

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

**ASTIM TEDAVİSİNDE KULLANILAN MONTELUKASTIN SAFSIZLIKLARININ
TAYİNİ VE OLASI GENOTOKSİK ETKİLERİNİN İN VİTRO
DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Esra EMERCE GÜRSEL

Tez Danışmanı
Prof.Dr. İsmet ÇOK

ANKARA
Aralık 2013

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

**ASTIM TEDAVİSİNDE KULLANILAN MONTELUKASTIN SAFSIZLIKLARININ
TAYİNİ VE OLASI GENOTOKSİK ETKİLERİNİN İN VİTRO
DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Esra EMERCE GÜRSEL

Tez Danışmanı
Prof.Dr. İsmet ÇOK

Bu tez Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından “TÜBİTAK 111T506”
proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Aralık 2013

Aydınlık yarınlara...

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 10/12/2013



Prof. Dr. Sema BURGAZ
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. İsmet ÇOK
Gazi Üniversitesi



Prof. Dr. Tuncer DEĞİM
Gazi Üniversitesi



Prof. Dr. Yalçın DUYDU
Ankara Üniversitesi



Prof. Dr. Nuran DİRİL
Hacettepe Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller, Grafikler	VII
Tablolar	IX
Kısaltmalar	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Safsızlıklar Ve İlaç Güvenliğine Etkileri	6
2.2. Safsızlıklar İle İlgili Düzenlemeler (Regülasyonlar)	9
2.3. Genotoksik Safsızlıklar	16
2.4. Genotoksik Safsızlıklar İle İlgili Düzenlemeler	17
2.4.1. Genotoksik Safsızlıklarda İleri Düzeyde Zorlayıcı Faktörler	24
2.5. Çocuklarda Safsızlık Maruziyetlerinin Toksikolojik Açıdan Değerlendirilmesi	26
2.6. Safsızlıklarda Analitik Yaklaşımlar	27
2.7. Safsızlıklarda Toksikolojik Yaklaşımlar	30
2.7.1. Safsızlıkların Mutajenitesinin Değerlendirilmesinde Yapı-Aktivite İlişkisinin (SAR) Kullanımı	31
2.7.2. Mutajenik Etkinin Değerlendirilmesi: Bakteride Geri Mutasyon Testi	34
2.7.3. Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi: Mitotik İndeks Değerlendirmesi	36
2.7.4. İn vitro Kromozomal Aberasyon Yöntemi	37
2.7.5. İn vitro Test Sistemlerinde Metabolik Aktivasyon	38

2.8. Astım	39
2.8.1. Tanım Ve Etiyoloji	39
2.8.2. Astım Hastalığının Dünya Ve Türkiye'deki Durumu	40
2.8.3. Astım Oluşum Mekanizmaları	42
2.8.4. Astımda Tedavi	43
2.9. Montelukast Etkin Maddesinin Astım Tedavisindeki Yeri	46
2.10. Literatürde Safsızlıklara Yönelik Analitik Çalışmalar: Montelukast Safsızlıkları	50
2.11. Literatürde Safsızlıklara Yönelik Toksikolojik Çalışmalar	53
3. GEREÇ VE YÖNTEM	57
3.1. Montelukast Etkin Maddesini İçeren Müstahzarlarda Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Safsızlıkların Miktar Tayini Ve Yöntem Validasyonu (Geçerlilik Onayı)	57
3.1.1. Kullanılan Ekipman, Alet Ve Malzemeler	58
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	58
3.1.3. Analizi Yapılan Safsızlık Bileşiklerinin Özellikleri	59
3.1.3.1. Sülfoksit Safsızlığı	59
3.1.3.2. Cis İzomer Safsızlığı	59
3.1.3.3. Michael Katımları I ve II Safsızlıkları	60
3.1.3.4. Metilketon Safsızlığı	62
3.1.3.5. Metilstiren Safsızlığı	62
3.1.4. Safsızlıkların HPLC ile Tayini Test Şartları	63
3.1.5. Çözeltilerin Hazırlanması	64
3.1.6. Analitik Yöntemin Validasyonu (Geçerlilik Onayı)	65
3.1.6.1. Özgünlük (Specificity)	65
3.1.6.2. Doğrusallık (Linearity)	66
3.1.6.3. Doğruluk Ve Geri Kazanım (Accuracy / Recovery)	66

3.1.6.4. Kesinlik (Precision)	67
3.1.6.4.1. Gün İçi Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)	67
3.1.6.4.2. Günler Arası Kesinlik (Orta Kesinlik)	67
3.1.6.5. Teşhis Ve Miktar Tayini Alt Sınırı (Limit of Detection LOD; Limit of Quantification LOQ)	67
3.1.7. Montelukast İçeren Müstahzarlarda Safsızlıkların Miktar Tayini	68
3.2. Safsızlıkta Yapı-Aktivite İlişkisinin (QSAR) Değerlendirilmesi	69
3.3. Ames Testi İle Mutajenitenin Değerlendirilmesi	69
3.3.1. Kullanılan Cihaz, Alet Ve Sarf Malzemeler	69
3.3.2. Kullanılan Kit İçerikleri Ve Kimyasallar	70
3.3.3. Kullanılan Suşlar Ve Özellikleri	71
3.3.4. Çalışmanın Tasarımı	72
3.3.5. Deneyin Uygulanması	72
3.3.5.1. Suşların Gecelik Kültürlerinin Hazırlanması	72
3.3.5.2. Test Maddesinin Ve Pozitif Kontrollerin Hazırlanışı	73
3.3.5.3. S9 Karışımı İçeriği	73
3.3.5.4. Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi	74
3.3.5.5. Mutajenite Deneyi	74
3.3.6. Mutajenik Etkinin Değerlendirilmesi	75
3.4. Safsızlığın Mitotik İndeks İle Sitotoksitesinin Belirlenmesi Ve İn Vitro Kromozomal Aberasyon Testi İle Genotoksitesinin Değerlendirilmesi	76
3.4.1. Kullanılan Cihaz, Alet Ve Sarf Malzemeler	76
3.4.2. Kullanılan Kimyasallar	77
3.4.3. Kullanılan Çözeltiler	77
3.4.4. Biyolojik Materyal Ve Deneyin Tasarımı	78

3.4.5. Deneyin Uygulanması	79
3.4.5.1. Çözünürlük Testi	79
3.4.5.2. Kültürün Hazırlanması	79
3.4.5.3. Test Maddelerinin Kültüre Eklenmesi	79
3.4.5.4. Hücrelerin Eldesi Ve Kromozom Preparatlarının Hazırlanışı	80
3.4.5.5. Kromozom Preparatlarının Boyanması	80
3.4.6. Metafazların Değerlendirilmesi	80
3.5. İstatistiksel Analiz	81
4. BULGULAR	82
4.1. Montelukast Etkin Maddesini İçeren Müstahzarlarda HPLC İle Safsızlık Miktar Tayini Ve Yöntem Validasyonu	82
4.1.1. Analitik Yöntemin Validasyonu	82
4.1.1.1. Özgünlük	82
4.1.1.2. Doğrusallık	86
4.1.1.3. Doğruluk Ve Geri Kazanım	88
4.1.1.4. Kesinlik	91
4.1.1.4.1. Gün İçi Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)	91
4.1.1.4.2. Günler Arası Kesinlik (Orta Kesinlik)	91
4.1.1.5. Teşhis Ve Miktar Tayini Alt Sınırı (LOD, LOQ)	95
4.1.2. Örnek Kromatogramlarında Pik Saflıklarının Kontrolü	95
4.1.3. Montelukast Etkin Maddesini İçeren Müstahzarlarda HPLC İle Safsızlık Miktar Tayini	96
4.2. Safsızlıkta Yapı-Aktivite İlişkisi (QSAR) Sonuçları	102
4.3. Sülfoksit Safsızlığında Bakteride Geri Mutasyon Testi İle Mutajenitenin Değerlendirilmesi	102

4.4. Sülfoksit Safsızlığının Mitotik İndeks İle Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi Ve İn Vitro Kromozomal Aberasyon Testi İle Genotoksik Etkilerinin Değerlendirmesi	111
4.4.1. Sülfoksit Safsızlığının Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi	111
4.4.2. Sülfoksit Safsızlığının Genotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi	113
5. TARTIŞMA	117
6. SONUÇ	135
7. ÖZET	137
8. SUMMARY	139
9. KAYNAKLAR	141
10. EKLER	157
11. ÖZGEÇMİŞ	159

Şekiller

Şekil 1: ICH Q3A/B rehberlerine göre kalifikasyon testleri karar ağacı	12
Şekil 2: Toksikofor gruplara bazı örnekler	32
Şekil 3: Dünya astım prevalans haritası	41
Şekil 4: Astım patojenezinde inflamasyon ve yeniden yapılanma etkileşimi	43
Şekil 5: Beş yaşından büyük çocuklar, ergenler ve yetişkinler için astımda kontrole dayalı tedavi yaklaşımı	45
Şekil 6: Beş yaşından küçük çocuklar için astımda kontrole dayalı tedavi yaklaşımı	46
Şekil 7: Montelukastın genel özellikleri	48
Şekil 8: Montelukastın metabolik yolları	49
Şekil 9: Sülfoksit safsızlığının kimyasal yapısı	59
Şekil 10: Cis izomer safsızlığının kimyasal yapısı	60
Şekil 11: Michael katımları I ve II safsızlıklarının kimyasal yapıları	61
Şekil 12: Metilketon safsızlığının kimyasal yapısı	62
Şekil 13: Metilstiren safsızlığının kimyasal yapısı	63
Şekil 14: İç standart 5-metil-2-nitrofenol'e ait kromatogram	83
Şekil 15: Sülfoksit safsızlığına ait kromatogram	83
Şekil 16: Michael katımları I ve II safsızlıklarına ait kromatogram	83
Şekil 17: Cis izomer safsızlığına ait kromatogram	84
Şekil 18: Metilketon safsızlığına ait kromatogram	84
Şekil 19: Metilstiren safsızlığına ait kromatogram	84
Şekil 20: Montelukast etkin maddesine ait kromatogram	85
Şekil 21: Safsızlıklar ve montelukast etkin maddesinin karışımına ait kromatogram	85

Şekil 22: Montelukast içeren ürün numunesi matriksinde safsızlıkların teşhisi örnek kromatogramı	86
Şekil 23: İlaç ürününde sülfoksit safsızlığına ait pikin saflık kontrolü örneği	95

Grafikler

Grafik 1: Sülfoksit safsızlığına ait kalibrasyon grafiği ve denklemi	86
Grafik 2: Michael katımları I ve II safsızlıklarına ait kalibrasyon grafiği ve denklemi	87
Grafik 3: Cis izomer safsızlığına ait kalibrasyon grafiği ve denklemi	87
Grafik 4: Metilketon safsızlığına ait kalibrasyon grafiği ve denklemi	87
Grafik 5: Metilstiren safsızlığına ait kalibrasyon grafiği ve denklemi	88
Grafik 6: Montelukast etkin maddesine ait kalibrasyon grafiği ve denklemi	88
Grafik 7: 4 mg montelukast içeren ilaç ürünlerinde safsızlık miktarlarının rehberdeki sınır değerlere göre durumu	101
Grafik 8: 10 mg montelukast içeren ilaç ürünlerinde safsızlık miktarlarının rehberdeki sınır değerlere göre durumu	101
Grafik 9: Sülfoksit safsızlığının metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğunda S. typhimurium TA98, TA100, TA1535, TA1537 ve E.coli combo suşlarında mutajenite değerlendirme sonuçları	110
Grafik 10: Sülfoksit safsızlığının hücrelerde mitotik indeks üzerine etkisi	112

Tablolar

Tablo 1: Yeni ilaç ürünlerinde bozunma ürünleri için eşik değerler	11
Tablo 2: Mutajenik ve karsinojenik potansiyellerine göre safsızlıkların sınıflandırılması ve kontrolleri	23
Tablo 3: ICH M7'ye göre kabul edilebilir maruziyet miktarları	23
Tablo 4: Yetişkinler ve çocuklar için astım tedavisinde yararlanılan ilaç grupları	44
Tablo 5: USP monografında (2010) montelukast sodyumun organik safsızlıkları ve izin verilen miktarları	52
Tablo 6: Ames testinde kullanılan suşların genotipleri	71
Tablo 7: Suşlara özgü pozitif kontroller ve deneyde kullanılan son konsantrasyonları	73
Tablo 8: Analiz edilen maddelerin ve iç standartın alıkonma zamanları	82
Tablo 9: Sülfoksit safsızlığına ait doğruluk ve geri kazanım çalışması sonuçları	89
Tablo 10: Michael katımları I ve II safsızlıklarına ait doğruluk ve geri elde çalışması sonuçları	89
Tablo 11: Cis izomer safsızlığına ait doğruluk ve geri elde çalışması sonuçları	89
Tablo 12: Metilketon safsızlığına ait doğruluk ve geri elde çalışması sonuçları	90
Tablo 13: Metilstiren safsızlığına ait doğruluk ve geri elde çalışması sonuçları	90
Tablo 14: Montelukast etkin maddesine ait doğruluk ve geri elde çalışması sonuçları	90
Tablo 15: Sülfoksit, michael katımları I ve II, cis izomer, metilketon, metilstiren safsızlıkları ve montelukast etkin maddesi için gün içi kesinlik çalışması sonuçları	91

Tablo 16: Sülfoksit safsızlığının günler arası kesinlik çalışması sonuçları	92
Tablo 17: Michael katımları I ve II safsızlıklarının günler arası kesinlik çalışması sonuçları	92
Tablo 18: Cis izomer safsızlığının günler arası kesinlik çalışması sonuçları	93
Tablo 19: Metilketon safsızlığının günler arası kesinlik çalışması sonuçları	93
Tablo 20: Metilstiren safsızlığının günler arası kesinlik çalışması sonuçları	94
Tablo 21: Montelukast etkin maddesinin günler arası kesinlik çalışması sonuçları	94
Tablo 22: Montelukast safsızlıklarının ve montelukastın teşhis sınırı ve miktar tayini alt sınırı sonuçları	95
Tablo 23: Montelukast etkin maddesini içeren çocuk ilaçlarında safsızlıkların miktarları	99
Tablo 24: Montelukast etkin maddesini içeren yetişkin ilaçlarında safsızlıkların miktarları	100
Tablo 25: Sülfoksit safsızlığının metabolik aktivasyon yokluğunda S. typhimurium TA98 suşunda geri dönen koloni sonuçları	103
Tablo 26: Sülfoksit safsızlığının metabolik aktivasyon varlığında S. typhimurium TA98 suşunda geri dönen koloni sonuçları	104
Tablo 27: Sülfoksit safsızlığının metabolik aktivasyon yokluğunda S. typhimurium TA100 suşunda geri dönen koloni sonuçları	105
Tablo 28: Sülfoksit safsızlığının metabolik aktivasyon varlığında S. typhimurium TA100 suşunda geri dönen koloni sonuçları	105
Tablo 29: Sülfoksit safsızlığının metabolik aktivasyon yokluğunda S. typhimurium TA1535 suşunda geri dönen koloni sonuçları	106

Tablo 30: Sülfoksit safsızlığının metabolik aktivasyon varlığında S. typhimurium TA1535 suşunda geri dönen koloni sonuçları	106
Tablo 31: Sülfoksit safsızlığının metabolik aktivasyon yokluğunda S. typhimurium TA1537 suşunda geri dönen koloni sonuçları	107
Tablo 32: Sülfoksit safsızlığının metabolik aktivasyon varlığında S. typhimurium TA1537 suşunda geri dönen koloni sonuçları	107
Tablo 33: Metabolik aktivasyon yokluğunda E.coli combo suşlarında sülfoksit safsızlığının mutajenik etki sonuçları	108
Tablo 34: Metabolik aktivasyon varlığında E.coli combo suşlarında sülfoksit safsızlığının mutajenik etki sonuçları	109
Tablo 35: Sülfoksit safsızlığına 3 saat ve 24 saatlik maruziyetlerde hücrelerde %mitotik indeks düzeyleri	112
Tablo 36: S9 yokluğunda sülfoksit safsızlığı ile indüklenmiş (3 saat maruziyet) insan lenfositlerinde kromozomal aberasyon yüzdeleri	113
Tablo 37: S9 varlığında sülfoksit safsızlığı ile indüklenmiş (3 saat maruziyet) insan lenfositlerinde kromozomal aberasyon yüzdeleri	114
Tablo 38: S9 yokluğunda sülfoksit safsızlığı ile indüklenmiş (24 saat maruziyet) insan lenfositlerinde kromozomal aberasyon yüzdeleri	114
Tablo 39: Sülfoksit safsızlığı ile indüklenmiş insan lenfositlerinde hücre başına kromozomal aberasyon ortalamaları	116

Kısaltmalar

ALARP: Uygulanabildiği ölçüde en düşük (As low as reasonably practicable)

BSS: Bağıl standart sapma (Relative standard deviation)

CDER: İlaç Araştırma ve Değerlendirme Merkezi (Center for Drug Evaluation and Research)

CHMP: Beşeri İlaç Ürünleri Komitesi (Committee for Medicinal Products for Human Use)

CPMP: Tescilli İlaç Ürünleri Komitesi (Committee for Proprietary Medicinal Products)

Cys-LT: Sisteinil lökotrien (Cysteinyl leukotriene)

EMA: Avrupa İlaç Ajansı (European Medicines Agency)

EPA: Çevre Koruma Ajansı (Environmental Protection Agency)

FDA: Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration)

GTI: Genotoksik safsızlık (Genotoxic impurity)

HPLC: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High performance liquid chromatography)

ICH: Beşeri İlaçların Ruhsatlandırılmasında Teknik Gerekliliklerin Uyumlaştırılması Konusunda Uluslar Arası Kurul (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)

IND: Araştırılan yeni ilaç (Investigational New Drug)

LOEL: En düşük etkinin gözlemlendiği doz (Lowest Observed Effect Level)

LOD: Teşhis alt sınırı (Limit of Detection)

LOQ: Miktar tayini alt sınırı (Limit of Quantification)

NDA: Yeni ilaç başvurusu (New Drug Application)

NOEL: Etkinin görülmediği doz (No Observed Effect Level)

OECD: Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (Organisation for Economic Co-operation and Development)

PDA: Foto diode array dedektörler (Photo Diode Array detectors)

PDE: İzin verilen günlük maruziyet (Permitted Daily Exposure)

PhRMA: Amerika İlaç Araştırma ve Üreticileri (Pharmaceutical Research and Manufacturers of America)

PTFE: Politetrafloroetilen (Polytetrafluoroethylene)

(Q)SAR: (Kantitatif) yapı aktivite ilişkisi (Quantitative Structure Activity Relationship)

RP: Ters faz (reverse phase)

SWP: Güvenlik Çalışma Grubu (Safety Working Party)

TTC: Toksikolojik sorun eşiği (Threshold of Toxicological Concern)

USP: Amerikan Farmakopesi (U.S. Pharmacopeia)

1.GİRİŞ

İlaçlar, insanları hastalıklardan korumak, tedavi etmek, teşhis koymak, bir fizyolojik fonksiyonu düzeltmek veya insan yararına değiştirmek amacı ile kullanılan, genellikle bir veya kombinasyon şeklinde doğal ve sentetik kaynaklı maddelerden formüle edilmiş etkin maddeler içeren, uygulanacağı doza göre hazırlanmış ürünlerdir¹. Günümüzde ilaçlar için yeni etken maddelerin geliştirilmesi ve tedavi uygulama alternatiflerinin çeşitlenip gelişmesi, ilaç güvenliğini daha da önemli bir konuma getirmiştir. Çünkü ilacın veya farmasötik ürünlerin güvenilirliğini belirlemek etkinlikleri kadar önemlidir. Farmasötik ürünlere ait güvenilirlik uygulamaları, ilaç etkin maddesinin sentezinden başlayıp en son ulaştığı eczane, servis, klinik, hatta ev ortamına kadar geçen süreç içinde oluşabilecek tehlikeleri ortadan kaldırmaya yönelik olarak ele alınmaktadır¹. İlaç maddelerinde etkin maddeler, ilaç ürünlerinde ise etkin madde ve yardımcı maddeler dışında kalan herhangi bir bileşen olarak tanımlanan safsızlıklar^{2,3}, ilaçların güvenilirliği konusunda problem yaratan istenmeyen kimyasallardır. Safsızlıklar hiçbir yarar sağlamadan sadece sağlık riski oluşturan, küçük miktarlarda dahi farmasötik ürünün etkinliği ve güvenilirliğini etkileyebilen bileşiklerdir⁴. Günümüzde ilaçların büyük bir kısmı sentetik olarak üretilmektedir. İlaç maddesinin sentezlenmesi ve ilacın dozaj formunun oluşturulması sırasında çok sayıda başlangıç maddesi, ara ürünler, reajanlar, katalizörler ve çözücülerden yararlanılmaktadır. Bu süreçlerde, sentez yöntemi, yetersiz saflaştırma, formülasyon, bozunma, başlangıç maddelerinin kalitesi ve bileşenler arasında ortak etkileşim gibi birçok farklı kaynaktan safsızlıklar oluşabilmektedir⁵. İlaçla tedavilerde, önemle üzerinde durulan iki temel unsur, güvenilirlik ve etkinlik olup, safsızlıklar konusu hem kalitenin hem de güvenliğin birlikte değerlendirilmesini gerektiren bir konudur⁶.

Farmasötik ürünleri kullanan bireylerde fazladan sağlık riskleri oluşturmaya neden olan genotoksik safsızlıklar, genetik mutasyonlar, kromozom kırıkları ve/veya kromozomların yeniden düzenlenmesine neden olabilmektedir. Bu yönü ile genotoksik safsızlıklar, insanlarda kanser oluşturma potansiyeline sahip olmaları açısından konu içinde özel bir yer tutmaktadır⁷. Özellikle ilaçlarda genotoksik potansiyele sahip safsızlıkların mutajenez ve karsinogenezde rol oynayabileceği göz önünde bulundurularak, son yıllarda ICH, FDA, EMA gibi düzenleyici kuruluşlar tarafından safsızlıklar ile ilgili rehberler hazırlanarak ilaç endüstrisine yönelik özel düzenlemeler getirilmektedir^{2,3,8,9,10}.

Söz konusu düzenlemelerde, etkin maddeler ve ilaç ürünlerinde safsızlık profillerinin belirlenmesi ile birlikte, başta genotoksisite olmak üzere toksikolojik değerlendirmelerin yapılması gerektiği belirtilmektedir. Safsızlıklarda karsinogenitenin tahmininde, uzun süreli ve pahalı kanser çalışmaları yerine yapı-aktivite ilişkisi veya genotoksisite testlerine odaklanılmakta ve değerlendirmeler sonunda safsızlıkların sınıflandırılmasına göre kontrollerin yapılması önerilmektedir. Konu ile ilgili tüm çabalar, ilaç madde ve ürünlerinden safsızlıkları ortadan kaldırmak için olsa da, teknik olarak bu durum olanaksız olup aynı zamanda maliyeti de artırmaktadır. Bu nedenle safsızlık kontrolünde, önemli bir toksikolojik etkinin görülmediği sınır değerler veya kabul edilebilir risk düzeyi yaklaşımının uygulanması gerektiği üzerinde durulmaktadır^{10,11}. Safsızlık değerlendirmeleri başlıca yeni ilaç maddeleri ve ürünlerinde ruhsat başvurularında istenmektedir. Ayrıca jenerik ilaçların üretimleri sırasında da orijinal ilaçtan farklı yapıda ve miktarda safsızlık meydana gelebilmekte ve değişen safsızlık profillerinin belirlenmesi gerekmektedir^{12,13}. Bununla birlikte, günümüzde piyasadaki ürünler için de bazı koşullarda safsızlık değerlendirmelerinin yapılması gerektiği üzerinde durulmaktadır¹⁴. Karar verici kuruluşlar ve konunun uzmanları tarafından

safsızlıklar ile ilgili çalışmalar ve tartışmalar hala devam etmekte olup düzenleyici yaklaşımlar dinamik bir süreçte ilerlemektedir.

Düzenleyici kuruluşların büyük önem verdiği, rehberlerin hazırlandığı ve bilimsel yaklaşımların sunulduğu safsızlıklar konusunda çalışmaların her geçen gün artmasına karşılık, tüm dünyada konu üzerine mevcut çalışma ve literatür oldukça kısıtlıdır. Çalışmalar safsızlıkların belirlenebilmesi için gerekli analitik yaklaşımlar üzerine yoğunlaşmıştır. “Kalifikasyon” olarak adlandırılan, safsızlıkların biyolojik olarak güvenli olduğunu gösteren verilerin elde edilmesi ve değerlendirilmesine² yönelik çalışmalar ise çok sınırlıdır. Ülkemiz açısından bakıldığında ise, safsızlıkların toksikolojik değerlendirmelerine yönelik düzenleme (regülasyon) ve çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle gerçekleştirilen çalışma ile toplum sağlığını yakından ilgilendiren, kaliteli ve güvenliği toksikolojik olarak kanıtlanmış ilaç üretimi sağlamak amacı ile ilaç sanayinin ve sağlıkla ilgili kamu kurumlarının safsızlıklar konusundaki farkındalığının artırılmasına yönelik bir adım atmak amaçlanmıştır.

Çocukluk döneminden başlayarak yaşamın önemli bir kısmında mevcut bir hastalık nedeniyle ilaç kullanımı, diğer bir deyişle ilaçların kronik olarak kullanılması durumu, kullanılan ilaç içindeki safsızlıklara da kronik maruziyeti beraberinde getirmektedir. Bu şekilde ele alınması gereken hastalıklardan biri de astım hastalığıdır. Astım, etiyolojisinde genetik ve çevresel faktörlerin rol aldığı bilinen, patojenezi ise henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamayan, yetişkinlerin yanı sıra özellikle çocukluk çağının en yaygın kronik solunum hastalığı olup tüm toplumlarda görülme sıklığı giderek artan en önemli hastalıkların başında gelmektedir¹⁵. Astım tedavisinde kullanılan ilaçların büyük bir kısmı, semptomları önleme ve kontrol altına almak, yaşam kalitesini iyileştirmek, astım ataklarının sıklık ve şiddetini azaltmak ve havayolu tıkanmalarını

düzeltilmek için, hastalığın başından itibaren kronik olarak kullanılmaktadır. Astım tedavisinde, son yıllarda lökotrien aktivitesinin selektif olarak engellenmesi üzerinde durulmakta ve lökotrien reseptör antagonisti olan montelukast etkin maddesini içeren ilaçlar, profilaktik ve kronik tedavide sıklıkla tercih edilmektedir¹⁶. Astımda ilaç kullanımı, hastalığın yaşamın erken döneminde başlaması ve tedavinin kronik olması nedeni ile dikkat gerektirmektedir. Konuya hassasiyeti artıran önemli bir nokta ise, montelukast etkin maddesini içeren ilaçların kronik kullanımının, içerebileceği safsızlıklara da kronik maruziyeti bir arada getirmesidir. Özellikle çocuklarda, ilaca ve dolayısıyla safsızlıklara hayatlarının büyük bir kısmında maruz kalmaları söz konusudur. Bununla birlikte çocuklarda kimyasalların absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve atılımlarında görülen yaşa bağlı farklılıklar göz önüne alındığında, kimyasallara duyarlılığın yetişkinlerden daha fazla olması, beklenilmeyen etkilerin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir¹⁷. Bu etkiler arasında genotoksisite, ileriye dönük başta kanser olmak üzere, olumsuz sonuçların meydana gelmesine zemin hazırlayabilmektedir. Bu çerçevede, herhangi toksikolojik değerlendirme verisinin bulunmadığı montelukastın safsızlıkları üzerine bir çalışma yapmanın, safsızlıkların hastalara getireceği fazladan toksisite yükünü belirlemek açısından değerli olacağı kanaatine varılmıştır.

Bu çalışma, piyasada montelukast etkin maddesi içeren farklı firmalara ait ilaçlarda, belirlenen safsızlıklar için miktar tayini analizlerinden yola çıkarak, sınır değerleri aşan safsızlıklarda, rehberlerde belirtilen mutajenite ve genotoksisite analiz ve değerlendirmelerinin yapılması ve kontrolüne yönelik önerilerin verilmesi amacı ile planlanmıştır.

Bu kapsamda belirlenen amaca ulaşmak için sistematik bir yaklaşımla,

- 1) Türkiye piyasasındaki farklı firmalara ait montelukast etkin maddesini içeren yetişkin ve çocuk ilaçlarında, Amerikan Farmakopesi'nde etkin madde için bildirilen altı adet safsızlığın (sülfoksit, cis izomer, michael katımları I ve II, metilketon, metilstiren) bulunup bulunmadığının belirlenmesi ve miktar tayinlerinin yapılması,
- 2) Düzenleyici kuruluşların yayımladığı rehberlere göre, her bir ilaç için safsızlıklarının raporlama, tanımlama ve kalifikasyon analizi sınır değerlerine göre değerlendirilmesi,
- 3) Farklı firmalarda üretilen ilaçların safsızlık miktarlarının farklılık gösterip göstermediğinin belirlenmesi,
- 4) Rehberlere göre, kalifikasyon sınır değerlerini aşan safsızlığın mutajenite/genotoksisite verilerine ulaşmak amacıyla toksikolojik değerlendirmelerin yapılması;
 - İn silico yapı-aktivite ilişkisi analizinin yapılması,
 - Bakteride geri mutasyon testi ile gen mutasyon analizinin gerçekleştirilmesi,
 - İn vitro kromozomal aberasyon yöntemi ile sitotoksisitenin (mitotik indeksin belirlenmesi) ve genotoksisitenin değerlendirilmesi,
- 5) Elde edilen toksisite verilerine dayanarak ilgili rehberlere göre safsızlığın değerlendirilmesi ve sınıflandırılması planlanılarak gerçekleştirilmiştir.

3. GENEL BİLGİLER

3.1. Safsızlıklar Ve İlaç Güvenliğine Etkileri

Multidisipliner bir yaklaşımla özgün, etkin ve güvenli bir ilaç üretiminin amaçlandığı ilaç keşfi, pahalı, karmaşık ve uzun bir süreçtir. İlaç geliştirme sürecinde araştırmalar, klinik öncesi çalışmalar ve klinik çalışmalar olarak iki aşamada gerçekleştirilmektedir¹⁸. Klinik öncesi aşamada aday ilaç maddeleri, in silico, in vitro ve in vivo testler ile farmakokinetik, etkinlik ve toksisiteleri açısından değerlendirilmektedir. Elde edilen ön değerlendirmeler doğrultusunda tedavi potansiyeline sahip test moleküllerinde araştırma ve geliştirmeye devam etme kararı verilmektedir. Klinik öncesi testlerde, toksikolojik çalışmalar ile kısa ve uzun dönemli toksik yan etkiler, karsinojenite, mutajenite, teratojenite bilgileri ve insan çalışmalarında kullanılacak izleme parametrelerinin tanımlanması sağlanmaktadır. Çalışmalarda potansiyel olarak insanlarda etkin ve güvenli olabilecek ilaç adayları için, araştırılan yeni ilaç (IND) başvurusu ile otoriteden onay alındıktan sonra klinik çalışmalara geçilmektedir. Klinik çalışmalar dört fazdan (faz 1-4) oluşmaktadır ve fazlarda giderek artan sayıda insan uygulamaları gerçekleştirilmektedir. İlaç güvenliği konusu özellikle faz 1 aşamasında öncelikli araştırma konusu olsa da, diğer tüm faz çalışmalarında da konuya ilgi devam etmektedir. Klinik çalışmalarda insanlarda farmakokinetik, terapötik etkinlik, doz ve yan etkiler üzerine araştırmalar gerçekleştirilerek başarılı sonuçlar otoriteye yeni ilaç başvurusu (NDA) olarak sunulmaktadır. Onay alınmasının ardından ilacın üretimi yapılmakta ve piyasaya girmektedir. İlacın pazara girmesinden sonraki izleme çalışmaları ise faz 4'ü oluşturmakta advers etkiler raporlanmaya devam edilmektedir¹⁹.

Klinik alışmalar için yeni ilaç geliştirme ve bu ilaçların onaylanması sırasında farmasötik ajanların güvenliğinin belirlenmesi, sağlık uzmanları ve düzenleyici kuruluşların içinde bulunduğu bir risk/yarar değerlendirmesini kapsamaktadır. Terapötik ilaçlarla ilişkili olarak “güvenli” terimi, hiçbir şekilde “toksikite oluşturmayan” anlamında değerlendirilmemelidir. “Güvenli” göreceli bir kavram olup doz, konsantrasyon, tür, sağlık durumu, uygulama şekli vb. birçok faktöre baėlıdır²⁰. Farmasötik ürünün güvenliği, etkin maddenin toksikolojik özellikleri kadar çeşitli kimyasal dönüşümler sırasında oluşan safsızlıkların karakteri ile de ilişkilidir. Kelime anlamı olarak “safsızlık” ele alındığı yere göre farklı fakat benzer tanımlamaları içermektedir. Yeni ilaç maddelerindeki safsızlıklar için “yeni ilaç maddesi olarak tanımlanan kimyasal madde dışında, yeni ilaç maddesinin içinde yer alan herhangi bir bileşen”², tanımı kullanılırken, yeni ilaç ürünlerindeki safsızlıklar için ise “yeni ilaç ürünü içinde yer alan ilaç maddesi ve yardımcı madde dışında kalan herhangi bir bileşen”³ tanımı kullanılmaktadır. İlaç tamamen inert veya üstün farmakolojik özellikli yabancı bir madde içerse dahi bu safsızlık olarak nitelendirilmekte ve küçük miktarlarda dahi ilaç ürününün etkinliği ve güvenliğini etkileyebilmektedir²¹. Safsızlıkların hiçbir yarar sağlamadan sadece risk oluşturması nedeni ile uygulanan tedavinin riski bu safsızlıkların sayısı, tipi ve konsantrasyonlarına bağlı olarak da artmaktadır. Bu kapsamda, ilaç safsızlıkları eczacılık dünyasında “kirletici” olarak da isimlendirilebilmektedir²².

Genel olarak safsızlıklar, ilaç maddesinin bozunması ile (ilaçla ilgili safsızlıklar), ilaç maddesinin üretim sürecinde (süreçle ilişkili safsızlıklar) ve ilaç ürününün üretimi ve saklanması sırasında oluřabilmektedir²³. Etkin maddenin sentezlenmesi sürecinde, çeşitli başlangıç maddeleri, ara ürünler ve re ajanlar kullanılmaktadır. Çoğunlukla sentetik organik kimyada tek bir son ürün elde etmek mümkün olmamakta,

kuvvetle muhtemel hedef ürünle birlikte yan ürünler de elde edilmektedir. Bu maddeler toksik özellikler taşıyabilmekte, etkin madde veya nihai ilaç ürününde safsızlık olarak düşük miktarlarda bulunabilmektedirler⁵.

Beşeri İlaçların Ruhsatlandırılmasında Teknik Gerekliliklerin Uyumlaştırılması Konusunda Uluslar Arası Kurul (ICH) rehberlerinde, safsızlıklar üç başlık altında sınıflandırmıştır:

Organik Safsızlıklar: İlaç maddesinin üretimi ve/veya saklanması sırasında oluşabilen, başlangıç ürünleri, yan ürünler, ara ürünler, bozunma ürünleri, re ajanlar, ligandlar ve katalizörler gibi maddelerdir.

İnorganik safsızlıklar: Ağır metaller, diğer kalıntı metaller, inorganik tuzlar, çeşitli maddeler (re ajanlar, ligandlar, katalizörler) ve diğer materyalleri (süzme yardımcıları, aktif kömür vb.) kapsamaktadır. İlaç ürünlerinde birçok kaynaktan gelebilen inorganik safsızlıklar, sentez sırasında kasten eklenebileceği gibi kontaminant olarak da bulunabilmektedir.

Kalıntı Çözücüler: İlaçlardaki kalıntı çözücüler ilaç maddeleri veya yardımcı maddelerin üretiminde veya ilaç ürünlerinin hazırlanmasında kullanılan veya meydana gelen organik uçucu çözücülerden kaynaklanmaktadır.

İlaçların güvenlik ve kalitesini değiştiren bu safsızlıkların yapısı ve miktarı, ilaç maddesinin sentetik yolağı, reaksiyon koşulları, ilaç maddesi başlangıç maddesinin kalitesi, re ajanlar, çözücüler, saflaştırma basamakları, yardımcı maddeler, ilaç ürünü üretim süreci, ambalajlama ve son ürünün saklanması gibi birçok faktörden etkilenebilmektedir²⁴. Bundan dolayı ilaçlardaki safsızlıkların oluşumunu önlemek, saflaştırmak ve safsızlık kontrolünü sağlamak için üretim sırasında yoğun çalışmalar ve deneyim gerekmektedir.

2.6.Safsızlıklar İle İlgili Düzenlemeler (Regülasyonlar)

Düzenlemelerin en çok bulunduğu endüstrilerden biri olan ilaç endüstrisi, araştırma, geliştirme, üretim ve pazarlama konularının her aşamasında birçok rehber ve sınırlamaya tabidir²⁰. Günümüzde ilaçlarda bulunan safsızlıklarla ilgili de düzenleyici kuruluşlar tarafından yayımlanan birçok rehber bulunmaktadır.

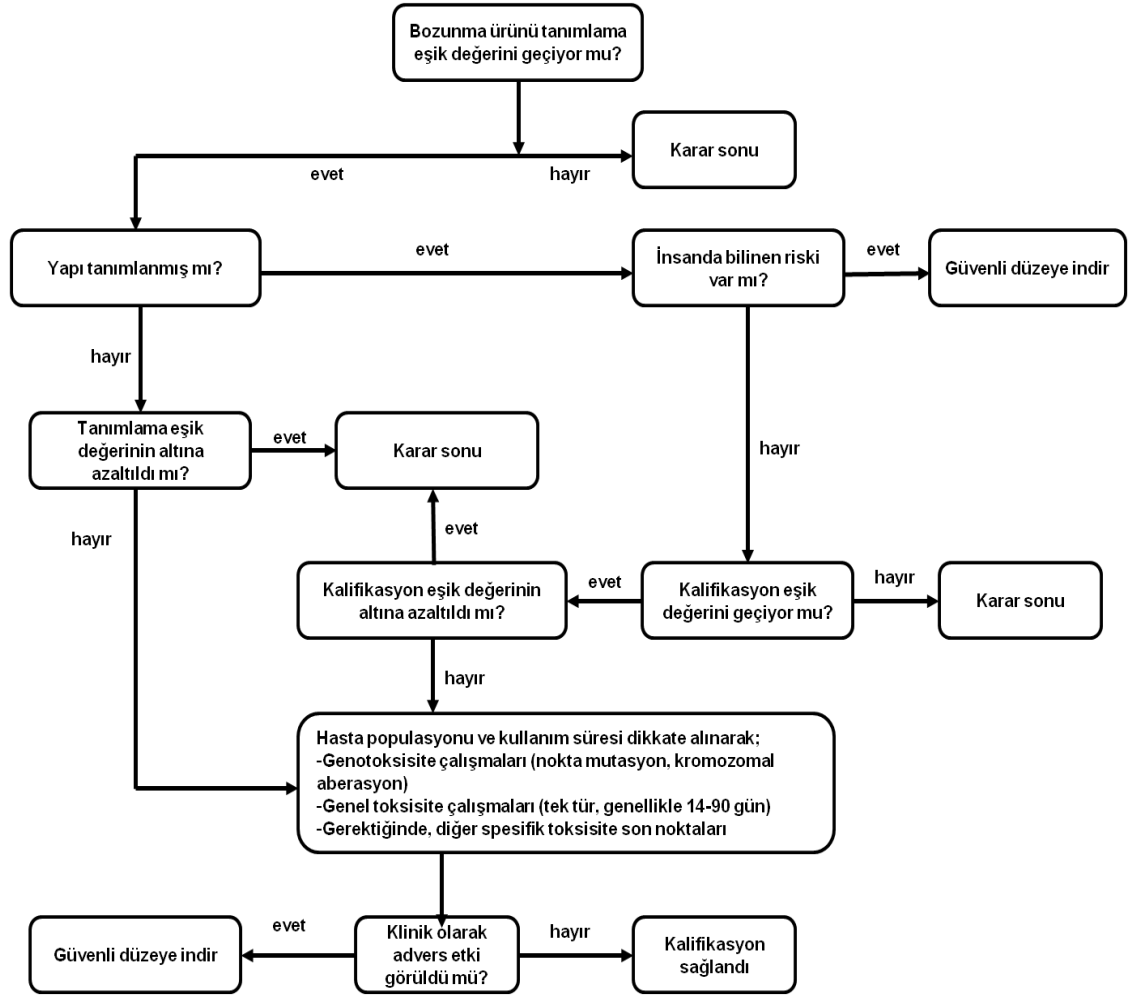
Avrupa, Amerika ve Japonya tarafından kabul edilen ICH'in ilk kez 1995 yılında safsızlıklar konusunda taslak rehber yayımlamasının ardından, günümüze dek konuyla ilgili beş temel rehber ortaya çıkarmıştır: "Q3A(R2), Yeni İlaç Maddelerinde Safsızlıklar", "Q3B(R2), Yeni İlaç Ürünlerinde Safsızlıklar", "Q3C(R4), Safsızlıklar: Kalıntı Çözücüler için Rehber", "Q3D, Safsızlıklar: Metal Safsızlıklar için Rehber" ve "M7, Potansiyel Karsinojenik Riskin Sınırlandırılması İçin İlaçlarda DNA Reaktif (Mutajenik) Safsızlıkların Değerlendirilmesi ve Kontrolü"^{2,3,8,14,25}. ICH Q3A(R2), kimyasal sentez ile üretilmiş ve daha önce ruhsat almamış yeni ilaç maddelerindeki safsızlıkları kapsamaktayken ICH Q3B(R2) rehberi, yeni ilaç maddelerinden üretilen yeni ilaç ürünlerindeki safsızlıkları (ilaç maddesinin bozunma ürünleri veya yardımcı madde ve/veya kap-kapak sistemi ile ilaç maddesinin reaksiyon ürünleri) ele almaktadır. Her iki rehber de ilaç geliştirmenin klinik araştırma fazındaki yeni ilaç maddelerine/ürünlerine uygulanmamaktadır. Bu rehberler, safsızlıkların raporlanması, tanımlanması, miktar tayinleri, ilaç madde ve ürünlerinde toksikolojik sorunlar ortaya çıkarmayacak eşik değerlerin tanımlanmasına ilişkin bilgileri sağlamaktadır. ICH rehberlerine göre, günde 2 g'dan az dozda alınan yeni ilaç maddelerinde; safsızlık %0.05'ten daha fazlaysa raporlanmalı, %0.1'den fazlaysa tanımlanmalı ve %0.15'ten fazlaysa kalifikasyonu yapılmalıdır. Maksimum günlük dozu 2 g'dan daha yüksek olan ilaç maddelerinde ise safsızlık raporlama, tanımlama ve kalifikasyon limitleri sırasıyla %0.03, %0.05 ve %0.05 olarak belirtilmektedir. Yeni ilaç

ürünlerinde de safsızlık limit değerleri günlük alınan ilaç madde miktarı açısından belirtilmektedir (Tablo: 1). Bununla birlikte, sınır değerler verilmesine rağmen bazı özel durumlarda daha düşük veya yüksek eşik değerlerin uygun olabileceğine de dikkat çekilmektedir. Safsızlıkların olağan dışı etkin, toksik veya farmakolojik etki gösterdiği durumlara bağlı olarak düşük sınır değerler ele alınırken, bazı durumlara göre bilimsel gerekçeler sağlanarak yüksek değerler de kullanılabilir. İlgili rehberlerde kalifikasyon sınırını aşan safsızlıklarda minimum taramanın yapılması tavsiye edilmektedir. Minimum tarama; gen mutasyon analizini (bakteride geri mutasyon testi) ve in vitro kromozomal aberasyon testini içermektedir. İhtiyaç duyulması halinde genel toksisite çalışmaları (tek türde, genellikle 14 veya 90 gün) ve diğer özel toksisite son nokta çalışmalarının da yapılabilmesi belirtilmektedir (Şekil: 1). Rehberlerde ruhsat başvurularında ilgili safsızlıkların belgelenmesinde gerekli bilgilerin içerikleri, analitik yaklaşımlar, karar süreçleri ve kalifikasyonlar hakkında bilgiler sunulmaktadır^{2,3}.

Tablo 1: Yeni ilaç ürünlerinde bozunma ürünleri için eşik değerler³

RAPORLAMA EŞİK DEĞERLERİ	
<u>Maksimum günlük doz^{1*}</u>	<u>Eşik değer</u>
≤1 g	%0.1
>1 g	%0.05
TANIMLAMA EŞİK DEĞERLERİ	
<u>Maksimum günlük doz</u>	<u>Eşik değer</u>
<1 mg	%1 veya 5 µg toplam günlük alım ^{2*}
1 mg – 10 mg	%0.5 veya 20 µg toplam günlük alım
>10 mg – 2 g	%0.2 veya 2 mg toplam günlük alım
>2 g	%0.1
KALİFİKASYON EŞİK DEĞERLERİ	
<u>Maksimum günlük doz</u>	<u>Eşik değer</u>
<10 mg	%1 veya 50 µg toplam günlük alım
10 mg – 100 mg	%0.5 veya 200 µg toplam günlük alım
>100 mg – 2 g	%0.2 veya 3 mg toplam günlük alım
>2 g	%0.15

1*: günlük alınan ilaç etkin maddesi miktarı, 2*: bozunma ürününün toplam günlük alım miktarı



Şekil 1: ICH Q3A/B rehberlerine göre kalifikasyon testleri karar ağacı

Sunulan çalışmanın konusunu oluşturmamakla birlikte, organik safsızlıkların dışında yer alan kalıntı çözücüler ve metal safsızlıklar ile ilgili de günümüzde çeşitli düzenlemeler bulunmaktadır. Safsızlıklar konusuna genel yaklaşımı göz önüne sermek amacıyla bu rehberler ve düzenleyici dokümanlar hakkında da aşağıda kısaca kapsamı belirtilmiştir.

ICH Q3C(R5) rehberi, hastaların güvenliği için ilaçlarda bulunabilen bazı kalıntı çözücülerde toksikolojik olarak kabul edilebilir sınır değerleri tanımlamakta ve toksik çözücülerin daha az kullanılmasını tavsiye etmektedir. İlgili rehberde göre, kalıntı çözücüler insan sağlığına olası riskleri açısından üç gruba ayrılmaktadır. “Sınıf 1 çözücüler: kaçınılması gereken çözücüler” risk/yarar değerlendirmesinde kullanımları için güçlü nedenler olmadıkça, ilaç etkin maddeleri, yardımcı maddeleri veya ilaç ürünlerinin üretiminde kaçınılması gereken çözücülerdir. İnsan karsinojeni olduğu bilinen, insan karsinojeni olduğuna yönelik güçlü şüphe uyandıran veya çevresel tehlikeler bu grupta yer almaktadır (ör: benzen). Daha az şiddette toksisite gösteren “sınıf 2 çözücüler: sınırlı bulunması gereken çözücüler” ise potansiyel advers etkilerden hastaları korumak amacıyla sınırlı kullanılmalıdır. Genotoksik olmayan hayvan karsinojenleri veya nörotoksisite/teratojenite gibi diğer geri dönüşümsüz toksisiteler için muhtemel neden oluşturan ajanlar bu grupta yer almaktadır (ör: metanol). Uygulamalarda “sınıf 3: toksik potansiyeli düşük olan çözücüler”in kullanılması tavsiye edilmektedir (ör: dimetilsülfoksit). Rehberde ilaçlarda kalıntı çözücülerin kabul edilebilir alım miktarları olarak “izin verilen günlük maruziyet” (PDE) kavramı tanımlanmaktadır. PDE organizmada etkinin görülmediği doz (NOEL) veya en düşük etkinin gözlemlendiği doz (LOEL)’den türetilmekte, ekstrapolasyon için çeşitli belirsizlik faktörleri hesaba katılmaktadır. Sınıf 2 çözücüler için günlük doz ve PDE değeri kullanılarak ppm cinsinden kabul edilebilir konsantrasyon değerine ulaşılmaktadır. Sınıf 2 çözücülerde hesaplanan konsantrasyon limitinin üzerinde bulunan ve sınıf 3 çözücülerde %0.5’in üzerinde bulunan durumlar için tanımlama ve kalifikasyon çalışmalarının yapılması gerektiği bildirilmektedir⁸.

Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından yayımlanan “Metal Katalizör veya Metal Reajan Kalıntıları İçin Spesifikasyon Limitleri” başlıklı rehberde, etkin madde, yardımcı madde veya ilaç ürünlerinde bulunabilen metal katalizör veya metal reajan kalıntıları için maksimum kabul edilebilir

konsantrasyon limitleri üzerine öneriler sunulmaktadır. Rehberde metal kalıntıları, güvenlik seviyelerine bağlı olarak sınıflandırılmakta ve konsantrasyon limitleri düzenlenmektedir. Sınıflandırma üç grupta yapılmaktadır: “Sınıf 1- önemli güvenlik sorunu olan metaller” (ör: platinum), “sınıf 2- düşük güvenlik sorunu olan metaller” (ör: bakır) ve “sınıf 3- asgari güvenlik sorunu olan metaller” (ör: demir). Sınır değerler maksimum günlük doz, tedavinin süresi, ilaç ürününün uygulama yolu ve metal kalıntının PDE değerine bağlı olarak hesaplanmaktadır. Rehberde ayrıca test stratejileri, analitik prosedürler, ilaç madde ve ürünlerindeki metal kalıntıları için raporlama seviyeleri üzerinde durulmaktadır²⁶. ICH Q3D rehberinde ise, ilaç ürünleri ve içeriklerinde metal safsızlıkların kalitatif ve kantitatif limit değerleri için küresel politika oluşturmayı hedefleyen bir rehber geliştirilmektedir. 2013 yılında ikinci basamak çalışmaları başlayan rehberde, potansiyel elementel safsızlıkların toksisite verilerinin değerlendirilmesi, toksikolojik sorun oluşturacak her element için PDE değerinin hesaplanması ve ilaç ürünlerindeki elementel safsızlıkların PDE değeri veya altındaki düzeylerde sınırlandırılması için tasarlanan kontrollerin geliştirilmesi üzerinde durulmaktadır²⁵.

Diğer taraftan farmasötik maddelerde bulunan metal safsızlıklarının kontrolünde, Amerikan Farmakopesi’nde (USP) Ağır Metaller <231> bölümünde belirtilen limit test uygulaması bir asırı aşkın süredir uygulanmaktadır²⁷. Bununla birlikte, <231> kısmında yer alan yöntemin önemli eksiklikler taşıması nedeni ile 2012 yılında farmasötik ürünlerde elementel safsızlıkların tanımlanması için yeni teknolojiler göz önünde bulundurularak yeni yöntemler oluşturulmuştur. USP <232> (Elementel safsızlıklar-Limitler) ve USP <233> (Elementel Safsızlıklar-Prosedürler) uzun süredir devam eden USP yöntem <231>’in yerine geçerek 1 Mayıs 2014 tarihinden itibaren yürürlüğe girecektir. USP <231> ağır metaller için limit teste benzer olarak, Uluslararası Farmakope 4.0. Ek-2 Bölüm 2.2.3’te yer alan “Ağır Metaller İçin Limit Test”, Avrupa

Farmakopesi 7.0. Bölüm 2.4.8 “Ağır Metaller”, Japon Farmakopesi XV Bölüm 1.07 “Ağır Metaller Limit Test” ve Hint Farmakopesi 6.0. Bölüm 2.3.13 “Ağır Metaller için Limit Test” gibi farmakopeler de aynı yaklaşımlarla kontrollere rehberlik etmektedir.

Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), İlaç Araştırma ve Değerlendirme Merkezi’nin (CDER) “Endüstri için Rehber, Kısaltılmış Yeni İlaç Başvuruları: İlaç Maddelerinde Safsızlıklar” ve “Endüstri için Rehber, Kısaltılmış Yeni İlaç Başvuruları: İlaç Ürünlerinde Safsızlıklar” başlıklı rehberleri de ilaç endüstrisine safsızlıklar konusunda yol gösterici nitelikte belgelerdir^{12,13}. Kısaltılmış yeni ilaç başvuruları, etkin madde ana dosyaları, ilaç maddesinin sentez veya proseslerindeki değişikliklerde veya bozunma ürünü tip ve miktarını etkileyebilecek değişikliklerde sunulan kısaltılmış yeni ilaç başvurusu eklerinde, ilaç maddesinin ve ürünlerinin saflık bilgilerini de içeren spesifikasyonların ibrazı gerekmektedir. Rehberlerde, safsızlıkların listelenmesi ve bu safsızlıkların kabul kriterlerinin belirlenmesi önerilmektedir. Safsızlıkların kabul kriterlerinin düzenlenmesinde, USP’de belirtilmiş safsızlıklar için Farmakope’deki değerlerin esas alınabileceği bildirilmiştir. Sınır değerlerin aşıldığı durumlarda kalifikasyonlarının yapılması önerilmektedir. USP’de sınır değerlerin belirlenmediği safsızlıklar için, referans ilahtaki safsızlık miktarları ile karşılaştırarak kalifikasyon yapılması önerilmektedir. İlaç ürünlerinde ICH Q3B’deki kalifikasyon limitlerinin dikkate alınabileceği ve bu değerlerin aşılması durumunda Q3B’de belirtilen toksisite çalışmaları önerilmektedir. Diğer bir seçenek ise, bilimsel literatür, metabolit verisi veya toksisite çalışmalarından elde edilen kalifikasyon düzeyleri temel alınarak kabul kriterlerinin düzenlenmesidir.

2.7. Genotoksik Safsızlıklar

Düşük dozlarda dahi genetik mutasyonlara, kromozom kırıklarına ve/veya kromozomların yeniden düzenlenmesini indükleyebilen ve bu şekilde insanlarda kanser oluşturma potansiyeline sahip olabilen safsızlıklar “genotoksik safsızlıklar” (GTI) olarak adlandırılmaktadır⁷. Genotoksikite ve karsinojenite gibi istenmeyen toksik etkilere sahip GTI’lar, güvenlik risklerinin oldukça yüksek olması nedeni ile safsızlık konusu içerisinde özel bir yer tutmaktadır. Genotoksik safsızlıklar etki mekanizmalarına göre “eşik etkili mekanizma ile etki ettiğine dair yeterli (deneysel) veri bulunan genotoksik maddeler” ve “eşik etkili mekanizma ile etki ettiğine dair yeterli (deneysel) veri bulunmayan genotoksik maddeler” olarak iki gruba ayrılmakta ve risklerinin değerlendirilmesinde farklı yaklaşımlar uygulanmaktadır. Eşik etkili mekanizma, açıkça görülebilir bir sınır seviyesinin belirlendiği ve bu seviyenin altında önemli bir toksikolojik etkinin görülmediği mekanizma olarak bilinmektedir¹⁰.

İlaçlarda oluşturabileceği sağlık riskleri nedeni ile GTI’ların hiç bulunmaması arzu edilse de, günümüzde farmasötiklerin sentetik üretim süreçlerinde kullanılan tüm ara maddelerin %20-25’inin mutajenik olduğu tahmin edilebilmektedir. Bir etkin madde sentez süreci, nadiren 10 kimyasal adımdan daha az basamakta tamamlanmakta ve pratiklik açısından süreç içinde bir veya daha fazla mutajenik aracı maddenin kullanılması sıklıkla gerçekleşmektedir²⁸. Bu nedenle arzu edilenin aksine pratikte GTI’lardan tamamen kaçınmak mümkün olmamakta günümüzde kabul edilebilir risk oluşturacak düzeylerin belirlenerek, sıkı kontrollerle ilaç güvenliği için çaba sarfedilmektedir.

Genotoksik safsızlıklar üzerine kamuoyunda dikkatleri çeken en önemli vaka, 1997 yılında FDA’dan onay alarak Roche firması

tarafından Viracept ismi ile piyasaya sunulmuş, HIV tedavisinde kullanılan proteaz inhibitörü nelfinavir mesilat ile gerçekleşmiştir. Firmanın Fransa ve İspanya'dan 2007 yılında nelfinavir şişesinden gelen tuhaf kokuyu ve bir hastanın mide bulantısı ve kusma şikayetlerini bildiren raporları almasının üzerine, araştırmalarında belirli partilerde alkileyici ajan olan etilmetansülfonat düzeylerinde artış olduğu tespit edilmiştir. Bu kontaminasyonun üretim sırasında etanolle yıkamayı takiben saklama tankının kurutulmasındaki eksiklikler nedeniyle meydana geldiği bulunmuştur. İlacın pazardan geri çekilmesinin ardından gerekli çalışmalar yapılarak kontaminasyon problemi çözülmüş ve tekrar 2007 sonlarında ilaç pazara sürülmüştür²⁹.

2.8. Genotoksik Safsızlıklar İle İlgili Düzenlemeler

GTI'ların toksik etkiler oluşturmaları ve hastalara fazladan güvenlik sorunları getirmeleri nedeni ile genotoksik olmayan safsızlıklarda düzenlenen sınır değerler GTI'lar için kabul edilememektedir³⁰. GTI'lara ilişkin düzenleme kaygıları konusunda halka açık ilk bulgu, 2000 yılında PharmEuropa'da yayımlanan ve tuz oluşumu sürecinin bir parçası olarak, alkol çözeltisinde sülfonik asit bulunması ile ortaya çıkan sulfonat ester oluşumu riskine dikkat çeken bir makaledir. Yayımlanan zamanda, makale sadece "daha fazla bilgi" çağrısı yapmakta ve ilgili riskleri daha iyi anlamaya yönelik bir girişim olarak ele alınmaktaydı. Bu yayın günümüzde, genotoksik safsızlıklarda risk değerlendirmesi ve kontrolü konusuna odaklanan, yeni bir çağa işaret eden bir kilometre taşı olarak görülmektedir³¹.

ICH Q3 rehberlerinde "olağan dışı toksik safsızlıklarda daha düşük eşik değerler uygun olabilir" ifadesiyle genotoksik safsızlıklara atıfta bulunulduğu düşünülmese de, bazı karsinogenik çözücülerin

kontrolüne yönelik tavsiyelerin yer alması dışında, önemli bir sorun oluşturan genotoksik safsızlıklar üzerinde durulmamaktadır. EMA, Güvenlik Çalışma Grubu (SWP) adına Tescilli İlaç Ürünleri Komitesi (CPMP) tarafından 2002 yılında genotoksik safsızlıklara yönelik taslak bir rapor (görüş yazısı) yayımlanmıştır. Daha sonra Beşeri İlaç Ürünleri Komitesi (CHMP) tarafından çalışmaların güncellenmesinin ardından yeni etkin maddeler ve mevcut etkin maddelerin yeni uygulamalarında genotoksik safsızlıkların ele alınması için genel çerçeveyi ve uygulama yaklaşımlarını konu alan “Genotoksik Safsızlıklarda Limitler Rehberi” yayımlanmıştır. Rehberde, sınırlamaların özel durumlar dışında hali hazırda pazarda bulunan ticari ürünlere uygulanmasının gerekmediği belirtilmektedir. Üretim sırasında son üründe genotoksik kalıntıya neden olmayacak potansiyel alternatif yolların araştırılması tavsiye edilmektedir.

GTI’ların kontrolünde genotoksisite mekanizmalarına göre farklı yaklaşımların kullanılması önerilmektedir. Eşik etkili genotoksik maddelerde kabul edilebilir maruziyet seviyeleri daha önce kalıntı çözücü safsızlıklarında tanımlanan PDE değeri hesaplanarak düzenlenmektedir. DNA reaktif kimyasalların eşik değere sahip olmadığı görüşü genel kabul görmekte ve eşiksiz etkili genotoksik maddeler için ise kaçınılmayan genotoksik safsızlıkların kontrolünün “uygulanabildiği ölçüde en düşük” prensibine (as low as reasonably practicable - ALARP prensibi) göre ele alınması gerektiği önerilmektedir¹⁰. ALARP prensibinin temeli, teknik yapılabilirlik göz önünde tutularak safsızlık konsantrasyonunu olabilecek en düşük seviyeye düşürmeye dayanmaktadır. Bahsedilen teknik yapılabilirliğin araştırılmasında; safsızlığı ortadan kaldırma işleminin yeterliliği ve bu miktarın belirlenmesi için uygun analitik yöntemin geliştirilmesi de değerlendirilmektedir²³.

EMA rehberinde, karsinojenik potansiyeli veya gücü bilinmeyen genotoksik safsızlıkların değerlendirilmesi için toksikolojik sorun eşiği (TTC) yaklaşımından bahsedilmektedir. Risk değerlendirme aracı olarak TTC, kimyasalların maruziyetlerinde kabul edilebilir risk düzeylerinin saptanması prensibine dayanmaktadır. Kimyasalın bu dozun altındaki maruziyetinde, insan sağlığına kayda değer risk oluşturabilecek etkiye sahip olmadığı kabul edilmektedir. Bu kavram, kimyasal yapısı bilinen fakat hiç veya sınırlı toksisite verisine sahip kimyasal maddelerin bir veya daha fazla mevcut veri tabanından benzer özellikteki kimyasalların toksisite verilerinin uyarlanması ile sağlanmaktadır. Bu yaklaşım; insanların eşik değerin altında maddeye maruz kalması durumunda, gereksiz kapsamlı toksisite testleri ve güvenlik değerlendirmelerinden kaçınarak; zaman, deney hayvanı kullanımı, para ve bu maddelerin test edilmesi ve değerlendirilmesinde gerekli uzmanlığın sınırlı kaynaklarının, insan sağlığına daha büyük potansiyel risk oluşturabilecek maddeler için kullanılmasına katkı sağlamaktadır³². Genel olarak in vitro genotoksisite çalışmalarında pozitif sonuç veren, in vivo genotoksisite veya karsinojenite verilerinin bulunmadığı durumlarda, safsızlığın genotoksik olarak ele alınması ve ilacın kronik kullanımında TTC değerinin 1.5 µg/gün olarak belirlenerek kontrolünün sağlanması gerektiği belirtilmektedir. TTC yaklaşımında belirlenen değerler maddenin kullanıldığı süreye bağlı olarak değişmektedir. Bu değerlerin altındaki günlük maruziyetlerin kabul edilebilir risk düzeylerinde kaldığı (yaşam boyu 1/100000 fazladan kanser riski) düşünülmektedir. Bu risk seviyesinin, aynı kavramın kullanıldığı diğer alanlarla kıyaslandığında ilaçtan sağlanan yarar nedeniyle artırıldığı görülmektedir. Güçlü etkili yapısal grup taşıyan maddeler (N-nitrozo-, azoksi-, aflotoksin benzeri bileşikler) TTC eşik değerinin altındaki dozlarda bile risk oluşturabilecekleri için maddeye özgü risk değerlendirmesi önerilmektedir. Bununla birlikte, bazı özel durumlarda daha yüksek değerlerin kullanılmasının mümkün olduğu üzerinde de durulmaktadır¹⁰. 2006 yılında yayımlanan rehberin açıklığa kavuşturulması

ve uyumlandırılmasını sağlamak amacıyla, 2008 yılında “CHMP, Genotoksik Safsızlıklarda Limitler Rehberi Üzerine Soru ve Cevaplar” başlıklı doküman yayımlanmış ve günümüzde 2010 yılında yayımlanan üçüncü revizyonu geçerlidir^{33,34}.

L. Müeller önderliğinde Amerika İlaç Araştırma ve Üreticileri (PhRMA) uzmanlar grubu, genotoksik safsızlık alımının farklı sürelerdeki maruziyetleri için “basamaklı TTC” yaklaşımı üzerinde durmuşlardır. Bu yaklaşımda, kabul edilebilir günlük doz, >12 ay kullanımda 1.5 µg/gün, 6-12 ay, 3-6 ay, 1-3 ay ve 1 aydan kısa maruziyetler için sırasıyla 10, 20, 40 ve 120 µg/gün olarak tanımlanmıştır³⁰. Bu öneri, doz oranı düzeltme faktörü “2” şeklinde ele alınarak EMA tarafından da kabul edilmiştir. Bu şekilde, genotoksik safsızlıkların günlük alımları için kabul edilebilir değerler; 6-12 ay, 3-6 ay, 1-3 ay ve 1 aydan kısa maruziyetler için sırasıyla 5, 10, 20 ve 60 µg/gündür. Tek doz kullanım için ise 120 µg sınır değer kabul edilmiştir³³.

PhRMA grubu safsızlıkları genotoksisite potansiyellerine göre sınıflandırmaktadır:

Sınıf 1: Genotoksik ve karsinojenik safsızlıklar

Sınıf 2: Genotoksik safsızlıklar fakat karsinojenik potansiyeli bilinmeyen safsızlıklar

Sınıf 3: Yapısında uyarıcı grup içeren, etkin madde yapısından farklı ve genotoksik potansiyeli bilinmeyen safsızlıklar

Sınıf 4: Yapısında uyarıcı grup içeren, etkin madde ile ilişkili safsızlıklar

Sınıf 5: Yapısında uyarıcı grup içermeyen veya genotoksik olmadığına dair yeterli kanıt bulunan safsızlıklar

Safsızlıklarla ilgili çalışmalarda öncelikle etkin maddeki yapısal uyarıcı grupların ve beklenen safsızlıkların tanımlanması, ardından maddelere ait literatür bilgisi ve elde edilmiş testlerden yararlanarak safsızlık sınıflandırması önerilmektedir. DNA ile etkileşime girebilecek kimyasal fonksiyonel gruplar hakkında bilgi edinmek amacı ile bilgisayar tabanlı yapı-aktivite programlarından yararlanılabileceği bildirilmiştir. Safsızlıkların sınıflandırması temel alınarak, kalifikasyon stratejisi belirlenmektedir. Uygun yaklaşım kullanılarak etkin maddede safsızlıkların kabul edilebilir limitleri, izin verilen günlük alım miktarları veya TTC kavramına göre kontrol şeması belirtilmektedir³⁰.

2008 yılında FDA–CDER tarafından yayımlanan “İlaç Madde ve Ürünlerinde Genotoksik ve Karsinojenik Safsızlıklar: Tavsiye Edilen Yaklaşımlar” başlıklı taslak rehber de klinik geliştirme (IND başvurusu) ve ruhsatlandırma (NDA, ANDA başvurusu) sırasında ilaç maddeleri ve ürünlerinde bulunan genotoksik ve karsinojenik safsızlıkların güvenliğinin nasıl değerlendirileceğine yönelik tavsiyeler vermektedir. Rehber daha önce ruhsat almış ürünlerde, safsızlıklarının karsinojenik risk oluşturabileceğine dair belirti verdiği ve ürünlerin uygulamalarında farklılık olduğu durumları da kapsamaktadır. GTI’ların değerlendirilmesi için minimum tarama (Ames testi ve in vitro kromozomal aberasyon testi) ve yapı-aktivite ilişkisi analizlerinin yapılması önerilmektedir. FDA’in taslak rehberi ile EMA’nın rehberi arasında büyük ölçüde benzerlikler bulunmaktadır. Bununla birlikte EMA’dan farklı olarak FDA rehberi, basamaklı TTC yaklaşımında 120 µg/gün limitini 14 günden daha kısa maruziyetler için de ele almış, 14 günden 1 aya kadar maruziyetler için 60 µg/gün sınır değerini kabul etmiştir. FDA rehberi genotoksik veya karsinojenik safsızlıkların oluşumlarının önlenmesi, seviyelerinin azaltılması, bu safsızlıkların ilave karakterizasyonlarının yapılması ve

yaklaşımlarda esneklikler için dikkate alınacak noktaları da içeren tavsiyelerde bulunmaktadır⁹.

Buraya kadar ele alınan rehberler ve yaklaşımların ardından günümüzde genotoksik safsızlıklar ile ilgili son rehber, 2013 yılında yayımlanan ICH M7 “Potansiyel Karsinogenik Risklerin Sınırlandırılması Amacı İle İlaçlarda DNA Reaktif (mutajenik) Safsızlıkların Değerlendirilmesi ve Kontrolü” başlıklı rehberdir¹⁴. Görüş ve yorumlar için kamuya sunulan rehber için üçüncü basamakta çalışmalara devam edilmektedir. ICH M7, klinik geliştirme ve sonraki başvurular sırasında yeni ilaç maddeleri ve ürünlerini kapsamaktadır. Ayrıca piyasadaki ilaçlarda etkin madde sentezi, formülasyon, içerik veya üretim sürecinin değişmesi, endikasyon ve dozun değişmesi durumlarında yeni pazar başvuruları ve onay sonrası ibrazlar da rehber tabi tutulmaktadır. İlaç maddeleri ve ürünlerinde ICH Q3A ve Q3B’ye göre tanımlama eşik değerini aşan safsızlıkların yapısının belirlenmesi gerekmektedir. Kimyasal yapısı bilinen safsızlıklar için mutajenik potansiyellerinin değerlendirilmesi öncelikle veri tabanı ve literatür araştırması ile yapılmakta safsızlık mutajenik potansiyeline göre sınıflandırılmaktadır. Herhangi bir verinin bulunmaması durumunda yapı-aktivite temelli ((Q)SAR) bilgisayar destekli toksikoloji değerlendirmesi ile bakteriyel mutajenitenin tahmin edilmesi sağlanmaktadır. Gerekli durumlarda, bakteride mutajenite testi uygulanarak elde edilen verilerden karar sürecinde yararlanılmaktadır (Tablo: 2).

Tablo 2: Mutajenik ve karsinojenik potansiyellerine göre safsızlıkların sınıflandırılması ve kontrolleri

Sınıf	Tanımlama	Kontrol
1	Mutajenik karsinojen	Bileşiğe özgü kabul edilebilir limit değerde veya altında kontrolü sağlanır.
2	Mutajenik olduğu bilinen fakat karsinojenik potansiyeli bilinmeyen	Kabul edilebilir limit değerde veya altında kontrolü sağlanır. (TTC)
3	Yapısında uyarıcı grup içeren, etkin madde yapısından farklı ve mutajenite verisi yok	Kabul edilebilir limit değerde veya altında kontrolü sağlanır (TTC) veya bakteride mutajenite testi yapılır. Mutajenik değilse: Sınıf 5 Mutajenik ise: Sınıf 2
4	Yapısında uyarıcı grup içeren, test edilmiş ve mutajenik olmadığı doğrulanmış etkin madde ile benzer yapıdaki safsızlıklar	Mutajenik olmayan safsızlık olarak kontrol edilir.
5	Yapısında uyarıcı grup içermeyen veya yapının mutajenik olmadığına dair yeterli kanıt bulunan safsızlıklar	Mutajenik olmayan safsızlık olarak kontrol edilir.

M7 rehberinde de safsızlıkların kontrolünde TTC yaklaşımı ön planda tutulmaktadır. Ancak ilacın uygulama sürelerine göre safsızlıkların izin verilen miktarları önceki rehberlerden farklılık göstermektedir. Klinik çalışmalarda ve kısa süreli tedavilerde Tablo 3'te belirtilen miktarların kullanılabileceği belirtilmektedir.

Tablo 3: ICH M7'ye göre kabul edilebilir maruziyet miktarları

Tedavi süresi	< 1 ay	>1-12 ay	>1-10 yıl	>10 yıl
Günlük maruziyet (µg/gün)	120	20	10	1.5

Yukarıda belirtilen temel rehberler ve destekleyici belgelerin yanı sıra safsızlıklar ile ilgili diğer yol gösterici kaynaklar da bulunmaktadır. Bu kapsamda bitkisel ilaçlar, tıbbi ürünlerde yardımcı maddeler ve antikanser ilaçlar üzerine rehberlerde de safsızlık sorununa önemli yorumlar getirilerek katkı sağlanmaktadır^{35,36,37}.

Türkiye’de ilaçlar, T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Tıbbi İlaç ve Cihaz Kurumu bünyesinde ruhsatlandırılmaktadır. Avrupa Birliği’nin beşeri tıbbi ürünler ile ilgili mevzuatına uyum sağlanması amacıyla, 2001/83/EC sayılı beşeri tıbbi ürünler hakkındaki direktifine paralel olarak hazırlanmış “Beşeri Tıbbi Ürünler Ruhsatlandırma Yönetmeliği” hükümleri geçerlidir. Bu yönetmelik kapsamında, başvurusu yapılan ilaca ait safsızlıklar hakkında bilgi verilmesi istenmektedir. Ancak Avrupa Birliği ve Amerika Birleşik Devletleri’nde ilaçlardaki safsızlıklar konusunda yoğun çabalar gösterilmesine karşın, ülkemizde sağlığı tehdit edici safsızlıklar konusunda, gerekli ilaç madde ve ürünlerindeki safsızlıkların belirlenmesi, tanınması ve miktar tayinine yönelik analizler yapılsa da toksikolojik analiz ve kontrole yönelik toksikolojik risk değerlendirmesi üzerinde durulmamaktadır.

2.4.1.Genotoksik Safsızlıklarda İleri Düzeyde Zorlayıcı Faktörler

İlaç maddelerinin sentezlenmesi genellikle nihai ilaç maddesi elde edilinceye kadar alkilasyon, konjugasyon, oksidasyon ve redüksiyon basamaklarını içermektedir. Bu basamaklar içinde genotoksik potansiyele sahip birden fazla ara ürün veya yan ürünlerin bulunabileceği ve bunların nihai ürüne aktarılabilmesi düşünülebilir. Bu nedenle, ilaç maddeleri ve ilaç ürünleri içindeki genotoksik safsızlıklar için yapılacak risk değerlendirmesi birkaç genotoksik safsızlığın sinerjik biçimde etkili olup olmayacağını da değerlendirilmesini gerektirebilir³⁸. Günümüzde geçerli

rehberler, mutajenik olduğu bilinen fakat karsinojenite bilgisi bulunmayan tek safsızlık için TTC yaklaşımının kullanılmasını tavsiye etmektedir. Bununla birlikte, birden çok safsızlığın bulunması durumunda risk değerlendirmesi daha karmaşık hale gelmektedir. Bercu ve ark.ları olasılıksal risk analizi kullanarak yeni ilaç maddesinde TTC ile kontrol edilen birden fazla genotoksik safsızlığın bulunması durumunda, TTC yaklaşımının tutucu varsayımları nedeni ile kanser riskindeki artışın nispeten küçük olduğunu değerlendirmiştir¹¹. EMA Soru ve Cevaplar belgesinde, ilaç maddesinde birden çok GTI'nın bulunması ve yapıları bakımından birbirinden farklı olması durumunda her bir safsızlık için 1.5 µg/gün TTC sınır değerinin uygulanabileceği, yapıları bakımından birbirleriyle ilgili olduklarında ise maruziyetlerin toplamının 1.5 µg/gün sınır değerini aşmaması gerektiği tavsiye edilmektedir³³. ICH M7 rehberinde ise ilaç etkin maddelerinde çok sayıda mutajenik safsızlığın bulunması durumunda, toplam mutajenik safsızlık için TTC temelli yaklaşımda, 1 aydan kısa uygulamalarda 20, 1-12 ay arasında 60, 1-10 yıl arasında 10 (3 yıl için 30) ve 10 yıldan fazla uygulamalarda 5 µg/gün kabul edilebilir miktarlar olarak verilmektedir. İlaç ürünlerindeki bozunma ürünleri için ise toplam limit değerleri yerine bireysel kontrolün yapılması belirtilmektedir¹⁴.

Sabit doz kombinasyonlu ürünlerde (tek doz formunda bir veya daha fazla etken maddeyi içeren ürünler) genotoksik safsızlık değerlendirmesi, bir veya birden fazla etken maddenin dış kaynaklardan sağlanmış olması, bunlara ait genotoksik safsızlık verilerinin yetersiz olması ve/veya bu etken maddelerin sentez yollarıyla ilgili bilgilerinin azlığından dolayı daha karmaşık ve potansiyel riski daha fazladır. . Bu nedenle ilaç firmaları pazardaki etken madde veya jenerikleri içeren sabit doz kombinasyonlu ürünleri geliştirmeden önce ayrıntılı bir risk değerlendirmesi yapmak durumundadır. Safsızlık değerlendirmesi tek etken maddeli ürünlere ait rehberlerdeki temel yaklaşımlarla aynı olmakla

birlikte analizler hem eski ilaç maddesine ilave edilen yeni ilaç maddesi hem de yeni ilaç ürünü için gerçekleştirilmelidir¹⁴.

2.9. Çocuklarda Safsızlık Maruziyetlerinin Toksikolojik Açıdan Değerlendirilmesi

Gittikçe artan bilgiler ışığında dünya nüfusunun üçte birini oluşturan çocukların, popülasyonun en duyarlı grubu olduğu ve farklı özellikteki birçok maruziyet ajanının çocuk sağlığı üzerinde yetişkinlerden farklı etkilerinin bulunduğu bilinmektedir. Çocuklarda gelişimin veya maruziyetin kritik penceresi olarak adlandırılan yaşam dönemleri, moleküler, hücresel, organ sistemi ve organizma düzeyinde gerçekleşen dinamik süreçlerle ilgilidir. Çocuklar büyüme ve gelişim evrelerindeki farklı yaşam dönemleri ve fizyolojik, metabolik, davranış özelliklerindeki farklılıklar nedeni ile çeşitli maruziyetlere duyarlılık göstermektedir. Özellikle toksikokinetik ve toksikodinamik özelliklerin yetişkinlere göre farklı olması, aynı kimyasal maddeye çoğunlukla daha ciddi olmak üzere farklı cevaplar vermesine neden olmaktadır^{39,40,41}. Çocuklar konusu ele alındığında toksikolojik önem gösteren bir diğer durum ise, gelecekteki yaşam sürelerinin daha uzun olması dolayısıyla kronik hastalıkların tetiklenmesi, gelişimi ve ortaya çıkmasının daha muhtemel olmasıdır. Tüm bu bilgiler doğrultusunda, çocuk sağlığını yeterince korumak amacı ile yeni risk değerlendirme yaklaşımları oluşturulmakta ve günümüzde duyarlı gruplar için ek güvenlik faktörleri devreye sokulmaktadır⁴².

Konu safsızlıklar açısından ele alındığında, özellikle kronik ilaç kullanımlarında, ilacın içerebileceği safsızlıkların maruziyetleri de kronik olmaktadır. Çocukluk çağında ortaya çıkan ve bir ömür boyu veya ömrün büyük bir kısmını kapsayacak sürede ilaç kullanımını gerektiren tedavilerde, safsızlık maruziyetleri hastalarda ek toksikolojik yükler

getirebilmektedir. Bu durum, özellikle genotoksik safsızlıkların bulunması halinde istenmeyen sonuçlara ve kanser oluşma riskinde artışa neden olabilmektedir. Bu nedenle, toksikolojik değerlendirmeler açısından, duyarlı alt gruplar her zaman önemle dikkate alınmalıdır. Genotoksik safsızlıklara ilişkin taslak FDA rehberinde, çocuklardaki yüksek kanser duyarlılığı nedeniyle, özellikle çocuk popülasyonunun daha düşük eşik değerleri olması gerektiği tavsiye edilmektedir. Çocuklardaki kanser duyarlılığına ilişkin, EPA - Hayatın Erken Evrelerinde Karsinojenlere Maruziyetten Kaynaklı Duyarlılığın Değerlendirilmesi İçin Yardımcı Rehber, 0 - 16 yaş arasında mutajenik karsinojenlere maruz kalan çocuklarda yetişkinlere kıyasla 70 yıllık yaşam dönemi içinde daha yüksek kanser riski bulunduğunu göstermektedir. EPA Rehberinde riskin hesaplanmasında, 2 yaş öncesi maruziyetlerde ek güvenlik faktörü 10 olarak verilmektedir. 2-16 yaş arası için spesifik düzeltme faktörü hesabının bulunmadığı durumlarda ise güvenlik faktörü 3 olarak verilmektedir⁴³. Bu yaklaşım, FDA tarafından ilaç safsızlıklarında kabul edilebilir safsızlık limitlerinin belirlenmesinde de kabul görmektedir⁹.

2.6. Safsızlıklarda Analitik Yaklaşımlar

Düzenleyici kuruluşların tavsiyeleri doğrultusunda, son yıllarda safsızlıklar konusu çok sayıda araştırmaya konu olmaya başlamıştır⁴⁴⁻⁴⁸. Safsızlıklar ile ilgili literatürlere ulaşıldığında, açıkça fark edilir düzeyde bu çalışmaların toksikolojik analizlerden daha çok, ilaçların içerdiği safsızlıkların profillerinin belirlenmesine yönelik olduğu gözlenmektedir. İlaç ürününde bulunan tanımlanmış ve tanımlanmamış safsızlıklar “safsızlık profili” olarak betimlenmektedir. “Safsızlık profilinin belirlenmesi” ise ilaç formülasyonlarında ve bulk ürünlerde organik ve inorganik safsızlıklar ve kalıntı çözücülerin saptanması, tanımlanması, yapılarının aydınlatılması ve miktar tayinlerini amaçlayan analitik işlemlerin tümüne verilen yaygın tanımdır². Safsızlık profilinin belirlenmesi

farmakolojik taramalar için yeni bileşiğin gram ölçeğinde hazırlanmasından, ölçeklendirme prosedürüne kadar sentetik ilaç araştırmalarının tüm fazlarında yer almaktadır. Yeni bileşiğin büyük ölçekte üretimi sırasında yeni safsızlıkların oluşmadığından ve daha önce tanımlanan safsızlıkların miktarlarının ise bulunması gereken sınır değerleri aşmadığından emin olmak gerekmektedir. Bu nedenle analitik kontroller üretim aşamasında anahtar rol oynamaktadır. Safsızlıkların profillerinin belirlenmesinde ilk adım safsızlıkların saptanmasıdır. Daha sonra bilinen potansiyel safsızlıklar tanımlanmaya çalışılmaktadır⁴⁹.

Çok düşük düzeylerde ve zorlayıcı şartlarda analizleri de gerektiren bu çalışmalarda, birçok farklı analitik yaklaşımdan yararlanılmaktadır ve uygun analitik yöntemi seçmek hedefe ulaşmak için en önemli noktalardan biridir. Safsızlıklar arasında organik safsızlıkların profillerinin elde edilmesi daha zorlayıcı olmaktadır. Bunun yanı sıra ilaç ürünlerinde safsızlıkların analizi, matriksin daha karmaşık olması ve daha hassas limitlere ihtiyaç duyulması nedeniyle ilaç maddelerindekinden daha zordur⁵⁰.

Safsızlık analizlerinde kullanılan araçlar çoğunlukla spektroskopik ve kromatografik yöntemleri veya her ikisini içermektedir⁵¹. Ultraviyole spektroskopisi (UV), fourier dönüşümlü-kızılötesi spektroskopisi (FT-IR), nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR), kütle spektroskopisi (MS) safsızlık ve bozunma ürünlerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerdendir. İnce tabaka kromatografisi (TLC), yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi (GC), kapiler elektroforez (CP) gibi kromatografik teknikler ilaçlardaki safsızlıkların saptanması ve miktar tayinlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak, LC-MS, GC-MS, LC-NMR, CE-MS ve indüktif olarak eşleştirilmiş plazma-kütle

spektrometresi (ICP-MS) gibi teknikler ilaç endüstrisinde çeşitli karmaşık analitik problemleri çözmek amacıyla geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin en önemli avantajlarından biri de geleneksel yöntemlere göre daha az örnek miktarına ihtiyaç duyulmasıdır⁵¹.

Metal safsızlıkların seçici olarak saptanması ve miktarlarının tayininde genellikle ICP optik emisyon spektroskopisi (ICP-OES), ICP-MS, atomik absorpsiyon spektrometresi (AAS) ve atomik emisyon spektroskopisi (AES) en uygun analitik yöntemlerdir⁵². Kalıntı çözücüler ve organik uçucu safsızlıklarda genellikle gaz kromatografisi gibi kromatografik teknikler kullanılarak saptanmaktadır.

Günümüzde ilaç safsızlıklarının analizine yönelik çalışmalarda kromatografik yöntemlerin %53'ünü HPLC tekniği oluşturmaktadır⁵³. HPLC tekniğinin tercih edilmesinin nedeni hassas olması, sıcaklıkla bozulabilen maddelere dahi uygulanabilmesi, doğruluk dereceleri ve kesinlikleri yüksek sonuçlar vermesidir. HPLC'nin çalışma prensibi, örnek çözeltisinin hareketli faza eklenerek bu karışımın yüksek basınç altında sabit fazdan geçirilmesi sırasında, maddelerin hareketli ve sabit faz arasında farklı dağılım göstermeleri ile kolonda alıkonma oranlarının farklı olması sonucu ayırımın sağlanmasıdır. HPLC cihazının dedektörüne farklı zamanlarda gelen maddeler konsantrasyona bağlı olarak pik oluşturmakta ve kantitatif analize imkan vermektedir. İlaç analizlerinde çoğunlukla ters faz kromatografiden yararlanılmaktadır⁵⁴.

2.7.Safsızlıklarda Toksikolojik Yaklaşımlar

Etkin madde veya ilaç ürünlerinde bulunabilecek safsızlıkların etkileyebileceği en önemli hedeflerden birisi olan DNA'da meydana gelebilecek hasarlar, insanlarda kanser oluşumuna yönelik zemin hazırlayabilmektedirler. Bu nedenle belirlenen safsızlığın potansiyel mutajenik, karsinojenik olup olmadığının değerlendirilmesi ele alınması gereken hayati öneme sahip bir toksikolojik sorundur. Bu kapsamda, ilgili rehberlerde safsızlıkların toksikolojik açıdan değerlendirilmesi sırasında izlenecek yol, kullanılacak araç ve yöntemler hakkında kısaca bilgiler sunulmaktadır.

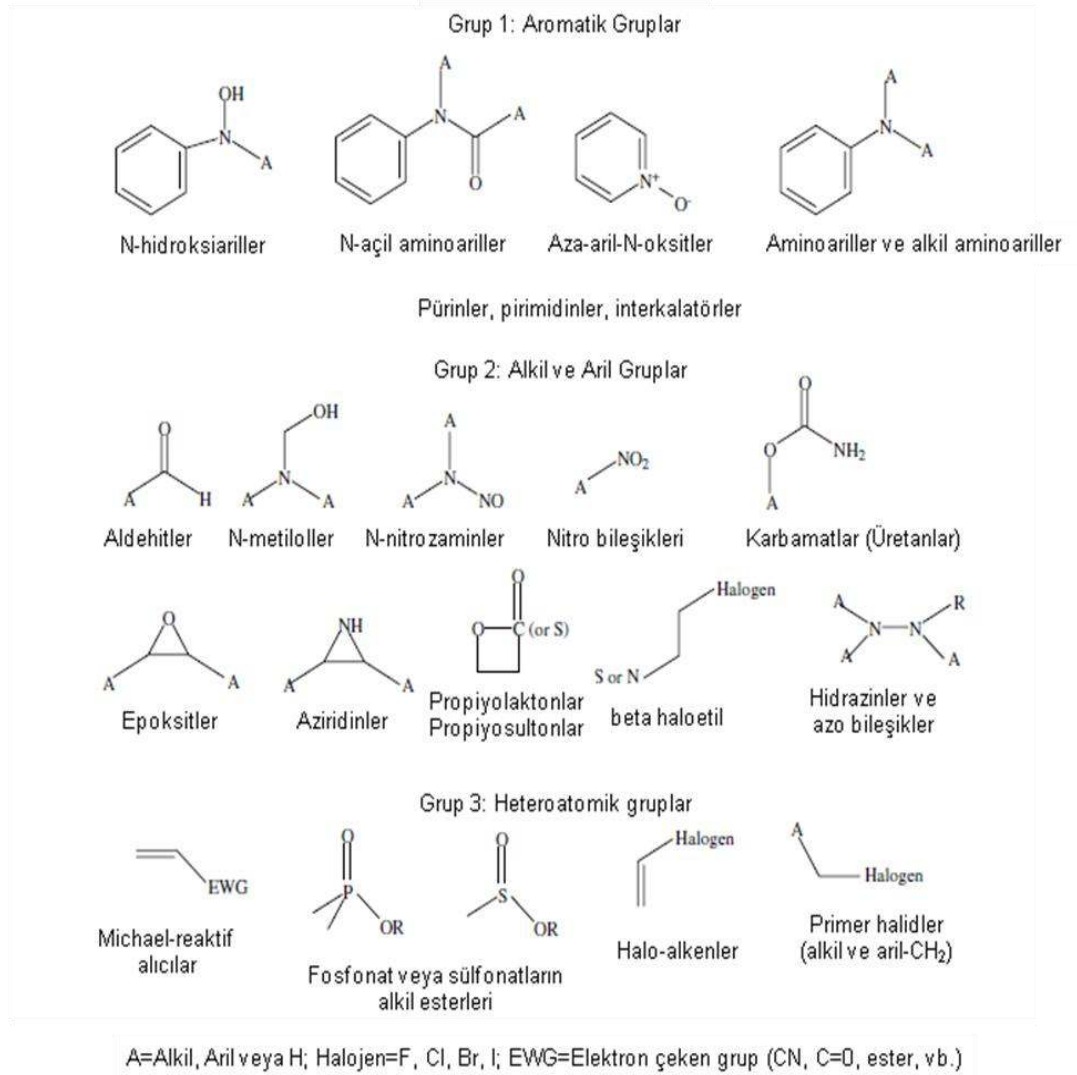
Kanser epigenetik değişimler ve genetik bozuklukların birikmesi sonucu ortaya çıkan kompleks bir hastalıktır. Neoplastik hücrelerin kromozomlarda sayısal hasarlar, kromozom değişimleri, delesyonlar gibi çeşitli genetik anormallikleri içermesi, hücrelerde kontrolsüz büyüme, temas inhibisyonunda bozulma, genomik instabilite ve metastaz eğilimi gösterme gibi normal olmayan davranışlara neden olmaktadır⁵⁵. Genotoksisite testleri, çeşitli mekanizmalarla genetik hasarlara (mutasyon veya kromozom hasarlarına) neden olan maddeleri belirlemek için in vitro veya in vivo test sistemlerde uygulanmaktadır. Genotoksisite testleri ile bileşiğin potansiyel mutajenite veya karsinojenite geliştirmesi erken dönemde belirlenmektedir⁵⁶. Genotoksisite testlerinden elde edilen sonuçların uzun yıllar yorumlanmasının ardından, tek bir testin tüm genotoksisite mekanizmalarını belirleme yeteneğine sahip olmaması nedeni ile günümüzde genotoksisite değerlendirmelerinde standart bir basamaklandırılmış test sistemi önerilmektedir⁵⁷. Genotoksisite, toksik ajana maruz bırakılmış kültür hücrelerinde, deney hayvanlarında ve maruz kalmış insanlardan sağlanan hücrelerde, kromozomların fiziksel bütünlük ve sağlamlığını araştırarak değerlendirilebilir. Spesifik gen ekspresyonuyla genetik değişimlerin tanımlanabildiği veya moleküler biyoloji teknikleri

kullanılarak spesifik DNA baz mutasyonlarının belirlendiği mutajenite testlerine karşın çeşitli kromozom testlerinin uygulanması genomun yapısal bütünlüğünün doğrudan gözlenmesine izin vermektedir⁵⁸.

İlaçlarda bulunan safsızlıklarda kimyasal yapının bilindiği durumlarda, öncelikle mevcut literatür ve çeşitli veri tabanlarından yararlanılarak safsızlığa ait teknik bilgilere, mutajenite veya genotoksisite verilerine ulaşmaya çalışılmaktadır. Herhangi bir sonuca ulaştıracak verinin bulunmaması durumunda, safsızlıklar uyarıcı fonksiyonel gruplar açısından değerlendirilmektedir.

2.7.1.Safsızlıkların Mutajenitesinin Değerlendirilmesinde Yapı-Aktivite İlişkisinin (SAR) Kullanımı

James ve Elisabeth Miller tarafından geliştirilen kimyasal karsinogenezde elektrofilité teorisi ile geçmişten beri bilinen hayvan karsinogenlerinin büyük bir bölümünün aktivitesi hakkında akılcı yorumlar yapılabilmektedir. Günümüzde karsinogenezde önemli rol oynayan kimyasal karsinogenlerin büyük bir kısmının nükleik asit ve proteinler gibi makromoleküllerin nükleofilik grupları ile etkileşen reaktif elektrofilité türevler olduğu veya metabolizma sonucu bunlara dönüştüğü sonucuna ulaşılmıştır^{59,60}. Bunun yanı sıra, kimyasalların yapısal özellikleri ile çeşitli genotoksisite testlerinin sonuçları arasındaki ilişkinin değerlendirildiği araştırmalar, yapı-aktivite ilişkisi çalışmalarına büyük katkı sağlamıştır⁶¹⁻⁶⁵. Karsinogenezde neden olan uyarıcı fonksiyonel grupların (toksikoforlar) belirlenmesi ile (Şekil: 2) günümüzde standart toksisite test sistemlerine alternatif yaklaşımlar sunulmaktadır.



Şekil 2: Toksikofor gruplara bazı örnekler³⁰

SAR, kimyasal yapı ile belirli biyolojik aktivite arasındaki ilişki olup kimyasalların olası toksikolojik profilini tahmin etmek amacıyla uygulanabilmektedir. Safsızlıkların analizinde rehberlerde belirtildiği gibi genotoksisiteye yönelik yapısal uyarıcı grup olup olmadığını belirlemek gerekmektedir. Literatür taramasıyla da yapılabilen bu değerlendirme için günümüzde bilgisayarlı toksikoloji analizlerinden yararlanılmaktadır.

Genotoksisitenin tahmini için geliştirilmiş bilgisayar tabanlı in silico uzman sistemler, bileşiklerin potansiyel kimyasal aktivitelerini biyolojik testlerden önce taramak için kullanılmaktadır. Bu sistemler temelde iki kategoride ele alınmaktadır. İlki, istatistiksel algoritmalar kullanarak kimyasal yapı ve biyolojik aktivite arasındaki ilişkinin tahmin edilmesinde yararlanılan “matematiksel model”ler, ikincisi ise geçmiş verilerde tanımlanan kuralların listelerde var olan bilgilerine dayanan “tahmin modeli” (uzman sistemi)’dir. Yapısal uyarıcı gruplar taşıyan kimyasalların belirlenmesinde bilgisayar destekli QSAR yaklaşımlarının kullanımı özellikle kolaylıkla bulunamayan özgün test maddelerinin (ilaç safsızlıkları gibi) değerlendirilmesi ve/veya kısıtlı zaman ve kaynak problemlerinin olması durumlarında ortaya çıkmaktadır. Uyarıcı yapıların belirlenmesi, en yüksek potansiyel genotoksik etkiye sahip test maddelerinin öncelikli değerlendirilmesine yardımcı olabilmektedir. İn silico teknolojiler günümüzde genetik toksikolojide önemli rol oynayan araçlar olup gelecekte deneysel testlerin yerini alabileceği tartışılrsa da var olan in vitro ve in vivo genotoksisite testleriyle karşılaştırıldığında gelişmiş performans bir yana henüz kabul edilebilir tek sistem bulunmamaktadır⁶⁶. Günümüzde çok sayıda bilgisayar tabanlı yapı-aktivite ilişkisi yazılımları mevcuttur; Derek for Windows, Leadscope, MC4PC, SciQSAR gibi. Bununla birlikte, başta ICH M7 rehberi olmak üzere mutajenik etkinin belirlenmesinde (Q)SAR sistemleri ile analiz önerilirken, bu değerlendirmeler sırasında birden fazla sistemin kullanılmasının yanı sıra, başta kimya, genetik toksikoloji ve literatür bilgisine sahip uzmanların da değerlendirmeye katılarak son karara ulaşılması gerektiği üzerinde durulmaktadır⁶⁷.

2.7.2. Mutajenik Etkinin Değerlendirilmesi: Bakteride Geri Mutasyon Testi

Bakteride ters mutasyon testi, kısa zamanlı test sistemleri içerisinde gen mutasyonlarına neden olan kimyasalların saptanmasında otuz yılı aşkın süredir sıklıkla kullanılan bir testtir⁶⁸⁻⁷¹. Bakteride ters mutasyon testi *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli* mutant suşlarında uygulanmaktadır. *Salmonella* suşlarının Dr. B. Ames tarafından geliştirilmesi nedeni ile genellikle Ames Testi olarak adlandırılrsa da, *E.coli* suşları bağımsız olarak Green ve Muriel tarafından geliştirilmiş ve bakteride triptofan ters mutasyon testi olarak anılmaktadır^{72,73}. OECD, ICH, EPA gibi düzenleyici kuruluşlar *E.coli*'de mutasyon testinin *Salmonella* suşlarında uygulanan Ames Testi ile birlikte kullanılmasını tavsiye etmektedir^{57,74,75}.

S. typhimurium bakterilerinde histidin, *E. coli* bakterilerinde triptofan operonlarında oluşturulmuş nokta mutasyonlar ile sırasıyla his⁻ veya trp⁻ organizmalar oluşturulmaktadır. Bu mutasyonlar sonucu ilgili amino asitin bulunmadığı ortamda bakterinin üreme yeteneği kaybolmaktadır. Test edilen kimyasalın mutajenik etkisi sonucu değişmiş genlerde mutasyon oluşumu oksotrof bakterinin prototrof hale dönmesine neden olabilmektedir. Mutasyonun geri dönmesi, bakterinin esansiyel amino asiti sentezlemesi için fonksiyonel yeteneğinin yeniden düzenlenmesine ve böylece bakterilerin histidin veya triptofan içermeyen ortamlarda üreyebilmesine neden olmaktadır⁷⁶.

Farklı mekanizmalar yoluyla etki eden mutajenleri tespit etmek amacı ile testte kullanılan *S.typhimurium* suşları, histidin operonlarındaki çeşitli genlerde farklı mutasyonları içerecek şekilde tasarlanmıştır. *E.coli* suşları ise tek bir gen mutasyonu (trpE) ile triptofan belirteci olarak kullanılmaktadır. Mutant suşlara his⁻ veya trp⁻

mutasyonların yanı sıra hassaslıklarının artırılması amacı ile farklı mutasyonlar da eklenmiştir. Bunlar arasında uvrB/uvrA delesyon mutasyonu ile hatasız kesme onarım mekanizması bertaraf edilerek hataya meyilli DNA onarım mekanizması ile onarılabilen, böylece daha fazla DNA lezyonu oluşumuna izin veren mutasyon gelmektedir. rfa mutasyonu ise bakteri yüzeyini kaplayan lipopolisakkarit tabakasını bozarak bakterinin büyük moleküllere geçirgenliğinin artmasına neden olmaktadır. Diğer yandan pKM101, R faktör plazmidi içeren bakteriler, hataya meyilli rekombinasyonel DNA onarım yolağı yoluyla kimyasal ve UV'nin indüklediği mutajenezi artırmaktadır^{77,78}.

Bakteride ters mutasyon testinin hassasiyetini artırmak ve güvenilir sonuçlar almak amacı ile düzenleyici kuruluşlar tarafından önerilen bir suş dizini bulunmaktadır. Salmonella bakterilerinde; TA98, TA100, TA1535, TA1537 / TA97 / TA97a, TA102 / E.coli WP2 uvrA / E.coli WP2 uvrA (pKM101) olmak üzere beş suшта, 5000 µg/plak doza kadar yapılan deneylerde mutajenik etki araştırılmaktadır⁷⁴.

Yapılan çalışmalarda Ames testinden elde edilen mutajenite sonuçlarının kemiricilerdeki karsinojeniteyi öngörme performansının %60-90 aralığında olduğu gösterilmiştir^{62,79-81}. Bu nedenle toksikofor grup içeren safsızlıkların genotoksik potansiyellerini belirlemede önemli rol oynayan Ames testinden elde edilen sonuçların negatif çıkması, safsızlığın rutin safsızlık olarak kontrol edilebileceğini göstermektedir. Ames testinde mutajenik olduğu belirlenen safsızlıklar için ise, TTC sınır değerlerin kullanılması kararı verilebilmektedir. Safsızlık çalışmalarında az miktarda kimyasala sahip olmak veya izole edilmiş safsızlığın olmaması nedeniyle standart Ames testlerinin yürütülmesi kimi zaman mümkün olmamaktadır. Bu durumlarda standart Ames testinden geliştirilen ve daha az miktarda

madde kullanımına olanak sağlayan yöntemlerden yararlanma seçenekleri göz önünde tutulmaktadır⁸²⁻⁸⁵.

2.7.3. Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi: Mitotik İndeks Değerlendirmesi

İnsan lenfositlerinde kromozomal aberasyon analizi için dozlar sitotoksosite parametresi olan mitotik indeksin değerlendirmesinden elde edilen veriler temel alınarak seçilmektedir. Düzenleyici ajanslar tarafından sunulan rehberlerde yer alan test protokolleri, test edilen kimyasalın çözünlülük kısıtlamasının olmadığı durumlarda limit doza kadar (1 mM veya 0.5 mg/ml) veya kontrole göre mitotik indeksinin en çok %50 azaldığı doza kadar geniş bir aralıkta test edilmesini gerektirmektedir. MI verisinin yorumlanması insan lenfositlerinde kromozom aberasyon testinde kimyasalların başarılı bir şekilde değerlendirilmesinde kritik öneme sahiptir⁸⁶.

Mitotik indeks ile hücre popülasyonunun proliferasyon durumu ölçülmektedir. Hücre sayısının artmasına doğrudan yardımcı olan mitotik hücreler kültürün büyüme oranındaki herhangi bir değişimin göstergesi olarak düşünölmektedir. Mitotik indeks, toplam hücre sayısı ve mitozdaki hücre sayısı arasındaki oran olarak belirtilmektedir. Sitotoksosite, mitotik indeks oranındaki azalmayla belirlenebilir⁸⁷.

Geçmişten günümüze, sitogenetik preparatlarda mitotik indeks değerlendirmesi mikroskop altında mitotik hücre sıklığının belirlenmesiyle yapılmaktadır. Günümüzde mitotik indeksin değerlendirilmesinde flow sitometri temelli uygulamalar ile ek sitotoksik parametrelerin aynı anda ölçümü sağlanarak test kimyasalının tehlike karakterizasyonu ve test sistemindeki etkileriyle ilgili önemli toksisite bilgilerine ulaşıldığı tartışılmakta ve bazı çalışmalarda bu yöntem de

uygulanmaktadır^{88,89}. Ek toksisite parametrelerinin mitotik indeks sıklıkları ile karşılaştırıldığında, doz seçimlerinin daha gerçekçi ve gerekçeli olarak yapılabileceği düşünülmektedir⁸⁸. Tüm bu tartışmalarla birlikte, mitotik indeks temel ve yaygın yöntem olarak halen mikroskopik inceleme ile yapılmaktadır.

2.7.4. İn vitro Kromozomal Aberasyon Yöntemi

Safsızlık çalışmalarında in vitro kromozomal aberasyon yöntemi ICH Q3A ve Q3B rehberlerinde safsızlıkların kalifikasyonları için istenen minimum tarama testleri içerisinde geçmektedir. Safsızlıklara ait in vitro kromozomal aberasyon verisinin bulunması genotoksisitenin değerlendirilmesi için değerli bir kaynaktır.

İn vitro kromozomal aberasyon testi, kültür memeli hücrelerinde yapısal kromozom hasarlara neden olan kimyasalları tespit etmek amacı ile kullanılmaktadır. Yapısal kromozomal aberasyonlar, kromozom ve kromatid tipi hasarlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Kimyasalların büyük bir kısmı kromatid tipi hasarlara neden olmaktadır. İn vitro kromozomal aberasyon testi yapısal hasarlar için uygulansa da kromozomlardaki sayısal değişiklikler de belirlenebilmektedir⁸⁶.

Kromozomlarda meydana gelen değişikliklerin belirlenmesinde genellikle insan periferik lenfosit hücreleri kullanılmaktadır. İn vitro kromozomal aberasyon testinde, kültür hücreleri test maddesine belirli bir süre maruz kaldıktan sonra ortama mitoz bölünmeyi metafazda durduran bir madde eklenmektedir. Hücreler preparat haline getirildikten sonra boyanarak metafazlar kromozomal anormallikler açısından ışık mikroskobu ile değerlendirilmektedir. Bu yöntem ile metafaz hücrelerinin doğrudan incelenmesi sayesinde aberasyon tipleri açıkça belirlenmekte ve

hasarın mekanizması açısından bilgilere sahip olunmaktadır. Yöntem, metabolik aktivasyon sistemi (S-9) ile birleştirildiğinde, klastojenez ile genetik hasarlara neden olan potansiyel kimyasallara hassas bir indikatör olarak karşımıza çıkmaktadır⁵⁶. Periferik kan lenfositlerinde artmış kromozom hasarı, kanseri öngörmeye etkin bir biyogösterge olarak kabul edilmektedir⁹⁰.

2.7.5. İn Vitro Test Sistemlerinde Metabolik Aktivasyon

Lipofilik maddelerin hidrofilik maddelere dönüşümünde biyotransformasyon karaciğerin başlıca fizyolojik görevi olup faz I ve faz II biyotransformasyon kapasitesi oldukça yüksektir. Metabolizmada asıl amaç detoksifikasyon olmasına karşın, bazı kimyasalların biyotransformasyon ile oluşan metabolitleri genellikle elektrofilik hale dönüştüğünden makromoleküllere bağlanma eğilimi göstermektedirler⁹¹. Birçok kimyasal karsinogen, enzimatik dönüşümler sayesinde DNA'ya kovalent bağlanma yapana kadar inaktif durumdadır. Bu nedenle mutasyonlarda metabolik aktivasyon kritik bir basamaktır⁹².

Genetik toksikolojide kullanılan yöntemlerin çoğu, metabolik aktivasyon potansiyeli içermeyen in vitro yöntemlerdir. Bu test sistemlerindeki eksikliği gidermek amacıyla yaygın olarak memeli metabolizmasının önemli elementleri dışarıdan sağlanmaktadır. Karaciğer homojenatının 9000 x g'de santrifüjlenmesiyle elde edilen supernatan S-9 fraksiyonu olarak tanımlanmaktadır. Bu postmitokondriyal karışım, promotajen ve prokarsinogenleri hepatik metabolizma (aktivasyon) ile reaktif ürünlerine dönüştüren mikrozomal ve sitozolik enzimleri içermektedir. S-9 fraksiyonu elde edilmesinde, hayvanlar öncelikle bu aktivasyon süreçlerine katılan hepatik mikrozomal enzimlerin seviyesini artıran Aroclor 1254 (poliklorlu bifenil karışımı) veya fenobarbital ve 5,6-

benzoflavon karışımı gibi enzim indükleyicilerine maruz bırakılmaktadırlar. Karaciğer homojenatları sıçan, fare veya hamsterlardan elde edilebilmekle birlikte, sıçan tavsiye edilen türdür. İndüklenmiş karaciğer S-9 fraksiyonu uygun kofaktörlerle (glukoz-6-fosfat, NADP vb.) birlikte “S-9 karışımı” olarak testlerde kullanılmaktadır⁵⁶.

2.8. Astım

2.8.1. Tanım Ve Etiyoloji

Astım tanımı, astımla ilgili uluslar arası rehberlerde daha çok hastalık özelliklerini tarif edici nitelikte yapılmaktadır⁹³: *“Astım organizmadaki birçok hücre ve hücre elemanının rol oynadığı hava yollarının kronik inflamatuvar bir hastalığıdır. Bu kronik inflamasyon, özellikle gece veya sabaha karşı, tekrarlayıcı hırıltılı solunum, göğüste sıkışma hissi, öksürük ve nefes darlığına neden olan hava yolunun değişik uyarılara karşı aşırı duyarlılığı ile ilişkilidir. Bu ataklara genellikle kendiliğinden veya tedavi ile geri dönüşlü değişik derecelerde hava yolu obstrüksiyonu eşlik etmektedir”*.

Astımın ortaya çıkması ve gelişmesini etkileyen faktörler birbirleri ile ilişkili ve karmaşık bir yapıdadır. Bireysel faktörlerin başında genetik özellikler yer almaktadır. Genetik araştırmalarda genellikle atopi, hava yolu aşırı duyarlılığı, inflamatuvar mediyatörlerin oluşumu ve Th1/Th2 immun cevap oranının belirlenmesi ile ilişkili genler üzerinde durulmaktadır. Bunlara ek olarak, obezite ve cinsiyet de astım etiyolojisinde yer alan bireysel faktörlerdir. Çevresel faktörler arasında alerjenler (iç ortam; akarlar, tüylü hayvanlar, hamamböcekleri, küfler, mayalar, mantarlar veya dış ortam; polenler, mantarlar, küfler, mayalar), başta virüsler olmak üzere enfeksiyonlar, mesleki duyarlaştırıcılar, sigara dumanı, ev içi/dış mekân hava kirliliği ve beslenme yer almaktadır⁹³.

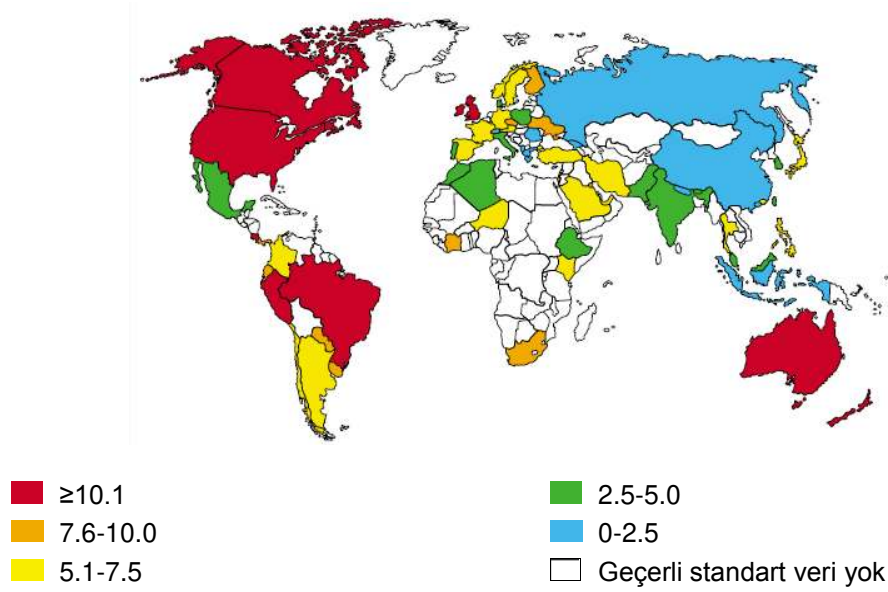
Astım hastalığı her yaşta görülebilirken çoğunlukla kökleri erken çocukluk dönemine varmaktadır. Astım çocukluk çağında en yaygın görülen hastalık olup çocuk hastaların %80'inde beş yaşından önce başlamaktadır. Bu hastaların %40-60'ı ergenlik dönemine ulaştıklarında hastalık iyileşmekte fakat bunların yarısında yetişkinlikte tekrar astım şikayetleri ortaya çıkmaktadır⁹⁴. Astımın akciğer gelişiminde olumsuz etkiler oluşturması nedeni ile çocuklarda bozulmuş akciğer fonksiyonuna bağlı olarak ileride kronik obstruktif akciğer hastalığı gelişimi söz konusu olabilmektedir⁹⁵.

2.8.2. Astım Hastalığının Dünya Ve Türkiye'deki Durumu

Resmi kayıtlarda, tüm dünyada astım nedeniyle yılda 250.000 ölüm olduğu bildirilirken, bu ölümlerin daha çok, hastalıkta kullanılması zorunlu ilaçlara ulaşımın düşük olduğu ülkelerde yoğunluk gösterdiği belirlenmiştir. Günümüzde tüm yaşlar ve etnik gruplar ele alındığında halen 300 milyon astım hastasının bulunduğu tahmin edilmektedir. Ülkeler arasında astım prevalansında farklılıklar olmasına karşın (Şekil: 3), tüm dünyada modern yaşama biçiminin ve şehirleşmenin benimsenmesi ile prevalansın giderek artacağı düşünülmekte ve 2025 yılına dek 100 milyon kişinin daha astım olacağı öngörülmektedir⁹⁶.

Ülkemizde ise, kayıt sisteminin düzenli olmaması nedeniyle çeşitli çalışmalardan elde edilen verilere dayanarak yaklaşık 3 – 4 milyon astım hastası olduğu tahmin edilmektedir. Türkiye'de de Dünya'daki gözlemlere paralel olarak prevalanslar bölgelere göre değişiklik göstermekte, erişkinlerde %2-6, çocuklarda %5-10 aralığında sonuçlar elde edilmektedir⁹⁸. Sağlık Bakanlığı'nın 2011 Sağlık İstatistikleri Yıllığı'nda yer alan 2010 yılı TÜİK Sağlık Araştırması verilerinde, on beş

yaş ve üzeri bireylerde hekim tarafından teşhis edilen hastalık/sağlık sorunları dağılımlarında, alerjik astım dahil, astım hastalığının kadınlarda daha çok olmak üzere populasyonun %4.8'inde görüldüğü bildirilmektedir. 2002-2004 yıllarında gerçekleştirilen Türkiye Hastalık Yüğü Çalışması verilerinde ise astımın yük oluşturan ilk 20 hastalık içinde olduğu görülmektedir⁹⁹.



Şekil 3: Dünya astım prevalans haritası⁹⁷

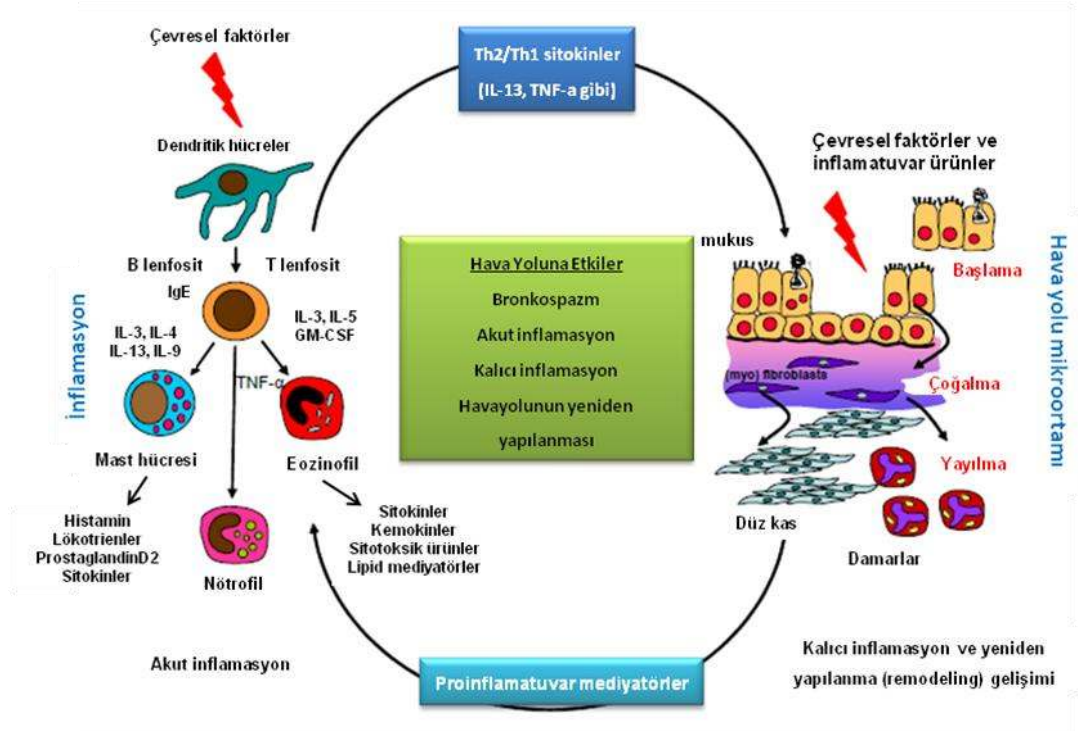
Astımın ekonomik maliyeti ele alındığında, hem doğrudan tedavi giderleri (tıbbi ve tıbbi olmayan giderler) hem de dolaylı maliyetler (kayıp okul ve çalışma günleri, iş verimi düşüşüne bağlı ücret kayıpları) göz önünde tutulmalıdır. Özellikle şiddetli astım vakaları ve kontrol edilemeyen olgularda maliyetler daha yüksektir. Astım kontrolünün iyi yapılması bu giderlerin azalmasında en önemli etken olarak kabul edilmektedir¹⁰⁰. Türkiye’de astım hastalığına ait doğrudan tıbbi gider analizlerinin yapıldığı bir çalışmada, giderlerin %81’ini ilaçların oluşturduğu ve doğrudan tıbbi giderlerin kişi başına yılda yaklaşık 1500\$ olduğu tespit edilmiştir¹⁰¹.

2.8.3. Astım Oluşum Mekanizmaları

Astım birçok inflamatuvar hücre ve çok sayıda mediyatörü içeren, çoklu biyolojik mekanizmaların rol aldığı sendromlar bütünüdür. Astım patojenezinden sorumlu tutulan mekanizmalar; kronik inflamasyon ve buna bağlı hava yolu akımının kısıtlanması ve hava yolu aşırı duyarlılığı olarak ele alınabilir.

- a. Kronik inflamasyon: Astımın farklı fenotipleri olsa da inflamasyon olgusu tüm tipler için geçerli ve astım patojenezinin temelini oluşturan mekanizma olarak düşünülmektedir. Astımda semptomlar ataklar halinde görülse de hava yolu inflamasyonu sürekli. Astım inflamasyonunda mast hücreleri, eozinofiller, T lenfositler, dendritik hücreler, makrofajlar, nötrofiller ve epitel hücreler anahtar rol oynayan hücrelerdir. Kemokinler, sitokinler, sisteinil-lökotrienler, nitrik oksit ve Ig-E ise astım patojenezinde önemli mediyatörlerdir¹⁰².
- b. Astımda lökosit ve epitel hücrelerden salınan mediyatörler, hastalığın kronikleşmesine neden olan inflamasyon döngüsünü yaratmakta, bu durum bronkospazm, ödem, epitel hasarı, hava yolu hücrelerinin stimülasyonu ve ek lökositlerin oluşumuna neden olmaktadır. Zaman içinde, organizma oluşan hasarı onarmak amacı ile hava yolunda kalıcı yapısal değişiklikler meydana getiren yeniden yapılanma (remodeling) sürecine girer. Yeniden yapılanma sonucu, subepitelyal fibrozis, mukus aşırı sekresyonu, goblet hücrelerin hiperplazisi, epitel hücre hasarı, düz kaslarda hipertrofi ve anjiogenez görülmektedir. (şekil: 4) Tüm bu hava yolunda meydana gelen etkiler hava yolunun daralmasına ve akımın kısıtlanmasına yol açmaktadır¹⁰³.
- c. Hava yolunun aşırı duyarlılığı ise, sağlıklı insanda zararsız olan bir uyarana, astımlı hastanın hava yolunda daralma ile cevap vermesidir. Hava yollarındaki bu aşırı duyarlılığa, hava yolu düz kasının aşırı kontraksiyonunun, ödem ve yapısal değişikliklerle ortaya çıkan hava yolu duvarı kalınlaşmasının, inflamasyon nedeniyle duyarlı hale

gelebilen duyuşal sinirlerin neden olduğu gibi hipotezler öne sürölmüş olsa da henüz tam olarak anlaşılamamıştır¹⁰².



Şekil 4: Astım patojenezinde inflamasyon ve yeniden yapılanma etkileşimi¹⁰²

2.8.4. Astımda Tedavi

Astım tedavisinde mümkün olan en az ilaç kullanılarak hastalığın kontrolü amaçlanmaktadır. Tedavide kullanılan ilaçlar kullanımlarına göre kontrol ediciler ve semptom gidericiler olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Kontrol edici ilaçlar, günlük, düzenli alınan ve kronik kullanımı bulunan, esas olarak antenflamatuvar etkilerinden yararlanılarak astımı kontrol altında tutmayı sağlayan terapötik ajanlardır. Semptom gidericiler ise, astım semptomlarını ortadan kaldırmak amacıyla, akut kullanımı olan, hızlı bir etki ile genellikle bronkodilatasyon amaçlı, “ihtiyaç halinde kullanılması” temeline dayanan tedavi ajanlarıdır.

Astım tedavisinde yaygın olarak kortikosteroidler, lökotrien reseptör antagonistleri ve β_2 adrenerjik agonistlerden yararlanılmakla birlikte, farklı tedavi mekanizmalarına ve ilaç formlarına sahip bileşiklerden ve çeşitli kombinasyonları da kullanılabilmektedir (Tablo: 4).

Tablo 4: Yetişkinler ve çocuklar için astım tedavisinde yararlanılan ilaç grupları⁹³

Yetişkinler		Çocuklar	
Kontrol ediciler	Semptom gidericiler	Kontrol ediciler	Semptom gidericiler
▪ inhale glukokortikosteroidler ▪ lökotrien düzenleyiciler ▪ uzun etkili inhale bronkodilatörler ▪ teofilin ▪ kromonlar ▪ uzun etkili oral β_2 agonistler ▪ anti-IgE ▪ sistemik glukokortikosteroidler ▪ oral antialerjik bileşikler ▪ alerjen-spesifik immunoterapiler ▪ diğer bileşikler	▪ hızlı etkili inhale β_2 agonistler ▪ sistemik glukokortikosteroidler ▪ antikolinerjikler ▪ teofilin ▪ kısa etkili oral β_2 agonistler	▪ inhale glukokortikosteroidler ▪ lökotrien düzenleyiciler ▪ teofilin ▪ anti-IgE ▪ kromonlar ▪ uzun etkili oral β_2 agonistler ▪ sistemik glukokortikosteroidler	▪ hızlı etkili inhale β_2 agonistler ▪ kısa etkili oral β_2 agonistler ▪ antikolinerjikler

Astım kronik inflamatuvar bir hastalık olduğu için tedavinin esası, bu inflamasyonu kontrol altında tutan ilaçlarla oluşturulmaktadır. Uluslar arası rehberlerde tedavi şeması düzenlenirken, hastalık kontrolünün düzeyine göre basamaklı bir yaklaşım uygulanması tavsiye edilmektedir (Şekil: 5 ve 6). Sistematik bir yaklaşımla uygulanan tedavi, hastada inflamasyonun baskılanmasına ve bu sayede semptomların düzelmesine veya yok olmasına neden olmaktadır. Ancak tedavinin kesilmesi ile semptomların tekrar ortaya çıkma olasılığı göz önünde bulundurularak hastanın izlenilmesi, hekim tarafından aksi belirtilmedikçe, akılcı ilaç kullanımı ile hastanın semptomları yaşamasa da düzenli ilaç kullanımına devam etmesi önerilmektedir.

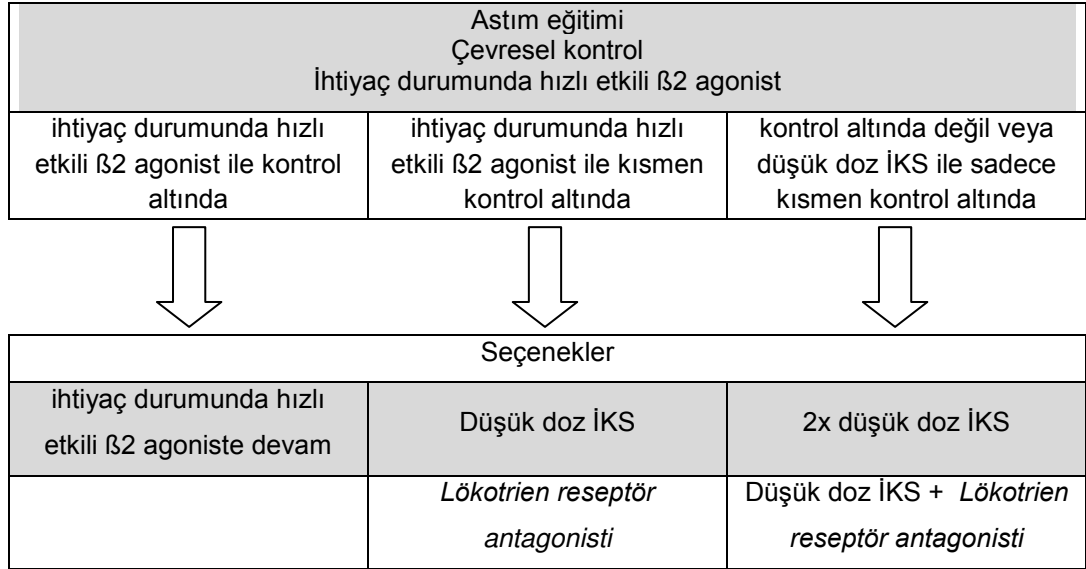
Kontrol düzeyi	Tedavi Şeması
Kontrol altında	Kontrolü sağlayan en düşük basamağı* bul ve kontrolü sürdür.
Kısmen kontrol altında	Kontrolü sağlamak için basamak* artırmayı düşün.
Kontrol altında değil	Kontrol sağlanıncaya kadar basamak* artır.
Atak	Atak tedavisi uygula.



Basamak 1	Basamak 2	Basamak 3	Basamak 4	Basamak 5
astım eğitimi, çevresel kontrol				
İhtiyaç durumunda hızlı etkili β_2 agonist				
	Tavsiye edilen tedavi**			
	Düşük doz İKS	Düşük doz İKS + uzun etkili β_2 agonist	Orta veya yüksek doz İKS + uzun etkili β_2 agonist	Basamak 4 tedavisi
	Alternatif tedavi	Alternatif tedavi	Alternatif tedavi	İlave olarak
	<i>Lökotrien reseptör antagonisti</i>	Orta veya yüksek doz İKS	<i>Lökotrien reseptör antagonisti</i>	en düşük doz oral kortikosteroid
		veya	ve/veya	ve/veya
		Düşük doz İKS + <i>Lökotrien reseptör antagonisti</i>	uzatılmış salımlı teofilin	Anti-IgE tedavisi
		veya		
		Düşük doz İKS + uzatılmış salımlı teofilin		

İKS: İn hale kortikosteroid, ** Tavsiye edilmiş tedaviler bulunsa da, hastaların bireysel ihtiyacı, tercihleri ve şartları dikkate alınmalıdır.

Şekil 5: Beş yaşından büyük çocuklar, ergenler ve yetişkinler için astımda kontrole dayalı tedavi yaklaşımı⁹³



Gölgeli kutular ilk tercih tedavilerdir.

Şekil 6: Beş yaşından küçük çocuklar için astımda kontrole dayalı tedavi yaklaşımı¹⁰⁴

2.9. Montelukast Etkin Maddesinin Astım Tedavisindeki Yeri

Başlıca mast hücreleri, eozinofiller, bazofiller ve makrofajlarda üretilen lökotrienler, araşidonik asidin 5-lipoksijenaz yolağı üzerinden sentezlenen lipid ürünlerdir. Farklı tipteki lökotrienler arasında, lökotrien C₄ (LTC₄), LTD₄ ve LTE₄ “sisteinil lökotrienler” (cys-LT) olarak adlandırılmaktadır. Sisteinil lökotrienler güçlü etkiye sahip inflamasyon mediyatörleri olup mukus sekresyonu, bronkokonstriksiyon ve vasküler geçirgenlikte artışa neden olmaktadır. Sisteinil lökotrienlerin astımın karakteristik özellikleri olan hava yolu obstrüksiyonu, bronş aşırı cevaplılığı ve eozinofil infiltrasyonu üzerine doğrudan etkili olduğu bildirilmektedir. Lökotrienlerin spesifik etkilerini gösterdiği reseptörler de farklı olup, sisteinil lökotrienler için cys-LT1 ve cys-LT2 reseptörleri tanımlanmıştır¹⁰⁵.

Astım tedavisinde en önemli seçenek olan kortikosteroidlerin çeşitli sorunlar taşıması ve bazı yetersizliklerinin görülmesi nedeniyle yeni

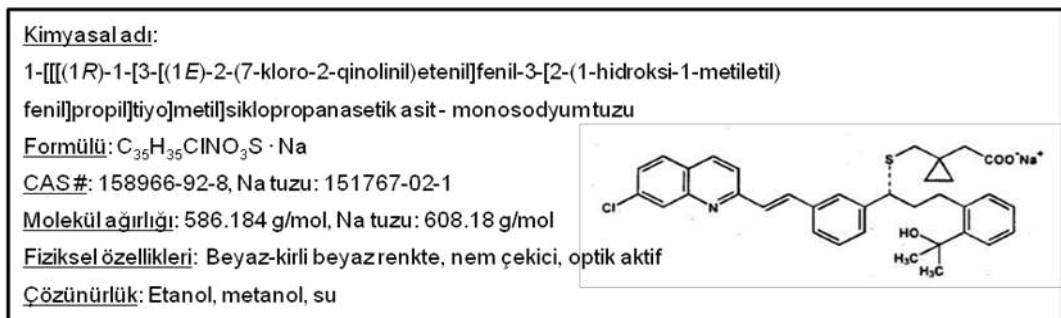
ilaç arayışları hız kazanmış ve astım patojenezinde güçlü biyolojik etkileri nedeniyle, lökotrien aktivitesinin selektif olarak engellenmesi için ilaç geliştirilmesi hedeflenmiştir. Lökotrien düzenleyiciler, günümüzde astım tedavisinde giderek önemi artan, kronik olarak, günlük ve oral alınan kontrol edici ilaçlardır. Geliştirilen lökotrien düzenleyiciler iki grupta ele alınmaktadır¹⁰⁵:

- a. 5-lipoksijenaz enzim inhibitörü: Lökotrien biyosentezini inhibe ederek etki göstermektedir. Zileuton etkin maddesi ile piyasaya çıkmıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanılmakta olup Türkiye'de ruhsatlı ilaç kapsamında değildir.
- b. Lökotrien reseptör antagonistleri: Montelukast, zafirlukast ve pranlukast etkin maddeleri, lökotrienlerin cys-LT1 reseptörlerine bağlanmalarını bloke ederek etki göstermektedirler. Pranlukast Japonya'da kullanılmakta olup Türkiye'de zafirlukast ve montelukast bulunmaktadır. Zafirlukast 5 yaş üzerindeki bireylerde, günde iki kez kullanılması tavsiye edilen ve hepatotoksisite oluşturmaması nedeniyle FDA tarafından kullanımı sınırlandırılmış bir bileşiktir¹⁰⁶.

Montelukast tüm dünyada yaygın olarak kullanılan lökotrien reseptör antagonistidir. Merck firmasının 1998 yılında FDA'den onayını aldığı ilaç ürünü, günümüzde astımın profilaksisinde ve kronik tedavisinde yetişkinler ve 1 yaşından büyük çocuklarda, egzersizle indüklenen bronkokonstriksiyonda 6 yaş ve üzerinde, mevsimsel alerjik rinitte 2 yaş ve üzerinde, uzun süreli alerjik rinitte ise 6. aydan itibaren endikedir. Ayrıca klinikte aspirine bağlı astımın tedavisinde de kaydadeğer etki gösterdiğine dair kanıtlar yer almaktadır¹⁰⁷. 15 yaş ve üzeri hastalarda 10 mg tablet, 6-14 yaş arası 5 mg çiğneme tableti, 2-5 yaş arası 4 mg çiğneme tableti / oral granül ve 6-23 ay arası 4 mg oral granül olarak doz ayarlaması yapılmaktadır.

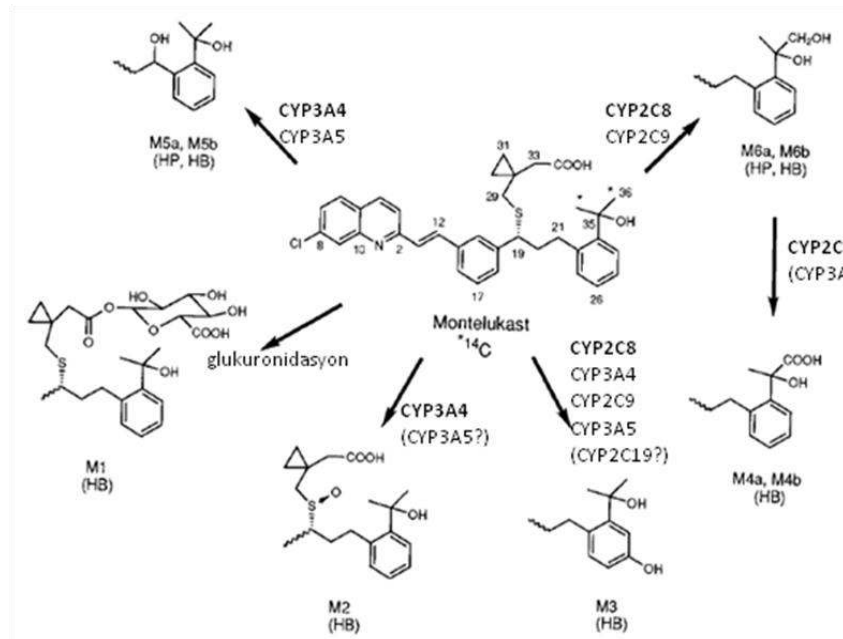
Ayrıca son yıllarda yapılan pek çok deneysel ve klinik çalışmada, montelukastın daha yüksek dozlarında atopik dermatitte, kronik ürtikerde, inflamatuvar deri hastalıklarında, iskemi-reperfüzyon hasarını önlemede, gastrik mukozayı koruma ve pulmoner fibrozisi engellemede etkileri olduğu gösterilmiştir¹⁰⁸. Montelukastın cys-LT reseptörüne antagonist etkisinden bağımsız olarak ikincil antienflamatuvar özelliğe sahip olduğu ve bu etkinin eozinofil, monosit ve özellikle kortikosteroidlerin duyarlı olmadığı nötrofilleri hedef alarak gerçekte düşünüldüğünden daha geniş bir spektrumda etki gösterebileceği tartışılmaktadır. Bu nedenle montelukastın, astımın yanı sıra kronik obstrüktif akciğer hastalığı, kistik fibrozis ve viral bronşiyolitte de potansiyel tedavi ajanı olarak kullanılabileceği üzerinde durulmaktadır¹⁰⁹. Bu çalışmalar değerlendirildiğinde, montelukastın gelecekte, klinikte uzun süreli ve yüksek dozlarda kullanılma olasılığının yüksek olduğu sonucu söz konusudur.

Montelukastın ağız yoluyla kolaylıkla alınması, etkinliğinin geniş olması ve yan etkilerinin az olması nedeniyle hem yetişkinler hem de çocuklar için kullanımı genişlemektedir. Kronik astımda, inhale kortikosteroidlerin yanı sıra ilave tedavi ajanı olarak montelukast verilmesi steroid dozunu azaltma ve β_2 agonist gereksinimini de azaltmakta bu durum montelukastın tercih edilmesinde önemli bir faktör olmaktadır.



Şekil 7: Montelukastın genel özellikleri

Montelukast, preparatlarda sodyum tuzu halinde bulunmakta oral olarak alındıktan sonra hızla absorbe olmaktadır. Yetişkinlerde aç karnına 10 mg doz alındığında ortalama doruk plazma konsantrasyonuna 3-4 saatte ulaşmakta ve oral biyoyararlanımı %64 olmaktadır. 2-5 yaş çocuklarda 4 mg çiğneme tableti alındığında ise, ortalama doruk plazma konsantrasyonuna 2 saatte ulaşmaktadır. Montelukast >%99 plazma proteinlere bağlanmaktadır¹¹⁰. Vücutta çok iyi metabolize olmakta, in vitro çalışmalarda, metabolizasyonunda başta CYP2C8 olmak üzere (%80), CYP3A4 ve CYP2C9 enzimlerinin görev aldığı saptanmıştır¹¹¹. Montelukastın minör metabolitleri olarak, açıl glukuronid (M1), sülfoksit (M2), 25-hidroksi (fenol, M3), 21-hidroksi analogunun iki diasteromeri (benzilik alkol, 21S- M5a ve 21R- M5b) ve 36-hidroksi analogunun iki diasteromeri (metil alkol, 36S- M6a ve 36R- M6b) tespit edilmiştir. Ana metabolit ise, M6 metabolitinin okside olması ile oluşan dikarboksilik asit olup iki diastereomeri bulunmaktadır (M4a ve M4b). Montelukastın yarılanma ömrü 2.7-5.5 saat arasında değişmekte, %86'sı feçesle, çok az bir kısmı (<%0.2) ise idrar ile atılmaktadır¹¹² (şekil: 9).



Şekil 8: Montelukastın metabolik yolları^{112, 113} 'den uyarlanmıştır.

2.10. Literatürde Safsızlıklara Yönelik Analitik Çalışmalar: Montelukast Safsızlıkları

Günümüze kadar, ilaç maddelerinde ve ürünlerinde bulunan çeşitli tipteki safsızlıkların saptanması, yapılarının aydınlatılması ve miktar tayinleri için yeni yöntem geliştirme ve validasyonları (geçerlilik onayları) uzun süredir araştırılmaktadır¹¹⁴⁻¹¹⁸. Bununla birlikte, bu çalışmaların araştırılan ilaç maddeleri ve ürünlerindeki safsızlıklara özgü olmaları nedeni ile bu kısımda montelukast safsızlıklarına yönelik örnek teşkil eden yayınlar ele alınmıştır.

Literatürde montelukast safsızlıkları üzerine yayımlanmış çalışma oldukça azdır. Bu çalışmaların bir kısmını, belirtilen farklı sentez ve üretimler sırasında oluşabilen farklı safsızlıkların izolasyon ve tanımlamaları üzerine yayımlanmış çalışmalar oluşturmaktadır¹¹⁹⁻¹²¹. Merck firmasının montelukast etkin maddesini geliştirmesinden sonra günümüze dek montelukast üretimi için çok sayıda farklı sentetik yaklaşım bildirilmiştir. Dolayısıyla üretim sürecindeki farklılıklara bağlı olarak oluşması muhtemel montelukasta ait çok sayıda farklı tipte safsızlık da söz konusu olmaktadır. İlaç piyasasına bakıldığında da, birçok ilaç firmasının montelukast etkin maddesi içeren jenerik ilaç ürettiği görülmektedir. İlaç ürününün meydana gelmesi sırasında, değişik kökenlerden temin edilen etkin maddenin yanı sıra yardımcı maddeler ve sentez sırasında oluşan ara ürünlerin ve bozunma ürünlerinin çeşitli safsızlıklara neden olabileceği ortadadır.

Ürdün'de bir ilaç firmasının montelukastın çözeltide ve katı formda ısı ve ışık etkisi ile bozunma ürünlerini araştırdığı çalışmada, çözelti içerisinde ana foto ürün olarak cis isomer oluşumu tespit edilmiş, katı formlarının ışığa daha dirençli olduğu gözlenmiştir. Paketlenmemiş

montelukast çiğneme tabletlerinde sülfoksit major foto ürün olarak belirlenmiş, film kaplı tabletlerin ise aynı şartlarda oldukça kararlı olduğu ortaya çıkmıştır. Termal stres testinde montelukastın asidik ve oksidan çözeltilerde hızla bozunduğu, hem çözeltide hem de tablet formda ısının esas degradasyon (yıkım) ürünü olarak sülfoksit safsızlığına neden olduğu bulunmuştur. Al Omari ve ark.larının bu bulguları, montelukastın safsızlıklarına yönelik önemli bilgiler sağlamıştır¹²².

Montelukastın jenerik ürünlerini sunan firma kaynaklı bir çalışmada, Saravanan ve ark.ları montelukastın potansiyel safsızlıklarının saptanması ve tanımlanmaları üzerinde yoğunlaşmışlardır. Montelukast sodyumun üretimi sırasında %0.05–0.15 miktarda bulunan montelukasta ait dört safsızlığın sentezi, ayrılması ve spektral analizlerle (HPLC, LC–MS, FT-IR ve NMR) kimyasal yapıları saptanmıştır¹²³. Ülkemizde yürütölmüş bir tez çalışmasında, ilaç ana dosyasında montelukast sodyum etkin maddesinin safsızlık tayini için belirtilen yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi, montelukast sodyum içeren tablet formuna uygulanmış ve bu yöntem ile montelukast sodyum ve safsızlıkların kalitatif ve kantitatif tayininin yapılabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada dört adet bozunma kaynaklı safsızlık (Safsızlık A,B,C,D) üzerinde çalışılmıştır¹²⁴.

USP monografında (Pharmacopeial Forum, 36(1), 2010) montelukast sodyum etkin maddesine ait bilgi 2010 yılında yer almış, analiz yöntemlerinin validasyonu üzerinde durulmuştur. Montelukast sodyum, Amerika ve Avrupa Farmakopelerinde ilaç maddeleri monograflarının ileriye yönelik uyumlandırılması pilot projesi için ele alınmış sayılı maddelerden olup monograf hem Amerika hem de Avrupa Farmakopesi işbirliği ile taslak halde yayımlanmıştır. Günümüzde 2010 USP’de montelukasta ait 6 adet organik safsızlık tanımlanmaktadır. Sülfoksit safsızlığı, cis izomer, Michael katımları I ve II, metilketon

safsızlığı ve metilstiren safsızlığı olarak belirtilen safsızlıkların ilaç etkin maddesinde bulunabilme sınırları ve analiz yöntemi hakkında bilgiler verilmektedir. Monografda etkin maddede her bir safsızlığın aşmaması gereken değerlerinin yanı sıra (Tablo: 5) toplam safsızlık miktarının %0.6'yı geçmemesi ve miktarı %0.05'i geçen safsızlıkların raporlanması gerektiği belirtilmektedir.

Tablo 5: USP monografında (2010) montelukast sodyumun organik safsızlıkları ve izin verilen miktarları

Safsızlık adı	İzin verilen safsızlık limiti (%)
Sülfoksit safsızlığı	0.2
Cis-izomeri	0.1
Michael katımları I & II	0.15
Metilketon safsızlığı	0.1
Metilstiren safsızlığı	0.3
Diğer safsızlıklar	0.1

Haidar ve ark.larının 2012 yılında yayımlanmış çalışmasında ise, farklı Asya firmalarından sağlanan beş montelukast sodyum örneğinde LC-UV-MS tekniği kullanılarak saflık analizi yapılmıştır. Araştırılan montelukast örneklerinde, rehberlerde kabul edilen safsızlık sınır değerlerinin üzerinde (bazılarında %1.25 civarında) safsızlık tespit edilmiş ancak bu safsızlıkların toksikolojik değerlendirmesi yapılmamıştır¹²⁵. Bir diğer çalışmada ise, montelukast sodyumun oral granül formlarında ultra performans sıvı kromatografisi ile montelukast ve ilgili safsızlıklarının saptanması için yöntem geliştirilmiş ve validasyonu yapılmıştır. Çalışmada sülfoksit, metilstiren, QUID-8, MOK-3 keto, MOK-1 nitril ve montelukastın doymuş analogu ele alınmıştır¹²⁶.

Benzer olarak, montelukast etkin maddesi ile aynı grupta bulunan zafirlukastın safsızlıkları üzerine bir çalışmada, zafirlukastın üretimi sırasında aralığı % 0.05-0.15 aralığında değişen bilinmeyen beş adet safsızlık HPLC yöntemi ile belirlenmiştir. İleri çalışmalarla bu safsızlıkların kimyasal yapıları da ortaya çıkarılmıştır¹²⁷.

2.11. Literatürde Safsızlıklara Yönelik Toksikolojik Çalışmalar

Günümüzde literatürde safsızlıkların toksisite profillerinin değerlendirildiği çalışma örneklerinden biri olarak, Agarwal ve ark.larının sefotaksimün üretimi ve saklanması sırasında oluşan farklı safsızlıklardan biri olan, dimerik safsızlığının akut toksisite ve genotoksitesinin değerlendirildiği çalışma gelmektedir. Bu çalışmada, safsızlık için Ames testi, *S. typhimurium* TA97, TA98, TA100, TA102 ve TA1535 suşlarında, metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğunda gerçekleştirilmiştir. 50 µg/plak doza kadar çalışılan safsızlıkta sitotoksisite ve mutajenite gözlenmemiştir. CHO hücrelerinde kromozomal aberasyon yönteminde de metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğunda genotoksisite gözlenmemiştir. Bunun yanı sıra, sefotaksimün dimerik safsızlığı sıçanlara akut i.m. uygulama ile 2000 mg/kg doza kadar verilmiş, safsızlığın akut toksisitesinin olmadığı belirlenmiştir¹²⁸.

Vijayan ve ark.larının yaptığı bir çalışmada ise, piperasilin safsızlıklarına yönelik herhangi bir genotoksisite verisi bulunmaması dolayısıyla, piperasiline ait safsızlık-A bileşiğinin in vitro genotoksisite testlerinde genotoksik etkisi incelenmiştir. Çalışmada Ames testinde TA97, TA98, TA100, TA102 ve TA1535 suşlarında metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğunda 5 mg/plak doza kadar çalışıldığında sitotoksisite ve mutajenite gözlenmediği bildirilmiştir. CHO hücrelerinde kromozomal aberasyon testinde de metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğunda 5

mg/kültür konsantrasyona kadar klastojenik etkinin bulunmadığı sonucuna varılmıştır¹²⁹.

Eichenbaum ve arkadaşlarınca gerçekleştirilen bir çalışmada, ilaç ürünlerinde ve boyalarda başlangıç maddesi olarak ve aynı zamanda fungusit özellikte olan p-nitrofenolün, safsızlık olarak varlığı ele alınmış olup, p-nitrofenolün genotoksisite ve karsinojenite riski araştırılmıştır. Daha önce yapılmış çalışmalarda toksisite ve güvenlik profilinin değerlendirilmesine karşın, safsızlık olarak bulunması durumunda risk analizi için verilerin tamamlanması amacı ile in vivo mikroçekirdek testi ve dermal farmakokinetik çalışmaları da yapılmıştır. Yapılan değerlendirme sonrası p-nitrofenolün genotoksik olmayan bir safsızlık olduğu ve eşik değerinin ICH Q3C(R4)'e göre 64 mg/gün olarak düzenlenebileceği sonucuna varılmıştır¹³⁰.

Gemifloksasin mesilata ait fotodegradasyon ürünü ve sentetik safsızlığın sitometrik yöntemle sitotoksitesinin değerlendirildiği diğer bir çalışmada ise, bozunma ürününün sitotoksositeye neden olduğu sonucuna varılmış ancak safsızlıklara herhangi bir genotoksosite testi uygulanmamıştır¹³¹.

Levofloksasinin n-oksit safsızlığının genotoksik etkisini değerlendirmek amacıyla Derek yazılımı ile n-oksit safsızlığında yapısal uyarıcı bir grubun (kinolon-3-karboksilik asit) olduğu belirlenmiştir. Safsızlığın fare lenfoma yöntemi (MLA) ve CHL hücrelerinde kromozomal aberasyon testi ile kendisi ve metabolitlerinde genotoksosite değerlendirmesi yapılmıştır. MLA testinde mutajenik olmadığı belirlenen safsızlık, sadece 1mg/ml dozda S9 varlığında kromozomlarda artan yapısal hasarlara neden olmuştur. Bu veriler esas alınarak, Derek'ten elde

edilen sonuca rağmen levofloksasin n-oksid safsızlığının rutin safsızlık olarak kontrol edilebileceği sonucuna varılmıştır¹³².

İkinci jenerasyon antidepresan ve sigara bırakmaya yardımcı ajan bupropionun 2-bromo-3'-kloropropiofenon (BCP) safsızlığının USP'de %0.1 seviyesini geçmemesi bildirilmektedir. BCP safsızlığına ait genotoksisite verisinin bulunmaması dolayısıyla, SAR çalışmasında Ames pozitif bulunan safsızlık için, Ames testi ve TK6 hücrelerinde in vitro mikroçekirdek yöntemi uygulanmıştır. Metabolik aktivasyon varlığında TA100 ve TA1535 suşlarında mutajenik olduğu gözlenmiştir. Ayrıca metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğunda mikroçekirdek sıklığında artış olduğu bulunmuştur. İleri analizlerde her iki testte de, ortama N-asetilsistein eklenerek genotoksik etkinin azaldığı belirlenmiştir. Çalışmalarda safsızlığın mutajenik, klastojenik ve anojenik olduğu tespit edilmiş ve bu etkilerin reaktif metabolitlerin oluşumu yoluyla gerçekleştiği sonucuna ulaşılmıştır¹³³.

Safsızlıkların kontrolüne yönelik olarak ilaç sentezinde kullanılan aralarında hidrazin, p-nitrotoluen, hidrokinon gibi kimyasalların bulunduğu 11 madde için mevcut genotoksisite ve karsinojenite verisinin değerlendirilmesi yapılmıştır. Araştırmada kimyasalların, mutajenik karsinojen veya non-genotoksik karsinojen olarak belirlenmesi, doz-cevap eğrileri, eşik etkili veya eşiksiz etkili olmalarına göre mekanizmaları belirlenmeye çalışılmıştır. Karsinojenite bilgisi bulunan kimyasallar için bileşiğe özgü limit değerlerin hesaplaması yapılmıştır. Çalışma safsızlıkların toksikolojik verilerinin detaylı olarak değerlendirildiği örnek bir çalışma olarak dikkat çekmektedir¹³⁴.

Bu çalışmanın konusunu oluşturan montelukastın safsızlıklarının toksisitelerinin değerlendirildiği herhangi bir çalışmaya literatürde ulaşılamamıştır. Çalışmadan elde edilen montelukast safsızlığının toksisitesine yönelik sonuçların bu yönü ile literatüre katkı yapması söz konusudur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Montelukast Etkin Maddesini İçeren Müstahzarlarda Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Safsızlıkların Miktar Tayini Ve Yöntem Validasyonu (Geçerlilik Onayı)

Türkiye piyasasında montelukast etkin maddesini içeren müstahzarlarda safsızlık analizini gerçekleştirmek için eczanelerden son kullanma tarihleri dolmamış 11 farklı firmaya ait çocuk ve yetişkin ilaçları temin edilmiştir. Çocuk ilaçları olarak, 8 firmanın 4 mg dozdaki 8 çiğneme tableti ve 1 adet oral granül preparatı çalışma kapsamına alınmıştır. Yetişkinler için montelukast etkin maddesini içeren 11 firmanın 10 mg dozdaki 11 tablet şeklindeki ürünü ile çalışılmıştır. Çocuk ve yetişkin dozlarında toplam 20 ürün için farklı parti numaralarına sahip ikişer örnek alınarak analizler yapılmıştır. Çalışmada ilaçların ve firmaların isimleri belirtilmemiş, parti numaraları da gizlenmiştir. İlaç isimleri harflerle kodlanmış, doz ve ilaç şekillerindeki farklılıklar belirtilmiştir.

Montelukast safsızlıklarının analizlerinde gradient ters faz HPLC yönteminden yararlanılmıştır. Mevcut literatürdeki yöntemler esas alınarak safsızlık tayini için yöntem geliştirilmiş ve validasyon çalışmaları yapılmıştır. Çalışmada olası kayıp ve hataların önüne geçmek amacıyla iç standart yöntemi tercih edilmiş ve iç standart olarak 5-metil-2-nitrofenol kullanılmıştır.

3.1.1. Kullanılan Ekipman, Alet Ve Malzemeler

- HPLC sistemi (Shimadzu Prominence LC-20A)

Konfigürasyon: LC-20AD pompa

DGU-20A3 gaz uzaklaştırıcı

SPD-M20A Fotodiode Array Dedektör (PDA)

- Bilgisayar (HP Compaq)
- Kolon 150/4.6, Kromasil, C18,100-5
- Vakum pompası (Roccer)
- Süzme aparatı
- Filtre 0.22µm
- Amber vial (Agilent)
- Hassas Terazı (Shimadzu AW320)
- Vorteks (Boeco)
- pH metre (Sartorius)
- Ultrasonik banyo (Kudos)

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

- Montelukast sodyum, sülfoksit, cis izomer, metilketon, metilstiren, michael katımları I ve II standartları (Molcan Corp., Kanada)
- 5-metil-2-nitrofenol (Sigma)
- Asetonitril (HPLC grade) (Merck)
- Metanol (HPLC grade) (Merck)
- Ortofosforik asit (Analitik grade) (Merck)
- Sodyum dihidrojen fosfat (HPLC grade) (Merck)
- Su (HPLC grade) (Merck)

3.1.3. Analizi Yapılan Safsızlık Bileşiklerinin Özellikleri

3.1.3.1. Sülfoksit Safsızlığı

Kimyasal adı: [1-[[[1-[3-[(E)-2-(7-klorokinolin-2-il)etenil]fenil]-3-[2-(2-hidroksi propan-2-il)fenil]propil]sulfinil]metil]siklopropil]asetik asit

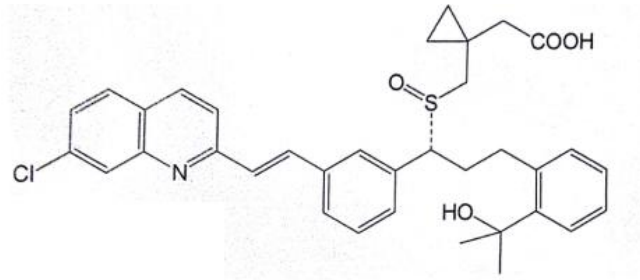
CAS numarası: 909849-96-3

Kimyasal formülü: $C_{35}H_{36}ClNO_4S$

Molekül ağırlığı: 602.18 g/mol

Görünüş: Kirli beyaz veya sarımsı, toz halde

Çözünürlük: Metanol, DMSO ve kloroformda çözünür, suda çözünmez.



Şekil 9: Sülfoksit safsızlığının kimyasal yapısı

3.1.3.2. Cis İzomer Safsızlığı

Kimyasal adı: [1-[[[(1S)-1-[3-[(Z)-2-(7-klorokinolin-2-il)etenil]fenil]-3-[2-(2-hidroksiopropan-2-il)fenil]propil]sulfanil]metil]siklopropil]asetik asit

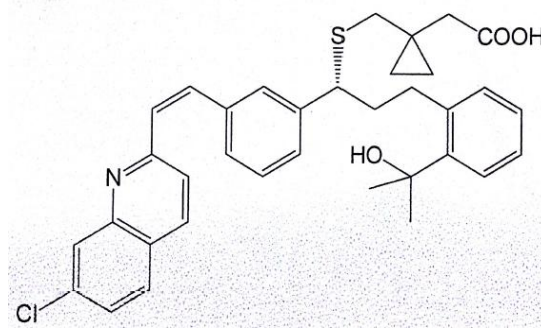
CAS numarası: 774538-96-4

Kimyasal formülü: $C_{35}H_{36}ClNO_3S$

Molekül ağırlığı: 586.18 g/mol

Görünüş: Kirli beyaz veya sarımsı, nem çekici, yarı-katı halde

Çözünürlük: Metanol ve kloroformda çözünür, suda çözünmez.



Şekil 10: Cis izomer safsızlığının kimyasal yapısı

3.1.3.3. Michael Katımları I ve II Safsızlıkları

Kimyasal adı: 1-[[[(1R)-2-[3-[(1R)-1-[[[1-(karboksimetil)siklopropil]metil]sulfanil]-3-[2-(2-hidroksipropan-2-il)fenil]propil]fenil]-1-(7-klorokinolin-2-il)etil]sulfanil]metil]siklopropan karboksilik asit ve 1-[[[(1S)-2-[3-[(1R)-1-[[[1-(karboksimetil)siklopropil]metil]sulfanil]-3-[2-(2-hidroksipropan-2-il)fenil]propil]fenil]-1-(7-klorokinolin-2-il)etil]sulfanil]metil]siklopropan karboksilik asit

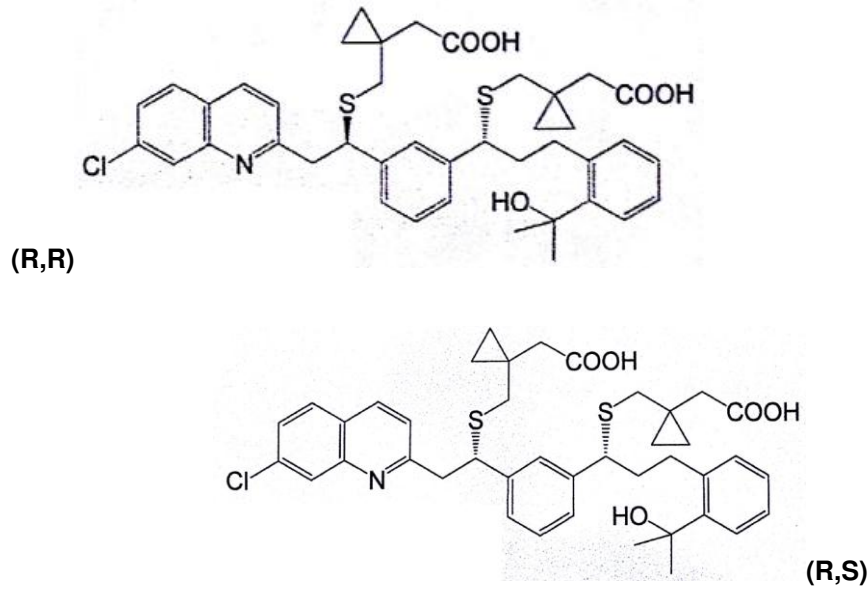
CAS numarası: 1187586-61-3

Kimyasal formülü: $C_{41}H_{46}ClNO_5S_2$

Molekül ağırlığı: 732.39 g/mol

Görünüş: Kirli beyaz veya sarımsı nem çekici katı halde

Çözünürlük: Metanol ve DMSO'da çözünür, suda çözünmez.



Şekil 11: Michael katımları I ve II safsızlıklarının kimyasal yapıları

Araştırılan safsızlıklardan Michael katımları I ve II birbirlerinin diastereomerleridir. Çalışmada kullanılan standart madde diastereomer karışımı olarak temin edilmiştir. Bu karışımın birbirinden ayrılması için özel kolon ve ayırma sistemi ile ileri analizler gerekmektedir. USP’de de bu safsızlıklar için izin verilen limit değer, karışım üzerinden belirtilmektedir. Dolayısıyla çalışmada önemli olan diastereomer halde bulunan bu maddeleri birbirinden ayırmak değil karışım halde bu safsızlıklardan ilaç numunelerinde ne düzeyde bulunduğu saptanmasıdır. Uygulanan HPLC yöntemi ve şartları ile Michael katımları I ve II kromatogramda birbiri ile girişim yapan iki pik vermekte ve bu piklerin hangi safsızlığa ait olduğu kesin bilinmemektedir. Bu nedenle çalışmada her türlü analizin bu iki safsızlığın oluşturduğu toplam alanlar üzerinden yapılmasına karar verilmiştir.

3.1.3.4. Metilketon Safsızlığı

Kimyasal adı: [1-[[[(1R)-3-(2-asetilfenil)-1-[3-[(E)-2-(7-klorokinolin-2-il)etenil]fenil]propil]sulfanil]metil]siklopropil]asetik asit

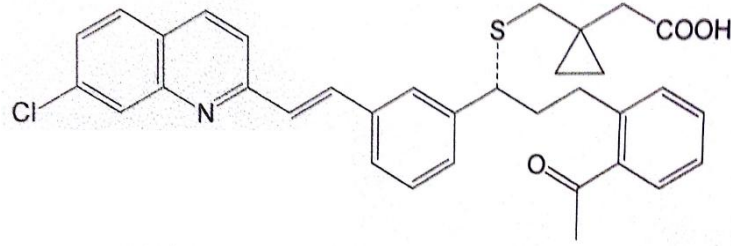
CAS numarası: 937275-23-5

Kimyasal formülü: $C_{34}H_{32}ClNO_3S$

Molekül ağırlığı: 570.14 g/mol

Görünüş: Beyaz veya kirli beyaz, katı halde

Çözünürlük: Metanolde çözünür.



Şekil 12: Metilketon safsızlığının kimyasal yapısı

3.1.3.5. Metilstiren Safsızlığı

Kimyasal adı: [1-[[[(1R)-1-[3-[(E)-2-(7-klorokinolin-2-il)etenil]fenil]-3-[2-(prop-1-en-2-il)fenil]propil]sulfanil]metil]siklopropil]asetik asit

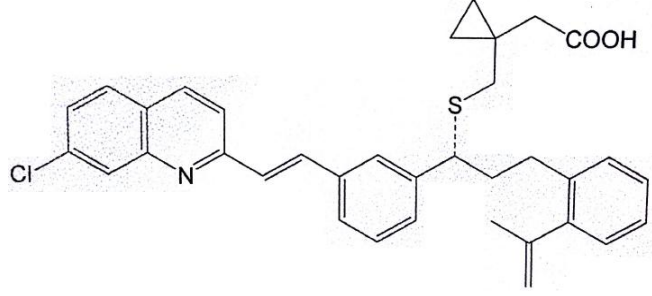
CAS numarası: 918972-54-0

Kimyasal formülü: $C_{35}H_{34}ClNO_2S$

Molekül ağırlığı: 568.17 g/mol

Görünüş: Kirli beyaz veya sarımsı, katı halde

Çözünürlük: Metanol, DMSO ve kloroformda çözünür, suda çözünmez.



Şekil 13: Metilstiren safsızlığının kimyasal yapısı

3.1.4. Safsızlıkların HPLC ile Tayini Test Şartları

Yapılan çalışmalarla safsızlıkların analizleri için en uygun kromatografik koşullar belirlenmiştir. Bu koşullara ait şartlar aşağıda sunulmuştur.

Kolon	: 150/4.6, Kromasil, C18,100-5
Kolon sıcaklığı	: 27 ⁰ C
Numune sıcaklığı	: 4 ⁰ C
Akış hızı	: 1.1ml/dk
Dalga boyu	: 225nm
Enjeksiyon hacmi	: 20µl
Enjeksiyon süresi	: 27dk
Çözücü	: Metanol
Mobil fazlar	: Mobil faz A – Asetonitril : Fosfat Tampon karışımı (63:37) Mobil faz B – Asetonitril : Su (90:10)

Gradient :

Zaman (dk)	Mobil Faz A	Mobil Faz B
0	50	50
2	50	50
15	10	90
23	10	90
26	50	50
27	50	50

3.1.5. Çözeltilerin hazırlanması

- Mobil faz A (Asetonitril : Fosfat Tampon karışımı (63:37)): 12.5mM fosfat tamponu sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ile hazırlanarak seyreltik fosforik asit ile pH=3.7'ye ayarlanır ve filtreden süzülür. Belirtilen oranda asetonitril ile karıştırılarak degaze edilir.
- Mobil faz B (Asetonitril : Su (90:10)): Belirtilen oranda asetonitril ve su karıştırılarak degaze edilir.
- İç standart çözeltisi: 5-metil-2-nitrofenol 2mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde metanol ile ultrasonik banyoda çözülerek hazırlanır. Hazırlanan stok çözelti 0.2µm PTFE filtreden süzülerek vialere alınır. Çalışmalarda iç standart ilavesi 25µg/ml konsantrasyonda yapılır.
- Safsızlık ve etken madde standart çözeltilerinin hazırlanması: Analizi yapılacak safsızlıklar ve etken madde 2mg/ml veya 1mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde ultrasonik banyoda metanol ile çözülür. Hazırlanan stok çözeltiler 0.2 µm PTFE filtreden süzülerek vialere alınır. Bu stok çözeltilerden hareketle gerekli dilüsyonlar yapılarak validasyon çalışmaları gerçekleştirilir.

3.1.6. Analitik Yöntemin Validasyonu (Geçerlilik Onayı)

Analitik yöntem validasyonu, analitik yöntemlerin belirlenen amaçları doğrultusunda kullanılabilmeleri için uygun olduğunun ve sonuçların geçerliliğinin gösterilmesi prosedürüdür¹³⁵. İlaç analizlerinde kullanılan analitik yöntem geçerliliğinin sağlanması ile bilimsel bütünlük ve uygunluğun sağlanması, istenen amaç için güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçların alınması sağlanır^{136,137}. Bu amaçla ICH ve FDA'nın rehberleri ve USP gibi uluslararası kaynaklarda, değerlendirilmesi gerekli parametrelerin ve kabul kriterlerine uygunluğunun onaylanması için bilgiler bulunmaktadır¹³⁸⁻¹⁴⁰. Çalışmada ICH Q2(R1) rehberi referans alınarak analitik yöntemin validasyonu gerçekleştirilmiştir. Özgünlük, doğrusallık, doğruluk ve geri kazanım, gün içi-günler arası kesinlik, teşhis sınırı ve miktar tayini alt sınırı çalışmaları yapılmıştır.

3.1.6.1. Özgünlük (Specificity)

Uygulanan analitik yöntemin amaçlanan bileşen veya bileşenleri tayin edebilme yeteneğinin gösterilmesidir.

Mobil faz A (Asetonitril:Fosfat Tampon) , mobil faz B (Asetonitril:Su), metanol (çözücü), iç standart (5-metil-2-nitrofenol), 50 µg/ml konsantrasyonda hazırlanan her bir safsızlık ve montelukast sodyuma ait standart çözeltiler belirlenen kromatografik koşullarda HPLC'ye enjekte edilerek bireysel ve karışım halinde kromatogramlardan her bir maddenin alıkonma zamanlarına ulaşılmıştır. Ayrıca analitlerin tablet numune çözeltisinde doğru şekilde ölçülebildiği kontrol edilmiştir.

3.1.6.2. Doğrusallık (Linearity)

Farklı konsantrasyonlarda analit içeren bir seri çözeltide, konsantrasyona bağlı olarak cihazın verdiği cevabın orantılı olarak arttığının belirlenmesidir. Doğrusallık, derişime karşı ölçülen cevabın regresyon analizi ile matematiksel olarak hesaplanmasıyla bulunur. Sonuçlardan kalibrasyon grafiğı elde edilerek doğru denklemine ulaşılır. Korelasyon katsayısı “r” ve tanımlayıcılık katsayısı “r²” değerleri 1’e yakın olmalıdır.

Analizlerin yapılacağı safsızlıklar (sülfoksit, Michael katımları I ve II, cis izomer, metilketon, metilstiren) ve montelukast etkin maddesine ait kalibrasyon eğrilerinin oluşturulabilmesi ve kalibrasyon denkleminin bulunabilmesi amacıyla stok standart çözeltilerinden belirlenen konsantrasyonlarda dilüsyonlar hazırlanmıştır. Analizi yapılan safsızlık maddeleri için 1.56; 3.125; 6.25; 12.5; 25; 50; 75 ve 100 µg/ml, montelukast etkin maddesi için ise 5; 10; 100; 250; 500 ve 700 µg/ml konsantrasyonları belirlenerek her bir nokta için ikişer kez enjeksiyon yapılarak doğrusallık parametrelerine ulaşılmıştır.

3.1.6.3. Doğruluk Ve Geri Kazanım (Accuracy / Recovery)

Ölçülen değerin doğru ya da doğru kabul edilen değere yakınlığını gösteren parametredir. Geri kazanım çalışmaları yapılarak sonuçlar % geri kazanım ve % BSS (bağıl standart sapma) olarak verilir.

Çalışmada tablet numune çözeltisi enjekte edilerek ölçümler yapılmıştır. Daha sonra 12.5 µg/ml konsantrasyonda her bir safsızlık ve montelukast çözeltisi, tablet numune çözeltisine ilave (spike) edilerek altı

kez ölçüm yapılmıştır. Elde edilen ölçüm değerlerinden % geri kazanım hesaplanmıştır.

3.1.6.4. Kesinlik (Precision)

Analitik yöntemin çalışılan şartlarda tekrarlanabilirliğinin ölçümüdür. % BSS olarak verilir.

3.1.6.4.1. Gün İçi Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)

Çalışmada her bir safsızlık ve montelukast etkin maddesi için 6.25 µg/ml konsantrasyonda çözelti hazırlanarak aynı gün içerisinde ardışık altı kez ölçüm yapılmıştır.

3.1.6.4.2. Günler Arası Kesinlik (Orta Kesinlik)

Çalışmada günler arası kesinliğin değerlendirilmesi amacıyla safsızlıklar ve montelukast etkin maddesi 6.25, 12.5 ve 25 µg/ml konsantrasyonlarda hazırlanmış, her bir derişim için ardışık üç gün ardarda üç ölçüm yapılmıştır.

3.1.6.5. Teşhis Ve Miktar Tayini Alt Sınırı (Limit of Detection - LOD; Limit of Quantification - LOQ)

Analitin örnek içinde saptanabilen en düşük konsantrasyonu teşhis sınırını, ölçülebilen en düşük konsantrasyonu ise miktar tayini alt sınırını vermektedir. Çalışmada teşhis sınırı ve miktar tayini alt sınırının belirlenmesi için kalibrasyon eğrilerinin eğimi ve alan standart sapmalarından yola çıkarak hesap yapılmıştır.

$$LOD = (3.3 * \delta) / S$$

$$LOQ = (10 * \delta) / S$$

δ : Kalibrasyon aralığındaki en düşük derişimin standart sapması

S: Kalibrasyon eğrisinin eğimi

3.1.7. Montelukast İçeren Müstahzarlarda Safsızlıkların Miktar Tayini

Montelukast etkin maddesini içeren müstahzarlarda Amerikan Farmakopesi'nde montelukast sodyum için tanımlanmış 6 adet safsızlığın tayini için validasyonu yapılmış gradient ters faz HPLC metodu kullanılmıştır. Her müstahzar için farklı parti numarasına sahip iki örnek çalışılmıştır. Örneklerde 10 adet tablet/çiğneme tableti/granül numunesi tartılarak ortalama ağırlık alınmıştır. Toz edilen örneklerde 4mg veya 10mg montelukasta eşdeğer numune, 0.5mg/ml konsantrasyonda metanol ile çözülmüştür. 25µg/ml son konsantrasyonda iç standart ilavesinin ardından hazırlanan çözelti 0.2µm PTFE filtreden süzülerek viallere alınmıştır. Belirtilen HPLC şartlarında her örnek için üç ölçüm yapılmıştır. Elde edilen kromatogramlardan miktarları belirlenmiştir.

Çalışmada, miktar tayini sonuçlarından safsızlıkların rehberlerde belirtilen kalifikasyon sınır değerlerini aşıp aşmadığı belirlenmiştir. Araştırılan safsızlıklar arasında kalifikasyon limitlerini aşan sülfoksit safsızlığı için ileri analizlere gereksinim duyulmuştur.

3.2. Safsızlıkta Yapı-Aktivite İlişkisinin (QSAR) Değerlendirilmesi

Toksikolojik özelliklerinin belirlenmesine ihtiyaç duyulan sülfoksit safsızlığında, ilk adım olarak Leadscope QSAR yazılımı kullanılarak mutajenite değerlendirmesi yapılmıştır. Bu amaçla; “Leadscope Model Applier Suites, Genetic Toxicity, The Gene Mutation-Microbial In Vitro models - Salmonella Mut (v3) and E Coli – Sal 102 A-T Mut (v1.), Model Applier Version: 1.7.3, Leadscope, Inc.” modellemesi kullanılmıştır.

3.3. Ames Testi İle Mutajenitenin Değerlendirilmesi

Safsızlığın mutajenik etkisinin değerlendirilmesinde, OECD Test Rehberinde yer alan 471 numaralı “bakteride geri mutasyon testi”nin (Ames testi) mikropak biçiminin geliştirildiği “Ames MPF™ Penta I Mutajenite Testi” kullanılmıştır.

3.3.1. Kullanılan Cihaz, Alet Ve Sarf Malzemeler

- İnkübatör (Nuaire)
- Çalkalayıcı (Stuart)
- Hassas terazi (Shimadzu)
- Otoklav (Hirayama)
- Buzdolabı (Uğur)
- -20 °C’lik dondurucu (Uğur)
- -80 °C’lik dondurucu (Daihan Scientific)
- Spektrofotometre (Shimadzu UV-160A)
- 24, 96 ve 384 kuyucuklu plak
- Reajan rezarvuarı

3.3.2. Kullanılan Kit İçerikleri Ve Kimyasallar

- Ames MPF™ Penta I Mutajenite Testi kiti (Xenometrix)
- Ampisilin (50mg/ml)
- S9 fraksiyonu (Aroclor 1254 ile indüklenmiş, karaciğer)
- Büyüme ortamı
- Salmonella maruziyet ortamı
- E.coli maruziyet ortamı
- Salmonella indikatör ortam
- E.coli indikatör ortam
- S9 100/1537 destek çözeltisi
- Glukoz-6-fosfat
- Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
- Tampon tuzları (Magnezyum klorür, Potasyum klorür, Monosodyum fosfat)
- N⁴-aminositidin (N⁴-ACT)
- 2-nitrofloren (2-NF) (Moltox)
- 9-aminoakridin (9-AA) (Moltox)
- 4-nitrokinolin-N-oksit (4-NQO) (Moltox)
- 2-aminoantrasen (2-AA) (Moltox)
- Sülfoksit safsızlığı (Molcan Co.)
- DMSO (Merck)

3.3.3. Kullanılan Suşlar Ve Özellikleri

Çalışma; uluslar arası rehberlerde önerildiği şekilde, farklı mutajenik etkilerin gözlemlenebilmesi amacı ile beş suş (*S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535 ve TA1537 ve *E. coli* wp2 [pKM101] + wp2 *uvrA*) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada *E.coli* suşları ayrı olarak kültüre alındıktan sonra sisteme karışım halinde eklenmiştir. Kullanılan dört *S. typhimurium* suşunda öncelikli geri dönen bölge olarak GC baz çiftleri bulunmaktadır. *E.coli* suşlarında ise AT baz çiftleri hedef olmakta aynı zamanda bazı okside edici mutajenler, çapraz bağlanmaya neden olan ajanlar saptanmaktadır. TA100, TA1535 ve *E.coli* suşları baz çifti değişimi mutasyonlarının, TA98 ve TA1537 ise çerçeve kayması mutasyonlarının teşhisine olanak sağlamaktadır.

Tablo 6: Ames testinde kullanılan suşların genotipleri

Suşlar		Mutasyon	Ek mutasyonlar			Hedef	Mutasyon tipi
			DNA onarımı	rfa	pKM101		
S. typhimurium	TA98	hisD3052	uvrB	+	+R	GCGCGCGC	Çerçeve kayması
	TA100	hisG46	uvrB	+	+R	GGG	Baz çifti değişimi
	TA1535	hisG46	uvrB	+	- R	GGG	Baz çifti değişimi
	TA1537	hisC3076	uvrB	+	- R	CCC...C	Çerçeve kayması
E. coli	uvrA	trpE65	uvrA	-	- R	A:T	Baz çifti değişimi
	[pKM101]	trpE65	-	-	+R	A:T	Baz çifti değişimi

3.3.4. Çalışmanın Tasarımı

Sülfoksit safsızlığı Ames testi ile beş suş kullanılarak metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğunda altı farklı konsantrasyonda değerlendirilmiştir. Tüm test sistemleri negatif kontrol ve suşa özgü pozitif kontrol içermektedir. Ames testinde ön inkübasyon tekniği kullanılarak, yaklaşık 10^7 bakteri eser miktarda histidin (S.typhimurium) veya triptofan (E.coli) içeren ortamda yaklaşık iki hücre döngüsü boyunca test maddesi ile maruz bırakılmaktadır. Metabolik aktivasyon içeren test sistemlerinde ortama S9 karışımı da eklenmektedir. Ön inkübasyon sonrasında, maruziyet kültürlerine histidin/triptofan içermeyen pH indikatör ortamı eklenir. Her doz için üç ayrı plakta kuyucuklara dağıtılan karışımlarda, 48 saat inkübasyon sırasında, amino asit prototrofisi gösteren hücreler koloni oluşturmaktadırlar. Bakteriyal metabolizma, ortamın pH'sının düşmesine ve kuyucuklardaki ortam renginin değişmesine neden olmaktadır. Test maddesinin her dozu ve çözücü kontrolde geri dönen koloni içeren kuyucuklar sayılarak istatistiksel analiz gerçekleştirilmektedir.

3.3.5. Deneyin Uygulanması

Mutajenite testi, “Ames MPF™ Penta I Mutajenite Testi” kit prosedürüne göre gerçekleştirilmiş, deney aşamaları aşağıda özetlenmiştir. Çalışmanın tamamı hücre kültürüne ve mikrobiyolojik çalışmalara olanak sağlayacak şekilde steril şartlar altında yürütülmüştür.

3.3.5.1. Suşların gecelik kültürlerinin hazırlanması

Bakteri suşları homojenize edildikten sonra genotiplerine uygun olarak hazırlanan besi ortamlarına ekimleri yapılarak 37°C 'de 250 rpm hızda, 14-16 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda besi ortamı da inkübe edilerek negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Gecelik

kültürün içerdiği hücre yoğunluğunu bulmak amacı ile spektrofotometre ile OD₆₀₀ değeri elde edilmiştir.

3.3.5.2. Test maddesinin Ve Pozitif Kontrollerin Hazırlanışı

Çalışmada stoklar 25x hazırlanmış olup, sülfoksit safsızlığı son konsantrasyonları 5000, 1581, 500, 158, 50, 15.8 µg/ml olacak şekilde DMSO'da çözülerek kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak DMSO kullanılmıştır. Her suş için kullanılan pozitif kontroller ve son konsantrasyonları Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7: Suşlara özgü pozitif kontroller ve deneyde kullanılan son konsantrasyonları

	S9 içermeyen sistemde		S9 içeren sistemde	
Suşlar	Kimyasal	Son kons.	Kimyasal	Son kons.
TA98	2-nitrofloren	2 µg/ml	2-aminoantrasen	1 µg/ml
TA100	4-nitrokinolin-N-oksit	0.1 µg/ml	2-aminoantrasen	2.5 µg/ml
TA1535	N ⁴ -aminositidin	100 µg/ml	2-aminoantrasen	5 µg/ml
TA1537	9-aminoakridin	15 µg/ml	2-aminoantrasen	5 µg/ml
E.coli karışımı	4-nitrokinolin-N-oksit	2 µg/ml	2-aminoantrasen	50 µg/ml

3.3.5.3. S9 Karışımı içeriği

S9 karışımı %30 S9 fraksiyonu içerecek şekilde, 1 M KCl, 0.25 M MgCl₂.6H₂O, 0.2 M glukoz-6-fosfat Na tuzu, 0.04 M NADP Na tuzu, 0.2 M NaH₂PO₄ tamponu ile hazırlanır.

3.3.5.4. Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

TA98 suşu, test maddesinin 5000 µg/ml'ye kadar yedi farklı konsantrasyonu maruziyet ortamında 90 dakika inkübe edilmiştir. Kitin önerdiği ön-tarama testi, sitotoksitenin görülmediği dozlarda bulanıklığın oluşması, sitotoksitenin varlığında ise bakteri parçalanmasına bağlı olarak berrak görüntünün gözlenmesi esasına dayanmaktadır. Süre sonunda her doz noktası için bulanıklık spektrofotometrede 600nm dalga boyunda ölçülerek sitotoksitenin değerlendirilmiştir.

3.3.5.5. Mutajenite Deneyi

Her suş için, metabolik aktivasyon içeren ve içermeyen sistemlerde, sülfoksit safsızlığının 6 konsantrasyonu, negatif ve pozitif kontrollerin bulunduğu seriler üçlü tekrarlar şeklinde çalışılmıştır. Bu kapsamda metabolik aktivasyon sağlanmayan serilerde; her kuyucuğa muamele edilen madde stoğu ve suşlara özgü maruziyet ortamı+bakteri karışımı konulmuştur. Metabolik aktivasyon sağlanan serilerde ise; her kuyucuğa muamele edilen madde stoğu ve suşlara özgü maruziyet ortamı+bakteri+%30'luk S9 karışımı konulmuştur. Salmonella suşlarını S9 karışımının toksik etkilerinden korumak amacıyla maruziyet ortamlarına S9 destek çözeltisi de eklenmiştir. Plaklar Salmonella suşlarında S9 varlığı ve yokluğunda 90 dakika, E.coli suşlarında S9 yokluğunda 90 dakika, varlığında 20 dakika 250 rpm, 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminin ardından maruziyetin gerçekleştirildiği plaklara her bir kuyucuğa Salmonella/E.coli indikatör ortam eklenmiştir. Daha sonra yukarıda belirtilen üçlü serilerin her biri 384 kuyucuklu plaklara dağıtılarak, her doz grubu için sonuç olarak 48 kuyucuklu üçer alan elde edilmiştir. Plaklardaki çözeltiler uygun şekilde dağıtıldıktan sonra 384 kuyucuklu plaklar inkübasyon poşetlerine koyularak 48 saat 37°C'de inkübe edilmiştir.

3.3.6. Mutajenik Etkinin Değerlendirilmesi

İnkübasyonun tamamlanmasının ardından üçlü tekrar plaklarda, her bir 48 kuyucuklu alanda geri dönen kolonileri içeren kuyucuklar sayılarak kaydedilmiştir. Her nokta için üç plağın sonuçlarının ortalaması ve standart sapma değeri hesaplandıktan sonra, çözücü kontrolün pozitif kuyucuklarının ortalamasına standart sapması eklenerek bir referans değer elde edilmiştir. Test maddesinin her bir dozu için pozitif kuyucuk sayılarının ortalamasının referans değere göre kaç kat artış gösterdiği hesaplanmıştır.

Elde edilen sonuçlarda açıkça doz-yanıt etkisi görülen ve/veya referans değerini iki ve daha fazla katı artışa neden olan dozlarda test maddesi mutajen olarak adlandırılabilir⁷⁴. Bununla birlikte, student t-test (tek yönlü, eşleştirilmemiş) kullanılarak $\alpha=0.05$ değerinde anlamlılık da belirlenebilir.

Kit prosedüründe belirtildiği şekilde, negatif kontrollerde geri dönen koloni içeren kuyucuk sayısı ortalaması TA98, TA1535 ve TA1537 için ≤ 8 , TA100 ve E.coli için ise ≤ 12 olmalıdır. Pozitif kontroller için, Salmonella suşlarında S9 içeren ve içermeyen deneylerde pozitif kuyucuk sayısı ≥ 25 , E.coli suşlarında ise S9 içermeyen deneyde ≥ 25 , S9 içeren deneyde referans değerinin ≥ 2 katı olması deney sisteminin doğruluğunu göstermektedir.

3.4. Safsızlığın Mitotik İndeks İle Sitotoksitesinin Belirlenmesi Ve İn Vitro Kromozomal Aberasyon Testi İle Genotoksitenin Değerlendirilmesi

Çalışmada sülfoksit safsızlığının genotoksik etkisini değerlendirmek amacıyla uygulanan in vitro kromozomal aberasyon testi OECD Test Rehberi No:473'e göre uygulanmıştır. Safsızlığın sitotoksitesinin belirlenmesi amacıyla, hücrelerin mitoza giriş hızını belirleyerek indirekt sitotoksik etkiyi gösteren mitotik indeks sonuçlarından yararlanılmıştır. Sitotoksite verileri in vitro kromozomal aberasyon yöntemi için uygun doz aralığının seçilmesine de yardımcı olup yol göstermiştir⁸⁶.

3.4.1. Kullanılan Cihaz, Alet Ve Sarf Malzemeler

- İnkübatör (Nuaire)
- Biyolojik güvenlik kabini (Trans)
- Santrifüj (Nüve)
- Vorteks (Boeco)
- Hassas terazi (Shimadzu)
- Buzdolabı (Uğur)
- Buz makinesi (Scotsman AF100)
- Soğutucu (-20⁰C) (Uğur)
- Soğutucu (-80⁰C) (Daihan Scientific)
- Işık mikroskobu (Leica DM 1000)
- Traşlı lam
- Dikey cam şale
- 15 ml'lik tüp
- Steril filtre

3.4.2.Kullanılan Kimyasallar

- Kromozom besi yeri-B (Biochrom)
- Giemsa's azur eosin methylene blue solution (Merck)
- Kolsemid (Biochrom)
- Potasyum klorür (Merck)
- Metanol (Merck)
- Glasiyel asetik asit (Merck)
- İmmersiyon yağı (Merck)
- Sodyum fosfat dibazik (Sigma)
- Sodyum fosfat monobazik monohidrat (Sigma)
- Magnezyum klorür hegzahidrat (Sigma)
- D-Glukoz-6-fosfat sodyum (Sigma)
- β -nikotinamid adenin dinükleotid fosfat sodyum (Sigma)
- Siklofosfamid monohidrat (Sigma)
- Mitomisin-C (Sigma)
- Sülfoksit safsızlığı (Molcan Corp., Kanada)

3.4.3. Kullanılan Çözeltiler

KCl çözeltisi: Potasyum klorür 0.075 M konsantrasyonda suda çözülerek taze olarak hazırlanmıştır.

Fiksatif Çözeltisi: Glasiyel asetik asit : metanol (1:3) karıştırılarak taze olarak hazırlanmıştır.

Giemsa Çözeltisi: Boyamada %4'lük giemsa çözeltisi kullanılmıştır.

Mitomisin-C çözeltisi: Mitomisin-C stok çözeltisi steril şartlarda distile su ile 200 μ g/ml konsantrasyonda hazırlanmıştır.

Siklofosfamid çözeltisi: Siklofosfamid stok çözeltisi steril şartlarda distile su ile 10 mg/ml konsantrasyonda hazırlanmıştır.

S9 karışımı: %10(v/v) S9 fraksiyonu, 1 M KCl, 0.25 M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.2 M G-6-P, 0.04 M NADP, 0.2 M fosfat tamponu (pH=7.4) ile steril şartlarda taze olarak hazırlanmıştır.

Sülfoksit safsızlığı stok çözeltisi: Sülfoksit safsızlığı 50 mg/ml konsantrasyonda metanolde çözülerek taze olarak hazırlanmış, ışıktan korunmuştur.

3.4.4. Biyolojik materyal ve deneyin tasarımı

Çalışmada sülfoksit safsızlığının genotoksik etkisinin değerlendirilmesi amacı ile Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (13.04.2011 tarihli karar no:90) izni ile (Ek:1) sağlıklı iki bireyden heparinli tüplere alınan periferik kan örneklerinden biyolojik materyal olarak yararlanılmıştır. Çalışmaya katılan bireyler sigara içmeyen, sağlıklı ve 28 yaşında bir kadın ve bir erkek bireyden oluşmaktadır. Çalışmamızda donörlere gönüllü olur formu imzalatılmış, anket uygulanmış ve temin edilen kanlar vakit kaybetmeden laboratuvara getirilerek deneylere başlanmıştır.

Çalışma; sülfoksit safsızlığının sitotoksik ve genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amacı ile lenfositlerin metabolik aktivasyon içeren ve içermeyen ortamda 3 saat ve metabolik aktivasyon içermeyen ortamda 24 saat safsızlığa maruz bırakılması şeklinde üç basamaklı olarak tasarlanmıştır. Her çalışma basamağına negatif kontrolün yanı sıra metabolik aktivasyon yokluğunda pozitif kontrol olarak mitomisin-C, metabolik aktivasyon varlığında ise siklofosfamid dahil edilmiştir. Metanolden çözücü kontrol olarak yararlanılmıştır. Sitotoksisite çalışması için sülfoksit safsızlığının en yüksek dozu 500 µg/ml son konsantrasyonda

olacak şekilde altı konsantrasyon (15.7-500 µg/ml) için %mitotik indeks değerine ulaşılarak sitotoksisite belirlenmiştir.

İn vitro kromozomal aberasyon testinde uygulanan konsantrasyon aralığı sitotoksisite verilerinden yararlanarak seçilmiştir. Kontrole göre mitotik indeksin %50 azaldığı dozdan daha yüksek dozlarda üç konsantrasyon belirlenmiştir. Bu dozlar, 3 saat (S9-/+) maruziyetler için 15.7, 31.3, 62.5 µg/ml; 24 saat maruziyet için 20, 30 40 µg/ml'dir. İn vitro kromozomal aberasyon testinde her deney ikişer kez çalışılmış, her doz grubundan 200 metafaz değerlendirilmiştir.

3.4.5. Deneyin Uygulanması

3.4.5.1. Çözünürlük Testi

Çalışma öncesi yapılan çözünürlük çalışmasında, sülfoksit safsızlığının metanolde çözünmesi incelenerek, 500 µg/ml dozda çalışılabilirliği onaylanmıştır.

3.4.5.2. Kültürün Hazırlanması

Heparinli tüpe alınan periferik kan örneklerinden 200 µl, 2.5 ml kromozom besi yerini içeren tüplere steril şartlarda eklenmiş ve tüpler etüvde 45⁰'lik açıyla 48 saat inkübe edilmiştir.

3.4.5.3. Test Maddelerinin Kültüre Eklenmesi

48. saat sonunda test maddeleri her tüpe gereken miktarlarda eklenmiştir. Mitomisin-C 24 saat maruziyetlerde 0.2 µg/ml, 3

saat maruziyetlerde 0.6 µg/ml, siklofosamid ise 15 µg/ml son konsantrasyonda eklenmiştir. S9 içeren deneyde tüpler santrifüjlenerek süpernatandan 500 µl atılmış ve %10'luk S9 karışımından 500 µl konulmuştur. Maddelerin eklenmesinin ardından tüpler 3 veya 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Üç saat maruz bırakılan tüpler süre sonunda yıkama işlemine tabi tutularak besi yeri tazelenmiş ve inkübasyona devam edilmiştir. İnkübasyonun sonlandırılmasına 3 saat kala kültüre metafazı durdurucu kolsemid çözeltisi (0.2 µg/ml) eklenmiş ve inkübasyona devam edilmiştir.

3.4.5.4. Hücrelerin Eldesi Ve Kromozom Preparatlarının Hazırlanışı

72. saatte inkübasyon durdurulmuş, 10 dk 1000 rpm'de santrifüjlenmiş ve üst kısım uzaklaştırılmıştır. 5 ml potasyum klorür çözeltisi ile hücreler 20 dk inkübe edilmiş, santrifüjlenerek üst kısım uzaklaştırılmıştır. Çökelti üzerine 5 ml fiksatif çözeltisi eklenmesi-santrifüjlenerek uzaklaştırılması işlemi dört kez tekrarlanmış ve son fiksasyondan sonra kalan pellet karıştırılarak elde edilen hücre süspansiyonu her kültür tüpü için iki lama yayılmıştır.

3.4.5.5. Kromozom Preparatlarının Boyanması

%4'lük giemsa çözeltisinde 15 dk bekletilen lamalar çıkarıldıktan sonra distile su ile yıkanmış ve kurutulmuştur.

3.4.6. Metafazların Değerlendirilmesi

Mitotik indeksin değerlendirilmesi 40x, kromozomal hasarların değerlendirilmesi 100x objektifle ışık mikroskopunda yapılmıştır.

Sitotoksosite deneyinde, her doz için 1000 hücre sayılmış metafaza giren hücre sayısına oranlama yaparak % mitotik indeks değerine varılmıştır. Kromozomal aberasyon değerlendirmesinde her doz için 46 ± 2 sayıda kromozom içeren toplam 200 metafaz değerlendirilmiştir. Çalışmada esas olarak kromatid ve kromozom tipi yapısal hasarlar değerlendirilmişse de poliploidi ve endoreduplikasyon verileri de kayıt altına alınmıştır. Yapısal hasarlarda, kromatid gap, kromatid kırık, kromatid değişimi (üçlü radyal, dörtlü radyal gibi kromozomlar arası değişimler, kromatid tipi halka, sister union, non-union distal, non-union proksimal), kromozom gap, kromozom kırık ve kromozom değişimleri (disentrik ve sentrik halka) değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar kromozomal aberasyon içeren hücrelerin yüzdesi ve hücre başına düşen yapısal kromozom anormalliklerinin (ka/hücre) sayısı şeklinde gösterilerek değerlendirilmiştir.

3.5. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerde istatistiksel analizler Graphpad Prism sürüm 5.00 programı (demo) kullanılarak yapılmıştır. Araştırma verilerine Kolmogorov-Smirnov testi uygulanarak normal dağılıma uyup uymadıkları incelenmiştir. Parametrik olmayan veri setlerinde, gruplar arasındaki ortalamaların karşılaştırılması Kruskal Wallis yöntemi ile belirlenmiş, anlamlı düzeydeki ($p < 0.05$) farklılıklarda, Dunn's çoklu karşılaştırma testi kullanılarak anlamlı farklılıklar ortaya çıkarılmıştır. Değişkenler arasındaki ilişki düzeylerinin tespiti için korelasyon analizi yapılmıştır. Parametrik dağılım gösteren veriler için Pearson korelasyon analizi, nonparametrik dağılım gösteren veriler için ise, Spearman korelasyon analizi uygulanmıştır. Gruplar arasındaki karşılaştırmalarda student t-test (tek yönlü, eşleştirilmemiş) kullanılarak $\alpha = 0.05$ değerinde anlamlılık belirlenmiştir. Ölçümler arasındaki farklılıklar için % bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Montelukast Etkin Maddesini İçeren Müstahzarlarda HPLC ile Safsızlık Miktar Tayini Ve Yöntem Validasyonu

4.1.1. Analitik Yöntemin Validasyonu

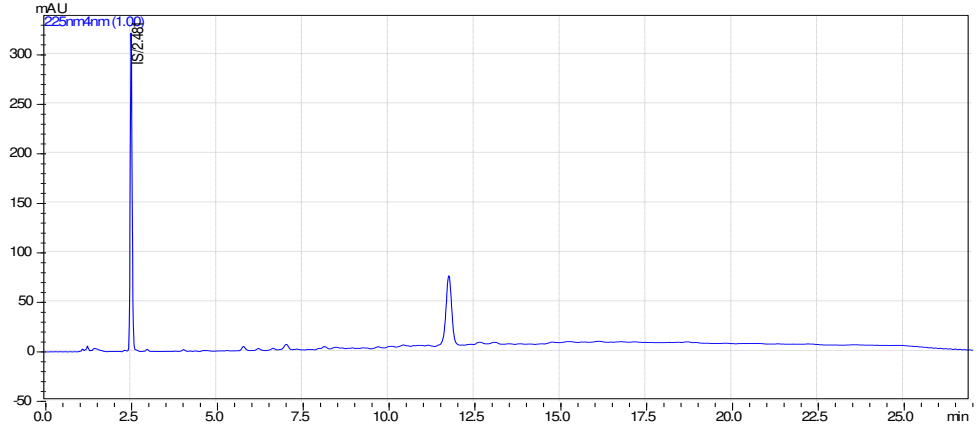
Çalışmada elde edilen bulgular USP validasyon kabul kriterlerine göre değerlendirilmiş olup validasyon sağlanmıştır¹⁴⁰.

4.1.1.1. Özgünlük

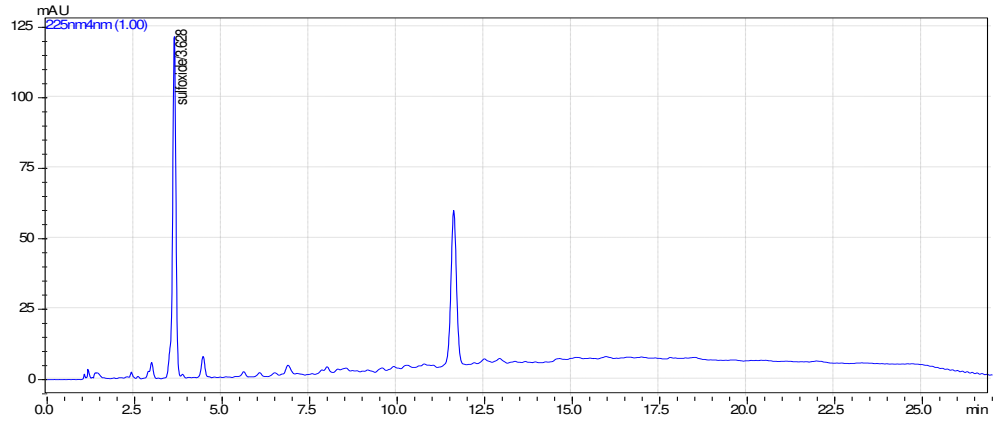
Özgünlük çalışmasından elde edilen her bir maddeye ait alıkonma zamanları Tablo 8’de sunulmuş, analiz edilen maddelerin, bunların karışımlarının ve miktar tayini yapılan ticari ürünün numune çözeltisindeki safsızlıkların ayrılmasına ait kromatogramlar aşağıda verilmiştir (Şekil: 14-22).

Tablo 8: Analiz edilen maddelerin ve iç standartın alıkonma zamanları

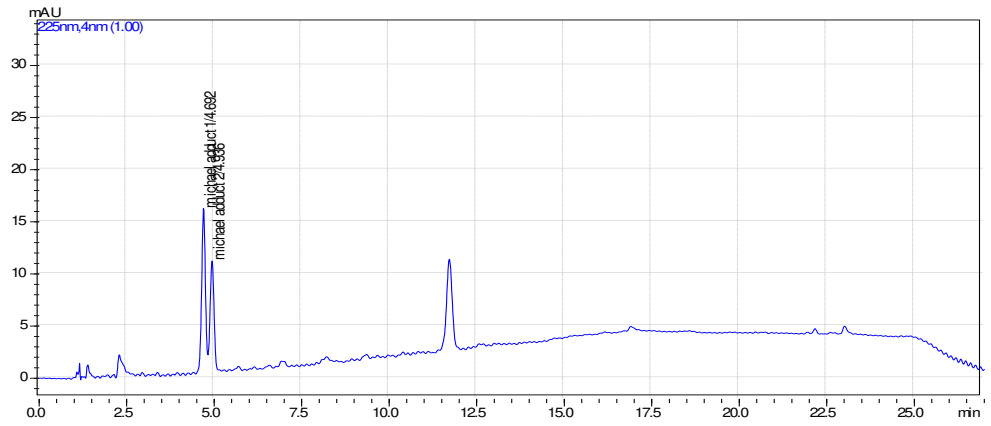
Madde	Alıkonma Zamanı (RT)	Rölatif Alıkonma Zamanı (dk) (RRT)
5-metil-2-nitrofenol (İç standart)	2.452	0.31
Sülfoksit safsızlığı	3.655	0.47
Michael katımları I ve II	4.601 / 4.817	0.59 / 0.61
Cis izomer safsızlığı	6.305	0.80
Montelukast Na	7.853	1
Metilketon safsızlığı	8.321	1.06
Metilstiren safsızlığı	15.322	1.84



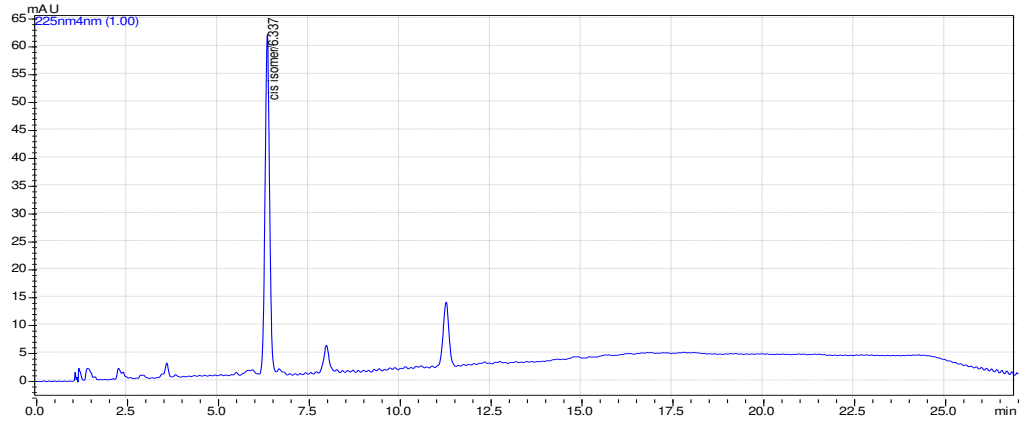
Şekil 14: İç standart 5-metil-2-nitrofenol'e ait kromatogram



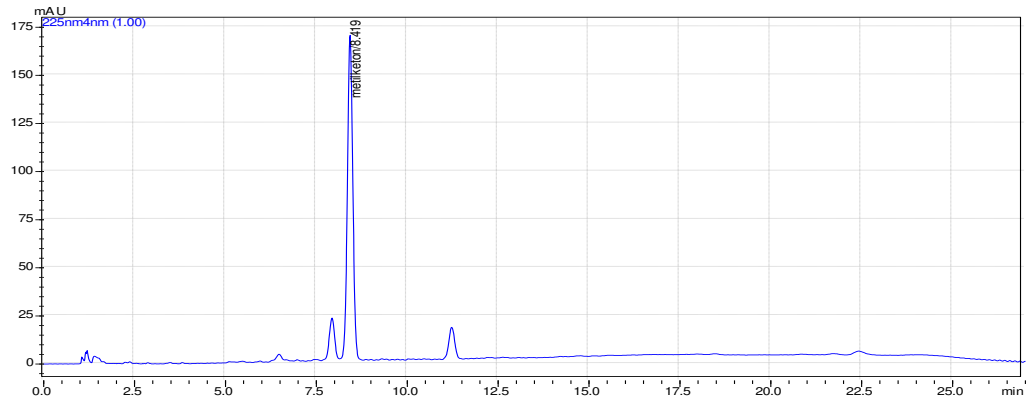
Şekil 15: Sülfoksit safsızlığına ait kromatogram



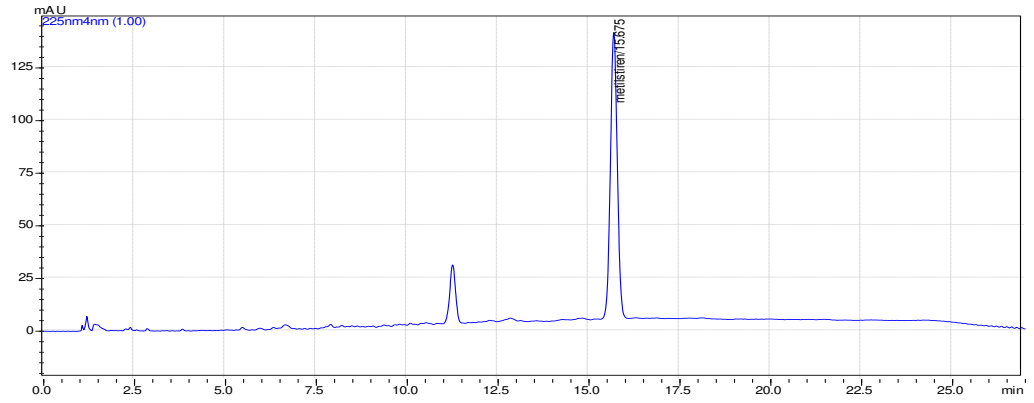
Şekil 16: Michael katımları I ve II safsızlıklarına ait kromatogram



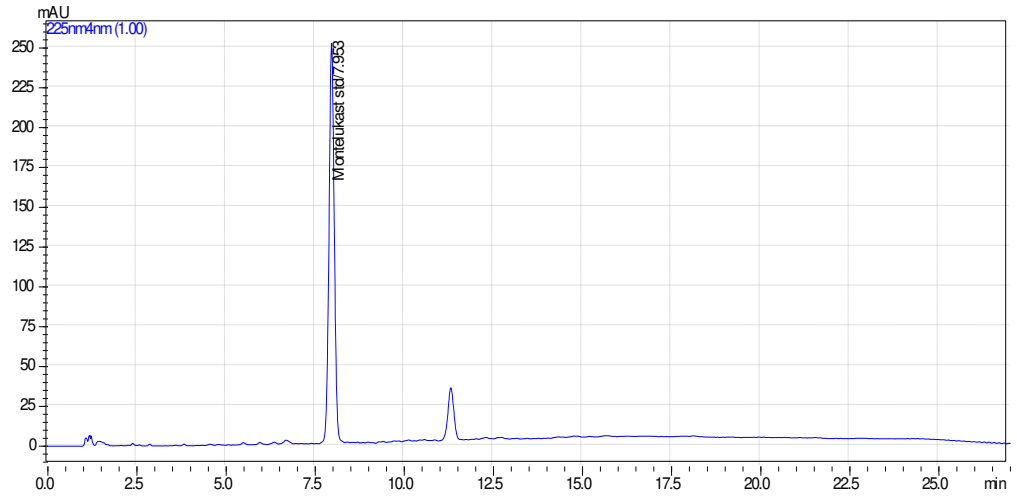
Şekil 17: Cis izomer safsızlığına ait kromatogram



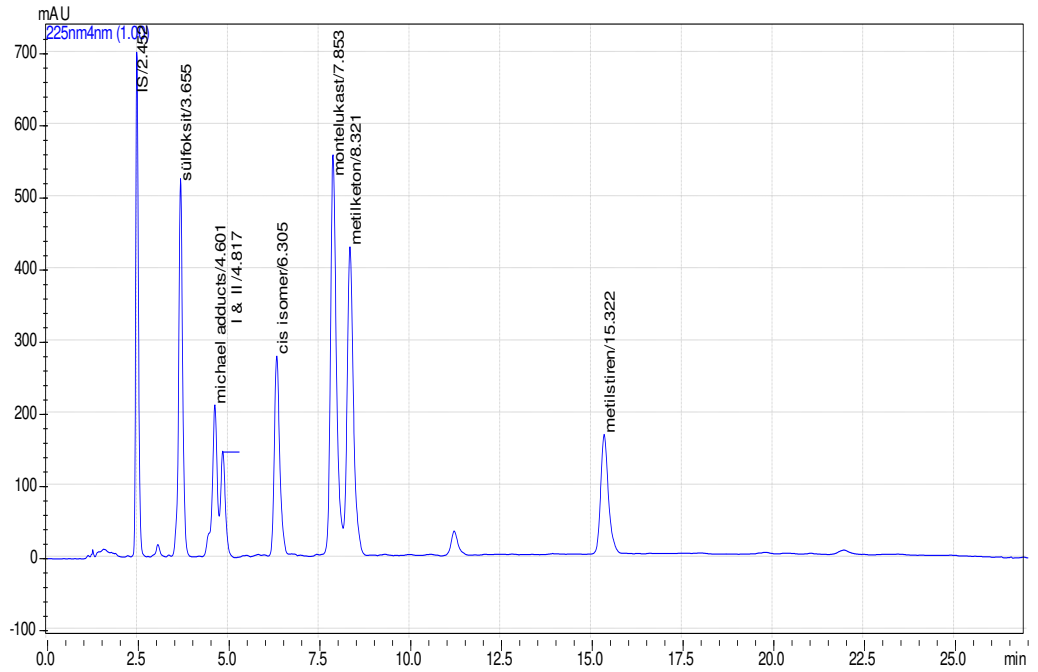
Şekil 18: Metilketon safsızlığına ait kromatogram



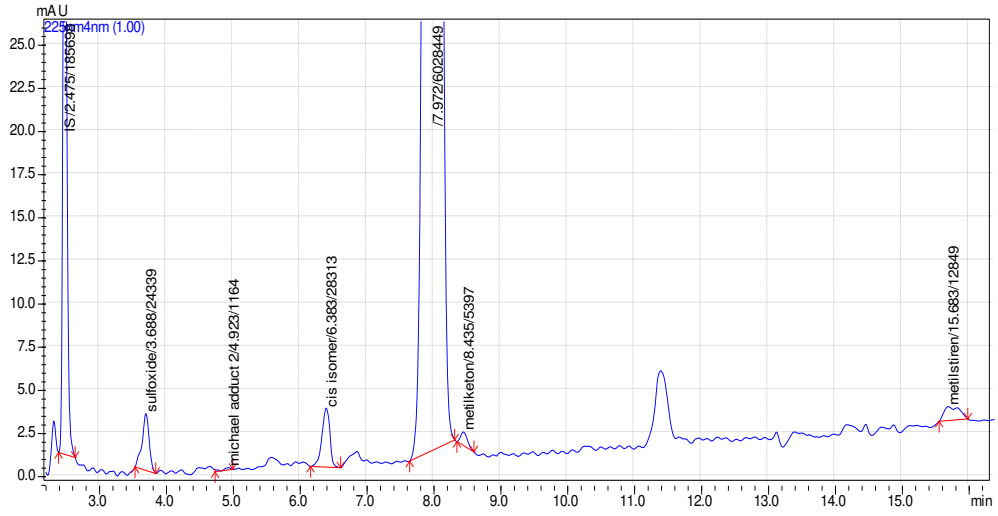
Şekil 19: Metilstiren safsızlığına ait kromatogram



Şekil 20: Montelukast etkin maddesine ait kromatogram



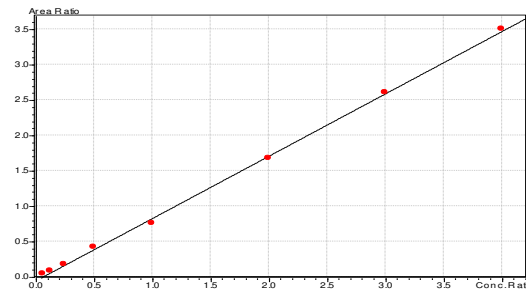
Şekil 21: Safsızlıklar ve montelukast etkin maddesinin karışımına ait kromatogram



Şekil 22: Montelukast içeren ürün numunesi matrisinde safsızlıkların teşhisi örnek kromatogramı (G çığ. tab. 4 mg)

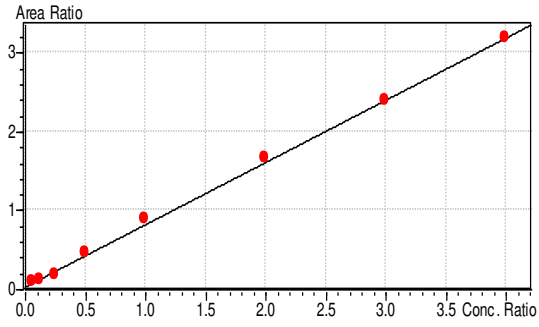
4.1.1.2. Doğrusallık

Doğrusallık çalışması 3.1.7.2. bölümünde belirtilen şekilde yapılarak, kalibrasyon eğrileri ve denklemlerinin oluşturulmasında maddelere ait kromatogramlarda alanlar üzerinden hesaplamalar yapılmıştır. Bu hesaplamalarda, safsızlık maddesi pik alanı iç standart pik alanına oranlanarak elde edilen alan oranlar, konsantrasyon oranlarına karşı grafiğe geçirilmiştir. Analizi yapılan maddelere ait standart doğru denklemleri bulunarak doğrusallıklar kanıtlanmıştır (Grafik: 1-6).



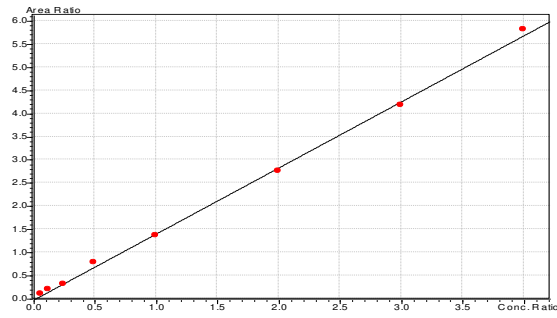
$$y = 0.881x - 0.047, R = 0.9996, r^2 = 0.9991$$

Grafik 1: Sülfoksit safsızlığına ait kalibrasyon grafiği ve denklemi



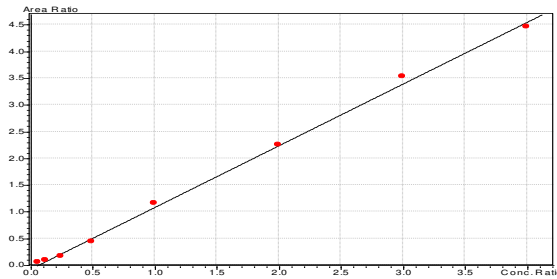
$$y = 0.790x + 0.036, R = 0.9995, r^2 = 0.9990$$

Grafik 2: Michael katımları I ve II safsızlıklarına ait kalibrasyon grafiği ve denklemleri



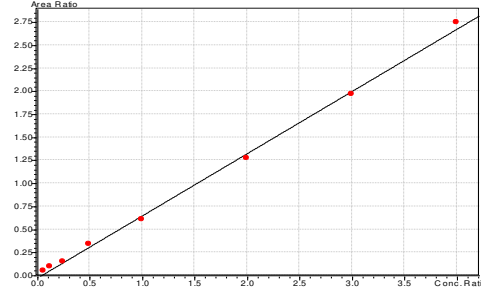
$$y = 1.427x - 0.018, R = 0.9993, r^2 = 0.9987$$

Grafik 3: Cis izomer safsızlığına ait kalibrasyon grafiği ve denklemleri



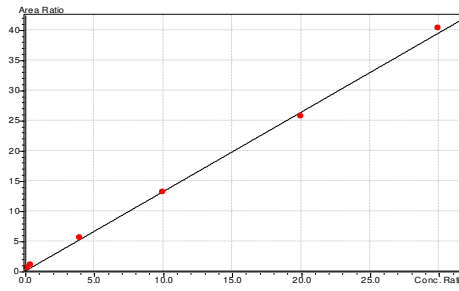
$$y = 1.155x - 0.065, R = 0.9990, r^2 = 0.9980$$

Grafik 4: Metilketon safsızlığına ait kalibrasyon grafiği ve denklemleri



$$y = 0.676x - 0.024 , R = 0.9990 , r^2 = 0.9980$$

Grafik 5: Metilstiren safsızlığına ait kalibrasyon grafiği ve denklemi



$$y = 1.315x + 0.195 , R = 0.9995 , r^2 = 0.9990$$

Grafik 6: Montelukast etkin maddesine ait kalibrasyon grafiği ve denklemi

4.1.1.3. Doğruluk Ve Geri Kazanım

Bölüm 3.1.6.3'te belirtildiği şekilde yapılan deneylerde tablet numune çözeltisinde bulunan değerler madde ilavesi ile elde edilen değerlerden çıkarılarak deneysel (saptanan) miktar sonucuna ulaşılmıştır. Geri kazanılan miktarlar deneysel ve teorik miktarların kullanıldığı aşağıdaki eşitlikten hareketle hesaplanmış, safsızlıklar ve montelukast etkin maddesine ait geri kazanım sonuçları Tablo: 9-14'te sunulmuştur.

Deneysel (saptanan miktar)

$$\% \text{Geri kazanım} = \frac{\text{Deneysel (saptanan miktar)}}{\text{Teorik (ilave edilen miktar)}} \times 100$$

Teorik (ilave edilen miktar)

Tablo 9: Sülfoksit safsızlığına ait doğruluk ve geri kazanım çalışması sonuçları

Teorik Kons. (µg/ml)	DeneySEL Kons. (µg/ml)	Geri kazanım (%)	Ort. Geri Kazanım %	% BSS
12.5	12.08	96.64	99.68	2.40
12.5	12.11	96.88		
12.5	12.82	102.56		
12.5	12.63	101.04		
12.5	12.52	100.16		
12.5	12.60	100.80		

Tablo 10: Michael katımları I ve II safsızlıklarına ait doğruluk ve geri kazanım çalışması sonuçları

Teorik Kons. (µg/ml)	DeneySEL Kons. (µg/ml)	Geri Kazanım (%)	Ort. Geri Kazanım %	% BSS
12.5	12.67	101.36	101.31	0.33
12.5	12.64	101.12		
12.5	12.65	101.20		
12.5	12.62	100.96		
12.5	12.66	101.28		
12.5	12.74	101.92		

Tablo 11: Cis izomer safsızlığına ait doğruluk ve geri kazanım çalışması sonuçları

Teorik Kons. (µg/ml)	DeneySEL Kons. (µg/ml)	Geri Kazanım (%)	Ort. Geri Kazanım %	% BSS
12.5	13.58	108.64	106.23	2.69
12.5	13.34	106.72		
12.5	12.69	101.52		
12.5	13.56	108.48		
12.5	13.01	104.08		
12.5	13.49	107.92		

Tablo 12: Metilketon safsızlığına ait doğruluk ve geri kazanım çalışması sonuçları

Teorik Kons. (µg/ml)	Deneysel Kons. (µg/ml)	Geri Kazanım (%)	Ort. Geri Kazanım %	% BSS
12.5	13.20	105.60	106.56	1.33
12.5	13.45	107.60		
12.5	13.59	108.72		
12.5	13.16	105.28		
12.5	13.16	105.28		
12.5	13.36	106.88		

Tablo 13: Metilstiren safsızlığına ait doğruluk ve geri kazanım çalışması sonuçları

Teorik Kons. (µg/ml)	Deneysel Kons. (µg/ml)	Geri Kazanım (%)	Ort. Geri Kazanım %	% BSS
12.5	12.56	100.48	101.27	2.82
12.5	12.08	96.64		
12.5	13.05	104.40		
12.5	12.50	100.00		
12.5	12.97	103.76		
12.5	12.79	102.32		

Tablo 14: Montelukast etkin maddesine ait doğruluk ve geri kazanım çalışması sonuçları

Teorik Kons. (µg/ml)	Deneysel Kons. (µg/ml)	Geri Kazanım (%)	Ort. Geri Kazanım %	% BSS
12.5	13.65	109.20	106.93	2.59
12.5	13.53	108.24		
12.5	12.80	102.40		
12.5	13.15	105.20		
12.5	13.72	109.76		
12.5	13.35	106.80		

4.1.1.4.Kesinlik

4.1.1.4.1. Gün İçi Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)

6.25 µg/ml konsantrasyonda ardışık altı ölçümle gerçekleştirilen gün içi kesinlik çalışmasından elde edilen sonuçlar ve istatistiksel hesaplamalar Tablo 15'te gösterilmiştir.

Tablo 15: Sülfoksit, michael katımları I ve II, cis izomer, metilketon, metilstiren safsızlıkları ve montelukast etkin maddesi için gün içi kesinlik çalışması sonuçları

Ölçüm no	Sulfoksit Kons. (µg/ml)	Michael Katımları 1 ve 2 Kons. (µg/ml)	Cis izomer Kons. (µg/ml)	Metilketon Kons. (µg/ml)	Metilstiren Kons. (µg/ml)	Montelukast Kons. (µg/ml)
1	6.42	6.20	6.67	6.72	6.71	6.45
2	6.17	6.49	6.31	6.40	6.34	6.42
3	6.62	6.63	6.57	6.98	6.76	6.33
4	6.39	6.43	6.18	6.31	6.24	6.31
5	6.53	6.83	6.77	6.51	6.59	6.14
6	6.46	6.30	6.21	6.34	6.29	6.26
Ort. kons.	6.43	6.48	6.45	6.54	6.49	6.32
SS	0.15	0.22	0.25	0.26	0.23	0.11
%BSS	2.36	3.46	3.92	4.00	3.52	1.77

4.1.1.4.2. Günlük Arası Kesinlik (Orta Kesinlik)

6.25, 12.5 ve 25 µg/ml konsantrasyonda ardışık üç ölçümle üç gün gerçekleştirilen günlük arası kesinlik çalışmasından elde edilen sonuçlar ve istatistiksel hesaplamalar Tablo 16 - 21'de sunulmuştur.

Tablo 16: Sülfoksit safsızlığının günler arası kesinlik çalışması sonuçları

Kons. (µg/ml)	Günler	Kons. (µg/ml) (n=3)	Ort. Kons. (µg/ml)	Ort. Kons. (µg/ml)	SS	% BSS
6.25	1. gün	6.19 / 6.42 / 6.15	6.25	6.38	0.14	2.23
	2. gün	6.51 / 6.48 / 6.62	6.54			
	3. gün	6.33 / 6.29 / 6.47	6.36			
12.50	1. gün	12.51 / 13.01 / 12.89	12.80	12.86	0.10	0.74
	2. gün	12.72 / 13.03 / 12.70	12.81			
	3. gün	12.92 / 12.89 / 13.10	12.97			
25.00	1. gün	25.88 / 25.05 / 25.73	25.55	25.70	0.37	1.45
	2. gün	25.55 / 24.76 / 25.95	25.42			
	3. gün	25.88 / 25.91 / 26.56	26.12			

Tablo 17: Michael katımları I ve II safsızlıklarının günler arası kesinlik çalışması sonuçları

Kons. (µg/ml)	Günler	Kons. (µg/ml) (n=3)	Ort. Kons. (µg/ml)	Ort. Kons. (µg/ml)	SS	% BSS
6.25	1. gün	6.25 / 6.28 / 6.13	6.22	6.25	0.03	0.54
	2. gün	6.42 / 6.29 / 6.15	6.28			
	3. gün	6.09 / 6.37 / 6.26	6.24			
12.50	1. gün	12.89 / 12.50 / 12.71	12.70	12.66	0.05	0.37
	2. gün	12.80 / 12.31 / 12.71	12.61			
	3. gün	12.71 / 12.26 / 13.07	12.68			
25.00	1. gün	29.48 / 26.51 / 29.80	28.59	27.60	0.86	3.10
	2. gün	25.37 / 29.65 / 26.35	27.12			
	3. gün	25.76 / 28.46 / 27.09	27.10			

Tablo 18: Cis izomer safsızlığının günler arası kesinlik çalışması sonuçları

Kons. (µg/ml)	Günler	Kons. (µg/ml) (n=3)	Ort. Kons. (µg/ml)	Ort. Kons. (µg/ml)	SS	% BSS
6.25	1. gün	6.49 / 6.29 / 6.42	6.40	6.43	0.05	0.78
	2. gün	6.40 / 6.53 / 6.54	6.49			
	3. gün	6.36 / 6.46 / 6.39	6.41			
12.50	1. gün	13.01 / 12.71 / 12.42	12.71	12.80	0.13	1.00
	2. gün	13.01 / 12.98 / 12.85	12.95			
	3. gün	12.68 / 12.53 / 13.03	12.75			
25.00	1. gün	24.45 / 26.30 / 24.88	25.21	25.13	0.18	0.72
	2. gün	25.15 / 25.21 / 25.38	25.25			
	3. gün	24.57 / 25.93 / 24.27	24.92			

Tablo 19: Metilketon safsızlığının günler arası kesinlik çalışması sonuçları

Kons. (µg/ml)	Günler	Kons. (µg/ml) (n=3)	Ort. Kons. (µg/ml)	Ort. Kons. (µg/ml)	SS	% BSS
6.25	1. gün	6.37 / 6.36 / 6.34	6.35	6.38	0.04	0.55
	2. gün	6.44 / 6.52 / 6.12	6.36			
	3. gün	6.49 / 6.39 / 6.38	6.42			
12.50	1. gün	12.62 / 12.86 / 12.83	12.77	12.79	0.22	1.69
	2. gün	12.35 / 12.96 / 12.43	12.58			
	3. gün	13.16 / 13.03 / 12.86	13.01			
25.00	1. gün	26.51 / 25.52 / 23.72	25.25	25.93	0.65	2.50
	2. gün	25.32 / 26.13 / 26.52	25.99			
	3. gün	24.65 / 27.76 / 27.22	26.54			

Tablo 20: Metilstiren safsızlığının günler arası kesinlik çalışması sonuçları

Kons. (µg/ml)	Günler	Kons. (µg/ml) (n=3)	Ort. Kons. (µg/ml)	Ort. Kons. (µg/ml)	SS	% BSS
6.25	1. gün	6.42 / 6.35 / 6.23	6.33	6.40	0.11	1.72
	2. gün	6.35 / 6.34 / 6.34	6.34			
	3. gün	6.54 / 6.59 / 6.46	6.53			
12.50	1. gün	12.66 / 12.68 / 12.94	12.76	12.56	0.29	2.31
	2. gün	12.62 / 12.25 / 11.81	12.23			
	3. gün	12.79 / 12.58 / 12.73	12.70			
25.00	1. gün	25.54 / 26.54 / 24.05	25.38	26.17	0.89	3.41
	2. gün	27.35 / 27.12 / 26.95	27.14			
	3. gün	25.97 / 25.55 / 26.45	25.99			

Tablo 21: Montelukast etkin maddesinin günler arası kesinlik çalışması sonuçları

Kons. (µg/ml)	Günler	Kons. (µg/ml) (n=3)	Ort. Kons. (µg/ml)	Ort. Kons. (µg/ml)	SS	% BSS
6.25	1. gün	6.20 / 6.73 / 6.37	6.43	6.34	0.09	1.40
	2. gün	6.18 / 6.27 / 6.32	6.26			
	3. gün	6.29 / 6.56 / 6.18	6.34			
12.50	1. gün	12.57 / 12.69 / 12.64	12.63	12.63	0.03	0.20
	2. gün	12.36 / 12.64 / 12.95	12.65			
	3. gün	12.57 / 12.70 / 12.54	12.60			
25.00	1. gün	25.64 / 24.49 / 27.01	25.71	25.68	0.10	0.40
	2. gün	26.38 / 26.53 / 24.41	25.77			
	3. gün	24.50 / 25.75 / 26.46	25.57			

4.1.1.5. Teşhis ve Miktar Tayini Alt Sınırı (LOD, LOQ)

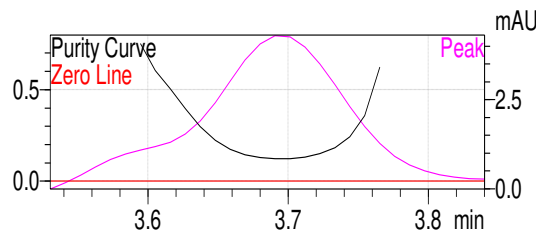
Doğrusallık çalışmalarından elde edilen kalibrasyon eğrilerinin eğimleri ve kullanılan en küçük konsantrasyonun standart sapmaları kullanılarak hesap edilen teşhis sınırı ve miktar tayini alt sınırı değerleri aşağıdaki Tablo 22’de verilmiştir.

Tablo 22: Montelukast safsızlıklarının ve montelukastın teşhis sınırı ve miktar tayini alt sınırı sonuçları

Kimyasal Madde	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
Sülfoksit safsızlığı	0.041	0.125
Michael katımları I ve II safsızlıkları	0.075	0.228
Cis izomer safsızlığı	0.058	0.175
Metilketon safsızlığı	0.086	0.260
Metilstiren safsızlığı	0.068	0.207
Montelukast etkin maddesi	0.030	0.090

4.1.2. Örnek Kromatogramlarında Pik Safliklarının Kontrolü

İlaç ürünlerinde safsızlıkların analizlerinin gerçekleştirilmesi sırasında ürün matrisinin pik saflığı üzerine oluşturabileceği etkiler HPLC cihazının yazılımı kullanılarak kontrol edilmiştir (Şekil 23).



Pik saflık indeksi: 0.999999, Safsızlık: saptanmadı

Şekil 23: İlaç ürününde sülfoksit safsızlığına ait pikin saflık kontrolü örneği (G çığ. tab. 4 mg)

4.1.3. Montelukast Etkin Maddesini İçeren Müstahzarlarda HPLC ile Safsızlık Miktar Tayini

Piyasadan temin edilerek analizleri yapılan montelukast etkin maddesi içeren ilaç ürünlerine ait safsızlık miktarları Tablo 23 ve 24'te sunulmuştur. 4 mg montelukast etkin maddesi içeren 8 firmaya ait 8 çiğneme tableti ve 1 granül formdaki ürünler için farklı parti numarasına sahip ikişer örnek temin edilmiştir. Bununla birlikte, F kodlu çiğneme tabletinin bir numunesi, analiz gerçekleştirilinceye kadar son kullanma tarihinin geçmesi nedeniyle çalışmaya alınmamıştır. Piyasadan analiz edilen F numunesinden farklı parti numarasına sahip numune aranmasına karşın, ilgili firmanın bu ilacın üretimini belirli bir dönem aksatmasından dolayı yeni numune elde edilememiştir. Bu nedenden dolayı F çiğneme tabletinde tek seri çalışma gerçekleştirilmiştir. Ayrıca çalışmada numune çözeltisi içinde yapılan ölçümlerde cis izomer safsızlığının miktarının enjeksiyonlar sırasında hızla artması nedeniyle sadece ilk ölçüm sonuçları hesaba katılmıştır.

ICH Q3B(R2)'de ilaç ürünlerinde safsızlıkların belirtilen sınır değerlere göre ele alınması gerektiği üzerinde durulmaktadır. Buna göre, çocuklarda kullanılan 4 mg montelukast etkin maddesi içeren ilaç ürünlerinde, safsızlıkların %0.1 (4 µg)'ı aşan miktarlarda bulunması durumunda raporlanması, %0.5 (20 µg)'ı aşan miktarlarında bu safsızlıkların tanımlanması ve %1 (40 µg)'ı aşan miktarlarında ise toksisitelerinin belirlenmesi gerekmektedir. Yetişkinler için kullanılan 10 mg montelukast etkin maddesi içeren ilaç ürünlerinde ise, safsızlıkların %0.1 (10 µg)'ı aşan miktarlarında raporlanması, %0.5 (50 µg)'ı aşan miktarlarında bu safsızlıkların tanımlanması ve %0.5 (50 µg)'ı aşan miktarlarında ise toksisitelerinin belirlenmesi gerekmektedir.

Çalışmada montelukast etkin maddesini içeren çocuk ilaçlarında analizi yapılan sülfoksit, Michael katımları I ve II, cis izomer, metilketon ve metilstiren safsızlıklarının miktarlarına bakıldığında, sülfoksit dışında diğer safsızlıklar toksikolojik testleri gerektirecek sınır değeri (%1) aşmamaktadır. Sülfoksit safsızlığı miktarı ise, iki farklı firmaya ait G ve J çiğneme tabletlerinde, analizlerinin yapıldığı her iki seride de kalifikasyon sınırının üzerinde çıkmıştır.

Tablo 24'te sunulan yetişkin ilaçlarındaki safsızlık miktarı sonuçları, on bir firmanın yetişkin ilaçlarının, sülfoksit dışındaki diğer safsızlıkları toksikolojik testleri gerektirecek sınır değerin (%0.5) altında içerdiğini göstermiştir. Sülfoksit safsızlığının ise, beş firmanın ürünlerinin (D, F, H, I, J tab.) her iki serisinde, iki firmanın ürünlerinin (A ve G tab.) ise bir serisinde sınır değerlerin üzerinde olduğu saptanmıştır.

Çalışılan iki serinin ortalamaları alınarak elde edilen safsızlık miktarları, raporlama ve tanımlama sınırları açısından da değerlendirilmiş (Grafik 7 ve 8), çocuk ilaçlarında H çiğneme tableti dışında diğer ürünlerde Michael katımları I ve II'nin raporlama sınırının altında olduğu gözlenmiştir. Diğer tüm safsızlıklar (%82) raporlama eşik değerini aşmıştır. Çocuk ilaçlarında dokuz ilaç ürünü için, araştırılan safsızlıkların yaklaşık yarısı (%49) tanımlama sınır değerinin üzerinde bulunmuştur. Yukarıda daha önce de konu edildiği gibi, analiz edilen safsızlıklarda sadece %4.4'ü (n=2) kalifikasyon testleri gerektirecek düzeyde ilaç ürününde bulunmaktadır.

Yetişkinlerde kullanılan 10 mg'lık tabletlerde ise, Michael katımları I ve II çoğunlukla yöntemde teşhis sınırının altında bulunmuş, hiçbir üründe raporlama sınırının üzerine çıkmamıştır. Araştırılan tüm safsızlıklara bakıldığında, safsızlıkların %80'i raporlama sınırını geçen

miktarlarda ürünlerde bulunurken, %11'i (n=6) tanımlama ve kalifikasyon eşik değerini aşmıştır. Bununla birlikte sonuçlarda, metilstiren ve metilketon safsızlıklarının kalifikasyon sınır değere yakın miktarlarda bulunduğu da dikkat çekmiştir.

Elde edilen miktar tayini sonuçlarında, ilgili rehberlerde düzenlenen limit seviyelerin üzerindeki sülfoksit safsızlığının sınıflandırmasının yapılabilmesi için toksikolojik açıdan değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Tablo 23: Montelukast etkin maddesini içeren çocuk ilaçlarında safsızlıkların miktarları (µg) (ort ± SS; n=3)

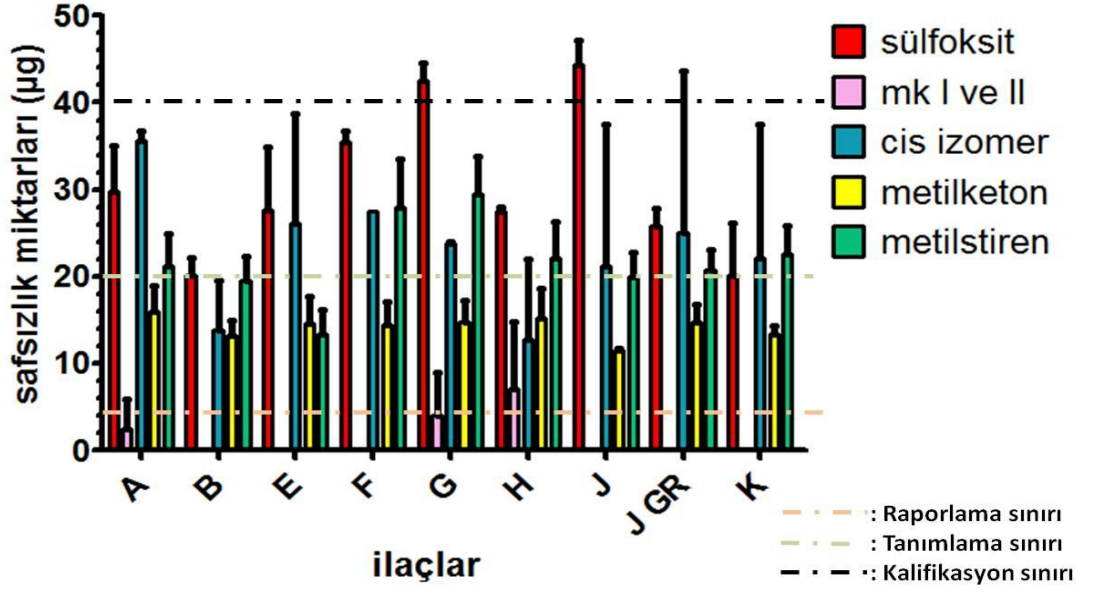
İlaç (4 mg)	Sülfoksit (µg)	Michael Katımları I ve II (µg)	Cis izomer (µg)	Metilketon (µg)	Metilstiren (µg)
A Çiğ. Tab.	34.53±1.07	5.06±2.86	36.43	14.82±3.62	23.74±2.66
	24.94±0.78	<LOD	34.82	17.17±1.70	18.76±2.44
B Çiğ. Tab.	18.33±0.69	<LOD	17.91	14.74±0.80	18.20±2.62
	21.83±1.12	<LOD	9.86	11.66±0.07	20.67±3.08
E Çiğ. Tab.	20.46±1.32	<LOD	13.56	11.67±0.18	11.55±2.58
	34.84±0.72	<LOD	38.64	17.59±1.21	15.24±2.49
F Çiğ. Tab.	35.52±1.15	<LOD	27.42	14.44±2.54	27.96±5.48
G Çiğ. Tab.	43.10±2.65*	<LOD	23.89	16.69±1.70	30.82±4.53
	42.06±1.03*	8.07±3.15	23.65	12.73±1.25	28.02±4.41
H Çiğ. Tab.	27.36±0.09	<LOD	6.23	12.14±0.42	24.14±3.11
	27.73±0.44	14.02±2.00	19.26	18.23±0.51	20.17±4.43
J Çiğ. Tab.	43.39±0.27*	<LOD	32.70	11.61±0.16	18.78±1.60
	45.43±3.84*	<LOD	9.78	11.47±0.15	21.03±3.79
J Granül	26.71±2.45	<LOD	12.06	16.01±1.41	19.51±3.09
	24.93±1.19	<LOD	38.12	13.52±1.58	21.82±0.62
K Çiğ. Tab.	25.62±0.57	<LOD	11.28	13.32±1.47	24.70±3.22
	14.74±0.87	<LOD	33.0	13.35±0.60	20.31±1.25

*toksikolojik testleri gerektiren eşik sınırı aşan değerler

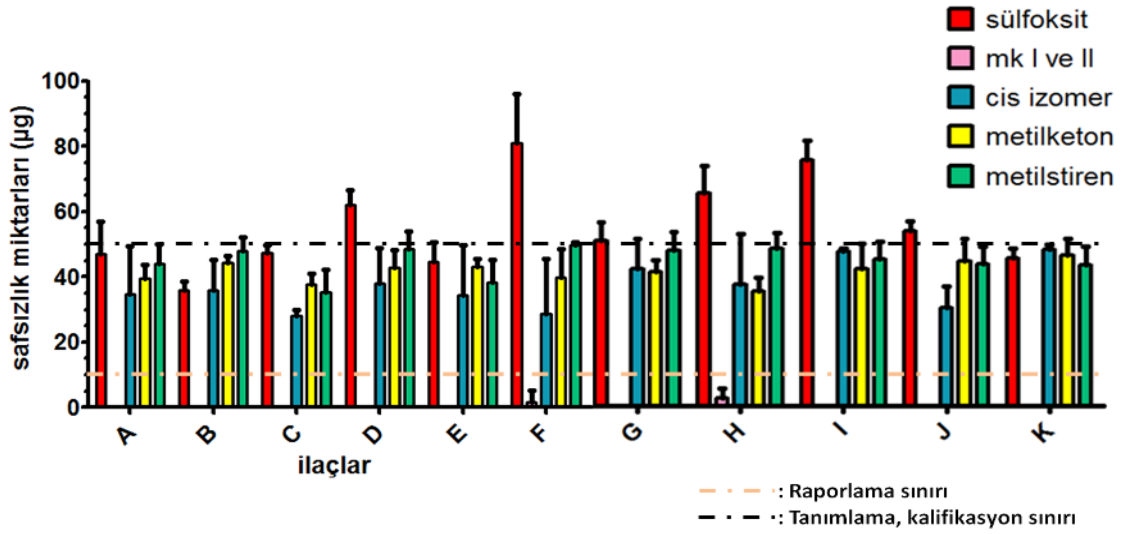
Tablo 24: Montelukast etkin maddesini içeren yetişkin ilaçlarında safsızlıkların miktarları (µg) (ort ± SS; n=3)

İlaç (4 mg)	Sülfoksit (µg)	Michael Katımları I ve II (µg)	Cis izomer (µg)	Metilketon (µg)	Metilstiren (µg)
A Tab.	54.85±3.89*	<LOD	24.36	36.26±2.53	39.35±1.85
	39.13±6.38	<LOD	45.19	42.69±2.77	47.29±5.64
B Tab.	37.94±0.26	<LOD	42.50	43.13±1.07	49.86±0.94
	33.53±2.77	<LOD	29.13	45.34±2.47	46.38±5.48
C Tab.	48.86±2.45	<LOD	26.98	34.89±1.62	40.59±3.45
	45.70±1.10	<LOD	29.45	40.61±1.20	30.26±5.29
D Tab.	59.88±5.34*	<LOD	45.70	38.81±4.29	48.87±8.49
	64.48±0.83*	<LOD	30.23	46.93±0.48	48.44±3.25
E Tab.	49.86±1.91	<LOD	45.20	42.19±2.35	45.31±4.07
	39.48±2.56	<LOD	23.65	43.99±2.74	33.72±1.28
F Tab.	99.01±4.20*	<LOD	40.62	32.49±1.58	49.20±0.24
	63.05±9.46*	<LOQ	16.84	47.37±3.50	49.96±1.26
G Tab.	53.02±6.71*	<LOD	49.03	38.66±2.87	49.26±1.94
	49.18 ±5.42	<LOD	35.72	44.23±1.88	47.21±7.78
H Tab.	73.03±3.35*	<LOD	26.67	35.71±6.10	48.84±7.50
	58.41±2.77*	5.03±1.38	48.74	35.51±1.69	48.64±1.84
I Tab.	78.85±2.46*	<LOD	48.41	48.64±5.68	49.94±1.55
	73.49±7.88*	<LOD	47.39	36.28±1.23	40.99±0.07
J Tab.	55.99±3.03*	<LOD	35.11	40.29±4.14	42.85±3.17
	52.17±2.27*	<LOD	25.50	49.60±5.79	45.36±9.75
K Tab.	45.43±2.45	<LOD	47.32	50.59±1.11	45.93±5.39
	45.96±3.99	<LOD	49.60	42.76±3.67	42.05±6.51

*toksikolojik testleri gerektiren eşik sınırı aşan değerler



Grafik 7: 4 mg montelukast içeren ilaç ürünlerinde safsızlık miktarlarının rehberdeki sınır değerlere göre durumu



Grafik 8: 10 mg montelukast içeren ilaç ürünlerinde safsızlık miktarlarının rehberdeki sınır değerlere göre durumu

4.2. Safsızlıkta Yapı-Aktivite İlişkisi (QSAR) Sonuçları

Leadscope QSAR yazılımında “Gen Mutasyonu-Mikrobiyal İn Vitro Modeller - Salmonella Mut and E Coli – Sal 102 A-T Mut” modellemesi ile E.coli – Sal 102 A-T mut analizinde tahmin sonucu alınamamış fakat Salmonella Mut analizinde mutajenite tahmini negatif (0.131) sonuç vermiştir.

4.3. Sülfoksit Safsızlığında Bakteride Geri Mutasyon Testi ile Mutajenitenin Değerlendirilmesi

Sülfoksit safsızlığının mutajenik etkisini belirlemek amacıyla S.typhimurium TA98, TA100, TA1535, TA1537 ve E.coli wp2 [pKM101] + wp2 uvrA suşlarında bakteride geri mutasyon testi uygulanmıştır. Mutajenite testi öncesinde safsızlığın bakteride toksik etki oluşturup oluşturmadığını belirleyici ve elde edilen sonuçlarla mutajenite deneyinin doz aralığı için yol gösterici olan sitotoksosite çalışması yapılmıştır. TA98 suşu ile yapılan toksisite çalışmasında, 5000 µg/ml konsantrasyona kadar çalışılan dozlarda sitotoksik etki gözlenmemiştir. Bu durumdan hareketle mutajenite deneyinde, sülfoksit safsızlığı için altı farklı dozla 5000 µg/ml’ye kadar değerlendirme yapılmıştır.

Çalışmada test maddesinin mutajenik olduğu yargısı, açıkca doz-yanıt etkisi görülen ve/veya geri dönen koloni içeren kuyucuk sayısında referans değerini iki ve daha fazla kat artışına neden olan dozlar için verilmektedir. Grupların kontrole göre geri dönen koloni içeren kuyucuk sayılarının t test (eşleştirilmemiş, tek yönlü) ile karşılaştırılması ile oluşan değişimlerin anlamlılık düzeyi de sonuçların yorumlanmasında yardımcı olmaktadır. Ames testinde her suşun kontrol ve pozitif kontrollerindeki geri dönen koloni içeren kuyucuk sayıları, protokolün

gerektiği değerleri sağlamış, deney sisteminin güvenilir sonuçlar verdiği sonucuna ulaşılmıştır.

TA98 suşunda metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğunda 5000 g/ml konsantrasyona kadar geri dönen koloni içeren kuyucuk sayısı ortalamalarında kontrole göre anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Tablo: 25 ve 26). Elde edilen bulgular sonucunda sülfoksit safsızlığının metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğunda TA98 suşunda ereve kayması mutasyonuna neden olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Tablo 25: Sülfoksit safsızlığının metabolik aktivasyon yokluğunda *S. typhimurium* TA98 suşunda geri dönen koloni sonuçları

Doz (g/ml)	geri dönen koloni içeren kuyucuk sayısı					Referans değer	Artış katı p değeri	
	Plak #1	Plak #2	Plak #3	ort.	SS			
0	5	3	4	4.00	1.00	5.00		
15,8	4	1	4	3.00	1.73		0.60	0.218
50	4	2	4	3.33	1.15		0.67	0.246
158	8	6	1	5.00	3.61		1.00	0.334
500	5	3	3	3.67	1.15		0.73	0.362
1581	2	5	4	3.67	1.53		0.73	0.384
5000	3	3	2	2.67	0.58		0.53	0.060
2-NF: 2	26	26	25	25.67	0.58			

2-NF: 2-nitrofloren

Tablo 26: Sülfoksit safsızlığının metabolik aktivasyon varlığında *S. typhimurium* TA98 suşunda geri dönen koloni sonuçları

Doz (µg/ml)	geri dönen koloni içeren kuyucuk sayısı					Referans değer	Artış katı	p değeri
	Plak #1	Plak #2	Plak #3	ort.	SS			
0	3	4	3	3.33	0.58	3.91	0.85	0.500
15,8	3	3	4	3.33	0.58			
50	2	0	4	2.00	2.00			
158	2	6	1	3.00	2.65			
500	4	6	2	4.00	2.00			
1581	2	2	4	2.67	1.15			
5000	2	4	1	2.33	1.53			
2-AA: 1	44	48	46	46.00	2.00			

2-AA: 2-aminoantrasen

Sülfoksit safsızlığının TA100 suşunda metabolik aktivasyon yokluğunda toksik olmayan 15.8 ve 50 µg/ml dozlarda mutajenik etkili olmadığı gözlenmiştir. Diğer dozlarda kontrole göre koloni sayılarındaki istatistiksel olarak anlamlı düzeydeki düşüş, sülfoksit safsızlığının metabolik aktivasyon yokluğunda TA100 suşunda sitotoksik etkileri olabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte, 158 ve 500 µg/ml dozlarda az sayıda olmasına rağmen canlı bakterilerin bulunduğu ve özellikle 500 µg/ml dozda p değerinin anlamlılık sınırına çok yakın olduğu gözlenmiştir (Tablo: 27). Metabolik aktivasyon varlığında ise, sülfoksit safsızlığının 5000 µg/ml dozda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde sitotoksik etkili olabileceği bulunurken, 1581 µg/ml dozda kontrole göre bakteri içeren kuyucuk sayısındaki düşüşün anlamlı olmadığı gözlenmiştir. Toksisitenin açıkça gözlenmediği dört konsantrasyon (15.8-500 µg/ml) değerlendirildiğinde, sülfoksit safsızlığı ile muamele edilmiş TA100 suşunun metabolik aktivasyon varlığında baz çifti değişimi mutasyonuna neden olmadığı belirlenmiştir (Tablo: 28).

Tablo 27: Sülfoksit safsızlığının metabolik aktivasyon yokluğunda *S. typhimurium* TA100 suşunda geri dönen koloni sonuçları

geri dönen koloni içeren kuyucuk sayısı						Referans değer	Artış katı	p değeri
Doz (µg/ml)	Plak #1	Plak #2	Plak #3	ort.	SS			
0	6	7	3	5.33	2.08	7.41	0.81	0.405
15,8	6	2	10	6.00	4.00			
50	6	2	5	4.33	2.08			
158	3	1	1	1.67	1.15			
500	0	4	0	1.33	2.31			
1581	1	0	1	0.67	0.58			
5000	0	0	0	0.00	0.00			
4-NQO: 0.1	47	48	48	47.67	0.58			

4-NQO: 4- nitrokinolin-N-oksit

Tablo 28: Sülfoksit safsızlığının metabolik aktivasyon varlığında *S. typhimurium* TA100 suşunda geri dönen koloni sonuçları

geri dönen koloni içeren kuyucuk sayısı						Referans değer	Artış katı	p değeri
Doz (µg/ml)	Plak #1	Plak #2	Plak #3	ort.	SS			
0	9	4	3	5.33	3.21	8.55	0.55	0.410
15,8	5	8	1	4.67	3.51			
50	9	5	7	7.00	2.00			
158	2	8	3	4.33	3.21			
500	2	9	4	5.00	3.61			
1581	0	5	1	2.00	2.65			
5000	0	0	1	0.33	0.58			
2-AA: 2.5	48	48	48	48.00	0.00			

2-AA: 2-aminoantrasen

TA1535 suşunda metabolik aktivasyon yokluğunda 5000 µg/ml konsantrasyona kadar geri dönen koloni içeren kuyucuk sayısı ortalamalarında kontrole göre anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Metabolik aktivasyon varlığında elde edilen kuyucuk sayıları karşılaştırıldığında, her ne kadar 1581 ve 5000 µg/ml dozlarda sayılarda

düşüş gözlenmiş olsa da, değerlendirilen altı doz için kontrole göre anlamlı bir değişim göstermediği ortaya çıkmıştır (Tablo: 29 ve 30). Elde edilen bu bulgular, sülfoksit safsızlığının metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğunda TA1535 suşunda baz çifti değişimi mutasyonuna neden olmadığı sonucuna ulaşılmasına neden olmuştur.

Tablo 29: Sülfoksit safsızlığının metabolik aktivasyon yokluğunda *S. typhimurium* TA1535 suşunda geri dönen koloni sonuçları

Doz (µg/ml)	geri dönen koloni içeren kuyucuk sayısı					Referans değer	Artış katı	p değeri
	Plak #1	Plak #2	Plak #3	ort.	SS			
0	3	2	2	2.33	0.58	2.91	0.46	0.051
15,8	1	2	1	1.33	0.58			
50	6	1	2	3.00	2.65			
158	4	2	2	2.67	1.15			
500	2	1	0	1.00	1.00			
1581	1	0	3	1.33	1.53			
5000	0	2	2	1.33	1.15			
N ⁴ -ACT: 100	48	48	48	48.00	0.00			

N⁴-ACT: N⁴-aminositidin

Tablo 30: Sülfoksit safsızlığının metabolik aktivasyon varlığında *S. typhimurium* TA1535 suşunda geri dönen koloni sonuçları

Doz (µg/ml)	geri dönen koloni içeren kuyucuk sayısı					Referans değer	Artış katı	p değeri
	Plak #1	Plak #2	Plak #3	ort.	SS			
0	2	5	2	3.00	1.73	4.73	0.77	0.355
15,8	5	5	1	3.67	2.31			
50	2	2	2	2.00	0.00			
158	4	1	3	2.67	1.53			
500	1	3	2	2.00	1.00			
1581	1	1	1	1.00	0.00			
5000	3	0	0	1.00	1.73			
2-AA: 5	25	34	30	29.67	4.51			

2-AA: 2-aminoantrasen

TA1537 suşunda metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğunda 1581 ve 5000 µg/ml konsantrasyonlarda bakteri üzerinde sitotoksik etkinin olduğu gözlenmiştir. Toksisitenin gözlenmediği 500 µg/ml konsantrasyona kadar mutajenik etkinin belirtisi olan kontrole göre geri dönen koloni sayılarındaki artış gözlenmemiş, sülfoksit safsızlığının metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğunda TA1537 suşunda çerçeve kayması mutasyonuna neden olmadığı bulunmuştur (Tablo: 31, 32).

Tablo 31: Sülfoksit safsızlığının metabolik aktivasyon yokluğunda *S. typhimurium* TA1537 suşunda geri dönen koloni sonuçları

Doz (µg/ml)	geri dönen koloni içeren kuyucuk sayısı					Referans değer	Artış katı	p değeri
	Plak #1	Plak #2	Plak #3	ort.	SS			
0	2	4	1	2.33	1.53	3.86		
15,8	1	3	3	2.33	1.15		0.60	0.500
50	2	1	2	1.67	0.58		0.43	0.259
158	1	0	1	0.67	0.58		0.17	0.076
500	2	0	0	0.67	1.15		0.17	0.103
1581	0	0	0	0.00	0.00		0.00	0.029*
5000	0	0	0	0.00	0.00		0.00	0.029*
9-AA: 15	48	48	48	48.00	0.00			

9-AA: 9-aminoakridin

Tablo 32: Sülfoksit safsızlığının metabolik aktivasyon varlığında *S. typhimurium* TA1537 suşunda geri dönen koloni sonuçları

Doz (µg/ml)	geri dönen koloni içeren kuyucuk sayısı					Referans değer	Artış katı	p değeri
	Plak #1	Plak #2	Plak #3	ort.	SS			
0	2	1	2	1.67	0.58	2.24		
15,8	2	4	3	3.00	1.00		1.34	0.058
50	2	0	2	1.33	1.15		0.59	0.339
158	0	4	2	2.00	2.00		0.89	0.398
500	2	3	0	1.67	1.53		0.74	0.500
1581	1	0	0	0.33	0.58		0.15	0.024*
5000	1	0	0	0.33	0.58		0.15	0.024*
2-AA: 5	42	43	47	44.00	2.65			

2-AA: 2-aminoantrasen

Sülfoksit safsızlığının E.coli wp2 [pKM101] ve wp2 uvrA suşlarının karışımını oluşturan E.coli combo ile metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğunda 5000 µg/ml konsantrasyona kadar mutajenik aktivitesinin değerlendirilmesi sonucunda, metabolik aktivasyon yokluğunda geri dönen koloni içeren kuyucuk sayısı ortalamalarında kontrole göre anlamlı bir değişim elde edilmemiştir (Tablo: 33). Bunun yanı sıra metabolik aktivasyon varlığında da, 158 µg/ml konsantrasyonda geri dönen koloni içeren kuyucuk sayısı ortalamasında kontrole göre 1.44 kat artış istatistiki anlamlılık düzeyinde görülmesine karşın mutajenik etkiye ulaşılamamıştır (Tablo: 34). Elde edilen bu bulgular göz önünde bulundurularak, sülfoksit safsızlığının metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğunda E.coli combo suşlarında A:T hedeflerinde baz çifti değişimi mutasyonuna neden olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Tablo 33: Sülfoksit safsızlığının metabolik aktivasyon yokluğunda E.coli combo suşlarında geri dönen koloni sonuçları

Doz (µg/ml)	geri dönen koloni içeren kuyucuk sayısı					Referans değer	Artış katı	p değeri
	Plak #1	Plak #2	Plak #3	ort.	SS			
0	3	4	7	4.67	2.08	6.75	0.54	0.312
15.8	4	1	6	3.67	2.52			
50	2	2	3	2.33	0.58			
158	1	5	6	4.00	2.65			
500	2	4	1	2.33	1.53			
1581	6	0	1	2.33	3.21			
5000	4	3	7	4.67	2.08			
4-NQO: 2	42	40	42	41.33	1.15			

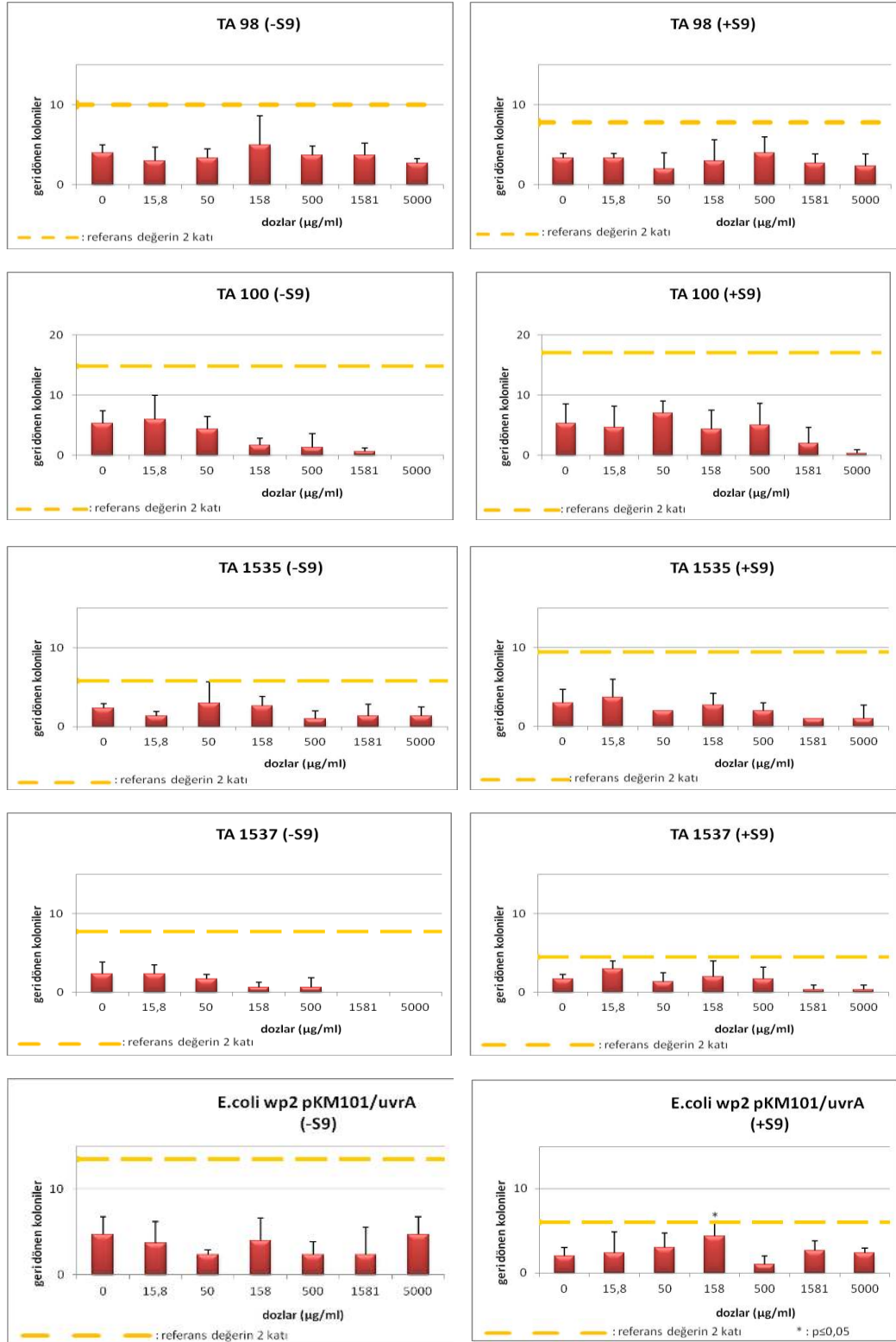
4-NQO: 4- nitrokinolin-N-oksit

Tablo 34: Sülfoksit safsızlığının metabolik aktivasyon varlığında E.coli combo suşlarında geri dönen koloni sonuçları

Doz (µg/ml)	geri dönen koloni içeren kuyucuk sayısı					Referans değer	Artış katı	p değeri
	Plak #1	Plak #2	Plak #3	ort.	SS			
0	1	2	3	2.00	1.00	3.00		
15.8	5	2	0	2.33	2.52		0.78	0.421
50	1	4	4	3.00	1.73		1.00	0.217
158	3	6	4	4.33	1.53		1.44	0.046*
500	0	2	1	1.00	1.00		0.33	0.144
1581	2	2	4	2.67	1.15		0.89	0.246
5000	2	2	3	2.33	0.58		0.78	0.322
2-AA: 50	15	19	21	18.33	3.06			

2-AA: 2-aminoantrasen

Sülfoksit safsızlığı için Ames testinde değerlendirilen tüm suşlar ve metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğundaki şartlar göz önünde tutulduğunda, sülfoksit safsızlığının mutajenik etkisinin bulunmadığı sonucuna ulaşılmıştır.



Grafik 9: Sülfoksit safsızlığının metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğunda *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 ve *E.coli* combo suşlarında mutajenite değerlendirme sonuçları

4.4. Sülfoksit Safsızlığının Mitotik İndeks İle Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi ve İn Vitro Kromozomal Aberasyon Testi İle Genotoksik Etkilerinin Değerlendirmesi

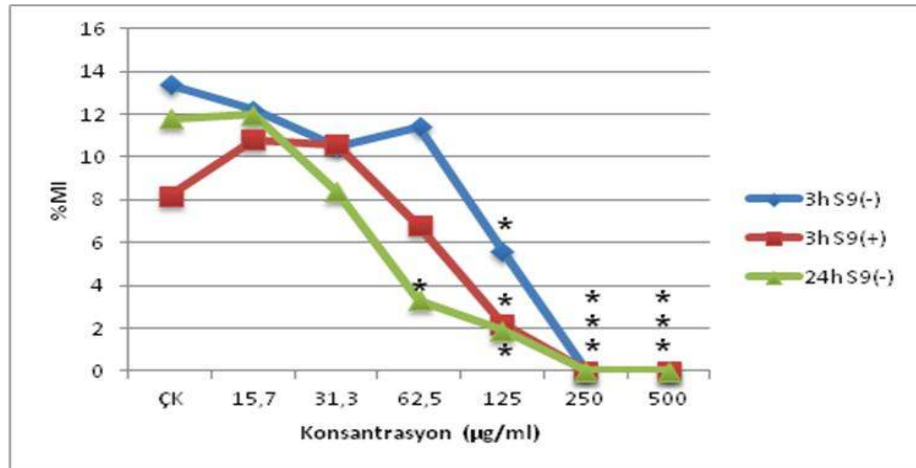
4.4.1. Sülfoksit Safsızlığının Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda yapılan uygulamalardan elde edilen %MI sonuçlarında, kontrole göre mitotik indekste %50 azalmaya neden olan dozların sitotoksik etki gösterdiği kabul edilmiştir. Çalışmada tam kan kültürünün sülfoksit safsızlığına 24 saat maruz bırakılması ile $62.5 \leq \mu\text{g/ml}$ dozlarda sitotoksik etkinin olduğu gözlenmiştir. Üç saatlik maruziyetlerde ise, hem metabolik aktivasyon yokluğunda hem de varlığında $125 \leq \mu\text{g/ml}$ doz uygulamalarında sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo: 35). İstatistiksel değerlendirmeler sonucu, S9 yokluğunda 3 saat, S9 varlığında 3 saat ve 24 saat maruziyet gruplarında, %MI'teki düşüş ile konsantrasyonlar arasında ilişki olduğu saptanmıştır (sırasıyla $r=-0.893$, $r=-0.826$, $r=-0.762$, $p<0.05$). Bu verilerden yola çıkarak kromozomal aberasyon testinin 24 saatlik uygulamalarda 40, 30 ve 20 $\mu\text{g/ml}$ dozlarda, 3 saatlik uygulamalarda ise 62.5, 31.3 ve 15.7 $\mu\text{g/ml}$ dozlarda gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

Tablo 35: Sülfoksit safsızlığına 3 saat ve 24 saatlik maruziyetlerde hücrelerde %mitotik indeks düzeyleri

Dozlar (µg/ml)	Süre (saat)	S9	%MI	Süre (saat)	S9	%MI	Süre (saat)	S9	%MI
Kontrol	3	(-)	16	3	(+)	11.5	24	(-)	13.2
Çözücü kontrol	3	(-)	13.4	3	(+)	8.2	24	(-)	11.8
15.7	3	(-)	12.2	3	(+)	10.8	24	(-)	12
31.3	3	(-)	10.5	3	(+)	10.6	24	(-)	8.4
62.5	3	(-)	11.4	3	(+)	6.8	24	(-)	3.3
125	3	(-)	5.6	3	(+)	2.2	24	(-)	1.9
250	3	(-)	0	3	(+)	Ø	24	(-)	0
500	3	(-)	Ø	3	(+)	Ø	24	(-)	Ø
Pozitif kontrol	3	(-)	8.9	3	(+)	7.8	24	(-)	7.5

Ø: toksisite nedeniyle hücre bulunmamakta veya çok az sayıda gözlenmektedir.



*: Sitotoksik dozlar (çözücü kontrole göre %mitotik indekste %50 ve üzeri düşüş)

Grafik 10: Sülfoksit safsızlığının hücrelerde mitotik indeks üzerine etkisi

4.4.2. Sülfoksit Safsızlığının Genotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi

Sülfoksit safsızlığının kromozomlar üzerine etkisinin değerlendirilmesi sonucu elde edilen yapısal ve sayısal hasarların yüzde değerleri Tablo 36, 37 ve 38’de gösterilmiştir. Araştırmada kromatid tipi ve kromozom tipi hasarlar gap, kırık ve değişimler olarak alt gruplara ayrılarak kaydedilmiştir. Toplam yapısal hasarlar, kromatid tipi ve kromozom tipi hasarlar, gap tipi hasarlar dahil ve gap tipi hasarlar hariç olmak üzere gruplandırılmıştır. Sunulan çalışmada sülfoksit safsızlığının sayısal hasarlara yol açmadığı gözlenmiştir.

Tablo 36: S9 yokluğunda sülfoksit safsızlığı ile indüklenmiş (3 saat maruziyet) insan lenfositlerinde kromozomal aberasyon yüzdeleri

dozlar (µg/ml)	KROMATİD TİPİ HASAR			KROMOZOM TİPİ HASAR			TOPLAM HASAR		SAYISAL HASAR			%MI
	ctg	ctb	cte	csg	csb	cse	gap-	gap+	PP	ER	Toplam	
NK	4	2	21	1	1	0	24	29	0	0	0	16
ÇK	2.5	5	15.5	7.5	0.5	0	21	31	0	0	0	11.95
15.7	2.5	9	22.5	13	1	0	32.5	48	0	0	0	11.85
31.3	2.5	10	20.5	13	0.5	0	31	46.5	0	0	0	9.75
62.5	3	15.5	17	6	4	0	36.5	45.5	0	0	0	9.2
PK	22.5	58.5	50.5	15.5	45	0	154	192	0.5	0	0.5	8.45

ÇK: Metanol, PK: Mitomisin-C (0.6 µg/ml), n=200, ctg: kromatid gap, ctb: kromatid kırık, cte: kromatid değişimi, csg: kromozom gap, csb: kromozom kırık, cse: kromozom değişimi, pp: poliploidi, er endoreduplikasyon

Tablo 37: S9 varlığında sülfoksit safsızlığı ile indüklenmiş (3 saat maruziyet) insan lenfositlerinde kromozomal aberasyon yüzdeleri

dozlar (µg/ml)	KROMATİD TİPİ HASAR			KROMOZOM TİPİ HASAR			TOPLAM HASAR		SAYISAL HASAR			%MI
	ctg	ctb	cte	csg	csb	cse	gap-	gap+	PP	ER	Toplam	
NK	1	2	19	9	3	0	24	34	0	0	0	11.4
ÇK	5	12.5	23	10.5	1	0	36.5	52	0	0	0	8.25
15.7	1	15.5	21.5	7.5	3	0	40	48.5	0	0	0	9.6
31.3	5.5	17.5	33	9.5	2	0	52.5	67.5	0	0	0	9.3
62.5	7.5	15.5	33.5	13.5	2	0	51	72	0	0	0	7.75
PK	5.5	25	48	16	8	0	81	102.5	0	0	0	8.15

ÇK: Metanol, PK: Siklofosfamid (15 µg/ml), n=200, ctg: kromatid gap, ctb: kromatid kırık, cte: kromatid değişimi, csg: kromozom gap, csb: kromozom kırık, cse: kromozom değişimi, pp: poliploidi, er: endoreduplikasyon

Tablo 38: S9 yokluğunda sülfoksit safsızlığı ile indüklenmiş (24 saat maruziyet) insan lenfositlerinde kromozomal aberasyon yüzdeleri

dozlar (µg/ml)	KROMATİD TİPİ HASAR			KROMOZOM TİPİ HASAR			TOPLAM HASAR		SAYISAL HASAR			%MI
	ctg	ctb	cte	csg	csb	cse	gap-	gap+	PP	ER	Toplam	
NK	1	4	24	2	0	0	28	31	0	0	0	8.3
ÇK	2.5	5.5	24	3.5	1	0	30.5	36.5	0	0	0	6.15
20	2	10	33	2	0.5	0	43.5	47.5	0	0	0	5.9
30	1.5	10	29	4	3	0	42	47.5	0	0	0	4.7
40	2.5	10	20	1,5	0	0	30	34	0	0	0	5.45
PK	25	54	67.5	11.5	20	0.5	142	178.5	0	0	0	5.4

ÇK: Metanol, PK: Mitomisin-C (0.2 µg/ml), n=200, ctg: kromatid gap, ctb: kromatid kırık, cte: kromatid değişimi, csg: kromozom gap, csb: kromozom kırık, cse: kromozom değişimi, pp: poliploidi, er: endoreduplikasyon

Hücre başına kromozomal aberasyon değerlerinin gruplar arasındaki farklılıklarının Kruskal–Wallis testi ve Dunn’s çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirilmesi sonucu, çözücünün kromozomlar üzerinde etkisinin olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Pozitif kontrollerin

Çözücü kontrollere göre karşılaştırılması ile hasarlarda istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$).

Safsızlıkla farklı dozlarda üç saat ve 24 saat muamele edilen hücrelerde, kromatid tipi ve kromozom tipi her bir gap, kırık ve değişim gruplarındaki hasarlar için yapılan istatistiksel analizlerde, çözücü kontrole göre hasarın anlamlı bir değişim göstermediği bulunmuştur ($p>0.05$). Bunun yanı sıra, insan periferel lenfositlerinin sülfoksit safsızlığı ile farklı dozlarda muamele edilmesi sonucu, kromatid tipi, kromozom tipi ve toplam hasarlarda da çözücü kontrole göre hücre başına düşen kromozomal aberasyon sayılarında anlamlı bir artış gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Tablo: 39).

Sülfoksit safsızlığına maruz bırakılmış hücrelerde, tüm çalışma gruplarında kromatid tipi ve kromozom tipi hasarların gap tipi hasarların dahil edildiği sonuçlarında, hücre başına kromozomal aberasyon ortalamaları ile konsantrasyonlar arasında ilişki olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Aynı şekilde, metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda sülfoksit safsızlığına 3 saat maruz bırakılmış hücrelerde, hücre başına gap dahil toplam yapısal kromozomal aberasyon ortalamaları ile çalışılan dozlar arasında korelasyon olmadığı bulunmuştur (sırasıyla $r=0.800$, $r=0.200$, $p>0.05$). Metabolik aktivasyon yokluğunda safsızlığa 24 saat maruz bırakılmış hücrelerde de, hücre başına gap hariç toplam yapısal kromozomal aberasyon ortalamaları ile çalışılan dozlar arasında ilişki olmadığı bulunmuştur ($r=-0.3162$, $p>0.05$).

Sülfoksit safsızlığının insan periferel lenfositlerinde in vitro kromozomal aberasyon testi ile değerlendirilmesi sonucu, safsızlığın metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğunda genotoksik etkili olmadığı sonucuna varılmıştır.

Tablo 39: Sülfoksit safsızlığı ile indüklenmiş insan lenfositlerinde hücre başına kromozomal aberasyon ortalamaları (yapısal ka/hücre; ortalama±SH)

	Doz µg/ml	KROMATİD TİPİ		KROMOZOM TİPİ		TOPLAM HASAR	
		gap-	gap+	gap-	gap+	gap-	gap+
3 saat S9(-)	ÇK	0.205±0.033	0.230±0.035	0.005±0.005	0.080±0.022	0.210±0.034	0.310±0.039
	15.7	0.315±0.045	0.340±0.048	0.010±0.007	0.140±0.028	0.325±0.046	0.480±0.058
	31.3	0.305±0.046	0.330±0.050	0.005±0.005	0.135±0.027	0.310±0.046	0.465±0.060
	62.5	0.325±0.046	0.355±0.048	0.040±0.014	0.100±0.022	0.365±0.048	0.455±0.054
	PK ₁	1.090±0.091*	1.315±0.108*	0.450±0.062*	0.605±0.068*	1.540±0.119*	1.920±0.138*
3 saat S9(+)	ÇK	0.355±0.051	0.405±0.055	0.010±0.007	0.115±0.027	0.365±0.052	0.520±0.061
	15.7	0.370±0.047	0.380±0.047	0.030±0.014	0.105±0.024	0.400±0.048	0.485±0.053
	31.3	0.505±0.054	0.560±0.058	0.020±0.010	0.115±0.025	0.525±0.056	0.675±0.063
	62.5	0.490±0.054	0.565±0.057	0.020±0.010	0.155±0.027	0.510±0.054	0.720±0.062
	PK ₂	0.725±0.066*	0.780±0.069*	0.080±0.019*	0.240±0.037*	0.810±0.069*	1.020±0.079*
24 saat S9(-)	ÇK	0.295±0.041	0.320±0.044	0.010±0.007	0.045±0.016	0.305±0.043	0.365±0.048
	20	0.430±0.055	0.450±0.056	0.005±0.005	0.025±0.011	0.435±0.055	0.475±0.057
	30	0.390±0.051	0.405±0.053	0.030±0.012	0.070±0.019	0.420±0.053	0.475±0.057
	40	0.300±0.048	0.325±0.051	0.000±0.000	0.015±0.009	0.300±0.048	0.340±0.052
	PK ₃	1.215±0.106*	1.465±0.123*	0.205±0.040*	0.320±0.051*	1.420±0.119*	1.785±0.143*

ÇK: Metanol, PK₁: Mitomisin-C (0.6 µg/ml), PK₂: Siklofosfamid (15 µg/ml), PK₃: Mitomisin-C (0.2 µg/ml), *: Çözücü kontrole göre anlamlı (p<0.05; Kruskal-Wallis test, Dunn's çoklu karşılaştırma testi)

5. TARTIŞMA

Yeni ilaç geliştirme ve üretim süreçlerinin oldukça pahalı ve zaman alıcı olduğu günümüz koşullarında ilaç güvenliği önemli bir yer tutmaktadır. Beklenen klinik etkiler ile oluşabilecek risklerin dengesi, hem klinik öncesi ve hem de klinik testlerin birincil amacını oluşturmaktadır. İlaça bağlı toksisite, güvenlik sorununun yanı sıra aynı zamanda ilaç geliştirme sırasında bileşiğin elenmesindeki ana nedendir. Hangi molekülün güvenli ve daha az soruna neden olacağını doğru olarak belirlemek hem hastaların korunmasını hem de üretimin verimliliğini artırmaktadır. İnsanlarda ilaç kullanımı nedeni ile oluşabilecek riski en aza indirmek temel istek olmakla birlikte bu riski ortadan kaldırmak mümkün olmamakta veya pratik olarak yapılamamaktadır. Bu nedenle tahmin edilen risk ve yarar dengesini sağlamak için klinik öncesi ve klinik testler hayati öneme sahiptir¹⁴¹. Bu kapsamda, ilaç maddelerinin güvenliği ve etkinliği, iyi planlanan ve uygulanan toksikolojik ve klinik testler başta olmak üzere, hammaddeler, ilaç maddeleri ve imalatın üzerinde uygun kontrollerin yapılmasıyla sağlanabilmektedir. Safsızlık maruziyetine bağlı riskler, tehlikeli kimyasal maddelerin tanımlanması, mümkün olduğu durumlarda doz-cevap ilişkisinin belirlenmesi ve insanların safsızlığa maruz kalması durumlarında göz ardı edilebilir risk taşıyan sınır değerlerin oluşturulması ile kontrol edilmektedir. Safsızlık sorunlarının ne şekilde ele alınacağı bilgisine, düzenleyici kuruluşların analitik ve toksikolojik yaklaşımların genel çerçevesini sundukları rehberler aracılığı ile ulaşılmaktadır^{3,9,10}. Rehberlerin gelişim süreci değerlendirildiğinde, safsızlıklar konusuna 1990'lı yılların ortalarında dikkat çekildiği görülmektedir. Bununla birlikte gelişmiş ülkelerde safsızlık güvenliğine ait çalışmalar, kalıntı çözücüler için 1998, genotoksik olmayan safsızlıklar için 2002/2003 ve genotoksik safsızlıklar için 2007 yılında yürürlüğe girmiştir^{2,3,8,10}. Günümüzde hala tartışmaların sürdüğü safsızlıklar

konusunda, düzenleyici yaklaşımlar da oldukça dinamik bir süreçte ilerlemektedir. FDA tarafından yayımlanan genotoksik safsızlıklar ile ilgili rehber hala taslak rehber niteliğindedir⁹. Bunun yanı sıra, ICH'in M7 rehberi de kısa bir süre önce değerlendirilmek üzere eczacılık dünyasının dikkatine sunulmuş olup son deneyimleri yansıtmamasından dolayı önem taşımaktadır¹⁴. Konunun yeni olması nedeni ile birçok açıklayıcı ve tamamlayıcı makale de konuya katkı sağlamıştır^{30,142,143}.

Türkiye'de Sağlık Bakanlığı tarafından uygulanan yürürlükteki yönetmelikler araştırıldığında, ilaçların ruhsatlandırılması sürecinde, safsızlıkların toksikolojik değerlendirmeleri ele alınarak kontrollerine yönelik bir düzenlemenin bulunmadığı görülmüştür. Avrupa Birliği uyum süreci çalışmaları doğrultusunda özellikle genotoksik safsızlıklar için ilgili rehberlerin takip edilmesi oldukça önemli olmakla birlikte henüz bu konuda Bakanlık tarafından bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak çok uzak olmayan bir gelecekte, bu rehberlerin ülkemize uyumlandırılmasına yönelik çalışmaların başlaması kaçınılmazdır. Son yıllarda ülkemizde endüstri ve üniversiteler AR-GE çalışmalarına gittikçe daha çok önem vermektedirler. Buna paralel olarak ilaç endüstrisi de yeni moleküllerin ve teknolojilerin keşfi ve geliştirilmesinde yoğun çabalar göstermektedir. Yeni ilaç üretimi ve jenerik ilaç üretimlerinde, küresel kalite standartlarında ve güvenilir ürünlerin ortaya çıkarılması için safsızlıkların mercek altına alınarak bilimsel potansiyelden yararlanmak gerekmektedir. Bu sürecin hızlandırılması ve daha güvenli ve kaliteli ilaç üretimi ile toplum sağlığının korunması amacı ile konu üzerine ülkemizde yapılacak bilimsel bir çalışmanın deneyim kazandıracağı ve konuya ilginin çekeceği görüşü doğmuştur. Bu amaçla safsızlıklarda toksikolojik yaklaşımların tartışıldığı ve uygulandığı tez çalışması gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada araştırılan safsızlıklar, ait olduğu ilacın klinik önemi, hedef kitlesi ve kullanım şartları göz önünde bulundurularak seçilmiştir. Kronik inflamasyon, hava yolu akımının kısıtlanması ve hava yolu aşırı duyarlılığının rol oynadığı bir solunum yolu hastalığı olan astımda, hastalığın kronik özellik göstermesi, tedavisinin de kronik olarak uygulanmasını gerektirmektedir. Hastalığı kontrol edici tedaviler, günlük olarak düzenli alınan kontrol edici ajanlarla sağlanmakta olup bu amaçla lökotrien reseptör antagonisti olan montelukast, tedavide sıklıkla kullanılmaktadır¹⁰². Özellikle inhale steroidlerin hastalarda yan etkileri nedeni ile kullanılamaması veya kortikofobi nedeni kullanmama durumlarında da alternatif olarak montelukasttan yararlanılmaktadır¹⁴⁴. Montelukastın seçilmesindeki en önemli faktörlerden biri de, astımın tüm yaş gruplarında görülmesine rağmen çocukluk çağı kronik hastalıklarının başında gelmesidir. Buna bağlı olarak, çocuklarda montelukast kullanımının yaşamın erken dönemlerinde başlayarak hayatlarının büyük bir kısmını kapsamaması söz konusudur. Çocukların maruziyet kaynaklarına yetişkinlerden daha duyarlı olduğunun bilinmesi ve verdikleri cevapların farklı olabilmesi toksikolojik açıdan önemlidir. Günümüzde pediatrik toksikoloji alanında birçok çalışma gerçekleştirilerek yaşa bağlı farmakokinetik, toksikokinetik farklılıklar ortaya konulmaktadır^{39,145,146}. Toksikolojik risklerin değerlendirilmesi sırasında da bu farklılıklar dikkate alınarak risk hesaplamalarına dahil edilmektedir^{147,148}. Dolayısıyla safsızlıkların olası genotoksik etkilerinin bulunması durumunda gerektiğinde çocuk popülasyonuna yönelik de risk değerlendirmesi yapılmaktadır.

Montelukast ile ilgili bir diğer önemli nokta ise, montelukastın ilk kez 1998 yılında onay alarak piyasaya sunulmuş olmasıdır. Safsızlık ile ilgili rehberlerin henüz yürürlüğe girmediği bu tarihte, üretici firma tarafından ilaçta oluşabilecek safsızlıkların genotoksisite değerlendirmeleri

de yapılmamaktadır. Literatürde de montelukasta ait safsızlıklara yönelik toksikolojik çalışma ve bilginin olmaması, safsızlıklardan kaynaklanabilecek olası risklerin belirlenmesi ihtiyacını ortaya koymaktadır.

Günümüzde montelukast etkin maddesini içeren orijinal ilacın yanı sıra Türk firmaları da dahil olmak üzere birçok farklı firma jenerik ilaç üretimi yapmaktadır. Jenerik ilaçların etkin maddeyi aldığı kaynağın farklı olması veya farklı sentez yöntemi kullanması, ilaç üretimi sırasında kullanılan yardımcı maddelerin değiştirilmesi, üretim koşulları ve kalite kontrolüne bağlı olarak farklı yapıda ve miktarda safsızlıkların oluşmasına neden olmaktadır¹⁴⁹. Montelukast etkin maddesini sentezleyen veya ilaç üretimini yapan firmaların montelukastta oluşabilecek birçok farklı safsızlığın izolasyon ve tanımlanmalarını gösteren çalışmaları bulunmaktadır¹¹⁹⁻¹²¹. Sunulan çalışmada, USP'de belirlenen montelukast etkin maddesinde bozunma ürünü veya proses ile ilişkili olarak bulunabilecek altı adet safsızlığın (sülfoksit, cis izomer, Michael katımları I ve II, metilketon, metilstiren) analizleri üzerinde durulmuştur.

Bu kapsamda Türkiye piyasasında bulunan orijinal ilaç ve jenerik ilaçlar temin edilerek, ilgili safsızlıkların PDA dedektör kullanarak gradient RP-HPLC ile saptanması ve miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir. Analizlerde uygun tekniğin seçilmesi analiz edilecek örneğin yapısına, mevcut safsızlıkların tipi ve stabilitesine bağlıdır. Hassaslık ve seçicilik özellikleri göz önünde bulundurularak uygun tekniğin seçilmesi gerekmektedir⁷. HPLC, sıklıkla kullanılan ve hassas bir yöntem olup ilaç araştırmalarında genellikle RP-HPLC'den yararlanılmaktadır. Çalışmamızda da uyguladığımız teknik olan RP-HPLC, sabit fazın nonpolar, hareketli fazın polar olduğu kromatografi örneğidir. Bu şartlarda daha polar maddeler kolondan daha önce ayrılmaktadır. Bununla birlikte,

hareketli fazın tek bir çözücünden oluştuğu ayırım isokratik ayırım olarak adlandırılırken, hareketli fazın farklı polaritede birden fazla çözücünden oluşması ve çözücü bileşiminin basamaklı olarak değiştirilmesi ise dereceli (gradient) ayırım olarak adlandırılmaktadır. Modern cihazlarda ve günümüz analizlerinde genellikle dereceli ayırımdan yararlanılarak daha iyi sonuçlar elde edilmektedir⁵⁴. HPLC tekniğinin temel bileşenlerinden olan dedektörlerin birçok çeşidi bulunmaktadır. Safsızlıkların izlenmesinde HPLC ile en yaygın kullanılan dedektör, absorbansın ölçülmesi esasına dayanan UV dedektörlerdir. Bununla birlikte, foto diode array dedektörler (PDA, DAD) pahalı olmasına karşın istenilen dalga boyu aralığında çalışılabilmesi ve her maddenin ayrı dalga boylarındaki absorbansları eş zamanlı olarak ölçebilmesi nedeniyle daha üstün özelliklere sahiptir⁵¹. Bu özellikleri nedeni ile sunulan çalışmada montelukast safsızlık analizlerinde PDA dedektörden yararlanılmıştır.

Çalışmada yurdumuzdaki 11 ayrı firmanın piyasada bulunan 4 mg ve 10 mg dozdaki toplam 20 farklı ilaç ürününde, ikişer partide ölçümler yapılmıştır. Ölçüm sırasında kullanılan yöntem, literatürde montelukast safsızlıklarına yönelik çalışmalardan yola çıkarak çeşitli modifikasyonlar ile oluşturulmuştur^{123,124,127}. Çalışmada uygulanan yöntemin validasyonu yani belirlenen amaçlara uygunluğunun test edilerek objektif kanıtlarla belgelendirilmesi¹⁵⁰, ICH Q2(R1) rehberine göre, özgünlük, doğrusalılık, doğruluk ve geri kazanım, gün içi-günler arası kesinlik, teşhis sınırı ve miktar tayini alt sınırı çalışmaları yapılarak sağlanmıştır¹³⁵.

Çocuk ilaçları olarak, 8 firmanın 4 mg dozdaki sekiz çiğneme tableti ve bir adet oral granül preparatında gerçekleştirilen analizlerde, michael katımları I ve II, cis izomer, metilketon ve metilstiren safsızlıkları kalifikasyon limitinin (%1) altında bulunmuştur. Sülfoksit safsızlığı ise G ve

J firmalarına ait iki çiğneme tabletinde kalifikasyon analizini gerektirecek düzeylerde (G çiğ. tab. 43.10 ± 2.65 / 42.06 ± 1.03 ; J çiğ. tab. 43.39 ± 0.27 / 45.43 ± 3.84 µg) bulunmuştur. Michael katımları I ve II düzeyleri, bir firma dışında raporlama sınırının altında seyretmektedir. Diğer safsızlıkların miktarları ise, tümünün raporlanmasını gerektirmektedir. Toplam dokuz ilaç ürünü için, araştırılan safsızlıkların yaklaşık yarısı tanımlama sınır değerinin üzerinde bulunmaktadır.

Yetişkin ilaçlarına bakıldığında ise, çocuk ilaçlarına benzer şekilde michael katımları I ve II, cis izomer, metilketon ve metilstiren safsızlıkları kalifikasyon limitinin (%0.5) altında bulunmuştur. Sülfoksit safsızlığı ise yedi firmada (A tab. 54.85 ± 3.89 / 39.13 ± 6.38 ; D tab. 59.88 ± 5.34 / 64.48 ± 0.83 ; F tab. 99.01 ± 4.20 / 63.05 ± 9.46 ; G tab. 53.02 ± 6.71 / 49.18 ± 5.42 ; H tab. 73.03 ± 3.35 / 58.41 ± 2.77 ; I tab. 78.85 ± 2.46 / 73.49 ± 7.88 ; J tab. 55.99 ± 3.03 / 52.17 ± 2.27 µg) tanımlama ve kalifikasyon sınır değerinin üzerinde saptanmıştır. Michael katımları I ve II düzeyleri, tüm ilaçlarda raporlama sınırının altında seyretmektedir. Diğer tüm safsızlıklar ise, raporlama sınır değerinin üzerindedir. Kalifikasyon ve tanımlama sınır değerinin aynı olması nedeni ile sadece ileri analizlere ihtiyaç duyulan sülfoksit safsızlıklarında doğal olarak tanımlama da gerekmekte, diğer safsızlıklar sınırı aşmamaktadır.

Analizlerde, yetişkin ilaç ürünlerinde çocuk ürünlerine göre, sülfoksit safsızlığının daha sıklıkla ve daha yüksek düzeylerde bulunduğu gözlenmiştir. Montelukastın termal stres testlerinde ısı ile bozunma ürünü olarak sülfoksit safsızlığına neden olduğu bilinmektedir¹²². Üretim ve saklama sırasında oluşabilen sülfoksit safsızlığının, farmakolojik olarak inaktif bir bileşik olması nedeni ile hastanın aldığı montelukastın etkin dozunun azaldığı bildirilmektedir¹⁵¹. Yetişkin ilaçlarında daha çok sülfoksit oluşumu, formülasyonunun çocuk ilaçlarına göre daha fazla yardımcı

madde içermesini ve tablet çeşidinin farklılığı kaynaklı olabileceğini akla getirirse de safsızlık oluşumunda birçok faktör rol almakta olduğu için kesin olarak bir çıkarım yapılamamaktadır. Bununla birlikte, literatürde montelukast içeren ilaç formülasyonlarının dayanıklılığına yönelik sülfoksit safsızlığının oluşum nedenleri ve düzeyini düşürmek için çözümleri üzerinde bir çalışma yapılmıştır¹⁵¹. Çalışmada formülasyonda kullanılan mikrokristalin selüloz yardımcı maddesinin peroksit içerebileceği ve bu nedenle montelukastın oksidasyonuna neden olabileceği belirtilmiştir. Bunun dışında tatlandırıcı olarak kullanılan aspartamın da sülfoksit safsızlığı miktarında artışa neden olduğu bildirilmiştir.

Sunulan çalışma ile benzer olarak, literatürde farklı ilaç ürünlerinin safsızlık profillerinin karşılaştırılmasına yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Bunlardan biri olan orlistat etkin maddesini içeren orijinal ilaç Xenical® ile Hindistan ve Rusya’da üretilmiş jenerik ilaçlar sırasıyla Cobese ve Orsoten’in, safsızlıklar açısından kalite karşılaştırmasının yapıldığı bir çalışmada, safsızlık profilleri HPLC (UV ve MS/MS) ile ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen bulgular sonucunda jenerik ilaçların safsızlık profilleri birbirine benzer olmalarına karşın orijinal ilaçtan farklı spektrum gösterdiği bulunmuştur. Jenerik ilaçların orijinal ilaca göre daha yüksek seviyelerde ve daha çok sayıda (Cobese: 14 safsızlık, Orsoten: 13 safsızlık, Xenical®: 3 safsızlık) safsızlık içerdiği gözlenmiştir¹⁵². Yine orlistat etkin maddesine yönelik bir çalışmada, orijinal ilaçla (Xenical, İsviçre) dokuz jenerik ürünün (Hindistan, Malezya, Arjantin, Filipinler, Uruguay, Tayvan) renk, erime derecesi, kristal form, partikül büyüklüğü, etkin madde miktar tayini, kapsül dolgu miktarı, çözünme ve safsızlık miktar tayinleri karşılaştırılmıştır. Tüm jenerik ürünler dört veya daha fazla testte Xenical’in spesifikasyonlarını sağlayamamıştır. Bununla birlikte, tüm jenerik ürünlerde ortak sorun Xenical’de bulunmayan safsızlık miktarlarında olmuş, güvenilirliği etkileyen en önemli unsur olarak ele alınmıştır¹⁵³.

Benzer bir diğer çalışmada ise, levadopa/benserazid hidroklorit (100mg/25mg) etkin madde kombinasyonunu içeren orijinal ilaç (Madopar / Prolopa 125, İsviçre) ile Almanya piyasasında bulunan yedi jenerik ilacın kalite karşılaştırması yapılmıştır. Düzenli olarak uygulanan kalite parametrelerinin ve HPLC yöntemi ile safsızlık miktarlarının ölçüldüğü çalışmada, jenerik ilaçların tümü bir veya iki parametrede orijinal ilacın spesifikasyonlarını sağlamamıştır. Ek olarak, tüm ilaçların safsızlıkları içermesinin yanı sıra bir kapsül formülasyonunun limitin üzerinde (+%26.5) bozunma ürünü verdiği gözlenmiştir¹⁵⁴.

Tüm bu çalışmalar değerlendirildiğinde, orijinal ilaç ve jenerik ilaçlar arasında kalite farkının değiştiği gözlenmektedir. Başta Çin ve Hindistan olmak üzere Asya firmalarının ilaç hammaddelerini Batı ülkelerindeki ilaç firmalarına göre daha ucuz üretmeleri, piyasada bu ürünlerin kullanılmasını neden olmakta ancak kalite konusu zaman zaman sorun olmaktadır¹²⁵. Bununla birlikte Türkiye piyasasında üretilen jenerik ilaçlarda, araştırılan safsızlıklar açısından, orijinal ilaç ile benzer özellikler bulunmuştur. Bu durum Türkiye'deki ilaç endüstrisi için olumlu bir durum oluşturmaktadır. Ancak çalışmada, sadece belirli safsızlıkların analizleri üzerinde durulduğu, ilaçlarda safsızlık profili araştırılmadığı için, ilaçların içerebileceği farklı safsızlıklar ve miktarları konusunda yorum yapılamamaktadır. Bu tip bir çalışmanın kütle spektroskopisi gibi daha ileri analizleri içermesi gerektiği ve çalışma kapsamının daha çok analitik ve farmasötik kimya bilgi ve becerilerini gerektirdiği bilinmektedir. Bu amaçla çalışma, toksikolojik yaklaşımların amaç edinildiği doğrultuda yürütülmüştür.

Çalışmada miktar tayini sonuçlarından yola çıkarak, ICH Q3B(R2) rehberine göre prosesle ilişkili michael katımları I ve II, metilketon, metilstiren safsızlıkları ve bozunma ürünü cis izomer

safsızlığının kalifikasyon gerektirmediği anlaşılmıştır. Bununla birlikte, görüş için kamuya sunulan ICH M7 taslak rehberinde, yapısı bilinen safsızlıklarda literatür taraması veya uyarıcı grup içerip içermemelerine göre araştırılması da önerilmektedir. Araştırılan tüm safsızlıkların benzer yapıları içermesi nedeni ile yürürlüğe girmiş ICH Q3B(R2) rehberi esas alınarak, sülfoksit safsızlığı üzerinde ileri analizler gerçekleştirilmiştir.

Sülfoksit safsızlığının montelukastın bozunma ürünü olarak karşımıza çıkmasının yanı sıra aynı zamanda bu safsızlığın, metabolit safsızlık olarak da yer aldığı bilinmektedir¹¹³. Safsızlıkla ilgili rehberlere bakıldığında, ICH Q3A, Q3B, EMA ve ICH M7 rehberlerinde metabolit safsızlıklarına ufak farklılıklarla yer verilirken, FDA taslak rehberinin bu konuya değinmediği görülmektedir. Bununla birlikte genel olarak, ilaç maddesinin klinik olmayan çalışmalarda maruz kalınan metabolit miktarı, uygulanan ilaç maddesinin safsızlıklarından daha yüksekse safsızlık için kalifikasyona ihtiyaç duyulmayacağı önerilmektedir. İlaçların güvenlik değerlendirmelerinde, ilacın plazmadaki en yüksek kararlı durumunda (steady state), metabolitlerin ana ilacın sistemik maruziyetinin %10'undan fazla düzeyde oluşmasının bir güvenlik sorunu olabileceği göz önünde bulundurularak toksisite testleri yapılmaktadır¹⁵⁵. Dolayısıyla böyle bir safsızlık için tekrar kalifikasyon sürecine gerek görülmemektedir. Ancak montelukastın metabolizması sırasında ~%1 oranında meydana gelen sülfoksit metaboliti¹¹³, kaydadeğer seviyelerde oluşmadığı için bu testlerin gerçekleştirmediği açıktır. Bu nedenle sülfoksit, bir metabolit olsa da safsızlık değerlendirmesine ihtiyaç duyulmuştur.

Sülfoksit safsızlığının kalifikasyon sınır değerini aşması, safsızlığın biyolojik olarak güvenli olduğunu gösteren verilerin elde edilmesi ve değerlendirilmesini gerektirmektedir. Bu nedenle ilgili rehberlerde belirtildiği şekilde, ilk aşama olarak safsızlığa ait toksikolojik

verilerin varlığı araştırılmıştır. Birçok veri tabanının gözden geçirilmesi sonucu sülfoksit safsızlığına ait herhangi bir toksisite verisi bulunamamıştır. Bununla birlikte, yapısında genotoksisiteye yönelik uyarıcı grup olup olmadığını belirlemek amacı ile literatürden yararlanmakla birlikte temel olarak bilgisayar tabanlı sayısal toksikoloji analizi sağlayan in silico yöntem kullanılmıştır. İlk olarak FDA taslak rehberinde safsızlıklarda yapı-aktivite ilişkisi değerlendirmesi üzerinde durulsa da, özellikle ICH M7 taslak rehberinden sonra, ilaçlardaki safsızlıkların kalifikasyonlarında, bu tip tahmin edici modern toksikoloji yöntemleri ile bakteride mutajenitenin değerlendirilebileceği önerilmektedir.

Çalışmada kullanılan FDA'in işbirliği ile oluşturulan Leadscope yazılımı, istatistiksel yaklaşım kullanarak mutajenite tahmini yapmaktadır. FDA'in İlaç Güvenliği Araştırmaları Bölümü tarafından derlenmiş veriler esas alınarak ve Leadscope yazılımı kullanılarak oluşturulan QSAR modelinde, çeşitli hesaplanan özellikler ve yapısal durumlar kullanılarak toksisite için tahminde bulunmaktadır. Sülfoksit safsızlığına yönelik QSAR değerlendirmesinde, mutajen pozitif tahmin olasılığı *Salmonella* suşlarında negatif çıkmıştır (0.131). *E.coli* suşları ve *Salmonella* TA102 suşunda A:T hedef bölgeleri ile ilgili olarak yazılım tahmin sonucu vermemiştir. Elde edilen veriler ile sülfoksit safsızlığının mutajenik olmadığı sonucu çıkarılabilmektedir.

Günümüzde rehberler, QSAR çalışmalarında mutajenik olmadığı belirlenen safsızlıklar için ileri analizlerin gerekmediğini belirtmektedirler^{9,14}. Bununla birlikte, yapı-aktivite ilişkisi değerlendirmelerinde, birinin istatistiksel tabanlı diğerinin uzman tahmin sistemi tabanlı iki yöntemle tamamlanması gerektiği de vurgulanmakta olup yapılan çalışmada sadece istatistiksel tabanlı QSAR sistemi ile analiz gerçekleştirilmiştir. Ancak günümüzde mutajenite tahmininde bulunan

birçok yazılım arasında, Leadscope, Derek ve Multicase sistemlerinin tahmin etme gücünün karşılaştırılması ile Leadscope sisteminin en yüksek mutajen pozitif tahmini (%76-78) ve en yüksek mutajen negatif tahminini (%73-81) sağladığı sonucuna varılmıştır¹⁵⁶. SAR sistemleri ile geniş tarama yapmaya olanak sağlayan hızlı bir analiz yapılmakta, zamandan kazanılmakta, malzeme kullanılmamakta, sadece kimyasal yapının bilinmesi ile işlem gerçekleştirilebilmektedir. Ek olarak, QSAR yöntemlerinin geliştirilerek riske özgü doz (RSD) gibi TTC limitinden daha yüksek limitlere imkan veren yaklaşımlar için de kullanılabileceği gösterilmiştir¹⁵⁷. Toksik etkilerin belirlenmesinde SAR sistemlerinin bilgisayar yazılımları aracılığı ile toksikoloji alanında yeni bir sayfa açtığı ortadadır. Ancak bu analizlerde halen alanında uzman insanların görüşleri, deneyimleri ve literatür verileri dikkate alınarak sonuca ulaşılmaktadır.

ICH Q3B ve EMA rehberine göre kalifikasyon sınır değerini aşan safsızlıklarda gerçekleştirilen minimum tarama testlerinden önemle üzerinde durulan toksisite testi, bakteride gen mutasyonudur. ICH M7 taslak rehberinde ise, genotoksisite testlerinde daha tutucu bir yaklaşım görülmekte, araştırmacıyı mümkün olduğunca SAR analiz sonuçları ile karar vermeye yönlendirmektedir. Ayrıca SAR değerlendirmesinde yapısal uyarıcı grup bulunan ve mutajenik olduğu gösterilen safsızlıklar için bakteride mutajenite testinin de uygulanabileceği belirtilmektedir.

Safsızlıkların genotoksisite potansiyellerini onaylamada anahtar yöntem olarak kullanılan Ames testinde (bakteride ters mutasyon testi) mutajen olan çok sayıda kimyasalın aynı zamanda kemiricilerde karsinojenik olduğu bulunmuştur¹⁵⁸. Bakteride ters mutasyon yöntemi düzenleyici kuruluşlarca validasyonu sağlanmış ve uzun yıllardır birçok farklı alanda mutajenitenin değerlendirilmesi için kullanılan hızlı bir yöntemdir⁶⁸⁻⁷¹. Bununla birlikte, sıklıkla bir ön tarama testi olarak kullanılan

yöntemin, yüksek verimli tarama sağlaması için standart bakteride ters mutasyon testinin yeni versiyonları geliştirilmiştir. Safsızlık çalışmalarının en büyük problemi madde yetersizliğidir. Özel olarak sentezlenmesi veya ilaçtan izole edilerek kullanılması gereken safsızlık için, testlerde kullanılacak miktarları sağlamak oldukça pahalı ve sıkıntılıdır. OECD ve ICH S2R rehberlerinde bildirildiği şekli ile standart bakteride gen mutasyonu yönteminde, sitotoksosite görülmemesi halinde 5000 µg/plak doza kadar, belirli beş suşta, metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğunda değerlendirme gerçekleştirilmelidir. Bu sistem gram düzeyinde safsızlık gerektirmektedir. Özellikle ilaç endüstrisinde erken dönemde yapılan çok sayıda analize olanak sağlanması ve az miktarda maddeye ihtiyaç duyulması için safsızlık çalışmalarında alternatif yöntemler tercih edilmektedir. Kullanılabilecek yöntemler arasında, mini-Ames test⁸², AmesII test⁸⁵, küçük ölçekli değişme testi^{83,159} gibi testler yer alsa da, sunulan çalışmada kullanılan Ames MPF Penta I, OECD Test Rehberi 471 no'lu standart bakteride gen mutasyonu testine uyumlu olarak *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1537, TA1535 ve *E.coli* WP2 uvrA + *E.coli* WP2 [pKM101] suşlarında çalışma imkanı sağlamıştır. Bu yöntem, Ames testinin agar plakları yerine sıvı kültür ortamında uygulanması işlemidir. Üretici firmanın yaptığı çalışmada, 17 mutajenik referans bileşik için çoğunlukla Ulusal Toksikoloji Programı (NTP) veri tabanında yayımlanmış standart bakteride gen mutasyonu testi sonuçları ile Penta I kitinden elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Mutajenitenin var/yok analizinde testler arasındaki uyumun %100 (17/17) olduğu bulunmuştur. S9 varlığı ve yokluğunda suşlara özgü uyuma bakıldığında ise, TA98 için %86, TA1535 için %93 ve TA100, TA1537, *E.coli* Combo için %100 olduğu sonucuna varılmıştır¹⁶⁰.

Çalışmada sülfoksit safsızlığı metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğunda yukarıda belirtilen beş suşta mutajenite açısından değerlendirilmiştir. Kit içeriğinde belirtildiği şekilde, TA98 suşunda ön

sitotoksisite tarama testi yapılmış, sülfoksit safsızlığının sitotoksik etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Bu testin yeterince hassas olmadığı ve kısa süreli maruziyet nedeni ile etkilerin açıkça gözlenebilmesinde sorunlar olabileceği tahmin edilse de, alınan sonuca göre belirtilen tüm suşlar için sülfoksit 15.8 – 5000 µg/ml doz aralığında mutajenite deneyine uygulanmıştır. Çalışmada *S. typhimurium* TA98, TA1535 ve *E. Coli* combo suşlarında S9 varlığı ve yokluğunda safsızlığın 5000 µg/ml doza kadar mutajenik olmadığı bulunmuştur. TA1537 suşunda ise, 500 µg/ml doza kadar S9 varlığı ve yokluğunda safsızlığın mutajenik olmadığı saptanmıştır. TA100 suşunda S9 varlığında, 5000 µg/ml dozda sitotoksisite gözlenebilirken, 1581 µg/ml doza kadar mutajenite varlığı söz konusu değildir. TA100 suşunda ise, S9 yokluğunda 50 µg/ml doza kadar mutajenik etki gözlenmemiştir. 1581 ve 5000 µg/ml (sırasıyla $p=0.010$ ve $p=0.006$) dozlarda sitotoksik etkili olduğu düşünülen sülfoksit safsızlığında, 158 ve 500 µg/ml dozlarda azalmış bakteri sayısı açıkça farkedilmiş ancak 500 µg/ml dozda anlamlılık derecesinin sınıra oldukça yakın ($p=0.045$) olduğu görülmüştür. TA100 suşunun diğer suşlara göre daha hassas olduğu bilinmekte¹⁶¹ ve standart Ames testinde sitotoksisite çalışması TA100 suşunda gerçekleştirilmektedir⁷⁶. Bu durum dikkate alındığında, TA100 suşunda yüksek dozlarda bakteri sayısının düşmesi açıklanabilmektedir. Kenyon ve arkadaşlarının safsızlıklarda yaptığı çalışmalarda Ames testinde mutajenlerin %85'inin 250 µg/plak veya altındaki dozlarda saptanabildiği bulunmuştur¹⁶². Bu durum sitotoksik olmayan düşük dozlarda da mutajenlerin büyük bir kısmının saptanabileceğini göstermektedir. Safsızlık değerlendirmesinin bu kısmında, bakteride gen mutasyon testi ile farklı hedef bölgeler için baz çifti değişmesi ve çerçeve kayması mutasyonları değerlendirilmiş, sülfoksit safsızlığının mutajenik olmadığı bulunmuştur.

ICH Q3BR2 rehberine göre minimum tarama testlerinden ikincisi olan in vitro kromozomal aberasyonu testi için insan periferik kan

kültüründe sülfoksit uygulaması yapılmıştır. Kromozomal aberasyon testinde uygulanacak doz aralığının seçimi ve sitotoksitenin belirlenmesi amacı ile öncelikle düzenleyici kılavuzlarda önerilen mitotik indeks değerlendirmesi yapılmıştır⁸⁶. İn vitro memeli hücrelerinde genotoksikite testlerine yönelik geriye dönük değerlendirmeler, günümüzde kullanılan testlerin hassaslığının yüksek fakat özgünlüğünün kemiricilerde karsinojen veya in vivo genotoksik olmayan kimyasallar için pozitif sonuç vermesi nedeniyle düşük olduğunu göstermektedir. İn vitro testlerin doğruluğunu artırmanın dolayısıyla in vivo ileri testlerin ihtiyacını azaltmanın bir yolu olarak in vitro memeli hücrelerinde genotoksikite yöntemlerinde araştırılacak en yüksek dozun tekrar ele alınması için uzman çalışma grupları tarafından çeşitli öneriler sunulmuştur. Uzun yıllar boyunca in vitro memeli hücrelerinde genotoksikite testlerinde araştırılması tavsiye edilen en yüksek konsantrasyon toksisite ve çözünürlük sorunlarının olmadığı durumlarda 10 mM olarak verilmekteydi. Ancak son yıllarda konu üzerine çalışma grupları, 10 mM'ın altındaki dozlarda yöntemin hassaslığında anlamlı bir kaybın olmadığına yönelik destekleyici kanıtlarla, araştırılacak en yüksek dozun azaltılması hakkında fikir birliğine varmışlardır. Bu kapsamda bazı durumlar hariç kimyasalların büyük kısmında limit doz olarak 1 mM veya 500 µg/ml tavsiye edilmektedir¹⁶³. Bu yeni düzenlemeler doğrultusunda, sülfoksit safsızlığı en yüksek doz olarak 500 µg/ml'a kadar çalışılmıştır.

Çalışmada, periferik lenfositlerin sülfoksit safsızlığına metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda 3 saat maruz bırakılması ile 125 µg/ml ve üstü dozlarda sitotoksik etki gözlenmiştir. Sülfoksit safsızlığına 24 saat maruziyetlerde ise metabolik aktivasyon yokluğunda 62.5 µg/ml ve üstü dozlarda sitotoksikite görülmüştür. Üç saatlik maruziyetlerde, maruziyet süresinin kısa olması ve tam kan kültüründe çalışılması dolayısıyla onarım şansının bulunması, sitotoksik hasarın daha yüksek dozlarda görülmesini açıklayabilmektedir. Çalışmada mitotik

indeks değerlendirmeleri ile sülfoksit safsızlığının doz ve zamanın artışına bağlı olarak hücre bölünmesini önemli derecede baskıladığı bulunmuştur.

Sitotoksisite çalışmasından elde edilen veriler ışığında in vitro kromozomal aberasyon testi, üç saatlik uygulamalarda 15.7, 31.3 ve 62.5 µg/ml dozlarda, 24 saatlik uygulamada ise 20, 30 ve 40 µg/ml dozlarda çalışılmıştır. Değerlendirmelerde, her iki donör için de kontrol gruplarında kromatid değişimi hasarlarının sayısal olarak yüksek olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde, doz grupları için de aynı durum söz konusudur. Bununla birlikte, istatistiki analizler doz gruplarının kontrole göre karşılaştırılması ile yapıldığı için kontrole göre oluşabilecek anlamlı hasar artışı belirlenmesinde bir problem olmamaktadır. Bazı çalışmalarda kromozomal aberasyon testi sonuçlarında gap hasarlarının dışlandığı grlmektedir¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. Birçok çalışmada ise hem gap tipi hasarların dahil edilmesi hem de hariç tutulması ile değerlendirme söz konusudur^{167,169}. Ancak Paz-y-Mino ve ark.larının çalışmasında gapler dahil edilerek oluşturulan verilerin hasarı daha doğru yansıttığı gsterilmiřtir¹⁷⁰. OECD test rehberinde de gaplerin dahil edilerek sonuçların gösterilmesi tavsiye edilmektedir. Bu nedenle sonuçlarda gap hariç veriler ayrı olarak gösterilse de, değerlendirmelerde gap dahil veriler dikkate alınmıştır.

Yapılan değerlendirmelerde, sülfoksit safsızlığının kromozomlarda sayısal bir hasara neden olmadığı bulunmuştur. Kromozomlarda meydana gelen hasarlar çoğunlukla kromatid tipi oluşmuştur. Üç saatlik metabolik aktivasyon yokluğunda safsızlık uygulamasında, hücre başına kromozomal aberasyon ortalamaları, 15.7, 31.3 ve 62.5 µg/ml dozlarda sırasıyla 0.480; 0.465 ve 0.455 olup çözücü ve pozitif kontroller için ise 0.310 ve 1.920'dir. Metabolik aktivasyon varlığında ise, doz grupları için sırasıyla 0.485, 0.675 ve 0.720, kontroller

için sırasıyla 0.520 ve 1.020'dir. Metabolik aktivasyon yokluğunda 24 saatlik uygulamalarda ise, doz grupları için sırasıyla 0.475, 0.475 ve 0.340, kontroller için 0.365 ve 1.785 olarak bulunmuştur. Safsızlığın oluşturduğu yapısal hasarlarda, istatistiksel değerlendirmeler sonucu kontrole göre anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Pozitif kontrollerin, çözücü kontrole göre anlamlı düzeyde artmış kromozom hasarı göstermesi test sistemlerinin doğruluğunu onaylamıştır ($p<0.05$). Değerlendirmeler sonucunda, sülfoksit safsızlığının in vitro kromozomal aberasyon testinde metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğunda genotoksik olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Genetik toksikoloji çalışmalarından elde edilen bulguların anlamlı bir cevap oluşturduğunu belirlemek için bilimsel muhakeme yapılması gerekmektedir. Bu amaçla, doz-cevap ilişkisi, cevabın tekrar edilebilirliği, pozitif kontrol cevabının test sistemi ve/veya metabolik aktivasyon sistemini doğrulaması, negatif kontrol verilerinin laboratuvarında elde edilen daha önceki verilerle uyumlu olup olmadığı, sonuçların yeterli yüksek doz / konsantrasyon değerlendirmelerini göstermesi mutlaka gözden geçirilmelidir⁵⁶. Çalışmamızda elde edilen sonuçlara, bu şartlar göz önünde bulundurularak ve sağlanarak ulaşılmıştır. Yapılan çalışmada QSAR analizi, bakteride gen mutasyon testi ve in vitro kromozomal aberasyon testinden elde edilen sonuçlar arasında da iyi bir uyum olduğu görülmüştür.

Yapılan değerlendirmeler sonucunda sülfoksit safsızlığının ilgili rehberlere göre mutajenik/genotoksik olmayan rutin safsızlık olarak ele alınması gerektiği sonucuna varılmıştır. Çalışmada safsızlığın yüksek dozlarda sitotoksisiteye neden olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, safsızlık ile ilgili rehberlerde genotoksik etkiler üzerine birçok bilgi bulunmasına rağmen, sitotoksisite üzerinde durulmamaktadır. Safsızlık

alışmalarında değerlendirmelerde, in vivo çalışmalardan elde edilen sitotoksisite sonuçlarından yararlanılmakla birlikte in vitro testlerde görülen sitotoksik etkiler göz ardı edilmektedir. Bununla birlikte, temel toksik etkiler arasında yer alan sitotoksisitenin, in vitro çalışmalarda, sadece olağan üstü sitotoksik etkiler oluşturduğu durumlarda dikkate alınabileceği ve bu durumda safsızlıklarda daha düşük sınır değerlerin kullanılabileceği üzerinde tartışılabilir (kaynak: L.Müeller ve A. Teasdale ile kişisel iletişim). Çalışmada genotoksik etkisi bulunmayan sülfoksit safsızlığı için, in vitro sitotoksisite bulgularından yola çıkarak, gelecekte safsızlığın in vivo akut toksisite açısından değerlendirilmesinin önemli olabileceği dşnlmektedir.

İn vitro çalışmalardan elde edilen sonuçların insanlara uyarlanarak kantitatif risk değerlendirmesinde kullanılması henüz yapılamamaktadır. Son yıllarda bu alanda çabalar bařlamıřtır¹⁷¹, belki gelecekte yaygın olarak in vitro testlerden elde edilen verilerle kantitatif risk değerlendirmeleri yapılabilecektir. Günümüzde genotoksik safsızlıklar için in vivo çalışmalar aracılığı ile hesaplamalar yapılarak veya TTC gibi yaklaşımlar kullanılarak risk kontrol altında tutulmaktadır.

Yapılan çalışmada sadece kalifikasyon sınır değerlerini aştığı için sülfoksit safsızlığı araştırılmıştır. Bununla birlikte, gerçek hayatta ilacın içerebileceği tüm safsızlıklar karışım halinde organizmaya etki etmektedir. Birden fazla safsızlığın bir arada bulunması durumunda, rehberler kontrole yönelik nerileri genotoksik safsızlıklar için vermektedir^{11,14,33}. Bununla birlikte, organizmada küçük dozlardaki herhangi tipteki safsızlıkların birbirleri ile etkileşimleri durumunda oluşabilecek tehlike bilinmemektedir. Ayrıca, montelukast etkin maddesinin piyasada desloratadin, levosetrizin gibi etkin maddelerle kombinasyonları da bulunmaktadır. Dolayısıyla kombinasyonda diğer ilaçtan gelen safsızlıklarla da etkileşimlerin

olabileceği düşünülerek, ilaç üreticilerinin bu duruma da dikkat etmesi gerekmektedir.

Gelişmiş ülkelerdeki düzenlemeler esas alınarak geliştirilen çalışmada, araştırılan safsızlığın rutin safsızlık olduğunun belirlenmesi, ilaçları kronik olarak kullanan yetişkinler ve çocukların sağlığı için olumlu bir sonuçtur. Hastaların yarar bekledikleri ilaçtan, safsızlıklar nedeni ile beklenmeyen toksisitelerin görülmesi ve muhtemel kanser risklerinin artması halk sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturmakta ve sağlık ekonomisini etkileyebilmektedir. Literatürde sülfoksit safsızlığına ait herhangi bir toksikolojik verinin bulunmayışı nedeni ile çalışmadan elde edilen sonuçlar, geniş ve karmaşık safsızlık konusuna bir katkı sağlamıştır.

İlaç firmaları, halka sunulan ilaçların güvenli ve etkili olmalarını sağlama yükümlülüklerinin farkındadır. Yeni ilaç maddeleri ve ürünleri geliştirmede düzenleyici kurumlarla etkileşim içindedirler¹⁷². Türkiye ilaç endüstrisinde Ar-Ge uygulamalarının geliştirilmesi ve gelişmiş ülke standartlarında ilaç üretilmesi için üniversiteler ve ilaç endüstrisinin işbirliği yapması büyük önem taşımaktadır. Akademik kurumların sahip olduğu bilgi, tecrübe ve araştırma imkanları dünyadaki gelişmelerin takip edilebilmesi ve yeni yaklaşımların geliştirilebilmesi için gerekli ve uygun ortama sahiptir ancak bu avantajların sanayi kuruluşlarıyla paylaşılması ve geliştirilmesi gerekmektedir. Yapılan çalışmada ülkemizde Avrupa Birliği uyum çalışmaları çerçevesinde, gelecekte ilaç safsızlıklarına ait düzenlenmesi muhtemel yönetmelik kapsamının önceden öngörülerek başta ilaç üretimi olmak üzere, ilaca ait ithalat-ihracat ve ruhsatlandırma proseslerinde gereken kontrollere ilgi çekilmeye çalışılmıştır.

6. SONUÇ

Günümüzde ilaç güvenliği ve kalitesinde önemli unsurlardan biri olan safsızlıklar konusunda, düzenleyici kuruluşların sundukları rehberler, ilaç endüstrisi ve ulusal sağlık kurumlarına yön vermektedir. Safsızlıkların genotoksik etkiler de gösterebileceği ve bu tip etkilerin eşik mekanizması göstermeksizin sağlık etkilerine neden olabileceği bilinmektedir. Her ne kadar ilaçlarda safsızlıkların bulunmaması yönünde beklentiler oluşsa da çözüm, mutajeniteden sorumlu tutulan, üretimde reaktif özelliğinden yararlanılan maddelerden tamamen kaçınmak değildir ve bu tutum gerçekçi olmamaktadır²⁸. İlaçlarda safsızlık profillerinin ortaya konması, toksikolojik değerlendirmeler ile sınıflandırmasının yapılması ve biyolojik olarak kabul edilebilir risk oluşturan düzeylerin belirlenmesi ile kontrolün sağlanması çözüme bilimsel bir yaklaşım getirmektedir.

Safsızlık kontrolüne yönelik çalışmalar halen dinamik bir süreçte ilerlemektedir. Günümüzde belirlenen yaklaşımlar doğrultusunda, planlanan safsızlık çalışması, astım tedavisinde kronik kullanım gerektiren sıklıkla yararlanılan montelukast etkin maddesi içeren ilaçlarda gerçekleştirilmiştir. Türkiye piyasasında yer alan çocuk ve yetişkin ilaçlarında, 20 farklı ürünün farklı partilerinde USP'de belirtilen safsızlık analizleri RP-HPLC yöntemi ile yapılmış, ülke çapında ilaç kalitesi hakkında fikir sağlanmıştır. Çalışmada araştırılan altı adet safsızlıktan sadece biri kalifikasyon testlerini gerektirecek düzeylerde bulunmuştur. Jenerik ilaçlar ve orijinal ilaç arasında, araştırılan safsızlık düzeyleri çok farklı görülmemiştir.

Toksikolojik değerlendirmeler gerektiren sülfoksit safsızlığında kantitatif yapı-etki ilişkisinden yararlanılarak mutajenite tahmin verileri elde edilmiştir. Düzenleyici kuruluşların önerdiği çalışma

tasarımları göz önünde bulundurularak, metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğunda sülfoksit safsızlığının, bakteride gen mutasyon testinde mutajenik olmadığı, in vitro kromozomal aberasyon testinde genotoksik olmadığı sonucuna varılmıştır.

Tehlikenin belirlenmesine yönelik gerçekleştirilen çalışmalarda, safsızlığın rutin safsızlık olarak ele alınabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Çalışma hedeflenen doğrultuda gerçekleştirilerek, ülkemizde henüz yürürlüğe girmemiş genotoksik safsızlık düzenlemeleri için, ilaç endüstrisine yönelik toksikolojik yaklaşımların sunulduğu ilk çalışma olmuştur. Toksisite verisi bulunmayan sülfoksit safsızlığının genotoksikolojik çalışma sonuçlarının sunulması literatüre ve endüstrideki uygulamalara katkı sağlayacaktır. Bununla birlikte, çalışmanın ilaç endüstrisi ve ulusal sağlık kurumlarının konu ile ilgili farkındalıklarının artırılmasına yardımcı olması beklenmektedir.

7. ÖZET

Astım tedavisinde kullanılan montelukastın safsızlıklarının tayini ve olası genotoksik etkilerinin in vitro değerlendirilmesi

Astım tedavisinde kronik olarak kullanılan montelukast içeren ilaçların üretimi ve saklanması sırasında çeşitli safsızlıklar oluşabilmektedir. Bu safsızlıklar ilacın güvenliği, etkinliği ve kalitesini etkilemekte özellikle genotoksik etki göstermeleri durumunda ciddi sorunlara neden olmaktadır. Çalışmada, son yıllarda düzenleyici kuruluşların safsızlıkların kontrolü için geliştirdiği yaklaşımlar dikkate alınarak montelukast safsızlıklarının analizi ve toksikolojik değerlendirmesi amaçlanmıştır.

Piyasadaki çocuk ve yetişkin montelukast ilaç ürünlerinde, USP'de belirtilen safsızlıklar için (sülfoksit, cis izomer, michael katımları I ve II, metilketon, metilstiren) RP-HPLC yöntemiyle miktar tayini yapılmıştır. Analitik yöntemin validasyonu ICH rehberine göre gerçekleştirilmiştir. Safsızlık rehberlerine göre kalifikasyon sınır değerini aşan sülfoksit safsızlığının literatürde toksikolojik verisinin bulunmaması nedeni ile in silico QSAR yöntemi ile mutajenite tahmin analizi, S.typhimurium TA98, TA100, TA1535, TA1537, E.coli wp2[pKM101] ve wp2uvrA suşlarında bakteride gen mutasyon testi, sitotoksisite ve genotoksisite değerlendirmesi için mitotik indeks analizi ve in vitro kromozomal aberasyon yöntemi uygulanmıştır.

On bir ayrı firmanın 4 mg ve 10 mg dozdaki 20 ilaç ürününün farklı partilerdeki analizlerinde, michael katımları I ve II, cis izomer, metilketon ve metilstiren safsızlıkları kalifikasyon limitlerin altında

bulunmuştur. Sülfoksit safsızlığı, çocuk ilaçlarında 2, yetişkin ilaçlarında ise 7 firmada limitlerin üzerinde bulunmuştur. Sülfoksit safsızlığının Leadscope QSAR analizinde ve metabolik aktivasyon varlığı/yokluğunda bakteride gen mutasyon analizinde (Ames MPF Penta I) mutajenik olmadığı görülmüştür. Safsızlığın insan periferik lenfositlerinde metabolik aktivasyon varlığı/yokluğunda doz artışına bağlı olarak sitotoksik olduğu fakat in vitro kromozomal aberasyon testinde genotoksik olmadığı bulunmuştur. Değerlendirmeler, sülfoksit safsızlığının günümüzdeki ilgili rehberlere göre genotoksik olmayan safsızlık olarak sınıflandırılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: genotoksik safsızlıklar, QSAR analizi, Ames testi, kromozomal aberasyon test, hplc, regülasyonlar

8. SUMMARY

Determination of impurities of montelukast which is used in asthma therapy and in vitro evaluation of their probable genotoxic effects

During manufacturing and storage of drugs that include montelukast used chronically in asthma therapy, various impurities can form. Impurities affect safety, efficacy, quality of drugs, particularly when they pose genotoxic effects, causing serious health problems. Current study aims analysis of montelukast impurities and toxicological assessment via considering the regulatory approaches regarding control of impurities.

Quantitation of impurities (sulfoxide, cis-isomer, Michael adducts I&II, methylketone, methylstyrene), already indicated in USP was conducted using RP-HPLC analysis on pediatric and adult drug products on market. Validation of analytical method was conducted according to ICH guideline. For sulfoxide impurity that was above qualification limits, having no report of toxicity data, prediction analysis in in silico QSAR method, bacterial gene mutation test in *S.typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, *E.coli* wp2[pKM101] and wp2uvrA were performed. The cytotoxicity and genotoxicity assessment was investigated respectively by determining mitotic index and using in vitro chromosomal aberration (CA) test.

Impurities except sulfoxide were under qualification limits in the analysis of different batches of 20 products at 4 mg/10 mg doses for 11 companies. The sulfoxide exceeds limits in 2 companies for pediatric chewable tablets and in 7 companies for adult tablets. Sulfoxide impurity

was not mutagenic in Leadscope QSAR analysis and bacterial gene mutation assay (Ames MPF Penta I) w/wo metabolic activation system. Sulfoxide impurity was dose-dependent cytotoxic in human peripheral lymphocytes w/wo metabolic activation system, however, it was nongenotoxic in CA test. Results have shown sulfoxide impurity as nonmutagenic/nongenotoxic and to be classified as an ordinary impurity according to guidelines.

Keywords: genotoxic impurities, QSAR analysis, Ames test, chromosomal aberration test, hplc, regulations

9. KAYNAKLAR

1. Sağlık Bakanlığı, Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. SKS ve İlaç Güvenliği. Ankara: Sağlıkta Kalite ve Akreditasyon Başkanlığı, 2012.
2. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Quality Guidelines, Q3A(R2), Impurities In New Drug Substances. Step 4. 2006.
3. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Quality Guidelines, Q3B(R2), Impurities In New Drug Products. Step 4. 2006.
4. Pilaniya K, Chandrawanshi HK, Pilaniya U, Manchandani P, Jain P, Singh N. Recent trends in the impurity profile of pharmaceuticals. J Adv Pharm Technol Res 2010; 1(3): 302–10.
5. Bari SB, Kadam BR, Jaiswal YS, Shirkhedkar AA. Impurity profile: Significance in Active Pharmaceutical Ingredient, EJAC 2007; 2(1): 32-53.
6. Teasdale A, editor. Genotoxic Impurities: Strategies for Identification and Control. New Jersey: John Wiley & Sons; 2010.
7. Raman NVVSS, Prasad AVSS, Ratnakar Reddy K. Strategies for the identification, control and determination of genotoxic impurities in drug substances: A pharmaceutical industry perspective. J Pharm Biomed Anal 2011; 55(4): 662–7.
8. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Quality Guidelines, Q3C(R5), Impurities: Guideline For Residual Solvents. Step 4. 2011.
9. Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry, Genotoxic and Carcinogenic Impurities in Drug Substances and Products: Recommended Approaches. (draft). 2008.
10. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities. 2006.
11. Bercu JP, Hoffman WP, Lee C, Ness DK. Quantitative assessment of cumulative carcinogenic risk for multiple genotoxic impurities in a new drug substance. Regul Toxicol Pharmacol 2008; 51(3): 270-7.

12. Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services
Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research.
Guidance for Industry, ANDAs: Impurities in Drug Products. 2010.
13. Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services
Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research.
Guidance for Industry, ANDAs: Impurities in Drug Substances. 2009.
14. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for
Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Multidisciplinary
Guidelines, M7, Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic)
Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk. (draft,
step2). 2013.
15. Akinbami LJ, Moorman JE, Garbe PL, Sondik EJ. Status of childhood
asthma in the United States, 1980-2007. *Pediatrics* 2009; (123-3): 131-45.
16. Özer F, Yosunkaya Ş. Astım ve lökötrienler. *Genel Tıp Derg* 2005; 15(2): 91-
9.
17. Moya J, Bearer CF, Etzel RA. Children's behavior and physiology and how it
affects exposure to environmental contaminants. *Pediatrics* 2004; (113-4):
996-1006.
18. Tamimi NA, Ellis P. Drug development: from concept to marketing!. *Nephron
Clin Pract* 2009; 113(3): 125-31.
19. Cowan CC. The Process of evaluating and regulating a new drug: phases of
a drug study. *AANA Journal* 2002; 70(5): 385-90.
20. Diener RM. Safety Assessment of Pharmaceuticals. In: Williams PD,
Hottendorf GH, editors. *Comprehensive Toxicology, Toxicological Testing
and Evaluation*. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1997. p.3-
16.
21. Ahuja S. Impurities Evaluation of Pharmaceuticals. 1st ed. New York: Marcel
Dekker; 1998. p.1-16.
22. Jacobson-Kram D, McGovern T. Toxicological overview of impurities in
pharmaceutical products. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59(1): 38-42.
23. Giordani A, Kobel W, Gally HU. Overall impact of the regulatory
requirements for genotoxic impurities on the drug development process. *Eur
J Pharm Sci* 2011; 43(1-2): 1-15.

24. Basak AK, Raw AS, Al Hakim AH, Furness S, Samaan NI, Gill DS, et al. Pharmaceutical impurities: regulatory perspective for Abbreviated New Drug Applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59(1): 64-72.
25. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Quality Guidelines, Q3D, Impurities: Guideline for Metal Impurities. (Step 2b). 2013.
26. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on the Specification Limits for Residues of Metal Catalysts or Metal Reagents. 2008.
27. Hussain S, Liba A, McCurdy E. Validating ICP-MS for the Analysis of Elemental Impurities According to Draft USP General Chapters <232> and <233> [internet]. 2011 [cited 02.06.2013]. Available from: URL: <http://www.spectroscopyonline.com/spectroscopy/Articles/Validating-ICP-MS-for-the-Analysis-of-Elemental-Im/ArticleStandard/Article/detail/749104>
28. Delaney EJ. An impact analysis of the application of the threshold of toxicological concern concept to pharmaceuticals. *Regul Toxicol Pharmacol* 2007; 49(2): 107-24.
29. Pozniak A, Müller L, Salgo M, Jones JK, Larson P, Tweats D. Elevated ethyl methanesulfonate (EMS) in nelfinavir mesylate (Viracept, Roche): overview. *AIDS Res Ther* 2009; 6:18.
30. Müller L, Mauthe RJ, Riley CM, Andino MM, Antonis DD, Beels C, et. al. A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity. *Regul Toxicol Pharmacol* 2006; 44(3): 198-211.
31. Ogilvie R, Teasdale A. Historical overview of the development of genotoxic impurities guidelines and their impact. In: Teasdale A, editor. *Genotoxic Impurities: Strategies for Identification and Control*. 1st ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2010. p.3-26.
32. Kroes R, Renwick AG, Cheeseman M, Kleiner J, Mangelsdorf I, Piersma A, et al. Structure-based thresholds of toxicological concern (TTC): guidance for application to substances present at low levels in the diet. *Food Chem Toxicol* 2004; 42(1): 65-83.

33. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use, Safety Working Party. Question & Answers on the CHMP Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities. (Rev. 1). 2008.
34. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use, Safety Working Party. Question & Answers on the CHMP Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities. (Rev. 3). 2010.
35. European Medicines Agency, Committee on Herbal Medicinal Products. Guideline on the Assessment of Genotoxicity of Herbal Substances/Preparations. 2008.
36. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use. The Potential Risks of Carcinogens, Mutagens and Substances Toxic to Reproduction When These Substances Are Used As Excipients of Medicinal Products for Human Use. 2007.
37. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Safety Guidelines, S9, Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals. (Step 4). 2009.
38. Brigo A, Müller L. Development of the Threshold of Toxicological Concern Concept and Its Relationship to Duration of Exposure. In: Teasdale A, editor. Genotoxic Impurities: Strategies for Identification and Control. 1st ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2010. p. 27-63.
39. Scheuplein R, Charnley G, Dourson M. Differential Sensitivity of Children and Adults to Chemical Toxicity I. Biological Basis, Regul Toxicol Pharmacol 2002; 35(3): 429-47.
40. Counter SA, Buchanan LH. Mercury exposure in children: a review. Toxicol Appl Pharmacol 2004; 198(2): 209-30.
41. Ginsberg G, Hattis D, Miller R, Sonawane B. Pediatric pharmacokinetic data: implications for environmental risk assessment for children. Pediatrics 2004; 113(4): 973-83.
42. World Health Organisation. Environmental Health Criteria 237, Principles for Evaluating Health Risks In Children Associated With Exposure To Chemicals. Geneva: WHO Press; 2006.
43. Environmental Protection Agency. Supplemental Guidance for Assessing Susceptibility from Early-Life Exposure to Carcinogens. 2005.

44. Sun C, Wu J, Wang D, Pan Y. Characterization of a novel impurity in bulk drug eprosartan by ESI/MS(n) and NMR. *J Pharm Biomed Anal* 2010; 51(3): 778-83.
45. Srinivasa Rao M, Rao SV, Srinivasa Rao DV, Bharathi Ch, Rajput P, Sharma HK. Identification and characterization of new impurities in rivastigmine. *Pharmazie* 2010; 65(5): 336-8.
46. Raj TJ, Bharati CH, Rao KR, Rao PS, Narayan GK, Parikh K. Identification and characterization of degradation products of dicloxacillin in bulk drug and pharmaceutical dosage forms. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 43(4): 1470-5.
47. Lalitha Devi M, Chandrasekhar KB. A validated stability-indicating RP-HPLC method for levofloxacin in the presence of degradation products, its process related impurities and identification of oxidative degradant. *J Pharm Biomed Anal* 2009; 50(5): 710-7.
48. Liu DQ, Chen TK, McGuire MA, Kord AS. Analytical control of genotoxic impurities in the pazopanib hydrochloride manufacturing process. *J Pharm Biomed Anal* 2009; 50(2): 144-50.
49. Görög S. New safe medicines faster: the role of analytical chemistry. *Trends Analyt Chem* 2003; 22(7): 407–15.
50. Roy A, Nyarady S, Matchett M. Genotoxic and non-genotoxic impurities in pharmaceuticals, Current regulations, status and trend. *Chim Oggi* 2009; 27(2): 19-23.
51. Sherikar OD, Mehta PJ, Khatri DM. Various approaches for impurity profiling of pharmaceuticals -An overview. *JPR* 2011; 4(6): 1937-42.
52. Abernethy DR, Destefano AJ, Cecil TL, Zaidi K, Williams RL, USP Metal Impurities Advisory Panel. Metal impurities in food and drugs. *Pharm Res* 2010; 27(5): 750-5.
53. Nageswara Rao R, Nagaraju V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 33(3): 335-77.
54. Gündüz T. *İnstrümental Analiz*. 6. baskı. Ankara: Gazi kitabevi;2002.s.1225-76.

55. Mills K. Molecular Analysis of Cancer: An Overview. In: Boulton J, Fidler C, editors. Molecular Analysis of Cancer. 1st ed. New Jersey: Humana Press; 2002. p. 1-5.
56. Oldham JW. Genetic Toxicology. In: Williams PD, Hottendorf GH, editors. Comprehensive Toxicology, Toxicological Testing and Evaluation. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1997. p. 133-44.
57. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Safety Guidelines, S2(R1), Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. (Step 4). 2011.
58. Klein CB, Broday L, Costa M. Assays for Detecting Chromosomal Aberrations. Curr Protoc Toxicol [serial online] 2001- May [03.10.2012]; 3.7: [16]. Available from: URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471140856.tx0307s03/abstract>
59. Miller EC, Miller JA. Mechanisms of chemical carcinogenesis. Cancer 1981; 47(5): 1055-64.
60. Miller EC, Miller JA. Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. Cancer 1981; 47(10): 2327-45.
61. Tennant RW, Margolin BH, Shelby MD, Zeiger E, Haseman JK, Spalding J, et al. Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays. Science 1987; 236(4804): 933-41.
62. Zeiger E, Haseman JK, Shelby MD, Margolin BH, Tennant RW. Evaluation of four in vitro genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: confirmation of earlier results with 41 additional chemicals. Environ Mol Mutagen 1990; (16-18): 1-14.
63. Ashby J, Tennant RW. Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP. Mut Res 1991; (257): 229-306.
64. Tennant RW, Ashby J. Classification according to chemical structure, mutagenicity to Salmonella and level of carcinogenicity of a further 39 chemicals tested for carcinogenicity by the U.S. National Toxicology Program. Mut Res 1991; (257): 209-27.

65. Kazius J, McGuire R, Bursi R. Derivation and Validation of Toxicophores for Mutagenicity Prediction. *J Med Chem* 2005; (48): 312-20.
66. Lynch AM, Sasaki JC, Elespuru R, Jacobson-Kram D, Thybaud V, De Boeck M, et al. New and Emerging Technologies for Genetic Toxicity Testing. *Environ Mol Mutagen* 2011; 52(3): 205-23.
67. Sutter A, Amberg A, Boyer S, Brigo A, Contrera JF, Custer LL, et al. Use of in silico systems and expert knowledge for structure-based assessment of potentially mutagenic impurities. *Regul Toxicol Pharmacol* 2013; 67(1): 39-52.
68. Zeiger E. Bacterial mutation assays. *Methods Mol Biol* 2013; 1044: 3-26.
69. Ashby J, Tinwell H, Callander RD, Kimber I, Clay P, Galloway SM, et al. Thalidomide: lack of mutagenic activity across phyla and genetic endpoints. *Mutat Res* 1997; 396(1-2): 45-64.
70. Stoltz DR, Bendall RD, Miller CT. Mutagenic effect of nialamide on *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res*. 1976; 40(4): 305-7.
71. Kaur A, Sandhu RS, Grover IS. Screening of azo dyes for mutagenicity with Ames/*Salmonella* assay. *Environ Mol Mutagen* 1993; 22(3): 188-90.
72. Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 1975; 31(6): 347-64.
73. Green MH, Muriel WJ. Mutagen testing using TRP⁺ reversion in *Escherichia coli*. *Mutat Res* 1976; 38(1): 3-32.
74. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Guideline for Testing of Chemicals: No:471- Bacterial Reverse Mutation Test. 1997.
75. Environmental Protection Agency. Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.5100- Bacterial Reverse Mutation Test. 1998.
76. Mortelmans K, Zeiger E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res*. 2000; 455(1-2): 29-60.
77. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 1983; 113(3-4): 173-215.
78. Mortelmans K, Riccio ES. The bacterial tryptophan reverse mutation assay with *Escherichia coli* WP2. *Mutat Res* 2000; 455(1-2): 61-9.

79. Mccann J, Ames BN. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion. *Proc Nat Acad Sci USA* 1976; 73(3): 950-4.
80. Kirkland D, Aardema M, Henderson L, Müller L. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutat Res* 2005; 584(1-2): 1-256.
81. Zeiger E. Carcinogenicity of mutagens: predictive capability of the Salmonella mutagenesis assay for rodent carcinogenicity. *Cancer Res* 1987; 47(5): 1287-96.
82. Flamand N, Meunier J, Meunier P, Agapakis-Caussé C. Mini mutagenicity test: a miniaturized version of the Ames test used in a prescreening assay for point mutagenesis assessment. *Toxicol In Vitro* 2001; 15(2): 105-14.
83. Gatehouse D. Detection of mutagenic derivatives of cyclophosphamide and a variety of other mutagens in a "microtitre" fluctuation test, without microsomal activation. *Mutat Res* 1978; 53(3): 289-96.
84. Flückiger-Isler S, Kamber M. Direct comparison of the Ames microplate format (MPF) test in liquid medium with the standard Ames pre-incubation assay on agar plates by use of equivocal to weakly positive test compounds. *Mutat Res* 2012; 747(1): 36-45.
85. Kamber M, Flückiger-Isler S, Engelhardt G, Jaeckh R, Zeiger E. Comparison of the Ames II and traditional Ames test responses with respect to mutagenicity, strain specificities, need for metabolism and correlation with rodent carcinogenicity. *Mutagenesis* 2009; 24(4): 359-66.
86. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Guideline for Testing of Chemicals: No:473- In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test. 1997.
87. Abu-Absi NR, Srienc F. Instantaneous evaluation of mammalian cell culture growth rates through analysis of the mitotic index. *J Biotechnol* 2002; 95(1): 63-84.
88. Muehlbauer PA, Schuler MJ. Measuring the mitotic index in chemically-treated human lymphocyte cultures by flow cytometry. *Mutat Res* 2003; 537(2): 117-30.

89. Roberts DJ, Spellman RA, Sanok K, Chen H, Chan M, Yurt P, et al. Interlaboratory assessment of mitotic index by flow cytometry confirms superior reproducibility relative to microscopic scoring. *Environ Mol Mutagen* 2012; 53(4): 297-303.
90. Hagmar L, Brøgger A, Hansteen IL, Heim S, Høgstvedt B, Knudsen L, et al. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res* 1994; 54(11): 2919-22.
91. Park BK, Kitteringham NR, Maggs JL, Pirmohamed M, Williams DP. The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 177-202.
92. Hakura A, Shimada H, Nakajima M, Sui H, Kitamoto S, Suzuki S, Satoh T. Salmonella/human S9 mutagenicity test: a collaborative study with 58 compounds. *Mutagenesis* 2005; 20(3): 217-28.
93. Global Initiative for Asthma (GINA). Global Strategy for Asthma Management and Prevention. 2012.
94. Türk Toraks Derneği. Türkiye’de Temel Akciğer Sağlığı Sorunları ve Çözüm Önerileri. (Beyaz Kitap). Ankara: Sentez Matbaacılık ve Yayıncılık; 2010.
95. Childhood Asthma Management Program Research Group. The Childhood Asthma Management Program (CAMP): design, rationale, and methods. *Control Clin Trials* 1999; 20(1): 91-120.
96. World Health Organization. Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach. Switzerland: WHO Press; 2007.
97. Global Initiative for Asthma (GINA), Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. Global Burden of Asthma: GINA Dissemination Committee Report. 2004.
98. T.C. Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Türkiye Kronik Hava Yolu Hastalıklarını (ASTIM-KOAH) Önleme ve Kontrol Programı, 2009-2013 Eylem Planı. Ankara: Anıl Matbaacılık; 2009.
99. T.C. Sağlık Bakanlığı, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı. Türkiye Hastalık Yüğü Çalışması (2004). Ankara: Aydoğdu Ofset Matbaacılık; 2006.
100. Beyhun NE, Çilingiroğlu N. Hastalık maliyeti ve astım. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi* 2004; 52(4): 386-92.

101. Celik GE, Bavbek S, Paşaoğlu G, Mungan D, Abadoğlu O, Harmanci E, et al. Direct medical cost of asthma in Ankara, Turkey. *Respiration* 2004; 71(6): 587-93.
102. U.S. National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Asthma Education and Prevention Program. Expert Panel Report 3: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma Full Report. 2007.
103. Ishmael FT. The inflammatory response in the pathogenesis of asthma. *J Am Osteopath Assoc* 2011; 111(11-7): 11-7.
104. Global Initiative for Asthma (GINA). Global Strategy for the Diagnosis and Management of Asthma in Children 5 Years and Younger. 2008.
105. Garcia-Marcos L, Schuster A. New perspectives for asthma treatment: Anti-leukotriene drugs. *Pediatr Allergy Immu* 1999; 10(2): 77–88.
106. Accolate (zafirlukast) tablet, Detailed View: Safety Labeling Changes Approved by FDA-CDER [online]. 2011 [cited 20.07.2013]. Available from: URL:
<http://www.fda.gov/safety/medwatch/safetyinformation/ucm220134.htm>
107. Park JS, Jang AS, Park SW, Lee YM, Uh ST, Kim YH, et al. Protection of leukotriene receptor antagonist against aspirin-induced bronchospasm in asthmatics, *Allergy Asthma Immunol Res* 2010; 2(1): 48-54.
108. Gideroglu K, Polat M, Firat T, Kukner A. Uzun süreli ve yüksek doz montelukast kullanımının deri üzerine etkileri: siçanlarda deneysel çalışma. *Türkderm* 2008; 42(4):118-21.
109. Tintinger GR, Feldman C, Theron AJ, Anderson R. Montelukast: more than a cysteinyl leukotriene receptor antagonist? *ScientificWorldJournal* 2010; 10: 2403-13.
110. Full Prescribing Information Singulair [online]. 2013 [cited 19.07.2013]. Available from: URL:
http://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/s/singulair/singulair_pi.pdf
111. Karonen T, Neuvonen PJ, Backman JT. CYP2C8 but not CYP3A4 is important in the pharmacokinetics of montelukast. *Br J Clin Pharmacol* 2012; 73(2): 257-67.
112. Balani SK, Xu X, Pratha V, Koss MA, Amin RD, Dufresne C, et. al. Metabolic Profiles of Montelukast Sodium (Singulair), A Potent Cysteinyl

- Leukotriene₁ Receptor Antagonist, in Human Plasma and Bile, *Drug Metab Dispos* 1997; 25(11): 1282-7.
113. Filppula AM, Laitila J, Neuvonen PJ, Backman JT. Reevaluation of the microsomal metabolism of montelukast: major contribution by CYP2C8 at clinically relevant concentrations. *Drug Metab Dispos* 2011; 39(5): 904-11.
 114. Tomar RS, Joseph TJ, Murthy AS, Yadav DV, Subbaiah G, Krishna Reddy KV. Identification and characterization of major degradation products of risperidone in bulk drug and pharmaceutical dosage forms. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 36(1): 231-5.
 115. Kłaczko G, Anuszevska EL. Determination of impurities in medical products containing metformin hydrochloride. *Acta Pol Pharm* 2010; 67(6): 593-8.
 116. Bansal G, Singh M, Jindal KC, Singh S. LC-UV-PDA and LC-MS studies to characterize degradation products of glimepiride. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 48(3): 788-95.
 117. Khan MA, Sinha S, Vartak S, Bhartiya A, Kumar S. LC determination of glimepiride and its related impurities. *J Pharm Biomed Anal* 2005; 39(5): 928-43.
 118. Zhou H, Tai Y, Sun C, Pan Y. Separation and characterization of synthetic impurities of triclobandazole by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2005; 37(1): 97-107.
 119. Chandra Sekhar BVVN, Ramesh Kumar N, Kalyan Chakravarthy A, Mukkanti K. Synthesis of Montelukast Sodium Via A Nitrile Intermediate; Synthesis and Characterization of Impurities. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2011; 2(3): 417-25.
 120. Bouskova O, Gibala P, Halama A, Jirman J. Specific impurities of montelukast. *European Patent, EP2260025 A2*, 2010.
 121. Overeem A, Ma Van DHDJ. Solid-state montelukast. *PCT Patent, 2005/040123*, 2005.
 122. Al Omari MM, Zoubi RM, Hasan EI, Khader TZ, Badwan AA. Effect of light and heat on the stability of montelukast in solution and in its solid state. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 45(3): 465-71.

123. Saravanan M, Siva Kumari K, Pratap Reddy P, Naidu MN, Moses Babu J, Srivastava AK, et al. Identification, synthesis, isolation and spectral characterization of potential impurities of montelukast sodium. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 48(3): 708-15.
124. Sivri EG. Montelukast Sodyum İçeren Tabletlerde Safsızlık Tayini Ve Yöntem Validasyonu. Yüksek Lisans. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2009.
125. Haidar S, Boettcher S, Al Mardini MA, Hartmann RW. Purity of Five Generic Bulk Montelukast Sodium Using Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Int J Pharm Pharm Sci* 2012; 4(3), 686-90.
126. Bapatu HR, Kumar MR, Garg LK, Venugopal D, Reddy AM. A Validated Stability Indicating UPLC Method for Montelukast Impurities in Montelukast Sodium Oral Granules. *Int J Pharm Bio Sci* 2012; 3(1): 345-55.
127. Goverdhana G, Reddy AR, Srinivas K, Himabindub V, Reddy GM. Identification, characterization and synthesis of impurities of zafirlukast. *J Pharm Biomed Anal* 2009; 49: 895–900.
128. Agarwal SK, Bhatnagar U, Rajesh N. Acute and genotoxic profile of a dimeric impurity of cefotaxime. *Int J Toxicol* 2004; 23(1): 41-5.
129. Vijayan M, Deecaraman M, Pudupalayam KT. In vitro genotoxicity of piperacillin impurity-A. *Afr J Biotechnol* 2007; 6(18): 2074-7.
130. Eichenbaum G, Johnson M, Kirkland D, O'Neill P, Stellar S, Bielawne J, et al. Assessment of the genotoxic and carcinogenic risks of p-nitrophenol when it is present as an impurity in a drug product. *Regul Toxicol Pharmacol* 2009; 55(1): 33-42.
131. Paim CS, Führ F, Barth AB, Gonçalves CE, Nardi N, Steppe M, et al. Gemifloxacin mesylate (GFM) stability evaluation applying a validated bioassay method and in vitro cytotoxic study. *Talanta* 2011; 83(5): 1774-9.
132. Zhu Q, Li T, Li J, Guo M, Wang W, Zhang X. In silico and in vitro genotoxicity evaluation of levofloxacin n-oxide, an impurity in levofloxacin. *Toxicol Mech Methods* 2012; 22(3): 225-30.
133. Meng F, Yan J, Li Y, Fu PP, Fossom LH, Sood RK, et al. Genotoxicity of 2-bromo-3'-chloropropiophenone, *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 270(2): 158-63.

134. Ellis P, Kenyon M, Dobo K. Determination of compound-specific acceptable daily intakes for 11 mutagenic carcinogens used in pharmaceutical synthesis. *Regul Toxicol Pharmacol* 2013; 65(2): 201-13.
135. European Medicine Agency. ICH Q2(R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Note For Guidance on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 1995.
136. Özkan Y, Savaşer A, Taş Ç, Özkan CK, Bayrak Z, Eşim Ö, et al. İlaçların Analiz ve Kalite Kontrollerinde Kullanılan Analitik Yöntemlerin Geçerliliği (Validasyon). 1. Baskı. Ankara: GATA Basımevi; 2011.
137. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry, Q2B, Validation of Analytical Procedures: Methodology. 1996.
138. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Quality Guidelines, Q2(R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005.
139. Food and Drug Administration. Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation: Chemistry, Manufacturing, and Controls and Documentation. 2000.
140. United States Pharmacopeia, General chapter on validation of compendial procedures <1225>, USP32-NF 27, 733, 2009.
141. Stevens JL, Baker TK. The future of drug safety testing: expanding the view and narrowing the focus. *Drug Discovery Today* 2009; 14(3/4): 162-7.
142. Elder DP, Lipczynski AM, Teasdale A. Control and analysis of alkyl and benzyl halides and other related reactive organohalides as potential genotoxic impurities in active pharmaceutical ingredients (APIs). *J Pharm Biomed Anal* 2008; 48(3): 497-507.
143. Humfrey CD. Recent Developments in the Risk Assessment of Potentially Genotoxic Impurities in Pharmaceutical Drug Substances, *Toxicol Sci* 2007; 100(1): 24-8.
144. Aran MR, Karakaya G. Bronş Astımı Tedavisi, *Dahili Tıp Bilim Derg* 2005; 12(3): 130-137.

145. Fernandez E, Perez R, Hernandez A, Tejada P, Arteta M, Ramos JT. Factors and Mechanisms for Pharmacokinetic Differences between Pediatric Population and Adults, *Pharmaceutics* 2011; 3(1): 53-72.
146. Ginsberg G, Hattis D, Sonawane B, Russ A, Banati P, Kozlak M, et. al. Evaluation of child/adult pharmacokinetic differences from a database derived from the therapeutic drug literature. *Toxicol Sci* 2002; 66(2): 185-200.
147. Dorne JL, Renwick AG. The refinement of uncertainty/safety factors in risk assessment by the incorporation of data on toxicokinetic variability in humans. *Toxicol Sci* 2005; 86(1): 20-6.
148. Dourson M, Charnley G, Scheuplein R. Differential sensitivity of children and adults to chemical toxicity II. Risk and regulation. *Regul Toxicol Pharmacol* 2002; 35(3): 448-67.
149. Kovaleski J, Kraut B, Mattiuz A, Giangiulio M, Brobst G, Cagno W, et al. Impurities in generic pharmaceutical development. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59(1): 56-63.
150. International Organization for Standardization, International Electrotechnical Commission. ISO/IEC 17025, International Standard, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 2005.
151. Hrakovsky J, Tenengauzer R, Bogomolny G, Dolitsky Y. Stable pharmaceutical formulations of montelukast sodium, European Patent, EP 1818057B1, 2010.
152. Schneider A, Wessjohann LA. Comparison of impurity profiles of Orlistat pharmaceutical products using HPLC tandem mass spectrometry, *J Pharm Biomed Anal*, 2010; 53(3): 767–72.
153. Taylor PW, Arnet I, Fischer A, Simpson IN. Pharmaceutical Quality of Nine Generic Orlistat Products Compared with Xenical®, *Obes Facts* 2010; 3(4): 231-7.
154. Gasser UE, Fischer A, Timmermans JP, Arnet I. Pharmaceutical quality of seven generic Levodopa/Benserazide products compared with original Madopar / Prolopa, *BMC Pharmacol Toxicol* 2013; 14(1): 24.

155. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry, Safety Testing of Drug Metabolites. 2008.
156. Stavitskaya L, Minnier BL, Benz RD, Kruhlak NL, FDA Center for Drug Evaluation and Research. Development of Improved Salmonella Mutagenicity QSAR Models Using Structural Fingerprints of Known Toxicophores, Society of Toxicology Meeting, San Antonio, TX 2013.
157. Contrera JF. Improved in silico prediction of carcinogenic potency (TD50) and the risk specific dose (RSD) adjusted Threshold of Toxicological Concern (TTC) for genotoxic chemicals and pharmaceutical impurities. *Regul Toxicol Pharmacol* 2011; 59(1): 133-41.
158. Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973; 70(8): 2281-5.
159. Gatehouse DG, Delow GF. The development of a "Microtitre" fluctuation test for the detection of indirect mutagens, and its use in the evaluation of mixed enzyme induction of the liver. *Mutat Res* 1979; 60(3): 239-52.
160. Xenometrix, Mutagenic responses in the Xenometrix Ames MPF PENTA I assay compared to published Ames plate incorporation data [online]. 2013 [cited 02.10.2013]. Available from: URL: http://www.xenometrix.ch/fileadmin/xenometrics/pdf/Penta_I_Reference_Compounds_HP_2.pdf
161. Jurado J, Alejandre-Durán E, Pueyo C. Genetic differences between the standard Ames tester strains TA100 and TA98. *Mutagenesis*. 1993; 8(6): 527-32
162. Kenyon MO, Cheung JR, Dobo KL, Ku WW. An evaluation of the sensitivity of the Ames assay to discern low-level mutagenic impurities. *Regul Toxicol Pharmacol* 2007; 48(1): 75-86.
163. Galloway S, Lorge E, Aardema MJ, Eastmond D, Fellows M, Heflich R, et. al. Workshop summary: Top concentration for in vitro mammalian cell genotoxicity assays; and report from working group on toxicity measures and top concentration for in vitro cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus). *Mutat Res* 2011; 723(2): 77-83.

164. Doherty AT, Hayes J, Holme P, O'Donovan M. Chromosome aberration frequency in rat peripheral lymphocytes increases with repeated dosing with hexamethylphosphoramide or cyclophosphamide. *Mutagenesis* 2012; 27(5): 533-9.
165. Zhang MS, Bang IS, Park CB. Lack of Mutagenicity Potential of *Periplocasepium Bge.* in Bacterial Reverse Mutation (Ames) Test, Chromosomal Aberration and Micronucleus Test in Mice. *Environ Health Toxicol* 2012; 27: e2012014.
166. Asakura K, Satoh H, Chiba M, Okamoto M, Serizawa K, et al. Genotoxicity studies of heavy metals: lead, bismuth, indium, silver and antimony. *J Occup Health* 2009; 51(6): 498-512.
167. Zhu J, Wan X, Zhu Y, Ma X, Zheng Y, Zhang T. Evaluation of salidroside in vitro and in vivo genotoxicity. *Drug Chem Toxicol* 2010; 33(2): 220-6.
168. Williams LD, Burdock GA. Genotoxicity studies on a high-purity rebaudioside A preparation. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47(8): 1831-6.
169. Brüsweiler BJ, Märki W, Wülser R. In vitro genotoxicity of polychlorinated butadienes (Cl4-Cl6). *Mutat Res* 2010; 699(1-2): 47-54.
170. Paz-y-Miño C, Dávalos MV, Sánchez ME, Arévalo M, Leone PE. Should gaps be included in chromosomal aberration analysis? Evidence based on the comet assay. *Mutat Res* 2002; 516(1-2): 57-61.
171. Crump KS, Chen C, Louis TA. The future use of in vitro data in risk assessment to set human exposure standards: challenging problems and familiar solutions. *Environ Health Perspect* 2010; 118(10): 1350-4.
172. Ahuja S. *Impurities Evaluation of Pharmaceuticals*. 1st ed. New York: Marcel Dekker;1998.p.17-41.

10. EKLER

EK-1: Etik Kurul Onayı

GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU DEĞERLENDİRME FORMU				
DEĞERLENDİRME KURULUNUN ADI		Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu		
AÇIK ADRES		Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 06500 Beşevler/Ankara		
TELEFON		0312 202 69 58		
FAKS		0312 202 46 73		
E-POSTA		tipetikkurul@gazi.edu.tr		
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Asthma tedavisinde kullanılan montelukastın safsızlıklarının tayini ve olası genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.İsmet ÇOK		
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ ☐	AKADEMİK AMAÇLI ☐	
		DİĞER ☐	Doktora Tezi ☒	
	İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMA	☒	☐ İLAÇ DIŞI GİRİŞİMSSEL: ☒ İLAÇ DIŞI GİRİŞİMSSEL OLMAYAN (C.3) Rutin takip ve tedavi sırasında elde edilmiş materyallerle yapılan araştırmalar (C.4) hücre ve doku kültürleriyle yapılacak in-vitro çalışmalar	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon No	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİL. GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒		
	SİGORTA	☐		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 90 Toplantı tarihi: 13.04.2011			
	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde Prof.Dr.İsmet Çok'un sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıdaki künyede kayıtlı başvuru bilgileri verilen, Doktora Tezi klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup araştırmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına ve "bütçesi dışında" uygun olduğuna G.Ü.T.F. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir. Etik Kurulun kararı, projenin bütçesi TÜBİTAK tarafından kabul edildiği takdirde yürürlüğe girecek olup, TÜBİTAK kararının Kurulumuza bildirilmesi gerekmektedir.			
ETİK KURUL BİLGİLERİ				
ÇALIŞMA ESASI	Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesinin son versiyonu, İyi Klinik Uygulamaları (Uluslararası ICH-GCP,) İKU kılavuzu ve bununla ilgili 2001/20/EC ve 2005/28/EC sayılı Avrupa Birliği direktifleri, Biyoloji ve Tıbbın uygulanması bakımından İnsan Hakları ve İnsan haysiyetinin korunması sözleşmesi ve İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin onaylanmasının uygun bulunduğu dair kanun (9.12.2003 tarihli 25311 sayılı Resmi Gazete), 2547 sayılı Yükseköğretim Kanunu (06.11.1981 tarihli 17506 sayılı Resmi Gazete).			
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof.Dr.Canan ULUOĞLU				

EK-2: Teşekkür

Tez dönemim boyunca desteğini, sabrını ve deneyimlerini esirgemeyen danışmanım Sayın Prof.Dr. İsmet ÇOK'a,

Tez izleme komitemde bulunan ve çalışmaya yön veren fikirlerini paylaşan Sayın Prof.Dr. Sema BURGAZ ve Sayın Prof.Dr. Tuncer DEĞİM'e,

Laboratuvarlarını, bilgi ve deneyimlerini paylaşarak bana kazandırdıkları alt yapıdan oldukça yararlandığım Hacettepe Üniversitesi'nden Sayın Prof.Dr. Nuran DİRİL'e ve değerli öğrencilerine,

Doktora eğitimim süresince büyük yardımlarını gördüğüm ve deneyimlerinden yararlandığım Sayın Doç.Dr. Gonca ÇAKMAK DEMİRCİGİL'e

Aynı ortamda çalışmaktan mutluluk duyduğum Sayın Doç.Dr. Ela KADIOĞLU'na,

Verilerin yorumlanması ve çalışma sırasında karşılaştığım sorunların çözülmesinde zaman ayırarak değerli fikirlerini esirgemeyen Sayın Dr. Andrew TEASDALE, Sayın Dr. Lutz MUELLER, Sayın Dr. Errol ZEIGER, Sayın Dr. Sheila GALLOWAY ve Sayın Dr. Sini FLUCKIGER'e,

Fakülte laboratuvarlarının tadilatı sırasında bir süre MOBAM'da çalışma olanağı sağlayan Sayın Prof.Dr. Belma ASLİM'a ve bu süreçte yardımlarını esirgemeyen Uzm. Esra GÜNDÜZER'e,

Çalışmalarım süresince desteklerinden dolayı sevgili eşim Özgür Doğaç GÜRSEL ve başta annem Yasemin EMERCE olmak üzere aileme teşekkürlerimi sunarım.

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Esra

Soyadı: EMERCE GÜRSEL

Doğum Yeri ve Tarihi: İzmit / 1983

Eğitimi:

2009 - 2010 Bradford Üniversitesi, Yaşam Bilimleri, Biyomedikal Bilimler Bölümü, Bradford, İngiltere, Ziyaretçi Öğrenci

2007 - 2013 Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi, Toksikoloji Anabilim Dalı, Doktora Programı

2004 - 2007 Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi, Toksikoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Programı

2000 - 2004 Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Lisans Programı

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:

- Türk Toksikoloji Derneği (TTD); www.turktox.org.tr
- European Societies of Toxicology (EUROTOX); www.eurotox.com
- International Union of Toxicology (IUTOX); www.iutox.org
- Moleküler Kanser Araştırma Derneği (MOKAD); www.mokad.org
- European Association for Cancer Research (EACR); www.eacr.org
- İlaç Araştırmacıları ve Uygulayıcıları Derneği; www.ilarud.org

Yüksek Lisans Tezi:

“DNA onarım enzimi OGG1 Ser326Cys polimorfizmi ile akciğer kanseri ilişkisinin Türk popülasyonunda araştırılması ve oksidatif hasarın biyogöstergesi 8-OHdG ölçümü” Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara, Temmuz 2007.

Bilimsel Etkinlikleri:

BURS

21 Eylül 2009 – 22 Ocak 2010 Biyomedikal Bilimler Bölümü, Yaşam Bilimleri, Bradford Üniversitesi, Bradford, İngiltere, **Hayat Boyu Öğrenme Programı / Erasmus Öğrenci Öğrenim Hareketliliği, Doktora çalışması**, 2009 - 2010 güz dönemi, Prof. Dr. Diana Anderson'ın Genetik ve Üreme Toksikolojisi Laboratuvarı.

ÖDÜL

- **Poster sunum ikincilik ödülü**, “5th International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations” isimli toplantıda “hOGG1 Ser326Cys Polymorphism and Lung Cancer Susceptibility in Turkish Population” konulu bildiri, 20-24 Mayıs 2007, Antalya, Türkiye.
- **Kongre destek ödülü**, ICEM (International Conference on Environmental Mutagens) Burs Komitesi, 10th International Conference on Environmental Mutagens, 20 – 25 Ağustos 2009, Floransa, İtalya.
- **IUTOX Genç Toksikolog Ödülü**, IUTOX (International Union of Toxicology) Ödül Komitesi, 8th Congress of Toxicology in Developing Countries, 10-13 Eylül 2012, Bangkok, Tayland.
- **Bildiri dalında üçüncülük ödülü**, Çocuk Alerji ve Astım Akademisi Derneği, “8.Ulusal Çocuk Astım ve Solunum Yolları Hastalıkları Kongresi” isimli toplantıda “Astım tedavisinde montelukast etkin maddesi içeren ilaçlarda safsızlıkların miktar tayinleri ve karşılaştırılması” konulu bildiri, 24-27 Nisan 2013, İzmir, Türkiye.
- **Kongre Destek Ödülü**, EUROTOX (European Societies of Toxicology) Ödül Komitesi, 49th Congress of the European Societies of Toxicology, 01-04 Eylül 2013, Interlaken, İsviçre.

PROJELER

1. “Akciğer Kanseri ve DNA Onarım Enzimi OGG1 Ser326Cys Polimorfizmi İlişkisinin Türk Populasyonunda Araştırılması” **Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi**, Proje kodu:02/2006-12, araştırmacı (tamamlandı – Aralık 2007)
2. “Miyokardiyal iskemi-reperfüzyonunda oksidatif DNA hasarının comet yöntemi ile araştırılması” **Türkiye Bilimler Akademisi tarafından desteklenen L’OREAL Genç Bilim Kadınlarına Destek Bursları**, araştırmacı (tamamlandı – Ocak 2008)
3. “Miyokardiyal iskemi reperfüzyonunda oksidatif DNA hasarının hOGG1 DNA onarım enzimi polimorfizmi ile ilişkisinin araştırılması” **TÜBİTAK projesi (1001)**, Proje kodu: 106S176 (SBAG-3424), araştırmacı / gerçekleştirme görevlisi (tamamlandı – Eylül 2008)
4. “Titanyum alaşımlı endoosseoz implant veya mini plak uygulanan hastalarda genotoksik etkilerin mikroçekirdek yöntemi ile araştırılması”, **Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi**, Proje kodu:02/2009-08, araştırmacı (tamamlandı – Aralık 2011)
5. “Hipertansiyon tedavisinde kullanılan hidroklorotiyazidin safsızlığının olası genotoksik etkisinin değerlendirilmesi” **Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi**, Proje kodu: 02/2011-05, araştırmacı (tamamlandı – Temmuz 2013)
6. “Astım tedavisinde kullanılan montelukastın safsızlıklarının tayini ve olası genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi” **TÜBİTAK projesi (1001)**, Proje kodu: 111T506 (TBAG), bursiyer / gerçekleştirme görevlisi (devam ediyor)

**ATIF DİZİNLERİNE (SCI) KAYNAK TEŞKİL EDEN DERGİLERDE
YAYIMLANMIŞ MAKALELER**

1. Karahalil B, Coskun E, Emerce E. **ADRA2A polymorphism and smoking in Turkish population.** Toxicol Ind Health. 24(3):171-6, 2008.
2. Karahalil B, Emerce E, Koçer B, Han S, Alkiş N, Karakaya AE. **The association of OGG1 Ser326Cys polymorphism and urinary 8-OHdG levels with lung cancer susceptibility: a hospital-based case-control study in Turkey.** Arh Hig Rada Toksikol. 59(4):241-50, 2008.
3. Karahalil B, Gumus T, Emerce E, Izdes S, Kanbak O, Kesimci E. **Comet assay in evaluating DNA damage associated with ischaemia-reperfusion injury in patients undergoing coronary surgery.** Arh Hig Rada Toksikol. 60(3):307-152, 2009.
4. Karahalil B, Kesimci E, Emerce E, Gumus T, Kanbak O. **The impact of OGG1, MTH1 and MnSOD gene polymorphisms on 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and cellular superoxide dismutase activity in myocardial ischemia-reperfusion.** Mol Biol Rep 38(4):2427-35, 2011.
5. Karahalil B, Emerce E, Kocabaş NA, Akkaş E. **Associations between GSTM1 and OGG1 Ser326Cys polymorphisms and smoking on chromosomal damage and birth growth in mothers.** Mol Biol Rep. 38(5):2911-8, 2011.
6. Gopalan RC, Emerce E, Wright CW, Karahalil B, Karakaya AE, Anderson D. **Effects of the anti-malarial compound cryptolepine and its analogues in human lymphocytes and sperm in the Comet assay.** Toxicol Lett. 207(3):322-5, 2011.
7. Karahalil B, Kadioglu E, Tuzuner-Oncul AM, Cimen E, Emerce E, Kisnisci RS. **Micronucleus assay assessment of possible genotoxic effects in patients treated with titanium alloy endosseous implants or miniplates.** Mutat Res. 2013 (doi: 10.1016/j.mrgentox.2013.10.005.)

HAKEMLİ DERGİLERDE YAYIMLANMIŞ MAKALELER

1. Cakmak Demircigil G, **Emerce E**, Ulutas OK. **Genotoxicity Tests from Biomarker Studies to the Regulations: National Perspective**, *FABAD J. Pharm. Sci.* 34, 217–232, 2009.
2. Cok I and **Emerce E**. **Overview of impurities in pharmaceuticals: Toxicological aspects**, *Asian Chemistry Letters* 16(1), 87-97, 2012.

ULUSLARARASI KONGRELERDE SUNULMUŞ BİLDİRİLER

1. **Emerce E***, Karahalil B, Akkaş E, Kocabaş NA. **Effect of the GSTM1 Polymorphism on the Relationship Between Maternal Exposure to Environmental Tobacco Smoke and Neonatal Birth Weight**, 6th International Congress of Turkish Society of Toxicology, the theme of the meeting is “Chemical Safety and Toxicology”, 2-5 November 2006, Antalya, Turkey, page:187.
2. **Emerce E***, Karahalil B, Koçer B, Han S, Alkış N, Karakaya AE. **hOGG1 Ser326Cys Polymorphism and Lung Cancer Susceptibility in Turkish Population**, 5th International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations, 20-24 May 2007, Antalya, Turkey, page:73.
3. Karahalil B, Yikan A, **Emerce E**, Alkış N. **Association of the OGG1 Ser326Cys Polymorphism With Gynecologic Cancer Risk**, 11th International Congress of Toxicology, the theme of the meeting is “Toxicology: Discovery Serving Society”, 15-19 July 2007, Montreal, Canada, PM2.058.
4. **Emerce E***, Karahalil B, Koçer B, Han S, Alkış N, Karakaya AE. **hOGG1 Ser326Cys Polymorphism and Lung Cancer Susceptibility in Turkish Population**, 44th Congress of the European Societies of Toxicology, the theme of the meeting is “Missing Links”, 7-10 October

2007, Amsterdam, The Netherlands, *Toxicology Letters*, 172, S174-S174, 2007.

5. Karakaya AE, Karahalil B, **Emerce E**, Kocer B, Han S, Alkis N. **Association of the OGG1 Ser326Cys Polymorphism With Lung Cancer Risk In A Turkish Population**, 47th Annual Meeting and ToxExpo, Society of Toxicology, the themes of the meeting are “Developmental Basis of Disease, Oxidative Signaling and Redox Biology, Nanotechnology, and Stem Cell Biology and Toxicology”, 16-20 March 2008, Seattle, America, No: 404.

6. **Emerce E***, Karahalil B, Akkaş E, Kocabaş NA. **Maternal Smoking Effects on Neonatal Birth Growth and Its Association with Maternal GSTM1 and OGG1 Polymorphisms**, 3rd EACEH - Euro-Asian Conference on Hazardous Waste & Human Health, 27-30 March 2008, İstanbul, Turkey, page: 62.

7. **Emerce E***, Karahalil B, Gumus T, Izdes S, Kanbak O, Kesimci E. **The Effects of Ischemia/Reperfusion Injury on Lactate Levels and DNA Damage in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Graft Surgery**, 38th Annual Meeting of Environmental Mutagen Society, the theme of the meeting is “Environmental Mutagens and Human Health”, 21 – 25 September 2008, Cavtat, Croatia, page: 127.

8. **Emerce E***, Karahalil B, Coskun E. **Alpha-2A Adrenergic Receptor Gene (ADRA2A) Polymorphism In Turkish Population**, 45th Congress of the European Societies of Toxicology, the theme of the meeting is “From Toxins to Omics: Health, Safety and Well-being”, 5 - 8 October 2008, Rhodes, Greece, page:81.

9. Karahalil B, **Emerce E**, Gumus T, Izdes S, Kanbak O, Kesimci E. **The Alkaline Comet Assay as Biomarker in Assessment of DNA Damage After Ischemia-Reperfusion Injury in Patients Undergoing Coronary Surgery**, 45th Congress of the European Societies of Toxicology, the

theme of the meeting is “From Toxins to Omics: Health, Safety and Well-being”, 5 - 8 October 2008, Rhodes, Greece, page:83.

10. **Emerce E***, Karahalil B, Kesim E, Gümüş T, Kanbak O. **Association of the OGG1 Ser326Cys Polymorphism with Oxidative DNA Damage in Myocardial Ischemia-Reperfusion**, 9th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 23 – 26 June 2009, Ankara, Turkey, page: 398.

11. **Emerce E***, Karahalil B, Kesim E, Gümüş T, Kanbak O. **The Roles of DNA Gene Polymorphisms and Antioxidant Activity in Ischemia – Reperfusion Status in Clinic**, 10th International Conference on Environmental Mutagens, the theme of the meeting is “The Renaissance of Environmental Mutagenesis”, 20 – 25 August 2009, Florence, Italy, page: 254.

12. Karahalil B, Kadioglu E, Tuzuner-Oncul AM, Cimen E, **Emerce E**, Kisinisci RS. **Assessment of genotoxic effects in patients treated with titanium alloy endosseous implants or miniplates by micronucleus assay**, 12nd International Congress of Toxicology, 19–23 July 2010, Barcelona, Spain, *Toxicology Letters*, 196(S), S162-S162, 2010.

13. **Emerce E***, Cok I, Sari S, Bostanci O. **Mutagenicity Evaluation of The Hydrochlorothiazide Impurity, 4-Amino-6-Chloro-1, 3-Benzenedisulfonamide, In Ames Test**, 8th Congress of Toxicology in Developing Countries, the theme of the meeting is “Sharing Toxicological Knowledge for Healthy Life & Environment”, 10-13 September 2012, Bangkok, Thailand, page: 76.

14. **Emerce E***, Cok I, Degim IT. **Quantification of Impurities in Commercial Drug Products Containing Montelukast and Evaluation of the Impurities' Cytotoxic Effects**. 49th Congress of the European Societies of Toxicology, the theme of the meeting is “New Frontiers in Safety Sciences”, 1 – 4 September 2013, Interlaken, Switzerland, *Toxicology Letters*, 221(S), S95-S95, 2013.

15. Cok I, **Emerce E**, Sari S, Bostanci O. **The Mutagenic Potential Assessment of the Major Impurity of Hypertension Drug Hydrochlorothiazide**, 49th Congress of the European Societies of Toxicology, the theme of the meeting is “New Frontiers in Safety Sciences”, 1 – 4 September 2013, Interlaken, Switzerland, *Toxicology Letters*, 221(S), S96-S96, 2013.

**Tarafımca sunulmuştur.*

ULUSAL KONGRELERDE SUNULMUŞ BİLDİRİLER

1. **Emerce E***, Karahalil B, Kesim E, Gümüş T, Kanbak O, **Koroner Arter Bypass Graftleme Cerrahisine Bağlı İskemi Reperfüzyonda Bireysel Duyarlılığın Oksidatif Hasar Üzerine Etkisi**, “İnsan Sağlığı ve Çevrenin Korunmasında Toksikolojinin Rasyonel Kullanımı” konulu 7. Uluslararası Katılımlı Türk Toksikoloji Derneği Kongresi, 30 Mayıs – 1 Haziran 2009, Ankara, Türkiye, sayfa: 87.
2. **Emerce E***, Cok I, Sari S, Bostanci O. **İlaç Safsızlıklarının Olası Kanseri Risklerinin Değerlendirilmesi I. Hipertansiyon Tedavisinde Kullanılan Hidroklorotiyazidin Safsızlığının (4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfonamid) Mutajenik Aktivitesinin Araştırılması**, IV. Multidisipliner Kanseri Araştırma Kongresi, 13-16 Aralık 2012, Bursa, Türkiye, P-35.
3. Çok İ, **Emerce E***, Değim İT. **Astım tedavisinde montelukast etkin maddesi içeren ilaçlarda safsızlıkların miktar tayinleri ve karşılaştırılması**. 8. Ulusal Çocuk Astım ve Solunum Yolları Hastalıkları Kongresi, 24-27 Nisan 2013, İzmir, Türkiye, PS-12.

**Tarafımca sunulmuştur.*

ULUSLARARASI KONGRELERDE SUNULMUŞ SÖZLÜ BİLDİRİLER

1. **Emerce E***, Çok İ, Değim İT. **Determination of the Impurities in Drug Products Containing Montelukast Which Is Used in Asthma Therapy and Genotoxicological Evaluation of Sulfoxide Impurity**, International Multidisciplinary Symposium on Drug Research & Development, 28-30 November 2013, Antalya, Turkey, page:52.

**Taraşımca sunulmuştur.*