

***IN VIVO* VE *IN VITRO* ŞARTLARDA CYCLOPHOSPHAMİDE MUTAJENİTESİ İLE VERAPAMİL ETKİLEŞİMİNİN UMU TEST SİSTEMİ İLE RATLARIN İDRARLARINDA İNCELENMESİ**

Adnan AYHANCI*, Gülfer GÜLTEKİN**

* Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
Eskişehir.

** Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Eskişehir.

ÖZET

Cyclophosphamide'in (CY) normal hücrelere olan toksisitesini önlemek amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilmektedir. Son zamanlarda Verapamil'in (Ver) bazı antineoplastik ilaçların toksik etkilerini azaltarak onların daha etkin olan yüksek dozlarda kullanılmalarına olanak sağladığı bildirilmiştir. Biz de bu literatür bilgilerinden yola çıkarak çalışmamızda; kullandığımız kimyasalların (CY ve Ver) olası mutajenik aktivitelerini ve bu aktiviteler dahilinde doza bağlı olan ya da olmayan etkileşimlerini Umu test yöntemine göre ortaya koymaya amaçladık.

CY ve CY+Ver kombinasyonlarının direkt olarak bakteriye uygulanmaları ve bu maddelerin sıçanlara enjeksiyonları sonrasında alınan idrar örneklerindeki metabolitlerinin bakteriye uygulanmaları sonucunda Umu test sistemi ile almış olduğumuz değerler bu doz ve kombinasyonlarının hiçbirinin herhangi bir mutajenik aktivite göstermediklerini yani; bu maddelerin bakterinin DNA'sı ile reaksiyona girecek bir aktivite kazanmadıklarını göstermiştir.

Bu sonuçlara bağlı olarak; CY ve CY+Ver kombinasyonlarının direkt olarak bakteriye uygulanmaları sonucu elde edilen değerler, sadece CY ile denenen sonuçlara göre bir azalma göstermediğinden Umu test sistemi dahilinde Ver'in CY'e karşı koruyucu olduğu konusundaki literatür bilgileri desteklenmemiştir.

Yine CY ve CY+Ver kombinasyonlarının sıçanlara enjeksiyonları sonrasında alınan idrar örneklerindeki metabolitlerinin bakteriye uygulanmaları sonucunda elde edilen sonuçlar; literatürde CY ve CY'in idrardaki

metabolitlerinin mutajen olduklarına dair olan çalışmalar ile farklılık göstermektedir. Sonuçlarımız bu açıdan literatür çalışmalarını desteklememiştir.

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

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

ABSTRACT

Various methods have been developed to prevent toxicity of CY in normal cells. Recently calcium channel blockers like Verapamil (Ver) have been as reported decreasing the toxicity of antineoplastic drugs and are reported to be used in high dosage rates.

By using literature knowledge in our in vitro and in vivo Umu test study, we aimed to determine whether or not probable mutagenic activity and interaction of our chemicals (CY and Ver) was their dosage rates.

Both of CY, CY+Ver combinations and metabolites in the urine taken from rats which were injected with our chemicals treated on bacteria and none of these dosage rates and their combinations showed no mutagenicity and these results showed that our chemicals weren't activated to react with bacterial DNA.

Literature knowledge which is reported Verapamil has protective effect against CY couldn't have supported because there was no decreasing between CY+Ver 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 its metabolites in urine. Therefore our results didn't support the literature studies.

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

1. GİRİŞ

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçları; kana karıştıktan sonra hızla çoğalan kanser hücrelerinin içine girerler. Kanser hücresinin büyüme ve çoğalmasını engeller ve sonunda yok olmasını sağlarlar [22].

Hücre bölünmesini engelleyen ve hücre ölümüne yol açarak immün sistemi baskılayan Cyclophosphamide (CY) bir Oksazofosforin türevidir. 1958 yılında Alman bilim adamları tarafından tıp dünyasına kazandırılmıştır ve ilerlemiş yetişkin tümörlerinin tedavisi için uygulanan kemoterapi reçetelerinde sıklıkla kullanılan bir antineoplastiktir. Anormal immünite sonucu ortaya çıkan malignitelerde başlıca tercih edilen ucuz bir ajandır ve yılda yaklaşık 500 bin vakada kullanılmaktadır [6]; [5]; [17]. CY; azotlu hardalın (nitrogen mustard) döngüsel bir fosfamid esteridir. CY'nin kimyasal yapısı Şekil 1'deki gibidir [7].

Bir CY metaboliti olan akroleinin 3-10 mg/lt arasındaki konsantrasyonlarının; 12 günlük fare embriyosunda anormal gelişmelere neden olduğu gözlenmiştir [21] CY; ovaryum foliküllerinde epitel doku için toksiktir. Zira dişi sıçanlara 40 mg/100 gr CY verildiğinde ovaryum foliküllerinin normal gelişiminin inhibe olduğu gözlenmiştir (Burkl, 1978). Deneysel bir çalışmada; sadece CY verilen lösemili farelerde, kilo kaybı olduğu bildirilmiştir [6]. CY'nin özellikle daha önce kemoterapi görmüş hastalarda lökopeni yaptığı bildirilmiştir [6]

Verapamil (Ver); kalsiyum kanal blokleri (kalsiyum antagonisti) olan bir ilaçtır [8] Hücrel etkinliklerin gerçekleşebilmesinde, hücre içinde bulunan serbest Ca^{+2} derişimi yattığı bilindiğinden; hücrelerdeki kalsiyum iyonu miktarı çok önemlidir. Ca^{+2} ; endoplazmik retikulum, sarkoplazmik retikulum ve mitokondri gibi çeşitli organellerde proteine bağlı durumdadır. Sitoplazmada yer alan serbest Ca^{+2} konsantrasyonu ise büyük önem taşır. Çünkü elektriksel uyarıların, transmitterlerin, çeşitli hormonların ve doku faktörlerinin gerçekleşen son etkileri; hücre içi serbest Ca^{+2} konsantrasyonunu arttırmaktır. Günümüzde kalsiyum iyonlarına, hücrel faaliyetlerdeki önemli rollerinden dolayı; ikinci haberci gözü ile bakılmaktadır [27] Kalsiyum Kanal Blokerleri (KKB), benzer etkilerine rağmen birbirinden çok farklı moleköl yapılarına sahiptirler

Ver gibi KKB'ler genellikle; voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını bloke ederek, hücre dışından hücre içine kalsiyum girişini engellerler. Ver'in de içinde bulunduğu fenilalkilamin türevi kalsiyum antagonistleri sitoplazma

membranında yer alan yavaş kanallardaki kalsiyum kanal proteinine veya oligomerik kompleksi üzerindeki özel bağlanma yerlerine yüksek afiniteli şekilde bağlanarak Ca^{+2} girişini azaltırlar. Ancak yüksek konsantrasyonlarda, alfa adrenerjik reseptörler üzerine nöradrenalin ile rekabete girerek reseptör bağımlı kalsiyum kanallarını da bloke ederler [29].

Ver'in tedavide sitotoksik ilaçlara karşı hücre direncini arttırmak için iyi bir aday olduğu bildirilmiştir ([4]; [1]; [25];[2];[23];[18]).

Ver'in sitoprotektif etkilerinin olduğu ve yan etkileri bakımından da oldukça güvenli bir ilaç olduğu öne sürülmüştür [3].

CY ve Ver uygulanması üzerine gerçekleştirilen bir çalışmada; Ver'in CY toksisitesini kanda ve kemik iliğinde belirgin bir biçimde azalttığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada; Ver'in sitoprotektif etkileri olduğu ve bu etkinin Ver dozununun arttırılması ile daha da arttığı gösterilmiştir [1]. 50, 100 ve 150 mg/kg CY'in neden olduğu ürotoksisite üzerine Ver'in mesanedeki muhtemel koruyucu etkisi normal sıçanlarda araştırılmış ve 2 mg/kg Ver'in, bu dozlardaki CY toksisitesini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir [25].

Bazen kanser hücreleri aynı anda birden fazla kemoterapötik ilaca karşı direnç geliştirebilirler. Bu direnci; ilaçları membranda bulunan pompalar aracılığı ile hücre dışına atmak şeklinde gösterirler. Bunu önlemek ve kanser tedavisinin olumlu sonuçlar vermesini sağlamak için; bu pompalarda yer alan ve antineoplastik ilaçları hücre dışına atan proteini kodlayan geni inhibe ettiği ileri sürülen Ver gibi KKB'ler denenmektedir [16].

Çalışmamızda; Ver'in olası bir CY mutajenitesi ile etkileşme gösterebileceği denenmiştir. Bu düşünceden yola çıkarak; Ver'in ve CY'nin mutajenitesini hangi yönde etkileyebileceğini Umu test sisteminden yararlanarak araştırdık. Umu test yöntemi geniş bir kullanım alanına sahip bir yöntemdir [26];[19];[12]. Bizde bu yöntemle maddelerin genotoksik potansiyellerini belirledik.

2. MATERYAL-METOD

Materyal

Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda kullanılan CY ve Ver eczaneden ilaç formları olarak, diğerleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Araştırmaları Destek Merkezinin yardımları ile Merck ve Sigma firmalarından alınmıştır.

Deney Hayvanları

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

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

Deneyde Kullanılan Bakteri Suşları

Kimyasalların mutajenik aktivitelerinin belirlenmesinde; bir genotoksisite ölçütü olarak *Salmonella typhimurium* adı verilen indikatör organizmalar kullanıldı [15]. 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'in içine yerleştirilmiştir. Bu özellikler sayesinde testin hassasiyeti artırılmış ve Umu testi için atasal suş olan *Salmonella typhimurium* TA 1535 / Psk 1002 suşu oluşturulmuştur [15]

***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.[15]

***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 göstermektedir [15].

CY ve Ver 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 [9]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.[10];[24][20]. Umu test ile genotoksik parametre belirlenmesi için; hazırlanan 150.000 µg'lık çözeltiden yaklaşık 1/10'luk seri sulandırma ile toplam 5 farklı doz çözeltisi elde edildi.

Tablo 1- CY'nin serum fizyolojik içinde doz ayarlanması

| | |
|------------|--|
| 150.000 µg | 24 ml SF + 900 mg CY |
| 20.000 µg | 25 ml SF + 500 mg CY |
| 10.000 µg | 3 ml SF + 3 ml 20.000 µg'lık çözelti |
| 5.000 µg | 2,5 ml SF + 2,5 ml 10.000 µg'lık çözelti |
| 2.500 µg | 2 ml SF + 2 ml 5.000 µg'lık çözelti |

Kullanılan bir diğer ilaç olan Verapamil'in 2.000 µg/kg'lık sıçanlara verilecek olan çözeltisinin hazırlanmasında 40 mg Ver, 20 ml serum fizyolojik (SF) de eritildi. Verapamil'in 4.000 µg/kg'lık sıçanlara verilecek olan çözeltisinin hazırlanmasında ise 40 mg Ver, 10 ml SF'de eritildi. Umu test sisteminde ise hazırlanan çözeltiler aynen kullanıldı. Sıçana göre (tablo 2) in vitro Umu test CY + Ver uygulamasında; CY'in ve Ver'in uygulanan farklı dozları 15'er µl'den toplamda 30 µl olarak kullanıldı.

Tablo 2- Grupların organizasyonu şu şekilde gerçekleştirildi:

| | |
|---------|-----------------------------|
| 1. grup | 150 mg/kg CY |
| 2. grup | 150 mg/kg CY ve 2 mg/kg Ver |
| 3. grup | 150 mg/kg CY ve 4 mg/kg Ver |

1. gruptaki hayvanlar CY enjeksiyonundan hemen sonra 24 saatlik idrar toplanması amacı ile metabolik kafeslere alındı. Her iki kimyasal ile muamele edilen 2. ve 3. gruptaki sıçanlara önce Ver (t=0), Ver uygulamasından 5 dk. sonra CY uygulaması yapıldı, bunun devamında t=4 ve t=8 sürelerinde yine Ver uygulamaları tekrarlandı [17]. Her kafese bir sıçan konuldu ve deney boyunca kafes başına 50 ml %2'lik sakkarozlu su konularak beklendi. Metabolik kafesler içinde 24 saatlik [17] olarak toplanan idrarlar 0,2 µm'lik membran filtreleri ile sterilizasyonları sağlandı ve Umu test uygulamasına hazır hale getirildi. İdrar örneklerinin mutajenitesi; NM 2009 ve NM3009 adını alan *S. typhimurium* bakteri suşları kullanılarak Umu test sistemi ile uygulandı.

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 (LB) 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'er ml Triptofan Glikoz Ampicillin (TGA) broth ile 1/50 kez seyreltilip, 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 sitotoksitesini saptamak amacıyla OD₆₀₀ de her tüpün bakteri yoğunluğu spektrofotometrede okundu. β-galaktosidaz aktivitesini ölçmek için; hazırlanmış bir seri tüpe, absorbanı 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 [15].

Test tüpleri 420 ve 550 nanometre dalgaboyunda spektrofotometrede okundu ve bu değerler Miller (1972) metoduna göre 1 ünite enzim aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı;

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

t = reaksiyon süresi (dakika)

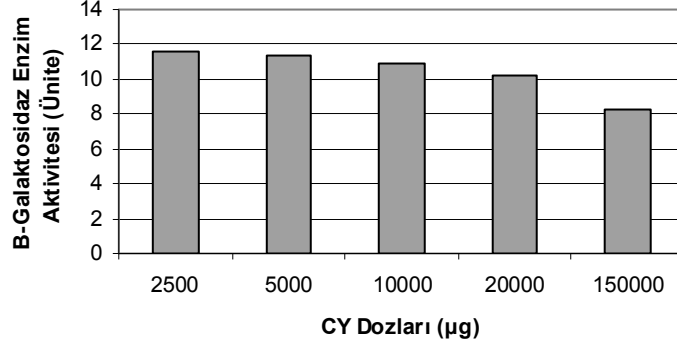
v = deneyde kullanılan kültürün miktarı (mililitre olarak)

A₆₀₀ = deneyde kullanılan kültürün yoğunluğu

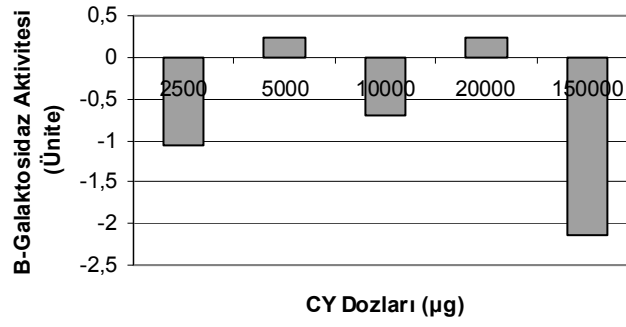
Umu-test sistemi uygulaması sonucunda ortaya çıkan β-galaktosidaz aktivitesinde, kontrole göre en az 2 katlık bir artışın gözlenmesi; test edilen kimyasalın mutajenite açısından pozitif olarak değerlendirilebileceğini gösterdi [15].

3.BULGULAR

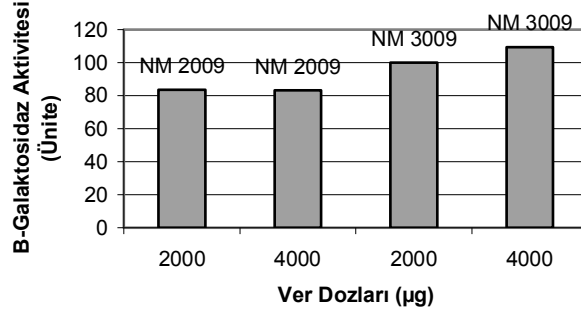
CY ve Ver'i tek başlarına ve birlikte çeşitli doz kombinasyonları şeklinde; direkt bakterilere vermek suretiyle ve sıçanlara enjeksiyonları sonrasında alınan idrar örneklerini bakterilere vermek suretiyle Umu-C Test Sistemi aracılığı ile mutajenite testine tabi tuttuk. Bu testler sonucunda *S.thyphimurium* NM 2009 ve *S.thyphimurium* NM 3009 suşlarından elde edilen β-galaktosidaz enzim aktivitesi değerleri şekillerde sunulmuştur.



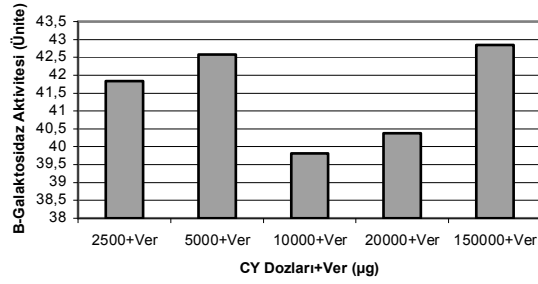
Şekil 1- *Salmonella thyphimurium* NM 2009 suşunun Cyclophosphamide'in 5 farklı dozu ile verdiği β -galaktosidaz enzim aktivitesinin (ünite değeri) doza bağlı grafiği



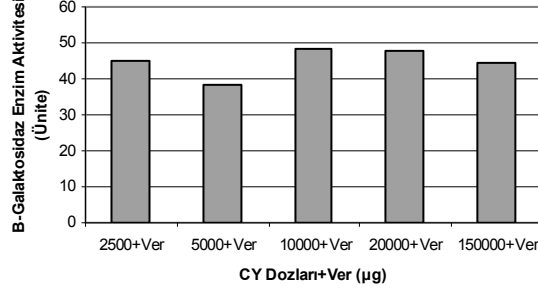
Şekil 2- *Salmonella thyphimurium* NM 3009 suşunun Cyclophosphamide'in 5 farklı dozu ile verdiği β -galaktosidaz enzim aktivitesinin doza bağlı grafiği



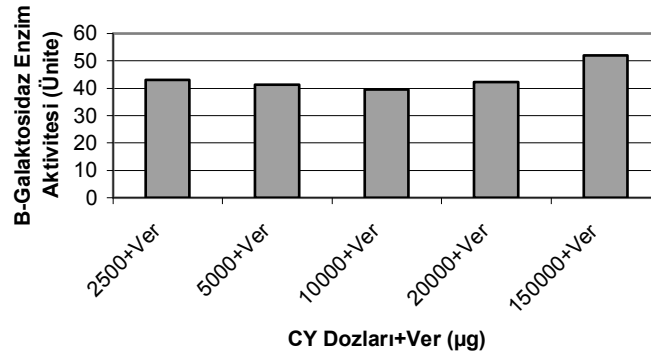
Şekil 3- *Salmonella thyphimurium* NM 2009 ve NM 3009 suşlarının Verapamil'in 2 farklı dozu ile verdikleri β -galaktosidaz enzim aktivitesinin doza bağlı grafiği



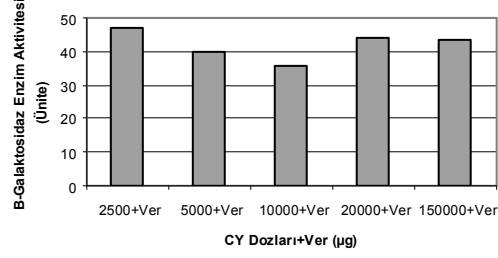
Şekil 4- *Salmonella thyphimurium* NM 2009 suşunun Cyclophosphamide dozları + 2000 µg Verapamil kombinasyonu ile verdiği β -galaktosidaz enzim aktivitesinin doza bağlı grafiği



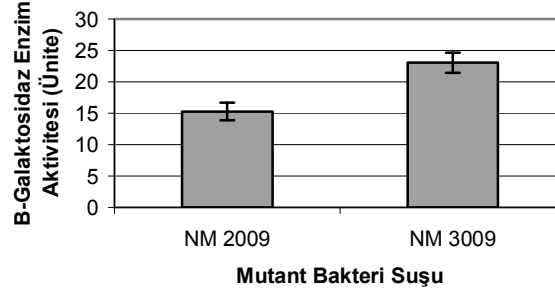
Şekil 5- *Salmonella thyphimurium* NM 3009 suşunun Cyclophosphamide dozları + 2000 µg Verapamil kombinasyonu ile verdiği β-galaktosidaz enzim aktivitesinin doza bağlı grafiği



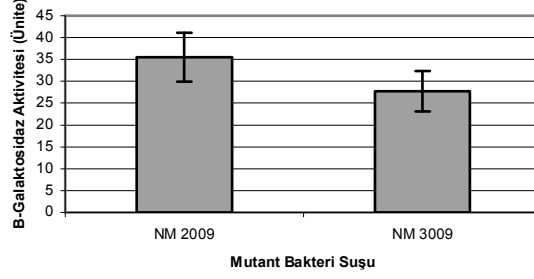
Şekil 6- *Salmonella thyphimurium* NM 2009 suşunun Cyclophosphamide dozları + 4000 µg Verapamil kombinasyonu ile verdiği β-galaktosidaz enzim aktivitesinin doza bağlı grafiği



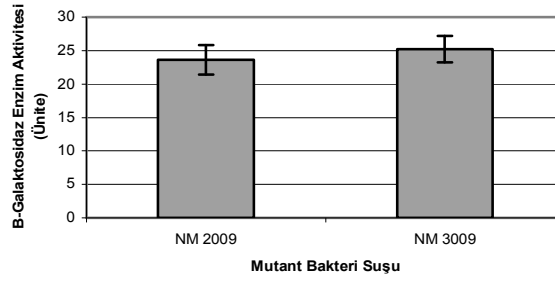
Şekil 7- *Salmonella thyphimurium* NM 3009 suşunun Cyclophosphamide dozları + 4000 µg Verapamil kombinasyonu ile verdiği β-galaktosidaz enzim aktivitesinin doza bağlı grafiği



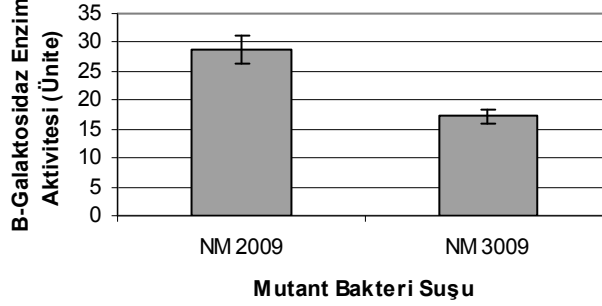
Şekil 8- *Salmonella thyphimurium* NM 2009 ve NM 3009 suşlarının sadece serum fizyolojik uygulanan kontrol grubundaki sıçanların idrarları ile verdikleri β-galaktosidaz enzim aktivitesi değerleri



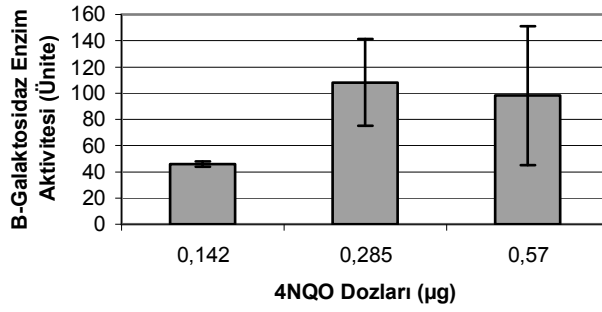
Şekil 9- *Salmonella thyphimurium* NM 2009 ve NM 3009 suşlarının 150.000 µg/kg Cyclophosphamide enjekte edilen gruptaki sıçanların idrarları ile verdikleri β-galaktosidaz enzim aktivitesi değerleri



Şekil 10- *Salmonella thyphimurium* NM 2009 ve NM 3009 suşlarının 150.000 µg/kg Cyclophosphamide + 2.000 µg/kg Verapamil enjekte edilen gruptaki sıçanların idrarları ile verdikleri β-galaktosidaz enzim aktivitesi değerleri



Şekil 11- *Salmonella thyphimurium* NM 2009 ve NM 3009 suşlarının 150.000 µg/kg Cyclophosphamide + 4.000 µg/kg Verapamil enjekte edilen gruptaki sıçanların idrarları ile verdikleri β-galaktosidaz enzim aktivitesi değerleri



Şekil 12- *Salmonella thyphimurium* NM 2009 suşunun pozitif mutajen olarak değerlendirilen 4 NQO'nun 3 farklı dozu ile verdiği β-galaktosidaz enzim aktivitesinin doza bağlı grafiği

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda CY'nin beş ayrı dozunu ve metabolit formlarını yine aynı şekilde Ver'in 3 ayrı dozunu ve metabolit formlarını ayrı ayrı ve birlikte deneylerimizde kullandık. Deneylerimizde bu kimyasalları genotoksik potansiyelleri açısından araştırdık. Elde ettiğimiz rakamsal değerleri ünite hesapları formülünde yerine koyarak ünite değerlerini pozitif mutajen 4NQO ve fizyolojik su ile karşılaştırdık.

CY ve CY+Ver kombinasyonlarının direkt olarak bakteriye uygulanmaları ile alınan değerler ile bu maddelerin sıçanlara enjeksiyonları sonrasında alınan idrar örneklerindeki metabolitlerinin çalışılması ile alınan değerler; bu maddelerin bakterinin DNA'sı ile reaksiyona girecek bir aktiflik kazanmadıklarını göstermiştir. Rakamlardaki sayısal farklılıklar da bu maddeler hakkında direkt mutajendir diyebileceğimiz bir sonuç ortaya koymamıştır.

Elde ettiğimiz bu sonuçlar; literatürde CY ve CY'in idrardaki metabolitlerinin mutajen olduklarına dair olan çalışmalar ile farklılık göstermektedir [17];[9]. Ancak CY'in farmakokinetiği ve memeli karaciğerindeki metabolizması sonucu açığa çıkan metabolitleri ile Ver gibi maddelerin etkileşiminin belirlenmesinde; bu ara ürünlerin yapılarının ve şayet bir etkileşim var ise bunun mekanizmasının açığa konabilmesi için çalışılan diğer kısa zamanlı testler ile birlikte uzun zamanlı testlerin denenmesi gerektiğini savunmaktayız. Çünkü sadece Umu test sistemi ile yalnızca mutajenite kavramı konusunda yorumlar yapabiliriz. Böyle kısa zamanlı testlere kimyasal maddelerin memeli metabolizmalarının gerçekleşebileceği ek ortamlar da ekleyerek (S9 mix gibi); CY ve koruyuculuğu araştırılan Ver gibi maddelerin metabolitleri ile gerçekleşen mutajenite yorumlarını daha kesin bir ifade ile yapabiliriz. Ayrıca mutajenite dışında diğer etkilerinin araştırılması yine yukarıda da değindiğimiz gibi kısa ve uzun zamanlı testlerin birlikte ortaya koyacağı sonuçlar ile değerlendirilebilir. Biz de bundan sonraki çalışmalarımızda denediğimiz kimyasalların biyolojik potansiyellerini; ek ortamlarla desteklenebilen kısa zamanlı testler ve diğer uzun zamanlı testlerle tekrar denemek istiyoruz.

Ayrıca in vitro ortamda CY+Ver dozlarından alınan enzim ünite değerlerinin sadece CY dozlarından alınan değerlere göre yüksek olmasına karşın; in vivo ortamda CY+Ver enjeksiyonu sonrasında alınan idrar örneklerinin enzim ünite değerlerinin sadece CY enjeksiyonu sonrasında alınan idrar değerlerinden düşük olmasının nedeni henüz tam olarak belli değildir.

[9]ve[17]'nin çalışmalarında da in vitro şartlarda alınan sonuçlara göre mesnanın (mercapto etan sulfonat) CY mutajenitesini düşürmediği ortaya konmuştur. CY'in olası mutajenitesinin Zn ile önlenmesinin amaçlandığı Umu test sistemi ile gerçekleştirilen bir çalışmada; bizim çalışmamıza benzer şekilde CY'in mutajenite göstermediği ve koruyucu ajan olarak kullanılan Zn ile mutajenite açısından bir koruyuculuğun gözlenmediği ortaya konmuştur [28]. Bu açıdan çalışmamızı desteklemektedir.

CY ve Ver gibi kimyasalların ikincil yapıları bazen onların aktivite göstermemelerine yada farklı aktivite göstermelerine sebep olabilirler. İşte bu gizli kalan potansiyeli açığa çıkarmada kısa zamanlı testlerin sayısını çoğaltmak ve ek olarak bunları uzun zamanlı testlerle desteklemek gerektiğine inanmaktayız. Bunun yanı sıra tıpta ilaç olarak kullanılan CY ve Ver gibi maddelerin farmakokinetiklerinin farklı ortamlarda ayrıntılı olarak incelenmesi; gerek tıpta kullanım yararlarını ve risklerini tam olarak ortaya koyabilme açısından, gerekse tedavide daha yüksek verim elde edebilme açısından son derece önemlidir.

5. KAYNAKLAR

1. Ayhancı, A., 1992, Cyclophosphamide'in Kanserojenik Etkisinin Kalsiyum Kanal Blokerleri (Verapamil) ile Kanda ve Kemik İliğinde Azaltılması, Yüksek Lisans Tezi, T.C. Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı.
2. Baeyens, J.M., 1988, Interaction Between Calcium Channel Blockers and Noncardiovascular Drugs: Interaction With Anticancer Drugs, *Pharmacol. Toxicol.*, 63:1-7.
3. Başaran, A., Erol, K., Başaran, N., 1991, Verapamilin Karaciğer Rejenerasyonu ve Bazı Enzim Düzeylerine Etkisi, *Doğa. Tr. J. of Medical Sciences*, Tübitak, 303-313.
4. Bayçu, C., Sayın, N., Gürer, F., Erol, K., Saran, Y., 1990, Methotrexate'in Karaciğerde Yaptığı Toksik Etkinin Verapamil ile Önlenmesi, *Anadolu Tıp Dergisi*, 12(2), 63-72.
5. Bernacki, R.J., Bansl, S.H., and Gurtoo, H.L., 1987, Combinations of Mesna With Cyclophosphamide Adriamycine in Treatment of Mice With Tumours, *Cancer Research* 47, 799-802.
6. Bramwell, VCH., Mouridsen, H.T., Santaro, A., Blackledge, G., Somers, R., Verwey, J., Dombernowsky, P., Onsrud, M., Thomas, D., Sylvester, R., 1987, Cyclophosphamide Versus Ifosfamide: Final Report of A Randomized Phase II Trial in Adult Soft Tissue Sarcomas, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 23(3):311-321.
7. Budavari, S., et al., 1989, *An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*, The Merck Index, Eleventh Edition Centennial Edition, USA, 429-430,1563.
8. Kayaalp, S.O., 1989, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Feryal Matbaacılık Ankara, C:I, S:973-993, C:II, S:1100-1107.

9. Lahdetie, J., Rety, R. and Sorsa, M., 1990, Interaction of Mesna With the Mutagenicity of Cyclophosphamide InVitro and In Vivo Mutation Research, 245, 27-32.
10. 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.
11. Lerza, R., Bogliolo, G., Mencoboni, M., Saviane, A., Pannacciuli, I., 1988, Studies On Hemotoxicity of Cyclophosphamide, Doxorubicin and Cis-Diamminodichloroplatinum Combined With Sodium–2-Mercaptoethane Sulfonate, Tumori, 74:333-337.
12. Matsui, N., Kaya, T., Nagamine, K., Yasukawa, T., Shiku, H., Matsue, T., 2006, Electrochemical mutagen screening microbial chip, Biosensors & Bioelectronics 21 (7) 1202-1209.
13. Miller, J.H., 1972, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 352-355.
14. Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T. and Shinagausa, H., 1985, Evalution of the New System (Umu Test) For the Detection of Environmental Mutagens and Carcinogens, Mutation Res., 147:219-229.
15. Oda, Y., Yamazaki, H., Watanase, 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.
16. Özgüroğlu, M., 2003, Akciğer Kanserinde İlaç Direnci, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı, İstanbul, Vol:5, Sayı:3, 180-183.
17. 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.
18. Rogan, A.M., Hamilton, T.C. and Young, R.C., 1984, Reversal of Adriamycin Resistance by Verapamil in Human Ovarian Cancer, Science, 224:994-996.
19. Schmidt, B., Rasmussen, LH., Svendsen, GW., Ingerslev, F., Hansen, HCB., 2005, Genotoxic activity and inhibition of soil respiration by

- plaquibside a bracken fern carcinogen, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24 (1) 2751-2756.
20. Slattery, JI., Sanders, JE., Buckner, CD., Schaffer, RL., 1995, Graft – Rejection and Toxicity Following Bone Marrow Transplantation in Relation to Busulfan Pharmacokinetics, *Bone Marrow Transplant*, 16(1):31-42.
 21. Stahlmann, R., Bluth, U. And Neubert, D., 1985, Effects of the Cyclophosphamide Metabolite Acrolein in Mammalian Limb Bud Cultures, *Arch. Toxicol.*, 57:163-167.
 22. Şenel, F., Çırakoğlu, B., Tübitak GMBAE., Şubat 2003, Yeni Ufuklara Kanserle Savaş, *Bilim ve Teknik, Tübitak.*
 23. Tsuruo, T., Iida, N. and Naganuma, K., 1981, Promotion by Verapamil of Vincristine Responsiveness in Tumor Cell Lines Inherently Resistant to the Drug, *Cancer Res.*, 43:808-811.
 24. 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. Immunol.*, 1(6):313-318.
 25. Uyar, R., Ayhancı, A. ve Altuner, Y., 1996, Siklofosfamid Ürotoksisitesi Verapamil ile Azaltılabilir mi?, *Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, Cilt:XVIII, Sayı:1, 29-39.
 26. Watanabe-Akanuma M., Ohta, T., Sasaki, YF., 2005, A novel genotoxic aspect of thiabendazole as a photomutagen in bacteria and cultured human cells, *Toxicology Letters*, 158, (3) 213-219.
 27. Yıldızoğlu-Arı, N., vd., 1988, Kalsiyum Kanalları ve Kalsiyum Antagonistleri, *Doğa Tübitak Sağlık Bilimleri*, 274-275.
 28. Yolay, E., 2004, İn Vivo ve İn Vitro Şartlarda Cyclophosphamide Mutajenitesi ile Çinko Etkileşiminin Rat İdrarında Umu Test Aracılığı ile Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı.
 29. Yurt, S., Kıyık, M., Tigin, C., Koşar, F., 2001, Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığına Sekonder Gelişen Pulmoner Hipertansiyonda Bronkodilatatör Ve Oksijen Tedavisine Ek Olarak Verilen Amlodipinin Pulmoner Arter Basıncına Etkisi, *Solunum* 2001, 3: 45-50.