

**ANTİHİSTAMİNİK İLAÇ
OLARAK KULLANILAN
FEKSOFENADİN ETKEN
MADDESİNİN İNSAN PERİFERAL
LENFOSİTLERİ ÜZERİNDEKİ
GENOTOKSİK ETKİLERİ**

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

**ANTİHİSTAMİNİK İLAÇ OLARAK KULLANILAN FEKSOFENADİN
ETKEN MADDESİNİN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİ
ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK ETKİLERİ**

CEREN BÖRÇEK KASURKA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AKADEMİK DANIŞMAN
Yrd. Doç. ZÜLAL ATLI ŞEKEROĞLU**

ORDU – 2010

T.C.
ORDU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından 20/08/2010 tarihinde yapılan sınav ile BİYOLOJİ Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Ömer ERTÜRK

Üye : Yrd. Doç. Dr. Zülal A. ŞEKEROĞLU

Üye : Yrd. Doç. Dr. Melek ÇOL

ONAY :

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../2010

Yrd. Doç. Dr. Beyhan TAŞ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ANTİHİSTAMİNİK İLAÇ OLARAK KULLANILAN FEKSOFENADİN ETKEN MADDESİNİN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİ ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK ETKİLERİ

ÖZ

Bu çalışmada, alerjik rinit tedavisinde yaygın olarak kullanılan Feksofenadin etken maddesinin insan periferal lenfosit hücrelerinde *in vitro* genotoksik etkisi, kromozom anormalliği (KA) ve mikronükleus (MN) testleri kullanılarak araştırılmıştır. Ayrıca mitotik indeks (MI) ve nükleer bölünme indeksi (NBI) belirlenerek test maddesinin hücre bölünmesine etkisi de incelenmiştir. Hücre kültürleri 50, 100 ve 150 µg/ml' lik konsantrasyonlara 24 ve 48 saat süreyle maruz bırakılmıştır.

Feksofenadinin 24 saatlik muamelelerinde 100 ve 150 µg/ml'lik konsantrasyonlarının ve 48 saatlik muamele sürelerinde tüm dozların MI' i istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşürdüğü belirlenmiştir. Ayrıca NBI'nin feksofenadinin sadece 150 µg/ml konsantrasyonun 24 saatlik muamelesinde istatistiksel olarak önemli derecede düştüğü saptanmıştır. Fakat feksofenadinin uygulaması sonucu, tüm doz ve muamele sürelerinde KA ve MN oluşumunda ortaya çıkan artışın istatistiksel açıdan önemli olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar feksofenadinin doz artışına bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiğini ortaya çıkarmıştır.

Anahtar sözcükler: Feksofenadin, *in vitro* genotoksisite, kromozomal anormallikleri, mikronükleus

**GENOTOXIC EFFECTS OF FEXOFENADINE ACTIVE SUBSTANCE
USED AS ANTIHISTAMINIC DRUG ON HUMAN PERIPHERAL BLOOD
LYMPHOCYTES**

ABSTRACT

In this study, *in vitro* genotoxic effects of Fexofenadin, which has been widely used in allergic rhinitis was investigated in peripheral human lymphocytes by using chromosomal aberrations (CA) and micronucleus (MN) tests. In addition to these methods, mitotic index (MI) and nuclear division index (NDI) were also calculated to determine the implications of test substance for cell division. The cell cultures were treated with 50, 100 and 150 µg/ml concentrations of fexofenadine for 24 and 48 hours.

It was stated that 100 and 150 µg/ml concentrations for 24 hours treatments and all used concentrations for 48 hours treatments of fexofenadine, significantly decreased the MI. Furthermore NDI significantly decreased only at 150 µg/ml concentration for 24 hours treatments of fexofenadine. However, the increases of CA and MN formation at all doses and treatment times of fexofenadine were not statistically significant. These results indicated that fexofenadine has a cytotoxic effect depending on increase of dose.

Key words: Fexofenadine, *in vitro* genotoxicity, chromosomal aberration, micronucleus

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında her zaman bilgi ve deneyimleriyle yolumu açan saygıdeğer hocam **Yrd. Doç. Dr. Zülal A. Şekeroğlu**' na içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu zorlu ve uzun süreçte sabırla yanımda olan ve çalışmanın her aşamasında en büyük yardımcım olan sevgili eşim **Nurettin Kasurka**' ya; hayatım boyunca yanımda olan ve ideallerimi gerçekleştirmemi sağlayan değerli annem **Fadime Börçek** ve değerli babam **Cahit Börçek**' e yürekten teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında karşılaştığım bütün teorik ve pratik problemlerde desteğini gördüğüm sayın hocam **Dr. Vedat Şekeroğlu**' na ve çalışmamın laboratuvar sürecinde her zaman yardımcı olan **Arş. Gör. İlyas CAN**' a teşekkür ederim.

Ayrıca bölüm başkanlığı süresince gösterdiği ilgi ve desteklerinden dolayı sayın **Yrd. Doç. Dr. Tuğba Bayrak ÖZBUCAK**' a ve Ordu Üniversitesi Biyoloji Bölümünün tüm çalışanlarına ve Yurtiçi Yüksek Lisans Bursiyeri Destek Programı kapsamında bursiyeri olduğum **TÜBİTAK-BİDEB**' e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZ	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Histamin:.....	4
2.2. Histamin Reseptörleri:	5
2.2.1. Histamin-1 (H ₁) Reseptörleri:	5
2.2.2. Histamin-2 (H ₂) Reseptörleri:	5
2.2.3. Histamin-3 (H ₃) Reseptörleri:	6
2.2.4. Histamin-4 (H ₄) Reseptörleri:	6
2.3. Antihistaminik İlaçlar:	6
2.3.1. Eski Ve Yeni Kuşak Antihistaminikler:	8
2.3.1.1. Birinci Kuşak (Klasik) Antihistaminikler:.....	8
2.3.1.2. İkinci Kuşak Antihistaminikler:.....	9
2.3.1.3. Üçüncü Kuşak Antihistaminikler (Naturel Metabolitler):	9
2.4. Feksofenadin:.....	10
2.4.1. Feksofenadinin Farmakodinamik Özellikleri:	10
2.4.2. Feksofenadinin Farmakokinetik Özellikleri:	11
2.4.3. İlaç Etkileşimleri:.....	11
2.5. Genetik Toksikoloji:	12
2.5.1. Genetik Toksikite Testleri:.....	13
2.5.1.1. Salmonella / mikrozom (Ames) Testi:.....	13
2.5.1.2. Memeli Hücre Kültürü Testleri:	14
2.5.1.2.1. <i>In vitro</i> Kromozom Anormallikleri (KA) Testi:	15
2.5.1.2.2. <i>In vitro</i> Mikronukleus (MN) Testi:.....	15
2.5.1.2.3. <i>In vitro</i> Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Testi:	17

2.5.1.2.4. Fare Lenfoma Testi (Mouse Lymphoma Assay=MLA):	17
2.5.1.2.5. Comet (Single Cell Gel Electrophoresis) Testi:	18
2.6. Antihistaminiklerle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları:	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	22
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar.....	22
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	22
3.1.1.1. Feksofenadine (Fexofenadine).....	22
3.1.1.2. Dimetil Sülfoksit (Dimethyl Sulfoxide, DMSO).....	23
3.1.1.3. Kromozom Medyumu	23
3.1.1.4. Mitomisin C (Mitomycin C, MMC)	24
3.1.1.5. Sitokalasin B (Cytochalasin B).....	24
3.1.1.6. Kolsemid (Colcemid).....	24
3.1.1.7. Hipotonik Eriyik	24
3.1.1.8. Fiksatif	25
3.1.1.9. Sorensen Tamponu	25
3.1.1.10. Giemsa	25
3.1.1.11. Entellan	25
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	26
3.1.2.1. Hassas Terazi	26
3.1.2.2. Biyogüvenlik Kabini.....	26
3.1.2.3. İnkübatör.....	26
3.1.2.4. Santrifüj	26
3.1.2.5. Vorteks Karıştırıcı.....	26
3.1.2.6. Mikroskop.....	26
3.2. Kromozom Anormalliklerini (KA) ve Mitotik İndeksi (MI) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması	27
3.2.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması	27
3.2.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması	28
3.2.3. Mikroskopik İncelemeler ve Mikroskopta Fotoğraf Çekme.....	28
3.2.4. Mitotik İndeks (MI) ve Kromozom Anormalliklerinin (KA) Saptanması	29
3.2.4. 1. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması.....	29
3.2.4. 2. Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması	29

3.3. Mikronükleus (MN) Testi İçin Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması	30
3.3.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması	30
3.3.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması	32
3.3.3. Mikroskopik İncelemeler ve Mikroskopta Fotoğraf Çekme.....	32
3.3.4. Mikronükleus Sayısı ve Nükleus Bölünme İndeksinin (NBI) Saptanması.....	32
3.4. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi.....	35
4. BULGULAR.....	36
4.1. Feksofenadinin Mitotik İndeks (MI) Oluşumu Üzerindeki Etkileri	36
4.2. Feksofenadinin Kromozom Anormallikleri (KA) 'nin Oluşumu Üzerindeki Etkileri	37
4.3. Feksofenadinin Sebep Olduğu Ortalama KA, AHO ve MI Arasındaki İlişki	45
4.4. Feksofenadinin Mikronükleus (MN) Oluşumu ve Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri.....	46
4.5. Ortalama KA ile Ortalama MN Arasındaki İlişki.....	50
4.6. % MI ile NBI Arasındaki ilişki.....	50
5. TARTIŞMA	53
5.1. Feksofenadinin Genotoksik Etkileri	54
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	57
7. KAYNAKLAR	59
ÖZ GEÇMİŞ	71

SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

AHO	: Anormal Hücre Ortalaması
Ames Testi	: Salmonella/Mikrozom Mutajenite Testi
BN	: Binükleat hücre
Cyt-B	: Cytochalasin-B (Sitokalsin-B)
DS	: Disentrik kromozom
EPA	: U.S. Environmental Protection Agency (Amerika Çevre Koruma Temsilciliği)
ER	: Endoreduplikasyon
F	: Fragment
FDA	: U.S. Food and Drug Administration (Amerika Gıda ve İlaç Yönetimi)
FXF	: Feksofenadin
ISAAC	: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (Uluslararası Çocukluk Dönemi Astım ve Alerji Araştırmaları)
K'	: Kromatit kırığı
K''	: Kromozom kırığı
KA	: Kromozom Anormallikleri (Kromozomal Aberasyonlar)
KB	: Kromozom birleşmesi
KD	: Kromatid değişimi
KKB	: Kardeş Kromatid Birleşmesi
KKD	: Kardeş Kromatid Değişimi (Sister Chromatid Exchange:SCE)
MI	: Mitotik İndeks
MN	: Mikronükleus
MNBN	: Mikronükleuslu binükleat hücre
NBI	: Nükleer bölünme indeksi
NTP	: National Toxicology Program
P	: Poliploidi
PDR	: Physicians' Desk Reference (Hekimin El Kitabı)
SCGE	: Single Cell Gel Electrophoresis (Comet Testi)
SF	: Sentrik füzyon
WHO	: World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1. Normal metafaz plağı (x1000).....	30
Şekil 3.2. Binükleat hücre (x400)	33
Şekil 3.3. Bir mikronükleus bulunduran binükleat hücre (x400)	33
Şekil 3.4. Mononükleat, binükleat ,trinükleat ve tetranükleat hücreler (x 400)	34
Şekil 4.1. Kromatid kırığı (100 µg/ml, 48 saatlik uygulama) x1000.....	40
Şekil 4.2. Kromatid kırıkları (150 µg/ml, 48 saatlik uygulama) x1000	40
Şekil 4.3. Kromozom kırığı (100 µg/ml, 24 saatlik uygulama) x1000.....	41
Şekil 4.4. Kromozom kırığı (100 µg/ml, 48 saatlik uygulama) x1000.....	41
Şekil 4.5. Fragment (150 µg/ml, 24 saatlik uygulama) x1000	42
Şekil 4.6. Fragment (150 µg/ml, 48 saatlik uygulama) x1000	42
Şekil 4.7. Kardeş kromatid birleşmesi (150 µg/ml, 24 saatlik uygulama) x1000	43
Şekil 4.8. Kardeş kromatid birleşmesi (150 µg/ml, 48 saatlik uygulama) x1000	43
Şekil 4.9. Kromozom birleşmesi (50 µg/ml, 48 saatlik uygulama) x1000	44
Şekil 4.10. Endoreduplikasyon (100 µg/ml, 24 saatlik uygulama) x1000.....	44
Şekil 4.11. Poliploidi (150 µg/ml, 24 saatlik uygulama) x1000.....	45
Şekil 4.12. 24 saatlik uygulamalar sonucu ortalama KA, AHO, MI arasındaki ilişki....	46
Şekil 4.13. 48 saatlik uygulamalar sonucu ortalama KA, AHO, MI arasındaki ilişki....	46
Şekil 4.14. Bir mikronükleus içeren binükleat hücre (50 µg/ml, 24 saatlik uygulama) x400	1
Şekil 4.15. Bir mikronükleus içeren binükleat hücre (50 µg/ml, 48 saatlik uygulama) x400	1
Şekil 4.16. Bir mikronükleus içeren binükleat hücre (100 µg/ml, 24 saatlik uygulama) x400	1
Şekil 4.17. Bir mikronükleus içeren binükleat hücre (100 µg/ml, 48 saatlik uygulama) x400	1
Şekil 4.18. Bir mikronükleus içeren binükleat hücre (150 µg/ml, 24 saatlik uygulama) x400	1

Şekil 4.19. Bir mikronükleus içeren binükleat hücre (150 µg/ml, 48 saatlik uygulama) x400	1
Şekil 4.20. Feksofenadinin 24 saatlik uygulamalarında dozlara bağlı olarak ortalama KA ile ortalama MN arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı	50
Şekil 4.21. Tüm dozların 24 ve 48 saatlik uygulamalarda ortalama %MI ve NBI üzerindeki etkileri	51
Şekil 4.22. Feksofenadinin 24 saatlik uygulamalarında dozlara bağlı olarak %MI ve NBI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı	51
Şekil 4.23. Feksofenadinin 48 saatlik uygulamalarında dozlara bağlı olarak %MI ve NBI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı	52

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 1.1. Eski ve yeni nesil bazı antihistaminik ilaçlar	10
Çizelge 4.1 Feksofenadinin ortalama ve % MI üzerine etkileri	37
Çizelge 4.2 Feksofenadinin sebep olduğu kromozomal anomarmallikleri ve ortalama KA ve AHO üzerine etkileri.....	39
Çizelge 4.3. Hücrelerin Nükleus sayısına göre, binükleat hücrelerin MN sayısına göre dağılımları ve ortalama MN, %MN ve NBI.....	49

1. GİRİŞ

Alerji, bağışıklık sisteminin bazı maddelere karşı gösterdiği aşırı duyarlılık reaksiyonudur. İlk defa 1906 yılında ortaya atılan alerji terimi genel olarak “farklılaşmış vücut cevabı” anlamına gelmektedir. Her yaştan ve her kesimden bireylerde alerjik reaksiyonlara rastlanmaktadır. Komplikasyonların şekli ve şiddeti kişiye göre değişse de hayat kalitesini etkilemekte ve hatta bazı durumlarda doğrudan hayatı tehdit etmektedir. Değişen iklim, ilerleyen endüstri ve hayatımızın her alanına giren kimyasal ve katkı maddeleri de bu durumu arttırmaktadır (Von Mutius, 1998; Kay, 2001).

Alerji, inflamatuvar bir hastalıktır ve alerjik reaksiyonlar, duyarlı bireylerin alerjen olarak adlandırılan maddelerle karşılaşması ile gelişen bir dizi karmaşık immünolojik tepkimeler sonrasında ortaya çıkar. Alerjenler, alerjik yanıtı tetikleyebilen her türlü madde olabilir. Fakat en sık rastlanan alerjenler; polenler, sporlar, akarlar, gıdalar, ilaçlar ve hayvansal atıklardır (Kay, 1997, 2001).

Alerjik hastalıklar yaklaşık son 30 yılda özellikle gelişmiş ülkelerde önemli bir artış göstererek bir halk sağlığı problemi haline gelmiştir. Alerjik hastalıklar genetik yapı ve çevre etkileşimi sonucu ortaya çıkan “ekogenetik” bir olgudur. Özellikle gelişmiş ülkelerde alerjik reaksiyonlardaki belirgin artışın sadece genetik etkenler ve tanı olanaklarının artışı ile açıklanamayacağı; bu artışta çevresel etkenlerin, enfeksiyonların ve paraziter hastalıkların azalmasının ve kişisel hijyenin artması gibi yaşam biçimindeki değişimlerin önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bu olaylar ise alerjik hastalık sıklığının artışı gündeme getirmektedir. Örneğin alerjik rinit, 19. yüzyıl başlarında henüz tam bilinmeyen ve çok az görülen bir hastalık iken, bugün için pediatrik hasta grubunda en sık rastlanan alerjik bir hastalıktır (ISAAC, 1998; Von Hertzen, 1998; Von Mutius, 1998; Gold ve Kemp, 2005; Herz ve Petschow, 2005; 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 bireyde alerjik 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

alerjik hastalıklara neden olmaktadır (Strachan, 1989; Arshad, 1997; Yıldız Zeyrek ve Zeyrek, 2006).

Alerjik hastalıkların tedavisinde H₁ histamin reseptör antagonistisi olan antihistaminik ilaçlar kullanılmaktadır. Bu ilaçlar ayrıca soğuk algınlığı semptomlarının giderilmesi ve mide bulantısının bastırılması amacıyla da yaygın olarak kullanılmaktadır. 1930'lerde ilk antagonistin keşfinden bu yana ihtiyaç doğrultusunda sürekli yeni ilaçlar keşfedilmektedir (Simons, 2003; Parsons ve Ganellin, 2006).

İlaçlar bir hastalığın teşhisini, iyileştirilmesi veya semptomlarının azaltılması amacıyla tedavisini veya bir hastalıktan korunmayı mümkün kılan, canlılara değişik uygulama yöntemleri ile verilen doğal, yarı sentetik veya sentetik kimyasal preparatlardır (WHO, 1969). İnsan sağlığını ve hayat kalitesini artırmak amacıyla sürekli yeni etken maddeler içeren yeni ilaçlar üretilmektedir. Son elli yıl içinde, eskiden tedavisi mümkün olmayan bazı hastalıklarda etkili ilaçların tıbbi kullanıma girmesi, daha etkili ve daha güvenli olan yenilerinin geliştirilmesi ile çok sayıda yeni ilaç piyasaya sunulmuştur. Ancak yeni bir etki mekanizmasına sahip ya da istenmeyen etkilerinden arındırılmış olan yeni ilaç da oldukça azdır. 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 (mutasyona yol açan) ilaçların çoğu karsinojenik (kansere yol açan) ve teratojenik (doğumsal anomalilere neden olan) 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; Saygi, 2003; Vural, 2005; Brambilla ve ark, 2009).

Yapılan çeşitli çalışmalar antihistaminiklerin de diğer birçok ilaç gibi yararlarının yanı sıra zararlı etkilerinin de olabileceğini göstermiştir. Bu etkilerin başında nörolojik ve kardiyotoksik etkiler göze çarpmaktadır. Yan etkileri, ilaç etkileşimleri ve diğer olumsuz etkilerini azaltarak, farmakolojik etkilerini korumak ve güçlendirmek için yeni üretilen antihistaminiklerin bile insan üzerinde olumsuz etkileri olabileceği gösterilmiştir. Örneğin saman nezlesinde kullanılan terfenadin ilacının İngiltere'de 33 kişide ciddi kardiyak aritmi ve 14 ölüme neden olması nedeniyle kullanımdan kaldırıldığı ifade edilmektedir. 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; Sayđı, 2003). Antihistaminiklerin genotoksik etkileri de uzun zamandır mercek altına alınan bir konudur. Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar bu ilaçların mutajenite potansiyelini açıkça sergilemektedir (Snyder ve Green, 2001; Brambilla ve ark, 2009).

Bizim de bu çalışmadaki amacımız; yaygın bir antihistaminik ilaç etken maddesi olarak kullanılan feksofenadini, insan lenfosit kültürlerinde *in vitro* mikronükleus testi ve kromozom anormallikleri yöntemleriyle araştırarak, bu maddenin genotoksik potansiyelini ortaya çıkarabilmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Histamin:

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

Histamin, vücutta birçok dokuda bulunan, fazla sayıda alt tipleri aracılığı ile karmaşık fizyolojik ve patolojik etkilere sahip, sıklıkla lokal olarak salınan ve çeşitli nedenlerle hücre dışına çıktığında, alerji denilen reaksiyonlara sebebiyet veren biyolojik olarak aktif bir amindir. Organizmada pek çok fizyolojik ve patolojik süreçte yer alan bir hücre-hücre habercisi olan histamin 1911 yılında etkili bir vazodilatör madde olarak keşfedilmiş, 1920' lerde rinit, astım, ürtiker, anaflaksi gibi alerjik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. 1953 yılında ise doku mast hücreleriyle bağlantısı bulunmuştur. Fakat kesin etki mekanizması 1966 yılında H_1 reseptörünün keşfine kadar çözülememiştir. Histamin, mide asidi üretimi ve merkezi sinir sistemindeki rolü gibi bazı homeostazik görevleri olmasına rağmen H_1 -reseptörü aracılı aktivitelerinden dolayı öncelikle inflamasyon öncesi bir ajan olarak değerlendirilmektedir (Simons, 2002; Karataş, 2005; Parsons ve Ganellin, 2006). Yapılan araştırmalar sonucu, histaminin lokal bir hormon gibi tesir ettiği, kan basıncını düşürdüğü, sinirsel iletimde rol aldığı, bazı reseptörleri (H_1 ve H_2 reseptörleri gibi) etkilediği ve damarlarda genişleme, damar geçirgenliğinin artması, mide salgısının artması, kalp atışlarının hızlanması, kaşıntı, hapşırık, ciltte kızarıklık gibi etkiler ortaya çıkarabildiği gösterilmiştir (Krause, 1992; Özlüoğlu ve ark., 1994; Simons, 2002; Karataş, 2005).

Histamin (2-(4-imidazolil)etilamin veya 5 β -amino-etilimidazol); histidinin histidin dekarboksilaz tarafından dekarboksillenmesiyle oluşmakta, mast hücreleri ile bazofillerin sitoplazmik granüllerinde depolanmakta ve özgül bir histaminaz ile etkisi ortadan kaldırılmaktadır. Histamin molekülleri, Ig-E (İmmünoglobülin-E) aracılı alerjik reaksiyonların sonrasında salınmaktadır (Simons, 2002; Parsons ve Ganellin, 2006; Rosenfeld ve Loose, 2007).

Vücudun pek çok hücresinde bulunan histaminin, özellikle akciğerler, cilt, karaciğer ve sindirim sistemi dokularında daha fazla miktarlarda bulunduğu

belirlenmiştir. Histamin ayrıca; mast hücreleri, bazofil lökositler, histaminerjik nöronlar, beyin kapillerlerinin endotel hücreleri ve yenilenen ve hızlı büyüyen doku hücrelerinde depolanmaktadır. Histamin salınımı immünolojik ya da non-immünolojik olabilir. Histamin, salınımının ardından astım, alerjik rinit ve konjuktivit, anaflatik şok ve ürtikerin patofizyolojisine katkıda bulunmaktadır. Erken ve geç-faz alerjik cevaba katılmakta, sitokin salınımı ve adezyon sürecinde önemli rol oynamaktadır (Simons, 2002; Parsons ve Ganellin, 2006; Rosenfeld ve Loose, 2007). Histamin, histaminerjik nöronlar ve mide mukozasındaki enterokromafin benzeri hücrelerde primer nörotransmitter olarak rol oynar ve sistemik etkilerinin yanı sıra nöronal olaylara aracılık eder (Wood, 1992; Hekimoğlu ve Çiçek, 2006).

2.2. Histamin Reseptörleri:

Bugün bilindiği kadarıyla insanlarda histaminin H₁, H₂, H₃ ve H₄ adlarıyla bilinen 4 tip reseptörü bulunmaktadır ve her bir reseptör farklı genler tarafından kodlanmaktadır. Bu reseptörler içerisinde en iyi bilinenleri H₁ ve H₂ reseptörleridir (Gonzalez ve Estes, 1998; Church, 2004; İnal ve Altıntaş, 2005; Parsons ve Ganellin, 2006).

2.2.1. Histamin-1 (H₁) Reseptörleri:

Histamin H₁ reseptörü üçüncü kromozomun kısa kolunda kodlanır ve alerjik yanıtta histamin etkilerinin çoğundan sorumludur. Alerjik hastalıkların pek çok klinik semptomu H₁ reseptör stimülasyonuna bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Hızla aktive olurlar, hızlı alerjik cevabın oluşturulmasında rol alırlar ve etkileri geçicidir. Uzun süreli etkinlik için sürekli histamin salınımı gerekmektedir. Vasküler geçirgenliği indüklemek için endotelial hücrelerde bulunurlar. H₁ reseptör blokleri antihistaminikler hedef hücrelerde H₁ reseptörlerine kompetitif bağlanarak etki gösterirler. Histamin, respiratuvar mukozada bu reseptöre bağlanarak, lokalize vasküler permeabilityyi artırır, mukus salgısını fazlalaştırır. Nörolojik stimülasyonla da kaşıntı ve hapşırık oluşturur (Krause, 1992; Simons, 2002; İnal ve Altıntaş, 2005).

2.2.2. Histamin-2 (H₂) Reseptörleri:

Beşinci kromozomun uzun kolunda kodlanır ve cAMP düzeyini arttırarak hücre fonksiyonlarını kontrol ederler. Uyarılmaları daha yavaştır, fakat cevapları daha uzun

sürelidir. Uyarılmaları sonucu cAMP artışı indüklenir ve gastrik mukozada, vasküler düz kaslarda, beyinde, adopsitlerde, bazofillerde, nötrofillerde ve diğer dokularda intrasellüler kalsiyum artışı gerçekleşir. H₂ reseptörlerinin uyarılması, vazodilasyonda küçük bir etkiye sahiptir fakat kalp üzerinde anaflaksi gibi durumlara aracılık edebilir. Mide asidi üretimi ve özefagal kasılma üzerinde de büyük rolü vardır. (Simons, 2002; İnal ve Altıntaş, 2005; Parsons ve Ganellin, 2006).

2.2.3. Histamin-3 (H₃) Reseptörleri:

Yirminci kromozomun kısa kolunda kodlanırlar. Lokalizasyon ve farmakolojik olarak H₁ ve H₂ reseptörlerinden farklıdırlar. Sadece beyinde bulunurlar ve primer olarak sinirlerde histamin için presinaptik reseptör olarak çalışırlar. Presinaptik lokalizasyonda bulunurlar ve merkezi sinir sisteminde histaminerjik sinir uçlarında histaminin salınması ve biyosentezini kontrol eden bir otoresseptör olarak görev yaparlar. Ayrıca noradrenalin, dopamin, serotonin ve asetilkolin gibi diğer amin nörotransmitterlerin sentez ve salınımında rol oynayan bir heteroresseptör olduğu da düşünülmektedir (Schlicker ve ark., 1994; İnal ve Altıntaş, 2005; Parsons ve Ganellin, 2006).

2.2.4. Histamin-4 (H₄) Reseptörleri:

Kemik iliği, timus, periferik kan monositleri ve granülositik lökositleri, dalak, karaciğer, akciğer ve kolonda bulunurlar. Uzun yıllar boyunca H₃ reseptörlerinin heterojen bir grup reseptör olduğu düşünülmüş, ancak yapılan genetik çalışmalar sonucunda H₄ reseptör geni 18. kromozom üzerinde bulunmuştur. H₄ reseptörü yapısal ve fonksiyonel olarak H₃ reseptöre çok benzemektedir. Ancak her iki reseptör grubu arasında bu bağlanmanın afinitesi ve bağlanma gücü açısından farklılıklar vardır (Nguyen ve ark., 2001; İnal ve Altıntaş, 2005; Parsons ve Ganellin, 2006).

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 anaflaksi 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. Antihistamikler H₁ reseptörlerine rekabet ederek bağlanmakta ve histamin “agonist” etkisini engellemektedir. H₁ reseptörlerine bağlanarak da damar geçirgenliğinin artmasına ve ödeme engel olmaktadır. Antihistaminiklerin antialerjik ve antiinflamatuvar etkileri ise H₁ reseptör blokajından bağımsız olarak ve H₁ reseptör blokajı için gereken dozdan daha yüksek dozlarda gerçekleşmektedir (Braun-Falco ve ark., 2000; Simons, 2003; Kiremitçi, 2004).

Antihistaminikler oral yoldan uygulandıklarında genelde iyi absorbe edilirler ve hızla etki gösterirler. Bazı antihistaminikler metabolize olmadan idrar ve/veya dışkı ile değişmeden atılırken, bazıları da karaciğer ve gastrointestinal kanaldaki sitokrom P450 sisteminde metabolize olurlar (Simons, 1999).

Antistaminikler kimyasal yapılarına göre 6 gruba ayrılmaktadırlar (Özluoğlu ve ark., 1994; Simons, 2003; Kiremitçi, 2004):

1. Ethanolaminler: Oldukça potent H₁ 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. Etilendiaminler: En eski H₁ reseptör blokerleridir. Antihistaminik etkileri güçlüdür, sedatif etkileri belirgindir ve gastrointestinal yan etki oluştururlar. Tripelenamin, prilamin, methapirilen ve antazolin bu gruba dahil olan antihistaminiklere örnektir.

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.

4. Piperidinler: Genellikle ekzema tedavisinde etkilidirler. Siproheptadin, mizolastin, loratadine, terfenadine, feksofenadin, ebastin ve astemizol bu gruba dahil olan antihistaminiklere örnektir.

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

6. Piperazinler: Sedatif etkileri zayıftır. Kronik ürtiker tedavisinde ve hareket hastalığında taşıt tutmasını önlemek için kullanılmaktadırlar. Hidroksizin, trunkilizan,

buklizin, meklizin, setirizin, siklizin ve oksatomid bu gruba dahil olan antihistaminiklere örnektir.

2.3.1. Eski Ve Yeni Kuşak Antihistaminikler:

Klasik antihistaminikler lipofilik oldukları ve bu nedenle kan-beyin bariyerini geçtikleri için önemli yan etkilere neden olabilirler. Bu nedenle bu tip antihistaminikler santral sinir sisteminde H₁ reseptörlerine bağlanarak sedatif etki oluştururlar ve dikkat ve motor kabiliyet gerektiren aktiviteleri etkileyebilirler. Ağız ve tüm solunum yolları boyunca mukoza tabakasının kurumasına, taşikardi ve kardiyak stimulasyon oluşmasına, görmede bulanıklaşmaya, yaşlılarda ve prostat hastalarında idrar yapmada güçlüğü ve kabızlığa yol açabilirler. Bu tür yan etkilerin özellikle de sedatif etkinin ortadan kaldırılabilmesi amacıyla yeni nesil antihistaminik ilaçlar piyasaya sürülmüştür. Antistaminikler üretim-gelişim süreçlerine göre birinci kuşak, ikinci kuşak ve üçüncü kuşak olmak üzere üç gruba ayrılmaktadırlar (Meltzer, 1990; Krause, 1992; Özlüoğlu ve ark., 1994; Handley ve ark., 1998; Braun-Falco ve ark., 2000; Weiler ve ark., 2000; Kiremitçi, 2004). Eski ve yeni kuşak bazı antihistaminik örnekleri Çizelge 1.1'de gösterilmiştir.

2.3.1.1. Birinci Kuşak (Klasik) Antihistaminikler:

Lipofilik yapıda olup kan-beyin bariyerini kolayca geçer ve belirgin derecede sedatif ve antikolinergik yan etki oluştururlar. Birinci kuşak antihistaminikler histaminle tersinir olarak yarışmalı bir şekilde H₁ reseptörlerine bağlanırlar ve histamin konsantrasyonu arttığında yer değiştirirler. Bu yüzden etkili olabilmeleri için histaminle yarışabilecek kadar yüksek dozlarda kullanılması gerekmektedir. Bu durum ise yan etkilerin meydana çıkmasına sebep olmaktadır. Birinci kuşak antihistaminik ilaçların, en sık rastlanan yan etkileri özellikle sedasyon başta olmak üzere koordinasyon zayıflığı, baş dönmesi, konsantrasyon problemleri ve paradoksal stimulasyondur ve bu tip yan etkiler, maddelerin H₁ reseptörlerine seçiciliğinin zayıflığından ya da kan-beyin bariyerini geçme kapasitelerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca antikolinergik ve antiserotonin etkileri de olduğu için depresyon rahatsızlıklarında ya da Parkinson gibi sinirsel hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadırlar (Krause, 1992; Greaves, 2001; Bernstein, 2002; Simons, 2003).

2.3.1.2. İkinci Kuşak Antihistaminikler:

İkinci kuşak antihistaminikler lipofobik yapıdadırlar ve kan-beyin bariyerini geçemezler. H₁ reseptörlerine yarışmasız olarak bağlanırlar. Reseptörden ayrılmaları yavaştır ve etki süreleri daha uzundur. Bu kuşak antihistaminikler kan-beyin bariyerini geçemediği için sedatif etkileri daha sınırlıdır. Dolayısıyla birinci kuşak antistaminiklerde görülen yan etkiler bunlarda görülmez ya da çok hafif görülür. Fakat kardiyotoksik özellik gösterebildikleri belirtilmiştir. Dermatolojide, ürtiker, anjiyoödem, atopik dermatit ve kaşıntıyla seyreden diğer birçok hastalığın tedavisinde birinci kuşak antihistaminikler ile birçoğu bunlardan türetilmiş olan ikinci kuşak antihistaminikler kullanılmaktadır. Birinci kuşak antistaminiklerin temel imidazol halkasının yeri değiştirilerek ilacın kan-beyin bariyerini geçmesi önlenmiştir (Handley ve ark., 1998; Greaves, 2001; Simons, 2003).

2.3.1.3. Üçüncü Kuşak Antihistaminikler (Naturel Metabolitler):

H₁ antagonistlerinin 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 H₁ antagonist etki sağlanmış olmaktadır. Üçüncü kuşak antihistaminikler, ikinci kuşak antihistaminikler gibi kan-beyin bariyerini geçemezler ve sedatif etki göstermezler (Greaves, 2001; Bernstein, 2002; Kiremitçi, 2004)

İkinci ve üçüncü kuşak (nonsedatif) yeni nesil antihistaminikler, yan etkileri, ilaç etkileşimleri ve antikolinerjik etkileri azaltarak farmakolojik etkilerini korumak ve güçlendirmek amacıyla yeni geliştirilen antihistaminik ilaçlardır. Yeni kuşak antihistaminikler; H₁ reseptörleriyle kompetisyonun yanında, hücre degranülasyonunu önlemekte ve özellikle sedasyon yapmamaları nedeniyle daha çok tercih edilmektedirler. Bu ajanlar büyük ölçüde lipofobik olduğu için kan beyin bariyerinden minimal düzeyde geçerler ve az sedasyon yaparlar. İnteraksiyona girdikleri ilaç sayısı daha azdır ve antikolinerjik etkisi yok denecek kadar az olduğu için bazı hastalıklarda güvenli bir şekilde kullanılabilirler. Yarılanma süreleri değişmekle birlikte genellikle uzun etkilidirler (Kaliner, 1992; Özlüoğlu ve ark., 1994; Handley ve ark., 1998; Greaves, 2001; Bernstein, 2002; Simons, 2003).

Çizelge 1.1. Eski ve yeni nesil bazı antihistaminik ilaçlar

Birinci Kuşak Antihistaminikler	Antazolin	Hidroksizin	Pirilamin
	Azetadin	Karbinoksamin	Siklizin
	Dimetinden	Klemastin	Siproheptadin
	Diphenhidramin	Methdilazin	Trimeprazin
	Doksilamin	Methapirilen	Triprolidin
	Feniramin	Promethazin	
İkinci Kuşak Antihistaminikler	Akrivastin	Loratadin	
	Astemizol	Levocabastin	
	Azelastin	Mizolastin	
	Ebastin	Setirizin	
	Ketotifen	Terfenadin	
Üçüncü Kuşak Antihistaminikler	Desloratatin		
	Feksofenadin		
	Levosetirizin		
	Norastemizol		

2.4. Feksofenadin:

Feksofenadin, periferel selektif H₁ reseptör antagonisti olarak aktivite gösteren üçüncü kuşak bir antihistaminiktir. Terfenadin antihistaminiğinin farmakolojik açıdan hidroklorid tuzu olarak sentezlenmiş aktif bir karboksilat metabolitidir (Handley ve ark., 1998; Markham ve Wagstaff, 1998; Başkan ve ark., 2003).

Feksofenadin, yan etkileri nedeniyle kullanımdan kaldırılmış ilk antihistaminik olan terfenadinin aktif metabolitidir. Terfenadin ise, senkop ve ani kardiyak ölümlere neden olan ciddi ventriküler aritmilere yol açmasından dolayı, ABD ve Avrupa'da piyasadan çekilen ilk antihistaminiktir. Feksofenadin, terfenadinin yararlı etkilerini gösteren, fakat sedatif etkisi olmayan yeni bir antihistaminik ilaçtır (Handley ve ark., 1998; Markham ve Wagstaff, 1998; Braun-Falco ve ark., 2000; Başkan ve ark., 2003).

Histaminin yol açtığı ödem, kızarıklık, sıcaklık ve kaşıntı gibi semptomların giderilmesinde, mevsimsel alerjik rinit ve kronik idiyopatik ürtiker tedavisinde sıklıkla feksofenadin kullanılmaktadır. Erişkinler ile 12 yaş ve üzerindeki çocuklar için günlük dozu 120 mg'dır (Simpson ve Jarvis, 2000; Amichai ve ark., 2001).

2.4.1. Feksofenadinin Farmakodinamik Özellikleri:

H₁ reseptör antagonisti olan feksofenadin kan beyin bariyerini geçemediği için sedasyon ve diğer santral sinir sistemi etkilerini göstermez. Ayrıca feksofenadinin, terfenadinden farklı olarak, potasyum kanallarını blokaj etkisi olmaması nedeniyle

doğrudan kardiyotoksik etkiler ortaya çıkarmaz (Markham ve Wagstaff, 1998; Simpson ve Jarvis, 2000; Amichai ve ark., 2001).

*In vitro*da feksofenadinin peritoneal fibroblast, bazofil, epitel ve mast hücrelerinde, histaminin de yer aldığı inflamatuvar aracı olan pek çok molekülün salınımını azalttığı belirlenmiştir. Feksofenadin, insan epitel hücrelerinde bulunan adhezif özellikteki ICAM-1 molekülünün salınımını azaltmaktadır. Ayrıca, insan nazal epitelyum hücrelerinde proinflamatuvar maddelerin ve adhezyon moleküllerinin salınımını ayarlayarak bazı antiinflamatuvar özellikler gösterdiği de bulunmuştur (Simpson ve Jarvis, 2000; Amichai ve ark., 2001).

2.4.2. Feksofenadinin Farmakokinetik Özellikleri:

Feksofenadinin tek ve tekrarlayan dozlardaki farmakokinetik özellikleri sağlıklı ve alerjik rinitli gönüllüler ile araştırılmıştır. Feksofenadin oral alımı takiben hızla absorbe olur ve absorpsiyon gıdalardan çoğunlukla etkilenmez. Oral yolla alınımı takiben, gastrointestinal sistemden hızla emilir. Dozu takip eden 1-3 saat içinde maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşır. Plazmada, feksofenadinin yaklaşık %60-70'i albümin ve α -1asit glikoprotein gibi plazma proteinlerine bağlanır. Oral yolla uygulanan toplam dozun yaklaşık %5'i metabolize olur. Bunun çoğunluğu intestinal mukozada ve %0.5-1.5' luk kısmı ise karaciğerde gerçekleşmektedir. Sitokrom P-450 sistemiyle metabolize edilmediğinden dolayı, aynı enzim sistemiyle metabolize edilen ilaçlarla yarışmaz. Kalan miktarın %80'i feçesle, %12'si idrarla değişmemiş olarak atılır. Feksofenadinin terminal eliminasyon yarılanma ömrü, çoklu dozu takiben yaklaşık 15 saattir. Günde tek doz ve iki doz şeklinde alınabilen ilacın antihistaminik etkisinin bir saat içinde başladığı ve 24 saat sürdüğü gözlenmiştir (Handley ve ark., 1998; Markham ve Wagstaff, 1998; Simpson ve Jarvis, 2000; Amichai ve ark., 2001).

2.4.3. İlaç Etkileşimleri:

Feksofenadin hepatik biyotransformasyondan geçmez ve bu nedenle hepatik mekanizmalar yoluyla diğer ilaçlarla etkileşmez. Feksofenadin hidroklorürün eritromisin ya da ketokonazol ile birlikte uygulanmasının, plazma feksofenadin seviyesinde yaklaşık 2-3 kat artışa yol açtığı saptanmıştır. Hayvan çalışmaları, eritromisin ya da ketokonazol ile birlikte uygulama sonrasında feksofenadinin plazma düzeylerinde görülen artışın gastrointestinal emilimde meydana gelen bir artışa ve safra

yoluyla atılımda ya da gastrointestinal sekresyonda meydana gelen bir azalmaya bağlı olabileceğini göstermiştir. Fakat feksofenadinin; antifungal ajanlar, antidepresanlar ve H₂-blokerleri ile birlikte kullanılmasının güvenli olduğu belirtilmiştir (Ament ve Paterson, 1997; Markham ve Wagstaff, 1998; Simpson ve Jarvis, 2000; Amichai ve ark., 2001).

2.5. Genetik Toksikoloji:

Son yıllarda bitkisel, hayvansal ve mineral kaynaklı doğal maddelerin yerini, biyolojik etkileri tam olarak bilinmeyen ve pek çoğu sentetik olan yeni kimyasal maddeler almıştır. Bu tip kimyasal maddelerin sayılarının ve kullanımlarının her geçen gün hızla artması, beraberinde pek çok istenmeyen yan etkiler ve sağlık problemleri ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle bu durum pek çok maddenin karsinojenik ya da mutajenik potansiyelleri yönünden test edilmeleri gereğini ortaya çıkarmış ve beraberinde genetik toksikolojinin önemi her geçen gün artmıştır. Çünkü etrafımızdaki pek çok etken madde mutajenik, karsinojenik ve teratojenik olabilmekte, ciddi sağlık sorunlarının ortaya çıkmasına, kanser oluşumuna ve ölümlere yol açabilmektedir (Purchase ve ark., 1978; Choy, 2001).

Genetik toksikoloji; toksikolojinin bir alt dalı olup, organizmanın normal biyolojik işleyişi sırasında veya kimyasal, fiziksel ve biyolojik etkenlere bağlı olarak hücrelerin kromozom ve DNA moleküllerinde meydana gelen değişiklikleri inceleyen bir bilimdir ve yeni bileşiklerin ve ilaçların toksikolojik açıdan değerlendirilmesinde önemli bir yere sahiptir (Mortelmans ve Rupa, 2004; Üstün, 2007). Genetik toksisite, çekirdek, kromozom ve DNA yapısında meydana gelen hasarlarını, DNA kırıklarını, gen mutasyonlarını, kromozom anormalliklerini, klastojenite ve anöploidi gibi olayları kapsayan genel bir terimdir (Young, 2002; Zeiger, 2004; Üstün, 2007).

DNA veya genomun kopyasının çıkarılmasını sağlayan enzimlerle etkileşime giren ve mutasyona neden olan maddelere genotoksik maddeler adı verilmektedir. Genotoksik maddelerin DNA'da hasar meydana getirmesi veya bazı değişimlere yol açması ise genotoksik etki olarak tanımlanmaktadır (Choy, 2001; Mortelmans ve Rupa, 2004; Üstün, 2007).

Yapılan araştırmalar, çevremizdeki çeşitli kimyasal maddelerin küçük miktarlarının bile genotoksik, mutajenik veya karsinojenik olabileceği gerçeğini ortaya koymaktadır. Bu etkilere sahip olma potansiyeli taşıyan ilaçların, tedavi edici etkilerinin

belirlenmesinin yanında, insan genomunda mutasyonlara sebep olup olmadıklarının ortaya çıkarılması son derece önem taşımaktadır. Genetik toksisite testlerinde alınan pozitif sonuçlar mutajenik olan birçok maddenin karsinojenik de olduğunu göstermektedir. Kimyasal maddelerin mutajenik etkileri ile karsinojenik potansiyelleri arasında böylesine kuvvetli bir ilişkinin olması, mutajenezis testlerinin endüstri kuruluşları tarafından kimyasal maddelerin karsinojenik risklerinin araştırılmasında biyogösterge testleri olarak kullanılması sonucunu doğurmuştur. Mutajenite testleriyle elde edilen sonuçlara göre bilinen kanserojenlerin yaklaşık %90 kadarının aynı zamanda mutajenik olduğu, buna karşın tüm mutajenlerin potansiyel kanserojen olabileceği bildirilmiştir (Purchase ve ark., 1978; Mavournin ve ark., 1990; Choy, 2001; Zeiger, 2004; Vural, 2005; Üstün, 2007).

2.5.1. Genetik Toksisite Testleri:

Genotoksisite testleri esas olarak kanserden korunmada, çevresel etkenlerin ve endüstriyel kimyasalların etkisini araştırmada, ilaçların piyasaya sürülmeden önce toksik etkilerini ve güvenilirliğini araştırmada yaygın olarak kullanılmaktadır. 1970'lerden bu yana mutajenik ve genotoksik olan maddelerin karsinojenik 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 bileşikler saptamak amacıyla geliştirilmiş *in vitro* ve *in vivo* testlerden oluşurlar (Choy, 2001; Bedir ve ark., 2004; Zeiger, 2004; Üstün, 2007).

2.5.1.1. Salmonella / mikrozoim (Ames) Testi:

Ames testi, Ames (1970) tarafından geliştirilmiş ve bakteriyal mutasyon testleri içinde detayları en iyi bilinen ve karakterize edilen, geçerliliği, uygulanma kolaylığı ve hassaslığı nedeniyle en fazla kabul görerek tercih edilen ve günümüzde de sıklıkla kullanılan bir mutajenite testidir (Maron ve Ames, 1983; Gatehouse ve ark., 1990; Jung ve ark., 1992; Jarvis ve ark., 1996; Mortelmans ve Zeiger 2000; Choy, 2001).

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

2.5.1.2. Memeli Hücre Kültürü Testleri:

Pekçok araştırıcı, genotoksik etkinin saptanmasında tek bir testin tek başına yeterli olmadığını, bir maddenin genotoksik ya da mutajenik aktivitesinin belirlenmesinde bir seri test sisteminin kullanılması gerektiğini belirtmişlerdir (Mortelmans ve Rupa, 2004; Üstün, 2007). 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 de 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 (Banerjee ve ark., 1997; Davila ve ark., 1998; Zoli ve ark., 1995; Robinson ve ark., 2002; Saygı, 2003).

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 alerjisi potansiyeline sahip olup olmadığını öngörülmesi (Wooster ve ark., 1993; Saygı, 2003).

İnsan hücre kültürlerinin toksisite araştırmalarındaki avantajları;

- a. Tür farklılığını ortadan kaldırır,
- b. Kimyasal maddelerin muhtemel toksik etki yapacağı düşünülen deri, karaciğer gibi spesifik doku hücreleri üzerinde araştırma yapılmasını sağlar,

- c. Toksikite mekanizmalarının hücreler üzerinde aydınlatılmasına imkân verir,
- d. Denejde kullanılan hayvanların acı çekmesi veya ölmesi söz konusu değildir (Saygı, 2003).

Kimyasal maddelerin mutajenik ve karsinojenik potansiyeleri 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.

2.5.1.2.1. *In vitro* Kromozom Anormallikleri (KA) Testi:

In vitro kromozom anormallikleri (KA) testi, genellikle periferel kan lenfosit hücre kültürlerinin kullanıldığı, test bileşikleri tarafından indüklenen yapısal ve sayısal kromozom anormalliklerinin ve dolayısıyla genotoksik risklerin belirlemede 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 gösterebileceği belirlenmiştir (Savage, 1993; Anderson, 1988; Carrano ve Natarajan, 1988; Albertini ve ark., 2000; Norppa ve ark, 2006; Yavuz Kocaman, 2007).

In vitro KA testinde, hücrelerin mitoz bölünme geçirmesini sağlayan ortamlarda, periferel kan lenfositlerinden oluşan hücre kültürleri inkübasyona bırakılır. Kültürler inkübasyonun belirli zamanlarında test bileşiği ilave edilir. Kültür süresi tamamlanmadan ortalama 2 saat önce, tübülün polimerizasyon inhibitörü olan ve hücre bölünmesini metafaz aşamasında durduran kolşisin uygulanır. Kültürü yapılan hücrelerin belirlenmiş olan protokollere uygun olarak metafaz kromozom preparatları hazırlanır ve mikroskop altında yapısal ve sayısal kromozom anormallikleri yönünden incelenir (EPA, 1998; Choy, 2001).

2.5.1.2.2. *In vitro* Mikronukleus (MN) Testi:

Mikronükleuslar (MN) hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan ve tüm kromozomlar ya da kromatidlerin anafazda geri kalmasından dolayı

telofazda oluşan kardeş nükleusun dışında rastlanan oluşumlardır. MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Anöploidiyi uyaran ajanlar, sentromer bölünme hatalarına ve iç iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna katkıda bulunmaktadırlar. Hücrelerde MN sayısında artış saptanması somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın göstergesidir ve MN oluşumuna neden olabilen kromozom kaybı ya da kromozomların ayrılammaması kanser ve yaşlanmada gözlenen önemli olaylardandır. Yapılan çalışmalarda, kanser hastalarından alınan periferel kan lenfositlerindeki MN frekansında belirlenen artış, kanser oluşan hedef dokudaki MN frekansı kadar bulunmuştur (Vanparys ve ark., 1990; Surrallés ve ark., 1995; Cheng ve ark., 1996; Duffaud ve ark., 1997; Kirsch-Volders ve ark., 1997; Choy, 2001; Demirel ve Zamani, 2002).

MN testi, çeşitli bileşikler tarafından oluşturulan kromozomal hasarların değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan standart genotoksisite testlerinden biridir. Ayrıca, sitogenetik harabiyetin tespitinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi gibi avantajları sayesinde yaygın kullanım alanı bulan bir tekniktir (Schmid, 1975; Garewal ve ark., 1993; Stopper ve Müler, 1997; Fenech, 2000; Krishna ve Hayashi, 2000; Widel ve ark., 2001; Demirel ve Zamani, 2002). Ayrıca bütün halde kromozom şeklinde mikronükleus oluşumuna neden olan ve kromozomal anormallik testleriyle çalışılması güç olan anöploidiyi indükleyici ajanlar bu testle kolaylıkla saptanabilmektedir (Aardema ve Kirsch-Volders, 2001; Lorge ve ark., 2007). Birçok araştırmacı MN analizi için çeşitli teknikler kullanmışlardır. Fakat Fenech ve Morley (1986) tarafından, küf mantarlarının metabolitlerinden olan Sitokalsin-B (Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanarak ve bir hücre siklusunu tamamlayan hücrelerin binükleer görünümüyle ayırt edilmesine olanak sağlayan modifiye bir teknik geliştirmişlerdir. Sitokinezi bloklama metodu ile bazı kinetik problemler ortadan kalkmış ve *in vitro* MN tekniğinin uygulanmasındaki güvenilirlik artmıştır (Fenech ve Morley, 1985; Fenech, 2000; Aardema ve Kirsch-Volders, 2001; Choy, 2001; Demirel ve Zamani, 2002).

In vitro MN testinde, hücrelerin mitoz bölünme geçirmesini sağlayan ortamlarda, periferel kan lenfositlerini içeren hücre kültürleri inkübasyona bırakılır ve

kültürlere belirli zamanlarında test bileşiği ilave edilir. İlk mitozdan önce kültürün yaklaşık 44. saatinde sitokinezi engellemek ve binükleer hücre elde etmek amacıyla kültürler belirli miktarda Cyt-B eklenir. İnkübasyon süresi sonunda kültürler protokollere uygun şekilde hasat edilir ve preparatlar hazırlanarak sitokinezi bloklanmış binükleer hücreler mikroskop altında mikronükleus yönünden incelenir (OECD, 2006).

2.5.1.2.3. *In vitro* Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Testi:

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

2.5.1.2.4. Fare Lenfoma Testi (Mouse Lymphoma Assay=MLA):

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

2.5.1.2.5. Comet (Single Cell Gel Electrophoresis) Testi:

Comet Tekniği, DNA sarmal kırılmalarının tespiti için hassas, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Comet Tekniği “Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) ya da “Mikrojel Elektforez Tekniği” olarak da adlandırılmaktadır. DNA kırıklarının tayini prensibine dayanan Comet yöntemi, pek çok DNA hasarının ve onarımının tayininde, biyoizleme çalışmalarında ve genetik toksikolojide yaygın kullanım alanı bulmuştur. Ayrıca her tür ökaryotik hücreye uygulanabilmesi, düşük hasar seviyesini ölçebilmesi, az sayıda hücre örneği gerektirdiği için hızlı, basit ve ucuz bir yöntem olması gibi avantajlarından dolayı genotoksisite testi olarak geniş bir kullanım alanına sahiptir (Östling ve Johanson, 1984; McKelvey-Martin ve ark., 1993; Fairbairn ve ark., 1995; Singh ve ark., 1988; Kassie ve ark., 2000; Tice ve ark., 2000; Olive ve Banáth, 2006; Kevlekçi, 2008).

2.6. Antihistaminiklerle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları:

Piyasada bulunan 838 ilacın genotoksisite ve karsinojenitesinin değerlendirildiği bir çalışmada, değerlendirilen ilaçların %43,7'sinde (366 ilaç) genotoksisite ve karsinojenite verisine ulaşılmamıştır. Fakat geriye kalan %56,3'ü (472 ilaç) yapılan çeşitli genotoksisite ve karsinojenite testlerinden en az birine pozitif cevap vermiştir (Brambilla ve Martelli, 2009).

Yapılan bir ilaç araştırmasında, 21 antihistaminik ilaç, genotoksitite etkisinin mekanizmasını anlamak için çeşitli testlere tabii tutulmuştur. Test edilen 2 ilaçta pozitif bir genotoksik sonuca ulaşılmamıştır. Geriye kalan 19 ilacın 9 tanesi *in vitro* genotoksitite bazında pozitif, bir tanesi de belirgin olmayan pozitif sonuç vermiştir (Snyder, 1998).

Mekuitazine dair yapılan bakteriyal mutasyon testleri ve farelerde 0.12 (klinik doz) - 48 mg/kg dozlarında yapılan *in vivo* mikronükleus testleri, ilacın mutajen olmadığını bildirmektedir (Sono ve ark., 1981).

Klorfeniraminin toksisite ve karsinojenitesinin değerlendirildiği bir çalışmada, klorfeniramin fare ve sıçanlara gavaj yoluyla verilmiş ve bu maddenin sıçanlarda karsinojen olduğuna dair kanıt olmadığı, fakat yüksek doz uygulanan farelerde karsinojen cevabın arttığı bildirilmiştir (NTP, 1986). “Flow cytometry mutation assay” ile 17 fiziksel ve kimyasal ajanla ilgili yapılan çalışmada **klorfeniraminin** mutajen olmadığı sonucuna ulaşılmıştır (French ve ark., 2006). Hastwell ve ark.'nin 2009 yılında

“GADD45a-GFP (GreenScreen HC) reporter assay” ile yaptığı bir çalışmada ise **klorfeniraminin** genotoksik olmadığı sonucuna varılmış olmasına rağmen, *in vitro* sitogenetik ve S9 testlerinde pozitif cevap verdiği bildirilmiştir.

Methapirilen ile ilgili yapılan çalışmalarda ise bu antihistaminin sitotoksik olmayan bir yoldan karsinojen etki gösterdiği bildirilmiştir (Turner ve ark. 1987, Steinmetz ve ark. 1988).

İlk basımı 1973 yılında yapılan ve 2004’ e kadar onbirinci baskıya ulaşan Catalog of Teratogenic Agents (Teratojenik Ajanlar Kataloğu)’da, **siklizinin** teratojenik etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Brambilla ve Martelli (2007) tarafından yapılan bir çalışmada ise bakteriyel mutasyon testlerinde ve *in vivo* olarak sıçanlarda (1000 ppm) yapılan çalışmaların sonucunda **siklizinin** mutajenik olmadığı bildirilmiştir.

Doksilamin ile ilgili insanda yapılan genotoksite çalışmalarında kardeş kromatid değişimi gözlenmemiştir (Müller ve ark., 1989). Fakat eldeki veriler, ilacın insanda karsinojen olarak sınıflandırılması için yetersizdir (IARC, 2001). **Doksilamin** ile yapılan fare deneylerinde, mikronükleus ve kardeş kromatid değişimi gibi genotoksik etkilerinin olmadığı, fakat doza bağlı olarak kromozomal değişimleri indüklediği görülmüştür. Sıçanlarda yapılan karsinojenite çalışmalarında ise, erkek sıçanlarda hepatoselüler adenoma ve karsinoma görülme sıklığının az da olsa etkilendiği rapor edilmiştir. Fare çalışmalarında ise dişi ve erkek deneklerde hepatoselüler ve tiroid foliküler hücre adenomalarında artış gözlenmiştir (IARC, 2001).

Pirilamin ile Fisher 344 sıçanlarında *in vivo* yapılan bir çalışma sonucu, uygulanan günlük dozların (11-150 mg/kg) karsinojenitesine dair bir kanıt bulunamamıştır (Greenman ve ark., 1995).

Klemastinin 25 µg/ml konsantrasyonda, V79 kültür hücrelerinde *in vitro* mikronükleus testinde negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir (Snyder, 1998).

Gebelik esnasında ve özellikle erken dönemlerinde (ilk 4 ay) **bromfeniramin** ve **feniramin** alımının teratojenik açıdan risk taşıyabileceği bildirilmiştir (Schatz ve ark., 1998).

Vlastos ve ark. (1998) tarafından yapılan çalışmada, **setrizin** veya **levosetrazinin** tedavi için kullanılan dozlarının teratojenik olmadığını söylemekle beraber, eldeki verilerin yetersizliği de vurgulamaktadır. **setrizinin** 25, 50, 75, 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonları *in vitro* ortamda insan lenfosit kültürlerinde kromozom anormallikleri ve kardeş kromatid değişimi açısından test edilmiştir. Yapılan çalışmada, bu

antihistaminin 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarının kromozom anormalliklerini indüklediği saptanmıştır. **Setrizin** 25, 50, 75, 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında *in vitro* mikronukleus oluşumu üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada da, doza bağlı olarak mikronukleus sıklığının arttığı bildirilmiştir (Vlastos ve Stephanou, 1998). Antihistaminiklerle yapılan bir teratojenite değerlendirilmesinde ise hamileliğin erken dönemlerinde **setrizin** veya **levosetrizin**in tedavi için kullanılan dozlarının teratojenik olmadığı ama kesin sonuca varmak için eldeki verilerin yetersiz olduğu bildirilmiştir (Wolfgang ve ark, 2004).

Synder (1998)'in yaptığı bir çalışmada, **klorsiklizinin** 10 µg/ml ve 30 µg/ml dozları kullanılarak *in vitro* mikronukleus testi yapılmış ve negatif sonuçlara ulaşılmıştır. Aynı çalışmada klorsiklizinin bakteriyel mutasyon testleri, fare lenfoma testleri ve SCE testlerinde de negatif sonuç verdiği bildirilmiştir.

Diphenhidramin ile ilgili olarak Jangi ve ark. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, dipenhidraminin doza ve süreye bağlı olarak sitotoksikite üzerinden apoptozu indüklediği belirtilmiştir. Aynı araştırmacılar **diphenhidraminin**, 0.2–1 mM konsantrasyonlarının, *in vitro* ortamda melanoma hücrelerinde sitotoksikite üzerinden apoptozu indüklediğini rapor etmişlerdir (Jangi ve ark., 2006).

Meda ilaç firmasının yayınlamış olduğu **Azelastin** ürün bilgisinde, azelastinin bakteriyel mutasyon testleri, fare lenfoma testleri ve *in vivo* sitogenetik testlerde genotoksik özellikte olmadığı rapor edilmiştir (Meda, 2010). Fakat öte yandan maya Green Screen metoduyla yapılan bir çalışmada genotoksik ve güçlü bir sitotoksik ajan olarak bildirilmiştir (Van Gompel ve ark., 2005).

2005 yılında 59. baskısı yapılan, tıp doktorlarına ilaçlarla ilgili referans sağlamakta olan 'The **Physicians' Desk Reference (PDR)**'da, **akrivastinin** *in vitro* genotoksikite testlerinde pozitif sonuç verdiği rapor edilmiştir. Synder ve ark. (2006)'nın yaptığı çalışmada ise, **akrivastinin** genotoksikitesinin interkalativ özelliğinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir.

Antihistaminik-kanser ilişkisine farklı bir açıdan bakan Jangi ve ark. (2006) terfenadin, astemizol, triprolidin ve diphenhidramin etken maddelerinin melanoma hücrelerinde genotoksik olduğunu ve kapsaz-2 bağımlı apoptozisi indüklediğini bildirmişlerdir.

Hidroksizinin, 1 µmol dozda bakteriyal mutasyon testlerinde zayıf pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir (Brambilla ve Martelli, 2007).

Brambilla ve Martelli (2007) yaptıkları bir çalışmada **trimeprazin**in bakteriyel mutasyon testlerinde mutajen olduğu rapor edilmiştir.

Buklizinin hayvan deneylerinde teratojenik olduğu gösterilmesine rağmen, henüz insan fetüsü üzerindeki etkileri tam olarak belirlenmemiştir (<http://drugsafetysite.com/buclizine/>, 28.01.2010).

Antihistaminiklerin kanser ve tümör oluşumu ile bunların gelişimindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada, antihistaminik kullanımının göğüs kanseri ile negatif ilişkisi olduğu ve bazı fare deneylerinde ise tümör gelişimini hızlandırdığı belirtilmiştir. Fakat eldeki verilerin yetersizliği, varılan sonuçların sadece *in vitro* kültürler ve fare deneylerinden sağlanmasından dolayı antihistaminiklerin insandaki karsinojenitesi hakkında çok kesin bir sonuca varılamamıştır (Weed, 1994).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada test maddesi olarak feksofenadin, 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 kanlar 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. Feksofenadine (Fexofenadine)

Bu çalışmada test maddesi olarak kullandığımız feksofenadin (Sigma), alerjik hastalıkların tedavisinde kullanılan ve terfenadinin aktif metaboliti olan antihistaminiktir.

Sinonimleri: Karboksiterfenadin, Feksofenadine hidroklorid, Terfenadin asit metabolit, Terfenadin karboksilat, Terfenadin-COOH

Ticari Adları: Alerteç, Alernex, Allegra, Feksine, Fexadyne, Fexavil, Fexizin, Fexofen, Mayfex, Telfast, Vivafeks

Kimyasal Adı: Benzeneasetikasit, 4-[1-hidroksi-4-[4-(hidroksidifenilmethyl) -1-piperidinil]butil]-a,a-dimethyl-,hidroklorid (1:1)

CAS no: 153439-40-8

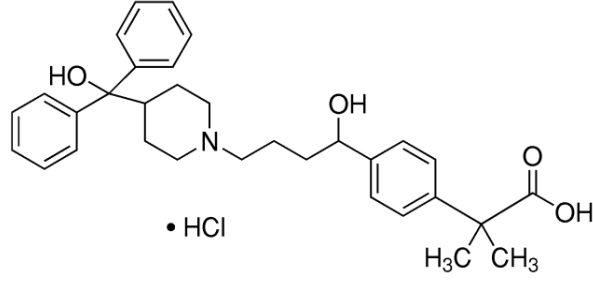
Molekül Ağırlığı: 538.12

Safılık düzeyi: >%98

Erime Sıcaklığı: 148-150°C

Kaynama Sıcaklığı: 697.3°C

Kapalı Formülü: C₃₂H₃₉NO₄-HCl

Açık Formülü:**3.1.1.2. Dimetil Sülfoksit (Dimethyl Sulfoxide, DMSO)**

Bu çalışmada fexofenadin konsantrasyonlarının hazırlanmasında çözücü olarak kullanılmıştır ve Merck'den sağlanmıştır. Test maddemiz olan feksofenadin %8'lik DMSO'da çözülmüştür ve aynı zamanda %8'lik DMSO, çözücü kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Kimyasal adı: Dimetil Sülfoksit (DMSO)

Molekül ağırlığı: 78.13 g/mol

Safılık düzeyi: \geq %99.7

Kaynama noktası: 189 °C

Erime noktası: 18.5 °C

CAS No: 67-68-5

Kapalı formülü: (CH₃)₂SO

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' sine aşağıdaki bileşikler belirtilen miktarlarda eklenmiştir.

RPMI 1640 (Biological Industries)	100 ml
Fetal Bovine Serum (Biological Industries)	20 ml
Penicillin/Streptomycin/Amphotericin (PSA) (Biological Industries)	1 ml
Phytohemagglutinin 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 hücre kültürlerinde kullanılmıştır.

3.1.1.4. Mitomisin C (Mitomycin C, MMC)

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

Kimyasal adı: Mitomisin C

Molekül ağırlığı: 334.327 g/mol

Erime noktası: 360°C

CAS No: 50-07-7

Safılık düzeyi: %99

Kapalı formülü: $C_{15}H_{18}N_4O_5$

3.1.1.5. Sitokalsin B (Cytochalasin B)

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

Kimyasal adı: Sitokalsin B

Molekül ağırlığı: 479.61 g/mol

Safılık düzeyi: \geq %98

CAS No: 14930-96-2

Kapalı formülü: $C_{29}H_{37}NO_5$

3.1.1.6. Kolsemid (Colcemid)

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

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

Cat. No: 12-004-1

Molekül ağırlığı: 399.4

Kapalı formülü: $C_{22}H_{25}NO_6$

3.1.1.7. Hipotonik Eriyik

Hipotonik eriyik olarak %0,4'lük KCl (Merck) kullanılmıştır. Uygulamadan yaklaşık bir gün önce 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 elde edilmiştir. Fiksatifler, kullanılmadan iki saat önce hazırlanarak buzdolabında saklanmıştır.

3.1.1.9. Sorensen Tamponu

Bu eriyik, iki stok çözelti halinde hazırlanmıştır ve bu çözeltiler çalışmanın amacına uygun olarak pH=6.8 olacak şekilde birbirleriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanılmıştır.

Hazırlanışı

-11.88 gr. Na_2HPO_4 (Sigma) 1000 ml distile suda çözülmüştür.

-9.08 gr. KH_2PO_4 (Merck) 1000 ml distile suda çözülmüştür.

KH_2PO_4 çözeltisi, Na_2HPO_4 çözeltisinin üzerine ilave edilmiştir.

3.1.1.10. Giemsa

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

3.1.1.11. 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 Eppendorf marka santrifüj kullanılmıştır.

3.1.2.5. Vorteks Karıştırıcı

Çalışmamızda kültür tüplerini dairesel salınımlı hareketler ile karıştırmak amacıyla Velp marka vorteks karıştırıcı kullanılmıştır.

3.1.2.6. Mikroskop

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

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

3.2.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Periferik kan örneklerinden KA'ni saptamak amacıyla hücre kültürünün yapılması ve preparatların hazırlanmasında Evans (1984)'ın tekniği 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 alınan kan örnekleri 1/10 oranında heparinize edilerek kullanılmıştır. Alınan periferik kan örneklerinden 300 µl steril şartlarda içerisinde 2.5 ml'lik kromozom medyumu 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, çözücü kontrol, pozitif kontrol ve **feksofenadin** grupları oluşturulmuştur. Negatif kontrol grubuna ait tüplere herhangi bir madde eklenmeksizin inkübasyona bırakılmıştır. Çözücü kontrol grubu olarak %8'lik DMSO kullanılmıştır ve bu gruptaki kültür tüpleri %8'lik DMSO'nun hem 24 ve hem 48 saatlik muamelesine maruz bırakılmıştır. DMSO kültür tüplerine 8 µl/ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Çalışmamızda pozitif kontrol olarak ise Mitomisin C kullanılmıştır ve kültür tüpleri Mitomisin C'nin 24 ve 48 saatlik muamele sürelerine maruz bırakılmıştır. Mitomisin C kültür tüplerine 0.16 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Test maddemiz olan **feksofenadinin** etkisini incelemek için kültür süresinin bitimine 24 ve 48 saat kala **feksofenadinin** daha önce belirlenmiş ve kültür tüplerine %8'lik DMSO'da çözülerek hazırlanmış konsantrasyonları olan 50, 100 ve 150 µg/ml'lik miktarları ilave edilmiştir.

Tüm tüplere kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (kültürün 70. saatinde) kolşisin eriyiğinden 0.06 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiş ve hücreler 2 saat süresince kolşisin ile muameleye bırakılmıştır.

Kültür süresinin bitiminde tüpler 1200 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiş ve altta biriken hücrelere zarar vermeden üstte biriken süpernatant su trompu yardımıyla atılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden yaklaşık 1ml'lik sıvı karıştırıldıktan sonra tüplere, daha önceden 37°C 'de ısıtılmış olan %0.4'lük KCl hipotonik solüsyonundan yavaş yavaş damlalar halinde 10 ml ilave edilmiştir. Tüplere hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler, ağzı kapatılarak inkübatöre konulmuştur ve 37°C 'de

20-30 dakika hipotonik eriyikle muamele edilmiştir. Muamele süresinin sonunda tüpler 15 dk. 1200 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır.

Hücrelerin fikse edilmesi için tüplere, 3:1 oranında hazırlanan ve buzdolabında muhafaza edilen soğuk tespit (fiksatif) çözeltisi (metil alkol: glisial asetik asit), tıpkı hipotonik eriyik ilavesi gibi 10 ml olacak şekilde damlalar halinde yavaş yavaş ilave edilmiştir. Yaklaşık 20 dakika oda sıcaklığında fiksatif ile muamele edilen hücreler 1200 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış ve bu defa tüplere 5 ml fiksatif ilave edilmiştir. Tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görülünceye kadar bu işlem yaklaşık 3 kez daha tekrarlanmıştır. Son santrifüj işleminden sonra tüplerde yaklaşık 1 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atılmıştır.

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

3.2.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması

Sorensen tamponu ile hazırlanmış olan % 5'lik Giemsa eriyiği filtre kağıdı ile dik bir şaleye süzülmüştür. Preparatların Giemsa-Tampon boya eriyiğinde yaklaşık 4-5 dakika 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 mikroskobik incelemeler yapılmıştır.

3.2.3. Mikroskobik İncelemeler ve Mikroskopta Fotoğraf Çekme

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

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

3.2.4. 1. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

Test maddelerinin mitoz bölünme üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile her kişiye ait preparatlardan toplam 2000 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 anormalliklerinin 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 ve kromozom anormalliği içeren anormal hücre ortalaması (AHO) 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). Benzer olarak bu çalışmada da gaplar, kromozom anormalliği olarak değerlendirilmemiştir.

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

3.3.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Çalışmamızda *in vitro* mikronükleus testi için hücre kültürünün yapılması ve preparatların hazırlanmasında Fenech (2000), Rothfuss ve ark. (2000) ve Kirsch-Volders ve ark. (2003)'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 medyumunu bulunan steril tüplere, alınan periferik kan örneklerinden 300 µl steril şartlarda ekilmiştir ve hücre kültürü $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 68 saat için inkübasyona bırakılmıştır.

Mikronükleus testi için de negatif kontrol, çözücü kontrol, pozitif kontrol ve **feksofenadin** grupları bulunmaktadır ve bu gruplara uygulanan tüm test maddeleri, kromozom anormallikleri testinde uygulanan konsantrasyon ve muamele sürelerinde kullanılmıştır. Yani; herhangi bir maddenin ilave edilmediği bir negatif kontrol grubu, %8'lik DMSO'nun hem 24 ve hem 48 saatlik muamelelerini içeren çözücü kontrol grupları, Mitomisin C'nin 24 ve 48 saatlik muamelelerinden oluşan pozitif kontrol grupları ve test maddemiz olan **feksofenadin**'in %8' lik DMSO'da hazırlanmış olan 50, 100 ve 150 µg/ml'lik konsantrasyonlarının 24 ve 48 saat boyunca etken madde ile muamelelerinin yapıldığı deney grupları mikronükleus testi için de aynen kullanılmıştır.

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

Kültür süresinin bitiminde tüpler 1200 rpm'de 15 dk. santrifüjlenerek süpernatant atılmıştır. Tüpte kalan yaklaşık 1 ml'lik sıvı karıştırıldıktan sonra tüplere, daha önceden 37°C'de ısıtılmış olan hipotonik eriyikten (%0.4 KCl) 5 ml yavaş yavaş ilave edilmiştir. Hipotonik eriyik ilave edilen tüpler, ağzı kapatılarak 37°C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda tüpler 1200 rpm'de 15 dk. santrifüjlenerek tekrar süpernatant atılmıştır. 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. 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.

3.3.2. 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 15 dakika boyanmıştır. Preparatlar boyadan çıkarıldıktan sonra farklı kaplardaki distile sulardan geçirilerek fazla boyanın akması sağlanmış ve preparatlar dik bir şekilde kurumaya bırakılmıştır. Boyanan preparatlar en az 1 gece kurutulduktan sonra, entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir. Entellan kuruduktan sonra daimi preparatlarda mikroskobik incelemeler yapılmıştır.

3.3.3. Mikroskobik İncelemeler ve Mikroskopta Fotoğraf Çekme

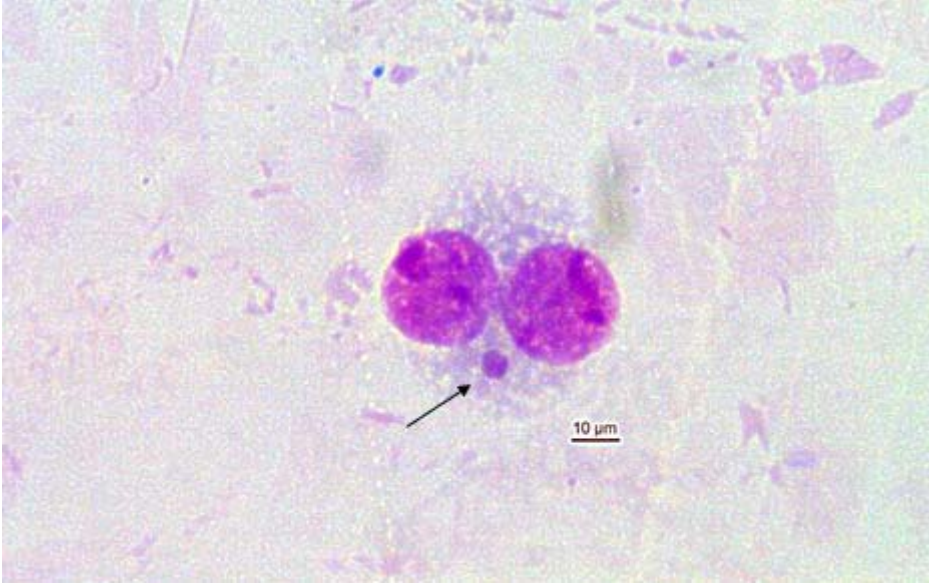
Hazırlanmış olan daimi preparatlar görüntü analiz sistemli Leica marka ışık mikroskobu ile x40 büyütmede incelenmiştir. İncelenen preparatlarda mononükleat (bir nükleuslu), binükleat (iki nükleuslu), trinükleat (üç nükleuslu) ve tetranükleat (dört nükleuslu) hücreler ile mikronükleuslu binükleat hücreler tespit edilmiştir. Bir, iki, üç ve dört nükleuslu bazı hücrelerin ve mikronükleus bulunduran bazı binükleat hücrelerin fotoğraflama işlemi yapılmış ve görüntüler bilgisayara aktarılmıştır.

3.3.4. 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 3.2) toplam 2000 hücre incelenmiş ve bu binükleat hücreler içerisinde mikronükleus taşıyanlar (Şekil 3.3) belirlenmiştir. Ayrıca incelenen binükleat hücrelerde toplam mikronükleus sayısı saptanarak, mikronükleus taşıyan iki nükleuslu hücrelerin oranı ve toplam mikronükleus sayısının incelenen iki nükleuslu hücre sayısına bölünmesiyle hücre başına düşen mikronükleus ortalaması ve % MN hesaplanmıştır.



Şekil 3.2. Binükleat hücre (x400)

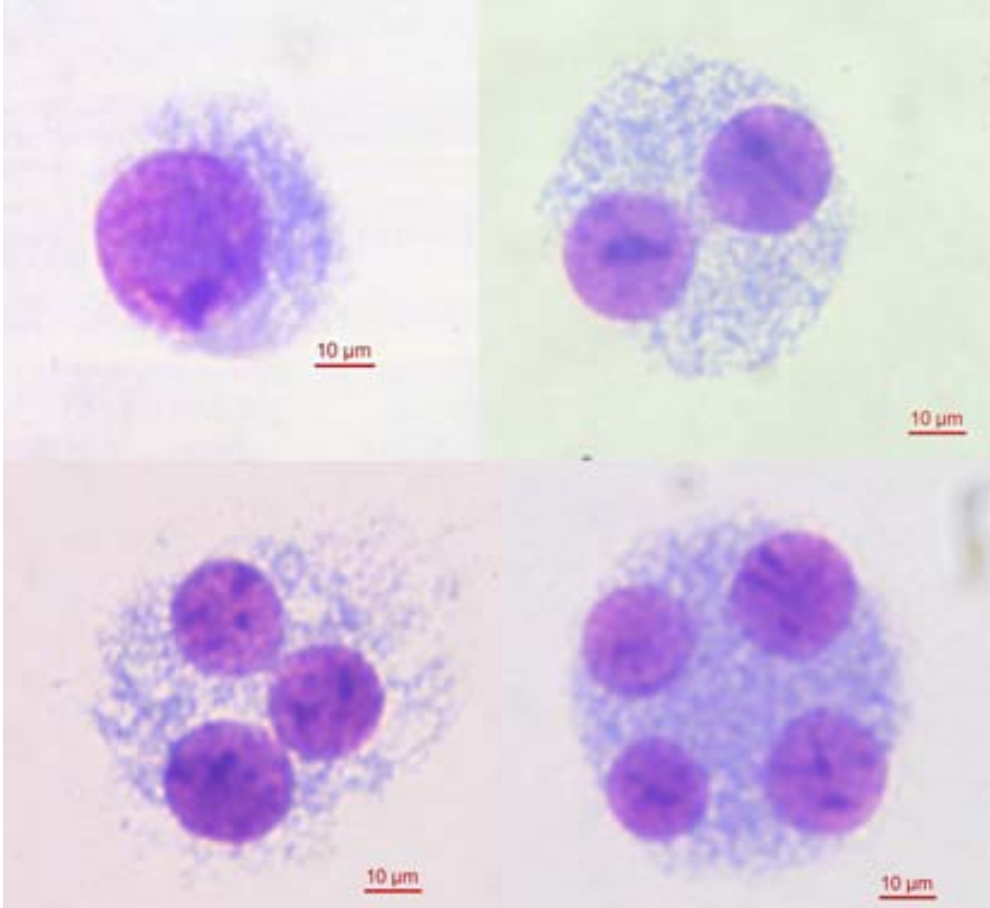


Şekil 3.3. Bir mikronükleus bulunduran binükleat hücre (x400)

Binükleer hücre ve mikronükleus ayırımı Titenko-Holland ve ark. (1997) ve Fenech (2000)'e göre yapılmıştır: (1) Hücreler belirgin sitoplazmasıyla yuvarlak ya da oval görünüme sahip olmalıdır; (2) Benzer olarak, nükleuslar belirgin nükleus zarıyla çevrili yuvarlak ya da oval olmalıdır; (3) İçerisinde MN sayılan hücreler sadece bir nükleus bölünmesi geçiren hücrelerdir; (4) MN'lar sadece ana nükleusun 1/3'ü ya da

daha küçük olduklarında hesaba katılmalıdır; (5) MN'lar ana nükleus gibi boyanmalıdır; (6) MN'lar ana nükleustan açık bir şekilde ayrılmış olmalıdır (Yavuz Kocaman, 2007).

Her bir kişiden hazırlanan preparatlardan 2000 (4 kişi 8000 hücre) hücre sayılarak, bu hücreler arasından bir nükleuslu, iki nükleuslu, üç nükleuslu ve dört nükleuslu (Şekil 3.4) olanların oranı saptanmıştır. Bu orandan yola çıkarak Eastmond ve Tucker (1989) tarafından önerilmiş olan formüle göre Nükleer Bölünme İndeksi (NBI) (Nuclear Division Index = NDI) hesaplanmıştır (Yavuz Kocaman ve Topaktaş, 2007). NBI'nin hesaplanması kimyasal veya fiziksel bir maddenin sitotoksik etkisini göstermede önemli bilgiler sağlar (Fenech, 1997; Yavuz Kocaman ve Topaktaş, 2007).



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

$$\text{NBI} = (\text{MI} + 2\text{MII} + 3\text{MIII} + 4\text{MIV}) / N$$

MI: Bir nükleuslu hücreler

MII: İki nükleuslu hücreler

MIII: Üç nükleuslu hücreler

MIV: Dört nükleuslu hücreler

N: Toplam hücre sayısı

3.4. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

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

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

4. BULGULAR

4.1. Feksofenadinin Mitotik İndeks (MI) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

Feksofenadin (FXF)'in 50-100-150 µg/ml dozlarında insan periferik lenfositlerine 24 ve 48 saat muamelesi sonucu ortalama ve % MI'in etkilendiği belirlenmiştir. Feksofenadin dozunun artışına bağlı olarak MI'in düştüğü tespit edilmiştir. Ayrıca 48 saatlik feksofenadin uygulamasının, 24 saatlik uygulamaya göre ortalama ve % MI'i daha fazla düşürdüğü ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.1).

24 saatlik muamele sonucunda 50 µg/ml dozun ortalama ve % MI'i düşürdüğü belirlenmiş, fakat bu düşüş istatistiksel anlamda negatif kontrol ve çözücü kontrol gruplarından farklı olmamıştır. 100 µg/ml doz, negatif kontrole göre ortalama ve % MI değerlerini 50 µg/ml doza göre daha fazla düşürmüş ve negatif kontrole göre istatistiksel olarak farklı bulunmuştur. MI'in en düşük ve pozitif kontrole en yakın değeri 150 µg/ml doz uygulamasında rastlanmıştır. Bu dozda, ortalama ve % MI hem negatif kontrol hem de çözücü kontrole göre düştüğü için istatistiksel açıdan her iki kontrol grubundan da farklı bulunmuştur (Çizelge 4.1).

48 saatlik muamelelerde ise 50 µg/ml dozu negatif kontrole göre ortalama ve % MI'i düşürmüş ve bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı olmuştur. Fakat bu değer pozitif kontrol kadar etkili olmadığı için aralarında istatistiksel farklılık tespit edilmiştir. 100 ve 150 µg/ml doz uygulamalarında ise ortalama ve % MI hem negatif kontrol hem de çözücü kontrole göre düşürmüş ve bu düşüş istatistiksel anlamda da farklı bulunmuştur. Ayrıca bu dozlardaki ortalama ve % MI indeks değerleri pozitif kontrol kadar etkili olmamıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Feksofenadinin ortalama ve % MI üzerine etkileri

Test Maddesi	Doz/ml	Muamele	Ortalama MI±SE	%MI±SE
Negatif kontrol			94,50±3,47	4,72±0,17
MMC (pozitif kontrol)	0.16 µg/ml	24 saat	26,50±3,92	1,32±0,19
DMSO (çözücü kontrol)	8µl/ml	24 saat	71,75±7,63	3,58±0,38
FXF	50 µg/ml	24 saat	67,25±6,44 b ₁	3,36±0,32 b ₁
	100 µg/ml	24 saat	46,75±5,67 a ₂	2,33±0,28 a ₂
	150 µg/ml	24 saat	36,25±6,14 a ₂ c ₁	1,81±0,30 a ₂ c ₁
Negatif kontrol			94,50±3,47	4,72±0,17
MMC (pozitif kontrol)	0.16 µg/ml	48 saat	14,50±3,30	0,80±0,23
DMSO (çözücü kontrol)	8µl/ml	48 saat	70,75±8,04	3,53±0,40
FXF	50 µg/ml	48 saat	58,00±4,49 a ₂ b ₂	2,90±0,22 a ₂ b ₂
	100 µg/ml	48 saat	38,75±3,32 a ₂ c ₁	1,93±0,16 a ₂ c ₁
	150 µg/ml	48 saat	31,50±4,66 a ₂ c ₂	1,57±0,23 a ₂ c ₂

a: Negatif kontrole göre b: Pozitif kontrole göre c: Çözücü kontrole göre aradaki farklılık önemlidir.

a₁b₁c₁: p≤0.01

a₂b₂c₂: p≤0.001

4.2. Feksofenadinin Kromozom Anormallikleri (KA) 'nin Oluşumu Üzerindeki Etkileri

Feksofenadinin insan periferik lenfositlerine 24 ve 48 saat muamelesi sonucu; kromatid kırığı (Şekil 4.1, Şekil 4.2), kromozom kırığı (Şekil 4.3, Şekil 4.4), fragment (Şekil 4.5, Şekil 4.6), kardeş kromatid birleşmesi (Şekil 4.7, Şekil 4.8), kromozom birleşmesi (Şekil 4.9), endoreduplikasyon (Şekil 4.10) ve poliploidi (Şekil 4.11) meydana geldiği belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

24 saatlik uygulamalarda; 50 µg/ml dozda kromatid ve kromozom kırığı, fragment ve poliploidi saptanmıştır. 100 µg/ml dozda kromatid ve kromozom kırığı, fragment, kardeş kromatid birleşmesi, endoreduplikasyon (Şekil 4.10) ve poliploidi gözlenmiştir. 150 µg/ml dozda ise kromatid ve kromozom kırığı, fragment (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6), kardeş kromatid birleşmesi (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8), kromozom birleşmesi ve poliploidi (Şekil 4.11) oluşumu saptanmıştır.

48 saatlik uygulamalarda; 50 ve 100 µg/ml dozlarında kromatid (Şekil 4.1) ve kromozom (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4) kırığı, fragment, kardeş kromatid birleşmesi, kromozom birleşmesi (Şekil 4.9) ve poliploidi gözlenmiştir. 150 µg/ml dozda ise

kromatid (Şekil 4.2) ve kromozom kırığı, fragment, kardeş kromatid birleşmesi, kromatid değişimi, kromozom birleşmesi, endoreduplikasyon, disentrik kromozom ve poliploidi saptanmıştır.

Feksofenadinin 50-100-150 µg/ml dozlarında toplam KA, ortalama KA ve AHO'nı artırdığı belirlenmiştir. Hem 24 saat hem de 48 saatlik uygulamalarda, en yüksek ve pozitif kontrole en yakın değerler 100 µg/ml dozda bulunmuştur. 50 µg/ml dozu dışındaki diğer dozlarda toplam KA, ortalama KA ve AHO değerlerinin 48 saatlik muamelelerde 24 saatlik muamelelere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Fakat bu ortalama KA ve AHO'ndaki artışlar pozitif kontrol kadar etkili olmamıştır ve tüm doz ve muamele sürelerinde bu artışlar istatistiksel anlamda negatif kontrol ve çözücü kontrol gruplarından farklı bulunmamıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Feksofenadinin sebep olduğu kromozomal anomallikleri ve ortalama KA ve AHO üzerine etkileri

Muamele														
Anormallik Türleri														
Test Maddesi	Süre (Saat)	Konsantrasyon (µg/ml)	K'	K''	F	KKB	KD	KB	ER	DS	P	Toplam KA	Ortalama KA±SE	AHO ±SE
Kontrol	-	-	12	5	6	-	-	-	-	-	6	29	7,25 ± 3,25	6,75 ± 3,09
MMC	24	0.16 µg/ml	91	82	88	7	23	2	-	4	5	302	75,50 ± 9,24	44,00 ± 2,91
DMSO	24	8 µl/ml	14	8	7	7	-	-	1	-	7	44	11,00 ± 0,81	11,00 ± 0,81
FXF	24	50 µg/ml	29	6	18	22	-	-	-	-	3	78	19,50 ± 6,61 b ₁ b ₂	17,75 ± 5,67 b ₁ b ₂
	24	100 µg/ml	37	10	15	34	-	-	2	-	4	102	25,50 ± 4,17 b ₁ b ₂	21,25 ± 2,80 b ₁
	24	150 µg/ml	34	12	12	18	-	1	-	-	2	79	19,75 ± 3,27 b ₁ b ₂	17,75 ± 2,71 b ₁ b ₂
Kontrol	-	-	11	5	6	-	-	-	-	-	6	28	7,25 ± 3,25	6,75 ± 3,09
MMC	48	0.16 µg/ml	69	141	320	32	97	2	-	-	-	661	165,25 ± 15,45	78,75 ± 3,11
DMSO	48	8 µl/ml	13	15	28	21	-	-	-	-	3	80	20,00 ± 3,55	18,50 ± 3,30
FXF	48	50 µg/ml	30	8	11	24	-	1	-	-	4	78	19,50 ± 3,50 b ₁ b ₂	16,50 ± 2,98 b ₁ b ₂
	48	100 µg/ml	53	23	11	25	-	1	-	-	6	119	29,75 ± 8,50 b ₁ b ₂	24,75 ± 5,93 b ₁ b ₂
	48	150 µg/ml	40	14	11	33	-	1	-	1	2	102	25,50 ± 6,84 b ₁ b ₂	20,25 ± 4,90 b ₁ b ₂

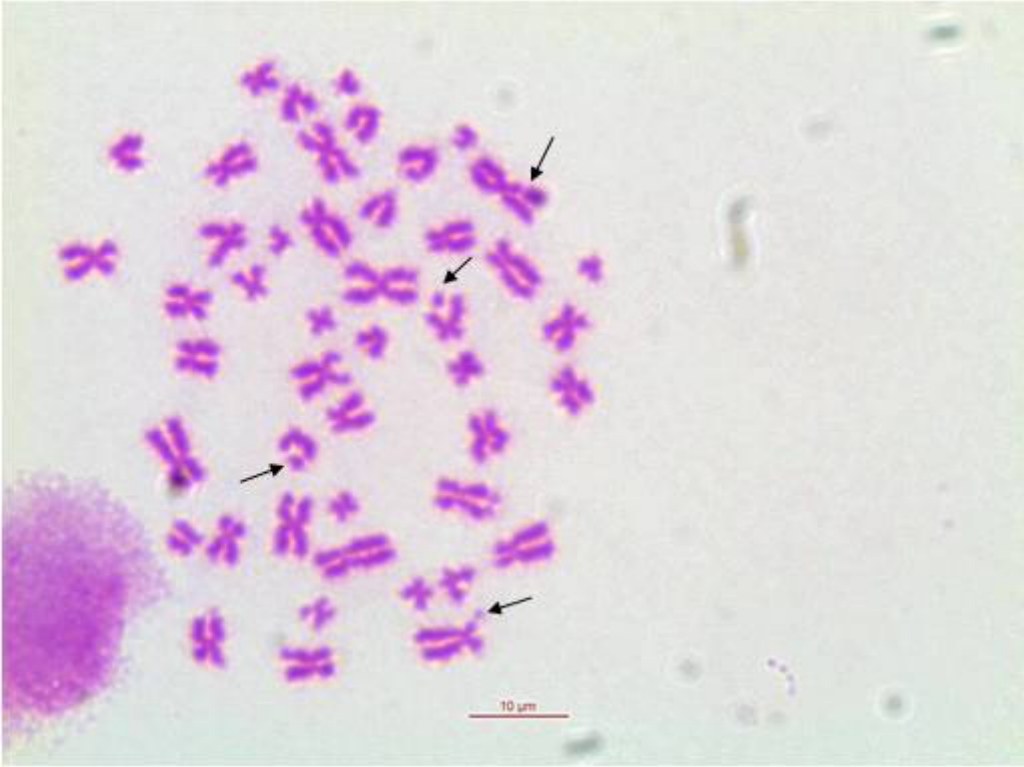
a: Negatif kontrole göre b: Pozitif kontrole göre c: Çözücü kontrole göre aradaki farklılık önemlidir.

a₁b₁c₁: p≤0.01 a₂b₂c₂: p≤0.001

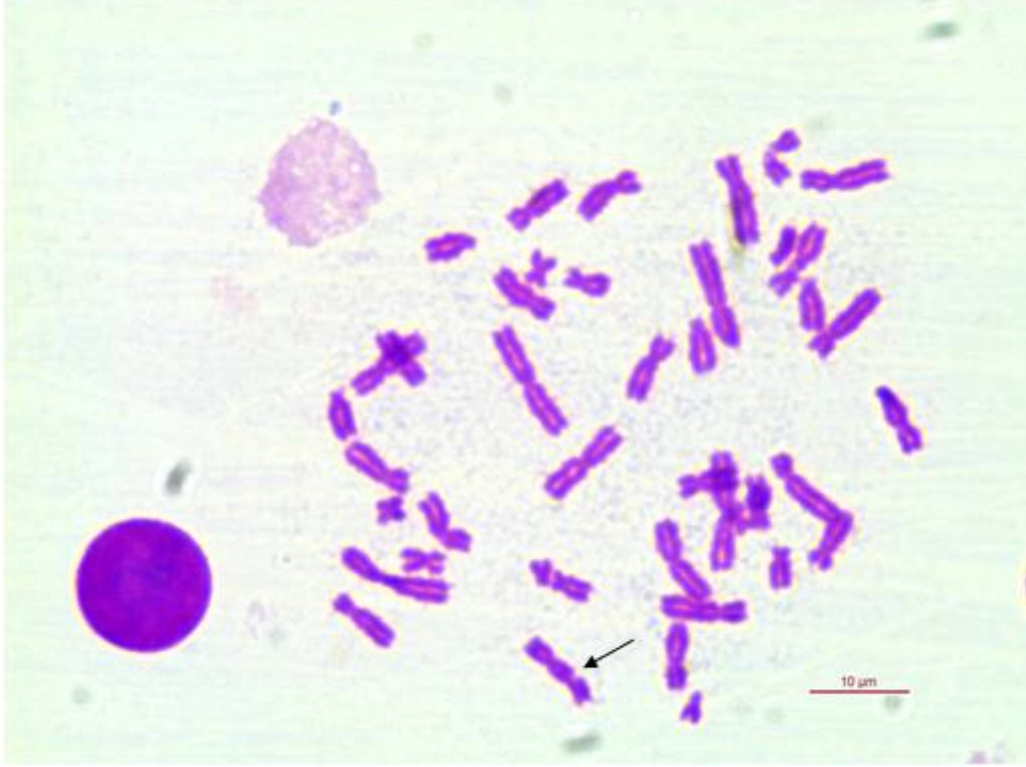
(K': Kromatid kırığı, K'': Kromozom kırığı, F: Fragment, KKB: Kardeş kromatid birleşmesi, KD: Kromatid değişimi, KB: Kromozom birleşmesi, ER: Endoreduplikasyon, DS: Disentrik kromozom, P: Poliploidi)



Şekil 4.1. Kromatid kırığı (100 µg/ml, 48 saatlik uygulama) x1000



Şekil 4.2. Kromatid kırıkları (150 µg/ml, 48 saatlik uygulama) x1000



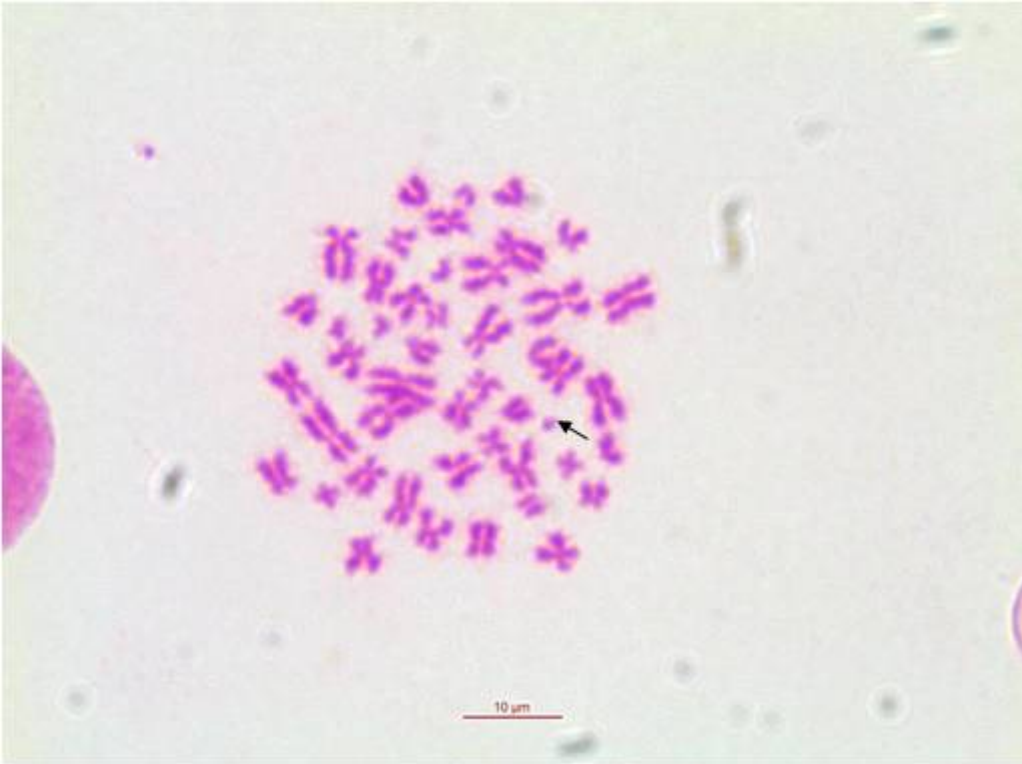
Şekil 4.3. Kromozom kırığı (100 µg/ml, 24 saatlik uygulama) x1000



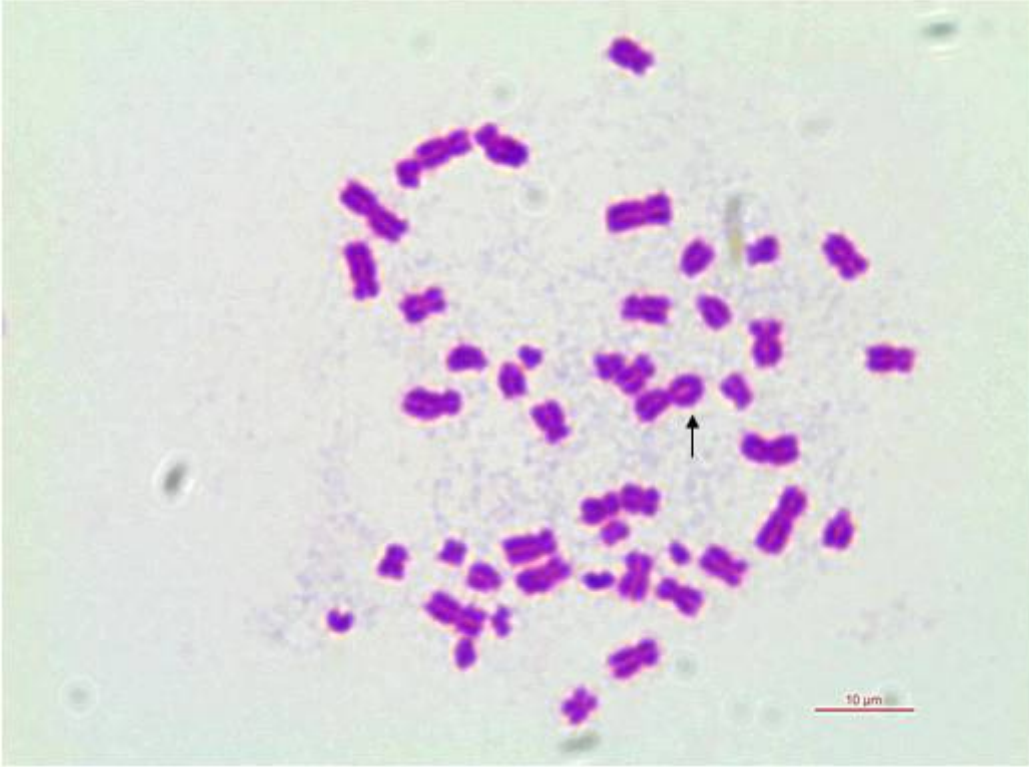
Şekil 4.4. Kromozom kırığı (100 µg/ml, 48 saatlik uygulama) x1000



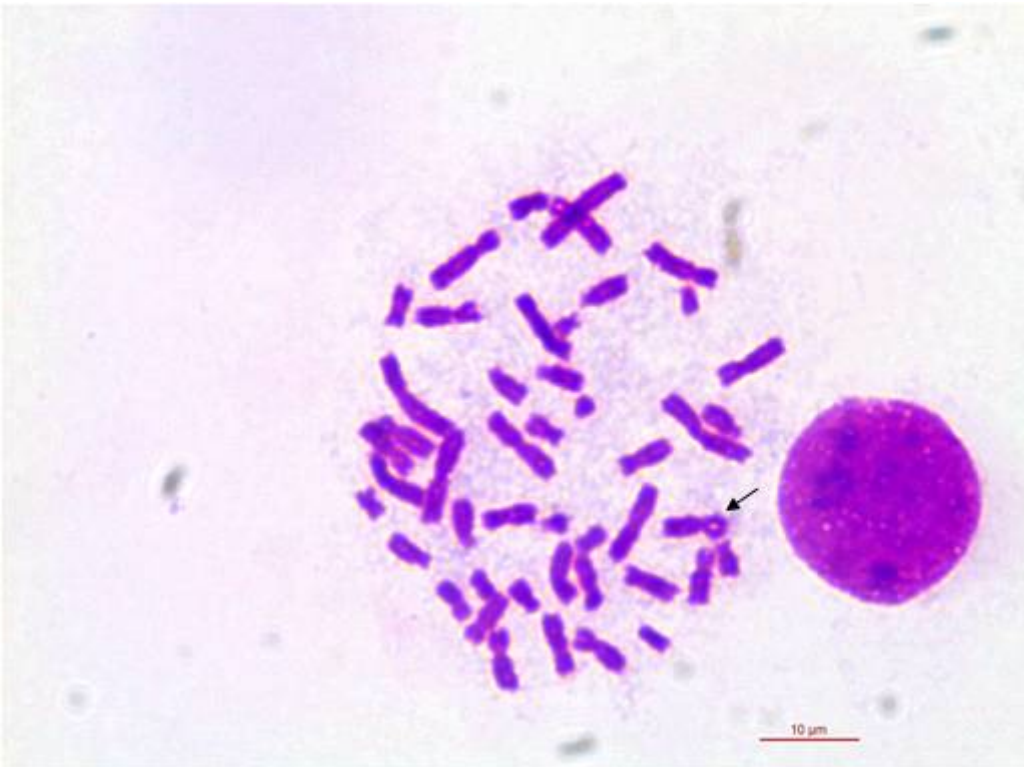
Şekil 4.5. Fragment (150 µg/ml, 24 saatlik uygulama) x1000



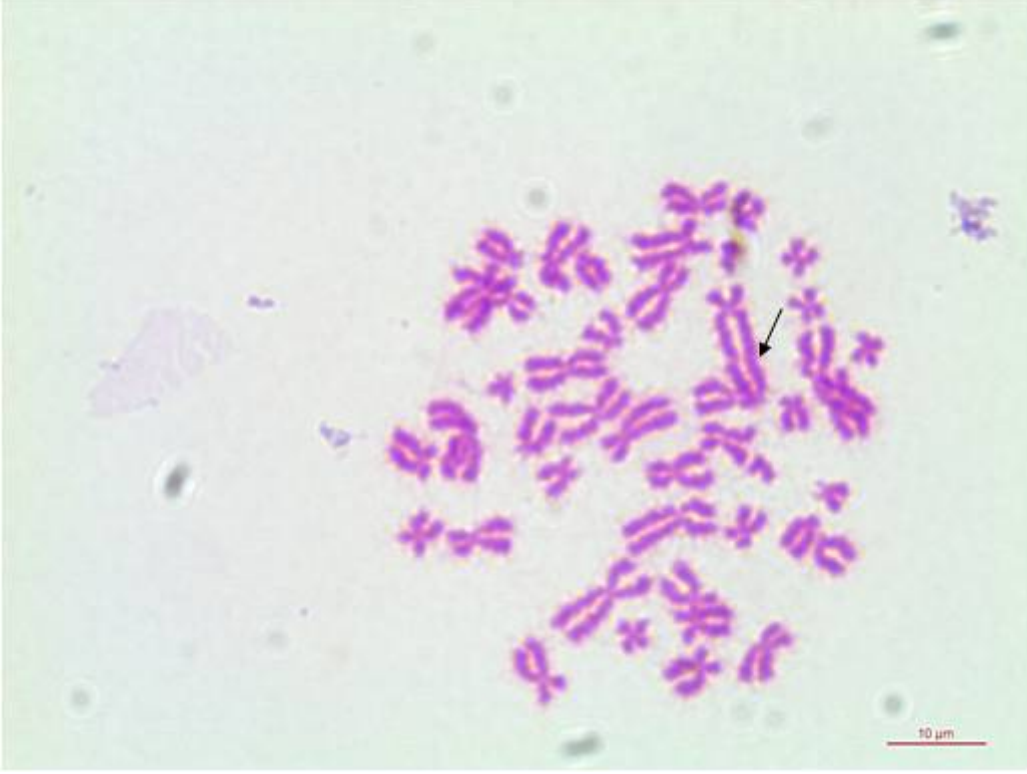
Şekil 4.6. Fragment (150 µg/ml, 48 saatlik uygulama) x1000



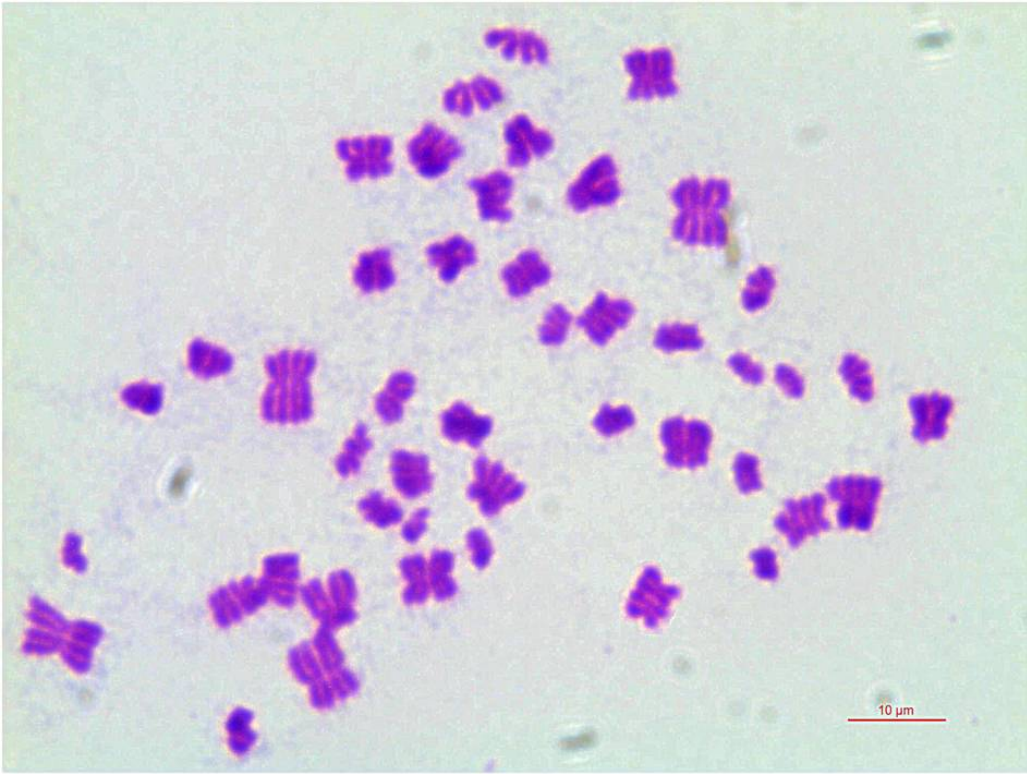
Şekil 4.7. Kardeş kromatid birleşmesi (150 µg/ml, 24 saatlik uygulama) x1000



Şekil 4.8. Kardeş kromatid birleşmesi (150 µg/ml, 48 saatlik uygulama) x1000



Şekil 4.9. Kromozom birleşmesi (50 µg/ml, 48 saatlik uygulama) x1000



Şekil 4.10. Endoreduplikasyon (100 µg/ml, 24 saatlik uygulama) x1000

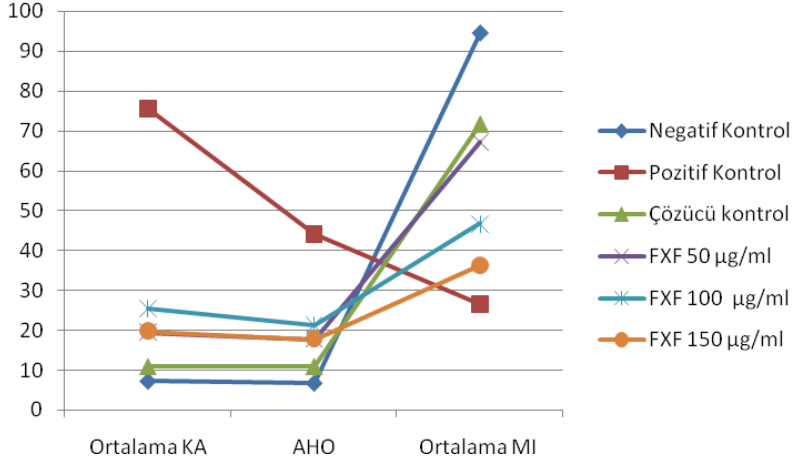


Şekil 4.11. Poliploidi (150 µg/ml, 24 saatlik uygulama) x1000

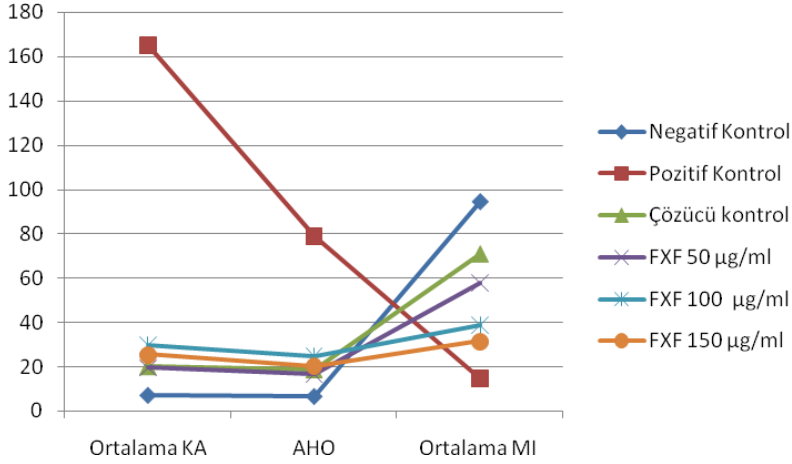
4.3. Feksofenadinin Sebep Olduğu Ortalama KA, AHO ve MI Arasındaki İlişki

Feksofenadinin 50, 100 ve 150 µg/ml'lik dozlarının 24 saatlik muameleleri sonucu, ortalama KA ve AHO değerleri ile MI değerleri arasında ters bir ilişki saptanmıştır. Genellikle ortalama KA ve AHO değerleri arttıkça MI düşüş göstermiştir. Fakat ortalama KA ve AHO değerleri 100 µg/ml'lik dozda en yüksek değerde tespit edilmesine rağmen, aynı dozda MI en düşük değerinde olmamıştır. MI bakımından en düşük değer feksofenadinin en yüksek dozu olan 150 µg/ml'de belirlenmiştir (Şekil 4.12).

Feksofenadinin 48 saatlik muamelesi sonucu da, ortalama KA ve AHO değerleri ile MI değerleri arasında 24 saatlik uygulama sonuçlarına benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ortalama KA ve AHO değerleri 100 µg/ml'lik dozda en yüksek değerde olmasına rağmen, MI'nin en düşük değeri 150 µg/ml'lik en yüksek dozunda gözlenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.12. 24 saatlik uygulamalar sonucu ortalama KA, AHO, MI arasındaki ilişki



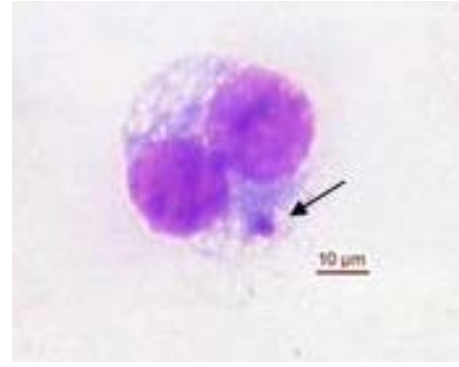
Şekil 4.13. 48 saatlik uygulamalar sonucu ortalama KA, AHO, MI arasındaki ilişki

4.4. Feksofenadinin Mikronükleus (MN) Oluşumu ve Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri

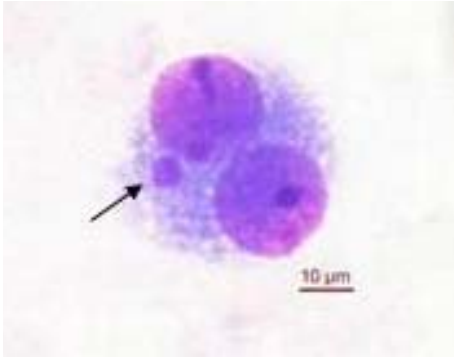
Feksofenadinin insan periferik lenfositlerine 24 ve 48 saat muamelesi sonucu oluşan MNBN'ler Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19'da, ortalama MNBN ve % MNBN'ni ile nükleer bölünme indeksi Çizelge 4.5'de verilmiştir.



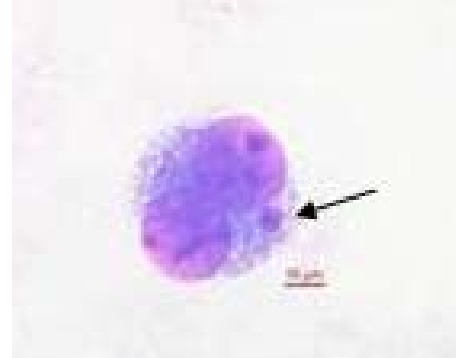
Şekil 4.14. Bir mikronükleus içeren binükleat hücre (50 µg/ml, 24 saatlik uygulama) x400



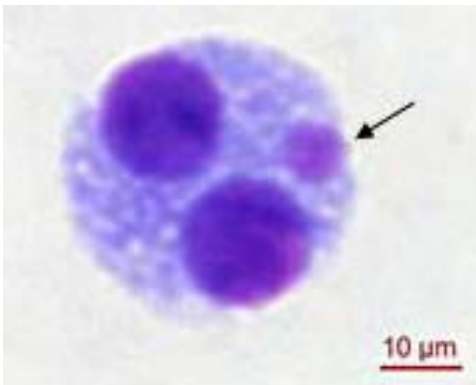
Şekil 4.15. Bir mikronükleus içeren binükleat hücre (50 µg/ml, 48 saatlik uygulama) x400



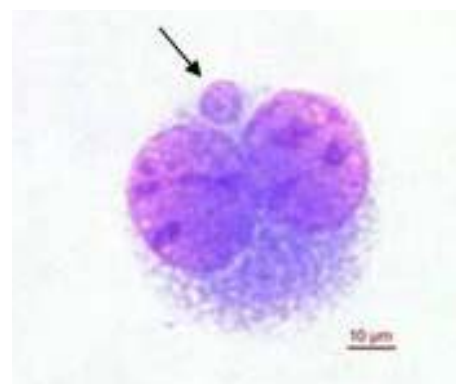
Şekil 4.16. Bir mikronükleus içeren binükleat hücre (100 µg/ml, 24 saatlik uygulama) x400



Şekil 4.17. Bir mikronükleus içeren binükleat hücre (100 µg/ml, 48 saatlik uygulama) x400



Şekil 4.18. Bir mikronükleus içeren binükleat hücre (150 µg/ml, 24 saatlik uygulama) x400



Şekil 4.19. Bir mikronükleus içeren binükleat hücre (150 µg/ml, 48 saatlik uygulama) x400

Feksofenadinin 50 µg/ml, 100 µg/ml ve 150 µg/ml dozlarının 24 saat ve 48 saatlik muameleleri, ortalama ve % MNBN'ni negatif kontrollerine göre artırmış olmasına rağmen bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır. Feksofenadinin hem 24 saat hem de 48 saatlik muamelelerinde, doz artışına bağlı olarak ortalama ve % MNBN'nin arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca 48 saatlik uygulamanın ortalama ve % MNBN'ni, 24 saatlik uygulamaya göre doza bağlı olarak artırdığı belirlenmiştir. Fakat feksofenadin uygulaması sonucu elde edilen tüm değerler pozitif kontroller kadar etkili olmadığından pozitif kontrollere göre de farklılık bulunmuştur (Çizelge 4.5).

Nükleer bölünme indeksi ise sadece 24 saatlik 150 µg/ml doz uygulamasında çözücü kontrole göre daha düşük değerde elde edilmiş ve istatistiksel farklılık saptanmıştır. Fakat bu düşüş pozitif kontrol kadar etkili olmamıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Hücrelerin Nükleus sayısına göre, binükleat hücrelerin MN sayısına göre dağılımları ve ortalama MN, %MN ve NBI

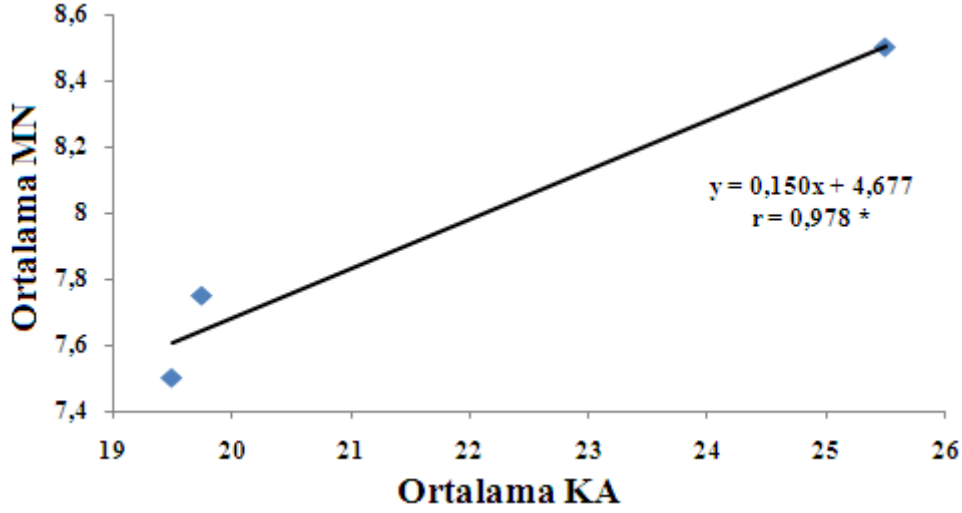
Test Maddesi	Süre (Saat)	Muamele	MN Sayısına Göre İki Nükleuslu Hücre Sayısı				Nükleus Sayısına Göre Hücrelerin Dağılımı				NBI±SE				
			0	1	2	3	>3	Ortalama MN ±SE	% MN±SE	1		2	3	4	
Kontrol	-	-	7989	11	-	-	-	-	2,75 ± 0,75	0,13 ± 0,03	1136	2769	38	57	1,75 ± 0,02
MMC	24	0,16 µg/ml	7644	341	13	2	-	-	98,00 ± 12,87	4,90 ± 0,64	1760	2228	9	3	1,56 ± 0,02
DMSO	24	8 µl/ml	7920	79	1	-	1	-	20,25 ± 2,92	1,01 ± 0,14	585	3104	126	185	1,97 ± 0,03
FXF	24	50 µg/ml	7970	30	-	-	-	-	7,50 ± 1,55 b ₂	0,37 ± 0,07 b ₂	1690	2202	53	55	1,62 ± 0,09
		100 µg/ml	7966	34	-	-	-	-	8,50 ± 1,75 b ₂	0,42 ± 0,08 b ₂	1765	2146	27	62	1,59 ± 0,07
		150 µg/ml	7969	31	-	-	-	-	7,75 ± 1,18 b ₂	0,38 ± 0,05 b ₂	1901	2014	31	54	1,56 ± 0,11 c ₁
Kontrol	-	-	7989	11	-	-	-	-	2,75 ± 0,75	0,13 ± 0,03	1136	2769	38	57	1,75 ± 0,02
MMC	48	0,16 µg/ml	6165	1695	119	19	2	2	458,75 ± 51,48	22,93 ± 2,57	2999	987	9	5	1,25 ± 0,06
DMSO	48	8 µl/ml	7905	89	4	2	89	-	23,75 ± 3,01	1,18 ± 0,15	778	3050	86	86	1,86 ± 0,03
FXF	48	50 µg/ml	7968	32	-	-	-	-	8,00 ± 2,12 b ₂	0,40 ± 0,10 b ₂	1753	2138	53	56	1,60 ± 0,08
		100 µg/ml	7963	35	2	-	-	-	9,25 ± 1,10 b ₂	0,46 ± 0,05 b ₂	1796	2139	22	43	1,57 ± 0,12
		150 µg/ml	7956	43	1	-	-	-	11,00 ± 3,24 b ₂	0,55 ± 0,16 b ₂	2119	1829	20	32	1,49 ± 0,06

a: Negatif kontrole göre b: Pozitif kontrole göre c: Çözücü kontrole göre aradaki farklılık önemlidir.

a₁b₁c₁: p≤0,01 a₂b₂c₂: p≤0,001

4.5. Ortalama KA ile Ortalama MN Arasındaki İlişki

Feksofenadin etken maddesinin 24 saatlik tüm doz uygulamalarında ortalama KA ve ortalama MN arasında istatistiksel olarak önemli bir ilişki olduğu saptanmıştır. Ortalama KA ve ortalama MN arasında paralel ve anlamlı bir ilişkinin olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.20). Fakat aynı ilişki 48 saatlik uygulama için saptanamamıştır.

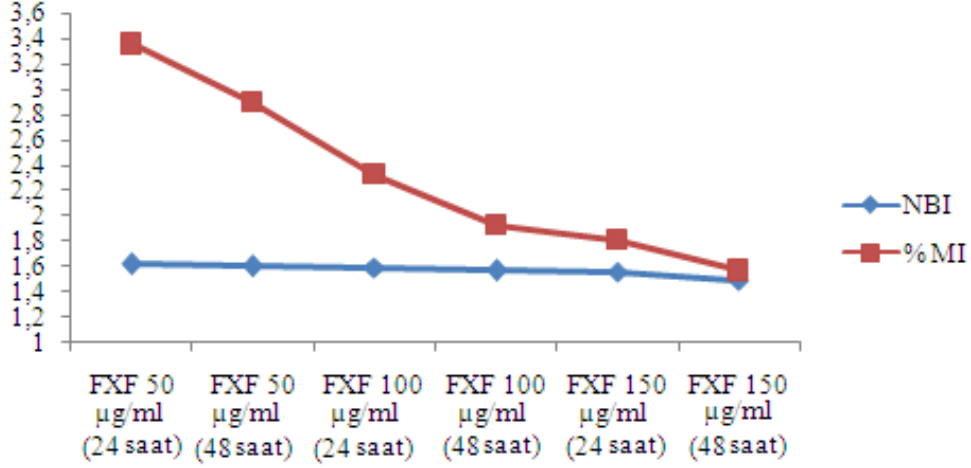


*: $P \leq 0,01$

Şekil 4.20. Feksofenadinin 24 saatlik uygulamalarında dozlara bağlı olarak ortalama KA ile ortalama MN arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı

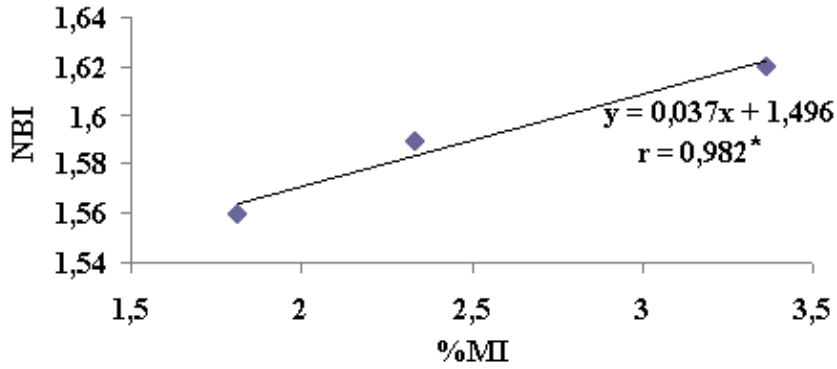
4.6. % MI ile NBI Arasındaki ilişki

Feksofenadin etken maddesi 24 saatlik ve 48 saatlik uygulamalarda MI'i doza bağlı olarak düşürerek sitotoksik bir tablo sergilemiştir. NBI değerleri, MI kadar belirgin olmamakla birlikte, MI'e paralel olarak doz artışına karşı bir düşüş sergilemiştir. Bu durum az da olsa NBI'nin feksofenadin dozuna bağlı olarak düştüğünü ve bu nedenle feksofenadinin sitostatik etkinin olabileceğini göstermektedir (Şekil 4.21).



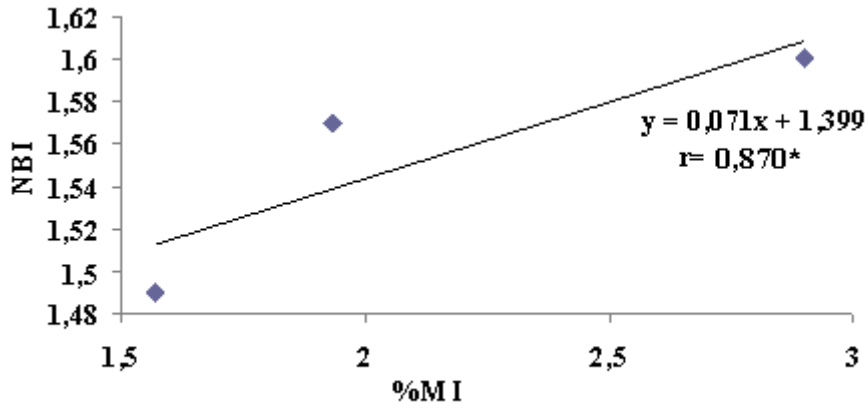
Şekil 4.21. Tüm dozların 24 ve 48 saatlik uygulamalarda ortalama %MI ve NBI üzerindeki etkileri

MI ile NBI arasındaki paralel ilişkinin 24 saatlik uygulamalarda 48 saatlik uygulamalara göre istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.22 ve Şekil 4.23).



*: $P \leq 0,01$

Şekil 4.22. Feksofenadinin 24 saatlik uygulamalarında dozlara bağlı olarak %MI ve NBI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı



*: $P \leq 0,01$

Şekil 4.23. Feksofenadinin 48 saatlik uygulamalarında dozlara bağlı olarak %MI ve NBI arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, yan etkileri nedeniyle kullanımdan kaldırılan ilk antihistaminik olan terfenadinin aktif metaboliti olan ve alerjik rinit ve ürtiker tedavisinde sıklıkla başvuru alan feksofenadinin *in vitro* genotoksik etkileri incelenmiştir. Çalışmamızda sağlıklı bireylerden alınan periferik kan lenfositlerine *in vitro* KA ve MN testleri uygulanmıştır. Feksofenadinin KA, MI, MN ve NBI üzerine etkileri ve bu parametrelerin birbirleri ile olan ilişkileri araştırılmıştır.

MI, hücre siklusunda metafazdaki hücre yüzdesini vermektedir. *In vitro* KA deneylerinde, MI indüklenen sitotoksiteyi belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. 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 mitozu 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 iğipliklerinin oluşum, toplanma veya oryantasyonun inhibisyonuna da bağlı olabilir (Yüzbaşı ve ark., 2006).

KA testi, kromozom veya kromatid tipi hasarların sıklığını belirlemektedir. KA'ndeki artış, klastojenitenin bir göstergesi olup, bu da genetik hastalıkları ve kanser riskini artırmaktadır (Norppa ve ark., 2006).

Mikronükleuslar 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. Bundan dolayı, MN'lar hem kromozom kırılması hem de kromozom kaybının uygun ve güvenilir ölçümünü sağlamaktadır (Fenech ve Morley, 1985; Fenech 2000).

MN metodunda bir, iki, üç ve dört çekirdekli hücrelerin sayılarak Eastmond ve Tucker (1989) tarafından önerilen formüle göre hesaplanan 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). Ayrıca NBI, sitostatik etkinin de bir göstergesidir (Eke, 2007).

5.1. Feksofenadinin Genotoksik Etkileri

Feksofenadinin hem 24 saat hem de 48 saatlik uygulamalarında doz artışına paralel olarak MI'in azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca 48 saatlik muamelenin 24 saate göre MI'i daha fazla düşürdüğü belirlenmiştir. Feksofenadin, 24 saatlik uygulamalarda 50 µg/ml dozun % MI ve ortalama MI üzerinde negatif ve çözücü kontrollere göre istatistiki olarak etkili olmamasına rağmen, 100 µg/ml doz negatif kontrole göre, 150 µg/ml doz ise negatif kontrole ve çözücü kontrole göre % MI ve ortalama MI'i önemli ölçüde düşürmüştür ve istatistiksel farklılık ortaya çıkmıştır. Fakat bu düşüş pozitif kontrol kadar olmamıştır. Feksofenadinin 48 saatlik uygulamalarında ise, 50 µg/ml dozda % MI ve ortalama MI değerleri negatif kontrolden daha düşük olduğu için farklı bulunmuştur. Buna karşın, 100 ve 150 µg/ml dozlarında feksofenadin uygulamasının % MI ve ortalama MI değerlerini oldukça düşürdüğü ve bu düşüşün hem negatif kontrol hem de çözücü kontrol gruplarından farklı olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Bu sonuçlar feksofenadin dozunun ve uygulama süresinin artmasının MI üzerinde olumsuz etki ortaya çıkardığını göstermektedir. Uygulanan bir kimyasalın toksisitesinin artmasının mitotik indeksi düşürdüğü belirtilmiştir (Eke, 2007). Bizim çalışmamızda da, mitotik indeksin 100 ve 150 µg/ml dozlarda orantılı olarak azalması, bu etken maddenin doza bağlı sitotoksik olabileceğini göstermektedir.

Uygulanan tüm feksofenadin dozları ve muamele sürelerinde ortaya çıkan değerlerin ortalama KA ve AHO bakımından negatif ve çözücü kontrolden yüksek olmasına rağmen, bu artışın istatistiki anlamda farklı olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Bu nedenle feksofenadinin tüm doz ve muamele sürelerinde KA oluşumu üzerinde çok fazla olumsuz etkisinin olmadığı sonucunu ortaya çıkarmaktadır.

MN testinde ise 24 ve 48 saatlik uygulamalarda ortalama MN ve % MN değerleri istatistiki olarak negatif ve çözücü kontrolden farklı bulunmamış, sadece pozitif kontrolden farkları istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. NBI değerleri incelendiğinde ise, sadece 150 µg/ml dozun 24 saatlik uygulamasıyla ortaya çıkan değerlerin pozitif kontrole aynı olduğu ve çözücü kontrolden istatistiksel açıdan farklı olduğu ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.5). Feksofenadinin MN oluşumu üzerindeki etkileri KA sonuçlarına benzer bulunmuştur. Feksofenadinin MN oluşumu üzerinde çok etkili olmadığı, fakat yüksek doz uygulamanın sitostatik etkinin bir göstergesi olan NBI üzerinde olumsuz etkilere yol açabileceği sonucu çıkmıştır.

Feksofenadinin, yapılan karsinojenite çalışmaları sonucunda negatif sonuç verdiği bildirilmektedir. Genotoksisite araştırmalarında ise, Ames ve CHO/HGPRT testleri ile *in vivo* ve *in vitro* sitogenetik testlerde negatif sonuç verdiği bildirilmektedir (Snyder ve Green, 2001; Brambilla ve Martelli, 2009). Bu sonuçlar çalışmamız sonucu elde edilen bulgularla kısmen uyumlu bulunmuştur.

Feksofenadinin genotoksisite bilgilerini içeren çok fazla sayıda çalışma bulunmamaktadır. Genotoksisite çalışmaları çoğunlukla ilaç piyasaya sürülürken yapılan araştırmalarla sınırlı kalmış olup, literatürde de genellikle PDR refere edilmektedir (Amichai ve ark., 2001; Snyder ve Green, 2001; Snyder 2009). Bu sebeple bu bölümde sonuçlar feksofenadinin de içinde yer aldığı piperidin grubu antihistaminiklerin genotoksisite sonuçlarıyla karşılaştırılacaktır.

Pfeifer ve ark. (1969) tarafından hamile sıçanlarda 5mg/kg dozla yapılan çalışmada **siproheptadinin** malformasyona sebep olmadığı bildirilmiştir. İnsan için teratojenik olmadığı da rapor edilmiştir (Sadowsky ve ark., 1972). Ayrıca **siproheptadinin**, insan periferik lenfositlerinde *in vitro* KA testinde negatif sonuç verdiği belirtilmiştir (Hite ve ark., 1977). 30 µg/ml konsantrasyonuyla V79 hücrelerinde yapılan *in vitro* MN testinin sonuçları da negatif sonuç vermiştir ve % MN oranı 0,8 olarak bildirilmiştir (Snyder, 1998). Bizim çalışmamızda, feksofenadinin bu konsantrasyona yakın olan 50 µg/ml dozun sebep olduğu % MN değerleri 24 saatlik uygulamada 0,37 ve 48 saatlik uygulamada ise 0,40 olarak bulunmuştur. Bu bulgu, feksofenadinin **siproheptadine** göre daha düşük genotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Snyder (1998)'in yaptığı çalışmada **terfenadinin** 10 µg/ml konsantrasyonuyla V79 hücrelerinde yaptığı *in vitro* MN testinin sonucunu negatif olarak bildirmiştir. Yine aynı çalışmada % MN oranı % 0,8 olarak rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda kullandığımız ve terfenadinin bir metaboliti olan feksofenadinin, sırasıyla 50, 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonları için sırasıyla önce 24 ardından 48 saatlik uygulamalarında oluşan %MN değerleri; 0,37 ve 0,40; 0,42 ve 0,46; 0,38 ve 0,55 olarak bulunmuştur. İki ilacın günlük dozları aynı (120 mg/gün) olduğu düşünülürse feksofenadinin daha yüksek konsantrasyonda daha düşük % MN oluşumuna sebep olduğu görülmektedir. Yine aynı çalışmada Woodward ve Munro (1982)'nin yaptıkları çalışma refere edilerek, terfenadinin Ames testinde ve farelerde *in vivo* MN testinde negatif sonuç verdiği bildirilmiştir.

Vanparys ve ark. (1981), **astemizolün** genotoksisitesi üzerinde yaptıkları çalışmada astemizolün, insan lenfositlerinde *in vitro* KA ve KKD, sıçanlarda *in vivo* MN ve farelerde dominant lethal testlerinin negatif sonuç verdiğini belirtmişlerdir.

Snyder (1998), **ebastinin** Ames testinde, farede *in vivo* MN testinde ve insan periferik lenfositlerinde *in vitro* KA testinde negatif sonuç verdiğini bildirmiştir.

PDR verilerine göre **loratadinin** fare ve sıçanda yapılan karsinojenite çalışmaları sonucu karaciğer tümörüne sebep olduğunu belirtilmiştir. Fakat **loratadin** muamelesiyle gerçekleştirilmiş Ames, CHO HGPRT (Chinese hamster ovary cell/hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase), fare UDS (Unscheduled DNA Synthesis), fare MN ve lenfoma testleri ve *in vitro* insan periferik lenfositlerinde KA testleri sonuçlarının negatif olduğunu bildirmiştir.

Novartis Firmasının 2008 yılında yaptığı ürün incelemesinde **levosebastinin** Ames testinde, Drosophila'da resesif letal testte, farede dominant letal testte ve sıçanda *in vivo* MN testinde 40 mg/kg kadar olan dozları araştırılmış ve bu testlerde negatif sonuç elde edildiği rapor edilmiştir (www.ask.novartispharma.ca/download.htm?res=livostin_scrip_e.pdf&resTitleId=147, 16.07.2010).

Brambilla ve Martelli (2009) tarafından yapılan bir derleme çalışmada, PDR ve FDA referans edilerek, **ketotifenin** bakteriyel mutasyon, *in vitro* ve *in vivo* sitogenetik testlerde negatif sonuç verdiğini bildirilmiştir.

Mizolastine dair genotoksikoloji çalışmaları sadece Ames testine dayanmakta olup negatif sonuçlar rapor edilmiştir (Brambilla ve Martelli, 2009).

Görüldüğü gibi feksofenadine yakın olan antihistaminiklerle yapılan pek çok çalışma sonucunda, çalışılan antihistaminiklerde genotoksisite bakımından negatif bulgular elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda da feksofenadinin KA ve MN üzerindeki etkileri incelendiğinde, istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulunamamış ve diğer çalışmaların sonuçlarına benzer şekilde negatif bir sonuç elde edilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İlaç seçiminde yaş, cinsiyet ve immün sistem farklılıkları gibi değişkenlerin yanı sıra genetik polimorfizmler de ilaç etkinliğini ve toleransını etkilemektedir. Ayrıca ilaçlar, bazı gıda maddeleriyle, diğer kimyasal maddelerle, alkolle veya alınan başka ilaçlarla etkileşime girebilmekte ve bu olay ise istenmeyen durumlara yol açabilmektedir. Tüm bu faktörlerin yanı sıra ilacın muhtemel genotoksik ve sitotoksik etkileri de düşünülürse tedavi için belirlenecek doz-maruziyet ilişkisinin sağlam temellere dayandırılması gerekir. Bu temellendirme görevini de yapılacak laboratuvar çalışmaları gerçekleştirmektedir. Yeni etken madde araştırmaları sonucunda ilaçlar piyasaya sürülürken eksik kalan veya ihmal edilen araştırmaları ve ilacın kullanılması ile ortaya çıkan yan etkilerinin gerektirdiği çalışmaların yapılması araştırmacılara büyük sorumluk getirmektedir.

Çalışmamız, özellikle alerji tedavisinde sıklıkla reçete edilen feksofenadin etken maddesinin kromozom anormalliklerine sebep olduğunu, fakat bu oranının istatistiki olarak önemsiz olduğunu göstermiştir. Mikronükleus testinde de mikronükleus oranı negatif ve çözücü kontrolden istatistiki olarak farklı bulunmamıştır. Çalışmamız ayrıca bu maddenin nükleer bölünme hızını tek bir uygulama dışında etkilemediğini de göstermiştir. Ancak feksofenadin uyguladığımız iki muamele süresinde ve iki dozda mitotik indeksin istatistiksel açıdan anlamlı derecede düşmesi, feksofenadinin *in vitro* doza bağlı olarak sitotoksik olabileceğinin göstergesidir.

Bu çalışma da dahil mevcut çalışmalar doğrudan feksofenadinin klastojenik etkisinin olmadığını söylemek için yetersizdir. Doza bağlı olarak artan sitotoksik etkisi, klastojenik etki için potansiyel bir zemin hazırlamaktadır. Çünkü kronik alerji durumlarında uzun süre ilaçla tedavi gören hastalarda 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.

Yapılan bu çalışma, literatürde feksofenadinin genotoksitesine dair veri açığına bir ölçüde destek sağlayacaktır ve bu ilaçla ilgili çalışmalar yapacak araştırmacılar için referans oluşturacaktır. Çalışmamız sonucunda feksofenadin, kromozom anormalliği ve mikronükleus oluşumunu arttırma bakımından istatistiksel anlamda yeterli derecede önemli bulunmamıştır. Ama feksofenadinin genotoksitesini hakkında kesin yargıya

varmak için diğer *in vitro* ve *in vivo* genotoksisite tekniklerinin de kullanıldığı yeni çalışmaların yapılması, bu maddenin genotoksisite ve karsinojenitesi hakkında daha çok bilgi sahibi olmamızı sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Aardema, J.M., Kirsch-Volders, M., 2001. The *in vitro* micronucleus assay. Choy, W.N. (Ed.), Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment. New York: Marcel Dekker, Inc. 163-186.
- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R, Hugmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T, Norppa, H.,Suhaker, D.E.G., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A., 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. Mutation Research, 463, 11-172.
- Ament, P.W., Paterson, A., 1997. Drug interactions with the nonsedating antihistamines. American Family Physician, 56 (1), 223-231.
- Amichai, B., Grunwald, M.H., Brenner, L., 2001. Fexofenadine Hydrochloride- A New Anti-Histaminic Drug. Israel Medical Association Journal, 3, 207-209.
- Anderson, D., 1988. Human Biomonitoring. Mutation Research, 204, 353-541.
- Arshad, S.H., 1997. Development of allergic disease in children. Clin Exp Allergy, 27, 1231-1233.
- Bachert, C., 1998. Histamine-a major role in allergy? Clin Exp Allergy, 28 (6), 15-19.
- Banerjee, S., Fallis, A.G., Brown, D.L., 1997. Differential effects of taxol on two human cancer cell lines. Oncol Res., 9 (5), 237-248.
- Başkan, E.B., Çal, A.S., Özdemir, B., Gemici, K., Tunalı, Ş., 2003. Uzun Süreli Feksofenadin Kullanımının Düzeltilmiş QT (QTc) Aralığı Üzerindeki Etkileri. Türkderm, 37 (3), 170-173.
- Bedir, A., Bilgici, B., Yurdakul, Z., Gürsel, B.Ş., Alvur, M., 2004. DNA Hasarı Analizinde μ -Fadu ve Comet Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Türk Klinik Biyokimya Dergisi, 2 (3), 97-103.
- Bernstein, J.A., 2002. Antihistamines. In: Grammer LC, Greenberger PA (eds). Patterson's Allergic Disease. USA: Lippincott Williams&Wilkins, 65-79.
- Brambilla G, Martelli A., 2007. Genotoxic and carcinogenic risk to humans of drug-nitrite interaction products. Mutation Research, 635, 17-52.
- Brambilla G., Martelli A., 2009. Update on genotoxicity and carcinogenicity testing of 472 marketed pharmaceuticals. Mutation Research, 681, 209-229.

- Brambilla, G., Mattioli, F., Martelli, A., 2009. Genotoxic and carcinogenic effects of antipsychotics and antidepressants. *Toxicology*, 261,77–88.
- Braun-Falco, O., Plewig, G., Wolff, H.H., Burgdorf, W.H.C., 2000. In *Dermatology*. Second Ed. Springer, 1747-1766 p., Berlin.
- Büyükleyla, M., 2007. Thymol'ün insan periferel lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi, kromozom anormalliği ve mikronükleus oluşumu üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 77 s.
- Carrano, A.V., Natarajan, A.T., 1988. Consideration for Population Monitoring Using Cytogenetic Techniques. *Mutation Research*, 204, 379-406.
- Cheng, T.J., Christiani, D.C., Xu, X., Wain, J.C., Wiencke, J.K., Kelsey, K.T., 1996. Increased Micronucleus Frequency in Lymphocytes from Smokers with Lung Cancer. *Mutation Research*, 349, 43-50.
- Choy, W.N., 2001. Genetic toxicology and Cancer Risk Assessment. Marcel Dekker Inc., 390 p., New York, USA.
- Church, M.K., 2004. Histamine receptors, inverse agonism, and allergy. *Journal of the World Allergy Organization*, 16, 112-116.
- Clive, D., Spector, J.F.S., 1975. Laboratory procedure for assessing specific locus mutations at the tk locus in cultured L5178Y mouse lymphoma cells. *Mutation Research*, 31, 17–29.
- Clive, D., Glover, P., Applegate, M., Hozier, J., 1990. Molecular aspects of chemical mutagenesis in L5178Y/tk+/- mouse lymphoma cells. *Mutagenesis*, 5, 191–197.
- Combes, R.D., Stopper, H., Caspary, W.J., 1995. The use of L5178Y mouse lymphoma cells to assess the mutagenic, clastogenic and aneugenic properties of chemicals. *Mutagenesis*, 10, 403–408.
- Davila, J.C., Rodriguez, R.J., Melchert, R.B., Acosta, D., 1998. Predictive value of *in vitro* model systems in toxicology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 38, 63-96.
- Demirel S., Zamani A., 2002. Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi*, 12 (3), 123-127.
- Drug Safety Society, 1990. Buclizine. www.drugsafetysite.com/buclizine/ (28.01.2010).
- Duffaud, F., Orsiere, T., Villani, P., Pelissier, A.L., Volot, F., Favre, R., Botta, A., 1997. Comparison Between Micronucleated Lymphocytes Rates Observed in Healthy Subject and Cancer Patients. *Mutagenesis*, 12, 227-231.

- Eastmond, D.A., Tucker, J.D., 1989. Identification of Aneuploidy-Inducing Agents Using Cytokinesis-Blocked Human Lymphocytes and an Anti-Kinetochore Antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 13, 34-43.
- Eke, 2007. Thimerosal'in İnsan Lenfosit Hücre Kültürlerinde Genotoksik, Mutajenik Ve Toksik Etkilerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin, 79 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 (Eds., Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C.), pp. 405-427, Second edition, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L., 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, 339, 37-59.
- Fenech, M., 1997. The Advantages and Disadvantages of the Cytokinesis-Block Micronucleus Method. *Mutation Research*, 392, 11-18.
- Fenech, M., 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat Res.*, 455, 81-95.
- Fenech, M., Morley, A.A., 1985. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus Assay. *Cytobios*, 43, 233-46.
- Fenech, M., Morley, A.A., 1986. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of *in vivo* ageing and dose X-irradiation. *Mutation Research*, 161, 193-198.
- French C. T., Ross C. D., Keysar S. B, Joshi D. D., Lim C., Fox M. H., 2006. Comparison of the mutagenic potential of 17 physical and chemical agents analyzed by the flow cytometry mutation assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 602 (1-2), 14-25.
- Garewal, H. S., Ramsey, L., Kaugars, G., Boyle, J., 1993. Clinical experience with the micronucleus assay. *Cellular Biochem*, 17, 206-212.
- Gatehouse, D. G, Rowland, I.R., Wilcox, P., Callander, R. D. ve Foster, R., 1990. Bacterial mutation assay, Basic Mutagenicity Ukems recommended procedures (Ed: Kirkland, D.J.), The Bath Press, Avon, Great Britain.

- Gold, M. S., Kemp, A. S., 2005. Atopic disease in childhood. *Med J Aust.*, 21, 298-304.
- Gonzalez, M. A., Estes, K. S., 1998. Pharmacokinetic assesment of second generation H₁ receptor antagonists. *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy, & Toxicology*, 36, 292-300.
- Gökalp Muranlı F.D., 2006. Kültürü Yapılan İnsan Lenfositlerinde Triasulfuron'un Genotoksik Etkileri. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, 90s.
- Greaves, W. M., 2001. Antihistamines. *Dermatologic clinics*, (19)1, 53-61.
- Greenman D.L., Cronin G. M, Dahlgren R., Allen R. and Allaben W., 1995. Chronic Feeding Study of Pyrilamine in Fischer 344 Rats. *Toxicological Sciences*, 25, 1-8.
- Handley, A.D., Magnetti, A., Higgins, A.J., 1998. Therapeutic advantages of third generation antihistamines. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 7, 1045-1054.
- Hastwell, P.W., Webster, T.W., Tate, M., Billinton, N., Lynch, A.M., Harvey, J.S., Rees, R.W., Walmsley, R.M., 2009. Analysis of 75 marketed pharmaceuticals using the GADD45a-GFP 'GreenScreen HC' genotoxicity assay. *Mutagenesis*, 24, 455-463.
- Hekimoğlu, A., Çiçek, R., 2006. Histamin H3 Reseptörlerinin Rat Gastrik Fundusundaki Kasılma Yanıtları Üzerine Etkisi. *Dicle Tıp Dergisi*, 33 (3), 127-133.
- Herz, U., Petschow, B., 2005. Perinatal events affecting the onset of allergic diseases. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy*, 4, 523-529.
- Hite, M., Algon, J., Peck, H.M., 1977. The effect of cyproheptadine on the chromosomes of human lymphocytes *in vitro*. *Drug Research*, 27, 1203-1206.
- IARC, 2001. Summaries & Evaluations, Doxylamine succinate. 79, 145.
- ISAAC, 1998. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *The Lancet*, 351, 1225-1232.
- İnal, A., Altıntaş, D.U., 2005. Histamin Reseptörleri. *Astım Alerji İmmünoloji*, 3 (3), 138-147.
- Jangi, S.M., Asumendi, A., Arlucea, J., Nieto, N., Perez-Yarza, G., Morales, M.C., de la Fuente-Pinedo, M., Boyano, M.D., 2004. Apoptosis of human T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by diphenhydramine, an H₁ histamine receptor antagonist. *Oncology Research*, 14 (7-8), 363-372.

- Jangi, S.M., Díaz-Pérez, J.L., Ochoa-Lizarralde, B., Martín-Ruiz, I., Asumendi, A., Pérez-Yarza, G., Gardeazabal, J., Díaz-Ramón, J-L., Boyano, M.D., 2006. H1 histamine receptor antagonists induce genotoxic and caspase-2-dependent apoptosis in human melanoma cells. *Carcinogenesis*, 27 (9), 1787–1796.
- Jarvis, A.S., Honeycutt, M. E., Mc Farland, V.A., Bulich, A.A., Bounds, H.C., 1996. A comparison of the Ames Assay and Mutatox in Assessing the Mutagenic potential of contaminated Dredged Sediment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 33, 193- 200.
- Jung, R., Engelhart, G., Herbolt, B., Jöckh, R. ve Muller W., 1992. Collaborative study of mutagenicity With salmonella typhimurium TA 102, *Mutation Research*, 278, 265- 270.
- Kaliner, M.A., 1992. Nonsedatign antihistamines. Pharmacology Clinical efficacy and adverse effects. *American Family Physician*, 45 (3), 1337-1342.
- Karataş, Y., 2005. Histamin ve Antihistaminiklerin Klinik Farmakolojisi. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 1 (1), 55-66.
- Kassie, F., Parzefall, W., Knasmüller, S., 2000. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutation Research*, 463, 13-31.
- Kay, A.B., 1997. Concepts of Allergy and Hypersensitivity. In: Key AB (Ed). *Allergy and Allergic Diseases*. Blackwell Science, England.
- Kay, A.B., 2001. Advances in immunology, allergy and allergic diseases. *The New England Journal of Medicine*, 344 (1), 30-37.
- Kevlekçi, C., 2008. Psoriasisite Darbant Ultraviyole-B ve E Vitamininin Mutajenik Risk Üzerine Etkilerinin Comet Tekniği İle Değerlendirilmesi. *Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara*, 109 s.
- Kiremitçi, Ü., 2004. Antistaminikler ve Dermatolojide Kullanımı. *İstanbul Tıp Dergisi*, 4, 25-28.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E., Van Hummelen, P., 1997. The *In Vitro* Micronucleus Test: A Multi-endpoint Assay to Detect Simultaneously Mitotic Delay, Apoptosis, Chromosome Breakage, Chromosome Loss and Non-disjunction. *Mutation Research*, 392 (1-2), 19-30.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardemac, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, J.R.M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J.,

- Vanhauwaert, A., Wakata, A., 2003. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research*, 540, 153–163.
- Korkmaz, B., 2005. Bazı 2-Süstitüe Perimidin Bileşiklerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames Mutajenite Testi ile Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 99 s.
- Krause, H., 1992. Antihistamines and decongestants. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 107 (6), 835-840.
- Krishna, G., Hayashi, M., 2000. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research*, 455, 155-166.
- Laffon, B., Pasaro, E., Mendez, J., 2001. Genotoxic effects of styrene-7,8-oxide in human white blood cells: comet assay in relation to the induction of sister-chromatid exchanges and micronuclei. *Mutation Research*, 491, 163-172
- Latt, S. A., Sehrek, R. R., Loveday, K. S., Dougherty, C. P., Schuler, C. F., 1980. Sister chromatid Exchange. *Advances in Human Genetics*, 10, 267-331.
- Latt, S.A., Schreck, R.R., 1980. Sister Chromatid Exchange Analysis. *The American Journal of Human Genetics*, 32, 297-313.
- Lorge E., Lambert C., Gervais V., Becourt-Lhote N., Delongas L., Claude N., 2007. Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation. Part II: Performances of the *in vitro* micronucleus test compared to the Mouse lymphoma assay and the *in vitro* chromosome aberration assay. *Toxicological Sciences*, 96 (2), 214-217.
- Mace, M.L.J., Daskal, Y., Wray, W., 1978. Scanning electron microscopy of chromosome aberrations. *Mutation Research*, 52, 199–206.
- Markham, A., Wagstaff, A.J., 1998. Fexofenadine. *Drugs*, 55 (2), 269-76.
- Maron, D.R., Ames, B.N., 1983. Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity test. *Mutation Research*, 113, 173-215.
- Mavournin, H.K., Blakey, H.D., Cimino, C.M., Salamone, F.M., Heddle, A.J., 1990. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*, 239, 29-80.
- McKelvey-Martin, V.J., Green, M.H., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Meo, M.P., Collins, A., 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutation Research*, 288, 47-63.

- Meda, 2010. Astelin, Meda Pharmaceuticals Inc.
- Meltzer, E.O., 1990. Antihistamines and decongestant induced performance decrements. *Journal of Occupational & Environmental Medicine*, 32 (4), 327-334.
- Mortelmans, K., Zeiger, E., 2000. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455, 29-60.
- Mortelmans, K., Rupa, S.D., 2004. Current Issues in Genetic Toxicology Testing for Microbiologists. *Advances in Applied Microbiology*, 56, 379-401.
- Müller, L., Korte, A., Madle, S., 1989. Mutagenicity testing of doxylamine succinate, an antinauseant drug. *Toxicology Letter*, 49(1), 79-86.
- 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 family. *Molecular Pharmacology*, 59, 427-433.
- Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I-L., Hagmar, L., Strömberg, U., Rössner, P., Boffetta, P., Lindholm, C., Gundy, S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Sram, R. J., Kunudsen, L.E., Barale, R., Fucic, A., 2006. Chromosomal Aberrations and SCE as Biomarkers of Cancer Risk. *Mutation Research*, 600 (1-2), 37-45.
- Novartis Pharmaceuticals, 2008. Livostin. www.ask.novartispharma.ca/download.htm?res=livostin_scrip_e.pdf&resTitleId=147 (16.07.2010).
- NTP, 1986. Toxicology and carcinogenesis studies of Chlorpheniramine maleate (cas no. 113-92-8) in f344/n rats and b6c3f1 mice (gavage studies), Technical Report series, NO. 317.
- OECD, 2006. *In vitro* Micronucleus Test. OECD Guideline For Testing of Chemicals Draft Proposal For A New Guideline.
- Olive, P.L., Banáth, J.P., 2006. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 1 (1), 23-29.
- Östling, O., Johanson, K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123 (11), 291-298.
- Özbek, T., 2006. Doğu Anadolu Tıbbi Bitkilerine Ait Bazı Türlerin Ames/Salmonella Mikrozom Testi Kullanılarak Antimutajenik Özelliklerinin Saptanması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 72 s.

- Özluoğlu, L.N., Saydam, L., Kızılay, A., 1994. Antihistaminikler. K.B.B. ve Baş Boyun Cerrahisi Dergisi, 2 (1), 71-74.
- Parsons, M.E., Ganellin, C.R., 2006. Histamine and its receptors. *British Journal of Pharmacology*, 147, 127–135.
- Paz-y-Mino, C., Bustamante, G., Sanchez, M.E., Leone, P.E., 2002. Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in Ecuador. *Environmental Health Perspectives*, 110, 1077-1080.
- Perry, P., Evans, H.J., 1975. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature*, 258, 121–125.
- Pfeifer, Y., Sadowsky, E., Sulman, F.G., 1969. Prevention of Serotonin Abortion in Pregnant Rats by Five Serotonin Antagonists. *Obstetrics & Gynecology*, 33 (5), 709-714.
- Purchase, I.F.H., Longstaff, E., Ashby, J., Styles, J.A., Anderson, D., Lefevre, P.A., Westwood, F.R., 1978. An evaluation of 6 short-term tests for detecting organic chemical carcinogens. *British Journal of Cancer*, 37, 873–959.
- Robinson, M.K., Cohen, C., de Fraissinette, Ade, B., Ponec, M., Whittle, E., Fentem, J.H., 2002. Non-animal testing strategies for assessment of the skin corrosion and skin irritation potential of ingredients and finished products. *Food and Chemical Toxicology*, 40 (5), 573-92.
- Rosenfeld, G.C., Loose, D.S., 2007. *Pharmacology*. Lippincott Williams & Wilkins, 4th. Edition, 373 p., USA.
- 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.
- Sadowsky, E., Pfeifer, Y., Polishuk, W.Z., Sulman, F.G., 1972. A trial of cyproheptadine in habitual abortion. *Israel Journal Of Medical Sciences*, 81(5), 623-625.
- Savage, J.R.K., 1993. Update on Target Theory as Applied to Chromosomal Aberrations. *Env. Mol. Mutagen.*, 22, 198-207.
- Saygı, Ş., 2003. Deneysel toksikolojide toksisite testleri ve test sonuçlarının önemi. *Gülhane Tıp Dergisi*, 45 (3), 291–298.

- Schatz, M., Zeiger, R.S., Claman, H.N., 1998. Asthma and immunological diseases in pregnancy and early infancy. 1100 p., Marcel Dekker, New York.
- Schlicker, E., Malinowska, B., Kathmann, M., Gothert, M., 1994. Modulation of neurotransmitter release via histamine H₃ heteroreceptors. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 8, 128-137.
- Schmid, W., 1975. The micronucleus test. *Mutation Research*, 31, 9-15.
- Shepard, T.H., 2004. Catalog of Teratogenic agents. 11 th. edition, 697 p., The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- 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 H₁-Antihistamines In Allergic Disease. 501 p., Marcel Dekker, U.S.A.
- Simons, F.E.R., 2003. Antihistamins. In: *Allergy Principles and Practice*. 834-870 p., Mosby, Inc., Philadelphia.
- Simpson, K., Jarvis, B., 2000. Fexofenadine A Review of its Use in the Management of Seasonal Allergic Rhinitis and Chronic Idiopathic Urticaria. *Drugs*, 59 (2), 301-321.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175, 184-191.
- Snyder, R., 1998. A review and investigation into the mechanistic basis of the genotoxicity of antihistamines. *Mutation Research*, 411, 235–248.
- Snyder, R.D., Green, J.W. 2001. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. *Mutation Research*, 488, 151–169.
- Snyder, R.D, Ewing, D., Hendry L.B., 2006. DNA intercalative potential of marketed drugs testing positive in invitro cytogenetics assays. *Mutation Research*, 609, 47-59.
- Sono, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, H., Hayano, K., 1981. Mutagenicity tests on mequitazine. *The Journal of Toxicological Sciences*, (2), 123-128.
- 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.

- Steinmetz, K.L., Tyson, K., Meierhenry, E.F., Spalding, J.W., Mirsalis, J.C., 1988. Examination of genotoxicity, toxicity and morphologic alterations in hepatocytes following *in vivo* or *in vitro* exposure to methapyrilene. *Carcinogenesis*, 9, 959-963.
- Stopper, H., Müller, O.S., 1997. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A Minireview. *Toxicology In Vitro*, 11, 661-667.
- Strachan, D.P., 1989. Hay fever, hygiene, and householdsize. *BMJ*, 299, 1259-1260.
- Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H., Marcos, R. 1995. Induction of Micronuclei by Five Pyrethroid Insecticides in Whole-Blood and Isolated Human Lymphocyte Cultures. *Mutation Research.*, 341, 169-184.
- 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. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 43, 122.
- Thomas, H., Shepard, T.H., Lemire, R.J., 2004. *Catalog of teratogenic agents*. 475 p., The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for *In Vitro* and *In Vivo* Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 206–221.
- 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.
- Turner, N.T., Woolley, J.L. Hozier J.C., Sawyer J.R., Clive D. 1987. Methapyrilene is a genotoxic carcinogen: studies on methapyrilene and pyrilamine in the L5178Y/TK +/- mouse lymphoma assay. *Mutation Research*, 189(3), 285-297.
- Üstün, F. 2007. Albendazol'un olası genotoksisitesi üzerine askorbik asitin etkisi. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 100 s.
- Van Gompel, J., 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.

- Vanparys, P., Fabry, L., Leonard, A., Marsbroom, R., 1981. Mutagenicity tests with astemizole *in vitro* and *in vivo*. Archives of Toxicology, 50, 167–173.
- Vanparys, P., Vermeiren, F., Sysmans, M., Temmerman, R., 1990. The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. Mutation Research, 244, 95-103.
- Vlastos, D., Stephanou G, Demopoulos, N.A., 1998. Effects of Cetirizine Dihydrochloride on Human Lymphocytes *in vitro*: Evaluation of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchanges. Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology, 11, 104-110.
- Vlastos, D., Stephanou, G. 1998. Effects of cetirizine dihydrochloride on human lymphocytes *in vitro*: micronucleus induction. Evaluation of clastogenic and aneugenic potential using CREST and FISH assays. Archives of Dermatological Research, 290(6), 312-318.
- Von Hertzen, L.C., 1998. The hygiene hypothesis in the development of atopy and asthma-still a matter of controversy? Oxford Journals Medicine, 91,767-771.
- Von Mutius, E., 1998. The rising trends in asthma and allergic disease. Clinical & Experimental Allergy, 28, 45-49.
- Vural, N., 2005. Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 73, Ankara.
- Weed, D.L. 1994. Between Science and Technology: the Case of Antihistamines and Cancer. Journal of the National Cancer Institute, 86, 740-741.
- Weiler, J.M., Bloomfield, J.R., Woodworth, G.G., Grant, A.R., Layton, T.A., Brown, T.L., McKenzie, D.R., Baker, T.W., Watson, G.S., 2000. Effects of fexofenadine, diphenhydramine, and alcohol on driving performance. A randomized, placebo-controlled trial in the Iowa driving simulator. Annals of Internal Medicine, 132 (5), 354 -63.
- WHO, 1969. WHO Expert Committee on Drug Dependence. Sixteenth report. Technical report series, No. 407, Geneva.
- Widel, M., Kolosza, Z., Jedrus, S., Lukaszczyk, B., Raczek-Zwierzycka, K., Swierniak, A., 2001. Micronucleus assay *in vivo* provides significant prognostic information in human cervical carcinoma: The updated analysis. International Journal of Radiation Biology, 77, 631-636.

- Wolff, S., 1980. Sister chromatid Exchange. *Advances in Human Genetics*, 10, 183-201.
- Wolfgang, P., Sabine, S., Karl, S., Frank, S., 2004. Pregnancy Outcome after Exposure to Cetirizine/Levocetirizine in the First Trimester—A Prospective Controlled Study. *Reproductive Toxicology*, 19, 239–260.
- Wood, J.D., 1992. Histamine signals in enteric neuroimmune interactions. *Ann NY Acad Sci*, 664, 275-283.
- Woodward, J.K., Munro, N.L., 1982. Terfenadine, the first non-sedating antihistamine. *Drug Res.*, 32, 1154–1217.
- 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.
- Yavuz Kocaman, A., 2007. Acetamidrid ve Alpha-Cypermethrin Pestisidlerinin Tek Başına ve Karışım Halinde Kullanıldıkları Zaman İnsan Periferal Lenfositlerindeki İn 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 Acetamidrid in Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 48, 483-490.
- Yıldız Zeyrek, F., Zeyrek, D.C., 2006. Alerjik Hastalıklar ve Parazitoz. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 30 (2), 135-140.
- Young, R.R., 2002. Genetic toxicology. *Toxicology*, 173, 103-121.
- Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F., Aksoy, H., 2006. Clastogenicity of fungicide afugan in cultured human lymphocytes. *Mutation Research*, 604, 53–59
- Zeiger, E., 2004. History and rationale of genetic toxicology testing: an impersonal, and sometimes personal, view. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44, 363-371. *Breast Cancer Research and Treatment*, 34 (1), 63-69.

ÖZ GEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ceren BÖRÇEK KASURKA

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 04.11.1984

Medeni Hali : Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Batıkent YDA Lisesi, 2002

Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2007

Çalıştığı Kurumlar

2009 - Ordu Üniversitesi Biyoloji Bölümü (Araştırma Görevlisi)

İletişim Bilgileri

Email : cerenborcek@yahoo.com