

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

**SİKLOFOSFAMİD'İN İNDÜKLEDİĞİ İN VİVO KROMOZOMAL
HASARA KARŞI DOĞAL VE SENTETİK ORJİNLI BİLEŞİKLERİN
KORUYUCU ETKİLERİNİN ÜROTELİYAL EPİTEL HÜCRELERİNDE
MİKROÇEKİRDEK TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Kimyager Neslihan GÜRBÜZ

90209

Danışman

Prof.Dr. Sema BURGAZ

Ankara, 2000

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**



Sayın Prof. Dr. Rıdvan EGE'ye

Çalışmalarım sırasında değerli bilgileri ile bana her türlü yardımı sağlayan, her an yardımcı olan, desteğini esirgemeyen, beni yönlendiren çok sevdiğim ve çok saygı duyduğum danışman hocam Sayın Prof.Dr. Sema BURGAZ'a teşekkür ederim.

Eğitimim sırasındaki hoşgörü ve katkılarından dolayı
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr.Ali Esat
KARAKAYA'ya yetişme katkıda bulunan, değerli bilgilerini aktaran ve
güler yüzünü esirgemeyen çok sevdiğim hocam sayın Prof.Dr. Semra
SARDAŞ'a

Deneyler sırasında yaptığımız çalışmalarda, histopatolojik
incelemelerin gerçekleştirildiğı Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Sayın Prof.Dr.İ. Ayhan
ÖZKUL'a

Eğitimime katkıda bulunan Sayın Doç.Dr.İsmet ÇOK'a

Çalışmalarım sırasında her türlü yardım ve dostluğunu
esirgemeyen Sayın Doç.Dr. Benu KARAHALİL'e

Çalışmalarım sırasında her türlü yardım ve güler yüzlerini
esirgemeyen başta Arş.Gör. Onur ERDEM, Arş.Gör. Neslihan AYGÜN
KOCABAŞ, Arş.Gör.Gonca ÇAKMAK, Arş.Gör. Umut ÖZTOK, Arş.Gör.
Eren CİVELEK'e

Deneyler sırasında, histopatolojik incelemelerin yapıldığı
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Arş.Gör.
Recai TUNCA'ya

Deneylerimiz sırasında kimyasal madde teminindeki
yardımlarından dolayı Bilim İlaç San. Ve Tic. A.Ş. Dış İlişkiler Müdürü
Sayın Dr.Ecz. Ülkü GÜNGÖR'e

Çalışmalarım sırasında bana rahat ve düzenli bir ortam
sağlayan sabır ve özverilerini eksik etmeyen aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

I. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
II. GENEL BİLGİLER.....	6
II.1. Karsinojenik ve Mutajenik Bileşiklerin Organizmada Etkileri..	6
II.2. Antikarsinojenler ve Önerilen Etki Mekanizmaları.....	6
II.2.1. Diyet Antimutajenleri.....	7
II.2.1.1. Bioantimutajenler.....	7
II.2.1.2. Desmutajenler.....	8
II.2.2. Tümör Gelişiminin Baskılanması.....	10
II.2.3. Vitaminler ve İlişkili Bileşikler.....	12
II.3. Karsinojenik ve Mutajenik Bileşiklere Maruz Kalan Toplulukların İzlenmesinde Kullanılan Genotoksik Yöntemler.....	16
II.4. Mikroçekirdek Testi.....	18
II.4.1. Mikroçekirdek Testinin Genotoksik Kimyasal Maddelere Maruziyeti Belirleme Çalışmalarındaki Yeri.....	23
II.4.2. Eksfoliyte Hücrelerde Mikroçekirdek Testi.....	24
II.4.3. Eksfoliyte Hücrelerde Mikroçekirdek Testinin Avantajları ve Dezavantajları.....	27
II.4.4. Eksfoliyte Üroteliyal Epitel Hücrelerinde Mikroçekirdek Testi.....	28
II.5. Siklofosamid.....	30
II.5.1. Siklofosamid'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	30
II.5.2. Siklofosamid'in Kullanımı.....	31
II.5.3. Siklofosamid'in Absorpsiyonu, Dağılımı, Metabolizması, Eliminasyonu.....	31
II.5.4. Siklofosamid'in Toksisitesi.....	33
II.6. N-Asetil Sistein.....	34

II.6.1. N-Asetil Sistein'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	34
II.6.2. N-Asetil Sistein'in Kullanımı.....	35
II.6.3. N-Asetil Sistein'in Absorpsiyonu, Dağılımı Metabolizması, Eliminasyonu.....	35
II.6.4. N-Asetil Sistein'in Genotoksisiteyi Modüle Edici Etkisi.....	36
II.7. C Vitamini (L-Askorbik Asit).....	38
II.7.1. Vitamin C (L-Askorbik Asit)'nin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	39
II.7.2. C Vitamininin Kullanımı.....	39
II.7.3. C Vitamininin Metabolizması.....	40
II.7.4. C Vitamininin Genotoksisiteyi Modüle Edici Etkisi.....	41
III. MATERYAL VE METOD.....	43
III.1. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	43
III.1.1. Test İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	43
III.1.2. Test İçin Kullanılan Çözeltiler.....	43
III.1.3 Test İçin Kullanılan Aletler.....	44
III.2. Deneyin Yapılışı.....	45
III.2.1. Ürotelial Epitel Hücrelerin Elde Edilmesi ve Değerlendirilmesi.....	45
III.2.2. Siklofosfamid'in Fare Mesanesindeki Etkisinin Histopatolojik Olarak İncelenmesi.....	46
III.3. Fare Ürotelial Epitel Hücrelerinde Siklofosfamid İle Genotoksik Hasarın Elde Edilmesi.....	46
III.4. Ürotelial Epitel Hücrelerinde Siklofosfamidin Oluşturduğu Genotoksik Hasarın N-Asetil Sistein (NAC) İle Modülasyonu.....	48
III.4.1. Deneyin Yapılışı.....	48
III.5. Ürotelial Epitel Hücrelerinde Siklofosfamid'in Oluşturduğu Genotoksik Hasarın Vitamin C (L-Askorbik Asid) ile Modülasyonu.....	49
III.5.1. Deneyin Yapılışı.....	49

IV. BULGULAR.....	50
V. TARTIşMA VE SONUÇ.....	74
VI. ÖZET.....	99
VII. SUMMARY.....	102
VII. KAYNAKLAR.....	105



TABLULARIN LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1: Seçilmiş Olan Diyet Antikarsinojenleri ve Varsayılan Mekanizmaları.....	11
Tablo 2: Siklofosfamid'in Fare Mesane Epitel Hücrelerinde Oluşturduğu MÇ Sıklığının (% o) Günlere Göre Dağılımı.....	50
Tablo 3: Siklofosfamid'in Fare Mesane Epitel Hücrelerinde Oluşturduğu MÇ Sıklığının (%o) Doz Gruplarına Göre Dağılımı.....	52
Tablo 4: 2,5,7,10,15 ve 17. Günlerde, 51.6mg/kg Siklofosfamid Verilen Grupların Vücut Ağırlıkları, Karaciğer Ağırlıkları Rölatif Karaciğer Ağırlıkları.....	54
Tablo 5: Maksimum Yanıt Alınan Zaman Aralığında (10. Günde) Siklofosfamid Verilen Grupların Vücut Ağırlıkları, Karaciğer Ağırlıkları, Rölatif Karaciğer Ağırlıkları.....	56
Tablo 6: 51.6mg/kg Dozda Siklofosfamid Verilen Farelerin Mesanesindeki Lezyonların Günlere Göre Dağılımı.....	58
Tablo 7: Siklofosfamid'in Fare Mesanesindeki Oluşturduğu Lezyonların Doz Gruplarına Göre Dağılımı.....	60
Tablo 8: Fare Üroteliyal Epitel Hücrelerinde Siklofosfamid'in Oluşturduğu Mikroçekirdek Sıklığına C Vitamininin Etkisi....	62
Tablo 9: C-Vitamini Verilmiş Deney Gruplarında Vücut Ağırlığı, Karaciğer Ağırlığı ve Rölatif Karaciğer Ağırlıkları.....	64
Tablo 10: C-Vitamini Verilen Fare Mesanesindeki Histopatolojik Bulgular.....	66
Tablo 11: Fare Üreteliyal Epitel Hücrelerinde Siklofosfamid'in Oluşturduğu Mikroçekirdek Sıklığına N-Asetil Sistein'in Etkisi.....	68

Tablo 12: N-Asetil Sistein Verilmiş Deney Gruplarında Vücut

Ağırlığı, Karaciğer Ağırlığı ve Rölatif Karaciğer

Ağırlıkları (gr/100gr Vücut Ağırlığı).....70

Tablo 13: N-Asetil Sistein Verilmiş Farelerin Mesanesindeki

Histopatolojik Bulgular.....72



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1: DNA İçeren Oluşumların Bazı Ortaya Çıkış Yolları.....	19
Şekil 2: Çekirdek Anomalileri.....	20
Şekil 3: Asentrik Fragmentlerden Mikroçekirdek Şekillenmesi.....	21
Şekil 4: Diğer Mekanizmalarla Mikroçekirdek Şekillenmesi.....	22
Şekil 5: Çok Tabakalı Skuamöz Epitelde Mikroçekirdek Oluşumu....	25
Şekil 6: Epitel Dokuda Değişik Maruziyet Durumlarında Mikroçekirdek Oluşumu.....	26
Şekil 7: Siklofosfamid'in Metabolizması.....	32
Şekil 8: Maksimum Genotoksik Hasarın Oluştığı Günde Mikroçekirdekli Epitel Hücresi.....	51
Şekil 9a: Mikroçekirdekli Epitel Hücre.....	53
Şekil 9b. Mikroçekirdekli Epitel Hücre.....	53
Şekil 10: Siklofosfamid Verilen Mesanenin Histopatolojik Yapısı (H.Ex200).....	61
Şekil 11: Kontrol Grubunda Mesanenin Histopatolojik Yapısı (H.Ex500).....	61

I. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde kanser gelişiminin kimyasal bileşiklerle önlenmesi (Chemoprevention) kanser kontrol yöntemi olarak giderek artan biçimde önem kazanmaktadır. Kanser gelişiminin önlenmesi; ilaç halinde ya da diyet içerisinde tabii orijinli bileşikler halinde bir ya da daha fazla sayıda kimyasal bileşiğin verilmesiyle kanser gelişiminin engellenmesi olarak tanımlanmaktadır¹.

Amerika Birleşik Devletleri'nde kanser hastalarının 5 yıl sağ kalım oranı genelde % 51'dir. Bu oran organlara göre; akciğerde % 13, yumurtalıklarda % 39, mide de % 16, pankreas ve özofagus için % 3 ve % 9 olarak değişmektedir¹. Türkiye'de kanser hastalarının 5 yıl sağ kalım oranları yönünde sistematik bir veriye ulaşılamamıştır.

Endüstrileşmiş ülkelerde mesane kanseri kanser ölümlerinde bilinen nedenlerden birisidir. A.B.D'de her yıl yaklaşık 50.000 yeni mesane kanseri teşhisi yapılmaktadır ve bu hastaların yaklaşık 10.000'i ölmektedir². Türkiye'de Sağlık Bakanlığı 1992 yılı kanser kayıtlarına göre, solunum sistemi kanser sıklığı % 26.5, sindirim sistemi kanser sıklığı % 20.5'dir. Aynı yıldaki Ürogenital sistem kanser sıklığı % 15.4 olarak bildirilmiştir³.

Mesane kanserinin etiyolojisi tam olarak bilinmemesine rağmen, epidemiyolojik çalışmalar mesane kanserinin patojenezinde çeşitli faktörlerin rol oynadığı ortaya koymaktadır. Bu faktörler başta sigara içme olmak üzere, tatlandırıcılar, endüstriyel bileşikler, bazı ilaçların uzun süreli kullanımı ve Schistosoma enfeksiyonlarıdır².

Halen mesane kanseri dahil çeşitli tip kanser vakalarında kanser gelişimini engelleyen bileşikler ile çeşitli klinik denemeler yapılmakta ve yeni bileşiklerden bazıları da klinik denemelere alınmaktadır². Bunun yanı sıra hayvan modellerinde sentetik ve tabii orijinli pek çok kimyasal bileşiğin sıçan ve farelerde

mesane kanseri üzerindeki inhibisyon ya da baskılama özellikleri test edilmektedir¹.

Sitogenetik yöntemler, mutajenik ve karsinojenik bileşiklere maruz kalan toplumların biyoizlenmesinde geniş ölçüde kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden birisi olan mikroçekirdek yöntemi, hem klastojenik hem de iç ipliği oluşumunu etkileyen toksik bileşikleri teşhis edebilmektedir⁴. Karsinojen ve mutajenler tarafından in vivo ve in vitro olarak mikroçekirdek hücre sayısının artması, bu gibi maddelerin genotoksik etkisinin bir göstergesidir⁴. Bu nedenle mikroçekirdek sıklığının saptanması, karsinojen ve mutajenlere maruz kalan insan ve hayvan hücrelerindeki genotoksik hasarı tespit etmek için önemlidir⁵.

Kanserlerin % 92'sinin kaynağı olduğu bilinen epitel dokularda genotoksik hasarı incelemeye yönelik ilk çalışmalar 1983 yılında Stich ve Rosin tarafından mikroçekirdek testinin eksfoliyte epitel hücrelerine uyarlanması ile başlanmıştır⁶.

Çeşitli insan toplumlarında burun, dil, damak, yanak, serviks, vajina, idrar kesesi, özofagus ve bronş dokularında eksfoliyte epitel hücrelerinde mikroçekirdek sıklığının saptandığı çok çeşitli çalışmalar yapılmıştır⁷.

Yapılan bu çalışmaların bir kısmında mikroçekirdek sıklığının saptanmasının sadece genotoksik bileşiklere maruziyeti yansıtmadığı, aynı zamanda kanseri önleme çalışmalarının etkinliğini izlemeye bir gösterge olarak kullanılabileceği ortaya konmuştur^{5,8,9}.

Mukolitik bir ilaç olarak kullanılan N-asetil sistein (NAC) tiyol içeren sentetik bir bileşiktir. GSH prekürsörü olması nedeniyle son yıllarda antioksidan çalışmaların hedefi haline gelmiştir. N-asetil sistein'in koyalarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında antioksidan rolü incelenmiş radyasyona bağlı akciğer hasarının önlenmesinde önemli rol oynadığı hem biyokimyasal parametrelerle hem de histolojik bulgularla desteklenmiştir¹⁰. N-asetil sistein'in

sıçanda benzopirenin oluşturduğu klastojenik etkiyi farklı hücrelerde önemli miktarlarda azalttığı incelenen çalışmalarda görülmüştür¹¹. N-asetil sistein'in bakteride (*Salmonella typhimurium* strain) Doxorubisin (DOX), Epiklorhidrin (ECH), Sodyumdikromat (SDC), Hidrojen peroksit (H₂O₂), 4-nitroquinoline-4-oxide (4NQO) ve N-methyl-N-nitro-N-nitrosaguanidin (MNNG) gibi çeşitli mutajenlerin indüklediği mutajeniteyi azalttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir¹². N-asetil sistein'in tümör nekroz faktör α ya bağlı T hücrelerinin antitümör aktivitesini arttırdığı in vitro ve in vivo çalışmalarda gösterilmiştir¹³. Sıçanlarda 2-asetil aminoflorenin diyetle verilmesi ile karaciğerde oluşan DNA katım ürünleri düzeyinin, N-asetil sistein verilmesi ile azaltılabildiği gösterilmiştir¹⁴. Mesane ve böbrek üzerindeki etkisini N-asetil sistein ve benzer SH (sülfidril) grubu içeren 7 bileşiğin mesna (sodyum-2-merkaptetan sülfonat) gibi etkili bir şekilde önleyemediği gösterilmiştir¹⁵.

N-asetil sistein, sigara içiminin neden olduğu vücuttaki olumsuz etkilere karşı da koruyucu özellikler gösterir. Bunlara örnek olarak; alveol, bronş ve bronşlara ait mukozada histopatolojik hasar, bronkoalveoler lavaj hücrelerinde sitolojik ve sitogenetik değişiklikler verilebilir¹⁴.

N-asetil sistein ve askorbik asidin koruyucu etkileri baş, boyun kanserli hastaların lenfosit hücre kültürlerinde yapılan in vitro çalışmada test edilmiş, mutajenlerin indüklediği kromozomal kırıklarının her iki ilaç ile etkili bir şekilde azaltılabildiği ortaya konmuştur¹⁴. N-asetil sistein'in kemiricilerde mesane ve diğer tümörler üzerine olan koruyucu etkileri ile ilgili çalışmaların henüz devam etmekte olduğu bilinmektedir¹⁶.

Karotenoid, tokoferol (Vitamin E) ve askorbik asit (Vitamin C) antioksidan potansiyeli ve fazla tüketimlerinden dolayı fizyolojik önemi olan doğal kaynaklı antioksidanlardır.

Biyolojik ortamların çoğunda askorbat olarak bulunan C- vitamini (L-askorbik asit) suda eriyen hücre dışı antioksidanlardandır. Limon, portakal gibi meyveler ve yeşil sebzelerde bulunur. Etkili olarak H_2O_2 , hipoklorit, süperoksit, peroksit radikallerini ve singlet oksijeni ortadan kaldırır¹⁰. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda sebze ve meyvelerde sağlanan antikarsinogenik etkiye E,C vitamini ve beta karoten'in katkıda bulunduğu ve özellikle mide, akciğer ve mesane tümörlerinde etkili olabildiği gösterilmiştir¹⁷.

Beta-karoten'in, vitamin C ve vitamin E ile kombinasyonunun, kolon poliplerinin tekrarlamasını azalttığı yapılan 3 yıllık klinik çalışmada gösterilmiştir¹⁸.

C vitaminin, pekçok pestisidin ve aflatoksin'in diyetle rastlanan düzeylerini ve sitogenetik etkilerini azalttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. C vitamini bu koruyucu etkisini; serbest radikal ve elektrofilik metabolitleri ortadan kaldırarak göstermektedir^{19,20}.

M. Konopacka ve arkadaşları (1998) farelerin eksfoliyel epitel hücrelerinde γ ışını ile indüklenen DNA hasarının C,E vitaminleri, betakaroten ve karışımları ile modülasyonunu mikroçekirdek yöntemi ile araştırmışlardır²¹.

Deney hayvanlarının eksfoliyel üroteliyal epitel hücrelerinde siklofosamid ile indüklenen genotoksik hasarın N-asetil sistein ve C vitamini ile modülasyonunu inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışma aşağıdaki amaçlara yönelik olarak planlanmıştır;

- 1- Fare üroteliyal epitel hücrelerinde genotoksik etki oluşturmada model bileşik olarak siklofosfamid'in kullanımının uygunluğunun mikroçekirdek testi ile belirlenmesi.
- 2- N- asetil sistein'in farelerin üroteliyal epitel hücrelerinde oluşan genotoksik hasarı modülasyonu ve doz-etki ilişkisinin mikroçekirdek testi ile incelenmesi.
- 3- C vitamininin farelerin üroteliyal epitel hücrelerinde oluşan genotoksik hasarı modülasyonu ve doz-etki ilişkisinin mikroçekirdek testi ile incelenmesi.



II. GENEL BİLGİLER

II.1. Karsinogenik ve Mutajenik Bileşiklerin Organizmada Etkileri

İnsanlar, günlük yaşamlarında çok sayıda kimyasal karsinogen ve mutajenlere maruz kalabilmektedirler. Bunlar arasında antineoplastik ilaçlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aromatik aminler, nitrozaminler, metaller, radyasyon bulunur²². Bunlara uygulanan in vivo ve in vitro testler, karsinogenik ve mutajenik aktivitelerinin araştırılmasının önemini ortaya koymuştur^{23,24}.

Bir kimyasal bileşiğin kendisi toksik olabileceği gibi organizmada biyotransformasyon sonucu toksik bileşiklere dönüşebilmektedir. Karsinogenik ve mutajenik bileşikler kuvvetli elektrofilik özellikler taşırlar. Elektrofilik ara ürünlere dönüşerek metabolize olan bileşikler genellikle alkilleyici ajanlar olarak bilinir. Reaktivitesi yüksek olan bu bileşikler organizmada nükleofilik özellikli -SH, -NH₂ ya da -OH gruplarını içeren proteinlerle, RNA ve DNA gibi makromoleküllerle kovalent bağ yapabilirler. Bu bağlanmanın kimyasal karsinogeneze olgusunda neoplastik gelişimi başlattığı ve ardından mutasyona yol açtığı düşünülmektedir²⁵⁻²⁸.

II. 2. Antikarsinogenler ve Önerilen Etki Mekanizmaları

Kanser gelişiminin kimyasal bileşiklerle önlenmesi Chemoprevention olarak tanımlanmaktadır. Kanser gelişimini önlemek amacıyla kullanılan kimyasal bileşikler; sentetik olarak ya da yiyeceklerde doğal bileşikler halinde bulunmaktadır¹.

Antioksidan, antimutajen ve antikarsinogenik maddelerin biyolojik kaynakları doğal bitkilerdir²⁹.

Sentetik antioksidanlar bu yüzyılın başından beri kullanılmaktadır. Sentetik antioksidanların kullanımına toksik etkileri yüzünden sınırlama getirilmiş bu yüzden doğal antioksidanların önemi artmıştır.

Şu anda, güvenilir, ekonomik antioksidanların bulunmasına gereksinim vardır²⁹.

II.2.1. Diyet Antimutajenleri

Tabii içerikli gıdalarda bulunan bileşiklerin bir çoğu karsinogenezi önleyebilecek aktiviteye sahiptir. Yiyeceklerde doğal olarak oluşan maddeler diyet antimutajenleri olarak rol oynamaktadırlar. Antimutajenler, tümör gelişiminden önce mutajeniteyi bloke ederler³⁰. Bütün kimyasal koruyucuların mekanizmaları tam olarak bilinemediği için kesin bir sınıflama yapmak zordur¹. Bununla birlikte çeşitli sınıflamalar yapılmıştır³¹. Diyetteki antimutajenler, geniş olarak iki grupta Bioantimutajenler ve Desmutajenler olarak sınıflandırılmaktadır. Bunlar DNA'yı önceden etkileyerek, genetik materyalin direkt olarak etkilenmesini önlerler³⁰.

II.2.1.1. Bioantimutajenler

Bunlar saf antimutajenler olarak tanımlanırlar³¹. DNA onarım ya da replikasyonda rol oynayarak mutasyon sıklığını azaltırlar³⁰.

Bioantimutajenler, DNA katım ürünleri oluşuktan sonra, DNA lezyonu oluşmadan önce mutasyonu durağan hale getirerek mutasyon oluşumunu önlerler³⁰. İn-vitro test sistemlerinde, antimutajenler farklı durumlarda gösterirler. Bioantimutajenler bazı deney şartlarında genotoksite de gösterebilirler. Bioantimutajenlere örnek olarak fenolik bileşikler (flavonoidler, tanenler, kateşinler) vanilya verilebilir¹⁸. İn vitro 31 çalışmanın 17 sinde vanilya mutajeniteyi azaltırken, 5'inde etki göstermemiş, 9'unda arttırmıştır³².

II.2.1.2. Desmutajenler

Clarke ve Shankel (1975) sadece belli antimutajenlerin Desmutajen olarak düşünülmesi gerektiğini desmutajenezis'in en azından üç mekanizma ile gerçekleştiğini ve bunların düzeylerini pratikte ayırt etmenin çok zor olduğunu ifade etmişlerdir³⁰.

Desmutajenler, DNA onarım ya da replikasyonundan farklı mekanizmalar ile mutajenik etkili bütün maddeleri sararlar. Bu mekanizmalar, kimyasal inaktive ediciler, enzim indükleyiciler, temizleyicilerdir¹⁸.

Desmutajenler, mutajen ya da prekürsörleri ile direkt etkileşerek onları inaktif hale getirirler³³.

Bioantimutajenler gibi desmutajenlerde belirli şartlar altında mutantları baskırlarlar. Bioantimutajenlere benzemezler fakat bununla birlikte genetik metaryalı direkt olarak etkilemeden, bu etkiler meydana gelir³¹. Net etki, her hücrede değişen DNA düzeyinin indirgenmesidir¹⁸.

Kimyasal İnaktive Ediciler ve Enzimatik Modölatörler:

Kimyasal inaktive ediciler ve enzimatik modölatörler, mutajen ya da onların daha güçlü aktif şekillerinin oluşumunu önleyici ajanlardır. Kimyasal inaktive ediciler, aktif karsinojen bileşiklerin oluşumunu direkt olarak inhibe ederler³¹. Mide'de nitrozaminlerin nitrit'e çevrilmesi gibi¹⁸ Mutajenler kimyasal olarak aktiftirler, sadece DNA'yı değil aynı zamanda protein ve enzimleri de etkilerler. Bunlar farklı kimyasallar ile direkt olarak inaktif hale getirilebilirler. Bir çok çalışmada toksik maddelerin inaktif hale getirilmesi ve detoksifikasyonu gösterilmiştir³¹. Modölatörler, faz I ya da faz II enzimlerini indükleyen ya da farklı enzim aktivitelerinin ayarını değiştiren enzim sistemleri olarak rol oynarlar¹⁸. Bunlara; örnek olarak askorbik asit, glukosinolatlar ve garlik bileşikleri

verilebilir¹⁸. Antimutajenik ve antikarsinojenik özellikler, sitokrom P-450 enzimlerinin hem indüklenmesi hem de inhibe edilmesi ile ilişkilendirilebilirler³⁴.

Temizleyiciler:

Desmutajenlerin bir çoğu, mutajenlere bağlanarak ya da onları adsorplayarak temizlerler³⁴.

Temizleyiciler, mutajen ile karşılıklı bağ oluşturarak DNA ile reaksiyona girme kabiliyetini yetersiz hale getirirler. Bir başka anlamda, mutajenin DNA ile reaksiyonunu önlerler³¹. Bu gruptaki bileşiklere örnek olarak, klorofil içeren porfirinleri verebiliriz³⁵. Klorofil'in in-vitro olarak, aflotoksin B₁, benzo(a)piren gibi mutajenlerini geniş bir sınıfının mutajenik etkisini inhibe ettiği sadece karsinojenlerin çok az bir kısmına karşı etki göstermediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir³¹.

Antioksidanlar:

Antioksidanlar, kimyasal maruziyet ya da radyasyonun sonucu olarak ya da iç kaynaklı olarak oluşan stabil olmayan oksijen türlerine elektron vererek etkilerini gösterirler. Bu özellikleri ile bir çok yol ile kansere karşı koruyucu olabilir³⁶. Antioksidanlar, hücre membranının fiziksel bütünlüğünün artmasına ve normal membranların oluşumuna yardım eder¹⁸. Bu gruptaki bileşiklere örnek olarak Askorbik asit (C vitamini), Karotenoidler (β -karoten)'i verebiliriz³⁷.

Antioksidanların başlıca avantajı, mutajenlerin geniş bir kısmına karşı etkili olmalarıdır³⁸.

II.2.2. Tümör Gelişiminin Baskılanması

Tümör gelişiminin baskılanması, karsinogenesinin oluşumunda geç durumlarda görülür (Post initiation gibi) Bu gruptaki maddeler, tümör geliştirici ile etkileşimi ya da tümörün büyüme ve diğer dokulara sıçramasını engelleyen etkileri ayrıntılı olarak açıklar³⁹. Tümör inhibisyonuna örnek olarak fitoestrogenler ve sarımsak yağı verilebilir^{40,41}.

Diyetteki antikarsinojenler birçok mekanizma ile rol oynarlar. DNA onarım ve replikasyon, kimyasal ya da enzimatik inaktivasyon, mutajenlerin temizlenmesi, antioksidan aktivitesi ve tümör inhibisyonu gibi¹⁸.

Tablo 1 de görüldüğü gibi bir çok bileşik birden fazla mekanizma ile antikarsinojenik etki gösterebilir¹⁸.

Tablo 1:

Seçilmiş Olan Diyet Antikarsinojenleri ve Varsayılan Mekanizmaları

Mekanizmaları						
Bileşik	Bioantimutajen	Desmutajen				
		Direk kimyasal İnaktivatörler	Enzim İnaktivatörleri	Temizleyiciler	Antioksidan	Tümör Gelişimini Baskılayanlar
Vanillin	X	--	--	---	--	---
Askorbik asit (C vitamini)	--	--	X	---	X	X
Porfirinler (Klorofil)	--	--	--	X	X	X
Karotenoidler (β-karoten)	--	--	--	--	X	X
Fitoestrogenler (Soya ürünleri)	--	--	?	--	?	X
Takoferoller	--	X	--	--	X	--
Fenolik Bileşikler (Flavonoidler, tanenler, katehinler)	X	--	X	--	X	X
Indol	--	--	X	--	--	X
Selenyum	--	--	--	--	X	X
Omega-3 yağ asidi	--	--	--	--	--	X

Karotenoidler, takoferoller, fenolik bileşikler, glukosinolatlar, metallere bağlanan proteinler, fitoestrogenler ve linoik asit konjugatları kuvvetli antikarsinojenik özellik gösterirler. Bu yiyecek çeşitlerinin antikarsinojen özelliği çok yönlüdür. Bu maddelerin çoğu birden fazla mekanizma ile karsinogeneziste etkili olabilir. İn-vitro olarak yapılan çalışmalarda bu maddelerin bazılarının şartlara bağlı olarak, hem antikarsinojenite hem de karsinojenite gösterdiği belirlenmiştir. Küçük çaplı araştırmalar, tek madde ya da tek yiyeceğin insanlar üzerine etkileri konusunda yapılmıştır. Epidemiyolojik çalışmalar, fazla meyve ve sebze tüketiminin düşük kanser riski ile ilişkili olduğunu göstermiştir¹⁸.

II.2.3. Vitaminler ve İlişkili Bileşikler

Karotenoidler, tokoferoller (Vitamin E) ve askorbik asit (Vitamin C) antioksidan özellik gösteren bitkisel kaynaklı maddelerdir¹⁸.

Karotenoidler:

Karotenoidler içinde en çok bilineni β -karotendir¹⁸.

Karotenoidler, serbest radikaller ile konjugasyon yaparak onları temizlerler⁴². İn-vivo olarak hamsterda yapılan çalışmalarda karotenoidler tümör insidansını etkilemiş ve hatta tümörleri azaltmıştır^{43,44}. İnsanlarda yapılan çalışmalarda karotenoidlerin fazla tüketiminin akciğer kanserini önlediğini göstermiştir⁴⁵.

Tokoferoller:

Doğal tokoferoller 8 bileşikten oluşur ki onlarda E vitamini olarak bilinir. Birçok çalışmada, kandaki α -tokoferol ve total vitamin E düzeyleri ile kanseri önleyici ilişkileri araştırılmıştır. Bu çalışmaların; çoğu Gastrointestinal, akciğer, kolon, göğüs, servikal ve oral kanserler gibi spesifik kanser tiplerinde önleyici etkilerin değerlendirilmesini içermektedir. β -karotenin C vitamini ve E vitamini ile birlikte alınması, kolon poliplerinin tekrarlamasını önleyemediği ifade edilmiştir⁴⁶. α -Tokoferol β -karoten'in klinik denemeleri koruyucu etki göstermez iken yapılan çalışmalarda E vitamini verilen gruplarda akciğer kanseri, prostat kanseri mortalitesinin önemli miktarda düşük olduğu ifade edilmiştir⁴⁷.

Askorbik asit (Vitamin C):

Suda eriyen hücre dışı antioksidanlara örnek olarak verilebilir. Çift özelliği vardır. Bir taraftan tek oksijeni ve serbest radikal sınıflarını söndürür. Diğer taraftan antioksidan bileşiklerin fonksiyonlarını korur³⁷.

Fenolik Bileşikler :

Fenolik bileşikler, fenoller, fenolik asitleri, hidroksisinamik asit ve onun türevlerini ve flavonoidleri içerirler¹⁸. Fenolik bileşikler, bazı mekanizmalar ile karsinogenezise karşı etkili olabilirler. Bu bileşikler, karsinogenleri ya da serbest radikalleri temizleyebilirler. Reaktif oksijen türlerini de bloke edebilirler¹⁸. İn-vivo (kemiricilerde) olarak yapılan çalışmalarda flavonoidler kolon tümörlerine karşı koruyucu etki göstermişlerdir⁴⁸. Hayvan deneyleri, birçok spesifik katehinin antikarsinogenik aktivitesini de gösterir. Çay katehinlerinin, farede tümörigenezi ve gelişimini indirdiği ifade edilmektedir⁴⁹.

Glukosinolatlar:

Glukosinolatlar, lahana, karnabahar, brüksel lahanası gibi turp familyasından olan sebzelerde özellikle Brassicaceae cinsinde bulunurlar. Avrupa'da lahana tüketimindeki farklılıklar kolon kanserinden ölüm oranlarındaki farklılıklar ile ilişkili, akciğer kanserinden ölüm oranında ise ilişkisizdir⁵⁰.

Brassica sebzelerinin tüketilmesi sonucu karsinogenezin modülasyonu, laboratuvar hayvanlarında değişik karsinogenler ile incelenmiştir. Hayvanlarda lahana katılarak ve katılmadan tümör gelişiminin kıyaslanması, bazı tümörlerin oluşumunun etkilerinin değerlendirilmesini sağlamıştır. Fare ve sıçanların diyetlerine lahana katılması ile tümör oluşumu azalmıştır^{51,52}. Brassicaceae bileşenlerinden olan indol-3 karbinol, estrogen metabolizmasında modülatör rol oynayarak karsinogenezisi indirir⁵³. Indol-3 karbinol, dimetil

benz(a)ntrasen ve benzo(a)piren gibi karsinogenlerin indirgediği 2-OH estradiol metabolit düzeylerinin idrar ile atılımını artırır¹⁸.

Metaller ve Metale Bağlanan Proteinler

Hücre içinde metallere bağlanan proteinler, uygun olmayan reaksiyonlardan açığa çıkan, oksidanları katalizlemek için, gereken metallerin çevrimi ile antioksidanlar gibi rol oynayabilirler. Direkt olarak serbest radikalleri de söndürebilirler. Hücre içinde metallere bağlanan proteinlerin en önemlileri; laktoferrin, transferrin, seruplazmin ve haptoglobinlerdir.

En çok çalışılan selenyum glutatyon peroksidazdır^{54,55}.

Kanser çeşitlerinin çoğunun vaka-kontrol çalışmasında, dokularda azalan selenyum düzeyleri gösterilmiştir. Çalışmaların çoğunda selenyum düzeylerinin hastalığın öncesinde ya da devamında azalıp azalmadığı açıktır.

Prospectif çalışmalarda, uzun süreli selenyum düzeyini belirlemede gösterge olarak kullanılan ayak tırnağı selenyum düzeyleri ile akciğer kanseri arasında ilişki gözlemlenmemiştir⁵⁶.

Fitoestrogenler:

Estrojen ve bazı kanserler (göğüs, yumurtalık kanserleri gibi) arasında kurulan ilişki bize fitoestrogenlerin önemini gösterir. Estrojenin hassas göğüs tümörleri gibi bazı kanserler için arttırıcı etki ve prostat tümörleri gibi diğer kanserleri azaltıcı etki gösterdiği düşünülmektedir¹⁸.

Linoleik Asit Konjugatları ve Omega-3 Yağ Asidi:

Linoleik asit'in izomerlerinin karışımı ile konjuge olan linoleik asit, tümör baskılayıcı olarak rol oynar. Karsinojenlere maruz bırakılan sıçanlarda, göğüs tümörleri sıklığını linoleik asit konjugatlarının önemli ölçüde azalttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir⁵⁷. Hindi ve kırmızı et, süt, peynir linoleik asit konjugatlarının diyetteki kaynaklarıdır. Omega-3 yağ asidi, hayvan modellerinde tümör gelişimini önlemektedir. Balıklar, Omega-3 yağ asidinin diyetteki başlıca kaynaklarıdır. Kemiricilere balık yağı verilmesi göğüs tümörlerini azaltmıştır⁵⁸.



II.3. Karsinogenik ve Mutajenik Bileşiklere Maruz Kalan Toplulukların İzlenmesinde Kullanılan Genotoksik Yöntemler

Karsinogenik ve mutajenik bileşiklere maruziyetlerde sağlık problemlerini etkili bir şekilde önleyebilmek için, sağlık risklerini gözlemlemek gerekmektedir. İnsanların çevresel mutajenlere maruziyetini izlemek için birçok teknik ve yaklaşımlar geliştirilmiştir. Geleneksel yaklaşımlarda kan hücreleri örneğin lenfosit ve kırmızı kan hücreleri etkileri izlemek için gösterge olarak kullanılmaktadır. Hernekadar uzun-süreli hastalıklarda kan hücreleri etkili değilse de, sağlık problemlerinin erken belirtilerini tespit etmede incelenebilen hücre tipleri olarak kabul edilirler.

Diğer taraftan, incelenen hücrelerde göstergelerin sonuçları (örneğin DNA adducts, gen mutasyon ve kromozom aberasyon) ile sağlık sonuçları arasındaki ilişkilere ait dokümanların yeterli olmadığı belirlenmiştir.

Prospektif ve retrospektif nitelikteki Kohort çalışmalarda elde edilen veriler kromozom aberasyon sıklığı yüksek olan popülasyonda düşük olanlar ile karşılaştırıldığında kanser oluşma sıklığının anlamlı biçimde yüksek olduğunu ortaya koymaktadır.

Diğer kullanılan göstergeler örneğin mikroçekirdek ve HPRT gen mutasyon testlerine ait benzer veriler henüz yoktur.

Bununla birlikte, göstergeler kesin riski belirlemek için hala güvenilir bilgi sağlamaktan uzaktır. Bunun nedenlerinden bazıları, maruz kalan topluluklardan biyolojik etkilerin gözlemlerinin tutarsızlığından, doz-cevap arasındaki ilişkinin eksikliğinden ve maruziyete cevapta bireyler arası değişimlerdenidir⁵⁹.

Kan hücreleri kullanılarak yapılan çalışmalar sırasında diğer hücrelerin özellikle hastalığın sonucu için uygun hedef hücrelerin, izleme amacıyla kullanılıp kullanılamayacağına ve hastalığın kesin belirtilerini gösterip gösteremeyeceğine ilişkin açıklamaların yapılmasına gereksinim vardır. Ayrıca kan hücrelerinde gözlenen etkilerin hedef hücrelerde de bulunanlarla uyumlu olması gerekir⁵⁹.

Kimyasallara maruz kalanlarda epidemiyolojik verilerin elde edilmesi uzun zaman gerektirmektedir. Bazen de izleme güçlüğünden dolayı gerçekleştirilememektedir. Kimyasal karsinojenlerin etki mekanizmasının iyice anlaşılmasıyla DNA hasarının kanser oluşumundaki rolü daha çok önem kazanmıştır⁶⁰.

DNA'da hasar olarak tanımlanan genotoksik etki kanser başlatıcı bir mekanizma olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle geliştirilen çeşitli yöntemler ile DNA'daki hasarın saptanması ileride oluşabilecek kanser olaylarındaki riskin belirlenmesinde yardımcı olabilmektedir. Bu şekilde yapılan genotoksik çalışmalar moleküler epidemiyoloji çalışmaları olarak tanımlanmaktadır. Bugüne kadar çok sayıda kimyasala uygulanmıştır. SCE, MN, CA, HPRT gen mutasyonu moleküler epidemiyoloji çalışmalarında kullanılan genotoksisite yöntemleridir⁶⁰.

Genotoksik çalışmalarında, geleneksel yaklaşımlarda kırmızı kan hücreleri kullanılır.

Kan hücreleri dışındaki diğer hücre tiplerinde kullanılabilen bazı genotoksik yöntemler;

Bukkal mukoza hücrelerinde; MÇ, DNA katım ürünleri (DNA adducts), DNA sarmal kırıkları

Nazal mukoza hücrelerinde; MÇ, FISH, (Plak İnsitu Hibridizasyon) DNA katım ürünleri, DNA sarmal kırıkları

Saç derisi folikülleri ; Mitokondriyal DNA mutasyon, Nükleer Aberasyon, Programlanmamış DNA sentezi

Salya, tükürük, balgamda; Mikroçekirdek, PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Tekniği.

Bronkoalveolar lavaj hücrelerinde; DNA katım ürünleri, Mitokondriyal DNA hasarı.

Servikal hücrelerde; MÇ, DNA katım ürünleri

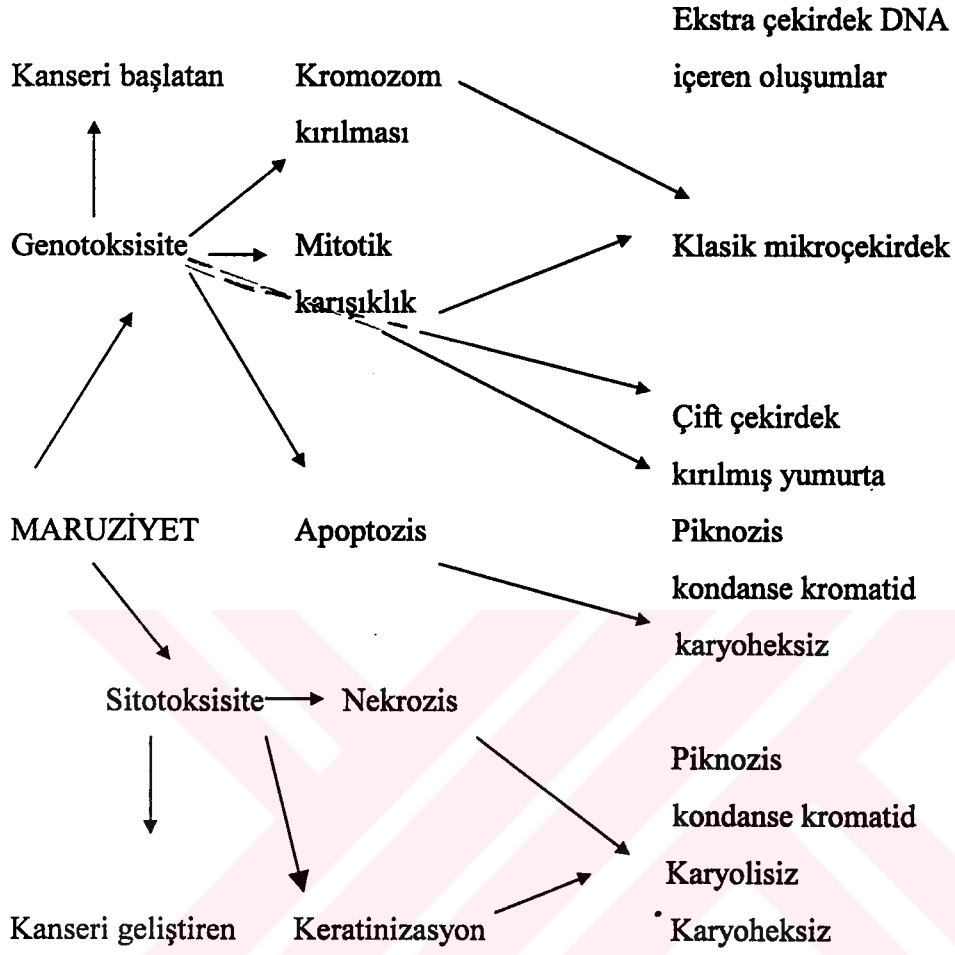
Eksfoliye üroteliyal epitel hücrelerinde; MÇ, FISH, DNA katım ürünleri

Sperm hücreleri ; DNA katım ürünleri FISH'dir⁵⁹.

II.4. MİKROÇEKİRDEK TESTİ

Kanser oluşumunda kromozomların sayısında ya da yapısında değişiklik olduğu gösterilmiştir. Karsinojen ve mutajenlere maruziyet sonucunda hücrede DNA içeren farklı oluşumlar bulunmuştur⁹.

Şekil 1: DNA İçeren Oluşumların Bazı Ortaya Çıkış Yolları⁹.



Bu oluşumları kullanarak mutajenik ve karsinojenik bileşiklerin genotoksisitesini ölçmede çeşitli test yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak kısa süreli ekonomik testler her geçen gün daha önem kazanmaktadır. Mikroçekirdek testi de bunlardan birisidir.

Epitel hücrelerinde görülen çekirdek anomalileri şunlardır:

Piknozis (bu hücrelerin çekirdeği küçüktür).

Karyoheksiz (çekirdeğin bütünlüğü kaybolmuştur).

Kırılmış yumurta (bu hücreler farklı büyüklükte çekirdekler içerir. Birbirlerine ince bir bağ ile bağlanmış ve feulgen boyası ile boyanmış çekirdeklerdir. Kromozomal aberasyonlar ve mitoz bölünme sırasında oluşan hatalar sonucu meydana gelir).

Kondanse kromatin (kromatin biraraya toplanmıştır).

Karyolizis (çekirdek, feulgen boyası ile boyanmamıştır).

Çift çekirdek (hücre içinde ikinci bir çekirdek daha bulunur. Hücre bölünmesinin son zamanlarında meydana gelen olaylar sonucunda oluşmuştur).

Şekil 2: Çekirdek Anomalileri⁹.



Piknozis ve kondanse kromatin, hücresel hasara cevap olarak yüksek seviyelerde meydana gelirler. Piknozis, kondanse kromatin, karyoheksiz, karyolizis bazı ajanların neden olduğu hasarı takiben oluşan hücre ölümünün bir şekli olan nekroza uğrayan hücrelerde meydana gelir. Bu oluşumlar, non-keratinize epitellerin hücresel hasara verdiği cevaptır.

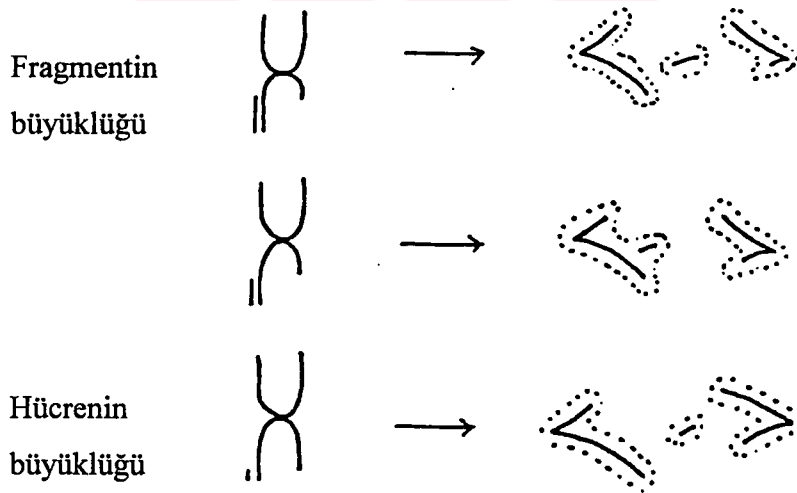
Piknozis, kondanse kromatin, karyoheksiz, hücre ölümünün bir diğer şekli olan apoptozisin ilk basamaklarında oluşur. Apoptozis, normal hücre siklus ve embryo oluşumu sırasında meydana gelen hücre ölümünü etkileyen, fizyolojik koşullar altında oluşan, canlı dokulardaki hücre ölümünün asıl şeklidir.

Nekroz durumunda hücre ölümünden sonra DNA parçalanırken, apoptozis durumunda ise hücre ölümünden önce DNA parçalanmaları söz konusudur.

Piknozis, kondanse kromatin ve karyoheksiz sitotoksisite (nekroz, keratinizasyon) ve genotoksisite (apoptozis) ile ilişkilidir, fakat karyolizis sadece sitotoksisite sonucu oluşur⁹.

Mikroçekirdek genellikle asentrik kromozom ve kromatid parçalarından ya da kromozom kırılması ve kromozom hatalarından oluşur⁶¹⁻⁶³. Kromozomlardaki ya da kromatidlerdeki kırılma lezyon öncesidir ve klastojenler tarafından indüklenir. Kromatidlerdeki kırılma tedavi edilmezse asentrik elementler oluşur⁶⁴.

Şekil 3: Asentrik Fragmentlerden Mikroçekirdek Şekillenmesi



Mitoz bölünmenin anafaz safhasında sentrik elementler kutuplara çekilirken:

- Klastojenik aktivite sonucu ortaya çıkan asentrik elementler.
- İğ ipliği mekanizmasında oluşan hata sonucu iğ ipliklerine bağlanamamış kromozomlar, hücre bölünmesi sonucunda sitoplazmada hücre çekirdeğinden ayrı olarak membranla çevrili bir yapı oluştururlar. Sitoplazmada lokalize olmuş, hücre çekirdeğinin yanında ayrı olarak ve ondan daha küçük bu yapıya mikroçekirdek denir^{65,66}.

Şekil 4: Diğer Mekanizmalarla Mikroçekirdek Şekillenmesi.

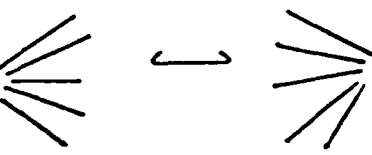
1. "Lagging" kromozomlar



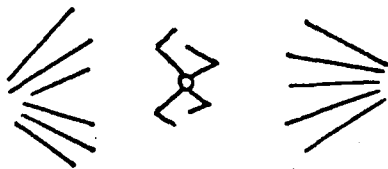
2. İnaktif kinetokhor



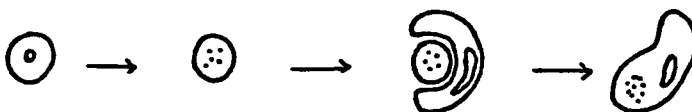
3. Kuvvetli kromozomal köprü



4. "Tangled" kromozomlar



5. Apoptozis ve fagositozis



Hücrede genellikle bir tek mikroçekirdek bulunmasına rağmen maruz kalınan kimyasal maddelerin klastojenik aktivitesine bağlı olarak 2 ya da 3 tane de olabilmektedir⁶⁷.

Mikroçekirdek hücrenin $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{5}$ 'i kadar büyüklükte olur. Mikroçekirdek büyüklüğü genotoksik ajana bağlıdır. Büyük mikroçekirdek kromozom hatasından, küçük olan ise kromatid parçalarından kaynaklanır⁶³.

Kromozom hasarının mekanizmasını ortaya koyarken mikroçekirdek boyutlarından yararlanılabilmektedir. Yamamoto ve Kikuchi (1980) vinkristin gibi iğ ipliği zehirleriyle oluşan mikroçekirdeğin, klastojenik maddelerle oluşandan daha küçük olduğunu göstermiştir. Bu da farklı sitogenetik mekanizmaları kullanarak etkili olan kimyasal bileşikleri birbirinden ayırt ederken mikroçekirdek boyutunun kullanılabileceğini göstermektedir⁶⁸.

II.4.1. Mikroçekirdek Testinin Genotoksik Kimyasal Maddelere Maruziyeti Belirleme Çalışmalarındaki Yeri

Kanserlerin % 92'sinin kaynağı olduğu bilinen epitel dokularda genotoksik hasarı incelemeye yönelik ilk çalışmalar 1983 yılında Stich ve Rosin tarafından lenfositlerde uygulanan mikroçekirdek testinin eksfoliye epitel hücrelerine uyarlanması ile başlamıştır⁶. Halen mikroçekirdek testi, nazal, bukkal, özofagus ve üroteliyal epitel hücrelerini içeren pek çok hücre tipinde gerçekleştirilmektedir⁶⁹. Bu yöntem kromozomal bozuklukların sıklığı hakkında iyi bir tahmin yapmamızı sağlar ve hücre kültürü çalışmalarından daha hızlı, basit ve ucuzdur⁷⁰. Hedef ya da direkt maruz kalan hücrede genotoksik hasarın değerlendirilmesi ayrı bir önem taşımaktadır⁷¹.

Kromozomal hasarın epitel hücrelerde tanımlanmasıyla mikroçekirdek testinin uygulandığı alanlarda da artış olmuştur.

II.4.2. Eksfoliye Hücrelerde Mikroçekirdek Testi

Epitel dokular, tüm vücut yüzeylerini, vücut boşluklarını ve bezlerin etrafını saran hücresel, ovasküler tabakalardan oluşmuştur. Bu dokulardaki hücreler, karsinojenlere maruz kalan insanlarda oluşabilecek genotoksik hasarı incelemek için uygundur. Şimdiye kadar, analiz yapmak üzere örneklerin elde edilmesindeki zorluklardan dolayı, bu hücreler çok az incelenmiştir. Eksfoliye hücrelerde genotoksik hasarı ölçmenin mümkün olduğunu bilmek, epitel dokularda ilk karsinojenik değişiklikleri incelemeye yeni bir ilgi odağı oluşturmuştur⁷¹.

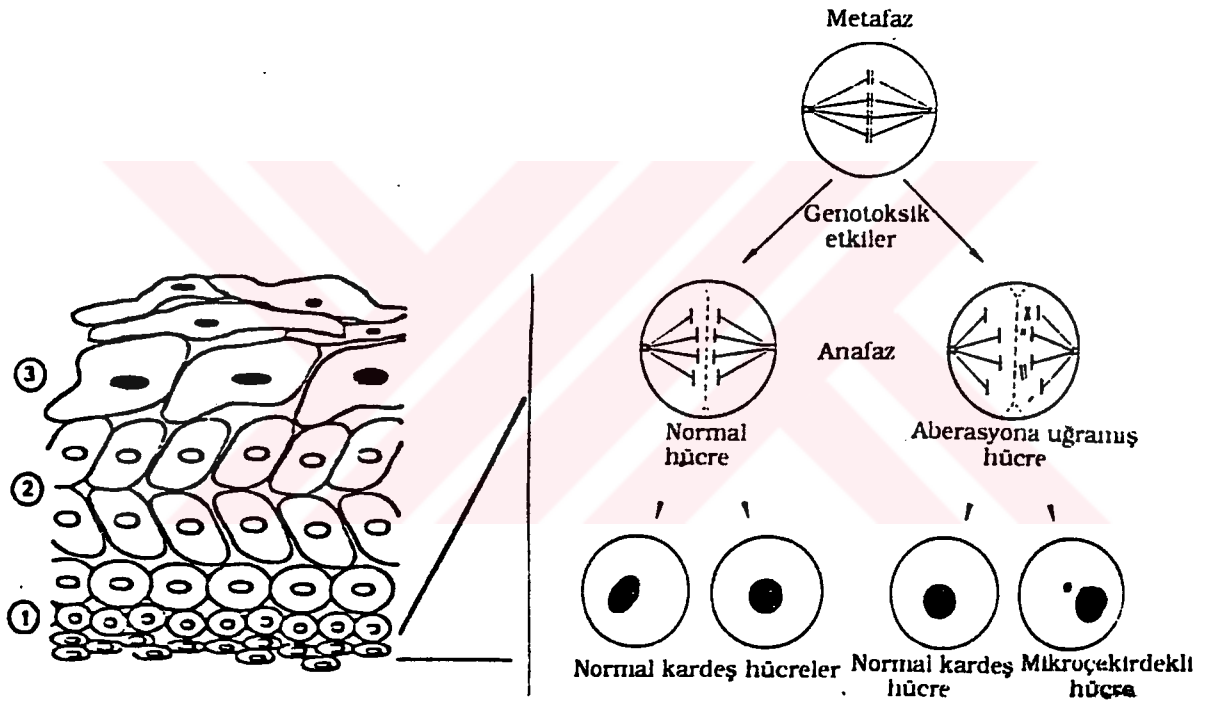
Bu hücreler devamlı olarak epitelin yüzeyinden dökülür ve dokunun bazal hücrelerinde meydana gelen hücre bölünmesi ile yenilenirler⁷¹.

Eksfoliye hücreler; serviks, vajina, burun, dil, damak ve yanaktan küçük fırçalar, tahta çubuklar ya da ucuna pamuk sarılı çubuklarla kolayca toplanabilir. Özafagus ve bronş dokularından numune almak zordur ve tekrar numune almak için belli bir sürenin geçmesi gerekir. İdrardan ise santrifüj yolu ile eksfoliye epitel hücresi elde edilebilir⁷¹.

Epitel dokularda mikroçekirdek testi uygulanmadan önce o dokuda mikroçekirdek oluşum kinetiklerini bilmek gerekir. Epiteller, dokuda bulunan hücrelerin tabaka sayısına ve yüzeysel hücrelerin şekline göre sınıflandırılırlar⁷¹. Şekil 5'de mesane gibi dokulara ait özel çok katlı değişken epiteller gösterilmiştir. Bu dokular bazal, ara yüzeysel hücrelerden meydana gelir. Bu hücreler, kardeş hücreleri oluşturmak üzere bölünüp, olgunlaşır ve atılan hücrelerin yerini almak üzere yüzeye doğru ilerlerler. Hücrelerin bölünmesi, olgunlaşması ve yüzeysel tabakalara doğru göç etmesi için gerekli süre incelenen dokuya göre değişir. Her doku için bu süre yaklaşık 25 gündür. Ayrıca fiziksel, kimyasal veya enfeksiyöz ajanların neden olduğu irritasyon dokuların yenilenme oranını etkileyebilir⁷¹.

Mikroçekirdek epitelin bazal hücrelerinde meydana gelen kromozomal hasar sonucu oluşur. Hücre bölünmesi sonucunda sitoplazmada hücre çekirdeğinden ayrı olarak etrafı membran ile çevrili bu yapı daha sonra olgunlaşıp atılır⁷¹.

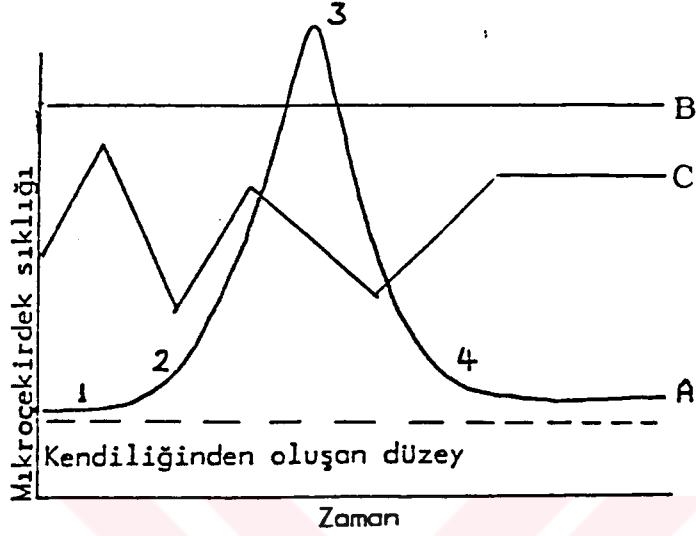
Şekil 5: Çok Tabakalı Skuamöz Epitelde Mikroçekirdek Oluşumu



Hücre tabakaları : 1) bölünen bazal hücreler 2) daha olgun olan, bölünmeyen ara hücreler 3) yüzeysel hücreler.

Mikroçekirdek oluşumu, maruziyetin tipine bağlıdır.

Şekil 6: Epitel Dokuda Değişik Maruziyet Durumlarında Mikroçekirdek Oluşumu⁷¹.



- A- Kısa süreli maruziyet
- B- Uzun süreli maruziyet
- C- Uzun süreli farklı dozlarda maruziyet

A eğrisinde kısa süreli ve sınırlı maruziyet görülmektedir. A eğrisindeki zaman noktaları: 1 maruziyet, 1-2 kromozomal hasara uğramış bazal hücrelerin bölünmesi, mikroçekirdek oluşumu ve bu hücrelerin yüzeye göç etmesi için gerekli süre. 3 Hasara uğramış hücrelerin çoğunluğu yüzeye göç etmiştir. 4 Hasara uğramış tüm hücrelerin atılmasıyla mikroçekirdek sıklığı spontan seviyeye düşmüştür ve artık bazal hücrelerde kromozomal kırıklar meydana gelmez. B eğrisi devamlı ve kronik maruziyet, C eğrisinde ise tekrar eden ve düzensiz bir maruziyet söz konusudur. Maruziyetler arasında zaman aralıkları vardır. Mikroçekirdek sıklıkları devamlı olarak değişir. Tekrarlanan maruziyetlerde karsinogen dozunda büyük değişiklikler varsa bu durum söz konusudur⁷¹.

Mikroçekirdek sıklığının saptanması, sadece genotoksik ajanlara maruziyeti yansıtmaz, ayrıca kanseri önleme çalışmalarının etkinliğini izlemek amacıyla bir gösterge olarak kullanılabilir⁵. Eğer bir koruyucu ajanın genotoksik

hasara karşı etkisi varsa, bu cevap karsinojene maruz kalan dokulardaki mikroçekirdek sıklığında azalma ile kendini gösterir. 1983'te epitel hücrelerinde yapılan mikroçekirdek testi, koruyucu çalışmaların etkinliğini değerlendirmede kullanılan bir metod olarak düşünülmüştür⁸. Bu düşünceyi de; aşağıdaki gözlem açıklamaktadır. Baş boyun bölgesinden radyoterapi alan kanser hastalarında mikroçekirdek oluşumu üzerine yapılan çalışmada tedavi süresince mikroçekirdek sıklığı yükselmiş ve tedavinin kesilmesinden 1 ay içinde hızlı bir şekilde maruz kalmayan dokularda gözlenen seviyelere kadar düşmüştür. Bu durum, hasara uğramış bazal hücrelerin olgunlaşıp, yüzeye doğru göç etmelerinden önce bazal hücre tabakasında 1-2 hücre bölünmesi için geçen süreyi yansıtır. Yani, eksfoliye hücrelerde bulunan mikroçekirdek, bazal hücrelerin bölünmesinden 1-3 hafta önce olan maruziyeti gösterir^{7,8}.

Hedef doku, epitel dokusu olduğu zaman eksfoliye hücrelerde mikroçekirdek testi, lenfositlere uygulanan mikroçekirdek testinden daha avantajlıdır. Doku tipleri arasında ekstrapolasyon önlenerek direk olarak hedef doku incelenebilir. Lenfositlerin mitoz bölünme için uyarılması gerekirken, epitel hücrelerin uyarılmasına gerek yoktur. Ayrıca kısa süreli sitogenetik etkiler ile uzun süreli karsinogenik etkiler arasındaki ilişki epitel hücrelerde daha iyi incelenebilmektedir⁹.

II.4.3. Eksfoliye Hücrelerde Mikroçekirdek Testinin Avantajları ve Dezavantajları

- Karsinogen ve mutajenlere maruziyet ölçümünde insanlara direkt uygulanabilir.
- Hem klastojenik hem de iğ ipliği oluşumunu etkileyen toksik bileşikleri teşhis edebilmektedir.
- İnsan eksfoliye hücrelerinde tekrarlanabilirlik özelliği vardır.
- Karsinogenlerin etkisini hedef organlarda belirleyebilme olanağı sağlar.
- Eksfoliye hücrelere ya da biyopsi örneklerine uygulanarak organın değişik bölgelerindeki mikroçekirdek sıklığı hakkında bilgi verir.
- Koruyucu ajanların etkisi bu testle saptanabilmektedir.

- Karsinojene maruziyet süresince kromatid kırılması ve parçaların şekillenmesi hakkında bilgi edinebiliriz. Maruziyet ortadan kalktıktan sonra mikroçekirdek sıklığındaki artış tekrar azalma yoluna gitmektedir.
- Kromozom hasarının mekanizmasını ortaya koyarken mikroçekirdek boyutlarından yararlanılabilmektedir.
- Hücre kültürü çalışmalarından daha hızlı ve basittir.
- Ekonomik bir testtir.
- Sitoloji uzmanlığı gibi özel bir eğitim alınmadan da yapılabilir.
- Klastojen olmayan fiziksel ve kimyasal karsinojenler bu test ile tanımlanamaz, çünkü sadece kromozom ve kromatid hataları ya da kromozomları indükleyen karsinojenler mikroçekirdek oluşturabilmektedir.
- Mikroçekirdek testi, karsinojenlere kronik ya da tekrarlanan dozlarda maruz kalındığında güvenilir sonuçlar vermektedir. Daha kısa süre karsinojenlere maruz kalınması sonucu oluşan genotoksik etki mikroçekirdek testi ile yakalanamayabilir.
- Örnekleme zamanından iki ya da daha fazla ay önceki maruziyetler bu test ile belirlenemeyebilir.
- Epitel hücrelerin üst üste yığılması, katlanması, dejenerasyona uğraması, keratinize olması, mikroçekirdek sayımında daha fazla zaman gerektirmektedir.
- Mikroçekirdek sayısı bazen değerinin altında belirlenebilir.

II.4.4. Eksfoliyat Üroteliyal Epitel Hücrelerinde Mikroçekirdek Testi

Sitogenetik yöntemler, mutajenik ve karsinojenik bileşiklere maruz kalan toplulukların biyolojik izlenmesinde geniş ölçüde kullanılmaktadır⁴. Mikroçekirdek yöntemi hem klastojenik hem de iş ipliği oluşumunu etkileyen toksik bileşikleri teşhis edebilmektedir. Mikroçekirdeğin hem kromatid/kromozom fragmanlarından ya da anafazda geri kalan kromozomlardan (lagging kromozomlar) oluştuğu gösterilmiştir⁷².

İndüklenen kromozomal hasar ve kanser hakkında daha fazla veri elde edebilmek için sadece lenfositlerde değil aynı zamanda epitel dokulardaki hasarı da incelemek gerekmektedir. Eksfoliyepitel hücrelerinde mikroçekirdek testi karsinojenlere maruz kalan kanser riski yüksek insan dokularını tesbit etmede antimutajenik bileşiklerin etkilerinin saptanması ve klinik çalışmalarda kanser gelişimini engelleyen kimyasal bileşiklere verilen yanıtların izlenmesinde bir gösterge olarak kullanılmaktadır⁷¹.

Bu çalışmalar özellikle oral kanser riskinin yüksek olduğu bireylerde (baş, boyun bölgesinden radyoterapi olan hastalar, betel quid çiğneyen ve alkol alan bireyler) ve bukkal mukoza epitel hücrelerinde yoğunlaşmıştır. Bu bireylerde beta-karoten ve retinil palmitat gibi antioksidanların etkisi mikroçekirdek testi ile izlenmektedir. Deney hayvanlarında yapılan oral kanser çalışmalarında da bukkal mukoza epitel hücreleri ideal bir model olarak alınmaktadır⁸. Mesane kanseri oluşma riski olan Schistosomiasis hastalarında yapılan çalışmalarda üroteliyal epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sıklığındaki artış praziquantel ilacı kullanılarak azaltıldığı tesbit edilmiştir⁸.

Antineoplastik bir ilaç olan siklofosfamid ilaçların muhtemel antimutajenik etkilerini tesbit etmede model bir bileşik olarak kullanılmaktadır^{73,74}. Konapacka 1994 yılında yaptığı çalışmada siklofosfamid fare üroteliyal epitel hücrelerinde genotoksik hasar oluşturduğunu ve bu nedenle bir model olarak kullanabileceğini öne sürmüştür⁷⁵.

Mikroçekirdek testinin eksfoliyepitel hücrelerine uygulanmaya başlamasından sonra eksfoliyepitel idrar epitel hücrelerinde çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Elektrofilik bileşiklere maruz kalan kişilerin idrarında çok sayıda mutajen ortaya çıkmaktadır⁷⁶. Ayrıca çeşitli hastalıkların da idrar kesesi mukozasından mikroçekirdekli eksfoliyepitel hücrelerin atılışında artışa neden olduğu gösterilmiştir⁷⁷.

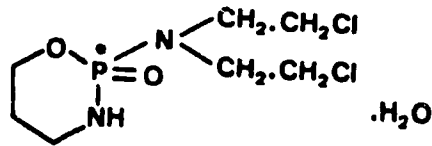
Sigara içenlerin idrarlarında fazla miktarda mutajenler bulunur. Bu yüzden üroteliyal hücreler, hedef organda absorplanan ve atılan mutajenleri gösterebilirler. Burgaz ve arkadaşları (1995) Sigara içenlerin idrar örneklerinden, eksfoliye üroteliyal hücrelerde mikroçekirdek testinin geçerliliğini test etmişler ve sigara içenler ve içmeyenler arasında yapılan kıyaslamada, sigara içenlerin eksfoliye üroteliyal hücrelerinde yüksek sıklıkta mikroçekirdek gözlemlemişlerdir⁷⁰.

Kanopacko (1998) yılında yaptığı çalışmada radyasyonun fare üroteliyal epitel hücrelerinde genotoksik hasar oluşturduğunu, bu hasarı da C,E vitamini ve β -karoten ve bunların karışımları ile doza bağlı olarak modüle ettiğini ortaya koymuştur²¹.

II.5. Siklofosfamid

Birçok antineoplastik ilaç mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etki gösterir⁷. Siklofosfamid hem intravenöz ve hem de oral kullanılabilen alkilleyici bir antineoplastiktir. Karaciğerde karma fonksiyonlu oksidaz enzimleri aracılığıyla metabolize olarak etkin metaboliti fosforamid hardala dönüştürerek etkinlik kazanır⁷⁷. İlk metabolitler 4-hidroksi-siklofosfamid ve aldofosfamid'dir. Bu metabolitler de tekrar metabolize olurlar. Aldofosfamid aktif fosforamid hardala ve mesane toksitesinden sorumlu olan akroleine dönüştür^{78,79}.

II.5.1. Siklofosfamidin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Siklofosfamidin formülü $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P.H_2O$ olup, molekül ağırlığı 279.1'gr/mol'dür.

Siklofosfamid, ince, beyaz, kokusuz hafif acı tadıyla kristal toz halindedir. Kaynama noktası 41-45°C olup, suda, etanolde çözünür. Zayıf olarak da benzen, etilen glikol, karbontetraklorür ve dioksan, dietil eter ve aseton'da çözünür. Çabuk oksitlenir, neme ve ışığa karşı korunmalıdır⁷⁹.

II.5.2. Siklofosfamidin Kullanımı

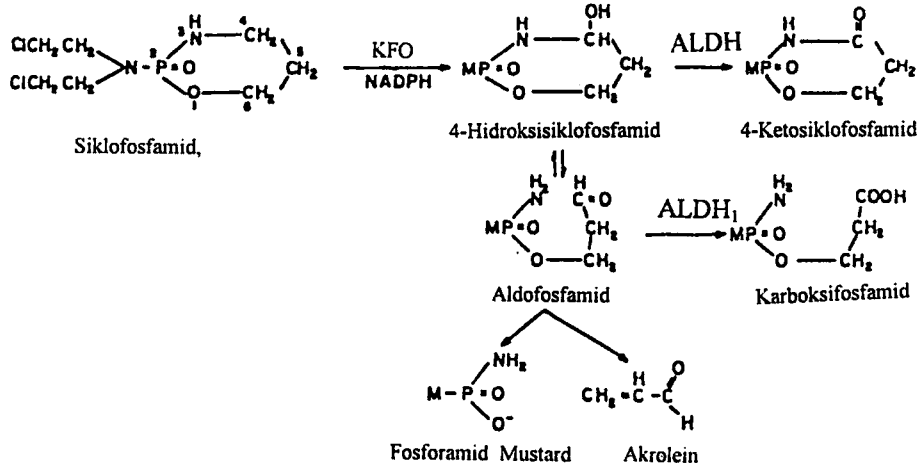
Siklofosfamid, antineoplastik ve immünosupresif olarak geniş bir terapötik uygulama alanı olan alkileyici oksoazofosforin yapısında bir bileşiktir. Antineoplastik özelliği ile; Hodgkin hastalığı ve Hodgkin-dışı lenfomalarda aynı zamanda akut ve kronik lenfositik lösemi, küçük hücreli akciğer kanseri, pediatrik solid tümörler, meme, over, testis, endometriyum, serviks, baş-boyun kanserleri, yumuşak doku sarkomları, multiple miyeloma, koriokarsinoma, nöroblastoma, retinoblastom gibi kanser türlerinde kullanıldığı bildirilmektedir.^{78,79}

İmmünosupresif olarak da otoimmün hastalıklarda, organ transplantasyonlarında kullanılır⁷⁹. İmmünosupresif ilaçların en güçlüsü olduğu kabul edilir. Ancak toksisitesinin fazlalığı nedeniyle immünosupresif ilaç olarak kısıtlı sayıdaki indikasyonlarda kullanılır (İmmünolojik böbrek hastalıkları ve romatoid artrit v.b gibi)⁷⁸.

II.5.3. Siklofosfamidin Absorpsiyonu, Dağılımı, Metabolizması, Eliminasyonu

Siklofosfamid farmakokinetik anlamda ön ilaçtır. Karaciğerde karma fonksiyonlu oksidazlar tarafından aktif metabolitlere dönüşür ve onlarda reaktif metabolitlere şekillenir⁷⁸.

Siklofosfamid'in alkilleyici bir bileşik olarak etki göstermesi için metabolik aktivasyona uğraması gerekir. İlacın aktivasyonu diğer dokularda olmasına rağmen karaciğerde daha yüksektir⁷⁹.



Şekil 7. Siklofosfamidin Metabolizması

Siklofosfamid kendi kendisine aktif değildir. Fakat sıra ile çeşitli reaksiyonlara uğrayarak aktif hale gelip, alkilleyici türü fosforamid mustard'a dönüşür. Aktivasyon basamakları sırasıyla, başlangıçta sitokrom P-450'ye bağımlı enzimler aracılığı ile 4-hidroksi siklofosfamid'e dönüşür. 4-OH siklofosfamid tautomeri olan aldofosfamid ile denge halinde bulunur ki o da, fosforamid mustard'a elimine olur. Akrolein, siklofosfamid'in aktivasyonu sonucunda ortaya çıkan reaksiyon ürünüdür ve siklofosfamid verilmesinden sonra gözlemlenen bazı toksik etkiler ile ilişkilendirilmektedir.

Bu aktivasyon sırasında, değişmemiş olan siklofosfamid ve birçok inaktif metaboliti böbrekten eliminasyonda birbirleri ile rekabet eder. Siklofosfamid, oksidasyona uğrayarak N-dealkanizasyon ile dekloraetilsiklofosfamid ve kloraasetaldehit'e dönüşebilir. Bu reaksiyon P450 enzimi aracılığı ile oluşur ve siklofosfamid'in izomeri ifosfamid'in metabolizmasında başlıca rotadır. Bununla birlikte, insanda siklofosfamid'in metabolitleri arasında dekloraetilsiklofosfamid belirlenmemiştir. İfosfamid yapıcı siklofosfamid'e benzer fakat metabolizması tamamıyla farklıdır.

Aktivasyon sırasında oksidasyon ürünlerinden olan 4-hidroksisiklofosfamid 4-ketosiklofosfamid'e okside olur ve bu iki metabolit ya tiyol ya da sülfat ile konjuge olarak atılır.

En önemli detoksifikasyon reaksiyonu, aldofosfamid'in karboksifosfamid'e, Aldehit Dehidrojenaz Enzimi (sitozolik ALDH₁) tarafından oksidasyonudur. Aldehit dehidrojenaz reaksiyonu, aldofosfamid'in fosforamid mustard'a çevrimi ile tamamlanır. Fosforamid mustard siklofosfamid'in son alkilleyici metabolitidir.

Aldofosfamid'in, karboksifosfamid'e dönüşmesinde rol oynayan ALDH enziminin genetik polimorfizm gösterdiği çalışmalarda belirlenmiştir. Bu farklılık oksoazofosforinlerin tedavi edici ve toksik etkilerinde önemli sonuçlara neden olmaktadır. Genetik polimorfizm gösteren bireylerde karboksifosfamid oluşmaz ve fosforamid mustard ve akrolein daha fazla oluşarak siklofosfamid'in genotoksik ve toksik etkisini artırır⁸⁰.

II.5.4. Siklofosfamidin Toksisitesi

Siklofosfamid'in Deney Hayvanlarındaki LD₅₀ değerleri

Oral fare	350,94mg/kg
i.p. fare	360mg/kg
Oral sıçan	350.94mg/kg
i.p. sıçan	360mg/kg

Siklofosfamidin intraperitoneal LD₅₀ değeri farede, 360 mg/kg dir. İntraperitoneal olarak tek doz siklofosfamid fare, sıçan ve köpekde mesane ve böbrek tübüllerinde nekroz oluşumuna neden olur.

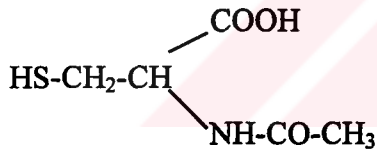
Mesanede oluşan toksisitenin, siklofosfamidin metabolize olması sonucunda meydana gelen akrolein'den oluştuğu bu toksiteyi de akrolein ile reaksiyona giren mesna (2-merkaptan sodyum sülfonat) ya da N-asetil sistein'in önlediği bildirilmektedir⁷⁹.

Antineoplastik bir ilaç olan siklofosfamidin yukarıda açıklanan, toksik yan etkisinden dolayı ilaçların muhtemel antimutajenik etkilerini test etmede model mutajenik bileşik olarak kullanılmaktadır.

II.6. N-Asetil Sistein

Mukolitik bir ilaç olarak kullanılan N-asetil sistein tiyol içeren bir bileşiktir. GSH prekürsörü olması nedeniyle son yıllarda antioksidan rolü ile de çalışmaların hedefi olmuştur¹⁰.

II.6.1. N-Asetil Sistein'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



N-Asetil sistein'in formülü $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3\text{S}$ olup, molekül ağırlığı 163,19 gr/mol'dür. Beyaz kristal toz halindedir. Kaynama noktası 108-110°C olup, suda ve mineral asitde kolaylıkla çözünür. Etanolde çözünür⁸¹.

N-Asetil Sistein'in Deney Hayvanlarındaki LD₅₀ değerleri

Oral fare	7788mg/kg
i.p. fare	3575mg/kg
Oral sıçan	5050mg/kg

II.6.2. N-Asetil Sistein'in Kullanımı

N-asetil sistein, akciğerleri etkileyen zararlı oksidantlara (inflamasyon, sigara dumanı, hiperoksi, iyonize radyasyon gibi) karşı koruyucu olarak kullanılmaktadır. Bunu, içerdiği tiyol'ün glutatyon öncülerini artırması ve bileşiğe nükleofilik özellik kazandırması ile gerçekleştirmektedir¹⁰.

N-asetil sistein en yaygın kullanılan mukolitik ilaç olup, etkinliğinin diğer mukolitiklerden daha fazla olduğu bildirilmektedir. N-asetil sistein, parasetamol zehirlenmesinde antidot olarak kullanılır. Bazı sülfidril gruplarının asetaminofen zehirlenmesi sonucunda oluşan hepatotoksiteyi engellediği bilinmektedir. Asetil sistein GSH öncüsü olan sisteini sağlar ve yıkıcı bir molekül olan GSH asetaminofenin toksik metabolitlerine bağlanır ve onları detoksifiye eder⁸².

N-asetil sistein, altın, kobalt, diğer ağır metaller, karbontetraklorid, metil civa, halotan, parakuat, arsenit, asetaldehit, kumarin ve INF zehirlenmesinde antidot olarak kullanılmaktadır¹⁰.

Bunların dışında bazı hayvan modellerinde ve bazı hastalarda sitotoksik ilaçlara karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir. Bu ilaçlar, siklofosamid, ifosfamid, doksorubisin, adriamisin, belomisin gibi ilaçlardır¹⁰.

II.6.3. N-Asetil Sistein'in Absorpsiyonu, Dağılımı, Metabolizması, Eliminasyonu

N-Asetil Sistein oral uygulamadan sonra hızla absorbe edilir ve öncelikle akciğer, böbrek ve karaciğere geçer. Gastrik ve intestinal sıvılarda stabildir. Asetil sistein plazma ve akciğerlerde hem serbest hem de di sülfid köprüleri ile proteine reversible bağlanmış halde bulunur. Uygulama sonrası 30-60 dakikada doruk plazma konsantrasyonuna ulaşır. Vücutta birikmez dokularda özellikle akciğer dokusunda yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Karaciğerde metabolize olup, böbrek karaciğer ve akciğer yolu ile vücuttan atılır.

100-600mg dozlarda oral olarak alınan N-asetil sistein'in hızla absorplanmasına rağmen biyoyararlılığı % 10'dan azdır⁸². Borgström ve arkadaşları bu durumu, N-asetil sistein'in bağırsak ve karaciğerde hızlı bir şekilde metabolize olmasına bağlamışlardır. İn-vivo çalışmalarda ise, N-asetil sistein'in

tamamına yakın bir kısmının de-asetillenerek sistein'e metabolize olduğu gösterilmiştir⁸³.

N-Asetil Sistein'in farmakokinetiği, N,N'-di asetil sistein, N-asetil sistein, sistein v.b. gibi çeşitli formlarda bulunabilmesi ve metabolize olması sonucunda oluşan sistein, sistin, metionin, GSH di sülfid karışımları v.b. ürünlerin artması yüzünden karışıktır⁸². İntravenöz alımda ise yarılanma ömrünün 2-6 saat olduğu ve dozun % 20-%30'unun idrarda değişmemiş olarak atıldığı ifade edilmiştir⁸².

Parasetamol zehirlenmelerinde oral olarak alınan N-Asetil Sistein'in biyoyararlılığı, intravenöz dozlardaki biyoyararlılığından daha düşüktür. Oral alımından sonra, antidot olarak kullanımının uygun olup olmadığı açık değildir. Bununla birlikte, N-asetil sistein'in bağırsak ve karaciğerde metabolize olması ve oral alındıktan sonra, karaciğer hücrelerinde glutatyon sentezi için gerekli olan tiyol gruplarını hemen vermesi, karaciğer hücrelerinde glutatyon sentezini ve diğer sülfür bileşiklerinin düzeyini arttırmaktadır. Parasetamol zehirlenmelerinde, N-asetil sistein'in oral olarak hemen verilmesi antidot olarak kullanımının uygun olduğunu göstermektedir⁸³.

II.6.4. N-Asetil Sistein'in Genotoksisiteyi Modüle Edici Etkisi

N-asetil sistein'in antimutajenik ve antikarsinojenik özellikleri birçok çalışmada gösterilmiştir. N-asetil sistein tiyol içeren bir bileşiktir ve bu durum bileşiğe nükleofilik özellik kazandırmaktadır.

Bütün kimyasal koruyucu bileşiklerin mekanizmaları tam olarak bilinemediği için kesin bir sınıflama yapmak zordur. (Wattenberg 1985). Karsinojenlerin hayvan modellerinde zamana bağlı olarak gösterdiği aktiviteye dayanarak bir sınıflama yaparak kimyasal koruyucu bileşikleri üç gruba ayırmıştır. Bunlar, karsinojen oluşumunu inhibe edenler, karsinojenleri bloke edenler ve karsinojenleri baskılayanlar olmak üzere, karsinojenlerin bloke edilmesi tümörün

başlamasını inhibe ederken, karsinojenleri baskılayanlar tümör gelişiminin/ilerlemesinin inhibe edilmesi olarak tanımlanmıştır. Morse ve Stoner (1993) ise bu sınıflamaya ek olarak başka bir sınıflama yaparak, karsinojenlerin bloke edilmesi ve karsinojenleri baskılayanlar olarak iki grupta incelemiştir.

Karsinojenlerin bloke edilmesinin temeli başlıca beş kategoriye ayrılarak incelenebilir. Bunlar, sitokrom P₄₅₀'ye bağımlı enzimlerin inhibisyonu, sitokrom P₄₅₀ enzimlerinin indüksiyonu, Faz II enzimlerinin indüksiyonu (Glutasyon S-transferaz gibi), elektrofilleri temizleyen nükleofilik bileşikler ve DNA onarımının indüklenmesidir¹.

Elektrofilleri temizleyen nükleofilik bileşikler karsinojenlerin elektrofilik formları ile reaksiyona giren bileşiklerdir. Potansiyel temizleyiciler; ellagic asit, N-asetil sistein ve sodyum tiyosülfat'ı içerir. N-asetil sistein'deki sülfidril grubunun elektrofilik özellikli bileşikleri parçaladığı kabul edilmektedir¹.

Son yıllarda N-Asetil Sistein'in glutasyon öncüsü olarak vücudun serbest radikalleri detoksifiye etme yeteneğini güçlendirici etkisi olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur¹⁰.

N-asetil sistein, reaktif elektrolitler ve serbest radikallerle konjugasyon ve redüksiyon yaparak etkileşir. Pekçok doku ve hücrede kolaylıkla deasetile olur, sistein'e dönüşür. Bu da glutasyon yapısında yer alan bir amino asittir. N-asetil sistein'in antioksidan etkisi hem radikalleri direkt inhibe etmesiyle hem de yapısındaki sisteini GSH sentezine verip glutasyon seviyesini arttırmasıyla gerçekleştirildiği öne sürülmektedir¹⁰.

Siklofosfamid yaygın olarak kullanılan antitümör ajandır ki onun klinik yararlılığı, doza bağlı olarak gösterdiği mesane toksisitesiyle sınırlandırılır. Siklofosfamid inaktif bir bileşiktir ve karma fonksiyonlu oksidaz enzimleri tarafından metabolize olarak fosforamid mustard'a dönüşür. Metabolize olması sonucu oluşan ürünlerden olan akrolein, siklofosfamidin güçlü ürotoksik etkisini

oluşturan başlıca bileşiktir. Endojen glutatyonun, siklofosfamidin detoksifikasyonunda rol oynadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır⁸⁴.

Glutatyonun nükleofilik tiyol grubu elektrofilik akrolein ile konjugasyon yaparak çok toksik metabolizma ürünlerinin temizlenmesinde başlıca rota olduğu düşünülür⁸⁴, asetil sistein karaciğer hücrelerinde glutatyonun rejenerasyonunu artırır⁸³.

Fare üroteliyol epitel hücrelerinde oluşan toksite siklofosfamidin metabolize olması sonucunda meydana gelen akroleinden oluşmaktadır. Bu toksiteyi akrolein ile reaksiyona giren N-asetil sistein önleyebilmektedir⁷⁹.

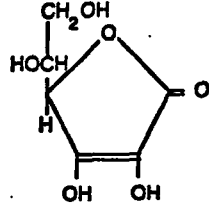
N-asetil sistein'in siklofosfamid ve doksorubisin toksitesindeki koruyucu etkisi araştırılmış, yapılan deneysel çalışmalarda N-asetil sistein'in antitümör ilaçların bazı toksik etkilerini önlediğini göstermişlerdir. N-asetil sistein hücreler tarafından kolaylıkla absorbe edilir ve çeşitli metabolik yollara girer. Yararlı etkisi özellikle siklofosfamide bağlı mesane toksitesinde gösterilmiştir. Ayrıca N-asetil sistein'in bu ajanların DNA üzerine olan antitümör etkisini önleyemediği, yalnızca ilaçların metabolitleri ile reaksiyona girerek toksik etkilerini azalttığını da gösterilmiştir¹⁰.

II.7. C Vitamini (L-Askorbik Asit)

Askorbik asit yapıcı, glukoz ve diğer altı karbonlu monosakkaridlere benzeyen bir ketolaktondur. İnsan ve diğer primatlarla kobaylarda vücutta sentez edilemez⁷⁸.

Suda eriyen hücre dışı sıvıların en önemli antioksidanıdır^{10,18,31}. Sebze ve meyvelerle sağlanan antikarsinogenik etkiye C vitamininin de katkıda bulunduğu yapılan epidemiyolojik çalışmalarda gösterilmiştir¹⁷.

II.7.1. Vitamin C (L-Askorbik Asit)'nin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



C vitamininin formülü $C_6H_8O_6$ olup, molekül ağırlığı 176.13 g/mol'dür. Kaynama noktası $192^{\circ}C$ 'dir. Su etanol, metanol ve asetonda çözülür. Solüsyon halinde iken kolaylıkla okside olur⁸¹. Limon suyu, patates (özellikle kabukları) domates ve yeşil sebzeler C vitamini bakımından zengin kaynaklardır⁸⁵. Askorbik asit en fazla limon, portakal ve greyfurt gibi turuncu meyvelerde bulunur. Yeşil yaprak şeklindeki sebzeler (özellikle, marul, ıspanak, ve maydanoz) domates, yeşil biber, üzüm, çilek, kavun, karpuz muzda vardır⁷⁸. Isıtmaya dayanıksız dondurulmaya ise dayanıklıdır⁸⁶.

C-Vitamininin Deney Hayvanlarındaki LD_{50} değerleri

Oral fare	
i.p. fare	
Oral sıçan	11900mg/kg
i.p. sıçan	

II.7.2. C Vitamininin Kullanımı

C vitamini antioksidanlar olarak bilinen ve E vitamini ve β -karoteni içeren bir grubun üyesidir. Bu bileşiklerin besinlerle fazla alınması, kronik kalp hastalığı ve bazı kanserler gibi kronik hastalıkların görülme sıklığını azaltır. Vitamin C, E ve β -karoten farklı koruyucu etki gösteriyor iseler de başlıca kimyasal özellikleri toksik oksijen serbest radikallerini inaktive etme yetenekleridir. Reaktif oksijen radikalleri hem normal metabolizmanın bir ürünü olarak; hem de güneş ışığı, ozon, sigara dumanı ve diğer çevre kirlenmelerine maruz kalma sonucu oluşabilir⁸⁵. C vitamininin hem kendisinin bir antioksidan olduğu hem de E vitamini ile etkileşmek suretiyle bir ko-antioksidan olarak yardım ettiği belirtilmektedir⁸⁷. Vitamin C, vitamin E'yi rejenere eder⁸⁸. Askorbik asit, çok

önemli bir antioksidan ve serbest radikal temizleyicisi olarak hareket etmektedir. Lipid membranlarının korunması için vitamin E'nin rejenere edilmesinde rol oynar⁸⁹.

Vitaminler özel hücresel fonksiyonların yerine getirilmesinde vücudun eser miktarlarda gereksinim duyduğu bileşiklerdir. Vitaminler insanlarda sentez edilemezler ve bu yüzden diyetle alınmak zorundadırlar. Son zamanlara kadar yaygın şekilde, vitaminlerin tek fonksiyonunun skorbüt ve beri beri gibi akut eksiklik hastalıkların önlenmesi olduğuna inanılırdı. Oysa son veriler, vitaminlere bu geleneksel bakışın çok sınırlı olduğunu göstermektedir. Sağlığın en iyi şekilde sürdürülmesi ve kronik hastalıkların önlenmesi için bazı vitaminlere önerilen günlük gereksinimden daha fazla miktarlarda gerek duyulabilir. Örneğin günde 100 İ.Ü. vitamin E alınması kroner kalp hastalığı riskini anlamlı şekilde azaltır. Vitaminlerin profilaktik kullanımı, tıbbın hedefi akut hastalıkların tedavisinden, kanser ve kalp hastalıkları gibi kronik hastalıkların önlenmesine kaydıçça daha çok önem kazanacaktır⁸⁵. Suda çözünen vitaminler toksik değildirler ve genellikle vücutta depo edilen miktarları azdır. Vücudun gereksiniminden fazla alındıklarında kolaylıkla idrarla atılırlar ve bu nedenle sürekli olarak diyetle alınması gerekir⁸⁵.

II.7.3. C Vitaminin Metabolizması

Askorbik asit mide-barsak kanalından kolayca absorbe edilir bir kerede alınan miktar 1 gramdan az ise absorpsiyonu tam ya da tama yakındır. 1 gram dozunda ise absorpsiyon oranı yaklaşık % 75'tir ve bunun üstünde dozla ters orantılı olarak biyoyararlanım giderek daha da düşer. Hücrelerin içi dahil vücutta geniş bir alana dağılır. Vücutta depolanır. Plazmadaki konsantrasyonu 1mg/dl dolayındadır. Kandaki lökositlerin ve trombositlerin içinde plazmadakinden çok daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Günde 75 mg veya daha yüksek dozlarda C vitamini alındığında vücut bu vitamin bakımından doymuş hale gelir. Doygunluk halindeki plazmada C vitamini konsantrasyonu yaklaşık 1.4 mg/dl veya bunun üzerindedir.

Böbreklerden atılımında eşik değer sözkonusudur ve bu eşik değer doygunluk konsantrasyonuna aşağı yukarı eşittir. Fazla C vitamini alındığında eşik değer aşıldığından C vitaminin fazlası hızla atılır. Bu nedenle vitaminin fazla dozda verilmesinin bir yararı olmaz⁷⁸.

Aşırı dozda alınma durumu hariç C vitaminin vücuttan eliminasyonu yavaştır. Normal durumda vücuttan eliminasyonun yarılanma ömrü yaklaşık 16 gün olarak hesaplanmıştır. Bu durum ve C vitaminin depolanması, diyetle C vitamini eksikliği olduğunda, skorbüt belirtilerinin niçin geç ortaya çıktığını açıklamaktadır. Askorbik asit karaciğerde kısmen oksalik aside dönüşür ve idrardaki oksalatın bir kısmı bunun sonucunda oluşur. Kısmen, sülfatlanmak suretiyle metabolize edilir. Askorbik asidin sülfat metabolitinin fizyolojik önemi vardır⁷⁸.

İnsanlarda idrarla atılan askorbik asidin son ürünü, ya değişmemiş askorbik asit ya da dehidroaskorbat ve dioksoglunalattır. Karaciğerdeki askorbik asidin yaklaşık % 20'sinin oldukça dayanıklı bir bileşik olan askorbik asit-2-sülfat bileşiminde olduğu saptanmıştır. Bunun karaciğerde ve belki de başka dokularda bir yedeklenme şekli veya askorbik asidin aktif bir metaboliti olabileceği düşünülmektedir. Nitekim, farelerin karaciğerinde, dalakta ve böbrek üstünde hatta insan idrarında bile var olduğu gösterilmiştir⁸⁹.

C vitamini, en çok idrar ile daha az miktarda ise feçes, ter ve sütle atılmaktadır⁸⁹.

II.7.4. C Vitamininin Genotoksiteyi Modüle Edici Etkisi

C vitamini, kanseri tabii olarak kimyasal önleyici ajanların başında gelmektedir⁸⁹. Memeli sistemlerinde çok etkili en az toksik antioksidan olarak tanımlanmaktadır. Askorbik asit, suda çözünen süperoksit, hidroksil radikalleri ve singlet oksijen ile direkt olarak reaksiyona giren zincir kırıcı bir antioksidandır⁸⁹.

C vitamininin, sebze ve meyvelerle sağlanan antikarsinojenik etkiye katkıda bulunduğu yapılan epidemiyolojik çalışmalarda gösterilmiştir¹⁷. Chemopreventative (kimyasal koruyucu) bileşiklerin mekanizmaları tam olarak bilinemediği için sınıflama yapmanın zor olduğu, (Wattenberg 1985) Kimyasal koruyucu bileşiklerin; karsinojen oluşumunu inhibe edenler, karsinojenleri bloke edenler ve karsinojenleri baskılayanlar olarak üç gruba ayrılabilceğini öne sürmüştür. Morse ve Stoner (1993) ise bu sınıflamaya ek bir sınıflama yaparak kimyasal koruyucu bileşiklerin; karsinojenleri bloke ederek ve karsinojenleri baskılayarak önleyebileceğini ifade etmişlerdir. Karsinojenlerin bloke edilmesinin temelini başlıca beş kategoriye ayrılabilceğini bunların da; sitokrom P₄₅₀ enzimlerinin inhibisyonu, sitokrom P₄₅₀ enzimlerinin indüksiyonu, faz II enzimlerinin indüksiyonu (Glutasyon S-transferaz), elektrofilleri temizleyen nükleofilik bileşikler ve DNA onarımının indüklenmesi şeklinde olduğunu ifade etmişlerdir.

Elektrofilleri temizleyen nükleofilik bileşikler karsinojenlerin elektrofilik formları ile reaksiyona giren bileşiklerdir. C- vitamini, kimyasal koruyucu özelliği ile bu gruba girmektedir¹.

Desmutajenlerin, direk kimyasal inaktive ediciler, enzim modülatörleri, temizleyiciler, antioksidan gibi mekanizmalar ile mutajeniteyi önlediği¹⁸.

Enzim modülatörlerinin Faz I ya da faz II enzimlerini indükleyen ya da farklı enzim aktivitelerinin ayarını değiştiren enzim sistemleri tarafından oluştuğu¹⁸.

Antioksidan ve serbest radikal temizleyicilerin, kimyasal maruziyet ya da radyasyonun sonucunda oluşan ya da iç kaynaklı olarak oluşan stabil olmayan oksijen türlerine elektron vererek etkilerini gösterdiği³⁶.

Tümör gelişiminin önlenmesinin ise Tümör gelişiminin baskılanmasında, karsinogenezin oluşumunda geç dönemlerde (post initiation) etkili olduğu, bu kategorideki maddelerin etkilerinin, tümörün ilerleme safhası ile etkileşimi ya da tümörün büyüme kabiliyetini ve diğer dokulara sıçramasını önlediği ifade edilmiştir³⁹.

C-Vitaminini de, enzim modülatörü ve antioksidan gibi mekanizmalar göstererek, karsinojenlere maruziyet sonucunda oluşan mutajeniteyi önlediği için, Desmutajen olarak ve de tümör gelişimini supresse edici kimyasal bileşik olarak sınıflamışlardır¹⁸.

III. MATERYAL VE METOD

III.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

III.1.1. Test İçin kullanılan Kimyasal Maddeler

- Siklofosfamid (Endoxan-Asta, 1g. Asta Med. Co.)
- L-Askorbik asit (Extra pure, Merck, Kat. No. 500069)
- N-Asetil- L- Sistein (% 100, Bilim İlaç A.Ş.)
- Etilalkol (Anhidr, Carlo Erba, Kat. No. 412522)
- Hidroklorik asit (% 37, Sigma)
- Ksilen (Extra pure, Merck, Kat. No. 1. 08685)
- Pararosanilin (Merck, Kat. No. 7509)
- Fast Green (Merck, Kat. No. 14 280)
- Sodyum Piro sülfür $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (Merck. Kat. No. 6357)
- Aktif Kömür

III.1.2. Test İçin Kullanılan Çözeltiler

- Fiksatif

% 1'lik Glutaraldehit (1/15 M fosfat tamponunda hazırlandı).

1/15 M fosfat tamponu (pH:7,5)

- 5 N hidroklorik asit

% 37'lik $d=1,19$ olan hidroklorik asit den 155 ml alınıp distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

- Feulgen reaktifi

100 ml kaynamış distile su içinde 1g. pararosanilin titreşimli su banyosu içinde çözülür. 60°C'ye kadar soğutulup, süzülür. 20ml 1N hidroklorik asit ve 2g. sodyum piroşülfit ilave edildikten sonra 24-48 saat karanlıkta bekletilir. 300mg aktif kömür ilave edilip, 1 dakika kuvvetlice çalkalanır ve süzülür. Reaktif koyu renkli şişede ve buzdolabında saklanmalıdır⁹⁰.

- Fast Green Çözeltisi

0,5gr fast green 100ml % 95'lik etanolde çözülür.

% 0.5 Sodyum piroşülfit (0.05 N HCl de)

III.1.3. Test İçin Kullanılan Aletler

- Terazi (Sartorius, BA-610)
- Hassas Terazi (Bosh)
- Su banyosu (Buch)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Etüv (Dedeoğlu)
- Çeker ocak
- Mikroskop (Zeiss A xioskop)
- pH metre (Mettler, Delta 320)
- Cerrahi malzeme (Makas, Pens)
- Cam fanus
- İçinde eritilmiş mum bulunan, mesane tesbit düzeneği
- Tahta spatül
- Traşlı lam

III.2. Deneyin Yapılışı

Deneyde kullanılan fareler Gülhane Askeri Tıp Akademisi Hayvan Laboratuvarından temin edilmiştir. Deneye standart fare yemiyle beslenen, 8-10 haftalık (20-30g. ağırlığında) erkek fareler (Swiss-albino balb / c) alınmıştır.

III.2.1. Üroteliyal Epitel Hücrelerin Elde Edilmesi ve Değerlendirilmesi

Üroteliyal epitel hücreleri elde etmek için; fareler deney prosedürüne uygun olan zamanlarda eter ile bayıltılıp mesaneler kesilerek çıkarılıp, mesane tesbit düzeneğine gerilir. Üroteliyal hücreler bir tahta spatül yardımıyla iç duvardan kazınarak lamlara yayılıp, açık havada kurutulmuştur. Ertesi gün hücreler % 1'lik soğuk glutaraldehit (1/15 M fosfat tamponu içinde hazırlanmış pH: 7,5) ile 20 dakika fiksasyon yapılır. Daha sonra lamalar distile su ile yıkanır ve 60 dakikalık süre için Schiff reaktifine konur⁷⁵.

Burada esas olan nükleik asidin hidrolizi ile serbest kalan aldehit gruplarının feulgen reaktifi ile reaksiyona girmesidir. Feulgen reaksiyonu DNA için spesifik kabul edilmektedir⁹⁰.

Sürenin sonunda lamalar % 0.5 sodyum piroşülfite (0.05N HCl'de hazırlanmış) ile yıkanır. Ve sonra da distile su ile çalkalanır. Daha sonra lamalar, Fast Green çözeltisi (% 96'lık etanol'de çözölmüş) ile karşıt boyanır (20-30 saniye) bütün bunların sonunda preparatlar ksilen ile dehidrate edilir⁷⁵.

Sayım sırasında mikroçekirdeğin aşğıdaki tanımlara uymasına dikkat edilmiştir⁵.

Mikroçekirdek, çekirdeğin 1/3- 1/5'i büyüklüğünde olmalıdır.

Mikroçekirdek ve çekirdek aynı düzlemde olmalıdır.

Mikroçekirdeğin renk yoğunluğu çekirdekten daha açık veya eşit olmalıdır.

Mikroçekirdek, çekirdeksel materyal içermelidir. (Feulgen boyası ile boyanmış fakat çekirdeksel olmayan yapılar sayılmamalıdır)

Mikroçekirdek, çekirdekten tamamen ayrı olmalıdır.

Mikroçekirdek ve çekirdek şekil olarak (oval veya yuvarlak) birbirine benzer olmalıdır.

Hücrelerin sitoplazmaları parçalanmamış olmalıdır.

Mikroçekirdek, çekirdeğin en kısa ekseninin 4 kat uzaklığına kadar bulunmalıdır.

Mikroçekirdek, sitoplazmanın sınırları içinde bulunmalıdır⁵.

Mikroskopta 1000 epitel hücresi/ hayvan mikroçekirdek analizi için incelenir ve mikroçekirdek içeren hücreler %o sıklık olarak ifade edilir.

III.2.2. Siklofosfamidin Fare Mesanesindeki Etkisinin Histopatolojik Olarak İncelenmesi

Mesane'nin Histopatolojik İncelemeleri Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

Mesaneden alınan doku örnekleri, % 10'luk nötral formalin solüsyonu içinde tespit edildikten sonra, tespit edilen doku örnekleri alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra mikrotomla 5-6 mikron kalınlığında kesilerek Hematoksilen- Eozin (H-E) ile boyanmıştır⁹¹.

III.3. Fare Üroteliyal Epitel Hücrelerinde Siklofosfamid İle Genotoksik Hasarın Elde Edilmesi

Siklofosfamid'in, fare üroteliyal epitel hücrelerinde maksimum genotoksik hasar oluşturduğu zaman aralığının tesbit edilmesi için her grupta 4 fare olmak üzere, farelere bi distile suda çözölmüş olan 51.6mg/kg siklofosamid

(i.p) olarak verildikten sonra 2.,5.,7.,10., 15., ve 17., günlerde mesaneler çıkarılarak üroteliyal epitel hücreler incelenir. Vücut ağırlıkları, karaciğer ağırlıkları belirlenir ve mesaneler histopatolojik olarak incelemeler için formalin'e alındı.

- Maksimum yanıt alınan zaman aralığında Doz-Cevap ilişkisinin incelenmesi için her grupta 4 fare olmak üzere, farelere bi distile suda çözölmüş olan değişik dozlarda (12.9,25.8,51.6,64.5mg/kg) siklofosfamid (i.p) olarak verildikten sonra maksimum yanıtın alındığı zaman aralığında (10. günde) mesaneler çıkarılarak üroteliyal epitel hücreler incelenir. Vücut ağırlıkları, karaciğer ağırlıkları belirlenir ve mesaneler histopatolojik olarak incelendi.



III.4.Üroteliyal Epitel Hücrelerinde Siklofosfamidin Oluşturduğu Genotoksik Hasarın N-Asetil Sistein (NAC) İle Modülasyonu

III.4.1. Deneyin Yapılışı

Siklofosfamidin fare üroteliyal epitel hücrelerinde oluşturduğu genotoksik hasarı N-asetil sistein'in modüle edici etkisi ve doz-etki ilişkisini araştırmak için; 20-30 g. ağırlığındaki 8-10 haftalık erkek fareler dokuz gruba ayrılarak her grupta 8 fare deneye alınır.

Bi Distile suda çözünen N-asetil sistein, 0.1ml hacimde oral olarak farelere verilir.

1. grup 7 gün süre ile oral bi distile su (kontrol grubu). (n=8)
2. grup 7 gün süre ile oral NAC 200 mg/kg (n=8)
3. grup 7 gün süre ile oral NAC 400 mg/kg (n=8)
4. grup 7 gün süre ile oral NAC 800 mg/kg (n=8)
5. grup 2. grup son NAC dozundan 30 dk sonra 51.6 mg/kg Cp (i.p) (n=8)
6. grup 3. grup son NAC dozundan 30 dk sonra 51.6 mg/kg Cp (i.p) (n=8)
7. grup 4. grup son NAC dozundan 30 dk sonra 51.6 mg/kg Cp (i.p) (n=8)
8. grup 7. günde sadece 51.6 mg/kg Cp (i.p) (kontrol grubu) (n=8)
9. grup 7. günde sadece serum fizyolojik (i.p) (kontrol grubu) verilir. (n=8)

Siklofosfamid verilmesinden 10 gün sonra mesaneler çıkarılarak epitel hücrelerinde mikroçekirdek sıklıkları incelenir. Farelerin vücut ağırlıkları ve karaciğer ağırlıkları tesbit edilir. Ve mesaneler histopatolojik incelemeler için formalin'e alınır.

III.5. Üroteliyal Epitel Hücrelerinde Siklofosfamidin Oluşturduğu Genotoksik Hasarın Vitamin C (L-Askorbik Asid) İle Modülasyonu

III.5.1. Deneyin Yapılışı

Siklofosfamidin fare üroteliyal epitel hücrelerinde oluşturduğu genotoksik hasarı vitamin C (L-askorbik asit)'nin modüle edici etkisi ve doz-etki ilişkisini araştırmak için; 20-30 g. ağırlığındaki 8-10 haftalık erkek fareler dokuz gruba ayrılarak her gruptan 8 fare deneye alınır. Vitamin C steril bi distile suda çözülür. 0.5 ml, i.p. olarak verilir.

1. grup bi distile su i.p (n=8)
2. grup C vitamini 10 mg/kg (n=8) i.p.
3. grup C vitamini 30 mg/kg (n=8) i.p.
4. grup C vitamini 60 mg/kg (n=8) i.p.
5. grup 51.6mg/kg Siklofosfamid verilmeden 24 saat önce 10 mg/kg C Vitamini + 51.6mg/kg siklofosfamid + 10mg/kg C-vitamini (n=8) (i.p)
6. grup 51.6 mg/kg Siklofosfamid verilmeden 24 saat önce 30 mg/kg C Vitamini + 51.6mg/kg siklofosfamid + 30mg/kg C-vitamini (n=8) (i.p)
7. grup 51.6mg/kg Siklofosfamid verilmeden 24 saat önce 60 mg/kg C Vitamini + 51.6mg/kg siklofosfamid + 60 mg/kg C-vitamini (n=8) (i.p)
8. grup sadece 51.6mg/kg Siklofosfamid (kontrol grubu) (i.p) (n=8)
9. grup sadece serum fizyolojik (i.p) verilir. (n=8)

Siklofosfamid verildikten sonra 10 gün sonra mesaneler çıkarılarak, mikroçekirdekler incelenir.

- Vücut ve karaciğer ağırlıkları tesbit edilerek, mesaneler histopatolojik analizler için formaline alınmıştır.

IV. BULGULAR

51.6mg/kg dozdaki siklofosfamidin fare mesane epitel hücrelerinde günlere göre (2.5.7.10.15.17. günlerde) oluşturduğu MÇ (%) sıklık ortalamaları tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2: Siklofosfamid’in Fare Mesane Epitel Hücrelerinde Oluşturduğu MÇ Sıklığının (% o) Günlere Göre Dağılımı

Gün	Siklofosfamid’li Grup (51.6mg/kg) MÇ Sıklığı (% o) ($\pm$ S.S) ortalaması	Kontrol Grubu MÇ Sıklığı (%o) ($\pm$ S.S) ortalaması
2	4.0 $\pm$ 1.16 ^{a, b}	1.5 $\pm$ 0.58
5	8.5 $\pm$ 1.00 ^{a, c}	2.3 $\pm$ 1.36
7	11.9 $\pm$ 0.50 ^{a, d}	4.3 $\pm$ 0.50
10	17.0 $\pm$ 2.68 ^{a, e}	3.0 $\pm$ 1.41
15	9.3 $\pm$ 1.71 ^{a, f}	1.5 $\pm$ 1.0
17	4.0 $\pm$ 0.50 ^a	1.5 $\pm$ 0.58

^a Her grupta 4 hayvan kullanılmıştır.

* p< 0.05 (Kendi Kontrol Grubu İle Karşılaştırıldığında; Mann-Whitney Testi)

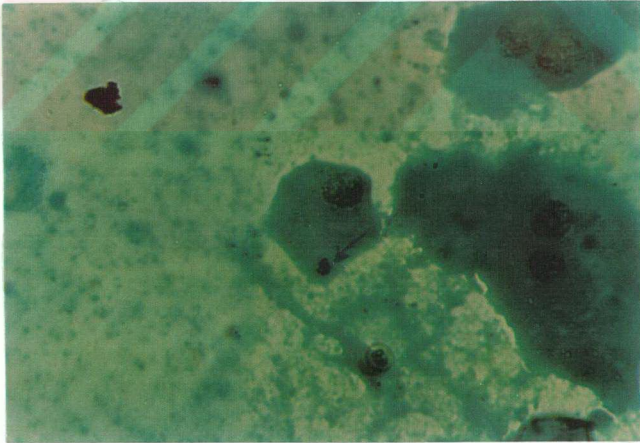
^b 2. gün 5,7,10 ve 15. günler ile; ^c 5.gün 7, 10 ve 17. günler ile; ^d 7. gün 10 ve 17. günler ile; ^e10. gün 15 ve 17. günler ile; ^f 15.gün ile 17. günler arasındaki karşılaştırmalar anlamlı bulunmuştur (p<0.05).

2. gün ile 17. gün, 5. gün ile 15. gün, 7. gün ile 15 gün günler arasındaki karşılaştırmada anlamlılık görülmemiştir.

2.5.7.10.15 ve 17. günlerde oluşan MÇ (%o) sıklık ortalamaları kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, günlerin hepsinde oluşan ortalama MÇ (%o) sıklıklarının kontrol gruplarından istatistiksel olarak önemli olarak arttığı görülmüştür. (p<0.05). Buda siklofosfamidin fare mesane epitel hücrelerinde genotoksik etki oluşturduğunu göstermektedir.

51.6mg/kg dozda siklofosamid verilen grupların 2.5.7.10.15 ve 17. günlerde mesane epitel hücrelerinde oluşan MÇ (%) sıklıkları günlerin birbirleri ile yapılan karşılaştırılmasında, günler arasında MÇ (%) oluşum sıklıkları bakımından istatistiksel olarak önemli farklılıklar gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Tablo 2'de, 2. günden itibaren MÇ (%) oluşum sıklığının artmaya başladığı 7. günde yükseldiği ve 10. günde maksimum değere ulaştığı, 15. günden azaldığı 17. günde minimum değere indiği gözlemlenmektedir. Bu sonuç siklofosamidin fare üroteliyal epitel hücrelerinde günlere göre farklı genotoksik etki oluşturduğunu göstermektedir. Maksimum genotoksik hasarın elde edildiği zaman aralığı 10. gün olarak belirlenmiştir. 2. gün ile 17. gün, 5. gün ile 15. gün, 7. gün ile 15. günler arasında MÇ (%) oluşum sıklıkları arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak farklılık görülmemiştir ($p>0.05$)

Şekil 8'de maksimum genotoksik hasarın elde edildiği 10. günde mikroçekirdekli bir epitel hücresi görülmektedir.



Şekil 8. Maksimum Genotoksik Hasarın Oluştugu Günde Mikroçekirdekli Epitel Hücresi

Maksimum yanıt alınan zaman aralığında Siklofosfamid'in doz-cevap ilişkisinin araştırılması Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3: Siklofosfamid'in Fare Mesane Epitel Hücrelerinde Oluşturduğu MÇ Sıklığının (% o) Doz Gruplarına Göre Dağılımı

Grup	MÇ sıklığı (%o) ortalaması (±S.S)
Kontrol Grubu	2.0±0.10
12.9 mg/kg Siklofosfamid	5.0±1.41*
25.8 mg/kg Siklofosfamid	7.25±0.50*
51.6 mg/kg Siklofosfamid	15.3±4.35* ^b
64.5 mg/kg Siklofosfamid	17.8±5.35* ^c

^a Her grupta 4 hayvan kullanılmıştır.

* p< 0.05 (Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; Mann-Whitney Testi)

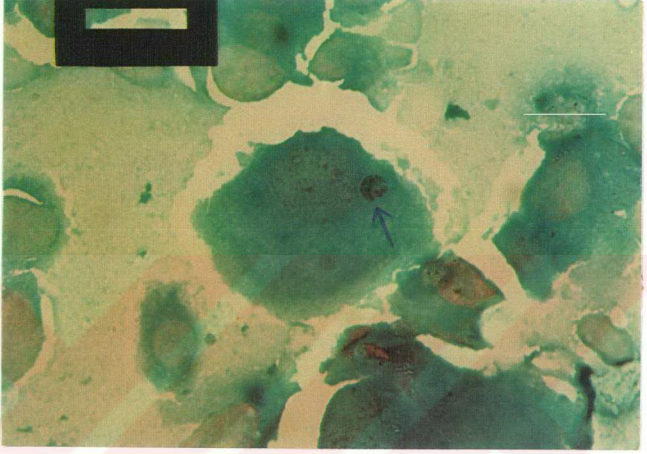
^b p< 0.05 (12.9 ve 25.8 mg/kg doz grupları ile karşılaştırıldığında)

^c p<0.05 (12.9 ve 25.8 mg/kg doz grupları ile karşılaştırıldığında)

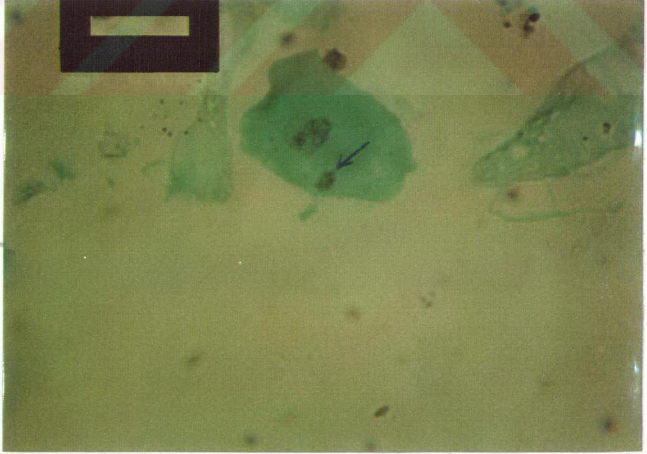
Doz grupları MÇ (%o) sıklık ortalamaları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bütün doz gruplarında (12.9,25.8,51.6,64.5mg/kg) ortalama MÇ (%o) sıklıklarının kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli olarak arttığı görülmüştür (p<0.05). 51.6mg/kg doz grubunda ortalama MÇ (%o) sıklığının diğer doz grupları ile (12.9,25.8mg/kg) yapılan karşılaştırılmasında istatistiksel olarak farklı düzeyde yüksek bulunmuştur (p<0.05). 51.6mg/kg doz grubundaki ortalama MÇ sıklığının 64.5mg/kg doz grubuyla yapılan karşılaştırılmasında istatistiksel olarak farklılık görülmemiştir (p>0.05). Doz arttıkça mikroçekirdek sıklığının arttığı tablo 3'de görülmektedir. 51.6mg ve 64.5mg/kg doz grubunda ortalama MÇ sıklığının 12.9 ve 25.8mg/kg ortalamalarından istatistiksel olarak farklı düzeyde yüksek olmasına rağmen 51.6 ve 64.5mg/kg arasında herhangi bir fark yoktur. Bu nedenle 51.6 ve 64.5mg/kg arasında fark olmaması 51.6mg/kg'ın

esas doz alınması temel alınmıştır. 51.6mg/kg en anlamlı artışa neden olan doz grubu olarak alınmıştır.

Şekil 9a ve 9b’de Mikroçekirdekli Epitel Hücreler Görülmektedir.



Şekil 9a. Mikroçekirdekli Epitel Hücre



Şekil 9b. Mikroçekirdekli Epitel Hücre

51.6mg/kg dozdaki siklofosfamid'in farelerin vücut ağırlıkları karaciğer ağırlıkları ve rölatif karaciğer ağırlıklarına günlere göre (2.,5.,7.,10., 15., 17. günlerde) olan etkisinin araştırılması Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4: 2,5,7,10,15 ve 17. Günlerde, 51.6mg/kg Siklofosfamid Verilen Grupların Vücut Ağırlıkları, Karaciğer Ağırlıkları, Rölatif Karaciğer Ağırlıkları^a

Gün	Vücut Ağırlığı (gr)		Karaciğer Ağırlığı (gr)		Rölatif Karaciğer Ağırlığı (gr/100g vücut Ağırlığı)	
	Deney Grubu	Kontrol Grubu	Deney Grubu	Kontrol Grubu	Deney Grubu	Kontrol Grubu
	(A.O±S.S)	(A.O±S.S)	(A.O±S.S)	(A.O±S.S)	(A.O±S.S)	(A.O±S.S)
2	30.3±2.43	27.7±3.41	1.81±0.38	1.55±0.47	5.94±1.04	5.75±2.03
5	29.5±4.45	30.2±3.99	1.35±0.33 ^b	1.89±0.36	4.57±0.71	6.41±1.58
7	28.7±4.22	22.5±3.68	1.66±0.35	1.52±0.24	5.73±0.44	6.75±0.76
10	29.2±3.43	30.4±7.81	1.81±0.34	1.82±0.46	6.09±0.94	6.06±1.16
15	38.5±0.95 ^{*c}	30.0±1.44	2.30±0.45 [*]	1.45±0.16	5.99±1.22	4.83±0.48
17	30.4±2.34 ^d	32.5±4.63	1.92±0.32	2.15±0.29	6.27±0.74	6.63±0.08

^a Her grupta 4 hayvan kullanılmıştır.

^{*}p<0.05 (Kendi Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; Mann-Whitney Testi)

^bp<0.05 (5. gün, 15. gün ile karşılaştırıldığında)

^cp<0.05 (15. gün; 2,5,7,10. gün ile karşılaştırıldığında)

^dp<0.05 (17. gün; 15. gün ile karşılaştırıldığında)

2.,5.,7.,10.,15. ve 17. günlerde, siklofosfamid verilen farelerin vücut ağırlıkları kontrol grupları ile karşılaştırıldığında vücut ağırlıklarında istatistiksel olarak farklılık olmadığı (vücut ağırlığında herhangi bir azalma söz konusu olmadığı) ve sadece tek grupta 15. günde siklofosfamid verilen farelerin vücut ağırlığı, kontrol grubundan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p<0.05).

2.,5.,7.,10.,15 ve 17. günlerde siklofosfamid verilen farelerin karaciğer ağırlıkları kendi kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, karaciğer ağırlıklarında genelde bir artma söz konusu olmadığı ancak sadece 15. günde

siklofosfamid verilen farelerin karaciğer ağırlığı kontrol grubundan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$).

2.,5.,7.,10., 15 ve 17. günlerde 51.6mg/kg dozda siklofosfamid verilen farelerin, vücut ağırlıkları ortalamalarının günlerin birbirleriyle yapılan karşılaştırılmasında 15. gün ile 2.5.7 ve 10. günler arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0.05$) en fazla ağırlık artışı 15. günde olmuştur. 17. gün ile 15. gün arasındaki farkın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0.05$).

2.,5.,7.,10., 15 ve 17. günlerde 51.6mg/kg dozda siklofosfamid verilen farelerin karaciğer ağırlıkları ortalamalarının günlerin birbirleri ile yapılan karşılaştırılmasında sadece 15. gün ve 5. gün arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0.05$).

2.,5.,7.,10., 15 ve 17. günlerde 51.6mg/kg dozda siklofosfamid verilen farelerin rölatif karaciğer ağırlık ortalamaları arasında günlerin birbirleri ile yapılan karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$).

Vücut, karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıkları (gr/100gr vücut ağırlığı) bütün doz gruplarında (12.9,25.8,51.6,64.5mg/kg) Tablo 5’de gösterilmiştir.

Tablo 5: Maksimum Yanıt Alınan Zaman Aralığında (10. Günde) Siklofosfamid Verilen Grupların Vücut Ağırlıkları, Karaciğer Ağırlıkları, Rölatif Karaciğer Ağırlıkları^a

Gün	Vücut Ağırlığı (gr) (A.O±S.S)	Karaciğer Ağırlığı (gr) (A.O±S.S)	Rölatif Karaciğer Ağırlığı (gr/100gr vücut ağırlığı) (A.O±S.S)
Kontrol	30.5±1.79	1.72±0.1	5.61±0.03
12.9mg/kg	31.14±2.97	1.60±0.15	5.12±0.02*
25.8mg/kg	31.33±1.56	1.68±0.61	5.28±1.64
51.6mg/kg	34.9±3.73	1.88±0.27	5.50±0.28 ^b
64.5mg/kg	33.82±0.3 ^{*.d}	2.00±0.25	5.91±0.75 ^c

^a Her grupta 4 hayvan kullanılmıştır.

*p<0.05 (Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; Mann-Whitney Testi)

^bp<0.05 (12.9mg/kg doz grubu ile karşılaştırıldığında)

^cp<0.05 (12.9mg/kg doz grubu ile karşılaştırıldığında)

^dp<0.05 (25.8 mg/kg doz grubu ile karşılaştırıldığında)

12.9,25.8,51.6 ve 64.5mg/kg dozda siklofosfamid verilen farelerin vücut ağırlıkları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında herhangi bir azalma gözlenmemiştir, sadece 64.5mg/kg doz grubunun vücut ağırlık ortalaması kontrol grubundan ve 25.8mg/kg doz grubundan istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek bulunmuştur (p<0.05).

12.9,25.8,51.6 ve 64.5mg/kg dozda siklofosfamid verilen farelerin karaciğer ağırlık ortalamaları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 12.9 ve 25.8mg/kg doz gruplarının kontrol değerleri ile benzer olduğu, 51.6 ve 64.5mg/kg doz gruplarının ise kontrol grubundan daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel anlamlılıkta bir farklılık gözlenmemiştir.

Rölatif karaciğer ağırlık ortalamaları, doz gruplarının (12.9,25.8,51.6,64.5mg/kg) birbirleriyle yapılan karşılaştırılmasında 64.5mg/kg, 51.6mg/kg doz gruplarının rölatif karaciğer ağırlık ortalamalarının 12.9mg/kg doz grubundan istatistiksel olarak önemli düzeyde fazla olduğu görülmüştür ($p < 0.05$).

Rölatif karaciğer ağırlık ortalamasının ise 12.9mg/kg doz grubunda kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli düzeyde düşük olduğu gözlenmiştir ($p < 0.05$).



51.6mg/kg dozda Siklofosfamid verilen farelerin 2.5.7.10.13.15 ve 17. günlerde çıkarılan mesanelerindeki lezyonların dağılımı Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6: Fare Mesanesindeki Lezyonların Günlere Göre Dağılımı.

Histopatolojik Bulgular	Günler							Kontrol Grubu
	2.gün	5.gün	7.gün	10.gün	13.gün	15.gün	17.gün	
Sidik kesesi epitellerinde dökülme	+++	++	++	++	+	++	++	--
Sidik kesesi epitellerinde hidropik								
Dejenerasyon	+++	++	+	+++	++	++	++	--
Yangısal reaksiyon	+	+	++	++	+	+++	+	--
Kanama	+	+	--	--	++	--	--	--
Tunika mukoza ve Tunika								
Muskulariste ödem	++	+	+	++	++	+	++	--

2. Gün

Yüzey epitellerin hemen tamamı dökülmüş, geriye kalan epitellerde hidropik dejenerasyon mevcut. Lamina propriya ve tunika muskularis ödemli, lamina propriyada tek tük nötrofil ve makrofajlardan oluşan yangısal bir reaksiyon bulunmaktadır.

5. Gün

Yüzey epidellerinde deskuamasyon mevcut ve epitellerde hidropik dejenerasyon bulunmakta. Lamina propriya, tunika muskularis ödemden dolayı gevşek yapıda. Lamina propriyada fokal alanlar halinde lenfosit ve makrofajlardan oluşan yangısal hücre infiltrasyonu gözlenmektedir.

7. Gün

Yüzey epitel hücrelerinin bazıları piknotik, bir kısmında hidropik dejenerasyon bulunmakta. Lamina propriya ödemli. Az sayıda mononükleer hücre infiltrasyonu mevcuttur.

10. Gün

Sidik kesesinin tüm katmanları ödemli. Eritellerde şiddetli hidropik dejenerasyon bulunmakta. Propriya mukozada çoğunlukla mononükleer (lenfosit ve makrofaj) hücrelerden oluşan yangısal reaksiyon bulunmaktadır.

13. Gün

Yüzey epitellerinin bir kısmı dökülmüş bir kısmının çekirdekleri piknotik, bir kısmında ise hidropik dejenerasyon bulunmakta. İdrar kesesinin tüm tabakaları ödemlidir.

15. Gün

Eritellerde hidropik dejenerasyon ve desguamasyon bulunmakta. Tunika mukoza ve tunika muskularis ödemden dolayı gevşek yapıda, ayrıca lamina propriyada fokal lenfoid hücre infiltrasyonu bulunmaktadır.

17. Gün

Tunika mukoza ve tunika muskularis ödemli. Eritellerde şiddetli hidropik dejenerasyon izlenmekte. Eritellerin bir kısmı dökülmüş Lamina propriyada hafif bir yangı bulunmaktadır.

Kontrol grubunda; patolojik bulguya rastlanmamıştır.

Siklofosfamidin maksimum genotoksik hasar oluşturduğu (10. günde) fare mesanelerindeki lezyonların dağılımı bütün doz gruplarında (12.9,25.8,51.6,64.5mg/kg) Tablo 7’da gösterilmiştir.

Tablo 7: Fare Mesanesindeki Lezyonların Doz Gruplarına Göre Dağılımı

Histopatolojik Bulgular	Doz				Kontrol Grubu
	12.9mg	25.8mg	51.6mg	64.5mg	
Sidik kesesi epitellerinde dökülme	--	--	+	++	+
Sidik kesesi epitellerinde hidropik Dejenerasyon	+	+	++	+++	--
Lamina propriyada ödem	+	+	+	++	--
Yangısal reaksiyon	--	--	--	+	--
Kanama	--	--	--	++	--
Tunika muskulariste ödem	--	--	--	+	--

12.9 mg/kg

Epitelde hafif hidropik dejenerasyon ve mukozada hafif ödem dikkati çekmiştir.

25.8 mg/kg

Epitelde hafif derecede hidropik dejenerasyon ile birlikte mukozada ödem dikkati çekmiştir.

51.6mg/kg

Epitelde hidropik dejenerasyon, epitel hücrelerinin tek tük dökülmüş olduğu ve mukozanın ödemli olduğu görülmüştür.

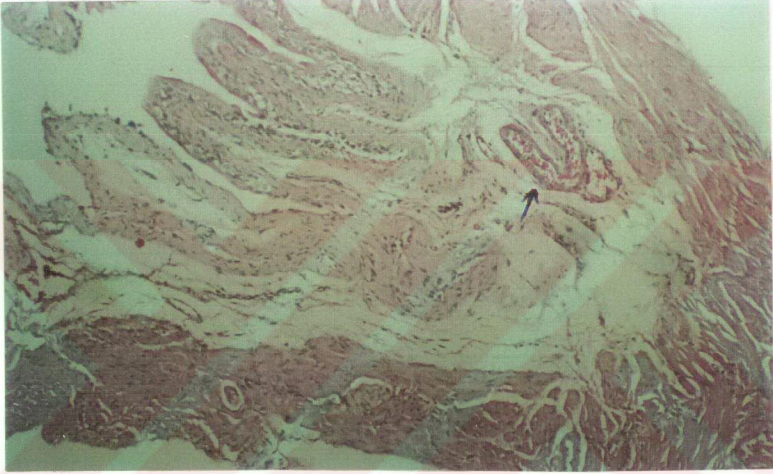
64.5mg/kg

Epitellerde ileri derecede hidropik dejenerasyon bulunmakta. Epiteller kısmen dökülmüş sağlam kalan birkaç epitel hücresinde mitotik faaliyet mevcut. Lamina propriyada yangısal hücre infiltrasyonu (tek tük nötrofil

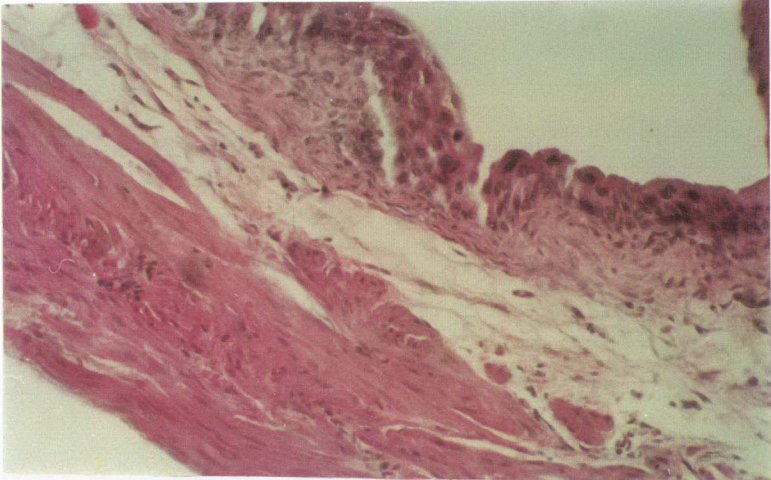
çoğunlukla makrofaj ve lenfositlerden oluşan) ve birkaç alanda kanama odakları gözlenmektedir.

Kontrol grubunda; mesanede hafif derecede hidropik dejenerasyon gözlemlenmiştir.

Şekil 10 ve 11'de Siklofosamid verilen fare mesanesinde maksimum genotoksik hasarın olduğu gündeki lezyonlar ve kontrol grubundaki lezyonlar görülmektedir.



Şekil 10. Siklofosamid verilen mesanenin histopatolojik yapısı (H.Ex200)



Şekil 11. Kontrol Grubunda Mesanenin Histopatolojik Yapısı (H.Ex500)

Maksimum yanıt alınan zaman aralığında (10. günde) fare üroteliyal epitel hücrelerinde siklofosfamid'in oluşturduğu mikroçekirdek sıklığına C vitaminin etkisi Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. Fare Üroteliyal Epitel Hücrelerinde Siklofosfamid'in Oluşturduğu Mikroçekirdek Sıklığına C Vitamini'nin Etkisi

Grup	n	MÇ Sıklığı (%o) Ortalaması (±S.S)
1 Bi Distile su	8	3.4±1.69
2 C-Vitamini 10mg/kg	7	3.6±1.27
3 C-Vitamini 30mg/kg	7	2.4±0.97
4 C-Vitamini 60mg/kg	7	3.4±0.97
5 C-Vitamini 10mg/kg + 51.6mg/kg siklofosfamid	6	9.7±1.50 ^{*b,c,d}
6 C-Vitamini 30mg/kg + 51.6mg/kg siklofosfamid	8	8.1±2.90 ^{*b,c,d}
7 C-Vitamini 60mg/kg + 51.6mg/kg siklofosfamid	8	7.0±2.27 ^{*a,b,c,d}
8 51.6mg/kg siklofosfamid	8	16.5±3.55
9 serum fizyolojik	6	3.66±1.03

* p < 0.05 sırasıyla 10,30,60mg/kg C-Vitamini ile karşılaştırıldığında; Mann-Whitney Testi.

^a p < 0.05 10mg/kg C-Vitamini + 51.6mg/kg siklofosfamid ile karşılaştırıldığında

^b p < 0.05 51.6mg/kg siklofosfamid ile karşılaştırıldığında

^c p < 0.05 Bi distile su ile karşılaştırıldığında

^d p < 0.05 Serum fizyolojik ile karşılaştırıldığında

10,30,60 mg/kg C vitamini + 51.6mg/kg siklofosfamid verilen farelerin ortalama MÇ (% o) sıklığı, sadece C vitamini (10,30,60mg/kg dozda) verilen farelerin ortalama MÇ (%o) sıklığı ile yapılan karşılaştırılmasında istatistiksel olarak farklı düzeyde yüksek bulunmuştur (p< 0.05).

10,30,60mg/kg C vitamini + 51.6mg/kg siklofosfamid verilen doz gruplarının birbirleriyle yapılan karşılaştırılmasında sadece 60mg/kg C vitamini + 51.6mg/kg siklofosfamid doz grubu ile 10mg/kg C vitamini + 51.6 mg/kg siklofosfamid doz grubu arasında ortalama MÇ (%o) sıklığının istatistiksel olarak

farklı olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$). C-vitamini dozu arttıkça MÇ (‰) sıklığı azalmıştır.

Sadece C-vitamini (10,30,60mg/kg dozda) verilen grupların birbirleriyle yapılan karşılaştırılmasında, gruplar arasında MÇ (‰) sıklığı bakımından istatistiksel olarak farklılık gözlemlenmedi ($p > 0.05$).

10,30,60mg/kg C-vitamini +51.6mg/kg siklofosfamid verilen doz gruplarının, sadece 51.6mg/kg dozda siklofosfamid verilen kontrol grubu ile yapılan karşılaştırılmasında, bütün doz gruplarında (10,30,60 mg/kg C-vitamini + 51.6mg/kg siklofosfamid) MÇ ‰ sıklık ortalamalarının kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli miktarda azaldığı görülmüştür ($p < 0.05$).

10,30,60mg/kg C-vitamini + 51.6mg/kg siklofosfamid verilen doz gruplarının, Bidistile su verilen grup ile yapılan karşılaştırmasında, bütün doz gruplarında (10,30,60mg/kg C-vitamini + 51.6mg/kg siklofosfamid) MÇ ‰ sıklık ortalamalarının Bi distile su verilen grupdan istatistiksel olarak önemli miktarda arttığı görülmüştür ($p < 0.05$).

10,30,60mg/kg C-vitamini + 51.6mg/kg siklofosfamid verilen doz gruplarının, serum fizyolojik verilen grup ile yapılan karşılaştırılmasında, bütün doz gruplarında (10,30,60mg/kg C-vitamini + 51.6mg/kg siklofosfamid) MÇ ‰ sıklık ortalamaların serum fizyolojik verilen grupdan istatistiksel olarak önemli miktarda arttığı görülmüştür ($p < 0.05$).

C-vitamini verilen deney gruplarında vücut, karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıkları (gr/100gr vücut ağırlığı) Tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 9: C-Vitamini Verilmiş Deney Gruplarında Vücut Ağırlığı, Karaciğer Ağırlığı ve Rölatif Karaciğer Ağırlıkları^a

Grup	n	Vücut ağırlığı (gr) (A.O ± S.S)	Karaciğer Ağırlığı (gr) (A.O ± S.S)	Rölatif Karaciğer Ağırlığı (g/100gr Vücut ağırlığı)
1 Bidistile su	8	32.7±3.80	1.85±0.46	5.62±1.07
2 C-Vitamini 10mg/kg	7	34.1±2.51	2.05±0.35	6.07±1.07
3 C-Vitamini 30mg/kg	7	31.5±4.09	1.98±0.35	6.31±1.24
4 C-Vitamini 60mg/kg	7	31.3±4.63	2.08±0.30	6.65±0.60
5 C-Vitamini 10mg/kg+51.6mg/kg siklofosfamid	6	28.5±4.20*	1.81±0.34	6.35±0.49
6 C-Vitamini 30mg/kg+51.6mg/kg siklofosfamid	8	32.6±2.37 ^b	2.50±0.33 ^{*b,c}	7.56±0.70 ^{*c}
7 C-Vitamini 60mg/kg+51.6mg/kg siklofosfamid	8	29.2±5.96	1.86±0.45	6.34±0.63
8 51.6mg/kg siklofosfamid	8	28.8±3.79	1.88±0.25	6.68±1.57
9 Serum fizyolojik	6	31.1±4.27	2.07±0.56	6.61±1.45

* p < 0.05 sırasıyla (10,30,60 mg/kg C-Vitamini) ile karşılaştırıldığında, Mann-Whitney Testi.

^a Her grupta 8 hayvan kullanılmıştır.

^b p < 0.05 51.6mg/kg siklofosfamid ile karşılaştırıldığında

^c p < 0.05 Bi distile su ile karşılaştırıldığında

10,30,60mg/kg C-vitamini + 51.6mg/kg siklofosfamid verilen farelerin vücut, karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıkları, sadece C-vitamini (10,30,60 mg/kg dozda) verilen farelerin vücut, karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıkları ile karşılaştırıldığında, vücut ağırlıkları istatistiksel olarak sadece 10mg/kg C-vitamini + 51.6mg/kg siklofosfamid verilen doz grubunda anlamlı düzeyde düşük (p<0.05) bulunurken karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıkları 30mg/kg C-vitamini + 51.6mg/kg siklofosfamid verilen doz grubunda anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p<0.05).

10,30,60mg/kg C-vitamini + 51.6mg/kg siklofosfamid verilen farelerin vücut, karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıkları, sadece 51.6mg/kg siklofosfamid verilen farelerin vücut, karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıkları ile karşılaştırıldığında, vücut ve karaciğer ağırlıkları istatistiksel olarak sadece 30mg/kg C-vitamini + 51.6mg/kg doz grubunda yüksek ($p<0.05$) bulunurken rölatif karaciğer ağırlıklarında istatistiksel olarak bir farklılık gözlemlenmemiştir ($p>0.05$).

10,30,60 mg/kg C-vitamini + 51.6mg/kg siklofosfamid verilen farelerin vücut, karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıkları Bidistile su verilen farelerin vücut, karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıkları ile karşılaştırıldığında, vücut ağırlıkları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmez iken ($p>0.05$), karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıklarında ise 30mg/kg C-vitamini + 51.6mg/kg siklofosfamid verilen doz grubunda artış olmuştur ($p<0.05$).

10,30,60mg/kg C-vitamini + 51.6mg/kg siklofosfamid verilen farelerin vücut, karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıkları serum fizyolojik verilen farelerin vücut, karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıkları ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak bir farklılık gözlenmemiştir.

C-vitamini verilen fare mesanesindeki histopatolojik bulgular Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10: C-vitamini verilen fare mesanesindeki Histopatolojik bulgular

Histopatolojik Bulgular	60mg/kg C vit+Cp	60mg/kg C Vit	30mg/kg C Vit+Cp	30mg/kg C Vit	10mg/kg C Vit +Cp	10mg/kg C Vit	51.6mg/kg Siklofosfamid	BiDistile Su	Serum Fizyolojik
Sidik kesesi epitellerinde dökülme	--	--	--		--	--	--	--	--
Sidik kesesi epitellerinde hidropik dejenerasyon	+	+	+		+++	+	--	--	+
Lamina propiya'da ödem	--	+	--		+	+	--	+	+
Yangısal reaksiyon	--	--	--		--	--	+	--	--
Kanama	--	--	--		--	--	+	--	--
Tunika mukozada ödem	--	--	--		--	--	--	--	--
Tunika muskulariste ödem	--	--	--		--	--	--	--	--

60mg/kg C-vitamini + 51.6mg/kg siklofosfamid verilen grupta;
yüzey epitellerinde az oranda hidropik dejenerasyon dışında bulgu yoktur.

Sadece 60mg/kg C-vitamini verilen grupta; Damarlar hiperemik
yüzey epitellerinde az oranda hidropik dejenerasyon mevcut. Propriya mukoza
ödemlidir.

30mg/kg C-vitamini + 51.6mg/kg siklofosfamid verilen grupta;
yüzey epitellerinde az oranda hidropik dejenerasyon dışında bulgu yoktur.

Sadece 30mg/kg C-vitamini verilen grupta; tamamen otoliz (kokuşma)

10mg/kg C-vitamini + 51.6mg/kg siklofosfamid verilen grupta; propriya mukozada birkaç alanda kanama odakları mevcuttur.

Damarlar hiperemik. Yüzey epitellerinde ileri derecede hidropik dejenerasyon bulunmaktadır.

Sadece 10mg/kg C vitamini verilen grupta; damarlar hiperemik. Yüzey epitellerinde az oranda hidropik dejenerasyon, mevcut. Propriya mukoza ödemlidir.

Sadece 51.6mg/kg siklofosfamid verilen grupta; bir alanda propriya mukoza ve kaslar arasında nötrofil lökositlerden oluşan yangısal infiltrasyon bulunmaktadır.

Sadece serum fizyolojik verilen grupta; yüzey epitellerinde az oranda hidropik dejenerasyon mevcut ve propriya mukozada tek tük nötrofil lökosit infiltrasyonu bulunmaktadır.

Sadece Bidistile su verilen grupta; Propriya mukoza hafif ödemlidir.

Genel olarak, C-vitamini verilen gruplarda yapılan incelemeler sonucunda; lezyonların çok hafif normale yakın olduğu görülmüştür. Tablo 7'deki veriler ile karşılaştırıldığında lezyonlarda olumlu yönde gelişme olduğu görülmüştür.

Maksimum yanıt alınan zaman aralığında (10. günde) fare üroteliyal epitel hücrelerinde siklofosfamid'in oluşturduğu mikroçekirdek sıklığına N-asetil sistein'in etkisi Tablo 11'de gösterilmiştir.

Tablo 11: Fare Üroteliyal Epitel Hücrelerinde Siklofosfamid'in Oluşturduğu Mikroçekirdek Sıklığına N-Asetil Sistein'in Etkisi.^a

Grup	n	MÇ sıklığı (%o) (A.O± S.S)
1 Bidistile su	8	2.63±0.91
2 N-Asetil Sistein 200mg/kg	6	2.83±1.17
3 N-Asetil Sistein 400mg/kg	6	2.33±1.21
4 N-Asetil Sistein 800mg/kg	6	2.0±0.89
5 N-Asetil Sistein 200mg/kg+51.6mg/kg siklofosfamid	6	7.66±2.94 ^{*b,c,d}
6 N-Asetil Sistein 400mg/kg+51.6mg/kg siklofosfamid	8	8.39±3.54 ^{*b,c,d}
7 N-Asetil Sistein 800mg/kg+51.6mg/kg siklofosfamid	6	5.0±1.41 ^{*b,c,d}
8 51.6mg/kg siklofosfamid	6	17.0±3.09
9 Serum fizyolojik	7	2.71±1.38

*p < 0.05 sırasıyla 200,400,800mg/kg N-Asetil Sistein ile karşılaştırıldığında, Mann-Whitney Testi.

^a Her grupta 8 hayvan kullanılmıştır.

^b p< 0.05 51.6mg/kg siklofosfamid (kontrol grubu) ile karşılaştırıldığında

^c p <0.05 Bidistile su ile karşılaştırıldığında

^d p < 0.05 Serum fizyolojik ile karşılaştırıldığında

200,400,800mg/kg N-asetil Sistein + 51.6mg/kg siklofosfamid verilen farelerin ortalama MÇ (%o) sıklığı, sadece N-asetil sistein (200,400,800mg/kg dozda) verilen farelerin ortalama MÇ (%o) sıklığı ile yapılan karşılaştırılmasında istatistiksel olarak farklı düzeyde yüksek bulunmuştur (p <0.05).

200,400,800mg/kg N-Asetil Sistein + 51.6mg/kg siklofosfamid verilen doz gruplarının birbirleriyle yapılan karşılaştırılmasında gruplar arasında MÇ (%o) sıklığı bakımından istatistiksel olarak farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Sadece N-Asetil Sistein (200,400,800mg/kg) verilen grupların birbirleriyle yapılan karşılaştırılmasında, gruplar arasında MÇ (%o) sıklığı bakımından istatistiksel olarak farklılık gözlemlenmemiştir ($p>0.05$).

200,400,800mg/kg N-Asetil Sistein +51.6mg/kg siklofosfamid verilen doz gruplarının, sadece 51.6mg/kg dozda siklofosfamid (kontrol) verilen grup ile yapılan karşılaştırılmasında, bütün doz gruplarında (200,400,800mg/kg N-Asetil Sistein +51.6mg/kg siklofosfamid) MÇ (%o) sıklık ortalamalarının kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli miktarda azaldığı görülmüştür ($p< 0.05$).

200,400,800mg/kg N-Asetil Sistein + 51.6mg/kg siklofosfamid verilen doz gruplarının, Bidistile su ile yapılan karşılaştırılmasında, bütün doz gruplarında (200,400,800mg/kg N-Asetil Sistein + 51.6mg/kg siklofosfamid) MÇ %o sıklık ortalamalarının Bidistile sudan istatistiksel olarak önemli miktarda arttığı görülmüştür ($p< 0.05$).

200,400,800mg/kg N-Asetil Sistein + 51.6mg/kg siklofosfamid verilen doz gruplarının, serum fizyolojik ile yapılan karşılaştırılmasında, bütün doz gruplarında (200,400,800mg/kg N-Asetil Sistein + 51.6mg/kg siklofosfamid) MÇ (%o) sıklık ortalamalarının serum fizyolojik'den istatistiksel olarak önemli miktarda arttığı görülmüştür ($p< 0.05$).

N-Asetil sistein verilen deney gruplarında vücut, karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıkları (gr/100gr vücut ağırlığı) Tablo 12’de gösterilmiştir.

Tablo 12: N-Asetil sistein verilmiş deney gruplarında vücut ağırlığı, karaciğer ağırlığı ve rölatif karaciğer ağırlıkları (gr/100gr vücut ağırlığı)^a

Grup	n	Vücut Ağırlığı (gr) (A.O± S.S)	Karaciğer Ağırlığı (gr) (A.O ±S.S.)	Rölatif Karaciğer Ağırlığı (gr/100gr Vücut ağırlığı)
1 Bidistile su	8	35.0±4.0	2.54±0.58	7.28±1.41
2 N-Asetil Sistein 200mg/kg	6	33.6±5.0	2.00±0.37	6.13±1.83
3 N-Asetil Sistein 400mg/kg	6	31.3±3.7	2.04±0.54	6.19±1.70
4 N-Asetil Sistein 800mg/kg	6	32.6±5.6	2.06±0.36	6.33±0.37
5 N-Asetil Sistein 200mg/kg +51.6mg/kg Siklofosfamid	6	29.5±4.3	1.83±0.38 ^{b,c}	6.20±0.95
6 N-Asetil Sistein 400mg/kg+51.6mg/kg Siklofosfamid	8	30.9±3.9	2.06±0.22 ^c	6.73±0.93
7 N-Asetil Sistein 800mg/kg+51.6mg/kg Siklofosfamid	6	28.6±5.6 ^c	1.53±0.24 ^{*b,c,d}	5.42±0.81 ^{*b,c}
8 51.6mg/kg siklofosfamid	6	31.5±4.9	2.36±0.34	7.61±1.38
9 Serum fizyolojik	7	32.2±3.7	2.18±0.26	6.56±1.13

* p <0.05 800,400,200mg/kg N-asetil sistein ile karşılaştırıldığında, Mann-Whitney Testi.

^a Her grupta 8 hayvan kullanılmıştır.

^b p< 0.05 51.6mg/kg siklofosfamid ile karşılaştırıldığında

^c p< 0.05 Bidistile su ile karşılaştırıldığında

^d p<0.05 serum fizyolojik ile karşılaştırıldığında

200,400,800mg/kg N-asetil sistein +51.6mg/kg siklofosfamid verilen farelerin vücut, karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıkları, sadece N-asetil sistein (200,400,800mg/kg dozda) verilen farelerin vücut, karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıkları ile karşılaştırıldığında, vücut ağırlıkları bakımından istatistiksel olarak bir azalma olmaz iken (p> 0.05), karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıkları 800mg/kg N-Asetil sistein +51.6mg/kg siklofosfamid verilen doz grubunda anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (p<0.05).

200,400,800mg/kg N-asetil sistein + 51.6mg/kg siklofosfamid verilen farelerin vücut, karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıkları sadece 51.6mg/kg siklofosfamid verilen farelerin vücut, karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıkları ile karşılaştırıldığında, vücut ağırlıkları bakımından istatistiksel olarak bir farklılık olmaz iken ($p>0.05$), karaciğer ağırlıkları 800,200mg/kg N-asetil sistein + 51.6mg/kg doz grubunda anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Rölatif karaciğer ağırlıkları ise sadece 800mg/kg N-asetil sistein + 51.6mg/kg siklofosfamid verilen doz grubunda anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0.05$).

200,400,800mg/kg N-asetil sistein + 51.6mg/kg siklofosfamid verilen farelerin vücut, karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıkları Bidistile su verilen farelerin vücut, karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıkları ile karşılaştırıldığında vücut, karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıkları bakımından istatistiksel olarak sadece 800mg/kg N-asetil sistein + 51.6mg/kg doz grupları anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0.05$).

200,400,800mg/kg N-asetil Sistein + 51.6mg/kg siklofosfamid verilen farelerin vücut, karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıkları, serum fizyolojik verilen farelerin vücut, karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıkları ile karşılaştırıldığında, vücut ağırlıkları ve rölatif karaciğer ağırlıkları bakımından istatistiksel olarak bir farklılık gözlemlenmez iken ($p>0.05$) karaciğer ağırlıkları 800mg/kg doz grubunda anlamlı düzeyde düşüktü ($p<0.05$).

N-Asetil Sistein Verilen Fare Mesanesindeki Histopatolojik Bulgular Tablo 13'de gösterilmiştir.

Tablo 13: N-Asetil Sistein Verilmiş Farelerin Mesanesindeki Histopatolojik Bulgular

Histopatolojik Bulgular	800mg/kg NAC+Cp	800mg/kg NAC	400mg/kg NAC+Cp	400mg/kg NAC	200mg/kg NAC+Cp	200mg/kg NAC	51.6mg/kg Siklofosfamid	Bidistile Su	Serum Fizyolojik
Sidik kesesi epitellerinde dökülme	+++	+++	+	+	++	+	--	--	--
Sidik kesesi epitellerinde hidropik dejenerasyon	+++	+++	--	--	+	+	--	--	--
Lamina propriya'da ödem	+	++	++	++	+	+	+	--	+
Yangısal reaksiyon	++	+	--	+	--	+	--	--	--
Kanama	+	--	--	--	--	+	--	--	--
Tunika mukozada ödem	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Tunika muskulariste ödem	--	--	--	--	--	--	--	--	--

800mg/kg N-asetil sistein + 51.6mg/kg siklofosfamid verilen grupta; damarlar ileri derecede hiperemik. Propriya mukoza ödemli. Bazı kısımlarda kanama odakları ile birlikte çoğunluğu nötrofil lökositlerden oluşan aralarında tek tük lenfositlerin de bulunduğu yangısal hücre infiltrasyonu mevcuttur.

Sadece 800mg/kg N-asetil Sistein verilen grupta; Yüzey epitellerinde şiddetli vakuole ve hidropik dejenerasyon mevcut. Propriya mukoza ödemli. Propriya mukozada yaygın nötrofil lökosit infiltrasyonu mevcuttur.

400mg/kg N-asetil sistein + 51.6mg/kg siklofosfamid verilen grupta; yüzey epitellerinde az oranda dejeneratif değişiklikler mevcut, propriya mukozada damarlar hiperemiktir.

Sadece 400mg/kg N-asetil sistein verilen grupta; damarlar hiperemik L. epiteliyalis yer yer dökülmüş. Propriya mukoza ödemli. Bazı alanlarda propriya mukozada nötrofil lökosit ve tek tük de lenfositlerin bulunduğu hücre infiltrasyonu mevcuttur.

Sadece 200mg/kg N-asetil sistein verilen grupta; damarlar hiperemik. Yüzey epitelleri yer yer dökülmüş diğerlerinde de hidropik dejenerasyon mevcut. Propriya mukozada yer yer az sayıda hücreyel infiltrasyonlara rastlanılmaktadır.

200mg/kg N-asetil sistein + 51.6mg/kg siklofosfamid verilen grupta; damarlar ileri derecede hiperemik, yüzey epitelleri kısmen dökülmüş, geriye kalanlarda da vakuoler ve hidropik dejenerasyon izlenmekte. Propriya mukozada ve kaslar arasında kanama odakları ile birlikte çoğunluğu nötrofil lökositlerden oluşan yangısal hücre infiltrasyonu mevcuttur.

Sadece siklofosfamid verilen grupta; otolitik değişikliklerin yanısıra propriya mukoza ödemlidir.

Sadece serum fizyolojik verilen grupta; propriya mukoza ödemlidir.

Sadece Bidistile su verilen grupta; belirgin bir değişiklik bulunamamıştır.

Genel olarak, N-Asetil sistein verilen gruplarda yapılan incelemeler sonucunda; lezyonlarda olumlu yönde iyileşme olduğu görülmüştür (Tablo 7'daki veriler ile karşılaştırıldığında). Ama lezyonlardaki bu iyileşmenin C-vitamini (Tablo 10) verilen gruba göre daha az olduğu gözlemlenmiştir.

V. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde kanser gelişiminin kimyasal bileşiklerle önlenmesi (Chemoprevention) kanser kontrol yöntemi olarak giderek artan biçimde önem kazanmaktadır. Kanser gelişimini önleyen kimyasal bileşikler, ilaç halinde ya da diyet içerisinde tabii orijinli bileşikler halinde bulunurlar¹.

Çevre ve endüstride çok sayıda bileşik insanlarda genotoksik etkileri indüklemektedir. İnsan vücudu bu toksik etkileri çeşitli enzim sistemleri aracılığıyla detoksifiye ederek önlemeye çalışmaktadır. Ancak bu tip kimyasallara maruziyetin artması durumunda karsinogenik ve mutajenik sonuçlar ortaya çıkmaktadır³¹.

Bitkilerde ve diğer kaynaklarda doğal olarak bulunan çeşitli maddeler ve sentetik kimyasal bileşiklerin çevresel mutajenlere/karsinogenlere karşı koruyucu etkiye sahip oldukları gerek bazı epidemiyolojik çalışmalarla ve gerekse deney hayvanlarında çeşitli karsinogenite testleri ile ortaya konmaktadır³¹.

Antimutajen ve antikarsinogenlerin günlük yaşamda yaygın kullanımının insan kanser ve genetik hastalıklarını önlemek için etkili olabileceği öne sürülmektedir⁹².

Günlük yiyecek tüketimi ve tümör sıklığı üzerine yapılan çalışmalar, yeşil sebze ve taze meyve içeren bileşiklerin insanları kansere karşı koruduğunu göstermektedir⁹³.

Block ve arkadaşları, insanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmaların 32'sinde, karotenoid'lerin fazla miktarda bulunduğu yiyeceklerin tüketimi ile karaciğer kanseri arasındaki ilişkiyi incelemişler ve bu çalışmaların 30'unda karotenoid'lerin koruyucu etkisini gözlemlemişlerdir⁴⁵. Micozzi ve arkadaşları epidemiyolojik çalışmalarda karotenoid'leri içeren yiyeceklerin

seçiminin epitel kanserlerin bazı çeşitlerinin oluşumunu önlediğini belirlemişlerdir⁹⁴. Canfield ve arkadaşları, serum β -karoten düzeyleri ve servikal displazi arasındaki ilişkiyi, yapılan epidemiyolojik çalışmalarda incelemişler ve β -karoten gibi antioksidan besinleri içeren yiyecek tüketiminin servikal displaziye karşı koruyucu etki oluşturduğunu saptamışlardır⁹⁵.

Tanaka ve arkadaşları, fare mesanesinde N-bütül-N (4-hidroksibütül) nitrozamin tarafından 20 haftada oluşturulan karsinojenik etkiye karşı doğal bileşik olan astaksantin ve kantaksandin'in koruyucu etkilerini çalışmışlar, astaksantin'in mesane kanser sıklığını azalttığını bununla birlikte kantaksantin'de bu etki görülmediğini (41. hafta sonunda) astaksantin'in mesane kanseri için kimyasal koruyucu bir bileşik olduğunu gözlemlemişlerdir⁹⁶.

Bandaru ve arkadaşları, sentetik bileşik olan piroksikam ve D-L- α -Diflorametilornitin'in kolon kanserine karşı koruyucu etkilerini sıçanlarda çalışmışlar ve azoksimetan ile 56 haftada oluşan kolon adenoma ve adenokarsinoma'nın gelişimini piroksikam diflorametilornitin'in etkili bir şekilde önlediğini gözlemlemişlerdir⁹⁷.

Ancak yapılmış ve yapılmakta olan bu tip çalışmalarda deney maliyeti ve sürenin uzunluğu çalışılan kimyasal bileşik sayısını kısıtlamaktadır.

Kanser oluşumunda kromozomların sayısında ya da yapısında değişiklik olduğu, karsinojen ve mutajenlere maruziyet sonucunda hücrede DNA içeren farklı oluşumların ortaya çıktığı için bu oluşumları kullanarak mutajenik ve karsinojenik bileşiklerin genotoksitesini belirlemek mümkündür⁹.

DNA'da hasar olarak tanımlanan genotoksik etki kanser başlatıcı bir mekanizma olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle geliştirilen çeşitli yöntemler ile DNA'daki hasarın saptanması ileride oluşacak kanser olaylarında riskin belirlenmesinde yardımcı olabilmektedir⁶⁰.

Mutajenik ve karsinojenik bileşiklerin genotoksisitesini ölçmek için çeşitli test yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak kısa süreli ekonomik testler her geçen gün önem kazanmaktadır. Mikroçekirdek testi de bunlardan birisidir⁹.

Mikroçekirdek genellikle asentrik kromozom ve kromatid parçalarından veya kromozom kırılması ve kromozom hatalarından oluşur⁶¹⁻⁶³ kromozomlardaki ya da kromatidlerdeki kırılma lezyon öncesidir ve klastojenler tarafından indüklenir. Kromatidlerdeki kırılma tedavi edilmezse asentrik elementler oluşur⁶⁴.

Mitoz bölünmenin anafaz safhasında sentrik elementler kutuplara çekilirken, klastojenik aktivite sonucu ortaya çıkan asentrik elementler ve iğ ipliği mekanizmasında oluşan hata sonucu iğ ipliklerine bağlanmamış kromozomlar hücre bölünmesi sonucunda sitoplazmada hücre çekirdeğinden ayrı olarak membranla çevrili bir yapı oluştururlar. Sitoplazmada lokalize olmuş hücre çekirdeğinden daha küçük olan bu yapıya mikroçekirdek denir^{65,66}.

İn-vivo olarak geniş çapta kemik iliği ve lenfosit hücre kültürlerinde mikroçekirdek testinin kullanılmasının yanısıra, 1983 yılında Stich ve Rosin tarafından lenfositlerde uygulanan mikroçekirdek testinin eksfoliyte epitel hücrelere uyarlanması ile bu çalışmalara yeni bir boyut katmışlardır. Stich ve Rosinin çalışmanın çıkış noktasını kanserlerin % 92'sinin kaynağı olduğu bilinen epitel dokularda genotoksik hasarın belirlenmesi oluşturmaktadır.

Mikroçekirdek testi ağız mukozası, akciğer, dalak, idrar kesesi, testis, serviks, vajina, özofagus, korneal epitel ve saç kökü hücrelerinde genetik hasarı ölçmek için de kullanılmaya başlanmıştır⁸.

Mikroçekirdek sıklığının saptanması, sadece genotoksik maddelere maruziyeti yansıtmaz, ayrıca kanseri önleme çalışmalarının etkinliğini izlemek amacıyla bir gösterge olarak da kullanılabilir⁵. Eğer koruyucu nitelikte bir kimyasal bileşiğin genotoksik hasara karşı etkisi varsa, bu cevap karsinojene

maruz kalan dokuda mikroçekirdek sıklığında azalma ile kendini gösterir. 1983'de epitel hücrelerinde yapılan mikroçekirdek testi koruyucu çalışmaların etkinliğini değerlendirmede kullanılan bir metod olarak düşünülmüştür. Bu sonuca da aşağıda açıklanan gözlemler ile ulaşılmıştır⁸.

Birincisi; baş ve boyun bölgesinden radyoterapi alan kanser hastalarında mikroçekirdek oluşumu, üzerine yapılan çalışmalardır. Tedavinin başlamasından 1 hafta içinde radyasyon alan bölgede mikroçekirdek sıklığı artmıştır. Tedavi süresince mikroçekirdek sıklığı yükselmiş ve tedavinin kesilmesinden 1 ay içinde hızlı bir şekilde maruz kalmayan dokularda gözlenen seviyelere kadar düşmüştür. Bu cevap, hasara uğramış bazal hücrelerin olgunlaşıp, yüzeye doğru göç etmelerinden önce bazal hücre tabakasında 1-2 kere hücre bölünmesi için geçen süreyi yansıtır. Yani eksfoliye hücrelerde bulunan mikroçekirdek, bazal hücrelerin bölünmesinden 1-3 hafta önce olan maruziyeti gösterir^{8,71}.

Diğer bir çalışmada, Filipinler'de betel quid (betel cevizi, betel yaprağı, tütün ve kireçten oluşan karışım) çiğneyenlerde oral kanser riskinin yüksek olduğu saptanmıştır⁹. Bu alışkanlığı olan kişilerin ağız mukozalarından elde edilen hücre örneklerinde mikroçekirdek sıklığında artış gözlenmiştir. Bu kişilere 3 ay boyunca haftada 2 kere vitamin A (50000 ünite retinil palmitat), B-karoten (90mg) verilmiştir. Çiğneme alışkanlığına devam etmelerine rağmen 4 hafta içinde ağız mukozası hücrelerinde mikroçekirdek sıklığında azalma görülmüştür^{8,41}. Enfiye kullananların ağız mukozası (Dudak)'ndaki mikroçekirdek sıklığının B-karoten alımı sonucunda, Schistosomiasis hastalarının ise idrar kesesindeki mikroçekirdek sıklığının praziquantel alımı sonucunda azaldığı görülmüştür⁷¹.

Hedef doku, epitel dokusu olduğu zaman eksfoliye hücrelerde mikroçekirdek testi, lenfositlere uygulanan mikroçekirdek testinden daha avantajlıdır. Doku tipleri arasında ekstraplosyon önlenerek direkt olarak hedef doku incelenebilir. Lenfositlerin mitoz bölünme için uyarılması gerekirken, epitel

hücrelerin uyarılmasına gerek yoktur. Ayrıca kısa süreli sitogenetik etkiler ile uzun süreli karsinojenik etkiler arasındaki ilişki epitel hücrelerde daha iyi incelenebilir⁹.

Bu nedenle deney hayvanlarının çeşitli hedef dokularında kimyasal bileşiklerin koruyucu etkilerinin mikroçekirdek yöntemi ile test edilmesine yönelik olarak gerçekleştirilecek model çalışmalar, gerek deney hayvanlarında yapılmakta olan antikarsinojenik çalışmalara ve gerekse insan popülasyonunda uygulanacak olanlara önemli veriler sağlayabilir. Bu çalışmamızda fare mesane epitel hücrelerinde oluşan genotoksik hasarın çeşitli kimyasal bileşiklerle modülasyonunun incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada fare mesane epitel hücrelerinde genotoksik hasar oluşturmak üzere model kimyasal mutajen olarak siklofosfamid kullanılmıştır.

Siklofosfamid çeşitli malign hastalıklarda, immün bozukluklarda ve organ transplantasyonlarında yaygın olarak kullanılan alkileyici bir bileşiktir. Siklofosfamid'in hemorajik sistit'e ve bazende mesanede fibrozis'e neden olduğu bilinmektedir aynı zamanda mesane ve idrar yolları kanseri oluşumu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir^{98,99}.

Siklofosfamid vücutta biyolojik etkisini karaciğerde mikrozomal enzimler aracılığıyla aktive olduktan sonra gösterir, siklofosfamid enzimler aracılığıyla akrolein ve fosforamid mustard bileşiklerine dönüşür. Fosforamid mustard antineoplastik, klastojenik ve mutajenik özelliklerinden sorumlu olan bileşiktir⁴⁹. Siklofosfamid'in diğer parçalanma ürünü olan akrolein'in reaktif bir bileşik olduğu DNA tek sarmal kırıklarını indüklediği ve bu nedenle bu bileşiğin de siklofosfamid'in sitotoksik ve mutajenik etkisine katkıda bulunduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir^{100,101}.

Bu nedenle antiklastojenik, antimutajenik etkilerin incelendiği pek çok deneysel çalışmada siklofosfamid model mutajen olarak sıklıkla kullanılmaktadır^{73,74,84,102,103,104}.

Siklofosfamid'in yanısıra Mitomisin C, Bleomisin ve Cis-platin'in kullanıldığı çalışmalar da bulunmaktadır^{102,105,106}.

Çok sayıda kimyasal bileşiğin antimutajenik etkisini test etmede genellikle kemik iliği kullanılmaktadır^{21,73,102,103,105,106,107}.

Ancak fare eksfoliye epitel hücrelerinde siklofosfamid'in indüklediği genotoksik hasarın çeşitli kimyasal bileşiklerle modülasyonun incelendiği hiçbir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda siklofosfamid'in günlere göre farklı genotoksik etkisinin olup olmadığını belirlemek için farklı günlerde alınan mesane epitelleri incelenmiş ve günlere göre farklı sonuçlar alınmıştır.

Tablo 2'de görüldüğü gibi, farelere 51.6mg/kg dozda siklofosfamid verildikten sonra değişik zaman aralıklarında (2.,5.,7.,10.,15 ve 17. günlerde) çıkarılan mesanelerden alınan eksfoliye epitel hücrelerde yapılan incelemeler sonucunda;

2.,5.,7.,10.,15 ve 17. günlerde oluşan MÇ (%o) sıklık ortalamaları kendi kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, günlerin hepsinde oluşan ortalama MÇ (%o) sıklıklarının kontrol gruplarından istatistiksel olarak önemli miktarda arttığı görülmüştür ($p<0.05$).

Ayrıca günlere göre dağılım incelendiğinde Tablo 2'de görüldüğü gibi, siklofosfamid verildikten sonra mikroçekirdek oluşumunun 2. günde başladığı, 5. günde ve 7. günde yükseldiği 10. günde en yüksek değere ulaştığı,

15. günde azalmaya başladığı 17. günde iyice azaldığı ancak kontrol grubunun değerine inmediği gözlemlenmiştir.

Bu sonuç bize siklofosfamid'in fare mesane epitel hücrelerinde genotoksik etki oluşturduğunu göstermektedir. Ancak bu genotoksik etkinin günlere göre farklı etki oluşturduğunu ortaya koymaktadır. Biz bu çalışmada, siklofosfamid'in fare mesane hücrelerinde maksimum genotoksik hasar oluşturduğu günü 10. gün olarak tesbit etmiş bulunmaktayız.

Maksimum yanıt alınan zaman aralığında, siklofosfamid'in fare mesane epitel hücrelerinde doz-cevap ilişkisinin incelendiği Tablo 3'de görüldüğü gibi, doz arttıkça mikroçekirdek sıklığının arttığı gözlemlenmiştir. 64.5mg/kg doz grubunda mikroçekirdek sıklığı en fazladır. 51.6mg/kg ile 64.5mg/kg doz grupları arasında istatistiksel olarak fark yoktur. Bu nedenle 51.6mg/kg doz grubu, çalışılan doz grubu olarak seçilmiştir.

Antiklastojenik, antimutajenik etkilerin incelendiği pek çok deneysel çalışmada model mutajen olarak kullanılan siklofosfamid dozlarının farede 10,12.5,20,25,40,50,80mg/kg olarak kullanıldığı^{73,74,102,103,104,107,108,109} ve kemik iliğinde mikroçekirdek ve kromozom aberasyon oluşumunun karsinojenin dozuna bağlı olarak arttığı gözlemlenmiştir^{74,102,107}. Maria Kanopacko'nun (1994) fare üroteliyal epitel hücrelerinde Benzo(a)piren, 2-Asetilaminofloren ve siklofosfamid'in mutajenik etkisini mikroçekirdek testi ile incelediği çalışmada kullandığı siklofosfamid dozları ise 20,40,80 mg/kg'dır⁷⁵.

Mikroçekirdek oluşumunda, karsinojen dozuna bağlı olarak mikroçekirdek oluşum sıklığında günlere göre değişiklikler olduğu M. Rosin tarafından gösterilmiştir⁶. Öte yandan Kanopacko 1994 yılında yaptığı çalışmada farelere Benzo(a)piren, 2-Asetilaminofloren ve siklofosfamid vererek fare mesane epitel hücrelerinde yaptığı çalışmada 2-Asetilaminofloren ile maksimum genotoksik hasarın elde edildiği günü 7. gün, Benzo(a)piren ve siklofosfamid ile maksimum genotoksik hasarın görüldüğü günü 10. gün olarak tesbit etmiştir. Aynı

Çalışma grubunun 1998 yılında yaptığı -radyasyon ile maksimum hasar 10. gün olarak tesbit edilmiştir. Sonuçlarımız bu çalışmalar ile uyum göstermektedir ve aynı zamanda deney hayvanlarında mikroçekirdek sıklığı üzerine bir çalışmaya başlamadan önce mutlaka maksimum genotoksik hasarın elde edildiğı günün ortaya konması gerektiğı saptanmıştır.

Tablo 4’de farelerin vücut, karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıklarına 51.6mg/kg dozdaki siklofosfamid’in etkisi incelenmiş ve 51.6mg/kg dozdaki siklofosfamid fare karaciğerinde toksite oluşturmamıştır.

Maksimum yanıt alınan zaman aralığında (10.günde) değişik dozlardaki siklofosfamid’in vücut, karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıkları üzerine etkisi incelenmiş doza bağlı olarak bazı toksite belirtilerinde artış olmuş ama bu artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı gözlemlenmiştir (Tablo 5).

51.6mg/kg dozda siklofosfamid verilen fare mesanesinde oluşan lezyonların 2.,5.,7.,10. 13.,15 ve 17. günlerde yapılan histopatolojik incelemeleri sonucunda, mikroçekirdek sıklığı bakımından maksimum genotoksik hasarın oluştuğu zaman aralığında (10. günde) lezyonların diğer günlere göre daha şiddetli olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 6).

Siklofosfamid’in fare mesanesinde maksimum hasar oluşturduğu 10. günde mesanelerin histopatolojik incelemeleri sonucunda, lezyonların doz gruplarına bağlı olarak arttığı, 51.6mg/kg doz grubunda yüksek olduğu ve 64.5mg/kg doz grubunda ise en fazla olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 7).

Mesane dokusundaki histopatolojik değişikliklerin incelendiğı çalışmalarda ise seçilen siklofosfamid dozunun farede 5,10,12.5,31.6,68.1,147 mg/kg olduğu^{110,111,112} sıçanda ise 29,44,66,68.1,100,148,200,222 mg/kg olduğu gzlemlenmiştir^{113,114,115}. Brock ve arkadaşlarının 1981 yılında siklofosfamid, ifosfamid gibi oksoazofosforinlerin sıçanlarda ürotoksik etkileri ve nlenmesine yönelik olarak yaptıkları çalışmada kullandıkları siklofosfamid ve ifosfamid

dozlarının (14.7,31.6,68.1,100,147,316 mg/kg) inflamasyon, kanama gibi histopatolojik değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, bu çalışma grubu kemoterapötik doz aralığı içerisinde yer alan 10mg/kg kadar düşük dozlarda da mesanede hasar oluşturabileceğini deneysel olarak göstermiřlerdir¹¹⁶.

Bu durum siklofosfamid'in ürogenital sistem üzerine olan toksik etkisine bağlanabilir. Özellikle siklofosfamid'in parçalanma ürünlerinden olan akrolein'in mesane üzerine olan toksik etkisinden olabilir. Yapılan çalışmalarda akrolein'in sıçanlarda mesane epitellerindeki lezyonları arttırdığı gösterilmiřtir¹⁰¹.

Philips ve arkadaşları 1961 yılında yaptıkları çalışmada, sıçanlarda tek doz 222mg/kg ya da 322mg/kg siklofosfamid (i.p) verildiğinde, mesanede 1 ile 4 gün arasında ödem ve hemoraji gözlemlenmişler bunlar daha sonra diffüzenerek submukoza ile ve diğer mesane dokuları ile fokal olarak birleşmiştir. 6. ve 8. Günde çıkarılan mesanelerde de aynı semptomlar görölmüştür. 12. ve 13. günde submukoza'da fokal olarak hemarajisiz ödem gözlemlenmiřlerdir¹¹³.

Campobassa ve Berrino, 10mg/kg siklofosfamid'i tek enjeksiyon ile farelere (i.p) olarak verdikten sonra 1,3,7,10,15 ve 30. günlerde yapılan incelemeler sonucunda, organlarda değişiklik gözlemlenmemiştir. Bununla birlikte, sıçanda mesane mukoza hasarına benzer çeşitli erken belirtiler görölmüştür. Siklofosfamid enjeksiyonundan 2 saat sonra epiteller normal fakat yüzey hücrelerinde geniş olarak epitellerin döküldüğü görölmüştür. 6 saat sonra yüzey hücrelerinin çoğu kaybolmuş ve dağılmış ve daha sonra epitel tamamıyla dağılmıştır. Submukozada iltihapsız ödem oluşmuştur. 3. günde epiteldeki ödem maksimum düzeye ulaşmış, nekroz ve hemorajik ülserasyon ve granülatik infiltrasyon gözlemlenmiş, 7. günde üroteliyumda bazı bölgelerde nekroz görölmüş. 15. günde epiteliumda devamlı olarak yassı hücrelerin 1 ya da 2 yüzeyinde sert çok ince düzenlendiği gözlemlenmiştir. Bu çalışmada siklofosfamid verilmesinden sonra 3 ile 10. günde DNA içeriği yükseldiği belirtilmektedir¹¹¹.

Fukushima ve arkadaşları, sıçanlarda siklofosfamid'in neden olduğu mesane hasarını belirlemek için, 50,75,100,150 ve 200mg/kg siklofosfamid'in intraperitoneal enjeksiyonundan sonra 1,2,3,5,7,9,14,21,28 ve 35. günlerde incelemişler ve tek doz siklofosfamid enjeksiyonundan sonra mesane mukozasında epiteliyal nekrozis ve ülserasyon bunları takiben epitelde rejenerasyon ve hiperplasia ve sonra onarım'ı içeren değişikliklere uğrar. Doza bağlı olarak cevaplar değişmiştir. 200mg/kg siklofosfamid enjeksiyonundan sonra 35. günde bile epiteliyal değişikliklerin olduğu görülmüştür¹¹⁷.

Bizim çalışmamızda siklofosfamid dozuna bağlı olarak mesanede oluşan histopatolojik sonuçlar, diğer çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda fare eksfoliyte epitel hücrelerinde siklofosfamid'in indüklediği genotoksik hasarın C-vitamini ile inhibisyonu ve doz-etki ilişkisini belirlemek için farelere değişik dozlarda C-vitamini (10,30,60 mg/kg) verilmiştir.

C-vitamini en önemli antioksidan maddelerin başında gelir. Etkili olarak H₂O₂, hipoklorit, süperoksit, peroksit radikallerini ve singlet oksijeni tutar¹⁰. C-vitamini koruyucu etkisini, mutajenik serbest radikal ve elektrofilik metabolitleri ortadan kaldırarak göstermektedir¹⁹.

Siklofosfamid vücutta metabolik aktivasyona uğrayarak aktif mutajenik metaboliti fosforamid mustard'a dönüşür. Güçlü bir indirgeyici madde olan askorbik asit varlığında aldofosfamid alkofofosfamid'e indirgenir ki bu bileşik, mutajenik metabolit fosforamid mustard'a dönüşmez. Bu durum, siklofosfamid'in genotoksik etkisine askorbik asidin in-vivo inhibe edici etkisinin sonuçlarından birisidir¹¹⁸.

Bizimde çalışmamızda C-vitamini, siklofosfamid'in fare üroteliyal epitel hücrelerinde oluşturduğu genotoksik etkiyi bu mekanizma ile önlemiştir.

Siklofosfamid'in maksimum genotoksik hasar oluşturduğu 10. günde Tablo 8'de görüldüğü gibi fare mesane epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sıklığına C-vitamini'nin etkisi incelenmiş ve 10,30,60mg/kg C-vitamini ve siklofosfamid verilen farelerin mikroçekirdek sıklık ortalamaları, sadece siklofosfamid verilen gruptan önemli miktarda azalmıştır ($p < 0.05$).

Sadece 10,30,60 mg/kg C-vitamini verilen gruplardaki mikroçekirdek sıklığının bidistile su ve serum fizyolojik verilen kontrol gruplardan çok farklı olmadığı görülmüştür. Sadece C-vitamini genotoksik hasar oluşturmamıştır.

10,30,60 mg/kg C-vitamini ve siklofosfamid verilen doz gruplarında inhibisyon gözlemlenmekle beraber kontrol grupları düzeyine inmemiştir.

Tablo 8'de görüldüğü gibi, C-vitamini dozu arttıkça mikroçekirdek sıklığının azaldığı gözlemlenmiştir. Ancak C-vitamini dozları arasında yapılan karşılaştırmada sadece 10 ile 60mg/kg arasında istatistiksel olarak farklılık gözlemlenmiştir. En fazla düşüşün % 58 ile 60mg/kg doz grubunda, daha sonra % 51 ile 30mg/kg da olduğu ve en az düşüşün ise % 41 ile 10mg/kg doz grubunda olduğu belirlenmiştir.

Vijayalaxmi ve Venu'nun 1999 yılında yaptıkları çalışmada, siklofosfamid'in fare kemik iliğinde oluşturduğu mikroçekirdek sıklığını askorbik asidin introperitoneal olarak verilmesi sonucunda etkili bir şekilde azalttığını, bu etkinin de C-vitaminin (10,30,60mg/kg) dozuna bağlı olarak gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir⁷⁴. Mikroçekirdek sayısında azalma en fazla % 72 ile 60mg/kg doz grubunda daha sonra % 57 ile 30mg/kg doz grubunda ve en düşük azalma % 49 ile 10mg/kg doz grubunda olmuştur¹⁰².

Giri ve arkadaşları, 1998 yılında yaptıkları çalışmada Cisplatin'in fare kemik iliğinde indüklediği mikroçekirdek hücre sayısının C-vitaminin oral (içme suyunda % 0.5) olarak verilmesi sonucunda azaldığını tesbit etmişlerdir¹⁰⁶.

Ghaskadbi ve arkadaşları 1992 yılında yaptıkları çalışmada, siklofosfamid verilen sıçanlarda kemik iliğinde mikroçekirdek sıklığının, en düşük (1.56 mg/kg) askorbik asit dozlarında bile azaldığını gözlemlemişlerdir¹¹⁸.

Krishna ve arkadaşları 1986 yılında yaptıkları çalışmada, fare de dalak ve kemik iliği hücrelerinde, siklofosfamid ve mitomisin C'nin indüklediği kromozomal hasar (SCE sıklığının)'ın askorbik asidin konsantrasyonuna (1,67g/kg, 3,34g/kg, 6,68g/kg) bağlı olarak iki hücre tipinde de doza bağlı olarak azaldığını ve en fazla düşüşün (% 50) 3,34g/kg dozunda olduğunu gözlemlemişlerdir¹⁰⁸.

Bizim sonuçlarımız bu çalışmalar ile uyumludur. Siklofosfamid'in fare eksfoliyte epitel hücrelerinde oluşturduğu genotoksik hasarı C-vitamini, denediğimiz 3 dozda (10,30,60mg/kg) azaltmıştır. Deney bulgularımız diğer dokularda yapılan çalışmalar ile benzerlik göstermiştir.

Khan ve Sinha, Vijayalaxmi ve Venu, farelerde askorbik asidin antiklastojenik etkisini belirlemek için, yaptıkları çalışmada 10,20,30,40,60mg/kg dozda C-vitamini kullanmışlardır^{105,102}. İnsanda C-vitaminin tedavi edici dozu 10mg/kg'dır. Bizde çalışmamızda insandaki tedavi edici dozun 3 ve 6 katını kullandık. İnsanlarda normalde kullanılan C-vitamini dozları yara iyileştirmede günlük 2 ya da 3 kez 1gr, skorbut'de günlük 2 ya da 3 kez 0.5 ile 1gr, diğer amaçlar için ise günlük 200-500 mg'dır.

Levine ve arkadaşları, insanlarda günlük C-vitamini dozunun 1gr'dan az olması gerektiğini daha fazla olduğunda insanlarda zıt etkilere neden olduğunu ifade etmişlerdir¹¹⁹.

Konopacka ve arkadaşları 1998 yılında γ -radyasyonun kemik iliği ve eksfoliyte epitel hücrelerinde oluşturduğu in-vivo genetik hasarı oral yolla verilen E vitamini, C-vitamini ve β -karoten'in önlediği bu etkilerin doza bağlı olduğu, günlük 50-400mg/kg doz gruplarındaki C-vitaminin, E vitamini ve beta

karotenden farklı olduğu entrasan bir şekilde günde 400mg/kg C-vitamini dozu polikromatik eritrositlerde mikroçekirdek sıklığını arttığını fakat bunun mesane eksfoliye epitel hücrelerinde daha az olduğu, 200mg/kg doz grubunun eksfoliye epitel hücrelerinde maksimum koruma oluşturduğu gözlemlenmiştir. C-vitaminin koruma sıklığının maksimum dozu seçilen organa göre değişmiştir. Bu araştırmacılar C-vitaminin maksimum koruma dozunun hedef organa göre değiştiğini gözlemlemişlerdir²¹.

Antunes ve Takahashi 1998 yılında, sıçan kemik iliğinde, doksorubisin'in indüklediği kromozomal hasarı C-vitamini ve E vitamininin ya da bu vitaminlerin karışımının azalttığını bu etkilerin doza bağılı olduğunu en yüksek vitamin dozunda bir değişiklik olmadığını, en düşük dozda ise koruyucu etkiyi gözlemlemişlerdir¹²⁰. Genelde doza bağılı olarak C-vitamini ve E vitamini azaltmasına rağmen düşük dozlarda verildiğinde ister tek ister kombine olsun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kromozom aberasyon sıklığını azaltmıştır¹²⁰.

Anderson, Başaran ve arkadaşları 1995 yılında, bleomisin'in indüklediği genotoksik hasara C ve E vitaminin koruyucu etkisini salmonella typhimurium'da mutajenik, insan periferel lenfositlerinde kromozom aberasyon ve fare periferel kan ve kemik iliğinde mikroçekirdek testleri ile incelemişler ve bakteride koruyucu etkisini gözlemlememişler fakat C-vitamini insan periferel lenfositlerinde hasarı ortadan kaldırdığını ve farede periferel kan hücrelerinde her iki vitaminin mikroçekirdek sıklığını azalttığını gözlemlemişlerdir¹²¹.

Tavares ve arkadaşları 1998 yılında, doksorubisin'in memeli hücre kültürlerinde indüklediği kromozomal hasarı glutamin ve askorbik asidin azalttığını gözlemlemişlerdir¹²².

Tyrsina ve arkadaşları, 1994 yılında yaptıkları çalışmada, N-metil-N'-nitro-N-nitrozoquanidin'in bakterideki mutajenik etkisine askorbik asidin ve askorбилpalmitat'ın inhibisyonunu incelemişler ve her iki maddenin MNNG'nin indüklediği mutajeniteyi inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir¹²³.

Chorvatovicova ve arkadaşları 1991 yılında yaptıkları çalışmada, sıçan ve kobayda, Cr^{+6} 'nın mutajenik etkisi ve toksisitesine karşı C ve E vitaminin etkisini incelemişler ve C-vitaminin, Cr^{+6} 'nın antimutajenik etkisini sıçan ve kobayda kemik iliğinde mikroçekirdek sıklıklarını azaltarak gösterdiğini, E-vitamininin sadece Normakromatik Eritrosit/Polikromatik Eritrosit oranını arttırdığını, Cr^{+6} 'nın sitotoksik etkisini azalttığını gözlemlemişlerdir¹²⁴.

Askorbik asidin hem antioksidan hem de prooksidan özelliği bulunmaktadır. Oksidatif stress sırasında antioksidan mı prooksidan mı olduğunu açıklayan yeterli çalışma yoktur.

Bijur ve arkadaşları CHO hücre kültürlerinde in-vitro çalışmada, hücrelerde oksidatif stres oluşturmadan önce 50 μ M C-vitamini verildiğinde sitotoksik ve mutajenik etkide azalma olduğunu göstermişlerdir. Bunun tersine askorbik asit, ve oksidatif strese neden olan RSG aynı anda verildiğinde hem sitotoksik hem de mutajenik etkilerde anlamlı bir artış olduğu gözlemlenmiştir⁹². Bu çalışma hücrelere oksidatif strese maruziyet ile ilişkili olarak, askorbik asit verilme süresinin askorbik asidin antimutajenik aktivitesini değiştiriyor ve bu çalışma kanseri kimyasal olarak önleyici bir bileşik olarak çeşitli sonuçlar ortaya koyuyor. Bu da askorbik asidin verilme zamanının önemli olduğunu gösteriyor. Askorbik asidin fizyolojik konsantrasyonları ile oksidatif stres ile geçici bir ilişki olduğunu göstermiştir¹²⁵.

Kanopacka ve arkadaşlarının 1998 yılında yaptıkları çalışmada, radyasyondan önce C-vitamini verildiği zaman sadece 50-100mg/kg askorbik asit polikromatik eritrositlerde mikroçekirdek sıklığını azaltırken mesane eksfoliye epitel hücrelerinde 200mg/kg da inhibisyon görülmüştür. Radyasyondan sonra C-vitamini verildiğinde tüm test edilen vitaminler (E,C vitamini, Beta karoten) faredeki mikroçekirdek sıklığını azaltıyor en etkili olanın Beta karoten olduğu tesbit edilmiştir. En yüksek dozda C-vitamini (400mg/kg) radyasyondan sonra verildiğinde gerek polikromatik eritrositlerde gerekse mesane eksfoliye epitel

hücrelerinde mikroçekirdek sıklığı anlamlı bir şekilde düşürmüştür. Aynı grup β -karoten, C-vitamini ve E vitamini karışımının radyoprotectif etkisinin her vitaminin kendi başına olan etkisinin mesane eksfoliye epitel hücrelerinde daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir²¹.

Amara ve arkadaşları 1996 yılında yaptıkları çalışmada, Doksorubisin'in insan lenfositlerinde indüklediği mikroçekirdek sıklığına askorbik asit'in etkisini çalışmışlar. C-vitaminini doksorubisin'den önce, birlikte ve sonra olmak üzere farklı zamanlarda vererek, C-vitaminin antimutajenik etkisini in-vitro incelemişler. Bu çalışma grubu C-vitaminin sadece doksorubisin ile aynı anda verildiğinde mikroçekirdek sıklığını azalttığını tesbit etmişlerdir¹²⁶.

Choravatovicova ve arkadaşlarının 1991 yılında yaptıkları çalışmada sıçan ve kobay'da Cr^{+6} 'nın mutajenite ve toksitesine karşı C ve E vitaminin etkilerini incelemişler ve Cr^{+6} 'dan önce C-vitamini verildiğinde, lipoperoksit oluşumunu önlemiştir¹²⁴.

Bizim verilerimizde de, C-vitaminin önce verilmesi, koruyucu etkisinde antioksidan özelliğine dayanıyor.

Sonra verildiğinde DNA repair mekanizmaları nedeniyle bu onarımı oluşturuyor.

Biz çalışmamızda, C-vitaminini mutajenik bileşikten 24 saat önce ve beraber verdik. Bunda doza bağlı bir inhibisyon görüldü. Bu durum diğer önce verilen çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. Burada C-vitaminin antioksidan özellik gösterdiğini gözlemledik.

Maria ve arkadaşları, C-vitaminini radyosyondan sonrada vererek DNA onarım proseslerinin devreye girerek rol oynadığı öne sürmüştür. Ancak biz sonra vermediğimiz için bu konuda bir gözlem yapamadık.

Onarımı gözlemek için, C-vitamini mutajenden önce ve sonra verilerek tekrar bir çalışma yapılabilir.

Maria Kanopacka'nın kullandığı dozlar bizim dozlarımızdan çok yüksektir.

Sonuç olarak, C-vitamini+N Asetil Sistein birlikte verildiği bir çalışma da yapılabilir.

Çalışmamızda doz kadar C-vitaminin veriliş zamanı da önemlidir.

Farelerin vücut, karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıklarına C-Vitamininin etkisi Tablo 9'da görülmektedir. 10,30,60mg/kg C-Vitamini + Siklofosfamid verilen farelerin vücut, karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıkları sadece siklofosfamid verilen grup ile karşılaştırıldığında, Sadece 30mg/kg C-Vitamini + siklofosfamid verilen doz grubunda karaciğer ve vücut ağırlığı sadece siklofosfamid verilen gruptan yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$).

Ayrıca 30mg/g C-Vitamini + siklofosfamid verilen doz grubunda karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlığı sadece Bidistile su verilen gruptan da yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$).

C-Vitamini karaciğerde toksite oluşturmamıştır.

C-Vitamini verilen fare mesanesindeki histopatolojik bulgular Tablo 10'da görülmektedir. Lezyonların çok az kontrol grubuna benzer olduğu görülmüştür. Tablo 7'deki veriler ile karşılaştırıldığında lezyonlarda olumlu yönde gelişme olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda fare eksfoliyepitel hücrelerinde siklofosfamid'in indüklediği genotoksik hasarın N-Asetil Sistein ile inhibisyonu ve doz-etki

ilişisini belirlemek için farelere değişik dozlarda N-Asetil Sistein (200,400,800mg/kg) verilmiştir.

N-Asetil Sistein yaygın olarak kullanılan mukolitikdir¹⁰. 100-600mg dozlarda oral olarak alınan N-Asetil Sistein akut ve kronik bronşitte sekresyonu azaltmak ve atılımını kolaylaştırmak amacı ile parasetamol zehirlenmesinde antidot olarak, akrilonitril ve parakuat zehirlenmelerinde, siklofosfamid ve ifosfamid'in neden olduğu hemorajik sistitlerde radyoterapiden sonraki akciğer fibrozislerinde, romatoid artrit ve AIDS'de kullanılmaktadır¹⁵.

N-Asetil Sistein tiyol içeren sentetik içerikli bir bileşiktir. Glutasyon prekürsörü olması nedeniyle son yıllarda antioksidan çalışmalarda popüler bir bileşik olarak kullanılmaya başlanmıştır.^{10,11,12,14}

De flora ve arkadaşları 1991 yılında yaptıkları çalışmada, farelere karsinogen madde olan ürean intra peritoneal olarak verilmeden 15 gün önce yiyeceklerine N-Asetil Sistein katıldığında 4 aylık sürenin sonunda akciğer tümör oluşumunun azaldığını gözlemlemişlerdir¹².

N-Asetil Sistein'in deney hayvanlarında akciğer tümörleri oluşumunu önlemesi antioksidan ve detoksifikasyon özelliklerine dayandırılmaktadır. N-Asetil sistein'in antioksidan özelliğinin başlıca 2 mekanizma ile oluştuğu öne sürülmüştür. Birincisi, N-Asetil Sistein'in hücre içi GSH sentezini arttırması, ikincisi ise, hücre dışında nükleofilik özelliği nedeniyle direkt oksijen radikalleri ile etkileşir ve aynı zamanda Glutasyon-S-transferaz aktivitesini de arttırdığı bilinmektedir¹².

Nitekim pek çok çalışmada GSH'ın hem tümör gelişimini ve hem de tümör ilerlemesini önleyici etki gösterdiği ortaya konmuştur^{127,128}.

1987 yılında Cesarone ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 2-asetilaminofloren (2-AAF) verilerek karsinogen oluşan sıçanlarda N-Asetil Sistein verildiğinde GSH düzeyinin arttığını gözlemlemişlerdir¹²⁹.

Wilpart ve arkadaşları ise sıçanlarda kolon karsinomlarına karşı N-Asetil sistein'in koruyucu etkileri olduğunu göstermişlerdir¹³⁰.

Boone ve arkadaşları metil nitrozo üre ile deneysel olarak oluşturulan akciğer ve meme kanserlerinde NAC'ın koruyucu etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır¹⁶. Bu nedenle N-Asetil Sistein'in halen hem ABD kanser Enstitüsünde ve hem de Avrupa Euroscan projesi kapsamında bu kanserlere karşı kimyasal koruyucu olarak klinik uygulamaları devam etmektedir¹³¹. Deney hayvanlarında NAC'ın mesane ve deri tümörlerine karşı koruyucu etkisine ilişkin araştırmalar devam etmektedir¹⁶.

Bu nedenle bizim çalışmamızda fare mesane epitel hücrelerinde siklofosamid ile oluşturulan genotoksik hasarın N-Asetil Sistein ile modülasyonunun incelenmesi önem taşımaktadır.

Ponz de Leon ve Roncucci, N-Asetil Sistein verilen bireylerde kolon poliplerinin tekrarlama sıklığının % 40 oranında azaldığını gözlemlemişlerdir¹³².

De Flora ve arkadaşları sıçanlarda Benzo (a) piren'in kemik iliği ve pulmoner alveolar makrofajlarda oluşturduğu genotoksik hasarı (DNA adduct) 3 gün süre ile 1000mg/kg dozda verilen N-Asetil Sistein'in inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada N-Asetil Sistein'in nükleofilik grubu nedeniyle Benzo (a) piren'in reaktif metabolitlere aktivasyonunu bloke ederek genotoksik hasarı azalttığı düşünülmektedir. DNA adduct'ların inhibisyonunun karaciğerde akciğerden fazla olduğu gözlemlenmiştir¹¹.

Aynı çalışma grubunun 1991 yılında yaptığı başka bir çalışmada 2-Asetilaminoflora (2AFF)'in sıçanların yiyeceklerine katılması sonucunda karaciğerde oluşan DNA adductların % 0.2'lik N-Asetil Sistein verilmesi ile azaldığı gözlemlenmiştir¹².

Tablo 13'de görüldüğü gibi fare mesane epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sıklığına N-Asetil Sistein'in etkisi incelenmiş ve 200,400 ve 800mg/kg N-Asetil Sistein + siklofosfamid verilen grupların mikroçekirdek sıklık ortalamaları, siklofosfamid verilen grup ile karşılaştırıldığında önemli miktarda azaldığı gözlemlenmiştir ($p < 0.05$).

Sadece N-Asetil Sistein verilen gruplardaki mikroçekirdek sıklığının gerek serum fizyolojik gerekse bidistile suyun ortaya koyduğu mikroçekirdek sıklığından farklı olmadığı görülmüştür. N-Asetil sistein siklofosfamid'in ortaya koyduğu genotoksik etkiyi inhibe ettiğini fakat bunun kontrol grupları düzeyine inmediği gözlemlenmiştir (Tablo 11).

Tablo 11'deki veriler incelendiğinde N-Asetil Sistein'in doz gruplarında en fazla inhibisyonunun % 70 ile 800mg/kg doz grubunda, daha sonra %55 ile 200mg/kg da olduğu ve en az inhibisyonun % 51 ile 400mg/kg doz grubunda olduğu belirlenmiştir.

Ancak N-Asetil Sistein'in dozları arasında yapılan karşılaştırmada doz grupları arasında istatistiksel olarak farklılık olmadığı ve bu nedenle de net bir doz-etki ilişkisinden söz etmek mümkün değildir.

Zhao ve Shichi, 1998 yılında yaptığı çalışmada farede Asetaminofen ile oluşturulan katarakt ve diğer göz hasarlarını 200mg/kg dozda Di- allil Di sülfid (DADS) katarakt'ı önlerken, 500mg/kg dozundaki NAC katarakt oluşumunu önlemede DADS'de oranla daha zayıf etki göstermiştir. Ancak karışım halinde verildiğinde (DADS ve NAC) katarakt'ı tamamiyle önlemiştir. NAC'ın katarakt'ı önlemede koruyucu etkisini, hücredeki sistein ve GSH düzeyini

arttırarak ve böylece Asetaminofen (APAP)'in elektrofilik metaboliti N-asetil-p-benzokinon imin (NAPQI)'ın glutatyon ile konjuge olarak detoksifikasyonunu arttırmak şeklinde sağladığını bildirmişlerdir¹³³.

Balonsky ve De Flora 1998 yılında yaptıkları çalışmada N-asetil sistein karsinogen verilmeden 27 gün önce 100-500mg/kg dozda verilmiş ve deney süresince verilmeye devam edilmiştir. Normakromatik eritrositlerdeki mikroçekirdek sıklığı incelendiğinde ürean'ın oluşturduğu klastojenik etki N-Asetil sistein tarafından doza bağlı olarak azaldığı gözlemlenmiştir. Bunun yanısıra ürean verilmesinden 4 ay sonra izlenen deney grubunda farelerin büyük bir kısmında NAC verilen deney grubundaki akciğer tümör sıklığının azaldığı gözlemlenmiştir¹³⁴.

Habs ve arkadaşları 1984 yılında yaptıkları çalışmada, N-Asetil Sistein'in de bulunduğu sülfür içeren 7 bileşiği, siklofosfamid'den önce sıçanlara 100mg/kg dozda oral olarak verdiklerinde, Di sülfiram haricindeki diğer bileşiklerin siklofosfamid'in toksisitesini azalttığını, ve sülfür içeren bileşikler arasında mesna (sodyum-2-merkaptotetan sülfonat) nın siklofosfamid'in indüklediği mesane ve böbrek toksitesini önlemede en etkili olduğunu gözlemlemişlerdir¹³.

N-Asetil sistein biyoyararlılığı % 10'dan az olmasına rağmen oral yolla 100-600mg dozlarda NAC verildiğinde hızla absorbe olmaktadır. İntravenöz alımda ise yarılanma ömrü 2-6 saat arasındadır ve dozun % 20- %30'u idrarda değişmemiş olarak atılır. N-Asetil Sistein'in farmakokinetiği komplikedir ve metabolizması sırasında çok sayıda ürün oluşur (sistein, sistin, metiyonin, GSH ve diğer karışım halinde di sülfidler) plazmada N-Asetil sistein'in büyük bir kısmı disülfidler halinde bulunur. Bu konuda yapılan çalışmada oral yolla verildiğinde N-asetil sistein, total sistin ve serbest ve total GSH değişmez iken plazmada serbest sistein konsantrasyonu gösterilmiştir⁸².

De Vires ve De Flora 1993 yılında yaptıkları çalışmada, N-Asetil Sistein'in GSH prekürsörü olduğu için yapısındaki sistein'i GSH'a vererek hücre ve dokulardaki glutatyon düzeyini arttırdığını ifade etmişlerdir¹⁵.

Bizim çalışmamızda da, N-Asetil sistein, mutajenik bileşik verilmesinden 7 gün önce 200,400,800mg/kg dozlarda verilerek mesane ve diğer dokularda GSH düzeyinin artırıldığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda kullandığımız doz gruplarında elde ettiğimiz antigenotoksik etkilerin diğer çalışmalarda kullanılan doz grupları dikkate alındığında karşılaştırılabilir ve paralellik gösterdiği düşünülmektedir.

Şimdiye kadar hayvanlarda çeşitli dokularda yapılan çalışmalarda genelde N-Asetil Sistein tümör sıklığını azaltarak koruyucu etkisi ve antiklastojenik etkisi 100-1000mg/kg doz gruplarında bizim çalışmamız da dahil olmak üzere gösterilmiştir. Ancak Oikawa ve arkadaşları 1999 yılında N-Asetil Sistein'in hücre kültürlerinde 1mM dozda, hayvanlarda ise 1000-2000mg/kg dozlarda oksidatif DNA hasarına neden olabileceğini göstermişler ve bu nedenle NAC'ın doza bağlı olarak karsinojenik ve antikarsinojenik potansiyele sahip olabileceğini öne sürmektedir¹³¹.

Gurtoo ve arkadaşları 1981 yılında yaptıkları çalışmada, siklofosfamid'in metabolize olması sonucunda oluşan elektrofilik bileşiklerden olan akrolein'in GSH'ın nükleofilik tiyol grubu ile konjugasyonu sonucunda atılımının çok toksik metabolitlerin temizlenmesinde başlıca yolak olduğunu gözlemlenmiştir¹³⁵. Nitekim siklofosfamid verilmesinden sonra GSH'ın hızlı bir şekilde azaldığı bu çalışmada gösterilmiştir.

N-Asetil Sistein gibi tiyol içeren bileşiklerin, mutasyon ve kanserin başlamasını önlemesi, antigenotoksik ve antioksidan gibi belli mekanizmalar aracılığı ile gerçekleştirdiği yapılan çalışmalarda ifade edilmektedir¹².

Berrigan ve arkadaşları 1982 yılında yaptıkları çalışmada, N-Asetil Sistein verilen sıçanlarda, sitokroma bağlı P₄₅₀ enzim aktivitesi ya da miktarında değişiklik olmadığını bununla birlikte N-Asetil sistein + siklofosfamid karışım halinde verildiğinde, karma fonksiyonlu oksidaz enzim sistemlerine siklofosfamid'in oluşturduğu baskılayıcı etkiye karşı koruyucu etkinin oluştuğunu gözlemlemişlerdir¹³⁶.

Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarda, N-Asetil Sistein'in antigenotoksik ve antioksidan etkisini, siklofosfamid'in metabolize olması sonucunda oluşan reaktif metabolitleri (fosforamid mustard, akrolein) nükleofilik özelliği ile temizleyerek, glutatyon prekürsörü olması nedeniyle GSH seviyesini artırması sonucunda GSH'nun nükleofilik tiyol grubu ile elektrofilik bileşiklerden akrolein'in konjugasyonu sonucunda atılımını sağlayarak, detoksifiye edici enzim sistemlerini ya faz I enzimlerini (karma fonksiyonlu oksidazları) ya da faz II (Glutatyon-S-transferaz) enzim aktivitelerini artırarak toksik metabolitlerin atılımını sağlayarak gerçekleştirmiştir.

Siklofosfamid karma fonksiyonlu oksidaz enzim sistemleri (KFO) tarafından aktivasyona uğrayarak, reaktif metabolitlerine (fosforamid mustard, akrolein) dönüşür. Aktif metabolitler, KFO enzimlerinin indüklenmesi ile oluşmaktadır. Siklofosfamid'in genotoksik etkiye neden olan metaboliti fosforamid mustard'dır ki o da, fare eksofoliyepitel hücrelerinde genotoksik etki oluşturmuştur. Siklofosfamid'in diğer reaktif metaboliti elektrofilik aldehit akrolein'dir. Akrolein, hemorajik sistit'e neden olmaktadır. Siklofosfamid'in ürotoksik etkisinden sorumlu olan metabolittir. Akrolein sitotoksik etkinin oluşumundan sorumlu değildir. Hepatik mikrozomal enzimlerin yıkımına neden olur¹³⁷.

N-Sistein, faz II enzim aktivitesini (Glutatyon-S-transferaz) ve dokulardaki GSH düzeyini artırarak toksik metabolitleri detoksifiye eder. Bizim çalışmamızda da muhtemelen, N-Asetil Sistein, antigenotoksik ve antioksidan etkisi bu mekanizmalar ile gerçekleşmiştir.

Çalışmamız kısa süreli test olarak, uzun süreli deney hayvanları ile yapılan karsinojenite çalışmalarına ön bilgiler vererek, Chemoprevention çalışmalara yol gösterecektir.

Antikarsinojenik etkisi belirlenecek olan bileşikler ile yapılarak çalışmalara model oluşturarak bir çok bileşiğin antikarsinojenik etkisi hedef organda bu yöntem ile test edilebilir. Ancak bir tek dezavantajı, maksimum genotoksik hasarın elde edildiği günde (10. günde) incelenme şansı vardır. Ayrıca mikroskop sayımında otomasyona geçirilmemiş olması nedeniyle mikroçekirdekli hücreleri gözlemleyebilmek için binlerce hücre saymak gibi de dezavantajı vardır.

Bunun dışında çalışmamızda sentetik kimyasal bileşik ve tabii orijinli bileşik mutajenden önce ve mutajenle birlikte verilmiştir. Bu bileşikler mutajenden sonra da verilerek, DNA repair hasarının incelenmesi yararlı olabilirdi.

N-Asetil Sistein ve C-Vitamini'nin antimutajenik etkileri ayrı ayrı çalışılmıştır. Bu bileşikler kombine verilerek, etkileri test edilip antioksidanların birbirlerine sinerjetik etkilerinin olup olmadığı belirlenebilirdi.

Nitekim Kanopacko 1998 yılında yaptığı çalışmada, fare mesane epitel hücrelerinde γ -radyasyonun indüklediği genotoksik etkiye C,E vitamini ve β -karotenin etkisini ve bu vitamin karışımlarının sinerjetik olarak etkisini göstermişlerdir²¹.

Ayrıca, N-Asetil Sistein, alfa tokoferol, 13Cis retinoik asit'in koruyucu etkilerinin denendiği in-vitro çalışmalarda, mutajenik etki ve kromozom kırıklarına karşı bu tip bileşikler önce verildiğinde doza bağlı azalma olduğu gözlemlenmiştir¹⁰⁵.

Farelerin vücut, karaciğer ve rölatif karaciğer ağırlıklarına N-Asetil sistein'in etkisi Tablo 12'de görülmektedir. 200,400,800mg/kg N-Asetil sistein + siklofosfamid verilen doz grupları siklofosfamid verilen grup ile karşılaştırıldığında,

Karaciğer ağırlıkları sadece 800,200mg/kg doz gruplarında rölatif karaciğer ağırlıkları ise sadece 800mg/kg doz grubunda düşük bulunmuştur ($p < 0.05$). N-Asetil sistein karaciğerde toksisite oluşturmamıştır.

N-Asetil Sistein verilen fare mesanesindeki histopatolojik bulgular Tablo 13'de görülmektedir. Lezyonlarda olumlu yönde iyileşme vardır ama bu düzelmenin C-Vitaminine göre daha az olduğu tesbit edilmiştir (Tablo 10).

Sonuç olarak, bizim bu çalışmamızda siklofosfamid'in hedef organda (Fare eksfoliyte epitel hücrelerinde) genotoksik etki oluşturmada model bir bileşik olarak kullanımının uygunluğu belirlenmiştir. Pek çok sayıdaki bileşiğin, antigenotoksik etkisi hedef organda incelenebilir, diğer organlar ile karşılaştırılabilir.

Çalışmamızda ayrıca, doğal orijinli bir bileşik olan C-Vitami ve sentetik kimyasal bileşik olan N-Asetil sistein'in antigenotoksik ve antioksidan etkileri de fare eksfoliyte epitel hücrelerinde (hedef organda) mikroçekirdek testi ile incelenmiş ve her iki bileşiğinde genotoksik etkiyi modüle ettiği hedef organda gözlemlenmiştir.

Antigenotoksik, antimutajenik, antioksidan etkisi belirlenecek olan kimyasal bileşiklere çeşitli hedef dokularda kısa süreli test olarak uygulanarak, uzun süreli deney hayvanları ile yapılan karsinogenite testlerine ön bilgiler verebilir. Diğer organlar ile karşılaştırma fırsatı verebilir.

Mesane dokusunda eksfoliyte epitel hücrelerine mikroçekirdek testinin uygulanması sırasında maksimum genotoksik cevabın ancak 10 gün sonra

incelenebilmesi gibi dezavantajı vardır. Bunun yanısıra hücreler kolaylıkla elde edilebilirken, epitel hücrelerde mikroçekirdekli hücreleri belirlemek için binlerce hücre saymak gibi dezavantajı vardır.



ÖZET

İnsanlar günlük yaşamlarında çok sayıda kimyasal karsinojen ve mutajenlere maruz kalabilmektedir. Bunlar arasında antineoplastik ilaçlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aromatik aminler, nitrozaminler, metaller ve radyasyon bulunur²². İnsan vücudu bu tip kimyasal bileşiklere karşı çok çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmesine rağmen bu kimyasal bileşiklere karşı giderek artan maruziyet, mutajenik ve karsinojenik etkilere yol açabilmektedir. Bu nedenle bu kimyasal bileşiklerin mutajenik ve/veya karsinojenik özelliklerini baskılayabilecek nitelikte diğer bileşiklerin belirlenmesine ve kullanılmasına gerek vardır.

Bu çalışmanın amacı; fare üroteliyal epitel hücrelerinde genotoksik etki oluşturmada model bileşik olarak, siklofosfamid'in uygunluğunu belirlemek, N-Asetil Sistein ve vitamin C ile, fare üroteliyal epitel hücrelerindeki genotoksik etkinin modülasyonunu ve doz-etki ilişkisini mikroçekirdek (MÇ) ile incelemektir.

Siklofosfamid'in fare üroteliyal epitel hücrelerinde maksimum genotoksik hasar oluşturduğu zaman aralığının tesbit edilmesi için 51.6mg/kg dozda siklofosfamid i.p. olarak farelere verildikten sonra 2.,5.,7.,10.,15 ve 17., günlerde çıkarılan mesanelerdeki üroteliyal epitel hücreler incelendi ve MÇ sıklık ortalamaları ($\pm$ S.S.) (%) sırasıyla 4.0 ($\pm$ 1.16), 8.5 ($\pm$ 1.00), 11.9 ($\pm$ 0.50), 17.0 ($\pm$ 2.68), 9.3 ($\pm$ 1.71), 4.0 ($\pm$ 0.50) bulunmuştur. 2. günden itibaren MÇ (%) oluşum sıklığının artmaya başladığı 7. günde yükseldiği ve 10. günde maksimum değere ulaştığı, 15. günde azaldığı 17. günde minimum değere indiği gözlemlenmektedir. Maksimum genotoksik hasarın elde edildiği zaman aralığı 10. gün olarak belirlenmiştir.

Maksimum genotoksik hasarın elde edildiği zaman aralığında doz-etki ilişkisini belirlemek için; 12.9,25.8,51.6,64.5mg/kg dozlarda siklofosfamid i.p. olarak farelere verildikten sonra üroteliyal epitel hücrelerindeki MÇ sıklık ortalamaları ($\pm$ S.S) (%o) doz gruplarında sırasıyla 5.0 ($\pm$ 1.41), 7.25 ($\pm$ 0.50), 15.3 ($\pm$ 4.35), 17.8 ($\pm$ 5.35) olarak bulundu. 51.6mg/kg doz grubundaki MÇ sıklığının 12.9 ve 25.8mg/kg doz gruplarından istatistiksel düzeyde anlamlı olarak arttığı ($p<0.05$), 64.5mg/kg doz grubu ile istatistiksel olarak farklı olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0.05$).

10,30 ve 60mg/kg dozda vitamin C farelere intraperitonel olarak siklofosfamid verilmeden 24 saat önce ve beraber verildikten sonra incelenen mesane epitellerinde MÇ sıklık ortalamaları ($\pm$ S.S) (%o) sırasıyla 9.7 ($\pm$ 1.50), 8.1 ($\pm$ 2.90), 7.0 ($\pm$ 2.27) olarak bulunmuştur. Pozitif kontrol (siklofosfamid) grubunun MÇ sıklığı (16.5 ± 3.55) ile karşılaştırıldığında istatistiksel düzeyde anlamlı azalmalar tesbit edilmiştir ($p<0.05$). Doza bağlı olarak istatistiksel düzeyde anlamlı azalma, sadece 10mg/kg ile 60mg/kg doz grupları arasında bulunmuştur ($p<0.05$).

200,400 ve 800mg/kg dozda oral yolla 7 gün süre ile N-Asetil Sistein verildikten sonra fare mesane epitel hücrelerinde MÇ sıklık ortalamaları ($\pm$ S.S) (%o) sırasıyla $7.66\pm (2.94)$, $8.39 (\pm 3.5)$, $5.0 (\pm 1.41)$ olarak bulunmuştur. Pozitif kontrol (siklofosfamid) grubu MÇ sıklığı (17.0 ± 3.09) ile karşılaştırıldığında istatistiksel düzeyde anlamlı azalmalar tesbit edilmiştir ($p<0.05$) Doza bağlı olarak azalmalar gözlemlenmesine rağmen, anlamlı bir doz-etki ilişkisi bulunamamıştır ($p>0.05$).

Sonuç olarak, bu çalışmada C-vitamini ve N-Asetil Sistein'in fare mesane epitel hücrelerinde siklofosfamid'in indüklediği genotoksik hasarı % 41-70 arasında azalttığı gösterilmiştir. Bu azalmada C-vitaminin muhtemelen antioksidan ve N-Asetil Sistein'in nükleofilik özelliği ve GSH prekürsörü olması nedeniyle etkili olduğu düşünülmektedir.

Çeşitli doğal ve sentetik orijinli kimyasal bileşiklerin hedef dokularda doza, veriliş zamanına bağlı olarak antigenotoksik etkilerinin araştırmasında, bu çalışmadaki hayvan modeli kolaylıkla uygulanabilir.



SUMMARY

People are exposed to many carcinogenic and mutagenic chemical in their everyday lifes. These include; antineoplastic drugs, PAHs, aromatic amines, nitrosamines, metals and radiation. Although the human body has developed a variety of defense mechanisms for its protection against such chemicals, increasing exposure to hazardous chemicals can lead to mutagenic and carcinogenic events in our cells. Thus, there is a need to indentify and use agents which can suppress the mutagenic and/or carcinogenic ability of environmental chemicals.

In the present study, our aim was; to evaluate whether cyclophosphamide (CP) is a model mutagen to screen the genotoxic damage in exfoliated bladder cells of mice, and to obtain information about the modulating effect of vitamin C and N-acetylcysteine including dose-response association against CP- induced genotoxic damage by micronucleus (MN) test.

Exfoliated cells were scraped from the bladder of mice at 2,5,7,10,15 and 17 days after i.p. treatment with a 51.6mg/kg of CP to evaluate the maximum response time of CP. The mean ($\pm$ S.D) MN frequencies (‰) for different treatment times were found as 4.0 ($\pm$ 1.16), 8.5 ($\pm$ 1.00), 11.9 ($\pm$ 0.50), 17.0 ($\pm$ 2.68), 9.3 ($\pm$ 1.71), 4.0 ($\pm$ 0.50) respectively. The number of micronucleated cells was increased at 2,5,7, days, and greatest at 10th day. At 15th and 17th days after treatment a decreasing trend was observed. The maximal response in frequency of MN occurred 10 days after treatment.

To determine the dose-response association at 10 days, animals were treated with CP at doses of 12.9mg/kg, 25.8mg/kg, 51.6mg/kg and 64.5mg/kg. The mean ($\pm$ S.D) MN frequencies (‰) by dose groups were found as 5.0 ($\pm$ 1.41), 7.25 ($\pm$ 0.50), 15.3 ($\pm$ 4.35), 17.8 ($\pm$ 5.35) respectively. CP at dose of 51.6mg/kg showed significant increases in MN frequencies when compared with

that doses of 12.9mg/kg and 25.8mg/kg ($p<0.05$) while for the dose of 64.5mg/kg was not significant ($p>0.05$).

Three doses (10,30 and 60mg/kg) of vitamin C were intraperitoneally administered twice, one dose 24 h prior to the positive mutagen cyclophosphamide and the second dose simultaneously to the positive mutagen. Mean ($\pm$ S.D) frequencies of MN ($\%$) in exfoliated bladder cells by dose groups were found as 9.7 ($\pm$ 1.50), 8.1 ($\pm$ 2.90), 7.0 ($\pm$ 2.27) respectively. All the three doses of Vitamin C showed a significant inhibitory effect on MN frequencies in mouse bladder cells when compared with those of positive control group (16.5 ± 3.55) ($p<0.05$). Dose-dependent inhibitory effect of vitamin C was only observed between at doses of 10mg/kg and 60mg/kg ($p<0.05$).

Three doses (200,400 and 800mg/kg) of N-acetylcysteine were administered by gavage for consecutive days before the injection of CP. Mean ($\pm$ S.D) frequencies of MN ($\%$) in exfoliated bladder cells were observed by dose groups as 7.66 ($\pm$ 2.94), 8.39 ($\pm$ 3.54), 5.0 ($\pm$ 1.41) respectively. All the three doses of N-acetylcysteine showed a significant inhibitory effect on MN frequencies in mouse bladder cells when compared with those of positive control group (17.0 ± 3.09) ($p<0.05$). Although there is a trend towards decreasing MN frequencies increasing with the dose the number of MN in bladder cells was not dose dependent ($p>0.05$).

In the present study, it has been observed that treatment with vitamin C and N-acetylcysteine have reduced the CP-induced MN frequencies in exfoliated bladder cells by 41-70 % in all cases. The modifying effects of vitamin C and N-acetyl cysteine against CP-induced genotoxic damage may be due to the their antioxidant, nucleophilic properties and to the ability to act as a precursor of GSH.

Our results suggest that CP-induced MN test in exfoliated cells from the bladder of mice appears to a promising assay to get information on the antigenotoxic effects of several synthetic and natural compounds depending on the dose and time of treatment.



VI. KAYNAKLAR

1. MORSE, M.A., STONER, G.D., Cancer Chemoprevention, Principles and Prospects. *Carcinogenesis*, 14.9, 1737-1746 (1993).
2. HIROSE, Y., TANAKA, T., KAWAMORI, T., OHNISHI, M., MAKITA, H., MORI, H., SATOH, K., HARA, A., Chemoprevention of Urinary Bladder Carcinogenesis by the Natural Phenolic Compound Protocatechuic Acid in Rats. *Carcinogenesis*. 16, 10, 2337-2342 (1995).
3. FIRAT, D., HAYRAN, M., Cancer Statistics in Turkey and in the World. Turkish Association for Cancer Research and Control (1990-1992).
4. MACHADO, SANTELLI, G.M., CERQUEIRA, E.M., OLIVEIRA, C.T., BRAGANCA, PEREIRA, C.A. Biomonitoring of Nurses handling antineoplastic drugs, *Mutation Research* 322, 203-208 (1994).
5. BELIEN, J.A.M., COPPER, M.P., BRAAKHUIS, B.J.M., SNOW, G.B., BAAK, J.P.A., Standardization of Counting Micronuclei: Definition of a protocol to Measure Genotoxic Damage in Human Exfoliated Cells, *Carcinogenesis*, 16 (10). 2395-2400 (1995).
6. STICH, H.F., SAN, R.H.C., ROSIN, M.P. Adaptation of the DNA Repair and Micronucleus Tests to Human Cell Suspensions and Exfoliated Cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 407, 93-105 (1983).
7. BURGAZ, S., KARAHALİL, B., BAYRAK, P., TAŞKIN, L., YAVUZASLAN, F., BOKESÖY, I., ANZİON, R.B.M., BOS, R.P., PLATIN, N., Urinary Cyclophosphamide Excretion and Micronuclei Frequencies in Peripheral Lymphocytes and in Exfoliated Buccal Epithelial Cells of Nurses Handling Antineoplastics *Mutation Research.*, 439,97-104 (1999).
8. ROSIN, M.P., Genetic Alterations in Carcinogenesis and Chemoprevention, *Environ Health. Perspec.* 101 (Suppl 3) 253-256 (1993).
9. TOLBERT, P.E., SHY, C.M., ALLEN, J.W. Micronuclei and other Nuclear Anomalies in Buccal Smears. *Methods Development. Mutation Research.* 271, 69-77 (1992).

10. FIRAT, S., Kobaylarda Radyasyonla Oluşan Akciğer Hasarında Doku Glutasyon, Glutasyon peroksidaz, Glutasyon-S- Transferaz Düzeyleri ve N-Asetil Sistein'in Bu sistem Üzerindeki Etkisi Uzmanlık Tezi. Gazi Üniv. Tıp Fakültesi. Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara (1997).
11. DE, FLORA, S., D'AGOSTINI, F., IZOTTI, A., BALANSKY, R., Prevention by N-acetylcystein of Benzo (a) pyrene Clastogenicity and DNA Adducts in Rats. Mutation Research 250, 87-93 (1991).
12. DE, FLORA, S., IZOTTI, A., D'AGOSTINI, F., CESARONE, C.F. Antioxidant Activity and Other Mechanisms of Thiols Involved in Chemoprevention of Mutation and Cancer. The American Journal of Medicine. 91 (Suppl 3c), 122-130 (1991).
13. DELNESTE, Y., JEANNIN, P., PÖTIER, L., ROMERO, P., BONNEFOY, J.Y., N-Acetyl-L-Cysteine Exhibits Antitumoral Activity by Increasing Tumor Necrosis factor α - Dependent T-Cell Cytotoxicity. Blood, 90.3, 1124-1132 (1997).
14. DE VIREN N., DE FLORA, S., N-Acetyl-L-Cysteine, Journal of Cellular Biochemistry, Supplement 17 F: 270-277 (1993).
15. HABS, M., HEBEBRAND, J., SCHMAHL, D., Influence of Sulfur Containing Compounds on the Acute Toxicity of Cyclophosphamide in male Sprague. Dawley Rats. Arzneim-Forsch/Drug. Res. 34, II, 7, 792-793 (1984).
16. BOONE, C.W., STEELE, V.E., KELLOFF, G.I., Screening for Chemopreventive (anticarcinogenic) Compounds in Rodents. Mutation Research, 267, 251- 255 (1992).
17. DORGAN, J.F., and SCHATZKIN, Antioxidant Micronutrients in Cancer Prevention. Hematol. Oncol. Clin. North. Am. 5,43-68 (1991).
18. KOHLMEIER, L., SIMONSEN, N., MOTTUS, K. Dietary Modifiers of Carcinogenesis. Environ Health Perspect. 103 (Suppl 8) 177-184 (1995).
19. BOSE S., SINHA, S.P. Modulation of Ochratoxin-Produced Genotoxicity in Mice by Vitamin C. Fd Chem. Toxic. 32, 6, 533-537 (1994).
20. SIES, H., STAHL, W., SUNDQUIST, A.R., Antioxidant function of Vitamins: Vitamins E and C Beta-Carotene, and Other Carotenoids. Ann. N. Y. Acad. Sci, 669, 7-20 (1992).

21. KONOPACKA, M., WIDEL, M., WOLNY, J.R., Modifying Effect of Vitamin C, E and beta-Carotene Against Gamma-Ray Induced DNA Damage in Mouse cells. *Mutation Research*. 417, 85-94 (1998).
22. AL-SABTI, K., METCALFE, C.D., Fish Micronuclei For Assessing Genotoxicity in Water. *Mutation Research*., 343, 121-135 (1995).
23. STICH, H.F., CURTIS, J.F., PARIDA, B.B., Application of the Micronucleus Test to Exfoliated Cells of High Cancer Risk Groups. Tobacco Chewers. *Int. J. Cancer*, 30, 553-559 (1982).
24. KADERLIK, R.K., LIN, D.X., LONG, N.P., KABLOBAR, F.F., Advantages and Limitation of Laboratory Methods for Measurement of Carcinogen DNA Adducts for Epidemiological Studies. *Toxicol. Let*, 64-65, 469-475 (1992).
25. BOYES, B.G., Short Term Mammalian in vitro Test For Carcinogenic Intraxtions. *Recent Trends Medical. Genetics Advances in the Biosciences* Vol. 56.
26. HENDERSON, P.T., VAN DOORN, R., LEIJDEKER, S., C.M., BOS, R.P., Excretion of Thioethers in Urine After Exposure to Electrophlic Chemicl. In "Monitoring Human Exposure to Carcinogenic and Mutagenic Agents" (BERLIN, A., DROPER, K., HEMMINK, I.K., VAINIO, H., Ed) IARC Scientific Publications No: 59. International Agenay for. Research on Cancer, Lyon. 173-187 (1984).
27. VAN SITTEERT, N., DELONG, G., Biomonitoring of Exposure to Potential Mutagens and Carcinogenes In Industrial Populations fd. *Chem Toxic*. Vol 23, 23-31 (1985).
28. LAUWERYS, R. Basic Concepts of Monitoring Human Exposure. In "Monitoring Human Exposure to Carcinogenic and Mutagenic Agents" (BERLIN, A., DROPER, K., HEMMINKI, K., VAINIO, H., Ed) IARC Scientific Publications No. 59. International Agency for Reseacrh on Cancer, Lyon, 31-36 (1984).
29. OSAWA, T., KATSUZAKI, H., HAGIWARA, Y., HAGIWARA, H., SHIBAMOTO, T. A Novel Antioxidant Isolated From Young Green Barley Leaves. *J. Agric. Food. Chem*. 40. 1135-1138 (1992).

30. CLARKE, C.H., SHANKELL, D.M., Antimutagenesis in Microbial Systems. *Bacteriol. Rev.* 39, 33-53 (1975).
31. FERGUSON, L.R., Antimutagens as Cancer Chemopreventive Agents in the Diet. *Mutation Research.* 307, 395-410 (1994).
32. OHTA, T., Modification of Genotoxicity by Naturally Occurring Flavorings and their Derivatives. *Crit. Rev. Toxicol.* 23, 127-146 (1993).
33. KURODA, Y., Antimutagenesis Studies In "Basic Life Sciences: Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms. II". Vol. 52 (KURODA, Y., SHENKEL, D.M., WATERS, M.D., Ed) Newyork, 1-22 (1990).
34. OESCH, F., Antimutagenesis by Shift in Manooxygenase Isoenzymes and Induction of Epoxide Hydrolase, *Mutation Research*, 202, 335-342 (1988).
35. HAYATSU, H., NEGISHI, T., ARIMOTO, S., HAYATSU, T. Porphyrins as Potential Inhibitors Against Exposure to Carcinogens and Mutagens. *Mutation Research*, 290, 79-85 (1993).
36. CERUTTI, P., SHAH, G., PESKIN, A., AMSTAD, P., Oxidant Carcinogenesis and Antioxidant Defense. *Ann. NY. Acad. Sci.* 663, 158-166 (1992).
37. BLOCK, G., Vitamin C and Cancer Prevention. The Epidemiologic Evidence. *Am. J. Clin. Nutr.* 53, 270-282 (1991).
38. BERTAM, J.S., KOLONEL, L.N., MEYSKENS, F.L., Rationale and Strategies for Chemoprevention of Cancer in Humans. *Cancer Research.* 47, 3012-3031 (1987).
39. STEINMETZ, K.A., POTTER, J.D., Vegetables, Fruit and Cancer II. Mechanisms. *Cancer Causes Control.* 2, 427-442 (1991).
40. MESSINA, M., BARNES, S. The Role of Soy Products in Reducing Risk of Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 83, 541-546 (1991).
41. DORANT, E., VAN DEN BRANOT, P.A., GOLDBOHN, R.A., HERMUS, R.J., STRUMANS, R., Garlic and its Significance for the Prevention of Cancer in Humans. A Critical View. *Br. J. Cancer.* 67, 424-429 (1993).

42. DIMASCIO, P., MURPHY, M.E., SIES, H., Antioxidant Defense Systems: The Role of Carotenoids, Tocopherols, and Thiols. *Am. J. Clin. Nutr.* 53, 194-200 (1991).
43. KRINSKY, N.I. Anticarcinogenic Activities of Carotenoids in Animals and Cellular Systems. In "Free Radicals and Aging" (EMERIT, I., CHANCE, B. Ed). Birkhavser Verlag, 227-234 (1992).
44. KRINSKY, N.I., Micronutrients and Their Influence on Mutagenicity and Malignant Transformation. *Ann, NY, Acad, Sci.* 686, 229-242 (1993).
45. BLOCK, G., PATTERSON, B., SUBAR, A. Fruit Vegetables, and Cancer Prevention. A Review of the Epidemiological Evidence. *Nutr. Cancer.* 18, 1-29 (1992).
46. GREENBERG, E.R., BARON, J.A., TOSTESON, T.D., FREEMAN, D.H., BECK, G.J., BOND, J.H., COLACCHIO, T.A. COLLER, J.A., FRANKL, H.D., HAILE, R.W., MANDEL, J.S., NIERENBERG, D.W., ROTHSTEIN, R., SNOVER, D.C., STEVENS, M.M., SUMMER, S.,R.W., VAN STOLK, R.U., A Clinical Trial of Antioxidant Vitamins to Prevent Colorectal Adenoma. *N. Engl. J. Med.* 331 (3), 141-147 (1994).
47. Anonymous. The Effect of Vitamin E and B- Carotene on the Incidence of Lung Cancer and Other Cancers in male Smokers. The Alpha-Tacopherol, β -Carotene Cancer Prevention Study Group. *N. Engl. J. Med.* 330, 1029-1035 (1994).
48. HUANG, M.T., WANG, Z.Y., GEORIADIS, C.A., LASKIN, J.D., CONNEY, A.H., Inhibitory Effects of Curcumin on Tumor Initiation by Benzo(a)pyrene and 7,12-diamethyl-benz(a)anthracene. *Carcinogenesis*, 13, 2183-2186 (1992).
49. CHUNG, F.L., XU,Y., HO, C.T., DESAI, D., HAN,C. Protection Against Tobacco-Spesific, Nitrosamine-Induced Lung Tumorigenesis by Green Tea and its Components. In "Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health. II. Antioxidants and Cancer Prevention" (HUANG, M.T., HO,C.T., LEE, C.T., LE,C,Y. Ed). Washington, 300-307 (1992).
50. KOHLMEIER, L., Health Divergence During Political Divisions. East and West Germany. In "Europe Without Frontiers. The Implications for Health" (NORMAND, C.E.M., VAUGHAN, J.P., Ed). England. 57-75 (1993).

51. STOEWSAND, G.S., ANDERSON, J.L., MUNSON, L. Protective Effect of Dietary Brussels Sprouts Against Mammary Carcinogenesis in Sprague. Dawley Rats. *Cancer Lett.* 39, 199-207 (1988).
52. BRESNICK, E., BIRT, D.F., WOLTERMAN, K., WHEELER, M., MARFIN, R.S., Reduction in Mammary Tumorigenesis in the rat by Cabbage and Cabbage Residue. *Carcinogenesis* 11, 1159-1163 (1990).
53. DAVIS, D.L., BRADLOW, H.L., WOLFF, M., WOODRUFF, T., HOEL, D.G., ANTON-COLVER, H. Medical Hypothesis. Xenoestrogens as Preventable Causes of Breast Cancer. *Environ Health Perspect* 101, 372-377 (1993).
54. BURK, R.F., Recent Developments in Trace Element Metabolism and Function. New Roles of Selenium in Nutrition. *J. Nutr.* 119, 1051-1054 (1989).
55. BURK, R.F., Protection Against Free Radical Injury by Selenoenzymes. *Pharmacol. Ther.* 45, 383-385 (1990).
56. VAN DEN BRANDT, P.A., GOLDBOHN, R.A. VAN'T VEER, P., BODE, P., DORANT, E., HERMUS, R.J., STURMANS, F.A. A Prospective Cohort Study on Selenium Status and the Risk of Lung Cancer. *Cancer. Res.* 53, 20, 4860-4865 (1993).
57. SCIMECA, J.A., THOMPSON, H.J., Conjugated Linoleic acid. A Powerful Anticarcinogen from Animal Fat Sources. *Cancer*, 74, 1050-1054 (1994).
58. ROSE, D.P., CONNOLLY, J.M., Effects of Dietary Omega-3 Fatty Acids on Human Breast Cancer Growth and Metastases in Nude Mice. *J. Natl. Cancer. Inst.* 85, 1743-1747 (1993).
59. SALAMA, A., MILAGNOS, S., WILLIAM, W., Biomonitoring Using Accessible Human Cells for Exposure and Health Risk Assessment. *Mutation Research.* 436, 99-112 (1999).
60. KARAHALİL, B., Çocuk İşçilerde Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlara (PAH) Maruziyetin Biyoizlenmesi ve Genotoksik Hasarın Araştırılması. Doktora Tezi, Gazi Üniv. Sağlık Bilimleri, Enstitüsü. Ankara, (1996).

61. WORGUL, B.V., DAVID, J., ODRICH, S., MERRIAM, G.R., MEDVEDOVSKY, J.C., MERRIAM, J.C., TROKEL, S.L., GERAD, C.R., Evidence of Genotoxic Damage in Human Cataractous Lenses, *Mutagen*. 6, 495-499 (1991).
62. HEDDLE, J.A., CIMINO, M.C., HAYASHI, M., ROMAGNA, F., SHELBY, M.D., TUCKER, J.D., VANPARYS, P., MACGREGOR, J.T. Micronuclei as an index of Cytogenetic Damage, *Post Present and Future, Environ. Mol. Mutagen*, 18, 277-291 (1991).
63. STICH, H.F., ROSIN, M.P: Micronuclei in Exfoliated Human Cells an Internal Dosimeter for Exposures to Carcinogens. STICH, H.F., *Carcinogens and Mutagens in the Environment. Vol. II, Naturally Occurring Compounds Endogenous Formation and Modulation* CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida (1983).
64. SELESINSKI, R.S., GUZZIE, P.J., Review of Recent Advances in the Development and Application of the Micronucleus Test System Ballantyne Basic and Applied Toxicology Printed and Bound by Butler and Tanner, USA (1998).
65. CONSTANINI, A.S., PACI, E., SCALA, D., CORIAGGI, P., CIPPARONNE, G., CONFARTINI, M., MEDDAU, G.: Monitoring of Carcinogenic Risk in Tannery Workers by Means of Desquamative Lung and Bladder Cytology and Urinary Mutagenicity, *Ann. Occup. Hyg.* 31 (1), 21-30 (1987).
66. STICH, H.F., ACTON, A.B., PALCIC, B.: Towards an Automated Micronucleus Assay on Internal Dosimeter of Carcinogen-Exposed Human Population Groups, *Recent Results in Cancer Research*, 120, 94-105 (1985).
67. STICH, H.F.: Micronucleated Exfoliated cells as Indicators For Genotoxic Damage and as Marker in Chemoprevention Trials, *J. Nutr. Growth. Cancer*, 4, 9-18 (1987).
68. YAMAMOTO, K., KIKUCHI, Y.: A Comparison of Diametres of Micronuclei Induced by Clastogens and by Spandle Poisons. *Mutation Research.*, 71, 127-131 (1980).

69. STICH, H.F., ACTON, A.B., PALCIC, B.: Towards on Automated Micronucleus Assay as an Internal Dosimeter of Carcinogen Exposed Human Population Groups. *Rec. Rev. Cancer. Res.* 120, 94-105 (1990).
70. BURGAZ, S., İŞCAN, A., BÜYÜKBİNGÖL, Z.K., BOZKURT, A., KARAKAYA, A.E.: Evaluation of Micronuclei in Exfoliated Urethelial Cells and Urinary Thioether Excretion of Smokers. *Mutation Research.*, 335, 163-169 (1995).
71. ROSIN, M.P.: The Use of the Micronucleus Test on Exfoliated Cells to Identify Anti-Clastogenic Action in Humans; a Biological Marker for the Efficacy of Chemopreventive Agents. *Mutation Research.* 267, 265-276 (1992).
72. COUNTRYMAN, P.J., HEDDLE, J.A.: The Production of Micronuclei from Chromosome Aberration in Irradiated Cultures of Human Lymphocytes. *Mutation Research.* 41, 321-332 (1976).
73. SALVADORI, D.M.F., RIBERIO, L.R., OLIVEIRA, M.D.M., PEREIRA, C., A.B., BECAK, W., The Protective Effect of Beta-Carotene on Genotoxicity Induced by Cyclophosphamide *Mutation Research.* 265, 237-244 (1992).
74. DE KRISTINA, A., AGARWAL, K., MUKHERJEC, A., SENGUPTA, D., Inhibition by Capsaicin Against Cyclophosphamide-Induced Clastogenicity and DNA Damage in Mice. *Mutation Research.*, 335, 253-258 (1995).
75. KONOPACKA, M.: Evaluation of Frequency of Micronuclei in Exfoliated Cells from Bladder of Mice Treated With benzo (a) pyrene, 2-Acetylaminofluorene and Cyclophosphamide. *Cell. Biol. Int.* 18 (6), 669-672 (1994).
76. SELENSINKI, R.S., GUZZIE, P.J., Review of Recent Advances in the Development and Application of the Micronucleus Test System Ballantyne, B. *Basic and Applied Toxicology*, Printed and Bound by Butler and Tanner, USA (1998).
77. ANWAR, A.A., ROSIN, M.P.: Reduction in Chromosomal Damage in Schistosomiasis Patients After Treatment With Praziquantel. *Mutation Research.* 298, 179-185 (1993).
78. KAYAALP, S.O., Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 8. Baskı, Cilt I,II, Ankara (1998).

79. IARC, 26, 165-185 (1981).
80. BODDY, A.V., FURTUN, Y., ŞARDAŞ, S., ŞARDAŞ. O., IDLE, J.R.,
Individual Variation in the Activation and Inactivation of Metabolic Pathways
of Cyclophosphamide. Journal of the National Cancer. Istitute. 84, 22, 1744-
1748 (1992).
81. O'NEIL, M.J., SMITH, A., HECKELMEN, P.E., KINNEARY, J.F. The Merck
Index-An encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. Twelfth Edition,
16, Merck Research Laboratories. Division of Merck γ- Co Inc, (1996).
82. ROBERT, J.F., LANAGAN, F., MEREDITH, T.J., Use of N-Asetil Sistein in
Clinical Toxicology. The American Journal of Medicine. 91, (Supl 3) 131-
138 (1991).
83. BORGSTROM, L., KAGEDAL, B., PAULSEN, O., Pharmacokinetics of N-
Acetylcysteine in Man. Eur. J. Clin. Pharmacol. 31, 217-222 (1986).
84. ROBERTS, J.C., FRANCETIC, D.J., Chemoprotection Against
Cyclophosphamide- Induced Urotoxicity. Ribose- Cysteine. Anticancer
Research. 14, 383-388 (1994).
85. DİRİCAN, M., Vitaminler. In "Biyokimya/Biochemistry" (CHAMPE, P.C.,
HARVEY, R.A., Ed). Lippincott's Illustrated Review Serisi. 2. Baskı. 319-
330, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. İstanbul, (1997).
86. AKKUŞ, I., Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. ISBN 975-543-385-
6 Mimoza Yayınları. Konya (1995).
87. TORUN, M., YARDIM, S., Serbest Radikallerin Kalp-Damar Hastalıkları ile
İlişkisi ve Savunma Mekanizmaları J. Pharm. Sci. 18, 173-184 (1993).
88. TORUN, M., Vitamin E'nin Kanserde ve Kalp Damar Hastalıklarındaki Rolü.
J. Pharm. Sci. 20, 95-103 (1995).
89. BOZKIR, A., Akciğer Kanserli Hastalarda Yüksek Basıncılı Sıvı
Kromatografisi (HPLC) ile Serum Askorbik Asit ve Ürik Asit Tayini. Yüksek
Lisans Tezi. Gazi Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Biyokimya Anabilim Dalı
Ankara (1996).
90. FRANKEL, S., REITMAN, S., SONNENWIR, A.C., A. Gradwohl's Clinical
Laboratory Methods and Diagnosis. Seventh Ed, Vol I, The C.V. Mosby
Company, Saint Lois, 942-943, (1970).

91. SILLIPHAN, T. W.M., TOWNSEND, F.M., AMBROGI, L.P., Manual of Histologic and Sperial Staining Technics, Second. Ed., Nc Graw Hill Book Company inc. New York, Toronto, London (1960).
92. CHATTERJEE, J.B., MUKHOPADHIYAY, C.K., GOSH, M.K., Vitamin C a Potential Scavencer Against free Radical Induced Oxidative Damage. Current Science. 69,9, 747-751 (1995).
93. STEINMETZ, K.A. and POTTER, J.D., Vegetables, Fruits and Cancer. I. Epidemiology. Cancer Causes Control, 2,325-357 (1991).
94. MICOZZI, M.S., BEECHER, G.R., TAYLOR, P.R and KHACHLIK, F., Carotenoid Analyses of Selected Raw and Cooked Foods Associated With a Lower Risk for Cancer. J. Natl. Cancer. Inst. 82, 282-285 (1990).
95. CANFIELD, L.M., FORAGE, J.W., VALENZUELA, J.G. Carotenoids as Celluar Antioxidants. Proc. Soc. Exp Biol. Med. 200-260-265 (1992).
96. TANAKA, T., MORISHITA, Y., SUZUI, M., TOSHIRIO, K., OKUMURO, A., MORI, H., Chemoprevention of Mouse Urinary Bladder Carcinogenesis by the Naturally Occurring Carotenoid Astaxanthin. Carcinogenesis, 15, 1,15-19 (1994).
97. REDDY, B.S., NAYINI, J., TOKUMO, K., RIGOTTY, J., ZANG, E., KELLOFF, G. Chemoprevention of Colon* Carcinogenesis by Concurrent Administration of Piroxicam, a Nonsteroidal Antiinflammatory Drug with D, L- α -Difluoromethylornithine, an Ornithine Decarboxylase Inhibitor, in Diet. Cancer. Research. 50, 2562-2568 (1990).
98. BRENNER, D.W., SCHELLHAMMER, P.F. Upper Urinary Tract Urethelial Malignancy After Cyclophosphamide Therapy: A Case Report and Literature Review. J. Urol., 137,1226-1227 (1987).
99. SAMRA, Y., MARJORIE, H., ARIECH, L., Urinary Bladder Tumors Following Cyclophosphamide Therapy: A Report of Two Cases With a Review of Literature. Med. Pediatr. Oncol. 13, 86-91 (1985).
100. CROOK, T.R., SOUHAMI, R.L., MCLEAN, AEM: Cytotoxicity, DNA Crosslinking and Single Strand Breaks Induced by Activated Cyclophosphamide and Acrolein in Human Leukemia Cells. Cancer. Res, 46, 5029-5034 (1986).

101. SAKATA, T., SMITH, R.A., GARLAND, COHEN, S.M. Rat Urinary Bladder Epithelial Lesions Induced by Acrolein. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 9 (2) 159-169 (1989).
102. VIJALAXMI, K.K., VENU, R. In-vivo Anticlastogenic Effects of L-Ascorbic Acid in Mice. *Mutation Research.* 438, 47-51 (1999).
103. CHORVATOVICOVA, D., NAVAROVA, J. Suppressing Effects of Glucan on Micronuclei Induced by Cyclophosphamide in Mice. *Mutation Research.* 282, 147-150 (1992).
104. CHORVATOVICOVA, D., BAUER, V., Stobadine-Inhibitor of Cyclophosphamide-Induced Micronuclei in Mice. *Mutagenesis*, 9,3, 241-244 (1994).
105. KHAN, P.K., SINHA, S.P. Antimutagenic Efficacy of Higher Doses of Vitamin C. *Mutation Research*, 298, 157-161 (1993).
106. GIRI, A., KHYNRIAM, D., PRASAD, S.B. Vitamin C Mediated Protection on Cisplatin Induced Mutagenicity in Mice. *Mutation Research.* 421, 139-148 (1998).
107. SEN, S., MUKHERJEE, A., AGARWAL, K., SHARMA, A. Phenethyl Isotiocyanate Modulates Clastogenicity of Mitomycin C and Cyclophosphamide in vivo. *Mutation Research.* 371, 159-164 (1996).
108. KRISHNA, G., NATH, J., ONG, T., Inhibition of Cyclophosphamide and Mitomycin C-Induced Sister Chromatid Exchanges in Mice by Vitamin C. *Cancer. Research.* 46, 2670-2674 (1986).
109. MUKHERJEE, A., AGARWAL, K., AGUILAR, M.A., SHARMA, A., Anticlastogenic Activity of β -Carotene Against Cyclophosphamide in mice in vivo. *Mutation Research*, 263, 41-46 (1991).
110. FARSUND, T., Cell Kinetics of Mouse Urinary Bladder Epithelium. *Virchows Arch. B Cell Path.* 21, 279-298 (1976).
111. CAMPOBASSO, O., BERRINO, F., Early Effects of Cyclophosphamide on Mouse Bladder Epithelium. *Path. Microbiol.* 38, 144-157 (1972).

- 112.BROCK,N., POHL, J., STEKAR, J., SCHEEF,W., Studies on the Urotoxicity of Oxazaphospharine Cytostatics and its Prevention- III. Profile of Action of Sodium 2-Mercaptoethane Sulfonate (Mesna). *Eur. J. Cancer Clin Oncol.* 18,2, 1377-1387 (1982)
- 113.PHILLIPS, F.S., STENBERG, S.S., CRONIN, A.P., VIDAL, M.P., Cyclophosphamide and Urinary Bladder Toxicity. *Cancer Research*, 21. 1577-1589 (1961).
- 114.KOSS, L.G., LAVIN, P. Effects of a Single Dose of Cyclophosphamide on Various Organs in the Rat. II. Response of Urinary Bladder Epithelium According to Strain and Sex. *J. Nat. Cancer Inst*, 44,5. 1195-1200 (1970).
- 115.THEMANN, H., OBERDORF, E., BROCK, N., POHL, J., Electron Microscopic Investigations of the Cyclophosphamide Induced Lesions of the Urinary Bladder of the Rat and Their Prevention by Mesna, *Urol. Int.* 42,37-43 (1987).
- 116.BROCK, N., POHL, J., STEKAR, J., Studies on the Urotoxicity of Oxazaphosphorine Cytostatics and its Prevention-I. *Europ. J. Cancer.* 17,6, 595-607 (1981).
- 117.FUKUSHIMA, S., MASAYUKI, A., COHEN, S.M., JACOBS, J.B., FRIEDEL, G.H. Scanning Electron Microscopy of Cyclophosphamide-Induced Hyperplasia of the Rat Urinary Bladder. *Laboratory Investigation* 44,2, 89-96 (1981).
- 118.GHASKADBI, S., RAJMACHIKAR, S., AGATE, C., KAPADI, A.H., VAIDYA, V.G., Modulation of Cyclophosphamide Mutagenicity by Vitamin-C in Vivo Rodent Micronucleus Assay. *Terato. Carcino Mutagen* 12,11-17 (1992).
- 119.LEVINE, M., RUMSEY, S.C., DARUWALA, R., PARK, J.B., WANG, Y. Criteria and Recommendations for Vitamin C Intake. *JAMA*, 21, 281 (15) 1415-1423.
- 120.ANTUNES, L.M., TAKAHASHI, C.S., Effects of High Doses of Vitamins C and E Against Doxorubicin-Induced Chromosomal Damage in Wistar Rat Bone Marrow Cells. *Mutation Research.* 9, 419 (1-3) 137-43 (1998).

121. ANDERSON, D., BAŞARAN, N., BLOWERS, S.D., EDWARDS, A.J., The Effect of Antioxidants on Bleomycin Treatment in vitro and in vivo Genotoxicity Assays. *Mutation. Res.*, 329, 1,37-47 (1995).
122. TAVARES, D.C., CECCHI, A.O., ANTUNES, L.M., TAKASHI, C.S. Protective Effects of the Amino Acid Glutamine and of Ascorbic Acid Against Chromosomal Damage Induced by Doxorubicin in Mammalian Cells. *Teratog Carcinog Mutagen.* 18, 4, 153-61 (1998).
123. TYRSINA, E.G., ROSSIKHINA, O.G., ABILEV, S.K., TYRSIN, Y.A., Inhibition of the Bacterial Mutagenicity of N-metil-N-nitro-N-nitrosuguanidine by Ascorbic Acid. *Mutation Research.* 321 (1-2), 81-87 (1994).
124. CHORVATOVICOVA, D., GINTER, E., KOSINOVA, A., ZDENEK, Z., Effect of Vitamins C and E on Toxicity and Mutagenicity of Hexavalent Chromium in Rat and Guinea. Pig. *Mutation. Research*, 262, 41-46 (1991).
125. BIJUR, G.N., ARIZA, M.E., HITCHCOCK, C.L., WILLIAMS, M.V., Antimutagenic and Promutagenic Activity of Ascorbic Acid During Oxidative Stress. *Environ Mol Mutagen*, 30,3,339-345 (1997).
126. AMARA-MOKRANE, Y.E., LEHUCHER, MICHEL, M.P., BALANSARD, G., DUMENIL, G., BOTTA, A. Protective Effects of Alpha-Hederin, Chlorophyllin and Ascorbic Acid Towards the Induction of Micronuclei by Doxorubicin in Cultured Human Lymphocytes. *Mutagenesis*, 11,2, 161-167 (1996).
127. PERCHELLET, J.P., OWEN, M.D., POSEY, T.D., ORTEN, D.K., SCHNEIDER, B.A. Inhibitory Effects of Glutathione Level-Raising Agents and D- α Tocopherol or Ornithine Decarboxylase Induction and Mouse Skin Tumor Promotion by 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate. *Carcinogenesis*, 6, 567-573 (1985).
128. ROTSTEIN, J.B., SLAGA, T.J. Anticarcinogenic Mechanisms, as Evaluated in the Multistage Mouse Skin Model. *Mutation Research*, 202, 421-427 (1988).

129. CESARONE, C.F., SCARABELLI, L., ORUNESU, M., BAGNASCO, M., DE FLORA, S., Effects of Amino thiols in 2-Acetylaminofluorene-Treated Rats. I. Damage and Repair of Liver DNA, Hyperplastic. Foci and Zymbal Gland Tumors. *In vivo*. 1, 85-91 (1987).
130. WILPARD, M., SPEDER, A., ROBERFROID, M., Anti-initiation Activity of N-Acetylcysteine in Experimental Colonic Carcinogenesis. *Cancer Lett.* 31, 319-324 (1986).
131. OIKAWA, S., YAMADA, K., YAMASHITA, N., TEDA, S., SHOSUKE, K. N-Acetylcysteine, a Cancer Chemopreventive Agent, Causes Oxidative Damage to Cellular and Isolated DNA. *Carcinogenesis*, 20, 8, 1485-1490 (1999).
132. DE LEON, P., RONCUCCI, L. Chemoprevention of Colorectal Tumors: Role of Lactulase and Other Agents. *Scand. J. Gastroenterol.* 222 (Suppl) 72-75 (1997).
133. ZHAO, C., SHICHI, H. Prevention of Acetaminophen-Induced Cataract by a Combination of Diallyl Disulfide and N-acetylcysteine. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 14,4, 345-355 (1998).
134. BALANSKY, R.M., DE FLORA, S. Chemoprevention by N-Acetylcysteine of Urethane-Induced Clastogenicity and Lung Tumors in Mice. *Int. J. Cancer.* 17, 77 (2), 302-305 (1998).
135. GURTOO, H.L., HIPKENS, J. H and SHARMA, S.D. Role of Glutathione in the Metabolism-Dependent Toxicity and Chemotherapy of Cyclophosphamide. *Cancer. Res.* 41, 3584-3591 (1981).
136. BERRIGAN, M.J., MARINELLO, A.J., PAVELLIC, Z., WILLIAMS, C.J., STRUCK, R.F. and GURTOO, H.L. Protective Role of Thiols in Cyclophosphamide-Induced Urotoxicity and Depression of Hepatic Drug Metabolism. *Cancer Research.* 42, 9, 3688-3695 (1982).
137. TRIZNA, Z., SCHANTZ, S.P. LEE, J.J. SPITZ, M.R. GOEPFERT, H., HSU, T.C. HONG, W.K. In-Vitro Protective Effects of Chemopreventive Agents Against Bleomycin-Induced Genotoxicity in Lymphoblastoid Cell Lines and Peripheral blood Lymphocytes of Head and Neck Patients. *Cancer Detect. Prev.* 17,6, 575-583 (1993).

ÖZGEÇMİŞ

1962 yılında İzmit'te doğdum. İlkokulu Ankara Hamdullah Suphi İlkokulunda, Orta okul ve Lise öğrenimimi Ankara Bahçelievler Cumhuriyet Lisesi'nde tamamladım.

1982 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'ne girdim. 1986 yılında mezun oldum. 1998 yılında Türkiye Trafik Kazaları Yardım Vakfı'nda iş yaşamıma başladım. 1989 yılında Gazi Üniversitesi Kazaları Araştırma ve Önleme Enstitüsü İşçi Sağlığı ve İş Güvenliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans'a başladım.

1991 yılında aynı Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak göreve başladım ve aynı yıl yüksek lisansımı tamamladım. 1994 yılında Enstitünün Eğitim ve Öğretim faaliyetlerinin durdurulması nedeniyle Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında görev yapmaya başladım. Halen Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarında görev yapmaktayım.