerin toksik etki potansiyellerinin saptanması,
 - d. İlacın metabolik yıkılma süresinin saptanması,
 - e. İlaçların birbirleri üzerine olan etkileşim derecesinin saptanması,
 - f. İlaç metabolizmasında genetik, yaş, çevre ve hastalık faktörlerinin araştırılması,
 - g. Bireylerin ilaç allerjisi potansiyeline sahip olup olmadığının öngörülmesi
- (Wooster ve ark., 1993; Saygı, 2003; Börçek Kasurka, 2010).

İnsan hücre kültürlerinin toksisite araştırmalarındaki avantajları;

- a. Tür farklılığını ortadan kaldırır,
 - b. Kimyasal maddelerin muhtemel toksik etki yapacağı düşünülen deri, karaciğer gibi spesifik doku hücreleri üzerinde araştırma yapılmasını sağlar,
 - c. Toksisite mekanizmalarının hücreler üzerinde aydınlatılmasına imkân verir,
 - d. Deneyde kullanılan hayvanların acı çekmesi veya ölmesi söz konusu değildir
- (Saygı, 2003; Börçek Kasurka, 2010).

Kimyasal maddelerin mutajenik ve kanserojenik potansiyelleri arasında bir ilişkinin kurulmasını sağlayan ve en yaygın olarak kullanılan *in vitro* hücre kültürü

mutajenite testleri; Kromozom anormallikleri (KA) testi, Mikronukleus (MN) testi, Kardeş kromatid değişimi (KKD), Fare lenfoma testi ve Comet testidir (Börçek Kasurka, 2010).

2.6.2.1. *In vitro* Kromozom Anormallikleri (KA) Testi

In vitro kromozom anormalliği (KA) testi, genellikle periferik kan lenfosit hücre kültürlerinin kullanıldığı, test bileşikleri tarafından indüklenen yapısal ve sayısal kromozom anormalliklerin ve dolayısıyla genotoksik risklerin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan en hassas yöntemlerden biridir. Kromozom anormallikleri DNA düzeyindeki zararın bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır ve yüksek KA sonucu genetik materyalde oluşan hasarlar tamir edilemediğinde; rekombinasyon, mutasyon, doku hasarı, yaşlanma ve kanser oluşabilmektedir. KA oluşum mekanizması farklı dokularda benzer olduğu için lenfositlerdeki anormallik seviyesinin, kansere eğilimli dokulardaki anormallik seviyesini gösterdiği ve böylece kanser riskini önceden gösterebildiği belirtilmiştir (Anderson, 1988; Carrano ve Natarajan, 1988; Savage, 1993; Albertini ve ark., 2000; Norppa ve ark, 2006; Yavuz Kocaman, 2007; Börçek Kasurka, 2010).

KA analizi için dolaşan kandaki lenfosit hücrelerinin seçilme nedenleri:

- 1-Radyasyona karşı çok duyarlı olmaları,
- 2-Vücudun herhangi bir noktasında radyasyon sebebi ile oluşan hasarın, kan dolaşım sisteminde tüm vücuda taşınmasını sağlamaları,
- 3-Kan dolaşım sisteminde G0 fazında olmaları,
- 4-Doku kültürü ortamında bölünmeye kolayca teşvik edilebilmeleri,
- 5-Senkronize (aynı anda, aynı fazda) bir populasyon olmaları şeklinde sıralanabilir.

Periferik kan lenfositlerinde sitogenetik testlerle genetik materyalin hasar gördüğü gösterildiği zaman, sonuçlar sadece populasyon düzeyinde risk hesaplamada kullanılabilir. Populasyondaki artan KA frekansı, kanser riskinin artışının bir işareti olarak dikkate alınmalıdır (Yırtıcı, 2007).

In vitro KA testinde, hücrelerin mitoz bölünme geçirmesini sağlayan ortamlarda, periferik kan lenfositlerinden oluşan hücre kültürleri inkübasyona bırakılır. Kültürler inkübasyonun belirli zamanlarında test bileşiğine maruz bırakılır. Kültür süresi tamamlanmadan ortalama 2 saat önce, tübinin polimerizasyon inhibitörü olan ve hücre bölünmesini metafaz aşamasında durduran kolşisin uygulanır. Kültürü yapılan hücrelerin belirlenmiş olan protokollere uygun olarak metafaz kromozom preparatları hazırlanır ve

mikroskop altında yapısal ve sayısal kromozom anormallikleri yönünden incelenir (EPA, 1998; Choy, 2001; Börçek Kasurka, 2010).

2.6.2.2. In vitro Mikronukleus (MN) Testi

Mikronukleuslar (MN) hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan ve tüm kromozomlar ya da kromatidlerin anafazda geri kalmasından dolayı telofazda oluşan kardeş nükleusun dışında rastlanan oluşumlardır. MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Anöploidiyi uyaran ajanlar, sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna katkıda bulunmaktadırlar. Hücrelerde MN sayısında artış saptanması somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın göstergesidir ve MN oluşumuna neden olabilen kromozom kaybı ya da kromozomların ayrılabilmesi kanser ve yaşlanmada gözlenen önemli olaylardan biridir. Yapılan çalışmalarda, kanser hastalarından alınan periferik kan lenfositlerindeki MN frekansında belirlenen artış, kanser oluşan hedef dokudaki MN frekansı kadar bulunmuştur (Vanparrys ve ark., 1990; Surrallés ve ark., 1995; Cheng ve ark., 1996; Duffaud ve ark., 1997; Kirsch-Volders ve ark., 1997; Choy, 2001; Demirel ve Zamani, 2002; Şekeroğlu ve Atlı Şekeroğlu, 2011).

MN testi, klastojenik ve anöjenik etkili bileşikler tarafından oluşturulan kromozomal hasarların değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan standart genotoksisite testlerinden biridir. Ayrıca, sitogenetik harabiyetin tespitinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi avantajı sağlamasıyla yaygın kullanım alanı bulan bir tekniktir (Schmid, 1975; Garewal ve ark., 1993; Stopper ve Müller, 1997; Fenech, 2000; Krishna ve Hayashi, 2000; Widel ve ark., 2001; Demirel ve Zamani, 2002; Şekeroğlu ve Atlı Şekeroğlu, 2011). Ayrıca bütün halde kromozom şeklinde mikronukleus oluşumuna neden olan ve kromozomal anormallik testleriyle çalışılması güç olan anöploidiyi indükleyici ajanlar bu testle kolaylıkla saptanabilmektedir (Aardema ve Kirsch-Volders, 2001; Lorge ve ark., 2007; Şekeroğlu ve Atlı Şekeroğlu, 2011). Birçok araştırmacı MN analizi için çeşitli teknikler kullanmışlardır. Fakat Fenech ve Morley (1986) tarafından, küf mantarlarının metabolitlerinden olan Sitokalsin-B (Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanır. Bir hücre siklusunu tamamlayan hücrelerin binükleer görünümüleriyle ayırt edilmesine olanak sağlayan sitokinezi bloklayıcı

metodu ile bazı kinetik problemler ortadan kalkmış ve *in vitro* MN tekniğinin uygulanmasındaki güvenilirlik artmıştır (Fenech ve Morley, 1985; Fenech, 2000; Aardema ve Kirsch-Volders, 2001; Choy, 2001; Demirel ve Zamani, 2002; Börçek Kasurka, 2010).

In vitro MN testinde, hücrelerin mitoz bölünme geçirmesini sağlayan ortamlarda, periferik kan lenfositlerini içeren hücre kültürleri inkübasyona bırakılır ve kültürler belirli zamanlarında test bileşiği ilave edilir. İlk mitozdan önce kültürün yaklaşık 44. saatinde sitokinezi engellemek ve binükleer hücre elde etmek amacıyla kültürler belirli miktarda Cyt-B eklenir. Kültür süresinin bitiminde tüpler santrifüjlenerek süpernatant atılır ve tüplere hipotonik eriyik ilave edilerek yaklaşık 10 dakika 37°C'de inkübasyona bırakılır. Süre sonunda tüpler santrifüjlenerek, tüplere glasiyal asetik asit ve metanol karışımından oluşan fiksatif ilave edilir. İlk fiksatif ile oda sıcaklığında muamele edildikten sonra tüpler tekrar santrifüj edilir ve bu işlem tüpte kalan sıvının berraklaştığı görülünceye kadar 2-3 kez tekrarlanır. Daha sonra tüplerdeki sıvı lamların üzerine damlatılarak preparatlar hazırlanır. MN'lerin boyanması için preparatlar Giemsa-tampon boya eriyiğinde boyanır ve ışık mikroskobu ile incelenir (Rothfuss ve ark.,2000; Fenech, 2000; Kirsch-Volders ve ark., 2003; OECD, 2006; Şekeroğlu ve Atlı Şekeroğlu, 2011).

2.6.2.3. Fare Lenfoma Testi (Mouse Lymphoma Assay=MLA)

En çok kullanılan *in vitro* memeli mutasyon testleri arasında yer alan fare lenfoma testi ilk kez Clive and Moore (1975) tarafından geliştirilmiştir. Fare lenfoma testi; L5178Y fare lenfoma hücrelerinin timidin kinaz (TK) lokusundaki veya insan lenfoblastoid TK6 hücrelerinin ya da Chinese hamster hücre serisinin (CHO, AS52 ve V79 hücrelerinin) hipoksantin guanin fosforibosil transferaz (HPRT) veya ksantin guanin fosforibosil transferaz (XPRT) lokusundaki gen mutasyonlarının ve kromozomal bozukluklarının saptanmasını sağlayan bir testtir. Yani fare lenfoma testi hem gen mutasyonları hem de kromozom anormalliklerini tespit etmek için kullanılabilir (Clive ve Spector, 1975; Clive ve ark., 1990; Combes ve ark., 1995; Choy, 2001; Üstün, 2007; Börçek Kasurka, 2010).

Fare lenfoma testinde, test bileşiği yaklaşık 3-4 saat süreyle metabolik aktivasyonlu veya aktivasyonsuz fare lenfoma hücreleri ile muamele edildikten sonra kültüre edilir. Test bileşiğine maruz kalan hücre kültüründen elde edilen hücreler mutant hücrelerin oranını saptamak amacıyla TFT içeren bir ortama ekilir. TK^{+/-} ve TK^{-/-} lokuslarında meydana gelen mutasyon sonucu timidin kinazdan yoksun olan mutant

hücreler pirimidin analogu olan triflorotimidinin (TFT) sitostatik etkilerine karşı dirençlidirler ve mutant hücreler TFT varlığında çoğalırlarken, normal hücreler çoğalamamaktadır. İnkübasyondan sonra koloniler sayılarak mutant koloni sayısı saptanır. Genellikle büyük koloniler nokta mutasyonlarla, küçük koloniler ise delesyon ve yeniden düzenlenmeleri içeren kromozom anormallikleriyle ilgilidir (Clive ve Spector, 1975; Clive ve ark., 1990; Combes ve ark., 1995; Choy, 2001; FDA, 2006; Üstün, 2007; Börçek Kasurka, 2010).

2.6.2.4. In vitro Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Testi

Kardeş kromatid değişimleri, DNA çift zincir kırıklarının homolog rekombinasyon yoluyla onarılmasını gösteren kardeş kromatidlerin homolog lokusları arasında DNA replikasyon ürünlerinin değişimidir. Kardeş kromatid değişimleri nokta mutasyonların indüksiyonu, gen amplifikasyonu ve sitotoksosite ile ilişkilidir. Kardeş kromatid değişim testi (Sister Chromatid Exchange=SCE) ise, bu değişime neden olan özellikle DNA eklentileri oluşturan veya DNA replikasyonu ile etkileşime giren mutajen bileşikler saptamaktadır. Bu test, çeşitli ajanların mutajenik ve karsinojenik etkilerinin, deneysel çalışmalarda indikatör test olarak özellikle kromozomlarda oluşan yapısal değişimleri araştırmak yönünden önemli bir yer tutmaktadır. Bu nedenle kimyasalların mutajenik ve karsinojenik etkilerini belirlemek için uygun bir yöntem olarak kardeş kromatid değişim yönteminin kullanımına devam edilmektedir (Taylor ve ark., 1957; Perry ve Evans, 1975; Latt ve ark, 1980; Latt ve Schreck, 1980; Wolff, 1980; Sonoda ve ark., 1999; Üstün, 2007; Börçek Kasurka, 2010).

KKD testi için insan lenfosit hücre kültürleri test bileşiğine maruz bırakılır ve belirli bir süre sonra kültürlerde kromatidlerin boyanarak birbirinden ayırt edilmesini sağlayan 5-bromo-2-deoksiüridin (BrdU) eklenir. Bu madde kardeş kromatidlerin birbirine kontrast sağlayacak şekilde boyanması ve bu sayede homolog kromozomlarda DNA parçalarının karşılıklı değişiminin gösterilmesini sağlar. İki hücre siklusu süresi geçtikten sonra kültürlerden KA yönteminde olduğu kromozom preparatları hazırlanır ve kromozomlar KKD yönünden incelenir. Testten pozitif sonuç alınması, test bileşiğinin memeli somatik hücre kültürlerinde karşılıklı kromatid değişimine neden olduğuna işaret etmektedir (Perry ve Evans, 1975; Latt ve ark, 1980; Latt ve Schreck, 1980; Wolff, 1980; Üstün, 2007; Börçek Kasurka, 2010).

2.6.2.5. Comet (Single Cell Gel Electrophoresis) Testi

Son yıllarda gelişen Comet tekniği, çeşitli ajanların yol açtığı DNA tek ve çift zincir kırıklarının tespiti için kullanılan hassas, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Tek hücre jel elektroforez (Single cell gel electrophoresis) tekniği olarak da adlandırılan Comet yöntemi, birçok memeli hücresinde çeşitli ajanların indüklediği DNA hasarı ve onarım bozukluğunun tayinini amaçlayan çalışmalarda kullanılmaktadır. DNA kırıklarının tayini prensibine dayanan bu yöntem, pek çok fiziksel ve kimyasal mutajenin özellikle insanlarda yol açtığı DNA hasarının tayininde, kanser hastalarında DNA hasarının derecesini ve tamirini tespit etmede, bazı kalıtsal hastalıkların prenatal tanısında, bazı hastalıklarda artmış DNA hasarını belirlemede kullanılan bir biyoizlem testidir. Ayrıca genotoksinleri ilk etki bölgelerde değerlendirebilmesi, hemen hemen tüm ökaryotik hücrelere uygulanabilmesi, düşük hasar seviyesini ölçebilmesi, az sayıda hücre örneği gerektirdiği için hızlı, basit ve ucuz bir yöntem olması gibi avantajlarından dolayı geniş bir kullanım alanına sahiptir (Choy, 2001; Östling ve Johanson, 1984; McKelvey-Martin ve ark., 1993; Fairbairn ve ark., 1995; Singh ve ark., 1988; Kassie ve ark., 2000; Tice ve ark., 2000; Olive ve Banáth, 2006; Dinçer ve Kankaya, 2010; Şekeroğlu ve ark., 2011; Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

2.7. Kinolonlarla Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Yapılan literatür taraması sonucu kinolon grubu bazı antibiyotiklerle ilgili toksik çalışmaları içeren çalışmalar aşağıda verilmiştir. Bu araştırma veya derlemelerden ofloksasin içeren ve içermeyen çalışmalar ayrı gruplandırılmıştır.

Mitelman ve ark. (1988) siprofloksasin ve ofloksasin ile tedavi edilen hastalarda bu etken maddelerinin genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla, hastalardan tedavi öncesi ve sonrası aldıkları kan örneklerini kültüre ederek, sitogenetik yöntemle KA oluşumlarını tespit etmeye çalışmıştır. Çalışmada günlük 200 mg OFX verilen, idrar yolu enfeksiyonlu 12 hastadan tedaviden 1 hafta sonra alınan kan örneklerinin ve tedavi öncesi örneklerin sitogenetik analizleri karşılaştırılmıştır. Sitogenetik analizlerde, OFX tedavisinden önce alınan örnekler ve tedavi sonrası örnekler arasında, toplam KA miktarında ve çeşidinde herhangi bir farklılık saptanmadığı rapor edilmiştir.

Forsgren ve ark. (1989) tarafından yeni kinolonların toksik etkilerinin araştırıldığı çeşitli çalışmaların bulunduğu bir derleme yayınlanmıştır. Bu çalışmada sunulan araştırma sonuçları şöyledir:

HeLa hücrelerinde OFX'in sadece yüksek konsantrasyonlarda hücre büyümesini inhibe ettiği belirtilmiş olup, OFX doz artışına bağlı olarak insan Raji hücrelerinde proliferasyonun düştüğü belirlenmiştir. Ayrıca OFX'in test edilen yüksek dozunda düşük dozlarına kıyasla DNA zincir kırıklarında önemli bir artışın olduğu rapor edilmiştir (Bredberg ve ark., 1989).

OFX'in dana timus hücrelerinde topoizomeraz enzimlerini zayıf bir şekilde inhibe ettiği ve diğer DNA sentez enzimleriyle etkileşime girdiği gösterilmiştir (Hussy ve ark., 1986). Ancak, her ne kadar OFX'in genotoksik olduğunu bildiren çalışmalar varsa da (McQueen ve Williams, 1987), DNA zincir kırıklarının DNA'nın normal replikatif sürecinde meydana geldiği ve karsinojenik veya mutajenik olması gerekmediği belirtilmiş ve bu görüş, negatif sonuç veren bazı mutasyon ve kromozomal test çalışmaları ile desteklenmeye çalışılmıştır (Schülter, 1987; Mayer, 1987; Mitelman ve ark., 1988).

Hücre döngüsü süreci ve işlevi üzerine çeşitli kinolonların etkisinin *in vitro* incelendiği bir çalışmada, lenfoblastlarda DNA zincir kırıkları sadece yüksek OFX (80 µg/ml) dozunda görünürken, ³H timin eklenmiş, mitozu uyarılmış periferik kan lenfositlerinde düşük dozlarda bile güçlü bir şekilde artmıştır (Bredberg ve ark., 1989).

Sıçan hepatositlerinde ve hepatosit hücre hattında, bazı kinolonların genotoksik etkisinin *in vivo* ve *in vitro* olarak bir çalışmada incelenmiştir. Bu çalışmada, DNA'da oluşan primidin dimerlerini uzaklaştıran bir eksizyonel tamir sürecinin sonucu olan programlanmamış DNA sentezi (UDS) araştırılmıştır. UDS'nin *in vitro*'da test edilen kinolonların yüksek dozları tarafından artırıldığı, ancak *in vivo*'da F344 yetişkin dişi sıçanlardan izole edilen hepatositlerde UDS'nin gözlenmediği rapor edilmiştir. Bu bulgulara göre test edilen tüm maddeler gibi OFX'in DNA reaktifi olmadığı, ancak bazı dolaylı etkileşimler sonucu *in vitro*'da UDS meydana getirdikleri ileri sürülmüştür (McQueen ve ark., 1991).

DNA'da hasar meydana getirebilen fiziksel veya kimyasal ajanların bakteriyel mutasyonlarının ölçülebildiği Ames testiyle 8 kinolonun bakteriyel mutajenitesi çalışılmıştır. Ofloksasini de içeren kinolonlar toplamda kalitatif Ames test sisteminde pozitif sonuç vermiştir. Ancak 0,25 µg/ml konsantrasyonunda test edilen ofloksasinin düşük seviyede mutajenite gösterdiği belirtilmiştir (Mamber ve ark., 1993).

5 yeni kinolon antibiyotiğinin fotohassas reaktif oksijen türleri oluşumuna etkisinin incelendiği çalışmada, OFX'in farklı reaktif oksijen türlerinin oluşumuna farklı derecelerde yol açtığının belirlenmesine rağmen DNA zincir kırığı oluşumuna etkisinin en az olduğu belirtilmiştir. Birçok çalışmada rapor edilmiş olmasına karşın bu ilaçların ROS

oluşturduğuna dair direkt bir kanıtın olmadığı sonucuna varılmıştır (Umezawa ve ark., 1997).

El-Habit ve ark. (2001) OFX'in genotoksisitesi ardışık olarak 14 gün boyunca 3 dozda (104, 520, 1040 mg/kg/gün) farelerde test etmişler, aynı zamanda OFX'in terapötik bir dozunu (104 mg/kg/gün) 2 Gy gama radyasyona maruz bırakılan bir fare grubuna 14 gün süreyle vermişlerdir. Araştırmacılar DNA fragment yüzdelerini dalak hücrelerinde, PCE ve NCE'lerde ise MN sıklığını kemik iliğinde incelemişlerdir. Her iki kriterde de, OFX'in doz artışına bağlı olarak, artış gözlenmiştir. Verilerin, potansiyel bir mutajen olarak bu ilacın etkisinin çeşitli organlarda farklı olduğunu gösterdiğini ifade etmişlerdir.

Sanchez ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, fotohassasiyet ile DNA ayrılmaları ve hücre membran hasarı meydana getiren bazı florokinolonların varlığının, kinolonların ışık tarafından indirgenerek aktif oksijen türleri veya radikaller oluşturabilmelerinin kanıtı olarak sunulmuştur. Bu çalışmada, Jurkat hücre hattında, $2,76 \times 10^{-5}M$ lık konsantrasyonda kullanılan ve üzerine UV ışın saçılan OFX'in genotoksik etkisi comet yöntemi ile test edilmiştir. Test sonuçları, UV ışığa maruz kalan OFX grubu ile UV ışığa maruz bırakılmayan grup arasındaki farklılığın istatistiksel olarak önemli olmadığını, UV'li OFX grubunun DNA hasarını artırdığını, ayrıca UV'siz OFX grubunun genotoksisitesinin de negatif kontrole göre önemli farklılık gösterdiğini işaret etmiştir. OFX genotoksik olarak ifade edilmiştir.

Farklı antibiyotik gruplarından altı antibiyotik etken maddesinin (eritromisin, oksitetrasiklin, sulfametoksazol, ofloksasin, linkomisin, klaritromisin) sucul organizmalar (balıklar, mikro kabuklular, rotiferler, algler ve bakteriler) üzerindeki ekotoksisitesi incelenmiştir. Bu ilaçların kronik ve akut toksisiteleri ve genotoksik potansiyelleri SOS-kromo testi ve ames testi ile tespit edilmeye çalışılmıştır. Ekotoksikolojik sonuçlara göre OFX'in genotoksik ve mutajen olduğu ve dolayısıyla çevresel risk düşünüldüğünde böyle bileşiklerin, sucul çevre için oldukça zararlı bileşikler oldukları belirtilmiştir (İsiori ve ark., 2005).

Itoh ve ark. (2006)'nın antimikrobiyal kinolonların genotoksisitesini inceledikleri bir çalışmada, *in vitro* comet testi ile nalidiksik asit (NA), pipemidik asit (PPA), oksolinik asit (OA), piromidik asit (PA), enoksasin (ENX), ofloksasin (OFX), norfloksasin (NFLX) ve ciprofloksasin (CPFX) olmak üzere 8 kinolonun genotoksik potansiyelini araştırılmıştır. Araştırmacılar test ettikleri 8 kinolonu WTK-1 hücrelerine (Mutant p53) 2, 4 ve 20 saat 62.5 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarda uygulamışlar. NFLX ve CPFX'in 4 ve 20 saatlik uygulamalardan sonra konsantrasyona bağlı olarak DNA hasarını önemli

derecede indüklediğini fakat bu hasar geri dönüştürebilir olduğunu tespit etmişlerdir. Diğer taraftan, diğer 6 kinolon uygulamasında ise DNA hasarının görülmediğini bildirmişlerdir. NFLX ve CPFX'nin uygulandığı hücrelerde comet testi ile DNA göçünün artışı belirlenmiştir. *In vitro* MN testi ile, WTK-1 hücrelerine 20 saat 15.63 ve 125 µg/mL dozlarında uygulanan 4 kinolondan (NA, PPA, NFLX ve CPFX) sadece NFLX'in hücrelerde önemli derecede MN artışına neden olduğunu, diğer 3 kinolonun ait bir değişimin gözlenmediğini kaydetmişlerdir. Bu sonuçlar NFLX ve CPFX'in DNA tek zincir kırıklarını indüklediği ve ayrıca kromozom anomalileri testiyle de NFLX'in tek zincir kırıklarına sebep olduğu belirtilmiştir.

Altı konsantrasyonda (1 mg/mL, 100, 10, 1 µg/mL, 100 ve 10 ng/mL) ve dört farklı sürede (15, 30, 60, 240 dk.) toplam beş florokinolonun (siprofloksasin, gatifloksasin, ofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin) her birinin 24 kez test edildiği çalışmada insan kornea epitelyum ve keratosit hücre kültürleri kullanılmıştır. Florokinolonların sitotoksik etkisi hücrelerin floresans tekniklerle sayılması yoluyla belirlenen çalışmada, genel sonuçlar bunların kullanılan hücre kültür ortamlarında doza ve süreye bağlı olarak sitotoksik oldukları ifade edilmiştir. Epitelyum kültüründe OFX sonuçlarına göre; süreye bağlı olarak yüksek dozda (1 mg/mL) ve düşük dozlarda (100 ve 10 ng/mL) ise sadece en uzun uygulama süresinde (240 dk.) sitotoksik olduğu belirlenmiştir. Keratosit kültürü OFX sonuçları göre ise; çalışılan diğer maddeler gibi en yüksek dozda ve tüm sürelerde kalıcı bir şekilde, düşük (100 ve 10 ng/mL) dozlarda 60 ve 240 dk. sürelerde sitotoksik olduğu tespit edilmiştir (Bezwada ve ark., 2008).

Genç tavşanlarda mikrokapsüllü kondrositlerde OFX'in hücre ölümüne etkisinin incelendiği bir çalışmada, OFX'in, pek çok DNA hasar ajanı tarafından aktive edilen, p53 tümör baskılayıcı ve apoptozisi kontrol eden genin ifadesinin artmasını sağlayarak, DNA fragmentasyonuna ve programlı hücre ölümünün oluşmasına sebep olduğu bildirilmiştir (Sheng ve ark., 2007; Sheng ve ark., 2008).

Li ve ark. (2010)'nın OFX'in oksidatif hasara bağlı artropatideki rolünü araştırmak amacıyla gerçekleştirdikleri bir çalışmada yavru tavşanlarda eklem kondrositlerine sırasıyla 5, 10, 20, 40 ve 80 µg/ml konsantrasyonlarında OFX uygulanmıştır. Çalışmada oksidatif hasarın büyüklüğü, bazı makromoleküllerin oksidatif hasarının, antioksidan enzim aktiviteleri ve reaktif oksijen türlerinin seviyelerinin ölçülmesiyle değerlendirilmiştir. OFX'in, reaktif oksijen türlerinin intrasellüler üretiminde konsantrasyona bağlı bir artışa yol açtığı gözlenmiştir. Benzer şekilde, ofloksasin tiyobarbitürik asit reaktif maddelerin seviyesinde önemli bir lipid peroksidasyonu ile

konsantrasyona bağlı bir artış ortaya çıkarmıştır. Aynı zamanda reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimine sebep olabilen OFX'in konsantrasyonuna bağlı olarak oluşturduğu DNA hasarı comet testi ile (24 saatte) ölçülebilir. Sonuç olarak, bu sonuçlar açıkça ofloksasinin oksidatif stres, lipid peroksidasyonu ve DNA'da oksidatif hasar ile kondrositlerde oksidatif strese neden olabileceğini göstermişlerdir.

Anupama ve ark. (2010)'nın insan periferel lenfositlerinde yaptığı 4 farklı florokinolonun sitotoksik ve genotoksik potansiyellerinin karşılaştırıldığı çalışmada, florokinolonlar hücrelere 4 saat boyunca uygulanmış, bu süre sonunda 20 ve 32 saatlik ifade süresi olarak adlandırılan periyotlar sonunda iki farklı sürede (24 ve 36 saat) hasat gerçekleştirilmiştir. 15.62, 31.25, 62.5, 125 ve 250 µg/ml dozlarında kullanılan OFX'in diğer florokinolonlar gibi mitotik indeks, kromozom aberasyonları ve kardeş kromatit değişimi ile test edilmesi sonucu, sadece en yüksek dozda MI'i hafif bir şekilde düşürdüğü, diğer test süreçlerinde ise negatif kontrole göre önemli bir anormal hücre oluşumuna sebep olmadığı tespit edilmiştir. Bu verilere göre OFX'in gerçek bir sitotoksik ve genotoksik ifadesinin olmadığı sonucuna varmışlardır.

Bazı florokinolonları içeren ilaçların üretiminde klinik öncesi yapılan araştırmalarda; UV veya gün ışığı ile ışınlanan test maddelerinin fototoksisite ile ilişkili olarak toksik etki gösterdiği bildirilmiştir. Üç farklı florokinolonun test edildiği bir çalışmada, Çin hamsteri V79 hücrelerinde kromozomal aberasyonların belirgin şekilde arttığı, comet yöntemi ile fare lenfoma hücrelerinde yaygın DNA kırılmalarının gözleendiği belirtilmiştir. Bu temelde, florokinolon tedavilerinin, ışık maruziyetine karşı basit önlemler alınmasa bile, kayda değer bir risk oluşturmasının beklenmediği sonucuna varılmıştır (Chetelat ve ark., 1996).

Gorla ve ark. (1999)'nın enrofloksasin (5 ve 50 µg/ml) ve siprofloksasin'in (5, 25 ve 50 µg/ml) insan periferel kan kültürlerinde genotoksik etkilerini incelediği çalışmada belirlenen KA oluşumlarına göre her iki test maddesinin de genotoksik olduğu ve COFX'in 50 µg/ml dozda metafaz sayımını engellediği ve MI'i düşürdüğü bildirilmiştir. Ayrıca 50 µg/ml COFX dozunda sitotoksik ve genotoksik bulguların birbiriyle uyumlu olduğu belirtilmiştir.

Siprofloksasin (COFX) ile yapılan *in vivo* genotoksisite çalışmasında, kullanılan tüm test sistemlerinin (fare kemik iliğinde mikronükleus, Çin hamsterında sitogenetik kromozom analizi, erkek farelerde dominant letal testi, sıçan ve farelerin ana hepatositlerinde UDS testi) COFX'in genotoksik etkisinin olmadığını gözler önüne serdiği belirtilmiştir (Herbold ve ark., 2001).

Itoh ve ark. (2002) bazı kinolonların fotokimyasal klastojenitelerinin belirlendiği bir çalışmada, test edilen kinolon grubu maddelerin ışınlanmış gruplarında negatif kontrole göre yaygın KA ve MN oluşumu gözleendiğini, ancak aynı çalışmada ışısız kinolonlar grubunda genotoksik etkinin görülmediğini bildirmişlerdir.

Siprofloksasin'in genotoksitesi idrar yolu enfeksiyonu hastalarında insan periferel kan lenfosit kültürleri ile değerlendirilmiştir. Hastalardan tedavi öncesi ve sonrasında alınan periferel lenfositlerde kardeş kromatit değişimi, mitotik indeks ve replikatif indeks ile siprofloksasin'in etkisinin incelendiği bu çalışmada, siprofloksasin tedavisinden sonra kardeş kromatit değişimi frekansının önemli derecede artığı ve mitotik indeks ve replikatif indeksin azaldığı gözlenmiştir (İkbal ve ark., 2004).

Ambulkar ve ark., (2009)'nın yaptığı çalışmada insan lenfositlerinde siprofloksasinin sitotoksik ve genotoksik etkisi çeşitli parametrelere göre *in vitro* değerlendirilmiştir. Bu parametreler; mitotik indeks, kromozom anomaliliği, anafaz anomaliliği, replikatif endeksi ve kardeş kromatid değişimidir. Çalışmada düşük Mitotik indeks, düşük replikatif indeks ve diğer yandan da yüksek frekansta anafaz anomaliliği, yüksek frekansta kromozom anomaliliği ve kardeş kromatid değişimi gözlenmiştir. Bu bulgulara göre *in vitro* insan lenfositlerinde siprofloksasin'in sitotoksik ve genotoksik olduğu sonucuna varmışlardır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında elde edilen tüm sonuçların istatistiksel olarak önemli olduğunu bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada test maddesi olarak ofloksasin, materyal olarak sigara içmeyen, geçirilmiş herhangi bir ciddi hastalığı olmayan, rutin bir şekilde herhangi bir ilaç kullanmayan ve 20-24 yaşları arasında olan sağlıklı iki erkek ve iki bayandan alınan periferik kan kullanılmıştır. Çalışmamızın yapılabilmesi amacıyla Samsun Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 10.11.2009 tarihinde 121 sayı numarası ile izin alınmıştır.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.1.1.1. Ofloksasin

Bu çalışmada test maddesi olarak kullandığımız ofloksasin (Sigma), enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan ve kinolon türevidir. 2. kuşak florokinolon grubu bir antibiyotiktir.

Ticari Adları: Droid, Exocin, Menefloks, Ofkozin, Oflocide, Ofloks, Travid, Urosin.

Kimyasal Adı: (+)-9-Fluor-2, 3 dihidro-3-metil-10-(4-metil-1-piperazinil)-7-okso-7 H-pirido-(1, 2, 3-de) (1, 4)-benz-oksazin-6-karbonik asittir.

CAS no: 82419-36-1

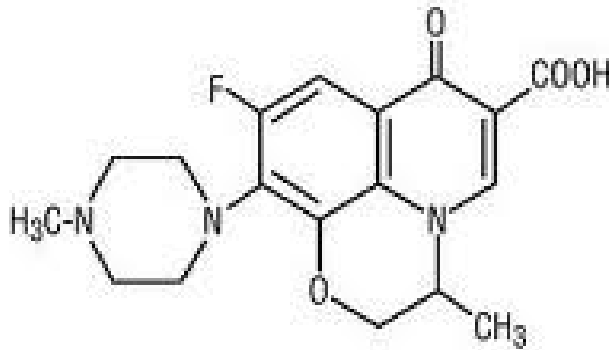
Molekül Ağırlığı: 361.4

Erime Sıcaklığı: 270-275 °C

Kaynama Sıcaklığı: 571.5 °C

Kapalı Formülü: C₁₈H₂₀FN₃O₄

Açık Formülü:



3.1.1.2. Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

Bu çalışmada ofloksasin konsantrasyonlarının hazırlanmasında çözücü olarak kullanılmıştır ve Merck'den sağlanmıştır. Test maddemiz olan ofloksasin saf DMSO'da çözülmüştür ve aynı zamanda saf DMSO, çözücü kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Kimyasal adı: Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

Molekül ağırlığı: 78.19 g/mol

Saflık düzeyi: \geq %99.0

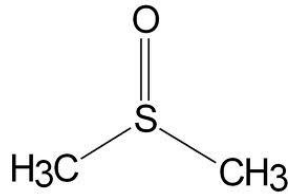
Kaynama noktası: 189 °C

Erime noktası: 18.0-18.5 °C

CAS No: 67-68-5

Kapalı formülü: (CH₃)₂SO

Açık formülü:



3.1.1.3. Kromozom Medyumu

Bu çalışmada Biological Industries firmasının ürettiği RPMI 1640 (01-106-1) hücre kültürü yapmak için kullanılmıştır. RPMI 1640 Medyumu'nun 100 ml.'sinde aşağıdaki bileşikler belirtilen miktarlarda bulunmaktadır.

RPMI1640 (Biological Industries).....	100 ml
Fetal Bovine Serum (Biological Industries)	20 ml
Penicillin/Streptomycin/Amphotericin (PSA) (Biological Industries)	1 ml
Phytohemaglutinin M (PHA-M) (Biological Industries)	1.2 ml
L-Glutamin (Merck)	2 ml

Bu karışımdan steril olan her bir kültür tüpüne 2.5 ml konulmuştur ve kültürde kullanılmıştır.

3.1.1.4. Mitomycin C (MMC)

Bu çalışmada Mitomycin C pozitif kontrol olarak kullanılmıştır ve Sigma firmasından sağlanmıştır.

Kimyasal adı: Mitomycin C

Molekül ağırlığı: 334.33 g/mol

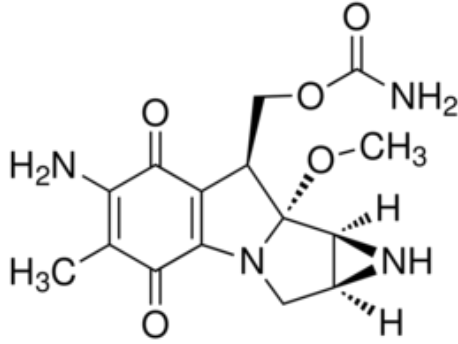
Erime noktası: 360°C

CAS No: 50-07-7

Safılık düzeyi: %99

Kapalı formülü: C₁₅H₁₈N₄O₅

Açık formülü:



3.1.1.5. Cytochalasin B (Sigma)

Mikronükleus testinde, hücre bölünmesi sırasında sitokinezi engellemek ve iki nükleuslu hücreler oluşturmak amacıyla kullanılmıştır ve Sigma'dan sağlanmıştır.

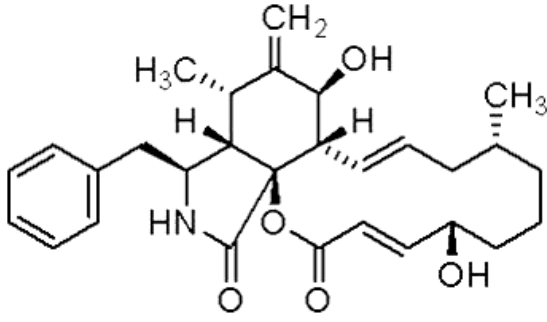
Kimyasal adı: Cytochalasin B

Molekül ağırlığı: 479.62 g/mol

Safılık düzeyi: ≥ %98

CAS No: 14930-96-2

Kapalı formülü: C₂₉H₃₇NO₅

Açık formülü:**3.1.1.6. Colcemid (Kolsemid, Kolşisin)**

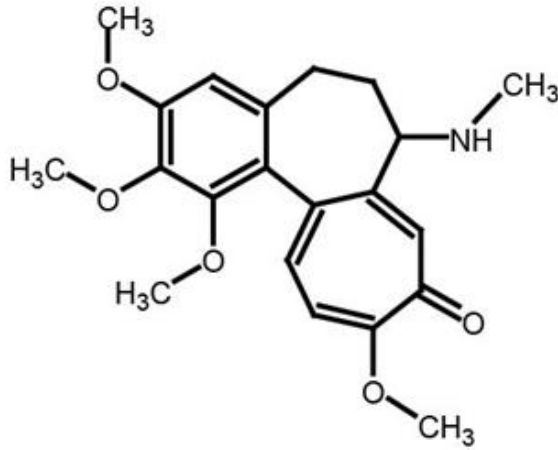
Kültürü yapılan hücreleri metafaz safhasında durdurmak için kullanılmıştır ve Biological Industries firmasından sağlanmıştır. Kolşisin eriyiği kromozom medyumunun her ml'sinde 0.06 µg olacak şekilde (0.06 µg/ml) 2.5 ml'lik kromozom medyumuna ilave edilmiştir.

Kimyasal adı: Colcemid, N-Deacetyl-N-methyl colchicine

Cat. No: 12-004-10

Molekül ağırlığı: 399.4 g/mol

Kapalı formülü: C₂₂H₂₅NO₆

Açık formülü:

3.1.1.7. Hipotonik Eriyik

Hipotonik eriyik olarak %0,4'lük KCl (Merck) kullanılmıştır. Uygulamadan yaklaşık bir gün önce eriyik bidistile su içinde hazırlanan hipotonik eriyik, her preparasyondan önce 37°C'deki inkübatörde ısıtılıp kullanılmıştır.

3.1.1.8. Fiksatif

KA deneylerinde 1 hacim asetik asit'in (Sigma) 3 hacim metanol (Sigma) ile karıştırılması sonucu hazırlanan fiksatif kullanılmıştır. MN deneylerinde ise birinci fiksatif; 1 hacim glasiyal asetik asit, 5 hacim metanol ve 6 hacim %0.9 NaCl (1/5/6 glasiyal asetik asit/metanol/%0.9'luk NaCl) karıştırılarak hazırlanmıştır. Diğer fiksatifler ise 1 hacim glasiyal asetik asit ve 5 hacim metanol'ün (1/5 glasiyal asetik asit/metanol) karıştırılması ile hazırlanmıştır. Fiksatifler, her preparasyonda kullanılmadan iki saat önce hazırlanarak buzdolabında saklanmıştır.

3.1.1.9. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd)

BrdUrd Sigma firmasından temin edilmiştir. BrdUrd eriyiği steril saf su içerisinde hazırlanmıştır. 1 mg BrdUrd 2 ml steril saf suda çözülmüştür. Bu eriyikten 50µl' lik miktarı kültür tüplerine ilave edildiği zaman kültür son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde BrdUrd ihtiva etmektedir.

Kimyasal adı: 5'-Bromo-2'-deoxyuridine

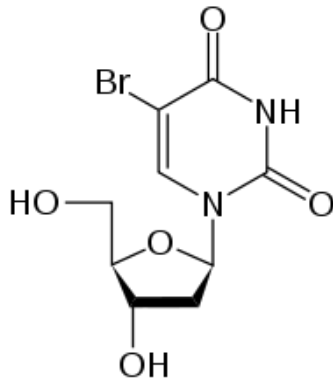
Molekül ağırlığı: 307.10 g/mol

Saflık düzeyi: % 99

CAS No: 59-14-3

Kapalı formülü: C₉H₁₁BrN₂O₅

Açık Formül:



Hazırlanışı

Saf Suyun Sterilizasyonu

Temiz bir erlene saf su doldurularak erlenin ağzı pamukla iyice kapatılmıştır. Sterilizasyon esnasında erlenin üzeri alüminyum kâğıdı ile örtülmüş ve erlendeki saf su otoklavda 1.2 atm. buhar basıncında, 120 °C'de 15 dk. steril edilmiştir.

BrdUrd Eriyiğinin Sterilizasyonu

BrdUrd eriyiği steril bir erlen içinde bulunan ve steril olan saf su içerisinde 5'-bromo-2'-deoxyuridine maddesinin eritilmesiyle hazırlanmıştır. Bu eriyik steril şartlarda por çapı 0.2 µm olan bakteri filtresinden (Corning Incorporated, membran filtre) geçirilerek steril edilmiştir. Hazırlanan eriyik ağzı vida kapaklı steril kültür tüplerine alınarak, etrafı ışık geçirmeyecek şekilde kapatıldıktan sonra buzdolabında saklanmıştır.

3.1.1.10. Sorensen Tamponu

Bu eriyik, iki stok çözelti halinde hazırlanmıştır ve bu çözeltiler çalışmanın amacına uygun olarak birbirleriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanılmıştır.

Hazırlanışı

Tampon A: 11.34 gr KH_2PO_4 (Merck) 250 ml distile suda çözülmüştür

Tampon B: 14.83 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Sigma) 250 ml distile suda çözülmüştür. KH_2PO_4 çözeltisi, Na_2HPO_4 çözeltisinin üzerine ilave edilmiştir.

3.1.1.11. Standart Saline Citrate (SSC) Eriyiği

11.05 gr tri sodyum sitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck) tartılarak bir miktar saf su içerisinde eritilmiştir. Daha sonra 21.9 gr NaCl (Sigma) tartılarak yine saf su içerisinde ancak ayrı bir kapta eritilmiştir. İki eriyik, bir şişeye dökülerek iyice karıştırılmış ve üzerine 500 ml oluncaya kadar saf su ilave edilmiştir. Hazırlanan bu 5 x SSC'lik stok eriyik buzdolabında saklanmıştır. KKD'yi incelemek için bu stoktan 20 ml alınarak üzeri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlanmış ve elde edilen 1 x SSC eriyiği kullanılmıştır.

3.1.1.12. Giemsa

Giemsa boyası Merck firmasından temin edilmiş olup, % 5'lik Giemsa-Tampon (Sorensen) boya eriyiği şeklinde hazırlanmıştır ve KA ve KKD testlerinde kromozomları, MN testinde ise nükleusları boyamak için kullanılmıştır.

3.1.1.13. Entellan

Hazırlanan preparatları daimi hale getirmek amacıyla lam ile lameli birbirlerine yapıştırmak için kullanılmıştır ve Merck'den temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

3.1.2.1. Hassas Terazı

Çalışmamızda kullanılan kimyasalların tartılması amacıyla, hava akımlarına karşı özel cam paravanlarla korunan ve 0.0001 gr hassasiyetindeki Precisa marka terazi kullanılmıştır.

3.1.2.2. Biyogüvenlik Kabini

Test solüsyonlarının hazırlanması, steril tüplere kan ekiminin yapılması ve test solüsyonlarının kültür tüplerine ilave edilmesinin steril şartlarda gerçekleşebilmesi için, ESCO marka Class-II biyogüvenlik kabini kullanılmıştır.

3.1.2.3. İnkübatör

Hücre kültürünün yapılmasında ve bazı eriyiklerin ısıtılmasında Binder marka inkübatör kullanılmıştır.

3.1.2.4. Santrifüj

Çalışmamızda kültür tüplerindeki hücreleri çöktürmek amacıyla Centrifuge MPW-351R marka santrifüj kullanılmıştır.

3.1.2.5. Vorteks Karıştırıcı

Çalışmamızda kültür tüplerini dairesel salınımlı hareketler ile karıştırmak amacıyla BioCote (Stuart-SA8) marka vorteks karıştırıcı kullanılmıştır.

3.1.2.6. UV Kabin

Çalışmamızda bölünme sırasında yeni sentezlenen polinükleotid ipliği içine timinin yerine ortamda bulunan BrdUrd'yi alan kromatidin soluk boyanmasını sağlamak amacıyla CAMAG marka UV kabin kullanılmıştır.

3.1.2.7. Mikroskop

Preparatları incelemek amacıyla Leica marka ışık mikroskobu ve görüntü analiz sistemi kullanılmıştır.

3.2. Kromozom Anormalliklerini (KA) ve Mitotik İndeksi (MI) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması

3.2.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Periferik kan örneklerinden KA'ni saptamak amacıyla hücre kültürünün yapılması ve preparatların hazırlanmasında Evans (1984)'ın tekniği modifiye edilerek kullanılmıştır. Sigara içmeyen, geçirilmiş herhangi bir ciddi hastalığı olmayan, rutin bir şekilde herhangi bir ilaç kullanmayan ve 20-24 yaşları arasında olan sağlıklı iki erkek ve iki bayandan 1/10 oranında heparinize edilerek kan alınmıştır. Alınan periferik kan örneklerinden 300 µl steril şartlarda içerisinde 2.5 ml'lik kromozom medyumunu bulunan steril tüplere ekilmiştir ve hücre kültürü $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 72 saat için inkübe edilmek üzere inkübatöre yerleştirilmiştir.

Çalışmamızda negatif kontrol, pozitif kontrol ve ofloksasin grupları oluşturulmuştur. Negatif kontrol grubunda saf DMSO kullanılmış ve inkübasyona bırakılmıştır. Bu gruptaki kültür tüpleri saf DMSO'nun 48 saatlik muamelesine maruz bırakılmıştır. DMSO kültür tüplerine 10 µl/ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Çalışmamızda pozitif kontrol olarak ise Mitomycin C kullanılmıştır ve kültür tüpleri Mitomycin C'nin 48 saatlik muamele süresine maruz bırakılmıştır. Mitomycin C kültür tüplerine 0.16 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Test maddemiz olan ofloksasin'in etkisini incelemek için kültür süresinin bitimine 48 saat kala ofloksasin'in daha önce belirlenmiş ve kültür tüplerine saf DMSO'da çözülerek hazırlanmış konsantrasyonları olan 30, 60 ve 120 µg/ml'lik miktarları ilave edilmiştir. Çalışılan OFX dozları yapılan ön çalışmalar ile belirlenmiştir. OFX ile ilgili literatürlerin taranması sonucu, insan periferik lenfosit kültüründe kullanılacak uygun dozlar hakkında yeterli veri bulunamadığı ve bu konuda karar verilemediği için ön çalışma yapılması uygun görülmüştür. Sitotoksitenin ve OFX'in konsantrasyonlarının belirlenebilmesi için bir seri hücre kültürü hazırlanmış ve bu kültürlerle 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 µg/ml şeklinde değişik dozlarda OFX eklenerek bir ön çalışma yapılmıştır. Hücre kültürleri 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda OFX ile muamele edilmiş ve kültürlerden elde edilen preparatlar mitotik indeks bakımından incelenmiştir. OFX'in test edilen konsantrasyonlarından 100 µg/ml dozundan sonra mitoz geçiren hücre sayısı dramatik bir şekilde azaldığı ve mitotik indeksi değerlendirebilecek sayıda yeterli hücre sayılamadığı için konsantrasyon aralıkları değiştirilerek ikinci bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada ise kültürlerle 100, 120, 140, 180 µg/ml OFX dozları eklenmiştir. Denenen ikinci OFX dozlarından 120 µg/ml dozu mitotik indekste yaklaşık % 50 oranında azalmaya neden olmasından dolayı

inhibitör konsantrasyon yani, IC50 değeri 120 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu nedenle çalışmamızda en yüksek OFX dozu 120 µg/ml olarak seçilmiştir. Ayrıca, yapılan ön çalışmalarda 120 µg/ml'den daha yüksek dozlarda doz artışına paralel olarak mitotik indeksin hızla azaldığı ve sitotoksitenin önemli oranda artış gösterdiği saptanmıştır. OFX'in 180 µg/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarında mitotik aktiviteye rastlanmamıştır. Çalışmamızda en yüksek OFX dozu olarak IC50 değeri olan 120 µg/ml'lik konsantrasyon kullanılırken en düşük OFX dozu olarak IC50 değerinin 1/4'ü olan 30 µg/ml'lik konsantrasyon kullanılmıştır. IC50 değerinin 1/2'si olan 60 µg/ml'lik konsantrasyon ise ara doz olarak kullanılmıştır.

Tüm tüplere kültür süresinin bitiminden 1 saat önce (kültürün 71. saatinde) kolşisin eriyiğinden 0.06 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiş ve hücreler 1 saat süresince kolşisin ile muamele bırakılmıştır.

Kültür süresinin bitiminde tüpler 1200 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiş ve altta biriken kan hücrelerine zarar vermeden üstte biriken süpernatant su trompu yardımıyla atılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden yaklaşık 1ml'lik sıvı karıştırıldıktan sonra tüplere, daha önceden 37°C'de ısıtılmış olan %0.4'lük KCI hipotonik solüsyonundan yavaş yavaş damlalar halinde 5 ml ilave edilmiştir. Tüplere hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler, ağzı kapatılarak inkübatöre konulmuştur ve 37°C'de 20 dakika hipotonik eriyikle muamele edilmiştir. Muamele süresinin sonunda tüpler 15 dk. 1200 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır.

Hücrelerin fikse edilmesi için tüplere, 3:1 oranında hazırlanan ve buzdolabında muhafaza edilen soğuk tespit (fiksatif) çözeltisi (metil alkol: glisial asetik asit), tıpkı hipotonik eriyik ilavesi gibi 5 ml olacak şekilde damlalar halinde yavaş yavaş ilave edilmiştir. Yaklaşık 20 dakika oda sıcaklığında fiksatif ile muamele edilen hücreler 1200 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görülünceye kadar bu işlem yaklaşık 3 kez daha tekrarlanmıştır. Son santrifüj işleminden sonra tüplerde yaklaşık 1 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atılmıştır.

Tüpteki süspansiyon pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirildikten sonra, daha önceden alkolle temizlenmiş ve buzdolabında saklanan soğuk lamlar üzerine damlatılarak hücrelerin lam üzerinde yayılması sağlanmıştır. Bu şekilde hazırlanmış preparatlar kurumak üzere kapalı bir yerde oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiştir.

3.2.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması

Sorensen tamponu ile hazırlanmış olan % 5'lik Giemsa eriyiği filtre kağıdı ile dik bir şaleye süzülmüştür. Preparatların Giemsa-Tampon boya eriyiğinde 4 dakika boyanması sağlanmıştır. Preparatlar boyadan çıkarıldıktan sonra farklı kaplardaki distile sularından geçirilerek fazla boyanın akması sağlanmış ve preparatlar dik bir şekilde kurumaya bırakılmıştır. Boyanan preparatlar en az 1 gece kurutulduktan sonra, entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir. Entellan kuruduktan sonra daimi preparatlarda mikroskopik incelemeler yapılmıştır.

3.2.3. Mikroskopik İncelemeler ve Mikroskopta Fotoğraf Çekme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar görüntü analiz sistemli Leica marka ışık mikroskobu ile x100 büyütmede incelenmiştir. İncelenen preparatlarda mitotik indeks (MI) ve kromozom anormallikleri (KA) belirlenmiştir. Mitozu geçiren bazı hücrelerin kromozomları ve saptanan bazı kromozom anormallikleri yine x100 büyütmede fotoğraflanmış ve bilgisayara aktarılmıştır.

3.2.4. Mitotik İndeks (MI) ve Kromozom Anormalliklerinin (KA) Saptanması

3.2.4.1. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

Test maddelerinin mitoz bölünme üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile her kişiye ait preparatlardan toplam 2000 bin hücre incelenmiş ve bunlar arasında metafaz devresinde olan hücreler saptanarak kaydedilmiştir. Her bir kişinin incelenen 2000 hücresi içinde bölünme halindeki (metafaz evresindeki) hücrelerin oranı yüzde cinsinden hesaplanarak mitotik indeks saptanmıştır.

3.2.4.2. Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması

Kromozom aberasyonlarının belirlenmesi amacıyla, her bir grup ve konsantrasyon için, her bir kişiden hazırlanan preparatlarda kromozomları iyi dağılmış 100 metafaz plağı (4 kişiden toplam 400 hücre) incelenerek normal (Şekil 3.1) ve yapısal ve sayısal kromozom anormallikleri taşıyan metafaz plakları tespit edilmiştir. Bu hücreler içinde gözlediğimiz kromozom yapı ve sayı anormallikleri Uluslararası İnsan Sitogenetik Adlandırma Sistemine (ISCN= International System for Human Cytogenetic Nomenclature) uygun olarak değerlendirilmiş ve adlandırılmıştır (Paz-y-Mino ve ark., 2002). İncelenen her 100 hücrede saptanmış olan kromozom anormalliklerinden toplam kromozom anormalliği, hücre başına düşen toplam kromozom anormalliği, hücre başına

düşen yapısal kromozom anormalliği ve kromozom aberasyonu içeren anormal hücre yüzdesi hesaplanmıştır.



Şekil 3.1. Normal metafaz plağı (x1000)

Mace ve ark. (1978) elektron mikroskobu çalışması ile gap bölgelerinde DNA ipliğinde kırık veya kırıklar olmadığını belirtmişlerdir. Bu nedenle pek çok çalışmada gaplar kromozom anormalliği olarak değerlendirilmemektedir (Yavuz Kocaman ve Topaktaş, 2007; Börçek Kasurka, 2010; Afan, 2011) Benzer olarak bu çalışmada da gaplar, kromozom anormalliği olarak değerlendirilmemiştir.

3.3. Mikronükleus (MN) Testi İçin Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması

3.3.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Çalışmamızda *in vitro* mikronükleus testi için hücre kültürünün yapılması ve preparatların hazırlanmasında Fenech (2000), Rothfuss ve ark. (2000) ve Kirsch-Volders ve ark. (2003)'nın kullandıkları tekniklerden yararlanılmıştır. Sigara içmeyen, geçirilmiş herhangi bir ciddi hastalığı olmayan, rutin bir şekilde herhangi bir ilaç kullanmayan ve 20-24 yaşları arasında olan sağlıklı iki erkek ve iki bayandan 1/10 oranında heparinize edilerek kan alınmıştır. İçerisinde 2.5 ml'lik kromozom medyumunu bulunan steril tüplere, alınan periferik kan örneklerinden 300 µl steril şartlarda ekilmiştir ve hücre kültürü $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 68 saat için inkübasyona bırakılmıştır.

Mikronükleus testi için de negatif kontrol, pozitif kontrol ve ofloksasin grupları bulunmaktadır ve bu gruplara uygulanan tüm test maddeleri, kromozom anormallikleri testinde uygulanan konsantrasyon ve muamele sürelerinde kullanılmıştır. Yani; saf DMSO'nun 48 saatlik muamelesini içeren negatif kontrol grubu, Mitomycin C'nin 48 saatlik muamelesinden oluşan pozitif kontrol grubu ve test maddemiz olan ofloksasin'in saf DMSO'da hazırlanmış olan 30, 60, 120 µg/ml'lik konsantrasyonlarının 48 saat boyunca etken madde ile muamele edilmelerinin yapıldığı deney grupları, mikronükleus testi için de aynen kullanılmıştır.

Tüm kültür tüpleri inkübasyona bırakıldıktan sonra, sitokinezi engelleyerek iki nükleuslu hücre oluşumunu sağlamak için kültürün bitimine 24 saat kala (inkübasyonun başlangıcından 44 saat sonra) bütün tüplere 8 µg/ml olacak şekilde sitokalsin B ilave edilmiştir.

Kültür süresinin bitiminde tüpler 1200 rpm'de 15 dk. santrifüjlenerek süpernatant atılmıştır. Tüpte kalan yaklaşık 1 ml'lik sıvı karıştırıldıktan sonra tüplere, daha önceden 37°C'de ısıtılmış olan hipotonik eriyikten (%0.4 KCl) 5 ml yavaş yavaş ilave edilmiştir. Hipotonik eriyik ilave edilen tüpler, ağzı kapatılarak 37°C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda tüpler 1200 rpm'de 15 dk. santrifüjlenerek tekrar süpernatant atılmıştır. Bu sefer hipotonik eriyik ilavesi gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 5 ml olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edilecektir. Daha sonra glasiyal asetik asit/metanol/%0.9 NaCl (1/5/6 oranlarında) karışımından oluşan 5 ml soğuk fiksatif, hipotonik eriyik ilavesi gibi yavaş yavaş ve damlalar halinde tüpteki sıvının üzerine ilave edilmiştir. İlk fiksatif ile oda sıcaklığında 20 dk fiksatif ile muamele edildikten sonra tüpler tekrar 1200 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Daha sonra tüplere bu defa 1 kısım asetik asit ve 5 kısım metil alkolden (1/5) oluşan 5 ml ikinci fiksatif ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 20 dk muamele edilmiştir. Bu işlem tüpte kalan sıvının berraklaştığı görülünceye kadar 2-3 kez tekrarlanmıştır. Son santrifüjden sonra tüplerde yaklaşık 1 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atılmıştır ve tüplerdeki sıvı pasteur pipeti ile karıştırılarak resüspanse edilmiştir. Daha önce temizlenmiş ve alkol içerisinde buzdolabında saklanan soğuk lamaların üzerine hücre süspansiyonu damlatılarak preparatlar hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatlar kurumaları için kapalı bir yerde 24 saat oda ısısında bekletilmiştir.

3.3.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması

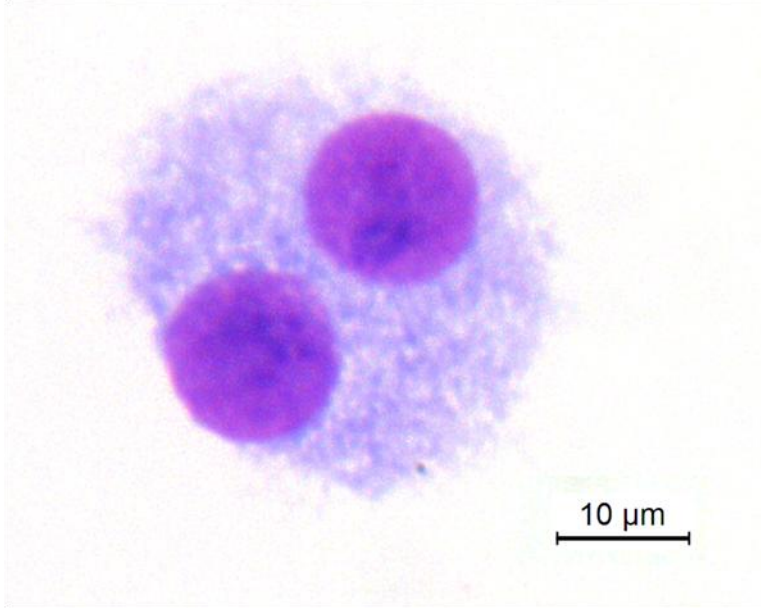
Sorensen tamponu ile hazırlanmış olan % 5'lik Giemsa eriyiği filtre kağıdı ile dik bir şaleye süzölmüştür. Mikronökleusların boyanması için preparatlar Giemsa-Tampon boya eriyiğinde yaklaşık 14 dakika boyanmıştır. Preparatlar boyadan çıkarıldıktan sonra farklı kaplardaki distile sulardan geçirilerek fazla boyanın akması sağlanmış ve preparatlar dik bir şekilde kurumaya bırakılmıştır. Boyanan preparatlar en az 1 gece kurutulduktan sonra, entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir. Entellan kuruduktan sonra daimi preparatlarda mikroskobik incelemeler yapılmıştır.

3.3.3. Mikroskobik İncelemeler ve Mikroskopta Fotoğraf Çekme

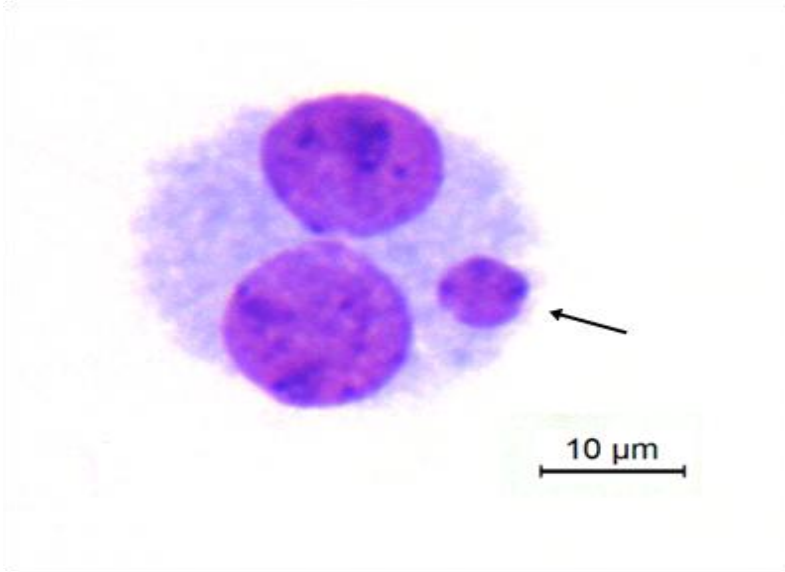
Hazırlanmış olan daimi preparatlar görüntü analiz sistemli Leica marka ışık mikroskobu ile x40 büyütmede incelenmiştir. İncelenen preparatlarda mononökleat (bir nükleuslu), binökleat (iki nükleuslu), trinökleat (üç nükleuslu) ve tetranökleat (dört nükleuslu) hücreler ile mikronökleuslu binökleat hücreler tespit edilmiştir. Bir, iki, üç ve dört nükleuslu bazı hücrelerin ve mikronökleus bulunduran bazı binökleat hücrelerin fotoğraflama işlemi x100 büyütmede yapılmış ve görüntüler bilgisayara aktarılmıştır.

3.3.4. Mikronökleus Sayısı ve Nökleus Bölünme İndeksinin (NBI) Saptanması

Mikronökleus sayısını belirlemek amacıyla daimi preparatlarda her kişi için, her muamele grubu ve kontrollerinde iki nükleusa sahip (Şekil 3.2) toplam 2000 hücre incelenmiş ve bu binökleat hücreler içerisinde mikronökleus taşıyanlar (Şekil 3.3) belirlenmiştir. Ayrıca incelenen binökleat hücrelerde toplam mikronökleus sayısı saptanarak, mikronökleus taşıyan iki nükleuslu hücrelerin oranı ve toplam mikronökleus sayısının incelenen iki nükleuslu hücre sayısına bölünmesiyle hücre başına düşen mikronökleus sayısı (MN/Hücre) ve % MN hesaplanmıştır.



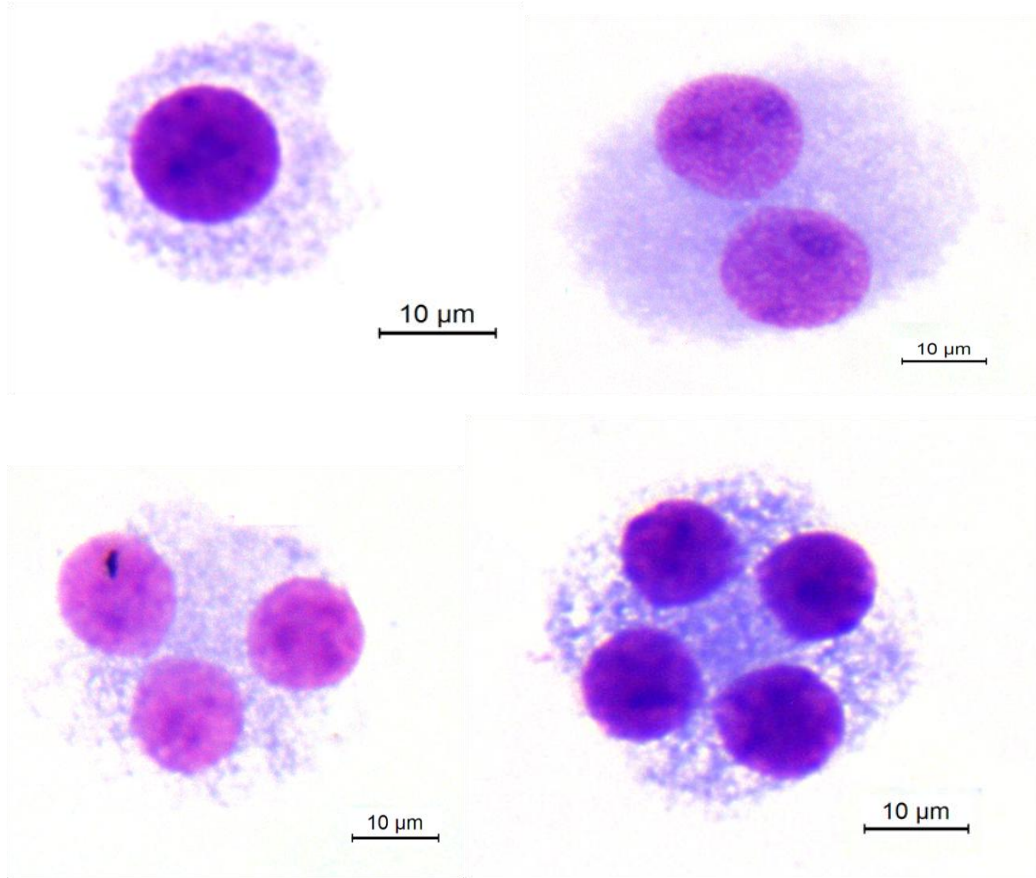
Şekil 3.2. Binükleat hücre (x400)



Şekil 3.3. Bir mikronükleus bulunduran binükleat hücre (x400)

Binükleer hücre ve mikronükleus ayırımı Titenko-Holland ve ark. (1997) ve Fenech (2000)'e göre yapılmıştır: (1) Hücreler belirgin sitoplazmasıyla yuvarlak ya da oval görünüme sahip olmalıdır; (2) Benzer olarak, nükleuslar belirgin nükleus zarıyla çevrili yuvarlak ya da oval olmalıdır; (3) İçerisinde MN sayılan hücreler sadece bir nükleus bölünmesi geçiren hücrelerdir; (4) MN'lar sadece ana nükleusun 1/3'ü ya da daha küçük olduklarında hesaba katılmalıdır; (5) MN'lar ana nükleus gibi boyanmalıdır; (6) MN'lar ana nükleustan açık bir şekilde ayrılmış olmalıdır (Yavuz Kocaman, 2007; Börçek Kasurka, 2010).

Her bir kişiden hazırlanan preparatlardan 1000 (4 kişi 4000 hücre) hücre sayılarak, bu hücreler arasından bir nükleuslu, iki nükleuslu, üç nükleuslu ve dört nükleuslu (Şekil 3.4) olanların oranı saptanmıştır. Bu orandan yola çıkarak Eastmond ve Tucker (1989) tarafından önerilmiş olan formüle göre Nükleer Bölünme İndeksi (NBI) (Nuclear Division Index = NDI) hesaplanmıştır (Yavuz Kocaman ve Topaktaş, 2007; Börçek Kasurka, 2010). NBI'nin hesaplanması kimyasal veya fiziksel bir maddenin sitotoksik etkisini göstermede önemli bilgiler sağlar (Fenech, 1997; Yavuz Kocaman ve Topaktaş, 2007; Börçek Kasurka, 2010).



Şekil 3.4. Mononükleat, binükleat, trinükleat ve tetranükleat hücreler (x 400)

$$NBI = \frac{(MI + 2MII + 3MIII + MIV)}{N}$$

MI: Bir nükleuslu hücreler

MII: İki nükleuslu hücreler

MIII: Üç nükleuslu hücreler

MIV: Dört nükleuslu hücreler

N: Toplam hücre sayısı

3.4. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Testi İçin Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması

3.4.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Periferik kan örneklerinden KKD'ni saptamak amacıyla hücre kültürünün yapılması ve preparatların hazırlanmasında sigara içmeyen, geçirilmiş herhangi bir ciddi hastalığı olmayan, rutin bir şekilde herhangi bir ilaç kullanmayan ve 20-24 yaşları arasında olan sağlıklı iki erkek ve iki bayandan 1/10 oranında heparinize edilerek kan alınmıştır. Alınan periferik kan örneklerinden 300 µl steril şartlarda içerisinde 2.5 ml'lik kromozom medyumunu bulunan steril tüplere ekilmiştir. Yine steril şartlarda ve daha önce hazırladığımız BrdU eriyiğinden her tüpe stoktan 50 µl damlatılarak iyice karıştırılmış ve hücre kültürü $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 72 saat için inkübe edilmek üzere inkübatöre yerleştirilmiştir. Hücre kültürünün yapılması ve preparatların hazırlanması için kromozom anormallikleri testinde uygulanan prosedür bu testte de uygulanmıştır.

3.4.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması

Bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını (Sister Chromatid Differentiation=SCD) sağlamak amacıyla Speit (1984), Speit ve Haupter (1985)'in geliştirdikleri metod modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla bir günlük preparatlar ışınlama kabına konarak üzeri bir film şeklinde Sorensen tamponu ile örtülecek şekilde kapatılmıştır. Işınlama eriyiği, 5 ml tampon A, 5 ml tampon B'den alınıp bu karışımın destile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır (pH=6.8).

Tampon A: 11.34 gr KH_2PO_4 (Merck) 250 ml distile suda çözülmüştür

Tampon B: 14.83 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Sigma) 250 ml distile suda çözülmüştür.

Işınlama eriyiğinin fazla veya az olması kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını önemli derecede etkilediği görülmüştür.

Bu şekilde ince bir tabaka halinde ışınlama eriyiği ile örtülen preparatlar, karanlıkta 15 cm yükseklikten 30W'lık 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen tek ultraviyole lambası ile 30 dk ışınlandırılmıştır. Işınlama bittikten sonra preparatlar 1x SSC eriyiği içerisinde $58-60^{\circ}\text{C}$ arasındaki sıcaklıklarda 60 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitmeden 15 dk önce %5'lik Giemsa boya eriyiği hazırlanmıştır. Sorensen tamponu ile hazırlanmış olan % 5'lik Giemsa eriyiği filtre kağıdı ile dik bir şaleye süzölmüştür. İnkübasyon süresinin sonunda preparatlar 1 x SSC eriyiğinden alınarak direk olarak boya içerisine konmuş ve yaklaşık olarak 20 dk boya içerisinde bekletilmiştir. Preparatlar

boyadan çıkarıldıktan sonra farklı kaplardaki distile sulardan geçirilerek fazla boyanın akması sağlanmış ve preparatlar dik bir şekilde kurumaya bırakılmıştır. Boyanan preparatlar en az 1 gece kurutulduktan sonra, entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir. Entellan kuruduktan sonra daimi preparatlarda mikroskopik incelemeler yapılmıştır.

3.4.3. Mikroskopik İncelemeler ve Mikroskopta Fotoğraf Çekme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar görüntü analiz sistemli Leica marka ışık mikroskobu ile x100 büyütmede incelenmiştir. İncelenen preparatlarda proliferasyon indeksi (PI) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) belirlenmiştir. Aynı preparatlarda 1., 2., 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin sayısı da saptanmıştır. Mitoz bölünmeyi geçiren hücreler ve saptanan kardeş kromatid değişimleri x100 büyütmede fotoğraflanmış ve bilgisayara aktarılmıştır.

3.4.4. Proliferasyon İndeksi (PI) ve Kardeş Kromatid Değişiminin (KKD)

Saptanması

3.4.4.1. Proliferasyon İndeksinin (PI) Saptanması

Test maddelerinin DNA replikasyonu üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile her kişiye ait preparatlardan tesadüfi seçilmiş toplam 100 hücrenin metafaz kromozomları incelenmiştir. Bu incelemeler sırasında gözlenen birinci, ikinci ve üçüncü metafaz devresindeki hücreler sayılmıştır. Bu verilerden yola çıkarak PI şu şekilde hesaplanmıştır:

M1: 1. Mitozdaki hücre sayısı

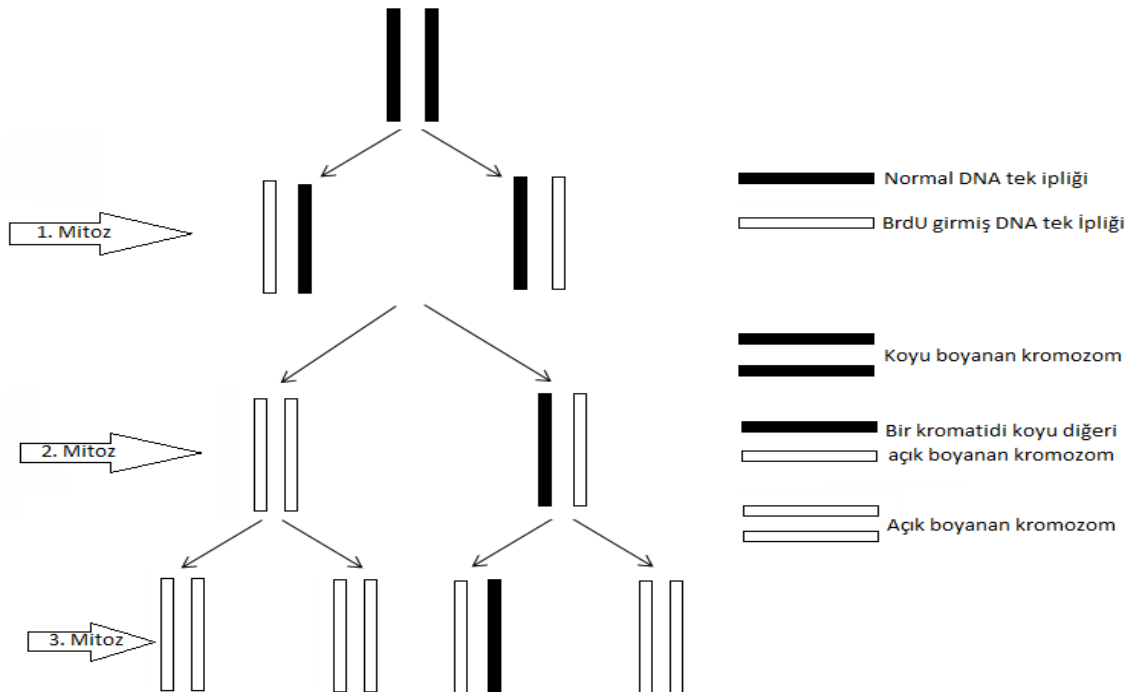
M2: 2. Mitozdaki hücre sayısı

M3: 3. Mitozdaki hücre sayısı

$$PI = \frac{(M1 + 2 M2 + 3 M3)}{100}$$

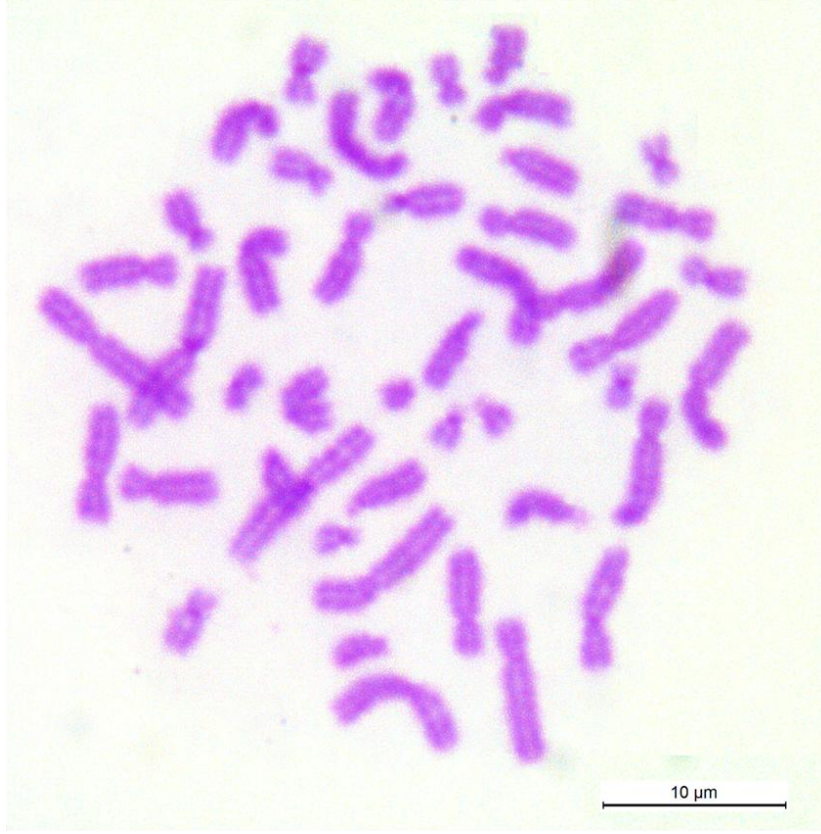
Birinci, ikinci ve üçüncü metafazlar şu şekilde ayırt edilmiştir (Topaktaş ve Speit, 1990): BrdUrd, DNA'nın yapısında bulunan timin bazlarının analogu olduğundan dolayı kültür ortamına BrdUrd koyduğumuzda hücre DNA'sını replike ettiği sırada (1.S fazında) yeni sentezlenen polinükleotid ipliği içine timinin yerine ortamda bulunan BrdUrd'yi alacaktır. Böyle hücrelerinin kromozomları boyandığında bir kromozomun her iki kromatidi de homojen koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler 1. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerden meydana gelen yavru hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd'li ortamda 2.S fazı) timin ihtiva eden polinükleotid

ipliğine komplementer olarak sentezlenen yeni DNA ipliğinde BrdUrd yer alacaktır. Bu iki polinükleotid ipliği bir kromozomun koyu boyanan kromatidini oluşturacaktır. BrdUrd'li ipliğe komplementer olarak sentezlenen yeni ipliğe de BrdUrd girecektir ve bir kromatidi oluşturan iki polinükleotid ipliği de BrdUrd ihtiva ettiklerinden bu kromatid aynı kromozomun açık boyanan kromatidini oluşturacaktır. Bu hücrenin metafaz devresinde preparat yapıldığında hücrenin tüm kromozomlarının kromatidlerinden biri koyu diğeri ise açık renkte boyanacaktır. Bunlar da 2. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir. Bu hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd'li ortamda 3.S fazı) ikinci mitozda açık boyanan kromatidden tüm polinükleotid ipliklerine BrdUrd girmiş olan bir kromozom meydana gelecektir ve bu kromozomun her iki kromatidi de açık renkte boyanacaktır. İkinci mitozda koyu boyanan kromatidden ise, bir kromatidin her iki ipliği BrdUrd'li ve diğerkromatidin bir ipliği BrdUrd'li diğeri ipliği timinli olan bir kromozom oluşacaktır. Bu kromozom da boyandığında bir kromatidi koyu renkte, bir kromatidi de açık renkte boyanacaktır. Böyle hücrelerin metafaz devresinde preparat yapıldığında bazı kromozomların her iki kromatidi açık renkte, bazı kromozomların bir kromatidi açık, diğerkromatidi de koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler de 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.5).

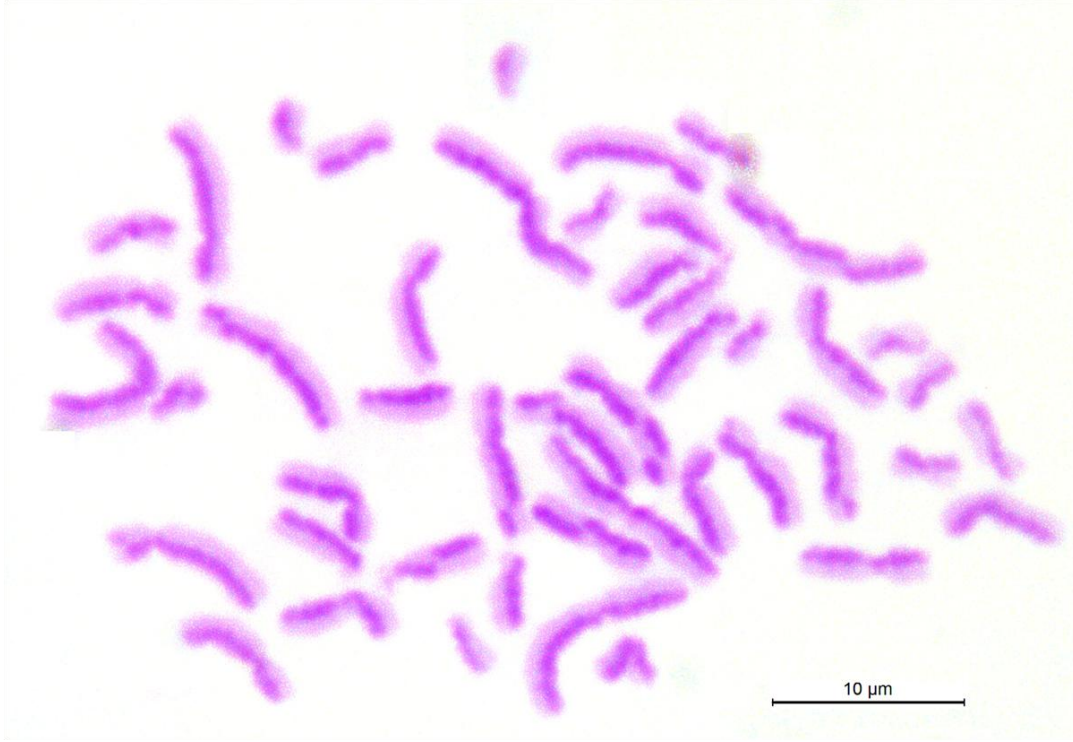


Şekil 3.5. BrdUrd' nin DNA yapısına girmesi ile birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması

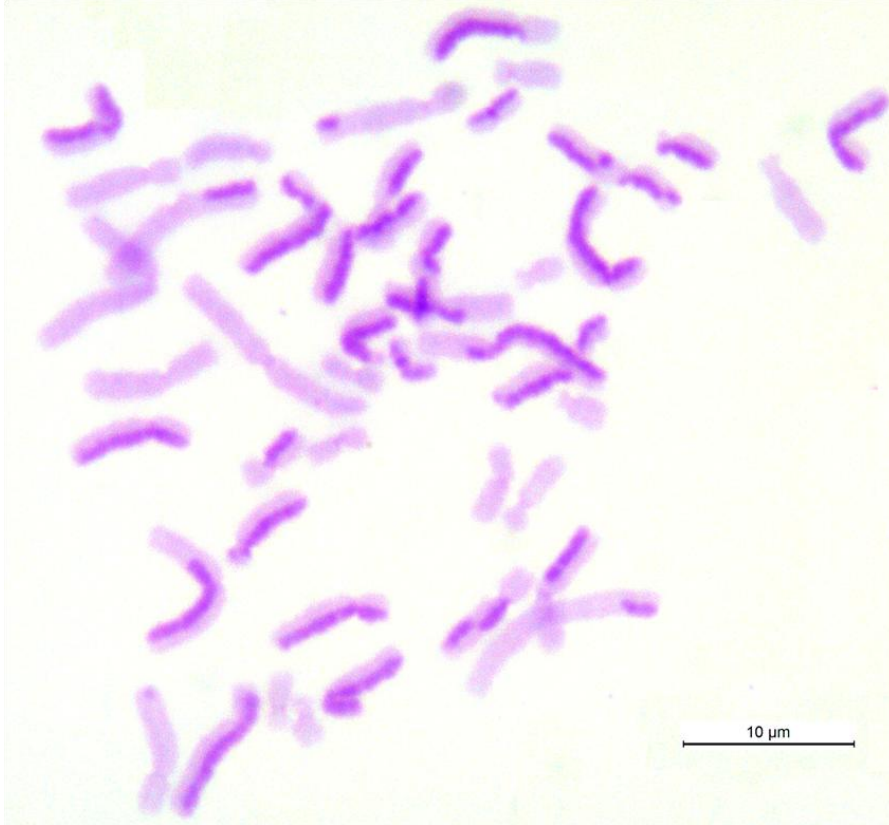
Bu şekilde 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücreler ayırt edilmiş (Şekil 3.6a; 3.6b; 3.6c), bu hücrelerin 100 hücre içindeki sayısı saptanmış, bundan da yukarıda belirtilen formüle göre proliferasyon indeksi (PI) hesaplanmıştır.



Şekil 3.6a. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomları (x100)



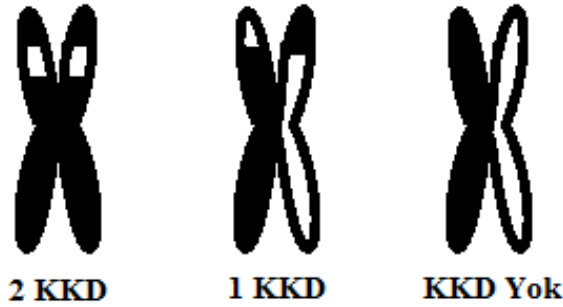
Şekil 3.6b. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomları (x100)



Şekil 3.6c. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomları (x100)

3.4.4.2. Kardeş Kromatid Değişiminin (KKD) Saptanması

KKD sayısı, her kişinin kan kültürüne ait preparatlardan iyi dağılmış ve ikinci mitozu geçiren 25 hücrede (4 kişiden toplam 100 hücre) saptanmıştır. KKD sayısı bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla belirlenmiştir. Ortadan bir parça değişimi olmuş ise bu iki KKD olarak değerlendirilmiş uçtan parça değişimi olmuş ise bu da bir KKD olarak sayılmıştır. Ancak bu incelemeler esnasında kromatidlerin primer boğum bölgelerinden dönüm yapıp yapmadıklarına dikkat etmek gerekir. Bu durumdaki kromozomlarda KKD yoktur (Şekil 3.8).



Şekil 3.7. Kardeş kromatid değişimi

3.5. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Mikroskobik inceleme sonucunda elde edilen test maddesinin uygulandığı MI, KA, NBI, MN, PI ve KKD parametrelerine ait verilerin hem kendi aralarında, hem de negatif kontrol ve pozitif kontrol grupları ile arasındaki farkın önemli olup olmadığı SPSS istatistik programı kullanılarak ANOVA analizi (Tukey testi) ile karşılaştırılmıştır. Doz-etki ilişkisini belirlemek amacıyla regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı (r) bulunmuş ve regresyon doğrusu çizilmiştir. Ayrıca hem KA, KKD ve MN arasındaki hem de MI, NBI ve PI arasındaki ilişkiler de belirlenmiştir.

Mikroskobik incelemeler sonucunda elde edilen görüntüler şekiller halinde, istatistiksel bulgular ise çizelgeler ve grafikler halinde verilmiştir.

4. BULGULAR

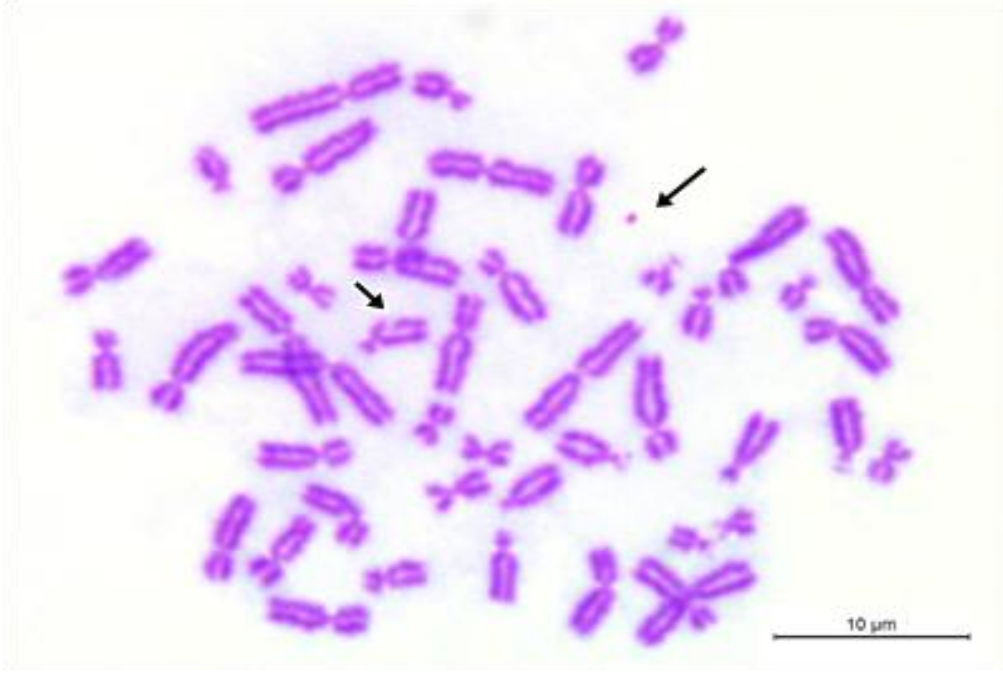
4.1. Ofloksasin'in Kromozom Anormalliği, Kardeş Kromatid Değişimi ve Mikronükleus Oluşumu Üzerindeki Etkileri

4.1.1. Ofloksasin'in Kromozom Anormalliklerinin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

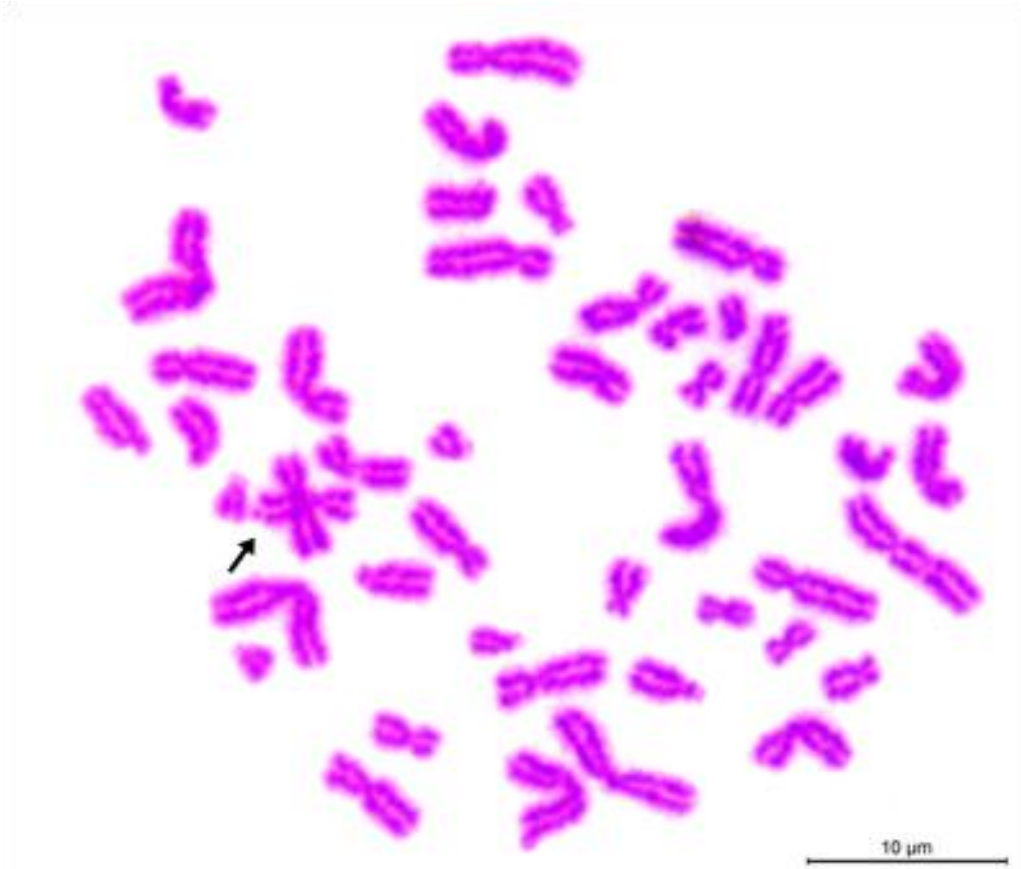
İnsan periferik lenfositlerinde test edilen Ofloksasin'in 30, 60 ve 120 µg/ml konsantrasyonlarda 48 saat muamelesi sonucu tüm dozlarda kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, kardeş kromatid birleşmesi, disentrik kromozom ve poliploidi meydana geldiği belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Bu çalışmada test edilen Ofloksasin'in dozlarından, en düşüğü olan 30 µg/ml dozunda; kromatid kırığı (Şekil 4.1), kromozom kırığı (Şekil 4.11), fragment (Şekil 4.1), kardeş kromatid birleşmesi (Şekil 4.6), disentrik kromozom (Şekil 4.9) ve poliploidi (Şekil 4.10) meydana geldiği belirlenmiştir. İkinci düşük doz olarak kullanılan 60 µg/ml konsantrasyonda; kromatid kırığı (Şekil 4.2), kromozom kırığı (Şekil 4.12), fragment (Şekil 4.4) ve kardeş kromatid birleşmesi (Şekil 4.7.) meydana geldiği belirlenmiştir. En yüksek doz olarak kullanılan 120 µg/ml dozunda ise; kromatid kırığı (Şekil 4.3), kromozom kırığı (Şekil 4.13), fragment (Şekil 4.5), kardeş kromatid birleşmesi (Şekil 4.8) ve poliploidi (Şekil 4.14) meydana geldiği belirlenmiştir.

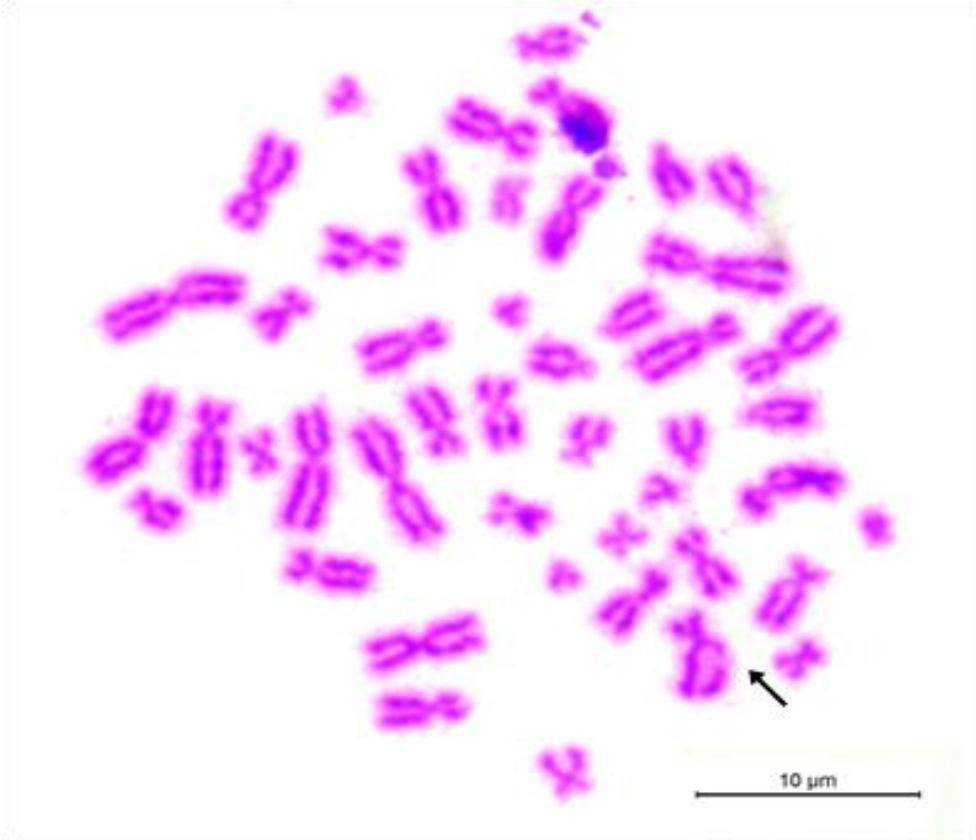
Ofloksasin'in 30, 60 ve 120 µg/ml dozlarında negatif kontrole göre toplam KA, % KA ve AHO'da bir artış gözlenmiş fakat bunun doz artışı ile paralellik göstermediği belirlenmiştir. 120 µg/ml dozda 60 µg/ml dozuna göre bir düşüş olmuştur (Şekil 4.15, Şekil 4.16) Ofloksasin'in 48 saatlik uygulamalarında, tüm değerlerde pozitif kontrole en yakın olan ve en yüksek artışın gözlendiği doz 60 µg/ml olmuştur. Ayrıca bu dozdaki AHO artışının, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında, test edilen tüm OFX dozlarında belirlenen pozitif kontrole yakın KA % KA ve AHO artışları istatistiksel anlamda farklılık görülmemiştir ($p < 0.05$) (Çizelge 4.1).



Şekil 4.1. Kromatid Kırığı ve Fragment (30 µg/ ml) X1000



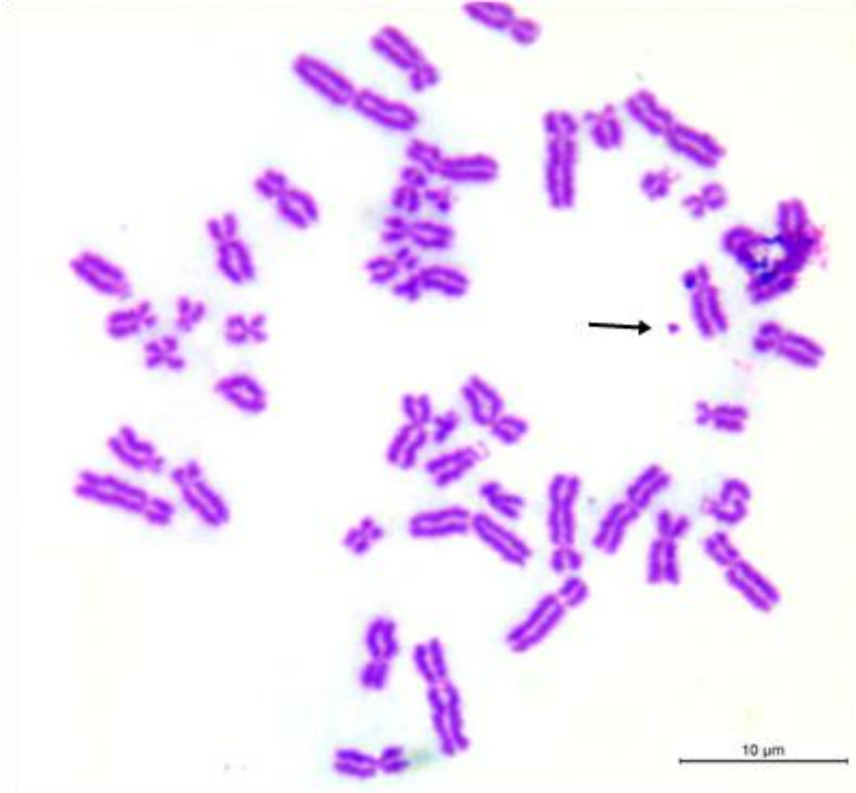
Şekil 4.2. Kromatid Kırığı (60 µg/ ml) X1000



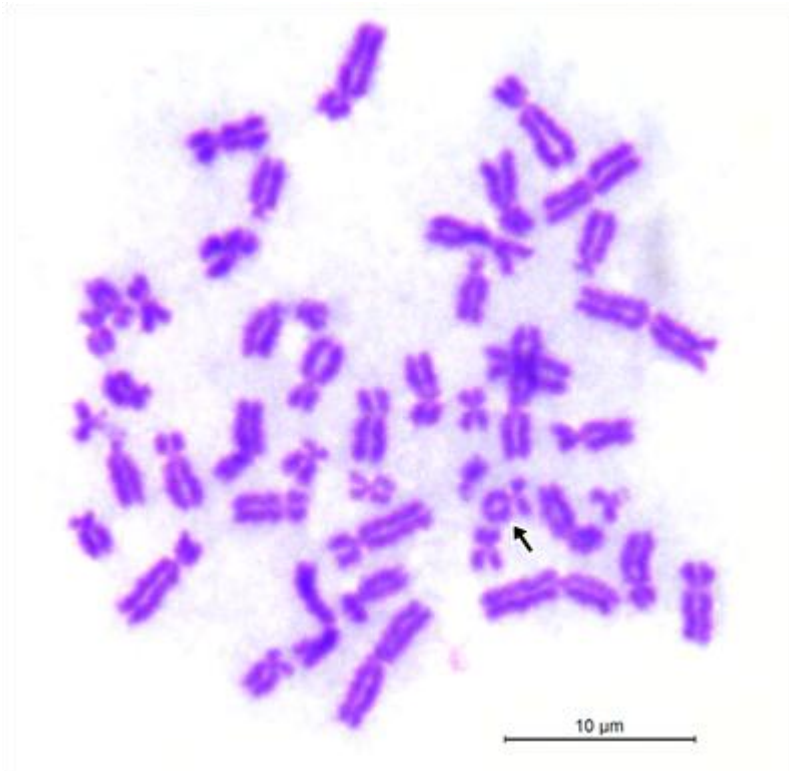
Şekil 4.3. Kromatid Kırığı (120 µg/ ml) X1000



Şekil 4.4. Fragment (60 µg/ ml) X1000



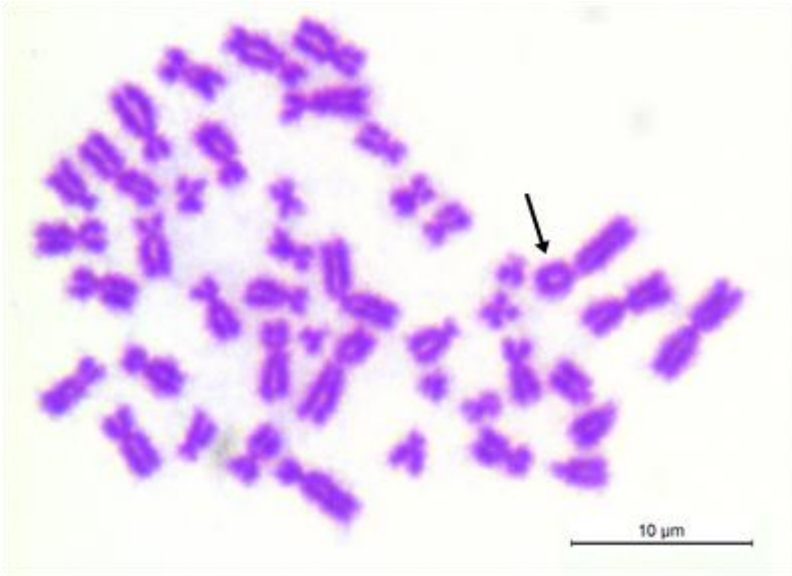
Şekil 4.5. Fragment (120 µg/ ml) X1000



Şekil 4.6. Kardeş Kromatit Birleşmesi (30 µg/ ml) X1000



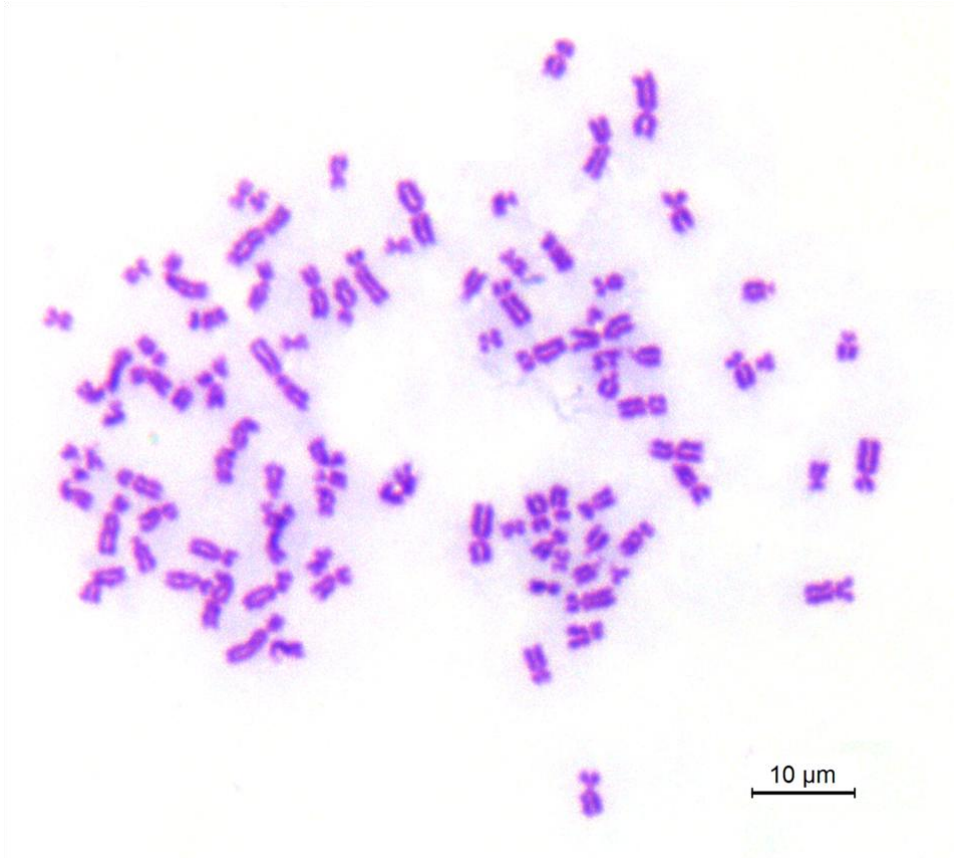
Şekil 4.7. Kardeş Kromatit Birleşmesi (60 µg/ ml) X1000



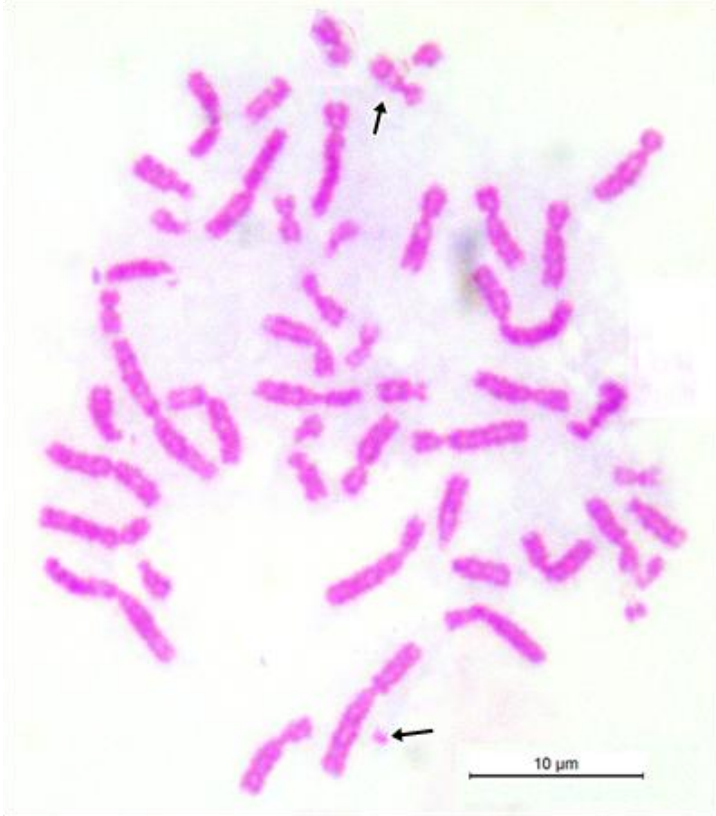
Şekil 4.8. Kardeş Kromatit Birleşmesi (120 µg/ ml) X1000



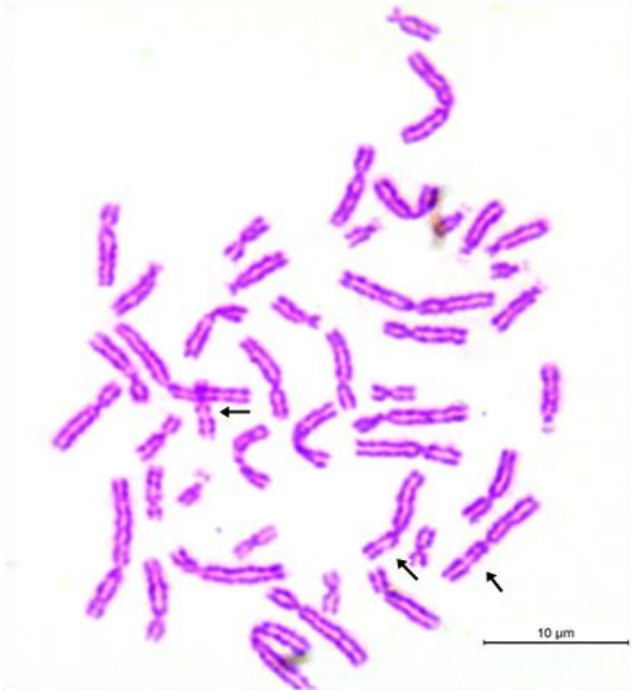
Şekil 4.9. Disentrik Kromozom ve kromatit kırığı (30 µg/ ml) X1000



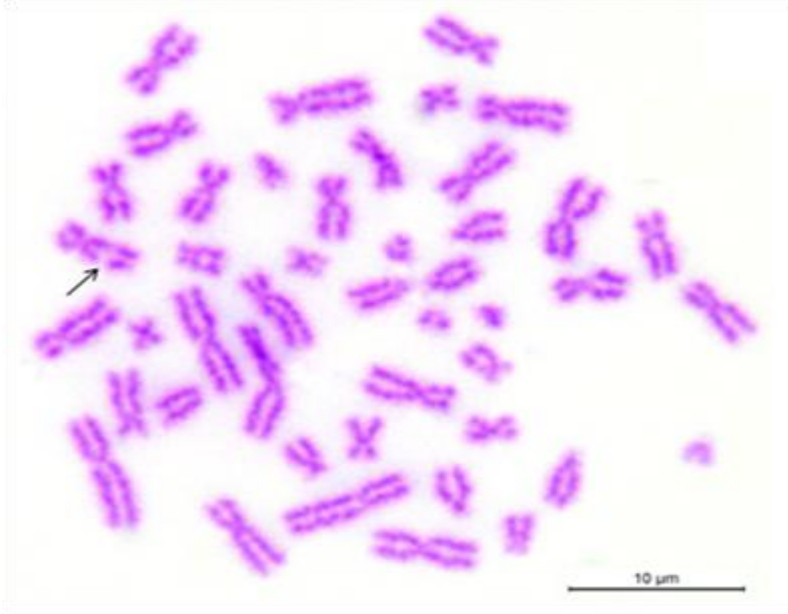
Şekil 4.10. Poliploidi (30 µg/ ml) X1000



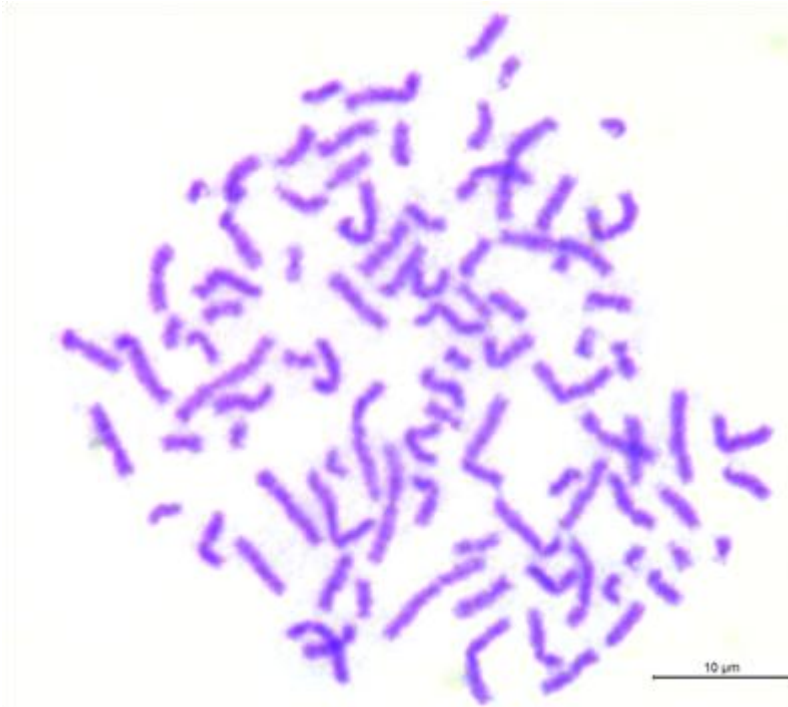
Şekil 4.11. Kromozom Kırığı ve Fragment (30 µg/ ml) X1000



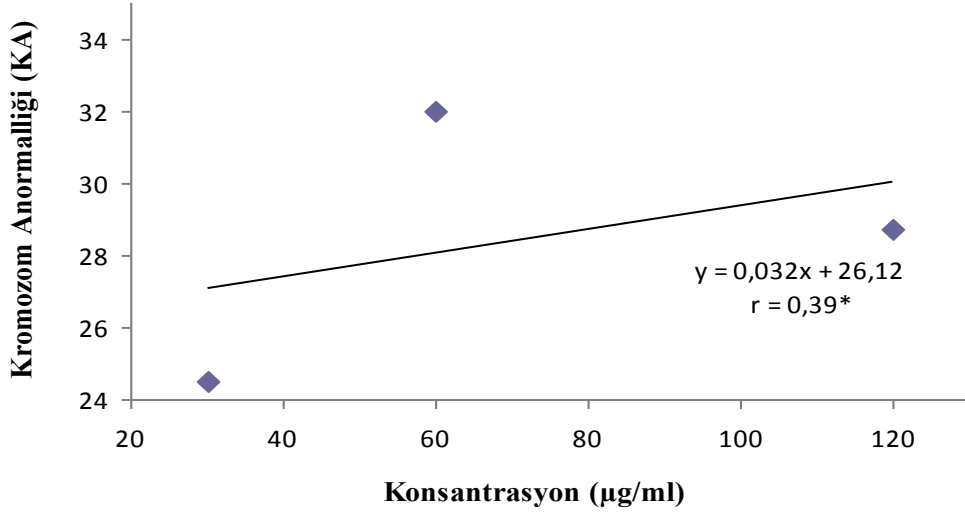
Şekil 4.12. Kromozom Kırığı (60 µg/ ml) X1000



Şekil 4.13. Kromozom Kırığı (120 µg/ ml) X1000

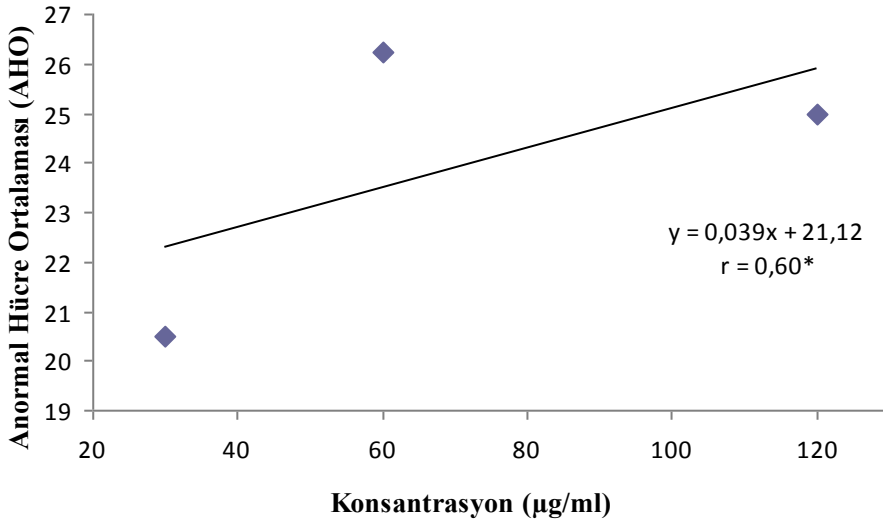


Şekil 4.14. Poliploidi (120 µg/ ml) X1000



* $P < 0.05$

Şekil 4.15. Ofloksasin'in test edilen dozları ile KA arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı



* $P < 0.05$

Şekil 4.16. Ofloksasin'in test edilen dozları ile AHO arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı

Çizelge 4.1. Ofloksasin' in sebep olduğu kromozomal anormallikler ve % MI, KA ve AHO' sı üzerine etkisi

Test Maddesi	Konsantrasyon	MI (%) ± SH	Anormallik Tipleri											
			K'	K''	F	KKB	KD	P	DSK	Toplam KA	%KA ± SH	AHO (%) ± SH		
Negatif Kontrol	10 µl/ml	3.47±0.29	18	6	1	-	-	-	2	-	-	27	6.75±1.31	6.25±1.31
Pozitif Kontrol (MMC)	0.16 µg/ml	1.27±0.24	72	56	27	-	-	20	-	-	-	175	43.75±9.32	36.50±6.61
Ofloksasin	30 µg/ml	2.77±0.81	46	32	13	4	-	-	1	2	-	98	24.50±3.61	20.50±2.59
	60 µg/ml	1.85±0.22	69	31	24	4	-	-	-	-	-	128	32.00±7.86	26.25±5.45 ^a
	120 µg/ml	1.45±0.22 ^a	47	32	29	6	-	-	1	-	-	115	28.75±3.47	25.00±3.39

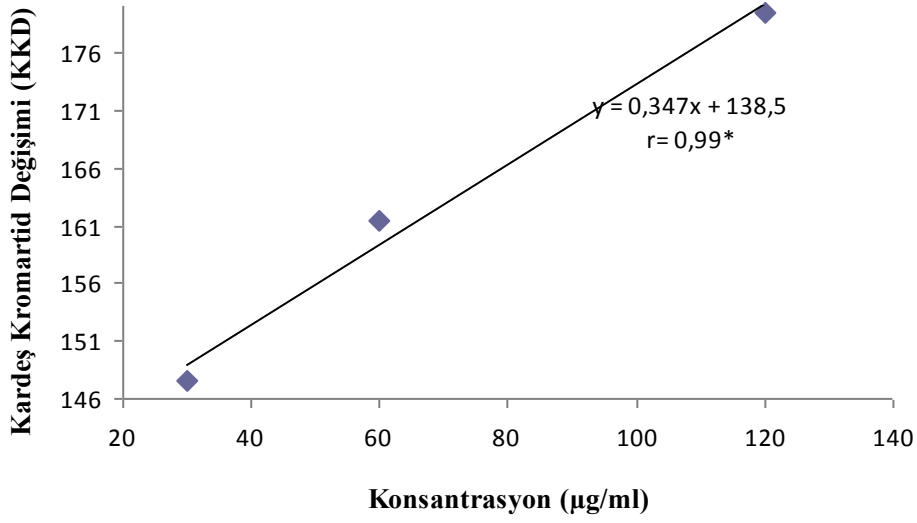
a: Negatif kontrol ile; b: Pozitif kontrol ile aradaki fark önemlidir.

(P < 0.05)

KA: Kromozom anormallikleri, AH: Kromozom anormallikleri içeren anormal hücreler, MI: Mitotik indeks, K': Kromatid kırığı, K'': Kromozom kırığı, F: Fragment, KKB: Kardeş kromatid birleşmesi, KD: Kromatid değişimi, P: Poliploidi, DSK: Disentrik kromozom

4.1.2. Ofloksasin'in Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

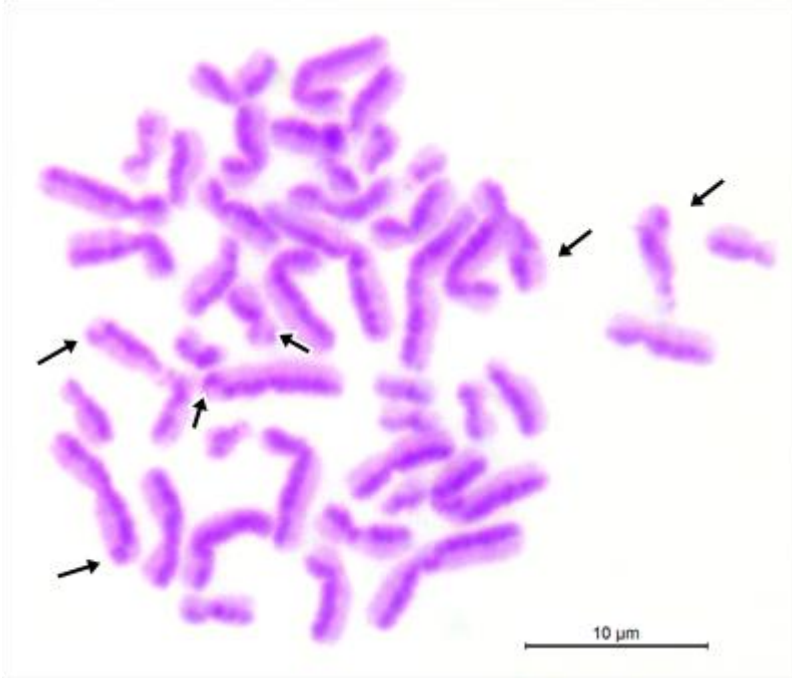
Ofloksasin'in 30, 60 ve 120 µg/ml'lik konsantrasyonlarının insan periferik lenfositlerine 48 saatlik muamelesi sonucu, doz artışına bağlı olarak KKD oranının arttığı görülmüştür (Şekil 4.17). Ofloksasin'in uygulamasına bağlı olarak ikinci mitoz safhasında metafaz kromozomlarında gözlenen KKD'ler Şekil 4.18., Şekil 4.19., Şekil 4.20., Şekil 4.21., Şekil 4.22., Şekil 4.23., Şekil 4.24., Şekil 4.25., Şekil 4.26.,' de gösterilmiştir.



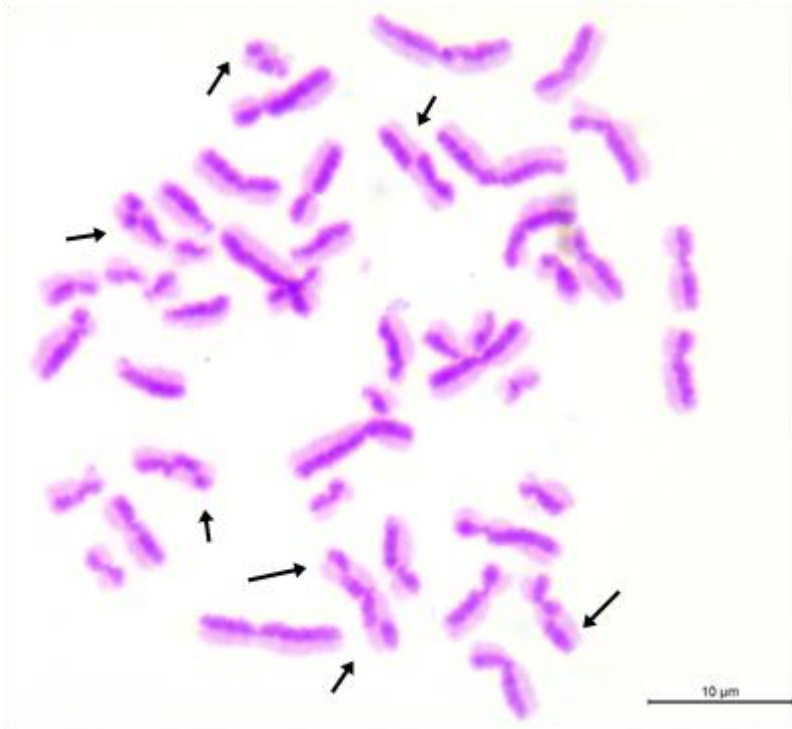
* P<0.05

Şekil 4.17. Ofloksasin'in test edilen dozları ile KKD arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı

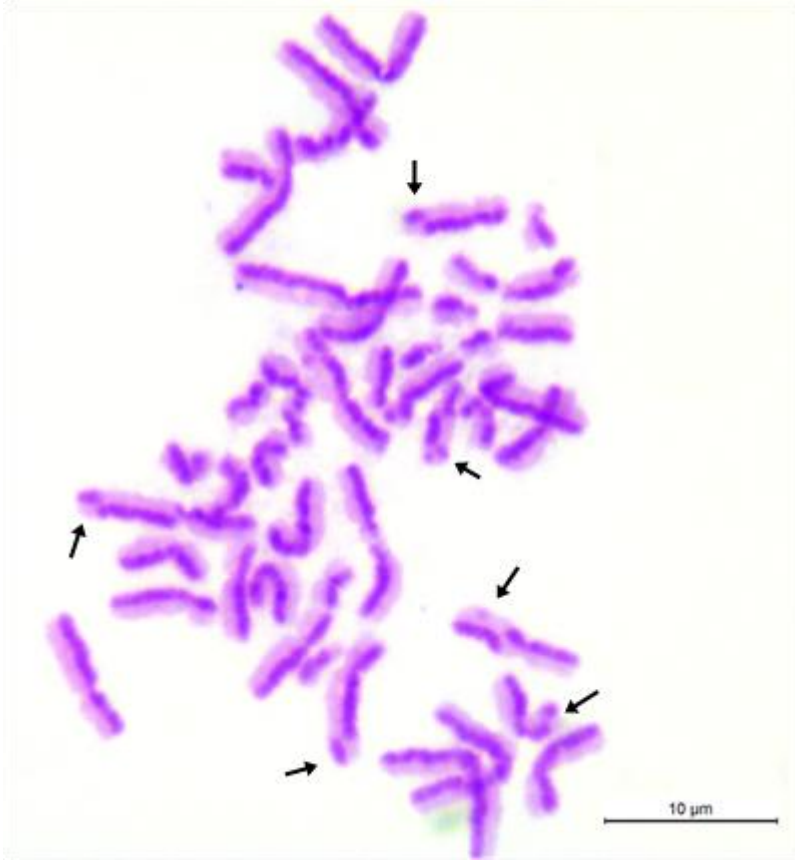
Ofloksasin'in 30, 60 ve 120 µg/ml'lik konsantrasyonlarda doz artışına bağlı olarak KKD frekansını artırdığı bulunmuştur. Ofloksasin'in 30, 60 ve 120 µg/ml'lik konsantrasyonlarında negatif kontrole göre yüksek KKD değerleri saptanmıştır. Fakat KKD frekansındaki bu artışlar negatif kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamda farklılık göstermemiştir. Ayrıca tüm dozlarda, KKD değerlerindeki bu artışlar pozitif kontrole göre düşük seviyede kalmış ve aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0.05) (Çizelge 4.2).



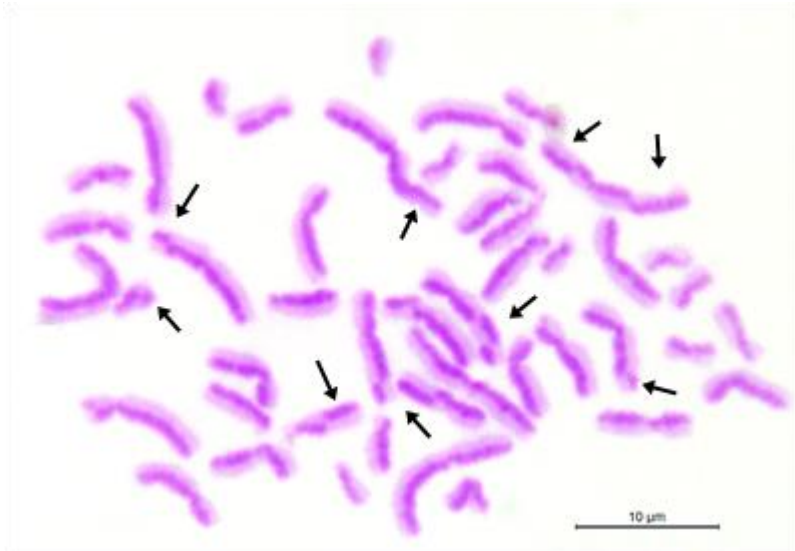
Şekil 4.18. 30 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler (X1000)



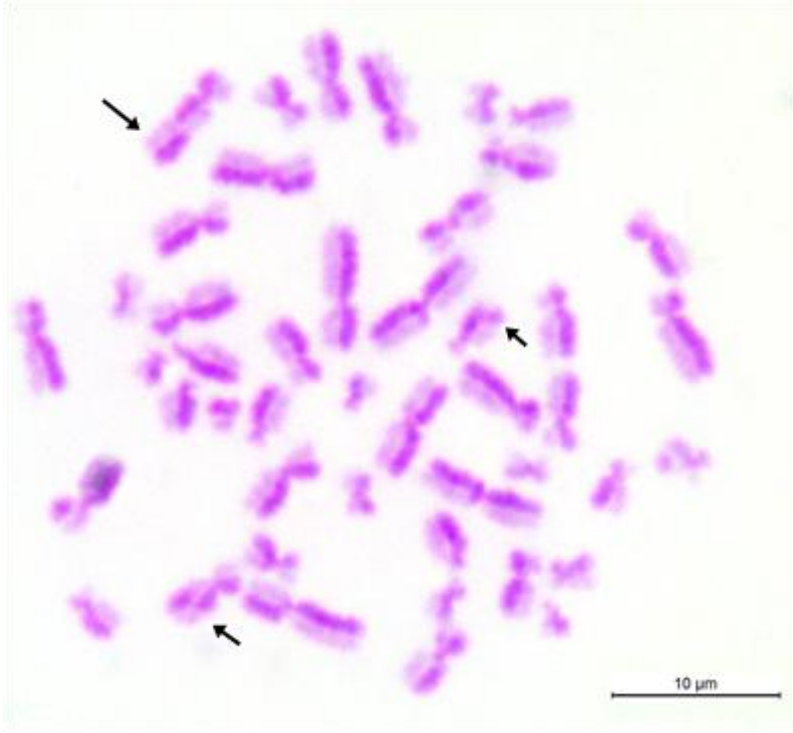
Şekil 4.19. 30 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler (X1000)



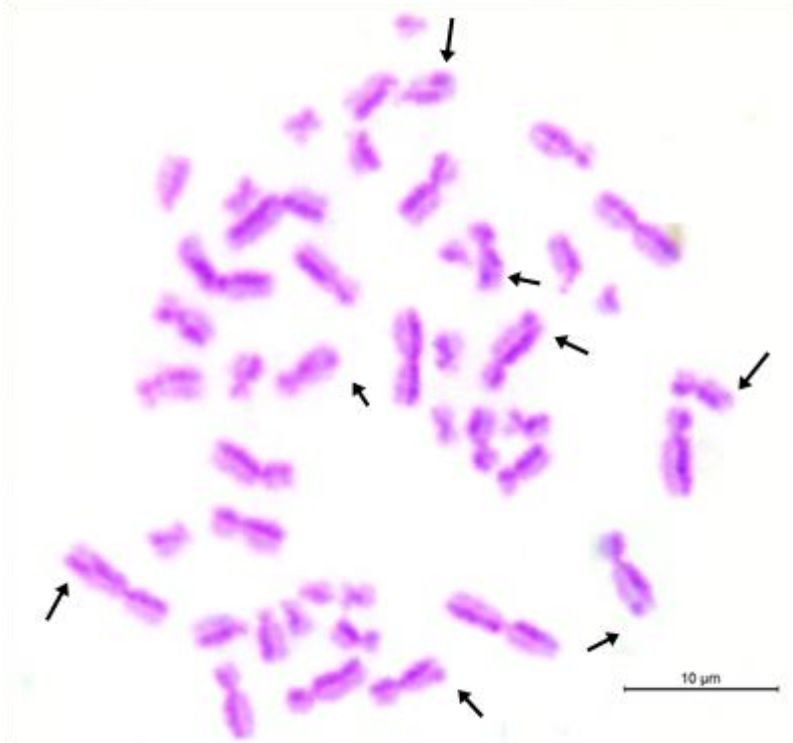
Şekil 4.20. 30 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler (X1000)



Şekil 4.21. 60 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler (X1000)



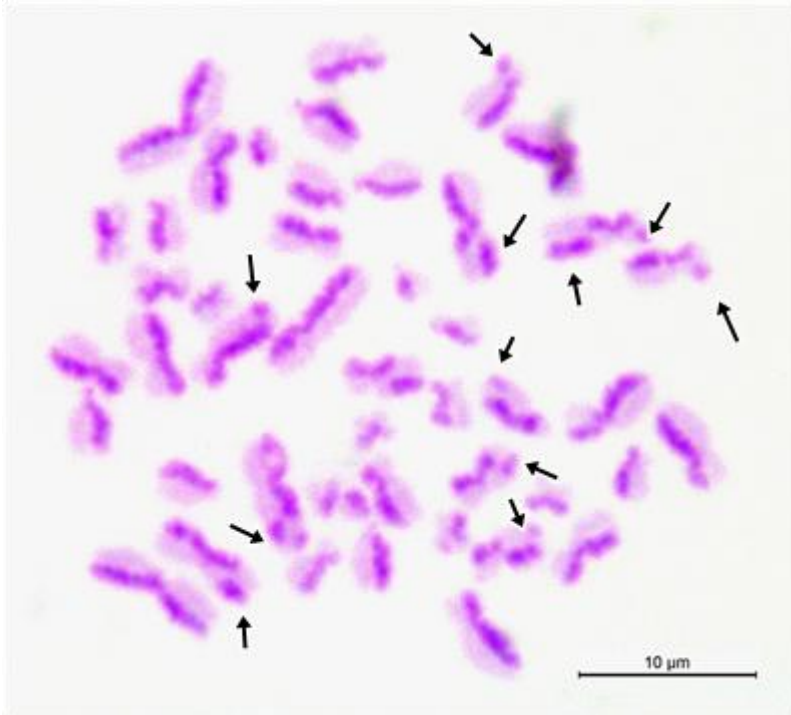
Şekil 4.22. 60 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler (X1000)



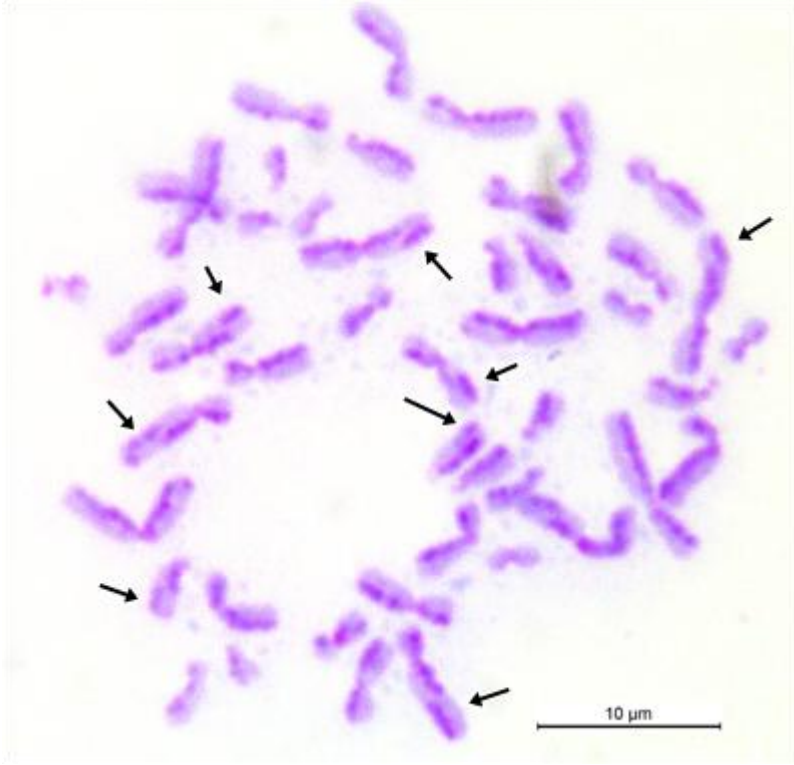
Şekil 4.23. 60 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler (X1000)



Şekil 4.24. 120 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler (X1000)



Şekil 4.25. 120 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler (X1000)



Şekil 4.26. 120 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler (X1000)

Çizelge 4.2. Ofloksasin' in sebep olduğu kardeş kromatid değişimleri ve KKD ve PI değerleri

Test Maddesi	Konsantrasyon	M1	M2	M3	PI ± SH	Min-Max KKD	KKD/Hücre ± SH
Negatif Kontrol	10 µl/ml	163	132	105	1.85±0.21	75-167	103.25±21.55
Pozitif Kontrol (MMC)	0.16 µg/ml	307	93	-	1.23±0.06	601-1922	1060.50±305.87
Ofloksasin	30 µg/ml	147	172	81	1.83±0.07 ^b	129-166	147.50±8.00 ^b
	60 µg/ml	191	162	47	1.61±0.06	139-177	161.50±8.38 ^b
	120 µg/ml	184	198	18	1.51±0.10	157-209	179.50±12.22 ^b

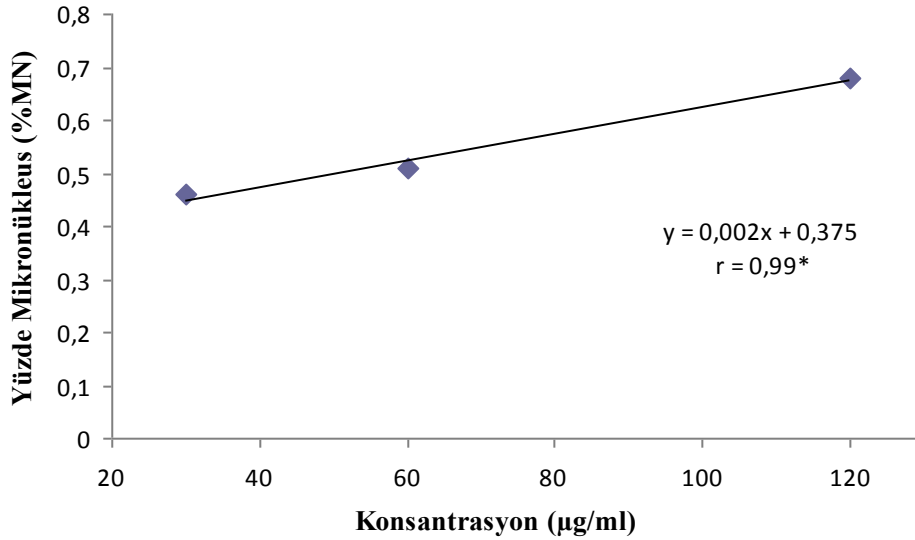
a: Negatif kontrol ile; b: Pozitif kontrol ile aradaki fark önemlidir.

(P < 0.05)

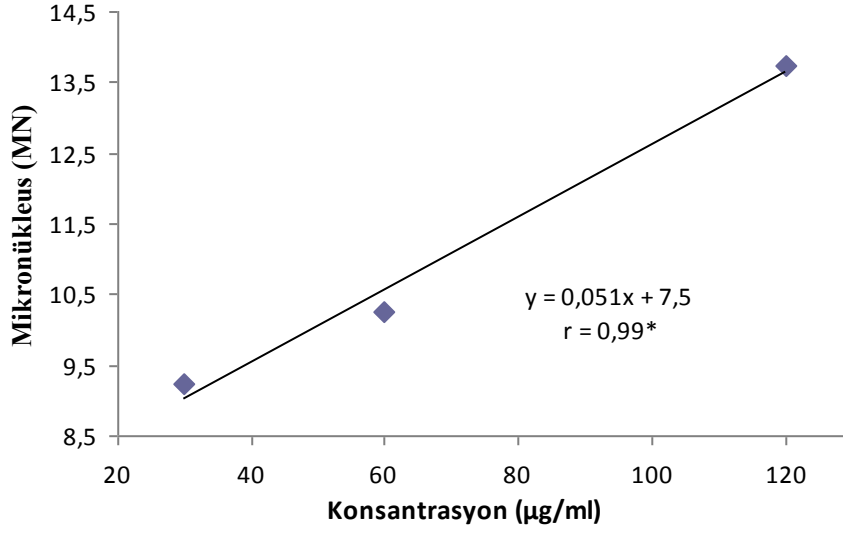
4.1.3. Ofloksasin'in Mikronükleus (MN) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

İnsan periferal lenfositlerinde Ofloksasin'in 30 µg/ml, 60 µg/ml ve 120 µg/ml konsantrasyonlarının 48 saatlik muameleleri sonucu, doz artışına bağlı olarak MN oluşum frekansını artırdığı belirlenmiştir (Şekil 4.27. ve Şekil 4.28.). Ofloksasin'in insan periferal lenfositlerine 48 saat muamelesi sonucu oluşan mikronükleuslu binükleat (MNBN) hücreler Şekil 4.29., Şekil 4.30., Şekil 4.31.' de gösterilmiştir.

MNBN hücrelerin sayısı ve yüzdesi, ilk OFX dozunda negatif kontrolden düşük belirlense de, OFX'in dozlarının artışına bağlı olarak yükselmiştir. Ancak bu artışlar ile negatif kontrol arasında istatistiksel anlamda önemli farklılık bulunmamıştır ($p < 0.05$). OFX'in 30, 60 ve 120 µg/ml'lik konsantrasyonlarının uygulaması sonucu elde edilen tüm MN frekansları pozitif kontrol ile kıyaslandığında aralarında istatistiksel anlamda önemli farklılık bulunmuştur ($p < 0.05$) (Çizelge 4.3).

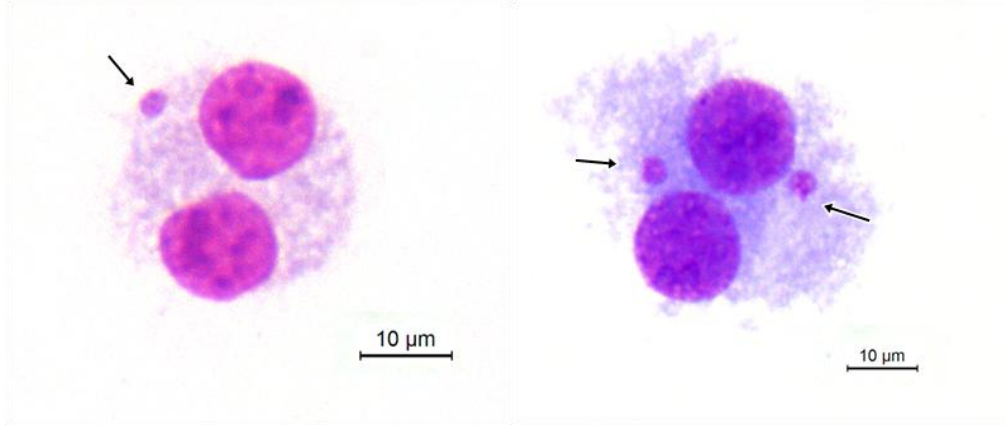


Şekil 4.27. Ofloksasin'in test edilen dozları ile % MN arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı

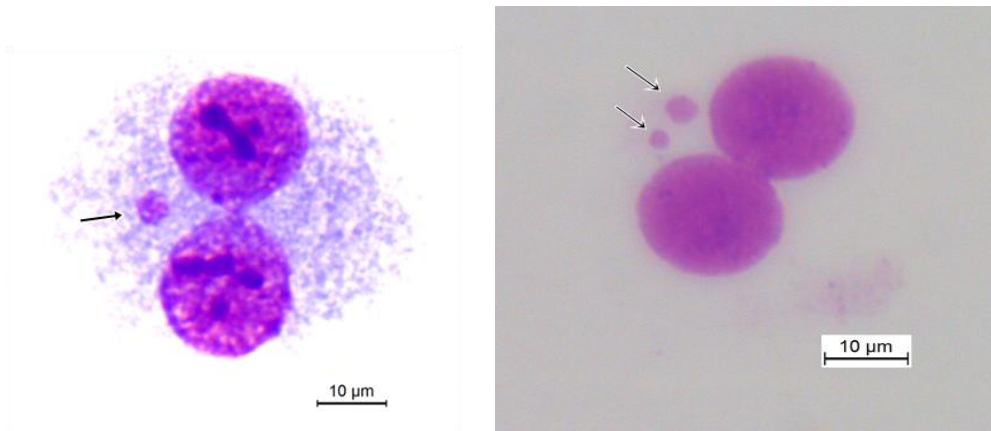


* $P < 0.05$

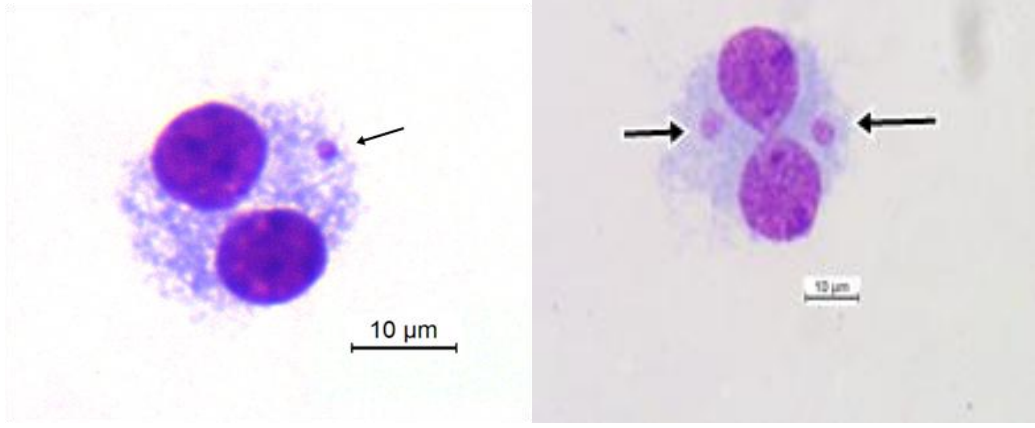
Şekil 4.28. Ofloksasin'in test edilen dozları ile MN arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı



Şekil 4.29. Bir mikronükleus ve iki mikronükleus içeren binükleat hücre (30 µg/ml) X400



Şekil 4.30. Bir mikronükleus ve iki mikronükleus içeren binükleat hücre (60 µg/ml) X400



Şekil 4.31. Bir mikronükleus ve iki mikronükleus içeren binükleat hücre (120 µg/ml)
X400

Çizelge 4.3. Hücrelerin nükleus sayısına göre, binükleat hücrelerin MN sayısına göre dağılımları ve MN, % MN ve NBI

Test Maddesi	Konsantrasyon	MN Sayısına Göre BN Hücrelerin Dağılımı					Nükleus Sayısına Göre Hücrelerin Dağılımı					
		0	1	2	3	>3	%MN±SH	1	2	3	4	NBI±SH
Negatif Kontrol	10 µl/ml	7962	38	-	-	-	0.47±0.05	1749	2067	80	104	1.63±0.06
Pozitif Kontrol (MMC)	0.16 µg/ml	7402	592	4	2	-	7.47±3.04	2514	1422	30	34	1.39±0.05
Ofloksasin	30 µg/ml	7963	36	1	-	-	0.46±0.14 ^b	2165	1825	4	6	1.46±0.03
	60 µg/ml	7959	39	2	-	-	0.51±0.07 ^b	2586	1406	8	-	1.35±0.05 ^a
	120 µg/ml	7945	53	2	-	-	0.68±0.15 ^b	2747	1252	1	-	1.31±0.03 ^a

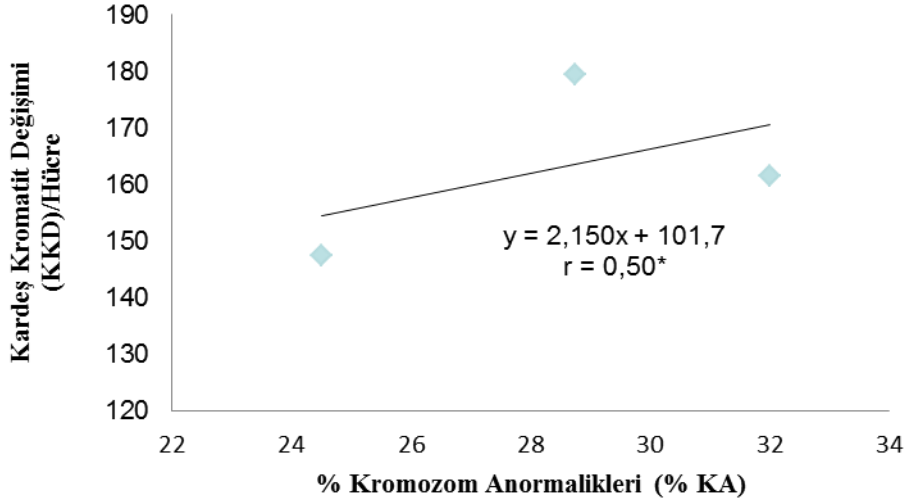
BN: Binükleat, MN: Mikronükleus, NBI: Nükleer bölünme indeksi

a: Negatif kontrol ile; b: Pozitif kontrol ile aradaki fark önemlidir.

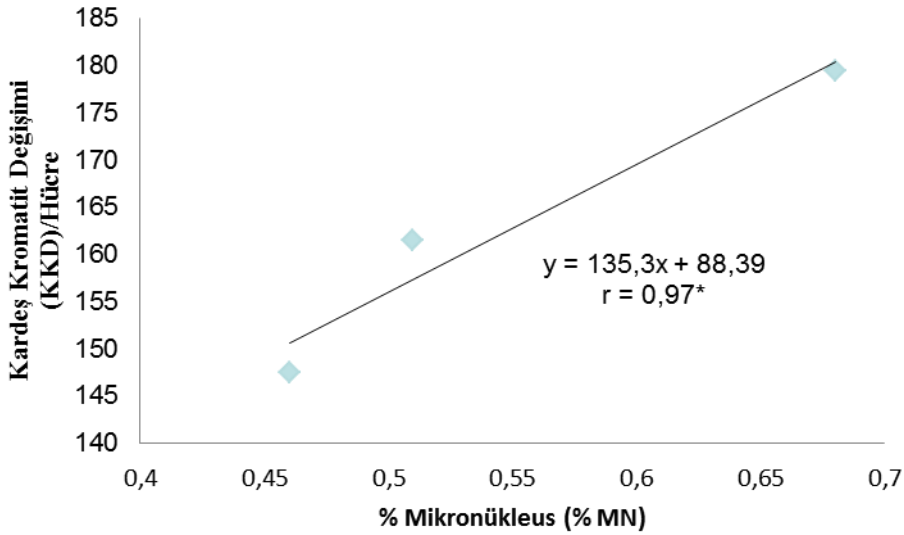
(p<0.05)

4.2. Ofloksasin Dozlarına Bağlı Olarak KKD, KA ve MN Arasındaki İlişki

İnsan periferel lenfositlerine 48 saat boyunca uygulanan OFX'in doz artışına bağlı olarak MN ve KKD frekanslarını artırdığı saptanmıştır, dolayısıyla MN ve KKD oluşum frekansları arasında kısmen paralel bir ilişki gözlenmiştir (Şekil 4.33). Daha önce tespit edilen KA frekansında ise doza bağlı bir artış görülmemiştir, bunun sonucunda KA ile MN ve KA ile KKD değerleri arasında daha zayıf bir ilişki tespit edilmiştir (Şekil 4.34, Şekil 4.32).

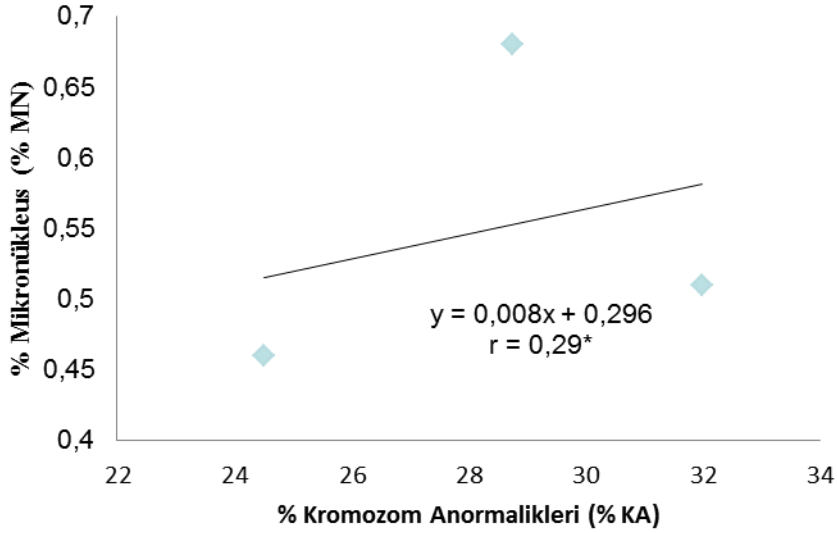


Şekil 4.32. Ofloksasin'in test edilen dozları ile % KA ve KKD/Hücre arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı



* P<0.05

Şekil 4.33. Ofloksasin'in test edilen dozları ile MN ve KKD/Hücre arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı



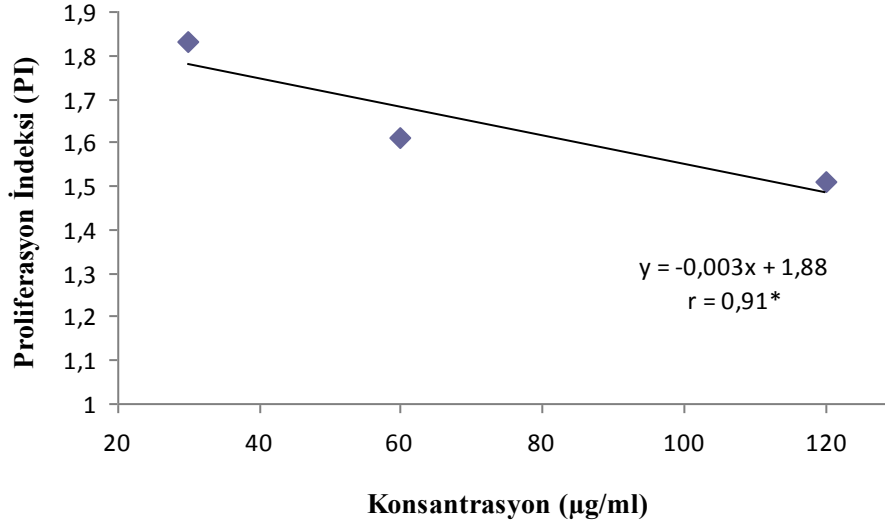
* $P < 0.05$

Şekil 4.34. Ofloksasin'in test edilen dozları ile %MN ve %KA arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı

4.3. Ofloksasin'in DNA Replikasyonu, Mitoz Bölünme ve Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri

4.3.1. Ofloksasin'in DNA Replikasyonu Üzerindeki Etkileri

Proliferasyon İndeksi (PI) hesaplanarak OFX'in DNA replikasyonu üzerindeki etkisi belirlenmiştir. 30, 60 ve 120 $\mu\text{g/ml}$ 'lik OFX konsantrasyonlarının insan periferik kan lenfositlerinde 48 saatlik muamele sonucunda elde edilen 1. Mitoz, 2. Mitoz ve 3. Mitoz oranlarıyla PI değeri hesaplanmış ve doz artışına göre bu değer azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.35.). OFX doza bağlı olarak PI'ni düşürmesine rağmen bu azalmalar negatif kontrole ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel açıdan farklılık bulunmamıştır. OFX dozları arasında gözlenen en az seviyedeki PI düşüşü 30 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonda olduğu belirlenmiş ve pozitif kontrole göre istatistik olarak farklı olduğu tespit edilmiştir. Bu dozun aksine 60 ve 120 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda pozitif kontrol ile istatistik farklılıklar tespit edilmemiştir ($p < 0.05$) (Çizelge 4.2.).

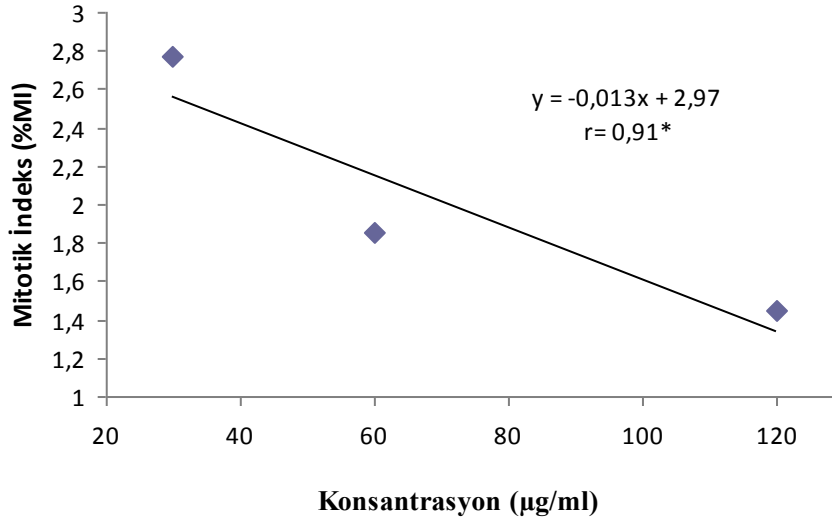


* P<0.05

Şekil 4.35. Ofloksasin'in test edilen dozları ile PI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı

4.3.2. Ofloksasin'in Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkileri

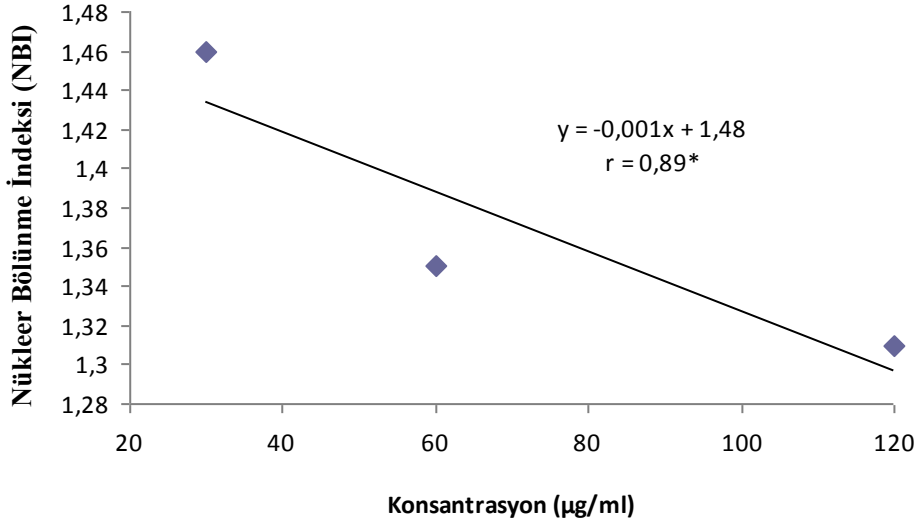
Ofloksasin'in mitoz bölünme üzerindeki etkisi Mitotik İndeks (MI) hesaplanarak belirlenmiştir. OFX'in 30, 60 ve 120 µg/ml'lik dozlarında insan periferik lenfositlerine 48 saat muamelesi sonucu, OFX dozlarının artışına bağlı olarak MI'in düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.36.). OFX'in 30 ve 60 µg/ml'lik konsantrasyonlarında MI'deki düşüş negatif kontrole göre istatistiksel anlamda önemli bulunmazken, OFX'in 120 µg/ml'lik doz uygulaması % MI'i negatif kontrole göre istatistiksel açıdan önemli olacak derecede düşürmüştür (p<0.05) (Çizelge 4.1)



Şekil 4.36. Ofloksasin'in test edilen dozları ile % MI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı

4.3.3. Ofloksasin'in Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri

Ofloksasin'in nükleus bölünmesi üzerindeki etkisi nükleer bölünme indeksi (NBI) hesaplanarak belirlenmiştir. Ofloksasin'in 30, 60 ve 120 µg/ml'lik dozlarının 48 saatlik muameleleri sonucu çok çekirdekli hücre sayısında doz artışı ile paralel olmayan bir düşüş gözlenirken, NBI'nin ise OFX dozlarının artışına bağlı olarak düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.37.). OFX'in 30 µg/ml'lik konsantrasyonunda NBI'indeki düşüş negatif kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan farklılık bulunmazken, 60 ve 120 µg/ml'lik konsantrasyonları ise NBI'ini negatif kontrole göre istatistiksel açıdan önemli olacak derecede düşürmüştür. Tüm dozlarda tespit edilen NBI düşüşleri pozitif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p<0.05) (Çizelge 4.3.).

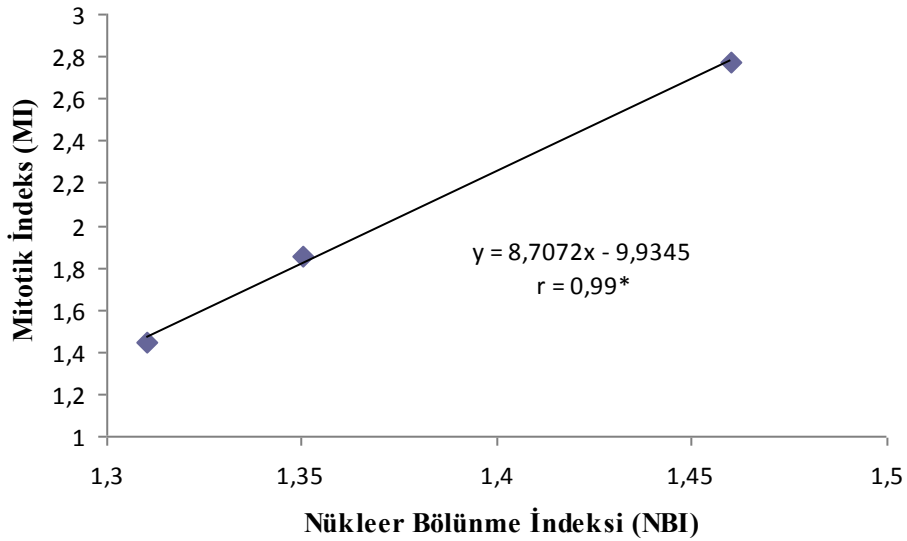


* P<0.05

Şekil 4.37. Ofloksasin'in test edilen dozları ile NBI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı

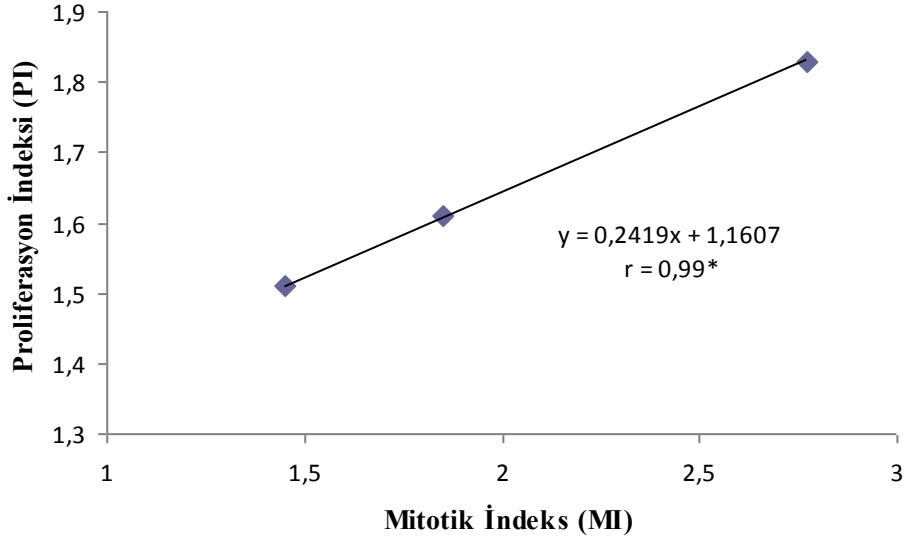
4.4. Ofloksasin Dozlarına Bağlı Olarak PI, MI ve NBI Arasındaki İlişki

İnsan periferal lenfositlerinde 48 saat muamele edilen OFX'in doz artışına bağlı olarak PI, MI ve NBI değerlerinde azalmaya sebep olduğu gözlenmiş ve OFX'in uygulanan dozlarına bağlı olarak bu parametrelerdeki düşüşler arasında paralel bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.38., Şekil 4.39., Şekil 4.40.).



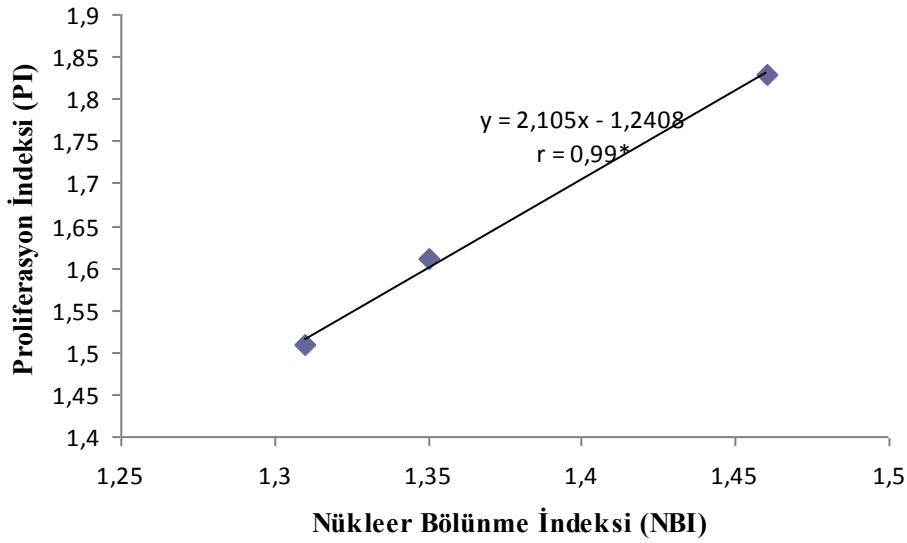
* P<0.05

Şekil 4.38. Ofloksasinin test edilen dozları ile NBI ve MI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı



*** P<0.05**

Şekil 4.39. Ofloksasinin test edilen dozları ile PI ve MI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı



*** P<0.05**

Şekil 4.40. Ofloksasinin test edilen dozları ile PI ve NBI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada pek çok gram negatif ve gram pozitif mikroorganizmanın sebep olduğu çeşitli sistemik (idrar yolu, prostatit, gonera, deri vb.) enfeksiyonların kontrol edilmesinde ve gerektiğinde koruyucu tedavisinde yaygın olarak kullanılan geniş spektrumlu kinolon grubu ikinci kuşak bir antibiyotik etken maddesi olan OFX'in *in vitro* sitotoksik ve genotoksik etkisi incelenmiştir. Çalışmamızda 4 sağlıklı bireylerden alınan periferik kan lenfositlerinde OFX'in MI, NBI ve PI ile sitotoksik etisi, KA, MN ve KKD testleri ile de genotoksik etkisi incelenmiştir. Ayrıca test edilen dozlarda ve sürede bu parametelerin birbirleriyle ilişkileri araştırılmıştır.

Bu kısımda, farklı test yöntem ve süreçleri ile OFX veya kinolon grubu diğer antibiyotiklerin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin incelendiği literatür bilgileri ışığında, çalışmamızın sonuçları tartışılacaktır. OFX toksisitesi ile ilgili, özellikle bu çalışmada kullanılan çeşitli test yöntemleri ve parametrelerini içeren, fazla genotoksik çalışma olmadığından, diğer kinolon grubu antibiyotiklerle yapılan veya OFX'in genotoksitesinin diğer dolaylı test sistemleri kullanılarak belirlendiği çalışmalarla karşılaştırılacaktır.

Hücre siklusunda metafaz evresindeki hücre yüzdesini veren MI 'in azalması hücre siklusu ilerlemesinin inhibe edildiğini ve/veya proliferatif kapasitedeki kaybı göstermektedir (Gökalp Muranlı, 2006). Bu kayıp, bölünmeye hazırlanan hücrede, interfazda hücresel veya DNA hasarının oluşması hücre döngüsü kontrol noktaları tarafından belirleneceğinden, hücrenin mitozu girmesinin engellenmesi şeklinde olabilir. Ayrıca, mitozu girmiş hücrede biyokimyasal yollarda veya genetik materyalde aksaklıklar meydana geldiğinde ve hasar uygun şekilde onarılmaz ise, mitozu giriş, G1, S veya G2 fazlarında, döngü zamanına göre aktif kontrol noktalarının sinyalizasyonu sonucu durdurulur. Veya hücre yüzeyi reseptörleri ve mitokondriyal yetersizlik gibi iki ana apoptoz yolağı tarafından hücre ölümü indüklenebilir (Altieri, 2004; Blagosklonny, 2007). Bunun yanı sıra, hücre döngüsü kontrol noktalarındaki bozukluklar ise, tümör oluşumuna katkıda bulunan gen mutasyonu, kromozom hasarı ve anöploidi ile sonuçlanabilir (Pietenpol ve Stewart, 2002). Her hangi bir kimyasal veya fiziksel etkenin, hücre döngüsünün engellenmesi sebebiyle hücrenin mitozu geçememesi, ATP seviyesinin düşmesi ve enerji üretim merkezinin zorlanması, hücre döngüsüne özgü proteinlerin/enzimlerin inhibisyonu ile DNA sentezinin inhibisyonu veya iğ ipliklerinin oluşum, toplanma veya oryantasyonun inhibisyonu şeklindeki, antimitotik aktivitesi

sonucu mitotik indekste düşüşler gözlenebilir. (Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006; Blagosklonny, 2007).

PI ve NBI'nin ortalama değerleri hücre siklusunun kinetik karakteri hakkında bilgi sağlamakta ve bu kinetiklerin ölçülmesi belli kimyasal veya fiziksel ajanların sitotoksik etkileri hakkında önemli verileri yansıtmaktadır. Hücre bölünme kinetiğini ifade eden PI, test edilen bileşiğin sitotoksitesini analiz etmek üzere sıklıkla kullanılır. Çünkü test edilen kimyasal maddenin hücre siklusu ile etkileşime geçmesi bu indeksi hızlandırır veya geciktirir (Sivikova ve Dianovsky, 2000; Gökalp Muranlı, 2006). Ayrıca her iki parametredeki anlamlı azalmalar, yeni bir DNA replikasyonu öncesi indüklenen genotoksik hasarı onarmak üzere onarım sistemlerine izin veren hücre siklusu gecikmesini göstermektedir (Laffon ve ark., 2001; Gökalp Muranlı, 2006; Eke, 2007).

OFX'in hücre döngüsü süreci ve işlevi üzerine etkisi *in vitro* incelendiğinde, HeLa hücrelerinde OFX'in sadece yüksek konsantrasyonlarda hücre büyümesini inhibe ettiği belirtilmiş olup, OFX yüksek dozlarda Raji lenfoblast hücre hattında proliferasyonun düştüğü belirlenmiştir (Bredberg ve ark., 1989). Aynı şekilde Hussy ve ark. (1986) dana timus hücrelerinde OFX'in 100 µg/ml dozunda hücre büyümesini hafif bir şekilde engellediğini ve 1000 µg/ml dozunda ise hücre ölümünü artırdığını rapor etmişlerdir.

Genç tavşanlarda mikrokapsüllü kondrositlerde OFX'in hücre ölümüne bağlı kondrosit hasarına etkisinin incelendiği iki çalışmada, OFX'in, pek çok DNA hasar ajanı tarafından aktive edilen, p53 tümör baskılayıcı ve apoptozisi kontrol eden genin ifadesinin artmasını sağlayarak ve kaspaz bağımlı mitokondriyal yolları etkileyerek programlı hücre ölümünün oluşmasına sebep olduğu bildirilmiştir. Bu iki çalışmada OFX, 2, 5, 10, 20 ve 40 µg/ml konsantrasyonlarda kullanılmış olup OFX'in rapor edilen etkisi 10 µg/ml'de görülmüştür (Sheng ve ark., 2007 ve Sheng ve ark., 2008).

Altı konsantrasyonda (1 mg/mL, 100, 10, 1 µg/mL, 100 ve 10 ng/mL) ve dört farklı sürede (15, 30, 60, 240 dk.) toplam beş florokinolonun (siprofloksasin, gatifloksasin, ofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin) her birinin 24 kez test edildiği çalışmada insan kornea endotelyum ve keratosit hücre kültürleri kullanılmıştır. Florokinolonların sitotoksik etkisi hücrelerin floresans tekniklerle sayılması yoluyla belirlenen çalışmada, genel sonuçlar bunların kullanılan hücre kültür ortamlarında doza ve süreye bağlı olarak sitotoksik oldukları ifade edilmiştir. Endotelyum kültüründe OFX sonuçlarına göre; süreye bağlı olarak yüksek dozda (1 mg/mL) ve düşük dozlarda (100 ve 10 ng/mL) ise sadece en uzun uygulama süresinde (240 dk.) sitotoksik olduğu

belirlenmiştir. Keratosit kültürü OFX sonuçları göre ise; çalışılan diğer maddeler gibi en yüksek dozda ve tüm sürelerde kalıcı bir şekilde, düşük (100 ve 10 ng/mL) dozlarda 60 ve 240 dk. sürelerde sitotoksik olduğu tespit edilmiştir (Bezwada ve ark., 2008).

Anupama ve ark. (2010)'nın insan periferik lenfositlerinde yaptığı 4 farklı florokinolonun hücrelere 4 saat boyunca uygulandığı ve 20-32 saatlik ifade zamanı sonunda iki farklı (24 ve 36 saat) hasat periyodu ile sitotoksik ve genotoksik potansiyellerinin karşılaştırıldığı çalışmada, 15.62, 31.25, 62.5, 125 ve 250 µg/ml dozlarında kullanılan OFX'in her iki maruz bırakma süresi içinde MI'e etkisi incelendiğinde, sadece en yüksek dozda MI'i hafif bir şekilde düşürdüğü, diğer test süreçlerinde ise negatif kontrole göre önemli bir anormal hücre oluşumuna sebep olmadığı tespit edilmiştir. Bu verilere göre OFX'in gerçek bir sitotoksik ifadesinin olmadığı sonucuna varmışlardır.

Bizim çalışmamızda; kullanılan tüm sitotoksisite parametrelerinde (PI, MI, NBI), OFX'in doz (30, 60 ve 120 µg/ml) artışına bağlı olarak bir inhibisyonun varlığı tespit edilmiştir. Bunlardan, PI'deki azalışın negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, MI'teki farklılığın sadece en yüksek dozda istatistiksel anlamda önemli bulunduğu ve NBI'nde gözlenen düşüşün 60 ve 120 µg/ml konsantrasyonlarında negatif kontrole göre anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu parametrelerin birbirleriyle olan ilişkisi değerlendirildiğinde; OFX'in uygulanan dozlarına bağlı olarak bu parametrelerdeki düşüşler arasında paralel bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.39-40-41). Sunulan bu çalışmada; sitotoksisite göstergesi olan parametrelerde, yalnız yüksek dozlarda da olsa, görülen düşüşler ışığında, sonuçlarımızın Bredberg ve ark., (1989)'nın ve Hussy ve ark. (1986)'nın yaptıkları çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olduğunu söyleyebiliriz. Her ne kadar, yukarıda bahsedilen testlerden bazıları farklı hücrelerde gerçekleştirilmiş ise de, kültür ortamlarının benzer şartları ve yine benzer dozlarla çalışılmış olmasından dolayı sonuçların birbirleriyle uyumlu olmalarının tahmin edilebilir olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, Sheng ve ark. (2007) ile Sheng ve ark. (2008)'nin kondrositlerde *in vivo* çalışmalarında sunulan sonuçlarda OFX'in doza ve zamana bağlı olarak kondrositlerde apoptozisi indüklediği verilmiştir. Normal hücrel bir süreç olan programlı hücre ölümünün artması MI'i düşüreceğinden, bu veri, bizim sunduğumuz sitotoksisite sonuçlarıyla örtüşmektedir. Aynı zamanda, *in vivo* ve *in vitro* olmak üzere iki farklı araştırma yönteminin birbirini desteklediğini vurgulamak gereklidir. Bu çalışmaların yanında Bezwada ve ark. (2008)'nin insan kornea keratosit ve endotelyum hücre kültürlerinde 1 mg/ml dozunda süreye bağlı olarak ve düşük dozlarda uzun

maruziyet sürelerinde, OFX'in doza ve süreye bağlı olarak sitotoksik olduğu sonucuna varmışlardır. Bu veriler bizim sunduğumuz sonuçlarla karşılaştırıldığında, farklı hücre kültürleri dikkate alındığında, uygulanan düşük doz uzun süre ilişkisi ve benzer dozlardaki yakın sitotoksik sonuçlar dikkat çekicidir.

Yukarıda verilen çalışmalara paralel olarak bizim çalışmamızın sitotoksosite sonuçları da, çalışılan dozlarda ve doza bağlı olarak PI, NBI ve MI'te düşüşler meydana getirmesi ve bu azalmaların yüksek dozlarda istatistiksel olarak anlamlı olmasından dolayı, OFX'in insanda bazı hücrelerde *in vitro* olarak hücre bölünmesi üzerine potansiyel inhibisyon etkisini desteklemektedir.

Diğer yandan, yakın zamanda çalışmamıza benzer bir araştırma Anupama ve ark. (2010) tarafından yürütülmüş olup kullanılan beş farklı OFX konsantrasyonlarından üçü çalışmamızda daha önceden yapılan doz belirleme ön testi ile kararlaştırılan OFX dozlarımızla büyük benzerlik göstermektedir. Ayrıca iki çalışmada da aynı hücre kültürü kullanılmıştır. Anupama ve ark. (2010) çalışmalarının sonucunda, OFX'in yüksek dozunun hafif bir şekilde MI'yi düşürdüğünü ve anormal hücre sayısında önemli bir artışın gözlenmediğini bildirmişlerdir. Verilen bu sonuçlar, çalışmamızda saptanan doza bağlı MI azalışı ve doz ile paralellik göstermeyen AHO'daki artış (en yüksek anormal hücre sayısı 60 µg/ml'de belirlenmiştir) ile benzerlik göstermemektedir. Bu benzemezliğin olası sebebini açıklamak için, Anupama ve ark. (2010)'nın uyguladığı test yönteminde, hücreleri etken maddelerle maruz bırakma ve kültürü hasat etme sürelerinden söz etmek gereklidir. Araştırmacılar çalıştıkları hücreleri 4 saat süre ile etkenlere maruz bırakmışlar ve 24 - 36 saatlik iki farklı hasat periyodu belirlemişlerdir. Hücreleri etken madde ile 4 saat maruz bıraktıktan sonra ve fakat hasatlamadan önce her iki uygulamada da sırasıyla 20 ve 32 saatlik ifade periyodu şeklinde tanımladıkları bir zaman dilimi kullanmışlardır. Her ne kadar toplamda hücrelerin hasat edilmesine kadar geçen süre 24 ve 36 saat olarak verilmişse de maruz kalma süreleri 4 saatle sınırlandırılmıştır. Anupama ve ark. (2010)'ndan farklı olarak, bizim çalışmamızda; lenfosit kültürlerinin, metafazlarının yarısından fazlasını ikinci bölünmede ve 48 saat sonra içerdiğini doğrulayan deneysel sonuçlara (Poddar ve ark., 2004) ve insan periferik lenfosit kültürlerinde mutajen maruziyeti sonucu oluşan kromozomal anomalileri belirlemek için en iyi ekim periyodunun 48 saat olduğunu bildiren (Crossen ve Morgan, 1978 ve Kalina ve ark., 1990) kaynaklara, ayrıca OFX'in farmakodinamik ve farmakokinetik özelliklerine (Wise ve Honeybourne, 1999; Sardohan, 2006; Chigutsa ve ark., 2011) dayanarak, OFX'i hücrelere 48 saat süreyle uygulamış ve bu süre sonunda hasat yapılmıştır. Bu yüzden

OFX'in sitotoksik etkisinin, özellikle MI değişimindeki, değerlendirilmesinde söz konusu farklılığın ortaya çıkmış olabileceği düşünölmektedir.

Çalışmamızın genotoksik analiz kısmında kullanılan KA testi, mutajen ve kanserojenlerin genotoksik risklerini belirlemede kullanılan en hassas yöntemlerden biridir. Kromozom anormallikleri DNA düzeyindeki zararın bir sonucu olarak ortaya çıkarlar. KA'ndeki artış, klastojenitenin bir göstergesi olup, bu durum bazı genetik hastalıkları ve kanser riskini artırmaktadır (Anderson, 1988; Savage, 1993; Norppa ve ark., 2006)

MN testi ise genotoksisite ve kanserojenitenin belirlenmesinde kullanılan sitogenetik metodlardan biridir. MN'ler asentrik kromozom ya da anafazda geri kalarak mitoz sırasında kutuplara gidemeyen kromozom bulunduran hücrelerin bölünmesi sırasında oluşurlar. Telofazda, geri kalan kromozomlar ve asentrik kromozomların etrafında nükleer bir zar oluşur ve bu yapı hücrenin ana çekirdeğinden daha küçük bir çekirdekçik olarak görölebilir. (Fenech ve Morley, 1985; Fenech 2000). MN oluşumuna neden olabilen kromozom kaybı ya da kromozomların ayrılamaması kanser ve yaşlanmada gözlenen önemli olaylardan biridir. MN testi ile hem klastojenik hem de anöjenik etkiler belirlenebilmesi ve bu hasarların uygun ve güvenilir ölçümünü sağlamaktadır. Ayrıca, insan mikronükleus projesi bulguları, MN ile kanser arasındaki ilişkiyi açıkça desteklemiştir (Kirsch-Volders ve ark., 1997; Fenech ve ark., 1999; Norppa ve Falck, 2003; Yavuz Kocaman, 2007).

Ayrıca genotoksik riski belirlemede kullanılan diğer yöntemlerden biri de, tek bir kromozomun iki kromatidi arasında gerçekleşen karşılıklı değişimleri gösteren KKD testidir (Tucker ve ark., 1993; Yavuz Kocaman, 2007). KKD tam DNA çiftsarmalı değiş - tokuşunu izleyen her iki DNA ipliğinin kırılmasını içerdiğinden dolayı KKD, DNA kırılmasının sitolojik göstergesidir (Natarajan ve Obe, 1982; Gökalp Muranlı, 2006). Mutajen ve kanserojen olduğu bilinen maddelere maruz kalan insan ve hayvanların hücrelerinde KKD frekansının arttığı bulunmuştur. Ayrıca, tek-gen mutasyonlarının artışı ile KKD frekansı arasında lineer bir ilişki olduğu da saptanmıştır. Benzer bir ilişkinin KKD'nin artışıyla *in vivo* tümörlerin oluşumu arasında da olduğu bildirilmiştir (Cheng ve ark., 1981; Albertini ve ark., 2000; Yavuz Kocaman, 2007). KA'nin aksine KKD tek başına genotoksik riski belirlemede yetersiz olmasına rağmen KKD'nin deneysel çalışmalarda indikatör test olarak insanlarda genotoksik etkileri göstermede uygun bir yöntem olarak kullanılmasına devam edilmektedir (Norppa ve ark., 2006; Yavuz Kocaman, 2007). Pek çok sitogenetik çalışmada hem KA, hem de KKD'lere bakılması, o

maddenin etkinliğinin anlaşılması açısından önemlidir (Natarajan ve Obe, 1982; Gökalp Muranlı, 2006).

Mitelman ve ark. (1988) COFX ve OFX ile tedavi edilen hastalarda bu etken maddelerinin genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla, hastalardan tedavi öncesi ve sonrası aldıkları kan örneklerini kültüre ederek, sitogenetik yöntemle KA oluşumlarını tespit etmeye çalışmıştır. Çalışmada günlük 200 mg OFX verilen, idrar yolu enfeksiyonlu 12 hastadan tedaviden 1 hafta sonra alınan kan örneklerinin ve tedavi öncesi örneklerin sitogenetik analizleri karşılaştırılmıştır. Sitogenetik analizlerde, OFX tedavisinden önce alınan örnekler ve tedavi sonrası örnekler arasında, toplam KA miktarında ve çeşidinde herhangi bir farklılık saptanmadığı rapor edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, burada sunduğumuz KA verilerimizle uyumlu olmamakla birlikte, verilerimizin analizleri sonucunda, OFX'in, AHO ve KA'lerinde bir artışa yol açan, tüm dozları ile negatif kontrol arasında istatistiksel bir fark belirlenmemiştir (60 µg/ml dozunda AHO negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur). Etken madde üzerindeki *in vivo* ve *in vitro* kültür şartlarına, test sistemlerine ve doz farklılıklarına bağlı olarak, iki çalışmadan elde edilen genotoksisite verilerinin değerlendirmeleri KA oluşumu açısından farklılık göstermektedir. Ancak yine de, bu çalışmamızda da belirlenen KA artışlarının istatistiksel önemi saptanmadığı için, iki çalışma sonuçları bakımından birbirini destekler niteliktedir.

DNA'da hasar meydana getirebilen fiziksel veya kimyasal ajanların bakteriyel mutasyonlarının ölçülebildiği Ames testiyle 8 kinolonun bakteriyel mutajenitesi çalışılmıştır. Ofloksasini de içeren kinolonlar toplamda kalitatif AMES Test sisteminde pozitif sonuç vermiştir. Ancak 0,25 µg/ml konsantrasyonunda test edilen ofloksasinin düşük seviyede mutajenite gösterdiği belirtilmiştir (Mamber ve ark., 1993). Her ne kadar Ames testi ile pozitif sonuç veren bir toksik ajanın insan dahil yüksek organizmalar için de mutajen olacağı varsayılsa da, bu sonuçların, çalışmamızda yürütülen diğer test sistemleri ile teyit edilmesi doğru bir değerlendirme yapılabilmesi için önemlidir. Bu çalışmamızda OFX'in KA'lerini, ilk iki dozda, doza bağlı artırdığı belirlenmiş ancak tüm dozlardaki kontrole göre olan artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

El-Habit ve ark. (2001) OFX'in genotoksisitesi ardışık olarak 14 gün boyunca 3 dozda (104, 520, 1040 mg/kg/gün) farelerde test etmişler, aynı zamanda OFX'in terapötik bir dozunu (104 mg/kg/gün) 2 Gy gama radyasyona maruz bırakılan bir fare grubuna 14 gün süreyle verilmişlerdir. Araştırmacılar DİFENİL Testi ile DNA fragment yüzdelerini dalak hücrelerinde, PCE ve NCE'lerde ise MN sıklığını kemik iliğinde incelemişlerdir.

Her iki ölçütte de, OFX'in doz artışına bağlı olarak, artış gözlenmiştir. Bu artışlardan sadece en yüksek dozlarda görülenler istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Verilerin, potansiyel bir mutajen olarak, bu ilacın çeşitli organlarda farklı etkileri olduğunu gösterdiğini ifade etmişlerdir. OFX'in doz artışına bağlı olarak MN oluşma sıklığının artırması göz önüne alındığında, çalışmamızda elde edilen MN verileri, El-Habit ve arkadaşlarının (2001) belirttiği *in vivo* MN artışına benzerlik göstermiştir. Bu veriler OFX'nin MN oluşturma potansiyelinin olduğunu ortaya koysada, çalışmamızda MN oluşumunun negatif kontrole göre istatistiksel anlamda farklı bulunmamasından dolayı, çalışılan test sistemleri ve dozlarda OFX'in mutajen etkisi konusunda kesin bir yargı oluşmamıştır.

Itoh ve ark. (2006)'nın antimikrobiyal kinolonların genotoksitesini inceledikleri bir çalışmada, *in vitro* comet testi ile nalidiksik asit (NA), pipemidik asit (PPA), oksolinik asit (OA), piromidik asit (PA), enoksasin (ENX), ofloksasin (OFX), norfloksasin (NFLX) ve ciprofloksasin (CPFX) olmak üzere 8 kinolonun genotoksik potansiyelini araştırılmıştır. Araştırmacılar test ettikleri 8 kinolonu WTK-1 hücrelerine (Mutant p53) 2, 4 ve 20 saat 62.5 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarda uygulamışlar. OFX uygulamasında DNA hasarına bağlı herhangi bir göç artışının görülmediğini bildirmişlerdir. KA, MN ve KKD testleri ile birlikte genotoksik potansiyel hakkında önemli bilgiler sunan COMET uygulaması ile bahsedilen çalışmadan elde edilen bu sonuçlar, konvansiyonel olarak kullanılan KA, MN ve KKD testlerinin araştırmamıza sunduğu verilerde negatif kontrole göre artış gösteren DNA hasarı ile uyumsuzdur. Ancak, her üç test verileri istatistiksel anlamda önemli bulunmadığı için, araştırma test şartlarında görülen değişimlerin OFX etkisini açıkça ortaya koyduğunu söylemek zordur.

Li ve ark. (2010)'nın OFX'in oksidatif hasara bağlı artropatideki rolünü araştırmak amacıyla gerçekleştirdikleri bir çalışmada, yavru tavşanlarda eklem kondrositlerine sırasıyla 5, 10, 20, 40 ve 80 µg/ml konsantrasyonlarında OFX uygulanmıştır. Çalışmada oksidatif hasarın büyüklüğü, bazı makromoleküllerin oksidatif hasarının, antioksidan enzim aktiviteleri ve reaktif oksijen türlerinin seviyelerinin ölçülmesiyle değerlendirilmiştir. OFX'in, reaktif oksijen türlerinin intrasellüler üretiminde konsantrasyona bağlı bir artışa yol açtığı gözlenmiştir. Benzer şekilde, ofloksasin tiyobarbitürik asit reaktif maddelerin seviyesinde önemli bir lipid peroksidasyonu ile konsantrasyona bağlı bir artış ortaya çıkarmıştır. Aynı zamanda reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimine sebep olabilen OFX'in konsantrasyonuna bağlı olarak oluşturduğu DNA hasarını 24 saatlik comet test protokolü ile ölçerek doz artışına bağlı olarak kuyruk

DNA'sında kontrole göre artış olduğunu belirlemişlerdir. Sonuç olarak, açıkça OFX'in oksidatif stres, lipid peroksidasyonu ile kondrositlerde DNA'da oksidatif hasara neden olabileceğini göstermişlerdir. Li ve ark.'nın (2010) yaptığı bu araştırmada özellikle comet protokolünden elde edilen veriler (kuyruk DNA'sındaki artış zincir kırıkları olduğunu ve KA'lerinin bazılarıyla ilişkisini gösterir), çalışmamızda belirlenen KA'lerinden fragment oluşumu, kromatit-kromozom kırıklarındaki ve MN oluşum sıklığındaki artış ile uyumludur. Ayrıca DNA hasarını geliştirebilen reaktif bileşiklerin belirlenmesi, çalışmamızda sunulan verileri desteklemektedir.

Anupama ve ark. (2010)'nın insan periferik lenfositlerinde yaptığı 4 farklı florokinolonun sitotoksik ve genotoksik potansiyellerinin karşılaştırıldığı çalışmada, 4 saatlik maruziyet süresi ve 20-32 saatlik ifade zamanı sonunda iki farklı (24 ve 36 saat) hasat periyodu uygulanmıştır. 15.62, 31.25, 62.5, 125 ve 250 µg/ml dozlarında kullanılan OFX'in mitotik indeks ve kromozom aberasyonları ile test edilmiştir. Sadece en yüksek dozda hafif bir şekilde düştüğü bildirilen MI'in yanında, KA test sürecinde ise negatif kontrole göre önemli bir anormal hücre oluşumuna sebep olmadığı tespit edilmiştir. Bu verilere göre OFX'in gerçek bir sitotoksik ve genotoksik ifadesinin olmadığı sonucuna varmışlardır. Bu araştırma ile çalışmamız arasında, tartışma bölümünün sitotoksikite kısmında bahsettiğimiz test sürelerindeki farklılıklardan dolayı oldukça farklı toplam KA değerlerine ulaşılmıştır (24 saatlik hasatlama sonucu hiç KA gözlemediklerini bildirmişlerdir). Araştırmacılar çalıştıkları hücreleri 4 saat süre ile etkenlere maruz bırakmışlar ve 24 - 36 saatlik iki farklı hasat periyodu belirlemişlerdir. Hücreleri etken madde ile 4 saat maruz bıraktıktan sonra ve fakat hasatlamadan önce her iki uygulamada da sırasıyla 20 ve 32 saatlik ifade periyodu şeklinde tanımladıkları bir zaman dilimi kullanmışlardır. Her ne kadar toplamda hücrelerin hasat edilmesine kadar geçen süre 24 ve 36 saat olarak verilmişse de maruz kalma süreleri 4 saatle sınırlandırılmıştır. Anupama ve ark. (2010)'ndan farklı olarak, bizim çalışmamızda; lenfosit kültürlerinin, metafazlarının yarısından fazlasını ikinci bölünmede ve 48 saat sonra içerdiğini doğrulayan deneysel sonuçlara (Poddar ve ark., 2004) ve insan periferik lenfosit kültürlerinde mutajen maruziyeti sonucu oluşan kromozomal anomalileri belirlemek için en iyi ekim periyodunun 48 saat olduğunu bildiren (Crossen ve Morgan, 1978 ve Kalina ve ark., 1990) kaynaklara, ayrıca OFX'in farmakodinamik ve farmakokinetik özelliklerine (Wise ve Honeybourne, 1999; Sardohan, 2006; Chigutsa ve ark., 2011) dayanarak, OFX'i hücrelere 48 saat süreyle uygulamış ve bu süre sonunda hasat yapılmıştır. Anupama ve ark.(2010)'nın uyguladığı iki farklı hasat zamanı arasındaki KA değerlerinin, hem kendi

içinde, kısa maruziyet süresinden sonra uzun ifade periyodu ile artışı, hem de bizim çalışmamızda kullanılan görece uzun maruz bırakma sürelerinde KA artışı, onların vardıkları sonucun aksine OFX'in klastojenik potansiyelini işaret etmektedir. Ayrıca, çalışmamızda 4 sağlıklı donör kullanılmış ve her doz için toplamda 400 metafaz incelenmişken, Anupama ve ark. (2010)'nın çalışmasında tek bir denek kullanılmış ve bu vericiden elde edilen preparatlarda 200 metafaz incelenmiştir. Bu sürecin sonunda ortaya çıkarılan bilginin doğru yorumlanmasının ve elde edilen veriler ile istatistiksel değerlendirmede güvenilir sonuçlara ulaşılmasının zor olacağı düşünülmektedir.

Forsgren ve ark. (1989) tarafından yeni kinolonların toksik etkilerinin araştırıldığı çeşitli çalışmaların bulunduğu bir derleme yayınlanmıştır. Bu derlemede, sunulan araştırma sonuçlarına göre; İnsan periferik lenfositlerinde, OFX'in hücre döngüsü süreci ve işlevi üzerine etkisi *in vitro* UDS yöntemiyle incelendiğinde, DNA zincir kırıklarının sadece yüksek OFX (80 µg/ml) dozunda düşük dozlarına kıyasla önemli bir artışın olduğu görüldüğü rapor edilmiştir (Bredberg ve ark., 1989). Her ne kadar OFX'in genotoksik olduğunu bildiren çalışmalar varsa da (McQueen ve Williams, 1987), DNA zincir kırıklarının DNA'nın normal replikatif sürecinde meydana geldiği ve karsinojenik veya mutajenik olması gerekmediği belirtilmiş ve bu görüş, negatif sonuç veren bazı mutasyon ve kromozomal test çalışmaları ile desteklenmeye çalışılmıştır (Schülter, 1987; Mayer, 1987; Mitelman ve ark., 1988).

McQueen ve ark. (1991) tarafından sıçan hepatositlerinde ve hepatosit hücre hattında, bazı kinolonların genotoksik etkisinin *in vivo* ve *in vitro* olarak gerçekleştirilen bir çalışmada, DNA'da oluşan primidin dimerlerini uzaklaştıran bir eksizyonel tamir sürecinin sonucu olan programlanmamış DNA sentezi (UDS) araştırılmıştır. Bu çalışmada, UDS'nin *in vitro*'da test edilen kinolonların yüksek dozları tarafından artırıldığı, ancak *in vivo*'da F344 yetişkin dişi sıçanlardan izole edilen hepatositlerde UDS'nin gözlenmediği rapor edilmiştir. Bu bulgulara göre test edilen OFX'in DNA reaktif olmadığı, ancak bazı dolaylı etkileşimler sonucu *in vitro*'da UDS meydana getirdiği ileri sürülmüştür.

Umezawa ve ark. (1997)'nin 5 yeni kinolon antibiyotiklerinin fotohassas Reaktif Oksijen Türleri (ROS) oluşumuna etkisini inceledikleri çalışmada, OFX'in farklı reaktif oksijen türlerinin oluşumuna farklı derecelerde yol açtığı belirlenmesine rağmen DNA zincir kırığı oluşumuna etkisinin en az olduğu belirtilmiştir. Birçok çalışmada rapor edilmiş olmasına karşın bu ilaçların ROS oluşturduğuna dair direkt bir kanıtın olmadığı sonucuna varılmıştır.

Sanchez ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, fotohassasiyet ile DNA ayrılmaları ve hücre membran hasarı meydana getiren bazı florokinolonların varlığının, kinolonların ışık tarafından indirgenerek aktif oksijen türleri veya radikaller oluşturabilmelerinin kanıtı olarak sunulmuştur. Bu çalışmada, Jurkat hücre hattında, $2,76 \times 10^{-5}M$ lık konsantrasyonda kullanılan ve üzerine UV ışın saçılan OFX'in genotoksik etkisi comet yöntemi ile test edilmiştir. Test sonuçları, UV ışığa maruz kalan OFX grubu ile UV ışığa maruz bırakılmayan grup arasındaki farklılığın istatistiksel olarak önemli olmadığını, UV'li OFX grubunun DNA hasarını artırdığını, ayrıca UV'siz OFX grubunun genotoksitesinin de negatif kontrole göre önemli farklılık gösterdiğini işaret etmiştir. OFX genotoksik olarak ifade edilmiştir.

Yukarıda bahsi geçen çalışmaların sonuçlarından görüleceği üzere, DNA hasarını görece daha az duyarlı testlerle belirlemeyi amaçlayan benzer çalışmalarda OFX'in genotoksik etkileri veya mutajenik potansiyeli hakkında farklı sonuçlar çıkartılmıştır. DNA zincir kırık oluşumunun dolaylı olarak belirlenmesine katkı veren bu testlerden, S-fazında olmayan hücrede işaretli timidin'in katılımıyla hasar görmüş DNA'nın onarımı sentezini dolaylı olarak ortaya çıkaran UDS ve oluşum mekanizmaları ve DNA'ya etklentileri, azotlu baz modifikasyonları yada DNA iskeletinde diğer kimyasal bağlar üzerine etkileri bilenen ROS'nin ölçülmesi ile ortak bir görüşe varılamamıştır. Hatta bazı çalışmalarda (Bredberg ve ark., 1989; McQueen ve Williams, 1987; Umezawa ve ark., 1997) OFX'in bu testler ile belirlenen genotoksik potansiyelinin gerçekte olmadığı, negatif sonuç veren başka bazı mutasyon ve kromozomal test sistemleri ile gerçekleştirilen deneylerle (Schülter, 1987; Mayer, 1987; Mitelman ve ark., 1988) desteklenmeye çalışılmıştır. Ancak Sanchez ve ark. (2005)'nin yaptığı çalışmada gösterildiği üzere, comet testi gibi güvenilir bir teste göre, OFX'in DNA kırıklarını artırdığı ve OFX'in genotoksik olduğuna dair önemli sonuçlar da elde edilmiştir. Bu çalışmada sunduğumuz, negatif kontrole göre, artmış KA, doza bağlı artış gösteren MN sıklığı ve doza bağlı değişim gösteren KKD sıklığı, hem tek başına bağımsız bir çalışmada güvenilir ve direkt mutasyon testlerinin deneysel sonuçları objektif olarak değerlendirilmiştir. Hem de OFX'in genotoksik etkileri ve mutajenik potansiyeli ile ilgili karışıklığın çözümüne katkı yapması hedeflenmiştir.

Tartışmamızın son kısmında, hem bu tezde çalışılan genotoksikite test sistemleri veya diğer farklı test protokollerinin kullanıldığı, OFX'in de ait olduğu florokinolonlar grubundan diğer etken maddeler ile yapılan çalışmalar, OFX'in mutajen potansiyeli ile aynı gruptan kimyasalların sitotoksik ve genotoksik potansiyellerini karşılaştırmak üzere,

ele alınmıştır. Bu sayede hem bu çalışmada hem de daha önce gerçekleştirilmiş OFX araştırmalarda elde edilen sonuçların benzerlik ve farklılıklara göre değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bazı florokinolonları içeren ilaçların üretiminde klinik öncesi yapılan araştırmalarda; UV veya gün ışığı ile ışınlanan test maddelerinin fototoksisite ile ilişkili olarak toksik etki gösterdiği bildirilmiştir. Üç farklı florokinolonun, COFX, Fleroksasin (FOX) ve lomefloksasin (LOFX), test edildiği bir çalışmada, Çin hamsteri V79 hücrelerinde kromozomal aberasyonların belirgin şekilde arttığı, comet yöntemi ile fare lenfoma hücrelerinde yaygın DNA kırılmalarının gözlemlendiği belirtilmiştir. Buna rağmen, florokinolonlar ile kısa süreli antibiyotik tedavileri boyunca ışık maruziyetine karşı basit önlemler alınmasa bile, ilk etapta kayda değer bir risk oluşturmayacağı sonucuna varılmıştır (Chetelat ve ark.,1996).

Gorla ve ark. (1999)'nın enrofloksasin (5 ve 50 µg/ml) ve siprofloksasin'in (5, 25 ve 50 µg/ml) insan periferel kan kültürlerinde genotoksik etkilerini incelediği çalışmada belirlenen KA oluşumlarına göre her iki test maddesinin de genotoksik olduğu ve COFX'in 50 µg/ml dozda metafaz sayımını engellediği ve MI'i düşürdüğü bildirilmiştir. Ayrıca 50 µg/ml COFX dozunda sitotoksik ve genotoksik bulguların birbiriyle uyumlu olduğu belirtilmiştir.

Itoh ve ark. (2002) bazı kinolonların fotokimyasal klastojenitelerinin belirlendiği bir çalışmada, test edilen kinolon grubu maddelerin ışınlanmış gruplarında negatif kontrole göre yaygın KA ve MN oluşumu gözlemlendiğini, ancak aynı çalışmada ışısız kinolonlar grubunda genotoksik etkinin görülmediğini bildirmişlerdir.

COFX'in genotoksisitesi idrar yolu enfeksiyonu hastalarında insan periferel kan lenfosit kültürleri ile değerlendirilmiştir. Hastalardan tedavi öncesi ve sonrasında alınan periferel lenfositlerde kardeş kromatit değişimi, mitotik indeks ve replikatif indeks ile COFX'in etkisinin incelendiği bu çalışmada, COFX tedavisinden sonra kardeş kromatit değişimi frekansının önemli derecede arttığı ve mitotik indeks ve replikatif indeksin azaldığı gözlenmiştir (İkbal ve ark., 2004).

Ambulkar ve ark., (2009)'nın yaptığı çalışmada insan lenfositlerinde siprofloksasinin sitotoksik ve genotoksik etkisi çeşitli parametrelere göre *in vitro* değerlendirilmiştir. Bu parametreler; mitotik indeks, kromozom anomaliliği, anafaz anomaliliği, replikatif indeksi ve kardeş kromatid değişimidir. Çalışmada düşük Mitotik indeks, düşük replikatif indeks ve diğer yandan da yüksek frekansta anafaz anomaliliği, yüksek frekansta kromozom anomaliliği ve kardeş kromatid değişimi gözlenmiştir. Bu

bulgulara göre *in vitro* insan lenfositlerinde siprofloksasin'in sitotoksik ve genotoksik olduğu sonucuna varmışlardır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında elde edilen tüm sonuçların istatistiksel olarak önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Chetelat ve ark. (1996)'nın gerçekleştirdiği çalışma sonuçları, test edilen COFX, Fleroksasin (FOX) ve lomefloksasin (LOFX)'in ilk etapta bir risk oluşturmayacağı belirtilmiştir. Buradaki önemli bir unsur da, bu çalışmada test edilen maddelerin UV ışık ile ışınlanmalarıdır. Maddeler ışınlanmadan önce yapılan Ames testinde parametrelerde herhangi bir artış görülmemiştir. Ancak, test maddelerinin ışınlanması ile KA'de ve DNA kırılmalarında artışlar belirlenmiştir. Florokinolon grubundan farklı maddelerle, farklı bir hücre hattında yapılan bu çalışmada, test edilen maddelerin sadece ışınlanmış formlarının etkisi, çalışmamızda OFX'in KA üzerine gözlenen etkisiyle benzerlik göstermektedir. Chetelat ve ark. (1996) bu verilere rağmen, test edilen etkenlerle kısa süreli tedavilerin risk oluşturmayacağını belirtmişlerdir. Biz de, KA'deki artışlara rağmen, OFX genotoksik etkisinin olmadığını çalışmamızın sonuçlar kısmında vereceğiz. Gorla ve ark. (1999)'nın çalışmasında ise farklı testlerde ve benzer dozlarda COFX'in genotoksik olduğunu belirtmiştir. İkbal ve ark. (2004) COFX'in, çalışmamızda da kullanılan KKD ile pozitif sonuç verdiğini rapor etmişlerdir. Ve Ambulkar ve ark. (2009) da yine bizim yürüttüğümüz protokollere paralel çalışmasında, COFX'in mutajen potansiyelinin istatistiksel anlamda önemli olduğu sonucuna varmıştır ki, farklı etken olsa da bizim OFX sonuçlarımızla paralellik göstermektedir. Ayrıca Chetela ve ark. (1996)'nın gerçekleştirdiği çalışmalara benzer yayınların sonunda bazen araştırmacıların gördükleri pozitif etkileri test sisteminden (hücre bölünme döngüsü gecikmesi, reaktif maddelerin aşırı oluşumu, kimyasal etkileşimi) kaynaklanan "yanlış pozitiflik" şeklinde yorumlamalarından dolayı bazı çalışmaların sonuçları diğerleriyle uyuşmamaktadır. Buraya kadar verilen, benzer tedavilerde kullanılan benzer farmakolojik özelliklere sahip, farklı florokinolonların etkilerin bağımsız ve tekrarlayan genotoksik çalışmalarda, benzer olabileceği görülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tezin konusunu oluşturan antibiyotiklerde dahil olmak üzere tıp'ta hastalıkların tedavisinde kullanılacak ilaçların seçiminde yaş, cinsiyet, immün sistem farklılıkları ve genetik polimorfizmler, ilaç etkinliğini ve toleransını etkileyen dikkat edilmesi gereken değişkenlerdir. Bunların yanı sıra ilaçlar, diğer bazı ilaçlarla, bazı gıda maddeleriyle, çeşitli kimyasal maddeler ve alkol ile etkileşime girebilmektedir. Bu durum ilaç etkinliğini değiştirebilmekte veya hedef olmayan hücre/doku üzerinde istenmeyen ve beklenmeyen sonuçlar doğurabilmektedir. Tüm bu etkenlerin dışında ayrıca düşünülmesi ve bilinmesi gereken, sentezlenen veya keşfedilen bir ilacın sitotoksik ve genotoksik etkileri ya da mutajen potansiyelidir. Öyle ki, bir ilacın canlı organizmadaki etkinliği ve tedavi için belirlenecek doz-maruziyet ilişkisi belirlemek için bu faktörlerin bilinmesine ihtiyaç vardır. Bu faktörlerin belirlenmesi ve dolayısıyla ilaç kullanımının sağlam temellere oturtulmasını, farmakoloji alanında ve özellikle toksisite alanında yapılacak, laboratuvar araştırmaları gerçekleştirecektir. Gerçekte, yeni etken madde araştırmaları sonucunda ilaçlar piyasaya sürülürken tamamlanmayan veya ihmal edilen ya da sonradan ilacın kullanılmasıyla, özellikle hedef olmayan hücre ve onun genetik materyali üzerinde, ortaya çıkan yan etkilerin gerektirdiği çalışmaların yürütülmesi bilim insanlarına büyük sorumluluklar getirmektedir.

Bu gereklilikler ışığında, özellikle ilaç toksisite çalışmaları ile, genetik materyalde hasara neden olmayacak yeni ilaçların geliştirilebilmesi, yeni hedeflerin saptanması ve yeni mekanizmaların belirlenmesi gerekmektedir. Çünkü tamir edilemeyen DNA hasarı ve bu hasarda rol alan kilit moleküllerde ve yollardaki bozukluklar; doku hasarı, yaşlanma, kanser, infertilite gibi çeşitli bozukluk ve hastalıklara yol açmaktadır. Bu nedenle akademik ve biyoteknolojik kuruluşlar, ilaç endüstrisi ve sağlık hizmeti sunan kurumlar işbirliği içinde çalışarak, yeni ilaçların piyasaya sürülmeden önce özellikle DNA molekülünde hasar meydana getirip getirmediği uygun testlerle mutlaka değerlendirilmeli ve ilacın genotoksisite bakımından güvenilirliği test edilmelidir. Bahsedilen bu araştırma ve işbirliği, tüm dünyada kullanımı gittikçe yaygınlaşan ve insan sağlığı açısından risk oluşturup oluşturmadığı henüz belli olmayan pek çok ilaç etken maddesinin kullanımlarının kontrol altına alınması ve gerekli sınırlandırmaların yapılması, kanser vakalarının önlenmesi ve insan sağlığı için büyük öneme sahip olacaktır.

Tüm dünyada enfeksiyonların ve hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde kullanılan oldukça çeşitli antibiyotik ilaçlardan kinolon grubu içinde yer alan ikinci nesil bir

florokinolon olan OFX, geniş spektrumlu olup sistemik enfeksiyonlarda sıklıkla reçete edilmektedir. Bu çalışmamızda incelenen OFX'in *in vitro* insan periferik lenfosit kültüründe hücrelerin bölünmeleri üzerine etkisi, çalışılan sitotoksikite parametrelerindeki (MI, NBI ve PI) değişimlere göre değerlendirilmiştir. OFX'in çalışılan dozlarda doza bağlı olarak MI, NBI ve PI değerlerini negatif kontrole göre düşürmüştür. Fakat bu düşüşlerin tüm parametreler ve tüm dozlar içinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilememiştir. Deneysel veriler, OFX'in, özellikle belirtilen yüksek dozlarda ve *in vitro* koşullarda sitotoksik potansiyelinin olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu sonuçlar daha önce OFX ile yapılan toksisite çalışmalarında bildirilen hücre bölünmesinin artan inhibisyonu sayesinde OFX'in sitotoksik potansiyel verilerini desteklemektedir. Bu veriler, hücresel veya DNA hasarına bağlı olarak, özellikle hücre döngüsü kontrol noktalarında ve apoptoziste etkin p53 proteini gibi mekanizmaların hücre döngüsünün durmasını veya programlanmış hücre ölümünü başlatmasını akla getirmektedir.

Toksisite araştırmamızın bir diğer kısmı olan genotoksik değerlendirme sonuçları; OFX'in KA oluşumlarını ve AHO'nı artırdığını göstermiştir. Bu parametreler, birbirleriyle paralellik gösterecek şekilde, negatif kontrole göre ilk iki dozda doza bağlı olarak artmış, en yüksek dozda ise ikinci doza göre düşüş göstermiştir. MN oluşumu ise yine doza bağlı artış göstermiştir. Diğer bir test olan KKD sıklığının, negatif kontrole göre doza bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. Ancak söz konusu üç test sisteminden elde edilen genotoksikite verileri ile negatif kontrol arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, deneylerde gözlenen zayıf klastojenik etkiye rağmen, OFX'in çalışılan dozlarda *in vitro* test şartlarında genotoksik olduğunu söylemek için yetersizdir.

Bu çalışmadan elde edilen sitotoksik ve klastojenik veriler, OFX'in genotoksik karakteri hakkında kesin bir sonuç vermese de, özellikle sitotoksik ve klastojenik potansiyelin genotoksik etkiye zemin hazırladığı düşünüldüğünde, bu etken maddenin risk değerlendirmesi konusunda, yargıya varılmasında önemli bir katkı sağlayacaktır. Bu fikir, tekrarlayan ve uzun süren enfeksiyonların tedavisi sırasında veya gereksiz ve aşırı kullanımı ile ilaç dozlarının ve maruz kalma sürelerinin artması durumunda, risklerin gözden geçirilmesinin önemini vurgulamaktadır. Çalışmamızda elde edilen sonuçları destekleyen çeşitli araştırmalar bulunmakla beraber farklı verilere ulaşılmış bazı incelemeler de mevcuttur. Ancak OFX hakkında karar verilebilmesine olanak sağlayacak benzer ve sağlam veri topluluğuna ulaşılması için OFX'in mutajen karakterinin, genotoksisiteyi duyarlı ve doğrudan belirleyen yöntemlerle, uygun doz yelpazelerinde ve

in vitro ve *in vivo* tekniklerle, tekrarlayan çalıřmalarda test edilmesinin daha kesin ve doęru bilgiye ulařmamızda fayda saęlayacaęı dūřunılmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Aardema, J.M., Kirsch-Volders, M., 2001. The *in vitro* micronucleus assay. Choy, W.N. (Ed.), Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment, p: 163-186, Marcel Dekker Inc., New York.
- Abbott, P.V., 2000. Selective and intelligent use of antibiotics in endodontics. Aust. Endod. J., 26 (1), 30-39.
- Afan, F., 2011. Doksisisiklinin İnsan Periferik Lenfositlerinde *In Vitro* Genotoksik Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ordu, 63 s.
- Akkan, G., 1997. Antibiyotiklerin sınıflandırılmaları. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu, 2-3 Mayıs 1997, İstanbul, s: 53-62.
- Aktuğlu, Y., 1997. Pratikte Antibiyotik Kullanımı. İ.Ü. Cerrahpaşa tıp fakültesi sürekli tıp eğitimi etkinlikleri sempozyum dizisi, Mayıs, İstanbul, 160 s.
- Aktürk, S., 2009. Adana-Tufanbeyli yol hattındaki çeşme sularının mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 83 s.
- Alabaz, D., 2011. Kinolonlar: Çocuklarda Kullanım. J Pediatr Inf., 5 (Suppl 1), 196-202.
- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R, Hugmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T, Norppa, H.,Suhaker, D.E.G., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A., 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. Mutation Research, 463, 11-172.
- Altay, G., 2008. Kültür Pozitif 70 Bruselloz Hastasının Klinik Ve Laboratuvar Verilerinin Değerlendirilmesi & Antibiyotik Duyarlılıklarının E-Test Yöntemi İle İncelenmesi. Uzmanlık Tezi, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, 53 s.
- Altieri, D.C., 2004. Molecular circuits of apoptosis regulation and cell division control: The survivin paradigm. Journal of Cellular Biochemistry, 92, 656-663.
- Ambulkar, P.S., Ghosh, S.K., Ingole, I.V., Pal A.K., 2009. Genotoxic and cytotoxic effects of antibacterial drug, ciprofloxacin, on human lymphocytes *in vitro*. Nepal Med Coll J., 11 (3), 147-151.
- Anderson, D., 1988. Human Biomonitoring. Mutation Research, 204, 353-541.
- Andriole, VT., 1993. The future of the quinolones. Drugs, 45 (supp.3), 1-7.
- Andriole, VT., 2005. The quinolones: past, present and future, Clin Infect Dis., 41 (2), 113-119.
- Anupama, M., Seiler, J. P., Murthy, P. B., 2010. A comparative analysis of chromosomal aberrations in cultured human lymphocytes due to fluoroquinolone drugs at different expression periods. Arch Toxicol., 84, 411-420.
- Arda, B., Yamazhan. T., Sipahi, OR., 2004. 2003 mali yılı bütçe uygulama talimatının Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ndeki bazı antibiyotiklerin kullanımı üzerine etkisi, Hastane İnfeksiyon Derg., 8, 14.
- Arda, B., Ulusoy, S., 2008. Kinolonlar In: Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S. eds. Güncel Bilgiler ışığında Antibiyotikler. s: 497-512, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara.
- Atlı Şekeroğlu, Z., Şekeroğlu, V., 2011. Genetik Toksikite Testleri. Tüfav Bilim Dergisi, 4(3), 221-229.
- Banerjee, S., Fallis, A.G., Brown, D.L., 1997. Differential effects of taxol on two human cancer cell lines. Oncol Res., 9 (5), 237-248.
- Barbosa, J., Barrn, D., Cano, J., Jiménez-Lozano, E., Sanz-Nebot, V., Toro, I., 2001. Evaluation of electrophoretic method versus chromatographic, potentiometric and

- absorptiometric methodologies for determining pKa values of quinolones in hydroorganic mixtures. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24, 1087-1098.
- Bartlett, J.G., Froggatt, J.W., 1995. Antibiotic resistance. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*, 121, 392-396.
- Başaran, A. A., 2002, *Farmakognozide Tek Hücre Jel Elektrofrezisi Uygulamaları*. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eskişehir, Eds. K.H.C.Başer ve N.Kırimer.
- Baştürk, S., 2005. *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa ve Acinetobacter baumannii* suşlarında çeşitli kinolon grubu antibiyotiklerin duyarlılıklarının araştırılması. Uzmanlık Tezi, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, 61 s.
- Başustaoğlu, A., Akova, M., 1999. Grepafloksasin. *Flora*, 4 (1).
- Bedir, A., Bilgici, B., Yurdakul, Z., Gürsel, B.Ş., Alvur, M., 2004. DNA Hasarı Analizinde μ -Fadu ve Comet Yöntemlerinin Karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2 (3), 97-103.
- Bezwada, P., Clark, L.A., Schneider S., 2008. Intrinsic cytotoxic effects of fluoroquinolones on human corneal keratocytes and endothelial cells. *Current Medical Research and Opinion*, 24 (2), 419-424.
- Bilgehan, H., 1994. *Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi*. Fakülteler Kitabevi, Barış Yayınları, 589 s, İzmir.
- Bilgehan, H., 1995. Nonfermentatif Gram olumsuz Basiller. *Klinik Mikrobiyoloji: Özel Bakterioloji ve Bakteri Enfeksiyonları*. s: 161-178, Şafak Matbaacılık, İzmir.
- Blagosklonny, M.V., 2007. Mitotic arrest and cell fate. *Cell Cycle*, 6 (1), 70-74.
- Börçek Kasurka, C., 2010. Antihistaminik İlaç Olarak Kullanılan Feksofenadin Etken Maddesinin İnsan Periferik Lenfositleri Üzerindeki Genotoksik Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ordu, 88 s.
- Brambilla, G., Martelli, A., 2009. Update on genotoxicity and carcinogenicity testing of 472 marketed pharmaceuticals. *Mutation Research*, 681, 209–229.
- Bredberg, A, Brandt, M, Riesbeck, K, Azou, Y, Forsgren, A., 1989. The 4- quinolone antibiotics: positive genotoxic screening tests despite an apparent lack of mutation induction. *Mutat Res.*, 211, 171-80.
- Burns, J.L., 1995. Mechanisms of bacterial resistance. *Pediatr. Clin. North. Am.*, 42, 497-507.
- Carrano, A.V., Natarajan, A.T., 1988. Consideration for Population Monitoring Using Cytogenetic Techniques. *Mutation Research*, 204, 379-406.
- Cheng, M., Conner, M. K. and Alaria, Y., 1981. Potency of Some Carbamates as Multiple Tissue Sister Chromatid Exchanges in Bloom's Syndrome Lymphocytes. *Cancer Research*, 71, 4508-4512.
- Cheng, T.J., Christiani, D.C., Xu, X., Wain, J.C., Wiencke, J.K., Kelsey, K.T., 1996. Increased Micronucleus Frequency in Lymphocytes from Smokers with Lung Cancer. *Mutation Research*, 349, 43-50.
- Cheltelat, A., Albertini, S., Gocke, E., 1996. The photomutagenicity of fluoroquinolones in tests for gene mutation, chromosomal aberration, gene conversion and DNA breakage (Comet assay). *Mutagenesis*, 11 (5), 497-504.
- Chigutsa, E., Meredith, S., Wiesner, L., Padayatchi, N., Harding, J., Kenzie, W.M., Weiner, M., McIleron, H., Kirkpatrick, C.M.J., 2011. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of ofloxacin in south african patients with drug-resistant tuberculosis. 4th International Workshop on Clinical Pharmacology of TB Drugs.

- Choy, W.N., 2001. Genetic toxicology and Cancer Risk Assessment. p: 390, Marcel Dekker Inc., New York.
- Christensen, F.M., 1998. Pharmaceuticals in the Environment—A Human Risk? Regulatory Toxicology and Pharmacology, 28, 212-221.
- Clive, D., Spector, J.F.S., 1975. Laboratory procedure for assessing specific locus mutations at the tk locus in cultured L5178Y mouse lymphoma cells. Mutation Research, 31, 17-29.
- Clive, D., Glover, P., Applegate, M., Hozier, J., 1990. Molecular aspects of chemical mutagenesis in L5178Y/tk+/- mouse lymphoma cells. Mutagenesis, 5, 191-197.
- Combes, R.D., Stopper, H., Caspary, W.J., 1995. The use of L5178Y mouse lymphoma cells to assess the mutagenic, clastogenic and aneugenic properties of chemicals. Mutagenesis, 10, 403-408.
- Cozarelli, N. R.1980. DNA Gyrase and supercoiling of DNA. Science, 207, 953-960.
- Cross, J.T., Jr, MD, MPH, 2001. Fluoroquinolones. Seminars in pediatric infectious diseases, 12 (3), 211-223.
- Crossen, P.E., Morgan, W.F., 1978. Occurrence of 1st division metaphases in humanlymphocyte cultures. Human Genetics, 41, 97-100.
- Davila, J.C., Rodriguez, R.J., Melchert, R.B., Acosta, D., 1998. Predictive value of *in vitro* model systems in toxicology. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 38, 63-96.
- Davis, R., Markham, A., Balfour, JA., 1996. Ciprofloxacin an updated review of its pharmacology therapeutic and toleability. Drugs, 51 (6), 1019-1071.
- Demirel, S., Zamani, A., 2002. Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. Genel Tıp Dergisi, 12 (3), 123-127.
- Denizbaşı, A., Özünür, Z., 1992., Endoskopi dergisi, 3, 12-19s.**
- Devrim, İ., Gülfidan, G., Tavlı, V., Dizdarer, C., Yaşar, N., Oruç, Y., Sorguç, Y., Ayhan, F.Y., 2009. Dr. Behçet Uz Çocuk Hastanesinde antibiyotik kullanımına ilişkin nokta prevelans çalışması. Çocuk Enf. Derg., 3, 11-13.
- Dinçer, Y., Kankaya, S., 2010. DNA Hasarının Belirlenmesinde Comet Assay. Türk Klinikleri J Med Sci., 30 (4), 1365-73.
- Dökmeci, İ., Akçasu, A., Banoglu, N., Berkarda, S. ve ark., 1992. Farmakoloji. İlaç uygulamalarında temel kavramlar. Nobel Tıp Kitabevleri, s: 705-785, İstanbul.
- Duffaud, F., Orsiere, T., Villani, P., Pelissier, A.L., Volot, F., Favre, R., Botta, A., 1997. Comparison Between Micronucleated Lymphocytes Rates Observed in Healthy Subject and Cancer Patients. Mutagenesis, 12, 227-231.
- Durupınar, B., 2001. Antibiyotiklere Dirençte Yeni Eğilimler. Klimik Dergisi, 14 (2), 47-56.
- Eastmond, D.A., Tucker, J.D., 1989. Identification of Aneuploidy-Inducing Agents Using Cytokinesis-Blocked Human Lymphocytes and an Anti-Kinetochore Antibody. Environmental and Molecular Mutagenesis, 13, 34-43.
- Eke, 2007. Thimerosal'in İnsan Lenfosit Hücre Kültürlerinde Genotoksik, Mutajenik ve Toksik Etkilerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin, 91 s.
- El- Habit Ola, H.M, Abd- Allah Adel, R.A, El- Sais Soad, N., 2001. Comparison of Genotoxicity of Ofloxacin in Normal and Immune Stressed Mice. Suez Canal Univ Med., 4 (1), 1-8.
- EPA, 1998. *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test. Health Effects Test Guidelines.
- Epstein, J.B., Chong, S., Le, N.D., 2000. A survey of antibiotic use in dentistry. J. Am. Dent. Assoc., 131 (11), 1600-1609.

- Erdem, M., 2004. Sütte doksisisiklinin sıvı kromatografik tayini. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 73 s.
- Espinosa-Mansilla, A., Muñoz de la Peña, A., González Gómez, D., Salinas, F., 2005. HPLC determination of enoxacin, ciprofloxacin, norfloxacin and ofloxacin with photoinduced fluorimetric (PIF) detection and multiemission scanning Application to urine and serum. *Journal of Chromatography B*, 822, 185-193.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L., 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, 339, 37-59.
- Fass, R., 1985. Quinolones: *Annals of Internal Medicine*, 102, 400-402.
- FDA, 2004. Center for drug evaluation and research, Pharmacology reviews. Application number: NDA 50 795.
- Fenech, M., Morley, A.A., 1985. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus Assay. *Cytobios*, 43, 233-46.
- Fenech, M., Morley, A.A., 1986. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of *in vivo* ageing and dose X-irradiation. *Mutation Research*, 161, 193-198.
- Fenech, M., 1997. The Advantages and Disadvantages of the Cytokinesis-Block Micronucleus Method. *Mutation Research*, 392, 11-18.
- Fenech, M., Holland, N., Chang, W. P., Zeiger, E., Bonassi, S., 1999. The Human Micronucleus Project-An International Collaborative Study on the Use of the Micronucleus Technique for Measuring DNA Damage in Humans. *Mutat. Res.*, 428, 271-283.
- Fenech, M., 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat Res.*, 455, 81-95.
- Forsgren, A., Bredberg A., Riesbeck K., 1989. New Quinolones: In Vitro Effects as a Potential Source of Clinical Toxicity. *Reviews of Infectious Diseases*, 11, (supp. 5), 1382-1389.
- Fraimow, H.S., Abrutyn, E., 1995. Pathogens resistant to antimicrobial agents. *Infect Dis. Clin. North Am.*, 9, 497-530.
- Gangle, B.J., 2005. Sources and occurrence of antibiotic in the environment. Master of Science, University of Maryland, Baltimore, 118 p.
- Garewal, H. S., Ramsey, L., Kaugars, G., Boyle, J., 1993. Clinical experience with the micronucleus assay. *Cellular Biochem*, 17, 206-212.
- Gasperi-Campani, A., 1995. In vitro activity of taxol and taxotere in comparison with doxorubicin and cisplatin on primary cell cultures of human breast cancers. *Breast Cancer Res Treat.*, 34 (1), 63-9.
- Gatehouse, D. G, Rowland, I.R., Wilcox, P., Callander, R. D. ve Foster, R., 1990. Bacterial mutation assay, Basic Mutagenicity Ukems recommended procedures (Editor: Kirkland, D.J.), s: 13-60, The Bath Press, Avon.
- Goldstein, E., 1987. Norfloxacin: Classification Mechanism of action *in vitro* activity. *Am. Jour. Med.*, 82 (6B), 3-16.
- Gorla, N., Ovando, H.G., Larripa, I., 1999. Chromosomal aberrations in human lymphocytes exposed *in vitro* to enrofloxacin and ciprofloxacin. *Toxicology letters*, 104, 43-48.
- Gökalp Muranlı, F.D., 2006. Kültürü Yapılan İnsan Lenfositlerinde Triasulfuron'un Genotoksik Etkileri. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, Edirne, 98 s.
- Herbold Bernd, A., Brendler-Schwaab, S.Y., Hans, J.A., 2001. Ciprofloxacin: in vivo genotoxicity studies. *Mutation Research*, 498, 193-205.

- Hooper, DC., Strahilevitz, J., 2010. Quinolones. In: Mandell GL, Beedsett JE, Dolin R. nn. Mandell Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone. 35, 487-510.
- Hussy, P, Mass, G., Tummler, B., Groose, F., Schomburg, U., 1986. Effect of 4-quinolones and novobiocin on calf thymus DNA polymerase α complex, topoisomerase 1 and 2, and growth of mammalian lymphoblasts. *Antimicrob Agents Chemother*, 29, 1073-8.
- Itoh, S., Nakayama, S., Shimada, H., 2002. *In vitro* photochemical clastogenicity of quinolone antibacterial agents studied by a chromosomal aberration test with light irradiation. *Mutation Research*, 517, 113-121.
- Itoh, T., Mitsumori, K., Kawaguchi, S., Sasaki Yu, F., 2006. Genotoxic potential of quinolone antimicrobials in the *in vitro* comet assay and micronucleus test. *Mutation Research*, 603, 135-144.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli A., Pascarella L., Parrella, A., 2005. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Science of the Total Environment*. 346, 87-98.
- İkbal, M., Doğan, H., Odabaş, H., Pirim, İ., 2004, Genotoxic Evaluation of the Antibacterial Drug, Ciprofloxacin, in cultured Lymphocytes of Patients with Urinary Tract Infection. *Türk J Med Sci.*, 34, 309-313.
- Jarvis, A.S., Honeycutt, M. E., Mc Farland, V.A., Bulich, A.A., Bounds, H.C., 1996. A comparison of the Ames Assay and Mutatox in Assessing the Mutagenic potential of contaminated Dredged Sediment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 33, 193-200.
- Jung, R., Engelhart, G., Herbolt, B., Jöckh, R. ve Muller W., 1992. Collaborative study of mutagenicity With salmonella typhimurium TA 102, *Mutation Research*, 278, 265-270.
- Kalina, I., Ondrussekova, A., Konecna, H., 1990. Relation of the occurrence of chromosome aberrations in human peripheral lymphocytes to the cell cycle. *Casopis Lekarů Ceskych*, 129 (1), 23-25.
- Kassie, F., Parzefall, W., Knasmüller, S., 2000. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutation Research*, 463, 13-31.
- Karabay, O., Hoşoğlu, S., 2008. Increased antimicrobial consumption following reimbursement reform in Turkey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61, 1169-1171.
- Kayaalp, O., 1991. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 6. Baskı, Feryal Matbaacılık, s: 826-863, Ankara.
- Kayaalp, O., 2000. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji, 8. baskı, 1.cilt. Hacettepe-Tas Yayınları, 175-292, Ankara.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E., Van Hummelen, P., 1997. The *In Vitro* Micronucleus Test: A Multi-endpoint Assay to Detect Simultaneously Mitotic Delay, Apoptosis, Chromosome Breakage, Chromosome Loss and Non-disjunction. *Mutation Research*, 392 (1-2), 19-30.
- Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., Eichenlaub-Ritter, U., Decordier, I., 2003. Indirect mechanisms of genotoxicity. *Toxicology Letters*, 140-141, 63-74.
- Korkmaz, B., 2005. Bazı 2-Süstitüe Perimidin Bileşiklerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames Mutajenite Testi ile Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 99 s.
- Krishna, G., Hayashi, M., 2000. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research*, 455, 155-166.

- Laffon, B., Pasaro, E., Mendez, J., 2001, Genotoxic effects of styrene-7,8-oxide in human white blood cells: comet assay in relation to the induction of sisterchromatid exchanges and micronuclei. *Mutation Research*, 491 (1-2), 163-172.
- Latt, S. A., Sehrek, R. R., Loveday, K. S., Dougherty, C. P., Schuler, C. F., 1980. Sister chromatid Exchange. *Advances in Human Genetics*, 10, 267-331.
- Latt, S.A., Schreck, R.R., 1980. Sister Chromatid Exchange Analysis. *The American Journal of Human Genetics*, 32, 297-313.
- Leblebicioğlu, H., 2002. Yeni Kinolonlarda Mikrobiyolojik ve Klinik Etkinlik Ankem Derg., 16 (3), 226-231.
- Li, Q., Peng, S., Sheng, Z., Wang, Y., 2010. Ofloxacin induces oxidative damage to joint chondrocytes of juvenile rabbits: Excessive production of reactive oxygen species, lipid peroxidation and DNA damage. *European Journal of Pharmacology*, 626, 146-153.
- Lorge, E., Lambert, C., Gervais, V., Becourt-Lhote, N., Delongas, L., Claude, N., 2007. Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation. Part II: Performances of the *in vitro* micronucleus test compared to the Mouse lymphoma assay and the *in vitro* chromosome aberration assay. *Toxicological Sciences*, 96 (2), 214-217.
- Mamber Stephen, W., Benjamin, K., Kenneth, W. B., Daniel, P. B., Joan Fung-Tomc, 1993. Activity of Quinolones in the Ames Salmonella TA102 Mutagenicity Test and Other Bacterial Genotoxicity Assays. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 37 (2), 213-217.
- Maron, D.R., Ames, B.N., 1983. Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity test. *Mutation Research*, 113, 173-215.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P., V., Decordier, I., Kirsch-Volders M., 2006 Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring *Biochimie.*, 88 (11), 1515-31.
- Mavournin, H.K., Blakey, H.D., Cimino, C.M., Salamone, F.M., Heddle, A.J., 1990. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*, 239, 29-80.
- Mayer, DG., 1987. „Mutagenitätsbefunde. Fortschritte der antimikrobiellen und antineoplastischen Chemotherapie; 6-10, 1043-55.
- Medicavet, 2011. Antibiyotikler. Antibiyotik nedir? Antibiyotiklerin tarihçesi, antibiyotik grupları. <http://antibiyotikler.com> (25.09.2010).
- Mc Queen, CA., Williams, GM., 1987. Effects of quinolone antibiotics in tests for genotoxicity. *Am J Med.*, 82 (Suppl 4A), 94-6.
- Mc Queen, CA., Way, B.M., Queener. S.M., Schlüter. G., Williams, G.M., 1991. Study of potential *in vitro* and *in vivo* genotoxicity in hepatocytes of quinoloneantibiotics. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 111 (2), 255-62.
- McKelvey-Martin, V.J., Green, M.H., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Meo, M.P., Collins, A., 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutation Research*, 288, 47-63.
- Melli, M., 2004. ‘Kinolonlar ’Türkiye Klinikleri Farmakoloji Özel sayısı, 2 (2), 154-161.
- Mitelman, F., Kolnig, A.M., Strömbeck, B., Norrby, R., Kromann-Andersen S.P., Wadstein, J., 1988. No cytogenic effects of quinolone treatment in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 32, 936-7.
- Mortelmans, K., Zeiger, E., 2000. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455, 29-60.

- Mortelmans, K., Rupa, S.D., 2004. Current Issues in Genetic Toxicology Testing for Microbiologists. *Adv App Microbiol.*, 56, 379-401.
- Mülazımoğlu, L., 1999. Yeni Kinolonlar. *Antimikrobik Kemoterapi Günleri, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Kemoterapi Derneği*, 30-4.
- Natarajan, A.T., Obe, G., 1982. Mutagenicity Testing with cultured Mammalian Cells. *Cytogenetic Assays. Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology.* (Editör: John A. Heddle), s: 171-183, Academic Pres. Inc., London.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 4th. Edition. Approved Standard NCCLS Document M7-A4, 17 (2), NCCLS, Wayne, PA.
- Nias, A. H.W., 1998. An Introduction to Radiobiology. John Wiley & Sons Ltd. 389, England.
- Norppa, H., Falck, G.C-M., 2003. What Do Human Micronuclei Contain? *Mutagenesis*, 18 (3), 221-233.
- Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I-L., Hagmar, L., Strömberg, U., Rössner, P., Boffetta, P., Lindholm, C., Gundy, S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Sram, R. J., Kunudsen, L.E., Barale, R., Fucic, A., 2006. Chromosomal Aberrations and SCE as Biomarkers of Cancer Risk. *Mutation Research*, 600 (1-2), 37-45.
- OECD, 2006. *In vitro* Micronucleus Test. OECD Guideline For Testing of Chemicals Draft Proposal For A New Guideline.
- Olive, P.L., Banáth, J.P., 2006. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 1 (1), 23-29.
- Östling, O., Johanson, K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123 (11), 291-298.
- Özalp, E.A.D., 2002. *Farmakoloji. Nobel Tıp Kitabevleri*, 798 s, İstanbul.
- Özbek, T., 2006. Doğu Anadolu Tıbbi Bitkilerine Ait Bazı Türlerin Ames/Salmonella Mikrozom Testi Kullanılarak Antimutajenik Özelliklerinin Saptanması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 72 s.
- Perry, P., Evans, H.J., 1975. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature*, 258, 121-125.
- Pietenpol, J.A., Stewart, Z.A., 2002. Cell cycle checkpoint: Cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology*, 181-182, 475-481.
- Poddar, S., Talukder, G., Sharma, A., 2004. Chromosome damage induced by ferric chloride in human peripheral lymphocytes. *International Journal of Human Genetics*, 4 (4), 261-264.
- Polk, R.E., 1989 Drug-drug interactions with ciprofloxacin and other fluoroquinolones. *Am J Med.*, 87 (5A), 76.
- Purchase, I.F.H., Longstaff, E., Ashby, J., Styles, J.A., Anderson, D., Lefevre, P.A., Westwood, F.R., 1978. An evaluation of 6 short-term tests for detecting organic chemical carcinogens. *British Journal of Cancer*, 37, 873-959.
- Robinson, M.K., Cohen, C., de Fraissinette, Ade, B., Ponec, M., Whittle, E., Fentem, J.H., 2002. Non-animal testing strategies for assessment of the skin corrosion and skin irritation potential of ingredients and finished products. *Food and Chemical Toxicology*, 40 (5), 573-92.
- Rosin, M.P., Stich, H.F., 1979. Assesment of the use of the Salmonella mutagenesis assay to determine the influence of antioksidants on carcinogen-induced mutagenesis. *Int. J. Cancer*, 23, 722-727.

- Rothfuss, A., Schutz, P., Bochum, S., Volm, T., Eberhardt, E., Kreienberg, R., Vogel, W., Speit, G., 2000. Induced Micronucleus Frequencies in Peripheral Lymphocytes as a Screening Test for Carriers of a BRCA1 Mutation in Breast Cancer Families. *Cancer Research*, 60, 390-394.
- Sanchez, G., María, E.H., José, M.V., Jorge, E., 2005. Induced and Photoinduced DNA Damage by Quinolones: Ciprofloxacin, Ofloxacin and Nalidixic Acid Determined by Comet Assay. *Photochemistry and Photobiology*, 81 (4), 819-822.
- Sardohan, T., 2006. Bazı Kinolonların İyonlaşma Sabitlerinin Su-Metanol Ve Su-Asetonitril İkili Karışımlarında Potansiyometrik Yöntem İle Tayini. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, s. 180.
- Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B.A., 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. *Chemosphere*, 65, 725–759.
- Savage, J. R. K., 1993. Update on Target Theory as Applied to Chromosomal Aberrations. *Env. Mol. Mutagen.*, 22, 198-207.
- Saygı, Ş., 2003. Deneysel toksikolojide toksisite testleri ve test sonuçlarının önemi. *Gülhane Tıp Dergisi*, 45 (3), 291-298.
- Schmid, W., 1975. The micronucleus test. *Mutation Research*, 31, 9-15.
- Schülter, G., 1987. Toxicology of quinolones. *Fortschritte der antimikrobiellen und antineoplastischen Chemotherapie*, 6-10, 1631-42.
- Sheng, Z.G., Peng, S.Q., Wang, C.Y., Li, H.B., Ravindra, K.H., Wang, Y.M., Li, Q.Q., Liu, M.F., Dong, Y.S., Han, G., 2007. Apoptosis in microencapsulated juvenile rabbit chondrocytes induced by ofloxacin: role played by β 1-integrin receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 322, 155–165.
- Sheng, Z., Cao, X., Peng, S., Wang, C., Li, Q., Wang, Y., Liu, M., 2008. Ofloxacin induces apoptosis in microencapsulated juvenile rabbit chondrocytes by caspase-8-dependent mitochondrial pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 226, 119-127.
- Singh, NP., McCoy, MT., Tice, RR., Schneider, EL., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.*, 175 (1), 184-91.
- Sivikova, K., Dianovski J., 2000, Mitotic index and cell proliferation kinetics as additional variables for assessment of genotoxic effect of the herbicide modown. *Acta Veterinaria Brno.*, 69 (1), 45-50.
- Snyder, R.D., Green, J.W., 2001. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. *Mutation Research*, 488, 151–169.
- Snyder, R.D, Ewing, D., Hendry L.B., 2006. DNA intercalative potential of marketed drugs testing positive in invitro cytogenetics assays. *Mutation Research*, 609, 47-59.
- Sonoda, E., Sasaki, M.S., Morrison, C., Yamaguchi-Iwai, Y., Takata, M., Takeda, S., 1999. Sister Chromatid Exchanges Are Mediated by Homologous Recombination in Vertebrate Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 19 (7), 5166-5169.
- Stopper, H., Müller, O.S., 1997. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A Minireview. *Toxicology In Vitro*, 11, 661-667.
- Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H., Marcos, R. 1995. Induction of Micronuclei by Five Pyrethroid Insecticides in Whole-Blood and Isolated Human Lymphocyte Cultures. *Mutation Research.*, 341, 169-184.
- Şardan Çetinkaya, Y., 2004. Antibiyotik kontrol komitesinin işlevi ve kontrollü antibiyotik kullanımı, *ANKEM Derg.*, 18, 56-8.
- Taner, G., 2004. Genotoksikoloji. *Bilim ve Teknik*, Eylül, s.28.

- Taylor, J.H., Woods, P.S., Hughes, M.L., 1957. The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 43, 122.
- Tucker, J. D., Auletta, A., Cimino, M. C., Dearfield, K. L., Jacobson-Kram, D., Tice, R. R. and Carrano, A. V., 1993. Sister-Chromatid Exchange: Second Report of the Gene-Tox Program. *Mutation Research*, 297(2), 101-180.
- Ulusoy, S., 2010. 1986'dan 2010'a Kinolonlar. *Ankem Derg.*, 24 (Ek 2), 96-100.
- Umezawa, N., Kumi, A., Akemi, R., Shinro, M., Masaaki, H., Tetsuo, N., 1997. Participation of Reactive Oxygen Species in Phototoxicity Induced by Quinolone Antibacterial Agents. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 342 (2), 275–281.
- Üstün, F. 2007. Albendazol'un olası genotoksitesi üzerine askorbik asitin etkisi. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 100 s.
- Vural, N., 2005. Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 73, Ankara.
- WHO, 1969. WHO Expert Committee on Drug Dependence. Sixteenth report. Technical report series, No. 407, Geneva.
- WHO, 2004. The world health report. <http://www.who.int/healthinfo/statistics/mortestimatesofdeathbycause/en/index.htm> (26.03.2008).
- Widel, M., Kolosza, Z., Jedrus, S., Lukaszczyk, B., Raczek-Zwierzycka, K., Swierniak, A., 2001. Micronucleus assay *in vivo* provides significant prognostic information in human cervical carcinoma: The updated analysis. *International Journal of Radiation Biology*, 77, 631-636.
- Wise, R., Hart, T., Cars, O., Streulens, M., Helmuth, R., Huovinen, P., Sprenger, M., 1998. Antimicrobial resistance. Is a major threat to public health. *Br Med J.*, 317, 609-610.
- Wise, R., Honeybourne, D., 1999. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones in the respiratory tract *Eur Respir J* ; 14, 221-229.
- Wolff, S., 1980. Sister chromatid Exchange. *Advances in Human Genetics*, 10, 183-201.
- Wooster, R., Ebner, T., Sutherland, L., Douglas, C.D., Brian, B., 1993. Drug and xenobiotic glucuronidation catalysed by cloned human liver UDP-Glucuronosyltransferases stably expressed in tissue culture cell lines. *Toxicology* 82 (1-3), 119-29.
- Yalap, S.K., 2008. Effects of water components on the photocatalytic and ozone oxidation of oxytetracycline antibiotic. Thesis of Master of Science, Boğaziçi University Institute of Environmental Sciences, İstanbul, 89 s.
- Yavuz Kocaman, A., 2007. Acetamiprid ve Alpha-Cypermethrin Pestisidlerinin Tek Başına ve Karışım Halinde Kullanıldıkları Zaman İnsan Periferik Lenfositlerindeki *In vitro* Genotoksik Etkileri. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 207 s.
- Yırtıcı, Ü., 2007. Tartrazin'in *Cyprinus carpio*'daki Genotoksik Etkisinin Mikronükleus Yöntemi İle Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 80 s.
- Young, R.R., 2002. Genetic toxicology. *Toxicology*, 173, 103-121.
- Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F., Aksoy, H., 2006. Clastogenicity of fungicide afugan in cultured human lymphocytes. *Mutation Research*, 604, 53–59.
- Zeiger, E., 1998. Identification of rodent carcinogens and noncarcinogens using genetic toxicity tests: Premises, promises, and performance. *Regul Toxicol Pharmacol*; 28, 85-95.

- Zeiger, E., 2004. History and rationale of genetic toxicology testing: an impersonal, and sometimes personal, view. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44, 363-371.
- Zoli, W., Flamigni, A., Frassinetti, G.L., Bajorko, P., De Paola, F., Milandri, C., Amadori, D., Gasperi-Campani, A., 1995. *In vitro* activity of taxol and taxotere in comparison with doxorubicin and cisplatin on primary cell cultures of human breast cancers. *Breast Cancer Research and Treatment*, 34(1), 63-69.

ÖZ GEÇMİŞ

Adı Soyadı : Muhammet AKSOY

Doğum Yeri : GİRESUN

Doğum Tarihi : 18.11.1986

Medeni Hali : Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Giresun Lisesi,2004

Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ordu Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji
Bölümü, 2009

Yüksek Lisans : Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim
Dalı - 2012

Çalıştığı Kurumlar: -

İletişim Bilgileri

Email : aksoy_duroglu@hotmail.com