



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DPP-4 İNHİBİTÖRÜ ANTİDİYABETİK VİLDAGLİPTİN İLE
SİTAGLİPTİNİN GENOTOKSİSİTE VE SİTOTOKSİSİTE
AÇISINDAN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Ceren BÖRÇEK KASURKA

Samsun

Temmuz-2017



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DPP-4 İNHİBİTÖRÜ ANTİDİYABETİK VİLDAGLİPTİN İLE
SİTAGLİPTİNİN GENOTOKSİTE VE SİTOTOKSİTE
AÇISINDAN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Ceren BÖRÇEK KASURKA

Danışman

Prof.Dr.Mehmet ELBİSTAN

Samsun

Temmuz-2017

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ceren BÖRÇEK KASURKA tarafından, Prof. Dr. Mehmet ELBİSTAN danışmanlığında, hazırlanan “DPP-4 inhibitörü antidiyabetik vildagliptin ile sitagliptinin genotoksisite ve sitotoksisite açısından araştırılması” başlıklı bu tez jürimiz tarafından 13 / 07 / 2017 tarihinde yapılan sınav ile Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ayşegül ATMAA, Ondokuz Mayıs niversitesi

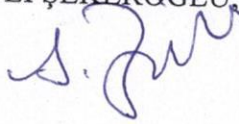


ye : Prof. Dr. Mehmet ELBİSTAN, Ondokuz Mayıs niversitesi



ye : Prof. Dr. Nurten KARA, Ondokuz Mayıs niversitesi

ye : Doç. Dr. Zülal ATLI şEKEROğLU, Ordu niversitesi



ye : Yrd. Doç. Dr. Serbülent YİğİT, Gaziosmanpaşa Üniversitesi



ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri yeleri tarafından uygun grlmştir.

.... / /

Prof.Dr.Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca desteğini ve yardımını esirgemeyen, tecrübeleri ile yol gösteren saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Mehmet ELBİSTAN'a... Doktora sürecinde her konuda desteğini gördüğüm değerli hocam Prof. Dr. Nurten KARA'ya... Bu araştırmanın gerçekleştirilmesi hususunda destek olan sayın hocam Prof. Dr. Ayşegül ATMACA'ya... Yrd. Doç. Dr. Şengül TURAL'a ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı araştırma görevlilerine... Doktora eğitimimin her anında yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini eksik etmeyen kıymetli hocalarım Doç. Dr. Zülal ATLI ŞEKEROĞLU ve Doç. Dr. Vedat ŞEKEROĞLU'na... Doktora boyunca deneyimlerini paylaşan, sorunlarımı çözmeme yardımcı olan sevgili arkadaşım, değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Elif ÇİL'e... Tez çalışmam süresince beni yalnız bırakmayan, emeğini ve zamanını benimle paylaşan kıymetli arkadaşım Seval KONTAŞ YEDİER'e... Doktora eğitimim boyunca ilgi ve desteğini gördüğüm değerli hocam Prof. Dr. Öznur E. AKÇİN'e, nezaketi ile her zaman yanımda olan değerli hocam Doç. Dr. Tuğba B. ÖZBUCAK'a... Yrd. Doç. Dr. Aliye G. ERTÜRK'e... Beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum Arş. Gör. Serdar YEDİER'e... Ordu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyelerine ve araştırma görevlilerine...Ebru UÇGUN ve Büşra GÜNEŞ'e...

İlk nefesimden bu yana daha iyi olabilmem, ilk adımdan bu yana daha ileriye gidebilmem için sınırsız sevgi ve sabır veren canım annem Fadime BÖRÇEK ve canım babam Cahit BÖRÇEK'e... Emeğini asla ödeyemeyeceğim kıymetli anneannem Nazik TOKGÖZ, büyükbabam Tahsin TOKGÖZ ve teyzelerime... Mutlu ve güzel yarınlar için elele verdiğim sevgili eşim Nurettin KASURKA'ya... Yüzümdeki tebessüm, kalbimdeki umut olan biricik oğlum Utku Can KASURKA'ya... Sevgi ve hoşgörüsü ile her zaman örnek aldığım kayınvalidem Kerime KASURKA ve kayınpederim Ali Rıza KASURKA'ya... Yaşanılan anı değerli kılan, uzakları yakın eden, hüznümü paylaşan sevgili dostlarım Ezgi E. BİNGÜL'e, Salim SÜNER'e, Ezgi Ç. ALNIAÇIK'a, İlhan ÇİL'e, Meral GÜDÜK'e, Sibel ve Barış ŞAHİN'e, Şeyma TEKİNTAŞA'a, Abdullah ve Canan ÇAKMAK'a...

OMÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sekreteri sayın Atilla YILMAZ'a ve öğrenci işleri görevlisi sayın Mehmet ECEVİZ'e... Yurtiçi Doktora Bursiyeri Destek Programı kapsamında bursiyeri olduğum TÜBİTAK-BİDEB'e... Bu araştırmayı (PYO.TIP.1904-15.030) mali yönden destekleyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi BAP Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

DPP-4 İNHİBİTÖRÜ ANTİDİYABETİK VİLDAGLİPTİN İLE SİTAGLİPTİNİN GENOTOKSİSİTE VE SİTOTOKSİSİTE AÇISINDAN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Bu çalışma ile tip 2 diyabetin tedavisinde kullanılan vildagliptin ve sitagliptin etken maddeleri ile metabolitlerinin *in vitro* kültür şartlarındaki genotoksisite ve sitotoksitesinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: 2 kadın ve 2 erkek sağlıklı gönüllüden kan alınarak tam kan kültürleri yapıldı. Kromozom anomalilerini, mikronükleus ve kardeş kromatid değişimlerini değerlendirmek için hücre kültürü yapılarak kromozom anormallikleri, mikronükleus ve kardeş kromatid değişim yöntemleri uygulandı. Hücre kültürleri, vildagliptinin 125 µg/ml, 250 µg/ml ve 500 µg/ml'lik konsantrasyonları ile sitagliptinin 250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml'lik konsantrasyonları ile muamele edilerek bu iki ilaca 24 saat ve 48 saat süre ile maruz bırakıldı. Ayrıca, aynı ilaç dozları ekzojen metabolik aktivatör ile muamele edilerek metabolitlerin de etkileri değerlendirildi. Çalışma sonunda iki ilacın ve metabolitlerinin genotoksik ve sitotoksik özellikleri belirlendi ve karşılaştırıldı.

Bulgular: Vildagliptinin doz artışına paralel olarak mitotik indeks üzerinde zayıf sitotoksik etki gösterdiği saptandı. Sitagliptinin de doz artışına bağlı mitotik indeks, nükleer bölünme indeksi ve proliferasyon indeksi üzerinde sitotoksik ve sitostatik etki gösterdiği belirlendi. İki etken maddenin ve metabolitlerinin de genotoksik etkinin önemli belirteçleri olan kromozom anormallikleri, mikronükleus ve kardeş kromatid oluşturma konusunda etkili olmadığı anlaşıldı.

Sonuç: Vildagliptin ve sitagliptinin insan periferik lenfositleri üzerinde sitotoksik ve sitostatik etkilere sahip olmaları, bu ilaçların hücre çoğalmasında baskılayıcı özellikte olduklarını ortaya koymuştur. Sitagliptinin daha fazla etkiye sahip olmasıyla birlikte, iki ilacın da sahip oldukları bu potansiyel, onların tip 2 diyabet tedavisinin yanı sıra antiproliferatif ve antikansorejen ajan olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Genotoksisite; sitotoksisite; sitagliptin; vildagliptin

Ceren, BÖRÇEK KASURKA, (Doktora Tezi)

Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Temmuz-2017

ABSTRACT

INVESTIGATION OF CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY OF VILDAGLIPTIN AND SITAGLIPTIN AS DPP-4 INHIBITOR ANTIDIABETIC DRUGS

Aim: In this study, it is aimed to investigate genotoxicity and cytotoxicity of vildagliptin and sitagliptin active ingredients and their metabolites, used in the treatment of type 2 diabetes in *in vitro* culture conditions.

Material and Method: Whole blood cultures were established with two male and two female healthy volunteers' blood. To assess chromosomal anomalies, micronuclei and sister chromatid exchanges, chromosomal anomaly, micronucleus and sister chromatid exchange methods were applied. Concentrations of vildagliptin at 125 µg/ml, 250 µg/ml and 500 µg/ml and concentrations of sitagliptin at 250 µg/ml, 500 µg/ml and 1000 µg/ml were applied to the cultures, and the cells were exposed to the two drugs for 24 and 48 hours. In addition, the effects of metabolites were assessed by treating the same drug doses with an exogenous metabolic activator. At the end of the study, genotoxic and cytotoxic properties of the two drugs and their metabolites were determined and compared.

Results: It is determined that vildagliptin showed weak cytotoxicity on the mitotic index, parallel to the increase in dose. It is also found that sitagliptin, depending on its increase in dose, caused potential cytotoxicity and cytostatic effect on the mitotic index, nuclear division index and proliferation index. It is decided that the active ingredients and their metabolites have no genotoxic effect on chromosomal anomalies, micronuclei and sister chromatid exchanges.

Conclusion: Vildagliptin and sitagliptin have cytotoxic and cytostatic effects on human peripheral lymphocytes; thus these drugs inhibit cell proliferation. Besides the fact that sitagliptin is more effective, due to this potential of the drugs, they may be used as an antiproliferative and anticancer agent in addition to the treatment of type 2 diabetes.

Keywords: Cytotoxicity; genotoxicity; vildagliptin; sitagliptin

Ceren, BÖRÇEK KASURKA (Ph. D. Thesis)

Ondokuz Mayıs University - Samsun, July-2017

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADA	:	American Diabetes Association (Amerikan Diyabet Birliği)
BrdU	:	5'-Bromo-2'-Deoksiüridin
CP	:	Siklofosfamid
DM	:	Diabetes Mellitus
DMH	:	1,2-Dimetilhidrazin
DMSO	:	Dimetil Sülfoksit
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
DPP-4	:	Dipeptidil Peptidaz-4
EMA	:	European Medicines Agency (Avrupa Tıbbi Ürünler Ajansı)
FDA	:	The Food And Drug Administration (Amerikan Gıda Ve İlaç Dairesi)
GLP-1	:	Glucagon-Like Peptide-1 (Glukagon Benzeri Peptid)
IDF	:	International Diabetes Federation (Uluslar Arası Diyabet Federasyonu)
KA	:	Kromozom Anormallikleri (Kromozomal Aberasyonlar)
KKD	:	Kardeş Kromatid Değişimi
Mİ	:	Mitotik İndeks
MMC	:	Mitomisin-C
MN	:	Mikronükleus
NBİ	:	Nükleer Bölünme İndeksi
OECD	:	Organisation For Economic Co-Operation And Development (İktisadi İşbirliği Ve Gelişme Teşkilatı)
Pİ	:	Proliferasyon İndeksi
PPAR-1	:	Peroxisome Proliferator Activated Receptor 1 (Peroksizom Proliferatör Tarafından Aktive Edilen Reseptör 1)
TEMĐ	:	Türkiye Endokrinoloji Ve Metabolizma Derneği
WHO	:	World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Diyabet Nedir?	5
2.1.1. Diyabet Tipleri.....	6
2.2. Diyabet Genetiği	8
2.3. Tip 2 Diyabetin Tedavisi.....	9
2.3.1. Vildagliptin ve Sitagliptinin Etki Mekanizması	11
2.4. Diyabet ve Kanser	13
2.5. Genotoksisite Testleri ve Önemi.....	14
2.5.1. Kromozom Anormallikleri Yöntemi	16
2.5.2. Mikronükleus Yöntemi	17
2.5.3. Kardeş Kromatid Değişimi Yöntemi	19
2.6. Antidiyabetiklerle Yapılan Genotoksisite ve Sitotoksisite Çalışmaları	20
3. MATERYAL VE METOD	26
3.1. Gönüllülerin Seçimi	26
3.2. Araştırma Gruplarının Planlanması.....	26
3.2.1. S9 Metabolik Aktivasyon Uygulanmayan Kültürler	26
3.2.2. S9 Metabolik Aktivasyon Uygulanan Tüpler	27
3.3. Dozların Belirlenmesi	33
3.4. Kromozom Analiz Yöntemi	34

3.5.	Mikronükleus Analiz Yöntemi.....	37
3.6.	Kardeş Kromatid Değişimi Analizi Yöntemi.....	40
3.7.	Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	44
3.7.1.	Kullanılan Kimyasallar	44
3.7.2.	Kullanılan Cihazlar	50
3.8.	İstatistiki Analizler	51
4.	BULGULAR	52
4.1.	Vildagliptin Etken Maddesinin Mitotik İndeks, Kromozom Anormallikleri ve Anormal Hücre Ortalaması Üzerine Etkileri.....	52
4.2.	Vildagliptin Etken Maddesinin Nükleer Bölünme İndeksi ve Mikronükleus Oluşumu Üzerine Etkisi	56
4.3.	Vildagliptin Etken Maddesinin Proliferasyon İndeksi ve Kardeş Kromatid Değişimi Üzerine Etkisi	58
4.4.	Vildagliptinin Kromozomal Anomali, Mikronükleus Ve Kardeş Kromatid Değişimi Testlerinden Elde Edilen Parametrelerin Pozitif Kontrol, Çözücü Kontrol ve Uygulanan Diğer Dozlara Ait Parametreler İle Karşılaştırılması	60
4.4.1.	Vildagliptin Uygulanması Sonucu Elde Edilen Mitotik İndeks, Kromozomal Anomali, ve Anormal Hücre Ortalamasına Ait Verilerin Karşılaştırılması.....	60
4.4.2.	Vildagliptin Uygulanması Sonucu Elde Edilen Nükleer Bölünme İndeksi ve Mikronükleus Oluşumuna Ait Verilerin Karşılaştırılması	68
4.4.3.	Vildagliptin Uygulanması Sonucu Elde Edilen Proliferasyon İndeksi ve Kardeş Kromatid Değişimi Ortalamasına Ait Verilerin Karşılaştırılması	72
4.5.	Vildagliptinin Kromozom Analizi, Mikronükleus ve Kardeş Kromatid Değişim Yöntemleri ile Elde Edilen Parametreler Arasındaki İlişki.....	76
4.6.	Vildagliptin Etken Maddesinin Uygulama Durumuna Göre Genotoksik ve Sitotoksik Etkilerinin Karşılaştırılması	78
4.6.1.	125 µg/ml’lik Vildagliptin Dozuna Ait Verilerin Karşılaştırılması	78

4.6.2.	250 µg/ml’lik Vildagliptin Dozuna Ait Verilerin Karşılaştırılması	81
4.6.3.	500 µg/ml’lik Vildagliptin Dozuna Ait Verilerin Karşılaştırılması	84
4.7.	Sitagliptin Etken Maddesinin Mitotik İndeks, Kromozomal Anomali ve Anormal Hücre Ortalaması Üzerine Etkileri.....	86
4.8.	Sitagliptin Etken Maddesinin Nükleer Bölünme İndeksi ve Mikronükleus Oluşumu Üzerine Etkileri	88
4.9.	Sitagliptin Etken Maddesinin Proliferasyon İndeksi ve Kardeş Kromatid Değişimi Üzerine Etkileri	91
4.10.	Sitagliptinin Kromozom Analizi, Mikronükleus ve Kardeş Kromatid Değişimi Yöntemlerinden Elde Edilen Parametrelerinin Pozitif Kontrol, Çözücü Kontrol ve Uygulanan Diğer Dozların Ait Parametreleri ile Karşılaştırılması.....	93
4.10.1.	Sitagliptin Uygulaması Sonucu Elde Edilen Mitotik İndeks, Kromozomal Anomali ve Anormal Hücre Ortalamasına Ait Verilerin Karşılaştırılması	93
4.10.2.	Sitagliptin Uygulaması Sonucu Elde Edilen Nükleer Bölünme İndeksi ve Mikronükleus Oluşumuna Ait Verilerin Karşılaştırılması	101
4.10.3.	Sitagliptin Uygulaması Sonucu Elde Edilen Proliferasyon İndeksi ve Kardeş Kromatid Değişimine Ait Verilerin Pozitif Kontrol ve Çözücü Kontrol ile Karşılaştırılması	105
4.11.	Sitagliptinin Kromozom Analizi, Mikronükleus ve Kardeş Kromatid Değişimi Yöntemleri ile Elde Edilen Parametreler Arasındaki Korelasyon.....	109
4.12.	Sitagliptin Etken Maddesinin Uygulama Durumuna Göre Genotoksik ve Sitotoksik Etkilerinin Karşılaştırılması	110
4.12.1.	250µg/ml Sitagliptin Dozuna Ait Verilerin Karşılaştırılması.....	110
4.12.2.	500 µg/ml’lik Sitagliptin Dozuna Ait Verilerin Karşılaştırılması	111
4.12.3.	1000 µg/ml’lik Sitagliptin Dozuna Ait Verilerin Karşılaştırılması	113
4.13.	Vildagliptin ve Sitagliptin Etken Maddelerinin Genotoksik ve Sitotoksik Etkilerinin Karşılaştırılması	116
4.13.1.	Minumum Dozlara Ait Verilerin Karşılaştırılması	116

4.13.2. Ara Dozlara Ait Verilerin Karşılaştırılması.....	119
4.13.3. Maksimum Dozlara Ait Verilerin Karşılaştırılması.....	124
5. TARTIŞMA.....	129
5.1. Vildagliptin ile Sitagliptinin Genotoksisitesi	130
5.2. Vildagliptin ile Sitagliptinin Sitotoksisitesi	132
5.3. Vildagliptin ile Sitagliptinin Genotoksik ve Sitotoksik Etkilerinin Karşılaştırılması	133
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	136
KAYNAKLAR	137
ÖZGEÇMİŞ	144

1.GİRİŞ

Dünya sağlık örgütü (World Health Organisation-WHO), sağlığı sadece hastalık ve sakatlığın olmaması durumu olarak değil, aynı zamanda fiziksel, zihinsel ve sosyal açıdan bütünüyle iyi olma hali olarak tanımlamaktadır (WHO, 2017b). Tıbbi bilimlerin çalışma hedefini oluşturan hastalık ise: hekimlerin görebildiği, dokunabildiği, ölçebildiği ve tamamıyla patolojik bir süreçtir (Boyd, 2000).

Diabetes mellitus (DM), insülin salınımı ve faaliyetindeki bozukluklar sonucu ortaya çıkan hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Diyabetin sebep olduğu kronik hiperglisemi; özellikle gözler, böbrekler, sinirler, kalp ve kan damarları olmak üzere, farklı organlarda uzun süreli hasara, disfonksiyona ve bozukluğa neden olabilmektedir. DM'un gelişiminde; pankreastaki β hücrelerinin otoimmün yıkımından kaynaklı insülin eksikliği ile insüline direnç oluşturan patojenik mekanizmalar rol almaktadır. DM hastalığında karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki anormal değişimlerin temelinde hedef dokulardaki insülin yetersizliği yatmaktadır. İnsülin faaliyetindeki yetersizlik, eksik insülin salınımından ya da azalmış insülin cevabından kaynaklanmaktadır. İnsülin yetersizliği, fonksiyonel açıdan kompleks olan yolağın bir veya birden fazla noktasında gerçekleşen düzensizliğe dayanmaktadır. Hipergliseminin belirgin semptomları; poliüri, polidipsi, kilo kaybı, polifaji ve bulanık görmedir. Kontrol edilemeyen diyabetin hayatı tehdit eden akut belirtisi ise ketoasidozis veya nonketotik hiperosmolar sendromun ortaya çıkmasıdır. Uzun süre diyabetle yaşayan hastalarda; potansiyel görme kaybına neden olan retinopati, böbrek yetersizliğine sebep olan nefropati, ayak ülserleri, amputasyonlar, Charcot eklem riski, periferik nöropati, gastrointestinal, genitoüriner ve kardiyovasküler bozukluklar gibi komplikasyonlar gelişmektedir. Ayrıca otonomik nöropati ile cinsel bozukluklar da sık görülmektedir. DM'te ayrıca reaktif oksijen türleri ile antioksidan koruma sistemi arasında da bir dengesizlik ortaya çıkmaktadır (Aleisa ve ark., 2007; ADA, 2010).

DM'un dünya genelindeki prevalansı, özellikle az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde olmakla beraber hızla artmaktadır. Hasta sayısı 1980'den bu yana 4 kat artarak 422 milyon vakaya ulaşmıştır ve önümüzdeki 20 yıl içinde ikiye katlanacağı öngörülmektedir (WHO, 2017a).

DM vakaları 3 temel etipatojenik kategoride toplanmaktadır. Tip I DM; bütün DM hastalarının %5-10'unu oluşturmaktadır. Buna insüline bağımlı ya da juvenil başlangıçlı diyabet de denmektedir. Hastalık; pankreasın β hücrelerinin hücresel aracılı otoimmün yıkımı sonucunda oluşmaktadır. Tip 2 DM; insüline direncin ve yetersiz insülin salınmasının birlikte görüldüğü ve prevalansı daha yüksek olan bir hastalıktır. Bu hastalık tipinde hiperglisemi düzeyi çeşitli hedef dokularda hiçbir klinik semptom göstermeden patolojik ve fonksiyonel değişikliklere sebep olabilmektedir. Gestasyonel diyabet de insülin direnci ve insülin yetersizliği ile karakterize olan bir hastalık tipidir. İlk tanısı hamilelik sırasında konan diyabet, (herhangi bir seviyede) glukoz intoleransı sonucunda oluşmaktadır. DM'un bu tipi birçok olguda doğum sonrasında ortadan kalksa da doğum sonrasında da devam edebilmektedir (ADA, 2010).

DM tedavisinde kullanılan oral antidiyabetikler, etki mekanizmaları bakımından gruplandırılmışlardır. Eski nesil ilaçların etki mekanizmaları; insülin sekresyonunu artırma (sülfonilüreler ve glinidler), insülin duyarlılığını güçlendirme (metformin ve tiyazolidinedonlar), intestinal karbonhidrat emilimini azaltma (α -glukozidaz inhibitörleri) gibi işlevsel davranışlar şeklinde tezahür etmektedirler. Oysa yeni nesil ilaçların etki mekanizması, dipeptidil peptidaz-4 (DPP-4) inhibisyonu yoluyla glukagon benzeri peptid 1 salınımını sağlamak ve glukoz bağımlı insülin sekresyonunu güçlendirmek şeklinde işlev görmektedir.

Yeni nesil ilaçlardan vildagliptin ve sitagliptin (inkretin mimetik ilaçlar grubundan) DPP-4 inhibitörleri olarak işlev görmektedirler. Bu ilaçlar, barsak inkretin hormonu glukagon benzeri peptid (glucagon-like peptide-1; GLP-1)'in hızlı dejenerasyonunu inhibe edip, biyolojik açıdan aktif GLP-1 seviyesini arttırmak suretiyle görev yapmaktadırlar. GLP-1 ise, β -hücrelerinden insülin salınımını güçlendirirken, glukagon salınımını engelleyip, hepatik glukoz üretimini azaltmaktadır. Oral DPP-4 inhibitörlerine, başlangıçta hemoglobin A1C'yi düşürmesi, kilo değişimine sebep olmaması ve hipoglisemi riski taşıması gibi etkileri nedeniyle, kombine tedavilerde geniş yer verilmektedir (Levetan, 2007). Diyabet hastalarının çoğu, hayatlarının geri kalanında ilaçlarla tedavi edilirler. Bu nedenle, bu ilaçların uzun vadeli etkinlik ve güvenilirliği hakkında bilgi sahibi olmak, yönetim stratejilerini belirlemek ve tip 2 diyabetin ekonomik yükünü azaltmak için önemlidir (Caballero, 2017).

DM ile kanser arasında muhtemel bir ilişkinin varlığı 1930'ların ilk yarısından bu yana tartışılmaktadır (Marble, 1934). Bir hastada kanser ve diyabetin birlikte görülme sıklığı, beklenenden daha fazladır. Diyabet ile kanserin insidansı global olarak artış göstermektedir. Epidemik araştırmalar, kanser insidansındaki artış ile diyabet arasında bir ilişkinin varlığını ortaya koymaktadır. Kanser ölüm sıralamasında dünyada 2. sırada yer alırken, diyabet 12. sırada yer almaktadır. Buna karşın, diyabet hastaları, birçok farklı kanserin gelişiminde yüksek risk taşımaktadırlar. Bu riskin ortak patogenetik süreçten mi, ortak risk faktörlerinden mi yoksa DM sonucu ortaya çıkan metabolik deformasyondan mı kaynaklandığı hala tartışılan bir konudur. Ayrıca diyabetik tedavinin de kansere yatkınlık yarattığı ileri sürülmüştür. Ardışık araştırmaların, hipergliseminin tedavisinde kullanılan bazı ilaçların kanser riskini artırdığını ve bazı ilaçların da azalttığını gösteren kanıtlar ortaya koyduğu belirtilmiştir (Giovannucci ve ark., 2010).

Diyabetin tiplendirilmesinde, hastalığa yol açtığı düşünülen genetik faktörler ile patofizyolojik nedenler yer almaktadır. Genetik, epigenetik ve çevresel faktörler arasında gerçekleşen etkileşim, Tip 2 diyabetin gelişimini sağlamaktadır. Tip 1 diyabet ise daha çok genetik faktörler etkenli olup; pankreatik gelişim ile insülin metabolizmasında görev alan genlerin mutasyonları ile epigenetik değişim kaynaklıdır. Gestasyonel diyabetin ise maternal, paternal ve fetal genomların ilgili genlerinin glukoz metabolizması üzerindeki etkilerinin sonucu geliştiği varsayılmaktadır. Tek gen mutasyonlarına bağlı olarak oluşan diyabet tiplerinin de olduğu bilinmektedir (Horenstein ve Shuldiner, 2004; Stankov ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2013; Bansal ve Pinney, 2017)

Diyabet hastalarında kanser insidansının normal popülasyona göre daha yüksek olmasından dolayı, bu ilaçlar genotoksisite ve sitotoksisite açısından araştırma konusu olmuştur (Oz Gul ve ark., 2013; Engüzel, 2015; Harishankar ve ark., 2015). Bu nedenle, bu çalışma ile son zamanlarda kullanım önceliği olan DPP-4 inhibitörü vildagliptin ve sitagliptinin *in vitro* ortamda genotoksik ve sitotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışma ile aynı grupta yer alan iki antidiyabetik ilacın genotoksik ve sitotoksik etkileri araştırılarak farklı dozlarına ve maruziyet sürelerine göre değerlendirme yapıp karşılaştırılmıştır. Ayrıca, ekzojen metabolik aktivasyon

sağlanarak, ilaç metabolitlerinin de genotoksik ve sitotoksik etkileri araştırılarak ilaçların doz değerleri ile karşılaştırılmıştır.



2.GENEL BİLGİLER

2.1.Diyabet Nedir?

Diabetes mellitus ya da kısaca diyabet, pankreasın yeterli miktarda insülin salgılayamadığı ya da vücudun mevcut insülini verimli şekilde kullanamadığı durumlarda ortaya çıkan kronik, ilerleyici ve organ sistemlerini bozan ciddi bir hastalıktır (IDF, 2015; WHO, 2016). İnsülin; pankreas tarafından salgılanan ve kandaki glukozun enerji olarak kullanılacağı hücrelere taşınmasını sağlayan bir hormondur. İnsülinin olmaması ya da kullanışsız olması kandaki glukozun artmasına neden olur (IDF, 2015).

21. yüzyılın en ciddi küresel sağlık sorunlarından birisini diyabet oluşturmaktadır. Diyabetik hasta sayısında, 1980lerden günümüze kadar neredeyse 4 kat artış olmuştur. (WHO, 2017a). Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF)'nin 2015 yılı verileri dünyada 415 milyon diyabet hastası olduğunu ortaya koymuş ve aynı yılda 5 milyon diyabetlinin öldüğünü bildirmiştir. Ayrıca 318 milyon glukoz toleransı bozulmuş yetişkinin de geleceğin diyabetlileri olacağını ifade etmiştir. 2015 yılında her 11 yetişkinden birinin diyabetik olduğu ve 2040 yılına gelindiğinde 10 kişiden birinin diyabetik olacağı bildirilmiştir (IDF, 2015).

Ülkemizin 2015 yılı verileri, her sekiz yetişkinden birinin diyabetik olduğunu ve toplamda 6,339 milyon kişinin bu hastalıktan muzdarip olduğunu göstermiştir. Ayrıca 2,179 milyon yetişkinin de henüz tanı almamış diyabetik hasta olduğu tahmin edilmektedir. Ülkemizin 2015 yılı diyabet prevalansı %12,5 iken, 2040 yılındaki prevalansının %16 olacağı tahmin edilmektedir (IDF, 2015).

Küresel sağlık hizmeti sistemi ve küresel ekonomi için büyük bir külfet olan diyabet, tıbbi bedeller, üretim kaybı, erken ölüm ve gayri safi milli hasıla üzerinde de negatif etkiler yaratan bir hastalıktır (WHO, 2016). Tip 2 diyabet; şişmanlık, obezite, fiziksel inaktivite ve sağlıksız beslenme gibi değiştirilebilir risk faktörlerinin prevalansı azaltılarak multisektörel ve popülasyon bazlı yaklaşımlarla büyük ölçüde engellenebilir (Giovannucci ve ark., 2010).

Diyabet, kan glukoz seviyesindeki yükselme ile karakterizedir. Kan glukozunun artışı kalp, kan damarları, gözler, böbrekler ve sinirleri etkileyip kalp krizine, inme, alt ekstremitte amputasyonuna, görüş kaybına, sinir hasarına ve benzeri

komplikeasyonlara yol açar. Komplikeasyonların ortaya çıkması hastalarda ölüm riskini arttırmaktadır (WHO, 2016). Tedavi sürecinin iyi yönetilememesi ve uzun bir hastalık sürecinin yaşanması sonucunda çoğunlukla mikroanjiyopati ve/veya makroanjiyopatiye bağlı olarak nefropati, retinopati, nöropati, ateroskleroz ve kalp hastalıkları gibi işlevsel bozukluklar oluşur (Sen ve ark., 2014). Diyabetin semptomları arasında poli uri, polidipsi, polifaji, iştahsızlık, halsizlik, çabuk yorulma, a ız kurulu u, noktüri, bulanık görme, açıklanamayan kilo kaybı, inatçı enfeksiyonlar, tekrarlayan mantar enfeksiyonları ve kaşıntı sayılmaktadır (TEMD, 2014). Tip 2 diyabette görülen hiperglisemi farklı ancak birbiri ile ilişki iki yol üzerinden ortaya çıkmaktadır. Hepatik glukoz yapımındaki artıştan dolayı açlık plazma glukozunda yükselme; insülin sekresyonunu ve takiben periferik kullanımında oluşan bozukluk sonucunda yemek sonrası glukozunda artış gözlenmektedir (Atmaca ve Ecemi , 2012) .

2.1.1.Diyabet Tipleri

Üç ana tip diyabet görülmektedir; tip 1, tip 2 ve gestasyonel diyabet. Bunların yanısıra monogenik diyabet vakaları ve çeşitli hastalıklar sonucu ortaya çıkan sekonder diyabetik vakalar da bulunmaktadır (IDF, 2015).

Tip 1 diyabet

Tip 1 diyabet; insülin bağımlı diyabet, juvenil veya çocukluk başlangıçlı diyabet olarak da adlandırılır. Vücudun yetersiz insülin üretimi ile karakterizedir. Tip 1 diyabetli insanlar, kanlarındaki yüksek glukoz seviyesini düzenlemek için günlük olarak insülin alırlar. Öyle ki, insüline ula amadıkları durumda hayati tehlike içine girebilirler (WHO, 2016).

Tip 1 diyabet, daha nadir olarak görülse de, her yıl prevalansı, özellikle çocuklar arasında, %3 oranında artış göstermektedir. 2015 yılında tip 1 diyabetli çocukların sayısı yarım milyonu geçtiği ileri sürülmektedir (IDF, 2015).

Tip 1 diyabetin kesin nedeni bilinmese de genler ve çevresel faktörler arasındaki karmaşık etkileşimler sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir (WHO, 2016). Otoimmün sistemin pankreastaki insülin üreten   hücrelerine saldırması sonucunda insülin üretiminin engellenmesiyle tip 1 diyabet ortaya çıkar (IDF, 2015). Mevcut   hücre rezervi %80-90 oranında azaldığında kişide diyabetin klinik semptomları ortaya çıkar (TEMD, 2014).

Tip 2 diyabet

Tip 2 diyabet; insüliniden bağımsız diyabet ya da erişkin başlangıçlı diyabet olarak da bilinen diyabettir. İnsülinin verimsiz kullanması sonucu ortaya çıkmaktadır (WHO, 2016). Prevelansı en yüksek olan diyabet tipi olup, kültürel ve toplumsal değişimlere göre artış gösterir. Gelişmiş ülkelerdeki diyabetlilerin %91'ini tip 2 oluşturur (IDF, 2015). Batı toplumlarındaki yetişkinlerin yaklaşık %6'sını etkilemektedir (EMA, 2017) Tip 2 diyabet yetişkinlerde en yaygın diyabet tipi olup, günümüzde gençler arasında da giderek artış göstermektedir (Bansal ve Pinney, 2017).

Bozulmuş glukoz toleransı ve bozulmuş açlık glisemisi normal kan glukoz seviyesinden diyabete geçişin emareleri olarak kabul görmektedir (WHO, 2016). Her 15 yetişkinden birinin bozulmuş glukoz toleransından sahip olduğu ve her 7 doğumdan birinin de gebelik diyabetinden etkilendiği varsayılmaktadır. Bu durum ileri yaşlarda tip 2 diyabet gelişimi için risk faktörü olarak görülmektedir (IDF, 2015).

Tip 2 diyabet riski; genetik ve metabolik faktörlerin birbirlerini etkilemesine bağlı olarak öne çıkar. Risk faktörleri arasında şişmanlık ve obezite, fiziksel inaktivite, etnisite, ailesel diyabet öyküsü, daha önce geçirilmiş gestasyonel diyabet, sağlıklı beslenme, ve sigara kullanımı yer alır. Ayrıca erken çocukluk dönemindeki beslenme şekli, zayıf fetal gelişim, düşük ve yüksek doğum ağırlığı da tip 2 diyabetin ileri yaşlarda gelişmesinde risk faktörü olarak rol alır (WHO, 2016).

Tip 2 diyabette insülin üretimi olsa bile insüline direnç gelişebilir ve insülin etkisizleşir. Zamanla insülin seviyeleri yetersiz kalır. İnsülin direnci ile yetersizliği kan glukoz seviyesinin yükselmesine yol açarak diyabetin ortaya çıkmasına neden olur (WHO, 2016).

Gestasyonel diyabet

Gestasyonel diyabet, başlangıcı veya ilk teşhisi gebelikte görülen glukoz intoleransıdır. Farklı populasyonlarda ve etnik gruplarda prevalansı değişen ve giderek artan ciddi bir sağlık problemidir (Zhang ve ark., 2013). Bireyler normalin üstünde kan glukoz seviyelerine sahip olsalar bile henüz diyabet tanısı almazlar. İleri anne yaşı, şişmanlık, obezite, gebelikte aşırı kilo alımı, diyabetik aile öyküsü, ölü doğum, kongenital anomalili bebek öyküsü, gebelik sırasında idrarda aşırı glukoz ve önceki gebeliklerde yaşanmış gestasyonel diyabet bu tip diyabetin risk faktörleridir (WHO, 2016). Bunlara ilaveten, gebelik öncesi ve süresince yetersiz beslenme ve fiziksel

hareketsizlik de gestasyonel diyabetin risk faktörü olarak kabul görmektedir (Zhang ve ark., 2013). Bu diyabet tipi, gebeliğin nihayete ermesiyle genellikle ortadan kalkabilmektedir. Fakat anne ve bebeği, ileri yaşlarda tip 2 diyabet olma riskine sahip olacaklardır (IDF, 2015).

2.2.Diyabet Genetiği

Diyabetin fenotipi oldukça heterojendir. Diyabet, altta yatan genetik faktörlere ve patofizyolojik sebeplere göre alttıplere ayrılır (Horenstein ve Shuldiner, 2004). “Thrifty gene” hipotezinin öngörüsü; farklı genetik kusurların ve polimorfizimlerin kümelenmesinden kaynaklı bazı popülasyonlarda genetik avantaj sağlanabilirken bazı etnik gruplarda gıda alımının artmasından dolayı (gıda alımı arttığında) insülin direncine ve diyabete eğilimin gelişmesine yol açtığını iddia etmektedir (Carulli ve ark., 2005).

Tek gen mutasyonlarından kaynaklanan diyabet tipleri toplumda %2-5 oranında görülmekte olup yüksek penetransa sahiptir ve çevresel faktörlerden çok az etkilenmektedir. Bunun aksine, tip 1 ve tip 2 diyabet de genetik temele sahip olup kalıtım paterni henüz bilinmeyen hastalıklar grubunda yer alırlar. Tip 1 ve tip 2 diyabet fenotipleri; her biri katkılı etkiye sahip olan çoklu genler ile çevresel faktörlerin etkileşimi sonucunda ortaya çıkmaktadır (Horenstein ve Shuldiner, 2004). Epigenetik modifikasyonlardan deoksiribonükleik asit (DNA) metilasyonu çevre ile genomun ile etkileştiğini ifade eder. DNA metilasyonundaki değişimlerin tip 1 ve tip 2 diyabet prevalansının artışına katkı yaptığına dair kanıtların bulunduğu bildirilmiştir (Bansal ve Pinney, 2017).

Tip 1 diyabet; genetik, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, mikroRNA disregülasyonu gibi epigenetik mekanizmalar ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle gerçekleşen kompleks bir hastalıktır. Tip 1 diyabet en sık görülen kalıtsal hastalıklardan biri olup, monozigot ikizlerin otoimmün hastalıklar arasında en fazla konkordans gösterdiği hastalıktır (Stankov ve ark., 2013). Kardeşi veya ebeveyni tip 1 diyabet olan bir kişinin tip 1 diyabete yakalanma olasılığının %6-7 olduğu bildirilmiştir. Akrabalarında tip 1 diyabet olmayan bir kişide bu oran % 0,4 olarak belirlenmiştir (Florez ve ark., 2003; Stankov ve ark., 2013). Tip 1 diyabet için yapılan asosiyasyon çalışmaları, hastalığa neden olan üç önemli gen bölgesinin olduğunu göstermiştir. Bunlar; human leukocyte antigen (HLA) bölgesi, insülinin variable number tandem

repeat (VNTR) bölgesi ve cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4; CD152 (CTLA4) geni olup, tip 1 diyabete neden olan genetik riskin yarısını oluşturduğu ileri sürülmüştür (Florez ve ark., 2003).

Tip 2 diyabetin de pankreatik gelişim ve β hücrelerindeki insülin geninin ekspresyonunda rol alan transkripsiyon faktörlerindeki mutasyonlar ile β hücrelerinin glukoz duyarlılığını etkileyen mutasyonlardan kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Florez ve ark., 2003). Genetik çalışmalar sonucunda ortaya konan genetik determinantların, transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler ve iltihap ile ilişkili genleri kapsadığı saptanmıştır. Bu gen ürünleri çoğunlukla β hücrelerinin çoğalması ve apoptozunda görev almaktadırlar (Tarnowski ve ark., 2017). Kardeşi veya ebeveyni tip 2 diyabet olan bir kişinin tip 2 diyabete yakalanma olasılığının %30-40 olduğu ileri sürülmüştür Oysa popülasyondaki tip 2 diyabetin oranı %7 olarak hesaplanmıştır (Florez ve ark., 2003). Monozigotik ikizlerde tip 2 diyabet, dizigotik ikizlere göre daha yüksek konkordansı göstermiştir. Bu sonuç, tip 2 diyabet riskinin %30-%70 oranında genetik temele dayandığının bir başka kanıtıdır (Cornelis ve Hu, 2012).

Gestasyonel diyabetle ilgili asosiyasyon çalışmaları, tip 2 diyabet için risk oluşturan bazı polimorfik varyasyonların gestasyonel diyabet için de risk oluşturduğunu göstermiştir. Bazı araştırmacılar, gestasyonel diyabetin gelişiminde sadece maternal genomun yer almadığını, paternal ve fetal genomların da etkili olabileceğini bildirmişlerdir (Zhang ve ark., 2013).

2.3. Tip 2 Diyabetin Tedavisi

Tip 2 diyabetli bireylerde optimal glisemik kontrolün sağlanmasında oral antidiyabetik ilaçlar kullanılmaktadır. İlaçlar etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmaktadır;

- a) İnsülin salgılatıcı ilaçlar
- b) İnsülin duyarlaştırıcı ilaçlar
- c) Alfa glukozidaz inhibitörleri
- d) İnsilünomimetik ilaçlar (Levetan, 2007; Atmaca ve Ecemiş, 2012; TEMD, 2014).

İnsülin salgılatıcı ilaçlar

Pankreatik β hücrelerinden insülin salınımını arttıran sulfonilüre ve glinid grubu ilaçlar bu gruba girmektedir. Bu ilaçlar, β hücrelerinin plazma membranında adenosin trifosfat (ATP) bağımlı potasyum kanallarını kapatarak potasyumun hücre dışına çıkışını engellemek suretiyle ve membranda depolarizasyon gerçekleştirmektedirler. Depolarizasyon sonucunda hücre içine kalsiyum girişi artarak insülin sekresyonunu uyarır (Atmaca ve Ecemiş, 2012; TEMD, 2014).

İnsülin duvarlaştırıcı ilaçlar

Farklı organ ve dokularda insülin hassasiyetini arttıran ilaçlardır. Periferik dokuların insülin duyarlılığını arttıran metformin, 1960'lerden beri kullanılan, biguanid türevidir. Esas etkisi hepatik glukoz çıkışını azaltmaktır. Metforminin hücre içi hedefi AMP tarafından aktive olan protein kinazdır. Bu sayede glukoz ve lipid metabolizmasında rol oynar ve hücresel enerji regülasyonunu sağlar. Tiazolidindionlar ise yağ doku, kas ve karaciğerde glukoz kullanımının arttığını ve üretiminin azalmasını sağlayarak insülin duyarlılığını arttırlar. Peroksizom proliferatör aktive edici reseptör (PPAR) üzerinden etkilerini gösterirler (Atmaca ve Ecemiş, 2012; TEMD, 2014).

Alfa glukozidaz inhibitörleri

Barsaktan glukoz emilimini geciktiren ilaçlardır. Türkiye piyasasında bu gruptan sadece akarboz bulunur. Akarboz, saflaştırılmış mikrobiyal kaynaklı bir psödotetrasakkarittir. Etkisini yemek sonrası glukozu düşürerek gösterir. (Atmaca ve Ecemiş, 2012; TEMD, 2014).

İnsülinomimetik ilaçlar

İnsülin salgılanmasını arttırarak etki gösteren ilaçlardır. Amilin agonistleri ve inkretin mimetik ilaçlar bu grup içinde yer almaktadır. İnkretinmimetik ilaçlar, inkretin hormonlarını (Glucagonlike peptide 1; GLP-1 ve Gastric inhibitory polypeptide; GIP) taklit etmek için veya yıkımını engellemek için tasarlanmıştır. Gliptinler, inkretin etkiyi güçlendirerek insülin salınımını arttıran ilaçlardır (Sromova ve ark., 2016). Dipeptidil peptidaz 4 (DPP-4) inhibitörü olan vildagliptin ve sitagliptinin de dahil olduğu bu grup, endojen inkretinlerin yıkımını engellemektedir (TEMD, 2014).

Sitagliptin, 2006 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (The Food and Drug Administration-FDA) tarafından onaylanan ilk DPP-4 inhibitörüdür (Matteucci ve

Giampietro, 2011; Plosker, 2014). Dünya çapında 130 ülkede tek başına veya kombine tedavilerde kullanılmaktadır (Scott, 2017). Vildagliptin ise 2007 yılında piyasaya sürülmüş ve tedavide kullanımı devam etmektedir (Ma ve ark., 2017).

2.3.1.Vildagliptin ve Sitagliptinin Etki Mekanizması

Yemek yemek; bağırsak motilitesinin düzenlenmesi, gastrik asit ve pankreatik enzimlerin salgılanması, safra kesesi kontraksiyonu ve besin absorpsiyonu ile ilgili birçok gastrointestinal hormonun salgılanmasına sebep olur. İntestinal hormonlar, aynı zamanda pankreastan insülin salgılanmasını uyararak emilen glukozun atılmasını da kolaylaştırır. İntestinal bir inkretin hormonu olan GLP-1, normal glukoz homeostazisinin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. İnkretinler, besin alımını takiben barsaklardan salgılanan gastrointestinal enzimlerdir. İnsülin salınımını stimüle eder ve glukagon salınımını baskırlar; gastrik boşalmayı önler ve iştah ile yemek alımını azaltırlar. Böylece oral glukoz toleransını geliştirirler (Drucker ve Nauck, 2006; Matteucci ve Giampietro, 2011). Ama tip 2 diyabet hastalarında bu hormonun etkisi azalır ve glukoz dengesi bozulur. İnkretin hormonu GLP-1'i baz alan ilk tedaviler 2005 yılında uygulamaya koyulmuştur. (Deacon, 2011; George ve Joseph, 2014).

GLP-1, dolaşımdan hızlıca temizlenen dayanıksız bir peptiddir. GLP-1'in ilk parçalanmasını sağılayıp insülinotropik etkisini yitirmesine neden olan enzim, bir serin ekzopeptidaz olan DPP-4'tür. Bu enzim T-cell activation antigen CD26 da bilinir (Deacon, 2011). DPP-4; karaciğer, akciğer, böbrek, bağırsak (fırça-kenar membranlarında), lenfositler ve endotel hücreleri gibi birçok dokuda yaygın olarak bulunan bir hücre yüzeyi aminopeptidazıdır. DPP-4 peptidleri, tercihen, ikinci aminoterminal pozisyonunda bulunan prolin veya alanin rezidüsünden parçalar. Aralarında GLP-1'in de bulunduğı nöropeptidler, sitokinler ve kemokinler gibi pek çok gastrointestinal hormon DPP-4'n substratıdır (Drucker ve Nauck, 2006).

Tip 2 diyabet tedavisi amacıyla GLP-1'in faaliyetlerini arttırmak için DPP-4'n inhibe edilme olasılığı ilk kez 1995'te tanımlanmıştır. DPP-4'n inhibisyonu ile yıkıma uğramayan GLP-1'in artışı gzlemelendikten sonra bu yolağı yönelik çeşitli tedaviler üzerinde çalışılmaya başlanmıştır. Bu amaçla çok sayıda DPP-4 inhibitörü geliştirilmiştir. 2002 yılına gelindiğinde bir DPP-4 inhibitörünün (NVP-DPP728) tip 2 diyabetli hastalarda 4 haftalık kullanım sonrası açlık ve tokluk glukoz seviyelerinde ve glikolize hemoglobin seviyesinde düşmeye sebep olduğı gösterilmiştir (Deacon ve ark.,

1995; Ahrén, 2006). Geliştirilen bileşikler DPP-4 için yüksek affinite göstermektedir, düşük nanomolar aralıkta inhibisyon sağlar ve hepsi kompetitif reversible inhibisyon özelliği gösterir. Tasarlanan her bir bileşiğin enzimle etkileşimi açısından farklılıklar vardır (Deacon, 2011).

Sitagliptin, DPP-4 enziminin katalitik bölgesi ile non-kovalent etkileşimler kurarak yaklaşık %97 inhibisyon sağlar. Oral biyoyararlanımı yaklaşık %87'dir. Sitagliptin, insanlarda çok az metabolize edilmekte ve dolaşımda %80 oranında değişmeyen ana bileşik olarak kalmaktadır (Deacon, 2011). Klinik olmayan absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve atılım çalışmalarının sonuçları sitagliptinin hızla absorbe edilen ve nispeten kısa bir plazma yarı ömrü olan ve orta ile yüksek klirens gösteren bir ilaç olduğunu göstermiştir (EMA, 2007). Sitagliptinin farmakokinetik özelliklerini saptamak amacıyla 70 sağlıklı erkek gönüllüde 100 mg'lık doz uygulanması yapılmış. Çalışma sonucunda plazma ilaç seviyesinin 2,5-4 saat sonra pik yaptığı; yarılanma ömrünün 12,4 saat olduğu ve renal klirensinin yaklaşık 350ml/dk olduğu bildirilmiştir. Sitagliptinin plazma proteinlerine bağlanmadığı ve sitokrom p450 vasıtasıyla herhangi bir ilaç etkileşimi göstermediği de bilinmektedir (Choy ve Lam, 2007).

Vildagliptin ise düşük hızlarda reversible enzim-inhibitör kompleksleri oluşturarak enzim işleyişini yavaşlatır ve yaklaşık %95 inhibisyon sağlar. Oral biyoyararlanımı %85 civarındadır. Vildagliptin, karaciğer ve diğer dokularda sitokrom P450 (CP450)'den bağımsız mekanizma aracılığı ile yoğun şekilde metabolize olmaktadır (Deacon, 2011). Vildagliptin için temel eliminasyon yolları hidroliz yoluyla metabolizasyon ve renal atımdır. Alınan dozun % 69'u metabolize olurken % 23 değişmeden idrar yoluyla atılmaktadır. Oksidasyon yoluyla metablizasyon ise %1,6 oranındadır. Oral alımı takiben hızlı ve iyi şekilde absorbe edilir. 11 sağlıklı gönüllü üzerinde 50 mg vildagliptin alımını takiben ilacın farmakokinetik özellikleri incelenmiştir. Plazma pik konsantrasyonuna 1,5 saatte ulaştığı, yarılanma ömrünün 1,6 ile 2,3 saat arasında olduğu bildirilmiştir (He, 2012). Vildagliptin β hücrelerindeki glukoz hassasiyetini ve insülin sekresyonunu arttırmaktadır. Mekanik olarak, vildagliptin, β -hücre fonksiyonunu geliştirir. Ayrıca hayvan çalışmaları, vildagliptinin β -hücre kütlesini artırma potansiyelini de göstermiştir. Bu nedenle vildagliptinin hastalık sürecini değiştirebileceği düşünülmektedir (Ahrén, 2006).

2.4.Diyabet ve Kanser

Hem diyabet hem de kanser, dünyada insidansı artan yaygın hastalıklardır. Dünya çapında ölümlere kanser ikinci, diyabet ise onikinci sırada neden olmaktadır. Kanser ve diyabetin aynı bireyde görülme olasılığı ise beklenenden daha fazladır (Giovannucci ve ark., 2010). Diyabet ile kanser arasındaki ilişkinin varlığına 1930’larda değinilmiştir (Marble, 1934). Bu konuda yapılan araştırmalar, farklı populasyonlarda belirli kanserlerin diyabetik hastalardaki insidansında artış olduğunu ortaya koymuştur. Diyabetli hastalarda pankreas, karaciğer, endometrium, kolorektal, meme, jinekolojik kanserler ile böbrek ve mesane tümörleri sıklığında artış; prostat kanseri riskinde ise azalma olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Okutur, 2015).

Ayrıca epidemiyolojik çalışmalar, kemoterapi alan veya ameliyat olan diyabetli hastaların daha kötü prognoz sergilediklerini ve yüksek mortalite oranına sahip olduklarını ortaya koymuştur (Sen ve ark., 2014).

Diyabet ile kanser arasındaki ilişki hala netleştirilememiştir. Diyabetin, kanser riskinin altında yatan biyolojik bir faktörün markerı olması olasılığı tartışılmaktadır. Ayrıca, diyabet ile kanser arasındaki ilişkinin obezite gibi ortak risk faktörlerine bağlı olabileceği araştırma konusudur. Yaş, cinsiyet, ırk ve etnisite gibi değiştirilemeyen faktörler ile şişmanlık, obezite, beslenme, fiziksel aktivite, sigara ve alkol kullanımı gibi değiştirilebilen faktörler diyabet ile kanserin ortak risk faktörleri olduğu bildirilmiştir (Giovannucci ve ark., 2010).

Diyabet ile kanser arasındaki ilişkiye onkogen, tümör supresör genler, glutamin metabolizması, inflamasyon ve obezite faktörleri de önemli katkı yapmaktadır (Sen ve ark., 2014). Diyabet hastalarındaki neoplastik sürecin hiperinsülinemi, hiperglisemi veya kronik inflamasyon gibi çeşitli mekanizmalardan etkilendiği ileri sürülmüştür (Giovannucci ve ark., 2010).

Hiperglisemi, diyabet için karakteristiktir. Artmış glukoz kullanımının malign hücrelerde varlığı da bilinmektedir. Kanser hücrelerindeki artmış glukoz metabolizması 1956 yılında Warburg tarafından tanımlanmış olup günümüzde “Warburg etkisi” olarak bilinmektedir. Hipergliseminin sağlamış olduğu yüksek glukozun, tümör hücreleri için “yakıt pompası” işlevi gördüğü düşünülmektedir (Warburg, 1956; Okutur, 2015). Hatta tümör hücrelerinin artmış glukoz metabolizmasından faydalanarak kanserde tanısıl

amaçlı glukoz türevlerinin kullanımı uzun yıllardır uygulamada olan bir yöntemdir (Fukuda ve ark., 1982; Nakachi ve ark., 2017).

Diyabet tedavisinde kullanılan ilaçların kilo alımı, hipoglisemi, ödem, gastrointestinal intolerans gibi akut ve kronik yan etkileri olduğu bildirilmiştir. Son yıllarda antidiyabetik ilaçların kansere de neden olabildiği ileri sürülmüştür (Cordero ve ark., 2009; Giovannucci ve ark., 2010; Matteucci ve Giampietro, 2011)

2.5.Genotoksisite Testleri ve Önemi

Bileşiklerin toksik etkisi, konsantrasyon ile maruz kalma süresinin bir bileşkesidir. Bir toksinle muamele edilen hücre popülasyonunda dinamik değişiklikler görülür. Bu değişiklikler hücre tipine ve yoğunluğa bağlı olarak farklılaşabilir. Kültürde yetişen hücreler üzerinde bileşiklerin etkilerinin analizi tüm hayvanlarda potansiyel toksik etkilerin tespiti amacıyla yaygın olarak yapılmaktadır (Riss ve ark., 2011).

Genetik toksisite ya da genotoksisite terimleri genel olarak çekirdekte, kromozomlarda ve/veya DNA yapısında meydana gelen hasarları nitelemektedir. Başka bir deyişle genotoksisite, kimyasal maddelerin DNA'ya veya genomun doğruluğunu düzenleyen hücresel bileşenlerden olan iç iplikçiklerine, topoizomerazlara, DNA onarım sistemine ve DNA polimerazlara zarar verme kapasitesini ve genetik bilgi üzerindeki tüm yan etkileri ifade etmektedir. Genetik materyale potansiyel zararı olan etkenler, doğrudan veya dolaylı olarak etki sağlayabilirler. Zararlı etkiler sadece mutajenik maddelerden kaynaklanmayabilir. Bu nedenle, genotoksisite, mutasyonlarda artış yapma yeteneği demek olan mutajeniteden daha kapsamlı bir biyolojik olaydır (Eastmond ve ark., 2009; Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

Genotoksisitesi araştırılacak maddelerin güvenlik değerlendirmeleri; genel olarak, insan hastalıkları ile ilişkili üç önemli genetik hasar yaratan gen mutasyonu, klatojenite ve anöploidi gibi anormallikleri değerlendiren farklı testlerin kombinasyonlarına dayanarak yapılmaktadır. Bu üç genetik değişim, germ hücrelerinde kalıtılabilir etkilere sahip olarak karşımıza çıkıp gelecek nesiller açısından ciddi risk oluşturma potansiyeli taşır. Somatik hücrelerdeki benzer değişimler ise malignansi oluşumunda önemli rol üstlenirler. Genotoksik veya mutajenik maddelerin oluşturacağı genetik hasarın derecesi, maruziyet süresine ve maddenin konsantrasyonuna bağlı olarak değişebilmektedir (Mark ve ark., 1994; Jena ve ark., 2002; Eastmond ve ark., 2009). Yapısal sitogenetik anomaliler ise doğrudan kanser etiyolojisinde rol

alabilmektedir. Kromozomal anomali frekansındaki yükselişe paralel olarak bir çok kanser türünde risk artmaktadır (Sant'Anna ve ark., 2013).

Çeşitli etki mekanizmaları ile doğrudan veya dolaylı olarak genetik hasarı indükleyen ilaçları belirlemek amacıyla *in vitro* ve *in vivo* olarak tanımlanan genotoksisite testleri tasarlanarak uygulanmıştır. Genotoksisite testlerinin uygulanışı, uzun dönemli karsinogenite çalışmalarının tasarlanması, yürütülmesi ve yorumlanması için de gerekli olmuştur. Yüksek hassasiyetleri ve hızlı sonuç vermeleri nedeniyle genotoksisite araştırmalarında *in vitro* yöntemlerin kullanımı vazgeçilmezdir (Jena ve ark., 2002).

İlaçların hücre, doku ve organlara kanserojen, mutajen veya teratojen etkilerini araştırmak amacıyla son yıllarda yapılan çalışmalar deney hayvanları yerine, hücre kültürleri üzerinde yapılmıştır. Memelilerin farklı hücre sistemleri gen mutasyonları ve büyük kromozomal hasarların belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır (Jena ve ark., 2002) İnsan hücre kültürleri ile çalışmakla, tür farklılığından dolayı ilaçların neden olduğu farklı etkilerden kaynaklı sorunlar aşılacağı gibi, deney hayvanlarıyla ilgili kaygıları da ortadan kalkmıştır (Saygı, 2003; Börçek Kasurka, 2010).

Bazı kimyasal maddelerin mutajenik kapasitelerinin ortaya çıkabilmesi için metabolize edilmeleri gerekmektedir (Mateuca ve ark., 2006). Bu durum gözönüne alınarak yetersiz endojen metabolik kapasiteye sahip periferik lenfositlerle oluşturulacak hücre kültürlerinde, memelilerde *in vivo* gerçekleşen biyotransformasyon olayını gerçekleştirebilmek için, ekzojen metabolik aktivasyon kaynağına ihtiyaç duyulur. *In vitro* test sistemlerine eklenen karaciğer mikrozom fraksiyonları (S9 mix), araştırılan kimyasalı metabolize ederek, metabolitlerin ortaya çıkmasına yardımcı olur. Böylece araştırılan kimyasalın ya da ilacın indirekt mutajenik etkiye sahip olup olmadığı saptanabilir. Tercih edilen en yaygın yöntem, fraksiyonun kemirici karaciğerinden elde edilmesi yöntemidir. Çeşitli ajanlarla enzim indüklenmesi gerçekleştirildikten sonra, çıkarılan karaciğerden elde edilen post-mitokondriyal fraksiyona kofaktörler ve gerekli tamponlar eklenir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda insan periferik lenfositlerinin kullanıldığı test sistemlerinde kemirici karaciğer mikrozom fraksiyonları yerine ticari olarak satın alınabilinen insan karaciğer mikrozom fraksiyonları tercih edilmiştir. Bu nedenle tür farklılıklarından dolayı ortaya çıkabilen sorunlardan kurtulmuş olmaktadır (Jena ve ark., 2002; OECD, 2016b; OECD, 2016a).

Genotoksik ve mutajenik açıdan incelenecek maddelerin etkilerini ortaya çıkarmak amacıyla en yaygın kullanılan *in vivo* ve *in vitro* testler Ames Testi, Comet Testi, Kromozom Anormallikleri Testi, Mikronükleus Testi ve Kardeş Kromatid Değişim Testidir (Tucker ve Preston, 1996; Jena ve ark., 2002; Mateuca ve ark., 2006; Eastmond ve ark., 2009; Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011; Kocaman ve ark., 2014)

2.5.1.Kromozom Anormallikleri Yöntemi

Kromozom anormallikleri (KA) analizi için öncelikle bölünmekte olan hücrelere kolşisin uygulanarak iğ iplikçikleri bloklanır ve bölünmesi durdurulan hücrelerin metafaz safhasında tutuklu kalması sağlanır. Fikse edilen hücrelerin lamalara yayılmasının ardından Giemsa ile boyanarak kromozomlarının görünür hale getirilir (Mateuca ve ark., 2006; OECD, 2016a).

Kromozomal değişimler yüzyılı aşkın süredir çalışılmaktadır ve bu değişimlerin bir çok hastalığın yanı sıra malignansi ile ilişkisi bilinmektedir (Tucker ve Preston, 1996). Garcia-Sagredo (2008), sitogenetiğin gelişimini özetleyen derlemesinde, modern insan sitogenetiğinin 1956 yılında insan kromozom sayısının 46 (diploid) olarak tespiti ile başladığını, 1959 yılında Down sendromu, Klinefelter sendromu ve Turner sendromu gibi anöploidik değişimlerin saptandığını ve 1960 yılında da klastojenik değişimlerin (Philadelphia kromozomu) tanımlandığını ifade etmiştir. 1970'lere gelindiğinde, genotoksik olduğu bilinen kimyasalların kromozom anomalileri ile kardeş kromatid değişimlerini indüklediği belirlenmiştir (Mark ve ark., 1994).

Kromozom araştırmalarında en yaygın kullanılan hücre grubu, kolay elde edilmesi, kültür ortamında bölünmesi ve metafaz aşamasında çok sayıda hücre görülmesi gibi avantajlarından dolayı periferik insan lenfositleri olmuştur (Tucker ve Preston, 1996). Periferik lenfositler elde edildiği aşamada genellikle G_0 fazında bulunurlar ve hücrenin S, G_2 ve M fazları genotoksisiteye daha hassastır (Fenech, 2000)

Kromozomal anomaliler; normal kromozom yapısında veya sayısındaki değişimleri ifade etmektedirler. Yapısal kromozomal anomalileri; direkt DNA kırığı, hasarlı DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı replikasyon, DNA sentezinin inhibisyonu ya da topoizomerazların inhibisyonu gibi farklı mekanizmalar tarafından oluşturulurlar (Mateuca ve ark., 2006). Yapısal kromozomal anomalilerini, kromozom ve kromatid olmak üzere iki tipe ayırmak mümkündür. İki tip yapısal anomalinin oluşumu ve onarımı farklı mekanizmalarla gerçekleşir. Kromozom tipi yapısal anomalileri,

klastrojenlerden etkilenen G_0 - G_1 fazındaki lenfositlerde eksik onarım veya onarılmayan çift zincir kırıkları oluştuğunda ortaya çıkarlar. DNA sentezi ve kromozom duplikasyonundan sonra, G_0 - G_1 'de oluşan anomaliler kopyalanır ve metafazda kromozom tipi kırıklar ile disentrik kromozom, ring kromozom ve dengeli translokasyonlar gibi anomaliler oluşabilir. Kromatid tipi anomaliler ise S fazı bağımlı klastrojenler tarafından indüklenerek oluşan tek zincir kırıklara ve baz modifikasyonlarına cevap olarak kültüre edilen lenfositlerde, *in vivo* şartlara göre, daha çok oluşabilirler. Kromozomal anomalinin tipi, hücrenin kaderi için belirleyicidir. Disentrik kromozom, ring kromozom veya fragment gibi kararsız anomaliler taşıyan hücreler p53 bağımlı yoldan apoptozis ile elemine edilir. Diğer taraftan dengeli translokasyonlar gibi kararlı anomaliler organizma için daha zararlı sonuçlara sahip olsa da, apoptoza daha az yol açarlar. Sayısal kromozomal anomalileri, kendiliğinden veya uyaran bir maddenin sonucunda anormal kromozom dağılımına bağlı olarak ortaya çıkarlar (Mateuca ve ark., 2006).

Kromozom analiz tekniği ile yalnızca kromozom hasarları değerlendirilmemektedir. Aynı zamanda metafaz aşamasındaki hücrelerin oranı hesaplanarak mitotik indeks (Mİ) de değerlendirilir. Mitotik indeks de sitotoksiste için hassas bir değerlendirme parametresidir (Mark ve ark., 1994; Mateuca ve ark., 2006; OECD, 2016a).

2.5.2.Mikronükleus Yöntemi

Kromozomal hasarın *in vivo* şartlarda –hematologlar tarafından kemik iliği gibi bölünen hücrelerde “Howell-Jolly” cisimcikleri olarak da bilinen- mikronükleus (MN) şeklinde ölçülebileceği 1970’lerde ileri sürülmüştür. O tarihten bu yana mikronükleus yöntemi, genetik toksikoloji çalışmalarının vazgeçilmezi olmuştur (Fenech, 2000; Fenech ve ark., 2011)

Mikronükleus yöntemi, nükleer bölünmesini tamamlamış fakat sitoplazma bölünmesi aktin polimeraz inhibitörü sitokalsin-B ile engellenmiş hücrelerde çekirdek dışında kalmış genetik materyallerin belirlenmesi esasına dayanır (Fenech, 2000; Mateuca ve ark., 2006; OECD, 2016b). Bu yöntem ile kromozom kayıpları ve kromozom kırıkları hatasız şekilde ölçülüp değerlendirilmektedir. Mikronükleus yönteminin farklı hücre tiplerine uygulanması yoluyla popülasyondaki genetik hasarın izlenmesi, genotoksik ilaçların araştırılması, radyasyona karşı tümör duyarlılığının

tespiti ve radyasyon duyarlılığının değerlendirilmesi mümkün olmaktadır (Fenech, 2000).

Mikronükleus yöntemi, klasik kromozom analiz yöntemi kadar hassas bir DNA hasarı indikatörüdür. Kromozom analiz yöntemi ile karşılaştırıldığında değerlendirme yapmak için sayımı basit, ileri tecrübe gerektirmeyen ve daha az zaman gerektiren bir yöntemdir. Yöntemin asıl avantajı, fazla hücre incelemesine dayanan istatistiksel değerlendirme sonucunun güvenilir olmasıdır. Bu güvenilirlik, kromozom analizinde kullanılan kolşisin blokajının 1-4 saat, mikronükleus yönteminde uygulanan sitokinez blokajının ise 24-28 saat boyunca uygulanmasından kaynaklanmaktadır (Mateuca ve ark., 2006).

Mikronükleuslar; sentromeri olmayan kromozom veya kromatid fragmentlerinden ya da anafazda geç kalıp kutuplara göç edemeyen kromozom veya kromatidlerden oluşabilirler. Mikronükleusun çevresi telofazda hücre zarı ile kuşatılır ve kardeş hücre çekirdeklerine dahil olmadan sitoplazmada çekirdek dışı küçük cisimcikler olarak kalır ve mikronükleus adı da bundan ileri gelmektedir. Mikronükleusların barındırdığı kromozom fragmentleri; doğrudan çift zincir kırıkları, replikasyonun ardından çift zincir kırığına dönüşen tek zincir kırıkları veya DNA sentezinin inhibisyonu sonucu oluşmaktadır (Fenech, 2000; Mateuca ve ark., 2006). Mikronükleus oluşumunu etkileyen bir diğer faktör de sentromerik ve perisentromerik tekrar bölgelerindeki sitozin rezidülerinin hipometilasyonudur. Metilasyon profili değişen tekrar bölgeleri, kinetokor proteinlerinin iğ iplikçikleri ile doğru bağlantı kurma yeteneğinin kaybolmasına neden olarak kromozom kayıplarına yol açarlar. Diğer yandan, mitoz kontrol noktalarındaki kusurlar, anormal sentrozom amplifikasyonları ve mitotik iğ iplikçiklerinin toplanmasındaki hatalar da kromozom kayıplarını artırarak mikronükleus oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Fenech ve ark., 2011).

İlk çekirdek bölünmesini takiben kültüre eklenen sitokalsin-B, bölünen hücrelerin iki çekirdekli (binükleat) aşamada tutulmasını sağlamaktadır. Mikronükleus sayımında bu iki çekirdekli hücreler değerlendirilmektedir. Nükleer bölünme indeksi (NBI) de birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü çekirdek bölünmelerini geçiren hücrelerin sayımıyla gerçekleştirilmektedir. Nükleer bölünme indeksi, hücre bölünmesinin inhibisyonu, yani sitotoksosite hakkında bilgi vermektedir (Fenech, 2000; Mateuca ve ark., 2006).

2.5.3. Kardeş Kromatid Değişimi Yöntemi

Kardeş kromatid değişimi (KKD) yöntemi genotoksinlerin ya da mutajenlerin etkilerinin değerlendirilmesinde genetik indikatör olarak kullanılmaktadır. Çünkü; DNA hasarının bir çok formu, replikasyon çatalının çöküşü üzerinden kardeş kromatid değişimini uyarmaktadır (Wilson ve Thompson, 2007).

Kardeş kromatid değişimleri, DNA replikasyon ürünleri arasında homolog olduğu anlaşılan bölgelerde meydana gelen değişimleri ifade eder (Tucker ve Preston, 1996). Kardeş kromatid değişimi, duplike olmuş kromozomda DNA replikasyonu sırasında, atasal zincirin fiziksel değişim bölgelerinde kardeş kromatidlerin kırılması ve bir diğerine katılması şeklinde gelişen bir süreçtir. Bu işlem, korumacı ve hatasız olarak kabul edilmektedir, çünkü homolog rekombinasyon sırasında genellikle hiçbir bilgi değiştirilmez (Wilson ve Thompson, 2007).

Hücre döngüsünün S fazında, DNA replike olur ve her bir kromozom, sentromerlerinden sıkıca bağlı, birbiriyle ilişkili iki kardeş kromatide dönüşür. Kardeş kromatidler, kardeş hücreleri verecek bölünmeden önce, mitozun geç profaz evresinde ve erken metafazda sitolojik olarak kolayca görülebilir (Wilson ve Thompson, 2007).

BrdU (5'-Bromo-2'-deoksiüridin), DNA molekülüne inkorpore olabilen bir timin analogudur. Bu molekül kromozom boyandığında kromozomu soluk gösterir. Bu yüzden BrdU taşıyan zincirler daha parlak görülür. Kültür ortamına eklendiğinde, timin yerine geçerek uzayan zincire inkorpore olabilir. DNA replikasyonu yarı-korunumlu olduğundan, BrdU her dublekste yeni oluşan zincire tamamen inkorpore olur. BrdU ortamında, büyümenin ikinci aşamasında kardeş kromatidler, BrdU mevcudiyeti miktarında farklılaşır; bir zincir DNA'nın orijinal kalıp zinciri diğeri ise BrdU taşıyan zincirdir. Diğer kardeş kromatidde ise her iki zincirde de BrdU inkorpore olmuş duruma gelir (Wilson ve Thompson, 2007). Bu durumdaki kültürlerde, hücrelerin metafazda kalması sağlanarak kardeş kromatid değişimleri sayılmaktadır (Tucker ve Preston, 1996). Standart kromozom analiz yöntemi ile hazırlanan preparatlar, BrdU'nun parlatma etkisini gösterebilmesi için UV ışınlamasına tabii tutulduktan sonra boyandığında, BrdU'nun mevcudiyetine göre açık renkli ve koyu renkli kromatidler görünür hale gelir (Wilson ve Thompson, 2007).

Kardeş kromatid değişimi, normal DNA replikasyonu sırasında çatalın doğal olarak çökmesiyle ilgili olarak doğal olarak görülür ve hücrenin her döngüsünde yaklaşık 3-4 defa gerçekleşebilir (Wilson ve Thompson, 2007).

X-ışını onarımı çapraz tamamlama 1 (X-ray repair cross-complementing 1; XRCC1) eksikliği, peroksisom proliferatör tarafından aktive edilen reseptör 1'in (Peroxisome proliferator activated receptor 1; PPAR-1) inhibisyonu veya devredışı kalması ve çift zincir kırıklarına sebep olan çeşitli kimyasallarla replikasyon çatalının kırılması sonucu DNA sentezinin inhibisyonu gibi tek zincir kırıklarını arttıran oluşumlar, kardeş kromatid değişimini etkili biçimde indüklemektedir. Bu nedenle, kardeş kromatid değişimi için en basit yolağın; kırık DNA replikasyon çatallarının, atasal zincirde bir boşluk veya çentik oluşturarak homolog rekombinasyon aracılığıyla yeniden başlatılması olduğu ileri sürülmüştür (Wilson ve Thompson, 2007).

KKD yönteminde ayrıca BrdU'nin kromatidlerdeki bulunuşuna göre hücrenin kaçınıcı mitoz bölünmeyi geçirdiği de belirlenebilmektedir. Birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünme geçiren hücrelerin oranı sitostatik bir belirteç olan proliferasyon indeksi (PI) hakkında bilgi vermektedir (Speit, 1984; Konaş ve Atlı Şekeroğlu, 2015).

2.6.Antidiyabetiklerle Yapılan Genotoksisite ve Sitotoksisite Çalışmaları

Vildagliptin ve Sitagliptin

Literatür taraması sonucunda vildagliptinin genotoksisitesi hakkında yapılmış bir yayına rastlanılmamıştır. Sadece EMA'nın vildagliptin etken maddesini içeren Galvus isimli ilaç için hazırladığı kamu değerlendirme raporuna ulaşılmıştır. Bu raporda vildagliptinin standart genotoksisite testlerinde genotoksik potansiyel göstermediği bildirilmiştir. Sıçanlarda yapılan karsinojenite çalışmaları sonucunda ilacın karsinojenetik potansiyel taşımadığı gözlenmiştir. Farelerde ise meme kansinimleri ve hemangiosarkomlar için riskin yükseldiği rapor edilmiştir. Ayrıca üreme sistemi üzerinde de toksik etkileri olmadığı bildirilmiştir (EMA, 2012).

Amritha ve ark. (2015) kolon kanseri hücre hattı (HT-29) üzerinde vildagliptin ve sitagliptinin 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml, 31,2 µg/ml, 15,6 µg/ml ve 7,8 µg/ml'lik konsantrasyonlarının hücre proliferasyonuna etkilerini analiz etmişler. Çalışma sonunda vildagliptinin IC₅₀ dozunun 125 µg/ml; sitagliptinin IC₅₀ dozunun 31,2 µg/ml olduğu ve her iki ilacında antikanser aktivite gösterdiği bildirilmiştir.

Sitagliptinin genotoksitesinin değerlendirildiği bir diğer çalışmada ise ratlara oral olarak 36 gün boyunca 1, 10 ve 100 mg/kg/gün dozları uygulanmış ve sitagliptinin artan dozlarda *in vivo* rat lenfositlerinde Comet yöntemi ile olası genotoksik etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda hasarlı hücre oranı ve genetik hasar indeksinin doz artışıyla paralel olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca çalışmada uygulama öncesi ve sonrası canlı ağırlık ve kan glukoz düzeylerine de bakılmış ve bu parametrelerin sitagliptin uygulamasından etkilenmediği görülmüştür (Öz Abak, 2010)

Altı ay boyunca farklı oral antidiyabetiklerden; sitagliptin, rosiglitazon ve pioglitazon kullanan veya medikal beslenme terapisi uygulanan toplam 4 grup tip 2 diyabetli hasta grubunda yapılan çalışma ile genotoksik (KA; MN; KKD) ve sitotoksik (Mİ, NBI, PI) parametreler karşılaştırılmıştır. Sitagliptin kullanan grubun, medikal beslenme terapisi uygulanan kontrol grubundan daha fazla genotoksite gösterdiği fakat rosiglitazon ve pioglitazon kullanan gruplardan daha az genotoksite gösterdiği belirlenmiştir. Sitotoksik parametreler üç ilaç grubu arasında fark göstermeyip kontrol grubundan anlamlı derecede düşük çıkmıştır. Bu bulgular, üç ilacın da tip 2 diyabetli hastalarda genotoksik ve sitotoksik etki gösterebileceğini ortaya koymuştur (Oz Gul ve ark., 2013)

Femia ve ark. (2013) tarafından 1,2-dimetilhidrazin (DMH) ile indüklenerek kolon kanseri oluşturulan farelerde sitagliptinin uzun süreli etkisi araştırılmıştır. Erkek fareleri DMH'ye maruz bıraktıktan sonra kolon kanseri ile insülin direnci için risk faktörü oluşturan yüksek yağlı diyetle tabi tutmuşlardır. Bu uygulamadan bir hafta sonra, yüksek yağlı beslenen (kontrol grubu) ve 260 ppm sitagliptin uygulanan grup olmak üzere iki çalışma grubu oluşturulmuştur. DMH uygulamasından 15 hafta sonra, prekanseröz lezyonların sitagliptin uygulanan grupta belirgin ölçüde daha düşük görüldüğü saptanmıştır. Araştırmacılar, sitagliptinin kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif özellikleri dolayısıyla DPP4 inhibitörlerinin kolon karsinogenezine karşı koruyucu etkilere sahip olabileceklerini ileri sürmüşlerdir.

Sitagliptinin 31,25 µg/ml; 62,5 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml µg/ml'lik konsantrasyonları ve sitagliptin-metformin kombinasyonunun 7,81 µg/ml; 15,62 µg/ml; 31,25 µg/ml; 62,50 µg/ml; 125,0 µg/ml ve 250,0 µg/ml'lik konsantrasyonları insan periferik lenfosit kültürlerinde, 24 ve 48 saatlik maruziyet sürelerinde KA yöntemi, MN yöntemi, KKD yöntemi ile Comet yöntemi

uygulanmıştır. Bu çalışma sonucunda, her iki uygulama süresinde de sitagliptinin 125, 250, 500 ve 1000 µg/ml'lik konsantrasyonlarının ve sitagliptin-metformin kombinasyonunun 250 µg/ml'lik konsantrasyonunun KA oranını önemli derecede arttırdığı belirlenmiştir. Sitagliptinin 125, 250, 500 ve 1000 µg/ml'lik konsantrasyonlarının her iki etki süresinde de KKD oranını arttırdığı; sitagliptin-metformin kombinasyonunun ise 24 saatlik uygulama süresindeki minimum dozu hariç diğer doz uygulamalarının KKD oranını arttırdığı gözlenmiştir. MN oranının ise en yüksek dozlarda artış gösterdiği tespit edilmiştir. Sitagliptin ve sitagliptin-metformin kombinasyonları uygulamalarının Mİ'in düşmesine sebep olduğu, ama Pİ ve NBİ üzerinde etkili olmadığı görülmüştür. Comet yöntemi sonuçları ise sitagliptinin tüm uygulamalarda kuyruk yoğunluğunun, kuyruk uzunluğunun ve kuyruk momentinin önemli derecede arttığı; sitagliptin-metformin kombinasyonlarında ise kuyruk yoğunluğunun, kuyruk uzunluğunun ve kuyruk momentinin sadece 31,25 ve 125,0 µg/mL'lik konsantrasyonlarda arttığı görülmüştür. Bu sonuçlara bağlı olarak araştırmacılar, sitagliptin ile sitagliptin-metformin kombinasyonunun insan lenfosit kültürlerinde genotoksik etki gösterdiğini ileri sürmüşlerdir (Engüzel, 2015).

EMA'nın sitagliptin etken maddesini içeren Januvia isimli ilaç için yayınladığı kamu değerlendirme raporunda; AMES testi (Salmonella/Mikrozom Mutajenite Testi), rat hepatositlerinde direkt DNA hasarı analizi, Chinese hamster ovary (CHO) hücrelerinde *in vitro* KA testi ve *in vivo* fare MN testi sonucunda ilacın genotoksik etki göstermediği bildirilmiştir. İki yıllık fare karsinogenite çalışmalarında; 50 mg/kg/gün, 125 mg/kg/gün, 250 mg/kg/gün, 500 mg/kg/gün dozlarının hiçbir organda tümör sıklığında bir artışa sebep olmadığı bildirilmiştir. İki yıllık rat karsinogenite çalışmaları sonucunda, uygulamaya bağlı olarak hepatik tümörlerde artış görüldüğünü ve uygulanan dozun, insana uyarlandığında, insanların maruz kaldığı dozun 58 katı olduğunu göstermiştir. Ayrıca ilacın üreme sistemi üzerinde de toksik etki yapmadığı rapor edilmiştir (EMA, 2017).

Sitagliptinin 0, 2, 20, 50, 100 ve 200 µg/ml'lik konsantrasyonları ile insan periferik lenfositlerinde *in vitro* proliferasyon çalışması yapılmış ve 50 µg/ml'lik konsantrasyon ve üzeri dozların hücre çoğalmasını inhibe edici etki gösterdiği tespit edilmiştir. Sitagliptin muamelesinden sonra, sitokin miktar tayini, Th1/Th2/Th17

fenotipleme ve CD26 gen ekspresyonu analiz edilerek sitagliptinin immünsüpresif etkileri ortaya konmuştur (Pinheiro et al., 2017).

Metformin

Sitotoksik bir ajan olan adriamisine maruz kalan ve kalmayan farelerin ilave olarak metforminin 62,5 mg/kg/gün, 125 mg/kg/gün ve 250 mg/kg günlük dozlarına maruz kalmaları sonucunda metforminin serbest radikallerin oluşumunu azaltarak ve mitojeniteyi inhibe ederek sekonder tümör riskini engellediği tespit edilmiştir (Aleisa ve ark., 2007).

Metforminin 100 mg/kg/gün, 500 mg/kg/gün ve 2500 mg/kg'lik konsantrasyonlarının kullanıldığı bir çalışmada diyabetli ve normal farelerde MN, KA, kemik iliğinin mitotik aktivitesi, sperm- baş anomalisi ve bazı oksidatif stres markerları incelenmiş ve metforminin genotoksik ve sitotoksik etki göstermediği kanaatine varılmıştır (Attia ve ark., 2009).

Tip 2 diyabetin tedavisinde en çok kullanılan ilaç metformindir. Kanser hücre hatlarında kullanılan metforminin hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, koloni oluşumunu azalttığı ve hücre döngüsünü kısmen bloke ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, populasyon çalışmaları, metforminin diğer glukoz düşürücü ilaçlara göre kanser riskini azalttığını göstermiştir (Giovannucci ve ark., 2010).

Metformin'in 12,5 mM, 25 mM or 50 mM konsantrasyonları ile *Aspergillus nidulans*'ın UT448//A757 suşunda rekombinojenik potansiyeli incelenmiş ve herhangi bir etki gözlenmemiştir. İnsan periferik lenfositlerinde aynı dozlar *in vitro* şartlarda uygulanmış ve KA ve MN testleri sonucunda herhangi bir etki gözlenmemiştir. Araştırmada, metforminin uygulanan dozlarının *in vivo* ve *in vitro* sistemlerde genotoksik özellik göstermediği tespit edilmiştir (Sant'Anna ve ark., 2013).

Metformin'in 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL, 100 µg/mL ve 125 µg/mL'lik konsantrasyonları insan periferik lenfosit kültürlerinde KA yöntemi, MN yöntemi, KKD yöntemi ve Comet yöntemi uygulanarak değerlendirme yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda metforminin yüksek konsantrasyonlarının özellikle uzun süreli maruziyette klastojenik ve anojenik etki gösterebildiği vurgulanmıştır (Mahmoud, 2013).

Meme kanseri hücre hatlarında metformin, pioglitazon, ekstenatid ve insülinin yalnız veya kombine kullanımlarıyla ilgili, doz ve uygulama süresine bağlı olarak

hücrelerinin çoğalması üzerinde bir araştırma yapılmıştır. Araştırma, metforminin kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiğini ve kombine kullanımının anti kanserojen ilaçların etkisini arttırdığını ortaya koymuştur. Pioglitazonun fizyolojik koşullarda meme kanseri hücrelerinde proliferasyona sebep olmadığı ve tedavi dozu üstündeki dozlarının sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. İnsülinin kanser hücreleri üzerindeki proliferatif etkisinin, metformin ile beraber kullanıldığında, azaldığı gözlenmiştir. Eksenatidin tek başına kullanıldığında meme kanseri hücrelerinde üzerine proliferatif etki yarattığı ve fakat metformin ile birlikte kullanıldığında, proliferatif etkiyi ortadan kaldırdığı saptanmıştır bildirilmiştir (Aydemir, 2014).

Glibenklamid

Glibenklamidin genotoksisitesi, 0,6 μM 'lık plazma konsantrasyonu ve 10 μM , 100 μM , 240 μM ve 480 μM 'lık konsantrasyonları insan periferik lenfosit kültürlerinde MN yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bu konsantrasyonların hiçbirinin glibenklamidin MN oranına etki etmediği anlaşılmıştır. Sadece 480 μM 'lık dozun NBI'ni azalttığı testpiti yapılmıştır. Mİ'in değerlendirmesi amacıyla 0,6 μM , 10 μM , 20 μM , 40 μM , 80 μM , 120 μM , 240 μM ve 480 μM 'lık konsantrasyonlar uygulanmış ve 40 μM 'lık dozdan itibaren Mİ'in düştüğü görülmüştür. Bu çalışma sonucunda Glibenklamidin genotoksik etkiye sahip olmadığı kanaatine varılmıştır (de Sant'Anna ve ark., 2015).

Thiazolidinedion grubu

Thiazolidinedion grubuna dahil olan troglitazonun sebep olduğu hepatik hasarın mekanizması insan hepatoma hücre hattında (HepG2) çalışılmış ve doz ve zamana bağlı olarak ilacın sitotoksisite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca ilacın metaboliti olan M3 (kuinon)'ün ise zayıf sitotoksisite gösterdiği belirlenmiştir. Bunlara ek olarak, ilacın apoptoza da neden olduğu bildirilmiştir (Yamamoto ve ark., 2001).

Ratlarda rosiglitazonun genotoksisitesi, Comet yöntemi uygulanarak periferik lenfosit ve hepatositlerde incelenmiştir. 0,0 mg/kg/günlük, 0,5 mg/kg/günlük, 1,0 mg/kg/günlük ve 2,0 mg/kg/günlük konsantrasyonların 14 gün uygulanmasının ardından, hepatositlerde tüm konsantrasyonların; lenfositlerde ise 1,0 mg/kg/günlük ve 2,0 mg/kg/günlük konsantrasyonların DNA hasarına yol açtığı tespit edilmiştir. Bulguların değerlendirilmesi sonucunda, ilacın lenfositlerden çok hepatositlerde genotoksik etki gösterdiği anlaşılmıştır (Bedir ve ark., 2006).

Pioglitazon ve glimepirid kombinasyonunun *in vivo* genotoksitesitesi de araştırılmıştır. 5 yıl ve daha fazla süre boyunca pioglitazon ve glimepirid kombinasyonu kullanan tip 2 diyabetli hastalarda MN oranının kontrollere göre daha yüksek gözleendiği bildirilmiştir (Shaik ve ark., 2010).

Morais ve arkadaşları (2016), pioglitazonu insan periferik lenfosit kültürlerinde 4 µM, 12 µM, 36 µM, 108 µM, 324 µM ve 972 µM’lık konsantrasyonlarda kullanılarak Mİ’i değerlendirmişlerdir. Aynı çalışmada 4 µM, 12 µM, 36 µM ve 108 µM’lık konsantrasyonlar ile MN yöntemi kullanılarak MN da değerlendirilmiştir. Sadece 108 µM’lık konsantrasyonun MN oluşumunu anlamlı şekilde arttırdığı ve proliferasyon indeksini düşürdüğü tespit edilmiştir. Diğer yandan 108 µM, 324 µM ve 972 µM’lık konsantrasyonlarda Mİ’de düşüş gözlenmiştir. Araştırmacılar, bulgularından yola çıkarak pioglitazone’un tıropatik dozun üzerindeki 108 µM’lık konsantrasyonunun genotoksik etki gösterdiğine ve bu özelliği sayesinde antitümorik aktivite açısından faydalı olabileceğine kanaat getirmişlerdir.

3.MATERYAL VE METOD

3.1. Gönüllülerin Seçimi

Çalışmada kullanılacak periferik lenfositler, kan vermeyi gönüllü kabul eden sağlıklı 2 kadın ve sağlıklı 2 erkek donörden onam alınarak ve etik kurallara riayet edilerek temin edildi. Samsun Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 09.05.2015 tarihinde 183 sayı numarası ile etik izin alındı.

Gönüllüler, aşağıdaki özellikleri dikkate alınarak seçildi.

- Sigara içmemeleri,
- Yaş aralığının 20-25 arasında olması,
- Rutin ya da sürekli ilaç kullanılmaması,
- Geçirilmiş herhangi bir ciddi hastalığın olmaması,
- Herhangi bir genotoksik ajana maruz kalmamış olması.

İktisadi İşbirliği ve Gelişme Teşkilatı (Organisation for Economic Co-operation and Development; OECD)'ye göre, *in vitro* genotoksisite çalışmalarında, gerekli şartları sağlayan 1 kadın ve 1 erkek gönüllüden temin edilen lenfosit kültürleri yeterli olmaktadır (OECD, 2016b). Bu çalışmada güvenilirliği arttırmak amacıyla sağlıklı 2 kadın ve sağlıklı 2 erkek gönüllü tercih edilmiştir.

3.2. Araştırma Gruplarının Planlanması

Çalışmada her bir gönüllü için ilgili prosedüre uygun şekilde 24 saatlik ve 48 saatlik maruziyet grubu ile S9 metabolik aktivasyon varlığında metabolit maruziyet grubu oluşturuldu. Kültür grupları aşağıda belirtildiği şekilde planlandı;

3.2.1. S9 Metabolik Aktivasyon Uygulanmayan Kültürler

a.Çözücü Kontrol Grubu: Vildagliptin ve sitagliptin için çözücü olarak kullanılan DMSO (Dimetil sülfoksit) kültür tüplerine 25 µl ilave edilerek (final konsantrasyonu 10 µl/ml olacak şekilde) 24 saat ve 48 saat süre ile muamele edildi. MN analizi için sitokalsin-B (final konsantrasyonu 8 µg/ml olacak şekilde), KKD analizi için BrdU (final konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde), KKD ile KA analizi için kolşisin kültürlerine (final konsantrasyonu 0,06 µg/ml olacak şekilde), prosedürde belirtilen doz ve zamanlarda ilave edildi (OECD, 2016b; OECD, 2016a).

b. Pozitif Kontrol Grubu: Pozitif kontrol gruplarına ait kültürlere, genotoksik ve sitotoksik etki gösterdiği bilinen Mitomycine-C (MMC), final konsantrasyonu 0,25 µg/ml olacak şekilde ilave edilerek 24 saat ve 48 saat süre boyunca maruziyet sağlandı MN analizi için sitokalsin-B (final konsantrasyonu 8 µg/ml olacak şekilde), KKD analizi için BrdU (final konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde), KKD ile KA analizi için kolşisin kültürlerine (final konsantrasyonu 0,06 µg/ml olacak şekilde), prosedürde belirtilen doz ve zamanlarda ilave edildi (OECD, 2016b; OECD, 2016a).

c.Vildagliptin Grubu: Ön çalışma sonucunda belirlenen 125 µg/ml, 250 µg/ml ve 500 µg/ml'lik vildagliptin dozlarının ilgili kültür tüplerine ilave edilerek 24 ve 48 saat süre ile maruziyet sağlandı. MN analizi için sitokalsin-B (final konsantrasyonu 8 µg/ml olacak şekilde), KKD analizi için BrdU (final konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde), KKD ile KA analizi için kolşisin kültürlerine (final konsantrasyonu 0,06 µg/ml olacak şekilde), prosedürde belirtilen doz ve zamanlarda ilave edildi (OECD, 2016b; OECD, 2016a).

d.Sitagliptin Grubu: Ön çalışma sonucunda belirlenen 250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml'lik sitagliptin dozlarının ilgili kültür tüplerine ilave edilerek 24 ve 48 saat süre ile maruziyet sağlandı. MN analizi için sitokalsin-B (final konsantrasyonu 8 µg/ml olacak şekilde), KKD analizi için BrdU (final konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde), KKD ile KA analizi için kolşisin kültürlerine (final konsantrasyonu 0,06 µg/ml olacak şekilde), prosedürde belirtilen doz ve zamanlarda ilave edildi (OECD, 2016b; OECD, 2016a).

3.2.2.S9 Metabolik Aktivasyon Uygulanan Tüpler

2,5 ml'lik besiyerine 300µl heparinize edilmiş kan örneklerinden ilave edilerek kültürler başlatıldıktan sonra inkübasyonun 48. saatinde, taze hazırlanan S9 karışımı ve uygulanacak etken madde dozları eklendi. 37 °C'de 3 saat inkübasyonun ardından 2000 rpm'de 4 dakika santrifüjlenerek süpernatant atıldı ve taze besiyeri eklendi. Ardından araştırma grubuna göre muamele devam etti ve kültürler 72. saatte sonlandırıldı (OECD, 2016b; OECD, 2016a).

a.Çözücü Kontrol Grubu: İnkübasyonun 48. saatinde S9 karışımı ile 10 µg/ml DMSO eklenerek 3 saat daha inkübasyonun devamı sağlandı. Ardından 2000 rpm'de 4 dakika santrifüjlenerek süpernatant atıldı. MN analizi için kültür tüplerine taze besiyeri ile birlikte final konsantrasyonu 8 µg/ml olacak şekilde sitokalsin-B, diğer

kültürlere sadece taze besiyeri eklenerek inkübasyon sürdürüldü. KKD analizi için 24. saatte final konsantrasyonu 10 µg/ml olacak BrdU, KKD ile KA analiz edileceği kültüre de kültür süresi bitiminden 1 saat önce final konsantrasyonu 0,06 µg/ml olacak kolşisin ilave edildi.

a. Pozitif Kontrol Grubu: MMC, direk etki gösteren bir klastojen olduğu için S9 metabolik aktivasyonu uygulanarak pozitif olarak kullanılamayacağı saptanmıştır. Bu sebeple, pozitif kontrol gruplarında, metabolik aktivasyon gerektiren bir klastojen olan siklofosamid (CP) kullanılmıştır. İnkübasyonun 48. saatinde S9 karışımı ile 0.45 µg/ml CP eklenerek 3 saat daha inkübasyonun devamı sağlandı. Ardından 2000 rpm’de 4 dakika santrifüjlenerek süpernatant atıldı. MN analizi için kültür tüplerine taze besiyeri ile birlikte final konsantrasyonu 8 µg/ml olacak şekilde sitokalsin-B, diğer kültürlere sadece taze besiyeri eklenerek inkübasyon sürdürüldü. KKD analizi için 24. saatte final konsantrasyonu 10 µg/ml olacak BrdU, KKD ile KA analiz edileceği kültüre de kültür süresi bitiminden 1 saat önce final konsantrasyonu 0,06 µg/ml olacak kolşisin ilave edildi.

b.Vildagliptin Grubu: İnkübasyonun 48. saatinde S9 karışımı ile belirlenen vildagliptin konsantrasyonları eklenerek 3 saat daha inkübasyonun devamı sağlandı. Ardından 2000 rpm’de 4 dakika santrifüjlenerek süpernatant atıldı. MN analizi için kültür tüplerine taze besiyeri ile birlikte final konsantrasyonu 8 µg/ml olacak şekilde sitokalsin-B, diğer kültürlere sadece taze besiyeri eklenerek inkübasyon sürdürüldü. KKD analizi için 24. saatte final konsantrasyonu 10 µg/ml olacak BrdU, KKD ile KA analiz edileceği kültüre de kültür süresi bitiminden 1 saat önce final konsantrasyonu 0,06 µg/ml olacak kolşisin ilave edildi.

c.Sitagliptin Grubu: İnkübasyonun 48. saatinde S9 karışımı ile belirlenen sitagliptin konsantrasyonları eklenerek 3 saat daha inkübasyonun devamı sağlandı. Ardından 2000 RPM’de 4 dakika santrifüjlenerek süpernatant atıldı. MN analizi için kültür tüplerine taze besiyeri ile birlikte final konsantrasyonu 8 µg/ml olacak şekilde sitokalsin-B, diğer kültürlere sadece taze besiyeri eklenerek inkübasyon sürdürüldü. KKD analizi için 24. saatte final konsantrasyonu 10 µg/ml olacak BrdU, KKD ile KA analiz edileceği kültüre de kültür süresi bitiminden 1 saat önce final konsantrasyonu 0,06 µg/ml olacak kolşisin ilave edildi.

Çalışma boyunca kurulan kültürler ve uygulanan maddeler Tablo 1’de gösterilmiştir. Her bir gönüllü için; kültür sonucu elde edilen preparatlarda KA’ni belirlemek için 100 metafaz, Mİ için 2000 hücre değerlendirilmiştir. MN’leri değerlendirmek için 2000 binükleat hücre, NBİ için 1000 hücre sayılmıştır. KKD’leri saptamak amacıyla ikinci mitozu geçiren 25 metafaz ve Pİ’ni belirlemek için 100 hücre değerlendirilmiştir.



Tablo 1. Tez çalışması boyunca kurulan kültürler

Yöntem	Uygulanan ilaç	Doz	Etki süresi	Kültür Sayısı
Kromozom Analizi	Sitagliptin	250 µg/ml	24 saat	2
			48 saat	2
		500 µg/ml	24 saat	2
			48 saat	2
		1000 µg/ml	24 saat	2
			48 saat	2
	Pozitif Kontrol (MMC)	0,16 µg/ml	24 saat	2
			48 saat	2
	Çözücü Kontrol (DMSO)	10 µl/ml	24 saat	2
			48 saat	2
Kardeş Kromatid Değişimi	Sitagliptin	250 µg/ml	24 saat	2
			48 saat	2
		500 µg/ml	24 saat	2
			48 saat	2
		1000 µg/ml	24 saat	2
			48 saat	2
	Pozitif Kontrol (MMC)	0,16 µg/ml	24 saat	2
			48 saat	2
	Çözücü Kontrol (DMSO)	10 µl/ml	24 saat	2
			48 saat	2
Mikronükleus	Sitagliptin	250 µg/ml	24 saat	2
			48 saat	2
		500 µg/ml	24 saat	2
			48 saat	2
		1000 µg/ml	24 saat	2
			48 saat	2
	Pozitif Kontrol (MMC)	0,16 µg/ml	24 saat	2
			48 saat	2
	Çözücü Kontrol (DMSO)	10 µl/ml	24 saat	2
			48 saat	2

Tablo 1'in devamı Tez çalışması boyunca kurulan kültürler

Yöntem	Uygulanan ilaç	Doz	Etki süresi	Kültür Sayısı
Kromozom Analizi	Vildagliptin	125 µg/ml	24 saat	2
			48 saat	2
		250µg/ml	24 saat	2
			48 saat	2
		500µg/ml	24 saat	2
			48 saat	2
	Pozitif Kontrol (MMC)	0,16 µg/ml	24 saat	2
			48 saat	2
	Çözücü Kontrol (DMSO)	10 µl/ml	24 saat	2
			48 saat	2
Kardeş Kromatid Değişimi	Vildagliptin	125 µg/ml	24 saat	2
			48 saat	2
		250µg/ml	24 saat	2
			48 saat	2
		500µg/ml	24 saat	2
			48 saat	2
	Pozitif Kontrol (MMC)	0,16 µg/ml	24 saat	2
			48 saat	2
	Çözücü Kontrol (DMSO)	10 µl/ml	24 saat	2
			48 saat	2
Mikronükleus	Vildagliptin	125 µg/ml	24 saat	2
			48 saat	2
		250µg/ml	24 saat	2
			48 saat	2
		500µg/ml	24 saat	2
			48 saat	2
	Pozitif Kontrol (MMC)	0,16 µg/ml	24 saat	2
			48 saat	2
	Çözücü Kontrol (DMSO)	10 µl/ml	24 saat	2
			48 saat	2

Tablo 1'in devamı Tez çalışması boyunca kurulan kültürler

Yöntem	Uygulanan ilaç	Doz	Etki süresi	Kültür Sayısı
Kromozom Analizi (S9 Metabolik aktivasyonu)	Sitagliptin	250 µg/ml	3 saat	2
		500 µg/ml	3 saat	2
		1000 µg/ml	3 saat	2
	Pozitif Kontrol (CP)	45 µg/ml	3 saat	2
	Çözücü Kontrol (DMSO)	10 µl/ml	3 saat	2
Kardeş Kromatid Değişimi (S9 Metabolik aktivasyonu)	Sitagliptin	250 µg/ml	3 saat	2
		500 µg/ml	3 saat	2
		1000 µg/ml	3 saat	2
	Pozitif Kontrol (CP)	45 µg/ml	3 saat	2
	Çözücü Kontrol (DMSO)	10 µl/ml	3 saat	2
Mikronükleus (S9 Metabolik aktivasyonu)	Sitagliptin	250 µg/ml	3 saat	2
		500 µg/ml	3 saat	2
		1000 µg/ml	3 saat	2
	Pozitif Kontrol (CP)	45 µg/ml	3 saat	2
	Çözücü Kontrol (DMSO)	10 µl/ml	3 saat	2
Kromozom Analizi (S9 Metabolik aktivasyonu)	Vildagliptin	125 µg/ml	3 saat	2
		250 µg/ml	3 saat	2
		500 µg/ml	3 saat	2
	Pozitif Kontrol (CP)	45 µg/ml	3 saat	2
	Çözücü Kontrol (DMSO)	10 µl/ml	3 saat	2
Kardeş Kromatid Değişim (S9 Metabolik aktivasyonu)	Vildagliptin	125 µg/ml	3 saat	2
		250 µg/ml	3 saat	2
		500 µg/ml	3 saat	2
	Pozitif Kontrol (CP)	45 µg/ml	3 saat	2
	Çözücü Kontrol (DMSO)	10 µl/ml	3 saat	2
Mikronükleus (S9 Metabolik aktivasyonu)	Vildagliptin	125 µg/ml	3 saat	2
		250 µg/ml	3 saat	2
		500 µg/ml	3 saat	2
	Pozitif Kontrol (CP)	45 µg/ml	3 saat	2
	Çözücü Kontrol (DMSO)	10 µl/ml	3 saat	2

3.3. Dozların Belirlenmesi

Çalışmada kullanılacak dozları belirlemek için OECD'nin kılavuzlarından faydalanıldı (OECD, 2016b; OECD, 2016a). Yapılan ön çalışmalarda kültürler vildagliptin ve sitagliptinin farklı konsantrasyonlarına 48 saat süre ile maruz bırakıldı. Prosedüre uygun şekilde çıkarım yapılarak preparatlar hazırlandı. Değerlendirilen preparatlardan elde edilen verilerden mitotik indeks hesaplandı. Uygulanan konsantrasyonlardan Mİ'de %50'lik bir azalmaya sebep olan doz, IC₅₀ yani inhibitör doz olarak belirlendi ve bu konsantrasyon çalışmada en yüksek konsantrasyon olarak seçildi. IC₅₀ dozunun yarısı ara doz, çeyreği ise minimum doz olarak belirlendi.

Vildagliptinin IC₅₀ değerini belirlemek için denenen dozlar ve bu dozlara ait Mİ değerleri Tablo 2'de verilmiştir. Vildagliptin için IC₅₀ dozu; yani maksimum doz 500 µg/ml olarak saptandı. 250 µg/ml ara doz, 125 µg/ml ise minimum doz olarak belirlendi.

Tablo 2. Doz belirleme çalışmalarında kullanılan vildagliptin konsantrasyonlar

Uygulanan madde	Konsantrasyon	Mitotik İndeks
DMSO	10 µl/ml	2,1
Vildagliptin	250 µg/ml	1,7
	500 µg/ml	0,95
	750 µg/ml	0,6
	1000 µg/ml	0,55
	1500 µg/ml	0,45

Sitagliptinin IC₅₀ değerini belirlemek için denenen dozlar ve bu dozlara ait Mİ değerleri Tablo 3'de verilmiştir. Sitagliptin için IC₅₀ dozu olan maksimum doz 1000 µg/ml olarak saptandı. 500 µg/ml ara doz, 250 µg/ml ise minimum doz olarak belirlendi.

Tablo 3. Doz belirleme çalışmalarında kullanılan sitagliptin konsantrasyonlar

Uygulanan madde	Konsantrasyon	Mitotik İndeks
DMSO	10 µl/ml	2,7
Sitagliptin	150 µg/ml	1,6
	250 µg/ml	1,8
	500 µg/ml	1,75
	750 µg/ml	1,6
	1000 µg/ml	1,15
	1500 µg/ml	0,45

3.4.Kromozom Analiz Yöntemi

Kan örnekleri, gönüllü donörlerden alınırken heparinize edilen enjektör kullanıldı. Periferik kan örneklerinden hücre kültürü yapılmasında ve preparat hazırlanmasında modifiye edilen Moorhead tekniği kullanıldı (Moorhead ve ark., 1960; Evans ve O'Riordan, 1975). Kan kültürlerine, kültür süresinin bitimine 24 saat ve 48 saat kala, çalışma gruplarında kullanılacak ilaçlar ön çalışma sonucu belirlenen konsantrasyonlar dikkate alınıp ilave edildi.

Kültürler steril şartlar altında 2,5 ml'lik besiyerine 300 µl kan ekilerek başlatıldı ve 72 saat boyunca 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Tüm kültürlere, kültür süresi bitiminden 1 saat önce (kültürün 71. saatinde) final konsantrasyonu 0,06 µg/ml olacak şekilde kolşisin ilave edilerek metafaz kromozomlarının tespiti sağlandı.

Süresi tamamlanan kültür tüpleri 1200 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi ve kültür tüpündeki süpernatant su trompu aracılığıyla çekilip atıldı. Tüp dibinde kalan ve hücreleri ihtiva eden yaklaşık 1ml'lik pellet nazikçe karıştırıldıktan sonra, tüplerin üstüne daha önce ısıtılarak 37°C'ye getirilmiş olan %0,4'lük KCI hipotonik solüsyonundan 10 ml yavaş yavaş ilave edildi ve tüpler 37°C'de 20 dakika bekletildi. Sürenin sonunda, tüpler tekrar 15 dk. 1200 rpm'de santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant su trompu ile alınıp atıldı ve tüp altındaki pellet nazikçe pipetaj yapıldı.

Hipotonik uygulamasından sonra, hücrelerin fikse edilmesi için her tüpe 3:1 oranında metil alkol ve glisial asetik asitten hazırlanan ve buzdolabında muhafaza edilen soğuk tespit (fiksatif) çözeltisinden toplam hacim 10 ml olana kadar, yavaş yavaş tüplere ilave edildi ve pipetaj yapıldı. Tüpler yaklaşık 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Sonra tüpler 1200 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi ve üstte kalan süpernatant su trompu ile çekilip atıldı. Tüp altında toplanan pellet berraklaşınca kadar, fiksatif uygulaması 3-4 kez tekrarlandı. Son santrifüj işleminden sonra, süpernatant çekilip atıldı ve pellet bırakıldı.

Tüpteki süspansiyon (pellet) pasteur pipeti ile karıştırılıp homojen hale getirildikten sonra, bir miktar pellet pastör pipeti ile çekilip, önceden alkolle temizlenerek buzdolabında saklanan soğuk lamalar üzerine yayıldı. Hazırlanan preparatlar, kurumak üzere kapalı bir yerde oda sıcaklığında gece boyu bekletilip işleme hazır hale getirildi. Kurumuş preparatlar, sorensen tamponuyla hazırlanan %5'lik

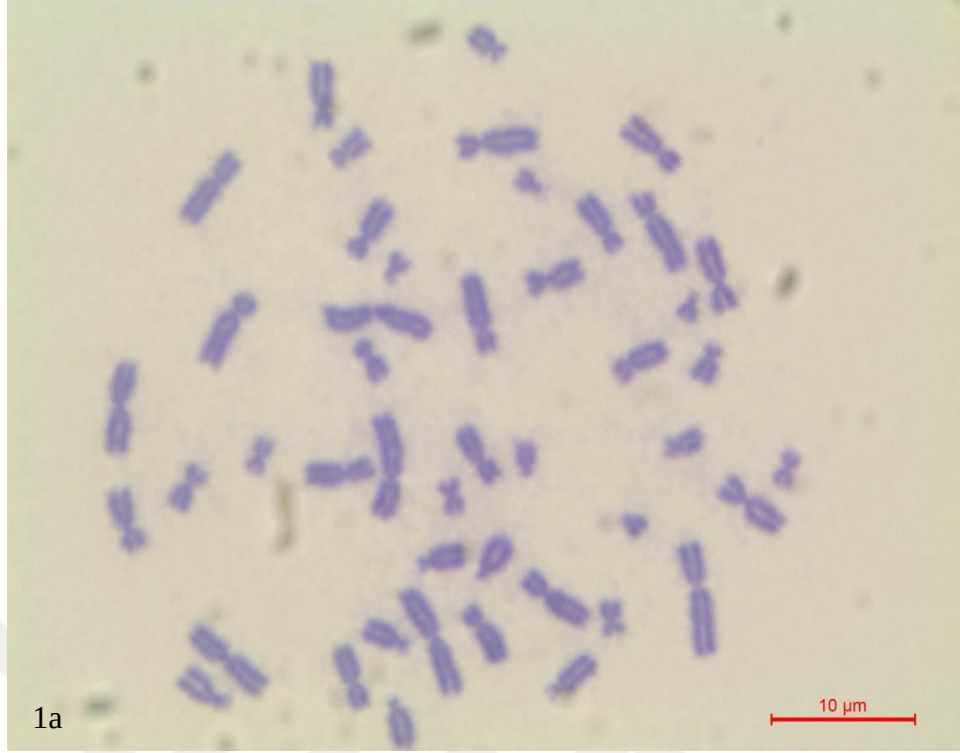
Giemsa boyası ile 4-5 dakika süresince boyandı. Bir gece kuruması beklenen preparatlar entellan ile kapatıldı

Tüm laboratuvar işlemlerinin tamamlanmasından sonra, preparatlarda görüntü kalitesi iyi olan 100 metafaz sayısal ve yapısal KA'nın saptanması amacıyla değerlendirildi (Şekil 1a ve Şekil 1b). Gap bölgelerinin elektron mikroskobu ile değerlendirilmesi sonucu bu bölgelerde DNA ipliğinde kırık veya kırıkların olmadığı bildirilmiştir (Mace ve ark., 1978). Mace ve arkadaşlarının önerileri doğrultusunda gaplar kromozom anomalisi olarak kabul edilmemektedir . Her bir tüpten hazırlanan preparatlardan 2000 hücre değerlendirilerek bunlar arasında bölünme halindeki (metafaz evresinde bulunan) hücreler saptandı ve metafaz hücrelerinin yüzde oranı Mİ olarak değerlendirildi.

S9 metabolik aktivasyonu için uygulanan test protokolü:

Vildagliptin ile sitagliptin ilaçlarından oluşan metabolitlerin sitotoksik ve genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla, ticari olarak satın alınan insan S9 fraksiyonu kullanılarak ayrı kültürler hazırlandı. Bu yolla ilaç metabolitlerinin sito-genotoksik etkileri değerlendirildi.

Hazırlanan kültürün 48. saatinde uygulanacak dozla birlikte S9 karışımı da final konsantrasyonu %2-4 oranında olacak şekilde kültüre ilave edildi. 3 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından 2000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi ve süpernatantı atıldı. Tüplere taze besi yeri eklenerek tekrar inkübatöre yerleştirildi. 71. saatte kolşisin eklendi ve süre sonunda çıkarım ve boyama işlemleri S9 kullanılmayan kültürlerde uygulanan yöntemlere göre yapıldı.



Şekil 1. Normal metafaz plağı (1a: 46, XY; 1b: 46 XX) (x1000)

3.5. Mikronükleus Analiz Yöntemi

Kan örnekleri, gönüllü donörlerden heparinize edilmiş enjektör kullanılarak temin edildi. Periferik kan örneklerinden hücre kültürü yapılmasında ve preparat hazırlanmasında modifiye edilen Fenech tekniği kullanıldı (Fenech, 2000). Kan kültürlerine, kültür süresinin bitimine 24 saat ve 48 saat kala, çalışma gruplarında kullanılacak ilaçlar ön çalışma sonucu belirlenen konsantrasyonlar dikkate alınıp ilave edildi.

Kültürler steril şartlar altında 2,5 ml'lik besiyerine 300 µl kan ekilerek başlatıldı ve 68 saat boyunca 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Tüm kültür tüpleri inkübasyona bırakıldıktan sonra, sitokinezi engelleyip, iki nükleuslu hücre oluşumunu sağlamak amacıyla kültürün bitimine 24 saat kala (inkübasyonun aşlangıcından 44 saat sonra) tüplerin her birine final konsantrasyonu 8 µg/ml olacak şekilde sitokalasin B ilave edildi (Fenech, 2000).

Kültür süresinin bitiminde tüpler 1200 rpm'de 15 dk. santrifüjlendi ve süpernatantları atıldı. Tüplerde kalan yaklaşık 1 ml'lik sıvı karıştırıldıktan sonra tüplere daha önceden 37°C'de ısıtılan hipotonikten (%0,4 KCI) 10 ml yavaş yavaş ilave edildi. Hipotonik ilave edilen tüpler 37°C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tüpler 1200 rpm'de 15 dk. Santrifüjlendi ve tekrar süpernatantları çekilip atıldı. Daha sonra glasiyal asetik asit/methanol/%0.9 NaCl (1/5/6 oranlarında) karışımından oluşan 5 ml soğuk fiksatif, yavaş yavaş damlalar halinde tüpteki sıvının üzerine ilave edildi ve oda sıcaklığında 20 dk. bekletildi. Ardından 1200 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi ve süpernatantı atıldı. Daha sonra tüplere bu defa 1 kısım asetik asit ve 5 kısım metil alkolden (1/5) oluşan ikinci fiksatif ilave edildi ve oda sıcaklığında 20 dk. bekletildi. Bu işlem, tüpte kalan sıvı berraklaşmaya kadar 2-3 kez tekrarlandı. Son santrifüj işleminden sonra tüplerde yaklaşık 1 ml sıvı (pellet) bırakıldı. Tüpteki süspansiyon pastör pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirildikten sonra, daha önceden alkolle temizlenmiş ve buzdolabında saklanan soğuk lamlar üzerine yayıldı. Bu şekilde hazırlanmış preparatlar, kurumak üzere kapalı bir yerde oda sıcaklığında 24 saat kurumaya bırakıldı.

Tamamen kuruyan preparatlar, sorenson tamponuyla hazırlanan %5'lik Giemsa ile 15 dakika süresince boyandı. Gece boyu kuruyan preparatlar entellan ile kapatıldı.

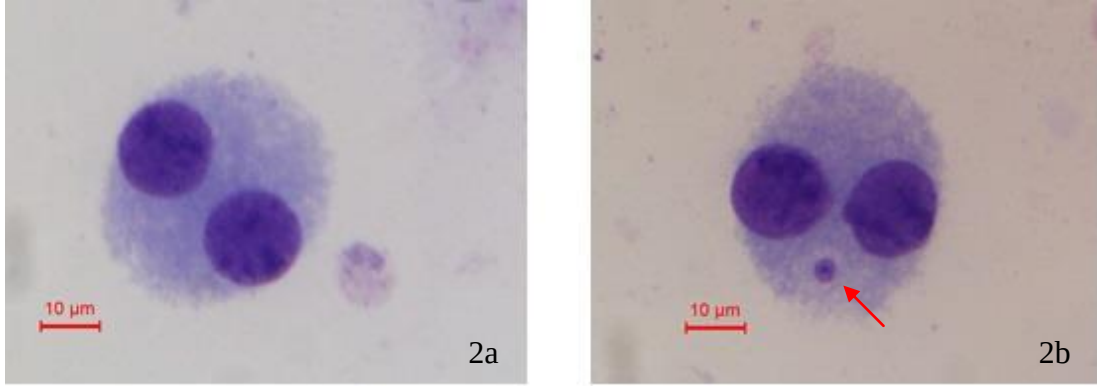
MN sayısını belirlemek amacıyla daimi preparatlarda her tüp için, iki nükleusa sahip toplam 2000 hücre incelendi ve bu binükleat hücreler içerisinde MN taşıyanlar kaydedildi (Şekil 2). Ayrıca 1 nükleus, 2 nükleus, 3 nükleus ve 4 nükleuslu hücreler de sayılarak NBI aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Şekil 3).

$$NBI = [(MI) + 2(MII) + 3(MIII) + 4(MIV)] / 2000$$

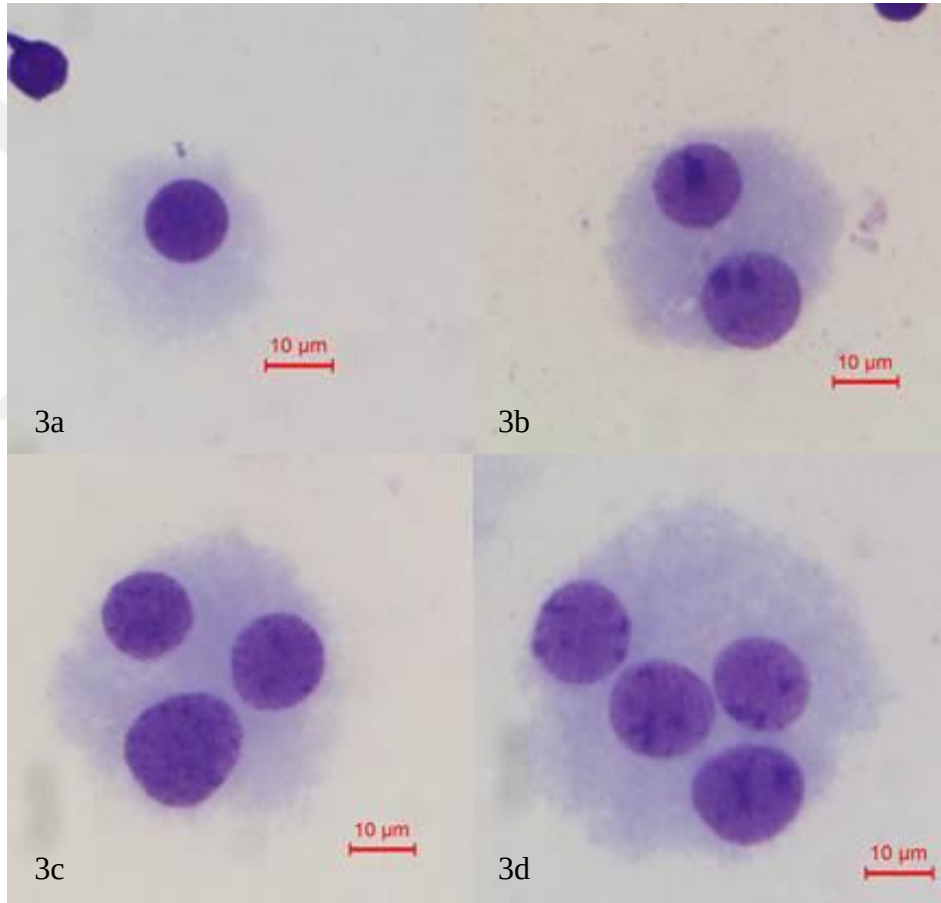
S9 metabolik aktivasyonu için uygulanan test protokolü:

Vildagliptin ile sitagliptin ilaçlarından oluşan metabolitlerin sitotoksik ve genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla, ticari olarak satın alınacak insan S9 fraksiyonu kullanılarak ayrı kültürler de hazırlandı. Böylece ilaç etken maddelerinin ve ilaç metabolitlerinin sito-genotoksik etkileri değerlendirildi.

Besiyerine kan ekildikten sonra kültürün 48. saatinde uygulanacak dozla birlikte S9 karışımı da final konsantrasyonu %2-4 oranında olacak şekilde ilave edildi ve 3 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından 2000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Tüplere taze besi yeri ve final konsantrasyonu 8 µg/ml olacak şekilde sitokalsin B ilave edilip tekrar inkübatöre yerleştirildi. Süre sonunda çıkarım ve boyama işlemleri S9 kullanılmayan kültürdekiyle aynı şekilde yapıldı.



Şekil 2. Normal (a) ve mikronükleuslu (b) iki çekirdekli hücre (x400)



Şekil 3. Mononükleat (a), binükleat (b), trinükleat (c) ve tetranükleat (d) hücreler (x400)

3.6. Kardeş Kromatid Değişimi Analizi Yöntemi

Kan, gönüllü donörlerden heparinize edilmiş enjektör kullanılarak temin edildi. Periferik kan örneklerinden hücre kültürü yapılmasında ve preparat hazırlanmasında modifiye edilen Speits tekniği modifiye edilerek kullanıldı . Kan kültürlerine, kültür süresinin bitimine 24 saat ve 48 saat kala, çalışma gruplarında kullanılacak ilaçlar ön çalışma sonucu belirlenen konsantrasyonlar dikkate alınıp ilave edildi.

Kültürler steril şartlar altında 2,5 ml'lik besiyerine 300 µl kan ekilerek başlatıldı ve 72 saat boyunca 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Kardeş kromatid değişim testi için Speit'in geliştirdiği teknik modifiye edilerek uygulandı (Gonzalez-Gil ve Navarrete, 1982; Speit, 1984). Tüm kültür tüplerine inkübasyona başlamadan 10 µg/ml olacak şekilde Bromodeoksiüridin (BrdU) (Kontaş ve Atlı Şekeroğlu, 2015) eklendi. Tüm tüplere kültür süresinin bitiminden 1 saat önce (kültürün 71. saatinde) final konsantrasyonu 0,06 µg/ml olacak şekilde kolşisin eriyiğinden ilave edildi

Kültür süresi bitiminde kültür tüpleri 1200 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi ve kültür tüpündeki süpernatant su trompu aracılığıyla çekilip atıldı. Tüp dibinde kalan ve hücreleri ihtiva eden yaklaşık 1ml'lik pellet nazikçe karıştırıldıktan sonra, tüplerin üstüne daha önce ısıtılarak 37°C'ye getirilmiş olan %0,4'lük KCl hipotonik solüsyonundan 10 ml yavaş yavaş ilave edildi ve tüpler 37°C'de 20 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda, tüpler 15 dk. 1200 rpm'de santrifüj edildi ve tekrar üstte kalan süpernatant su trompu ile alınıp atıldı.

Hipotonik uygulamasından sonra, hücrelerin fikse edilmesi için her bir tüpe 3:1 oranında metil alkol ve glisial asetik asitten hazırlanan ve buzdolabında muhafaza edilen soğuk tespit (fiksatif) çözeltisi, 10 ml olacak şekilde damlalar halinde yavaş yavaş ilave edildi. Yaklaşık 20 dakika oda sıcaklığında fiksatif ile muamele edilen tüpler 1200 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi ve üstte kalan süpernatant su trompu ile çekilip atıldı. Tüp altında toplanan pellet berraklaşınca kadar, fiksatif uygulaması 3-4 kez tekrarlandı. Son santrifüj işleminden sonra, süpernatant atılırken tüp altında 1 ml pellet bırakıldı. Tüpteki süspansiyon (pellet) pasteur pipeti ile karıştırılıp homojen hale getirildikten sonra, bir miktar pellet pastör pipeti ile çekilip, önceden alkolle temizlenerek buzdolabında saklanan soğuk lamlar üzerine yayıldı. Hazırlanan preparatlar, kurumak üzere kapalı bir yerde oda sıcaklığında gece boyu bekletilip işleme hazır hale getirildi.

Preparatlar %10'luk Sorenson tamponu içinde 256 nm. dalga boyuna sahip UV ışığı altında 30 dk. süre ile bekletildi. Ardından 60 °C'ye ısıtılmış 1x SSC solüsyonu içinde 1 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda preparatlar %5'lik giemsa boya solüsyonunda 20 dakika süre ile bekletilerek boyandı. Gece boyu kuruyan preparatlar entellan ile kapatıldı.

Hazırlanan preparatlarda KKD sayısı, her tüpe ait preparatlardan iyi dağılmış ve ikinci mitozu geçiren 25 hücrede saptandı. KKD sayısı bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla belirlendi (Şekil 4). Ayrıca preparatlarda 1. mitozu (Şekil 5) 2. mitozu (Şekil 4) ve 3. mitozu (Şekil 6) geçiren hücreler sayılarak aşağıdaki formüle göre Pİ de hesaplandı, ve

$$PI = [(MI) + 2(M2) + 3(M3)] / 100$$

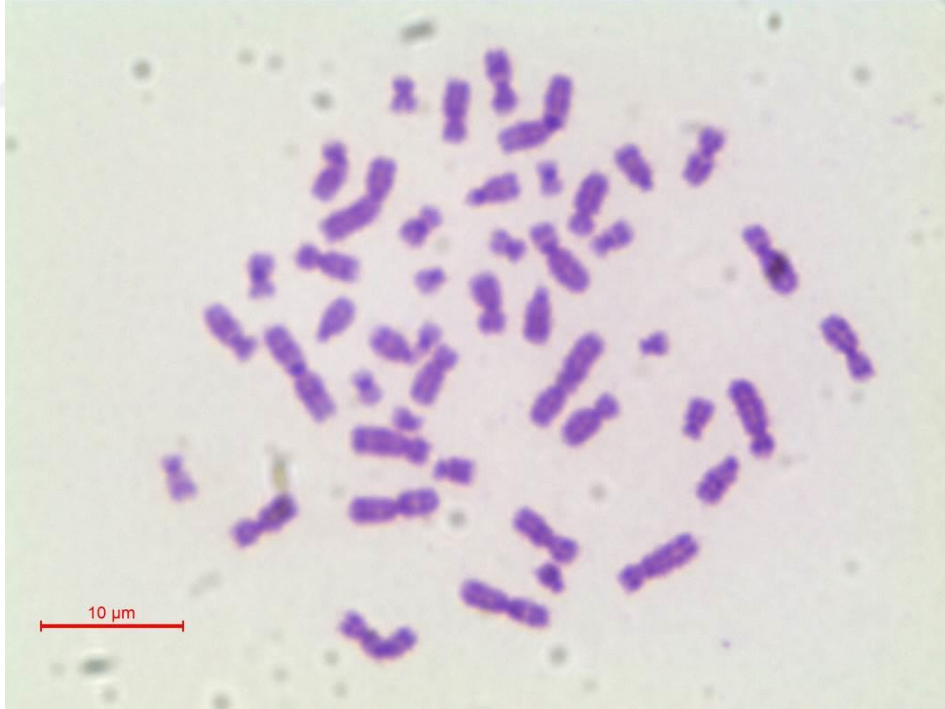
S9 metabolik aktivasyonu için uygulanan test protokolü:

Vildagliptin ile sitagliptin ilaçlarından oluşan metabolitlerin sitotoksik ve genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla, ticari olarak satın alınan insan S9 fraksiyonu kullanılarak ayrı kültürler hazırlandı. Böylece ilaç metabolitlerinin sito-genotoksik etkileri değerlendirildi.

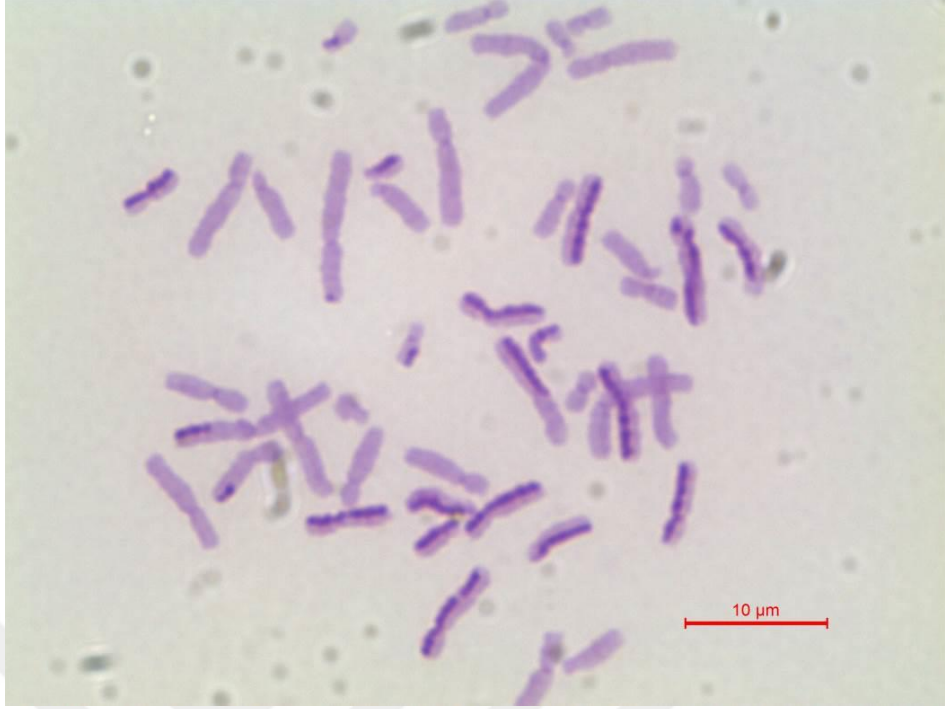
Kültürün 48. saatinde uygulanacak dozla birlikte S9 karışımı da final konsantrasyonu %2-4 olacak şekilde ilave edildi ve 3 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından 2000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Taze besi yeri eklenip tekrar inkübatöre yerleştirilen tüplere 71. saatte kolşisin eklendi ve süre sonunda çıkarım ve boyama işlemleri S9 kullanılmayan kültürlerdeki gibi yapıldı.



Şekil 4. İkinci mitoz bölünme geçiren hücre (x1000)



Şekil 5. Birinci mitoz bölünme geçiren hücre (x1000)



Şekil 6. Üçüncü mitoz bölünme geçiren hücre (x1000)

3.7.Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

3.7.1. Kullanılan Kimyasallar

3.7.1.1. Vildagliptin

Cayman firmasından temin edilmiştir.

Sinonimleri: (2S)-(((3-hydroxyadamantan-1-yl)amino)acetyl)pyrrolidine-2-carbonitrile, Galvus, NVP-LAF237

Ticari Adları: Galvus, Jalra, Xiliarx

Kimyasal adı: 1-[2-[(3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl)amino]acetyl]-2S-pyrrolidinecarbonitrile

Molekül ağırlığı: 303,4 g

Safılık düzeyi: ≥ % 98

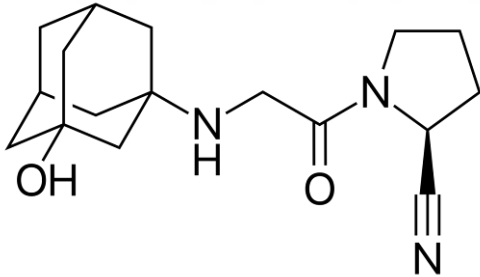
Kaynama noktası: - °C

Erime noktası: 148-150 - °C

CAS No (Chemical Abstract Servis Number): 274901-16-5

Kapalı formülü: C₁₇H₂₅N₃O₂

Açık formülü:



3.7.1.2. Sitagliptin

Cayman firmasından temin edilmiştir.

Sinonimleri: (2R)-4-OXO-4-[3-(trifluoromethyl)-5,6-dihydro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrazin-7(8H)-yl]-1-(2,4,5-trifluorophenyl)butan-2-amine, MK-0431, Sitagliptan, Sitagliptin phosphate, Sitagliptina, Sitagliptine, Sitagliptinum

Ticari Adları: Januvia, Xelevia

Kimyasal adı: (3R)-3-amino-1-[5,6-dihydro-3-(trifluoromethyl)-1,2,4-triazolo[4,3-a]pyrazin-7(8H)-yl]-4-(2,4,5-trifluorophenyl)-1-butanone, monophosphate

Molekül ağırlığı: 505.3

Safılık düzeyi: $\geq 98\%$

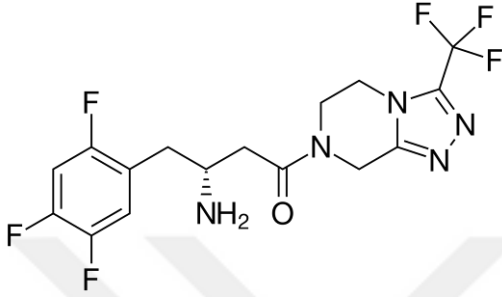
Kaynama noktası: 203 °C

Erime noktası: 529,9 °C

CAS No: 654671-78-0

Kapalı formülü: $C_{16}H_{15}F_6N_5O \cdot H_3PO_4$

Açık formülü:



3.7.1.3. Dimethyl Sülfoksit (DMSO)

Merck'den temin edilen DMSO, vildagliptin ve sitagliptin konsantrasyonlarının hazırlanmasında çözücü olarak kullanıldı. Çözücü kontrol grubunda final konsantrasyonu, 10 µl/ml olacak şekilde ayarlandı.

Kimyasal adı: Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

Molekül ağırlığı: 78,13 g/mol

Safılık düzeyi: $\geq 99,7\%$

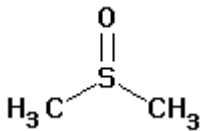
Kaynama noktası: 189 °C

Erime noktası: 18.5 °C

CAS No: 67-68-5

Kapalı formülü: $(CH_3)_2SO$

Açık formülü:



3.7.1.4.Mitomisin C (MMC)

Serva firmasından temin edilen MMC, bu çalışmada pozitif kontrol olarak kullanıldı. Kültür tüplerinde final konsantrasyonu 0.16 µg/ml olacak şekilde uygulandı.

Kimyasal adı: Mitomisin C

Molekül ağırlığı: 334,327 g/mol

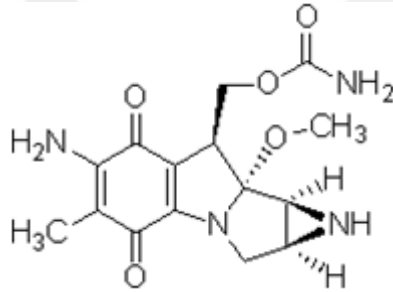
Erime noktası: 360°C

CAS No: 50-07-7

Saflık düzeyi: %99

Kapalı formülü: C₁₅H₁₈N₄O₅

Açık formülü:



3.7.1.5. Siklofosfamid (CP)

Acros organics firmasından temin edilen CP, bu çalışmada S9 metabolik aktivasyonu uygulanan kültürler için pozitif kontrol olarak kullanıldı. Kültür tüplerinde final konsantrasyonu 45 µg/ml olacak şekilde uygulandı.

Kimyasal adı: Cyclophosphamide

Molekül ağırlığı: 279,1 g/mol

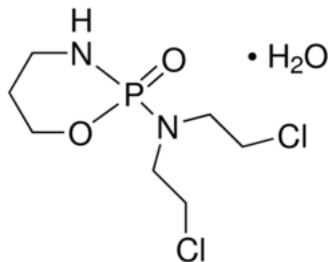
Erime noktası: 49-51 °C

CAS No: 6055-19-2

Saflık düzeyi: %99

Kapalı formülü: C₇H₁₅Cl₂N₂O₂P·H₂O

Açık formülü:



3.7.1.6. Kolşisin

Periferal lenfositleri metafaz safhasında durdurmak için kullanılan Kolsemid (Kolşisin) Biological Industries firmasından alındı. Kültür tüplerinde final konsantrasyonu 0,06 µg/ml olacak şekilde uygulandı.

Kimyasal adı: Kolsemid, N-Deasetil-N-metil kolşisin

Cat. No: 12-004-1

Molekül ağırlığı: 399,4

Kapalı formülü: C₂₂H₂₅NO₆

3.7.1.7. Sitokalsin-B

Sigma firmasından alınan sitokalsin-B, mikronükleus yönteminde, sitokinezi bloke etmek ve binükleat hücreler oluşturmak için kullanıldı.

Kimyasal adı: Sitokalsin B

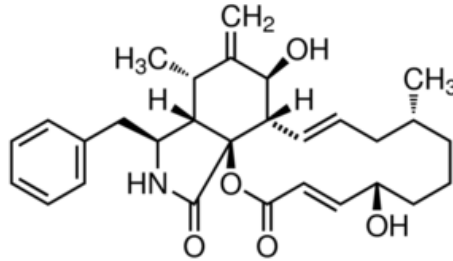
Molekül ağırlığı: 479,61 g/mol

Saflık düzeyi: ≥ %98

CAS No: 14930-96-2

Kapalı formülü: C₂₉H₃₇NO₅

Açık formülü:



3.7.1.8. 5'-Bromo-2'-deoksiüridin (BrdU)

Sigma firmasından temin edilen BrdU, kromozom kültürlerine eklenebilmesi için saf suda 0,5g/ml olacak şekilde çözelti haline getirildi. Kültür tüplerinde final konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde uygulandı.

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

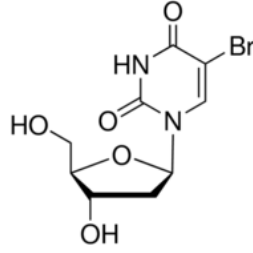
Molekül ağırlığı: 307,10 g/mol

Saflık düzeyi: % 99

CAS No: 59-14-3

Kapalı formülü: C₉H₁₁BrN₂O₅

Açık Formül:



3.7.1.9. Hücre Kültürü Besiyeri

Periferal lenfosit kültürü için Biological Industries firmasının ürettiği RPMI 1640 (01-106-1) besiyeri kullanıldı. RPMI 1640 Medyumu'nun 100 ml' sine Fetal Bovine Serum 20 ml; Penicillin/Streptomycin/Amphotericin (PSA) 1ml; Phytohemagglutinin M (PHA-M) 1,2 ml; L-Glutamin 2 ml eklenerek optimum kromozom medyumu hazırlandı ve steril şartlar altında kültür tüplerine 2,5 ml olacak şekilde paylaştırıldı.

3.7.1.10. S9 karışımı

Vildagliptin ve sitagliptinin metabolize edilebilmesi için Corning firmasından alınan insan S9 enzim fraksiyonu ve tamponları kullanıldı. S9 karışımı (S9 fraksiyonu; 93 µl; Tris buffer (pH=7,6) 3326 µl; NADPH B 74,4 µl; NADPH A 186 µl) hazırlandı. Kültür tüplerinde final konsantrasyonu %2-5 olacak şekilde uygulandı.

3.7.1.11. Hipotonik Çözelti

Hipotonik eriyik olarak Merck'ten temin edilen KCl'ün saf su ile hazırlanan %0,4'lük çözeltisi kullanıldı.

3.7.1.12. Fiksatif

Çalışmalarda 3 farklı fiksatif hazırlandı. Kullanılan glasiyal asetik asit ve metanol Sigma firmasından alındı. Kromozom analizi ve kardeş kromatid değişim analizi yöntemi için 1 hacim asetik asit'in 3 hacim metanol ile karıştırılması sonucu hazırlanan fiksatif kullanıldı. Mikronükleus testinde ise birinci fiksatif; 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) oranlarında hazırlandı. Mikronükleus testinin ikinci fiksatifi ise 1 hacim glasiyal asetik asit ve 5 hacim metanol'ün (1/5 glasiyal asetik asit/metanol) karıştırılması ile elde edildi.

3.7.1.13. Sorensen Tamponu

A tamponu: 11,88 gr. Na_2HPO_4 (Sigma) 1000 ml saf suda çözüldü

B tamponu: 9,08 gr. KH_2PO_4 (Merck) 1000 ml saf suda çözüldü.

A ve B tamponları $\text{pH}=6,8$ olacak şekilde KH_2PO_4 çözeltisi, Na_2HPO_4 çözeltisinin üzerine eklenerek hazırlandı.

3.7.1.14. Standart Salin Sitrat (SSC) Çözeltisi

5X SSC'lik stok çözelti hazırlamak için öncelikle 11,05 gr tri sodyum sitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck) tartılarak bir miktar saf su içerisinde eritildi. Daha sonra 21.9 gr NaCl (Sigma) tartılarak yine saf su içerisinde ve ayrı bir kapta eritildi. Ardından iki eriyik, bir şişeye dökülerek iyice karıştırıldı ve son hacim 500 ml olacak şekilde saf su eklendi.

3.7.1.15. Giemsa

Giemsa boyası Merck firmasından temin edildi. Preparatların boyanması için boyanın Sorensen tamponunda %5'lik çözelti hazırlandı.

3.7.1.16. Entellan

Hazırlanan preparatları daimi kullanım haline getirmek için Merck'den temin edilen entellan kullanıldı.

3.7.1.17. İmmersiyon yağı

Mikroskopik değerlendirme sırasında 100x objektif ile değerlendirme sırasında kullanılan immersiyon yağı Merck firmasından satın alındı.

3.7.2. Kullanılan Cihazlar

3.7.2.1. Hassas Terazı

Kullanılan kimyasalları tartmak için 0,0001 gr hassasiyetindeki Precisa marka terazi kullanıldı.

3.7.2.2. Biyogüvenlik Kabini

Kültüre eklenecek çözeltilerin hazırlanması, steril tüplere kan ekiminin yapılması ve kültürle çözeltilerin eklenmesi sırasında steril ortam sağlanması amacıyla ESCO marka Class-II biyogüvenlik kabini kullanıldı.

3.7.2.3. İnkübatör

Hücre kültürünün yapılmasında ve bazı eriyiklerin ısıtılmasında Binder marka inkübatör kullanıldı.

3.7.2.4. Santrifüj

Kültürlerin sonlandırılıp çıkarımın tamamlanması için Eppendorf marka santrifüj kullanıldı

3.7.2.5. Mikroskop

Preparatları incelenmesi ve görüntülenmesi Leica marka ışık mikroskobu ile görüntü analiz sistemi ile sağlandı.

3.7.2.6. Su banyosu

Çeşitli çözeltilerin ısıtılması ve kardeş kromatid değişim analiz yönteminin preparasyon aşamalarında Termal marka su banyosu kullanıldı.

3.7.2.7. UV kabin

Kardeş kromatid değişimi analiz yöntemi preparasyon aşamalarında Camag marka UV kabin kullanıldı.

3.8. İstatistiki Analizler

Vildagliptin ve sitagliptin etken maddelerinin genotoksik ve sitotoksik etkilerini değerlendirmek amacıyla KA, MN ve KKD yöntemlerinden elde edilen parametreler IBM SPSS Statistics 22 istatistik programı ile analiz edildi. Bütün analizlerde güven aralığı %95 olarak belirlendi ($p < 0.05$).

Uygulanan dozların kendi aralarında ve pozitif kontrol ile çözücü kontrol grupları arasında önemli bir farkın olup olmadığının değerlendirilmesinde; iki ilacın 24 saat ve 48 saatlik maruziyeti ile ilgili etkilerin karşılaştırılmasında; iki ilacın direk etkileri ile metabolitlerinin etkilerinin karşılaştırılmasında; ANOVA, Tukey testi-Post-Hoc analizi uygulandı. İki ilacın etkilerinin karşılaştırılmasında ve iki ilaca ait metabolit etkilerinin karşılaştırılmasında ise *t testi* uygulandı.

Ayrıca ortagonal polinom analizi de yapılarak doz-etki ilişkisi belirlendi; ilaveten regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı (r) bulundu.

4. BULGULAR

4.1. Vildagliptin Etken Maddesinin Mitotik İndeks, Kromozom Anormallikleri ve Anormal Hücre Ortalaması Üzerine Etkileri

S9 metabolik aktivasyonu kullanılmayan kültürlerde vildagliptinin 125 µg/ml, 250 µg/ml ve 500 µg/ml'lik dozlarının 24 saatlik maruziyet süresi sonunda doz artışı bağlamında KA ve dolayısıyla anormal hücre ortalaması (AHO)'na sebep olacak kadar etkili olmadığı saptandı ($p<0,05$). Mİ üzerinde ise doz artışına paralel olarak kübik bir değişim gözlemlendi ($p<0,05$) (Tablo 4).

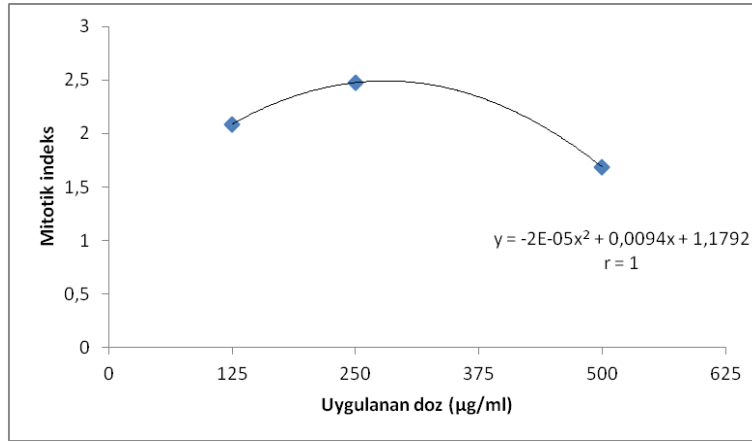
125 µg/ml, 250 µg/ml ve 500 µg/ml'lik dozlarda uygulanan vildagliptinin, 48 saatlik maruziyet süresi içerisinde doz artışı ile beraber Mİ, KA ve AHO'nı lineer şekilde etkilediği görüldü ($p<0,05$) (Tablo 4). Mİ'de düşüş gözlenirken KA ve AHO'da yükselme saptandı.

Tablo 4. S9 olmadan vildagliptinin farklı doz ve süre uygulamalarının mitotik indeks, kromozomal anomali ve anormal hücre ortalaması üzerine etkileri

Analiz Edilen Parametre	Muamele	Kontrol	Vildagliptin Dozları			Standart Hata	P	Etki		
			125 µg/ml	250 µg/ml	500 µg/ml			L	Q	C
Mitotik İndeks	24 saat	2,71	2,09	2,48	1,69	± 0,12	*	*	-	*
Kromozomal Anomali	24 saat	12,00	11,75	13,25	10,75	± 0,97	-	-	-	-
Anormal Hücre Ortalaması	24 saat	11,25	12,75	13,25	10,25	± 0,96	-	-	-	-
Mitotik İndeks	48 saat	2,55	1,84	2,00	1,34	± 0,14	*	*	-	-
Kromozomal Anomali	48 saat	3,00	8,00	12,25	13,00	± 1,27	*	*	-	-
Anormal Hücre Ortalaması	48 saat	7,25	7,75	11,50	10,50	± 0,76	*	*	-	-

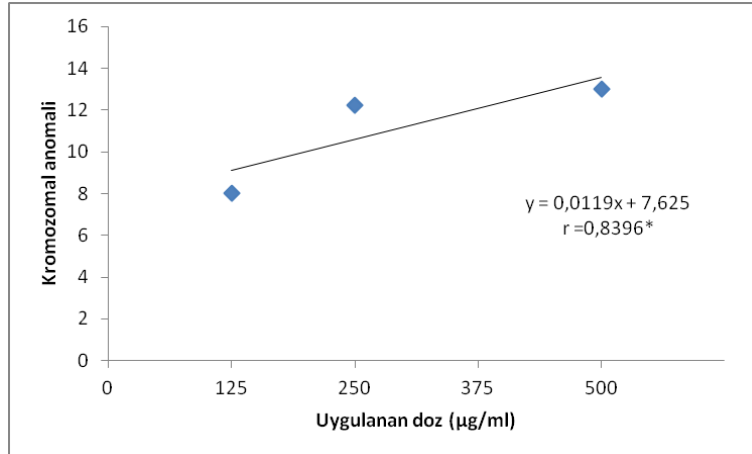
(* $p<0,05$; L:Lineer etki; Q:Kuatratik etki; C:Kübik etki)

Vildagliptinin farklı dozlarının 24 saat muamele sonrasında, kontrolle karşılaştırıldığında Mİ'i kübik olarak değiştirdiği belirlendi ($p<0,05$) (Şekil 7).

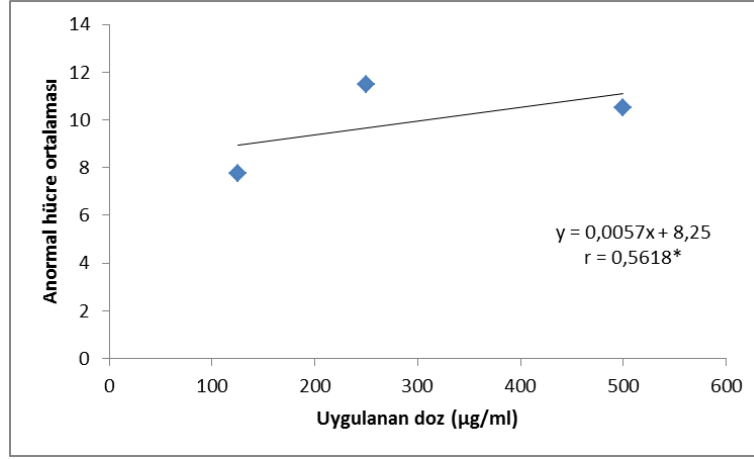


Şekil 7. Vildagliptinin farklı doz uygulamalarının 24 saatlik süre içerisinde mitotik indekse etkileri

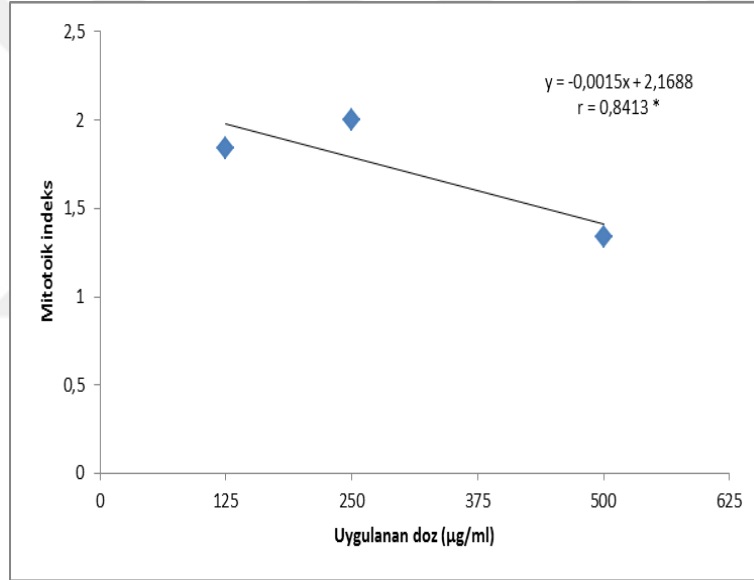
Vildagliptinin 48 saatlik uygulamasında, doz artışına bağlı olarak KA oluşumunu arttırarak pozitif lineer etki ortaya koyduğu anlaşıldı ($p<0,05$) (Şekil 8). Aynı şekilde anormal hücre ortalamasında da lineer artış gösterdiği belirlendi ($p<0,05$) (Şekil 9). Ayrıca uygulanan doz arttıkça mitotik indeksin negatif lineer şekilde etkilenip düştüğü gözlemlendi ($p<0,05$) (Şekil 10).



Şekil 8. Vildagliptinin farklı doz uygulamalarının 48 saatlik süre içerisinde kromozomal anomali oluşumuna etkileri



Şekil 9. Vildagliptinin farklı doz uygulamalarının 48 saatlik süre içerisinde anormal hücre ortalamasına etkileri



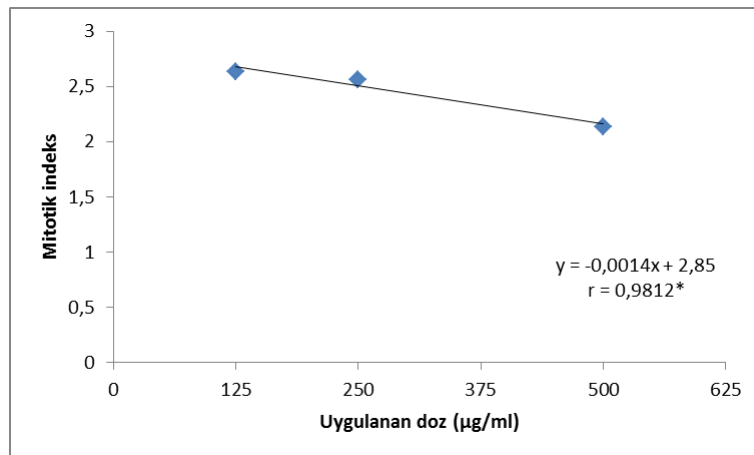
Şekil 10. Vildagliptinin farklı doz uygulamalarının 48 saatlik süre içerisinde mitotik indekse etkileri

S9 metabolik aktivasyon karışımı ile muamele edilen kültürlerde doz artışı ile ters orantılı olarak Mİ'nin düşmesine sebep olduğu ve Mİ'ni negatif yönde lineer olarak etkilediği saptandı ($p<0,05$) (Şekil 11). Metabolitlerin doz artışı doğrultusunda KA oluşumu ve dolayısıyla AHO üzerinde istatistiki açıdan fark gösterecek kadar etkili olmadığı görüldü ($p<0,05$) (Tablo 5).

Tablo 5. S9 varlığında vildagliptinin farklı uygulamalarının mitotik indeks, kromozomal anomali ve anormal hücre ortalaması üzerine etkileri

Analiz Edilen Parametre	Muamele	Kontrol	Vildagliptin Dozları			Standart Hata	P	Etki		
			125 $\mu\text{g/ml}$	250 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$			L	Q	C
Mitotik İndeks	S9 karışımı	2,84	2,64	2,56	2,14	$\pm 0,11$	*	*	-	-
Kromozomal Anomali	S9 karışımı	10,50	15,00	13,25	14,00	$\pm 4,71$	-	-	-	-
Anormal Hücre Ortalaması	S9 karışımı	10,00	14,00	11,50	11,25	$\pm 1,35$	-	-	-	-

(* $p<0,05$; L:Lineer etki; Q:Kuadratik etki; C:Kübik etki)



Şekil 11. Uygulanan farklı dozlardaki vildagliptin metabolitlerinin mitotik indekse etkileri

4.2. Vildagliptin Etken Maddesinin Nükleer Bölünme İndeksi ve Mikronükleus Oluşumu Üzerine Etkisi

125 µg/ml, 250 µg/ml ve 500 µg/ml'lik vildagliptin dozlarının 24 saatlik uygulaması sonucunda NBI'nin düşme eğilimi taşıdığı görüldü. Fakat dozlar arasında istatistiki açıdan fark gösterecek kadar değişim saptanmadı ($p<0,05$). MN oluşumu ise, doz artışıyla ters ilişkili olarak azalış gösterse de istatistiki olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p<0,05$) (Tablo 6).

Farklı vildagliptin dozlarının 48 saatlik uygulamasının, doz artışına bağlı olarak NBI'ne ve MN oluşumuna istatistiki açıdan etkili olmadığı saptandı ($p<0,05$) (Tablo 6).

Tablo 6. S9 olmadan vildagliptinin farklı uygulamalarının nükleer bölünme indeksi ve mikronükleus oluşumu üzerine etkisi

Analiz Edilen Parametre	Muamele	Kontrol	Vildagliptin Dozları			Standart Hata	P	Etki		
			125 µg/ml	250 µg/ml	500 µg/ml			L	Q	C
Nükleer Bölünme İndeksi	24 saat	1,98	1,98	1,95	1,89	0,04	-	-	-	-
Mikronükleus Yüzdesi	24 saat	0,38	0,35	0,29	0,25	0,03	-	-	-	-
Nükleer Bölünme İndeksi	48 saat	1,98	1,91	1,89	1,99	0,03	-	-	-	-
Mikronükleus Yüzdesi	48 saat	0,44	0,28	0,36	0,21	0,04	-	-	-	-

(* $p<0,05$; L:Lineer etki; Q:Kuadratik etki; C:Kübik etki)

S9 metabolik aktivasyon karışımı ile muamele edilen kültürlerde doz artışının aksine, NBI’nde düşüş olduğu halde doz etkileri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark göstermediği saptandı ($p<0,05$). MN oluşumuna etkisinin de, doz artışıyla ters ilişkili olarak azaldığı gözlemlendi. Fakat sonuçlar arasında istatistiksel açıdan fark görülmediği anlaşıldı ($p<0,05$) (Tablo 7).

Tablo 7. Vildagliptin metabolitlerinin nükleer bölünme indeksine ve mikronükleus oluşum oranlarına etkileri

Analiz Edilen Parametre	Muamele	Kontrol	Vildagliptin Dozları			Standart Hata	P	Etki		
			125 $\mu\text{g/ml}$	250 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$			L	Q	C
Nükleer Bölünme İndeksi	S9 karışımı	1,97	1,99	1,98	1,96	$\pm 0,03$	-	-	-	-
Mikronükleus Yüzdesi	S9 karışımı	0,40	0,41	0,32	0,19	$\pm 0,06$	-	-	-	-

(* $p<0,05$; L:Lineer etki; Q:Kuadratik etki; C:Kübik etki)

4.3. Vildagliptin Etken Maddesinin Proliferasyon İndeksi ve Kardeş Kromatid Değişimi Üzerine Etkisi

Vildagliptinin farklı dozlarının 24 saatlik uygulama süresi içinde Pİ'ne etkili olmadığı gözlemlendi ($p<0,05$). KKD oranının doz artışıyla ters orantılı olarak azaldığı gözlemlense de istatistiki açıdan anlamlı bir fark göstermediği anlaşıldı ($p<0,05$) (Tablo 8).

Vildagliptinin farklı dozlarının 48 saatlik uygulama süresi içinde Pİ'ne ve KKD oranına yaptığı etkiler arasında doz artışına paralel olarak, istatistiksel bir fark göstermediği saptandı ($p<0,05$) (Tablo 8).

Tablo 8. 24 saatlik vildagliptin uygulamasının proliferasyon indeksi ve kardeş kromatid değişim oranına etkisi

Analiz Edilen Parametre	Muamele	Kontrol	Vildagliptin Dozları			Standart Hata	P	Etki		
			125 $\mu\text{g/ml}$	250 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$			L	Q	C
Proliferasyon İndeksi	24 saat	2,56	2,58	2,67	2,63	$\pm 0,02$	-	-	-	-
Kardeş Kromatid Değişimi Sayısı	24 saat	174,50	173,50	164,00	153,75	$\pm 5,93$	-	-	-	-
Proliferasyon İndeksi	48 saat	2,43	2,51	2,51	2,48	$\pm 0,02$	-	-	-	-
Kardeş Kromatid Değişimi Sayısı	48 saat	174,75	175,75	180,00	188,00	$\pm 10,19$	-	-	-	-

(* $p<0,05$; L:Lineer etki; Q:Kuadratik etki; C:Kübik etki)

S9 metabolik aktivasyon karışımı ile muamele edilen kültürlerde Pİ ve KKD oranı üzerinde istatistiki açıdan fark gösterecek kadar etki yapmadığı saptandı ($p<0,05$) (Tablo 9).

Tablo 9. Vildagliptin metabolitlerinin proliferasyon indeksi ve kardeş kromatid değişim oranına etkisi

Analiz Edilen Parametre	Muamele	Kontrol	Vildagliptin Dozları			Standart Hata	P	Etki		
			125 $\mu\text{g/ml}$	250 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$			L	Q	C
Proliferasyon İndeksi	S9 karışımı	1,97	1,94	1,93	1,94	0,01	-	-	-	-
Kardeş Kromatid Değişimi Sayısı	S9 karışımı	139,00	159,00	146,75	156,50	6,11	-	-	-	-

(* $p<0,05$; L:Lineer etki; Q:Kuadratik etki; C:Kübik etki)

4.4. Vildagliptinin Kromozomal Anomali, Mikronükleus Ve Kardeş Kromatid Değişimi Testlerinden Elde Edilen Parametrelerin Pozitif Kontrol, Çözücü Kontrol ve Uygulanan Diğer Dozlara Ait Parametreler İle Karşılaştırılması

4.4.1. Vildagliptin Uygulanması Sonucu Elde Edilen Mitotik İndeks, Kromozomal Anomali, ve Anormal Hücre Ortalamasına Ait Verilerin Karşılaştırılması

24 saatlik vildagliptin uygulamasında, bütün doz uygulamalarından elde edilen ortalama KA sayısı ile AHO bulguları çözücü kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel bir farkın olmadığı görüldü. Fakat elde edilen sonuçlar, pozitif kontrolden önemli derecede farklılık gösterdi. En yüksek vildagliptin dozu, Mİ üzerinde çözücü kontrole ve ara doza göre farklılığa sebep olurken pozitif kontrolle karşılaştırıldığında farklılık görülmedi. Ara dozun ise, çözücü kontrole ve minimum doza göre istatistiki açıdan fark gösterdiği, pozitif kontrol ve en yüksek dozdan ise farklı olmadığı belirlendi. En düşük doz da kontrollerden ve diğer dozlardan farklı sonuç vermedi ($p<0,05$) (Tablo 10).

Vildagliptinin 48 saatlik uygulamasından, ortalama KA sayısında doz artışına paralel olarak artış görüldüyse de istatistiki olarak anlamlı bir fark saptanmadı. KA sayısı ve AHO değerlerinin çözücü kontrolle karşılaştırılması sonucu istatistiksel bir fark görülmedi. Fakat elde edilen sonuçların, pozitif kontrolden farklı olduğu anlaşıldı. Uygulanan en yüksek vildagliptin dozuyla ilgili olarak, mitotik indeksin çözücü kontrolle karşılaştırılması sonucu farklılık saptanırken, pozitif kontrol ve diğer dozlara göre farklılık saptanmadı. Vildagliptinin ara ve minimum dozlarının Mİ açısından kontrollerle ve diğer dozlarla farklılık göstermediği belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 10).

Vildagliptin uygulamaları sonucu fragment (Şekil 12), kromozom kırığı (Şekil 13), kromatid kırığı (Şekil 14), kardeş kromatid birleşmesi (Şekil 15), halka kromozom, minute, double minute, poliploidi (Şekil 16), sentromer ayrılması, ve endoreduplikasyon (Şekil 17) gözlemlendi.

Tablo 10. S9 olmadan vildagliptinin farklı uygulamaları sonucunda elde edilen mitotik indeks, kromozomal anomali ve anormal hücre ortalamasına ait verilerin karşılaştırılması

Test Maddesi (konsantrasyon)	Muamele	Kromozomal anomali tipi													Toplam KA	Ortalama KA $\pm$ SE	AHO $\pm$ SE	MI $\pm$ SE
		Kromatit kırığı	Kromozom kırığı	Fragment	Minute	Double minute	KKB	Kromatid değişimi	Halka kromozom	Sentromer ayrılması	Sentrik Füzyon	Disentrik kromozom	Poliploidi	Endoreduplikasyon				
DMSO (10 μ l/ml)	24 saat	24	11	7	1	0	0	0	0	3	0	0	2	0	48	12,00 $\pm$ 20,45	11,25 $\pm$ 2,32	2,71 $\pm$ 0,16
MMC (0,16 μ g/ml)	24 saat	134	262	71	18	1	10	14	0	0	0	0	2	0	512	128,00 $\pm$ 80,57	71,25 $\pm$ 2,56	1,60 $\pm$ 0,21
Vildagliptin (125 μ g/ml)	24 saat	25	18	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	0	47	11,75 $\pm$ 20,36 a	12,75 $\pm$ 2,29 a	2,09 $\pm$ 0,16
Vildagliptin (250 μ g/ml)	24 saat	21	15	7	1	0	1	0	0	4	0	0	2	2	53	13,25 $\pm$ 20,43 a	13,25 $\pm$ 2,43 a	2,48 $\pm$ 0,09 a,e
Vildagliptin (500 μ g/ml)	24 saat	15	14	6	0	0	2	0	1	4	0	0	1	0	43	10,75 $\pm$ 0,48 a	10,25 $\pm$ 0,25 a	1,69 $\pm$ 0,12 b,d
DMSO (10 μ l/ml)	48 saat	9	7	5	1	0	2	0	0	1	0	3	0	0	28	3,00 $\pm$ 1,91	7,25 $\pm$ 1,38	2,55 $\pm$ 0,30
MMC (0,16 μ g/ml)	48 saat	216	329	348	15	2	0	135	1	0	0	0	5	0	1051	262,75 $\pm$ 33,48	93,25 $\pm$ 1,65	1,15 $\pm$ 0,32
Vildagliptin (125 μ g/ml)	48 saat	13	9	6	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	32	8,00 $\pm$ 2,04 a	7,75 $\pm$ 1,89 a	1,84 $\pm$ 0,07
Vildagliptin (250 μ g/ml)	48 saat	22	19	5	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	49	12,25 $\pm$ 1,44 a	11,50 $\pm$ 1,32 a	2,00 $\pm$ 0,08
Vildagliptin (500 μ g/ml)	48 saat	26	16	3	1	1	0	0	0	4	0	0	1	0	52	13,00 $\pm$ 1,15 a	10,50 $\pm$ 0,29 a	1,34 $\pm$ 0,18 b

(p<0,05; **a**:pozitif kontrolden farklı; **b**:çözücü kontrolden farklı; **c**: 125 μ g/ml’ den farklı; **d**: 250 μ g/ml’ den farklı; **e**: 500 μ g/ml’ den farklı)

S9 metabolik aktivasyon karışımı ile muamele edilen kültürlerde, KA oranını ve AHO'nı sadece pozitif kontrolden farklılık gösterecek şekilde etkilediği saptandı. Mİ değerlerinde ise çözücü kontrolden, pozitif kontrolden ve diğer dozlardan farklı sonuçlar gözlenmedi ($p<0,05$) (Tablo 11).

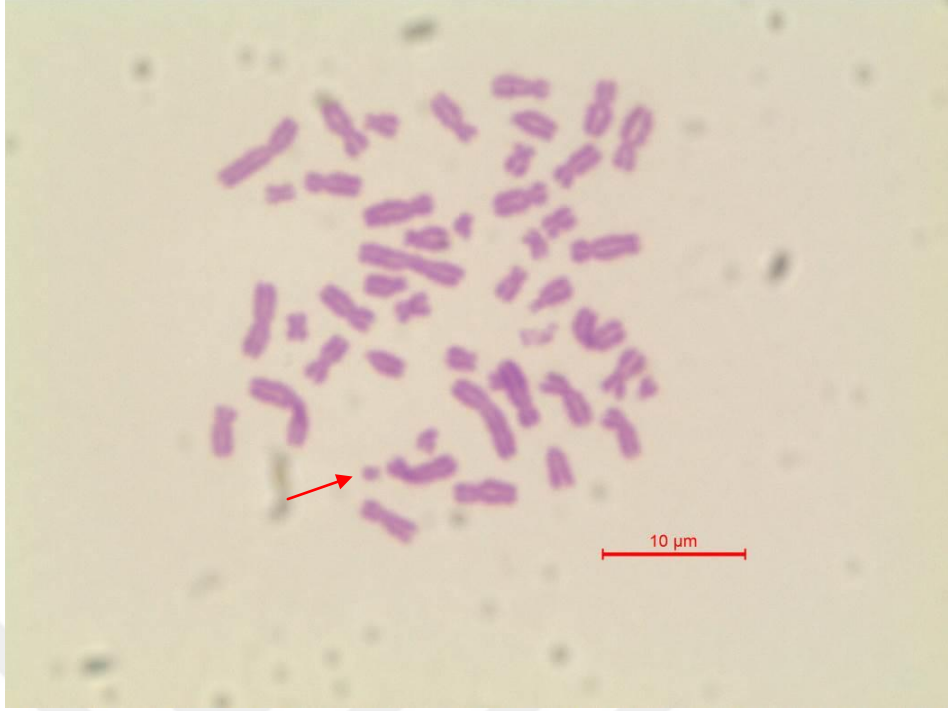
Vildagliptin metabolitlerinin uygulamaları sonucu fragment, kromozom kırığı, kromatid kırığı, minute (Şekil 18), double minute, poliploidi, sentromer ayrılması, ve endoreduplikasyon gözlemlendi.



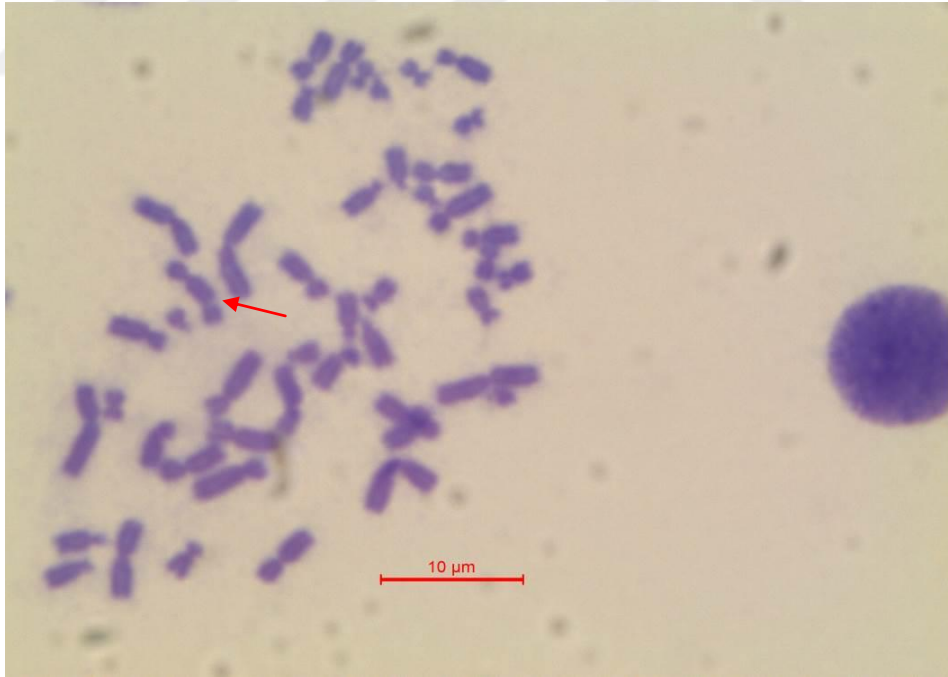
Tablo 11. S9 metabolik aktivasyon sonrası ortaya çıkan vildagliptin metabolitlerinin uygulanması sonucunda elde edilen mitotik indeks, kromozomal anomali ve anormal hücre ortalamasına ait verilerin pozitif kontrol ve çözücü kontrol ile karşılaştırılması

Test Maddesi (konsantrasyon)	Muamele	Kromozomal anomali tipi													Toplam KA	Ortalama KA ±SE	AHO ±SE	Mİ±SE
		Kromatit kırığı	Kromozom kırığı	Fragment	Minute	Double minute	KKB	Kromatid değişimi	Halka kromozom	Sentromer ayrılması	Sentrik Füzyon	Disentrik kromozom	Poliploidi	Endoreduplikasyon				
DMSO (10 µl/ml)	S9 karışımı	19	12	5	1	0	0	0	0	0	0	1	4	0	42	10,50 ±2,53	10,00 ± 2,04	2,84 ± 0,33
CP (45 µg/ml)	S9 karışımı	54	64	15	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	137	34,25 ± 1,25	28,25 ± 1,11	2,10 ± 0,33
Vildagliptin (125 µg/ml)	S9 karışımı	29	19	8	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	60	15,00 ± 2,04 a	14,00 ± 1,08 a	2,64 ± 0,14
Vildagliptin (250µg/ml)	S9 karışımı	17	24	10	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	53	13,25 ± 4,96 a	11,50 ± 4,33 a	2,56 ± 0,09
Vildagliptin (500 µg/ml)	S9 karışımı	26	14	14	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	56	14,00 ± 4,71 a	11,25 ± 3,07 a	2,14 ± 0,17

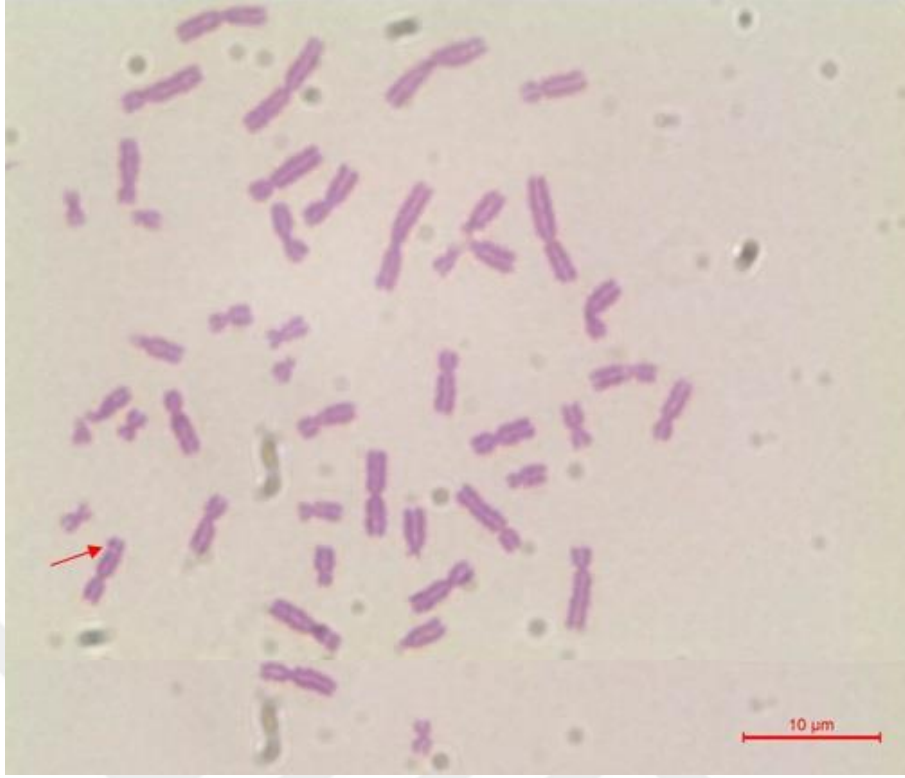
(p<0,05; **a**:pozitif kontrolden farklı; **b**:çözücü kontrolden farklı; **c**: 125 µg/ml’ den farklı; **d**: 250 µg/ml’ den farklı; **e**: 500 µg/ml’ den farklı)



Şekil 12. Fragment (Vildagliptin 250 µg/ml, 24 saatlik uygulama) (x1000)



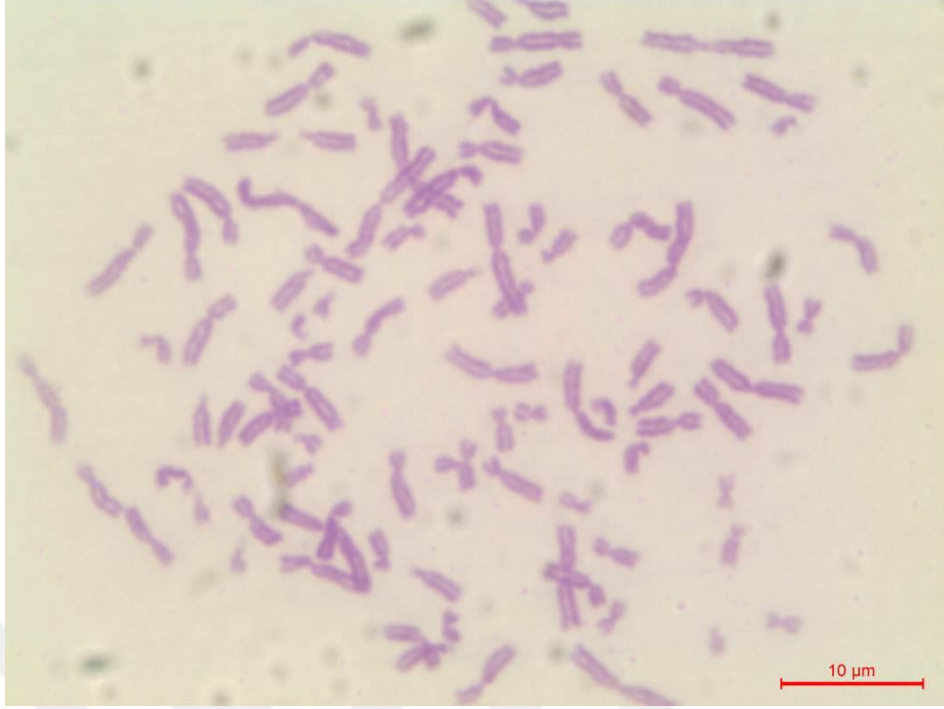
Şekil 13. Kromozom kırığı (Vildagliptin 500 µg/ml, 48 saatlik uygulama) (x1000)



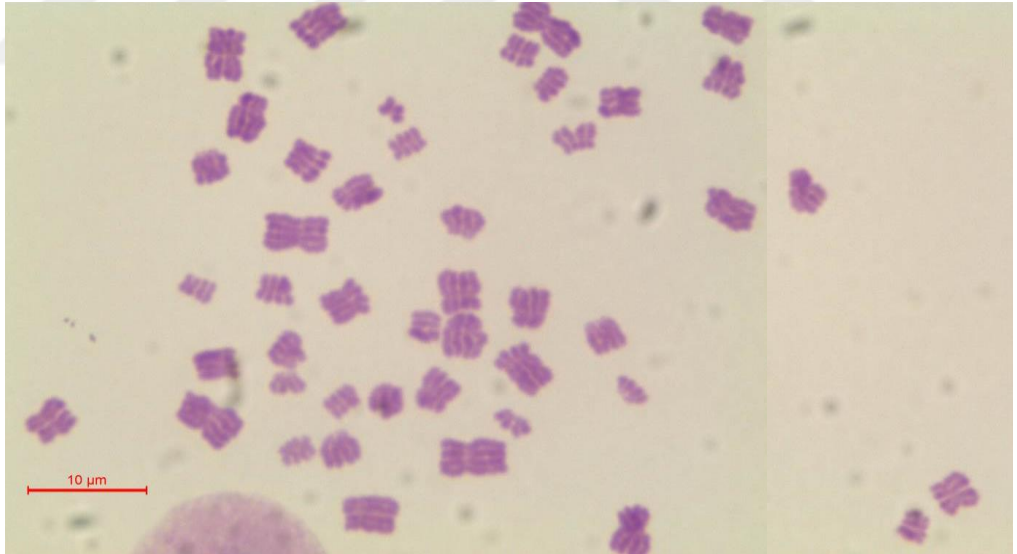
Şekil 14. Kromatid kırığı (Vildagliptin 125 µg/ml, 24 saatlik uygulama) (x1000)



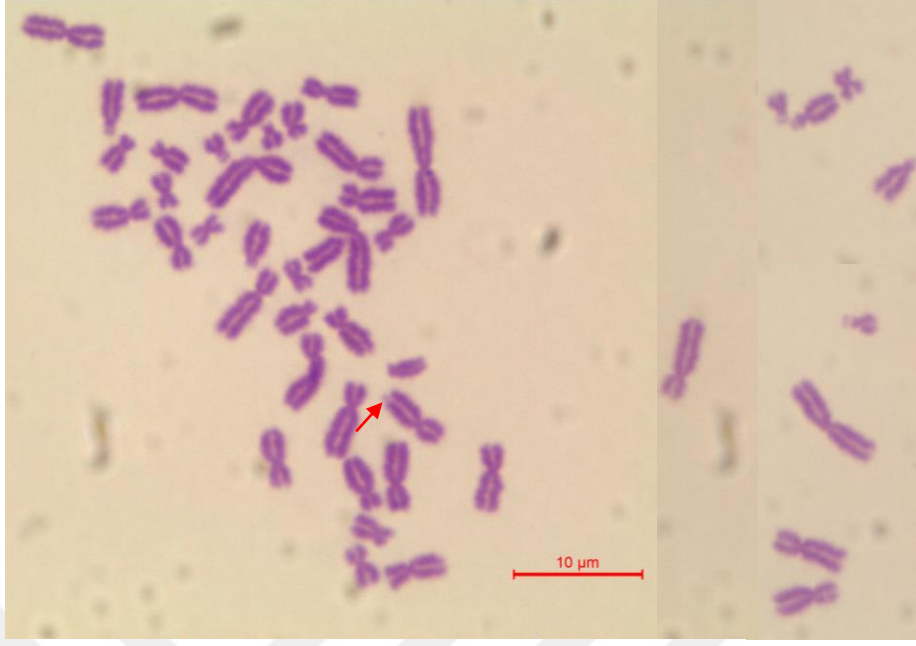
Şekil 15. Kardeş kromatid birleşmesi (Vildagliptin 500 µg/ml, 24 saatlik uygulama) (x1000)



Şekil 16. Poliploidi (Vildagliptin 125 µg/ml, 24 saatlik uygulama) (x1000)



Şekil 17. Endoreduplikasyon (Vildagliptin 250 µg/ml, 24 saatlik uygulama) (x1000)



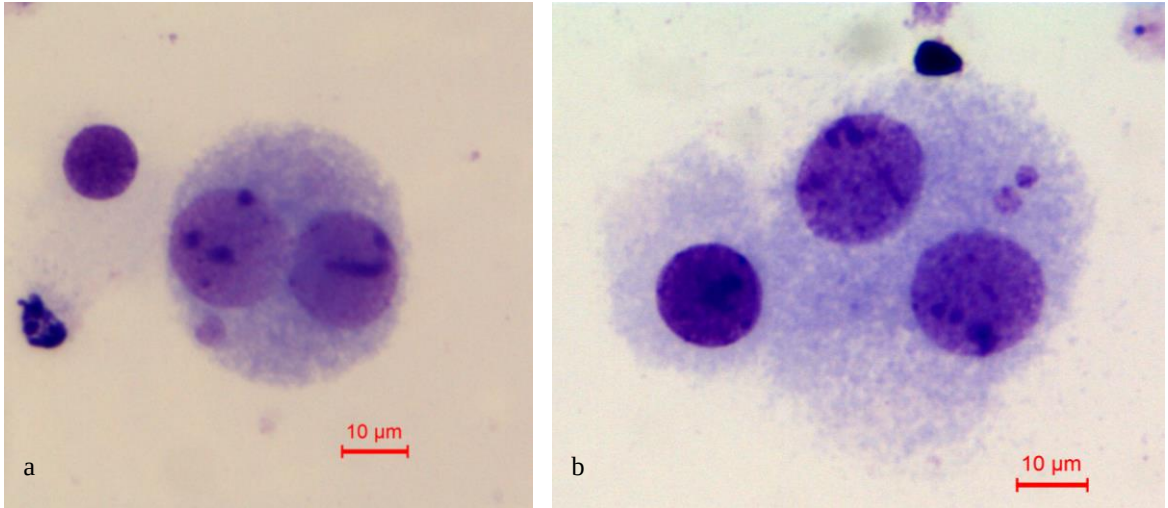
Şekil 18. Minute (Vildagliptin 125 µg/ml, S9 metabolik aktivasyonu) (x1000)

4.4.2.Vildagliptin Uygulanması Sonucu Elde Edilen Nükleer Bölünme İndeksi ve Mikronükleus Oluşumuna Ait Verilerin Karşılaştırılması

Vildagliptinin farklı dozlarının 24 saatlik uygulaması sonucunda, MN yüzdelik oranlarında çözücü kontrolden istatistiksel olarak bir farklılık saptanmadı. Fakat sonuçlar pozitif kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı fark olduğu ortaya çıktı. NBİ’nde ise uygulanan tüm dozların çözücü kontrolden farklı olmadığı görüldü. Uygulanan dozların NBİ sonuçları pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında, yalnızca minimum dozla ilgili bulgular arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark saptandı ($p<0,05$) (Tablo 12).

Tüm dozların 48 saatlik uygulamasının ardından, MN yüzdelik oranı çözücü kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir fark saptanmadı. Tüm dozların MN oranları için pozitif kontrolle karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak fark olduğu anlaşıldı. NBİ, doz artışına ters orantılı olarak azalasa da uygulanan dozlarla ilgili bulguların çözücü kontrolden farklı olmadığı saptandı. Fakat bütün dozların pozitif kontrolden istatistiki açıdan farklılık gösterdiği görüldü ($p<0,05$) (Tablo 12).

Vildagliptin uygulamaları sonucunda elde edilen preparatlarda değerlendirilen bir mikronükleuslu (Şekil 19a) ve iki mikronükleuslu (Şekil 19b) binükleat hücreler gözlenmiştir.



Şekil 19. 1 mikronükleuslu (a) ve 2 mikronükleuslu (b) binükleat hücre (Vildagliptin 250 µg/ml, 48 saatlik uygulama) (x400)

Tablo 12. S9 olmadan vildagliptinin farklı uygulamaları sonucunda elde edilen nükleer bölünme indeksi ve mikronükleus oluşumuna ait verilerin

Test Maddesi (konsantrasyon)	Muamele	MN Sayısına Göre İki Nukleuslu Hücre Sayısı					% MN±SE	Nukleus Sayısına Göre Hücrelerin Dağılımı				NBİ±SE	
		0	1	2	>3			1	2	3	4		
DMSO (10 µl/ml)	24 saat	7970	30	-	-	-	0,38 ± 0,08	731	2916	53	300	1,98	0,07 ± 0,38
MMC (0,16 µg/ml)	24 saat	7779	216	5	-	-	2,76 ± 0,44	1917	2077	1	9	1,53	0,13 ± 2,76
Vildagliptin (125 µg/ml)	24 saat	7972	25	3	-	-	0,35 ± 0,05 a	781	2844	60	320	1,98	0,05 ± 0,35 a
Vildagliptin (250µg/ml)	24 saat	7977	23	-	-	-	0,29 ± 0,06 a	767	2918	47	266	1,95	0,07 ± 0,29
Vildagliptin (500 µg/ml)	24 saat	7980	19	1	-	-	0,25 ± 0,07 a	1041	2682	71	236	1,89	0,16 ± 0,25
DMSO (10 µl/ml)	48 saat	7965	32	2	1	-	0,44 ± 0,13	731	2916	53	300	1,98	0,03 ± 0,44
MMC (0,16 µg/ml)	48 saat	6755	1088	143	-	-	15,39 ± 3,00	1917	2077	1	9	1,41	0,06 ± 15,39
Vildagliptin (125 µg/ml)	48 saat	7978	22	-	-	-	0,28 ± 0,07 a	781	2844	60	320	1,91	0,09 ± 0,28 a
Vildagliptin (250µg/ml)	48 saat	7968	29	-	-	-	0,36 ± 0,07 a	767	2918	47	266	1,89	0,07 ± 0,36 a
Vildagliptin (500 µg/ml)	48 saat	7983	15	2	-	-	0,21 ± 0,07 a	1041	2682	71	236	1,99	0,05 ± 0,21 a

(p<0,05 a:pozitif kontrolden farklı; b:çözücü kontrolden farklı; c: 125 µg/ml' den farklı; d: 250 µg/ml' den farklı; e: 500 µg/ml' den farklı)

Vildagliptin metabolitlerinin farklı dozları arasında, MN oranları, ve NBİ açısından farklılık oluşmadığı tespit edildi. Metabolitlere ait MN oranlarının çözücü kontrolden farklı olmadığı, fakat pozitif kontrole göre farklı olduğu anlaşıldı. Minimum doz ve ara dozun NBİ bakımından çözücü kontrolden istatistiksel olarak farklı sonuçlar çıkarmadığı, fakat pozitif kontrolden önemli derece farklı olduğu anlaşıldı. Maksimum doza ait NBİ'nin kontrollere göre farklı olmadığı saptandı ($p<0,05$) (Tablo 13).



Tablo 13. S9 varlığında vildagliptinin farklı uygulamaları sonucunda elde edilen nükleer bölünme indeksi ve mikronükleus oluşumuna ait verilerin karşılaştırılması

Test Maddesi (konsantrasyon)	Muamele	MN Sayısına Göre İki Nükleuslu Hücre Sayısı					% MN±SE	Nükleus Sayısına Göre Hücrelerin Dağılımı				NBI±SE
		0	1	2	3	>3		1	2	3	4	
DMSO (1µl/ml)	S9 karışımı	7968	29	3	-	-	0,40 ± 0,11	731	2916	53	300	1,97 ± 0,09
CP (45 µg/ml)	S9 karışımı	7831	161	8	-	-	2,11 ± 0,26	1968	1722	135	175	1,63 ± 0,09
Vildagliptin (125 µg/ml)	S9 karışımı	7967	31	2	-	-	0,41 ± 0,13 a	781	2844	60	320	1,99 ± 0,05 a
Vildagliptin (250µg/ml)	S9 karışımı	7974	23	3	-	-	0,33 ± 0,13 a	767	2918	47	266	1,98 ± 0,10 a
Vildagliptin (500 µg/ml)	S9 karışımı	7985	14	1	-	-	0,19 ± 0,09 a	1041	2682	71	236	1,96 ± 0,05 -

<0,05; **a**:pozitif kontrolden farklı; **b**:çözücü kontrolden farklı; **c**: 125 µg/ml’ den farklı; **d**: 250 µg/ml’ den farklı; **e**: 500 µg/ml’ den farklı)

4.4.3.Vildagliptin Uygulanması Sonucu Elde Edilen Proliferasyon İndeksi ve Kardeş Kromatid Değişimi Ortalamasına Ait Verilerin Karşılaştırılması

Vildagliptinin 125 µg/ml, 250 µg/ml ve 500 µg/ml'lik dozlarının 24 saatlik maruziyet süresi sonunda Pİ ve KKD oranı bakımından çözücü kontrole göre farklı saptandı. Pozitif kontrolle karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak farklılık olmadığı anlaşıldı ($p<0,05$) (Tablo 14).

Vildagliptinin üç dozunun 48 saatlik maruziyeti sonucunda Pİ ile KKD oranının, çözücü kontrol verilerinden farklı olmadığı görüldü. Fakat elde edilen veriler pozitif kontrolle karşılaştırıldığında, veriler arasında anlamlı fark gözlemlendi (Tablo 14).

KKD'ni belirlemek için değerlendirilen 2. mitoz örneği Şekil 20'de verilmiştir.



Şekil 20. 2. mitoz geçiren hücre, kardeş kromatid değişim sayısı 11 (Vildagliptin 250 µg/ml, 48 saatlik uygulama) (1000x)

Tablo 14. 24 saatlik vildagliptin uygulanması sonucunda elde edilen proliferasyon indeksi ile kardeş kromatid değişimi oranına ait verilerin pozitif kontrol ve çözücü kontrol ile karşılaştırılması

Test Maddesi (konsantrasyon)	Muamele	1.mitoz geçiren hücre sayısı	2.mitoz geçiren hücre sayısı	3.mitoz geçiren hücre sayısı	Minumum- Maksimum KKD sayısı	Toplam KKD sayısı	Ortalama KKD $\pm$ SE	PI $\pm$ SE
DMSO (10 μ l/ml)	24 saat	20	137	243	159 - 194	698	174,50 $\pm$ 7,31	2,56 $\pm$ 0,06
MMC (0,16 μ g/ml)	24 saat	28	256	116	975 - 1429	4735	1.183,75 $\pm$ 111,69	2,22 $\pm$ 0,03
Vildagliptin (125 μ g/ml)	24 saat	38	122	250	148 - 201	694	173,50 $\pm$ 12,55 a	2,58 $\pm$ 0,04 a
Vildagliptin (250 μ g/ml)	24 saat	15	100	285	145 - 208	656	164,00 $\pm$ 14,75 a	2,68 $\pm$ 0,02 a
Vildagliptin (500 μ g/ml)	24 saat	16	118	266	119 - 215	615	153,75 $\pm$ 13,42 a	2,63 $\pm$ 0,04 a
DMSO (10 μ l/ml)	48 saat	42	143	215	119 - 215	699	174,75 $\pm$ 20,27	2,43 $\pm$ 0,06
MMC (0,16 μ g/ml)	48 saat	108	290	2	2380 - 4049	11988	2.997,00 $\pm$ 380,60	1,74 $\pm$ 0,13
Vildagliptin (125 μ g/ml)	48 saat	24	149	227	160 - 199	703	175,75 $\pm$ 9,20 a	2,51 $\pm$ 0,06 a
Vildagliptin (250 μ g/ml)	48 saat	18	162	220	141 - 237	720	180,00 $\pm$ 20,47 a	2,51 $\pm$ 0,01 a
Vildagliptin (500 μ g/ml)	48 saat	27	156	217	93 - 243	752	188,00 $\pm$ 33,54 a	2,48 $\pm$ 0,06 a

(p<0,05; **a**:pozitif kontrolden farklı; **b**:çözücü kontrolden farklı; **c**: 125 μ g/ml’ den farklı; **d**: 250 μ g/ml’ den farklı; **e**: 500 μ g/ml’ den farklı)

S9 varlığında ortaya çıkan metabolitlerin, proliferasyon indeksi ile kardeş kromatid değişim oranı verileri, çözücü kontrolle karşılaştırıldığında önemli bir farkın olmadığı belirlendi. Metabolit verileri ile pozitif kontrol verileri karşılaştırıldığında, iki grup veri arasında istatistiksel bir fark görüldü ($p<0,05$) (Tablo 15).



Tablo 15. S9 metabolik aktivasyon sonrası ortaya çıkan vildagliptin metabolitlerinin sebep olduğu proliferasyon indeksi ile kardeş kromatid değişimi oranına ait verilerin pozitif kontrol ve çözücü kontrol ile karşılaştırılması

Test Maddesi (konsantrasyon)	Muamele	1.mitoz geçiren hücre sayısı	2.mitoz geçiren hücre sayısı	3.mitoz geçiren hücre sayısı	Minumum- Maksimum KKD sayısı	Toplam KKD sayısı	Ortalama KKD $\pm$ SE	P $\pm$ SE
DMSO (10 μ l/ml)	S9 karışımı	44	324	32	115 - 174	556	139,00 $\pm$ 14,16	1,97 $\pm$ 0,02
CP (45 μ g/ml)	S9 karışımı	100	297	3	532 - 628	2310	577,50 $\pm$ 22,14	1,76 $\pm$ 0,02
Vildagliptin (125 μ g/ml)	S9 karışımı	49	328	23	136 - 188	636	159,00 $\pm$ 12,38 a	1,94 $\pm$ 0,02 a
Vildagliptin (250 μ g/ml)	S9 karışımı	51	327	22	126 - 185	587	146,75 $\pm$ 13,09 a	1,93 $\pm$ 0,02 $\pm$ a
Vildagliptin (500 μ g/ml)	S9 karışımı	45	333	22	127 - 181	626	156,50 $\pm$ 11,71 a	1,94 $\pm$ 0,02 a

(p<0,05; **a**:pozitif kontrolden farklı; **b**:çözücü kontrolden farklı; **c**: 125 μ g/ml’ den farklı; **d**: 250 μ g/ml’ den farklı; **e**: 500 μ g/ml’ den farklı)

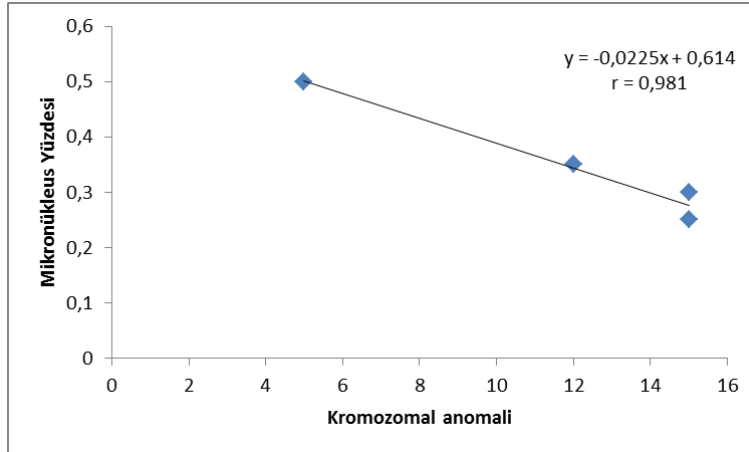
4.5.Vildagliptinin Kromozom Analizi, Mikronükleus ve Kardeş Kromatid Değişim Yöntemleri ile Elde Edilen Parametreler Arasındaki İlişki

Vildagliptinin kromozom analizi, mikronükleus ve kardeş kromatid değişim yöntemleri ile testlerinden elde edilen parametreleri arasındaki ilişki korelasyon analizi ile değerlendirildi. Bu amaçla;

- Kromozomal anomali-Mikronükleus oranı
- Kromozomal anomali-Kardeş kromatid değişimi oranı
- Kardeş kromatid değişimi-Mikronükleus oranı
- Mitotik indeks-Anormal hücre ortalaması
- Mitotik indeks-Nükleer bölünme indeksi
- Mitotik indeks-Proliferasyon indeksi

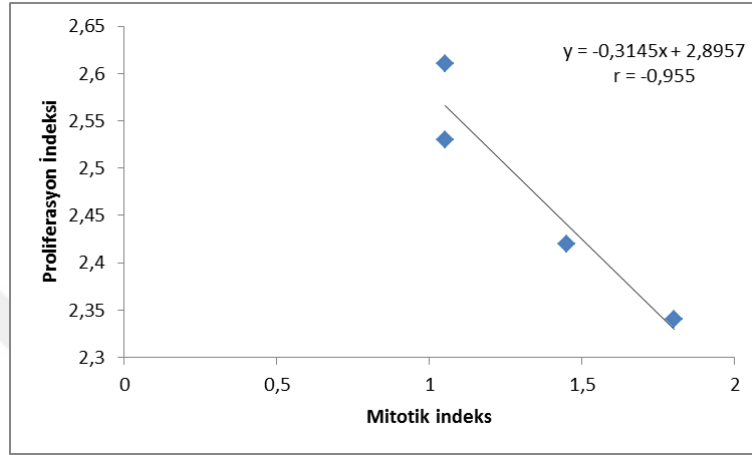
g) Nükleer bölünme indeksi-Proliferasyon indeksi arasındaki ilişkiler incelendi ve anlamlı bulunan sonuçların regresyon grafiği çizilerek regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı hesaplandı.

Vildagliptinin 125 µg/ml’lik dozunun 24 saat süre ile uygulanması sonucunda MN yüzdesi ile KA arasında 0,981 korelasyon katsayısı ile %98,1 oranında ilişki ile pozitif korelasyon saptandı ($p < 0,05$) (Şekil 21).

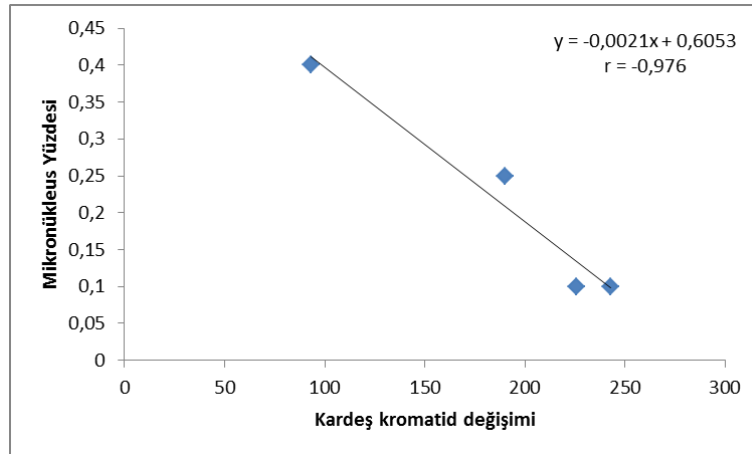


Şekil 21 125 µg/ml’lik vildagliptinin 24 saatlik uygulaması sonucunda mikronükleus oranı ile kromozomal anomali oranı arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon grafiği ve korelasyon katsayısı

Vildagliptinin 500 µg/ml’lik dozunun 48 saat süre ile uygulanması sonucunda Pİ ile Mİ arasında %95,5 oranında negatif korelasyon saptandı. Korelasyon katsayısı -0,955 olarak hesaplandı (Şekil 22). KKD ile MN yüzdesi arasında da negatif korelasyon belirlendi. Korelasyon katsayısının -0,976; iki veri arasındaki ilişkinin %97,6 oranında olduğu saptandı ($p<0,05$) (Şekil 23).



Şekil 22. 500 µg/ml’lik vildagliptinin 48 saatlik uygulaması sonucunda proliferasyon indeksi ile mitotik indeks arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon grafiği ve korelasyon katsayısı



Şekil 23. 500 µg/ml’lik vildagliptinin 48 saatlik uygulaması sonucu mikronükleus oranı ile kardeş kromatid değişim oranı arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon grafiği ve korelasyon katsayısı

500 µg/ml’lik dozun metabolitlerinin uygulanması sonucunda ilgili veriler arasında bir korelasyon saptanmadı ($p<0,05$).

4.6.Vildagliptin Etken Maddesinin Uygulama Durumuna Göre Genotoksik ve Sitotoksik Etkilerinin Karşılaştırılması

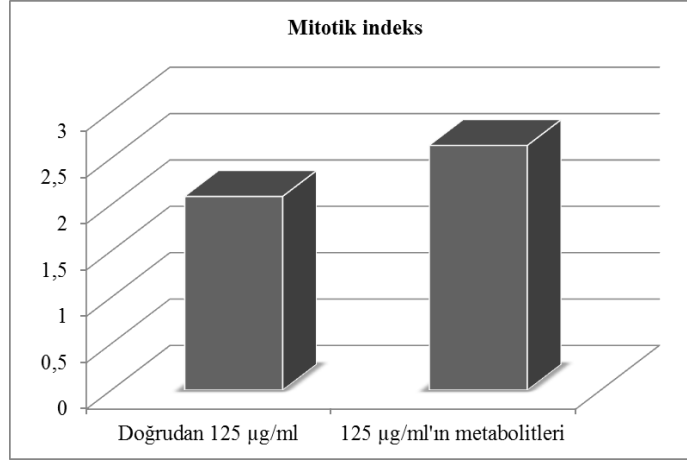
4.6.1. 125 µg/ml’lik Vildagliptin Dozuna Ait Verilerin Karşılaştırılması

Vildagliptinin 125 µg/ml’lik konsantrasyonun 24 saatlik ve 48 saatlik etkileri ile bu maruziyet sürelerinin metabolitlerin etkileri ile karşılaştırılması sonucunda Mİ ve Pİ’nde farklılıklar olduğu görüldü ($p<0,05$) (Tablo 16). Mİ’in metabolitlerin uygulandığı grupta hem 24 saatlik (Şekil 24) hem de 48 saatlik etki süresine (Şekil 25) göre daha yüksek olduğu saptandı. Pİ’nin ise metabolitlerin uygulandığı grupta 24 saatlik (Şekil 26) ve 48 saatlik (Şekil 27) etki süresine göre daha düşük olduğu belirlendi.

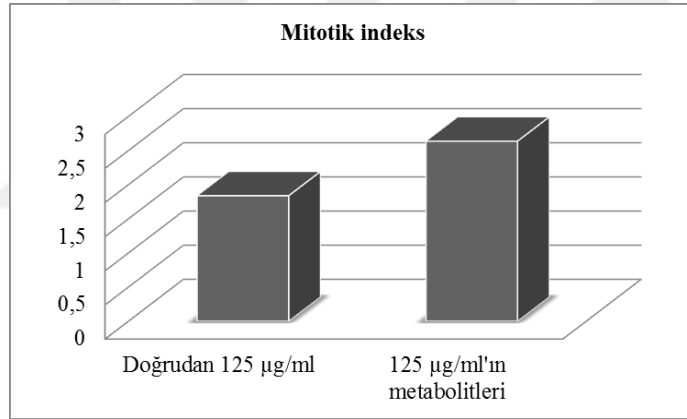
Tablo 16. 125 µg/ml’lik vildagliptin konsantrasyonuna ait verilerin karşılaştırılması

Değerlendirilen parametre	Uygulama	Ortalama ± Standart Hata
Mitotik indeks	24 saat	2,09 ± 0,16 c
	48 saat	1,84 ± 0,07 c
	Metabolitler	2,64 ± 0,14 a, b
Kromozomal Anomali	24 saat	11,75 ± 2,36
	48 saat	8,00 ± 2,04
	Metabolitler	15,00 ± 2,04
Anormal Hücre Ortalaması	24 saat	12,75 ± 2,29
	48 saat	7,75 ± 1,89
	Metabolitler	14,00 ± 1,08
Proliferasyon İndeksi	24 saat	2,58 ± 0,04 c
	48 saat	2,51 ± 0,06 c
	Metabolitler	1,94 ± 0,02 a, b
Kardeş Kromatid Değişimi	24 saat	173,50 ± 12,55
	48 saat	175,75 ± 9,20
	Metabolitler	159,00 ± 12,38
Nükleer Bölünme İndeksi	24 saat	1,98 ± 0,05
	48 saat	1,91 ± 0,09
	Metabolitler	1,99 ± 0,05
Mikronükleus	24 saat	0,35 ± 0,05
	48 saat	0,28 ± 0,07
	Metabolitler	0,41 ± 0,13

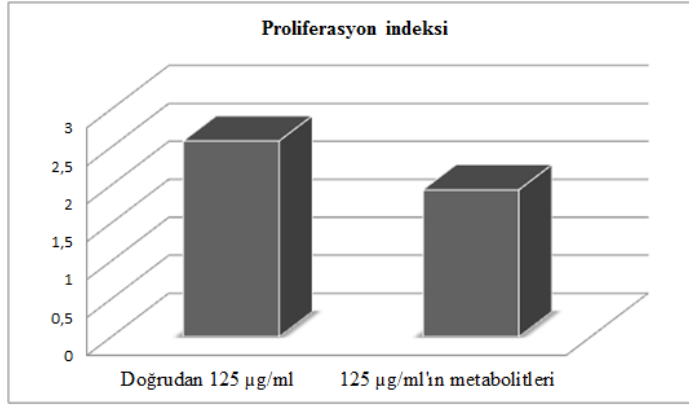
($p<0,05$; a: 24 saatlik uygulamadan farklı, b:48 saatlik uygulamadan farklı, c: Metabolitlerden farklı)



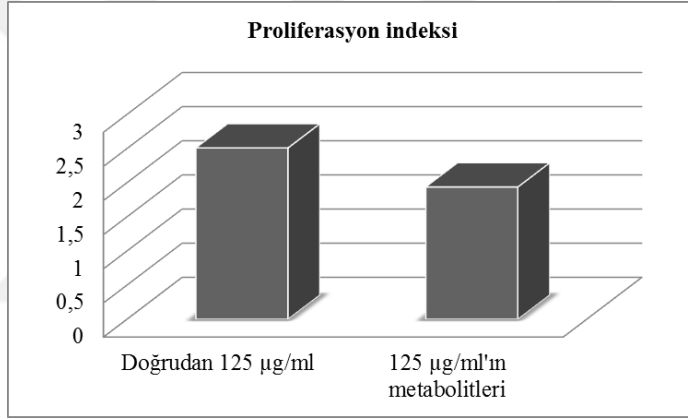
Şekil 24. 125 µg/ml'lik vildagliptin metabolitlerinin ve 125 µg/ml'lik vildagliptinin 24 saatlik maruziyet süresinin mitotik indekse etkileri



Şekil 25. 125 µg/ml'lik vildagliptin metabolitlerinin ve 125 µg/ml'lik vildagliptinin 48 saatlik maruziyet süresinin mitotik indekse etkileri



Şekil 26. 125 µg/ml'lik vildagliptin metabolitlerinin ve 125 µg/ml'lik vildagliptinin 24 saatlik maruziyet süresinin proliferasyon indeksine etkileri



Şekil 27. 125 µg/ml'lik vildagliptin metabolitlerinin ve 125 µg/ml'lik vildagliptinin 48 saatlik maruziyet süresinin proliferasyon indeksine etkileri

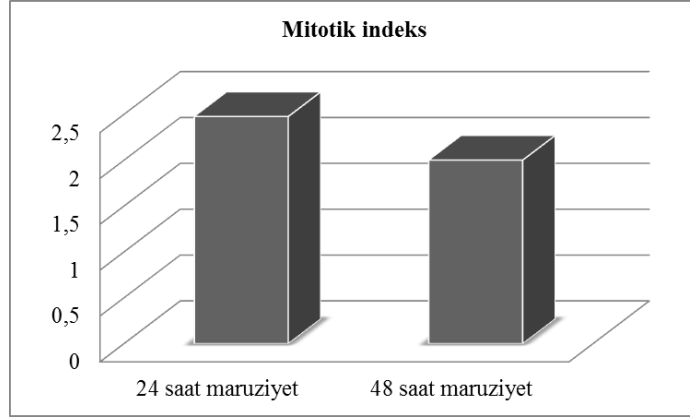
4.6.2.250 µg/ml’lik Vildagliptin Dozuna Ait Verilerin Karşılaştırılması

Vildagliptin etken maddesinin ara doz olarak belirlenen 250 µg/ml’lik konsantrasyonun 24 saatlik ve 48 saatlik etki süreleri ile bu maruziyet sürelerinin etkileri ve metabolitlerin etkilerinin karşılaştırılması sonucunda Mİ ve Pİ’nde farklılıklar olduğu görüldü ($p<0,05$) (Tablo 17). 24 saatlik uygulama sonucunda oluşan Mİ’in 48 saatlik uygulama sonucu oluşan Mİ’ten daha yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 28). 48 saatlik etki süresi sonrasında elde edilen Mİ’in hem 24 saatlik uygulama grubundan hem de metabolitlerin uygulandığı gruptan (Şekil 29) daha düşük olduğu belirlendi. Pİ’nin 48 saatlik uygulama grubunda 24 saatlik gruba göre daha düşük olduğu görüldü (Şekil 30). Metabolitlere ait Pİ’nin 24 saatlik (Şekil 31) ve 48 saatlik (Şekil 32) uygulama gruplarına göre daha düşük olduğu saptandı.

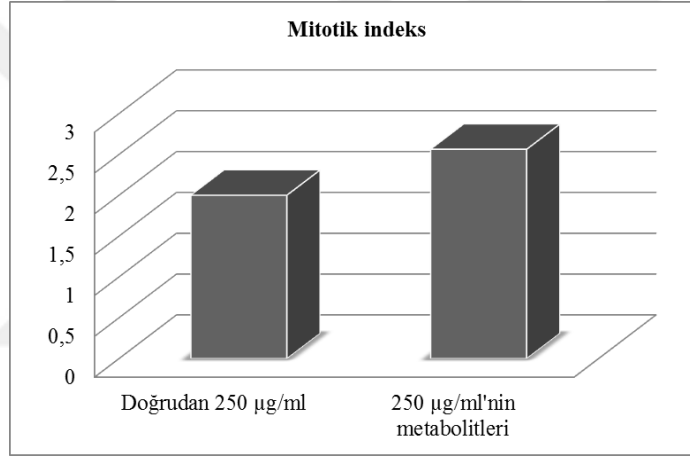
Tablo 17. 250 µg/ml’lik vildagliptin dozuna ait verilerin karşılaştırılması

Değerlendirilen parametre	Uygulama	Ortalama ± Standart Hata
Mitotik indeks	24 saat	2,48 ± 0,09 b
	48 saat	2,00 ± 0,08 a,c
	Metabolitler	2,56 ± 0,09 b
Kromozomal Anomali	24 saat	13,25 ± 2,43
	48 saat	12,25 ± 1,44
	Metabolitler	13,25 ± 4,96
Anormal Hücre Ortalaması	24 saat	13,25 ± 2,43
	48 saat	11,50 ± 1,32
	Metabolitler	11,50 ± 4,33
Proliferasyon İndeksi	24 saat	2,68 ± 0,02 b, c
	48 saat	2,51 ± 0,01 a, c
	Metabolitler	1,93 ± 0,02 a, b
Kardeş Kromatid Değişimi	24 saat	164,00 ± 14,75
	48 saat	180,00 ± 20,47
	Metabolitler	146,75 ± 13,09
Nükleer Bölünme İndeksi	24 saat	1,95 ± 0,07
	48 saat	1,89 ± 0,07
	Metabolitler	1,98 ± 0,10
Mikronükleus	24 saat	0,29 ± 0,06
	48 saat	0,36 ± 0,07
	Metabolitler	0,33 ± 0,13

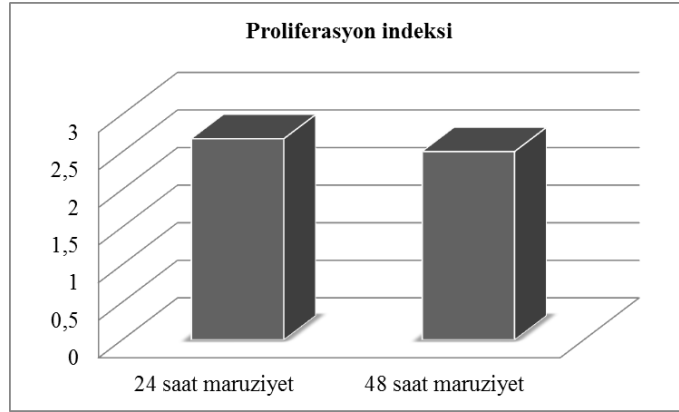
($p<0,05$; a: 24 saatlik uygulamadan farklı, b:48 saatlik uygulamadan farklı, c: Metabolitlerden farklı)



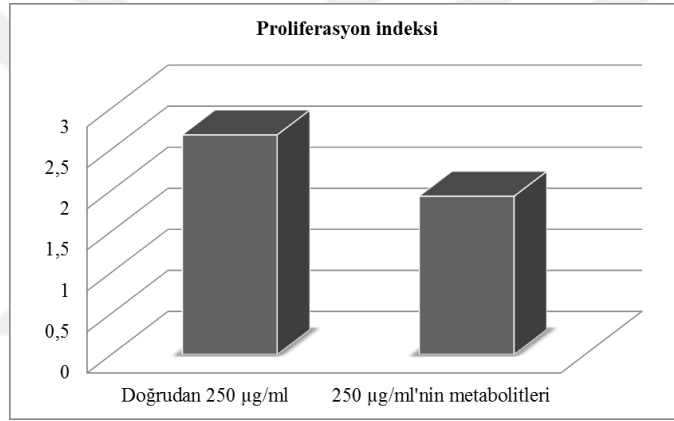
Şekil 28. 250 µg/ml’lik vildagliptine 24 ve 48 saat maruz kalan gruplarda mitotik indeks



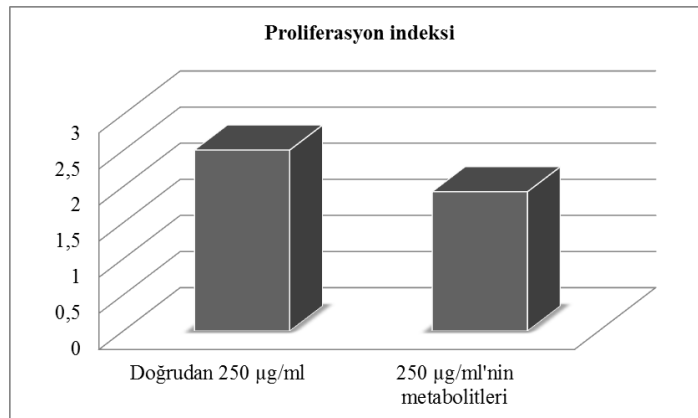
Şekil 29. 250 µg/ml’lik vildagliptin metabolitlerinin ve 250 µg/ml’lik vildagliptinin 48 saatlik maruziyet süresinin mitotik indeks etkileri



Şekil 30. 250 µg/ml’lik vildagliptine 24 ve 48 saat maruz kalan gruplarda proliferasyon indeksi



Şekil 31. 250 µg/ml’lik vildagliptin metabolitlerinin ve 250 µg/ml’lik vildagliptinin 24 saatlik maruziyet süresinin proliferasyon indeksine etkileri



Şekil 32. 250 µg/ml’lik vildagliptin metabolitlerinin ve 250 µg/ml’lik vildagliptinin 48 saatlik maruziyet süresinin proliferasyon indeksine etkileri

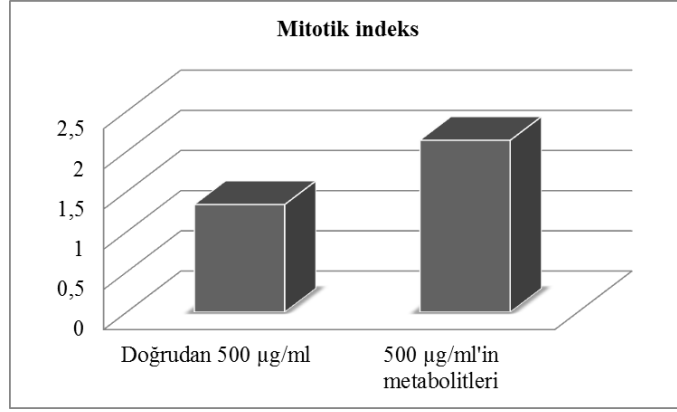
4.6.3.500 µg/ml’lik Vildagliptin Dozuna Ait Verilerin Karşılaştırılması

Vildagliptin etken maddesinin maksimum doz olarak belirlenen 500 µg/ml’lik konsantrasyonun 24 saatlik ve 48 saatlik etki süreleri ile bu maruziyet sürelerinin etkileri ve metabolitlerin etkilerinin karşılaştırılması sonucunda Mİ ve Pİ’nde farklılıklar olduğu görüldü ($p<0,05$) (Tablo 18). Metabolitlerin sebep olduğu Mİ’in 48 saatlik uygulama grubundan daha yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 33). Metabolitlere ait Pİ’nin hem 24 saatlik (Şekil 34) hem de 48 saatlik (Şekil 35) uygulama gruplarından daha düşük olduğu belirlendi.

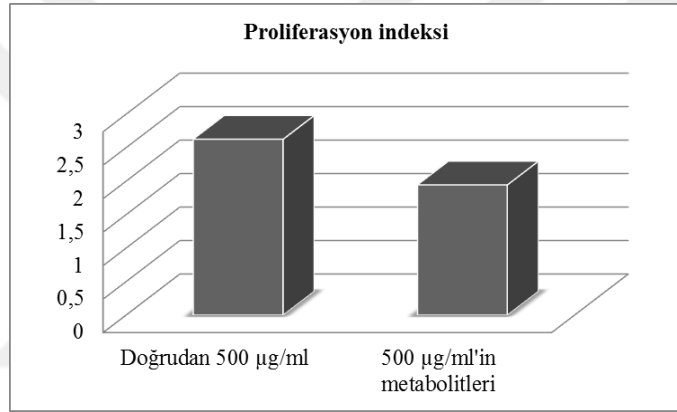
Tablo 18. 500 µg/ml’lik vildagliptin dozuna ait verilerin karşılaştırılması

Değerlendirilen parametre	Uygulama	Ortalama ± Standart Hata
Mitotik indeks	24 saat	1,69 ± 0,12
	48 saat	1,34 ± 0,18 c
	Metabolitler	2,14 ± 0,17 b
Kromozomal Anomali	24 saat	10,75 ± 0,48
	48 saat	13,00 ± 1,15
	Metabolitler	14,00 ± 4,71
Anormal Hücre Ortalaması	24 saat	10,25 ± 0,25
	48 saat	10,50 ± 0,29
	Metabolitler	11,25 ± 3,07
Proliferasyon İndeksi	24 saat	2,63 ± 0,04 c
	48 saat	2,48 ± 0,06 c
	Metabolitler	1,94 ± 0,02 a, b
Kardeş Kromatid Değişimi	24 saat	153,75 ± 13,42
	48 saat	188,00 ± 33,54
	Metabolitler	156,50 ± 11,71
Nükleer Bölünme İndeksi	24 saat	1,89 ± 0,16
	48 saat	1,99 ± 0,05
	Metabolitler	1,96 ± 0,05
Mikronükleus	24 saat	0,25 ± 0,07
	48 saat	0,21 ± 0,07
	Metabolitler	0,19 ± 0,09

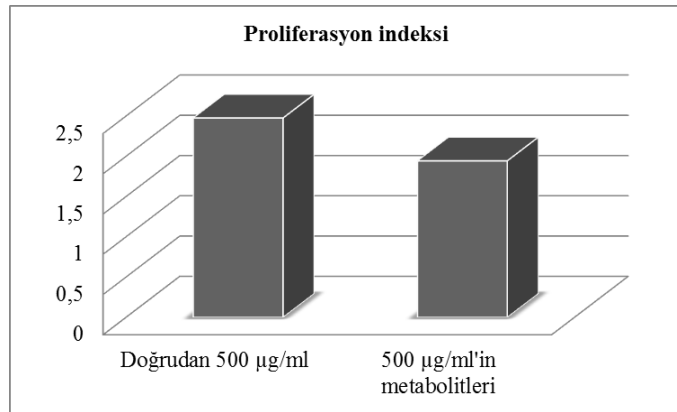
($p<0,05$; a: 24 saatlik uygulamadan farklı, b:48 saatlik uygulamadan farklı, c: Metabolitlerden farklı)



Şekil 33. 500 µg/ml'lik vildagliptin metabolitlerinin ve 500 µg/ml'lik vildagliptinin 48 saatlik maruziyet süresinin mitotik indekse etkileri



Şekil 34. 500 µg/ml'lik vildagliptin metabolitlerinin ve 500 µg/ml'lik vildagliptinin 24 saatlik maruziyet süresinin proliferasyon indeksine etkileri



Şekil 35. 500 µg/ml'lik vildagliptin metabolitlerinin ve 500 µg/ml'lik vildagliptinin 48 saatlik maruziyet süresinin proliferasyon indeksine etkileri

4.7. Sitagliptin Etken Maddesinin Mitotik İndeks, Kromozomal Anomali ve Anormal Hücre Ortalaması Üzerine Etkileri

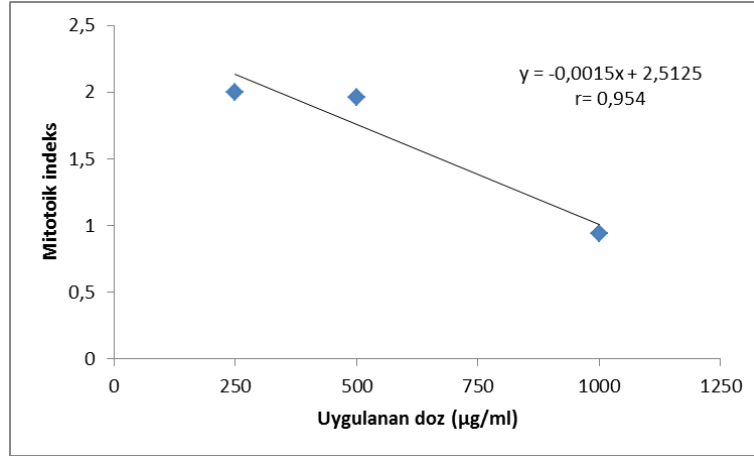
250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml'lik sitagliptin dozlarının 24 saatlik maruziyet süresi sonunda doz artışı ile ilişkili olarak KA'ne ve dolayısıyla AHO'na sebep olacak kadar etkili olmadığı saptandı. Mİ üzerinde de önemli bir etkisinin olmadığı görüldü ($p<0,05$) (Tablo 19).

Sitagliptinin 48 saatlik maruziyet süresi sonunda doz artışına ters yönlü olarak Mİ'te lineer bir değişime sebebiyet verdiği anlaşıldı (Şekil 36). Fakat uygulanan dozların, KA ve AHO'da artışa neden olduğu ancak bu iki veri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farka yol açmadığı görüldü ($p<0,05$) (Tablo 19).

Tablo 19. S9 olmadan sitagliptinin farklı uygulamalarının mitotik indeks, kromozomal anomali ve anormal hücre ortalaması ile ilgili verileri üzerine etkileri

Analiz Edilen Parametre	Muamele	Kontrol	Sitagliptin Dozları			Standart Hata	P	Etki		
			250 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml			L	Q	C
Mitotik İndeks	24 saat	2,80	2,34	2,34	2,26	0,18	-	-	-	-
Kromozomal Anomali	24 saat	14,25	11,25	10,25	17,50	1,86	-	-	-	-
Anormal Hücre Ortalaması	24 saat	12,75	12,75	9,50	16,25	1,60	-	-	-	-
Mitotik İndeks	48 saat	2,49	2,00	1,96	0,94	0,23	*	*	-	-
Kromozomal Anomali	48 saat	11,50	12,75	15,25	17,00	1,43	-	-	-	-
Anormal Hücre Ortalaması	48 saat	10,25	11,50	13,25	16,75	1,26	-	-	-	-

(* $p<0,05$; L:Lineer etki; Q:Kuadratik etki; C:Kübik etki)



Şekil 36. Sitagliptinin farklı doz uygulamalarının 48 saatlik süre içerisinde mitotik indeks üzerine etkileri

S9 metabolik aktivasyonu ile muamele edilen kültürlerde Mİ, KA ve AHO bakımından doz artışına bağlı olarak bir değişim saptanmadı ($p < 0,05$) (Tablo 20).

Tablo 20. S9 metabolik aktivasyon sonrası ortaya çıkan sitagliptin metabolitlerinin mitotik indeks, kromozomal anomali ve anormal hücre ortalaması ile ilgili verileri

Analiz Edilen Parametre	Muamele	Kontrol	Sitagliptin Dozları			Standart Hata	P	Etki		
			250 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml			L	Q	C
Mitotik İndeks	S9 karışım	3,08	3,20	2,58	2,26	0,21	-	-	-	-
Kromozomal Anomali	S9 karışım	12,00	10,75	13,50	17,00	1,61	-	-	-	-
Anormal Hücre Ortalaması	S9 karışım	11,25	10,50	13,00	15,50	1,43	-	-	-	-

(* $p < 0,05$; L:Lineer etki; Q:Kuadratik etki; C:Kübik etki)

4.8. Sitagliptin Etken Maddesinin Nükleer Bölünme İndeksi ve Mikronükleus Oluşumu Üzerine Etkileri

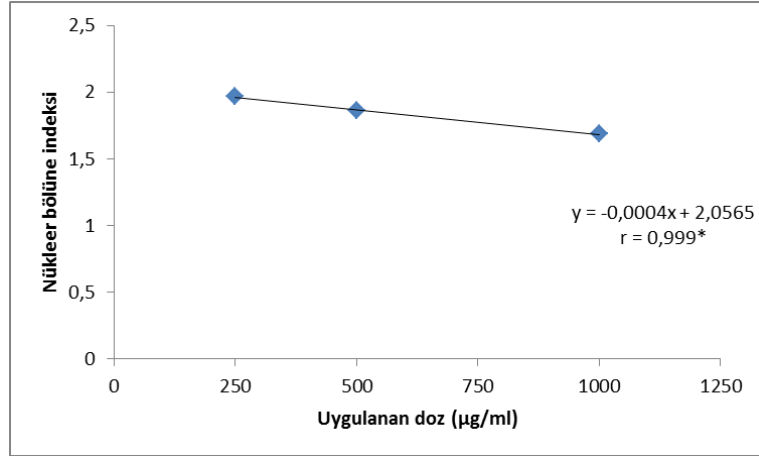
24 saat süre ile 250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml’lik sitagliptin dozlarına maruz kalan gruplarda doz artışına bağlı olarak NBI’nde negatif lineer bir etki saptandı (Şekil 37). MN oluşum verileri arasında, doz artışına bağlı olarak istatistiksel açıdan önemli bir fark gözlenmedi ($p<0,05$) (Tablo 21).

48 saat süre ile 250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml’lik sitagliptin dozlarına maruz kalan gruplarda, MN oluşumuyla ilgili değişim saptanmazken NBI’nde kuadratik bir etki belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 21) (Şekil 38).

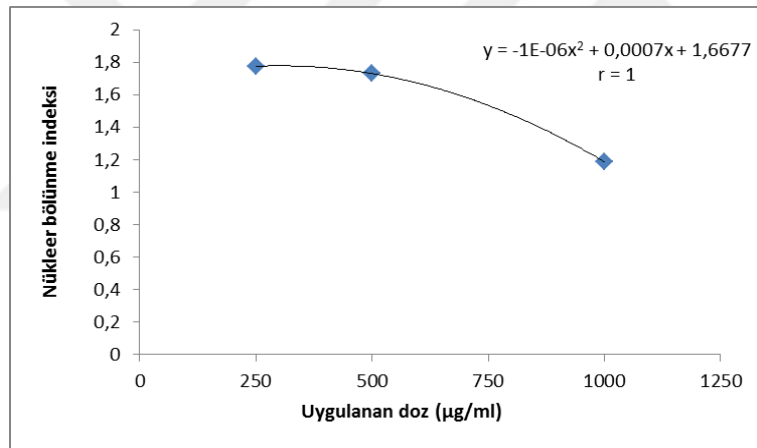
Tablo 21. S9 olmadan sitagliptinin farklı uygulamalarının nükleer bölünme indeksi ve mikronükleus oluşumu hakkındaki verileri

Analiz Edilen Parametre	Muamele	Kontrol	Sitagliptin Dozları			Stanadart Hata	P	Etki		
			250 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml			L	Q	C
Nükleer Bölünme İndeksi	24 saat	2,03	1,97	1,86	0,69	0,05	*	*	-	-
Mikronükleus Yüzdesi	24 saat	0,26	0,45	0,39	0,30	0,07	-	-	-	-
Nükleer Bölünme İndeksi	48 saat	0,97	0,81	10,62	10,19	0,08	*	*	*	-
Mikronükleus Yüzdesi	48 saat	0,65	0,40	0,49	0,40	0,10	-	-	-	-

(* $p<0,05$; L:Lineer etki; Q:Kuadratik etki; C:Kübik etki)



Şekil 37. Sitagliptinin farklı doz uygulamalarının 24 saatlik süre içerisinde nükleer bölünme indeksine etkileri



Şekil 38. Sitagliptinin farklı doz uygulamalarının 48 saatlik süre içerisinde nükleer bölünme indeksine etkileri

Metabolik aktivasyon sonrasında ortaya çıkan metabolitlerin, NBI'ni ve MN oluşumunu doz artışına bağlı olarak değiştirmedeği gözlemlendi ($p<0,05$) (Tablo 22).

Tablo 22. S9 metabolik aktivasyon sonrası ortaya çıkan sitagliptin metabolitlerinin nükleer bölünme indeksi ve mikronükleus oluşumuna etkileri

Analiz Edilen Parametre	Muamele	Kontrol	Sitagliptin Dozları			Standart Hata	P	Etki		
			250 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	1000 $\mu\text{g/ml}$			L	Q	C
Nükleer Bölünme İndeksi	S9 karışım	10,97	10,98	10,99	10,91	0,03	-	-	-	-
Mikronükleus Yüzdesi	S9 karışım	0,26	0,30	0,24	0,33	0,04	-	-	-	-

(* $p<0,05$; L:Lineer etki; Q:Kuadratik etki; C:Küçük etki)

4.9.Sitagliptin Etken Maddesinin Proliferasyon İndeksi ve Kardeş Kromatid Değişimi Üzerine Etkileri

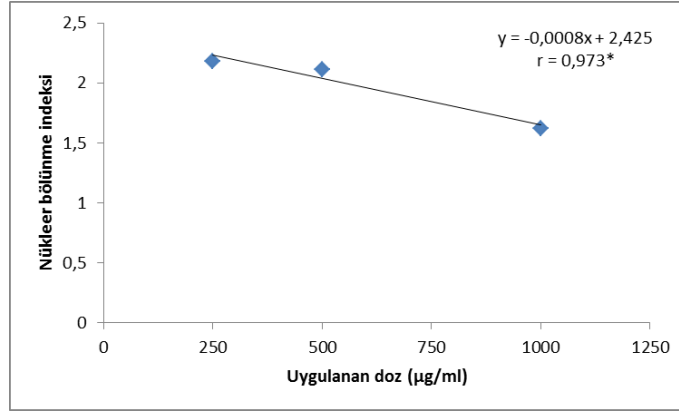
Farklı sitagliptin dozlarına 24 saat süre boyunca maruz kalan gruplarda, Pİ ve KKD verileri arasında istatistiksel bir fark saptanmadı ($p<0,05$) (Tablo 23).

250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml'lik sitagliptin dozlarının 48 saat süre ile muamele edildiği gruplarda, Pİ'nin doz artışına bağlı lineer olarak negatif yönde değişim gösterdiği anlaşıldı (Şekil 39). KKD ile ilgili olarak doz artışına paralel bir değişim saptanmadı ($p<0,05$) (Tablo 23).

Tablo 23. S9 olmadan sitagliptinin farklı uygulamalarının proliferasyon indeksi ve kardeş kromatid değişimine etkileri

Analiz Edilen Parametre	Muamele	Kontrol	Sitagliptin Dozları			Standart Hata	P	Etki		
			250 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml			L	Q	C
Proliferasyon İndeksi	24 saat	2,45	2,25	2,31	2,29	0,06	-	-	-	-
Kardeş Kromatid Değişimi Sayısı	24 saat	161,50	157,75	179,25	169,50	14,90	-	-	-	-
Proliferasyon İndeksi	48 saat	2,36	2,18	2,12	1,62	0,09	*	*	-	-
Kardeş Kromatid Değişimi Sayısı	48 saat	179,00	183,00	157,00	259,00	16,42	-	-	-	-

(* $p<0,05$; L:Lineer etki; Q:Kuadratik etki; C:Kübik etki)



Şekil 39. Sitagliptinin farklı doz uygulamalarının 48 saatlik süre içerisinde proliferasyon indeksine etkileri

250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml’lik sitagliptin dozlarının metabolitlerine maruz kalan gruplarda, Pİ ve KKD açısından bir farklılık gözlenmedi ($p < 0,05$) (Tablo 24).

Tablo 24. S9 metabolik aktivasyon sonrası ortaya çıkan sitagliptin metabolitlerinin proliferasyon indeksi ve kardeş kromatid değişimine etkileri

Analiz Edilen Parametre	Muamele	Kontrol	Sitagliptin Dozları			Standart Hata	P	Etki		
			250 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml			L	Q	C
Proliferasyon İndeksi	S9 karışımı	1,93	1,95	1,94	1,86	0,02	-	-	-	-
Kardeş Kromatid Değişimi Sayısı	S9 karışımı	132,00	158,00	156,50	157,00	7,33	-	-	-	-

(* $p < 0,05$; L:Lineer etki; Q:Kuadratik etki; C:Kübik etki)

4.10. Sitagliptinin Kromozom Analizi, Mikronükleus ve Kardeş Kromatid Değişimi Yöntemlerinden Elde Edilen Parametrelerinin Pozitif Kontrol, Çözücü Kontrol ve Uygulanan Diğer Dozların Ait Parametreleri ile Karşılaştırılması

4.10.1. Sitagliptin Uygulaması Sonucu Elde Edilen Mitotik İndeks, Kromozomal Anomali ve Anormal Hücre Ortalamasına Ait Verilerin Karşılaştırılması

Sitagliptinin farklı dozlarının 24 saatlik uygulama süresi sonunda, KA ve AHO oranlarında çözücü kontrolle karşılaştırıldığında veriler arasında istatistiksel bir fark saptanmadı. Fakat elde edilen sonuçların, pozitif kontrolden farklılık gösterdiği anlaşıldı. Mİ verilerinin hiçbir dozda pozitif ve çözücü kontrolle farklı olmadığı gözlemlendi ($p<0,05$) (Tablo 25).

Sitagliptinin farklı dozlarına 48 saat maruz kalan gruplarda elde edilen KA sayısı ve AHO oranları çözücü kontrol verileri ile karşılaştırıldığında, veriler arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi. Fakat elde edilen verilerin, pozitif kontrole göre farklı olduğu belirlendi. Mİ ile ilgili sonuçların ise kontrollerden farklı olmadığı gözlemlendi ($p<0,05$) (Tablo 25).

Sitagliptin uygulamaları sonucunda fragment (Şekil 40), kromozom kırığı (Şekil 41), kromatid kırığı, kardeş kromatid birleşmesi, halka kromozom (Şekil 42), minute (Şekil 43), double minute, sentromer ayrılması (Şekil 44) poliploidi (Şekil 45), gibi yapısal ve sayısal kromozom anomalileri gözlemlendi.

Tablo 25. S9 olmadan sitagliptinin farklı uygulamaları sonucunda elde edilen mitotik indeks, kromozomal anomali, ve anormal hücre ortalamasına ait verilerin karşılaştırılması

Test Maddesi (konsantrasyon)	Muamele	Kromozomal anomali tipi													Toplam KA	Ortalama KA ±SE	AHO ±SE	Mİ ±SE
		Kromatit kırığı	Kromozom kırığı	Fragment	Minute	Double minute	KKB	Kromatid değişimi	Halka kromozom	Sentromer ayrılması	Sentrik Füzyon	Disentrik kromozom	Poliploidi	Endoreduplikasyon				
DMSO (10 µl/ml)	24 saat	33	11	9	0	0	2	0	0	0	0	1	1	0	57	14,25 ± 4,50	12,75 ± 3,40	2,80 ± 0,31
MMC (0.16 µg/ml)	24 saat	172	291	118	6	0	6	22	6	0	0	2	0	0	623	155,75 ± 15,72	80,75 ± 3,84	1,16 ± 0,18
Sitagliptin (250 µg/ml)	24 saat	23	10	2	1	0	1	0	0	4	0	0	4	0	45	11,25 ± 4,40 a	12,75 ± 4,13 a	2,34 ± 0,37
Sitagliptin (500µg/ml)	24 saat	25	10	2	1	0	1	0	0	0	0	0	2	0	41	10,25 ± 3,33 a	9,50 ± 2,90 a	2,34 ± 0,53
Sitagliptin (1000 µg/ml)	24 saat	34	8	10	3	1	2	0	1	6	0	0	5	0	70	17,50 ± 2,84 a	16,25 ± 2,59 a	2,26 ± 0,24
DMSO (10 µl/ml)	48 saat	20	11	8	1	1	5	0	0	0	0	0	0	0	46	11,50 ± 1,71	10,25 ± 1,60	2,49 ± 0,33
MMC (0.16 µg/ml)	48 saat	264	448	332	16	3	0	133	0	1	0	4	4	0	1205	301,25 ± 60,54	91,25 ± 2,95	1,18 ± 0,26
Sitagliptin (250 µg/ml)	48 saat	19	19	12	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	51	12,75 ± 2,02 a	11,50 ± 1,44 a	2,00 ± 0,44
Sitagliptin (500µg/ml)	48 saat	36	13	7	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	61	15,25 ± 4,66 a	13,25 ± 3,57 a	1,96 ± 0,55
Sitagliptin (1000 µg/ml)	48 saat	39	13	10	1	0	0	0	0	0	0	0	5	0	68	17,00 ± 2,48 a	16,75 ± 2,50 a	0,94 ± 0,16

(p<0,05; **a**:pozitif kontrolden farklı; **b**:çözücü kontrolden farklı; **c**: 125 µg/ml’ den farklı; **d**: 250 µg/ml’ den farklı; **e**: 500 µg/ml’ den farklı)

Sitagliptin metabolitlerinden kaynaklanan KA oranının çözücü kontrol grubundan sağlanan verilerden farklı olmadığı ve fakat pozitif kontrol grubu verilerinden anlamlı düzeyde farklı olduğu saptandı. AHO'nun 250 µg/ml'lik ve 500 µg/ml'lik dozlardada çözücü kontrolden farklı olmadığı ve pozitif kontrol grubundan farklı olduğu gözlemlendi. 1000 µg/ml'lik dozdan elde edilen AHO'nun ne çözücü kontrolden ne de pozitif kontrolden farklı olmadığı belirlendi. Mİ verilerinin de direkt uygulamalarda olduğu gibi çözücü kontrol ve pozitif kontrolden farklı olmadığı anlaşıldı ($p<0,05$) (Tablo 26).

Sitagliptin metabolitlerinin uygulanmaları sonucunda da fragment, kromozom kırığı, kromatid kırığı (Şekil 46), minute, double minute, sentromer ayrılması ve endoreduplikasyon gibi kromozomal anomaliler gözlemlendi.

Tablo 26. S9 varlığında sitagliptinin farklı uygulamalarından sağlanan mitotik indeks, kromozomal anomali ve anormal hücre ortalamasıyla ilgili verilerin karşılaştırılması

Test Maddesi (konsantrasyon)	Muamele	Kromozomal anomali tipi													Toplam KA	Ortalama KA ±SE	AHO ±SE	MI±SE
		Kromatit kırığı	Kromozom kırığı	Fragment	Minute	Double minute	KKB	Kromatid değişimi	Halka kromozom	Sentromer ayrılması	Sentrik Füzyon	Disentrik kromozom	Poliploidi	Endoreduplikasyon				
DMSO (10 µl/ml)	S9 karışımı	28	10	6	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	48	12,00 ± 4,38	11,25 ± 3,71	3,08 ± 0,71
CP (45 µg/ml)	S9 karışımı	60	50	12	0	0	2	0	0	0	0	0	3	0	127	31,75 ± 3,54	26,25 ± 2,06	1,96 ± 0,27
Sitagliptin (250 µg/ml)	S9 karışımı	27	10	5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	43	10,75 ± 1,70 a	10,50 ± 1,71 a	3,20 ± 0,50
Sitagliptin (500µg/ml)	S9 karışımı	20	17	13	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0	54	13,50 ± 0,87 a	13,00 ± 1,00 a	2,58 ± 0,15
Sitagliptin (1000 µg/ml)	S9 karışımı	37	13	12	0	1	0	0	0	1	0	0	4	0	68	17,00 ± 4,64 a	15,50 ± 4,25	2,26 ± 0,21

(p<0,05; **a**:pozitif kontrolden farklı; **b**:çözücü kontrolden farklı; **c**: 125 µg/ml’ den farklı; **d**: 250 µg/ml’ den farklı; **e**: 500 µg/ml’ den farklı)



Şekil 40. Fragment (Sitagliptin 500 µg/ml, 48 saatlik uygulama) (x1000)



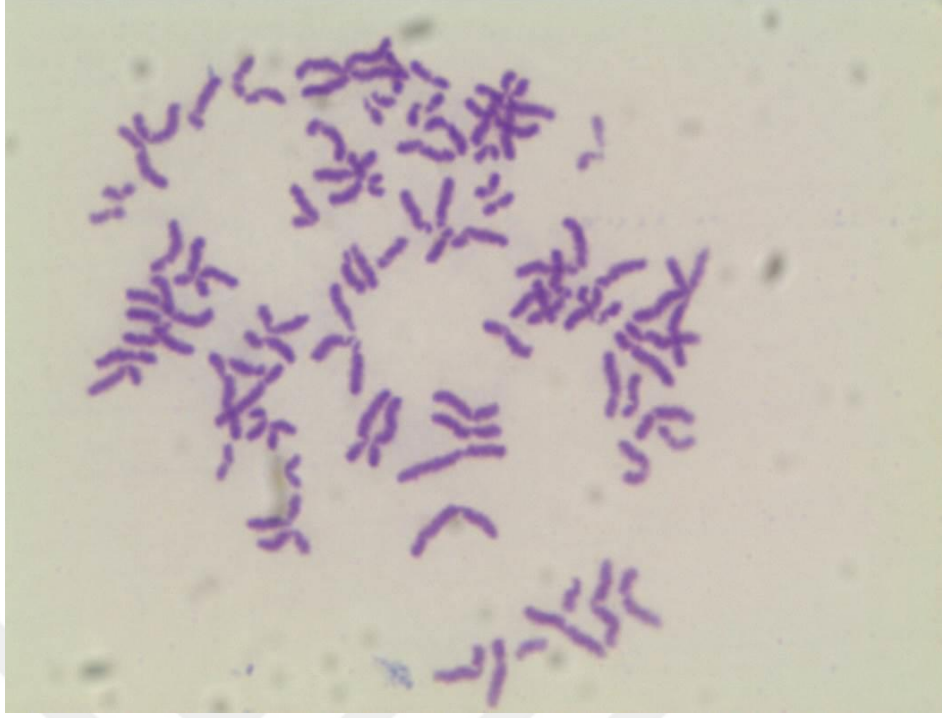
Şekil 41. Kromozom kırığı (Sitagliptin 1000 µg/ml, 24 saatlik uygulama) (x1000)



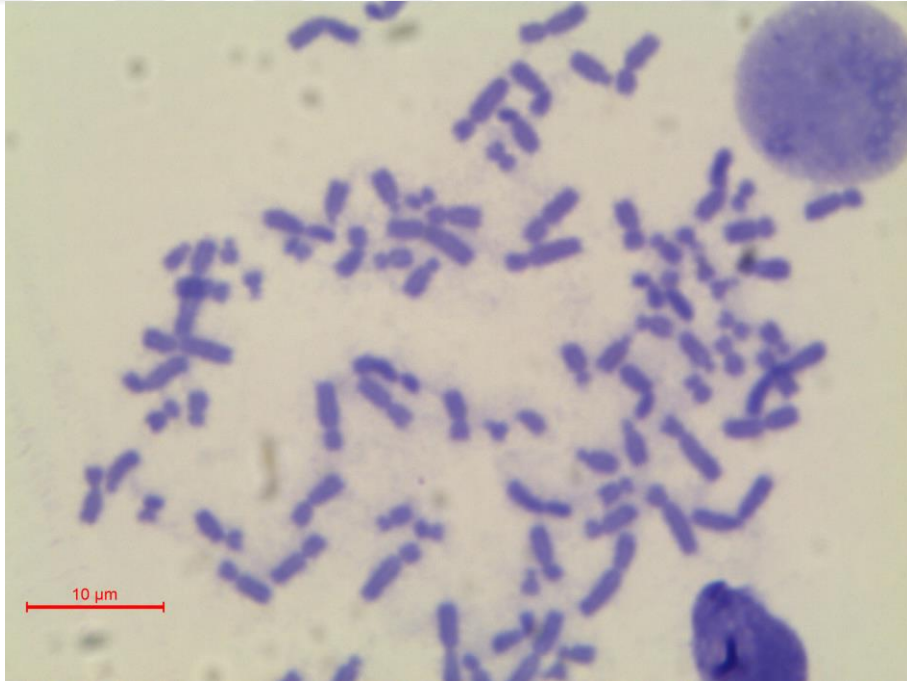
Şekil 42. Halka kromozom (Sitagliptin 1000 µg/ml, 24 saatlik uygulama) (x1000)



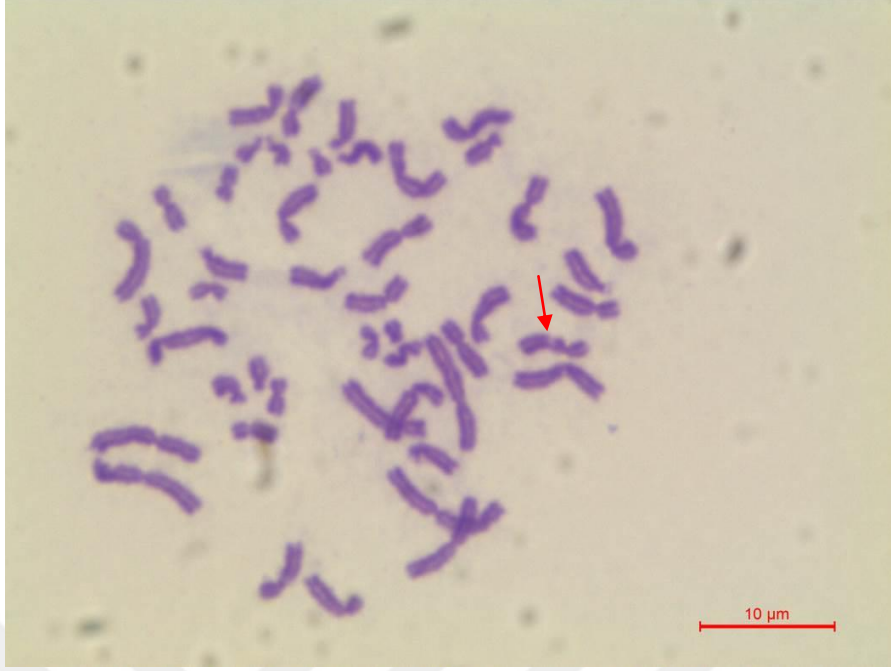
Şekil 43. Minute (Sitagliptin 1000µg/ml, 24 saatlik uygulama) (x1000)



Şekil 44. Sentromer ayrılması (Sitagliptin 250 µg/ml, 24 saat) (x1000)



Şekil 45. Poliploidi (Sitagliptin 500 µg/ml, 24 saatlik uygulama) (x1000)



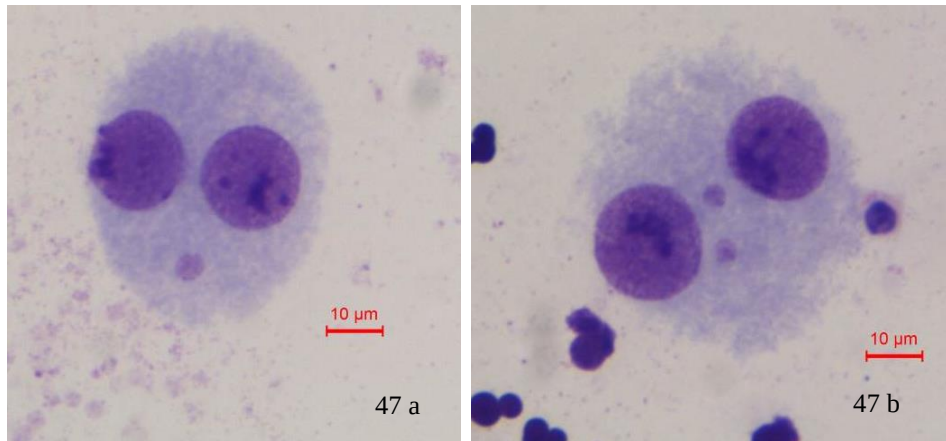
Şekil 46. Kromatid kırığı (Sitagliptin 250 µg/ml, S9 metabolik aktivasyonu) (x1000)

4.10.2. Sitagliptin Uygulaması Sonucu Elde Edilen Nükleer Bölünme İndeksi ve Mikronükleus Oluşumuna Ait Verilerin Karşılaştırılması

Sitagliptinin farklı dozlarının 24 saatlik uygulamalarının, MN oluşumuna üzerinde, çözücü kontrolden farklı etki yapmadığı, fakat pozitif kontrole göre farklı etki yaptığı saptandı. 250 µg/ml'lik dozda çözücü kontrole göre NBİ'nin, fark göstermediği, fakat pozitif kontrolden farklı olduğu belirlendi. 500 µg/ml'lik dozda ise NBİ'nin çözücü kontrol ile pozitif kontrolden farklı sonuçlar verdiği saptandı. 1000 µg/ml'lik dozun ise pozitif kontrolden fark göstermeden sadece çözücü kontrolden fark gösterdiği belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 27).

Dozların 48 saatlik uygulamasının, çözücü kontrole göre MN oluşumunda fark oluşturmadığı anlaşıldı. Fakat bütün dozların, pozitif kontrole göre, farklı sonuçlara neden olduğu saptandı. NBİ'nin, minimum dozda çözücü kontrole göre fark göstermediği, fakat pozitif kontrol ve maksimum dozdan farklı sonuç verdiği saptandı. Ara dozun NBİ'ni pozitif kontrolden farklılaştırmadığı, fakat çözücü ve maksimum dozdan farklılık gösterdiği saptandı. Maksimum doza ait NBİ'nin sonuçlarının ise pozitif kontrolden fark göstermeden çözücü kontrolden ve diğer dozlardan fark gösterdiği belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 27).

Sitagliptin uygulamaları sonucunda bir mikronükleuslu (Şekil 47a) ve iki mikronükleuslu (Şekil 47b) binükleat hücreler gözlemlendi.



Şekil 47. 1 mikronükleuslu (a) ve 2 mikronükleuslu (b) binükleat hücre (Sitagliptin 500 µg/ml, 48 saatlik uygulama) (x400)

Tablo 27. S9 olmadan sitagliptinin farklı uygulamaları sonucunda elde edilen nükleer bölünme indeksi ve mikronükleus oranlarıyla ilgili verilerin karşılaştırılması

Test Maddesi (konsantrasyon)	Muamele	MN Sayısına Göre İki Nükleuslu Hücre Sayısı					% MN±SE	Nükleus Sayısına Göre Hücrelerin Dağılımı				NBI±SE
		0	2	>3				1	2	3	4	
DMSO (10 µl/ml)	24 saat	7979	20	1	0	0	0,26 ± 0,04	590	3220	59	228	2,03 ± 0,08
MMC (0,16 µg/ml)	24 saat	7735	255	8	1	1	3,31 ± 1,06	1512	2450	8	10	1,62 ± 0,06
Sitagliptin (250 µg/ml)	24 saat	7964	35	1	0	0	0,45 ± 0,24 a	579	3173	48	200	1,97 ± 0,04 a
Sitagliptin (500µg/ml)	24 saat	7969	29	2	0	0	0,39 ± 0,19 a	812	3035	39	114	1,86 ± 0,08
Sitagliptin (1000 µg/ml)	24 saat	7976	24	0	0	0	0,30 ± 0,07 a	1289	2664	8	25	1,69 ± 0,08 b
DMSO (10 µl/ml)	48 saat	7948	48	4	0	0	0,65 ± 0,34	631	3089	50	230	1,97 ± 0,05
MMC (0,16 µg/ml)	48 saat	6361	1448	163	24	4	20,49 ± 3,83	2130	1798	57	15	1,49 ± 0,08
Sitagliptin (250 µg/ml)	48 saat	7968	31	1	0	0	0,40 ± 0,15 a	871	3062	17	50	1,81 ± 0,06 a, e
Sitagliptin (500µg/ml)	48 saat	7961	36	3	0	0	0,49 ± 0,20 a	1536	2446	6	12	1,62 ± 0,10 b, e
Sitagliptin (1000 µg/ml)	48 saat	7968	32	0	0	0	0,40 ± 0,09 a	3259	737	4	0	1,19 ± 0,05 b, c, d

(p<0,05; **a**:pozitif kontrolden farklı; **b**:çözücü kontrolden farklı; **c**: 125 µg/ml’ den farklı; **d**: 250 µg/ml’ den farklı; **e**: 500 µg/ml’ den farklı)

Sitagliptin metabolitlerinin, 250 µg/ml'lik dozda ve 500 µg/ml'lik dozda NBİ'ne çözücü kontrolden farklı etki yapmadığı, fakat pozitif kontrole göre farklılık gösterdiği saptandı. 1000 µg/ml'lik dozun NBİ'nin ise kontrollerden farklı olmadığı gözlemlendi. MN oluşumuyla ilgili olarak dozlar arasında bir fark gözlenmedi. Dozların MN oranlarının sadece pozitif kontrolden farklı olduğu belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 28).



Tablo 28. S9 varlığında sitagliptinin farklı uygulamaları sonucunda elde edilen nükleer bölünme indeksi ile mikronükleus oranıyla ilgili verilerin karşılaştırılması

Test Maddesi (konsantrasyon)	Muamele	MN Sayısına Göre İki Nükleuslu Hücre Sayısı					% MN±SE	Nükleus Sayısına Göre Hücrelerin Dağılımı				NBI±SE
		0	1	2	3	>3		1	2	3	4	
DMSO (10 µl/ml)	S9 karışımı	7979	20	1	0	0	0,26 ± 0,04	590	3110	59	228	1,97 ± 0,08
CP (45 µg/ml)	S9 karışımı	7831	161	8	-	-	2,11 ± 0,26	1968	1722	135	175	1,63 ± 0,09
Sitagliptin (250 µg/ml)	S9 karışımı	7976	24	0	0	0	0,30 ± 0,12 a	525	3220	50	202	1,98 ± 0,05 a
Sitagliptin (500µg/ml)	S9 karışımı	7981	17	2	0	0	0,24 ± 0,09 a	577	3132	62	233	1,99 ± 0,05 a
Sitagliptin (1000 µg/ml)	S9 karışımı	7974	26	0	0	0	0,33 ± 0,06 a	598	3256	22	119	1,91 ± 0,05

(p<0,05 **a**:pozitif kontrolden farklı; **b**:çözücü kontrolden farklı; **c**: 125 µg/ml’ den farklı; **d**: 250 µg/ml’ den farklı; **e**: 500 µg/ml’ den farklı)

4.10.3.Sitagliptin Uygulaması Sonucu Elde Edilen Proliferasyon İndeksi ve Kardeş Kromatid Değişimine Ait Verilerin Pozitif Kontrol ve Çözücü Kontrol ile Karşılaştırılması

Sitagliptin dozlarına 24 saatlik maruziyetin, KKD'ni çözücü kontrole göre farklılaştıracak kadar etkilmediği, fakat pozitif kontrole göre farklılık oluşturduğu belirlendi. Her üç dozun da Pİ'ni, kontrollerden farklı etkilemediği anlaşıldı ($p<0,05$) (Tablo 29).

Sitagliptinin farklı dozlarının 48 saat süre ile uygulanmasının, KKD'ni çözücü kontrole göre, farklı etkilemediği, fakat pozitif kontrole göre farklı etkilediği gözlemlendi. Pİ'nin minimum dozda çözücü kontrole ve pozitif kontrole göre farklı olmadığı, fakat maksimum doza göre farklı olduğu gözlemlendi. Ara dozun Pİ'ni çözücü kontrol ve pozitif kontrole göre farklılaştırmadığı anlaşıldı. Maksimum dozun ise pozitif kontrole göre farklı olmayıp, çözücü kontrol ve minimum doza göre farklı olduğu saptandı ($p<0,05$) (Tablo 29).

Sitagliptin uygulamaları sonucu KKD sıklığını belirlemek için değerlendirilen 2. mitoz örneği Şekil 48'de verilmiştir.



Şekil 48. 2. mitoz geçiren hücre, kardeş kromatid değişim sayısı 8 (Sitagliptin 500 µg/ml, 24 saatlik uygulama) (x1000)

Tablo 29. S9 olmadan sitagliptinin farklı uygulamaları sonucunda elde edilen elde edilen proliferasyon indeksi ve kardeş kromatid değişim oranlarıyla ilgili verilerin karşılaştırılması

Test Maddesi (konsantrasyon)	Muamele	1.Mitoz geçiren hücre sayısı	2.Mitoz geçiren hücre sayısı	3.Mitoz geçiren hücre sayısı	Minumum- Maksimum KKD sayısı	Toplam KKD sayısı	Ortalama KKD $\pm$ SE	PI $\pm$ SE
DMSO (10 μ l/ml)	24 saat	35	152	213	83 - 225	646	161,50 $\pm$ 35,72	2,45 $\pm$ 0,10
MMC (0,16 μ g/ml)	24 saat	105	229	66	857 - 1252	4264	1.073,50 $\pm$ 86,87	1,90 $\pm$ 0,16
Sitagliptin (250 μ g/ml)	24 saat	63	176	161	121 - 224	631	157,75 $\pm$ 22,98 a	2,25 $\pm$ 0,19
Sitagliptin (500 μ g/ml)	24 saat	62	151	187	94 - 231	717	179,25 $\pm$ 29,73 a	2,31 $\pm$ 0,12
Sitagliptin (1000 μ g/ml)	24 saat	59	167	174	76 - 270	678	169,50 40,75 a	2,29 $\pm$ 0,12
DMSO (10 μ l/ml)	48 saat	53	150	197	101 - 267	716	179,00 $\pm$ 39,66	2,36 $\pm$ 0,19
MMC (0,16 μ g/ml)	48 saat	129	263	8	1749 - 3751	10570	2.642,50 $\pm$ 413,59	1,70 $\pm$ 0,13
Sitagliptin (250 μ g/ml)	48 saat	63	212	128	117 - 230	732	183,00 $\pm$ 26,23 a	2,18 $\pm$ 0,13 e
Sitagliptin (500 μ g/ml)	48 saat	57	240	103	91 - 207	628	157,00 $\pm$ 25,34 a	2,12 $\pm$ 0,03
Sitagliptin (1000 μ g/ml)	48 saat	173	206	21	203 - 299	1036	259,00 $\pm$ 22,57 a	1,62 $\pm$ 0,08 b,c

(p<0,05 **a**:pozitif kontrolden farklı; **b**:çözücü kontrolden farklı; **c**: 125 μ g/ml' den farklı; **d**: 250 μ g/ml' den farklı; **e**: 500 μ g/ml' den farklı)

S9 metabolik aktivasyon sonrası ortaya çıkan sitagliptin metabolitlerine maruziyetin, KKD'ne çözücü kontrolden farklı etki etmediği, fakat değerlerin pozitif kontolden farklı olduğu gözlemlendi. Her üç dozda da Pİ'nin kontrollerden istatistiksel farklılık göstermediği anlaşıldı ($p<0,05$) (Tablo 30).



Tablo 30. S9 varlığında sitagliptinin farklı uygulamaları sonucunda elde edilen proliferasyon indeksi ve kardeş kromatid değişimi ile ilgili verilerin karşılaştırılması

Test Maddesi (konsantrasyon)	Muamele	1. mitoz geçiren hücre sayısı	2.mitoz geçiren hücre sayısı	3.mitoz geçiren hücre sayısı	Minumum-Maksimum KKD sayısı	Toplam KKD sayısı	Ortalama KKD $\pm$ SE	P $\pm$ SE
DMSO (10 μ l/ml)	S9 karışımı	59	310	31	114 - 174	528	132,00 $\pm$ 14,17	1,93 $\pm$ 0,07
CP (45 μ g/ml)	S9 karışımı	72	325	3	500 - 676	2391	597,75 $\pm$ 39,46	1,83 $\pm$ 0,05
Sitagliptin (250 μ g/ml)	S9 karışımı	44	334	22	127 - 216	632	158,00 $\pm$ 20,32 a	1,95 $\pm$ 0,04
Sitagliptin (500 μ g/ml)	S9 karışımı	39	348	13	138 - 168	626	156,50 $\pm$ 7,23 a	1,94 $\pm$ 0,03
Sitagliptin (1000 μ g/ml)	S9 karışımı	82	293	25	115 - 189	628	157,00 $\pm$ 15,81 a	1,86 $\pm$ 0,05

(p<0,05 **a**:pozitif kontrolden farklı; **b**:çözücü kontrolden farklı; **c**: 125 μ g/ml' den farklı; **d**: 250 μ g/ml' den farklı; **e**: 500 μ g/ml' den farklı)

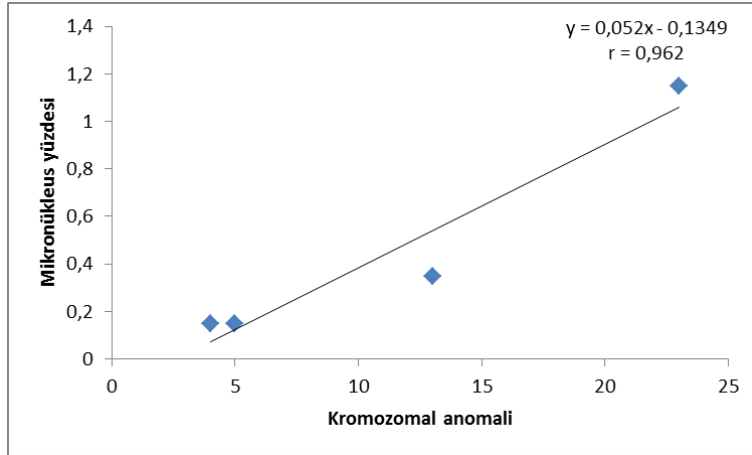
4.11. Sitagliptinin Kromozom Analizi, Mikronükleus ve Kardeş Kromatid Değişimi Yöntemleri ile Elde Edilen Parametreler Arasındaki Korelasyon

Sitagliptinin KA, MN ve KKD yöntemleri ile testlerinden elde edilen parametreleri arasındaki ilişki korelasyon analizi ile değerlendirildi. Bu amaçla;

- Kromozomal anomali-Mikronükleus oranı
- Kromozomal anomali-Kardeş kromatid değişimi oranı
- Kardeş kromatid değişimi-Mikronükleus oranı
- Mitotik indeks-Anormal hücre ortalaması
- Mitotik indeks-Nükleer bölünme indeksi
- Mitotik indeks-Proliferasyon indeksi

g)Nükleer bölünme indeksi-Proliferasyon indeksi arasındaki ilişkiler incelendi ve anlamlı bulunan sonuçların regresyon grafiği çizilerek regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı hesaplandı.

250 µg/ml’lik sitagliptin dozuna 24 saat boyunca maruz kalan gruplarda KA ile MN oranı arasında pozitif korelasyon saptandı. Korelasyon katsayısı 0,962 olarak hesaplandı. İki parametre arasında %96,2 oranında ilişki olduğu belirlendi ($p < 0,05$) (Şekil 49).



Şekil 49. 250 µg/ml’lik sitagliptinin 24 saatlik uygulaması sonucunda mikronükleus oranı ile kromozomal anomali oranı arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon grafiği ve korelasyon katsayısı

4.12. Sitagliptin Etken Maddesinin Uygulama Durumuna Göre Genotoksik ve Sitotoksik Etkilerinin Karşılaştırılması

4.12.1. 250µg/ml Sitagliptin Dozuna Ait Verilerin Karşılaştırılması

250 µg/ml’lik dozun 24 saat ve 48 saat süre ile uygulandığı gruplar ile bu etki süreleri ile S9 metabolik aktivasyonun uygulandığı gruplar arasında Mİ, KA, AHO, Pİ, KKD, NBI, MN oluşumu bakımından istatistiki açıdan anlamlı fark oluşmadı ($p<0,05$) (Tablo 31).

Tablo 31. 250µg/ml sitagliptin dozuna ait verilerin karşılaştırılması

Değerlendirilen Parametre	Uygulama	Ortalama $\pm$ Standart Hata
Mitotik İndeks	24 saat	2,34 $\pm$ 0,37
	48 saat	2,00 $\pm$ 0,44
	S9 karışımı	3,20 $\pm$ 0,50
Kromozomal Anomali	24 saat	11,25 $\pm$ 4,40
	48 saat	12,75 $\pm$ 2,02
	S9 karışımı	10,75 $\pm$ 1,70
Anormal Hücre Ortalaması	24 saat	12,75 $\pm$ 4,13
	48 saat	11,50 $\pm$ 1,44
	S9 karışımı	10,50 $\pm$ 1,71
Proliferasyon İndeksi	24 saat	2,25 $\pm$ 0,19
	48 saat	2,18 $\pm$ 0,13
	S9 karışımı	1,95 $\pm$ 0,04
Kardeş Kromatid Değişimi	24 saat	157,75 $\pm$ 22,98
	48 saat	183,00 $\pm$ 26,23
	S9 karışımı	158,00 $\pm$ 20,32
Nükleer Bölünme İndeksi	24 saat	1,97 $\pm$ 0,04
	48 saat	1,81 $\pm$ 0,06
	S9 karışımı	1,98 $\pm$ 0,05
Mikronükleus	24 saat	0,45 $\pm$ 0,24
	48 saat	0,40 $\pm$ 0,15
	S9 karışımı	0,30 $\pm$ 0,12

($p<0,05$; a: 24 saatlik uygulamadan farklı, b:48 saatlik uygulamadan farklı, c: Metabolitlerden farklı)

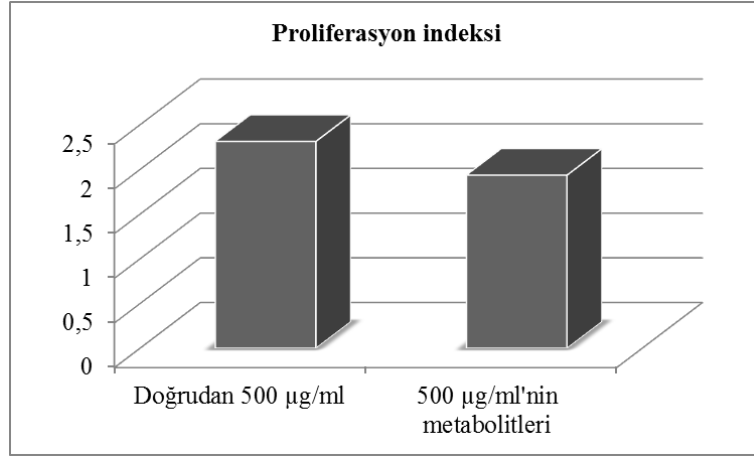
4.12.2. 500 µg/ml’lik Sitagliptin Dozuna Ait Verilerin Karşılaştırılması

500 µg/ml’lik doza ait veriler karşılaştırıldığında Pİ ve NBİ açısından istatistiksel fark olduğu görüldü ($p<0,05$) (Tablo 32). 24 saat maruz kalan kültürlerden elde edilen Pİ değerleri ile 500 µg/ml’lik dozun metabolitlerine maruz kalan grupların Pİ değerleri arasında fark olduğu saptandı. Metabolitlere ait Pİ’nin daha düşük olduğu belirlendi (Şekil 50). Metabolitlere ait NBİ’nin 48 saatlik etki grubunun NBİ’ne göre daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 51).

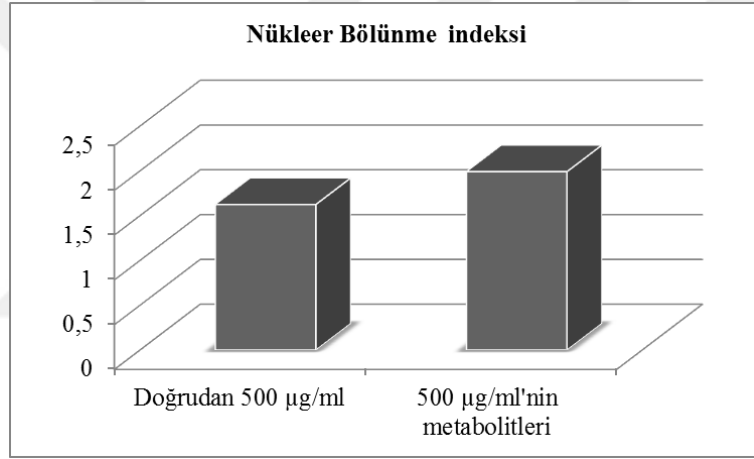
Tablo 32. 500 µg/ml sitagliptin dozuna ait verilerin karşılaştırılması

Değerlendirilen Parametre	Uygulama	Ortalama ± Standart Hata
Mitotik İndeks	24 saat	2,34 ± 0,53
	48 saat	1,96 ± 0,55
	S9 karışımı	2,58 ± 0,15
Kromozomal Anomali	24 saat	10,25 ± 3,33
	48 saat	15,25 ± 4,66
	S9 karışımı	13,50 ± 0,87
Anormal Hücre Ortalaması	24 saat	9,50 ± 2,90
	48 saat	13,25 ± 3,57
	S9 karışımı	13,00 ± 1,00
Proliferasyon İndeksi	24 saat	2,31 ± 0,12 c
	48 saat	2,12 ± 0,03
	S9 karışımı	1,93 ± 0,03 a
Kardeş Kromatid Değişimi	24 saat	179,25 ± 29,73
	48 saat	157,00 ± 25,34
	S9 karışımı	156,50 ± 7,23
Nükleer Bölünme İndeksi	24 saat	1,86 ± 0,08
	48 saat	1,62 ± 0,10 c
	S9 karışımı	1,99 ± 0,05 b
Mikronükleus	24 saat	0,39 ± 0,19
	48 saat	0,49 ± 0,20
	S9 karışımı	0,24 ± 0,09

($p<0,05$; a: 24 saatlik uygulamadan farklı, b:48 saatlik uygulamadan farklı, c: Metabolitlerden farklı)



Şekil 50. 500 µg/ml'lik sitagliptin dozuna 24 saat doğrudan maruz kalan ve metabolik aktivasyon sonrası metabolitlere maruz kalan gruplarda proliferasyon indeksi



Şekil 51. 500 µg/ml'lik sitagliptin dozuna 48 saat doğrudan maruz kalan ve metabolik aktivasyon sonrası metabolitlere maruz kalan gruplarda nükleer bölünme indeksi

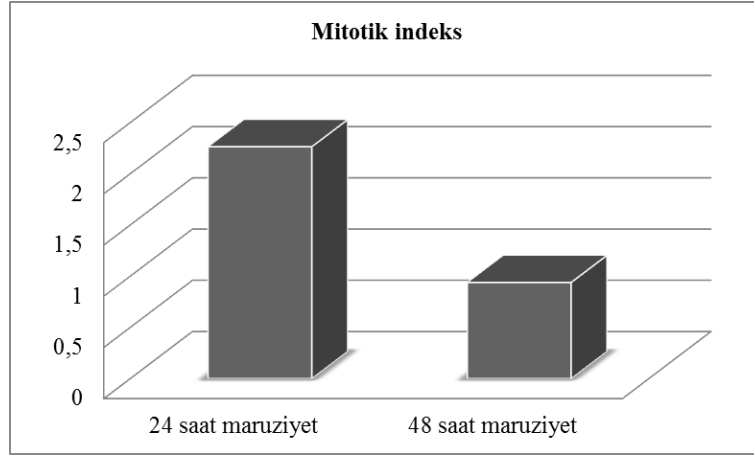
4.12.3. 1000 µg/ml’lik Sitagliptin Dozuna Ait Verilerin Karşılaştırılması

1000 µg/ml’lik sitagliptin dozuna ait veriler karşılaştırıldığında Mİ, Pİ ve NBİ açısından farklar olduğu gözlemlendi ($p<0,05$) (Tablo 33). Mİ’in 48 saatlik uygulamada 24 saatlik uygulamaya göre daha düşük olduğu belirlendi (Şekil 52). 48 saatlik uygulama grubuna ait Mİ değerlerinin, 1000 µg/ml’lik doza ait metabolitlerin Mİ değerlerinden de düşük olduğu görüldü (Şekil 53). 24 saatlik uygulama sonucunda elde edilen Pİ’nin hem 48 saatlik uygulama gruplarından (Şekil 54) hem de metabolitlerden (Şekil 55) daha yüksek olduğu saptandı. 48 saatlik uygulama gruplarının NBİ’nin hem 24 saatlik uygulama gruplarına göre (Şekil 56) hem de metabolitlere göre (Şekil 57) daha düşük olduğu anlaşıldı.

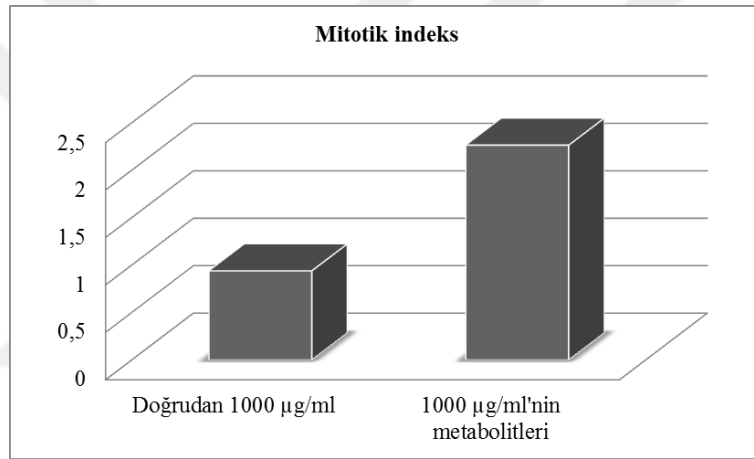
Tablo 33. 1000 µg/ml’lik sitagliptin dozuna ait verilerin karşılaştırılması

Değerlendirilen parametre	Uygulama	Ortalama ± Standart Hata
Mitotik indeks	24 saat	2,26 ± 0,24 b
	48 saat	0,94± 0,16 a, c
	S9 karışımı	2,26 ± 0,21 b
Kromozomal Anomali	24 saat	17,50± 2,84
	48 saat	17,00± 2,48
	S9 karışımı	17,00± 4,64
Anormal Hücre Ortalaması	24 saat	16,25± 2,59
	48 saat	16,75± 2,50
	S9 karışımı	15,50± 4,25
Proliferasyon İndeksi	24 saat	2,29± 0,12 b, c
	48 saat	1,62± 0,08 a
	S9 karışımı	1,86± 0,05 a
Kardeş Kromatid Değişimi	24 saat	169,50± 40,75
	48 saat	259,00± 22,57
	S9 karışımı	157,00± 15,81
Nükleer Bölünme İndeksi	24 saat	1,69± 0,08 b
	48 saat	1,19± 0,05 a, c
	S9 karışımı	1,91± 0,05 b
Mikronükleus	24 saat	0,30± 0,07
	48 saat	0,40± 0,09
	S9 karışımı	0,32± 0,06

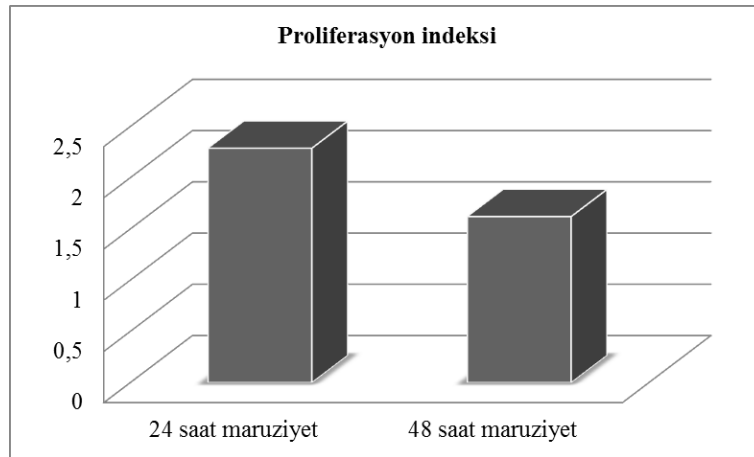
($p<0,05$; a: 24 saatlik uygulamadan farklı, b:48 saatlik uygulamadan farklı, c: Metabolitlerden farklı)



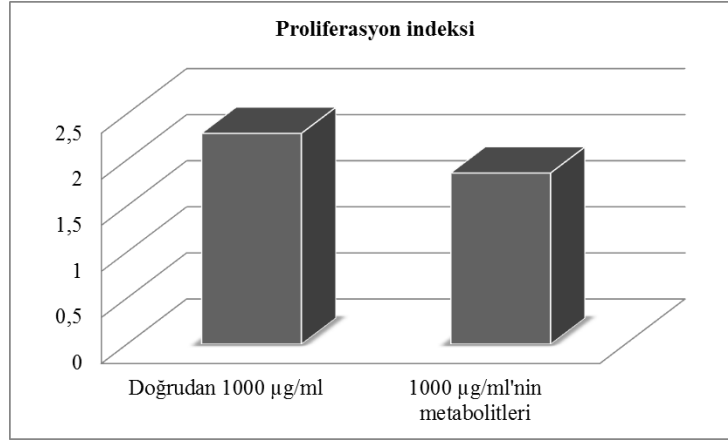
Şekil 52. 1000 µg/ml’lik sitagliptin dozuna 24 ve 48 saat maruz kalan gruplarda mitotik indeks



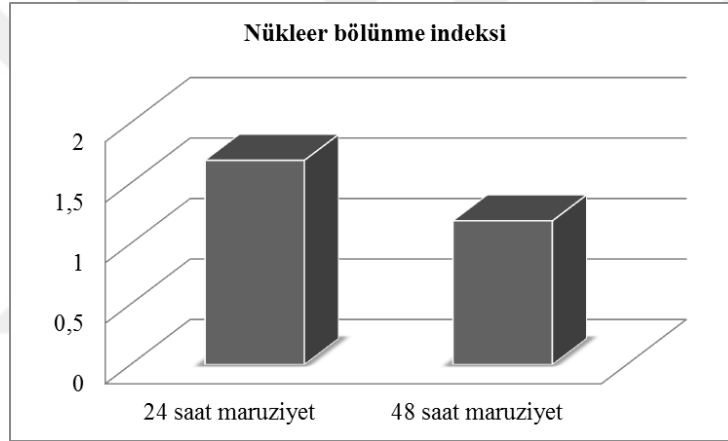
Şekil 53. 1000 µg/ml’lik sitagliptin dozuna 48 saat doğrudan maruz kalan ve metabolik aktivasyon sonrası metabolitlere maruz kalan gruplarda mitotik indeks



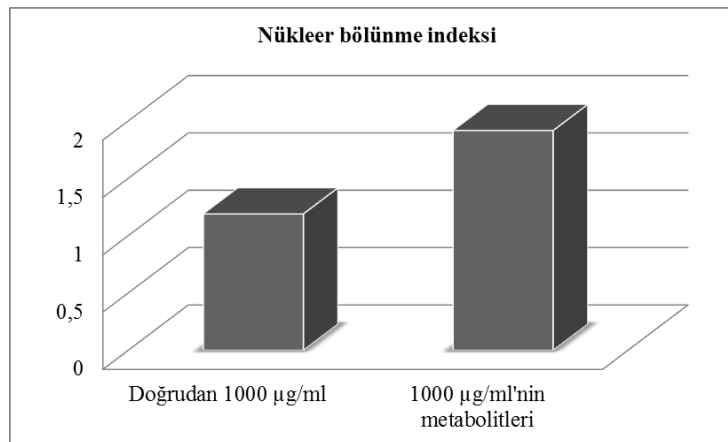
Şekil 54. 1000 µg/ml’lik sitagliptin dozuna 24 ve 48 saat maruz kalan gruplarda proliferasyon indeksi



Şekil 55. 1000 µg/ml'lik sitagliptin dozuna 24 saat doğrudan maruz kalan ve metabolik aktivasyon sonrası metabolitlere maruz kalan gruplarda proliferasyon indeksi



Şekil 56. 1000 µg/ml'lik sitagliptin dozuna 24 ve 48 saat maruz kalan gruplarda nükleer bölünme indeksi



Şekil 57. 1000 µg/ml'lik sitagliptin dozuna 48 saat doğrudan maruz kalan ve metabolik aktivasyon sonrası metabolitlere maruz kalan gruplarda nükleer bölünme indeksi

4.13. Vildagliptin ve Sitagliptin Etken Maddelerinin Genotoksik ve Sitotoksik Etkilerinin Karşılaştırılması

4.13.1. Minumum Dozlara Ait Verilerin Karşılaştırılması

Vildagliptin ve sitagliptin etken maddelerinin minumum dozlarına 24 saat süre ile maruz kalan kültür gruplarında incelenen genotoksik ve sitotoksik parametreler arasında anlamlı bir fark oluşmadığı belirlendi ($p < 0,05$) (Tablo 34).

Tablo 34. Minumum vildagliptin ile sitagliptin dozlarının 24 saatlik etkilerine ait verilerin karşılaştırılması

Değerlendirilen parametre	Vildagliptin 125 µg/ml 24 saat	Sitagliptin 250 µg/ml 24 saat	t değeri
	Ortalama ± Standart hata	Ortalama ± Standart hata	
Mitotik İndeks	2,09 ± 0,163	2,34 ± 0,368	-0,62
Kromozomal Anomali	11,759 ± 2,36	11,254 ± 4,40	0,10
Anormal Hücre Ortalaması	12,759 ± 2,29	12,754 ± 4,13	-0,37
Nükleer Bölünme İndeksi	1,989 ± 0,05	1,97 ± 0,039	0,24
Mikronükleus Yüzdesi	0,35 ± 0,05	0,45 ± 0,29	-0,41
Proliferasyon İndeksi	2,58 ± 0,04	2,25 ± 0,19	1,72
Kardeş Kromatid Değişimi	173,50 ± 12,55	157,75 ± 22,99	0,60

* $p < 0,05$

Vildagliptin ve sitagliptin etken maddelerinin minumum dozlarına 48 saat boyunca maruz kalan kültür gruplarında da genotoksik ve sitotoksik parametreler açısından istatistiksel bir fark gözlenmedi ($p<0,05$) (Tablo 35).

Tablo 35. Minumum vildagliptin ile sitagliptin dozlarının 48 saatlik etkilerine ait verilerin karşılaştırılması

Değerlendirilen parametre	Vildagliptin 125 µg/ml 48 saat	Sitagliptin 250 µg/ml 48 saat	t değeri
	Ortalama ± Standart hata	Ortalama ± Standart hata	
Mitotik İndeks	1,84 ± 0,07	2,00 ± 0,44	-0,37
Kromozomal Anomali	8,00 ± 2,04	12,75 ± 2,02	-1,66
Anormal Hücre Ortalaması	7,75 ± 1,89	11,50 ± 1,44	-1,58
Nükleer Bölünme İndeksi	1,91 ± 0,09	1,81 ± 0,06	0,93
Mikronükleus Yüzdesi	0,28 ± 0,07	0,40 ± 0,15	-0,76
Proliferasyon İndeksi	2,51 ± 0,06	2,18 ± 0,13	2,34
Kardeş Kromatid Değişimi	175,75 ± 9,20	183,00 ± 26,23	-0,26

* $p<0,05$

Minumum dozlara ait metabolitlerin verileri arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark gözlenmedi ($p<0,05$) (Tablo 36).

Tablo 36. Minumum doz metabolitlerine ait verilerin karşılaştırılması

Değerlendirilen parametre	Vildagliptin 125 µg/ml S9	Sitagliptin 250 µg/ml S9	t değeri
	Ortalama ± Standart hata	Ortalama Standart hata	
Mitotik İndeks	2,64 ± 0,14	3,20 ± 0,50	-1,08
Kromozomal Anomali	15,00 ± 2,04	10,75 ± 1,70	1,60
Anormal Hücre Ortalaması	14,00 ± 1,08	10,50 ± 1,71	1,73
Nükleer Bölünme İndeksi	1,99 ± 0,05	1,98 ± 0,05	0,07
Mikronükleus Yüzdesi	0,41 ± 0,13	0,30 ± 0,12	0,64
Proliferasyon İndeksi	1,94 ± 0,02	1,95 ± 0,04	-0,23
Kardeş Kromatid Değişimi	159,00 ± 12,38	158,00 ± 20,32	0,04

* $p<0,05$

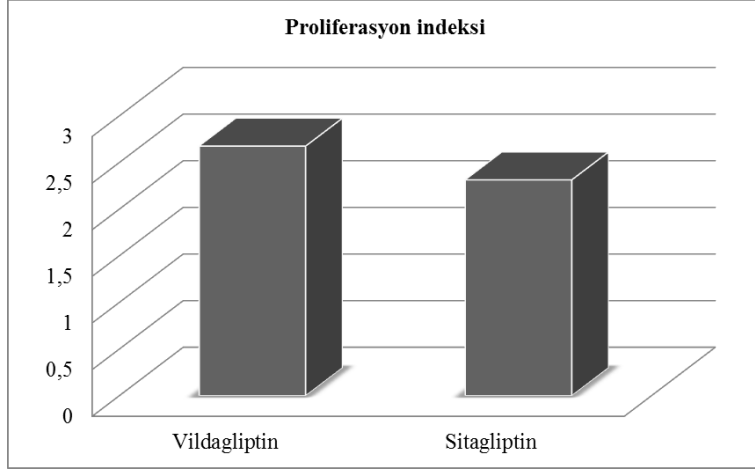
4.13.2. Ara Dozlara Ait Verilerin Karşılaştırılması

24 saat süre ile ara dozlara maruz kalan kültür gruplarının genotoksik ve sitotoksik parametreleri değerlendirildiğinde vildagliptin ve sitagliptin etken maddelerinin Pİ'leri arasında fark olduğu saptandı (Şekil 58). 500 µg/ml 'lik sitagliptin ara dozu uygulanan kültür gruplarında, Pİ'nin 250 µg/ml'lik vildagliptin ara dozu uygulanan kültür grubuna göre daha düşük olduğu belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 37).

Tablo 37. Vildagliptin ile sitagliptinin ara dozlarının 24 saatlik etkilerine ait verilerin karşılaştırılması

Değerlendirilen parametre	Vildagliptin 250 µg/ml 24 saat	Sitagliptin 500 µg/ml 24 saat	t değeri
	Ortalama ± Standart hata	Ortalama ± Standart hata	
Mitotik İndeks	2,48 ± 0,09	2,34 ± 0,53	0,26
Kromozomal Anomali	13,25 ± 2,43	10,25 ± 3,33	0,73
Anormal Hücre Ortalaması	13,25 ± 2,43	9,50 ± 2,90	0,99
Nükleer Bölünme İndeksi	1,95 ± 0,07	1,86 ± 0,08	0,84
Mikronükleus Yüzdesi	0,29 ± 0,06	0,39 ± 0,19	-0,50
Proliferasyon İndeksi	2,68 ± 0,02	2,31 ± 0,12	2,93*
Kardeş Kromatid Değişimi	164,00 ±14,75	179,25 ± 29,73	-0,46

* $p<0,05$



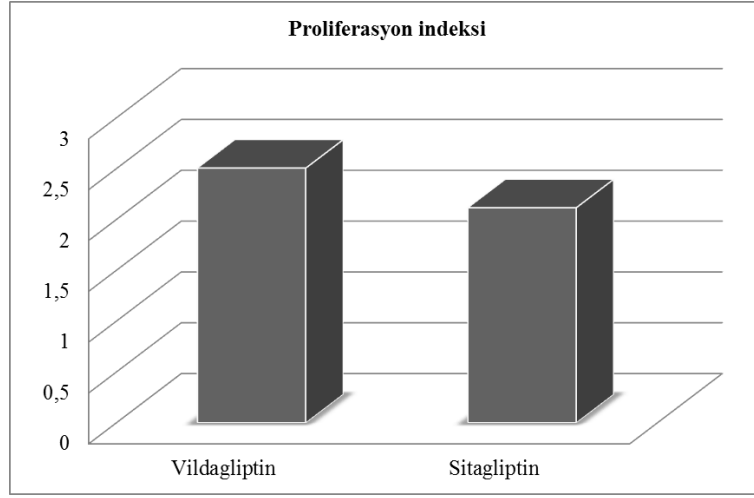
Şekil 58. Vildagliptin ve sitagliptin ara dozlarının 24 saat süre ile uygulandığı kültür gruplarında proliferasyon indeksi

Vildagliptin ve sitagliptin ara dozlarına 48 saat süre boyunca maruz kalan kültür gruplarının genotoksik ve sitotoksik parametreleri değerlendirildiğinde, etken maddelerin Pİ'leri arasında istatistiksel farklılık saptandı ($p<0,05$) (Tablo 38). 500 µg/ml 'lik sitagliptin ara dozu uygulanan kültür grubunda Pİ'nin, 250 µg/ml'lik vildagliptin ara dozu uygulanan kültür gruba göre daha düşük olduğu anlaşıldı (Şekil 59).

Tablo 38. Ara vildagliptin ve sitagliptin dozlarının 48 saatlik etkilerine ait verilerinin karşılaştırılması

Değerlendirilen parametre	Vildagliptin 250 µg/ml 48 saat	Sitagliptin 500 µg/ml 48 saat	t değeri
	Ortalama ± Standart hata	Ortalama ± Standart hata	
Mitotik İndeks	2,00 ± 0,08	1,96 ± 0,55	0,07
Kromozomal Anomali	12,25 ± 1,44	15,25 ± 4,66	-0,62
Anormal Hücre Ortalaması	11,50 ± 1,32	13,25 ± 3,57	-0,46
Nükleer Bölünme İndeksi	1,89 ± 0,07	1,62 ± 0,10	2,13
Mikronükleus Yüzdesi	7,25 ± 1,31	9,75 ± 3,97	-0,60
Proliferasyon İndeksi	2,51 ± 0,01	2,12 ± 0,03	10,89*
Kardeş Kromatid Değişimi	180,00 ± 20,47	157,00 ± 25,34	0,71

* $p<0,05$



Şekil 59. Vildagliptin ve sitagliptin ara dozlarının 48 saat süre ile uygulandığı kültür gruplarında proliferasyon indeksi

Vildagliptin ve sitagliptin ara dozlarının metabolik aktivasyon sonrası ortaya çıkan metabolitlerinden elde edilen genotoksik ve sitotoksik parametreler arasında fark gözlenmedi ($p<0,05$) (Tablo 39).

Tablo 39. Vildagliptin ile sitagliptinin ara doz metabolitlerinin etkilerine ait verilerin karşılaştırılması

Değerlendirilen parametre	Vildagliptin 250 µg/ml S9	Sitagliptin 500 µg/ml S9	t değeri
	Ortalama ± Standart hata	Ortalama ± Standart hata	
Mitotik İndeks	2,56 ± 0,09	2,58 ± 0,15	- 0,07
Kromozomal Anomali	13,25 ± 4,96	13,50 ± 0,87	- 0,05
Anormal Hücre Ortalaması	11,50 ± 4,33	13,00 ± 1,00	- 0,34
Nükleer Bölünme İndeksi	1,98 ± 0,10	1,99 ± 0,05	- 0,06
Mikronükleus Yüzdesi	0,33 ± 0,13	0,24 ± 0,09	0,55
Proliferasyon İndeksi	1,93 ± 0,02	1,94 ± 0,03	- 0,23
Kardeş Kromatid Değişimi	146,75 ± 13,09	156,50 ± 7,23	- 0,65

* $p<0,05$

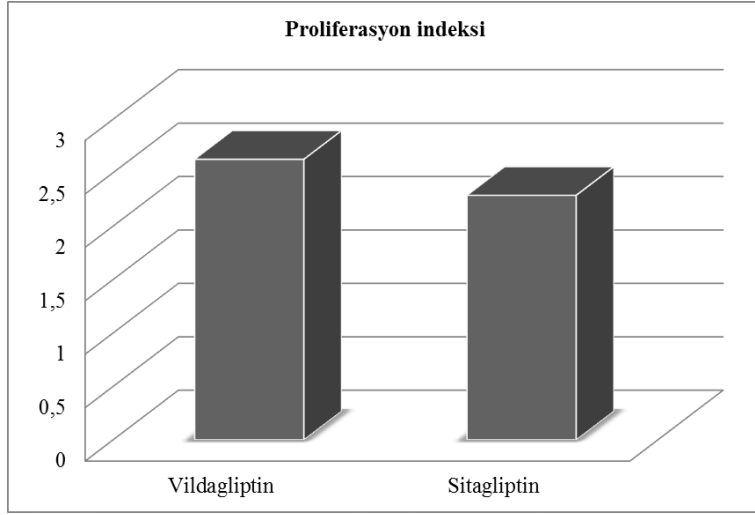
4.13.3. Maksimum Dozlara Ait Verilerin Karşılaştırılması

Vildagliptin ve sitagliptin etken maddelerinin maksimum dozuna 24 saat süre ile maruz kalan kültür gruplarının Pİ'lerinde farklılık olduğu anlaşıldı ($p<0,05$) (Tablo 40). Sitagliptinin Pİ'nin vildagliptine göre daha düşük olduğu belirlendi(Şekil 60).

Tablo 40. Maksimum vildagliptin ve sitagliptin dozlarının 24 saatlik etkilerine ait verilerin karşılaştırılması

Değerlendirilen parametre	Vildagliptin 500 µg/ml 24 saat	Sitagliptin 1000 µg/ml 24 saat	t değeri
	Ortalama ± Standart hata	Ortalama ± Standart hata	
Mitotik İndeks	1,69 ± 0,12	2,26 ± 0,24	- 2,14
Kromozomal Anomali	10,75 ± 0,48	17,50 ± 2,84	- 2,34
Anormal Hücre Ortalaması	10,25 ± 0,25	16,25 ± 2,59	- 2,30
Nükleer Bölünme İndeksi	1,89 ± 0,16	1,69 ± 0,08	1,14
Mikronükleus Yüzdesi	0,25 ± 0,07	0,30 ± 0,07	- 0,49
Proliferasyon İndeksi	2,63 ± 0,04	2,29 ± 0,12	2,74*
Kardeş Kromatid Değişimi	153,75 ± 13,42	169,50 ± 40,75	- 0,37

* $p<0,05$



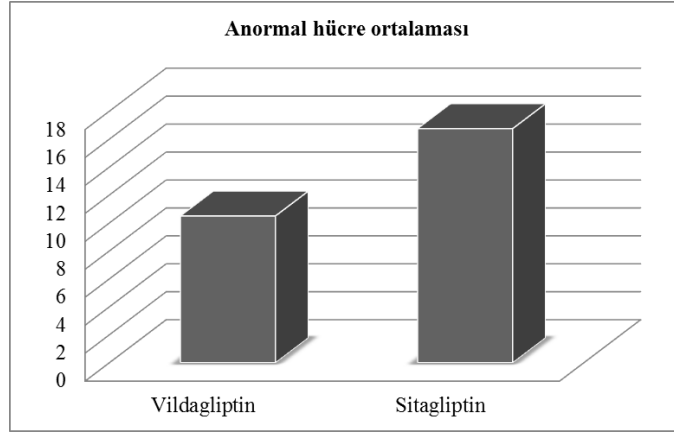
Şekil 60. Vildagliptin ile sitagliptinin maksimum dozlarının 24 saat süre ile uygulandığı kültür gruplarında proliferasyon indeksi

500 µg/ml’lik vildagliptin ile 1000 µg/ml’lik sitagliptin maksimum dozlarına 48 saat süre ile maruz kalan kültür grupların AHO, NBİ ve Pİ açısından istatistiksel farklılıklar saptandı ($p<0,05$) (Tablo 41). Maksimum sitagliptin dozunun AHO’nı arttırırken (Şekil 61), NBİ’ni (Şekil 62) ve Pİ’ni (Şekil 63) azalttığı saptandı.

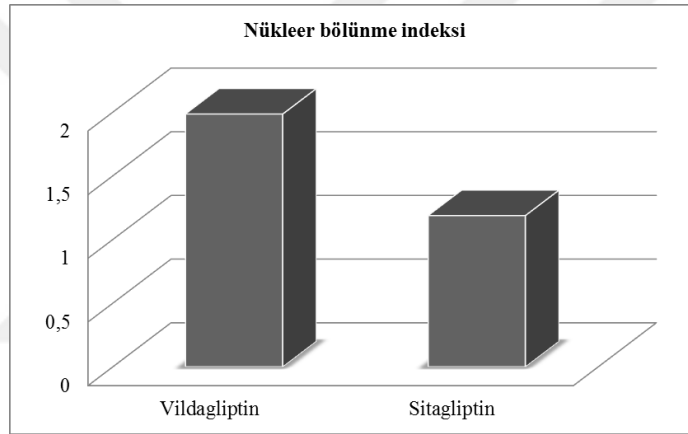
Tablo 41. Maksimum vildagliptin ile sitagliptin dozlarının 48 saatlik etkilerine ait verilerin karşılaştırılması

Değerlendirilen parametre	Vildagliptin 500 µg/ml 48 saat	Sitagliptin 1000 µg/ml 48 saat	t değeri
	Ortalama ± Standart hata	Ortalama ± Standart hata	
Mitotik İndeks	1,34 ± 0,18	0,94 ± 0,16	1,68
Kromozomal Anomali	13,00 ± 1,15	17,00 ± 2,48	- 1,46
Anormal Hücre Ortalaması	10,50 ± 0,29	16,75 ± 2,50	- 2,49*
Nükleer Bölünme İndeksi	1,99 ± 0,05	1,19 ± 0,05	11,74*
Mikronükleus Yüzdesi	0,21 ± 0,07	0,40 ± 0,09	- 1,64
Proliferasyon İndeksi	2,48 ± 0,06	1,62 ± 0,08	8,24*
Kardeş Kromatid Değişimi	188,00 ± 33,54	259,00 ± 22,57	- 1,76

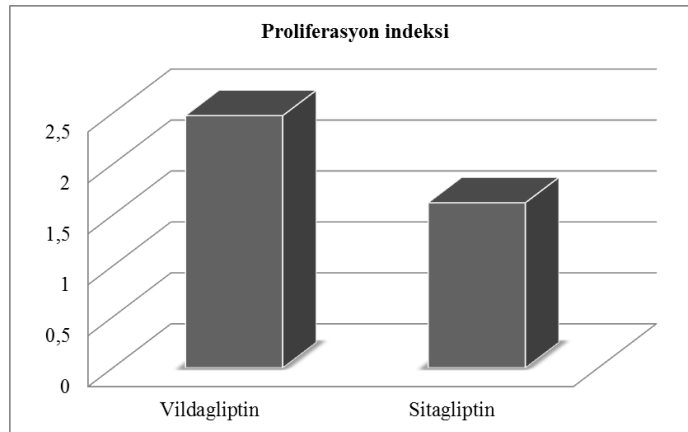
* $p<0,05$



Şekil 61. Vildagliptin ile sitagliptinin maksimum dozlarının 48 saat süre ile uygulandığı kültür gruplarında anormal hücre ortalaması



Şekil 62. Vildagliptin ile sitagliptinin maksimum dozlarının 48 saat süre ile uygulandığı kültür gruplarında nükleer bölünme indeksi



Şekil 63. Vildagliptin ile sitagliptinin maksimum dozlarının 48 saat süre ile uygulandığı kültür gruplarında proliferasyon indeksi

Maksimum doz metabolitlerinin, incelenen genotoksik ve sitotoksik parametreleri arasında istatistiksel olarak bir fark saptanmadı ($p<0,05$) (Tablo 42).

Tablo 42. Maksimum doz metabolitlerinin etkilerine ait verilerin karşılaştırılması

Değerlendirilen parametre	Vildagliptin 500 µg/ml S9 saat	Sitagliptin 1000 µg/ml S9 saat	t değeri
	Ortalama ± Standart hata	Ortalama ± Standart hata	
Mitotik İndeks	2,14 ± 0,17	2,26 ± 0,21	- 0,46
Kromozomal Anomali	14,00 ± 4,71	17,00 ± 4,64	- 0,45
Anormal Hücre Ortalaması	11,25 ± 3,07	15,50 ± 4,25	- 0,81
Nükleer Bölünme İndeksi	1,96 ± 0,05	1,91 ± 0,05	0,59
Mikronükleus Yüzdesi	0,19 ± 0,09	0,33 ± 0,06	- 1,32
Proliferasyon İndeksi	1,94 ± 0,02	1,86 ± 0,05	1,47
Kardeş Kromatid Değişimi	156,50 ± 11,71	157,00 ± 15,81	- 0,03

* $p<0,05$

5. TARTIŞMA

Yapılan çalışmada; yeni nesil antidiyabetiklerden vildagliptin ile sitagliptinin ve bu iki ilacın metabolitlerinin genotoksik ve sitotoksik etkileri *in vitro* olarak araştırıldı. Sağlıklı gönüllülerden temin edilen tam kandan yapılan periferik lenfosit kültürlerine KA, MN ve KKD yöntemleri uygulandı. Kültürlerde kullanılan etken maddelerin ve metabolitlerinin doz ve maruziyet süreleri bakımından farklı uygulamalarının KA, Mİ, AHO, MN, NBI, KKD ve Pİ üzerine etkileri ve bu parametrelerin birbirleri ile olan ilişkileri araştırıldı. Ayrıca iki etken maddenin neden olduğu değişimler istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Sayısal ve yapısal sitogenetik anomaliler, kanserden multifaktöriyel hastalıklara, infertiliteden doğum anomalilerine kadar, birçok sağlık sorunundan sorumlu tutulmaktadır. Bu sebeple, sitogenetik anomaliler, endüstriyel kimyasalların ve atıkların toksikolojik değerlendirilmesinde, yeni ilaçların geliştirilme sürecinde, ekolojik ve çevresel etkenlerin izlenmesinde, değerlendirilmesinde ve temizliğinde ve işyeri güvenliğinde indikatör olarak kullanılmaktadır. Hücre bölünmesi esnasında genetik materyalde değişikliğe neden olabilen kimyasalların genotoksisite açısından araştırılması, kanser oluşturma potansiyeline de ışık tutabilir. *İn vitro* çalışmalarda genotoksisite araştırmaları genellikle KA, KKD ve MN yöntemleriyle ile değerlendirilmektedir (Tucker ve Preston, 1996; Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011; Celik ve Eke, 2011; Gwinn ve ark., 2011).

Sayısal ve yapısal KA varlığı, MN oluşumu ve KKD'nin artan oranı, genetik materyalde meydana gelen hasarların saptanmasında ve ilaç ve kimyasalların genotoksisitelelerinin değerlendirilmesinde başvuru olan ciddi parametreleri oluşturur. (Rojas ve ark., 1993; Mark ve ark., 1994; Fenech, 2000; Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

Normal kromozom sayısı ve yapısındaki değişimler kromozom anomalileri olarak tanımlanmaktadır. Kromozomal anomalinin tipi, hücrenin kaderini de belirlemektedir. Yapısal kromozom anomalilerine; DNA kırıkları, hasarlı DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı replikasyon, replikasyon inhibisyonu ve replikasyonda görevli enzimlerin mutasyonu veya inhibisyonu gibi genetik etkenler neden olabilmektedir. Sayısal kromozom anomalileri sporadik olabileceği gibi, kimyasal indükleyiciler tarafından da oluşturabilmektedir (Tucker ve Preston, 1996; Mateuca ve ark., 2006).

Tamir edilmeyen ya da yanlış tamir edilen DNA kırıklarının, anafazda geri kalan asentrik kromozom ya da kromatid parçalarının sebep olduğu çekirdek orjinli yapılara mikronükleus denmektedir. Ayrıca, kinetokor proteinlerindeki hatalar ya da hatalı birleşen proteinler, hatalı anafaz kontrol genleri, işlevsiz iğ iplikçikleri ya da sentrik ve perisentrik bölgedeki tekrar bölgelerinin hipometilasyonu sonucu anafazda yanlış ayrılan tüm kromozomlar da mikronükleus oluşumuna sebep olabilmektedir (Fenech ve ark., 2011).

BrdU, DNA replikasyonu sırasında timinin yerine inkorpore olabilen bir baz analogudur. Rutin kromozom kültürlerine eklendiğine, UV ışığı etkisinde kalan preparatlarda bulunduğu bölgelerin soluk renkli görünmesine sebep olur. BrdU bu özelliği sayesinde, homolog rekombinasyon sonucu tamir edilen tek zincir kırıklarının teşhis edilmesini sağlamaktadır (Tucker ve Preston, 1996; Wilson ve Thompson, 2007).

Mİ, NBİ ve Pİ parametreleri, hücre çoğalmasının, bölünmesinin, DNA replikasyonunun ve hücre ölümünün değerlendirilmesinde kullanılan parametrelerdir. (Rojas ve ark., 1993; Mark ve ark., 1994; Fenech, 2000; Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011). Bunun yanı sıra kimyasal veya fiziksel ajanların sitotoksik etkilerini değerlendirilmesinde Pİ ve NBİ parametreleri kullanılmaktadır. Böylece bu parametrelerle hücre siklusu kinetiğinin ölçümü yapılabilmektedir. Bu parametre oranlarındaki düşüşler, hücre siklusundaki gecikmenin delili sayılmaktadır. Hücre siklusu sürecindeki gecikme, DNA replikasyonu başlamadan önce, varolan genotoksik hasarın tamir edilmesi için onarım sistemlerinin devreye girmesine neden olur (Laffon ve ark., 2001). Hücre siklusunun her fazında hücre siklusunun duraklamasını ve tamir mekanizmalarının uyarılmasını sağlayan kontrol noktaları mevcuttur. Tanınan sürede DNA hasarı tamir edilemiyorsa hücre apoptozise gider. (Maddika ve ark., 2007)

5.1. Vildagliptin ile Sitagliptinin Genotoksitesi

EMA, yayınladığı raporda vildagliptinin standart genotoksisite testleri sonucuna dayanarak genotoksik potansiyeli olmadığını bildirmiştir (EMA, 2012). Bizim çalışmamızda da vildagliptinin 125 µg/ml, 250 µg/ml ve 500 µg/ml’lik dozları ve bu dozlara ait metabolitlerin KA, AHO, MN ve KKD açısından genotoksiteyi indüklediği saptandı. Fakat KA ve AHO’nın doz artışına bağlı olarak yükselme eğiliminde olduğu anlaşıldı.

Vildagliptin uygulamaları sonucunda genotoksisite ve sitotoksisitenin saptanması amacıyla tespit edilen KA, MN, KKD, Mİ, NBİ ve Pİ gibi abnormalite verilerinin kontrol uygulamalarının verileri ile karşılaştırılmasıyla görülen ilişki yanında bu veriler arasında bir korelasyonun gözlenişi dikkati çekmiştir. Vildagliptinin 125 µg/ml'lik dozunun 24 saatlik uygulaması sonucu tespit edilen KA ve MN verileri arasında yüksek korelasyon görüldü. KA sonuçlarının artmasına paralel olarak MN sonuçlarının da arttığı saptandı. Fakat bu iki verinin de istatistiksel olarak genotoksik sayılamayacağı anlaşıldı. Vildagliptinin 500 µg/ml'lik dozunun 48 saatlik uygulamalarında da MN ile KKD arasında yüksek korelasyon saptandı. Korelasyon, kardeş kromatid değişim sonuçlarının artmasına karşın, mikronükleus oranının azlaması şeklindeydi. Bu ilişkiden, vildagliptinden kaynaklanan genotoksik hasarın onarılabildiği sonucuna varılmıştır

EMA, sitagliptinin için 2007 yılında yayınladığı raporda, CHO hücrelerinde *in vitro* KA, *in vivo* fare MN testi sonunda genotoksisite göstermediğini bildirmiştir (EMA, 2017). Öz Abak (2010) tarafından yapılan *in vivo* çalışmada ratlara 36 gün boyunca, oral olarak 1 mg/kg/gün, 10 mg/kg/gün ve 100 mg/kg/gün sitagliptin uygulaması yapılmış ve Comet yöntemi ile DNA hasarı incelenmiş. Sitagliptinin artan dozlarda, *in vivo* rat lenfositlerinde, hasarlı hücre oranı ve genetik hasar indeksinin doz artışına paralel olmadığı bildirilmiştir. Bir diğer *in vivo* çalışmada, 6 ay boyunca sitagliptin kullanan tip 2 diyabetli hasta grubunda, genotoksik markerların (KA, MN, KKD) ilaç kullanmayan kontrol grubundan yüksek olduğu rapor edilmiştir (Oz Gul ve ark., 2013). Engüzel (2015) tarafından yapılan bir tez çalışmasında ise sitagliptinin 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml'lik dozlarının periferik lenfositlerde, *in vitro* şartlarda, 24 ve 48 saatlik uygulamalarında KA ve KKD oranlarında önemli derecede artış gözlemlendiği bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada sitagliptinin 1000 µg/ml'lik dozunun 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinde MN oranının önemli derecede arttığı belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda sitagliptinin 250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml'lik dozlarının 24 saatlik ve 48 saatlik uygulamalarda KA, AHO, MN ve KKD oluşumunu genotoksik sayılacak kadar arttırmadığı belirlendi. Bu dozlara ait metabolitlerin de KA, MN, KKD sıklığını arttırmadığı fakat 1000 µg/ml'lik dozun AHO üzerinde zayıf genotoksisite gösterdiği saptandı.

Sitagliptinin 250 µg/ml'lik dozunun 24 saat uygulamalarında KA ile MN arasında görülen yüksek korelasyon KA oluşumunun artışıının MN oluşumunun da artışıına sebep olduğunu göstermiştir.

5.2.Vildagliptin ile Sitagliptinin Sitotoksitesi

Amritha ve ark. (2015), vildagliptinin 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml, 31,2 µg/ml, 15,6 µg/ml ve 7,8 µg/ml' lik konsantrasyonlarını kolon kanseri hücre hattında (HT-29) uygulayarak vildagliptinin hücre çoğalmasını baskıladığını ve IC₅₀ dozunun 125 µg/ml olduğunu rapor etmiştir. Bizim çalışmamızda vildagliptinin 125 µg/ml ve 250 µg/ml'lik dozlarının Mİ üzerinde zayıf sitotoksiste gösterdiği ve IC₅₀ dozu olarak belirlediğimiz 500 µg/ml'lik dozun Mİ üzerinde sitotoksiste gösterdiği saptandı. Metabolitlerin de Mİ üzerinde zayıf sitotoksik olduğu gözlemlendi. Ayrıca, Mİ üzerindeki toksik etkinin doz artışıına bağlı olarak artış gösterme eğiliminde olduğu belirlendi. NBİ'nde 250 µg/ml ve 500 µg/ml'lik dozların ve 500 µg/ml'lik metabolitlerin zayıf sitotoksik etki gösterdiği anlaşıldı. Ancak Pİ'nin hiçbir doz ve metabolit grubundan etkilenmediği görüldü. Yaptığımız çalışmada ayrıca, metabolitlerin doğrudan doz uygulamalarına göre daha yüksek Mİ değerlerine ve daha düşük Pİ değerlerine sahip olduğu belirlendi.

Vildagliptinin 500 µg/ml'lik dozunun 48 saatlik uygulamalarında Pİ ile Mİ arasında da yüksek korelasyon saptandı. Yani proliferasyon indeksinin azalması ile mitotik indeks artışı arasında yakın ilişki saptandı. Bu ilişki; vildagliptinin sebep olduğu hasarın onarılabilmesi için hücre döngüsünün yavaşladığını ve onarımın tamamlanınca mitoz bölünmenin gerçekleştirildiğini düşündürmektedir.

Femia ve ark. (2013), 1,2-dimetilhidrazin (DMH) ile indüklenerek kolon kanseri oluşturulan farelere 15 hafta boyunca 260 ppm sitagliptin uygulayarak sitagliptinin uzun süreli etkisini araştırdığı çalışmada, prekanseröz lezyonların sitagliptin uygulanan grupta kontrol grubuna göre belirgin ölçüde daha düşük görüldüğünü bildirmiştir. Engüzel (2015), uyguladığı 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml'lik sitagliptin konsantrasyonlarının Mİ'in düşmesine sebep olduğunu fakat NBİ ve Pİ üzerinde etki yapmadığını bildirmiştir. Amritha ve ark. (Amritha ve ark., 2015) sitagliptinin kolon kanseri hücre hattında (HT-29) hücre çoğalmasını baskıladığını ve IC₅₀ dozunun 31,2 µg/ml olduğunu bildirmiştir. Pinheiro ve ark. (2017) sitagliptinin 50 µg/ml'lik konsantrasyon ve üzeri dozlarının insan lenfosit kültürlerinde

hücre çoğalmasını inhibe edici etki gösterdiğini testpit etmiştir . Bizim çalışmamızda da sitagliptinin 250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml'lik dozlarının ve bu dozlara ait metabolitlerin Mİ üzerinde zayıf sitotoksikite gösterdiği belirlendi. Ayrıca dozların Mİ üzerindeki etkilerinin doz artışına bağlı olarak yükseldiği saptandı. Sitagliptinin 250 µg/ml ve 500 µg/ml'lik konsantrasyonlarının NBI'ni zayıf sitotoksik olarak etkilediği ve bu etkinin doz artışına bağlı olarak arttığı belirlendi. Metabolitlerden yalnızca maksimum doza ait olanının NBI üzerinde zayıf sitostatik etkiye sahip olduğu anlaşıldı. 1000 µg/ml'lik dozun PI üzerinde sitostatik, diğer dozların zayıf sitostatik etki gösterdiği ve bu toksik etkinin doz artışına bağlı olarak yükselme eğiliminde olduğu belirlendi. Bütün metabolit gruplarının da PI'ni zayıf sitostatik olarak etkilediği görüldü. Çalışmamızda metabolitlerin direkt sitagliptin uygulanan gruptan daha düşük PI'ne ve daha yüksek NBI'ne sahip olduğu anlaşıldı.

5.3.Vildagliptin ile Sitagliptinin Genotoksik ve Sitotoksik Etkilerinin Karşılaştırılması

Amritha ve ark. (2015) tarafından vildagliptin ve sitagliptinin antikansorejen etkilerinin kolon kanseri hücre hattında (HT-29) araştırıldığı bir çalışmada ilaçların 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml, 31,2 µg/ml, 15,6 µg/ml ve 7,8 µg/ml' lik konsantrasyonları MTT yöntemiyle analiz edilmiştir. Çalışmada vildagliptinin IC₅₀ dozu 125 µg/ml; sitagliptinin IC₅₀ dozu ise 31,2 µg/ml olarak belirlenmiş ve sitagliptinin HT-29 hücrelerinde daha etkili olduğu bildirilmiştir. (Amritha ve ark., 2015). HT-29 kolon kanseri hücre hattında yapılan çalışmada vildagliptin ile sitagliptin için belirlenen IC₅₀ dozları, sağlıklı gönüllülerden temin edilen periferik lenfositlerin kullanıldığı çalışmamıza göre, daha düşük konsantrasyonda kalmıştır. Dozlar farklı belirlenmiş olsa da, sonuçların benzerlik göstermesi anlamlı bulunmuştur. Bu çalışma ile her iki ilacın da antikanserojen etkilerinin olduğu ama sitagliptinin potansiyelinin daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Çalışmamızda vildagliptin ve sitagliptinin minimum dozlarının genotoksik ve sitotoksik açıdan farka sebep olmadığı anlaşıldı. Ara doz ve maksimum doza ait uygulamalarda, sitagliptinin PI'nin vildagliptine göre daha düşük olduğu saptandı. Ayrıca maksimum dozun uzun süreli uygulamasında sitagliptinin daha yüksek AHO ve daha düşük NBI'ne sahip olduğu belirlendi. Yaptığımız çalışmada elde edilen sonuçlar, vildagliptinin Mİ indeks üzerinde göstererek mitoz bölünmeyi baskılama potansiyeline sahip olduğunu

göstermiştir. Oysa sitagliptinin Mİ, Pİ ve NBİ üzerinde etki göstererek hem mitoz bölünme, hem çekirdek bölünmesi hem de replikasyonu baskılayabildiğini olduğunu ortaya koymuştur (Tablo 43). Tüm bu sonuçlar, sitagliptinin hücre proliferasyonunu baskılama konusunda daha etkili olduğunu ortaya koymaktadır.



Tablo 43. Vildagliptin ile sitagliptinin genotoksik ve sitotoksik etkileri

	Kromozomal Anomali			Anormal Hücre Ortalaması			Mikronükleus			Kardeş Kromatid Değişimi			Mitotoik İndeks			Nükleer Bölünme İndeksi			Proliferasyon İndeksi		
	24s	48s	S9	24s	48s	S9	24s	48s	S9	24s	48s	S9	24s	48s	S9	24s	48s	S9	24s	48s	S9
Vildagliptin 125 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Zayıf sitotoksik	Zayıf sitotoksik.	Zayıf sitotoksik.	-	-	-	-	-	-
Vildagliptin 250 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Zayıf sitotoksik.	Zayıf sitotoksik.	Zayıf sitotoksik.	-	-	-	-	-
Vildagliptin 500 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sitotoksik	Sitotoksik.	Zayıf sitotoksik.	Zayıf sitotoksik.	-	Zayıf sitotoksik.	-	-	-
Sitagliptin 250 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Zayıf sitotoksik.	Zayıf sitotoksik.	Zayıf sitotoksik.	-	-	-	Zayıf sitotoksik.	Zayıf sitotoksik.	Zayıf sitotoksik.
Sitagliptin 500 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Zayıf sitotoksik.	Zayıf sitotoksik.	Zayıf sitotoksik.	Zayıf sitotoksik.	sitotoksik.	-	Zayıf sitotoksik.	Zayıf sitotoksik.	Zayıf sitotoksik.
Sitagliptin 1000 µg/ml	-	-	-	-	-	Zayıf genotoksik.	-	-	-	-	-	-	Zayıf sitotoksik.	Zayıf sitotoksik.	Zayıf sitotoksik.	Sitotoksik.	sitotoksik.	Zayıf sitotoksik.	Zayıf sitotoksik.	Zayıf sitotoksik.	Zayıf sitotoksik.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

KA, AHO, KKD ve MN verileri vildagliptin ile sitagliptinin genotoksik etkiye sahip olmadığını, Mİ, Pİ ve NBI sonuçları ise bu iki ilacın insan periferik lenfositlerine sitotoksik ve sitostatik etkilere sahip olabileceğini ortaya koymuştur. Sitagliptinin etkisinin daha fazla olmakla birlikte sahip oldukları potansiyel onların anti-proliferatif ajan olarak da kullanılabileceğini göstermiştir.

Vildagliptin ile sitagliptinin hücre çoğalmasını baskıladığının görülmesi, bu iki ilacın hücre döngüsünü ve hücre döngüsünü kontrol eden mekanizmaları yöneten ve denetleyen genler ile bu gen ürünlerini etkileyebileceğini de düşündürmüştür. İlaçların, genler üzerinde genotoksik etki gösterip mutasyonları indüklemekten, hücre döngüsünü sadece ekspresyon profilini değiştirerek veya epigenetik yoluyla mı baskıladığı da aydınlatılması gereken bir konudur.

Kanser ilaçlarının çoğu sitotoksiktir. Sitotoksik ilaçlar sadece kanser hücrelerine özgü değildir; normal hücreleri de etkilerler ve dolayısıyla vücut için zararlıdır. Bu sebeple, kanser hücrelerine spesifik yeni ilaçların tasarlanması gerekli bir hedef olmalıdır. Metformin gibi birçok antidiyabetik ilacın kanser hücreleri üzerinde dikkate değer antikanserojen etkileri gösterilmiştir. Bu çalışmada araştırılan iki ilacın da kanser için yatkınlık gösteren tip 2 diyabet hastalarında faydalı ve koruyucu bir rol üstlenebileceği ihtimal dahilindedir. Fakat bu konuda daha kesin bir yoruma gidebilmek, bu ilaçlarla daha çok çalışmanın yapılmasına doğrudan bağlı görünmektedir.

KAYNAKLAR

- ADA. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes care 2010; 33 (Supplement 1): S62-S69.
- Ahrén B. Vildagliptin: An Inhibitor of Dipeptidyl Peptidase-4 with Antidiabetic Properties. Expert opinion on investigational drugs 2006; 15 (4): 431-442.
- Aleisa AM, Al-Rejaie SS, Bakheet SA, Al-Bekari AM, Al-Shabanah OA, Al-Majed A, Al-Yahya AA, Qureshi S. Effect of Metformin on Clastogenic and Biochemical Changes Induced by Adriamycin in Swiss Albino Mice. Mutat Res 2007; 634 (1-2): 93-100.
- Amritha CA, Kumaravelu P, Chellathai DD. Evaluation of Anti Cancer Effects of Dpp-4 Inhibitors in Colon Cancer- an Invitro Study. J Clin Diagn Res 2015; 9 (12): FC14-16.
- Atlı Şekeroğlu Z, Şekeroğlu V. Genetik Toksisite Testleri. TÜBAV Bilim Dergisi 2011; 4 (3): 221-229.
- Atmaca MH, Ecemiş GC. Oral Antidiyabetik Ajanlar. Journal of Experimental and Clinical Medicine 2012; 29 (1s):
- Attia SM, Helal GK, Alhaider AA. Assessment of Genomic Instability in Normal and Diabetic Rats Treated with Metformin. Chem Biol Interact 2009; 180 (2): 296-304.
- Aydemir M. Diyabet Tedavisinde Kullanılan Metformin, Pioglitazon, Glp1 Analogu Ve İnsülin İle Antikanser Ajanların Meme Kanseri Hücre Kültürü Üzerine Etkilerinin in Vitro Koşullarda Karşılaştırılması. Cumhuriyet Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı, Sivas, Yandal Uzmanlık Tezi, 2014; 86
- Bansal A, Pinney SE. DNA Methylation and Its Role in the Pathogenesis of Diabetes. Pediatric Diabetes 2017; 18 (3): 167-177.
- Bedir A, Aliyazicioglu Y, Kahraman H, Yurdakul Z, Uysal M, Suvaci DE, Okuyucu A, Hokelek M, Alvur M. Genotoxicity in Rats Treated with the Antidiabetic Agent, Rosiglitazone. Environ Mol Mutagen 2006; 47 (9): 718-724.
- Boyd KM. Disease, Illness, Sickness, Health, Healing and Wholeness: Exploring Some Elusive Concepts. Medical Humanities 2000; 26 (1): 9-17.
- Börçek Kasurka C. Antihistaminik İlaç Olarak Kullanılan Feksofenadin Etkin Maddesinin İnsan Periferik Lenfositleri Üzerindeki Genotoksik Etkileri. Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Ordu, Yüksek Lisans Tezi, 2010; 84
- Caballero AE. Long-Term Studies of Treatments for Type 2 Diabetes. Postgraduate Medicine 2017; 129 (3): 352-365.

- Carulli L, Rondinella S, Lombardini S, Canedi I, Loria P, Carulli N. Review Article: Diabetes, Genetics and Ethnicity. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2005; 22 (s2): 16-19.
- Celik A, Eke D. The Assessment of Cytotoxicity and Genotoxicity of Tetracycline Antibiotic in Human Blood Lymphocytes Using Cbmn and Sce Analysis, in Vitro. *International Journal of Human Genetics* 2011; 11 (1): 23-29.
- Choy M, Lam S. Sitagliptin: A Novel Drug for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Cardiol Rev* 2007; 15 (5): 264-271.
- Cordero OJ, Salgado FJ, Nogueira M. On the Origin of Serum Cd26 and Its Altered Concentration in Cancer Patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2009; 58 (11): 1723-1747.
- Cornelis MC, Hu FB. Gene-Environment Interactions in the Development of Type 2 Diabetes: Recent Progress and Continuing Challenges. *Annual review of nutrition* 2012; 32 245-259.
- de Sant'Anna JR, Franco CC, Mathias PC, de Castro-Prado MA. Assessment of in Vivo and in Vitro Genotoxicity of Glibenclamide in Eukaryotic Cells. *PLoS One* 2015; 10 (3): e0120675.
- Deacon CF. Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors in the Treatment of Type 2 Diabetes: A Comparative Review. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2011; 13 (1): 7-18.
- Deacon CF, Nauck MA, Toft-Nielsen M, Pridal L, Willms B, Holst JJ. Both Subcutaneously and Intravenously Administered Glucagon-Like Peptide I Are Rapidly Degraded from the Nh2-Terminus in Type II Diabetic Patients and in Healthy Subjects. *Diabetes* 1995; 44 (9): 1126-1131.
- Drucker DJ, Nauck MA. The Incretin System: Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists and Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors in Type 2 Diabetes. *The Lancet* 2006; 368 (9548): 1696-1705.
- Eastmond DA, Hartwig A, Anderson D, Anwar WA, Cimino MC, Dobrev I, Douglas GR, Nohmi T, Phillips DH, Vickers C. Mutagenicity Testing for Chemical Risk Assessment: Update of the Who/Ipcs Harmonized Scheme. *Mutagenesis* 2009; 24 (4): 341-349.
- EMA TEMA 2007. Januvia Inn: Sitagliptin.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000722/WC500039057.pdf 2017
- EMA TEMA 2012. Galvus: Vildagliptin.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000771/WC500020328.pdf 2017
- Engüzel C. Bir Anti-Diyabetik İlaç Etken Maddesi Olan Sitagliptin'in Tek Başına Ve Metformin İle Birlikte in Vitro Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi. *Gazi*

- Evans H, O'Riordan ML. Human Peripheral Blood Lymphocytes for the Analysis of Chromosome Aberrations in Mutagen Tests. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 1975; 31 (3): 135-148.
- Femia AP, Raimondi L, Maglieri G, Lodovici M, Mannucci E, Caderni G. Long-Term Treatment with Sitagliptin, a Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor, Reduces Colon Carcinogenesis and Reactive Oxygen Species in 1,2-Dimethylhydrazine-Induced Rats. *Int J Cancer* 2013; 133 (10): 2498-2503.
- Fenech M. The in Vitro Micronucleus Technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2000; 455 (1-2): 81-95.
- Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surrallés J, Crott JW, Parry J, Norppa H, Eastmond DA, Tucker JD, Thomas P. Molecular Mechanisms of Micronucleus, Nucleoplasmic Bridge and Nuclear Bud Formation in Mammalian and Human Cells. *Mutagenesis* 2011; 26 (1): 125-132.
- Florez JC, Hirschhorn J, Altshuler D. The Inherited Basis of Diabetes Mellitus: Implications for the Genetic Analysis of Complex Traits. *Annual review of genomics and human genetics* 2003; 4 (1): 257-291.
- Fukuda H, Matsuzawa T, Abe Y, Endo S, Yamada K, Kubota K, Hatazawa J, Sato T, Ito M, Takahashi T. Experimental Study for Cancer Diagnosis with Positron-Labeled Fluorinated Glucose Analogs:[18 F]-2-Fluoro-2-Deoxy-D-Mannose: A New Tracer for Cancer Detection. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 1982; 7 (7): 294-297.
- Garcia-Sagredo JM. Fifty Years of Cytogenetics: A Parallel View of the Evolution of Cytogenetics and Genotoxicology. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1779 (6-7): 363-375.
- George RE, Joseph S. A Review of Newer Treatment Approaches for Type-2 Diabetes: Focusing Safety and Efficacy of Incretin Based Therapy. *Saudi Pharm J* 2014; 22 (5): 403-410.
- Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergenstal RM, Gapstur SM, Habel LA, Pollak M, Regensteiner JG, Yee D. Diabetes and Cancer: A Consensus Report. *CA Cancer J Clin* 2010; 60 (4): 207-221.
- Gonzalez-Gil G, Navarrete M. On the Mechanism of Differential Giemsa Staining of Brdu-Substituted Chromatids. *Chromosoma* 1982; 86 (3): 375-382.
- Gwinn MR, Johns DO, Bateson TF, Guyton KZ. A Review of the Genotoxicity of 1, 2-Dichloroethane (Edc). *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 2011; 727 (1): 42-53.

- Harishankar MK, Logeshwaran S, Sujeevan S, Aruljothi KN, Dannie MA, Devi A. Genotoxicity Evaluation of Metformin and Glimepiride by Micronucleus Assay in Exfoliated Urothelial Cells of Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Food Chem Toxicol* 2015; 83 146-150.
- He Y-L. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Vildagliptin. *Clinical pharmacokinetics* 2012; 51 (3): 147-162.
- Horenstein RB, Shuldiner AR. Genetics of Diabetes. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 2004; 5 (1): 25-36.
- Jena GB, Kaul CL, Ramarao P. Genotoxicity Testing, a Regulatory Requirement for Drug Discovery and Development: Impact of Ich Guidelines. *Indian Journal of Pharmacology* 2002; 34 86-99.
- Kocaman AY, Rencüzoğulları E, Topaktaş M. In Vitro Investigation of the Genotoxic and Cytotoxic Effects of Thiacloprid in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Environmental toxicology* 2014; 29 (6): 631-641.
- Kontaş S, Atlı Şekeroğlu Z. Investigation of Cytotoxic and Genotoxic Effects of the Antihistaminic Drug, Loratadine, on Human Lymphocytes. *Drug and chemical toxicology* 2015; 38 (1): 57-62.
- Laffon B, Pásaro E, Méndez J. Genotoxic Effects of Styrene-7, 8-Oxide in Human White Blood Cells: Comet Assay in Relation to the Induction of Sister-Chromatid Exchanges and Micronuclei. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2001; 491 (1): 163-172.
- Levetan C. Oral Antidiabetic Agents in Type 2 Diabetes. *Curr Med Res Opin* 2007; 23 (4): 945-952.
- Ma J, Li H, Hu X, Yang L, Chen Q, Hu C, Chen Z, Tian X, Yang Y, Luo Yve ark. Cmd-05, a Novel Promising Clinical Anti-Diabetic Drug Candidate, in Vivo and Vitro Studies. *Sci Rep* 2017; 7 46628.
- Mace ML, Daskal Y, Wray W. Scanning-Electron Microscopy of Chromosome Aberrations. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1978; 52 (2): 199-206.
- Maddika S, Ande SR, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A, Eshraghi M, Manda KD, Wiechec E, Los M. Cell Survival, Cell Death and Cell Cycle Pathways Are Interconnected: Implications for Cancer Therapy. *Drug Resistance Updates* 2007; 10 (1): 13-29.
- Mahmoud JH. Antidiyabetik İlaç Etken Maddesi Metformin'in ın Vitro Genotoksik Etkileri. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Yüksek Lisans Tezi, 2013; 64
- Marble A. Diabetes and Cancer. *New England Journal of Medicine* 1934; 211 (8): 339-349.

- Mark H, Naram R, Pham T, Shah K, Cousens LP, Wiersch C, Airall E, Samy M, Zolnierz K, Mark R. A Practical Cytogenetic Protocol for in Vitro Cytotoxicity and Genotoxicity Testing. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 1994; 24 (5): 387-395.
- Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M. Chromosomal Changes: Induction, Detection Methods and Applicability in Human Biomonitoring. *Biochimie* 2006; 88 (11): 1515-1531.
- Matteucci E, Giampietro O. Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibition: Linking Chemical Properties to Clinical Safety. *Current medicinal chemistry* 2011; 18 (31): 4753-4760.
- Moorhead PS, Nowell P, Mellman WJ, Battips Dt, Hungerford D. Chromosome Preparations of Leukocytes Cultured from Human Peripheral Blood. *Experimental cell research* 1960; 20 (3): 613-616.
- Morais JF, Sant'Anna JR, Pereira TS, Franco CC, Mathias PC, de Castro-Prado MA. Genotoxic Investigation of a Thiazolidinedione Ppargamma Agonist Using the in Vitro Micronucleus Test and the in Vivo Homozygotization Assay. *Mutagenesis* 2016; 31 (4): 417-424.
- Nakachi S, Okada M, Morishima S, Agarie Y, Kitamura S, Uchibori S, Tomori S, Hanashiro T, Shimabukuro N, Tamaki K. Clinical Usefulness of Fdg-Pet/Ct for the Evaluation of Various Types of Adult T-Cell Leukemia. *Hematology* 2017; 1-8.
- OECD. Test No. 473: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test. Paris, OECD Publishing. 2016a; 22
- OECD. Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. Paris, OECD Publishing. 2016b; 29
- Okutur SK. İki Eski Dost: Diyabet Ve Kanser. *Okmeydanı Tıp Dergisi* 2015; 31 23-32.
- Oz Gul O, Cinkilic N, Gul CB, Cander S, Vatan O, Ersoy C, Yilmaz D, Tuncel E. Comparative Genotoxic and Cytotoxic Effects of the Oral Antidiabetic Drugs Sitagliptin, Rosiglitazone, and Pioglitazone in Patients with Type-2 Diabetes: A Cross-Sectional, Observational Pilot Study. *Mutat Res* 2013; 757 (1): 31-35.
- Öz Abak ES. Antidiabetik Olarak Kullanılan Sitagliptin'in Ratlarda Genotoksisitesinin Değerlendirilmesi. *Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Aydın, Yüksek Lisans Tezi*, 2010; 61
- Pinheiro MM, Stoppa CL, Valduga CJ, Okuyama CE, Gorjao R, Pereira RM, Diniz SN. Sitagliptin Inhibit Human Lymphocytes Proliferation and Th1/Th17 Differentiation in Vitro. *Eur J Pharm Sci* 2017; 100 17-24.
- Plosker GL. Sitagliptin: A Review of Its Use in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Drugs* 2014; 74 (2): 223-242.

- Riss TL, Moravec RA, Niles AL. Cytotoxicity Testing: Measuring Viable Cells, Dead Cells, and Detecting Mechanism of Cell Death. *Methods Mol Biol* 2011; 740 103-114.
- Rojas E, Herrera LA, Sordo M, Gonsebatt ME, Montero R, Rodriguez R, Ostrosky-Wegman P. Mitotic Index and Cell Proliferation Kinetics for Identification of Antineoplastic Activity. *Anti-Cancer Drugs* 1993; 4 (6): 637-640.
- Sant'Anna JR, Yajima JP, Rosada LJ, Franco CC, Prioli AJ, Della-Rosa VA, Mathias PC, Castro-Prado MA. Metformin's Performance in in Vitro and in Vivo Genetic Toxicology Studies. *Exp Biol Med (Maywood)* 2013; 238 (7): 803-810.
- Saygı Ş. Deneysel Toksikolojide Toksisite Testleri Ve Test Sonuçlarının Önemi. *Gülhane Tıp Dergisi (GTD)* 2003; 291-298.
- Scott LJ. Sitagliptin: A Review in Type 2 Diabetes. *Drugs* 2017; 1-16.
- Sen S, He Y, Koya D, Kanasaki K. Cancer Biology in Diabetes. *Journal of Diabetes Investigation* 2014; 5 (3): 251-264.
- Shaik NA, Shaik JP, Ali S, Imran A, Rao DK. Increased Frequency of Micronuclei in Diabetes Mellitus Patients Using Pioglitazone and Glimepiride in Combination. *Food Chem Toxicol* 2010; 48 (12): 3432-3435.
- Speit G. Considerations on the Mechanism of Differential Giemsa Staining of Brdu-Substituted Chromosomes. *Human genetics* 1984; 67 (3): 264-269.
- Sromova L, Busek P, Posova H, Potockova J, Skrha P, Andel M, Sedo A. The Effect of Dipeptidyl Peptidase-Iv Inhibition on Circulating T Cell Subpopulations in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2016; 118 183-192.
- Stankov K, Benc D, Draskovic D. Genetic and Epigenetic Factors in Etiology of Diabetes Mellitus Type 1. *Pediatrics* 2013; 132 (6): 1112-1122.
- Tarnowski M, Śluczanska-Głabowska S, Pawlik A, Mazurek-Mochol M, Dembowska E. Genetic Factors in Pathogenesis of Diabetes Mellitus after Kidney Transplantation. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2017; 13 439-446.
- Tucker JD, Preston RJ. Chromosome Aberrations, Micronuclei, Aneuploidy, Sister Chromatid Exchanges, and Cancer Risk Assessment. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 1996; 365 (1-3): 147-159.
- Warburg O. On the Origin of Cancer. *Science* 1956; 123 (3191): 309-314.
- WHO. Global Report on Diabetes. Fransa, WHO Press. 2016; 88
- WHO 2017a. 10 Facts on Diabetes. <http://www.who.int/features/factfiles/diabetes/en/>

WHO 2017b. Constitution of Who: Principles. <http://www.who.int/about/mission/en/>

Wilson DM, 3rd, Thompson LH. Molecular Mechanisms of Sister-Chromatid Exchange. *Mutat Res* 2007; 616 (1-2): 11-23.

Yamamoto Y, Nakajima M, Yamazaki H, Yokoi T. Cytotoxicity and Apoptosis Produced by Troglitazone in Human Hepatoma Cells. *Life Sciences* 2001; 70 (4): 471-482.

Zhang C, Bao W, Rong Y, Yang H, Bowers K, Yeung E, Kiely M. Genetic Variants and the Risk of Gestational Diabetes Mellitus: A Systematic Review. *Human Reproduction Update* 2013; 19 (4): 376-390.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Ceren BÖRÇEK KASURKA

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Tarihi: 04.11.1984

Medeni Hali: Evli, 1 çocuk annesi

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu:

2002-2007: Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (Lisans)

2007-2009: Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü (Yüksek Lisans; ders dönemi)

2009-2010: Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı (Yüksek Lisans)

2010-2017: Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı (Doktora)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

2009 – 2017: Ordu Üniversitesi

E-posta: cerenborcek@yahoo.com