

FULYA ÜSTÜN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2007

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**ALBENDAZOL'ÜN OLASI GENOTOKSİSİTESİ ÜZERİNE
ASKORBİK ASİT'İN ETKİSİ**

FULYA ÜSTÜN

**DANIŞMAN
PROF.DR. SÜLEYMAN ŞENER**

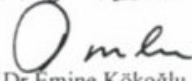
**FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI /
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2007

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

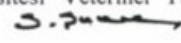
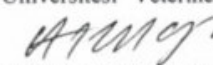
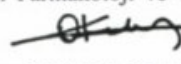
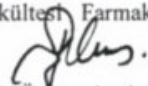
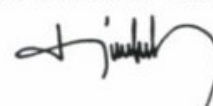
23 / 10 / 2007


 Prof. Dr. Emine Kökoğlu
 Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
 Program Adı : Veteriner Fakültesi
 Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☐ Doktora ☒
 Anabilim Dalı : Farmakoloji ve Toksikoloji
 Tez Sahibi : Fulya ÜSTÜN
 Tez Başlığı : Albendazol'un Olası Genotoksisitesi Üzerine Askorbik Asit'in Etkisi
 Sınav Yeri : Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı
 Sınav Tarihi : 15 / 10 / 2007

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1. Prof. Dr. Süleyman ŞENER (Tez Danışmanı) İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı 
2. Prof. Dr. Ahmet MENGİ (Tez İzleme Komitesi Üyesi) İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı 
3. Prof. Dr. Oya KELEŞ İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı 
4. Prof. Dr. Muammer ELMAS Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı 
5. Doç. Dr. Tülay BAKIREL (Tez İzleme Komitesi Üyesi) İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı 

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Fulya ÜSTÜN

İTHAF

Rahmetli Babam Biyolog Selahattin ÜSTÜN'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında bana yol gösteren, destek ve yardımlarını esirgemeyen, tecrübeleriyle beni yetiştiren tez danışmanım çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Süleyman ŞENER'e, doktoram süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Oya KELEŞ'e, değerli bilgi, öneri ve eleştirileriyle çalışmama yön veren Doç. Dr. Tülay BAKIREL'e, deneysel çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Araş.Gör. S.Aslı AYDIN'a, istatistiksel değerlendirmedeki yardımlarından dolayı Doç.Dr. Bülent EKİZ'e, Anabilim Dalımızdaki diğer hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma, tüm hayatım boyunca bana maddi ve manevi desteği veren sevgili aileme, tez süresince gösterdiği hoşgörü ve anlayış nedeniyle eşim Uzman Veteriner Hekim Yaşar ALKAN'a teşekkür ederim.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından T-463/25062004 nolu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
BEYAN	İİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Benzimidazoller.....	3
2.1.1. Benzimidazol Antelmantiklerin Etki Mekanizması.....	4
2.2. Albendazol'ün İdentifikasyonu	6
2.2.1. Albendazol'ün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	6
2.2.2. Albendazol'ün Etki Mekanizması	7
2.2.3. Albendazol'ün Farmakokinetiği	7
2.2.3.1. Albendazol'ün Deney Hayvanlarındaki Farmakokinetiği.....	8
2.2.3.2. Albendazol'ün Çiftlik Hayvanlarındaki Farmakokinetiği.....	9
2.2.3.3. Albendazol'ün İnsanlardaki Farmakokinetiği	11
2.2.4. Albendazol'ün Veteriner Hekimlikte Kullanım Alanları.....	12
2.2.5. Albendazol'ün Gıdalardaki Kalıntısı	13
2.2.6. Albendazol'ün Toksisitesi.....	14
2.2.6.1. Albendazol'ün Akut Toksisitesi	14
2.2.6.2. Albendazol'ün Kronik Toksisitesi ve Karsinogenisitesi.....	15
2.2.6.3. Albendazol'ün Teratojenik Etkisi	16
2.2.6.4. Albendazol'ün Reprodüktif Etkileri	18
2.2.7. Benzimidazol Türevlerinin ve Albendazol'ün Genotoksisitesi.....	18
2.3. Askorbik Asit	23

2.3.1. Askorbik Asit İdentifikasyonu, Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	23
2.3.2. Askorbik Asit'in Organizmadaki Metabolizması ve Biyolojik Fonksiyonları ..	23
2.3.3. Askorbik Asit'in Genotoksitesisi.....	24
2.3.3.1. Askorbik Asit'in Nükleik Asitler Üzerine Etkisi.....	24
2.3.3.2. Askorbik Asit'in Bakteriler Üzerine Etkisi	25
2.3.3.3. Askorbik Asit'in Memeli Hücreleri Üzerine Etkisi	26
2.3.4. Askorbik Asit'in Antimutajenik Etkisi	28
2.3.4.1. Askorbik Asit'in Bakterilerdeki Antimutajenik Etkisi	28
2.3.4.2 Askorbik Asit'in Memeli Hücrelerindeki Antimutajenik Etkisi	30
2.3.5. Askorbik Asit' in Antimutajenik Etki Mekanizması	33
2.3.6. Askorbik Asit'in Anti-karsinojenik Etkileri.....	34
2.3.6.1. Askorbik Asit'in Hücre Bölünmesi ve Gelişimi Üzerine Etkileri	34
2.3.6.2. Askorbik Asit'in Kanser Hücrelerindeki Seçici Toksisitesi.....	35
2.4. Genetik Toksikoloji	35
2.4.1. Mutasyon Oluşum Mekanizmaları.....	37
2.4.2. DNA Onarımı	40
2.4.3. Genetik Toksikolojinin Tarihçesi	41
2.4.4. Genetik Toksikite Testleri	42
2.4.4.1 Bakteriyel Ters (Reverse) Mutasyon Testi.....	43
2.4.4.2. Memeli Hücre Kültürü Testleri	45
2.4.4.2.1. İn vitro Memeli Kromozom Aberasyon Testi	45
2.4.4.2.2. İn vitro Mikronükleus Testi	47
2.4.4.2.3. Fare Lenfoma Testi	49
2.4.4.2.4. İn vitro Kardeş Kromatid Değişim Testi (Sister Chromatid Exchange Assay)	50
2.4.4.2.5. Memeli Hücre Kültürlerinde Unscheduled (Düzensiz) DNA Sentez Testi .	50
2.4.4.3. İn vivo Testler.....	51
2.4.4.3.1. Memeli Kemik İliği Kromozom Aberasyon Testi	51
2.4.4.3.2. İn vivo Rodent Mikronükleus Testi	52
2.4.4.3.3. İn vivo Kardeş Kromatid Değişim Testi (Sister Chromatid Exchange Assay)	59
2.4.4.3.4. Memeli Spermatogonial Kromozomal Aberasyon Testi.....	60
2.4.4.3.5. Rodent Dominant Lethal (Öldürücü) Testi.....	60

2.4.5. Genotoksisite Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi	61
2.4.6. Genotoksik Etkinin Değerlendirilmesi.....	62
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	67
3.1 Gereç	67
3.1.1 Deney Hayvanları	67
3.1.2 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	67
3.2 Yöntem.....	68
3.2.1 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	68
3.2.2 <i>In vivo</i> Fare Mikronükleus Testi.....	68
3.2.3 Preparatların Hazırlanması	70
3.2.4 Preparatların Boyanması	71
3.2.5 Mikroskopta İnceleme.....	71
3.2.6 Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatiksel Yöntemler.....	71
4. BULGULAR.....	72
5. TARTIŞMA	77
KAYNAKLAR	83
ETİK KURUL KARARI	98
ÖZGEÇMİŞ	99

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1 Albendazol'ün gıdalarda bulunmasına izin verilen maksimum kalıntı düzeyi	13
Tablo 2-2 Albendazol'ün Akut Toksisitesi	15
Tablo 2-3 Plazmadaki albendazol sülfoksit konsantrasyonu ile teratojenez arasındaki ilişki	17
Tablo 4-1 Albendazol ve C vitaminini uygulanan gruptaki farelerin kemik iliğindeki mikronukleus içeren polikromatik eritrosit sayıları	73

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Albendazol'ün Kimyasal Yapısı	7
Şekil 2.2. Albendazol'ün organizmadaki metabolik yolları	8
Şekil 2.3. Mutasyonların neden olduğu zararlar	37
Şekil 2.4. Kromozomlarda Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler	39
Şekil 2.5. a) <i>İn vivo</i> eritropoezis şeması b) Polikromatik ve normokromatik eritrositler içerisinde mikronükleus oluşum mekanizması	54
Şekil 4.1. Polikromatik eritrositlerde gözlemlenen mikronükleusların ışık mikroskobu altındaki görüntüleri (10x100 büyütme).....	74
Şekil 4.2. Polikromatik eritrositlerin ışık mikroskobu altındaki genel görünümü ve mikronükleus içeren polikromatik eritrosit (10x100 büyütme).....	75
Şekil 4.3. Mitozun telofaz aşamasında kromozomların kutuplara çekildiği, sitokinezin gerçekleşmekte olduğu ve 2 eş hücrenin oluşum görüntüsü	75

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ADI: Acceptable Daily Intake, Kabul Edilebilir Günlük Alım

ALB: Albendazol

ALBSO: Albendazol sülfoksit

ALBSO₂: Albendazol sülfon

c.a.: Canlı ağırlık

CHO: Chinese hamster ovaryum

CP: Siklofosfamid

Cu: Bakır

CVMP: Committee for Medicinal Products for Veterinary Use, Tıbbi Ürünlerin Veteriner Hekimlikte Kullanımı Komitesi

CYP-450: Sitokrom P450

CYS: Sistein

CYT-B: Sitokalazin B

DEN: Dietilnitrozamin

DNA: Deoksiribonükleik asit

EDTA: Etilendiamin tetraasetikasit

EMA: The European Medicines Agency, Avrupa İlaç Ajansı

FBS: Fötal buzağı serumu

FISH: Floresan in situ hibridizasyon

GSH: Glutatyon

HPLC: High Performance Liquid Chromatography, Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi

JECFA: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

kDa: kilodalton

MBC: Metil 2-benzimidazolkarbamat

MMC: Mitomisin C

MN: Mikronükleus

NADH: Nikotinamid adenin dinükleotit hidrojen

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat hidrojen

nm: Nanometre

NO₂: Azot dioksit

NOEL: No observable effect level, Gözlemlenebilir etkinin oluşmadığı düzey

O₂⁻: Süperoksit radikali

OH: Hidroksil radikali

RNA: Ribonükleik asit

RO: Alkoksil radikalleri

SCE: Kardeş kromatid değişimi

TLC: Thin Layer Chromatography, İnce Tabaka Kromatografi

WHO: World Health Organisation, Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

Üstün F. Albendazol'ün olası genotoksisitesi üzerine askorbik asit'in etkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ve Toksikoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2007.

Albendazol, veteriner ve beşeri hekimlikte helmintlerin neden olduğu paraziter enfestasyonların tedavisinde sıklıkla kullanılan, etkinliği yüksek ve antelmentik etki spektrumu geniş benzimidazol türevi bir bileşiktir. Bu çalışmanın amacı albendazol'ün olası genotoksisitesine karşı askorbik asit'in koruyucu etkisinin araştırılmasıdır. Albendazol 500, 1000 ve 1500 mg/kg c.a. dozlarında tek başına ve 200 mg/kg c.a. dozda vitamin C ile kombine edilerek gavaj şeklinde uygulandı. Genotoksisitenin tespiti amacıyla fare kemik iliği hücrelerinde mikronükleus içeren polikromatik eritrosit frekansı saptandı. Albendazol uygulanan farelerin kemik iliğindeki polikromatik eritrositlerdeki mikronükleus sayısının uygulama dozuna bağlı bir şekilde arttığı tespit edildi. 1000 ve 1500 mg/kg albendazol uygulanan gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında meydana gelen artış istatistiksel yönden önemli ($p < 0,001$) bulundu. Albendazol'le birlikte askorbik asit uygulanan tüm gruplarda mikronükleus frekansında değişen oranlarda düşüş meydana geldiği saptandı. Albendazol'ün tek başına verildiği grupların verileri ile askorbik asitle kombine halde verilen grupların verileri karşılaştırıldığında meydana gelen düşüşün istatistiksel yönden önemsiz ($p > 0,001$) olduğu sonucuna varıldı. Çalışmanın sonuçları albendazol'ün yapısında bulunan karbamat grubunun mikrotübüler proteinlerle etkileşmesiyle muhtemelen anöploidojen bir ajan olarak mikronükleus oluşumuna yol açtığına, fare eritrositlerinde genotoksik etkiye sahip olduğuna ve askorbik asit'in uygulanan dozunun meydana gelen genotoksik etkiye karşı koruyucu etki gösteremediğine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler : Albendazol, genotoksisite, mikronükleus, askorbik asit, kemik iliği

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-463/25062004

ABSTRACT

Üstün F. The effect of ascorbic acid on the probable genotoxicity of albendazole. İstanbul University, Institute of Health Science, Pharmacology and Toxicology Department. Doctorate Thesis. İstanbul. 2007.

Albendazole is a benzimidazole compound frequently used as an anthelmintic in veterinary and human medicine for the treatment of several helminthiases due to its broad antiparasitic activity and efficiency. The aim of the present study was to investigate the protective effect of ascorbic acid against the probable genotoxicity of albendazole. Albendazole was administered at the rate of 500, 1000 and 1500 mg/kg b.w. alone and in combination with ascorbic acid at 200 mg/kg b.w. of mice by gavage. For the determination of genotoxicity micronucleated polychromatic erythrocytes was calculated in mouse bone marrow cells. A dose-dependent increase was found in the micronucleated polychromatic erythrocytes in bone marrow cells of albendazole treated mice. 1000 and 1500 mg/kg albendazole administered groups were found statistically significant ($p < 0,001$) by comparison with control group. Simultaneous treatment with ascorbic acid found to decrease micronucleus frequency at a varying range in all groups treated with albendazole. Results of the groups treated with albendazole alone in comparison with combination of ascorbic acid were found not to be statistically significant ($p > 0,001$). Results of the study indicated that albendazole is a potential aneuploidogen agent inducing micronucleus by the interaction of the carbamate group which was found in the structure of albendazole with microtubular proteins, has genotoxic effect in mouse erythrocytes and the administered dose of ascorbic acid has shown no protective effect against this genotoxic activity.

Key Words: Albendazole, genotoxicity, micronucleus, ascorbic acid, bone marrow

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. T-463/25062004

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Helmintiazis, dünya popülasyonunun % 10'undan daha fazlasında sağlık problemlerine yol açan ve büyük çapta hayvansal üretim kayıplarına neden olan bir paraziter hastalıktır. Özellikle tropikal iklim kuşağındaki gelişmemiş ülkelerde görülen bu hastalığın sağaltımında benzimidazol grubu antelmentiklerden albendazol yaygın olarak kullanılmaktadır (112). Benzimidazol grubu antelmentiklerin toksisitesine ilişkin yapılan çalışmalarda etki spektrumlarının geniş ve toksisitelerinin düşük olduğu bildirilmiştir (27).

Genetik bilimindeki ilerlemelere paralel olarak son yıllarda, benzimidazol grubu antelmentiklerin genler üzerine olan etkilerine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Yapılan araştırmalarda bu bileşiklerin gen mutasyonlarına veya kromozomal bozukluklara neden olduğu bildirilmiştir (27, 118).

Albendazol, parazit hücrelerindeki β -tubuline bağlanıp tubulinlerin mikrotübüllere polimerizasyonunu inhibe ederek etki göstermektedir (3, 121). Ökaryotik hücrelerde yapısal, mitotik, hücresel sekresyon ve transport gibi birçok farklı fonksiyonda görev alan mikrotübüller, tubulin adı verilen proteinlerin polimerizasyonu sonucu oluşmakta ve mikrotübüller hücre bölünmesi sırasında kromozomların kutuplara çekilmesini sağlayan iğ iplikçiklerin ve sentriollerin yapısında bulunmaktadırlar (74, 76). Albendazol'un genel toksisite çalışmaları sonucu gözlemlenen bazı toksik etkilerinin, yapısında bulunan karbamat grubunun mikrotübüler proteinlere bağlanmasının bir sonucu olarak iğ iplikçiği oluşumu ile fonksiyonlarının bozulmasından kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür; bunun sonucunda da mitotik gecikme ve kromozomlarda ayrılmama gibi mutajenik etkilere yol açabileceği görüşü bildirilmiştir (19, 113, 118).

Mutajenik etkisi olan kimyasal maddelerin veya metabolitlerin çoğunun karsinojenik etkili olması, insan ve hayvan sağlığında kullanılan bir çok maddenin karsinojenik risklerinin araştırılmasında mutajenite testlerinin önemini gündeme getirmiştir (67). Mutajenik etkili birçok bileşiğin kansere neden olduğu görüşünden hareketle, mutajenik etkili genotoksik ve karsinojenik kimyasalları belirlemede önceden haber verici olarak bir çok kısa süreli *in vitro* ve *in vivo* genotoksisite testi geliştirilmiştir (85, 127).

Kısa süreli genotoksisite testlerinden biri olan *in vivo* mikronükleus testi, diğer *in vivo* memeli testlerine göre daha hızlı ve ucuz olması nedeniyle, kromozomlarda yapısal ve sayısal bozukluklara neden olan mutajenlerin ve karsinojenlerin, *in vivo* olarak fare kemik iliği hücrelerinde erken biyolojik etkilerinin belirlenmesinde en yaygın olarak kullanılan sitogenetik testler arasında yer almaktadır (38, 82, 83, 134).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Avrupa İlaç Ajansı'nın (EMA) raporlarında albendazol'un sitogenetik testlerden biri olan *in vivo* fare kemik iliği mikronükleus testinde pozitif sonuç verdiği, muhtemelen anöploidojen bir ajan olarak rol oynadığı ve sonucun albendazol'un *in vivo* somatik hücre mutajeni olduğuna işaret ettiği belirtilmiştir. Buna karşın aynı raporlarda *in vitro* bakteriyel AMES testinde ve Chinese hamster ovaryum hücrelerinde yapılan *in vitro* kromozom aberasyon testinde bu bileşiğin *in vitro* genotoksisitesinin bulunmadığı bildirilmiştir (21, 27, 64).

Son yıllarda antioksidan bileşiklerin çevresel mutajen, karsinojen ve endojen mutajenlere karşı koruyucu etkiye sahip olduğu bildirilmiş ve araştırmacılar tarafından yapılan deneysel ve epidemiyolojik çalışmalarda birçok çevresel ve endüstriyel kimyasala maruz kalan organizmalarda oluşan genotoksik etkilere karşı antioksidanların antimutajenik veya antikarsinojenik etki gösterdikleri ispatlanmıştır (58, 132).

Antioksidanlar birçok değişik reaksiyonda serbest radikalleri ortadan kaldırıp mutajenlerin oluşumunu önleyerek, metabolik aktivasyonu inhibe edip premutajenlerin reaktif metabolitlere biyotransformasyonunu önleyerek veya detoksifikasyon enzimlerini stimüle ederek, reaktif molekülleri yok etmede blokör ajan olarak, deoksiribonükleik asit (DNA) onarım mekanizmasında, tümör oluşumunda ve gelişiminde rol oynayan hücre içi fonksiyonları baskılayıcı ajan olarak rol oynadığı belirtilmiştir (20, 133). Güçlü bir antioksidan özelliğe sahip askorbik asit ile yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda askorbik asidin antimutajenik ve antikarsinojenik etki gösterdiği saptanmıştır (5, 43, 132).

Bu çalışmanın amacı, deneysel çalışmalar sonucunda genotoksik etkisine ilişkin çelişkili sonuçlar elde edilmiş albendazol'un *in vivo* koşullarda genotoksik etkili olup olmadığını saptamanın yanısıra antimutajenik ve antikarsinojenik özellikte bir antioksidan olan askorbik asidin albendazol'un olası genotoksisitesi karşısında koruyucu etkisini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Benzimidazoller

Benzimidazol türevleri güçlü antelmentik, antimikrobiyal ve pestisidal etkilere sahip (121) ve özellikle insanlarda ve evcil hayvanlarda endoparazitik hastalıkların tedavisinde kullanılan, etki spektrumları ve güven aralığı geniş bileşiklerdir (19).

Merck tarafından 2-(4-thiazolyl) benzimidazol'ün (tiabendazol) 1961 yılında ilk geniş spektrumlu antelmentik olarak sunulması helmintiazisin kemoterapisine yeni bir yaklaşım getirmiştir (13, 88, 121). Benzimidazol halkasının 2. ve 5. pozisyonlarında yapılan kimyasal modifikasyonlar sonucu terapötik olarak etkin benzimidazol bileşikleri sentezlenmiştir. Bu bileşikler tiabendazol analoğu ve benzimidazol karbamat bileşikler olan kambendazol, parbendazol, mebendazol, fenbendazol, oksfendazol, oksibendazol, albendazol, tiofanat, netobimin ve triklabendazoldür (19, 47, 138). Ana bileşik benzimidazol çekirdeğine farklı zincirlerin ve radikallerin bağlanması ve tiazol halkasının yerine metil-karbamatın yer alması sonucu sentezlenen benzimidazol karbamat bileşikler, etki spektrumları daha geniş, etki güçleri daha yüksek ve atılımları daha yavaş olması nedeniyle diğer benzimidazol bileşiklerine oranla tedavide daha fazla kullanım alanı bulmuşlardır (19, 74).

Benzimidazoller, hücrelerde yapısal bir protein olan β -tubuline bağlanıp tubulinlerin mikrotübüllere polimerizasyonunu bloke ederek etki göstermektedirler (74, 75). Birçok benzimidazolün antimitotik yani mitoz bölünmeyi aksatıcı ya da bozucu etkisinin tubulinlere bağlanmasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Deneysel çalışmalar neticesinde, hücre replikasyonu sırasında mikrotübüllerin depolarizasyonuna bağlı olarak oluşan iç iplikçiklerindeki fonksiyon bozukluğu sonucu kromozomların birbirinden ayrılmadığı saptanmıştır. Bu nedenle anöjen sınıfında benzimidazol antelmentiklerin yer alabileceği ve mutajenik/karsinojenik etkiye sahip olabilecekleri ileri sürülmüştür (19, 88, 107, 122, 138).

Benzimidazollerin, parazitik β -tubuline afinitelerinin memeli dokularına oranla daha fazla ve seçici olması güven aralıklarının geniş olmasını sağlamaktadır (19, 75). Benzimidazol antelmentikler memelilerde düşük toksisiteye sahip olmalarına karşın bazı benzimidazoller doz oranına bağlı olarak teratojenik etki göstermektedirler. Bu nedenle gebeliğin erken dönemlerinde kullanımları kontrendikedir (19, 88).

2.1.1. Benzimidazol Antelmantiklerin Etki Mekanizması

Benzimidazollerin sudaki çözünürlüklerinin zayıf olması nedeniyle oral yolla süspansiyon, toz veya rumeniçi enjeksiyon şeklinde uygulanmaktadırlar. Bileşiklerin sindirim kanalından emilim oranları tür, dozaj, formülasyon ve çözünürlük gibi faktörlere bağlı olarak değişmekle birlikte genellikle sindirim kanalından emilimleri düşüktür (19). Emilim ve atılım hızlarının yavaş olması sindirim kanalı parazitlerine karşı bileşiklerin güçlü antelmantik etki göstermelerini sağlamaktadır (88).

İnsan ve hayvanlarda helmintlerin neden olduğu birçok hastalığın tedavisinde benzimidazol türevlerinin kullanımı, bu ilaçların antelmantik etki mekanizmasını belirlemeyi gerekli kılmıştır ve benzimidazollerin helmintler üzerindeki antelmantik etki mekanizmasının mitokondriyal fumarat redüktaz enziminin inhibisyonundan, glikoz transportunun azalmasından ve parazitlerde β -tubuline bağlanarak mikrotübüllerin polimerizasyonunun inhibisyonundan kaynaklandığı ileri sürülmüştür (13, 121).

Benzimidazollerin etki mekanizmasına yönelik ileri sürülen ilk hipotez parazitlerin enerji kullanımına dayanmaktadır. Tiabendazol'un, erişkin *Ascaris suum* ve *Haemonchus contortus* parazitlerinin mitokondrilerinden izole edilen ve anaerobik metabolizma için önemli bir enzim olan fumarat redüktazı *in vitro* olarak inhibe ettiği ve dirençli parazitlerde bu inhibisyonun oluşmadığı belirtilmiştir (74, 88). Parazitlerin anaerobik sisteminde fumarat redüktaz enziminin önemli bir rol oynadığının saptanmasıyla; parazitlere enerji sağlayan oksidatif fosforilasyon metabolizmasının benzimidazol türevleri tarafından bu aşamada kesilmesinin veya sitoplazmik mikrotübüllerde hasara yol açması sonucu, sitoplazmaya proteolitik ve hidrolitik enzimlerin dolmasına bağlı olarak parazitlerin ölümüne ve paralizine neden olduğu bildirilmiştir (3, 121). Bununla birlikte, benzimidazollerin parazitlerde tubulin polimerizasyonunu inhibe eden konsantrasyonlarından daha yüksek konsantrasyonlarda fumarat redüktaz enzimini inhibe edebildiği bildirilmiştir (88).

Antelmantik etki mekanizmasına ilişkin diğer bir hipotez ise bileşiğin parazitlerde mikrotubüllere bağlı glikoz alımını inhibe etmesi esasına dayanmaktadır. Glikoz alımının bloke edilmesi, parazitlerin yaşamını sürdürmesi ve replikasyonu için gerekli olan ATP sentezinde düşüşe ve enerji kaynaklarının tükenmesine yol açmaktadır (3, 79, 88, 121).

Araştırmacılar tarafından bu iki hipotezin tüm benzimidazoller için tam olarak geçerli olan bir etki mekanizması olmadığı belirtilmiştir. Benzimidazol antelmantiklerin etki mekanizmasına ilişkin en geçerli teori benzimidazollerin, tüm hücreler için önemli bir bileşen olan tubuline *in vitro* ve *in vivo* bağlanma afinitesine dayanmaktadır (121). Tubulinler protein yapıdaki α ve β tubulinlerden oluşan, moleküler ağırlığı yaklaşık 50 kDa olan ve zincir uzunluğu 445-450 aminositten oluşan dimerik yapıda proteinlerdir (74, 75). Tubulinler veya mikrotübüller mitokondri, golgi aygıtı, ribozom, lizozom, hücre membranı ve çekirdek gibi birçok organelin yapısına girerler (74). Mikrotübüller, tubulinlerle belli bir denge içerisinde yer alırlar ve dimerik tubulinlerin polimerik mikrotübüllere oranı birçok endojen proteinin ve yardımcı faktörün kontrolü altındadır (75). Mikrotübüller, silindirik yapıda, içi boş borucuklar halinde, lumen çapı yaklaşık 15 nm ve dış çapı 25 nm olan tubuler organellerdir. Elektron mikroskopla yapılan incelemelerde 13 protofilamentten oluştukları saptanmıştır. Mikrotübüller hücresel düzeyde hücre bölünmesi sırasında mitotik iğ iplikçığı oluşumu, hücre bütünlüğünün korunması, hücrenin motilitesi, hücresel sekresyon, besinlerin emilimi ve hücre içi transport gibi birçok farklı fonksiyona sahiptirler (74). Hücresel iskelet yapısını oluşturan mikrotübüllerin benzimidazoller tarafından inhibisyonu sonucu, parazit hücrelerinin bütünlüğünün ve transport fonksiyonlarının bozulduğu buna bağlı olarak da parazitlerde ölüm meydana geldiği bildirilmiştir (19).

Benzimidazollerin seçici toksisite gösterme nedeni memeli proteinlerine oranla parazitlerdeki β -tubuline daha yüksek bağlanma afinitesine sahip olmalarıdır. Araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalar sonucunda benzimidazole dirençli *H. contortus* suşlarında bu afinitenin düşük olduğu, β -tubulin izotip geninde değişiklikler olduğu saptanmış ve bu durumun ilaç direnci ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Nematodlarda benzimidazollere karşı meydana gelen direncin, β -tubulin gen izotiplerinde meydana gelen kayıp veya β -tubulinin 200.cü pozisyonunda fenilalanin yerine tirozinin kodlanmasına neden olan nokta mutasyon sonucu gerçekleştiği bildirilmiştir (13, 88).

Kolşisin ve vinca alkaloidleri (Vinblastin ve Vincristin) gibi mitotik iğ iplikçığı zehirlerinin tubulinlerle direk etkileşime girerek tubulin polimerizasyonunu inhibe etmektedirler (121). Kolşisin, vinblastin gibi polimerizasyon inhibitörlerinin hızla bölünen tümör hücrelerinin mitozunda seçici toksisite oluşturarak antitümör aktivite gösterdikleri bildirilmiştir (76). Benzimidazol karbamat sınıfında yer alan geniş

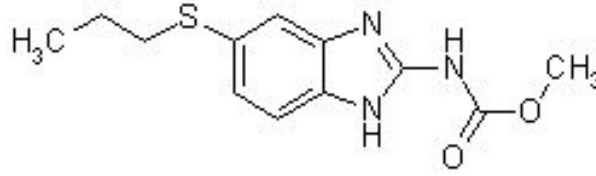
spektrumlu antifungal ve antelmantik etkili bileşiklerin de tubuline bağlanma bölgesinde kolşisinle yarışarak tubulin polimerizasyonunu inhibe ettiği saptanmıştır (75, 76). Benzimidazollerin de bu bileşiklere benzer şekilde iç iplikçığı oluşumu ve hücre bölünmesini bozarak ayrıca hücre membranları arasında proton transferini engelleyip hücresel biyoenerji döngüsünü bozarak etki gösterdiği bildirilmiştir (138). Benzimidazollerin etki mekanizmasını araştırmak amacıyla bir benzimidazol türevi olan onkodazol ile yapılan bir çalışmada, bileşiğin sıçan beyin tubulinlerine bağlanarak mikrotübül oluşumunu inhibe ettiği ve hücre bölünmesinde aksaklığa neden olduğu bildirilmiş ve benzimidazollerin antimitotik etkisinin tubulinlere bağlanmasından kaynaklanabileceği görüşü ileri sürülmüştür (88). Sığır ve koyun beyin tubulinlerinde yapılan *in vitro* çalışmalarda da antimikrotübüler etki ile antelmantik etki arasında korrelasyon bulunduğu ve tiabendazol, albendazol, kambendazol, oksibendazol, parbendazol ve fenbendazolün tubulinlere bağlanarak tubulinlerin mikrotübüllere polimerizasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (121). McKellar ve ark. tarafından (88) belirtilen, ergin *A. suum* parazitinin bağırsak hücrelerinde mebendazol ve kolşisinle yapılan bir çalışmada, mebendazol'un tubulinlere bağlanmada kolşisinin kompetitif inhibitörü olarak rol oynaması nedeniyle mebendazol'un sitoplazmik mikrotübüllerde hasara neden olduğu bildirilmiştir.

2.2. Albendazol'un İdentifikasyonu

Albendazol, veteriner hekimlikte ve beşeri hekimlikte helmintlerin neden olduğu parazitler enfestasyonların tedavisinde kullanılan, düşük dozlarda yüksek etkinliğe ve geniş antelmantik etki spektrumuna sahip benzimidazol türevi bir bileşiktir (27, 51).

2.2.1. Albendazol'un Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Albendazol, [5-(propylthio)-1H-benzimidazol-2-yl] benzimidazol karbamik asit metil esteridir (110, 122). Albendazol'un kimyasal yapısı Şekil 2.1.'de gösterilmiştir (21). 4-(propylthio)-o-phenylenediamine'in cyanamide-methyl chloroformate veya 1,3-dicarbomethoxy-S-methylisothiourea ile reaksiyona girmesi sonucu sentezlenmektedir (121). Kimyasal formülasyonu $C_{12}H_{15}N_3O_2S$ ve moleküler ağırlığı 265.34 g/mol'dür (108). Beyazımsı renkte toz halinde bulunur. Suda, metanolde, kloroformda ve asetonitrilde çok az, dimetilsülfoksitte, kuvvetli asit ve bazlarda iyi çözünür. Erime noktası 209 °C'dir (130).



Şekil 2.1. Albendazol'ün Kimyasal Yapısı (21)

2.2.2. Albendazol'ün Etki Mekanizması

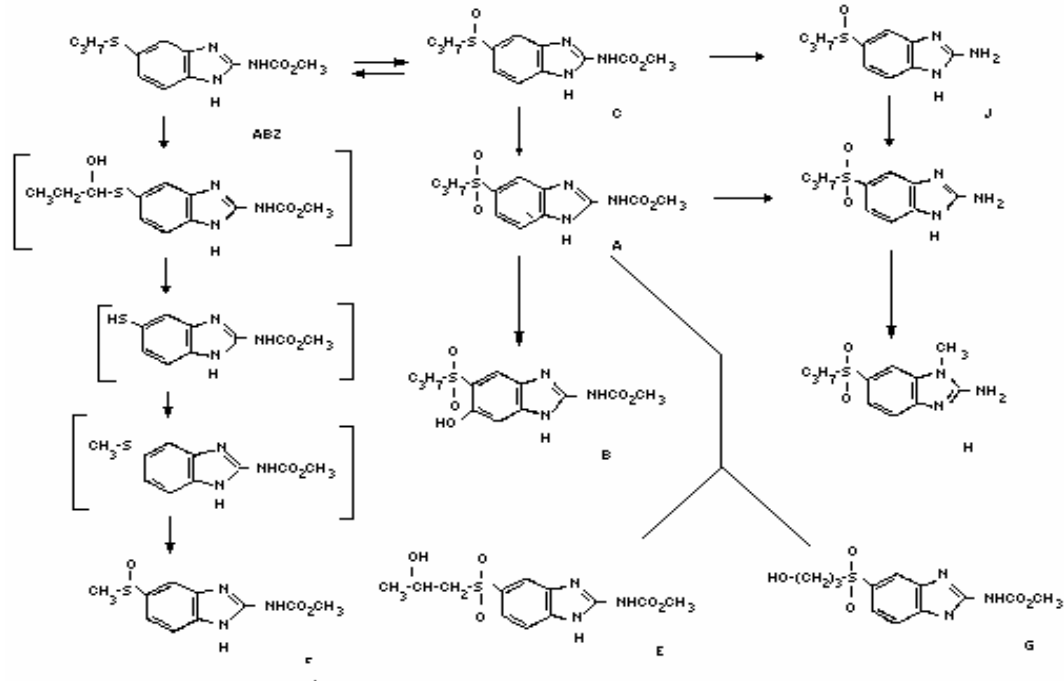
Memelilere oranla parazitlere karşı spesifik ve yüksek toksisite gösteren albendazol'ün tubulinlerin mikrotüllere polimerizasyonunu inhibe ederek bir etki oluşturduğu bildirilmiştir (3, 121).

Albendazol'ün benzimidazollerin etki mekanizmalarından biri olan tubulin polimerizasyonu ile etkileşime girmesi sonucu iğ iplikçiği oluşumunu ve mitozu inhibe etmesinden kaynaklanan bazı toksik etkilerinin açığa çıktığı saptanmıştır (64). Albendazol'ün 1984 yılında onkojen (kanserojen) olduğu ileri sürülmüş olmasına rağmen; yapılan çalışmalarda ilacın onkojenik (kanserojenik) etkiye sahip olduğu henüz ispatlanamamıştır (108).

2.2.3. Albendazol'ün Farmakokinetiği

Albendazol'ün su ve organik çözücülerdeki çözünürlüğünün düşük olması nedeniyle, çözünürlüğündeki ufak değişiklikler emilimini dolayısıyla etkinliğini büyük ölçüde etkilemektedir (21, 47). Albendazol'ün oral yolla verilmesini takiben hayvan türlerine göre sindirim kanalından farklı düzeylerde emildiği; yağlı gıdaların ve safra tuzlarının albendazol'ün emilimini 5 kata kadar arttırdığı bildirilmiştir (21, 27, 78). Albendazol'ün biyotransformasyonunda başlıca sitokrom (CYP) P450 ve mikrozomal flavin monooksijenaz enzimleri rol oynamaktadır (47). Emilimi takiben karaciğerde ve bağırsaklarda hızla ilk geçiş etkisiyle sülfid grubu oksidasyona uğrayıp albendazol sülfoksite metabolize olmaktadır (21, 27, 48). Flavın içeren monooksijenazların sülfoksidasyon, sitokroma bağlı monooksijenazların ise sülfonasyon reaksiyonlarından sorumlu oldukları bildirilmiştir (77). Albendazol'ün organizmadaki metabolik yolları Şekil 2.2.'de gösterilmiştir (51). Karaciğerde enzimatik biyotransformasyon sonucu albendazol sülfoksitin (ALBSO) hem (+) hem de (-) enantiomerleri oluşmaktadır. Hepatik flavin monooksijenaz enzimleri genellikle (+) ALBSO, CYP P450 enzimleri ise (-) ALBSO oluşumuna neden olmaktadır (21, 77). Her iki sülfoksit türevi oksidasyon sonucu farmakolojik olarak inaktif olan albendazol sülfon (ALBSO₂) metabolitine

okside olurlar ve karbamat grubunun deasetilasyonu sonucu amin sulfona metabolize olurlar (27, 88). ^{14}C radyoaktif işaretli albendazol'un oral yolla verildikten sonra etkin metabolit olan albendazol sülfoksitin insanlarda, sıçanlarda ve koyunlarda uygulamadan 2-3 saat sonra pik plazma konsantrasyonuna ulaştığı ve yaklaşık % 70 oranında plazma proteinlerine bağlandığı bildirilmiştir (13, 21, 130). Plazmada yarılanma ömrü 4-15 saattir (13). Metabolitleri idrar, dışkı ve safra yoluyla atılmaktadır (21, 47).



Şekil 2.2. Albendazol'un organizmadaki metabolik yolları (51)

2.2.3.1. Albendazol'un Deney Hayvanlarındaki Farmakokinetiği

Fare ve sıçanlarda yapılan deneysel çalışmalar sonucunda oral yolla verilen albendazol'un % 20-30'unun emildiği ve etkin metabolit olan albendazol sülfoksitin uygulamadan 2-3 saat sonra pik plazma konsantrasyonuna ulaştığı saptanmıştır (21, 27). Sıçanlarda, insanlardan ve köpeklerden farklı olarak albendazol sülfoksit'in CYP P450'ye dayalı mikrozomal reaksiyon sonucu oluştuğu, plazmada ALBSO (-) enantiomerinin ALBSO (+) enantiomerinden daha yüksek oranda bulunduğu ve bu oranın yaklaşık (-)59/(+)41 olduğu bildirilmiştir (21, 23, 27, 77).

Albendazol'un farelerdeki metabolizmasını incelemek amacıyla yapılan diğer bir araştırmada, Charles River CD erkek farelere % 1'lik karboksimetilselüloz içerisinde

süspanse edilmiş ve ^{14}C ile işaretlenmiş albendazol'un 13,2 mg/kg c.a. dozunda oral yolla tek seferde verilmesinden 72 saat sonra idrarda % 20,5'i saptanmıştır. İnce tabaka kromatografisi (TLC) yöntemi kullanılarak yapılan analizler sonucu ^{14}C ile işaretlenmiş maddenin % 81'inin sülfoksit, G ve E metabolitlerinden geri kalan kısmının asıl ilaç olan albendazol, albendazol sülfon, F, I ve J metabolitlerinden oluştuğu saptanmıştır (64).

Gyurik ve ark. (51) tarafından yapılan bir çalışmada ratlara ve farelere ^{14}C radyoaktif işaretli albendazol 13,25 mg/kg dozda mide tüpü yoluyla uygulanmış ve 24 saat aralıklarla hayvanların idrarları toplanmıştır. Uygulanan dozun farelerde ve ratlarda sırasıyla % 28,7 ve 19,5'ünün ilk 24 saat içerisinde sülfoksit ve sülfon metabolitleri şeklinde, % 0,5-1,9 oranlarında ise idrarla değişmemiş formda atıldığı saptanmıştır. Buna benzer bir diğer çalışmada dişi ve erkek Sprague Dawley sıçanlara % 1'lik karboksimetilselüloz içerisinde süspanse edilen ve ^{14}C işaretli albendazol tek doz halinde aynı dozda gavaj şeklinde uygulanmış ve uygulamadan 72 saat sonra idrarda radyoaktivitenin % 31'i tespit edilmiştir. Bu kısmın % 89'unun da sülfoksit, G metaboliti, 2-aminosülfon ve E metabolitlerinden oluştuğu saptanmıştır. Ayrıca düşük düzeylerde asıl ilaç, sülfon, D, F, H ve J metabolitleri tespit edilmiştir (64).

Souhaili-El Amri ve ark. (122) tarafından albendazol'un farmakokinetiğini incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada albendazol'un sulu süspanسیونunun dişi ve erkek Sprague Dawley sıçanlara tek doz halinde 10,6 mg/kg c.a. dozunda oral yolla verilmesini takiben hızla sülfoksit ve sülfon metabolitlerine metabolize olduğu ve 18 saat sonra bu metabolitlerin plazmada çok düşük seviyelere ulaştığı bildirilmiştir. Albendazol'un erkek sıçanlara 10 gün süreyle günde 10,6 mg/kg c.a. dozda verilimi sonucunda ise plazmada sülfoksit metabolitinin düşük düzeyde sülfon metabolitinin daha yüksek düzeylerde olduğu saptanmıştır. Albendazol'un karaciğerde ilaçları metabolize eden enzimleri indüklediği ve bu nedenle albendazol'un tekrarlı uygulamalarının karaciğerde sülfoksitin sülfona yıkımlanmasını arttırmasından enzimlerin sorumlu olabileceği görüşü ileri sürülmüştür.

2.2.3.2. Albendazol'un Çiftlik Hayvanlarındaki Farmakokinetiği

Ruminantlarda oral yolla verilen albendazol'un sindirim kanalından yaklaşık % 50'sinin emildiği bildirilmiştir. Koyunlarda yapılan çalışma sonucunda ^{14}C radyoaktif işaretli albendazol'un oral yolla verildikten sonra hızla emildiği ve aktif metabolit olan

ALBSO'in uygulamadan 2-3 saat sonra pik plazma konsantrasyonuna ulaştığı saptanmıştır (21, 27).

WHO ve Gıda Tarım Örgütünden (Food and Agriculture Organisation, FAO) oluşan Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi'nin (Joint of FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA) raporlarında yer alan albendazol'un sığırlardaki farmakokinetiğini incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada, sığırlara ^{14}C radyoaktif işaretli albendazol tek doz halinde oral yolla 20 mg/kg c.a. dozunda uygulanmış ve uygulamadan 1-12 gün süre sonra hayvanlar kesilmiştir. Bileşiğin 1. günde karaciğerde albendazol, sülfoksit ve sülfon metabolitleri şeklinde saptandığı bildirilmiştir. Albendazol'un 6. günden itibaren tespit edilemediği, sülfoksit ve sülfon metabolitlerinin ise 12. güne doğru 2-aminosülfon metabolitine dönüştüğü belirtilmiştir. Böbrek dokusuna yönelik incelemelerde de benzer metabolik profilin olduğu bildirilmiştir. Aynı raporda yer alan bir diğer çalışmada ise ^{14}C radyoaktif işaretli albendazol tek doz halinde oral yolla 20 mg/kg c.a. dozunda uygulanmış ve uygulamadan sonraki 7 günlük süreçte radyoaktivitenin % 47'si idrarda saptanmıştır. Bu radyoaktivitenin % 70'inin sülfoksit, sülfon ve 2-aminosülfon metabolitlerinden oluştuğu belirlenmiştir. Ayrıca düşük düzeylerde albendazol, B, D, E, G, H ve J metabolitleri saptanmıştır (64).

Albendazol'un koyunlardaki farmakokinetiğine ilişkin bir çalışmada, albendazol'un % 2,5'lik formülasyonu tek doz halinde oral yolla 10 mg/kg c.a. dozda uygulanmış; albendazol'un rumenden değişmemiş formda emildiği, organizmada hızla yıkımlandığı ve plazmada yüksek düzeyde sülfon metabolitlerine dönüştüğü saptanmıştır. Albendazol, albendazol sülfoksit ve sülfon metabolitlerinin uygulamadan sonra abomasumda tespit edilebilir düzeyde olduğu, uygulamadan 96 saat sonra rumende ve plazmada, 120 saat sonra ise abomasumda saptanamayacak kadar düşük düzeylere düştüğü bildirilmiştir (64).

Goudah (48) tarafından koyunlarda ALBSO metabolitinin farmakokinetiğini incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada, i.v. yolla ABZSO uygulanmasından 10 dakika ve 48 saat sonra plazmada başlıca ABZSO ve ALBSO₂ metabolitleri saptanmıştır. ABZSO (-) enantiomerinin yarılanma ömrünün ABZSO (+) enantiomere oranla daha kısa olduğu, plazmada (+) ABZSO/(-) ABZSO oranının başlangıçta aynı olduğu ve zamanla bu oranın arttığı gözlemlenmiştir.

Delatour ve ark. (23) tarafından sığır ve koyunlarda ALBSO metabolitinin enantiomerlerinin dağılımını saptamak amacıyla yapılan çalışmada; ALBSO'nin (+):(-) enantiomerlerinin oranı koyunlarda yüzde 91:9, sığırlarda ise 96:4 olarak saptanmıştır. Araştırmacılar her iki enantiomerin türe özgü spesifikliğinin muhtemelen flavin adenozin dinükleotid ve CYP P450 enzimatik sistemlerine dayalı olduğu sonucuna varmışlardır.

Sığırların koyunlara oranla oksidatif metabolik kapasitesinin daha yüksek olması sığırlarda daha fazla oranda okside albendazol sülfon metabolitlerinin oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir. Albendazol koyunlara terapötik dozda tek seferde verildiğinde plazmada sülfoksit metabolitinin sülfon metabolitine oranla daha fazla oranda bulunduğu bununla birlikte; yavaş salınımlı sistem şeklinde uygulandığında ise sülfon metabolitinin daha yüksek düzeyde olduğu görülmüş; sığırlarda ise tam tersi şeklinde tek seferde uygulandığında sülfon metabolitinin, yavaş salınımlı sistem şeklinde uygulandığında ise sülfoksit metabolitinin daha yüksek düzeyde olduğu saptandığı belirtilmiştir. Albendazol'un türler arasındaki farmakokinetiğinin farklı olması ve özellikle antelmentik etkiden sorumlu sülfoksit metabolitinin sığır ve koyunlar arasında farklılık göstermesi albendazol'un sığırlarda koyunlara oranla daha yüksek dozda kullanımına açıklama getirdiği görüşü belirtilmiştir (88).

Gyurik ve ark. (51) tarafından sığır ve koyunlarda albendazol'un farmakokinetiğine ilişkin farklılığı incelemek amacıyla yapılan çalışmada, ¹⁴C işaretli albendazol sığırlara 20 mg/kg ve koyunlara 10 mg/kg dozlarda oral yolla uygulanmış ve 72 saat süreyle idrarları toplanarak metabolitleri incelenmiştir. Uygulanan dozun sığırlarda ve koyunlarda sırasıyla % 59,1 ve 54,3'ünün ilk 72 saat içerisinde idrarla atıldığı saptanmıştır. Sığır ve koyunların idrarlarında fare ve ratlarınkinden farklı olarak methyl [6-hydroxy-5-(propylsulfonyl)-1H-benzimidazol-2-yl] karbamat ve 1-Methyl-6-(propylsulfonyl)-1H-benzimidazol-2-amin metaboliti saptanmıştır.

2.2.3.3. Albendazol'un İnsanlardaki Farmakokinetiği

Albendazol'un insanlardaki metabolizmasını incelemeye yönelik yapılan çalışmalarda, albendazol'un hayvanlardaki metabolizması ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Oral yolla emiliminin yaklaşık %1 dolayında olduğu, albendazol'un yağlı maddelerle birlikte alındığında emiliminin ortalama 4,5 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (47, 78, 137). Gottschall ve ark.'larının (47) belirttiği üzere, sağlıklı ve kist hidatidli hastalara uygulanan albendazol'un plazma, idrar, safra ve kist sıvısındaki

başlıca metabolitinin ALBSO olduğu; karaciğerde hızla ilk geçiş etkisine uğradıktan sonra CYP P450 1A1 ve 3A4 enzimleri tarafından ALBSO'e metabolize edildiği ve plazmada ALBSO (+) enantiomer metabolitinin (-) enantiomer metabolitine göre daha yüksek oranda bulunduğu [(+)-80/(-)-20] bildirilmiştir.

Dünya Sağlık Örgütü raporlarında sağlıklı bireylerde albendazol'un 400 mg'lık tek dozunun oral yolla uygulanması sonucu plazmada 2,4 saat sonra sülfoksit metabolitinin kanda pik konsantrasyona ulaştığı ve yarılanma ömrünün uzun (8-12 saat) olduğu; uygulamadan sonraki 24 saat içinde toplanan idrarda sülfoksit, sülfon metabolitleri ile bunların amino türevlerinin, B, E ve G metabolitlerinin bulunduğu bildirilmiştir (64, 137).

2.2.4. Albendazol'un Veteriner Hekimlikte Kullanım Alanları

Albendazol, çiftlik ve pet hayvanlarında geniş etki spektrumu, güçlü etkisi ve güvenilir nitelikte olması nedeniyle sestod, nematod ve trematodların neden olduğu sindirim kanalı paraziter enfestasyonlarının tedavisinde yaygın biçimde kullanılır (14, 27, 79, 88). Özellikle ruminantlarda *Ostertagia ostertagi*, *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp., *Nematodius* spp., *Cooperia* spp., *Bunostomum phlebotomum*, *Fasciola hepatica* (erişkin) ve *Moniezia* spp. endoparazitlerine karşı etkilidir (108). Genellikle sindirim kanalı enfestasyonlarına karşı 5-7,5 mg/kg c.a. dozda ve Fasiolazis enfestasyonunda ise 7,5-10 mg/kg c.a. dozda oral yolla kullanılır (14, 27, 88).

Albendazol'un sestodlara etkinliği:

Sığır-koyun: Albendazol koyunlarda *Moniezia* spp.'ye karşı 10 mg/kg dozda ve sığırlarda *Taenia saginata*'ya karşı 45-50 mg/kg dozda yüksek etkinlik göstermektedir. Yapılan araştırmalarda doğal yolla *M. expansa* ve *M. benedeni* ile enfekte olan koyunlarda albendazol'un 10-20 mg/kg dozda uygulanması sonucu parazitlerin % 100'ünün elimine edildiği bildirilmiştir (121).

Köpek: Köpeklerde seyrek olarak karşılaşılan *Mesocostoides corti* sestodlarına karşı etkinlikleri yüksektir; 12 saat arayla ve 2 gün süreyle 50 mg/kg veya tek seferde 100 mg/kg dozda kullanılır (66, 121).

Albendazol'un nematodlara etkinliği:

Sığır: *Bunostomum phlebotomum*'a karşı 2,5-5 mg/kg dozda uygulanması sonucu parazitlerin % 98-99'unun elimine edildiği bildirilmiştir. Sığır ve koyunlara 3,8-7,5

mg/kg dozda uygulandığında ise akciğer kurtları *Dictylocaulus viviparus* ve *D. filaria*'ya karşı % 96-100 etkin olduğu bildirilmiştir (121).

Köpek: *Ancylostoma caninum*'a karşı 3 gün süreyle 50 mg/kg'lık dozunun yüksek etkinlik gösterdiği saptanmıştır. Oral yolla uygulanan 15 mg/kg'lık dozunun ise *Toxocara canis*'in % 70'ini elimine ettiği bildirilmiştir (121). Ayrıca akciğer kurdu *Filaroides hirthe*'ye karşı 25-50 mg/kg dozda etkin olduğu saptanmıştır (108, 121).

Albendazol'ün trematodlara etkinliği: Benzimidazol antelmentikler, trematodlara karşı nematodlara ve sestodlara oranla daha zayıf etkinlik gösterirler. Buna karşın albendazol'ün farklı trematod türlerine karşı öldürücü etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (121).

Sığır-Koyun: Albendazol'ün koyun, kuzu ve sığırlara 5,7-45 mg/kg canlı ağırlık doz aralığında uygulandığında erişkin *Fasciola hepatica*'ya karşı % 92-100 oranında etkin olduğu belirlenmiştir. Koyunlarda 10 mg/kg dozda olgun *F.hepatica*'lara karşı % 99 olgun olmayanlara ise sadece % 25 dolayında oranında etkili olduğu; olgun olmayanlara karşı % 75 düzeyinde etkinlik oluşturmak içinse 50 mg/kg dozda verilmesi gerektiği bildirilmiştir (66).

Kedi-Köpek: *Paragonimus kellicotti* ile enfekte kedi ve köpeklere 2-3 hafta süreyle 50-100 mg/kg dozunda oral yolla uygulanması sonucu dışkı ile parazit yumurtası atılımının durduğu bildirilmiştir (108, 121).

2.2.5. Albendazol'ün Gıdalardaki Kalıntısı

Albendazol ve 2-amino-benzimidazol sülfon şeklinde ölçülen metabolitlerinin Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından gıdalarda bulunmasına izin verilen maksimum kalıntı düzeyi Tablo 2.1.'de gösterilmiştir (27).

Tablo 2-1 Albendazol'ün gıdalarda bulunmasına izin verilen maksimum kalıntı düzeyi

Etken Madde	Rezidü	Hayvan Türü	Maksimum Kalıntı Düzeyi	Hedef Doku
Albendazol	Albendazol ve 2-amino-benzimidazol sülfon şeklinde ölçülen metabolitleri	Sığır, Koyun	100 µg/kg 500 µg/kg 1000 µg/kg	Kas, yağ, süt Böbrek Karaciğer

Albendazol'ün oral yolla uygulanmasının takiben rezidülerin en uzun süre ve en fazla miktarda karaciğerde bulunduğu, sığırlarda ve koyunlarda uygulamadan 24 saat sonra ekstrakte edilebilir rezidülerin kaslarda % 80-100'ünün albendazol sülfoksit, albendazol sülfon ve 2-amino-sülfon metabolitlerinden oluştuğu bildirilmiştir (27).

EMEA raporunda albendazol'ün sığırlarda oral yolla uygulanması sonucu gıdalardaki kalıntı miktarını saptamak amacıyla yapıldığı belirtilen bir çalışmada, ¹⁴C işaretli albendazol'ün 15 mg/kg c.a. dozda uygulanmasını takiben toplam rezidülerin 4 gün sonra karaciğerde 6 mg/kg'a, 20 gün sonra 1,2 mg/kg'a düştüğü bildirilmiştir. Karaciğerden sonra en fazla oranda kalıntı içeren dokunun böbrek olduğu, kas dokuda ve yağda daha düşük düzeylerde bulunduğu belirlenmiştir. Oral yolla uygulanan albendazol'ün (15 mg/kg c.a.) 1. günde kas dokuda 5 mg/kg'a, 4. günde 64 µg/kg'a, 20. günde 20 µg/kg'a düştüğü bildirilmiştir. Sütteki toplam rezidü düzeyine ilişkin incelemede sütteki toplam rezidü düzeyinin 11 saat sonra 5000 µg/kg, 35 saat sonra 640 µg/kg ve 72 saat sonra 35 µg/kg düzeyinde olduğu saptanmıştır. Koyunlara yönelik aynı dozda yapılan uygulamalarda ise tespit edilen rezidü düzeyinin sığırlarinkine benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (27).

2.2.6. Albendazol'ün Toksisitesi

2.2.6.1. Albendazol'ün Akut Toksisitesi

EMEA raporlarında, albendazol'ün insanlarda laboratuvar veya çiftlik hayvanlarına oranla sindirim kanalından emiliminin az (~ % 1) olması nedeniyle toksisitesinin de düşük olabileceği bildirilmiştir (27).

Oral yolla verilen albendazol'ün fare, sıçan, hamster, kobay ve tavşanda akut toksisitesinin düşük olduğu bildirilmiştir. Albendazol'ün laboratuvar hayvanlarındaki akut toksisitesine ilişkin değerler Tablo 2.2'de verilmiştir (64). Albendazol'ün farelerde, sıçanlarda ve köpeklerde yapılan tekrarlı oral doz çalışmaları sonucu başlıca toksik etkisinin hepatotoksisite ve testiküler toksisite olduğu saptanmıştır. Sıçanlara çiftleşme, gebelik ve doğum sonrası periyodu kapsayan 60 gün ve doğan yavrulara 24 ay süresince oral yolla günde 7 mg/kg c.a. dozunda albendazol uygulanması sonucu EMEA tarafından gözlemlenebilir etkinin oluşmadığı düzey (NOEL) 7 mg/kg/c.a./gün olarak belirlenmiştir (27).

JECFA raporlarında gösterilen albendazol'ün kısa süreli toksisitesini saptamaya yönelik laboratuvar hayvanlarında yapılan iki farklı çalışmada, albendazol'ün 400 mg/kg c.a./gün'lük dozunun farelerde yem tüketiminde azalmaya, 800 mg/kg ve daha yüksek dozlarının ise hayvanların kan parametrelerinde düşüşe neden olduğu bildirilmiştir. Otopsi incelemelerinde 40 mg/kg c.a./gün ve daha üzeri dozlarının farelerin karaciğer ağırlıklarında artış meydana getirdiği bildirilmiştir. Diğer çalışmada ise albendazol'ün 48 mg/kg c.a./gün'lük dozunun sıçanlarda kilo alımında azalmaya ve kan parametrelerinde düşüşe, 168 mg/kg c.a./gün'lük dozunun ise kilo kaybına neden olduğu bildirilmiştir. Otopsi incelemelerinde adrenal bezde büyüme, testislerde yumuşama ve küçülme saptanmıştır. Aynı raporlarda yer alan albendazol'ün köpeklerdeki akut toksisitesini belirlemeye yönelik yapılan bir araştırmada, albendazol'ün 48 ve 168 mg/kg c.a./gün'lük dozlarının bazı hayvanlarda diyare, kusma, ritm bozukluğu ve ölüme neden olduğu saptanmıştır. 16 mg/kg c.a./gün ve daha üzeri dozlarının hayvanlarda kilo alımında azalmaya ve 48 mg/kg c.a./gün ve daha üzerindeki dozlarının ise hayvanların yem tüketiminde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Albendazol'ün 48 mg/kg c.a. ve 168 mg/kg c.a. dozlarının ise lökosit sayısında düşüşe ve testislerde küçülmeye yol açtığı saptanmıştır (64).

Tablo 2-2 Albendazol'ün Akut Toksisitesi

Tür	Cinsiyet	Taşıt Madde	LD ₅₀ (mg/kg canlı ağırlık)
Fare	Erkek	% 0,75 methocel	3000 üzerinde
Rat	Dişi ve erkek	% 2 tragacanth	1320
Rat	Dişi ve erkek	% 1 methocel	2400
Hamster	Dişi ve erkek	% 2 tragacanth	10000 üzerinde
Kobay	Dişi ve erkek	% 2 tragacanth	900
Tavşan	Dişi ve erkek	% 2 tragacanth	500-1250

2.2.6.2. Albendazol'ün Kronik Toksisitesi ve Karsinojenisitesi

WHO ve JECFA raporlarında belirtilen albendazol'ün kronik toksisitesini saptamaya yönelik 25 ay süreyle yapılan bir çalışmada, albendazol'ün 400 mg/kg'lık dozunun farelerde eritrosit ve lökosit değerlerinde düşüşe, trombosit değerlerinde artışa

ve katarakt oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir. 100 ve 400 mg/kg'lık dozlarının karaciğerde küçülmeye neden olduğu saptanmıştır. Tümör oluşumu incelendiğinde ise endometriyal poliplerin insidensinde artış saptandığı bildirilmiştir (64, 137).

JECFA raporlarında yer alan diğer bir çalışmada Sprague Dawley CD sıçanlar çiftleşme, gebelik ve doğum sonrası dönemlerini kapsayan 60 gün süreyle 0, 1, 2, 5, ve 5 mg/kg c.a./gün dozunda ve doğan yavrular 28 ay süreyle 0, 3, 5, 7 ve 20 mg/kg c.a./gün dozunda albendazol içeren yemlerle beslenmiştir. Gebe hayvanlarda uygulamaya bağlı herhangi bir etki gözlemlenmediği, doğan yavrulardan 20 mg/kg dozda albendazol uygulanan erkek sıçanlarda 24 ay sonra ölüm oranında artış meydana geldiği, hematolojik değerlerden lökosit ve nötrofil sayılarında düşüş ve dişi farelerde serum kolesterol düzeylerinde artış meydana geldiği bildirilmiştir. Histopatolojik incelemede 20 mg/kg albendazol verilen gruptaki sıçanlarda farelerdekine benzer şekilde testislerde yumuşama, karaciğerde atrofi ve yağlanma gözlemlendiği, tümör oluşumu yönünden incelendiğinde kontrol gruplarına göre endometriyal/servikal tümör ve deride histokistik sarkoma insidenslerinde artış saptandığı, istatistiksel açıdan değerlendirilmesi sonucunda meydana gelen bu artışın önemli bulunmadığı ifade edilmiştir (64).

2.2.6.3. Albendazol'un Teratojenik Etkisi

EMEA raporlarına ve fare, sıçan, tavşan ve koyunlarda yapılan çalışmalara göre albendazol'un teratojenik etkili olduğu bildirilmiştir (27, 88, 138). Plazmadaki albendazol sülfoksit konsantrasyonu ile teratojenez arasındaki ilişki Tablo 2.3.'te gösterilmiştir (64).

Capece ve ark. (15, 16) tarafından sıçanlarda ve koyunlarda yapılan çalışmalar sonucunda albendazol ve metabolitlerinin plasentayı geçip fötusa ulaşarak doğan yavrularda malformasyonlara neden olduğu bildirilmiştir.

Tıbbi ürünlerin veteriner hekimlikte kullanımı komitesi (CVMP) 1992 yılında sıçanlarda veya tavşanlarda teratojenik etkinin oluşmadığı düzeyi 5 mg/kg c.a./gün gebelikte albendazol için kabul edilebilir günlük alım değerini (ADI) 0,005 mg/kg c.a. olarak belirlemiştir (27).

JECFA raporunda belirtilen albendazol'un teratojenik etkisini araştırmaya yönelik yapılan bir çalışmada, Charles River CD-1 farelere albendazol 0, 2, 5, 10 ve 30

mg/kg c.a./gün dozunda gebeliğin 6-15 günlerinde uygulanmış ve fareler gebeliğin 18. gününde öldürülmüştür. Yapılan otopside belirgin bir maternal toksisite bulgusuna rastlanmadığı veya fetal ağırlık, iskelet ve fetus gelişimi üzerine herhangi bir etkisinin görülmediği bildirilmiştir (64).

Teruel ve ark. (125) tarafından yapılan bir araştırmada, sıçanlara gebeliğin 6-15 günlerinde 10 mg/kg'a c.a./gün kadar olan dozlarda albendazol verilmesinin sıçanların gelişiminde herhangi bir etkiye neden olmadığı buna karşın 20-30 mg/kg c.a./gün dozlarının fetal ölümlere, kemikleşme bozukluklarına, iskelet anomalilerine ve malformasyonlara neden olduğu bildirilmiştir.

Albendazol'un tavşanlardaki teratojenik etkisini araştırmaya yönelik JECFA raporunda bildirilen bir çalışmada, albendazol'un 10 mg/kg c.a./gün dozunun maternal mortalitede artışa ve implantasyon sayısında azalmaya, 10 ve 30 mg/kg c.a./gün dozlarının ise fetus büyüklüğünde ve ağırlığında düşüşe neden olduğu belirtilmiştir. Aynı raporda albendazol'un 20 mg/kg c.a. dozunun koyunlarda prematüre doğumlara neden olduğu bildirilmiştir (64). Woodward (138) tarafından bildirilen, ineklerde yapılan bir araştırmada ise albendazol oral yolla 30 mg/kg c.a. dozunda gebeliğin 5-33, 35. ve 39. haftalarında uygulanmış ve albendazol'un koyunlardakinin aksine gebe hayvanlarda ve doğan yavrularda herhangi bir olumsuz etkiye neden olmadığı saptanmıştır.

Tablo 2-3 Plazmadaki albendazol sülfoksit konsantrasyonu ile teratojenez arasındaki ilişki

Tür	Albendazol Dozu (mg/kg c.a.)	Pik plazma albendazol konsantrasyonu (mg/ml)	Teratojenik
Koyun	10	2,50	Evet
Sığır	10	0,57	Hayır (ama embriyotoksik)
Tavşan	30	8,82	Evet
Sıçan	10	6,6	Evet
Fare	30	bilinmiyor	Hayır
İnsan	400 mg/kişi	0,16	Hayır

2.2.6.4. Albendazol'un Reprodüktif Etkileri

EMA raporlarında gebelik sırasında albendazol uygulanan sıçanların doğum sonrası laktasyon periyodundaki yavrularının yaşama ve büyüme oranlarında düşüş meydana geldiği bildirilmiş ve gebelikte etkisiz düzey 5,8 mg/kg c.a./gün olarak belirtilmiştir (27).

JECFA raporlarında belirtilen albendazol'un reprodüktif etkilerini belirlemek amacıyla yapılan bir araştırmada Long Evans sıçanlara (12 erkek ve 20 dişi) 0, 30, 75 ve 150 mg/kg/yem dozda albendazol yem içerisinde 3 jenerasyon boyunca çiftleşmeden 64 gün önce verilmiş ve vücut ağırlığı, yem tüketimi, çiftleşme, fertilité, gebelik oranı, gebelik süresi, yavru büyüklüğü ve ağırlığı üzerine herhangi bir etkisi saptanamamıştır. Laktasyon süresince sadece 150 mg/kg doz grubundaki F₁ ve F₂ yavruların yaşama oranında ve kilo alımında hafif dereceli bir azalma olduğu görülmüştür. Aynı raporda belirtilen benzer bir çalışmada her bir grupta 20 adet Sprague Dawley bulunan erkek sıçana, uygulama yapılmamış dişi sıçanlarla çiftleşmeden 60 gün önce 0, 1, 10 ve 30 mg/kg c.a./gün dozunda albendazol oral yolla uygulanmış ve 30 mg/kg grubunda 4 sıçanda ölüm, kilo alımında azalma, kanlı burun akıntısı, testislerde küçülme ve hipoplazi görülmesine rağmen fertilité yeteneğinin etkilenmediği bildirilmiştir (64).

2.2.7. Benzimidazol Türevlerinin ve Albendazol'un Genotoksitesisi

Benzimidazollerin ilk başlarda yaygın bir şekilde sistemik fungusit olarak kullanılmaları ve nükleik asit metabolizmasında biyolojik etkilere sahip olmaları bu bileşiklerin mutajenik özelliklerini araştırmayı gerekli kılmıştır (117).

Benomyl'in etkin türevi olan benzimidazol-2-karbamik asit metil esterinin (BCM) fungitoksitesinin DNA sentezi ile etkileşime girmesine bağlı olarak olduğu bildirilmiştir. Bu noktadan hareketle Seiler (117) tarafından yapılan araştırmada benzimidazol ve birçok türevinin bakteriyel genotoksitesite testlerinden Ames testinde *Salmonella typhimurium*'un his G 46 ve TA 1530 suşlarında mutasyona neden olduğu saptanmıştır. Yapılan analizlerde mutajenik etki şeklinin baz eklenmesi, baz çıkması veya parça değişimi şeklinde olmadığı; DNA molekülünde meydana gelen baz değişimi şeklinde olduğu saptanmıştır. Bu durum, benzimidazollerin bakterilerdeki etki mekanizmasına bağlı olarak; benzimidazollerin bakterilerin nükleik asitleri ile birleşmesinin baz değişimine ve mutasyonlara neden olduğu şeklinde açıklanmıştır. Seiler (118) tarafından *in vivo* genotoksitesite testlerinden *in vivo* mikronükleus testinde

farklı bir benzimidazol türevi olan metil 2-benzimidazolkarbamat (MBC) kullanılarak yapılan bir çalışmada MBC'in kontrol grubuna göre fare kemik iliği hücrelerinde mikronükleus sayısında önemli bir artış meydana getirdiği bildirilmiştir. MBC'in iğ zehiri gibi etki göstermesinin nedeni olarak yapısında bulunan karbamat grubunun mikrotübüler proteinlerle etkileşime girmesi gösterilmiştir. Bu etkileşimin mikrofibriller iğ iplikçikleri oluşumunu bozarak mitotik gecikme, kromozomlarda ayrılmama ve diğer mitotik bozukluklara neden olduğu bildirilmiştir.

Barale ve ark. (10) benzimidazol türevlerinden MBC'in kemik iliği hücrelerindeki etkisinin düşük düzeyde olmasına rağmen mikronüklei oluşumunu ve hiperdiploidi ve poliploidiyi indüklediğini; metil tiofanatın'da benomyl ve MBC'tan daha düşük düzeyde etki oluşturduğunu bildirmiştir. Araştırmacılar fare kemik iliğinde mikronükleus ölçümünün anöjenik etkilerin yani kromozomlarda meydana gelen sayısal bozuklukların önemli bir göstergesi olduğu sonucuna varmışlardır.

Seiler (119) tarafından benzimidazol türevlerinin fare ve Chinese hamsterların kemik iliğindeki sitogenetik etkilerini incelemek amacıyla yapılan *in vivo* mikronükleus testi sonucunda MBC'in farelerde mutajenik etki gösterdiği bildirilmiştir. Oluşan mutajenik etkiyi karakterize etmek amacıyla Chinese hamster kemik iliği hücreleri kullanılarak yapılan kromozom analizleri sonucunda da kromozomlarda mitotik şekil bozukluklarının saptandığı belirtilmiştir. MBC'in iğ iplikçiği oluşumu veya iğ iplikçiği fonksiyonları ile etkileşip, mitotik işlemleri inhibe ederek mikronüklei oluşumuna neden olduğu ileri sürülmüştür.

Ahmed ve Othman (2) tarafından insanlarda ve çiftlik hayvanlarında fasiolazisin tedavisinde kullanılan benzimidazol türevi triklabendazol'un lenfosit hücre kültürlerindeki klastojenik etkisini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, kültürlerle 25, 50 ve 100µg/ml triklabendazol ilave edilmiş ve kromozom aberasyon, kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus gibi sitogenetik parametreler incelenmiştir. Tüm uygulama grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında uygulama gruplarında her 3 parametrede kontrol grubuna göre doza bağımlı bir şekilde artışın meydana geldiği saptanmıştır.

JECFA raporunda bir benzimidazol türevi olan albendazol'un bakteriyel *in vitro* genotoksisite testlerinde; *S. typhimurium*'un TA1535, TA1537, TA1538, TA98, TA100 suşları kullanılarak ve 1-10000 µg albendazol/plaka konsantrasyonunda uygulanan

Ames testinde ve aynı bakterinin TA97a, TA98, TA100, TA102 suşları kullanılarak ve 0,5-1000 µg ALB/plaka konsantrasyonunda uygulanan sıçan karaciğer S-9 metabolik aktivasyonlu ve aktivasyonsuz Ames testinde negatif sonuç verdiği bildirilmiştir. Aynı raporda *in vitro* hücre kültürü genotoksisite testlerinden Chinese hamster ovaryum (CHO) hücreleri kullanılarak yapılan kromozom aberasyon testinde 0.047-1.5µg/ml konsantrasyonunda uygulanan ve BALB/3T3 fare hücreleri kullanılarak yapılan transformasyon testinde 10-100 µg/ml konsantrasyonunda uygulanan albendazol'ün negatif sonuç verdiği bildirilmiştir (64).

Albendazol'ün genotoksisitesinin genel olarak değerlendirildiği EMEA raporlarında albendazol'ün *S. typhimurium*'un TA1530, TA1532, TA1534, TA1537, TA98, TA100, LT2 his ve G46 suşları kullanılarak yapılan bakteriyel mutasyon testlerinde negatif, CHO hücrelerinde yapılan *in vitro* kromozom aberasyon testinde negatif yani metafaz analizinde klastojenite oluşturmadığı ve BALB/3T3 fare hücrelerinde *in vitro* hücre transformasyon testinde negatif sonuç verdiği belirtilirken; formüle edilmiş bir üründe yapılan *in vivo* fare kemik iliği mikronükleus testinde albendazol'ün pozitif sonuç verdiği ve bu sonucun albendazol'ün *in vivo* somatik hücre mutajeni olduğuna işaret ettiği bildirilmiştir. EMEA tarafından albendazol'ün mutajenite testlerinin sonuçlarının *in vivo* anöjenler yani kromozomlarda sayısal bozukluğa yol açan ajanlar ile benzerlik gösterdiği belirtilmiştir (27).

Yapılan araştırmalarda benzimidazol türevi antiparazitik ilaçların mitotik iğ iplikçiği zehiri olarak etki göstermesinin bu ilaca maruz kalan insanlarda anöploidi indüksiyonu açısından potansiyel risk teşkil ettiği bildirilmiştir. Albendazol tarafından tubulin polimerizasyonunun inhibisyonu sonucu mikrotubul oluşumunun bozulmasının anöploid hücrelerin oluşumunda rol oynayan mekanizma olan kromozomlarda ayrılmama (non-disjunction) gibi kromozomal bozukluklarda artışa neden olduğu bildirilmiştir. Ramírez ve ark. (113) tarafından albendazol ve aktif metaboliti ALBSO'in insan lenfosit hücre kültürlerinde kromozomlarda ayrılmamaya neden olup olmadığını saptamak amacıyla yapılan bir çalışmada, tedavi uygulanmış hastaların serumlarındaki albendazol konsantrasyonuyla aynı konsantrasyonda hücre kültürlerine albendazol ve ALBSO ilave edilmiş ve sonuçta her iki bileşiğin kromozomlarda ayrılmamaya neden olduğu saptanmıştır. Ramírez ve ark. (112) tarafından yapılan bir diğer araştırmada kromozomlarda hasara neden olan ajanların erken biyolojik etkilerinin

belirlenmesinde en yaygın olarak kullanılan sitogenetik parametreler arasında yer alan mikronuklei insidensini saptamak amacıyla insan lenfosit hücre kültüründe *in vitro* mikronukleus testi uygulanmıştır. Çalışmada kültür ortamına 1 µM ve daha yüksek konsantrasyonlarda albendazol ilave edildiğinde mikronuklei insidensinin önemli derecede arttığı buna karşın ALBSO'nin sadece 10-100 µM gibi en yüksek konsantrasyonlarda mikronuklei oluşumuna neden olduğu ALBSO₂'un ise mikronuklei insidensinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı saptanmıştır. Çalışma sonucunda albendazolün genotoksik etkisinden albendazol ve albendazol sülfoksit metabolitinin sorumlu olduğu görüşüne varmışlardır.

Altıntaş ve ark. (4) tarafından albendazol'ün potansiyel bir mutajen olup olmadığının aydınlatılması amacıyla yapılan bir araştırmada, karaciğer kist hidatiği tanısı konmuş 13 kadın ve 8 erkek olmak üzere toplam 21 hastaya *in vitro* genotoksisite testlerinden kardeş kromatid değişim (SCE) testi uygulanmıştır. Hastalara operasyon öncesi ve sonrası kemoterapi amaçlı albendazol verilmiş, ameliyat öncesi ve sonrasında periferik kan örnekleri alınarak kültür ortamında albendazol uygulanan hastaların kromozomlarında genotoksisite parametrelerinden SCE frekansı araştırılmıştır. Hücre DNA'sı genotoksik ajanlar tarafından zarar gördüğünde SCE frekansının arttığı bildirilmiştir. Buna bağlı olarak albendazol uygulanan karaciğer kist hidatidli 21 hastanın albendazol uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda SCE frekansında artış meydana geldiği saptanmış ($p < 0.05$) ve araştırmacılar albendazol'ün muhtemel bir mutajen olabileceğini bildirmişlerdir.

Oztas ve ark. (105) tarafından insan lenfositlerinde albendazol'ün *in vivo* genotoksik etkisini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada; yaşları 6-13 arasında değişen karaciğer kist hidatidli çocuk hastalarda albendazol ile tedavi öncesi ve tedavi sonrası kardeş kromatid değişimi ve mikronukleus frekansı ölçülmüş ve tüm hastalarda albendazol ile tedavi sonrasında tedavi öncesine göre SCE ve mikronukleus frekansında önemli bir artış ($p < 0.001$) meydana geldiği saptanmıştır. Araştırmacılar elde edilen sonuçlara göre albendazol'ün insan lenfositlerinde *in vivo* genotoksik olabileceği fikrini ileri sürmüşlerdir.

Pourgholami ve ark. (110) tarafından yapılan bir çalışmada; albendazol insan, sıçan ve fare hepatoselüler karsinoma (HCC) hücre kültürlerinde ve *in vivo* olarak deneysel HCC oluşturulmuş farelerde test edilmiş ve albendazol'ün kanser hücrelerinin

büyümesini *in vitro* ve *in vivo* olarak baskıladığı bildirilmiştir. Albendazol'un 100 nM ve 1000 nM konsantrasyonlarının tüm tümör hücre serilerinde hücre proliferasyonunu % 80'den fazla oranda inhibe ettiği gözlemlenmiş ve hücre siklusu analiz edildiğinde doza bağlı olarak albendazol'un SKHEP-1 kanser hücrelerini 250 nM konsantrasyonda hücre siklusunun G0-G1 fazlarında ve 1000 nM konsantrasyonda G2-M fazlarında durdurduğu saptanmıştır. Derialtı yolla SKHEP-1 kanser hücresi inokule edilen farelerde 20 gün süreyle oral yolla 300 mg/kg/gün dozda albendazol uygulanması sonucu tümör büyümesinin baskılandığı saptanmıştır. Tümörlerin immunohistokimyasal analiz sonucu albendazol uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında albendazol uygulanan gruptaki tümörlerin büyüme fraksiyonunun kontrol grubuna göre daha düşük olduğu görülmüştür. Aynı araştırmacılar (109) tarafından yapılan benzer bir araştırmada albendazol'un *in vitro* ve *in vivo* insan kolon-rektum kanser hücre serisi HT-29'a karşı antitümör etki gösterdiği ve albendazol'un fizikokimyasal ve farmakokinetik özelliklerinin albendazol'e peritoneal karsinomatozisin bölgesel tedavisinde kullanılabilme özelliği kazandırdığı bildirilmiştir. Albendazol'un antitümör etki mekanizmasına ilişkin yapılan çalışmalar, albendazol'un HT-29 kanser hücrelerinin hücre siklusunu G2/M fazında durdurduğunu göstermiştir. Ayıca 6 hafta süresince 150 mg/kg dozda karıniçi yolla uygulanan albendazol'un kolon-rektum kaynaklı karın tümörlerinin büyümesini baskıladığı saptanmıştır.

Albendazol'un biyotransformasyonu sonucu oluşan ve antelmentik etkiden sorumlu metabolitine ilişkin EMEA raporlarında ALBSO'in *in vivo* fare kemik iliği testinde pozitif sonuç verdiği belirtilmiştir. Maya testinde ise ALBSO'in anöjenik etki gücüne sahip olduğu gösterilmiş ve bu durumun ALBSO'in tubulinlere *in vitro* bağlanma yeteneğine sahip olduğu ispatlanarak doğrulandığı ifade edilmiştir. Albendazol'un CHO hücrelerinin *in vitro* metafaz analizinde negatif sonuç verdiği göz önüne alındığında ALBSO'inde klastojenik güce sahip olmadığının varsayılabilceği bildirilmiştir. Bununla birlikte EMEA raporlarında ALBSO'in mutajenitesi üzerine yapılan testlerin sonuçlarına dayanarak ALBSO'in *in vivo* somatik hücrelerde anöjenik etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (26).

Sonuç olarak; albendazole ilişkin raporlardan ve yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre albendazol'un etki mekanizmasına bağlı olarak *in vivo* somatik hücre mutajeni olabileceği fikri ileri sürülebilir.

2.3. Askorbik Asit

2.3.1. Askorbik Asit İdentifikasyonu, Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Askorbik asit (C vitamini) 1928 yılında Albert Szent-Gyorgyi tarafından keşfedilmiştir (120). 3-keto-L-glukofuranolaktonun enolik formudur (94), α ve β karbon atomları arasında çift bağ ve asit iyonize edici grup içerir (120). Kimyasal yapısı L-threo-2,3,4,5,6-pentahydroxy-1-hexenoic acid-4-lactone, kimyasal formülü $C_6H_8O_6$ ve moleküler ağırlığı 176,13 g/mol'dür (63). Suda iyi çözünen beyaz kristalize toz halinde bulunur (52). 190-192 °C'de yıkımlanır. Sudaki çözünürlüğü 20 °C'de 33 g/100 ml'dir. Sudaki pH değeri 2,4-2,8'dir. Aerobik koşullarda 5 gün sonra % 97'si 15 gün sonra % 100'ü yıkımlanmaktadır (63).

2.3.2. Askorbik Asit'in Organizmadaki Metabolizması ve Biyolojik Fonksiyonları

Askorbik asit pKa değerleri 4.25 ve 11.8 olan iyonize olabilen 2 gruba sahiptir. Bu nedenle mide sıvısı hariç tüm vücut kompartmanlarında en yaygın bulunan formu olan mono-anyon askorbat şeklinde bulunmaktadır. Askorbat biyosentezinin son reaksiyonunu katalize eden glukanolakton oksidaz enziminin insan ve diğer primatlarla kobaylarda bulunmaması nedeniyle bu türlerin vücutlarında sentezlenememektedir (52). Kobay ve rat gibi, organizmalarında askorbik asit sentezleyemeyen türlerde askorbik asidin karboksi grubunun önemli bir kısmı karbondioksite dönüşmektedir. Askorbik asidin katabolizması sonucu oluşan başlıca ürün olan karbondioksit akciğerler aracılığı ile atılmaktadır. Dışkı ve idrar ile atılımı düşük düzeydedir. Verilen dozun % 2-3'lük kısmı değişmemiş formda askorbik asit, dehidroaskorbik asit ve 2,3-diketogulonic asit şeklinde, çok düşük bir kısmı da 2-O-metil askorbat, L-askorbik asit 2-sülfat ve sakkaro-askorbik şeklinde atılmaktadır (63).

Askorbik asit bir çok elektron transportunda güçlü bir indirgeyici ajan olarak rol oynamaktadır. Organizmada normal fizyolojik koşullar altında askorbik asit iyonize formu olan askorbat anyonu şeklinde bulunur (94). Elektronunun 1.'sini kaybetmesiyle semihidroaskorbat (veya askorbil) radikali, 2.'sini kaybetmesiyle stabil olmayan dehidroaskorbat molekülü oluşur. Askorbil radikali ve dehidroaskorbat nikotinamid adenin dinükleotit hidrojen (NADH) veya glutatyonu (GSH) indirgeyici kaynak olarak kullanarak askorbata geri dönüşebilirler. Askorbil radikali reaktif değildir, bu zayıf reaktivite askorbatın antioksidan etkisinin temelini oluşturmaktadır. Alkoks (RO, RO₂),

hidroksil (OH) ve azot dioksit (NO₂) gibi yüksek reaktif serbest radikaller askorbat tarafından indirgenip zayıf reaktif yapıda olan yeni askorbil radikali oluşmaktadır (52).

Askorbat antioksidan etkisinin yanısıra farklı metabolik yollarda görevli olan birçok enzim için de kofaktör olarak rol oynamaktadır. Askorbat, mide sıvısında çözünmeyen demirin (Fe⁺³) ince bağırsaklardan daha kolay şekilde emilen demire (Fe⁺²) indirgenmesinde görev almaktadır (52).

2.3.3. Askorbik Asit'in Genotoksitesi

Son yıllarda askorbik asit üzerine yapılan birçok genetik araştırma sonucu, askorbik asidin biyokimyasal ve genetik özelliklerine ilişkin bilinmeyen birçok yönü keşfedilmiştir (94). *In vitro* ve *in vivo* genotoksite testleriyle yapılan çalışmalar sonucu askorbik asidin farklı ökaryotik dokularda antimutajenik etkiye sahip olduğu, buna karşın bazı çalışmalarda yardımcı genotoksik (cogenotoxic) aktivite gösterdiği saptanmıştır. Bu nedenle askorbik asidin antimutajenik ve yardımcı mutajenik etkisini anlamak amacıyla daha fazla araştırma yapılmasına gerek duyulduğu bildirilmiştir (65).

2.3.3.1. Askorbik Asit'in Nükleik Asitler Üzerine Etkisi

Askorbik asidin mutajenik etkisi kovalent-kapalı sirküler DNA'nın (covalently-closed circular, ccc) açık sirküler (open circular, oc) DNA'ya dönüşümünü ölçen test ile keşfedilmiştir. C vitamini'nin cccDNA'yı ocDNA'ya dönüştürdüğü, bu işlem için moleküler oksijenin gerektiği ve bakır (Cu⁺⁺) iyonlarının bu işlemi hızlandığı saptanmıştır. Katalazın ise cccDNA'nın ayrılmasını önleyerek askorbik asidin etkisini inhibe ettiği bildirilmiştir (94).

Shamberger (120) tarafından belirtilen bir çalışmada askorbik asit ve askorbatla ilişkili 2 tip redüktonun nükleik asitler üzerine etkileri karşılaştırılmış ve hem amino redüktonların hem de tiyol redüktonların nükleik asitlerde zincir bölünmesine neden olduğu ifade edilmiş ve bu durum, araştırmalar sonucu redüktonların DNA solüsyonunun viskozitesini düşürdüğü saptanması ile doğrulanmıştır. DNA solüsyonunun viskozitesi askorbik asit veya eritorbik asit etkisi sonucu düştüğü ve Cu⁺² iyonlarının varlığının DNA'nın viskozitesini daha fazla oranda düşmesini sağladığı bildirilmiştir. Sukroz yoğunluk gradyan santrifüjasyonu kullanılarak yapılan incelemelerde de askorbik asit veya eritorbik asit ve D-isoaskorbik asidin DNA'da hem tek hem de çift zincir kırılımına neden olduğu saptanmıştır. Askorbik asit ve D-

isoaskorbik asidin benzer etkileri ribonükleik asit (RNA) için de gözlemlenmiştir. Sonuçlar askorbik asidin enediol grubunun nükleik asitlerde zincir kırılımında esansiyel rol oynadığına ve Cu^{+2} iyonlarının bu etkiyi artırdığına işaret etmektedir (120).

2.3.3.2. Askorbik Asit'in Bakteriler Üzerine Etkisi

Askorbik asidin mutajenitesini incelemek amacıyla yapılan Ames testinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Shamberger (120) tarafından belirtilen bir araştırmada askorbik asit ve Cu^{+2} karışımına kısa süreli (15 dakika) maruz kalan *S. typhimurium*'un TA 100 suşu bakterilerde saptanabilir bir mutajenik etki görülmediği bildirilmesine karşın; diğer bir çalışmada askorbik asidin zayıf mutajenik etki gösterdiği bildirilmiştir. Aynı araştırmacı tarafından belirtilen diğer çalışmalarda ise toksik olmayan konsantrasyonlarda sistein (CYS), sisteamin, GSH, askorbik asit ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi indirgeyici ajanların medyuma Cu^{+2} ilavesi yapıldığında ve yapılmadığında *S. typhimurium*'un TA98 ve TA100 suşlarında mutajenik etki oluşturmadığı bildirilmiştir. Buna karşın Odin (94) tarafından belirtilen çalışmalarda ise CYS, GSH ve askorbik asidin Cu^{+2} iyonlarını içeren ve içermeyen medyumda *S. typhimurium*'un TA100 suşuna karşı zayıf mutajenik etki oluşturduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte memeli hücre kültüründe yapılan diğer testlerde bu indirgeyici ajanların özellikle (Cu^{+2}) iyonlarının varlığında önemli düzeyde mutajenik aktivite gösterdiği ve bu etkinin katalaz tarafından tamamen ortadan kaldırıldığı bildirilmiştir. *S. typhimurium*'un TA100 suşu kullanılarak yapılan benzer çalışmada 5 mM askorbik asit ile 1 veya 5 μM Cu^{+2} iyonlarını içeren solüsyona maruz bırakılan bakterilerde önemli düzeyde mutajenik etkinin oluştuğu belirtilmiştir (120).

Norkus ve Kuenzig (93) Ames testinde inkübasyon medyumunun steril musluk suyu ile hazırlandığında askorbik asidin zayıf mutajenik etki oluşturduğunu buna karşın deiyonize su ile hazırlandığında ise mutajenik etkinin oluşmadığını bildirmişlerdir. Zayıf mutajenik etkinin nedeni olarak, askorbik asidin musluk suyunda bulunan oksijen ve metal iyonlarıyla reaksiyona girip test sistemleri için sitotoksik ve mutajenik etkili olan hidrojen peroksiti oluşturması ileri sürülmüş ve medyuma bakır ilavesi ile genotoksisitenin arttığı, etilendiamin tetraasetikasit (EDTA) ve katalaz ilavesi ile azaldığı bildirilmiştir.

2.3.3.3. Askorbik Asit'in Memeli Hücreleri Üzerine Etkisi

Deneyisel çalışmalar sonucunda askorbik asidin *in vitro* toksik ve mutajenik etkisinin, oksijenli medyunda askorbik asidin otooksidasyonu sırasında moleküler O_2 'in indirgenmesinin tamamlanmaması sonucu oluşan O_2 , H_2O_2 gibi reaktif ürünlere bağlı olarak oluştuğu saptanmıştır. Kültür medyumuna düşük düzeyde metal iyonlarının eklenmesinden sonra askorbik asidin mutajenik etkisinin artmasının nedeni olarak Cu^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} ve Fe^{+3} gibi geçiş metal iyonlarının (TMI) askorbik asidin otooksidasyonunu katalize etmesi gösterilmiştir (94, 120). Askorbik asidin TMI ile etkileşimi, O_2 'in 2 elektron kaybetmesi sonucu H_2O_2 'ye indirgenmesini ve askorbik asidin dehidroaskorbik aside oksidasyonunu hızla takiben moleküler oksijen ile bağ kuran kompleks oluşumunu kapsamaktadır. H_2O_2 'in ise TMI varlığında DNA'da hasar oluşturan ajan olan $OH^\cdot$ oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir. Bu durum, H_2O_2 'yi toksik olmayan O_2 ve H_2O 'ya ayırtıran katalazın organizmadaki koruyucu rolü ile ispatlanmıştır. $O_2^\cdot$ 'yi O_2 ve H_2O_2 'e dönüştüren süperoksit dismutazın ise organizmayı askorbik asit ve TMI karışımlarının oluşturduğu mutajeniteye karşı korumada düşük aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar tarafından alkali ortamda askorbik asidin oksidasyonu sırasında $O_2^\cdot$ oluşumu; nötral ve asidik solüsyonlarda O_2 'nin indirgenmesinin hızla H_2O_2 oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir. EDTA gibi kompleks oluşturan bileşiklerin kültür medyumuna ilave edilmesiyle bu bileşiklerin metal iyonlarıyla bağlanıp askorbik asitten daha kuvvetli kompleks oluşturup askorbatın mutajenitesini inhibe ettikleri belirtilmiştir (94).

Askorbik aside ilişkin JECFA raporlarında askorbik asidin metabolik aktivasyonlu ve metabolik aktivasyonsuz bakteriyel olmayan *in vitro* testlerden fare lenfoma L5178Y TK^{+/+} hücre mutasyon testinde negatif sonuç verdiği bildirilmiştir (63). Buna karşın *in vitro* memeli hücre kültürlerinde askorbik asidin mutajenik aktivitesine ilişkin yapılan bazı araştırmalarda askorbik asidin $>10^{-4}$ M konsantrasyonlarda CHO hücrelerinde ve $>10^{-3}$ M konsantrasyonlarda V79 hücrelerinde SCE frekansında artışa neden olduğu bu nedenle askorbik asidin genotoksik özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir (94).

Askorbatın, CHO hücrelerinde ve insan lenfositlerinde doza bağlı SCE'inde artışa neden olduğu; buna ilaveten HeLa hücrelerinde yapılan DNA sentezi inhibisyon

testinde tipik DNA hasarına neden olan bileşiklere benzer sonuçlar verdiği belirtilmiştir (120).

Askorbik asidin süperoksit radikalının oluşumuna neden olan ksantin/ksantin oksidaz (X/XO) sisteminin CHO hücrelerine etkisi sırasında yardımcı mutajen olarak rol oynadığı belirlenmiştir. Askorbik asidin yüksek dozlarının, X/XO sisteminin neden olduğu SCE frekansında artış meydana getirdiği, düşük dozlarının ise SCE frekansında düşüş oluşturduğu bildirilmiştir. Düşük konsantrasyonlardaki askorbik asidin muhtemelen O_2^- radikalini ortadan kaldırdığı ve yüksek dozlardaki askorbik asidin ise kendine özgü genotoksik özelliğini ortaya koyduğu görüşü ileri sürülmüştür (94).

Shamberger (120) tarafından belirtilen bir araştırmada CHO hücreleri $2-5 \times 10^{-4}$ M konsantrasyondaki askorbik asit çözeltisine maruz bırakıldığında hücrelerin HGPRT lokusunda somatik mutasyonların oluştuğu, mutajenik etki oluşturan askorbik asit dozlarının aynı zamanda toksik olduğu ve yüksek düzeydeki askorbik asit içeren çözeltilere katalaz ilave edildiğinde mutajenitenin ve toksisitenin önlendiği bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlardan, askorbik asidin mutajenik metabolitlerinin muhtemelen peroksit radikallerinden oluştuğu ileri sürülmüştür. Diğer bir çalışmada, CHO hücrelerinin $10^{-4} - 10^{-2}$ M konsantrasyonlarda askorbik aside 2-3 saat süreyle maruz kalması sonucu askorbik asidin SCE'ni indüklediği, hücre kültürlerinin daha uzun süreli (24 saat) askorbik aside maruz kaldığında ise bu etkinin daha da güçlendiği ve bakır iyonlarının askorbik asidin SCE'ni indüklemeye yeteneğinde ve toksisiteyi artırmada etkili olduğu saptanmıştır.

Krishnaja ve Sharma (73) tarafından insan periferik kan lenfosit hücre kültüründe mutajen bir bileşik olan mitomisin C (MMC) ile oluşturulan kromozomal hasar üzerine askorbik asidin etkisini incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada, hücrelerde kardeş kromatid değişimi, kromozomal aberasyon ve mikronuklei insidensi incelenmiş ve kültürler 0.1 ve 0.2 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda MMC uygulamadan 1-2 saat önce 200 $\mu\text{g/ml}$ dozda ilave edilen askorbik asidin, tüm uygulama gruplarında MMC ile oluşturulan kardeş kromatid değişimi ve mikronuklei insidensinde önemli bir artışa neden olduğu, kromozomal aberasyon insidensinde ise herhangi bir artışa neden olmadığı bildirilmiştir. Araştırmacılar, MMC tarafından indüklenen kromozomal hasarın oksijenli ortamda metal iyonlarının katalize ettiği askorbik asidin otooksidasyonu sonucu arttığı ve *in vivo* sistemlerde oksiradikallerin DNA ile etkileşime girmeden önce

organizmanın kendi antioksidan sistemleri tarafından ortadan kaldırıldığını belirtmişlerdir.

İnsan fibroblast hücre kültüründe askorbik asit ve askorbik asit-Cu⁺² karışımı birçok farklı test sistemi ile çalışılmış ve askorbik asit-Cu⁺² karışımının DNA fragmentasyonu, DNA-onarım sentezi ve kromatid kırılımı ve değişimi gibi kromozomal aberasyonlara neden olduğu ve solüsyonlara indirgeyici ajanlarla birlikte katalaz ilavesinin kromozomal aberasyonları azalttığı bildirilmiştir (120).

Genel olarak askorbik asidin mutajenitesi değerlendirildiğinde, askorbik asidin *in vitro* testlerde tek başına aktif mutajen olarak etki göstermediği, mutajenitesinin ise yüksek konsantrasyonlarının okside olması sonucu oluşan hidrojen peroksit ve oksiradikallerden kaynaklandığı şeklinde açıklanmaktadır (63). *In vivo* testlerde mutajenik etki göstermemesinin nedeni olarak ise, canlı organizmalarda oksiradikallerin DNA ile etkileşime girmeden önce organizmanın kendi antioksidan savunma sistemi tarafından inaktive edilmesi olarak gösterilmektedir (94).

2.3.4. Askorbik Asit'in Antimutajenik Etkisi

Vitaminlerin antimutajenik ve antikarsinojenik etkilerine ilişkin birçok araştırma yapılmıştır. Araştırmacılar tarafından yapılan *in vitro* ve *in vivo* genotoksisite testleri sonucu askorbik asidin bazı bileşikler tarafından oluşturulan mutajenezise karşı antimutajenik etkili olduğu görülmüştür (132).

2.3.4.1. Askorbik Asit'in Bakterilerdeki Antimutajenik Etkisi

DNA ve diğer hücresel makromoleküllerin alkilasyonuna neden olan ve karsinojenik özelliğe sahip N-Nitroso bileşiklerinin mikrobiyal testlerdeki mutajenitesine karşı askorbik asidin inhibitör rolü üzerine birçok araştırma yapılmış ve çalışmalar sonucunda askorbik asidin nükleofilik etki göstererek N-nitroso bileşiklerinin elektrofilik metabolitleri tarafından indüklenen mutajeniteyi inhibe ettiği saptanmıştır (93, 94, 120).

Norkus ve Kuenzig (93) tarafından yapılan bir çalışmada modifiye edilmiş Ames bakteriyel mutajenite sisteminde inkübasyon medyumuna deiyonize su ile hazırlandığında askorbik asidin N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidinin (MNNG) mutajenitesini azaltmadığı; buna karşın medyum steril su veya Cu⁺² iyonları ilavesi yapılmış deiyonize su ile hazırlandığında askorbik asidin MNNG'nin mutajenitesini

önlediği saptanmıştır. Odin (94) tarafından bildirilen benzer bir çalışmada, MNNG ve N-nitrosodimetilamin (DMN) ile *S. typhimurium*'un TA1530 suşunda oluşturulan mutajenik etkinin askorbik asit tarafından inhibe edildiği belirtilmiştir. Bir diğer çalışmada, askorbik asidin pH'a bağlı olarak 1,4-dinitro-2-metilpirol'ün mutajenitesini etkilediği; düşük pH değerlerinde askorbik asidin inaktif olduğu buna karşın fizyolojik koşullar altında bu bileşiğin mutajenitesinin tamamen askorbik asit tarafından önlendiği bildirilmiştir. Araştırmacılar tarafından DMN, dietilnitrozamin (DEN) ve N-nitromorfolin gibi diğer N-nitroso analogları kullanılarak *S. typhimurium*'un TA100 ve TA1535 suşlarında oluşturulan mutajeniteye karşı askorbik asidin antimutajenik etki gösterdiği saptanmıştır (94).

Sıçan karaciğer veya insan eritrosit lizatlarında krom (Cr^{+6}) bileşiklerinin *S. typhimurium*'un his suşlarında hem çerçeve kayması (frameshift) hem de baz çifti değişimine neden olarak mutajenik etkili olduğu saptanmıştır. Test edilen indirgeyici ajanlar (askorbik asit ve sodyum sülfite) ve metabolitler (GSH, NADH ve NADPH) tarafından Cr^{+6} 'un oksido-redüksiyon reaksiyon sonucu Cr^{+3} inaktif forma dönüşümüne bağlı olarak mutajenitesinin önlenebildiği bildirilmiştir (120).

Shamberger (120) antioksidanların antimutajenik etkilerini birçok *Salmonella* suşunda test etmiş ve malondialdehid veya β -propiolaktone'un neden olduğu mutajenezisin askorbik asit ve bütill hidroksitoluen, E vitamini ve selenyum gibi diğer antioksidanlar tarafından önlendiğini saptamıştır.

Gentile ve ark. (43) tarafından kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan siklofosfamid, bleomisin, doksorubisin ve sisplatin gibi güçlü antitümör ajanların askorbik asit varlığında ve yokluğundaki mutajeniteleri test etmek amacıyla *Salmonella*/mikrozom test sistemi kullanılarak yapılan bir çalışmada, askorbik asidin sisplatine karşı antimutajenik etkinliğinin çok fazla, bleomisin ve doksorubisine karşı etkinliğinin daha az ve siklofosfamide karşı antimutajenik etkinliğinin olmadığı saptanmıştır. Araştırmacılar askorbik asidin siklofosfamide karşı etkinliğinin olmamasının nedeni olarak; siklofosfamidin mutajenik etkisini gösterebilmesi için gerekli olan *in vitro* metabolik aktivasyonu sağlayan memeli karaciğer S9 metabolize edici sistem tarafından askorbik asidin inaktive edilmesini ileri sürmüşlerdir.

2.3.4.2 Askorbik Asit'in Memeli Hücrelerindeki Antimutajenik Etkisi

Askorbik asidin memeli hücrelerinde yapılan *in vivo* testlerde antimutajenik etkiye sahip olduğu ve bileşikler tarafından indüklenen mutajeniteye karşı koruyucu rol üstlendiği bildirilmiştir (94).

Premkumar ve Bowlus (111) tarafından yapılan bir çalışmada, güçlü oksidan özelliğe sahip olan demirin yüksek düzeyde diyetle birlikte alınmasının genotoksik etkili lipid peroksitlerin oluşumuna neden olarak fare kemik iliğindeki polikromatik eritrositlerde mikronükleus frekansında artışa neden olduğu saptanmıştır. Diyetle demirle birlikte askorbik asit alımının mikronükleus frekansında düşüş meydana getirdiği belirlenmiştir. Buna benzer bir diğer çalışmada kobay ve sıçanlarda Cr^{+6} tarafından indüklenen mikronükleus frekansının askorbik asitle birlikte verilmesi sonucu düştüğü bildirilmiştir. Araştırmacılar askorbik asidin göstermiş olduğu antimutajenik etkinin antioksidan özelliğinden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir (94).

Fahmy ve Aly (39) tarafından farelerde kadmiyum kloridin genotoksitesini araştırmak amacıyla yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda kadmiyum kloridin genotoksik etkili olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada *in vitro* fare dalak hücre kültüründe kadmiyum klorid tarafından indüklenen kromozomal aberasyon üzerine askorbik asidin etkisi incelenmiş ve askorbik asidin kadmiyum klorid tarafından indüklenen aberrant hücre oranında önemli bir düşüş oluşturduğu gözlenmiştir.

Antiametik bir ilaç olan diiodohidroksiokinolin'un genotoksitesini üzerine askorbik asidin etkisini incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada, Swiss albino farelerin kemik iliği hücrelerinde bileşik tarafından indüklenen mikronükleus frekansında askorbik asidin düşüş meydana getirdiği saptanmıştır (94).

Askorbik asidin *in vitro* ve *in vivo* test sistemlerinde antimutajenik etkisi araştırılmış ve askorbik asidin uygulama zamanı ve konsantrasyonuna göre genotoksiteye neden olduğu veya genotoksiteyi önlediği bildirilmiştir (73).

Askorbik asidin siklofosfamid (CP) ve MMC gibi alkilleyici yapıda olan mutajen maddeler üzerine etkisini incelemek amacıyla fare kemik iliği ve dalak hücreleri kullanılarak yapılan çalışmadan elde edilen test sonuçları askorbik asidin mutajen maddeler tarafından indüklenen SCE oranında önemli bir artışa neden olmadığını bununla birlikte askorbik asidin artan konsantrasyonlarının her 2 hücre tipinde SCE oranında düşüşe neden olduğunu göstermiştir. Askorbik asidin en yüksek

konsantrasyonunun (6,68 g/kg c.a.) her 2 hücre tipinde SCE oluşumunda CP ve MMC için sırasıyla yaklaşık %75 ve % 40 inhibisyon oluşturduğu saptanmıştır. Fare blastositleri gibi farklı bir doku kullanılarak yapılan testler sonucunda da CP tarafından indüklenen SCE ve kromozomal aberasyon sayısında askorbik asidin önemli bir düşüşe neden olduğu bildirilmiştir (94).

Antunes ve Takahashi (8) kemoterapötik olarak kullanılan ve mutajenik etkili bir ajan olan doksorubisin tarafından indüklenen kromozomal aberasyon üzerine askorbik asidin antiklastojenik etkisini ve doza bağlı etkinliğini *in vitro* insan periferel kan lenfosit hücre kültürlerinde araştırmışlar ve tedavi öncesinde, tedavi sırasında ve tedavi sonrasında 100 veya 200 µg/ml konsantrasyonlardaki askorbik asidin antiklastojenik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Buna karşın 500 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlardaki askorbik asidin sitotoksik olduğunu, aynı koruyucu etkinliği göstermediğini ve kromozomlarda kırılmaya neden olduğunu saptamışlardır. Aynı araştırmacılar (7) tarafından ve aynı bileşikle yapılan *in vivo* fare kemik iliği hücrelerinde yapılan çalışmada, yüksek dozda C ve E vitaminlerinin kromozomal hasar üzerine etkinlikleri araştırılmış ve 200 mg/kg c.a. dozunda oral yolla uygulanan C ve E vitaminlerinin doksorubisin tarafından indüklenen kromozomal aberasyon frekansında önemli derecede düşüş oluşturduğu saptanırken 400 mg/kg ve 800 mg/kg dozlarında uygulandığında herhangi bir etki koruyucu etki oluşturmadığı belirtilmiştir. Araştırmacılar C ve E vitaminlerinin kromozomal hasara karşı olan koruyucu etkinliklerinin antioksidan özelliklerinden kaynaklandığını ve doza bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Yüksek dozda kimyasal mutajenlere maruz kalan insan gruplarında yapılan araştırmalar, insanlar tarafından uzun süreli oral yolla yüksek düzeyde askorbik asit tüketiminin farklı ksenobiyotiklerin insan lenfositlerinde neden olduğu kromozomal kırılım sayısında önemli derecede düşüşe neden olduğuna işaret etmektedir (94).

Amara-Mokrane ve ark. (6) tarafından *in vitro* insan periferel kan lenfosit hücre kültüründe doksorubisinle yapılan bir diğer çalışmada; doksorubisin tarafından indüklenen mikronükleus oluşumuna karşı askorbik asidin koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır. Askorbik asit, doksorubisin uygulamasından önce, doksorubisinle birlikte ve doksorubisin uygulamasından sonra kültüre ilave edilmiş ve askorbik asidin sadece doksorubisinle aynı zamanda olan uygulamada mikronükleus frekansında düşüşe neden

olduğu ve doksorubisin tarafından indüklenen sitotoksistide artışa neden olduğu belirtilmiştir.

Aly ve Donya (5) tarafından C ve E vitaminlerinin *in vivo* antimutajenik etkilerini saptamaya yönelik yapılan bir çalışmada fare kemik iliği hücrelerinde makrosiklik bir antibiyotik olan rifampisin tarafından indüklenen kromozom aberasyon üzerine bu vitaminlerin koruyucu etkileri incelenmiştir. Tek doz şeklinde 100 mg/kg, 200 mg/kg ve 400 mg/kg c.a. dozlarında oral yolla uygulanan C ve E vitaminlerinin rifampisin tarafından indüklenen kromozomal aberasyon frekansında önemli derecede doza bağlı bir düşüş oluşturduğu saptanmıştır. Vitaminlerin rifampisin ile birlikte 30 gün süreyle tekrarlı uygulamalarında 25, 50 ve 75 mg/kg c.a. dozunda uygulanan C vitamininin tüm uygulama gruplarında kromozom aberasyon frekansında önemli oranda düşüşe neden olurken E vitamininin sadece en yüksek uygulama grubu olan 40 mg/kg dozunda etkili olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar yüksek düzeyde eşleşmemiş elektron delokalizasyonu ile birlikte stabil askorbil anyon radikali oluşurken meydana gelen askorbik asidin antimutajenik etkisinin oksidatif/redüktif transmutasyonları ile ilişkili olabileceği görüşünü ileri sürmüşlerdir.

Giri ve ark. (45) tarafından kanser tedavisinde kullanılan antitümör etkili bir bileşik olan sisplatin tarafından farelerde indüklenen mutajenite üzerine askorbik asidin etkisi araştırılmış ve kromozomal aberasyon, kemik iliğinde mikronüklei ve sperm başı anomalileri gibi mutajenite parametreleri incelenmiştir. Sisplatinle birlikte askorbik asit uygulanan tüm farelerde sadece sisplatin uygulanan farelere göre tüm mutajenite parametrelerinde önemli bir düşüş meydana geldiği saptanmıştır. Ayrıca kemik iliği hücrelerinde oksidatif stres ve toksik ajanlara karşı hücre içi koruma sağlayan bir sitoplazmik antioksidan olan GSH düzeyinde önemli bir artış meydana geldiği gözlemlenmiştir. Araştırmacılar askorbik asidin sisplatinle indüklenen mutajeniteye karşı koruyucu etkisinin muhtemelen antioksidan özelliğinden kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Nefic (92) tarafından insan lenfosit hücre kültüründe sisplatinle indüklenmiş kromozomal aberasyon üzerine askorbik asidin koruyucu etkisini araştırmak amacıyla yapılan çalışma sonucunda, askorbik asidin kromozom aberasyon sayısında önemli bir düşüş meydana getirdiği buna karşın; hücreleri sisplatinin neden olduğu serbest radikallerin oluşturduğu hasara karşı tamamen koruyamadığı bildirilmiştir. Askorbik

asidin gösterdiği antiklastojenik/antimutajenik etki mekanizması tam olarak açığa kavuşturulamamış olsa da serbest radikalleri ortadan kaldırıcı etkisi ve daha az olarakta nükleofilik özelliği ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.

2.3.5. Askorbik Asit' in Antimutajenik Etki Mekanizması

Vitaminler canlı organizmalarda birçok biyolojik fonksiyonlara sahiptirler. Özellikle antioksidan özelliğe sahip olan E, A, ve C vitaminleri DNA ve diğer hedef hücrelerde hasara yol açan serbest radikalleri veya elektrofilleri ortadan kaldırarak antimutajenik etki gösterdikleri bildirilmiştir. Mutajenite ile kanserojenite arasındaki ilişkiden dolayı vitaminler gibi doğal antimutajenlerin düzeylerinin artmasının tümör oluşumunu engellemede yararlı olabileceği düşünülmektedir (94).

Antioksidanlar, DNA üzerindeki nükleofilik bölgeler için elektrofilik mutajenlerle yarışma, oksidasyon işlemlerini bloke edip promutajenlerin biyoaktivasyonunu inhibe etme veya promutajenlerin elektrofilik metabolitleriyle reaksiyona girme gibi birçok farklı mekanizmayla bileşikler tarafından indüklenen mutasyonu azaltabilmektedirler (65).

Fizyolojik koşullar altında askorbik asit DNA, RNA ve proteinlerdeki hücresel nükleofilik bölgelerin alkilasyonunda alkilleyici ajanlarla yarışa girerek bu bölgeleri maskeleyip mutajen maddelerin bu bölgelere bağlanmasını engellemektedir (65, 73).

Askorbik asidin mutajenik aktiviteyi inhibe etmesine ilişkin mekanizmalardan birisinin askorbik asit'ten monodehidroaskorbik asit oluşurken veya yüksek düzeyde eşleşmemiş elektronun delokalizasyonu sırasında deiyonize formu olan stabil askorbil anyon radikali oluşurken meydana gelen oksidatif/redüktif transmutasyonları ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (94).

Askorbik asit promutajenleri mutajenlere dönüştüren serbest radikal mikrozomal oksidasyon sistemini inhibe edebileceği yalnız bu etkisinin *in vitro* CP, trenimon gibi indirek yolla etki gösteren mutajenlere karşı düşük olduğu; buna karşın *in vivo* hayvan ve insan organizmalarında askorbik asidin bu mutajenlere karşı inhibitör etkisinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Askorbik asidin *in vitro* inhibitör etkisinin düşük olmasının nedeninin serbest radikalleri ortadan kaldırıcı etkisinin zayıf olması yada aktivasyon işlemleri sırasında serbest radikallere zayıf şekilde bağlanması ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (94).

Askorbik asidin en önemli özelliği elektrofilik yapıdaki bileşikler ve reaktif elektrofilik türleri yakalamasıdır. Elektrofilik alkilleyici ajanlar ile askorbik asit özellikle nükleofilik güce sahip olan askorbil anyonu AH^- arasında etkileşim olduğu bildirilmiştir. Bu durum elektrofilik türlere dönüşen ve indirek yolla etkileyen bazı mutajenlere karşı askorbik asidin antimutajenik etkisini açıklamaktadır (94).

2.3.6. Askorbik Asit'in Anti-karsinojenik Etkileri

2.3.6.1. Askorbik Asit'in Hücre Bölünmesi ve Gelişimi Üzerine Etkileri

In vitro insan lenfosit hücre kültüründe fitohemaglutinin ve konkanavalin gibi mitojenler ile stimüle edilen hücre proliferasyonu üzerine askorbik asit ve dehidroaskorbik asidin direk etkileri araştırılmış, fizyolojik ve yüksek konsantrasyonlarda askorbik asit ve dehidroaskorbik aside maruz kalan hücrelerde yapılan viabilite çalışmaları sonucunda hücrelerde toksik etki oluşmadığı, buna karşın lenfosit aktivasyonundaki metabolik olayların etkilendiği bildirilmiştir. Makromolekül sentezi ölçüldüğünde ise RNA, protein ve DNA sentezinin önemli derecede inhibe olduğu saptanmış ve askorbik asit ve dehidroaskorbik asid tarafından oluşturulan inhibe edici etkinin moleküler transport, fosfolipid metabolizması, sodyum ve potasyum iyon değişimi ve kalsiyum akışı gibi mitojenezde önemli faktörler olan hücre membranı ile ilişkili olaylar olabileceği ileri sürülmüştür (120).

Shamberger (120) tarafından belirtilen bir çalışmada, askorbik asidin farmakolojik dozunun kanserojenik etkili bir bileşik madde olan 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA) üzerine etkisi kısmen hepatektomi yapılmış 10-12 haftalık yaştaki dişi farelerde DNA, RNA ve protein seviyelerini ölçülerek araştırılmış ve hem DMBA hem de askorbik asidin rejenere olan karaciğerde DNA sentezini inhibe ettiği ve ikisinin birlikte kullanılması durumunda etkinin daha da arttığı saptandığı bildirilmiştir. Araştırmacılar DMBA'nın etkisinin, düşük düzeydeki DNA polimeraz aktivitesine veya artan DNAase aktivitesine bağlı olarak oluşabileceği sonucuna vardıklarını belirtmişlerdir. Askorbik asit uygulamasından sonra rejenere olan karaciğerdeki DNA içeriğindeki düşüşün tamamen yada kısmen vitaminin DNA'da kırılma oluşturucu etkisine bağlı olarak oluşabileceğini ileri sürmüşlerdir. Buna ilaveten kısmen hepatektomize edilmiş farelerde DMBA uygulamasının karaciğerde RNA ve protein içeriğini baskıladığı buna karşın askorbik asit uygulanması ile DMBA'nın bu etkisinin ortadan kalktığı bildirilmiştir. Aynı araştırmacı tarafından belirtilen bir diğer

çalışmada, D-izoaskorbik asit ve askorbik asidin izomeri olan betain hidratın tek başına ve birlikte kullanılmalarının normal ve malignant hücrelerdeki *in vitro* etkileri araştırılmış, her iki bileşiğinde kanser hücresi olan sarkoma hücrelerinde mitozu inhibe ettiği saptanmış ve bileşiklerin birlikte kullanımında oluşan inhibe edici etkinin tek başlarına kullanımına göre daha güçlü olduğu bildirilmiştir.

2.3.6.2. Askorbik Asit'in Kanser Hücrelerindeki Seçici Toksisitesi

Araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda askorbik asit'in organizmayı karsinogenezise karşı farklı mekanizmalarla koruduğu ve özellikle antioksidan özelliğine bağlı olarak hücresel bileşenlerde hasar oluşturan serbest radikallerin oluşumuna neden olan lipid peroksidasyonu azaltarak kanser gelişimini önleyebildiği bildirilmiştir (120).

Askorbik asit'in doku kültürlerinde kanser hücrelerini seçici olarak inhibe ettiği ve bu inhibisyonun toksik etkiye veya anti-karsinogenik etkiye bağlı olduğu bilinmektedir. Araştırmalar sonucu L-askorbik asidin akut non-lenfosit lösemili hastaların kemik iliği hücrelerindeki büyümeyi baskıladığı saptanmıştır. Lösemili ve sağlıklı bireylerden alınan kemik iliği hücre kültürlerinde, L-askorbik asidin 0,1 mM gibi düşük konsantrasyonlarda bile lösemi hücre kolonisinin gelişimini baskıladığı bildirilmiştir (120).

Yapılan çalışmalar sonucunda askorbatın *in vitro* olarak Ehrlich ascites karsinoma hücrelerinde aşırı toksik veya öldürücü olduğu gösterilmiş ve bu toksisitenin askorbatla birlikte 3-amino-1,2,4-triazol (ATA) verildiğinde sinerjistik olarak yüksek derecede arttığı bildirilmiştir. ATA, tek başına verildiğinde kanser hücrelerinin H_2O_2 'yi dekompoze eden katalaz aktivitesini inhibe ederek hemen hemen tamamen kanser hücrelerinde toksik etki gösterdiği belirtilmiştir. Araştırmacılar askorbatın sitotoksik etkisinin hücre içi hidrojen peroksit üretiminden kaynaklandığını ve ATA tarafından askorbatın etkisinin artmasında ATA'nın hücresel katalazı inhibe edip böylelikle hücrelerin hidrojen peroksiti detoksifiye etme yeteneklerini azaltmasına bağlı olarak oluştuğu sonucuna varmışlardır (120).

2.4. Genetik Toksikoloji

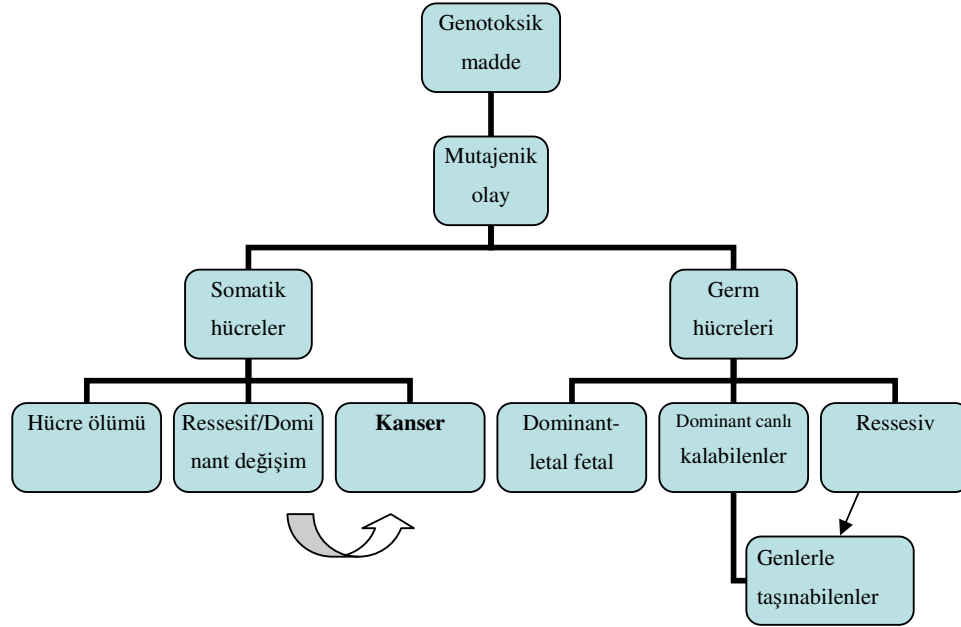
Genetik toksikoloji organizmanın normal biyolojik işleyişi sırasında veya kimyasal, fiziksel ve biyolojik etkenlere bağlı olarak hücrelerin kromozom ve DNA

moleküllerinde meydana gelen değişiklikleri inceleyen bir bilimdir **(89, 139)**. Yeni bileşiklerin ve ilaçların toksikolojik açıdan değerlendirilmesinde önemli bir yere sahiptir **(89)**.

Genetik toksisite hücre DNA'sında, kromozomlarda veya çekirdeğin yapısında meydana gelen hasarları, DNA onarım enzimlerinin indüksiyonu, DNA eklentileri, DNA zincir kırılımı, gen mutasyonu, kromozom aberasyonu, klastojenite ve anöploidi gibi olayları kapsayan genel bir terimdir **(89, 139, 140)**.

DNA veya topoizomeraz gibi genomun kopyasının çıkarılmasını sağlayan enzimlerle etkileşime giren maddelere ve mutasyona neden olan kimyasallara genoma karşı toksik yani genotoksik adı verilmektedir **(18, 89)**. DNA ile direk etkileşime girmeyen mitotik iğ iplikçiklerini bozarak veya topoizomeraz enzimini inhibe ederek mutajenik etki oluşturan bileşiklere indirek genotoksinler ya da DNA'ya reaktif olmayan genotoksinler adı verilmektedir **(128)**. Kimyasalın kendisi veya metabolitleri tarafından DNA'da meydana gelen hasar veya DNA eklentilerinin oluşması genotoksik etki olarak tanımlanmaktadır. Genotoksik etkiler aynı zamanda düzensiz DNA sentezi (unscheduled DNA synthesis), kardeş kromatid değişimi ve mitotik rekombinasyonu da içermektedir **(18)**.

Organizmanın genetik materyal yapısında meydana gelen değişiklikler genel olarak mutasyon olarak tanımlanmaktadır. Bu değişiklikler bağımsız bir gende, gen bloklarında veya tüm kromozomlarda meydana gelebildiği gibi somatik doku hücrelerinde de oluşabilmektedir **(18, 135)**. Mutasyonun zararlı etkileri üreme bozuklukları, embriyojenik ve perinatal ölüm, malformasyonlar, genelde hastalıklar ve kanser şeklinde görülmektedir **(89, 135)**. Mutajenik fiziksel veya kimyasal ajanlara maruz kalma sonucu, eşey hücrelerinde meydana gelen mutasyon kalıtsal hastalıklara veya somatik hücrelerde meydana gelen mutasyon kanser oluşumuna neden olabilmektedir **(18, 127)**. Mutasyonun zararlı etkileri Şekil 2.3'te gösterilmiştir **(135)**. Memelilerde *in vivo* mutasyona neden olabilen bileşikler potansiyel kanserojen olarak nitelendirilmektedir **(127)**.



Şekil 2.3. Mutasyonların neden olduğu zararlar (135)

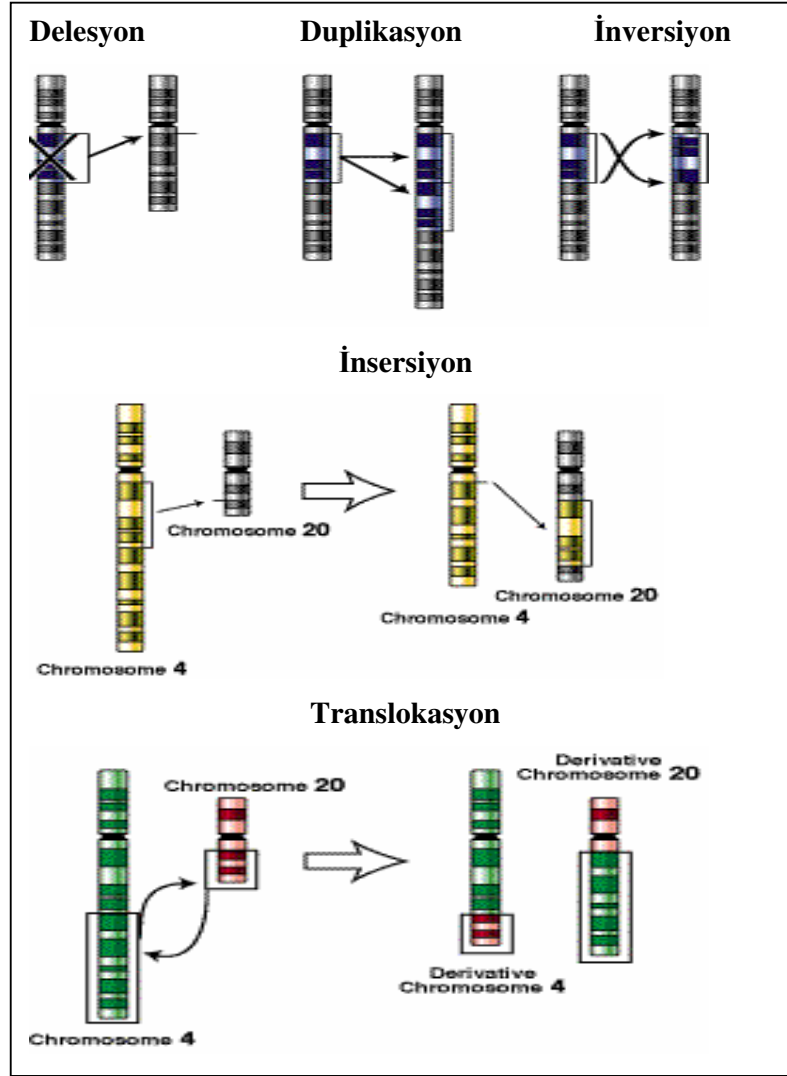
2.4.1. Mutasyon Oluşum Mekanizmaları

Bir kimyasalın mutajenik gücünü belirleyen mutasyon seviyeleri gen düzeyinde meydana gelen mutasyonlar, klastojenite ve anöploididir (18). DNA molekülündeki kalıtsal değişimler, gen mutasyonuna neden olmaktadır. Genetik materyalde meydana gelen bu değişimler nokta mutasyonlar ve kromozomlarda meydana gelen değişimler (yapısal ve sayısal kromozomal aberasyon) şeklinde 2 sınıfta incelenmektedir (127, 135).

Mutasyonlar tek bir DNA baz çiftinde (nokta mutasyon) veya daha geniş çapta DNA'dan bir parçanın çıkması veya birleşmesi şeklinde olmaktadır. Nokta mutasyonlarda bir baz çiftinde, bazın bir yerine diğer aynı tip baz geçerse baz çifti geçişi (transisyon), tersine farklı bir tip baz geçerse buna baz çifti çaprazlaması (transversiyon) şekillenir. Kimyasal mutajenlerle oluşan nokta mutasyonlar (DNA bazlarının değişimleri) kimyasal modifikasyon, DNA molekülünde anormal bazların yer alması (substitüsyon), alkilendirici maddelerle alkilasyon (katılma) ve çerçeve kayması (frame-shift) şeklinde olmaktadır. Kimyasal maddelerin DNA bazları ile etkileşime girerek bazların kimyasal yapılarında değişiklik oluşturmaları ve kanser tedavisinde kullanılan baz analoglarının DNA yapısında yer almaları sonucu nokta mutasyonlar meydana gelebilmektedir. Ayrıca alkilendirici maddelerin pozitif yüklü karbonyum iyonu vererek DNA molekülünün elektronca zengin bazlarına alkil gruplarını eklemeleri

ve DNA molekülüne bir baz ilavesi veya bazın eksilmesi ile triplet (üçlü) kodun yanlış şifrenmesi neticesinde de nokta mutasyonlar oluşabilmektedir **(42, 135)**. Triplet kodonun yanlış şifrenmesi sonucu sessiz mutasyon (silent), kayıp mutasyon (missens) ve nonsens mutasyon oluşur. DNA üçlü kodonunda bir nokta mutasyona rağmen kodondan sentezlenen aminoasitte değişikliğe neden olmuyorsa sessiz mutasyon, kodondan sentezlenen aminoasitte değişikliğe neden oluyorsa kayıp mutasyon kodonda meydana gelen mutasyon sonrasında kodon stop kodonuna neden oluyorsa nonsens mutasyon şekillenir **(106)**.

Kromozom kırılmalarının düzensiz ve yanlış kaynaması (birleşmesi) sonucu olan değişmelere kromozomal mutasyon, kromozomlara katılma, eksilme veya farklı sıralama sonucu oluşan ve ışık mikroskopu ile görülen lezyonlara klastojenezis denmektedir. Kromozomlarda meydana gelen bu değişiklikler sayısal veya yapısal olabilmektedir **(18)**. Kromozomlarda meydana gelen yapısal değişiklikler eksilme (delesyon), ikiye katlama (duplikasyon), ters dönme (inversiyon), ekleme (insersiyon), yer değiştirme (translokasyon), halka kromozom ve izokromozom şeklinde olmaktadır. Delesyon, gen kaybı ile sonuçlanan DNA'dan bir parçanın kopması; duplikasyon, DNA'nın bir parçasının bir veya birden fazla parçasının fazlalığı olarak tanımlanmaktadır. İnversiyonun (ters dönme) 2 alt tipi bulunmaktadır. Parasentrik inversiyon sentromeri içine almaz aynı koldaki bir kromozom parçasının 180 derece dönerek yeniden aynı bölgeye lokalize olmasıdır. Perisentrik inversiyon sentromeri içine alacak şekilde değişime uğrayan parça uzun koldan kısa kola yada kısa koldan uzun kola transfer olur. Kromozomlardan birinde 2 noktada diğesinde ise bir noktada kırılma olup iki kırılma olan kromozomdaki parçanın tek kırılma olan kromozoma gidip kaynaşmasına insersiyon denir. Translokasyon ise kromozomların karşılıklı olarak parça değişikliği yapmasıdır. Bir kromozomun iki ucunda iki darbe sonucu iki kırılma olur ve bu kırık uçlara başka bir parça birleşmeden iki uç kaynaşırsa halka şeklinde ortaya çıkan kromozoma halka kromozom denir. İzokromozom ise metafazda boylamasına bölünen sentromer enlemesine bölünürse yavru hücrelerden birisinde yalnızca kromozomun kısa kolları bulunurken diğesinde uzun kolları bulunur **(11)**. Kromozomlarda meydana gelen yapısal değişiklikler Şekil 2.4'te gösterilmiştir **(24)**.



Şekil 2.4. Kromozomlarda Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler (24)

Kimyasalların mitoz veya mayoz hücre bölünmesini etkilemesi kromozomların hücrelere düzensiz dağılımına ve sonuç olarak sayısal kromozom bozukluklarına neden olmaktadır. Bu durum anöploidi olarak tanımlanmaktadır. Anöploidi oluşturan kimyasallara anöjen adı verilmektedir (18, 59). Hücrede bölünme hatasına bağlı olarak kromozomlarda haploid (n) yapının katları şeklinde meydana gelen triploidi ($3n$), tetraploidi ($4n$) gibi kromozom artışlarına poliploidi, hücre bölünmesi sırasında kromozomların ayrılmaması (nondisjunction) sonucu bir kutuba fazla diğer kutuba eksik kromozom gitmesi veya anafazda birbirinden ayrılan eş kromozom yada kardeş kromatitlerden birinin kutuplara çekilmesi sırasındaki gecikme nedeniyle haploid

yapının katları şeklinde olmayan kromozom artış yada eksilmelerine ($2n-1$ monozomi gibi) anöploidi denmektedir (38, 59). Araştırmacılar tarafından yapılan incelemelerde tümörlerin kromozomal birleşmeyi ve/veya anöploidiyi içeren anormal karyotip gösterdikleri saptanmış ve buradan hareketle anöploidinin tümör gelişiminde önemli bir rol üstlendiği bildirilmiştir (59).

2.4.2. DNA Onarımı

Mutasyona neden olan etkenlere doğal olarak tüm yaşam boyunca maruz kalınmaktadır. Bu nedenle de canlı organizmalar bu değişimleri kendi zararına olmayacak şekilde en aza indirebilen koruma ve onarım sistemi geliştirmiştir (25, 91). Bu koruyucu yada onarım sistemleri DNA eklentileri (DNA ile birleşen yabancı maddeler) gibi DNA molekülünde yapısal değişmeye neden olan ve böylece nükleotid sentezini bozan fakat henüz mutasyon olmadan (premutasyon) ortaya çıkan hasarın onarımı ve hasarı uzaklaştırmadan hücrenin yaşamını sağlayan tolerans mekanizmalarıdır (42, 135).

Onarım sistemleri doğrudan ya da dolaylı olarak iki grupta toplanabilir.

1. Doğrudan DNA onarımı:

a. Fotoliaz (foto onarım): DNA bazlarından yabancı maddelerin uzaklaştırılması, baz kaybı olan yere DNA polimerazın etkisi ile doğru bazların ilave edilmesi, DNA ligazlarla tek çizgili kırılmaların kapatılması şeklinde olmaktadır (91, 135). UV radyasyona özgü olarak DNA'da, aynı sarmalda yan yana, yada sarmallarda karşılıklı olarak kovalent bağlanmayla pirimidin dimerleri oluşur. Bakterilerde onarım sistemlerinden birini oluşturan fotoliaz enzimi, DNA'daki bu dimerleri karanlıkta tanır ve bağlanır, ancak ışıktaki aktive olarak bu kovalent oluşumu koparır (25, 42).

b. O⁶-mG-metil-transferaz: Metiltransferaz O⁶-metilguanini demetilasyona uğratarak, DNA'da yanlış metillenen bazların CH₃ gruplarını, kendi yapısındaki sistein birimlerine geri dönüşümsüz olarak bağlayarak DNA yapısını tek basamakta rejenere eder (25, 135).

2. Kesme-Çıkarma ile DNA onarımı:

a. Baz kesme - çıkarma (eksizyon, ulaştırma mekanizması): Hasar görmüş bazların, yanlış baz çiftinin veya DNA segmenti hasarının uzaklaştırılması mekanizmalarını içerir. DNA replikasyonunda yanlış eşleşmeler sonunda meydana

gelen bazların bir eksonükleaz aktivite ile koparılıp tekrar DNA polimeraz I'in 5' → 3' polimerizasyon aktivitesiyle doğru bazın eklenmesi esastandır ibarettir. Reaksiyonun son basamağında DNA ligaz görev yapmaktadır (25, 135).

b. Nükleotid kesme - çıkarma: DNA'daki daha büyük hasarların giderilmesini sağlayan ve daha fazla protein ve enzimin gerekli olduğu bir onarım tipidir (25).

c. Yanlış eşleşme onarımı: DNA sentezi sırasında oluşan yanlış eşleşmeler, bu hatayı farkedenden ve düzelten enzim sistemleri tarafından tanınır. Ancak bunun için yeni sentezlenmiş sarmalın tanınması gereklidir. Hatalı eşleşmeyi içeren DNA sarmalı enzim tarafından kesilir ve oluşan boşluk DNA polimeraz ile dolar ve ligaz ile fosfodiester bağ ile birleşir (25).

d. Tolerans sistemleri (post-transkripsiyonel tamir, replikasyon sonrası onarım): DNA glioksilaz enzimi tarafından yapılan transkripsiyon sonrası tamir mekanizmasıdır (25).

2.4.3. Genetik Toksikolojinin Tarihçesi

Kimyasal mutajenez, 1970'li yıllar öncesinde gen ve kromozom fonksiyonlarının araştırılmasında önemli bir konu olmuştur. Genetik toksikolojiye ilgi ise özellikle 20. yüzyılın ortalarında Auerbach ve Robson tarafından 1944 yılında çeşitli kimyasalların meyve sineği olan *Drosophila melanogaster*'de mutasyon oluşturduğunun rapor edilmesi sonucu başlamıştır. Bu testin bazı yanlış sonuçlara yol açması ve duyarlılığının çok düşük olması nedeniyle mutajenite izleme prosedürleri içerisinde yer almamıştır. Bunu izleyen 1950'li yılların başında *Escherichia coli*'de süspansiyon ve plaka (spot) testleri denenmiştir; bu testler sadece çok spesifik baz çifti değişimine duyarlıdır ve DNA'da baz eklenmesi veya çıkması sonucu kalıp kaymasına neden olan mutajenler bu testlerle saptanamamaktadır. Bruce Ames 1971 yılında aynı spot test sistemini ve kendi geliştirdiği histidine karşı mutant *S. typhimurium* suşlarını kullanarak bakteriyel mutasyon testi olan Ames testini geliştirmiştir. Yanofsky aynı yıl Ames testinde triptofana karşı mutant *E. coli* suşlarında mutajenleri saptamada kullanılabileceğini bildirmiştir. Bakteriyel mutasyon test sisteminin geliştirilmesine paralel olarak memeli hücrelerinde kromozom aberasyon testi, gen mutasyon testi gibi *in vitro* testler geliştirilmiştir. İlerleyen yıllarda mutajeniteyi saptamak amacıyla *in vivo* kemik iliği aberasyon ve kardeş kromatid değişimi testleri geliştirilmiştir. Zamanla bu

testlerin yerini etkinlik yönünden Schmid ve ark. (116) tarafından geliştirilen kemik iliği mikronükleus testi almıştır (57, 140).

2.4.4. Genetik Toksisite Testleri

Genetik toksisite testleri, çeşitli mekanizmalarla direk veya indirek olarak genetik materyalde hasara neden olan bileşikler saptamak amacıyla geliştirilmiş *in vitro* ve *in vivo* testlerden oluşurlar ve ilaçların ruhsatlandırılmasından önce yapılması zorunlu prosedür içerisinde yer alırlar (60, 104, 140).

Son yıllarda, karsinogenik etkili olan birçok maddenin mutajenik; benzeri şekilde mutajenik olan birçok maddenin de karsinogenik etkili olduğu gösterilmiştir. Kimyasal maddelerin mutajenik etkileri ile karsinogenik potansiyelleri arasındaki bu kuvvetli ilişkinin olması, mutajenezis testlerinin endüstri kuruluşları tarafından kimyasal maddelerin karsinogenik risklerinin araştırılmasında tarama testleri olarak kullanılması sonucunu doğurmuştur (89, 135). Genetik toksisite testlerinde alınan pozitif sonuçlar kimyasalın kanser oluşumuna neden olabileceğini göstermektedir (140). Ames testi ve diğer mutajenite testleriyle elde edilen sonuçlara göre bilinen kanserojenlerin yaklaşık % 90 kadarının aynı zamanda mutajenik olduğu buna karşın tüm mutajenlerin potansiyel kanserojen olabileceği bildirilmiştir (25, 84-86).

Dünyada farklı ülkelerdeki değişik kuruluşlar tarafından, United States Environmental Protection Agency (US EPA), Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) ve International Conference on Harmonisation (ICH) gibi genetik toksisite izleme rehberleri yayımlanmıştır (104). Veteriner ilaçların genotoksitesinin değerlendirilmesinde Avrupa Birliği, Japonya ve Amerika tarafından onaylanan ICH rehberi temel alınmaktadır (62, 89).

Tüm bileşiklerin genotoksik etkisinin saptanmasında tek bir testin yeterli olmadığı bu nedenle bileşiklerin genotoksik aktivitesinin belirlenmesinde 3 aşamadan oluşan standart test sisteminin uygulanması önerilmektedir (60, 62, 89, 104, 129). Standart test sistemi şu aşamalardan oluşmaktadır: (22, 128)

- a) Bakterilerde gen mutasyon testi
- b) Kromozomal hasarın sitogenetik değerlendirilmesinde memeli hücreleri kullanılarak yapılan *in vitro* testler veya *in vitro* fare lenfoma timidin kinaz gen mutasyon testi

c) *İn vivo* sitogenetik testler

Bakteriyel mutasyon testleri genetik değişiklerin ve özellikle genotoksik rodent karsinojenlerin belirlenmesinde uygundur. Bakterilerde yeterince ölçülemeyen ve memeli hücreleriyle ilişkili olduğu düşünölen genetik hasarların belirlenmesinde memeli hücreleri kullanılmaktadır. Bu amaçla büyük kromozomal hasarları tespit eden (yapısal ve sayısal kromozomal bozukluklar için *in vitro* testler), primer gen mutasyonlarını tespit eden, gen mutasyonları ve klastojenik etkileri saptayan (fare lenfoma tk testi) birçok memeli hücre sistemi geliştirilmiştir. Bileşigin genotoksik aktivitesini etkileyebilecek emilim, dağılım metabolizması ve atılım gibi faktörlerin değerlendirilmesini sağlamak amacıyla test sisteminde *in vivo* testler de yer almaktadır. Standart test sistemi sadece anöploidiyi tespit eden ayrı bir test içermemektedir. Buna ilişkin bilgi *in vitro* ve *in vivo* mikronökleus testi gibi kromozomal hasarı saptayan testlerden elde edilmektedir. Mitotik indeks, poliploidi indüksiyonu ve mikronökleus değerlerinde meydana gelen artış anöploidiye ilişkin bilgiler sağlamaktadır. Anöploidiye neden olan ajanların fare lenfoma tk testi ile de saptanabileceğine dair deneysel kanıtlar bulunmaktadır (22, 60).

3 aşamalı standart genotoksisite test sisteminde negatif sonuç veren buna karşın genotoksik olmayan mekanizmalarla birlikte karsinojenite testlerinde etkileri görölen bileşiklerin etki mekanizmalarını ortaya koymak amacıyla metabolik aktivasyon içeren *in vitro* testlerin veya tümör oluşın hedef dokularda genetik hasarı ölçen karaciğer UDS testi veya ³²P-postlabelling gibi *in vivo* testlerin ilaveten yapılabileceği bildirilmiştir (60, 104).

2.4.4.1 Bakteriyel Ters (Reverse) Mutasyon Testi

Kimyasal maddelerin mutajenik ve karsinojenik etkilerinin araştırılmasında öncelikle ve en yaygın olarak kullanılan kısa zamanlı test sistemlerinden bakteriyel genotoksisite testi, 1971 yılında Bruce Ames tarafından geliştirilen Ames testi olarak da adlandırılan Salmonella/mikrozom mutajenite testidir (90).

Bakteriyel ters mutasyon testi hızlı, ucuz ve uygulanabilirliği kolay bir testtir. Bileşiklerin genotoksik aktivitesinin saptanmasında; özellikle insanlarda ve deney hayvanlarında tümör oluşumunda somatik hücrelerin tümör baskılayıcı genlerinde meydana gelen nokta mutasyonların saptanmasında kullanılmaktadır (30, 95, 103).

Bakteriyel ters mutasyon testi, gelişimleri için sırasıyla histidin ve triptofan gibi aminoasitlere ihtiyacı olan *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli* suşlarının kullanılarak bir veya birkaç DNA baz çiftindeki baz eklenmesi, baz çıkması veya baz değişimi gibi nokta mutasyonların saptanmasını sağlayan bir testtir. Bu test; mutant bakteri suşlarında ikinci bir mutasyon oluşumunu saptamaktadır. İkinci kez mutasyon geçirmiş mutant bakteriler esansiyel aminoasit sentezleme yeteneklerini tekrar geri kazanarak esansiyel aminoasitlerin olmadığı ortamda da gelişimlerine devam ederler **(30, 90, 95, 103)**.

Ames testinde *S. typhimurium*'un LT2 suşundan *in vitro* mutasyonlarla elde edilmiş, hedef histidin genlerinin guanin-sitozin bölgesindeki değişiklikleri saptayan, DNA onarım mekanizmasından yoksun ve üreyebilmeleri için eksojen kaynaklı histidine ihtiyaç duyan TA1535, TA1537, TA97, TA98, TA100 mutant suşları ve adenin-timin bölgesindeki nokta mutasyonları saptayan TA 102 mutant suşu ve hisG genlerinde meydana gelen mutasyonları saptayan ve üreyebilmeleri için triptofana ihtiyaç duyan *E. coli*'nin WP2 *uvrA* veya Wp2 *uvrA* pKM101 mutant suşları kullanılmaktadır **(30, 61, 103)**. Test bileşiğine maruz bırakılan bu mutant suşlarda oluşan mutasyon sonucu bakteriler tekrar aminoasit sentezleme yeteneklerini geri kazanırlar **(30, 103)**.

Test suşlarının, histidinsiz ve triptofansız ortamda üreyebilmelerine yol açan kendiliğinden geriye dönüş, mutajenite deneylerinde rutin olarak ölçülüp ve her plakta kendiliğinden geriye dönen bakteri sayısı olarak ifade edilir **(30, 90, 103)**. Salmonella/mikrozom test sisteminde geriye dönen (revertant) koloni sayısındaki artış testin pozitif olarak değerlendirilmesini sağlamaktadır **(30, 86, 90, 103)**. Lizozimlerden endonükleaz salınımına bağlı olarak meydana gelen apoptozis gibi olaylar genotoksisite ile ilişkili olmayıp sitotoksik etkiden kaynaklanan testin yanlış değerlendirilmesine neden olmaktadır **(28)**.

Salmonella/mikrozom test sistemine daha sonra; Aroclor 1254 gibi enzim indükleyici ajanlar uygulanmış ratların karaciğerinden hazırlanan karaciğer homojenatının 9000 g'de santrifüj edilmesinden dolayı S9 adı verilen metabolik aktivasyon sistemi eklenerek memelilerdeki biyotransformasyon olaylarının benzeri sağlanmaya çalışılmıştır **(90, 140)**.

Bakterilere karşı toksisiteleri yüksek olan bazı antibiyotiklerin ve memeli hücrelerinin spesifik sistemleriyle etkileşime giren topoizomera inhibitörleri veya nükleozid analogları gibi bileşiklerin bakteriyel test sistemleri ile test edilmeleri uygun değildir (30, 62, 104). DNA veya kromozomların protein yapıdaki kısımları ile etkileşime girmeyen buna karşın hücre bölünmesi sırasında kromozomların ayrılmasını sağlayan iğ iplikçiklerinin oluşumunda rol oynayan proteinlerle etkileşime giren bileşikler de bakteriyel mutajenite testleri ile saptanamamaktadır (38). Ayrıca üretan gibi bazı karsinojenlerin genotoksik olmayan mekanizmalarla etki göstermesi yada metabolik aktivasyonun yetersiz olması nedeniyle bu testle saptanamadıkları bildirilmiştir (30, 85, 103). Bu durumda 2 farklı hücre tipi ve gen mutasyonu, kromozomal hasar gibi 2 farklı değerlendirme kriteri içeren *in vitro* memeli hücre testinin uygulanması gerektiği bildirilmiştir (62, 104).

Karsinojenler ile test arasındaki korrelasyon kesin olmamakla birlikte daha önceki çalışmalarda mutajen aktivite göstermeyen birçok prokarsinojenin, test sisteminin metabolik aktivasyonu sonucu pozitif sonuç verdiği bildirilmiştir (30, 85, 103). Ames testinde pozitif sonuç veren mutajenlerin % 90'ının karsinojenik etkiye, test edilen karsinojenlerin % 89'unun da mutajenik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (85, 140).

2.4.4.2. Memeli Hücre Kültürü Testleri

Bileşiklerin mutajenik potansiyelleri değerlendirilirken memeli hücrelerindeki mutajenik etkilerinin de araştırılması gerekmektedir. Avrupa Birliği bu amaçla metafaz analizini kullanarak klastojenite ve anöploidiyi birlikte saptayan *in vitro* sitogenetik testleri, Amerika hem gen mutasyonu hemde kromozomal hasarı saptayan fare lenfoma testini, Japonya ise her iki testi kullanmayı tercih etmektedir (62).

In vitro testler, metabolik aktivasyon sistemi varlığında ve yokluğunda uygulanmaktadır. En çok kullanılan metabolik aktivasyon sistemi Aroclor 1254 enzim indükleyici ajanı uygulanmış ratların karaciğerinden hazırlanan S9 karışımıdır (62).

2.4.4.2.1. *In vitro* Memeli Kromozom Aberasyon Testi

In vitro kromozom aberasyon testinin amacı memeli hücre kültürlerinde yapısal kromozom aberasyonlarına neden olan ajanları saptamaktır. Yapısal kromozomal bozukluklar kromozom ve kromatid olmak üzere 2 tiptir. Birçok kimyasal mutajen

kromatid tip aberasyona neden olmakla birlikte kromozom tip aberasyonlarda meydana gelebilmektedir. Direk DNA hasarına yol açmayan mekanizmalarla etki gösteren kanserojen maddeler bu testle saptanamamaktadır (31, 96).

Hücreler mitoz bölünme geçirerek çoğalmaktadırlar ve hücre kültürü çalışmalarında öncelikli olarak hücrelerin normal hücre siklus süresi bilinmesi gerekmektedir. Kültüre edilen memeli hücrelerindeki hücre siklusunun süresi değişkenlik göstermekle birlikte genellikle 24 saat, farelerde ise bu süre yaklaşık 12 saattir. Memelilerde mitoz bölünme 20 dakika-1 saat kadar sürmektedir. Buna karşılık DNA replikasyonu 6-9 saat kadardır. İnterfaz, bölünme siklusunda bir dönemdir. Hücre mitoz başlağığı zaman her bir DNA molekülü kendi kendini replike eder yada kendinin tam bir kopyasını yapar. Bu kopyalama işlemi sonunda bir kromozom, kromatid denen iki işlevsel özdeş dal oluşturur ve her ikisi sentromerde birleşir. Bu basamakta kromozomlar çok incelmıştır ve ışık mikroskopunda kromatin parçacıkları olarak gözükmemektedirler. Hücre mitoz bölünmeye hazırlanmaktadır. Bir mitoz bölünmeden sonra dinlenme halindeki hücre G₁, S ve G₂ evrelerinden geçerek interfaz dönemini tamamlamaktadır. G₁ dönemi yaklaşık 10 saat kadar sürmektedir. Hücre RNA ve protein sentezi yapar, fakat DNA sentezi yoktur. Bu evrede DNA sentezi için hazırlıklar yapılmaktadır. S dönemi, DNA replikasyonunun başlağığı dönemdir ve DNA miktarı G₁ dönemindeki 2 katına çıkar. Her kromozom kendi özel yapısına uygun örnekte DNA sentezi yapar. G₂ dönemi ise 4 saat kadar sürmektedir. Bu dönemde DNA sentezi durur buna karşın RNA ve protein sentezi devam etmektedir. Bu 3 evre tamamlandıktan sonra hücre profaz, metafaz, anafaz ve telofazdan oluşan mitoz bölünmeye girmektedir. Profazda çekirdek zarı kaybolur, sentrioller ikiye bölünerek hücrenin karşılıklı uçlarına çekilirler ve kromozomlar iğ ipliklerine sentromerleriyle tutunarak mitotik merkezi oluştururlar. Metafazda, yavru kromatidler sentromerlere tutunurlar ve hücre merkezine hareket ederler. Anafaz başlağığında sentromerleriyle iğ ipliklerine tutunmuş olan 2 yavru kromatid karşılıklı kutuplara hareket ederler. Telofazda ise karşı kutuplara yerleşen kromatidlerin çevresi çekirdek zarıyla örtölmeye başlar ve sitokinez adı verilen sitoplazma bölünmesi meydana gelmesiyle birlikte 2 yavru hücre oluşur (11).

İn vitro memeli kromozom aberasyon testinde hücrelerin mitoz bölünme geçirmesini sağlayan fitohemaglutinin (PHA) gibi mitojen maddeler içeren metabolik aktivasyonlu ve aktivasyonsuz Chinese Hamster fibroblast, memeli periferik kan

lenfosit gibi hücre kültürleri 37 °C’de 48 saat süreyle inkübe edilir. İnkübasyondan sonra kültürler 3-6 saat süreyle test bileşiğine maruz bırakılır ve uygulamanın başlangıcından itibaren 1,5 hücre siklusu süresi geçtikten sonra kültürler hasat edilir. Kültürler hasat edilmeden genellikle 1-3 saat önce hücre bölünmesini metafaz aşamasında durduran kolşisin gibi bileşikler uygulanır. Hasat aşamasında kromozomlar hipotonik solüsyona maruz bırakılır, fikse edilir ve lamaların üzerine damlatılarak preparatlar hazırlanır, boyanır ve metafaz hücreleri mikroskop altında kromozomal aberasyonlar yönünden incelenir. Bu prosedürden negatif sonuç alındığı takdirde 1,5 hücre siklusu olan süre daha uzun tutulmaktadır (31, 96).

Her grupta en az 200 metafaz analiz edilerek kromozom aberasyon tipleri ve her bir kültürde 100 metafaz hücresi sayılarak poliploid metafaz hücrelerinin frekansı saptanır. Poliploidi hücrelerinin sayısındaki artış test bileşiğinin mitoz bölünmeyi inhibe etme ve sayısal kromozom aberasyonları indüklemeye gücüne sahip olduğunu, endoreduplicated kromozomlu hücrelerin sayısındaki artış yani DNA replikasyonun gerçekleştiği S periyodundan sonra hücrenin mitozla girmeyip başka bir S periyoduna başlaması sonucu 4,8,16,... kromatide sahip olan hücreler ise test bileşiğinin hücre siklusu ilerleyişini inhibe etme gücüne sahip olabileceğine işaret etmektedir (31, 96).

2.4.4.2.2. İn vitro Mikronükleus Testi

Mikronükleus testleri, klastojenik ve anöjenik etkili bileşikler tarafından oluşturulan kromozomal hasarların değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan standart genotoksisite test sistemi içerisinde yer alan *in vivo* ve *in vitro* testlerdir (70, 100, 124). Mikronükleuslar, fiziksel ve kimyasal mutajenlere maruz kalan hücrelerde mitoz bölünmenin anafaz evresinde kromozomların geri kalmalarından yada kromozom parçacıklarından köken almaktadırlar (1, 41, 69). Kemik iliği ve periferik kan eritrositlerinde mikronükleus indeksi genetik toksikoloji araştırmalarında kullanılan standart sitogenetik testlerden biri olmuştur (40).

In vitro mikronükleus testinin genotoksisite test sistemi içerisinde yer alan kromozom aberasyon testi veya fare lenfoma testine alternatif olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (80). Testin amacı interfaz hücrelerinin sitoplazmasında mikronükleus gibi kromozom parçacıklarının oluşumuna neden olan bileşiklerin saptanmasına yöneliktir (100). Fenech ve ark.’ları tarafından geliştirilen Sitokinezis Blok Mikronükleus Testi (CBMN) lenfositlerin mikronükleus analizlerinde küf mantarlarının metabolitlerinden

biri olan Sitokalazin-B' nin (Cyt-B) kullanılmasıyla sitokinezi yani hücre bölünmesi sırasında sitoplazmanın bölünmesini bloke ederek aynı sitoplazma içinde kardeş çekirdeklerin oluşmasını sağlayan ve bir hücre siklusunu tamamlayan hücrelerin binükleer görünümleriyle ayırt edilmesine olanak sağlayan modifiye edilmiş *in vitro* mikronükleus testidir (1, 40, 41, 100). CBMN testi ile interfaz hücrelerinin sadece mikronükleus içerip içermediği saptanarak metafaz hücrelerindeki kromozom aberasyonlarından çok daha objektif şekilde değerlendirilebilmekte ve daha hızlı sayılabilmektedir (100). Ayrıca bütün halde kromozom şeklinde mikronüklei oluşumuna neden olan ve kromozomal aberasyon testleriyle çalışılması güç olan anöploidiyi indükleyici ajanlar bu testle kolaylıkla saptanabilmektedir (1, 80, 100). Yapılan çalışmalar sonucu fare lenfoma testinde negatif sonuç veren birçok bileşiğin *in vitro* mikronükleus testinde pozitif sonuç verdiği saptanmıştır ve buradan hareketle *in vitro* mikronükleus testinin fare lenfoma testine göre daha duyarlı bir test olduğu bildirilmiştir (80).

Hücre bölünmesinin interfaz aşamasındaki hücrelerinde mikronükleus oluşumuna neden olan kromozomal hasarın meydana gelebilmesi için eksojen kaynaklı metabolik aktivasyonlu veya aktivasyonsuz Chinese Hamster fibroblast, memeli periferik kan lenfosit gibi hücre kültürlerine hücrelerin mitoz bölünme geçirmesini sağlayan fitohemaglutinin gibi mitojen maddeler eklenir ve 37 °C'de inkübasyona bırakılır (1, 69). PHA ile stimülasyondan 24 saat sonra kültürler test bileşiğine 20 saat süreyle maruz bırakılır. Maruz kalmayı takiben ilk mitozdan en az 6 saat önce yani 44. saatte sitoplazmanın bölünmesini durdurmak ve en az % 50 oranında binükleer hücre elde etmek amacıyla her bir test kültürüne yaklaşık 3-6 µg/ml Cyt-B eklenir. Başlangıçtan 72 saat sonra kültürler hasat edilir, preparatlar hazırlanır, boyanır ve hücre bölünmesini tamamlamış binükleer hücreler ışık yada floresans mikroskobu altında mikronükleus yönünden incelenir. Mikronükleusu belirleyen kriterler; esas çekirdekle bağlantılı olmayıp keskin sınırlara sahip olması, esas çekirdeğin 1/3-1/6 çapta olması ve çekirdekle benzer yoğunlukta boyalı olmasıdır (40, 69). Mikronükleus içeren binükleer hücrelerin insidensini saptamak amacıyla her bir kültürden hazırlanan preparatlarda en az 1000 binükleer hücre sayılmaktadır (1, 69, 100). Doza bağlı olarak uygulama yapılan test gruplarında mikronükleus içeren hücre sayısında istatistiksel yönden önemli bir artış meydana gelmesi testin pozitif olarak değerlendirilmesini sağlamaktadır. *İn vitro* mikronükleus testinden elde edilen pozitif sonuçlar test bileşiğinin memeli somatik

hücre kültürlerinde kromozom hasarına veya hücre bölünme aparatında hasara yol açtığına işaret etmektedir (100).

2.4.2.2.3. Fare Lenfoma Testi

Fare lenfoma testi en çok kullanılan *in vitro* memeli mutasyon testleri arasında yer almaktadır (89). Fare lenfoma testi; L5178Y fare lenfoma hücrelerinin timidin kinaz (TK) lokusundaki veya insan lenfoblastoid TK6 hücrelerinin yada Chinese hamster hücre serisinin (CHO, AS52 ve V79 hücrelerinin) hipoksantin guanin fosforibosil transferaz (HPRT) lokusundaki veya ksantin guanin fosforibosil transferaz (XPRT) lokusundaki gen mutasyonunun aynı zamanda değişik boyutlarda meydana gelen kromozomal bozukluklarında (delesyon, translokasyon, mitotik rekombinasyon ve anöploidi) saptanmasını sağlayan bir testtir (89, 104). TK lokusu nokta mutasyon, delesyon, translokasyon ve rekombinasyon mutasyonlarını, HPRT ve XPRT lokusları ise büyük çapta meydana gelen kromozom delesyonlarının saptanmasına duyarlıdır (60, 101). TK ve XPRT genlerinin otozomal kromozomlarda yer alması, X kromozomunda yer alan HPRT lokusunda saptanamayan kromozomal exchange gibi genetik değişikliklerin saptanmasına olanak sağlamaktadır (104).

TK^{+/-} ve TK^{-/-} lokuslarında meydana gelen mutasyon sonucu timidin kinazdan yoksun olan mutant hücreler pirimidin analogu olan triflorotimidinin (TFT) sitostatik etkilerine karşı dirençlidirler. Timidin kinaza sahip olan hücreler, hücresel metabolizmayı inhibe eden ve hücre bölünmesini durduran TFT'ye karşı duyarlıdır. Mutant hücreler TFT varlığında çoğalırlarken normal hücreler çoğalamamaktadır (101).

Test bileşiği 3-4 saat süreyle metabolik aktivasyonlu veya aktivasyonsuz fare lenfoma hücre kültürü ortamına maruz bırakılır. Metabolik aktivasyonsuz kısa süreli uygulamalarda negatif sonuç edildiği takdirde metabolik aktivasyonsuz ortamda uygulama yaklaşık 24 saat süre daha devam etmesi sağlanır. Uygulamayı takiben hücreler mutant seleksiyondan önce fenotipik ekspresyon amacıyla kültüre edilir. Mutant hücrelerin oranını saptamak amacıyla test bileşiğine maruz kalan hücre kültüründen elde edilen sayısı bilinen hücreler TFT içeren medyuma ekilir. Uygun inkübasyon süresinden sonra koloniler sayılır. Mutant frekansı TFT içeren medyumdaki mutant koloni sayısı hesaplanarak saptanır. Mutant kolonilerin büyüklüğü test bileşiğinin nokta mutasyon veya kromozomal hasar oluşturduğuna dair bilgiler

vermektedir. Kromozomal bozukluklar sonucu küçük çapta mutant koloniler, gen mutasyonları sonucu ise büyük çapta mutant koloniler oluşmaktadır (101).

2.4.4.2.4. İn vitro Kardeş Kromatid Değişim Testi (Sister Chromatid Exchange Assay)

Kardeş kromatid değişimleri, tek bir kromozomu oluşturan iki kromatid kolunda meydana gelen kırılımı takiben kırılan bu parçalarının karşılıklı değişim yapmasıdır. Kardeş kromatid değişim testi (SCE) ise, bu değişime neden olan özellikle DNA eklentileri oluşturan veya DNA replikasyonu ile etkileşime giren mutajen bileşikler saptamaktadır. Kardeş kromatid değişimleri nokta mutasyonların indüksiyonu, gen amplifikasyonu ve sitotoksite ile ilişkilidir (29).

Mitojen madde eklenmiş rodent veya insan lenfosit hücre kültürleri 24-30 saat sonra test bileşiğine maruz bırakılır. Daha sonra kültürler kromatidlerin kolayca boyanarak birbirinden ayırt edilmesini sağlayan bromodeoksiuridin (BrdU) eklenir. İki hücre siklusu süresi geçtikten sonra kültürler hasat edilir ve hasat edilmeden 2 saat önce hücre bölünmesini metafaz aşamasında durduran kolşisin uygulanır. Hasat yapılır, kromozom preparatları hazırlanır ve metafaz hücreleri SCE yönünden incelenir. Kardeş kromatid değişimi meydana gelen kollardaki kısımlar daha açık renkte boya almaktadır. Kardeş kromatid değişimi sayısında istatistiksel yönden önemli bir artış meydana gelmesi testin pozitif olarak değerlendirilmesini sağlamaktadır. Testten pozitif sonuç alınması, test bileşiğinin memeli somatik hücre kültürlerinde karşılıklı kromatid değişimine neden olduğuna işaret etmektedir (29).

2.4.4.2.5. Memeli Hücre Kültürlerinde Unscheduled (Düzensiz) DNA Sentez Testi

Memeli hücre kültürlerinde unscheduled DNA sentezi (UDS) testi kimyasallar, radyasyon ve virüsler gibi birçok farklı ajan tarafından indüklenen DNA hasarının onarımını ölçmektedir. UDS hem *in vitro* hemde *in vivo* sistemlerde ölçülebilmektedir. Memeli hücre kültürlerinde UDS tritium ile işaretlenmiş timidinin (^3H -TdR) hücre siklusunun S fazında olmayan hücrelerin DNA'sı ile birleşmesidir (36).

Rodent hepatositlerinden oluşan primer memeli hücre kültürleri test bileşiğine maruz bırakılır ve S fazında olmayan hücrelerin DNA'sı ile birleşen ^3H -TdR alımı ile UDS ölçülür. Ayrıca hücreler tarafından ^3H -TdR alımı otoradyografi veya uygulama yapılmış hücrelerin DNA'sının sıvı skintilasyon sayımı (liquid scintillation counting LSC) ile saptanabilmektedir. Otoradyografi yönteminde hücreler ^3H -TdR içeren

kültürde test bileşiğine maruz bırakılırlar. Uygulama süresi sonunda hücreler fikse edilir, otoradyografik emülsiyona daldırıldıktan sonra 4 °C'ye kaldırılır. Bekleme süresi sonunda hücreler boyanır ve işaretli çekirdekler manuel veya elektronik sayıcı ile sayılır. LSC saptanmasında ise karışık hücre kültürleri test bileşiğine maruz bırakılır. Uygulama süresi sonunda uygulama yapılmış hücrelerden DNA ekstrakte edilir. Toplam DNA içeriği ve $^3\text{H-TdR}$ ile birleşme derecesi sintilasyon sayımıyla saptanır (36).

Uygulama yapılmış hücrelerde $^3\text{H-TdR}$ ile birleşmede istatistiksel yönden önemli bir artış meydana gelmesi testin pozitif olarak değerlendirilmesini sağlamaktadır. UDS testindeki pozitif sonuçlar, test bileşiğinin memeli somatik hücre kültürlerinde DNA hasarına neden olabileceğine işaret etmektedir (36).

2.4.4.3. *In vivo* Testler

Potansiyel genotoksik karsinojenleri ve mutajenleri belirlemede *in vitro* testlerin yararlı olduğuna dair genel bir görüş bulunmasına rağmen, zararlıları belirleme uzman çalışma grubu (Expert working group on hazard identification) tarafından test edilen ajanlara ilişkin *in vitro* testlerden elde edilen bulguların insanlar için karsinojenik veya karsinojenik bir risk taşımadığını ve kanser riski araştırmalarının sadece *in vitro* bulgulara dayanılarak yapılmaması gerektiği bildirilmiştir (128).

In vitro testlerde metabolik aktivasyon kaybından ortaya çıkabilecek hatalı yada çelişkili sonuçların ortadan kaldırılması amacıyla *in vivo* testlerin de uygulanması gerekmektedir. Ancak *in vivo* testler test edilen bileşiklerin veya metabolitlerin her zaman hedef dokuya ulaşamaması gibi dezavantajlara sahiptir (57).

2.4.4.3.1. Memeli Kemik İliği Kromozom Aberasyon Testi

Memeli *in vivo* kromozom aberasyon testi genellikle rodentlerin kemik iliği hücrelerinde test bileşikleri tarafından indüklenen yapısal kromozom aberasyonların saptanması amacıyla kullanılmaktadır. Kromozom aberasyon testi özellikle mutajenik hasarın belirlenmesinde türe ve dokuya göre değişebilen metabolizma, farmakokinetik ve DNA-onarım mekanizmaları gibi *in vivo* faktörlerin değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır (32, 97).

Test prosedürü *in vitro* kromozom aberasyon testi ile benzerlik göstermektedir. Hedef doku olarak vaskülarizasyonu fazla olan ve hızlı sirkülasyona sahip hücre

popülasyonu içeren rodentlerin kemik iliği kullanılmaktadır. Hayvanlar test bileşiği uygulandıktan yaklaşık 12-18 saat (1,5 hücre siklusu geçtikten) sonra öldürülürler. Öldürülmeden yaklaşık 3-5 saat önce hücre bölünmesini metafaz aşamasında durduran kolşisin uygulanır. Kemik iliği hücrelerinden kromozom preparatları *in vitro* kromozom aberasyon testindeki gibi hazırlanır, boyanır ve metafaz hücreleri kromozom aberasyon yönünden incelenir (32, 97).

Sitotoksisteyi ölçmek amacıyla her bir hayvandan en az 1000 hücre sayılarak mitotik indeks belirlenir ve her bir hayvandan 100 metafaz hücresi sayılarak yapısal ve sayısal kromozom aberasyon oranı saptanır. Sonuçların değerlendirilmesi *in vitro* kromozom aberasyon testindeki gibidir (32, 97).

2.4.4.3.2. *İn vivo* Rodent Mikronükleus Testi

In vivo rodent mikronükleus testi, bileşiklerin *in vivo* genotoksitesinin saptanması ve güvenilirliğinin değerlendirilmesi amacıyla düzenleyici kuruluşlar tarafından yapılması önerilen, standart genotoksiste test sistemi içerisinde yer alan ve sıklıkla kullanılan kısa süreli *in vivo* mutajenite testidir (54, 57, 68, 70, 114).

Mikronükleus (mikronuklei) aynı zamanda hematolojik olarak Howell-Jolly cisimcikleri olarak bilinen, hücre bölünmesi sırasında asentrik kromozom parçalarının veya kromozomların hücre bölünmesinin anafaz aşamasında gecikmesi sonucu kardeş hücre çekirdeği ile birleşemeyen, sitoplazmik kromatin içeren kromozom parçacıklarıdır (34, 57, 70, 81, 102). Mitotik merkezde fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak şekillenen anafazda geri kalma, anafaz gecikmesi veya anaphase lagging olarak adlandırılan bu durum sonucu normal olarak uzunlamasına bölünerek kutuplara çekilmekte olan kromozomlardan biri anafazda geri kalır. Geri kalan bu kromozom ya özdeşinin bulunduğu kromozom grubuna katılır yada bölünme sırasında ortadan kaybolur (11, 70, 72). Kromozom kırılmaları, yapısal kromozom anomalileri veya iç iplikçikleri fonksiyon bozuklukları mikronükleus oluşumuna neden olmaktadır ve mikronükleus insidensi bu tip kromozomal hasarların saptanmasında kullanılan bir parametredir (57, 70). Mikronükleus oluşumundaki muhtemel mekanizma hücre siklusunun G₂ fazında kromozomların yoğunlaşması ve anafazda kromatidlerin ayrılmasını içermektedir. Bu mekanizmalarda meydana gelen bir bozukluk ya da aksaklık, mitoz bölünmede kromatin köprülerinin oluşmasına neden olarak kromatidlerin ayrılmasının tamamlanamaması dolayısıyla anöloid hücrelerin oluşumu ile sonuçlanmaktadır (59,

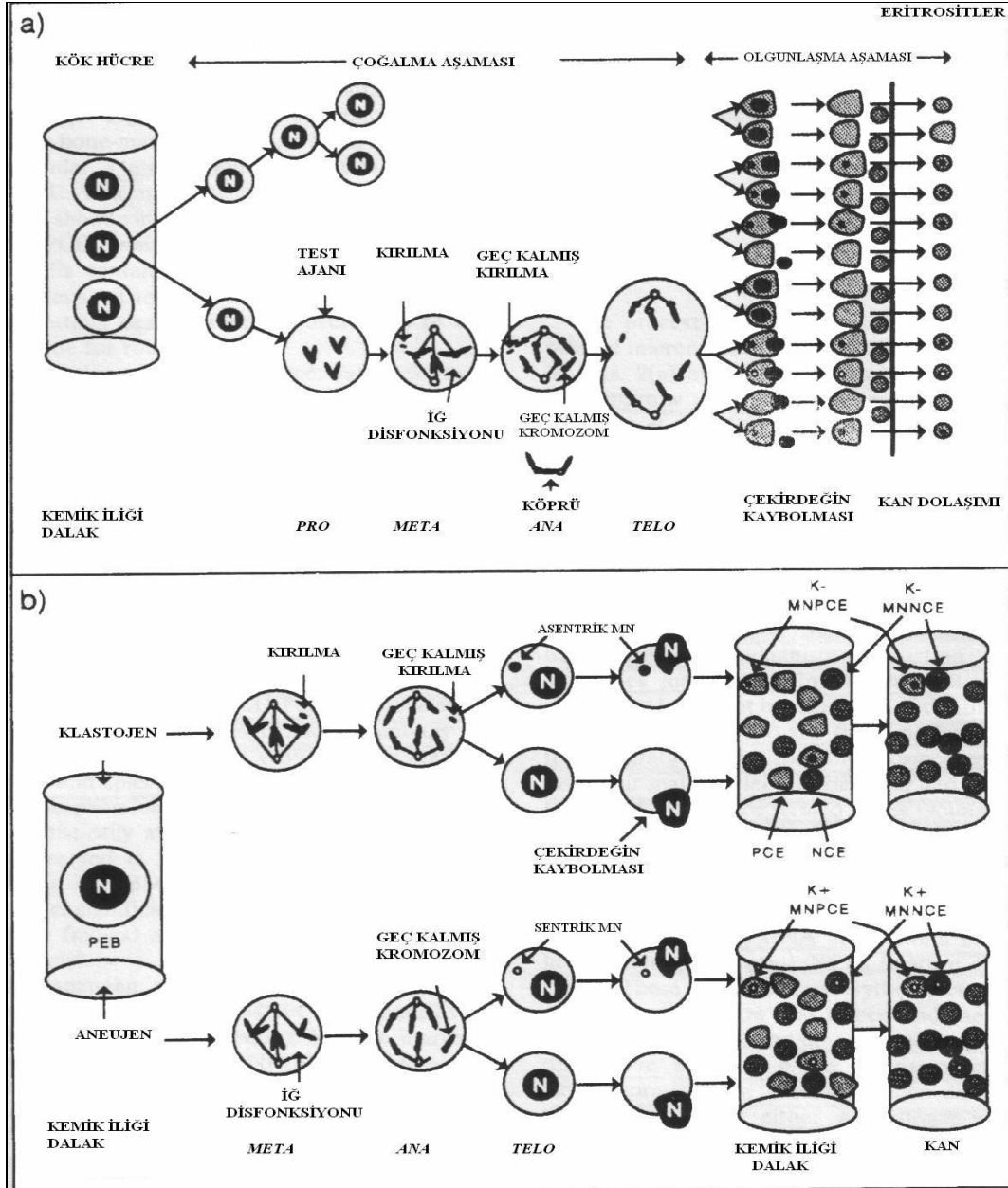
124). Kromozomlarda kırılma oluşturan klastojen ajanların ve anöploidizasyona neden olan anöjenlerin saptanmasını sağlayan *in vivo* mikronükleus testi kromozom aberasyon testine göre daha hızlı ve kolay uygulanabilme avantajına sahiptir **(81, 98, 102).**

En sıklıkla kullanılan *in vivo* mikronükleus testi, memeli eritrosit mikronükleus testidir. Bu test genellikle rodentlerin kemik iliğinde ve/veya periferik kan hücrelerindeki eritrositlerin analizi yapılarak, test edilen bileşiğin kromozom veya kromozomların iç ipliklerine sentromerleri ile tutunarak oluşturdukları eritroblastların mitotik merkezinde hasar oluşturup oluşturmadığının saptanmasında kullanılır. Mikronükleus testinin amacı sitogenetik hasar sonucu kromozom parçacıkları veya bütün haldeki kromozomlardan oluşan mikronükleus oluşumuna neden olan maddeleri saptamaktır. Memeli *in vivo* mikronükleus testi, *in vitro* test sistemlerinden elde edilen mutajenik etkinin daha detaylı araştırılmasına ve bileşiğin *in vivo* metabolizması, farmakokinetiği ve DNA onarım prosesleri gibi faktörlerin değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Test edilen bileşiklerin veya metabolitlerinin hedef dokuya ulaşmadığı durumlarda testin kullanımı uygun değildir **(98, 102).**

Eritropoezis (eritrosit yapımı) aşamasında son mitozdan birkaç saat sonra kemik iliğindeki eritroblastlar polikromatik eritrositlere dönüşürken çekirdeklerini kaybederler ve bu sırada meydana gelen kromozomal hasar sitoplazmada mikronükleus oluşumuna neden olmaktadır **(107, 134).** Mikronükleus içeren tam olarak olgunlaşmamış (polikromatik) eritrosit sayısındaki artış kromozomal hasarın veya anafaz gecikmesi sonucu meydana gelen sitogenetik hasarın bir göstergesidir **(34, 57, 81, 98, 102).** Mikronükleus oluşum mekanizması Şekil 2.5'te gösterilmiştir **(72).**

Rodentlerin kemik iliği, polikromatik eritrositlerin üretim yeri olmasından dolayı rutin olarak kullanılmasının yanı sıra son yıllarda çevre kirleticilerinin ve mutajenlerinin genotoksisitelerinin değerlendirilmesinde balıkların periferik kanı da kullanılmaktadır **(49).** Ayrıca dalağın mikronükleus içeren eritrositleri yok edemediği türlerde periferik kanda mikronükleus içeren olgunlaşmamış eritrositlerin sayılması ve bileşiğin uygulanma süresi eritrositlerin yaşam süresinden (farelerde 4 hafta) uzun olduğu durumlarda periferik kanda olgunlaşmış (normokromatik) eritrositler içerisinde mikronüklei sayılması yapısal ve sayısal kromozomal bozukluklara neden olan bileşiklerin saptanmasında duyarlı bir yol olarak belirlenmiştir **(56, 84, 98, 102, 134).** Polikromatik eritrositler henüz gelişme aşamasında olmaları, nükleusun

kaybolmasından sonra yaklaşık 2 gün süreyle hücrede kalan RNA ve ribozom içermeleri ve bazofilik özellikleri nedeniyle mavimsi renge boyanarak, asidofilik yapıda olan ve turuncu-pembe renkte olan normokromatik eritrositlerden ayrılırlar (56, 57, 81, 84, 98, 102, 134).



N: Çekirdek PEB: proeritroblast MN: mikronükleus, K: Kinetokor

Şekil 2.5. a) *In vivo* eritropoezis şeması b) Polikromatik ve normokromatik eritrositler içerisinde mikronükleus oluşum mekanizması (72)

Testin prensibi: Hayvanlar test edilecek bileşiğe akut yada kronik olarak uygun yolla maruz kalırlar. Kemik iliği kullanılacaksa, hayvanlar uygulamadan sonraki uygun saatlerde öldürülerek kemik ilikleri ekstrakte edilir ve preparatlar hazırlanarak boyanır. Periferik kan kullanılacaksa, uygulamadan sonraki uygun saatlerde kan alınır, sürme preparat hazırlanarak boyanır. Preparatlar mikronüklei varlığı yönünden analiz edilir (34, 81, 98, 102).

Testin amacı: Mikronükleus testinin amacı, genellikle rodentlerin kemik iliği hemapoitik hücrelerinde klastojenisite veya anöjenisite sonucu mikronüklei oluşumuna neden olan test bileşiklerini saptamaktır (70).

Hayvan türü seçimi: Rutin olarak fare ve sıçan kullanılmaktadır. Kemik iliği kullanılacaksa herhangi bir memeli türü kullanılabilir (28). Uygun türün seçimi toksikolojik çalışmalar ile ortaya konmalıdır. Periferik kan kullanılacaksa fare kullanımı yada dalağın mikronükleus içeren eritrositleri yok edemediği türler önerilmektedir. Seçilen memeli türü yapısal ve sayısal kromozomal bozuklukları saptamada yeterli duyarlılığı göstermelidir. Genellikle genç ve sağlıklı laboratuvar hayvanları kullanılmaktadır. Çalışmanın başlangıcında hayvanlar arasındaki ağırlık farklılığı en az olmalıdır ve her cinsiyetteki hayvanın ağırlığı ortalama ağırlığın $\pm 20\%$ 'sini geçmemelidir. Fare ve sıçanlarda her bir uygulama ve kontrol grubu her bir cinsiyetten en az 5 hayvan içermelidir. Aynı türden ve aynı uygulama yoluna maruz kalan hayvanlarda yapılan çalışmalar toksisite yönünden cinsiyetler arasında herhangi bir farklılığın olmadığını ortaya koyuyorsa, testin tek bir cinsiyette yapılması yeterlidir (56, 81, 98, 102). Mikronükleus indüksiyonu açısından genellikle erkek farelerin dişi farelere oranla daha duyarlı oldukları, cinsiyetler arasındaki bu farklılığın kalitatif değil kantitatif olduğu bildirilmiştir. Dişi ve erkek rodentler arasında toksisite ve metabolizma açısından herhangi bir farklılık yoksa sadece erkek rodentlerin kullanılmasının yeterli olabileceği belirtilmiştir (28, 61, 126).

Çözücü/Taşıt madde seçimi: Çözücü/taşıt madde kullanılan dozlarda toksik etki oluşturmamalıdır ve test maddesi ile etkileşime girmemelidir. Çözücü/taşıt madde genel olarak kullanılanlardan farklıysa, bunların test maddesi ve hayvanlarla geçimli olduğunu destekleyen bilgiler olmalıdır (98, 102). Çözücü olarak parenteral uygulamalar için genellikle izotonik tuzlu su, oral yolla uygulamalar için su veya izotonik tuzlu su kullanılması önerilmektedir. Bunun yanı sıra farelerde yapılan

çalışmalarda dimetilsülfoksitin birçok madde için etkili bir çözücü olduğu ve sıklıkla kullanıldığı bildirilmiştir (81).

Kontrol: Pozitif ve negatif kontrol grupları bulunmalıdır. Testte her iki cinsiyetten de hayvan kullanılmışsa her cinsiyetin pozitif ve negatif kontrol grubu bulunmalıdır. Pozitif kontrol grubu maruz kalma düzeylerinde saptanabilir düzeyde mikronuklei oluşturmalı ve istatistiksel yönden mikronuklei sayısında önemli artışa neden olmalıdır. Negatif kontrol grubundaki hayvanlara test maddesinin özündürüldüğü çözücü/taşıt madde uygulanır. Pozitif kontrol grubuna genellikle uygulanan bileşikler Etil methansülfonat, Etil nitrosoüre, Mitomisin C, Siklofosfamid ve trietilenmelamindir (34, 98, 102).

Doz düzeyleri: Uygulanacak test bileşiğinin dozları hayvanlarda toksisite oluşturmayan doz ile maksimum tolere edilebilen doz aralığında olmalıdır ve en az 3 farklı doz uygulanması gerekmektedir. En yüksek doz ölüm oluşturmadan, kemik iliğinde toksisite belirtileri (örneğin kemik iliğinde veya periferel kanda olgunlaşmamış eritrositlerin sayısının toplam eritrosit sayısına oranındaki düşüş) ve klinik toksisite belirtileri oluşturan maksimum tolere edilebilen doz olarak tanımlanmaktadır (54, 56, 70, 81, 98, 102). Maksimum tolere edilebilen dozu tanımlamak amacıyla letal doz 50 (LD₅₀) kullanılacaksa uygulanacak en yüksek doz LD₅₀'nin %50'sinden düşük olmaması gerekmektedir (84). Ortanca doz en yüksek dozun yarısı, en düşük dozun ise ortanca dozun yarısı şeklinde olması önerilmektedir (70). Pratikte uygulanan en yüksek doz LD₅₀'nin % 50-80'i olmaktadır (57).

Limit test: 14 güne kadar olan uygulamalar için limit doz 2000 mg/kg c.a./gün, 14 günden daha uzun süreli uygulamalar için 1000 mg/kg c.a./gün olarak belirlenmiştir (34, 56, 98, 102).

Dozların uygulanması: Süspansiyon halindeki test bileşiği genellikle mide tüpü kullanılarak gavaj şeklinde veya intraperitoneel enjeksiyon yoluyla uygulanmaktadır. Tek seferde verilecek olan bileşiğin hacmi 2 ml/100 g c.a.'nı geçmemelidir (34, 56, 98, 102).

Uygulama programı: Test edilen bileşikler, son uygulamadan sonra eritroblastların hücre sikluslarının tamamlanması ve çekirdeklerinin kaybolmasından sonra mikronükleus oluşumuna neden olabilirler (81, 84). Mitozun tamamlanıp polikromatik eritrositlerin oluşumuna kadar geçen süre farelerde yaklaşık 6-12 saattir

(57, 84, 115). Birçok bileşiğin uygulamadan sonraki 9-12 saatten önce mikronükleus frekansında önemli bir artışa neden olmadığı saptanmıştır (115). Farelerde polikromatik eritrositlerin kemik iliğindeki ömrünün 12-24 saat arasında olduğu ve mikronuklei içeren polikromatik eritrositlerin kemik iliğinde en az 10-12 saat süreyle kaldığı; bu nedenle ilk uygulamadan sonraki 19-24. saatlerden önce periferik kan örneklerinin alınmasının uygun olmadığı bildirilmiştir (81, 84). Polikromatik eritrositler kana geçerek 12-24 saat içerisinde normokromatik eritrositlere dönüşürler ve normokromatik eritrositlerin kandaki ömrü yaklaşık 1 aydır. Periferik kanda normokromatik eritrositler içindeki mikronükleuslar insan, sıçan gibi bazı türlerde dalak tarafından yok edilememektedir. Bu durum bazı fare ırkları için geçerli değildir. Kronik uygulamalar bu tip farelerde periferik kanda normokromatik eritrosit içinde mikronuklei akümülyasyonuna neden olabilmektedir (84). Yapılan çalışmalarda kemik iliğinde polikromatik eritrositler içerisindeki mikronükleus sayısının genellikle uygulamadan sonraki 24-60 saatler arası pike ulaştığı saptanmıştır (81, 84, 115).

Birçok değişik uygulama programı (1, 2 veya 24 saat aralıkla daha fazla sayıda uygulama) önerilmektedir. Fazla hacimdeki test bileşiğinin uygulanışını kolaylaştırmak veya bileşiğin kandaki düzeyindeki dalgalanmaları en aza indirmek amacıyla bileşiğin dozları bölünerek, doz aralıkları birkaç saatten fazla olmamak koşuluyla aynı günde 2 veya daha fazla sayıda uygulama yapılabilir. Test 2 yolla uygulanabilir. Birincisi hayvanlara test edilecek bileşik bir kez yada uygulama aralığı 24 saatten fazla olmamak koşuluyla 2 kez uygulanır. Son uygulamadan sonraki 24-48 saatler arası kemik ilikleri, 36-72 saatler arası periferik kan örnekleri alınır. İkincisi üç veya daha fazla gün süreli uygulama (örneğin 24 saat aralıklarla 3 veya daha fazla) yapılmışsa son uygulamadan sonraki 24 saati geçmeden kemik iliği örnekleri ve son uygulamadan sonraki 48. saate kadar periferik kan örnekleri alınır (56, 84, 98, 102).

Kemik iliği/kan preparatlarının hazırlanması: Hayvanların öldürülmesini takiben kemik iliği hücreleri genellikle femur veya tibiadan, periferik kan ise kuyruk venasından yada diğer uygun damarlardan elde edilir. Sürme preparatlar hazırlanarak boyama aşamasına geçilir. Giemsa gibi rutin olarak kullanılan boyaların yanı sıra DNA'ya spesifik acridine orange, Hoechst 33258 veya pyronin-Y gibi boyaların kullanılması ile boyamadan kaynaklanan hatalar elimine edilebilir (54, 98, 102).

Analiz: Sitotoksitesiyi değerlendirmek amacıyla her bir hayvanda olgunlaşmamış (polikromatik) eritrosit sayısının toplam (polikromatik+normokromatik) eritrosit sayısına oranı yada polikromatik eritrosit sayısının normokromatik eritrosit sayısına oranı belirlenmektedir. Bu amaçla her bir hayvanın kemik iliği preparatlarında 200 eritrosit, periferel kan preparatlarında 1000 eritrosit sayılır. Araştırmacılar tarafından polikromatik eritrosit sayısının normokromatik eritrosit sayısına oranındaki azalma hedef dokunun test bileşiğine maruz kaldığını ispatlamak amacıyla kullanılmaktadır (12). Polikromatik eritrosit sayısının toplam eritrosit sayısına oranı kontrol grubundaki değerlerin % 20'sinden az olmaması gerektiği; kontrol grubunun kemik iliğindeki polikromatik eritrosit oranının yaklaşık % 50-60, periferel kanındaki oranının ise yaklaşık % 5 olması gerektiği bildirilmiştir (12, 54, 70, 84). Periferel kandaki polikromatik eritrosit oranının % 1'den aşağıya düşmesi kemik iliği toksisitesine işaret etmektedir (54, 70, 84).

Mikronükleus içeren polikromatik eritrositlerin insidensinin saptanması amacıyla her bir hayvanın kemik iliği preparatlarında en az 2000 polikromatik eritrosit sayılmaktadır. Hayvanlara 4 hafta veya daha uzun süreli uygulama yapılmışsa mikronükleus insidensinin saptanması amacıyla her hayvandan hazırlanan preparatlarda en az 2000 normokromatik eritrosit sayılmaktadır (56, 70, 98, 102). Mikronükleuslar genellikle koyu renkte boyanmış, yuvarlak şekilli ve keskin sınırlara sahip polikromatik yada normokromatik eritrositlerin genellikle 1/5-1/20'si büyüklüğündedirler (70, 116).

Işık mikroskopunda mikronükleus içeren hücrelerin sayımının uzun süre alması nedeniyle otomatik sayım yapan akım sitometrisi (flow cytometry) ve görüntü analiz (image analysis) sistemleri geliştirilmiştir (54, 114, 124). Akım sitometrisinde bileşiğin sitotoksitesinin belirlenmesi açısından önemli olan PCE/NCE oranının belirlenememesi ve görüntü analizinde yeterli kalitede preparatların hazırlanamaması dolayısıyla sayısal artifaktlara yol açması bu sistemlerin kullanımını sınırlandıran en büyük dezavantajlar olarak bildirilmiştir (114).

Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması: Doza bağlı olarak uygulama yapılan test gruplarında mikronükleus içeren hücre sayısında istatistiksel yönden önemli bir artış meydana gelmesi testin pozitif olarak değerlendirilmesini sağlamaktadır (56). Testin istatistiksel yönden değerlendirilebilmesi için en az 3 doz grubu, aynı zamanda taşıt kontrol grubu ve pozitif kontrol grubu içermesi, her bir grupta her 2 cinsiyetten en az 4

hayvan bulunması ve her hayvanda 2000 polikromatik eritrosit sayılmış olması gerekmektedir (57, 98, 102). Sonuca ulaşmada sadece istatistiksel farklılığın belirleyici olmaması gerektiği aynı zamanda biyolojik faktörlerinde gözönüne alınarak yorumlanması gerektiği bildirilmiştir. Mikronükleus testinden elde edilen pozitif sonuçlar, test edilen bileşiğin uygulama yapılan hayvanların kemik iliği eritroblastlarında kromozomal hasar veya mitotik merkezinde hasar oluşturması sonucu mikronükleus oluşumuna neden olduğunu göstermektedir (54, 57, 98, 102). Negatif sonuçlar ise test bileşiğinin mikronükleus oluşumuna yol açan kromozomal hasar veya iğ iplikçığı hasarına neden olmadığını göstermektedir. Mikronükleuslarda sentromerlerin varlığını belirlemek dolayısıyla mikronükleusların klastojenik veya anöjenik kaynaklı olduğunun saptanması amacıyla immunofluorescent CREST-boyama ve fluorescence in situ hibridizasyon (FISH) gibi moleküler sitogenetik metodlar geliştirilmiştir (54, 98, 102). Mikronükleusların %70-100'ü sentromerik DNA yani kinetokor içeriyorsa test edilen bileşiğin anöploidiyi indüklediği şeklinde ve genellikle anöjen olarak değerlendirilmektedir (1, 59, 124). Kinetokor içeren mikronükleus sayısının az (% 0-30) olduğu durumlarda kinetokor kaybının yüksek düzeyde olması nedeniyle kromozomlarda kırılmanın mutlaka olduğu kabul edilerek bileşikler genellikle klastojenik olarak değerlendirilmektedir (124).

Mikronükleusların biyolojik önemi: Kromatin kaybı sonucu oluşan mikronükleus, tümör baskılayıcı gen gibi kanser gelişiminde rol oynayan bir gen içeriyorsa meydana gelen bu tip kromozomal hasarlar kanser oluşumu için risk teşkil edebilmektedir (1). Gene-Tox Karsinojenite Çalışma Grubu tarafından, mikronükleus sonuçları ile karsinojenite verileri arasında yapılan karşılaştırmalar sonucunda 51 karsinojenin mikronükleus testinde pozitif sonuç verdiği buna karşın sadece 5 karsinojenin mikronükleus oluşturmadığı saptanmıştır. Saptama oranı (duyarlılık) % 91 olarak belirlenmiştir (84).

2.4.4.3.3. İn vivo Kardeş Kromatid Değişim Testi (Sister Chromatid Exchange Assay)

Genellikle rodentlerin kemik iliği veya lenfositleri kullanılarak yapılan *in vivo* kardeş kromatid değişim (SCE) testi ile kromozomun iki kardeş kromatid kolunda karşılıklı parça değişimine neden olan bileşikler *in vitro* SCE testindeki gibi saptanmaktadır. Test prosedürü ve analiz yöntemi *in vitro* SCE testine

benzemektedir. Hayvanlara test bileşiğinin uygulanmasını takiben BrdU verilir ve hayvanlar öldürülmeden 2 saat önce kolşisin uygulanır. Hayvanlar öldürüldükten sonra kemik ilikleri alınır, preparatlar hazırlanıp ve boyanarak SCE yönünden incelenir. Kontrol grubuna göre uygulama yapılan gruplardaki SCE sayısında istatistiksel yönden önemli bir artış meydana gelmesi testin pozitif olarak değerlendirilmesini sağlamaktadır. Testin pozitif sonuç vermesi, test bileşiğinin test edilen türlerin kemik iliğinde karşılıklı kromatid değişimine neden olduğuna işaret etmektedir (37).

2.4.4.3.4. Memeli Spermatogonial Kromozomal Aberasyon Testi

In vivo memeli spermatogonial kromozom aberasyon testinin amacı memeli hayvanların gonadlarına ulaşarak spermatogonial hücrelerde mitoz aşamasında yapısal kromozomal aberasyonlara neden olan bileşikler ve somatik hücre mutajenlerinin eşey hücrelerinde etkin olup olmadığını saptamaktır. Bu test erkek hayvanların spermatogonial eşey hücrelerinde meydana gelen kromozomal bozuklukları ölçerek, eşey hücrelerinde meydana gelebilecek kalıtsal mutasyon olaylarını önceden haber vermektedir. Erkek gonadlarındaki haploid spermatogonia denmektedir. Test prosedürü *in vivo* kromozom aberasyon testindeki gibidir. Uygulamayı takip eden ilk mitoz hücre bölünmesindeki spermatogonial hücreler kromatid tip aberasyon yönünden incelenmektedir. Her bir hayvanın testislerinden hazırlanan kromozom preparatlarında en az 100 metafaz incelenerek değerlendirme yapılmaktadır. Test yapılan türün gonadlarında kromozomal aberasyon frekansı yönünden önemli bir artış meydana gelmesi testin pozitif olarak değerlendirilmesini sağlamaktadır (33, 99).

2.4.4.3.5. Rodent Dominant Lethal (Öldürücü) Testi

Dominant lethal testi *in vivo* olarak eşey hücrelerinde klastojenisiteyi veya anöploidiyi araştırmak amacıyla kullanılmaktadır. Dominant letal etkiler embriyonik veya fetal ölümlere neden olmaktadır (9). Bileşiğe maruz kalmadan sonra meydana gelen dominant letal olaylar bileşiğin test edilen türlerde germinal dokuları etkilediğine işaret etmektedir. Dominant letallerin gen mutasyonu veya toksik etkiler sonucu değil yapısal ve sayısal kromozomal anomaliler sonucu oluştuğu kabul edilmektedir. Eşey hücresinde meydana gelen dominant letal mutasyon gametin disfonksiyonuna neden olmayıp döllenmiş yumurtanın yada gelişmekte olan embriyonun ölümüne neden olmaktadır (35).

Erkek farelere yada sıçanlara test bileşiği uygulanır ve uygulama yapılmamış dişilerle çiftleştirilirler. Dişiler gebeliğin ikinci yarısında öldürülürler ve uterusları implante, yaşayan ve ölü embryo sayısı açısından incelenir. Kontrol grubuna göre uygulama yapılan gruptaki dişilerdeki ölü implante sayısındaki artış implantasyon sonrası kaybı yansıtmaktadır. Kontrol grubuna göre uygulama yapılan gruplardaki dominant letal sayısında istatistiksel yönden önemli bir artış meydana gelmesi testin pozitif olarak değerlendirilmesini sağlamaktadır. Testten pozitif sonuç alınması, test bileşiğinin test edilen türlerin eşey hücrelerinde genotoksik etkili olabileceğine işaret etmektedir (9, 35).

2.4.5. Genotoksisite Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Genotoksisite testleri öncelikle direk genetik hasara yol açan mekanizmalarla etki gösteren karserojen bileşikler saptamaktadır. Bu nedenle genotoksik olmayan karsinogenler bu testlerle saptanamamaktadır (50).

In vitro genotoksisite testlerinden pozitif sonuç alındığında sonuçlar değerlendirilirken negatif veya taşıt kontrol gruplarına göre meydana gelen artışın hücreler için anlamlı bir genotoksik etki oluşturup oluşturmadığı, cevabın konsantrasyon ile ilişkili olup olmadığı, zayıf/çelişkili sonuçlarda etkinin tekrarlanabilirliği, pozitif sonucun *in vitro* spesifik metabolik aktivasyon yolağından mı yoksa *in vitro* spesifik aktif metabolitten kaynaklanıp kaynaklanmadığı, normalde *in vivo* ortamda oluşmayan buna karşın kültür ortamı koşullarına bağlı olarak etkinin oluşup oluşmadığı ve test edilen bileşiklen aynı kimyasal sınıfta yer alan diğer bileşiklerinden elde edilen sonuçlarla uyumlu olup olmadığı; *in vitro* genotoksisite testlerinden negatif sonuç alındığında ise bileşiğin yapısı veya bilinen metabolizması rodent karaciğer S9 gibi *in vitro* metabolik aktivasyon tekniklerinin yetersiz olduğunu gösterip göstermediği veya bileşiğin yapısı veya bilinen reaktivitesi diğer test metodlarının/sistemlerinin kullanımına uygun olup olmadığı sorularına cevap aranarak değerlendirme yapılması gerektiği bildirilmiştir (50, 61).

Eğer bileşik *in vitro* testlerde negatif sonuç vermişse buna ilaveten sadece bir *in vivo* sitogenetik testle de değerlendirilmesi yeterli olabilmektedir. Eğer bileşik bir veya birkaç *in vitro* testte pozitif sonuç vermişse bu durumda kemik iliği veya periferel kanda yapılan *in vivo* sitogenetik testlere ilaveten bileşiğin farklı bir dokuda da test edilmesi gerektiği bildirilmiştir (50, 61).

Herhangi bir *in vivo* testte pozitif sonuç veren bileşiklerin *in vivo* testlerde de hedef dokunun bu bileşiği maruz kaldığı şu ölçütlerle belirlenmektedir. a) *In vivo* mikronükleus testinde kemik iliğinde olgunlaşmamış eritrositlerin toplam eritrosit sayısına oranındaki önemli değişiklik veya kromozomal aberasyon testinde mitotik indeksteki önemli oranda düşüş b) ilacın biyoyararlanımı ile ilişkili olarak kan veya serum düzeylerinin ölçümü c) kemik iliğinde ilaç ile ilişkili maddenin ölçümü d) doku maruziyetinin otoradyografik olarak değerlendirilmesi (28, 50, 61).

In vitro ve *in vivo* test sonuçları arasındaki farklılıklar şu faktörlerden kaynaklanabilmektedir: i) aktif metabolitin *in vitro* olarak oluşurken *in vivo* olarak oluşmaması yada tam tersi şeklinde ii) aktif metabolitin *in vivo* olarak hızla detoksifiye edilebilirken *in vitro* olarak detoksifiye edilememesi iii) bileşiğin atılımının hızlı ve etkili biçimde *in vivo* olarak meydana gelebilirken *in vitro* olarak oluşmaması (50, 61).

2.4.6. Genotoksik Etkinin Değerlendirilmesi

Genetik materyalde hasara neden olan bileşiklerin saptanmasında ve genotoksik aktivitenin değerlendirilmesinde *in vitro* ve *in vivo* genotoksisite testleri birlikte kullanılmaktadır. Bu testlerde pozitif sonuç veren bileşikler kanserojenik ve/veya mutajenik olarak tanımlanmaktadır (18, 60).

İngiltere’de bulunan gıdalarda, tüketici ürünlerinde ve çevrede bulunan kimyasalların mutajenitesinin değerlendirildiği komitede (COM) 3 aşamalı test sistemi uygulanmaktadır:

I. ve II. aşama kimyasalın mutajenitesine ilişkin bilgi vermektedir. III. Aşama ise, II. aşamada incelenen mutajenik etkinin memelilerin eşey hücrelerinde oluşup oluşmadığının saptanmasını sağlamaktadır (18).

I. Aşama: 2 veya 3 *in vitro* test kullanılarak kimyasalın mutajenitesi değerlendirilmektedir. Bileşiğe insan maruziyetinin çok az olduğu veya olmadığı durumlarda 2 test uygulanmaktadır. Testlerden herhangi birisinde pozitif sonuç veren bileşikler *in vitro* mutajen olarak değerlendirilmekte ve 2. aşamaya geçilmektedir. Bu aşamada sadece *in vivo* olarak aktif olan kimyasalların mutajenitesi saptanamaz bu nedenle alınan sonuçlar negatifse; mutajenik testlerin doğrulanmasında *in vivo* testlere gerek duyulmaktadır. I. aşamanın ilk testi Ames testi olarak ta bilinen bakteriyel ters mutasyon testi, II. test klastojeniteyi ve anöjenisiteyi saptamaya yönelik *in vitro* metafaz

analizi (kromozom aberasyon) veya *in vitro* mikronükleus testidir. Bu testlerde interfaz aşamasındaki hücrelerde mutasyon sonucu mikronükleus adı verilen kromozom parçacıkları saptanmaktadır (18). Bakteriyel mutasyon testleri, test edilen bileşiklerin bakterilere aşırı toksik olması veya memeli hücre replikasyon sistemi ile etkileşime girmesi durumlarında genotoksitesinin saptanmasında yeterli ve uygun değildir. Bu durumda iki farklı hücre tipi ve iki farklı değerlendirme noktasına (gen mutasyonu ve kromozomal hasar) sahip olan *in vitro* mikronükleus ve fare lenfoma tk testi gibi *in vitro* memeli hücre testleri uygulanması gerektiği bildirilmiştir. III. test ise insanların bileşiğe maruz kalma oranı ve sıklığı düşük olduğu durumlarda uygulanır ve genellikle fare lenfoma testi tercih edilir. Bakteriyel mutasyon ve fare lenfoma testi gibi *in vitro* testlerde negatif sonuç veren buna karşın *in vivo* testlerde pozitif sonuç veren prokarbazin, hidrokinon ve urethan gibi bileşiklerin olması II. aşamanın uygulanmasını gerekli kılmıştır (60).

II. Aşama: II. aşama testleri I.aşama testlerinin herhangi birinde pozitif veya çelişkili sonuç veren bileşiklerin mutajenik aktivitelerini *in vivo* ortamda gösterip göstermediklerini belirlemek amacıyla yapılmaktadır. Somatik hücrelerde *in vivo* aktivitenin değerlendirilmesini kapsamaktadır. Ayrıca insanlarda orta veya uzun süreli maruziyeti olan tüm kimyasalları değerlendirmek amacıyla *in vivo* testler uygulanmaktadır. I. aşamada *in vitro* testlerde pozitif sonuç veren bazı bileşikler *in vivo* testlerde emilim eksikliği, etkin metabolitlerin DNA ile etkileşememesi, hızlı detoksifikasyon ve eliminasyon gibi faktörlere bağlı olarak negatif sonuç verebilir. Bu nedenle bir veya daha fazla *in vitro* testte pozitif sonuç veren bileşiklerin potansiyel mutajenik zararları hakkında kesin bir sonuca varılmadan önce *in vivo* testlerin yapılması gerekmektedir. *In vivo* testler yürütülmeden önce *in vitro* testlerden elde edilen sonuçların, bileşiğin metabolik profili ve yapısı ile ilgili mevcut bilgilerin gözden geçirilmesi gerekmektedir. II. aşamada uygulanan ilk test rodentlerin kemik iliği veya periferik kanı kullanılarak yapılan *in vivo* mikronükleus testidir. Testten pozitif sonuç alındığında bileşik *in vivo* somatik hücre mutajeni olarak değerlendirilir; negatif veya çelişkili sonuçlar alındığında bileşiğin genotoksik etkili olup olmadığını doğrulamak amacıyla testin tekrarlanması yada kemik iliğinden farklı bir hedef doku kullanılarak ikinci bir *in vivo* genotoksikite testinin yapılması gerekmektedir. Bu testler karaciğer UDS testi, Comet testi veya transgenik hayvan modelleri testleridir. Bu testlerden de pozitif sonuç alındığı takdirde bileşik *in vivo* somatik hücre mutajeni, potansiyel

karsinojen ve muhtemel eşey hücresi mutajeni olarak değerlendirilir ve 3. aşamaya geçilir. Negatif sonuç alındığında bileşiğin *in vivo* mutajen olup olmadığı sonucuna varılabilmesi için mevcut bütün bilgiler değerlendirilir. Çelişkili sonuçlar alındığında ise mevcut tüm veriler değerlendirilerek verilerin karar için yeterli olup olmadığına yada ek testlerin yapılması gerektiğine karar verilmektedir (18, 62, 127). Somatik hücrelerdeki ilk *in vivo* testte negatif sonuç; I. aşamadaki 3 *in vitro* testte negatif sonuç veren bileşikler ve insanlardaki maruziyet derecesiyle ilişkili olarak *in vivo* incelenen bileşikler için kesinlik sağlar. I. aşamada çelişkili sonuçlar veren bileşikler ve bu sorunu çözmek için *in vivo* test uygulanan bileşiklerde bir negatif sonuç elde edilmesi yeterli olabilmektedir. I. aşamada herhangi bir *in vitro* testte pozitif sonuç veren bileşiklerde, tek bir dokuda yapılan *in vivo* testte negatif sonuç elde edilmesi bileşiğin somatik hücrelerde *in vivo* olarak inaktif olduğu sonucuna varılması için yeterli veri sağlamamaktadır. Bu durumda farklı dokular kullanılarak daha fazla *in vivo* test yapılması gerekmektedir. Bunlardan karaciğer UDS testi dışındakiler uluslararası kabul gören metodolojiler değildir. Rodent karaciğer UDS testi karaciğerde genotoksik aktiviteyi araştırmak amacıyla geliştirilen karaciğer hücrelerinde DNA hasarını ve bunun takiben onarımını ölçen bir testtir. Karaciğer emilen bileşiklerin metabolize edildiği başlıca organ olması nedeniyle bu test özellikle genotoksik etkisini gösterebilmek için metabolik aktivasyona ihtiyaç duyan bileşiklerin incelenmesi için uygundur. Comet (single cell gel electrophoresis) testi herhangi bir dokuda genotoksisite tespiti için relatif olarak daha basit bir prosedürdür. Testin geliştirilmesi ile sitotoksik bileşikler ile genotoksinler arasındaki fark büyük ölçüde açıklığa kavuşturulmuştur. Test özellikle direk etkili genotoksinleri ilk etki bölgelerinde değerlendirmek için önemlidir. Diğer DNA zincir kırılma testleri de Comet testine alternatif olarak kullanılabilir. Transgenik hayvan modelleri yeterli DNA izole edilebilmesini sağlayacak herhangi bir dokuda *in vivo* gen mutasyonlarını ölçme potansiyeline sahiptirler. Bu modellere örnek olarak BigBlue ve Muta Mouse verilebilir. Bu testlerin validasyonu ile ilgili az sayıda yayın bulunmaktadır ve özel dokular için metodolojinin optimize edilmesi için daha çok çalışma gerekmektedir. Fakat bu testler rutin olarak kullanılmamaktadır. Özellikle bileşiklerle ilk temas eden sindirim kanalı, deri ve nefes borusu gibi özel dokularda yapılan destekleyici testler mutajenik aktivitenin değerlendirilmesinde önemli bilgiler sağlamaktadır. Ayrıca DNA'ya kovalent bağlanma veya ³²P-postişaretleme kullanılarak DNA eklentilerinin ölçümüne

(DNA adducts) dayalı yeni yaklaşımlar da bulunmaktadır. Bu testler mutajenisiteyi ölçmeden daha çok maruz kalmayı ve DNA'ya karşı reaktiviteyi ölçmektedir. ³²P-postişaretleme testi DNA eklentilerinin ölçümü için duyarlı bir testtir ve test bileşiğinin radyoaktif işaretlenmesini gerektirmemektedir. DNA eklentilerinin ölçümünde kullanılan bir diğer bir metod radyoişaretleli bileşik kullanılarak DNA'ya kovalent bağlanmanın ölçülmesidir. Bu testle gözlenen düşük düzeydeki bağlanma DNA'ya kovalent bağlanmayla ilgili olamayabileceği için bu düşük düzeydeki bağlanmanın öneminin açıklanması güçtür **(18)**.

III. Aşama: Bir bileşikten kaynaklanan mutajenik hasarın araştırılmasının başlangıç aşamalarında eşey hücrelerinde mutajenik etki oluşturup oluşturmadığının araştırılmasına gerek duyulmamaktadır. Tüm eşey hücre mutajenleri kemik iliği testlerinde pozitif sonuç vermesine karşın somatik hücre testlerinde pozitif sonuç veren bileşiklerin hepsi eşey hücresi testlerinde aynı sonucu vermemektedir yani tüm somatik hücre mutajenleri eşey hücrelerinde mutajen değildir. Bununla birlikte *in vivo* somatik hücre mutajeni olduğu doğrulanmış birçok bileşiğin hem potansiyel genotoksik karsinogen hemde potansiyel eşey hücresi mutajeni olarak kabul edildiği için daha fazla genotoksisite testi yapılmasına gerek duyulmamaktadır **(18, 28)**. Ancak bazı durumlarda eşey hücresi çalışmaları bir *in vivo* somatik hücre mutajeninin eşey hücresi mutajeni olup olmadığını göstermek amacıyla yapılmaktadır **(18)**.

Eşey hücrelerinde uygulanan mutajenisite/genotoksisite testleri memeli spermatogonial hücrelerinde veya spermatositlerinde klastojenisite ve anöjenisite testi, dominant lethal testi veya mutajenisite veya DNA hasarını ölçen diğer metodlardan oluşmaktadır. Test seçiminde önceki mutajenisite testlerinin verileri, bileşiğin özellikleri ve toksikokinetiği ve metabolizması gözönüne alınmalıdır. Uygulanan testten pozitif sonuç alındığında bileşik eşey hücresi mutajeni veya anöjeni olarak değerlendirilir. Negatif sonuç alındığında bileşiğin eşey hücresi mutajeni olmadığı sonucuna varmak amacıyla tüm mevcut veriler tekrar değerlendirilmektedir. Çelişkili sonuçlar alındığında ise eldeki verilerin yeterli olup olmadığına veya daha fazla test yapılması gerektiğine karar verilmektedir **(18)**.

Eşey hücrelerinde genotoksisite hakkında veri toplamak amacıyla en uygun çalışmayı belirlerken önceki çalışmalarda görülen başlıca nokta mutasyon, klastojenisite veya anöjenisite olmak üzere genetik etkinin tipi gözönüne alınmalıdır. Bileşiğin eşey

hücreleri için genotoksik olup olmadığına dair bilgi birçok test ile elde edilebilmektedir. Bunlar memelilerin spermatogonial hücrelerinde klastojeniteyi araştırmak amacıyla geliştirilen memeli spermatogonial kromozom aberasyon testi, anöjenik ve klastojenik etkiyi birlikte saptayabilen spermatositlerde yapılan mikronükleus testi ve dominant lethal testidir. Alternatif olarak transgenik hayvan modelleride kullanılabilmektedir. Dominant letal mutasyonların yapısal veya sayısal kromozom aberasyonlara bağlı olarak oluştuğu düşünülmektedir. Bu testte embryo-letal genetik değişiklikler ölçülmektedir. Eşey hücresi DNA'sında hasar veya DNA eklentilerinin oluşumu çeşitli yaklaşımlar kullanılarak araştırılmasıyla maruziyet ve reaktivite ile ilgili bilgiler elde edilebilir. Eşey hücrelerinde DNA lezyonlarına ilişkin bilgi II. aşamadaki ³²P-postişaretleme, Comet testi, UDS veya DNA kovalent bağlanma testleri ile sağlanabilmektedir (18).

Gelecek jenerasyonlarda kalıtsal etki riskinin kantitatif değerlendirilmesi: Bu tür risk değerlendirmesine olanak sağlayan mevcut tek yöntem tedavi uygulanan hayvanlardan yetiştirilen birbirini izleyen jenerasyonlarda etkinin değerlendirilmesidir. Bu yöntemler fare kalıtsal translokasyon testi ve fare spesifik lokus testidir. Bu çalışmalar özellikle fare spesifik lokus testi çok fazla sayıda hayvan gerektiği için pratikte kullanılmamaktadır ve sadece özel durumlarda kullanılmaktadır. Ayrıca bu testler ratlarda yapılamamaktadır. Evebeyn hayvanlarda maruziyeti takiben yeni nesillerde anöploidi artışını değerlendiren mevcut metodda bulunmamaktadır (18).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Deney Hayvanları

Çalışmada, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Ünitesinden sağlanan, yaklaşık 8-9 haftalık ve ağırlıkları 20-25 gr olan 72 adet CD-1 ırkı erkek fare kullanıldı. Hayvanlar polipropilen kafeslere yerleştirildi ve İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında bulunan deney hayvanları bakım odasına adaptasyonu sağlandı. Çalışma süresince (2006 Mayıs-2007 Ağustos) yem ve su ad libitum olarak verildi. Tüm hayvanlar 12 saat ışık/12 saat karanlık periyodunda ve 22 ± 1 °C sıcaklık ortamında tutuldu.

3.1.2 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Hassas Tartı: Shimadzu AEL - 40 SM

Hayvan tartım terazisi: Precisa XT 6200C

Santrifüj: Heraeus 00902

Ultrasonik Banyo: Sonorex RIC 100 H

Vorteks: Elektro-Mag M16

Mikroskop: Olympus CX31

Dijital Kamera: Olympus CAMEDIA C7070

Kimyasal Malzemeler:

Albendazole: (Methyl 5-propylthio-2-benzimidazole-carbamate, 98 %) Acros Organics 345360050, 5 gr. Cas No: 54965-21-8

Siklofosamid: Cyclophosphamide monohydrate %97, Acros Organics 2039600050, Cas No: 6055-19-2

Askorbik Asit: Amresco L-Ascorbic Acid 0143-100 gr Cas No:50-81-7

Dimetilsülfoksit: Merck 2951

FTS: Eczacıbaşı Baxter İzotonik NaCl Solüsyonu

Fötal Buzağı Serum (FBS): Biological Industries 04-121-1B

PBS: Amresco Phosphate Buffered Saline Tablets E 404-200 TABS

Metanol: Methanol Riedel-de Haën 24229

Giemsa: Merck/Giemsa's Azur-Eosin Methylene Blue Solution. 1.09204.2500

May-Gruenwald: Merck/May-Gruenwalds Solution 1.01424.2500

İmmersiyon Yağı: Merck Art 4699, 100 ml.

Entellan: Merck 1.07961.0100, 100 ml.

Ksilol: Xylol Riedel-de Haën 16446

Rodajlı Lam: Objektträger 76x22 mm, Lamel: Isolab 24x50 mm

Besleme sondası: Bıçakcılar 1,33 mm x (4Ch) x 470 mm, İnsülin enjektörü: Hayat 26 G x 10-13 mm, Enjektör: Set Inject 5 ml, Pastör Pipeti: Isolab 3 ml

3.2 Yöntem

3.2.1 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Tüm çözeltiler uygulamadan ve preparatlar hazırlanmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

Albendazol Süspansiyonu: Albendazol dimetilsülfoksit içinde çözündürülerek 300 mg/5 ml yoğunlukta hazırlandı. 45 dakika süreyle ultrasonik banyoda tutuldu.

Siklofosamid Çözeltisi: Fizyolojik tuzlu suda çözündürülerek 40 mg/5 ml yoğunlukta hazırlandı.

Askorbik Asit Çözeltisi: Distile suda çözündürülerek 100 mg/5 ml yoğunlukta hazırlandı.

Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS): 100 ml distile suda 1 adet fosfat tampon tuz tableti çözündürülerek hazırlandı.

Giemsa Solüsyonu: Fosfat tampon çözeltisi içerisinde 1:6 oranında hazırlandı (116).

3.2.2 *In vivo* Fare Mikronükleus Testi

Çalışmada kromozomal hasarların saptanmasında diğer testlere göre daha kısa sürede sonuç veren, uygulanması ve analizi daha kolay olan kısa süreli genotoksisite testlerinden biri olan *in vivo* rodent mikronükleus testi tercih edildi (38).

Çalışmada kullanılacak olan 72 adet erkek fare tesadüfi olarak 9 gruba ayrıldı.

I. Grup: Negatif Kontrol Grubu. Çözücü madde olan dimetilsülfoksit uygulandı.

II. Grup: Pozitif Kontrol Grubu. 100 mg/kg c.a. dozunda Siklofosfamid gavaj şeklinde uygulandı.

III. Grup: 500 mg/kg c.a. dozunda Albendazol gavaj şeklinde uygulandı.

IV. Grup: 1000 mg/kg c.a. dozunda Albendazol gavaj şeklinde uygulandı.

V. Grup: 1500 mg/kg c.a. dozunda Albendazol gavaj şeklinde uygulandı.

VI. Grup: 500 mg/kg c.a. dozunda Albendazol ve 200 mg/kg Askorbik Asit gavaj şeklinde uygulandı.

VII. Grup: 1000 mg/kg c.a. dozunda Albendazol ve 200 mg/kg Askorbik Asit gavaj şeklinde uygulandı.

VIII. Grup: 1500 mg/kg c.a. dozunda Albendazol ve 200 mg/kg Askorbik Asit gavaj şeklinde uygulandı.

IX. Grup: 100 mg/kg c.a. dozunda Siklofosfamid ve 200 mg/kg Askorbik Asit gavaj şeklinde uygulandı.

Doz ve grup seçiminde pratik olarak seçilebilen doz yöntemi temel alındı (**70, 81**). Bu amaçla Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation, WHO) ve Gıda Tarım Örgütünden (Food and Agriculture Organisation) oluşan Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (Joint of FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA) tarafından belirlenen albendazolün LD₅₀ dozuna bağlı olarak 3000 mg/kg'lık LD₅₀ dozu gözönüne alındı. Örnekleme doz aralıkları 1500 mg/kg, 1000 mg/kg ve 500 mg/kg olarak belirlendi (**64**). Pozitif kontrol olarak mikronükleus oluşumuna neden olan mutajenik etkili, alkilleyici bir ajan olan Siklofosfamid seçildi (**49, 71, 82**). Araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda *in vivo* mikronükleus testinde erkek farelerin dişi farelere oranla siklofosfamide karşı verdiği cevabın daha yüksek derecede olması nedeniyle tüm uygulama gruplarında erkek fareler kullanıldı (**17, 61, 71, 87, 126**). Siklofosfamidin örnekleme zamanı ve uygulanacak dozu ise Japonya Çevresel Mutajen Topluluğunun alt grubu olan Memeli Mutajenleri Çalışma Grubuna bağlı (Mammalian Mutagenesis Study Subgroup of the Mutagen Society of Japan, JEMS.MMS) Mikronükleus Test Çalışma Grubu Birliği (Collaborative Study Group for the

Micronucleus Test, CSGMT) ve araştırıcılar tarafından yapılan çalışmalar sonucu belirlenen dozlar gözönünde tutularak 100 mg/kg c.a olarak belirlendi (55, 136). Askorbik asit'in dozu araştırıcılar tarafından yapılan çalışmalar sonucunda antitümör etkili ajanlara karşı koruyucu etkinlik gösteren doz olarak saptanan 200 mg/kg c.a. olarak belirlendi (5, 7).

Albendazol süspansiyonu 500 mg/kg c.a. ve 1000 mg/kg c.a. doz grubundaki (grup 3 ve grup 4) farelere tek seferde gavaj şeklinde uygulandı. 1500 mg/kg c.a. doz grubundakilere (grup 5) ise albendazolün gavaj şeklinde tek seferde verilmesi gereken hacim olan 2 ml/100 gr vücut ağırlığını getiğı için doz 2'ye bölünerek 2 saat arayla gavaj şeklinde uygulandı. Negatif kontrol grubuna (grup 1) taşıt madde olan dimetilsülfoksit ve pozitif kontrol grubuna (grup 2) siklofosamid aynı şekilde uygulandı. Diğerk doz gruplarına uygulama ise aynı yolla 200 mg/kg c.a. askorbik asitle kombine edilerek yapıldı.

Örneklerin alımında *in vivo* mikronükleus testi protokolünde bildirilen saat dilimi ve pozitif kontrol grubundaki mikronükleus sayısının en yüksek düzeye ulaştığı 48. saat seçildi (55, 131). Kemik iliklerinin elde edilmesi ve preparat hazırlama yöntemi Schmid'in (116) yönteminden modifiye edilerek hazırlandı. Hayvanlar öldürölmeden önce her bir enjektöre 2 ml fötal buzağı serumu (FBS) çekildi ve her bir test tüpüne 3 ml FBS kondu. Uygulamadan sonraki 48. saatte hayvanlar servikal dislokasyon yöntemiyle öldürölldü. Farelerin her iki bacağındaki femur kemikleri pelvis ve tibia kemikleri ile bağlantılı olan bölgelerinden kesilerek çıkarıldı ve tüm kaslardan temizlenerek 2 ucundan kesildi. FBS içeren enjektör kemiğın proksimal ucundan içeri sokuldu ve FBS enjekte edildi. FBS'un kemik iliğı kanalından geçmesi sağlanarak kemik iliğı FBS'la birlikte tüpe aktarılmış oldu. Kemik iliğı örnekleri 10 dakika süreyle 1000 rpm'de santrifüj edildi. Tüplerdeki süpernatant plastik pastör pipeti yardımıyla uzaklaştırıldı. Tüpün dibinde kalan kemik iliğı hücrelerinden oluşan çökelti birkaç damla FBS ile sulandırıldı.

3.2.3 Preparatların Hazırlanması

Tüpün dibindeki sulandırılmış halde bulunan çökelti iyice karışması amacıyla vortekslendi. Dipteki ökelti pastör pipetinin kapillar kısmına aspire edildi ve daha önceden temizlenmiş lamaların üzerine küçük bir damla halinde damlatıldı. Başka bir lam yardımıyla 45 derecelik açı oluşturularak sürme preparat hazırlandı. Her bir

hayvanın bir kemik iliği için çökelti durumuna göre 3-5 adet preparat hazırlandı ve 1 gün süreyle havada kurumaya bırakıldı (116).

3.2.4 Preparatların Boyanması

Kuruyan preparatlar 10 dakika süreyle absolüt metanolde tespit edildi. Preparatlar kuruduktan sonra 1:1 oranında PBS ile sulandırılmış May-Gruenwald solüsyonuyla 2 dakika süreyle boyandı. Distile su ile yıkandıktan sonra 10 dakika süreyle Giemsa solüsyonu ile boyandı. Boyamayı takiben preparatlar distile su ile yıkandı ve havada kurumaya bırakıldı. Hazırlanan preparatların üzerine 1-2 damla entellan damlatıldı ve lamel ile kapatıldı (46, 116).

3.2.5 Mikroskopta İnceleme

Işık mikroskobu altında her hayvan için hazırlanan preparatlardan 100x10 büyütme ile 2000 adet polikromatik eritrosit sayılarak, mikronükleus içeren hücrelerin sayısı belirlendi. Mikronükleuslar Schmid'in belirttiği kriterlere göre (yuvarlak, kesin sınırlara sahip, koyu renkte boyalı ve hücrenin 1/5-1/20'si büyüklüğünde) belirlendi. Ayrıca sitotoksiteyi değerlendirmek amacıyla 200 adet eritrosit sayılarak polikromatik eritrositlerin normokromatik eritrositlere oranı hesaplandı (116).

3.2.6 Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatiksel Yöntemler

Elde edilen veriler SPSS istatistiksel analiz 11.5 paket programı kullanılarak değerlendirildi. Grupların istatistiki karşılaştırması Kruskall-Wallis testi ile yapıldı; gruplar arasındaki farkın önemi Mann-Whitney *U*-testi ile belirlendi (123).

4. BULGULAR

Albendazol'ün *in vivo* koşullarda genotoksik etkili olup olmadığını saptamanın yanısıra antimutajenik ve antikarsinojenik özelliklere sahip antioksidan etkili askorbik asidin albendazol'ün olası genotoksitesisi karşısında koruyucu etkisini araştırmak amacıyla yapılan çalışma sonucunda albendazol'ün ve albendazol'le birlikte C vitamininin kombine kullanımının fare kemik iliğindeki polikromatik eritrositler içerisindeki mikronükleus insidensi üzerine etkisi ve sitotoksitesiyi belirleyici parametrelerden biri olan polikromatik eritrosit sayısının normokromatik eritrosit sayısına % oranı Tablo 4.1'de verildi. Albendazol uygulanan gruplarda kontrol grubuna oranla değişen düzeylerde mikronükleus insidensinde artış saptandı. Veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde 500 mg/kg albendazol uygulanan grup ile DMSO uygulanan kontrol grubunun her bir hayvanın kemik iliği örneğinden 2000 polikromatik eritrosit sayılarak hesaplanan ortalama mikronükleus içeren polikromatik eritrosit sayıları birbirine benzerlik gösterdiği belirlendi ve istatistiksel açıdan önemsiz ($p>0,001$) bulundu. Buna karşın 1000 ve 1500 mg/kg albendazol uygulanan gruplar negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında mikronükleus sayısının önemli düzeyde yükseldiği ve istatistiksel yönden önem ($p< 0,001$) kazandığı saptandı. Albendazol uygulanan gruplar arasında mikronükleus sayısı açısından doza bağlı bir artış meydana geldiği; 500 mg/kg albendazol uygulanan grup 1000 mg/kg ve 1500 mg/kg ile karşılaştırıldığında meydana gelen artışın istatistiksel yönden önemli ($p< 0,001$) bulunduğu, 1000 mg/kg albendazol uygulanan grup ile 1500 mg/kg albendazol uygulanan grup karşılaştırıldığında ise mikronükleus insidensi yönünden artış meydana geldiği fakat bu artışın istatistiksel açıdan önemli olmadığı ($p>0,001$) belirlendi. Genotoksik etkili bir bileşik olan siklofosfamidin uygulandığı pozitif kontrol grubunda ise en yüksek oranda mikronükleus oluşumu gözlemlendi ve istatistiksel yönden diğer tüm uygulama gruplarına göre önemli ($p< 0,001$) olduğu saptandı. Polikromatik eritrositlerin ışık mikroskobu alındaki genel görünimleri ve mikronükleus içeren polikromatik eritrositlerin görüntüsü şekil 4.1 ve şekil 4.2'de verilmiştir.

Uygulanan bileşiklerin kemik iliğinde toksisite oluşturup oluşturmadığını belirlemek amacıyla her bir hayvanda 200 toplam eritrosit sayılarak polikromatik eritrositlerin normokromatik eritrositlere % oranı hesaplandı. En yüksek oranda

sitotoksosite kemoterapötik bir ajan olan siklofosfamidin uygulandığı grupta saptandı. Elde edilen verilerden negatif kontrol ve 500 mg/kg albendazol uygulanan gruplarda sitotoksosite oluşumu saptanmazken diğer grupların verileri negatif kontrol ve 500 mg/kg albendazol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan önemli ($p < 0,001$) bulundu ve elde edilen verilerin sitotoksositeye işaret ettiği belirlendi.

Tablo 4-1 Albendazol ve C vitaminini uygulanan gruplardaki farelerin kemik iliğindeki mikronukleus içeren polikromatik eritrosit sayıları

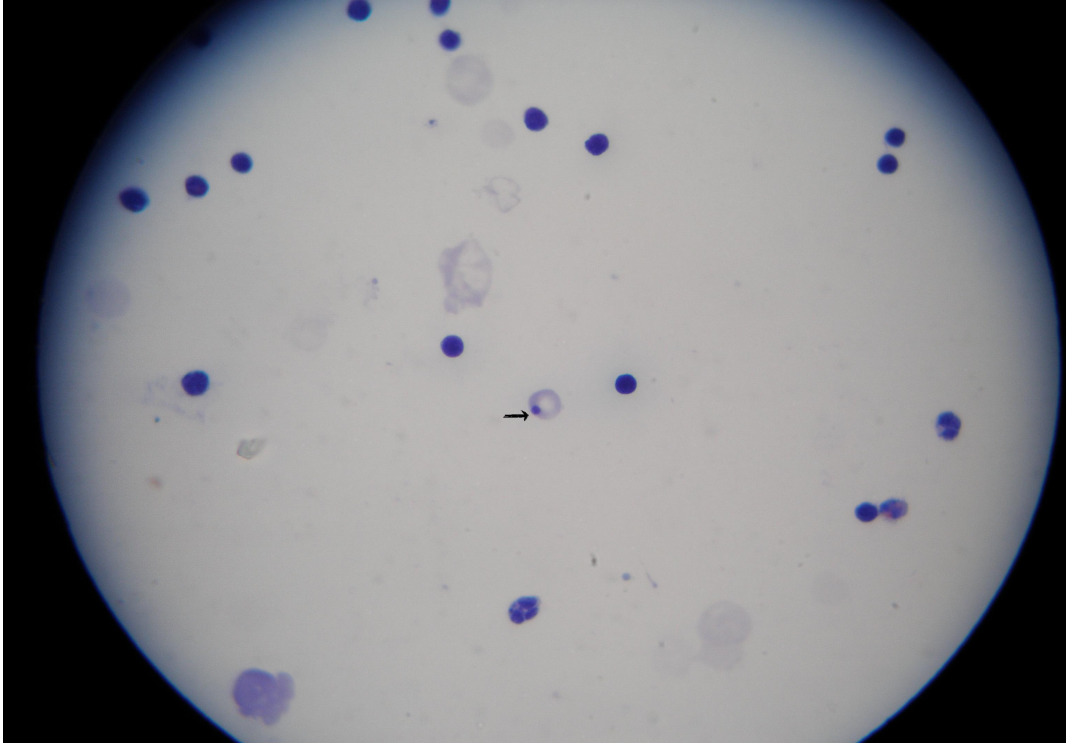
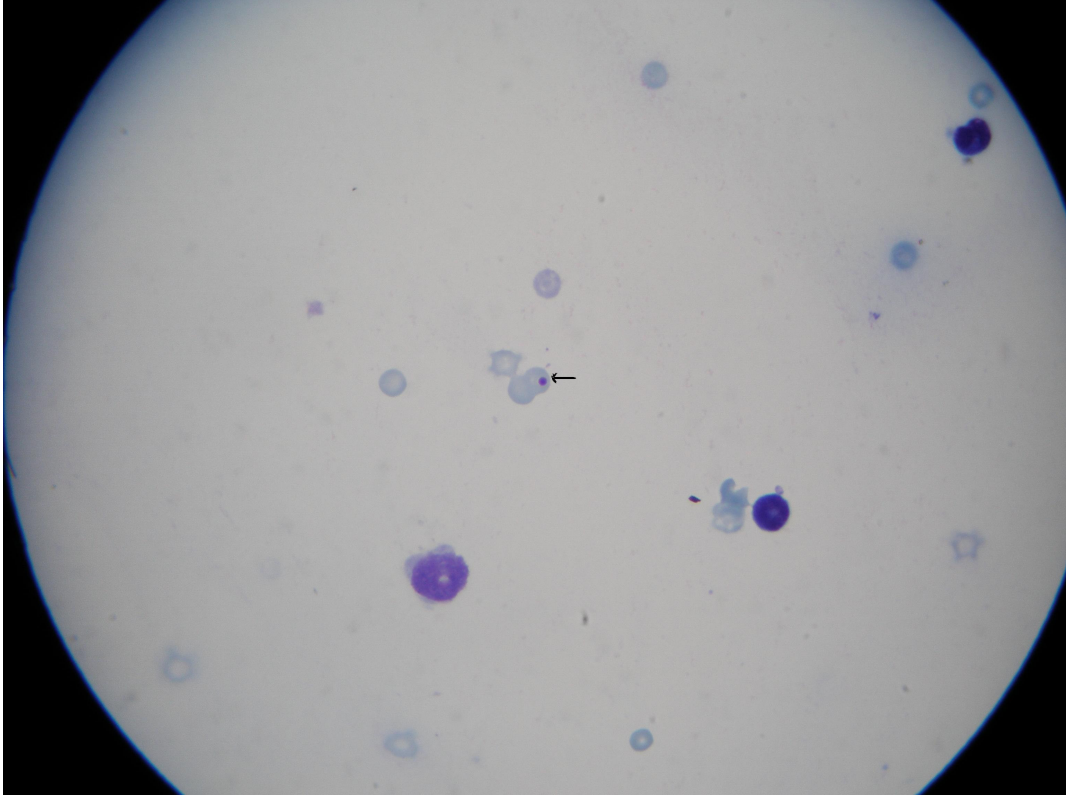
Grup	Doz (mg/kg)	n	mnPCE/2000 (ortalama değer $\bar{x}$)	PCE (ortalama değer $\bar{x}$)	Standart hata ($s_{\bar{x}}$)	PCE/NCE (%) (ortalama değer $\bar{x}$)	Standart hata ($s_{\bar{x}}$)
Kontrol (DMSO)		8	6,00 ^e		0,46	0,87 ^a	0,01
CP	100	8	47,13 ^a		1,55	0,55 ^f	0,01
ALB	500	8	7,00 ^e		0,46	0,83 ^{a,b}	0,01
ALB	1000	8	15,38 ^{c,d}		0,68	0,73 ^{d,e}	0,01
ALB	1500	8	17,38 ^c		0,89	0,71 ^c	0,01
ALB+Vit C	500+200	8	6,75 ^e		0,53	0,79 ^{b,c}	0,02
ALB+Vit C	1000+200	8	13,5 ^d		0,85	0,77 ^{c,d}	0,01
ALB+Vit C	1500+200	8	15,13 ^{c,d}		1,52	0,73 ^{d,e}	0,01
CP+Vit C	100+200	8	30,88 ^b		1,53	0,68 ^c	0,02

ALB= albendazol, CP= Siklofosfamid, Vit C= C Vitamini

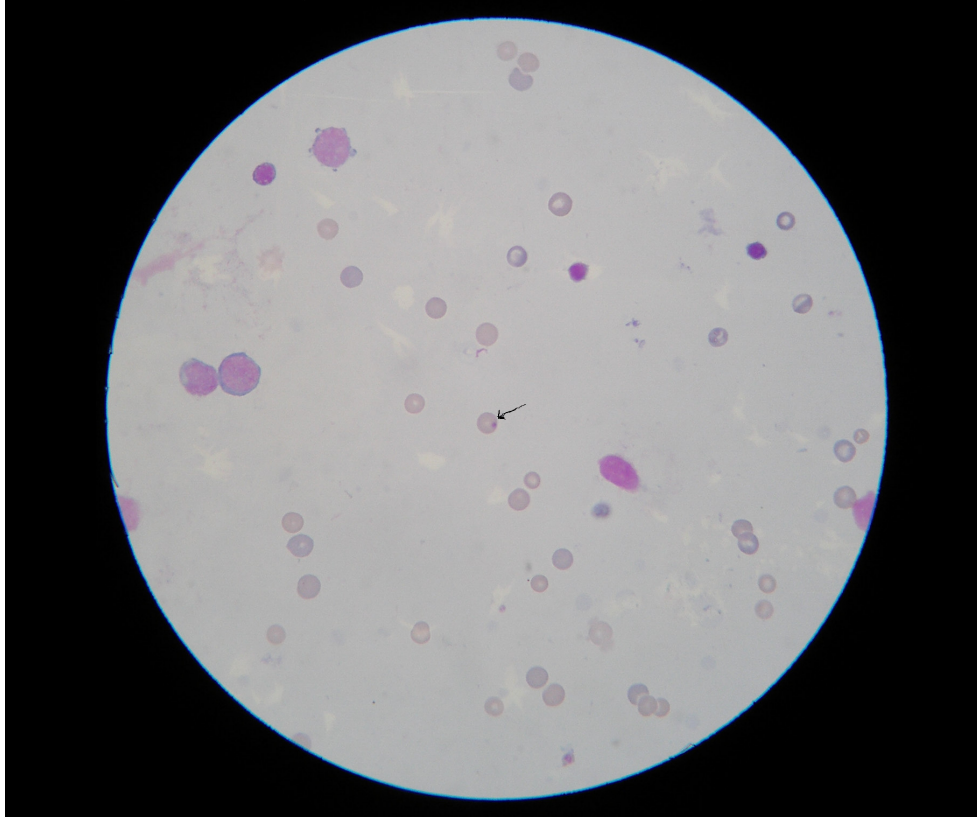
mnPCE= mikronükleus içeren polikromatik eritrosit, NCE= normokromatik eritrosit

^{a,b,c,d,e}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklar önemli ($p < 0,001$), aynı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar ise önemsizdir.

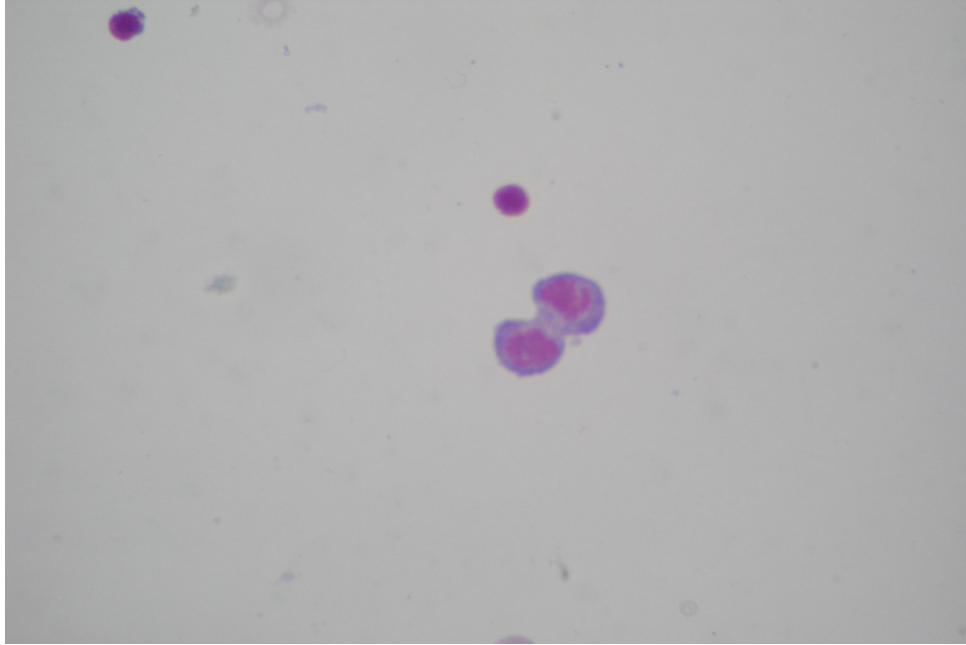
^{a,b,c,d,e,f}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklar önemli ($p < 0,001$), aynı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar ise önemsizdir.



Şekil 4.1. Polikromatik eritrositlerde gözlemlenen mikronükleusların ışık mikroskobu altındaki görüntüleri (10x100 büyütme)



Şekil 4.2.Polikromatik eritrositlerin ışık mikroskobu altındaki genel görünümü ve mikronükleus içeren polikromatik eritrosit (10x100 büyütme)



Şekil 4.3.Mitozun telofaz aşamasında kromozomların kutuplara çekildiği, sitokinezin gerçekleşmekte olduğu ve 2 eş hücrenin oluşum görüntüsü

Albendazol'le birlikte 200 mg/kg dozda C vitamini uygulanan tüm gruplarda C vitaminin mikronükleus frekansında değişen oranlarda düşüş meydana getirdiği saptandı. Albendazol'ün tek başına 500 mg/kg, 1000 mg/kg ve 1500 mg/kg dozlarda uygulandığında oluşturduğu ortalama mikronükleus frekansı sırasıyla 7, 15,38 ve 17,38 iken C vitamini ile birlikte verildiğinde bu oranların sırasıyla 6,75, 13,5 ve 15,13'e düştüğü gözlemlendi. Albendazol'ün tek başına verildiği grupların verileri ile C vitaminiyle birlikte verildiği grupların verileri istatistiksel yönden değerlendirildiğinde meydana gelen düşüşün önemsiz ($p>0,001$) olduğu sonucuna varıldı. Diğer taraftan mutajenik etkili siklofosfamidin C vitamini ile kombine halde verilmesi sonucu mikronükleus frekansında önemli oranda ($p<0,001$) düşüş meydana geldiği ve C vitaminin siklofosfamidin mutajenitesine karşı antimutajenik etki oluşturduğu saptandı.

5. TARTIŞMA

Albendazol, veteriner ve beşeri hekimlikte helmintlerin neden olduğu paraziter enfestasyonların tedavisinde sıklıkla kullanılan, düşük dozlarda etkinliği yüksek ve antelmentik etki spektrumu geniş benzimidazol türevi bir bileşiktir (27, 51). Diğer benzimidazol türevleri gibi albendazol'un de parazit hücrelerindeki β -tubuline bağlanıp tubulinlerin mikrotübüllere polimerizasyonunu inhibe ederek parazit için motilite ve besin alımı gibi hayati fonksiyonları bloke ettiği bildirilmiştir (3, 74, 75, 121). Mikrotübüller, hücrenin iskelet yapısını oluşturmaktadır; hücre bölünmesi sırasında kromozomların kutuplara çekilmesini sağlayan iğ iplikçiklerin ve sentriollerin yapısında bulunmaktadırlar (74, 76).

Albendazol'un memelilerdeki toksisitesine yönelik çalışmalarda gözlemlenen bazı toksik etkilerinin, bileşiğin memelilerde tubulin polimerizasyonu ile etkileşime girmesi sonucu iğ iplikçığı oluşumunu ve mitozu inhibe etmesinden kaynaklandığı şeklinde açıklanmaktadır (64). Albendazol'un teratojenite gibi bazı yan etkilere sahip olduğu bilinmesine karşın genotoksik etkisine ilişkin çok az çalışma bulunduğu bildirilmiştir (27, 112).

Genetik toksikoloji organizmanın normal biyolojik işleyişi sırasında veya kimyasal, fiziksel ve biyolojik etkenlere bağlı olarak hücrelerin kromozom ve DNA moleküllerinde meydana gelen değişiklikleri yani mutasyonu incelemektedir (89, 139). Özellikle somatik hücrelerde meydana gelen değişikliklerin kanser oluşumunda önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bu nedenle somatik hücrelerdeki genotoksik etkilerin saptanması bileşiklerin mutajenik etkilerinin araştırılmasında büyük önem taşımaktadır (18, 127).

Mutajenik etkili birçok bileşiğin kansere neden olduğu görüşünden hareketle, mutajenik etkili genotoksik ve karsinojenik kimyasalları belirlemede önceden haber verici olarak bir çok kısa süreli *in vitro* ve *in vivo* genotoksisite testi geliştirilmiştir (9, 85, 127). Kromozomlarda yapısal ve sayısal bozukluklara neden olan mutajenlerin ve karsinojenlerin, *in vivo* olarak fare kemik iliği hücrelerinde erken biyolojik etkilerinin belirlenmesinde en yaygın olarak kullanılan sitogenetik testler arasında *in vivo* mikronükleus testi yer almaktadır (38, 82, 83, 134). Mikronükleuslar hücre bölünmesi sırasında fiziksel ve kimyasal mutajenlere maruz kalan hücrelerde mitoz bölünmenin

anafaz evresinde kromozomların geri kalmalarından ya da kromozom parçacıklarından köken almaktadırlar (1, 41, 69). Albendazol'un somatik hücrelerdeki olası genotoksik etkisinin araştırılmasında diğer *in vivo* memeli testlerine göre daha kısa sürede sonuç veren ve maliyeti düşük olan *in vivo* mikronükleus testi tercih edildi.

Yapılan araştırmalarda albendazol'un *in vitro* ve *in vivo* genotoksisite test sonuçları arasında farklılıkların bulunduğu bildirilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Avrupa İlaç Ajansı'nın (EMA) raporlarında albendazol'un *in vivo* fare kemik iliği mikronükleus testinde pozitif sonuç verdiği, muhtemelen anöploidojen bir ajan olarak somatik hücre mutajeni olduğuna işaret edilmiştir. Buna karşın aynı raporlarda AMES testinde ve CHO hücrelerinde yapılan *in vitro* kromozom aberasyon testinde bu bileşiğin *in vitro* genotoksisitesinin bulunmadığı bildirilmiştir (21, 27, 64). Yapılan araştırmalarda albendazol'un *in vivo* genotoksisitesine ilişkin fare kemik iliği mikronükleus testi kullanılarak yapılan çalışma bulunamamıştır. Günümüz araştırmacıları genotoksik etkili bileşiklerin istenmeyen yan etkilerine karşı antimutajenik ya da antikarsinojenik özellikteki antioksidanların kullanımına dikkati çekmişlerdir (58, 132). Bu doğrultudan hareketle planlanan çalışmada albendazol'un olası genotoksik etkisi ve bu etkiye karşı C vitamininin koruyucu rolü mikronükleus frekans analizleri esasına dayanan fare mikronükleus testi ile incelendi.

Albendazol, parazitlerde mitoz bölünme aşamasında iğ iplikçiklerinin yapısında bulunan mikrotubul oluşumunu inhibe etmektedir. Mitoz bölünme geçiren hücrelerde mitotik iğ iplikçikleri fonksiyonlarındaki bozukluk sonucu kromozomlarda ayrılamama (non-disjunction) veya kromozom kaybının mikronükleus oluşumu ile sonuçlandığı belirtilmiştir (83, 105).

Benzimidazol türevi antiparaziter ilaçların mitotik iğ iplikçığı zehiri olarak etki gösterdiği bu ilaca maruz kalan insanlarda anöploidi indüksiyonu açısından potansiyel bir riskin mevcut olduğu bildirilmiştir. Albendazol tarafından tubulin polimerizasyonunun inhibisyonu sonucu mikrotübül oluşumunun bozulmasının anöploid hücrelerin oluşumunda rol oynayan mekanizma olan kromozomlarda ayrılmama gibi kromozomal bozuklarda artışa neden olduğu belirtilmiştir (113). Ramírez ve ark. (113) tarafından albendazol ve aktif metaboliti olan albendazol sülfoksitin insanlardaki genotoksik etkisini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada *in vitro* mikronükleus testi kullanılmıştır. Sağlıklı bireylerden elde edilen kanlardan

hazırlanan lenfosit hücre kültürlerine, albendazol ve albendazol sülfoksit tedavisi uygulanmış hastaların serumlarında bulunan konsantrasyonlarda (0,1, 1,0 ve 10 μ M) albendazol ve albendazol sülfoksit ilave edilmiştir. Lenfositlerdeki mikronükleus frekansı ve FISH yöntemi ile kromozomlarda ayrışmanın olup olmadığı araştırılmıştır. Albendazol'un en yüksek konsantrasyonda (10 μ M) binükleer hücrelerde 1,0 ve 10 μ M konsantrasyonlarda ise mononükleer hücrelerde mikronükleus frekansında artışa neden olduğu saptanırken albendazol sülfoksitin test edilen hiçbir konsantrasyonda artış meydana getirmediği belirlenmiştir. Ayrıca her iki bileşiğin kromozomlarda ayrılmasına neden olduğu bu etkinin ise albendazol'de daha yüksek oranda açığa çıktığı bildirilmiştir. Sonuç olarak, araştırmacılar her iki bileşiğin hücrelerde mikrotubul polimerizasyonu ile etkileşime girdiğini, mitotik iğ zehiri olarak etki gösterdiklerini ve bileşiklere maruz kalan hücrelerde anöploid riskini artırdığını bildirmişlerdir.

Aynı araştırmacılar albendazol ve metabolitlerinin insan lenfositlerindeki *in vitro* sitotoksitesi ve genotoksitesini incelemişler ve sitotoksite ölçütü olarak kültürlerde bir ya da daha fazla oranda bölünme geçiren hücre sayısını (mitotik indeks) hesaplamışlar, genotoksite ölçütü olarak ise lenfositlerdeki mikronükleus frekansını saptamışlardır. İnsan lenfosit hücre kültürlerinde albendazol (1-100 μ M) ve albendazol sülfoksitin (10-100 μ M) mitotik indeksi ve mikronükleus insidensini önemli derecede arttırdığı albendazol sülfonun ise bu parametreler üzerinde önemli bir değişikliğe neden olmadığını saptamışlardır. Araştırmacılar hücre proliferasyonunun albendazol ve albendazol sülfoksit tarafından metafaz aşamasında durdurulduğunu ve mikronükleus oluşumunun anöploidinin indüklenmesi sonucu oluşabileceğini bildirmişlerdir (112).

Çalışmamızda da benzer şekilde 1000 mg/kg ve 1500 mg/kg albendazol uygulanan farelerin kemik iliğinde mikronükleus içeren polikromatik eritrositlerin frekansında kontrol grubuna göre önemli bir artış meydana geldiği saptanmıştır. Bu etkinin ise albendazol'un hücre proliferasyonu ve farklılaşması aşamasındaki değişikliklere bağlı olarak açığa çıkabileceği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra albendazol'un parazitlerde tubuline bağlanarak mikrotubul oluşumunu inhibe etme mekanizması göz önüne alındığında mikronükleus oluşumunun kromozomlarda ayrılmama kaynaklı olduğu ve hücre bölünmesi sırasında albendazol'un iğ zehiri etkisi göstermesiyle mikronükleus oluşumunu teşvik ettiği ve anöploidiyi indüklediği söylenebilir.

DNA hasarına neden olan ajanların erken biyolojik etkilerinin belirlenmesinde en yaygın kullanılan sitogenetik testlerden biri kardeş kromatid değişim (SCE) testidir. SCE hücre bölünmesinin normal bir özelliği olarak meydana gelebilmekle birlikte, hücre DNA'sı genotoksik ajanlar tarafından zarar gördüğünde oranı artmaktadır. SCE ile ilgili yapılan çalışmaların bir kolu tedavi amaçlı kullanılan ilaçların genotoksik etkilerinin belirlenmesidir. Kemoterapötik amaçla kullanılan albendazol'un potansiyel bir mutajen olup olmadığının aydınlatılması amacıyla karaciğer kist hidatiği tanısı konulmuş hastalarda (13 kadın ve 8 erkek) *in vitro* SCE testi uygulanmış ve hasta kromozomlarındaki SCE frekansı araştırılmıştır. Albendazol uygulanan karaciğer kist hidatidli hastalarda SCE frekansında artış meydana geldiği saptanmış ve araştırmacılar albendazol'un uygulanan dozuna bağlı olarak SCE frekansında artış meydana gelmesi nedeniyle bileşiğin mutajen olabileceğini ileri sürmüşlerdir (4).

Oztaş ve ark. (105) karaciğer kist hidatidli çocuklarda albendazol'un lenfosit kültürlerindeki genotoksik etkisini incelemeye yönelik yaptıkları çalışmada tedavi öncesi ve sonrası SCE frekansı ve mikronükleus frekansını ölçmüşlerdir. Tüm hastalarda albendazol ile tedavi sonrası öncesine göre SCE ve mikronükleus frekansında önemli bir artış meydana geldiğini saptamışlardır. Araştırmacılar ilgili çalışmalar sonucunda albendazol'un *in vivo* insan lenfositlerinde genotoksik olabileceği görüşünü ileri sürmüşlerdir.

Çalışmamızda da albendazol'un dozuna bağlı olarak gözlemlenen mikronükleus frekansındaki artış bu bileşiğin potansiyel bir mutajen olabileceğini gösterir bir nitelik taşımaktadır.

Deneyisel çalışmalarda mutajenik etkinin oluşturulmasında standart bir bileşik olarak kullanılan siklofosfamid'in (CP) canlılarda biyokimyasal aktivasyondan sonra nükleik asit ve proteinler gibi duyarlı moleküllerin elektrondan zengin bölgeleriyle reaksiyona giren alkilleyici bir ajan olduğu bildirilmiştir. yapılan araştırmalarda CP metabolitlerinin, DNA'daki nükleofilik bölgeler üzerine elektrofilik saldırılar aracılığı ile kromozomlarla etkileşime girdiği belirtilmiştir (132). Wakata ve ark. (136) tarafından siklofosfamidin CD-1 farelere 100 mg/kg dozda oral yolla uygulanması sonucu kemik iliğinin deprese olduğu ve 48 saat sonra mnPCE (%) oranı $1,89 \pm 0,88$ olarak; Hatanaka ve ark. (53) tarafından siklofosfamidin 50 mg/kg dozda oral yolla uygulanması sonucu 24 saat sonra mnPCE (%) $3,14 \pm 2,07$ ve 48 saat sonra $1,30 \pm 0,27$

olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda CP 100 mg/kg c.a. dozda oral yolla uygulandı ve 48 saat sonra kemik iliğindeki polikromatik eritrositler içerisinde oluşturduğu mikronükleus frekansı hesaplandı; bu oran 2000 hücrede ortalama 47,13 (% 2,35) olarak saptandı. Çalışmamızda CP'in oluşturduğu mikronükleus frekansının benzer çalışmalardan daha yüksek olduğu belirlenmiş olup aradaki farkın çevresel koşulların değişkenliğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Son yıllarda antioksidan özelliğine bağlı olarak koruyucu ve sağaltıcı tedavide yaygın kullanım alanı bulan askorbik asidin nükleofilik bir özellik gösterdiği ve organizmada askorbat formunda reaktif ajanları engelleyerek DNA üzerine olan elektrofilik saldırılara karşı koruduğu saptanmıştır (132).

Ghaskadbi ve ark. (44) CP genotoksitesisi üzerine C vitamininin etkinliğini belirlemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada C vitamininin fare kemik iliği polikromatik eritrositlerinde mikronükleus frekansında düşüşe neden olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar CP'in mutajenik etkisinden metabolik aktivasyonu sonucu oluşan fosforamid hardal gazının sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. Yanısıra askorbik asidin CP'in mutajenik nitelik gösteremeyen alkofofosfamide indirgenmesinden sorumlu olduğunu ve dolayısıyla CP'nin genotoksitesisi üzerinde askorbik asidin *in vivo* inhibitör etkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Benzer şekilde çalışmamızda CP'le birlikte askorbik asit uygulamasının fare kemik iliği hücrelerinde CP tarafından indüklenen mikronükleus oluşumunu inhibe ettiği, askorbik asidin mikronükleus içeren polikromatik eritrosit frekansında önemli oranda düşüş oluşturarak siklofosfamidin genotoksitesisi üzerine inhibitör etki gösterdiği saptandı. Buna karşın çalışmamızda askorbik asidin uygulanan dozda albendazol'ün genotoksitesisine karşı aynı etkinliği gösteremediği belirlendi. Ancak askorbik asidin albendazol'ün genotoksitesisine karşı koruyucu etkisinin saptanmasında askorbik asidin birden fazla dozunun etkinliğinin araştırılması önerilebilir.

Çalışmanın sonuçları albendazol'ün muhtemelen anöploidojen bir ajan olarak mikronükleus oluşumuna neden olduğuna, fare eritrositlerinde genotoksik etkiye sahip olduğuna ve askorbik asidin uygulanan dozunun meydana gelen genotoksik etkiye karşı koruyucu etki gösteremediğine işaret etmektedir. Sonuç olarak albendazol'ün beşeri ve veteriner hekimlikte endoparaziter hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılan bir kemoterapötik ajan olması nedeniyle bu bulguların albendazol uygulamasının

genotoksik etki riskinin değerlendirmesi ile ilişkilendirilmesi için daha çok çalışma yapılmasına gerek duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Aardema J.M. ve Kirsch-Volders M. The *in vitro* micronucleus assay. İçinde Choy, W.N. (Ed.), *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment*. New York: Marcel Dekker; 2001. 163-186.
2. Ahmed S. ve Othman E.O. Clastogenic effects of the fasciolicide drug fasinex on river buffalo lymphocyte cultures *in vitro*. *Mutat Res* 2003; **541**:115-121. Erişim 14.01.2007, [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718\(03\)00185-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00185-2)
3. Albanese G. ve Venturi C. Albendazole: a new drug for human parasitoses. *Dermatol Clin* 2003; **21**:283-290. Erişim 12.11.2005, [http://dx.doi.org/10.1016/S0733-8635\(02\)00085-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0733-8635(02)00085-2)
4. Altıntaş N., Örenay S., Aşçı M., Reyhan E., Türk M. Yolasıgırmaz A. ve ark. Karaciğer Kist Hidatiği Tedavisinde Albendazol Kullanan Hastalarda Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Çalışması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2005, **29**; 235-237. Erişim 25.03.2007, http://www.tparazitolog.org/pdf/pdf_TPD_5.pdf
5. Aly E.A.F. ve Donya M.S. *In vivo* antimutagenic effect of vitamins C and E against rifampicin-induced chromosome aberrations in mouse bone-marrow cells. *Mutat Res* 2002; **518**:1-7. Erişim 12.11.2006, [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00037-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00037-2)
6. Amara-Mokrane A.Y., Lehucher-Michel P.M., Balansard G., Duménil G. ve Botta A. Protective effects of α -hederin, chlorophyllin and ascorbic acid towards the induction of micronuclei by doxorubicin in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis* 1996; **11**:161-167.
7. Antunes G.M.L. ve Takahashi S.C. Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. *Mutat Res* 1998; **419**:137-143. Erişim 12.11.2006, [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718\(98\)00134-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718(98)00134-X)
8. Antunes G.M.L. ve Takahashi S.C. Protection and induction of chromosomal damage by vitamin C in human lymphocyte cultures. *Teratogen Carcin Mut* 1999; **19**:53-59. Erişim 12.11.2006, <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/55002150/PDFSTART>

9. Bajpayee M., Pandey K.A., Parmar D. ve Dhawan A. Current status of short-term tests for evaluation of genotoxicity, mutagenicity and carcinogenicity of environmental chemicals and NCEs. *Toxicol Mech Method* 2005; **15**, 155-180. Erişim 14.02.2007, <http://dx.doi.org/10.1080/15376520590945667>
10. Barale R., Scapoli C., Meli C., Casini D., Minunni M., Marrazzini A. ve ark. Cytogenetic effects of benzimidazoles in mouse bone marrow. *Mutat Res* 1993; **300**, 15-28.
11. Başaran N. *Tibbi Genetik*, 8.baskı. İstanbul. Motif Matbaacılık, Güneş & Nobel Tıp Kitapevi; 2003.
12. Bhaskar Gollapudi B. ve McFadden G.L. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Muta Res* 1995; **347**, 97-99.
13. Brunton L.L., editor. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. İçinde Chemotherapy of Helminth Infections. 11th ed. 2005. <http://www.accessmedicine.com/resourceTOC.aspx?resourceID=28>
14. Campbell C.W. Benzimidazoles:Veterinary Uses. *Parasitol Today* 1990; **6**, 130-133.
15. Capece B.P.S., Navarro M., Arcalis T., Castells G., Toribio L. Carretero A. ve ark. Albendazole sulphoxide enantiomers in pregnant rats. Embryo concentrations and developmental toxicity. *Vet J* 2003; **165**:266-275. Erişim 14.03.2007, [http://dx.doi.org/10.1016/S1090-0233\(02\)00158-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1090-0233(02)00158-2)
16. Capece B.P.S., Perez R., Andaluz A., Perez F., Garcia F., Castells G. ve ark. Placental transfer of albendazole sulphoxide enantiomers in sheep. *Vet J* 2002; **163**:155-160. Erişim 12.11.2005, <http://dx.doi.org/10.1053/tvj.2001.0628>
17. Choudhury C.R., Ghosh K.S. ve Palo K.A. Cytogenetic toxicity of methotrexate in mouse bone marrow. *Environ Toxicol Phar* 2000; **8**:191-196. Erişim 14.03.2007, [http://dx.doi.org/10.1016/S1382-6689\(00\)00041-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1382-6689(00)00041-7)
18. Committee on mutagenicity of chemicals in food, consumer products and the environment (COM) Guidance on a strategy for testing of chemicals for mutagenicity

- 2000, Aralık. Erişim 14.03.2007, <http://www.dh.gov.uk/assetRoot/04/07/71/96/04077196.pdf>
19. Cynthia M. ve Kahn M.A. The Merck Veterinary Manual, 8th ed. Whitehouse Station, NJ, USA; 2006. <http://www.merckvetmanual.com>
20. Dashwood H.R. Modulation of heterocyclic amine-induced mutagenicity and carcinogenicity: an 'A-to-Z' guide to chemopreventive agents, promoters, and transgenic models. *Mutat Res* 2002; **511**:89-112. Erişim 12.03.2007, [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5742\(02\)00005-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5742(02)00005-4)
21. Dayan D.A. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Trop* 2003; **86**:141-159. Erişim 15.04.2007, [http://dx.doi.org/10.1016/S0001-706X\(03\)00031-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0001-706X(03)00031-7)
22. Dearfield L.K. ve Moore M.M. Use of genetic toxicology information for risk assessment. *Environ Mol Mutagen* 2005; **46**:236-245. Erişim 12.04.2006, <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/112137717/PDFSTART>
23. Delatour P., Garnier F., Benoit E. ve Caude I. Chiral behaviour of the metabolite albendazole sulphoxide in sheep, goats and cattle. *Res Vet Sci* 1991; **50**, 134-138.
24. Ehrlich V. Overview on tests used in genetic toxicology. [Web page on the internet]. Erişim 14.03.2007, Medical University of Vienna, Austria, Institute of Cancer Research, <http://www.sbmcta.org.br/workshop-plant/Download-br/v01.pdf>
25. Ekmekci A. DNA Onarımı, [Web page on the internet]. Erişim tarihi 11.03.2007, <http://www.med.gazi.edu.tr/egitim/donem1/dersler/dnaonarimaekmekci.htm>
26. EMEA Committee for medicinal products. Albendazole sulphoxide summary report (1). 1996 Haziran. Erişim 28.10.2004, <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/009496en.pdf>
27. EMEA Committee for medicinal products for veterinary use. Albendazole summary report (3). 2004 Haziran. Erişim 15.09.2004, <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/086503en.pdf>
28. EMEA Guidelines : Genotoxicity: Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals. Genotoxicity: Guidance on Spesific Aspects of Regulatory

Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals 3BS6a. 1995 Aralık. Erişim 22.12.2004
<http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol-3/pdfs-en/3bs6aen.pdf>

29. EPA Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.5900 *In vitro* Sister Chromatid Exchange Assay 1996 Haziran. Erişim 12.11.2005,
http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Drafts/870-5900.pdf

30. EPA Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.5100 Bacterial Reverse Mutation Test 1998 Ağustos. Erişim 12.11.2005,
http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/870-5100.pdf

31. EPA Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.5375 *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test 1998 Ağustos. Erişim 12.11.2005,
http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/870-5375.pdf

32. EPA Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.5385 Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test 1998 Ağustos. Erişim 12.11.2005,
http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/870-5385.pdf

33. EPA Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.5380 Mammalian Spermatogonial Chromosomal Aberration Test 1998 Ağustos. Erişim 12.11.2005,
http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/870-5380.pdf

34. EPA Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.5395 Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test 1998 Ağustos. Erişim 12.11.2005,
http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/870-5395.pdf

35. EPA Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.5450 Rodent Dominant Lethal Assay 1998 Ağustos. Erişim 12.11.2005,
http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/870-5450.pdf

36. EPA Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.5550 Unscheduled DNA Synthesis in Mammalian Cells in Culture 1998 Ağustos. Erişim 12.11.2005, http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/870-5550.pdf
37. EPA Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.5915 *In vivo* Sister Chromatid Exchange 1998 Ağustos. Erişim 12.11.2005, http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Drafts/870-5915.pdf
38. Evans J.H. Cytogenetic Methods for Detecting Effects of Chemical Mutagens. *Ann NY Acad Sci* 1983; **407**:131-141. Erişim 22.02.2007, <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1749-6632.1983.tb47819.x>
39. Fahmy A.M. ve Aly E.A.F. *In vivo* and *in vitro* studies on the genotoxicity of cadmium chloride in mice. *J Appl Toxicol* 2000; **20**:231-238. Erişim 14.03.2007, <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/71500191/PDFSTART>
40. Fenech M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat Res* 2000; **455**:81-95. Erişim 12.04.2007, [http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8)
41. Fenech M. ve Morley A.A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 1985; **147**, 29-36.
42. Friedeberg C.E., Walker C.G. ve Siede, W. *DNA Repair and Mutagenesis*. USA, American Society Microbiology 1995.
43. Gentile M.J., Rahimi S., Zwiesler J., Gentile J.G. ve Ferguson R.L. Effect of selected antimutagens on the genotoxicity of antitumor agents. *Mutat Res* 1998; **402**:289-298. Erişim 14.02.2007, [http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00308-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00308-4)
44. Ghaskadbi S., Rajmachikar S., Agate C., Kapadi H.A. ve Vaidya G.V. Modulation of cyclophosphamide mutagenicity by vitamin C in the *in vivo* rodent micronucleus assay. *Teratogen Carcin Mut* 1992; **12**, 11-17.
45. Giri A., Khyntiam D. ve Prasad B.S. Vitamin C mediated protection on cisplatin induced mutagenicity in mice. *Mutat Res* 1998; **421**:139-148. Erişim 18.03.2007, [http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107\(98\)00158-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107(98)00158-4)

46. Gollapudi B. ve Karma P.O. Application of a simple giemsa-staining method in the micronucleus test. *Mutat Res* 1979; **64**, 45-46.
47. Gottschall W.D., Theodorides J.V. ve Wang R. The metabolism of benzimidazole anthelmintics. *Parasitol Today* 1990; **6**, 115-124.
48. Goudah A. Aspects of the pharmacokinetics of albendazole sulphoxide in sheep. *Vet Res Commun* 2003; **27**:555-566. Erişim 15.02.2007, <http://www.springerlink.com/content/x551484n177q808w/fulltext.pdf>
49. Grisolia K.C. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutat Res* 2002; **518**:145-150. Erişim 14.02.2007, [doi:10.1016/S1383-5718\(02\)00086-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00086-4)
50. Guideline for Industry Specific aspects of regulatory genotoxicity tests for pharmaceuticals, ICH S2A Nisan 1996. Erişim 15.01.2007, <http://www.fda.gov/cder/guidance/ichs2a.pdf>
51. Gyurik J.R., Chow W.A., Zaber B., Brunner L.E., Miller A.J., Villani J.A. ve ark. Metabolism of albendazole in cattle, sheep, rats, and mice. *Drug Metab Dispos* 1981; **9**, 503-508.
52. Halliwell B. Vitamin C and genomic stability. *Mutat Res* 2001; **475**:29-35. Erişim 12.01.2007, [http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00072-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00072-0)
53. Hatanaka Y., Kitagawa Y., Toyoda Y., Kawata T., Ando N., Kawabata Y. ve ark. Micronucleus test with cyclophosphamide using mouse peripheral blood reticulocytes. *Mutat Res* 1992; **278**, 99-101.
54. Hayashi M., MacGregor T.J., Gatehouse G.D., Adler I., Blakey H.D., Dertinger D.S. ve ark. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environ Mol Mutagen* 2000; **35**:234-252. Erişim 12.11.2005, <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/71002009/PDFSTART>
55. Hayashi M., Sutou S., Shimada H., Sato S., Sasaki F.Y. ve Wakata A. Difference between intraperitoneal and oral gavage application in the micronucleus test. *Mutat Res* 1989; **223**, 329-344.

56. Hayashi M., Tice R.R., MacGregor T.J., Anderson D., Blakey H.D. Kirsh-Volders M. ve ark. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat Res* 1994; **312**, 293-304.
57. Heddle A.J., Hite M., Kirkhart B., Mavournin K., MacGregor T.J., Newell W.G. ve ark. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 1983; **123**, 61-118.
58. Hosseinimehr J.S. ve Karami M. Citrus extract modulates genotoxicity induced by cyclophosphamide in mice bone marrow cells. *J Pharm Pharmacol* 2005; **57**:505-509.
59. Iarmarcovai G., Botta A. ve Orsière T. Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy. *Toxicol Lett* 2006; **166**:1-10. Erişim 01.03.2007, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.05.015>
60. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Genotoxicity: A Standart Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals S2B 1997, Temmuz. Erişim 25.11.2005, <http://www.nihs.go.jp/dig/ich/safety/s1b/s1bstep4.pdf>
61. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals S2A 1997, Temmuz. Erişim 25.11.2005, <http://www.biologicsconsulting.com/docs/ich/ICH2A.pdf>
62. International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products. (VICH) Guidance for Industry. Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: Genotoxicity Testing 2001, Haziran. Erişim 15.10.2006, <http://www.fda.gov/cvm/Guidance/guide116.pdf>
63. JECFA Ascorbic acid 1990. Erişim 21.12.2006, <http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/ascorbic.htm>
64. JECFA Toxicological Evaluation of Certain Veterinary Drug Residues in Food. Albendazole, WHO Food Additive Series: 25, World Health Organisation. 1990,

- Geneva, 3-29. Erişim 22.03.2007,
<http://www.who.int/ipcs/publications/jecfa/monographs/en/index.html>
- 65.** Kaya B. Anti-genotoxic effect of ascorbic acid on mutagenic dose of three alkylating agents. *Turk J Biol* 2003; **27**:241-246. Erişim 05.03.2007,
<http://journals.tubitak.gov.tr/biology/issues/biy-03-27-4/biy-27-4-7-0306-4.pdf>
- 66.** Kaya S., Piriñci İ ve Bilgili A. Veteriner Uygulamalı Farmakoloji. 1. Cilt, 2. Baskı Medisan Yayınevi: 2000. pp. 421-477.
- 67.** Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Cilt 1, 7. Baskı. Ankara: Feryal matbaası.1978. pp. 315-322.
- 68.** Kim S.B., Cho M. ve Kim J.H. Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay. *Mutat Res* 2000; **469**:233-241. Erişim 22.03.2007,
[http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718\(00\)00085-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00085-1)
- 69.** Kirsch-Volders M., Sofuni T., Aardema M., Albertini S., Eastmond D., Fenech M. ve ark. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Environ Mol Mutagen* 2000; **35**, 167-172. Erişim 18.09.2004,
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.07.005>
- 70.** Krishna G. ve Hayashi M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res* 2000; **455**:155-166. Erişim 18.04.2007,
[http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00117-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00117-2)
- 71.** Krishna G., Urda G. ve Paulissen J. Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats. *Mutat Res* 2000; **453**:45-50. Erişim 12.11.2005,
[http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00074-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00074-9)
- 72.** Krishna G., Urda G. ve Theiss C.J. Comparative mouse micronucleus evaluation in bone marrow and spleen using immunofluorescence and Wright's Giemsa. *Mutat Res* 1994; **323**, 11-20.
- 73.** Krishnaja P.A. ve Sharma K.N. Ascorbic acid potentiates mitomycin C-induced micronuclei and sister chromatid exchanges in human peripheral blood lymphocytes *in vitro*. *Teratogen Carcin Mut Suppl.* 2003; **1**:99-112. Erişim 12.11.2006,
<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/103020527/PDFSTART>

74. Lacey E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int J Parasitol* 1988; **18**, 885-936.
75. Lacey E. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol Today* 1990; **6**, 112-115.
76. Lacey E. ve Watson R.T. Structure-activity relationships of benzimidazole carbamates as inhibitors of mammalian tubulin, *in vitro*. *Biochem Pharmacol* 1985; **34**, 1073-1077.
77. Landoni F.M., Soraci L.A., Delatour P. ve Lees P. Enantioselective behaviour of drugs used in domestic animals: a review. *J Vet Pharmacol Therap* 1997; **20**:1-16. Erişim 12.03.2007, doi:10.1046/j.1365-2885.1997.00045.x
78. Lange H., Eggers R. ve Bircher J. Increased systemic availability of albendazole when taken with a fatty meal. *Eur J Clin Pharmacol* 1988; **34**, 315-317.
79. Liu X.L. ve Weller F.P. Drug Therapy: Antiparasitic Drugs. *New Engl J Med* 1996; **334**:1178-1184. Erişim 31.03.2007, <http://content.nejm.org/cgi/reprint/334/18/1178.pdf>
80. Lorge E., Lambert C., Gervais V., Becourt-Lhote N., Delongas L. ve Claude N. Performances of the *in vitro* micronucleus test compared to the Mouse lymphoma assay and the *in vitro* chromosome aberration assay. *Toxicol Sci* 2006, 27 Aralık. Erişim 09.01.2007, <http://toxsci.oxfordjournals.org/cgi/reprint/kfl193v1>
81. MacGregor T.J., Heddle A.J., Hite M., Margolin H.B., Ramel C., Salamone F.M. ve ark. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat Res* 1987, **189**, 103-112.
82. Maier P. ve Schmid W. Ten model mutagens evaluated by the micronucleus test. *Mutat Res* 1976; **40**, 325-337.
83. Matter E.B. ve Grauwiler J. Micronuclei in mouse-bone marrow cells. A simple *in vivo* model for the evaluation of drug-induced chromosomal aberrations. *Mutat Res* 1974; **23**, 239-249.
84. Mavournin H.K., Blakey H.D., Cimino C.M., Salamone F.M. ve Heddle A.J. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 1990; **239**, 29-80.

85. McCann J. ve Ames N.B. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion. *Proc. Nat. Acad. Sci* 1976; **73**:950-954. Erişim 21.03.2007, <http://www.pnas.org/cgi/reprint/73/3/950>
86. McCann J., Choi E., Yamasaki E. ve Ames N.B. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc. Nat. Acad. Sci* 1975; **72**:5135-5139. Erişim 18.04.2007, <http://www.pnas.org/cgi/reprint/72/12/5135>
87. McKee H.R., Vergnes S.J., Galvin B.J., Douglas F.J., Kneiss J.J. ve Andrews, S.L. Assessment of the *in vivo* mutagenic potential of methyl tertiary-butyl ether. *J Appl Toxicol* 1997; **17**:S31-S36. Erişim 14.03.2007, <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/8613/PDFSTART>
88. McKellar A.Q. ve Scott W.E. The benzimidazole anthelmintic agents- a review. *J Vet Pharmacol Ther* 1990; **13**, 223-247.
89. Mortelmans K. ve Rupa S.D. Current Issues in Genetic Toxicology Testing for Microbiologists. *Adv App Microbiol* 2004 ; **56**:379-401. Erişim 15.09.2006, [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164\(04\)56012-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164(04)56012-4)
90. Mortelmans K. ve Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res* 2000; **455**:29-60. Erişim 12.06.2006, [http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00064-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00064-6)
91. Natarajan, T.A., Tucker, D.J. ve Sasaki, S.M. Monitoring Cytogenic Damage *In vivo*. İçinde Tardiff, G.R., Lohman, M.H.P., Wogan, N.G (Ed.),. Methods to assess DNA Damage and Repair : Interspecies Comparisons. England: John Wiley and Sons Ltd; 1994; 95-116.
92. Nefic, H. Anticlastogenic effect of vitamin C on cisplatin induced chromosome aberrations in human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 2001; **498**:89-98. Erişim 15.02.2007, [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00269-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00269-8)
93. Norkus, P.E. ve Kuenzig, A.W. Studies on the antimutagenic activity of ascorbic acid *in vitro* and *in vivo*. *Carcinogenesis* 1985; **6**:1593-1598.

94. Odin, P.A. Vitamins as antimutagens: Advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. *Mutat Res* 1997; **386**:39-67. Erişim 22.03.2005, [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5742\(96\)00044-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5742(96)00044-0)
95. OECD. Bacterial Reverse Mutation Test. OECD Guideline For Testing of Chemicals 471 1997, Temmuz. Erişim 11.04.2007, <http://www.oecd.org/dataoecd/18/31/1948418.pdf>
96. OECD. *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test. OECD Guideline For Testing of Chemicals 473 1997, Temmuz. Erişim 15.04.2007, <http://ecb.jrc.it/documents/Testing-Methods/ANNEXV/B10web2000.pdf>
97. OECD. Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test. OECD Guideline For Testing of Chemicals 475 1997, Temmuz. Erişim 15.04.2007, <http://www.oecd.org/dataoecd/18/11/1948450.pdf>
98. OECD. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. OECD Guideline For Testing of Chemicals 474 1997, Temmuz. Erişim 15.04.2007, <http://www.oecd.org/dataoecd/18/34/1948442.pdf>
99. OECD. Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test. OECD Guideline For Testing of Chemicals 483 1997, Temmuz. Erişim 05.04.2007, <http://ecb.jrc.it/DOCUMENTS/Testing-Methods/ANNEXV/B23web2000.pdf>
100. OECD. *In vitro* Micronucleus Test. OECD Guideline For Testing of Chemicals Draft Proposal For A New Guideline 487 2006, Aralık. Erişim 15.04.2007, <http://www.oecd.org/dataoecd/33/22/37865944.pdf>
101. Office of Food Additive Safety Redbook 2000. Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients. Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay 2006, Nisan. Erişim 14.08.2006, <http://www.cfsan.fda.gov/~redbook/redivc1c.html>
102. Office of Food Additive Safety Redbook 2000. Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test 2000, Temmuz. Erişim 14.06.2004, <http://www.cfsan.fda.gov/~redbook/redivc1d.html>

- 103.** Office of Food Additive Safety Redbook 2000. Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients. Bacterial Reverse Mutation Test 2000, Temmuz. Erişim 14.08.2005, <http://www.cfsan.fda.gov/~redbook/redivc1a.html>
- 104.** Office of Food Additive Safety Redbook 2000. Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients. Short-Term Tests for Genetic Toxicity 2000, Temmuz. Erişim 14.08.2005, <http://www.cfsan.fda.gov/~redbook/red-ivc1.html>
- 105.** Oztas S., Salman B.A., Tatar A., Yigiter M., Halil Yazgi. ve ark. Genotoxic effect of albendazole in pediatric patients with hepatic hydatid disease. *Int J Infect Dis* 2007; **11** :446-449. Erişim 15.09.2007, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2007.01.002>
- 106.** Öztürk Ö. Mutasyon ve Mutajenler, 2004, [Web page on the internet]. Erişim tarihi 11.12.2006, <http://tip.cumhuriyet.edu.tr/cutf/Donem1/DonemI20042005/Ilozturkozdemir/mutasyonlar.ppt>
- 107.** Parry M.J. Detecting chemical aneugens: a commentary to ‘Aneuploidy: a report of an ECETOC task force’. *Mutat Res* 1998; **410**:117-120. Erişim 12.03.2006, [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5742\(97\)00031-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5742(97)00031-8)
- 108.** Plumb C.P. Veterinary Drug Handbook, 3rd ed. Iowa/Ames, Iowa State University Press; 1999.
- 109.** Pourgholami H.M., Akhter J., Wang L., Lu Y. ve Morris L.D. Antitumor activity of albendazole against the human colorectal cancer cell line HT-29: *in vitro* and in a xenograft model of peritoneal carcinomatosis. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; **55**:425-432. Erişim 27.03.2007, <http://www.springerlink.com/content/8p71b1pvp9fkcvxk/fulltext.pdf>
- 110.** Pourgholami H.M., Woon L., Almajd R., Akhter J., Bowery P. ve Morris L.D. *In vitro* and *in vivo* supression of growth of hepatocellular carcinoma cells by albendazole. *Cancer Lett* 2001, **165**:43-49. Erişim 25.02.2007, [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00382-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00382-2)
- 111.** Premkumar K. ve Bowlus L.C. Ascorbic acid reduces the frequency of iron induced micronuclei in bone marrow cells of mice. *Mutat Res* 2003; **542**:99-103. Erişim 15.02.2007, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.09.002>

112. Ramírez T., Benítez-Bribiesca L., Ostrosky-Wegman P. ve Herrera L. *In vitro* effects of albendazole and its metabolites on the cell proliferation kinetics and micronuclei frequency of stimulated human lymphocytes. *Arc Med Res* 2001; **32**:119-122. Erişim 25.02.2007, [doi:10.1016/S0188-4409\(01\)00259-4](https://doi.org/10.1016/S0188-4409(01)00259-4)
113. Ramírez T., Eastmond A.D. ve Herrera A.L. Non-disjunction events induced by albendazole in human cells. *Mutat Res* 2007; **626**:191-195. Erişim 12.11.2005, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.09.004>
114. Romagna F. ve Staniforth D.C. The automated bone marrow micronucleus test. *Mutat Res* 1989; **213**, 91-104.
115. Salamone M., Heddle J., Stuart E. ve Katz M. Towards an improved micronucleus test. Studies on 3 model agents, Mitomycin C, Cyclophosphamide and Dimethylbenzanthracene. *Mutat Res* 1980; **74**, 347-356.
116. Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res* 1975; **31**, 9-15.
117. Seiler P.J. The mutagenicity of benzimidazole and benzimidazole derivatives. I. Forward and reverse mutations in *Salmonella typhimurium* caused by benzimidazole and some of its derivatives. *Mutation Res* 1972; **15**, 273-276.
118. Seiler, P.J. Toxicology and genetic effects of benzimidazole compounds. *Mutat Res* 1975; **32**, 151-167.
119. Seiler P.J. The mutagenicity of benzimidazole and benzimidazole derivatives. VI. Cytogenetic effects of benzimidazole derivatives in the mouse and the chinese hamster. *Mutat Res* 1976; **40**, 339-347.
120. Shamberger J.R. Genetic toxicology of ascorbic acid. *Mutat Res* 1984; **133**, 135-159.
121. Sharma S. ve Abuzar S. The benzimidazole anthelmintics-chemistry and biological activity. *Progress in Drug Research* 1983; **27**, 85-161.
122. Souhaili-El Amri H., Fargetton X., Benoit E., Totis M. ve Batt A. Inducing effect of albendazole on rat liver drug-metabolizing enzymes and metabolite pharmacokinetics. *Toxicol Appl Pharm* 1988; **92**, 141-149.
123. SPSS: SPSS for Windows Advanced Statistics Release 11.5.2004.

- 124.** Stopper H. ve Mler O.S. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A Minireview. *Toxicol in vitro* 1997; **11**, 661-667.
- 125.** Teruel M.T., Felipa A.E., Solana H.D., Sallovitz J.M., ve Lanusse C.E. Placental and fetal toxicity of albendazole sulphoxide in Wistar rats. *Vet Hum Toxicol* 2003; **45**(3), 131-136.
- 126.** The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Sex difference in the micronucleus test. *Mutat Res* 1986; **172**, 151-163.
- 127.** The Interdepartmental Group on Health Risks from Chemicals (IGHRC) Assessment of chemical carcinogens: Background to general principles of a weight of evidence approach 2002.
- 128.** Thybaud V., Aardema M., Clements J., Dearfield K., Galloway S., Hayashi M. ve ark. Strategy for genotoxicity testing: Hazard identification and risk assessment in relation to *in vitro* testing, *Mutat Res* 2007; **627**:41-58. Erişim 15.03.2007, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.10.003>
- 129.** U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Guidance for Industry and Review Staff Recommended Approaches to Integration of Genetic Toxicology Study Results. 2006 Ocak. Erişim 13.01.2007, <http://www.fda.gov/Cder/guidance/6848fml.pdf>
- 130.** United States of Pharmacopeia Albendazole 1999. Erişim 10.03.2007, <http://www.drugs.com/MMX/Albendazole.html>
- 131.** Vanparys P., Deknudt G., Vermeiren F., Sysmans M. ve Marsboom, R. Sampling times in micronucleus testing. *Mutat Res* 1992; **282**, 191-196.
- 132.** Vijayalaxmi K.K. ve Venu R. *In vivo* anticlastogenic effects of L-ascorbic acid in mice. *Mutat Res* 1999 ; **438**:47-51. Erişim 12.11.2006, [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718\(98\)00161-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718(98)00161-2)
- 133.** Vitaglione P. ve Fogliano V. Use of antioxidants to minimize the human health risk associated to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in food. *J Chromatogr B* 2004; **802**:189-199. Erişim 12.03.2007, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.09.029>

- 134.** Von Ledebur M. ve Schmid W. The micronucleus test, methodological aspects. *Mutat Res* 1973; **19**, 109-117.
- 135.** Vural N. Toksikoloji Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları 1996, No: 73. 115-128.
- 136.** Wakata A., Yamashita T., Tamaoki M., Ohshima T. ve Kojima M. Micronucleus test with cyclophosphamide administered by intraperitoneal injection and oral gavage. *Mutat Res* 1989; **223**, 369-372.
- 137.** WHO. Report of the WHO informal consultation on the use of Praziquantel during pregnancy/Lactation and Albendazol/Mebendazol in children under 24 months. Geneva, 16-20. 2002 Nisan. Erişim 17.10.2004, http://www.who.int/wormcontrol/documents/en/pvc_20024full.pdf
- 138.** Woodward N.K. Veterinary pharmacovigilance. Part 6. Predictability of adverse reactions in animals from laboratory toxicology studies. *J Vet Pharmacol Therap* 2005; **28**: 213-231. Erişim 12.11.2005, <http://www.blackwell-synergy.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2885.2005.00650.x>
- 139.** Young, R.R. Genetic toxicology: Web resources. *Toxicology* 2002; **173**:103-121. Erişim 12.11.2005, [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00026-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00026-4)
- 140.** Zeiger, E. History and rationale of genetic toxicology testing: an impersonal, and sometimes personal, view. *Environ Mol Mutagen* 2004; **44**:363-371. Erişim 21.03.2007, <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/109741538/PDFSTART>

ETİK KURUL KARARI

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ ETİK KURULU İstanbul University Veterinary Faculty Ethic Committee

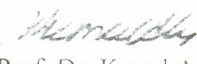
Karar No: 2004-87

28.05.2004

İlgi: İ. Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlığının 2-2373 sayı ve 28. 05.2004 tarihli yazısı.

Fakültemiz Farmakoloji ve Toksikoloji Anabnilim Dalı öğretim elemanlarından Arş. Gör. Fulya ÜSTÜN'ün sorumluluğunu üstlendiği "Albendazol'un olası Genotoksitesi üzerine Askorbik asidin etkisi" başlıklı araştırma projesi kurulumuz tarafından incelenmiş ve **"Etik Kurul İlkelerine Uygun Bulunmuştur"**.


Prof. Dr. Müfit TOPARLAK
Başkan


Prof. Dr. Kemal AK
Başkan Yardımcısı


Doç. Dr. Recep KAHRAMAN
Üye


Doç. Dr. H. Hakan BOZKURT
Üye


Yard. Doç. Dr. Dr. Altan ARMUTAK
Raportör

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	FULYA	Soyadı	ÜSTÜN
Doğ.Yeri	BURSA	Doğ.Tar.	23.06.1978
Uyruğu	T.C	TC Kim No	53869465770
Email	fustun@istanbul.edu.tr , fulyaust@yahoo.com	Tel	0 212 473 70 70/17144

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ	2007
Yük.Lis.	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ	2001
Lisans		
Lise	BURSA U.H. ANADOLU LİSESİ	1995

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ	2001-2007
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	Çok İyi	89	
Almanca	Zayıf	Zayıf	Zayıf		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	68,54	69,84	71,09
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office XP	Çok İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

1. KELEŞ Ü.O., BAKIREL T., ÜSTÜN F. Köpek meme tümörlerinde sağaltım seçeneği olarak cox inhibitörlerinin önemi. II. Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi 6-8 Eylül 2007/Samsun
2. AYDIN, S.A., ÜSTÜN F. Tanenler-1 Kimyasal yapıları, Farmakolojik Etkileri, Analiz Yöntemleri. İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi 33 (1), 21-31, 2007.
3. ÜSTÜN F., AYDIN, S.A. Tanenler-2 Toksisiteleri, Beslenme Üzerine Etkileri, Detannifikasyon. İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi 33 (1), 33-41, 2007.
4. Genetik Araştırmalarda Kullanılan Yöntemlerin Farmakoloji’de Uygulamaları Toplantısı. Türk Farmakoloji Derneği 13. Farmakoloji Eğitim Sempozyumu. 2 Haziran 2006/Van
5. Makale Yazma Uygulaması 16-17 Şubat 2006 İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü/İstanbul
6. ÜSTÜN F. Nitrik Oksit’in Farmakolojisi. I. Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi 22-24 Eylül 2005/Ankara
7. Kontrollü Salım Sistemleri 4. Sempozyumu. Beşeri ve Veteriner Kontrollü Salım Sistemleri Güncel Durum ve Geleceğe Bakış. Kontrollü Salım Sistemleri Derneği 27 Mayıs 2005/İstanbul.
8. Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Seminerleri Programı. Prof. Dr. Şahin Akman Toplantısı. 2-4 Mart 2005/Ankara.
9. ŞENER, S., ÜSTÜN, F., AYDIN, A.S.: Küçük Hayvan Formülleri (Çeviri) İstanbul Üniversitesi Yayın no: 4522, ISBN: 975-404-735-9, Aralık 2004.
10. The 6th International Post-Graduate Course on Poultry Management: Nutritional, Physiological and Veterinary Aspects. The Hebrew University of Jerusalem, Faculty of Agricultural, Food and Environmental Quality Sciences 8 Kasım- 2 Aralık 2004 Rehovot/ İsrail
11. ÜSTÜN, F. Disease Control in modern poultry houses/ Aspergillosis Disease Abstract Final Project Presentation. The 6th International Post-Graduate Course on Poultry Management: Nutritional, Physiological and Veterinary Aspects 8 Kasım- 2 Aralık 2004 The Hebrew University of Jerusalem, Faculty of Agricultural, Food and Environmental Quality Sciences Rehovot/ İsrail
12. II. Ulusal HPLC ve Diğer Separasyon Teknikleri Sempozyumu. Gata Tıp Fakültesi. 07-09 Ekim 2004/Ankara.
13. II. Deney Hayvanlarının Biyolojik Araştırmalarda Kullanılması Kursu 27-30 Eylül 2004/ Diyarbakır
14. 17. Ulusal Farmakoloji Kongresi ve I. Klinik Farmakoloji Sempozyumu. Türk-Hollanda Farmakoloji Dernekleri Ortak Toplantısı. 17-21 Ekim 2003/Antalya.
15. HPLC ve Kütle Spektrometre Tekniklerinin Gıda Güvenliği ve Çevre Alanlarında Uygulanması. 18 Haziran 2003/İstanbul.
16. Yeni Yüzyılda Modern İnce Tabaka Kromatografisi (T.L.C.) ve HPTLC, Kromatografinin Temel Uygulanmasının Geldiği Son Nokta ve Kantifikasyon Semineri. 23 Mayıs 2003/İstanbul.

Özel İlgil Alanları (Hobileri): Müzik dinlemek, Yüzmek, Tiyatro