

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Rima ÇELİK

EZETİMİB'İN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE *İN VİTRO* GENOTOKSİK ETKİLERİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2017

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

EZETİMİB'İN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE *İN VİTRO* GENOTOKSİK ETKİLERİ

Rima ÇELİK

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 25/9/2017 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Hasan Basri İLA
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU
ÜYE

.....
Prof. Dr. Sadık DİNÇER
ÜYE

.....
Prof. Dr. Ahmet KAYRALDIZ
ÜYE

.....
Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN
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: FDK-2015-4468**

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

DOKTORA TEZİ

EZETİMİB'İN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE *İN VİTRO* GENOTOKSİK ETKİLERİ

Rima ÇELİK

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Hasan Basri İLA
Yıl: 2017, Sayfa:73
Jüri : Prof. Dr. Hasan Basri İLA
: Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU
: Prof. Dr. Sadık DİNÇER
: Prof. Dr. Ahmet KAYRALDIZ
: Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN

Bu çalışma, bir kolesterol ilacı olan Ezetimib'in insanlar için genotoksik risk oluşturup oluşturmadığını, insan periferik lenfositlerinde *in vitro* kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom anormallliği (KA) ve mikronukleus (MN) testleri ile belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Kültüre alınmış insan periferik lenfositleri 24 veya 48 saat boyunca test maddesinin 60, 80, 100, 120 µg/ml konsantrasyonları ile muamele edilmiştir.

İnsan periferik kan kültürlerine 24 veya 48 saat uygulanan ezetimib, KKD'yi hiçbir konsantrasyonda kontrol ve çözücü kontrole göre istatistiksel olarak uyarmamıştır ($P>0.05$). Gözlenen dalgalanmalar güven sınırları içinde kalmaktadır. Ezetimib, 24 saatlik muamelede anormal hücre (AH) yüzdesini ve hücre başına düşen anormallik sayısını (KA/Hücre) sadece 100 µg/ml konsantrasyonda önemli ölçüde artırmıştır. Ajan, 48 saatlik muamelede ise en düşük doz hariç bütün konsantrasyonlarda anormal hücre yüzdesini anlamlı olarak uyarmıştır. Ezetimib ayrıca 24 saatlik muamele periyodunda 100 ve 120 µg/ml konsantrasyonları ile 48 saatlik muamelede en düşük doz hariç diğer dozlarda mikronukleus (MN) yüzdesini önemli düzeyde artırmıştır ($P\leq 0.05$). Test maddesi proliferasyon indeksinde (PI) önemli azalmalara yol açmıştır. Aynı zamanda 24 saatlik muamelede yüksek iki konsantrasyon ve 48 saatlik muamelede bütün konsantrasyonlarda saptanan PI kontrole göre önemli seviyede düşük bulunmuştur. Ezetimib'in mitotik indeks (MI) üzerine olan etkisi PI'ye benzer tarzda olmuştur. Nükleer bölünme indeksi (NBI) yönünden daha net bulgular göze çarpmaktadır. Test maddesi ile 24 saatlik muameleli kültürlerde en düşük konsantrasyon hariç diğerlerinde, 48 saatte ise bütün konsantrasyonlarda NBI'de anlamlı düşüşler saptanmıştır ($P\leq 0.05$).

Bu çalışmada gözlenen bulgulara göre Ezetimib'in yüksek konsantrasyonda ve uzun süreli muamelelerde sağlıklı insan periferik lenfositlerinde genotoksik ve sitotoksik etkiler gösterdiğini söyleyebiliriz.

Anahtar Kelimeler: Ezetimib, kromozom aberasyonu, mikronukleus, kardeş kromatid değişimi.

ABSTRACT

PhD THESIS

IN VITRO GENOTOXIC EFFECTS OF EZETİMİBE ON HUMAN PERIPHERAL LYMPHOCYTES

Rima ÇELİK

CUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Hasan Basri İLA
Year: 2017, Pages:73
Jury : Prof. Dr. Hasan Basri İLA
: Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU
: Prof. Dr. Sadık DİNÇER
: Prof. Dr. Ahmet KAYRALDIZ
: Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN

This study was conducted to determine whether ezetimibe a cholesterol drug, poses a genotoxic risk for humans by in vitro sister chromatid exchange (SCE), chromosome abnormality (CA) and micronucleus (MN) tests in human peripheral lymphocytes. Human peripheral lymphocytes were treated with concentrations of 60, 80, 100, 120 µg / ml of the test substance for 24 or 48 hours. Ezetimibe applied to human peripheral blood cultures for 24 or 48 hours did not statistically significant induce SCE at all concentrations compared to control and solvent control ($P>0.05$). Ezetimibe significantly increased the percentage of abnormal cells (AH) and the aberrations per cell (CA / Cell) at a concentration of only 100 µg/ml in the 24-hour treatment. Ezetimibe significantly altered the percentage of abnormal cells at all concentrations except for the lowest dose at 48 hours of treatment. Ezetimibe significantly increased the micronucleus (MN) percentage at the concentrations of 100 µg/ml and 120 µg/ml for 24 hour treatment, and at all concentrations in the exception of the lowest concentrations for 48 hours treatment ($P<0.05$). The test substance resulted in significant decreases in the proliferation index (PI). PI significantly decreased at the concentrations of 100 and 120 µg/ml Ezetimibe reduced the mitotic index (MI). Ezetimibe decreased significantly in NBI at all concentrations except the lowest concentration for 24 hours treatments ($P<0.05$). From the results of this study, we can say that ezetimibe shows genotoxic and cytotoxic effects in healthy human peripheral lymphocytes at high concentration and long term treatments.

Key Words: Ezetimibe, chromosome aberration, micronucleus, sister chromatid exchange.

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Kandaki kolesterol seviyesi artışı ölüm riski yüksek birçok hastalığında habercisi olmaktadır. Kalp krizi gibi ciddi sonuçları olan bir durum gerek Türkiye’de gerekse dünyada endişeyle karşılanmaktadır. Kolesterol seviyesini optimum düzeyde tutmak için doktorların sıklıkla başvurduğu tedavi biçimi ilaç kullanımıdır. Kandaki kötü kolesterol artışı birçok hastalığa zemin hazırladığı için tüm dünyada en çok kullanılan ilaçların başında gelmektedir. Dünya çapında yaklaşık 200 milyon insan kolesterol ilaçları kullanırken, 2030 yılında 370 milyona kadar çıkacağı tahmin edilen bu ilaçlara araştırmacılar da kayıtsız kalmamışlardır.

Sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın iki erkek (24 ve 25 yaşlarında) ve iki kadından (24 yaşında) alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri kromozom medyumlarına steril şartlarda 6 damla (0.2 ml) (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991) ekilmiştir. Yine steril şartlarda ve daha önce hazırladığımız BrdUrd eriyiğinden her tüpe son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde ilave edilerek iyice karıştırılmış ve hücre kültürü inkübatörde 37±1°C’de 72 saat için inkübe edilmiştir. Ezetimib’in etkisini incelemek için kültür süresinin bitiminden 24 ve 48 saat önce Ezetimib’in daha önce DMSO içerisinde hazırlanmış ve son konsantrasyonu 60, 80, 100, 120 µg/ml Ezetimib kültür tüplerine ilave edilmiştir. Test maddesi Ezetimib suda çözünmediği için çözücü kontrol (DMSO) kullanılmıştır. Hazırlanmış olan daimi preparatlar OLYMPUS CX21 marka ışık mikroskopunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir (10 × 100 = 1000 büyütmede). Bu incelemeler sırasında kardeş kromatid değişimi sayısı (KKD) ve kromozomal anormallikler belirlenmiştir. Aynı preparatlarda birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin sayısı ve toplam hücre içerisinde mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin sayısı saptanmıştır. Bu incelemeler sonucunda proliferasyon indeksi (PI) ve mitotik indeks (MI) saptanmıştır. KKD sayısı, her kişinin kan kültürüne ait preparatlardan iyi dağılmış ve ikinci mitozu geçiren 25 hücrede (dört kişiden toplam 100 hücre) saptanmıştır. Her kişinin 25 ikinci mitoz

bölünmeyi geçiren hücrelerinde KKD sayısı belirlenmiş bundan her kişi için hücre başına düşen ortalama KKD sayısı (KKD/hücre) hesaplanmıştır. Ezetimib'in DNA replikasyonu üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla PI bulunmuştur. Her kişinin kan kültüründen yapılan preparatlardan tesadüfi seçilmiş 100 hücrenin incelenmesiyle PI belirlenmiştir. Her bir kişiden hazırlanan preparatlardan iyi dağılmış kromozomlara sahip toplam 100 hücre (dört kişiden toplam 400 hücre) KA'yı saptamak amacıyla incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda KA'lı hücreler ve toplam KA sayısı saptanmıştır. Bu hücrelerde gözlenen yapı ve sayı anormallikleri kaydedilmiştir. KA'lı hücrelerin yüzdelerinin hesaplanmasında sadece yapısal kromozom aberasyonları göz önünde bulundurulmuştur. İncelenen bu 100 hücre içinde anormallik taşıyan hücrelerin yüzdesi hesaplanmıştır. Toplam KA sayısı incelenen hücre sayısına bölünerek hücre başına düşen KA sayısı (KA/Hücre) saptanmıştır. Bu çalışmada gap'lar anormallik olarak değerlendirilmemiştir. In vitro mikronukleus testinde Rothfuss ve ark. (2000)'nın geliştirdikleri yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu yöntemle göre, sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın iki erkek ve iki kadından (KKD ve KA testi için kan alınan kişilerden) alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri kromozom medyumlarına steril şartlarda 6 damla (0.2 ml) ekilmiştir ve hücreler $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 68 saat inkübe edilmiştir. Çalışmada kullanılan Ezetimib'in etkisini belirlemek için son konsantrasyon 60, 80, 100, 120 $\mu\text{g/ml}$ olacak şekilde Ezetimib kültür ortamına, kültürün başlangıcından 20 ve 44 saat sonra ilave edilmiştir. Mikronukleus sayısını belirlemek amacıyla her bir kişiye ait daimi preparatlarda her kişinin, her muamele grubu ve kontrollerinde iki nukleusa sahip (binukleer) toplam 1000 hücre incelenmiş (4 kişi 4000 hücre) ve bu binukleer hücreler içerisinde mikronukleuslu olanlar saptanmıştır. Bundan mikronukleuslu iki nukleuslu hücre %'si hesaplanmıştır. Ayrıca incelenen hücrelerde toplam mikronukleus sayısı belirlenmiştir. Toplam mikronukleus sayısından MN %'si hesaplanmıştır.

Ezetimib insan periferik kan lenfositlerinde 24 ve 48 saatlik muameleli

kültürlerde bütün konsantrasyonlarda KKD'yi uyarmamıştır. Ezetimib anormal hücre oranını 24 saatlik uygulamada sadece 100 µg/mL konsantrasyonda 48 saatlik uygulama periyotunda ise yüksek konsantrasyonlarda artırmıştır. Ezetimibin mikronukleus oluşturma potansiyeline sahip olduğu ve anormal hücre oranlarıyla benzerlikler gösterdiği anlaşılmıştır. Bu da ajanın klastojenik özelliğine işaret etmektedir. Ezetimib, bölünme indekslerinden birisi olarak değerlendirilen proliferasyon indeksi (PI) azalmasına 24 saatlik muameleli kültürlerde yüksek konsantrasyonlarda, 48 saatlik muameleli kültürlerde ise bütün konsantrasyonlarda neden olmuştur. İlginç bir şekilde mitotik indeks (MI) ve nükleer bölünme indeksi de (NBI) PI'ye benzer tarzda azalma eğrileri göstermiştir. Yaptığımız bu çalışma ile bir kolesterol ilacı olan Ezetimib'in kültüre alınmış insan periferallenfositlerinde test edilen doz ve sürelerden özellikle yüksek konsantrasyon ve 48 saatlik periyotta genotoksik ve sitotoksik etkiler gösterdiğini söyleyebiliriz.



TEŞEKKÜR

Üniversite hayatım boyunca beni bilgi ve deneyimleriyle aydınlatan, yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca bana büyük sabır, anlayış ve güler yüzle davranan, tez konumun belirlenmesinde ve yürütülmesinde her türlü desteği sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ'a sonsuz teşekkür ve minnetimi sunarım.

Danışman hocam emekli olduktan sonra kendisini daha yakından tanıma imkânı bulduğum, doktora eğitimim sırasında benden destek ve emeğini esirgemeyen, akademisyen misyonu ve abi samimiyeti ile hepimize bilgilerini aktaran, geleceğimle ilgili adımların temeli oluşturan değerli hocam Prof. Dr. Hasan Basri İLA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında her konuda yardımcı olan Uzm. Biyolog Taygun TİMOÇİN'e, Ar. Gör. Mehmet Tahir HÜSUNET'e, Uzm. Biyolog Tuba DÖRDÜ'ye teşekkür ederim.

Hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her konuda emek ve sabır gösteren, bana olan inançlarını her daim hissettiğim sevgili ailem Ahmet ÇELİK, Leyla ÇELİK, Dina ÇELİK'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tezimde bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na ve Fen Bilimleri Enstitüsü'ne maddi desteklerinden dolayı Ç.Ü. Araştırma Projeleri Birimi Yöneticilerine de teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER.....	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIV
SİMGELER VE KISALTMALAR	XVI
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
2.1. Kolesterol Düşürücülerin Sınıflandırılması.....	5
2.1.1. Statinler.....	5
2.1.1.1. Lovastatin İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları	5
2.1.1.2. Rosuvastatin İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları	8
2.1.1.3. Fluvastatin İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları	8
2.1.1.4. Atorvastatin İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları	9
2.1.1.5. Pitavastatin İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları	10
2.1.1.6. Pravastatin İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları	10
2.1.1.7. Simvastatin İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları	11
2.1.2. Resinler.....	12
2.1.2.1. Kolestipol (Kolestiramin).....	12
2.1.3. Kolesterol Emilimini Engelleyen İlaçlar	13
2.1.3.1. Ezetimib.....	13
2.1.4. Fibratlar	13
2.1.4.1. Fenofibrat İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları	13
2.1.4.2. Gemfibrozil ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	14
2.1.4.3. Bezafibrat ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	14

2.1.5. Niasin ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	14
3. MATERYAL VE METOD	17
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	17
3.1.1. Ezetimib (Test Maddesi)	17
3.1.1.1. Ezetimib'in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri.....	17
3.1.1.2. Ezetimib'in Farmakolojik Özellikleri.....	17
3.1.1.3. Ezetimib'in Farmakokinetik Özellikleri.....	18
3.1.2. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd) (Sigma).....	18
3.1.3. Cytochalasin B (Sigma).....	18
3.1.4. Entellan (Merck).....	19
3.1.5. Fiksatif.....	19
3.1.6. Giemsa (Merck).....	20
3.1.7. Hipotonik Eriyik.....	20
3.1.8. Kolşisin (Kolkisin) (Sigma).....	20
3.1.9. Kromozom Medyumu.....	21
3.1.10. Mitomycin C (MMC) (Sigma)	21
3.1.11. Nitrik Asit (HNO ₃).....	22
3.1.12. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer)	22
3.1.13. Standart Saline Citrate (SSC) Eriyiği	23
3.2. Kullanılan Deney Ekipmanları	23
3.2.1. Flow Kabin (Steril Kabin)	23
3.2.2. Hassas Terazî.....	23
3.2.3. İnkübatör.....	24
3.2.4. Mikroskop.....	24
3.2.5. pH Metre.....	24
3.2.6. Santrifüj	24
3.2.7. Su Banyosu.....	24
3.3. Lamların Temizlenmesi.....	24
3.4. Sterilizasyon	25

3.4.1. BrdUrd ve Test Maddesi Eriyiğinin Sterilizasyonu.....	25
3.5. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) (Sister Chromatid Exchange= SCE) ve Kromozom Anormalliklerini (KA) (Chromosome Aberration=CA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İnceleme	25
3.5.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması	25
3.5.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması	27
3.5.3. Daimi Preparatlarda Mikroskopik İnceleme.....	28
3.5.3.1. KKD Sayısının ve Proliferasyon İndeksinin (PI) (Replikasyon İndeksi=RI) Saptanması.....	28
3.5.3.1.(1). KKD Sayısının Saptanması.....	28
3.5.3.1.(2). Proliferasyon İndeksi (PI) (Replikasyon İndeksi=RI)'nin Saptanması	29
3.5.3.2. Kromozom Anormallikleri (KA) ve Mitotik İndeksin (MI) Saptanması	34
3.5.3.2.(1). Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması	34
3.5.3.2.(2). Mitotik İndeksin (MI) Saptanması	35
3.6. Mikronukleus (MN) Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İncelemeler	35
3.6.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması	35
3.6.2. Preparatların Boyanması.....	36
3.6.3. Mikronukleus Testi İçin Hazırlanan Preparatlarda Mikroskopik İnceleme	37
3.6.3.1. Mikronukleus Sayısı ve Nukleus Bölünme İndeksinin (NBI) Saptanması	37
3.7. Mikroskopta Fotoğraf Çekme.....	40
3.8. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi	40

4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	41
4.1. Bulgular	41
4.1.1. Ezetimib'in İnsan Periferik Lenfositlerindeki Genotoksik Etkileri ...	41
4.1.1.1. Ezetimib'in Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerine Etkileri.....	41
4.1.1.2. Ezetimib'in Kromozom Anormallikleri (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri	42
4.1.1.3. Ezetimib'in DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkileri	48
4.1.1.4. Ezetimib'in Mikronukleus (MN) Oluşumu ve Nukleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri.....	51
4.2. Tartışma.....	56
4.2.1. Ezetimib'in İnsan Periferik Lenfositlerinde Kardeş Kromatid Değişimi (KKD), Kromozom Aberasyonu (KA) ve Mikronukleus (MN) Oluşumu Üzerindeki Etkisi	56
4.2.2. Ezetimib'in Hücre Proliferasyonu, Mitoz Bölünme ve Nukleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri	59
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	73

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 4.1. Değişik konsantrasyonlarda Ezetimib ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde ve Onların Kontrol Kültürlerinde Hücre Başına Düşen Ortalama KKD Sayısı*.....	41
Çizelge 4.2. Değişik konsantrasyonlarda Ezetimib ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Lenfositlerinde ve Onların Kontrol Kültürlerinde Kromozom Anormallikleri Çeşitleri, Anormal Hücre Oranı, KA/Hücre*.....	44
Çizelge 4.3. Değişik konsantrasyonlarda Ezetimib ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan Periferal Lenfositlerinde Proliferasyon İndeksi (PI) ve Mitotik İndeks (MI).....	49
Çizelge 4.4. Değişik Konsantrasyonlarda Ezetimib ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Lenfositlerinde MN İçeren İki Nukleuslu Hücre%'si, MN %'si ve NBI.....	53



Şekil 3.1.	Kardeş Kromatid Değişiminin Olduğu ve Olmadığı Durumun Şematik Olarak Gösterilmesi (Topaktaş ve Speit, 1990).....	29
Şekil 3.2.	Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin(dU)'in kimyasal yapıları.....	30
Şekil 3.3.	BrdUrd'nin DNA Yapısına Girmesi ile Birinci, İkinci ve Üçüncü Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Ayırt Edilmesinin Şematik Olarak Açıklanması (During, 1985'e göre Topaktaş ve Speit, 1990).....	32
Şekil 3.4.	Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000).	33
Şekil 3.5.	İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000).....	33
Şekil 3.6.	Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000).	34
Şekil 3.7.	Bir nukleuslu hücre (X1000).....	38
Şekil 3.8.	İki nukleuslu hücre (X1000).	39
Şekil 3.9.	Üç nukleuslu hücre (X1000).....	39
Şekil 3.10.	Dört nukleuslu hücre (X1000).	40
Şekil 4.1.	KKD uyarılmış hücre (120 µg/ml Ezetimib, 24 saatlik muamele, ♀) (X1000).....	42
Şekil 4.2.	Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (100µg/ml Ezetimib, 24 saatlik muamele, ♂) (X1000).....	45
Şekil 4.3.	Kromozom kırığı (B'') bulunan metafaz plağı (120µg/ml Ezetimib, 24 saatlik muamele, ♂). (X1000)	45
Şekil 4.4.	Fragment (F) bulunan metafaz plağı (Çözücü kontrol, 48 saatlik muamele, ♀). (X1000)	46

Şekil 4.5.	Poliploidi olan metafaz plağı (120 µg/ml Ezetimib, 48 saatlik muamele, ♀). (X1000).....	46
Şekil 4.6.	Farklı konsantrasyonlarda Ezetimib ile 24 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde AH%'sinin konsantrasyona bağı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı	47
Şekil 4.7.	Farklı konsantrasyonlarda Ezetimib ile 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde KA/Hücre'nin konsantrasyona bağı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.	47
Şekil 4.8.	Farklı konsantrasyonlarda Ezetimib ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde PI'nin konsantrasyona bağı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.	50
Şekil 4.9.	Farklı konsantrasyonlarda Ezetimib ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde MI'nin konsantrasyona bağı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.	51
Şekil 4.10.	Tek mikronukleus içeren iki nukleuslu hücre (60 µg/ml Ezetimib, 48 saatlik muamele, ♂) (X1000)	54
Şekil 4.11.	İki mikronukleus içeren iki nukleuslu hücre (80 µg/ml Ezetimib, 24 saatlik muamele, ♀) (X1000)	54
Şekil 4.12.	Farklı konsantrasyonlarda Ezetimib ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde MN'nin konsantrasyona bağı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.	55
Şekil 4.13.	Farklı konsantrasyonlarda Ezetimib ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde NBI'nin konsantrasyona bağı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
µl	: Mikrolitre
AH	: Anormal Hücre
B'	: Kromatid Kırığı
B''	: Kromozom Kırığı
BrdUrd	: 5'-Bromo-2'-Deoxyuridine
CA	: Chromosome Aberration
CE	: Chromatid Exchange
CHO	: Chinese Hamster Ovary
Cyt-B	: Cytochalasin-B
DNA	: Deoksiribonukleik Asit
DS	: Disentrik Kromozom
dT	: Deoksitimidin
dU	: Deoxyuridine
eNOS	: Endotel Nitrik Asit Sentaz
FDA	: Food and Drug Administration
GTPaz	: Guanozin Trifosfataz
HMG-CoA	: 3-hidroksi-3metil-glutaril CoA redüktaz
HNO ₃	: Nitrik asit
HUVEC	: Primer İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücreleri
IPCS	: The International Programme on Chemical Safety
KA	: Kromozomal Anormallikleri
KCl	: Potasyum klorür
KD	: Kromatid Değişimi
KKD	: Kardeş Kromatid Değişimi
LDL	: Low Density Lipoprotein
LDLR	: Low Density Lipoprotein Receptor

MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MI	: Mitotik İndeks
MMC	: Mitomycin C
MN	: Mikronükleus
MNNG	: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
MTT	: 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid
NaCl	: Sodyum klorür
NPC1L1	: Niemann- Pick C1 Like1
P	: Poliploidi
ppm	: Parts Per Million
PC12	: Pheochromocytoma Cells
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PI	: Proliferasyon İndeksi
PK	: Pozitif Kontrol
r	: Korelasyon Katsayısı
RI	: Replikasyon İndeksi
rpm	: Rotation Per Minute (devir/dakika)
RT-PCR	: Real time PCR
SCD	: Sister Chromatid Differentiation (Kardeş Kromatidlerin Farklılaşması)
SCE	: Sister Chromatid Exchange (Kardeş Kromatid Değişimi)
SSC	: Standart Saline Citrate
T	: Translokasyon
TNFR2	: Tumor Necrosis Factor
UV	: Ultraviyole
UV-A	: Ultraviyole-A

1. GİRİŞ

Kolesterol, hayvanların vücut dokularındaki hücre zarlarında bulunan ve kan plazmasında taşınan bir sterol, yani bir steroid ve alkol birleşimidir. İlk defa 1754'te safra taşlarında kolesterol bulunduğu için bu maddenin ismi Yunanca chole- (safra) ve steros (katı) sözcükleri ile kimyadaki -ol ekinden türetilmiştir. Kolesterol pek çok biyokimyasal reaksiyonda yer almasına rağmen özellikle lipoproteinlerin kolesterolü taşıma biçimleri ve kandaki kolesterol düzeyleriyle kalp hastalıkları arasındaki bağlantıdan dolayı bilinir.

Kolesterol çoğu hücre ve dokuda HMG-CoA Redüktaz enziminin başlattığı mevalonat yolu adlı reaksiyon zinciri ile sentezlenir. Kanda aşırı miktarda kolesterol olması halinde bu kolesterol damarların çeperlerini oluşturan hücrelerde birikir. Bu birikmeyle başlayan ateroskleroz sonucunda damar tıkanabilir ve tıkanan damarın bulunduğu organa bağlı olarak, kalp krizi veya inme meydana gelebilir (Wikipedia-kolesterol).

Oksitlenmiş kolesterol içeren küçük boyutlu LDL taneciklerinin yüksek düzeyde olduğu hallerde bu LDL damar çeperlerinde aterom denen birikmelere yol açar, bu duruma ateroskleroz denir. Ateromlar hangi organın damarında birikirse o organa ait hastalıklar ortaya çıkar. Örneğin, kalbi besleyen atardamarlarda (koroner arterler) aterom koroner arter hastalığına, böbrek damarlarında yüksek tansiyona ve böbrek yetmezliğine, beyin damarlarında ise inme yol açabilir (Tymoczko ve ark. 2002).

Beyini besleyen boyun damarlarında kolesterol birikimi olması felçlere, konuşma bozukluklarına, dengesiz yürümeye, bilinç kaybına yol açar. Böbrek damarlarında kolesterol birikimi yüksek tansiyon ve böbrek yetmezliğine yol açabilir. Ana atardamarda (aort) kolesterol birikimi de tehlikelidir. Buradan kopan kolesterol birikintileri daha küçük damarları tıkayarak çok değişik sorunlara yol açabilirler. Bağırsağı besleyen damarları tıkayarak bağırsak ölümüne, göz damarlarını tıkayarak körlüğe, bacak damarlarını tıkayarak kangrene vs. yol

açabilirler. Kolesterol yüksekliğine bağlı sorunlar ortaya çıktığı zaman hasta geç kalmış olabilir. Bu nedenle kolesterol yüksekliğini önlemek, yükselmisse düşürmek çok önemlidir (ethicaincirliahastanesi).

Kolesterol yüksekliğini düşürmek için çeşitli ilaç tedavileri uygulanır. Bu ilaçların tamamına kolesterol düşürücü ilaçlar denir ve bu ilaçlar etki mekanizmasına göre 7 alt gruba ayrılmaktadır.

1. Statinler: Bu gruptaki ilaçlar; lovastatin, rosuvastatin, fluvastatin, atorvastatin, pitavastatin, pravastatin ve simvastatin gibi ilaçlardır.
2. Resinler: Kolestipol, kolestiramin ve kolesevelam bu gruptandır.
3. Kolesterol emilimini engelleyen ilaçlar: Ezetimib adlı ilaç bu grupta bulunur.
4. Kolesterol emilimini engelleyen ilaçlar ve statin kombinasyonu: Ezetimib-simvastatin bir arada kullanılır.
5. Fibratlar: Fenofibrat ve gemfibrozil gibi ilaçlardır.
6. Statinler ve kalsiyum kanal blokerleri kombinasyonu: Atorvastatin ve amlodipin bu grupta yer alır.
7. Niasin: Bu grupta niasin vardır.(hayatsağlık)

Kolesterol seviyesi artışı ölüm riski yüksek birçok hastalığında habercisi olmaktadır. Kalp krizi gibi ciddi sonuçları olan bir durum gerek Türkiye’de gerekse dünyada endişeyle karşılanmaktadır. Kolesterol seviyesini optimum düzeyde tutmak için doktoların sıklıkla başvurduğu tedavi biçimi ilaç kullanımıdır. Kandaki kötü kolesterol artışı birçok hastalığa zemin hazırladığı için tüm dünyada en çok kullanılan ilaçların başında gelmektedir. Dünya çapında yaklaşık 200 milyon insan kolesterol ilaçları kullanırken, 2030 yılında 370 milyona kadar çıkacağı tahmin edilen bu ilaçlara araştırmacılar da kayıtsız kalmamışlardır. Bu konuda yapılan çalışmalara sonraki bölümlerde yer verilmiştir (Wikipedia-

kolesterol).

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan Ezetimib diğer kolesterol düşürücü ilaçlardan farklı bir etki mekanizmaya sahiptir. Ezetimib'in moleküler hedefinin sterol taşıyıcısı Niemann- Pick C1-benzeri 1 (NPC1L1) molekülü olduğu gösterilmiştir; NPC1L1 kolesterol ve fitosterollerin bağırsaktan emiliminde rol oynar. Ezetimib ince bağırsağın fırçamsı kenarına lokalize olur ve kolesterol emilimini inhibe ederek karaciğere giden bağırsak kolesterolünü azaltır; statinler ise karaciğerde kolesterol sentezini azaltır (ilacrehberi).

Kolesterol emilimini bloke eden bir ajan olan Ezetimib ile daha önceden yapılmış çalışmalarda çeşitli sonuçlar elde edilmiştir. Bunlardan birisi olan Seedorf ve ark. (2004) çalışmalarında Ezetimib'in NPC1L1'e bağlı kolesterol alım yolunun spesifik inhibisyonuna yol açtığını göstermişlerdir. Farklı bir çalışmada Halleck ve ark. (2009) Ezetimib'in kanserojik ve genotoksik olup olmadığını araştırmışlardır. Bunun için in vitro olarak *Salmonella typhimurium* TA1535, TA97a, TA98, TA100 ve E.coli WP2uvrA suşlarında Ames testi uygulanmış; in vivo olarak da farelerde kanser bulguları ve bunların RNA örnekleri incelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre Ezetimib'in kanserojenik ve genotoksik etkiler göstermediği ortaya çıkmıştır. Gouni-Berthold ve ark. (2008) çalışmalarında da her tetkik grubunda 24 erkek (toplamda 72 sağlıklı erkekte (ort. yaş 32±9)), Ezetimibe (10 mg / gün), Simvastatin (40 mg / gün) veya bunların kombinasyonu ile 14 günlük bir muamele uygulanmış ve çalışma sonrasında hastalardan alınan kan örneklerinde HMG-CoA redüktaz ve LDLR gen ekspresyonları incelenmiştir. Ezetimib'in tek başına herhangi bir etkisinin olmadığı halde, Simvastatin ve Ezetimib-Simvastatin kombinasyonunun HMG-CoA redüktaz ve LDLR gen ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır. Kuhlencordt ve ark. (2009) Ezetimib muamelesi ile ateroproteksiyonun (damar koruması) eNOS'a (endotel nitrik oksit sentaz) bağlı olup olmadığı araştıran çalışmada dişi ve erkek farelerde Ezetimib'in, eNOS'dan bağımsız olarak ateroskleroz (damar sertliği) ve vasküler inflamasyonu (damar iltihaplanması) şiddetle azalttığını saptamışlardır. Farklı bir çalışmada FDA

kayıtlarına göre ABD’de Ezetimib veya Ezetimib/Simvastatin kombinasyonlarının verildiği hastaların 2004-2009 yılları arasında tutulan verilerine göre Ezetimib veya Ezetimib/Simvastatin kombinasyonunun kanser riskini artırmadığı açıklanmıştır (Alsheikh-Ali ve ark. 2009). Nakagami ve ark. (2009) ApoE eksikliği olan erkek farelerde Real-time PCR ve Western Blot metodları kullanılarak yaptıkları çalışmada; Ezetimib’in bu farelerde doğrudan veya dolaylı yollardan ateroskleroza önemli ölçüde önlediğini belirlemişlerdir. ABCG5 veya G8 protein genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanan, diyet sterollerinin hiperabsorpsiyonu ile sonuçlanan resesif kalıtsal bir hastalık olan sitosteroemili kişilerde, Ezetimib’in bitki sterollerinin bağırsak emilimini ve kolestrolü inhibe ettiği saptanmıştır (Salen ve ark. 2004). Ason ve ark. (2011) tarafından farelerdeki proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) inhibisyonunun LDL-c düşüşünü artırıp artıramayacağını belirlemek için yapılan çalışmalara göre, statin terapileriyle birlikte PCSK9 inhibitörlerinin hem serum kolesterolünde hem de trigliseridlerde daha fazla düşüş sağlama potansiyeline sahip olduğunun kanıtları ortaya konulmuştur. Kolesterol emiliminde gerekli olan Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1) genindeki mutasyonlar Niemann-Pick hastalığına sebep olmaktadır. Hepatositlerinde insan NPC1L1 eksprese eden transgenik fareler (L1-Tg fareleri) ile yapılan çalışmada ezetimibin bağırsakta ve karaciğerde NPC1L1 fonksiyonunu inhibe ederek plazma kolestrolünü düşürebileceği ortaya konulmuştur (Temel ve ark. 2007).

Kolesterol ilaçlarının dünyadaki kullanım yoğunluğu ve daha önceki çalışmaların birbirleriyle çelişen sonuçları bu ajanların genotoksik ve sitotoksik etkileri hakkındaki görüşlerin netleşmesine engel teşkil etmektedir. Bu durumun açığa kavuşmasına katkı sağlamak için bu doktora çalışması gerçekleştirilmiştir. Özetlenecek olursa bu çalışma, kolesterolün bağırsaklardan emilimini engelleyen ezetimib etken maddesinin, sağlıklı insanların in vitro periferik kan lenfositlerindeki kısa süreli genotoksik ve sitotoksik etkisini ortaya çıkarmak amacıyla yapılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Kolesterol Düşürücülerin Sınıflandırılması

2.1.1. Statinler

2.1.1.1. Lovastatin İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Lovastatin, statin grubu içerisinde yer almaktadır. Diyet yolu ile vücuda alınan bu madde, kolesterolün üretimini engelleyerek kandaki kolesterolün azalmasını sağlar. Böylelikle hiperkolesterolemi ile birlikte kardiyovasküler hastalıkların oluşma riski azaltılabilmektedir. Lovastatin doğada kavak mantarı ile kırmızı maya pirincinde bulunmaktadır. Vücut lovastatine genellikle iyi tolerans gösterir. Ancak çok seyrek de olsa yan etkileri görülebilmektedir. Kreatin fosfatın yükselmesi, şişkinlik, karın ağrısı, kabızlık, ishal, kas ağrısı veya ağrıları, hazımsızlık, halsizlik, bulanık görme, kızarıklık, baş dönmesi bu yan etkilere örnek gösterilebilir. Yine tüm statin grubu ilaçlarda da görüldüğü gibi nadiren miyopati, hepatotoksisite (karaciğer hasarı), dermatomiyosite veya rabdomiyolize neden olabilir (Wikipedia-lovastatin).

Keyomarsi ve ark. (1991) yaptıkları çalışmada Lovastatin maddesinin normal ve tümörlü hücrelerde hücre döngüsüne etki edip etmediğini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda normal ve tümör hücre döngülerinin Lovastatinden etkilenmediği saptamıştır.

O'Donnell ve ark. (1993) Lovastatin maddesinin altı haftalık obez Zucker sıçanlarında DNA sentezi ve proliferasyonuna etki edip etmediğini araştırmışlardır. Lovastatin'in doza bağlı olarak sıçanlardaki DNA sentezinde bir düşüşe sebep olduğunu saptamışlardır.

Choi ve Jung (1999) C6 glial hücrelerinde Lovastatin'in sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda deneyde kullanılan düşük konsantrasyonların hücre döngüsünü ve ölümünü etkilemediği ancak yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etkinin görüldüğü saptanmıştır.

Lamprecht ve ark. (1999) 24 ve 48 saatlik inkübasyon ile PtK2, T24, HeLa hücreleri ve fibroblastik L929 hücrelerinde Lovastatin'in mitotik döngülerine etkisini araştırmışlardır. Lovastatin kaynaklı mitotik bozukluklarının nedeninin Lovastatin'in kromozomların sentromerlerinin gelişimine ve işlevine müdahale etmesinden kaynakladığı düşünülmektedir.

Gnad ve ark. (2001) Rho ailesindeki küçük GTPazların, HeLa hücrelerinde genotoksik ajanlar veya TNF α ile NF-kB sinyallemesinin uyarılmasında yer alıp almadığını Lovastatin'in HeLa hücreleri ile muamelesi yapılarak western blot ve jel retardasyon yöntemiyle araştırılmıştır. Verilere dayanarak, genotoksik stres kaynaklı NF-kB sinyali için Rho GTPazların esasen gerekli olduğu sonucu ortaya atılmıştır.

Holstein ve Holh (2001) Lovastatin ve Paklitokselin'in beraber kullanıldığı durumlarda sinerjik etkisini araştırmışlardır. Çalışmayı MTT assay ve Western Blot metodlarıyla K562 hücre hattı (insan eritrolösemi) ve HL-60 hücre hattında (insan promiyelositik lösemi) yapmışlardır. Çalışmaya göre Lovastatin ve Paklitokselin birlikte kullanıldığında sitotoksik bir sinerjik etkinin olduğu saptanmıştır.

Bardeleben ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada Lovastatin'in DNA'ya zarar veren ilaçlara karşı hücresel duyarlılığı etkileyip etkilemediğini araştırmışlardır. Lovastatin'in hücreleri doksorubisine (antikanser ilaç) karşı oldukça dirençli hale getirdiğini saptamışlardır.

Damrot ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada Lovastatin'in antikanser ilaçları olan Doksorubisin ve Etoposidin' karşı insan endotel hücrelerindeki genotoksik ve sitotoksik etkileri RT-PCR, Western blot ve comet yöntemiyle araştırmışlardır. Lovastatin, insan endotel hücrelerindeki Doksorubisin'in sitotoksik potensini azaltmış, kontrol noktasındaki kinazın (Chk-1) ve stresle aktive edilmiş protein kinaz / c-Jun-N-terminal kinazın (SAPK / JNK) aktivasyonunun yanı sıra doksorubisin ile indüklenen p53'teki artışı zayıflatmıştır. Özellikle, Lovastatin aynı zamanda, etoposid'in sitotoksik ve genotoksik etkilerine karşı çapraz direnç sağlamıştır.

Nübel ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada Lovastatin'in iyonize radyasyona karşı koruyucu etkisinin olup olmadığı HUVEC (primer insan umbilikal ven endotel hücreleri) hücrelerinde araştırılmıştır. Lovastatin HUVEC hücrelerini iyonize radyasyon kaynaklı hücre ölümünden koruduğunu fakat insan fibroblastlarında radyasyona karşı herhangi bir direnç sağlayamadığını açıklamışlardır.

Ajith ve Soja (2006) statinler grubundan Lovastatin'in antimutajenik etkisini araştırmıştır. Aynı anda NPDA ile NaN_3 *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları Lovastatin ile muamele edilmiştir. Muamele sonucunda Lovastatin'in antimutajenik etkisinin olduğunu saptamışlardır.

Gauthaman ve ark. (2007) statinlerin kanser hücreleri üzerinde apoptotik etkisinin olup olmadığını araştırmışlardır. Lovastatin'in yumurtalık ve kolorekteal kanser hücrelerinde apoptotik genlerin aktivasyonunda bir artışa neden olduğunu ve hücreleri apoptoza sevk ettiğini saptamışlardır.

Ostrau ve ark. (2009) HMG-CoA redüktaz inhibitörü olan Lovastatin'in in vivo ortamda radyasyon muamelesi yapıldıktan sonra normal doku toksisitesini indükleyip indüklenmediğini araştırmışlardır. Lovastatin'in in vivo normal dokuda radyasyon kaynaklı hücre ölümünü inhibe ettiğini ve bu nedenle, Lovastatin'in radyoterapinin neden olduğu normal doku hasarını seçici olarak hafifletmek için yararlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Henniger ve ark. (2012) ana detoksifikasyon organı olan karaciğere yüksek konsantrasyonlarda ve sürekli olarak çeşitli çevresel ajanlar, genotoksik bileşikler göndermişlerdir. Lovastatin'in karaciğer üzerinde koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmak için fareleri doksorubisin ile muamele edilip daha sonra Lovastatin ile tedavi etmişlerdir. Tedavi edilen farelerin gen ekspresyonları yapılmıştır. Mevcut DNA hasarında azalma görülmüştür.

2.1.1.2. Rosuvastatin İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Rosuvastatin yüksek kolesterol ve ilişkili durumları tedavi etmek ve kardiyovasküler hastalığı önlemek için egzersiz, diyet ve kilo kaybı ile kombinasyon halinde kullanılan statinlerin ilaç sınıfının bir üyesidir Rosuvastatin, diğer statinlere benzer bir etki mekanizmasına sahip olan HMG-CoA redüktaz enzimi inhibitörüdür (Wikipedia-rosuvastatin).

Berber ve ark. (2013), Rosuvastatin ile yaptıkları çalışmada bu ilacın insan periferik lenfositlerinde genotoksik etkisinin olup olmadığını comet, KA ve MN testleri ile incelemişler ve bu ilacın genotoksik olduğunu saptamışlardır.

Orsolin ve ark. (2015) Rosuvastatin'in mutajenik etkiye sahip olup olmadığını araştırmışlardır. Bu çalışmada *Drosophila melanogaster*'in somatik hücrelerinde *Drosophila* wing spot testi kullanılmış ve bu test sonucuna göre Rosuvastatinin mutajenik potansiyeli olmadığını saptamışlardır.

2.1.1.3. Fluvastatin İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Fluvastatin hiperkolesteroleminin tedavisinde ve kardiyovasküler hastalığın önlenmesinde kullanılan statin ilaç sınıfının bir üyesidir.

Fluvastatin, kolesterol sentezinde önemli bir adımı kolaylaştıran karaciğer enzimi HMG-CoA redüktazı bloke ederek çalışır. İlaç bağırsaktan hızlı ve hemen hemen tamamen emilir (% 98) (Wikipedia-fluvastatin).

Robison ve ark. (1994) Fluvastatin'in genotoksik potansiyelini, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* (gen mutasyonları), V79 Çin hamster hücreleri (HGPRT gen mutasyonları, kromozomal sapmalar), sıçan hepatosit primer kültürleri (DNA tamiri) ve BALB / 3T3 hücreleri (habis Dönüşümler), in vivo olarak fare kemik iliği mikronukleus testi ve klastojenite testleri yaparak araştırmışlardır. Bu testlerin tümünde, Fluvastatin'in herhangi bir genotoksik potansiyele sahip olmadığını saptamışlardır.

Imaeda ve ark. (2002) Fluvastatin'in hücreleri metabolitlerin in vitro oksidatif DNA hasarına karşı koruyup koruyamadığı araştırmışlardır. Farelere

uygulanan 7 günlük Fluvastatin tedavi sonrasında comet incelemeleri yapılmış ve Fluvastatin'in streptozin kaynaklı DNA hasarına karşı hücreyi koruduğunu ve in vivo oksidatif stres riskini azaltabileceğini bildirmişlerdir.

2.1.1.4. Atorvastatin İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Lipitor ticari ismi altında pazarlanan Atorvastatin, statin olarak bilinen ilaç sınıfının bir üyesidir ve bunlar başta lipid düşürücü bir madde olarak ve kardiyovasküler hastalıkla ilişkili olayların önlenmesi için kullanılır. Atorvastatin, tüm statinler gibi vücuttaki kolesterol üretiminde önemli bir rol oynayan karaciğer dokusunda bulunan bir enzim olan HMG-CoA redüktazı inhibe ederek çalışır (Wikipedia-atorvastatin).

Ciaravino ve ark. (1995) Atorvastatin'in genotoksik etkisini in vivo ve in vitro olarak incelemişlerdir. Bu çalışmada in vitro Çin hamsterlerin V79 hücrelerinde in vivo olarak da CD-1 farelerinde KA ve MN testleri yapılmıştır. Araştırma sonucuna göre Atorvastatin'in KA ve MN'yi uyarmadığı açıklanmıştır. Ayrıca *Salmonella typhimurium* ve *E.coli* bakterilerde S9 mix varlığında ve yokluğunda herhangi bir genotoksik etki göstermediği saptanmıştır.

Ajith ve Soja (2006) statinler grubundan Atorvastatin'in antimutajenik etkisini araştırmıştır. Aynı anda NPDA ile NaN₃ *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları Atorvastatin ile muamele edilmiştir. Muamele sonucunda Lovastatin'in antimutajenik etkisinin olduğunu saptamışlardır.

Coetsee ve ark. (2008) Atorvastatin'in genotoksik etkilerini araştırmak için farelere beş gün boyunca 70mg/kg/gün Atorvastatin vermişlerdir. Beş günün sonunda comet deneyi yapılmış ve Atorvastatin'in genotoksik olduğu bildirilmiştir.

Gajski ve ark. (2008) comet, KA ve KKD, MN testleri ile insan periferel lenfositlerinde Atorvastatin genotoksik olup olmadığını araştırmışlardır. Kültürdeki lenfositler 72 saat inkübasyon geçirmişlerdir. Bu çalışmaya göre Atorvastatin'in genotoksik olduğu saptanmıştır.

Rocco ve ark. (2010) Atorvastatin'in zebra balıklarında comet ve RAPD – PCR testi kullanılarak ve bu ilacın genotoksik etkiye sahip olduğu saptanmıştır.

2.1.1.5. Pitavastatin İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Pitavastatin (genellikle bir kalsiyum tuzu olarak), kan kolesterolü düşürücü olarak pazarlanmaktadır. Diğer statinler gibi, kolestrol sentezinin ilk adımını katalize eden enzim olan HMG-CoA redüktaz inhibitörüdür. Çoğu statin, kısmen bir veya daha fazla hepatik sitokrom P450 enzimi tarafından metabolize edilir ve bu da ilaç etkileşimleri ve belirli gıdalarla (greyfurt suyu gibi) sorunlar için potansiyelin artmasına neden olur. Pitavastatin CYP2C9'un bir substratıdır ve CYP3A4 ise diğer statinlerdeki ortak etkileşim kaynaklarıdır. Sonuç olarak, Pitavastatin, CYP3A4 yoluyla metabolize olan ilaçlarla etkileşime girme olasılığı düşüktür; bu da birden fazla ilaç almak zorunda olan yaşlı hastalar için önemli olabilir (Wikipedia-pitavastatin)

Maejima ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada Pitavastatin'in kromatin yapılarını nasıl değiştirdiğini araştırmışlardır. Bunun için HUVEC (umbilikal ven endotel hücreleri) hücrelerinde microarray yöntemi ile SiRNA incelemeleri yapmışlardır. KLF4 (Kruppel like factor) Pitavastatin ile kromatin yapı değişikliğini indüklediğini saptamışlardır.

2.1.1.6. Pravastatin İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Pravastatin kolesterolü düşürmek ve kardiyovasküler hastalığı önlemek için diyet, egzersiz ve kilo kaybı ile kombine olarak kullanılan statinler sınıfının bir üyesidir. Pravastatin, iki yol ile lipoprotein düşürücü ilaç olarak işlev görür. Ana yolda pravastatin, hidroksimetilglutaril-CoA (HMG-CoA) redüktaz işlevini inhibe eder. Pravastatin, düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) öncülü olan çok düşük yoğunluklu lipoproteinlerin sentezini de engeller. Bu engellemeler, hücresel LDL reseptörlerinin sayısını artırır, böylece LDL alımları artar, böylece kan dolaşımından uzaklaştırılır (Wikipedia-pravastatin).

Campbell ve ark. (2006) Statinlerin meme kanseri hücreleri üzerindeki etkileri, hem in vitro hem de in vivo olarak ve onların etki mekanizmalarını belirlemeyi amaçlamışlardır. In vivo sonuçlara göre oral yolla verilen statinlerin önemli ölçüde fare meme karsinomasının büyümesini engellemiş hücre proliferasyonu düşürerek in vitro antikanser aktivitesiyle ilişkili olduğunu saptamışlardır.

Coetsee (2008) Pravastatinin genotoksik etkisi araştırmak için C57BI/J6 farelerine her gün bir kere oral olarak 70mg/kg olmak üzere beş gün Pravastatin vermiştir. Comet testi ile yapılan bu çalışma sonucunda Pravastatin'in genotoksik olduğunu saptamıştır.

Minagh (2008) Pravastatin ile yaptığı bu çalışmada in vitro PLHC-1 (zebra balığı karaciğer dokusundaki hücreler) ve RTG-2 (gökkuşağı alabalığı yumurtalığı) hücre hatlarında comet testi ile araştırmıştır. Bu araştırmadan alınan sonuçlara göre bu ilacın genotoksik etkiye sahip olmadığı saptamıştır.

2.1.1.7. Simvastatin İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Zocor markası altında pazarlanan Simvastatin, lipit düşürücü bir ilaçtır. Yüksek lipid (yağ) seviyelerini düşürmek için egzersiz, diyet ve kilo kaybı ile birlikte kullanılır. Aynı zamanda, yüksek risk altındaki kişilerde kalp problemleri riskini azaltmak için de kullanılır. Simvastatin Merck tarafından geliştirilmiş ve 1992'de tıbbi kullanıma girmiştir. Dünya Sağlık Örgütü Temel İlaç Listesinde yer almaktadır. Simvastatin mantar *Aspergillus terreus*'dan elde edilmiştir (Wikipedia-simvastatin).

Graaf ve ark. (2004) statinlerin kanser üzerine etkisini araştırmak için kanser hastası olan insanların bir kısmına statin tedavisi uygulamış, kalan kısmına ise statin tedavi uygulamamışlardır. Yapılan tedavi sonrasında kanser hastalarında tümör incelemeleri yapılmış ve statin ile tedavi edilen hastaların tümör seviyelerinde azalma gözlemlenmiştir.

Strandberg ve ark. (2004) statinlerin kanser riski olup olmadığını saptamak için 10 yıl süren bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmanın neticesinde statinlerin kanser riski oluşturmadığını bildirmişlerdir.

Pernice ve ark. (2006) üremik hastalarda kardeş kromatid değişimi sıklığı genel popülasyondan belirgin olarak daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Simvastatin ile tedavi gören üremik hastalarında bu yüksek KKD oranının önemli derece azaldığını saptamışlardır.

Gauthaman ve ark. (2007) statinlerin kanser hücreleri üzerinde apoptotik etkisinin olup olmadığını araştırmışlardır. Yumurtalık ve kolorekteal kanser hücrelerinde in vitro olarak incelendiğinde Simvastatin'in apoptotik genlerin aktivasyonuna bir artışa neden olduğu ve hücreleri apoptoza sevk ettiğini bildirmişlerdir.

Manfredini ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada Simvastatin'in DNA'ya zarar verip vermediğini insan periferik lökositlerinde comet testi ile araştırmışlardır. Hastalara uygulanan Simvastatin tedavisinin oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu bir etkisinin olduğu saptamışlardır.

2.1.2. Resinler

Safra asidi bağlayıcıları olarak bilinen resinler, LDL'yi düşürmek suretiyle kan kolesterolünü yönetmede kullanılan başka bir ilaç sınıfıdır. Resinler, kolesterol kullanılarak yapılan safra asitlerine bağlanırlar ve safra asitlerini sindirim sisteminden tamamen geçirmeye zorlarlar. Bu da vücudun safra asidi üretmek için daha fazla kolesterol kullanmasına yol açar ve bunun sonucunda kolesterol seviyesi düşer.

2.1.2.1. Kolestipol (Kolestiramin)

Sindirim kanalında emilmeyen yüksek molekül ağırlıklı sentetik anyon değiştirici, safra asidini bağlayan reçinedir.

2.1.3. Kolesterol Emilimini Engelleyen İlaçlar

2.1.3.1. Ezetimib

Bu çalışmada kullandığımız test maddesidir. Giriş bölümünde detaylı bilgi verilmiştir.

2.1.4. Fibratlar

2.1.4.1. Fenofibrat İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Müller ve ark. (1995) Fenofibrat'ın sitotoksik ve genotoksik etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar in vitro olarak sıçan karaciğerini kültüre edip Fenofibrat ile muamele etmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre Fenofibrat mitotoik indeksi düşürmesine rağmen mikronükleus sayısında ciddi bir artışa neden olmamıştır.

İsiori ve ark. (2007) yapmış oldukları çalışmada Fenofibrat'ın genotoksik etkisini incelemişlerdir. Çalışmada *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 ile *E.coli* PQ37 bakterileri kullanılmıştır. Bu araştırmanın sonuçlarına göre Fenofibratın genotoksik olduğu ortaya çıkmıştır.

Tawfeeq ve ark. (2010) Fenofibrat'ın genotoksik potansiyele sahip olup olmadığını araştırmak için, karaciğeri kısmen alınmış (hepatektomi) erkek sıçanlara 2 hafta süreyle 0,1000 ve 2000 mg/kg Fenofibrat oral yolla vermiştir. Sıçanların karaciğer dokusu alınarak comet testi yapılmış ve DNA tamir genlerinin çalışıp çalışmadığı incelenmiştir. Comet testinde, Fenofibrat muamelesini takiben 3 saat sonra alınan örnekte pozitif sonuçlar elde edilmiştir. DNA tamir genleri incelendiğinde de en yüksek Fenofibrat konsantrasyonu ile muameleyi takiben 3 saat sonra alınan örneklerde Apex1, Ogg1 ve Mlh1 gibi DNA tamir genlerinin ekspresyonunda artış tespit edilmiştir. Bu çalışmada Fenofibratın sıçan karaciğerlerinde DNA hasarına yol açtığı, fakat bazı DNA tamir genlerinin artması ile tamir edilen DNA hasarı olduğu için Fenofibrat'ın güçlü bir genotoksik etkisinin olmadığı saptanmıştır.

2.1.4.2. Gemfibrozil ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Sallustio ve ark. (1997) Gemfibrozilin genotoksik potansiyelini *E.coli* JM105 bakterilerinde ve M13 ileri mutasyon testi ile analiz ettiklerinde bu maddenin genotoksik risk oluşturabileceğini açıklamışlardır.

İsidori ve ark. (2007) yapmış oldukları çalışmada Gemfibrozilin genotoksik etkisini incelemişlerdir. Çalışmada Ames testinde *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 ile SOS Chromotest *E.coli* PQ37 bakterileri kullanılmıştır. Bu araştırmanın sonuçlarına göre Gemfibrozilin genotoksik olduğu ortaya çıkmıştır.

2.1.4.3. Bezafibrat ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

İsidori ve ark. (2007) yapmış oldukları çalışmada Bezafibratın genotoksik etkisini incelemişlerdir. Çalışmada Ames testinde *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 ile SOS Chromotest *E.coli* PQ37 bakterileri kullanılmıştır. Bu araştırmanın sonuçlarına göre Bezafibratın genotoksik olduğu ortaya çıkmıştır.

2.1.5. Niasin ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Niasin suda çözünür bir vitamindir. Türevleri olan NADH, NADPH, NAD ve NAD⁺ hücrelerde enerji metabolizması, nükleik asit, protein, yağ ve karbonhidrat metabolizmasında gereksinim duyulan zorunlu bir vitamindir. İlk defa 1955 yılında Niasin'in lipid düşürücü özelliğine sahip olduğunu açıklanmıştır. Bu nedenle Niasini en eski lipid düşürücü ilaç sayılmaktadır. Kan kolesterolünü ve trigliserid'ini yan etkisi olmadan düşürebildiği için Niasin doktorlar tarafından bu amaçla sıklıkla kullanılmaktadır. Niasin yağ dokusundaki niasin reseptörü 1 (NIACR1) ve niasin reseptör 2 (NIACR2)'ye bağlanarak kan lipidini düşürür (Wikipedia-niasin).

Yong ve Peterson (2010) da yaptıkları çalışmada insan popülasyonunda iyonize radyasyona maruz kalmış kişilerde Niasin maddesinin DNA koruyucu özelliğinin olup olmadığı araştırmışlardır. Bunun için havayollarında aktif çalışan

iyonize radyasyona maruz kalan 35- 56 yaş aralığında olan 82 erkek pilot üzerinde inceleme yapılmıştır. Donörlere ayda altı veya daha fazla Niasin takviyesi yapılmıştır. Periferik lenfosit ve floresan in situ hibridizasyon yöntemi kullanılmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda Niasin'in DNA hasarı koruyucu özelliği olduğu saptanmıştır.





3. MATERYAL VE METOD

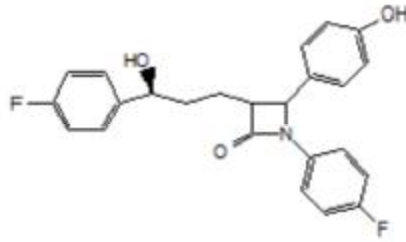
Bu çalışmada test maddesi olarak kolesterol düşürücü bir ilaç olan ezetimib, materyal olarak da sigara içmeyen yaşları birbirine yakın sağlıklı iki erkek (24ve 25 yaşlarında) ve iki kadından (24yaşında) alınan periferik kan kullanılmıştır.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.1.1. Ezetimib (Test Maddesi)

3.1.1.1. Ezetimib'in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Ezetimib, C₂₄H₂₁F₂NO₃ molekül yapısına sahiptir ve molekül kütlesi 409,4 g/mol'dür. IUPAC tarafından verilen sistematik adı 1-(4-florofenil)-3(R)-3-(4-florofenil)-3-((Shidroksipropil)- 4(S)-(4-hidroksifenil)-2-azetidinon'dur. Erime noktası 164–166 °C (327–331 °F) arasındadır. Kristal formda beyaz renkli bir tozdur. Suda ve asetonitrilde çözünürlüğü az iken, metanol, etanol, 1-propanol ve 2-propanolde çözünürlüğü yüksektir. pKa değeri yaklaşık 9,75 ± 0,30'dur (Kul 2011).



Ezetimib açık formül

3.1.1.2. Ezetimib'in Farmakolojik Özellikleri

Kolesterol emilim inhibitörlerinden olan ezetimib, ince bağırsağın tüylü çeperinde toplanır ve bağırsak kolesterolünün karaciğere gitmesini engeller.

Karaciğer kolesterol depolarında azalma sağlar. Ezetimib safra asidi salgısını artırmaz ve statinler gibi karaciğerde kolesterol sentezini azaltır (Van Heek 2000, Yola 2009).

3.1.1.3. Ezetimib'in Farmakokinetik Özellikleri

Ezetimib oral yolla alındıktan sonra emilir ve aktif metaboliti olan Ezetimib-glukoronid'e konjuge olur (Van Heek 2000). Ezetimib'in yarı ömrü 22 saattir. İnsan plazma proteinlerine %90'dan daha yüksek oranda bağlanır. Ezetimib ve Ezetimib-glukoronid plazmadan yavaş elimine olurlar. İnce bağırsak ve karaciğerde Ezetimib-glukoronid konjugasyonundan sonra metabolize olur (Van Heek 2002).

3.1.2. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd) (Sigma)

BrdUrd kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını sağlamak amacıyla kullanılmıştır. BrdUrd eriyiği bidistile su içerisinde hazırlanmış, daha sonra 0.2 µm por çapındaki membran filtre (Sartorius marka) ile steril edilmiştir. Bu eriyikten 50 µl alınarak kültür tüplerine ilave edildiğinde kültür, son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde BrdUrd içermiştir.

Kimyasal adı: 5'-Bromo-2'-deoxyuridine

Kapalı formülü: C₉H₁₁BrN₂O₅

Molekül ağırlığı: 307.10 g/mol

Erime noktası: 191-194°C

CAS No: 59-14-3

Sigma No: B 5002

3.1.3. Cytochalasin B (Sigma)

Mikronukleus (MN) testinde, hücre bölünmesi sırasında sitokinezi engellemek ve iki nukleuslu hücreler oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. 5 mg

Cytochalasin B'yi, 3 ml %50'lik etil alkolde çözerek 0.6mg/ml stok çözelti elde edilir.

Kimyasal adı: Cytochalasin B

Kapalı formülü: $C_{29}H_{37}NO_5$

Molekül ağırlığı: 479.61 g/mol

Erime noktası: 218-223°C

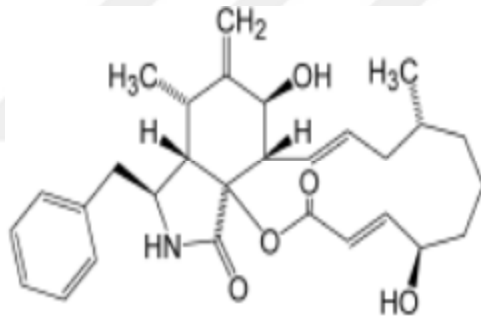
Kaynama noktası: 218-223°C

Safılık düzeyi: %98

CAS No: 14930-96

Sigma No: C-6762

Açık formülü:



Cytochalasin B açık formülü

3.1.4. Entellan (Merck)

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

3.1.5. Fiksatif

KKD ve KA'yı incelemek amacıyla yapılan preparasyon için kullanılan fiksatif, 1 hacim glacial asetik asit'in 3 hacim metanol ile karıştırılması sonucu

hazırlanmıştır. MN inceleme amacıyla yapılan preparasyon için ise iki farklı fiksatif kullanılmıştır. İlk fiksatif muamelesi için 1 kısım glasiyal asetik asit 5 kısım metanol ile karıştırıldıktan sonra bu karışım 1/1 oranında %0.9 NaCl ile seyreltilmesiyle (1/5/6) hazırlanmıştır. Diğer fiksatifler ise 1 hacim glasiyal asetik asit 5 hacim metanol (1;5) karıştırılmasıyla elde edilmiştir. Fiksatif kullanılmadan iki saat önce hazırlanmış ve buzdolabında saklanmıştır. Her seferinde preparat yapım işleminden iki saat önce taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır.

3.1.6. Giemsa (Merck)

Giemsa boyası Merck firmasından (Cat. No. 9204) temin edilmiştir. Sorensen tamponu içinde hazırlanıp, filtre edilmiş % 5'lik boya eriyiği, kromozomları ve MN testinde nukleusları boyamak için kullanılmıştır.

3.1.7. Hipotonik Eriyik

% 0.4'lük KCl (Merck) hipotonik eriyik olarak kullanılmıştır. Eriyik bidistile su içerisinde stok halinde hazırlanıp, ağzı kapalı cam kap içerisinde buzdolabında (+4°C) saklanmıştır. Her preparasyondan yaklaşık bir saat önce yeterli miktarda hipotonik eriyik alınmış, inkübatör ile 37°C'ye kadar ısıtılarak kullanılmıştır.

3.1.8. Kolşisin (Kolkisin) (Sigma)

Kolşisin (Colchicine) (Sigma Cat. No. C9754), KKD ve KA'yı inceleme amacıyla preparatların hazırlanmasında mitotik zehir olarak kullanılmıştır. Kolşisin eriyiği steril saf su içerisinde hazırlanmış ve kromozom medyumunun her mililitresinde 0.06 µg olacak şekilde (0.06 µg/ml) 2.7 ml'lik kromozom medyumunu içerisindeki hücre kültürüne ilave edilmiştir. Kolşisin'e ait özellikler aşağıda verilmiştir.

Kimyasal adı: Colchicine

Kapalı formülü: C₂₂H₂₅NO₆

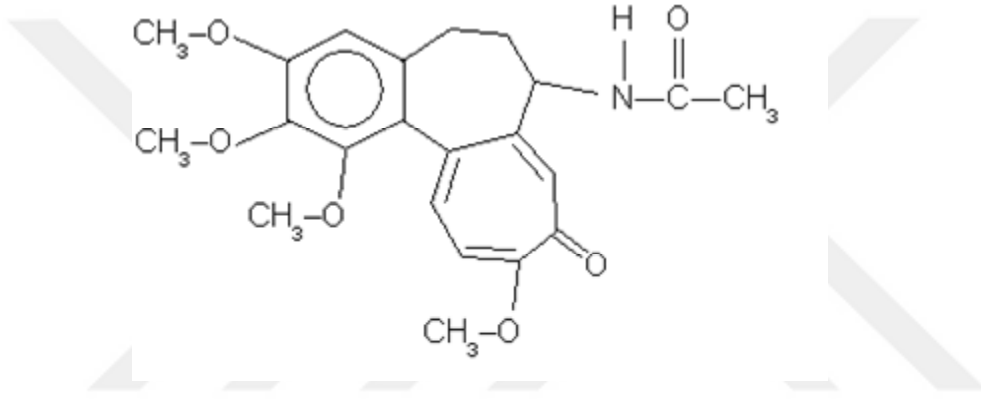
Molekül ağırlığı: 399.4

Etil asetat içeriği: %3.4

Kloroform içeriği: < %0.1

Sigma No: C-9754

Açık formülü:



Kolşisin açık formülü

3.1.9. Kromozom Medyumu

Bu çalışmada Gibco firmasının ürettiği PB Max. Kromozom medyumu (cat.no. 12552-013) hücre kültürü için kullanılmıştır. PB Max medyumu tam medyumdur. Fakat heparin içermemektedir. Bu medyum her tüpe 2.5 ml olacak şekilde paylaştırılmış ve bu miktarlarda kullanılmıştır. Kültür tüpleri steril olarak temin edilmiştir.

3.1.10. Mitomycin C (MMC) (Sigma)

Mitomycin C, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Stok, 2 mg Mitomycin C'yi 30 mL steril saf suda çözerek elde edilir.

Kimyasal adı: 6-Amino-1,1a,2,8,8a,8b-hexahydro-8-(hydroxymethyl)-8amethoxy-5-methyl-azirino[2',3':3,4] pyrrolo[1,2-a]indole-4,7-dione carbamate (ester)

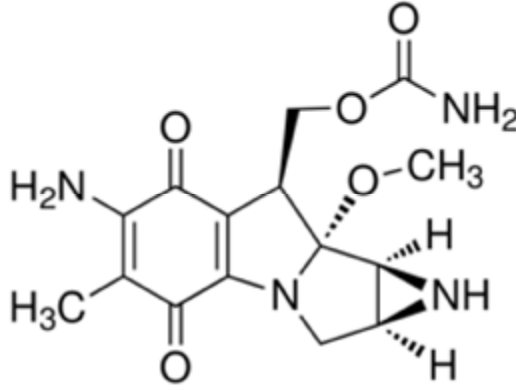
Kapalı formülü: C₁₅H₁₈N₄O₅

Molekül ağırlığı: 334.33 g/mol

Erime noktası: >360°C

CAS No: 50-07-7

Açık formülü:



Mytomycin C açık formülü

3.1.11. Nitrik Asit (HNO₃)

Lamları temizlemek amacıyla 1 N çözelti olarak hazırlanmıştır. Plastik şişede saklanarak her defasında tekrar tekrar kullanılmıştır.

3.1.12. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer)

KKD'ni incelemek amacıyla preparat yapımı sırasında preparatlar Sorensen tamponu içerisinde UV lambası ile ışınlandırılmıştır. Ayrıca bu tampon %5'lik Giemsa boyası hazırlanmasında da 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.

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).

3.1.13. Standart Saline Citrate (SSC) Eriyiği

11.05 gr tri sodyum sitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) tartılarak bir miktar saf su içerisinde eritilmiştir. Daha sonra 21.9 gr NaCl tartılarak yine saf su içerisinde ancak ayrı bir kapta eritilmiştir. İki eriyik, bir şişeye dökülerek iyice karıştırılmış ve üzerine 500 ml oluncaya kadar saf su ilave edilmiştir. Hazırlanan bu stok eriyik $5 \times \text{SSC}$ 'dir ve bu eriyik buzdolabında saklanmıştır. KKD'yi incelemek için deney yapılırken bu stoktan 20 ml alınarak üzeri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlanmış ve elde edilen $1 \times \text{SSC}$ eriyiği kullanılmıştır.

3.2. Kullanılan Deney Ekipmanları**3.2.1. Flow Kabin (Steril Kabin)**

Hücre kültürü tüplerine kromozom mediumu konulması, kan ekiminin yapılması, test eriyiklerinin ve kültür tüplerine ilave edilmesi sırasında steril bir ortam olarak, % 99.9 partikül tutma özellikli filtreye sahip, $1500 \text{ m}^3/\text{h}$ emiş kapasiteli, UV ve flüoresan ampülü olan LABORMED marka flow kabin kullanılmıştır.

3.2.2. Hassas Terazî

Hava akımlarına karşı özel cam paravanlarla korunan ve 0.0001 gr hassasiyetindeki GEC AVERY marka terazî kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.

3.2.3. İnkübatör

Hücre kültürünün yapılmasında ve bazı eriyiklerin 37°C'ye kadar ısıtılmasında Incucell marka 0°C -100°C ayarlanabilir inkübatör kullanılmıştır.

3.2.4. Mikroskop

Koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan OLYMPUS marka binoküler ışık mikroskobu preparat incelemeleri sırasında kullanılmıştır. Fotoğraflar ise yine OLYMPUS marka mikroskopta dijital olarak çekilmiştir.

3.2.5. pH Metre

Kimyasalların pH değerlerini saptamak için WTW 315i (Germany) marka pH metre kullanılmıştır.

3.2.6. Santrifüj

Rotor çapı 21 cm olan ve 4000 devir/dk'ya (rpm) kadar yükselebilen devir hızı, 99 dk.'lık zaman ayarlayıcı, açılabilir başlığa sahip ve 28 tüp kapasiteli HETTICH UNIVERSAL marka santrifüj çalışmalarda kullanılmıştır.

3.2.7. Su Banyosu

Hücre kültürü preparatları hazırlandıktan sonra, kardeş kromatidlerin farklı boyanmasında kullanılan SSC eriyiğinin 58-60°C'de sabit kalmasını sağlamak amacıyla BM 302 NÜVE marka 0-60°C ayarlanabilir su banyosu kullanılmıştır.

3.3. Lamların Temizlenmesi

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

3.4. Sterilizasyon

3.4.1. BrdUrd ve Test Maddesi Eriyiğinin Sterilizasyonu

BrdUrd eriyiği steril bir erlen içinde bulunan ve steril olan saf su içinde 5'-bromo-2'-deoxyuridine maddesinin eritilmesiyle hazırlanmıştır. Bu eriyik steril şartlarda por çapı 0.2 µm olan bakteri filtresinden (Sartorius, membran filtre) geçirilerek steril edilmiştir. Sonra vida kapaklı steril cam kültür tüplerine konulan bu eriyik, etrafı alüminyum folyo ile kapatılarak buzdolabında saklanmıştır. Test maddesi DMSO ile çözüldüğü için tekrar steril etmeye ihtiyaç duyulmamıştır.

3.5. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) (Sister Chromatid Exchange= SCE) ve Kromozom Anormalliklerini (KA) (Chromosome Aberration=CA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İnceleme

İnsanlarda genotoksik etkiye sahip olabilecek mutajenlerin ve kanserojenlerin genotoksik etkilerinin saptanması başta KKD, KA, MN ve comet testleri yardımıyla saptanabilmektedir. Bu tür çalışmalar planlanırken, uygulanırken ve yorumlanırken uluslararası yönergelere uygun hareket edilmesi zorunluluğu bulunmaktadır. Bundan dolayı Ezetimib'in insan lenfositlerindeki genotoksik etkilerinin olup olmadığının araştırıldığı bu çalışma Albertini ve ark. (2000)'ları tarafından yayınlanan IPCS (The International Programme on Chemical Safety) yönergesine göre gerçekleştirilmiştir.

3.5.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Bu çalışmada KKD ve KA'ni saptamak amacıyla hücre kültürünün yapılması ve preparatların hazırlanması Evans (1984), Perry ve Thompson (1984)'un metotlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın iki erkek (24 ve 25 yaşlarında) ve iki kadından (24 yaşında) alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri kromozom medyumlarına steril şartlarda 6 damla (0.2 ml) (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991) ekilmiştir.

Yine steril şartlarda ve daha önce hazırladığımız BrdUrd eriyiğinden her tüpe son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde ilave edilerek iyice karıştırılmış ve hücre kültürü inkübatörde 37±1°C'de 72 saat için inkübe edilmiştir. Ezetimib'in etkisini incelemek için kültür süresinin bitiminden 24 ve 48 saat önce Ezetimib'in daha önce DMSO içerisinde hazırlanmış ve son konsantrasyonu 60, 80, 100, 120 µg/ml Ezetimib kültür tüplerine ilave edilmiştir. Test maddesi Ezetimib suda çözünmediği için çözücü kontrol (DMSO) kullanılmıştır. Ayrıca 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde pozitif kontrol olarak MMC kullanılmıştır. MMC tüplere son konsantrasyonu 0.25 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (yani kültürün 70. saatinde) her tüpe hazırlanan kolşisin eriyiğinden ilave edilmiş (0.06 µg/ml) ve tüpler hafifçe sallanarak iyice karıştırılmıştır. Hücreler 2 saat süresince (37°C'de) kolşisin ile ön muameleye tabi tutulmuştur.

Kültür süresinin sonu olan 72. saatin bitiminde preparat yapma işlemine geçilmiştir. Kültür tüpleri 2000 devir/dk'da 5 dk. santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri içeren 0.5-0.7 ml'lik sıvı iyice karıştırıldıktan ve hücreler resüspanse edildikten sonra tüplere, etüvde 37°C'de tutulan hipotonik eriyik ilave edilmiştir. Bu eriyiğin ilavesi damla damla ve karıştırarak yapılmıştır ve hücre süspansiyonu pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Aksi halde hücrelerde kümeleşme olmakta ve amaca uygun olmayan preparatlar hazırlanmaktadır. Her tüpe 5 ml hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler, ağzı kapatılarak inkübatöre konulmuştur. Hücreler 5 dk. hipotonik eriyikte 37°C'de muamele edilmiştir. Sürenin sonunda tüpler 10 dk. 1200 devir/dk santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. Daha sonra hipotonik eriyik ilavesinde olduğu gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 5 ml olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edilmiştir. Hücreler oda sıcaklığında 20 dk. fiksatif ile muamele edilmiş ve sonra hücre süspansiyonu 1200 devir/dk 10 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem 3 kere tekrarlanmıştır. 3. fiksatif muamelesinin sonunda tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görülmüştür. Her

fiksatif ilavesinden sonra tüpler santrifüj edilerek üstteki sıvı atılmıştır. Son santrifüjden sonra tüplerin dibinde 0.5-0.7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra preparat yapma işlemine geçilmiştir. Tüpün dibinde toplanan hücreler pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Pasteur pipetine 4-5 damla olacak şekilde bu hücre süspansiyonundan çekilmiştir. Özel olarak hazırlanmış düzeneğe tutturulan pasteur pipetinden daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanmış lamaların üzerine 50 cm yükseklikten farklı alanlara 1'er damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak (her lama 3-4 damla) hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerinde yayılması sağlanmıştır. Hücre süspansiyonunun lamlara damlatılması esnasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.

3.5.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması

Bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını (Sister Chromatid Differentiation = SCD) sağlamak amacıyla Speit (1984), Speit ve Haupter'in (1985) geliştirdikleri metod modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla bir günlük preparatlar ışınlama kabına konarak üzeri bir film şeklinde Sorensen tamponu ile örtülecek şekilde kapatılmıştır. Işınlama eriyiği 5 ml Sorensen Tampon A, 5 ml Sorensen Tampon B alınıp bu karışımın destile su ile 100 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır (pH=6.8). Işınlama eriyiğinin az ya da fazla olmasının kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını önemli derecede etkilediği görülmüştür. Bu şekilde ince bir tabaka halinde ışınlama eriyiği ile örtülen preparatlar, karanlıkta 15 cm yükseklikten 30 W'lık 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen tek ultraviyole lambası ile 30 dk. ışınlandırılmıştır. Işınlama bittikten sonra preparatlar 1 × SSC eriyiği içerisinde 60°C (±2 °C)'de 60 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitmeden 15 dk. önce % 5'lik Giemsa boya eriyiği hazırlanmıştır.

%5'lik Giemsa boyasının hazırlanması: 4 ml tampon A, 4 ml tampon B ve 4 ml Giemsa karıştırılarak üzerine 80 ml oluncaya kadar saf su ilave edilmiştir (pH=6,8). Sonra bu boya dik bir şale içerisine filtre kâğıdı yardımıyla süzülmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda preparatlar $1 \times \text{SSC}$ eriyiğinden alınarak doğrudan boya içerisine konmuş ve yaklaşık olarak 20 dk. boya içerisinde bekletilmiştir (kardeş kromatidler arasındaki en iyi kontrast farkı bu sürenin sonunda elde edilmiştir). Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarılmış ve üç ayrı kaptaki saf sudan geçirilerek preparatların üzerindeki fazla boyanın akması sağlanmıştır. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette kurumaya bırakılmıştır. Boyanmış preparatlar kuruduktan sonra entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir.

3.5.3. Daimi Preparatlarda Mikroskopik İnceleme

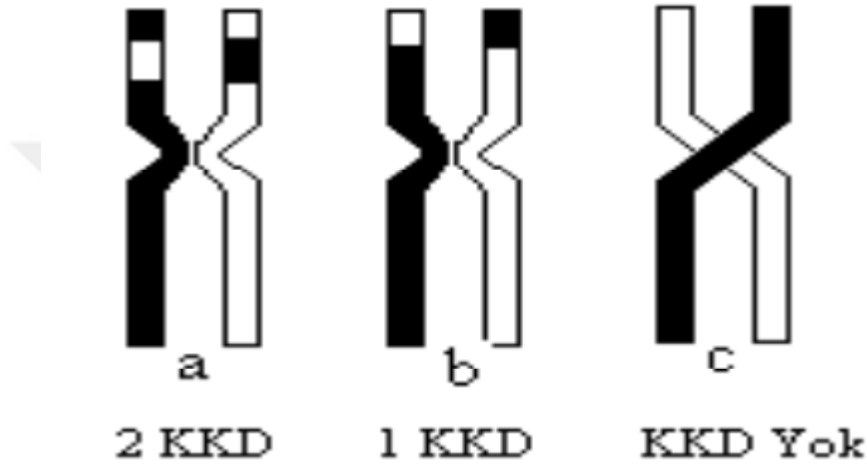
Hazırlanmış olan daimi preparatlar OLYMPUS CX21 marka ışık mikroskopunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir ($10 \times 100 = 1000$ büyütme). Bu incelemeler sırasında kardeş kromatid değişimi sayısı (KKD) ve kromozomal anormallikler belirlenmiştir. Aynı preparatlarda birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin sayısı ve toplam hücre içerisinde mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin sayısı saptanmıştır. Bu incelemeler sonucunda proliferasyon indeksi (PI) ve mitotik indeks (MI) saptanmıştır.

3.5.3.1. KKD Sayısının ve Proliferasyon İndeksinin (PI) (Replikasyon İndeksi=RI) Saptanması

3.5.3.1.(1). KKD Sayısının Saptanması

KKD sayısı, her kişinin kan kültürüne ait preparatlardan iyi dağılmış ve ikinci mitozu geçiren 25 hücrede (dört kişiden toplam 100 hücre) saptanmıştır. Her kişinin 25 ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerinde KKD sayısı belirlenmiş bundan her kişi için hücre başına düşen ortalama KKD sayısı (KKD/hücre) hesaplanmıştır. KKD sayısı bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların

sayılmasıyla belirlenmiştir. Ortadan bir parça değişimi olmuş ise bu iki KKD olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.1.a). Uçtan parça değişimi olmuş ise bu da bir KKD olarak sayılmıştır (Şekil 3.1.b). Ancak bu incelemeler esnasında kromatidlerin primer boğum bölgelerinden dönüm yapıp yapmadıklarına dikkat etmek gerekir. Bu durumda kromozomlarda KKD yoktur (Şekil 3.1.c).



Şekil 3.1. Kardeş Kromatid Değişiminin Olduğu ve Olmadığı Durumun Şematik Olarak Gösterilmesi (Topaktaş ve Speit, 1990).

3.5.3.1.(2). Proliferasyon İndeksi (PI) (Replikasyon İndeksi=RI)'nin Saptanması

Ezetimib'in DNA replikasyonu üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla PI bulunmuştur. Her kişinin kan kültüründen yapılan preparatlardan tesadüfi seçilmiş 100 hücrenin incelenmesiyle PI belirlenmiştir. Bu incelemeler sırasında gözlenen birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreler sayılmıştır. Bu verilerden yola çıkılarak her bir kişinin kan kültüründeki PI şu şekilde hesaplanmıştır:

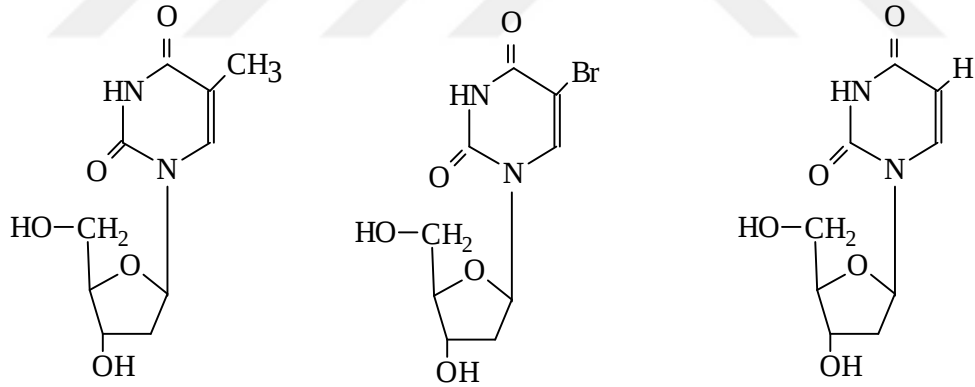
$$PI = \frac{1 \times (M1) + 2 \times (M2) + 3 \times (M3)}{100}$$

M1: Birinci mitozu geçiren hücrelerin sayısı

M2: İkinci mitozu geçiren hücrelerin sayısı

M3: Üçüncü mitozu geçiren hücrelerin sayısı

Birinci, ikinci ve üçüncü metafaz plakları şu şekilde ayırt edilmiştir (Topaktaş ve Speit. 1990): BrdUrd, deoxytimidin (dT) ve deoxyuridin (dU) birbirlerinin analogu olan bileşiklerdir. BrdUrd, dT ve dU arasındaki tek fark taşıdıkları heterosiklik benzen halkasındaki beşinci C atomuna bağlanan grupların farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Beşinci C atomuna bağlanan grup dT'de CH₃, BrdUrd'de Br ve dU'de H atomudur (Şekil 3.2).



Deoxytimidin (dT)

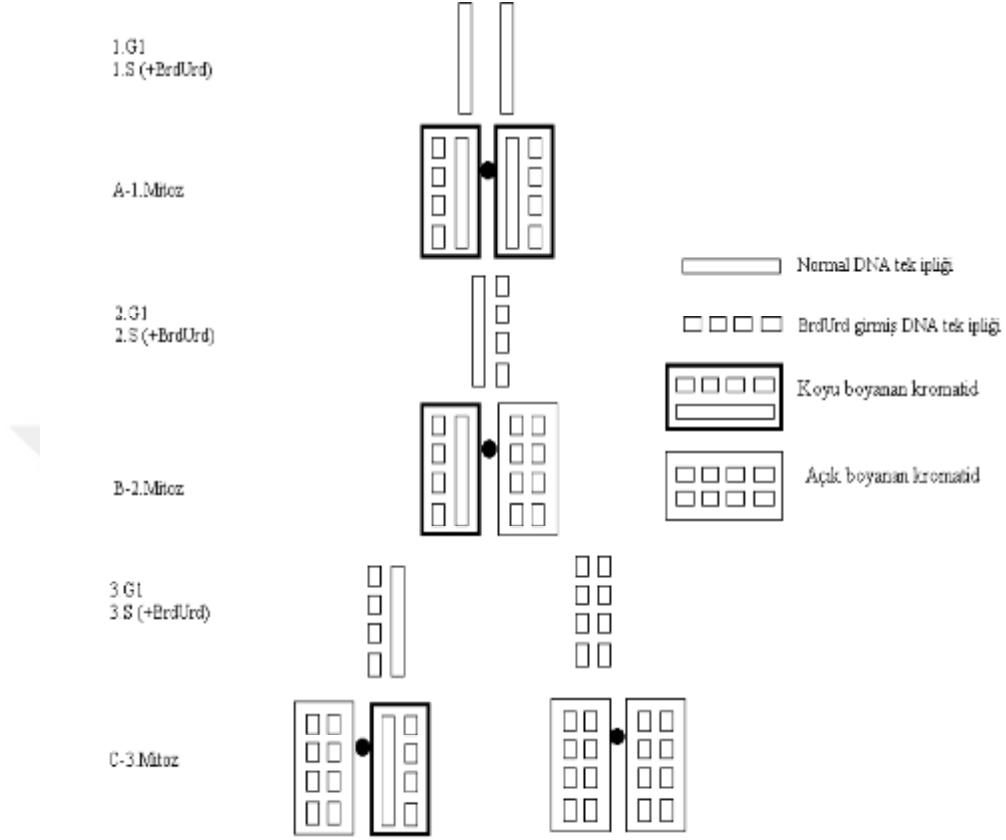
Bromodeoxyuridin (BrdUrd)

Deoxyuridin (dU)

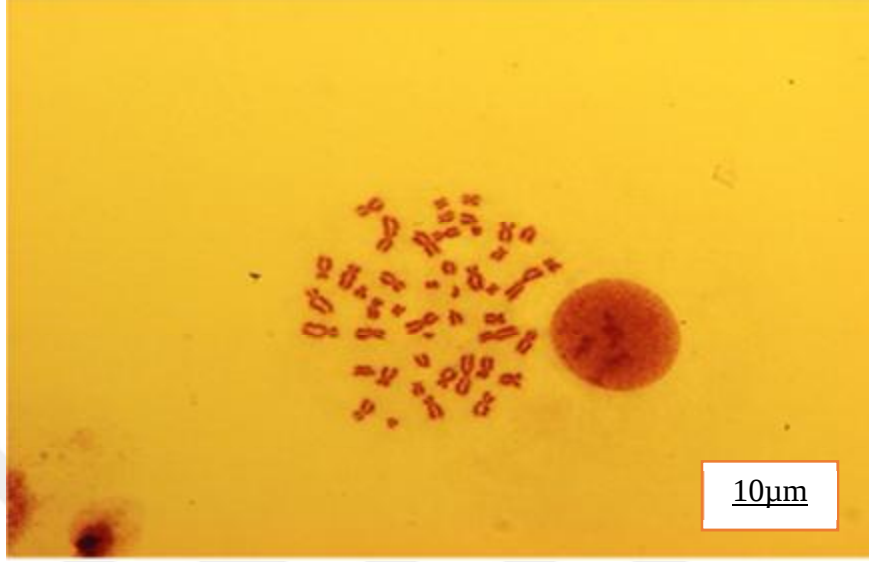
Şekil 3.2. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin(dU)'in kimyasal yapıları.

BrdUrd, DNA'nın yapısında bulunan timin bazlarının analogu olduğundan kültür ortamına BrdUrd eklendiğinde hücreler DNA'larını replike ettikleri esnada (birinci S fazında) yeni sentezlenen polinukleotid ipliği içine timinin yerine

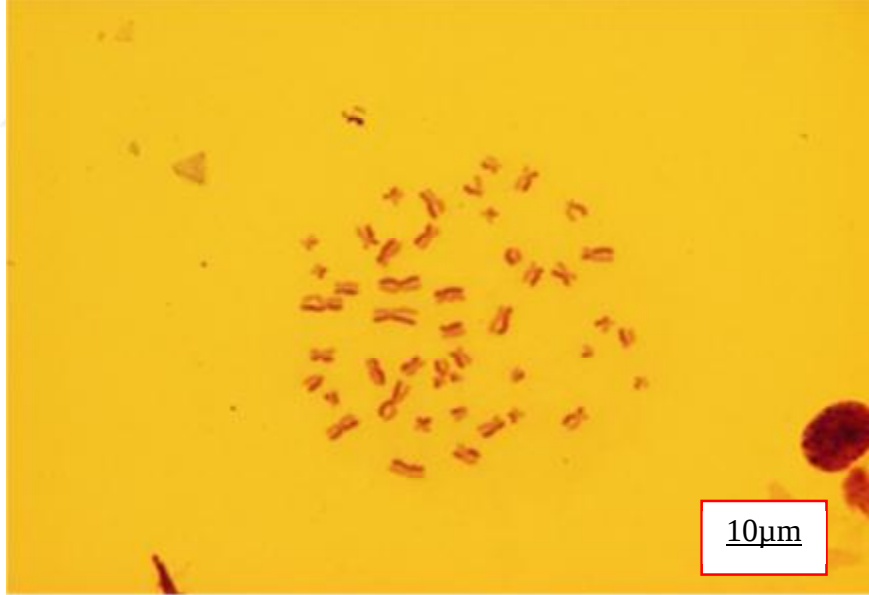
ortamda bulunan BrdUrd girecektir. Böyle hücrelerin kromozomları boyandığında bir kromozomun her iki kromatidi de (BrdUrd/dT:dT/BrdUrd) homojen koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.3 A ve Şekil 3.4). Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerden meydana gelen yavru hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd' li ortamda ikinci S fazı) timin içeren polinukleotid ipliğine komplementer olarak sentezlenen yeni DNA ipliğinde BrdUrd yer alacaktır. Bu iki polinukleotid ipliği bir kromozomun koyu boyanan kromatidini (BrdUrd/dT) oluşturacaktır. BrdUrd içeren ipliğe komplementer olarak sentezlenen yeni ipliğe de BrdUrd girecektir ve bir kromatidi oluşturan iki polinukleotid ipliği de BrdUrd içereceğinden (BrdUrd/BrdUrd) bu kromatid, aynı kromozomun açık boyanan kromatidini oluşturacaktır (BrdUrd/BrdUrd). İşte bu hücrenin metafaz devresinde kromozomlar boyandığında tüm kromozomların kromatidlerinden birisi koyu diğeri açık renkte boyanacaktır (BrdUrd/dT: BrdUrd/BrdUrd). Bunlar da ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.3 B ve Şekil 3.5). Bu hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd'li ortamda üçüncü S fazı) ikinci mitozda açık boyanan kromatidden (BrdUrd/BrdUrd) tüm polinukleotid ipliklerine BrdUrd girmiş olan bir kromozom meydana gelecektir ve bu kromozomun her iki kromatidi de açık boyanacaktır (BrdUrd/BrdUrd: BrdUrd/BrdUrd). İkinci mitozda koyu boyanan kromatidden ise (dT/BrdUrd), bir kromatidin her iki ipliği BrdUrd'li ve diğer kromatidinin bir ipliği timinli diğer ipliği BrdUrd'li olan bir kromozom (BrdUrd/BrdUrd:dT/BrdUrd) oluşacaktır. Bu kromozom da boyandığında bir kromatidi koyu renkte, diğer kromatidi açık renkte olacaktır. İşte böyle hücrenin metafaz devresinde preparat yapıldığında bazı kromozomların her iki kromatidi açık renkte, bazı kromozomların bir kromatidi açık diğer kromatidi koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler de üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.3 C ve Şekil 3.6). İşte bu şekilde birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreler ayırt edilmiş, 100 hücre içinde bu hücrelerin sayısı saptanmış ve elde edilen veriler kullanılarak yukarıdaki formüle göre PI hesaplanmıştır



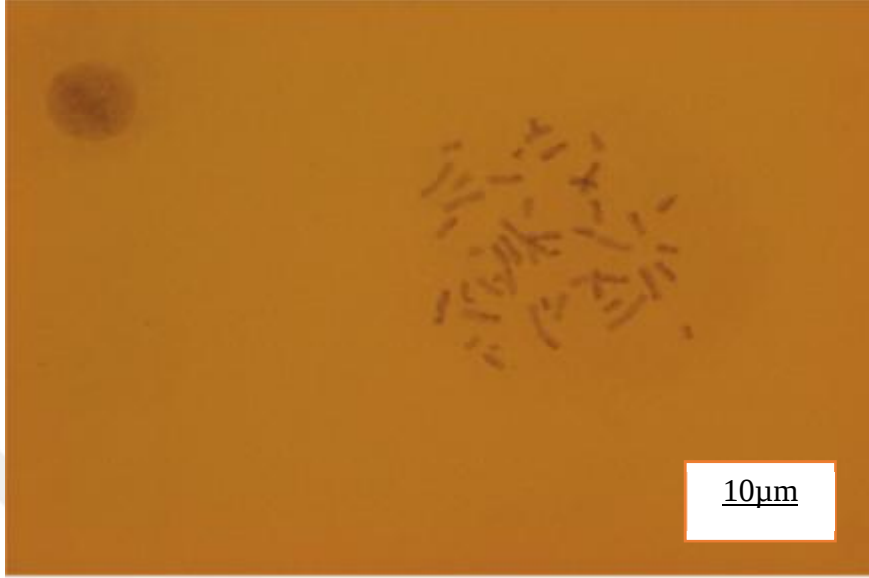
Şekil 3.3. BrdUrd'nin DNA Yapısına Girmesi ile Birinci, İkinci ve Üçüncü Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Ayırt Edilmesinin Şematik Olarak Açıklanması (During, 1985'e göre Topaktaş ve Speit, 1990).



Şekil 3.4. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000).



Şekil 3.5. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000).



Şekil 3.6. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000).

3.5.3.2. Kromozom Anormallikleri (KA) ve Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

3.5.3.2.(1). Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması

Her bir kişiden hazırlanan preparatlardan iyi dağılmış kromozomlara sahip toplam 100 hücre (dört kişiden toplam 400 hücre) KA'yı saptamak amacıyla incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda KA'lı hücreler ve toplam KA sayısı saptanmıştır. Bu hücrelerde gözlenen yapı ve sayı anormallikleri kaydedilmiştir. KA'lı hücrelerin yüzdelerinin hesaplanmasında sadece yapısal kromozom aberasyonları göz önünde bulundurulmuştur. İncelenen bu 100 hücre içinde anormallik taşıyan hücrelerin yüzdesi hesaplanmıştır. Toplam KA sayısı incelenen hücre sayısına bölünerek hücre başına düşen KA sayısı (KA/Hücre) saptanmıştır. Bu çalışmada gap'lar anormallik olarak değerlendirilmemiştir (Mace ve ark. 1978). Gap'lar ile kromatid ve kromozom tipi kırıkları arasındaki farklar şu şekilde ayırt edilmiştir (Preston, 1987'e göre; Kauderer ve ark. 1991'den): Gap'larda, kromatidin birinde (kromatid tipi gap) veya kromatidin her ikisinde (kromozom tipi gap) görülen boyanmamış bölge bir kromatidin kalınlığından daha azdır. Kırıklarda

bir kromatiddeki (kromatid tipi kırık) veya her iki kromatiddeki (kromozom tipi kırık) boyanmamış bölge bir kromatidin kalınlığından daha fazladır. İşte bu ölçülere göre gap ve kromatid kırıkları birbirinden ayırt edilmiştir. Mace ve ark. (1978) ise gap bölgesinde DNA ipliğinde kırık olmadığını elektron mikroskobu fotoğraflarında göstermişlerdir. Bu çalışmada kromatid kırığı ve tek kol birleşmesi gibi anormallikler kromatid tipi anormallik olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca kromozom kırığı, kardeş kromatid birleşmesi, kromatid değişimi, halka kromozom, fragment ve disentrik kromozom oluşumu gibi anormallikler de kromozom tipi anormallikler olarak değerlendirilmiştir.

3.5.3.2.(2). Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

Ezetimib'in mitoz bölünme üzerine etkilerini belirlemek amacıyla MI saptanmıştır. MI'ı belirlemek için her bir kişiye ait preparatlarda toplam 3000 hücre incelenmiş ve bunlar arasında mitoz bölünme geçiren hücrelerin sayısı kaydedilmiştir. 3000 hücre içinde mitoz bölünme geçiren hücrelerin oranı yüzde cinsinden hesaplanarak MI saptanmıştır.

3.6. Mikronukleus (MN) Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İncelemeler

3.6.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

In vitro mikronukleus testinde Rothfuss ve ark. (2000)'nın geliştirdikleri yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu yöntemle göre, sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın iki erkek ve iki kadından (KKD ve KA testi için kan alınan kişilerden) alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri kromozom medyumlarına steril şartlarda 6 damla (0.2 ml) ekilmiştir ve hücreler $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 68 saat inkübe edilmiştir. Çalışmada kullanılan Ezetimib'in etkisini belirlemek için son konsantrasyon 60, 80, 100, 120 $\mu\text{g/ml}$ olacak şekilde Ezetimib kültür ortamına, kültürün başlangıcından 20 ve 44 saat sonra ilave edilmiştir.

Ayrıca her deneyin bir kontrolü, bir de pozitif kontrol grubu oluşturulmuştur. İnkübasyonun başlangıcından 44 saat sonra her tüpe son konsantrasyonu 6 µg/ml olacak şekilde sitokalsin-B maddesi ilave edilmiş ve böylece bölünen hücrelerde sitokinez engellenmiştir. İnkübasyonun sonunda, kültür tüpleri 2000 devir/dk'da 5 dk. santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve hücrelerin bulunduğu tüplere hipotonik eriyik (%0.4 KCl, 37°C) ilave edildikten sonra tüpler inkübasyon yapmaksızın direkt olarak santrifüje alınmıştır. Hipotonik eriyik, kültüre yavaş yavaş ve pipetaj yapılarak ilave edilmiştir. Kültür tüpleri 1200 devir/dk'da 10 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atılarak soğuk 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 20 dk. muameleden sonra 1200 devir/dk'da 10 dk. daha santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. İkinci ve üçüncü fiksatif muamelesi ise 1 kısım glasiyal asetik asit, 5 kısım metanol karışımının sonucunda hazırlanmış (1/5) fiksatifle yapılmış, ikinci ve üçüncü fiksatif muamelesi 10 dk. oda sıcaklığında yapılmış, her fiksatif muamelesinden sonra tüplerdeki hücre süspansiyonu 10 dk. 1200 devir/dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Kültür tüplerinin dibinde toplanmış olan hücreler resüspanse edilmiştir. Daha sonra, hücre süspansiyonu soğuk ve temiz lamalar üzerine 10 cm yükseklikten damlatılarak preparatlar hazırlanmıştır.

3.6.2. Preparatların Boyanması

Hazırlanan preparatlar bir gün sonra Sorensen tamponunda hazırlanmış %5'lik Giemsa boyası ile 7-8 dk. boyanmış ve üç ayrı kapta bulunan saf sudan geçirilerek kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işleminden sonra preparatlar entellan ile kapatılarak incelemeye hazır hale getirilmiştir.

3.6.3. Mikronukleus Testi İçin Hazırlanan Preparatlarda Mikroskopik İnceleme

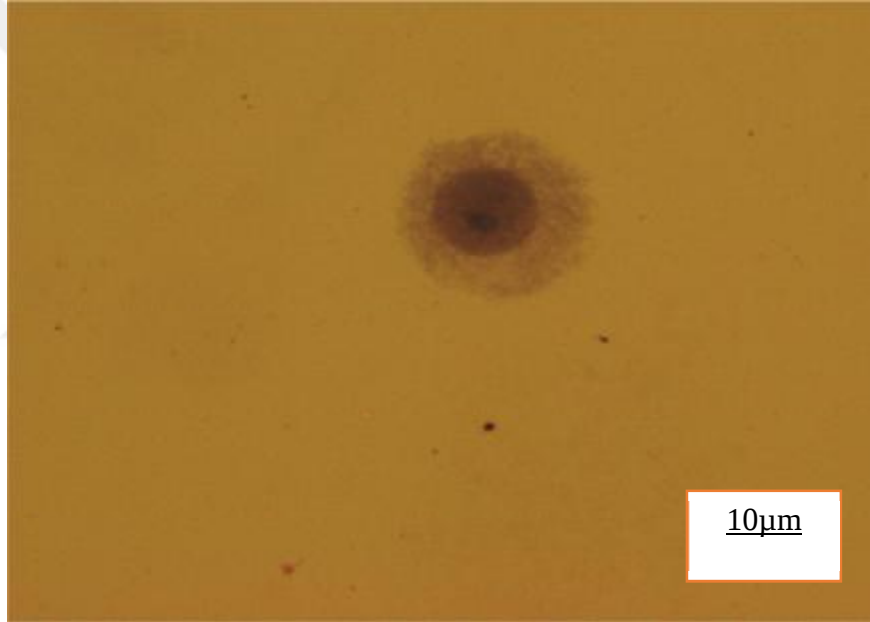
Hazırlanan daimi preparatlar OLYMPUS marka ışık mikroskopunda $10 \times 40=400$ büyütmede incelenmiştir.

3.6.3.1. Mikronukleus Sayısı ve Nukleus Bölünme İndeksinin (NBI) Saptanması

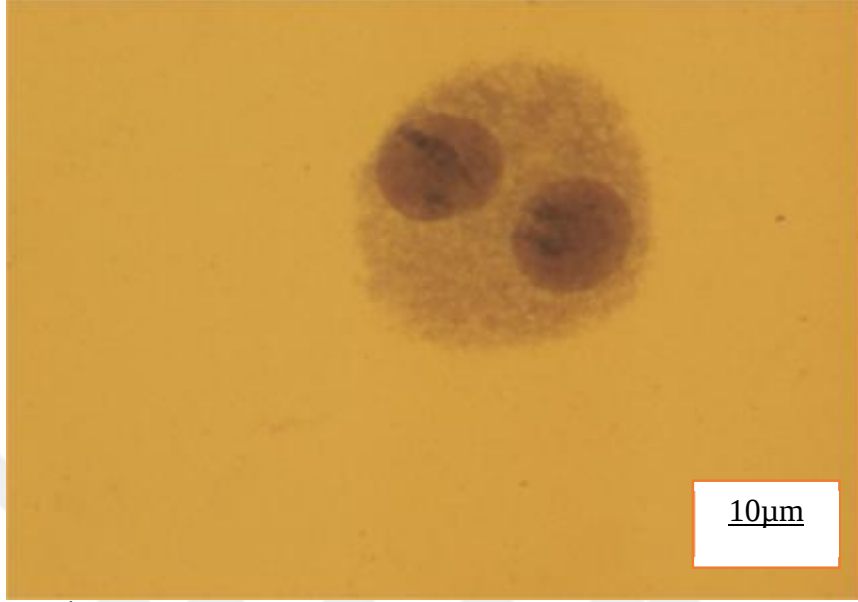
Mikronukleus sayısını belirlemek amacıyla her bir kişiye ait daimi preparatlarda her kişinin, her muamele grubu ve kontrollerinde iki nukleusa sahip (binukleer) toplam 1000 hücre (Şekil 3.8) incelenmiş (4 kişi 4000 hücre) ve bu binukleer hücreler içerisinde mikronukleuslu olanlar saptanmıştır. Bundan mikronukleuslu iki nukleuslu hücre %'si hesaplanmıştır. Ayrıca incelenen hücrelerde toplam mikronukleus sayısı belirlenmiştir. Toplam mikronukleus sayısından MN %'si hesaplanmıştır. Binukleer hücre ve mikronukleus ayrımı Titenko-Holland ve ark. (1997) ve Fenech (2000)'e göre yapılmıştır: (1) Hücreler belirgin sitoplazmasıyla yuvarlak ya da oval görünüme sahip olmalıdır; (2) Benzer olarak, nukleuslar belirgin nukleus zarıyla çevrili yuvarlak ya da oval olmalıdır; (3) İçerisinde MN sayılan hücreler sadece bir nukleus bölünmesi geçiren hücrelerdir; (4) MN'lar sadece ana nukleusun 1/3'ü ya da daha küçük olduklarında hesaba katılmalıdır; (5) MN'lar ana nukleus gibi boyanmalıdır; (6) MN'lar ana nukleustan açık bir şekilde ayrılmış olmalıdır. Sitokinez bloklayıcı yönteminin en önemli yararı, bölünen hücre popülasyonunda nukleus bölünmesinin ilerleyişini ve çoğalmasını belirleyecek imkanı vermesidir. Bu durum, sitokalsin-B ilavesinin ardından oluşan bir nukleuslu, iki nukleuslu, multinukleuslu (>2) hücrelerin sayılmasıyla yapılır. Nukleus bölünme indeksi (NBI) Eastmond ve Tucker (1989) tarafından önerilen formüle göre hesaplanmıştır.

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

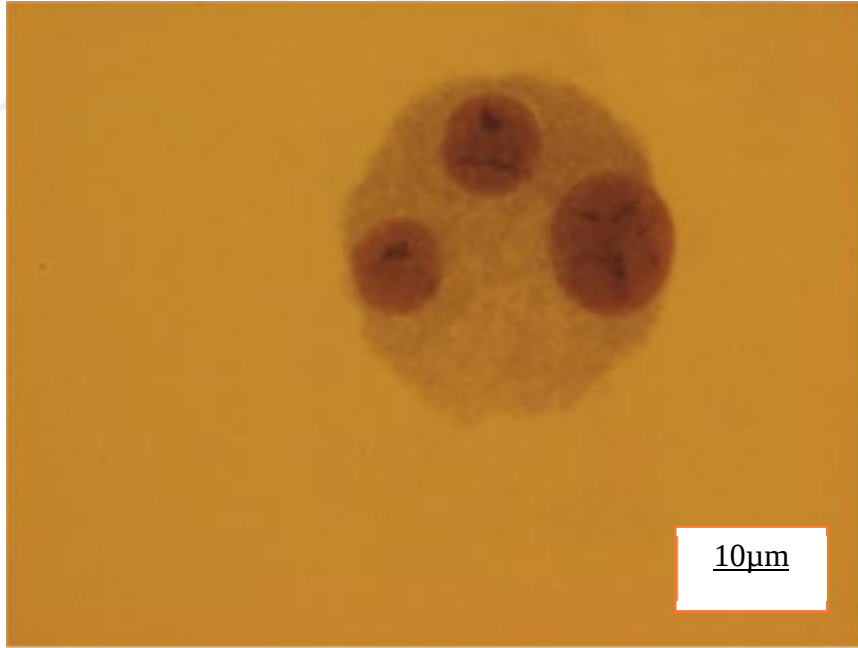
Formüle göre, *MI* bir nukleuslu (Şekil 3.7), *MII* iki nukleuslu (Şekil 3.8), *MIII* üç nukleuslu (Şekil 3.9), *MIV* dört nukleuslu (Şekil 3.10) hücrelerin sayısını, *N* ise toplam hücre sayısını göstermektedir. NBI'nin hesaplanması kimyasal veya fiziksel bir maddenin sitotoksik etkisini göstermede önemli bilgiler sağlar (Fenech, 1997). Bu nedenle, MN oluşumunu saptamak için incelenen preparatlar daha sonra nukleus bölünme indeksini (NBI) belirlemek için tekrar incelenmiştir. Bu çalışmada NBI için, her bir kişinin preparatlarından tesadüfi seçilmiş alanlarda toplam 1000 hücre (4 kişi 4000 hücre) incelenmiştir.



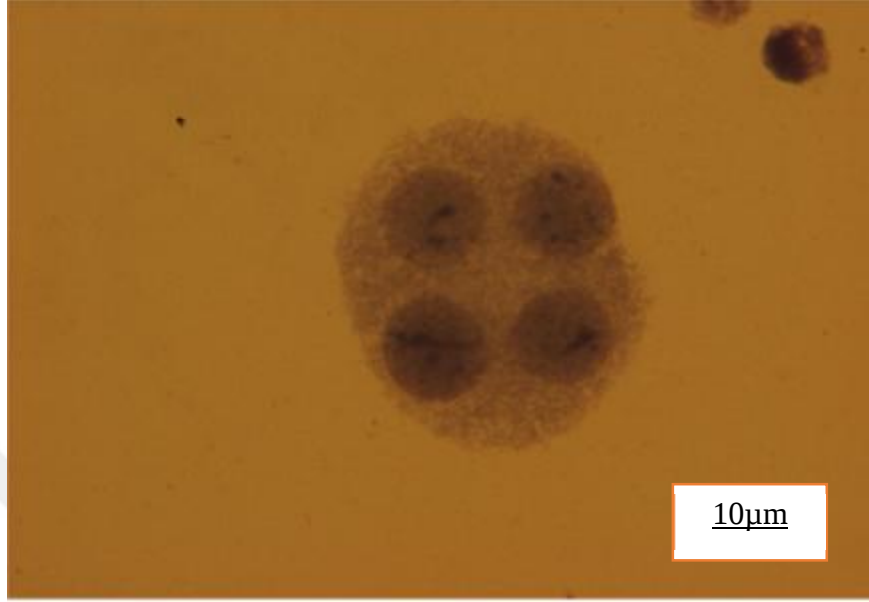
Şekil 3.7. Bir nukleuslu hücre (X1000).



Şekil 3.8. İki nukleuslu hücre (X1000).



Şekil 3.9. Üç nukleuslu hücre (X1000).



Şekil 3.10. Dört nukleuslu hücre (X1000).

3.7. Mikroskopta Fotoğraf Çekme

Fotoğraf çekme işlemi OLYMPUS marka trinoküler mikroskoba bağlı dijital fotoğraf makinesinde 1000 büyütmede yapılmıştır (Olympus CX31RTSF, 7.1 Megapixel). 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin, sık rastlanan ve ilginç olan KA'ların, mikronukleuslu binukleer hücreler ile 1, 2, 3, 4 nukleuslu hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir.

3.8. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Mikroskobik inceleme sonucunda elde edilen KA, KKD, MI, PI, MN ve NBI parametrelerine ait veriler için her bir muameleli grubun ortalamaları ile kontrol kültürlerinin ortalamaları arasındaki farkın önemli olup olmadığı SPSS programı ile kontrol edilmiştir. Konsantrasyon-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla regresyon ve korelasyon analizleri yapılmış, regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı (r) bulunmuş ve regresyon doğrusu çizilmiştir. Mikroskobik incelemeler sonucunda elde edilen bulgular çizelge ve grafikler halinde verilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Ezetimib'in İnsan Periferik Lenfositlerindeki Genotoksik Etkileri

4.1.1.1. Ezetimib'in Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerine Etkileri

Test maddesi olan Ezetimib'in etkileri dört farklı konsantrasyonun (60, 80, 100, 120 µg/ml) insan periferik lenfositlerindeki 24 ve 48 saatlik muameleli sürelerde incelenmiştir. Kültürdeki hücrelerde saptanan kardeş kromatid değişimi sayıları (KKD/Hücre) çizelge 4.1.'de gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel analizlere göre test maddesi olan ezetimib hiçbir muamele süresi ve konsantrasyonda KKD'yi önemli derecede uyarmamıştır.

Çizelge 4.1. Değişik konsantrasyonlarda Ezetimib ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferik Kan Lenfositlerinde ve Onların Kontrol Kültürlerinde Hücre Başına Düşen Ortalama KKD Sayısı*.

Test Maddesi	Muamele Süresi (saat)	Konsantrasyon (µg/ml)	Min-Max KKD	KKD/Hücre±SH
Kontrol	-	-	3-12	7.01 ± 0,73
DMSO (Ç.K)	24	9 µL/mL	6-17	8.02 ± 1,29
MMC (P.K)	24	0.25	12-71	33.35 ± 1,51
Ezetimib	24	60	2-18	8.04 ± 1,10
		80	3-18	9.30 ± 0,94
		100	2-12	7.65 ± 0,58
		120	3-37	8,65 ± 0,22
DMSO (Ç.K)	48	9 µL/mL	7-23	9.36 ± 0,53
MMC (P.K)	48	0.25	15-73	41.86 ± 2,56
Ezetimib	48	60	1-20	7.56 ± 0,47
		80	2-28	8.17 ± 0,26
		100	6-36	8.10 ± 0,40
		120	8-52	7.76 ± 0,34

*: Her preparattan 25, herbir grupta toplam 100 metafaz II evresi değerlendirilmiştir.



Şekil 4.1. KKD uyarılmış hücre (120 µg/ml Ezetimib, 24 saatlik muamele, ♀) (X1000)

4.1.1.2. Ezetimib'in Kromozom Anormallikleri (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

Ezetimib ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde kromatid tipi anormalliklerden özellikle kromatid kırığı (Şekil 4.2) en fazla görülen anormallik arasında sayılabilir. Kromozom tipi anormalliklerden özellikle kromozom kırığı (Şekil 4.3), fragment (Şekil 4.4) gibi yapısal anormalliklere ve poliploidi (Şekil 4.5) gibi kromozom sayı anormalliklerine rastlanmıştır.

Dört farklı konsantrasyonda (60, 80, 100, 120 µg/ml) Ezetimib ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde saptanan kromozom anormallik çeşitleri, kromozom anormalliğine sahip anormal hücre yüzdesi ve hücre başına düşen kromozom anormallikleri (KA/Hücre) çizelge 4.2.'de görülmektedir.

Ezetimib, 24 ve 48 muamele sürelerinde tüm konsantrasyonlarda anormal hücre (AH) yüzdesi ve KA/hücre oranlarının belli ölçülerde artmasına neden olmuştur. 24 saatlik muamele süresinde sadece 100 µg/ml konsantrasyonda, 48

saatlik muamele periyodunda ise en dūřuk konsantrasyon hariç būtin konsantrasyonlarındaki artıřın istatistiki bakımdan önemli olduėu ortaya çıkmıřtır. (izelge 4.2). Ezetimib yūksek konsantrasyonlarda ve uzun periyotta kromozom aberasyonu oluřumunu uyarmıřtır.



Çizelge 4.2. Değişik konsantrasyonlarda Ezetimib İle 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferel Lenfositlerinde ve Onların Kontrol Kültürlerinde Kromozom Anormallikleri Çeşitleri, Anormal Hücre Oranı, KA/Hücre*.

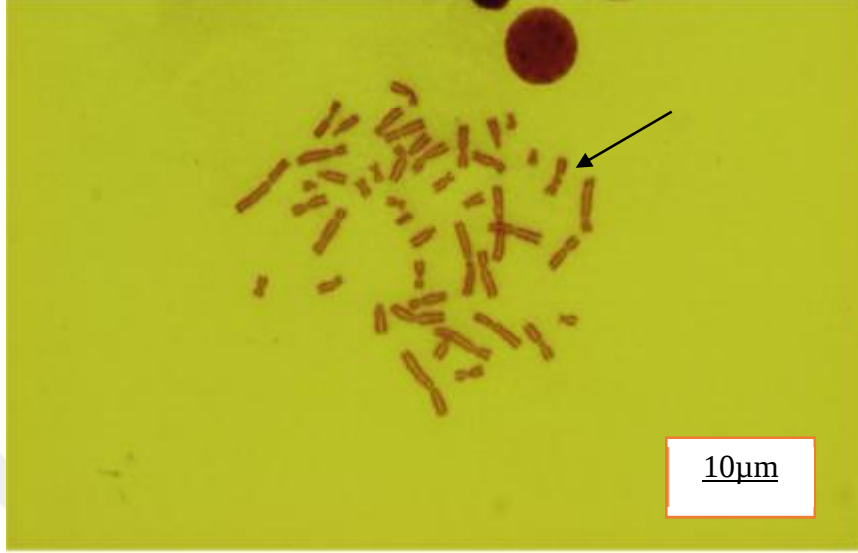
Test maddesi	Muamele		Anormallik Çeşitleri							Anormal Hücre (%)’si±SH	KA/Hücre±SH
	Süre (saat)	Kons. (µg/ml)	B’	B’’	F	T	DS	KD	P		
Kontrol	--	--	14	-	-	-	-	-	-	3.50 ± 0.96	0.04 ± 0.001
DMSO (ÇK)	24	9 µL/mL	22	-	-	-	-	-	-	5.50 ± 1.71	0.06 ± 0.018
MMC (PK)	24	0.25	47	11	6	-	-	-	-	13.25 ± 1.25 a ₂	0.14 ± 0.019 a ₂
Ezetimib	24	60	16	4	1	--	-	-	-	5.25 ± 1.31	0.05 ± 0.013
		80	31	-	1	-	-	-	-	8.00 ± 1.63	0.08 ± 0.016
		100	41	7	2	-	-	-	-	12.00 ± 1.22 a ₁ b ₁	0.13 ± 0.015 a ₁ b ₁
		120	39	-	-	-	-	-	-	9.75 ± 2.21	0.10 ± 0.022
DMSO(ÇK)	48	9 µL/mL	31	-	2	-	-	-	1	8.50 ± 1.94	0.09 ± 0.019
MMC(PK)	48	0.25	65	10	5	-	-	-	-	18.25 ± 1.65 a ₃	0.20 ± 0.025 a ₃
Ezetimib	48	60	29	-	-	--	-	-	-	7.25 ± 1.60	0.07 ± 0.016
		80	34	12	-	-	-	-	-	11.25 ± 2.06 a ₁	0.12 ± 0.023
		100	37	8	3	-	-	-	-	11.75 ± 2.63 a ₁	0.12 ± 0.025 a ₁
		120	32	11	9	-	-	-	-	11.75 ± 2.56 a ₁	0.13 ± 0.031 a ₁

B’: Kromatid kırığı, B’’: Kromozom kırığı, F: Fragment, T: Translokasyon, DS: Disentrik kromozom, KD: Kromatid değişimi, P: Poliploidi

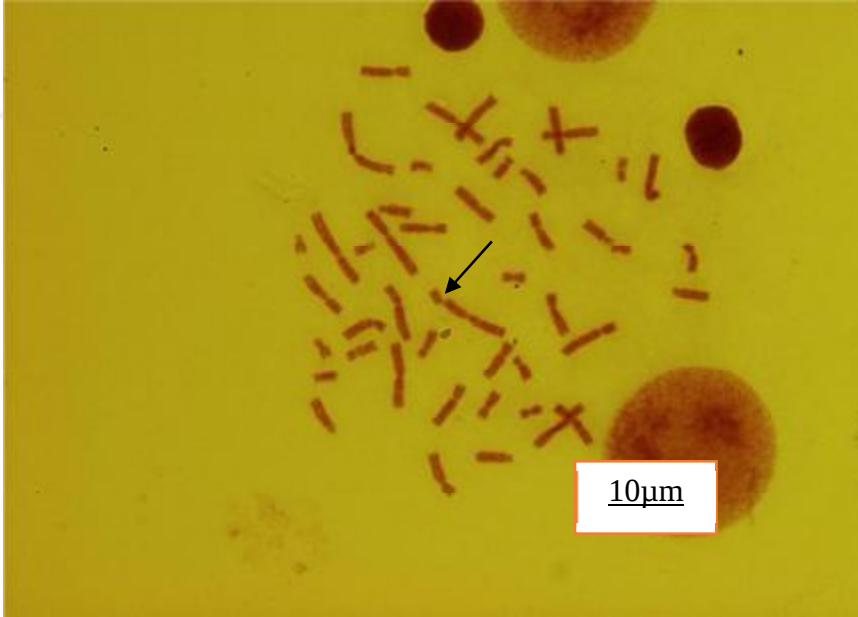
a: Kontrol ile; b: Çözücü Kontrol ile aradaki fark önemlidir.

a₁b₁: P≤0.05; a₂b₂: P≤0.01; a₃b₃: P≤0.001

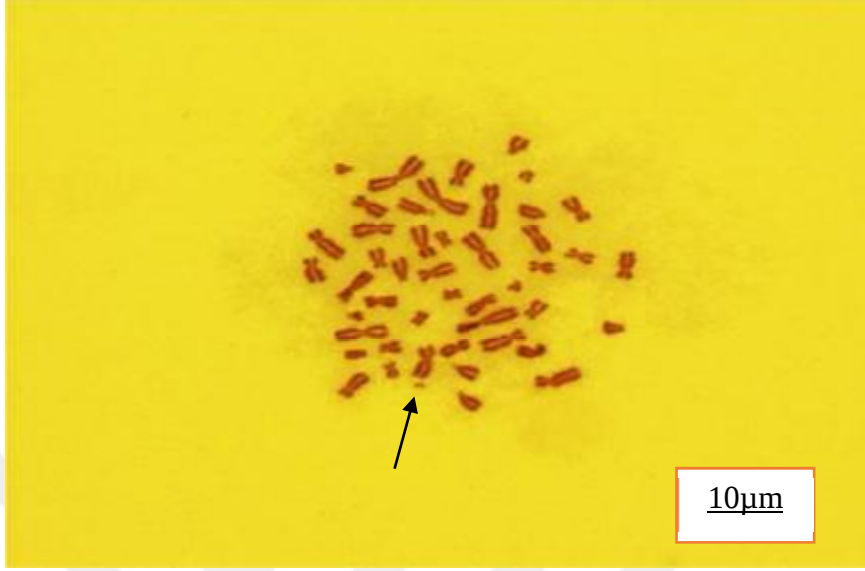
*: Her bir preparattan 100, her muamele grubu için toplamda 400 metafaz değerlendirilmiştir.



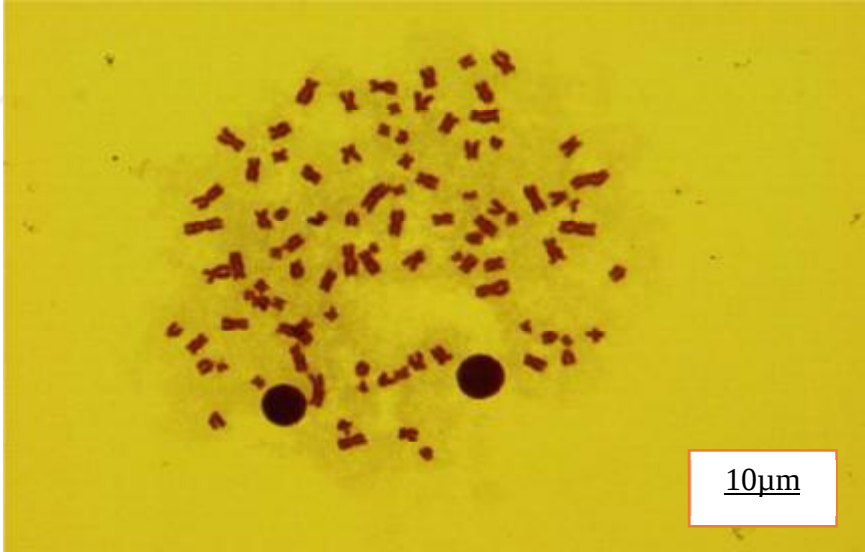
Şekil 4.2. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (100µg/ml Ezetimib, 24 saatlik muamele, ♂) (X1000)



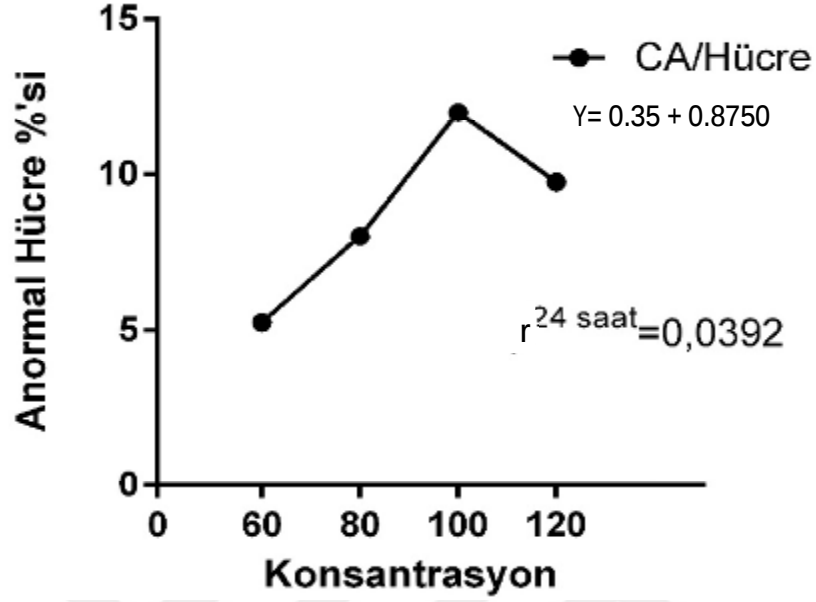
Şekil 4.3. Kromozom kırığı (B'') bulunan metafaz plağı (120µg/ml Ezetimib, 24 saatlik muamele, ♂). (X1000)



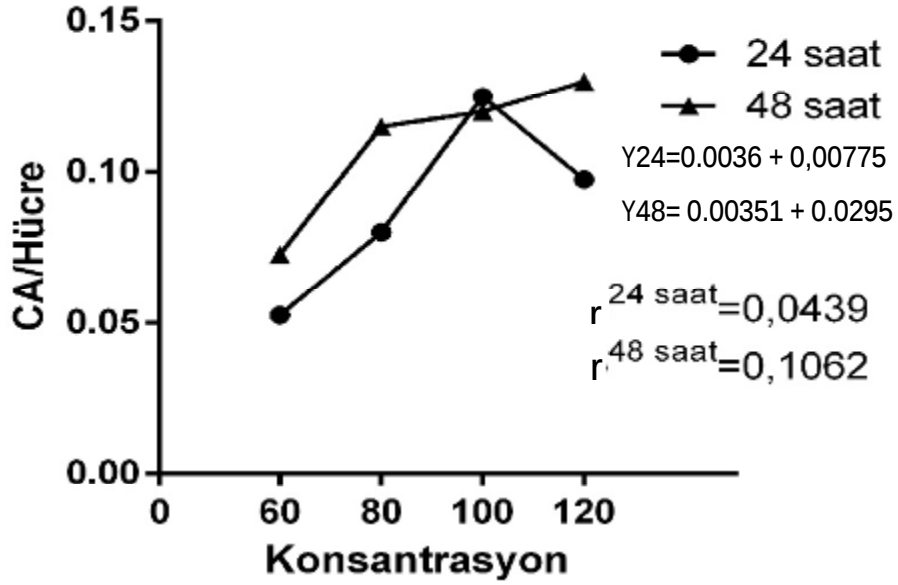
şekil 4.4. Fragment (F) bulunan metafaz plağı (özücü kontrol, 48 saatlik muamele, ♀). (X1000)



şekil 4.5. Poliploidi olan metafaz plağı (120 µg/ml Ezetimib, 48 saatlik muamele, ♀). (X1000).



Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda Ezetimib ile 24 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde AH%'sinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı



Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda Ezetimib ile 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde KA/Hücre'nin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.

4.1.1.3. Ezetimib'in DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkileri

Ezetimib'in DNA replikasyonu üzerindeki etkisi proliferasyon indeksi (PI) (Replikasyon indeksi (RI))'nin, mitoz bölünme üzerindeki etkisi ise mitotik indeks (MI)'in bulunması yoluyla saptanmıştır.

Ezetimib ile 24 saat muamele edilen kültürlerde PI kontroldekine nazaran genel olarak düşmüş olup en yüksek iki konsantrasyonundaki (100 µg/ml ve 120 µg/ml) azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 48 saatlik ezetimib muamelesindeki PI azalmaları daha belirgin bir nicelik göstermektedir. Bu muamele periyodundaki bütün konsantrasyonlar anlamlı PI düşüşlerine yol açmıştır (Çizelge 4.3.). Bu bulgulara göre ezetimibin özellikle yüksek konsantrasyon ve 48 saatlik periyotluk muamele süresinde DNA replikasyonunu önemli derecede engellediğini söylenebilir.

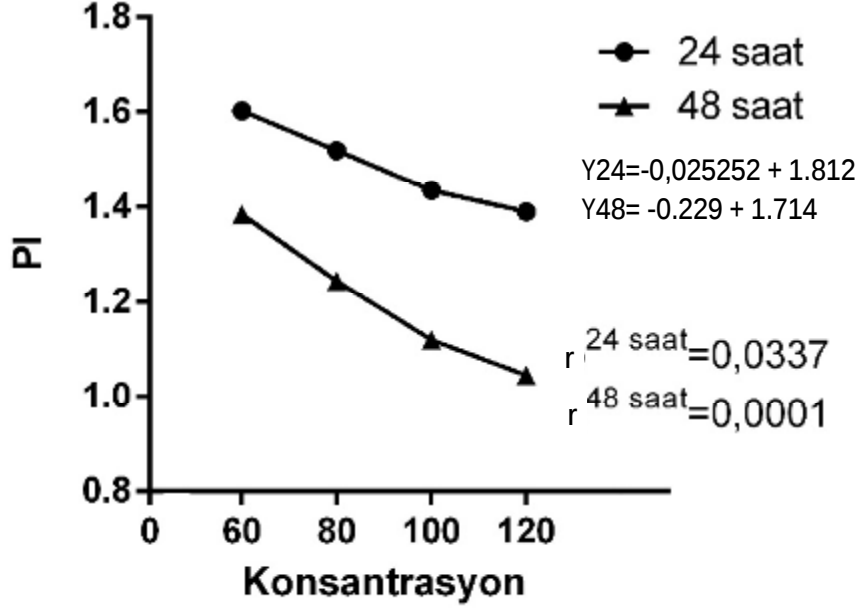
Test maddesi, mitototik indeks yönünden proliferasyon indeksine benzer tarzda etkiler sergilemiştir. Yani ezetimib, 24 saatlik muamelede yüksek iki konsantrasyonda, 48 saatlik muamelenin 60 µg/ml konsantrasyonu hariç diğer dozajların tamamında anlamlı MI düşmelerine neden olmuştur (Çizelge 4.3.). PI ve MI'deki bulgular birlikte değerlendirilecek olursa Ezetimib, hem DNA replikasyonunu hem de hücre bölünmesini olumsuz yönde etkilemektedir. Ezetimibin PI ve MI üzerine olan etkilerinde konsantrasyon-etki ilişkisi göze çarpmaktadır ($P<0.01$).

Çizelge 4.3. Değişik konsantrasyonlarda Ezetimib ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan Periferik Lenfositlerinde Proliferasyon İndeksi (PI) ve Mitotik İndeks (MI)

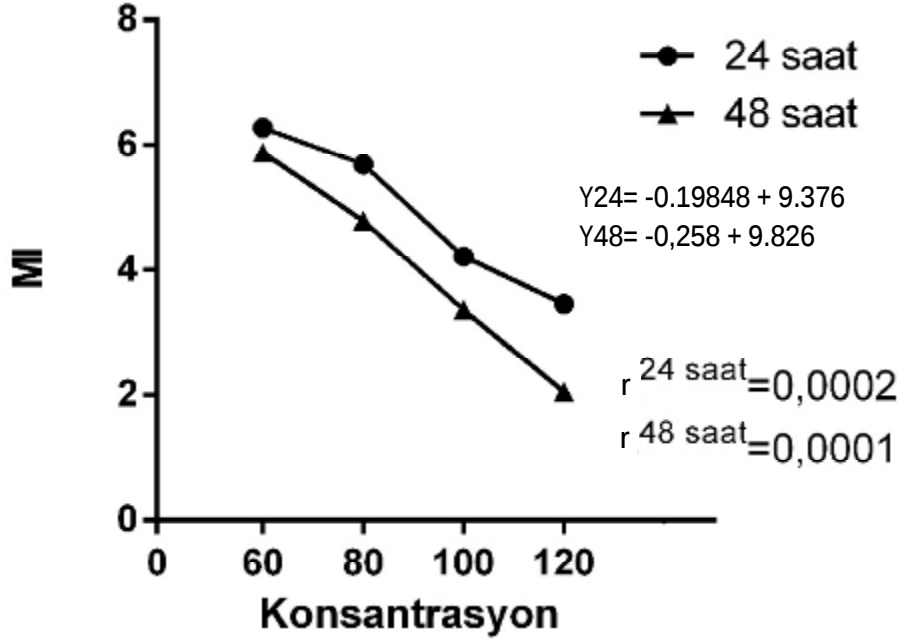
Test maddesi	Muamele		M1 M2 M3			PI±SH	MI±SH
	Süre (saat)	Kons. (µg/ml)					
Kontrol	--	--	183	146	71	1.720 ± 0.040	7.17 ± 0.62
DMSO (ÇK)	24	9 µL/mL	182	133	85	1.757 ± 0.101	6.56 ± 0.58
MMC (PK)	24	0.25	280	113	7	1.318 ± 0.043	2.82 ± 0.21
Ezetimib	24	60	225	109	66	1.603 ± 0.097	6.28 ± 0.56
		80	242	108	50	1.520 ± 0.073	5.69 ± 0.54
		100	280	66	54	1.435 ± 0.053 a ₁ b ₁	4.22 ± 0.43 a ₂ b ₁
		120	280	84	36	1.390 ± 0.065 a ₂ b ₁	3.46 ± 0.22 a ₃ b ₃
DMSO(ÇK)	48	9 µL/mL	215	134	51	1.590 ± 0.078	6.44 ± 0.67
MMC(PK)	48	0.25	352	41	7	1.138 ± 0.055	2.08 ± 0.26
Ezetimib	48	60	278	90	32	1.385 ± 0.058 a ₂	5.88 ± 0.63
		80	319	64	17	1.245 ± 0.075 a ₃ b ₂	4.79 ± 0.67 a ₁
		100	356	40	4	1.120 ± 0.041 a ₃ b ₃	3.37 ± 0.58 a ₃ b ₂
		120	383	16	1	1.045 ± 0.006 a ₃ b ₃	2.05 ± 0.44 a ₃ b ₃

a: Kontrol ile; b: Çözücü Kontrol ile aradaki fark önemlidir.

a₁b₁: P≤0.05; a₂b₂: P≤0.01; a₃b₃: P≤0.001



Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda Ezetimib ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde PI'nin konsantrasyona bağlı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.



Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlarda Ezetimib ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde MI'nin konsantrasyona bağlı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.

4.1.1.4. Ezetimib'in Mikronukleus (MN) Oluşumu ve Nukleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri

Ezetimib, klastojenik ya da anojenik etkilerden kaynaklanan mikronukleus oluşumunu bariz şekilde uyarmıştır. Bu frekanstaki artışlar ekseriyetle yüksek konsantrasyonlarda ortaya çıkmıştır. Çalışmanın 24 saatlik periyodunda test maddesi yüksek iki konsantrasyonda (100 ve 120 µg/ml) mikronukleuslu hücre yüzdesini ve MN yüzdesini önemli seviyede artırmıştır. Deneyin 48 saatlik periyodunda ise ajanın en düşük (60 µg/ml) konsantrasyonu hariç uygulanan dozların tamamında MN frekansında istatistiksel olarak önemli artışlar saptanmıştır (Çizelge 4.4). mikronukleus frekansındaki artışta konsantrasyon-etki ilişkisi tespit edilmiştir ($P < 0.0002$) (Şekil 4.12). Bazı binukleer hücrede bir mikronukleus, bazı hücrelerde ise iki mikronukleuslara rastlanmıştır (Şekil 4.13).

Ezetimib ile 24 ve 48 saatlik muamele edilen kültürlerde bir uygulama (60 µg/ml, 24 saat) hariç tüm konsantrasyonlarda nükleer bölünme indeksinin (NBI) kontrol ve çözücü kontrole göre önemli derecede düşük olduğu belirlenmiştir ($P<0.01$) (Çizelge 4.4). MN frekansında olduğu gibi NBI frekansında da konsantrasyon-etki ilişkisi gözlenmiştir ($P<0.0171$).

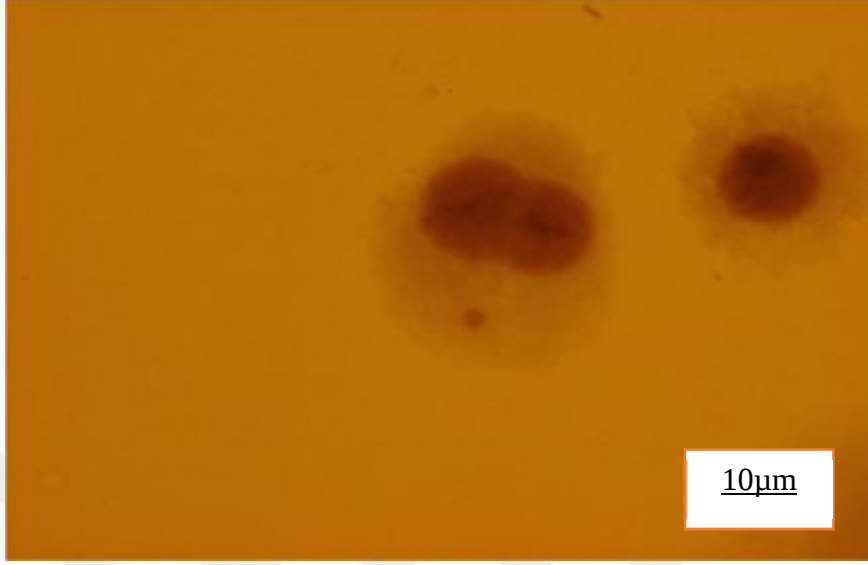
Sonuç olarak farklı konsantrasyonlardaki Ezetimib ile muamele edilen kültürlerde test maddesinin nukleus bölünmesini anlamlı düzeylerde azaltmıştır. Bu indeks (NBI) üzerindeki etkisi genel olarak hücre proliferasyonu (PI) ve mitoz bölünme (MI) üzerindeki etkisine benzemektedir.

Çizelge 4.4. Değişik Konsantrasyonlarda Ezetimib İle 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferel Lenfositlerinde MN İçeren İki Nukleuslu Hücre%'si, MN %'si ve NBI.

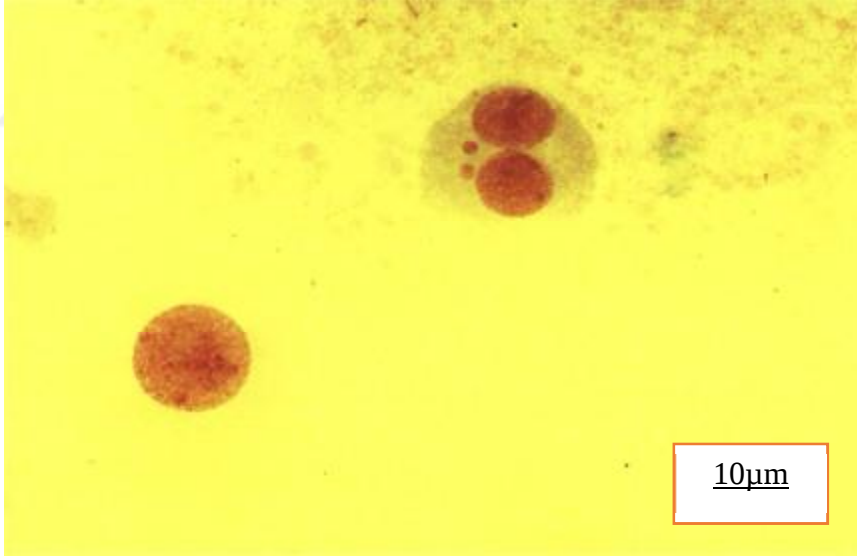
Test Maddesi	Muamele		MN İçeren İki Nukleuslu Hücre %'si	MN %'si	Nukleus Sayısına Göre Hücrelerin Dağılımı				NBI±SH
	Süre (saat)	Kons. (µg/ml)			1	2	3	4	
Kontrol	-	-	1.00 ± 0.71	1.00 ± 0.71	2554	1200	159	87	1.445 ± 0.058
DMSO(ÇK)	24	9 µL/mL	5.25 ± 1.31	5.25 ± 1.31	2625	1195	95	85	1.410 ± 0.099
MMC(PK)	24	0.25	30.25 ± 2.39	32.50 ± 3.50	2873	1110	14	3	1.287 ± 0.032
Ezetimib	24	60	4.25 ± 1.11	4.25 ± 1.11	3126	846	17	11	1.228 ± 0.086
		80	7.50 ± 1.55	7.50 ± 1.55	3494	491	9	6	1.132 ± 0.038 a ₂ b ₁
		100	15.75 ± 2.95 a ₃ b ₁	16.25 ± 3.42 a ₂ b ₁	3629	359	9	3	1.097 ± 0.048 a ₃ b ₁
		120	18.75 ± 3.45 a ₃ b ₂	19.75 ± 3.47 a ₃ b ₂	3846	151	2	1	1.040 ± 0.014 a ₃ b ₂
DMSO(ÇK)	48	9 µL/mL	7.50 ± 1.55	7.75 ± 1.44	2802	1055	72	71	1.353 ± 0,101
MMC(PK)	48	0.25	40.25 ± 4.33	46.25 ± 4.66	3975	20	5	0	1,008 ± 0.019
Ezetimib	48	60	9.25 ± 0.75	9.50 ± 0.96	3727	270	3	0	1,069 ± 0.018 a ₃ b ₂
		80	13.50 ± 1.94 a ₂	13.50 ± 1.94 a ₁	3812	188	0	0	1.047 ± 0.019 a ₃ b ₃
		100	17.00 ± 2.27 a ₃ b ₁	18.50 ± 2.47 a ₃ b ₁	3935	65	0	0	1.016 ± 0.004 a ₃ b ₃
		120	26.00 ± 2.80 a ₃ b ₃	28.25 ± 3.38 a ₃ b ₃	3968	30	2	0	1.009 ± 0.003 a ₃ b ₃

a: Kontrol ile; b: Çözücü Kontrol ile aradaki fark önemlidir.

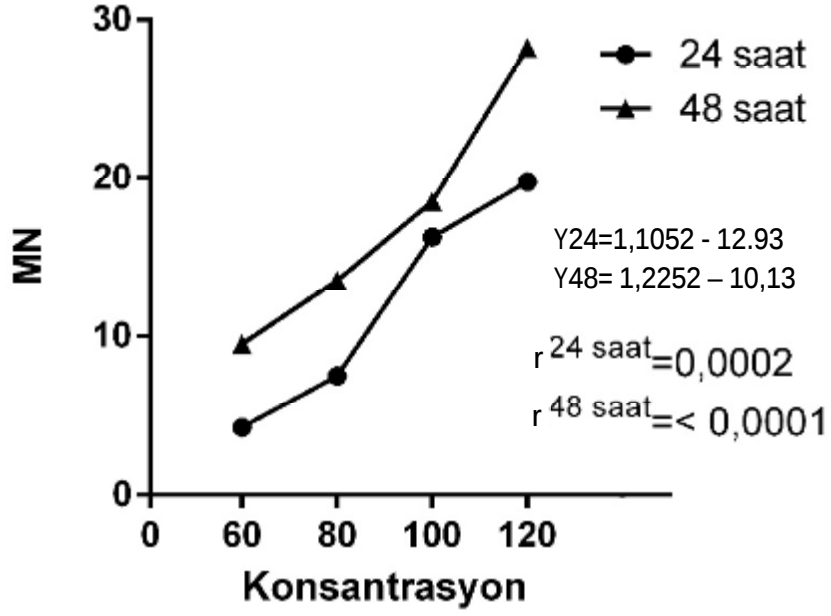
a₁b₁: P≤0.05; a₂b₂: P≤0.01; a₃b₃: P≤0.001



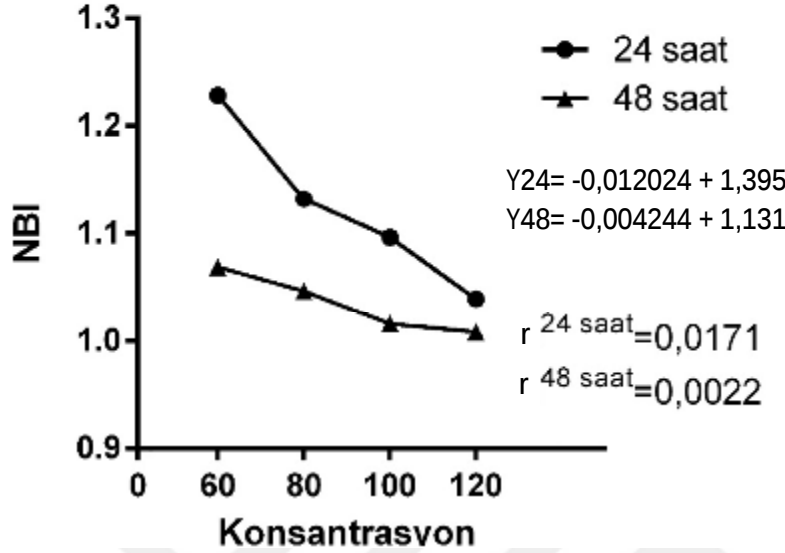
şekil 4.10. Tek mikronukleus içeren iki nukleuslu hücre (60 µg/ml Ezetimib, 48 saatlik muamele, ♂) (X1000)



şekil 4.11. İki mikronukleus içeren iki nukleuslu hücre (80 µg/ml Ezetimib, 24 saatlik muamele, ♀) (X1000)



Şekil 4.12. Farklı konsantrasyonlarda Ezetimib ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde MN'nin konsantrasyona bağlı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.



Şekil 4.13. Farklı konsantrasyonlarda Ezetimib ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde NBI'nin konsantrasyona bağlı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.

4.2. Tartışma

4.2.1. Ezetimib'in İnsan Periferik Lenfositlerinde Kardeş Kromatid Değişimi (KKD), Kromozom Aberasyonu (KA) ve Mikronukleus (MN) Oluşumu Üzerindeki Etkisi

Bu çalışma ezetimibin in vitro ortamda insan periferik lenfositlerinde genotoksikiteyi uyurıp uyarmadığını araştıran ilk çalışmadır. Araştırma sonuçlarına göre ezetimibin KKD'yi önemli derecede uyarmadığı saptanmıştır. Öte yandan lenfositlerdeki kromozom aberasyonunu özellikle iki hücre siklusu döneminde uyurduğu anlaşılmıştır. Ezetimib özellikle kromozom kırığı ve kromatid kırıklarına neden olarak klastojenik potansiyelini göstermiştir. Benzer çalışmalar birçok araştırmacı tarafından farklı kolesterol ilaçlarında da yapılmıştır. Berber ve ark. (2013), Rosuvastatin ile yaptıkları çalışmada bu ilacın insan periferik lenfositlerinde genotoksik etkisinin olup olmadığını comet, KA ve MN testleri ile incelemişler ve bu ilacın genotoksik olduğunu saptamışlardır. Ciaravino ve ark.

(1995) Atorvastatin'in genotoksik etkisini in vivo ve in vitro olarak incelemişlerdir. Bu çalışmada in vitro Çin hamsterlerin V79 hücrelerinde in vivo olarak da CD-1 farelerinde KA ve MN testleri yapılmıştır. Araştırma sonucuna göre Atorvastatin'in KA ve MN'yi uyarmadığı açıklanmıştır. Ayrıca *Salmonella typhimurium* ve *E.coli* bakterilerde S9 mix varlığında ve yokluğunda herhangi bir genotoksik etki göstermediği saptanmıştır. Gajski ve Garaj-Vrhovac (2008) tarafından Atorvastatin'in comet, KA ve KKD, MN testleri ile insan periferik lenfositlerinde genotoksik olduğu saptanmıştır. Pernice ve ark. (2006) üremik hastalarda kardeş kromatid değişimi sıklığı genel popülasyondan belirgin olarak daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Simvastatin ile tedavi gören üremik hastalarında bu yüksek KKD oranının önemli derece azaldığını saptamışlardır. Bardeleben ve ark. 2003 yılında yaptıkları çalışmada lovastatinin UVC ışınları tarafından uyarılan hücre ölümünü inhibe ettiğini açıklamışlardır. Yine Snyder ve ark. 2006 yaptıkları çalışmaya göre Lovastatinin in vitro ve in vivo ortamda genotoksik olmadığını ancak kanserojenik olduğunu belirtmişlerdir.

Kromozom hasar oranındaki artışın kanser için risk faktörü olduğu uzun yıllardır bilim insanlarınca kabul edilen bir durumdur. Öyleki, bilinen karsinojenlerin büyük bir çoğunluğu kromozom kırıklarına yol açmakta veya anoploidileri indüklemektedir. Eğer kanser hücrelerinin gelişimi mutasyonlarla besleniyorsa, bu durumda mutasyon oranındaki artış ve daha da önemlisi hipermutabl hücrelerin sayısındaki artış kanser riskinin artmasına yol açacaktır (Fenech,2000, 2000b). Bu sebepten elde ettiğimiz sonuçlar kanser riski ile de ilişkilendirilmesi gerekmektedir. Campbell ve ark. (2006) Statinlerin meme kanseri hücreleri üzerindeki etkileri, hem in vitro hem de in vivo olarak ve onların etki mekanizmalarını belirlemeyi amaçlamışlardır. In vivo sonuçlar oral yolla verilen statinlerin önemli ölçüde fare meme karsinomasının büyümesini engellemiş, hücre proliferasyonu düşürerek in vitro antikanser aktivitesiyle ilişkili bulunmuştur. Bardeleben ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada Lovastatin'in DNA'ya zarar veren ilaçlara karşı hücresel duyarlılığı etkileyip etkilemediğini araştırmışlardır.

Lovastatin'in hücreleri doksorubisine (antikanser ilaç) karşı oldukça dirençli hale getirdiğini saptamışlardır.

Keyomarsi ve ark. (1991) yaptıkları çalışmada Lovastatin maddesinin normal ve tümörlü hücrelerde hücre döngüsüne etki edip etmediğini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda normal ve tümör hücre döngülerinin Lovastatin'den etkilenmediğini saptamışlardır. Ostrau ve ark. (2009) HMG-CoA redüktaz inhibitörü olan Lovastatin'in in vivo ortamda radyasyon muamelesi yapıldıktan sonra normal doku toksisitesini indükleyip indüklenmediğini araştırmışlardır. Lovastatin'in in vivo normal dokuda radyasyon kaynaklı hücre ölümünü inhibe ettiğini ve bu nedenle, Lovastatin'in radyoterapinin neden olduğu normal doku hasarını seçici olarak hafifletmek için yararlı olabileceğini bildirmişlerdir. Henniger ve ark. (2012) ana detoksifikasyon organı olan karaciğere yüksek konsantrasyonlarda ve sürekli olarak çeşitli çevresel ajanlar, genotoksik bileşikler göndermişlerdir. Lovastatin'in karaciğer üzerinde koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmak için fareleri doksorubisin ile muamele edilip daha sonra Lovastatin ile tedavi etmişlerdir. Tedavi edilen farelerin gen ekspresyonları yapılmıştır. Mevcut DNA hasarında azalma görülmüştür. Maejima ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada Pitavastatin'in kromatin yapılarını nasıl değiştirdiğini araştırmışlardır. Bunun için HUVEC (umbilikal ven endotel hücreleri) hücrelerinde microarray yöntemi ile SiRNA incelemeleri yapılmıştır. KLF4 (Kruppel like factor) Pitavastatin ile kromatin yapı değişikliğini indüklediği ortaya çıkmıştır. Graaf ve ark. (2004) statinlerin kanser üzerine etkisini araştırmak için kanser hastası olan insanların bir kısmına statin tedavisi uygulamış, kalan kısmına ise statin tedavi uygulamamışlardır. Yapılan tedavi sonrasında kanser hastalarında tümör incelemeleri yapılmış ve statin ile tedavi edilen hastaların tümör seviyelerinde azalma gözlemlenmiştir. Strandberg ve ark. (2004) statinlerin kanser riski olup olmadığını saptamak için 10 yıl süren bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmanın neticesinde statinlerin kanser riski oluşturmadığını bildirmişlerdir. Yukarıdaki çalışmaların büyük bir kısmının sonuçlarına göre statinler genotoksik

riskleri minimize etmektedir. Bu koruyucu etkinin oksidatif stresin baskılanmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

4.2.2. Ezetimib'in Hücre Proliferasyonu, Mitoz Bölünme ve Nukleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri

Ciaravino ve ark. (1995) Atorvastatinin genotoksik etkisini in vivo ve in vitro olarak incelemişlerdir. Atorvastatin'in genotoksik olmadığını saptamışlardır. Snyder ve ark. (2006) çalışmalarında içlerinde lovastatinin de bulunduğu birçok madde çalışmışlardır. Lovastatin'in in vitro ortamda sitotoksik olmadığını söylemişlerdir. Choi ve Jung (1999) C6 glial hücrelerinde Lovastatinin sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda deneyde kullanılan düşük konsantrasyonların hücre döngüsünü ve ölümünü etkilemediği ancak yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etkinin görüldüğünü saptamışlardır. Nübel ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada Lovastatinin iyonize radyasyona karşı koruyucu etkisinin olup olmadığı HUVEC (primer insan umbilikal ven endotel hücreleri) hücrelerinde araştırılmıştır. Lovastatin HUVEC hücrelerini iyonize radyasyon kaynaklı hücre ölümünden koruduğunu fakat insan fibroblastlarında radyasyona karşı herhangi bir direnç sağlayamadığını saptamışlardır. Gauthaman ve ark. (2007) statinlerin kanser hücreleri üzerinde apoptotik etkisinin olup olmadığını araştırmışlardır. Yumurtalık ve kolorekteal kanser hücrelerinde in vitro olarak incelendiğinde Lovastatinin bu hücrelerdeki apoptotik genlerin aktivasyonunda bir artış olduğunu ve bu hücreleri apoptoza sevk ettiğini bildirmişlerdir. Solomon ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada Ezetimib'in fareler üzerindeki apoptotik etkisi araştırmak için prostatlı fareleri iki hafta süre ile Ezetimib ile muamele etmişlerdir. Çalışma sonucuna göre Ezetimib'in progresyonu düşürdüğünü bildirmişlerdir. Maekawa ve ark. (2012) yaptıkları çalışmalarında 44 tavşanı iki gruba ayırmışlardır. Birinci grup kontrol grubu ikinci grup ise (0.6 mg / kg/gün) Ezetimib verilen gruptur. 14 gün sonra hücre sayımı yapıldığında Ezetimib ile muamele edilen grupta hücre proliferasyonunun düştüğü açıklanmıştır. Lee ve

ark. (2016) alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) olan hastalarda Ezetimibin apoptotik rolünü araştırmışlardır. Ezemibin bu hastalarda karaciğerin oksidatif hasara duyarlılığını azalttığı ve buna bağlı olarak apoptotik hücre ölümünü koruduğunu saptamışlardır.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Dünyada kullanılan ilaç sıralaması yönünden liste başı olan kolesterol ilaçları yüzbinlerce insan tarafından günlük olarak alınmakta ve yıllar süren tedavilerde kullanılmaktadır. Bu çalışmada kolesterol düşürücü olarak kullanılan Ezetimib'in sağlıklı insan lökositlerinde in vitro şartlarda kardeş kromatid değişmesi, kromozom anormalliği ve mikronukleus oluşumu gibi genotoksisite parametrelerini uyardığı saptanmıştır. Sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde Ezetimib'in genotoksik risk oluşturabileceği yönünde verilere ulaşıldığı söylenebilir. Bu genotoksisite eğiliminin hangi etkilerden kaynaklandığı bu çalışmada yapılan testlerle belirlenememiştir.

Ezetimib proliferasyon indeksi, mitotik indeks ve nükleer bölünme indeksi gibi hücre bölünme indekslerinde, konsantrasyonlara bağlı olarak önemli azalmalara neden olmuştur. Bu düşüşler ezetimibin sitotoksik potansiyeli ile ilgili önemli ipuçları vermektedir.

Daha önce yapılan çalışmalardan farklı sonuçlara ulaşılması seçilen hücre tipiyle ve test yöntemi ile ilgili olabilir. Çünkü bu çalışmada sağlıklı insan lenfositleri Ezetimib'e in vitro kültür şartlarında kısa süreli (24 veya 48 saat) olarak maruz bırakılmıştır. Araştırma bulgularına göre test maddesi kanser tedavisinde kullanılan antikanserojenlerin etkisine benzer tarzda etkiler göstermiştir. Ancak anılan bu etkilerin sağlıklı hücre kültüründe saptanmış olması bu çalışmanın farkını ortaya koymaktadır.

Tüm bu veriler göz önüne alındığında, çalışmada elde edilen verileri desteklemek için farklı in vitro ve in vivo test sistemleri ve farklı hücre hatlarında çalışılması, Ezetimib ile ilgili belirsizliği büyük ölçüde ortadan kaldıracaktır.



KAYNAKLAR

- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E.G., Tice, R., Waters, M.D. and Artio, A., 2000. IPCS Guidelines for The Monitoring of Genotoxic Effects of Carcinogens in Humans. *Mutat. Res.*, 463:111-172.
- Ajith, T.A., Soja, M., 2006. A comparative study on the antimutagenicity of atorvastatin and lovastatin against directly acting mutagens, *Cell Biol Toxicol* 22:269–274.
- Alsheikh-Ali, A.A., Karas, R.H., 2009. Ezetimibe, and the combination of ezetimibe/simvastatin, and risk of cancer: A post-marketing analysis, *Journal of Clinical Lipidology*, 3(2):138–142.
- Ason, B., Tep, S., Davis Jr., H.R., Xu, Y., Tetzloff, G., Galinski, B., Ferdie Soriano, F., Natalya Dubinina, N., Lei Zhu, L., Alice Stefanni, A., K. Wong, K.K., Tadin-Strapps, M., Bartz, S.R., Hubbard, B., Ranalletta, M., Sachs, A.B., Flanagan, W.M., Strack, A., Kuklin, N.A., 2011. Improved efficacy for ezetimibe and rosuvastatin by attenuating the induction of PCSK9, *J. Lipid Res.*, 52:679–687.
- Bardelen, R.V., Dunkern, T., Kaina, B., Fritz, G., 2002. The HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin protects cells from the antineoplastic drugs doxorubicin and etoposide. *International Journal of Molecular Medicine.*, 10: 473-479.
- Bardeleben, R.V., Kaina, B., Fritz, G., 2003. Ultraviolet light-induced apoptotic death is impaired by the HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307:401–407.
- Berber, A. A., Celik, M., Aksoy, H., 2013. Genotoxicity evaluation of HMG CoA reductase inhibitor rosuvastatin. *Drug Chem Toxicol.*, 37(3):316-21.

- Campbell, M.J., Esserman, L.J., Zhou, Y., Shoemaker, M., Lobo, M., Borman, E., Baehner, F., Kumar, A.S., Adduci, K., Marx, C., Petricoin, E.F., Liotta, L.A., Winters, M., Benz, S., Benz, C.C., 2006. Breast Cancer Growth Prevention by Statins, *Cancer Res*, 66(17):8707-8714.
- Choi, J.W., Jung, S.E., 1999. Lovastatin induced proliferation inhibition and apoptosis in C6 glial cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289 (1) :572-579.
- Ciaravino, V., Kropko, M.L., Rothwell, C.E., Hovey, C.A., Theiss, J.C., 1995. The genotoxicity profile of atorvastatin, a new drug in the treatment of hypercholesterolemia, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 343(2-3):95-107.
- Coetsee, T.N., Pretorius, P.J., Blache, G.T., Bergh, J.J., 2008. Investigating the potential neuroprotective effects of statins on DNA damage in mouse striatum, *Food and Chemical toxicology*, 46(9): 3186-3192.
- Damrot, T., Nübel, B., Epe, W.P., Roos, B., Kaina, G., 2006. Lovastatin protects human endothelial cells from the genotoxic and cytotoxic effects of the anticancer drugs doxorubicin and etoposide *British Journal of Pharmacology*, 149:988–9.
- Eastmond, D. A. and Tucker, J. D., 1989. Identification of Aneuploidy- Inducing Agents Using Cytokinesis-Blocked Human Lymphocytes and an Anti-Kinetochore Antibody. *Environ. Mol. Mutagen.*, 13:34-43.
- Evans, H.J., 1984. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. In: Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (Eds.), Second edition, Elsevier Science Publishers, 405-427.
- Fenech, M., 1997. The Advantages and Disadvantages of the Cytokinesis-Block Micronucleus Method. *Mutat. Res.*, 392: 11-18.
- Fenech, M. 2000. The invitro micronucleus Tecnique, *Mutation Research* 455: 81-95.

- Fenech, M. 2002b. Chromosomal Biomarkers of Genomics Instability Relevant to Cancer. *Drug Discovery Today*, 22: 1128-1137.
- Gajski, G., Garaj-Vrhovac, V., Orescanin, V., 2008. Cytogenetic status and oxidative DNA-damage induced by atorvastatin in human peripheral blood lymphocytes: Standard and Fpg-modified comet assay, *Toxicology and Applied Pharmacology*. 231(1):85-93.
- Gauthaman, K., Richards, M., Wong, J., Bongso, A., 2007. Comparative evaluation of the effects of statins on human stem and cancer cells in vitro. *Reproductive biomedicine Online*, 15(5):566-581.
- Gnad, R., Kaina, B., Fritz, G., 2001. Rho GTPases Are Involved in the Regulation of NF- κ B by Genotoxic Stress, *Experimental Cell Research*, 264:244–249.
- Graff, M.R., Beiderbeck, A.B., Egberts, A.C.G., Richel, D.J., Guchelaar, H., 2004. The Risk of Cancer in Users of Statins, *Journal of Clinical Oncology*, 22(12):2388-2394.
- Gouni-Berthold, I., Berthold, H.K., Gylling, H., Hallikainen, M., Giannakidou, E., Stier, S., Ko, Y., Patel, D., Soutar, A.K., Seedorf, U., Mantzoros, C.S., Plat, J., Krone, W., 2008. Effects of ezetimibe and/or simvastatin on LDL receptor protein expression and on LDL receptor and HMG-CoA reductase gene expression: A randomized trial in healthy men, *Atherosclerosis* 198:198–207.
- Halleck, M., Davis, H.R., Kirschmeier P., Levitan, D., Snyder, R.D., Treinen, K., MacDonald J.S., 2009. An assessment of the carcinogenic potential of ezetimibe using nonclinical data in a weight-of-evidence approach, *Toxicology* 258:116–130.
- Heek, V.M., Farley, C., Compton, D.S., Hoos, L., Alton, K.B., Sybertz, E.J., Davis, H.R., 2000. Comparison of the activity and disposition of the novel cholesterol absorption inhibitor, SCH58235, and its glucuronide, SCH60663, *Br J Pharmacol.*, 129(8):48-54.

- Henninger, C., Huelsenbeck, J., Huelsenbeck, S., Grösch, S., Schad A., Lackner, K.J., Kaina, B., Fritz, G., 2012. The lipid lowering drug lovastatin protects against doxorubicin-induced hepatotoxicity, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 261:66–73.
- Holstein, S.A., Holh, R.J., 2001. Synergistic interaction of lovastatin and paclitaxel in human cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 1(2):141-149.
- Imaeda, A., Kaneko, T., Aoki, T., Kondo, Y., Nakamura, N., agase, H., Yoshikawa, T., 2002. Antioxidative effects of fluvastatin and its metabolites against DNA damage in streptozotocin-treated mice, *Food and Chemical Toxicology*, 40(10):1415-1422.
- Isidori, M., Nardelli, A., Pascarella, L., Rubino, M., Parrella, A., 2007. Toxic and genotoxic impact of fibrates and their photoproducts on non-target organisms, *Environment International*, 33(5):635-641.
- Kauderer, B., Zamith, H., Paumgarten, F. J. and Speit, G., 1991. Evaluation of the Mutagenicity of Beta-Myrcene in Mammalian Cells In Vitro. *Environ. and Mol. Mutagen.*, 18(1):28-34.
- Keyomarsi, K., Sandoval, L., Band, M., Pardee, A.B., 1991. Synchronization of Tumor and Normal Cells from G to Multiple Cell Cycles by Lovastatin. *Cancer Research*, 51:3602-3609.
- Kuhlencordt, P.T., Padmapriya, P., Rützel, S., Schödel, J., Hua, K., Schäfer, A., Huang, P.L., Ertl, G., Bauersachs J., 2009. Ezetimibe potently reduces vascular inflammation and arteriosclerosis in eNOS-deficient ApoE ko mice, *Atherosclerosis*, 202:48–57.
- Kul, D., 2011. Electrochemical determination of anti-hyperlipidemic drug ezetimibe based on its oxidation on solid electrodes. *Analytical Letters*, Vol: 44(7),1341-1357.
- Lamprecht, J., Wójcik, C., Jakoubisak, M., Stoehr, M., Schroeter D., Paweletz, N., 1999. Lovastatin Induces Mitotic Abnormalities In Various Cell Lines, *Cell Biology International*, 23:(1)51–60.

- Lee, D.H., Han, D.H., Nam, K.T., Park, J.S., Kim, S.H., Lee, M., Kim, G., Min, B.S., Cha, B., Lee, Y.S., Sung, S.H., Jeong, H., Ji, H.W., Lee, M.N., Lee, J.S., Lee, H., Chun, Y., Kim, J., Bae, S.H., 2016. Ezetimibe, an NPC1L1 inhibitor, is a potent Nrf2 activator that protects mice from diet-induced nonalcoholic steatohepatitis, *Free Radical Biology and Medicine* 99:520-532.
- Mace, M.L. JR., Daskal, Y. and Wray, W., 1978. Scanning electron microscopy of chromosome aberrations. *Mutat. Res.*, 52:199-206.
- Maekawa, T., Komori, K., Morisaki, K., Itoh, T., 2012. Ezetimibe reduces intimal hyperplasia in rabbit jugular vein graft, *Journal of Vascular Surgery* 56:(6) 1689-1697.
- Maejima, T., Inoue, T., Kanki, Y., Kohro, T., Li, G., Ohta, Y., Kimura, H., Kobayashi, M., Taguchi, A., Tsutsumi, S., Iwanari, H., Yamamoto, S., Aruga, H., Dong, S., Stevens, J.F., Poh, H.M., Yamamoto, K., Kawamura, T., Mimura, I., Suehiro, J., Sugiyama, A., Kaneki, K., Shibata, H., Yoshinaka, Y., Doi, T., Asanuma, A., Tanabe, S., Tanaka, T., Minami, T., Hamakubo, T., Sakai, J., Nozaki, N., Aburatani, H., Nangaku, M., Ruan, X., Tanabe, H., Ruan, Y., Ihara, S., Endo, A., Kodama, T., Wada, Y., 2014. Direct Evidence for Pitavastatin Induced Chromatin Structure Change in the KLF4 Gene in Endothelial Cells, *Plos One*, 5;9(5).
- Manfredini, V., Biancini, G.B., Vanzin, C.S., Vesco, A.N.R.D., Cipriani, F., Biasi, L., Tremea, R., Deon, M., Peralba, M.C.R., Wajner, M., Vargas, C.R., 2010. Simvastatin treatment prevents oxidative damage to DNA in whole blood leukocytes of dyslipidemic type 2 diabetic patients, *Cell Biochemistry and Function*, 28(5):360-366.
- Minagh, E., 2008. Ecotoxicological investigations of pharmaceutical compounds on a battery of freshwater test species. Dublin Institute of Technology. doi:10.21427/D7D893.

- Müller-Tegethoff, K., Asper, P., Müller, L., 1995. Evaluation studies on the in vitro rat hepatocyte micronucleus assay, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 335(3):293-307.
- Nakagami, H., Osako, M.K., Takami, Y., Hanayama, R., Koriyama, H., Mori, M., Hayashi, H., Shimizu, H., Morishita, R., 2009. Vascular protective effects of ezetimibe in ApoE-deficient mice, *Atherosclerosis* 203:51–58.
- Nubel, T., Chmitt, S.S., Aina, B.K., Fritz, G., 2005. Lovastatin stimulates p75 TNF receptor (TNFR2) expression in primary human endothelial cells. *Int J Mol Med.*, 16(6):1139-45.
- Nubel T., Damrot, J., Roos, W.P., Kaina, B., Fritz, G., 2006. Lovastatin protects human endothelial cells from killing by ionizing radiation without impairing induction and repair of DNA double-strand breaks. *Clin. Cancer Res.*, 12(3):933-939.
- O'Donnell, M.P., Kasiske, B.L., Kim, Y., Schmitz, P.G., Keane, W.F., 1993. Lovastatin retards the progression of established glomerular disease in obese Zucker rats. *American Journal of Kidney Diseases*. 22(1):83-89.
- Orsolin, P.C., Silva-Oliveira, R.G., Nepomuceno, J.C., 2015. Modulating effect of synthetic statins against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*, *Food and Chemical Toxicology* 81:111–119.
- Ostrau, C., Hülsenbeck, J., Herzog, M., Schad, A., Torzewski, M., Lackner, K.J., Fritz, G., 2009. Lovastatin attenuates ionizing radiation-induced normal tissue damage in vivo, *Radiotherapy and Oncology* 92:492–499.
- Pernice, F., Floccari, F., Caccamo, C., Belghity, N., Antuano, S., Pacile, M.E., Romeo, A., Nostro, L., Barilla, A., Crasci, E., Frisina, N., Buemi, M., 2006. Chromosomal damage and atherosclerosis. A protective effect from simvastatin, *European Journal of Pharmacology*, 532(3):223-229.
- Perry, P. and Thomson, E.J., 1984. The methodology of sister chromatid exchanges, in: B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel (Eds.). *Handbook of Mutagenicity*, 459–529.

- Preston R.J., San Sebastian, J.R., McFee A.F., 1987. The in vitro human lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents. *Mutat. Res.*, 189:175-183.
- 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.
- Robison, R.L., Suter, W., Cox, R.H., 1994. Carcinogenicity and Mutagenicity Studies with Fluvastatin, a New, Entirely Synthetic HMG-CoA Reductase Inhibitor, *Toxicol Sci* 23(1):9-20.
- Rocco, L., Frenzilli, G., Zito, G., Archimandritis, A., Peluso, C., Stingo, V., 2010. Genotoxic effects in fish induced by pharmacological agents present in the sewage of some Italian water-treatment plants, *Environmental Toxicology*, 27(1):18-25.
- 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.
- Salen, G., Bergmann, K.V., Lütjohann, D., Kwiterovich, P., Kane, J., S.B. Patel, S.B., Musliner, T., Stein, P., Musser, B., 2004. Ezetimibe Effectively Reduces Plasma Plant Sterols in Patients With Sitosterolemia, *Circulation*, 109(8): 966–971.
- Sallustio, B.C., Harkin, L.A., Mann, M.C., Krivickas, S.J., and Burcham, P.C., 1997. Genotoxicity of Acyl Glucuronide Metabolites Formed from Clofibric Acid and Gemfibrozil: A Novel Role for Phase II-Mediated Bioactivation in the Hepatocarcinogenicity of the Parent Aglycones, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 147:459–464.

- Snyder, R.D., Ewing, D., Hendry, L.B., 2006. DNA intercalative potential of marketed drugs testing positive in in vitro cytogenetics assays, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 609(1):47-59.
- Speit, G., 1984. Considerations on the mechanism of differential Giemsa staining of BrdU-substituted chromosomes. *Hum. Genet.*, 67:264-269.
- Speit, G, and Haupter, S., 1985. On the mechanism of differential Giemsa staining of bromodeoxyuridine substituted chromosomes. II. Differences between the demonstration of sister chromatid differentiation and replication patterns. *Hum. Genet.*, 70:126-129.
- Strandberg, T.E., Pyörälä, K., Cook, T.J., Wilhelmsen, L., Faergeman, O., Thorgeirsson, G., Pederson, T.R., Kjekshus, J., 2004. Mortality and incidence of cancer during 10-year follow-up of the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S), *Lancet* 364:771–777.
- Solomon, K.R., Pelton, K., Boucher, K., Joo, J., Tully, C., Zurakowski, D., Schaffner, C.P., Kim, J., Freeman, M.R., 2009. Ezetimibe Is an Inhibitor of Tumor Angiogenesis, *The American Journal of Pathology* 174: 1017-1026.
- Tawfeeq, M.M., Suzuki, T., Shimamoto, K., Hayashi, h., Shibutani, M., mitsumori, K., 2010. Evaluation of in vivo genotoxic potential of fenofibrate in rats subjected to two-week repeated oral administration. *Archives of toxicology*, 85(8):1003-1011.
- Temel, R.E., Weiqing Tang, W., Yinyan Ma, Y., Lawrence L. Rudel, L.L., Willingham, M.C., Ioannou, Y.A., Davies, J.P., Nilsson, L.M., Yu, L., 2007. Hepatic Niemann-Pick C1-like 1 regulates biliary cholesterol concentrations and is a target of ezetimibe, *J. Clin. Invest.*, 117:1968–1978.

- 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. *Mutat. Res.*, 388(1):85-95.
- Topaktaş, M. ve Speit, G., 1990. Sister Chromatid Exchange (SCE) Testinin Mutajenite ve Kanserojenitenin Belirlenmesinde Kullanılması. *Ç. Ü. Sağlık Bil. Der.*, 5(1,2, 3):73-84.
- Tymoczko JL, Berg T, Stryer L, Berg JM 2002. *Biochemistry*. San Francisco: W.H. Freeman. 726–727.
- Seedorf U., Engel, T., Lueken, A., Bode, G., Lorkowski, S., Assmann, G., 2004. Cholesterol absorption inhibitor Ezetimibe blocks uptake of oxidized LDL in human macrophages, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320:1337–1341.
- Yola, M. 2009. Ezetimib’in elektrokimyasal davranışlarının incelenmesi ve elektroanalitik yöntemlerle farmasötik preparatlardan analizi. Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı.
- Yong, L.C., Peterson, M.R., 2010. Evaluation of in vivo genotoxic potential of fenofibrate in rats subjected to two-week repeated oral administration, *British journal of Nutrition*, 105(4):496-505.
- <http://www.hayatisaglik.com/saglik-bilgiler/kolesterol-dusurucu-ilaclar.html>
- <http://www.ethicaincirlihanesesi.com.tr/kolestrol-yuksekligi-hiperlipidemi>
- <http://tr.wikipedia.org/wiki/Statinler>
- <http://www.ilacrehberi.com/v/ezetrol-10-mg-tablet-a049/kub/farmakolojik-ozellikler/>
- <https://tr.0wikipedia.org/index.php?q=aHR0cHM6Ly90ci53aWtpcGVkaWEub3JnL3dpa2kvTml5YXNpbG>
- <https://tr.0wikipedia.org/index.php?q=aHR0cHM6Ly90ci53aWtpcGVkaWEub3JnL3dpa2kvS29sZXN0ZXJvbA>

<https://tr.wikipedia.org/wiki/Lovastatin>

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

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

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

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

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

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



ÖZGEÇMİŞ

12/08/1987 tarihinde Adana’da doğdu. İlköğretimi Ahmet Karabucak İlköğretim Okulu’nda tamamladıktan sonra, liseyi Şehit Temel Cingöz Lisesi’nde bitirdi. 2010 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2013 yılında aynı bölümde yüksek lisansı bitirdi.

