

***IN VIVO* VE *IN VITRO* ŞARTLARDA CYCLOPHOSPHAMIDE MUTAJENİTESİ İLE ÇİNKO ETKİLEŞİMİNİN UMU TEST SİSTEMİ İLE RATLARIN İDRARLARINDA İNCELENMESİ**

Adnan AYHANCI*, , Ayşe MERCANGÖZ*,
Emre CEYHAN* Emre YOLAY**

* Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
Eskişehir.

** Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Eskişehir.

ÖZET

Çalışmamızda ön tedavide sitotoksik ilaçlara karşı hücre direncini arttırmak için iyi bir aday olduğu öne sürülen çinkonun 3000 µg/kg ve 6000 µg/kg dozlarını kullanarak cyclophosphamide 'in (CY) antineoplastik etkinliğini düşürmeden toksisitesini azaltmayı ve daha yüksek dozlarda kullanılarak daha güçlü bir terapötik etkinliğin sağlanması amaç edinildi

Bu deneysel çalışmada in vitro olarak ZnCl₂'ün 3000 ve 6000 µg/kg dozları ile CY'in 2500, 5000, 10000, 20000, 150000 µg/kg dozları ve bu dozlar dahilindeki kombinasyonları Umu-test sistemi kullanılarak genotoksik ve mutajenik değerlendirmeleri yapıldı.

Çalışmamızın ikinci aşamasında ise in vivo olarak 150000 µg/kg CY, 150000 µg/kg CY + 3000 µg/kg ZnCl₂, 150000 µg/kg CY + 6000 µg/kg ZnCl₂ enjekte edilen sıçanlardan alınan idrar örnekleri yine umu test sistemi ile değerlendirildi.

Umu test sistemi ile CY ve CY + ZnCl₂ kombinasyonlarının ve yine idrar örneklerinin bakteri test sistemleri ile verdikleri sonuçlar genotoksik/mutajenik etki yaratmadığı gözlemlendi. Elde edilen deneysel değerler kontrol olarak kullanılan 4NQO pozitif mutajen maddesinin sonuçlarına yakın veya iki katı sonuçlar vermemiştir.

Sonuç olarak deneyde kullandığımız maddelerin genotoksik/mutajenik etkileri bu uygulanan yönlendirilmiş mutasyon deneyleri ile cevap vermemiştir. Ancak diğer kısa zamanlı ve uzun zamanlı testler ile

değerlendirilmesi gerekmektedir. Çalışmalarımız bu doğrultuda devam etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Genotoksik Aktivite, Cyclophosphamide, Çinko, Umu-test

***IN VITRO AND IN VIVO CONDITIONS RESEARCH OF
CYCLOPHOSPHAMIDE MUTAGENICITY AND ZINC
INTERACTION BY UMU TEST SYSTEM USING RAT URINE
SAMPLES***

SUMMARY

In this experimental study first 3000 µg and 6000 µg Zinc chloride and 2500, 5000, 10000,20000 and 150000 µg/kg CY dosage rates test were administered singly and then combination and hence tested by Umu mutagenicity test system in vitro conditions. At the second stage of our experimental study urine samples taken from rats having received 150000 µg/kg CY, 150000 µg/kg CY+3000 µg/kg ZnCl₂ and 150000 µg/kg CY + 6000 µg/kg ZnCl₂ tested by Umu test system.

Literature knowledge which is reported Zinc chloride has protective effect against CY couldn't have supported because there was no decreasing between CY+ZnCl₂ combination groups and only CY treated groups.

In addition, there are differences between our study results of urine taken from rats treated on bacteria and literature knowledge that reported mutagenicity of CY alone and metabolites in urine. Therefore our results did not support the literature studies.

Key Words: Genotoxic activity, Cyclophosphamide, Zinc, Umu-test

1. GİRİŞ

Kanser tedavisinde en fazla kullanılan ilaçlardan birisi CY'dir. Antineoplastik ilaçların alkilleyici grubuna giren bir oksazofosforin'dir [2]; [19]. Bağışıklık baskılayıcı ve bir antitümör ajan olan CY'nin farmakolojik etkileri metabolik aktivasyonuna bağlıdır [10]; [19]. Çünkü inaktif formdadır ve onkosidal etki gösterebilmesi için metabolik olarak aktive edilmesi gerekir. Aşağıda açık kimyasal yapısı verilen ilaç 2 tane etil grubu taşır ve bunları da metabolik aktivasyon sonucu almış olduğu aktif form ile etil veren

donörlere dönüşür. DNA heliksine katılır ve çapraz bağlanmalara neden olarak DNA zincirinin bozulmasını sağlar. Özellikle hızlı bölünen hücrelere etkilidir ve bu nedenle T lenfosit proliferasyonunu bloke eder. O halde CY hem humoral hem de hücrel bağışıklığı baskılar [2];[9]). Bu durum ana ilahtan çok metabolitleri tarafından kaynaklanmaktadır.

CY'nin Kemik iliği mutajenitesi konusunda yapılan çalışmalar, bu maddenin insanlarda ve sıçanlarda hematopoietik sistemde kanserojen olduğunu göstermiştir [12];[3]. Buna ek olarak pek çok çalışmada CY ve diğer bir çok kemoterapik ajanın gen mutasyonları kromozomal kırıklıklar yeniden düzenlemeler ve somatik hücrelerde anoploidi gibi etkilere neden olduğu öne sürölmektedir [20];[1].

Biyolojik eser elementler içinde olağanüstü özelliklere sahip olan çinko tüm hücrelerin büyüme ve replikasyonu için gerekli esansiyel bir elementtir. Doğal olarak çok önemli proteinlerin yapısına girer ve enzimlerin aktif bölgelerinde görev alır veya moleküler etkileşimlerde hücre içi proteinler için yapısal bir destek görevi görür. Biyolojik zarların ve iyon kanallarının stabilesini ve integritesini sağlar [7]

Çinko nükleik asit metabolizmasına da girer. Bu nedenle yaşamsal önemi vardır. DNA ve RNA polimeraz enzimlerinin yapısına girdiği için DNA ve RNA sentezi ile hücre bölünmesinde önemli görevi vardır [6];[11];[25]

Çinko bağışıklık sistemi için temel iz elementtir. Bağışıklık yanıtındaki bozukluk düşük çinko düzeyi ile bağlantılıdır [24]. Bunun yanı sıra ön tedavide sitotoksik ilahtara karşı hücre direncini artırmak için iyi bir aday olduğu bildirilmiştir [21] Çinkonun CY mutajenitesi ile ilgili etkileşme gösterebileceği düşünülmüştür. Maddelerin genotoksik potansiyelleri sağlığımız için büyük önem taşır. Umu test yöntemi son yıllarda genotoksik potansiyel araştırmalarında oldukça fazla kullanılan kısa zamanlı testlerden birisidir [18]; [23]; [14]. Biz de bu amaçla CY mutajenitesi ile çinkonun etkileşmesini ve sıçan idrarında almış olduğu metabolik formu Umu test sisteminde *Salmonella typhimurium* NM2009 ve NM3009 suşlarıyla denedik.

2. MATERYAL-METOD

Materyal

Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda kullanılan CY eczaneden ilaç formları olarak, Çinko ve diğer kimyasal maddeler Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Araştırma Destek Merkezinin yardımları ile Merck ve Sigma firmalarından alınmıştır.

Deney Hayvanları

Deneylelerimizde kullandığımız sıçanlar; yaklaşık 2,5-3 aylık ve 150-250 gr. ağırlığındaki 16 adet yetişkin dişi ve erkek Wistar cinsidir. Sıçanlar; Sağlık Bakanlığı Hıfzı Sıha Serum Çiftliği'nden sağlandı.

Her grupta en az 3, en fazla 5 hayvan olacak şekilde 4 ayrı gruba ayrılan hayvanlar; her kafeste 4 hayvan olacak şekilde yerleştirildi.

Deneyde Kullanılan Bakteri Suşları

Kimyasalların mutajenik aktivitelerinin belirlenmesinde; bir genotoksisite ölçütü olarak *Salmonella typhimurium* adı verilen indikatör organizmalar kullanıldı [17]. Umu test sisteminde kullanılan mutant bakteri suşları *Salmonella thyphimurium* NM 2009 ve *Salmonella thyphimurium* NM 3009'u atasal tipten ayıran özellikler; makromolekül özellikteki kimyasallara maruz kaldıklarında atasal tipe göre daha hassas olmaları ve tamir mekanizmalarının daha hassas olup özellikle SOS tamir yolunu başlatmalarıdır. Bu suşlar; β -galaktosidaz aktivitesi için hibrit bir protein oluşturan UmuC-LacZ füzyonuna sahip pSK 1002 plazmidini taşırlar. Bu plazmid Umu test sisteminde kullanılan atasal suşu oluşturmak için; kesip çıkarma onarım mekanizması hatalı (uvrB mutasyonu), birçok kimyasal için daha kolay geçirgenliğe sahip (rfa mutasyonu) ve laktoz operonunda doğal bir delesyon gibi üstün özelliklere sahip olan *Salmonella typhimurium* TA 1535 içine yerleştirilmiştir. Bu özellikler sayesinde testin hassasiyeti artırılmış ve Umu testi için atasal suş olan *Salmonella typhimurium* TA 1535 / Psk 1002 suşu oluşturulmuştur [17].

***Salmonella thyphimurium* NM 2009**

Normalin üstünde O-Asetiltransferaz (O-AT) etkisine sahip olan bir suştur. Bu suş; O-AT geninin vektör bir plazmid olan pACYC 184 içine subklonlanmasıyla oluşturulmuş pMN12 plazmidinin, TA 1535/pSK 1002 içine yerleştirilmesiyle oluşturulmuştur [17].

***Salmonella thyphimurium* NM 3009**

Normalin üzerinde O-AT ve Nitroredüktaz (NR) etkisine sahip olan bir suştur. Bu suş; hem O-AT hem de NR genlerinin vektör bir plazmid olan pACYC içine subklonlanmasıyla oluşturulmuş pNM13 plazmidinin, TA 1535/pSK 1002 içine yerleştirilmesiyle oluşturulmuştur. NM 3009 suşu atasal suşa göre; O-asetiltransferaz etkisi açısından 13 misli, nitroredüktaz etkisi açısından ise 3 misli yüksek etkiye sahip olduğu için; nitroarenlerin genotoksik etkisini saptamada çok büyük bir duyarlılık gösterir [17].

CY ve Çinko Uygulaması ile İdrar Toplanması

Deney hayvanları; Eskişehir Yem Sanayi'nin ürettiği yemlerle ve çeşme suyu ile beslendiler. Tüm hayvanlar enjeksiyondan önce bir hafta stabilizasyona alındı. Her bir hayvan ilk enjeksiyondan önce tartılarak ağırlığı kaydedildi. Verilecek olan dozlar her bir hayvanın ağırlığına bağlı olarak ayarlanarak enjeksiyon yapıldı. Kontrol grubuna verilen 5ml/kg hacminde serum fizyolojik [12] ve diğer gruplara verilen ilaçlar intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı.

Kullanılan ilaçlardan Cyclophosphamide'in (Endoxan = Cytoxan) 150.000 µg/kg'lık sıçanlara verilecek olan çözeltisinin hazırlanmasında 900 mg CY, 24 ml serum fizyolojikte eritildi. Uygulanan bu CY dozu; literatürlerdeki önceki çalışmalar da (50, 70, 100, 120, 150 ve 200 mg/kg) göz önünde tutularak 150.000 µg/kg olarak belirlendi ve tablo 1'de gösterildi[13];[26]; [27];[28]. Umu test ile genotoksik parametre belirlenmesi için; hazırlanan 150.000 µg'lık çözeltiden yaklaşık 1/10'lük seri sulandırma ile toplam 5 farklı doz çözeltisi elde edildi.

Tablo.1. Enjeksiyonların gruplara göre dağılımı.

Dozlar	150mg/kg CY	150mg/kgCY + 3 mg/kg ZnCl ₂	150mg/kg CY + 6 mg/kg ZnCl ₂
1. Grup	+		
2. Grup		+	
Grup			+

İn vitro şartlarda CY ile ZnCl₂'ün etkileşiminin belirlenmesi amacıyla 150.000 µg dozundaki CY'den yaklaşık 1/10 luk serilerde sulandırma yapılarak sırasıyla 150.000 µg CY, 20.000 µg CY, 10.000 µg CY, 5.000 µg CY ve 2.500 µg CY şeklindeki 5 farklı doz genotoksik parametre saptanması amacıyla hazırlandı. Dozların hazırlanmasında kullanılan CY ve serum fizyolojik miktarları Tablo.2.'de gösterilmektedir.

Tablo.2. Doz hazırlanmasında kullanılan CY ve serum fizyolojik miktarlarının dozlara göre miktarları.

Doz	Uygulanan Karışımlar
150.000 µg CY	900.000 µg CY + 24 ml Serum Fizyolojik
20.000 µg CY	500.000 µg CY + 25 ml Serum Fizyolojik
10.000 µg CY	3 ml 20.000 µg CY + 3 ml Serum Fizyolojik
5.000 µg CY	2,5 ml 10.000 µg CY + 2,5 ml Serum Fizyolojik
2.500 µg CY	2 ml 5.000 µg CY + 2 ml Serum Fizyolojik

Bu dozların in vitro koşullarda *Salmonella thyphimurium* NM 2009 ve *Salmonella thyphimurium* NM 3009 bakteri suşları üzerindeki genotoksik etkisi öncelikle 150.000 µg, 20.000 µg, 10.000 µg, 5.000 µg ve 2.500 µg CY tek başına, daha sonra 3.000 µg /kg ZnCl₂ ve 6.000 µg /kg ZnCl₂ ile birlikte uygulanarak belirlendi.

Hayvan deneylerinde birinci gruba 150.000 µg/kg CY, ikinci gruba 150.000 µg/kg CY + 3.000 µg /kg ZnCl₂, üçüncü gruba ise 150.000 µg/kg CY + 6.000 µg /kg ZnCl₂ şeklinde enjekte edilecek olan kimyasal maddeler oda sıcaklığında uygulamaya dek bekletilmiş, kimyasal maddeler ve kontrol gruplarına uygulanan gerekli dozlardaki serum fizyolojik intraperitoneal olarak verilmiştir.

Bütün hayvanlar ilk enjeksiyondan önce tartılmış ve ağırlıkları saptanmıştır. Literatürde yaklaşık; 70.000, 120.000 ve 200.000 µg /kg CY uygulandığı

görüldüğünden [13] çalışmamızda etkin doz olduğu düşünülerek 150.000 µg /kg CY uygulanmıştır.

Her iki kimyasal ile muamele edilen sıçanlara ağırlıklarına göre hesaplanan dozda t=0'da 3.000 µg /kg ZnCl₂ veya 6.000 µg /kg ZnCl₂ ve 5 dakika sonrada 150.000 µg/kg CY enjekte edildi . Ayrıca t=4 ve t=8 saatlerinde de aynı dozda ZnCl₂ enjeksiyonu tekrarlandı.

İdrar toplanması

Enjeksiyon işlemine tabi tutulan ratlar metabolik kafeslere konuldu (Kafes başına 1 rat) ve deney boyunca kafes başına 50 ml olmak üzere sadece %2'lik sakkarozlu su verildi. Metabolik kafeslerdeki ratların idrarı, hayvanların öldürülmelerine dek geçen süre boyunca biriktirildi. İdrar örnekleri 24 saatlik idrar olarak toplandı ve mutajenite belirlenmesinden önce her bir örnek su ile 15 ml'ye seyreltildi ve 0,2 µm'lik membran filtreleri ile sterilizasyonları sağlandı [19]. Metabolitlerin mutajenik aktivitelerinin belirlenmesinde; bir genotoksisite ölçütü olarak *Salmonella typhimurium* MN 2009ve NM3009 suşları kullanıldı.

Umu-Test Sistemi Deneyinin Yapılışı

S.thyphimurium NM 2009 ve *S.thyphimurium* NM 3009 suşlarının donmuş örneklerinden 0,1'er ml alınarak, 200°C'de 20 dk. otoklavlanarak steril hale getirilmiş 20 ml Lutria Berthani broth içeren 50 ml'lik erlenlere ekim yapıldı ve gece boyu (16 saat) 37°C'deki etüvde inkübe edildi. Gecelik kültür; steril hale getirilmiş olan, 37°C'deki 50'şer ml Triptofan Glikoz Ampicillin (TGA) broth ile 1/50 kez dilue edilerek, 175 rpm'de 37°C de OD₆₀₀ değeri 0,25 ile 0,3 olana kadar yaklaşık 2 saat inkübe edildi. Daha sonra bu kültürler 0,9 ml'lik kısımlar halinde, farklı konsantrasyonlardaki kimyasalın ve idrarın 30 µl'sini içeren steril tüplere eklendi ve 37°C'de 3,5 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, farklı konsantrasyonlardaki kimyasalın ve idrarın sitotoksisitesini saptamak amacıyla OD₆₀₀ de her tüpün bakteri yoğunluğu spektrofotometrede okundu. β-galaktosidaz aktivitesini ölçmek için; hazırlanmış bir seri tüpe, absorbansı okunan kültürlerin 0,2 ml'si alınarak enzim deneyine başlandı. 0,2 ml kültür içeren her tüpe 1,8 ml Z tamponu, 50 µl %0,1'lik sodium dodecyl sulfate (SDS) ve 10 µl saf kloroform eklenerek karıştırıldı. Ardından reaksiyonu başlatmak için ortama 0,2 ml O-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG) çözeltisi eklendi ve tekrar karıştırıldı. Renk oluşumu için 37°C su banyosunda 10-60 dakika

bekletildikten sonra reaksiyon 1 ml 1 M Na₂CO₃ çözeltisi ile durduruldu [17].

Test tüpleri 420 ve 550 nanometre dalgaboyunda spektrofotometrede okundu ve bu değerler ünite hesaplamalarında kullanıldı.[15] metoduna göre hesaplanır. Buna göre; ünite hesaplamalarında kullanılan formül;

$$\text{Ünite} = 1000 \times \frac{A_{420} - 1,75 \times A_{550}}{t \cdot v \cdot A_{600}} \text{ şeklinde idi.}$$

t = reaksiyon süresi (dakika)

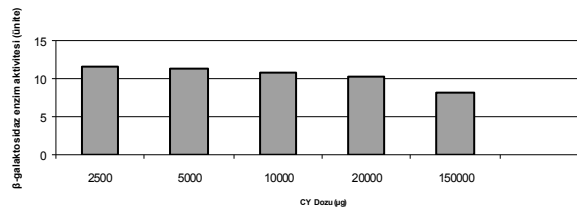
v = deneyde kullanılan kültürün miktarı (mililitre olarak)

A₆₀₀ = deneyde kullanılan kültürün yoğunluğu

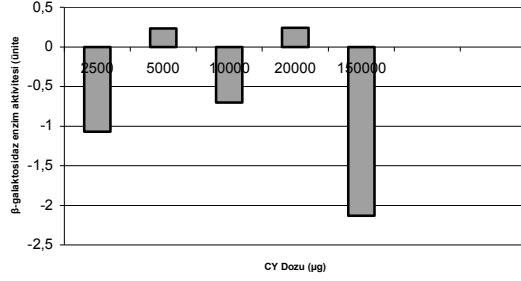
Umu-test sistemi uygulaması sonucunda ortaya çıkan β-galaktosidaz aktivitesinde, kontrole göre en az 2 katlık bir artışın gözlenmesi; test edilen kimyasalın mutajenite açısından pozitif olarak değerlendirilebileceğini gösterir [25]

3.BULGULAR

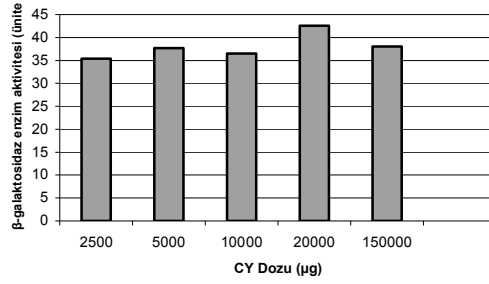
CY ve ZnCl₂ 'ü tek başlarına ve birlikte çeşitli doz kombinasyonları şeklinde; direkt bakterilere vermek suretiyle ve sıçanlara enjeksiyonları sonrasında alınan idrar örneklerini bakterilere vermek suretiyle Umu-C Test Sistemi aracılığı ile mutajenite testine tabi tuttuk. Bu testler sonucunda *S.t.* NM 2009 ve *S. t.* NM 3009 suşlarından elde edilen β-galaktosidaz enzim aktivitesi değerleri tablolarda sunulmuştur.



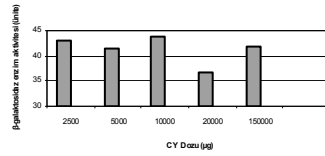
Şekil 1 *S.t.* NM 2009 suşunun 5 ayrı dozdaki CY ile verdiği β-galaktosidaz enzim aktivitesi (ünite) değerleri .



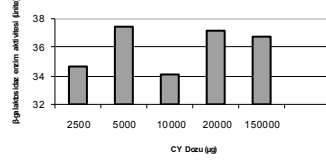
Şekil 2 S.t. NM 3009 suşunun 5 ayrı dozdaki CY ile verdiği β-galaktosidaz enzim aktivitesi değerleri .



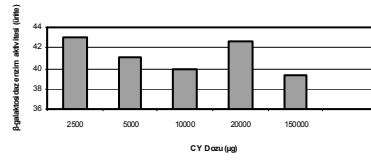
Şekil 3 S.t. NM 2009 suşunun 5 ayrı dozdaki CY ve 3000 µg ZnCl₂ ile verdiği β-galaktosidaz enzim aktivitesi değerleri .



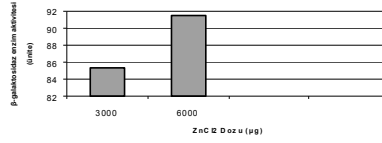
Şekil 4 S.t. NM 3009 suşunun 5 ayrı dozdaki CY ve 3000 µg ZnCl₂ ile verdiği β-galaktosidaz enzim aktivitesi değerleri .



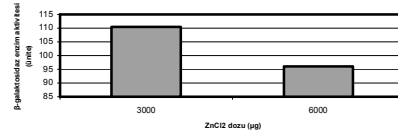
Şekil 5. *S.t.* NM 2009 suşunun 5 ayrı dozdaki CY ve 6000 µg ZnCl₂ ile verdiği β-galaktosidaz enzim aktivitesi değerleri .



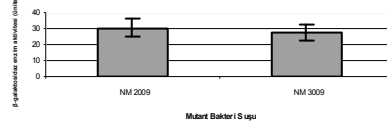
Şekil 6. *S.t.* NM 3009 suşunun 5 ayrı dozdaki CY ve 6000 µg ZnCl₂ ile verdiği β-galaktosidaz enzim aktivitesi değerleri .



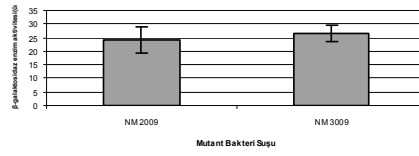
Şekil 7 *S.t.* NM 2009 suşunun 2 farklı dozdaki ZnCl₂ ile verdiği β-galaktosidaz enzim aktivitesi değerleri .



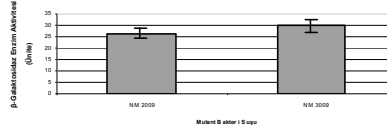
Şekil 8 *S.t.* NM 3009 suşunun 2 farklı dozdaki ZnCl₂ ile verdiği β-galaktosidaz enzim aktivitesi değerleri .



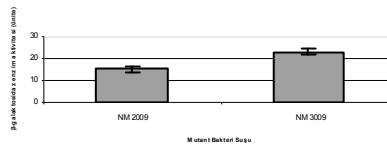
Şekil 9 *S.t.* NM 2009 ve NM 3009 suşlarının 150000 µg CY verilen sıçanların idrar örneklerinde gösterdikleri β-galaktosidaz enzim aktivitesi değerleri .



Şekil 10 *S.t.* NM 2009 ve NM 3009 suşlarının 150000 µg CY ve 3000 µg ZnCl₂ verilen sıçanların idrar örneklerinde gösterdikleri β-galaktosidaz enzim aktivitesi değerleri.



Şekil 11. *S.t.* NM 2009 ve NM 3009 suşlarının 150000 µg CY ve 6000 µg ZnCl₂ verilen sıçanların idrar örneklerinde gösterdikleri β-galaktosidaz enzim aktivitesi değerleri.



Şekil 12 *S.t.* NM 2009 ve NM 3009 suşlarının serum fizyolojik verilen sıçanların idrar örneklerinde gösterdikleri β-galaktosidaz enzim aktivitesi değerleri .

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Umu-C test sisteminde CY'nin ve CY + ZnCl₂ ile ilgili yaptığımız deneyler iki aşamada gerçekleştirildi. Birinci aşamasında direkt olarak bakteriye uygulanması ile yaptığımız çalışmada CY'nin hazırlanan 5 dozuna karşılık cinko klorür'ün iki ayrı dozu denenmiştir. İkinci aşamasında kullanılan maddelerin farelere verilmesi ve daha sonra almış olduğumuz idrar örneklerinde maddelerin metabolize formları umu test sisteminde bakteriler üzerinde kullanılmıştır.

Çalışmalarımızın her iki aşaması sonucunda elde ettiğimiz β-galaktosidaz aktivitesi değerlerindeki değişimler ile mutajenite arasında bağlantı kurarak vardığımız sonuçları özetlemek gerekirse:

Sadece CY'i Umu test sistemi ile direkt olarak bakterilere uyguladığımızda elde ettiğimiz β-galaktosidaz aktivitesi değerleri; hem pozitif kontroldeki β-galaktosidaz aktivitesi değerleri ile hem de serum fizyolojik alan hayvanların idrarlarında ortaya çıkan β-galaktosidaz aktivitesi değerleri ile karşılaştırıldığında enzim aktivitesinde artışa rastlanılmamıştır. Bu doğrultuda çalışmamızın sonuçları ışığında CY'in metabolize olmamış formunun mutajen olmadığı sonucuna varmış bulunmaktayız.

CY ile birlikte 3.000 µg ve 6.000 µg miktarındaki 2 farklı dozda ZnCl₂'ün Umu test sistemi ile bakterilere direkt olarak uygulanması ile yaptığımız kısa zamanlı mutajenite deneylerinde elde ettiğimiz β-galaktosidaz enzim aktivitesi değerleri; sadece ZnCl₂'ün vermiş olduğu değerleri aşamamıştır. Sadece ZnCl₂'ün kullanıldığı bu uygulamalarda β-galaktosidaz enzim aktivitesi daha da düşük değerler göstermiştir.

Çalışmamızın sadece kısa zamanlı testler dahilinde mutajenliği değerlendirmeye olanak sağlaması nedeniyle ZnCl₂'ün mutajenik aktifliği konusunda uzun zamanlı mutajenite deneylerinin de kullanıldığı daha kapsamlı incelemeler yapılması gerektiğine inanmaktayız. CY ve ZnCl₂'ün mutasyona uğratma potansiyellerini incelediğimiz uygulamalarımızdan elde ettiğimiz sayısal değerler kapsamında CY ve ZnCl₂ kombinasyonunun verdiği absorbans değerlerinin mutajenik bir değerlendirme için kesin olarak belirleyici olmadığını söyleyebiliriz. Buna ek olarak CY ve ZnCl₂ kombinasyonları ile çalışmamız sonucu elde edilen değerler, sadece CY yaptığımız çalışmada elde edilen değerlerle kıyaslandığında bir azalma görülmediğinden uygulamalarımızın sonucu Umu test sistemi dahilinde ZnCl₂'ün CY'e karşı koruyucu olduğu konusundaki literatür bilgileri ile

örtüşmemektedir. Bu iki madde kombinasyonu ile elde edilen β -galaktosidaz enzim aktivitesi değeri pozitif mutajen ile karşılaştırıldığında her iki doz kombinasyonunun mutajen olmadığı sonucu ortaya çıkmaktadır. CY ve $ZnCl_2$ kombinasyonlarının direkt olarak Umu test sisteminde sisteminde çalışılması ile elde edilen β -galaktosidaz enzim aktivitesi değerleri, her ne kadar serum fizyolojik verilen sıçanların idrarlarının Umu test sistemi ile vermiş olduğu β -galaktosidaz enzim aktivitesi değerlerinin üstünde de olsa mutajenite değerlendirmesi açısından kayda değer bir önem taşımamaktadır. CY'in sıçanlara enjeksiyonu sonrasında sıçanlardan alınan idrar örnekleri ile yaptığımız Umu test sistemi uygulamasından elde ettiğimiz β -galaktosidaz enzim aktivitesi değerleri; serum fizyolojik verilen hayvanların idrarlarında elde edilen değerlerle karşılaştırıldığında enzim aktivitesinde bir artış olduğu gözlenmiştir. Ancak pozitif mutajen baz alınarak yapılan değerlendirmede bu artış kayda değer değildir ve mutajeniteyi belirleyici yönde özellik taşımamaktadır. Bu değerlendirmenin ışığında idrar içerisindeki CY metabolitlerinin bakterilerde mutajen olmadıkları sonucuna varılmıştır.

CY ile 3.000 μg ve 6.000 μg dozlarında $ZnCl_2$ enjeksiyonu yapılan sıçanların idrarlarından alınan örneklerin direkt olarak bakteriye uygulanması ile yaptığımız Umu test sistemi çalışmalarımızda elde edilen β -galaktosidaz enzim aktivitesi değerleri, sadece CY enjeksiyonu yapılmış olan sıçanların idrar örneklerinin ortaya çıkardığı β -galaktosidaz enzim aktivitesi değerlerine oranla daha düşüktür. Ancak β -galaktosidaz enzim aktivitesi değerindeki bu farklılık pozitif mutajen baz alınarak yapılan değerlendirmede mutajeniteden söz edilmesine imkan verecek boyutlarda değildir. CY ve $ZnCl_2$ kombinasyonlarının verdiği β -galaktosidaz enzim aktivitesi değerleri yalnızca serum fizyolojik alan sıçanların idrarlarının ve pozitif kontrol olan 4NQO'nun verdiği değerler ile kıyaslandığında enzim aktivitesi açısından anlamlı bir artıştan bahsetmek mümkün değildir. Bu doğrultuda kimyasal maddelerimizin uygulanan kombinasyonlarının mutajenik karakter taşımadıkları da ortaya konmuştur.

Özetle; CY ve CY+ $ZnCl_2$ 'ün kombinasyonlarının direkt olarak bakteriye uygulanmaları (in vitro) ile alınan β -galaktosidaz enzim aktivitesi değerleri ile yine CY ve CY+ $ZnCl_2$ 'ün kombinasyonlarının sıçanlara enjeksiyonları sonrasında alınan idrar örnekleri ile yapılan Umu test sistemi çalışmalarımızda kimyasallarımızın metabolitlerinin çalışılması ile (in vivo) alınan β -galaktosidaz enzim aktivitesi değerleri; bu maddelerin bakterinin DNA'sı ile reaksiyona girecek bir aktiflik kazanmadıklarını göstermektedir. Bu nedenle uygulamamız sonucu ortaya çıkan β -galaktosidaz enzim aktivitesi değerleri ışığında bu maddeleri mutajen olarak değerlendiremeyiz.

Elde ettiğimiz bu sonuçlar; literatürde CY ve CY'in idrardaki metabolitlerinin mutajen olduklarını bildiren çalışmalar ile örtüşmemektedir (Pool, 1988; Lahdetie, 1990). Ancak CY'in farmakokinetiği ve memeli karaciğerindeki metabolizması sonucu açığa çıkan metabolitleri ile ZnCl₂ gibi maddelerin etkileşiminin belirlenmesinde; bu ara ürünlerin yapılarının ve şayet bir etkileşim var ise bunun mekanizmasının açığa konabilmesi için, kısa ve uzun zamanlı deneylerin bir arada yürütüldüğü daha detaylı ve kesin bilgiler sağlayacak çalışmaların yapılması gerektiğini inanmaktayız. Zira çalışmamızda kullandığımız Umu-test sistemi yöntemi sadece mutajenitenin belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Çalışmanın çok yönlü hale getirilmesi amacıyla kombinasyonların çoğaltılması ve bu kısa zamanlı testlere kimyasal maddelerin metabolizmalarının gerçekleşebileceği ek ortamlar da eklenmesi (S9 fraksiyonu gibi); CY ve koruyuculuğu araştırılan ZnCl₂ gibi maddelerin metabolitleri ile gerçekleşen mutajenite yorumlarını daha sağlıklı yapmamızı sağlayabilir. Ayrıca kullandığımız kimyasal maddelerin uygulama sırasında mutajenitenin yanı sıra doğabilecek zararlı etkilerinin de araştırılması ancak kısa ve uzun zamanlı testlerin birlikte kullanılması ile mümkün olabilir. Bizim amacımız da bundan sonraki çalışmalarımızda denediğimiz kimyasalların biyolojik potansiyellerini; ek ortamlarla desteklenebilen kısa zamanlı testler ile uzun zamanlı testlerin ortak bir disipline yürütüldüğü uygulamalar ile kapsamlı bir şekilde incelemektir.

Yapılan benzer çalışmalar incelenecek olursa Pool'un CY genotoksitesini üzerine mesnanın in vivo ve in vitro etkileri konulu çalışmasında mutajenite düşük miktarda da olsa azalmıştı.[19]. Bu çalışmada kullanılan etken madde ile CY'nin etkileşimi akla şu düşünceleri getirmektedir. ZnCl₂, CY'in bakterisidal fonksiyonlarını azaltmış olabilir. ZnCl₂ in vivo şartlarda oluşan fakat in vitro koşullarda oluşmayan yollarla CY'in biyolojik dönüşümünü etkilemektedir. Bunu örneğin; aktive edici enzimleri inhibe ederek ya da deaktive edici enzimleri indükleyerek başarıyor olabilir.

Pool'un çalışmasında CY'in farklı metabolitleri üzerinde sadece akroleinin toksisitesinin mesna ile yok edilebilmiş olması ve diğer metabolitlerin hiçbirine mesnanın etki etmemesi çalışmamızda ZnCl₂'ün mutajeniteyi neden düşürmediği konusunda bize fikir vermiştir.

ZnCl₂ tek başına mutajenik değildir ve CY ile birlikte uygulandığında CY metabolitlerinin mutajenitesini kayda değer biçimde düşürememektedir. Bu nedenle in vitro koşullarda ZnCl₂'ün hem CY'i aktive etmekle sorumlu enzimleri inhibe etmediği, hem de reaktif mutajenik ara ürünleri ortamdaki uzaklaştırmadığı sonucuna varılabilir. Zira, ZnCl₂'ün direkt olarak faaliyet

gören genotoksinlerin genotoksik aktivitelerini baskılamadığı da açık bir biçimde görülmektedir.

Bunun yanı sıra düşünüldüğü gibi $ZnCl_2$ 'ün oksazofosforinlerin aktivitesini büyük oranda engellediği gösterilememiştir. CY ve $ZnCl_2$ uygulaması üzerine gerçekleştirilen bir çalışmada; $ZnCl_2$ 'ün kanda ve kemik iliğindeki çekirdekli hücre sayılarının korunması yönünde etki göstererek CY toksisitesini belirgin bir biçimde azalttığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada; $ZnCl_2$ 'ün sitoprotektif etkileri olduğu ve bu etkinin $ZnCl_2$ dozunun artırılması ile daha da arttığı gösterilmiştir [7]. Doza bağlı olarak gelişen bu etki bizim çalışmamız tarafından da desteklenmektedir. Bir başka çalışmada sıçanlara 30 mg/kg CY verildiğinde bu sıçanlardan alınan idrar örneklerinin Ames testinde mutajenite gösterdiği bildirilmiştir [12]

Benzer bir çalışmada ise, sıçanlara verilen CY-mesna kombinasyonunun, CY'in farklı metabolitleri üzerinde sadece akroleinin detoksifikasyonunu arttırdığı ancak diğer metabolitlerin hiçbirisine mesnanın etki etmediği ortaya konmuştur. Ayrıca CY'in neden olduğu ürotoksisiteyi önlemede mesnanın etkili olmadığı gösterilmiştir [19];[13],[22]. Her iki çalışmada da in vitro şartlarda alınan sonuçlara göre, mesnanın CY mutajenitesini düşürmediği ortaya konmuştur.

Sıçanlarda yapılan bir deneysel çalışmada; 20 ve 40 mg/kg intraperitoneal CY uygulamasının ardından intrakardiyak olarak alınan kan örneklerinin, kan sayım cihazında ölçümleri sonucu CY uygulanan ve uygulanmayan sıçanların doz-toksisite eğrileri çizilmiş ve bu toksisitenin azalıp azalmadığını göstermek için yapılan varyans analizleri ile , CY'in dalakta ve kemik iliğinde mutajen olduğu gösterilmiştir [16].

CY ve $ZnCl_2$ ile yaptığımız Umu test sonuçları başta Pool 'un çalışması olmak üzere birçok çalışma ile benzer niteliktedir [19]

CY mutajenitesinin Verapamil ile önlenmesinin amaçlandığı Umu test sistemi ile gerçekleştirilen bir çalışmada; bizim çalışmamıza benzer şekilde CY'in mutajenite göstermediği ve koruyucu ajan olarak kullanılan Verapamil ile mutajenite açısından bir koruyuculuğun gözlenmediği ortaya konmuştur [8]. Bu açıdan çalışmamızı desteklemektedir.

Çalışmamızda kullandığımız kimyasalların yapıları da, bazen onların aktivite göstermemelerine sebep olmaları nedeniyle göz ardı edilmemelidir. İşte bu gizli kalan potansiyeli açığa çıkarmada, kısa zamanlı testlerin sayısını

çoğaltmak ve uzun zamanlı testlerle desteklemek gerekir [5] Umu test sistemini kullanarak, sıçanların idrarında kimyasal maddelerimizin etkileşimini incelediğimiz çalışmalardan elde ettiğimiz bulgular ve literatür bilgilerimiz ışığında, çinko dozunun belirli oranlarda artırılması ile daha yüksek dozlarda CY kullanılarak daha güçlü bir terapötik etkinliğin sağlanabileceğini ve çinko ile tedavinin, CY'in terapötik indeksini yükseltmek için kullanılabilir bir model olabileceğini söyleyebiliriz.

Sonuçlarımız literatür bildirimleriyle uygunluk göstermemekle beraber, özellikle bu tür kimyasalların farmakokinetikleri konusunda daha kapsamlı araştırmalar yapılması gerektiğine inanıyor ve bundan sonraki çalışmalarımızda, kullandığımız kimyasalların biyolojik potansiyellerini, uzun zamanlı testlerle tekrar denemek istiyoruz.

5. KAYNAKLAR

1. Ben-Yehuda, D., Krichevsky, S. and Caspi, O., 1996, Microsatellite Instability and p53 Mutations In Therapy Related Leuemia Suggest Mutator Phenotype. *Blood*, 88, 4296-4303.
2. Bernacki, R.J., Bansl, S.H. and Gurtoo, H.L., 1987, Combinations of Mesna With Cyclophosphamide Adriamycin In Treatment of Mice With Tumors, *Cancer Research* 47, 799-802 .
3. Bramwell, V.C.H., Mouridsen, H.T., Santaro, A., Blackledge, G., Somers, R., Verwey, J., Dombrowsky, P., Onsrud, M., Thomas, D. and Sylvester, R., 1987, Cyclophosphamide Versus Ifosfamide, Final Report of A Randomized Phase II Trial In Adult Soft Tissue Sarcomas, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 311-321.
4. Brock, N., Burkert, H., Günther, U., Hofer-Janker, H., Metrenga, D., Schnitker, J. and Voigtman, R., 1979, Controlled Clinical Studies with an Antidote Against the Urotoxicity of Oxazaphosphorines: Preliminary Results, *Cancer Treat. Rep.*, 63, 501-505.
5. Ceyhan, E., 2001, 2,3-Difenil Substitue Kinoksalin'in 11 Farklı Türevinin Mutajenik Aktivitesinin Umu Test Sistemi İle Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi.
6. Ciliv, G., Emerk, B. ve Karan, A., 1980, İnsan Biyokimyasına Giriş, 224.
7. Doğan, S., 2003, Antikanser Tedavide Siklofosfamid Nedenli Hemotoksisitenin Önlenmesinde Çinkonun Olası Sitoprotektif Etkileri, T.C. Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi Biyoloji Anabilim Dalı.
8. Gültekin, G., 2004, In Vivo ve In Vitro Şartlarda Cyclophosphamide Mutajenitesi ile Verapamil Etkileşiminin Rat İdrarında Umu Test Aracılığı ile Belirlenmesi, Osmangazi Üniversitesi Genel Biyoloji Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.

9. Kayaalp, O.,1989, Rasyonel Tedavi Yönünden Tibbi Farmakoloji, Feryal Kayaalp, O.,1991,Tibbi Farmakoloji Altıncı Baskı,305-309.
10. Kawabata, T.T., Chapman, M.Y., Kim, D.H., Stevens, W.D. and Holsapple, M.P., 1990. Mechanism of In Vitro Immunosuppression by Hepatocyte Generated Cyclophosphamide Metabolites and 4-Hydroxycyclophosphamide, *Biochemical Pharmacology.*, Vol.40, No. 5, 927-935.
11. Krupp, MA., Chatton, MJ. and Tierney, LM.,1986, Current Medical Diagnosis and Treatment Large Med. Pub., Copyright, 802-803.
12. Lahdetie, J., Rety, R., and Sorsa, M., 1990, Interaction of Mesna With the Mutagenicity of Cyclophosphamide In Vitro and In Vivo Mutation Research, 245, 27-32.
13. Lerza, R.,1988, Studies On Hemotoxicity of Cyclophosphamide, Doxorubicin and Cis-Diamminodichloroplatinum Combined With Sodium-2-Mercaptoethane Sulfonate, *Tumori*, 74, 333-337.
14. Matsui, N., Kaya, T., Nagamine, K., Yasukawa, T., Shiku, H., Matsue, T., 2006, Electrochemical mutagen screening microbial chip, *Biosensors & Bioelectronics* 21 (7) 1202-1209.
15. Miller, JH., 1972, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 352-355.
16. Moore, FR., Urda, GA., Krishna, G. and Theiss, JC., 1995, An In Vivo/In Vitro Method for Assessing Micronucleus and Chromosome Aberration Induction in Rat Bone Marrow and Spleen , *Studies with Cyclophosphamide Mutat. Res.* 335(2), 191-199.
17. Oda, Y.,Yamazaki, H., Watanabe, M., Nohmi,T. and Shimada , T.,1993, Highly Sensitive Umu Test System For The Detection of Mutagenic Nitroarenes In Salmonella typhimurium NM 3009 Having High O-acetyltransferase and Nitroreductase Activities Environ and Molecular Mutagenesis, 21,357-364.
18. Plaza, G., Nalecz-Jawecki, G., Ulfing, K., Brigmon, RL., 2005, Assessment of genotoxic activity of petroleum hydrocarbon-bioremediated soil, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62, (3) 415-420.
19. Pool, B.L., Bos, R.P., Niemeyer, U., Theuws, J.L.G. and Schmahl, D., 1988, In Vitro/ In Vivo Effect of Mesna on The Genotoxicity and Toxicity of Cyclophosphamide, A study Aimed At Clarifying The Mechanism of Mesna's Anticarcinogenic Activity, *Toxicology Letters*, 41, 49-56.
20. Povirk, L. and Shuker, D., 1994, DNA Damage and Mutagenesis Induced by Nitrogen Mustards. *Mutat. Res.*, 318, 205-226.

21. Roosen, N., Doz, F., Yeomans, K.L., Dougherty, D.V. and Rosenblum, M.L., 1994, Effect of Pharmacologic Doses of Zinc On The Therapeutic Index of Brain Tumor Chemotherapy With Carmustine, *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 385-392.
22. Scheef, W., Klein, H.O., Moore, F.R., Urda, G.A., Krishna, G. and Theiss, J.C., 1995, An In Vivo/In Vitro Method for Assessing Micronucleus and Chromosome Aberration Induction in Rat Bone Marrow and Spleen , *Studies with Cyclophosphamide Mutat. Res.* 335(2), 191-199.
23. Schmidt, B., Rasmussen, L.H., Svendsen, G.W., Ingerslev, F., Hansen, H.C.B., 2005, Genotoxic activity and inhibition of soil respiration by plaqubside a bracken fern carcinogen, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24 (1) 2751-2756.
24. Wellinghausen, N., Kirchner, H. and Rink, L., 1997, The Immunobiology of Zinc. *Immunology Today* November vol. 18, 519-521.
25. Yenson, M., 1984, İnsan Biyokimyası 5. Baskı , Beta Basım Yayım Dağıtım A.Ş. İstanbul, 588-591.
26. Le Bricon, T., Gugins, S., Cyoneber, L. and Baracos, V.E., 1995, Negative Impact of Cancer Chemoterapy on Protein Metabolsim in Healty and Tumor – Bearing Rats, *Metabolism*, 44(10):1340-1348
27. Slattery, J.I., Sanders, J.E., Buckner, C.D., Schaffer, R.L., 1995, Graft – Rejection and Toxicity Following Bone Marrow Transplantation in Relation to Busulfan Pharmacocinetics, *Bone Marrow Transplant*, 16(1):31-42.
28. Uchida, S., Suzuki, K., Akiyama, S., Miyamoto, M., Juji, T. and Fujiwara, M., 1994, Suppressive Effect of Cyclophosphamide on the Progression of Lethal Graft-Versus-Host Disease in Mice: A Therapeutic Model of Fatal Post – Transfusion GVHD, *Ther. Imuunol.*, 1(6):313-318.
29. Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T. and Shinagausa, H., 1985, Evaluation of the New System (Umu Test) For the Detection of Environmental Mutagens and Carcinogens, *Mutation Res.*, 147:219-229.