

**LORATADİN'İN İNSAN PERİFERAL  
LENFOSİTLERİ ÜZERİNDEKİ  
SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK  
ETKİLERİ  
SEVAL KONTAŞ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**T.C.**  
**ORDU ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LORATADİN'İN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİ ÜZERİNDEKİ**  
**SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİ**

**SEVAL KONTAŞ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AKADEMİK DANIŞMAN**  
**Yrd. Doç. Dr. Zülal ATLI 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:** Prof. Dr. Tefvik NOYAN

**Üye:** Yrd. Doç. Dr. Zülal ATLI ŞEKEROĞLU

**ONAY:**

.../.../2012

Doç. Dr. M. Fikret BALTA  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## LORATADİN'İN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİ

### ÖZ

Bu çalışmada, alerjik semptomların tedavisinde sıklıkla kullanılan loratadinin (LOR) etken maddesinin insan periferal lenfosit hücrelerindeki *in vitro* genotoksik etkileri, kromozom anormalliği (KA), mikronükleus (MN) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) testleri kullanılarak araştırılmıştır. Ayrıca test maddesinin hücre bölünmesi üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek için, mitotik indeks (MI), nükleus bölünme indeksi (NBI) ve proliferasyon indeksi (PI) hesaplanmıştır. Hücre kültürleri LOR'in 5, 15 ve 25 µg/ml'lik konsantrasyonlara 48 saatlik süreyle maruz bırakılmıştır. Ayrıca hem negatif hem de pozitif kontrol grupları da oluşturulmuştur.

LOR'in KKD, KA ve MN oluşumu üzerindeki etkileri incelendiğinde, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında LOR'in test edilen tüm dozlarda bu değerleri istatistiksel açıdan önemli olacak kadar artırmadığı görülmüştür. PI, MI ve NDI değerleri, LOR konsantrasyonunun artışına paralel olarak azalmıştır. MI'de doza bağlı bir azalma olmasına rağmen, negatif kontrol karşılaştırıldığında istatistiksel anlamda önemli düşüşler kullanılan yüksek konsantrasyonları olan 15 ve 25 µg/ml'de saptanmıştır. LOR'in test edilen tüm dozlarında PI ve NBI değerlerindeki doza bağlı azalmalar negatif ve pozitif kontrole göre kıyaslandığında aralarında istatistiksel açıdan farklılık bulunmamıştır.

Çalışmamızın sonuçları, LOR'in test edilen tüm dozlarda genotoksik etkiye sahip olmadığını, ancak doza bağlı olarak PI ile NBI üzerindeki zayıf sitostatik potansiyeli ve yüksek dozlarda MI'yi istatistiksel açıdan anlamlı derecede düşürmesi bu ilacın *in vitro* koşullarda sitotoksik etkisinin olabileceğini göstermektedir. Bu ilacın hücre bölünmesi üzerindeki engelleyici etkisinin açıklanması ve sitotoksik, genotoksik ve apoptotik etkileri arasındaki ilişkinin belirlenebilmesi için, hem insan periferal lenfositleri hem de değişik hücre serileri üzerinde daha detaylı *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların yapılması gerekmektedir.

**Anahtar sözcükler:** Loratadin, sitotoksisite, genotoksisite, kromozomal anormallikleri, kardeş kromatid değişimi, mikronükleus

## CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF LORATADINE ON HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

### ABSTRACT

In this study, *in vitro* genotoxic effects of loratadine (LOR) which has been widely used to treat allergic symptoms were investigated in peripheral human lymphocytes by using chromosomal aberrations (CA), micronucleus (MN) and sister chromatid exchange (SCE) tests. In addition to these methods, mitotic index (MI), nuclear division index (NDI) and proliferation index (PI) were also calculated to determine the cytotoxic effect of test substance for cell division. The cell cultures were treated with 5, 15 and 25 µg/ml concentrations of LOR for 48 hours. Both negative and positive control groups were also established.

When the effects of LOR were examined on formation of KKD, KA and MN, it did not increase these values were statistically significant at all concentrations tested compared with the negative control. PI, MI and NDI values decreased linearly as LOR concentration increased. Although a dose-dependent decrease was observed in the MI, statistically significant decreases were detected at higher concentrations (15 and 25 µg/ml) compared with the negative control. Dose-dependent decreases were observed in the PI and NDI were not found statistically significant at all LOR concentrations tested compared with the negative and positive controls.

The results of this study show that LOR has not genotoxic effect at all the concentrations tested, but it may have a cytotoxic effect *in vitro* condition due to weak cytotoxic effects in PI and NDI in a dose-dependent manner and significantly decrease the MI in high doses. Further detailed studies are required to elucidate the inhibitory effect on cells division and to determine the relationship between cytotoxic, genotoxic and apoptotic effects of this drug in human peripheral blood lymphocytes and different cell lines *in vitro* and *in vivo*.

**Key words:** Loratadine, cytotoxicity, genotoxicity, chromosomal aberration, sister chromatid exchange, micronucleus

## TEŞEKKÜR

Tüm çalışmalarım boyunca her zaman bilgi ve deneyimleriyle yolumu açan, yardımlarını esirgemeyen ve her konuda çok değerli katkıları olan değerli hocam **Yrd. Doç. Dr. Zülal ATLI ŞEKEROĞLU**' na içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında her konuda büyük yardımlarını gördüğüm sayın hocam **Yrd. Doç. Dr. Vedat ŞEKEROĞLU**' na ve emeği geçen tüm bölüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını eksik etmeyen **Muhammet AKSOY, Tuğçe ÇELİK** ve **Derya KEÇECİ**' ye teşekkür ederim.

Hem bu zorlu ve uzun süreçte hem de hayatım boyunca yanımda olan ve ideallerimi gerçekleştirmemi sağlayan değerli aileme yürekten teşekkürü bir borç bilirim.

**İÇİNDEKİLER**

<b>ÖZ</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iv</b>
<b>SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	<b>x</b>
<b>ÇİZELGELER LİSTESİ</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1. Histamin</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2. Histamin Reseptörleri</b> .....	<b>6</b>
<b>2.2.1. Histamin H<sub>1</sub> Reseptörleri</b> .....	<b>6</b>
<b>2.2.2. Histamin H<sub>2</sub> Reseptörleri</b> .....	<b>6</b>
<b>2.2.3. Histamin H<sub>3</sub> Reseptörleri</b> .....	<b>7</b>
<b>2.2.4. Histamin H<sub>4</sub> Reseptörleri</b> .....	<b>7</b>
<b>2.3. Antihistaminik İlaçlar</b> .....	<b>7</b>
<b>2.3.1. Antihistaminik İlaç Grupları</b> .....	<b>8</b>
<b>2.3.1.1. Ethanolaminler</b> .....	<b>8</b>
<b>2.3.1.2. Etilendiaminler</b> .....	<b>8</b>
<b>2.3.1.3. Alkilaminler</b> .....	<b>8</b>
<b>2.3.1.4. Piperidinler</b> .....	<b>8</b>
<b>2.3.1.5. Fenothiazinler</b> .....	<b>9</b>
<b>2.3.1.6. Piperazinler</b> .....	<b>9</b>
<b>2.3.2. Eski ve Yeni Kuşak Antihistaminikler</b> .....	<b>9</b>
<b>2.3.2.1. Birinci Kuşak (Klasik-Eski) Antihistaminikler</b> .....	<b>9</b>
<b>2.3.2.2. İkinci Kuşak (Nonklasik-Yeni) Antihistaminikler</b> .....	<b>9</b>
<b>2.3.2.3. Üçüncü (Natürel Metabolitler) Kuşak Antihistaminikler</b> .....	<b>10</b>
<b>2.4. Loratadin</b> .....	<b>11</b>
<b>2.4.1. Loratadinin Farmakodinamik Özellikleri</b> .....	<b>11</b>
<b>2.4.2. Loratadinin Farmakokinetik Özellikleri</b> .....	<b>11</b>
<b>2.5. Genetik Toksikoloji</b> .....	<b>12</b>

2.6. Genetik Toksikite Testleri .....	15
2.6.1. Memeli Hücre Kültürü Testleri: .....	15
2.6.1.1. <i>In vitro</i> Kromozom Anormallikleri (KA) Testi .....	17
2.6.1.2. <i>In vitro</i> Mikronukleus (MN) Testi .....	17
2.6.1.3. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Testi .....	18
2.7. Antihistaminiklerle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları .....	19
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>25</b>
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar .....	25
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	25
3.1.1.1. Loratadin .....	25
3.1.1.2. Dimetil Sülfoksit (DMSO) .....	26
3.1.1.3. Kromozom Medyumu .....	26
3.1.1.4. Mitomisin C (MMC) .....	27
3.1.1.5. Sitokalasin B (Sigma) .....	27
3.1.1.6. Kolsemid (Kolşisin) .....	28
3.1.1.7. Hipotonik Eriyik .....	28
3.1.1.8. Fiksatif .....	29
3.1.1.9. 5'-Bromo-2'-deoksiüridin (BrdUrd) .....	29
3.1.1.10. Sorensen Tamponu .....	30
3.1.1.11. Standart Salin Citrat (SSC) Eriyiği .....	30
3.1.1.12. Giemsa .....	30
3.1.1.13. Entellan .....	30
3.1.2. Kullanılan Cihazlar .....	31
3.1.2.1. Hassas Terazî .....	31
3.1.2.2. Biyogüvenlik Kabini .....	31
3.1.2.3. İnkübatör .....	31
3.1.2.4. Santrifüj .....	31
3.1.2.5. Vorteks Karıştırıcı .....	31
3.1.2.6. Su Banyosu .....	31
3.1.2.7. UV Kabin .....	31
3.1.2.8. Mikroskop .....	32
3.2. Kromozom Anormalliklerini (KA) ve Mitotik İndeksi (MI) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması .....	32



3.2.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması.....	32
3.2.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması.....	34
3.2.3. Mikroskopik İncelemeler ve Mikroskopta Fotoğraf Çekme .....	34
3.2.4. Mitotik İndeks (MI) ve Kromozom Anormalliklerinin (KA) Saptanması.....	34
3.2.4.1. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması .....	34
3.2.4.2. Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması .....	35
3.3. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Testi İçin Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması.....	36
3.3.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması.....	36
3.3.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması.....	36
3.3.3. Mikroskopik İncelemeler ve Mikroskopta Fotoğraf Çekme .....	37
3.3.4. Proliferasyon İndeksi (PI) ve Kardeş Kromatid Değişiminin (KKD) Saptanması.....	37
3.3.4.1. Proliferasyon İndeksinin (PI) Saptanması .....	37
3.3.4.2. Kardeş Kromatid Değişiminin (KKD) Saptanması .....	41
3.4. Mikronükleus (MN) Testi İçin Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması .....	41
3.4.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması.....	41
3.4.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması.....	42
3.4.3. Mikroskopik İncelemeler ve Mikroskopta Fotoğraf Çekme .....	43
3.4.4. Mikronükleus Sayısı ve Nükleus Bölünme İndeksinin (NBI) Saptanması.....	43
3.5. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi.....	45
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>46</b>
4.1. Loratadinin Kromozom Anormalliği, Kardeş Kromatid Değişimi ve Mikronükleus Oluşumu Üzerindeki Etkileri.....	46
4.1.1. Loratadinin DNA Replikasyonu Üzerindeki Etkileri .....	46
4.1.2. Loratadinin Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkileri.....	47
4.1.3. Loratadinin Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri .....	48
4.2. Loratadin Dozlarına Bağlı Olarak PI, MI ve NBI Arasındaki İlişki.....	48
4.3. Loratadinin Kromozom Anormalliği, Kardeş Kromatid Değişimi ve Mikronükleus Oluşumu Üzerindeki Etkileri.....	50

<b>4.3.1.</b> Loratadinin Kromozom Anormalliklerinin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri .....	<b>50</b>
<b>4.3.2.</b> Loratadinin Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Oluşumu Üzerindeki Etkileri .....	<b>60</b>
<b>4.3.3.</b> Loratadinin Mikronükleus (MN) Oluşumu Üzerindeki Etkileri.....	<b>65</b>
<b>4.4.</b> Loratadin Dozlarına Bağlı Olarak KKD, KA ve MN Arasındaki İlişki .....	<b>68</b>
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	<b>70</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	<b>77</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b> .....	<b>79</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>94</b>

## SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

<b>SCGE</b>	: Single Cell Gel Electrophoresis (Comet Testi)
<b>Ames Testi</b>	: Salmonella/Mikrozom Mutajenite Testi
<b>KA</b>	: Kromozom Anormallikleri (Kromozomal Aberasyonlar)
<b>MN</b>	: Mikronükleus
<b>KKD</b>	: Kardeş Kromatid Değişimi (Sister Chromatid Exchange:SCE)
<b>SCD</b>	: Sister Chromatid Differentiation
<b>UDS</b>	: Unscheduled DNA Synthesis (programlanmamış DNA sentezi)
<b>MI</b>	: Mitotik İndeks
<b>NBI</b>	: Nükleus Bölünme İndeksi
<b>NDI</b>	: Nuclear Division Index
<b>PI</b>	: Proliferasyon İndeksi
<b>AHO</b>	: Anormal Hücre Ortalaması
<b>BN</b>	: Binükleat Hücre
<b>MNBN</b>	: Mikronükleuslu Binükleat Hücre
<b>K'</b>	: Kromatit Kırığı
<b>K''</b>	: Kromozom Kırığı
<b>F</b>	: Fragment
<b>KD</b>	: Kromatid Değişimi
<b>KKB</b>	: Kardeş Kromatid Birleşmesi
<b>P</b>	: Poliploidi
<b>LOR</b>	: Loratadin
<b>IgE</b>	: Immunoglobulin E
<b>PSA</b>	: Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin
<b>BrdUrd</b>	: 5'-Bromo-2'-deoksiüridin
<b>SSC</b>	: Standart Salin Citrat
<b>PHA-M</b>	: Fitohemaglutinin M
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>MMC</b>	: Mitomisin C
<b>Cyt-B</b>	: Cytochalsin-B (Sitokalsin-B)
<b>EPA</b>	: U.S. Environmental Protection Agency (Amerika Çevre Koruma Temsilciliği)

- FDA** : Food and Drug Administration (Amerika Gıda ve İlaç Yönetimi)
- ISAAC** : The International Study of Asthma and Allergies in Childhood  
(Uluslararası Çocukluk Dönemi Astım ve Alerji Araştırmaları)
- GPCR** : G-Protein-Coupled-Receptor (G-protein-bağlantılı-reseptör)
- ISCN** : International System for Human Cytogenetic Nomenclature  
(Uluslararası İnsan Sitogenetik Adlandırma Sistemine)
- ml** : mililitre
- dk** : dakika
- µl** : mikrolitre

## ŞEKİLLER LİSTESİ

<b>Şekil 2.1.</b> Genotoksinlerin DNA üzerindeki doğrudan ve dolaylı etki mekanizması.....	<b>13</b>
<b>Şekil 2.2.</b> Genotoksinlerin DNA üzerindeki etki mekanizması ve sonuçları .....	<b>14</b>
<b>Şekil 3.1.</b> Normal metafaz plağı X1000 .....	<b>35</b>
<b>Şekil 3.2.</b> BrdUrd' nin DNA yapısına girmesi ile birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması.....	<b>39</b>
<b>Şekil 3.3.</b> Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomları X1000 .	<b>39</b>
<b>Şekil 3.4.</b> İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomları X1000 ...	<b>40</b>
<b>Şekil 3.5.</b> Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomları X1000	<b>40</b>
<b>Şekil 3.6.</b> Kardeş kromatid değişimi .....	<b>41</b>
<b>Şekil 3.7.</b> Binükleat hücre X400.....	<b>44</b>
<b>Şekil 3.8.</b> Bir mikronükleus bulunduran binükleat hücre X400 .....	<b>44</b>
<b>Şekil 3.9.</b> Mononükleat (a), binükleat (b) ,trinükleat (c) ve tetranükleat hücreler (d) X400.....	<b>45</b>
<b>Şekil 4.1.</b> Loratadinin test edilen dozları ile PI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı .....	<b>46</b>
<b>Şekil 4.2.</b> Loratadinin test edilen dozları ile % MI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı .....	<b>47</b>
<b>Şekil 4.3.</b> Loratadinin test edilen dozları ile NBI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı .....	<b>48</b>
<b>Şekil 4.4.</b> Loratadinin test edilen dozları ile NBI ve MI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı .....	<b>49</b>
<b>Şekil 4.5.</b> Loratadinin test edilen dozları ile PI ve MI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı .....	<b>49</b>
<b>Şekil 4.6.</b> Loratadinin test edilen dozları ile PI ve NBI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı .....	<b>50</b>
<b>Şekil 4.7.</b> Kromatid Kırığı (15 µg/ ml) X1000 .....	<b>51</b>
<b>Şekil 4.8.</b> Kromatid Kırığı (5 µg/ ml) X1000 .....	<b>51</b>
<b>Şekil 4.9.</b> Kromatid Kırığı (25 µg/ ml) X1000 .....	<b>52</b>
<b>Şekil 4.10.</b> Kromozom Kırığı (15 µg/ ml) X1000 .....	<b>52</b>
<b>Şekil 4.11.</b> Kromozom Kırığı (5 µg/ ml) X1000 .....	<b>53</b>
<b>Şekil 4.12.</b> Kromozom Kırığı (25 µg/ ml) X1000 .....	<b>53</b>

<b>Şekil 4.13.</b> Fragment (5 µg/ ml) X1000 .....	<b>54</b>
<b>Şekil 4.14.</b> Fragment (15 µg/ ml) X1000 .....	<b>54</b>
<b>Şekil 4.15.</b> Fragment (25 µg/ ml) X1000 .....	<b>55</b>
<b>Şekil 4.16.</b> Kardeş Kromatid Birleşimi (KKB) (5 µg/ ml) X1000 .....	<b>55</b>
<b>Şekil 4.17.</b> Kardeş Kromatid Birleşimi (KKB) (15 µg/ ml) X1000 .....	<b>56</b>
<b>Şekil 4.18.</b> Kardeş Kromatid Birleşimi (KKB) (25 µg/ ml) X1000 .....	<b>56</b>
<b>Şekil 4.19.</b> Poliploidi (25 µg/ ml) X1000 .....	<b>57</b>
<b>Şekil 4.20.</b> Loratadinin test edilen dozları ile KA arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı .....	<b>57</b>
<b>Şekil 4.21.</b> Loratadinin test edilen dozları ile AHO arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı .....	<b>58</b>
<b>Şekil 4.22.</b> Loratadinin test edilen dozları ile KKD arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı .....	<b>60</b>
<b>Şekil 4.23.</b> 5 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler X1000 .....	<b>61</b>
<b>Şekil 4.24.</b> 5 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler X1000 .....	<b>61</b>
<b>Şekil 4.25.</b> 15 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler X1000 .....	<b>62</b>
<b>Şekil 4.26.</b> 15 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler X1000 .....	<b>62</b>
<b>Şekil 4.27.</b> 25 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler X1000 .....	<b>63</b>
<b>Şekil 4.28.</b> 25 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler X1000 .....	<b>63</b>
<b>Şekil 4.29.</b> Loratadinin test edilen dozları ile % MN arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı .....	<b>65</b>
<b>Şekil 4.30.</b> Bir mikronükleus (a) ve iki mikronükleus (b) içeren binükleat hücre (5 µg/ml) X400.....	<b>66</b>
<b>Şekil 4.31.</b> Bir mikronükleus (a) ve iki mikronükleus (b) içeren binükleat hücre (15 µg/ml) X400.....	<b>66</b>
<b>Şekil 4.32.</b> Bir mikronükleus (a) ve iki mikronükleus (b) içeren binükleat hücre (25 µg/ml) X400.....	<b>66</b>

- Şekil 4.33.** Loratadinin test edilen dozları ile MN ve KKD arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı ..... **68**
- Şekil 4.34.** Loratadinin test edilen dozları ile MN ve KA arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı ..... **69**
- Şekil 4.35.** Loratadinin test edilen dozları ile KA ve KKD arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı ..... **69**

**ÇİZELGELER LİSTESİ**

<b>Çizelge 2.1.</b> Eski ve yeni nesil bazı antihistaminik ilaçlar .....	<b>10</b>
<b>Çizelge 4.1.</b> Loratadinin sebep olduğu kromozomal anormallikler ve % MI, KA ve AHO'sı üzerine etkisi .....	<b>59</b>
<b>Çizelge 4.2.</b> Loratadinin sebep olduğu kardeş kromatid değişimleri ve KKD ve PI değerleri .....	<b>64</b>
<b>Çizelge 4.3.</b> Hücrelerin nükleus sayısına göre, binükleat hücrelerin MN sayısına göre dağılımları ve MN, % MN ve NBI .....	<b>67</b>



## 1. GİRİŞ

Alerji, en basit ifadeyle ‘insanların çoğunluğu için zararlı olmayan bir maddenin bazı kişilerde oluşturduğu olumsuz bir reaksiyon’ olarak tanımlanabilir. Alerjen terimi, genetik olarak yatkınlığı olan bireylerde İmmunoglobulin E (IgE) cevabını tetikleyen antijen olarak kullanılır. Alerjik hastalıklar ise, IgE aracılıklı immün yanıt ile aynı alerjenle tekrarlayan karşılaşmalar sonucunda bir veya daha fazla organda ortaya çıkan hastalıklardır (Wahn ve ark., 1997; Arshad ve ark., 2003; Turan Akyol, 2009).

Allerji terimi, ilk kez 1906 yılında Von Pirquet tarafından eski Yunanca’da değişik iş veya değişik reaksiyon anlamına gelen iki kelimenin birleştirilmesi ile oluşturulmuştur. Bu olayların oluşmasında hipersensitivite reaksiyonları dediğimiz aşırı duyarlılık reaksiyonları rol oynamaktadır (Karaman ve ark., 1994; Gelişken, 2008).

Alerji ve atopi terimleri sıklıkla birbirine yakın ve birbirinin yerine kullanılırlar (Wutrich, 1999; Turan Akyol, 2009). Günümüzde alerji, çeşitli alerjenlere karşı immün aracılıklı artmış cevap olarak tanımlanmaktadır. Atopi teriminin kökeni yerinde olmayan anlamına gelen ‘atopos’ kelimesine dayanmaktadır. Atopi, alerjen maruziyetine cevap olarak IgE yapısında antikörler oluşturmaya genetik eğilim olarak tanımlanmaktadır (Wahn ve ark., 1997; Arshad ve ark., 2003; Turan Akyol, 2009).

Alerjiye neden olan maddeler bitki polenleri, toz partikülleri, mantar sporları, besinler, lateks kauçuğu, arı zehiri, penisilin gibi bazı ilaçlar ve gıdalar şeklinde sıralanabilir. Alerjisi olan insanlar genellikle birden fazla maddeye karşı hassastırlar (Topuz, 2001; Kadıköylü, 2007).

Alerjik hastalıkların oluşumunda çok sayıda çevresel faktör ile karmaşık bir gen grubunun karşılıklı etkileşimi rol oynamakta ve başta astım bronşiale, alerjik rinit ve atopik dermatit olmak üzere atopik hastalıklar gelişmektedir (Turan Akyol, 2009).

Alerjik hastalıklar giderek daha çok önem kazanmaktadır. Bu hastalıklara yol açan alerjenler daha iyi bilinmekte, tanı ve tedavi yöntemleri de gelişmektedir. Alerjik hastalıklara yol açan alerjenlerin klinik önemi, bölgesel farklılıklar göstermektedir. Bir bölgedeki sorumlu alerjenlerin bilinmesi, deri testleri sonuçlarının daha iyi değerlendirilmesini sağlayarak, hastanın semptomlarının oluşmasından sorumlu alerjenlerin saptanarak alerjen immünoterapisinde doğru alerjen seçimini, dolayısıyla tedavinin başarısını belirlemektedir. Bu nedenle alerjenler ve bunların hastalıkların gelişimindeki rollerin iyi bilinmesi çok önemlidir. Ülkemizde iklim ve bitki özelliklerinden dolayı, alerjenlerin çeşitliliği ve yoğunluğu fazladır (Kokuludağ, 2002).

Alerjik hastalıklar, son yıllarda özellikle gelişmiş ülkelerde önemli bir artış göstererek bir halk sağlığı problemi haline gelmiştir (Beasley, 1998; Yıldız Zeyrek ve Zeyrek, 2006). Gelişmekte olan ülkeler endüstriyel ülkelerle karşılaştırıldığında allerjik hastalıklar açısından belirgin oranda düşük prevalansa (bir hastalığın toplumda görülme sıklığı) sahiptir. Hatta aynı ülke içinde kentsel bölgelerde allerjik hastalıkların prevalansı kırsal bölgelere göre belirgin derecede yüksek saptanmıştır (Yemaneberhan ve ark., 1997; Von Ehrenstein ve ark., 2000; Yıldız Zeyrek ve Zeyrek, 2006). Gelişmiş ülkelerdeki bu belirgin artışın sadece genetik etkenler ve tanı olanaklarının artışı ile açıklanmasının mümkün olmadığı ve çevresel etkenlerin, özellikle aile yapısının küçülmesi, enfeksiyonların ve paraziter hastalıkların azalması, kişisel hijyenin artması gibi batılılaşmış yaşam biçiminin önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bu olaylar ise, bağışıklık sistemini gereksinim duyduğu ajanlardan mahrum bırakmakta ve allerjik hastalık sıklığının artışı gündeme getirmektedir (Von Hertzen, 1998; Yıldız Zeyrek ve Zeyrek, 2006).

Strachan, ilk kez 1989 yılında “hijyen hipotezi” olarak adlandırılan bir görüşünde, çocukluk döneminde enfeksiyöz mikroorganizmalara daha az maruz kalmanın ileride allerjik hastalık gelişme riskini artırdığını savunmuştur ve bu hipotez daha sonra yapılan çeşitli çalışmalarla da doğrulanmıştır. Yaşamın erken dönemindeki olaylar, çevresel faktörler, özellikle sistemik enfeksiyonlara neden olan patojenlere sınırlı ölçüde maruz kalınması, özellikle genetik yatkınlığı olan çocuklarda allerjik hastalıklara neden olmaktadır. Çünkü, yaşamın erken dönemindeki enfeksiyona maruz kalma gibi olaylar bağışıklık sisteminin gelişmesinde temel rol oynamaktadır (Strachan, 1989; Arshad, 1997; Yıldız Zeyrek ve Zeyrek, 2006; Börçek Kasurka, 2010).

1911 yılındaki keşfinden beri, histaminin allerjik reaksiyonlarda ve hastalıklarda rol oynayan majör mediatör olduğu anlaşılmış olup, antihistaminikler bu hastalıkların tedavisinde halen önemli ajanlar olarak yerlerini korumaktadır (Bachert, 1998; İnal ve Ufuk Altıntaş, 2005).

İlaç; insanlarda hastalıklardan korunma, tanı, tedavi veya bir fonksiyonun düzeltilmesi ya da insan yararına değiştirilmesi için kullanılan genellikle bir veya birden fazla yardımcı madde ile formüle edilmiş etkin madde veya maddeleri içeren bitmiş dozaj ürünüdür (Özata ve ark., 2007; Yılmaz ve ark., 2008). İlaç, doğru kullanıldığında insan sağlığını ve yaşamını tehdit eden olumsuzluklara son verirken, yanlış

kullanıldığında yaşama son verebilen bir madde olması nedeniyle, toplum sağlığında önemli bir yere sahiptir (Canbolat, 2007; Yılmaz ve ark., 2008).

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 belirlenememektedir ve ilaçlar bazen istenmeyen yan etkiler ve sağlık problemleri ortaya çıkarmaktadır. Bazı ilaçlar ise, hücre çekirdeğinde DNA moleküllerinde mutasyona yol açmaktadır ve bu tip mutajenik ilaçların çoğu karsinojenik ve teratojenik potansiyele de sahiptir. Yapılan pek çok çalışma, bazı ilaçların etken maddelerinin bu tip değişimlere yol açtığını açıkça göstermiştir ve her geçen gün liste daha da uzamaktadır (Snyder ve Green, 2001; Saygı, 2003; Vural, 2005; Brambilla ve ark, 2009; Börçek Kasurka, 2010).

Yapılan çeşitli çalışmalar, antihistaminiklerin de diğer birçok ilaç gibi yararlarının yanı sıra zararlı etkilerinin de olabileceğini göstermiştir. Bu etkilerin başında, nörolojik ve kardiyotoksik etkiler olarak göze çarpmaktadır. Farmakolojik etkileri korunarak olumsuz etkileri en aza indirilmiş ve güçlendirilmiş yeni antihistaminik ilaçların da insan üzerinde olumsuz etkileri olabileceği belirtilmiştir. Örneğin, saman nezlesinde kullanılan terfenadin antihistaminiği ciddi kardiyak aritmi ve ölüme neden olması nedeniyle kullanımdan kaldırılmıştır. Bu nedenle başta ilaçlar olmak üzere, yeni geliştirilen ve günlük hayatta yaygın olarak kullanılacak kimyasal maddelerin insanlarda emniyetli kullanımı için toksisite testlerinin önemi büyüktür (Krause, 1992; Özlüoğlu ve ark., 1994; Estelle ve Simons, 1999; Saygı, 2003).

Antihistaminiklerin genotoksik etkileri de uzun zamandır mercek altına alınan bir konudur. Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar bu ilaçların sitotoksik, genotoksik ve karsinojenik etkilerinin olabileceğini sergilemektedir (Snyder ve Green, 2001; Brambilla ve ark, 2009; Börçek Kasurka, 2010; Brambilla ve ark., 2011).

Bu çalışmadaki amacımız, yaygın bir antihistaminik ilaç etken maddesi olarak kullanılan loratadinin (LOR) insan periferik lenfosit kültürlerinde; mikronükleus testi, kromozom anormallikleri testi ve kardeş kromatid değişimi testi yöntemleriyle genotoksik etkisinin, mitotik indeks, nükleus bölünme indeksi ve proliferasyon indeksi değerlerini kullanarak da sitotoksik etkisinin bulunup bulunmadığını ortaya çıkarabilmektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Histamin:

Histamin, histidin adındaki aminoasitin dönüşüme uğramasıyla oluşan ve önemli biyolojik etkiler gösteren maddedir. Etkin olmayan biçimi organizmanın hemen her dokusunda yaygın olarak bulunur. Doku lezyonları sonucunda etkin hale geçen histamin; ağrı, kaşıntı, hava yollarında daralma (bronş spazmı), atardamarlarda genişleme, tansiyon düşmesi, mide salgısının artması gibi sonuçlara yol açar (Kaleli, 2010).

Histamin vücutta birçok farklı dokuda bulunan ve karmaşık fizyolojik ve patolojik etkileri olan biyolojik aktif bir amindir. Henüz biyolojik öneminin bilinmediği 1900' lü yılların başlarında ilk kez ergot eksterelerinde uterus stimulanı olarak dikkat çekmiş ve bu gözlemin ardından 1907' de Windaus ve Vogt tarafından sentez edilmiştir. Bunu izleyen yıllarda çeşitli farmakolojik çalışmalarla histaminin etkilerini araştıran Dale ve Laidlaw, bu yeni kimyasal maddenin düz kası uyardığını ve kuvvetli bir vazodepresör etkisi olduğunu, ayrıca bu etkilerin birçok doku ekstresinin farmakolojik etkilerine benzer olduğunu gözlemlemişlerdir (Dale ve Laidlaw, 1910; Ülker, 1991). Dale ve Laidlaw ilk kez 1910 yılında histaminin anaflakside rol oynadığını göstermişlerdir. Histamin Best ve arkadaşları tarafından taze akciğer ve karaciğer dokularından izole edildikten sonra gerçekte organizmada varolan doğal bir madde olduğu saptanmıştır (Best ve ark., 1927; Ülker, 1991). Sonraları diğer dokularda da varlığının gösterilmesi ile bu biyolojik aktif amine Yunanca' da "doku" anlamına gelen "histos" kelimesinden türetilen "histamin" adı verilmiştir (Ülker, 1991). Daha sonraki yıllarda dokuda antijen antikor reaksiyonu sonucu histamin salındığı gözlemlenmiştir ve günümüzde histaminin erken allerjik yanıtta etkin bir rol oynadığı belirlenmiştir. Ayrıca santral sinir sisteminde bir nörotransmitter olarak rolü de tanımlanmıştır (Ülker, 1991).

Allerjik hastalıkların oluşmasında çok önemli kimyasal bir medyatör olan histamin, histidinin dekarboksilasyonu ile oluşur ve özgül bir histaminaz ile etkisi ortadan kaldırılır. Histamin çoğu hayvan türünde, birçok venomda, böcek sekresyonlarında, bakterilerde ve hatta bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır. Doku ve organların çoğunda mast hücreleri ya da kanda bazofil lokositlerde histamin, heparin ve ATP' ye bağlanmış olarak granüller içinde depo edilir. Hemen hemen tüm memeli dokuları belirli miktarlarda histamin içermektedir. Plazma ve diğer vücut sıvılarında

genellikle düşük konsantrasyonlardadır. Özellikle cilt, bağırsak, mukoza akciğerlerdeki konsantrasyonu kısmen daha yüksektir. Hızlı doku büyümesi ve doku tamiri olan bölgelerde de histamin sentezinin yüksek olduğu görülmektedir (Hill, 1990; Ülker, 1991). Santral sinir sisteminde nöronal histamin şeklinde özellikle hipotalamusta ve beyin-omurilik sıvısında yüksek miktarlarda bulunmaktadır (Kayaalp, 1986; Garrison, 1990; Ülker, 1991; Dökmeci, 1992; Özlüoğlu ve ark., 1994).

Histamin salınması, membranda bağlı bulunan spesifik IgE antikorlarla antijenin bağlanması sonucunda veya bazı fiziksel ajanlar (mekanik tramva, ısı, radyasyon) ve ilaçlar aracılığıyla ya da *in vitro* olarak kalsiyum iyonoforu aracılığıyla olmaktadır. Lenfosit, nötrofil, trombosit, makrofaj ve eozinofil gibi inflamasyonda rol oynayan hücreler, endotelial hücreler ve ayrıca nazal lavaj sıvısı histamin salıverici faktörleri içermektedir (Ülker, 1991). Sayılan tüm bu histamin salıverici maddeler ve faktörler bu etkilerini mast hücresi veya bazofillerde intrasellüler kalsiyum düzeyine artırarak yaparlar. Bazıları iyonofor özelliindedir ve kalsiyumun hücre içine transportuna neden olur, anaflatoksin gibi peptid yapılı maddeler spesifik antijenleri taklit edip kalsiyuma karşı membran permabilitesini artırarak etkilidirler (Burkhalter ve Frick, 1989; Garrison, 1990; Kayaalp, 1990; Ülker, 1991).

Histaminin alerjik astım, rinit (burun yangısı) ve saman nezlesi; öte yandan da ilaç ve böcek sokmaları gibi bir dizi alerjik reaksiyonda salınımı gerçekleşmektedir. Bunun yanı sıra fiziksel etkenler (fiziksel stres, travmalar, iyonlaştırıcı radyasyonlar hipotonik çözelti, pH değişikliği, termik değişim vb...), yılan veya arı zehirleri, tedavide kullanılan mikro ve makromoleküler kimyasal maddelerin yol açtığı salınımlar da söz konusudur (Söğüt, 1992).

Histaminin salıverildikten sonra adı geçen reseptör bölgeleriyle etkileşerek oluşturduğu genel etkileri ile, vücutta sistemik ve lokal anaflaksinin (Tip I Alerjik Reaksiyon) oluşumunda, immün yanıtın oluşturulmasında, doku proliferasyonu ve onarımında, mide asit salgısının düzenlenmesinde, ayrıca santral sinir sisteminde etkileri tam olarak tanımlanamamakla birlikte genelde uyanıklık ve uyku halinin düzenlenmesinde ve termoregülasyonda rol oynamaktadır (Kayaalp, 1990; Ülker, 1991). Histaminin ana görevi hüneral duyarlılıkta aracı rol oynamasıdır. Aynı zamanda beyinde norotransmitter olarak görev yapar. H<sub>1</sub> ve H<sub>2</sub> olarak tanımlanan histamin reseptörleri üzerinden etki gösterir. Histamin kapiller permeabiliteyi artırır, bronş düz kaslarını kasar (Kayaalp, 1986; Dökmeci, 1992; Krause, 1992; Özlüoğlu ve ark., 1994).

## **2.2. Histamin Reseptörleri**

Histamin; serotonin, asetilkolin, epinefrin, norepinefrin ve dopamin gibi benzer yapıdaki moleküller amin hormon sistemi içinde yer alır. Hepsi de ortak olarak, biyolojik aktiviteleri için pozitif yüklü amin grubu içerir. Yapı benzerliklerinin yanı sıra, reseptörleri de birbiriyle yakın ilişkili olan G-protein-bağlantılı-reseptör [G-protein-coupled-receptor (GPCR)] ailesine aittir (Church, 2004; İnal ve Ufuk Altıntaş, 2005).

Bugün bilindiği kadarıyla insanlarda farklı genler tarafından kodlanan H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> ve H<sub>4</sub> olarak dört tip histamin reseptörü vardır (Leurs ve ark., 2001; Church, 2004; İnal ve Ufuk Altıntaş, 2005).

### **2.2.1. Histamin H<sub>1</sub> Reseptörleri**

Histamin H<sub>1</sub> reseptörü üçüncü kromozomun kısa kolunda kodlanır ve allerjik yanıtta histamin etkilerinin çoğundan sorumludur. Allerjik hastalıkların çoğunda klinik semptomların çoğu H<sub>1</sub> reseptör stimülasyonuna bağlıdır. H<sub>1</sub> antihistaminikler burunda akıntı, kaşıntı, hapşırık ve ödeme bağlı tıkanıklığı azaltır. Gözde H<sub>1</sub> reseptör stimülasyonu allerjik konjunktivitinin semptomları olan akıntı, kızarıklık, kaşıntı ve kemozisten sorumludur. Hava yollarında H<sub>1</sub> reseptör stimülasyonu bronş düz kaslarının stimülasyonuna ve mukus üretiminin artmasına katkıda bulunur. Ancak hava yollarındaki bu etkilerden öncelikli olarak lökotrienler sorumlu olup, H<sub>1</sub> antihistaminiklerin astım semptomlarını gidermedeki etkinliği azdır. Deride H<sub>1</sub> histamin reseptörleri, postkapiller ven endotel hücrelerinde kontraksiyon ile endürasyon oluşumuna, duyu sinir stimülasyonu ile de kaşıntıya yol açar (İnal ve Ufuk Altıntaş, 2005).

### **2.2.2. Histamin H<sub>2</sub> Reseptörleri**

Beşinci kromozomun uzun kolunda kodlanır ve cAMP düzeyini arttırarak hücre fonksiyonlarını kontrol eder (Del Valle ve Gantz, 1997; İnal ve Ufuk Altıntaş, 2005). Başlıca H<sub>2</sub> antihistaminikler burimamid, simetidin ve ranitidindir. Özellikle simetidin ve ranitidin gastrointestinal sistemin peptik asit hastalıklarında, diğer bazı H<sub>2</sub> antihistaminikler de şizofreni gibi nöropsikiyatrik ve nörolojik bazı hastalıkların tedavisinde kullanılır (İnal ve Ufuk Altıntaş, 2005).

### 2.2.3. Histamin H<sub>3</sub> Reseptörleri

Yirminci kromozomun kısa kolunda kodlanır. Sadece beyinde bulunur ve primer olarak sinirlerde histamin için presinaptik reseptör olarak çalışır (Oda ve ark., 2000; İnal ve Ufuk Altıntaş, 2005). Histaminerjik sinirlerden histamin sentez ve salınımını kontrol eden bir otoreseptör işlevi vardır (Schwartz ve ark., 1991; İnal ve Ufuk Altıntaş, 2005). Bunun yanı sıra, noradrenalin, dopamin, serotonin ve asetilkolin gibi diğer amin nörotransmitterlerin sentez ve salınımında rol oynayan bir heteroreseptör olduğu da düşünülmektedir (Schlicker ve ark., 1994; İnal ve Ufuk Altıntaş, 2005).

### 2.2.4. Histamin H<sub>4</sub> Reseptörleri

Uzun yıllar boyunca H<sub>3</sub> reseptörlerinin heterojen bir grup reseptör olduğu düşünülmüş, ancak yapılan genetik çalışmalar sonucunda H<sub>4</sub> reseptör geni 18. kromozomun uzun kolu üzerinde bulunmuştur (Oda ve ark., 2000; İnal ve Ufuk Altıntaş, 2005). H<sub>4</sub> reseptörü yapısal olarak H<sub>3</sub> reseptöre çok benzer (Nguyen ve ark., 2001; İnal ve Ufuk Altıntaş, 2005). Yapılan çalışmalarda, histamin H<sub>4</sub> reseptörünün sadece yapısal olarak değil, agonist ve antagonist bağlanmasında fonksiyonel olarak da H<sub>3</sub> reseptöre benzediği gösterilmiştir. Ancak her iki reseptör grubu arasında bu bağlanmanın afinitesi ve bağlanma gücü açısından farklılıklar vardır (Oda ve ark., 2000; Liu ve ark., 2001; İnal ve Ufuk Altıntaş, 2005).

## 2.3. Antihistaminik İlaçlar

İlk olarak 1937'de Avrupa'da kullanılmaya başlanan ve 1945'den sonra yaygın bir şekilde tıpta ve veterinerlikte özellikle alerjik hastalıklar başta olmak üzere anafilaksi ve ürtiker gibi hastalıklarda ve bazı durumlarda sedatif ve antiemetik olarak kullanılmaktadır. Antihistaminikler, histamin reseptör antagonistleri olan, yani reseptöre histamin yerine bağlanan ve böylece histamine bağlı etkilerin oluşmasını önleyen ilaçlardır. Antibiyotiklerden sonra dermatolojide en yaygın kullanılan sistemik ilaçlardır. Antihistaminikler H<sub>1</sub> reseptörlerine rekabet ederek bağlanmakta ve histamin "agonist" etkisini engellemektedir. H<sub>1</sub> reseptörlerine bağlanarak da damar geçirgenliğinin artmasına ve ödeme engel olmaktadır. Antihistaminiklerin antialerjik ve antiinflamatuvar etkileri ise H<sub>1</sub> reseptör blokajından bağımsız olarak ve H<sub>1</sub> reseptör blokajı için gereken dozdan daha yüksek dozlarda gerçekleşmektedir (Braun-Falco ve ark., 2000; Simons, 2003; Kiremitçi, 2004; Börçek Kasurka, 2010).

Antihistaminikler oral yoldan uygulandıklarında genelde iyi absorbe edilirler. Eliminasyonları iki yolla gerçekleşmektedir:

1. Karaciğer vegastrointestinal kanaldaki sitokrom P 450 sisteminde metabolize olarak (örneğin; astemizol, azelastin, klorfeniramin, ebastin, hidrosizin, loratadin ve mizolastin).
2. Metabolize olmadan idrar veya dışkı ile değişmeden atılarak (örneğin, cetirizin ve feksofenadin).

Antihistaminiklerin ana moleküllerinin terminal yarılanma ömrü 7 ile 24 saat arasında değişmektedir. Metabolitlerinin yarılanma ömrü ise en fazla 9 saat olmak üzere daha kısadır. Antihistaminikler oral yolla tek doz alındıktan sonra 1-2 saat içerisinde yeterli H<sub>1</sub> reseptör blokajı sağlamaktadır (Simons, 1999; Kiremitçi, 2004).

### **2.3.1. Antihistaminik İlaç Grupları**

Antihistaminikler kimyasal yapılarına göre beş gruba ayrılmaktadır (Özlüoğlu ve ark., 1994; Simons, 2003; Kiremitçi, 2004; Börçek Kasurka, 2010):

**2.3.1.1. Etanolaminler:** Oldukça potent H<sub>1</sub> reseptör antagonisti olmalarının yanında güçlü antikolinergik ve sedasyon yapıcı etkileri vardır. Diphenhidramin, klemastin, bromazin, klorfenoksamin, dimenhidrinat ve doksilamin bu gruba dahil olan antihistaminiklere örnektir.

**2.3.1.2. Etilendiaminler:** En eski H<sub>1</sub> reseptör blokerleridir. Antihistaminik etkileri güçlüdür, sedatif etkileri belirgindir ve gastrointestinal yan etki oluştururlar. Tripelenamin, prilamin, methapirilen ve antazolin bu gruba dahil olan antihistaminiklere örnektir.

**2.3.1.3. Alkilaminler:** Sedasyon yapıcı etkileri zayıftır. Bu nedenle en sık kullanılan antihistaminik grubudur. Bromfeniramin, dimetibden, feniramin, triprolidin, klorfeniramin, tripalidin ve akrivastin bu gruba dahil olan antihistaminiklere örnektir.

**2.3.1.4. Piperidinler:** Genellikle ekzema tedavisinde etkilidirler. Siproheptadin, mizolastin, loratadin, terfenadin, feksofenadin, ebastin ve astemizol bu gruba dahil olan antihistaminiklere örnektir.



**2.3.1.5. Fenotiazinler:** Güçlü antihistaminik olmalarının yanında oldukça sedatiftirler. Antikolinergik etkileri de vardır. Antiemetik olarak bulantı ve kusmalarda kullanılırlar. Prometazin, trimeprazin ve methdilazin bu gruba dahil olan antihistaminiklere örnektir.

**2.3.1.6. Piperazinler:** Sedasyon yapan etkileri zayıftır. Kronik ürtiker tedavisinde ve hareket hastalığında taşıt tutmasını önlemek için kullanılmaktadırlar. Hidroksizin, trankilizan, bukizin, meklizin, setirizin, siklizin ve oksatomid bu gruba dahil olan antihistaminiklere örnektir.

### **2.3.2. Eski ve Yeni Kuşak Antihistaminikler**

Antistaminikler üretim-gelişim süreçlerine göre de birinci, ikinci, üçüncü kuşak olmak üzere üç gruba ayrılmaktadırlar (Handley ve ark., 1998; Kiremitçi, 2004).

#### **2.3.2.1. Birinci Kuşak (Klasik-Eski) Antihistaminikler**

Santral H<sub>1</sub> reseptörlerine afiniteleri yüksektir. Etkileri hızlı başlar ve etki süreleri kısadır. Çoğunlukla karaciğerde metabolize edilirler. Renal veya gastrointestinal yolla atılırlar (Özlüoğlu ve ark., 1994). Lipofilik yapıdaki birinci kuşak antihistaminikler yeni kuşak antihistaminiklerin aksine, kan-beyin bariyerini kolayca geçer ve belirgin derecede sedatif ve antikolinergik yan etki oluştururlar (Greaves, 2001; Kiremitçi, 2004). Diğer ilaçlarla etkileşimleri özellikle önemlidir. Santral sinir sistemini deprese eden bazı maddelerin etkilerini artırır (Kayaalp, 1986; Özlüoğlu ve ark., 1994).

#### **2.3.2.2. İkinci Kuşak (Nonklasik-Yeni) Antihistaminikler**

Yan etkileri, ilaç etkileşimleri ve antikolinergik etkilerini azaltarak farmakolojik etkilerini korumak ve güçlendirmek amacıyla yeni grup antihistaminikler geliştirmiştir. Yeni kuşak H<sub>1</sub> antagonistleri H<sub>1</sub> reseptörleriyle kompetisyonun yanında, mediyatörlerin intrasellüler yapımını azaltmakla hücre degranülasyonunu önleyerek de etki göstermektedir (Krause, 1992; Özlüoğlu ve ark., 1994). Bu ajanlar büyük ölçüde lipofobik olduğu için kan beyin bariyerinden minimal düzeyde geçerler ve az sedasyon yaparlar. İyi absorbe edilirler ve genellikle karaciğerde metabolize edilirler. Renal ve gastrointestinal yolla atılırlar. Antihistaminik aktiviteleri klasik antihistaminiklerle eş değerdedir. Antikolinergik etkisi yok ya da çok az olduğu için glokom ve prostat

hipertrofisinde güvenle kullanılabilirler. İnteraksiyona girdikleri ilaç sayısı daha azdır. Yarılanma süreleri değişmekle birlikte genellikle uzun etkilidirler (Kaliner, 1992; Özlüoğlu ve ark., 1994). Bu grubun üyesi olan terfenadin ve astemizol antihistaminiklerinin özellikle kardiyotoksik etkilerinden dolayı FDA (Food and Drug Administration) (2006) onayları iptal edilmiş ve kullanımdan kaldırılmıştır (Kiremitçi, 2004).

### 2.3.2.3. Üçüncü (Natürel Metabolitler) Kuşak Antihistaminikler

H<sub>1</sub> antogonistlerinin doğal metabolitleridir ve lipofobik yapıdadırlar. İkinci kuşak ilaçların enantiyomerleri ya da aktif metabolitlerinden oluşurlar. Bunların kullanıma girmesiyle, ana molekülle aynı etkinliği gösteren, fakat ana molekülden ve diğer metabolitlerinden yan etki bakımından daha güvenli bir H<sub>1</sub> antogonist etki sağlanmış olmaktadır. Üçüncü kuşak antihistaminikler, ikinci kuşak antihistaminikler gibi kan-beyin bariyerini geçemezler ve sedatif etki göstermezler (Greaves, 2001; Bernstein, 2002; Kiremitçi, 2004).

**Çizelge 2.1.** Eski ve yeni nesil bazı antihistaminik ilaçlar

<b>Birinci Kuşak Antihistaminikler</b>	Antazolin	Hidroksizin	Pyrilamin
	Azetadin	Karbinoksamin	Siklizin
	Dimetinden	Klemastin	Siproheptadin
	Diphenhidramin	Methdilazin	Trimeprazin
	Doksilamin	Methapirilen	Triprolidin
	Feniramin	Promethazin	
<b>İkinci Kuşak Antihistaminikler</b>	Akrivastin	Loratadin	
	Astemizol	Levocabastine	
	Azelastin	Mizolastin	
	Ebastin	Setirizin	
	Ketotifen	Terferadin	
<b>Üçüncü Kuşak Antihistaminikler</b>	Desloratatin	Levosetirizin	
	Fexofenadin	Norastemizol	

#### **2.4. Loratadin (LOR) (Etil-4-(8-kloro-5,6-dihidro-11H-benzo[5,6]siklohepta [1,2b] piridin-11-ylidene)-1-piperidinkarboksilat)**

İkinci kuşak bir antihistaminik olan LOR, 1973 yılında Schering Plough ilaç firması tarafından birinci kuşak antihistaminik olan N-metilazetedin'in etilkloroformat ile tepkimesinden elde edilmiştir. Bu bileşiğin sistemik etkilerinin hızlı olduğu ve etkili doza ulaşma süresinin 6 ile 8 saat arasında değiştiği gösterilmiştir. Bu bileşiğin 8 konumuna klor bağlanması ile oluşan LOR'in ise daha uzun süreli etkili olduğu bulunmuştur (Li ve ark., 2004; Kaleli, 2010).

LOR bir piperidin türevi antihistaminiktir ve alerjik deri bozukluğu, özellikle atopik dermatit, ürtiker, alerjik rinit, akut nezlesi, göz alerjisinin tedavisinde kullanılan, merkez sinir sistemi etkilerinden yoksun olan, uzun etkili selektif periferik bir H<sub>1</sub> antagonistidir (Kay ve Harris, 1999; Kathiresan ve ark., 2010).

##### **2.4.1. Loratadinin Farmakodinamik Özellikleri**

LOR selektif olarak periferik histamin H<sub>1</sub>-reseptörlerinde antagonist etki gösteren güçlü ve uzun etkili bir antihistaminiktir. 10 mg'lık dozu alındığında birkaç saat içinde önemli ölçüde histamin kaynaklı kabarıklıkları önler ve bu baskılama 12-24 saat sürer (Roman ve ark., 1986; Kassem ve ark., 1988; Kontou-Fili ve ak., 1989; Fadel ve ark., 1990; Simons ve ark., 1990; Grant ve ark., 1999; Simons, 2002).

Radyoligand kullanılarak yapılan araştırmalarda LOR'in merkezi sinir sistemi yerine periferdeki histamin H<sub>1</sub>-reseptörlerini seçerek bağlandığı gösterilmiştir (Bousquet ve ark., 1990; Simons, 2002). Büyük ölçüde lipofobik olduğu için kan beyin bariyerinden minimal düzeyde geçerler ve az sedasyon yaparlar (Kaliner, 1992; Özlüoğlu ve ark., 1994).

##### **2.4.2. Loratadinin Farmakokinetik Özellikleri**

LOR oral kullanımdan sonra iyi emilir ve etkisi genellikle 15 dakika sonra başlar. Günde 10 mg LOR mast hücre mediyatör salınımını oldukça etkili şekilde inhibe eder ve genellikle sedasyon yapmaz veya çok az düzeyde sedasyon yapar. 10 mg'lık tek doz kullanımdan sonra, iki saatte 3.4 ng/ml maksimum konsantrasyona ulaşır ve 2-8 saatte elemine edilir. Karaciğerde sitokrom P-450 CYP3A4 tarafından metabolize edilir ve böbreklerden atılır (Horak ve ark., 1992; Özlüoğlu ve ark., 1994; Pineyro-Lopez ve ark., 2006). İnsan karaciğer mikrosomları ile yapılan araştırmalarda LOR'in P450

sisteminin izozimleri olan CYP2D6 ve CYP3A4 tarafından metabolize olduğunu göstermiştir LOR metabolize edildikten sonra 12 aktif metabolit oluşur. Metabolize LOR'in %70'ini desloratadin oluşturur. Verilen bir LOR dozunun % 80'i metabolitlere dönüşerek 10 gün içinde eşit oranda idrar ve feçes ile atılır (Du Buske, 2002; <http://www.ilacbilgi.com/ac/AlarinTb.htm>, 04.06.2012). Ağır karaciğer yetmezliği olan hastalarda daha düşük başlangıç dozları kullanılmalıdır. Başlangıç dozu olarak günde 5 mg veya gün aşırı 10 mg kullanılması önerilir. LOR'in 2 yaşından küçük çocuklarda etkisi ve kullanım güvenliğine dair yeterli bilgi olmadığından, 2 yaşın altındaki çocuklarda kullanımı önerilmez. Gebe kadınlarda güvenilirliği ve etkinliği henüz gösterilmemiş olduğundan, beklenen yararlar olası zarar dikkatle değerlendirilmeden kullanılmamalıdır. İlaç anne sütüne geçtiğinden laktasyon süresinde kullanılmamalıdır (<http://www.1ilac.com/ilaclar/Biofarma/Alarin.Tablet.htm>, 04.06.2012).

### **2.5. Genetik Toksikoloji**

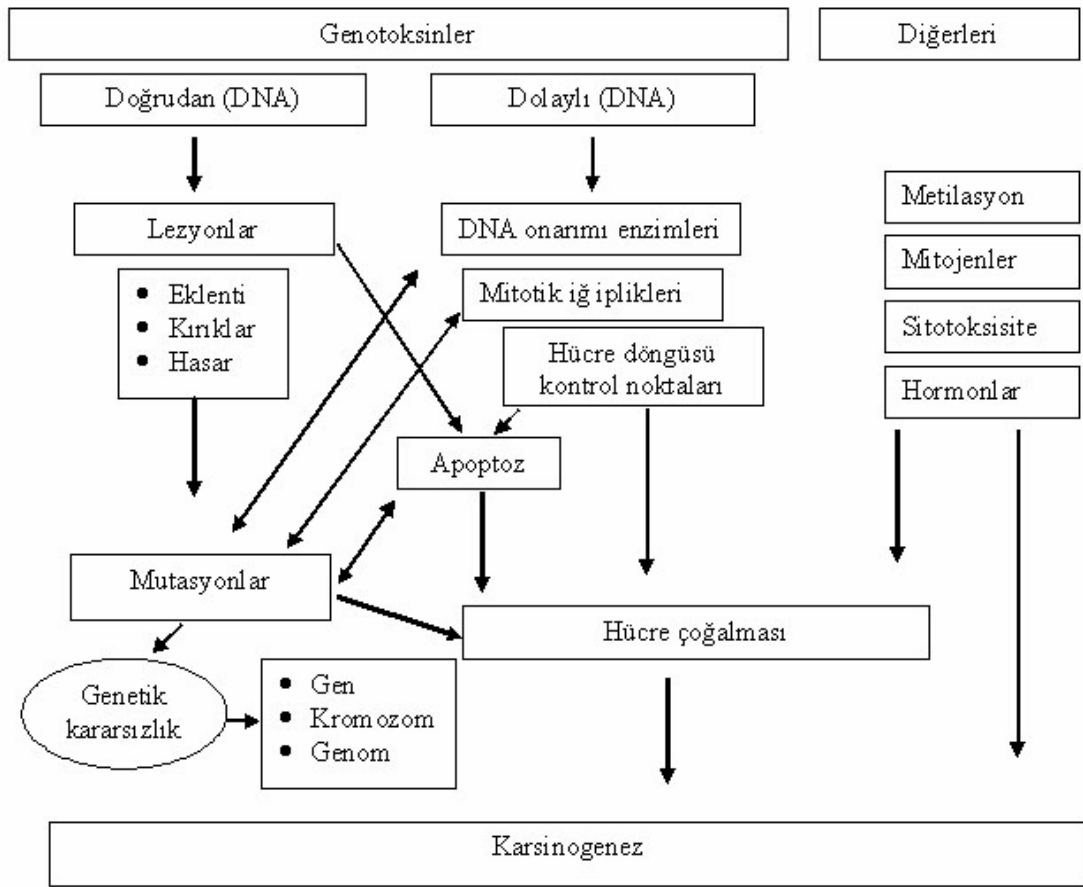
Genetik toksisite; genotoksinlerin kromozom ve DNA yapısında meydana getirdiği hasarları kapsayan bir terimdir. Bu hasarlar genellikle gen mutasyonları, kromozom anormallikleri, DNA zincir kırıkları, çekirdek, kromozom ve DNA yapısında meydana gelen DNA eklentileri, klastojenite ve anöploididir. Bu tip genetik hasarlar; doğum defektleri, kanser, yaşlanma, infertilite ve bazı genetik ve multifaktoryal hastalıklara yol açabildiği için, mutajen ve karsinojenlerin tanımlanması ve risklerinin en düşük seviyeye indirilebilmesi halk sağlığının korunması için önemlidir (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; Young, 2002; Mortelmans ve Rupa, 2004; Zeiger, 2004; Üstün, 2007; Börçek Kasurka, 2010).

Toksikolojinin özelleşmiş 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

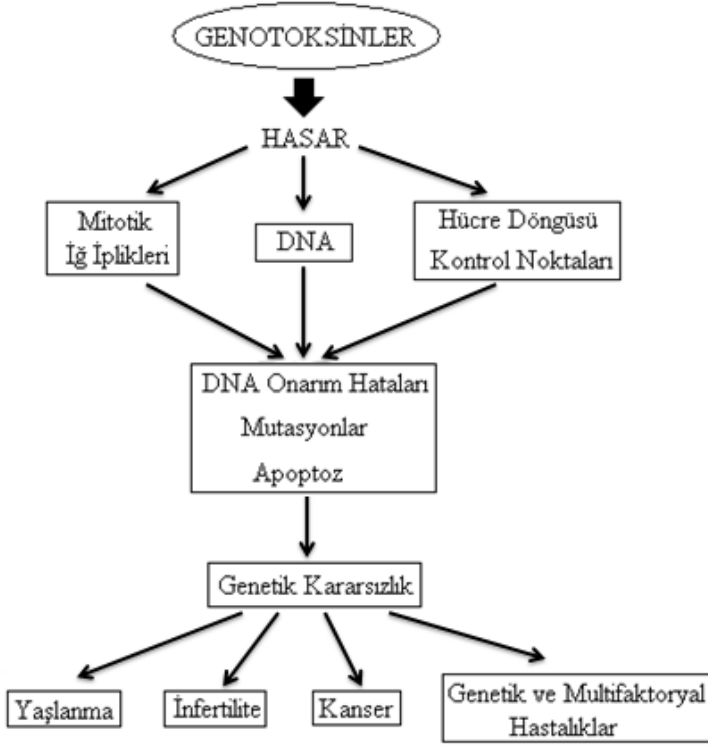
bir yere sahiptir (Choy, 2001; Young, 2002; Mortelmans ve Rupa, 2004; Vural, 2005; Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

Mutajenlerin genotoksik etkisi, hücrel 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 2.1) (Nias, 1998; Kirsch-Volders ve ark., 2003; Yırtıcı, 2007).



**Şekil 2.1.** Genotoksinlerin DNA üzerindeki doğrudan ve dolaylı etki mekanizması (Mateuca ve ark., 2006; Yırtıcı, 2007)

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 2.2) (Kirsch-Volders ve ark., 2003; Mateuca ve ark., 2006; Yırtıcı, 2007; Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).



**Şekil 2.2.** Genotoksinlerin DNA üzerindeki etki mekanizması ve sonuçları (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011)

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).

Son yıllarda, karsinojenik olan birçok maddenin mutajenik; benzeri şekilde mutajenik olan birçok maddelerin de karsinojenik olduğu gösterilmiştir. Kimyasal maddelerin mutajenik etkileri ile karsinojenik potansiyelleri arasında kuvvetli bir ilişkinin olması, genotoksisite testlerinin kimyasal maddelerin karsinojenik risklerinin araştırılmasında tarama testleri olarak kullanılması sonucunu doğurmuştur. Genetik toksisite testlerinden alınan pozitif sonuçlar test edilen ajanın karsinojenik potansiyelinin olduğunu göstermektedir. Bu testlerle elde edilen sonuçlara göre, bilinen

karsinojenlerin yaklaşık %90 kadarının aynı zamanda mutajenik olduğu ve tüm mutajenlerin potansiyel karsinojen olabileceği bildirilmiştir. Özellikle rodentlerde *in vivo* mutasyona neden olabilen bileşiklerin insanda da potansiyel karsinojen olarak nitelendirilebileceği ileri sürülmüştür (Purchase ve ark., 1978; Mavournin ve ark., 1990; Choy, 2001; Zeiger, 2004; Vural, 2005).

## 2.6. Genetik Toksisite Testleri

Genotoksisite 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* genotoksisite testi geliştirilmiştir. Genetik toksisite testleri, çeşitli mekanizmalarla direkt veya indirekt olarak genetik materyalde hasara neden olan bileşikleri 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; Börçek Kasurka, 2010).

Genetik toksisite testleri, Salmonella / mikrozoom (Ames) Testi ve Memeli Hücre Kültürü Testleri olarak iki gruba ayrılır.

### 2.6.1. 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 düşünölen deri, karaciğer gibi spesifik doku hücreleri üzerinde araştırma yapılmasını sağlar,
- c. Toksikite 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) testi, Fare lenfoma testi ve Comet testidir (Börçek Kasurka, 2010). Biz çalışmamızda KA, MN ve KKD testlerini kullandığımız için sadece bu testler hakkında bilgiler verilmiştir.



### **2.6.1.1. *In vitro* Kromozom Anormallikleri (KA) Testi**

*In vitro* kromozom anormallığı (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). *In vitro* KA testinde, kültürü yapılan hücrelerin belirlenmiş olan protokollere uygun olarak metafaz kromozom preparatları hazırlanır ve yapısal ve sayısal kromozom anormallikleri yönünden incelenir (EPA, 1998; Choy, 2001; Börçek Kasurka, 2010; Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

KA analizi için 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 popülasyon olmaları şeklinde sıralanabilir.

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

### **2.6.1.2. *In vitro* Mikronukleus (MN) Testi**

Mikronukleus (MN)'lar hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkarlar ve esas çekirdeğe dâhil olmazlar. MN' ler tam kromozom veya asentrik kromozom parçalarından köken alan oluşumlardır. MN sayısındaki artış, somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın göstergesidir. MN testi, fiziksel ve kimyasal ajanların hücrelerde

oluşturduğu genotoksik etkinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir testtir. Bu test mitoz bölünme ile oluşan hemen hemen tüm hücre tipleri üzerinde *in vitro* ve *in vivo* olarak uygulanabilmekte ve kromozom anormallikleri testine göre daha kolay ve hızlı sonuç vermektedir. Kültürde bir kez bölünmesini tamamlamış binükleat hücrelerde MN frekansını saptayan ve sitokalsin-B ile sitokinezin bloklanmasına dayanan metodun gelişmesi ile MN testinin güvenilirliği ve geçerliliği artmıştır. MN testi aynı zamanda, *in vitro* çalışmalarda nükleus bölünme indeksi, *in vivo* çalışmalarda ise polikromatik eritrositler ile normokromatik eritrositler arasındaki oran kullanılarak sitotoksitenin tahmin edilmesini de sağlamaktadır. İnsan ve diğer türler çevrelerinde bulunan çok sayıda farklı kimyasal ve fiziksel etkenlere maruz kalmaktadır. Bu nedenle kimyasal ve fiziksel faktörlerin potansiyel riskleri ve olumsuz etkilerini değerlendiren genotoksisite çalışmaları giderek daha çok önem kazanmaktadır. MN testi; fiziksel etkenlerin, ilaçların, çevresel kirleticiler ve gıda katkı maddeleri gibi günlük yaşamda sıklıkla maruz kaldığımız her türlü kimyasal maddenin genotoksik ve karsinojenik potansiyellerinin ve güvenilirliklerinin araştırılmasını, kanser riskinin tahmin edilmesini ve kanserin izlenmesini sağlayan oldukça kullanışlı bir biyoizlem testidir. Basitliği, güvenilirliği, geçerliliği ve farklı hücre tiplerine uygulanabilirliği gibi avantajlara sahip olması nedeniyle yıllardır kullanılmakta olan MN testinin, gelecekte de mutajenitenin belirlenmesi ve önlenmesinde önemli bir rolü olacaktır (Şekeroğlu ve Atlı-Şekeroğlu, 2011).

### **2.6.1.3. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Testi**

Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) testi, kromozom morfolojisi değişmeksizin, kardeş kromatidler arasında, özdeş segmentlerin simetrik genetik materyal alışverişi sonucu oluşan değişimlere neden olan mutajen bileşikler saptamak için kullanılan bir testtir. KKD testi uygulanırken kardeş kromatidlerdeki değişimi saptamak için bromodeoksiüridin (BrdU) kullanılır. KKD sayısı, bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla belirlenir. Bu test çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların genotoksik etkilerini araştırmakta kullanılmakla birlikte, kromozom instabilitesi ile seyreden Bloom Sendromu, Fankoni Aplastik Anemisi, Duchenne ve Becker tipi kas distrofileri gibi bazı hastalıklarda da araştırma ve tanı amaçlı olarak da kullanılmaktadır (Kontaş ve ark., 2011).

KKD testi, homolog kromozomlarının gen lokusları arasındaki DNA replikasyon ürünlerinin değişimini test etmektedir ve mikroskopik olarak tanımlanabilir kromozomal hasarları gösterebilmektedir (Wolff, 1977; Latt ve ark., 1980; Bayel, 2006; Kontaş ve ark., 2011). Özellikle DNA eklentileri oluşturan veya DNA replikasyonu ile etkileşime giren mutajen bileşiklerin saptanmasını sağlayan 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 kullanılmaktadır (Taylor ve ark., 1957; Latt ve ark., 1980; Latt ve Schreck, 1980; Wolff, 1977; Sonoda ve ark., 1999; Üstün, 2007; Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011; Kontaş ve ark., 2011).

Çeşitli ajanların genetik materyalde oluşturduğu mikroskopik olarak tanımlanabilen yapısal düzensizliklerinin göstergesi olarak değerlendirilen ve nokta mutasyonların indüksiyonu, gen amplifikasyonu ve sitotoksosite ile ilişkili olan KKD testi, organizmayı etkileyen ajanların sitogenetik etkilerini belirlemek, kanser ve bazı genetik hastalıkların tanı ve takibi için yapılabilecek tarama çalışmalarında güvenle kullanılabilir bir genotoksosite testidir (Kontaş ve ark., 2011).

### 2.7. Antihistaminiklerle Yapılan Genotoksosite Çalışmaları

Brambilla ve ark. (2011) satışı yapılan bazı antihistaminik ilaçlarla ilgili derleme çalışmasında; genotoksosite ve/veya karsinojenite testleri ile incelenen 29 ilaçtan 22 tanesinin uygulanan genotoksosite ve/veya karsinojenite testlerinden en az birinde pozitif sonuç verdiğini belirtmiştir. Bu ilaçlardan 12 tanesi en az bir genotoksosite testinde, 6 tanesi en az bir karsinojenite testinde pozitif sonuç verirken, 4 ilacın ise hem genotoksosite hem de karsinojenite testlerinde en az bir pozitif sonuca sahip olduğu tespit edilmiştir.

**Akrivastinin** Ames testi, fare lenfoma gen mutasyon testi ve *in vivo* rat kemik iliği kromozom anormallikleri testinde negatif sonuç verdiği, fakat insan periferik lenfositlerinde *in vitro* kromozom anormalliklerini artırdığı belirtilmiştir. Ayrıca fare ve ratlarla yapılan uzun dönem karsinojenite testleri sonuçlarına göre karsinojenik etkiye sahip olmadığı vurgulanmıştır (Physicians' Desk Reference, 2005).

**Astemizol** Ames testi, dominant ve resesif letal mutasyon testlerinde negatif sonuçlar verirken, insan periferik lenfositlerinde *in vitro* KKD testi ve ratlarda *in vivo*

MN testinde şüpheli sonuçlar vermiştir. Fare ve ratlarla yapılan uzun dönem karsinojenite testleri sonuçlarına göre de bu ilacın karsinojenik olmadığı belirtilmiştir (Mavournin ve ark., 1990; Tucker ve ark., 1993; Benze ve ark., 1995; NCI/NTP Carcinogenesis Technical Report Series, 1999; <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>; <http://www.fda.gov.cder>).

**Azelastinin** Ames testi, ratlarda programlanmamış DNA sentezi (UDS=Unscheduled DNA Synthesis) testi, fare lenfoma testi, farelerde *in vivo* MN testi ve ratlarda *in vivo* KA testi ile yapılan çalışmalar sonucu genotoksik özellikte olmadığı rapor edilmiştir (<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=11204>, 16.02.2010). Fakat maya Green Screen metoduyla yapılan bir çalışmada genotoksik ve güçlü bir sitotoksik ajan olarak bildirilmiştir (Gompel ve ark., 2005). Ayrıca fare ve ratlarla yapılan uzun dönem karsinojenite çalışmaları sonucu karsinojenik etki göstermediği vurgulanmıştır (<http://www.fda.gov.cder>).

**Desloratadinin** genotoksitesitesi ile ilgili yapılan Ames testi, insan periferik lenfositlerinde *in vitro* KA testi ve farelerde *in vivo* MN testlerinde negatif sonuç verdiği görülmesine rağmen, rat ve farelerde yapılan uzun dönem karsinojenite çalışmalarının bazılarında negatif bazılarında ise pozitif sonuç verdiği vurgulanmıştır (Physicians' Desk Reference, 2005; <http://www.fda.gov.cder>).

**Difenhidraminin** genotoksitesitesi ile ilgili yapılan Ames testi, ratlarda UDS testi, fare lenfoma testi ve Çin hamster hücrelerinde *in vitro* KKD testi sonuçları negatif olmasına rağmen, ratlarda *in vitro* alkali elüsyon DNA zincir kırıkları testi, Çin hamster V79 hücrelerinde *in vitro* MN testi ve Çin hamster hücreleri ile insan hücreleri kullanılarak yapılan bazı *in vitro* KA testlerinde pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Karsinojenite çalışmalarının sonuçları farelerde negatif sonuç verirken, ratlarda hem negatif hem de şüpheli sonuçlar elde edilmiştir (Probst ve Neal, 1980; Andrews ve ark., 1984; Lijinsky, (1984a); Martelli ve ark., 1984; Zeiger ve ark., 1987; Loveday ve ark., 1989; National Toxicology Program, 1989; Snyder, 1998; Snyder ve ark., 2006; <http://www.potency.berkeley.edu>; <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>).

**Dimenhidrinat** ile yapılan Ames testinin sonuçlarına göre hem negatif hem de pozitif sonuçlar bildirilmiştir. Ratlarda UDS testi ve *in vitro* alkali elüsyon DNA zincir kırıkları testinde ise negatif sonuçların olduğu vurgulanmıştır (Martelli ve ark., 1984; Zeiger ve ark., 1987; <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>).

**Doksilaminin** Ames testi, Çin hamster V79 hücrelerinde *in vitro* MN testi, insan periferik lenfositlerinde *in vitro* KKD testi, fetal fare hücrelerinde KKD ve MN testi ile Çin hamster kemik iliğinde *in vivo* MN testi üzerine yapılan genotoksisite çalışmalarında negatif sonuçlar elde edildiği vurgulanırken, ratlarla yapılan UDS testinde pozitif sonucun olduğu belirtilmiştir. Rat ve farelerde yapılan karsinojenite çalışmalarında ise negatif ve pozitif sonuçlar elde edilmiştir (Budroe ve ark., 1984; Müller ve ark., 1989; Jackson ve Sheldon, 1993; Jackson ve Blackwell, 1993; Snyder, 1998; <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>; <http://www.potency.berkeley.edu>).

**Ebastinin** Ames testi, Çin hamster hücrelerinde gen mutasyonları testi, insan periferik lenfositlerinde *in vitro* KA testi, farelerde *in vivo* MN testi ve fare ile ratlar kullanılarak yapılan karsinojenite çalışmalarında negatif sonuçlar verdiği vurgulanmıştır (Snyder, 1998). **Epinastin** Ames testi, Çin hamster hücrelerinde gen mutasyonları testi, Suriye hamster embriyo hücrelerinde hücre transformasyonu çalışmaları, ratlarda UDS testi, farelerde *in vivo* MN testi ve Çin hamster hücrelerinde *in vivo* KA testlerinde negatif sonuçlar vermiştir. Ayrıca fare ve ratlarla yapılan uzun dönem karsinojenite çalışmaları sonucu karsinojenik etki göstermediği vurgulanmıştır. Çin hamster V79 hücrelerinde genotoksisite ile ilgili yapılan *in vitro* KA testinde ise pozitif sonuçların olduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda insan periferik lenfositleri ile yapılan *in vitro* KA testlerinin bazıları pozitif bazıların ise negatif sonuç verdiği belirtilmiştir (Physicians' Desk Reference, 2005; <http://www.fda.gov.cder>).

**Feksofenadinin** Ames testi, Çin hamster hücrelerinde gen mutasyonları testi, insan periferik lenfositlerinde *in vitro* KA ve MN testi, rat lenfositlerinde *in vitro* KA testi ve farelerde *in vivo* MN testi sonuçlarının negatif olduğu vurgulanmıştır (Physicians' Desk Reference, 2005; Börçek Kasurka ve ark., 2011). Rat ve farelerde yapılan uzun dönem karsinojenite çalışmalarında da aynı şekilde negatif sonuçlar elde edilmiştir (Physicians' Desk Reference, 2005).

**Feniltoloksaminin** Çin hamster V79 hücrelerinde *in vitro* MN testinde ise pozitif sonuçlar elde edilmiştir (Snyder, 1998).

**Feniramin** ile yapılan Ames testinde de negatif sonucun elde edildiği vurgulanmıştır (Mortelmans ve ark., 1986; <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>).

**Klemastinin** Çin hamster V79 hücrelerinde *in vitro* MN ve farelerde *in vivo* MN testleri sonucu genotoksik olmadığı vurgulanırken, uzun dönem karsinojenite

çalışmaları sonucu fare ve ratlarda karsinojenik etki göstermediği da belirtilmiştir Snyder, 1998; <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>).

**Klorfeniraminin** genotoksitesitesi ile ilgili Ames testi, ratlarda UDS testi, fare lenfoma testi ve Çin hamster V79 hücrelerinde *in vitro* KA testlerinde negatif sonuçlar bulunurken, Çin hamster V79 hücrelerinde *in vitro* MN ve KKD testi ile ratlarda *in vitro* alkali elüsyon DNA zincir kırıkları testinde pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan bazı uzun dönem karsinojenite çalışmaları sonucu ise, bu ilacın ratlarda ve farelerde karsinojenik olmadığı sonuçlarına ek olarak farelerle yapılan bazı çalışmalarda şüpheli sonuçlar da elde edilmiştir (Probst ve Neal, 1980; Lijinsky, 1984a; National Toxicology Program, 1986; Anderson ve ark., 1990; McGregor ve ark., 1991; Storer ve ark., 1996; Snyder, 1998; <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>).

**Klorsiklizinin** Ames testi, ratlarda UDS testi, fare lenfoma testi ve Çin hamster V79 hücrelerinde *in vitro* MN testlerinde negatif sonuç verdiği bildirilmiştir (Probst ve Neal, 1980; Snyder, 1998).

**LOR** ile yapılan Ames testi, ratlarda UDS testi, insan periferik lenfositlerinde *in vitro* KA testi ve farelerde *in vivo* MN testlerinde negatif sonuçların elde edildiği vurgulanmıştır. Çin hamster hücrelerinde yapılan gen mutasyonu testinde negatif sonuca ulaşılırken, ilacın fare lenfoma testinde kullanılmasıyla pozitif sonuç verdiği belirtilmiştir. Rat ve farelerde yapılan uzun dönem karsinojenite çalışmalarının bazılarında negatif bazılarında ise pozitif sonuçlara ulaşılmıştır (<http://www.toxnet.nlm.nih.gov>).

**Mepiraminin** Ames testi ve fare lenfoma testinde negatif sonuçlar elde edilmiştir. Ratlarla yapılan UDS testinde pozitif sonuçlara ulaşılırken, Çin hamster V79 hücrelerinde genotoksitesite ile ilgili yapılan *in vitro* MN testinde ise şüpheli sonuçlara ulaşıldığı vurgulanmıştır. Farelerdeki karsinojenite çalışmalarında negatif sonuçlar elde edilmesine rağmen, ratlarda yapılan bu çalışmaların bazılarının negatif sonuç verdiği bazılarının ise pozitif sonuçlar verdiği belirtilmiştir (Probst and Neal, 1980; Andrews ve ark., 1984; Budroe ve ark., 1984; Lijinsky, 1984b; Oberly ve ark., 1984; Greenman ve ark., 1995a; Greenman ve ark., 1995b; Habs ve ark., 1986; Hansen ve ark., 1987; Turner ve ark., 1987; Zeiger ve ark., 1987; Snyder, 1998; <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>).

**Metapirilen** ile yapılan Ames testinde bazı sonuçların pozitif bazılarının ise negatif olduğu vurgulanmıştır. Aynı şekilde ratlar kullanılarak yapılan *in vivo* UDS

testinde de bazı sonuçlar negatifken bazılarının pozitif sonuçlandığı vurgulanmıştır. Ratlarda *in vitro* alkali elüsyon DNA zincir kırıkları testi uygulanmış ve pozitif sonuçların elde edildiği belirtilmiştir. Rat kemik iliği hücrelerinde *in vivo* KKD testi, Fare lenfoma testi, Çin hamster hücrelerinde *in vitro* KKD testi ve fare lenfoma hücrelerinde *in vitro* KA testinde sonuçlar negatifken, Çin hamster V79 hücrelerinde *in vitro* MN testinde ise pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Suriye hamster embriyo hücrelerinde ve fare hücrelerinde hücre transformasyonu çalışmalarının pozitif sonuçlandığı vurgulanmıştır. DNA covalent binding ile yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda bazı sonuçların negatif bazılarının ise şüpheli olduğu elde edilmiştir. Ratlardaki karsinojenite çalışmalarında ise ilacın karsinojenik olduğu belirtilmiştir (Probst ve Neal, 1980; Kubinski ve ark., 1981; Althaus ve ark., 1982; Iype ve ark., 1982; Andrews ve ark., 1984; Budroe ve ark., 1984; Casciano ve ark., 1984; Oberly ve ark., 1984; Mirsalis, 1987; Turner ve ark., 1987; Ashby ve ark., 1988; Lijinsky ve Yamashita, 1988; Casciano ve ark., 1991; Oberly ve ark., 1993; Madle ve ark., 1994; Snyder, 1998; Snyder ve ark., 2006).

**Metidilazinin** genotoksitesitesi ile ilgili yapılan Ames testi, ratlarda *in vivo* UDS testi ve Çin hamster hücrelerinde *in vitro* KA testi sonuçlarının negatif olduğu belirtilmiştir (Mortelmans ve ark., 1986; Galloway ve ark., 1987; Madle ve ark., 1994; <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>).

**Mizolastinin** mutajenitesini belirlemek için Ames testi uygulanmış ve sonuçların negatif olduğu bildirilmiştir (Iwase ve ark., 1998; <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>).

**Prometazinin** Ames testi, resesif letal mutasyon testi, Ratlarda *in vitro* alkali elüsyon DNA zincir kırıkları testi, ratlarda *in vivo* UDS testi, Çin hamster V79 hücrelerinde gen mutasyonu testi, Çin hamster hücrelerinde *in vitro* KKD testi ve Çin hamster hücreleri ile insan periferik lenfositlerinde yapılan *in vitro* KA testinde negatif sonuçlar verirken, Çin hamster V79 hücrelerinde *in vitro* MN testinde şüpheli sonuç verdiği vurgulanmıştır. Ayrıca fare ve ratlardaki karsinojenite çalışmalarında karsinojenik olmadıkları belirtilmiştir (Fujioka ve Maizumi, 1983; Martelli ve ark., 1984; Galloway ve ark., 1987; National Toxicology Program, 1993; Madle ve ark., 1994; Gocke, 1996; Motohashi ve ark., 1997; Snyder, 1998; <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>).

**Setirizinin** Ames testi, fare lenfoma testi, insan periferik lenfositlerinde *in vitro* KA testi ve ratlarda *in vivo* MN testi sonucu genotoksik olmadığı belirtilmiştir. Yapılan uzun dönem karsinojenite çalışmaları sonucu bu ilacın farelerde karsinojenik potansiyele sahip olduğu bildirilirken, ratlarda böyle bir etkisinin olmadığı vurgulanmıştır (Snyder, 1998; Physicians' Desk Reference, 2005).

**Siproheptadin** Ames testi, Çin hamster V79 hücrelerinde *in vitro* MN testi ve insan periferik lenfositlerinde *in vitro* KA testinin sonuçlarına göre negatif sonuç verdiği bildirilmiştir (Hite ve ark., 1977; Snyder, 1998).

**Tenildiaminin** Ames testinde negatif sonuç vermesine rağmen, ratlarla yapılan UDS testinde pozitif sonuç verdiği belirtilmiştir. Karsinojenite testlerinde ise ratlar kullanılmış ve yine negatif sonuçlar elde edilmiştir (Budroe ve ark., 1984; Habs ve ark., 1986; Zeiger ve ark., 1987; National Toxicology Program, 1989; <http://www.potency.berkeley.edu>).

**Terfenadinin** genotoksitesisi ile ilgili yapılan Ames testi, Çin hamster V79 hücrelerinde *in vitro* MN testi ve farede *in vivo* MN testin sonuçlarının negatif olduğu vurgulanmıştır. Rat ve farelerde yapılan karsinojenite çalışmalarına bakıldığında şüpheli sonuçların elde edildiği bildirilmiştir (Gibson ve ark., 1982; Snyder, 1998; <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>).

**Tripelennaminin** Ames testi ve fare lenfoma hücrelerinde gen mutasyon testlerinde negatif sonuçlar verdiği belirtilmiştir. Ratlarda ve insanlarda yapılan *in vitro* alkali elüsyon DNA zincir kırıkları testi ve UDS testinin pozitif sonuçlandığı vurgulanmıştır. Ayrıca Çin hamster V79 hücreleri kullanılarak yapılan *in vitro* MN testinde şüpheli sonuçlar elde edilmiştir (Probst ve Neal, 1980; Budroe ve ark., 1984; Martelli ve ark., 1984; Oberly ve ark., 1984; Robbiano ve ark., 1986; Snyder, 1998).

**Tripirilidinin** Ames testi sonuçları negatif olmasına rağmen, Çin hamster V79 hücrelerindeki *in vitro* MN testinde şüpheli sonuçlar elde edildiği belirtilmiştir. Karsinojenik özelliklerini öğrenmek amacıyla uygulanan uzun dönem karsinojenik çalışmalarda ise karsinojenik olmadığı vurgulanmıştır (Hensen ve ark., 1988; Greenman ve ark., 1995c; Greenman ve ark., 1995d; Snyder, 1998).



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada test maddesi olarak loratadin (LOR), 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. Loratadin

Bu çalışmada test maddesi olarak kullandığımız LOR'e (Sigma), alerjik hastalıkların tedavisinde kullanılan ve piperidin türevi olan 2. kuşak bir antihistaminiktir.

**Ticari Adları:** Claritin, Claritin RediTabs, Alavert, Triaminic, Claritin-D, Alarin, Histadin, Loradif, Lorantis, Loratine, Ritin.

**Kimyasal Adı:** Etil-4-(8-kloro-5,6-dihidro-11H-benzo[5,6]siklohepta[1,2b]piridin-11-ylidene)-1-piperidinkarboksilat.

**CAS no:** 79794-75--5

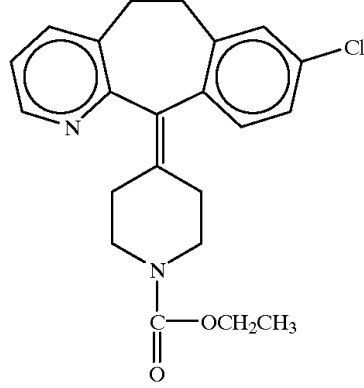
**Molekül Ağırlığı:** 382.883 g/mol

**Safılık düzeyi:** >%98

**Erime Sıcaklığı:** 134-136 °C

**Kaynama Sıcaklığı:** 531.3 °C

**Kapalı Formülü:** C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Açık Formülü:****3.1.1.2. Dimetil Sülfoksit (DMSO)**

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

**Kimyasal adı:** Dimetil Sülfoksit (DMSO)

**Molekül ağırlığı:** 78.19 g/mol

**Safılık düzeyi:**  $\geq$ %99.0

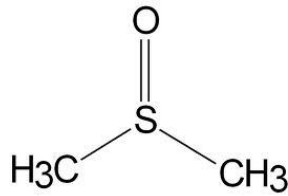
**Kaynama noktası:** 189 °C

**Erime noktası:** 18.0-18.5 °C

**CAS No:** 67-68-5

**Kapalı formülü:** (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO

**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.

RPMI 1640 (Biological Industries) .....100 ml

Fetal Bovine Serum (Biological Industries) .....	20 ml
Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin (PSA) (Biological Industries) .....	1 ml
Fitohemaglutinin 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. Mitomisin C (MMC)

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

**Kimyasal adı:** Mitomisin C

**Molekül ağırlığı:** 334.33 g/mol

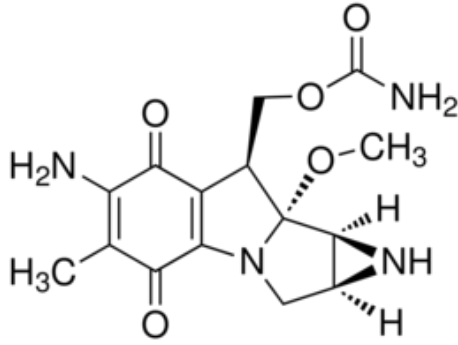
**Erime noktası:** 360°C

**CAS No:** 50-07-7

**Safılık düzeyi:** %99

**Kapalı formülü:** C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>

**Açık formülü:**



#### 3.1.1.5. Sitokalsin B (Sigma)

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

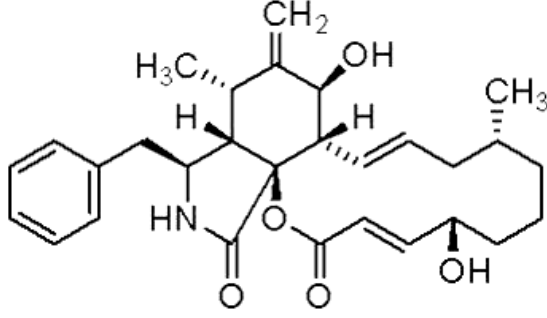
**Kimyasal adı:** Sitokalsin B

**Molekül ağırlığı:** 479.62 g/mol

**Safılık düzeyi:** ≥ %98

**CAS No:** 14930-96-2

**Kapalı formülü:** C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>5</sub>

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

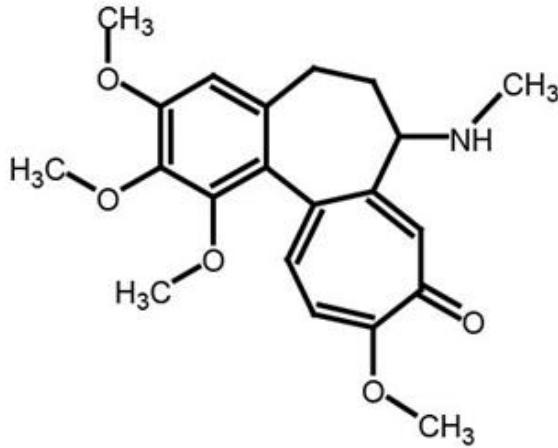
Kültürü yapılan hücreleri metafaz safhasında durdurmak için kullanılmıştır ve Biological Industries firmasından sağlanmıştır. Kolşisin eriyiği kromozom medyumunun her ml'sinde 0.06 µg olacak şekilde (0.06 µg/ml) 2.5 ml'lik kromozom medyumuna ilave edilmiştir.

**Kimyasal adı:** Kolsemid, N-Deasetil-N-metil kolşisin

**Cat. No:** 12-004-10

**Molekül ağırlığı:** 399.4 g/mol

**Kapalı formülü:** C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>6</sub>

**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'-deoksiüridin (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'-deoksiüridin

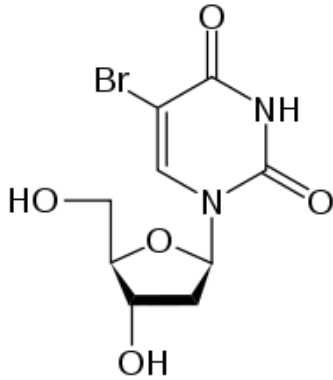
**Molekül ağırlığı:** 307.10 g/mol

**Safılık düzeyi:** % 99

**CAS No:** 59-14-3

**Kapalı formülü:** C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

**Açık Formül:**



**Hazırlanışı**

**Saf Suyun Sterilizasyonu**

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

### **BrdUrd Eriyiğinin Sterilizasyonu**

BrdUrd eriği 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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (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.

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  çözeltisi,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  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 5X 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 1X SSC eriği kullanılmıştır.

#### **3.1.1.12. Giemsa**

Giemsa boyası Merck firmasından temin edilmiş olup, % 5'lik Giemsa-Tampon (Sorensen) boya eriği 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 Terazi**

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. Su Banyosu**

Hücre kültürü preparatları hazırlandıktan sonra, kardeş kromatidlerin farklı boyanmasında kullanılan SSC eriyiğinin 58-60 °C'de sabit kalmasını sağlamak amacıyla TERMAL marka su banyosu kullanılmıştır.

#### **3.1.2.7. UV Kabin**

Çalışmamızda üzeri Sorensen tamponu ile örtülen preparatları ışınlamak amacıyla 254 ve 366 nm dalga boylarında ışık yayabilen CAMAG marka UV kabin kullanılmıştır.

### 3.1.2.8. 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)'in tekniği hafif 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 medyumuna 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 LOR grupları oluşturulmuştur. Negatif kontrol grubunda etken maddemiz olan LOR için çözücü olarak kullandığımız saf DMSO kullanılmıştır. Bu gruptaki kültür tüpleri, saf DMSO ile 48 saat muamele edilecek şekilde inkübasyona bırakılmıştır. DMSO kültür tüplerine 10 µl/ml olacak şekilde ilave edilmiştir. LOR dışındaki tüm koşulların aynı olduğu negatif kontrol grubu, LOR uygulanan deney gruplarında LOR'in etkisini karşılaştırmak amacıyla kullanılmıştır. Çünkü negatif kontrol grubu ile deney gruplarının karşılaştırılması sonucunda, bu gruplar arasında istatistiksel farklılığın bulunması, bu farklılığın deney grubuna uygulanan LOR'den kaynaklandığını gösterecektir. Çalışmamızda pozitif kontrol olarak, sitotoksik ve genotoksik hasar yaptığı bilinen Mitomycin C (MMC) maddesi kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan MMC, kültür tüplerine 0.16 µg/ml olacak şekilde kültürlerin 24. saatinde ilave edilmiş ve kültürler 48 saat boyunca MMC ile muamele edilmiştir. Pozitif kontrol grubu, test maddemiz olan LOR ile MMC arasındaki sitotoksik ve genotoksik etkileri karşılaştırmak amacıyla kullanılmıştır. Pozitif kontrol grubu ile deney gruplarının karşılaştırılması sonucunda, bu gruplar arasında istatistiksel farklılığın bulunması LOR'in MMC kadar etkili olmadığını



gösterirken, bu gruplar arasında farklılığın bulunmaması ise LOR'in MMC kadar sitotoksik ve genotoksik etkisinin bulunduğunu gösterecektir. Test maddemiz olan LOR'in etkisini incelemek için kültür süresinin bitimine 48 saat kala LOR'in daha önce belirlenmiş ve kültür tüplerine saf DMSO'da çözülerek hazırlanmış konsantrasyonları olan 5, 15 ve 25 µg/ml'lik miktarları ilave edilmiştir.

LOR ile ilgili literatürde yeterince sitotoksosite verisi olmadığı için, LOR konsantrasyonlarının belirlenebilmesi için bir seri hücre kültürü hazırlanmış ve bu kültürlerle 0.5-250 µg/ml arasındaki değişik dozlarda LOR eklenerek sitotoksositeyi belirleyebilmek amacıyla bir ön çalışma yapılmıştır. Hücre kültürleri 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda LOR ile muamele edilmiş ve kültürlerden elde edilen preparatlar mitotik indeks bakımından incelenmiştir. LOR'in test edilen konsantrasyonlarından, 25 µg/ml dozun mitotik indekste yaklaşık % 50 oranında azalmaya neden olmasından dolayı inhibitör konsantrasyon yani, IC50 değeri 25 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu nedenle çalışmamızda en yüksek LOR dozu 25 µg/ml olarak seçilmiştir. Ayrıca, yapılan ön çalışmada 25 µg/ml'den daha yüksek dozlarda doz artışına paralel olarak mitotik indeksin azaldığı ve sitotoksitenin önemli oranda artış gösterdiği saptanmıştır. LOR'in 50 µg/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarında mitotik aktiviteye rastlanmamıştır. Çalışmamızda en düşük LOR dozu olarak IC50 değerinin 1/5'ü olan 5 µg/ml'lik konsantrasyon ve en düşük doz ile en yüksek doz arasındaki 15 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 muameleye bırakılmıştır. Kültür süresinin bitiminde tüpler 1200 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiş ve altta biriken hücrelere zarar vermeden 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 KCl 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 dk 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 dk 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 süzölmüştür. Preparatların Giemsa-Tampon boya eriyiğinde 4 dk boyanması sağlanmıştır. 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.

### **3.2.3. Mikroskopik İncelemeler ve Mikroskopta Fotoğraf Çekme**

Hazırlanmış olan daimi preparatlar görüntü analiz sistemli Leica marka ışık mikroskobu ile X1000 büyütmede incelenmiştir. İncelenen preparatlarda mitotik indeks (MI) ve kromozom anormallikleri (KA) belirlenmiştir. Mitozu geçiren bazı hücrelerin kromozomları ve saptanan bazı kromozom anormallikleri yine X1000 büyütmede fotoğraflanmış ve bilgisayara aktarılmıştır.

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

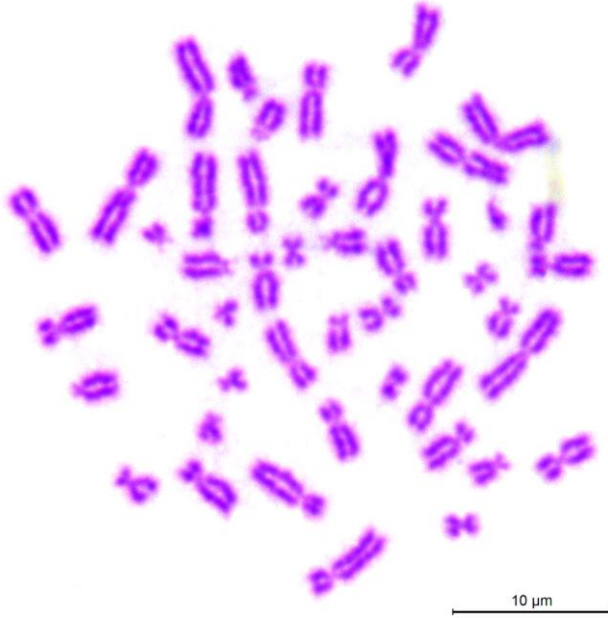
#### **3.2.4.1. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması**

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 (Büyükleyla, 2007; Yavuz Kocaman ve Topaktaş, 2007; Börçek Kasurka, 2010). Benzer olarak bu çalışmada da gaplar, kromozom anormalliği olarak değerlendirilmemiştir.

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

#### **3.3.1. 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 aynen uygulanmıştır.

#### **3.3.2. 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 oluşturan Yavuz Kocaman (2007)'in belirttiği test protokolü 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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck) 250 ml distile suda çözünmüştür

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

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, 254 nm dalga boyuna ayarlanmış olan UV kabinde 30 dk ışınlandırılmıştır. Işınlama

bittikten sonra preparatlar 1x SSC eriyiği içerisinde 58-60°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 içerisinde 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.

### **3.3.3. Mikroskopik İncelemeler ve Mikroskopta Fotoğraf Çekme**

Hazırlanmış olan daimi preparatlar görüntü analiz sistemli Leica marka ışık mikroskobu ile X1000 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 X1000 büyütmede fotoğraflanmış ve bilgisayara aktarılmıştır.

### **3.3.4. Proliferasyon İndeksi (PI) ve Kardeş Kromatid Değişiminin (KKD) Saptanması**

#### **3.3.4.1. 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:

$$PI = \frac{(M1 + 2 M2 + 3 M3)}{100} \quad (3.1)$$

M1: 1. Mitozdaki hücre sayısı

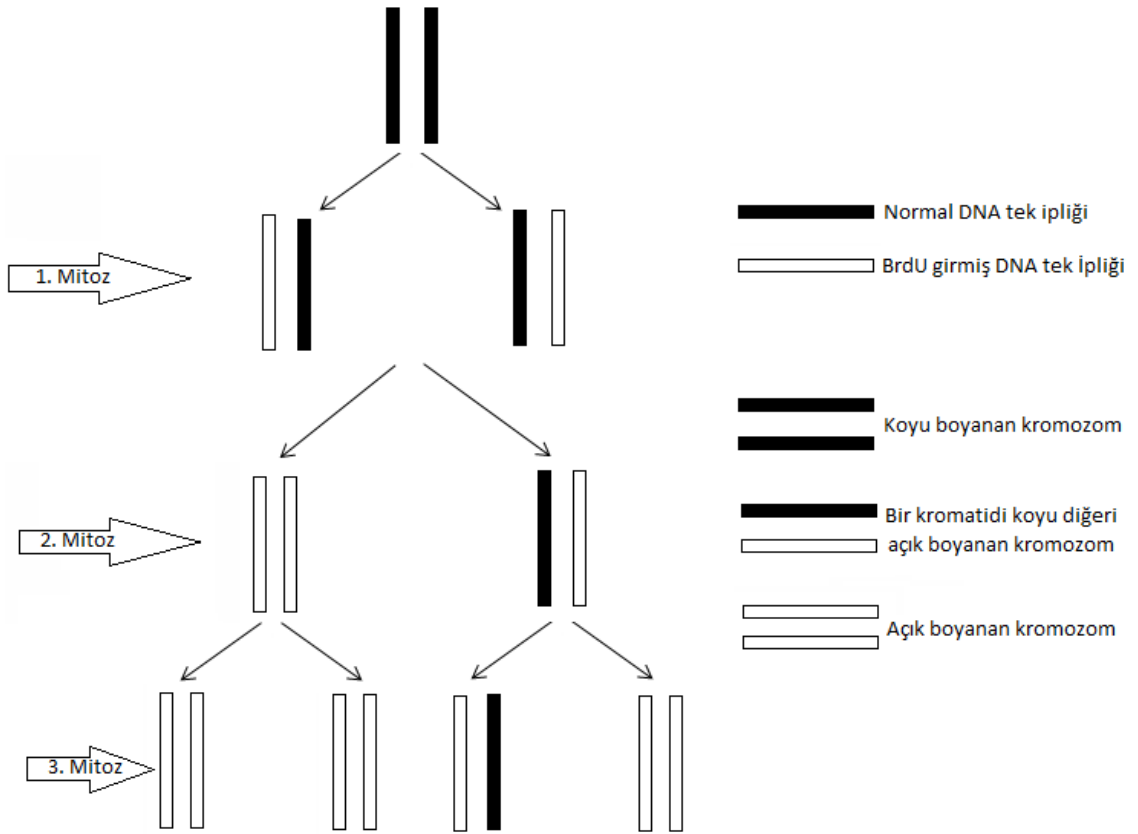
M2: 2. Mitozdaki hücre sayısı

M3: 3. Mitozdaki hücre sayısı (Yavuz kocaman, 2007).

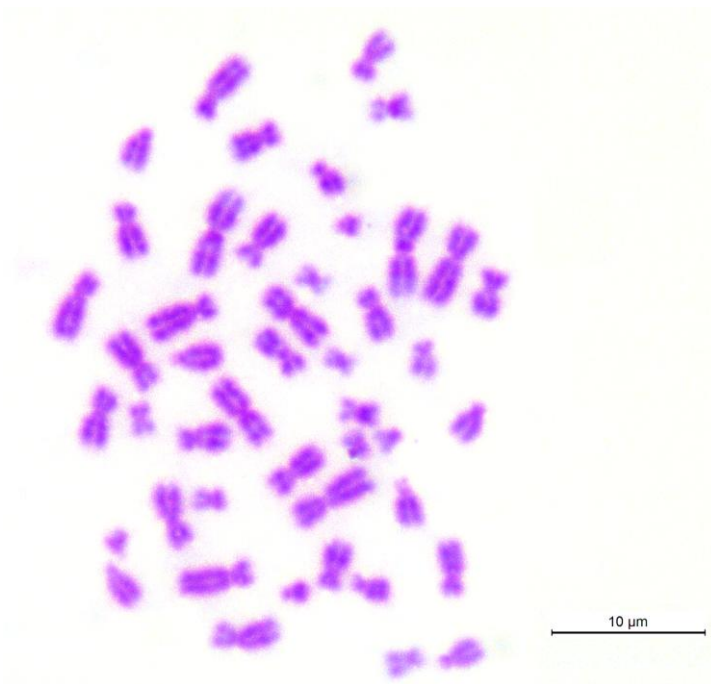
Birinci, ikinci ve üçüncü metafazlar şu şekilde ayırt edilmiştir;

BrdUrd, DNA'nın yapısında bulunan timin bazlarının analogu olduğundan dolayı kültür ortamına BrdUrd konulduğunda 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 diğerkromatidin ipliği timinli olan bir kromozom oluşacaktır. Bu kromozom da boyandığında bir kromatidi koyu renkte, bir kromatidi de açık renkte boyanacaktır. İşte böyle hücrelerin metafaz devresinde preparat yapıldığında bazı kromozomların her iki kromatidi açık renkte, bazı kromozomların bir kromatidi açık, diğerkromatidi de koyu renkte boyanacaktır. Bu hücrelerde 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.2) (Topaktaş ve Speit, 1990; Yavuz Kocaman, 2007).

Bu şekilde 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücreler ayırt edilmiş (Şekil 3.3, Şekil 3.4 ve Şekil 3.5), bu hücrelerin 100 hücre içindeki sayısı saptanmış ve formüle göre PI hesaplanmıştır.



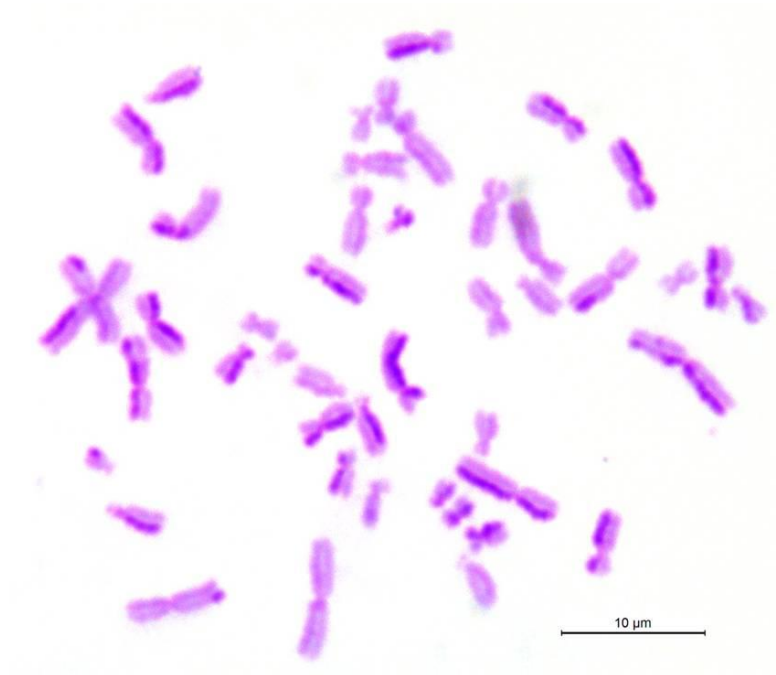
**Şekil 3.2.** BrdUrd' nin DNA yapısına girmesi ile birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması



**Şekil 3.3.** Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomları (X1000)



**Şekil 3.4.** İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomları (X1000)

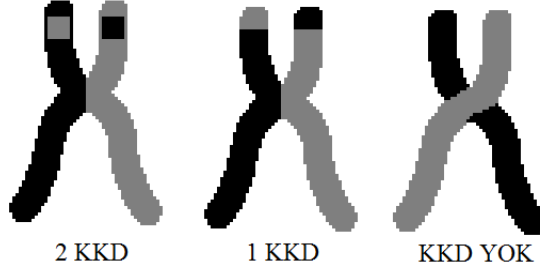


**Şekil 3.5.** Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomları (X1000)



### 3.3.4.2. 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 3.6) (Yavuz Kocaman, 2007).



Şekil 3.6. Kardeş kromatid değişimi

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

### 3.4.1. 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)'ün 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 medyumu 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 LOR 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 LOR'in saf DMSO'da hazırlanmış olan 5, 15, 25 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 sitokalasin 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 dk 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 lamların üzerine hücre süspansiyonu damlatılarak preparatlar hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatlar kurumaları için kapalı bir yerde 24 saat oda ısısında bekletilmiştir.

### **3.4.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması**

Sorensen tamponu ile hazırlanmış olan % 5'lik Giemsa eriyiği filtre kağıdı ile dik bir şaleye süzülmüştür. Mikronükleusların boyanması için preparatlar Giemsa-

Tampon boya eriyiğinde yaklaşık 14 dk 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 mikroskopik incelemeler yapılmıştır.

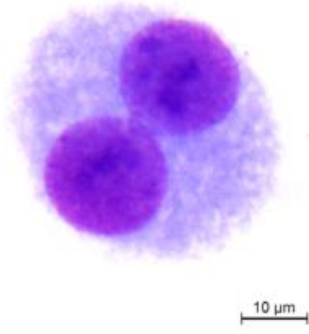
### **3.4.3. Mikroskopik İncelemeler ve Mikroskopta Fotoğraf Çekme**

Hazırlanmış olan daimi preparatlar görüntü analiz sistemli Leica marka ışık mikroskobu ile X400 büyütmede incelenmiştir. İncelenen preparatlarda mononükleat (bir nükleuslu), binükleat (iki nükleuslu), trinükleat (üç nükleuslu) ve tetranükleat (dört nükleuslu) hücreler ile mikronükleuslu binükleat hücreler tespit edilmiştir. Bir, iki, üç ve dört nükleuslu bazı hücrelerin ve mikronükleus bulunduran bazı binükleat hücrelerin fotoğraflama işlemi X400 büyütmede yapılmış ve görüntüler bilgisayara aktarılmıştır.

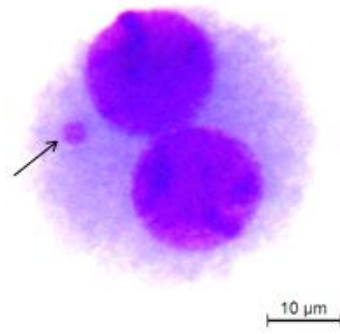
### **3.4.4. Mikronükleus Sayısı ve Nükleus Bölünme İndeksinin (NBI) Saptanması**

Mikronükleus sayısını belirlemek amacıyla daimi preparatlarda her kişi için, her muamele grubu ve kontrollerinde iki nükleusa sahip (Şekil 3.7) toplam 2000 hücre incelenmiş ve bu binükleat hücreler içerisinde mikronükleus taşıyanlar (Şekil 3.8) belirlenmiştir. Ayrıca incelenen binükleat hücrelerde toplam mikronükleus sayısı ve toplam mikronükleus sayısının incelenen iki nükleuslu hücre sayısına bölünmesiyle hücre başına düşen mikronükleus sayısı (MN/Hücre) ve % MN hesaplanmıştır.

Binükleer hücre ve mikronükleus ayrımı Titenko-Holland ve ark. (1997) ve Fenech (2000)'e göre yapılmıştır: (1) Hücreler belirgin sitoplazmasıyla yuvarlak ya da oval görünümüne 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).



**Şekil 3.7.** Binükleat hücre (X400)



**Şekil 3.8.** Bir mikronükleus bulunduran binükleat hücre (X400)

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 3.9) 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).

$$NBI = \frac{(MI+2MII+3MIII+MIV)}{N} \quad (3.2)$$

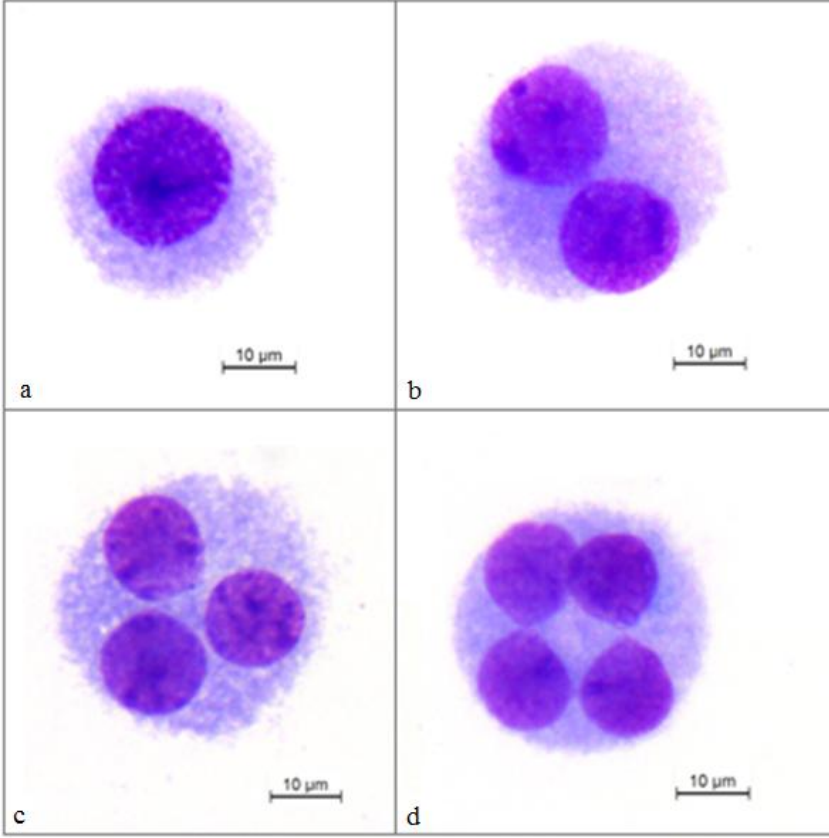
**MI:** Bir nükleuslu hücreler

**MII:** İki nükleuslu hücreler

**MIII:** Üç nükleuslu hücreler

**MIV:** Dört nükleuslu hücreler

**N:** Toplam hücre sayısı



**Şekil 3.9.** Mononükleat (a), binükleat (b) ,trinükleat (c) ve tetranükleat hücreler (d) (X400)

### 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 ortalamaları SPSS istatistik programı kullanılarak ANOVA analizi kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen verilerin hem kendi aralarında, hem de negatif kontrol ve pozitif kontrol grupları ile arasındaki farkın önemli olup olmadığı Tukey testi-Post-Hoc analizi 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. Tüm analizler 4 bireyden elde edilen verilerin ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Tüm analizlerde; p değeri (güven aralığı) 0.05 olarak alınmıştır.

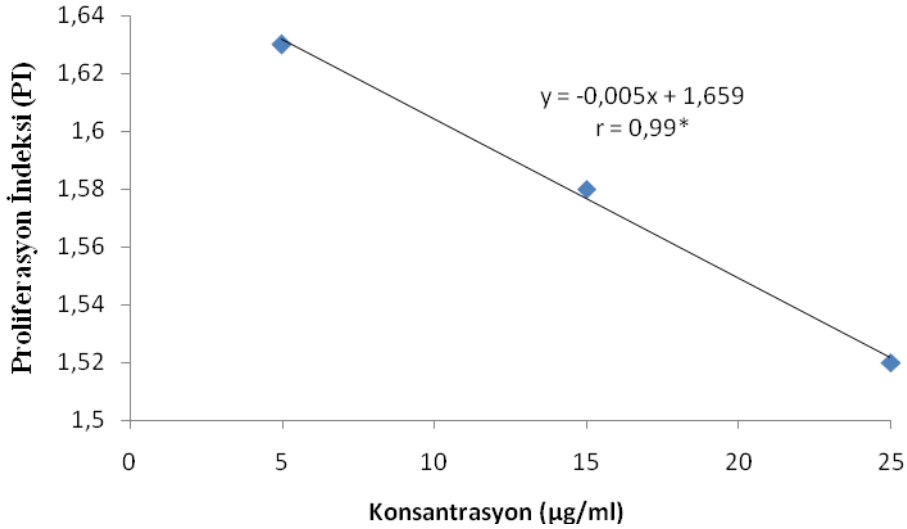
Mikroskobik incelemeler sonucunda elde edilen görüntüler şekiller halinde, istatistiksel bulgular ise çizelgeler ve grafikler halinde verilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Loratadinin DNA Replikasyonu, Mitoz Bölünme ve Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri

#### 4.1.1. Loratadinin DNA Replikasyonu Üzerindeki Etkileri

Loratadinin (LOR) DNA replikasyonu üzerindeki etkisi Proliferasyon İndeksi (PI) hesaplanarak belirlenmiştir. 5, 15 ve 25 µg/ml'lik konsantrasyonlarda LOR'in 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 değerler anlamlı ölçüde azaldığı ve LOR dozları ile PI değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir korelasyon olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1).



(\*P<0.05)

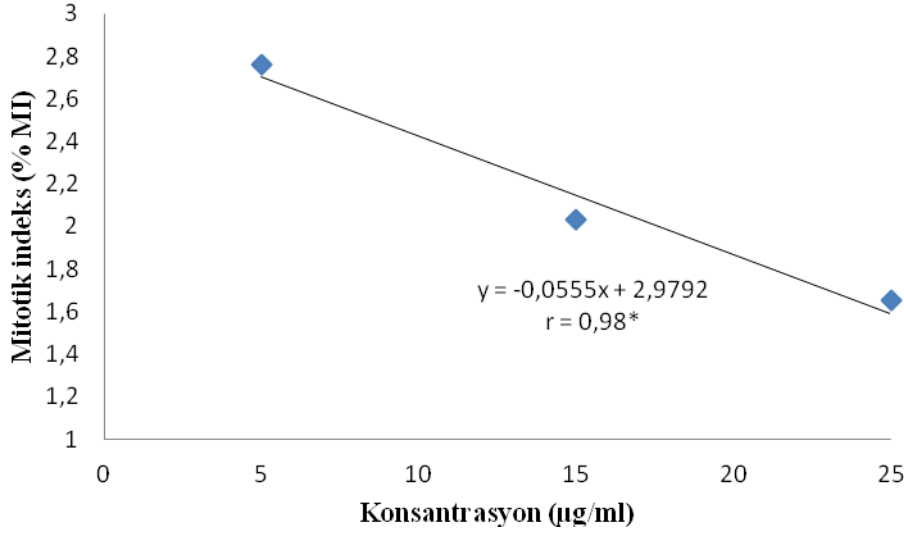
**Şekil 4.1.** Loratadinin test edilen dozları ile PI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı

LOR doza bağlı olarak PI'ni düşürmesine rağmen bu azalmalar negatif kontrollere göre kıyaslandığında aralarında istatistiksel açıdan farklılık bulunmamıştır. Fakat LOR uygulaması sonucu PI'nde elde edilen tüm değerler ile pozitif kontrol arasında da istatistiksel farklılıklar tespit edilmemiştir (p<0.05) (Çizelge 4.2). Yapılan istatistik hesaplamalara göre LOR uygulanan kültürlerin PI'ndeki değerler, negatif ve

pozitif kontrol grubuna ait değerlerin arasında değerler olarak tespit edilmiştir ve LOR'in zayıf sitotoksik bir profile sahip olduğu düşünülebilir.

#### 4.1.2. Loratadinin Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkileri

LOR'in mitoz bölünme üzerindeki etkisi Mitotik İndeks (MI) hesaplanarak belirlenmiştir. LOR'in 5, 15 ve 25 µg/ml dozlarında insan periferik lenfositlerine 48 saat muamelesi sonucu, LOR dozunun artışına bağlı olarak MI'in anlamlı ölçüde düştüğü ve LOR dozları ile MI değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



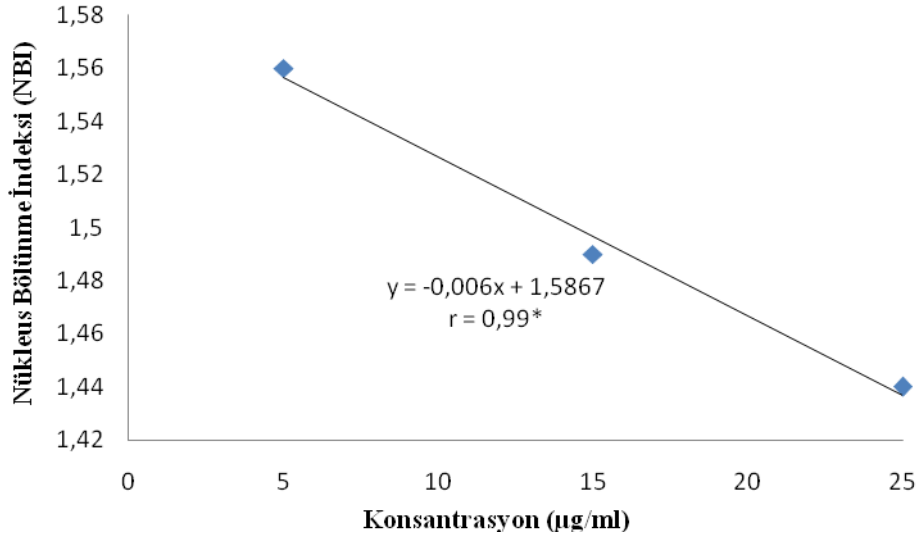
(\*P<0.05)

**Şekil 4.2.** Loratadinin test edilen dozları ile % MI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı

LOR'in en düşük dozu olan 5 µg/ml konsantrasyonda MI'deki düşüş negatif kontrole göre istatistiksel anlamda önemli bulunmazken, LOR'in 15 ve 25 µg/ml doz uygulamaları % MI' i negatif kontrole göre istatistiksel açıdan önemli olacak derecede düşürmüştür (p<0.05). Ayrıca 15 ve 25 µg/ml'lik konsantrasyonlardaki değerler ile pozitif kontrol arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar bulunmadığı için, bu dozlarda MI'deki düşüşlerin pozitif kontrol kadar etkili olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

#### 4.1.3. Loratadinin Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri

LOR'in nükleus bölünmesi üzerindeki etkisi nükleus bölünme indeksi (NBI) hesaplanarak belirlenmiştir. LOR'in 5 µg/ml, 15 µg/ml ve 25 µg/ml dozlarının 48 saatlik muameleleri sonucu LOR dozunun artışına bağlı olarak NBI'in anlamlı ölçüde düştüğü ve LOR dozları ile NBI değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



(\*P<0.05)

**Şekil 4.3.** Loratadinin test edilen dozları ile NBI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı

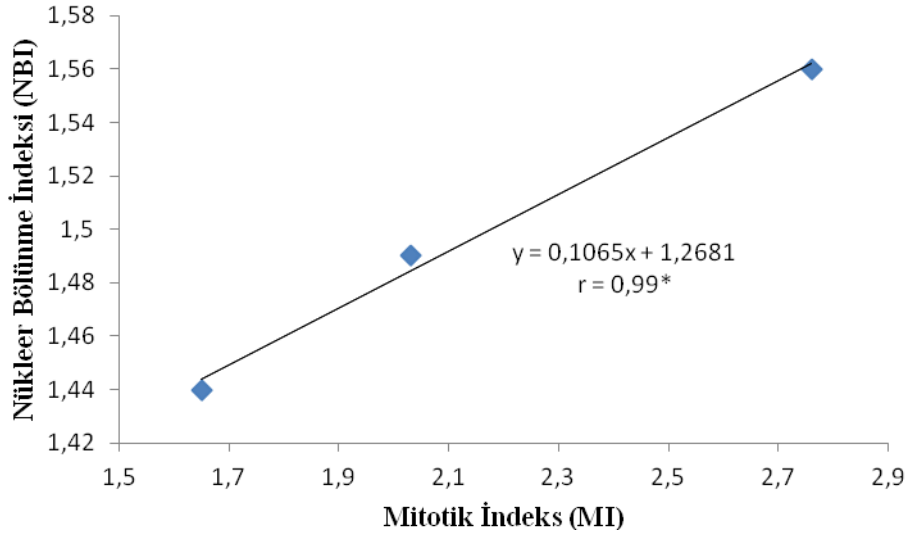
LOR doza bağlı olarak hem çok çekirdekli hücre sayısı hem de NBI'ni düşürmesine rağmen NBI'ndeki bu azalmalar negatif kontrole göre kıyaslandığında istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır. Fakat LOR uygulaması sonucu NBI'nde elde edilen tüm değerler ile pozitif kontrol arasında da istatistiksel farklılıklar bulunamamıştır (p<0.05) (Çizelge 4.3). İstatistiki hesaplamalara göre LOR'e ait veriler negatif ve pozitif kontrol gruplarına ait değerlerin arasında değerler olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar LOR'in zayıf sitotoksik bir profile sahip olduğu göstermektedir.

#### 4.2. Loratadin Dozlarına Bağlı Olarak PI, MI ve NBI Arasındaki İlişki

LOR ile 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde test maddesinin doz artışına bağlı olarak PI, MI ve NBI değerlerini düşürdüğü ve LOR dozlarına bağlı

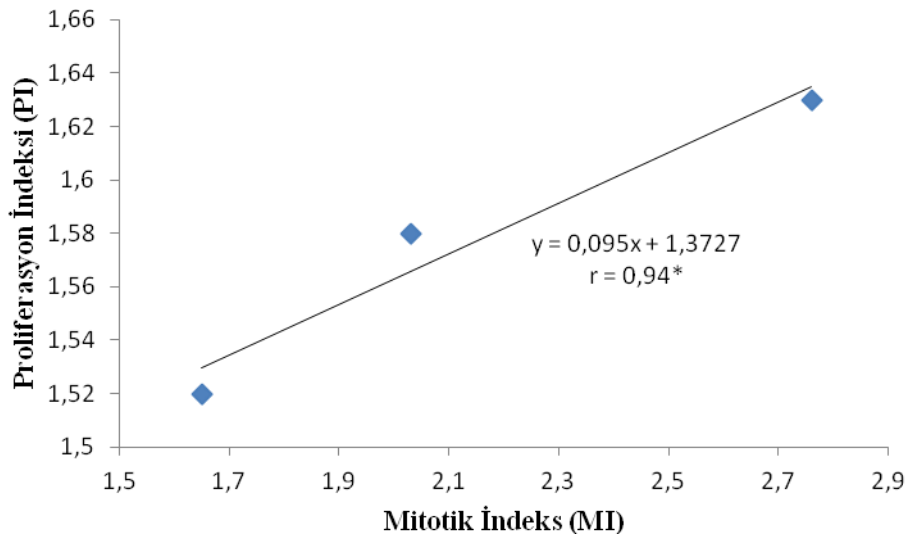


olarak bu parametrelerdeki azalmalar arasında paralel bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6). LOR dozlarına bağlı olarak PI, MI ve NBI değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir korelasyon belirlenmiştir.



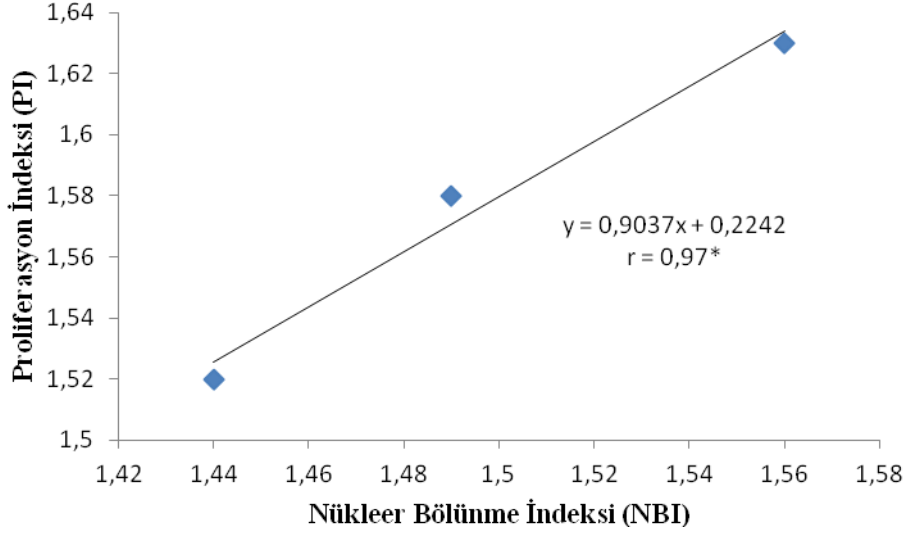
(\*P<0.05)

**Şekil 4.4.** Loratadinin test edilen dozları ile NBI ve MI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı



(\*P<0.05)

**Şekil 4.5.** Loratadinin test edilen dozları ile PI ve MI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı



(\*P<0.05)

**Şekil 4.6.** Loratadinin test edilen dozları ile PI ve NBI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı

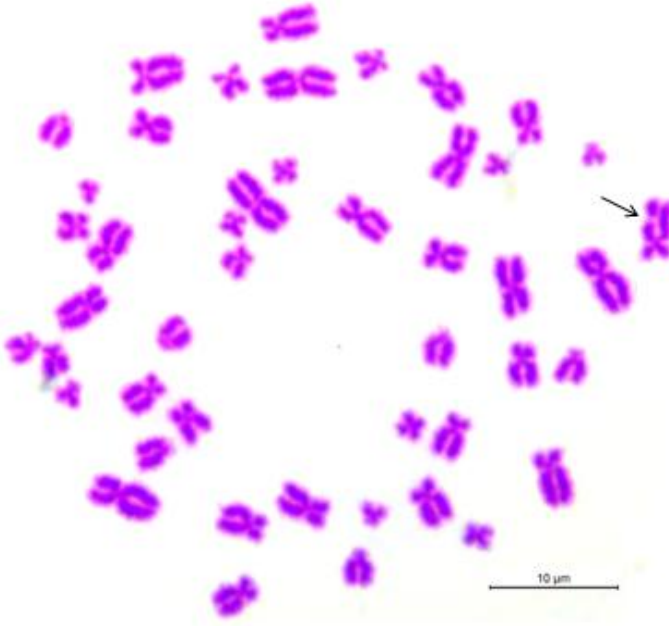
### 4.3. Loratadinin Kromozom Anormalliği, Kardeş Kromatid Değişimi ve Mikronükleus Oluşumu Üzerindeki Etkileri

#### 4.3.1. Loratadinin Kromozom Anormalliklerinin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

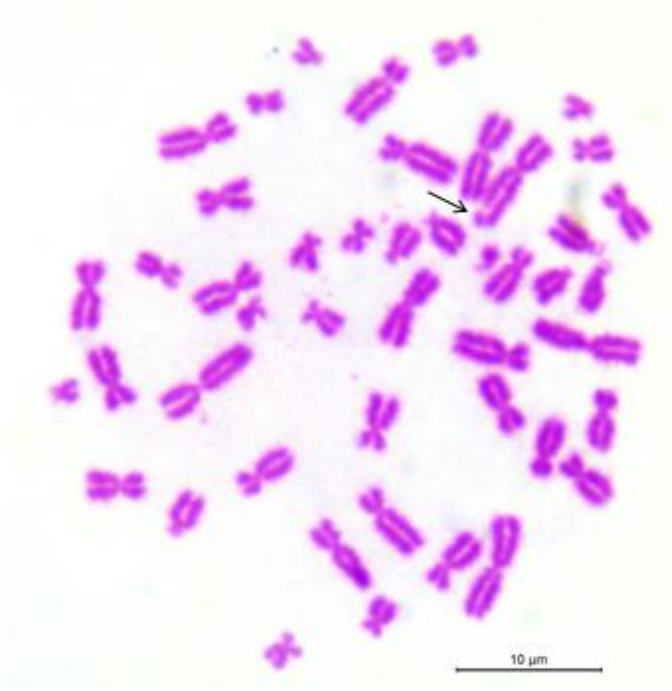
5, 15 ve 25 µg/ml konsantrasyonlarındaki LOR'in insan periferik lenfositlerine 48 saat muamelesi sonucu, test edilen tüm dozlarda; kromatid kırığı (Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9), kromozom kırığı (Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12), fragment (Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15), kardeş kromatid birleşmesi (Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18), ve poliploidi (Şekil 4.19) meydana geldiği belirlenmiştir (Çizelge 4.1).



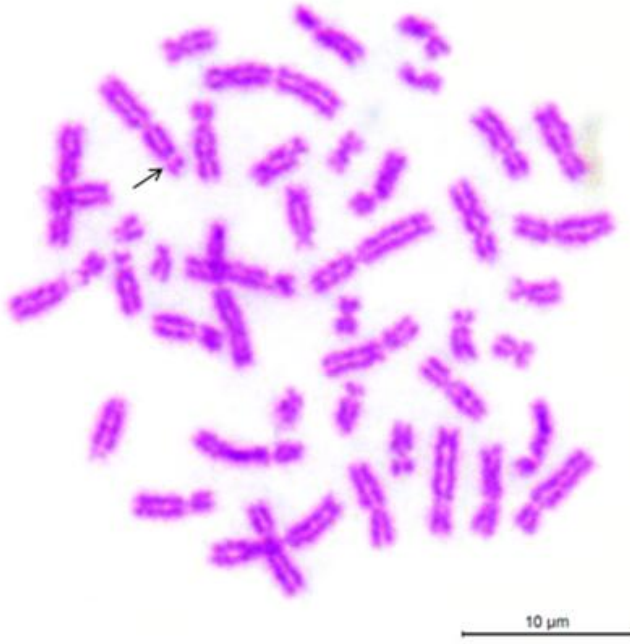
Şekil 4.7. Kromatid Kırığı (15 µg/ ml) X1000



Şekil 4.8. Kromatid Kırığı (5 µg/ ml) X1000



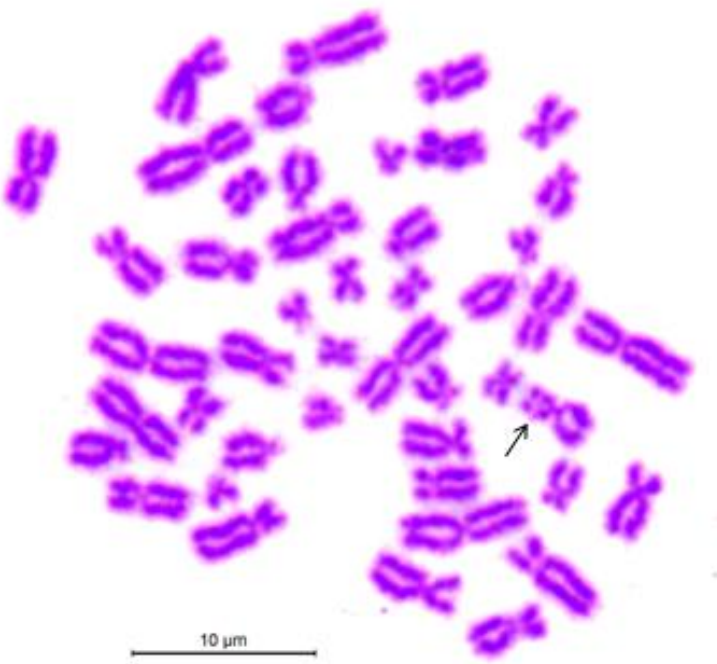
**Şekil 4.9.** Kromatid Kırığı (25 µg/ ml) X1000



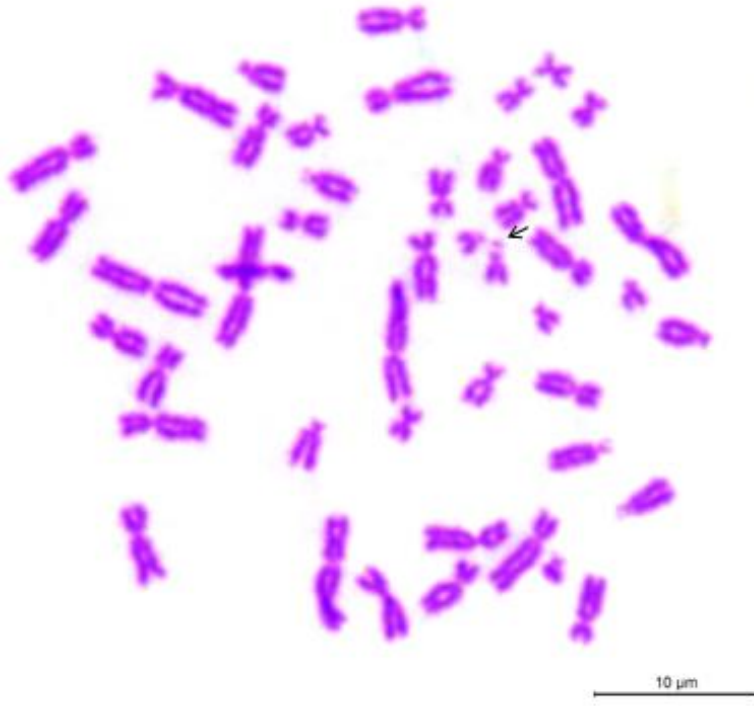
**Şekil 4.10.** Kromozom Kırığı (15 µg/ ml) X1000



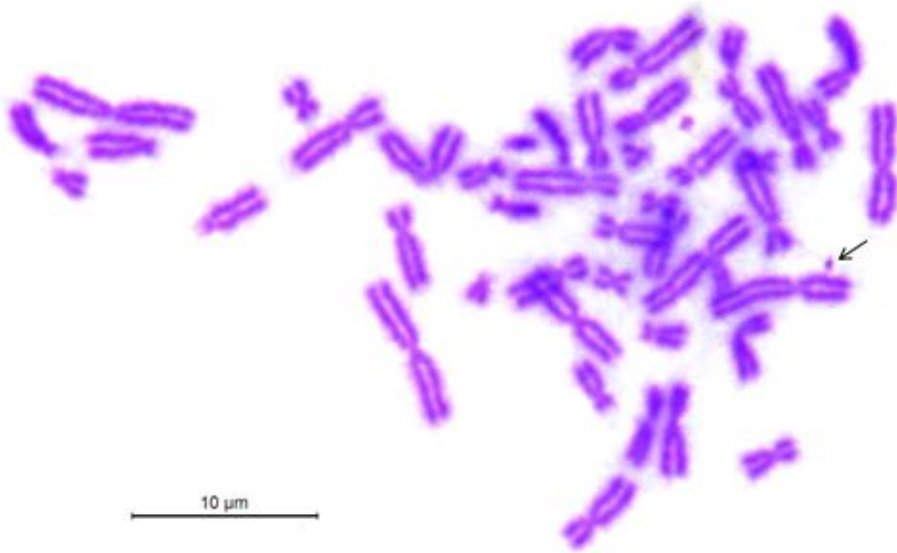
Şekil 4.11. Kromozom Kırığı (5 µg/ ml) X1000



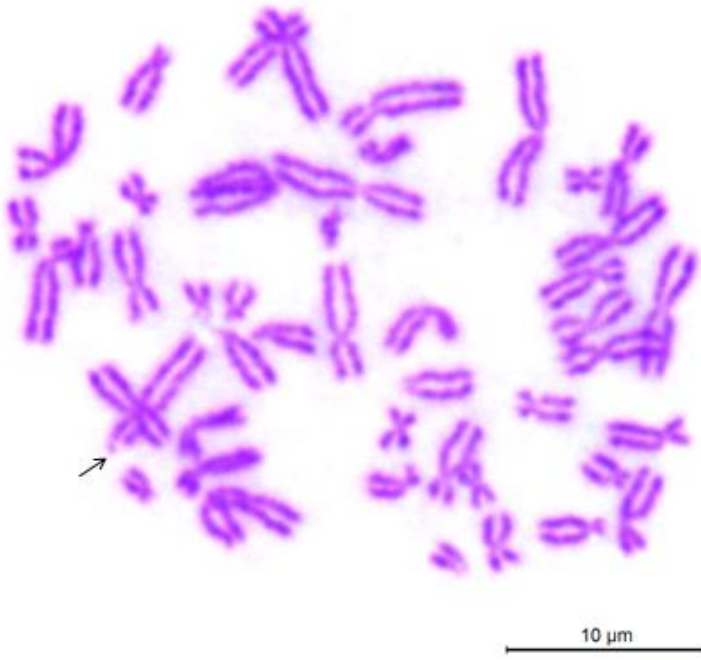
Şekil 4.12. Kromozom Kırığı (25 µg/ ml) X1000



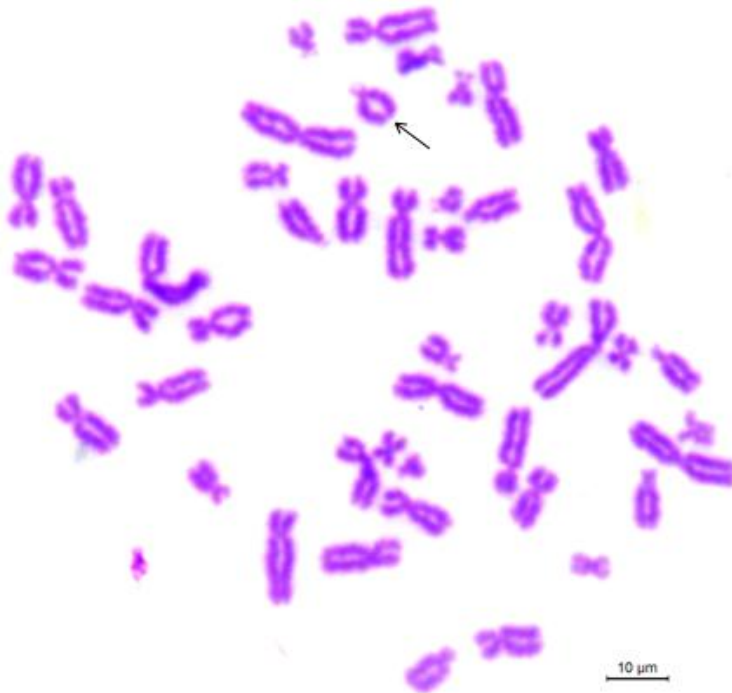
Şekil 4.13. Fragment (5 µg/ ml) X1000



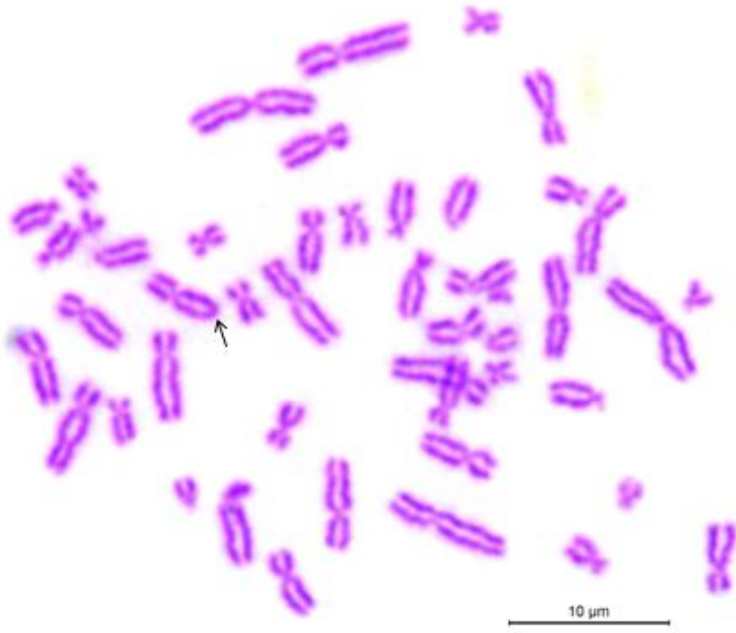
Şekil 4.14. Fragment (15 µg/ ml) X1000



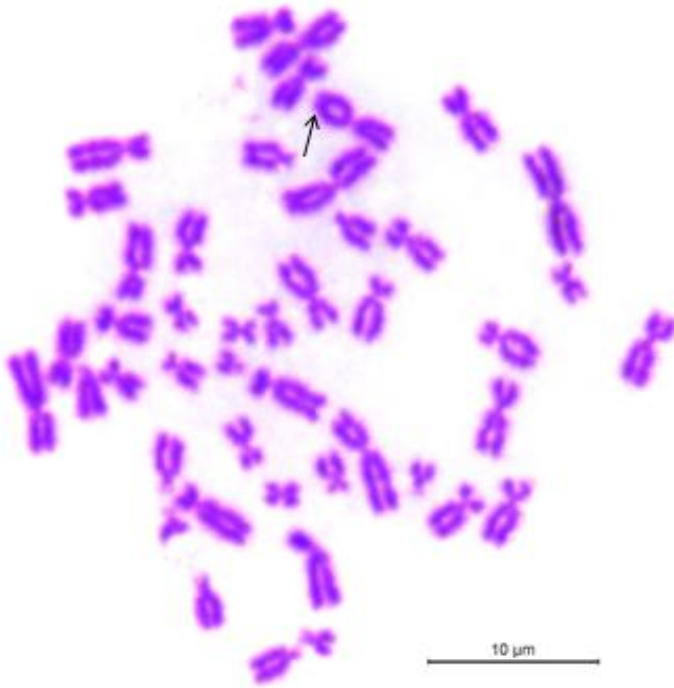
Şekil 4.15. Fragment (25 µg/ ml) X1000



Şekil 4.16. Kardeş Kromatid Birleşimi (KKB) (5 µg/ ml) X1000



Şekil 4.17. Kardeş Kromatid Birleşimi (KKB) (15 µg/ ml) X1000



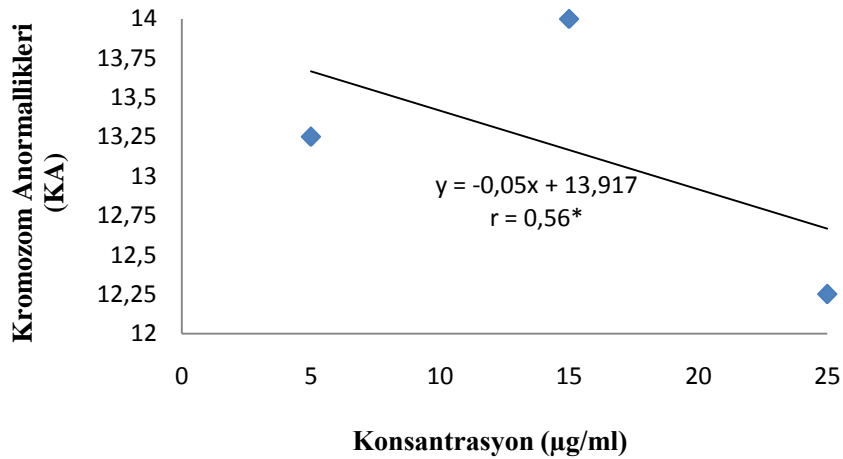
Şekil 4.18. Kardeş Kromatid Birleşimi (KKB) (25 µg/ ml) X1000





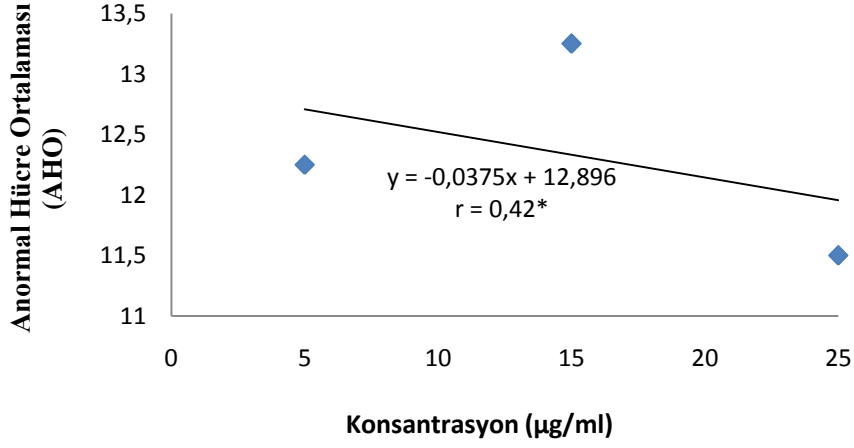
**Şekil 4.19.** Poliploidi (25 µg/ ml) X1000

LOR'in test edilen tüm dozlarında, toplam KA ile KA ve AHO yüzdeleri bakımından artışlar görülmesine rağmen (Çizelge 4.1), bu artışların doza bağlı olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.20, Şekil 4.21). Bu nedenle LOR dozları ile KA ve AHO değerleri arasında istatistiksel olarak önemli korelasyon olmadığı bulunmuştur.



(\*P<0.05)

**Şekil 4.20.** Loratadinin test edilen dozları ile KA arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı



(\*P<0.05)

**Şekil 4.21.** Loratadinin test edilen dozları ile AHO arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı

LOR' in 48 saatlik uygulamalarda, toplam KA ile KA ve AHO yüzdeleri bakımından en yüksek ve pozitif kontrole en yakın değerler 15 µg/ml dozda bulunmuştur. Fakat tüm dozlarda bu artışlar istatistiksel anlamda negatif kontrol gruplarından farklı bulunmamıştır. Ayrıca uygulanan tüm dozlarda gözlenen bu artışlar pozitif kontrol kadar etkili olmamıştır ( $p<0.05$ ) (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** Loratadinin sebep olduğu kromozomal anomallikler ve % MI, KA ve AHO' sı üzerine etkisi

Test Maddesi	Konsantrasyon	MI (%) ± SH	Anormallik Tipleri										AHO (%) ± SH
			K'	K''	F	KKB	KD	P	Toplam KA	%KA ± 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	
Loratadin	5 µg/ml	2.76±0.15 <sup>b</sup>	24	18	6	4	-	-	1	53	13.25±3.06 <sup>b</sup>	12.25±2.49 <sup>b</sup>	
	15 µg/ml	2.03±0.14 <sup>a</sup>	23	15	12	5	-	-	1	56	14.00±2.73 <sup>b</sup>	13.25±2.49 <sup>b</sup>	
	25 µg/ml	1.65±0.13 <sup>a</sup>	23	17	4	4	-	-	1	49	12.25±1.65 <sup>b</sup>	11.50±1.55 <sup>b</sup>	

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

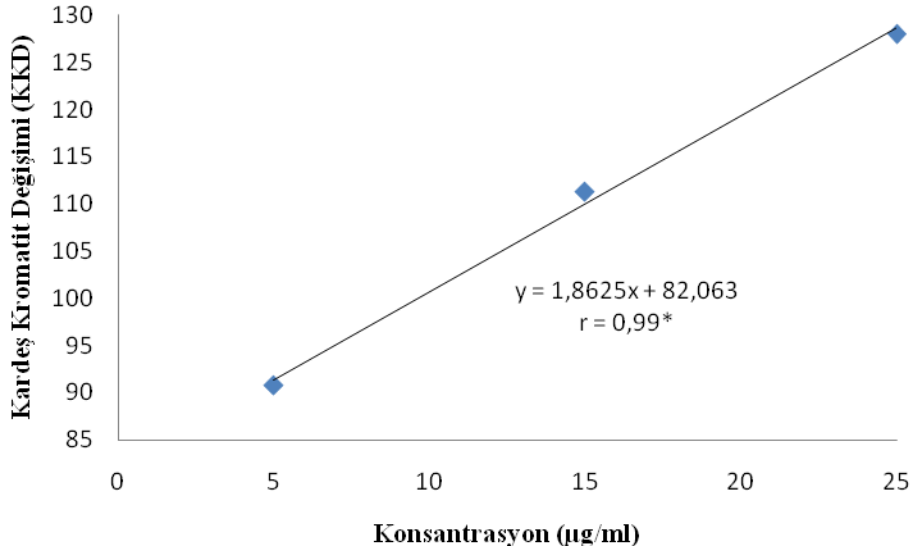
(P < 0.05)

KA: Kromozom anomallikleri, AH: Kromozom anomallikleri içeren anormal hücreler, MI: Mitotik indeks, K': Mitotik indeks, K'': Kromatid kırığı,

K'': Kromozom kırığı, F: Fragment, KKB: Kardeş kromatid birleşmesi, KD: Kromatid değişimi, P: Poliploidi

### 4.3.2. Loratadinin Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

LOR'in 5, 15 ve 25 µg/ml'lik konsantrasyonlarının insan periferik lenfositlerine 48 saatlik muamelesi sonucu, doz artışına bağlı olarak KKD oranının anlamlı ölçüde arttığı ve LOR dozları ile KKD değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir korelasyon olduğu bulunmuştur (Şekil 4.22).



(\*P<0.05)

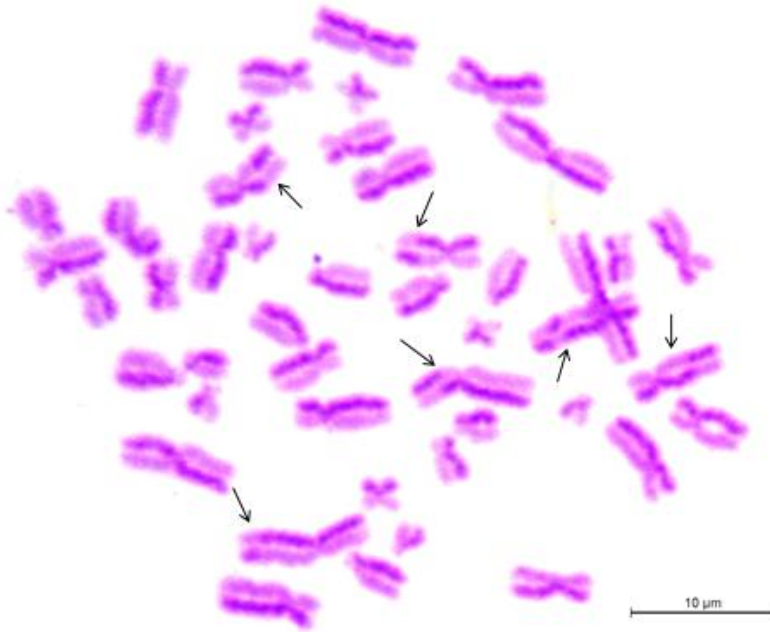
**Şekil 4.22.** Loratadinin test edilen dozları ile KKD arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı

LOR uygulamasına bağlı olarak ikinci mitoz safhasında metafaz kromozomlarında gözlenen KKD'ler Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28' de gösterilmiştir.

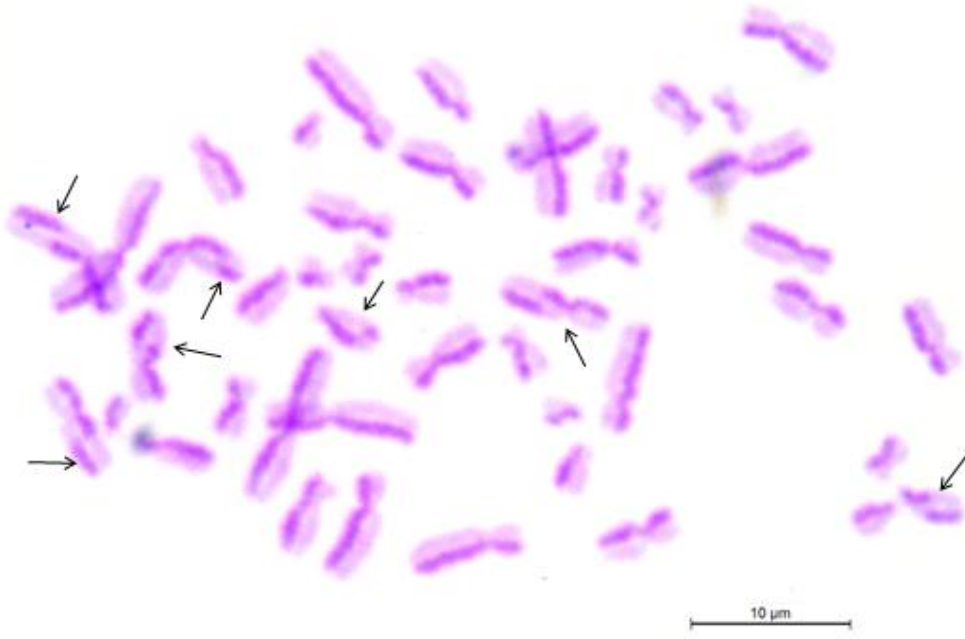
LOR'in 5, 15 ve 25 µg/ml'lik konsantrasyonlarını doz artışına bağlı olarak KKD frekansını artırmaya rağmen, LOR'in test edilen en düşük dozu olan 5 µg/ml'lik konsantrasyonda ortaya çıkan KKD frekansının negatif kontrole göre düşük olduğu bulunmuştur. LOR'in 15 ve 25 µg/ml'lik konsantrasyonlarında ise negatif kontrole göre yüksek KKD değerleri saptanmıştır. Fakat KKD frekansındaki bu artışlar negatif kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamda farklılık göstermemiştir. Ayrıca bu dozlarda KKD değerlerindeki bu artışlar istatistiksel olarak pozitif kontrole göre önemli derecede düşük bulunmuştur (P<0.05) (Çizelge 4.2).



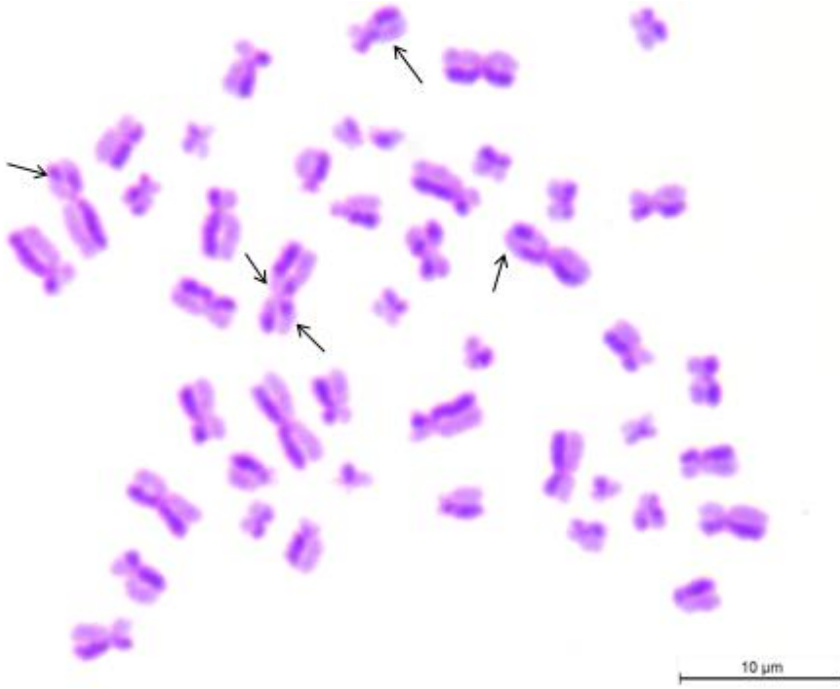
**Şekil 4.23.** 5 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler (X1000)



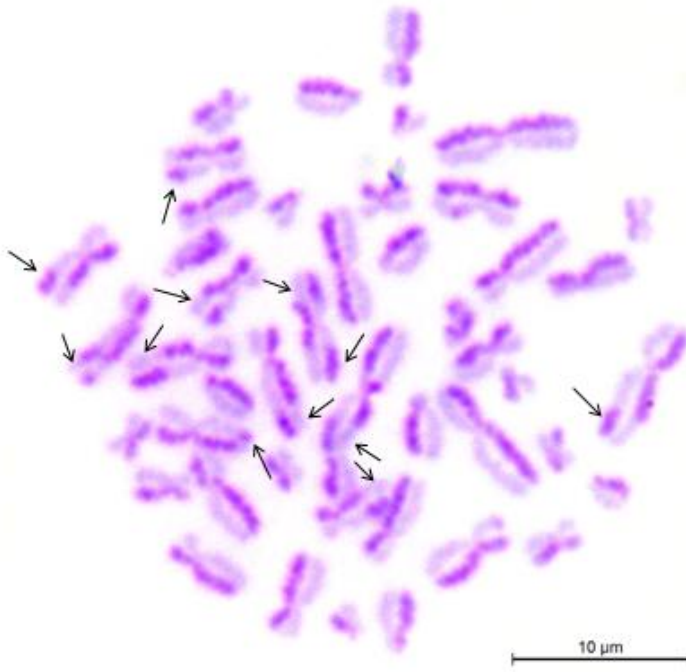
**Şekil 4.24.** 5 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler (X1000)



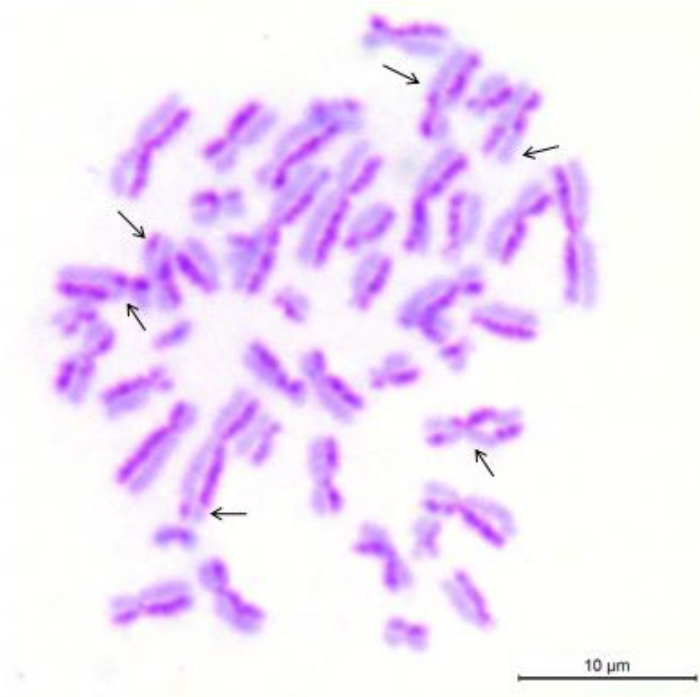
**Şekil 4.25.** 15 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler (X1000)



**Şekil 4.26.** 15 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler (X1000)



**Şekil 4.27.** 25 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler (X1000)



**Şekil 4.28.** 25 µg/ml konsantrasyondaki ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomlarında görülen KKD'ler (X1000)

**Çizelge 4.2.** Loratadinin 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
Loratadin	5 µg/ml	213	119	68	1.63±0.10	63-120	90.75±13.15 <sup>b</sup>
	15 µg/ml	200	167	33	1.58±0.09	61-138	111.25±17.42 <sup>b</sup>
	25 µg/ml	208	176	16	1.52±0.08	64-172	128.00±23.94 <sup>b</sup>

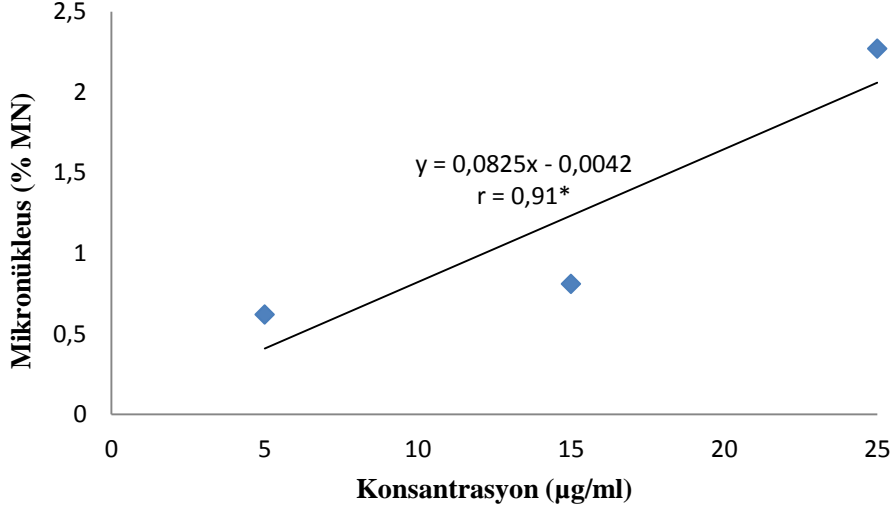
a: Negatif kontrol ile; b: Pozitif kontrol ile aradaki fark önemlidir.

( $P < 0.05$ )



### 4.3.3. Loratadinin Mikronükleus (MN) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

LOR'in 5, 15 ve 25 µg/ml konsantrasyonlarının insan periferal lenfositlerine 48 saatlik muameleleri sonucu LOR'in, doz artışına bağlı olarak MN oluşumunu anlamlı ölçüde uyardığı ve LOR dozları ile MN değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir korelasyon olduğu bulunmuştur (Şekil 4.29).

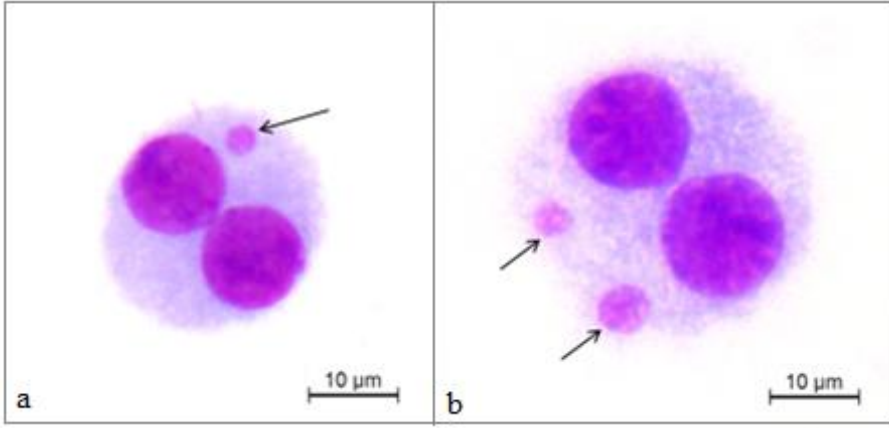


(\*P<0.05)

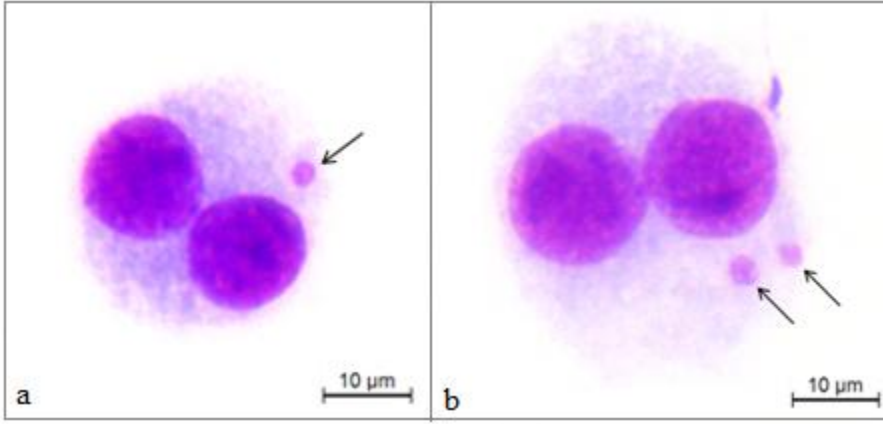
**Şekil 4.29.** Loratadinin test edilen dozları ile % MN arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı

LOR'in insan periferal lenfositlerine 48 saat muamelesi sonucu oluşan MNBN'ler Şekil 4.30, Şekil 4.31, Şekil 4.32' de gösterilmiştir.

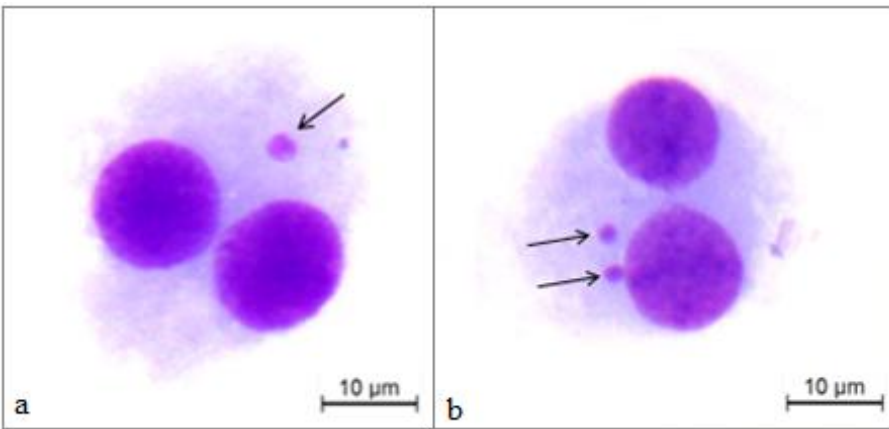
MN bulunduran BN (MNBN) hücrelerin sayısı ve yüzdesi, LOR dozunun artışına bağlı olarak artmasına rağmen, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında bu artışlar istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır (P<0.05). Ayrıca LOR'in 5 ve 15 µg/ml'lik konsantrasyonlarının uygulaması sonucu elde edilen değerler pozitif kontroller kadar etkili olmadığı halde, LOR'in test edilen en yüksek dozu olan 25 µg/ml'lik konsantrasyonda ortaya çıkan MN frekansı pozitif kontrol ile kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak önemli farklılık bulunmamıştır (p<0.05) (Çizelge 4.3). Bu nedenle test edilen en yüksek dozda LOR'in zayıf genotoksik bir profil sergilediği söylenilebilir.



**Şekil 4.30.** Bir mikronükleus (a) ve iki mikronükleus (b) içeren binükleat hücre (5 µg/ml) X400



**Şekil 4.31.** Bir mikronükleus (a) ve iki mikronükleus (b) içeren binükleat hücre (15 µg/ml) X400



**Şekil 4.32.** Bir mikronükleus (a) ve iki mikronükleus (b) içeren binükleat hücre (25 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	-	-	-	0.51±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
Loratadin	5 µg/ml	7950	49	1	-	-	0.62±0.06 <sup>b</sup>	1937	1923	64	76	1.56±0.06
	15 µg/ml	7935	60	4	1	-	0.81±0.10 <sup>b</sup>	2074	1877	25	24	1.49±0.01
	25 µg/ml	7818	179	3	-	-	2.27±1.26	2265	1719	6	10	1.44±0.07

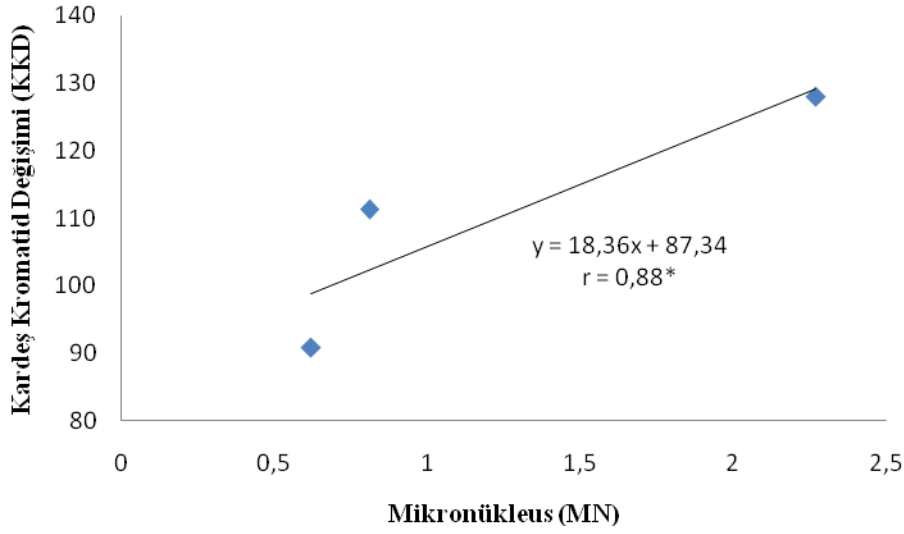
BN: Binükleat, MN: Mikronükleus, NBI: Nükleer bölünme indeksi

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

(p<0.05)

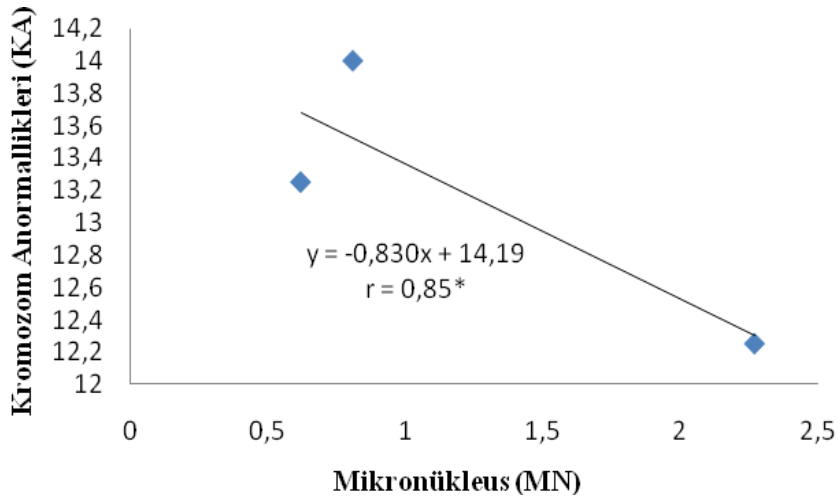
#### 4.4. Loratadin Dozlarına Bağlı Olarak KKD, KA ve MN Arasındaki İlişki

İnsan periferel lenfositlerine 48 saat boyunca uygulanan LOR'in doz artışına bağlı olarak MN ve KKD frekanslarını anlamlı ölçüde artırdığı saptanırken, KA frekansında doza bağlı artış görülmemiştir. Bu nedenle MN ve KKD değerleri arasında kısmen paralel bir ilişki bulunurken (Şekil 4.33), KA ile MN ve KA ile KKD değerleri arasında daha zayıf ilişkiler tespit edilmiştir (Şekil 4.34, Şekil 4.35). KA frekansındaki artışlar doza bağlı olmadığı için, KA ile KKD ve KA ile MN değerleri arasında istatistiksel olarak çok önemli korelasyon olmadığı saptanmıştır.



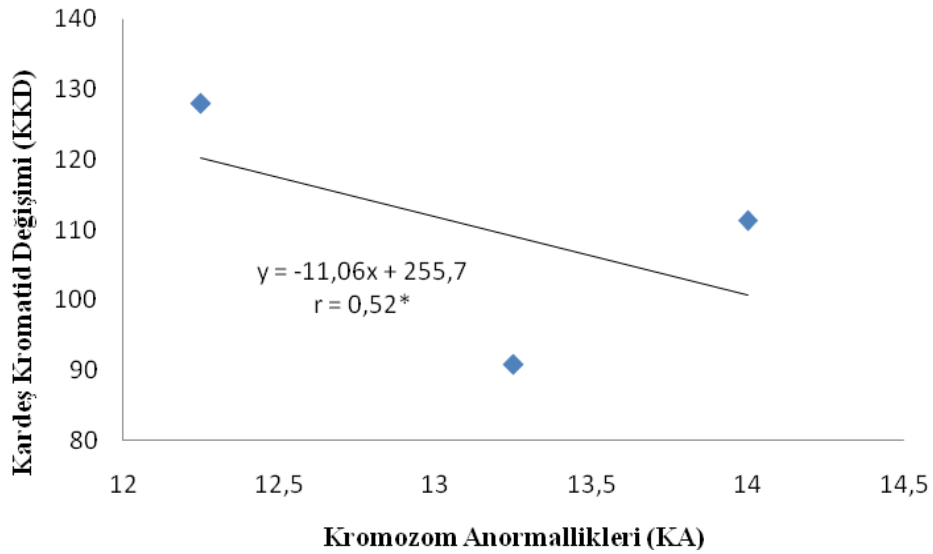
(\*P<0.05)

**Şekil 4.33.** Loratadinin test edilen dozları ile % MN ve KKD arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı



(\*P<0.05)

**Şekil 4.34.** Loratadinin test edilen dozları ile % MN ve % KA arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı



(\*P<0.05)

**Şekil 4.35.** Loratadinin test edilen dozları ile KA ve KKD arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayı

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, alerjik semptomların tedavisinde sıklıkla kullanılan loratadinin (LOR) *in vitro* sitotoksik ve genotoksik etkileri incelenmiştir. LOR'in genotoksisitesinin belirlenmesi amacıyla, sağlıklı bireylerden alınan periferik kan lenfositlerine *in vitro* KA, KKD ve MN testleri uygulanmıştır. Sitotoksisiteyi belirlemek için LOR'in PI, MI ve NBI üzerine etkileri ve bu parametrelerin birbirleri ile olan ilişkileri araştırılmıştır.

MI, hücre siklusunda metafazdaki hücre yüzdesini vermektedir. Azalmış MI, hücre siklusu ilerlemesinde inhibisyonu ve/veya proliferatif kapasitedeki kaybı göstermektedir (Gökalp Muranlı, 2006). Mitotik indeksteki düşme, hücre döngüsünün G2 fazının engellenmesi sebebiyle hücrenin mitozaya geçememesinden kaynaklanabilir. Diğer bir olasılık da ATP seviyesinin düşmesi ve enerji üretim merkezinin zorlanması olabilir. Maddelerin antimitotik aktivitesi, hücre döngüsüne özgü proteinlerin/enzimlerin inhibisyonu ile DNA sentezinin inhibisyonu veya iğ ipliklerinin oluşum, toplanma veya oryantasyonun inhibisyonundan da kaynaklı olabilir (Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006).

PI ve NBI ortalama değerleri hücre siklusu kinetiğinin ölçülmesini sağlamakta ve bu ölçümler belli kimyasal veya fiziksel ajanların sitotoksik etkileri hakkında önemli verileri yansıtmaktadır. Bu indekslerdeki anlamlı azalma, yeni bir DNA replikasyonu başlamadan önce indüklenen genotoksik hasarı onarmak üzere onarım sistemlerine izin veren hücre siklusu gecikmesini göstermektedir (Laffon ve ark., 2001; Gökalp Muranlı, 2006). NBI sitostatik etkinin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır ve NBI'ndeki anlamlı azalma, yeni bir DNA replikasyon sürecinden önce indüklenen genotoksik hasarın onarılması için onarım sistemlerine izin veren hücre siklusu gecikmesini göstermektedir (Laffon ve ark., 2001; Eke, 2007). Hücre bölünme kinetiğini ifade eden bir parametre olan PI, test edilen bileşiğin sitotoksisitesini 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).

LOR'in sitotoksisitesi ile ilgili yapılan bazı çalışmalarla bu ilacın çeşitli mekanizmaları değiştirerek antitümör etki gösterdiği belirtilmiştir (Chen ve ark., 2006). Terfenadin (1-20  $\mu\text{M}$ ) ve LOR (10-50  $\mu\text{M}$ )'in doza bağlı olarak insan primer neoplastik mast hücreleri ve insan mast hücre serisi HMC-1'de *in vitro* büyümeyi baskıladığı ve

apoptozisi indüklediği belirtilmiştir (Hadzijusufovic ve ark., 2010). İnsan kolon kanseri HT29 hücre serisine ait hücreler radyasyon verilmeden önce ve sonra farklı zamanlarda LOR'in farklı dozları ile muamele edilmiştir. LOR'in ile ön muamele edilen hücrelerde radyasyonun indüklediği sitotoksitenin daha çok arttığı bildirilmiştir. Radyasyonla uyarılmada olduğu gibi LOR'in de G2/M fazını alıkoyduğunu ve G2/M kontrol noktası ile uyumlu Serin/treonin-protein kinazı (Chk1) ve siklin B'nin ekspresyonunu azalttığını ve böylece bu hücrelerin *in vitro* büyümesini engellediğini belirtilmiştir. Radyasyonla indüklenen hasarın artışına ek olarak LOR ile muamele edilen hücrelerde de belirgin bir DNA hasarı tespit edilmiştir (Soule ve ark., 2010). Bu çalışmalar LOR'in kemoterapik potansiyeline sahip olduğunu ve kanser tedavisinde radyasyon duyarlılığını modifiye eden bir ajan olduğunu göstermektedir. Bizim çalışmamızda da test edilen tüm dozlarda LOR'in PI ve NBI'deki azalmalara bağlı olarak zayıf sitotoksik etki göstermesi, yüksek dozlarda MI'de istatistiksel olarak önemli düşüşler meydana getirmesi ve doz belirlemek için yaptığımız ön çalışmada 50 µg/ml konsantrasyondan sonra hiç bölünen hücreye rastlanmaması bakımından bu çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermektedir. Daha önceki çalışmalar ile uyumlu olarak bizim elde ettiğimiz sonuçlar da, LOR'in bazı insan hücreleri üzerinde bölünmeyi inhibe eden bir potansiyele sahip olabileceği fikrini desteklemektedir.

Hücre siklusu, çoğalmak (prolifere olmak) üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen ve bir dizi geçici biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreçtir. Bir sıklusa giren hücre, morfolojik ve genetik olarak birbirine tıpa tıpa benzeyen iki hücre oluşumuyla döngüyü tamamlar. Hücre proliferasyonu hücre siklusu içinde yer alan bazı kontrol noktaları (check-points) tarafından düzenli olarak kontrol edilir. Bu kontrol noktalarında varsa genetik defektler düzeltilir ve hücrenin sıklusa devam edip etmeyeceği kararı verilir. Hücre siklusunda, onkogenler ve tümör baskılayıcı genler (p53 ve Rb) olarak bilinen iki tip gen grubunun rolü vardır. Onkogenler, kanser gelişimini doğrudan ve dolaylı olarak etkileyen gen grubudur. Tümör baskılayıcı genler ise kanser gelişimini baskılayan genlerdir. Normal bir hücrede DNA hasarı olduğunda, p53 düzeyi artar ve hücre siklusunu G1 fazında inhibe ederek DNA onarımı için hücreye zaman kazandırır. Genel olarak, hücreler bir bölünme sinyali almadıkları sürece hücre siklusunun aktif (G1, G2, S ve M) fazlarına girmezler. Bu dinlenme periodları, siklin bağımlı kinazların ve tümör baskılayıcı proteinlerin aktivitelerinin azalmasıyla gerçekleşir. Radyasyon veya değişik mutajenlerle muamele

edilen hücrelerde DNA'da meydana gelen hasara göre hücre siklusu kontrol noktaları G1'den S fazına veya G2'den mitozu geçişi engeller. DNA'sı replike olmamış hücrelerde mitozu giriş kinaz komplekslerinin inaktivasyonu ile engellenir. Tanınan bu süreçte DNA hasar tamir edilemiyorsa hücre apoptozise gider (Vermeulen ve ark., 2003; Maddika ve ark., 2007; Cabadak, 2008; Foster, 2008). Bazı kanser tiplerine ait hücreler üzerinde yapılan çalışmalarda LOR'in, Serin/treonin-protein kinazı (Chk1) ve siklin B'nin ekspresyonunu azaltarak hücre döngüsünü G2/M fazında alıkoyması, hücrelerin *in vitro* büyümesini baskılaması, apoptozisi indüklemesi ve benzer şekilde bizim çalışmamızda da periferal lenfositlerde LOR'in sitotoksik etki göstermesi ve 50 µg/ml ile daha yüksek konsantrasyonlarda proliferasyonu tamamen inhibe etmesi, bu ilacın hücre döngüsü kontrol noktalarını denetleyen genler ve bu genlerin ürünleri üzerindeki etkileri ile ilgili daha detaylı çalışmaların yapılması gerekliliğini açıkça ortaya koymaktadır. Çünkü LOR'in hücre siklusunu kontrol eden genlerde mutasyona yol açmadan sadece ekspresyonu değiştirerek proliferasyonu engellediği tespit edilirse, bu ilacın antihistaminik olarak kullanımının yanı sıra uygun doz ve muamele süreleri belirlenerek kanser tedavisinde antineoplastik bir ilaç olarak kullanımı da düşünülebilir.

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 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 görülebilir. (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 anojenik 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).



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).

LOR'in genotoksisite ve karsinojenite bilgilerini içeren çok fazla sayıda çalışma bulunmamaktadır. Genotoksisite çalışmaları çoğunlukla ilaç piyasaya sürülürken yapılan araştırmalarla sınırlı kalmış olup, literatürde de yayınlanmamış bu raporlar refere edilmektedir (<http://www.toxnet.nlm.nih.gov>, 07.06.2012; [http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3737b\\_12\\_label-claritin.pdf](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3737b_12_label-claritin.pdf), 07.06.2012). Bu raporlarda LOR'in Ames testi, ratlarda UDS testi, insan periferik lenfositlerinde *in vitro* KA testi ve farelerde *in vivo* MN testleri ile yapılan çalışmalarda negatif sonuçların elde edildiği vurgulanmıştır. Fakat bu çalışmaların dozlarına ait herhangi bir bilgi verilmemiştir. Çin hamster hücrelerinde yapılan gen mutasyonu testinde negatif sonuca ulaşılrken, ilaç fare lenfoma testinde 10 µM dozun pozitif sonuç verdiği belirtilmiştir. Görüldüğü gibi LOR sadece fare lenfoma testinde pozitif sonuç vermiş, yapılan diğer testlerin hepsinde negatif sonuçlar elde edilmiştir. Negatif sonuç veren bu testlerin sonuçları bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgularla uyumlu görünmektedir. Rat ve farelerde karaciğer tümörlerinde yapılan uzun dönem karsinojenite çalışmalarda ise günde kg başına 10, 25 ve 40 mg dozlar kullanılmış ve ilacın karsinojenik etkisinin olduğu sonucuna varılmıştır. Buna rağmen dişi farelerdeki

karsinojenite testinde 40 mg olarak uygulanan dozda negatif etkinin olduğu sonucuna ulaşılmıştır (<http://www.toxnet.nlm.nih.gov>).

LOR'in genotoksisite ve karsinojenitesi ile ilgili çok fazla çalışma bulunmadığından, çalışma sonuçlarımız feksofenadin, siproheptadin, mizolastin, terfenadin, ebastin, astemizol ve LOR'in de içinde yer aldığı gibi piperidin grubu antihistaminiklerin genotoksisite sonuçlarıyla da karşılaştırılacaktır.

**Feksofenadinin** Ames testi, Çin hamster hücrelerinde gen mutasyonları testi, rat lenfositlerinde *in vitro* KA testi ve farelerde *in vivo* MN testi sonuçlarının negatif olduğu vurgulanmıştır. Rat ve farelerde yapılan uzun dönem karsinojenite çalışmalarında da aynı şekilde negatif sonuçlar elde edilmiştir (Physicians' Desk Reference, 2005). Feksofenadinin *in vitro* sitotoksik ve genotoksik etkisinin KA ve MN yöntemleriyle araştırıldığı bir çalışma, 50, 100 ve 150 µg/ml' lik konsantrasyonlara 24 ve 48 saatlik süreyle maruz bırakılan insan periferik lenfosit hücrelerinde feksofenadinin genotoksik etki göstermediği, fakat doz artışına bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiğini ortaya çıkarmıştır (Börçek Kasurka ve ark., 2011). Bu sonuçlara benzer olarak bizim çalışmamızda da LOR genotoksik etki göstermezken, PI ve NBI'e ait değerler hafifçe azaldığından ve özellikle yüksek dozlarda MI değerleri istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düştüğünden, LOR'in sitotoksik potansiyelinin olabileceğini düşündürmektedir.

**Siproheptadinin** Ames testinde negatif sonuç verdiği bildirilmiştir. Fakat kullanılan doz ile ilgili herhangi bir bilgi verilmemiştir. Çin hamster V79 hücrelerinde *in vitro* MN testi uygulanmış ve 30 µg/ml konsantrasyonda negatif sonuç verdiği vurgulanmıştır (Snyder, 1998). İnsan periferik lenfositlerinde genotoksisite ile ilgili yapılan *in vitro* KA testinde ise 0.2 mM konsantrasyon kullanılmış ve negatif sonuçlar elde edildiği belirtilmiştir (Hite ve ark., 1977; Snyder, 1998). Bizim çalışmamızda LOR'in genotoksik etki göstermemesi, bu çalışmaların bizim çalışmamızla benzer bir sonuç ortaya çıkardığını göstermektedir.

**Mizolastin'e** dair genotoksikoloji çalışmaları sadece Ames testine dayanmakta olup 5,000 µg dozda sonuçların negatif olduğu bildirilmiştir (Iwase ve ark., 1998; <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>). Yapılan bu çalışmada bizim çalışmamıza göre farklı bir metot kullanılmasına rağmen, bu çalışma sonucunda LOR'in mutajenik etkisinin görülmemesi bizim çalışmamızla benzer bir sonuç ortaya çıkarmıştır.

**Terfenadinin** genotoksisitesi ile ilgili yapılan Ames testinde 1 µg dozda, Çin hamster V79 hücrelerinde *in vitro* MN testinde 10 µg/ml dozda (Snyder, 1998) ve farede *in vivo* MN testinde 2 mg/kg/gün dozda sonuçların negatif olduğu belirtilmiştir (Gibson ve ark., 1982; <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>). Rat ve farelerde yapılan karsinojenite çalışmalarına bakıldığında ise 150 mg/kg/gün dozda şüpheli sonuçların elde edildiği bildirilmiştir (Gibson ve ark., 1982; <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>). Bu çalışmanın sonuçlarına göre, çalışmamızda LOR'in kullanılan en yüksek dozdaki hafif artış dışında MN frekansını artırmaması bu çalışma ile benzer bir sonuç elde edildiğini göstermektedir.

**Ebastinin** Ames testi, Çin hamster hücrelerinde gen mutasyonları testi, insan periferik lenfositlerinde *in vitro* KA testi, farelerde *in vivo* MN testi ve fare ile ratlar kullanılarak yapılan karsinojenite çalışmalarında negatif sonuçlar verdiği vurgulanmıştır. Fakat bu testlere ait doz bilgileri verilmemiştir (Snyder, 1998). Bu sonuçlara benzer olarak bizim çalışmamızda da LOR'in genotoksik etki göstermemesi yönünden uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

**Astemizol** Ames testi ile dominant ve resesif letal mutasyon testlerinde negatif sonuçlar verirken, ratlarda *in vivo* MN testinde şüpheli sonuç vermiştir ve bu testlerle ilgili kayıtlı doz bilgisi bulunmamaktadır (Mavournin ve ark., 1990; NCI/NTP Carcinogenesis Technical Report Series, 1999; <http://www.fda.gov.cder>). İnsan periferik lenfositlerinde *in vitro* KKD testinde 10 µM doz uygulanmış ve şüpheli sonuçlar elde edilmiştir (Tucker ve ark., 1993; <http://www.fda.gov.cder>). Fakat bizim çalışmamızda uygulanan tüm LOR dozlarında KKD frekansında istatistiksel anlamda önemli artışlar tespit edilmemiştir. Fare ve ratlarla yapılan uzun dönem karsinojenite testlerinde sırasıyla 400 ppm ve 800 ppm dozları kullanılmış ve sonuçlara göre bu ilacın karsinojenik olmadığı belirtilmiştir (<http://www.fda.gov.cder>). Ayrıca fare ve ratlarla yapılan farklı bir karsinojenite testinde ise günde kg başına 80 mg doz uygulanmış ve aynı şekilde karsinojenik etkinin bulunmadığı görülmüştür (Benze ve ark., 1995; <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>).

Görüldüğü gibi piperedin grubu antihistaminiklerle yapılan çalışmaların pek çoğunda, çalışılan antihistaminikler genotoksisite bakımından negatif sonuçlar vermiştir. Bizim çalışmamızda da LOR'in KKD, KA ve MN üzerindeki etkileri incelendiğinde, negatif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulunamamış ve pekçok çalışmanın sonuçlarına benzer şekilde negatif bir sonuç elde

edilmiştir. Bazı antihistaminiklerin nispeten zayıf genotoksik profil sergiledikleri ve bu durumun ilgili çalışmaları daha zor hale getirdiği ifade edilmiştir (Snyder, 1998). Bizim çalışmamızda da LOR'in test edilen en yüksek dozunda MN frekansındaki artış zayıf bir genotoksik etki olarak düşünülebilir ve daha detaylı çalışmaların yapılmasını gerektirebilir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İlaç etkileşimlerini ve istenmeyen yan etkileri en aza indirmek, tedavi için belirlenecek doz-maruziyet ilişkisini sağlam temellere dayandırmak ve genetik materyalde hasara neden olmayacak yeni ilaçların geliştirilebilmesi amacıyla, 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 ve çeşitli 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. Tüm dünyada kullanımı gittikçe yaygınlaşan ve insan sağlığı açısından risk oluşturup oluşturmadığı henüz belli olmayan pekçok ilaç etken maddesinin kullanımlarının kontrol altına alınması ve gerekli sınırlandırmaların yapılması, kanser vakalarının önlenmesi ve insan sağlığı için büyük öneme sahip olacaktır.

Kullanımları giderek artan ilaç gruplarından olan antihistaminik ilaçlardan bazıları piyasaya sunulduktan sonra istenmeyen ciddi etkileri nedeniyle piyasadan çekilmiştir. Bu nedenle yeni ilaç gruplarının etkinlik ve güvenilirlik açısından titizlikle değerlendirilmesi gerekmektedir. Antihistaminik ilaçların neden olduğu çeşitli yan etkiler arasında, sitotoksik, genotoksik ve kanserojenik etkilerinin değerlendirilmesi gerekliliği göz ardı edilmemelidir ve bu ilaçların satışa sunulması için gerekli onay alınmadan önce uygun genotoksisite ve karsinojenite çalışmalarının yapılması zorunlu kılınmalıdır.

Çalışmamız, alerji tedavisinde sıklıkla reçete edilen Loratadin (LOR) antihistaminikinin test edilen dozlarda genotoksik etkiye sahip olmadığını, ancak yüksek dozlarda MI'ı istatistiksel açıdan anlamlı derecede düşürmesi ve doz artışına bağlı olarak PI ile NBI'ı azaltmasından kaynaklanan zayıf sitositatik potansiyelinden dolayı LOR'in *in vitro* koşullarda sitotoksik olabileceği göstermektedir. Daha önceden yapılan çalışmalarda LOR'in bazı tümör hücrelerinde hücre bölünmesi üzerinde inhibitör etkisinin bulunduğu gösterilmesi bu düşüncemizi desteklemektedir. Sadece çalışmamızın sonuçlarına dayanarak LOR'in doğrudan sitotoksik ve genotoksik etkilerinin olmadığını söylemek yetersizdir. Çünkü LOR'in doza bağlı olarak artan sitotoksik etkisi, genotoksik ve dolaylı olarak karsinojenik etki için potansiyel bir zemin

hazırlamaktadır. Çünkü kronik alerji durumlarında uzun süre ilaçla tedavi gören hastalarda şikayetlerinin artması durumunda bazen ilaç dozunun artırılması gerekmektedir. Bu nedenle doz artışı ve ilaca maruz kalınan sürenin uzaması beraberinde, insanlarda antihistaminiklerin risk oranının da gözden geçirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır. Çünkü ilaçlar, tedavi amacıyla kullanılırken doz artışı ve maruziyet süresine bağlı olarak genotoksik hasarlara da yol açabilirler. Ayrıca çeşitli tümör hücreleri üzerinde bilinen sitotoksik etkisinden dolayı LOR'in, doğrudan tümör gelişimini durdurmasa bile bölünmeyi engellemesi özelliğinden dolayı, uygun doz ve muamele sürelerinde antitümöral olarak kullanımı ile ilgili daha detaylı çalışmalar yapılmasının faydalı olacağı düşüncesindeyiz.

Sonuç olarak LOR'in sitotoksitesi, genotoksitesi ve karsinojenitesi hakkında kesin yargıya varmak için çeşitli hücreler üzerinde daha detaylı *in vitro* ve *in vivo* sitogenetik çalışmaların yapılması; bu ilacın hücre bölünmesi üzerindeki etkileri, sitotoksik, genotoksik ve apoptotik etkileri arasındaki ilişkinin belirlenmesini ve bu ilacın kullanımı ile ilgili yeni düzenlemelerin yapılabilmesi bakımından daha çok bilgi sahibi olmamızı sağlayacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

- 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(2), 11-172.
- Althaus, F.R., Lawrence, S.D., Sattler, G.L., Pitot, H.C., 1982. DNA damage induced by the antihistaminic drug methapyrilene hydrochloride. *Mutation Research*, 103(3-6), 213-218.
- Anderson D., Jenkinson P.C., Dewdney R.S., Franis A.J., Godbert P., Butterworth K.R., 1988. Chromosome aberrations, mitogen-induced blastogenesis and proliferative rate index in peripheral lymphocytes from 106 control individuals of u.k. population. *Mutation Research*, 204, 407-420.
- Anderson, B.E., Zeiger, E., Shelby, M.D., Resnick, M.A., Gaulati, D.K., Ivett, J.L., Loveday, K.S., 1990. Chromosome aberration and sister chromatid exchange test results with 42 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 16(18), 55-137.
- Andrews, A.W., Lijinsky, W., Snyder, S.W., 1984. Mutagenicity of amine drugs and their products of nitrosation. *Mutation Research*, 135(2), 105-108.
- Arshad, S.H., 1997. Development of allergic disease in children. *Clinical & Experimental Allergy*, 27, 1231-1233.
- Arshad, S.H., Tariq, S.M., Matthews, S., Hakim, E., 2003. Sensitization to common allergens and its association with allergic disorders at age 4 years: a whole population birth cohort study. *Pediatrics*, 108(2), 1-8.
- Ashby, J., Callander, R.D., Paton, D., Zeiger, E., Ratpan, F., 1988. Weak and unexpected mutagenicity to *Salmonella* of the rat hepatocarcinogen methapyrilene. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 12(2), 243-252.
- Atlı Şekeroğlu, Z., Şekeroğlu, V., 2011. Genetik toksisite testleri. *Tübav Bilim Dergisi*, 4(3), 221-229.
- Bachert, C., 1998. Histamine-a major role in allergy? *Clinical & Experimental Allergy*, 28(6), 15-19.
- Banerjee, S., Fallis, A.G., Brown, D.L., 1997. Differential effects of taxol on two human cancer cell lines. *Oncology Research*, 9(5), 237-248.
- Bayel, İ., 2006. Terbinafin'in insan lenfosit kültürlerindeki etkilerinin kardeş kromatid değişimi (sister chromatid exchange) yöntemi ile *in vitro* araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin, 61 s.

- Beasley, R., 1998. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic eczema: ISAAC. *The Lancet.*, 351, 1225–1232.
- Bedir, A., Bilgici, B., Yurdakul, Z., Gürsel, B.Ş., Alvir, M., 2004. DNA hasarı analizinde  $\mu$ -fadu ve comet yöntemlerinin karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2(3), 97-103.
- Benze, J., Gypen, L., Vanderberghe, J., Lampo, A., De Coster, R., Bowden, C., Van Cauteren, H., 1995. Carcinogenicity studies of astemizole in mice and rats. *Cancer Research*, 55, 5589-5594.
- Bernstein, J.A., 2002. Antihistamines. In: *Patterson's Allergic Disease*. (Editörler: L.C. Grammer, P.A. Greenberger), s: 65-79, Lippincott Williams&Wilkins, USA.
- Best, C.H., Dale, H.H., Dudley, H.W., Tharpe, W.V., 1927. The nature of the vasodilator constituents of certain tissue extracts. *Journal of Physiology (London)* 62, 397-417.
- Bousquet, J., Chanal, I., Skassa-Brociek, W., Lemonier, C., Michel, F.B., 1990. Lack of subsensitivity to loratadine during long-term dosing during 12 weeks. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 86(2), 248-253.
- Börçek Kasurka, C., 2010. Antihistaminik ilaç olarak kullanılan feksofenadin etken maddesinin insan periferik lenfositleri üzerindeki genotoksik etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ordu, 84 s.
- Brambilla, G., Mattioli, F., Martelli, A., 2009. Genotoxic and carcinogenic effects of antipsychotics and antidepressants. *Toxicology*, 261, 77–88.
- Brambilla, G., Mattioli, F., Robbiano, L., Martelli, A., 2011. Genotoxicity and carcinogenicity studies of antihistamines. *Archives of Toxicology*, 85(10), 1173-1187.
- Braun-Falco, O., Plewig, G., Wolff, H.H., Burgdorf, W.H.C., 2000. *Dermatology*. Springer, Second Ed., 1747-1766 s, Berlin.
- Budroe, J.D., Shaddock, J.G., Casciano, D.A., 1984. A study of the potential genotoxicity of methapyrilene and related antihistamines using the hepatocyte/DNA repair assay. *Mutation Research*, 135(2), 131-137.
- Burkhalter, A., Frick, O.L., 1989. Histamine, serotonin and the ergot alkaloids. *Basic and Clinical Pharmacology*. (Editör: B.G. Katzung), Appleton and Lange, 4. Edition, 199-216s, San Francisco.
- Büyükleyla, M., 2007. Thymol'ün insan periferik lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi, kromozom anormallığı ve mikronükleus oluşumu üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 77 s.



- Cabadak, H., 2008. Hücre siklusu ve kanser. ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi, 9(3), 51-61.
- Canbolat, F., 2007. Birinci basamak sağlık kuruluşlarına başvuran hastalarda ilaç kullanım alışkanlıklarının ve reçete maliyetlerinin değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Konya Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Carrano, A.V., Natarajan, A.T., 1988. Consideration for population monitoring using cytogenetic techniques. Mutation Research, 204(3), 379-406.
- Casciano, D.A., Schol, H.M., 1984. Methapyrilene is inactive in the hepatocyte-mediated Chinese hamster ovary/hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase mutational assay. Cancer Letters, 21(3), 337-341.
- Casciano, D.A., Talaska, G., Clive, D., 1991. The potent carcinogen methapyrilene induces mutations in the L5178Y mouse lymphoma cells in the apparent absence of DNA adduct formation. Mutation Research, 263(2), 127-132.
- Chen, J.S., Lin, S.Y., Tso, W.L., Yeh, G.C., Lee, W.S., Tseng, H., Chen, L.C., Ho, Y.S., 2006. Checkpoint kinase 1-mediated phosphorylation of cdc25C and bad proteins are involved in antitumor effects of loratadine-induced G2/M phase cell-cycle arrest and apoptosis. Molecular Carcinogenesis, 45(7), 461-478.
- 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.
- Choy, W.N., 2001. *Genetic Toxicology And Cancer Risk Assessment*. Marcel Dekker Inc., 390s, New York.
- Church, M.K., 2004. Histamine receptors, inverse agonism and allergy. Journal of the World Allergy Organization, 16(3), 112-116.
- Dale, H.H., Laidlaw, P.P., 1910. The physiological action of  $\beta$ -imidazolyethylamine. Journal of Physiology (London), 41, 318-344.
- Davila, J.C., Rodriguez, R.J., Melchert, R.B., Acosta, D., 1998. Predictive value of *in vitro* models, systems in toxicology. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 38, 63-96.
- Del Valle, J., Gantz, I., 1997. Novel insights into histamine H2 receptor biology. American Journal of Physiology, 273, 987-996.
- Dökmeçi, F., 1992. *Farmakoloji*. Nobel Tıp Kitabevi, 561-574s, İstanbul.
- Du Buske, L.M., 2002. *Antihistamines: A comparative assesment*. Handouts on CD-Rom, AAAAI 58th Annual Meeting, March 1-6, New York City, USA.

- Eke, D., 2007. Thimerosal'in insan lenfosit hücre kültürlerinde genotoksik, mutajenik ve toksik etkilerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin, 91 s.
- EPA, 1998. *In vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*. Health Effects Test Guidelines.
- Estelle, F., Simons, R., 1999. H1-receptor antagonists: safety issues. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 83(5), 481-488.
- Evans, H.J., 1984. Handbook of Mutagenicity Test Procedures. *In: Human peripheral blood 63 lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests*. (Editörler: B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel), s: 405-427, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Fadel, R., Herpin-Richard, N., Dufresne, F., Rihoux, J.P., 1990. Pharmacological modulation by cetirizine and loratadine of antigen and histamine-induced skin wheals and flares and late accumulation of eosinophils. *Journal of International Medical Research*, 18, 366-371.
- FDA, 2006. U.S. Food and Drug Administration, Redbook 2000: *IV.C.1.c Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay*. Department of Health and Human Services, U.S.
- Fenech, M., 1997. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 392(1-2), 11-18.
- Fenech, M., 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*, 455(1-2), 81-95.
- 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. *Mutation Research*, 428(1-2), 271-283.
- Fenech, M., Morley, A.A., 1985. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus Assay. *Cytobios*, 43(172-173), 233-246.
- Foster, I., 2008. Cancer: A cell cycle defect. *Radiography*, 14(2), 144-149.
- Fujioka, Y., Maizumi, H., 1983. Further studies on mutagenicity of chlorpromazine and promethazine. *Shigaku*, 71, 141-142.
- Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpou, J., Margolin, B.H., Resnick, M.A., Anderson, B., Zeiger, E., 1987. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: evaluations of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 10(10), 1-35.

- Garrison, J.C., 1990. Histamin, bradykinin, 5-hydroxytryptamine and their antagonists. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. (Editörler: A.G. Gilman, T.W. Rall, A.S. Nies, P. Taylor), Pergamon Press, 8. Edition, 575-599s, Newyork.
- Gelişken, R., 2008. Adana' daki ev içi mantarlardan protein ekstratlarının hazırlanması ve alerjik taramada yararlanılan deri testinde kullanılabilirliği. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 103 s.
- Gibson, J.P., Huffmann, K.W., Newberne, J.W., 1982. Preclinical safety studies with terfenadine. *Arzneimittel-Forschung*, 32(9), 1179-1184.
- Gocke, E., 1996. Review of the genotoxic properties of chlorpromazine and related phenothiazines. *Mutation Research*, 366(1), 9-21.
- Gompel, J.V., Woestenborghs, F., Beerens, D., Mackie, C., Cahill, P.A., Knight, A.W., Billinton, N., Tweats, D.J., Walmsley, R.M., 2005. An assessment of the utility of the yeast GreenScreen assay in pharmaceutical screening. *Mutagenesis*, 20(6), 449-454.
- Gökalp Muranlı, F.D., 2006. Kültürü yapılan insan lenfositlerinde triasulfuron'un genotoksik etkileri. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, Edirne, 98 s.
- Grant, J.A., Danielson, L., Rihoux, J.P., De Vos, C., 1999. A double-blind, single-dose, crossover comparison of cetirizine, ebastine, fexofenadine, terfenadine and loratadine terfenadine, versus placebo: suppression of histamine-induced skin wheal and flare response for 24 hours in healthy male subjects. *Allergy*, 54(7), 700-707.
- Greaves, W.M., 2001. Antihistamines. *Dermatologic Clinics*, (19)1, 53-61.
- Greenman, D.L., Allen, R., Dahlgren, R., Cronin, G.M., Allaben, W.T., 1995a. Chronic toxicity/carcinogenicity study of pyrilamine in B6C3F1 mice. *Journal of the American College of Toxicology*, 14(2), 148-157.
- Greenman, D.L., Cronin, G.M., Dahlgren, R., Allen, R., Allaben, W., 1995b. Chronic feeding study of pyrilamine in fisher 344 rats. *Toxicological Science*, 25(1), 1-8.
- Greenman, D.L., Sheldon, W., Schieferstein, G., Allen, R., Allaben, W.T., 1995c. Chronic study of triprolidine for oncogenicity in mice. *Toxicological Science*, 25(1), 138-145.
- Greenman, D.L., Sheldon, W., Schieferstein, G., Allen, R., Allaben, W.T., 1995d. Triprolidine: 104-week feeding study in rats. *Toxicological Sciences*, 27(2), 223-231.
- Habs, M., Shubik, P., Eisenbrand, G., 1986. Carcinogenicity of methapyrilene hydrochloride, mepyramine hydrochloride, thenyldiamine, hydrochloride, and

pyribenzamine hydrochloride in Sprague-Dawley rats. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 111(1), 71-74.

Hadzijusufovic, E., Peter, B., Gleixner, K.V., Schuch, K., Pickl, W.F., Thaiwong, T., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Mirkina, I., Willmann, M., Valent, P., 2010. H1-receptor antagonists terfenadine and loratadine inhibit spontaneous growth of neoplastic mast cells. *Experimental Hematology*, 38(10), 896-907.

Handley, A.D., Magnetti, A., Higgins, A.J., 1998. Therapeutic advantages of third generation antihistamines. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 7, 1045-1054.

Hansen, E.B., Cerniglia, C.E., Korfmacher, W.A., Miller, D.W., Heflich, R.H., 1987. Microbial transformation of the antihistamine pyrilamine maleate. Formation of potential mammalian metabolites. *Drug Metabolism and Disposition*, 15(1), 97-106.

Hansen, E.B., Jr, Heflich, R.H., Korfmacher, W.A., Miller, D.W., 1988. Microbial transformation of the antihistaminic drug triprolidine hydrochloride. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77(3), 259-264.

Hill, S.J., 1990. Distribution, properties and functional characteristics of three classes of histamine receptors. *Pharmacological Reviews*, 42, 45-81.

Hite, M., Algon, J., Peck, H.M., 1977. The effect of cyproheptadine on the chromosomes of human lymphocytes *in vitro*. *Arzneimittel-Forschung*, 27(6), 1203-1206.

Horak, F., Jager, S., Berger, U., 1992. Onset and duration on effects of three antihistamines in current use. astemizole. loratadine and terfenadine forte studied during prolonged controlled allergen challenges in volunteers. *Journal of International Medical Research*, 20(5), 422-434.

<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=11204>, 16.02.2010.

<http://www.1ilac.com/ilaclar/Biofarma/Alarin.Tablet.htm>, 04.06.2012.

<http://www.fda.gov/cder>, 07.06.2012.

[http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3737b\\_12\\_label-claritin.pdf](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3737b_12_label-claritin.pdf), 07.06.2012.

<http://www.ilacbilgi.com/ac/AlarinTb.htm>, 04.06.2012.

<http://www.potency.berkeley.edu>, 07.06.2012.

<http://www.toxnet.nlm.nih.gov>, 07.06.2012.

- Iwase, Y., Uno, Y., Ohkouchi, A., Molinier, B., Simonnard, A., Lebrun, C., Moysan, F., 1998. Mutagenicity and clastogenicity studies with mizolastine. *Yakuri to Chiryo*, 26(4), 663-672.
- Iype, P.T., Ray-Chaudhuri, R., Lijinsky, W., Kelley, S.P., 1982. Inability of methapyrilene to induce sister chromatid exchanges *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Research*, 42, 4614-4618.
- İnal, A., Ufuk Altıntaş, D., 2005. Histamin reseptörleri. *Astım Allerji İmmünoloji*, 3(3), 138-147.
- Jackson, C.D., Blackwell, B.N., 1993. Two-year toxicity study of doxylamine succinate in the fisher 344 rat. *International Journal of Toxicology*, 12(1), 1-11.
- Jackson, C.D., Sheldon, W., 1993. Two-year toxicity study of doxylamine succinate in B6C3F1 mice. *Journal of the American College of Toxicology*, 124, 311-321.
- Kadıköylü, S., 2007. Alerjik rinitli hastalarda mevsimsel bronşial hiperreaktivite değişimi. Uzmanlık Tezi, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Anabilim Dalı, Denizli, 46 s.
- Kaleli, E., 2010. Loratadin'den desloratadin sentezi ve polimorfik yapılarının incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 94 s.
- Kaliner, M.A., 1992. Nonsedatign antihistamines: pharmacology clinical efficacy and adverse effects. *American Family Physician*, 45(3), 1337-1342.
- Karaman, Ö., Ünal, N., Karaman, M., 1994. Anafilaktik tip (ani tip) hipersensitivite reaksiyonu. *Medikal Dergi*, 100, 16-17.
- Kassem, N., Roman, I., Gurel, R., Dyer, J.G., Robillard, N., 1988. Effects of loratadine (sch 29851) in suppression of histamine-induced skin wheals. *Annals of Allergy*, 60(6), 505-507.
- Kathiresan, K., Vijin, P., Moorthi, C., Manavalan, R., 2010. Formulation and evaluation of loratadine chewable tablets. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 1(4), 763-774.
- Kay, G.G., Harris, A.G., 1999. Loratadine: a non-sedating antihistamine. Review of its effects on cognition, psychomotor performance, mood and sedation. *Clinical & Experimental Allergy*, 3, 147-150.
- Kayaalp, O., 1986. *Tıbbi Farmakoloji*. Ulucan Matbaası, 2260-2291s, Ankara.
- Kayaalp, S.O., 1990. Histamin ve Antihistaminikler. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. (Editör: S.O. Kayaalp), s: 2804-2843, Feryal Matbağacılık Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi, Ankara.

- Kiremitçi, Ü., 2004. Antihistaminikler ve Dermatolojide Kullanımı. İstanbul Tıp Dergisi, 4, 25-28.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E. and 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, Vol.: 140-141, p: 63-74.
- Kokuludağ, A., 2002. Alerjik rinitli ve astımlı hastalarda zeytin alerjisinin önemi. Alerji Uzmanlık Tezi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir, 34 s.
- Kontaş, S., Atlı Şekeroğlu, Z., Şekeroğlu, V., 2011. Kardeş kromatid değişimi testi ve kullanım alanları. Tübav Bilim Dergisi, 4(4), 226-234.
- Kontou-Fili, K., Paleologos, G., Herakleous, M., 1989. Suppression of histamine-induced skin reactions by loratadine and cetirizine dihydrochloride. European Journal of Clinical Pharmacology, 36(6), 617-619.
- Krause, H., 1992. Antihistamines and decongestants. Otolaryngology - Head and Neck Surgery, 107(6), 835-840.
- Kubinski, H., Gutzke, G.E., Kubinski, Z.O., 1981. DNA-cell-binding (DCB) assay for suspected carcinogens and mutagens. Mutation Research, 89(2), 95-136.
- 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., Schreck, R.R., 1980. Sister chromatid exchange analysis. The American Journal of Human Genetics, 32, 297-313.
- Latt, S.A., Sehrek, R.R., Loveday, K.S., Dougherty, C.P., Schuler, C. F., 1980. Sister chromatid exchange. The American Journal of Human Genetics, 10, 267-331.
- Leurs, R., Watanabe, T., Timmerman, H., 2001. Histamine receptors are finally "coming out". Trends Pharmacological Science, 22, 337-339.
- Li, J.J., Douglas, S.J., Sliskovic, D.R., Roth, B.D., 2004. *Contemporary Drug Synthesis*. Wiley & Sons Inc., 41-47s, New Jersey.
- Lijinsky, W., 1984a. Induction of tumours in rats by feeding nitrosatable amines together with sodium nitrite. Food and Chemical Toxicology, 22(9), 715-720.

- Lijinsky, W., 1984b. Chronic toxicity tests of pyrilamine maleate and methapyrilene hydrochloride in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, 22(1), 27-30.
- Lijinsky, W., Yamashita, K., 1988. Lack of binding of methapyrilene and similar antihistamines to rat liver DNA examined by <sup>32</sup>P postlabeling. *Cancer Research*, 48, 6475-6477.
- Liu, C., Ma, X.J., Jiang, X., Wilson S.J., Hofstra C.L., Blevitt J., Pyati J., Li X., Chai W., Carruthers N., Lovenberg T.W., 2001. Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H4) expressed in bone marrow. *Molecular Pharmacology*, 59, 420-426.
- Loveday, K.S., Lugo, M.H., Resnick, M.A., Anderson, B.E., Zeiger, E., 1989. Chromosome aberration and sister chromatid exchange tests in Chinese hamster ovary cells *in vitro*: II. Results with 20 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 13(1), 60-94.
- Mace, M.L.J., Daskal, Y., Wray, W., 1978. Scanning electron microscopy of chromosome aberrations. *Mutation Research*, 52, 199-206.
- Maddika, S., Ande, S.R., Panigrahi, S., Paranjothy, T., Weglarczyk, K., Zuse, A., Eshraghi, M., Manda, K.D., Wiechec, E., Los, M., 2007. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are inter connected: Implications for cancer therapy. *Drug Resistance Updates*, 10(1-2), 13-29.
- Madle, S., Dean, S.W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C.A., Mori, H., 1994. Recommendations for the performance of UDS tests *in vitro* and *in vivo*. *Mutation Research*, 312(3), 263-285.
- Martelli, A., Cajelli, E., Pino, A., Robbiano, L., Brambilla, G., 1984. DNA damage and repair induced in rat hepatocytes primary cultures by five antihistamines and their nitrosation products. *ICRS Medical Science*, 12, 1054-1055.
- 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), 1515-1531.
- 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(1), 29-80.
- McGregor, D.B., Brown, A.G., Howgate, S., McBride, D., Riach, C., Caspary, W.J., 1991. Responses of the L5178Y mouse lymphoma cell forward mutation assay. V: 27 coded chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 17(3), 196-219.
- Mirsalis, J.C., 1987. Genotoxicity, toxicity, and carcinogenicity of the antihistamine methapyrilene. *Mutation Research*, 185(3), 309-317.

- Mortelmans, K., Haworth, S., Lawlor, T., Speck, K., Tainer, B., Zeiger, E., 1986. Salmonella mutagenicity tests: II. Results from the testing of 270 chemicals. *Environmental Mutagenesis*, 8(7), 56-119.
- Mortelmans, K., Rupa, S.D., 2004. Current issues in genetic toxicology testing for microbiologists. *Advances in Applied Microbiology*, 56, 379-401.
- Motohashi, N., Kurihara, T., Kawase, M., Hever, A., Tanaka, M., Szabo, A., Nacs, J., Yamanaka, W., Kerim, A., Molnar, J., 1997. Drug resistance reversal, anti-mutagenicity and antiretroviral effect of phthalimido and chloroethyl-phenothiazines. *Anticancer Research*, 17(5), 3537-3543.
- Müller, L., Korta, A., Madle, S., 1989. Mutagenicity testing of doxylamine succinate, an anti-nauseant drug. *Toxicology Letters*, 49(1), 79-86.
- Natarajan, A.T., Obe, G., 1982. Mutagenicity testing with cultured mammalian cells: Cytogenetic assays. *In: Mutagenicity, new horizons in genetic toxicology.* (Editors: J.E. Heddle), s: 172-213, Academic Press, New York.
- National Toxicology Program, 1989. Toxicology and carcinogenesis studies of diphenhydramine hydrochloride (CAS No. 147-24-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies). National Toxicology Program, Tech Rep Ser 355.
- NCI/NTP Carcinogenesis Technical Report Series, 1999. National cancer institute/national toxicology program; US Department of Health and Human Services, TR-485.
- Nguyen, T., Shapiro, D.A., George, S.R., Setola V., Lee D.K., Cheng R., Rauser L., Lee S.P., Lynch K.R., Roth B.L., O'Dowd B.F., 2001. Discovery of a novel member of the histamine receptor (H4) expressed in bone marrow. *Molecular Pharmacology*, 59(3), 427-433.
- Nias, A.H.W., 1998. *An Introduction To Radiobiology*. Chichester, Second Edition, s: 400, England.
- Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, L., Hagmard, L., Stromberg, U., Rossner, P., Boffetta, P., Lindholm, C., Gundy, S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Sram, R.J., Knudsen, L.E., Barale, R., Fucic, A. 2006. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutation Research*, 600(1-2), 37-45.
- Norppa, H., Falck, G.C.M., 2003. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis*, 18(3), 221-233.
- Oberly, T.J., Bewsey, B.J., Probst, G.S., 1984. An evaluation of the L5178Y TK ± mouse lymphoma forward mutation assay using 42 chemicals. *Mutation Research*, 125(2), 291-306.



- Oberly, T.J., Scheuring, J.C., Richardson, K.A., Richardson, F.C., Garriot, M.L., 1993. The evaluation of methapyrilene for bacterial mutation with metabolic activation by Aroclor-induced, methapyrilene- induced and noninduced rat-liver S9. *Mutation Research*, 299(2), 77-84.
- Oda, T., Morikawa, N., Saito, Y., Masuho, Y., Matsumoto, S., 2000. Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 36781-36786.
- Özata, M., Mete, M., Aslan, Ş., 2007. Rasyonel İlaç Kullanımının Hasta Güvenliğine Etkileri: Hekimlerin Rasyonel İlaç Kullanımına Yönelik Tutumlarının Sorgulanması. I.Uluslararası Hasta Güvenliği Kongresi, Antalya.
- Özlüoğlu, L.N., Saydam, L., Kızılay, A., 1994. Antihistaminikler. *K.B.B. ve Baş Boyun Cerrahisi Dergisi*, 2(1), 71-74.
- Paz-y-Mino, C., Bustamante, G., Sanchez, M.E., Leone, P.E., 2002. Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in Ecuador. *Environ. Health Perspective*, 110(11), 1077-1080.
- Physicians Desk reference, 2005. 59th ed. Thomson PDR, Montvale.
- Pineyro-Lopez, A., Pineyro-Garza, E., Torres-Alanis, O., Reyes-Araiza, R., Gomez Silva, M., Wacksman, N., Lujan Rangel, R., de Lago, A., Trejo, D., Gonzalez-de la Parra, M., Namur, S., 2006. Bioavailability of two oral formulations of loratadine 20 mg with concomitant ketoconazole: an open-label, randomized, two-period crossover comparison in healthy mexican adult volunteers. *Clinical Therapeutics*, 28(1), 110-115.
- Probst, G.S., Neal, S.B., 1980. The induction of unscheduled DNA synthesis by antihistamines in primary hepatocyte cultures. *Cancer Letters*, 10(1), 67-73.
- 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(6), 873-903.
- Robbiano, L., Gazzaniga, G.M., Martelli, A., Pino, A., Brambilla, G., 1986. DNA-damaging activity of tripeleennamine in primary cultures of human hepatocytes. *Mutation Research*, 173(3), 229-232.
- Robinson, M.K., Cohen, C., Fraissinette, A.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), 573-592.
- Roman, I.J., Kassem, N., Gurel, R.P., Herron, J., 1986. Suppression of histamine-induced wheals response by loratadine (sch 29851) over 28 days in man. *Annals of Allergy*, 57(4), 253-256.

- 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.
- Savage, J.R.K., 1993. Update on target theory as applied to chromosomal aberrations. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 22(4), 198-207.
- Saygı, Ş., 2003. Deneysel toksikolojide toksisite testleri ve test sonuçlarının önemi. *Gülhane Tıp Dergisi*, 45(3), 291-298.
- Schlicker, E., Malinowska, B., Kathmann, M., Gothert, M., 1994. Modulation of neurotransmitter release via histamine H<sub>3</sub> heteroreceptors. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 8, 128-137.
- Schwartz, J.C., Arrang, J.M., Garbarg, M., Pollard, H., Ruat, M., 1991. Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiological Reviews*, 71(1), 1-51.
- Simons, F.E.R., 1999. Mizolastine: antihistaminic activity from preclinical data to clinical evaluation. *Clinical Experimental Allergy*, 29, 3-8.
- Simons, F.E.R., 2002. Histamine and H<sub>1</sub>-Antihistamines in Allergic Disease. *Clinical Allergy and Immunology*, (Editor: M.A. Kaliner), CRC Press, Second Edition, 497s, New York.
- Simons, F.E.R., 2003. Antihistamines. *Allergy Principles and Practice*, (Editörler: E. Middleton, C.E. Jr Reed, E.F. Ellis, N.F. Adkinson, J.W. Jr Yunginger, W.W. Busse), Mosby, s: 834-870, Philadelphia.
- Simons, F.E.R., McMillan, J.C., Simons, K.C., 1990. A double-blind, single-dose, crossover comparison of cetirizine, terfenadine, loratadine, astemizole and chlorpheniramine versus placebo: suppressive effects on histamine-induced wheals and flares during 24 hours in normal subjects. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 86, 540-547.
- 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., 1998. A review and investigation into the mechanistic basis of the genotoxicity of antihistamines. *Mutation Research*, 411(3), 235-248.
- Snyder, R.D., Ewing, D., Hendry, L.B., 2006. DNA intercalative potential of marketed drugs testing positive in *in vitro* assays. *Mutation Research*, 609(1), 47-59.
- Snyder, R.D., Green, J.W., 2001. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. *Mutation Research*, 488, 151-169.

- 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.
- Soule, B.P., Simone, N.L., DeGraff, W.G., Choudhuri, R., Cook, J.A., Mitchell, J.B., 2010. Loratadine dysregulates cell cycle progression and enhances the effect of radiation in human tumor cell lines. *Radiation Oncology*, 3, 5-8.
- Söğüt, Ö., 1992. Histamin tayini ve bazı histamin-zn komplekslerinin analitik incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 104 s.
- Speit, G., 1984. Considerations on the mechanism of differential giemsa staining of bromodeoxyuridine-substituted chromosomes. *Human Genetics*, 67, 264-269.
- Speit, G., Haupter, S., 1985. On the mechanism of differential giemsa staining of brdu-substituted chromosomes. *Human Genetics*, 70(2), 126-129.
- Storer, R.D., McKelvey, T.W., Kraynak, A.R., Elia, M.C., Barnum, J.E., Harmon, L.S., Nichols, W.W., De Luca, J.G., 1996. Revalidation of the *in vitro* alkaline elution/rat hepatocyte assay for DNA damage: improved criteria for assessment of cytotoxicity and genotoxicity and results for 81 compounds. *Mutation Research*, 368(2), 59-101.
- Strachan, D.P., 1989. Hay fever, hygiene, and household size. *British Medical Journal*, 299(6710), 1259-1260.
- Şekeroğlu, V., Atlı Şekeroğlu, Z., 2011. Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68(4), 241-252.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 43(1), 122-128.
- Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., Reinisch, F., Parvatham, S., Osorio, A.M., Smith, M.T., 1997. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro and in vivo*: a study of malathion-exposed workers. *Mutation Research*, 388(1), 85-95.
- Topaktaş, M., Speit, G., 1990. Sister chromatid exchange (SCE) testinin mutajenite ve kanserojenitenin belirlenmesinde kullanılması. *Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(1-2-3), 73-84.
- Topuz, B., 2001. Alerjenler. *Kulak Burun Bogaz Hastalıklarında Alerji*, (Editorler: H. Dogru, B. Topuz), s: 20-25, İstanbul.

- Tucker, J.D., Auletta, A., Cimino, M.C., Dearfield, K.L., Jacobson-Kram, D., Tice, R. R., Carrano, A.V., 1993. Sister-chromatid exchange: second report of the gene-tox program. *Mutation Research*, 297(2), 101-180.
- Turan Akyol, Ş., 2009. Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu olan çocukların atopi ve alerjik hastalıklar yönünden incelenmesi. Uzmanlık Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Samsun, 83 s.
- Turner, N.T., Woolley, J.L., Jr. Hozier, J.C., Sawyer, J.R., Clive, D., 1987. Methapyrilene is a genotoxic carcinogen. Studies on methapyrilene and pyrilamine in the L5178Y/TK  $\pm$  mouse lymphoma assay. *Mutation Research*, 189(3), 285-297.
- Ülker, S., 1991. İzole insan lökositlerinden histamin salıverilmesi ve histamin reseptörlerinin rolü. Uzmanlık Tezi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, İzmir, 46s.
- Üstün, F. 2007. Albendazol'un olası genotoksitesisi üzerine askorbik asitin etkisi. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 100 s.
- Vermeulen, K., Berneman, Z.N., vanBockstaele, D.R., 2003. Cell cycle and apoptosis. *Cell Proliferation*, 36(3), 165-75.
- Von Ehrenstein, O.S., Von Mutius, E., Illi, S., Baumann, L., Bohm, O., Von Kries, R., 2000. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clinical Experimental Allergy*, 30, 187-193.
- Von Hertzen, L.C., 1998. The hygiene hypothesis in the development of atopy and asthma-still a matter of controversy? *Q J Med.*, 91, 767-771.
- Von Pirquet, C., 1906. Allergie. *Munch Med Wochenschr*, 53, 1457.
- Vural, N., 2005. *Toksikoloji*. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 677s, Ankara.
- Wahn, U., Lau, S., Bergmann, R., Kulig, M., Forster, J., Bergmann, K., Bauer, C.P., Guggenmoos-Holzmann, I., 1997. Indoor allergen exposure is a risk factor during the first three years of life. *Journal Allergy of Clinical Immunology*, 99, 763-99.
- Windaus, A., Vogt, W., 1907. Synthese des imidazolylathylamins. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 40(3), 3691- 3695.
- Wolff, S., 1977. Sister chromatid exchange. *Annual Review of Genetics*, 11, 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.
- Wutrich, B., 1999. What is atopy? Condition, disease or syndrome? *Curr Probl Dermatol*, 28, 1-8.
- Yavuz Kocaman, A., 2007. Acetamiprid ve alpha-cypermethrin pestisidlerinin tek başına ve karışım halinde kullanıldıkları zaman insan periferel lenfositlerindeki *in vitro* genotoksik etkileri. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 207 s.
- Yavuz Kocaman, A., Topaktaş, M., 2007. *In vitro* evaluation of the genotoxicity of acetamiprid in human peripheral blood lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 48(6), 483-490.
- Yemaneberhan, H., Bekele, Z., Venn, A., Lewis, S., Parry, E., Britton, J., 1997. Prevalence of wheeze and asthma and relation to atopy in urban and rural Ethiopia. *The Lancet*, 350, 85-90.
- Yıldız Zeyrek, F., Zeyrek, D.C., 2006. Alerjik hastalıklar ve parazitoz. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 30(2), 135-140.
- Yılmaz, E., Yılmaz, E., Karaca, F., Uçar, S., Yüce, T., 2008. Sağlık yüksekokulu öğrencilerinin ilaç kullanma durumlarının incelenmesi. *70 Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi*, Cilt:3, Sayı:8, 15s.
- Yırtıcı, Ü., 2007. Tartrazinin *Cyprinus carpio*'daki genotoksik etkisinin mikronükleus yöntemi ile 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(1-2), 53-59.
- Zeiger, E., 2004. History and rationale of genetic toxicology testing: an impersonal, and sometimes personal, view. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44, 363-371.
- Zeiger, E., Anderson, B., Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K., Speck, W., 1987. Salmonella mutagenicity tests: III. Results from the testing of 255 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 9(9), 61-110.
- 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** : Seval KONTAŞ

**Doğum Yeri** : Altındağ

**Doğum Tarihi** : 27.04.1988

**Medeni Hali** : Bekar

**Bildiği Yabancı Diller:** İngilizce

**Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)**

**Lise** : Keçiören Kanuni Lisesi (YDA) - 2006

**Lisans** : Ordu Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü – 2010

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

**Çalıştığı Kurumlar:** -

**İletişim Bilgileri**

**Email** : sevalkontas07@gmail.com