

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Goulzar ULAYA

**HİPERFOSFATEMİ HASTALARI TARAFINDAN
KULLANILAN FOSFAT BAĞLAYICILARI KALSİYUM
KARBONAT VE SEVELAMER HİDROKLORÜR
AJANLARININ İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE
KARŞILAŞTIRMALI İN VİTRO SİTOGENETİK ANALİZİ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2019

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİPERFOSFATEMİ HASTALARI TARAFINDAN KULLANILAN
FOSFAT BAĞLAYICILARI KALSİYUM KARBONAT VE
SEVELAMER HİDROKLORÜR AJANLARININ İNSAN
PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE KARŞILAŞTIRMALI İN VİTRO
SİTOGENETİK ANALİZİ**

Goulzar ULAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 29.07 2019 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

İmza.....

İmza.....

İmza.....

Prof.Dr.Hasan Basri İLA Prof.Dr.Sadık DİNÇER Prof.Dr.Ahmet KAYRALDIZ

Danışman

Üye

Üye

Bu Tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FLY-2018-11139

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.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİPERFOSFATEMİ HASTALARI TARAFINDAN KULLANILAN FOSFAT BAĞLAYICILARI KALSİYUM KARBONAT VE SEVELAMER HİDROKLORÜR AJANLARININ İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE KARŞILAŞTIRMALI *IN VITRO* SİTOGENETİK ANALİZİ

Goulzar ULAYA

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Hasan Basri İLA
Yıl: 2019, Sayfa: 101
Jüri : Prof. Dr. Hasan Basri İLA
: Prof. Dr. Sadık DİNÇER
: Prof. Dr. Ahmet KAYRALDIZ

Bu çalışma, hiperfosfatemili hastaların tedavisinde sıklıkla reçete edilen ve fosfat bağlayıcı grubunda yer alan sevelamer hidroklorür ve kalsiyum karbonat ajanlarının genotoksik ve/veya sitotoksik potansiyelini karşılaştırmalı olarak ortaya çıkarmak amacıyla yürütülmüştür. Çalışmalar *in vitro* koşullarda insan periferal lenfositlerle mikronukleus (MN) ve tek hücre jel elektroforez (Komet) testleri yapılmıştır. Ayrıca nokta mutasyonu ve çerçeve kayması mutasyonlarını uyarıp uyarmadığını belirlemek amacıyla *Salmonella typhimurium*'un mutant suşlarıyla (TA98 ve TA100) geri mutasyon testi (Ames testi) gerçekleştirilmiştir. İnsan periferal lenfositleri 20 ve 44 saat, komet testinde ise 1 saat boyunca 1/2, 1, ve 2 mg/mL konsantrasyonlardaki sevelamer hidroklorür ve kalsiyum karbonat ile muamele edilmiştir. Ames/Salmonella bakteriyel ters mutasyon testinde ise sevelamer hidroklorür ve kalsiyum karbonatın, 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL konsantrasyonları kullanılmıştır.

Bu çalışmadaki test maddeleri sevelamer hidroklorür ve kalsiyum karbonatın mikronukleus oluşumu hafif artış yönünde uyardığı ancak bu artışın kontrole göre anlamlı olmadığı saptanmıştır. Komet testinin bulgularına göre kullanılan test maddeleri bir istisna (2 mg/mL, sevelamer hidroklorür, 48 saat) hariç önemli DNA hasarlarına neden olmamıştır. Ames testinde ise mutajenik olmadığı ancak zayıf bir sitotoksik etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Her iki test maddesi, özellikle de sevelamer hidroklorür, NBI'yi kontrole göre anlamlı şekilde azaltmıştır. Yani sevelamer hidroklorürün zayıf bir sitotoksitesinden söz edilebilir. Ayrıca iki test maddesi birbirlerine karşılaştırıldığında sevelamer hidroklorürün genotoksikite ve sitotoksikite açısından kalsiyum karbonattan daha reaktif olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Sevelamer hidroklorür, Kalsiyum Karbonat, Mikronukleus, Tek Hücre Jel Elektroforezi, AMES/Salmonella Bakteriyel geri mutasyon testi.

ABSTRACT

MSc THESIS

COMPARATIVE *IN VITRO* CYTOGENETIC ANALYSIS OF CALCIUM CARBONATE AND SEVELAMER HYDROCHLORIDE AGENTS USED BY PATIENTS WITH HYPERPHOSPHATEMIA

Goulzar ULAYA

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor : Prof. Dr. Hasan Basri İLA
Year: 2019, Pages: 101
Jury : Prof. Dr. Hasan Basri İLA
: Prof. Dr. Sadık DİNÇER
: Prof. Dr. Ahmet KAYRALDIZ

This study was conducted to compare the genotoxic and / or cytotoxic potential of two agents included in the phosphate binding group, Sevelamer hydrochloride and Calcium carbonate, which are frequently prescribed in the treatment of patients with hyperphosphatemia. Micronucleus (MN) and single cell gel electrophoresis (comet assay) tests were performed on human peripheral lymphocytes. In addition, the *Ames Salmonella*/microsome mutagenicity assay was performed with mutant strains of *Salmonella typhimurium* (TA98 and TA100) to determine whether they stimulate substitutions and frame shift mutations. Human peripheral lymphocytes were treated with sevelamer hydrochloride and calcium carbonate at concentrations of 1/2, 1, and 2 mg / mL for 20 and 44 hours for micronucleus assay and 1 hour in the comet assay. In the Ames / Salmonella bacterial reverse mutation test, sevelamer hydrochloride and calcium carbonate concentrations of 2 mg / mL, 1 mg / mL, 0.5 mg / mL, 0.25 mg / mL and 0.125 mg / mL were used.

In this study, sevelamer hydrochloride and calcium carbonate stimulated slight increase in micronucleus formation but this increase was not significant compared to the results of the control group. According to the findings of the comet test, sevelamer hydrochloride and calcium carbonate did not cause significant DNA damage with one exception (2 mg / mL, sevelamer hydrochloride, 48 hours). In the Ames test, it was found that the drugs were devoid of mutagenic activity in bacterial assay, but had a weak cytotoxic effect. Both sevelamer hydrochloride and calcium carbonate, particularly SH, significantly reduced NBI compared to the control group. Thus, a weak cytotoxicity effect can be mentioned. Furthermore, sevelamer hydrochloride was more reactive in terms of genotoxicity and cytotoxicity than calcium carbonate when the two agents were compared.

Key Words: Sevelamer Hydrochloride, Calcium Carbonate, Micronucleus, Single Cell Gel Electrophoresis, *Ames Salmonella*/microsome mutagenicity assay.

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Fosfor, iskelet gelişimi, mineral metabolizması, hücre zarı fosfolipid fonksiyonu, mitokondri metabolizması, hücre sinyalleme ve trombosit agregasyonu gibi insan vücudunun birçok hücre içi ve hücre dışı yapısı ve işlemleri için gerekli olan temel bir elementtir (Yu, 2004; Schucker ve Ward, 2005).

National Kidney Foundation (NKF)'un verilerine göre sağlıklı bireylerde serum fosfat konsantrasyonun 4.6 mg/dL değerinin altında tutulması gerekmektedir (Agodoa ve ark., 1996; Schucker ve Ward, 2005).

Fosfor atılımı, böbrek fonksiyonuna oldukça bağımlıdır ve açık bir şekilde kronik böbrek yetmezliği (KBY) hiperfosfateminin en sık nedenidir.

Böbreklerin temel işlevi, metabolik atık ürünlerin kandan uzaklaştırılması ve hücre dışı sıvı hacminin düzenlenmesidir. Böbrek fonksiyonu azaldıkça fosfat atılımı da azalır.

Hemodiyaliz fosfatın kandan yeterince uzaklaştırılamadığı için hiperfosfatemini hastalarının çoğunda, fosfat bağlayıcı kullanımı gerekmektedir. Fosfat bağlayıcılar bağırsaktaki fosfor alımını gastrointestinal (GI) lümen içerisindeki fosforu bağlayarak kolayca emilmeyen ve çözünmeyen ürünler oluşturmaktadır (Burke ve ark., 1997; Schucker ve Ward, 2005).

Bu çalışma; yukarıda da açıklandığı gibi önemli metabolik hastalıklardan birisi olan hiperfosfatemini tedavisinde sıklıkla reçete edilen ve fosfat bağlayıcı grubunda yer alan sevelamer hidroklorür ve kalsiyum karbonat ajanlarının genotoksik ve/veya sitotoksik potansiyelini karşılaştırmalı olarak ortaya çıkarmak amacıyla yürütülmüştür. Çalışmalar in vitro koşullarda sağlıklı ve gönüllü kişilerden alınan kültüre edilmiş lenfositlerle mikronükleus (MN) ve tek hücre jel elektroforez (Komet) testleri yapılmıştır. Ayrıca nokta mutasyonu ve çerçeve kayması mutasyonlarını uyarıp uyarmadığını belirlemek amacıyla *Salmonella typhimurium*'un mutant suşlarıyla (TA98 ve TA100) geri mutasyon testi (Ames testi) gerçekleştirilmiştir.

Araştırmada MN oluşumunu saptamak amacıyla sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın dört kadından (24 ve 29 yaşlarında) alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri steril kültür tüpleri içerisindeki 2.5 mL'lik kromozom medyumlarına (Gibco, PB Max) steril şartlarda 6 damla (0.2 mL) (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991) ekilmiş ve hücreler $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 68 saat inkübe edilmiştir. Sevelamer hidroklorür ve kalsiyum karbonat'ın etkisini incelemek için kültürün başlangıcından 20 ve 44 saat sonra daha önceden hazırlanmış konsantrasyonlar 1/2, 1 ve 2 mg/mL olacak şekilde test maddeler kültür tüplerine ilave edilmiştir. Her deneyin bir kontrolü, bir çözücü kontrolü ve bir de pozitif kontrol grubu oluşturulmuştur. İnkübasyon başlangıcından 44 saat sonra her tüpe son konsantrasyonu 6 µg/ ml olacak şekilde sitokalsin-B maddesi ilave edilmiş ve böylece bölünen hücrelerde sitokinez engellenmiştir.

Mikronükleus sayısını belirlemek amacıyla her bir kişiye ait daimi preparatlarda her kişinin her muamele grubu ve kontrollerinde iki nukleusa sahip (binükleer) toplam 1000 hücre incelenmiş ve bu binükleer hücreler içerisinde mikronükleuslu olanlar saptanmıştır. Ayrıca incelenen hücrelerde toplam mikronükleus sayısı belirlenmiştir. Sonuç olarak mikronükleuslu hücrelerin toplam hücrelere oranlanması ile mikronükleuslu hücre oranı, toplam mikronükleus sayısının incelenen hücre sayısına oranlanmasıyla da hücre başına düşen MN sayısı (MN/hücre) saptanmıştır. Buradan da MN yüzdesi hesaplanmıştır. Ayrıca çalışmanın bu kısmında nükleus bölünme indeksini (NBI) saptamak için MN preparatlarında tesadüfi seçilmiş alanlarda 1000 hücre içerisinde bir, iki, üç ve dört nükleuslu hücre sayısı belirlenmiş bu verilerden de NBI saptanmıştır.

Son yıllarda ökaryotik hücrelerde farklı fiziksel ve kimyasal bileşiklerin neden olduğu DNA hasarının belirlenmesinde kullanılan bir diğer test tek hücre jel elektroforez testi (Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE) olarak da bilinen Comet Assay (komet test) yöntemidir.

Komet tekniğinin temel amacı, genotoksik ve sitotoksik ajanların canlı hücreler üzerindeki etkilerini, tek tek hücrelerin nükleuslarını inceleyerek tespit etmektir.

İlk defa 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından DNA sarmal kırıklarının ölçülmesi amacıyla kullanılan ve daha sonra 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından geliştirilen komet testi modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın iki kadından (26-27) alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri ependorf tüplerine 100 µl olacak şekilde paylaştırılmıştır. Daha önceden belirlenen dozlardaki test maddeleri son konsantrasyonu 1/2, 1 ve 2 mg/mL olacak şekilde 100 µL içerisinde stok lenfositlere eklenmiştir. Pozitif kontrol, çözücü kontrol ve kontrol grupları da kullanılmıştır.

Daha sonra etidyum bromid ile boyanmış preparatlar floresan mikroskop altında 400X büyütmede incelenmiştir. Kullanılan test maddelerinin etkisini belirleyebilmek amacıyla her bir kişiye ait preparatlarda her kişinin her muamele grubu ve kontrollerinde rastgele seçilmiş 100 hücre incelenmiş ve fotoğrafları çekilerek görüntüleri kaydedilmiştir. Elde edilen görüntü, bir baş ve kuyruk ile bir "kuyruklu yıldız" andırıyor. Baş bozulmamış DNA'dan oluşurken, kuyruk hasarlı (tek iplikli veya çift iplikli kopmalar) veya kırık DNA parçalarından oluşmaktadır. Nükleustaki DNA hasarı nitel yolla (göz kararı) değerlendirmiştir. Bu yöntemde hücreler hasarsız olmaları ve hasar düzeylerine göre 0'dan 4'e kadar belirlenmiş kategoriler (Grade) skorlanmıştır.

Maddelerin mutajenitelerinin saptanmasında kullanılan önemli bir mutajenite testi olarak kabul edilen Ames testi 1970'lerin başında Bruce Ames ve onun çalışma arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Kısaca deneyin amacı; daha önceden büyümesi için histidin amino asidine gereksinim duyan oksotrof susların, kullandığımız test maddesi ile tekrar histidin sentezleyebilir (prototrof) hale dönüşmesi temeline dayanmaktadır. Ames testi metabolik aktivasyonsuz (S9-) olarak çalışılmıştır. Çalışmamızda, Maron ve Ames (1983) tarafından, *Salmonella*

typhimurium LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla geliştirilmiş TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmıştır. TA 98 suşu çerçeve kayması, TA 100 ise baz çifti dönüşümü tipindeki mutasyonların saptanmasında kullanılmıştır. Sevelamer hidroklorür ve Kalsiyum karbonat'ın, 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL konsantrasyonları kullanılmıştır. Ayrıca deneylere paralel olarak spontan kontrol, çözücü kontrol ve pozitif kontrol kullanılmıştır.

48–72 saat inkübasyon süresi sonunda petrilerdeki gözle görülür His+ mikroorganizma kolonileri sayılmıştır.

Araştırmanın sonuçları, sevelamer hidroklorürün 24 veya 48 saatlik uygulamalarında saptanan MNBN ve MN oranları (‰) ile kontrol ve çözücü kontrol (DMSO) grubu hücrelerinde saptanan değerler arasında anlamlı farklılıklar oluşturmadığını göstermiştir. Diğer test maddesi olan kalsiyum karbonat (KK) ile muamele sonucu hücrelerde saptanan MN değerlerinin bir miktar daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bütün varyantlarda saptanan MN değerlerinin muamelesiz kontrol düzeylerine yakın bulunmuştur. Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda ortaya çıkan MN artışları anlamlı bulunmamıştır. İki test maddesi birbiriyle karşılaştırıldığında sevelamer hidroklorürün kalsiyum karbonata göre daha etkili bir mikronükleus uyarıcısı olduğunu göstermektedir. Ayrıca sevelamer hidroklorürün sitostatik etkisinin daha fazla olduğu anlaşılmıştır. Komet testinin sonuçlarına göre de sevelamer hidroklorür DNA hasarını kalsiyum karbonata göre daha fazla artırmıştır. Ek olarak her iki test maddesi ile yapılmış çalışmada revertant koloni sayısında anlamlı artışlar saptanmamıştır. Ancak TA98 suşunda koloni sayıları dikkate alındığında sevelamer hidroklorürün kalsiyum karbonata göre daha sitotoksik olduğu gözlenmiştir.

Özetle tüm bu sonuçlara göre çalışmamızdaki test maddelerinin *in vitro* şartlarda sağlıklı hücreler üzerine genotoksik ve güçlü sitotoksik etkiler göstermediği ek olarak sitogenotoksik açıdan sevelamer hidroklorürün kalsiyum karbonata göre daha reaktif olduğu kanaati ortaya çıkmıştır.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve çalışmalarım sırasında her konuda bana destek olan, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, yönlendirmeleri ile tezin şekillenmesine büyük katkıları olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Hasan Basri İLA'ya sonsuz minnetlerimi sunarım.

Meslek hayatından emekli olmasına rağmen laboratuvarımızda olduğu sürece yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ'a, Genetik laboratuvarında birlikte çalıştığım ve çok büyük yardımlarını gördüğüm Uzman Biyolog Arş. Gör. Mehmet Tahir HÜSUNET, Dr. Erman S. İSTİFLİ, Biyolog Rumeysa MEŞE, Biyolog Leyla YARDIMCI, Biyolog Amine HAFIS ABDELSALAM ve Biyolog Büşra BOZ arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca çalışmam için gönüllü olarak destek veren Uzman Biyolog Arş. Gör. Fatıma M. USLU ve Biyolog Ayşe KARA arkadaşlarıma da çok teşekkür ederim.

Ayrıca, yüksek lisans tez çalışmasını maddi yönden destekleyen Ç.Ü. Araştırma Fonu ile Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak tüm aileme, özellikle sevgili annem Kaniz HASSANALY ve kız kardeşlerim Nirmalah GOULZAR ve Artinah GOULZAR'a sürekli destek ve cesaretlendirdikleri için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı, hayatımın her anında o sonsuz sevgisiyle rahmetli olan babam Goulzar JOGEE'ye ithaf ediyorum. Bu çalışma benim eğitimim ve geleceğim için babamın yaptığı tüm fedakârlıkların sonucudur.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XIV
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	13
2.1. Fosfat Bağlayıcıların Sınıflandırılması ve Kullanımı	14
2.1.1. Kalsiyum içeren fosfat bağlayıcılar.....	14
2.1.2. Magnezyum İçeren Fosfat Bağlayıcılar.....	15
2.1.3. Alüminyum İçeren Fosfat Bağlayıcılar	16
2.1.4. Sevelamer Hidroklorür (SH) ve Sevelamer Karbonat.....	17
2.1.5. Lantanum Karbonat ve Lantanum Klorür	18
2.1.6. Sükroferrik oksihidroksit.....	19
2.2. Fosfat Bağlayıcı Ajanlar İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları	20
2.2.1. Lantanum Karbonat İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	20
2.2.2. Sevelamer Hidroklorür (SH) ve Kalsiyum Asetat (KA) İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları	21
3. MATERYAL VE METOD	24
3.1. Materyal	24
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	24
3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları	41
3.1.3. Lamların Temizlenmesi	43
3.1.4. Sterilizasyon	44

3.2. Metod	44
3.2.1. Mikronukleus (MN) Oluşumunu Saptaması	44
3.2.2. Alkalın Komet Testi (Tek hücre jel elektroforez/Kuyruklu yıldız testi)	50
3.2.3. AMES/Salmonella Bakteriyel Geri Mutasyon Testi.....	60
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	63
4.1. Bulgular.....	63
4.1.1. Sevelamer Hidroklorür ve Kalsiyum Karbonatın Mikronukleus (MN) Oluşumu ve Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri	63
4.1.2. Test Maddelerinin (Sevelamer Hidroklorür ve Kalsiyum Karbonat) DNA Hasarı Üzerindeki Etkileri	69
4.1.3. Sevelamer Hidroklorür ve Kalsiyum Karbonat'ın Salmonella Suşlarının Üzerindeki Mutajenik Etkileri.....	73
4.2. Tartışma	76
4.2.1. Sevelamer Hidroklorür ve Kalsiyum Karbonatın Mikronukleus (MN) Oluşumu ve Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri	76
4.2.2. Sevelamer Hidroklorür ve Kalsiyum Karbonatın DNA Hasarı Üzerindeki Etkileri.....	79
4.2.3. Sevelamer Hidroklorür ve Kalsiyum Karbonatın Salmonella Suşlarının Üzerindeki Mutajenik Etkileri	80
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	83
5.1. Sonuçlar	83
5.2. Öneriler	84
KAYNAKLAR	85
ÖZGEÇMİŞ	101

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. Kromozom medyumuna içeriği	34
Çizelge 4.1. SH ve KK ile Muamele Edilmiş İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde MN İçeren İki Nukleuslu Hücre %'si, Hücre Başına Düşen Ortalama MN Sayısı ve Nukleus Bölünme İndeksi (NBI)	66
Çizelge 4.2. Üç Farklı Konsantrasyonda SH ve KK İle 1 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferal Lenfositlerinde DNA Hasarı.....	71
Çizelge 4.3. Salmonella typhimurium TA98 ve TA100 suşları ile denenen SH ve KK'nın S9 fraksiyonu yokluğunda deney sonuçları.....	74



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 3.1. Kalsiyum karbonatın açık formülü (ChemBioDraw Ultra 13.0)	24
Şekil 3.2. Sevelamer hidroklorürün açık formülü (ChemBioDraw Ultra 13.0)	28
Şekil 3.3. Mitomycin C'nin açık formülü.....	37
Şekil 3.4. Sitokalsin B'nin açık formülü.....	39
Şekil 3.5. Bir nükleuslu hücre. X1000.....	48
Şekil 3.6. İki nükleuslu hücre. X1000.....	48
Şekil 3.7. Üç nükleuslu hücre. X1000.	49
Şekil 3.8. Dört nükleuslu hücre. X1000.....	49
Şekil 3.9. DNA hasarına uğramış hücrede baş ve kuyruk oluşumu.....	55
Şekil 3.10. Komet tekniği genel aşamaları (Fidan, 2008).....	56
Şekil 3.11. Komet testi ile farklı seviyelerde hasara uğramış DNA'ların görüntüleri	57
Şekil 3.12. DNA'sı göç etmiş (kuyruklu=a) ve göç etmemiş (kuyruksuz=b) nükleuslar. X1000.....	59
Şekil 3.13. DNA'sı göç etmiş (kuyruklu=a) ve göç etmemiş (kuyruksuz=b) nükleuslar. X1000.....	59
Şekil 3.14. <i>Salmonella typhimurium</i> TA 98 suşunun kontrol sonuçları.....	61
Şekil 3.15. <i>Salmonella typhimurium</i> TA 100 suşunun kontrol sonuçları.....	62
Şekil 4.1. Binükleer hücrede görülen bir mikronukleus örneği (sevelamer hidroklorür 1 mg/mL, 24 saat) (x1000).....	67
Şekil 4.2. Binükleer hücrede görülen iki mikronukleus (sevelamer hidroklorür 0,5 mg/mL, 48 saat) (x1000)	67
Şekil 4.3. Binükleer hücrede görülen bir mikronukleus (kalsiyum karbonat 1 mg/mL, 24 saat) (x1000)	68
Şekil 4.4. Binükleer hücrede görülen bir mikronukleus (kalsiyum karbonat 0,5 mg/mL, 48 saat) (x1000)	68

Şekil 4.5.	Farklı konsantrasyonlarda kalsiyum karbonat ile 24 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde mikronukleus içeren iki nükleuslu hücre bindesinin (MNBN %'si) konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.	69
Şekil 4.6.	Sevelamer hidroklorürün 0,5 mg/mL' lik dozu ile muamele edilen insan periferel lenfosit hücreleri (a= DNA'sı göç etmiş ve b= DNA'sı göç etmemiş nükleuslar). x40.....	72
Şekil 4.7.	Kalsiyum karbonatın 0,5 mg/mL' lik dozu ile muamele edilen insan periferel lenfosit hücreleri (a= DNA'sı göç etmiş ve b= DNA'sı göç etmemiş nükleuslar). x40.....	72
Şekil 4.8.	Sevelamer hidroklorürün 0,5 mg/mL'lik dozuna ait <i>Salmonella typhimurium</i> TA 98 suşunun deney sonuçları	75
Şekil 4.9.	Kalsiyum karbonatın 1 mg/mL'lik dozuna ait <i>Salmonella typhimurium</i> TA 100 suşunun deney sonuçları	75

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	:	Santigrat derece
µg	:	Mikrogram
µg/mL	:	Mikrogram/mililitre
µg/µL	:	Mikrogram/mikrolitre
µM	:	Mikromolar
ark.	:	Arkadaşları
C	:	Karbon
Ca	:	Kalsiyum
CA	:	Chromosome Aberration
CBMN	:	Sitokinezi-Bloklayan Mikronukleus Testi
CFU	:	<i>Colony-Forming Unit</i>
CHO	:	Chinese Hamster Ovary
Cl	:	Klor
cm	:	Santimetre
ÇK	:	Çözücü kontrol
Cyt-B	:	Cytochalasin-B
Da	:	Dalton
DCFH-DA	:	Diklorofloresein diasetat
dk.	:	Dakika
DMSO	:	Dimethyl Sulfoxide
DNA	:	Deoksiribonukleik Asit
EDTA	:	Etilendiamin tetraasetik asit
EtBr	:	Etidyum Bromid
g	:	Gram
GFH	:	Glomerüler Filtrasyon Hızı
GHI	:	Genetik Hasar İndeksi
GI	:	Gastrointestinal

H	:	Hidrojen
H ₂ O ₂	:	Hidrojen peroksit
HB	:	Histidin-Biyotin
HHO	:	Hasarlı Hücre Oranı
HMA	:	High Melting Agar; Yüksek Kaynama Dereceli Agar
HNO ₃	:	Nitrik Asit
i.v.	:	İntravenöz
K	:	Potasyum
KA	:	Kromozom Aberasyonu
KA	:	Kalsiyum Asetat
KBH	:	Kronik Böbrek Hastalığı
KBY	:	Kronik Böbrek Yetmezliği
KCl	:	Potasyum klorür
KK	:	Kalsiyum Karbonat
KKD	:	Kardeş Kromatid Değişimi
LDL	:	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LMA	:	Low Melting Agar; Düşük Kaynama Dereceli Agar
Mg	:	Magnezyum
MGA	:	Minimal Glukoz Agar
MgCl ₂	:	Magnezyum klorür
MI	:	Mitotik İndeks
mL	:	Mililitre
MMC	:	Mitomycin C
MN	:	Mikronukleus
MNPCE	:	Mikronukleuslu Polikromatik Eritrosit
N	:	Azot
Na	:	Sodyum
NaCl	:	Sodyum Klorür
NB	:	Nutrient Broth

NBI	:	Nukleus Bölünme İndeksi
NKF	:	National Kidney Foundation
4-NPD	:	4-Nitro-fenilendiamine
O ₂	:	Oksijen
OH	:	Hidroksit
P	:	Fosfor
PBS	:	Fosfat tamponu
pH	:	Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
PK	:	Pozitif Kontrol
PMN	:	Polimorfonükleer nötrofil
PTH	:	Paratiroid Hormonu
RNA	:	Ribonukleik asit
ROT	:	Reaktif Oksijen Türleri
rpm	:	Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)
S	:	Kükürt
SA	:	Sodyum azid
SCE	:	Sister Chromatid Exchange
SCGE	:	Single cell gel electrophoresis
SDBH	:	Son Dönem Böbrek Hastalığı
SH	:	Sevelamer Hidroklorür
SH	:	Standart Hata
S9 mix	:	Memeli Karaciğer Fraksiyonu [S9]
UV	:	Ultraviyole



1. GİRİŞ

Canlı organizmalarda fosfor; iskelet gelişimi, mineral metabolizması, hücre zarı fosfolipid fonksiyonu, mitokondri metabolizması, hücre sinyalleme ve trombosit agregasyonu gibi insan vücudunun birçok hücre içi ve hücre dışı yapısı ve işlemleri için gerekli olan temel bir elementtir. Vücut içinde, temel fosfor öncelikle fosfat anyonu olarak bulunur (Yu, 2004; Schucker ve Ward, 2005).

Toplam olarak bir yetişkinin vücut fosfat depoları yaklaşık 700 gr'dır; bunun % 85'i kemik matriksi (osteosit arası madde) içinde bulunur ve hipofosfatemi dönemlerinde fosfat rezervuarı görevi görür. Ardından % 14 hücre içi ve sadece %1 hücre dışıdır. Hücre dışı fosforun % 70'i organik ve fosfolipidlerin içinde bulunur. Geriye kalan % 30 ise inorganiktir, bunların % 15'i protein bağlı geri kalan % 85'i ise serbest mono- veya di-hidrojen formları halinde dolaşımda bulunur ya da kalsiyum sodyum, magnezyum ile komplekslenir. Hücre dışı fosforun sadece bu % 15'i serbestçe dolaşır ve ölçülür (Moe, 2008; Kalaitzidis ve Elisaf, 2014).

Hücre içi seviyede, DNA, protein ve adenosin trifosfatın sentezinde fosfat kullanılır. Ayrıca, fosfat fosforilasyon yoluyla ikinci haberciler olarak kullanılmak üzere proteinlerin ve lipidlerin aktivasyonu için gereklidir.

Fosfat homeostazı, vücuda diyet alımı yoluyla fosforun sürekli eklenmesi nedeniyle statik bir seviye değildir.

Tipik bir diyetle günde yaklaşık 1000-1400 mg fosfor alınır; bunun yaklaşık %65'i duodenum ve jejunum tarafından emilir (Yu, 2004; Schucker ve Ward, 2005). Alınan fosforun yaklaşık 2/3'ü idrarla, geriye kalan 1/3'ü dışkıda atılır. Fosfatın renal atılımı, serum fosfat seviyelerini düşürür ve toplam vücut fosfatını düşürmenin tek yoludur.

Sağlıklı bireylerde serum fosfat konsantrasyonları 2,5 ile 4,5 mg/dL arasında tutulur. Amerika Ulusal Böbrek Vakfı (NKF), < 4.6 mg/dL'lik bir serum fosfat konsantrasyonunun korunmasını önerir (Agodoa ve ark., 1996; Schucker ve Ward, 2005).

Fosfor atılımı, böbrek fonksiyonuna oldukça bağımlıdır ve açık bir şekilde kronik böbrek yetmezliği (KBY), hiperfosfateminin en sık nedenidir. Fosfat tutulması, filtrelenmiş fosfat yükündeki azalma nedeniyle erken böbrek yetmezliğinde başlar. böbrek yetmezliği ilerledikçe Hiperfosfatemi belirginleşmektedir. Tedavi edilmediğinde, hiperfosfatemi sekonder hiperparatiroidizm, renal osteodistrofi ve damarların ve yumuşak dokunun metastatik kalsifikasyonuna neden olabilir (Kalaitzidis ve Elisaf, 2014).

Böbreklerin temel işlevi, metabolik atık ürünlerin kandan uzaklaştırılmak ve hücre dışı sıvı hacminin düzenlenmektir. Kronik böbrek hastalığı (KBH), glomerüler filtrasyon hızında (GFH) bir düşüş olarak ifade edilen, böbrek fonksiyonunda aşamalı ve ilerici bir azalmadır. Böbrek hasarı, özellikle fonksiyonel alt ünite olan nefron hasarı, GFH'da bir azalmaya neden olur. Nefron hasarının en yaygın nedenleri, zamanla nefronun bütünlüğünü tahrip eden ve böbreklerin atık ürünleri filtreleme yeteneğini etkin bir şekilde azaltan diyabet ve hipertansiyondur (Agodoa ve ark., 1996; Schucker ve Ward, 2005).

Böbrek fonksiyonu azaldıkça fosfat atılımı da azalır. Serum fosfat seviyesindeki yükselmeler, vücutta atipik tepkiler kademesine neden olur. Serum fosfat serum kalsiyumuna kolayca bağlanır ve serum kalsiyum konsantrasyonunu etkili bir şekilde azaltır (Akizawa ve ark., 2003; Schucker ve Ward, 2005). Serum kalsiyum azaldıkça, paratiroid hormonunun (PTH) salınımında telafi edici bir artış meydana gelir ve bu da sekonder hiperparatiroidizm ile sonuçlanır. Serum kalsiyum seviyelerini eski haline getirmek için, PTH kemik matriksini parçalamak ve kalsiyumu bırakmak için osteoklastları aktive eder. Ek olarak, artan serum fosfat seviyeleri, serum kalsiyum ve D3 vitamin seviyelerinden bağımsız olarak PTH salınımına neden olur. Ayrıca, PTH fosfatın tübüler resorpsiyonunu engellerken, kalsiyum resorpsiyonunu desteklemektedir

(Murer ve ark., 2000; Ritz, 2004; Schucker ve Ward, 2005).

Daha önce de belirtildiği gibi serum fosfat, kalsiyum fosfat ürünü yaratarak serum kalsiyum ile bağlanır. Eğer konsantrasyon 55 mg/dL²'den daha fazla (> 55

mg²/dL²) olursa, kalsiyum-fosfat ürünü kristalleşerek yumuşak doku ve damar içerisinde kristal birikmesine neden olur. Kalsiyum-fosfat ürün konsantrasyonu 70 mg²/dL² daha yüksek olan hastalar, fosfat durumlarından bağımsız olarak artmış ölüm riskine sahiptir (Block ve ark., 1998 ; Kalaitzidis ve Elisaf, 2014). Mortalite riskinde artış, vasküler kalsifikasyonun sonucu olarak ortaya çıkabilir ve damar esnekliğinde müteakip düşüşler potansiyel olarak sol ventrikül hipertrofisine neden olabilir.

GFH değeri <15 mL/dk olan hastalara son dönem böbrek hastalığı (SDBH) olduğu kabul edilir ve bu hastalar muhtemelen kronik diyaliz veya böbrek nakli gerektirecek klinik tablo göstermektedir (National Kidney Foundation, 2003).

Diyalizin temel mekanizması, üre ve kreatinin gibi azot içeren atık ürünlerin kandan bir konsantrasyon gradyanı boyunca yarı geçirgen bir zardan bir diyalizat çözeltisine taşınmasını içerir. Hemodiyaliz yoluyla etkili fosfat giderimi yani fosfatın vücuttan bifazik eliminasyonu karmaşık bir süreçtir. Hemodiyalizden sonra serum fosfatta başlangıçta bir düşüş olmasına rağmen, hücrelerden %30-40'lık bir fosfat akışı bir saat içinde gerçekleşir (Haas ve ark., 1991; Schucker ve Ward, 2005). Periton diyalizi ile fosfat giderimi değişkendir, çünkü periton içindeki kan akışı dalgalanır ve membran hemodiyaliz filtrelerinden daha az geçirgendir. Bu nedenle, hemodiyaliz veya periton diyalizi ile hiperfosfateminin yönetimi, fosfatın kandan yeterince uzaklaştıramadığı için sınırlıdır.

Ortalama dört saatlik hemodiyaliz seansı yalnızca 700-1000 mg fosfat uzaklaştırarak haftada vücuttan 2,1–3 gr azalma sağlar. Periton diyalizi ile haftalık olarak uzaklaştırılan ortalama fosfat miktarı yaklaşık 2.2 gr'dır. Diyet fosfor alımının kısıtlanması, fosfat birikimini yavaşlatabilir. Bununla birlikte, SDBH olan insanlarda kabul edilebilir sınırdaki serum fosfatın sağlanması için uygulanan diyet ve diyaliz programları gibi girişimler protein yetersizliğine yol açabilir (Sellaes ve Ramirez, 2004; Schucker ve Ward, 2005).

Dikkate alınması gereken ilk adım, düşük bir fosfat diyeti ile bağırsak fosfat emiliminin azaltılmasının önemidir. İlginç bir şekilde, son kanıtlar farmakolojik

müdahalelere dayanmak yerine, diyetteki fosfat miktarını azaltmanın daha iyi olacağını ortaya koymaktadır (Chue ve ark., 2013; Kalaitzidis ve Elisaf, 2014). Bununla birlikte fosforun diyet yoluyla kısıtlanması protein alımını engellemezken bu kısıtlamanın serum fosfat seviyelerini kontrol etmede yeterli olmadığı gündeme getirilmiştir. Hemodiyaliz hastalarında ikinci adım fosfat yükünün etkili bir diyaliz ile uzaklaştırılmasını sağlamaktır. Üçüncü adım, emilim için serbest fosfatı azaltabilen, antiasitler, fosfat bağlayıcılar veya kalsiyum gibi fosforla bağlanan yiyecekler veya ilaçlardır. Hiperfosfatemide hastaların çoğunda, bir fosfat bağlayıcı reçetesi gerekir (Kalaitzidis ve Elisaf, 2014).

Serum fosfattaki yükselmelerle mortalite riskini ilişkilendiren mevcut kanıtlara göre serum fosfat SDBH olan hastaları için kritik bir odak noktasıdır. Fosfat bağlayıcılar bağırsaktaki fosfor alımını gastrointestinal (GI) lümen içerisindeki fosfora bağlayarak kolayca emilmeyen ve çözünmeyen ürünler oluşturur. Mekanik olarak benzer olmasına rağmen ayrı ayrı fosfat bağlayıcıların etkinliği ve yan etkileri ajanlar arasında farklılık gösterir (Burke ve ark., 1997; Schucker ve Ward, 2005).

SDBH'nin oksidatif stres ile ilişkili olduğunu gösteren kanıtlar mevcuttur. Bu oksidatif stres hem oksidan üretiminin artması hem de antioksidanların azalmasının bir sonucudur (Palleschi ve ark., 2007; Stoyanova ve ark., 2010).

Böbrek nakli SDBH için etkili bir tedavi olmasına rağmen diyaliz bu tür hastalar için hala en yaygın tedavi yöntemidir. Diyalizle devam ettirilen hastalar aşağıdakileri içeren çeşitli nedenlerden dolayı potansiyel olarak artmış kanser riski taşırlar: Özellikle idrar yollarında kronik enfeksiyon varlığı, zayıf bir bağışıklık sistemi, immünosupresif veya sitotoksik ilaçlarla önceki tedavi, beslenme yetersizlikleri ve değiştirilmiş DNA onarımı. Ek olarak böbrek yetmezliğine yol açan altta yatan hastalık, bununla ilişkili kalıcı metabolik değişiklikler ve edinilmiş böbrek kistik hastalığı gibi bazı komplikasyonların gelişmesi kansere neden olabilir. Bu nedenle dokularda tutulan herhangi bir fosfat bağlayıcısının hastalar

için gizli bir genotoksik tehlike oluşturmamasını sağlamak önemlidir (Vamvakas ve ark., 1998; Maisonneuve, 1999).

Bu varsayımı teyit etmek, yayınlanmış genotoksisite çalışmalarından kaynaklanan çelişkili sonuçları netleştirmek ve tıbbi kullanımdan önce güvenliğin sağlam bir değerlendirmesini sağlamak için genotoksik potansiyelin kapsamlı bir değerlendirmesi yapılmalıdır.

İlaç geliştirmede toksisite önemli bir faktördür ve %30 - %40'luk bir başarısızlık oranı vardır. Genotoksisite ve kanserojenite güvenlik değerlendirmesinde dikkat edilmesi gereken başlıca faktörler arasındadır (Kola ve Landis, 2004; Mohs ve Greig, 2017).

Bu çalışmanın test maddeleri, hiperfosfatemi hastası kişilerin tedavisinde kullanılan fosfat bağlayıcılar Kalsiyum karbonat ve Sevelamer hidroklorür ajanlarıdır. Bu çalışma kültüre edilmiş insan periferik lenfositlerinde bu iki ajanın genotoksik risk oluşturup oluşturmadığını belirlemek amacıyla yürütülmüştür.

Genotoksisite terimi ile hücrede genetik bilgiye zarar veren ve kansere neden olabilecek mutasyonlara neden olan kimyasal maddelerin özelliği açıklanmaktadır. Genotoksisite sıklıkla mutajenite ile karıştırılırken, tüm mutajenler genotoksiktir olmasına rağmen bütün genotoksik maddeler mutajenik değildir. Toksik ajanların DNA üzerinde doğrudan veya dolaylı etkileri; mutasyonlara yol açan doğrudan DNA hasarı veya yanlış uyarılmış aktivasyon şeklinde olabilir. Kalıcı kalıtsal değişiklikler, organizmanın somatik hücrelerini veya gelecek nesillere aktarılacak olan germ hücrelerini etkileyebilir. Hücreler gerçekleşen genotoksik mutasyonların ifadesi DNA onarımı veya apoptoz yoluyla önlenir; öte yandan hasar her zaman aynı şekilde ortaya çıkmayabilir (Wikipedia; Genotoxicity).

1960'ların sonlarında, ilk olarak kanserojenleri taramak için kabul edilebilirliği yüksek oranda olduğu öngörülen kısa süreli genotoksisite analizleri geliştirilmiştir. Bu sonuç çeşitli iyi tanımlanmış in vitro deneylere yol açmış ve 1980'lerden bu yana genotoksisiteyi tahmin etmek, kimyasal maddeleri etiketlemek

ve kanser riski değerlendirme sürecini bilgilendirmek için başarıyla kullanılmıştır (Balls, 2018).

Genetik materyalin bütünlüğünün değişikliğe uğraması kansere neden olduğu bilinmektedir. Karsinogenez ve kalıtsal hastalıklarda yer aldığı için genotoksitenin yeterli bir değerlendirmesi zaruridir. Bu amaçla, üç ana son nokta verileri değerlendirilmelidir (gen mutasyonu, yapısal kromozom aberasyonları ve sayısal kromozom aberasyonları). Standart in vitro testleri, kardeş kromatid değişimi (KKD) (Sister Chromatid Exchange=SCE) (Tucker ve ark., 1993), kromozom aberasyonu (KA) (Chromosome Aberration=CA) (Carrano ve Natarajan, 1988; Anderson, 1988; Hagmar ve ark., 1994), mikronukleus (MN) (Heddle ve ark., 1991, Fenech, 2002) ve tek hücreli jel elektroforez (komet) (Singh ve ark., 1988) testleridir. Perry ve Evans (1975)'in bilinen mutajen ve kanserojenlerin Çin hamsteri (*Cricetulus griseus*=Çin kemiricisi) yumurtalık (CHO) hücrelerinde KKD ve KA'yı uyardığını saptamalarından sonra bu testler mutajen ve kanserojenlerin belirlenmesinde kullanılmaya başlanmıştır. *Salmonella* bakteriyel geri mutasyon testi (Ames testi), en basit en anlamlı ve kabul edilebilir kısa süreli mutajenite ve antimutajenite test sistemlerinden biridir. Test ilk olarak 1971 yılında Ames tarafından geliştirilmiştir (Ames ve ark., 1973; Maron ve Ames, 1983; Zeiger, 2004, 2010).

Mikronukleus (MN) testi genotoksik kanserojenler için en başarılı ve güvenilir testlerden biri olarak kabul edilmektedir (Heddle ve ark., 1991; Fenech, 2002). MN testi 1950'lerde bitki hücrelerinde kromozom hasarının ölçülmesinde, 1970'lerde hayvan hücrelerinde ve daha sonra Heddle ve arkadaşları (1991) tarafından kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kimyasal karsinojenleri belirlemeye yönelik bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır. MN yapıları asentrik kromozom ya da kromatid kırıklarından ve tüm kromozomlar ya da kromatidlerin anafazda geri kalmasından dolayı (kalgın kromozom) telofazda oluşan kardeş nükleusun dışında rastlanan küçük nükleuslardır (Surrallés ve ark., 1995). Ayrıca multipolar anafaz ve telofaz da MN oluşumuna sebep olmaktadır (Topaktaş ve

Rencüzoğulları, 2010). MN oluşumuna neden olabilen kromozom kaybı ya da kromozomların ayrılamaması (non-disjunction) kanser ve yaşlanmada gözlenen önemli olaylardan biridir. Bu durum muhtemelen iç iplikçiği kusuru, sentromer bozukluğu ya da metafazdan önce kromozom yapısının yoğunlaşması sonucu oluşmaktadır (Dellarco ve ark., 1985). Dolayısıyla bu test hem klastojenik hem de anöjenik kimyasalların aktivitesini saptama potansiyeline sahiptir (Kirsch-Volders ve ark., 1997; Norppa ve Falck, 2003). Daha sonra sitokinez-bloklama mikronukleus metodunun Fenech ve Morley (1985) tarafından geliştirilmesiyle, nükleus bölünmesini tamamlamış hücrelerdeki mikronukleuslar incelenmeye başlanmıştır. Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Sitokalsin-B ilavesiyle çekirdek bölünmesini tamamlamış ancak sitoplazma bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte ve MN bulunduran hücrelerin oranı saptanabilmektedir. Mikroskopla incelenen alanda kültür süresi içinde ikinci bölünmesini tamamlamış 4 çekirdekli hücrelere de rastlanmaktadır. Sağlıklı bireylerden oluşan insan populasyonunda periferik kan lenfositlerindeki MN frekansının da KA frekansı gibi kanser riskinin tahmin edilmesinde belirleyici bir rol oynadığına dair epidemiyolojik bulgular mevcuttur (Bonassi ve ark., 2007, Murgia, 2008). MN'nin kanserli hastaların periferik lenfositlerindeki varlığı hakkında birçok makale yayınlanmıştır. Kanserli hastaların büyük çoğunluğunda kontrol gruplarına göre MN'de anlamlı bir artış göstermektedir (Iarmarcovai ve ark, 2008, Bonassi ve El-Zein, 2011). Bu nedenle MN frekansının kanser riskinin tahmininde geçerli bir biyomarkör olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Maddelerin mutajenitelerinin saptanmasında kullanılan önemli bir mutajenite testi olarak kabul edilen Ames testi 1970'lerin başında Bruce Ames ve onun çalışma arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Bu test *Salmonella typhimurium*'un histidin sentez mutantlarının (his^-) kullanılarak yapılır ve histidin sentezleyebilen (his^+) revertantların oranı geri mutasyon frekansını gösterir. Eğer kimyasallar histidin sentezleme genindeki mutasyonu geri çevirebilirse (his^+) geri

dönen koloni sayıları plak üzerinde görülecektir. Kısaca deneyin amacı; daha önceden büyümesi için histidin amino asidine gereksinim duyan oksotrof susların, kullandığımız test maddesi ile tekrar histidin sentezleyebilir (prototrof) hale dönüşmesi temeline dayanmaktadır (Ames ve ark.,1973; Maron & Ames, 1983; Gee ve ark., 1994; Mortelmans ve Zeiger, 2000; Tejs, 2008). Bilim dünyasına girdikten sonra, Ames testi, gen mutasyonlarına neden olabilecek kimyasalları belirlemek için kısa süreli bir bakteri test sistemi olarak yaygın şekilde kabul edilmiştir. Test, gen mutasyonlarına neden olan kimyasalların tanımlanmasında birçok avantaja sahiptir. Bu avantajlar şöyle sıralanabilir:

- Kısa süreli sonuç: Kısa sürede tekrarlar oluşturmanıza ve daha güvenilir sonuçlar elde etmenize olanak sağlar. Deney sadece yaklaşık 48 saat sürer.
- Düşük maliyetli: Çok sayıda test malzemesinin ucuza çalışılmasını sağlar.
- Birkaç gen mutasyonuna sahip çeşitli bakteri suşlarıyla test malzemelerinin moleküler etki mekanizmasının araştırılmasını sağlar.
- *Salmonella* suşlarının mezofil (ılık seven) karakteri: Kimyasalların mutajen potansiyelini insan vücudunda ölçmeyi sağlar.

Tüm avantajların yanı sıra, Ames / *Salmonella* test sistemi çok yönlüdür ve çevre kimyasalları, çevre karışımları, vücut sıvıları, gıdalar, ilaçlar ve fiziksel ajanlar gibi çeşitli malzemelerin mutajenik potansiyellerini belirlemek için birçok modifikasyon geliştirilmiştir. Genel mutajenite testleri için en çok kullanılan test suşları TA98, TA100, TA102, TA1535 ve TA1538'dir. Her bir test suşu histidin operonunda değişik tipte mutasyonlar içermektedir (Maron and Ames, 1983).

Bizim çalışmamızda *Salmonella typhimurium* TA100 ve TA98 suşları kullanılmıştır. TA100 baz çifti değişimine, TA98 ise çerçeve kaymasına yol açan mutajenlerin belirlenmesi için kullanılmıştır. Deneyler metabolik aktivasyon (S9

miks) yokluğunda gerçekleştirilmiştir. Test sonuçlarının ortalaması alınarak, pozitif ve negatif kontrol grupları ile karşılaştırılmış ve değerlendirilmiştir.

Son yıllarda ökaryotik hücrelerde farklı fiziksel ve kimyasal bileşiklerin neden olduğu DNA hasarının belirlenmesinde kullanılan bir diğer test tek hücre jel elektroforez testi (Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE) olarak da bilinen Comet Assay (komet test) yöntemidir. Hızlı, basit, ucuz, güvenilir ve hassas bir test sistemidir. İnsan periferik lenfositlerinde meydana gelen DNA hasarı kuyruklu yıldız görünümünde olduğu için yöntem "COMET" ismiyle de anılmaktadır. Komet tekniğinin temel amacı, genotoksik ve sitotoksik ajanların canlı hücreler üzerindeki etkilerini, tek tek hücrelerin nükleuslarını inceleyerek tespit etmektir.

1984 yılında İsveçli araştırmacılar olan Ostling ve Johanson, nötral pH'daki lizis şartlarında uygulanarak DNA çift iplik kırıklarının belirlenmesi sağlamak amacıyla bu tekniği geliştirdi. Ancak DNA hasarlarının tespitinde nötral şartlar alkali şartlar kadar hassas olmadığı için nötral şartlar altında yapılan lizis ve elektroforezis uygulamaları DNA çift iplik kırıklarının tespitine izin verirken, DNA tek iplik kırıklarının tespitine izin vermemektedir. Bu nedenle, Singh ve arkadaşları, daha sonra 1988'de Alkaline Comet Assay olarak bu tekniği değiştirdi. Singh ve arkadaşlarının Komet tekniği protokolü bugün dünya genelinde en yaygın kullanılan protokol olmuştur. Tek düşmüş hücreler, mikroskop lamı üzerinde ince bir agaroz jeli içine gömülür. Tüm hücresel proteinler daha sonra hücrelerden parçalanarak uzaklaştırılır. DNA'nın alkali/nötral koşullar altında çözülmesine izin verilir. Genotoksik ajanların etkisiyle DNA'da tek veya çift zincir kırıkları oluşabilir ve buna bağlı olarak ortaya çıkan farklı ağırlık ve elektrik yüküne sahip DNA molekülleri elektroforetik ortamda farklı hızlarda göç ederler. Daha sonra kırık DNA'nın katottan anoda göçü Etidyum bromid gibi flüoresan boya ile boyandıktan sonra görüntülenmektedir. Elde edilen görüntü, bir baş ve kuyruk ile bir "kuyruklu yıldız" andırıyor (Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010). Baş bozulmamış DNA'dan oluşurken, kuyruk hasarlı (tek iplikli veya çift iplikli kopmalar) veya kırık DNA parçalarından oluşur.

Komet tekniği aşağıda da sıralanan birtakım avantajlara sahiptir (Vrzoc ve Petras, 1997; Tice ve ark., 2000; Choy, 2001; Piperakis, 2009; McArt ve ark., 2010) :

- Tek hücre seviyesinde bilgi edinilebilir.
- Hücrelerdeki DNA kırıklarını görsel olarak ortaya koyar,
- Az sayıda hücre örneği gerektirir,
- Değişik hücre ve doku gruplarına uygulanabilir,
- Ucuz bir tekniktir ve çabuk sonuç elde edilir,
- Hassas ve güvenilir bir yöntemdir,
- Test edilen hücrede mitotik aktivite etkisinin dışlanması,
- Endüstriyel toksikoloji, çevresel toksikoloji, genetik toksikoloji, insan biyoizlenimleri, DNA onarım ve hasarının temel mekanizması gibi çalışmalarda kullanılabilmektedir.

Bu özellikleri sayesinde Komet testi oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bu yöntem günümüzde:

- DNA hasar ve onarım incelemelerinde
- Çeşitli kimyasal kaynaklı genotoksisite değerlendirmesinde
- Ekogenotoksikolojik değerlendirmelerde (trafik ve fabrika atıklarının çevreye verdiği zarar, kimyasal atıklar, zehirli gazlar vb. gibi birçok durumlarda, çevre sağlığının tespit edilmesinde)
- Biyoizleme çalışmalarında (meslekleri nedeniyle ya da kazayla çeşitli kimyasal maddelere maruz kalan kişilerde, DNA hasarının incelenmesinde)
- Yaşlanmadan, genetik toksikoloji ve moleküler epidemiyolojiye kadar pek çok toksikoloji uygulamalarında

- Beslenme çalışmalarında (Gıda, gıda katkı maddelerinin yararlı ve zararlı etkilerinin araştırılması)
- Klinik hastalık tanısında ve ilaç uygulamalarının etkilerinin izlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Klaude ve ark., 1996).

Bu çalışmadaki test maddeleri (Sevelamer hidroklorür ve Kalsiyum karbonat) fosfat bağlayıcı nitelik göstermektedir ve hastalardaki aşırı serum fosfat yükünün azaltılmasında etkili şekilde kullanılmaktadır. Piyasada bulunan fosfat bağlayıcıların, hiperfosfatemi hastalarında yaygın şekilde kullanılmasına rağmen literatür taramasında fosfat bağlayıcı ajanlarla ilgili genotoksisite ve sitotoksisite çalışmalarının sadece birkaç ilaçla yapılmış az sayıda çalışmadan ibaret olduğu anlaşılmıştır. Bu çalışmaların sonuçları aşağıda kısaca özetlenmiştir.

Peres (2009), hemodiyaliz hastalarında Sevelamer hidroklorür (SH) ve Kalsiyum asetatın (KA) oksidatif stres üzerindeki etkisini değerlendirmeyi amaçlayan bir çalışma yapılmıştır. Her iki gruptaki hastaların 12 ayda spontan reaktif oksijen türleri (ROT) üretiminde anlamlı bir azalma göstermiştir. Ayrıca Sevelamer hidroklorürdeki spontan ROT üretimindeki azalmanın Kalsiyum asetat grubuna göre daha fazla olduğu raporlanmıştır.

Serumunda yüksek seviyelerde fosfor ve kalsiyum ürünleri bulunduran SDBH hastalarının tedavisinde, hiperkalseminin önlenmesinde ve paratiroid hormon, LDL, kolesterol seviyesinin düzenlenmesinde ve de mortalite seviyesinin iyileştirilmesinde Sevelamer ilk seçenek olarak gözükmektedir (Block ve ark., 2007). Önceki çalışmalar, KBH hastalarında artmış DNA hasarı ve genomik instabilite seviyeleri göstermiştir (Sandoval ve ark., 2010, 2012; Stoyanova ve ark., 2010, 2014; Rodriguez-Ribera ve ark., 2014). Bu bağlamda, Pastor ve arkadaşları (2018), bu tür hastalarda gözlenen artmış DNA hasarı düzeyinin Sevelamer de dâhil yaygın farmakolojik tedavilerin kullanımıyla ilişkili olup olmadığını saptamak için çalışma yapmışlardır. SDBH hastalarında DNA hasarı seviyelerini değerlendirmek için kromozom kırkları ve anöploidi ölçmek için in vitro

mikronukleus (MN) testini kullanılmıştır. Kuyruklu yıldız yöntemi de DNA kırıklarının ve DNA bazlarının oksidasyonunun ölçülmesinde kullanılmıştır. Sonuçlar, bu ilacı alan hastaların komet veya mikronukleus testlerinde gözlenen DNA hasarı seviyelerinde herhangi bir artış olmadığını göstermektedir.

Başka bir çalışmada (Damment, 2005), post-mitokondriyal fraksiyonun (S9) varlığında ve yokluğunda lantanum (karbonat ve klorür olarak) ile bazı in vitro analizler (Ames test, Çin hamsteri yumurtalık hücrelerinde hgp⁺ lokusunda gen mutasyonu testi, CHO hücreleri kullanılarak in vitro sitogenetik test) kullanılarak potansiyel genotoksisite açısından değerlendirilmiştir. Mutajenite ve klastojenite için in vivo olarak üç bağımsız test kullanılmıştır. Bunlar; lantanum karbonatın oral yoldan verilmesinden sonra fare kemik iliğinde in vivo MN testi, lantanum klorürün intravenöz uygulamasından sonra sıçan kemik iliğinde in vivo MN testi ve lantanum klorürün intravenöz uygulamasından sonra sıçan karaciğerinde planlanmamış DNA sentezi için in vivo analizlerdir. Sonuçlara göre lantanum bir in vivo genotoksin değildir ve CHO hücreleri kullanılarak yapılan bir in vitro sitogenetik deneyde bir takım etkiler gözlenmiştir. Lantanum karbonatın kullanımının güvenli olduğuna ve diyaliz hastalarında uzun süreli çalışmalardan ortaya çıkan iyi güvenlik profiline uygun olduğuna dair klinik olmayan kanıtlar sunmuştur (D'Haese ve ark. 2003; Behets ve ark. 2004).

Bu çalışma yukarıda da açıklandığı gibi önemli metabolik hastalıklardan birisi olan hiperfosfatemi tedavisinde sıklıkla reçete edilen Sevelamer hidroklorür ve Kalsiyum karbonat ajanlarının genotoksik ve/veya sitotoksik potansiyelini karşılaştırmalı olarak ortaya çıkarmak amacıyla planlanmıştır. Çalışmalar in vitro koşullarda sağlıklı ve gönüllü kişilerden alınan kültüre edilmiş lenfositlerle mikronukleus (MN) ve tek hücre jel elektroforez (Komet) testleri yapılmıştır. Ayrıca nokta mutasyonu ve çerçeve kayması mutasyonlarını uyarıp uyarmadığını belirlemek amacıyla *Salmonella typhimurium*'un mutant suşlarıyla (TA98 ve TA100) geri mutasyon testi (Ames testi) gerçekleştirilmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

İnsan vücudunun düzgün çalışması için yaklaşık 20 temel elemente ihtiyacı vardır. İlk olarak, H, C, N ve O “organik” elementleri vardır. Ayrıca yedi makro-mineral de (Na, K, Mg, Ca, Cl, P ve S) hücre için esastır (Nielsen, 1991).

Doz yeterince yüksekse insan yaşamı için gerekli elementler toksik olabilmekte ve Paracelsus’un “ilacı zehirden ayıran dozudur” prensibine işaret etmektedir. Hangi elementlerin gerekli ve hangilerinin gerekli olmadığı, hangilerinin organizmalar özellikle insanlar için toksik olup olmadığı halen tartışılmaktadır (Maret, 2016).

Kalsiyumdan sonra fosfor vücudumuzdaki en bol bulunan ikinci mineraldir. Vücudun güçlü kemikler ve dişler oluşturmak, doku ve hücreleri onarmak, enerji üretmek, kas ve sinir fonksiyonunu düzenlemek, böbreklerdeki atıkları filtrelemek gibi birçok fonksiyon için fosfora ihtiyacı vardır. Çoğu insan günlük diyetlerinde ihtiyaç duydukları fosfor miktarını almaktadır. Vücudumuzda hipofosfatemi oldukça yaygındır çünkü fazla fosfor toksik olabilmektedir. Bu mineralin fazlalığı, ishal, ayrıca organların ve yumuşak dokunun sertleşmesine neden olabilmektedir. Yüksek düzeyde fosfor vücudumuzun demir, kalsiyum, magnezyum ve çinko gibi diğer mineralleri etkin şekilde kullanma yeteneğini etkileyebilmektedir. Kalsiyum ile birleşerek kaslarımızda mineral birikintileri oluşmasına neden olabilmektedir.

Fosfat dengesinin korunması yaşam için önemlidir ve memeliler evrim boyunca fosfat homeostazını düzenlemek için sofistike bir sistem geliştirmiştir. Bununla birlikte fosfatın ortadan kaldırılmasının böbreğe olan bağımlılığı nedeniyle böbrek fonksiyonlarında azalma olan kişilerin pozitif bir fosfat dengesinde olmaları muhtemeldir. Fosfat fazlası, kronik böbrek hastalığı (KBH)’na bağlı mineral ve kemik bozukluklarının patogeneğinde kritik bir faktör olarak kabul edilmiştir ancak son araştırmalar fosfatın kardiyovasküler sistem ve yaşlanma süreci üzerindeki toksik etkilerini de ortaya çıkarmıştır (Hirotaka ve Masafumi 2016).

Diyaliz ve diyet fosfor kısıtlaması geçiren hastaların yaklaşık %70'inde hâlâ hiperfosfatemi olduklarından, fosfat bağlayıcıların kullanıma eklenmesi gerekir (Hutchison, 2004; Schucker ve Ward, 2005).

2.1. Fosfat Bağlayıcıların Sınıflandırılması ve Kullanımı

İlerlemiş KBH olanlarda (evre 4 ve 5) gözlenen hiperfosfatemi kardiyovasküler hastalık ve mortalitenin bağımsız bir belirleyicisidir ve böbrekteki bozulmuş fosfat atılımıyla ilgilidir (Covic ve ark., 2009; Palmer ve ark., 2011; Chan ve ark., 2017). Tipik olarak oral fosfat bağlayıcıları, diyet fosfat kısıtlaması ile birlikte yönetilmektedir. Bu ilaçlar diyet fosfatın bağırsak emilimini azaltarak serum fosfatın azaltılmasını amaçlamaktadır. Fosfat bağlayıcılar diyaliz hastaları için genel olarak reçete edilen bir ilaç sınıfıdır.

Üç ana fosfat bağlayıcı türü vardır: Kalsiyum veya magnezyum içeren bağlayıcılar, alüminyum içeren bağlayıcı maddeler ve kalsiyum içermeyen yeni bağlayıcılar (Sevelamer, lantanum ve sükroferrik oksihidroksit).

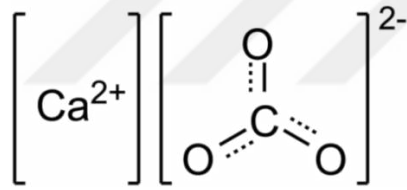
2.1.1. Kalsiyum içeren fosfat bağlayıcılar

Etkili ve ucuz kalsiyum içeren fosfat bağlayıcılar fosfatı iyonik olarak bağlamaktadır.

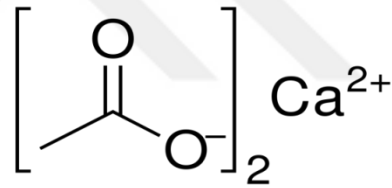
Kalsiyum içeren fosfat bağlayıcıları tarihsel olarak çekici bir seçim olmuştur çünkü KBH olan hastalarda hiperfosfatemi ile sıklıkla görülen hipokalsemiyi de ele almaktadır. Kalsiyum karbonat ve Kalsiyum asetat en yaygın kullanılanlardır ancak bunlar özellikle D vitamini analogları ile birlikte kullanıldığında hastaların %50'sine kadar hiperkalsemi ile sonuçlanmaktadır (Schaefer ve ark., 1992; Hutchison ve ark., 2011). Küçük randomize kontrollü bir çalışmada Kalsiyum asetatın Kalsiyum karbonattan üç kat daha fazla fosfat bağlama kapasitesine sahip olduğu bulunmuştur (Sheikh ve ark., 1989 ; Hutchison ve ark., 2011). Böbrek Hastalığı Kalite İnisiyatif Yönergesi (The Kidney Disease Outcomes Quality Initiative Guidelines) KBH'nda artmış kalsiyum deposu (yumuşak doku ve damar

kalsifikasyonuna neden olan kalsiyumun vücut depoları) oluşturduğuna dair mevcut kanıtlara dayanarak dozların 1500 mg/gün elementer kalsiyumdan fazla olmamasını önermektedir (London ve ark., 2010; Hill ve ark., 2013; Chan ve ark., 2017). Bununla birlikte bu tavsiyeyi destekleyen hasta sonuçlarına dair çok az kanıt vardır. Bu ilaçların bir başka yaygın yan etkisi özellikle kabızlık gibi gastrointestinal rahatsızlıktır.

Kalsiyum içeren ancak daha az yaygın olarak kullanılan diğer bağlayıcılar arasında Kalsiyum aljinat (% 25 element kalsiyum) (Harris ve Yuill, 1993; Passlick ve ark., 1989; Hutchison ve ark., 2011) ve Kalsiyum laktat (%12 element kalsiyum) (Takahashi ve ark., 1999; Hutchison ve ark., 2011) bulunmaktadır. Kalsiyum ketoglutaratın ayrıca kayda değer hiperkalsemi oluşturmada fosfat bağlama özelliklerine sahip olduğu rapor edilmiştir (Birck ve ark., 1999; Macia ve Coronel, 1995; Schaefer ve ark., 1988; Hutchison ve ark., 2011).



Kalsiyum Karbonat

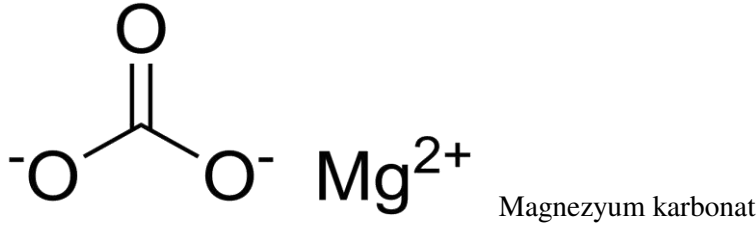


Kalsiyum Asetat

2.1.2. Magnezyum İçeren Fosfat Bağlayıcılar

Magnezyum içeren bağlayıcılar (örneğin magnezyum karbonat) kalsiyum temelli ajanlara bir alternatif olmakla birlikte genellikle etkili değildirler. Magnezyum esas olarak hücre içi bir katyondur ancak diyaliz hastalarında serum magnezyum seviyeleri genellikle hafifçe yükselmektedir ve diyaliz sıvısındaki magnezyum konsantrasyonundan etkilenmektedir (Hutchison ve ark., 1993; Hutchison ve ark., 1996; Hutchison ve ark., 2011). 1980'lerde yapılan retrospektif (geçmişe dönük) çalışmalar, magnezyum takviyelerinin diyaliz hastalarında

vasküler kalsifikasyonu önleyebileceğini öne sürmüştü ancak bu bulgu doğrulanmayı beklemektedir (Meema ve ark., 1987; Hutchison ve ark., 2011).



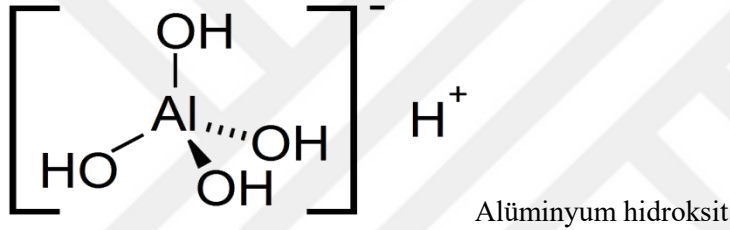
2.1.3. Alüminyum İçeren Fosfat Bağlayıcılar

Alüminyum temelli fosfat bağlayıcılar 1970'lerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bağlayıcılar oldukça etkilidir ancak bilişsel bozukluklar, osteomalazi ve anemi ile ilişkili olduğundan şimdilerde düşük ölçekte kullanılmaktadır (Wills ve Savory, 1983; González-Revaldería ve ark., 2000; Hutchison ve ark., 2011).

Alüminyum, serum fosfat seviyelerini iki mekanizma ile başarıyla azaltmaktadır. İlk olarak bağırsaktaki alüminyum iyonları çözünmeyen ve emilemeyen alüminyum fosfat çökeltileri oluşturmaktadır. İkincisi alüminyum hidroksit kanda fosfat iyonları ile ligand oluşturarak serum fosfat seviyesini azaltmaktadır.

Tedavi için güvenli bir alüminyum dozu tanımlanmamıştır ve birkaç vaka çalışmasında düşük dozda alüminyum alan diyaliz hastalarında toksisite gelişimi ile ilgili klinik kanıtlar bildirilmiştir (Becaria ve ark., 2002; Rüster ve ark., 2002; Jaffe ve ark., 2005; Andrade ve ark., 2005; Hutchison ve ark., 2011). Bununla birlikte alüminyum tuzları, çoğu gelişmekte olan ülkede hiperfosfateminin tedavisinde önemli bir araç olmaya devam etmekte ve halen çoğu Batı ülkesinde yüksek seviyelerde fosfatın akut kontrolünü sağlamak için kısa süreli “kurtarma” terapisi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bazen diğer komorbiditeden (çoklu bozukluk, rahatsızlık) dolayı prognozunun (hastalığın seyri) çok kısa olduğu

hissedilen hastalarda da avantajları risklerden ağır basabileceği için kullanılmaktadır. 2010'da yayınlanan bir yazışmada, Geert W. Feith tartışmalı bir şekilde düşük dozda alüminyum (günde 2 g) olduğundan, yaşam beklentisi düşük olan hastalarda (diyaliz alan 75 yaş üstü) muhtemelen toksisiteye neden olmadığını öne sürmüştür. Bu hastalara alüminyum içeren fosfat bağlayıcıları uygulayarak maliyetlerin düşürülmesi önerilmiştir (Feith, 2010; Hutchison ve ark., 2011). Bununla birlikte bu görüş genel olarak kabul edilmez ve alüminyuma toksisite potansiyeli reddedilemez bu nedenle gelişmiş ülkelerde alüminyum kullanma riskleri neredeyse kesinlikle tüm potansiyel faydalardan ağır basmaktadır.



2.1.4. Sevelamer Hidroklorür (SH) ve Sevelamer Karbonat

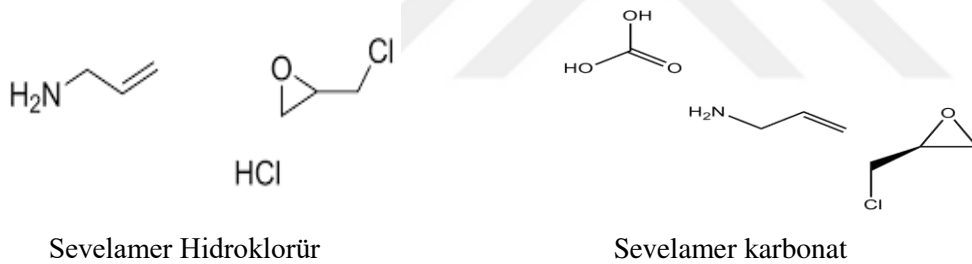
Sevelamer en yaygın olarak tarif edilen kalsiyum bazlı olmayan fosfat bağlayıcıdır ancak diğer fosfat bağlayıcılardan daha düşük bir fosfat bağlama kapasitesine sahiptir. Sevelamer (molekül ağırlığı 10^{16} Da) (Goldsmith ve ark., 2008; Hutchison ve ark., 2011), yapısı epiklorohidrin ile çapraz bağlanmış poli-alillamin hidroklorür içerdiğinden hidrofilik olan fakat suda çözünmeyen katyonik bir hidrojelidir. Sevelamer her biri polimer omurgasında bir karbon ile ayrılan çok sayıda amin grubuna sahiptir. Bu grupların yaklaşık %40'ı gastrointestinal kanalda protonlanmaktadır ve ağırlıklı olarak iyonik/hidrojen bağlanma yoluyla negatif yüklü fosfat anyonlarını bağlamaktadır (Burke ve ark., 1997; Burke ve ark., 2001; Hutchison ve ark., 2011).

Sevelamer molekülleri gastrointestinal sistemden absorbe edilemeyecek kadar büyük olup partiküller mide ve bağırsak sıvılarında hidrate hale gelmekte ve

in vitro ağırlıklarının altı katından daha fazla artmaktadır (Rosenbaum ve ark., 1997; Plone ve ark., 2002; Hutchison ve ark., 2011).

Sevelamer karbonat, Sevelamer hidroklorür (SH) ile benzer bir yapıya sahiptir. Metabolik asidozun indüklenmemesinin yanı sıra Sevelamer karbonat, etkinlik ve tolere edilebilirlik açısından Sevelamer hidroklorür ile eşdeğer gibi görünmektedir (Delmez ve ark., 2007; Pai ve ark., 2009; Hutchison ve ark., 2011). Sevelamer karbonat tozunun Sevelamer hidroklorür tabletlerle karşılaştırılmış randomize bir çalışmada hemodiyalizdeki 75 hastada güvenlik ve etkinlik yönünden bunların eşdeğer olduğu bulunmuştur (Fan ve ark., 2009; Hutchison ve ark., 2011).

Bu ilacın ilk dezavantajları, yüksek fiyatı ve yüksek hap yüküdür. Ayrıca yağda çözünen vitaminlerin biyoyararlanımını da azaltabilmektedir. En önemli yan etkileri gastrointestinal intoleransı ve metabolik asidozdur (Fishbane ve ark., 2010; Chan ve ark., 2017).

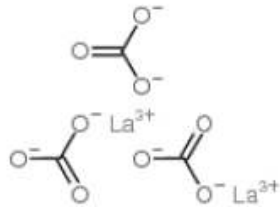


2.1.5. Lantanum Karbonat ve Lantanum Klorür

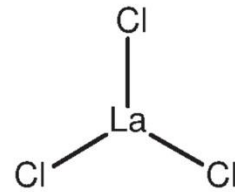
Lantanum 1839'da Carl Gustaf Mosander tarafından keşfedilmiştir. Lantanum, 138.91 bir atom ağırlığı ve bir trivalent yapısına sahiptir. Lantanum karbonat pH 1-7 aralığında bağlanma aktivitesini korur ancak pH 3-5'te fosfatı optimum şekilde bağlamaktadır (Autissier ve ark., 2007; Hutchison ve ark., 2011). Böylece, lantanum karbonat midenin düşük pH ortamında ayrıca duodenum ve jejunumda bulunan daha yüksek pH değerlerinde fosfatı etkin bir şekilde bağlayabilmektedir.

Kalsiyum karbonattan farklı olarak lantanum karbonat oldukça çözünmezdir ve bu nedenle birikim için düşük bir potansiyele sahiptir; bu yalnızca % 0.001'lik bir oral dozu gastrointestinal kanalda emilirken, alüminyum için % 0.1'dir. Minimal olarak emilen bir ilaç için beklendiği gibi oral lantanum karbonat dozunun çoğunluğu dışkı ile atılır (sıçanlarda % 99,36 ve köpeklerde % 94,50) (Damment ve ark., 2008; Hutchison ve ark., 2011). Ayrıca sıçanlarda çözünür lantanum klorür tuzu ile yapılan bir intravenöz çalışmada uygulanan lantanum'un <% 2'si idrarda geri kazanılmıştır. Alüminyumun aksine lantanum kan-beyin bariyerini geçmemektedir ve bu nedenle nörolojik advers olaylar için potansiyeli son derece düşüktür (Persy ve ark., 2006; Altmann ve ark., 2007; Hutchison ve ark., 2011). Lantanumun bağırsakta düşük emilimine rağmen dokularda özellikle de karaciğer ve kemikte birikebilmektedir (Zhang ve ark., 2013; Chan ve ark., 2017). Bununla birlikte uzun süreli takip edilen çalışmalarda klinik hepatotoksisite ve kemik toksisitesi kanıtı olmadığı belirtilmiştir (D'Haese ve ark., 2003; Spasovski ve ark., 2006; Hutchison ve ark., 2009; Chan ve ark., 2017).

Diğer fosfat bağlayıcılar gibi lantanum gastrointestinal intoleransa özellikle bulantıya neden olabilir. Ayrıca Sevelamere benzer şekilde bu ilaç da pahalıdır.



Lantanum karbonat



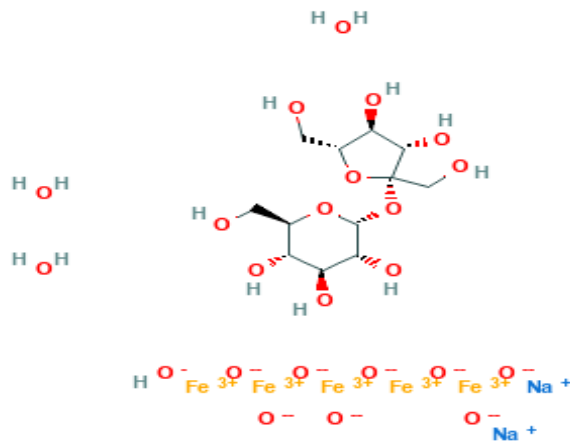
Lantanum klorür

2.1.6. Sü kroferrik oksihidroksit

Sü kroferrik oksihidroksit diyalizde KBH olan hastalar için kullanılan demir temelli bir fosfat bağlayıcıdır. Midede fosfat bağlanması geniş bir pH aralığında

olmakla birlikte pH 2.5'te en yüksek seviyede gerçekleşmektedir (Wilhelm ve ark., 2014; Chan ve ark., 2017).

Yaygın yan etkiler arasında ishal ve dışkı renginde değişiklik sayılabilmektedir. Bağlayıcı lantanum karbonata benzer bir hap yüküne sahiptir çünkü her yemekte bir hap olarak verilmektedir ve kolayca çiğnenebilmektedir. Sükroferrik oksihidroksit'in maliyeti lantanum ve Sevelamer'e benzemektedir.



Sükroferrik oksihidroksit

Bu çalışmada test maddeleri olarak kullanılan ve fosfat bağlayıcı grubunda yer alan ajanları Sevelamer hidroklorür (SH) ve Kalsiyum karbonat (KK) ile daha önce tamamlanmış in vivo deney hayvanları, in vitro insan ve deney hayvanlarının çeşitli dokuları kullanılarak gerçekleştirilen genotoksisite/antigenotoksisite çalışmalarının sonuçları aşağıda özetlenmiştir.

2.2. Fosfat Bağlayıcı Ajanlar İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

2.2.1. Lantanum Karbonat İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Damment ve arkadaşları (2008) Lantanum (karbonat ve klorür olarak), post-mitokondriyal fraksiyonun (S9) varlığında ve yokluğunda bazı in vitro analizler (Ames test, CHO hücrelerinde hgprt lokusunda gen mutasyonu testi, CHO

hücreleri kullanılarak in vitro sitogenetik test) kullanılarak potansiyel genotoksisite açısından değerlendirilmiştir. Bir dizi bakteri test suşu kullanılarak (*Salmonella typhimurium* TA1535, TA1537, TA1538, TA98, TA100 ve TA102 ve *Escherichia coli* WP2 uvrA ve WP2 uvrA pkm101) mutajenik aktiviteye sahip olmadığını gösterilmiştir. Test maddesinin en yüksek konsantrasyonu 5000 mg/plaka olmuştur. Hgprt gen mutasyon testinde CHO hücrelerinde eksojen metabolik aktivasyon varlığında herhangi bir etki gözlenmemiştir. Metabolik aktivasyon yokluğunda revertant koloni sayılarındaki sporadik artışların doza bağlı olmadığı ortaya çıkmıştır. CHO hücreleri kullanılarak yapılan in vitro KA deneyinde eksojen metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda klastojenik (konsantrasyon 200-5000 mg / ml) ve sitotoksik etkisi saptanmıştır. Bunu doğrulamak için ilacın kapsamlı bir in vivo değerlendirmesi gerçekleştirilmiştir. Negatif sonuçlar iki bağımsız mikronukleus testinde elde edilmiştir. İlk farelerde 2000 mg/kg'a kadar oral dozlar (karbonat) ikinci farelere ise tek bir i.v. 0.1 mg/kg'a (klorür) kadar verilmiştir. Çalışmada 28 gün boyunca 0.1 mg/kg/gün'e (klorür) kadar i.v. enjeksiyonları ile tedaviden sonra sıçan karaciğer programlanmamış DNA sentezi testinde negatif sonuçlar elde edilmiştir. In vivo çalışmalarda lantanum plazma konsantrasyonlarının, lantanum karbonat'ın terapötik dozları verilen diyaliz hastalarında gözlemlenen kararlı durum pik plazma konsantrasyonundan > 3000 kat daha yüksek olduğunu saptanmıştır. Lantanumun genotoksik olmadığı ve lantanum karbonatın terapötik kullanımda gizli bir tehlike yaratma ihtimalinin olmadığı vurgulanmıştır.

2.2.2. Sevelamer Hidroklorür (SH) ve Kalsiyum Asetat (KA) İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

SDBH hastaları aşırı ROT üretimi (örneğin, O₂, H₂O₂ ve OH) gibi kronik oksidatif stres durumundadır (Witko-Sarsat ve ark., 2003; Massy ve ark., 2005; Peres, 2009). Diyaliz hastalarında antioksidan rezervindeki bir düşüş ve ROT

sentezindeki bir artış nedeniyle oksidatif stresin arttığını düşünülmüştür (Diepeveen ve ark., 2005; Karamouzis ve ark., 2007; Peres, 2009).

Bugüne kadar fosfat bağlayıcıların oksidatif stres üzerindeki etkisi hakkında bir rapor yoktur. Bu nedenle bu çalışmada hemodiyaliz hiperfosfatemik hastalarda uzun süreli tedavinin Sevelamer hidroklorür ve Kalsiyum asetat ile uzun süreli tedavinin polimorfonükleer nötrofiller (PMN) ile spontan ROT üretimi ile ölçülen oksidatif stres üzerindeki etkilerini karşılaştırmak amacıyla yapılmıştır. 31 hastanın 17'sine Sevelamer hidroklorür, 14'üne Kalsiyum asetat uygulanmıştır. Daha önce fosfat bağlayıcıları ile tedavi edilmeyen ve fosfor > 6 ve < 7.5 mg / dL olan hastalar 800 mg Sevelamer hidroklorür tabletleri veya 667 mg Kalsiyum asetat tabletleri ile tedavi edilmiştir. Fosfor ≥ 7.5 mg / dL olan hastalara ise 1600 mg Sevelamer hidroklorür veya 1334 mg Kalsiyum karbonat tableti günde 3 kez verilmiştir. Hedef fosfor ve kalsiyum konsantrasyonlarını sırasıyla 3.0 ila 5.5 ve 8.5 ila 10.5 mg / dL aralığında tutmak için fosfat bağlayıcıların dozu aylık olarak ayarlanmıştır.

ROT üretimi, stimülasyonu olan ve olmayan (PI etiketli *S. aureus* (2.4×10^9 CFU / mL), 20,70 diklorofloresein diasetat (DCFH-DA) ile değerlendirilmiştir. Her iki grupta da takip sırasında spontan ROT üretimi azalmıştır. Bununla birlikte sadece Sevelamer hidroklorür grubu, *S. aureus* tarafından uyarılan ROT üretiminde 12 ayda önemli bir düşüş göstermiştir. Bu sonuçlara dayanarak özellikle Sevelamer hidroklorür olan fosfat bağlayıcılarla yapılan tedavinin hemodiyaliz hastalarında PMN'nin ROT üretimini azalttığı özetlenmektedir (Peres, 2009).

KBH hastalarının kardiyovasküler patolojilerin yanı sıra farklı kanser türlerinde (özellikle rahim ağzı, mesane, tiroid ve böbrek) yüksek oranda ortaya çıktığı iyi bilinmektedir (Di Angelantonio ve ark., 2010; Stengel, 2010; Pastor ve ark., 2018). Bu artan kanser riski, semptom şiddetinden veya diyaliz geçirip geçirmediğinden bağımsızdır. Önceki çalışmalar, KBH hastalarında artmış DNA hasarı ve genomik instabilite düzeylerini göstermiştir (Sandoval ve ark., 2010, 2012; Stoyanova ve ark., 2010, 2014; Rodriguez-Ribera ve ark., 2014; Pastor ve

ark., 2018). Bu DNA hasarı hastalarda yüksek kanser ve / veya ölüm oranı ile doğrudan ilişkili olabilir. Pastor ve ark. (2018)'nın yaptığı çalışma, tedavi alan hastalarda gözlenen artmış DNA hasarının bir kısmının yaygın farmakolojik tedavilerin kullanımı ile ilişkili olup olmadığını ortaya çıkarmak amacıyla planlanmıştır. SDBH hastalarında DNA hasarı seviyelerini değerlendirmek için kromozom aberasyonu ve anöploidi ölçmek için MN testini kullanılmıştır. Kuyruklu yıldız testi ise DNA kırıklarının ve DNA bazlarının oksidasyonunun ölçülmesinde kullanılmıştır. Bu etkiler SDBH hastalarının periferik kan lökositlerinde ölçülmüştür. Temel amaç Sevelamer de dâhil olmak üzere SDBH hastaları tarafından en sık kullanılan üç ilaca yapılan takviyenin farklı DNA hasar biyolojik markörleri (kuyruklu yıldız ve mikronukleus analizleri) seviyelerini değiştirip değiştirmediğini analiz etmektir. Çalışma hepsi bir hemodiyaliz programına dâhil olan ciddi böbrek yetmezliği olan 214 erişkin hastayı içermektedir. Sevelamer alan hastaların komet ve MN testleri verilerinde gözlenen DNA hasarı seviyelerinde herhangi bir artış olmadığı bildirilmiştir (Pastor ve ark., 2018).

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada test maddesi olarak hiperfosfatemi hastası kişilerin tedavisinde kullanılan fosfat bağlayıcı ajanları olan Sevelamer hidroklorür (SH) ve Kalsiyum karbonat (KK), deney materyali olarak da sigara içmeyen yaşları birbirine yakın (24-29 yaşlarında) sağlıklı dört kadından alınan periferik kan kullanılmıştır.

3.1. Materyal

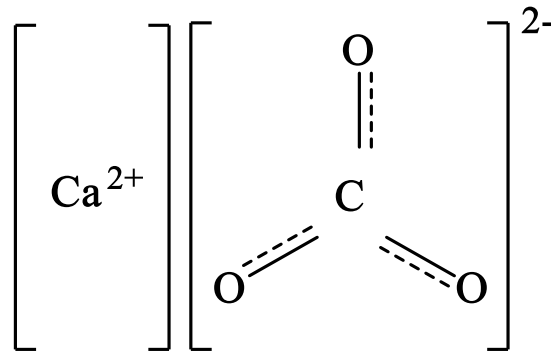
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.1.1.1. Kalsiyum karbonat (test maddesi)

3.1.1.1.(1) Kalsiyum Karbonatın Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Kalsiyum karbonat, halk arasında kireç taşı olarak bilinen bir tür kimyasal bileşiktir. Bileşik formülü CaCO_3 şeklindedir. Kayaçlarda kalsit ve aragonit (özellikle kalsitlerden oluşan bir tortul kaya türü olan kireçtaşı) olarak bilinen bir madde. Aynı zamanda incilerin ana bileşeni ve deniz organizmalarının, salyangozların ve yumurtaların kabuklarıdır. Renksiz kristaller veya kokusuz beyaz bir toz formundadır.

Kalsiyum karbonat'ın moleküler yapısına ait özellikler aşağıda verilmiştir (https://tr.wikipedia.org/wiki/Kalsiyum_karbonat).



Şekil 3.1. Kalsiyum karbonatın açık formülü (ChemBioDraw Ultra 13.0)

Moleküler (kapalı) Formül	: CaCO_3
Açık formül	: Şekil 3.1
Moleküler Ağırlık	: 100,0869 g/mol
Yoğunluk	: 2,71 g/cm ³
Erime noktası	: 1339 °C
CAS No	: 471-34-1

3.1.1.1.(2) Kalsiyum Karbonatın Farmakodinamik Özellikler

Kalsiyum karbonat özellikle diyaliz olmayan kronik böbrek hastalığında reçete edilen en yaygın fosfat bağlayıcı formudur. Bununla birlikte tipik olarak diyaliz alan dâhil olmak üzere ileri kronik böbrek hastalığı olan hastalara verilmektedir (Chan ve ark., 2017).

Fosfat bağlayıcı ajan olarak CaCO_3 'ın önemi, gastrik hidroklorik asid ile aktive edilmesinden sonra bağırsaktaki diyet fosfatı ile insolübl kalsiyum bileşikleri oluşturmastandır. Oluşan bu insolübl bileşikler ise idrarla atılır. Kronik böbrek yetmezliği kalsiyum ve fosfat metabolizması üzerine ciddi etkiler yapar. Renal yetmezlik nedeniyle D3 vitamini metabolizması da bozulur ve hiperfosfatemi meydana gelir. Kalsiyum absorpsiyonu yalnızca sağlıklı böbreklerde üretilen D3 vitamini yardımı ile sağlanmaktadır. Glomerüler Filtrasyon Hızı (GFH) 30 mL/dk altına düştüğünde D3 vitamini seviyesi anlamlı olarak azalır ve kalsiyum absorpsiyonunda azalmaya yol açmaktadır. Sonrasında hipokalsemi oluşur ve bu tablo paratiroid bezlerini uyarak hormon sekresyonu yaptırmaktadır. Sekonder hiperparatiroidizm kemikten kalsiyum mobilizasyonuna, bu durum ise kemik ağrılarına ve sonrasında osteomalaziye neden olmaktadır. Renal atılımdaki azalma ile birlikte renal fosfat atılımında da azalma görülmektedir. Diyetle fosfat alımının sürmesi nedeniyle kolayca hiperfosfatemi oluşur. Kreatin klirensi (bir dakikada kreatininden temizlenen plazma hacmi olarak tanımlanmakta olup birimi mL/dk'dır) 30 mL/dk'nın altına inmesi ile fosfat retansiyonu başlamış olur. D3 vitamini, kalsiyum ve fosfat metabolizmalarındaki

bozukluklar nedeniyle kronik böbrek yetmezliği olan hastalar renal osteopati geliştirmeye başlarlar. Kronik böbrek yetmezliği olan hastaların hemen hepsinde osteomalazi, osteoporoz ve osteitis fibroza veya bunların kombinasyonları klinik olarak ve radiografi çalışmaları ile kolayca görülebilir. Serum fosfat seviyesi ve paratiroid hormon seviyesindeki anlamlı artışlar nedeniyle hasta serumlarında kalsiyum-fosfat kompleksleri de oluşur ve dâhili organlarda, kan damarlarında ve yumuşak dokularda kemik dışı kalsifikasyonlara neden olur ki yaşamı tehdit etmeye başlar. Midede hidroklorik asid ile reaksiyona girerek çözünabilir kalsiyum klorid ve karbon dioksit oluşturur. Kalsiyum iyonları ise çözünmez kalsiyum fosfat bileşikleri oluşturmak üzere fosfat ile birleşirler ve bu halde atılırlar.

Besin fosfatının mevcudiyeti durumunda presipitasyon reaksiyonunun midede bile oluşma şansı vardır. pH bağımlı solübülite nedeniyle optimal etkinlik pH 5.0 ile 7.0 arasında hafif asidik olmalıdır, en uygun pH ise 6.0'dır. Bu durumda fosfatın % 80 ile 95'i bağlanır. pH 8.0'de bağlama kapasitesi % 60'a düşer. Bu nedenle terapötik olarak istenen fosfat presipitasyonu kalsiyum karbonat için mide asidi ile reaksiyona girdikten sonra besin fosfatının çoğunun açığa çıktığı ve pH'in hafifçe 7.0 - 8.0 aralığında tamponlu olduğu ince bağırsakta ortaya çıkar. Bu aktivite şekli kalsiyum karbonatın fosfat bağlayabilmesi için mide asidine bağlı olduğunu göstermektedir.

Dolaylı olarak fosfatın yavaş sekresyonu nedeniyle serum fosfatı normalleşir ve uzun dönemli tedavide normal sınırlar içinde tutulabilir. Kalsiyum karbonatın kullanımı yalnızca diyet zamanı ile sınırlandırılmalıdır. Çünkü yalnızca bu zaman fosfatı bağlama şansı vardır (ilacrehberi/ANTI-FOSFAT CC 500 mg 100 tablet).

3.1.1.1.(3) Kalsiyum Karbonatın Farmakokinetik Özellikler

Hormonlar kalsiyum absorpsiyonunu kontrol eder. Absorpsiyonu yaşla beraber azalır, hipokalsemik durumlarda artar. Alınan 500 mg kalsiyum karbonatın % 30 – 40'ı absorbe olur. Daha yüksek dozların alınması absorbe edilen miktarı yalnızca hafifçe artırır. Günlük normal diyetle alım yaklaşık 1000 mg'dır.

Kalsiyum, serum kalsiyum seviyesine bağı olarak böbrekler yoluyla atılır. Sağlıklı bir böbrekte filtre edilen kalsiyumun % 98'i glomerüler tübülüslerden absorbe edilir.

Kalsiyum karbonat gastrik asid ile reaksiyona girerek solübl kalsiyum klorid oluşturur. Besinlerle alınan fosfat mevcut değilse bu kalsiyum tuzları kalsiyum iyonları şeklinde bağırsaktan absorbe olur. Absorbsiyonun derecesi değişik faktörlere bağıdır (midedeki aktiviteye, paratiroid hormona, kalsitonine vs). Eğer kalsiyum karbonat yiyeceklerle beraber alınırsa yüksek fosfat bağlama kapasitesi kalsiyum absorbsiyonunu azaltır (ilacprospektusu/anti-fosfat cc 500 mg).

3.1.1.1.(4) Kalsiyum Karbonatın Kullanım Şekli

İlacın dozu serum fosfat seviyesine bağı olarak ayarlanır. Tedavi yemeklerle beraber alınan ikişer tablet ile başlamaktadır (günde 3 gram kalsiyum karbonata tekabül eder). İlacın dozunu her yemekle beraber alınan 4 – 6 tablete artırmak mümkündür (bu miktar günde 10 grama kadar kalsiyum karbonata tekabül eder).

Bu tedavi serum kalsiyum ve serum fosfat seviyelerinin moniterizasyonunu (ölçümünü) gerektirir. Kalsiyum-fosfat ürünlerinin seviyesi $5.3 \text{ mmol}^2/\text{L}^2$ 'yi aşmamalıdır. (ilacprospektusu/anti-fosfat cc 500 mg).

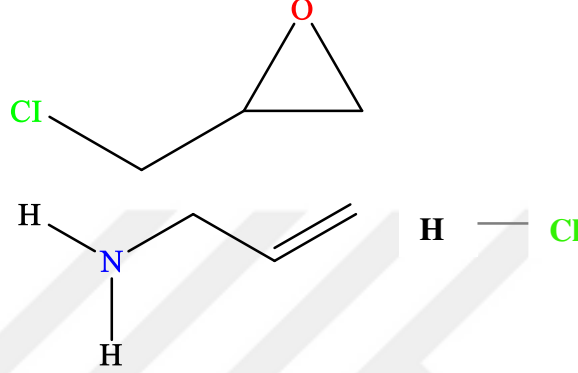
3.1.1.2. Sevelamer hidroklorür (test maddesi)

3.1.1.2.(1) Sevelamer Hidroklorürün Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Aktif farmasötik bileşen olan sevelamer hidroklorür polimerik bir ilaç maddesidir. Sevelamer hidroklorür, kronik böbrek yetmezliği sonucu ortaya çıkan hiperfosfateminin tedavisi için kalsemik olmayan bir fosfat bağlayıcıdır. Sevelamer GelTex Pharmaceuticals tarafından icat edilerek geliştirilmiştir. Sevelamer şu anda Sanofi tarafından Renagel ticari adı altında pazarlanmaktadır. Sevelamer hidroklorür yaklaşık olarak %40 amin hidroklorür ve %60 sevelamer baz olarak mevcut olan kısmi bir hidroklorür tuzudur. Polimer omurgasından bir karbon ile ayrılan çoklu aminler içerir. Bu aminler bağırsakta protonlu bir formda bulunur ve

iyonik ve hidrojen bağı yoluyla fosfat molekülleri ile etkileşime girer (Wikipedia/Sevelamer).

Sevelamer hidroklorürün moleküler yapısına ait özellikler aşağıda verilmiştir:



Şekil 3.2. Sevelamer hidroklorürün açık formülü (ChemBioDraw Ultra 13.0)

IUPAC adı : 2-(chloromethyl)oxirane;prop-2-en-1 amine hydrochloride

Kapalı formülü : $C_6H_{13}Cl_2NO$

Moleküler ağırlık : 186.076 g/mol

PubChem CID: 159247

CAS Numarası : 152751-57-0

3.1.1.2.(2) Sevelamer Hidroklorürün Farmakodinamik Özellikler

Sevelamerin farmakodinamik etkisi in vitro ve in vivo olarak incelenmiştir. Sevelamer kısmen protonlanmış polimer aminler içermektedir. Kapsül mideye dağıldıktan sonra tamamen protonlanmış hale gelirler. Fosfat sindirim sırasında serbest bırakıldığı için serbest fosfat polimere yayılabilir ve protonlanmış (katyonik) polimer aminlerle etkileşime girebilir. Fosfat polivalent olduğu için tercihen bağlanır. Fosfat molekülündeki dört oksijen atomu sevelamer'in protonlanmış veya protonlanmamış aminleriyle iyonik veya hidrojen bağı etkileşimlerini yapabilir.

Sevelamerin fosfat bağlama kapasitesini in vivo olarak araştırmak için birkaç kısa süreli (4-5 gün) hayvan çalışması yapılmıştır. Sevelamerin farelere oral yoldan verilmesiyle fosfatın fekal atılımını önemli ölçüde arttırmış ve idrarda fosfor seviyelerini azaltmıştır. Sıçanlarda idrar ve serum elektrolitleri üzerine yapılan çalışmalar, sevelamerin hidrojen fosfat (HPO_4) karşılığında klorür iyonları (Cl^-) salgıladığına dair kanıt sağlar. Bu olgu sıçanlar ve köpeklerde tekrarlı doz toksisite çalışmalarında doğrulanmıştır. Diyet fosfatlarının bağlanmasına ek olarak sevelamer safra asitlerinin fekal atılımını önemli ölçüde arttırdı bu da iyon değişim özelliklerinden dolayı safra asitlerini de bağladığını göstermektedir. Bu durum yağda çözünen vitaminlerin ve kolesterolün emiliminde değişikliklere yol açabilir. Enterohepatik dolaşıma sahip ilaçların farmakokinetiğini de etkileyebilir (EMEA 2005).

3.1.1.2.(3) Sevelamer Hidroklorürün Farmakokinetik Özellikleri

Radyoaktif etiketli sevelamer kullanılarak sıçan ve köpeklerde tek doz ve tekrarlanan doz farmakokinetiği araştırılmıştır. Tüm vücut otoradyografisi ya da kan, idrar, safra ve doku örneklerinin sıvı parıldama sayımı sonuçları önemli miktarda radyoaktivite tespit edemedi. Bu nedenle sevelamerin gastrointestinal sistemden emilmediği sonucuna varılmıştır. İn vitro çalışmalarda simüle edilmiş mide sıvısında (pH 1.2 + pepsin) ve sıçanların gastrointestinal içeriğinde sevelamerin belirgin bir şekilde bozulmadığı gösterilmiştir.

Sıçanlarda radyoaktif etiketli sevelamerin alımını takiben dışkıda radyoaktivite atılım oranları 12 saat sonra %20-80 ve 24 saat sonra %90'dan fazla olmuştur. Dışkı atılımı köpeklerde biraz daha yavaş olup 12 saat sonra %30, 24 saat sonra %50-75 ve 48 saat sonra %90 belirlenmiştir. Sevelamer neredeyse tamamen dışkıya atılır. İdrarda yalnızca az miktarda radyoaktivite işareti bulunmuştur (EMEA 2005).

3.1.1.2.(4) Sevelamer Hidroklorürün Kullanım Şekli

Sevelamerin kullanım dozu hastaların serum fosfat konsantrasyonuna göre belirlenmektedir. Alternatif bir fosfat bağlayıcı olarak reçete edilirse hastanın önceki kullandığı kalsiyum bazlı fosfat bağlayıcıya kıyasla bir mg ağırlık eşdeğer dozlarda verilmelidir. Serum fosfat seviyeleri yakından izlenmeli ve ilacın dozu serum fosfatın 1.94 mmol/L veya altına düşürülmesi hedefine göre ayarlanmalıdır. Kan serum fosfat düzeyi istikrarlı bir serum fosfat seviyesine ulaşılan kadar ve sonrasında düzenli aralıklarla her bir ile üç haftada bir test edilmelidir. Doz aralığı günde 1 ila 10 kapsül arasında değişebileceği belirtilmiştir (Scientific discussion; EMEA 2005).

3.1.1.3. Elektroforez Tamponu

Komet testinde elektroforez işlemini gerçekleştirmek için kullanılan elektroforez tamponu 10 M NaOH ve 0.2 M EDTA bileşenlerinden oluşmuştur. Bu kimyasallar uygun oranlarda tartıldıktan sonra üzerine 1350 mL saf su ilave edilmiştir. Bir gün önceden hazırlanarak + 4 °C’de saklanmıştır.

3.1.1.4. Entellan

Reçineden üretilen ve tolüen solventli, akıcı, şeffaf, lam-lamel kapatılmasını sağlayan ve ksilenle temizlenebilen bir yapıştırıcı olup preparat kapatma solüsyonudur (Merck, Cat No: 7961). Hazırlanan preparatları daimi hale getirmek amacıyla lam ile lameli birbirine yapıştırmak için kullanılmıştır.

3.1.1.5. Etidyum Bromid (EtBr)

Bir floresan boya olan EtBr (Sigma Cas No: 1239-45-8) komet testinde DNA’nın boyanması amacıyla kullanılmıştır. Bunun için EtBr’den 1 mg alınıp üzerine 10 mL saf su ilave edilerek son konsantrasyon 100 µg/mL olacak şekilde stok çözeltisi hazırlanmıştır.

3.1.1.6. Etil Alkol (Sigma No: 32205)

Deneyin birçok aşamasında sterilizasyon amaçlı %70'lik etil alkol hazırlanarak yüzeylerin ve kullanılan araç-gereç ve materyalin temizlenmesinde kullanılmıştır.

3.1.1.7. Fiksatif

Mikronukleusları (MN) incelemek amacıyla yapılacak olan preparatların hazırlanmasında iki farklı fiksatif kullanılmıştır. İlk fiksatif muamelesi 1 kısım glasiyal asetik asit'in 5 kısım metanol ile karıştırılmasından sonra bu karışımın 1/1 oranında % 0.9 NaCl ile seyreltilmesiyle (1 glasiyal asetik asit / 5 metanol / 6 NaCl) hazırlanmıştır. İkinci fiksatif işlemi ise 1 hacim glasiyal asetik asit ve 5 hacim metanol'ün (1/5 = glasiyal asetik asit / metanol) karıştırılması ile hazırlanan fiksatif ile yapılmıştır.

Fiksatifler kullanılmadan iki saat önce hazırlanmış ve ağzı kapalı cam bir kaptaki buzdolabında (+4 °C) saklanmıştır. Her seferinde preparat yapım işleminden iki saat önce taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır.

3.1.1.8. Fosfat Tamponu (Phosphate Buffer Saline = PBS)

Komet testinde hücre kültürü için PBS kullanılmıştır.

3.1.1.9. Giemsa Boyası

Giemsa solüsyonunu ilk defa Alman mikrobiyolog Gustav Giemsa adlandırılmış olup malarya ve diğer parazitlerin histopatolojik tanısında ve sitogenetikte kullanılmaktadır. Giemsa DNA'daki fosfat grubu için spesifik yapıdadır ve adenin-timin yoğunluğu yüksek DNA bölgelerine sıkıca bağlanır. Bizim çalışmamızda Giemsa boyası Merck firmasından (CAS. No: 1.09204) hazır olarak temin edilmiştir. Sorensen tamponu içerisinde hazırlanmış ve filtre edilmiş % 5'lik boya eriyiği MN testinde nukleusları boyamak için kullanılmıştır. Boya her seferinde taze hazırlanmıştır.

3.1.1.10. Glasiyal Asetik Asit

Glasiyal asetik asit (CAS No: 64-19-7) MN testinde fiksatif hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.1.1.11. (%20) Glukoz Çözeltisi

Ames testinde Minimal Glukoz Agar (MGA) plakları hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.1.1.12. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit (CAS No: 7722-84-1) komet testi için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Saf haldeki H₂O₂'den 6 µL alınıp 1000 µL saf su ile tamamlanarak stok hazırlanmıştır. H₂O₂'nin bekletilmesinden doğabilecek olumsuz etkileri önlemek amacıyla her komet testi için taze olarak hazırlanmıştır.

3.1.1.13. Hipotonik Eriyik

Hipotonik eriyik olarak % 0.4'lük Potasyum klorür (KCl) kullanılmıştır. Eriyik bidistile su içerisinde stok halinde hazırlanarak ağzı kapalı cam bir kap içerisinde buzdolabında (+4°C) saklanmıştır. Her preparasyondan yaklaşık bir saat önce yeterli miktarda eriyik alınıp inkübatör ile 37°C'ye kadar ısıtılarak kullanılmıştır. Bu çözeltinin yoğunluğu hücrenin plazmasından daha az olduğu için lenfositlerinin dengeli bir şekilde su alarak şişmesini ve preparasyonun kaliteli olmasını sağlamaktadır.

3.1.1.14. Histidin/Biyotin (HB) Solüsyonu (0,5 mM)

Bu çözelti Ames testinde top agarı yeterli miktarda biyotin ve eser miktarda histidin takviye etmek için kullanılmıştır (100 mL top agara 10 mL olarak).

250 mL HB solüsyonu hazırlamak için:

- D-Biyotin (F.W. 247,3): 30,9 mg
- L-Histidin-HCl (F.W. 191,7): 24,0 mg
- Distile su : 250 mL

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülmüş daha sonra histidin ilave edilerek otoklavda 121°C'de 20 dk sterilize edilmiştir. Solüsyon +4°C'de saklanmıştır.

3.1.1.15. HMA Agar (High Melting Agar=Yüksek Kaynama Dereceli Agar)

HMA agar (Sigma CAS No: 9012-36-6) komet testinde lamaların kaplanması amacıyla kullanılmıştır. Bunun için HMA agardan 0.65 gr alınıp 100 mL saf suda ısıtılarak çözülmüştür. Daha sonra rodajlı lamaların tek tarafı hazırlanan bu agarla kaplanmış ve lamalar kurumaya bırakılmıştır. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. Lamaların agarla kaplanması işlemi deneyden 1 gün önce yapılmıştır.

3.1.1.16. Kromozom Medyumu

Bu çalışmada Gibco firmasının ürettiği PB-Max. kromozom karyotipleme medyumu (CAS. No. 12557-013) MN testinde hücre kültürü için kullanılmıştır. PB-Max. medyumu fitohemaglutinin içeren tam medyumdur.

Bu medyum her tüpe 2.5 mL olacak şekilde paylaştırılmış ve bu miktarlarda kullanılmıştır. Kültür tüpleri steril olarak temin edilmiştir (12 mL'lik vida kapaklı, Cellstar, Cat No: 164 160). Medyum'un içeriği Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Kromozom medyumuna içeriği

İçerik	Moleküler Ağırlık	Konsantrasyon (mg/mL)	mM
Aminoasitler			
Glisin	75.0	10.0	0.13333334
L-Arjinin	174.0	200.0	1.1494253
L-Asparajin	132.0	50.0	0.37878788
L-Aspartik asit	133.0	20.0	0.15037593
L-Sistin 2HCl	313.0	65.0	0.20766774
L-Glutamik Asit	147.0	20.0	0.13605443
L-Glutamin	146.0	300.0	2.0547945
L-Histidin	155.0	15.0	0.09677419
L-Hidroksiprolin	131.0	20.0	0.15267175
L-İzolusin	131.0	50.0	0.3816794
L-Lösin	131.0	50.0	0.3816794
L-Lizin hidroklorid	183.0	40.0	0.21857923
L-Metiyonin	149.0	15.0	0.10067114
L-Fenilalanin	165.0	15.0	0.09090909
L-Prolin	115.0	20.0	0.17391305
L-Serin	105.0	30.0	0.2857143
L-Treonin	119.0	20.0	0.16806723
L-Triptofan	204.0	5.0	0.024509804
L-Tirosin disodyum tuzu dihidrat	261.0	29.0	0.11111111
L-Valin	117.0	20.0	0.17094018
Vitaminler			
Biotin	244.0	0.2	8.1967213E-4
Kolin klorür	140.0	3.0	0.021428572
D-Kalsiyum pantotenat	477.0	0.25	5.24109E-4
Folik asit	441.0	1.0	0.0022675737
Niasinamid	122.0	1.0	0.008196721
Para-Aminobenzoik asit	137.0	1.0	0.0072.9927
Piridoksin hidroklorid	206.0	1.0	0.004854369
Riboflavin	376.0	0.2	5.319149E-4
Tiamin hidroklorür	337.0	1.0	0.002967359
Vitamin B12	1355.0	0.005	3.690037E-6
I-İnositol	180.0	35.0	0.19444445
İnorganik tuzlar			
Kalsiyum Nitrat (Ca (NO ₃) ₂ 4H ₂ O)	236.0	100.0	0.4237.2882
	120.0	48.84	0.407
Magnezyum Sülfat (MgSO ₄)	75.0	400.0	5.3333335
Potasyum Klorid (KCl)	84.0	2000.0	23.809525

Sodyum Bikarbonat (NaHCO₃)	58.0	6000.0	103.44827
Sodyum Klorid (NaCl)	142.0	800.0	5.633803
Sodyum Fosfat dibazik (Na₂HPO₄) susuz			
Diğer Bileşenler			
D-Glikoz (Dekstroz)	180.0	2000.0	11.111111
Fetal sıgır serumu	-	Gizli	-
Gentamisin Sülfat	-	35.0	∞
Glutasyon	307.0	1.0	0.0032573289
Fenol kırmızısı	376.4	5.0	0.013283741
Fito hemaglutinin	-	Gizli	-

3.1.1.17. Lizis Çözeltisi

Komet testinde lysing solüsyonunun bir bileşeni olarak kullanılmıştır. Lizis solüsyonu 2.5 M NaCl (Merck CAS No: 1.06404), 10 µM EDTA (Sigma CAS No: 6381-92-6), 10 mM Tris (Merck CAS No: 77-86-1) ve saf su bileşenlerinden oluşmuştur. Bu kimyasallar uygun oranlarda tartıldıktan sonra üzerine 270 mL saf su konup bir erlen içerisinde ısıtılarak çözülmüş ve soğuma işlemi gerçekleştirildikten sonra 10 M NaOH ile pH'ı 10'a ayarlanmıştır. Kullanılmak üzere oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.1.1.18. LMA Agar (Low Melting Agar=Düşük Kaynama Dereceli Agar)

LMA agar (Sigma CAS No: 39346-81-1) komet testinde hücrelerin sandviç modeli gibi agara gömülmesi amacıyla kullanılmıştır. Bunun için LMA agardan 0.065 gr tartılıp 10 mL saf suda kaynatılmıştır. Hücrelerin agarla karıştırılması işleminde agarın el yakmayacak sıcaklıkta olmasına özen gösterilmiştir.

3.1.1.19. Lysing Çözeltisi

Komet testinde DNA'daki hasar boyutunu belirlemek için çıplak DNA'nın elde edilmesi işleminde kullanılmıştır. Lysing solüsyonu 3 mL Triton X (Merck CAS No: 9036-19-5), 30 mL DMSO (Carlo ERBA CAS No: 67-68-5) ve 267 mL

lizis çözeltisi kullanılarak son hacmi 300 mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Bir gün önceden hazırlanarak + 4 °C’de saklanmıştır.

3.1.1.20. Metanol (Methanol, Metil Alkol, Karbinol)

MN testinde fiksatif hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.1.1.21. Minimal Glukoz Agar (MGA) Plakları

Ames testinde, mutajenite deneyi için kullanılmıştır.

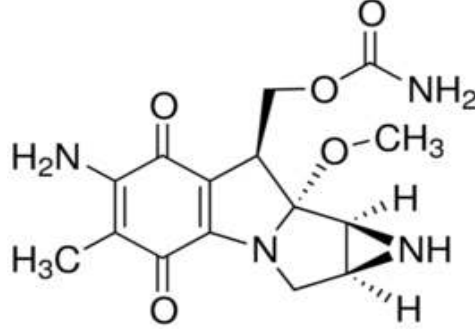
1000 mL MGA hazırlamak üzere:

- Agar 15 g
- Distile su 930 mL
- 50X VB 20 mL
- %20 glukoz 50 mL

Maddeler distile suya ilave edilmiştir. Son hacimlerine tamamlanır. Kaptan karıştırılıp çözölmüş ve otoklavlanarak sterilize edilmiştir. 45 °C’ye soğutulup petri kutularına 30 mL olarak aktarılmıştır.

3.1.1.22. Mitomisin C (MMC) (Sigma No: Y0000378)

Bu çalışmada kuvvetli bir mutajen olduğu bilinen mitomisin C, mikronukleus testinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Mitomisin C steril saf suda çözölmek stok çözelti hazırlandıktan sonra kültür tüplerine son konsantrasyonu 0.25 µg/mL olacak şekilde 10 µL içerisinde ilave edilmiştir.



Şekil 3.3. Mitomycin C'nin açık formülü

Kimyasal adı	: 6-Amino-1,1a,2,8,8a,8b-hexahydro-8-(hydroxymethyl)-8a-methoxy- 5-methyl-azirino[2',3':3,4] pyrrolo[1,2-a]indole-4,7-dione-carbamate (ester)
Kapalı formülü	: C ₁₅ H ₁₈ N ₄ O ₅
Açık formülü	: Şekil 3.3
Molekül ağırlığı	: 334.33 g/mol
Erime noktası	: >360°C
CAS No	: 50-07-7

3.1.1.23. Nitrik Asit (HNO₃)

Kuvvetli bir asit olan nitrik asit (Sigma 438073) ve HNO₃ formülüyle gösterilir. Nitrik asitin konsantrasyonu arttıkça tehlikesi artar bu yüzden istenilen konsantrasyon dikkatli bir şekilde hazırlanmalıdır. MN testinde kullandığımız lamaları temizlemek amacıyla 1N HNO₃ çözeltisi kullanılmıştır. Lam temizleme solüsyonu laboratuarda ağzı kapalı uygun plastik bir kaptaki saklanarak her defasında tekrar tekrar kullanılmıştır.

3.1.1.24. Nötralizasyon Tamponu

Komet testinde elektroforezden çıkan preparatlarda pH dengesini sağlamak amacıyla kullanılmıştır. 0.4 M Tris (Merck Cas No: 77-86- 1) alınıp üzerine 300 mL saf su eklenmiştir. Daha sonra HCl ile çözeltinin pH'ı 7.5'e ayarlanmıştır. Kullanılmak üzere oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.1.1.25. 4- Nitro-o-Fenilendiamine (NPD) (20 µg/petri)

Ames testi organizmalarından olan TA 98 suşu ile metabolik aktivasyon (S9 fraksiyonu) olmaksızın yapılan geri mutasyon testinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Stok, 0,02 g 4-NPD tartılıp 10 mL DMSO'da çözülerek hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında saklanmıştır. Deneyde kullanılan pozitif kontrol 1/10 oranında seyretilmiş 4-NPD'dir. Bu çözelti 100 µL içinde petrilere ilave edilmiştir.

3.1.1.26. Nutrient Broth Sıvı Kültür Ortamı (NB)

Ames testinde bakterilerin gecelik kültürde büyütülmeleri için kullanılmıştır. 200 mL NB hazırlamak için:

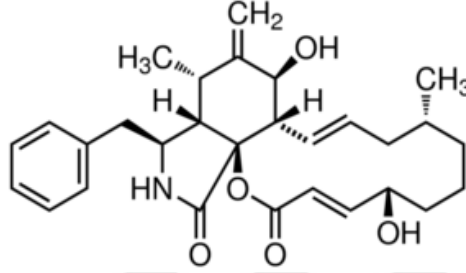
- Oxoid nutrient broth no°2: 5 g
- Distile su: 200 mL

Broth ve su karıştırılıp otoklavda 121°C'de 20 dk sterilize edilip +4°C'de saklanmıştır.

3.1.1.27. Sitokalsin B

Sigma Aldrich'den satın alınan sitokalsin B (Cat No: 2743) mikronukleus testinde hücreler bölünürken sitokinezi inhibe etmek ve iki nukleustan meydana gelen hücreler oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. 5 mg sitokalsin-B' yi yaklaşık

6173 μL %50'lik etanol çözeltisinde çözülmüştür. Bu şekilde her bir tüpe (2.7 mL) 20 μL verildiğinde besi yerinin 1 mL'si için 6 μg sitokalasin B vermiş oluruz.



Şekil 3.4. Sitokalasin B'nin açık formülü

Kimyasal adı	: Cytochalasin B
Kapalı formülü	: C ₂₉ H ₃₇ NO ₅
Açık formülü	: Şekil 3.4
Molekül ağırlığı	: 479.61 g/mol
Erime noktası	: 218-223 °C
Kaynama noktası	: 218-223 °C
Safılık düzeyi	: % 98
CAS No	: 14930-96
Sigma No	: C-67

3.1.1.28. Sodyum Azid (SA) (1 μg /petri)

Ames testinde TA 100 suşu için S9 fraksiyonu yokluğunda kullanılan kimyasaldır. Pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Stok, 0,01 g Sodyum Azid tartılıp 100 mL distile suda çözülerek hazırlanılmıştır. +4°C'de saklanmıştır. Deneyde kullanılan pozitif kontrol 1/10 oranında seyreltilmiş Sodyum Azid çözeltisi'dir. Sodyum azid 100 μL içinde petrilere ilave edilmiştir.

3.1.1.29. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer)

İlk defa Danimarkalı Soren Sorensen tarafından kullanıldığı için Sorensen tamponu olarak anılan bu tampon %5'lik Giemsa boyası hazırlanırken boya çözeltisinin pH değerini ayarlamak için kullanılmıştır. Bu tampon eriyik tampon A ve tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanmış olup, bu çözeltiler çalışmanın amacına uygun olarak birbirleriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanılmıştır.

Tamponların Hazırlanışı:

Tampon A: 11.34 gr KH_2PO_4 250 mL saf su içinde eritilmiştir (pH=4.8).

Tampon B: 14.83 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 250 mL saf su içinde eritilmiştir (pH=9.3).

3.1.1.30. Top agar (yumuşak agar)

Ames testinde mutasyon deneyi için kullanılmıştır.

1000 mL top agar hazırlamak üzere:

- Agar 6 gr
- NaCl 5 gr
- Distile su 1000 mL

Agar, su ve tuz manyetik karıştırıcıda ısıtılarak ve karıştırılarak çözülmüş ve otoklavda 121°C'de 20 dk sterilize edilmiştir.

3.1.1.31. Tripan Blue

Komet testi yapılırken izole lenfositlerin canlılık oranını belirlemek amacıyla tripan blue (Sigma CAS No: 72-57-1) boyası kullanılmıştır. Stok tripan blue hazırlamak için % 0.4'lük tripan blue'den 4 mL alınıp üzerine 1 mL saf su eklenmiştir. Bu şekilde hazırlanan stok tripan blue'den 10 µL alınıp üzerine 10 µL

stok lenfosit ilave edilip canlılık testine bakılmıştır. Mikroskopta canlı hücreler şeffaf ölü hücreler ise mavi renkte görülmüştür.

3.1.1.32. Vogel-Bonner-E Ortamı (50XVB tuzları)

Ames testinde minimal glukoz agar (MGA) plakları hazırlamak için kullanılmıştır.

1000 mL 50XVB tuzları hazırlamak üzere:

- Magnezyum sülfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) : 10 gr
- Sitrikasit monohidrat: 100 gr
- Potasyum fosfat (K_2HPO_4): 500 gr
- Sodyum amonyum fosfat ($NaH_2N_2PO_4 \cdot 4H_2O$): 175 gr
- Distile su ($45^\circ C$) : 670 mL

Maddeler yukarıda yazdıkları sıra ile distile suya eklenmiştir. Son hacimlerine tamamlanıp otoklavda $121^\circ C$ 'de 20 dk sterilize edilmiştir. Oda sıcaklığında karanlıkta saklanmıştır.

3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları

3.1.2.1. Elektroforez Sistemi

Komet testinde DNA örneklerini elektroforez tamponunda yürütmek amacıyla kullanılmıştır.

3.1.2.2. Güç Kaynağı

Komet testinde DNA örneklerini yürütmek amacıyla elektroforez tankına bağlanabilen Cleaver nanoPAC-300 mA'lık güç kaynağı kullanılmıştır.

3.1.2.3. Hassas Terazı

Hava akımlarına karşı özel cam paravanlarla korunan ve 0.0001 gr hassasiyetindeki Gec Avery marka terazi kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.

3.1.2.4. İnkübatör

Hücre kültürünün yapılmasında hipotonik eriyik ile muamele edilen hücrelerin 37°C’de inkübe edilmesi ve bazı eriyiklerin 37°C’ye kadar ısıtılmasında Incucell marka 0°C-100°C ayarlanabilir inkübatör kullanılmıştır.

3.1.2.5. Manyetik Karıştırıcı Isıtıcı

Bazı çözeltileri hazırlamak için Chiltern Hotplate HS31 marka karıştırma devri ve ısıtma sıcaklığı ayarlanabilir manyetik karıştırıcı ısıtıcı tabla kullanılmıştır.

3.1.2.6. Mikroskop

Koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan Olympus marka binoküler ışık mikroskobu preparat incelemeleri sırasında kullanılmıştır. Fotoğraflar ise yine Olympus marka mikroskopta dijital fotoğraf makinesi (Olympus CX31RTSF, 7.1 Megapixel) ile çekilmiştir. Komet testinde nükleus incelemeleri için de aynı marka floresan mikroskobu kullanılmıştır.

3.1.2.7. Otoklav

Deneylerde kullanılan donanım, malzeme ve eriyiklerin sterilizasyonu amacıyla Hiramaya marka otoklav kullanılmıştır. Sterilizasyon, 120°C sıcaklık ve 1.2 atm basınca 20 dk sürede gerçekleştirilmiştir.

3.1.2.8. pH Metre

Kimyasalların pH değerlerini saptamak için Thermo Fischer marka pH metre kullanılmıştır.

3.1.2.9. Santrifüj

Rotor çapı 21 cm olan ve 4000 devir/dakikaya kadar yükselebilen devir hızı, 99 dk.'lık zaman ayarlayıcı, açılabilir başlığa sahip ve 28 tüp kapasiteli Hettich Universal marka santrifüj çalışmalarda kullanılmıştır.

3.1.2.10. Soğutmalı Santrifüj

Komet testinde eppendorf tüplerindeki örneklerin santrifüj edilmesi amacıyla Vwr Micro Star 17 R marka soğutmalı santrifüj cihazı (24 x 2.2 - 1.5 mL rotor için maksimum 9.000 rpm hızına erişebilen) kullanılmıştır.

3.1.2.11. Steril Kabin (Flow Kabin)

Hücre kültürü tüplerine kromozom mediumu konulması, kan ekiminin yapılması ve test eriyiklerinin kültür tüplerine ilave edilmesi sırasında steril bir ortam olarak, %99.9 partikül tutma özellikli filtreye sahip, 1500 m³/h emiş kapasiteli, UV ve floresan ampul eklentisi olan Labormed marka flow kabin kullanılmıştır.

3.1.2.12. Vorteks

Örneklerin karıştırılması için çeşitli hız kademelerine sahip Velp Scientifica marka vorteks cihazı kullanılmıştır.

3.1.3. Lamların Temizlenmesi

Kültür süresinin bitiminden iki gün önce etiketli olan lamlar şaleye dizilerek üzerlerini iyice örtecek şekilde 1 N nitrik asit (HNO₃) 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. Bu lamlar preparat yapılacağı zaman buzdolabından çıkartılarak soğuk halde kullanılmıştır.

3.1.4. Sterilizasyon

Deney aşamasında kullanılan cam malzemeler, pipet uçları, ependorf tüpler vs. tüm araç gereçler alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra otoklav bandı ile bağlanmıştır. Daha sonra 121 °C sıcaklık ve 1.2 atm basınçta 20 dk süre ile sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2. Metod**3.2.1. Mikronukleus (MN) Oluşumunu Saptaması****3.2.1.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması**

In vitro MN testinde Rothfuss ve ark. (2000)'nın geliştirdikleri yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu yöntemle göre, sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın dört kadından alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş periferik kan örnekleri kromozom medyumlarına steril şartlarda 6 damla (0.2 mL) ekilmiştir ve hücreler 37±1°C'de 68 saat inkübe edilmiştir.

- ✓ Kalsiyum karbonat ve Sevelamer hidroklorürün genotoksik/sitotoksik etkilerini belirlemek için son konsantrasyon 0,5, 1 ve 2 mg/mL olacak şekilde kültür ortamına kültürün başlangıcından 20 ve 44 saat sonra ilave edilmiştir.
- ✓ İnkübasyonun başlangıcından 44 saat sonra her tüpe konsantrasyonu 6 µg/mL olacak şekilde sitokalsin-B maddesi ilave edilmiş ve böylece bölünen hücrelerde sitokinez engellenmiştir.
- ✓ İnkübasyonun sonunda kültür tüpleri 2000 devir/dk hızında 5 dk süreyle santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve hücrelerin bulunduğu tüplere hipotonik eriyik (%0.4 KCl) yavaş yavaş ve pipetaj yapılarak ilave edildikten sonra tüpler inkübasyon yapılmaksızın direkt olarak santrifüj edilmiştir.
- ✓ Kültür tüpleri 1200 devir/dk hızında 10 dk. boyunca santrifüj edilmiş ve süpernatant atılarak birinci fiksatif (1/5/6=glasiyal asetik

asit/metanol/%0.9 NaCl) ilave edilmiş ve hücreler bu fiksatif ile muamele edilmiştir.

- ✓ Birinci fiksatif ile oda sıcaklığında 15 dk muameleden sonra 1200 devir/dk, 10 dk. daha santrifüj edilen tüplere bu kez glasiyal asetik asit / metanol (1/5) karışımından ibaret ikinci fiksatif ilave edilerek 10 dk oda sıcaklığında fiksatif muamelesi yapılmıştır (Bu fiksatif muamelesi iki kere tekrarlanmıştır).
- ✓ Santrifüj yapılarak süpernatant atılmış ve kültür tüplerinin dibinde toplanmış olan hücreler resüspanse edilmiştir.
- ✓ Hücre süspansiyonu soğuk ve temiz lamalar üzerine 10 cm yükseklikten damlatılarak preparatlar hazırlanmıştır.

3.2.1.2. Preparatların Boyanması

Hazırlanan preparatlar bir gün sonra Sorensen tamponunda hazırlanmış %5'lik Giemsa boyası ile 4-5 dakika boyanmış ve boyanmış preparatlar üç ayrı kapta bulunan saf sudan geçirilerek boyama işlemi durdurulmuş ve sonra havada kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işleminden sonra preparatlar entellan ile kapatılarak daimi preparat haline getirilmiştir.

3.2.1.3. Mikronukleus Testi İçin Hazırlanan Preparatlarda Mikroskopik İnceleme

Hazırlanan daimi preparatlar Olympus marka ışık mikroskopunda $10 \times 40 = 400$ büyültmede incelenmiştir.

3.2.1.4. Mikronukleus Sayısı ve Nükleus Bölünme İndeksinin (NBI) Saptanması

Mikronukleus sayısını belirlemek amacıyla her bir kişiye ait daimi preparatlarda her kişinin her muamele grubu ve kontrollerinde iki nükleusa sahip (binükleer) toplam 1000 hücre (Şekil 3.6) incelenmiş ve bu binükleer hücreler

içerisinden mikronukleuslu olanlar saptanmıştır. Ayrıca incelenen hücrelerde toplam mikronukleus sayısı belirlenmiştir. Sonuç olarak mikronukleuslu hücrelerin toplam hücrelere oranlanması ile mikronukleuslu hücre oranı, toplam mikronukleus sayısının incelenen hücre sayısına oranlanmasıyla da hücre başına düşen MN sayısı (MN/hücre) saptanmıştır. Buradan da MN yüzdesi hesaplanmıştır.

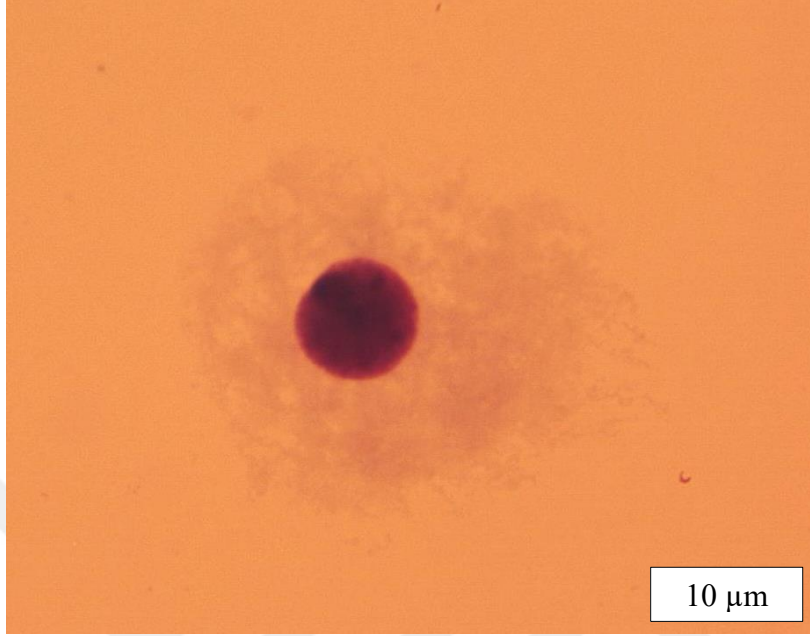
Binükleer hücre ve mikronukleus ayırımı Titenko-Holland ve ark. (1997) ve Fenech (2000)'e göre yapılmıştır. Buna göre:

- (1) Hücreler belirgin sitoplazmasıyla yuvarlak ya da oval görünüme sahip olmalıdır,
- (2) Benzer olarak, nükleuslar belirgin nükleus zarıyla çevrili yuvarlak ya da oval olmalıdır,
- (3) İçerisinde MN sayılan hücreler sadece bir nükleus bölünmesi geçiren hücrelerdir,
- (4) MN'lar sadece ana nükleusun 1/3'ü ya da daha küçük olduklarında hesaba katılmalıdır,
- (5) MN'lar ana nükleus gibi boyanmalıdır,
- (6) MN'lar ana nükleustan açık bir şekilde ayrılmış olmalıdır.

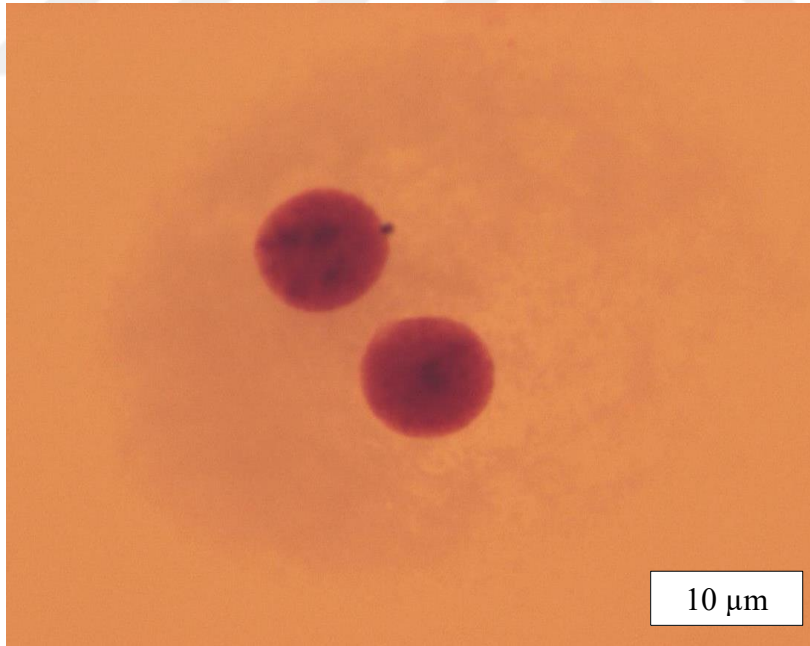
Sitokinez bloklama yönteminin en önemli yararı, bölünen hücre popülasyonunda nükleus bölünmesinin ilerleyişini ve çoğalmasını belirleyecek imkânı vermesidir. Bu durum sitokalsin-B ilavesinin ardından oluşan bir nükleuslu, iki nükleuslu, üç nükleuslu ve dört nükleuslu hücrelerin sayılarının belirlenmesiyle yapılır. Nükleus bölünme indeksi Eastmond ve Tucker (1989) tarafından önerilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$NBI = \frac{1 \times M1 + 2 \times M2 + 3 \times M3 + 4 \times M4}{N}$$

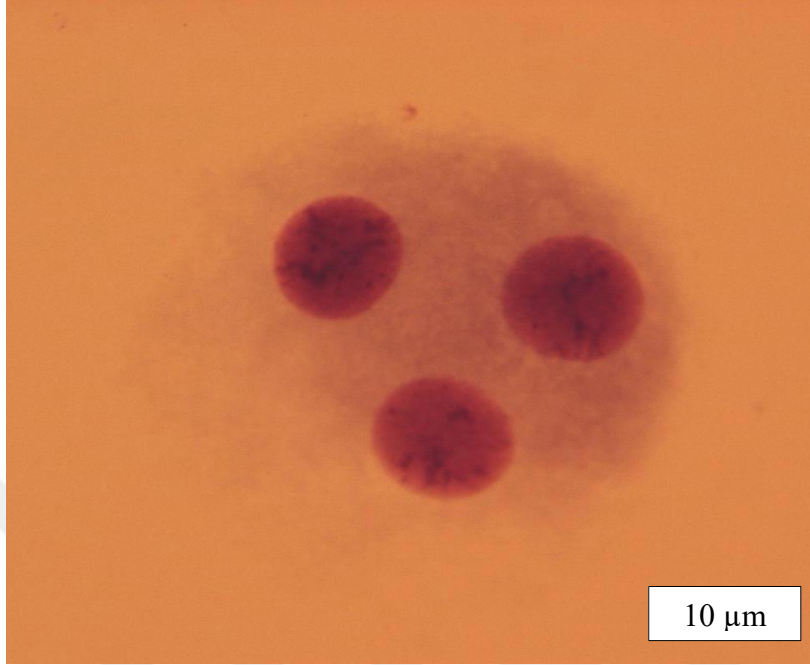
Formüle göre, M1 bir nükleuslu (Şekil 3.5), M2 iki nükleuslu (Şekil 3.6), M3 üç nükleuslu (Şekil 3.7), M4 dört nükleuslu (Şekil 3.8) hücrelerin sayısını, N ise toplam hücre sayısını göstermektedir. NBI'nin hesaplanması kimyasal maddenin veya fiziksel bir etkenin sitotoksik etkisini göstermede önemli bilgiler sağlar (Fenech, 1997). Bu nedenle MN bakımından incelenen preparatlar daha sonra nükleus bölünme indeksini (NBI) (Nuclear Division Index=NDI) belirlemek için tekrar incelenmiştir. Bu çalışmada NBI için her bir kişinin preparatlarından tesadüfi seçilmiş alanlarda toplam 1000 hücre (4 kişide toplam 4000 hücre) incelenmiştir.



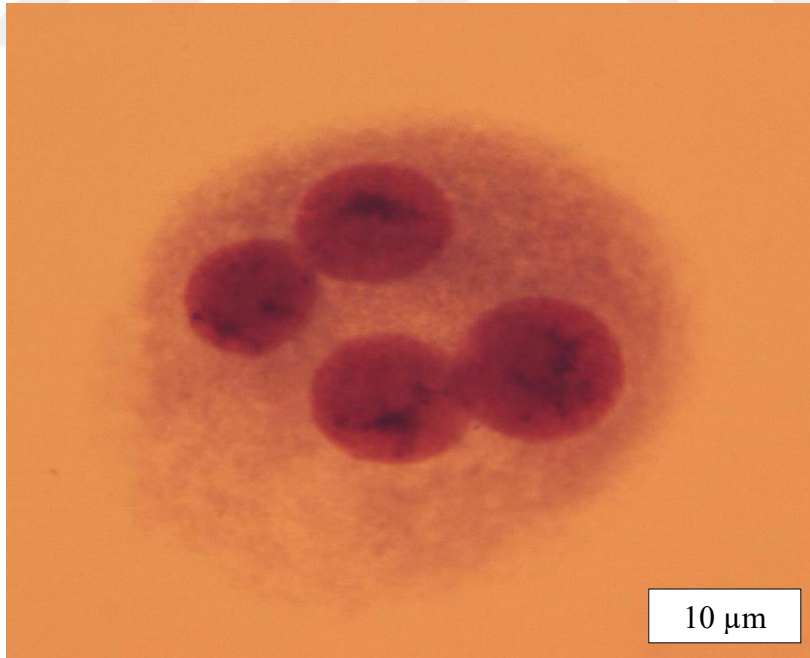
Şekil 3.5. Bir nükleuslu hücre. X1000.



Şekil 3.6. İki nükleuslu hücre. X1000.



Şekil 3.7. Üç nükleuslu hücre. X1000.



Şekil 3.8. Dört nükleuslu hücre. X1000.

3.2.1.5. Mikroskopta Fotoğraf Çekme

Fotoğraf çekme işlemi Olympus marka trinoküler mikroskoba bağlı dijital fotoğraf makinasında 1000 büyütmede yapılmıştır (Olympus CX31RTSF, 7.1 Megapixel) binükleer hücrelerden mikronukleusa sahip olanların ve 1, 2, 3 ve 4 nükleuslu hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.2. Alkalın Komet Testi (Tek hücre jel elektroforez/Kuyruklu yıldız testi)**3.2.2.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması**

Komet testinin uygulanması için preparatların hazırlanması ve gerekli diğer işlemler için Singh ve arkadaşlarının (1988) kullandıkları metod laboratuvar koşullarımıza uyacak şekilde modifiye edilerek kullanılmıştır. Deney için sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın iki kadından (26-27) alınan kandan elde edilmiş lenfosit örnekleri ependorf tüplerine 100 µL olacak şekilde paylaştırılmış ve üzerine 1000 µL PBS (fosfat tamponu) ilave edilerek lenfosit süspanse edilmiştir. Bu aşamadan sonra yapılacak tüm işlemler, görünür ışığın DNA molekülü üzerinde neden olabileceği tüm etkileri engellemek amacıyla karanlıkta gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bekletilmeden tüpler + 4 °C ve 1000 devir/dakika (rpm)'da 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüpler buz üzerine konulmuş ve 15-20 dakika bekletilerek lenfositlerin bulutsu bir yapı oluşturarak ara katmandan toplanması sağlanmıştır. Ara katmandan (lenfositler) 100 µL alınıp stok lenfosit oluşturmak üzere ayrı bir ependorf tüpüne aktarılmıştır. Bu aşamada izole lenfositlerde canlılık testine bakılmıştır. Bunun için temiz bir lam üzerine 10 µL seyreltilmiş tripan blue çözeltisi konulmuş ve üzerine kontrol tüpünden alınan 10 µL lenfosit ilave edilip süspanse edilmiştir. Ardından lamel ile kapatma işlemi yapıp lenfositlerin canlılık oranına bakılmıştır. Şeffaf olarak görünen hücreler canlı mavi renge boyalı olarak görünen hücreler ise cansız kabul edilmiştir. Deneye devam edebilmek için canlılık alt sınırının ≥ 90 olması dikkate alınmıştır. Canlılık testinin ardından daha önceden belirlenen dozlardaki test maddeleri (kalsiyum karbonat ve sevelamer hidroklorür) son konsantrasyonu 0,5, 1 ve 2 mg/mL olacak

şekilde 100 µL içerisinde stok lenfositlere eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak % 35'lik hidrojen peroksit (H₂O₂) (100 µL), çözücü kontrol olarak DMSO (100 µL) ve kontrol olarak ise distile su (100 µL) kullanılmıştır. Tüplere test maddesi, pozitif kontrol, çözücü kontrol ve steril distile su ilave edildikten sonra hücreler 37 °C' de 1 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüpler + 4 °C ve 3000 devir/dk' da 5 dakika santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrası tüplerdeki süpernatant atılmıştır. Kalan lenfositlerin üzerine 100 µL PBS tamponu ilave edilerek tüpler dikkatlice karıştırılmıştır. Sonrasında daha önceden hazırlanan düşük kaynama dereceli LMA (low melting agar) agardan 75 µL alınıp ependorf tüplerinde bulunan 100 µL lenfosit ile hızlıca karıştırılmıştır. Bu karışımdan 150 µL alınıp bir gün önceden yüksek kaynama dereceli HMA (high melting agar) agar kullanılarak kaplanmış olan lama yayılarak üzeri lamel ile kapatılmıştır. Kapatılan preparatlar kapalı kutu içerisinde 20-25 dakika buzdolabında bekletilmiştir. Süre sonunda lam üzerindeki lameller tek bir hamlede yana çekilerek çıkartılmış ve lamalar içerisinde lysing solüsyonu bulunan şale içerisine yerleştirilmiştir. Bu şekilde preparatlar buzdolabında 16 saat (en az 1 saat en fazla ise 16 saat) bekletilmiştir. Lizis işleminden sonra lamalar elektroforez tankında bulunan tampon içerisine konulmuş ve 25 V ve 300 mA'da 20 dakika elektroforezde DNA iplik parçalarının yürütme işlemi yapılmıştır. Elektroforez tankı bir gün önceden +4 °C'de bekletilmiştir. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra lamalar elektroforez tamponundan dikkatli bir şekilde alınarak bir gün önceden hazırlanıp +4 °C'de bekletilen nötralizasyon tamponu içeren şale içerisine konulmuş ve yine +4 °C'de 5 dakika bekletilmiştir. Bu işlem 2 defa tekrarlanmıştır. İşlemler sonrasında nötralizasyon tamponundan çıkartılan her bir lama 50 µL Etidyum Bromid (EtBr) (100 µg/mL) ilave edilerek hücrelerin boyanması sağlanmıştır. Lamel ile kapatılan lamalar kapalı kutu içerisinde 15-20 dakika buzdolabında bekletilmiştir. Süre sonunda fazla boyanın uçmasını sağlamak amacıyla lamalar karanlık bir ortamda ve oda sıcaklığında 20 dakika bekletilmiştir. Bu şekilde elde edilen preparatlarda

EtBr'nin uçucu etkisinden dolayı görüntü kalitesinin bozulmaması için aynı gün içerisinde inceleme yapılmıştır.

3.2.2.2. Mikroskopik İnceleme

Etidyum bromid ile boyanmış preparatlar Olympus (CX31RTSF, 7.1 Megapixel) marka floresan mikroskop (546 nm eksitasyon ve 590 nm bariyer filtre) altında 400X büyütmede incelenmiştir. Kullanılan test maddelerinin etkisini belirleyebilmek amacıyla her bir kişiye ait preparatlarda her kişinin her muamele grubu ve kontrollerinde rastgele seçilmiş 100 hücre incelenmiş ve fotoğrafları çekilerek görüntüleri kaydedilmiştir. Mikroskopik incelemeler sırasında nükleustan dışarı doğru göç etmiş DNA parçaları nükleusa bağlı bir kuyruk halinde (kuyruklu yıldız benzer bir imaj) görülür. Bu nükleuslarda DNA hasarının meydana geldiği anlaşılır (Şekil 3.9). Daha sonra nükleustaki DNA hasarı nitel yolla (göz kararı) değerlendirmiştir. Bu yöntemde hücreler hasarsız olmaları ve hasar düzeylerine göre 0'dan 4'e kadar skorlanmaktadır.

Dünyada uygulanan komet test tekniğinin genel basamakları Şekil 3.10'da gösterilmiş ve aşağıda özetlenmiştir (Tice ve ark, 2000; Çavaş ve Könen, 2007-2008):

1. **Hücrelerin İzolasyonu:** Lenfositlerin tam kandan ayrılması işlemidir.
2. **Preparasyon Aşaması:** Hücrelerin agar ile karıştırılarak lam üzerine yayılmasını içeren safhadır.
3. **Lizis:** Agara gömülü halde lam üzerine yayılmış olan hücrelerin hücre zarlarının ve proteinlerinin yıkımının gerçekleştiği aşamadır. Bu aşamanın sonunda çıplak DNA elde edilir. Lizis işlemi gerçekleştirilmek için önceden hazırlanan ve +4 °C'de soğutulmuş saklanan lizis solüsyonu kullanılmaktadır. Lizis çözeltisinin bileşeninde bulunan tuz proteinlerin hücre ile olan bağlarını ve RNA yapısını bozarken; deterjanlar ise hücre membran yapısını bozmaktadır. Böylece lizis işlemi sonrasında hücre yapısındaki membran, protein, RNA, sitoplazmik ve nükleer

bileşenler parçalanmaktadır. Sonuçta nükleoid olarak adlandırılan ve komet oluşumunun gözlenebileceği DNA yumağının kalması sağlanmaktadır.

4. DNA Sarmalının Çözülme Aşaması: Lizis işleminden çıkan preparatlar soğuk elektroforez solüsyonu içeren ($\text{pH} > 13$) tanka yerleştirilir ve burada 20 dakika süreyle bekletilir. Bu aşamada DNA zincirlerinin ayrılarak tek iplikli hale geçmesi sağlanır.

5. Elektroforez Aşaması: DNA sarmalı çözüldükten sonra aynı tank ve solüsyon içerisinde elektrik akımı uygulanarak elektroforez işlemi gerçekleştirilir. Bu işlem sonucunda tek iplikli DNA molekülünde bulunan kırık fragmentler ve kırılma sonucu oluşan DNA ilmekleri negatif (-) yüklü oldukları için boyutlarına bağlı olarak değişen hızlarda anoda (+ uca) doğru hareket etmektedir.

6. Nötralizasyon Aşaması: Elektroforez işleminin sona ermesiyle tanktan çıkarılan preparatlar pH ayarlamasını sağlamak için nötralizasyon işlemine tabi tutulur. Bu işlem için preparatlar önceden hazırlanarak $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilen soğuk nötralizasyon tamponu içeren şalelere alınarak 30 dakika süreyle bekletilir.

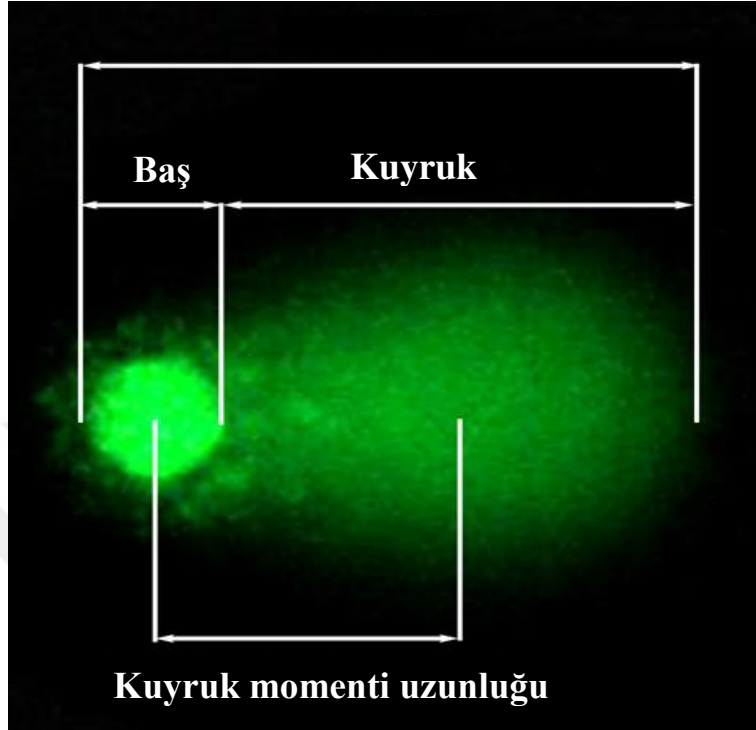
7. Boyama Aşaması: Nötralizasyon tamponundan çıkarılan preparatlar 2 kez soğuk distile sudan geçirilerek boyama işlemine tabi tutulur. Bu işlem için en yaygın olarak kullanılan floresan boya Etidyum bromid (EtBr)' dir. Ancak EtBr oldukça iyi sonuç vermesine rağmen yüksek oranda genotoksik etkiye sahip olduğu için bu boyaya alternatif olarak komet testinde akridin oranj, DAPI, YOYO-1 veya propidyumiyodit boyaları da kullanılmaktadır.

8. Değerlendirme Aşaması: Komet ölçümlerinde kullanılmak üzere birçok parametre geliştirilmiş olmakla birlikte kuyruk uzunluğu, kuyruk moment ve kuyruktaki DNA yüzdesi en yaygın olarak kullanılan parametrelerdir. Komet test tekniği kullanılarak DNA'da oluşabilecek hasarların kantitatif olarak tayin edilmesinde gözle değerlendirmeye dayalı ölçümler kullanılabileceği gibi en garantili yöntem olarak bilgisayarlı komet analiz programları da kullanılmaktadır. Komet yapısı içerisinde belirli bir bölgede bulunan DNA miktarı ile o bölgede bulunan floresan yoğunluğu arasında doğru orantı bulunmaktadır. Bu özellikten

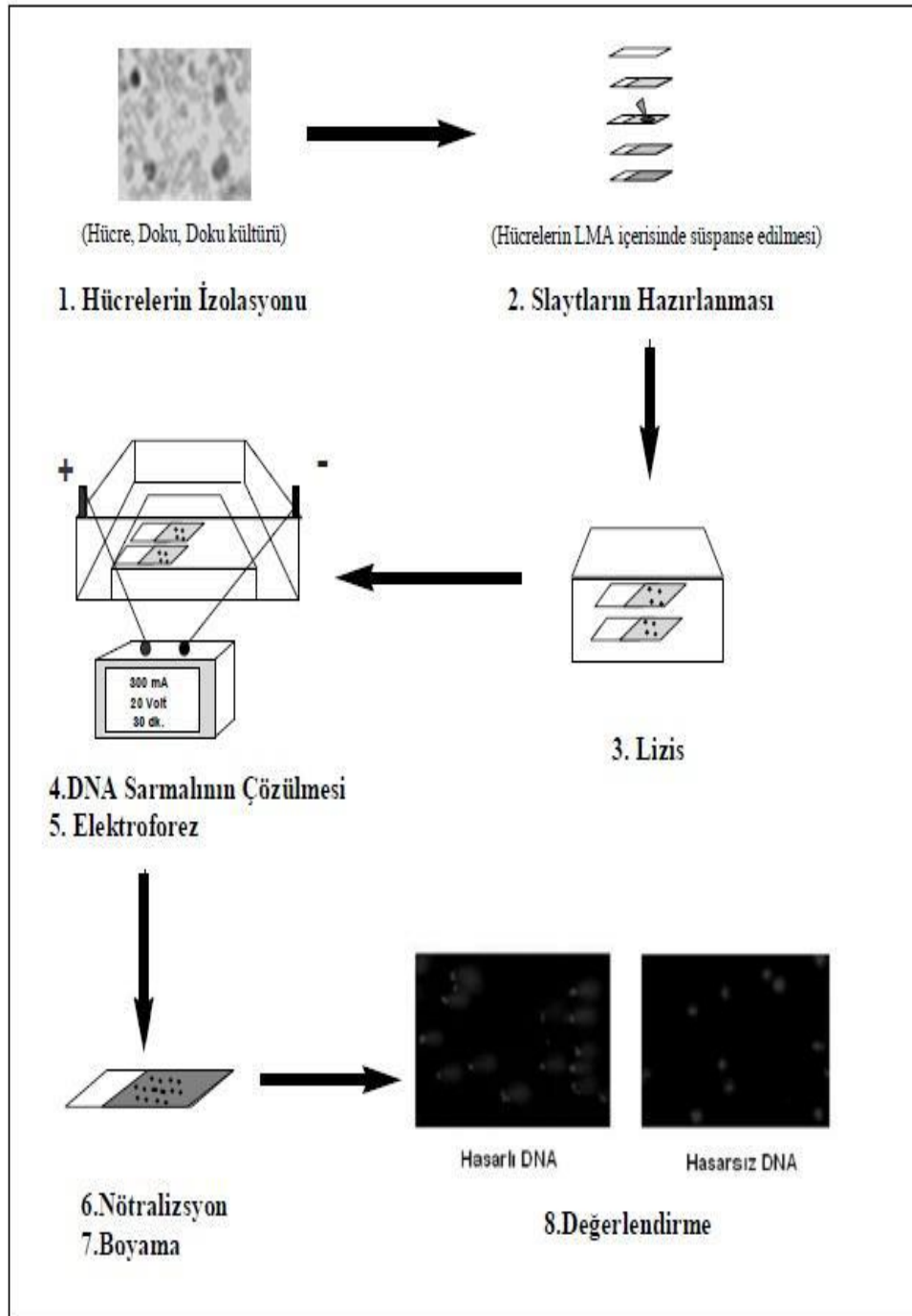
faaydalanılarak dijital görüntü sistemleri ve bilgisayar yazılım programlarında kullanılan çeşitli tayin yöntemleri geliştirilmiştir ( ekil 3. 10). Bunlar;

- **Kuyruk Uzunluğu:**  ekirdek ba  bölge dış kısmından itibaren göç eden DNA uzunluğuunun ölçümüdür.
- **Merkezden Kuyruk Uzunluğu:** Kuyruk uzunluğu+Ba   apı/2
- **Kuyruktaki DNA %'si:** Kuyrukta bulunan DNA'nın hücrede bulunan toplam DNA'ya olan yüzdesi
- **Kuyruk Momenti:** Kuyrukta bulunan toplam DNA yüzdesi ile ba  bölgesinin merkezinden itibaren kuyruğuun merkez kısmına kadar olan mesafenin ortak olarak hesaplanmasıdır.

$$\text{Kuyruk momenti} = \frac{\text{Kuyruk uzunluğu} \times \text{Kuyruktaki DNA Yoğuunluğu}}{100}$$



Şekil 3.9. DNA hasarına uğramış hücrede baş ve kuyruk oluşumu

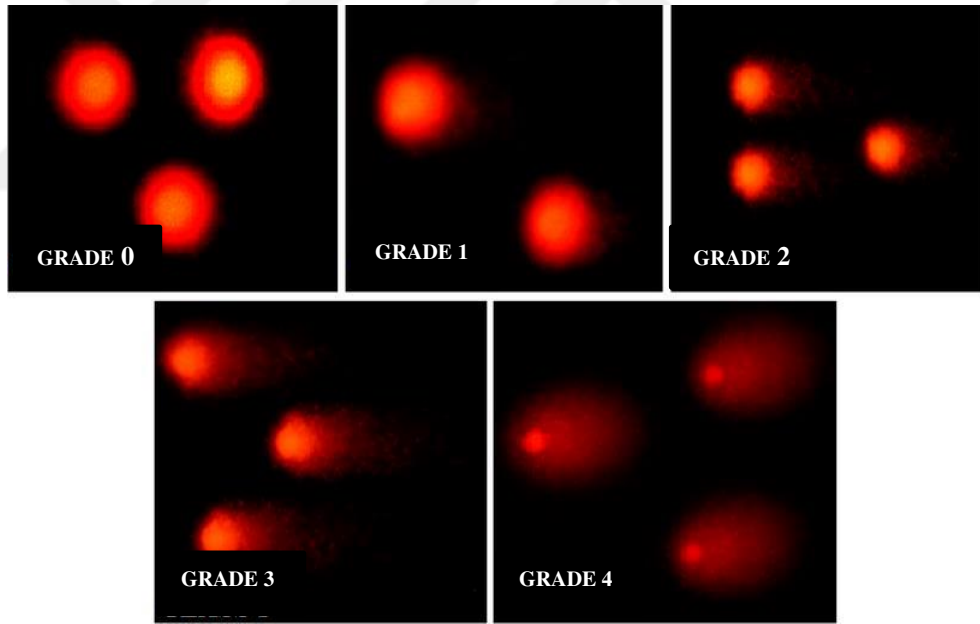


Şekil 3.10. Komet tekniği genel aşamaları (Fidan, 2008)

Nükleustaki DNA hasarının diğer bir değerlendirme yöntemi manuel yani gözle değerlendirmedir. Bu yöntemde hücreler hasarsız olmaları ve hasar düzeylerine göre 0'dan 4'e kadar kategoriler (Grade) skorlanmaktadır (Şekil 3.11). Bu tasnife göre;

- Grade 0 → kuyruğun hiç olmadığını
- Grade 1 → kuyruk uzunluğunun çok az olduğunu
- Grade 2 → kuyruk uzunluğunun az olduğunu
- Grade 3 → kuyruk uzunluğunun çok olduğunu
- Grade 4 → kuyruk uzunluğunun çok fazla olduğunu göstermektedir

(Bandyopadhyaya ve ark., 2008; Çavaş ve Könen, 2007, 2008).



Şekil 3.11. Komet testi ile farklı seviyelerde hasara uğramış DNA'ların görüntüleri

Toplam skorun belirlenmesi için Tabakçioğlu tarafından önerilen hesaplama yöntemi kullanılmıştır (Tabakcioglu, Aktac, Pala, & Omurlu, 2016). Görsel kalitatif skorlama sistemi ile kuyruk ve kafa yoğunluğuna göre toplam 100

kuyruklu yıldız beş kategoriden (Grade) birine ait olarak sınıflandırılır. Hasarlı hücrelerin (Grade 2,3, ve 4) skor ortalaması hasarlı hücre oranı (HHO) olarak değerlendirilmiştir.

Genetik hasar indeksi (GHI) olarak tanımlanan genel skor ise aşağıdaki formül uygulanarak hesaplanmıştır:

Grade 0.....Sayılan Hücre x 0

Grade 1.....Sayılan Hücre x 1

Grade 2.....Sayılan Hücre x 2

Grade 3.....Sayılan Hücre x 3

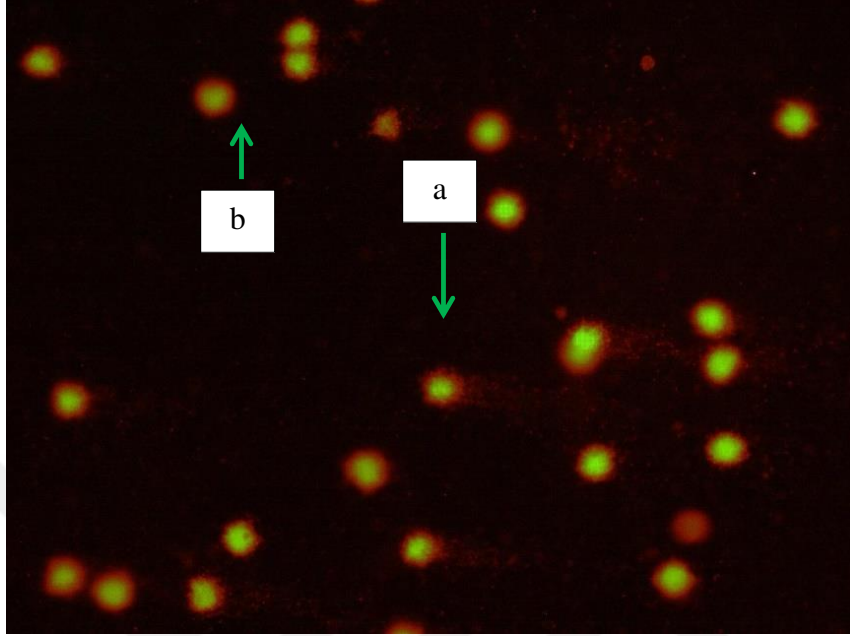
Grade 4.....Sayılan Hücre x 4

Toplam Hücre Sayısı (100)

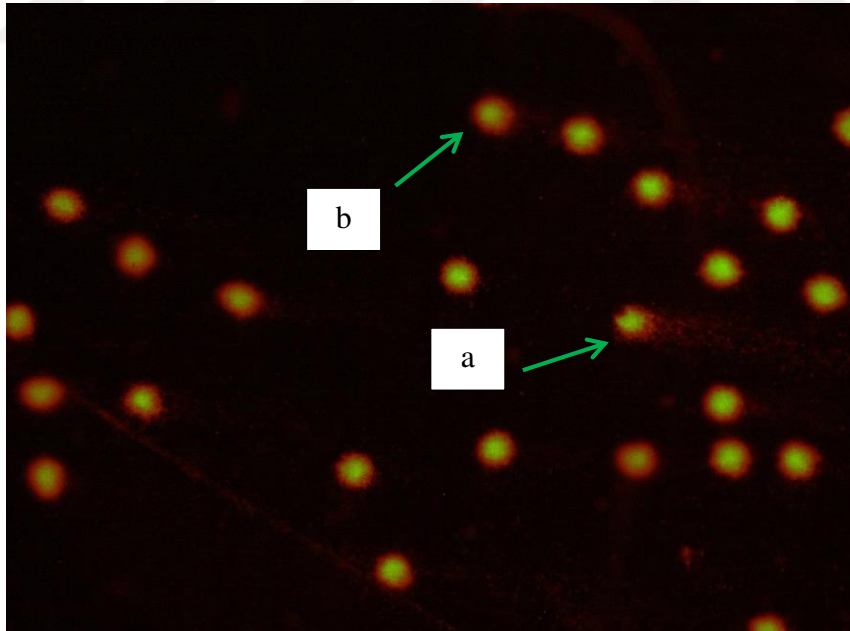
Formülüyle toplam hasar skoru (Genetik Hasar indeksi=GHI) hesaplanmıştır.

Görsel skorlama 5 dakikada 1000 hücreyi sayacak kadar hızlı ve bir bilgisayar programı gerektirmediği için ucuz ve kolay bir yöntemdir. Bu konudaki değerlendirmeler görsel değerlendirmenin yazılım kullanımı kadar etkili olduğunu doğrulamaktadır (<http://www.geocities.com/cometassay>).

Ayrıca mikroskopta okülere yerleştirilen ve mikron seviyesinde ölçüm yapabilen bir cetvelden (mikrometre) de yararlanarak ölçüm yapmak suretiyle gerekli parametreler hesaplanabilmektedir (Çavaş ve Könen, 2008).



Şekil 3.12. DNA'sı göç etmiş (kuyruklu=a) ve göç etmemiş (kuyruksuz=b) nükleuslar. X1000.



Şekil 3.13. DNA'sı göç etmiş (kuyruklu=a) ve göç etmemiş (kuyruksuz=b) nükleuslar. X1000.

3.2.3. AMES/Salmonella Bakteriyel Geri Mutasyon Testi

Deneyin bilimsel esası; çoğalması için histidin amino asidine gereksinim duyan *Salmonella typhimurium* mutant oksotrofik suşların, mutajenik etkilerle tekrar histidin sentezleyebilir atasal (prototrof) forma dönüşmesi temeline dayanmaktadır. Bu yolla test maddelerinin neden olacağı geri mutasyonların frekansı saptanabilmiştir. Ames testi metabolik aktivasyonsuz (S9-) olarak çalışılmıştır.

3.2.3.1. Salmonella typhimurium Test Suşları

Çalışmamızda, Maron ve Ames (1983) tarafından, *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan in vitro mutasyonlarla geliştirilmiş TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmıştır. TA 98 suşu çerçeve kayması, TA 100 ise baz çifti dönüşümü tipindeki mutasyonların saptanmasında kullanılmıştır.

3.2.3.2. Test Maddelerinin Dozları ve Hazırlanışı

Uygulanacak dozları belirlemek için Sevelamer hidroklorür (SH) ve Kalsiyum karbonat (KK)'ın, 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL konsantrasyonları kullanılmıştır. Elde edilecek sonuçların değerlendirilebilmesi için deneylere paralel olarak spontan kontrol, çözücü kontrol (sevelamer hidroklorür DMSO içinde eritilmiş, kalsiyum karbonat ise steril saf suda eritilmiş) ve pozitif kontrol (TA100 suşu için 1 µg/ petri 100µL içinde sodyum azid (NaN₃), TA98 suşu için, 20 µg/petri 100µL içinde 4-Nitro-o-fenilendiamine (O₂NC₆H₃(NH₂)₂) kullanılmıştır.

3.2.3.3. Salmonella Suşlarının Gecelik Kültürlerinin Hazırlanması

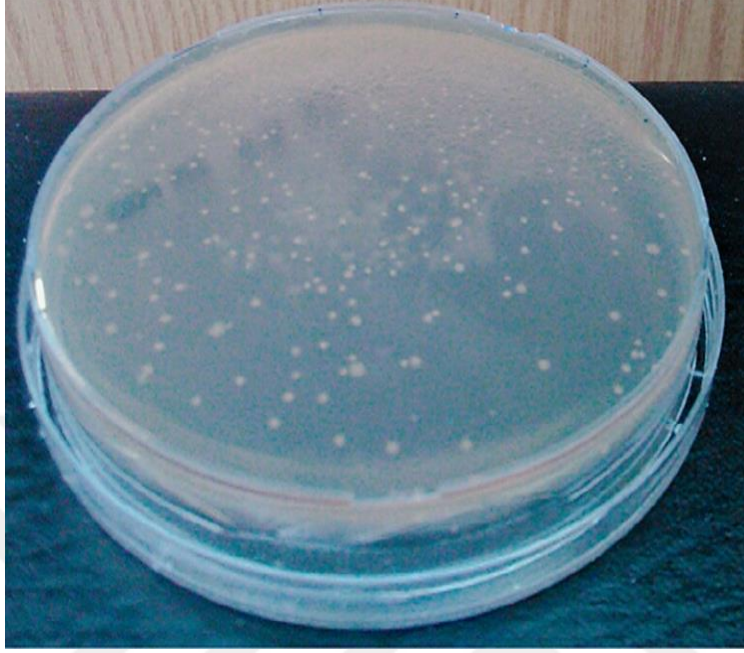
Önceden hazırlanmış ve -80°C'de saklanmış *Salmonella* suşlarının stoklarından 500 µL çekilip 50 mL NB ortamına ilave edilmiştir. 12-16 saat sürecinde inkübatörde 37°C'de bırakılmıştır.

3.2.3.4. Ames Mutajenite Testinin Yapılışı (S9'suz Deney)

Bu deneyde, 45°C'ye soğutulmuş olan ve içerisinde 0.2 mL histidin-biyotin çözeltisi ilave edilmiş 2 mL'lik top agara test maddelerinin değişik konsantrasyonlarından 0,1 mL ve 12-16 saatlik bakteri kültürlerinden 0,1 mL eklenmiştir. Tüpler çalkalanarak bir gün önce hazırlanılmış MGA paklarına dökülüp, petrilere hızla 8 işareti yaptırılarak top agarın petri üzerine homojen dağılması sağlanmıştır. 15 dakika agarın donması beklendikten sonra plaklar ters çevrilerek 37°C'lik etüvde 48–72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petrillerdeki gözle görülür His+ mikroorganizma kolonileri sayılmıştır (Şekil 3.14, Şekil 3.15). Deneyde TA 98 ve TA 100 için her bir test konsantrasyonu 3 tekrarlı olarak ekilmiştir.



Şekil 3.14. *Salmonella typhimurium* TA 98 suşunun kontrol sonuçları



Şekil 3.15. *Salmonella typhimurium* TA 100 suşunun kontrol sonuçları

3.2.4. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Mikroskobik inceleme sonucunda elde edilen MN, NBI, KOMET ve Ames parametrelerine ait veriler için her bir muameleli grubun ortalamaları ile kontrol gruplarının ortalamaları arasındaki farkın önemli olup olmadığı analiz edilmiştir. Ayrıca sevelamer hidroklorür ile kalsiyum karbonat arasındaki farkın da önemli olup olmadığı analiz edilmiştir. İstatistiksel analiz IBM SPSS Statistics 25 programı kullanılarak Anova Dunnett testi ile gerçekleştirilmiştir ($P \leq 0.05$). Mikroskobik incelemeler sonucunda elde edilen bulgular çizelgeler ve grafik halinde verilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Sevelamer Hidroklorür ve Kalsiyum Karbonatın Mikronukleus (MN) Oluşumu ve Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri

Bu çalışmadaki test maddeleri hiperfosfatemi tedavisinde kullanılan fosfat bağlayıcıları sevelamer hidroklorür (SH) ve kalsiyum karbonat (KK) ajanlarıdır. Test maddelerinin üç farklı konsantrasyonu (1/2, 1 veya 2 mg/mL) ile 24 veya 48 saat süreyle muamele edilen kültüre alınmış insan periferel kan lenfositlerinde MN oluşumu ve nükleus bölünme indeksi (NBI) üzerindeki etkileri Çizelge 4.1.'de görülmektedir. Ayrıca test maddelerinin neden olduğu kimi binükleer hücrede bir (Şekil 4.1, 4.3 ve 4.4.), bazılarında ise iki MN oluşum (Şekil 4.2) görselleri eklenmiştir.

Test maddesi uygulanan tüplerde saptanan MN içeren iki nükleuslu (binükleer) hücre (MNBN) ve total MN oranları (‰) birkaç istisna hariç birbirlerine benzerlik göstermektedir.

Sevelamer hidroklorürün 24 veya 48 saatlik uygulamalarında saptanan MNBN ve total MN oranları (‰) ile kontrol ve çözücü kontrol (DMSO) grubu hücrelerinde saptanan değerler arasında anlamlı farklılıklar bulunmamıştır. Sevelamer hidroklorür ile 24 saat muamele edilen kültürlerde saptanan MN ortalamalarıyla pozitif kontrol (MMC) tüplerinde saptanan değerler arasında anlamlı farklılık gözlenmezken 48 saatlik sevelamer hidroklorür uygulamasında MMC'de saptanan oranlardan önemli seviyede düşük bulunmuştur ($P<0.05$) (Çizelge 4.1.).

Çalışmadaki diğer test maddesi olan kalsiyum karbonat (KK) ile hücrelerin muamelesi sonucu saptanan MN değerlerinin bir miktar daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bütün varyantlarda saptanan MN değerlerinin muamelesiz kontrol düzeylerine yakın ancak pozitif kontrol MMC'de saptanan mikronukleus ortalamalarından önemli düzeyde düşük ($P<0.001$) olduğu ortaya çıkmıştır.

Kalsiyum karbonat muamelesinde ekseriyetle yüksek konsantrasyonlarda ortaya çıkan MN artışları dikkat çekmekle birlikte bunlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Özellikle 24 saat 0,5 ve 2 mg/mL kalsiyum karbonat uygulanan hücrelerde saptanan MN değerlerinin aynı süre ve konsantrasyon sevelamer hidroklorür uygulanan kültürde saptanan MN değerlerinden anlamlı şekilde daha düşük olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Kalsiyum karbonat sonuçlarıyla karşılaştırıldığında sevelamer hidroklorürün etkili bir mikronukleus uyarıcısı olduğu gösterilmiştir. Bu bulgu çalışma kurgusu açısından test edilen iki kimyasalın mikronukleus üretme potansiyelinin ortaya çıkarılması adına önem arz etmektedir. (Çizelge 4.1.).

Test maddelerinin sitostatik/sitotoksik potansiyellerinin değerlendirilmesi amacıyla nükleus bölünme indeks (NBI) değerleri analiz edildiğinde; sevelamer hidroklorürün NBI değerlerini muamelesiz kontrol ve çözücü (DMSO) kontrole göre anlamlı düzeyde azalttığı bulunmuştur ($P<0.05$). Öyle ki NBI değerlerindeki azalma pozitif kontrol (MMC) değerlerine yakın bulunmuştur. Burada sevelamer hidroklorürün sitotoksik potansiyeli dikkat çekicidir (Çizelge 4.1.).

Kalsiyum karbonat muamelesi sonucu kültürde incelenen NBI değerleri analiz edildiğinde özellikle muamelesiz kontrole göre 24 saat 1 veya 2 mg/mL uygulamasında NBI azalması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$). Bu azalma pozitif kontrolde incelenen NBI değerlerine yakın bulunmuştur. Ancak 48 saat kalsiyum karbonat uygulamasında önemli NBI değişikliği bulunmamıştır (Çizelge 4.1.).

Çalışmadaki iki test maddesinin etkilediği NBI değerleri kendi içinde karşılaştırıldığında sadece sevelamer hidroklorürün 0,5 mg/mL 48 saat uygulandığı kültürde hesaplanan NBI değerinin ($1,200\pm0,024$) aynı konsantrasyon ve süre kalsiyum karbonat uygulanan kültüründe saptanan NBI değerinden ($1,375\pm0,034$) anlamlı şekilde daha düşük olduğu ortaya çıkmıştır ($P<0.05$) (Çizelge 4.1.). Bu analiz sonuçlarına göre sevelamer hidroklorürün sitostatik etkisinin daha yüksek

olduğu, bölünme indeksini (NBI) kalsiyum karbonattan daha fazla azaltmasından anlaşılmıştır.

Ayrıca 24 saat kalsiyum karbonat uygulamasında kontrole göre önem olmamasına rağmen konsantrasyona bağı mikronukleus artışı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir doğrusal ilişki ($P < 0.05$) (MNBN ‰'si için $r = 0,997$) saptanmıştır (Şekil 4.5.).



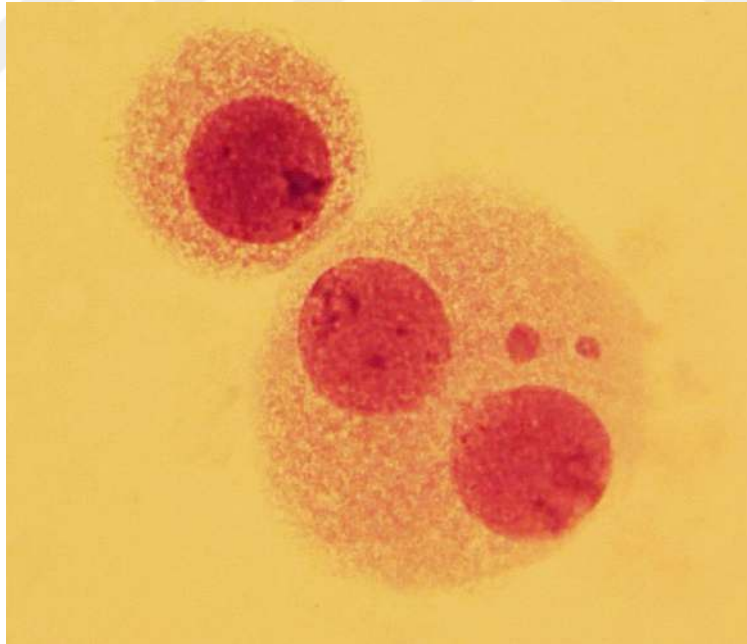
Çizelge 4.1. SH ve KK ile Muamele Edilmiş İnsan Periferik Kan Lenfositlerinde MN İçeren İki Nukleuslu Hücre %'si, Hücre Başına Düşen Ortalama MN Sayısı ve Nukleus Bölünme İndeksi (NBI).

Test Maddesi	Muamele		MN İçeren İki Nukleuslu Hücre %'si	Total MN %'si	Nukleus Sayısına Göre Hücrelerin Dağılımı			
	Süre (saat)	Kons. (mg/mL)			1	2	3	4
Kontrol	---	---	4.75 ± 0.25	5 ± 0.40	2522	1250	139	89
DMSO (ÇK)	24	30 µL	7.5 ± 1.93	8.25 ± 2.39	2628	1176	74	122
MMC (PK)	24	0.25 µg/mL	9 ± 0.40	9.5 ± 0.50	2873	1043	39	45
SH	24	1/2	8 ± 1.68	9.5 ± 2.02	3188	760	32	20
		1	6.25 ± 1.65	6.25 ± 1.65	3126	838	23	13
		2	8.25 ± 1.54	8.75 ± 1.88	3128	836	20	16
DMSO (ÇK)	48	30 µL	6.25 ± 0.75	6.25 ± 0.75	2726	1133	56	85
MMC (PK)	48	0.25 µg/mL	19.5 ± 2.63	20.25 ± 3.03	3236	697	30	37
SH	48	1/2	5.75 ± 2.21 b2	7.25 ± 3.06 b1	3243	725	19	13
		1	7.75 ± 2.52 b2	7.75 ± 2.32 b1	3059	893	30	18
		2	4 ± 1.08 b2	5 ± 1.58 b2	3091	886	14	9
KK	24	1/2	2.5 ± 0.28 b3 d1	2.5 ± 0.28 b3 d2	2921	950	69	60
		1	3.5 ± 0.50 b3	3.5 ± 0.50 b3	3208	742	29	21
		2	5 ± 0.57 b3 d1	5.5 ± 0.64 b3	3180	780	21	19
KK	48	1/2	4 ± 1.22 b3	4 ± 1.22 b3	2703	1152	77	68
		1	5.5 ± 1.65 b3	5.5 ± 1.65 b3	2855	1062	46	37
		2	4.5 ± 0.28 b3	4.5 ± 0.28 b3	3119	789	61	31

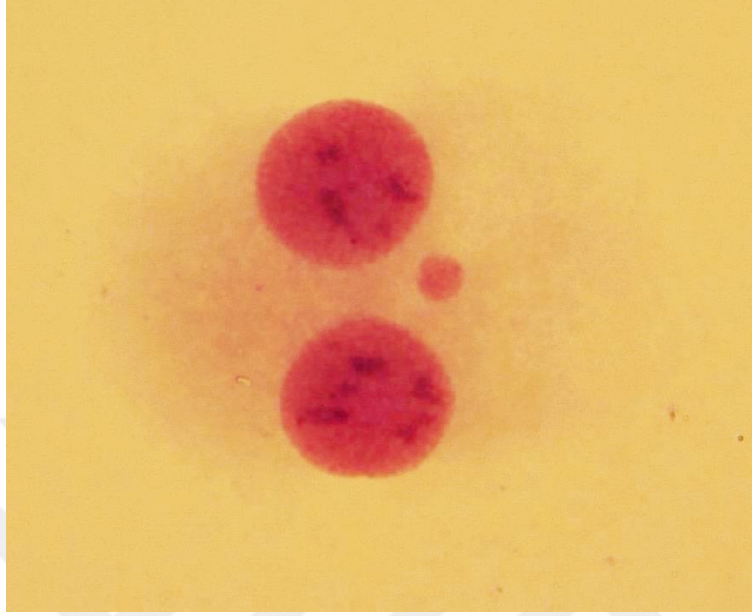
a : Kontrol ile; b : Pozitif kontrol ile; c : Çözücü kontrol ile; d : SH ve KK ile aradaki fark önemlidir.
a₁b₁c₁d₁: P≤0,05 ; a₂b₂c₂d₂: P≤0,01 ; a₃b₃c₃d₃: P≤0,001



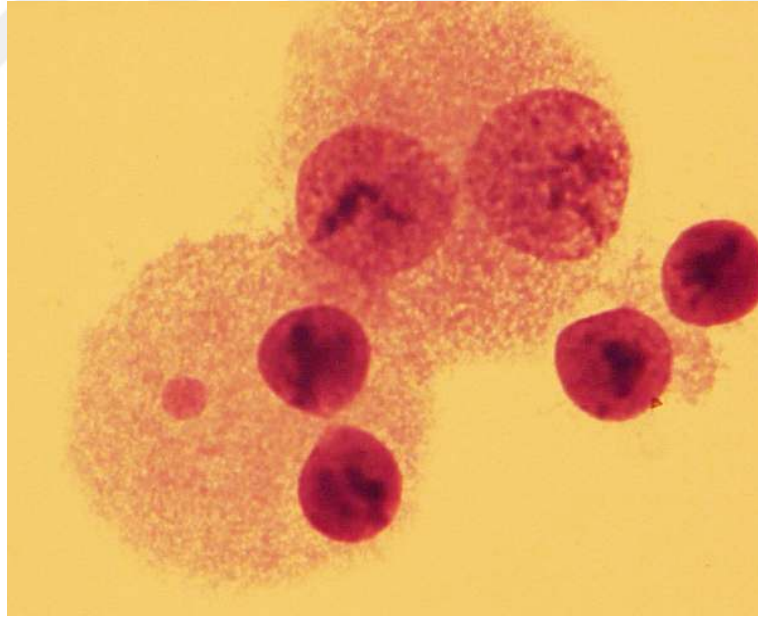
şekil 4.1. Binükleer hücrede görülen bir mikronukleus örneği (sevelamer hidroklorür 1 mg/mL, 24 saat) (x1000)



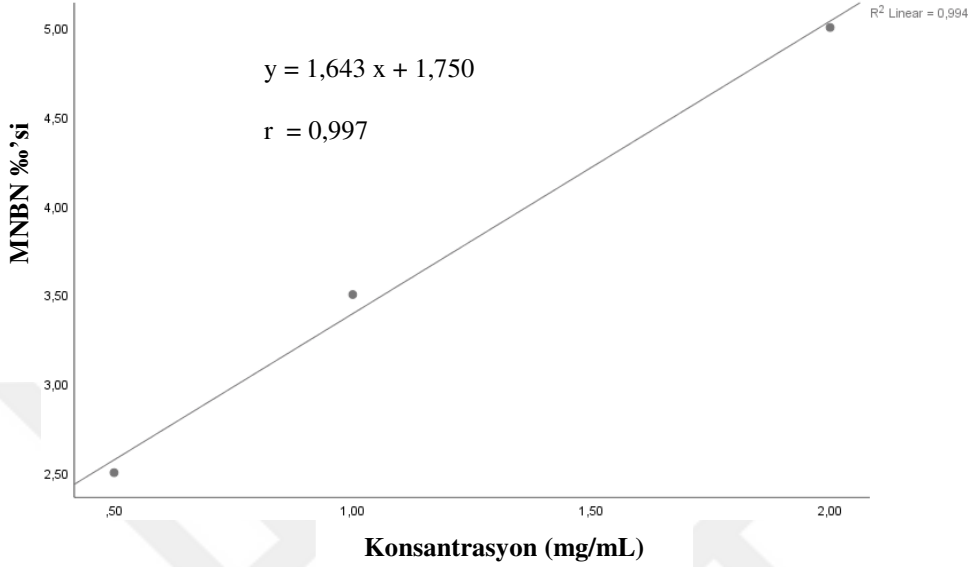
şekil 4.2. Binükleer hücrede görülen iki mikronukleus (sevelamer hidroklorür 0,5 mg/mL, 48 saat) (x1000)



şekil 4.3. Binükleer hücrede görülen bir mikronukleus (kalsiyum karbonat 1 mg/mL, 24 saat) (x1000)



şekil 4.4. Binükleer hücrede görülen bir mikronukleus (kalsiyum karbonat 0,5 mg/mL, 48 saat) (x1000)



Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda kalsiyum karbonat ile 24 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde mikronukleus içeren iki nükleuslu hücre bindesinin (MNBN %'si) konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.

4.1.2. Test Maddelerinin (Sevelamer Hidroklorür ve Kalsiyum Karbonat) DNA Hasarı Üzerindeki Etkileri

Sevelamer hidroklorür ve kalsiyum karbonat ile muamele edilen insan periferik lenfosit hücrelerindeki DNA hasarı Komet (kuyruklu yıldız) yöntemi ile değerlendirilmiştir. Sevelamer hidroklorür ve kalsiyum karbonatın 1/2, 1 ve 2 mg/mL'lik konsantrasyonları ile toplam 1 saat muamele edilen hücre kültürlerinde saptanan hasarlı hücre oranı (HHO) (%) ve genetik hasar indeksi (GHI) Çizelge 4.2'de görülmektedir. Kuyruklu yıldız görünümüne ait örnekler Şekil 4.6. ve 4.7.'de verilmiştir.

Hücre kültürlerinin sevelamer hidroklorür ile yapılan muamele sonucunda hasarlı hücre %'si ve GHI değerlerinde minör artışlar gözlenmekle birlikte bir istisna hariç bu artışların kontrol ve çözücü kontrol düzeylerinde olduğu anlaşılmıştır. İfade edilen istisna olarak en yüksek konsantrasyondaki hasarın

muamelesiz kontrolle karşılaştırıldığında aradaki farkın önemli derecede yüksek olduğu ortaya çıkmıştır ($P<0.05$). Öte yandan sevelamer hidroklorürün sebep olduğu hasarlı hücre ve genetik hasar indeksi değerlerinin pozitif kontrol olarak kullanılan hidrojen peroksitin (H_2O_2) indüklediği etkilere göre oldukça düşük kaldığı gözlenmiştir ($P<0.001$) (Çizelge 4.2). Elde edilen bulgularda konsantrasyon-etki ilişkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($P>0.05$).

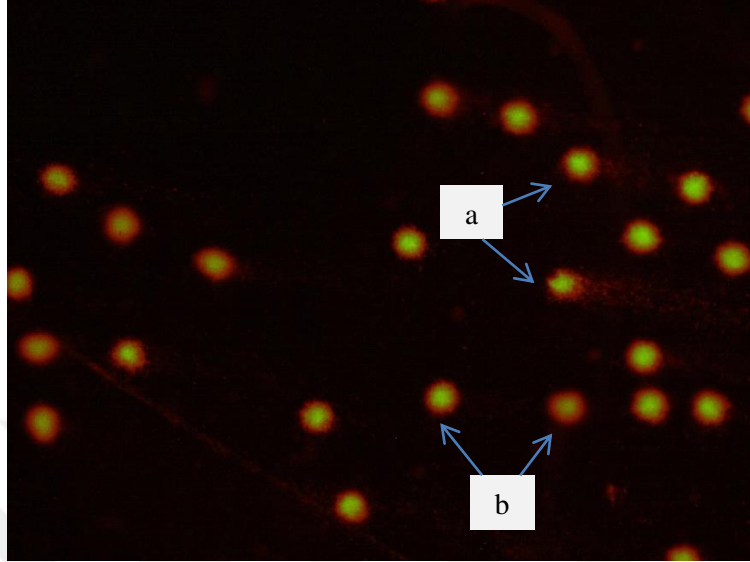
Kültürler kalsiyum karbonat ile muamele edildiğinde saptanan hasarlı hücre oranı (HHO) ve GHI değerlerinin tamamının muamelesiz kontrol değerlerine çok yakın olduğu net şekilde ortaya çıkmıştır. Ancak bunların pozitif kontrolde (H_2O_2) saptanan hasarlardan istatistiksel olarak önemli seviyede düşük olduğu ortaya çıkmıştır ($P<0.001$) (Çizelge 4.2.). Kalsiyum karbonatın neden olduğu konsantrasyona bağlı DNA hasar artışları anlamlı bulunmamıştır ($P>0.05$).

Bu iki test maddesinin neden oldukları GHI değerleri aynı konsantrasyon/sürede karşılaştırıldıklarında sevelamer hidroklorürün GHI değerini daha etkili şekilde artırdığı bariz olarak görülmüştür ($P<0.05$) (Çizelge 4.2.). bir önceki testte (MN ve NBI) olduğu gibi bu testte de sevelamer hidroklorür DNA hasarını kalsiyum karbonata göre daha fazla artırmıştır.

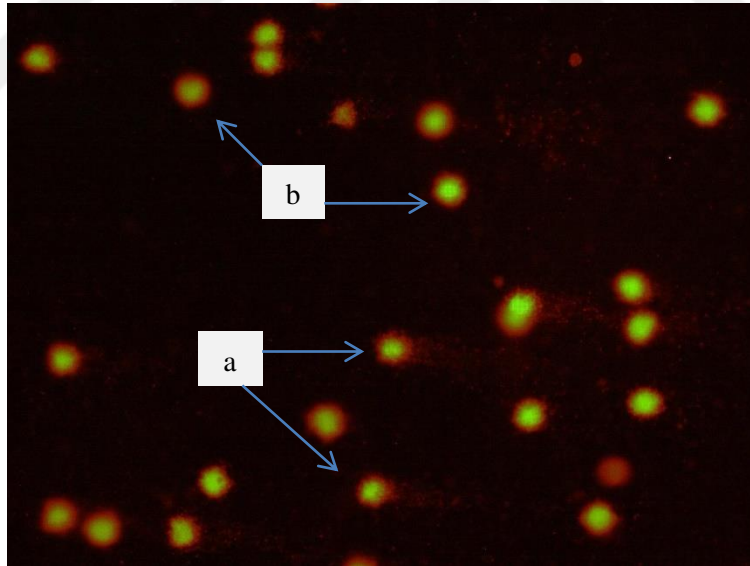
Çizelge 4.2. Üç Farklı Konsantrasyonda SH ve KK İle 1 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde DNA Hasarı

Test Maddesi	Muamele		Hasarlı Hücre Oranı (%)’si	Genetik Hasar İndeksi
	Süre (saat)	Kons. (mg/mL)		
Kontrol	---	---	31.5 ± 3.5	1.015 ± 0.085
DMSO (ÇK)	1	50 µL/mL	35 ± 3.0	1.105 ± 0.065
H ₂ O ₂ (PK)	1	100 µM	93 ± 2.0	3.550 ± 0.020
SH	1	0,5	37 ± 1.5 b3	1.160 ± 0.030 b3
		1	40 ± 1.0 b3	1.205 ± 0.025 b3
		2	43 ± 2.0 a1 b3	1.270 ± 0.050 a1 b3
Kontrol	---	---	27 ± 2.0	0.915 ± 0.035
H ₂ O ₂ (PK)	1	100 µM	98.5 ± 0.5	3.800 ± 0.040
KK	1	0,5	30 ± 2.0 b3	0.950 ± 0.030 b3 d1
		1	31.5 ± 2.5 b3	0.985 ± 0.035 b3 d1
		2	33.5 ± 2.5 b3	1.035 ± 0.035 b3 d1

a : Kontrol ile; b : Pozitif kontrol ile; c : Çözücü kontrol ile; d : SH ve KK ile aradaki fark önemlidir.
a₁b₁c₁d₁: P≤0,05 ; a₂b₂c₂d₂: P≤0,01 ; a₃b₃c₃d₃: P≤0,001



şekil 4.6. Sevelamer hidroklorürün 0,5 mg/mL' lik dozu ile muamele edilen insan periferel lenfosit hücreleri (a= DNA'sı göç etmiş ve b= DNA'sı göç etmemiş nükleuslar). x40.



şekil 4.7. Kalsiyum karbonatın 0,5 mg/mL' lik dozu ile muamele edilen insan periferel lenfosit hücreleri (a= DNA'sı göç etmiş ve b= DNA'sı göç etmemiş nükleuslar). x40.

4.1.3. Sevelamer Hidroklorür ve Kalsiyum Karbonat'ın Salmonella Suşlarının Üzerindeki Mutajenik Etkileri

Test maddelerinin gen mutasyonunu (çerçeve kayması veya baz değişimi) uyarma potansiyelini sınamak için *Salmonella typhimurium*'un histidin sentezleyemeyen mutant (oksotrof) suşlarının kullanıldığı bu çalışmada test ajanlarının neden olduğu geri mutasyon (reversiyon) frekansı koloni sayısındaki artış olarak ortaya çıkmıştır (Şekil 4.8. ve 4.9). Bu testte sevelamer hidroklorür, mutant suşlarda (TA98 ve TA100) geri mutasyon frekansını artırmamıştır ($P>0.05$). Hatta sevelamer hidroklorür TA98 suşunda çözücü (DMSO) kontrolün neden olduğu geri mutasyon sıklığını anlamlı şekilde ($P<0.001$) azaltmıştır. Ayrıca her iki suş için Sevelamer hidroklorürün neden olduğu mutasyon sıklığı pozitif kontrollerin neden olduğu mutasyon sıklığından önemli düzeyde daha düşük bulunmuştur ($P<0.05$) (Çizelge 4.3.). Özetle çalışmanın bu kısmında sevelamer hidroklorürün ispatlanmamış bir sitotoksik etkisi dikkat çekmektedir.

Diğer test maddesi olan kalsiyum karbonat TA98 suşunda bir varyant (1 mg/mL kalsiyum karbonat) hariç sevelamer hidroklorür benzeri bir etki göstermiştir. TA100 suşunda muamelesiz kontrole göre önem bulunmamıştır. Ancak sadece en yüksek en yüksek iki konsantrasyondaki (1 ve 2 mg/mL) koloni sayısı pozitif kontrolde sayılan koloni sayısından anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($P<0.05$). Bu azalma kalsiyum karbonatın TA 100 suşları üzerindeki olası sitotoksik etkisinden kaynaklanmış olabilir (Çizelge 4.3.).

Test maddelerinin geri mutasyon oluşturma potansiyeli mikronukleus ve DNA hasarı oluşturma potansiyelinden farklılık göstermiştir. Çünkü kalsiyum karbonat önceki iki çalışmanın aksine mutant suşlarda geri mutasyon frekansını özellikle yüksek konsantrasyonlarda sevelamer hidroklorürden daha fazla artırdığı gözlenmiştir (Çizelge 4.3.). Ancak bu etkinin de sevelamer hidroklorürün sitotoksik potansiyelinden kaynaklanmış olabileceği dışlanmamalıdır.

Bu çalışmada mutant suşlarla yapılan testlerin hiç birisinde konsantrasyona bağlı etki ilişkisi gözlenmemiştir.

Çizelge 4.3. Salmonella typhimurium TA98 ve TA100 suşları ile denenen SH ve KK nm S9 fraksiyonu yokluğunda deney sonuçları

Test maddesi	Kons. (mg/petri)	Revertant Sayısı Aritmetik Ortalama + Standart Sapma
Kontrol	-	TA 98 TA 100
DMSO	100 µL	39.66 ± 14.33 236.33 ± 29.90
4-NPD ⁽¹⁾	20 µg/petri	73.66 ± 2.84 264.00 ± 13.11
SA ⁽²⁾	1 µg/petri	969.33 ± 205.23 -
SH	0.125	31 ± 2.51 b3c3 214.66 ± 9.68 b1
	0.25	32.33 ± 1.45 b3c3 200.00 ± 9.01 b2
	0.5	29.33 ± 3.71 b3c3 213.33 ± 13.77 b1
	1	30.33 ± 7.68 b3c3 206.66 ± 9.82 b2
	2	30.33 ± 3.17 b3c3 225.33 ± 34.04 b1
KK	0.125	37.33 ± 4.05 b3 293.33 ± 33.84
	0.25	33.66 ± 2.96 b3 289.66 ± 24.45 d1
	0.5	63.33 ± 14.09 b3 d1 286.00 ± 20.00
	1	84.66 ± 6.38 a1 b3 d3 228.33 ± 10.91 b1
	2	71.33 ± 4.40 b3 d2 234.66 ± 8.66 b1

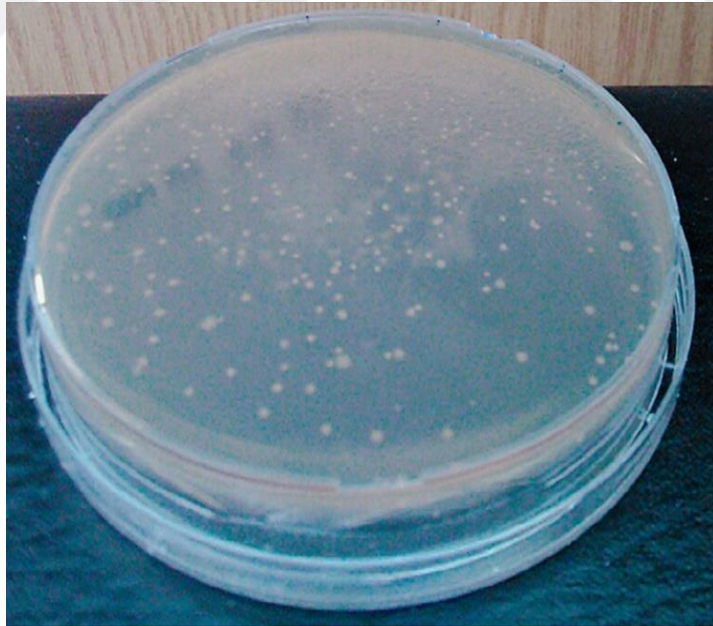
(1) 4-NPD : 4-Nitro-o-fenilendiamine ; (2) SA : Sodyum Azid

a: Kontrol ile ; b : Pozitif kontrol ile ; c: Çözücü kontrol ile ; d : SH ve KK ile aradaki fark önemlidir.

a₁b₁c₁d₁: P≤0,05 ; a₂b₂c₂d₂: P≤0,01 ; a₃b₃c₃d₃: P≤0,001



şekil 4.8. Sevelamer hidroklorürün 0,5 mg/mL'lik dozuna ait *Salmonella typhimurium* TA 98 suşunun deney sonuçları



şekil 4.9. Kalsiyum karbonatın 1 mg/mL'lik dozuna ait *Salmonella typhimurium* TA 100 suşunun deney sonuçları

4.2. Tartışma

Bu çalışma ile hiperfosfatemi hastaları tarafından kullanılan fosfat bağlayıcı sevelamer hidroklorür ve kalsiyum karbonatın genotoksik, mutajenik sitotoksik/sitostatik etkilerini belirlemek üzere kültüre edilmiş insan periferallenfositleri üzerinde mikronukleus (MN), Komet testleri ve *Salmonella typhimurium* bakterisi mutant suşları üzerinde Ames testi gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla in vitro olarak çeşitli konsantrasyonlardaki sevelamer hidroklorür ve kalsiyum karbonat ile belirli süreler muamele edilmiş periferallenfositleri ve bakteri suşlarıyla yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar diğer araştırmacıların yaptıkları çalışmaların sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

4.2.1. Sevelamer Hidroklorür ve Kalsiyum Karbonatın Mikronukleus (MN) Oluşumu ve Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri

Sevelamer hidroklorürün 1/2, 1, 2 mg/mL konsantrasyonlarının oluşturduğu mikronukleus içeren binukleer hücre (MNB) frekansları ve total MN oranları kontrol ve çözücü kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. Bununla birlikte 24 saat sevelamer hidroklorür uygulanan hücrelerdeki MN oranlarının aynı süre uygulanan pozitif kontrol (MMC) değerlerine yakın olduğu anlaşılmıştır. Süre 48 saate çıkarıldığında ise test maddesi ile pozitif kontrol değerleri arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir ($P < 0.05$). EMEA (2005) tarafından yapılan bilimsel bir tartışmaya göre hâlihazırda resmi kanserojenlik verileri mevcut olmamakla birlikte, in vitro ve in vivo çalışmalar gastrointestinal sistemde emilmeyen sevelamer hidroklorür etken maddeli Renagel adlı ticari preparatın genotoksik potansiyelinin olmadığı ifade edilmiştir. Bu sonuçlar bizim bulgularımızı desteklemektedir. Ancak ajansın 2009 verilerine göre Sevelamer hidroklorürün ames bakteriyel mutasyon testinde mutajenik olmadığı vurgulanmakla beraber metabolik aktivasyon varlığında Çin Hamster Ovaryum (CHO) hücrelerinde yapısal kromozom aberasyonu sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğu belirtilmiştir. Sevelamer vücutta absorbe

olmadığından in vivo çalışmalar geçersiz kabul edilmiştir. Bununla birlikte ajans ek mutajenite testleri talep etmemiştir. Çünkü çalışmalarından Sevelamerin genotoksik özelliklerle ilgili herhangi bir endişe, tekrarlanan doz toksisitesi, kanserojenite veya üreme toksisitesi bulgusu ortaya çıkmamıştır. Kanserojenite çalışmaları, fareler ve sıçanlarda 104 haftalık bir süre zarfında gerçekleştirilmiştir. Dişi farelerde yüksek konsantrasyonlarda (50.000 ppm) lenfoma sıklığının artmasına rağmen bu artışın sevelamer ile ilişkilendirilemeyeceği ifade edilmiştir (EMA 2009). Bu sonuçların bir kısmı bizim bulgularımızla benzerlik göstermektedir.

Bizim çalışmamızın sonuçlarına benzer ancak in vivo şartlarda Pastor ve ark. (2018) tarafından yapılan MN deneyinde sevelamer alan ciddi böbrek yetmezliği olan 214 erişkin hastada genotoksik ve sitotoksik potansiyel gözlenmemiştir. Hastalarda in vivo şartlarda yapılan çalışmanın sonuçları bizim bulgularımızla bilimsel olarak örtüşmektedir.

Çalışmadaki diğer test maddesi olan kalsiyum karbonat bizim sonuçlarımıza göre hiçbir konsantrasyonda ve periyotta MN oluşumunu indüklememiştir. Ayrıca saptanan MN değerleri pozitif kontrolün (MMC) indüklediği oranlarından önemli derecede düşüktür.

Efsa (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi) (2011) tarafından yapılan çalışmada nano boyuttaki (60-100 nm) kalsiyum karbonatın bir dizi in vitro genotoksosite analizinde negatif sonuçlar verdiği saptanmıştır. İlaveten kronik toksisite veya kanserojenitesi hakkında veri mevcut olmadığı ve uzun ömürlü bir güvenli kullanım geçmişi olduğu göz önüne alındığında, kalsiyum karbonatın kanserojen potansiyele sahip olma ihtimalinin çok düşük olduğu kanaatine varılmıştır. Bu rapordaki genotoksosite ile ilgili veriler bizim sonuçlarımızla önemli ölçüde uyumludur.

Hücre hatlarıyla farklı biyoanalizler kullanılarak yapılan bir çalışmada kalsiyum karbonat (CaCO_3) nanokristalinin fare embriyo fibroblast hücre hattı (NIH/3T3) üzerinde sitotoksosite ve genotoksitesi analiz edildiğinde kontrol ile

anlamlı bir farklılık göstermemiştir (Kamba ve ark., 2014). Bu sonuçlar bizim bulgularımızla tutarlılık göstermektedir. Ancak yüksek konsantrasyonlara (200 - 400 µg/mL) maruz kalınması durumunda hücrelerin canlılığında küçük bir düşüş fark edilirken, anılan konsantrasyonlarda ROS oluşumunda ve salınan laktat dehidrojenaz düzeyinde artış gözlenmiştir (Kamba ve ark., 2014).

Kalsiyum karbonatın nano formunun genotoksitesi, OECD Yönergesi (473) göre memeli kromozom aberasyon testi kullanılarak yapılan çalışmada insan lenfositleri 1000 µg/mL'ye kadar olan konsantrasyonlarda test edilmiştir. Bu çalışmada kalsiyum karbonat (nano form), metabolik aktivasyon bulunduran veya bulundurmeyen kültürlerde KA taşıyan hücrelerin sıklığında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olmadığı rapor edilmiştir. Dolayısıyla ajanın klastojenik olmayan sınıfta yer aldığı ifade edilmiştir. Ayrıca 1000 mg/kg'a kadar olan konsantrasyonlarda oral toksite göstermediği belirtilmiştir. Benzer şekilde üreme toksitesi ve teratojenik etki ile ilgili belirgin bir emareye rastlanmamıştır. Kalsiyum karbonatın sıçanlarda akut oral LD₅₀ konsantrasyonunun 2000 mg/kg civarında veya daha yüksek olduğu raporlanmıştır (CIR, 2016). Bu çalışmadaki sonuçlar bizim sonuçlarımızı genel anlamda doğrulamaktadır. Farklı bir çalışmada nano-kalsiyum karbonatın (NCC) sekiz haftalık C57BL/6 farelerine iki hafta boyunca her gün oral olarak verilerek yapılan MNPCE (mikronukleuslu polikromatik eritrositler) analizinde, mikronükleus sıklığının NCC alımından etkilenmediği ve NCC'ye maruz kalmanın genotoksite riski yaratmadığı gösterilmiştir (Wang ve ark., 2017). Bu sonuçlar da öncekilerde olduğu gibi bizim bulgularımızla korelasyon göstermektedir.

Farklı fosfat bağlayıcılarla yapılmış MN testlerinde önemli sonuçlar bulunmamıştır. Bunlardan Damment ve ark. (2005)'nın fare kemik iliği hücrelerinde in vivo yaptıkları iki bağımsız mikronükleus deneyinde lantanum karbonatın oral yoldan verilmesi (800, 1250 ve 2000 mg/kg) veya klorürü formu olan lantanum klorürün intravenöz yoldan uygulamasının (0.025, 0.05 ve 0.1 mg/kg) fare kemik iliğinde mikronükleuslu polikromatik eritrosit (MNPCE)

frekanslarının kontrol düzeyinde olduğu kaydedilmiştir. Ancak 1250 ve 2000 mg / kg'lık dozların 48 saat uygulanmasında erkek gruplardaki ortalama MNPCE için istatistiksel olarak anlamlı farklar kaydedilmiştir. Lantanum karbonatın 2000 mg / kg'lık maksimum uygulanabilir oral doza kadar olan konsantrasyonların uygulanmasından sonra fare kemik iliğinde MN indüklediği sonucuna varılmıştır. Lantanum klorür uygulamasından sonra sıçan kemik iliği MN testinde ise 0,1 mg / kg doza kadar MN çalışmaları negatif sonuç vermiştir. Sonuç olarak, bu kimyasalın biyolojik ve genotoksik olarak anlamlı sonuçlar üretmediği varsayılmıştır. Buna göre lantanum gibi başka fosfat bağlayıcı kullanarak yapılan MN testinden elde edilen sonuçlar çalışmamızdan elde ettiğimiz bulguları destekler niteliktedir.

Test maddelerinin sitotoksiteleriyle ilgili yaptığımız bilimsel değerlendirmede ajanların nükleus bölünmesi ve hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini belirlemek için nükleer bölünme indeksi (NBI) saptanmış ayrıca bakterilerdeki koloni sayıları dikkate alınmıştır. Çalışmamızda sevelamer hidroklorür NBI'yi genel anlamda düşürmüş olup bu azalmanın kontrol ve eritici kontrole göre önemli olduğu saptanmıştır. Bu sonuç Kamba ve ark.'nın (2014) sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Paralel şekilde sevelamer hidroklorür *Salmonella typhimurium* koloni sayısında önemli olmayan azalmalara neden olmuş ve yüksek konsantrasyonlardaki koloni azalması dikkate alındığında kalsiyum karbonattan önemli derecede daha toksik olduğu dikkati çekmektedir. Buradaki sonuçlar da bizim diğer bulgumuzda (NBI) olduğu gibi sevelamer hidroklorürün kalsiyum karbonattan daha sitotoksik olduğunu gerçeğini doğrulamaktadır.

4.2.2. Sevelamer Hidroklorür ve Kalsiyum Karbonatın DNA Hasarı Üzerindeki Etkileri

Test maddesinin DNA hasarı üretme potansiyeline belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada uygulanan tüm konsantrasyonlarda hasarlı hücre ve genetik hasar indeksi oranlarını sevelamer hidroklorürün en yüksek konsantrasyonu hariç

önemli düzeyde etkilememiştir. Öte yandan istatistiksel olarak önemli olmayan konsantrasyona etki ilişkisi mevcuttur.

Sevelamer hidroklorür ile yapılan farklı bir çalışmada bu ilacın alımı ile birlikte bir hemodiyaliz programına dâhil edilen 214 hasta grubu değerlendirilmiştir. Komet testi kullanılarak tüm bireylerde bazal ve oksidatif DNA hasarı seviyeleri ölçüldüğü çalışmada sevelamer hidroklorürün oksidatif DNA hasar seviyelerini etkilemediği rapor edilmiştir. Sonuç olarak bu ilacı alan hastaların DNA hasarı seviyelerinde bir artış olmadığını göstermektedir (Pastor ve ark., 2018). Bu sonuçlar bizim bulgularımızla benzerlik göstermektedir. Sevelamer hidroklorür bu çalışmada da GHI değerini kalsiyum karbonata göre daha fazla artırmıştır.

4.2.3. Sevelamer Hidroklorür ve Kalsiyum Karbonatın Salmonella Suşlarının Üzerindeki Mutajenik Etkileri

Mutajenik etkinin belirlenmesi amacı ile test maddeleri *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarıyla test edilmiştir. Her iki test maddesi ile yapılmış çalışmada revertant koloni sayısında anlamlı farklılıklar saptanmamıştır. Bu sonuca göre sevelamer hidroklorür ve kalsiyum karbonatın bakterial gen mutasyonunu uyarmadığı ifade edilebilir. Literatürde benzer deneylerin yapıldığı başka bir çalışmaya rastlanmadığı için elde ettiğimiz bu bulgular açısından çalışma özgün niteliktedir. Bununla birlikte bir bütün olarak düşünüldüğünde diğer testlerin sonuçlarında olduğu gibi test ajanları herhangi bir genotoksik ve mutajenik nitelik (risk) taşımamaktadır. Bununla birlikte bizim NBI bulgusu ve TA 98 koloni sayısı bulgularımıza göre sevelamer hidroklorürün zayıf bir sitotoksik etkisi göz ardı edilmemelidir.

Yaptığımız çalışmanın kurgusu açısından en önemli çıkarım, test edilen iki kimyasalın sitogenotoksik ve mutajenik potansiyellerinin birbirlerine olan farklılığıdır. Buna göre elde edilen sonuçlar ayrı ayrı ele alınacak olursa sevelamer hidroklorürün MN ve DNA hasarı üretme ve sitotoksik potansiyelinin kalsiyum

karbonattan daha yüksek olduğu oysa geri mutasyon testinde ise kalsiyum karbonatın sevelamer klorürden daha etkili olabileceği varsayımı ne sürülebilir.

Özetle, elde ettiğimiz bulgular önceki yapılan çalışmaların birçoğunun sonuçlarıyla büyük ölçüde birbirini destekler niteliktedir. Çalışmamızdaki seçilen doz ve srelerde kullanılan test maddelerinin *in vitro* şartlarda sağlıklı hücreler üzerine genotoksik ve güçlü sitotoksik etkiler göstermediği belirgin olarak ortaya çıkmıştır.





5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu çalışma ile en geniş perspektifte hiperfosfatemi hastalarının kullanmak zorunda olduğu antifosfat ajanlardan popüler olan ikisinin (sevelamer hidroklorür ve kalsiyum karbonatın) hastaya sitogenetik yönden olumsuz sekonder etkilerinin olup olmadığı in vitro şartlarda modellenmiştir.

Bu çalışmadaki test maddeleri Sevelamer hidroklorür ve Kalsiyum karbonat sağlıklı insan lenfositlerinde in vitro şartlarda mikronükleus oluşumu gibi genotoksisite parametrelerini hafif artış yönünde uyardığı ancak bu artışın kontrole göre anlamlı olmadığı saptanmıştır. Bununla birlikte kalsiyum karbonat tarafından uyarılan MN frekansında gözlenen konsantrasyon-etki ilişkisinin istatistiksel yönden anlamlı olduğu saptanmıştır. Test maddesinin sitotoksik potansiyeli nükleus bölünme indeksi ile gösterilmiştir. Bu bulgulara göre her iki test maddesi, özellikle de sevelamer hidroklorür, NBI'yi kontrole göre anlamlı şekilde azaltmıştır. Burada sevelamer hidroklorürün zayıf bir sitotoksik etkisinden söz edilebilir.

DNA hasarını özellikle de DNA iplik kırığı varlığını ve sıklığını belirlemede, ekonomik ve uygulaması kolay olan tek hücre jel elektroforez analiziyle kuyruklu yıldız (komet) oluşumları araştırılmıştır. Bu test bulgularına göre kullanılan test maddeleri bir istisna (2 mg/mL, sevelamer hidroklorür, 48 saat) hariç önemli DNA hasarlarına neden olmamıştır.

Test maddelerinin geri mutasyon oluşturma potansiyelini ortaya çıkarmak için gerçekleştirilen Ames Salmonella/mikrozom testi sonuçlarına göre her iki test maddesinin de denenen bütün konsantrasyonlarda mutajenik etki göstermediği anlaşılmıştır.

Sonuçlar toplu olarak özetlendiğinde Sevelamer hidroklorür ve Kalsiyum karbonatın in vitro şartlarda genotoksik olmadığı, Ames testinde mutajenik olmadığı ancak zayıf bir sitotoksik etkiye sahip olduğu söylenebilir. Bununla

birlikte bu çalışmanın en önemli bulgusu, Sevelamer hidroklorürün bazı konsantrasyonlarda mikronukleus oluşumunu ve genetik hasar indeksini diğer test maddesi Kalsiyum karbonata göre daha fazla artırmış olup bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğunun anlaşılmasıdır. Ancak Ames testi sonuçlarına göre tersi durum yani Kalsiyum karbonatın daha etkili olduğu ortaya çıkmıştır. Ortaya çıkan bu farklılığın kullanılan hücre tiplerinden kaynaklanmış olabileceği değerlendirilmektedir.

5.2. Öneriler

İnsanlarda böbrek yetmezliği gibi çeşitli nedenlerle ortaya çıkan hiperfosfatemi hastalığında tek başına veya diyaliz yöntemine ilave olarak pratik kullanım kolaylığı sağlayan antifosfatların popülaritesi artarak devam etmektedir.

Bu sınırlı çalışmada test edilen antifosfatların her ne kadar anlamlı genotoksik etkileri saptanmamış olsa da başka çalışmalarla farklı test sistemleri ve / veya farklı hücre tipleri (kanser hücresi hatları vb.) kullanılarak elde edilecek çıktılar sayesinde Sevelamer hidroklorür ve Kalsiyum karbonatın genotoksik, sitotoksik ve oksidatif profilinin ve varsa birbirlerine olan üstünlüklerinin daha iyi yansıtılacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Abdullahi Shafiu Kamba, Maznah Ismail, Tengku Azmi Tengku Ibrahim, and Zuki Abu Bakar Zakaria, 2014. Biocompatibility of Bio Based Calcium Carbonate Nanocrystals Aragonite Polymorph on NIH 3T3 Fibroblast Cell Line. *Afr J Tradit Complement Altern Med.*; 11(4): 31–38.
- Agodoa LY, Jones CA, Held PJ., 1996. End-stage renal disease in the USA: data from the United States Renal Data System. *Am J Nephrol.*; 16:7-16.
- Akizawa T, Kamimura M, Mizobuchi M., 2003. Management of secondary hyperparathyroidism of dialysis patients. *Nephrology.* 8(suppl 2):S53-7.
- Aline T. PERES, 2009. Effect of phosphate binders on oxidative stress and inflammation markers in hemodialysis patients, *Hemodialysis International*; 13:271–277.
- Altmann, P., Barnett, M. E. & Finn, W. F., 2007. Cognitive function in stage 5 chronic kidney disease patients on hemodialysis: no adverse effects of lanthanum carbonate compared with standard phosphate-binder therapy. *Kidney Int.* 71, 252–259.
- Ames, B. N.; Lee, F. D. & Durston, W. E., 1973. An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70, (3), 782-786, ISSN-0027-8424.
- Anderson, D. 1988. Human Biomonitoring. *Mutation Res.*, 204:353-541.
- Andrade, L. G. et al., 2005. Dialysis encephalopathy secondary to aluminum toxicity, diagnosed by bone biopsy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 20, 2581–2582.
- Autissier, V., Damment, S. J. & Henderson, R. A., 2007. Relative in vitro efficacy of the phosphate binders lanthanum carbonate and sevelamer hydrochloride. *J. Pharm. Sci.* 96, 2818–2827.

- Bandyopadhyaya, G., Sinha, S., Chattopadhyay, B.D. and Chakraborty, A. 2008. Protective role of curcumin against nicotine-induced genotoxicity on rat liver under restricted dietary protein. *European Journal of Pharmacology*, 588 (2–3):151–157.
- Becaria, A., Campbell, A. & Bondy, S. C., 2002. Aluminum as a toxicant. *Toxicol. Ind. Health* 18, 309–320.
- Behets, G.J., Verberckmoes, S.C., D’Haese, P.C., DeBroe, M.E., 2004. Lanthanum carbonate: a new phosphate binder. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 13, 403–409.
- Birck, R., Zimmermann, E., Wassmer, S., Nowack, R. & van der Woude, F. J., 1999. Calcium ketoglutarate versus calcium acetate for treatment of hyperphosphataemia in patients on maintenance haemodialysis: a cross-over study. *Nephrol. Dial. Transplant.* 14, 1475–1479.
- Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW., 1998. Association of serum phosphorus and calcium $\times$ phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. *Am J Kidney Dis.* 1998; 31:607-17.
- Block GA, Raggi P, Bellasi A, Kooienga L, Spiegel DM. 2007. Mortality effect of coronary calcification and phosphate binder choice in incident hemodialysis patients. *Kidney Int* 71:438–441.
- Bonassi S., El-Zein, 2011. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies; *Mutagenesis*, Volume 26, Issue 1, Pages 93–100.
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M. P., Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M. R., Zijno, A., Norppa, H., Fenech, M., 2007. An Increased Micronucleus Frequency in

- Peripheral Blood Lymphocytes Predicts the Risk of Cancer in Humans. *Carcinogenesis*, 28:625-631.
- Burke SK, Slatopolsky EA, Goldberg DI., 1997. RenaGel, a novel calcium- and aluminumfree phosphate binder, inhibits phosphate absorption in normal volunteers. *Nephrol Dial Transplant*; 12:1640-4.
- Burke, S., Amin, N., Incerti, C., Plone, M. & Watson, N., 2001. Sevelamer hydrochloride (Renagel), a nonabsorbed phosphate-binding polymer, does not interfere with digoxin or warfarin pharmacokinetics. *J. Clin. Pharmacol.* 41, 193–198.
- Carrano, A.V., Natarajan, A.T. 1988. Consideration for Population Monitoring Using Cytogenetic Techniques. *Mutation Res.*, 204:379-406.
- Choy, W.N. 2001. Genetic toxicology and cancer risk assessment. Marcel Dekker. New York. 29-187.
- Chue CD, Townend JN, Moody WE, et al., 2013. Cardiovascular effects of sevelamer in stage 3 CKD. *J Am Soc Nephrol*;24:842-52.
- CIR (Cosmetic Ingredient Review), 2016. Safety Assessment of Carbonate Salts as Used in Cosmetics. Status: Final Report. Release Date: January11, 2017. Panel Date: December 5-6.
- Covic A, Kothawala P, Bernal M, Robbins S, Chalian A, Goldsmith D., 2009. Systematic review of the evidence underlying the association between mineral metabolism disturbances and risk of all-cause mortality, cardiovascular mortality and cardiovascular events in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*;24:1506-23. <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfn613>.
- Çavaş, T. and Könen, S. 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheralerythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis*, 22(4):263–268.

- Çavaş, T. and Könen, S. 2008. In vivo genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. *Aquatic Toxicology*, 90:154-159.
- D’Haese PC, Spasovski GB, Sikole A, Hutchison A, Freemont TJ, Sulkova S, et al., 2003. A multicenter study on the effects of lanthanum carbonate (Fosrenol) and calcium carbonate on renal bone disease in dialysis patients. *Kidney Int Suppl*; 85:S73-8. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1755.63.s85.18.x>
- Damment, S. J. & Pennick, M., 2008. Clinical pharmacokinetics of the phosphate binder lanthanum carbonate. *Clin. Pharmacokinet.* 47, 553–563.
- Dellarco, V.L., Mavournin, K.H., Tice, R.R., 1985. Aneuploidy and Health Risk Assessment: Current Status and Future Directions, *Environ. Mutagen.*, 7:405-424.
- Delmez, J. et al., 2007. A randomized, double-blind, crossover design study of sevelamer hydrochloride and sevelamer carbonate in patients on hemodialysis. *Clin. Nephrol.* 68, 386–391.
- Di Angelantonio E, Chowdhury R, Sarwar N, Aspelund T, Danesh J, Gudnason V., 2010. Chronic kidney disease and risk of major cardiovascular disease and non-vascular mortality: Prospective population based cohort study. *Br Med J* 341:c4986.
- Diepeveen SH, Verhoeven GH, van der Palen J, et al., 2005. The effect of the initiation of renal replacement therapy on lipid profile and oxidative stress during the first 6 months of treatment. *Clin Chim Acta.*; 361:112–118.
- Dikilitaş, M., Koçyiğit, A. 2010. Canlılarda tek hücre jel elektroforez yöntemi ile DNA hasar analizi: comet analiz yöntemi. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi.* 2-14.
- Eastmond, D.A., Tucker, J.D. 1989. Identification of aneuploidyinducing agents using cytokinesisblocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ Mol Mutagen.*, 13:34–43.

- EFSA Journal, 2011; SCIENTIFIC OPINION. Scientific Opinion on re-evaluation of calcium carbonate (E 170) as a food additive. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). 9(7):2318.
- Elitsa Stoyanova, Silvia Berenice Sandoval, Liliana Andrea Zúñiga, Naouale El-Yamani, Elisabeth Coll, Susana Pastor, Joselyn Reyes, Enrique Andrés, José Ballarin, Noel Xamena, Ricard Marcos; Nephrol Dial Transplant, 2010. Oxidative DNA damage in chronic renal failure patients. 25: 879–885.
- F.H. Nielsen, 1991. Nutritional requirements for boron, silicon, vanadium, nickel, and arsenic: current knowledge and speculation, FASEB J. 5 (12) 2661–2667.
- Fan, S. et al., 2009. A randomized, crossover design study of sevelamer carbonate powder and sevelamer hydrochloride tablets in chronic kidney disease patients on haemodialysis. Nephrol. Dial. Transplant. 24, 3794–3799.
- Feith, G. W., 2010. Oral phosphate binders in patients with kidney failure. N. Engl. J. Med. 363, 989–990.
- Fenech, M. 1997. The Advantages and Disadvantages of the Cytokinesis-Block Micronucleus Method. Mutat Res. 392:11-18.
- Fenech, M. 2002. Biomarkers of Genetic Damage for Cancer Epidemiology. Toxicology, 181-182:411-416.
- Fenech, M., 2000. The in vitro Micronucleus Technique. Mutat. Res., 455:81-95.
- Fenech, M., Morley, A. A., 1985. Measurement of Micronuclei in Lymphocytes. Mutation Res., 147:29-36.
- Fidan, A.F. 2008. DNA hasar tespitiinde tek hücre jel elektroforezi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Dergisi, 8(1). 52s.
- Fishbane S, Delmez J, Suki WN, Hariachar SK, Heaton J, Chasan-Taber S, et al., 2010. A randomized, parallel, open-label study to compare once-daily sevelamer carbonate powder dosing with thrice-daily sevelamer

- hydrochloride tablet dosing in CKD patients on hemodialysis. *Am J Kidney Dis*; 55:307-15. <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2009.10.051>
- Gee, P.; Maron, D. M. & Ames, B. N. (1994). Detection and Classification of Mutagens: A Set of Base-Specific Salmonella Tester Strains. *Proceedings of the National Academy of*
- Goldsmith, D. R., Scott, L. J., Cvetkovic, R. S. & Plosker, G. L., 2008. Sevelamer hydrochloride: a review of its use for hyperphosphataemia in patients with end-stage renal disease on haemodialysis. *Drugs* 68, 85–104.
- González-Revaldería, J. et al., 2000. Biochemical and hematological changes in low-level aluminum intoxication. *Clin. Chem. Lab. Med.* 38, 221–225.
- Haas T, Hillion D, Dongradi G., 1991. Phosphate kinetics in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.*; 6(suppl 2): S108-13.
- Hagmar, L., Brøgger, A., Hansteen, I. L., Heim, S., Høgstødt, B., Knudsen, L., Lambert, B., Linnainmaa, K., Mitelman, F., Nordenson, I., Reuterwall, C., Salomaa, S., Skerfving, S. and Sorsa, M. 1994. Cancer Risk in Human Predicted by Increased Levels of Chromosomal Aberrations in Lymphocytes: Nordic Study Group on the Health Risk of Chromosome Damage. *Cancer Res.*, 54:2919-2922.
- Harris, D. C. & Yuill, L., 1993. Calcium alginate versus aluminum hydroxide in patients on hemodialysis. *Nephron* 65, 324–325.
- Heddle, J. A., Cimino, M. C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M. D., Tucker, J. D., Vanparys, Ph. and MacGregor, J. T., 1991. Micronuclei as an Index of Cytogenetic Damage: Past, Present, and Future. *Environ. and Mol. Mutagen.*, 18:277-291.
- Hill KM, Martin BR, Wastney ME, McCabe GP, Moe SM, Weaver CM, et al., 2013. Oral calcium carbonate affects calcium but not phosphorus balance in stage 3-4 chronic kidney disease. *Kidney Int* 2013; 83:959-66. <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2012.403>

- Hirota K., Masafumi F., October 2016. Phosphate—a poison for humans? *Kidney International*. Volume 90, Issue 4, Pages 753-763.
- Hutchison AJ, Barnett ME, Krause R, Kwan JTC, Siami GA, 2009. Lanthanum Carbonate Study Group. Lanthanum carbonate treatment, for up to 6 years, is not associated with adverse effects on the liver in patients with chronic kidney disease Stage 5 receiving hemodialysis. *Clin Nephrol*; 71:286-95.
- Hutchison AJ., 2004. Improving phosphatebinder therapy as a way forward. *Nephrol Dial Transplant*; 19(suppl 1):119-24.
- Hutchison, A. J. et al., 1996. Hypercalcaemia, hypermagnesaemia, hyperphosphataemia and hyperaluminaemia in CAPD: improvement in serum biochemistry by reduction in dialysate calcium and magnesium concentrations. *Nephron* 72, 52–58.
- Hutchison, A. J. et al., 2011; Pharmacology, efficacy and safety of oral phosphate binders. *Nat. Rev. Nephrol.* 7, 578–589; doi:10.1038/nrneph.2011.112
- Hutchison, A. J., Merchant, M., Boulton, H. F., Hinchcliffe, R. & Gokal, R., 1993. Calcium and magnesium mass transfer in peritoneal dialysis patients using 1.25 mmol/L calcium, 0.25 mmol/L magnesium dialysis fluid. *Perit. Dial. Int.* 13, 219–223.
- Iarmarcovai G, Ceppi M, Botta A, Orsiere T, Bonassi S., 2008. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis, *Mutat. Res.*, vol. 659 (pg. 274-283).
- Jaffe, J. A., Liftman, C. & Glickman, J. D., 2005. Frequency of elevated serum aluminum levels in adult dialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* 46, 316–319.
- Karamouzis I, Sarafidis PA, Karamouzis M, et al., 2007. Increase in oxidative stress but not in antioxidant capacity with advancing stages of chronic kidney disease. *Am J Nephrol.*; 28:397–404.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E. and Van Hummelen, P., 1997. The In Vitro Micronucleus Test: A Multi-endpoint Assay to Detect

- Simultaneously Mitotic Delay, Apoptosis, Chromosome Breakage, Chromosome Loss and Non-disjunction. *Mutation Res.*, 392(1-2):19-30.
- Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., Ahnstrom, G. 1996. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Res.*, 363:89-96.
- Kola I, Landis J.; 2004. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov*; 3:711–5.
- London G, Coyne D, Hruska K, Malluche HH, Martin KJ., 2010. The new kidney disease: improving global outcomes (KDIGO) guidelines - expert clinical focus on bone and vascular calcification. *Clin Nephrol*; 74:423-32.
- Lorenzo Sellares V, Torres Ramirez A., 2004. Management of hyperphosphataemia in dialysis patients: role of phosphate binders in the elderly. *Drugs Aging*; 21:153-65.
- Macia, M. & Coronel, F., 1995. Serum phosphate control: what about calcium salts of keto-amino acids? *Nephrol. Dial. Transplant.* 10, 2159–2160.
- Maisonneuve, July 10, 1999. Cancer in patients on dialysis for end-stage renal disease: an international collaborative study. *THE LANCET*, Vol 354.
- Maron, D. & Ames, B. N., 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113, (3-4), 173–215, ISSN 0165-1161.
- Massy ZA, Mazie`re S, Kamel M, et al., 2005. Impact of inflammation and stress oxidative on vascular calcifications in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.*; 20:380–382.
- McArt, D.G., Mckerr, G., Saetzler, K., Howard, C.V., Downes, C.N., Wasson, G.R. 2010. Comet sensitivity in assessing DNA damage and repair in different cell cycle stages. *Mutagenesis*, 25(3):299-303.
- Meema, H. E., Oreopoulos, D. G. & Rapoport, A., 1987. Serum magnesium level and arterial calcification in end-stage renal disease. *Kidney Int.* 32, 388–394.
- Michael Balls, 2018. *The History of Alternative Test Methods in Toxicology.*

- Ming-Jyun Wang, Ching-Chin Chen, Jie-Ting Huang, Jenn-Wen Huang(4) and Shuen-Ei Chen, 2017. Evaluation of the toxicity of nano-calcium carbonates and their effects on anti-heat stress in laying hens. *J. Chin. Soc. Anim. Sci.* 46(4): 223~234.
- Moe SM., 2008. Disorders involving calcium, phosphorus, and magnesium. *Prim Care.*
- Mortelmans K, Zeiger E., 2000. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res*; 455: 29-60.
- Murer H, Hernando N, Forster I et al., 2000. Proximal tubular phosphate reabsorption: molecular mechanisms. *Physiol Rev.*; 80:1373-409.
- Murgia E., 2008. Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study; *Mutat Res.* Mar 1;639(1-2):27-34. Epub 2007 Nov 13.
- National Kidney Foundation, 2003. K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis.*; 42 (suppl 3):S1-201.
- Norppa, H., Falck, G. C-M., 2003. What Do Human Micronuclei Contain? *Mutagenesis*, 18(3):221-233.
- Ostling, O., Johanson, K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res.*, 123(1):291-298.
- Pai, A. B. & Shepler, B. M., 2009. Comparison of sevelamer hydrochloride and sevelamer carbonate: risk of metabolic acidosis and clinical implications. *Pharmacotherapy* 29, 554–561.
- Palleschi S, De Angelis S, Diana L et al., 2007. Reliability of oxidative stress biomarkers in hemodialysis patients: a comparative study. *Clin Chem Lab Med*; 45: 1211–1218.
- Palmer SC, Hayen A, Macaskill P, Pellegrini F, Craig JC, Elder GJ, et al., 2011. Serum levels of phosphorus, parathyroid hormone, and calcium and risks

- of death and cardiovascular disease in individuals with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*; 305:1119-27. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2011.308>
- Passlick, J., Wilhelm, M., Busch, T., Grabensee, B. & Ohnesorge, F. K., 1989. Calcium alginate, an aluminum-free phosphate binder, in patients on CAPD. *Clin. Nephrol.* 32, 96–100.
- Perry, P., Evans, H. J. 1975. Cytological Detection of Mutagen-Carcinogen Exposure by Sister Chromatid Exchange. *Nature*, 258:121-125.
- Persy, V. P., Behets, G. J., Bervoets, A. R., De Broe, M. E. & D’Haese, P. C., 2006. Lanthanum: a safe phosphate binder. *Semin. Dial.* 19, 195–199.
- Piperakis, S.M. 2009. Comet assay: A brief history. *Cell Biology and Toxicology*, 25:1-3.
- Plone, M. A., Petersen, J. S., Rosenbaum, D. P. & Burke, S. K., 2002. Sevelamer, a phosphate-binding polymer, is a non-absorbed compound. *Clin. Pharmacokinet.* 41, 517–523.
- R.C. Mohs and N.H. Greig, 2017. Drug discovery and development: Role of basic biological research; *Alzheimer’s & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* 3, 651-657.
- Rencüzoğulları, E. and 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):19-24.
- Rigas G. Kalaitzidis & Moses S. Elisaf, 2014. Hyperphosphatemia and phosphate binders: effectiveness and safety. *Current Medical Research and Opinion*, 30:1, 109-112.
- Ritz E., 2004. Managing mineral balance in endstage renal disease. *Nephrol Dial Transplant.*; 19(suppl 1):11-3.
- Rodriguez-Ribera L, Stoyanova E, Corredor Z, Coll E, Silva I, Diaz JM, Ballarin J, Marcos R, Pastor S. 2014. Time in hemodialysis modulates the levels of

- genetic damage in hemodialysis patients. *Environ Mol Mutagen* 55:363–368.
- Rosenbaum, D. P., Holmes-Farley, S. R., Mandeville, W. H., Pitruzzello, M. & Goldberg, D. I., 1997. Effect of RenaGel, a non-absorbable, cross-linked, polymeric phosphate binder, on urinary phosphorus excretion in rats. *Nephrol. Dial. Transplant.* 12, 961–964.
- Rothfuss, A., Schutz, P., Bochum, S., Volm, T., Elberhard, E., Kreinberg, R., Vogel, V. and Speit, G., 2000. Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in Breast cancer families. *Cancer Res.*, 60:390-394.
- Rüster, M., Abendroth, K., Lehmann, G. & Stein, G., 2002. Aluminum deposition in the bone of patients with chronic renal failure—detection of aluminum accumulation without signs of aluminum toxicity in bone using acid solochrome azurine. *Clin. Nephrol.* 58, 305–312.
- S.J.P.Damment, 2005. Evaluation of the potential genotoxicity of the phosphate binder lanthanum carbonate ; *Mutagenesis* vol. 20 no. 1 pp. 29--37.
- Samuel Chan, Kenneth Au, Ross S Francis, David W Mudge, David W Johnson, Peter I Pillans, 2017. Phosphate binders in patients with chronic kidney disease *Aust Prescr*;40:9–14. <http://dx.doi.org/10.18773/austprescr.2017.002>.
- Sandoval SB, Pastor S, Stoyanova E, Rodriguez-Ribera L, Garcia- Quispes WA, Coll E, Reyes J, Andres E, Ballarin J, Marcos R. 2012. Genomic instability in chronic renal failure patients. *Environ Mol Mutagen* 53:343–349.
- Sandoval SB, Stoyanova E, Coll E, Pastor S, Reyes J, Andres E, Ballarin J, Xamena N, Marcos R. 2010. Genetic damage in chronic renal failure patients is associated with the glomerular filtration rate index. *Mutagenesis* 25:603–608.

- Schaefer, K., Umlauf, E. & von Herrath, D., 1992. Reduced risk of hypercalcemia for hemodialysis patients by administering calcitriol at night. *Am. J. Kidney Dis.* 19, 460–464.
- Schaefer, K., von Herrath, D., Asmus, G. & Umlauf, E., 1988. The beneficial effect of ketoacids on serum phosphate and parathyroid hormone in patients with chronic uremia. *Clin. Nephrol.* 30, 93–96.
- Schucker And Ward, 2005: Hyperphosphatemia and phosphate binders. *Am J Health-Syst Pharm—Vol 62. Sciences of the United States of America*, 91, (24), 11606-11610, ISSN-0027-8424.
- Sheikh MS, Maguire JA, Emmett M, Santa Ana CA, Nicar MJ, Schiller LR, et al., 1989. Reduction of dietary phosphorus absorption by phosphorus binders. A theoretical, in vitro, and in vivo study. *J Clin Invest*; 83:66-73. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI113886>
- Singh, N. P., Mccoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Res.*, 175:184-191.
- Spasovski GB, Sikole A, Gelev S, Masin-Spasovska J, Freemont T, Webster I, et al., 2006. Evolution of bone and plasma concentration of lanthanum in dialysis patients before, during 1 year of treatment with lanthanum carbonate and after 2 years of follow-up. *Nephrol Dial Transplant*; 21:2217-24. <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfl146>
- Stengel B., 2010. Chronic kidney disease and cancer: A troubling connection. *J Nephrol* 23:253–262.
- Stoyanova E, Pastor S, Coll E, Azqueta A, Collins AR, Marcos R. 2014. Base excision repair capacity in chronic renal failure patients undergoing hemodialysis treatment. *Cell Biochem Funct* 32:177–182.
- Stoyanova E, Sandoval SB, Zuniga LA, El-Yamani N, Coll E, Pastor S, Reyes J, Andres E, Ballarin J, Xamena N, Marcos R. 2010. Oxidative DNA damage in chronic renal failure patients. *Nephrol Dial Transplant* 25:879–885.

- Surrallés, J., Xamena, N., Creus, A., Marcos, R., 1995. The Suitability of the Micronucleus Assay in Human Lymphocytes as a New Biomarker of Excision Repair. *Mutation Res.*, 342:43-59.
- Susana Pastor, Elisabeth Coll, Lara Rodriguez-Ribera, Elitsa Stoyanova, Zuray F. Corredor, Ricard Marcos; 2018. Influence of Carnicor, Venofer, and Sevelamer on the Levels of Genotoxic Damage in End-Stage Renal Disease Patients ; *Environmental and Molecular Mutagenesis*.
- Tabakcioglu, K., Aktac, T., Pala, F. S., & Omurlu, I. K., 2016. Investigation of the radioprotective effect of Myricetin on the DNA of the human lymphocytes. *Toxicology Letters*, 258, S137-S138.
- Takahashi, N. et al., 1999. Effect of histamine H2-receptor antagonist on the phosphorus-binding abilities of calcium carbonate and calcium lactate in hemodialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 1090–1094.
- Tejs, S., 2008. The Ames test: a methodological short review. *Environmental Biotechnology*, 4, (1), 7-14, ISSN 1432-0614.
- Thomson Health Care Inc., 2008. Physicians' Desk Reference 62 ed., Montvale, NJ, p. 1255.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. 2000. Single cell gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35:206-221.
- Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., Reinisch, F., Parvatham, S., Osorio, A.M. and Smith, M.T., 1997. Genotoxicity of Malathion in Human Lymphocytes Assessed Using the Micronucleus Assay In Vitro and In Vivo: a Study of Malathion-Exposed Workers. *Mutation Res.*, 388(1):85-95.
- Topaktaş, M. ve Rencüzoğulları, E., 2010. Sitogenetik. Nobel Yayınevi, Ankara, 176s.

- Tucker, J. D., Auletta, A., Cimino, M. C., Dearfield, K. L., Jacobson-Kram, D., Tice, R. R. and Carrano, A. V., 1993. Sister- Chromatid Exchange: Second Report of the Gene-Tox Program. *Mutation Res.*, 297:101-180.
- Vamvakas S, Bahner U, Heidland A., 1998. Cancer in end-stage renal disease: potential factors involved. *Am J Nephrol*; 18: 89–95.
- Wrzoc, M. , Petras, M.L., 1997. Comparison of alkaline single cell gel (Comet) and peripheral blood micronucleus assays in detecting DNA damage caused by direct and indirect acting mutagens. *Mutat Res.*, 381(1):31-40.
- W. Maret, 2016. The metals in the biological periodic system of the elements: concepts and conjectures, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (1).
- Wilhelm M, Gaillard S, Rakov V, Funk F., 2014. The iron-based phosphate binder PA21 has potent phosphate binding capacity and minimal iron release across a physiological pH range in vitro. *Clin Nephrol*; 81:251-8. <http://dx.doi.org/10.5414/CN108119>
- Wills, M. R. & Savory, J., 1983. Aluminium poisoning: dialysis encephalopathy, osteomalacia, and anaemia. *Lancet* 2, 29–34.
- Witko-Sarsat V, Gausson V, Descamps-Latscha B., 2003. Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins? *Kidney Int.*; 84(Suppl):S11–S14.
- Yu AS., 2004. Renal transport of calcium, magnesium, and phosphate. In: Brenner BM, ed. *Brenner & Rector's the kidney*. 7th ed. Philadelphia: Saunders; 552-3.
- Zeiger, E., 2004. History and Rationale of Genetic Toxicity Testing: An Impersonal, and Sometimes Personal, View. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44, (5), 363–371, ISSN 1098-2280.
- Zeiger, E., 2010. Historical Perspective on the Development of the Genetic Toxicity Test Battery in the United States. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51, (8-9), 781–791, ISSN 1098-2280.

Zhang C, Wen J, Li Z, Fan J., 2013. Efficacy and safety of lanthanum carbonate on chronic kidney disease-mineral and bone disorder in dialysis patients: a systematic review. BMC Nephrol; 14:226. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2369-14-226>.

<https://en.wikipedia.org/wiki/Genotoxicity>

<https://en.wikipedia.org/wiki/Sevelamer>

<https://pdf.ilacprospektusu.com/6792-anti-fosfat-cc-500mg-film-kapli-tablet-kub.pdf>

<https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+7608>

https://tr.wikipedia.org/wiki/Kalsiyum_karbonat

<http://www.ema.europa.eu/docs/en.../WC500052615.pdf>

https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-discussion/renagel-epar-scientific-discussion_en.pdf

<http://www.geocities.com/cometassay>

<https://www.ilacrehberi.com/v/anti-fosfat-cc-500-mg-100-tablet-9fcd/kub/farmakolojik-ozellikler/>



ÖZGEÇMİŞ

07.11.1994 tarihinde Tolagnaro / Madagaskar'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini doğduğu yerde tamamladı. 2011 yılında başladığı ACEEM Üniversitesi, Biyomedikal Bilimler Bölümü'nden 2015 yılında Tıbbi Laboratuvar Teknisyen unvanı alarak mezun oldu. Eğitiminin sonraki kısmına devam etmek üzere Ekim 2016'da Türkiye'ye geldi ve Kasım 2016'da Türkçe hazırlık kursuna başladı. C1 düzey sertifikasını aldıktan sonra Eylül 2017'de Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı.