

GENOTOKSİSİTE TESTLERİNİN YENİ İLAÇ GELİŞTİRME SÜRECİNDEKİ YERİ VE ÖNEMİ

By SELEN ŞEN

Genotoksisite testlerinin yeni ilaç geliştirme sürecindeki yeri ve önemi

Özet

İlaç geliştirme sürecinin başlangıcındaki prelinik araştırma döneminde, aday ilaçların genotoksisite testlerinden geçirilmesi bir zorunluluktur. Bu testlerle elde edilen genotoksisite verileri, çeşitli ülkelerdeki düzenleyici otoriteler tarafından güvenlik değerlendirme prosesinin bir parçası olarak istenmektedir. Elde edilmesi oldukça zahmetli ve maliyetli olan bu bilgilerin, farklı ülkelerin düzenleyici otoriteleri tarafından değişik standartlarda istenmesi, potansiyel ilaç adaylarının pazarlanmasını engellemekte, ilaç geliştirme sürecini kesintiye uğratmakta ve araştırmalarda gereksiz yere deney materyali kullanımına neden **13** naktadır. Bu bakımdan, günümüzde bu bilgileri elde etmeyi amaçlayan araştırmaların, ICH (İnsanda Kullanılan İlaçların Ruhsatlandırılması İçin Teknik Gerekliliklerin Uyumlandırılması Uluslararası Birliği) ve OECD (Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü) gibi uluslararası harmonizasyon örgütlerinin kılavuzlarında standardize edilen yaklaşımlarla uygulanması genel kabul görmektedir. Bu derlemede, ilaç geliştirme sürecinde kullanılan genotoksisite testlerine ilişkin, ICH, OECD kılavuzları ve literatür ışığında güncel bilgiler verilmesi amaçlanmıştır.

GİRİŞ

Günümüzde, klinik kullanımda olan bazı ilaçların tedavi edici etkileri iyileştirilmiş ve yan etkileri azaltılmış varyantlarına, bazı hastalıklar için farklı farmakolojik mekanizmalarla etki eden ilaçlara, yeni antimikrobiyalere ve kanser gibi henüz kesin tedavisi olmayan hastalıklarda kullanılabilecek etkili ilaçlara ihtiyaç vardır. Dolayısıyla, hem dünyada ve hem de ülkemizde, yeni ilaç geliştirmeye yönelik çalışmalar her geçen gün artarak devam etmektedir. Yeni geliştirilen ilaçların anlamlı biyolojik aktivitelere sahip olduğunun belirlenmesi, bunların ilaç olarak önerilebilmesi için yeterli değildir. Kemoterapide hastaları sağlık riskleri oluşturmadan tedavi etmek esastır ve ilaçların güvenilirlikleri etkinliklerinden daha önemlidir. Bu bakımdan, ilaç olarak önerilmesi düşünülen kimyasal maddeler, insanlar üzerinde kullanılmadan önce birer güvenlik testi niteliğinde olan kapsamlı toksikolojik araştırmalardan geçirilmektedir (Şen, 2018). Toksikiteyi kanıtlayan biyolojik bilginin elde edilmesi, ilaç güvenlik değerlendirilmesinin en önemli amacıdır (Jena, Kaul & Ramarao, 2002).

Toksikolojik araştırmaların safhalarından biri olan genotoksisite araştırmalarında, aday ilaçların genetik materyal üzerindeki olası zararları hücre kültürleri ve deney hayvanları üzerinde değerlendirilmektedir. Bu amaçla, *in vivo* veya *in vitro* koşullarda uygulanabilen kısa süreli genotoksisite testlerinden yararlanılmaktadır. İlaç geliştirme sürecinin başlangıcında, genotoksisite araştırmalarının yapılması çok önemlidir. Çünkü, genotoksik etkili ajanların neden olduğu DNA hasarları insanlarda doğum defektleri, kanser, infertilite, kardiyovasküler, immun sistem ve dejeneratif hastalıklar gibi ciddi sağlık sorunlarına yol açabilmektedir (Bonassi ve ark, 1995; Hagmar ve ark, 1998; Cardoso ve ark, 2001; Şen, 2018).

YENİ İLAÇ GELİŞTİRME SÜRECİ

Doğal kaynaklardan elde edilen veya laboratuvarında sentezlenen aday ilaçlar, piyasaya sunulmadan önce sırasıyla prelinik ve klinik araştırma dönemlerinden geçirilir. Prelinik araştırma dönemi; yeni ilaçların etkinlikleri ile güvenilirliklerinin sağlıklı canlı hayvanlar, izole organ preparatları ve hücre kültürleri üzerinde değerlendirildiği çalışmaları içeren 2-3 yıl süren dönemdir (İskit, 2006). Bu dönemde yürütülen çalışmaların başında, insanlar için güvenli bileşikler bulmayı amaçlayan toksikolojik araştırmalar gelir. Toksikolojik araştırmalar, toksikokinetik çalışmaları ve toksisite testlerini içerir. Toksikokinetik çalışmalarda, incelenen maddenin organizmada emilimi, dağılımı, metabolizması, biyotransformasyonu ve atılımı incelenir. Toksisite çalışmalarında ise akut, subakut, kronik, subkronik ve özel toksisite testleri yapılır. Özel toksisite testlerinde, aday

ilaç moleküllerinin genotoksik, karsinojenik, teratojenik, transplesental, immunotoksik, nörotoksik ve üremeyeyle ilgili toksik etkileri araştırılır (Brummelan, 2007).

Prelinik araştırma döneminden başarıyla geçen aktif ilaç maddeleri için, klinik araştırma dönemi başlatılır. Bu dönemde yapılan çalışmalar, insanlar üzerinde gerçekleştirebilir ve dört fazda yapılır. Faz I çalışmaları, genellikle 20-80 sağlıklı gönüllü üzerinde güvenlik ve toksisite yönünden uygun doz aralığının saptanması amacıyla yapılır. Yaklaşık 9-18 ay sürer. İlacın belirli bir uygulama yolundan verilmesiyle, insanda maksimum tolere edilebilen doz belirlenir. Bu fazın amaçları, ilacın insanlardaki güvenilirliğinin, doz sınırlayıcı istenmeyen etkilerinin, toksisitesinin, etki mekanizmasının, yapı aktivite ilişkisinin, farmakokinetik profilinin ve faz II çalışmalar için insanlara verilecek farmasötik şeklinin belirlenmesidir. Faz II çalışmaları, 100-300 hasta gönüllüde ve faz I'de saptanan tolere edilebilir doz ile 1-3 yıl devam eden çalışmalardır. Ana amacı, ilacın etkinliğini incelemektir. Diğer amaçları, ilacın hedef hasta grubundaki terapötik ve profilaktik dozunu belirlemektir (İskit, 2006).

Faz III çalışmalar, 1000-3000 hasta gönüllüde 3-4 yıl süren genellikle çok merkezli, çok uluslu, randomize, çift kör nitelikteki çalışmalardır. Bu çalışma süreci, ilacın klinik etkinliğinin ve yararlarının daha geniş bir hasta popülasyonunda değerlendirilmesini sağlar. Faz III çalışmaları ile yeterli veriler elde edildikten sonra, ürünün ilaç olarak kullanılabilmesi için onay alınması gerekir. Her ülkenin yeni ilaçlarla ilgili yapılmış preklinik ve klinik araştırmaları onaylayacak ve ilaca ruhsat verecek resmi makamları vardır. Faz IV çalışmalar, ruhsat almış bir ilaç ile yapılan pazarlama sonrası izlem çalışmalarıdır. İlacı kullanmakta olan geniş hasta topluluklarının söz konusu olduğu bu çalışmaların ana amacı, uzun süreli güvenlik verilerinin toplanmasıdır. Ayrıca, ilacın maliyet-yarar-risk oranlarının analiz edilmesi, etkinliğinin daha geniş hasta gruplarında gösterilmesi, ilaca bağlı gelişen ve ender rastlanan ciddi istenmeyen reaksiyonların ve ilaç etkileşimlerinin belirlenmesi, ilaçla ilgili cevaplanmamış soruların cevaplanması ve aynı endikasyon için kullanılan ilaçlarla yeni ilacın karşılaştırılması da amaçlanır (İskit, 2006).

Prelinik ve Klinik Dönem Araştırmalarında Düzenleyici Otoritelerin ve Uluslararası Harmonizasyon Örgütlerinin Rolü

Yeni geliştirilen bir ilacın onay alabilmesi için, prelinik ve klinik araştırma dönemlerinde elde edilen aday ilaca ait kalite, güvenlik ve etkinlik ile ilgili ayrıntılı bilgilerin ilaçların geliştirildiği ülkelerdeki düzenleyici otoritelere sunulması gerekmektedir. Bu otoriteler: Amerika'da FDA (Gıda ve İlaç Dairesi), Avrupa Birliği'nde EMEA (Avrupa İlaç Ajansı) ve Türkiye'de Sağlık Bakanlığı'dır. Şu anda, bu bilgileri elde etmek için yapılacak araştırmaların uluslararası geçerliliği olan ICH (İnsanda Kullanılan İlaçların Ruhsatlandırılması İçin Teknik Gerekliliklerin Uyumlandırılması Uluslararası Birliği) ve OECD (Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü) gibi harmonizasyon örgütlerinin yayınladığı kılavuzlarında standardize edilen ortak bir yaklaşımla uygulanması ve yorumlanması genel kabul görmektedir (Topaloğlu, 2014).

Üç büyük ilaç üreticisi olan Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Avrupa Birliği (AB) ve Japonya'nın düzenleyici makamları ile ilaç endüstrisi derneklerinin katılımıyla kurulmuş ICH, ilaç geliştirme sürecinde izlenmesi gereken yaklaşımla ilgili kalite, güvenlik, etkinlik ve multidisipliner olmak üzere dört ana başlık altında toplanan çok sayıda uyumlandırılmış kılavuz yayınlamıştır. Güvenlik başlığı altında toksikokinetik, akut/kronik toksisite, üreme toksisitesi, genotoksisite ve karsinojenite testlerine ilişkin bilgiler içeren kılavuzlar yer almaktadır (Topaloğlu, 2014). Bir diğer uluslararası harmonizasyon örgütü olan ve Türkiye'nin dahil olduğu 31 üye ülkeden oluşan OECD de, ilaçlar gibi kimyasal maddelerin insan sağlığı üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde kullanılabilecek standardize edilmiş toksikolojik test metodlarını içeren kılavuzlar yayınlamıştır (Thybaud ve ark, 2014).

ICH ve OECD Kılavuzları Perspektifinden Prelinik Genotoksisite Testleri

Son yüzyılda dünya üzerindeki kimyasal kirlenme, sanayi devrimiyle gelişen teknolojinin en büyük yan etkisidir. Havanın, suyun, toprağın, gıdaların, sigaranın ve hatta hastalıkları iyileştirmek

için kullanılır. İlaçların içindeki kimyasal maddeler bir kimyasal kirlilik havuzu oluşturmaktadır. Bu maddelerin bazıları organizmanın genetik yapısında herhangi bir değişikliğe sebep olmamakta ya da ortaya çıkan hasarlar DNA onarım enzimleri ile tamir edilebilmektedir. Ancak, bazıları gen mutasyonlarına, yapısal kromozom hatalarına veya rekombinasyonel değişimlere sebep olabilmektedir. Bu değişimler üreme hücrelerinde meydana geldiğinde, daha sonraki nesillere aktarılmaktadır. Somatik hücrelerde meydana geldiğinde ise, bireyin kendisinde çeşitli sağlık sorunlarına yol açmaktadır (Bostancı, 2014).

DNA ile ve DNA ilişkili hücresel komponentler (ör: mitotik ve mayotik iğ iplikleri, replikasyon enzimleri, DNA onarım sistemi enzimleri, hücre döngüsünü kontrol eden proteinler, apoptozis ile ilişkili gen ürünleri, oksidatif hasara karşı savunma sağlayan proteinler) ile etkileşime giren veya genomda, kromozomlarda ya da genlerde hasarlara yol açan fiziksel ve kimyasal ajanlar genotoksik etkilidir. Genotoksisite; DNA, gen veya kromozom yapısında meydana gelen DNA eklentileri, DNA zincir kırıkları, gen mutasyonları, yapısal ve sayısal kromozom anormallikleri gibi hasarları kapsayan genel bir terimdir. Genotoksik etkili ajanların hem bireyin kendisinde hem de gelecek nesillerinde neden olduğu genetik hasarlar, insanlarda ciddi sağlık sorunlarına yol açmaktadır. Özellikle, genotoksisite ile kanser arasında kuvvetli bir ilişki olduğu ve insanlar için karsinojen olan ajanların % 90'ının genotoksik etkili olduğu bildirilmiştir (Kılıç 2005; Şekeroğlu & Şekeroğlu, 2011a).

İnsanların kullanımına sunulan kimyasal maddelerin sayısında gün geçtikçe artış gözlenmesi ve genotoksik etkili olanların önemli sağlık sorunlarına yol açtığı belirlenmesi, bu tip ajanların tespit edilmesini sağlayan kısa süreli genotoksisite testlerinin geliştirilmesine neden olmuştur (Tarhan, 2006; Yırtıcı, 2007). Günümüzde bu testler; ilaçlar gibi insanların maruz kaldığı kimyasal maddelerin genotoksik potansiyellerinin tespitinde de yaygın kullanım alanı bulmuştur (Şekeroğlu & Şekeroğlu, 2011). Yeni ilaç geliştirme sürecinde, insanlar üzerinde yapılan Faz I çalışmalarına başlamadan önce bu testler ile genotoksisite verileri değerlendirilmekte ve eğer genotoksisite yoksa klinik araştırma dönemi başlatılmaktadır. İlaç geliştirmenin prelinik döneminde aday ilaç molekülleriyle yapılması gereken genotoksisite testlerinin sonuçları, ilaçların deneysel koşullardaki etkinliğinden çok daha önemlidir (Demircigil, 2009).

Günümüzde, kısa süreli genotoksisite testlerinin kullanımı, ilaçlar gibi kimyasal maddelerin genotoksisite ve karsinojenite potansiyellerinin öngörülmesinde en akılcı yaklaşımdır. Tüm dünyanın geçerliliğini kabul ederek, rutin olarak kullandığı bu testlerin farklı hücre tipleri üzerinde yapılabilen 200'den fazla çeşidi vardır (Bajpayee, Pandey, Parmar & Dhawan, 2005; Bostancı, 2014; Doğan, Durusoy, Gökçe & Öztürk, 2014). Farklı uygulamalar olmakla beraber, bu testlerde model hücre olarak genellikle bakteriler ve lenfositler gibi memeli hücreleri kullanılmaktadır (Tarhan, 2006). Kısa süreli genotoksisite testleriyle ilgili genel kanı, genotoksik etkilerin tamamı hakkında bilgi sağlayabilecek geçerlilikte bir testin olması yönündedir. Çünkü, genotoksisite farklı mekanizmalarla oluşabilmekte ve farklı yöntemler ya da organizmalar kullanılarak yapılan testlerle farklı sonuçlar alınabilmektedir. Bu bakımdan, ilaçlar gibi kimyasalların genotoksik potansiyellerinin tek bir testle belirlenemeyeceği ve birbirini tamamlayan birkaç kısa zamanlı genotoksisite testinin bir arada kullanıldığı seri test sistemleriyle değerlendirilmesi önerilmektedir (Tarhan, 2006; Yırtıcı, 2007).

ICH'nin genotoksisite testlerine ilişkin ilk kılavuzu Mart 1994'de "S2A: Farmasotikler İçin Düzenleyici Genotoksisite Testlerinin Spesifik Yönlerine İlişkin Kılavuz" (ilaçlar hususundaki genotoksisite testleri konusunda belirlenmiş test protokollerini tanıtan) yayınlanmıştır. İkinci kılavuzu ise Ekim 1996'da "S2B: Genotoksisite: Farmakotiklerin Genotoksisite Testleri Hususunda Bir Standart Seri Test Serisi Kılavuzu" (genotoksisite test koşullarında uyumun sağlanması için test koşulları, test sonuçlarının yorumlanması ve bir terimler sözlüğünü içeren ek bir dökümanı içeren) yayınlanmıştır. Bu iki kılavuz, Mart 2008'de birleştirilerek "ICH S2(R1): İnsan Kullanımı İçin Tasarlanan Farmakotiklerin Genotoksisite Testlerine ve Verilerin Yorumlanmasına İlişkin Kılavuz" başlığı altında revize edilmiştir. Kasım 2011'de ise son versiyonu hazırlanmıştır (Topaloğlu, 2014).

ICH kılavuzunda, ilaç üretiminde kullanılacak bir etken maddenin insanlar üzerinde kullanılmadan önce mutlaka standart test serisi kullanılarak genotoksik açıdan güvenilirliğinin test edilmesi gerektiği bildirilmektedir. ICH kılavuzunda, standart test serisi olarak, aynı derecede uygun olduğu kabul edilen iki seçenek önerilmektedir. Birinci seçenekte: ilk basamakta, bakteriler üzerinde gerçekleştirilen bir gen mutasyon testi (ör: *Salmonella typhimurium* suşları ile AMES testi) yapılması önerilmektedir. İkinci E12 makta, memeli hücrelerinde kromozomik hasarları belirleyebilen sitogenetik bir test (ör: *in vitro* metafaz CA testi veya *in vitro* MN testi) veya E12 *in vitro* fare lenfoma timidin kinaz testi yapılması önerilmektedir. Son basamakta ise, bir *in vivo* genotoksisite testi, genellikle rodent hematopoietik hücreleri üzerinde kromozomal hasarı belirleyebilen bir test (ya mikronukleus testi ya da metafaz hücrelerinde kromozomal anomallikler testi) yapılması önerilmektedir. *In vivo* testlerle, organizmada metabolize edildikten sonra oluşabilen genotoksik ajanların belirlenmesi mümkün olmaktadır (ICH, 2011; Brambilla, Mattioli, Rbiano & Martelli, 2012).

ICH kılavuzunda, standart test serisi için kabul edilen ikinci seçenekte: birinci basamakta, bakteriler üzerinde gerçekleştirilen bir gen mutasyon testi yapılması önerilmektedir. İkinci basamakta, iki farklı doku ile yapılan *in vivo* genotoksisite değerlendirmesi, genellikle rodent hematopoietik hücreleri kullanılarak yapılan mikronukleus analizi ve ikinci bir *in vivo* analiz (ör: karaciğerde DNA zincir kırığı analizi) yapılması önerilmektedir. Ayrıca bu kılavuzda, standartlara uygun olarak yapılan ve değerlendirilen üçlü seri test sistemi ile negatif sonuçlar veren kimyasal bileşiklerin genotoksik aktivitenin yokluğunu ispat etmek için yeterli düzeyde güvenilir oldukları belirtilmektedir. Standart seri testlerden biri veya daha fazlasıyla ile pozitif sonuç veren herhangi bir bileşiğin ise genotoksik olduğu ve risk değerlendirmesi için daha fazla test yapılması gerektiği belirtilmektedir. ICH kılavuzunda, standart üçlü test serisinin genişletilmesi ve modifiye edilmesi gereken durumların neler olduğu da bildirilmektedir (ICH, 2011).

Diğer bir harmonizasyon örgütü olan OECD'nin "Kimyasalların Test Edilmesi Hususunda Test Kılavuzları" içerisinde, "4. Bölüm: Sağlık Etkileri" başlığı altında genotoksisite/mutajenite testlerinin uygulanması ve yorumlanması hakkında bilgiler yer almaktadır (OECD, 2015). En son 2015 yılında revize edilen OECD Genetik Toksikoloji Test Kılavuzunda yer alan genotoksisite testlerinin güncel durumu Tablo 1'de görülmektedir.

Tablo 1.Genetik toksikoloji test kılavuzlarının güncel durumları (OECD, 2015)

TG	Başlık	Kabul edildi	Revize edildi	Silindi
	Yakın zamanda revize edilenler			
473	<i>In vitro</i> memeli kromozomal anomallik testi	1983	1997/2014	
474	Memeli eritrosit mikronukleus testi	1983	1997/2014	
475	Memeli kemik iliği kromozomal anomallik testi	1984	1997/2014	
476	Hprt veya xprt lokusunda <i>in vitro</i> memeli hücre gen mutasyon testi	1984	1997/2015	
478	Rodent dominant lethalite testi	1984	2015	
483	Memeli spermatogonial kromozom anomallik testi	1997	2015	
	Yakın zamanda kabul edilenler			
487	<i>In vitro</i> memeli hücre mikronukleus testi	2010	2014	
488	Transgenik rodent somatik ve germ hücre gen mutasyon analizi	2011	2013	
489	<i>In vivo</i> memeli alkali comet analizi	2014		
490	Timidin kinaz lokusu <i>in vitro</i> gen mutasyon analizi	2015		
	Arsivlenenler/Silinenler			
472	Genetik toksikoloji: <i>Escherichia coli</i> , geri mutasyon analizi	1983		1997
477	<i>Drosophila melanogaster</i> 'de eşeye bağlı resesif lethal test	1984		2013
479	Memeli hücrelerinde <i>in vitro</i> kardeş kromatit değişimi analizi	1986		2013
480	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , gen mutasyon analizi	1986		2013
481	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , mitotik rekombinasyon analizi	1986		2013
482	DNA hasarı ve onarımı, memeli hücrelerinde <i>in vitro</i> programlanmamış DNA sentezi	1986		2013
484	Fate spot test	1986		2013
	Muhafaza edilen, ancak revize edilmeyenler			

471	Bakteriyel geri mutasyon analizi	1983	1997	
475	Fare kalıtlabilir translokasyon analizi	1986		
486	Memeli hücrelerinde <i>in vivo</i> programlanmamış DNA sentezi (UDS)	1987		

TG (Test kılavuzu)

Bakteriyel Geri Mutasyon Analizi

Bakteriyel geri mutasyon analizi (genellikle AMES testi olarak adlandırılır), nokta mutasyonlarını (ör: küçük insersiyonlardan ve delesyonlardan kaynaklanan baz çifti değişimleri ve 5' rçeve kayması mutasyonları) indükleyen kimyasal maddelerin tespit edilmesini sağlamaktadır. Bu testte, ya *Salmonella typhimurium* ya da *Escherichia coli mutant* suşları kullanılmaktadır. Bu suşlar, sırasıyla ya histidin ya da triptofan aminoasitleri biyosentez genlerinin operonlarının değişik bölgelerinde çeşitli mutasyonlar içermektedir. Bu mutasyonlar, büyüme ortamında histidin veya triptofan aminoasitlerinin yokluğunda bakteriyel büyümeyi önlemektedir. Bu testin temeli, *S. typhimurium*'un histidin sentezleme ya da *E. coli*'nin triptofan sentezleme yeteneklerini mutasyon ile kaybetmiş suşlarının test maddesi ile muamele edildikten sonra ikinci bir mutasyon geçirip histidin'i veya triptofan'ı sentezleme özelliğini geri kazanması ve histidinsiz/triptofansız büyüme ortamında üreyebilmesi esasına dayanmaktadır. Histidinsiz ya da triptofansız besi ortamında üreyebilen koloniler sayılarak mutajenite belirlenmektedir. *S. typhimurium* ve *E. coli* prokaryotik bakterilerdir ve hücresel işleyiş, metabolizma, kromozom yapısı ve DNA onarım prosesleri gibi faktörler açısından ökaryotik/memeli hücrelerinden farklıdır. Bu nedenle, AMES testinin insanları da içeren memeli türlerindeki etkilerin yansıtılmasında bir miktar sınırlılıkları vardır (Oğuz, Omurtaş, Arıcıoğlu & Sardeş, 2013; Yüzbaşıoğlu, Zengin & Ünal, 2014; OECD, 2015).

Kromozomal Anormallikler (KA) Testi

Kromozomal anormallikler (KA), hasar görmüş kromozomların tamir edilememesinden, yanlış tamirinden ya da hücre bölünmesi esnasında kutuplara göçte oluşan anormalliklerden kaynaklanan ve kromozomlarda mikroskobik düzeyde gözlenebilen genetik değişikliklerdir. Bu anormallikler, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda uygulanabilen KA testi ile belirlenebilmektedir. *In vitro* KA testinde; kültüre edilmiş sperm, fibroblast, kemik iliği ya da sıklıkla periferik kan lenfositleri gibi memeli hücreleri kullanılır. *In vivo* KA testinde ise, genellikle kemik iliği hücreleri kullanılır. *In vitro* KA testinde, hücre kültürleri hasat edilmeden 2 saat önce; *in vivo* çalışmalarda ise hayvanlar sakrifiye edilmeden 2-4 saat önce bir tübülün polimerizasyon inhibitörü olan ve hücre bölünmesini metafaz safhasında durduran kolşisin uygulanır. Daha sonra, kültürlerden veya kemik iliği hücrelerinden elde edilen metafaz hücrelerinin kromozomlarında ortaya çıkan sayısal ve yapısal anormallikler tespit edilir (Bonassi ve ark, 1995; Şekeroğlu & Şekeroğlu, 2011b; Norppa ve ark, 2006; Yüzbaşıoğlu, Yılmaz, Ünal, 2014).

Bilinen veya şüphelenilen genotoksik ajanlara, çevresel veya mesleki olarak maruziyet sonrası oluşan erken biyolojik etkinin gösterilmesinde en fazla kullanılan biyoizlem testlerinden biri olan CA, diğer biyoizlem testleri arasında altın standart olarak tanımlanmıştır. Çünkü kromozomal aberasyonun indüksiyon mekanizmaları çok iyi bilinmektedir. Ayrıca çoğu mutajen veya karsinojenin kromozomal aberasyonunu indüklediği gösterilmiştir (Albertini, 2004). Tüm genomdaki hasarın izlenmesini mümkün kılan KA tekniği ile kanser riskinin erken dönemde belirlenmesi mümkündür (Bonassi ve ark, 1995; Au, 2007; Bonassi ve ark, 2000; Hagmar ve ark, 1994). İnsan popülasyonları üzerindeki yapılan çalışmalar, periferik kan lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallik sıklığının, hem genotoksik karsinojenlere maruz kalmanın erken biyolojik etkilerini, hem de kansere bireysel duyarlılığı yansıttığını dolayısıyla insanlarda kanser riskiyle ilgili bir biyolojik gösterge olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca bu çalışmalar, periferik lenfositlerdeki spontan kromozom anormalliklerinin frekansı ile kanser oluşumu arasında doğru orantı olduğunu bildirmiştir (Yüzbaşıoğlu, Zengin & Ünal, 2014; Santovito, Cervella & Delpero, 2014; Ginzkey ve ark, 2014; Zemanova ve ark, 2014).

Mikronukleus (MN) Testi

Genotoksosite ve kanserojenitenin belirlenmesinde kullanılan mikronukleus (MN) testi, mitoz geçişi tüm bitki, hayvan ve insan hücrelerinde *in vivo* ve *in vitro* olarak uygulanabilmektedir. MN testi, *in vitro* çalışmalarda nukleer bölünme indeksinin, *in vivo* çalışmalarda ise polikromatik eritrositler (PKE) ile normokromatik eritrositler (NKE) arasındaki oran kullanılarak sitotoksitenin tahmin edilmesini sağlar (Şekeroğlu & Şekeroğlu, 2011b). *In vitro* MN testinde, uygun ortamlarda inkübasyona bırakılan hücre kültürlerine, ilk mitozdan önce kültürün yaklaşık 44. saatinde küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan ve sitokinez için gerekli olan aktinin polimerizasyonunu inhibe eden sitokalesin B (Cyt-B) ilave edilir. Böylece, çekirdek bölünmesini tamamlamış ancak stoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli (binukleat) hücreler elde edilir. Inkübasyon süresi sonunda, hazırlanan preparatlarda binukleat hücrelerdeki MN'ler sayılır. *In vivo* MN testinde ise, sitokinezi bloke edilmemiş memeli eritrosit hücrelerindeki MN sıklığı belirlenir. Bu yöntemde genellikle kemik iliğindeki ve/veya periferel kan hücrelerindeki olgunlaşmamış (polikromatik) eritrositlerin MN oluşumu bakımından analizi yapılarak, test edilen bileşiğin genetik bir hasar oluşturup oluşturmadığı saptanır (Şekeroğlu & Şekeroğlu, 2011a).

Mitozun anafazında sentrik elementler kutuplara çekilirken, genotoksik ve/veya anojenik etkiler sonucu ortaya çıkmış asentrik elementler ve iğ ipliklerin bağlanamamış kromozomlar kutuplara gidemezler. Böylece hücre bölünmesi sonunda, aynı hücre sitoplazması içinde ana nukleusların yanında, onunla aynı şekil, yapı ve boyanma özelliği gösteren küçük küresel yapılar olarak gözlenirler. Bu yapılar anafaz evresinde geri kalan kromozomlar, asentrik kromozom segmentleri veya yavru nukleusa girmeyen kromozomların yoğunlaşmasıyla oluşur. Anojenler, sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenler ise kromatid veya kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna katkıda bulunurlar (Kirsch-Volders, 1997; Brambilla ve ark, 2012). Epidemiyolojik çalışmalar ve bazı kimyasalların genotoksitenin araştırıldığı çalışmalar, insan periferel lenfositlerinde artmış MN frekansı ile kanser insidansı arasında önemli bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur (Fenech ve ark, 1999; Bonassi ve ark, 2007; Parry & Kirsch-Volders, 2010; Preston, Skare & Aardema 2010; Nersesyan ve ark, 2014).

Tek Hücre Jel Elektroforezi (Komet Analizi)

Tek hücre jel elektroforezi veya yaygın olarak kullanılan adı ile komet analizi, kimyasal veya fiziksel ajanların canlı hücreler üzerindeki genotoksik etkilerinin göstergesi olan DNA hasar oranını ölçen floresan mikroskopik bir metodur. İlk olarak, insan ve hayvan hücreleri üzerinde uygulanmıştır. Daha sonra bitkiler, bakteriler, funguslar üzerinde de denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu teknikle insan hücreleri olarak en sık, lökositler ve lenfositler kullanılmaktadır. Ancak nasal veya gastrik mukoza, lens, deri, kolon, fibroblast, pankreas, üreme ve adenokarsinom gibi insan hücreleri de kullanılabilir (Fidan, 2008; Dikilitaş & Koçyiğit, 2010). Tek bir hücredeki DNA zincir kırıklarının belirlenmesini sağlayan komet testi, DNA hasarının hücresel seviyede gözlenebilmesini sağlar. Ayrıca DNA tamir aktivitesinin, alkali şartlarda tayin edilebilen hasarların, çapraz bağlanmaların ve tamamlanamamış eksizyon tamir bölgelerinin tayinine de olanak sağlar (McCart ve ark, 2010; Sukumaran & Grant, 2013). Bu analizin ayrı amaçlara yönelik olan ve genellikle kullanılan iki farklı uygulaması vardır (Rojas, Lopez & Valverde, 1999). Bu uygulamalardan biri, çözülme ve elektroforez aşamalarının nötral koşullar altında gerçekleştirildiği nötral komet tekniğidir. Bu teknikle sadece DNA çift sarmal kırıkları tayin edilebilmektedir. Teknikteki çözülme ve elektroforez aşamalarının alkali koşullar altında gerçekleştirildiği alkali komet tekniğiyle ise çift zincir kırıklarının yanı sıra tek zincir kırıkları da tanımlanabilmektedir (Kassie, Parzefall & Knassmuller, 2000).

Günümüzde en çok kullanılan metod olan alkali komet tekniğinde ilk olarak, canlı dokulardan izole edilen hücreler mikroskop lamı üzerindeki agaroz jel içerisine gömülür. Daha sonra, bu lamlar yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren lizis solüsyonunda bekletilir. Lizis solüsyonu, hücre ve çekirdek zarlarını eriterek, çekirdekteki süperkoil DNA'nın agaroz içinde

serbest kalmasını sağlar. Lizis aşamasından sonra, sarmal yapıda olan DNA zincirlerinin çözülüp gevşemesi ve kırıkların ortaya çıkması için lamlar yüksek alkali özellikteki (pH>13) elektroforez tampon çözeltisine daldırılır ve inkübasyona bırakılır. Inkübasyon tamamlandıktan sonra, DNA'lar bu tampon çözelti içerisindeki elektriksel alanda elektroforeze tabi tutulur. Elektroforezi takiben oluşan alkali ortamı nötrleştirmek ve lamlardan mikroskop altında net görüntü alınmasını sağlamak için, preparatlar nötralizasyon tamponu ile yıkanır. Nötralizasyon aşamasından sonra ise, DNA molekülleri etidium bromür gibi DNA'ya spesifik boyalarla boyanıp, görüntüleri floresan mikroskop altında incelenir (Dikilitaş & Koçyiğit, 2010).

Boyanmış preparatların mikroskopik incelemesinde, DNA'lar içerdikleri hasarın derecesine göre, dairesel formdan kuyruklu yıldız benzer forma kadar değişen görüntüler oluştururlar. Hasarsız DNA'lar, elektroforezde bütünlüklerini kaybetmeden nota doğru yürüdüklerinden dairesel şekilli görülürler. Genotoksik ajanlarla hasarlanmış, tamir mekanizmaları ile tamir edilememiş ve tek veya çift zincirlerinde kırılmalar oluşmuş DNA'lar ise, farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüklerine sahip olduklarından elektroforezde anota doğru farklı hızlarda göç ettiklerinden kuyruklu yıldız şeklinde görüntüler oluştururlar. Yönteme İngilizcede "kuyruklu yıldız" anlamına gelen komet adının verilmesi bu sebeptendir. Karakteristik komet görüntülerinin analizi, floresan mikroskop üzerine monte edilen kapalı sistem dijital kamera bağlantısı ile yapılır. Bu analizler için, özel programlar kullanılır. Programlar, komet başını kuyruktan ayırt edebilecek ve kuyruk uzunluğu, kuyruktaki DNA yoğunluğu, kuyruk momenti gibi parametreleri belirleyebilecek şekilde tasarlanmıştır (Dikilitaş & Koçyiğit, 2010).

Timidin Kinaz *Geni İn Vitro* Gen Mutasyon Analizi

Bu analizde, L 5178Y fare lenfoma ve TK6 insan lenfoblastoid hücre serilerinin timidin kinaz (Tk) geni için heterozigot olanları (Tk^{+/+}) kullanılarak, Tk geninin ifadesini etkileyerek ileri mutasyonlara neden olan kimyasallar belirlenir. (Daha önceden gerçekleşen inaktive edici bir mutasyonu geri döndürmekten ziyade, gen ürününün fonksiyonunu inaktive eden mutasyonlara ileri mutasyon denir.) Bu analizde, uygulanan test kimyasalının etkisiyle Tk geninin fonksiyonunu kaybeden mutant hücreler (Tk^{-/-}), bir pirimidin analogu olan, hücre metabolizmayı inhibe eden ve bir sonraki hücre bölünmesini durduran triflorotimidin (TFT)'in sitotoksik etkilerine direnç kazanır. Böylece, mutant hücreler TFT içeren üreme ortamında çoğalarak, mutant olmayan ve TFT'li ortamda çoğalamayan TK enzimi içeren heterozigotlar arasından seçilirler. Tk geninin, otozomal ve heterozigot doğası, tk^{+/+}'dan tk^{-/-}'ye mutasyonun ardından Tk enzimi olmayan hücrelerin tespit edilmesini sağlar. Bu eksiklik, Tk genini etkileyen gen mutasyonları (nokta mutasyonları, çerçeve kayması, küçük delesyonlar vb...) ve kromozomal olaylar (büyük delesyonlar, kromozomal yeniden düzenlenmeler ve mitotik rekombinasyon) gibi genetik olaylardan kaynaklanır (Clements, 2000; Yüzbaşıoğlu, Yılmaz, Ünal, 2016; OECD TG 490, 2015).

Bu testte, süspansiyondaki veya tek tabakalı kültürdeki hücreler, hem metabolik aktivasyon varlığında hem de yokluğunda belli sürelerde ve dozlarda test maddesine maruz bırakılır. Sonrasında, sitotoksitenin belirlenmesi ve mutant seçiminden önce fenotipik ifadenin ortaya çıkması için alt kültürler yapılır. Sitotoksitenin; fare lenfoma analizinde bağış total büyümeyle, TK6 analizinde bağış sağ kalımla belirlenir. Muameleli kültürler, indüklenen mutasyonların optik fenotipik ifadesini sağlamak için yeterli bir zaman periyodunda büyüme ortamı içerisinde sürdürülür. Fenotipik ifadeyi takiben, seçici ajan içeren ortam içerisinde mutant frekansı belirlenir. Seçici ajan içermeyen ortam içerisinde bilinen sayıda hücre ekilerek, klonlanma verimliliği belirlenir. Mutant koloni sayısına dayanarak hesaplanan mutant frekansı, mutant seleksiyonu sırasındaki klonlanma verimliliği ile doğrulanır (OECD TG 490, 2015).

Tk gen mutasyon testinde, Tk mutantlarının iki farklı fenotipik sınıfı meydana gelir. Bunlar: Tk heterozigot hücreleri ile aynı hızda büyüyen normal büyüyen mutantlar ve uzamış ikilenme zamanında büyüyen yavaş büyüyen mutantlardır. Fare lenfoma analizinde, normal büyüyen ve yavaş büyüyen mutantlar, büyük koloni ve küçük koloni mutantları olarak tanınır. TK6 analizinde ise, erken beliren koloni ve geç beliren koloni mutantları olarak tanınır. Her iki hücre tipinde de,

yavaş büyüyen mutantlar, Tk lokusunun yakınında bulunan ve büyümeyi düzenlediği düşünülen gen/genlerde genetik hasar içerir. Bu durum, uzamış ikilenme zamanına ve geç beliren veya küçük kolonilerin ortaya çıkmasına neden olur. Yavaş büyüyen mutantların indüklenmesi, kromozomal düzeyde büyük yapısal değişiklikleri indükleyen maddelerle ilişkilidir. İçerdikleri hasar Tk lokusunun yakınındaki büyümeyi düzenlediği düşünülen genleri içermeyen hücreler, atasal hücrelerle aynı hızlarda büyür ve normal büyüyen mutantlar oluşur. Normal büyüyen mutantların indüksiyonu, nokta mutasyonlarına neden olan maddelerle ilişkilidir. Sonuç olarak, hem yavaş büyüyen hem normal büyüyen mutantları sayılması, test kimyasalı tarafından indüklenen hasarın tipine dair bir bilgi sağlamak için gereklidir (OECD TG 490, 2015). Moleküler ve sitogenetik analizler, bu test ile pozitif sonuçlar elde edilen kimyasal maddelerin çoğunun memeli karsinogeni olduğunu göstermiştir. Ancak bu test ile negatif sonuçlar veren karsinogenler de vardır ve bu maddeler ya genotoksik olmayan mekanizmalarla ya da fare lenfoma hücrelerinde kolaylıkla tespit edilemeyen mekanizmalarla etki etmektedir. Dolayısıyla, bu test ile kanserojenlik arasında tam bir bağlantı yoktur (Moore ve ark, 2003).

1

Hipoksantin Guanin Fosforibozil Transferaz (HPRT) ve Ksantin Guanin Fosforibozil Transferaz (XPRT) *In Vitro* Memeli Gen Mutasyon Analizleri

Bu analizlerle, pürin biyosentezi için gerekli Hprt ve Xprt enzimlerini kodlayan lokuslarda gen mutasyonları indükleyen maddeler tespit edilir. Bu testler, kullanılan hücre serilerindeki raportör genlerdeki (endojen hipoksantin guanin fosforibozil transferaz (Hprt) geni ve ksantin guanin fosforibozil transferaz transgeni (gpt)) ileri mutasyonları belirler. HPRT testi, çok çeşitli hücre serileriyle yapılabilmektedir. En çok kullanılan hücreler: Çin hamster over (CHO), akciğer (CHL) ve akciğer fibroblast (V79) hücreleri, L5178Y fare lenfoma hücreleri ve TK6 insan lenfoblastoid hücreleridir. HPRT geninin otozomal olmayan lokasyonu nedeniyle, bu analizde tespit edilen mutasyon çeşitleri küçük insersiyon ve delesyonlardan kaynaklanan baz çifti değişimleri ve çerçeve kayması mutasyonlarını içeren nokta mutasyonlarıdır. HPRT geni, insanların ve rodentlerin sadece X kromozomu üzerinde bulunduğundan, her bir hücrede bu genin sadece bir kopyası aktiftir. Bu nedenle, sadece tek aktif HPRT lokusunda oluşan bir mutasyon bir hücre içerisinde fonksiyonel HPRT enziminin bulunmaması ile sonuçlanır (OECD TG 476, 1997; Albertini 2001).

XPRT testinde, bakteriyel gpt transgeni içeren AS52 hücreleri kullanılır. Gpt transgeni, memelilerdeki HPRT proteininin analogu olan XPRT proteinini kodlar. Gpt lokusunun otozomal lokasyonu, X kromozomlarının üzerindeki hemizigot HPRT lokusunda kolay tespit edilemeyen büyük delesyonlar ve heterozigotluğun kaybı gibi belli genetik olayların tespit edilmesini sağlar. Sonuç olarak, HPRT ve XPRT mutasyon testleri genetik olayların farklı spektrumlarını ortaya çıkarır. XPRT, günümüzde düzenleyici amaçlar için HPRT testinden çok daha az kullanılır. HPRT testinde Hprt enzim aktivitesi veya XPRT testinde Xprt enzim aktivitesi olmayan mutant hücreler, bir pürin analogu ve metabolik bir zehir olan 6-thioguanin (6-TG)'in sitostatik etkilerine dirençlidir. Bu nedenle, test kimyasalının etkisiyle oluşan mutant hücreler 6-TG'li üreme ortamında çoğalabilirler Hprt (HPRT testinde) veya gpt (XPRT testinde) enzim aktivitesi olan hücreler ise, hücre metabolizmayı inhibe eden ve daha sonraki hücre bölünmelerini inhibe eden 6-TG'ye hassastır. Dolayısıyla, Hprt veya gpt enzim aktivitesi olan normal hücreler 6-TG'li üreme ortamında çoğalamaz (OECD TG 476, 1997).

Her iki testte de, süspansiyon içerisindeki veya tek tabakalı kültürlerdeki hücreler eksojen kaynaklı metabolik aktivasyon varlığında ve yavaş büyüme hızında uygun bir zaman periyodunda (3-6 saat) test kimyasalına maruz bırakılır. Sonrasında, sitotoksitenin belirlenmesi ve mutant seçiminden önce fenotipik ifadenin ortaya çıkması için alt kültürlerir. Sitotoksitate, bağlı sağ kalım ile belirlenir. (Ör: test maddesiyle muameleden sonra kültürlerin klonlanma verimliliği ölçülür ve muamele süresince olan hücre kaybı belirlenerek negatif kontrol ile karşılaştırılır.) Muameleli kültürler, indüklenen mutasyonların fenotipik ifadesinin optimaile yakın olmasını sağlamak için yeterli bir zaman periyodunda (umumiyetle en az 7-9 gün) büyüme ortamı içerisinde devam

ettirilir. Fenotipik ifadeyi takiben, seçici ajan olan 6-TG içeren ortam içerisinde mutant frekansı belirlenir. Seçici ajan içermeyen ortama bilinen sayıda hücre ekilerek, klonlanma verimliliği (canlılığı sürdürme yeteneği) belirlenir. Uygun bir inkübasyon süresinden sonra koloniler sayılır. Mutant frekansı, seçici ortamdaki mutant kolonilerin sayısı ile seçici olmayan ortamdaki kolonilerin sayısından belirlenir. Mutant seleksiyonu ya petri kutularında (tek tabakalı kültür için) veya mikrotiter kültür plakalarında (süspansiyon hücre kültürleri için) gerçekleştirilir. HPRT veya XPRT içermeyen mutant hücreler, 6-TG'ye direnç göstermeleriyle seçilirler (OECD TG 476, 1998).

Rodent Dominant Letalite Testi

Rodent dominant letalite testi en sık fareler üzerinde yürütülür ancak sıçanlar da kullanılabilir. Bu testle erkek ebeveyn germ hücrelerinde veya fertilizasyon sonrası zigotta, dominant letal (DL) mutasyonları indükleyen maddeler tespit edilir. DL mutasyonlar, embriyonik veya fetal ölüme sebep olur. Bir test kimyasalına maruziyetin ardından bir DL mutasyonun indüksiyonu, kimyasalın test hayvanının germinal dokularını etkilediğini gösterir. DL mutasyonlar genellikle kromozomal hasarın (yapısal ve sayısal anomaliler) sonucudur. Ancak, gen mutasyonları da bertaraf edilmemelidir (OECD, 2015; Yüzbaşıoğlu, Yılmaz, Ünal, 2016). DL mutasyonu ya bir germ hücresinde oluşan veya erken dönemdeki embriyoya fertilizasyon sonrası fikse olmuş mutasyondur. Bu mutasyon, gamet disfonksiyonuna sebep olmaz ancak döllenmiş yumurta veya gelişen embriyo için letaldir. Eğer test kimyasalının ve onun metabolitlerinin erkek germ hücrelerine (ör: spermatogonial kök hücreleri ve/veya spermatogonia) ulaşamayacağına dair delil varsa, bu testi kullanmak uygun değildir (OECD TG 478, 2015).

Bu analizde genellikle erkek ratlar, test maddesiyle muamele edilir. Ancak, yumurtanın fertilizasyonunun ve embriyonik ölümün değerlendirileceği durumlarda dişi ratlar muamele edilir (OECD, 2015; Yüzbaşıoğlu, Yılmaz, Ünal, 2016). Kullanılan maruziyet ve çiftleştirme sistemi DL çalışmasının temel amacına bağlıdır. Testin başlangıcında, erkek hayvanlar test kimyasalına maruz bırakılır ve muamele edilmemiş, daha önce çiftleşmemiş dişilerle çiftleştirilir. Çiftleştirmenin ardından, dişilere uygun bir zaman periyodundan sonra ötenazi uygulanır ve implantlar ile canlı ve ölü embriyoların sayılarının belirlenmesi için uterusları incelenir. Muamele edilen gruptaki her bir dişideki canlı implantların, kontrol grubundaki her bir dişideki canlı implantlar ile karşılaştırılması ile test ajanının DL'si belirlenir. Muameleli gruptaki her bir dişideki ölü implantlardaki artış, kontrol grubundaki her bir dişideki ölü implantlardan fazla olması test maddesinin implantasyon sonrası kaybı uyardığını yansıtır. İmplantasyon sonrası kayıp; muameleli gruptaki total implant içerisindeki ölü oranının, kontrol grubundaki total implant içerisindeki ölü oranı ile karşılaştırılmasıyla hesaplanır. İmplantasyon öncesi kayıp, corpus luteumların sayısından veya muamele ve kontrol gruplarındaki her bir dişideki total implantlar karşılaştırılarak hesaplanır. Total dominant letal etki, preimplantasyonel veya postimplantasyonel kaybın toplamıdır. Total dominant letal etkinin hesaplanması, test grubundaki her bir dişideki canlı implantlar ile kontrol gruplarındaki her bir dişideki canlı implantların karşılaştırılmasına dayanır. Belirli aralıklarda implant sayısındaki azalma hücre ölümünün (ör: spermatozoid ve/veya spermatogonyum) sonucu olabilir (OECD TG 478, 2015).

1 Memeli Karaciğer Hücrelerinde *In Vivo* Programlanmamış DNA Sentezi Testi

Bu testin amacı, kimyasallarla muamele edilen hayvanların genellikle de ratların karaciğer hücrelerinde DNA onarımını indükleyen maddeleri tespit etmektir. Kimyasalların karaciğerdeki genotoksik etkilerinin araştırılmasını sağlayan *in vivo* bir metottur. Bu analizle belirlenen sonuç, karaciğer hücrelerindeki DNA hasarı ve bunu takiben gerçekleşen onarımın göstergesidir. Karaciğer genellikle absorbe edilen bileşiklerin metabolizmasındaki en önemli bölgedir. Bu nedenle, *in vivo* DNA hasarını ölçmek için en uygun bölgedir. Eğer test maddesinin hedef dokuya ulaşamayacağına dair delil varsa, bu testi kullanmak uygun değildir. Özellikle karaciğeri hedef alan ve metabolik aktivasyon varlığında AMES testi ile pozitif sonuçlar veren maddelere maruziyet sonrası oluşan DNA hasarını tespit etmek için uygun bir testtir. Bu test, sadece nükleotid kesip-

çıkarma (eksizyon) tamir mekanizması ile onarılan DNA hasar tipini indükleyen kimyasal maddelere pozitif yanıt verir (OECD TG 486, 1997).

Bu teste, hayvanlar önce test maddeleri ile uygun yolla muamele edilir. Daha sonra, hayvanların karaciğer hücrelerinin kısa süreli kültürleri genellikle karaciğerin kollajenazla *in situ* perfüzyonuyla elde edilir ve kültüre alınır. İzole edilen memeli karaciğer hücreleri genellikle trityum işaretli timidin ($^3\text{H-TdR}$) içeren bir ortamda 3-8 saat gibi uygun bir zaman uzunluğunda inkübe edilir. Böylece $^3\text{H-TdR}$ 'nin eksizyon sonrası onarım sentezi yolu ile karaciğer hücre DNA'sına dahil olması *in vitro* olarak yapılmış olur. $^3\text{H-TdR}$ alımı genellikle otoradyografiye belirlenir (OECD, 2015; OECD TG 486, 1997).

Test sonucunda bir pozitif cevabının tespit edilmesi, hasarlı bölgede çıkarılan ve yer değiştiren DNA bazlarının sayısına bağlıdır. Dolayısıyla bu analitik test maddesiyle indüklenen uzun yama onarımının (20–30 baz) belirlenmesinde çok değerlidir. Tersine, kısa yama onarımı (1–3 baz) çok daha az duyarlılıkla belirlenir. Ayrıca, mutajenik olaylar DNA hasarlarının onarılmasından, yanlış onarılmasından veya yanlış replikasyonundan kaynaklanabilir. Pozitif cevabın derecesi, onarım proseslerinin doğruluğu hakkında herhangi bir bilgi vermez. Diğer yandan, mutajenin DNA ile etkileşime girmesi ancak DNA hasarının eksizyon onarım işlemiyle onarılmasında da mümkündür. UDS testiyle elde edilen mutajenik etkinlik ile ilgili spesifik bilgi eksikliği, ulaşılan sonucun potansiyel duyarlılığının belirlenebilmesiyle telafi edilir, çünkü bu tüm genom içinde ölçülmüştür (OECD TG 486, 1997).

SONUÇ

İlaç endüstrisinde, yeni ilaçların geliştirilme sürecinin önemli bir kısmını oluşturan toksikolojik araştırmalar, kullanıma sunulacak ilaç etken maddelerinin etkinlikleri ile güvenilirlikleri arasındaki dengenin kurulmasını sağlar. Ayrıca bu araştırmalar sonucunda, yeni ilaçlarla ilgili yarar-zarar, güvenilirlik-toksisite, en yüksek tolere edilebilen doz-toksik olmayan etkili doz, LD₅₀-ED₅₀ ile ilgili soruların cevapları deney hayvanları, izole organlar veya *in vitro* koşullarda hücre kültürleri üzerinde belirlenmiş olur. Toksikolojik araştırmaların aşamalarından biri olan özel toksisite çalışmalarında, ilaç etken maddelerinin karsinojenik, immunotoksik, nörotoksik, teratojenik ve genotoksik etkileri araştırılır. Preklinik dönemde yapılan genotoksik etki araştırmalarında, ilaç adayı kimyasal bileşiklerin genetik materyal üzerinde değişiklik oluşturup oluşturmadığı değerlendirilir. İlaç etken maddeleri olarak önerilmesi düşünülen kimyasal maddelerin insanların kullanımına sunulmadan önce genotoksisite testleri gibi güvenlik testlerinden geçirilmesi ilaç geliştirmede çok önemli bir ilkedir (Şen, 2018).

Toplanması yıllarca süren ve elde edilmesi çok maliyetli olan aday ilaçlara ait genotoksisite verilerinin, farklı ülkelerin düzenleyici otoriteleri tarafından değişik formatlarda ve standartlarda istenmesi yeni ilaçların piyasaya çıkmasını geciktirmekte ve araştırmalarda gereksiz yere deney materyali kullanımına neden olmaktadır. Bu nedenle, bu verileri elde etmek için kullanılacak genotoksisite testlerinin prosedürleri, temel prensipleri ve yorumlanması hususunda dünya genelinde ortak bir stratejinin izlenmesini sağlamak amacıyla ICH ve OECD gibi harmonizasyon örgütleri kılavuzlar yayınlamıştır. Bu kılavuzlar, üye ülkeler için bağlayıcı olsa da, üye ülkelere ilaç ihraç edebilmek ve uluslararası ilaç araştırmalarında daha çok yer alabilmek için bu kılavuzlardan haberdar olmak ve bunlara uyum sağlamak gerekmektedir (Topaloğlu, 2014).

GENOTOKSİSİTE TESTLERİNİN YENİ İLAÇ GELİŞTİRME SÜRECİNDEKİ YERİ VE ÖNEMİ

ORIGINALITY REPORT

15%

SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES

1	www.csb.gov.tr Internet	228 words — 4%
2	tubav.yt.com.tr Internet	113 words — 2%
3	katalog.hacettepe.edu.tr Internet	61 words — 1%
4	acikerisim.pau.edu.tr Internet	48 words — 1%
5	YÜZBAŞIOĞLU, Deniz, ZENGİN, Nazmiye and ÜNAL, Fatma. "GIDA KORUYUCULARI ve GENOTOKSİSİTE TESTLERİ", Gıda Teknolojisi Derneği, 2014. Publications	36 words — 1%
6	xa.yimg.com Internet	36 words — 1%
7	DİKİLİTAŞ, Murat and KOÇYİĞİT, Abdurrahim. "Canlılarda "tek hücre jel elektroforez" yöntemi ile DNA hasar analizi (teknik not): comet analiz yöntemi", Harran Üniversitesi, 2010. Publications	34 words — 1%
8	ŞEKEROĞLU, Vedat and ATLI-ŞEKEROĞLU, Zülal. "Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi", Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, 2011. Publications	29 words — 1%

9	www.researchgate.net Internet	29 words — 1%
10	openaccess.inonu.edu.tr:8080 Internet	28 words — 1%
11	tip.baskent.edu.tr Internet	25 words — < 1%
12	Şaziye Sezin PALABIYIK, Terken BAYDAR, Gönül ŞAHİN. "Genotoxic Impurities in Drugs for Human: Review", <i>Turkiye Klinikleri Journal of Pharmacy Sciences</i> , 2016 Crossref	21 words — < 1%
13	www.sgs.com.tr Internet	20 words — < 1%
14	www.sagliktanabiz.com Internet	19 words — < 1%
15	Yıldız DİNÇER, Selin KANKAYA. "Comet Assay for Determining of DNA Damage: Review", <i>Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences</i> , 2010 Crossref	16 words — < 1%
16	docplayer.biz.tr Internet	14 words — < 1%
17	ÜNLÜ, Sibel and SAĞLAR, Emel. "Tek hücre jel elektroforezi yöntemi için alternatif güvenli boyalar", <i>Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi</i> , 2012. Publications	10 words — < 1%
18	www.sedagok.com Internet	9 words — < 1%

