

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NANDROLONUN GENOTOKSİSİTESİNİN TEK HÜCRE
JEL ELEKTROFOREZ TEKNİĞİ İLE İN VİTRO
İNCELENMESİ**

Ecz. Emre KORKMAZ

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Ankara

2019

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NANDROLONUN GENOTOKSİSİTESİNİN TEK HÜCRE
JEL ELEKTROFOREZ TEKNİĞİ İLE İN VİTRO
İNCELENMESİ**

Ecz. Emre KORKMAZ

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Sevtap AYDIN DİLSİZ**




Ankara

2019

ONAY SAYFASI

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
NANDROLONUN GENOTOKSİSİTESİNİN TEK HÜCRE JEL ELEKTROFOREZ TEKNİĞİ İLE İN
VİTRO İNCELENMESİ
Öğrenci: Ecz. Emre KORKMAZ
Danışman: Doç. Dr. Sevtap AYDIN DİLSİZ

Bu tez çalışması 26.11.2019 tarihinde jürimiz tarafından "Farmasötik Toksikoloji Programı"nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

| | | |
|---------------|---|---|
| Juri Başkanı: | Prof. Dr. Ayşe Nurşen BAŞARAN (Hacettepe Üniversitesi) |  |
| Tez Danışmanı | Doç. Dr. Sevtap AYDIN DİLSİZ (Hacettepe Üniversitesi) |  |
| Üye: | Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT (Hacettepe Üniversitesi) |  |
| Üye: | Doç. Dr. Suna SABUNCUOĞLU (Hacettepe Üniversitesi) |  |
| Üye: | Doç. Dr. Merve BACANLI (Sağlık Bilimleri Üniversitesi) |  |

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

27 Kasım 2019


Prof. Dr. Diclehan Orhan
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir

26 / 11 / 2019


Ecz.Emre KORKMAZ

“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sisteminde yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Doç. Dr. Sevtap AYDIN DİLSİZ danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ecz. Emre KORKMAZ

TEŐEKKÖR

Tez çalışmalarımın tđm aşamasında bilgi ve emeğini esirgemeyen, bana yol gđsteren ve beni her zaman destekleyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Sevtap Aydın Dilsiz'e en içten teőekkđrlerimi sunarım.

Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarıma ve tđm arkadaşlarıma desteklerinden dolayı teőekkđrlerimi sunarım.

Tez çalışmama yapacakları katkılarından dolayı değerli sayın tez jurime teőekkđr ederim.

Her Şekilde bana destek olan aileme teőekkđr ederim.

ÖZET

Korkmaz, E. Nandrolonun Genotoksitesinin Tek Hücre Jel Elektroforez Tekniği ile İn Vitro İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2019. Nandrolon, kas gücünü ve performansını arttırmak üzere genellikle gençler ve sporcular tarafından sıklıkla süistimal edilen anabolik androjenik steroidler arasında yer alır. Birçok ülkede kontrole tabidir ve bu nedenle tıbbi olmayan kullanımı genellikle yasa dışıdır. Sağlığı olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir. Önemli yan etki risklerine rağmen, yaygın olarak kötüye kullanılmaktadır. Yüksek doz ve uzun süreli kullanımı söz konusudur. Literatür taramasının sonucu olarak, nandrolon dekanoatın genotoksitesi konusunda birkaç çalışmanın yapıldığı ve bu çalışmaların da yetersiz olduğu görülmektedir. Bu çalışmanın amacı, nandrolon dekanoatın geniş aralıktaki dozlarda V79 Çin hamster fibroblast hücrelerinde hücre canlılığı ve sitotoksik olmayan dozlarda insan lenfositlerinde DNA hasarı üzerine etkilerini değerlendirmektir. Sitotoksite, MTT yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Nandrolon dekanoatın insan lenfositlerinde genotoksitesi ve ayrıca H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif DNA hasarına karşı etkisi alkali tek hücre jel elektroforez yöntemi (Comet yöntemi) ile belirlenmiştir. V79 hücrelerinde 250 µM üzeri konsantrasyonlarda nandrolon dekanoatın hücre canlılığını doz-bağımlı bir şekilde anlamlı olarak azaltmıştır. IC₅₀ dozu 739 µM olarak belirlenmiştir. Nandrolon dekanoat, tek başına çalışılan tüm konsantrasyonlarında (0,5-100 µM) lenfositlerde DNA hasarına yol açmamıştır. 10-100 µM arasındaki konsantrasyonlarda doz-bağımlı olarak oksidatif DNA hasarını önemli ölçüde azalttığı; ancak düşük konsantrasyonlarında (0,5 ve 1 µM) değıştirmedeği görülmüştür. Çalışmanın sonuçları, nandrolon dekanoatın, genotoksik olmayan dozlarda oksidatif stres ile indüklenen DNA hasarını azaltabileceğini göstermektedir. Sonuç olarak, nandrolonun çalışmamızda gözlenen oksidatif strese karşı olası antigenotoksitesi toksisite mekanizmasının ortaya çıkarılmasında mevcut bilimsel çalışmalara katkıda bulunabilir, bununla birlikte daha ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Nandrolon, genotoksite, lenfositler, DNA hasarı, tek hücre jel elektroforez yöntemi

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmektedir. Proje no: TYL-2019-17945

ABSTRACT

Korkmaz, E. In vitro investigation of nandrolone deconoate genotoxicity using alkaline comet assay. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Master Thesis in Pharmaceutical Toxicology, Ankara, 2019. Nandrolone decanoate is among the most widely used anabolic androgenic steroids (AAS) that are often abused by young people and athletes to improve muscle strength and performance. It is subjected to control in many countries and so non-medical use is generally illicit. It is known to adversely affect health. Despite the risks of significant side effects, it is commonly abused. It has high dose and long term intake. As a results of literature review, it seems that a few studies have been conducted on the genotoxicity of nandrolone decanoate, which are insufficient. The aim of this study was to evaluate the effects of nandrolone decanoate on cell viability in V79 Chinese hamster fibroblast cells in a wide range of doses and DNA damage in human lymphocytes at non-cytotoxic doses. The cytotoxicity was determined using MTT assay. Genotoxicity of nandrolone decanoate in human lymphocytes as well as the effect of H₂O₂-induced oxidative DNA damage was determined by alkaline single cell gel electrophoresis method (Comet assay). Nandrolone decanoate significantly decreased the cell viability in a dose dependent manner at the concentrations higher than 250 µM in V79 cells. IC₅₀ dose was found to be 739 µM. Nandrolone decanoate alone did not lead to DNA damage in the lymphocytes at all studied concentrations (0.5-100 µM). It seemed to significantly reduce oxidative DNA damage at the concentrations between 10-100 µM in a dose-dependent manner, but not to change at the lower concentrations (0.5 and 1 µM). The results of study show that nandrolone decanoate may decrease oxidative stress-induced DNA damage at non-genotoxic doses. In conclusion, the possible antigenotoxicity of nandrolone against the oxidative stress observed in our study may contribute to the current scientific studies in revealing the mechanism of toxicity; however, further research is needed.

Key Words: Nandrolone, genotoxicity, lymphocytes, DNA damage, single cell gel electrophoresis assay

This thesis is supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit. Project no: TYL-2019-17945

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--|--------------|
| ONAY SAYFASI | iii |
| YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI | iv |
| ETİK BEYAN SAYFASI | v |
| TEŞEKKÜR | vi |
| ÖZET | vii |
| ABSTRACT | viii |
| İÇİNDEKİLER | ix |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | xii |
| ŞEKİLLER | xiv |
| TABLolar | xv |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Nandrolon Dekanoatın Fizikokimyasal Özellikleri | 3 |
| 2.2. Nandrolon Dekanoatın Genel Kullanımı | 5 |
| 2.3. Nandrolon Dekanoatın Farmakokinetik Özellikleri | 5 |
| 2.4. Nandrolon Dekanoatın Farmakodinamik Özellikleri | 7 |
| 2.5. Nandrolon Dekanoatın Sistemler Üzerine Etkileri | 9 |
| 2.5.1. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri | 9 |
| 2.5.2. Böbrek Üzerine Etkileri | 14 |
| 2.5.3. Karaciğer Üzerine Etkileri | 15 |
| 2.5.4. Diğer Sistemler Üzerine Etkileri | 17 |
| 2.6. Nandrolon Dekanoatın Toksisitesi | 18 |
| 2.6.1. Akut Toksisitesi | 19 |

| | |
|--|----|
| 2.6.2. Tekrarlı Doz Toksisitesi | 19 |
| 2.6.3. Karsinojenisitesi | 20 |
| 2.6.4. Mutajenisitesi ve Genotoksisitesi | 22 |
| 2.6.5. Üreme Toksisitesi | 23 |
| 2.6.6. Teratojenisitesi ve Gebelikte Kullanımı | 24 |
| 2.6.7. Laktasyon Döneminde Kullanımı | 25 |
| 2.6.8. İlaç-İlaç Etkileşimleri | 25 |
| 2.6.9. Kontrendikasyonlar ve Dikkat Edilecek Hususlar | 26 |
| 2.6.10. Doz Aşımı ve Tedavi | 27 |
| 2.7. Yasal Düzenlemeler | 29 |
| 2.8. MTT Yöntemi | 29 |
| 2.9. Çin Hamster Akciğer Fibroblast (V79) Hücre Özellikleri | 30 |
| 2.10. Alkali Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi | 31 |
| 3. GEREÇ ve YÖNTEM | 34 |
| 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler | 34 |
| 3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler | 35 |
| 3.3. Kullanılan Çözeltiler | 37 |
| 3.3.1. Sitotoksisitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler | 37 |
| 3.3.2. Alkali Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi ile DNA Hasarının Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler | 38 |
| 3.4. MTT Yöntemi ile Sitotoksisitesinin Belirlenmesi | 40 |
| 3.5. Lenfositlerde Alkali Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi ile DNA Hasarının Belirlenmesi | 43 |
| 3.6. İstatistiksel Yöntemler | 45 |
| 4. BULGULAR | 46 |

| | |
|---|----|
| 4.1. Nandrolon Dekanoatın V79 Hücrelerinde Sitotksisitesinin Belirlenmesi | 46 |
| 4.2. Nandrolon Dekanoatın Lenfositlerde Genotoksitesinin ve Oksidatif DNA Hasarına Karşı Etkisinin Alkali Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi ile Belirlenmesi | 48 |
| 5. TARTIŞMA | 52 |
| 6. SONUÇ ve ÖNERİLER | 56 |
| 7. KAYNAKLAR | 59 |
| 8. EKLER | |
| EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri | |
| EK-2: Tez Çalışması Orjinallik Raporu | |
| EK-3: Dijital Makbuz | |
| 9. ÖZGEÇMİŞ | |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|-----------------------------------|---|
| μM | Mikromolar |
| 5-HIAA | 5-hidroksiindol-3-asetik asit |
| 5-HT | 5-hidroksi triptamin |
| 8-OHdG | 8-Hidroksi-2'- deoksiguanozin |
| AAS | Anabolik androjenik steroid |
| ACTH | Adrenokortikotropik hormon |
| ALP | Alkalin fosfataz |
| ALT | Alanin aminotransferaz |
| ANOVA | Tek yönlü varyans analizi |
| ANP | Atrial natriüretik peptid |
| AR | Androjen reseptörü |
| AST | Aspartat aminotransferaz |
| Comet | Tek hücre jel elektroforez yöntemi |
| DHT | Dihidrotestosteron |
| DMSO | Dimetil sülfoksit |
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| EDTA | Etilen diamin tetraasetik asit disodyum tuzu |
| EtBr | Etidiyum bromür |
| FBS | Yenidoğan sığır serumu |
| Fpg | Formamidopirimidin glikozilaz |
| FSH | Folikül uyarıcı hormon |
| GGT | Gamaglutamiltransferaz |
| GSH | Glutatyon |
| H₂O₂ | Hidrojen peroksit |
| HCl | Hidroklorik asit |
| HDL | Yüksek yoğunluklu lipoprotein |
| IC₅₀ | Hücrelerin %50'sinin öldüğü inhibitör konsantrasyon |
| IGF-1 | İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 |

| | |
|--------------------------------|--|
| i.m. | İntramüsküler |
| LD₅₀ | Popülasyonun %50'sinde ölüm meydana getiren doz |
| LDH | Laktat dehidrojenaz |
| LDL | Düşük yoğunluklu lipoprotein |
| LH | Lüteinize edici hormon |
| LMPA | Düşük erime noktalı agar |
| MHPG | 4-hidroksi-3 metoksifenilglükol |
| mRNA | Mesajcı ribonükleik asit |
| MTT | 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür |
| Na₂EDTA | Etilen diamin tetraasetik asit disodyum tuzu |
| NaCl | Sodyum klorür |
| NAD | Nikotinamid adenin dinükleotid (yükseltgenmiş hali) |
| NADH | Nikotinamid adenin dinükleotid (indirgenmiş hali) |
| NADP | Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (yükseltgenmiş hali) |
| NADPH | Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (indirgenmiş hali) |
| NaOH | Sodyum hidroksit |
| NE | Norepinefrin |
| NMPA | Normal erime noktalı agar |
| PBS | Fosfat tamponlu serum fizyolojik |
| pH | Potansiyel hidrojen |
| PI3K | Fosfoinozid-3 kinaz |
| PKC | Protein kinaz C |
| PLC | Fosfolipaz C |
| rpm | Dakikadaki devir sayısı |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| SGOT | Serum glutamik oksaloasetik transaminaz |
| SGPT | Serum glutamik pirüvik transaminaz |
| SHGB | Seks hormonu bağlayıcı globülin |
| TNF-α | Tümör nekroz edici faktör alfa |
| V79 hücresi | Çin hamster akciğer fibroblast hücresi |

ŞEKİLLER

| Şekil | | Sayfa |
|-------|--|-------|
| 2.1. | Nandrolon dekanoatın kimyasal yapısı | 3 |
| 2.2. | Testosteron (sol) ve nandrolonun (sağ) kimyasal yapı benzerliği | 4 |
| 2.3. | Nandrolon ve metabolitleri | 6 |
| 2.4. | Nandrolon metabolizması | 7 |
| 2.5. | V79 hücresinin mikroskopik görünümü | 31 |
| 3.1. | Neubauer hücre sayım lamı | 43 |
| 4.1. | Nandrolon dekanoatın V79 hücre canlılığı üzerine etkisi | 48 |
| 4.2. | İnsan lenfosit hücrelerinde H ₂ O ₂ ile oluşturulan DNA hasarına karşı nandrolon dekanoatın etkisi | 51 |

TABLÖLAR

| Tablo | | Sayfa |
|--------------|--|--------------|
| 2.1. | AAS'lerin anabolik/androjenik aktivite oranları | 4 |
| 4.1. | Çin Hamster akciğer fibroblast (V79) hücre canlılığı üzerine nandrolon dekanoatın etkisi | 47 |
| 4.2. | İnsan lenfosit hücrelerinde H ₂ O ₂ ile oluşturulan DNA hasarına karşı nandrolon dekanoatın etkisi | 50 |

1. GİRİŞ

Testosteron vücudumuzda salgılanan en güçlü doğal androjen hormondur. Testosteron ve diğer androjenler, protein sentezini arttırarak ya da protein ve aminoasitlerin yıkımını azaltarak, yağsız vücut kitlesini, büyüme ve gelişmeyi arttıran maddelerdir (1). Anabolik androjenik steroidler (AAS) testosteronun esterleri veya alkileri şeklinde sentetik olarak üretilen ilaçlardır (2). AAS, etkilerini vücudun birçok yerinde gösterir. Bu sistemler üreme organları, kas ve kemik dokusu, derideki saç kökleri, karaciğer, böbrekler, hematopoetik sistem, bağışıklık sistemi ve merkezi sinir sistemidir (1, 3).

AAS'ler sağlığı olumsuz yönde etkileyebilir; örnek olarak ödem, yağ birikimi ve çocuklarda epifiz kemiğinin erken kapanması bunlara örnek olarak verilebilir (2, 4). Klinik belirtiler arasında; saldırgan davranış (sinirlilik, öfke), bilişsel belirtiler, unutkanlık ve konfüzyon, testiküler atrofi, jinekomasti, prostat ve seminal veziküllerde değişiklikler, adet döngüsünde değişiklikler, büyüme değişiklikleri, hepatik kistler, hepatom (karaciğer tümörü), kardiyak anomaliler (miyokard enfarktüsü, inme) yer alır. Trombosit sayısında artış ve agregasyonu ile patolojik hipertrofik miyokard oluşumuna ve böylece aritmi olasılığını arttırarak ani ölümlere neden olabilir. AAS'lerin yüksek doz kullanımı sonucu ölüm vakaları rapor edilmiştir (5-7).

Bu maddeler, kas gücünü ve performansını arttırmak için profesyonel sporcular tarafından uzun zamandır kullanılmaktadır. Son yıllarda AAS'nin gerek sporcular gerekse ergenlik çağındaki çocuklar tarafından yasal ya da yasal olmayan yollardan performansı arttırmak üzere yüksek miktarlarda (tedavi dozlarının yaklaşık 10-100 katı oranında) kullanımı söz konusudur. Yasal olmayan steroidler, sporcular arasında kas gelişimini ve sportif başarıyı arttırmak amacıyla önemli yan etki oluşturma risklerine rağmen suistimal edilmektedir. Dünya genelinde AAS'nin kötüye kullanım sıklığı gün geçtikçe artmaktadır (8-10).

Bu grupta bulunan nandrolon (19-nortestosteron) ise en çok kullanılan AAS'ler arasında yer almaktadır (11). Nandrolon insan vücudunda doğal olarak az miktarda

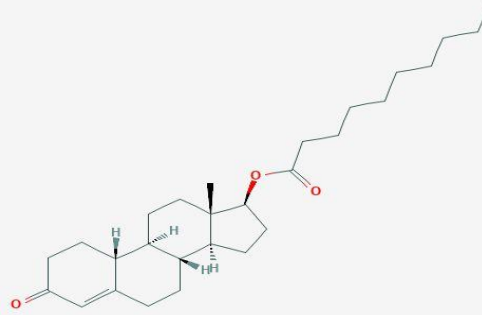
sentezlenmektedir. Testosterona yapı benzerliği nedeniyle yüksek dozda kullanımı sonucu testosterona benzer yan etkiler oluşturur (12). Yüksek dozlarda ve uzun süreli kullanımı söz konusudur. Bu koşullarda sağlık üzerine zararlı etkileri olabileceği düşünölmektedir. Literatür incelemesi sonucunda nandrolonun genotoksisitesi üzerine çalışmaların az sayıda olduğu, *in vivo* ve *in vitro* çalışmaların ise yeterli olmadığı görölmüştür. Bu çalışmada nandrolonun Çin Hamster Akciğer Fibroblast Hücre hattında (V79 hücresi) geniş konsantrasyon aralığında sitotoksisitesi 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi ile belirlendikten sonra sitotoksik olmayan dozlarında insan periferal lenfosit hücrelerinde tek hücre jel elektroforez (comet) tekniği ile genotoksisitesinin ve hidrojen peroksit (H₂O₂) ile oluşan oksidatif deoksiribonökleik asit (DNA) hasarına karşı olası koruyucu etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nandrolon Dekanoatın Fizikokimyasal Özellikleri

19-Nortestosteron (veya nandrolon) bir anabolik steroid olup, ilk kez 1950'de sentezlenmiştir. Nandrolon, nandrolon dekanıat ve nandrolon fenilpropiyonat gibi esterler şeklinde kullanılır. Nandrolon dekanıat, vücutta bir esteraz aracılığı ile nandrolona hidrolize olur (13).

Nandrolon dekanıatın molekül formülü $C_{28}H_{44}O_3$; molekül ağırlığı 428,6 g/mol'dür.



Şekil 2.1. Nandrolon dekanıatın kimyasal yapısı.

CAS no: 360-70-3

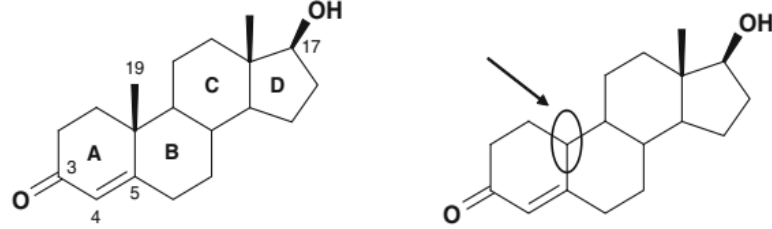
IUPAC adı: [(8R,9S,10R,13S,14S,17S)-13-metil-3-okso 2,6,7,8,9,10,11,12,14,15,16,17- dodekahidro-1 H-siklopenta [a] fenantren-17-il] dekanıat (Şekil 2.1) (14)

Sinonimleri: *Adenocorin, Anaboline Depot, Deca-Durabolin, Dimapolan, Hybolin decanoate, Naboline, Nandrobolic L.A, Nandrolone 17-beta-decanoate, Ndrostone-D, Norandrostenolone decanoate, Retabolil, Rougerol, Salistoperm, Superbolan, 19-Norandrostenolone decanoate, 19-Nortestosterone decanoate* (14)

Görünümü: Beyaz renkli katı kristalize halde bulunur (15).

Erime Noktası: 118 °C

Çözünürlük: Sudaki çözünürlüğü 3,09 mg/mL at 25 °C (14)



Şekil 2.2. Testosteron (sol) ve nandrolonun (sağ) kimyasal yapı benzerliği.

Nandrolon insan vücudunda doğal olarak bulunan testosteron ile kimyasal yapı benzerliğine sahiptir (Şekil 2.2.) (16). Nandrolon dekanoat, testosteronun anabolik bir steroid analogu olan dekanoat tuz şeklidir (14).

Nandrolon ve testosteron arasındaki ana biyokimyasal en önemli farklardan biri, testosteron için anabolik/androjenik oranın yaklaşık değeri 1 iken, nandrolon için bu oranın değeri 10 olmasıdır. Bu oran kas büyümesini uyarma kabiliyetlerini gösterir. Nandrolon androjen reseptörlerine testosterondan daha yüksek bağlanma afinitesine sahiptir. Bunun nedeni nandrolonun, testosterondan farklı olarak C19 metil grubunda bir hidrojen atomuna sahip olmasıdır (Şekil 2.2.) (16-18). Tablo 2.1.'de AAS'lerin anabolik/androjenik aktivite oranları verilmiştir (2).

Tablo 2.1. AAS'lerin anabolik/androjenik aktivite oranları.

| Androjenik anabolik steroid | Anabolik/ androjenik aktivite oranı |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| Testosteron | 1 |
| Metiltestosteron | 2 |
| Oksimetolon | 9 |
| Oksandrolon | 10 |
| Nandrolon | 10 |
| Stanozolol | 30 |

2.2. Nandrolon Dekanoatın Genel Kullanımı

Nandrolon dekanonun başlıca endikasyonları erkeklerde primer ve sekonder hipogonadizm, androjen eksikliği, ereksiyon sorunları ve ejakülasyon yetmezliği, büyüme geriliği, pubertenin gecikmesi, osteoporoz, aplastik anemi, refrakter anemi, meme karsinomu, antitrombin III eksikliği, Turner sendromu ve herediter anjiyoödemdir (3, 14).

Kronik böbrek yetmezliği ve insan bağışıklık yetmezlik virüsü gibi hastalıklarda anoreksi ve kaşeksi tedavisinde nandrolonun kullanımının temelini kas büyümesini uyarması oluşturur (19).

Uygulama yolu sadece intramüsküler (i.m.) uygulamadır. Nandrolon dekanonun insanlarda önerilen terapötik kullanım dozu i.m. yoldan yaklaşık 0,4-0,7 mg/kg arasındadır (20, 21).

2.3. Nandrolon Dekanoatın Farmakokinetik Özellikleri

Nandrolon dekanonun oral absorpsiyonuna dair bir çalışmaya rastlanmamıştır. Testosteron için oral uygulama sonrası hızlı emilime uğradığı ve diğer anabolik steroidlerin de muhtemelen hızlı emilime uğrayabileceği bildirilmiştir (15). Emilime uğrayan AAS'lerin metabolizması hızlı ve plazma yarılanma ömrü çok kısadır. Bu nedenle etkileri kısa sürelidir. AAS'lerin biyolojik etki süresi, ester formunda verilmesine ve veriliş yoluna (subkutan veya i.m. uygulamada artar) bağlı uzatılabilir (22).

17-alfa pozisyonunda süstitüe edilmiş olanlar hariç, nandrolon (17-beta) dahil tüm AAS'ler hepatik ilk geçiş metabolizmasına uğrarlar. Bu nedenle nandrolon dekanonun oral biyoyararlanımının düşük olabileceği öngörülmektedir (22, 23).

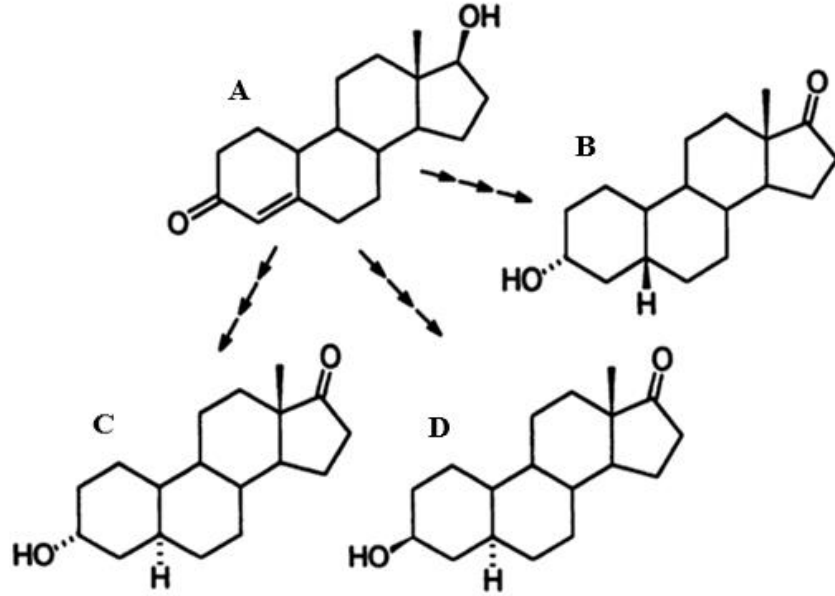
Anabolik steroidler yüksek oranda proteine bağlanır ve plazmada seks hormonu bağlayıcı globülin (SHBG) adı verilen spesifik bir protein tarafından taşınır (22).

Dolaşımdaki testosteron'un %98'i SHBG'e (Seks Hormonu-Bağlayan Globülin) ve albümin'e bağlı olup %2'si serbest halde bulunur (22).

Nandrolonun metabolizması tam olarak anlaşılammıştır (16). Nandrolon dekanonun metabolizması testosteron mekanizmasına büyük oranda benzemektedir (24).

Serbest (de-esterlenmiş) anabolik androjen olan nandrolon karaciğerde hepatik

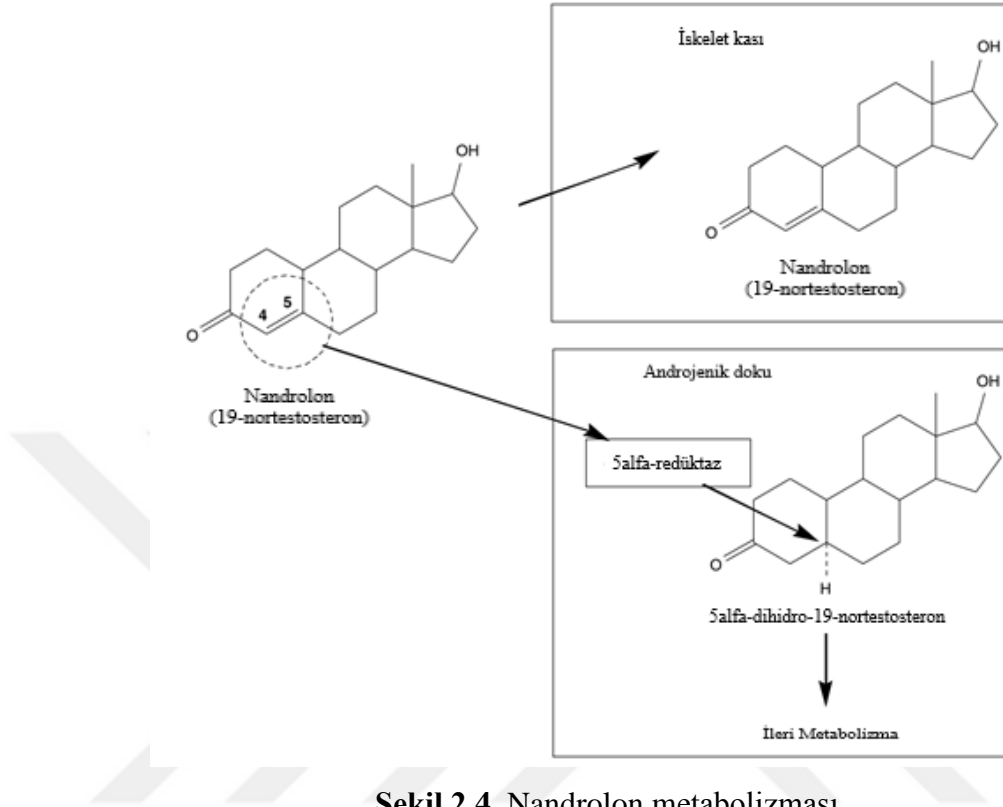
karma fonksiyonlu oksidazlar tarafından metabolize edilir (23). Ana metabolitleri norandrosteron, noretiyokolanolon; 3-beta-hidroksi-5-alfa-estran-androsterondur (Şekil 2.3.) (24).



Şekil 2.3. Nandrolon ve metabolitleri.*

* Nandrolone (A), noretiyokolanolon (B), norandrosteron (C), 3-beta-hidroksi-5-alfa-estran-17-on (D)

Nandrolon dekanolat i.m. enjeksiyonla uygulandığında androjenik dokularda 5-alfa-redüktaz enzimi ile 3-norandrosterona dönüştürülerek testosterona benzer şekilde metabolize edilir. Plazma yarılanma ömrü yaklaşık 8 gündür (Şekil 2.4.) (16, 25).



Şekil 2.4. Nandrolon metabolizması.

Radyoaktif işaretli nortestosteronun farelerde ve buzağılarda organ dağılımının incelendiği bir çalışmada, ilk 24 saatte tüm organlarına farklı oranlarda dağıldığı, bu dağılımın hızla azaldığı ve 10. hafta sonunda kalıntı seviyede olduğu bildirilmiştir. Nandrolonun yaklaşık %90'ı idrarla ve %6'sı dışkı ile atılır. Bu yüksek oranda üriner atılım sadece 19-nortestosteronun karaciğerde klasik steroid metabolik transformasyonuna (C₃'ün hidroksilasyonu daha sonra glukurono- veya sülfokonjugasyona) uğraması ile açıklanabilmektedir. Böylece daha polar ve dolayısıyla suda kolay çözünen bileşikler haline gelerek idrar ile atılır (22, 23, 26).

2.4. Nandrolon Dekanoatın Farmakodinamik Özellikleri

AAS'ler anabolik etkilerini iskelet kasları üzerine androjen reseptörleri (AR) aracılığıyla oluşturmaktadır. Özellikle kas gelişimi üzerine etkisi vardır. AAS'ler özellikle üreme organları, kas ve yağ dokusunda bulunan spesifik reseptörlere bağlanır. AR, kas

gelişmesi için gerekli olan DNA çoğalmasını kontrol eden hedef gen transkripsiyonunu düzenlemektedir (25, 27).

AAS'ler ayrıca erkek cinsiyet farklılaşmasında sorumlu hormonlardır. Anabolik (kas geliştirme) etkilerin, androjenik (virilize edici) etkilere oranı farklılık göstermekle birlikte tüm AAS'ler uygulamada bir dereceye kadar her iki özelliğe sahiptir (22, 28).

İnsan vücudunda nandrolonun katıldığı mekanizmaları anlamak için, testosteron etki yolunu anlamak önemlidir. Prostat veya saç kökleri gibi bazı dokularda, 5-alfa-redüktaz aktivitesi ile testosteron, dihidrotestosterona (DHT) dönüştürülür. Oluşan DHT, testosteron tedavisinin prostat büyümesi ve alopesi üzerindeki bilinen yan etkilerinden sorumlu tutulmaktadır (16). Nandrolon, 5-alfa-redüktaz enzimi tarafından 5-alfa-dihidro-19-nortestosteron'a dönüştürülebilir. Bu indirgenmiş nandrolon formu testosteron ile karşılaştırıldığında, androjen reseptörüne çok daha düşük bağlanma afinitesine sahiptir. Teorik olarak, bu mekanizma sonucu nandrolon tedavisi ile iyi huylu prostat hiperplazisi gelişen hastalarda prostat büyümesinde azalma, alt idrar yolu üzerindeki olumsuz semptomlarda ve ayrıca alopesi görülme oranlarında potansiyel bir gerileme sağlayabileceği düşünülmektedir (25).

İskelet kasında ise 5-alfa-redüktaz aktivitesi tespit edilememiştir. İskelet kasında testosteron doğrudan (5-alfa-redüktaz aktivitesi olmadan) kas büyümesine katkıda bulunarak androjen reseptörlerine bağlanır (16). İskelet kasında 5-alfa-redüktaz bulunmaması, nandrolonun kastaki androjen reseptörlerine güçlü bir şekilde bağlanmasına ve kas büyümesini arttırarak yüksek anabolik/androjenik oranına katkıda bulunur (25).

Nandrolon dekanoyatın, androjenik, anabolik ve eritropoietin uyarıcı etkileri vardır. Nandrolon, prostat, seminal veziküller, skrotum, penis, gırtlak, saç folikülleri, kas ve kemik dahil olmak üzere duyarlı dokulardaki hücrelerin sitoplazmasına spesifik nükleer androjen reseptörleri vasıtasıyla geçer, oluşan hormon reseptör kompleksi, çekirdeğe translokasyon yapar ve hedef genlerin promoter bölgesindeki androjen duyarlı elemanlarına bağlanır; böylece oluşan kompleks, erkek cinsiyet özelliklerini korumak için gerekli gen ekspresyonunu aktive eder. Nandrolon dekanoyat, testosteronun negatif feedback mekanizmasını taklit ederek, luteinize edici hormonun (LH) salgılanmasını da

baskılar. Ayrıca, bu madde eritropoietik uyarıcı faktörlerin yapımını artırarak eritropoietin üretimini uyarır (17, 29).

2.5. Nandrolon Dekanoatın Sistemler Üzerine Etkileri

Yüksek doz kronik AAS kullanımının olumsuz etkileri, vücudumuzda kardiyovasküler sistem başta olmak üzere, üreme sistemi, sinir sistemi, endokrin sistem, kas ve iskelet sistemi gibi birçok sistem ayrıca karaciğer, böbrek, pankreas gibi solid organlarımız üzerinde görülmektedir.

2.5.1. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri

AAS'lerin insan ve hayvanlarda kardiyovasküler sistem üzerine etkilerine dair oldukça fazla çalışma yapılmıştır. AAS'lerin uzun süre yüksek doz kullanımı sonucu en sık görülen kardiyovasküler toksik etkileri arasında hipertansiyon, miyokard enfarktüsü, ritm bozuklukları, hipertrofik kardiyomiopati, serum lipoproteinlerinin artışı yer almaktadır ve bu etkilere bağlı ani kalp ölümleri görülebilmektedir (3, 30). Vaka çalışmalarında AAS'lerin çoğunlukla testosteron, stanozolol ve nandrolon dekanatın yüksek dozlarında bir arada kombine edildiği durumlarda görülmektedir.

Bir vaka çalışmasında ani başlayan göğüs ağrısı şikayeti ile sağlık merkezine başvuran, AAS'leri 20 yıldan uzun süredir suistimal ettiği bilgisi alınan 41 yaşında erkek fitness eğitmenin miyokard enfarktüsü geçirdiği rapor edilmiştir. Acilde bu hastaya kardiyografisi yapılmış ve sağ koroner arterin tamamen tıkalı olduğu görülmüştür. Kardiyak ekokardiyografide sağ atriyum, sağ ventrikül ve sol atriyumda ciddi derecede dilatasyon olduğu, orta derecede sol ventrikül hipertrofisi ve ciddi oranda azalmış (<%20) sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu bulgusu tespit edilmiştir. Tedavi sonrası hastanedeki 2. gününde değişken atriyoventriküler blok (çoğunlukla üçüncü derece blok) ile komplikasyon gelişmiştir. Akut böbrek hasarı, pıhtılaşma profilinde bozulma, hiperbilirubinemi, aspartat transaminaz (AST) (2073 IU/L) ve alkalik fosfataz (ALP) (1837 IU/L) seviyelerindeki yükselmeye bağlı akut karaciğer hasarı geliştiği tespit edilmiştir. Sonrasında gastroenterolog ve nefrolog tarafından yapılan değerlendirmede, hastanın, kalp debisinde azalmaya bağlı olarak böbrek ve karaciğerde akut iskemik hasar

geliştiği rapor edilmiştir. Hastanede 7 gün takip ve tedavi sonucunda tekrarlanan ekokardiyografide sol ventrikl ejeksiyon fraksiyonunda (%35) artış ile sol ventrikl fonksiyonlarında iyileşme grldğu, karaciğer ve böbrek fonsiyonlarının düzeldiği gözlenmiştir. Ancak normal kalp atım hızı ile aritmi birinci derece atriyoventriküler blokta stabil kalmıştır ve hasta takip nerileri ile taburcu edilmiştir. Bu vaka, AAS'in kronik olarak kötüye kullanımının kronik dilate kardiyomiyopati, sekonder olarak sol ventrikl disfonksiyonu ve sağ koroner arter enfarktüsü ile sonuçlanan akut bir protrombotik olaya (damar tıkanması öncesi durumu) neden olabileceğini göstermektedir (31).

AAS kullanımının, yüksek yoğunluklu lipoproteinde (HDL) azalma ve düşük yoğunluklu lipoproteinde (LDL) yükselme yönündeki kan lipid değişikliklerine sebep olarak ateroskleroz ve koroner arter hastalığı görülme riskini arttırdığı dşnlmektedir (15).

22 yaşında profesyonel erkek haltercinin, şiddetli göğüs ağrısı şikayetiyle başvurduğu sağlık tesisinde yapılan incelemede, miyokard enfarktüsü geçirdiği teşhis edilmiştir. Altı hafta önce, yüksek dozda oral ve parenteral anabolik steroidler kullanmış olduğu bilgisi alınan sporcunun total serum kolesterol konsantrasyonu 596 mg/dL (HDL 14 mg/dL, LDL 513 mg/dL) olarak tespit edilmiştir (32). Total serum kolesterol konsantrasyon değerinin 200 mg/dL'nin altında olması önerilmektedir (22). AAS kullanımının total serum kolesterol seviyelerinde artışa neden olduğu dşnlmektedir.

Birçok alışmada AAS'lerin insanlarda vasküler direnci ve kan basıncını arttırdığı gösterilmiştir. Gönüllüler üzerinde yapılan bir çalışmada, kan basıncı 24 saat boyunca izlenmiş, venöz tıkanma pletismografisi ile ön kol kan akımı ölçülmüş ve mikronrografi tekniği kullanılarak kas sempatik sinir aktivitesi doğrudan peroneal sinirden kaydedilmiştir. Bu alışmada, AAS kullananların, kullanmayanlara göre kas sempatik sinir aktivitesinin daha yüksek ve önkol kan akışının daha düşük olduğu hipotezi ile 24 saatlik kan basıncıyla kas sempatik sinir aktivitesi arasında bir ilişki olduğu hipotezi test edilmiştir. Böylece AAS'ın kullanımının sebep olduğu fizyolojik değişiklikler hakkında önemli bilgiler araştırılmıştır. AAS'lerin sempatik sinir aktivitesini ve kan basıncını arttırırken, kaslara kan akışını azalttığı, ayrıca HDL düzeyini azalttığı ve LDL düzeyini arttırdığı gösterilmiştir. Öncelikle, kaslardaki sempatik sinir sistemi aktivitesi, tek başına

kalp yetmezliği olan hastalarda bir ölüm nedenidir. Bu nedenle, azalmış ön kol kan akımı bu hastalarda kötü prognoz ile ilişkilidir. Ayrıca, yüksek tansiyon, kardiyovasküler hastalık için ana risk faktörlerinden biri olarak kabul edilir. Benzer şekilde, HDL kolesterolündeki azalma ve LDL kolesterol seviyelerindeki artış, tüm yaş gruplarında kardiyovasküler bozukluklara neden olur. Parasempatik ve sempatik sinir sisteminin kalp üzerindeki düzenleyici etkisindeki bozulmalar, kalp atım hızında artış ve aritmi ile sonuçlanabilir. Bu mekanizmanın AAS kullanan kişilerde ani kalp ölümü için önemli bir neden olduğu düşünülmektedir (33).

Anjiyotensin II tip 1 reseptör stimülasyonunun, hücre büyümesinin düzenlenmesi, endotelial disfonksiyonda yer alan endotelial hücrelerin, vasküler düz kas hücrelerinin ve kardiyomyositlerin proliferasyonu, aterosklerotik vasküler olaylar, konjestif kalp yetmezliği ve miyokard enfarktüsü ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Sıçanlar üzerinde anjiyotensin II ile aldosteron reseptör antagonistlerinin ve nandrolon dekanonatın yüksek doz uygulamasının kardiyak otonomik sisteme ve ventriküler repolarizasyona olan etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmaya göre; AAS'lerin bu yolak üzerinden etki edebileceği düşünülmektedir. Yüksek doz AAS uygulanan sıçanlarda hem egzersiz yapan hem de sedanter grupta, QT aralığının uzamasına neden olarak ventriküler depolarizasyonda düzensizliklere ve kardiyak parasempatik sistemde bozulmaya yol açtığı gösterilmiştir (34).

Medei ve ark. (35)'nin, 8 hafta boyunca 10 mg/kg nandrolon dekanonat i.m. uygulanan sıçanlar üzerinde yaptığı çalışmada, ventriküler repolarizasyonda iyonik ve moleküler süreçler araştırılmıştır. Sıçan kalbindeki aksiyon potansiyeli, geçici hücre dışına potasyum akımı (I_{to}) ve elektrokardiyografisi haftalık olarak kaydedilmiştir. Geçici hücre dışına potasyum akımı memeli miyokardındaki ana repolarize edici akımlardan birisidir. Nandrolon dekanonat uygulanan grupta potasyum iyon kanalı alt birimlerindeki ve potasyumun hücre dışına geçiş yoğunluğundaki azalmaya neden olarak olarak sol ventrikülde aksiyon potansiyel süresinde ve QT aralığında uzama görülmüştür. Sonuç olarak, bu çalışma AAS'nin kalbin elektriksel, morfolojik ve histolojik yapısında değişikliklere yol açabileceğinin güçlü bir kanıtıdır (3, 35).

Tylicki ve ark. (36)'nın sıçanlar üzerinde yaptığı bir diğer çalışmada yüksek doz nandrolon dekanoatın (20 mg/kg) tek bir doz uygulanmasının anabolik etkiye neden olup olmayacağı incelenmiştir. Ayrıca, farklı dokulardaki anabolik ve biyoenerjetik enzimlerin aktivite ve kinetik özelliklerindeki değişikliklerin EKG parametreleri ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Sıçanların vücut ve karaciğer ağırlıklarının değişmediği, ancak kalp ağırlığının nandrolon dekanoat enjeksiyonundan 10 gün sonra arttığı gösterilmiştir. Nandrolon dekanoat tedavisinden 3, 6 ve 10 gün sonra QRS kompleksinde az da olsa bir uzama tespit edilmiştir. Nandrolon dekanoat ile tedavinin, kalp kütlesindeki büyümeye bağlı olarak kalp ventriküllerinde iletinin yayılma hızını yavaşlattığı ve QRS kompleksinde uzamaya neden olduğu düşünülmüştür. Nandrolon dekanoatın, sıçan kalplerinde glukoz-6-fosfat ve 6-fosfoglukonat dehidrogenaz, malik enzim ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP⁺) bağlantılı izositrat dehidrogenaz aktivitesinde artışa yol açtığı tespit edilmiştir. Çalışmada nandrolon dekanoatın, kalpte NADP⁺'yi NADPH'ye indirgeyen tüm dihidrogenazların aktivitesini arttırdığı görülmektedir. Sonuç olarak, NADPH gibi redüktif enzimlerin üretilmesi kalpteki anabolik işlemler için önem taşımaktadır. Çalışmada nandrolon dekanoatın sıçanların kalp dokusunda bulunan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzim substratına daha yüksek afinite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca karaciğerde transketolazın aktivasyonuna, glukoz-6-fosfat ve 6-fosfoglukonat dehidrogenazların inhibisyonuna sebep olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, sıçanların iskelet kaslarında glukoz 6-fosfat dehidrogenaz ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) bağımlı malat dehidrogenaz enzim düzeylerinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (36).

AAS'ler, katekolaminlerin ekstrasöronal dokuya geri alımını akut olarak inhibe ettiği ve sonuç olarak reseptör bölgelerinde katekolamin konsantrasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (37). Nöronal katekolamin taşıyıcısı, normalde noradrenalin geri alımından sorumludur, ancak iskemi sırasında noradrenalinin sempatik sinir ucundan hücre dışına salınımından da sorumlu olduğu bilinmektedir. İskemiye bağlı aritmide noradrenalinin salınımı artmaktadır (38, 39).

Nandrolon dekonoatın fareler üzerinde 10 hafta boyunca yüksek dozda (5 mg/kg) uygulandığı bir çalışmada kalp fonksiyonları üzerine etkisi araştırılmıştır. Fareler yüzme

eğitimi alan ve almayan olarak iki gruba ayrılmıştır. Yüzme eğitimi ile birlikte nandrolon dekanolat uygulanan grupta, intertisyel fibrozis ile patolojik kardiyak hipertrofi meydana geldiği görölmüştür. Bu bulgular, malign kardiyak aritmilerin nasıl meydana geldiğini açıklamaktadır. Ayrıca renin-anjiyotensin sistemi (RAS) tarafından sempatik otonomik aktivite değişiminin altta yatan diğer bir neden olabileceği düşünölmektedir. Deneyler, sol ventriköl hipertrofisi ve miyokard fibrozun gelişiminde RAS'ın önemli bir rol oynadığını göstermiştir (40).

Sıçanlar üzerinde nandrolon dekanolat (5 mg/kg i.m., haftada 2 kez, 6 hafta boyunca) ve direnç egzersizi uygulanması sonucu patolojik kardiyak hipertrofi gelişmesi incelenmiştir. Nandrolon dekanolat tedavisi alan ve direnç egzersizi uygulanan sıçanların kalp dokusunda miyokardiyal kollajen artışına, sistolik ve diyastolik fonksiyon bozukluğuna ve sol ventriköl hipertrofisine meydana geldiği bildirilmiştir. Nandrolon dekanolat uygulamasıyla birlikte egzersiz yaptırılan grup diğer tüm gruplarla karşılaştırıldığında, iskelet α -aktin ve atrial natriüretik peptid (ANP) genlerini anlamlı şekilde arttırdığı görölmüştür. ANP'nin diğer belirteçler (marker) ile birlikte (iskelet α -aktin gibi) yüksek miktarda ekspresyonu; patolojik kardiyak hipertrofiyi gösteren önemli kriterler arasında kabul edilir (41, 42). Bu sonuçlar, nandrolon dekanolatın direnç eğitimi ile birlikte uygulanmasının; miyosit büyüklüğünde bir artışa (kantitatif değişiklik) ve miyosit geninin yeniden programlanmasına (kalitatif değişiklik) sebep olduğunu göstermektedir (3, 43).

AAS'lerin insan umbilikal ven endotel hücrelerinin yapısı ve fonksiyonu üzerindeki toksisitesinin araştırıldığı bir *in vitro* çalışmada, özellikle hücre proliferasyonu, apoptozu ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki değişiklikler gibi temel endotel hücre fonksiyonları değerlendirilmiştir. Endotel hücreleri normal şartlar altında intravasküler pıhtılaşmayı önlemede rol alır, ancak damar hasarı meydana gelen bölgelerde ise kanın pıhtılaşmasına ve inflamasyon oluşumuna katkı sağlayan etki gösterirler. Görevlerini yerine getirmek için endotel hücreleri kanın pıhtılaşmasını, kan akışını ve lokal immün yanıtları düzenleyen proteinler salgırlar. Kardiyovasküler sistemde, endotel hücreleri güçlü vazoaktif maddeler (prostaglandin, trombin aktive edici faktör, nitrik oksit, endotelin) üreterek ve pıhtılaşma durumlarını düzenleyerek kilit rol

oyunlar (44). Hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki değişiklikler endotel hücre fonksiyonları üzerinde önemli etkiye sahiptir. Yapılan bir *in vitro* çalışmada endotel hücreleri 5-100 μM konsantrasyonda nandrolon ile 72 saat süreyle inkübe edilmiştir. Hücre içi kalsiyum seviyesindeki artışa bakılarak nandrolon için IC_{50} değeri 9 μM olarak belirlenmiştir. Nandrolon IC_{50} değerinde %18 seviyesinde apoptotik hücre sayısını arttırmıştır. Bu çalışma, AAS'ye maruz kalmanın vasküler temel hücre bileşenleri olan endotel hücrelerinde, güçlü bir antiproliferatif etki ile endotel hücre büyümesini değiştirdiğini, apoptozu indüklediğini ve hücre içi kalsiyum seviyelerini değiştirdiğini göstermektedir. Gözlenen bu endotel değişikliklerinin hücre düzeyindeki vasküler hasarda ve aterosklerozda predispozan faktörler olduğu düşünülmektedir (45).

2.5.2. Böbrek Üzerine Etkileri

Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda gelişen anemi tedavisinde; eritropoietin içeren preparatların henüz klinik kullanıma girmediği dönemde, terapötik dozlarında testosteron ve diğer AAS'lerin kullanımının yer aldığı görülmüştür. Ancak yüksek doz AAS kullanımı sonucu kalbin kasılma gücündeki azalmaya bağlı böbrek yetmezliğinin oluşabileceği bildirilmiştir (46). Uzun süreli AAS kullanımından sonra görülen böbrek fonksiyon bozuklukları, hafif bir serum kreatinin artışından akut böbrek yetmezliğine kadar değişebilmektedir. AAS kaynaklı böbrek fonksiyon bozukluğu, karaciğer hasarı ve toksik bilirubin konsantrasyonu sonucu ortaya çıkabilir. Ancak AAS'ın kullanımının kesilmesinden sonra sklerotik/fibrotik morfolojik değişiklikler oluşmadan serum kreatinin, sistatin-c klirensinin (böbrek işlev belirteci), kan idrar azotunun ve ürik asit seviyesinin yüksekliği ile karakterize hafif böbrek fonksiyon bozukluğunun genellikle normale döndüğü belirtilmiştir. Ayrıca oluşabilecek çoklu organ yetmezliği durumuna bağlı da böbrekler etkilenebilir. Uzun dönem AAS suistimali, tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis ile birlikte histopatolojik olarak fokal segmental glomerüloskleroz gelişimine neden olabileceği bildirilmiştir (47).

Socas ve ark'nın (48) yayımladığı bir vaka çalışmasına göre 23 yaşında erkek vücut geliştirme sporcusunun bir aydır devam eden bilinç bulanıklığı, kronik yorgunluk ve anoreksi şikayetleri ile hastaneye başvurduğu bildirilmiştir. Hasta, semptomların ortaya

çıkmasından 6 ay önce AAS ve diüretik ilaçlar kullanmaya başladığını ve yarışma öncesi kas kütlesini arttırmak için sıkı diyetler yaptığını bildirmiştir. AAS, 8 hafta süresince haftada iki ya da üç kez uygulanmış, her bir döngü içinde ise 2 haftalık AAS alınmayan dönemler olduğunu, ilaç alım haftaları ise stanozolol ve oksimetolon, nandrolon dekanolat, testosteron, boldenondan oluşan bir kombinasyon kullandığı bilgisi alınmıştır. Biyokimyasal veriler değerlendirildiğinde akut böbrek yetmezliği ve kas hasarının olduğu belirlenmiştir. Hastanın beraberinde almış olduğu diüretik ilaçların ve oluşan elektrolit dengesizliğinin (hipokalemi gibi) de AAS'lerin bu etkisine katkıda bulunduğu belirtilmiştir. Tedavide akut böbrek yetmezliği nedeniyle hastaya hemodiyaliz uygulanmıştır. 20 günlük tedavi sonrasında biyokimyasal parametrelerin normale döndüğü ve hastanın taburcu edildiği rapor edilmiştir (48).

Haftada 2 kez 1,875 mg/kg/gün veya 5 mg/kg/ gün, 6 hafta boyunca i.m. nandrolon uygulanan farelerde yapılan çalışmada uzun süreli nandrolon uygulamasının, fare böbreklerinde oksidatif hasarı ve apoptozu arttırdığı gösterilmiştir. Renal hücrelerde nandrolona bağlı görülen apoptozda tümör nekroz edici faktör alfa (TNF- α) aracılı hem intrinsik hem de ekstrinsik yollarının aktivasyonunun rol oynayabileceği ileri sürülmektedir (49).

2.5.3. Karaciğer Üzerine Etkileri

AAS'lerin maruz kalınan dozuna ve süresine bağlı olarak hepatotoksik etki gösterebileceği bilinmektedir (50). Oral kullanılan 17-alfa-alkil formlarının parenteral olarak kullanılan 17-beta-ester formlarına göre daha yüksek oranda karaciğer toksisitesine neden olduğu belirtilmektedir. Karaciğerde hepatositlerin subselüler değişiklikleri, hepatoselüler hiperplazisi, karaciğer enzim artışları (ALP, laktat dehidrojenaz (LDH), AST, alanin aminotransferaz (ALT), gama glutamil transferaz (GGT)) ve konjuge bilirubin seviyelerinde artış bildirilmiştir. Maruziyetin kesilmesinden birkaç hafta sonra artan transaminaz (AST ve ALT) düzeylerinin normale döndüğü gösterilmiştir (51).

15 yıldır yüksek dozda nandrolonun da yer aldığı kombine AAS kullanan 35 yaşında bir erkek vücut geliştirme sporcusunda hepatomegali geliştiği ve karaciğer ve kas

hasarı ile ilişkili biyokimyasal parametrelerin (ALT, AST, ALP, GGT, total bilirubin, CPK) bozulduğu tespit edilmiştir. Sporcunun 8 hafta kür halinde (oral yoldan stanozolol ve oksimetolon (400 mg/gün), parenteral olarak nandrolon dekanolat, testosteron enantat ve metenolon enantatın (2-3x600 mg/hafta)) kombine olarak kullandığı bilgisine ulaşılmıştır. Karaciğerinde adenom ile uyumlu iyi huylu lezyonlar tespit edilmiştir. Bu tümörlerin AAS'lerin yüksek doz kullanımına bağlı oluşabileceği ileri sürülmektedir (48).

Nandrolon dekanolatın suprafizyolojik dozda uygulamasının erişkin sıçanların hepatik fonksiyonları ve yapısı üzerindeki etkisini değerlendirmeyi ve nandrolon dekanolat yoksunluğundan sonra bozulan fonksiyonların düzelme oranını belirlemeyi amaçlayan bir çalışmada; sıçanlar kontrol, nandrolon dekanolat (i.m., 10 mg/kg/hafta, 4 hafta boyunca) alan, iyileşme (4 hafta nandrolon dekanolat uygulanmış sonrasında 4 hafta iyileşme süresi verilmiş) grupları olarak ayrılmıştır. Kontrol grubunda karaciğer doku kesitleri normal yapı özellikleri gösterirken, nandrolon dekanolat uygulanan gruptan alınan karaciğer doku kesitlerinde, merkezi ve portal venlerde dilatasyon, kan akımında azalma, hepatositlerde hücre çekirdeğinde yoğunlaşma ile yaygın vakuoler sitoplazmik dejenerasyon, damar çevresinde inflamatuvar sistem hücrelerinin birikimi görülmüştür. ALT ve AST değerleri karşılaştırıldığında nandrolon dekanolat uygulanan grubun en yüksek seviyede, iyileşme grubunun daha düşük seviyede olduğu, ancak her iki grubun ALT ve AST değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu ölçülmüştür. Nandrolon dekanolat uygulanan grupta karaciğer enzim değerleriyle uyumlu olarak damar çevresinde kollajen birikimi artmıştır ve iyileşme grubuna kıyasla karaciğer fibroz dokudaki artış oranının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Apoptotik hücre sayısındaki artış açısından nandrolon dekanolat uygulanan grupta en yüksek düzeyde ölçülmüştür. Nandrolon dekanolat kesilmesinden 4 hafta sonra iyileşme grubundaki sıçanların karaciğer histolojisi ve biyokimyasal değişikliklerde önemli ölçüde iyileşme olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, suprafizyolojik nandrolon dekanolat dozunun sıçanda hepatotoksik etkileri olduğunu ve bu toksik etkilerin tedavi kesildikten sonra geri dönüşümlü olabileceğini göstermiştir (11).

Nandrolon dekanolatın suprafizyolojik dozda karaciğer yapısında histopatolojik değişikliklere yol olmakla birlikte, aynı zamanda bağışıklık sisteminin aktive olması ve karaciğer dokusunda oksidatif stres artışının da bu duruma katkı sağlayacağı

düşünülmektedir (52).

AAS alan hastalarda, karaciğer parankim dokusunda veya dalakta peliozis hepatitis (kan dolu kistlerle karakterize bir durum) bulgusu tespit edilmiştir. Bu kistler genelde minimal karaciğer fonksiyon bozukluğu ile ortaya çıkar ve karaciğer yetmezliği ile ilişkilendirilmektedir (53). Hastalarda, bu kistler hayatı tehdit edici karaciğer yetmezliği oluşana kadar veya karın içi kanaması gelişene kadar sıklıkla teşhis edilemediği, ancak maddenin kesilmesiyle bu lezyonların çoğunlukla tamamen kaybolacağı bildirilmiştir (4, 54).

2.5.4. Diğer Sistemler Üzerine Etkileri

Nandrolonun üreme ve endokrin sistem üzerine birçok olumsuz etkilerinin olduğu bilinmektedir. Kadınlarda adet düzensizlikleri, meme dokusunda atrofi, klitoriste büyüme ve virilizasyona, erkeklerde prostat hipertrofisi, testiküler atrofi, azospermi ve iktidarsızlık sorunlarına neden olabileceği bildirilmektedir. Hem erkeklerde hem de kadınlarda, uzun süreli nandrolon kullanımının anormal glukoz toleransı, anormal lipid profili, akne ve erkek tipi kellik oluşumuna yol açabileceği belirtilmektedir (2, 55).

Nandrolonun depresyon ve saldırgan davranışlar gibi psikiyatrik yan etkileri arttırabileceği belirtilmektedir (56). 4 aydan uzun bir süre i.m. yoldan testosteron ve oral methandrostenolon kullanan 19 yaşındaki amerikan futbol oyuncusunun eşi ve çocuğuna karşı artan saldırgan davranış gösterdiği, çocuğuna ciddi düzeyde zarar vermesi üzerine AAS kullanmayı bıraktığı ve iki ay içinde şiddet eylemlerin ve saldırgan davranışların sona erdiği bildirilmiştir (57).

Erkek sıçanlar üzerinde, nandrolon dekanat uygulamasının santral sinir sistemindeki spesifik aminlerin ve metabolitlerinin seviyeleri üzerindeki etkileri incelenerek, agresif davranışlara neden olup olmayacağı ve artmış motor performans sağlama kapasitesi değerlendirilmiştir. Sıçanlara, nandrolon dekanat üç farklı dozda (steroid-1: 0,375mg/kg/hafta, steroid-2: 3,75mg/kg/hafta, steroid-3: 37,5mg/kg/hafta) ve bir defa uygulanmıştır. Uygulamadan bir hafta sonra, serebral korteks, hipotalamus ve serebellumdan kesitleri alınarak, biyokimyasal parametreler (Norepinefrin [NE], 5-hidroksi triptamin [5-HT], 5-hidroksiindol-3-asetik asit [5-HIAA] ve 4-hidroksi-3

metoksifenilglükol [MHPG]) ve c-fos gen ekspresyonu değerlendirilmiştir. Tüm grupların vücut ağırlıkları arasında önemli bir fark olmadığı görülmüştür. Serebral korteks ve serebellumdaki NE, MHPG, 5-HT seviyelerinin benzerlik gösterdiği, yüksek doz nandrolon dekanat alan iki grubun hipotalamus kesitinde de MHPG ve 5-HT seviyelerinin yüksek olduğu görülmüştür. Steroid-2 grubunun hipotalamus dokusundaki 5-HIAA seviyesinin belirgin olarak yüksek olduğu görülmüştür. Steroid-2 grubunda nöronların periventriküler bölgesinde anlamlı derecede artmış c-fos gen ekspresyonu gözlenmiştir. Her ne kadar c-fos gen ekspresyonu tek başına nöronal aktivasyonu yansıtmada, tek doz nandrolon dekanat uygulaması sonrası hiperadrenerjik durumu gösteren biyokimyasal parametrelerle birlikte değerlendirildiğinde tutarlı bulunmuştur. Bu sonuçlar, AAS uygulamasının, hipotalamusta adrenerjik ve serotonerjik sistemi uyurabileceği ve buna bağlı olarak, saldırgan davranışlarda ve motor performansta artış içeren kompleks bir tepkiye katkıda bulunabileceğini göstermektedir (20).

AAS kullanımı ile kas gücü arttırılırken tendonların esneme kapasitesinin azaldığı ve daha sert bir yapıya dönüştüğü gösterilmiştir. Tendon yapısındaki bu bozulma sporcuların sakatlanmasını kolaylaştırmaktadır. ASS kullanımı ile sporcuların tendon yaralanması arasında gözlenen klinik korelasyonu açıklamak amacıyla sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, AAS uygulaması ile birlikte egzersizin tendonun yapısı ve mekanik özellikleri yönünden etkileri değerlendirilmiştir. Sıçanlara, 6 hafta boyunca i.m. yoldan yaklaşık 3 mg/kg nandrolon dekanat ve 10 mg/kg stanozolol verilmiştir. Sonrasında aşıll tendonları çıkartılmış; esneklik-kuvvet ve esneklik-enerji testi (biyomekanik testleri) uygulanmıştır. Bu çalışmada elde edilen biyomekanik test sonuçlarına göre, AAS kullanılmasının, daha az esneme kapasitesi ile sertleşmiş bir tendon oluşumu gösterilmiştir (58).

2.6. Nandrolon Dekanoatın Toksisitesi

Nandrolon dekanatın toksisitesine dair yapılan çalışmaların yeterli olmadığı görülmektedir.

2.6.1. Akut Toksisitesi

Nandrolonun farelerde LD₅₀ değeri intraperitoneal enjeksiyon uygulaması ile 566 mg/kg olarak bildirilmiştir (26).

Dişi tüysüz hamsterlar üzerine yapılan bir çalışmada, nandrolon fenilpropiyonatın mikronize kristalli süspansiyonunun tek intrakütan enjeksiyonunu takiben, 7 gün sonunda sebase bez hacminde belirgin bir artışla birlikte hayvanlarda lokal epidermis kalınlaşmasına neden olmuştur (59).

2.6.2. Tekrarlı Doz Toksisitesi

Nandrolonun deney hayvanlarında tekrarlı doz toksisite çalışmasına dair kısıtlı çalışmalar bulunmaktadır.

Nandrolon dekanoatın sıçanlara 5 mg/kg dozunda haftada 2 kez ve 6 hafta boyunca uygulandığı bir çalışmada, nandrolon ve direnç egzersizinin sıçanlar üzerinde tek başına ve kombine uygulanmasının, kalp morfolojisi, kardiyak fonksiyonlar ve patolojik kardiyak hipertrofi belirteçlerinin (iskelet α -aktin, atrial natriüretik peptid, ventriküler beta miyozin ağır zinciri, ventriküler alfa miyozin ağır zinciri) mesajcı ribonükleik asit (mRNA) ekspresyonları üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Nandrolon dekanoatın tek başına veya direnç eğitimi ile birlikte uygulanmasının, değerlendirilen bu parametreleri olumsuz etkilediği gösterilmiştir (43).

Sıçanlar üzerinde nandrolon dekanoatın i.m. yoldan 0,7 mg/kg (terapötik doz), 5,3 mg/kg ve 10,3 mg/kg, haftada beş kez 5 hafta süre ile uygulamasından sonra hepatik fonksiyon ve yapı üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmada nandrolonun tüm dozlarda AST, ALT ve ALP seviyelerinde doz-bağımlı bir artışa yol açtığı, ancak bu seviyelerin normal aralıklarda kaldığı ve karaciğerde parankim dokusunda, portal aralıkta ve sentrolobüler vende kollajen birikimine neden olduğu gösterilmiştir. Terapötik dozunda (0,7 mg/kg/gün) toksik etki oluşturmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, subkronik tedavide nandrolon dekanoatın klinik dozdan daha yüksek dozlarda uygulandığında, karaciğere potansiyel olarak zararlı olduğunu ve yeni başlayan fibroz oluşumuna yol açabileceğini göstermektedir (21).

Sıçanlar üzerinde yapılan bir diğer çalışmada, kronik nandrolon uygulanması ile birlikte yüksek yoğunluklu dayanıklılık egzersizine maruz kalan sıçanlarda, ventriküler aritmi riski değerlendirilmiştir. Hem egzersiz yaptırılan hem de sedanter gruba nandrolon dekanat 5 mg/kg, haftada 2 kez ve 8 hafta boyunca uygulanmıştır. Bu çalışmada seçilen nandrolon dozu, AAS bağımlıları tarafından sıklıkla kullanıldığı bildirilen doza uyumlu olarak seçilmiştir. Nandrolonun, sıçanlarda kilo alımını azaltıcı bir etkiye sahip olduğu ve kalp dokusunda hidrokspirolin ve malondialdehit düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir. Uzun süreli yüksek yoğunluklu yüzme egzersizleri yaptırılan erkek sıçanlarda, kronik nandrolon dekanat uygulanmasının, kalp kollajen düzeyinde yükselmeye, miyokard fibrozuna, ventriküler fibrilasyon insidansında ve süresinde artışa neden olabileceği sonucuna varılmıştır (30).

Tavşanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, deri altı ve i.m. yoldan 6 ay süreyle haftada 2 gün nandrolonun 4 mg/kg ve 10 mg/kg dozlarında uzun süreli uygulanması sonucunda, böbrek spesifik biyokimyasal parametreleri, oksidatif stres belirteçleri, telomeraz aktivitesi izlenerek böbrek fonksiyonlarına ve histopatolojisine olası zararlı etkileri araştırılmıştır. Biyokimyasal parametreler incelendiğinde, deri altına nandrolon uygulanmasının serum üre, kreatinin, serum glutamik oksaloasetik transaminazın (SGOT) ve serum glutamik pirüvik transaminazın (SGPT) değerlerini belirgin bir seviyede arttırdığı, ancak i.m. uygulamada bu artışın daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu durum, nandrolonun i.m. yoldan daha yavaş absorpsiyonunun sonucu olduğu düşünülmektedir. Özellikle i.m. yüksek doz nandrolon uygulanan grupta, böbrek glutatyon (GSH) seviyelerinde azalmayla birlikte oksidatif stresin arttığı görülmüştür. Katalaz enzim aktivitesinin, herhangi bir dozda nandrolon dekanat uygulamasından etkilenmediği ölçülmüştür. Sonuç olarak, nandrolon dekanatın tavşanlara uygulanması, doz-bağımlı oksidatif stresin artışına neden olarak böbrek histolojisinde değişikliklere ve renal biyokimyasal belirteçlerin önemli ölçüde bozulmasına neden olmuştur (46).

2.6.3. Karsinojenisitesi

Nandrolon, IARC sınıflandırmasına göre Grup 2A'da (İnsanda çok muhtemel kanserojen) yer almaktadır. Yapılan çalışmalarda hipogonadizm, hipopitüitarizm, kronik

böbrek yetmezliği ve genel zayıflık için nandrolon dekonoat kullanılan hastalarda, tedavi sonrasında hepatoselüler karsinom, kolanjiokarsinom ve adenom bildirilmiştir (60).

AAS'lerin kronik kullanımı sonucu kolestaz, karaciğer tümörleri ve peliozis hepatitis gibi karaciğer hastalıklarına ilişkin vakalar bildirilmiştir AAS, normal steroid metabolizması sürecini inhibe eden ve kolesterol depolamasına yol açan steatoz hepatitis gelişiminde kilit bir rol oynar (54).

Karaciğer hücre tümörleri, genelde benign ve androjene duyarlıdır, ancak daha nadiren malign tümörler de görülmüştür. İlacın kesilmesi, sıklıkla tümör ilerlemesinin yavaşlaması veya durması ile sonuçlanır. Bununla birlikte, AAS'le ilişkili hepatic tümörler bildirilmiştir. Ancak hayatı tehdit eden karın içi kanama gelişene kadar herhangi bir semptom görülmeyebilir (15).

AAS'ler seks hormonunun etkilediği dokulardan, özellikle erkeklerde prostat bezinin büyümesini arttırabilir. Erken dönem prostat kanseri, uzun süreli AAS'lerin kötüye kullanımı sonrasında tanımlanmıştır. Bir olgu sunumunda; 38 yaşında erkek hasta akut idrar retansiyonu ile başvurmuştur. Yapılan tetkik ve değerlendirme sonrası prostat kanseri olduğu tespit edilmiştir. Bu hastanın, uzun yıllar anabolik steroidler kullandığı ve güç sporlarında profesyonel olarak yarıştığı bildirilmiştir (61).

AAS kaynaklı karsinogenisitesinde DNA transkripsiyonu rol almaktadır. AAS'ler, DNA transkripsiyonunu iki farklı yoldan etkileyebilir: 1- Androjen reseptörü aracılığıyla doğrudan bağlanabilir (5-alfa-redüktaz enzimi tarafından DHT sentezlenerek); 2- Östrojen reseptörü aracılığıyla (CYP19 aromataz enzimi ile estradiol sentezlenmesi) etkileyebilir. Nandrolon ve stanazolol, ayrıca fosfoinozid-3-kinaz/Akt (PI3K/Akt) ve fosfolipaz/fosfokinaz C (PLC/PKC) yollarını insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) üzerinden aktive edebilir. Bu durum Leydig hücre kanserinde hücre çoğalmasıyla ya da meme hücresi çoğalmasını indükleyen siklin-D1 konsantrasyonunu arttırmasıyla sonuçlanır. AAS'nin yüksek dozlarında suiistimali testosteron biyosentezinde yer alan enzimlerin ifadesini (ekspresyonunu) bozar. Testosteronun anormal sentezinin hormonal değişiklikler/regülasyon üzerinde olumsuz etkiye sahip olduğu ve bazı kanser mekanizmalarında rol oynayabileceği belirtilmektedir (62)

2.6.4. Mutajenisitesi ve Genotoksisitesi

Nandrolon dekanolat 1,0 mg/kg, 2,5 mg/kg ve 5,0 mg/kg dorsal subkütan enjeksiyonla 0,5 ml'lik tek bir dozda farelere uygulanmıştır. Nandrolon dekanolatın çalışılan tüm dozlarında, comet yöntemiyle değerlendirildiğinde somatik ve germinal hücrelerde genotoksik etkiler ve mikronükleus testiyle de kemik iliği hücrelerinde klastojenik etkileri gösterilmiştir (12).

Vücut geliştirme ile uğraşan sporcular üzerinde yapılan bir çalışmada, 2 aylık AAS maruziyetinden sonra bukkal mukoza hücrelerinde DNA hasarı ve sitotoksisite düzeyinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Anabolik steroid (nandrolon dekanolat ve stanozolol) kullanan grupta yer alan sporcularda mikronükleer hücrelerde artış gözlenmiştir. Sitotoksik parametreler, diğer kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında piknosiz, karyolisiz ve karyoreksiz görülme sıklığının, anabolik steroidlere maruz kalan grupta anlamlı istatistiksel fark gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, mikronükleus testi ile değerlendirilen oral mukoza hücrelerinde genomik instabilite ve sitotoksisitenin, anabolik steroid uygulaması ile indüklendiği gösterilmiştir (63).

Sıçanlar üzerinde yapılan bir başka çalışmada düşük dozda (3 mg/kg/hafta) ve yüksek dozda (10 mg/kg/hafta) i.m. yoldan 8 hafta boyunca uygulanan nandrolon dekanolatın spermatojenik hücrelerin histopatolojisi ve apoptozisi ile lipid peroksidasyonu, antioksidan enzim aktiviteleri, sperm anormalliği ve DNA fragmentasyonu üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Yüksek doz nandrolon dekanolat uygulanan grup, düşük doz uygulanan grup ile karşılaştırıldığında comet yöntemiyle gösterilen DNA hasarında bununla birlikte seminifer epitelin germ ve leydig hücrelerinde kaspaz-3 yöntemiyle apoptik hücre sayısında artış olduğu gösterilmiştir. Ayrıca nandrolon dekanolatın yüksek ve düşük dozlarda uygulanması, bozulmuş sperm parametrelerine, DNA fragmentasyonuna ve testis apoptozuna yol açmıştır. Sonuç olarak, yüksek dozlarda nandrolon dekanolat uygulanması, lipid peroksidasyonu, antioksidan enzim aktiviteleri, sperm anormalliği, histopatoloji, apoptotik ve DNA değişiklikleri düşük doz ve kontrol grubuna göre daha etkili olduğu belirlenmiştir (64).

Egzersiz uygulanması, sıçanlarda nandrolon dekanolat suprafizyolojik dozunun

neden olduğu apoptotik değişikliklerin derecesini arttırdığı ve bu durumun da doğurganlığı etkilediği bildirilmiştir (65).

Comet yöntemi ve mikronükleus testi ile subkütanöz yoldan uygulanan nandrolon dekanolatın sıçanlarda çoklu organ DNA hasarı üzerindeki etki potansiyelini değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmada denekler düşük doz (5 mg/kg/gün), yüksek doz (15 mg/kg/gün) ve kontrol (serum fizyolojik uygulanmış) olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Bu çalışmada, sıçan lökositlerinde nandrolon dekanolat uygulaması sonrasında gruplar arasında net bir doz-cevap ilişkisine bağlı primer DNA hasarı gözlemlendiği bildirilmiştir. Karaciğer hücrelerinde nandrolon dekanolatın kullanılan dozdan bağımsız olarak DNA hasarına sebep olmuştur. Bu durum karaciğerin nandrolon dekanolatın zararlı etkileri için bir hedef doku olduğunu desteklemektedir. Kalp hücrelerinde nandrolon dekanolatın uygulandığı her iki grupta, comet yöntemi ile genetik hasara yol açtığı belirlenmiştir. Böbrek hücrelerinde nandrolon dekanolat sadece yüksek dozda uygulanan grupta DNA kırılmasında bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Ancak, mikronükleus testi verileri gruplar arasında belirgin farklılıklar göstermemiştir. Sonuç olarak, comet yöntemi sonuçlarına göre nandrolon dekanolatın, sıçan periferik kanında, karaciğer, kalp ve böbrek hücrelerinde genetik hasara yol açtığı gösterilmiştir (7).

2.6.5. Üreme Toksisitesi

AAS'lerin üreme sistemi üzerine toksik etkilerine dair çalışmalar bulunmaktadır.

Kronik yüksek doz AAS kullanımının üreme sistemi üzerindeki en önemli olumsuz etkisi, hipotalamik-hipofiz gonadal fonksiyonu baskılamasıdır (64, 66). Kadınlarda AAS'ın kötüye kullanımına bağlı, gecikmiş menarş, dismenore, oligomenore, sekonder amenore, anovülasyon ve bunların sonucu, kısırlık görüldüğü bildirilmiştir. Bu durum, LH ve folikül uyarıcı hormonunda (FSH) bir azalmaya ve böylece östrojen üretiminin azalmasına yol açar (9).

Erkeklerde ise AAS'lerin oluşturduğu olumsuz etki sonucu; LH ve FSH düzeyinin baskılanmasına, intratestiküler ve dolaşıma salgılanan testosteronun azalmasına ve dolayısıyla spermatogenez ve sperm üretiminde düşüşe yol açar. Bu etki erkek infertilitesinin temel sebebi olarak görülmektedir (9).

Erkek sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada egzersiz ve yüksek doz nandrolon dekanonatın spermatojenik hücre hattında apoptoz yönünden etkileri araştırılmıştır. Sıçanlar beş gruba ayrılmıştır. Grup A: 8 hafta boyunca nandrolon dekanonat çözünürü yer fıstığı yağı verilen (10 mg/kg/hafta), grup B: 8 hafta boyunca nandrolon dekanonat (10 mg/kg/hafta), grup C: sadece egzersiz (egzersiz protokolü, günde 1 saat kesintisiz yüzme, 8 hafta boyunca haftanın 5 günü), grup D: 8 hafta boyunca nandrolon dekanonat (10 mg/kg/hafta) ve egzersiz (egzersiz protokolü, günde 1 saat kesintisiz yüzme, 8 hafta boyunca haftanın 5 günü) uygulanmıştır. Grup E: herhangi bir enjeksiyon veya egzersiz protokolü uygulanmayan gruptur. Yer fıstığı yağı ve nandrolon dekanonat haftada bir kez kas içine enjekte edilmiştir. Bu çalışmada, sıçanların testis ve diğer üreme organlarının ağırlığı, sadece nandrolon dekanonat uygulanan, sadece egzersiz uygulanan ve hem nandrolon dekanonat hem egzersiz uygulanan gruplarda, kontrol gruplarına göre anlamlı derecede düşük olduğu ölçülmüştür. Egzersiz ve nandrolon dekanonat tedavisinin sperm özellikleri üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Sadece egzersiz uygulanan, sadece nandrolon dekanonat uygulanan ve nandrolon dekanonat ile egzersiz uygulanan gruplar, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında sperm sayısında belirgin bir azalma gözlenmiştir. Sadece egzersiz uygulanan, sadece nandrolon dekanonat uygulanan ve nandrolon dekanonat ile egzersiz uygulanan gruplarda sperm hareketliliği tamamen azalırken, anormal sperm ve ölü sperm prevalansının da daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Germ hücre apoptozu açısından bakıldığında apoptotik indeksin kontrol gruplarında daha düşük olduğu görülmüştür. Nandrolon dekanonat ile egzersiz uygulanan grupta artmış kaspaz-3 aktivitesi ile birlikte apoptotik hücre sayısında artış ve doku hasarı görülmüştür. Spermatogenezin testis parametreleri incelendiğinde yine nandrolon dekanonat ile egzersiz uygulanan grupta spermatogenez düzeyinin anlamlı seviyede azaldığı bildirilmiştir. Sonuç olarak, spermatojenik hücre hattında yapılmış olan tüm değerlendirmelerde en büyük değişimler, suprafizyolojik dozda nandrolon dekanonat ile birlikte egzersiz uygulanan grupta gözlenmiştir (65).

2.6.6. Teratojenisitesi ve Gebelikte Kullanımı

Gebelik döneminde androjen alımının fetüsün virilizasyonuna neden olabileceği

belirtilmektedir. Anabolik steroidler hamilelik sırasında kullanımı kontrendikedir, çünkü hayvanlarda yapılan çalışmalar, anabolik steroidlerin fetüsün maskülinizasyonuna neden olduğunu göstermiştir (15).

Gebelikte nandrolon kullanımı Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kontrendike olarak bildirilmiştir. Hayvanlar ya da insanlarda yapılan araştırmalar, gebelikte kullanımı sonucu fetal anomali riski yönünden pozitif kanıtlar olduğunu göstermiştir (15).

Erken kemik olgunlaşması ve azalmış doğum ağırlığına neden olduğu bildirilmiştir. Nandrolon, hamile kalan veya ilaç alırken gebe kalma potansiyeli olan kadınlarda kontrendikedir (22).

2.6.7. Laktasyon Döneminde Kullanımı

Laktasyon döneminde bebekte nandrolon dekaonat maruziyetine bağlı ciddi olumsuz etki potansiyeli nedeniyle, emzirme döneminde kontrendikedir (22).

2.6.8. İlaç-İlaç Etkileşimleri

Nandrolon dekaonat sitokrom P450 19A1 enzimini indükleyici, amin oksidaz [flavin içeren] A ve amin oksidaz [flavin içeren] B enzimlerini inhibe edici etkiye sahiptir. Sitokrom P450 19A1, C19 androjenlerden aromatik C18 östrojen oluşumunu katalizler. Amin oksidaz [flavin içeren] A ve B biyojenik ve ksenobiyotik aminlerin oksidatif deaminasyonunu katalizler ve merkezi sinir sistemi ve periferik dokulardaki nöroaktif ve vazoaktif aminlerin metabolizmasında önemli fonksiyonlara sahiptir. Amin oksidaz [flavin içeren] A tercihen 5-HT, norepinefrin ve epinefrin gibi biyojenik aminleri okside eder. Amin oksidaz [flavin içeren] B tercihen benzilamin ve feniletilamini degrade eder.

Nandrolon dekaonatın etkileşebileceği ilaç grupları arasında özellikle antikoagülan ilaçlar, insülin, insülin türevleri ve antidiabetik ilaçlar, interferonlar, kortikosteroidler yer alır (15-19).

Androjenler ve anabolik steroidler, oral antikoagülanlarla birlikte kullanıldığında ilacın reseptör afinitesini artırarak hipoprotrombinemik cevabı kuvvetlendirebilir ve kanama riskini artırabilir. Etkileşim başlangıcı genellikle 2 ila 3 gün içinde gözlenir.

Mekanizması net olarak ortaya çıkarılamamıştır.

Anabolik steroidler, insülin salgılanma miktarını ve sonuç olarak hipoglisemik etkiyi arttırabilir.

Beta interferonların, nandrolon ile birlikte uygulanması karaciğer hasarı riskini arttırabilir. Beta interferon kullanımı, otoimmün hepatit ve bazıları transplantasyon gerektiren karaciğer yetmezliğine yol açan ciddi karaciğer hasarı gibi nadir görülen vakalarla ilişkilendirilmiştir.

Androjenlerin adrenokortikotropik hormon (ACTH) veya kortikosteroidlerle birlikte kullanılması, steroidal etkilere bağlı olarak artmış sıvı tutulması ve ödeme sonuçlanabilir (15, 29).

2.6.9. Kontrendikasyonlar ve Dikkat Edilecek Hususlar

Nandrolon dekanat için kontrendike olduğu durumlar aşağıda sıralanmıştır (15, 22).

- Anabolik steroidlere karşı aşırı duyarlılık,
- Prostat kanseri veya meme kanseri tanısı almış erkek hastalar ya da bu dokulara ait tümör şüphesi ile araştırılan hastalar,
- Meme kanseri tanısı almış hiperkalsemili kadınlarda,
- Kalp yetmezliği olan hastalarda,
- Böbrek hastalığı tanısı almış hastalarda,
- Gebelik veya emzirme döneminde olan kadınlarda kontrendikedir.

Dikkate edilecek hususlar ise;

- Çocuklarda kullanılması durumunda doğrusal büyümeden daha hızlı bir şekilde epifizlerin erken kapanmasına neden olabilir. Bu etki ilaç kesildikten sonra 6 ay boyunca devam edebilir. Bu nedenle, 6 ay ara ile x-ışını görüntüleme yöntemleri ile takip gerekir.
- Tedavi sırasında peliozis hepatitis gelişmesi durumunda tedavinin kesilmesi gerekir. Uygulamanın durdurulması ile bu klinik tablonun düzeldiği görülmüştür.
- Karaciğer hücre tümörleri, genelde iyi huylu ve androjene bağımlı tümörlerdir,

ancak malign tümörler de görülmüştür. Tedavinin kesilmesi, sıklıkla tümör progresyonunun gerilemesi veya durması ile sonuçlanır. Bununla birlikte, bu tümörler diğer hepatik tümörlerden çok daha vasküler yapıdadır ve hayatı tehdit eden karın içi kanama gelişene kadar teşhis edilemeyebilir.

- Androjen ve anabolik steroidler ile tedavi edilen hastalarda ateroskleroz riskini arttıran kan lipid değerlerinde değişiklikler görülebilir. Bu değişiklikler, HDL seviyelerinde azalma ve bazen LDL seviyelerinde yükselme şeklinde olabilir. Değişiklikler çok belirgin olabilir ve ateroskleroz ile koroner arter hastalığı riski üzerinde ciddi bir etkiye sahip olabilir. Kadında virilizasyon meydana gelebilir. Tedavi sırasında amenore veya adet düzensizlikleri oluşursa, ilacı keserek etiyojinin belirlenmesi gereklidir.

- Konjestif kalp yetmezliği bulunan ya da bulunmayan hastalarda ödeme neden olabilir. Bir adrenal steroid veya ACTH'nin birlikte verilmesi ödemi arttırabilir.

- Geriatrik hastaların anabolik steroidlerle tedavi edilmesi, prostat hipertrofisi ve prostat kanseri gelişme riskini arttırabilir.

- Kadınlarda anabolik steroid tedavisi, büyüyen klitoris, ses kısıklığı veya sesin kalınlaşması ve erkek tipi kıllanmaya ve saç kaybına neden olabilir. Tedavinin kesilmesiyle bu bulgularda geri dönüş görülmez. Eş zamanlı östrojen kullanımı kadınlarda virilizasyonu önleyemez.

- Ergenlik sonrası erkeklerde anabolik steroidlerle tedavi uygulanması, mesane irritabilitesine (sık idrara çıkma), göğüs ağrısına, jinekomastiye (memelerin büyümesi) veya priapizme (sık veya sürekli ereksiyonlar) neden olabilir.

2.6.10. Doz Aşımı ve Tedavi

Nandrolon dekanoatın doz aşımına dair birçok vaka raporu bulunmaktadır. Vaka raporlarında nandrolon dekanoatın tek başına değil benzer etki mekanizmasına sahip olan diğer AAS'ler ile birarada kullanıldığı görülmektedir.

Kronik bir hastalığı bulunmayan, 21 yaşında, vücut geliştirme sporcusunun ağırlık antrenmanı sırasında hayatını kaybettiği bir vaka çalışmasında, sporcunun birkaç ay boyunca parenteral olarak birden fazla AAS'ler kullandığı bilgisi alınmış ve postmortem

idrarında nandrolon (19-nortestosteron) metabolitleri tanımlanmıştır. Otopsi bulgularında ise bölgesel kalp miyokard fibrozu ve fokal miyokard nekrozu ile birlikte belirgin kardiyak ve renal hipertrofi ve hepatosplenomegali tespit edilmiştir (15). AAS kullanmayan sporcular üzerinde yapılan çalışmalarda ağırlık kaldırma egzersizi ile sol ventrikül duvar hacminde ve kalınlığında artış olduğu; ancak kardiyak fonksiyonun etkilenmediği görülürken, AAS'leri yüksek doz kullananlarda kalp fonksiyonunun olumsuz etkilendiği ve patolojik kardiyak hipertrofi geliştiği bildirilmiştir (3).

Doz aşımı tedavisinde AAS'lerin etkinliğinin azaltılması gereken durumlarda, antiandrojenik etkili ilaçlardan yararlanır. Antiandrojenik etkili ilaçlar prostat kanseri tedavisi, erkeklerde aşırı seksüel dürtülerin azaltılması, kadınlarda aşırı derecede androjenik hormon salınmasına bağlı virilizm (yüzde kıllanma, erkek tipi kellik, yoğun akne, seste kalınlaşma) ve hirsutizm belirtilerinin düzeltilmesi amacıyla kullanılmaktadır.

AAS'lerin oral yoldan alınması; karaciğerde biyokimyasal değerlerde bozulmaya, sarılığa ve şiddetli karaciğer hasarına neden olabilmektedir. Ancak parenteral preparatların kullanımına bağlı hepatik hasar beklenmediği bildirilmektedir (22).

Akut doz aşımı son derece nadir görülür ve spesifik bir antidotu bulunmamaktadır. Oral yoldan alınması durumunda, bulantı ve kusma görülebilir. Hastaların akut doz aşımı sonrası hızla iyileşmeleri beklenmektedir. Aşırı saldırganlık davranışları görülmesi durumunda, intravenöz benzodiazepinler ve antipsikotiklerle tedavi önerilmektedir.

Kronik kullanım sonrası öncelikle yapılması gereken AAS uygulamasının kesilmesi ve sonra ilişkili semptomlar için destekleyici tedavinin yapılmasıdır (15, 29).

Tedavide kullanılan ilaçlar:

- Spiroteron asetat: Steroid yapılı, parsiyel agonist, zayıf androjenik etki gösterir. Hedef organlarda androjenik reseptörleri kompetitif olarak bloke ederek antiandrojenik etki gösterir.

- Flutamid: Steroid olmayan tam bir androjen reseptör blokörüdür. AAS'lerin hedef hücreye alım oranını azaltır.

- Bikalutamid: Steroid olmayan bir androjen reseptör antagonistidir.

- Finasterid: 5-alfa-redüktaz enziminin prostat ve diğer erkek genital yapılarında egemen formu olan tip-2 formunu seçici kompetitif olarak inhibe eden bir azotlu

steroiddir.

- Benzodiazepin: Anksiyete bozuklukları, nöbetler, status epileptikus ve kronik bağımlıların yoksunluk sendromu tedavisinde kullanılır. Etki mekanizması esas olarak, gamma-aminobutirik asidin merkezi sinir sistemi üzerindeki inhibitör etkilerinin arttırmasıyla ortaya çıkar.

Anabolik steroidlerin vücuttan atılımını hızlandırmada diyaliz, hemoperfüzyon, idrar alkalinizasyonu veya çoklu dozda kömür tedavisinin bir etkisi yoktur.

2.7. Yasal Düzenlemeler

Anabolik steroidlerin çoğu ülkede reçetesiz olarak satılmaları yasal olabilmektedir; bu durum bu maddeleri kolay ulaşılabilir hale getirmektedir ve suistimaline neden olabilmektedir. AAS'ler Avustralya, Arjantin, Brezilya, Kanada, Birleşik Krallık ve Amerika Birleşik Devletleri gibi bazı ülkelerde ve ülkemizde kontrole tabii maddelerdir. Türkiye'de nandrolon dekanoat ruhsatlı ürün olarak yer alır ve ancak tedavi amacıyla reçete ile verilir (67,68).

Sporcuların kan ve idrar gibi vücut sıvılarında yasaklı maddelerin ve/veya bu maddelerin parçalanma ürünlerinin ya da biyolojik "marker"larının bulunması doping olarak kabul edilir. Yasaklı Maddeler ve Yöntemler listesi 5 Mart 2003 tarihinde Danimarka'nın Kopenhag kentinde yapılan Dünya Anti-doping Konferansında kabul edilen Dünya Antidoping Koduna göre hazırlanmaktadır. Dünya Anti-doping Ajansı her yıl yeni yasaklı maddeler ve yöntemler listesi yayınlamaktadır. Uluslararası Olimpiyat Komitesi ve Uluslararası Spor Federasyonları bu listeleri kabul etmektedir. 1974 yılında Uluslararası Olimpiyat Komitesi nandrolonun da yer aldığı birçok AAS'leri doping maddesi olarak kabul ederek sporcular tarafından kullanımını yasaklamıştır (68, 69).

Her ne kadar ana metabolizma yolu biliniyor olsa da nandrolon dekanoatın kötüye kullanımının söz konusu olduğu bilinmektedir. Analizinde metabolitleri gaz ya da sıvı kromatografi-kütle spektrometri yöntemleriyle tespit edilmektedir (18, 69).

2.8. MTT Yöntemi

3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid (MTT) yöntemi hücre

canlılığını ve çoğalmasını, maddelerin sitotoksitesini belirlemede yaygın kullanılan kolorimetrik *in vitro* bir test yöntemidir. Mosmann ve diğ. (70) tarafından geliştirilen bu yöntem, makrofaj-aracılı sitotoksiteyi nicel olarak ölçmede başarılı bir şekilde kullanılmıştır. MTT yöntemi, kolay olarak uygulanabilir bir yöntemdir. MTT ve diğer tetrazolyum tuzları, solunum zinciri ve diğer elektron taşıma sistemleri tarafından hücre içinde suda çözünmeyen menekşe renkli formazan kristallerine indirgenir. Bir tetrazolyum tuzu olan sarı renkli MTT, krebs döngüsü enzimlerinden biri olan ve mitokondrielerin matriksinde bulunan süksinat dehidrogenaz enzime özgül olarak bağlanır. Canlı hücrelerde süksinat dehidrogenaz gibi mitokondriyal enzimler, metabolik aktiviteleri ile tetrazolyum halkasını açarak suda çözünmeyen mor formazan MTT kristallerini oluşturur. Organik çözücülerde kolayca çözünen formazan kristalleri, konsantrasyona bağımlı olarak spektrofotometrik yöntemle görünür dalga boylarında (500-600 nm) ölçülen bir absorbans verir. Bu ölçülen absorbans değerleri dolaylı olarak hücrelerin canlılığını yansıtır. Ölçülen değer yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir. Tetrazolyum tuzları, sadece metabolik olarak aktif hücreler tarafından indirgenebilir. MTT yönteminde, hücre içi mitokondrinin metabolik aktivitesi değerlendirilebilirken, hücreler arası aktivitelerin değerlendirilmesine olanak vermez (70-73).

2.9. Çin Hamster Akciğer Fibroblast (V79) Hücre Özellikleri

Çin hamster akciğer fibroblast (V79) hücresi *Cricetucus griseus* (2n=22) türü erkek Çin hamster akciğerlerinden elde edilen adheran özellikte fibroblast hücreleridir. Bu hücrelerde G1 fazı gerçekleşmez veya çok kısa sürer. G1 büyüme dönemi çalışmalarında tercih edilmektedir. Bu hücreler endojen sitokrom P450 enzimini ifade (ekspre) edemezler. Toksikite, mutajenite ve DNA onarım çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Karyotipi ve morfolojisi stabildir; bu durum bu hücrelerin gen toksisite çalışmaları için uygun olmasını sağlamaktadır. V79 hücrelerinde mitotik bölünme esnasında interfaz aşamasında mikroçekirdek oluşumu gerçekleştiği için yapısal ve sayısal kromozom hasarını tespit etmek için kullanılmıştır (Şekil 2.5.) (74-76).



Şekil 2.5. V79 hücresinin mikroskobik görünümü.

2.10. Alkali Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi

Tek Hücre Jel Elektroforez (comet) deneyi ökaryotik hücrelerde DNA zincir kırıklarını ölçen basit bir yöntemdir. Bu yöntem DNA hasar ve onarım mekanizmalarını inceler. İlk olarak 1984 yılında Östling ve Johanson (77) tarafından tek hücre DNA hasarını görüntülemek amacıyla geliştirildi. Bu yöntem, Singh ve diğ. (78) tarafından geliştirilerek günümüzde yaygın kullanılan alkali comet tekniği olarak oluşturuldu. Singh ve diğ. (78) bu yöntemde hücreleri pH10'da 2,5M NaCl, Triton X-100 ve Sarkosil içeren ortamda 1 saat lize etmiştir ve ardından yüksek pH'da (>13) alkali (0,3M NaOH) elektroforez uygulamıştır. Olive ve diğ. (79) elektroforez öncesi hücreleri daha zayıf alkali (0,03 M NaOH) koşulda 1 saat lize etmiştir ve DNA sarmal ipliklerinin alkali koşulda denatürasyonla ayrılabilceğini ve alkali koşulların comet kuyruk oluşumunu daha belirgin hale getirebileceğini belirtmişlerdir. Bu yöntemde; bir mikroskop lamı üzerine gömdürülen az miktarda hücre deterjan ve yüksek tuzlu bir ortamda nükleer matriks ile ilişkili DNA'nın süpersarmal halkalarını içeren nükleotidler oluşturmak üzere lize edilir ve DNA sarmalının farklı pH'larda açılması sağlanır. Takiben elektroforez uygulanır. Elektroforezde farklı derecede hasarın ölçülmesine olanak vermek üzere farklı pH'lar seçilebilir. Yüksek pH'da gerçekleşen elektroforez floresan mikroskobu ile gözlenen kuyruklu yıldızlara benzeyen yapılar ile sonuçlanır; kuyruklu yıldız kuyruğunun başa göre yoğunluğu, DNA kırıklarının sayısını yansıtır. Bunun temeli, hasarsız DNA molekülü kuyruk bırakmadan yavaş göç ederken süpersarmal yapıdan ayrılan kırılmış ve hafiflemiş DNA parçacıklarının elektrik akımı altında anoda doğru çekirdekten hızlı göç etmeleridir. DNA göçünün derecesi, hücrede DNA hasarı hakkında bilgi verir (78, 80,

81). Floresans özellikli bir boya ile DNA boyanır; floresan mikroskop altında görünüşleri itibariyle kuyruklu yıldız benzeyen “Comet” olarak adlandırılan bir görüntü oluşur ve bu görüntüler ölçülüp değerlendirilir (79, 81-83)

Bu comet görüntülerini değerlendirmek için birçok teknik geliştirilmiştir. Değerlendirme tekniklerinin en basiti, hasar boyutuna dayalı bir şekilde hücreleri ampirik olarak gözle değerlendirmektir. Bu değerlendirmede 515-600 nm’lik eksitasyon filtreli epifloresan mikroskop kullanılır. Hücredeki DNA, en basit şekliyle çok hasarlı, hasarlı, orta derece hasarlı, az hasarlı ve hasarsız şeklinde görünüşlerine göre ya da bilgisayarlı görüntüleme sistemleri ile daha detaylı ve geniş kapsamlı olarak değerlendirilebilir. Bilgisayarlı görüntüleme sistemlerinde Comet Software programlarının da yardımıyla kuyruktaki % DNA, baş kısmındaki % DNA, kuyruk momenti, kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu vb. değerler kullanılır. Kuyruk uzunluğu, başın merkezinden ya da uç kısmından kuyruğun sonuna kadar olan uzunluktur. Kuyruk yoğunluğu, kuyruktaki DNA yoğunluğudur. Kuyruk momenti, kuyruk uzunluğu ve kuyruktaki DNA yoğunluğundan elde edilen bir değerdir (82).

Comet yönteminde çok az sayıda hücre gerektiğinden küçük hacimde örneklerle çalışmak mümkündür. Kısa zamanda gerçekleştirilen, hızlı, pratik ve duyarlılığı yüksek bir yöntemdir. Yöntemdeki uygulama farklılıklarının çoğu elektroforez esnasında görülür ve uygulanan voltaj, elektroforez zamanı, tampondaki tuz konsantrasyonu DNA hasar düzeyi değerlendirilmesi ile ilişkilidir (77, 78, 84-86).

Comet yönteminde özel glikozilaz aktivitesine sahip DNA onarım enzimleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu enzimler, hasarlı bazı uzaklaştırır, apürinik/apirimidinik bölgeler oluşturur ve apürinik/apirimidinik bölgeleri zincir kırıklarına götürebilir (87). DNA onarımın belirlenmesi için lizis sonrasında nükleotitler, tamir enzimleriyle inkübe edilir. Nükleotitler, lezyonları DNA kırıklarına dönüştüren ve böylece comet kuyruğundaki DNA miktarını artıran ve DNA'daki özgül hasar türünü tanımlayan bakteriyel onarımı endonükleazları ile inkübe edilmesiyle testin duyarlılığı ve özgüllüğü büyük ölçüde artırılır. DNA onarımı, hücrelere zarar veren ajanla muameleden sonra inkübe edilerek ve belli aralıklarla kalan hasarı ölçerek izlenebilir. Ayrıca, bir hücre ekstraktındaki onarım aktivitesi, spesifik hasarlı nükleotitlerle inkübe edilerek de

ölçülebilir. Enzimle inkübasyondan sonra ve inkübasyondan önceki değerlerle karşılaştırıldığında, comet parametrelerinde artış olması okside bazların varlığını gösterir. İnsan hücrelerinde DNA hasarının tipini belirlemek üzere farklı enzimler kullanılır. Endonükleaz III okside pirimidinlerini belirlerken, formamidopirimidin glikozilaz (Fpg) enzimi (*Escherichia Coli*'den elde edilen bir DNA onarım enzimi) ise oksidatif DNA baz hasarını, özellikle pürin oksidasyon ürünü olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) belirler (88, 89).

Comet yöntemi, tek bir hücrede DNA hasarının doğrudan tayininin yanı sıra bir populasyondaki tüm hücrelerin aynı oranda hasara uğrayıp uğramadığının da tayinine olanak sağlar. Herhangi bir tedavi sırasında hücrelerin heterojen cevabının, radyoterapi ve kemoterapi tedavi protokollerinde tümör cevabının öngörülmesine yardımcı olabilir (82). *In vivo* hayvan çalışmalarında kan, karaciğer ve nazal mukoza hücreleri kullanılabilir. *In vitro* toksikokinetik çalışmalarda nazal mukoza hücreleri, lenfositler ve lenfoblastoid hücreler, akciğer hücreleri, gastrointestinal kanal hücreleri (özefagus, duodenum, kolon mukozası) incelenebilir. Bu yöntem yeni kimyasal maddelerin genotoksitesinin belirlenmesinde, genotoksinlerle oluşan çevresel kontaminasyonun izlenmesinde, insan biyomonitorizasyonunda ve moleküler epidemiyolojide ve DNA hasarı ve onarımında temel araştırmalarda dahil birçok uygulama alanlarına sahiptir (81-86).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, ‘Helsinki Bildirgesi’ne göre Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı (Tarih: 05.02.2019 ve Proje no: GO 19/124). Bu çalışmaya katılan tüm gönüllülerden kan örnekleri alınmadan önce onam formu alındı.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

| | |
|--|---------------|
| Dimetil Sülfoksit (DMSO) | Sigma-Aldrich |
| Dulbecco’s Fosfat Tampon Tuzu, steril | Sigma-Aldrich |
| Düşük Erime Noktalı Agar (LMA) | Sigma-Aldrich |
| Etidyum Bromür (EtBr) | Sigma-Aldrich |
| Etil Alkol | Sigma-Aldrich |
| Etilen Diamin Tetraasetik Asit, Disodyum Tuzu (Na ₂ EDTA) | Sigma-Aldrich |
| Ficoll (Histopaque-1077) | Sigma-Aldrich |
| Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik (PBS) tablet | Sigma-Aldrich |
| Heparin Sodyum (5.000 U/ml) | Nevparin® |
| Hidrojen Peroksit (%35) | Sigma-Aldrich |
| Hidroklorik Asit (HCl) (%37) | Sigma-Aldrich |
| MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) | Sigma-Aldrich |
| N-Lauril Sarkosinat Sodyum Tuzu | Sigma-Aldrich |
| Normal Erime Noktalı Agar (NMA) | Sigma-Aldrich |

| | |
|--|-------------------------------------|
| Penisilin-Streptomisin | Biological Industries |
| RPMI 1640 Vasatı | Sigma-Aldrich |
| Sodyum Hidroksit (NaOH) | Sigma-Aldrich |
| Sodyum Klorür (NaCl) | Sigma-Aldrich |
| Tripan Mavisi | Sigma-Aldrich |
| Tripsin-EDTA | Sigma-Aldrich |
| Tris | Sigma-Aldrich |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich |
| V79 (Çin Hamster Akciğer Fibroblast) Hücre Hattı | Americal Type Culture Collection |
| Yenidoğan Sığır Serumı (Fetal Bovine Serum, FBS) | Sigma-Aldrich |

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

| | |
|--|--|
| Buzdolabı | Hotpoint |
| Cam pastör pipeti | Interlab |
| Comet Bilgisayarlı Görüntüleme Sistemi | Comet Analysis Software, version 4.0 Kinetic Imaging |
| Derin Dondurucu (-20 ⁰ C) | Ariston |
| Derin Dondurucu (-80 ⁰ C) | Revco |
| Distile Su Cihazı | MES ultrapure |
| Elektroforez | Biometra Analitik |

| | |
|--|---|
| Elektroforez Güç Kaynağı | Power Pack P 25 |
| Etüv | Dedeoğlu |
| Floresan Mikroskop | Leica |
| Hücre kültürü uyumlu flask (25/75 cm ²), 6/96-kuyucuklu plaka, pipet (1- 25 ml), santrifüj tüpü (15 ml, 50 ml) | Corning |
| Isıtıcı | Multi-Blok, Lab-Line |
| İnkübatör (CO ₂ 'li) | Heraeus Instruments |
| Karıştırıcı-Isıtıcı | Jankel&Kunkel, Ikamag |
| Kırık Buz Makinası | Scotsman AF100 |
| Lam (26x76mm) | Marienfeld |
| Lamel (24x60mm) | Marienfeld |
| Laminar Flow | Heraeus |
| Manyetik Karıştırıcı | Stuart Scientific |
| Mikrodalga Fırın | Vestel |
| Mikrofiltre | Millipore® Merck |
| Mikropipet, 8 kanallı (5-300 µl) | Eppendorf |
| Mikropipetler (0,5-1µl, 1-5µl, 5-10µl, 10-200µl, 200-1000µl, 1-5ml) | Finnpipette, Gilson, Discovery Confort |
| Mikrosantrifüj | Hettich Micro 12-24 |
| Mikrosantrifüj tüpü (1.5ml) | Eppendorf |
| Nandrolon Dekanoat | Sigma |
| Neubauer Camı (Hücre sayım camı) | Marienfeld |
| Otoklav | Rodwell Monarch MP 24 |

| | |
|--|--------------------------|
| pHmetre | Cyberscan |
| Pipet ucu, 0,5-10, 10-200, 100-1000 µl'lik | Eppendorf |
| Santrifüj | Heraeus, Hettich |
| Spektrofotometre | SpektraMax M2 |
| Su Banyosu | Termal® Laboratory Tools |
| Terazi (Standart) | Schimadzu Libror |
| Terazi (Hassas) | Mettler Toledo |
| Ultrasonik Banyo | Transsonic 460/H |
| Vakum Pompası | Welch Vacuum |
| Vorteks | Heidolph Reax 2000 |
| Yatay çalkalayıcı | Edmund Bühler |

3.3. Kullanılan Çözeltiler

3.3.1. Sitotoksitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

Besi ortamı

V79 hücrelerinin çoğalmasında kullanılacak besi ortamı için; 500 ml RPMI1640 (L-Glutamin içeren RPMI1640 vasatı) üzerine 50 ml FBS (%10) ve 5 ml penisilin/streptomisin (%1) eklendi. +4°C'de saklandı.

MTT stok çözeltisi (5 mg/ml)

5 mg MTT 1 ml PBS içerisinde çözülür. Elde edilen MTT stok çözeltisi Millipore (0,2 µm) filtresi kullanılarak sterilize edilmelidir ve ışıktan uzak tutulmalıdır. 4° C sıcaklıkta en fazla 4 gün saklanabilir. Uzun süre saklanacaksa -20°C'de saklanabilir.

Nandrolon dekanolat çözeltisi (1 mM)

1,285 mg nandrolon dekanolat 30 µl DMSO içinde çözülür. Üzerine 3 ml hücre vasatı ilave edilerek 1 mM çözelti elde edilir. Çözelti Millipore (0,2 µm) filtresi kullanılarak sterilize edilir. Çözelti taze olarak hazırlanmalı ve ışıktan uzak tutulmalıdır.

3.3.2. Alkali Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi ile DNA Hasarının Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler**Düşük Erime Noktalı Agar (LMPA) Çözeltisi (%0,65)**

325 mg LMPA tartılır. Kaynar su banyosu kullanılarak 50 ml PBS içinde çözülür. Küçük hacimler halinde buzdolabında saklanır.

Elektroforez Tampon Çözeltisi

1705 ml soğuk distile su, 52,8 ml 10 N NaOH, 8,8 ml 200 mM EDTA çözeltisi karıştırılır. Deney günü taze hazırlanır.

Etanol Çözeltisi (%75)

Mutlak etanol çözeltisinden (%99,8'lik) 225,5 ml alınır, 300 ml'ye distile suyla tamamlanır.

Etanol Çözeltisi (%50)

Mutlak etanol çözeltisinden (%99,8'lik) 150,3 ml alınır, 300 ml'ye distile suyla tamamlanır.

Etidyum Bromür (EtBr) Çözeltisi

10 mg EtBr 50 ml distile suda çözülerek 200 µg/ml'lik stok EtBr çözeltisi hazırlanır. Oda sıcaklığında karanlıkta saklanır. Stok EtBr çözeltisinden 1 ml alınıp distile su ile 10 ml'ye tamamlanarak 20 µg/ml'lik EtBr çözeltisi hazırlanır. Oda sıcaklığında karanlıkta saklanır.

EDTA Çözeltisi (200 mM)

14,89 g EDTA 200 ml distile suda çözülüp pH 10'a ayarlanır. Oda sıcaklığında saklanır.

Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi (PBS)

1 PBS tableti 200 ml distile suda çözülür. 4 °C'de saklanır.

H₂O₂ Çözeltisi (100 mM)

%35'lik H₂O₂ çözeltisinden 9,7 µl alınır, 4°C'de 990,3 µl soğuk distile su ile 1 ml'ye tamamlanır. Çözelti 1 hafta buzdolabında saklanabilir.

H₂O₂ Çözeltisi (1mM)

Deney günü 100 mM H₂O₂ çözeltisinden 10 µl alınıp 4°C'de 990 µl soğuk PBS ilave edilerek 1 mM H₂O₂ çözeltisi hazırlanır.

Lizis Çözeltisi

146,1 g NaCl, 37,2 g EDTA, 1,2 g Tris tartılıp 500 ml distile suda çözülür. 10 g NaOH eklenerek pH 10'a ayarlanır. 10 g N-Lauril sarkosinat sodyum tuzu eklenir. Distile suyla 890 ml'ye tamamlanıp çözününceye kadar karıştırılarak stok lizis çözelti hazırlanır. Oda sıcaklığında saklanır.

178 ml stok lizis çözelti, 2 ml Triton x-100 ve 20 ml DMSO ile karıştırılır. Deney günü taze hazırlanır, kullanılacağı zamana kadar buzdolabında tutularak soğuk çözeltisi kullanılır.

NaOH Çözeltisi (10 N)

200 g NaOH 500 ml distile suda çözülür. Buzdolabında saklanır.

Normal Erime Noktalı Agar (NMPA) Çözeltisi (%1)

500 mg NMPA tartılır. Kaynar su banyosu kullanılarak 50 ml PBS içinde çözülür.

Lamlar bu çözeltiliye daldırılır ve bir tarafı silindikten sonra kurumaya bırakılır.

Nötralizasyon Tampon Çözeltisi

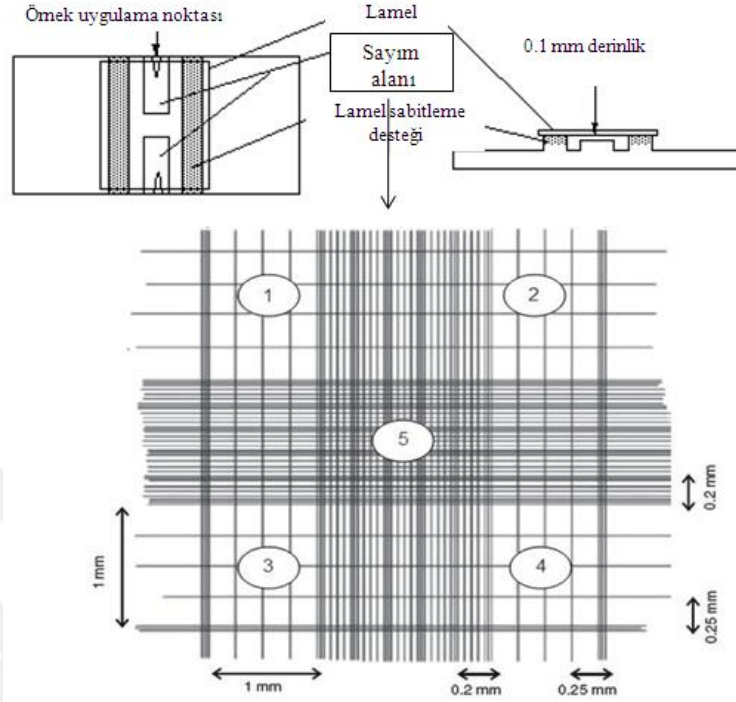
48,5 mg tris 750 ml distile suda çözülüp pH 7,5'e ayarlanır. Distile suyla 1000 ml'ye tamamlanır. Oda sıcaklığında saklanır.

3.4. MTT Yöntemi ile Sitotoksitesinin Belirlenmesi

1. V79 hücreleri (-80°C'de, %10 DMSO içeren besiyerinde saklanır) 37°C'lik su banyosunda 1 dakika bekletilerek oda sıcaklığına getirildi. Daha sonra her işlem steril şartlarda ve hava-akışlı steril kabin (BSL-2 düzeyinde) içerisinde gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılacak gereçler %70'lik etanol ile sterilize edildi.
2. Steril bir tüp içerisinde 1 ml hücre ve 9 ml besiyeri ile karıştırıldıktan sonra 1200 rpm'de 5 dakika santrifüjleme yapılarak süpernatant kısmı atıldı, ortamındaki DMSO uzaklaştırıldı.
3. Kalan hücre pelleti, 5 ml besiyeri ile karıştırılarak 25 cm²'lik yatay kültür kapları içerisine aktarıldı.
4. Kültür ortamındaki hücrelerin inkübatör içerisinde (37°C ± 1°C, %90 ± %5 nem, %5,0 ± %1 CO₂/hava) büyümeleri sağlandı.
5. 24 saat sonra eski besi yeri atılarak ölü hücreler uzaklaştırıldı. Daha sonra ortama taze besiyeri ilave edildi. Kültür ortamındaki hücrelerin inkübatör içerisinde büyümeleri sağlandı.
6. 2-3 günlük süre içerisinde hücreler ve besiyeri mikroskopta kontaminasyon durumu ve doyumluğu açısından kontrol edildi.
7. Büyümeye bırakılan hücreler, zemine tutunarak tüm kültür ortamını kapladıkları büyüklüğe ulaştıklarında ortamdaki besiyeri uzaklaştırıldı.
8. Hücreler 2 kez 5 ml 37°C'lik PBS ile yıkandı.
9. Hücrelerin üzerine 2 ml Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek belirli dakika bekletildi. Hücrelerin yapıştıkları yerden kalkıp kalkmadığı mikroskop altında kontrol edildi ve bu amaçla kültür kabının tabanına hafif hafif vuruldu. V79 hücreleri 5. dakikada yapıştıkları yerden kalktı.

10. Hücreler yapıştıkları yerden kalktıktan sonra ortama 4 ml besiyeri ilave edildi. Ortam nazıkçe süspand edildi ve hücre süspandesi steril bir tüpe aktarıldı.
11. Hücre süspansiyonu 1200 devir/dakika hızda 25°C'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.
12. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve hücre pelleti 10 ml 37°C'lik PBS ile yıkandı.
13. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve dipte toplanan hücre pelleti 2 ml besiyeri ile nazıkçe süspand edildi.
14. Bu aşamada elde edilen hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak steril bir ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine 90 µl tripan mavisi çözeltisi (%0,4) eklenerek iyice süspand edildi.
15. Neubauer hücre sayım lamı (hemasitometre) üzerine lamel yerleştirildi ve yaklaşık 10 µl hücre süspansiyonu kapiler etkiyle dolduruldu.
16. Işık mikroskobu altında, hücre sayıcı lamı oluşturan dört karenin 2 kenar çizgileri hariç, üzerlerindeki parlak ve renksiz görüntülü yaşayan hücreler sayıldı. Yaşayan hücrelerin konsantrasyonunu hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı:
 Yaşayan hücre konsantrasyonu (hücre/ml) = $A \times B \times 10^4$
 A: Yaşayan hücre sayısının ortalaması (4 karede sayım yapıldıktan sonra toplam sayı dörde bölünerek ortalama sayı elde edilir)
 B: Seyreltme faktörü = 10/1 (Hücre süspansiyonu ve tripan mavisi çözeltisi karışımı)
17. Yaşayan hücre konsantrasyonu hesaplandıktan (sayılan hücre sayısı x 10⁵ hücre/ml) sonra hücre süspansiyonu besiyeri kullanılarak hücre kültürü çalışmalarında istenilen konsantrasyonlara seyreltildi.
18. Çoklu pipetler kullanılarak 96 kuyucuklu plakalara, her bir kuyucukta 200 µl besiyeri içerisinde 10.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı.
19. Hücrelerin kuyucuklar içinde tutunarak çoğalmaları için 24 saat inkübasyona bırakıldı.
20. Steril şartlarda besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler 1,95-1000 µM konsantrasyon aralığında nandrolon dekanat içeren besiyeri içerisinde 24 saat inkübe edildi.

21. Negatif kontrol olarak, hücreler %1 DMSO içeren besiyeri ile 24 saat inkübe edildi.
22. Pozitif kontrol olarak, hücreler 50 μ M sisplatin içeren besiyeri ile 24 saat inkübe edildi.
23. İnkübasyon sonunda madde çözeltileri atıldı. Her bir kuyucuğa 90 μ l besi ortamı ve hazırlanan 5 mg/ml MTT çözeltisinden 10 μ l eklendi. Hücreler 0,5 mg/ml MTT çözeltisi ile 4 saat inkübe edildi.
24. İnkübasyon sonrasında MTT çözeltisi hücrelere dokunmadan çoklu pipet yardımıyla dikkatli bir şekilde atıldı.
25. Kuyucuklarda oluşan formazan kristallerini çözmek üzere her bir kuyucuğa 100 μ l çözme çözeltisi (DMSO) eklendi. Plak yatay çalkalayıcıda 1-2 dakika süreyle çalkalandı.
26. Spektrofotometrede örneklerin absorbans değerleri 570 nm dalga boyunda ölçüldü.
27. Boya ışıktaki bozulduğu için, deneyin her aşaması mümkün olduğunca karanlıkta yapıldı.
28. Çalışma farklı zamanlarda en az dört kez tekrarlandı ve sonuçlar dört çalışmanın ortalaması olarak hesaplandı.
29. Her bir madde konsantrasyonu için ölçülen absorbans değerinin, kontrol değerine oranı 100 ile çarpılarak % hücre canlılığı ve hücrelerin %50'sinin öldüğü inhibitör konsantrasyonu (IC_{50}) hesaplandı.



Şekil 3.1. Neubauer hücre sayım lamı.

3.5. Lenfositlerde Alkali Tek Hücre Jel Elektrophorez Yöntemi ile DNA Hasarının Belirlenmesi

1. İçerisinde 0,1 ml heparin bulunan steril enjektörle sağlıklı vericiden 5 ml kan örneği alındı.
2. Alınan kan örneği 5 ml PBS ile 1:1 oranında seyreltildi.
3. 2 ml *Ficoll* (*Histopaque-1077*) üzerine seyreltilmiş kan örneği pastör pipetiyle yavaşça tabakalandırılarak ilave edildi.
4. Oda sıcaklığında 2300 rpm'de 20 dakika süreyle santrifüje edildi.
5. Santrifüj işlemi sonunda *Ficoll* üzerindeki interfazda ince bir tabaka halinde bulunan lenfositler pastör pipetiyle dikkatle alındı.
6. Alınan lenfositler steril tüpe kondu ve üzerine 10 ml PBS eklendi. 2300 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüje edildi.

7. Süpernatant atılarak çöken kısımdaki hücreler 1 ml PBS ile süspand edildi ve 10 µl hücre süspandesi 90 µl metilen mavisi ile karıştırılır. *Neubauer* lamında hücreler sayıldıktan sonra 50 µl'de 1×10^4 hücre olması için PBS ile seyreltildi.
8. 50 µl hücre süspansiyonu eppendorf tüplere alındı. Çözeltideki DMSO konsantrasyonu %1'i aşmayacak şekilde nandrolon dekanoyatın bu çözücüdeki çözeltilerinden uygun hacimler konularak son hacim PBS ile 1 ml'ye tamamlandı ve 1 saat inkübe edildi. Maddenin sitotoksik olmadığı dozlarının (0,5 µM, 1 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM ve 100 µM) lenfosit DNA'sı üzerine etkileri incelendi. Negatif kontrol olarak %1 konsantrasyonda DMSO kullanıldı.
9. Pozitif kontrol olarak 50 µM H₂O₂ kullanıldı.
10. 50 µl hücre üzerine +4°C'de 900 µl PBS ve 50 µl 1 mM H₂O₂ çözeltisinden ilave edildi. 5 dakika buzdolabında inkübe edildi. +4°C'de 2300 rpm'de 5 dakika santrifüje edildi. Süpernatant atıldı. +4°C'de 1 ml PBS ile 2300 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüje edilerek hücreler yıkandı. Süpernatant atıldı.
11. Nandrolon dekanoyatın lenfositlerde H₂O₂ ile indüklenen DNA hasarına karşı etkilerinin incelenmesi için nandrolon dekanoyat ile 1 saat inkübe edilmiş hücrelere PBS ile yıkama işlemi uygulandı. Elde edilen hücre pelleti 50 µl PBS ile süspand edildi ve hücre süspandesi üzerine +4°C'de 900 µl PBS ve 50 µl 1 mM H₂O₂ çözeltisinden ilave edildi. 5 dakika buzdolabında inkübe edildi. +4°C'de 2500 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüje edildi. Süpernatant atıldı. +4°C'de 1 ml PBS ile 2500 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüje edilerek hücreler yıkandı. Süpernatant atıldı.
12. 150 µl %0,65'lik LMPA, 50 µl hücre süspansiyonu ile karıştırıldıktan sonra önceden %1'lik NMPA çözeltisine daldırılıp agarla kaplanmış lamlara yayıldı, üzerine lamel kapatıldı ve buzlu yüzey üzerinde 5 dakika bekletilerek agarın katılaşması sağlandı. Agar üzerindeki lamel zedelenmeden alındı.
13. Lamalar daha önceden hazırlanıp buzdolabında bekletilen soğuk lizis çözeltisine daldırılarak en az 1 saat süreyle buzdolabında bekletildi.

14. 50 μM H_2O_2 uygulanan lamalar ayrı olarak soğuk lizis çözeltisine daldırılarak en az 1 saat süreyle buzdolabında bekletildi.
15. Takiben elektroforez işlemi uygulandı.
16. Elektroforez işlemi için tank soğuk elektroforez çözeltisi ile dolduruldu.
17. Lamlar, agar yayılan kısımları üste gelecek şekilde elektroforez tankının içine aralarında boşluk olmadan yerleştirildi. Akım uygulamadan 20 dakika bekletildi.
18. 25 V ve 300 mA akım uygulayarak 20 dakika elektroforez uygulandı.
19. Elektroforez işlemi bittikten sonra alınan lamalar 5 dakika distile suda bekletildi.
20. Takiben lamalar 15 dakika nötralizasyon tampon çözeltisinde bekletildi.
21. Takiben lamalar sırasıyla 5'er dakika %50'lik, %75'lik ve %99'lük etanol çözeltisinde bekletildi.
22. Okuma öncesi lamaların kuruması için en az 1 gün bekletildi.
23. Tüm bu işlemler ek bir DNA hasarını önlemek üzere karanlıkta yapıldı.
24. Tüm örnekler çift çalışıldı ve deney en az 3 kez tekrarlandı.
25. Lamaların üzerine 30 μl (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) etidiyum bromür çözeltisi ilave edildi.
26. Her lamada 50 hücre ve toplam 100 hücre 400X objektif kullanılarak floresan mikroskopunda bilgisayarlı görüntüleme sistemi ile (Comet Analysis Software, version 4.0, Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK) değerlendirildi ve DNA hasar derecesinde DNA kuyruk yoğunluğu (% *Tail DNA*), DNA kuyruk momenti ve DNA kuyruk göçü esas alındı (84, 85).

3.6. İstatistiksel Yöntemler

Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verildi. SPSS 10.5 for Windows programı kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmorog-Smirnov testiyle yapıldı. Grup farklılıkları tek yönlü varyans alanizi (ANOVA), LSD test ile belirlendi. $p < 0,05$, istatistiksel anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Nandrolon Dekanoatın V79 Hücrelerinde Sitotoksitesinin Belirlenmesi

Nandrolon dekanonun V79 hücrelerinde, 1,95-1000 μM konsantrasyon aralığında 24 saatlik inkübasyon sonrası MTT yöntemi ile ölçülen hücre canlılığı üzerine etkileri Tablo 4.1. ve Şekil 4.1.'de verilmiştir.

V79 hücrelerinde negatif kontrolle karşılaştırıldığında nandrolon dekanonun 1,95-125 μM konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı ($p>0.05$), ancak 250 μM ve üzeri konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı ($p<0,05$) görülmektedir.

Nandrolon dekanonun % hücre canlılığını 250 μM , 500 μM ve 1000 μM dozları için sırasıya %20, %40 ve %73 oranında azaltmıştır.

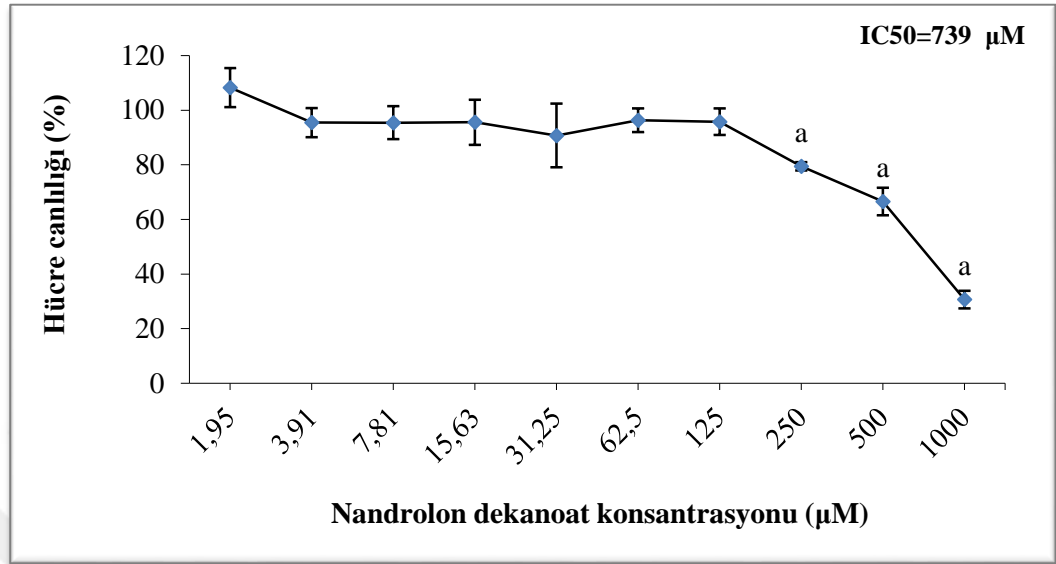
Pozitif kontrol olarak kullanılan sisplatin (50 μM) ile 24 saat inkübe edilen V79 hücrelerinde hücre canlılığı %44,7 olup, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında nandrolonun 250 μM ve 500 μM dozlarında sisplatinden daha düşük, ancak 1000 μM dozda sisplatinden daha yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğu görülmektedir (Tablo 4.1.).

V79 hücrelerinde nandrolon dekanonun 24 saatlik mazruziyette IC_{50} (hücre canlılığını %50 düşüren değer) değeri 739 μM olarak bulunmuştur (Şekil 4.1.).

Tablo 4.1. Çin Hamster akciğer fibroblast (V79) hücre canlılığı üzerine nandrolon dekanolatın etkisi. *

| | | I. Deney | II. Deney | III. Deney | IV. Deney | Hücre canlılığı* |
|-----------|---|---------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------------|
| 1 | (-) Kontrol ((%1 DMSO) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100,0 |
| 2 | (+) Kontrol (50µM sisplatin) | 41,2 | 45,6 | 38,4 | 53,7 | 44,7±6,7^a |
| 3 | 1,95 µM Nandrolon dekanolat | 102,7 | 106,5 | 105,3 | 118,7 | 108,3±7,1 |
| 4 | 3,91 µM Nandrolon dekanolat | 90,1 | 102,5 | 92,9 | 96,4 | 95, 5±5,4 |
| 5 | 7,81 µM Nandrolon dekanolat | 97,8 | 102,7 | 92,4 | 88,9 | 95,4±6,1 |
| 6 | 15,63 µM Nandrolon dekanolat | 95,3 | 102,1 | 100,9 | 84,0 | 95,6±8,3 |
| 7 | 31,25 µM Nandrolon dekanolat | 93,4 | 91,5 | 103,1 | 75,0 | 90,8±11,7 |
| 8 | 62,5 µM Nandrolon dekanolat | 91,2 | 100,0 | 94,1 | 100,0 | 96,3±4,4 |
| 9 | 125 µM Nandrolon dekanolat | 94,9 | 102,0 | 96,2 | 90,1 | 95,8±4,9 |
| 10 | 250 µM Nandrolon dekanolat | 81,3 | 78,2 | 78,1 | 80,0 | 79,4±1,5^{a,b} |
| 11 | 500 µM Nandrolon dekanolat | 72,2 | 65,9 | 68,2 | 60,1 | 66,6±5,1^{a,b} |
| 12 | 1000 µM Nandrolon dekanolat | 31,1 | 34,5 | 30,3 | 26,7 | 30,7±3,2^{a,b} |

* Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi (Nandrolon dekanolat uygulanmayan grup için hücre canlılığı %100 alındı). Negatif kontrol olarak %1 DMSO uygulandı. ^a $p < 0,05$; negatif kontrol (%1 DMSO) ile karşılaştırıldı. ^b $p < 0,05$; pozitif kontrol (50 µM sisplatin) ile karşılaştırıldı.



Şekil 4.1. Nandrolon dekanooatın V79 hücre canlılığı üzerine etkisi.*

* Dört bağımsız deneyden elde edilen sonuçlar yüzde hücre canlılığı olarak ifade edilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole (nandrolon dekanooat uygulanmayan grup için hücre canlılığı %100 alındı) göre değerlendirildi. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol olarak %1 DMSO uygulandı. IC_{50} : %50 hücre çoğalma inhibisyon yüzdesi. $^a p < 0,05$; negatif kontrol (%1 DMSO) ile karşılaştırıldı.

4.2. Nandrolon Dekanoatın Lenfositlerde Genotoksisitesinin ve Oksidatif DNA Hasarına Karşı Etkisinin Alkali Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi ile Belirlenmesi

Nandrolon dekanooatın sitotoksik olmadığı (0,5-100 µM) dozlarında, insan lenfosit hücrelerinde alkali comet yöntemi ile genotoksisitesinin ve H_2O_2 ile indüklenen DNA hasarı üzerine etkisinin değerlendirilmesine ait sonuçlar Tablo 4.2. ve Şekil 4.2.'te verilmiştir. DNA hasar derecesi DNA kuyruk yoğunluğu, DNA kuyruk momenti ve DNA kuyruk göçü olarak verildi.

DNA hasarı DNA kuyruk yoğunluğu cinsinden değerlendirildiğinde, negatif kontrole karşılaştırıldığında, nandrolon dekanooatın tek başına çalışılan tüm konsantrasyonlarında (0,5-100 µM) DNA hasarını anlamlı olarak değiştirmedığı ($p > 0,05$) bulunmuştur.

DNA hasarı DNA kuyruk momenti cinsinden değerlendirildiğinde, negatif kontrolle karşılaştırıldığında, nandrolon dekanoatın tek başına çalışılan tüm konsantrasyonlarında (0,5-100 μM) DNA hasarını anlamlı olarak arttırmadığı ($p>0,05$), hatta 100 μM dozunda DNA hasarını negatif kontrole kıyasla anlamlı olarak azalttığı ($p<0,05$) bulunmuştur.

DNA hasarı DNA kuyruk göçü cinsinden değerlendirildiğinde de negatif kontrolle karşılaştırıldığında, nandrolon dekanoatın tek başına çalışılan tüm konsantrasyonlarında (0,5-100 μM) DNA hasarını anlamlı olarak değiştirmedığı ($p>0,05$) belirlenmiştir.

İnsan lenfositlerinde H_2O_2 (50 μM) ile indüklenen DNA hasarına karşı nandrolon dekanoatın antigenotoksik etkisi incelendiğinde; DNA hasarı DNA kuyruk yoğunluğu cinsinden değerlendirildiğinde nandrolon dekanoatın 0,5 μM ve 1 μM dozlarında H_2O_2 ile indüklenen DNA hasarını değiştirmedığı ($p>0,05$) gösterilmiştir. 10-100 μM doz aralığında ise oksidatif DNA hasarını anlamlı olarak azaltmıştır (10 μM , 25 μM , 50 μM ve 100 μM konsantrasyonlarında sırasıyla %22,9; %39,7; %35,8 ve %37,6 kadar azaltmıştır) ($p<0,05$), ancak bu DNA hasar derecesi negatif kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksektir.

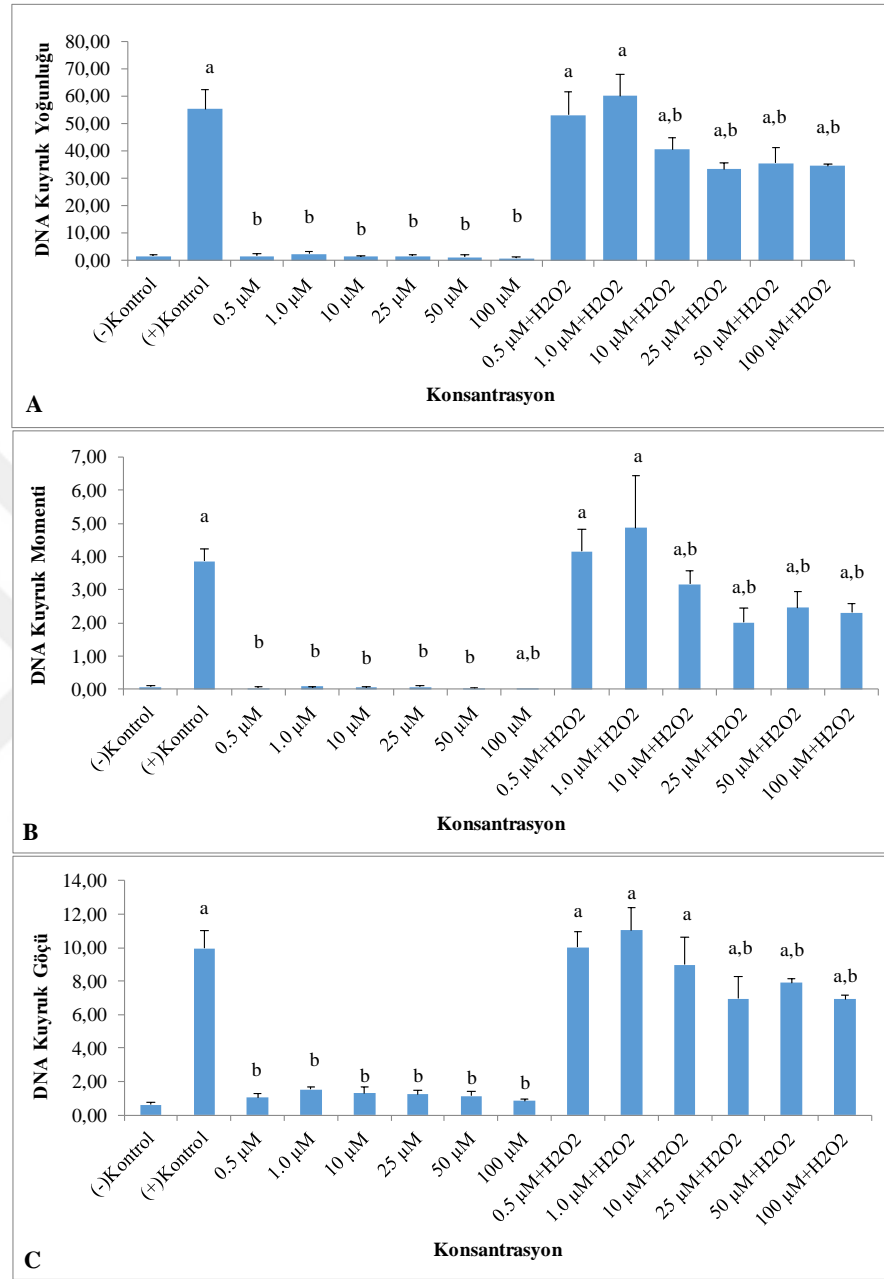
DNA hasarı DNA kuyruk momenti cinsinden değerlendirildiğinde, H_2O_2 ile indüklenen DNA hasarını nandrolon dekanoatın 0,5 μM ve 1 μM dozlarında değiştirmedığı ($p>0,05$) gösterilmiştir. 10-100 μM doz aralığında ise oksidatif DNA hasarını anlamlı olarak azaltmıştır (10 μM , 25 μM , 50 μM ve 100 μM konsantrasyonlarında sırasıyla %18,0; %47,5; %36,1 ve %40,1 kadar azaltmıştır) ($p<0,05$), ancak bu DNA hasar derecesi negatif kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksektir.

DNA hasarı DNA kuyruk göçü cinsinden değerlendirildiğinde nandrolon dekanoatın 0,5 μM , 1 μM ve 10 μM dozlarında H_2O_2 ile indüklenen DNA hasarını değiştirmedığı ($p>0,05$) gösterilmiştir. 25-100 μM doz aralığında ise oksidatif DNA hasarını anlamlı olarak azaltmıştır (25 μM , 50 μM ve 100 μM konsantrasyonlarında sırasıyla %30,3; %20,6 ve %30,6 kadar azaltmıştır) ($p<0,05$), ancak bu DNA hasar derecesi negatif kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksektir.

Tablo 4.2. İnsan lenfosit hücrelerinde H₂O₂ ile oluşturulan DNA hasarına karşı nandrolon dekanolatın etkisi. *

| | | DNA Kuyruk Yoğunluğu | DNA Kuyruk Momenti | DNA Kuyruk Göçü |
|----|--|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 1 | (-)Kontrol (%1 DMSO) | 1,72±0,47 | 0,06±0,04 | 0,61±0,14 |
| 2 | (+)Kontrol (50 µM H ₂ O ₂) | 55,44±7,13 ^a | 3,86±0,38 ^a | 9,97±1,04 ^a |
| 3 | 0,5 µM Nandrolon dekanolat | 1,72±0,73 ^b | 0,05±0,02 ^b | 1,04±0,25 ^b |
| 4 | 1,0 µM Nandrolon dekanolat | 2,42±1,10 ^b | 0,09±0,02 ^b | 1,52±0,17 ^b |
| 5 | 10 µM Nandrolon dekanolat | 1,36±0,55 ^b | 0,05±0,001 ^b | 1,29±0,37 ^b |
| 6 | 25 µM Nandrolon dekanolat | 1,63±0,55 ^b | 0,07±0,03 ^b | 1,24±0,20 ^b |
| 7 | 50 µM Nandrolon dekanolat | 1,27±0,73 ^b | 0,03±0,04 ^b | 1,14±0,28 ^b |
| 8 | 100 µM Nandrolon dekanolat | 0,86±0,44 ^b | 0,02±0,001 ^{a,b} | 0,85±0,12 ^b |
| 9 | 0,5 µM Nandrolon dekanolat + H ₂ O ₂ | 53,15±8,66 ^a | 4,16±0,66 ^a | 10,02±0,95 ^a |
| 10 | 1,0 µM Nandrolon dekanolat + H ₂ O ₂ | 60,12±8,06 ^a | 4,86±1,59 ^a | 11,03±1,38 ^a |
| 11 | 10 µM Nandrolon dekanolat + H ₂ O ₂ | 40,55±4,46 ^{a,b} | 3,16±0,42 ^{a,b} | 8,98±1,66 ^a |
| 12 | 25 µM Nandrolon dekanolat + H ₂ O ₂ | 33,45±2,12 ^{a,b} | 2,03±0,42 ^{a,b} | 6,95±1,30 ^{a,b} |
| 13 | 50 µM Nandrolon dekanolat + H ₂ O ₂ | 35,58±5,65 ^{a,b} | 2,46±0,50 ^{a,b} | 7,91±0,26 ^{a,b} |
| 14 | 100 µM Nandrolon dekanolat + H ₂ O ₂ | 34,57±0,82 ^{a,b} | 2,31±0,26 ^{a,b} | 6,91±0,25 ^{a,b} |

* Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeridir ve sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verildi. ^ap<0,05, negatif kontrol ile karşılaştırıldı (%1 DMSO). ^bp<0,05, pozitif kontrol ile (50 µM H₂O₂) karşılaştırıldı.



Şekil 4.2. İnsan lenfosit hücrelerinde H₂O₂ ile oluşturulan DNA hasarına karşı nandrolon dekanoatın etkisi.*

* DNA hasarı DNA kuyruk yoğunluğu (A), DNA kuyruk momentini (B) ve DNA kuyruk göçü (C) olarak verildi. Sonuçlar, üç çalışmanın ortalama değeridir ve sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verildi. ^a*p*<0,05, negatif kontrol ile karşılaştırıldı (%1 DMSO). ^b*p*<0,05, pozitif kontrol ile (50 µM H₂O₂) karşılaştırıldı.

5. TARTIŞMA

AAS'ler kas gücünü ve performansını arttırmak için özellikle profesyonel sporcular ve gençler tarafından yüksek dozlarda suistimal edilebilmektedir. Dünya genelinde AAS'nin kötüye kullanım sıklığı gün geçtikçe giderek artmaktadır. Bu grupta bulunan nandrolon (19-nortestosteron) ise en çok kullanılan AAS'ler arasında yer almaktadır. Testosterona yapı benzerliği nedeniyle yüksek dozda kullanımı sonucu testosterona benzer yan etkiler oluşturur (12).

Yapılan çalışmalarda nandrolonun insanlar üzerinde toksik etkilere neden olabileceği görülmektedir. Nandrolonun sitotoksitesi ve genotoksitesi üzerine mekanistik çalışmaların yetersiz olduğu görülmektedir. Çalışmamızda V79 hücrelerinde nandrolon dekanoatın, 1,95-125 μM konsantrasyon aralığında negatif kontrolle karşılaştırıldığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı, 250 μM ve üzeri konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak (250 μM , 500 μM ve 1000 μM dozları için sırasıyla %20, %40 ve %73 oranında) hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı ve IC_{50} değerinin 739 μM olarak bulunduğu gösterilmiştir.

D'Ascenzo ve ark. (45)'nin AAS'lerin hücre hasarına neden olan etkilerini gösterdiği bir çalışmada, insan umbilikal ven endotel hücreleri 5-100 μM konsantrasyonda nandrolon ile 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübe edilmiştir. Nandrolonun 24.saat inkübasyonda çalışmamızla uyumlu olarak 5-100 μM dozlarında XTT/PMS hücre canlılık deneyi kullanılarak hücre proliferasyonunu değiştirmediği, ancak maruziyet süresine bağlı olarak 48.saat için 100 μM dozda ve 72.saat için 5-100 μM dozları arasında proliferasyon oranını doz-bağımlı olarak %20'den fazla azalttığı gözlenmiştir. Hücre içi kalsiyum seviyesindeki artışa bakılarak nandrolon için 72 saat için IC_{50} değeri 9 μM olarak tespit edilmiştir. Nandrolonun IC_{50} değerinde %18 seviyesinde apoptotik hücre sayısını arttırdığı bildirilmiştir. Çalışmada vasküler temel hücre bileşenlerinden olan endotel hücresinin AAS'ye maruz bırakılmasının, hücre içi kalsiyum seviyesini arttırdığı, güçlü bir antiproliferatif etki ile endotel hücre büyümesini azalttığı ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir. AAS'lerin endotelial kalsiyum uyarı sistemini düzenleyen mekanizmaları da etkileyebileceği ileri sürülmektedir. Gözlenen bu endotel değişikliklerin hücre düzeyindeki vasküler hasara ve ateroskleroza predispozan faktörler olduğu

düşünülmektedir (45). Apoptoz hücre gelişimi ve farklılaşmasında önemli bir mekanizmadır ve modülasyonu hücre fonksiyon bozukluğu ile sonuçlanır. Endotel hücrelerinin bütünlüğü ve normal fonksiyonu, doku onarımı ve hücre büyümesi için kritik öneme sahiptir (89). Özellikle, endotel hücrelerinin apoptozu, ateroskleroz gelişiminde ilk adım olarak kabul edilir (91). Son çalışmalar kalsiyum artışının apoptozda önemli bir rol oynadığını göstermektedir (92).

Sıçan kortikal hücre kültürlerinde nandrolonun 10, 30 ve 100 μM dozlarında 24 saat ve 72 saat maruziyette MTT ve LDH yöntemi ile sitotoksitesinin değerlendirildiği çalışmada; 24.saat maruziyet için 100 μM dozda mitokondri aktivitesini düşürdüğü, ancak bu azalmanın anlamlı olmadığı görülmektedir. LDH yönteminde ise 100 μM dozda LDH salınımı anlamlı olarak arttırdığı ve 72.saat maruziyet için 30 μM ve 100 μM dozda mitokondri aktivitesini anlamlı olarak azalttığı ve LDH salınımını anlamlı arttırdığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, nandrolonun doz ve zaman bağımlı olarak mitokondri aktivitesini düşürdüğünü ve LDH salınımı arttırdığını ve hücre canlılığını mikromolar konsantrasyonlarında azaltabileceğini göstermektedir (93).

Çalışmamızın aksine, Orlando ve diğ. (94) yaptıkları çalışmada fare korteks hücresinde nandrolonun çalıştıkları en yüksek doz olan 10 μM 'da 96 saat inkübasyonunda LDH salınımında artışa neden olmadığını ve sitotoksik özellik göstermediğini bildirmişlerdir. Welder ve ark. (95) ise sıçan hepatositlerinde nandrolonun 100 μM dozunda 4.saat ve 24.saat inkübasyonlarında LDH salınımını arttırmadığını ve GSH tüketimine neden olmadığını rapor etmişlerdir.

Alkali comet yöntemi kullanarak nandrolon dekanoatın genotoksitesini incelemek üzere yaptığımız çalışmada, insan lenfosit hücrelerinde tek başına nandrolon dekanoatın çalışılan tüm konsantrasyonlarında (0,5-100 μM) DNA hasarını negatif kontrolle karşılaştırıldığında, anlamlı olarak değiştirmedeği gösterilmiştir. İnsan lenfosit hücrelerinde nandrolon dekanoatın sitotoksik olmayan dozlarında tek başına genotoksik olmadığı görülmektedir.

İnsan lenfositlerinde H_2O_2 (50 μM) ile indüklenen oksidatif DNA hasarına karşı nandrolon dekanoatın antijenotoksik etkisi incelendiğinde; DNA hasarı DNA kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti cinsinden değerlendirildiğinde, nandrolon dekanoatın

H₂O₂ ile indüklenen DNA hasarını 0,5 µM ve 1 µM dozlarında değiştirmediği, 10-100 µM doz aralığında ise bu hasarı anlamlı olarak azalttığı, ancak negatif kontrole karşılaştırıldığında DNA hasar derecesinin anlamlı olarak daha yüksek olduğu gösterilmiştir. DNA hasarı DNA kuyruk gu cinsinden değerlendirildiğinde ise nandrolon dekanolatın 0,5 µM, 1 µM ve 10 µM dozlarında H₂O₂ ile indüklenen DNA hasarını değiştirmediği ve 25-100 µM doz aralığında ise oksidatif DNA hasarını anlamlı olarak azalttığı, ancak bu DNA hasar derecesinin negatif kontrole karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, çalışmamızda nandrolon dekanolatın, H₂O₂ ile indüklenen oksidatif DNA hasarını sitotoksik olmadığı dozlarında (10-100 µM), her ne kadar hasar derecesi kontrol düzeyinde olmasa da, anlamlı olarak azaltabildiği gösterilmiştir.

AAS'ler anabolik etkilerini iskelet kasları üzerine androjen reseptörleri aracılığıyla oluşturmaktadır. Androjen reseptörleri, kas gelişmesi için gerekli olan DNA çoğalmasını kontrol eden hedef gen transkripsiyonunu düzenlemektedir (25). AAS'ler çeşitli yollarla meydana gelen DNA hasarı ve takiben oluşan hücre mutasyonu sonucu genetik kararsızlık oluşturabilir. Genomdaki bu tür değişikliklerin birikimi genomik kararsızlıkla ilişkili olup; aynı zamanda kanser gibi çeşitli dejeneratif hastalıkların gelişim riskinde de artışa neden olabilir (96). Genel olarak çoğu sporadik solid tümörün aşamalı birikmiş genetik değişiklik sürecinden kaynaklandığı kabul edilmektedir (97).

Martins ve ark. (63) yaptığı bir çalışmada yüksek doz anabolik steroidi (haftada bir kez 50 mg, i.m yoldan nandrolon dekanolat ve haftada 3 kez 18 mg oral yoldan stanozolol) 4 hafta süresince kullanan sporcularda, bukkal mukoza hücrelerinde kromozomal hasar (mikronükleus) ve hücresel ölüm (piknoz, karyoliz ve karyoreksiz) değerlendirilmiştir. Anabolik steroid kullanicılarında mikroçekirdek içeren hücre sayısında ve sitotoksisite parametrelerinde artış olduğu rapor edilmiştir (63).

Düşük ve yüksek dozda nandrolon dekanolatın spermatojenik hücrelerin histopatolojisi ve apoptozu ile lipid peroksidasyonu, antioksidan enzim aktiviteleri, sperm anormalliği ve DNA fragmantasyonu üzerindeki etkilerinin *in vivo* olarak incelendiği bir çalışmada; sıçanlarda yüksek dozda (10 mg/kg/hafta i.m. yoldan 8 hafta boyunca uygulanan) nandrolon dekanolatın düşük doz (3 mg/kg/hafta) uygulanan grup ile

karşılaştırıldığında comet yöntemiyle gösterilen DNA hasarının yüksek olduğu, bununla birlikte seminifer epitelin germ ve leydig hücrelerinde kaspaz-3 yöntemiyle apoptik hücre sayısında artış olduğu gösterilmiştir. Ayrıca nandrolon dekanonun yüksek ve düşük dozlarda uygulanması, bozulmuş sperm parametrelerine, DNA fragmantasyonuna ve testis apoptozuna yol açmıştır. Sonuç olarak, yüksek dozlarda nandrolon dekanon uygulanmasında, düşük doz ve kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, lipid peroksidasyonunu arttırdığı, antioksidan enzim aktivitelerini düşürdüğü, sperm anormalliklerine, apoptotik değişiklikler ve DNA değişikliklerine neden olduğu belirlenmiştir (64).

İnsanlar tarafından yaygın olarak kullanılmasından dolayı, nandrolon hormonunun *in vivo* memeli sistemlerinde genotoksik etkisini incelemek özellikle önemlidir. Do Carmo ve ark. (12) comet yöntemi ve mikronükleus testi kullanılarak nandrolonun cilt altı 1,0 mg/kg, 2,5 mg/kg ve 5,0 mg/kg doz uygulamada farelerin farklı hücrelerinde genotoksik ve klastojenik potansiyelini değerlendirmişlerdir. Mikroçekirdek, kromozom kırılması veya iğ iplikçikleri disfonksiyonu sonucu anafaz sırasında kutuplara göçmeyen ve bölünen hücrenin telofaz çekirdeğine dahil edilmeyen kromatin materyali parçacıklarından oluşur (97). Kromozom fragmanları, test edilen maddenin klastojenik (kromozom kırılması) aktivitesi ile ilişkilidir, oysa bütün bir kromozomun varlığı, mitotik iğ iplikçikleri üzerinde olumsuz bir etki gösterir (anöjenik etkiler) (99). Çalışmada maruziyetten 24 saat sonra nandrolon dekanonun tüm dozlarında comet yönteminde farelerin periferik kan, karaciğer, kemik iliği, beyin ve testis hücreleri üzerinde DNA hasarının yüksek olduğu ve mikronükleus yönteminde klastojenik etkinin indüklendiği (polikromatik/normokromatik eritrosit oranlarının arttığı) bildirilmiştir (12). Sonuç olarak, nandrolon dekanon hormonunun somatik ve germinal hücrelerde genotoksik etki oluşturduğu ve kemik iliği hücrelerinde klastojenik etkiye sahip olduğu görülmektedir. Bazı araştırmalar AAS'lerin klasik bakteriyel ve memeli mutasyon analizlerinde gen mutasyonunu indüklediğini göstermektedir, ancak kromozomal düzeyde yapılan bazı çalışmalar AAS'lerin kromozomal kopmalar veya anormallikleri indüklediğini bildirmektedir (100-102).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

AAS'ler testosteronun esterleri veya alkileri şeklinde sentetik olarak üretilen ilaçlardır (2). AAS, etkilerini vücudun birçok yerinde gösterir. Bu sistemler üreme organları, kas ve kemik dokusu, derideki saç kökleri, karaciğer, böbrekler, hematopoetik sistem, bağışıklık sistemi ve merkezi sinir sistemidir (1, 3). Bu maddeler, kas gücünü ve performansını arttırmak için profesyonel sporcular tarafından uzun zamandır kullanılmaktadır. Son yıllarda AAS'nin gerek sporcular gerekse ergenlik çağındaki çocuklar tarafından yasal ya da yasal olmayan yollardan performansı artırmak üzere yüksek miktarlarda kullanımı söz konusudur. Nandrolon (19-nortestosteron) ise en sık kullanılan AAS'ler arasında yer almaktadır (5-7).

Nandrolon testosterona yapı benzerliği nedeniyle yüksek dozda kullanımı sonucu testosterona benzer yan etkiler oluşturur. Yüksek dozlarda ve uzun süreli kullanımı söz konusudur. Bu koşullarda sağlık üzerine zararlı etkileri olabileceği düşünülmektedir. Literatür incelemesi sonucunda insanlar üzerinde nandrolonun genotoksitesisi üzerine çalışmaların az sayıda olduğu, *in vivo* ve *in vitro* çalışmaların ise yeterli olmadığı görülmüştür (12).

Çalışmamızda nandrolon dekanonun geniş aralıktaki dozlarda (1,95-1000 μM) V79 hücrelerinde MTT yöntemi kullanılarak 24. saat hücre canlılığı ve insan lenfositlerinde sitotoksik olmayan dozlarında 1 saat maruziyette alkali tek hücre jel elektroforez yöntemi (Comet) ile DNA hasarı üzerine etkilerini değerlendirmeyi amaçladık. V79 hücrelerinde 250 μM üzeri konsantrasyonlarda nandrolon dekanonun hücre canlılığını doz-bağımlı bir şekilde anlamlı olarak azalttığı ve IC_{50} değerinin 739 μM olduğu tespit edilmiştir. Nandrolon dekanon, tek başına çalışılan tüm konsantrasyonlarında (0,5-100 μM) lenfositlerde DNA hasarına yol açmamıştır. 10-100 μM arasındaki konsantrasyonlarda doz-bağımlı olarak oksidatif DNA hasarını önemli ölçüde azalttığı; ancak düşük konsantrasyonlarında (0,5 ve 1 μM) değiştirmedeği görülmüştür.

Önceki çalışmalarda yüksek doz testosteron türevi hormonların ve nandrolon dekanonun genotoksik potansiyelleri gösterilmekle birlikte, çalışmamızda insan lenfosit

hücrelerinde nandrolon dekanoatın sitotoksik olmayan dozlarında (0,5-100 µM) tek başına alkali comet yöntemi ile DNA hasarı oluşturmadığı, hatta H₂O₂ ile indüklenen DNA hasarını azaltabileceği gösterilmiştir. Bu sonuç nandrolonun sitotoksik olmayan dozlarında doğrudan DNA hasarı yapmadığını, ancak olası genotoksitesinde dolaylı olarak farklı mekanizmaların ve epigenetik olayların rol alabileceğini göstermektedir.

Nandrolon, kimyasal olarak geliştirilmiş bir testosteron hormonudur; metabolizması sırasında, kanser gelişimi ile ilişkili metabolitler ve yüksek konsantrasyonlarda 17-beta- estradiol oluşturulabileceğini gösterir (102). Seks hormonlarının toksisitesi, mutajenitesi, genotoksitesisi ve karsinojenisitesi genetik ve epigenetik faktörlerin kombinasyonunun bir sonucudur (101-103).

Nandrolon dekanoat yüksek doz i.m. uygulanmasının serbest radikal üretimi ile ilişkili olabileceğine dair mekanizmalar ileri sürülmektedir. Bu çalışmaya göre testisler üzerindeki zararlı etkilerini önlemek üzere yüksek doz nandrolon dekanoat kullanımının sınırlandırılması önerilmektedir.

AAS'nin genotoksik etkisi, metabolik aktivatörlerden ve redoks döngüsü esnasında oluşan reaktif oksijen radikallerinden kaynaklanabilir (101). Bu şekilde, testosteron türevlerinin metabolik aktivasyonu serbest radikallerin oluşmasına bağlı olarak DNA katım ürünlerinin oluşmasına yol açar. AAS'lerin, yoğun DNA hasarının olduğu durumlarda harekete geçen DNA onarım sistemlerini aktive edebileceği bildirilmiştir (104).

Çalışmamızın bazı kısıtlamaları nedeniyle daha ileri çalışmaların gerekli olduğu görülmüştür. Öncelikle sitotoksisite çalışmamızda *in vitro* olarak oldukça yüksek doz aralığında çalışılmasına rağmen, maruziyet süresi kısa olduğu için ancak çok yüksek dozlarında sitotoksitesisi gösterilmiştir. Oysa literatür çalışmalarına göre nandrolon dekanoatın daha uzun maruziyet sürelerinde (örneğin 48 saat ve 72 saat gibi) sitotoksitesinin zaman-bağımlı olarak artacağı öngörülmektedir. Endotel hücreleri ve üreme hücreleri başta olmak üzere farklı hücre hatlarında çalışılarak toksik etki mekanizmaları aydınlatılabilir. Karaciğer hücreleri kullanılarak metabolik aktivasyon sonucu oluşan ara ürün ve son ürünlerin etkileri gösterilebilir. Daha ileri genotoksisite testleri kullanılarak (Ames testi, mikroçekirdek testi, kromozomal sapma testi, kardeş

kromatid değişim testi ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi (DNA onarım ve apoptoz ilişkili genlerin ifadelerin analizi) gibi), genotoksisite mekanizmalarına açıklık getirilebilir.

Çalışmalarda AAS'ın insanlarda zararlı etkileri uzun süreli yüksek dozlarının kullanımında gösterilmiştir. Epidemiyolojik çalışmalardan bu maddelerin kandaki nicel ölçümlerinin yetersiz kaldığı ve uzun vadede sistemik etkilerinin değerlendirilemediği görölmektedir.

Nandrolonun, alışmamızda gözlenen oksidatif strese karşı olası antigenotoksisitesi, toksisite mekanizmasının ortaya çıkarılmasında mevcut bilimsel çalışmalara katkıda bulunabilir; bununla birlikte uzun vadede etkilerini öngörmek için daha kapsamlı mekanistik araştırmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, kanser etiyojisinde veya diğer genetik hastalıklarda birçok farklı mutasyon türü bulunmaktadır. Klinikte nandrolonun akut veya kronik uygulamasına bağlı tedavisinin risk/fayda analizinde bu hususları göz önüne bulundurarak planlamalıdır ve bu şekilde güvenli bir tedavi protokolu oluşturabilir.

AAS suistimali ciddi bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Bunlardan dolayı toplumun ASS'lerin kötüye kullanımına karşı uyarılması ve bilinçlendirilmesi açısından bu ve benzeri çalışmaların yapılmasının gerektiği kanaatine varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Guyton AC, Hall JE. Textbook of medical physiology. 11th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006. Chapter 80, Reproductive and Hormonal Functions of the Male (and Function of the Pineal Gland); p.1003-6.
2. Evans NA. Current concepts in anabolic-androgenic steroids. *Am J Sports Med.* 2004;32(2):534-42.
3. Frati P, Busardo FP, Cipolloni L, De Dominicis E, Fineschi V. Anabolic androgenic steroid (AAS) related deaths: autoptical, histopathological and toxicological findings. *Curr Neuropharmacol.* 2015;13(1):146-59.
4. Maravelias C, Dona A, Stefanidou M, Spiliopoulou C. Adverse effects of anabolic steroids in athletes a constant threat. *Toxicol Lett.* 2005; 158(2):167-75.
5. Su TP, Pagliaro M, Schmidt PJ, Pickar D, Wolkowitz O, Rubinow DR. Neuropsychiatric effects of anabolic steroids in male normal volunteers. *JAMA.* 1993;269(21):2760-64.
6. Bronson FH. Effects of Prolonged exposure to anabolic steroids on the behavior of male and female mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996; 53(2):329-34.
7. Pozzi R, Fernandes L, Calegare BF, D'Almeida V. Leandro Fernandes, Bruno FA Calegare and Vânia D'Almeida. Validation of reference genes for qPCR analysis of resistance training and androgenic anabolic steroids on hypothalamus, adrenal gland and fat tissue. *J Steroids Horm Sci.* 2016;7(3):1-7.
8. McGinnis MY. Anabolic androgenic steroids and aggression studies using animal models. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1036:399-415.
9. Nieschlag E, Vorona E. Mechanisms in endocrinology: medical consequences of doping with anabolic androgenic steroids: effects on reproductive functions. *Eur J Endocrinol.* 2015;173(2):R47-58.
10. Rasmussen JJ, Selmer C, Ostergren PB, Pedersen KB, Schou M, Gustafsson F, ve ark. Former abusers of anabolic androgenic steroids exhibit decreased testosterone levels and hypogonadal symptoms years after cessation: a case-control study. *Plos One.* 2016;11(8):1-16.
11. Shalaby AM, Bahey NG. Reversal of the hepatic damage induced by the supraphysiological dose of nandrolone decanoate after its withdrawal in the adult male rat. *Tissue and Cell.* 2018;53:44-52.
12. Do Carmo CA, Gonçalves ALM, Salvadorib DMF, Maistro EL. Nandrolone androgenic hormone presents genotoxic effects in different cells of mice. *J Appl Toxicol.* 2012;32:810-4.
13. Birch AJ. Hydroaromatic steroid hormones 10-nortestosterone. *J Chem Soc.* 1950;367-8.

14. Nandrolone decanoate pubchem [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 09 Kasım 2019]. Erişim adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nandrolone-decanoate>
15. Nandrolone decanoate toxnet [Internet]. 2005 [Erişim Tarihi: 09 Kasım 2019] Erişim adresi: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+3368>
16. Pan MM, Kovac JR. Novel Uses for the Anabolic Androgenic Steroids Nandrolone and Oxandrolone in the Management of Male Health. *Transl Androl Urol*. 2016;5(2):213-9.
17. Wu C, Kovac JR, Takeda H, Matsumiya T, Roy RR, Edgerton VR. Nandrolone decanoate enhances hypothalamic biogenic amines in rats. *Curr Urol Rep*. 2016;17(72):1-7.
18. Hemmersbach P, Große J. Nandrolone: a multi-faceted doping agent. Thieme D, Hemmersbach P, editors. *Doping in sports*. Berlin. Springer-Verlag. 2010.
19. Johansen KL, Mulligan K, Schambelan M. Anabolic effects of nandrolone decanoate in patients receiving dialysis. *JAMA*. 1999;281(14):1275-81.
20. Tamaki T, Shiraishi T, Takeda H, Matsumiya T, Roy RR, Edgerton VR. Nandrolone decanoate enhances hypothalamic biogenic amines in rats. *Med Sci Sports Exerc*. 2003;35:32-8.
21. Vieira RP, França RF, Damaceno-Rodrigues NR, Dolhnikoff M, Caldini EG, Crvalho CRF. Dose-dependent hepatic response to subchronic administration of nandrolone decanoate. *Med Sci Sports Exerc*. 2008;40:842-7.
22. Nandrolone inchem [Internet]. 1998 [Erişim Tarihi: 09 Kasım 2019] Erişim adresi: <http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/pim910.htm>
23. Rico AG, Benard P, Braun JP, Burgat-Sacaze V. Metabolism of 19 nortestosterone-14C associated with estradiol in mice and calves. *Ann Rech Vét*. 1977;8(2):135-141.
24. Schanzer W. Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clinical chemistry*. 1996;42(7):1001-20.
25. Kicman AT. Pharmacology of anabolic steroids. *Br J Pharmacol*. 2008;154:502-21.
26. Khattab SA, Omran BHF, Mohamed EM, Wafaa F, Hussain WF. Potential toxic effect of steroids abuse on reproductive system of adult male albino rat. *Br J Sci*. 2017;15(1):32-54.
27. Bamman MM, Shipp JR, Jiang J, Gower BA, Hunter GR, Goodman A, et al. Mechanical load increases muscle IGF-I and androgen receptor mRNA concentrations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;280:E383-E390.
28. Inoue K, Yamasaki S, Fushiki T, Okada Y, Sugimoto E. Androgen receptor antagonist suppresses exercise-induced hypertrophy of skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*. 1994;69:88-91.

29. Nandrolone decanoate drugbank [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi: 09 Kasım 2019] Erişim adresi: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB08804>
30. Abdollahi F, Joukar S, Najafipour H, Karimi A, Masumi Y, Binayi F. The risk of life-threatening ventricular arrhythmias in presence of high-intensity endurance exercise along with chronic administration of nandrolone decanoate. *Steroids*. 2016;105:106-12.
31. Flo FJ, Kanu O, Teleb M, Chen Y, Siddiqui T. Anabolic androgenic steroid-induced acute myocardial infarction with multiorgan failure. *Forensic Sci Res*. 2019;4(3):267-73.
32. McNutt RA, Ferenchick GS, Kirilin PC, Hamlin NJ. Acute myocardial infarction in a 22 year old world class weight lifter using anabolic steroids. *Am J Cardiol*. 1988;62:164.
33. Alves MJNN, Santos MRD, Dias RG, Akiho CA, Laterza MC, O Rondon MUPB, et al. Abnormal neurovascular control in anabolic androgenic steroids users. *Med Sci Sport*. 2010;42:865-71.
34. Marques Neto SR, da H Silva A, dos Santos MCP, Ferraz EF, Nascimento JH. The blockade of angiotensin AT1 and aldosterone receptors protects rats from synthetic androgen-induced cardiac autonomic dysfunction. *Acta Physiol*. 2013;208(2):166-71.
35. Medei E, Marocolo M, Rodrigues DC, Arantes PC, Takiya CM, Silva J, et al. Chronic treatment with anabolic steroids induces ventricular repolarization disturbances: cellular, ionic and molecular mechanism. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;49(2):165-75.
36. Tylicki A, Kawalko A, Sokolska J, Strumilo S. Effect of anabolic steroid nandrolonedecanoate on the properties of certain enzymes in the heart, liver, and muscle of rats, and their effect on rats' cardiac electrophysiology. *Horm Metab Res*. 2007;39(4):268-72.
37. Salt PJ. Inhibition of noradrenaline uptake 2 in the isolated rat heart by steroids, clonidine and methoxylated phenylethylamines. *Eur J Pharmacol*. 1972;20(3):329-40.
38. Du XJ, Dart AM. Mechanisms of noradrenaline release in the anoxic heart of the rat. *Cardiovasc Res*. 1993;27(11):2011-5.
39. Du XJ, Woodcock EA, Little PJ, Esler MD, Dart AM. Protection of neuronal uptake-1 inhibitors in ischemic and anoxic hearts by norepinephrine-dependent and - independent mechanisms. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998;32(4):621-8.
40. Rocha FL, Carmo EC, Roque FR, Hashimoto NY, Rossoni LV, Frimm C, et al. Anabolic steroids induce cardiac renin-angiotensin system and impair the beneficial effects of aerobic training in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(6):H3575-83.
41. Klein RM, MacGillivray BK, McKenzie JC. Markers of cardiac hypertrophy. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;752:210-7.

42. Barauna VG, Magalhaes FC, Krieger JE, Oliveira EM. AT1 receptor participates in the cardiac hypertrophy induced by resistance training in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;295:R381-7.
43. Tanno AP, das Neves VJ, Rosa KT, Cunha TS, Giordano FC, Calil CM, et al. Nandrolone and resistance training induce heart remodeling: role of fetal genes and implications for cardiac pathophysiology. *Life Sci.* 2011;89(17-18):631-7.
44. Sullivan ML, Martinez CM, Gennis P, Gallagher EJ. The cardiac toxicity of anabolic steroids. *Prog Cardiovasc Dis.* 1998;41:1-15.
45. D'Ascenzo S, Millimaggi D, Di Massimo C, Saccani-Jotti G, Botre F, Carta G, et al. Detrimental effects of anabolic steroids on human endothelial cells. *Toxicol Lett.* 2007; 169:129-136.
46. Tsitsimpikou C, Vasilaki F, Tsarouhas K, Fragkiadaki P, Tzardi M, Goutzourelas N, et al. Nephrotoxicity in rabbits after long-term nandrolone decanoate administration. *Toxicol Lett.* 2016;259:1-27.
47. Nieschlag E, Vorona E. Doping with anabolic androgenic steroids (AAS): Adverse effects on non-reproductive organs and functions. *Rev Endocr Metab Disord.* 2015;16:199-211.
48. Socas L, Zumbado M, Perez-Luzardo O, Ramos A, Pe´rez C, Herna´ndez JR, et al. Hepatocellular adenomas associated with anabolic androgenic steroid abuse in bodybuilders: a report of two cases and a review of the literature. *Br J Sports Med.* 2005;39(e27):1-4.
49. Riezzo I, Turillazzi E, Bello S, Cantatore S, Cerretani D, Di Paolo M, et al. Chronic nandrolone administration promotes oxidative stress, induction of pro-inflammatory cytokine and TNF- α mediated apoptosis in the kidneys of CD1 treated mice. *Toxic Appl Pharmacol.* 2014;280:97-106.
50. Kafrouni M, Anders RA, Verma S. Hepatotoxicity associated with dietary supplements containing anabolic steroids. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007;5:809-12.
51. Kurling, S., Kankaanpaa, A., Ellermaa, S., Karila, T., Seppala, T. The effect of sub-chronic nandrolone decanoate treatment on dopaminergic and serotonergic neuronal systems in the brains of rats. *Brain Res.* 2005;1044:67-75.
52. Arazi H, Mohammadjafari H, Asadi A. Use of anabolic androgenic steroids produces greater oxidative stress responses to resistance exercise in strength-trained men. *Toxicol. Rep.* 2017;4:282-6.
53. Warfel KA, Ellis GH. Peliosis of the spleen. Report of a case and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med.* 1982;106(2):99-100.
54. Solimini R, Rotolo MC, Mastrobattista L, Mortali C, Minutillo A, Pichini S, et al. Hepatotoxicity associated with illicit use of anabolic androgenic steroids in doping. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2017;21:7-16.

55. Rodrigues JM, Oliveira VPP, Furlan JP, Munhoz AC, Rempel MRS, Brito MN, et al. Immediate and residual effects of low-dose nandrolone decanoate and treadmill training on adipose and reproductive tissues of male Wistar rats. *Arch Physiol Biochem*. 2017;123(2):68-77.
56. Rainer Q, Speziali S, Rubino T, Dominguez-Lopez S, Bambico FR, Gobbi G, et al. Chronic nandrolone decanoate exposure during adolescence affects emotional behavior and monoaminergic neurotransmission in adulthood. *Neuropharmacology*. 2014;83:79-88.
57. Schulte HM, Hall MJ, Boyer M. Domestic violence associated with anabolic steroid abuse. *Am J Psychiatr*. 1993;150(2):348.
58. Miles JW, Grana WA, Egle D, Min KW, Chitwood J. The effect of anabolic steroids on the biomechanical and histological properties of rat tendon. *J Bone Joint Surg*. 1992;74A:411-22.
59. Clark MA, Picton W. The effect of intracutaneous injections of micronized crystalline suspensions of nandrolone phenyl-propionate in the skin of female hairless hamsters. *Br J Dermatol*. 1977;96(3):271-6.
60. IARC, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans supplement 7. 1987;Vol 1-42:96-99. Lyon.
61. Roberts JT, Essenhigh DM. Adenocarcinoma of prostate in 40-year-old body-builder. *Lancet*. 1986;328(8509):742.
62. Salerno M, Cascio O, Bertozzi G, Sessa F, Messina A, Monda V, et al. Anabolic androgenic steroids and carcinogenicity focusing on leydig cell: a literature review. *Oncotarget*. 2018;9(27):19415-26.
63. Martins RA, Gomes GAS, Aguiar O, Medalha CC, Ribeiro DA. Chromosome damage and cytotoxicity in oral mucosa cells after 2 months of exposure to anabolic steroids (decadurabolin and winstrol) in weight lifting. *Steroids*. 2010;75:952-5.
64. Mohamed EHM, Mohamed MAH. Effect of different doses of nandrolone decanoate on lipid peroxidation, DNA fragmentation, sperm abnormality and histopathology of testes of male wister rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2014;67:1-11.
65. Shokri S, Aitken RJ, Abdolvahabi M, Abolhasani F, Ghasemi FM, Kashani I, et al. Exercise and supraphysiological dose of nandrolone decanoate increase apoptosis in spermatogenic cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010;106:324-30.
66. Takahashi M, Tatsugi Y, Kohno T. Endocrinological and pathological effects of anabolic-androgenic steroid in male rats. *Endocrine Journal*. 2004;51(4):425-34.
67. FDA Onaylı İlaç Ürünleri. [İnternet] [Erişim Tarihi: 11 Kasım 2019]. Erişim adresi: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=013132>

68. World anti doping code [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi: 11 Kasım 2019]. Erişim adresi: <https://www.wada-ama.org>
69. Bagchus WM, Smeets JMW, Verheul HAM, De Jager-Van Der Veen SM, Port A, Geurts TBP. Pharmacokinetic evaluation of three different intramuscular doses of nandrolone decanoate: analysis of serum and urine samples in healthy men. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 2005;90(5):2624-30.
70. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
71. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods.* 1986;89(2):271-7.
72. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3- (4, 5-dimethylthiazol 2- yl)- 2, 5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemistry.* 1997;69(2):581-93.
73. Holst-Hansen C, Brünner N. MTT-cell proliferation assay, *Cell Biology: a Laboratory Handbook.* 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1998.
74. Chaung W, Mi L, Boorstein RJ. The p53 status of Chinese hamster V79 cells frequently used for studies on DNA damage and DNA repair. *Nucleic Acids Research.* 1997;25(5):992-994.
75. Doehmer J. V79 Chinese hamster cells genetically engineered for cytochrome P450 and their use in mutagenicity and metabolism studies. *Toxicology.* 1993;82:105-118.
76. ATCC (American Type Culture Collection): The Global Bioresource Center. [Erişim tarihi 3 Ocak 2017]. Erişim adresi: https://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=tr.
77. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;123:291-8.
78. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research.* 1988;175:184-91.
79. Olive PL, Wlodek D, Durand RE, Banáth JP. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Experimental Cell Research.* 1992;198(2):259-67.
80. Tice RR, Andrews PW, Singh NP. The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. *Basic Life Sciences.* 1990;53:291-301.
81. Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnström G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutatation Research.* 1996;363(2):89-96.

82. Olive PL, Banath JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay. *Radiation Research*. 1990;122(1):86-94.
83. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res*. 1995;339(1):37-59.
84. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P. et al. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*. 2003;18:45-51.
85. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H. et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35(3):206-21.
86. Collins AR, Dobson VL, Dusinka M, Kennedy G, Stetina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research*. 1997;375:183-93.
87. Speit G, Schütz P, Bonzheim I, Trenz K, Hoffmann H. Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicology Letters*. 2004;146(2):151-8.
88. Boiteux S, Gajewski E, Laval J, Dizdaroglu M. Substrate-specificity of the Escherichia-Coli Fpg protein (formamidopyrimidine DNA glycosylase) - excision of purine lesions in DNA produced by ionizing-radiation or photosensitization. *Biochemistry*. 1992;31(1):106-10.
89. O'Conner TR., Graves RJ, Murcia GDe, Castaing B, Laval J. Fpg protein of Escherichia coli is a zinc finger protein whose cysteine residues have a structural and/or functional role. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993; 268:9063-70.
90. Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol*. 2003;196:430-43.
91. Nakano T, Watanabe H, Ozeki M, Asai M, Katoh H, Satoh H, et al. Endoplasmic reticulum Ca²⁺ depletion induces endothelial cell apoptosis independently of caspase-12. *Cardiovasc Res*. 2006;69:908-15.
92. Guerini D, Coletto L, Carafoli E. Exporting calcium from cells. *Cell Calcium*. 2005;38:281-9.
93. Zelleroth S, Nyberg ENF, Grönbladh A, Hallberg M. Toxic impact of anabolic androgenic steroids in primary rat cortical cell cultures. *Neuroscience*. 2019;397:172-83.
94. Orlando R, Caruso A, Molinaro G, Motolese M, Matrisciano F, Togna G, et al. Nanomolar concentrations of anabolic-androgenic steroids amplify excitotoxic neuronal death in mixed mouse cortical cultures. *Brain Research*. 2007;1165:21-9.
95. Welder AA, Robertson JW, Melchert RB. Toxic effects of anabolic-androgenic steroids in primary rat hepatic cell cultures. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1995;33(4):187-95.

96. Noguti J, Pereira VG, Martins AM, D'Almeida V, Ribeiro DA. Genomic instability in blood cells from murine model of mucopolysaccharidosis type I. *J Mol Histol.* 2011;42(6):575-8.
97. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.* 1996;56(11):2488-92.
98. Miller RC. The micronucleus test as an *in vivo* cytogenetic method. *Environ. Health Perspec.* 1973;6:167-70.
99. Wahnschaffe U, Bitsch A, Kielhorn J, Mangelsdorf I. Mutagenicity testing with transgenic mice. Part 1: Comparison with the mouse bone marrow micronucleus test. *J Carcinog.* 2005;4:3.
100. Schuler M, Hasegawa L, Parks R, Metzler M, Eastmond DA. Dose-response studies of the induction of hyperdiploidy and polyploidy by diethylstilbestrol and 17 β -estradiol in cultured human lymphocytes using multicolor fluorescence in situ hybridization. *Environ. Mol. Mutagen.* 1998;31:263-73.
101. Fischer WH, Keiwan A, Schmitt E, Stopper H.. Increased formations of micronuclei alter hormonal stimulation of cell proliferation in human breast cancer cells. *Mutagenesis.* 2001;16:209-12.
102. Torres- Bugarín O, Covarrubias- Bugarín R, Zamora- Perez AL, Torres- Mendoza BMG, García- Ulloa M, Martínez- Sandoval FG. Anabolic androgenic steroids induce micronuclei in buccal mucosa cells of bodybuilders. *Brit J Sport Med.* 2007;41:592-6.
103. Huseby RA. Demonstration of a direct carcinogenic effect of estradiol on Leydig cells of the mouse. *Cancer Res.* 1980;40:1006-13.
104. Hurh YJ, Chen ZH, Na HK, Han SY, Surh YJ. 2- Hydroxyestradiol induces oxidative DNA damage and apoptosis in human mammary epithelial cells. *J. Toxicol. Environ Health.* 2004;67:1939-53.

EK 1



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 - 305

Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 05 ŞUBAT 2019 SALI
Toplantı No : 2019/04
Proje No : GO 19/124 (Değerlendirme Tarihi: 05.02.2019)
Karar No : 2019/04-32

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Sevtap Aydın DİLSİZ'in sorumlu araştırmacı olduğu, Ecz. Emre KORKMAZ'ın yüksek lisans tezi olan, GO 19/124 kayıt numaralı, "*Nandrolonun Genotoksitesitesinin Tek Hücre Jel Elektroferez Tekniği İle İn-Vitro İncelenmesi*" başlıklı proje önerisi araştırmannın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, 06 Şubat 2019-06 Şubat 2020 tarihleri arasında geçerli olmak üzere etik açıdan **uygun bulunmuştur**. Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

- | | | | |
|----------------------------------|----------|-----------------------------------|-------|
| 1. Prof. Dr. Nurten AKARŞU | (Başkan) | 9 Doç. Dr. Gözde GİRGİN | (Üye) |
| 2. Prof. Dr. Sevdâ F. MÜFTÜOĞLU | (Üye) | 10 Doç. Dr. Fatma Visal OKUR | (Üye) |
| 3. Prof. Dr. M. Yıldırım SAĞLAM | (Üye) | İZİNLİ | (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Necdet SAĞLAM | (Üye) | 11. Doç. Dr. Can Ebru KURT | (Üye) |
| 5. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN | (Üye) | 12. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL | (Üye) |
| İZİNLİ | | 13. Dr. Öğr. Üyesi Özay GÖKÖZ | (Üye) |
| 6. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL | (Üye) | 14. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR | (Üye) |
| İZİNLİ | | 15. Öğr. Gör. Dr. Meltem ŞENGELEN | (Üye) |
| 7. Prof. Dr. Oya Nilan EMİROĞLU | (Üye) | 16. Av. Meltem ONURLU | (Üye) |
| 8. Doç. Dr. M. Özgür UYANIK | (Üye) | | |

EK 2

TEZİN TAM BAŞLIĞI: NANDROLONUN GENOTOKSİSİTESİNİN TEK HÜCRE JEL ELEKTROFOREZ TEKNİĞİ İLE İN VİTRO İNCELENMESİ

ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI: EMRE KORKMAZ

DOSYANIN TOPLAM SAYFA SAYISI: 74

NANDROLONUN GENOTOKSİSİTESİNİN TEK HÜCRE JEL ELEKTROFOREZ TEKNİĞİ İLE İN VİTRO İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

| | | | |
|-------------------|---------------------|------------|------------------|
| % 19 | % 19 | % 2 | % |
| BENZERLİK ENDEKSİ | İNTERNET KAYNAKLARI | YAYINLAR | ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |

BİRİNCİL KAYNAKLAR

| | | |
|----------|--|-------------|
| 1 | www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı | % 16 |
| 2 | acikerisim.aku.edu.tr İnternet Kaynağı | % 1 |
| 3 | halter.gov.tr İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 4 | saglikcalisanisagligi.org İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 5 | www.j3.jstage.jst.go.jp İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 6 | adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 7 | es.scribd.com İnternet Kaynağı | <% 1 |



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Emre Korkmaz
Ödev başlığı: NANDROLONUN GENOTOKSİSİTE..
Gönderi Başlığı: NANDROLONUN GENOTOKSİSİTE..
Dosya adı: Emre_Korkmaz_TEZ_denticate.pdf
Dosya boyutu: 941.78K
Sayfa sayısı: 74
Kelime sayısı: 15,293
Karakter sayısı: 103,557
Gönderim Tarihi: 26-Kas-2019 04:46PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1222115481



9. ÖZGEÇMİŞ

EMRE KORKMAZ

1. KİŞİSEL BİLGİLER

| | |
|---|------------------------------|
| ADI, SOYADI: DOĞUM TARİHİ ve YERİ: | EMRE KORKMAZ 1979, MERSİN |
| HALEN GÖREVİ: Eczacı YAZIŞMA ADRESİ: Ahi Mesut Mah. 1880. Cad. No:6/10 Etimesgut TELEFON: 0537 259 05 48 E-MAIL: emrekorkmaz97@gmail.com | |

2. EĞİTİM

| YILI | DERECESİ | ÜNİVERSİTE | ÖĞRENİM ALANI |
|------|----------|----------------------|---------------|
| 2001 | Lisans | Marmara Üniversitesi | Eczacılık |

3. AKADEMİK DENEYİM

| GÖREV DÖNEMİ | ÜNVAN | BÖLÜM | ÜNİVERSİTE |
|--------------|-------|-------|------------|
| | | | |

4. MESLEKİ DENEYİM

2004-2008: Tarsus Devlet Hastanesi
2008-2012: İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü
2012-2017: Tarsus Devlet Hastanesi
2017- : Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu

5. ÇALIŞMA ALANLARI

| ÇALIŞMA ALANI | ANAHTAR SÖZCÜKLER |
|---------------|-------------------|
| | |

5. SON BEŞ YILDAKİ ÖNEMLİ YAYINLAR