

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hydroxychloroquine Sulfate Bileşiminin İn Vitro Sitogenotoksik Etkileri

Hatice YILDIZ

Biyoloji Anabilim Dalı

Haziran, 2023

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZ ONAYI

Hydroxychloroquine Sulfate Bileşiminin İn Vitro Sitogenotoksik Etkileri

Hatice YILDIZ

Biyoloji Anabilim Dalı

Bu Yüksek Lisans Tezi 16/06/2023 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Değerlendirilmiş ve Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Kabul Edilmiştir.

Jüri : Prof. Dr. Hasan Basri İLA (Danışman)
: Prof. Dr. Sadık DİNÇER
: Prof. Dr. Ahmet KAYRALDIZ

Bu Tez Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

Tez No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2020-13390

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

İÇİNDEKİLER

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VI
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	9
2.1. Quinine (Kinin) ile Yapılmış Genotoksisite ve Sitotoksisite Çalışmaları.....	9
2.2. Amodiaquine ile Yapılmış Genotoksisite ve Sitotoksisite Çalışmaları	10
2.3. Atovaquone-Proguanil ile Yapılmış Genotoksisite ve Sitotoksisite Çalışmaları.....	11
2.4. Lumefantrine ile Yapılmış Genotoksisite ve Sitotoksisite Çalışmaları	11
2.5. Mefloquine ile Yapılmış Genotoksisite ve Sitotoksisite Çalışmaları	12
2.6. Piperaquine ile Yapılmış Genotoksisite ve Sitotoksisite Çalışmaları	12
2.7. Primaquine ile Yapılmış Genotoksisite ve Sitotoksisite Çalışmaları.....	13
2.8. Chloroquine ve Hydroxychloroquine ile Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları.....	14
3. MATERYAL VE METOT	19
3.1. Materyal	19
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	19
3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları.....	31
3.2. Metot.....	34
3.2.1. Lamların Temizlenmesi	34
3.2.2. Sterilizasyon.....	34
3.2.3. Ames/Salmonella/Mikrozom (Bakteriyel Geri Mutasyon) Testi	34
3.2.4. Komet Testi (Tek Hücre Jel Elektropherez Testi / Kuyruklu Yıldız Testi).....	38
3.2.5. DNA Hasarlayıcı-Koruyucu (Radikal-Antiradikal) Aktivite Testi	44
3.2.6. Mikronukleus (MN) Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Hücrelerin Hasatı, Boyanması ve Mikroskopik İncelemeler	46
3.2.7. Toplam Oksidan Kapasite (TOK) ve Total Antioksidan Yanıt (TAY) Ölçümü	50
3.2.8. <i>In silico</i> Moleküler Kenetlenme Analizi	51
3.3. İstatistiksel Analiz.....	51
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	53
4.1. Bulgular	53
4.1.1. Ames/Salmonella Gen Mutasyonu Bulguları.....	53

4.1.2. Komet (Kuyruklu Yıldız) Bulguları.....	54
4.1.3. DNA Hasarlayıcı-Koruyucu (Radikal-Antiradikal) Aktivite Bulguları.....	55
4.1.4. Mikronukleus Bulguları	56
4.1.5. Oksidatif Stres Bulguları.....	59
4.1.6. <i>In Silico</i> (Dijital Simülasyonla) Moleküler Kenetlenme Analizi	60
4.2. Tartışma	61
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	67
5.1. SONUÇLAR.....	67
5.2. ÖNERİLER.....	67
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	83



Hydroxychloroquine Sulfate Bileşiminin İn Vitro Sitogenotoksik Etkileri

Hatice YILDIZ

Danışman: Prof. Dr. Hasan Basri İLA

Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZ

Bu çalışma hem antimalaryal, hem de immünmodülatör etkiye sahip 4-amino kinolin grubu Hydroxychloroquine Sulfate (HCQ) bileşiminin sitogenotoksik etkilerini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Çalışmalar sağlıklı insan lenfositleri ve bakteri suşlarıyla in vitro koşullarda gerçekleştirilmiştir. Ames reversiyon testi için, Salmonella typhimurium mutant oksotrofik TA98 ve TA100 suşları HCQ'nun 5, 10, 20, 40 ve 80 µg/petri konsantrasyonlarına 72 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Burada HCQ, TA98 suşunda mutajenik etki göstermemiş, TA100 suşunda ise koloni sayısında azalmaya neden olmuştur. Lenfositlerde yapılan komet testi verilerine göre test maddesi, Genetik Hasar İndeksi (GHI) ve Hasarlı Hücre Oranı (HHO) üzerine anlamlı bir etkiye sahip değildir. DNA hasarlayıcı-koruyucu aktivite testi bulgularına göre 20 ve 40 µg/mL dozlarda HCQ, pBR322 plazmid DNA üzerinde tek başına önemli bir hasarlayıcı etki göstermemiş, aksine UV+ H₂O₂ etkisine karşı olası bir koruyucu (antiradikal) potansiyelle ilgili işaretler sergilemiştir. Mikronukleus (MN) testinde HCQ bütün konsantrasyonlarda (10, 20 veya 40 µg/mL) lenfositlerde herhangi bir genotoksisite göstermemişken, özellikle yüksek dozlarda anlamlı sitotoksik etki göstermiştir. MN deneyinde ilk santrifüjden sonra alınan hücre kültürü süpernatantında spektrofotometrik olarak 590 nm dalga boyunda ölçülen Total Oksidan Kapasite (TOK) ve Total Antioksidan Yanıtı (TAY) (660 nm) üzerinden hesaplanan Oksidatif Stres İndeksinin (OSI) özellikle yüksek HCQ konsantrasyonlarında anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. In silico moleküler kenetlenme simülasyon verilerine göre HCQ ile DNA polimeraz delta, güçlü olmayan bir serbest bağlanma (Gibbs enerjisi = -5.6 kcal/mol) enerjisiyle etkileşime girmektedir. Genel bir sonuç olarak bu çalışmada HCQ belirgin bir genotoksik etki göstermemiştir ancak sitotoksik etkisi dikkat çekicidir. Bu bulgu, farklı hastalıkların tedavisinde paradigma değişimi vadetmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hydroxychloroquine Sulfate, Sitogenotoksisite, Mikronukleus testi, Komet testi, Ames testi.

In vitro Cytogenotoxic Effects of Hydroxychloroquine Sulfate Compound

Hatice YILDIZ

Advisor: Prof. Dr. Hasan Basri İLA

Department of Biology

ABSTRACT

This study was carried out to investigate the cytogenotoxic effects of the 4-amino quinoline group hydroxychloroquine sulfate (hydroxychloroquine sulfate) (HCQ) compound, which has both antimalarial and immunomodulatory effects. Studies were performed in vitro conditions with healthy human lymphocytes and bacterial strains. For the Ames reversion test, Salmonella typhimurium mutant auxotrophic TA98 and TA100 strains were exposed to HCQ concentrations of 5, 10, 20, 40, and 80 µg/petri for 72 hours. Here, HCQ did not show a mutagenic effect in the TA98 strain but caused a decrease in the number of colonies in the TA100 strain. According to the comet test data on lymphocytes, the test substance did not significantly affect the Genetic Damage Index (GHI) and Damaged Cell Ratio (HHO). According to the DNA damaging-protective activity test findings, HCQ did not show a significant damaging effect on pBR322 plasmid DNA alone; on the contrary, it showed signs of a possible protective (antiradical) potential against the effect of UV+ H₂O₂ at 20 and 40 µg/mL doses. In the micronucleus (MN) test, HCQ showed no genotoxicity in lymphocytes at all concentrations (10, 20, or 40 µg/mL) but showed a significant cytotoxic effect, especially at high doses. The Oxidative Stress Index (OSI) calculated from the Total Oxidant Capacity (TOC) and Total Antioxidant Response (TAR) (at 660 nm wavelength) measured spectrophotometrically (at 590 nm) using the cell culture supernatant taken after the first centrifugation in the MN experiment, was significantly higher, especially at high HCQ concentrations were found to decrease. According to in silico molecular docking simulation data, HCQ and DNA polymerase delta interact with weak free binding energy (Gibbs energy = -5.6 kcal/mol). As a general result, HCQ did not show a significant genotoxic effect in this study, but its cytotoxic effect is remarkable. This finding promises a paradigm shift in the treatment of different diseases.

Keywords: Hydroxychloroquine sulfate, Cytogenotoxicity, Micronucleus test, Comet assay, Ames test.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin ders döneminden itibaren tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve yazılmasına kadar her konuda bana destek olan, bilgi ve tecrübelerini gönülden paylaşan, çalışma sürecimde sabrı ve hoşgörüsü ile çalışma isteğimi arttıran, her daim samimi yardım ve desteğini gönülden hissettiğim, öğrencisi olmaktan onur ve gurur duyduğum danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hasan Basri İLA'ya en içten duygularıyla sonsuz minnetlerimi sunarım.

Genetik laboratuvarında birlikte çalıştığımız ve çok büyük yardımlarını gördüğüm laboratuvar arkadaşlarım Doktora öğrencisi Uzman Biyolog Rumeysa MEŞE'ye, Uzman Biyolog Amine HAFİS ABDELSALAM'a, Biyolog Büşra BOZ'a, Biyolog Sevgi TEKREÇ'e ve Biyolog Emin ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak çalışmama destek olan Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Tahir HÜSUNET'e şükranlarımı sunarım.

Çalışmam sürecinde verdiği moral desteğin yanı sıra, bilgi ve tecrübesi ile tezimin yazım sürecine de destek olan Dr. Ayşegül YILDIZ'a teşekkür ederim.

Çalışmama maddi destek sağlayan Bilimsel Araştırma ve Projeler birimine teşekkür ederim.

Ayrıca, başta rektörlük üst yönetimi olmak üzere Fen Bilimleri Enstitüsü ve Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeler Birimi yönetici ve çalışanlarına minnetlerimi sunarım.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1.	Beş Farklı Konsantrasyonda HCQ ile Metabolik Aktivasyon Yokluğunda Muamele Edilen <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 ve TA100 Suşlarındaki Revertant Koloni Sayısı Ortalamaları	53
Çizelge 4.2.	Üç Farklı Konsantrasyonda HCQ ile 1 saat Muamele Edilen İnsan Periferel Kan Lenfositlerinde Komet Testi Kapsamında Saptanan DNA Hasar Oranları	54
Çizelge 4.3.	Farklı Konsantrasyonlarda HCQ ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferel Kan Lenfositlerinde Hücre Başına Düşen Toplam MN %'si, MN içeren İki Nukleuslu Hücre Oranı (%MNBH) ve Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ) Değerleri.....	57
Çizelge 4.4.	Farklı Konsantrasyonlarda HCQ ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferel Kan Lenfositlerinde Toplam Oksidan Kapasite (TOK), Toplam Antioksidan Yanıt (TAY) ve Oksidatif Stres İndeksi (OSİ).....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Kinin	20
Şekil 3.2. a: Klorokin b: Hydroxychloroquine c: Kinolin halkası	20
Şekil 3.3. HCQ'in sentez aşamaları	20
Şekil 3.4. Colchicine'in açık formülü.....	22
Şekil 3.5. Cytochalasin-B'nin açık formülü	22
Şekil 3.6. Mytomycin-C'nin açık formülü	28
Şekil 3.7. <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 suşunun kontrol koloni görünümü.	37
Şekil 3.8. <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 suşunun kontrol koloni görünümü.	37
Şekil 3.9. DNA hasarına uğramış hücrede baş ve kuyruk oluşumu.	41
Şekil 3.10. Komet tekniği genel aşamaları	42
Şekil 3.11. Komet testi ile farklı seviyelerde hasara uğramış DNA'ların görüntüleri.....	43
Şekil 3.12. DNA'sı göç etmemiş (kuyuksuz=a) nükleuslar (X400).....	43
Şekil 3.13. DNA'sı göç etmiş (kuyruklu=b) nükleuslar (X400).	44
Şekil 3.14. DNA hasarlayıcı-koruyucu aktivite testi jel görüntüsü	46
Şekil 3.15. Bir nükleuslu hücreler (X400).....	49
Şekil 3.16. İki nükleuslu hücreler (X400).	49
Şekil 3.17. Üç nükleuslu hücre (X400).	50
Şekil 3.18. Dört nükleuslu hücre (X400).....	50
Şekil 4.1. HCQ'nun pBR322 plazmid DNA'sı üzerine olan zarar verici-koruyucu etkileri.....	56
Şekil 4.2. Bir mikronükleuslu binükleer hücre (10 µg/mL HCQ, 24 saat inkübasyon) (X400).	58
Şekil 4.3. İki mikronükleuslu binükleer hücre (20 µg/mL HCQ, 24 saat inkübasyon) (X400).	58
Şekil 4.4. HCQ ile 48 saat muamele edilen hücrelerde saptanan nükleus bölünme indeksi (NBI) verilerinde anlamlı konsantrasyon-etki ilişkisini gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.	59
Şekil 4.5. HCQ'nun DNA polimeraz Delta aminoasit residüleriyle yaptığı etkileşim.	61

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABTS	: 2,2'-azinobis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonate)
ATO	: Atovaquone
ATM	: Ataxia Telangiectasia Mutant kinaz
ATP	: Adenozin trifosfat
AQ-13	: ([N1-(7-kloro-kinolin-4il)-3-(N3,N3-dietilamino)propilamin] dihidroklorür trihidrat)
CHO	: Çin hamsteri (<i>Cricetulus griseus</i>) Yumurta Hücreleri
COVID-19	: Koronavirüs hastalığı 2019
CQ	: Klorokin
CYP	: Sitokrom P450 enzimleri
dk	: Dakika
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle medium
DMF	: Dimethyl formamid
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	: Enzyme Linked Immün-Sorbent Assay
EMA	: Avrupa İlaç Ajansı
epiDXR	: Epideoksorubisin
EtBr	: Etidyum Bromid
EtOH	: Etanol
FBS	: Fetal Bovine Serum
FDA	: U.S. Food and Drug Administration, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
Fe/S	: Demir/Kükürt
G	: Gram
GHİ	: Genetik Hasar İndeksi
Gy	: Radyasyon dozu birimi
h	: Saat
HB Agar	: Histidin-biyotin plakları
HBA	: Histidin-biyotin ampisilin plakları
HIF	: Hipoksi-İndüklenebilir Faktör
his+	: Histidine gereksinim duymayan suşlar
HMA	: High Melting Agar
HCl	: Hidroklorik asit

HCQ	: Hydroxychloroquine Sulfate
HHO	: Hasarlı Hücre Oranı
HNO₃	: Nitrik Asit
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
IRP/IRE	: Demir düzenleyici protein/demire duyarlı element sistemi
KA	: Kromozom Aberasyonu
KCl	: Potasyum klorür
KH₂PO₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
KKD	: Kardeş Kromatid Değişimi
KOMET	: Kuyruklu yıldız testi, Tek Hücre Jel Elektroferez testi
L	: Litre
LF	: Lumefantrine
LMA	: Low Melting Agar
LPS	: Lipopolisakkarit
M	: Molar
MDR	: Multi Drug Resistant, Çoklu İlaç Direnci
MEF	: Fare Embriyonik Fibroblastları
mg	: Miligram
MGA	: Minimal Glikoz Agar Plakları
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
MI	: Mitotik İndeks
MMC	: Mytomycin-C
MMS	: Metil metansülfonat
MN	: Mikronukleus
mRNA	: Mesenger RNA
m³	: Metreküp
NaCl	: Sodyum klorür
Na₂HPO₄	: Disodyum hidrojen fosfat
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NB	: Nutrient Broth Sıvı Kültür Ortamı
°C	: Santigrat derece
OH•	: Hidroksil radikali
OSİ	: Oksidatif Stres İndeksi
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PCE	: Polikromatik eritrosit
P-gp	: P-glikoprotein

pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritması
PK	: Pozitif Kontrol
PROG	: Proguanil hidroklorür
RA	: Romatoid artrit
RBC	: Eritrosit
RKSAO	: Revertant Koloni Sayısı Ortalaması
RNA	: Ribonukleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
rpm	: Bir dakikadaki devir sayısı
rRNA	: Ribozomal Ribonukleik Asit
SA	: Sodyum Azid Çözeltisi
SH	: Standart Hata
SLE	: Sistemik Lupus Eritematozus
SCGE	: Tek Hücreli Jel Elektroforezi
S9+	: Metabolik aktivasyon varlığında
S9-	: Metabolik aktivasyon yokluğunda
TAE tamponu	: Tris, Asetik asit, EDTA tamponu
TAY	: Total Antioksidan Yanıt
TOK	: Total Oksidan Kapasitesi
tRNA	: Transfer RNA
UV-C	: Ultraviyole- C
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
ΔG	: Serbest bağlanma enerjisi
4-NPD	: 4-Nitro-o- phenylenediamine
6TNY	: DNA polimeraz delta

1. GİRİŞ

Tabiattaki bütün canlılar çevrelerinde bulunan diğer canlı ve cansız varlıklarla denge içerisinde bulunmaktadır. Diğer canlılar gibi insanlar da hayatlarını sürdürebilmek için ihtiyaç duyduğu beslenme, barınma ve tedavi amaçlı her türlü materyali doğadan sağlamaktadır. İhtiyacı karşılamak için temin edilen bu hammaddeler doğrudan olabileceği gibi işlenerek farklı form ve saflıktaki ürünler şeklinde de kullanılmaktadır.

Mitolojide bitkilerin tanrılar tarafından insanın hizmetine sunulmuş armağanlar olarak ele alındığı, varoluşundan itibaren insanın bitkilerle ilişkisinin başladığı ve tüm bitkilerin insanın hizmetinde olduğu bildirilmiştir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011). İlk çağlardan kalan antik bulgular incelendiğinde insanların gıda temini ve hastalıkları tedavi edebilmek için bitkileri kullandıkları anlaşılmaktadır (Koçyiğit, 2005).

Anavazalı hekim ve eczacı Pedanius Dioscorides, M.S. 50-70 yıllarında yazdığı ve “De Materia Medica” adını verdiği beş ciltlik ansiklopedik eserinde tedavi amacıyla 600 adet bitkisel, 35 adet hayvansal ve 100 adet de anorganik maddelerden elde edilen droglardan (ilaç, medikal ürün) söz etmiştir (Kayıran ve ark., 2019). O günlerden günümüze gelinceye kadar bilim insanları tarafından doğal veya sentetik ilaç üretimi konusunda birçok çalışma yapılmış ve birçok yeni ilaç üretilerek kullanıma sunulmuştur.

Bu ilaçlardan biri olan ve Cinchona (Kınakına) ağacının kabuklarında bulunan “kinin” (quinine) 19.yy’a kadar antimalaryal olarak kullanılan tek alkaloiddir. Tedavi edici etkisi ilk kez 1600’lü yıllarda Peru’ya giden ve orada sıtma hastalığına yakalanan Avrupalıların, yerliler tarafından kınakına ağacı kabuklarının tozu ile iyileştirilmesi sonucunda fark edilmiştir. Daha sonra Avrupalı misyonerler bu ağacın kabuklarını Avrupa’ya dönerken yanlarında götürmüşlerdir. Sıtma hastalığı o günlerde yaygın bir hastalık olduğundan bu kabuk tozlarının kullanımı tüm kıtaya yayılmıştır. Bilim insanları 19.yüzyılda kınakına ağacının kabuğundan 25 farklı alkaloid izole etmiştir. Dünyada kinin ihtiyacı önceleri doğal yoldan karşılanırsa da çeşitli sebeplerden ötürü doğal yollardan yeteri kadar sağlanamayınca sentetik kinin üretme çalışmaları 1915 yılında Paul Ehrlich’in çabalarıyla başlamış ve II. Dünya Savaşı’ndan önce kinakrin, pamakrin ve kinin’in 4-aminokinolin türevi olan CQ’in sentezlenmesiyle sonuçlanmıştır. 1945 yılında CQ’in hidroksillenmesi ile hydroxychloroquine sulfate (HCQ) sentezlenmiş ve 1955 yılında piyasaya sürülmüştür (Bebitoğlu ve ark., 2020; Ben-Zvi ve ark., 2012; Uğur Poyraz ve Mat, 2014). Kinin, CQ ve HCQ moleküllerinin her üçünde de kinolin halkası bulunmaktadır (Bebitoğlu ve ark., 2020).

Antiinflamatuvar özellikleri nedeniyle antimalaryal ajanlar klorokin ve HCQ’in, 1950 yılından beri birçok bağ doku hastalığının tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir. Bu hastalıklar romatoid artrit, sistemik lupus eritematozis, kronik juvenil artrit, ankilozan spondilit, psoriatik artrit, palindromik romatizma, eozinofilik fasiit, juvenil dermatomyozit, Sjögren sendromu, erozif

osteoartrit, kalsiyum pirofosfat depo hastalığı, porfiria kutanea tarda, kronik ülseratif stomatit, dermatomyozit, sarkoidoz, polimorfik ışık erüpsiyönü, generalize granuloma annulare olduğu bildirilmiştir (Aslanova, 2017).

II. Dünya Savaşı sırasında profilaksi amacıyla askerlere klorokin verilmiş ve yapılan gözlemlerde inflamasyonlu artriti iyileştirdiği ve Sistemik Lupus Eritematozus (SLE) hastalığını ise hafiflettiği tespit edilmiştir. Bu gözlemler sonrasında tespit edilen immünmodülatör etkisi nedeniyle antimalaryal olarak kullanımının yanı sıra antiromatizmal olarak da kullanılmaya başlanmıştır (Ben-Zvi ve ark., 2012). Klorokinde bulunan N-dietil yan zincirinin N-hidroksietile dönüştürülmesiyle HCQ elde edilmiştir (Kumar ve ark., 2021). HCQ'in klorokinden sadece bir hidroksil grubu farklı olmasına rağmen antimalaryal ve antiromatizmal etkinliğini koruduğu ve klorokine göre daha az toksik olduğu bildirilmiştir (Ben-Zvi ve ark., 2012). Tipik olarak tekrarlayan artrit atakları ve birtakım eklem çevresi bulgularıyla karakterize olan palindromik romatizma hastalarının, romatoid artrit tedavisinde kullanılan HCQ'e cevap verdiği bildirilmiştir. Retrospektif olarak değerlendirilen toplam 113 palindromik romatizma hastasında yapılan bir çalışmada HCQ kullananlarda kronik romatizmal hastalığın kullanmayanlara göre %20 daha az oranda geliştiği raporlanmıştır (Gerek, 2019). Nadir görülen inflamatuvar bir rahatsızlık olan eozinofilik fasit tanılı bir kadın hastanın incelendiği olgu sunumunda sistemik steroid ve HCQ tedavisine hastadan çok iyi derecede pozitif yanıt alındığı bildirilmiştir (Çölgeçen ve ark., 2013). Aynı tanılı 52 hastanın değerlendirildiği bir başka çalışmada, tedavide prednizon ve HCQ arasında fark olmadığı her ikisinin de eşit derecede etkili olduğu bildirilmiştir (Lakhanpal ve ark., 1988). Kas güçsüzlüğü ve deride döküntülerle kendini gösteren sistemik bir hastalık olan dermatomyositis semptomlarının tedavisi için miyozit, immünsupresif ilaçlar ve kortikosteroidler yanıt verse de kutanöz (deri ile ilgili) hastalığa yanıt vermeyebileceği belirtilmiştir. Bu durumdaki yedi hastanın HCQ ile tedavi edildiği rapor edilmiştir (Woo ve ark., 1984). Kuru göz ve kuru ağız belirtileriyle kendini gösteren otoimmün bir rahatsızlık olan Primer Sjögren sendromlu 50 hasta ile yapılan retrospektif bir çalışmada; en az 2 yıl süresince HCQ kullanan hastalarda, tipik semptomların (kuru göz ve kuru ağız) iyileşme eğilimine girdiği, hastalardaki tükürük ve gözyaşı salgılanma hızının arttığı bildirilmiştir (Fox ve ark., 1996). Farklı bir çalışmada Granulome annulare hastalığına sahip olan 100 hasta ile yapılan bir çalışmada HCQ'in zayıf etkinlik gösterdiği belirtilmiştir (Cannistraci ve ark., 2005). Yine vücudun çeşitli yerlerinde tutunabilen inflamatuvar bir deri hastalığı olan liken planusu iyileştirme yeteneği açısından yapılan bir çalışmada, 10 hastadan dokuzunun HCQ tedavisine mükemmel yanıt verdiği bildirilmiştir (Eisen, 1993). Diskoid lupus eritematozus hastalığını iyileştirmek için etkin olan ilaçların araştırıldığı bir çalışmada Asitretin isimli ilaç ile karşılaştırılan HCQ'nun tam iyileşme açısından asitretin ile eşit derecede etkin olduğu, yan etkiler açısından değerlendirildiğinde ise HCQ'in daha az yan etkisi bulunduğu saptanmıştır (Jessop ve ark., 2017). Farklı bir çalışmada sistemik lupus eritematozus hastalığının tedavisinde en etkin ilacın HCQ olduğu bildirilmiştir (Dima ve ark., 2022).

Betacoronavirus ailesinin en son tanımlanan üyesi olan SARS-CoV-2 virüsü, koronavirüs hastalığı 2019'a (COVID-19) neden olmaktadır. Günümüzde global bir sağlık problemi haline gelen SARS-CoV-2 enfeksiyonuna henüz spesifik ve etkin bir tedavi bulunmamıştır. Bununla birlikte sıklıkla romatolojik hastalıklarda kullanılan ve içinde CQ ve HCQ'in de yer aldığı birtakım ajanların tedavide etkin olduğu kontrollü çalışmalar ile gösterilmiştir (Güler ve Babaoğlu, 2020). 2019 yılından itibaren yaşanan COVID-19 pandemi sürecinde başlangıçtan itibaren Sağlık Bakanlığı tarafından tedaviye dahil edilen HCQ pandemi sürecinin sonlarına doğru prosedürden çıkarılmıştır (Bilimsel Danışma Kurulu Çalışması, 2022).

Antimalaryal olarak keşfedilip antiromatizmal ve antiinflamatuvar etkili bir immünmodülatör olarak bazı hastalıkların tedavisinde kullanılarak insan sağlığına hizmet eden, COVID-19 pandemisi sebebiyle tüm dünyanın gündemine yerleşen HCQ için yapılan literatür taraması sonuçlarına göre, HCQ'in sitogenotoksik ve mutajenik etkilerinin akademik çalışmalara neredeyse hiç konu edilmemiş olduğu görülmüştür. Bu tespit üzerine test maddesi olarak HCQ seçilmiştir.

Yukarıda paylaşılan veriler ışığında gıda, ilaç, boya veya tekstil gibi endüstrilerde hâlihazırda kullanılan veya yeni sentezlenen maddelerin insan sağlığına olan genel ve özel/kısmi toksikodinamik etkilerinin ortaya çıkarılması son derece önemlidir. Herhangi bir kimyasal maddenin olası genotoksik ve sitotoksik risk haritasının belirlenmesi (risk analizi) için güvenilirliği global normlarca onaylanan kısa süreli genotoksisite testleri tercih edilmektedir. Kısa süreli genotoksisite testleri, bir kimyasal maddenin genotoksik/antigenotoksik ve/veya sitotoksik/proliferatif etkili olup olmadığı ve etki şiddetinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler olarak tanımlanabilir.

Bir ajanın mutasyonları indüklemesi, genleri aktif veya inaktif hale getirmesi gibi doğrudan veya dolaylı etkilerinden ötürü hücrelerin genetik bilgisine (DNA yapı, dizi, gen sayısı ve genin regülasyonundaki değişiklikler) potansiyel zarar verme kabiliyeti, genotoksisite olarak ifade edilir. DNA tamir mekanizması veya apoptoz yollarının uyarımı normal olarak hasarı onarmak veya kontrol altına almak için aktifleştirilir. Ancak eğer hasar tamir edilmeden kalırsa; sessiz mutasyonlar, kanser gibi proliferatif veya tam tersi sitotoksik etkiler ortaya çıkabilir. Genomdaki değişiklik ve/veya kararsızlıklar genellikle kalıcı ve kalıtsal olup hem somatik hücreleri hem de gelecek nesillere aktarılacak olan germ hücrelerini etkilemiş olabilir. Tüm mutajenlerin genotoksik etkiye sahip olduğu söylenebilir ancak genotoksik bileşiklerin (mutajen, kanserojen veya teratojen olabilir) her zaman mutlaka mutajenik olmadıkları bilinmelidir (Udayangani, 2019). Genotoksisite testlerinin amacı, herhangi bir ajanın hücrelerdeki genetik maddelere zarar vererek kansere veya sitotoksisiteye neden olup olmayacağını belirlemektir. Bu tür testler sayesinde, hücre şüpheli etkene maruz kaldıktan sonra ortaya çıkabilecek nokta mutasyonları, DNA iplik kopması, yapısal veya sayısal kromozomal anormallikler gibi DNA hasarlarını saptamak amacıyla bakteriyel, maya ve memeli hücrelerinde yapılabilecek çeşitli genotoksisite testleri geliştirilmiştir.

Standart *in vitro* testler; kardeş kromatid değişimi (KKD) (Tucker ve ark., 1993), kromozom aberasyonu (KA) (Carrano ve Natarajan, 1988; Hagmar ve ark., 1994), mikronükleus (MN) (Fenech, 2002; Heddle ve ark., 1991) ve tek hücre jel elektroforez (Comet) (Singh ve ark., 1988) testleridir. Perry ve Evans'ın bilinen mutajen ve kanserojenlerin Çin hamsteri (*Cricetulus griseus*) yumurta (CHO) hücrelerinde KKD ve KA'yı uyardığını saptamalarından (Perry ve Evans, 1975) sonra bu testler mutajen ve kanserojenlerin belirlenmesinde kullanılmaya başlanmıştır. Salmonella bakteriyel reverse (geri) mutasyon testi (Ames testi); basit, anlamlı ve yüksek kabul gören kısa süreli mutajenite ve antimutajenite test sistemlerinden biridir. Test ilk olarak 1971 yılında Ames tarafından geliştirilmiştir (Ames ve ark., 1973; Maron ve Ames, 1983; Zeiger, 2004).

Mikronükleus (MN) testi genotoksik kanserojenler için en başarılı ve güvenilir testlerden biri olarak kabul edilmektedir. MN'ler hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dâhil olmayan, tam kromozom (iğ, kinetokor veya sentromer hasarından dolayı) veya asentrik kromozom fragmentlerinden (DNA iplik kırılması nedeniyle) köken alan oluşumlar olarak tanımlanmaktadır.

In vitro MN testi ile hem anojenlerin hem de klastojenlerin saptanması mümkündür ve aynı anda mitotik gecikmeyi, apoptozu, kromozom kırılmasını, kromozom kaybını ve ayrılmayı tespit edebilmektedir (Kirsch-Volders ve ark., 2003; Parry ve Sors, 1993). Fenech ve Morley tarafından geliştirilen sitokinez-blok metodu kullanılarak, *in vitro* mitoz sırasında aktin inhibitörü Cytochalasin-B ilavesi ile çekirdek bölünmesini tamamlamış ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirilememiş çift veya daha fazla çekirdekli hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte ve MN bulunduran hücrelerin oranı saptanabilmektedir. Ayrıca *in vitro* MN testini iyileştirmek ve spontan veya uyarılmış MN frekansının doğru ve güvenilir olarak tespiti için sadece bir nükleer bölünmeyi tamamlamış hücrelerde skorlanması gerektiğini önermişlerdir (Fenech ve Morley, 1985, 1986).

In vitro mikronükleus testi günümüzde kimyasal madde ve farmasötiklerin genotoksitesini test etmek için uygun bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu testin en önemli avantajları:

- *In vitro* MN testi basit bir test yöntemi olup bulguların hesaplanması kolay, objektif ve hızlı olduğundan araştırmacıya yüksek bir verim sağlar,
- *In vitro* MN testi herhangi bir primer hücreye veya hücre hattına uygulanabilen bir testtir (Kirsch-Volders ve ark., 2003).

Ames Salmonella/mikrozom mutajenite testi (Ames testi), gen mutasyonlarına yol açan genetik hasar üretebilecek çok çeşitli kimyasal maddelerin tespit edilmesi için özel olarak tasarlanmış kısa süreli bir bakteriyel mutasyon testidir (Mortelmans ve Zeiger, 2000). Ames testi 1970'lerde UC-Berkeley'deki Biyokimya Profesörü Bruce Ames tarafından kimyasal bir bileşiğin

veya karışımın DNA'da mutasyonlara neden olma kabiliyetinin hızlı ve hassas bir şekilde analiz edilebilmesi için geliştirilmiştir. Bu testte canlı bir hayvan modeli kullanılmama zorunluluğu olmadığı için ucuz, kolay ve hızlıdır. 1975 yılında Dr. Ames ve meslektaşları tarafından yayınlanan çalışma, yeni kimyasalların ve ilaçların toksikolojik değerlendirmesinin ayrılmaz bir parçası olan genetik toksikolojinin stabilizasyonunda önemli bir rol oynamıştır (Ames ve ark., 1975). İlgili yayında geri mutasyon testi olan Ames Salmonella/memeli mikrosomu mutajenlik testinin gerçekleştirilmesine yönelik yöntemler tarif edilmiştir. Bu testte, test suşlarında mevcut baz çifti değişimi (nokta mutasyonu) ve çerçeve kayması mutasyonlarını geri döndüren mutasyonları tespit eden özel olarak tasarlanmış birkaç histidin mutanlığı oksotrofik *Salmonella typhimurium* suşu kullanılır. Reversiyon, bakterilerin temel bir amino asit olan histidini sentezleme işlevselliğini geri kazandırır. Bu bir bakıma atavizm fenomeni olarak ifade edilebilir.

Ames testinde kullanılan Salmonella suşları, histidin operonundaki çeşitli genlerde farklı mutasyonlara sahiptir. Bu mutasyonların her biri farklı mekanizmalarla etki eden mutajenlere duyarlı olacak şekilde tasarlanmıştır. Çeşitli maddelere karşı daha hassas olmalarını sağlamak için bu suşlara ek mutanlığı da geliştirilmiştir. Bu mutasyonlar farklı mekanizmalar yoluyla DNA hasarına neden olan mutajenler için sıcak noktalar görevi görür. Ames test suşları, eser miktarda histidin içeren minimal bir ortam agar plakası üzerinde çoğaltıldığında sadece geri mutasyonla histidine gereksinim duymayan suşlar (his+) koloni oluşturabilir. Plaka başına kendiliğinden indüklenen revertant kolonilerin sayısı nispeten sabittir. Bununla birlikte plakaya bir mutajen eklendiğinde, petri başına geri mutasyon sonucu gözlenen kolonilerin sayısı, genellikle doza bağlı bir şekilde artmaktadır (Ames ve ark. 1975). *Salmonella typhimurium*'un TA98 (çerçeve kayması mutanlığı) ve TA100 (baz çifti değişim mutanlığı) suşları Ames testinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kuyruklu yıldız (Komet), diğer adıyla tek hücreli jel elektroforez testi ökaryotik hücrelerde deoksiribonükleik asit (DNA) iplik kopmalarını ve miktarlarını saptamak için kullanılan basit bir yöntemdir. Son yıllarda komet testi veya tek hücreli jel elektroforezi, DNA hasarını değerlendirmek için yapılan genotoksikite, biyoizleme, moleküler epidemiyoloji, ekotoksikoloji ve DNA hasarı ve onarımı ile ilgili temel araştırmalarda tercih edilen standart yöntemlerden biri haline gelmiştir. Komet testi sadeliği, duyarlılığı, çok yönlülüğü, hızı ve düşük maliyeti ile öne çıkmaktadır. Ayrıca komet testinin sonuçlarını içeren yayın sayısı indekslerde her geçen gün artmaktadır. Yeni kimyasalların ve çevresel kirlenmelerin genotoksik etkisinin izlenmesi, moleküler epidemiyoloji, DNA hasarı ve onarımı ile ilgili temel araştırmalar için bu test güvenilir şekilde kullanılabilir (Collins, 2002). DNA iplik kırılmalarını doğrudan ölçmek için yapılan ilk çalışma, 1978'de Rydberg ve Johanson tarafından lamlar üzerinde agaroz içine gömülmüş ve hafif alkalik koşullar altında lizi edilmiş hücrelerle yapılmıştır. 1984 yılında Ostling ve Johanson, yukarıda açıklanan yaklaşıma dayanarak, tek hücreli jel elektroforezi (SCGE) olarak da adlandırılan kuyruklu yıldız testi geliştirdiler (Piperakis, 2009). Komet testi lizis ve elektroforezin nötr koşullar

altında yapıldığı bir testtir. DNA'nın boyanması etidyum bromid ile yapılmıştır. Deneyin sonunda elde edilen hücre görüntüsü, hasarlı veya kırık DNA parçalarından oluşan bir kuyruk ve sağlam DNA içeren kafaya sahip "kuyruklu yıldız" şeklindedir. Bunun bir sonucu olarak kuyruklu yıldız testi adı verilmiştir. Kuyruk kısmındaki serbest kalmış olan DNA miktarı, kullanılan mutajenin dozuna bağlıdır. Bununla birlikte bu prosedürde sadece çift zincirli kopmalar analiz edilebilir (Ostling ve Johanson, 1984). Bu test daha sonra iki farklı araştırma grubu (Olive ve ark., 1990; Singh ve ark., 1988) tarafından modifiye edilmiştir.

İlk araştırma grubunun yüksek alkalın koşullar altında ($\text{pH} > 13$) yaptığı elektroforez, DNA süper heliksinin gevşemesini sağlar ve elektroforez sırasında DNA'daki alkali kararsız bölgelerin aynı anda çift ve tek sarmal kopmalarının saptanmasını mümkün kılar. Bu yöntem düşük iplik kırığı seviyesini yüksek hassasiyetle ölçmektedir. İkinci grubun nötr (hafif alkalın) koşullar altında gerçekleştirdiği elektroforez ise DNA molekülündeki çift sarmal kopmalarının tespit edilmesini sağlayan bir yöntemdir. Bu nedenle Singh ve ark. tarafından geliştirilen alkalın komet test versiyonunun nötr varyanta kıyasla daha duyarlı olduğu bulunmuştur (Peycheva ve ark., 2014).

Bu tekniğin büyük faydası ve araştırmalar arasındaki hızlı yayılması sahip olduğu çeşitli avantajlardan kaynaklanmaktadır:

- Hücre hatları için uygundur.
- Geniş bir hücre yelpazesinde uygulanmıştır (birçok prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde).
- Tek hücre seviyesinde hasar tespit eder.
- Çok hassas (50–15.000 kırılma / hücre).
- Sonuçlar aynı gün elde edilir.
- Hızlı, basit ve ucuzdur.
- Non-invaziv (cerrahi işlem gerektirmeyen) bir tekniktir.
- Taze veya dondurulmuş numuneler (örnekler) için uygundur.
- Numune boyutu çok küçüktür (10.000 ila 50.000 hücre).

Yukarıda değinildiği gibi komet tekniği tek hücrede DNA iplik kopmalarını saptamak için birçok çalışmada yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunların bazıları aşağıda belirtilmiştir:

- 1) **İnsan çalışmaları:** Kuyruklu yıldız testi, radyoaktivite veya diğer zararlı prosedürlerle ön etiketleme gerektirmediği için insan araştırmaları için idealdir. Genotoksik kimyasallara veya radyasyona mesleki maruziyet de dahil olmak üzere biyo-izlemede (biyomonitorizasyonda) kullanılmıştır. Beslenme çalışmalarında diyetin DNA hasar onarımına etkileri değerlendirilebilir. Kuyruklu yıldız testi, tanıya yardımcı olma (Xeroderma pigmentosum, Nijmegen kırık sendromu) ve bireyde DNA hasar seviyelerini değerlendirmek için kullanılabilir.

- 2) **Ekolojik izleme:** Uygun organizmalar (midye, solucan, küçük kemirgenler) ile birlikte kuyruklu yıldız testi, çevrenin genotoksinlerle kontaminasyonunu ölçmek için biyosensör olarak kullanılabilir.
- 3) **Genotoksisite testi:** Kuyruklu yıldız testi kimyasalların veya farmasötiklerin güvenliğini değerlendirmek için standart bir test olarak kullanılmaktadır.
- 4) **DNA onarımının tahmini:** Hücresel düzeyde onarım kapasitesinin ölçülmesinde bu teknik kullanılabilir. Alternatif olarak hücre ekstraktının onarım kapasitesi bir *in vitro* analizde değerlendirilebilir (Piperakis, 2009).

Komet yönteminde hasarsız hücrelerin (lenfosit) incelemesinde bozulmamış yuvarlak kenarları daha az yoğun olmak üzere ortası (çekirdek) parlak bir ışık görünümü vardır. Bu hücrelerin görünümü göç etmemiş (nonmigrate) olarak değerlendirilir. Eğer DNA hasarı oluşmaya başlamışsa normalde düzgün kenarlı olan görüntü DNA kırıklarının çekirdek dışına göçünün de başlaması nedeni ile düzensiz kenarlı bir görünüm alır (low migration). Hasar arttıkça lenfositler kuyruklu yıldız (high migration) şeklini alırlar. Hasarda son aşama apoptozdur. Hasarın şiddetine göre merkezden kenara doğru uzama olur. Bu kuyruk uzunluğu hasar ile doğrudan ilişkilidir. Ayrıca kuyruktaki floresan yoğunluğu da hasarın derecesi ile paralellik gösterir (Fairbairn ve ark., 1995).

DNA parçalayıcı veya koruyucu aktivite için, pBR322 gibi plazmid DNA ve Ultraviyole-C (UV-C) yöntemi kullanılmaktadır. Metabolizmada ortaya çıkan en etkili radikallerden biri hidroksil (OH•) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) radikalidir. Bu radikaller reaktif özelliklerinden dolayı DNA'nın yapısında kalıcı hasara neden olabilir (Gutteridge ve Halliwell, 2000). H₂O₂ varlığında plazmid DNA'nın UV ışınlanması, süper sarmal DNA'nın yarılmasına, dairesel formdaki DNA'nın açılmasına ve lineer formların her iki zincirinde bir veya daha fazla parçalanmaya neden olmaktadır (Tepe ve ark., 2011). DNA zincirindeki parçalanmaların bir sonucu olarak genetik bozukluklar gelişebilir. Geri dönüşümsüz DNA hasarı karsinogenez, yaşlanma ve diğer dejeneratif hastalıklara neden olabilir (Good ve ark., 1996; Halliwell, 1994). Test maddesinin (HCQ) DNA hasarlayıcı veya koruyucu etkisini ortaya çıkarabilmek için çalışmada pBR322 plazmid DNA hem test maddesinin doğrudan kendisine hem de oksidatif stresin neden olduğu hasarlara karşı DNA'yı koruma aktivitesini belirlemek için oksitleyici ajandan (H₂O₂ ve UV) sonra kullanılmaktadır (Russo ve ark., 2000).

Ekzogen kimyasallar, fiziksel kaynaklar ve insan vücudundaki endojen metabolik süreçler, yüksek derecede reaktif oksijen türleri (ROS) üretebilir. Kontrolsüz ROS üretiminin fazla olması, hücrede oksidatif stresin tetiklenmesine yol açar. Bu da hücre hasarına ve homeostatik dengenin bozulmasına yol açar ve sonuçta bir dizi insan hastalığına neden olur. Lipidler, DNA ve proteinler ROS'un vücuttaki ana hedefleridir (Lobo ve ark., 2010). ROS kaynaklı oksidatif hasara karşı koruyucu aktivite gösteren ekzogen ve endojen bileşiklerin etkilerini test etmek için çeşitli analizler

geliştirilmiştir. DNA koruyucu aktivite testi ve total oksidan kapasite ve total antioksidan yanıt (TOK ve TAY) testleri bu analizler içinde değerlendirilebilir.

Hücre kültürü ortamındaki aselüler fazın total oksidan kapasite (TOK) ve total antioksidan yanıtı (TAY), hücrelerin maruz kaldığı oksidatif stres etkisi hakkında fikir vermektedir. TOK ölçümü, hidrojen peroksit kullanılarak kalibre edilir. Oksidan varlığında reaksiyon ortamındaki kitte yer alan divalent demirin (Fe^{+2}) trivalent demire (Fe^{+3}) okside olması beklenir. Oksidasyon reaksiyonunun yoğunluğu, oksidanların varlığına bağlı olarak artar. Trivalent demir (Fe^{+3}) iyonu asidik bir ortamda renkli bir kompleks oluşturur. Renk yoğunluğu spektrofotometrik (590 nm) olarak ölçülür. Absorbans değeri numunedeki oksidan değerini gösterir. Elde edilen sonuçlar TOK değerini belirlemek için $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eşdeğeri/L ile karşılaştırılmaktadır (Tarpey ve ark., 2004).

Test maddesinin yarattığı antioksidan yanıtı (TAY) belirlemek için ticari olarak temin edilebilen kitler kullanılır. Numunedeki antioksidan ajanlar, koyu mavi-yeşil ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonate)) radikalini indirgeyerek renginin ağarmasına neden olur. Rengin 660 nm'deki absorbansındaki değişiklik numunenin TAY seviyesini gösterir (Halliwell, 1994).

Oksidatif stres indeksi (OSI):

Oksidatif stres indeksi (OSI), oksidatif stres seviyesinin bir göstergesidir ve aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$OSI = \frac{\text{TOK } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ eşdeğeri/L}}{\text{TAY mmol Trolox eşdeğeri/L}}$$

Farklı konsantrasyonlarda test maddesinin numunelerindeki oksidatif stres seviyesi, total antioksidan ve total oksidan değer ölçümlerini takiben hesaplanır (Ulas ve ark., 2013).

Bu çalışma, ticari olarak satın alınan HCQ bileşiğinin sitogenotoksik ve mutajenik etkilerinin olup olmadığını saptamak amacıyla planlanmıştır. Çalışmada test ortamı olarak sağlıklı ve gönüllü dört kişiden (iki kadın ve iki erkek) alınan kültüre edilmiş periferik kan lenfositleri ile mikronukleus (MN) testi, bir kadın ve bir erkekten alınan kandan izole edilen lenfositler ile tek hücre jel elektroforez (Komet) testi, *Salmonella typhimurium* mutant suşları (TA98 ve TA100) ile geri mutasyon testi (Ames testi) ve çıplak plazmid DNA (pBR322) üzerine olan radikal veya antiradikal etkileri araştırılmıştır. Ayrıca total oksidan kapasitesi (TOK) ve total antioksidan yanıt (TAY) verileri değerlendirilerek oksidatif stres indeksleri (OSI) saptanmıştır. Çalışmada yapılan bütün deneyler Çukurova Üniversitesi, Fen ve Edebiyat Fakültesi, Biyoloji ABD Genetik Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan Hydroxychloroquine Sulfate (HCQ) bileşiği, sıtma tedavisinde kadim bir kullanım geçmişi olan kininin 4-amino kinolin türevi olan klorokinin hidroksillenmesi ile sentetik olarak üretilmiştir (Bayram, 2015; Bebitoğlu ve ark., 2020). İkinci Dünya Savaşı yıllarında sentezlenen ve o yıllardan bu yana antimalaryal ve antiromatizmal bir ilaç olarak geniş bir kullanım alanı bulan HCQ ajanının sitogenotoksik etkisiyle ilgili çok az sayıda çalışma yapıldığı tespit edilmiştir. Mevcut test ajanı molekülle olan benzerliği göz önüne alınarak chloroquine (CQ) hakkında yapılan sitotoksosite ve genotoksosite (gen mutasyonları ve kromozom anormallikleri) çalışmaları da bu bölümde derlenmiştir.

2.1. Quinine (Kinin) ile Yapılmış Genotoksosite ve Sitotoksosite Çalışmaları

Kinin hidroklorürün dört farklı test sistemi kullanılarak genotoksik aktivite açısından test edildiği çalışmada Ames test sisteminde nokta mutasyonları için hiçbir gösterge gözlenmemiştir. Kinin, Çin hamsterlerinde hiçbir genotoksik aktivite göstermezken, kendilenmiş fare suşlarında doza bağımlı bir KKD artışı, mikronükleus sıklığında artış ve yüksek kromatid kırılmaları ortaya çıkarmıştır (Münzner ve Renner, 1983).

Kinin ajanının üreme toksikolojisi ve klastojenik etkiler açısından değerlendirildiği bir çalışmada dişi fareler çiftleşme öncesinde sırasıyla 1,5 mL/kg/gün, 3,0 mL/kg/gün veya 4,5 mL/kg/gün kinin dozlarına 28 gün süresince maruz bırakılarak sonrasında, yetişkin fertil erkeklerle çiftleşmeye bırakılmıştır. Elde edilen plesantal indeks verilerine göre kinin maruziyetinin üreme kapasitesini önemli ölçüde değiştirmedeği ancak insan dozunun üç katı daha yüksek konsantrasyonda fetal ağırlıkta azalma gözlenmiştir ($p < 0.05$). Mikronükleuslu polikromatik eritrositlerin ortalama sayısı açısından ise kontrol ve fitoterapötik preparat arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p > 0,05$) (Do Amaral ve ark., 2014).

Sitotoksosite ilgili eski tarihli bir çalışmada, yaygın olarak kullanılan bir antimalarya ajanı olan kininin, *in vitro* antrasikline dirençli DHD/K12 sıçan kolon kanseri hücrelerinde epideoksorubisinin (epiDXR) sitotoksitesini arttırdığı, öte yandan kinin ajanının, antrasiklin güçlendirmesi için kinidin veya verapamilden biraz daha az etkili olduğu görülmüştür (Chauffert ve ark., 1990). Benzer bir çalışmada iyi tanımlanmış çoklu ilaç direncine sahip (MDR) insan lösemik hücre dizisi olan K562/ADM'nin doksorubisin direncini tersine çevirme ve sitotoksosite yaratma sürecinde kinin formiatın etkinliği araştırılmıştır. O çalışmada kültür ortamında her iki ilaç da aynı konsantrasyonda kullanıldığında, ADM alımı ve sitotoksosite yaratmada verapamile göre kinin biraz daha az etkili bulunmuştur (Solary ve ark., 1991). Çoklu doymamış yağ asitleri dahil olmak üzere farklı yağ asitleri ile hazırlanan kinin türevlerinin aktivitesi yağ asil grubunun doymuş veya doymamış olmasına bağlı olmadığı ve de kinin türevlerinin meme tümörü hücre hattı FM3A'ya karşı kininin kendisine göre önemli ölçüde daha yüksek sitotoksosite gösterdiği belirtilmiştir

(Kumura ve ark., 2005). Sıtmanın terapötik tedavisinden dolayı iyi bilinen doğal bir alkaloid olan kinin, antiapoptotik protein B hücreli lenfoma (BCL-2)'nin inhibisyonu ve proapoptotik faktör BCL-2 ile ilişkili X proteininin aktivasyonu yoluyla HeLa ve A549 tümör hücre hatlarında belirgin bir antiproliferatif ve proapoptotik etki sergilemiştir. Burada kinin, Thr-308 ve Ser-473'te fosforilasyonunu inhibe ederek ve lipopolisakarit (LPS) kaynaklı proliferasyonu tersine çevirerek Protein kinase B'nin LPS kaynaklı aktivasyonunu inhibe etmiştir (Liu ve ark., 2016). Kininden sentezlenen 13 cinchona (kınakına) alkaloid organokatalizörün test edildiği çalışmada türevlerin *in vitro* antikanser aktivitesinin belirlenmesi için MES-SA ve Dx5 tipindeki rahim sarkom hücre hatlarına karşı taranarak P-glikoprotein (P-gp) aracılı MDR'nin üstesinden gelme potansiyelleri araştırılmıştır. P-gp inhibitörü tariquidar varlığında yapılan sitotoksisite çalışmaları, birkaç analogun, özellikle tiyosikaramidin dışındaki cinchona aminleri ve squaramidlerin, P-gp tarafından MDR hücrelerinden atıldığını göstermiştir. Yerleşik P-gp inhibitörü kininine benzer şekilde, 6 kınakına analogunun kalsein-AM akışını engellediği dolayısıyla sitotoksisitenin arttığı gösterilmiştir. İlginç bir şekilde, kinin ve didehidrokinin, çoklu ilaca dirençli Dx5 hücrelerine karşı marjinal olarak artmış bir toksisite sergilemiştir. MDR hücre hattının kollateral duyarlılığı, cinchona tiosquaramide ajanı Cu (II) asetat ile birleştirildiğinde daha belirgin hale gelmiştir. Bu sonuçlara göre kınakına türevlerinin iyi antikanser adaylar olduğu vurgulanmıştır (Pósa ve ark., 2022).

2.2. Amodiaquine ile Yapılmış Genotoksisite ve Sitotoksisite Çalışmaları

İçinde amodiaquine (amodiakin)'in olduğu üç farklı sıtma önleyici ilacın karşılaştırmalı mutajenik ve genotoksik etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada yapılan Ames mutajenite testi (TA97a, TA100, TA102 ve TA104 suşlarında) ve farelerin kemik iliği hücrelerinde *in vivo* kardeş kromatid değişimi (KKD) ve kromozom aberasyonu (KA) bulguları irdelenmiştir. Bakteriyel mutajenite deneylerinin sonuçları, Salmonella suşları TA97a ve TA100'de hem S9 karışımı ile hem de S9 karışımı olmaksızın ve TA104'te sadece S9 karışımı ile üç ilacın çok zayıf bir mutajenik etkisi olduğunu göstermiştir. Ayrıca *in vivo* KKD ve KA deneylerinin sonuçları, bu üç ilacın farelerin kemik iliği hücrelerinde genotoksik olduğunu göstermektedir (Chatterjee ve ark., 1998). Farklı bir çalışmada Amodiaquine ajanına ilaveten sulphadoxine-pyrimethamine kombinasyon terapisinin İsviçre deney farelerinde hepatotoksik olduğunu açıkça göstermiştir (Mishra ve ark., 2011). Amodiakinin epigenetik profili üzerine yapılmış yakın tarihli bir çalışmada (Espinoza ve ark., 2019), rRNA transkripsiyonunu doza bağlı bir şekilde inhibe ettiği bilinen FDA (ABD Gıda ve İlaç Dairesi) onaylı antimalarial ilaç amodiakinin RNA polimeraz I'in (Pol I) katalitik alt biriminin bozulmasını tetikleyerek ribozomun büyük alt birim proteinlerine (RPL5/RPL11) bağlı p53'ü stabilize ederek aktivasyonunu sağladığı ortaya çıkmıştır. Bu etki çerçevesinde Pol I susturulması, DNA hasarı olmadığında ve ardından rRNA transkripsiyonunun ATM'ye bağlı

inhibisyonu olmaksızın gerçekleşir. O çalışmanın sonuçlarına göre amodiakinin neden olduğu otofaji inhibisyonu ile rRNA transkripsiyonunun inhibisyonu arasında net bir ilişki bulunmamıştır. Bu sonuç iki bağımsız antikanser mekanizmasını akla getirmektedir.

2.3. Atovaquone-Proguanil ile Yapılmış Genotoksisite ve Sitotoksisite Çalışmaları

Bir hidroksinaftokinon olan Atovaquone, sıtma parazitinin mitokondriyal solunum zincirini seçici olarak hedef alan bir anti-parazit ilaç olup bu çalışmada insan periferik kan lenfositlerine yönelik sitogenotoksik potansiyeli değerlendirilmiştir. Çalışma çıktılarına göre lenfosit canlılığının tedaviden sonra etkilenmediği, bu da atovaquone'un verilen konsantrasyonlarda sitotoksik olmadığına işaret etmektedir. Alkalın komet deneyi ile insan periferik kan lenfositlerinde muameleden sonra komet parametrelerinde önemli bir değişiklik meydana gelmediği gösterilmiştir. S9 metabolik aktivasyonunun eklenmesiyle test edilen parametrelerde herhangi bir anlamlı fark bulunmamıştır. Bu sonuç; atovaquone'un ya hiç metaboliti olmadığını ya da test edilen konsantrasyonlarda toksik olmadığını göstermiştir (Dinter ve ark., 2013). *Plasmodium falciparum* sıtmasının önlenmesi ve tedavisi için sabit kombinasyonu kullanılan Atovaquone (ATO) ve proguanil hidroklorür (PROG) antimalaryal ajanlarının insan lenfositlerinde sebep olduğu olası sito/genotoksik potansiyel ve bundan sorumlu olası mekanizmanın belirlenmesi için yapılan çalışmada; hücre ve DNA'ya zarar veren etkiler, hücre canlılığı ve alkali kuyruklu yıldız testleri ile oksidatif stres potansiyeli ise malondialdehit ve glutatyon seviyelerinin ölçülmesiyle değerlendirilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre ATO/PROG kombinasyonunun oksidatif stres üzerinde hiçbir etkisi olmaksızın insan lenfositlerine karşı yalnızca zayıf sito/genotoksik potansiyel sergilemiştir. Zarar verici etkilerin kilit kısmının S9 metabolik aktivasyonundan sonra indüklendiği göz önüne alındığında, PROG'un ana metaboliti olan sikloguanil'in en büyük etkiye sahip olduğu varsayılabilirliği belirtilmiştir (Dinter ve ark., 2015). Yine proguanil'in *in vitro* insan lenfositlerinde canlılık ve DNA bütünlüğü üzerine etkisinin değerlendirildiği çalışmada plazma konsantrasyonlarından elde edilen iki farklı proguanil konsantrasyonu (130 ng/mL veya 520ng/mL) metabolik aktivasyon varlığında veya yokluğunda kullanılmıştır. Lenfositlerin canlılığı zamanla ve doza bağlı olarak azaldığı ve kuyruklu yıldız tahlil parametreleri de benzer etkiler gösterdiği rapor edilmiştir. Ancak kardeş kromatid değişimlerinin sıklığı, kontrol örneklerinden anlamlı bir sapma göstermemiştir (Gajski ve ark., 2010).

2.4. Lumefantrine ile Yapılmış Genotoksisite ve Sitotoksisite Çalışmaları

Dünya çapında sıtmaya karşı kombinasyon terapilerinde kullanılan artemisinin bazlı bir aril-amino alkol antimalaryal ilaç olan lumefantrine (LF), 60, 80 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında DNA kırılmalarının sayısı ve nükleer tomurcukların sıklığını önemli ölçüde artırmıştır. Mikronukleus oluşumunun sıklığı da LF işlemlerinden sonra artmış, ancak bu sadece 80 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında önemli bulunmuştur. Bununla birlikte LF, nükleoplazmik

köprülerin frekansını veya nükleer bölünme indeksini önemli seviyede etkilememiştir. *In silico* 3D analizi, LF'nin -7.2 kcal/mol'lük tahmini bir bağlanma afinite enerjisiyle DNA küçük oluk yüzeyi ile kovalent olmayan bir şekilde etkileşime girebileceğini göstermiş olup *in vitro* olarak insan lenfositlerinde klastojenik etkilere sahip olduğunu göstermiştir (de Lucca ve ark., 2015).

2.5. Mefloquine ile Yapılmış Genotoksisite ve Sitotoksisite Çalışmaları

Antimalarial ajan Mefloquine (Meflokin) mutajenitesinin saptanması amacıyla *Salmonella typhimurium* pKM101 plazmiti içeren suşları ile pEB017 ve pKM101 plazmitlerini içeren *Escherichia coli* WP₂ trp ve WP₂ uvrA test suşları kullanılarak yapılan çalışmanın sonuçlarına göre pEB017 ve pKM101 plazmitlerinin varlığı, meflokinin mutajenitesinin saptanmasını artırmıştır. Mikrozoal enzimler ile aktive olan meflokin, tartışmasız bir şekilde baz çifti süstitüsyonu mutajenitesini ortaya çıkarmıştır. Bakteriyel genotoksisite testlerine göre meflokinin genel olarak genotoksik olmadığı ancak klorokin fosfat ile aynı potansiyel mutajenik etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Akerle ve Obaseiki-Ebor, 2002). Farklı bir çalışmada meflokin'in sitotoksik ve genotoksik etkilerini araştırmak amacıyla erkek farelerle yapılan çalışmada; mitotik indeks, hücre döngüsü kinetiği ve kemik iliği hücrelerinde kromozomal hasarların sıklığı, spermatozoidlerde translokasyon sıklığı ve spermde baş ve kuyruk anomallikleri gibi parametreler değerlendirilmiştir. Çalışmanın çıktıları yüksek dozda meflokin mitotik indekste azalmaya neden olarak doz-yanıt ilişkisini düşündürmektedir. Muameleden sonraki birinci ve üçüncü haftada, mitotik aktivitede, kontrolün mitotik indeksine yaklaşan kayda değer bir iyileşme gözlenmiştir. Kromozom gapları (boşlukları), kırılmalar ve fragmentler dahil olmak üzere kromozomal anomallikler yüksek meflokin dozu ile artmıştır. Spermatozoidler ve sekonder spermatozoidler ajana orta derecede duyarlıyken birincil spermatozoidler daha duyarlı olduğu ve spermatogonianın, meflokin'nin her iki dozuna da oldukça duyarlı olduğu saptanmıştır (El-Habit ve Al-Khamash, 2012).

2.6. Piperazine ile Yapılmış Genotoksisite ve Sitotoksisite Çalışmaları

2020 yılı dünya sağlık örgütü (WHO) verilerine göre; piperakin ve dihidroartemisinin, *in vitro* ve *in vivo* testlere göre genotoksik/klastojenik değildir. Herhangi bir karsinogenite çalışması yapılmamıştır. Piperazine, sıçanlarda ve tavşanlarda malformasyona neden olmamıştır. 80 mg/kg ile tedavi edilen dişi sıçanlarda yapılan bir perinatal ve postnatal gelişim çalışmasında bazı hayvanlarda yenidoğan ölümlerine neden olan bir doğum gecikmesi olmuştur. Normal doğum yapan dişilerde, hayatta kalan neslin gelişimi, davranışı ve büyümesi, rahimde veya süt yoluyla maruz kalmanın ardından normal olduğu bulunmuştur. Dihidroartemisinin ve piperakin kombinasyonu ile üreme toksisitesi çalışması yapılmamıştır (WHO, 2020). Avrupa İlaç Ajansı'nın (EMA) resmi web sitesi tarafından piperazine'in, *in vitro* ve *in vivo* testlere dayanarak genotoksik/klastojenik olmadığı raporlanmıştır. Ancak karsinogenite çalışmaları yapılmadığı için

bu maddenin kansere neden olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Ayrıca piperakin, sıçanlarda ve tavşanlarda malformasyona neden olmamıştır. Perinatal ve postnatal gelişim çalışmasında (segment III) 80 mg/kg ile tedavi edilen dişi sıçanların bazılarında yavru ölümüne yol açan doğum gecikmesi görülmüştür. Normal doğum yapan dişilerde ise yavruların gelişimi, davranışı ve büyümesi, rahim içi veya süt yoluyla maruz kaldıklarında normal düzeyde olduğu gözlenmiştir (CHMP, 2011). Sıçan ve tavşanda embriyofetal etkinin araştırıldığı bir çalışmada piperakin fosfatın, fetal maruziyet varlığında bile tolere edilen maksimum dozda teratojenik olmadığı belirtilmiştir. Benzer şekilde piperakin fosfatın hamilelikte süt verme işlevini ve yavru gelişimini etkilemediği ancak nedeni bilinmeyen doğum gecikmesine neden olabileceği ifade edilmiştir. Başka sıtma ilaçlarıyla karşılaştırıldığında, sadece meflokin'in piperakin'e benzer sonuçlar verdiği yönünde görüş bildirilmiştir (Longo ve ark., 2012).

2.7. Primaquine ile Yapılmış Genotoksisite ve Sitotoksisite Çalışmaları

FDA verilerine göre primaquine ile hiçbir karsinogenite ve doğurganlık çalışması yapılmamıştır. Primaquine literatürde zayıf bir genotoksik ajan olarak bildirilmiş olup hem gen mutasyonlarına, hem kromozomal hasara hem de DNA zincir kırıklarına neden olduğu açıklanmıştır. Yayınlar, bakteriler kullanılarak yapılan *in vitro* reversiyon mutasyon testlerinde (Ames testi) ve kemirgenler kullanılarak yapılan *in vivo* çalışmalarda (fare kemik iliği hücresi kardeş kromatid değişimi, fare kemik iliği hücresi kromozom anormalliyi vb) elde edilen genotoksisite verileri, insanlarda primaquine uygulamasıyla ortaya çıkan genotoksisite riskine işaret etmektedir. Üreme toksikolojisi ile ilgili literatür verilerinde, ajanın neden olduğu embriyo-fetal gelişim toksisitesi tanımlanmıştır. Sıçanlarda yapılan çalışmalarda fetüs üzerinde teratojenik etkiler gözlenmiştir. Yüksek doz seviyeleri hemen hemen tüm vakalarda gebe dişilerin ölümüne neden olurken, daha düşük doz seviyeleri maternal toksisiteye neden olmuştur. Uygulanan sezaryen sırasında, orta doz seviyesinde embriyo resorpsiyonu (erimesi), fetüsün hayatta kalma oranı ve vücut büyüklüğünde azalma, iç organlarda anormallikler (hidrosefali, organların yer değiştirmesi gibi) ve iskelet farklılıklarında artışlar görülmüştür (FDA ve cder, 2017). İçinde primaquine (primakin)'in olduğu üç farklı sıtma önleyici ilacın karşılaştırmalı mutajenik ve genotoksik etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada yapılan Ames mutajenite testi (TA97a, TA100, TA102 ve TA104 suşlarında) ve farelerin kemik iliği hücrelerinde *in vivo* kardeş kromatid değişimi (KKD) ve kromozom aberasyonu (KA) bulguları irdelenmiştir. Bakteriyel mutajenite deneylerinin sonuçları, Salmonella suşları TA97a ve TA100'de hem S9 karışımı ile hem de S9 karışımı olmaksızın ve TA104'te sadece S9 karışımı ile primakin'in çok zayıf bir mutajenik etkisi olduğunu göstermiştir. Ayrıca *in vivo* KKD ve KA deneylerinin sonuçları, bu üç ilacın farelerin kemik iliği hücrelerinde genotoksik olduğunu göstermektedir (Chatterjee ve ark., 1998).

2.8. Chloroquine ve Hydroxychloroquine ile Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları

HCQ'in memeli üzerindeki sitogenotoksik ve mutajenik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada öncelikle HCQ ile uzun süreli tedavi gören romatoid artrit (RA) hastalarının kanındaki HCQ düzeyinin 0.75 mg/L (yaklaşık olarak 2.23 $\mu\text{Mol/L}$) seviyesine ulaşabileceği ifade edilmiştir (Cunha ve ark., 2018). Sonuçlarının enzim bağlantılı immünosorbent deneyi (ELISA) ile belirlendiği bir çalışmada 5 ve 25 μM konsantrasyonlarda HCQ ile muamele edilen primer fare embriyonik fibroblastlarında (MEF'ler) oksidatif DNA hasarının bir göstergesi olan 8-oxodG üretiminin önemli ölçüde indüklendiği (sırasıyla $P=0.020$ ve $P=0.029$) gösterilmiştir. Ayrıca yine bu ilacın 25 μM dozuyla muamele edilen primer veya kendiliğinden ölümsüzleştirilmiş Big Blue® MEF'lerde sırasıyla 2,2 veya 1,8 kat artışlara sebep olarak HCQ'nun önemli mutajenitesini ortaya çıkarmıştır (Besaratina ve ark., 2021).

Chatterjee ve ark. (1998), klorokin (CQ) dahil üç farklı antimalaryal ajanın mutajenik ve genotoksik etkilerini karşılaştırmışlardır. Yapılan Ames mutajenite testinde CQ farklı konsantrasyonlarda (0,1, 1, 10, 100, 1000, 5000 veya 10000 $\mu\text{g/petri}$) olmak üzere TA97a ve TA100 suşlarına uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre CQ hem metabolik aktivasyon (S9+) varlığında hem de metabolik aktivasyon olmaksızın (S9-) revertant koloni sayısını zayıf ama önemli oranda arttırdığını ancak S9+ ortamında mutajenik etkinin daha az olduğu rapor edilmiştir. TA102 suşunda S9 olsun ya olmasın CQ ile test edilen konsantrasyonların tamamında revertant koloni sayısında önemli bir değişiklik gözlenmediği ancak TA104 suşu ile yapılan deneyde ise S9+ ortamda revertant koloni sayısında zayıf ama önemli bir artış gözlendiğini bildirmişlerdir (Chatterjee ve ark., 1998). CQ'in genotoksisitesini araştırmak için *Salmonella typhimurium* TA97 ve TA102 suşları ile yapılan bir çalışmada, TA97 suşunda 25 veya 50 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında revertant koloni sayısında artışa neden olduğu, dolayısıyla CQ'in çerçeve kayması mutasyonuna aracılık ettiği ancak TA102 suşunda ise etkili olmadığı bildirilmiştir (Obaseiki-Ebor ve Obasi, 1986). Farklı bir çalışmada *Salmonella typhimurium* suşları TA100 ve TA98, CQ'in 10, 100, 500, 1000 veya 5000 $\mu\text{g/petri}$ dozları ile muamele edilmiştir. Deney sonuçlarına göre CQ TA100 üzerinde S9(-) ortamda zayıf mutajenik etki gösterdiği ancak TA98 suşu üzerinde ise S9 varlığında veya yokluğunda herhangi bir mutajenik etki göstermediği bildirilmiştir (Kumar ve ark., 2013). Benzer bir çalışmada klorokin difosfat ile *Plasmodium falciparum*'un CQ dirençli suşlarına karşı etkili bir aminokinolin antimalaryal ilaç olan AQ-13 ([N1-(7-kloro-kinolin-4il)-3-(N3,N3-dietilamino)propilamin] dihidroklorür trihidrat) ajanı, *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli*'de bakteriyel mutajenez ve L5178Y fare lenfoma mutajenezini ile sıçan kemik iliğinde mikronukleus indüksiyonu açısından değerlendirilmiştir. Belirlenen sonuçlara göre CQ, TA98'de S9- ortamda, AQ-13 ise TA1537 suşunda hem S9+ ve hem de S9- ortamda revertant koloni sayısında küçük ama istatistiksel artışlara neden olmuştur. Öte yandan hem CQ hem de AQ-13 ajanları L5178Y hücrelerinde metabolik aktivasyondan bağımsız şekilde revertant koloni sayısında artış sağlamadığı değerlendirilmiştir. Sıçan kemik iliği ile yapılan deneyler sonucunda ise CQ

verilen erkek ve dişi sıçanlarda ve AQ-13 verilen dişilerde polikromatik eritrositlerin (PCE) kırmızı kan hücrelerine (RBC) oranında istatistiksel olarak anlamlı olmayan hafif düşüşler gözlenmiştir. Ayrıca CQ veya AQ-13'ün herhangi bir doz seviyesinde mikronukleuslu PCE sıklığında artışa yol açmadığı rapor edilmiştir (Ricchio ve ark., 2001). Oral yolla 4 gün boyunca 15 mg/kg konsantrasyonunda CQ alan CD1 erkek farelerindeki ortalama mikronukleus sayısının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde arttığı ($P < 0.05$) saptanmıştır (Rivera ve ark., 2014).

Chloroquine'in (CQ) DNA'da tek veya çift iplik kırıkları oluşturması üzerinden genotoksik etki potansiyeli sıçan karaciğer hücrelerinde kuyruklu yıldız deneyi ile araştırılmıştır. Deneyin sonucunda 0–1000 $\mu\text{mol/L}$ CQ, sıçan karaciğer hücrelerinde doza bağlı olarak DNA zinciri kırılmalarına neden olduğu ve kırılmanın doza bağlı olarak önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir. İlaveten 100–500 $\mu\text{mol/L}$ CQ ile muamele edilen sıçan karaciğer hücrelerindeki pürin ve pirimidinlerde oksidasyonun indüklendiğine dair kanıtlar bulunmuştur. Bununla birlikte hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) temizleyicisi olan N-asetilsistein ve yerleşik bir demir şelatör olan deferoksamin ile muamelesi, sırasıyla CQ kaynaklı iplik kırılmalarını ve baz oksidasyonunu önemli ölçüde azaltmıştır (Farombi, 2006). Benzer bir çalışmada (Giovannella ve ark., 2015) Wistar sıçanlarında CQ ve primaquin'in 7, 14 ve 21 günlük uygulaması sonrasında beyin, karaciğer ve böbrek üzerindeki oksidatif DNA hasar olguları araştırılmıştır. Sıçanlara anılan süre boyunca intraperitoneal yoldan 10 mg/kg konsantrasyondaki CQ solüsyonundan verilmiştir. Muamele süresi sonunda CQ'in 7 ve 14 gün uygulamasının böbrekte, 14 ve 21 gün uygulamasının ise karaciğerde DNA hasarına neden olduğu bildirilmiştir. Çin hamsteri akciğer fibroblastı (V79) hücre hattı ile yapılan bir *in vitro* çalışmada klastojenite kaynaklı MN oluşumundaki aksiyon modu irdelemesinde topoizomeraz II aktivasyonu araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre CQ'in DNA topoizomeraz II enzimini inhibe ederek DNA interkalasyonuna sebep olabileceği bildirilmiştir (Snyder ve Arnone, 2002).

Farklı bir *in vivo* çalışmada CQ'in 12,5, 25 ve 50 mg/kg konsantrasyonlarına maruz bırakılan farelerin kemik iliği hücrelerinde önemli düzeyde KKD frekansı saptanmasına rağmen KA yüzdesinde artış sadece 100 mg/kg dozda saptanmıştır. Mitotik İndekste (MI) tespit edilen azalmanın (sitotoksitenin) ise sadece en yüksek konsantrasyonda olduğu rapor edilmiştir (Chatterjee ve ark., 1998). Farklı bir çalışmada CQ'nun genotoksik etkisi beyaz fareler *in vivo* KA, MN ve sperm başı anormallik parametreleri kullanılarak değerlendirilmiştir. CQ farelere 10, 20 ve 30 mg/kg konsantrasyon olacak şekilde akut doz ve bir kez de 3x10 mg/kg (toplam 30 mg/kg) subakut doz şeklinde intraperitoneal olarak verilmiştir. CQ, belirli koşullarda kemik iliği hücrelerinde hem MN hem de KA'yı indüklemiş, ayrıca CQ uygulamasını takip eden 24. saatte ve 21. günde sperm başı anormallik sıklığında önemli bir artışa neden olmuştur. Ayrıca ön muamele olarak yapılan C vitamini, CQ tarafından indüklenen KA, MN ve sperm başı anormallik sıklığını azaltmıştır. CQ ile birlikte radyasyon etkilerinin değerlendirildiği çalışmada, uygulanma öncesi veya sonrası düşük radyasyon dozlarına (0.5 Gy) maruz kalmanın somatik hücrelerde çok az

mutajenik etkiye neden olduğu veya hiç olmadığı ortaya çıkmıştır. Buna karşın CQ tedavisi ile birlikte radyasyona maruz kalan grupta tedavinin 21. gününde sadece CQ verilen gruplara kıyasla sperm başı anormallik sıklığında önemli bir artışa neden olduğu bildirilmiştir. Sonuçta araştırmacılar tarafından CQ'in, memeli hücrelerinde genotoksisiteyi indüklemeye potansiyeli olduğu, ve eşey hücrelerinin, somatik hücrelere göre daha duyarlı olabileceği rapor edilmiştir (Das Roy ve ark., 2008).

Fare merkezi sinir sistemindeki immün hücreler olan mikroglial BV-2 hücre hattı üzerinde hem FBS (Fetal Bovine Serum) varlığında, hem de yokluğunda CQ ve HCQ, sitotoksisite ve ROS etkileri açısından değerlendirilmiştir. Çalışmada DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) ortamında 24 saat boyunca hem FBS varlığında, hem de yokluğunda 5 µM, 10 µM ve 25 µM konsantrasyonlarda CQ ve HCQ'e maruz bırakılan murin mikroglial BV-2 hücrelerinin canlılıklarında düşüş gözlemlendiği, bu düşüşün FBS içermeyen ortamda daha yüksek olduğu, bu nedenle test maddelerinin FBS içermeyen ortamda koruyucu etkisinin olmadığı rapor edilmiştir. CQ ve HCQ'in etkileri birbiri ile karşılaştırıldığında ise murin mikroglial BV-2 hücreleri üzerinde FBS yokluğunda CQ'in HCQ'e göre daha yüksek sitotoksisite gösterdiği bildirilmiştir. Yapılan ileri tetkiklerde, 10 µM CQ'in FBS yokluğunda erken apoptozu arttırdığı, her iki test maddesinin 25 µM konsantrasyonları tarafından ise erken apoptozun indüklendiği bildirilmiştir (Račková ve Csekés, 2022). Farklı bir derleme çalışmada, CQ'nun mutajenik, genotoksik ve DNA hasarlarına neden olduğu ve bu durumun genomik kararsızlığı indüklediği ancak HCQ'in genotoksisitesi üzerine yeterli çalışma olmaması nedeniyle HCQ'nun mutajenik ve genotoksik etkilerinin yeterince bilinmediği ifade edilmiştir (Giri ve ark., 2020).

Michael ve Williams (1974) kültüre alınmış sıçan karaciğer hücrelerinde metil metansülfonat (MMS)'in neden olduğu DNA hasar onarımının CQ tarafından önemli ölçüde azaltıldığı, bu sayede MMS öldürücülüğünün artırıldığı ortaya çıkmıştır. Bu etkinin ise protein sentez inhibisyonundan kaynaklanmayabileceği belirtilmiştir (Michael ve Williams, 1974). Shalumashvili ve Sigidin (1976), insan lenfositleriyle yaptıkları çalışmada, G1 veya G2 evrelerinde kültüre eklenen 15 µg/mL konsantrasyonunda CQ'nun kromozom aberasyon düzeyine etki etmediğini, buna karşın 60 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda hücrelerin mitotik aktivitesinin neredeyse tamamen baskılandığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte G2 aşamasında 100 µg/mL konsantrasyonda kromozom sapmalarını yüksek düzeyde arttırdığı rapor edilmiştir (Shalumashvili ve Sigidin Ya., 1976). Çoğu interkalasyona neden olan sekiz mutajen madde ile Çin hamsteri yumurtalık hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada CQ'nun kullanım dozu arttıkça MN ve KKD frekansını arttırdığı bildirilmiştir (Sudharsan Raj ve Heddle, 1980). Benzer bir çalışmada CQ'nun antimalaryal dozunun sıçan karaciğer hücrelerinde DNA hasarını ve p53 ile ilişkili olarak apoptozu indükleyip indüklediğinin araştırıldığı çalışmada CQ'in DNA hasarına yol açtığı ve sıçan karaciğer hücrelerinin apoptozunu zamana bağlı bir şekilde indüklediği rapor edilmiştir. Bu çalışmada CQ uygulamasından sonra p53 ekspresyonunun zamana bağlı olarak arttığı, dolayısıyla

ajanın antimalaryal dozunun sıçan karaciğer hücrelerinde DNA hasarını ve buna bağlı apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Mohamed, 2005).

CQ tedavisinden sonra aplastik anemi geliştiren üç hastanın incelendiği bir çalışmada hastalardan ikisinin uzun süre yüksek dozda CQ tedavisi aldığı ve sonrasında hastalardan birinin akut miyeloblastik lösemi geliştirdiği, üçüncü hastanın ise sadece küçük bir doz CQ aldığı ve ilacın alınmasından üç hafta sonra aplazi ile pansitopeni geliştirdiği raporlanmıştır (Nagaratnam ve ark., 1978). Malarya tedavisinde yaygın olarak kullanılan ajanların deoksiribonükleik aside güçlü şekilde bağlanarak mutagenezi önlediğini kabul eden çalışmalar mevcuttur. Böyle bir çalışmada Wistar sıçanlarında transplasental uygulanan etilnitrozoüre sayesinde indüklenen sinir sisteminin karsinogenezi üzerindeki antimalaryal ajanların olası kemoprotektif etkisi incelenmiştir. Deney grubu, doğum öncesi prenatal etilnitrozoüre maruziyetinden sonra kronik olarak klorokin ile tedavi edilen sıçanlardan oluşmuştur. Kontrollerle karşılaştırıldığında, tümör insidansında anlamlı bir fark gözlenmemiş ancak klorokin ile muamele edilen sıçanlarda ($P < 0.02$) erken tümör büyümesi gözlenmiştir. Bu farklılıklar çoğunlukla omuriliğin ependimomalarının hızlı gelişiminden kaynaklanmıştır. Sonuçlar, klorokinin uzun vadede sinir sisteminde yüksek neoplazm insidansına yol açan etilnitrozoüre tarafından DNA'da indüklenen yapısal değişiklikleri önlemediğini göstermektedir. Tersine bu çalışmada incelenen CQ, etilnitrozoürenin ependimal hücreler üzerindeki kanserojen etkileri azaltma yerine teşvik ettiği yönünde emareler mevcuttur (Reyes ve ark., 2001). Benzer bir çalışmada CQ verilen Mısır kurbağalarının (*Bufo regularis*) % 14'ünde ve primaquin verilenlerin % 19'unda tümör oluşumu tespit edilmiştir. CQ ve primaquin birlikte uygulandığında tümör insidansının % 23.5' yükseldiği bildirilmiştir. Tümör oluşumunun CQ uygulanan kurbağalarda karaciğerde (lenfosarkom) ve primaquin uygulananlarda ise böbrekte (histiyositik sarkom) olduğu tespit edilmiştir. Her iki ilacın birlikte uygulandığı kurbağalarda ise karaciğer, akciğer, böbrek ve mesanede tümör geliştiği ve tüm tümörlere histiyositik sarkom teşhisi konulduğu bildirilmiştir (El-Mofty ve ark., 1992).



3. MATERYAL VE METOT

Tamamı *in vitro* koşullarda yapılan bu çalışmada test maddesi olarak tıpta immünmodölatör olarak tedavi amacıyla kullanılan %98 saflıktaki HCQ (Acros Organics CAS: 747-36-4) deneyde kullanılmak üzere ticari olarak temin edilmiştir. MN testi için gönüllü olarak donör olmayı kabul eden, 18-22 yaşları arasında, sigara, alkol ve ilaç kullanmayan sağlıklı iki kadın ve iki erkekten, komet testinde aynı özelliklere sahip bir kadın ve bir erkekten alınan heparinize edilmiş periferik kan kullanılmıştır. Ames testi için *Salmonella typhimurium* LT2 atasal (prototrof) suşundan *in vitro* mutasyonlarla geliştirilmiş oksotrof TA98 ve TA100 suşları kullanılmıştır. DNA hasarlayıcı veya koruyucu (radikal/antiradikal) aktivite testi için ticari olarak satın alınan pBR322 plazmid DNA'sı, TOK ve TAY deneyleri için MN deneyinde inkübasyon süresi (68 saat) sonunda yapılan birinci santrifüj işleminden sonra alınan süpernatant kullanılmıştır. Çalışmada kurgulanan deneysel çalışmaların tamamı Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulunun 06.10.2020 tarih, 105 no'lu toplantı ve 59 no'lu kararı ile alınan onay çerçevesinde gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Hydroxychloroquine Sulfate (HCQ) (Test Maddesi)

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan %98 saflıktaki HCQ bileşiği Acros Organics firmasından (AC263010250 barkotlu, CAS: 747-36-4) ticari temin yoluyla alınmıştır. Kinin (Şekil 3.1), CQ (Şekil 3.2.a) ve HCQ (Şekil 3.2.b) moleküllerinin her üçünde de kinolin halkası (Şekil 3.2.c) bulunmaktadır (Bebitoğlu ve ark., 2020). Kinolin, bir benzen ve bir piridin halkasının birleşmesi ile sentezlenmiştir. HCQ molekülü, hetero halkalı bir bileşik olan kinolinin türevidir (Bayram, 2015; Bebitoğlu ve ark., 2020). HCQ'in sentez basamakları Şekil 3.3'te gösterilmiştir.

HCQ'in bağırsaktan emiliminin oldukça hızlı olduğu bildirilmiştir (Collins ve ark., 2018). HCQ yaklaşık 1-2 aylık bir yarılanma ömrüne ve 1300 saat civarında ortalama kalış süresine sahiptir (Cutler ve ark., 1988). CQ'den daha polar ve daha az lipofilik olan HCQ'in hücre membranlarına difüzyonunun daha zor olduğu bildirilmiştir (Bebitoğlu ve ark., 2020). Vücuda alınan HCQ'in yaklaşık olarak %60'ı değişmeden kalırken yaklaşık %40'ı ise karaciğerde sitokrom P450 (CYP) enzimlerinin etkisiyle desetilklorokin ve bisdesetilklorokin adı verilen iki metabolite dönüştürölmektedir (Giri ve ark., 2020).

Katalog bilgilerine göre; HCQ kristal formda, PBS'de ~5 mg/ml (pH 7.2) ve EtOH, DMSO ve DMF'de eser miktarda çözünen katı bir maddedir (Cayman Chemical - Hydroxychloroquine, 2023).

Formül adı: 2-[[4-[(7-chloro-4-quinolinyl)amino]pentyl]ethylamino]-ethanol, monosulfate

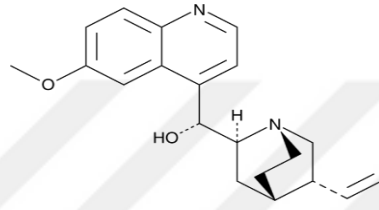
Molekül formülü: C₁₈H₂₆ClN₃O•H₂SO₄

Molekül ağırlığı: 434 g/mol

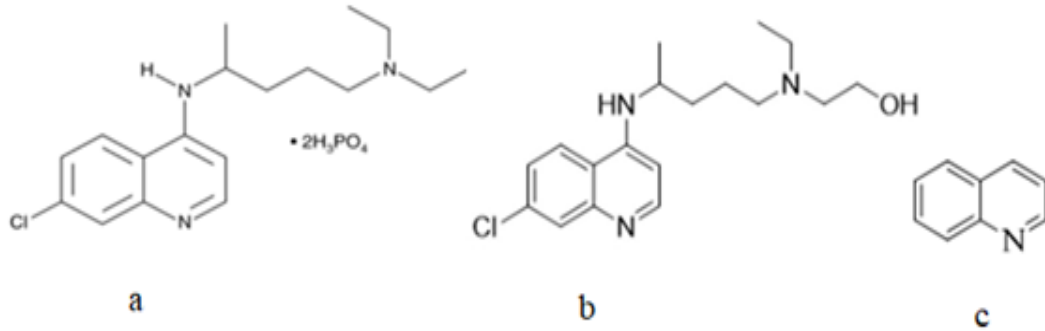
Molekül yapısı: Katı, kristal

Çözünürlük: PBS’de ~5 mg/ml (pH 7.2) ve EtOH, DMSO ve DMF’de eser miktarda

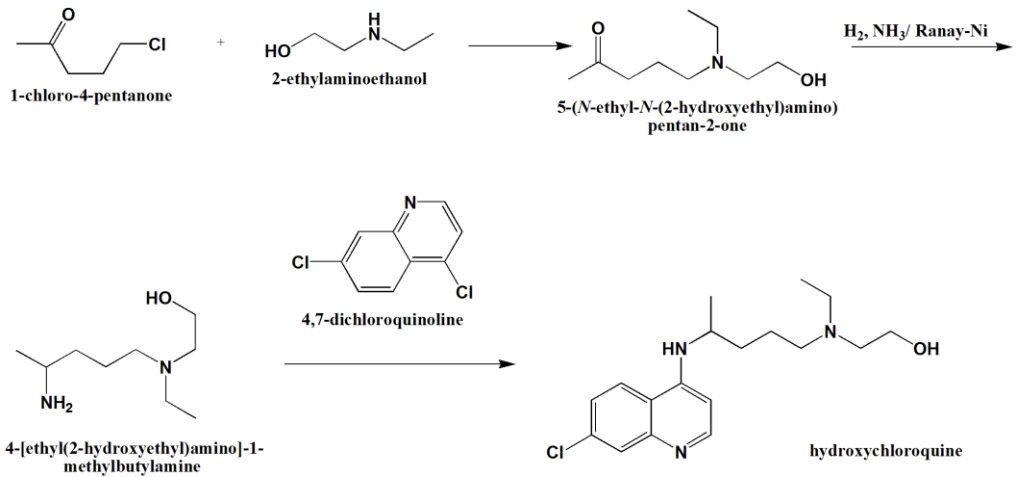
Dünyada ticari olarak satılan birçok formu bulunan HCQ, Türkiye Sosyal Güvenlik Kurumu geri ödeme kapsamında bulunan ilaçlar listesinde mevcuttur. Etken maddesi HCQ olan Plaquenil adlı preparat Sanofi firması tarafından üretilerek reçeteli şekilde eczanelerde satılmaktadır (titck.gov.tr, 2023).



Şekil 3.1. Kinin (Cayman Chemical - Quinine, 2023)



Şekil 3.2. **a:** Klorokin (Cayman Chemical - Chloroquinine, 2023), **b:** Hydroxychloroquine (Ni ve ark., 2022), **c:** Kinolin halkası (Bayram, 2015).



Şekil 3.3. HCQ’in sentez aşamaları (<https://gpatindia.com>, t.y.)

Agaroz jel (%1)

Test maddesinin neden olduğu DNA hasarlayıcı-koruyucu (radikal-antiradikal) aktivite deneylerinde elektroforez işlemleri sırasında DNA molekülünün (pBR322 plazmidi) yürütüldüğü (koşturulduğu) hareket ortamı olarak kullanılmıştır. 1 gr agaroz, 100 mL 1X Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tampon içinde çözünene kadar ısıtılmış ve 60-70°C sıcaklığa gelince 5 µL SafeView™Classic (Cat#G108) DNA boyası eklenmiştir. Hazırlanmış jel elle tutulur sıcaklığa gelince tarakları yerleştirilmiş tanka dökülmüş ve jelin donması beklendikten sonra taraklar çıkartılmıştır.

Ampisilin Çözeltisi (%0.8 Ampisilin / 0.02 N NaOH)

Ames testinde *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının ampisiline dirençlilik davranışı test suşlarının kontrolü amacıyla kullanılmıştır.

0.02 N NaOH Hazırlanışı:

250 mL için;

0.2 g NaOH distile su ile 250 mL'ye tamamlanır.

Hazırlanışı:

	<u>100 mL için Ampisilin solüsyonu için;</u>
Ampisilin Trihidrat	0.8 g
0.02 N NaOH	100 mL

0,8 g Ampisilin Trihidrat, 0.02 N NaOH solüsyonu içerisinde çözdürülmüş ve sterilizasyon için 0.22 µm çaplı membran filtreden geçirilmiştir. Ampisilin solüsyonu filtre yöntemi ile steril edildiğinden deneye başlamadan önce solüsyonun saklanacağı kap (beher ya da mavi kapaklı şişe) otoklavda steril edilmiş ve hazırlanan solüsyon +4°C'de saklanmıştır.

Biyotin Çözeltisi (%0.13)

Genotip kontrolü ve histidin-biyotin agar (HBA) plakların hazırlanmasında kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

	<u>100 mL için</u>
D-Biyotin	0.13 g
Distile Su	100 mL

D-Biyotin 100 mL suda kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülmüş, otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilerek +4°C'de saklanmıştır.

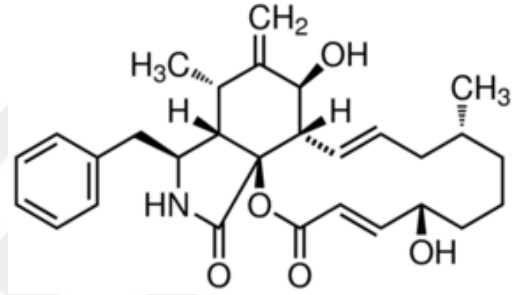
Bromofenol Boyası

Jel yükleme boyası olarak kullanılmaktadır. Plazmid DNA'nın agaroz jeldeki hareketi bu boyanın varlığında anlaşılır.

Colchicine (CAS: 64-86-8)

Ticari olarak temin edilen Colchicine mitotik indeks testinde iğ ipliklerinin oluşumunu engelleyerek hücre bölünmesini metafaz evresinde durduran mitotik bir zehir olarak kullanılmıştır. Colchicine eriyiği, steril saf su içerisinde hazırlanmış ve kromozom mediumun her mL'sinde 0.06 µg olacak şekilde (0.06 µg/mL) 2.7 mL'lik kromozom mediumu içerisindeki hücre kültürüne ilave edilmiştir.

Kimyasal Adı	: Colchicine
Kapalı Formülü	: C ₂₂ H ₂₅ NO ₆
Molekül Ağırlığı	: 399.4
Etil Asetat İçeriği	: %3.4
Kloroform İçeriği	: < %0.1
Sigma No	: C-9754

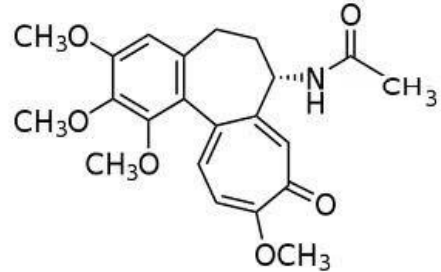


Şekil 3.4. Colchicine'in açık formülü

Cytochalasin-B (CAS: 14930-96-2)

Mikronukleus (MN) testinde sitokinezi engellemek ve iki veya daha fazla nukleuslu hücrelerin meydana gelmesini sağlamak amacı ile kullanılmıştır. Cytochalasin-B solüsyonu, çözeltinin konsantrasyonu 6 µg/mL olacak şekilde %50'lik alkol içerisinde çözdürülerek hazırlanmıştır. 5 mg Cytochalasin-B, yaklaşık 6173 µL %50'lik etanol çözeltisinde çözdürülerek, her bir tüpe (2.7 mL) 20 µL verilir. Böylece her bir tüpün 1 mL'sine 6 µg Cytochalasin-B verilmiş olur.

Kimyasal Adı	: Cytochalasin-B
Kapalı Formülü	: C ₂₉ H ₃₇ NO ₅
Molekül Ağırlığı	: 479.61 g/mol
Erime Noktası	: 218-223°C
Kaynama Noktası	: 218-223°C
Saflik Düzeyi	: %98



Şekil 3.5. Cytochalasin-B'nin açık formülü

Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (CAS: 67-68-5)

Ames testinde TA98 suşu için pozitif kontrol olarak kullanılan 4-Nitro-o-phenylenediamine (4-NPD) hazırlanmasında çözücü olarak dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma Cat. No: 8418) kullanılmıştır. Ayrıca komet deneyinde lysing çözeltisinin bileşeni olarak da kullanılmıştır.

Kimyasal Adı	: Dimethyl Sulfoxide (DMSO)
Saflık Düzeyi	: \geq %99,9
Kapalı Formülü	: C ₂ H ₆ SO

Elektroforez Tamponu

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

Entellan (CAS: 25608-33-7, Cat No: 7961)

Lam ile lamelin birbirine daimi olarak yapıştırılmasında kullanılan bir tutkaldır. Reçine kökenli ve tolüen solventli, ksilen ile çözülebilen, kuruduktan sonra hava kabarcığı oluşturmayan, iyi kapama sağlayan şeffaf ve akıcı bir sıvıdır. Hazırlanan lam preparatlarını daimi hale getirmek için kullanılmıştır.

Etidium Bromid (EtBr) (Cas: 1239-45-8)11.

Bir floresan boya olan EtBr komet testinde DNA’nın boyanması amacıyla kullanılmıştır. Bunun için EtBr’den 1 mg alınıp üzerine 10 mL saf su ilave edilerek son konsantrasyon 100 µg/mL olacak şekilde stok çözeltisi hazırlanmıştır.

Etil Alkol (CAS. 64-17-5)

Deneylerin birçok aşamasında yüzey ve araç-gereçlerin dezenfeksiyonu için %70’lik etil alkol kullanılmıştır.

Fiksatif

Mitotik indeks testi yapılan preparasyonda, 1 hacim glacial asetik asidin 3 hacim metanol ile karıştırılması sonucu hazırlanmış olan alkol bazlı Carnoy fiksatifi kullanılmıştır.

MN incelemek için yapılan preparasyonda ise iki farklı fiksatif kullanılmıştır:

1. **Fiksatif 1:** 1 hacim glasiyal asetik asit, 5 hacim metanol ve 6 hacim %0,9 NaCl (1/5/6=glasiyal asetik asit / metanol / %0,9'luk NaCl) karıştırılarak hazırlanmıştır.
2. **Fiksatif 2:** 1 hacim glasiyal asetik asit ve 5 hacim metanol'ün (1/5=glasiyal asetik asit/metanol) karıştırılması ile elde edilmiştir. Fiksatifler kullanılmadan iki saat önce hazırlanmış ve kapalı cam bir şişede +4°C'de muhafaza edilmiştir. Preparat yapım işleminden iki saat önce taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır.

Fosfat Tamponu (Phosphate Buffer Saline, PBS)

Komet testinde hücre kültürü için PBS tamponu kullanılmıştır.

Giemsa (Merck)

İlk defa Alman mikrobiyolog Gustov Giemsa tarafından keşfedilmiş olup hücrelerin renklendirilmesini sağlamak amacı ile kullanılmıştır. Giemsa boyası, adenin-timin yoğunluğunun yüksek olduğu DNA bölgelerine bağlanır.

Sorensen tamponu içerisinde %5'lik olacak şekilde ve filtre edilerek hazırlanan boya eriyiği, Mitotik indeks deneyinde kromozomları ve MN testinde nukleusları boyamak için kullanılmıştır.

Glasiyal Asetik asit (CAS No: 64-19-7)

Mitotik indeks ve MN testinde fiksatif hazırlamak için kullanılmıştır.

Glikoz Çözeltisi (%20)

Ames deneyinde Minimal agarlı ortamlarda karbon kaynağı olarak kullanılmıştır.

20 g glikoz tartılıp 100 mL distile su eklenerek hazırlanan karışım berraklaşana kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve +4°C'de saklanmıştır.

Hidrojen Peroksit (H₂O₂, CAS: 7722-84-1)

Komet ve DNA hasarlayıcı/koruyucu aktivite deneylerinde hidrojen peroksit pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Komet deneyi için % 0,21 H₂O₂ kullanılmaktadır. H₂O₂'nin bekletilmesinden doğabilecek olumsuz etkileri önlemek amacıyla her komet testinde taze olarak hazırlanmıştır. DNA koruyucu aktivite deneyinde ise pozitif kontrol olarak H₂O₂'in %10'luk çözeltisi kullanılmıştır.

Hipotonik Eriyik

Mikronukleus deneyinde hipotonik eriyik olarak %0,4'lük KCl kullanılmıştır. Eriyik bidistile su içerisinde stok halinde hazırlanarak kapalı cam bir kap içerisinde +4°C'de saklanmıştır. Her preparasyon işleminden yaklaşık 3 saat önce yeterli miktarda hipotonik eriyik alınarak 37±1°C'lik inkübatörde istenilen sıcaklık olan 37°C'ye kadar bekletilip kullanılmıştır.

Histidin/Biyotin Plakları (HB Agar)

Ames testinde kullanılan suşların histidin gereksinimi kontrolünde kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

	<u>1000 mL için</u>
Agar	15 g
%20 Glikoz	100 mL
50xVB Tuzu	20 mL
Histidin HCl.H ₂ O	10 mL
0.5 mM Biyotin	6 mL
Distile Su ile	1000 mL'ye tamamlanır

Agar ve su karıştırıldıktan sonra otoklavda 121°C ve 1,2 atm basınç altında 15 dk steril edilmiştir. 45°C'ye kadar soğutulup (yaklaşık 20-30 dk) %20 glikoz, 50xVB tuzu ve histidin çözeltileri eklenmiştir. Solüsyonun biraz daha soğuması beklendikten sonra biyotin eklenerek karıştırılmıştır. Her birinde 25 mL olacak şekilde petri kutularına dökülerek kendi halinde donması beklenmiş ve +4°C'de saklanmıştır.

Histidin/Biyotin (HB) Solüsyonu (0.5 mM)

Oksotrof TA98 ve TA100 bakteri suşları histidin eksikliğinde üreyemediklerinden ortama konan çok az miktardaki Histidin/Biyotin solüsyonu bakteri suşlarının birkaç bölünme geçirmelerine imkân tanır ve böylece kullanacağımız bakterilerin his⁻ mutasyonunu taşıyıp taşımadığının anlaşılmasına olanak sağlar. Ames mutajenite deneyinde 2 mL top agara 0.2 mL Histidin/Biyotin solüsyonu eklenerek kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

	<u>250 mL için</u>
D-Biyotin (F.W. 247.3)	0.0309 g
L-Histidin-HCl (F.W. 191.7)	0.024 g
Distile Su ile	250 mL'ye tamamlanır

Belirlenen miktar ve hacimdeki biyotin solüsyonu suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözdürüldükten sonra histidin ilave edilerek otoklavda 121°C'de 15 dk veya 0.22 µm membran filtre ile steril edilmiş ve +4°C'de saklanmıştır.

Histidin/Biyotin/Ampisilin Plakları (HBA)

Ames deneyinde suş kontrolü amacıyla yapılan ampisiline dirençlilik testi ve master plak hazırlanmasında kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

	<u>1000 mL için</u>
Agar	15 g
50xVB Tuzu	20 mL
%20 Glikoz	100 mL
Histidin HCl.H ₂ O	10 mL
0.5 mM Biyotin	6 mL
(%0,8/0.02 N NaOH) Ampisilin	3150 µL
Distile Su ile	1000 mL'ye tamamlanır

Agar ve su otoklavlanarak 45°C'ye kadar soğutulup %20 glikoz, 50xVB tuzları ve histidin bu sıcak solüsyona eklenip karıştırılmış, daha sonra biyotin ve ampisilin de eklenerek her petri kabında 25 mL olacak şekilde aktarılmıştır. Bu plaklarda bakteriler +4°C'de 2 ay saklanabilmektedir.

Histidin Çözeltisi (%0,5)

Ames deneyinde genotip kontrolü ve master plakların hazırlanmasında kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

	<u>100 mL için</u>
L-Histidin-HCl (F.W.191.7)	0.5 g
Distile Su ile	100 mL'ye tamamlanır

Karıştırılarak çözdürüldükten sonra otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilmiş ve +4°C'de saklanmıştır.

HMA (High Melting Agar, CAS: 9012-36-6)

HMA komet testinde lamaların kaplanması amacıyla kullanılmıştır. Deneyden bir gün önce 0,65 gr HMA, 100 mL distile suda ısıtılarak çözülmüştür. Deneyde kullanılacak olan rodajlı (etiketli) lamaların tek tarafı hazırlanan HMA agarla kaplanmış ve doğal bir şekilde kuruması beklendikten sonra bu işlem ikinci defa tekrarlanmıştır.

Kromozom Mediumu (Gibco PB Max, Cas. No. 12557-013)

Hücre kültürü için Gibco firmasının ürettiği kromozom mediumu kullanılmıştır. Bu medium her tüpe 2.5 mL olacak şekilde paylaştırılmıştır. Enjektöre 1/10 oranında heparin çekilerek istenilen miktarda kan alınmış ve mediuma ilave edilmiştir.

Lizis Çözeltisi

Bu çözelti komet testinde lysing solüsyonunun bir bileşeni olarak kullanılmıştır.

Lizis solüsyonu;

- 2.5 M NaCl (Merck CAS No: 1.06404)
- 10 µM EDTA (Sigma CAS No: 6381-92-6)
- 10 mM Tris (Merck CAS No: 77-86-1)

Bileşenlerinden oluşmuştur. Bu kimyasallar uygun oranlarda tartıldıktan sonra üzerine 270 mL saf su konup bir erlen içerisinde ısıtılarak çözülmüş ve soğuma işlemi gerçekleştirildikten sonra 10M NaOH ile pH'ı 10'a ayarlanmıştır. Kullanılmak üzere oda sıcaklığında saklanmıştır.

LMA (Low Melting Agar, CAS: 39346-81-1)

LMA komet testinde hücrelerin sandviç modeli gibi agara gömülmesi amacıyla kullanılmıştır. Bunun için LMA agardan 0.065 gr tartılıp 10 mL saf su içerisinde kaynatılmıştır. Hücrelerin agarla karıştırılması işleminde agarın el yakmayacak sıcaklıkta olmasına özen gösterilmiştir.

Lysing Çözeltisi

Bu çözelti komet testinde nükleer DNA'daki hasar boyutunu belirlemek için çıplak DNA'nın elde edilmesi işleminde kullanılmıştır.

Lysing solüsyonu;

- 3 mL Triton X (Merck CAS No: 9036-19-5)
- 30 mL DMSO (Carlo ERBA CAS No: 67-68-5)
- 267 mL lizis çözeltisi kullanılarak son hacmi 300 mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Bir gün önceden hazırlanarak + 4 °C'de saklanmıştır.

Metanol (CAS: 67-56-1)

Mikronukleus deneyinde fiksatif hazırlamak için kullanılan bileşenlerden birisidir.

Minimal Glikoz Agar Plakları (MGA)

Mutajenite deneylerinde kullanılan bakteri suşlarının kendiliğinden geri dönen koloni sayılarının saptanması amacı ile kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

	<u>1000 mL için</u>
Agar	15 g
50xVB tuzları	20 mL
%20 Glikoz	100 mL
Distile Su ile	1000 mL'ye tamamlanır

Yukarıda yazıldıkları sıra ile distile suya ilave edilerek son hacimlerine tamamlanmış ve hazırlanan karışım otoklavda 121°C’de 15 dk steril edilmiştir. 45°C’ye kadar soğutulan bu karışım petri kaplarına 25 mL olacak şekilde dağıtılmıştır.

Mytomycin-C (CAS: 50-07-7)

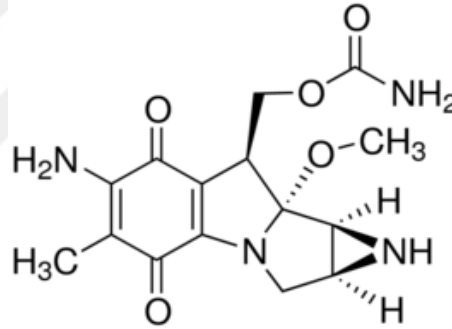
Mytomycin-C (MMC), mitotik indeks ve mikronukleus testlerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Stok çözelti; 2 mg Mytomycin-C, 30 mL steril destile su içerisinde çözdürülerek hazırlanmıştır. Her bir tüpe son konsantrasyonu 0.25 µg/mL olacak şekilde 10 µL içerisinde verilmiştir.

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

Kapalı Formülü : C₁₅H₁₈N₄O₅

Molekül Ağırlığı : 334.33 g/mol

Erime Noktası : >360°C



Şekil 3.6. Mytomycin-C'nin açık formülü

Nitrik Asit (HNO₃ Cas. No. 7997-37-2)

Kuvvetli bir asit olan nitrik asit sitogenetik çalışmalarda lamaları temizlemek amacı ile 1 N çözelti olarak hazırlanmaktadır. Kapalı plastik bir kapta saklanarak, tekrar tekrar kullanılmıştır.

4-Nitro-o-phenylenediamine (4-NPD, CAS: 99-56-9)

Ames testinde TA98 bakteri suşu için metabolik aktivasyon yokluğunda pozitif kontrol olarak 20 µg/petri konsantrasyonunda kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

	<u>10 mL için</u>
4-NPD	0.02 g
DMSO ile	10 mL'ye tamamlanır

DMSO'da çözdürülerek, oda sıcaklığında ve karanlık ortamda saklanmıştır. Deneyde kullanılan pozitif kontrol (4-NPD) 1/10 oranında seyreltilmiştir. Bu seyreltilen çözeltiliden petri başına 100 µL ilave edilmiştir.

Nötralizasyon Tamponu

Komet testinde elektroforezden çıkan preparatlarda pH dengesini sağlamak amacıyla kullanılmıştır. 0.4 M Tris (CAS: 77-86- 1) alınıp üzerine 300 mL saf su eklenmiştir. Daha sonra HCl ile çözeltinin pH'ı 7.5'e ayarlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

Nutrient Broth Sıvı Kültür Ortamı (NB)

Test suşlarının gecelik kültürde üreyebilmeleri için kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

	<u>200 mL için</u>
Oxoid Nutrient Broth no:2	5 g
Distile su ile	200 mL'ye tamamlanır

Toz halinde bulunan Nutrient Broth distile su ile iyice çözülünceye kadar elle karıştırılmıştır. Karışım otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilerek oda sıcaklığında karanlıkta saklanmıştır.

pBR322 Plazmidi (172 ng/µL) (Thermo Scientific, REF:SD0041)

Ticari olarak satın alınan pBR322 plazmidinden 34,4 µL alınıp ve distile su ile 100 µL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

SafeView™ Classic (Cat#G108) DNA Boyası

pBR322 plazmid DNA'sını boyamak amacıyla %1'lik agaroz jel içine konularak kullanılmıştır.

Serum Fizyolojik (%0,9)

Fiksatif 1 hazırlamak için bileşenlerden biri olarak kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

	<u>1000 mL için</u>
NaCl	9 g
Distile su ile	1000 mL'ye tamamlanır

Sodyum Azid Çözeltisi (SA, CAS No. 26628-22-8)

Ames testinde TA100 bakteri suşu için metabolik aktivasyon yokluğunda pozitif kontrol olarak 1 µg/petri konsantrasyonunda kullanılmıştır.

Hazırlanışı:100 mL için

Sodyum azid

0.01 g

Distile su ile

100 mL'ye tamamlanır

Distile su içerisinde çözdürülerek, +4°C'de ve alüminyum folyoya sarılı olarak saklanmıştır. Deneyde kullanılan pozitif kontrol (SA) 1/10 oranında seyreltilmiştir. Bu seyreltilen çözeltiden petri başına 100 µL ilave edilmiştir.

Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer)

Sorensen tamponu ilk olarak Danimarkalı biyokimyacı Soren Sorensen tarafından kullanıldığı için bu ismi almıştır. %5'lik Giemsa boyası hazırlanırken tampon A ve tampon B olmak üzere farklı iki şekilde hazırlanan stok çözeltiler ortamın pH değerini ayarlamak için kullanılmıştır.

Hazırlanışı:Tampon A: 11.34 gr KH_2PO_4 250 mL saf su içerisinde eritilmiştir (pH=4.8).Tampon B: 14.83 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 250 mL saf su içerisinde eritilmiştir (pH=9.3).***Top Agar***

Mutajenite deneylerinde kullanılmıştır.

Hazırlanışı:1000 mL için

Agar

6 g

NaCl

5 g

Histidin/biyotin solüsyonu

100 mL

Distile su ile

1000 mL'ye tamamlanır

Agar, su ve tuz karışımı manyetik karıştırıcıda ısıtılarak ve karıştırılarak çözülmüş sonrasında otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

IXTAE Tamponu

DNA hasarlayıcı-koruyucu (radikal-antiradikal) aktivite deneylerinde elektroforez amacıyla tankın doldurulması için IXTAE tamponu kullanılmıştır. Ayrıca DNA molekülünün (pBR322 plazmidi) yürütüleceği hareket ortamı olan agaroz jel hazırlanırken de IXTAE tamponu kullanılmıştır.

Hazırlanışı:**50XTAE Solüsyonu (stok)**

	<u>100 mL için</u>
Tris Base	24,2 g
Glacial Asetik asit	5,71 mL
Na ₂ EDTA	3,72 g
Distile su ile çözülerek	100 mL 'ye tamamlanır
pH:8.0-8.5 ayarlanır	

1XTAE Tamponu hazırlamak için;

20 mL 50XTAE stok solüsyonuna 995 mL distile su eklenir ve karıştırılır.

Tripan Blue (CAS: 72-57-1)

Komet testi yapılırken izole lenfositlerin canlılık oranını belirlemek amacıyla tripan blue boyası kullanılmıştır. Stok tripan blue hazırlamak için % 0.4'lük tripan blue boyasından 4 mL alınıp üzerine 1 mL saf su eklenmiştir. Bu şekilde hazırlanan stok tripan blue çözeltisinden 10 µl alınıp üzerine 10 µl stok lenfosit ilave edilip canlılık testine bakılmıştır. Canlı hücreler şeffaf, ölü hücreler ise mavi renkte görülmüştür.

Vogel-Bonner-E Ortamı (50xVBE Tuzları)

Minimal glikoz agar (MGA) plaklarının tuzu olarak kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

	<u>1000 mL için</u>
Magnezyum sülfat (MgSO ₄ .7H ₂ O)	10 g
Sitrik asit monohidrat	100 g
Dipotasyum hidrojen fosfat (K ₂ HPO ₄)	500 g
Sodyum amonyum fosfat (NaH ₂ NH ₄ PO ₄ .4H ₂ O)	175 g
Distile su ile	1000 mL 'ye tamamlanır

Maddeler yukarıda yazıldıkları sıra ile distile suya ilave edilerek son hacimlerine tamamlanıp maddelerin tamamen çözülmesi için manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra otoklavda steril edilerek hazırlanan çözelti oda sıcaklığında karanlıkta saklanmıştır.

3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları***Buzdolabı***

+4 C'de saklanması gereken deney sarflarının muhafazası için kullanılmıştır

Elektroforez Tankı

Komet deneyinde DNA örneklerinin elektroforez tamponunda yürütmek amacıyla Cleaver Scientific marka, CSL-COM20 seri numaralı, 27,5 x 25 x 5,5 cm ölçülerinde komet deneyi için özel olarak dizayn edilmiş olan siyah renkli elektroforez tankı kullanılmıştır.

DNA Koruyucu Aktivite deneyinde DNA örneklerinin elektroforez tamponunda yürütmek amacıyla Thermo Scientific marka, model no: B2, 14 x 21,5 x 5 cm ölçülerinde elektroforez tankı kullanılmıştır.

Elektroforez Güç Kaynağı

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

DNA Koruyucu Aktivite deneyinde ise Thermo Scientific marka, model no: EC300XL2 güç kaynağı kullanılmıştır.

Ependorf Tüpleri

Komet deneyinde inkübasyon süresi sonunda hücrelerin süpernatanttan ayrıştırılması amacı ile soğutmalı santrifüj cihazında santrifüj etmek için kullanılmıştır.

Hassas Terazî

Hava akımına karşı özel cam paravanlarla korunan ve 0.0001 g hassasiyetindeki Gec Avery marka terazi, katı kimyasal maddelerin tartılmasında kullanılmıştır.

İnkübatör

Deneyler sırasında kullanılan eriyiklerin ve kan kültürlerinin istenilen sıcaklıkta tutulması amacı ile Incucell marka, 0°C-100°C'ye kadar ayarlanabilir inkübatör kullanılmıştır.

Kültür Tüpleri (Greiner Bio-One Cat No. 164 160)

Mitotik indeks ve mikronukleus deneylerinde hücrelerin kromozom mediumunda inkübe edilmesi için, steril olarak temin edilen ve santrifüj cihazına uygun yuvarlak taban, kırmızı standart vidalı kapak, şeffaf, cellstar markalı kültür tüpleri kullanılmıştır.

Manyetik Karıştırıcı Isıtıcı

Ames testinde kimyasal maddeleri hazırlamak için Chiltern Hotplate HS31 marka karıştırma devri ve ısıtma sıcaklığı ayarlanabilir manyetik karıştırıcı ısıtıcı tabla kullanılmıştır.

Mikropipet

Deneyler yapılırken istenen miktarda çözelti aktarabilmek için 2-20 µL ve 0.1-1000 µL aralığında ölçüm yapabilen Thermo Scientific marka ve 20-200 µL aralığında ölçüm yapabilen Nichipet EXII marka mikropipetler kullanılmıştır.

Mikroskop

Preparat incelemeleri sırasında koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan Olympus marka binoküler ışık mikroskobu kullanılmıştır. Tezde bulunan fotoğraflar ise yine aynı marka mikroskopta dijital olarak çekilmiştir.

Otoklav

Deneylerde kullanılan ekipmanların ve eriyiklerin sterilizasyonu amacıyla Hirayama marka otoklav kullanılmıştır. Sterilizasyon, 121°C sıcaklık ve 1.2 atm basınçta 15 dk süre ile gerçekleştirilmiştir.

Petri Kutuları

Ames testi için Fıratmed tarafından üretilen ve bir paketi 28 adetten oluşan petri kutuları kullanılmıştır. Her bir petri kutusu 8,5 cm çapa sahip olup toplam hacim; 25 mL MGA besiyeri + 2000 µL top agar + 100 µL organizma kültürü + 100 µL test maddesinden oluşmaktadır.

pH Metre

Hazırlanan çözeltilerin PH değerlerini saptamak için Thermo Fischer marka pH metre kullanılmıştır.

Santrifüj

Deneyisel çalışmalarda çöktürme için rotor çapı 21 cm olan ve 4000 devir/dk'ya (rpm) kadar yükselebilen devir hızı, 99 dk'lık zaman ayarlayıcı, açılabilir başlığa sahip ve 28 tüp kapasiteli Hettich Universal marka santrifüj kullanılmıştır.

Soğutmalı Santrifüj

Komet deneyinde ependorf tüplerindeki DNA örneklerini santrifüj etmek amacıyla Vwr Micro Star 17 R marka soğutmalı santrifüj cihazı (24 x 2.2-1,5 mL rotor için maksimum 9.000 rpm hıza erişebilen) kullanılmıştır.

Steril Kabin (Flow Kabin)

Hücre kültürü tüplerine kromozom mediumu konulması, kan ekiminin yapılması, test eriyiklerinin ve kültür tüplerine ilave edilmesi sırasında steril bir ortam olarak, %99,9 partikül

tutma özellikli filtreye sahip, 1500 m³/h emiş kapasiteli, UV ve floresan ampul eklentisi olan Labormed marka flow kabin kullanılmıştır.

Vorteks

Örnekleri karıştırmak amacı ile iki farklı hız kademesine sahip Velp Scientifica marka vorteks cihazı kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Lamların Temizlenmesi

MN deneyi yapılmadan iki gün evvel lamlar şaleye dizilerek üzerlerini tamamen örtecek şekilde 1 N HNO₃ konulmuş ve şalenin kapağı kapatılarak 24 saat bekletilmiştir. Süre bitiminde lamlar yaklaşık yarım saat akan çeşme suyu altında iyice yıkanmış, ardından 3-4 defa saf sudan geçirildikten sonra şale saf su ile doldurularak buzdolabında (+4°C) saklanmıştır. Deney esnasında soğuk olarak kullanılmıştır.

3.2.2. Sterilizasyon

Deneyler yapılırken kullanılan bütün cam malzemeler, pipet uçları, ependorf tüpler ve diğer tüm araç-gereçler alüminyum folyoya sarılarak, besiyerleri ağzı pamuk ve alüminyum folyo ile kapatılmış erlen içerisinde, HCQ için çözücü olarak kullanılan distile su ise kapaklı cam bir şişe içerisinde steril edilmiştir. Sterilizasyon, 121°C sıcaklık ve 1.2 atm basınçta 15 dk süre ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Ames/Salmonella/Mikrozom (Bakteriyel Geri Mutasyon) Testi

Ames Testi'nin Yapılış Amacı

Deneyin bilimsel esası, çoğalması için histidin amino asidine gereksinim duyan *Salmonella typhimurium* mutant oksotrofik suşların, mutajenik etkiler ile tekrar histidin sentezleyebilir atasal (prototrof) forma dönüşmesi temeline dayanmaktadır. Bu yolla test maddelerinin neden olacağı geri mutasyonların frekansı saptanabilecektir. TA98 suşu çerçeve kayması, TA100 suşu ise baz çifti değişimi tipindeki gen mutasyonların saptanmasında kullanılmıştır. Ames testine metabolik aktivasyon olmaksızın çalışılmıştır. Planlanan çalışma ile test maddesi hidroxychloroquine'in (HCQ) mutajenik etkisi Ames/Salmonella/Mikrozom test yöntemi ile araştırılmıştır.

Salmonella typhimurium Test Suşları ve Özellikleri

Maron ve Ames (1983) tarafından deneysel mutasyonlarla geliştirilen TA98 ve TA100 suşları bağış olarak temin edilip kullanılmıştır (Maron ve Ames, 1983).

Standart test suşları türleri, TA97, TA98, TA100 ve TA102 R-faktör plazmidi pKM101'i içerir. Bu R-faktörü suşları, R-faktörü olmayan ana suşlarla zayıf bir şekilde algılanan veya hiç saptanmayan bir dizi mutajen tarafından geri döndürülür (Levin ve ark., 1982; McCann ve ark.,

1975). Hem *Escherichia coli* hem de *Salmonella typhimurium*'da pKM101 plazmidini normalde bu organizmalarda mevcut olan hata eğilimli bir DNA onarım sistemini geliştirerek kimyasal ve spontan mutajenezi artırır (McCann ve ark., 1975; Shanabruch ve Walker, 1980; Walker ve Dobson, 1979).

TA100'deki hisG46 mutasyonu, histidin biyosentezinin ilk enzimini kodlayan hisG geninde bulunur (Ames, 1971). DNA dizi analizi ile belirlenen bu mutasyon, yabancı tip organizmadaki -GAG-, -CTC- (lösin) yerine -CCC-, -GGG- (prolin) geçer (Oliveira-Ramos ve ark., 2021). TA1535 ve bunun R-faktörü türevi TA100, temel olarak bu G-C çiftlerinden birinde baz çiftine neden olan mutajenleri tespit eder. TA1538 ve TA98'deki his3030 mutasyonu, histidinol dehidrogenazı kodlayan his genidir. TA1538 ve R-faktörü türevi olan TA98, çeşitli çerçeve kaymasına neden olan mutajenleri tespit eder. Çerçeve kaymasını uyaran mutajenler, DNA'nın tekrarlayan dizilerinde veya 'hot spots (sıcak noktalarında)' meydana gelen değişen eşleşmeyi stabilize edebilir, bu da histidin sentezi için doğru okuma çerçevesini geri yükleyen (düzelten) bir çerçeve kayması mutasyonuna yol açar. HisD3052 mutasyonu, hisD geninde bir çerçeve kayması mutasyonu yerine yakın -GCGCGCGC-, -CGCGCGCG- 8 tekrarlayan -GC-dizisine sahiptir (Isono ve Yourno, 1974; Maron ve Ames, 1983)

Genel mutajenite testleri için öncelikle TA97, TA98, TA100 ve TA102 önerilir (Maron ve Ames, 1983).

Salmonella Suşlarının Kültürlerinde Canlılık Belirlenmesi

Derin dondurucuda (-80°C) saklanan TA98 ve TA100 suşlarından erimeden bir öze yardımı ile kazıntı alınarak Histidin/Biyotin/Ampisilin (HBA) plaklarına çizgi ekimleri yapılmış ve 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda iyi izole olmuş bir koloni seçilip, 2 mL Nutrient Broth (NB) ortamı içinde süspanse edilmiş ve 16 saat 37°C'de çalkalamalı inkübatörde 140 rpm'de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra platin öze ile bir öze dolusu sıvı kültür alınıp tekrar yeni HBA üzerine çizgi ekim yapılmış ve yeterli üremenin gözlenebilmesi için plaklar 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Bu plaklar alüminyum folyoya sarılarak +4°C'de iki ay süre ile saklanabilmekte ve pasajlar yapılabilmektedir.

Bakteri Suşlarının Dondurulması ve Saklanması

Test suşlarının canlılıklarını ve mutant özelliklerini uzun süre koruyabilmek amacı ile dondurulmuş örnekler hazırlanmıştır. Bunun için önceden gecelik kültürü hazırlanan NB ortamından 500 µL bakteri steril edilmiş olan ependorf tüplerine alınarak, üzerine bakteri/glisin oranı 1:1 oranında olacak şekilde (500 µL) glisin eklenerek iyice karıştırılmıştır. -20°C'de bir gece bekletildikten sonra tekrar kullanılmaya kadar -80°C'de saklanmıştır. Test suşlarının genetik özellikleri bozulmadan bu şekilde 3 yıl saklanabildiği rapor edilmektedir.

Çalışmada Kullanılacak Test Suşlarının Genetik Kontrolü (Histidin Gereksinimi Kontrolü)

Bakterilerin MGA üzerine ekilmeleri sonucu his⁻ bakteriler his⁺ suşlardan ayırt edilir. Bu amaçla besiyerinden gecelik kültür hazırlanır. NB'da bir gece üretilen bakterilerden sabah MGA ve histidin/biyotin (HB) plaklarına çizgi ekim yapılır. 37°C'de 48-72 saat inkübasyondan sonra HB plaklarında üreme gözlenirken MGA plaklarında üreme gözlenmemiştir. Böylece kullanacağımız bakterilerin his⁻ mutasyonunu taşıdığı anlaşılır.

Gecelik Kültürün Hazırlanması

Önceden hazırlanan ve -80°'de saklanan suş stokları eritilmiş ve içerisinden 500 µL alınıp hazırlanan 50 mL NB ortamına ilave edilmiştir. 37°C'lik inkübatörde 16 saat süre ile üremeye bırakılmıştır.

Test Maddesinin Dozlarının Belirlenmesi

MN ve komet testinde µg/mL olarak kullanılan dozlar, Ames testi için µg/petri olarak hesaplanıp kullanılmıştır. Ames testinde, MN deneyindeki dozlardan farklı olarak iki doz daha eklenerek beş doz şeklinde kullanılmıştır (5, 10, 20, 40 ve 80 µg/petri). 8.5 cm çapa sahip petri kaplarına her dozdan ayrı ayrı 100'er µL eklenmiştir.

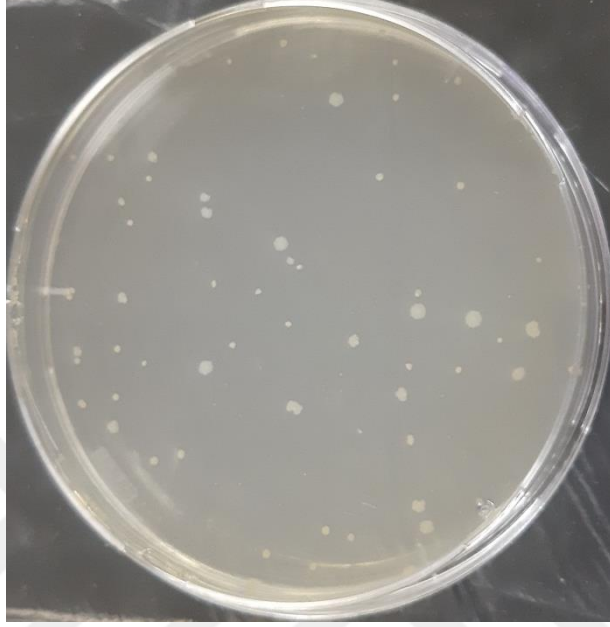
Pozitif Mutajenler

Suşların pozitif kontrollerini sağlamak amacı ile mutajen oldukları daha önceden tespit edilen kimyasal maddeler kullanılmıştır. Pozitif mutajen olarak *S. typhimurium* TA98 için 4-Nitro-o-Fenilendiamine (4-NPD) ve *S. typhimurium* TA100 için Sodyum Azid (SA) kullanılmıştır.

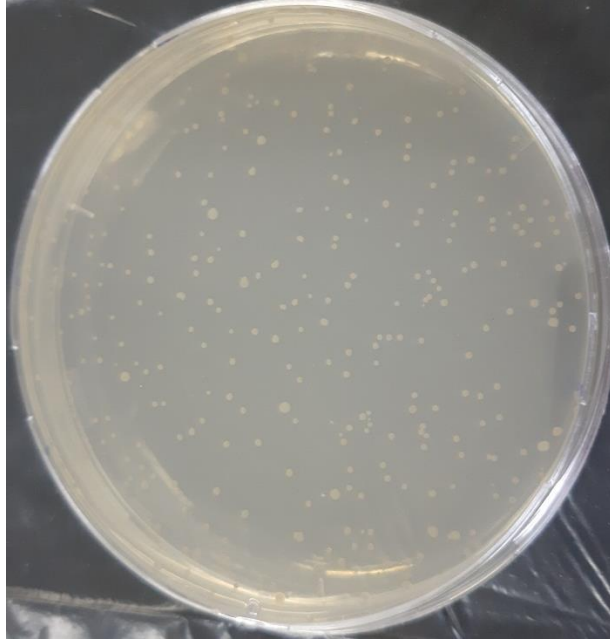
Ames Testinin Yapılışı

- Hazırlanan top agar otoklavda steril edilerek 45°C'ye kadar soğumaya bırakılmıştır. Bakterilerin yüksek sıcaklıkta ölmelerini engellemek için sıcaklığa dikkat edilmiştir.
- Steril ortamda yapılan deneyde 2 mL top agardan (histidinli) alınarak steril edilen tüpe aktarılmış devamında gecelik kültür olarak hazırlanan NB ortamındaki bakterilerden 100 µL alınarak üzerine eklenmiştir.
- Test maddesinin daha önceden belirlenen dozlarından (5, 10, 20, 40 ve 80 µg/petri) 100 µL alınarak tüplere aktarılmış ve önceden hazırlanan MGA'lı plaklara dökülmüştür.
- Top agarın petri kabı üzerinde homojen dağılmasını sağlamak için hızlı bir şekilde zeminde 8 işareti yapılmıştır.
- Petri kaplarındaki top agarların yoğunlaşması için 15 dk bekletildikten sonra petri kutuları ters çevrilerek 37°C'lik inkübatörde 72 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon süresi sonunda petrilerdeki gözle görülür koloniler sayılmıştır.

- Elde edilecek sonuçların değerlendirilmesi için de kontrol grupları kullanılmıştır. Kontrol olarak 100 µL steril distile su, pozitif kontrol olarak; TA98 suşu için 100 µL 4-NPD, TA100 suşu için ise 100 µL SA top agar ve bakteri üzerine eklenmiştir.
- Her test konsantrasyonu 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.7. *Salmonella typhimurium* TA98 suşunun kontrol koloni görünümü.



Şekil 3.8. *Salmonella typhimurium* TA100 suşunun kontrol koloni görünümü.

3.2.4. Komet Testi (Tek Hücre Jel Elektrophorez Testi / Kuyruklu Yıldız Testi)

Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Komet testinin uygulamasında preparatların hazırlanması ve gerekli diğer işlemler için Singh ve arkadaşlarının (Singh ve ark., 1988) kullandıkları metot laboratuvar koşullarımıza uyacak şekilde modifiye edilerek kullanılmıştır. Testin bilimsel temeli, jel elektrophorezinde hasarlı DNA parçacıklarının negatif yükleri nedeniyle nukleusdan uzaklaşarak anota doğru hareket etmesi esasına dayanır.

- Sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın bir erkek ve bir kadından alınan kandan lenfosit hücreleri izole edilmiştir.
- İzole edilen lenfosit örneklerinden her bir ependorf tüpüne 100'er µL eklenmiş ve üzerine 1000 µL PBS (Fosfat Tamponu) eklenerek lenfositler süspanse edilmiştir.
- Bu aşamadan sonra yapılacak tüm işlemler ışığın DNA üzerinde neden olabileceği tüm etkileri engellemek amacıyla karanlıkta gerçekleştirilmiştir.
- Daha sonra tüpler bekletilmeden +4 °C, 1000 devir/dakikada (rpm) 3 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra tüpler buz üzerine konulmuş ve lenfositlerin bulutsu bir yapı oluşturarak ara katmanda toplanması sağlanmıştır.
- Ara katmandan (lenfositler) 100 µL alınıp stok lenfosit oluşturmak üzere ayrı bir ependorf tüpüne aktarılmıştır.
- İzole edilmiş lenfositlerden 10 µL alınıp, 10 µL seyreltilmiş boya (tripanblue) ile karıştırılarak bir lamın üzerine konulmuş ve lamel ile kapatılarak lenfositlerin canlılık oranı incelenmiştir. Şeffaf görünen hücreler canlı, mavi renge boyalı olarak görünen hücreler ise cansız kabul edilmiştir (Deneye devam edebilmek için canlılık alt sınırının ≥ 90 olmasına dikkat edilmiştir.).
- Canlılık testinin ardından daha önceden belirlenen dozlardaki test maddesi (HCQ) son konsantrasyonu 10, 20, 40 µg/mL olacak şekilde 100 µL içerisinde stok lenfositlere eklenerek hücrelerin test maddesiyle muamele olması sağlanmıştır.
- Pozitif kontrol olarak H₂O₂'den (%35'lik hidrojen peroksitten 6µL, üzerine 9994 mL distile su) 100 µL, kontrol olarak ise distile su 100 µL kullanılmıştır.
- Etiketlenen tüplere test maddesi, pozitif kontrol ve kontrol olarak da distile su ilave edildikten sonra hücreler 37 °C'de 1 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonunda tüpler +4 °C ve 3000 devir/dk'da 5 dk santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrasında süpernatant atılmıştır.
- Kalan lenfositlerin üzerine 100 µL PBS tamponu ilave edilerek tüpler dikkatlice karıştırılmıştır.

- Daha önceden hazırlanan LMA (Low Melting Agar) agardan 75 µL alınıp ependorf tüplerinde bulunan 100 µL lenfosit ile hızlıca karıştırılmış ve bu karışımdan 150 µL alınıp bir gün önceden hazırlanan HMA (High Melting Agar) agar kullanılarak kaplanmış olan lama yayılarak lamel ile kapatılmıştır.
- Kapatılan preparatlar kapalı kutu içerisinde 20-25 dk +4 °C'de bekletilmiş, sürenin sonunda lam üzerindeki lameller tek hamlede yana doğru çekilerek çıkarılmış ve lamalar içerisinde Lysing solüsyonu bulunan şale içerisine yerleştirilmiştir. Bu şekilde preparatlar buzdolabında 16 saat (En az 1, en fazla 16 saat) bekletilmiştir.
- Lizis işleminden sonra lamalar bir gün önceden +4 °C'de bekletilen elektroforez tankında bulunan tampon çözelti içerisine konulmuş, kapağı kapatılarak üzerine buz aküleri yerleştirilmiş ve 20-25 dk süre boyunca bekletilmiştir. Ardından 25 V ve 300 mA'de 20 dk süreyle elektroforezde DNA iplik parçalarının yürütme işlemi yapılmıştır.
- Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra lamalar elektroforez tamponundan dikkatli bir şekilde alınarak içerisinde bir gün önceden hazırlanıp +4 °C'de bekletilen nötralizasyon tamponu bulunan şale içerisine konulmuş ve yine +4 °C'de 5 dk bekletilmiştir. Bu işlem iki defa tekrarlanmıştır.
- Nötralizasyon işleminden sonra ilgili tampondan çıkarılan her bir lama 50 µL Etidyum Bromid (EtBr) (100 µg/mL) ilave edilerek hücrelerin boyanması sağlanmış ve lamel ile kapatılarak, preparatlar kapalı kutu içerisinde 15-20 dakika buzdolabında bekletilmiştir.
- Süre sonunda fazla boyanın uçmasını sağlamak amacıyla lamalar karanlık bir ortamda ve oda sıcaklığında 20 dakika bekletilmiştir.

Bu şekilde elde edilen preparatlarda EtBr'nin uçucu etkisinden dolayı görüntü kalitesinin bozulmaması için mikroskopik inceleme aynı gün içerisinde yapılmıştır.

Mikroskopik İnceleme

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

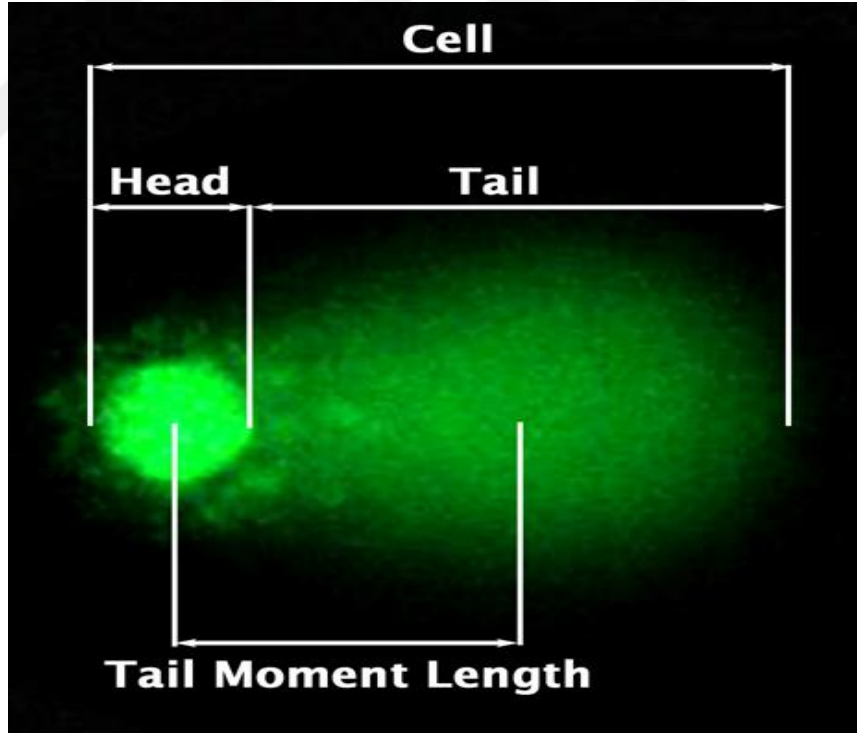
Dünyada uygulanan komet test tekniğinin genel basamakları (Şekil 3.10.) gösterilmiş ve aşağıda özetlenmiştir (Çavaş ve Könen, 2007, 2008; Tice ve ark., 2000):

- 1. Hücrelerin İzolasyonu:** Lenfositlerin tam kandan ayrılması işlemidir.
- 2. Preparasyon Aşaması:** Hücrelerin agar ile karıştırılarak lam üzerine yayılmasını içeren safhadır.
- 3. Lizis:** Agara gömülü halde lam üzerine yayılmış olan hücrelerin hücre zarlarının ve proteinlerinin yıkımının gerçekleştiği aşamadır. Bu aşamanın sonunda çıplak DNA elde edilir. Lizis işlemi gerçekleştirmek için önceden hazırlanan ve +4°C'de soğutulmuş saklanan lizis solüsyonu kullanılmaktadır. Lizis çözeltisinin bileşeninde bulunan tuz proteinlerin hücre ile olan bağlarını ve RNA yapısını bozarken, deterjanlar ise hücre membran yapısını bozmaktadır. Böylece lizis işlemi sonrasında hücre yapısındaki membran, proteinler, RNA, sitoplazmik ve nükleer bileşenler parçalanmaktadır. Sonuçta nükleoid olarak adlandırılan ve komet oluşumunun gözlenebileceği DNA yumağının kalması sağlanmaktadır.
- 4. DNA Sarmalının Çözülme Aşaması:** Lizis işleminden çıkan preparatlar soğuk elektroforez solüsyonu içeren (pH>13) tanka yerleştirilir ve burada 20 dakika süreyle bekletilir. Bu aşamada DNA zincirlerinin ayrılarak tek iplikli hale geçmesi sağlanır.
- 5. Elektroforez Aşaması:** DNA sarmalı çözüldükten sonra aynı tank ve solüsyon içerisinde elektrik akımı uygulanarak elektroforez işlemi gerçekleştirilir. Bu işlem sonucunda tek iplikli DNA molekülünde bulunan kırık fragmentler ve kırılma sonucu oluşan DNA ilmekleri negatif (-) yüklü oldukları için boyutlarına bağlı olarak değişen hızlarda anoda (+ uca) doğru hareket etmektedir.
- 6. Nötralizasyon Aşaması:** Elektroforez işleminden sonra tanktan çıkarılan preparatlar pH ayarlamasını sağlamak için nötralizasyon işlemine tabi tutulur. Bu işlem için preparatlar önceden hazırlanarak +4°C'de bekletilen soğuk nötralizasyon tamponu içeren şalelere alınarak 30 dakika süreyle bekletilir.
- 7. Boyama Aşaması:** Nötralizasyon tamponundan çıkarılan preparatlar 2 kez soğuk distile sudan geçirilerek boyama işlemine tabi tutulur. Bu işlem için en yaygın olarak kullanılan floresan boya Etidyum bromiddir (EtBr). Ancak EtBr oldukça iyi sonuç vermesine rağmen yüksek oranda genotoksik etkiye sahip olduğu için bu boyaya alternatif olarak komet testinde akridin oranj, DAPI, YOYO-1 veya propidyum iyodit gibi seçenekler tavsiye edilebilir.
- 8. Değerlendirme Aşaması:** Komet ölçümlerinde kullanılmak üzere birçok parametre geliştirilmiş olmakla birlikte kuyruk uzunluğu, kuyruk momentleri ve kuyruktaki DNA yüzdesi en yaygın olarak kullanılan parametrelerdir. Komet test tekniği kullanılarak DNA'da oluşabilecek hasarların kantitatif olarak tayin edilmesinde gözle değerlendirmeye

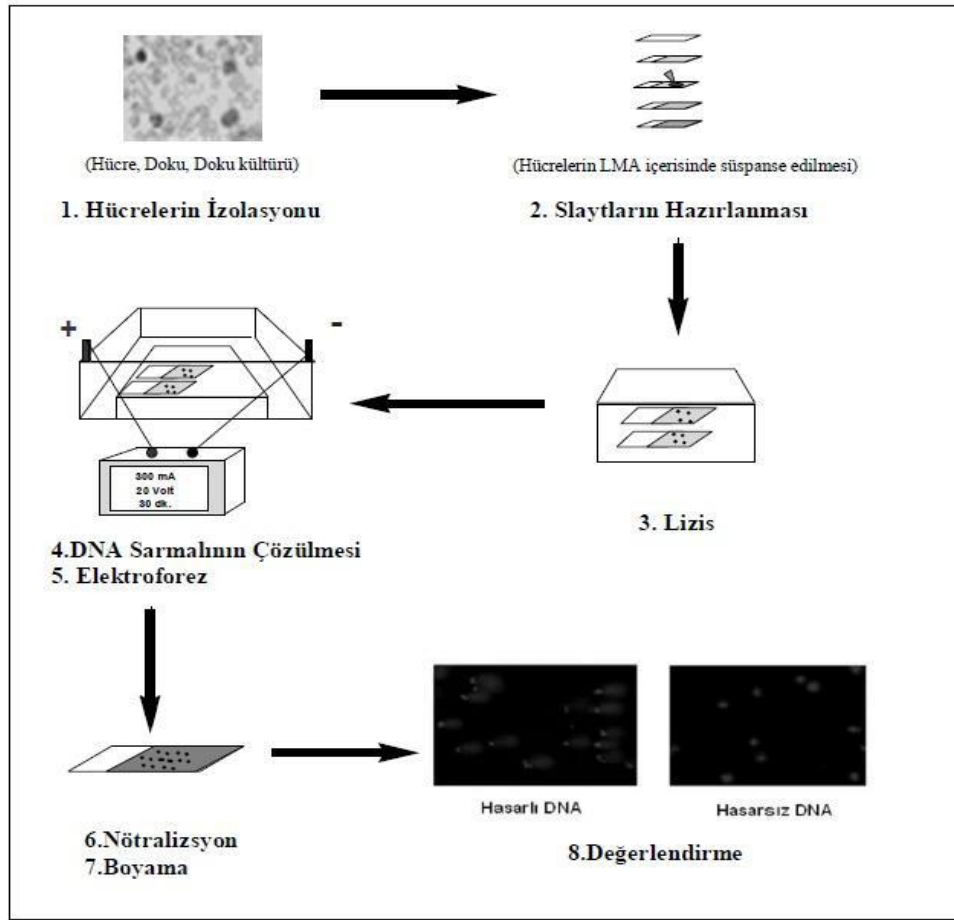
dayalı ölçümler kullanılabileceği gibi en garantili yöntem olarak bilgisayarlı komet analiz programları da kullanılmaktadır. Komet yapısı içerisinde belirli bir bölgede bulunan DNA miktarı ile o bölgede bulunan floresan yoğunluğu arasında doğru orantı bulunmaktadır. Bu özellikten faydalanılarak dijital görüntü sistemleri ve bilgisayar yazılım programlarında kullanılan çeşitli tayin yöntemleri geliştirilmiştir. Bunlar;

- **Kuyruk Uzunluğu:** Çekirdek baş bölge dış kısmından itibaren göç eden DNA uzunluğunun ölçümüdür.
- **Merkezden Kuyruk Uzunluğu:** Kuyruk uzunluğu + Baş çapı/2
- **Kuyruktaki DNA %'si:** Kuyrukta bulunan DNA'nın hücrede bulunan toplam DNA'ya olan yüzdesidir
- **Kuyruk Momenti:** Kuyrukta bulunan toplam DNA yüzdesi ile baş bölgesinin merkezinden itibaren kuyruğun merkez kısmına kadar olan mesafenin ortak olarak hesaplanmasıdır.

$$\text{Kuyruk moment i} = \frac{\text{Kuyruk uzunluğu} \times \text{Kuyruktaki DNA yoğunluğu}}{100}$$



Şekil 3.9. DNA hasarına uğramış hücrede baş ve kuyruk oluşumu.



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

Nükleustaki DNA hasarının diğer bir değerlendirme yöntemi manuel (gözle) değerlendirme adı verilen skorlama metodudur. Bu yöntemde hücreler hasarsız olmaları ve hasar düzeylerine göre 0'dan 4'e kadar sınıflandırılmaktadır (Şekil 3.11.). Bu skorlamada;

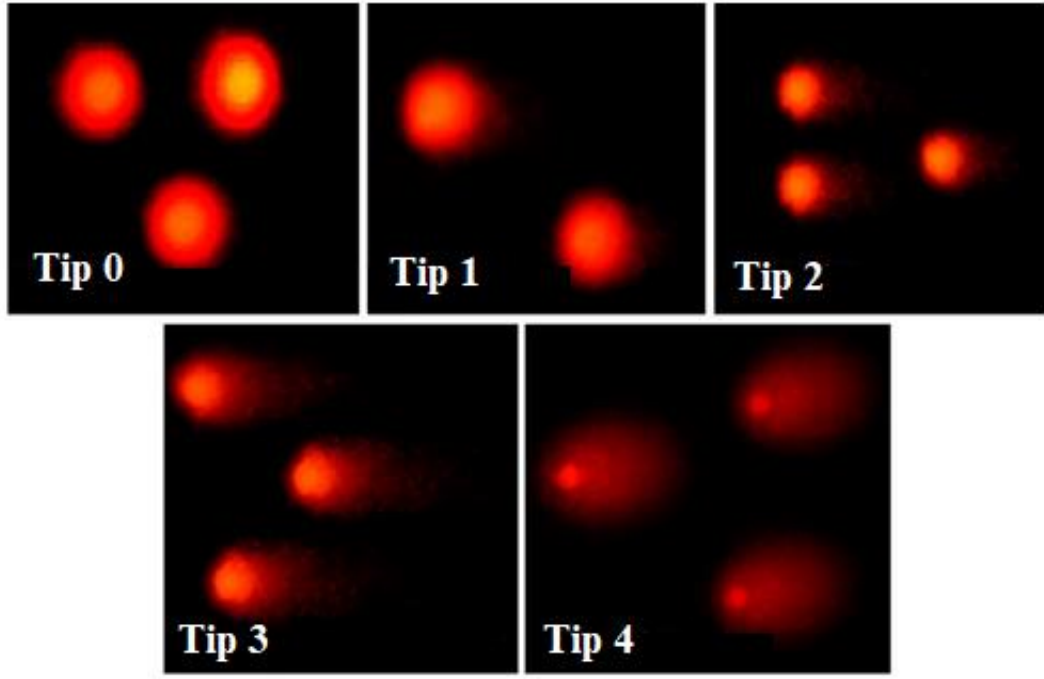
- Tip 0 → kuyruğun hiç olmadığını (Şekil 3.12)
- Tip 1 → kuyruk uzunluğunun çok az olduğunu
- Tip 2 → kuyruk uzunluğunun az olduğunu
- Tip 3 → kuyruk uzunluğunun çok olduğunu Şekil 3.13)
- Tip 4 → kuyruk uzunluğunun çok fazla olduğunu göstermektedir

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

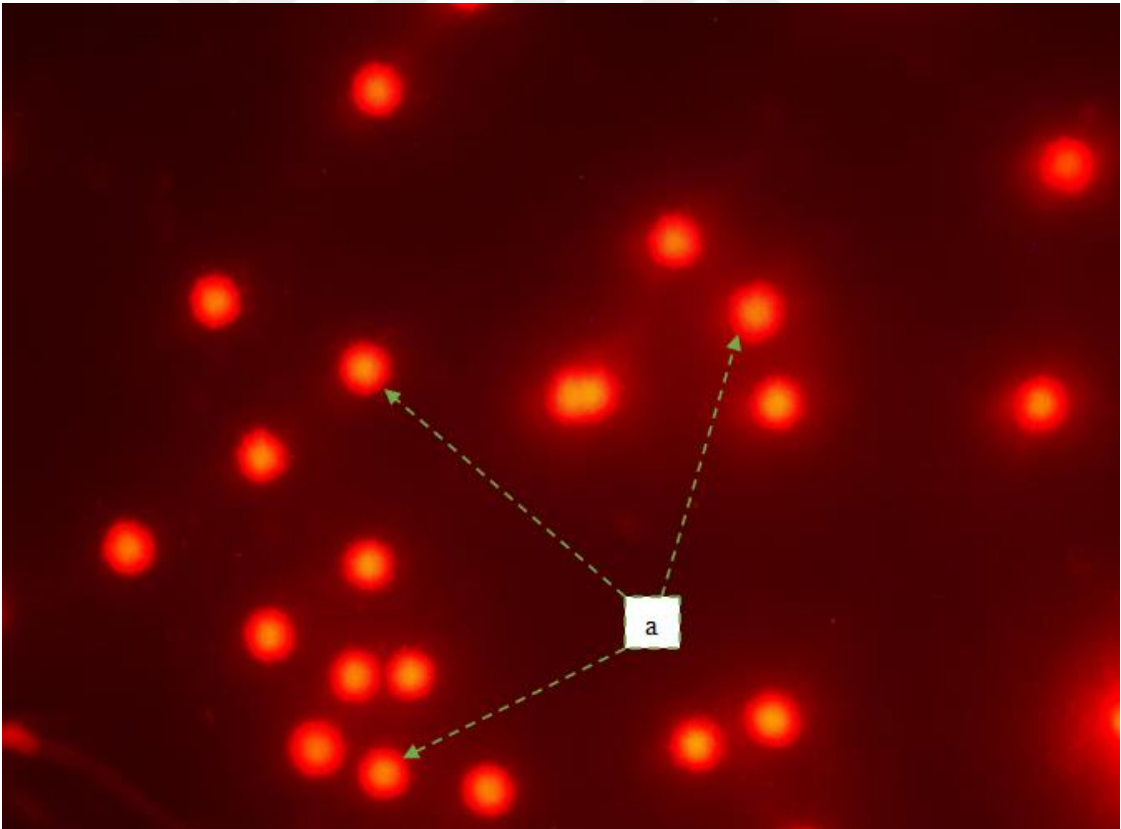
Skorlama sonucunda hücrelerdeki kuyruk verileri kullanılarak Genetik Hasar İndeksi (GHI) ve % Hasarlı Hücre (HHO) hesaplanmaktadır (Zorlu, 2010).

$$GHI = \frac{(1 \times \sum Tip1) + (2 \times \sum Tip2) + (3 \times \sum Tip3) + (4 \times \sum Tip4)}{(\sum Tip0 + \sum Tip1 + \sum Tip2 + \sum Tip3 + \sum Tip4)}$$

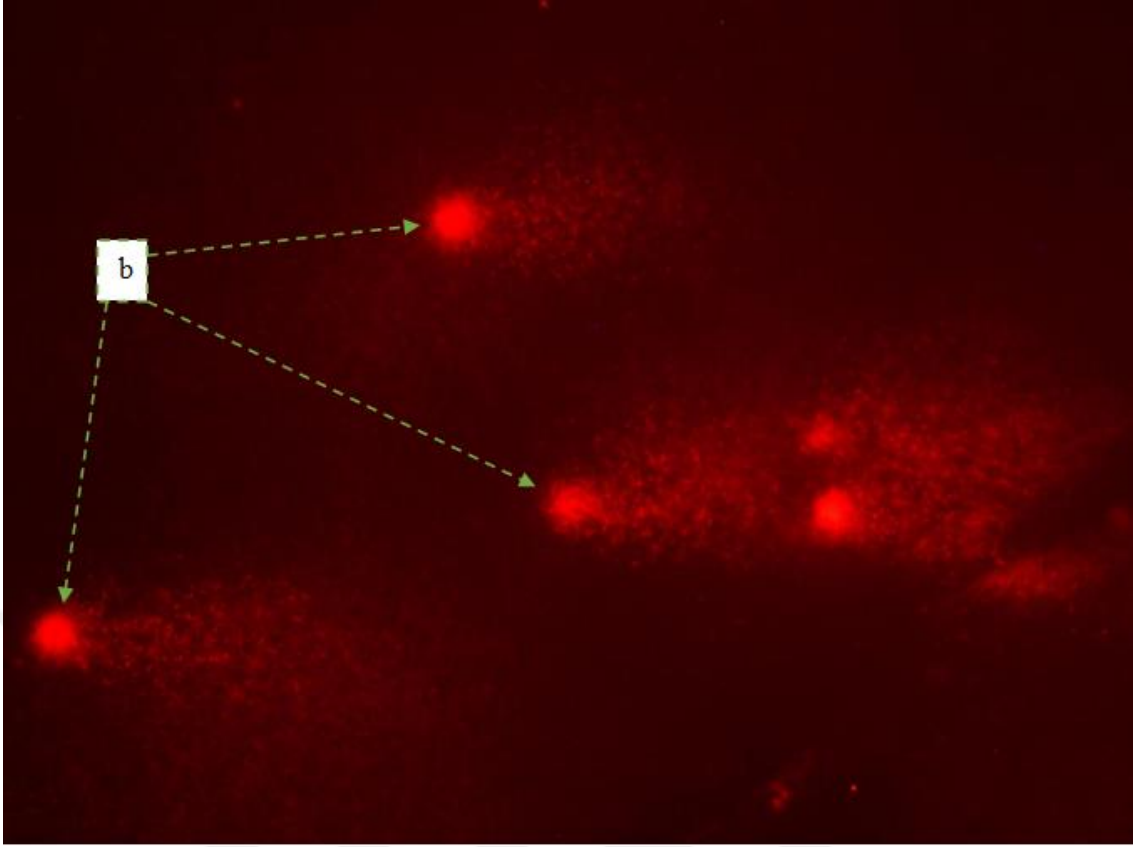
$$\% \text{ Hasarlı Hücre (HHO)} = \sum Tip2 + \sum Tip3 + \sum Tip4$$



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



Şekil 3.12. DNA'sı göç etmemiş (kuyuksuz=a) nükleuslar (X400).



Şekil 3.13. DNA'sı göç etmiş (kuyruklu=b) nükleuslar (X400).

3.2.5. DNA Hasarlayıcı-Koruyucu (Radikal-Antiradikal) Aktivite Testi

Bu çalışmada, test maddesinin doğrudan DNA hasarını uyarması veya tersine uyarılmış DNA hasarlarına karşı koruma aktivitesini belirlemek için pBR322 plazmid DNA (Thermo Scientific, REF:SD0041) kullanılmıştır. Doğrudan HCQ konsantrasyonlarına veya HCQ varlığında H₂O₂ ve UV uygulamasına maruz bırakılan plazmid DNA hasar düzeylerinin belirlenmesi için Russo ve arkadaşları (Russo ve ark., 2000) tarafından belirlenen metot modifiye edilerek kullanılmıştır.

- 1X Tris Asetik asit EDTA (TAE) elektroforez tamponu hazırlanmıştır (20 mL 50XTAE üzerine 995 mL distile su).
- % 1'lik agaroz jel hazırlanmıştır: 1 gr agaroz 100 mL 1XTAE tamponun içinde çözünene kadar ısıtılmış ve 60-70 °C sıcaklığa kadar soğuması beklenmiştir.
- 60-70°C sıcaklık aralığında gelince 5 µL SafeView™Classic (Cat#G108) DNA boyası agaroz jelin içine eklenerek iyice karıştırılmıştır.
- Elle tutulur sıcaklığa gelince tarafları yerleştirilmiş jel tankına dökülmüş ve jel donduktan sonra taraflar yavaşça çıkartılmıştır.
- Jel tankı, elektroforez yürütme tankına yerleştirilmiş ve elektroforez yürütme tankı 1XTAE

tamponu ile doldurulmuştur.

- pBR322 plazmidi (172 ng/μL) hazırlanmıştır (34,4 μL pBR322 distile suyla 100 μL'e tamamlanmış).
- Test edilecek örnekler hazırlanmıştır (MN testinde kullanılan HCQ konsantrasyonlarının aynısı (10, 20, 40 μg/mL), pozitif kontrol olarak ise H₂O₂ ve UV kullanmıştır):

1. Kontrol : DNA(5 μL) + saf su (8 μL)
2. Kontrol : DNA (5 μL) + saf su (8 μL) + UV
3. Kontrol : DNA (5 μL) + saf su (5 μL) + H₂O₂ (3 μL)
4. Kontrol : DNA (5 μL) + saf su (5 μL) + UV + H₂O₂ (3 μL)

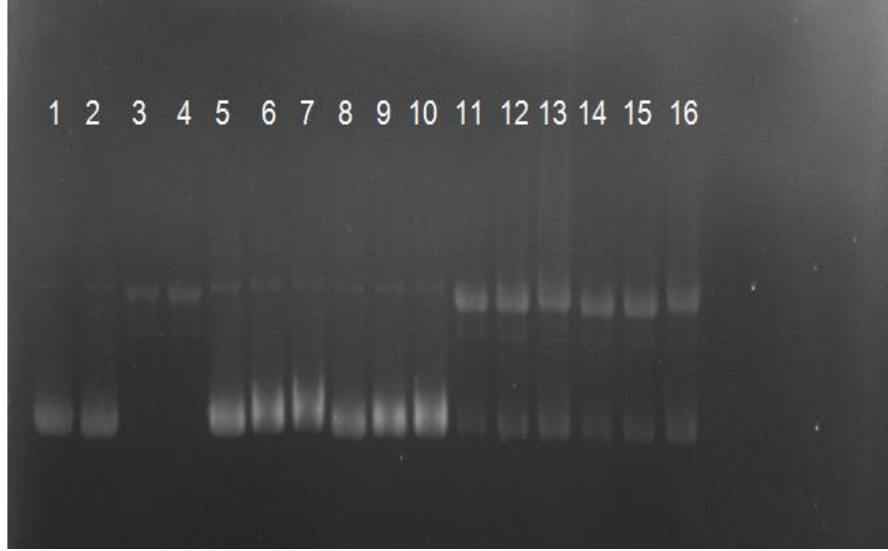
5. D(do2) : DNA (5 μL) +1.doz (5 μL) + saf su (3 μL)
6. D(do2) : DNA (5 μL) +2.doz (5 μL) + saf su (3 μL)
7. D(do2) : DNA (5 μL) + 3.doz (5 μL) + saf su(3 μL)

8. D(UV) : DNA (5 μL) +1.doz (5 μL) + saf su (3 μL) + UV
9. D(UV) : DNA (5 μL) +2.doz (5 μL) + saf su (3 μL) + UV
10. D(UV) : DNA (5 μL) + 3.doz (5 μL) + saf su(3 μL) + UV

11. D(H₂O₂): DNA (5 μL) +1.doz (5 μL) + H₂O₂ (3 μL)
12. D(H₂O₂): DNA (5 μL) +2.doz (5 μL) + H₂O₂ (3 μL)
13. D(H₂O₂): DNA (5 μL) +3.doz (5 μL) + H₂O₂ (3 μL)

14. D(2Pk) : DNA (5 μL) +1.doz (5 μL) + UV + H₂O₂ (3 μL)
15. D(2Pk) : DNA (5 μL) +2.doz (5 μL) + UV + H₂O₂ (3 μL)
16. D(2Pk) : DNA (5 μL) +3.doz (5 μL) + UV + H₂O₂ (3 μL)

- UV uygulanması gereken tüpler bir ultraviyole ışık kaynağı (UV lambası Camag, cıva tüplü 8000 μw'lık 302 nm kısa dalga boyu) altında 5-10 dk. UV ışığa maruz bırakılmıştır.
- Birinci tüpten 10 μL alınıp 3 μL jel yükleme boyası ile (Bromofenol boyası) karıştırılmış ve bu karışımdan 10 μL alınarak agaroz jeldeki birinci kuyucuğa yükleme yapılmıştır.
- Bu işlem sırayla bütün tüpler (16 tüp) için tekrarlanmış ve sonunda agaroz jelde 16 adet kuyucuğa yükleme yapılmıştır.
- Tankın kapağı kapatılarak, 100 V'ta 120 dk yürütülmüştür (elektrik akımı uygulandığında moleküller porların içerisinden geçerek hareket etmeye başlarlar).
- Sürenin sonunda agaroz jel tanktan çıkarılarak jelde yürüyen DNA UV ışık altında görüntülenmiş ve fotoğrafı çekilmiştir (Şekil 3.14.).



Şekil 3.14. DNA hasarlayıcı-koruyucu aktivite testi jel görüntüsü

Nükleik asitler, fosfat gruplarına bağlı olarak negatif yüklü olduğu için pozitif (anod) kutba doğru hareket ederler. Moleküllerin elektriksel alan boyunca hareket oranları uygulanan akımın şiddetine, moleküllerin büyüklük ve şekline bağlıdır. Burada elde edilen görüntü kontrol guruplarıyla karşılaştırarak değerlendirilmiştir.

3.2.6. Mikronukleus (MN) Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Hücrelerin Hasatı, Boyanması ve Mikroskopik İncelemeler

Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması (Hücre Hasadı)

In vitro mikronukleus testinde Rothfuss ve ark. (Rothfuss ve ark., 2000) geliştirdikleri yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu yöntem gereği;

- Sağlıklı ve sigara içmeyen 19-22 yaş aralığında iki erkek ve iki kadından alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri kromozom mediumlarına steril şartlarda 6 damla (0.2 mL) ekilmiş ve hücreler $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 68 saat inkübe edilmiştir.
- Çalışmada kullanılan test maddesi HCQ'nun etkilerini belirlemek için kültür ortamına son konsantrasyonları 10, 20 veya 40 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde, kültürün başlangıcından 20 veya 44 saat sonra (kültür süresinin tamamlanmasından 48 veya 24 saat önce) ilave edilmiştir. Ayrıca her deneyin bir muamelesiz kontrol ve bir de pozitif kontrol grubu vardır. Test maddesi HCQ sitotoksik olmayan konsantrasyonları ön çalışmalarla saptanmıştır. En yüksek konsantrasyon olarak hücre bölünmesini %50 civarında azaltan doz seçilmiştir.
- İnkübasyonun başlangıcından 44 saat sonra (son 24 saat) her tüpe son konsantrasyonu 6 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde Cytochalasin-B maddesi ilave edilmiş ve böylece bölünen hücrelerde sitokinez engellenmiştir.

- İnkübasyonun sonunda, kültür tüpleri 2000 devir/dk'da 5 dk. santrifüj edilerek süpernatant alınmış ve hücrelerin bulunduğu tüplere hipotonik eriyik (%0,4 KCl, 37°C) yavaşça ve pipetaj yapılarak ilave edildikten sonra tüpler inkübasyon yapmaksızın direkt olarak santrifüje alınmıştır.
- Kültür tüpleri 1200 devir/dk.'da 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atılarak daha önceden hazırlanıp buzdolabında bekletilen birinci fiksatif (FİX1) (1/5/6 = glasiyal asetik asit/ metanol/%0,9 NaCl) ilave edilmiş ve tüplerdeki hücreler bu fiksatif ile oda sıcaklığında, ağızları kapalı olarak 20 dk boyunca bekletilerek muamele edilmiştir.
- Muameleden sonra 1200 devir/dk'da 10 dk. daha santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır.
- İkinci ve üçüncü fiksatif muamelesi, 1 kısım glasiyal asetik asit ile 5 kısım metanol (1/5) karıştırılarak hazırlanmış olan ikinci fiksatif (FİX2) ile yapılmıştır. Hücreler ikinci ve üçüncü fiksatif muamelesinden sonra 10 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Her fiksatif muamelesinden sonra tüplerdeki hücre süspansiyonu 10 dk. 1200 devir/dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Kültür tüplerinin dibinde toplanmış olan hücreler resüspanse edilerek homojen hale getirilmiştir.
- Daha sonra hücre süspansiyonu soğuk ve temiz lamalar üzerine 10 cm yükseklikten damlatılarak preparatlar hazırlanmıştır.

Preparatların Boyanması

Hazırlanan preparatlar bir gün sonra Sorensen tamponunda hazırlanmış %5'lik Giemsa boyası ile 5-7 dakika boyanmış ve boyanmış preparatlardaki fazla boyanın alınması için üç ayrı kapta bulunan saf sudan geçirilerek kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işleminden sonra preparatlara entellan ile lamel kapatılarak incelenmeye hazır daimî preparat haline getirilmiştir.

Mikronukleus (MN) Testi İçin Hazırlanan Preparatlarda Mikroskopik İnceleme

Hazırlanan daimî mikronukleus preparatları Olympus marka ışık mikroskopunda (10x40=400 büyütmede) incelenmiştir.

Mikronukleus Sayısı ve Nukleus Bölünme İndeksinin (NBİ) Saptanması

Mikronukleus sayısını belirlemek amacıyla her bir kişiye ait daimî preparatlarda her kişinin her muamele grubu ve kontrollerinde iki nukleusa sahip (binükleer) toplam 1000 hücre incelenmiş (4 kişi x 1000=4000 hücre) ve bu binükleer hücreler içerisinde mikronukleuslu olanlar saptanmıştır. Bundan mikronukleuslu binükleer hücre %'si hesaplanmıştır. Ayrıca incelenen hücrelerde toplam mikronukleus sayısı belirlenmiştir. Toplam mikronukleus sayısından MN %'si hesaplanmıştır.

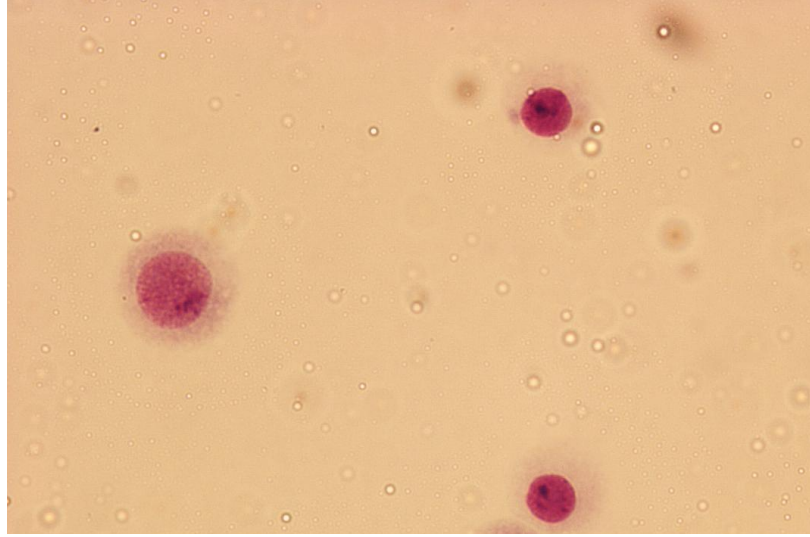
Binükleer hücre ve mikronükleus ayırımı Titenko-Holland ve ark. (1997) ve Fenech (2000)'in belirlediği özelliklere göre yapılmıştır (Fenech, 2000; Titenko-Holland ve ark., 1997).

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

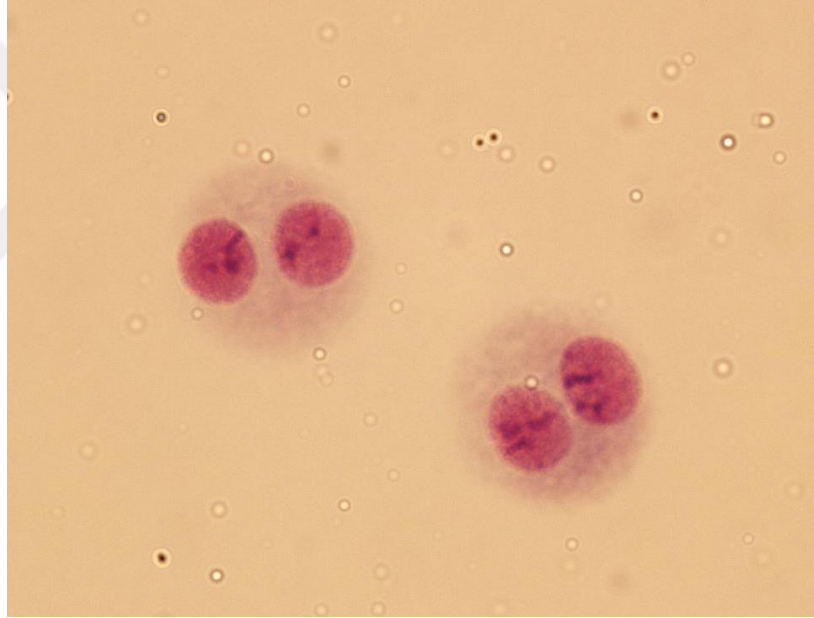
Sitokinez bloklama yönteminin en önemli yararı, bölünen hücre popülasyonunda nükleus bölünmesinin ilerleyişini ve çoğalmasını belirleyecek imkânı vermesidir. Bu durum, Cytochalasin-B ilavesinin ardından oluşan bir nükleuslu, iki nükleuslu, multinükleuslu (>2) hücrelerin sayılmasıyla yapılır. Nükleus bölünme indeksi Eastmond ve Tucker tarafından önerilen formüle göre hesaplanmıştır (Eastmond ve Tucker, 1989).

$$NBİ = \frac{(1xM1) + (2xM2) + (3xM3) + (4xM4)}{N}$$

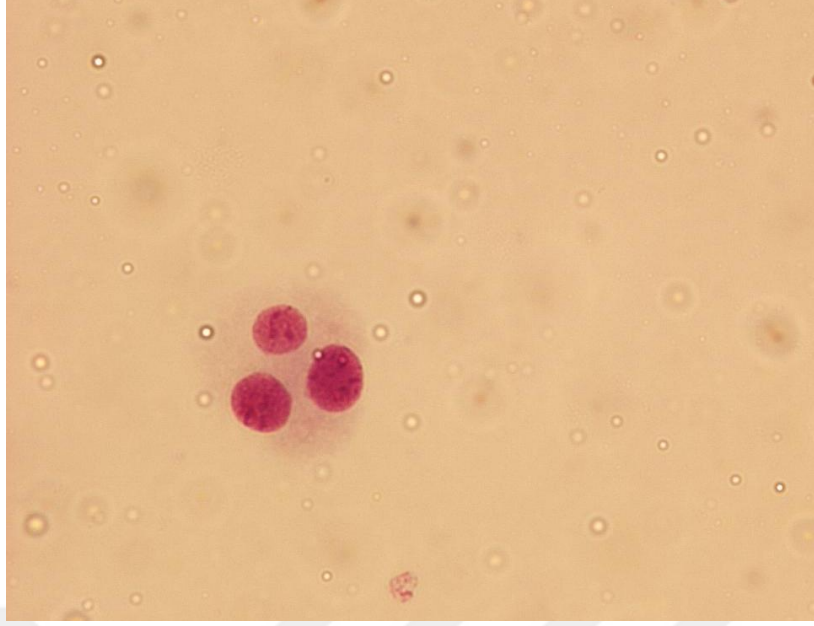
Formüle göre, M1 bir nükleuslu (Şekil 3.15.), M2 iki nükleuslu (Şekil 3.16.), M3 üç nükleuslu (Şekil 3.17.), M4 dört nükleuslu (Şekil 3.18.) hücrelerin sayısını, N ise toplam hücre sayısını göstermektedir. MN bakımından incelenen preparatlar daha sonra nükleus bölünme indeksini (NBİ) belirlemek için tekrar incelenmiştir. Bu çalışmada NBİ için, her bir kişinin preparatlarından tesadüfi seçilmiş alanlarda toplam 1000 hücre (4 kişide toplam 4000 hücre) incelenmiştir. NBİ'nin hesaplanması kimyasal maddenin veya fiziksel bir etkenin sitotoksik etkisini göstermede önemli bilgiler sağlar (Fenech, 1997).



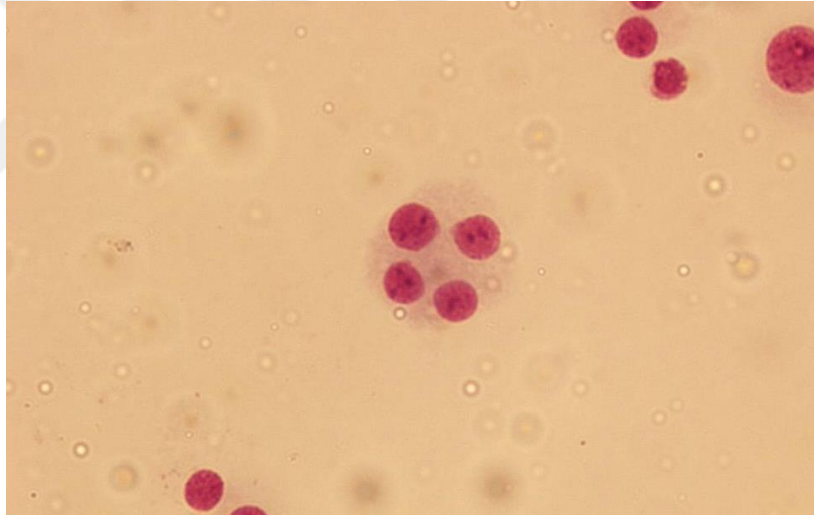
Şekil 3.15. Bir nukleuslu hücreler (X400).



Şekil 3.16. İki nukleuslu hücreler (X400).



Şekil 3.17. Üç nukleuslu hücre (X400).



Şekil 3.18. Dört nukleuslu hücre (X400).

3.2.7. Toplam Oksidan Kapasite (TOK) ve Total Antioksidan Yanıt (TAY) Ölçümü

TOK ve TAY deneyleri, ticari olarak temin edilen Elabscience marka biyokimyasal ölçüm kitleri (TOK için Cat no: E-BC-K802-M ve TAY için Cat no: E-BC-K801-M) kullanılarak yapılmıştır. Ölçümler Thermo Scientific marka Multiskan GO spektrofotometre (Seri no: 1510-03360C) kullanılarak yapılmıştır. Her iki test için de materyal olarak MN testi için 68 saat inkübe (24 veya 48 saat muamele) edilmiş hücre kültürlerinin ilk santrifüjünden sonra alınan ve $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan süpernatantlar kullanılmıştır.

TOK değerlerinin ölçümü, numune içindeki oksidanların, Fe^{+2} iyonunu (ferrous iyon) Fe^{+3} iyonuna (ferric iyon) okside etme esasına dayanmaktadır. Ferrik iyon asidik bir mediumda bulunan kromojenle etkileşmekte ve örnekte var olan oksidanların miktarıyla orantılı olarak renkli bir

kompleks oluşturmaktadır. Oluşan bu renkli kompleksin renk yoğunluğu testin sonunda 590 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Testin kalibrasyonu hidrojen peroksit ile yapılmakta ve sonuçlar litrede mikromolar hidrojen peroksit eşdeğer (μmol eşdeğeri $\text{H}_2\text{O}_2/\text{L}$) şeklinde ifade edilmektedir (Erel, 2005).

TAY değerlerinin belirlenmesi ise oldukça kararlı bir yapısı olan ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sülfonik asit)) radikal katyonunun sahip olduğu karakteristik rengin materyalin içinde bulunan antioksidanlar tarafından ağartılması esasına dayanmaktadır. Sonuçta oluşan renk 660 nm’de spektrofotometre ile ölçülmektedir. Sonuçlar mmol Trolox eşdeğeri/L olarak ifade edilmektedir (Erel, 2004).

Oksidatif stres indeksi (OSI) ise şu şekilde hesaplanmaktadır: OSI (rastgele ünit) = TOK (μmol H_2O_2 eşdeğeri/L) / TAY (mmol Trolox eşdeğeri/L) (Harma ve ark., 2003; Kosecik ve ark., 2005; Yumru ve ark., 2009).

3.2.8. *In silico* Moleküler Kenetlenme Analizi

Sitogenotoksik etkinin sebebini tespit edebilmek için *in silico* moleküler kenetlenme simülasyon analizi ücretsiz açık kaynak kodlu AutoDock vina paket programı kullanılarak yapılmıştır. Ligand molekül olarak kullanılan test maddesinin (HCQ) üç boyutlu yapısı PubChem veritabanından, reseptör proteininin DNA polimeraz delta holoenzimi (6TNY) üç boyutlu yapısı ise Protein Data Bank (PDB) veritabanından indirilmiştir. Ligandın (HCQ) reseptör proteinine bağlanma bölgesi Discovery Studio programı ile tanımlanmıştır. Ligand moleküllerinin, DNA polimeraz delta’ya en uygun bağlanma (kenetlenme) modları ve serbest bağlanma enerjisi (kcal/mol cinsinden Gibbs enerjisi) AutoDock Vina programının skorlama fonksiyonu ile hesaplanmıştır. Bu analizde hedef protein (reseptör) olan DNA polimeraz delta üzerinde seçilen bölgeler üç boyutlu X, Y, Z merkezli ızgara kutucuk koordinatları; center x = 154.198, center y = 159.785 ve center z = 174.375, ızgara kutusu boyutu (npts) 48 122 104 (size x = 48, size y = 122 ve size z = 104) olarak, ızgara kutusunun her bir ızgara noktası arasındaki mesafe ise 1 angstrom (Å) olarak ayarlanmıştır.

3.3. İstatistiksel Analiz

Lenfositlerin mikroskopik incelenmesi sonucunda elde edilen MN, NBI, komet, DNA hasarlayıcı-koruyucu aktivite testi sonucunda elde edilen veriler, total oksidan kapasite ile total oksidan yanıt testi yapılarak elde edilen spektrofotometrik absorban verileri ve Ames testi sonucunda elde edilen koloni verileri değerlendirilmiştir. Bunun için her bir muameleli gruptan belirlenen bulgu ortalamaları ile kontrol gruplarının ortalamaları arasındaki farkın önemli olup olmadığı IBM SPSS Statistics 25 programı kullanılarak One-Way Anova (ANOVA) analizi ile LSD testinde kontrol edilmiş ve $P \leq 0.05$ düzeyi anlamlı olarak kabul edilmiştir. Konsantrasyon-etki ilişkisini tespit etmek amacıyla regresyon ve korelasyon analizleri yapılmış, regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı (r) bulunmuş ve regresyon doğrusu çizilmiştir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Ames/Salmonella Gen Mutasyonu Bulguları

Farklı konsantrasyonda (0, 5, 10, 20, 40, 80 µg/petri) HCQ'e maruz bırakılmış *Salmonella typhimurium*'un oksotrofik TA98 ve TA100 suşları maruziyeti takiben katı besiyerinde farklı sayıda koloni oluşturmuştur. Bir çerçeve kayması mutanti olan TA98 suşuna uygulanan test maddesinin bütün konsantrasyonları kontrol grubu (0 µg/petri) düzeyinde bir revertant (prototrof) koloni sayısı oluşturmuştur. Olası sitotoksisite kaynaklı olan koloni sayısındaki kısmi azalmalar dikkat çekse de gözlenen önemsiz dalgalanmalar şeklinde olup güven aralığı içinde kalmıştır. Bu sonuç, test maddesinin TA98 suşunda çerçeve kayması tipi reversiyon (geri) mutasyonu uyardığı anlamına gelmektedir ($P>0.05$). Bununla birlikte pozitif kontrol olarak kullanılan ve çerçeve kayması mutajeni olan 4-Nitro-o-phenylenediamine (4-NPD) maddesi revertant koloni sayısını çok yüksek miktarda (≈ 1754 adet/petri) artırdığı için HCQ'nun neden olduğu koloni sayılarıyla arasında çok anlamlı farklılıklar çıkmıştır ($P<0.001$) (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Beş Farklı Konsantrasyonda HCQ ile Metabolik Aktivasyon Yokluğunda Muamele Edilen *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 Suşlarındaki Revertant Koloni Sayısı Ortalamaları*

Test Maddesi	Kons. (µg/petri)	TA98	TA100
		Koloni sayısı (Adet/Petri)	Koloni sayısı (Adet/Petri)
		RKSAO±SH	
PK (4-NPD)	20 µg/petri	1754,67±175,18	--
PK (SA)	1 µg/petri	--	422,33±28,75
HCQ	0	70,67±5,04	344,33±9,83
	5	71,33±11,83 b ₃	288,67±9,20 a ₁ b ₃
	10	64,67±2,90 b ₃	288,67±14,38 a ₁ b ₃
	20	75,33±5,66 b ₃	283,33±16,49 a ₁ b ₃
	40	57,67±12,01 b ₃	281,33±23,13 a ₁ b ₃
	80	58,00±2,08 b ₃	286,00±4,58 a ₁ b ₃

*: Her bir test grubu 3 tekrarı olarak sayılmıştır.

a: Kontrole (0 µg/petri) göre fark önemli; b: Pozitif kontrole (4-NPD ve SA) göre fark önemlidir. $a_1b_1 \leq 0.05$, $a_2b_2 \leq 0.01$, $a_3b_3 \leq 0.001$.

Nükleotid değişim mutanı olan TA100 suşunda, deneyde test edilen HCQ konsantrasyonlarının tamamı revertant koloni sayısı, kontrol (0 µg/petri) grubundaki koloni (~344 adet/petri) sayısından anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (P<0.05). Burada test maddesinin TA100 suşu üzerine olan muhtemel sitogenetik etki dikkat çekicidir. Yine pozitif kontrol ile test maddesi koloni sayıları arasındaki anlamlı fark oldukça yüksek seviyede bulunmuştur (P<0.001) (Çizelge 4.1.).

4.1.2. Komet (Kuyruklu Yıldız) Bulguları

Üç farklı konsantrasyonda (10, 20 veya 40 µg/mL) HCQ ile 1 saat muamele edilen insan periferel kan lenfositlerinde DNA hasarına bağlı olarak ortaya çıkan kuyruklu yıldız görüntüleri skorlanarak elde edilen verilere göre hasarlı hücre oranı (HHO) ve genetik hasar indeksi (GHI) verileri muamelesiz kontrol düzeyinde kalmıştır (P>0.05). Öte yandan aynı değerler pozitif kontrolden (H₂O₂) çok önemli düzeyde düşük bulunmuştur (P<0.001) (Çizelge 4.2.). Bu deneyin sonuçlarına göre HCQ'nun DNA üzerine belirgin bir zarar verici potansiyeli saptanmamıştır.

Çizelge 4.2. Üç Farklı Konsantrasyonda HCQ ile 1 saat Muamele Edilen İnsan Periferel Kan Lenfositlerinde Komet Testi Kapsamında Saptanan DNA Hasar Oranları

Test Maddesi	Muamele		Bulgu						
	Süre (saat)	Kons (µg/mL)	Hücre Tipleri*					% Hasarlı Hücre (HHO) ±SH	Genetik Hasar İndeksi (GHI) ±SH
			Tip 0	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4		
PK (H ₂ O ₂)	1	100 µM	15	36	32	45	72	74,50±5,50	2,62±0,16
HCQ	1	0	188	2	2	4	4	5,00±0,00	0,17±0,00
		10	191	2	2	3	2	3,50±0,50 b ₃	0,12±0,02 b ₃
		20	190	2	2	3	3	4,00±0,00 b ₃	0,14±0,00 b ₃
		40	192	2	2	2	2	3,00±0,00 b ₃	0,10±0,00 b ₃

*: Toplam 200 hücre değerlendirilmiştir. a: Kontrol (0 µg/mL) göre fark önemli; b: Pozitif kontrole (H₂O₂) göre fark önemlidir. a₁b₁ ≤ 0.05, a₂b₂ ≤ 0.01, a₃b₃ ≤ 0.001.

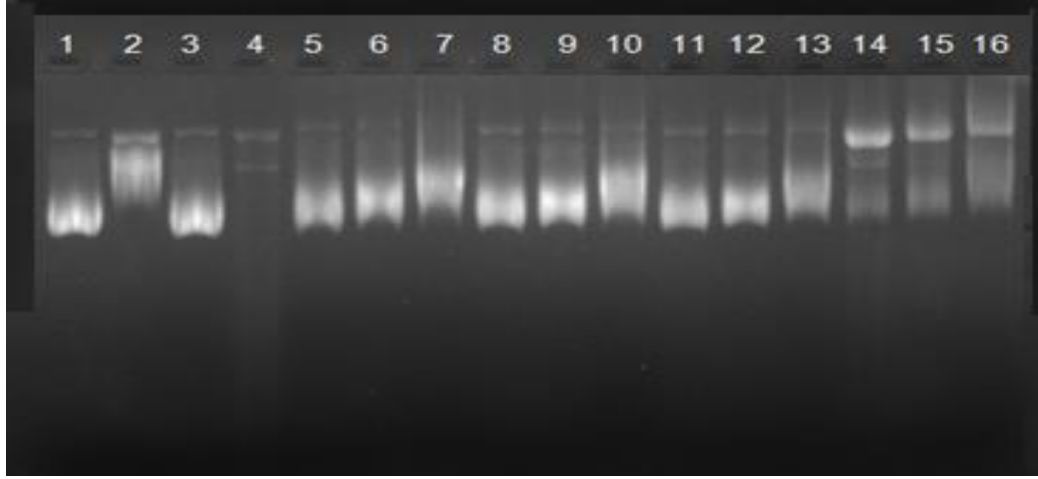
4.1.3. DNA Hasarlayıcı-Koruyucu (Radikal-Antiradikal) Aktivite Bulguları

Test maddesinin radikal veya antiradikal etkilerini belirlemek için ticari olarak temin edilen saf plazmit (pBR322) DNA ile yapılan çalışmada HCQ'nun DNA üzerindeki tek/çift iplik kırıcı etkileri araştırılmıştır. HCQ'nun doğrudan DNA hasarlayıcı etkisini belirlemek için muamelesiz kontrol olan 1 nolu örneğin bant deseni ile test maddesinin 5, 6 ve 7 nolu (sırasıyla 10, 20 ve 40 µg/mL konsantrasyonlarına maruz bırakılmış) varyantların bant desenleri karşılaştırılmıştır. Muamelesiz kontrol olan 1 nolu örnekte ilk bant belirgin, diğeri ise belirsiz bir bulanık bant (smear) şeklinde gözükmemektedir. Karşılaştırılan 5 ve 6 nolu örnekteki ilk bantın çok az bir farkla geride kaldığı gözlenmiştir. İlk bantta gözlenen bu durum örnekteki DNA konsantrasyon farklılığından ve/veya DNA moleküllerinin düzenli sarmal yapısının bozulmuş olmasından kaynaklanabileceği değerlendirilmektedir. En yüksek HCQ uygulanan 7 numaralı örnekte ise ilk bant tamamen kaybolmuş, smear şeklindeki diğeri bant ise belirgin olarak geride kalmıştır (Şekil 4.1.). Gözlenen bu sonuç HCQ ajanının özellikle yüksek konsantrasyonda olası klastojenik potansiyeli ile açıklanabilir.

Test maddesinin UV etkisine karşı DNA koruyucu potansiyelini ortaya çıkarmak için 2 nolu kontrol ile 8, 9 ve 10 numaralı (10, 20 ve 40 µg/mL) elektroforez yolu karşılaştırılmıştır. Her üç örnekte de ilk bantlar kontrol bantıyla aynı mesafeye ilerlemiş ancak 10 numaralı örnekte (40 µg/mL) bantın yoğunluğu görünür olarak azalmıştır. Bu durum test maddesinin yüksek konsantrasyonundan kaynaklanmış olabilir. Aynı grupta diğeri bantlar jelde bir miktar ilerleyerek smear görüntüsü oluşturmuştur. UV kontrolde (2 nolu örnek) gözükmeyen belirsiz ve bulanık bantlar ajanın olası koruyucu etkisinin kanıtı sayılabilir.

Çalışmadaki H₂O₂ etkisine karşı HCQ'nun koruyucu etkisini anlamak için 3 nolu kontrol ile 11, 12 ve 13 nolu örneklerin elektroforez yolu karşılaştırılmıştır. Burada kontroldeki bant motifleri ile test maddesi (11, 12 ve 13 numaralı) örneklerindeki motifler aynı çıkmıştır (Şekil 4.1.). Ayrıca bu çalışmada muhtemel bir deneysel artefakt sebebiyle H₂O₂'nin DNA bant desenleri üzerine herhangi bir bariz etki göstermediği dolayısıyla da koruyucu etkinin olup olmadığı konusu belirsiz kalmıştır.

UV+ H₂O₂ etkisine karşı HCQ'nun koruyucu etkisini anlamak için 4 nolu kontrol ile 14, 15 ve 16 nolu örnekler karşılaştırılmıştır. Kontrolde açık şekilde iki bant gözlenmiş olup 14 nolu örnek (10 µg/mL), kontrole benzer çıkmış yani test maddesinin herhangi bir koruyucu etkisi gözlenmemiştir. Oysa diğeri konsantrasyonlarda (15 ve 16 nolu örnekler) H₂O₂ kaynaklı ikinci bant gözden kaybolmuştur (Şekil 4.1.). Dolayısıyla bu örneklerde (20 ve 40 µg/mL) olası koruyucu etki ortaya çıkmıştır.



Şekil 4.1. HCQ'nun pBR322 plazmid DNA'sı üzerine olan zarar verici-koruyucu etkileri.

1. Kontrol : DNA + saf su
2. Kontrol : DNA + saf su + UV
3. Kontrol : DNA + saf su + H₂O₂
4. Kontrol : DNA + saf su + UV + H₂O₂
5. D(do21) : DNA +10 µg/mL + saf su
6. D(do22) : DNA +20 µg/mL + saf su
7. D(do23) : DNA + 40 µg/mL + saf su
8. D(UV) : DNA +10 µg/mL+ saf su + UV
9. D(UV) : DNA +20 µg/mL+ saf su + UV
10. D(UV) : DNA + 40 µg/mL+ saf su + UV
11. D(H2O2): DNA +10 µg/mL+ H₂O₂
12. D(H2O2): DNA +20 µg/mL+ H₂O₂
13. D(H2O2): DNA +40 µg/mL+ H₂O₂
14. D(2Pk) : DNA +10 µg/mL+ UV + H₂O₂
15. D(2Pk) : DNA +20 µg/mL+ UV + H₂O₂
16. D(2Pk) : DNA +40 µg/mL+ UV + H₂O₂

4.1.4. Mikronukleus Bulguları

Farklı konsantrasyon ve sürelerde HCQ'ya maruz bırakılan insan periferik kan lenfositlerinde ajanın klastojenik ve/veya anöjenik etkilerinden kaynaklanan iki nukleuslu (binukleer) hücrelerdeki toplam mikronukleus (MN) sayıları küçük dalgalanmalarla birlikte muamelesiz kontrol düzeyinde kalmıştır ($P>0.05$). Bu önemsiz dalgalanmalar 24 saatlik muamelede yukarı yönlü, 48 saatlik muamelede ise aşağı yönlü olmuştur. Öte yandan saptanan bu MN oranları pozitif kontrol mitomycin C (MMC)'nin sebep olduğu MN oranları ile karşılaştırıldığında oldukça önemli farklılıklar saptanmıştır ($P<0.001$) (Çizelge 4.3.). Deneyde MN

içeren binukleer hücre oranları toplam MN oranlarıyla büyük ölçüde benzerlik göstermektedir (Şekil 4.2. ve Şekil 4.3.). Bu durum belirlenen MN oluşumlarının her birinin bir hücrede olduğuna işaret etmektedir.

Çizelge 4.3. Farklı Konsantrasyonlarda HCQ ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferik Kan Lenfositlerinde Hücre Başına Düşen Toplam MN %'si, MN içeren İki Nukleuslu Hücre Oranı (%MNBH) ve Nükleer Bölünme İndeksi (NBI) Değerleri*

Test maddesi	Muamele		Toplam % MN \pm SH	% MN içeren iki nukleuslu hücre \pm SH	Nükleus Sayısına Göre Hücrelerin Dağılımı				NBI \pm SH
	Süre (saat)	Kons (μ g/mL)			1	2	3	4	
PK (MMC)	24	0,25 μ L/mL	25,50 \pm 1,75	24,00 \pm 1,58	2782	1118	70	30	1,337 \pm 0,04
HCQ	24	0	8,00 \pm 0,40	7,75 \pm 0,47	2161	1432	221	186	1,608 \pm 0,04
		10	9,50 \pm 0,64 b ₃	9,00 \pm 0,70 b ₃	2584	1220	131	65	1,419 \pm 0,03 a ₂
		20	9,75 \pm 0,85 b ₃	9,00 \pm 1,22 b ₃	2711	1140	116	33	1,368 \pm 0,04 a ₃
		40	9,75 \pm 1,10 b ₃	9,75 \pm 1,10 b ₃	2801	1112	73	14	1,325 \pm 0,04 a ₃
PK (MMC)	48	0,25 μ L/mL	147,50 \pm 3,40	134,75 \pm 4,38	3278	632	78	12	1,206 \pm 0,02
HCQ	48	0	8,00 \pm 0,40	7,75 \pm 0,47	2161	1432	221	186	1,608 \pm 0,04
		10	8,00 \pm 0,70 b ₃	8,00 \pm 0,70 b ₃	2344	1399	182	75	1,497 \pm 0,04 b ₃
		20	6,25 \pm 0,47 b ₃	6,25 \pm 0,47 b ₃	2653	1189	119	39	1,386 \pm 0,05 a ₃ b ₂
		40	4,00 \pm 0,57 b ₃ †	4,00 \pm 0,57 b ₃ †	3063	783	130	24	1,279 \pm 0,02 a ₃

*: Her bir donörden 1000, toplam 4000 hücre üzerinden hesaplanmıştır. †: Toplam 3000 hücre üzerinden hesaplanmıştır. a: Kontrole göre fark önemli; b: Pozitif kontrole (MMC) göre fark önemlidir. a₁b₁ \leq 0.05, a₂b₂ \leq 0.01, a₃b₃ \leq 0.001.

HCQ'nun sitotoksik etkisini belirlemek için yapılan nükleus bölünme indeksi (NBI) verileri incelendiğinde özellikle 24 saatlik muamele grubunda bütün konsantrasyonlarda bariz sitotoksik/sitostatik etki saptanmıştır (P<0.001). HCQ bu muamele süresinde pozitif kontrol MMC kadar sitotoksik etki göstermiştir. Öte yandan 48 saatlik HCQ uygulamasında yüksek iki konsantrasyonda kontrole göre anlamlı NBI azalmaları saptanmış hatta bu azalma en yüksek konsantrasyonda (40 μ g/mL) pozitif kontrole benzer çıkmıştır. Bu periyotta en düşük dozda saptanan NBI azalması kontrole göre anlamlı bulunmamıştır (P>0.05) (Çizelge 4.3.).

Özetle, mikronükleus deneyinde test maddesi HCQ, test edilen konsantrasyonlarda kültüre alınmış periferik kan lenfositlerinde bariz sitotoksik etki göstermiştir.

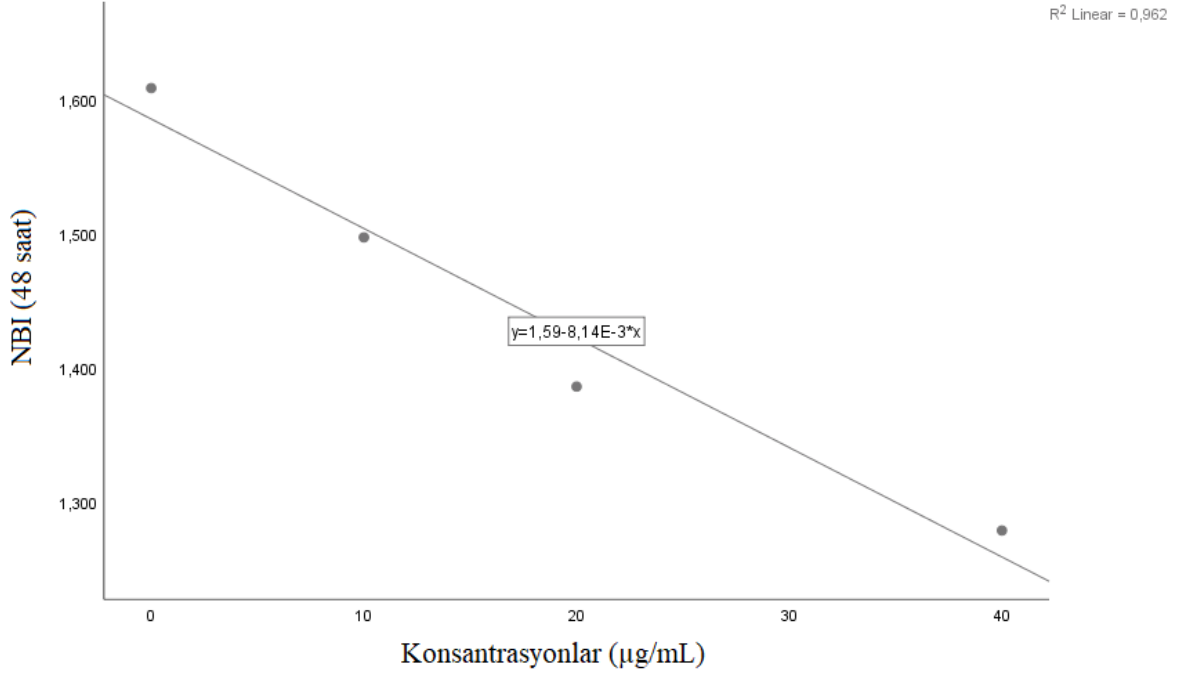
Ayrıca 48 saatlik HCQ uygulamasının neden olduğu konsantrasyona bağı NBI azalması anlamlı bulunmuştur (P=0.019) (Şekil 4.4).



Şekil 4.2. Bir mikronukleuslu binükleer hücre (10 µg/mL HCQ, 24 saat inkübasyon) (X400).



Şekil 4.3. İki mikronukleuslu binükleer hücre (20 µg/mL HCQ, 24 saat inkübasyon) (X400).



Şekil 4.4. HCQ ile 48 saat muamele edilen hücrelerde saptanan nükleus bölünme indeksi (NBI) verilerinde anlamlı konsantrasyon-etki ilişkisini gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.

4.1.5. Oksidatif Stres Bulguları

Oksidatif stresi belirlemek için kullanılan materyal, MN deneyindeki 68 saatlik kültürlerden alınan hüresiz süpernatant sıvısıdır. Kontroller ve 24 veya 48 saat muamele edilen kültürlerden alınan sıvılardaki total oksidan kapasite (TOK) değerleri farklı bir eğilim göstermiştir. Genel anlamda TOK seviyesinde kontrole göre bir azalma saptanmakla birlikte 24 saatte 10 ve 20 µg/mL, 48 saatte ise 20 ve 40 µg/mL konsantrasyonlardaki TOK azalması kontrole göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($P < 0.05$). Bununla birlikte pozitif kontrole göre farklılık saptanmamıştır.

Total antioksidan yanıt (TAY) verileri yönünden hiçbir varyantta her iki kontrole göre önemli farklılıklar gözlenmemiştir.

Ölçülen TOK ve TAY değerlerinden hesaplanan oksidatif stres indeksi (OSİ) verileri analiz edildiğinde sadece 48 saatlik, 20 ve 40 µg/mL uygulamalarındaki saptanan değerler muamelesiz kontrole göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (Çizelge 4.4.).

Bu sonuçlara göre 48 saat yüksek dozda HCQ uygulaması oksidatif stresi baskılamaktadır.

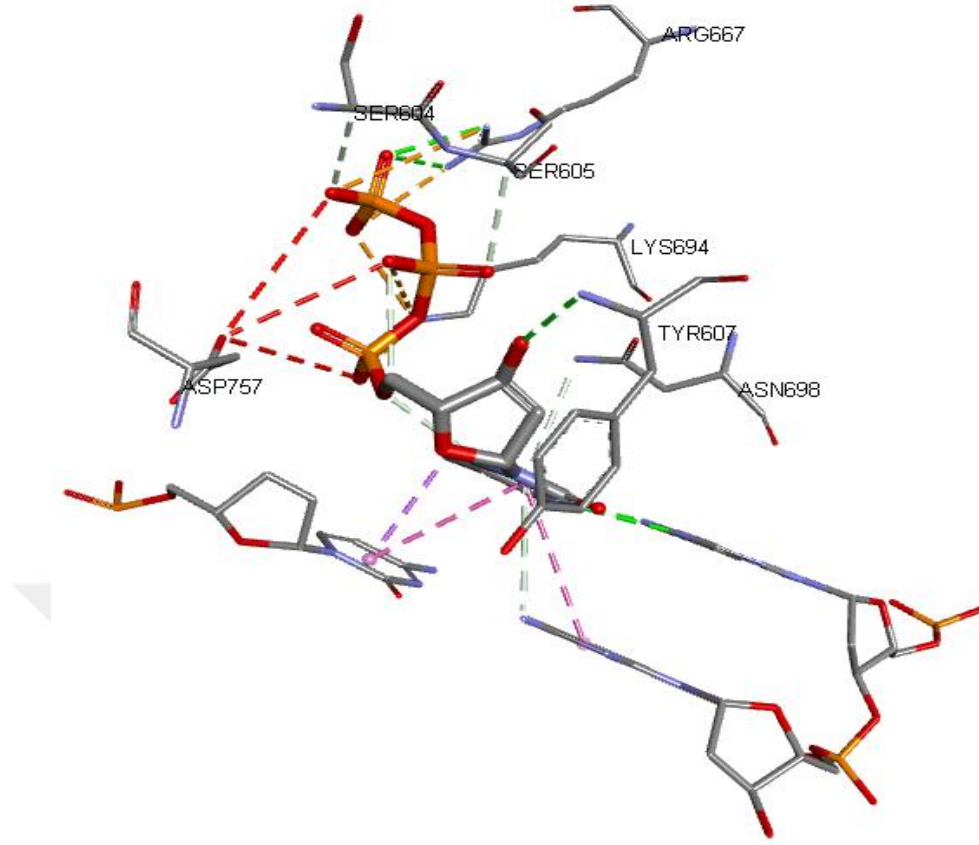
Çizelge 4.4. Farklı Konsantrasyonlarda HCQ ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferik Kan Lenfositlerinde Toplam Oksidan Kapasite (TOK), Toplam Antioksidan Yantı (TAY) ve Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Test maddesi	Muamele		TOK $\mu\text{mol eşdeğeri H}_2\text{O}_2/\text{L}$	TAY $\text{mmol eşdeğeri Trolox/L}$	OSİ (TOK/TAY)
	Süre (saat)	Kons. ($\mu\text{g/mL}$)			
Kontrol	24		0,0908 \pm 0,003	0,488 \pm 0,008	0,1864 \pm 0,009
PK (MMC)	24	0,25 $\mu\text{L/mL}$	0,0848 \pm 0,004	0,497 \pm 0,005	0,1705 \pm 0,06
HCQ	24	10	0,0828 \pm 0,003 a1	0,4835 \pm 0,016	0,172 \pm 0,010
		20	0,0826 \pm 0,001 a1	0,491 \pm 0,007	0,1684 \pm 0,004
		40	0,0853 \pm 0,002	0,4921 \pm 0,008	0,1735 \pm 0,006
Kontrol	48	-	0,0908 \pm 0,003	0,488 \pm 0,008	0,1864 \pm 0,009
PK (MMC)	48	0,25 $\mu\text{L/mL}$	0,0869 \pm 0,002	0,5066 \pm 0,010	0,1719 \pm 0,006
HCQ	48	10	0,084 \pm 0,002	0,5017 \pm 0,007	0,1676 \pm 0,006
		20	0,082 \pm 0,002 a1	0,5029 \pm 0,003	0,163 \pm 0,004 a1
		40	0,0827 \pm 0,002 a1	0,5099 \pm 0,005	0,1623 \pm 0,005 a1

a: Kontrole göre fark önemli; b: Pozitif kontrole (MMC) göre fark önemlidir.
 $a_1b_1 \leq 0.05$, $a_2b_2 \leq 0.01$, $a_3b_3 \leq 0.001$.

4.1.6. *In Silico* (Dijital Simülasyonla) Moleküler Kenetlenme Analizi

Çalışmamızda yapılan deneylerin tamamında test maddesi HCQ'nun belirgin genotoksik etkisine ulaşmadık ancak bariz sitotoksik etkinin varlığı dikkat çekicidir. Sitotoksik etkinin DNA sentez (replikasyon) handikabıyla ilişkili olup olmadığını saptamak için insan prosesif DNA polimeraz delta (6TNY) ile HCQ molekülleri arasındaki *in silico* kenetlenme analizi (Autodock vina paket programı) yapılmıştır. Bu işlemde spacing 1 Å ve X, Y, Z boyutundaki nokta sayısı sırasıyla 48, 122, 104 ilaveten X, Y, Z merkezli ızgara kutu koordinatları ise 154.198, 159.785, 174.375 olarak belirlenmiştir. Ligand HCQ'nun reseptör olarak seçilen DNA polimeraz deltaya ait aminoasit residüleriyle yaptığı etkileşim Şekil 4.5'te gösterilmiştir. *In silico* analizlerden elde edilen çıktılara göre moleküllerin birbirine olan afinitesinin göstergesi olan en düşük Gibbs serbest bağlanma enerjisi (ΔG), yani reaksiyondaki entalpi değişimi -5.6 kcal/mol olarak bulunmuştur. Bu serbest bağlanma enerjisi spontan olarak gerçekleşen ve dışarıya ısı veren ekzotermik bir reaksiyona işaret etmekte olup reseptör (DNA pol.) ile ligand (HCQ) arasında çok güçlü olmayan bir afinitenin olduğunu göstermektedir. Literatürde aktif ve güçlü kenetlenme enerjisinin <-6 kcal/mol sınırı belirlenmiş (Shityakov ve Förster, 2014) olsa da bizim analiz ettiğimiz moleküllerin kenetlenme enerjisi bu değere yakın bulunmuştur. Bu sonuç sitotoksikite bulgusuyla kısmen ilişkilidir.



Şekil 4.5. HCQ'nun DNA polimeraz Delta aminoasit residüleriyle yaptığı etkileşim.

4.2. Tartışma

Bulgular kısmında geniş kapsamlı ve ayrıntılı olarak ele alındığı gibi test maddesi hydroxycloquine sulfate (HCQ) ile yapılan *in vitro* deneylerde belirgin bir genotoksik ve mutajenik etki saptanmamıştır. Ayrıca ajan ılımlı antioksidan (antiradikal) potansiyele sahiptir. Bununla birlikte güçlü sitotoksik etki oldukça belirgindir. Hydroxycloquine (HCQ) ve DNA polimeraz delta ile yaptığımız moleküler kenetlenme simülasyon analizine göre etkileşimin çok kuvvetli olmadığı (Gibbs enerjisi = -5.6 kcal/mol) ortaya çıkmıştır. Ancak farklı bir çalışmada HCQ'nun insan topoisomerase III-beta enziminin aktif bölgesine bağlandığı ve bağlanma enerjisinin -6.1 kcal/mol olduğu raporlanmıştır (Navya ve Hosur, 2021). Bulunan bu sitotoksik etkinin sebeplerini tartışmaya geçmeden önce HCQ'nun tarihçesi ile ilgili özet bir bilgi aşağıdadır.

Cinchona (Kınakına) ağacının kabuğunda bulunan ve acı bir alkaloid olan kinin sıtma hastalığı tedavisinde yüzyıllardır kullanılmaktadır. Sıtmayı tedavi etmek için kinin kullanımı dair ilk veriler 1600'lerde Güney Amerika'daki Cizvit misyonerler tarafından kaydedilmiştir. Bölgenin yerli halkının yüksek ateşi tedavi etmek için kınakına ağaç kabuğu kullandıklarına dair gözlemin ardından kınakına kabuğu Avrupa'ya getirilmiştir. Zamanla saflaştırılan kinin hızla sıtma için standart tedavi haline gelmiş ve 200 yıldan fazla bir süredir öyle kalmıştır. 1900'lerin başında sentetik sıtma önleyici ilaçlar geliştirilmesiyle kinin daha az sıklıkla kullanılmaya başlamıştır. Bununla birlikte özellikle sentetik sıtma önleyici ilaçlara direncin yüksek olduğu bölgelerde, sıtma

için kinin hala önemli bir tedavi edicidir. Ayrıca bacak kramplarını tedavi etmek, hareket hastalığını önlemek ve ateşi azaltmak gibi başka amaçlar için de kinin kullanılmaktadır. Aynı zamanda kinin popüler bir alkolsüz içecek olan tonik içeceğinin bir bileşenidir (Achan ve ark., 2011; Menakuru ve ark., 2021).

Klorokin (CQ) ajanı sıtma, romatoid artrit, lupus ve diğer otoimmün hastalıkları tedavi etmek için kullanılan bir ilaçtır. İlk olarak 1934 yılında Alman bilim adamları tarafından sentezlenmiş ve 1940'larda tıbbi kullanıma sunulmuştur. Kinin'den sentetik olarak türetilmiş olan klorokin, kinine kıyasla daha az yan etkiye sahiptir. Her ikisi de antimalaryal ilaç olan bu ajanlardan klorokin, kininden daha güçlüdür. Kinin genellikle doğal olarak kınakına ağacından elde edilirken klorokin sentetik olarak üretilir (Kouznetsov ve Amado Torres, 2008; Krafts ve ark., 2012).

HCQ, klorokin molekülüne bir hidroksil grubu eklenmesiyle elde edilen bir türev olup her ikisi de 4-aminokinolin yapısında bileşiklerdir. Bu ajanların antimalaryal, antienflamatuar ve immün modülatör özellikleri vardır. İlk olarak 1955 yılında keşfedilmiş ve tedavi amaçlı kullanılmaya başlanmıştır. HCQ, malarya tedavisinde etkili olduğu gibi romatoid artrit ve lupus gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. HCQ, klorokine kıyasla daha az toksik olduğu için tercih edilmektedir (Ben-Zvi ve ark., 2012; Ducharme ve Farinotti, 1996).

HCQ'in yapısında klorokinden farklı olarak bir hidroksil grubu bulunur. Hidroksil grubu, HCQ'i klorokinden daha az lipofilik (yağda çözünür) hale getirir, bu da molekülün farmakodinamik ve farmakokinetik karakterine farklı katkıda bulunabilir. Sonuç olarak HCQ'in yan etkileri ve şiddeti klorokinden daha az iken yarı ömrü daha uzundur. HCQ'in biyoyararlanımı da klorokinden daha yüksektir. Bu nedenle HCQ'in dozu klorokinden daha düşüktür (Stokkermans ve ark., 2022).

Bir derleme çalışmada, immünomodülatör etkilere sahip olduğu bilinen CQ'nun çoklu test sistemlerinde mutajenik ve genotoksik etkilere neden olabileceğine dair verilerin bulunduğu bununla birlikte, HCQ için mutajenik ve genotoksik etkileri değerlendirmek için yeterli verinin henüz mevcut olmadığı belirtilmektedir (Giri ve ark., 2020).

Hücrelerin hasarlı veya gereksiz protein ve organellerinin parçaladığı biyolojik bir süreç olan otofaji, hücre sağlığı açısından hayati bir rol oynar. Bu özelliği ile kanser hücrelerinde otofaji beklenenin aksine tümör büyümesini ve metastazı teşvik etmeye yardımcı olabilir. Dolayısıyla yeni antikanser rejimlerinin tasarımı için otofaji makinesi cazip bir hedef haline gelmiştir. Buna göre klorokin ve HCQ dahil olmak üzere otofaji inhibitörlerinin özellikle kemo- veya radyoterapötik müdahalelerle birleştirildiğinde, prelinik modellerde önemli antineoplastik etkilerin ortaya çıkmasına aracılık ettiği ifade edilmiştir (Manic ve ark., 2014). Çeşitli insan hastalıklarının tedavisinde kullanılan CQ ve HCQ hem kanser hücreleri hem de tümör mikro ortamı üzerinde birtakım etkiler gösterir. CQ ve HCQ'nun en çok çalışılan anti-kanser etkisi olan otofajik akış

inhibisyonuna ek olarak kanser hücrelerinde Toll benzeri reseptör 9, p53 ve bir kemokin reseptörü ve ligandı olan CXCR4-CXCL12 yolunu etkiler. Burada CQ'nun tümör stromasında, tümör vaskülatürünü (yeni damar oluşumu), kanserle ilişkili fibroblastları ve bağışıklık sistemini etkilediği gösterilmiştir (Verbaander ve ark., 2017).

Lizozomotropik bir amin olan HCQ'nun hem pH gradyanında azalmaya bağlı lizozomal membran geçirgenliğiyle bağlantılı kaspaz aktivasyonu yoluyla, hem de mitokondrial zara HCQ kaynaklı Bax eklenmesi ve konformasyon değişikliğini takiben mitokondri membran permeabilitesine neden olarak sitokrom C salınımı yoluyla apoptozu uyardığı ifade edilmiştir. Burada HCQ hem lizozomal hem de mitokondriyal yolu kullanarak sitotoksiteyi (apoptozu) indüklemektedir (Boya ve ark., 2003). Farklı bir çalışmada HCQ klinik konsantrasyonu; bir tür beyaz kan hücresi olan CD4 T- hücrelerinde mitokondriyal süperoksitin artmasına, otofaji etkinliğinin bozulmasına ve CD4 T- hücrelerinde proliferasyonun azalmasına yol açmıştır (Kim ve ark., 2021). HCQ muamelesi, böbrek karsinom hücrelerinde mitokondriyal oksijen tüketimini inhibe ederek, glikoliz oranı ve apoptozu teşvik eder, bu sonuç büyümeyi inhibe etmektedir (Lee ve ark., 2015).

HCQ'nun 8 ve 5 μ M konsantrasyonları ile muamele edilen primer fare embriyonik fibroblastlarındaki (MEF'ler) oksidatif DNA hasarında (8-oksodG) anlamlı indüksiyonunun varlığı enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA) ile gösterilmiştir. Ayrıca bu ajanın 25 μ M dozuyla tedavi edilen primer ve kendiliğinden ölümsüzleştirilmiş Big Blue MEF'lerde kanser genetiğini incelemek için değerli bir araç olan cII mutant frekansında sırasıyla 2.2 ve 1.8 kat göreceli artışlar ortaya çıkmıştır (Besaratina ve ark., 2021).

Birkaç istisna hariç yukarıda alıntılanan çalışmaların genelinde ve bizim çalışmamızda HCQ için yeterli genotoksite verilerine ulaşılamamış ancak bizim çalışmamız dâhil tamamına yakınında belirgin sitotoksik etki teyit edilmiştir. Sitotoksiteye neden olan moleküler değişikliğin olağan doğası net olarak açıklanmasa da HCQ'nun demir atomu ile olan etkileşimi sitotoksite olgusuna kritik ipuçları sağlayabilir. Çok sayıda hücrel mekanizmayı düzenleyen demir temel bir mikro elementtir ve birçok metabolik yolda kofaktör olarak işlev gören önemli bir redoks elementidir. Demirin önemli fizyolojik rolleri arasında oksidatif fosforilasyon (ATP üretimi), embriyonik nöronal gelişim, demir-kükürt kümelerinin oluşumu ve çoklu DNA onarım enzimleri (helikazlar, nükleazlar, glikozilazlar, demetilazlar) ve ribonükleotid redüktaz dâhil olmak üzere DNA metabolizmasındaki kritik enzimler, demiri işlev görmek için vazgeçilmez bir kofaktör olarak kullanır. Son zamanlardaki çarpıcı sonuçlar, DNA polimerazların katalitik alt biriminin, kararlı ve aktif komplekslerin oluşumu için gerekli olan demir-kükürt (Fe-S) kümelerini bağlayan korunmuş sistein bakımından zengin motifler içerdiğini ortaya koymuştur. Buna paralel olarak, DNA sentezi/onarımında rol oynayan ve demir gerektiren enzimlere yerleşecek olan Fe/S kümesinin biyogenez veya eklenmesindeki kritik hatalar mitokondriyal ve sitoplazmik defektlere, nükleer DNA hasarına ve genom instabilitesine yol açmaktadır (Puig ve ark., 2017). Ayrıca hücredeki

fizyolojik ve patolojik önemi nedeniyle demir alımı, taşınması ve depolanması sıkı bir şekilde düzenlenerek homeostazın sağlanması gerekir. Endolizozomlar, demir ve diğer metaller dâhil olmak üzere çeşitli katyonları kolayca salabilen asidik depo organellerdir. Ancak demir (Fe^{2+}) seviyesi artışları, Fenton kimya reaksiyonları yoluyla reaktif oksijen türleri (ROS) üretebilir ve bu artışlar, mitokondri ve genomik DNA'ya zarar vermenin yanı sıra karsinogenezi teşvik edebilir. Klorokin'in (CQ) dâhil olduğu bir grup ilacın (fluoksetin, imipramin, dimebon, tamoksifen, rotenon, klorpromazin, amitriptilin ve verapamil), endolizozom lümeninin asiditesini azaltabileceği ve buna bağlı olarak endolizozomal kalsiyumun sitozole salınabileceği ifade edilmiştir (Halcrow ve ark., 2021; Lu ve ark., 2017; Mader ve ark., 2012; Styrt ve Klempner, 1988).

Yaşlanan hücreler ışınlama, replikatif veya onkojenik uyarılara bakılmaksızın, demir homeostaz proteinlerinin seviyelerinde eşlik eden değişikliklerle birlikte çok miktarda hücre içi demir (30 katına kadar) biriktirir. Yaşlanan hücrelerde demir birikimi, ferritin degradasyonunu ve ferroptozu teşvik eden bir lizozomal süreç olan bozulmuş ferritinofaji¹ tarafından yönlendirilmektedir (Masaldan ve ark., 2018).

Bununla birlikte literatürde HCQ'nun hücredeki demir homeostazı üzerine olumsuz etkisi net olarak vurgulanmaktadır (Drakesmith ve Prentice, 2008). Demir kısıtlaması olan diyetlerin, mitokondriyal sitrat sentezi inhibisyonunun veya demir şelasyonunun bazı tümörler için lizozomal pH inhibitörleri ile kombinasyon halinde hedeflenip hedeflenemeyeceğinin belirlenmesi araştırmacılar tarafından önemsenmektedir. Bu konuda yapılan deneyler, lizozomal disfonksiyonun, demir tükenmesinden dolayı mitokondriyal metabolizmayı ve kanser gelişiminde bir transkripsiyon faktörü olan HIF (Hipoksi-İndüklenebilir Faktör) sinyalini önemli ölçüde değiştirdiği ortaya konmuştur. Mevcut bulgular hücre proliferasyonu ve lizozomal asitliğin anahtar işlevi için demir homeostazının belirleyici olabileceğini önermiştir (Weber ve ark., 2020). Bu bağlamda HCQ gibi lizozomal pH'ı bozan ilaçlar, çeşitli kanser türleri için klinik deneylerde etkinlik göstermektedir. Etkilerin bir kısmı, bazı tümörlerin makropinositoz ve otofaji gibi katabolik yollara bağlı olmasına atfedilirken, demirin kanser hücreleri için sınırlayıcı bir metal olma olasılığı artmaktadır. Gerçekten de fare pankreas kanseri modelinde demir şelasyonu ve klorokin muamelesi deneysel olarak öldürücü etki göstermiştir. Benzer şekilde demir homeostazı hedeflenerek tümör mikroçevresinde lizozomal asitliği bozabilecek konsantrasyonlarda toksik amonyak birikebilir (Spinelli ve ark., 2017). Lizozomal asidite artışı, konakçı hücreler tarafından demir alımını engelleyebilir. Fe^{3+} 'in transferrinden ayrışması ve demirin endozom lümeninden sitozole çıkarılması gibi hücresel demir alımındaki adımların çoğu organel pH'ına bağlıdır ve bu CQ ve HCQ tarafından bozulabildiği önerilmektedir. Kültürlenmiş embriyonik fibroblastlarda, 100 μ M CQ'nun transferrin alımını engellediği gösterilmiştir. Bu nedenle CQ ve HCQ, hücresel demir

¹ Ferritinofaji, vücutta demir depolayan ve ferritin adı verilen bir proteinin otofaji yoluyla parçalanması ve demirin salınması sürecidir.,

açlığını tetikleyebileceği ve bağışıklığı azaltabileceği ifade edilmiştir (Altulea ve ark., 2021; Octave ve ark., 1982; Quiros Roldan ve ark., 2020).

Ökaryotik hücreler, demir-kükürt (Fe-S) küme proteinleri, hemoproteinler ve ribonükleotit redüktazlar (RNR'ler) gibi çok sayıda demir gerektiren protein içerir. Bu proteinler demiri bir kofaktör olarak kullanır ve DNA replikasyonu, DNA onarımı, metabolik kataliz, demir regülasyonu ve hücre döngüsü ilerlemesinde kilit roller üstlenir. Demir homeostazının bozulması, her zaman bu demir gerektiren proteinlerin işlevlerini bozar ve genetik olarak, memelilerde DNA onarım kusurları ile karakterize edilen hastalıklarla ilişkilidir (Zhang, 2014). Benzer şekilde demir, translasyon da dâhil olmak üzere temel hücresel işlevlerde yer alan birçok enzim için kofaktör görevi gördüğünden tüm ökaryotlarda temel bir elementtir. Memeli demir düzenleyici protein/demire duyarlı element (IRP/IRE) sistemi, yüksek ökaryotlarda translasyonel düzenlemenin ilk örneklerinden biri olarak ortaya çıkmıştır. *Saccharomyces cerevisiae* mayasında başlangıç adımı amino asit eksikliği, oksidatif stres, hipoksi, demir eksikliği gibi çeşitli stres faktörlerine karşı hücreleri korumak için mRNA çevirisini düzenleyen Gcn2-eIF2 α yolunun aracılık ettiği global bir translasyon bozukluğuna neden olur. Transkripsiyon sonrası mayalarda RNA bağlayıcı bir protein olan Cth2 demir eksikliği sinyalini algılar ve demir içeren proteinleri kodlayan mRNA'ları parçalar. Bu durum hücrenin hayatta kalmasını ve yaşlanmasını etkiler. Demir eksikliği durumunda Cth2, demirle ilişkili transkriptlerin bir alt grubunun translasyonunu spesifik olarak baskılar. Ek olarak translasyon işleminin başlama, uzama ve sonlanma gibi birkaç aktif aşaması demir içeren enzimlere bağlıdır. Bunlar içinde translasyon uzatma faktörlerinin ve transfer RNA'ların (tRNA'lar) özel modifikasyonları ile ATP bağlayıcı kaset ailesi üyesi olan maya hücrelerinde ribozom biyogenezi ve translasyonu başlatma/sonlandırma gibi işlevlere sahip bir demir-kükürt (Fe-S) proteini olarak da bilinen Rli1 (insanlarda ABCE1) ve prolin hidrosilaz Tpa1 sayılabilir (Romero ve ark., 2021).

Bizim deneyimizde en yüksek iki konsantrasyonun (20 ve 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 48 saat uygulandığı hücre kültüründe oksidatif stres muamelesiz kontrole göre anlamlı oranda azalmıştır. Bu sonuç test maddesinin demir bağlama (şelasyon) etkinliğinden kaynaklanmış olabilir. Çünkü hücredeki demir oksidatif stresin önemli sebeplerinden biridir. Hücrelerde ve dokularda fazla miktarda demir bulunduğu, redoks homeostazi bozularak reaktif oksijen türlerinin (ROS) yayılmasını katalize eder, bu da oksidatif strese yol açar. ROS, fizyolojik sinyal yolları için kritiktir, ancak oksidatif stres, doku yaralanması ve birçok hastalıkla ilişkilidir. Hücresel düzeyde, oksidatif stres, demire bağımlı bir hücre ölümü şekli olan ferroptozaya yol açabilir (Galaris ve ark., 2019).



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Halk sağlığı alanında antimalaryal, antiinflamatuvar ve romatoid artrit, sistemik lupus eritematozis, kronik juvenil artrit, ankilozan spondilit, psoriatik artrit, palindromik romatizma, eozinofilik fasiit, juvenil dermatomiyozit, Sjögren sendromu, erozif osteoartrit, kalsiyum pirofosfat depo hastalığı, porfiria kutanea tarda, kronik ülseratif stomatit, dermatomiyozit, sarkoidoz, polimorfik ışık erüpsiyönü, generalize granuloma annulare gibi birçok bağ doku hastalığının tedavisinde kullanılan ve bu çalışmada test maddesi olan Hydroxychloroquine Sulfate (HCQ)'ın *in vitro* genotoksik/sitotoksik etki potansiyeli modellenmiştir.

5.1. Sonuçlar

1. Ames Salmonella testi bulgularına göre HCQ bir çerçeve kayması mutanlığı olan TA98 suşuna belirgin bir mutajenik etki göstermemiştir. Ancak nükleotid değişim mutanlığı olan TA100 suşunda muhtemelen test maddesinin neden olduğu bakteriyostatik/bakterisidal etkiden dolayı koloni sayısında kontrole göre önemli azalma ortaya çıkmıştır.
- 2- Test maddesinin klastojen/anöjen etkisini araştırmak için yapılan komet (kuyruklu yıldız) ve mikronukleus test sonuçları birbirine benzer olup muamelesiz kontrol ile deney grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.
- 3- Özellikle yüksek konsantrasyonda HCQ oksidatif stresi azaltıcı yönde etki göstermiştir.
- 4- Test maddesi belirgin ve dikkat çekici sitotoksik etkiler göstermiştir.
- 5- DNA hasarlayıcı/koruyucu aktivite testi bulgularına göre test maddesi HCQ, 20 ve 40 µg/mL konsantrasyonlarda UV+ H₂O₂ etkisine karşı olası bir koruyucu etki göstermiştir.
- 6- *In silico* moleküler yerleştirme analizine göre HCQ, DNA polimeraz gama holoenzimi üzerine güçlü olmayan bir kenetlenme aktivitesi göstermiştir.

5.2. Öneriler

Yukarıda sayılan birçok insan hastalığında tedavi edici olarak kullanılan ajan bizim yaptığımız çalışma setinde genotoksik aktivite göstermemişken sitotoksik etkisi açık olarak ortadadır. Mevcut sitotoksitenin genotoksik etki kaynaklı olmadığını değerlendirmekteyiz. Sitotoksik etkinin, protein ve/veya DNA sentez/onarım yolundaki aksamalardan kaynaklandığı yönünde bir görüşe sahibiz. Kaynak taramasında ajanın demir iyonu ile olan etkileşimine dikkat çekilmektedir. Tartışma kısmında vurgulandığı gibi demir birçok biyokimyasal reaksiyonda görev alan kilit enzimlerin kofaktörüdür. Ayrıca hücrede demirin tutulması, Fenton kimya reaksiyonunu engelleyerek oksidatif stresin azalması ve genotoksik etkinin engellenmesine sebep olması muhtemeldir. Öte yandan hücrede demir veya demir depolarının muhtemelen HCQ tarafından olumsuz etkilenmesi çok sayıda enzimatik tepkimeyi yavaşlatmakta veya engellemektedir.

Bu bağlamda test ajanının demir metabolizması üzerine olan etkisi sofistike deney teknikler kullanılarak hücredeki mevcut aksiyon modu ortaya çıkarılabilir ve mevcut etki optimize edilebilir. Bu sayede ilaç herhangi bir genotoksik etki göstermeksizin insanda görülen çok sayıda rahatsızlığa karşı kapsamlı bir savunma enstrümanı olabilir. Ayrıca kontrolsüz hücre bölünmesinden kaynaklanan çağımız hastalığı kansere karşı HCQ'nun sitotoksik etkisi yeni bir alternatif olarak kemoterapi protokolüne eklenebilir.

HCQ ile yapılan çok sayıda bilimsel çalışmalara rağmen hücredeki demir ile olan etkileşimi ve buna bağlı metabolik etkilerin daha kapsamlı yenilikçi deneysel prosedürlerle test edilmesiyle alanına yeni metodolojik çerçeveler sağlaması mümkündür.



KAYNAKLAR

- Achan, J., Talisuna, A.O., Erhart, A., Yeka, A., Tibenderana, J.K., Baliraine, F.N., ... D'Alessandro, U., 2011. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malaria Journal*, 10, 144. doi:10.1186/1475-2875-10-144
- Akerele, J.O., ve Obaseiki-Ebor, E.E., 2002. Studies on the Genotoxic and Mutagenic Potentials of Mefloquine. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 1(2), 91-98. doi:10.4314/tjpr.v1i2.14589
- Altulea, D., Maassen, S., Baranov, M. V., ve Van Den Bogaart, G., 2021. What makes (hydroxy)chloroquine ineffective against COVID-19: insights from cell biology. *Journal of Molecular Cell Biology*, 13(3), 175. doi:10.1093/JMCB/MJAB016
- Ames, B.N., Lee, F.D., ve Durston, W.E., 1973. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(3), 782-786. doi:10.1073/PNAS.70.3.782
- Ames, B.N., McCann, J., ve Yamasaki, E., 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 31(6), 347-363. doi:10.1016/0165-1161(75)90046-1
- Aslanova, M., 2017. Klorokin veya hidrosiklorokin kullanan hastalarda makülopatinin değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi. [http://katalog.istanbul.edu.tr/client/tr_TR/default_tr/search/detailnonmodal/ent:\\$002f\\$002fSD_ILS\\$002f0\\$002fSD_ILS:2043409/ada?qu=Y%C3%B6ntem.&rw=900&ic=true&ps=300&isd=true](http://katalog.istanbul.edu.tr/client/tr_TR/default_tr/search/detailnonmodal/ent:$002f$002fSD_ILS$002f0$002fSD_ILS:2043409/ada?qu=Y%C3%B6ntem.&rw=900&ic=true&ps=300&isd=true) adresinden erişildi.
- Bandyopadhyaya, G., Sinha, S., Chattopadhyay, B.D., ve Chakraborty, A., 2008. Protective role of curcumin against nicotine-induced genotoxicity on rat liver under restricted dietary protein. *European journal of pharmacology*, 588(2-3), 151-157. doi:10.1016/J.EJP.2008.04.023
- Bayram, N., 2015. Kinolin ve Kinoksalin Aminogliksimlerin Sentezi, Bunların Nikel Kompleksleri ve Antikanser Özelliklerinin İncelenmesi. <http://acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/10603/389699.pdf?sequence=1&isAllowed=y> adresinden erişildi.
- Bebitoğlu, B.T., Oğuz, E., Hodzic, A., Hatiboğlu, N., İstanbul, K., Üniversitesi, M., ... Dalı, A., 2020. Klorokin/Hidrosiklorokin: COVID-19 Tedavisi ile Gündeme Gelen Eski Bir İlaça Farmakolojik Bakış Chloroquine / Hydroxychloroquine: Pharmacological View of an Old Drug Currently Used in COVID-19 Treatment. *Özel Sayı*, 1. doi:10.21673/anadoluklin.735826

- Ben-Zvi, I., Kivity, S., Langevitz, P., ve Shoenfeld, Y., 2012. Hydroxychloroquine: from malaria to autoimmunity. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 42(2), 145-153. doi:10.1007/S12016-010-8243-X
- Besaratinia, A., Caliri, A.W., ve Tommasi, S., 2021. Hydroxychloroquine induces oxidative DNA damage and mutation in mammalian cells. *DNA repair*, 106. doi:10.1016/J.DNAREP.2021.103180
- Bilimsel Danışma Kurulu Çalışması, 2022, 12 Nisan. COVID-19 (SARS-CoV-2 Enfeksiyonu) Erişkin Hasta Tedavisi. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. 1 Şubat 2023 tarihinde <https://covid19.saglik.gov.tr/Eklenti/43095/0/covid-19rehberieriskinhastayonetimivetedavi-12042022pdf.pdf> adresinden erişildi.
- Boya, P., Gonzalez-Polo, R.A., Poncet, D., Andreau, K., Vieira, H.L.A., Roumier, T., ... Kroemer, G., 2003. Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. *Oncogene* 2003 22:25, 22(25), 3927-3936. doi:10.1038/sj.onc.1206622
- Cannistraci, C., Lesnoni La Parola, I., Falchi, M., ve Picardo, M.M., 2005. Treatment of generalized granuloma annulare with hydroxychloroquine. *Dermatology (Basel, Switzerland)*, 211(2), 167-168. doi:10.1159/000086452
- Carrano, A. v., ve Natarajan, A.T., 1988. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication no. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutation research*, 204(3), 379-406. doi:10.1016/0165-1218(88)90036-5
- Cayman Chemical - Chloroquinine, 2023. Chloroquinine (phosphate) (DL-Chloroquine, NSC 14050, CAS Number: 50-63-5) | Cayman Chemical. Safety Data Sheet. 3 Şubat 2023 tarihinde [https://www.caymanchem.com/product/14194/chloroquine-\(phosphate\)](https://www.caymanchem.com/product/14194/chloroquine-(phosphate)) adresinden erişildi.
- Cayman Chemical - Hydroxychloroquine, 2023. Hydroxychloroquine (sulfate) (HCQ, NSC 4375, CAS Number: 747-36-4) | Cayman Chemical. Safety Data Sheet. 3 Şubat 2023 tarihinde [https://www.caymanchem.com/product/17911/hydroxychloroquine-\(sulfate\)](https://www.caymanchem.com/product/17911/hydroxychloroquine-(sulfate)) adresinden erişildi.
- Cayman Chemical - Quinine, 2023. Quinine (NSC 192949, CAS Number: 130-95-0) | Cayman Chemical. Safety Data Sheet. 3 Şubat 2023 tarihinde <https://www.caymanchem.com/product/23958/quinine> adresinden erişildi.
- Chatterjee, T., Mukhopadhyay, A., Khan, K.A., ve Giri, A.K., 1998. Comparative mutagenic and genotoxic effects of three antimalarial drugs, chloroquine, primaquine and amodiaquine. *Mutagenesis*, 13(6), 619-624. doi:10.1093/MUTAGE/13.6.619

- Chauffert, B., Pelletier, H., Corda, C., Solary, E., Bedenne, L., Caillot, D., ve Martin, F., 1990. Potential usefulness of quinine to circumvent the anthracycline resistance in clinical practice. *British journal of cancer*, 62(3), 395-397. doi:10.1038/BJC.1990.305
- CHMP, 2011. Eurartesim, INN-piperaquine & INN artemimol. EMA. 25 Mart 2023 tarihinde https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/eurartesim-epar-product-information_en.pdf adresinden erişildi.
- Collins, A.R., 2002. The comet assay. Principles, applications, and limitations. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 203, 163-177. doi:10.1385/1-59259-179-5:163
- Collins, K.P., Jackson, K.M., ve Gustafson, D.L., 2018. Hydroxychloroquine: A physiologically-based pharmacokinetic model in the context of cancer-related autophagy modulation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 365(3), 447-459. doi:10.1124/JPET.117.245639/-/DC1
- Cunha, C., Alexander, S., Ashby, D., Lee, J., Chusney, G., Cairns, T.D., ve Lightstone, L., 2018. Hydroxychloroquine blood concentration in lupus nephritis: a determinant of disease outcome? *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 33(9), 1604-1610. doi:10.1093/NDT/GFX318
- Cutler, D.J., MacIntyre, A.C., ve Tett, S.E., 1988. Pharmacokinetics and cellular uptake of 4-aminoquinoline antimalarials. *Agents and actions. Supplements*, 24, 142-157. doi:10.1007/978-3-0348-9160-8_13
- Çavaş, T., ve Könen, S., 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis*, 22(4), 263-268. doi:10.1093/MUTAGE/GEM012
- Çavaş, T., ve Könen, S., 2008. In vivo genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands), 90(2), 154-159. doi:10.1016/J.AQUATOX.2008.08.011
- Çölgeçen, E., Erdoğan, Y., Yıldırım Erdoğan, N., Okur, A., Korkmaz, M., Amanvermez Şenarslan, D., ve Günaydın, İ., Eozinofilik Fasiit (Shulman Sendromu). 53 (2) Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi (2013). https://jag.journalagent.com/hnhjournal/pdfs/HNHJ_53_2_121_123.pdf adresinden erişildi.
- Das Roy, L., Mazumdar, M., ve Giri, S., 2008. Effects of low dose radiation and vitamin C treatment on chloroquine-induced genotoxicity in mice. *Environmental and molecular mutagenesis*, 49(6), 488-495. doi:10.1002/EM.20408

- de Lucca, R.M.R., Batista Júnior, J., Fontes, C.J.F., Bahia, M. de O., ve Bassi-Branco, C.L., 2015. Genotoxic effects of the antimalarial drug lumefantrine in human lymphocytes in vitro and computational prediction of the mechanism associated with its interaction with DNA. *Environmental and molecular mutagenesis*, 56(6), 556-562. doi:10.1002/EM.21942
- Dima, A., Jurcut, C., Chasset, F., Felten, R., ve Arnaud, L., 2022. Hydroxychloroquine in systemic lupus erythematosus: overview of current knowledge. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*, 14. doi:10.1177/1759720X211073001
- Dinter, D., Gajski, G., Domijan, A.M., ve Garaj-Vrhovac, V., 2015. Cytogenetic and oxidative status of human lymphocytes after exposure to clinically relevant concentrations of antimalarial drugs atovaquone and proguanil hydrochloride in vitro. *Fundamental & clinical pharmacology*, 29(6), 575-585. doi:10.1111/FCP.12153
- Dinter, D., Gajski, G., ve Garaj-Vrhovac, V., 2013. An alkaline comet assay study on the antimalarial drug atovaquone in human peripheral blood lymphocytes: a study based on clinically relevant concentrations. *Journal of applied toxicology: JAT*, 33(1), 56-62. doi:10.1002/JAT.1711
- Do Amaral, V.L.L., Frajbat, M., Petreanu, M., Zermiani, T., De Freitas, R.A., Maistro, E.L., ... De Andrade, S.F., 2014. Reproductive toxicology and clastogenic evaluation in mice of a phytotherapeutic formulation obtained from *Cinchona calisaya* Weddel (Rubiaceae) used in Brazilian folk medicine as female fertility stimulant. *Journal of ethnopharmacology*, 155(3), 1508-1512. doi:10.1016/J.JEP.2014.07.038
- Drakesmith, H., ve Prentice, A., 2008. Viral infection and iron metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 6(7), 541-552. <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-45749100909&origin=inward&txGid=56ebe241db6361d4da41ce04cbf2476a> adresinden erişildi.
- Ducharme, J., ve Farinotti, R., 1996. Clinical pharmacokinetics and metabolism of chloroquine. Focus on recent advancements. *Clinical Pharmacokinetics*, 31(4), 257-274. doi:10.2165/00003088-199631040-00003/METRICS
- Eastmond, D.A., ve Tucker, J.D., 1989. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. *Environmental and molecular mutagenesis*, 13(1), 34-43. doi:10.1002/EM.2850130104
- Eisen, D., 1993. Hydroxychloroquine sulfate (Plaquenil) improves oral lichen planus: An open trial. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 28(4), 609-612. doi:10.1016/0190-9622(93)70082-5
- El-Habit, O.H., ve Al-Khamash, H.S., 2012. Testing the cytotoxicity and genotoxicity of the antimalarial drug mefloquine. *Journal of King Saud University - Science*, 24(3), 277-284. doi:10.1016/J.JKSUS.2011.06.001

- El-Mofty, M., VV, K.V., Sakr, S., ve Abdel-Gawad, H., 1992. The carcinogenicity of some antimalarial drugs using the Egyptian toad *Bufo regularis* as a biological test animal. *Nutrition and cancer*, 18(2), 191-198. doi:10.1080/01635589209514219
- Erel, O., 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37(4), 277-285. doi:10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015
- Erel, O., 2005. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*, 38(12), 1103-1111. doi:10.1016/J.CLINBIOCHEM.2005.08.008
- Espinoza, J.A., Zisi, A., Kanellis, D.C., Carreras-Puigvert, J., Henriksson, M., Hühn, D., ... Bartek, J., 2019. The antimalarial drug amodiaquine stabilizes p53 through ribosome biogenesis stress, independently of its autophagy-inhibitory activity. *Cell Death & Differentiation* 2019 27:2, 27(2), 773-789. doi:10.1038/s41418-019-0387-5
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L., ve O'Neill, K.L., 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation research*, 339(1), 37-59. doi:10.1016/0165-1110(94)00013-3
- Farombi, E.O., 2006. Genotoxicity of chloroquine in rat liver cells: protective role of free radical scavengers. *Cell biology and toxicology*, 22(3), 159-167. doi:10.1007/S10565-006-0173-2
- Faydaoğlu, E., ve Sürücüoğlu, M.S., 2011. Geçmişten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Ekonomik Önemi. *Journal of Forestry Faculty*, 11(1), 52-67.
- FDA, ve cder, 2017. PRIMAQUINE PHOSPHATE TABLETS, USP. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/008316s023lbl.pdf adresinden erişildi.
- Fenech, M., 1997. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation research*, 392(1-2), 11-18. doi:10.1016/S0165-1218(97)00041-4
- Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation research*, 455(1-2), 81-95. doi:10.1016/S0027-5107(00)00065-8
- Fenech, M., 2002. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicology*, 181-182, 411-416. doi:10.1016/S0300-483X(02)00480-8
- Fenech, M., ve Morley, A., 1985. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay - PubMed. *Cytobios.*, 43(172-173), 233-246. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4075848/> adresinden erişildi.
- Fenech, M., ve Morley, A., 1986. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutation research*, 161(2), 193-198. doi:10.1016/0027-5107(86)90010-2
- Fidan, A.F., 2008. Dna Hasar Tespitinde Tek Hücre Jel Elektroforezi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8(1), 41-52. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/akufemubid/issue/1607/20025> adresinden erişildi.

- Fox, R.I., Dixon, R., Guarrasi, V., ve Krubel, S., 1996. Treatment of primary Sjögren's syndrome with hydroxychloroquine: a retrospective, open-label study. *Lupus*, 5 Suppl 1(SUPPL. 1). doi:10.1177/0961203396005001081
- Gajski, G., Dinter, D., ve Garaj-Vrhovac, V., 2010. In vitro effect of the antimalarial drug proguanil hydrochloride on viability and DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. *Environmental toxicology and pharmacology*, 30(3), 257-263. doi:10.1016/J.ETAP.2010.07.001
- Galaris, D., Barbouti, A., ve Pantopoulos, K., 2019. Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1866(12), 118535. doi:10.1016/J.BBAMCR.2019.118535
- Gerek, M.E., 2019. Romatoid artrit hastaları ile artraljisi olup artrit bulguları olmayan hastaların direkt grafilerinde eklem erozyonunun karşılaştırılması. *Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Dr. Mehmet Emin Gerek Uzmanlık Tezi*. <https://acikerisim.erbakan.edu.tr/xmlui/handle/20.500.12452/4923> adresinden erişildi.
- Giovanella, F., Ferreira, G.K., De Prá, S.D.T., Carvalho-Silva, M., Gomes, L.M., Scaini, G., ... de Souza, R.P., 2015. Effects of primaquine and chloroquine on oxidative stress parameters in rats. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 87(2 Suppl), 1487-1496. doi:10.1590/0001-3765201520140637
- Giri, A., Das, A., Sarkar, A.K., ve Giri, A.K., 2020. Mutagenic, Genotoxic and Immunomodulatory effects of Hydroxychloroquine and Chloroquine: a review to evaluate its potential to use as a prophylactic drug against COVID-19. *Genes and Environment*, 42(1), 25. doi:10.1186/S41021-020-00164-0
- Good, P.F., Werner, P., Hsu, A., Olanow, C.W., ve Perl, D.P., 1996. Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology*, 149(1), 21. /pmc/articles/PMC1865248/?report=abstract adresinden erişildi.
- Gutteridge, J.M.C., ve Halliwell, B., 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, 136-147. doi:10.1111/J.1749-6632.2000.TB06182.X
- Güler, A.A., ve Babaoğlu, H., 2020. Klorokin ve Hidroksiklorokin COVID-19 Tedavisindeki Yeri. *Türkiye Klinikleri COVID - 19*, 1(40), 46-53. <https://www.turkiyeklinikleri.com/article/en-klorokin-ve-hidroksiklorokinin-covid-19-tedavisindeki-yeri-89708.html> adresinden erişildi.
- Hagmar, L., Brøgger, A., Hansteen, I.L., Heim, S., Högstedt, B., Knudsen, L., ... Nordenson, I., 1994. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage - PubMed. *Cancer research*, 54(11), 2919-2922. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8187078/> adresinden erişildi.

- Halcrow, P.W., Lynch, M.L., Geiger, J.D., ve Ohm, J.E., 2021. Role of Endolysosome Function in Iron Metabolism and Brain Carcinogenesis. *Seminars in cancer biology*, 76, 74. doi:10.1016/J.SEMCANCER.2021.06.013
- Halliwell, B., 1994. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition reviews*, 52(8 Pt 1), 253-265. doi:10.1111/J.1753-4887.1994.TB01453.X
- Harma, M., Harma, M., ve Erel, O., 2003. Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. *Swiss medical weekly*, 133(41-42), 563-566. doi:10.4414/SMW.2003.10397
- Heddle, J.A., Cimino, M.C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M.D., Tucker, J.D., ... MacGregor, J.T., 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environmental and molecular mutagenesis*, 18(4), 277-291. doi:10.1002/EM.2850180414
- <https://gpatindia.com>, (t.y.). HYDROXYCHLOROQUINE Synthesis, SAR, MCQ, Structure, Chemical Properties and Therapeutic Uses in COVID 19 and Malaria - Gpatindia: Pharmacy Jobs, Admissions, Scholarships, Conference, Grants, Exam Alerts. 22 Mayıs 2023 tarihinde <https://gpatindia.com/hydroxychloroquine-synthesis-sar-mcqstructurechemical-properties-and-therapeutic-uses/> adresinden erişildi.
- Isono, K., ve Yourno, J., 1974. Chemical carcinogens as frameshift mutagens: Salmonella DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(5), 1612-1617. doi:10.1073/PNAS.71.5.1612
- Jessop, S., Whitelaw, D.A., Grainge, M.J., ve Jayasekera, P., 2017. Drugs for discoid lupus erythematosus. *The Cochrane database of systematic reviews*, 5(5). doi:10.1002/14651858.CD002954.PUB3
- Kayran, S.D., Üyesi, Ö., Üniversitesi, Ç., Fakültesi, E., ve Botanik, F., 2019. Dioscorides'in De Materia Medica Adlı Eserindeki Tıbbi Bitkilerin Doğu Akdeniz Bölgesi'ndeki Güncel Kullanımlarının Araştırılması * A Research on the Present Uses of the Medicinal Plants in De Materia Medica written by Dioscorides in Eastern Mediterranean. *Lokman Hekim Dergisi*, 9(2), 189-202. doi:10.31020/mutfd.519382
- Kim, M.L., Hardy, M.Y., Edgington-Mitchell, L.E., Ramarathinam, S.H., Chung, S.Z., Russell, A.K., ... Wicks, I.P., 2021. Hydroxychloroquine inhibits the mitochondrial antioxidant system in activated T cells. *iScience*, 24(12). doi:10.1016/J.ISCI.2021.103509
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., ... Wakata, A., 2003. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 540(2), 153-163. doi:10.1016/j.mrgentox.2003.07.005

- Koçyiğit, M., 2005. Yalova ilinde etnobotanik Bir Araştırma. Ulusal Tez Merkezi. https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezDetay.jsp?id=MkbZzkIg_uGzPM1eeKD-Ag&no=tKa7TPpmWYyTocj2WZ9v8g adresinden erişildi.
- Kosecik, M., Erel, O., Sevinc, E., ve Selek, S., 2005. Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. *International journal of cardiology*, 100(1), 61-64. doi:10.1016/J.IJCARD.2004.05.069
- Kouznetsov, V. V., ve Amado Torres, D.F., 2008. Antimaláricos: construcción de híbridos moleculares de la cloroquina. *Universitas Scientiarum*, 13(3), 306-320. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-74832008000300010&lng=en&nrm=iso&tlng=es adresinden erişildi.
- Krafts, K., Hempelmann, E., ve Skórska-Stania, A., 2012. From methylene blue to chloroquine: A brief review of the development of an antimalarial therapy. *Parasitology Research*, 111(1), 1-6. doi:10.1007/S00436-012-2886-X/FIGURES/10
- Kumar, Rajnish, Sharma, A., Srivastava, J.K., Siddiqui, M.H., Uddin, M.S., ve Aleya, L., 2021. Hydroxychloroquine in COVID-19: therapeutic promises, current status, and environmental implications. *Environmental science and pollution research international*, 28(30), 40431-40444. doi:10.1007/S11356-020-12200-1
- Kumar, Rakesh, Banjare, L., ve Yadav, S., 2013. Study of the evaluation of mutagenic effects of antimalarial drug chloroquine in ames salmonella assay. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 3(6), 66-69. doi:10.22270/JDDT.V3I6.691
- Kumura, N., Izumi, M., Nakajima, S., Shimizu, S., Kim, H.S., Wataya, Y., ve Baba, N., 2005. Synthesis and biological activity of fatty acid derivatives of quinine. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 69(11), 2250-2253. doi:10.1271/BBB.69.2250
- Lakhanpal, S., Ginsburg, W.W., Michet, C.J., Doyle, J.A., ve Moore, S.B., 1988. Eosinophilic fasciitis: clinical spectrum and therapeutic response in 52 cases. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 17(4), 221-231. doi:10.1016/0049-0172(88)90008-X
- Lee, H.O., Mustafa, A., Hudes, G.R., ve Kruger, W.D., 2015. Hydroxychloroquine Destabilizes Phospho-S6 in Human Renal Carcinoma Cells. *PloS one*, 10(7). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0131464
- Levin, D.E., Yamasaki, E., ve Ames, B.N., 1982. A new Salmonella tester strain, TA97, for the detection of frameshift mutagens. A run of cytosines as a mutational hot-spot. *Mutation research*, 94(2), 315-330. doi:10.1016/0027-5107(82)90294-9
- Liu, W., Qi, Y., Liu, L., Tang, Y., Wei, J., ve Zhou, L., 2016. Suppression of tumor cell proliferation by quinine via the inhibition of the tumor necrosis factor receptor-associated factor 6-AKT interaction. *Molecular medicine reports*, 14(3), 2171-2179. doi:10.3892/MMR.2016.5492

- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., ve Chandra, N., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118-126. doi:10.4103/0973-7847.70902
- Longo, M., Pace, S., Messina, M., Ferraris, L., Brughera, M., Ubben, D., ve Mazuè, G., 2012. Piperaquine phosphate: Reproduction studies. *Reproductive Toxicology*, 34(4), 584-597. doi:10.1016/J.REPROTOX.2012.09.001
- Lu, S., Sung, T., Lin, N., Abraham, R.T., ve Jessen, B.A., 2017. Lysosomal adaptation: How cells respond to lysosomotropic compounds. *PloS one*, 12(3). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0173771
- Mader, B.J., Pivtoraiko, V.N., Flippo, H.M., Klocke, B.J., Roth, K.A., Mangieri, L.R., ve Shacka, J.J., 2012. Rotenone inhibits autophagic flux prior to inducing cell death. *ACS chemical neuroscience*, 3(12), 1063-1072. doi:10.1021/CN300145Z
- Manic, G., Obrist, F., Kroemer, G., Vitale, I., ve Galluzzi, L., 2014. Chloroquine and hydroxychloroquine for cancer therapy. *Molecular & Cellular Oncology*, 1(1). doi:10.4161/MCO.29911
- Maron, D.M., ve Ames, B.N., 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation research*, 113(3-4), 173-215. doi:10.1016/0165-1161(83)90010-9
- Masaldan, S., Clatworthy, S.A.S., Gamell, C., Meggyesy, P.M., Rigopoulos, A.T., Haupt, S., ... Cater, M.A., 2018. Iron accumulation in senescent cells is coupled with impaired ferritinophagy and inhibition of ferroptosis. *Redox Biology*, 14, 100. doi:10.1016/J.REDOX.2017.08.015
- McCann, J., Spingarn, N.E., Kobori, J., ve Ames, B.N., 1975. Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(3), 979. doi:10.1073/PNAS.72.3.979
- Menakuru, S.R., Priscu, A., Salih, A., ve Dhillon, V., 2021. Disseminated Intravascular Coagulation Due to Drinking Tonic Water. *Cureus*, 13(12). doi:10.7759/CUREUS.20512
- Michael, R.O., ve Williams, G.M., 1974. Chloroquine inhibition of repair of DNA damage induced in mammalian cells by methyl methanesulfonate. *Mutation research*, 25(3), 391-396. doi:10.1016/0027-5107(74)90068-2
- Mishra, S.K., Singh, P., ve Rath, S.K., 2011. A study of toxicity and differential gene expression in murine liver following exposure to anti-malarial drugs: amodiaquine and sulphadoxine-pyrimethamine. *Malaria journal*, 10. doi:10.1186/1475-2875-10-109
- Mohamed, M.M., 2005. Anti-malarial chloroquine stimulate p53-apoptotic pathway in rat hepatocytes - PubMed. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 35(1), 19-32. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15880991/> adresinden erişildi.

- Mortelmans, K., ve Zeiger, E., 2000. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation research*, 455(1-2), 29-60. doi:10.1016/S0027-5107(00)00064-6
- Münzner, R., ve Renner, H.W., 1983. Mutagenicity testing of quinine with submammalian and mammalian systems. *Toxicology*, 26(2), 173-178. doi:10.1016/0300-483X(83)90068-9
- Nagaratnam, N., Chetiyawardana, A.D., ve Rajiyah, S., 1978. Aplasia and leukaemia following chloroquine therapy. *Postgraduate medical journal*, 54(628), 108-112. doi:10.1136/PGMJ.54.628.108
- Navya, V.B., ve Hosur, M. V., 2021. A computational study on hydroxychloroquine binding to target proteins related to SARS-COV-2 infection. *Informatics in Medicine Unlocked*, 26, 100714. doi:10.1016/J.IMU.2021.100714
- Ni, Y., Liao, J., Qian, Z., Wu, C., Zhang, X., Zhang, J., ... Jiang, S., 2022. Synthesis and evaluation of enantiomers of hydroxychloroquine against SARS-CoV-2 in vitro. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 53. doi:10.1016/J.BMC.2021.116523
- Obaseiki-Ebor, E.E., ve Obasi, E.E., 1986. Aspects of chloroquine mutagenicity. *Mutation research*, 175(2), 51-59. doi:10.1016/0165-7992(86)90125-9
- Octave, J.N., Schneider, Y.J., Hoffmann, P., Trouet, A., ve Crichton, R.R., 1982. Transferrin uptake by cultured rat embryo fibroblasts. The influence of lysosomotropic agents, iron chelators and colchicine on the uptake of iron and transferrin. *European journal of biochemistry*, 123(2), 235-240. doi:10.1111/J.1432-1033.1982.TB19758.X
- Olive, P.L., Banáth, J.P., ve Durand, R.E., 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiation research*, 122(1), 86-94. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2320728/> adresinden erişildi.
- Oliveira-Ramos, C.M., Yoshida, E.H., Oshima-Franco, Y., Hanai-Yoshida, V.M., Oliveira-Ramos, C.M., Yoshida, E.H., ... Hanai-Yoshida, V.M., 2021. Organic and Inorganic Pigments from Commercial Inks Used in Eyebrows' Microblading: Approach for Assessing the Safety Use by Bacterial Reverse Mutation Assay. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, 11(4), 330-341. doi:10.4236/JCDSA.2021.114027
- Ostling, O., ve Johanson, K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 123(1), 291-298. doi:10.1016/0006-291X(84)90411-X
- Parry, J.M., ve Sors, A., 1993. The detection and assessment of the aneuploidic potential of environmental chemicals: the European Community Aneuploidy Project. *Mutation research*, 287(1), 3-15. doi:10.1016/0027-5107(93)90140-B
- Perry, P., ve Evans, H.J., 1975. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature*, 258(5531), 121-125. doi:10.1038/258121A0

- Peycheva, E., Georgieva, M., ve Miloshev, G., 2014. Comparison Between Alkaline and Neutral Variants of Yeast Comet Assay. <http://mc.manuscriptcentral.com/tbeq>, 23(1), 1090-1092. doi:10.1080/13102818.2009.10817618
- Piperakis, S.M., 2009. Comet assay: a brief history. *Cell biology and toxicology*, 25(1), 1-3. doi:10.1007/S10565-008-9081-Y
- Pósa, S.P., Dargó, G., Nagy, S., Kisszékelyi, P., Garádi, Z., Hámori, L., ... Tóth, S., 2022. Cytotoxicity of cinchona alkaloid organocatalysts against MES-SA and MES-SA/Dx5 multidrug-resistant uterine sarcoma cell lines. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 67. doi:10.1016/J.BMC.2022.116855
- Puig, S., Ramos-Alonso, L., Romero, A.M., ve Martínez-Pastor, M.T., 2017. The elemental role of iron in DNA synthesis and repair. *Metallomics : integrated biometal science*, 9(11), 1483-1500. doi:10.1039/C7MT00116A
- Quiros Roldan, E., Biasiotto, G., Magro, P., ve Zanella, I., 2020. The possible mechanisms of action of 4-aminoquinolines (chloroquine/hydroxychloroquine) against Sars-Cov-2 infection (COVID-19): A role for iron homeostasis? *Pharmacological research*, 158. doi:10.1016/J.PHRS.2020.104904
- Račková, L., ve Csekés, E., 2022. Redox aspects of cytotoxicity and anti-neuroinflammatory profile of chloroquine and hydroxychloroquine in serum-starved BV-2 microglia. *Toxicology and applied pharmacology*, 447. doi:10.1016/J.TAAP.2022.116084
- Reyes, S., Rembao, D., ve Sotelo, J., 2001. The antimalarials quinacrine and chloroquine potentiate the transplacental carcinogenic effect of ethylnitrosourea on ependymal cells. *Brain tumor pathology*, 18(2), 83-87. doi:10.1007/BF02479420
- Riccio, E.S., Lee, P.S., Winegar, R.A., Krogstad, D.J., ve Mirsalis, J.C., 2001. Genetic toxicology testing of the antimalarial drugs chloroquine and a new analog, AQ-13. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 38(1), 69-79. doi:10.1002/em.1052
- Rivera, N., López, P.Y., Rojas, M., Fortoul, T.I., Reynada, D.Y., Reyes, A.J., ... Malagón, F., 2014. Antimalarial efficacy, cytotoxicity, and genotoxicity of methanolic stem bark extract from *Hintonia latiflora* in a *Plasmodium yoelii yoelii* lethal murine malaria model. *Parasitology research*, 113(4), 1529-1536. doi:10.1007/S00436-014-3797-9
- Romero, A.M., Martínez-pastor, M.T., ve Puig, S., 2021. Iron in Translation: From the Beginning to the End. *Microorganisms*, 9(5). doi:10.3390/MICROORGANISMS9051058
- Rothfuss, A., Schütz P., Bochum, S., Volm, T., Eberhardt, E., Kreienberg, R., ... Speit, G., 2000. Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in breast cancer families - PubMed. *Cancer Research*. 27 Mayıs 2022 tarihinde <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10667592/> adresinden erişildi.

- Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Sorrenti, V., di Giacomo, C., Virgata, G., ... Vanella, A., 2000. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell biology and toxicology*, 16(2), 91-98. doi:10.1023/A:1007685909018
- Shalumashvili, M.A., ve Sigidin Ya., A., 1976. [Cytogenetic effects of chloroquine in a culture of human lymphocytes]. *Biulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*, 82(7), 879-881. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1085185/> adresinden erişildi.
- Shanabruch, W.G., ve Walker, G.C., 1980. Localization of the plasmid (pKM101) gene(s) involved in recA+lexA+-dependent mutagenesis. *Molecular & general genetics: MGG*, 179(2), 289-297. doi:10.1007/BF00425456
- Shityakov, S., ve Förster, C., 2014. In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood-brain barrier choline transporter. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry: AABC*, 7(1), 23. doi:10.2147/AABC.S63749
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., ve Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175(1), 184-191. doi:10.1016/0014-4827(88)90265-0
- Snyder, R.D., ve Arnone, M.R., 2002. Putative identification of functional interactions between DNA intercalating agents and topoisomerase II using the V79 in vitro micronucleus assay. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 503(1-2), 21-35. doi:10.1016/S0027-5107(02)00028-3
- Solary, E., Velay, I., Chauffert, B., Bidan, J.M., Caillot, D., Dumas, M., ve Guy, H., 1991. Sufficient levels of quinine in the serum circumvent the multidrug resistance of the human leukemic cell line K562/ADM - PubMed. *Cancer*, 68(8), 1714-1719. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1913513/> adresinden erişildi.
- Spinelli, J.B., Yoon, H., Ringel, A.E., Jeanfavre, S., Clish, C.B., ve Haigis, M.C., 2017. Metabolic recycling of ammonia via glutamate dehydrogenase supports breast cancer biomass. *Science (New York, N.Y.)*, 358(6365), 941. doi:10.1126/SCIENCE.AAM9305
- Stokkermans, T.J., Goyal, A., ve Trichonas, G., 2022. Chloroquine And Hydroxychloroquine Toxicity. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537086/> adresinden erişildi.
- Styrt, B., ve Klempner, M.S., 1988. Lysosomotropic amines modulate neutrophil calcium homeostasis. *Journal of cellular physiology*, 135(2), 309-316. doi:10.1002/JCP.1041350219
- Sudharsan Raj, A., ve Heddle, J.A., 1980. Simultaneous detection of chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges: experience with DNA intercalating agents. *Mutation research*, 78(3), 253-260. doi:10.1016/0165-1218(80)90106-8
- Tarpey, M.M., Wink, D.A., ve Grisham, M.B., 2004. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *American journal of*

- physiology. *Regulatory, integrative and comparative physiology*, 286(3). doi:10.1152/AJPREGU.00361.2003
- Tepe, B., Degerli, S., Arslan, S., Malatyali, E., ve Sarikurkcü, C., 2011. Determination of chemical profile, antioxidant, DNA damage protection and antimicrobial activities of *Teucrium polium* and *Stachys iberica*. *Fitoterapia*, 82(2), 237-246. doi:10.1016/J.FITOTE.2010.10.006
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., ... Sasaki, Y.F., 2000. *Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing*.
- titck.gov.tr, 2023. Plaquenil - Kısa Ürün Bilgisi. Sağlık Bakanlığı. 3 Şubat 2023 tarihinde adresinden erişildi.
- Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., Reinisch, F., Parvatham, S., Osorio, A.M., ve Smith, M.T., 1997. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers. *Mutation research*, 388(1), 85-95. doi:10.1016/S1383-5718(96)00140-4
- Tucker, J.D., Auletta, A., Cimino, M.C., Dearfield, K.L., Jacobson-Kram, D., Tice, R.R., ve Carrano, A. v., 1993. Sister-chromatid exchange: second report of the Gene-Tox Program. *Mutation research*, 297(2), 101-180. doi:10.1016/0165-1110(93)90001-4
- Udayangani, S., 2019, 22 Ağustos. Mutagenicity | Compare the Difference Between Similar Terms. www.differencebetween.com. 1 Şubat 2023 tarihinde <https://www.differencebetween.com/difference-between-genotoxicity-and-mutagenicity/> adresinden erişildi.
- Uğur Poyraz, M., ve Mat, A., 2014. MUCİZE KABUK KINAKINA VE OSMANLI DÖNEMİNDE SITMA. *Lokman Hekim Journal XI*, 25-28. <http://lokmanhekim.mersin.edu.tr> adresinden erişildi.
- Ulas, T., Buyukhatipoglu, H., Kirhan, I., Dal, M.S., Ulas, S., Demir, M.E., ... Aksoy, N., 2013. Evaluation of oxidative stress parameters and metabolic activities of nurses working day and night shifts. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, 47(2), 471-476. doi:10.1590/S0080-62342013000200028
- Verbaanderd, C., Maes, H., Schaaf, M.B., Sukhatme, V.P., Pantziarka, P., Sukhatme, V., ... Bouche, G., 2017. Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)-chloroquine and hydroxychloroquine as anti-cancer agents. *Ecancermedicinescience*, 11. doi:10.3332/ECANCER.2017.781
- Walker, G.C., ve Dobson, P.P., 1979. Mutagenesis and repair deficiencies of *Escherichia coli* umuC mutants are suppressed by the plasmid pKM101. *Molecular & general genetics : MGG*, 172(1), 17-24. doi:10.1007/BF00276210

- Weber, R.A., Yen, F.S., Nicholson, S.P.V., Alwaseem, H., Bayraktar, E.C., Alam, M., ... Birsoy, K., 2020. Maintaining iron homeostasis is the key role of lysosomal acidity for cell proliferation. *Molecular cell*, 77(3), 645. doi:10.1016/J.MOLCEL.2020.01.003
- WHO, 2020. Who-Pq Recommended Summary Of Product Characteristics. <https://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/MA139part4v1.pdf> adresinden erişildi.
- Woo, T.Y., Callen, J.P., Voorhees, J.J., Bickers, D.R., Hanno, R., ve Hawkins, C., 1984. Cutaneous lesions of dermatomyositis are improved by hydroxychloroquine. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 10(4), 592-600. doi:10.1016/S0190-9622(84)80263-7
- Yumru, M., Savas, H.A., Kalenderoglu, A., Bulut, M., Celik, H., ve Erel, O., 2009. Oxidative imbalance in bipolar disorder subtypes: a comparative study. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 33(6), 1070-1074. doi:10.1016/J.PNPBP.2009.06.005
- Zeiger, E., 2004. History and rationale of genetic toxicity testing: an impersonal, and sometimes personal, view. *Environmental and molecular mutagenesis*, 44(5), 363-371. doi:10.1002/EM.20062
- Zhang, C., 2014. Essential functions of iron-requiring proteins in DNA replication, repair and cell cycle control. *Protein & Cell*, 5(10), 750. doi:10.1007/S13238-014-0083-7
- Zorlu, T., 2010, 11 Haziran. Bazı Bitkisel Antioksidanların Mutajenik Ve Antimutajenik Etkilerinin Kısa Süreli Genotoksisite Test Yöntemleri İle Belirlenmesi. <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp> adresinden erişildi.

ÖZGEÇMİŞ

Hatice YILDIZ, Lise eğitimini Adana Karşıyaka Endüstri Meslek Lisesi'nde tamamladı. Üniversite eğitimini Adana Çukurova Üniversitesi Fen ve Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde 2018 yılında tamamladı. 2019-2020 eğitim-öğretim yılı, güz yarıyılı eğitim döneminde Adana Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisansa başladı.

