

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DORİPENEM'İN GENOTOKSİK ETKİSİNİN SİTOGENETİK VE
MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI**

ONUR BOZKURT

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

2016

T.C.
ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DORİPENEM'İN GENOTOKSİK ETKİSİNİN SİTOGENETİK VE
MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI**

Onur BOZKURT
Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Ana Bilim Dalı

Bu tez 14/07/2016 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI
BAŞKAN (DANIŞMAN)

Doç.Dr.Ahmet KAYRALDIZ
ÜYE

Yrd.Doç.Dr.Deniz TAŞTEMİR KORKMAZ
ÜYE

Doç. Dr. Ramazan GÜRBÜZ
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: FEFYL/2014-0004

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DORİPENEM'İN GENOTOKSİK ETKİSİNİN SİTOGENETİK VE MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI

Onur BOZKURT
Adıyaman Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI
İkinci Danışman : Doç. Dr. Süleyman BAYRAM
Yıl: 2016, Sayfa sayısı: 68

Jüri : Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI
Doç. Dr. Ahmet KAYRALDIZ
Yrd.Doç.Dr.Deniz TAŞTEMİR KORKMAZ

Bu çalışma Doripenem (DRP)'in genotoksik etkisinin hem sitogenetik hemde moleküler yöntemlerle araştırılması amacıyla yapılmıştır. Sitogenetik yöntem olarak kısa süreli genotoksisite testleri olan kromozom anormalliği (KA) ve mikronükleus (MN) testleri kullanılmış, moleküler yöntemlerden ise RAPD-PCR tekniği uygulanmıştır. İnsan periferik lenfositleri 100 µg/ml, 200 µg/ml ve 400 µg/ml DRP ile 24 ve 48 saat boyunca muamele edilmişlerdir. DRP kromozom anormalliği ve mikronükleus frekanslarını artırmamış, ayrıca sitotoksik etki de göstermemiştir. Fakat RAPD-PCR çalışmasında elde edilen polimorfik band sayılarını artırmış ve genomik kalıp stabilite (GKS) oranlarını özellikle 48 saatlik muamele süresinde düşürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Kromozom anormalliği, mikronükleus, genotoksisite, RAPD PCR

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE GENOTOXIC EFFECTS OF DORIPENEM AT CYTOGENETIC AND MOLECULAR LEVELS

Onur BOZKURT
Adiyaman University
Institute of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI
Co-Supervisor : Assoc.Prof.Dr. Süleyman BAYRAM
Year: 2016, Pages: 68

Jury : Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI
Assoc. Prof. Dr. Ahmet KAYRALDIZ
Ass. Prof. Dr. Deniz TAŞTEMİR KORKMAZ

The aim of this study was to investigate the genotoxic effects of doripenem (DRP) using both cytogenetic and molecular test systems. The chromosome aberration (CA) and micronucleus (MN) methods were used as the cytogenetic tests and RAPD-PCR method was used as the molecular test. The human peripheral lymphocytes were treated with 100 µg/ml, 200 µg/ml and 400 µg/ml concentrations of DRP for 24 and 48 hours treatment periods. DRP did not induce the chromosome aberrations and micronucleus frequencies at all concentrations and treatment periods and it was not showed any cytotoxic effect. However, DRP increased the polymorphic bands and decreased the ratio of genomic template stability especially at 48 hour treatment period.

Key Words: Chromosome aberration, micronucleus, genotoxicity, RAPD-PCR

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve bütün çalışmalarım boyunca bana rehber olan, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI'na ve ikinci danışman hocam Sayın Doç. Dr. Süleyman BAYRAM'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yardımlarından dolayı saygıdeğer hocalarım, Doç. Dr. Ahmet GENÇ'e, Doç. Dr. Yusuf SEVGİLER'e ve Prof. Dr. E. Rıdvan SIVACI'ya ayrıca teşekkür ederim.

Desteklerinden dolayı biyolog Mahmut Arık'a, biyolog Ferit Gikli'ye, biyolog Nurettin Akgün'e, biyolog Özge Buket Demirdağ'a ve biyolog Sevgi Başalan'a teşekkürü bir borç bilirim.

Projemizi maddi yönden destekleyen Adıyaman Üniversitesi Araştırma Fonu personellerine de teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	12
2.1. Nitroimidazol Türevi Antibiyotiklerle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	12
2.2. β -laktam Antibiyotiklerle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	13
2.3. Makrolid Grubu Antibiyotiklerle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	14
2.4. Kinolon Grubu Antibiyotiklerle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	15
2.5. Rifamisin Grubu Antibiyotiklerle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	16
2.6. Sefalosporin Grubu Antibiyotiklerle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	16
2.7. Tetrasiklin Grubu Antibiyotiklerle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	17
2.8. Antrasiklin Grubu Antibiyotiklerle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	18
2.9. Antileprotik Antibiyotiklerle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	19
2.10. Antitüberküloz Antibiyotiklerle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	20
2.11. Aurefungin İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	20
2.12. Bleomisin İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	21
2.13. Sülfametoksazol Ve Trimetoprim İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	21
2.14. Kloramfenikol İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	21
3. MATERYAL VE METOD.....	22
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları.....	22
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	22
3.1.1.1. Doripenem.....	22
3.1.1.1.1. Doripenem'in kullanım alanları.....	22
3.1.1.1.2. Doripenem'in biyolojik metabolizması.....	23
3.1.1.1.3. Doripenem'in özellikleri.....	23

3.1.1.2. Etil metan sülfonat.....	23
3.1.1.3. Sodyum azid.....	24
3.1.1.4 Kromozom medyumunu.....	24
3.1.1.5. Kolşisin.....	25
3.1.1.6. Hipotonik eriyik.....	25
3.1.1.7. Fiksatif.....	26
3.1.1.8. Sorenson tamponu.....	26
3.1.1.9. Giemsa.....	26
3.1.1.10. Entellan.....	26
3.1.1.11. Nitrik asit.....	27
3.1.1.12. Sitokalsin B.....	27
3.1.2. Kullanılan deney ekipmanları.....	27
3.1.2.1. Hassas terazi.....	27
3.1.2.2. Santrifüj.....	27
3.1.2.3. Mikroskop.....	28
3.1.2.4. İnkübatör.....	28
3.1.2.5. Steril kabin.....	28
3.1.2.6. Otoklav.....	28
3.1.2.7. PCR cihazı.....	28
3.1.2.8. Jel görüntüleme cihazı.....	28
3.1.2.9. Elektroforez sistemi.....	29
3.1.2.10. DNA miktarını ölçme cihazı.....	29
3.2. Lamların Temizlenmesi.....	29
3.3. Genotoksisite Çalışmaları.....	29
3.3.1. İnsan periferel lenfositlerinde kromozom anormalliği (KA) ve mikronukleus (MN) oluşumunu saptamak amacıyla hücre kültürünün yapılması.....	29
3.3.1.1. Kromozom anormalliklerini saptamak amacıyla hücre kültürünün yapılması, test maddelerinin kültüre ilave edilmesi ve preparatların hazırlanması.....	29
3.3.1.1.1. Hücre kültürünün yapılması ve test maddelerinin kültüre ilave edilmesi.....	29

3.3.1.1.2. Preparatların boyanması.....	30
3.3.1.1.3. Mikroskopik inceleme.....	31
3.3.1.2. Mikronükleus (MN) oluşumunu saptamak amacıyla hücre kültürünün yapılması, test maddelerinin kültüre ilave edilmesi ve preparatların hazırlanması.....	31
3.3.1.2.1. Hücre kültürünün yapılması ve test maddelerinin kültüre ilave edilmesi.....	31
3.3.1.2.2. Preparatların boyanması.....	32
3.3.1.2.3. Mikroskopik inceleme.....	33
3.3.2. İnsan periferel lenfositlerinde RAPD-PCR yöntemi için hücre kültürünün yapılması.....	34
3.3.2.1. RAPD-PCR için lenfosit hücre kültürünün başlatılması ve besiyerinin uzaklaştırılması.....	34
3.3.2.2. Lenfosit kültüründen DNA izolasyonu.....	35
3.3.2.3. İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyonunun belirlenmesi ve uygun konsantrasyonlarında DNA eriyiklerinin hazırlanması.....	35
3.3.2.4. İzole edilen DNA örneklerinden RAPD-PCR'in gerçekleştirilmesi...	36
3.3.2.5. Agaroz jelin hazırlanması.....	37
3.3.2.6. RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	37
3.3.2.7. Jeldeki RAPD-PCR ürünlerinin görüntülenmesi.....	37
3.3.2.8. Elde edilen RAPD profillerinin değerlendirilmesi.....	38
3.4. Mikroskopta Fotoğraf Çekme.....	38
3.5. İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi.....	38
4. BULGULAR.....	40
5. TARTIŞMA.....	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	54
KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	67
EKLER.....	68

Çizelge 3.1. Bu çalışmada kullanılan RAPD-PCR primerleri.....	36
Çizelge 3.2. RAPD-PCR’da kullanılan kimyasallar ve hacimleri.....	36
Çizelge 3.3. RAPD tekniğinin uygulanmasında PCR sıcaklık ve döngü koşulları.....	37
Çizelge 4.1. Değişik dozlarda doripenem ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde yapısal kromozom anormallikleri ile anormal hücre yüzdesi.....	40
Çizelge 4.2. Değişik dozlarda doripenem ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde mikronükleuslu binükleer hücre yüzdesi.....	44
Çizelge 4.3. Değişik dozlarda doripenem ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde MI ve NBI frekansları.....	45
Çizelge 4.4. Doripenem ile muamele edilen erkek birey DNA’sının her bir primere ait RAPD profillerinin kontroldeki band sayıları ve muameleli grupların kontrolle kıyaslanması sonucunda elde edilen polimorfik band sayıları.....	46
Çizelge 4.5. Doripenem ile muamele edilen bayan birey DNA’sının her bir primere ait RAPD profillerinin kontroldeki band sayıları ve muameleli grupların kontrolle kıyaslanması sonucunda elde edilen polimorfik band sayıları.....	47
Çizelge 4.6. Doripenem ile muamele edilen erkek ve bayan DNA’sının RAPD-PCR primerleri ile mapifikasyonu sonucu elde edilen ortalama band sayısı.....	48
Çizelge 4.7. Doripenem ile muamele edilen erkek ve bayan periferik kan lenfositlerinden elde edilen DNA ile uygulanan RAPD-PCR sonucu saptanan polimorfik bantlardan yararlanarak hesaplanan genomik kalıp stabilitesi (GKS) yüzde değerleri.....	49
Çizelge 4.8. Doripenem ile muamele edilmiş insan lenfositlerinde genomik kalıp stabilitesi (GKS) (genomic template stability, GTS) oranları.....	50

Şekil 1.1. Antibiyotiğin (doksisisiklin) ribozomun A alt ünitesine bağlanıp protein sentezini inhibe etmesi.....	3
Şekil 1.2. Dihidrofolat redüktaz enziminin inhibisyonu.....	3
Şekil 1.3. DD-Transpeptidaz enzimi amino asitler arasında peptid bağı kurması (Proteopedia Sandbox 128).....	4
Şekil 1.4. β -laktam halkanın DD-Transpeptidaz enzimine geri dönüşümsüz bağlanması (Proteopedia Sandbox 128).....	4
Şekil 1.5. Hücre membran geçirgenliğini engelleyen (Amfoterisin B) antibiyotiklerin etki mekanizması.....	5
Şekil 1.6. DNA girazı inhibe eden ajanların etki mekanizması.....	6
Şekil 3.1. Bir (a), iki (b), üç (c) ve dört (d) nükleuslu hücreler.....	34
Şekil 4.1. Kromatid kırığı (DRP, 400 μ g/ml, 48 saat).....	41
Şekil 4.2. Kromatid kırığı (DRP, 400 μ g/ml, 48 saat).....	42
Şekil 4.3. Kromatid kırığı (a) ve kromatid değişimi (chromatid exchange)(b) (EMS, 0.2 μ g/ml, 24 saat).....	42
Şekil 4.4. Poliploid hücre (DRP, 100 μ g/ml, 24 saat).....	43
Şekil 4.5. Mikronükleuslu binükleer hücre.....	44
Şekil 4.6. Bayan birey DNA'sının band profilleri (PM6).....	46

SİMGELER VE KISALTMALAR

AH	: Anormal Hücre Yüzdesi
AsA	: Asetik Asit
Bç (bp)	: Baz Çifti (Base Pair)
dATP	: Deoksi Adenozin Trifosfat
dCTP	: Deoksi Sitozin Trifosfat
dGTP	: Deoksi Guanozin Trifosfat
DHFR	: Dihidrofolat redüktaz
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksiribo Nükleotid Trifosfat
DRP	: Doripenem
dTTP	: Deoksi Timidin Trifosfat
EDTA	: Etilen Diamin Tetrasetik Asit
EMS	: Ethyl methanesulfonate (Etil Metan Sülfonat)
EtOH	: Etil Alkol
gDNA	: Genomik Deoksiribo Nükleik Asit
HNO₃	: Nitrik Asit
ISCN	: International System for Human Cytogenetic Nomenclature (Uluslararası İnsan Sitogenetik Adlandırma Sistemi)
KA	: Kromozom Anormallikleri
KCl	: Potasyum Klorür
MeOH	: Metil Alkol
mg	: Miligram
MI	: Mitotik İndeks
mL	: Mililitre
MN	: Mikronükleus
NaCl	: Sodyum Klorür
NBI	: Nükleer Bölünme İndeksi
ng	: Nanogram
PABA	: Para aminobenzoik asit

PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RAPD	: Randomly Amplified Polymorphic DNA (Rastgele Amplifiye Edilmiş Polimorfik DNA)
rpm	: Revolution Per Minute (devir/dakika)
Taq pol	: <i>Thermus aquaticus</i> polimeraz
TBE	: Tris-Borik Asit EDTA Tamponu
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
µmol	: Mikromol

1. GİRİŞ

Enfeksiyon hastalıkları yüzyıllardır insanoğlunun yaşamını tehdit eden en büyük tehlikelerden biri olmuştur. Binlerce yıldır insanlar, enfeksiyon hastalıklarını tedavi edebilmenin yolunu aramışlardır. 1991 yılında, Avusturya-İtalya sınırındaki Ötztal Alplerinde doğal olarak mumyalanmış, 5300 yıl önce yaşamış Ötzi adamının çantasında huş ağacı mantarı (*Piptoporus betulinus*) bulunmuştur. Araştırmacılar bu mantarın antibakteriyel ve kan durdurucu etkisinin olduğunu bildirmişlerdir (Capasso 1998). Sentetik antibiyotiklerin keşfedilmesinden önceki yüzyıllarda da sarımsak, soğan gibi bitkiler antibiyotik özelliklerinden dolayı insanlar tarafından kullanılmışlardır. Sarımsakta bulunan organo-sülfür bir bileşik olan allicin'in, antibakteriyel etkinliği tespit edilip enfeksiyon hastalıklarda kullanılmak üzere izole edilmiştir (Cavallito ve Bailey 1944).

Günümüzde kullanılan antibiyotikler ilk olarak 1928 yılında Alexander Fleming tarafından; *Staphylococcus sp.* bakterilerini üretirken petri kaplarının küflü bölgelerinde bakterilerin öldüğünü görmesi ve *Penicillium notatum* mantarının ürettiği bir kimyasal olan penisilinin bu duruma neden olduğunu keşfetmesi sonucu bulunmuştur (Fleming 1929). 1940 yılında iki araştırmacı tarafından penisilin saflaştırılıp 1941 yılında araştırmacılardan biri tarafından ilk klinik kullanımının yapılması ile penisilinin seri üretimi yapılmıştır (Florey 1945). Penisilinin tedavide kullanımından önce 1932 yılında bir sülfonamid olan prontosil keşfedilmiş ve ağız yoluyla alınan ilk antibiyotik olmuştur (Iyer 2008). Ancak sülfonamidler, penisilin kadar iyi bir aktiviteye sahip olmamışlardır. Penisilin biyolojik artık maddelerden, sülfonamidler gibi etkilenmemiştir. Penisilinin bu başarısı sebebiyle antibiyotik araştırmalarının önü açılmıştır (Florey 1945). Günümüzde antibiyotikler yarı sentetik veya sentetik olarak üretilmektedirler. Bakterisidal ve bakteriyostatik olmak üzere antibiyotiklerin iki çeşidi vardır. Bakterisidal antibiyotikler bakterileri öldürerek etki ederler, bakteriyostatik antibiyotikler ise bakterilerin çoğalmalarını durdurarak etki ederler (Finberg ve vd. 2004).

La Roche Ltd Co (1990) ve Gülhan (1991) tarafından bildirildiğine göre ideal bir antibiyotiğin sahip olması gereken özellikler şunlardır:

- 1- Bakterisidal olmalıdır.
- 2- Ağız yoluyla verilebilmelidir.

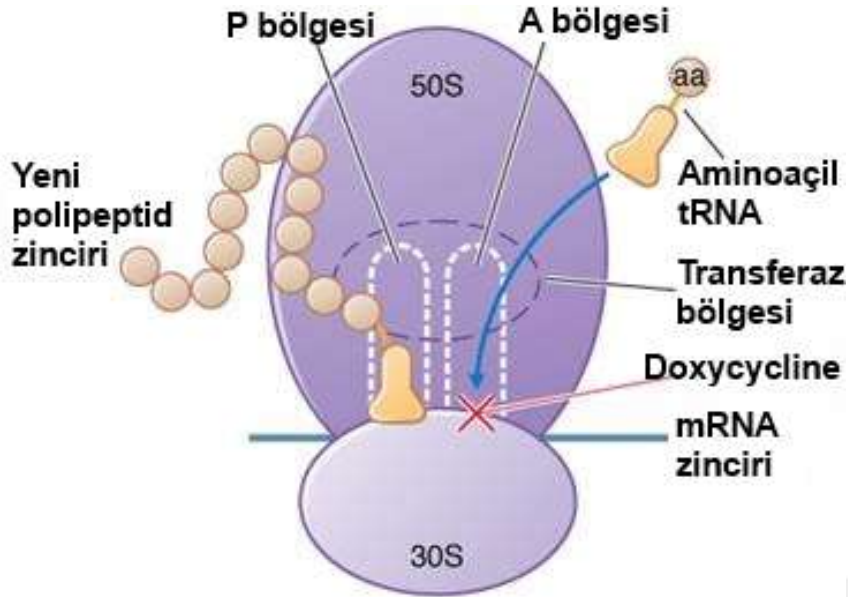
- 3- Dar spektrumlu olmalıdır.
- 4- Tedavi gücü yüksek olmalıdır.
- 5- Pahalı olmamalıdır.
- 6- Vücut sıvılarını etkilememelidir.
- 7- Diğer ilaçlarla uyumlu olmalıdır.
- 8- Alerjik olmamalıdır.
- 9- Direnç gelişimine eğilimli olmamalıdır.
- 10- Etkisi çabuk başlayıp uzun süre devam etmelidir

Antibiyotikler, daha çok bakteriyel enfeksiyonlar için kullanılırlar da diğer mikroorganizmalara karşı da kullanılabilirler. Etki ettiği mikroorganizma grubuna göre antibiyotikler; antibakteriyel, antiviral, antifungal, antiparaziter, antimikobakteriyel olmak üzere beş çeşittirler. Etki spektrumuna göre antibiyotikler; dar spektrumlu, orta derecede geniş spektrumlu ve geniş spektrumlu olmak üzere üç çeşittirler. İmmünomodülatör etkilerine göre antibiyotikler; konak immün savunmasına belirgin etkileri olmayanlar, immün sistemle sinerjik davrananlar, immün fonksiyonları deprese edenler, immün fonksiyonları şiddetlendirenler olmak üzere 4 çeşittirler (Gemmell 1993).

Antibiyotiklerin, mikroorganizmalar üzerindeki etki mekanizmaları şunlardır;

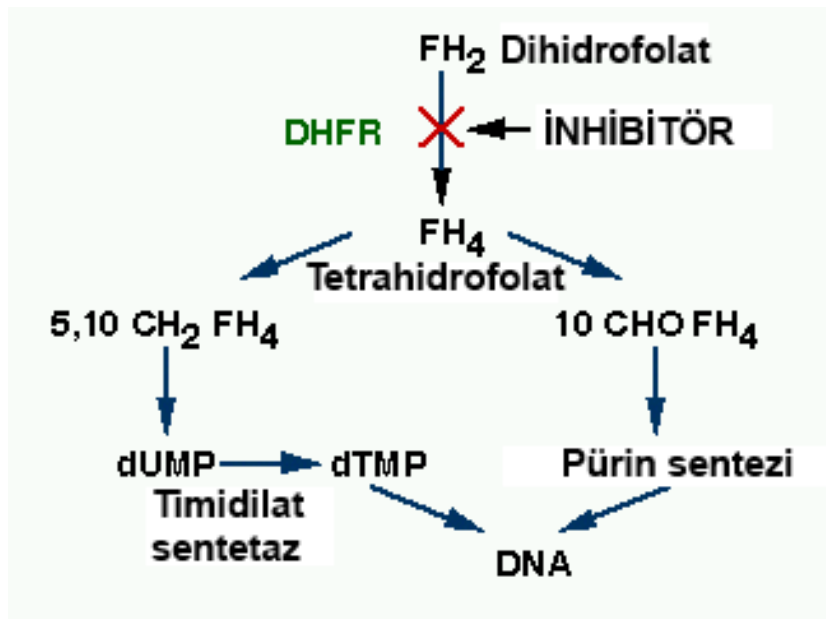
- Protein sentezinin engellenmesi.
- Nükleik asit sentezinin engellenmesi.
- Hücre duvarı sentezinin engellenmesi.
- Hücre membran geçirgenliğinin bozulması.
- DNA replikasyonu ve transkripsiyonun engellenmesi.

Protein sentezini inhibe eden ajanlar; ribozomun 30S ve 50S alt birimlerin A ve P alt ünitelerine bağlanarak peptidil-tRNA translokasyonunu inhibe ederler (Şekil 1.1). Bu durum proteinin uzamasını engeller. Prokaryot ve ökaryot hücrelerin ribozomları farklı büyüklükte olduğu için (prokaryot ribozomu 30S ve 50S alt birimlerinden, ökaryot ribozomu 40S ve 60S alt birimlerinden oluşur), protein sentezini inhibe eden antibiyotikler ökaryot hücrelerin ribozomlarına bağlanmazlar. Bu nedenle protein sentezini inhibe eden antibiyotik, enfekte olmuş konak ökaryot canlıya zarar vermez (Brodersen ve vd. 2000, Selmer ve vd. 2006).



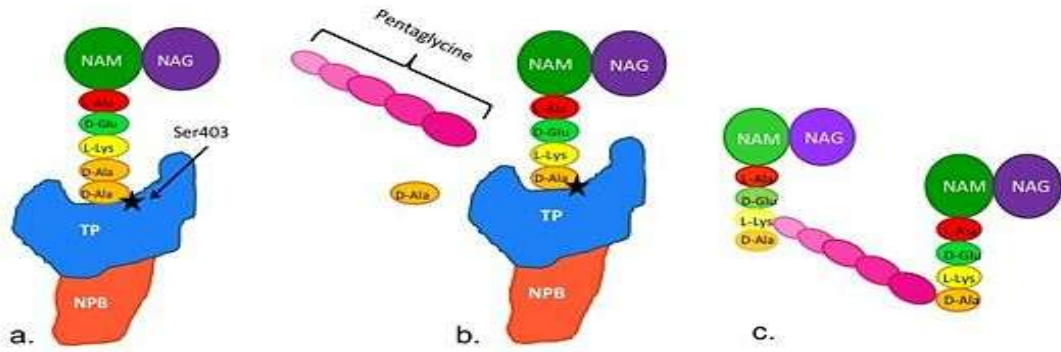
Şekil 1.1. Antibiyotiğin (doksisisiklin) ribozomun A alt ünitesine bağlanıp, protein sentezini inhibe etmesi.

Nükleik asit sentezini inhibe eden ajanlar; PABA (para aminobenzoik asit)'dan folik asit sentezlenmesinde görev alan dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimini inhibe ederler (Şekil 1.2). Folat sentezinin durması pürin ve timin sentezini durdurur, böylece bakteri büyüyemez. Nükleik asit sentezini engelleyen antibiyotikler bakteriyostatik özellik gösterirler (Brogden ve vd. 1982).

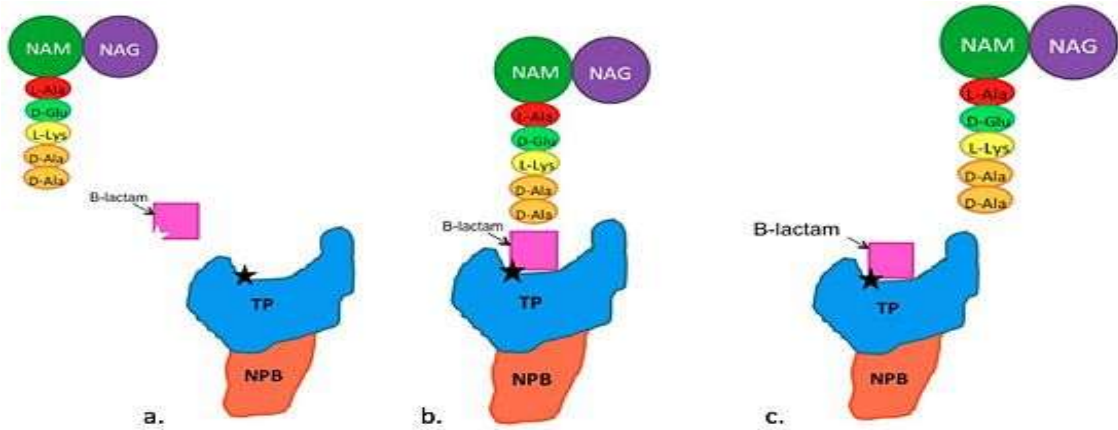


Şekil 1.2. Dihidrofolat redüktaz enziminin inhibisyonu.

Hücre duvarı sentezini inhibe eden ajanlar; Gram-pozitif bakterilerin dışında bulunan duvarın ana bileşeni olan peptidoglukanın sentezinin son aşamasında, N-asetil muramik aside bağlı amino asitler arasında peptit bağı kurulmasında görev alan DD-Transpeptidaz enzimini inhibe ederler (Şekil 1.3 ve Şekil 1.4). DD-Transpeptidaz enzimi Penisilin Bağlayıcı Protein (PBP) olarak da bilinir. Penisilinler, monobaktamlar, karbapenemler ve sefalosporinler moleküler yapılarında bir β -laktam halkası içerirler. β -laktam halka PBP'nin aktif yerindeki Ser₄₀₃ rezidüsüne geri dönüşümsüz olarak bağlanır. PBP'nin inhibisyonu sonucu bakteri hücre duvarı sentezlenemez. Bu durumda bakterinin içi, dış ortamdan daha yoğun olduğu için bakteri hücresi patlar (Fisher ve vd. 2005).

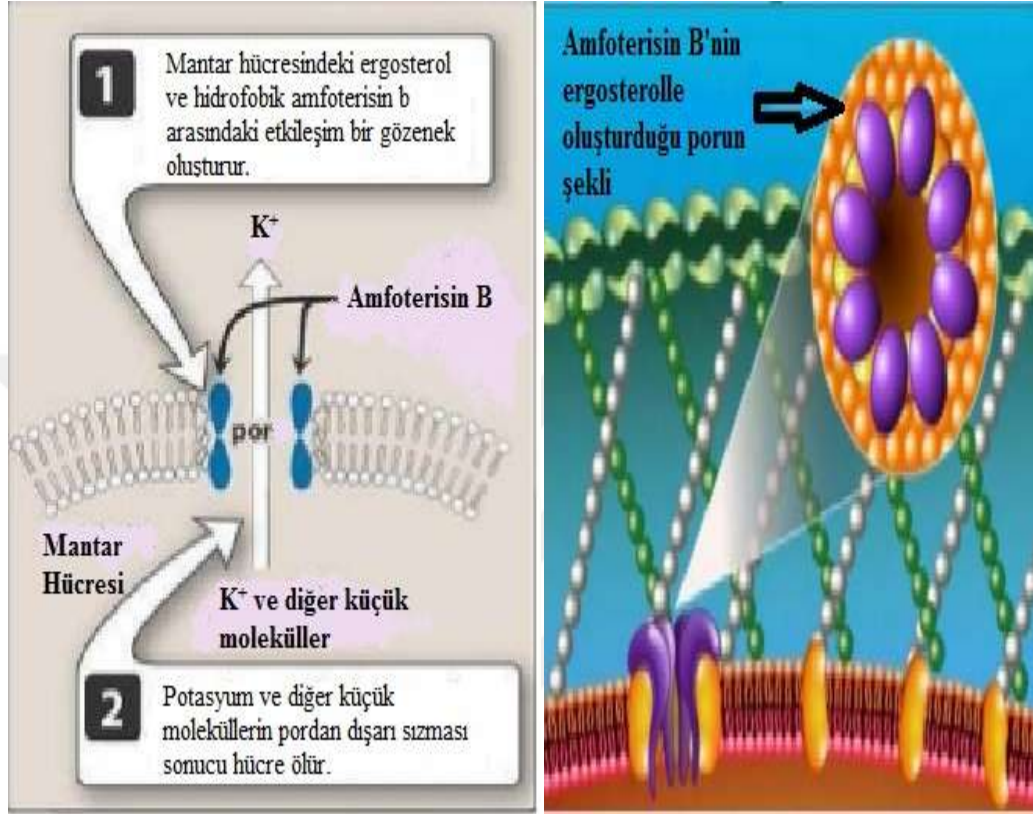


Şekil 1.3. DD-Transpeptidaz enziminin amino asitler arasında peptit bağı kurması (www.proteopedia.org).



Şekil 1.4. β -laktam halkanın DD-Transpeptidaz enzime geri dönüşümsüz bağlanması (www.proteopedia.org).

Hücre-membran geçirgenliğini bozan ajanlar; hücre zarındaki ergosterole bağlanarak membranda kutuplu gözenekler oluştururlar. Bu gözeneklerden hücrenin yaşamı için gerekli olan K^+ ve H^+ iyonlarının ve diğer moleküllerin dışarı sızması sonucu hücreyi öldürerek etki ederler (Şekil 1.5) (Ellis 2002).

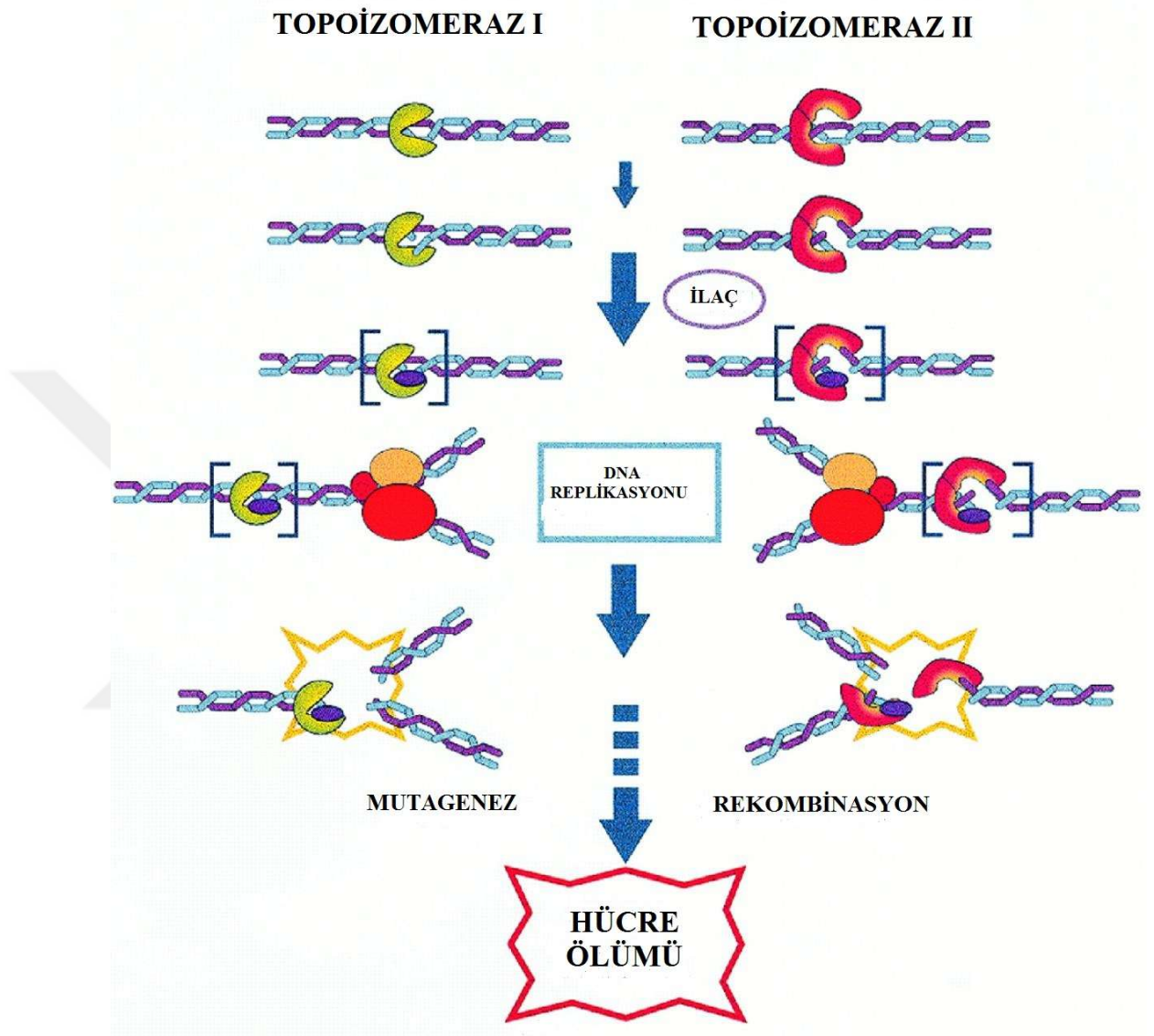


Şekil 1.5. Hücre membran geçirgenliğini bozan (Amfoterisin B) antibiyotiklerin etki mekanizması.

DNA replikasyonunu ve transkripsiyonu engelleyen ajanlar; DNA girazı inhibe ederek etki ederler (Şekil 1.6). DNA giraz iki alt birimden oluşur; her iki alt birim de, 2A ve 2B alt birimlerinden oluşur. A ve B alt birimlerindeki ATPaz enziminin inhibisyonu sonucu DNA giraz aktivitesi durur. Böylece fazla gerilen DNA parçalanır ve bakteri ölür (Castora ve vd. 1983, Bergan 1988).

Antibiyotiklerin, çok fazla ve gereksiz yere alınmaları birçok mikroorganizmada antibiyotik direnci gelişmesine neden olmuştur (Goossens ve vd. 2005). Gram-negatif bakteriler, yoğun bakım ünitesinde baskın katil bakteriyel patojenler arasındadır. Antibiyotik direnci hastane ortamında bir tehdit haline gelmiştir (Torres ve vd. 2007). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından Nisan 2014'te yayınlanan raporda; mikroorganizmalarda gelişen antibiyotik direnci nedeniyle 21. yüzyılda çok uzak

olmayan bir gelecekte, insanların en ufak bir yaralanma sonucu enfeksiyon kapıp ölebileceği bildirilmiştir (WHO 2014).



Şekil 1.6. DNA girazı inhibe eden ajanların etki mekanizması.

Günümüzde direnç geliştiren mikroorganizmalara karşı yeni antibiyotikler üretilmektedir. Bunlardan biri de bu çalışmada kullanılan β laktam sınıfından, grup 2 karbapenemlerden olan doripenemdir. Doripenem (DRP), Shionogi & Co. Ltd. (Osaka, Japonya) tarafından bir araştırmayla keşfedilmiş olup, Amerika Birleşik Devletleri'nde Peninsula Pharmaceuticals, Inc. (Alameda, California) tarafından sistemik bakteriyel enfeksiyonlar nedeniyle hastanede yatan hastalar için geliştirilen parenteral 1 β -

metilkarbapenemdir (Iso ve vd. 1996). Karbapenemler, enfeksiyon hastalığı olan ağır hastalarda veya çoğul dirençli bakteri enfeksiyonu şüphesi taşıyan hastalarda son çare antibiyotik olarak kullanılmaktadırlar (Bradley ve vd. 1999; Paterson, 2000; Paterson ve Bonomo 2005; Torres ve vd. 2007). DRP, penisilinazlar ve safalosporinazlar da dahil olmak üzere, Gram-negatif ve Gram-pozitif mikroorganizmalar tarafından üretilen beta-laktamazlara dayanıklıdır (Mori ve vd. 1996). Antipsödomonal etkinliğe sahip olan DRP, komplike intra-abdominal enfeksiyonlar, komplike üriner sistem enfeksiyonları ve nozokomiyal pnömoni tedavisinde kullanılmaktadır (Bhavnani ve vd. 2005; Mandell 2009). DRP'in antimikrobiyal spektrumu, ertapenemden daha çok imipenem ve meropeneme benzerdir. Bu nedenle, Enterobacteriaceae (genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten suşlar dahil), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter sp.*, *Bacteroides fragilis*, streptokoklar ve metisiline duyarlı stafilokoklara karşı anlamlı *in vitro* aktiviteye sahiptir (Paterson ve Depestel 2009) ve penisiline dirençli streptokoklara karşı en aktif karbapenemdir (Jones ve vd. 2004). DRP, *Streptococcus pneumoniae*, viridans (yeşil) grubu streptokoklar ve beta-hemolitik streptokoklara karşı test edilmiş en güçlü ajanlar arasındadır (Fritsche ve vd. 2005). Ayrıca yapılan çalışmalarda, nozokomiyal pnömoni tedavisinde doripenemin tercih edilmesi daha az bakteri direnci, daha az yan etki ve daha kısa sürede tedavi etmesiyle hasta ve hastane için ekonomik ve klinik fayda gösterdiği bildirilmiştir (Merchant ve vd. 2008, Kongnakorn ve vd. 2010).

DRP, hastaneden edinilmiş pnömoni vakalarında 8 saatte bir 1 saat süre ile 500 mg doz intravenöz infüzyon şeklinde uygulanır. Etkisi süreye bağlıdır (Bhavnani ve vd. 2005; Mandell 2009). DRP hücre duvar sentezini inhibe ederek bakterisidal etki gösterir.

DRP; baş ağrısı, nöbetler, döküntü, prurit, Stevens-Johnson sendromu, bulantı, diyare, oral kandidiyazis, vulvomitik enfeksiyon, böbrek fonksiyon bozukluğu, böbrek yetmezliği, anemi, lökopeni, nötropeni, trombositopeni anafilaksi, artmış karaciğer enzimleri gibi yan etkilere neden olabilmektedir (www.drugs.com).

DRP dahil diğer tüm antibiyotiklerin tedavi edici amaçla kullanılmalarının yanı sıra bu kimyasalların insanlarda mutasyona neden olup olmadıklarının ortaya çıkarılması son derece önemlidir. Günümüzde bir maddenin genotoksik olup olmadığını belirlemek için birçok genotoksisite testi vardır. Kısa süreli testler olarak tanımlanan ve kromozom düzeyinde yapılan genotoksisite testleri; kardeş kromatid değişimi (KKD) (Galloway ve Evans 1975, Perry ve Evans 1975), kromozom anormallikleri (KA) (Chromosome

Aberration; CA) (Evans 1984, Carrano ve Natarajan 1988, Bonassi ve vd. 2004) ve mikronükleus (MN) (Micronucleus) (Fenech ve Morley 1985, Heddle ve vd. 1991, Hagmar ve vd. 1998, Fenech 2000, 2002) yöntemleridir. Bu testlere ilave olarak moleküler düzeyde yapılan ve baz değişimi mutasyonları saptamaya yaran PCR temelli testler de güvenilir sonuçlar vermektedir. Bu testlerin birisi de RAPD-PCR testidir.

KA testi ise kromozomal yapı ve sayı anormalliklerini saptamaya yarayan bir testtir. Dolayısıyla test maddelerinin hem klastojenik hem de anojenik etkilerinin saptanmasında etkindir. Theodor Boveri, 20. yüzyıl başında kanser patogenezi KA'ni bağlayan mekanizma üzerinde kapsamlı bir araştırma yolu açmıştır. Bu çabanın bir sonucu olarak, insanlarda kanserin erken aşamalarında sitogenetik hasarı ilişkilendiren sağlam teorik ve deneysel kanıtlar elde edilmiş ve sağlıklı bireylerde yüksek seviyedeki KA'nin kanser riskini artırdığı iddia edilmiştir. KA'nin kanser riski belirleyicisi olarak doğrulanmasını amaçlayan ilk epidemiyolojik araştırma 1990'ların başında gerçekleştirilmiştir (Bonassi ve vd. 2004). KA oluşum mekanizmasının farklı dokularda benzer olması nedeniyle, lenfositlerdeki kromozomların anormallik seviyesinin, kansere eğilimli dokulardaki anormallik seviyesini gösterdiği ve bu nedenle kanser riskinin göstergesi olduğu düşünülmektedir (Albertini ve vd. 2000, Bonassi ve vd. 2000, 2004, 2005). Kromozom anormallikleri sayısal ve yapısal anormallikler olarak 2 ana gruba ayrılır. Trizomi 21 (Down sendromu) ve monozomi (Turner sendromu) en çok bilinen sayısal anormalliklerdir (Dearce ve Kearns 1984, Sutherland 1984, Antonarakis 1998). Duplikasyonlar, delesyonlar, translokasyonlar, inversiyonlar ve ring kromozomlar yapısal anormalliklerdir (Turpin ve Lejeune 1969, Yunis 1977, Wilkins ve vd. 1980).

MN, asentrik kromozom veya kromatid kırıklarından, bir veya birkaç kromozom ya da kromatidin anafazda geri kalmasından dolayı telofazda meydana gelen esas nükleusun dışında oluşan küçük çekirdeklerdir (Surrallés ve vd. 1995). Ayrıca multipolar (çok kutuplu) anafaz ve telofaz safhaları da MN oluşumuna sebep olmaktadır (Topaktaş ve Rencüzoğulları 1996). Dolayısıyla MN testi de KA testi gibi hem klastojenik hem de anojenik etkiyi saptamaya yarayan bir testtir. Fakat, KA testinin aksine anormallik direkt olarak değil, mikronükleus olarak saptanabilmektedir. MN oluşumuna neden olabilen kromozom kaybı ya da kromozomların ayrılmaması (nondisjunction), kanser ve yaşlanmada rol oynayan önemli olaylardan biridir. Bu durum, muhtemelen iğ ipliklerinde ve sentromerde bozulma veya metafazdan önce kromozom yapısının yoğunlaşması

nedeniyle oluşmaktadır (Dellarco ve vd. 1985). Böylece, *in vitro* MN testi; basit, hızlı ve objektif mikroskopik analiz ile mekanik bilgi sağlayan bir sitogenetik testtir (Kirsch-Volders ve vd. 1997, Norppa ve Falck 2003). Fenech ve vd. (1999) tarafından yapılan bir araştırmada insanlarda MN ile kanser arasında bir ilişkinin olduğu bildirilmiştir.

Genotoksisite araştırma yöntemleri sürekli olarak gelişme göstermiştir (Noel ve Rath 2006). Son yıllarda moleküler genetikçiler genotoksisteyi belirlemek için birkaç yeni, hızlı ve güvenilir yöntem geliştirmişlerdir (Zhiyi ve Haowen 2004, Swaileh ve vd. 2007). Bunlardan biri de RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA, Rastgele Artırılmış Polimorfik DNA) yöntemidir (Ferrero ve vd. 1998, Swaileh ve vd. 2007). Son on yıl içinde, polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayalı RAPD tekniği, DNA markerları (belirteç) geliştirmek için kullanılan en yaygın moleküler tekniklerden biri olmuştur. RAPD belirteçleri sayesinde gen haritalama, populasyon genetiği, moleküler evrimin genetiği, bitki ve hayvan ıslahında geniş bir uygulama yelpazesi oluşmuştur (Kumar ve Gurusubramanian 2011). Williams ve vd. (1990) tarafından açıklanan RAPD analizi genetik polimorfizm çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir moleküler belirteçtir.

RAPD tekniği; DNA hakkında ön bilgi gereksiniminin olmaması, restriksiyon enzimleriyle muameleye tabi tutulmaması, southern hibridizasyonu ve transferine gerek duyulmaması, elde edilen polimorfik band sayısının yüksek olması, elde edilen band özelliğinin baskın olması ve maliyetin düşük olması gibi avantajlara sahiptir (Devrim ve Kaya 2006).

RAPD tekniği birçok çalışmada kullanılmaktadır. Bunlar;

- Genetik çeşitlilik / polimorfizm.
- Germplazma karakterizasyonu.
- Populasyonların genetik yapısı.
- Evcilleştirme.
- Somaklonal varyasyon tespiti.
- Çeşitlilik tanımlama.
- Hibrid saflığı.
- Genom haritalama.
- Söz konusu bir özellikle bağlantılı genetik işaretleyiciler geliştirilmesi.
- Nüfus ve evrimsel genetik.

- Bitki ve hayvan ıslahı.
- Hayvan, bitki, mikroorganizma etkileşimleri.
- Pestisit/herbisit direnci

RAPD yönteminin aşamaları şu şekilde özetlenebilir:

1. PCR işleminde kullanılacak olan primerlerin nükleotid dizileri belli bir kriter olmaksızın rastgele seçilir ve sentezi yapılır.
2. Rasgele seçilen bu primerler kullanılarak araştırılan genomik DNA'da PCR uygulamasına başlanır. PCR işlemi esnasında primerler genomik DNA'da simetriği olan bölgelere yapışır ve bu bölgeler geometrik olarak çoğalır.
3. Çoğalan bu DNA parçacıkları, elektroforez işlemiyle agaroz jelde yürütülür.
4. Etidyum bromid ya da radyoaktif maddelerle boyanarak molekül büyüklüklerine göre sıralanan ve bandlaşma gösteren DNA parçacıkları değerlendirilerek DNA üzerindeki genetik polimorfizm belirlenir (Williams ve vd. 1990, Scott ve vd. 1992, Morgan ve vd. 1993).

Çevresel kontaminantların sahip olduğu genotoksik etkileri belirlemek için, başlangıçta tarama yöntemi olarak RAPD yöntemini kullanmak, daha sonra DNA adduktları (DNA katımları, kanserojen bir bileşiğin DNA'ya kovalent olarak bağlanması), gen mutasyonlarını ya da sitogenetik etkileri ölçen daha spesifik yöntemleri uygulamak güçlü bir stratejidir (Atienzar ve Jha 2006). Yürütülen PCR örneklerinin hepsinde bulunan RAPD bandları monomorfik olarak kabul edilmektedir. Bazı bireylerde bulunmayanlar veya değişken mobiliteye (göç hızına) sahip olan DNA fragmentlerinin bandları ise polimorfik olarak kabul edilmektedir. Elde edilen RAPD bandlarında gözlenen polimorfizmlerin genetik ilişkilerin belirlenmesinde önemli olduğu kabul edilmiştir (Devrim ve Kaya 2006).

RAPD-PCR yöntemi, genotoksik etkileri belirlemek için çok sayıda avantaja sahiptir. RAPD-PCR yöntemi, mutasyonların (nokta mutasyonları, DNA kırıkları ve yeniden düzenlenmeler) yanı sıra çok sayıda DNA hasarını (DNA adduktları gibi) belirleme potansiyeline sahiptir. Kanseri araştırma alanlarında RAPD yöntemi ve ilişkili yöntemler, değişmiş bölge hakkında ön bilgi gerektirmeksizin genomik değişikliklerin aynı zamanda klonlanması ve belirlenmesine izin verir. Kanseri (malignant) hücrelerdeki nokta mutasyonları, genomik ve kromozomal yeniden düzenlenmeleri, delesyon ve insersiyon gibi moleküler olayları kapsayan genomik kararsızlıkları belirlemek için fayda

sağlar (Atienzar ve vd., 2002, Atienzar ve Jha 2004, Atienzar ve Jha 2006, Büyükleyla 2013).

Yapılan çalışmalarda antibiyotiklerin bir kısmının genotoksik olduğu bir kısmının da genotoksik olmadığı saptanmıştır (Jaju ve vd. 1984, Rencüzoğulları ve vd. 2002, Agarwal ve vd. 2004, Venkatesh ve vd. 2007, Rencüzoğulları ve vd. 2009, Rocco ve vd. 2012, Cui ve vd. 2012).

Yapılan literatür taramasında DRP'in genotoksitesi ile ilgili hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle DRP'in genotoksik etkiye sahip olup olmadığı *in vitro* insan periferik lenfositlerinde kromozom aberasyonu (KA), mikronükleus (MN) ve RAPD-PCR yöntemleriyle araştırılması amaçlanmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

DRP bir beta-laktam ailesinden grup 2 karbapenem grubu antibiyotiktir. Dolayısıyla bu başlık altında hem diğer antibiyotiklerin hem de bu gruba dahil olan antibiyotiklerin genotoksik etkileri kronolojik olarak belirtilecektir.

2.1. Nitroimidazol Türevi Antibiyotiklerle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Fahrig ve Engelke (1997), tarafından yapılan çalışmada iki insandan alınan periferik kan lenfositlerinde metronidazolün (MTZ) genotoksik etkisi araştırılmıştır. 5-8 gün boyunca 3x500 mg/gün, 3x750 mg/gün MTZ ile muamele edilen lenfositlerin muamele edilme öncesi ve sonrası incelenmiştir. Her bir hasta için 400 çekirdek incelenmiştir. Sonuçta MTZ'ün KA ve DNA kırığını indüklediği ve genotoksik kanserojen olduğu bildirilmiştir.

Ornelas-Aguirre ve vd. (2006), sıçan vajinal mukozal hücrelerinde metronidazolün (MTZ) MN frekansını artırıp artırmadığını değerlendirmişlerdir. Beş gruba ayrılan sıçanlardan; bir grup negatif kontrol muamelesiz, üç grup 30, 50, 100 mg/kg dozlarda vajinal olarak MTZ ile muamele edilmiş ve bir grup da pozitif kontrol olarak 5-florourasil (2.5 mg) ile muamele edilmiştir. 30 ve 50 mg/kg dozlarla muamele edilen farelerin vajinal smear hücrelerinde MN frekansında anlamlı bir değişiklik görülmezken, 100 mg/kg dozda MTZ ile muamele edilen farelerin hücrelerinde MN frekanslarını önemli ölçüde artırdığı görülmüştür. Böylece, MTZ'ün yüksek dozlarda sıçan vajinal mukoza hücrelerinde genotoksik olduğu bildirilmiştir.

Çelik ve Aras (2006), metronidazolün (MTZ) *in vitro* mutajenik ve sitotoksik dozlarında genotoksik ve sitotoksik etkilerini değerlendirdikleri çalışmada; MTZ ile muamele edilmiş insan periferik kan lenfositlerinde kontrol grubuna göre mitotik indeks ve replikasyon indeksinde (RI) düşüş, KKD frekansında da artış olduğu bildirilmiştir.

Lopez ve Carballo (2008), 2. nesil 5-nitroimidazol türevi olan tinidazolün terapötik dozlarla (0.1, 1, 10 ve 50 µg/ml) kültürlenmiş insan lenfositlerinde sitotoksik ve genotoksik etkilerini değerlendirmek için MI, RI, KKD ve KA parametrelerini incelemişlerdir. İncelemeler sonucunda MI'de anlamlı bir düşüş, KKD ve KA

frekanslarında artış gözlenmiştir. RI'de hiçbir değişiklik bulunamamıştır. Tinidazolün sitotoksik ve genotoksik olduğu bildirilmiştir.

Talapatra ve vd. (2010), *Channa punctatus* (Yılanbaş balığı)'un periferik eritrositlerinde metronidazolün (MTZ) önemli seviyede mikronükleus frekansını indüklediğini bildirmişlerdir.

İkbal ve vd. (2011), *Entamoeba histolytica* ile enfekte 32 hastanın lenfositlerinde ornidazolün genotoksik etkisini KKD ve MN yöntemiyle araştırmışlardır. Her bir hastaya 10 gün boyunca 1000 mg/gün ornidazol verilmiştir. Tedavi öncesinde ve sonrasında KKD ve MN frekansları incelenmiştir. Ornidazol tedavisi sonrasında KKD ve MN frekanslarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendiği bildirilmiştir.

2.2. β -laktam Antibiyotiklerle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Jaju ve vd. (1984), *in vitro* insan periferik lenfositlerini terapötik dozlarında ampicilin ve karbenisilin antibiyotikleri ile tek tek 72 saat boyunca muamele etmişlerdir. Sonuçta her iki antibiyotikğin KA, KKD ve MI frekanslarını indüklemedikleri yani nonklastojenik ve nontoksik etki gösterdikleri bildirilmiştir.

Zavarise ve vd. (1984), kloksasilinin tedavi edici dozlarında DNA'ya zarar vermediğini, KA ve KKD sayısını indüklemediğini fakat yüksek konsantrasyonlarda kromozom değişikliklerine neden olduğunu bildirmişlerdir.

Köseoğlu ve vd. (2004), yaptıkları çalışmada dokuz sağlıklı bireyden elde edilen lenfositleri 0.002, 0.02 ve 0.1 $\mu\text{g/ml}$ benzatin penisilin G (BPG) ile 72 saat boyunca muamele etmişlerdir. Tüm gruplar karşılaştırıldığında KKD frekansının önemli oranda değişmediği yani BPG'nin KKD frekansını artırmadığı saptanmıştır.

Istifli ve Topaktaş (2010), gram-pozitif ve gram-negatif mikroorganizmalara karşı, geniş spektrumlu bakterisidal etkiye sahip penisilin olan amoksisilinin farklı dozlarını (400, 600, 800 ve 1000 $\mu\text{g/ml}$) metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda insan periferik lenfositleri ile muamele etmişlerdir. Metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda amoksisilinin KA ve KKD frekansını indüklemediğini, sadece metabolik aktivatör yokluğunda ve 24 saatlik bir muamele periyodunda RI'ni düşürdüğünü, MI'i etkilemediğini, bununla birlikte ne MN frekansını ne de nükleer bölünme indeksini

etkilediğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak amoksisilinin genotoksik risk taşımadığını rapor etmişlerdir.

2.3. Makrolid Grubu Antibiyotiklerle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Amacher ve vd. (1993), tarafından yapılan Ames testinde *Salmonella tyhimurium* TA1535, TA1537, TA98 ve TA100 suşlarında azitromisinin mutajenik olmadığı saptanmıştır. Oral olarak 200 mg/kg doz uygulanan farelerin idrarında da mutajenik etkiye sahip metabolitlere rastlanmadığı tespit edilmiştir. Sitotoksik doz olan 240 µg/ml seviyesine kadar test edildiğinde, L5178Y/TK hücrelerinin timidin kinaz lokusundaki mutasyon sıklığında herhangi bir artışa neden olmadığı bildirilmiştir. 24 saat süre ile 2.5-7.5 µg/ml dozları arasında ve 3 saat süre ile 30.0-40.0 µg/ml konsantrasyonlarda sıçan S9 varlığında muamele edilen insan lenfositlerinde KA frekansını önemli derecede artırmadığını sadece hücre bölünmesini baskıladığını bildirmişlerdir. Tek doz olarak oral 200 mg/kg verilen erkek ve dişi farelerde 6, 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde bile azitromisinin herhangi bir genotoksik ve sitotoksik etkisine rastlanmadığı rapor edilmiştir.

Rencüzoğulları ve vd. (2002), insan lenfositlerinde spiramisin ile yaptıkları çalışmada spiramicinin 24 ve 48 saat muamele sürelerinde, 200 µg/ml ve 400 µg/ml konsantrasyonlarda KA ve KKD frekanslarını artırmadığını, MI'ı düşürmediğini, sadece 48 saatlik muamele süresinde RI'ini düşürdüğünü bildirmişlerdir.

Rocco ve vd. (2012), Zebra balığı (*Danio rerio*) eritrositlerinde eritromisin, linkomisin ve ikisinin kombinasyonunun MN frekansını artırıp artırmadığını test etmişlerdir. Balıklar 14 saat ışık, 10 saat karanlık fotoperiyotta; 80 L, 7.6 pH ve 28°C sıcaklıktaki suda tutulmuştur. NH₃ konsantrasyonu 0.01 mg/L'den az tutulan suda balıklar, tetramarin ile günlük olarak beslenmiştir. Gün arasında zebra balıklarına 100 mg/L eritromisin uygulanmıştır. Seçilen bu konsantrasyonda MN frekansında negatif kontrole göre 7. günün sonunda % 3.3, 14. günün sonunda % 4.4, 28. günün sonunda % 8.0 ve 42. günün sonunda % 10.4 ortalama bir artış tespit edilmiştir. Muamele kesildikten 200 gün sonra MN frekansında % 0.8 gibi anlamlı bir düşüş olmuştur. Linkomisin ile 100 mg/L muamele edilen zebra balıklarının MN frekansında 7. günün sonunda % 0.8, 14. günün sonunda % 2.7 ve 28. günün sonunda % 6.9 ortalama bir artış gözlenmiştir.

Muamele kesildikten 200 gün sonra % 1.3 gibi anlamlı bir düşüş olduğunu bildirmişlerdir. Dolayısıyla her iki antibiyotiğin balıklarda hem genotoksik hem de mutagenik etkiye sahip oldukları açıklanmıştır.

Singh ve vd. (2014), klinik açıdan eşdeğer doz olan 14.2 mg/kg ve bir alt doz olan 10 mg/kg eritromisinin prenatal ve postnatal evredeki farelerde hem periferel kan hücrelerinde hem de kemik iliği hücrelerinde MN frekansında anlamlı bir artışa neden olduğunu gözlemişlerdir.

2.4. Kinolon Grubu Antibiyotiklerle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Shimada ve vd. (1992), levofloksasinin mutagenik ve genotoksik etkisini Ames Testi, HPGRT mutasyon testi, *in vitro* Chinese hamster hücrelerinde ve *in vivo* fare kemik iliğinde MN ve KKD testi, sıçan hepatosit hücrelerinde programsız DNA sentezi (unscheduled DNA synthesis) testi ile farelerde dominant letal testleri kullanılarak araştırmışlardır. Levofloksasinin hiçbir testte pozitif olmadığı ve dolayısıyla mutagenik ve genotoksik etkisinin olmadığını belirtmişlerdir.

Takahashi ve vd. (1994), tarafından yapılan çalışmada; 24 saat boyunca nadifloksasinle (NDFX) muamele edilmiş Çin hamster akciğer hücrelerinde; NDFX'in S enantiomerinin KA'ne neden olduğu ancak, R enantiomerinin KA'ne neden olmadığı belirtilmiştir.

Gorla ve vd. (1999), sekiz sağlıklı donörden aldıkları insan periferel kan lenfosit kültürlerinde enrofloksasinin ve ana metaboliti olan siprofloksasinin KA'ya neden olup olmadığını araştırmışlardır. Her iki muamelede de kromatid ve kromozom kırıkları görülmüştür. Kontrol kültürleri analizinde 100 hücre başına 3.6 ± 0.6 kromozom anomaliği varken sırasıyla 5 ve 50 µg/ml enrofloksasin ile muamele edilen kültürlerde 8.3 ± 0.8 ve 9.6 ± 1.2 anomali gözlenmiştir. 5 ve 25 µg/ml antimikrobiyal konsantrasyondaki siprofloksasin ile muamele edilen kültürlerde 100 hücre başına sırasıyla 5.6 ± 1.3 ve 7.7 ± 3.5 anomali bulunmuştur. 50 µg/ml konsantrasyonda siprofloksasin, mitotik indekste azalma ve anormal metafaz oranlarında artışa neden olmuştur.

Herbold ve vd. (2001) Ciprofloxacin'in *in vivo* kemiricilerde genotoksik olmadığını ve uzun süreli muamelelerde kanserojenik etki göstermediğini bildirmişlerdir.

Khadra ve vd. (2012), kontamine topraklarda *Vicia faba* bitkilerini nalidiksik asit, siprofloksasin ve enrofloksasin ile tek tek ve karışım halinde muamele ederek kök ucu hücrelerinde MN frekansını incelemişlerdir. Her bir antibiyotiğin 0.01, 0.1, 1 ve 10 mg/kg dozları ile nalidiksik asitin 0.05, 0.5, 5, 10 mg/kg dozları kullanılmıştır. Tüm antibiyotiklerin en yüksek iki dozu *V.faba* kök ucu hücrelerinde MN frekansını önemli derecede artırırken düşük dozlarda herhangi bir artışın olmadığı bildirilmiştir. Üç bileşiğin karışım halinde uygulandığı çalışmalarda ise tüm dozlarda MN frekansında artış olduğu saptanmıştır.

Aksoy ve vd. (2012), ofloksasin(OFX) ile yaptıkları çalışmada; sağlıklı iki erkek ve iki kadından alınan periferik kan örneklerini MN testi için 68 saat kültüre almışlardır. Kültürleri 30, 60 ve 120 µg/ml konsantrasyonlarda 48 saat süre ile OFX'le muamele etmişlerdir. OFX'in sadece en yüksek dozda (120 µg/ml) MN artışına neden olduğunu fakat nükleer bölünme indeksini (NBİ) ise tüm dozlarda anlamlı bir şekilde düşürdüğünü saptamışlardır. Bu sonuçlara dayanarak OFX'in yüksek dozlarda sitotoksik olduğu ancak MN testinin sonuçları değerlendirildiğinde genotoksik etkisinin olmadığı belirtilmiştir.

2.5. Rifampisin Grubu Antibiyotiklerle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Attia (2007), rifampisinin MN oluşumu üzerine etkisini fare kemik iliğinde incelemiştir. Fareler 10-320 mg/kg doz aralıklarında rifampisin ile muamele edilmiştir. Rifampisin'in 160 ve 320 mg/kg dozları ile muamele edilen farelerin kemik iliğinde mikronükleuslu polikromatik eritrositlerin frekanslarının önemli ölçüde arttığı belirtilmiştir. Ayrıca, rifampisinin yüksek dozda eritroblast çoğalmasını da ciddi bir şekilde azaltmıştır. Fare minör satellit probu kullanılarak FISH tekniği ile MN oluşum mekanizmaları incelendiğinde Attia (2007) mikronükleusların %58.1'inin sentromer negatif olduğu yani klastojenik etkiden dolayı MN oluşumunun gözlemlendiğini, geri kalan % 41.9'unun ise anojenik etki sonucu oluştuğunu saptamıştır.

2.6. Sefalosporin Grubu Antibiyotiklerle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Agarwal ve vd. (2004), üçüncü nesil sefalosporin olan sefotaksimın mutagenik etkisinin olup olmadığını mikrozomal fraksiyon varlığında ve yokluğunda *Salmonella*

typhimurium'un TA97a, TA98, TA100, TA102 ve TA1535 mutantlarında denemişlerdir. *S.typhimurium* ihtiva eden plakalara; 0.62, 1.85, 5.56, 16.67 ve 50 µg/plaka konsantrasyonlarda sefotaksim ilave edildiğinde revertant sayısında her hangi bir artışın görülmediği saptanmıştır. Aynı araştırmacılar, 2×10^5 yoğunluğundaki Çin hamster ovaryum (CHO) hücrelerini metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda 11.25, 22.5 ve 45 mg konsantrasyonlarda sefotaksim ile 18 saat muamele etmişlerdir. Sonuçta CHO hücrelerinde CA sayısının artmadığı görülmüştür. Bu çalışmalar sonucu sefotaksimin Ames testinde mutajenik olmadığı ve ayrıca *in vitro* klastojenik olmadığı da bildirilmiştir.

Cui ve vd. (2012), sefuroksimle bir dizi genotoksisite testleri yapmışlardır. Karaciğer mikrozomal enzimleri varlığında ve yokluğunda sefuroksim ile muamele edilen çeşitli *Salmonella typhimurium* suşlarında (TA97, 98, 100 ve 102) sefuroksimin revertant koloni sayısını artırmadığını yani mutajenik olmadığını saptamışlardır. Ayrıca 125, 250 ve 500 mg/kg dozunda sefuroksim verilen farelerde MN ve KA oranında herhangi bir artışın gerçekleşmediği bildirilmiştir.

Metovic ve vd. (2013), seftriaksonun 0.15, 0.25 ve 0.50 mg/ml konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilen insan periferel kan lenfositlerinde konsantrasyonlar arttıkça KA frekansının arttığını tespit etmişlerdir. Seftriaksonun en yüksek konsantrasyonunda (0.50 mg/ml) anöjenik faaliyet gösterdiği, yani 0.5 mg/ml dozu ile muamele edilmiş kültürlerde sayısal anomalilerin sıklığında anlamlı bir fark olduğu bildirilmiştir.

Istifli ve Topaktaş (2015), kanser tedavisinde folat sentezini inhibe eden bir ilaç olan pemetrexed (PMX) ve üçüncü nesil sefalosporin olan cefixime (CFX) ile yaptıkları çalışmada sırasıyla 12.5+450, 25+800, 37.5+1150 ve 50+1500 µg/ml konsantrasyonlardaki karışımlar ile 24 ve 48 saat süre ile muamele edilen insan periferel kan lenfositlerinde bu karışımların MN, KA ve KKD frekanslarını uyarmadığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte kombinasyonun sitotoksik etki gösterdiğini ve bu etkinin sinerjik olarak insan periferel kan lenfositlerinde sitotoksisiteyi artırdığı bildirilmiştir.

2.7. Tetrasiklin Grubu Antibiyotiklerle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Dimitrijevic ve vd. (2006), *Chlamydia trachomatis* bakterisi enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan azitromisin ve doksisisiklin antibiyotiklerinin standart dozlarının hasta bayanların periferel kan lenfositlerinde MN frekansını artırıp artırmadığını

araştırmışlardır. MN sıklığı, genital *C.trachomatis* enfeksiyonu tanısı konulmuş 38 bayanın lenfositlerinde ölçülmüştür. Periferik kanlar, 38 hasta grubu ve 50 sağlıklı kontrol grubundan tedavi öncesi ve sonrası alınmıştır. Tedavi 10 gün boyunca oral yolla günde iki defa 100 mg (2x100 mg) doksisisilin, başka bir 10 günde de günde 1x100 mg doksisisilin ve tek bir doz 1 g azitromisin olarak yapılmıştır. Cytochalasin B ile sitokinez bloklayıcı yöntemine göre hazırlanan preparatlarda doksisisiklin ile tedavi edilen hastaların lenfositlerinde MN frekansında önemli bir artış saptanmışken, azitromisin ile tedavi edilen hastaların lenfositlerinde MN frekansının artmadığı bildirilmiştir.

Xie ve vd. (2011) 0.25-300 mg/ml konsantrasyon aralığında tetrasiklin ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilen buğday (*Triticum aestivum L.*) kök ucu meristem hücrelerinde tetrasiklinin genotoksik etkisini araştırmışlardır. Sonuçlarda, daha düşük konsantrasyonlarda (0.25-1 mg/l) tetrasiklinin hücre mitoz bölünmesini uyardığı fakat daha yüksek konsantrasyonlarda (50-300 mg/l) ise mitotik indekste (MI) azalmaya neden olduğu belirtilmiştir. Ayrıca tetrasiklin düşük dozlarda buğday kök uçlarında MN, KA ve KKD sıklığında hafif bir artışa neden olurken yüksek konsantrasyonlarda ise tüm parametreleri önemli derecede ve doza bağlı olarak artırmıştır.

Şekeroğlu ve vd. (2012), doksisisiklini 48 saat süre ile 2, 4, 6 µg/ml konsantrasyonlarda KA, MN, mitotik indeks (MI) ve nükleer bölünme indeksi (NDI) üzerine etkileri yönünden incelemişlerdir. Doksisisilin tüm dozlarda MI düşürürken sadece yüksek dozlarda NDI frekansını önemli ölçüde azaltmıştır. Fakat test edilen konsantrasyonlarda doksisisilin KA ve MN oranını ise indüklediğini, sonuç olarak doksisisiklinin sitotoksik etkiye sahip olduğunu ama genotoksik etkiye sahip olmadığını bildirmişlerdir.

2.8. Antrasiklin Grubu Antibiyotiklerle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Venkatesh ve vd. (2007), antineoplastik ilaç olan doksorubisinin (DOX) genotoksik etkisini MN testiyle değerlendirmişlerdir. Beş gün boyunca günde iki defa oral olarak distile su verilmiş farelere bir saat sonra intraperitoneal yolla 5, 10 ve 15 mg/kg vücut ağırlığı DOX verilmiştir. Hayvanlar DOX ile 12, 24, 48 ve 72 saat muamele süresinden sonra öldürülmüşlerdir. DOX'in farklı dozlarıyla muamele edilen farelerin kemik iliği hücrelerinde MNCE (mikronükleuslu norkromatik eritrosit) oranında doza

bağlı bir artış gözlenmiş, MNCE sayısının ise en fazla 15mg/kg DOX dozunda saptandığı bildirilmiştir.

Manjanatha ve vd. (2014), comet assay, MN ve gen ifadesi profillemeye yolu ile F344 sıçanlarında doksorubisinin (DOX) genotoksik etkisini araştırmışlardır. DOX'un genotoksik etkisinin araştırmak için 7 haftalık erkek F344 sıçanlarına intravenöz yolla 1, 2 ve 3 mg/kg dozlar verilmiş ve 0, 24, 48 ve 69 saat sonra ise akış sitometrisi kullanılarak DOX'un periferik kan eritrositlerinin MN değerine etkisinin olup olmadığını, ayrıca kalp, karaciğer, böbrek ve testislerde mutageniteyi saptamak için ise comet assay tekniğini uygulamışlardır. Comet assay sonuçlarına göre DOX'un kalp dokusunda oksidatif DNA hasarında doza bağlı önemli bir artış gözlenmiştir ($P \leq 0.05$). Karaciğerde sadece üst dozda oksidatif DNA hasarında önemli bir artış görülmüştür ($P \leq 0.05$). Şiddetli toksisite nedeniyle MN'a bakılamamıştır. DOX'in kalpte reaktif oksijen türlerinin üretimi yoluyla genotoksik etkiye ve DNA hasarına neden olmuş olabileceği bildirilmiştir.

2.9. Antileprotik Antibiyotiklerle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Roy ve Das (1988), antileprotik ilaç dapsonun *in vivo* fare kemik iliği ve testisinde genotoksisitesini değerlendirmişlerdir. Yetişkin erkek fareler farklı doz (20, 40 ve 80 mg/kg/gün; 4 hafta için) ve farklı periodlarda (40mg/kg/gün; 2, 4 ve 8 hafta için) dapson ile muamele edilmişlerdir. Bu farelerden hem kemik iliği hem de testisler alınmıştır. Ayrıca farelerin ayrı bir grubu 20, 40 ve 80 mg/kg/gün konsantrasyonlarında dapson ile 2 hafta boyunca muamele edilmişlerdir. Bu gruptan da MN testi yapılmıştır. Sonuçta dapsonun kemik iliği hücrelerinde kromozom anormallliği oranını doza bağlı olarak indüklediği, MN oranında da artış saptanmasına rağmen doz-etki ilişkisi görülmediği saptanmıştır. Mayotik hücrelerde de aynı şekilde KA oranının özellikle yüksek dozda önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir.

Das ve Roy (1990), antileprotik ilaç olan klofazimin *in vivo* fare kemik iliği ve spermatositlerde genotoksik etkisinin araştırmak için yaptıkları çalışmada yetişkin farelere 40mg/kg dozda klofazimin ilacını 1, 2 ve 4 hafta boyunca, ayrıca genç farelere de 4, 20 ve 40 mg/kg/gün dozlarındaki ilacı 7 gün boyunca vermişlerdir. Tüm gruplarda KA sayısında önemli artışların olduğu saptanmıştır.

Roy ve Das (1990), klofazimin fare kemik iliği eritrositlerinde MN frekansının yüksek oranda indüklendiğini, özellikle polikromatik eritrositlerin yanı sıra rejenere hepatositlerde de ilacın pozitif klastojenik etkisinin var olduğunu bildirmişlerdir.

Dash ve vd. (1991), farelerde klofazimin genotoksik etkisini KKD analizi ile değerlendirmişlerdir. Üç farklı doz ile (4, 20 ve 40 mg/kg) 15 gün boyunca günde bir kez muamele edilen farelerde tüm dozlarda KKD frekanslarında anlamlı bir artışın olduğu bildirilmiştir.

2.10. Antitüberküloz Antibiyotiklerle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Anitha ve vd. (1994), bir antitüberküloz ilaç olan pirazinamidin genotoksisitesini değerlendirmişlerdir. Pirazinamidin farelere ve tavşanlara sırasıyla her biri terapötik dozun 5, 10 ve 20 katı olan 125, 250 ve 500 mg/kg olmak üzere üç doz ve üç farklı muamele sürelerinde (3, 6 ve 24 saat) intraperitoneal olarak verilmiştir. İncelemeler sonucunda MI'in düştüğü, KA frekansının da arttığı saptanmıştır. Bu gözlemler sonucunda pirazinamidin zayıf genotoksik olduğu bildirilmiştir.

2.11. Antifungal Antibiyotik Olan Aureofungin İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Mujumdar ve vd. (1994), tarımda antifungal ajan olarak kullanılan aureofunginin (ARF) geniş bir doz aralığında (1-1000 µg/ml) Ames Salmonella TA97a, TA98, TA100 ve TA102 suşlarında metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda mutagenik etkisini incelemişlerdir. Aureofunginin TA102 suşunda mutagenik olduğunu fakat TA97a, TA98 ve TA100 suşlarında mutagenik olmadığını saptamışlardır. Aynı araştırmacılar aureofunginin genotoksik etkisini Swiss farelerinde *in vivo* MN testi ile dominant letal mutasyon testi ile de çalışmışlardır. Aureofunginin kemik iliğinde mikronükleuslu polikromatik eritrositlerinin frekansını önemli derecede indüklediğini ve dominant letal mutasyonlarını artırdığını bildirmişlerdir.

2.12. Glikopeptid Antibiyotik Olan Bleomisin İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Promchainant (1975), tedavi edici konsantrasyonlarda (0.1, 0.5, 1.0, 10 ve 50 µg/ml) bleomisin ile muamele edilmiş insan periferel lökositlerinde bleomisinin hem kromozom hem de kromatid tipi anomalileri indüklediğini gözlemiştir. Daha büyük kromozom grupları diğer kromozom gruplarına göre daha çok etkilenmiştir. 0.1-10 µg/ml dozlarda anlamlı bir fark görülmezken 50 µg/ml'lik dozda mitotik indeks ve kromozom anomalisinde anlamlı bir artış olduğu bildirilmiştir.

2.13. Sülfametoksazol Ve Trimetoprim İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Abou-Eisha ve vd. (1999), tarafından trimetoprimin genotoksik etkisi insan periferel kan lenfositlerinde KKD ve MN testleri ile değerlendirilmiştir. İki donörden alınan ve 1-100 mg/ml arasında değişen trimetoprim konsantrasyonları ile muamele edilen kan hücrelerinde KKD ve MN frekanslarının arttığı, trimetoprimin hem sitotoksik hem de genotoksik etkilerinin var olduğu bildirilmiştir.

Abou-Eisha ve vd. (2004), insan periferel kan lenfositlerinde sülfametoksazolün genotoksik etkisini KKD ve MN testleri ile araştırmışlardır. Sağlıklı iki donörden alınan kan örnekleri 10-500 µg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda sülfametoksazol ile muamele edilmiştir. İncelemeler sonucunda sülfametoksazolün yüksek konsantrasyonlarda KKD ve MN frekanslarında hafif bir artış gösterdiğini, sonuç olarak zayıf genotoksik etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

2.14. Kloramfenikol İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Sbrana ve vd. (1991), kloramfenikolün genotoksik olup olmadığını insan lenfositlerinde, fare kemik iliğinde ve Çin Hamster hücrelerinde (V79) incelemişlerdir. İncelemeler sonucunda kloramfenikolün insan periferel lenfositlerinde ve Çin hamster V79 hücrelerinde KKD sayısını zayıf bir şekilde indüklediği, fare kemik iliği hücrelerinde ise güçlü sitotoksik ve genotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir.

3. MATERİYAL VE METOD

Bu çalışmada materyal olarak sağlıklı ve sigara içmeyen 2 bayan ve 2 erkekten alınan periferik kan ve test maddesi olarak DRP kullanılmıştır.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

3.1.1.1. Doripenem

3.1.1.1.1. Doripenem'in kullanım alanları

DRP, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan karbapenem sınıfına ait parenteral 1 β -metilkarbapenem grubu bir antibiyotiktir (Iso ve vd. 1996; Ortho McNeil Janssen Pharmaceuticals. 2008).

Karbapenemler, enfeksiyon hastalığı olan ağır hastalarda veya çoğul dirençli bakteri enfeksiyonu şüphesi taşıyan hastalarda son çare antibiyotik olarak kullanılmaktadırlar (Bradley ve vd. 1999, Paterson 2000, Paterson ve Bonomo 2005, Torres ve vd. 2007). DRP, penisilinazlar ve safalosporinazlar da dahil olmak üzere, Gram-negatif ve Gram-pozitif mikroorganizmalar tarafından üretilen beta-laktamazlara dayanıklıdır (Mori ve vd. 1996). Etkisi süreye bağlıdır (Bhavnani ve vd. 2005, Mandell 2009).

Antipsödomonal etkinliğe sahip olan DRP, komplike intra-abdominal enfeksiyonlar, komplike üriner sistem enfeksiyonları ve nozokomiyal pnömoni tedavisinde kullanılmaktadır. DRP hastaneden edinilmiş pnömoni vakalarında 8 saat arayla bir saatlik süre boyunca 500 mg doz intravenöz infüzyon şeklinde uygulanır. DRP hücre duvar sentezini inhibe ederek bakterisidal etki gösterir. DRP'in antimikrobiyal spektrumu, ertapenemden daha çok imipenem ve meropeneme benzerdir. Bu nedenle, Enterobacteriaceae (genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten suşlar dahil), *Pseudomonas aeruginosa* (dirençli Gram-negatif bir bakteridir), *Acinetobacter sp.*, *Bacteroides fragilis*, streptokoklar ve metisiline duyarlı stafilokoklara karşı anlamlı *in*

vitro aktiviteye sahiptir (Paterson ve Depestel 2009) ve penisline dirençli streptokoklara karşı en aktif karbapenemdir (Jones 2004). DRP, *Streptococcus pneumoniae*, viridans (yeşil) grubu streptokoklar ve beta-hemolitik streptokoklara karşı test edilmiş en güçlü ajanlar arasındadır (Fritsche ve vd. 2005).

3.1.1.1.2. Doripenem'in biyolojik metabolizması

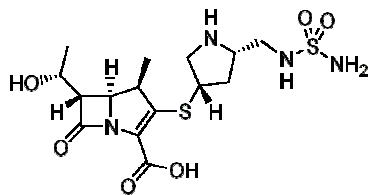
DRP'in plazma proteinlerine bağlanması düşüktür (%8.1) ve plazmada ilacın konsantrasyonları bağımsızdır. DRP'in tahmini eliminasyon yarı ömrü 0.95 saattir. Renal dehidropeptidaz enzimi ile hidrolize olmaz (Anderson 2006). DRP, tek major inaktif metabolit olan açık β -laktam halkası değişmeden böbreklerden elimine edilir. DRP esas olarak, %68-80 oranında değişmeden idrarla atılmaktadır. %1 oranında safra yoluyla atılır (Keam 2008).

3.1.1.1.3. Doripenem'in özellikleri

Kimyasal adı (IUPAC): (4R, 5S, 6S)-6-[(1R)-1-hydroxyethyl]-4-methyl-7-oxo-3-[(3S, 5S)-5-[(sulfamoylamino) methyl]pyrrolidin-3-yl]sulfanyl-1-azabicyclo[3. 2. 0] hept-2-ene-2-carboxylic acid.

Kapalı formülü: C₁₅H₂₄N₄O₆S₂

Açık formülü:



Molekül ağırlığı: 420.50426 g/mol

CAS No: 148016-81-3

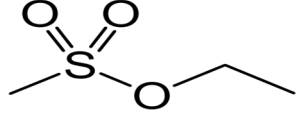
3.1.1.2. Etil metan sülfonat (EMS)

EMS, bu çalışmada mikronükleus, kromozom aberrasyon ve RAPD-PCR testlerinin 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Sigma M0880).

Kimyasal adı (IUPAC):1-Methylsulfonyloxyethane

Kapalı formülü: CH₃SO₃C₂H₅

Açık formülü:



Molekül ağırlığı: 124.16 g/mol

Erime noktası: <25°C

CAS No: 62-50-0

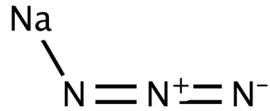
3.1.1.3. Sodyum azid (SA)

Sodyum Azid nokta mutasyonuna neden olan bir mutajendir. Sodyum Azid (Sigma, S2002), bu çalışmada RAPD-PCR testinin 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Diğer İsimleri: Azid, Azium, Sodyum tuzu, hidrazoik asit

Kapalı formülü: NaN₃

Açık formülü:



Molekül ağırlığı: 65.0099 g/mol

Erime noktası: 275°C

CAS No: 26628-22-8

3.1.1.4. Kromozom medyum

Bu çalışmada Gibco firmasının ürettiği PB-Max besi yeri (cat. no. 12552-013), hücre kültürü için kullanılmıştır. PB-Max içerisinde Fetal Bovine Serum, L-glutamine, Gentamicin sulfate ve Phytohemagglutinin bulunmaktadır.

Bu medyum steril kültür tüplerine 2.5 ml olacak şekilde paylaştırılmış ve bu miktarlarda kullanılmıştır.

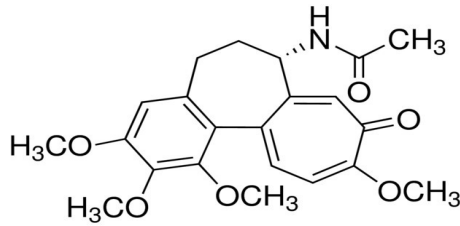
3.1.1.5. Kolşisin

Kolşisin (Colchicine, Sigma, C9754), preparatlar hazırlanırken mitozu durdurucu ajan olarak kullanılmıştır. Kolşisin eriyiği steril saf su içinde hazırlanarak, kromozom medyumunun her mililitresinde 0.06 µg olacak şekilde 2.5 ml'lik kromozom medyumuna ilave edilmiştir.

Kimyasal adı (IUPAC): N-[(7 S)-1, 2, 3, 10-tetramethoxy-9-oxo-5, 6, 7, 9-tetrahydrobenzo[a]heptalen-7-yl]acetamide

Kapalı formülü: C₂₂H₂₅NO₆

Açık formülü:



Molekül ağırlığı: 399.4 g/mol

Etil asetat içeriği: %3.4

Kloroform içeriği: < %0.1

CAS No: 64-86-8

3.1.1.6. Hipotonik eriyik

Hipotonik eriyik olarak %0.4'lük KCl (Merck) kullanılmıştır. Hipotonik eriyik bidistile su içinde stok halinde hazırlanıp, ağzı kapalı cam şişe içinde buzdolabında +4°C'de saklanmıştır. Her preparasyonun iki saat öncesinde yeterli miktarda hipotonik eriyik alınıp, 37°C'deki inkübatörde ısıtılarak kullanılmıştır.

3.1.1.7. Fiksatif

KA deneylerinde, 1 kısım glasiyal asetik asit ve 3 kısım metil alkol karıştırılarak hazırlanan fiksatif kullanılmıştır.

MN deneyleri için ise iki farklı fiksatif karışımı kullanılmıştır. Birinci fiksatif, 1 kısım glasiyal asetik asit, 5 kısım metil alkol olarak hazırlanmıştır. Daha sonra bu fiksatif 1/1 oranında %0.9 NaCl ile karıştırılarak ikinci fiksatif hazırlanmıştır.

Fiksatif kullanılmadan 2 saat önce hazırlanmış ve buzdolabında saklanmıştır. Her preparat yapım işleminde 2 saat önce taze olarak hazırlanarak kullanılmıştır.

3.1.1.8. Sorenson tamponu

Bu eriyik, tampon A ve tampon B olmak üzere iki stok çözelti olarak hazırlanmış ve bu çözeltiler çalışmanın amacına uygun olarak birbirleri ile karıştırılarak (4 ml Tampon A, 4 ml Tampon B) kullanılmıştır.

Sorenson tamponunun hazırlanışı:

Tampon A için 11.34 g KH_2PO_4 250 ml saf suda eritilmiştir (pH=4.8).

Tampon B için 14.83 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 250 ml saf suda eritilmiştir (pH=9.3).

Sorenson tamponu, MN ve KA'ni incelemek için preparat yapımı sırasında 4 ml Tampon A, 4 ml Tampon B ve 4 ml Giemsa ile karıştırılıp 80 ml'ye gelecek şekilde saf su eklenerek preparatların boyanması için kullanılmıştır.

3.1.1.9. Giemsa

Giemsa boyası Merck firmasından (Merck, Cat. No. 1.09204.0500) temin edilip, deneylerimizde Sorenson tamponu ile karıştırılarak elde edilen %5'lik boya eriyiği KA ve MN deneylerinde kromozomları ve çekirdekleri boyamak için kullanılmıştır.

3.1.1.10. Entellan

Hazırlanan preparatları daimi hale getirmek amacıyla lam ve lameli birbirine yapıştırmak için kullanılan şeffaf yapışkan sıvıdır (Merck, Cat. No. 7961).

3.1.1.11. Nitrik asit (HNO₃)

Lamları temizlemek amacıyla 1N HNO₃ çözeltisi kullanılmıştır. Cam şişede saklanarak her defasında tekrar tekrar kullanılmıştır.

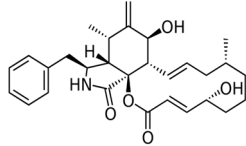
3.1.1.12. Sitokalsin B

MN testinde, hücre bölünmesi sırasında sitokinezi engellemek ve iki nükleuslu hücreler oluşturmak için kullanılmıştır (Sigma, C6762). 6 µg/ml olacak şekilde %50 etil alkol ile hazırlanmıştır.

Kimyasal adı: Cytochalasin B

Kapalı formülü: C₂₉H₃₇NO₅

Açık formülü:



Molekül ağırlığı: 479.6 g/mol

Erime noktası: 218-223°C

CAS No: 14930-96-2

3.1.2. Kullanılan deney ekipmanları

3.1.2.1. Hassas terazi

Kimyasalların tartılmasında, hava akımlarına karşı cam paravanlarla korunan ve 0.0001 g hassasiyetindeki OHAUS PIONEER marka terazi kullanılmıştır.

3.1.2.2. Santrifüj

Rotor çapı 21 cm olan ve 4000 rpm'e kadar yükselebilen devir hızı, 99 dk.'lık zaman ayarlayıcı, açılabilir başlığa sahip ve 16 tüp kapasiteli NÜVE NF 400 marka santrifüj bu çalışmalarda kullanılmıştır.

3.1.2.3. Mikroskop

Koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan OLYMPUS marka binoküler ışık mikroskobu preparat incelemeleri sırasında kullanılmıştır.

3.1.2.4. İnkübatör

Hücrelerin 37°C’de inkübe edilmesi için NÜVE EN 120 marka inkübatör kullanılmıştır.

3.1.2.5. Steril kabin

Hücre kültürü tüplerine kromozom medyumunun konulması, kan ekiminin yapılması, test eriyiklerinin hazırlanması ve kültür tüplerine ilave edilmesi esnasında steril bir ortam olarak, %99.999 partikül tutma özellikli filtreye sahip, UV ve floresan ampulü bulunan ESCO CLASS II BSC marka flow kabin kullanılmıştır.

3.1.2.6. Otoklav

Malzemelerin ve suyun sterilizasyonunda dijital kronometreli WITEG DAIHAN WISECLAVE marka otoklav kullanılmıştır.

3.1.2.7. PCR cihazı

RAPD çalışmaları için 96 hazneli APPLIED BIOSYSTEMS marka PCR cihazı kullanılmıştır.

3.1.2.8. Jel görüntüleme cihazı

Jel, VILBER LOURMAT marka INFINITY 1100 model jel görüntüleme cihazıyla görüntülenmiştir.

3.1.2.9.Elektroforez sistemi

Thermo marka elektroforez sistemi DNA örneklerini jelde yürütmek amacıyla kullanılmıştır.

3.1.2.10.DNA miktarını ölçme cihazı

Genomik DNA miktarı Qubit fluorometer cihazı kullanılarak ng/μl cinsinden ölçülmüştür.

3.2. Lamların temizlenmesi

Kültür süresinin bitiminden iki gün önce etiketli olan lamlar şaleye dizilerek üzerlerini iyice örtecek şekilde 1 N nitrik asit konmuştur. Şalenin ağzı kapatılarak bu şekilde 24 saat bekletilmiştir. Süre bitiminde lamlar yarım saat akan çeşme suyunda iyice yıkanmıştır. Lamlar 3-4 defa saf sudan geçirildikten sonra şale saf su ile doldurularak buzdolabında saklanmıştır.

3.3. Genotoksisite Çalışmaları

3.3.1. İnsan periferik lenfositlerinde kromozom anormalliği (KA) ve mikronukleus (MN) oluşumunu saptamak amacıyla hücre kültürünün yapılması

3.3.1.1. Kromozom anormalliğini saptamak amacıyla hücre kültürünün yapılması, test maddelerinin kültüre ilave edilmesi ve preparatların hazırlanması

3.3.1.1.1. Hücre kültürünün yapılması ve test maddelerinin kültüre ilave edilmesi

Kromozom anormalliklerini saptamak amacıyla hücre kültürünün yapılması ve preparatların hazırlanması Evans (1984), Perry ve Thompson (1984)'un metodlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Aynı yaşlarda, sağlıklı ve sigara içmeyen 4 kişiden (24 ve 25 yaşlarında 2 erkek, 23 ve 25 yaşlarında 2 kadın) alınan 1/10 oranında heparinize

edilmiş periferik kan 2.5 ml'lik kromozom medyumlarına steril şartlarda 0.2 ml olacak şekilde ekilmiştir (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010). Hücre kültürü inkübatörde $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 72 saat inkübe edilmiştir.

DRP'in etkisini incelemek için, kültür süresinin bitimine 24 ve 48 saat kala DRP'in ön çalışma ile belirlenen ve toksik olmayan 3 konsantrasyonu (100, 200 ve 400 $\mu\text{g/ml}$) kültür tüplerine ilave edilmiştir. 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde pozitif kontrol olarak EMS (0.2 $\mu\text{g/ml}$) kullanılmıştır. Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (kültürün 70. saatinde) her tüpe daha önceden hazırlanan kolşisin (0.06 $\mu\text{g/ml}$) eriyiğinden ilave edilmiş ve tüpler hafifçe sallanarak iyice karıştırılmıştır. Hücreler 2 saat süresince (37°C 'de) kolşisin ile ön muameleye tabi tutulmuştur.

Kültür süresi olan 72. saatin bitiminde kültür tüpleri 1200 rpm'de 10 dk. santrifüj edilip, süpernatant atılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden 0.5-0.7 ml'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, etüvde 37°C 'de tutulan hipotonik eriyik (KCl) ilave edilmiştir. Her tüpe 10 ml hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler, ağzı kapatılarak inkübatörde 6 dk. hipotonik eriyik ile 37°C 'de muamele edilmiştir. Sürenin sonunda tüpler 10 dk. 1200 rpm'de santrifüj edilerek, süpernatant atılmıştır. Bir sonraki aşamada her tüpe 10 ml olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 20 dk. fiksatif ile muamele edilen hücreler 10 dk. 1200 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Her fiksatif ilavesinden sonra tüpler santrifüj edilerek üsteki sıvı atılmıştır. Bu işlem 3 defa tekrarlanmıştır. Son santrifüjden sonra dipte 0.5-0.7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra preparat yapma işlemine geçilmiştir. Tüpün dibinde toplanan hücreler pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Pasteur pipeti ile daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanmış lamaların üzerine, farklı alanlara 1'er damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak (her lama 3-4 damla) hücrelerin ve dolayısı ile kromozomların lam üzerinde yayılması sağlanmıştır. Hücre süspansiyonunun lamlara damlatılması esnasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edilmiştir.

3.3.1.1.2. Preparatların boyanması

Kromozomların boyanması için % 5'lik Giemsa boya eriyiği hazırlanmıştır. %5'lik Giemsa boyası; 4 ml Tampon A, 4 ml Tampon B ve 4 ml Giemsa boyası karıştırılarak

üzerine 68 ml saf su eklenerek 80 ml'ye tamamlanması ile hazırlanmıştır. Daha sonra boya dik şale içerisine filtre kağıtları ile süzölmüştür. Kurumuş preparatlar dik şalelere yerleştirilip 10-15 dk. bekletilip boyanmaları sağlanmıştır. Süre sonunda boyanan preparatlar üç ayrı kaptaki saf sudan geçirilerek boyanın fazlasından kurtulması sağlanmış ve ardından preparatlar dik konumda kurumaya bırakılmıştır. Kurumuş preparatlar entellan ile lamelin kapatılması sonucu daimi hale getirilmiştir. Entellan kuruduktan sonra daimi preparatlarda mikroskobik incelemeler yapılmıştır.

3.3.1.1.3. Mikroskobik inceleme

Hazırlanan daimi preparatlardaki kromozom anormallikleri OLYMPUS marka binoküler mikroskopta immersiyon objektifi ile (10x100=1000 kez büyütölerek) taranmıştır.

Her bir kişiden hazırlanan preparatlardan iyi dağılmış kromozomlara sahip toplam 100 metafaz plağı KA'ni saptamak amacıyla incelenmiştir. Bu hücreler içinde gözlediğimiz yapısal ve sayısal kromozom anormallikleri Uluslararası İnsan Sitogenetik Adlandırma Sistemine (ISCN= International System for Human Cytogenetic Nomenclature) uygun olarak değerlendirilmiş ve adlandırılmıştır (Paz-y-Mino ve vd. 2002). Bu çalışmada gaplar kromozom anormalliğı olarak değerlendirilmemiştir (Mace ve vd. 1978).

3.3.1.2. Mikronukleus (MN) oluşumunu saptamak amacıyla hücre kültürünün yapılması, test maddelerinin kültüre ilave edilmesi ve preparatların hazırlanması

3.3.1.2.1. Hücre kültürünün yapılması ve test maddelerinin kültüre ilave edilmesi

Mikronükleus sayısını saptamak için Fenech (2000) ile Kirsch-Volders ve vd. (2003) tarafından geliştirilen metod modifiye edilerek kullanılmıştır. Aynı yaşlarda, sağlıklı ve sigara içmeyen 4 kişiden (2 erkek, 2 kadın) alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş periferik kanın 0.2 ml'si 2.5 ml'lik kromozom medyumlarına steril şartlarda

ekilmiştir (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010). Hücre kültürü inkübatörde $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 68 saat inkübe edilmiştir.

DRP'in etkisini incelemek için kültür süresinin bitimine 24 ve 48 saat kala DRP'in ön çalışma ile belirlenen ve toksik olmayan 3 konsantrasyonu (100, 200 ve 400 $\mu\text{g/ml}$) kültür tüplerine ilave edilmiştir. 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde pozitif kontrol olarak EMS (0.2 $\mu\text{g/ml}$) kullanılmıştır. İki nükleuslu hücre oluşumunu sağlamak için kültür bitimine 24 saat kala bütün tüplere 6 $\mu\text{g/ml}$ olacak şekilde sitokalsin B (Cytochalasin B, Sigma, C6762) ilave edilmiştir. . Kültür süresi olan 68. saatin bitiminde kültür tüpleri 1200 rpm'de 15 dk. santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden 0.5-0.7 ml'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, 37°C 'de tutulan hipotonik eriyik ilave edilmiştir. Her tüpe 5 ml hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler, ağzı kapatılarak inkübatörde tutulmuştur. Hücreler 2 dk. hipotonik eriyikte 37°C 'de muamele edilmiştir. Sürenin sonunda tüpler 10 dk. 1200 rpm'de santrifüj edilerek, süpernatant atılmıştır. Bu sefer her tüpe 5 ml olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edilmiştir. İlk fiksatif 1 kısım asetik asit 5 kısım metil alkol karışımının 1/1 oranında %0.9 NaCl ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında 20 dk. fiksatif ile muamele edilen hücreler 1200 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem 2 kere tekrarlanmış ve ilk fiksatiften farklı karışımlar kullanılmıştır (1 kısım asetik asit 5 kısım metil alkol). Her fiksatif ilavesinden sonra tüpler santrifüj edilerek üstteki sıvı atılmıştır. Son santrifüjden sonra dipte 0.5-0.7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra preparat yapma işlemine geçilmiştir.

Tüpün dibinde toplanan hücreler pastör pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirilmiş ve daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanan lamaların üzerine farklı alanlara 1'er damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak (her lama 3-4 damla) hücrelerin lam üzerinde yayılması sağlanmıştır. Bu şekilde hazırlanacak preparatlar kurumak üzere 24 saat oda ısısında bekletilmiştir.

3.3.1.2.2. Preparatların boyanması

Mikronükleusların boyanması için % 5'lik Giemsa boya eriyiği hazırlanmıştır. %5'lik Giemsa boyası; 4 ml Tampon A, 4 ml Tampon B ve 4 ml Giemsa boyası karıştırılarak ve üzerine 68 ml saf su eklenerek 80 ml'ye tamamlanması ile hazırlanmıştır.

Daha sonra, boya dik şale içerisine filtre kağıtları ile süzölmüştür. Kurumuş preparatlar, dik şalelere yerleştirilip 10-15 dk. bekletilip, boyanmaları sağlanmıştır. Süre sonunda boyanan preparatlar üç ayrı kaptaki saf sudan geçirilerek boyanın, fazlasından kurtulması sağlanmış ve ardından preparatlar dik konumda kurumaya bırakılmıştır. Kurumuş preparatlar entellan ile lamelin kapatılması sonucu daimi hale getirilmiştir. Entellan kuruduktan sonra, daimi preparatlarda mikroskobik incelemeler yapılmıştır.

3.3.1.2.3. Mikroskobik inceleme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar Olympus marka binoküler ışık mikroskobunda 40'lık objektif (10x40=400 büyütmede) ile incelenmiştir. Bu incelemeler sırasında her bir kişiden hazırlanan preparatlardan 2000 tane iki nukleuslu (binökleer) hücre sayılmış, bu iki nukleuslu hücreler içerisinden mikronukleuslu olanlar saptanmıştır. Mikronukleus bulunan iki nukleuslu hücrelerin toplam hücre sayısına oranlaması ile mikronukleuslu binökleer hücre oranı hesaplanmıştır. Binökleer hücre ve mikronukleus ayrımı Titenko-Holland ve vd. (1997) ve Fenech (2000)'e göre yapılmıştır:

- 1-Hücreler iki nukleusa sahip olmalıdır.
- 2-Hücreler belirgin sitoplazması ile yuvarlak veya oval görünümlü olmalıdır.
- 3-Nukleuslar belirgin nukleus zarı ile çevrili yuvarlak veya oval görünümlü olmalıdır.
- 4-Mikronukleus çapı ana nukleusun 1/3'ü kadar ya da daha küçük olmalıdır.
- 5-MN'ler ana nukleus kadar boyanmış olmalıdır.
- 6-Yalnızca bir nukleus bölünmesi geçiren hücrelerde MN sayımı esas alınmalıdır.
- 7-MN'ler ana nukleustan bariz bir şekilde ayrılmış olmalı ya da MN sınırları ana nukleusun sınırlarından ayırt edilebilir olmalıdır.

Ayrıca aynı kişiden hazırlanan preparatlardan 1000 tane hücre sayılarak, bu hücreler arasından bir, iki, üç ve dört nukleuslu olanların oranı saptanmıştır (Şekil 3.1). Bu orandan yola çıkarak Nukleer Bölünme İndeksi (NBİ) (Nuclear Division Index = NDI) hesaplanmıştır (Fenech, 2000). Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

$$NBİ = (1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times N_3 + 4 \times N_4) / n$$

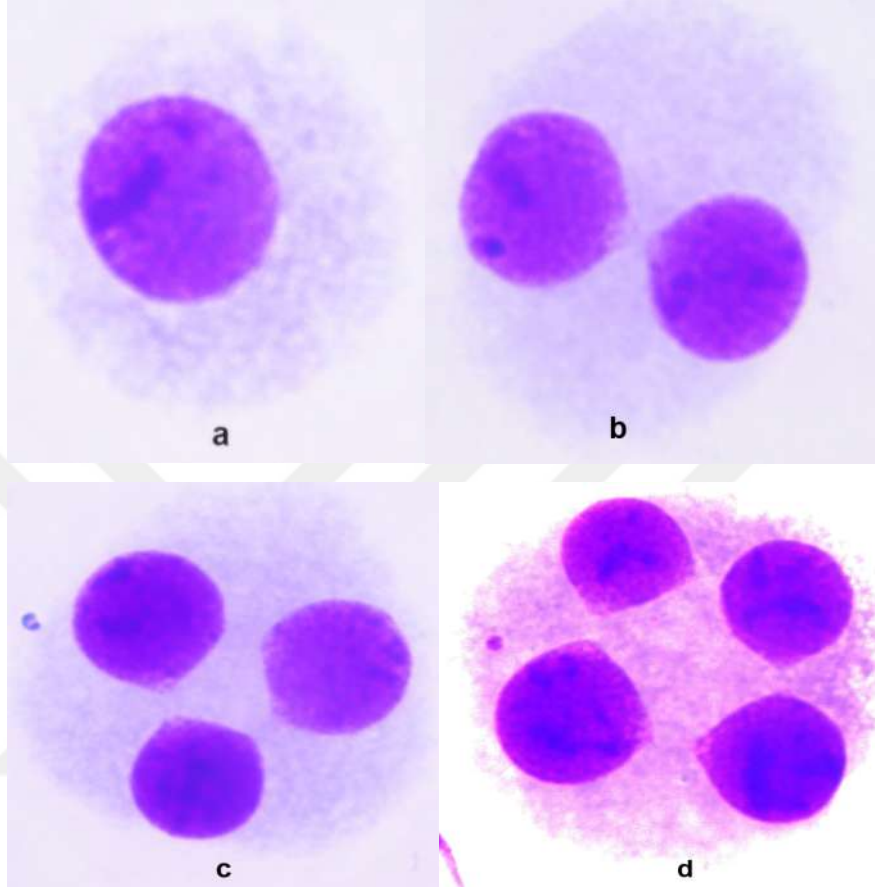
N_1 : 1 nukleuslu hücre sayısı

N_2 : 2 nukleuslu hücre sayısı

N_3 : 3 nukleuslu hücre sayısı

N_4 : 4 nukleuslu hücre sayısı

n : Toplam hücre sayısı



Şekil 3.1. Bir (a), iki (b), üç (c) ve dört (d) nukleuslu hücreler

3.3.2. İnsan periferel lenfositlerinde RAPD-PCR yöntemi için hücre kültürünün yapılması

3.3.2.1. RAPD-PCR için lenfosit hücre kültürünün başlatılması ve besiyerinin uzaklaştırılması

Yaşları aynı ve sigara içmeyen bir erkek ve bir bayandan alınan fakat heparinize edilmeyen periferel kan hızlı bir şekilde ve steril şartlarda 3 ml'lik besi yerine 10 damla (0.33 ml) olacak şekilde ekilmiş, hücre kültürünün $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 'deki inkübatörde 72 saat boyunca inkübe edilmesi sağlanmıştır. İnkübasyon sırasında DRP'in üç farklı dozu (100, 200 ve 400 $\mu\text{g/ml}$) 24 ve 48 saat muamele süresi için besiyerine ilave edilmiş ve periferel

lenfositlerin kimyasal ile muamele edilmesi sağlanmıştır. Çalışmanın bu kısmında hem EMS (0.2 µg/ml) hem de sodyum azid (SA, 2 µg/ml) pozitif mutajen olarak kullanılmıştır.

RAPD-PCR çalışması için DNA izolasyonundan önce kültürdeki besiyerinin uzaklaştırmak amacıyla kültür süresi olan 72. saatin bitiminde kültür tüpleri 4000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilerek lenfositlerin dibe çökmesi sağlanmıştır. Süpernatant atıldıktan sonra 10 ml %0.9 NaCl ilave edilmiş ve tüpler karıştırılarak homojenize edilmiştir. Örnekler 2000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Bu işlem iki defa tekrarlanarak ortamdaki besiyerinin uzaklaştırılması sağlanmıştır.

3.3.2.2. Lenfosit kültüründen DNA izolasyonu

Lenfosit kültüründen DNA izolasyonu Roch marka kit ile yapılmıştır (Roche Diagnostics GmbH, Man-nheim, Germany)(www.roche-applied-science.com). Eppendorf tüpe 200 µl bağlayıcı tampon ve 40 µl proteinaz K eklenmiş ve üzerine 200 µl muameleli kan ilave edilmiştir. Karışım 70°C derecede 10 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyon bittikten sonra 100 µl isopropanol eklenerek iyice karıştırılmış ve karışım daha sonra, filtre tüpüne aktarılmıştır. 8000 g'de 1 dk. santrifüj edilmiş, santrifüj bittikten sonra, koleksiyon tüpü atılıp yeni bir koleksiyon tüpüne konulmuştur. 500 µl inhibitör removal tamponu eklenip, 8000 g'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Her santrifüjden sonra koleksiyon tüpleri yenilenmiştir. Santrifüj bittikten sonra 500 µl yıkama tamponu eklenip, 8000 g'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kez tekrar edilmiştir. Santrifüj bittikten sonra 13000 g'de 10 sn. santrifüj edilmiştir. En sonunda yeni bir tüpe alınan DNA'yı bağlamış olan filtrelerin üzerine 70°C'de ısıtılmış 200 µl elution tamponu konulmuştur. Filtreler 8000 g'de 1 dk. santrifüj edilmiş ve DNA filtrelerden kurtararak elution solüsyonunda toplanmıştır.

3.3.2.3. İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyonunun belirlenmesi ve uygun konsantrasyonlarında DNA eriyiklerinin hazırlanması

DNA örneklerinin konsantrasyonunun belirlenmesinde Qubit fluorometer cihazı kullanılmıştır. Bir eppendorfa her bir örnek için, 199 µl Quant-iT tamponu ve 1 µl Quant-iT reaktifi eklenip çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden 190 µl alınıp, üzeri 10 µl

gDNA ile tamalanarak Qubit ile DNA miktarı saptanmıştır. Daha sonra $M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$ formulu kullanılarak istenilen konsantrasyonlarda DNA hazırlanmıştır.

3.3.2.4. İzole edilen DNA örneklerinden RAPD-PCR'in gerçekleştirilmesi

Bu çalışmada 10 bç uzunluğunda ve toplam 10 adet alfa DNA primeri kullanılmıştır. Primerlerin 5'-3' nükleotid sıraları çizelgedeki gibidir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Bu çalışmada kullanılan RAPD-PCR primerleri

Primerler	Sekanslar (5'-3')	G+C %	Cat.no
PM1	5'-GTTTCGCTCC- 3'	60	OPB-01
PM2	5'-GTAGACCCAT- 3'	50	Buyukleyla, 2013
PM3	5'-AAGAGCCCGT- 3'	60	Buyukleyla, 2013
PM4	5'-TTGGCACGGG- 3'	70	OPD-07
PM5	5'-AACGCGCAAC- 3'	60	Buyukleyla, 2013
PM6	5'-GGTGACGCAG- 3'	70	OPB-07
PM7	5'-GGGTAACGCC- 3'	70	OPA-09
PM8	5'-CCCGTCAGCA- 3'	70	Buyukleyla, 2013
PM9	5'-TCCGATGCTG- 3'	60	OPS-07
PM10	5'-CTGCGCTGGA- 3'	70	OPU-16

RAPD-PCR'ı yapılacak her bir DNA örneği için Çizelge 3.2'de görülen bileşenler ve miktarlar kullanılarak flow kabinde gerekli hazırlıklar buz üzerinde yapılmıştır. Hazırlanan bu örnekler RAPD-PCR reaksiyonlarını gerçekleştirmek üzere Thermal Cycler cihazına yerleştirilerek belirtilen PCR sıcaklık, süre ve döngülerde DNA örneklerinin polimerizasyon işlemleri başlatılmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.2. RAPD-PCR'da kullanılan kimyasallar ve hacimleri

PCR Bileşenleri	Hacim (µL)
ddH ₂ O	11.5
10X Taq Buffer	2.5
MgCl ₂ (25 mM)	3.0
dNTP mix (25mM)	0.5
Primer (5 pmol)	4.0
Taq DNA Polimeraz(500 Ünite/µL)	1.0
DNA (5 ng/ml)	2.5
Toplam hacim	25

Çizelge 3.3. RAPD tekniğinin uygulanmasında PCR sıcaklık ve döngü koşulları

Program No	İşlem	Sıcaklık (0C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
1.	Ön denatürasyon	95	5	1
2.1	Denatürasyon	95	1	35
2.2	Primerin DNA'ya			
2.3	bağlanması	34	1	
	Uzama safhası	72	2	
3.	Son uzama safhası	72	10	1
4.	Soğutma	4	∞	

3.3.2.5. Agaroz jelin hazırlanması

PCR örneklerinin yürütülmesi için %1.8'lik agaroz jel hazırlanmıştır. 10X TBE çözeltisinden 50 mL alınarak 1000 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır. Böylece 0.5X TBE çözeltisi elde edilmiştir. %1.8'lik agaroz jel hazırlamak için; 1.8 g agaroz, hassas terazide tartılıp erlene konulup, üzerine 100 mL 0.5X TBE çözeltisi eklenmiştir. Erlen mikrodalga fırına konulup çözelti şeffaf olana kadar kaynatılmıştır. Uygun sıcaklığa kadar soğutulup, tarak yerleştirilmiş plağa dökülmüştür. Donan jel tanka konulup tarak çıkartılmıştır. Bu şekilde PCR örneklerini yüklemek için %1.8'lik agaroz jel hazırlanmıştır.

3.3.2.6. RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

PCR ile amplifiye olmuş DNA moleküllerinin ayrıştırılmasında %1.8'lik agaroz jel kullanılmıştır. PCR örneklerinden 25 µl alınıp 3 µl 6X DNA loading dye ile karıştırılıp, jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. Yüklenen örnekler, 150 voltta 75 dk. yürütülmüştür.

3.3.2.7. Jeldeki RAPD-PCR ürünlerinin görüntülenmesi

Elektroforez yapılan jeller, 1 dk etidyum bromür (5 µg/ml) ile boyanmış, boya artıklarından temizlenmesi için ise 30 dk. saf suda bekletilmiştir. Daha sonra, kullanılmış primerlerle elde edilmiş, RAPD profillerinde amplifikasyonun olup olmadığını öğrenmek için jel görüntüleme cihazı ile fotoğrafları çekilmiştir.

3.3.2.8. Elde edilen RAPD profillerinin değerlendirilmesi

Elde edilen RAPD profillerinde yeni bandların oluşup oluşmadığı; band kaybının olup olmadığı, kontrol grupları ile karşılaştırılarak puanlama yapılmıştır. Örneklerin puanlaması yapılırken RAPD profilindeki kontrolde herbir band için, gözlenen farklılık (yeni bir band oluşumu veya band kaybı) varsa "1", farklılık yoksa "0" olarak değerlendirmeye alınmıştır. Puanlama sonucunda elde edilen doneler çizelge haline getirilerek t testiyle istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel değerlendirme ortalama polimorfik band sayısının hesaplanması temeline dayanmaktadır. Hesaplama, herbir muamele grubuna ilişkin toplam polimorfik band sayısı, o grup için primerlerin hepsiyle elde edilen toplam (polimorfik+monomorfik) band sayısına bölünerek yapılmıştır. Genotoksik tesir, ayrıca genomik kalıp stabilite (GKS) yüzdeliği (%GTS: Genomic Template Stability) $100 - 100.(a/n)$ formülüne göre hesaplanarak değerlendirilmiştir. "a" değeri muamele edilen herbir numunedeki belirlenmiş olan polimorfik band sayısını, "n" değeri ise kontroldeki toplam band sayısını ifade etmektedir (Atienzar ve vd. 1999). Kontrol numunesinin GKS yüzdesi 100 olarak kabul edilmiştir. Herbir primer için hesaplanan yüzde GKS değerleri kullanılarak erkek ve dişi fertler birlikte değerlendirilerek istatistiki analizler yapılmıştır. Muameleli numunelerin GKS yüzde değeri kontrolün GKS yüzde değerinden ne kadar azalırsa, yapılan işlem sonucunda oluşan genotoksik etki de o derecede artmaktadır.

3.4. Mikroskopta Fotoğraf Çekme

KA ve MN'ların fotoğrafları, LEICA DM750 marka trinoküler mikroskoba bağlı fotoğraf makinesinde 1000 büyütmede çekilmiştir. Çeşitli kromozomal anormallik içeren hücreler ile iki nükleuslu (çekirdekli) hücreler içinden mikronükleusa sahip olanların fotoğrafları ve bir, iki, üç ve dört çekirdekli hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir.

3.5. İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Mikroskobik inceleme sonunda, muameleli gruplardan elde edilmiş KA, anormal hücre (AH), MN, MI ve NBI değerleri ile kontrol değerleri karşılaştırılarak arasındaki

farkın önemli olup olmadığı t-testiyle araştırılmıştır. Doz ve etki arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacı ile regresyon ve korelasyon analizleri yapılmıştır. Bununla birlikte, mikroskobik incelemelerden elde edilmiş sonuçlar çizelgeler şeklinde verilmiştir.

Ortalama polimorfik band sayısı ve yüzde genomik kalıp stabilite (GKS) değerleri de t-testi ile analiz edilerek kontrol değerleri ile muameleli grupların değerleri arasındaki farkın önemli olup olmadığı saptanmıştır.



4. BULGULAR

DRP'in *in vitro* ortamda insan periferik lenfositlerinde genotoksik ve sitotoksik etkisinin araştırılması amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada, DRP'in üç farklı dozu (100, 200 ve 400 µg/ml) 24 ve 48 saat boyunca insan periferik lenfositleri ile muamele edilmiştir. Genotoksik etki kromozom anormallığı (KA) ve anormal hücre (AH) yüzdeleri ile mikronükleus frekansının saptanması ile araştırılmıştır. DRP'in sitotoksik etkisi ise mitotik indeks (MI) ve nükleer bölünme indeksi (NBI)'nin hesaplanması ile saptanmıştır. Ayrıca RAPD-PCR yöntemi ile DRP'in DNA baz değişimine sebep olup olmadığı da saptanmıştır.

Çizelge.4.1. Değişik dozlarda doripenem ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde yapısal kromozom anormallikleri ile anormal hücre yüzdesi

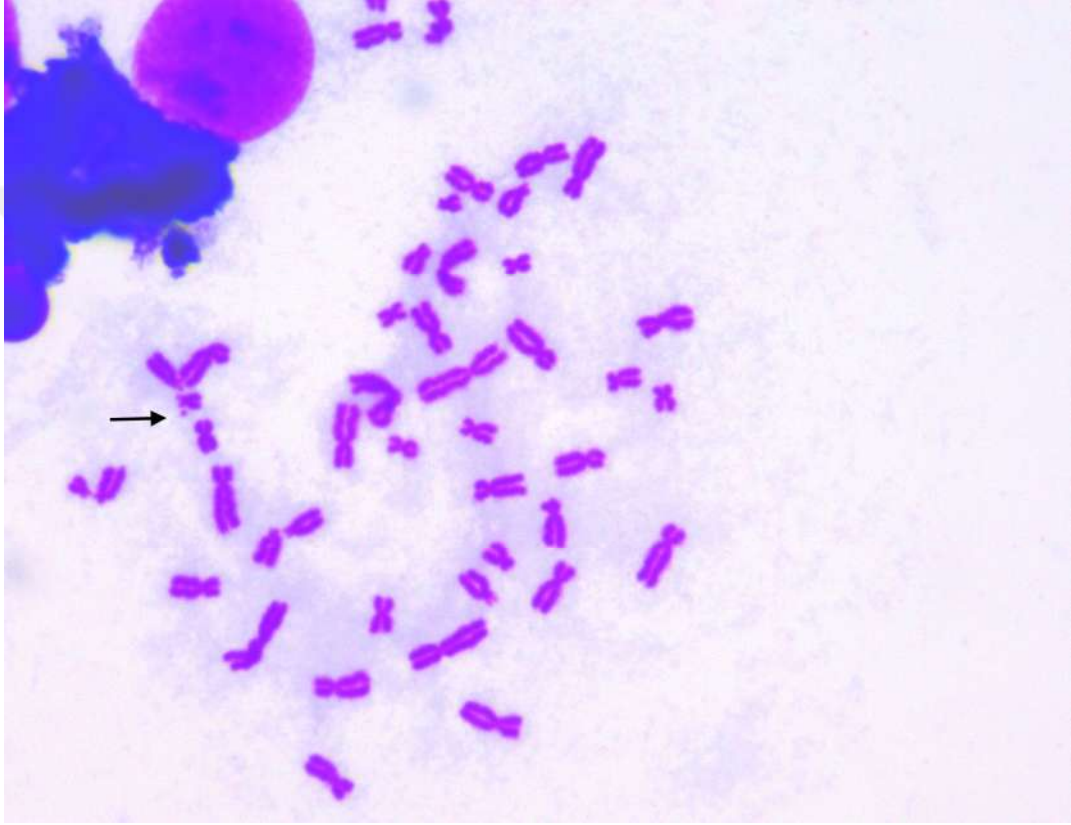
Test maddesi	Süre (saat)	Konsant. (µg/ml)	Anormallik çeşitleri+		P	Yapısal KA±SE (%)	Anormal hücre±SE (%)
			B'	B''			
Kontrol	-	-	5	1	3	1.50±0.64	2.00±0.70
EMS	24	0.2	64	26		22.50±4.85	18.75±3.81
DRP	24	100	7	1	5	2.00±0.57	3.25±1.03
“	24	200	20	1	3	5.25±0.47**	5.50±0.86*
“	24	400	11	2		3.25±1.79	3.25±1.79
EMS	48	0.2	100	75		43.75±9.89	26.25±6.75
DRP	48	100	11	3		3.50±1.84	3.50±1.84
“	48	200	19	2		5.25±1.65	4.50±1.50
“	48	400	12	7		4.75±1.43	4.25±1.18

+B', Kromatid tipi kırık; B'', kromozom tipi kırık; P, poliploidi
Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli; *: P≤0.05; **: P≤0.01

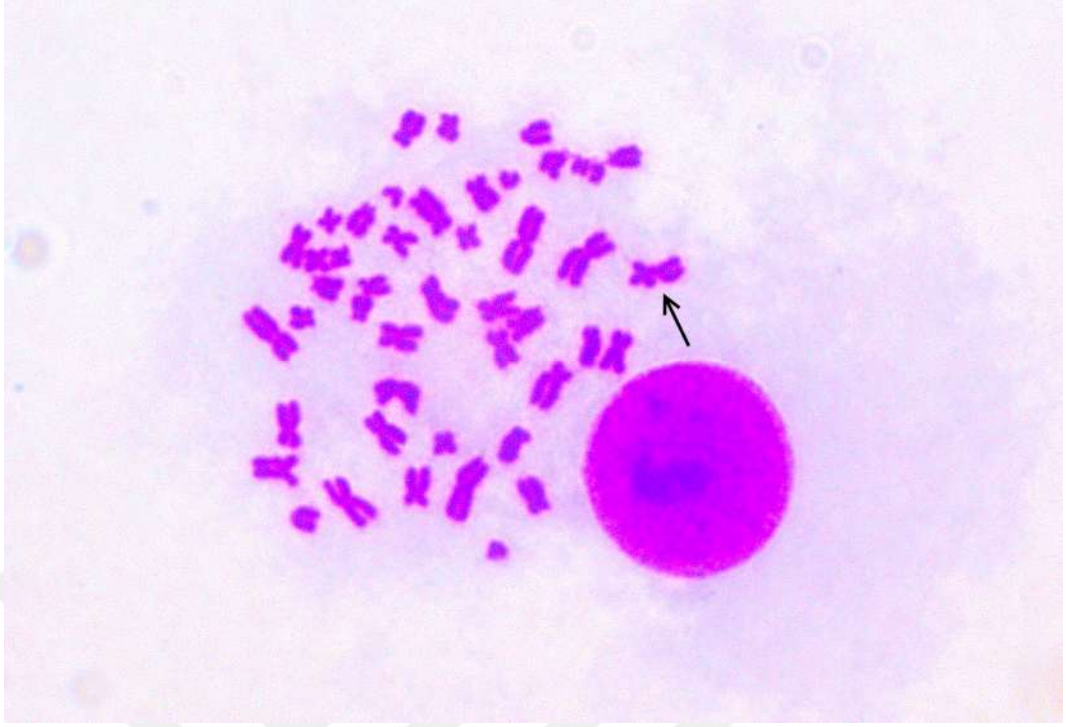
Yapılan incelemeler sonucunda DRP, hem KA hem de AH yüzdesini istatistiksel anlamda önemli derecede artırmamıştır (Çizelge 4.1). Çizelge incelendiğinde DRP'in

sadece 200 µg/ml'lik muamele dozunda ve 24 saatlik muamele süresinde her iki anormalliği önemli derecede indüklediği görülmektedir. Fakat diğer dozlarda KA ve AH yüzdeleri artırılmış olsada istatistiki anlamda önemsiz bulunmuştur. Ayrıca korelasyon ve regresyon analizlerine göre herhangi bir doz-etki ilişkisine de rastlanmamıştır.

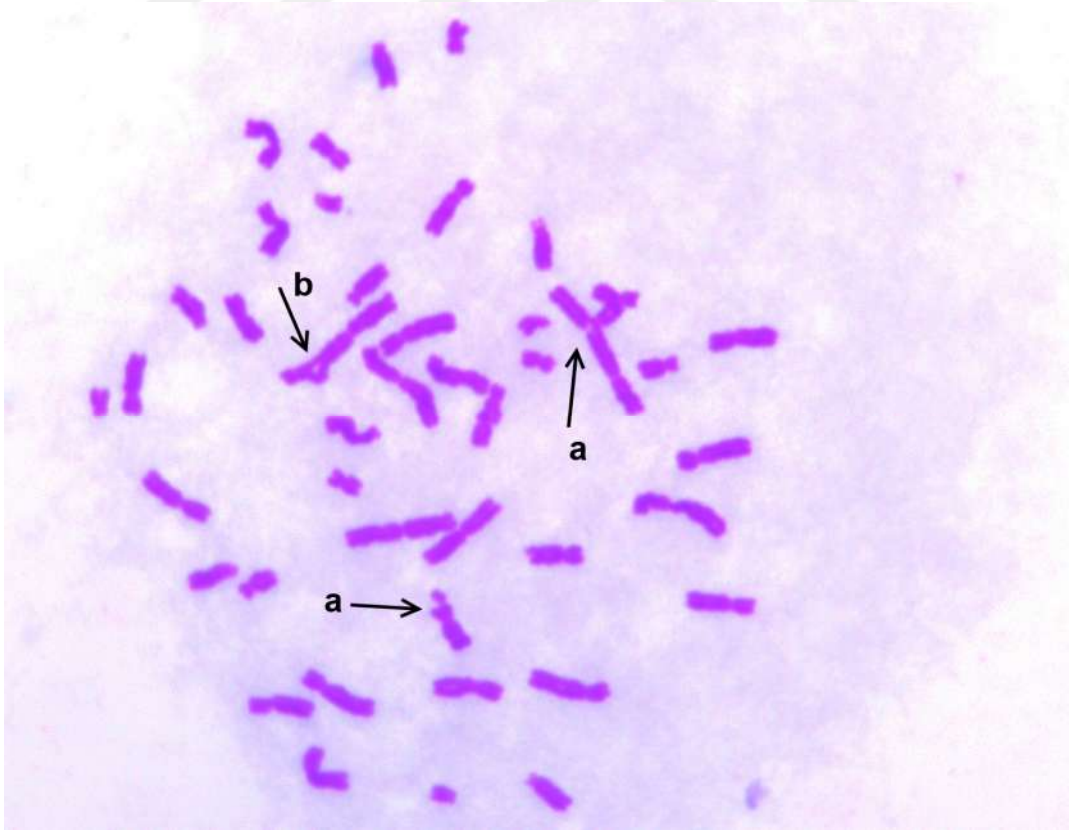
Bu çalışmada daha çok kromatid tipi kırık görülürken (Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3a), daha az olarak da kromozom tipi kırık (Şekil 4.3b) ve poliploidi (Şekil 4.4) gözlenmiştir.



Şekil 4.1. Kromatid kırığı (DRP, 400 µg/ml, 48 saat)



Şekil 4.2. Kromatid kırığı (DRP, 400 µg/ml, 48 saat)



Şekil 4.3. Kromatid kırığı (a) ve kromozom kırığı (kromatid değişimi, chromatid exchange)(b) (EMS, 0.2 µg/ml, 24 saat)



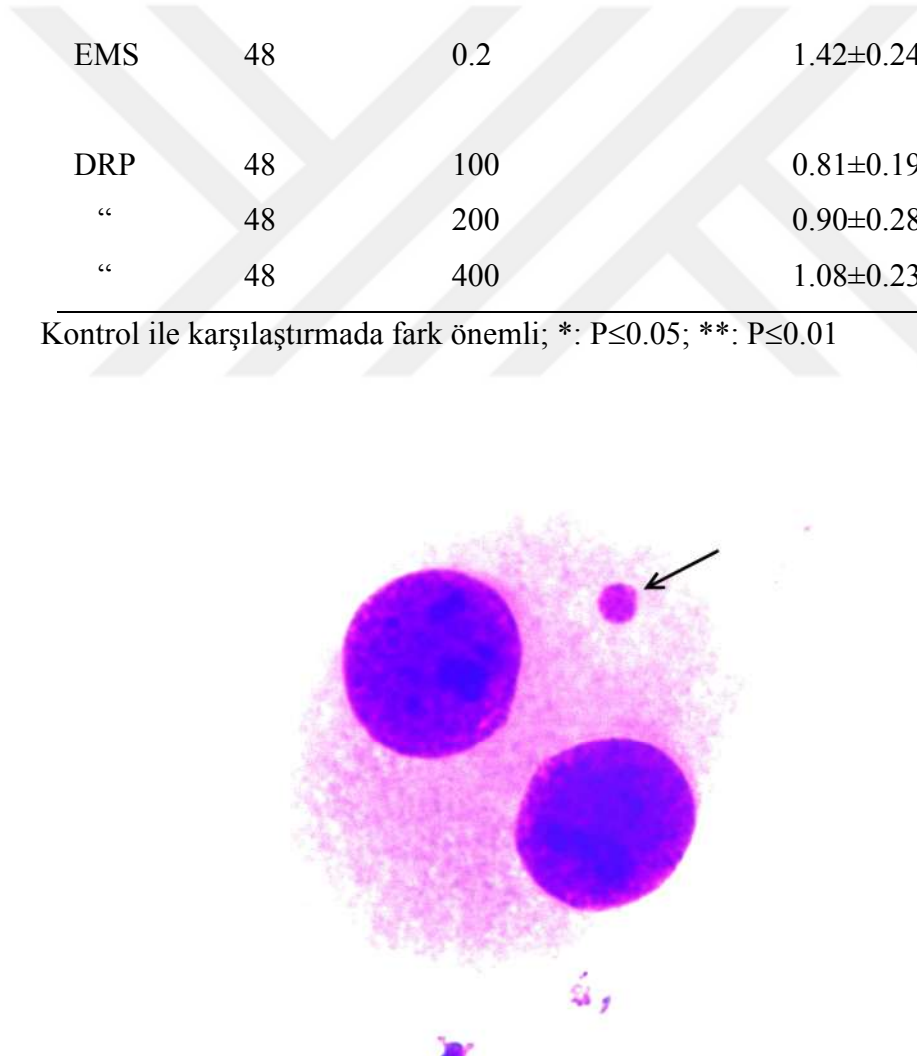
Şekil 4.4. Poliploid hücre (DRP, 100 µg/ml, 24 saat)

MN iki nükleuslu (binükleer) hücrelerde incelenmiştir (Şekil 4.5). DRP tüm dozlarda ve muamele sürelerinde insan periferik lenfositlerinde MN frekansını istatistiki anlamda artırmamıştır (Çizelge 4.2). Çizelge incelendiğinde her iki muamele süresinde ve en yüksek dozda MN frekansının artmış olduğu gözlenirse de istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.

Çizelge 4.2. Değişik dozlarda doripenem ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferallenfositlerinde mikronükleuslu binükleer hücre yüzdesi

Test maddesi	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/ml)	Mikronükleus'lu binükleer hücre (%) ±SE
Kontrol	-	-	0.39±0.10
EMS	24	0.2	1.02±0.12
DRP	24	100	0.76±0.13
“	24	200	0.84±0.24
“	24	400	1.08±0.29
EMS	48	0.2	1.42±0.24
DRP	48	100	0.81±0.19
“	48	200	0.90±0.28
“	48	400	1.08±0.23

Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli; *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$



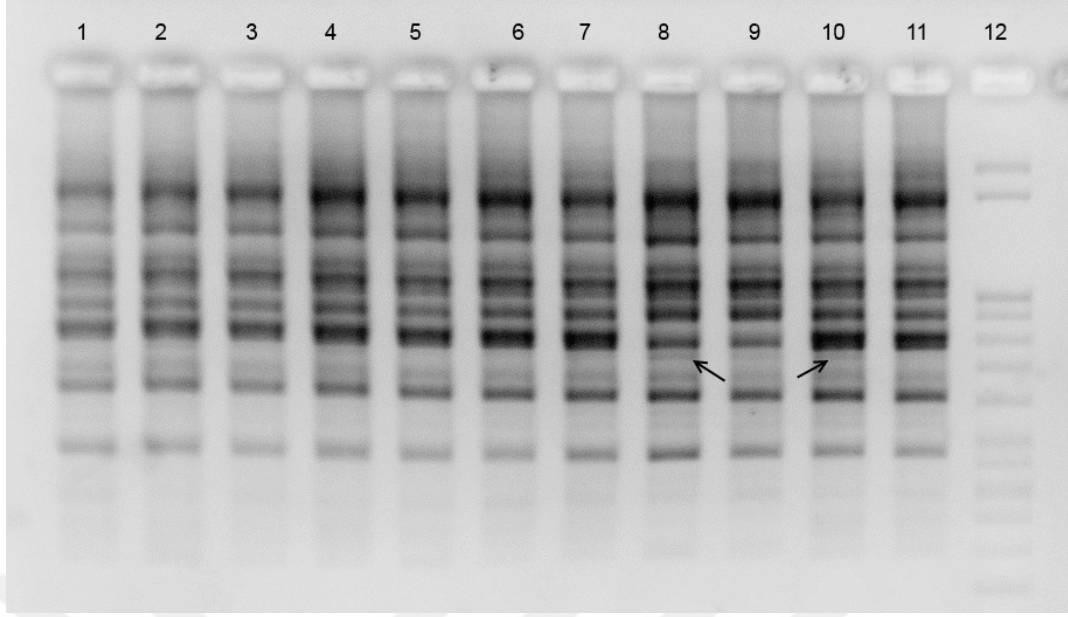
Şekil 4.5. Mikronükleuslu binükleer hücre

Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi DRP, kullanılan tüm dozlarında hem MI hem de NBI oranlarını indüklememiş, dolayısıyla sitotoksik etki göstermemiştir.

Çizelge 4.3. Değişik dozlarda doripenem ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde MI ve NBI frekansları

Test maddesi	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/ml)	MI±SE (%)	NBI±SE
Kontrol	-	-	7.89±0,71	1.62±0.12
EMS	24	0.2	5.13±0.48	1.31±0.08
DRP	24	100	7.60±0.49	1.43±0.09
“	24	200	7.80±0.19	1.51±0.09
“	24	400	7.08±0.31	1.42±0.08
EMS	48	0.2	5.21±1.16	1.59±0.08
DRP	48	100	8.18±0.40	1.67±0.05
“	48	200	7.50±0.64	1.56±0.05
“	48	400	7.18±0.27	1.61±0.10

RAPD-PCR çalışmaları sonucu yapılan elektroforez çalışmalarında çeşitli band profilleri saptanmıştır (Şekil 4.6). Elde edilen band profilleri analiz edilerek çizelge 4.4 ve çizelge 4.5'te verilmiştir. Çalışma sonucunda erkek DNA'sının 10 primer ile amplifikasyonunda kontrol grubunda toplam 106 band, bayan DNA'sının amplifikasyonu sonucunda da kontrol grubunda toplam 88 band sayılmıştır. Kontrol ile kıyaslanarak her muamele grubunda tesbit edilen polimorfik band sayılarının toplam sayısı hesaplanmış ve tablolarda sunulmuştur.



Şekil 4.6. Bayan birey DNA'sının band profilleri (PM6). 1: Kontrol, 2: EMS 0.2 µg/ml 24 h; 3: SA 2 µg/ml 24 h; 4: DRP 100 µg/ml 24 h; 5: DRP 200 µg/ml 24 h; 6: DRP 400 µg/ml 24 h; 7: EMS 0.2 µg/ml 48 h; 8: SA 2 µg/ml 48 h; 9: DRP 100 µg/ml 48 h; 10: DRP 200 µg/ml 48 h; 11: DRP 400 µg/ml 48 h; 12: Marker (100 bç)

Çizelge 4.4. Doripenem ile muamele edilen erkek birey DNA'sının her bir primere ait RAPD profillerinin kontroldeki band sayıları ve muameleli grupların kontrolle kıyaslanması sonucunda elde edilen polimorfik band sayıları

Primer	Toplam KBS*	Kontrolden farklı olarak gözlenen polimorfik band sayısı									
		24 saat muamele µg/ml					48 saat muamele µg/ml				
		EMS 0.2 µg/ml	SA 2 µg/ml	DRP 100 µg/ml	DRP 200 µg/ml	DRP 400 µg/ml	EMS 0.2 µg/ml	SA 2 µg/ml	DRP 100 µg/ml	DRP 200 µg/ml	DRP 400 µg/ml
PM1	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PM2	8	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2
PM3	11	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
PM4	11	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1
PM5	11	1	1	0	0	0	2	2	0	0	0
PM6	12	2	2	0	0	1	0	0	0	1	1
PM7	11	1	2	1	0	1	1	1	1	0	0
PM8	12	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1
PM9	9	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
PM10	13	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*KBS. Kontroldeki band sayısı

Çizelge 4.5. Doripenem ile muamele edilen bayan birey DNA'sının her bir primere ait RAPD profillerinin kontroldeki band sayıları ve muameleli grupların kontrolle kıyaslanması sonucunda elde edilen polimorfik band sayıları

Primer	Toplam KBS*	Kontrolde farklı olarak gözlenen polimorfik band sayısı									
		24 saat muamele µg/ml					48 saat muamele µg/ml				
		EMS 0.2 µg/ml	SA 2 µg/ml	DRP 100 µg/ml	DRP 200 µg/ml	DRP 400 µg/ml	EMS 0.2 µg/ml	SA 2 µg/ml	DRP 100 µg/ml	DRP 200 µg/ml	DRP 400 µg/ml
PM1	10	1	0	0	0	1	2	1	0	1	0
PM2	10	3	0	0	0	1	2	1	1	1	0
PM3	10	1	0	0	0	0	0	3	2	0	4
PM4	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PM5	10	2	2	0	1	1	4	3	2	0	1
PM6	8	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
PM7	5	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1
PM8	6	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
PM9	8	1	1	0	0	1	0	2	0	0	1
PM10	13	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0

*KBS. Kontroldeki band sayısı

DRP ile 48 saat muamele edilmiş erkek lenfosit DNA'larında polimorfik band sayısının sadece en yüksek iki dozda artmış olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.6). Halbu ki bayan DNA'sı band profilleri incelendiğinde DRP, 48 saatlik muamele grubunda tüm dozlarda polimorfik band sayısını artırmış, ayrıca 24 saatlik muamele süresinde 400 µg/ml dozunda da band sayısının arttığı saptanmıştır. Ortalama band sayısı incelendiğinde DRP'in polimorfik band sayısını 24 saat muamele süresinde en yüksek dozda (400 µg/ml) ve 48 saat muamele süresinde de tüm dozlarda artırdığı görülmüştür.

Çizelge 4.6. Doripenem ile muamele edilen erkek ve bayan DNA'sının RAPD-PCR primerleri ile amplifikasyonu sonucu elde edilen ortalama band sayısı

	Konsant. (µg/ml)	Süre (saat)	Erkek DNA±SE	Bayan DNA±SE	Ortalama band ±SE
Kontrol	--	--	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
EMS	0.2	24	0.094±0.028***	0.113±0.034***	0.103±0.021***
SA	2.0	24	0.056±0.022*	0.056±0.024**	0.056±0.012***
DRP	100	24	0.009±0.008	0.011±0.010	0.010±0.007
DRP	200	24	0.009±0.006	0.022±0.015	0.015±0.008
DRP	400	24	0.018±0.013	0.056±0.024**	0.036±0.013**
EMS	0.2	48	0.056±0.022*	0.113±0.034***	0.082±0.019***
SA	2.0	48	0.056±0.021*	0.147±0.038***	0.097±0.021***
DRP	100	48	0.018±0.013	0.068±0.027**	0.041±0.014**
DRP	200	48	0.037±0.018*	0.056±0.024**	0.046±0.015**
DRP	400	48	0.066±0.024**	0.090±0.030***	0.077±0.019***

Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli; *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$; ***: $P \leq 0.001$

GKS yüzdesi daha önce belirlenen formüle göre hesaplanmıştır (Çizelge 4.7). Bunun için kontrolden elde edilen bandlar %100 olarak kabul edilmiştir. Çizelge 4.4. ve Çizelge 4.5'te verilen değerler kullanılarak GKS yüzdesi hesaplanmıştır. Bu değerler istatistiki analize tabi tutulmuş ve GKS oranları elde edilmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.7. Doripenem ile muamele edilen erkek ve bayan periferik kan lenfositlerinden elde edilen DNA ile uygulanan RAPD-PCR sonucu saptanan polimorfik bamlardan yararlanarak hesaplanan genomik kalıp stabilitesi (GKS) yüzde değeri

Erkek	Primer	Kontrol (%)	Kontrolde farklı olarak gözlenen polimorfik bamların sayısı									
			24 saat muamele µg/ml					48 saat muamele µg/ml				
			EMS 0.2 µg/ml	SA 2 µg/ml	DRP 100 µg/ml	DRP 200 µg/ml	DRP 400 µg/ml	EMS 0.2 µg/ml	SA 2 µg/ml	DRP 100 µg/ml	DRP 200 µg/ml	DRP 400 µg/ml
PM1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
PM2	100	100	100	100	100	100	87,5	87,5	87,5	87,5	75	
PM3	100	90,9	90,9	100	100	100	100	100	100	100	100	
PM4	100	90,9	100	100	90,9	100	100	90,9	100	90,9	90,9	
PM5	100	90,9	90,9	100	100	100	81,81	81,81	100	100	100	
PM6	100	83,33	83,33	100	100	91,66	100	100	100	91,66	91,66	
PM7	100	90,9	81,81	90,9	100	90,9	90,9	90,9	90,9	100	100	
PM8	100	91,66	100	100	100	100	91,66	91,66	100	100	91,66	
PM9	100	88,88	100	100	100	100	88,88	100	100	100	88,88	
PM10	100	84,61	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Bayan												
PM1	100	90	100	100	100	90	80	90	100	90	100	
PM2	100	70	100	100	100	90	80	90	90	90	100	
PM3	100	90	100	100	100	100	100	70	80	100	60	
PM4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
PM5	100	80	80	100	90	90	60	70	80	100	90	
PM6	100	100	100	100	100	100	100	87,5	100	87,5	100	
PM7	100	80	80	80	80	80	60	60	80	80	80	
PM8	100	100	83,33	100	100	100	100	100	100	83,33	83,33	
PM9	100	87,5	87,5	100	100	87,5	100	75	100	100	87,5	
PM10	100	92,3	92,3	100	100	100	100	100	100	100	100	

24 saatlik muamele süresinde sadece 400 µg/ml dozunda DRP ile muamele edilen grupta GKS oranları düşmüştür (Çizelge 4.8). Bununla birlikte 48 saatlik muamele süresinde DRP, GKS oranlarını tüm dozlarda düşürmüştür.

Çizelge 4.8. Doripenem ile muamele edilmiş insan lenfositlerinde genomik kalıp stabilitesi (GKS) (genomic template stability, GTS) oranları

	Konsantrasyon (µg/ml)	Süre (saat)	Genomik kalıp stabilitesi ortalama±SE
Kontrol	--	--	100,00±0.00
EMS	0.2	24	90.09±1.77***
SA	2.0	24	93.50±1.79**
DRP	100	24	98.54±1.07
DRP	200	24	98.04±1.15
DRP	400	24	96.00±1.34**
EMS	0.2	48	91.03±2.88**
SA	2.0	48	89.26±2.71***
DRP	100	48	95.42±1.71*
DRP	200	48	95.04±1.49**
DRP	400	48	91.94±2.41**

Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli; *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$; ***: $P \leq 0.001$

5.TARTIŞMA

Bu çalışma DRP'in genotoksik etkisinin hem sitogenetik hem de moleküler yöntemlerle araştırılması amacıyla yapılmıştır. Sitogenetik yöntem olarak kısa süreli genotoksisite testleri olan kromozom anormalliği (KA) ve mikronükleus (MN) testleri kullanılmış, moleküler yöntemlerden ise RAPD-PCR tekniği uygulanmıştır.

DRP KA ve MN frekanslarını artırmamış, ayrıca sitotoksik etki göstermemiştir. Fakat DRP, RAPD-PCR çalışmasında elde edilen polimorfik band oranlarını özellikle 48 saat muamele süresinde artırmış ve genomik kalıp stabilite (GKS) oranlarını ise düşürmüştür.

Bu çalışmada kullanılan yöntemler ksenobiyotiklerin hem kromozom yapı ve sayı anormalliklerini hem de DNA baz değişimlerini saptamamıza yaramaktadır. KA ve MN metodları mikroskobik düzeyde saptanabilen kromozom ve kromatid tipi kırıkları ve bunlardan köken alan diğer kromozomal hasarları (fragmen, translokasyon, kardeş kromatid birleşmesi, delesyon) incelememize imkan verirken (Turpin ve Lejeune 1969, Yunis 1977, Wilkins ve vd. 1980, Kirsch-Volders ve vd. 1997, Norppa ve Falck 2003), RAPD-PCR yöntemi ise DNA primerlerin bağlanmasını engelleyecek tip nükleotid değişimlerini (baz süstitüsüyonu, baz delesyonları veya adisyonları) saptamamıza yaramaktadır (Atienzar ve Jha 2006, Büyükleyle 2013). GKS değerlerinin düşmesi de özellikle kimyasalın toksik olduğunu ve direkt olarak DNA zararının boyutunu veya DNA tamir ve replikasyonuna etkilerini gösterir (Atienzar ve Jha, 2006).

Dolayısıyla EMS gibi kimyasallar çoğunlukla kromozomal hasarlar oluşturabilirken, SA gibi bazıları nükleotid değişimlerine neden olmaktadır. Bizim bu çalışmamızda da DRP kullanılan dozlarda kromozomal anormallikler oluşturmazken DNA düzeyinde baz değişimlerine neden olarak mutajenik etki yapmış olduğu görülmektedir. Fakat DRP tedavi amacıyla intravenöz olarak 500 mg/kişi/gün dozunda kullanılmaktadır (Bhavnani ve vd. 2005; Mandell 2009). Normal olarak bir kişinin ortalama 60 kg olduğu kabul edilirse bu doz 0.0083 µg/mg/gün dozuna tekabül etmektedir. Bu doz bizim bu çalışmada kullandığımız dozlardan çok daha düşüktür. Dolayısıyla en düşük doz olan 100 µg/ml'lik dozda DRP sadece 48 saatlik muamele süresinde GKS oranlarını düşürmüştür. Bütün bunlar bir bütün olarak dikkate alındığında

ve tedavi amaçlı DRP'in bu kadar yüksek dozda kullanılamayacağı da göz önüne alındığında DRP'in genotoksik ve mutajenik risk taşımayacağı söylenebilir.

DRP sitotoksik bir etkiye de sahip değildir. Mitotik indeksi ve nükleer bölünme indeksini azaltmamıştır. Dolayısıyla hem hücre üzerinde hem de DNA replikasyonu üzerinde herhangi bir baskı oluşturmadığı sonucuna varılabilir.

Bu çalışmada tedavi amaçlı kullanılan dozun çok üstünde deneysel dozlar kullanılmıştır. Çünkü DRP suda çözünmektedir. Madle ve vd. (1993) açıklamalarında suda çözünmeyen ve herhangi bir sitotoksik etki göstermeyen kimyasalların *in vitro* test sistemlerinde 5 mg/ml dozuna kadar kullanılabileceğini belirtmiştir. Burada amaç suda çözünen ve sitotoksik olmayan kimyasalların çok yüksek dozlarında olası genotoksik etkilerinin gösterilmesi ve olası kazalarda kimyasalın belirlenen dozundan çok daha fazla dozda alınması durumunda muhtemel etkilerinin öngörülmesidir. Bizim bu çalışmamızda DRP 400 µg/ml (0.4 mg/ml) dozunda kullanılmıştır. Günlük doz 0.0083 µg/mg/gün olarak düşünüldüğünde Doripenem'in bu kadar yüksek dozda kullanılmayacağı açık bir şekilde anlaşılmaktadır.

Ayrıca DRP'in metabolizması da hızlıdır. Yarı ömrü yaklaşık 1 saattir. DRP'nin yaklaşık %80'i değişmeden idrarla atılır. Geri kalan kısmı ise açık β-laktam halkasına metabolize olur ve böbreklerden elimine edilir (Keam 2008).

Yapılan literatür taramalarında DRP'nin genotoksitesitesi ile ilgili hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yüzden bizim bu çalışmamız DRP'nin genotoksitesitesi ve mutajenitesi hakkında ilk çalışma olma özelliğindedir. Dolayısıyla DRP'nin başka canlılarda veya farklı test sisteminde genotoksik risklerini karşılaştırma imkanı söz konusu değildir. Fakat DRP'nin de içinde yer aldığı β-laktam grubu antibiyotikler ile yapılan genotoksitesite çalışmalarında bu antibiyotiklerin genotoksik olmadığı ve hücre bölünmesini etkilemeyerek sitotoksik etki göstermedikleri rapor edilmiştir (Jaju ve vd. 1984, Köseoğlu ve vd. 2004, Istifli ve Topaktaş 2010).

Zavarise ve vd. (1984) yayınladıkları çalışmalarında kloksasilinin tedavi edici dozlarında kromozomal anormalliklerin meydana gelmediğini fakat yüksek dozlarda bazı kromozomal hasarların oluştuğunu bildirmişlerdir.

Aynı durum bizim bu çalışmamızda da gözlenmiştir. DRP tedavi edici dozun çok üstündeki dozlarda mutasyona neden olmaktadır. Bu sonuç antibiyotikler de dahil hemen hemen tüm sitotoksik olmayan kimyasalların yüksek dozlarda genotoksik risk

doğurabileceği söylenebilir. β -laktam grubu diğer antibiyotikler ile yapılan genotoksisite çalışmalarında da herhangi bir etki görülmemiştir.



6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak DRP antibiyotiği tedavi edici dozlarda herhangi bir genotoksik risk gösterememiştir. Hızlı metabolize edilmesi de onun güvenli bir antibiyotik olabileceğini göstermektedir. Fakat herhangi bir kimyasalın genotoksik olup olmadığı ancak bir test grubu ile çalışıldıktan sonra belirlenebilir. Bu test grupları arasında hem *in vitro* insan periferel lenfositlerinin hem de *in vivo* hayvan kemik iliği hücrelerinin kullanıldığı kısa süreli genotoksisite testleri yer alırken ayrıca bakteriyel reversiyon testinin de kullanılması gerekmektedir. Bütün bu testlerden elde edilecek sonuçlara göre karar verilmelidir.

Bu çalışmadan çıkan ve daha önceki çalışmalardan da desteklenen en önemli sonuçlardan bir tanesi sitotoksik olmayan herhangi bir kimyasalın yüksek dozlarda genotoksik risk taşıyabileceğidir. Bu yüzden antibiyotik kullanırken kullanım ve doz aşımı uyarılarına uyulması tavsiye edilir. Bu vesileyle ancak birey hem kendi genetik yapısını korur hem de gelecek nesillerin daha sağlıklı olmasına katkı sağlayabilir.

KAYNAKLAR

- Abou-Eisha, A., Creus, A., Marcos, R., (1999). Genotoxic evaluation of the antimicrobial drug, trimethoprim, in cultured human lymphocytes. *Mutat Res.*, 440(2):157-162.
- Abou-Eisha, A., Marcos, R., Creus, A., (2004). Genotoxicity studies on the antimicrobial drug sulfamethoxazole in cultured human lymphocytes. *Mutat Res.*, 564(1):51-56.
- Agarwal, S.K., Bhatnagar, U., Rajesh, N., (2004). Acute and genotoxic profile of a dimeric impurity of cefotaxime. *Int J. Toxicol.*, 23(1):41-45.
- Aksoy, M., Kontaş, S., Şekeroğlu, V., Şekeroğlu Atlı, Z., (2012). Antibiyotik ilaç olarak kullanılan ofloksasin'in insan periferik lenfositlerindeki genotoksik etkisinin mikronükleus (MN) testi ile belirlenmesi. 21. ulusal Biyoloji Kongresi, 03-07 Eylül, Ege Üniversitesi İzmir, Türkiye.
- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A., (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety *Mutat Res*, 463(2):111-172.
- Amacher, D.E., Ellis, L.H. Jr., Joyce, A.J., Muehlbauer, P.A., Turner, G.N., Wahrenburg, M.G., Holden, H.E., Ray, V.A., (1993). Preclinical toxicology studies with azithromycin: genetic toxicology evaluation. *Mutat Res*, 300(2):79-90.
- Anderson, D.L., (2006). Doripenem. *Drugs Today (Barc)*, 42:399-404.
- Anitha, B., Sudha, S., Gopinath, P.M., Durairaj, G., (1994). Genotoxicity evaluation of pyrazinamide in mice. *Mutat Res.*, 321(1-2):1-5.
- Antonarakis, S.E., (1998). Ten years of Genomics, chromosome 21, and Down syndrome. *Genomics*, 51:1-16.
- Atienzar, F.A., Conradi, M., Evenden, A.J., Jha, A.N., Depledge, M.H., (1999). Qualitative assesment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: Comparison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* exposed to benzo[a]pyrene. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(10): 2275–2282.
- Atienzar, F.A., Evenden, A.J., Jha, A.N., Depledge, M.H., (2002). Use of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations: possible implications of confounding factors. *Biomarkers*. 7(1):94-101.

- Atienzar, F.A., Jha, A.N., (2004). The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay to determine DNA alterations, repair and transgenerational effects in B(a)P exposed *Daphnia magna*. *Mutat Res.*, 552(1-2):125-40
- Atienzar, F.A., Jha, A.N., (2006). The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. *Mutat Res.*, 613(2-3):76-102.
- Attia, S.M., (2007). Chromosomal composition of micronuclei in mouse bone marrow treated with rifampicin and nicotine, analyzed by multicolor fluorescence in situ hybridization with pancentromeric DNA probe. *Toxicology.*, 235(1-2):112-118.
- Bergan, T., (1988). Pharmacokinetics of fluorinated quinolones. In Andriole V.T. (Ed.) *The quinolones*, pp. 119-154, Academic Press, London.
- Bhavnani, S.M., Hammel, J.P., Cirincione, B.B., Wikler, M.A., Ambrose, P.G., (2005). Use of pharmacokinetic-pharmacodynamic target attainment analyses to support phase 2 and 3 dosing strategies for doripenem. *Antimicrob Agents Chemother.*, 49: 3944-3947.
- Bonassi, S., Hagmar, L., Strömberg, U., Montagud, A.H., Tinnerberg, H., Forni, A., Heikkilä, P., Wanders, S., Wilhardt, P., Hansteen, I.L., Knudsen, L.E., Norppa, H., (2000). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Cancer Res.*, 60(6):1619-1625.
- Bonassi, S., Znaor, A., Norppa, I.H., Hagmar, L., (2004). Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective. *Cytogenet Genome Res.*, 104(1-4):376-382.
- Bonassi, S., Ugolini, D., Kirsch-Volders, M., Strömberg, U., Vermeulen, R., Tucker, J.D., (2005). Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future perspectives. *Environ Mol Mutagen.*, 45(2-3):258-270.
- Bradley, J.S., Garau, J., Lode, H., Rolston, K.V., Wilson, S.E., Quinn, J.P., (1999). Carbapenems in clinical practice : a guide to their use in serious infection. *Int.J. Antimicrob Agents.*, 11(2): 93-100.
- Brodersen, D.E., Clemons, W.M. Jr., Carter, A.P., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T., Ramakrishnan, V., (2000). The structural basis for the action of the antibiotics

- tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell.*, 103(7):1143-1154.
- Brogden, R.N., Carmine, A.A., Heel, R.C., Speight, T.M., Avery, G.S., (1982). Trimethoprim: a review of its antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutic use in urinary tract infections. *Drugs* 23(6): 405–430.
- Buyukleyla, M. (2013). Gıda katkı maddesi sodyum metabisülfid'in genotoksik etkisinin RAPD-PCR ile araştırılması. Doktora Tezi, Ç.Ü.Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Capasso, L., (1998). 5300 years ago, the Ice Man used natural laxatives and antibiotics. *Lancet.*, 352(9143):1864.
- Carrano, A.V., Natarajan, A.T., (1988). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication no. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res.*, 204(3):379-406.
- Castora, F.J., Vissering, F.F., Simpson, M.V., (1983). The effect of bacterial DNA gyrase inhibitors on DNA synthesis in mammalian mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression.* 740(4):417-427.
- Cavallito, C.J., Bailey, J.H., (1944). Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. *Journal of the American Chemical Society* 66 (11):1950-1951.
- Cui, J., Zhang, Z., Ran, Y., Zhao, W., Kang, X., Deng, W., (2012). Study on the genotoxicity of cefuroxime lactone--an impurity substance in antibiotics. *Wei Sheng Yan Jiu.*, 41(5):717-722.
- Çelik, A., Aras, A.N., (2006). The frequency of sister chromatid exchanges in cultured human peripheral blood lymphocyte treated with metronidazole *in vitro*. *Drug Chem Toxicol.*, 29(1):85-94.
- Das, R.K., Roy, B., (1990). Evaluation of genotoxicity of clofazimine, an antileprosy drug, in mice *in vivo*. I. Chromosome analysis in bone marrow and spermatocytes. *Mutat Res.*, 241(2):161-168.
- Dash, B.C., Roy, B., Das, R.K., (1991). Evaluation of genotoxicity of clofazimine, an antileprosy drug, in mice *in vivo*. III. Sister chromatid exchange analysis in bone marrow cells. *In Vivo.*, 5(1):69-70.

- Dearce, M.A., Kearns, A., (1984). The fragile X syndrome: The patients and their chromosomes. J. Med. Genet. 21:84-91.
- Dellarco, V.L., Mavournin, K.H., Tice, R.R., (1985). Aneuploidy and health risk assessment: current status and future directions. Environ Mutagen., 7(3):405-424.
- Devrim, A.K., Kaya, N., (2006). RAPD tekniği ve biyokimya alanında kullanımı. Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 12(1):97-101.
- Dimitrijevic, A., Milosevic-Djordjevic, O., Grujicic, D., Arsenijevic, S., (2006). Micronucleus frequency in women with genital Chlamydia Trachomatis infection before and after therapy. Mutat Res., 19; 608(1):43-48.
- Ellis, D., (2002). Amphotericin B:spectrum and resistance. J. Antimicrob. Chemother. 49(1):7-10.
- Evans, H.J., (1984). Handbook of Mutagenicity Test Procedures. In: Kilbey BJ, Legator M, Nichols W, Ramel C, editors, Human peripheral blood 63 lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. Second edition, Elsevier Science Publishers, BV, p. 405-427, Amsterdam.
- Fahrig, R., Engelke, M., (1997). Reinvestigation of *in vivo* genotoxicity studies in man. I. No induction of DNA strand breaks in peripheral lymphocytes after metronidazole therapy. Mutat Res., 395 (2-3):215-221.
- Fenech, M., (2000). The *in vitro* micronucleus technique. Mutat. Res., 455, 81–95.
- Fenech, M., (2002). Biomarkers of Genetic Damage for Cancer Epidemiology. Toxicology, 181: 411-416.
- Fenech, M., Holland, N., Chang, W.P., Zeiger, E., Bonassi, S., (1999). The Human MicroNucleus Project--An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. Mutat Res., 428(1-2):271-283.
- Fenech, M., Morley, A.A., (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mutat Res. 147(1-2):29-36.
- Ferrero, M., Castano, A., Gonzalez, A., Sanz, F., Becerril, C., (1998). Characterization of RTG-2 fish cell line by random amplified polymorphic DNA. Ecotoxicol Environ Saf., 40(1-2):56-64.
- Finberg, R.W., Moellering, R.C., Tally, F.P., Craig, W.A., Pankey, G.A., Dellinger, E.P., West, M.A., Joshi, M., Linden, P.K., Rolston, K.V., Rotschafer, J.C., Rybak, M.J.,

- (2004). The importance of bactericidal drugs: future directions in infectious disease. Clin. Infect. Dis. 39(9):1314-1320.
- Fisher, J.F., Meroueh, S.O., Mobashery, S., (2005). Bacterial Resistance to β -Lactam Antibiotics: Compelling Opportunism, Compelling Opportunity. Chemical Reviews 105(2): 395–424.
- Fleming, A., (1929). On the antibacterial action of cultures of a *Penicilium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. Br J Exp Pathol., 10:226-236.
- Florey, H.W., (1945). Use of Micro-organisms for Therapeutic Purposes. BMJ 2 (4427):635-642.
- Fritsche, T.R., Stilwell, M.G., Jones, R.N., (2005). Antimicrobial activity of doripenem (S-4661): a global surveillance report 2003. Clin Microbiol Infect., 11(12):974-984.
- Galloway, S.M., Evans, H.J., (1975). Sister chromatid exchange in human chromosomes from normal individuals and patients with ataxia telangiectasia. Cytogenet Cell Genet., 15:17-29.
- Gemmell, C.G., (1993). Antibiotics and neutrophil function-potential immunomodulating activities. J. Antimicrob. Chemother. 31 (suppl B):23-33.
- Goossens, H., Ferech, M., Stichele, R.V., Elseviers, M., (2005). Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance. Lancet 365:579-587.
- Gorla, N., Garcia Ovando, H., Larripa, I., (1999). Chromosomal aberrations in human lymphocytes exposed *in vitro* to enrofloxacin and ciprofloxacin. Toxicol Lett., 104(1-2):43-48.
- Gülhan, A., (1991). Antibiyotikler ve pedodontide kullanımları ANKEM Derg 5 (4):412-415.
- Hagmar, L., Bonassi, S., Strömberg, U., Brögger, A., Knudsen, L.E., Norppa, I.H., Reuterwall, C., (1998). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). Cancer Res., Sep 15; 58(18):4117-4121.
- Heddle, J.A., Cimino, M.C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M.D., Tucker, J.D., Vanparys, P., MacGregor, J.T., (1991). Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. Environ Mol Mutagen., 18(4):277-291.

- Herbold, B.A., Brendler-Schwaab, S.Y., Ahr, H.J., (2001). Ciprofloxacin: *in vivo* genotoxicity studies. *Mutat Res.*, 498(1-2):193-205.
- Ikbal, M., Yılmaz, G., Doğan, H., Alp, M.Y., Çebi, A.H., (2011). The evaluation of genotoxic potential of ornidazole, nitroimidazole, in lymphocyte culture of patients with amebiasis. *drug Chem Toxicol.*, 34(2):162-166.
- Iso, Y., Irie, T., Nishino, Y., Motokawa, K., Nishitani, Y., (1996). A novel 1 β -methylcarbapenem antibiotic, S-4661: Synthesis and structure-activity relationships of 2-(5 substituted pyrrolidin-3-ylthio)-1 β -methylcarbapenems. *J. Antibiot.(Tokyo)* 49:199-209.
- Istifli, E.S., Topaktaş, M., (2010). Cytogenetic genotoxicity of amoxicillin. *Environ Mol Mutagen.*, 51(3):222-228.
- Istifli, E.S., Topaktaş, M., (2015). *In vitro* genotoxicity and cytotoxicity of a particular combination of pemetrexed and cefixime in human peripheral blood lymphocytes. *Springerplus.*, doi: 10.1186/s40064-015-0803-3.
- Iyer, H.V., (2008). History revisited-Prontosil red. *J Emerg Med.* 35(2):209-210.
- Jaju, M., Jaju, M., Ahuja, Y.R., (1984). Evaluation of genotoxicity of ampicillin and carbenicillin on human lymphocytes *in vitro*: chromosome aberrations, mitotic index, cell cycle kinetics, satellite associations of acrocentric chromosomes and sister chromatid exchanges. *Hum Toxicol.*, 3(3):173-191.
- Jones, R.N., Huynh, H.K., Biedenbach, D.J., (2004). Activities of doripenem (S-4661) against drug-resistant clinical pathogens. *Antimicrob Agents Chemother.*, 48(8):3136-3140.
- Keam, S.J., (2008). Doripenem. A review of its use in the treatment of bacterial infections., 68 (14):2021-2057.
- Khadra, A., Pinelli, E., Lacroix, M.Z., Bousquet-Melou, A., Hamdi, H., Merlina, G., Guiresse, M., Hafidi, M., (2012). Assessment of the genotoxicity of quinolone and fluoroquinolones contaminated soil with the *Vicia faba* micronucleus test. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 76(2):187-192.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E., Van Hummelen, P., (1997). The *in vitro* micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat Res.*, 392(1-2):19-30.

- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A., (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutat Res.*, 540(2):153-163. Erratum in: *Mutat Res.*, 2004; 564(1):97-100.
- Kongnakorn, T., Mwamburi, M., Merchant, S., Akhras, K., Caro, J.J., Nathwani, D., (2010). Economic evaluation of doripenem for the treatment of nosocomial pneumonia in the US: discrete event simulation. *Curr Med Res Opin.* 26(1):17-24.
- Köseoglu, V., Kismet, E., Soysal, Y., Ulucan, H., Dündaröz, R., Imirzalioglu, N., Gökçay, E., (2004). Investigation of DNA damage in lymphocytes exposed to benzathine penicillin G. *Pediatr Int.*, 46(4): 415-418.
- Kumar, N.S., Gurusubramanian, G., (2011). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *Sci Vis* 11(3), 116-124.
- La Roche Ltd Co (1990). Oral Beta-Laktam Antibiyotikler, Roche Müstahzarları A.Ş., İstanbul.
- Lopez N.M.M., Carballo, M.A., (2008). Genotoxicity and cell death induced by tinidazole (TNZ). *Toxicol Lett.*, 180(1):46-52.
- Mace, J.M.L., Daskal, Y., Wray, W., (1978). Scanning-electron microscopy of chromosome aberration. *Mutat Res.*, 52:199–206.
- Madle, S., Beek, B., Nowak, C. (1993). Zum Verständnis von Chromosomenmutationstests an Somazellen. (To Understand the Chromosome Mutations in Somatic Cells) In: Fahrig, R., ed. *Mutationsforschung und Genetische Toxikologie* (Mutation and Genetic Toxicology). Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Germany, pp. 224–242.
- Mandell, L., (2009). Doripenem: a new carbapenem in the treatment of nosocomial infection, *Clin Infect Dis.*, 49 (suppl 1):1-3.
- Manjanatha, M.G., Bishops, M.E., Pearce, M.G., Kulkarni, E., Lyn-Cook, L.E., Ding, W., (2014). Genotoxicity of doxorubicin in F344 rats by combining the comet assay, flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, and pathway-focused gene expression profiling. *Environ Mol Mutagen.*, 55(1):24-34.

- Merchant, S., Gast, C., Nathwani, D., Lee, M., Quintana A., Ketter N., Friedland, I., Ingham, M., (2008). Hospital resource utilization with doripenem versus imipenem in the treatment of ventilator-associated pneumonia. *Clin Ther.* 30(4):717-733.
- Metovic, A., Mackic-Djurovic, M., Ibrulj, S., (2013). Analysis of chromosome aberrations contained *in vitro* human peripheral blood lymphocytes after treatment with ceftriaxone. *Med Arch.*, 67(4):228-232.
- Morgan, U.M., Constantine, C.C., Greene, W.K., Thompson, R.C., (1993). RAPD analysis of *Giardia* DNA and correlation with isoenzyme data. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 87(6):702-705.
- Mori, M., Hikida, M., Nishihara, T., Nasu, T., Mitsuhashi, S., (1996). Comparative stability of carbapenem and penem antibiotics to human recombinant dehydropeptidase-I. *J Antimicrob Chemother.*, 37 (5):1034-1036.
- Morimoto, I., Nozaka, T., Watanabe, F., Ishino, F., Hirose, Y., Okitsu, T., (1983). Mutagenic activities of gentisin and isogentisin from *Gentiana radix*. *Mutat Res.*, 116:103–117.
- Mujumdar, A.M., Shinde, S.L., Karekar, V.R., Joshi, S.S., Dhuley, J., Shanbhag, V., Ghaskadbi, S., (1994). Genotoxicity assessment of the antifungal antibiotic aureofungin in *Salmonella typhimurium* and Swiss albino mice. *Mutat Res.*, 321(1-2):13-17.
- Noel, S., Rath, K.S., (2006). Randomly amplified polymorphic DNA as a tool for genotoxicity: an assessment. *Toxicology and Industrial Health*, 22:267-275.
- Norppa, H., Falck, G.C.M., (2003). What Do Human Micronuclei Contain? *Mutagenesis*, 18: 221-233.
- Ornelas-Aguirre, J.M., Gomez-Meda, B.C., Zamora-Perez, A.L., Ramos-Ibarra, M.L., Batista-Gonzalez, C.M., Zuniga-Gonzalez, G.M., (2006). Micronucleus induction by metronidazole in rat vaginal mucosa. *Environ Mol Mutagen.*, 47(5):352-356.
- Ortho-McNeil-Janssen Pharmaceutical, Inc., (2008). Doribax (doripenem for injection). Prescribing information. Ortho-McNeil-Janssen Pharmaceutical, Inc., Raritan, NJ.
- Paterson, D.L., (2000). Recommendation for treatment of severe infections caused by Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBL_s). *Clin. Microbiol. Infect.*, 6:460-463.

- Paterson, D.L., Bonomo, R.A., (2005). Extended-spectrum β -lactamases : a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18:657-686.
- Paterson, D.L., Depestel, D.D., (2009). Doripenem, *Clin Infect Dis.*, 49 (2):291-298.
- Paz-y-Miño, C., Bustamante, G., Sánchez, M.E., Leone, P.E., (2002). Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in Ecuador. *Environ Health Perspect.*, 110(11):1077-1080.
- Perry, P., Evans, H.J., (1975). Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature.*, 258(5531):121-125.
- Perry, P.E., Thompson, E.J., (1984). Handbook of Mutagenicity Test Procedures, in: Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C., editors, *The methodology of sister chromatid exchanges*, 2nd Edition, Elsevier, p. 459–529, Amsterdam.
- Promchainant, C., (1975). Cytogenetic effect of bleomycin on human leukocytes *in vitro*. *Mutat Res.*, 28:107–112.
- Rencüzogullari, E., İla, H.B., Topaktas, M., Kayraldiz, A., Budak, S., Arslan, M., (2002). No Significant Increase in Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchanges in Cultured Human Lymphocytes Treated With Spiramycin. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 22:51–58.
- Rencüzoğullari, E., Azirak, S., Canimoglu, S., Parlak, S., Buyukleyla, M., (2009). Effects of natamycin on sister chromatid exchanges, chromosome aberrations and micronucleus in human lymphocytes. *Drug Chem Toxicol.*, 32(1):47-52.
- Rencüzoğullari, E., Topaktaş, M., (1991). The Relationship between Quantities of Bromodeoxyuridine and Human Peripheral Blood with Determination of the Best Differential Staining of Sister Chromatids Using Chromosome Medium-B. *Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 5(3), 19-24.
- Rocco, L., Peluso, C., Stingo, V., (2012). Micronucleus test and comet assay for the evaluation of zebrafish genomic damage induced by erythromycin and lincomycin. *Environ Toxicol.*, 27(10):598-604.
- Roy, B., Das, R.K., (1988). Cytogenetic effect of dapsone, an antileprotic drug, in the mouse *in vivo* system. *Int J. Lepr Other Mycobact Dis.*, Dec; 56(4):574-579.
- Roy, B., Das, R.K., (1990). Evaluation of genotoxicity of clofazimine, an antileprosy drug, in mice *in vivo*. II. Micronucleus test in bone marrow and hepatocytes. *Mutat Res.*, 241(2):169-173.

- Sbrana, I., Caretto, S., Rainaldi, G., Loprieno, N., (1991). Induction of chromosomal aberrations and SCE by chloramphenicol . *Mutat Res.*, 248(1):145-153.
- Scott, M.P., Haymes, K.M., Williams S.M., (1992). Characterization of Zebu cattle breeds in Tanzania using random amplified polymorphic DNA markers. *Anim Genet.* 25, 89-94.
- Selmer, M., Dunham, C.M., Murphy, IV F.V., Weixlbaumer, A., Petry, S., Kelley, A.C., Weir, J.R., Ramakrishnan, V., (2006). Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science* 313: 1935 -1942.
- Shimada, H., Itoh, S., Hattori, C., Tada, S., Matsuura, Y., (1992). Mutagenicity of the new quinolone antibacterial agent levofloxacin. *Arzneimittelforschung.*, 43(3A):378-385.
- Singh, P., Singh, L., Mondal, S.C., Kumar, S., Singh, I.N., (2014). Erythromycin-induced genotoxicity and hepatotoxicity in mice pups treated during prenatal and postnatal period. *Fundam Clin Pharmacol.*, 28(5):519-529.
- Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Marcos, R., (1995). The suitability of the micronucleus assay in human lymphocytes as a new biomarker of excision repair. *Mutat Res.*, 342(1-2):43-59.
- Sutherland, G., (1984). The fragile X chromosome. *Int Rev. Cytol.* 81:107-43.
- Swaileh, K.M., Hussein, R., Ezzughayyar, A., (2007). Evaluating wastewater-induced plant genotoxicity using randomly amplified polymorphic DNA. *Environmental Toxicology*, 23:117–122.
- Şekeroğlu, Z.A., Afan, F., Şekeroğlu, V., (2012). Genotoxic and cytotoxic effects of doxycycline in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Drug Chem Toxicol.* Jul; 35(3):334-340.
- Takahashi, N., Shiragiku, T., Itoh, T., Kaneko, E., Shibahara, T., Kanbe, T., Yamashita, S., (1994). *In vitro* clastogenicity of optical isomers of nadifloxacin. *Arzneimittelforschung.*, 44(11):1265-1268.
- Talapatra, S.N., Dasgupta, S., Guha, G., Auddy, M., Mukhopadhyay, A., (2010). Therapeutic efficacies of *Coriandrum sativum* aqueous extract against metronidazole-induced genotoxicity in *Channa punctatus* peripheral erythrocytes. *Food Chem Toxicol.*, 48(12):3458-3461.

- Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., Reinisch, F., Parvatham, S., Osorio, A.M., Smith, M.T., (1997). Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: a study of malathion-exposed workers. *Mutat Res*, 388(1): 85-95.
- Topaktaş, M., Rencüzoğulları, E., (1996). Genotoxic effect of marshal in *Allium cepa* L. *Tr. J. of Botany*, 20, 481-487.
- Topaktaş, M., Rencüzoğulları, E., (2010). *Sitogenetik*, Nobel Yayınları, 2.baskı, 176s.
- Torres, JA., Villegas, MV., Quinn, JP., (2007). Current concepts in antibiotic-resistant gram-negative bacteria. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 5:833-843.
- Turpin, R., Lejeune, J., (1969). Human afflictions and chromosomal aberrations. Pergamon Press, Oxford.
- Venkatesh, P., Shantala, B., Jagetia, G.C., Rao, K.K., Baliga, M.S., (2007). Modulation of doxorubicin-induced genotoxicity by *Aegle marmelos* in mouse bone marrow: a micronucleus study. *Integr Cancer Ther.*, 6(1):42-53.
- WHO (World Health Organization), (2014). Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance. p 257, ISBN: 978 92 4 156474 8
- Wilkins, L.E., Brown, J.A., Wolf, B., (1980). Psychomotor development in 65 home-reared children with cri-du-chat syndrome. *J. Pediatr.*, 97:401-405.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18(22):6531-6535.
- www.drugs.com
- www.proteopedia.org
- www.roche-applied-science.com
- Xie, X., Zhou, Q., Bao, Q., He, Z., Bao, Y., (2011). Genotoxicity of tetracycline as an emerging pollutant on root meristem cells of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environ Toxicol.*, 26(4):417-423.
- Yunis, J.J., ed., (1977). New chromosomal syndromes. FL: Academic Press, Orlando.
- Zavarise, G., Ghiazza, G., Grillo, G., Morino, P., Mondavio, M., (1984). Evaluation of the effect of cloxacillin on human lymphocyte chromosomes through the study of karyotypic changes and sister chromatid exchanges. *Boll Soc Ital Biol Sper.*, 30; 60(11):2143-2148.

Zhiyi, R., Haowen, Y., (2004). A method for genotoxicity detection using random amplified polymorphism DNA with *Danio rerio*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58:96–103.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Onur Bozkurt
Doğum Yeri : Adıyaman
Doğum Tarihi : 07/11/1989
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Adıyaman Lisesi, 2006

Lisans : Giresun Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji
Bölümü, 2008-2013

Yüksek Lisans : Adıyaman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji
Ana Bilim Dalı, 2013-2016

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl :

Bağlıca İlkokulu, 2015-2016

Yayınları (SCI ve diğer) :

EKLER

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR NO	ÇALIŞMACININ ADI SOYADI
13.01.2015	01	06	Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI

KARAR

“Doripenem’in Genotoksik Etkisinin Sitogenetik ve Moleküler Düzeyde Araştırılması” konulu çalışma etik kurulumuzda görüşülmüş olup; çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna oybirliğiyle karar verilmiştir.
--

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN (Başkan)			
Prof. Dr. Engin ŞAHNA (Üye)	İmza	Prof. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU (Üye)	İmza
Prof. Dr. Sefa KAZANÇ (Üye)	İmza	Prof. Dr. Süleyman Serdar KOCA (Üye)	İmza
Doç. Dr. Erdal TAŞKIN (Üye)	İmza	Doç. Dr. Demet ÇİÇEK (Üye)	İmza
Doç. Dr. Fatih FIRDOLAŞ (Üye)	İmza	Doç. Dr. Yalın Kılıç TÜREL (Üye)	İmza
Doç. Dr. Ertan EVİN (Üye)	İmza	Doç. Dr. Alper Osman ÖĞRENMİŞ (Üye)	Bulunmadı
Doç. Dr. Murat SUNKAR (Üye)	İmza	Doç. Dr. Yüksel SAVUCU (Üye)	İmza
Doç. Dr. Funda GÜLCU (Üye)	İmza	Yrd. Doç. Dr. Nurhan HALİSDEMİR (Üye)	İmza