

Mutajenik Karsinojenik Etkinin Ames Testi İle Araştırılması

Selin Oğuz¹, Gülden Z. Omurtag¹, Feyza Arıcıoğlu², Semra Şardaş¹

¹Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul - Türkiye

²Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul - Türkiye

Yazışma Adresi / Address reprint requests to: Gülden Z. Omurtag,
Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji AD, Tıbbiye Cd. 34668 Haydarpaşa, İstanbul - Türkiye
Elektronik posta adresi / E-mail address: gomurtag@hotmail.com
Kabul tarihi / Date of acceptance: 20 Haziran 2013 / June 20, 2013

ÖZET

Mutajenik karsinojenik etkinin ames testi ile araştırılması

Amaç: Kimyasalların insan hayatında daha fazla yer alması ve buna bağlı olarak kimyasal maddelerin gerekli güvenlik testlerinden geçmeden kullanılmaya başlanmasıyla birlikte kimyasalların insan sağlığı ve doğal kaynaklar üzerine olumsuz etkileri ortaya çıkmıştır. Bu sebeple birçok araştırmacı, kimyasalların karsinojenik ve mutajenik aktivitelerini inceleyip kısa zamanda sonuç veren düşük maliyetli mutajenite test sistemleri geliştirmişlerdir. Kimyasallar tarafından meydana gelen mutasyonların hücre düzeyinde belirlenmesi amacıyla kullanılan kısa zamanlı test sistemlerinden biri de Ames testidir. Ames testi, özellikle ilaç ham maddesi olarak kullanılmak istenen test maddelerinin toksik, mutajenik-karsinojenik etkilerini incelemek için güvenilir yöntemler arasında kabul edilmektedir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışma ile ilaçların geliştirilmesinde ve karsinojen maddelerin mutajenitelerinin saptanmasında kullanılan önemli bir mutajenite testi olarak kabul edilen Ames Salmonella/mikrozom Testi uygulanarak dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğunda kullanılan ilaç ham maddesi metilfenidatın mutajenik ve karsinojenik etkisi araştırılmıştır. Yöntemde Salmonella typhimurium TA 100 ve TA 98 suşları ile çalışılmıştır. TA 100 baz çifti değişimine, TA 98 ise çerçeve kaymasına yol açan mutajenlerin belirlenmesi için kullanılmıştır. Deneyler S9'lu ve S9'suz olmak üzere iki grup halinde gerçekleştirilmiştir. Test sonuçlarının ortalaması alınarak, pozitif ve negatif kontrol grupları ile karşılaştırılmış ve değerlendirilmiştir.

Bulgular: TA98 ve TA100 ile yapılan deney sonuçları değerlendirildiğinde, S9'lu ve S9'suz ortamda tüm çalışma konsantrasyonlarında revertant koloni sayıları, spontan revertant koloni sayılarından daha fazla bulunmamıştır ($p>0.05$).

Sonuç: Çalışmamızda, metilfenidatın TA 100 ve TA 98 suşları ile S9 varlığında ve yokluğunda mutajenik aktiviteye sahip olmadığı gösterilmiştir.

Anahtar sözcükler: Ames testi, karsinojenite, metilfenidat, mutajenite, S9 fraksiyonu

ABSTRACT

The investigation of mutagenic and carcinogenic effects by the ames test

Aim: Research has shown that the increased use of chemicals which are offered to consumers, sometimes without sufficient testing, has impacted human health and natural resources negatively. For this reason, many researchers have developed cost-effective test systems which can examine the carcinogenic and mutagenic activity of chemicals in a short time. Ames is an example of such a test system which can detect mutations at cellular level. Also the Ames test is accepted as a reliable method for specifically testing the toxic and mutagenic-carcinogenic effects of raw materials to be used in pharmaceuticals.

Material and Methods: In this study, the mutagenic and carcinogenic effect of methylphenidate, that is used for the treatment of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder, was investigated by the Ames Salmonella/microsome test in the absence and presence of metabolic activation. The Ames Salmonella/microsome test can play an important role to identify the mutagenic effects of carcinogenic compounds and is used for the research and development of drugs. TA 98 and TA 100 strains were used in experiments. TA 98 is designed for frame-shift mutagens and TA 100 is designed for base-pair mutagens. The mutagenic activity was screened in two groups with or without S9 metabolic activation. The results were evaluated and the mean values were compared with positive and negative controls.

Results: According to the results of experiments conducted with TA98 and TA100, revertant colony count was not found higher than those spontaneous revertant colony count among all of the concentrations and as well as under the conditions of with and without S9 ($p>0.05$).

Conclusion: In conclusion, it was shown that methylphenidate was non-mutagenic for TA 98 and TA 100 with or without S9 metabolic activation.

Key words: Ames test, carcinogenicity, methylphenidate, S9 fraction, mutagenicity

GİRİŞ

Teknolojideki hızlı gelişim ve yaşam tarzı ile birlikte kimyasalların insan hayatında daha fazla yer alması ve kimyasal maddelerin gerekli güvenlik testlerinden geçmeden kulla-

nılmaya başlanması sonucu insan sağlığı ve doğal kaynaklar üzerine olumsuz etkileri gözlenmiştir (1). Kimyasal endüstrisinin gelişmesiyle, mesleki maruziyetin sıklığındaki artışa bağlı olarak çoğu kimyasal için tehlike değerlendirilmesi gerekliliği artmaktadır (2). Dolayısıyla insan ve çevre

için önem arz eden ilaç, gıda katkı maddesi (3), kozmetik (4), tarım ilacı (5), endüstri kimyasalı (6) olarak kullanılan sentetik ve doğal kimyasal maddelerin (7) teknolojinin sağladığı imkanlar ile ayrıntılı olarak incelenmesi ve yine insan sağlığı açısından günümüzde çok önemli olan mutajenik ve karsinojenik etkilerinin araştırılması ile değerlendirilmesinin yapılarak, meydana gelebilecek risklerin kabul edilir düzeye indirilmesi gerekmektedir. Böylece genotoksik ve non-genotoksik mekanizmaların sınıflandırılması kimyasalların ve ilaçların kanser riski değerlendirmeleri açısından önem kazanmıştır (8).

Dünyada birçok ülkede kimyasalların karsinojenik ve mutajenik aktiviteleri için test sistemleri geliştirilmiş ve bu şekilde kimyasalların insanda kansere sebep olabilecekleri gözlemlenmiştir. Çalışmalar karsinojenite ve mutajenite arasında bağlantı olduğunu ortaya koyduğundan, kimyasal maddelerin mutajen/karsinojen olarak incelemesinin daha doğru olduğu kabul edilmektedir (9).

Mutasyonlar genetik materyallerin doğrudan etkilenmesi sonucu somatik hücrelerde veya germ hücrelerinde ortaya çıkmaktadır ancak her mutasyon kansere dönüşmemektedir. Kimyasal maddelerin kanser oluşturabileceği ise deneysel olarak gösterilse de her karsinojen mutajendir, ama her mutajen karsinojen değildir. Karsinojen maddeler genellikle DNA (deoksiribonükleik asit), RNA (ribonükleik asit) ve proteinlerdeki nükleofilik (elektronca zengin) gruplara kolaylıkla saldırabilen elektrofillik yapıları maddelerdir (10). Mutajenite ile karsinojenite arasındaki ilişki yüksek olduğu için karsinojen maddelerin araştırılmasında mutajenite esas alınmaktadır (11).

Mutajenik etkinin aydınlatılması ve mutajenlerin saptanması için çeşitli test sistemlerinin geliştirilmesi ve mutajenezin insanlar için oluşturduğu kalıtsal hastalık ve kanser riskinin azaltılması için yapılan çalışmalar genetik toksikolojinin en önemli araştırma alanlarından birini oluşturmaktadır (12). 1972'de Dr. Bruce Ames tarafından geliştirilmiş olan ve kimyasal maddelerin mutajenik etkilerini belirlemek amacıyla tarama testi olarak uygulanan Ames testi, çok yaygın ve güvenilir bir biçimde kısa zamanlı bakteriyel test sistemi olarak kullanılmaktadır (13).

Yaygın olarak dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu (DEHB) olan hastaların tedavisinde kullanılan metilfenidat (MPH), merkezi sinir sistemi uyarıcısı olup ilk kez Panizzon tarafından 1944'de sentezlenmiştir (14). Prefrontal korteks ve sitriatumda dopamin geri alınımını engelleyerek ve presi-

naptik alanda dopamin düzeyini arttırarak etki gösterdiği düşünülmektedir (15,16). MPH'nin kronik kullanımına bağlı olarak uzun dönemde ortaya çıkan etkileri net değildir (17). Kronik kullanımına bağlı olarak mutajenik ve karsinojenik riske neden olup olmayacağı çeşitli çalışmalar ile araştırılmıştır (18). Bu çalışmada ilaçların toksik ve mutajenik etkilerini değerlendirmek amacıyla kullanılan kısa süreli ve güvenilir testlerden biri olan Ames testi, MPH'nin mutajenik potansiyelini değerlendirmek için kullanıldı. Bu amaçla, Anabilim Dalı laboratuvarımızda önemli bir mutajenite testi olan ve ilaç geliştirilmesinde prelinik çalışmalar için de yararlanılan Ames testinin kurulması, karsinojen maddelerin Ames testi ile mutajenitelerinin saptanması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda Ames (Salmonella/Mikrozomal) testi kullanılmıştır (13). Bakteriler, petri kutusu başına 0.1 ml olacak şekilde, nutrient broth (besleyici buyyon) içinde yaklaşık 120 rpm çalkalamayla, 37°C'de, 10-14 saat boyunca (kültür yoğunluğu ml'de $1-2 \times 10^9$ bakteri) çoğaltıldı. Testin güvenilirliği açısından test suşlarının orijinal mutasyonlara sahip olup olmadıkları aşağıdaki testlerle kontrol edildi:

a. Histidin Gereksinimi: Bir gece nutrient broth içinde çoğaltılan kültürden alınan his-bakteriler, MGA ve histidin/biyotin plaklarına ekildi. Plaklar 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Histidin/biyotin plaklarında üreme gözlenirken, MGA plaklarında üreme olmadı.

b. Rfa Mutasyonu: Bu mutasyonun varlığı kristal viyole hassasiyet testiyle tanımlanmıştır. Bunun için 45°C'de tutulan 2 ml top agar içine 0.1 ml bakteri kültürü konuldu ve çalkalanarak bakterilerin agar içinde homojen dağılması sağlandı. Bakteri-top agar karışımı, NA üzerine yayıldı. Agar katılaştıktan sonra agar üzerine, 1 mg/ml konsantrasyonundaki kristal viyolede 10^8 emdirilmiş 0.5 cm çapındaki steril diskler plak ortasına yerleştirildi. Plaklar 37°C'de 12 saat tutulduktan sonra disk çevresinde bakteri üremesinin görülmediği alanın çapı ölçüldü. Rfa mutasyonu taşıyan bakterilerin yaklaşık 14 mm çapında bir zon oluşturdukları gözlemlendi (yaban tipi bakteriler disk kenarında üreyebilmektedir).

c. UVr B Mutasyonu: Bu mutasyon, ultra viyole ışınlarına duyarlılık testiyle tanımlandı. Bunun için kültürden alınan bakterilerin nütrient agar üzerine çizgi ekimi yapıldı. Cam bir kapak, ekilen kısmın yarısını kaplayacak şekilde plak üzerine örtüldü. Plak, 15 W gücünde bir UV lambasıyla 33 cm uzak-

tan 8 sn süreyle ışınlandı. Işınlama sonrasında petri kutusunun kapağı kapatıldı ve plak 37°C'de 24 saat tutuldu. Uvr B mutasyonlu suşların plakta camla kapatılan kısımda üredikleri, ışınlanan bölgede üremedikleri gözlemlendi.

d. R Faktör Varlığı: Bu test için bakteri kültürünün, ampisilinli plaklara çizgi ekimi yapıldı. Plak 37°C'de 24 saat süreyle tutuldu. Plazmidli mutantların 25⁰g/mg ampisilinde ürediği gözlemlendi.

Çalışılan bakteri suşlarının his- fenotipinden his+ fenotipine spontan olarak uyarılmadan dönüşmesi belirli limitler içinde (TA 98 için 30-50 revertant/plak ve TA 100 için 120-200 revertant /plak) değerlendirildi. Nutrient broth'ta 37°C'de 12-14 saat süreyle çoğaltılan bakterilerden 0.1 ml alınarak, 45°C'de tutulan histidin-biyotinli (0.05 mM) top agar içine eklendi. Tüp çalkalandı ve tüp içeriği 37°C'de yarım saat tutularak ısıtılmış MGA plaklarına eklendi. Plaklar 37°C'de inkübasyona bırakıldı ve 48 saat ile 72 saat sonra plaklarda görülen koloniler sayılarak his+ revertantların sayısı belirlendi.

Metabolik aktivasyon gerektiren promutajen/prekanse-rojen maddelerin bu testle saptanabilmeleri için karaciğer mikrozomları hazırlanarak kimyasalların metabolik aktivasyonları sağlanmaktadır. Test maddesinin metabolik ürünlerinin mutajen olup olmadığını araştırmak amacıyla mikrozomal enzim ekstresi (S9 Fraksiyonu) kullanılmaktadır. Mikrozomal enzim miktarının artırılması için 12 haftalık bir sıçana enzim aktivasyonu oluşturmak amacıyla sakrifiye edilmeden 3 gün önce intraperitoneal yolla 80 mg/kg dozunda Fenobarbital enjekte edildi. Fenobarbital enjekte edilmiş olan sıçan 3.gün sonunda servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Karaciğer zedelenmeden çıkarıldı ve net ağırlığı bulundu. 1 g karaciğer, 1 ml soğuk 0.15 M KCl ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra 1 g karaciğere 3 ml soğuk 0.15 M KCl eklendi. Karaciğer daha sonra steril makasla parçalandı ve doku parçaları homojenize edildi. Homojenat 8700 rpm'de 0-4°C'de 10 dak. santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant kısmı (S9) alındı ve -80°C'de saklandı.

Mutasyon deneyi için "Plak inkorporasyon" yöntemi kullanıldı. Bunun için, 45°C'lik su banyosunda tutulan ve içeriğine 2 ml'lik histidin ve biyotin eklenmiş top agar bulunan tüplere, 0.1 ml 12-14 saatlik bakteri kültürü, S9'lu deney için 0.5 ml S9 karışımı ve son konsantrasyonu 0.1 ml olacak şekilde test maddesi konuldu. Bu karışım MGA plaklarına dökülerek agarın donması beklendi. 37°C'de 48 saat inkübasyon sonrası his+ koloniler sayıldı.

Bakterilerin bilinen standart mutajenlere karşı tepkilerinin saptamak için her suş için belirlenmiş bir mutajen pozitif kontrol olarak, esas denemeye paralel şekilde testler yapıldı. MPH'nin metabolitlerinin mutajenik etkiye sahip olup olmadığının araştırılması için S9'lu pozitif kontrol önem taşımaktadır. Çalışmamızda pozitif kontrol amacıyla 2-aminofluoren kullanıldı.

İstatistiksel Analiz Yöntemi

Çalışmamızda elde edilen veriler, SPSS 17 programı kullanılarak analiz edildi. Her veri grubu için ortalama değer, standart sapma (\pm) ve en büyük ve en küçük değer arasındaki fark dahil olmak üzere kategorik değişkenler, tanımlayıcı istatistik ile belirtildi. İkili gruplar arasındaki farklılıkların analizi için Student-t testi kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmamızda, MPH'nin mutajenik aktivitesi 5 farklı konsantrasyondaki TA 98 ve TA 100 suşları kullanılarak Ames testi ile araştırılmıştır. MPH çalışma konsantrasyonları plak başına 312.5, 625, 1250, 2500 ve 5000 μ g olacak şekilde uygulanmıştır. Her doz için 3 ayrı plağa ekim yapılmış ve ortalama değerler verilmiştir. Ayrıca MPH metabolitlerinin mutajenik aktivitelerini değerlendirmek amacıyla S9 fraksiyonu varlığında, TA 98 ve TA 100 suşları ile Ames testi uygulanmıştır.

Çalışılan bakteri suşlarının his- fenotipinden his+ fenotipine spontan olarak dönüşmesi belirli limitler içinde olmalıdır. Bu limitler; TA 98 suşu için revertant koloni sayısı 30-50 revertant/plak, TA 100 için 120-200 revertant/plak'tır. Çalışmamızda TA 98 ve TA 100 suşlarının genotip kontrolleri yapılmıştır, test suşlarının orjinal mutasyonlara sahip olduğu gösterilmiştir.

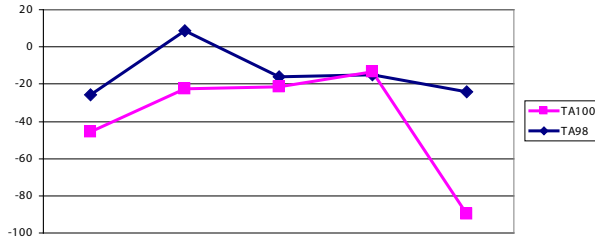
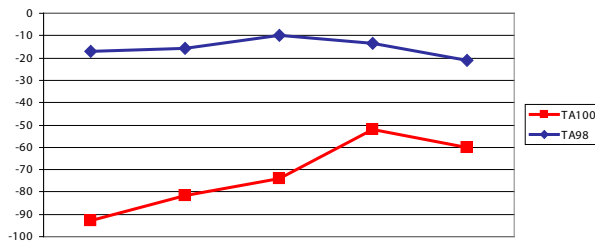
Çalışmamızda, pozitif mutajen olarak 2-aminofluoren (0.1 ml/plak) kullanılmıştır ve S9 fraksiyonlu ortamda TA 98 suşu için sayılamayacak kadar fazla revertant koloni ve TA 100 suşu için 611/plak revertant koloni sayılmıştır. S9 fraksiyonsuz ortamda ise TA 98 suşu için 1341/plak revertant koloni ve TA 100 suşu için 521/plak revertant koloni sayılmıştır.

Sonuçlar, standart sapmaları ile birlikte ortalamaları alınarak, çözücü kontrol olan dimetilsülfoksit (DMSO) sonuçları ile Student-t kullanılarak karşılaştırılmak suretiyle değerlendirilmiştir. S9 fraksiyonlu ortamda TA 98 suşu için 312.5,

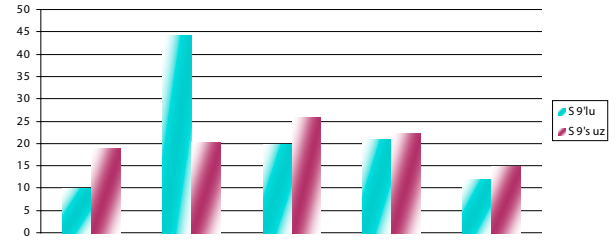
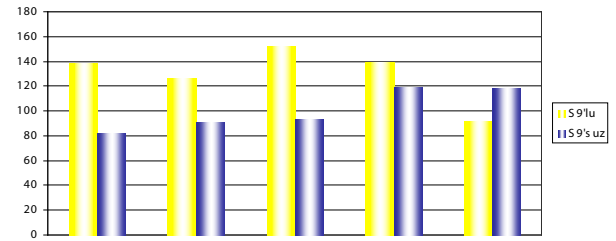
Tablo 1: MPH'nin S9'lu ve S9'suz ortamdaki TA98 ve TA100 suşları ile verdiği revertant koloni sayıları

Metilfenidat Konsantrasyonu (µg/plak)	Revertant Koloni Sayısı		
	TA98 (Ort±SS) S9 (+)	S9 (-)	TA100 (Ort±SS) S9 (+)
312.5	10±2	19±2	138.5±10.5
625	44.5±2.5	20.5±2.5	127±6
1250	20±1	26±1	152.5±19.5
2500	21±4	22.5±3.5	139.5±4.5
5000	12±1	15±0	92±7
Pozitif Kontrol 2-Amino-fluoren (0.1 ml/plak)	+++		611
DMSO (0.1 ml)		36	158

DMSO: dimetilsülfoksit; Ort±SS: ortalama±standart sapma; S9 (+): S9'lu ortam; S9 (-): S9'suz ortam

**Şekil 1:** MPH'nin S9 fraksiyonu varlığında TA 98 ve TA 100 suşları ile DMSO (dimetilsülfoksit) kontrol petriplerindeki koloni sayısı ile deney grupları petriplerindeki koloni sayısı arasındaki farkın konsantrasyona bağlı gösterimi**Şekil 2:** MPH'nin S9 fraksiyonu yokluğunda TA 98 ve TA 100 suşları ile DMSO (dimetilsülfoksit) kontrol petriplerindeki koloni sayısı ile deney grupları petriplerindeki koloni sayısı arasındaki farkın konsantrasyona bağlı gösterimi

625, 1250, 2500 ve 5000 µg konsantrasyonlarda revertant koloni sayılarının ortalamaları sırasıyla; 10±2, 44.5±2.5, 20±1, 21±4 ve 12±1 olarak bulunmuştur. S9 fraksiyonsuz ortamda ise TA98 suşu için 312.5, 625, 1250, 2500 ve 5000 µg konsantrasyonlarda revertant koloni sayılarının ortalamaları sırasıyla; 19±2, 20.5±2.5, 26±1, 22.5±3.5 ve 15±0 olarak bulunmuştur. S9 fraksiyonlu ortamda TA100 suşu için 312.5, 625, 1250, 2500 ve 5000 µg konsantrasyonlarda revertant koloni sayılarının ortalamaları sırasıyla; 138.5±10.5, 127±6, 152.5±19.5,

**Şekil 3:** MPH'nin çalışma konsantrasyonlarında S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda TA 98 suşu ile verdikleri revertant koloni sayıları**Şekil 4:** MPH'nin çalışma konsantrasyonlarında S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda TA 100 suşu ile verdikleri revertant koloni sayıları

139.5±4.5 ve 92±7 olarak bulunmuştur. S9 fraksiyonsuz ortamda ise TA100 suşu için 312.5, 625, 1250, 2500 ve 5000 µg konsantrasyonlarda revertant koloni sayılarının ortalamaları sırasıyla; 82±8, 91.5±11.5, 94±1, 119.5±1.5 ve 119±5 olarak bulunmuştur. 1'de MPH'nin farklı konsantrasyonlarında bulunan revertant koloni sayıları yer almaktadır.

TA 98 ve TA 100 ile yapılan deney sonuçları değerlendirildiğinde, S9'lu ve S9'suz ortamda tüm çalışma konsantrasyonlarında revertant koloni sayıları, spontan revertant koloni sayılarından daha fazla bulunmamıştır (p>0.05).

Test bakterilerinin TA 98 ve TA 100 suşlarında MPH ile S9'lu ve S9'suz ortamda verdiği doz-cevap eğrileri, Şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir.

MPH'nin çalışma konsantrasyonlarında S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda TA 98 ve TA 100 suşları ile verdikleri revertant koloni sayıları Şekil 3 ve 4'de gösterilmiştir.

MPH'nin çalışma konsantrasyonlarında, S9'lu ve S9'suz ortamda çalışılan TA 98 ve TA 100 suşlarına ait plak görüntüleri Resim 1-4'te verilmiştir.

TARTIŞMA

Kimyasallar tarafından meydana gelen mutasyonların hücre düzeyinde belirlenmesi amacıyla kullanılan kısa zamanlı test sistemlerinden en önemlisi Ames testidir (19). Genotoksik aktivite tayini için birçok test bu amaçla kullanılmakla birlikte standart ve güvenilir sonuçlar sağlaması nedeniyle Ames testi sıklıkla tercih edilmektedir. Ames testi, özellikle ilaç ham maddesi olarak kullanılmak istenen test maddelerinin toksik, mutajenik-karsinojenik etkilerini incelemek için güvenilir yöntemler arasında kabul edilmektedir (20).

Yaygın olarak dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu olan hastaların tedavisinde kullanılan MPH, bir merkezi sinir sistemi uyarıcısıdır. MPH'nin kronik kullanımına bağlı olarak uzun dönemde ortaya çıkan etkileri net değildir. 50 yılı aşkın süredir tedavide kullanılmasına karşın, yapılan birkaç araştırma ile hem insan hem de hayvanlar üzerinde ciddi yan etkileri olabileceği gösterilmiştir (21). Kronik kullanımına bağlı olarak mutajenik ve karsinojenik riske neden olup olmayacağı çeşitli çalışmalar ile araştırılmıştır (22).

Bu çalışma ile dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğunda sıkça reçete edilen Ritalin®'in ham maddesi olan MPH ve metabolitlerinin oluşturabileceği mutajenik aktivite, Ames Salmonella/mikrozom testi ile araştırıldı. Deneyler 5 mg/plak, 2.5 mg/plak, 1.25 mg/plak, 0.625 mg/plak ve 0.3125 mg/plak olmak üzere beş farklı konsantrasyonda yapıldı. Maddenin kendisi ve metabolitlerinin toksik etkiye sahip olup olmadığının incelenmesi için hem S9'lu hem de S9'suz ortamda aktivite tayini yapılmıştır. Böylece memeli karaciğerinde enzimatik yollarla parçalanarak farklı metabolitlere çevrilmesiyle oluşan bileşiklerin, mutajenik özelliğe sahip olabilme ihtimali araştırılmıştır. Çalışmamızda, TA 98 ve TA 100 ile yapılan deney sonuçları değerlendirildiğinde, S9'lu ve S9'suz ortamda tüm çalışma konsantrasyonlarında revertant koloni sayıları, spontan revertant koloni sayılarının

dan daha fazla bulunmamıştır. Diğer bir ifade ile bu suşlarda MPH ve metabolitleri mutajenik etki göstermemiştir.

MPH'nin mutajenik ve karsinojenik etkisini araştıran çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Ancak Ames Salmonella/mikrozom testi ile yapılan bakteriyel mutajenite çalışmaları oldukça sınırlıdır (18). Çalışmamıza benzer şekilde, Salmonella typhimurium ve Çin hamster ovaryum hücre kültürleri (CHO) kullanılarak yapılan genetik toksikoloji çalışmalarında, hem S9'lu hem de S9'suz ortamda S. typhimurium'un TA 97, TA 100, TA 1535 ve TA 1537 suşları mutajen özellik göstermemiştir. CHO'da kromozomal aberasyon ve kardeş kromatid değişimleri incelenmiş, S9'lu ve S9'suz ortamda kromozomal aberasyon sıklığının arttığı ancak, S9 varlığında kardeş kromatid değişim sıklığının artış göstermediği bildirilmiştir. Bununla birlikte farklı bir laboratuvarında, bu madde daha yüksek konsantrasyonda uygulandığında S9'suz ortamda pozitif sonuç elde edilmiştir (18).

Ames testi, fare lenfoma deneyi ve mikroçekerdek testi ile MPH'nin toksisitesi araştırılmıştır. Ames testinde TA 98, TA 100, TA 1535 ve TA 1537 suşları kullanılmış ve deney her suş için beş ayrı madde konsantrasyonunun plak inkorporasyon yönteminin uygulanması ile yapılmıştır. Sonuçlar tüm suşlar için hem S9'lu hem de S9'suz ortamda negatif olarak değerlendirilmiştir. Fare lenfoma deneyi için sonuçlar negatif olup, mikroçekerdek testinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunmamıştır (23). Deney hayvanlarında tümör indüksiyonu veya hücre serileri kullanılarak yürütülen çeşitli çalışmalar ile MPH'nin mutajenik/karsinojenik riskleri aydınlatılmaya çalışılmıştır. MPH'nin uzun süre kullanımının herhangi bir potansiyel sağlık riski oluşturup oluşturmayacağı ile ilgili insanlarda yapılan kronik çalışmaların eksikliği, fareler üzerinde yapılan 2 yıllık kanser çalışmalarından pozitif sonuçlar alınması, bu alanda yapılan çalışmaların artmasına neden olmuştur (21). Bu amaçla National Toxicology Program'ın dişi ve erkek sıçanlar üzerinde yürütmüş oldukları toksikoloji ve karsinogenesis çalışmalarında F344/N sıçanlarına farklı dozlarla verilen MPH'nin herhangi bir karsinojenik aktivitesi gözlenmezken, B6C3F1 farelerinde hepatoselüler neoplazma gelişimi gibi bazı karsinojenik etkiler bulunmuştur (18). MPH uygulanan dişi F344 sıçanlarında spontan meme bezi tümör insidansının düştüğü bildirilmiştir (24). MPH'nin F344 sıçanları ile B6C3F1 fareleri üzerindeki karsinojen etkileri incelenmiş ve yüksek dozda MPH'ye bağlı olarak dişi ve erkek farelerde hepatoselüler tümörlerin ciddi şekilde arttığı gösterilmiştir (14). CHO hücre kültürlerinde MPH ile yapılan

başka bir çalışmada ise kromozomal aberasyon ve kardeş kromatid değişim sıklığının arttığı rapor edilmiş (25) ve insan lenfositleri ile yapılan *in vitro* bir çalışmada ise kardeş kromatid değişim sıklığında artış gözlenmiştir (26). Ancak, memeli hücre kültürü kullanılarak yapılmış olan MPH mutajenite testinde, herhangi bir mutajenik etkiye rastlanmamıştır (27,28). Kan ve beyin hücrelerindeki hipokampus ve stratumdaki DNA hasar düzeyi incelenmiş ve bir hasar tespit edilmemiştir (29,30). MPH'nin *in vitro* uygulamasının DNA üzerine zararlı etkisi ile ilgili oldukça şüpheli verilerin aksine, Teo et al (2003) tarafından yayınlanan ve mevcut uluslararası kurallara göre yürütülen fare lenfoma deneyi ile açıkça negatif sonuçlar elde edilmiş ve bu çalışma, *in vitro* memeli hücrelerinde MPH'nin genotoksik potansiyeli olmadığına dair önemli bir gösterge olarak kabul edilmiştir (31,32). Fare lenfoma timidin kinaz testi, kromozomal mutasyonların yanı sıra gen mutasyonlarını da belirlediğinden, bu veriler MPH'nin klastojenik potansiyelinin değerlendirilmesi açısından önemlidir. Bununla birlikte, Bonassi et al. 2004 ve 2007 yıllarında yapmış oldukları çalışmalarda kromozomal aberasyon sıklığı ve periferik kan lenfositlerindeki mikroçekirdek artışının kanser riski ile ilişkisinin bildirilmesi ile tıp camiasında ve MPH tabanlı tedaviyi kabul eden DEHB'li çocukların ailelerinde tepkilere neden olmuştur (33-35).

Çocukların yetişkinlere göre genotoksik ajanlara daha savunmasız olmalarından dolayı çalışmalarını pediatrik popülasyonda yürütmeye karar vermişlerdir. Bu çalışmada, gönüllü 12 çocuk üzerinde MPH'nin terapötik düzeyde sitogenetik bir anomaliye sebep olup olmadığı araştırılmıştır. MPH tedavisinin başlangıcında ve tedaviye başladıktan 3 ay sonra sitogenetik analizler yapılmıştır. Kromozomal aberasyon sonuçları değerlendirildiğinde kromatid kırıkları, delesyonlar ve gap'ler belirlenmiştir. Kardeş kromatid değişimleri incelendiğinde her iki dönem için de artış gözlenmiştir. Denemeye katılan tüm katılımcılarda tedavinin başlamasında ve sonraki 3 ay sonunda mikroçekirdek sıklığında anlamlı bir artış gözlenmiştir (36). Bu çalışmalardan farklı olarak, diğer bir çalışmada MPH ile tedavi gören DEHB'li çocuklarda ve yetişkin popülasyonunda kardeş kromatid değişimi, kromozomal aberasyon ve mikroçekirdek sıklığında artış gözlenmemiştir. Genomik zararın bulunmaması, MPH maruziyetine bağlı potansiyel kanser riskinin arttığı iddiasını desteklememektedir (37). Walitza ve ark. çocuk popülasyonunda mikroçekirdek sıklığını değerlendirmişlerdir. 1. grupta bir, üç ve altı aydan beri MPH ile tedavi gören

çocuklar, 2. grupta ise altı aydan daha fazla MPH ile tedavi gören çocuklarla çalışılmıştır. Her iki grupta da genomik zarar saptanmadığı bildirilmiştir (38). MPH ve amfetamin bazı ilaçlarla tedavi edilen çocukların kan lenfositlerinde muhtemel kromozomal hasar çalışmalarında MPH'nin terapötik seviyelerde kullanımının sitogenetik bir zarara neden olmadığı gösterilmiştir (35). Suter ve ark. MPH ile tedavi gören hastaların periferik kan lenfositlerinde *in vitro* kromozomal aberasyon yöntemi ve B6C3F1 farelerinde ise mikroçekirdek yöntemi (doz oranı 250 mg/kg) kullanarak yapmış oldukları çalışmada her iki çalışmada da negatif sonuçlar bulunmuştur (39). Ağız mukozasından örnek alınarak genomik zararının değerlendirildiği bir çalışmada ise herhangi bir genomik zarara rastlanılmadığı bildirilmiştir (38). Tucker ve ark. 109 hastayı içeren geniş bir popülasyonda çalışarak MPH kullanımına bağlı kromozomal aberasyon, mikroçekirdek ve kardeş kromatid değişimlerini incelemişlerdir. Tedaviye başlamadan önce ve başladıktan sonra tedavinin 3. ayında değerlendirmeler yapılmış ve MPH tedavisinin herhangi bir sitogenetik anomaliye neden olmadığı kabul edilmiştir (40).

Sonuç olarak, ilaçlar, ilaç ham maddesi olarak kullanılmak istenen test maddeleri, kozmetikler, gıda katkı maddeleri gibi insanların kullanımına sunulan ksenobiyotiklerin mutajenitelerinin saptanmasında oldukça geniş bir uygulama alanı olan Ames testi, aynı zamanda kimyasalların anti-mutajenik özelliklerinin belirlenmesinde de kullanılabilen hızlı sonuç veren, güvenilir yöntemlerden biridir. Bu çalışma ile dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğunun tedavisinde sıkça kullanılan MPH ve metabolitlerinin oluşturabileceği mutajenik aktivite, Ames Salmonella/mikrozom testi ile araştırıldı. MPH'nin, TA 98 ve TA 100 suşlarında S9'lu ve S9'suz ortamda mutajenik etki göstermediği saptandı. Böylece, Ames testinin çeşitli ksenobiyotiklerin mutajenite tayininde ön değerlendirme açısından faydalı bir yöntem olduğu gösterildi. Ksenobiyotiklerin mutajenite ve karsinojenite profillerinin tam olarak aydınlatılması için ilave genotoksisite çalışmaları ile kesin yargıya varılabileceği düşünülmektedir.

Teşekkür

Selin Oğuz'un yüksek lisans tezi Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu Başkanlığı (SAG-C-YLP-040310-033) tarafından projelendirilmiş olup bu makale tez kaynaklıdır.

KAYNAKLAR

- Alzuet PR, Gaspes E, Ronco AE. Mutagenicity of Environmental Samples from an Industrialized Area of the Rio de la Plata Estuary using the Salmonella/Microsomal Assay. *Environ Toxicol Water Qual.* 1996; 11: 231-236.
- Kim SJ, Rim KT, Kim HY, Yang JS. Mutagenicity of octane and tetrasodium pyrophosphate in bacterial reverse mutation (Ames) test. *J Toxicol Sci.* 2010; 35(4): 555-562.
- Brusick D, Grotz VL, Slesinski R, Kruger CL, Hayes AW. The absence of genotoxicity of sucralose. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48: 3067-3072.
- Aygun N. Saç Boyası Uygulayıcılarında Mutajenik Aktivitelerin Saptanması. Ankara: Gazi Üniversitesi; 1996.
- Karabay NÜ, Oğuz MG. Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and methamidophos. *Genet Mol Res.* 2005; 4 (4): 653-662.
- Fall M, Haddouk H, Morin JP, Forster R. Mutagenicity of benzyl chloride in the Salmonella/microsome mutagenesis assay depends on exposure conditions. *Mutat Res.* 2007; 633: 13-20.
- Calvo TR, Cardoso CR, da Silva Moura AC, Dos Santos LC, Colus IM, Vilegas W, Varanda EA. Mutagenic Activity of *Indigofera truxillensis* and *I. Suffruticosa*. *Aerial Parts.* 2009; eCAM, 1-8.
- Ziegelbauer HE, Aubrecht J, Kleinjans JC, Ahr HJ. Applications of toxicogenomics to study mechanisms of genotoxicity and carcinogenicity. *Toxicol Lett.* 2009; 186: 36-44.
- Korkmaz B. Bazı 2-sübstitüe Perimidin Bileşiklerinin Mutajenik aktivitelerinin Ames Mutajenite Testi ile Belirlenmesi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi; 2005.
- Murray RK, Mayes PA, Granter DDK, Rodwell VW. ed: Gülriz Menteş Harper'in Biyokimyası. İstanbul: Barış Kitabevi; 1993. s:811-917.
- Temizkan GO. Moleküler Genetik. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları; 1996. s:281.
- Barile FA. Principle of Toxicology testing. Chapter 15: New York; 2008. p:209-228.
- Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella/ microsome mutagenicity assay. *Mutat Res.* 2000; 455: 29-60.
- Dunnick JK, Hailey JR. Experimental studies on the long-term effects of methylphenidate hydrochloride. *Toxicol.* 1995; 103: 77-84.
- Challman TD, Lipsky JJ. Methylphenidate: its pharmacology and uses. *Mayo Clin Proc.* 2000; 75(7): 711-721.
- Sood A, Barton DL, Loprinzi CL. Use of methylphenidate in patients with cancer. *Am J Hosp & Palliat Med.* 2006; 23(1): 35-40.
- Kimko HC, Cross JT, Abernethy DR. Pharmacokinetics and clinical effectiveness of methylphenidate. *Clin Pharmacokinet.* 1999; 37(6): 457-70.
- National Toxicology Program. Toxicology and Carcinogenesis Studies of Methylphenidate Hydrochloride (CAS No. 298-59-9) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser.* 1995; 439: 1-299.
- Kier LD. Use of the Ames test in toxicology. *Regul Toxicol Pharmacol.* 1985; 5(1): 59-64.
- Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogens are Mutagens: A Simple Test System Combining Liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection. *Proc Nat Acad Sci.* 1973; 70(8): 2281-2285.
- El-Zein AR, Abdel-Rahman SZ, Hay MJ, Lopez MS, Bondy ML, Morris DL, Legator MS. Cytogenetic effects in children treated with methylphenidate. *Cancer Lett.* 2005; 230: 284-291.
- Ashton H, Gallagher P, Moore B. The adult psychiatrist's dilemma: psychostimulant use in attention deficit/hyperactivity disorder. *J Psychopharmacol.* 2006; 20(5): 602-610.
- Teo ST, San RH, Wagner VO, Gudi R, Stirling DI, Thomas SD, Khetani VD. d-Methylphenidate is non-genotoxic in *in vitro* and *in vivo* assays. *Mutat Res.* 2003; 537: 67-69.
- Dunnick JK, Elwell MR, Haseman JK. Decreased incidence of spontaneous mammary gland neoplasms in female F344 rats treated with amphetamine, methylphenidate, or codein. *Cancer Lett.* 1996; 102: 77-83.
- Gallaway SM, Armstrong MJ, Reuben C, Colman S, Brown B, Cannon C, Bloom AD, Nakamura F, Ahmed M, Duk S. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: evaluations of 108 chemicals. *Environ Mol Mutagen.* 1987; 10: 1-175.
- Walker AP, Dumars KW. Commonly used pediatric drugs, sister chromatid exchanges and the cell cycle. *Am J Hum Genet.* 1977; 29: 110A.
- Matthews EJ, Spalding RW, Tennant RW. Transformation of BALB/c-3T3 cells: V. Transformation responses of 168 chemicals compared with mutagenicity in Salmonella and carcinogenicity in rodent bioassay. *Environ Health Perspect.* 1993; 101: 347-482.
- Rudd CJ, Mitchell AD, Spalding J. Mouse lymphoma cell mutagenesis assay of coded chemicals incorporating analyses of the colony size distributions. *Environ Mol Mutagen.* 1983; 5: 419.
- Andreazza AC, Frey BN, Valvassori SS, Zanotto C, Gomes KM, Comim CM, Cassini C, Stertz L, Ribeiro LC, Quevedo J, Kapczinski F, Berk M, Gonçalves CA. DNA damage in rats after treatment with methylphenidate. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2007; 31(6): 1282-1288.
- Witt KL, Malarkey DE, Hobbs CA, Davis JP, Kissling GE, Caspary W, Travlos G, Recio L. No Increases in Biomarkers of Genetic Damage or Pathological Changes in Heart and Brain Tissues in Male Rats Administered Methylphenidate Hydrochloride (Ritalin) for 28 Days. *Environ Mol Mutagen.* 2010; 51(1): 80-88.
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals; 1995.
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use. Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals s2B; 1997.

33. Bonassi S, Znaor A, Norppa H, Hagmar L. Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective. *Cytogenet Genome Res.* 2004; 104(1-4): 376-382.
34. Bonassi S, Norppa H, Ceppi M, Strömberg U, Vermeulen R, Znaor A, Wasilewska AC, Fabianova E, Fucic A, Gundy S, Hansteen IL, Knudsen LE, Lazutka, Rossner P, Sram RJ, Boffetta P. Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22 358 subjects in 11 countries. *Carcinogen.* 2008; 29(6): 1178-1183.
35. Witt K, Shelby MD, Itchon-Ramos N, Faircloth M, Kissling GE, Chrisman AK, Ravi H, Murli H, Mattison DR, Kollins SH. Methylphenidate and Amphetamine Do Not Induce Cytogenetic Damage in Lymphocytes of Children With ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2008; 47(12): 1375-1383.
36. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use. *Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals S2B*; 1997.
37. Ponsa I, Ramos-Quiroga JA, Ribasés M, Bosch R, Bielsa A, Ordeig MT, Morell M, Miro R, Cid R, Estivill, Casas M, Bayés M, Cormand B, Hervas A. Absence of cytogenetic effects in children and adults with attention-deficit /hyperactivity disorder treated with methylphenidate. *Mutat Res.* 2009; 666: 44-49.
38. Walitza S, Werner B, Romanos M, Warnke A, Gerlach M, Stopper H. Does methylphenidate cause a cytogenetic effect in children with attention deficit hyperactivity disorder? *Environ Health Perspect.* 2007; 115(6): 936-940.
39. Suter W, Martus HJ, Elhajouji A. Methylphenidate is not clastogenic in cultured human lymphocytes and in the mouse bone-marrow micronucleus test. *Mutat Res.* 2006; 607: 153-159.
40. Tucker JD, Suter W, Petibone DM, Thomas RA, Bailey NL, Zhou Y, Zhao Y, Muniz R, Kumar V. Cytogenetic assessment of methylphenidate treatment in pediatric patients treated for attention deficit hyperactivity disorder. *Mutat Res.* 2009; 677: 53-58.