



ARAŞTIRMA/RESEARCH

Tenofovir disoproksil fumaratın insan lenfositlerinde genotoksik aktivitesinin incelenmesi

Evaluation of genotoxic activity of tenofovir disoproxil fumarate in human peripheral lymphocytes

Kübra Kurt¹, Lale Dönbak¹, Ahmet Kayraldız¹

¹Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kahramanmaraş, Turkey

Cukurova Medical Journal 2016;41(2):229-235.

Abstract

Purpose: Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV (Human Immunodeficiency Virus) infection, treat by preventing the proliferation of HIV in human body. People with HIV have to use this drugs for lifelong because of inability of the drugs to eradicate the viruses. In this study, we investigated the in vitro genotoxic activity of tenofovir disoproxil fumarate one of the antiretroviral drugs, in human peripheral lymphocytes.

Material and Methods: The cells were treated with four different concentrations of tenofovir disoproxil fumarate for 24 and 48 hours. The levels of sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations, and micronucleus in the cells were examined for the genotoxic activity of tenofovir disoproxil fumarate. Mitotic index, proliferation index, and nuclear division index of treated cells were also determined for the cytotoxic effect of tenofovir disoproxil fumarate.

Results: There was no significant differences in the level of sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations, and micronucleus in human lymphocytes treated with all concentrations of tenofovir disoproxil fumarate for all treatment period as compared to control group. Similarly, it was observed that treatment of tenofovir disoproxil fumarate did not affect the mitotic index, proliferation index, and nuclear division index values.

Conclusion: As a result, in this study, it is demonstrated that tenofovir disoproxil fumarate did not have genotoxic or cytotoxic effect in the human peripheral lymphocytes.

Key words: Genotoxic risk, tenofovir disoproxil fumarate, chromosomal aberrations.

Öz

Amaç: HIV (Human Immunodeficiency Virus) enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan antiretroviral ilaçlar, HIV virüsünün vücutta çoğalmasını ve etkinleşmesini engelleyerek tedavi sağlarlar. Bu ilaçlar virüsü eradike etmediğinden, hastaların viral replikasyonu baskılamak amacıyla ilaçları ömür boyu kullanmaları gerekmektedir. Bu çalışmada antiretroviral ilaçlardan birisi olan tenofovir disoproksil fumaratın insan periferik lenfositlerindeki in vitro genotoksik aktivitesi araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu amaçla hücreler, tenofovir disoproksil fumaratın dört farklı konsantrasyonuyla (2,5, 5, 10, 20 µg/ml) 24 ve 48 saat süreyle muamele edilmiştir. Tenofovir disoproksil fumaratın olası genotoksik aktivitesi için hücrelerdeki kardeş kromatid değişimi, kromozom anormallığı ve mikronükleus düzeyleri incelenmiştir. Sitotoksik etkiyi saptamak amacıyla muamele edilmiş hücrelerde ayrıca mitotik indeks, proliferasyon indeksi ve nükleer bölünme indeksi belirlenmiştir.

Bulgular: Tenofovir disoproksil fumarat etken maddesinden hazırlanan dört farklı doz ile 24 ve 48 saat muamele edilen hücrelerde kardeş kromatid değişimi, kromozomal anormallik ve mikronükleus değerlerinde kontrol grubuna kıyasla önemli bir farklılık saptanmamıştır. Aynı şekilde tenofovir disoproksil fumarat etken maddesi ile muamelelenin mitotik indeks, proliferasyon indeksi ve nükleer bölünme indeksi değerlerini etkilemediği gözlenmiştir.

Sonuç: Bu çalışmada tenofovir disoproksil fumaratın insan periferik lenfositlerinde genotoksik ve sitotoksik etki göstermediği saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Genotoksik risk, tenofovir disoproksil fumarat, kromozomal anormallikler.

GİRİŞ

AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome/Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu), HIV (Human Immunodeficiency Virus/İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü) etkeni nedeniyle insanlarda bağışıklık sisteminin çökmesine neden olan bulaşıcı bir hastalıktır. HIV, bağışıklık sistemine yavaş yavaş nüfuz ederek vücudun enfeksiyonlara karşı direncini yok eder ve bireyi çeşitli rahatsızlıklara karşı korunmasız hale getirerek sonunda ölümüne sebebiyet verir¹.

İlk defa 1981 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde bir grup homoseksüel erkekte ve Haiti'den gelen göçmenlerde AIDS hastalığı tanımlanmıştır. Temel olarak cinsel yolla bulaşan bu hastalık, tanımlandığı ilk yıllarda HIV ile enfekte vakaların az sayıda olması nedeni ile fazla ilgi toplamasa da, daha sonraki yıllarda vakaların giderek artmaya başlaması ile bilim adamlarının odak noktası haline gelmiştir². Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre; Aralık 2014 itibari ile dünyada ortalama 35 milyon insanın HIV-pozitif taşıyıcısı olduğu ve yaklaşık 39,1 milyon hastanın da AIDS nedeniyle hayatlarını kaybettiği belirlenmiştir³.

HIV enfeksiyonunun tedavisinde, viral yükü maksimum ve uzun süreli olarak baskılayan antiretroviral ilaçlar kullanılmaktadır. Antiretroviral tedavinin ilk olarak 1987 yılında uygulanmasından itibaren, DNA virüslerine etki mekanizmaları farklılık gösteren birçok antiretroviral ilaç geliştirilmiştir. Günümüzde, enfeksiyonun tedavisinde; daha etkin ve avantajlı olduğu belirtilen Yüksek Aktiviteli Antiretroviral Terapi (Highly Active Antiretroviral Therapy) uygulanmakta olup bu yöntemde; farklı etki mekanizmasına sahip en az üç antiretroviral ilaç birlikte kullanılmaktadır⁴⁻⁷. Ancak yapılan çalışmalarda, antiretrovirallerin, laktik asidoz, mitokondrial toksisite, hepatotoksisite, hipersensitivite (Stevens-Johnson Sendromu, toksik epidermal nekroliz), kardiovasküler hastalıklar, lipodistrofi, osteoporoz ve osteonekroz, renal toksisite, anemi, pankreatitis, ortostatik hipotansiyon, üst solunum yolu enfeksiyonları, ateş, ishal, isilik, deri kuruması, mide bulantısı, baş ağrısı, baş dönmesi ve halsizlik gibi majör ve minor yan etkilere sahip oldukları saptanmıştır⁸.

Antiretroviral ilaçlar klinik olarak uzun süreli kullanılması gereken ilaçlar arasında yer aldığından, bu ilaçların çeşitli yan etkilerinin yanı sıra genotoksik ve kanserojenik potansiyellerinin de iyi bilinmesi gerekmektedir^{9,10}. Bu çalışmada AIDS tedavisinde

kullanılan antiretroviral ilaçlardan birisi olan tenofovir disoproksil fumaratın (TDF) insan lenfositlerinde genotoksik aktivitenin olup olmadığı kromozom aberasyon (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) testleri ile araştırılmıştır. Olası sitotoksik etkisini incelemek amacıyla ise; proliferasyon indeksi (PI), mitotik indeks (MI) ve nükleer bölünme indeksi (NBI) saptanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Test maddesinin hazırlanması

Bu çalışmada test maddesi olarak Viread (Gilead Sciences Inc.) ticari isimli ilacın etken maddesi olan tenofovir disoproksil fumarat kullanılmıştır. Güçlü bir nükleotid revers transkriptaz inhibitörü olan TDF, adenozin monofosfatın asiklik nükleosid fosfonat diester analogudur ve virüslerin kendilerini yeniden üretmesi için esas olan enzimlerin (hepatit B'de DNA polimeraz, HIV'de revers transkriptaz) normal çalışmasını engelleyerek aktivite gösterir¹¹.

Çalışmada kullanılacak TDF konsantrasyonları, yetişkin bir bireyin günlük alması gereken doz (1 tablet, 300 mg) baz alınarak belirlenmiştir. Buna göre bir tabletin gramı (0.685 gr) ve içindeki etken madde miktarından (245 mg) yola çıkılarak 2.7 ml kromozom mediyumu içeren tüplere, etken maddeden 0.00945 mg ilave edilmesi gerektiği hesaplanmıştır. İlaç saf suda çözündüğü için; 20 ml'lik saf suda 0.0528 gr etken madde ilave edilerek 10 µg/ml stok solüsyon hazırlanmıştır. Bu stok solüsyondaki etken madde miktarı hastanın bir günde alması gereken etken madde miktarına eşittir. Deneylerde, bu doz ile birlikte bir artan ve iki azalan doz olacak şekilde 2.5, 10 ve 20 µg/ml olmak üzere dört doz çalışılmıştır.

Hücre kültürlerinin hazırlanması

Hücre kültürü için sağlıklı, sigara içmeyen ve aynı yaşlardaki (22-24) gönüllü iki bayan ve iki erkekte 5 ml kan örneği alınarak 1/10 oranında heparinize edilmiştir. KKD ve KA testi için, heparinize edilmiş kan örneklerinden 6'şar damla kromozom mediyumu (Gibco, 12552-013) besiyeri içeren tüplere eklenerek 72 saat inkübe edilmiştir. Lenfositler hücre kültüründe, 24 ve 48 saat süreyle 2,5, 5, 10 ve 20 µg/ml'lik TDF ile muamele edilmiştir.

İnkübasyonun 70. saatinde, tüplere kolşisin (Sigma, C-3915) ilave edildikten sonra 2 saat süreyle

inkübatörde bekletilmiştir. Ayrıca, 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde pozitif kontrol olarak mitomisin C (Sigma, M-0503) kullanılmıştır. KKD ve KA analizi için preparatlar Perry ve Thomson¹² ve Evans'a¹³ göre hazırlanmıştır.

MN testi için; kromozom medyumuna, heparinize edilmiş kan örneklerinden 6'şar damla eklenmiş ve tüpler 37 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Lenfositler 24 ve 48 saat süreyle TDF dozları ile muamele edilmiştir. İnkübasyonun 44. saatinde tüplere sitokalsin-B (Sigma, C-6762) ilave edilerek hücrelerde sitokinezin bloklanması sağlanmıştır. MN testi için preparatlar, Rothfuss ve arkadaşlarının¹⁴ geliştirdikleri yöntem modifiye edilerek hazırlanmıştır.

Mikroskopik incelemeler: Mikroskopik incelemelerde, hücre başına düşen kardeş kromatid değişimi (KKD/Hücre) frekansı her bir kişi ve doz için kromozomları iyi dağılmış ve ikinci mitoz bölünmeyi geçiren 25 hücrede saptanmıştır. KA analizi için 100 hücre incelenmiş ve bu hücrelerde gözlenen kromozom yapı ve sayı anormallikleri kaydedilmiştir.

İncelenen bu hücreler içinde anormal hücrelerin yüzdesi ile hücre başına düşen KA sayısı (KA/Hücre) saptanmıştır. Preparatlarda her bir örnek için 1000 binükleat hücrede mikronükleus ve mikronükleuslu binükleat hücre (BNMN) frekansı

belirlenmiştir. Ayrıca TDF'nin sitotoksik etkisini tespit etmek için her bir örnekte proliferasyon indeksi, mitotik indeks ve nükleer bölünme indeksi saptanmıştır.

İstatistiksel analiz

Mikroskopik incelemeler ile elde edilen veriler SPSS 17.0 paket programında t-testi kullanılarak kontrol grubu ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

BULGULAR

Tenofovir disoproksil fumarattan hazırlanan 2,5, 5, 10 ve 20 µg/ml'lik konsantrasyonlarla muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde saptanan sitogenetik markırlara ait ortalama değerler, Tablo 1, 2 ve 3'de verilmiştir.

İnsan periferik lenfositlerinin TDF ile 24 ve 48 saat muamelesi sonucunda elde edilen veriler hücre başına düşen kardeş kromatid değişimi frekansı yönünden karşılaştırıldığında, tüm dozlarda kontrol grubuna göre önemli bir farklılık gözlenmemiştir (p>0.05) (Tablo 1). Benzer şekilde, proliferasyon indeksi yönünden değerlendirme yapıldığında TDF ile hem 24 hem de 48 saatlik muamele ile tüm dozlarda PI değerinde kontrole göre gözlenen farklılıkların istatistiksel olarak önemli düzeyde olmadığı saptanmıştır (p>0.05).

Tablo 1. Tenofovir disoproksil fumaratın farklı dozları ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi (KKD/Hücre) ve proliferasyon indeksi (PI) değerleri.

Test maddesi	Muamele		KKD±SD	PI±SD
	Süre (s)	Doz (µg/ml)		
K (-)a	24	0,0	3.47±0.37	2.13±0.00
K (+)b		0,1	42.56±2.28	1.35±0.01
TDFc		2,5	3.18±1.18	2.22±0.12
		5	3.43±0.55	2.17±0.20
		10	3.11±0.47	2.31±0.21
		20	3.36±1.63	2.25±0.02
K (-)	48	0,0	3.47±0.37	2.13±0.00
K (+)		0,1	45.29±3.12	1.12±0.01
TDF		2,5	3.19±1.15	2.06±0.03
		5	3.26±0.70	2.27±0.09
		10	3.20±0.52	2.13±0.08
		20	3.20±1.11	2.25±0.09

a: Kontrol, b: Pozitif kontrol, Mitomisin C, c: Tenofovir Disoproksil Fumarat, * p<0,05

Tablo 2'den de görüldüğü gibi, bu çalışmada kontrol grubunda hücre başına düşen kromozomal anormallik oranı 0,04±0,01 olarak belirlenmiştir. Bu değer tüm dozlar ile 24 ve 48 saat muamele edilen

insan periferik lenfositlerinde saptanan KA/Hücre değerleriyle karşılaştırılmıştır. Tüm dozlar ile kontrol grubu arasında gözlenen farklılıkların anlamlı düzeyde olmadığı saptanmıştır (p>0.05). İnsan

periferel lenfositlerinin TDF ile 24 saat muamele edilmesi sonucunda tüm dozlarda % 3,62-5.75 arasında, 48 saat muamelesi sonucunda ise; % 3.25-5.00 arasında değişen oranlarda anormal hücre gözlenmiştir. Karşılaştırma yapıldığında 24 ve 48 saatlik muamele gruplarında tüm dozlarda kontrol grubuna göre (% 4.50) önemli bir farklılık

saptanmamıştır ($p>0.05$). Tenofovir disoproksil fumarat ile hem 24 hem de 48 saatlik muamele sonucunda tüm dozlarda kontrol grubuna göre mitotik indeks değerinde gözlenen farklılıklar istatistiksel olarak önemli düzeyde değildir ($p>0.05$) (Tablo 2).

Tablo 2. Tenofovir disoproksil fumaratın farklı dozları ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde hücre başına düşen anormallik oranı (KA/Hücre), kromozom anormalli tipleri, anormal hücre (AH) yüzdesi ve mitotik indeks (MI).

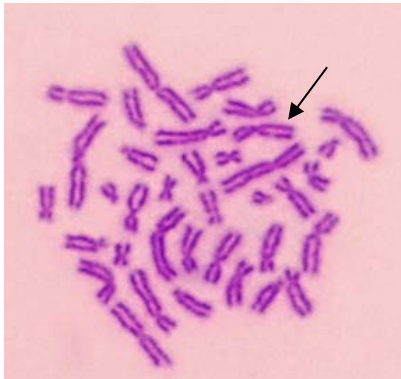
Test maddesi	Muamele		KA/Hücre±SD	Kromozom Anormallikleri						AH±SD (%)	MI±SD
	Süre (s)	Doz (µg/ml)		B'	B''	F	SU	DS	P		
K (-)b	24	0.0	0.04±0.01	7	3	2	1	0	4	4.50±1.73	0.04±0.01
K (+)c		0.1	0.25±0.45	38	25	14	7	6	10	21.25±2.39	0.02±0.01
TDFc		2.5	0.03±0.01	6	2	3	0	1	3	3.75±1.70	0.03±0.01
		5	0.04±0.00	5	4	2	1	1	2	3.75±1.50	0.04±0.01
		10	0.05±0.03	7	4	4	2	1	5	5.75±3.09	0.03±0.01
		20	0.04±0.01	7	3	2	2	1	3	4.50±1.73	0.04±0.01
K (-)	48	0.0	0.04±0.01	7	3	2	1	0	4	4.50±1.73	0.04±0.01
K (+)		0.1	0.34±0.45	46	31	15	10	7	16	31.25±2.39	0.02±0.01
TDF		2.5	0.04±0.01	6	2	3	2	0	4	4.25±1.25	0.05±0.01
		5	0.04±0.01	7	3	2	0	0	3	3.75±1.70	0.05±0.01
		10	0.05±0.02	8	4	3	0	1	4	5.00±2.16	0.05±0.00
		20	0.04±0.02	6	3	2	1	0	2	3.50±0.50	0.05±0,01

*: B', Kromatid Kırığı; B'', Kromozom Kırığı; F, Fragment; SU, Kardeş Kromatidlerin Birleşmesi, DS, Disentrik Kromozom; P, Poliploidi; b: Kontrol, c: Tenofovir Disoproksil Fumarat, * $p<0,05$

İncelenen KA preparatlarında, yapısal kromozomal anormallikler; kromatid kırığı (Şekil 1), kromozom kırığı (Şekil 2), fragment (Şekil 3), kardeş kromatidlerin birleşmesi (Şekil 4) ve disentrik kromozom (Şekil 5) şeklinde gözlenmiştir. Çalışmada sayısal anormallik olarak poliploidiye (Şekil 6) rastlanmıştır (Tablo 2).

Tablo 3'de görüldüğü gibi kontrol grubunda MN frekansı % 11,50 olarak gözlenmiştir. TDF ile muamele edilen tüm dozlarda MN düzeyinde bir

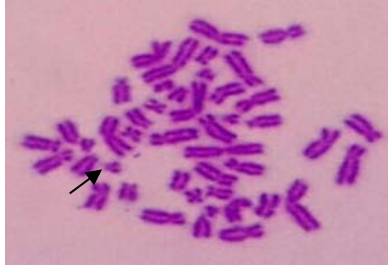
artış olduğu saptanmış olmakla birlikte bu artış anlamlı düzeyde değildir ($p>0,05$). Benzer şekilde, tüm dozlarda mikronukleuslu binukleer hücre oranındaki artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli düzeyde olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$). Elde edilen veriler nukleer bölünme indeksi yönünden değerlendirildiğinde, TDF konsantrasyonları ile 24 ve 48 saatlik muamele sonucunda tüm dozlarda NBI değerinde kontrol grubuna göre önemli bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$).



Şekil 1. Kromatid Kırığı (10 µg/ml TDF, 48 saatlik muamele, x1000).



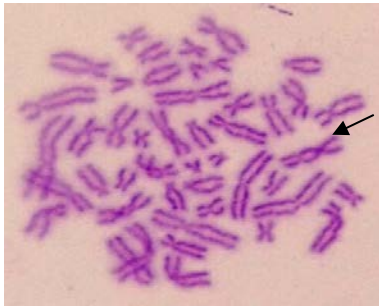
Şekil 2. Kromozom Kırığı (5 µg/ml TDF, 48 saatlik muamele, x1000).



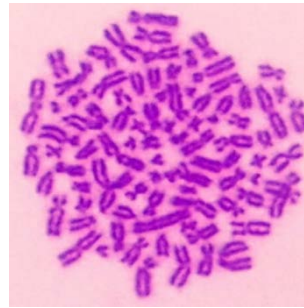
Şekil 3. Fragment (10 µg/ml TDF, 48 saatlik muamele, x1000).



Şekil 4. Kardeş kromatidlerin birleşimi (20 µg/ml TDF, 24 saatlik muamele, x1000).



Şekil 5. Disentrik kromozom (10 µg/ml TDF, 24 saatlik muamele, x1000).



Şekil 6. Poliploidi (20 µg/ml TDF, 24 saatlik muamele, x1000).

Tablo 3. Tenofovir disoproksil fumaratın farklı dozları ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde mikronukleus (MN), mikronukleuslu binukleer hücre (BNMN) ve nukleer bölünme indeksi (NBI).

Test maddesi	Muamele		MN±SD (%)	BNMN±SD (%)	NBI±SD
	Süre (s)	Doz (µg/ml)			
K (-)a	24	0.0	11.50±2.64	11.00±4.20	2.06±0.18
K (+)b		0.1	58.25±2.14	55.75±3.52	1.17±0.39
TDFc		2.5	13.37±2.51	12.75±9.97	2.01±0.19
		5	14.37±3.69	13.50±3.30	1.98±0.09
		10	12.50±1.73	11.75±2.06	2.05±0.09
		20	15.25±2.06	15.00±2.30	2.16±0.22
K (-)	48	0.0	10.50±2.64	11.50±4.20	2.06±0.18
K (+)		0.1	73.25±2.14	68.75±3.52	1.03±0.39
TDF		2.5	14.00±2.06	13.25±4.92	2.20±0.33
		5	13.00±2.70	12.25±1.25	2.01±0.25
		10	14.50±3.69	13.75±1.79	2.04±0.21
		20	13.12±5.35	12.80±4.08	2.06±0.28

a: Kontrol, b: Pozitif kontrol, Mitomisin C, c: Tenofovir Disoproksil Fumarat, * p<0.05

TARTIŞMA

Birçok antibakteriyal, antiviral, antimalaryal ve antifungal ilaçlar klinikte uzun süreli veya sık aralıklarla kullanılan farmasötiklerdir. Bu ilaçların neden olabileceği çeşitli yan etkilerin arasında genotoksik ve kanserojenik etkilerinin olabileceği de göz ardı edilmemelidir^{15,16}. Yapılan çalışmalar, genotoksik bir ajanın hücrede DNA dizilimi ile

etkileşime girerek genetik materyalde hasar oluşumunu indüklediğini göstermiştir. Bununla birlikte, pozitif genotoksik sonuçların gerçek bir ilaç-DNA etkileşiminden ziyade sitotoksik etkiyen kaynaklanabileceğine yönelik artan bulgular mevcuttur. dNTP havuzundaki düzensizlikler ile topoizomeras, DNA polimeraz veya kinazların inhibisyonu gibi non-DNA interaktif genotoksikite mekanizmaları da mevcuttur. Bu moleküller,

DNA'ya kovalent olarak bağlı olmadıklarında genotoksik özellik gösterebilmektedirler¹⁷⁻¹⁹.

Antiretroviral ilaçlar klinik olarak uzun süreli kullanılması gereken ilaçlar arasında yer almaktadır. Bu nedenle, bu ilaçların genotoksik ve kanserojenik potansiyellerinin iyi bilinmesi gerekmektedir. Bu amaçla birçok araştırmacı, AIDS tedavisinde kullanılan çeşitli antiretroviral ilaçların olası genotoksik ve kanserojenik etkilerini in vivo ve in vitro yöntemlerle çalışmışlardır. Bazı araştırmacılar ise; piyasada mevcut çeşitli antiretroviral ilaçlarla daha önce yapılmış genotoksikite ve kanserojenite çalışmalarının sonuçlarını derleyerek, bu ilaçların genotoksik ve kanserojenik potansiyellerine ait verilerin yeterliliğini ve güvenilirliğini saptamaya çalışmışlardır^{9,10}.

Ayers ve arkadaşları²⁰, zidovudin (ZDV), 3 µg/ml ve üzerindeki dozlarının, kültüre edilmiş insan lenfositlerinde doza bağlı olarak yapısal kromozomal anormallikleri arttırdığını ve sıçanlara multidoz verilen ZDV'nin MN oluşumunu indüklediğini saptamışlardır. Zeller ve arkadaşlarının²¹ çalışmasında ise; ZDV'nin Ames testi ile TA102 suşunda metabolik aktivasyon yokluğunda revertant koloni sayısında bir artışa neden olduğu, Komet testinde de DNA hasarına yol açtığı gözlenmiştir. Sussman ve arkadaşları²², insan lenfoblastoid hücre serisinde (TK6), 3 gün ZDV maruziyetinden sonra HPRT (hipoksantin-guanin fosforibosiltransferaz) mutant frekansında önemli oranda bir artış olduğunu saptamışlardır. Brambilla ve arkadaşlarına⁹ göre; insan lenfositleri kullanılarak yapılan in vitro testlerde, zidovudin KKD, KA ve MN frekanslarını arttırmıştır. Kaushik ve arkadaşlarının²³ çalışmasında; abakavir verilen sıçanlarda, periferik kan MN düzeyinde önemli oranda artış olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde abakavir kromozomal aberasyonları önemli oranda arttırmıştır. Bayram ve Topaktaş²⁴ ise, yüksek lamivudin konsantrasyonları ile muamele edilen hücrelerde KKD'nin, yapısal kromozomal anormalliklerin ve MN düzeyinin önemli oranda arttığını gözlemişlerdir. Brambilla ve arkadaşlarına⁹ göre; lamivudin, Salmonella typhimurium TA100 suşu ile Ames testinde negatif sonuç vermiş, sıçanlarda in vivo olarak yapılan çalışmada kromozomal aberasyonları indüklememiştir. Buna karşılık; fare lenfoma L5178Y hücrelerinde timidin kinaz (TK) lokusunda gen mutasyon oranını arttırmıştır.

Carter ve arkadaşları²⁵, TK6 B-lenfoblastoid hücrelerinde didanozin, lamivudin ve stavudin

hücre yaşamı üzerine etkisini ve HPRT ve TK genlerindeki mutajenik aktivitesini araştırmışlar ve HIV-1'e karşı antiviral aktivite gösteren bu ilaçların DNA hasarına, neden olabileceğini ve dolayısıyla kanser riski taşıdıklarını bildirmişlerdir. Brambilla ve arkadaşlarının⁹ elde ettikleri verilere göre, stavudin, revers mutasyon testlerinde negatif sonuç verirken, in vitro insan lenfositlerinde yapılan KA testinde, in vivo fare MN testinde ve in vitro fare fibroblast hücrelerinde yapılan hücre transformasyon testinde pozitif sonuç vermiştir. Didanozin ise; revers mutasyon testinde ve in vivo fare hücrelerinde yapılan MN testinde negatif sonuç vermiştir. Buna karşılık, in vitro insan lenfositlerinde kromozomal aberasyonları arttırmıştır. Wutzler ve Thust'a¹⁰ göre; didanozin fare lenfoma L5178Y hücrelerinin TK lokusunda mutasyon artışına neden olmuş ve in vitro hücre transformasyon testinde de pozitif sonuç vermiştir.

Bu çalışmada ise; tenofovir disoprosil fumaratın olası genotoksik etkisi insan periferik lenfositlerinde in vitro KKD, KA ve MN testleri ile araştırılmıştır. Tenofovirin 2,5, 5, 10 ve 20 µg/ml konsantrasyonları ile 24 ve 48 saatlik muamelelerin insan periferik lenfositlerinde KKD/Hücre, KA/Hücre ve AH oranını etkilemediği gözlenmiştir. Aynı şekilde, tüm dozlar ile 24 ve 48 saat muamelelerin MN ve BNMN frekanslarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde bir artışa neden olmamıştır. TDF ile muamelelerin hücre kinetik parametreleri olan PI, MI ve NBI değerlerini de etkilemediği saptanmıştır.

Çalışma öncesi yapılan kaynak taramasında TDF'nin genotoksik etkisinin araştırıldığı her hangi bir yayınlanmamış çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, Brambilla ve arkadaşlarının⁹, Amerikan Toksikoloji Data Network'den (<http://www.nlw.nih.gov>) aldıkları verilere göre; tenofovir Salmonella typhimurium suşu kullanılarak yapılan Ames testinde negatif sonuç vermiş ve geri mutasyonu indüklememiştir. Benzer şekilde erkek farelerde in vivo olarak yapılan mikronükleus testinde, tenofovir mikronükleus oluşumunu arttırmamıştır. Buna karşılık, fare lenfoma L5178Y hücrelerinde TK lokusunda yapılan gen mutasyonu analizinde pozitif sonuç alınmış olup, tenofovir TK lokusunda gen mutasyonunu indüklemiştir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, Ames testi ve in vivo fare MN testinde alınan negatif sonuçları desteklemektedir. TDF, Ames testinde revertant koloni sayısını ve in vivo fare MN testinde MN

oluşumunu arttırmadığı⁹ gibi çalışmamızda insan lenfositlerinde de KKD, KA ve MN frekanslarını indüklememiştir. Sonuç olarak bu çalışmada; TDF'nin insan periferik lenfositlerinde genotoksik ve sitotoksik etkiye sahip olmadığı saptanmıştır. Ancak TDF'nin genotoksitesi ile ilgili net bir kaniya varabilmek için ilave testlerin yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmaya Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Araştırma Fonu maddi destek vermiştir. (Proje No: 2013/6-6 YLS).

KAYNAKLAR

- Serter D. Türkiye'de ve dünyada cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar ve HIV/AIDS. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi. 2006;2:1-5.
- Açıoğlu S, Ünal S. Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıkların Epidemiyolojisi. Ankara, Bilim Tıp Yayınevi, 2001.
- Tümer A. AIDS nedir? Dünyada ve Türkiye'de HIV/AIDS. http://www.hatam.hacettepe.edu.tr/AIDS_web2014.pdf (Erişim tarihi Haziran 2015).
- Sulukan EE, Küçüköğlü K, Gül Hİ. AIDS ve tedavisinde kullanılan ilaçlar. Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi. 2009;38:47-78.
- Türker N, Örmən B. Antiretroviral tedavi. İnfeksiyon Dergisi. 2006;20:207-17.
- Hammer SM, Eron JJ, Reiss P, Schooley RT, Thompson MA, Walmsley S et al. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. JAMA. 2008;300:555-70.
- Karaoşmanoğlu HK, Aydın ÖA, Özyiğit F, İnce ER, Korkusuz R, Nazlıcan Ö. Antiretroviral tedavi ile ilişkili yan etkiler: 260 HIV/AIDS olgusunun değerlendirilmesi. Pamukkale Tıp Dergisi. 2013;6:118-21.
- Calmy A, Hirschel B, Cooper DA, Carr A. A new era of antiretroviral drug toxicity. Antivir Ther. 2009;14:165-79.
- Brambilla G, Mattioli F, Robbiano L, Martelli A. Studies on genotoxicity and carcinogenicity of antibacterial, antiviral, antimalarial and antifungal drugs. Mutagenesis. 2012;27:387-413.
- Wutzler P, Thust R. Genetic risks of antiviral nucleoside analogues-a survey. Antiviral Res. 2001;49:55-74.
- Gallant JE, Deresinski S. Tenofovir disoproxil fumarate. Clin Infect Dis. 2003;37:944-50.
- Perry P, Thompson EJ. The methodology of sister chromatid exchanges. In: Handbook of Mutagenicity Test Procedures. (Eds BJ Kilbey, M Legator, W Nichols, C Ramel):495-529. New York, Elsevier, 1984.
- Evans HJ. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. In: Handbook of Mutagenicity Test Procedures. 2nd ed, (Eds BJ Kilbey, M Legator, W Nichols, C Ramel):405-27. New York, Elsevier, 1984.
- Rothfuss A, Schutz P, Bochum S, Volm T, Eberhardt E, Kreienberg R, et al. Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in breast cancer families. Cancer Research. 2000;60:390-4.
- Müller L, Kikuchi Y, Probst G, Schechtman L, Shimada H, Sofuni T, et al. ICH-harmonised guidances on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. Mutat. Res. 1999;436:195-225.
- US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry. S1B. Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals. 1997.
- Brambilla G, Martelli A. Genotoxic and carcinogenic risk to humans of drug nitrite interaction products. Mutat Res. 2007;635:17-52.
- Snyder RD, Green JW. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. Mutat Res. 2001;488:151-69.
- Snyder RD. An update on the genotoxicity and carcinogenicity of marketed pharmaceuticals with reference to in silico predictivity. Environ Mol Mutagen. 2009;50:435-50.
- Ayers KM, Clive D, Tucker WE Jr, Hajian G, Miranda P. Nonclinical toxicology studies with zidovudine: genetic toxicity tests and carcinogenicity bioassays in mice and rats. Fundam Appl Toxicol. 1996;32:148-58.
- Zeller A, Koenig J, Schmitt G, Singer T, Guerard M. Genotoxicity profile of azidothymidine in vitro. Toxicol Sci. 2013;135:317-27.
- Sussman A, Olivero OA, Meng Q, Pietras SM, Poirier MC, O'Neill JP et al. genotoxicity of 3'-azido-3'-deoxythymidine in the human lymphoblastoid cell line, TK6: relationships between DNA incorporation, mutant frequency and spectrum of deletion mutations in HPRT. Mutat Res. 1999;429:249-59.
- Kaushik A, Saini R, Rana AC, Kaushik P. Genocytotoxicity study of antiretroviral drug used in HIV-therapy. Journal of Innovative Biology. 2014;2:63-7.
- Bayram S, Topaktaş M. Confirmation of the chromosome damaging effects of lamivudine in vitro human peripheral blood lymphocytes. Environ Mol Mutagen. 2008;49:328-33.
- Carter MM, Torres SM, Cook DL Jr, McCash CL, Yu M, Walker VE et al. Relative mutagenic potencies of several nucleoside analogs, alone or in drug pairs, at the HPRT and TK loci of human TK6 lymphoblastoid cells. Environ Mol Mutagen. 2007;48:239-47.