

**T.C.
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GUANOZİN ANALOĞU OLAN ENTEKAVİR'İN *IN VITRO*
GENOTOKSİK ETKİSİ**

Çiğdem ÇELİK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2013

**T.C.
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GUANOZİN ANALOĞU OLAN ENTEKAVİR'İN *IN VITRO* GENOTOKSİK
ETKİSİ**

Çiğdem ÇELİK

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Bu tez 13/09/2013 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından
oybirliği/Öyçokluğu ile kabul edilmiştir.

**Doç. Dr. Erdal Rıdvan SIVACI
BAŞKAN (DANIŞMAN)**

**Yrd. Doc. Dr. Sebile AZIRAK
ÜYE**

**Yrd. Doc. Dr. Miyase YAYLAGÜL
ÜYE**

**Doç. Dr. Mustafa ÖZDEN
Enstitü Müdürü**

Bu çalışma Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından desteklenmiştir.

Proje No: FEFYL.2011.0017

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak
gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

GUANOZİN ANALOĞU OLAN ENTEKAVİR'İN *IN VITRO* GENOTOKSİK ETKİSİ

Çiğdem ÇELİK
Adıyaman Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
2013, 81 Sayfa

Danışmanı: Doç. Dr. Erdal Rıdvan SIVACI
Eş Danışman: Yrd. Doç. Dr. Deniz TAŞTEMİR KORKMAZ
Jüri: Doç. Dr. Erdal Rıdvan SIVACI
Yrd. Doc. Dr. Sebile AZIRAK
Yrd. Doc. Dr. Miyase YAYLAGÜL

Hepatit B hastalığı dünyada önemli bir sağlık sorunu olup, tedavisi için günümüzde FDA onayı almış pek çok nükleozid analogu ilaç kullanılmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız entekavir de bunlardan biri olup, genotoksitesisi ile ilgili pek fazla çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda entekavirin genotoksik etkisini belirlemek amacıyla, insan periferik lenfosit hücreleri *in vitro* kültür ortamında entekavirin üç farklı konsantrasyonu (1,66 µg/ml, 3,33 µg/ml ve 6,66 µg/ml) ile 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. Çalışmamızda, 6,66 µg/ml konsantrasyonundaki entekavirin 48 saatlik uygulamalarında yapısal kromozomal anomali ile kromozom anormalliği taşıyan hücre sayısının arttığı ve istatistiksel olarak değerlendirildiğinde artışın önemli olduğu saptanmıştır. Ayrıca, mitotik indeksin (MI) 24 ve 48 saatlik uygulamalarında düştüğü ve bu düşüşün 24 saatlik uygulamalarda daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra entekavirin mikronükleus oluşumu üzerine kontrolden farklı bir etki göstermediği de saptanmıştır. Ayrıca, entekavirin sadece 24 saatlik uygulamasının Nükleer Bölünme İndeksi (NBI)'ini anlamlı olarak düşürdüğü belirlenmiştir. Sonuç olarak, entekavirin yüksek dozda uzun süre kullanımının genotoksitesiteye yol açtığı ve entekavirin uygulanan ilk 24 saatte sitotoksik etki gösterdiği ve de hücrelerin daha sonraki süreçte mitotik aktiviteyi tekrardan kazanarak bölünmeye devam ettikleri görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Entekavir, Genotoksitesite, Kromozom anormallikleri, Mikronükleus, Nükleer bölünme indeksi

ABSTRACT

MSc Thesis

IN VITRO GENOTOXIC EFFECT OF GUANOSINE ANALOGUE ENTECAVIR

Çiğdem ÇELİK

Adiyaman University

Institute of Natural and Applied Sciences

Biology Department

2013, 81 Pages

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Erdal Rıdvan SIVACI

Co-Supervisor: Asst. Prof. Dr. Deniz TAŞTEMİR KORKMAZ

Jury: Assoc. Prof. Dr. Erdal Rıdvan SIVACI

Asst. Prof. Dr. Sebile AZIRAK

Asst. Prof. Dr. Miyase YAYLAGÜL

Hepatitis B is a major health problem around the world, and for treatment of this disease many nucleoside analogue drugs received FDA approval are currently used. Entecavir, used in our study, is one of these drugs and there isn't any studies about its genotoxicity in the literature. In the present study, human peripheral lymphocytes were treated with three different concentrations (1.66 µg/ml, 3.33 µg/ml and 6.66 µg/ml) for 24 and 48 hours *in vitro* to determine the genotoxic effect of entecavir. In the present study, the number of structural chromosomal anomalies and cells with chromosomal anomalies increased in 6,66 µg/ml entecavir concentration for 48 hours treatment period and it was found statistically significant. Also, the mitotic index (MI) decreased in 24 and 48 h treatments and this drop was found higher in 24 h treatments. Besides, it was determined that the effect of entecavir on micronucleus formation was not different from control. Also, entecavir decreased the Nuclear Division Index (NDI) in only 24 h treatment periods significantly. In conclusion, it was seen that the prolonged use of large doses of entecavir lead to genotoxicity and entecavir treated in the first 24 h lead to cytotoxicity, and then cells gained mitotic activity again and continued to divide.

Key Words: Entecavir, Genotoxicity, Chromosomal anomalies, Micronucleus, Nuclear division index

TEŞEKKÜR

Danışmanım Doç. Dr. Erdal Rıdvan SIVACI'ya, bana ailem kadar yakın davranan, her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen eş danışmanım Yrd. Doç. Dr. Deniz TAŞTEMİR KORKMAZ'a, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI'na, arkadaşlarım Ümmühan ARSLAN'a, Yunus KÜÇÜKKAYA'ya, M. Abdullah ALMAS'a, Murat TAK'a, Sayın Prof. Dr. Ali AYDIN ve Arş. Gör. Adem DOĞANER'e, olanaklarından faydalanmamda bana yardımcı olan Üniversite yönetimine ve personellerine, çok sevdiğim ve her anımda destekçim olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. HBV GENOMU	3
1.2. HBV’NİN REPLİKASYON DÖNGÜSÜ	6
1.3. HBV’NİN SIKLIĞI	8
1.4. HBV’DE RİSK GRUBU	11
1.5. HEPATİT HASTALIĞININ BELİRTİLERİ	11
1.6. HBV’NİN NEDEN OLDUĞU HASTALIKLAR	12
1.7. HBV’DE TEDAVİ YOLLARI	12
1.7.1. HBV TEDAVİSİNDE KULLANILAN İLAÇLAR	14
1.7.1.1. İnterferon- α (IFN- α)	14
1.7.1.2. Pegile İnterferon-.....	14
1.7.1.3. Lamivudin	15
1.7.1.4. Adefovir Dipivoksil	16
1.7.1.5. Entekavir	17
1.7.1.5.1. Entekavirin Kullanım Alanları	18
1.7.1.5.2. Entekavirin Vücuda Alınım Yolları ve Kullanım Şekli	18
1.7.1.6. Tenofovir	19
1.7.1.7. Telbivudine	20
1.7.1.8. Yeni Geliştirilen İlaçlar	21
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	22

İÇİNDEKİLER

2.1. HBV Tedavisinde Kullanılan İlaçların Genotoksisitesi ile İlgili Yapılmış Çalışmalar	22
2.1.1. Entekavir ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları	22
2.1.2. Lamivudin ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları	23
2.1.3. Tenofovir ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	25
2.2. HBV Dışındaki Hastalıkların Tedavisinde Kullanılan İlaçların Genotoksisitesi ile İlgili Çalışmalar.....	26
2.2.1. Acyclovir, Valaciclovir, Penciclovir, Famciclovir ve Ganciclovir ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları	26
2.2.2. Brivudin ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları	28
2.2.3. Didanosin ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları	29
2.2.4. Ganciclovir ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları	30
2.2.5. Penciclovir ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları	31
2.2.6. Zidovudin ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları	33
3. MATERYAL VE YÖNTEM	38
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	38
3.1.1. Entekavir ve Özellikleri.....	38
3.1.1.1. Entekavir'in Hazırlanması	39
3.1.2. Mitomycin C (MMC)	39
3.1.3. Kromozom Medyumu.....	40
3.1.4. Kolşisin	40
3.1.5. Hipotonik Çözelti.....	41
3.1.6. Sorensen Tamponu	41
3.1.7. Fiksatifler	41
3.1.8. Giemsa	42

İÇİNDEKİLER

3.1.9. Entellan	42
3.1.10. Nitrik Asit (HNO ₃).....	42
3.1.11. Sitokalsin (Cytochalasin B).....	42
3.2. Kullanılan Deney Ekipmanları	43
3.2.1. Hassas Terazî	43
3.2.2. Laminar Flow Kabin.....	43
3.2.3. Santrifüj	44
3.2.4. Mikroskoplar	44
3.2.5. İnkübatör	44
3.3. Lamların Temizlenmesi	44
3.4. Kromozom Anormalliklerini (KA) Belirlemede Kullanılan Hücre Kültür Yöntemi ve Preparasyon	45
3.5. Kromozom Anormalliklerinin (KA) Saptanması İçin Hazırlanan Preparatlarda Mikroskopik İncelemenin Yapılması, Yapısal ve Sayısal Kromozomal Anormalliklerin (KA) Belirlenmesi ve Mitotik İndeksin (MI) Saptanması	47
3.6. Mikronükleus (MN) Oluşumlarının Belirlenmesinde Kullanılan Hücre Kültür Yöntemi ve Preparasyon	48
3.7. Mikronükleus Preparatlarında Mikroskopik İncelemenin Yapılması ve Mikronükleus Sayısının Saptanması	49
3.8. NBI (Nükleer Bölünme İndeksi) Yüzdesinin Hesaplanması	49
3.9. Mikroskopta Fotoğraf Çekme	50
3.10. İstatistiksel Analiz	50
4. BULGULAR	51
4.1. Entekavir'in İnsan Periferal Lenfositlerinde Kromozom Anormallikleri (KA) Oluşumuna Etkisi	51

İÇİNDEKİLER

4.2. Entekavir'in Mitotik İndeks (MI) Üzerine Etkisi	60
4.3. Entekavir'in Mikronükleus (MN) Oluşumu Üzerine Etkisi	62
4.4. Entekavir'le Muamele Edilmiş İnsan Periferal Lenfositlerinde Nükleer Bölünme İndeksi (NBI)	64
5.TARTIŞMA	66
5.1. Entekavir'in Kromozom Anormalliklerinin (KA) Oluşumu Üzerine Etkisi	66
5.2. Entekavir'in Mikronükleus (MN) Oluşumu Üzerine Etkisi.....	67
5.3. Entekavir'in Hücre Bölünmesi Üzerine Etkisi	69
KAYNAKLAR.....	72
ÖZGEÇMİŞ.....	81

SİMGELER DİZİNİ

AB	: Avrupa birliği
AIDS	: Acquired immune deficiency syndrome (Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu)
A2H1	: Heterozigot insan lenfoblastoid hücre hattı
APRT	: Adenin fosforibozil transferaz
ATP	: Adenozin trifosfat
°C	: Santigrat derece
cccDNA	: Uçları kovalent olarak bağlanmış sirküler deoksiribonükleik asit
CHO-HSVTk	: Çin hamster yumurtalık hücreleri
Cm	: Santimetre
Dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ETV	: Entekavir
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
H	: Saat
H₂O	: Su
HBcAg	: Hepatit B core antijeni
HBeAg	: Hepatit B e Antijeni
HePG2	: Karaciğer hücre hattı
HGPRT	: Hipoksantin guanin fosforibozil transferaz
HBsAg	: Hepatit B yüzey antijeni
HBV	: Hepatit B virüsü
HCV	: Hepatit C virüsü
HIV	: İnsan immün yetmezlik virüsü
HNO₃	: Nitrik asit

SİMGELER DİZİNİ

HSK	: Hepatoselüler karsinoma
G	: Gram
IFN	: İnterferon
Kb	: Kilobaz
Kg	: Kilogram
KA	: Kromozom anormallikleri
KKD	: Kardeş kromatid değişimi
KCl	: Potasyum klorür
KH₂POH₄	: Kalsiyumdihidrojenfosfat
KHB	: Kronik hepatit B
KHC	: Kronik hepatit C
Ki	: Klirens
LHBs	: Büyük hepatit B virüsü antijeni
L	: Litre
mg	: Miligram
mol	: Mol
mM	: Milimolar
μM	: Mikromolar
μg	: Mikrogram
μmol	: Mikromol
MMC	: Mitomycin C
MN	: Mikronükleus
MI	: Mitotik indeks
mtDNA	: Mitokondriyal DNA

SİMGELER DİZİNİ

mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
N	: Normal
NaCl	: Sodyum klorür
Na₂HPO₄	: Disodyum hidrojen fosfat
NBI	: Nükleer bölünme indeksi
nm	: Nanometre
PBMC	: Periferik kan mononükleer hücreleri
PA317	: İnsan gliyom hücreleri
Peg IFN	: Pegil interferon
pH	: Power of Hidrogen (hidrojen gücü)
RNaz	: Ribonükleik polimeraz
RNA	: Ribonükleikasit
RPTECs	: Renal proksimal tübül epitel hücreleri
rpm	: Revolutions per minute (dakikada devir sayısı)
SH	: Standart hata
SDH	: Süksinat dehidrogenaz
Tk	: Timidin kinaz
TP	: Aktif trifosfat
%	: Yüzde
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	HBV partiküllerinin elektron mikroskobu görüntüsü.....	3
Şekil 1.2.	HBV genom organizasyonu ve sentezlenen RNA' lar.....	5
Şekil 1.3.	HBV replikasyon döngüsü.....	8
Şekil 1.4.	HBV'nin dünya üzerindeki görülme sıklığı.....	9
Şekil 1.5.	Ülkemizdeki HBV taşıyıcılık oranlarının bölgesel dağılımı.....	10
Şekil 1.6.	İnterferon- α -2a.....	14
Şekil 1.7.	Lamivudin.....	16
Şekil 1.8.	Adefovir dipivoksil.....	17
Şekil 1.9.	Entekavir.....	17
Şekil 1.10.	Tenofovir.....	20
Şekil 1.11.	Telbivudin.....	20
Şekil 4.1.	İnsan periferel lenfositlerinde 24 ve 48 saat 1,66, 3,33 ve 6,66 μ g/ml konsantrasyonlarda entekavirin oluşturduğu toplam anormal hücre yüzdesi.....	51
Şekil 4.2.	Kromatid kırığı (6,66 μ g/ml entekavir, 48 saat muamele, X1000, ♂).....	53
Şekil 4.3.	Kromatid kırığı (6,66 μ g/ml entekavir, 48 saat muamele, X1000, ♀).....	54
Şekil 4.4.	Kromozom kırığı (6,66 μ g/ml entekavir, 48 saat muamele, X1000, ♀).....	55
Şekil 4.5.	48,XY,+4,+ace kromozom kuruluşuna sahip bir metafaz (3,33 μ g/ml, 24 saat muamele, X1000, ♂).....	56
Şekil 4.6.	Delesyon [del(1)(q21)] (6,66 μ g/ml entekavir, 48 saat muamele, X1000, ♂).....	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.7.	Disentrik kromozom (3,33 µg/ml entekavir, 24 saat muamele, X1000, ♀)	59
Şekil 4.8.	Poliploidi (6,66 µg/ml entekavir, 48 saat muamele, X1000, ♂)	59
Şekil 4.9.	Farklı dozlarda 24 saat entekavir uygulanan insan periferel lenfosit hücrelerinde MI'in doza bağlı olarak düşüşünü gösteren regresyon eğrisi ve korelasyon katsayısı ($p>0,05$)	60
Şekil 4.10.	Farklı dozlarda 48 saat entekavir uygulanan insan periferel lenfosit hücrelerinde MI'in doza bağlı olarak düşüşünü gösteren regresyon eğrisi ve korelasyon katsayısı ($p>0,05$)	60
Şekil 4.11.	Entekavir ile muamele edilmiş insan lenfositlerinde saptanan MN'li binükleer hücreler (X400)	62
Şekil 4.12.	Entekavir ile muamele sonucu insan lenfositlerinde oluşan (a) mononükleer, (b) binükleer, (c) trinükleer ve (d) tetranükleer hücreler (X400)	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	Kültür tüplerine ilave edilen entekavir miktarları, konsantrasyonları ve süreleri.....	38
Çizelge 4.1.	Farklı dozlarda entekavir ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferal lenfositlerinde gözlenen yapısal ve sayısal kromozom anormallikleri ile toplam anormal hücre yüzdeleri.....	52
Çizelge 4.2.	Farklı dozlarda entekavir ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan lenfositlerinde binüklear ve MN içeren hücre ortalaması (\pm SH)	61

1. GİRİŞ

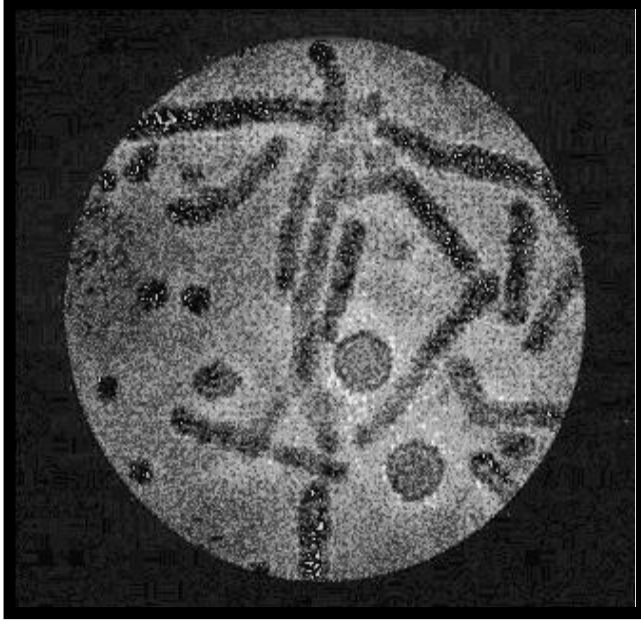
Hepatit B hastalığı dünyada önemli bir sağlık problemi olup, hastalığa neden olan hepatit B virusu (HBV) doğrudan hücre hasarı oluşturmayan çift sarmallı bir DNA virusudur. HBV ve Hepatit C virusu (HCV), ülkemizde ve dünyada kronik karaciğer hastalığı ve hepatoselüler karsinomanın (HSK) en sık sebeplerindendir. Yaklaşık 2 milyar kişi HBV ile karşılaşmış olup, bunların yaklaşık 400 milyonunda kronik taşıyıcılık belirlenmiştir. HBV ile infekte olan kişilerin %15-40'ında siroz, karaciğer yetmezliği, HSK gibi ciddi hepatik komplikasyonlar gelişebilmektedir (Lavanchy 2004, Saltoğlu 2005). Kronik hepatit C (KHC) ise yaklaşık 170 milyon kişide bulunmakta ve kronik HBV enfeksiyonu gibi siroz ve HSK'ya sebep olmaktadır (Lavanchy 2004, WHO 2004, Saltoğlu 2005). Aşı ile korunabilen bir hastalık olmasına rağmen dünyada 2 milyar insan HBV ile infektidir. Yaygın immünizasyon, kan ürünlerinin test edilmesi, güvenli cinsel ilişki önerilerinin hepatit B enfeksiyonunu önemli derecede azaltmasına rağmen infekte bireylerin yüksek oranı hepatit B'nin daima ciddi bir sorun olarak kalmasına neden olmaktadır (Lee 1997, Maddrey 2000, Saltoğlu 2005). Ayrıca, kronik hepatit B (KHB) dünyada önde gelen ölüm nedenleri arasında yer almaktadır (Lee 1997, Maddrey 2000, Saltoğlu 2005). Her yıl yaklaşık 250.000 kişi HBV ile ilişkili karaciğer hastalıklarından dolayı ölmektedir (Maynard 1990, Saltoğlu 2005). Ülkemizde ise KHB sonucu her yıl yaklaşık 10.000-15.000 kişinin siroz ve komplikasyonlarından, 5000 kişinin de HSK nedeniyle kaybedildiği tahmin edilmektedir. KHB ve KHC tedavilerinin de çok pahalı ve etkinliklerinin arzu edilen düzeylerde olmaması nedeni ile çok önemli bir sağlık sorunu ile karşı karşıya olduğumuz açıktır. Her ne kadar etkin aşılama ile önümüzdeki on yılda hastalığın tehlikesi azalacaksa da milyonlarca kişinin etkin tedavilerinin yapılması gerekmektedir. KHB tedavisinde şimdiye kadar pek çok sayıda anti-viral ve immünomodülatör ilaç kullanılmış, fakat ya etkisiz ya da çok toksik bulduklarından kullanımı durdurulmuştur (Regenstein 1994, Mıstık ve Balık 2001).

KHB'nin tedavi seçenekleri interferonlar (α -IFN, β -IFN, γ -IFN), nükleozid analogları (lamivudin, adefovir dipivoksil, tenofovir, telbivudin, entekavir, vb.),

immünomodülatör ilaçlar (kortikosteroidler, thymosin- α , levamisole, koloni stimüle edici faktörler, interlökinler), moleküler biyolojik yöntemler (DNA aşılı, antisens oligonükleotidler, ribozimler, DNazlar, dominant negatif mutantlar) ve ilaçların karaciğeri hedeflemesi ile yapılan tedavilerdir. Bugün için KHB'nin interferon dışı tedavisi denildiğinde akla gelen tek seçenek nükleozid analoglarıdır (Akarca 2002). Bunlar arasında, son yıllarda dünyada ve hatta ülkemizde KHB tedavisinde yaygın olarak kullanılan nükleozid analoglarından biri de entekavirdir (Anonim 2011).

HBV, uzun kuluçka süreli hepatit, serum hepatiti, MS-2 hepatiti ve viral hepatit B diye isimlendirilen infeksiyon hastalığının etkenidir. Viral hepatit ilk olarak milattan önce 5. yüzyılda tanımlanmış, Hippocrates tarafından epidemik (infeksiyöz) sarılık olarak isimlendirilmiş ve tarih boyunca özellikle savaşlar esnasında çok fazla infeksiyöz salgını görülmüştür (Mahoney 1999).

HBV, Blumberg vd. (1965) tarafından "Avustralya Antijeni" diye adlandırılan bir serum proteini olarak ilk kez rapor edilmiştir (Blumberg ve vd. 1965, Blumberg ve vd. 1967). İlerleyen zamanlarda ise yapılan diğer çalışmalarda Avustralya Antijeni'nin bir HBV serum belirteci olduğunu ve hastalarda uzun süreli seyreden klinik bulgulara neden olduğu gösterilmiştir (Prince 1968, Gocke ve vd. 1969). 1970 yılında ise HBV ile infekte olmuş hastadan alınan serum örneklerinin elektron mikroskopu görüntülerinin tümü belirlenerek, saptanan partiküller, "Dane Partikülleri" ismini almıştır. Kırkiki (42) nm büyüklüğündeki dane partiküllerinin yanı sıra 22 nm'lik sferik ve 22 x 100-200 nm büyüklüğünde filamentöz partikülleri de elektron mikroskopunda tanımlanmıştır (Dane ve vd. 1970) (Şekil 1.1). WHO tarafından 1973 yılında Avustralya Antijeni'nin ismi Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) olarak değiştirilmiştir. Bunu takip eden yıllarda yapılan çeşitli çalışmalarla virusun genomik yapısı ve proteinleri belirlenmiştir. Aynı yıl içerisinde HBsAg pozitif bir hasta serumundan elde edilen dane partiküllerinde DNA polimeraz aktivitesi de keşfedilmiştir (Kaplan ve vd. 1973).



Şekil 1.1. HBV partiküllerinin elektron mikroskobu görüntüsü

HBV, Hepadnaviridae virus familyasında yer almakla birlikte familyanın diğer üyelerinden farklı olarak, yalnızca insan ve şempanzelerin karaciğerlerinde enfeksiyon meydana getirmektedir. Ancak, genom organizasyonu, doku tropizmi ve replikasyon stratejisi açısından familyanın prototip özelliklerini bulundurmaktadır (Ustaçelebi ve Ergünay 2007).

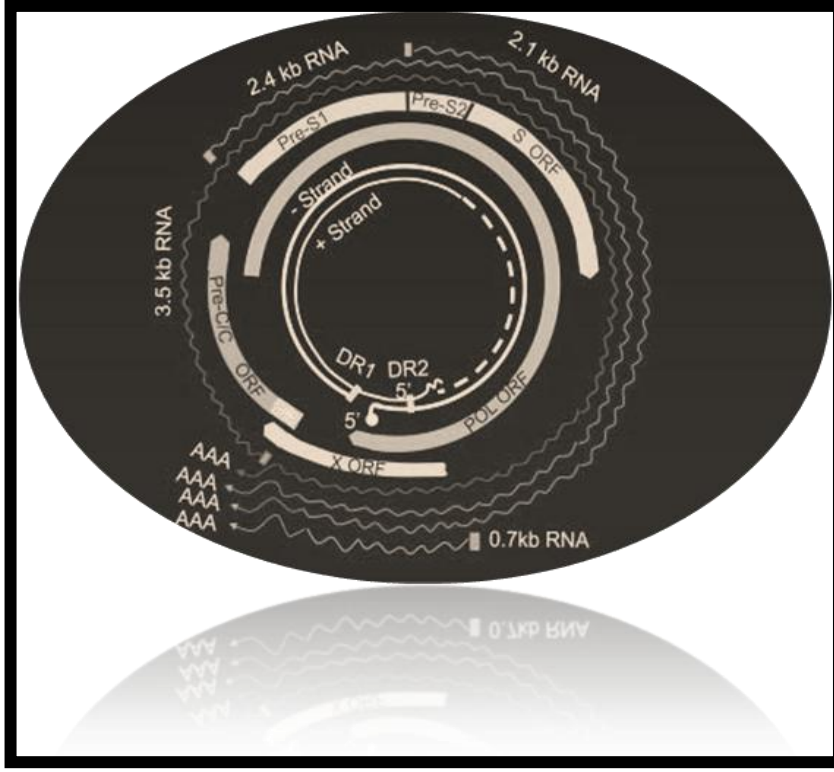
1.1. HBV GENOMU

HBV, genomu yaklaşık 3200 nükleotidden meydana gelen ve çok küçük olan zarflı bir DNA virusudur. Virusun DNA'sı ikozahedral bir kapsid içerisinde yer almakta olup, bir kısmı çift bir kısmı tek iplikçikli (% 70 çift, % 30 tek iplikçikli) küçük çembersel bir yapıdadır. İpliklerden uzun olan (- iplik) üst üste binmiş genlerden meydana gelmiş olup yapısal proteinleri [pre-S, yüzey (HBsAg ya da S), kor] ve replikatif proteinleri (polimeraz, X) kodlamaktadır. Kısa olan ipliğin boyu ise 1700-2800 nükleotid arasında olmakla beraber her virusta değişkenlik göstermektedir (Ganem 1991). HBV viral genomunun dışında 3 farklı yüzey antijenini taşıyan lipid yapılı ve HBV dezenfektan işlemlerine karşı yüksek oranda direnç gösteren bir zarf

bulunmaktadır. HBV, zarflı bir virus olmasından dolayı düşük pH, eter, ısı, dondurma ve çözmeye karşı yüksek oranda direnç göstermektedir. Bu etkenlere karşı yüksek dirençli oluşu sayesinde bulaşıcılığındaki etkinliği de sağlanmış olur (Chieochansin ve vd. 2006, Ustaçelebi ve Ergünay 2007).

HBV, bir DNA virusu olmasına rağmen “revers transkriptaz” enzimi kodlamaktadır. Revers transkriptaz enzimi sayesinde infekte ettiği hücrede replikasyonunu gerçekleştirir. Viral DNA, infekte hücre nükleusunda bir minikromozom halinde bulunur.

HBV genomu dört açık okuma çerçevesi (P, C, X, S) meydana getirecek şekilde organize olmuştur. Bunlar üzerinden replike olarak infekte olduğu hücrede varlığını sürdürmektedir. Oluşturmuş olduğu bu okuma çerçevelerinden en büyüğü olan P, viral polimerazı kodlamaktadır. Zarf yapılarına ait bölge de P okuma çerçevesi içerisinde yer almaktadır. Çekirdek [özyapı (C;core)] ve X açık okuma çerçeveleri ise zarfı meydana getiren kısım ile bazı bölgelerde üst üste binmiş olarak yer almaktadır. cccDNA yapısı tüm viral transkriptler için birer kaynak oluşturmaktadır. HBV’ye ait 3.5, 2.4, 2.1 ve 0.7 kb’lik mRNA’ların ekspresyonu, cccDNA kalıp olarak alınıp sırasıyla enhancer II / bazal kor, majör yüzey antijeni (L), küçük yüzey antijeni (S) ve enhancer I / X geni promotörleri aracılığıyla kontrol edilmektedir (Gish ve Locarnini 2007, Ustaçelebi ve Ergünay 2007). Şekil 1.2’de HBV genomunun organizasyonu ve sentezlenen RNA’lar gösterilmiştir.



Şekil 1.2. HBV genom organizasyonu ve sentezlenen RNA'lar (Gish ve Locarnini 2007)

Genomda P ve C ile sembolize edilen polimeraz ve viral çekirdek gen ürünleri, sırasıyla viral DNA replikasyonunda ve viral kapsid proteinlerinden nükleokapsid oluşumunda görev almaktadır. Polimerazın amino terminali, pre-genomik RNA'ların paketlenmesi ve DNA sentezi için hazırlayıcı görevini üstlenmiş olup terminal protein adını almaktadır. Karboksi terminali ise "revers transkriptaz" ve RNaz H aktivitesinden sorumludur. Diğer hepadnavirus polimerazlar gibi HBV polimerazı da enzimatik aktiviteleri için bulunduğu hücrenin bazı hücresel faktörlerini kullanır. Pre-kor/kor bölgesinden sentezlenen protein ürününün parçalanması ile oluşan HBeAg'nin ilk bölümü, tüm molekülün endoplazmik retikuluma salgılanmasında görev almaktadır. Golgi aygıtında bu molekülün karboksi terminalinden 29 aminoasitin ayrılması ile HBeAg olgunlaşmakta ve kana salınmaktadır. HBx proteini ise bazı özel indirek etkiler ile viral ve bazı hücresel genlerin transkripsiyonunu arttırabilme özelliği taşımaktadır (Ustaçelebi ve Ergünay 2007).

1.2. HBV’NİN REPLİKASYON DÖNGÜSÜ

HBV, karaciğerde çoğalma özelliğinde olan bir virustur. Ancak insan karaciğer hücrelerine tutunma ve girişi için kullandığı yüzey proteinleri henüz tam olarak bilinmemektedir. Bunun yanı sıra büyük hepatit B yüzey antijeninin (LHBs) amino terminalinde yer alan pre-S1 bölgesinin hedef hücreye tutunmada önemli göreve sahip epitopları içerdiği saptanmıştır. Ayrıca HBV zarf proteinlerini bağlayan çeşitli hücresel bağlanma proteinleri de tespit edilmiştir. Viral alt tiplere göre 109 ya da 120 aminoasit büyüklüğünde olan pre-S1 bölgesinde tutunma aktivitesinden sorumlu kısım 21- 47. aminoasitler olarak tanımlanmış, tutunma için bu bölgenin bulunmasının yeterli ve elzem olduğu görülmüştür. Zaman içerisinde yapılan mutajenite çalışmalarında LHBs antijeninde bu epitop içerisinde yer alarak hücreye tutunmada etkin rol oynayan QLDPAF dizisi tanımlanmıştır. Bu dizi başka birçok virus, bakteri ve mikroorganizmanın yapısında olup HBV’deki gibi virusun hücreye tutunmasında görev almaktadır. HBV’nin doku-organ özgüllüğünün belirlenmesinde ise geri kalan pre-S1 kısımlarının etkin rol aldığı belirtilmiştir. Pre-S1’e benzer bir epitopun X proteininde de bulunması ve bu bölgenin de benzer şekilde QLDPAR dizisi içermesi, X proteininin de tutunmada görev aldığını akla getirmektedir. Ancak *in vitro* çalışmalarda virusun karaciğer hepatositlerine tutunmasında tüm yüzey proteinlerinin aynı oranda aktivite gösterdiği de görülmüştür. Hepatositlere tutunma gerçekleşikten sonra virus zarfı ve hücre membranı arasında füzyon meydana gelmekte ve nükleokapsid sitoplazmaya salınmaktadır. Enzimatik araçlarla kapsidin sitoplazmada parçalanmasının ardından viral genomik DNA ve polimeraz çekirdeğe taşınmaktadır (Torresi ve Locarnini 2000, Ustaçelebi ve Ergünay 2007).

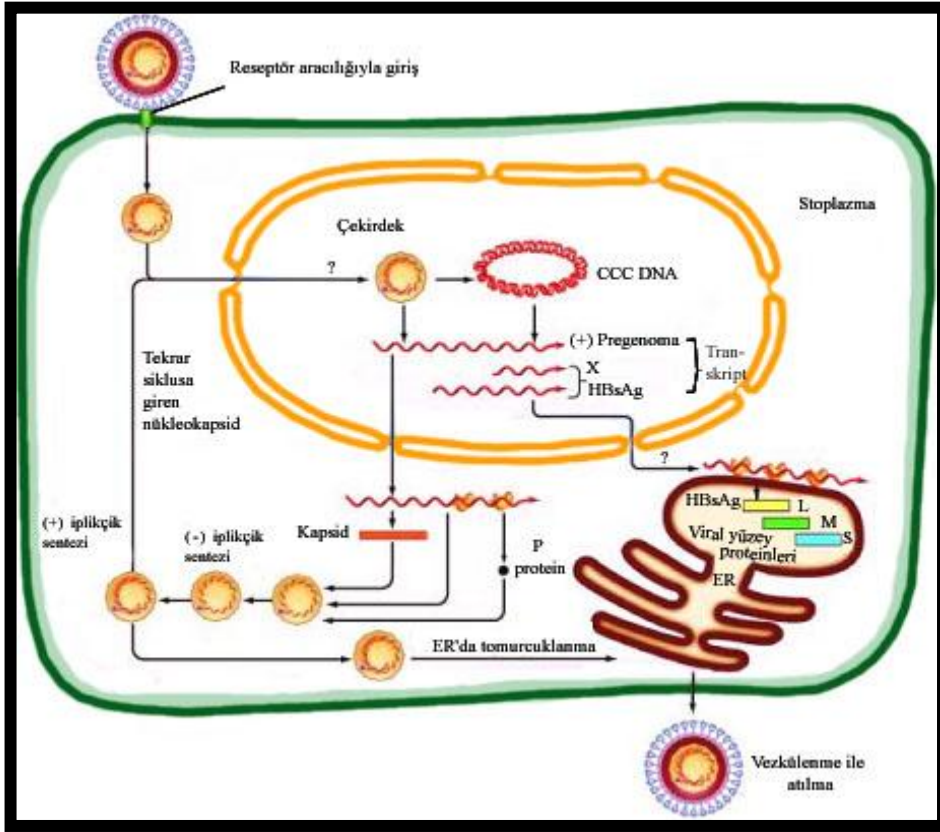
HBV virionları, biri daha baskın olan negatif iplik, diğeri ise kısmen tamamlanmış olan pozitif iplikli çembersel DNA genomuna sahiptir. Ayrıca, virus içerisinde hazırlık mekanizmasında kendi kendine oluşmuş az miktarda lineer DNA da bulunabilir. Replikasyon döngüsünün başlaması ile her 2 form DNA cccDNA’ya dönüştürülür. Genom replikasyonunun ilk ve en önemli basamağı burasıdır. Karaciğer

hepatositlerinde gerçekleşen bu olay, virusun hepatosite inokülasyonundan sonraki ilk 24 saatte meydana gelmektedir. Negatif DNA ipliğine kovalent olarak bağlanan revers transkriptaz yerinden ayrılarak pozitif iplikcik tamamlanmakta, daha sonra pozitif ve negatif zincirlerin ligasyon reaksiyonu ile birbirine bağlanmasıyla cccDNA oluşmaktadır. Bu aşamalarda hücresel DNA tamir enzimleri ile viral revers transkriptaz enziminin birlikte rol aldığına, ayrıca virus özyapısının çekirdeğe taşınmasında, özyapı (kor) ve revers transkriptaz proteinlerinin rol aldığına dair veriler bulunmaktadır. cccDNA, HBV'nin hepatositlerde kalmasında etkili olan bir moleküldür. Antiviral tedavi sonrasında izlenen viral reaktivasyonlarından cccDNA sorumludur. cccDNA oluşumu, nüklear membrandan viral DNA'nın çekirdeğe taşınması sonrasında virusa ait transkriptazlar ve hücresel RNA polimerazlar tarafından başlatılmaktadır. Viral RNA'lar olan 3,5 kb'lık RNA'dan nükleokapsid proteini ya da HBcAg, HBe antijeni ve viral polimeraz; 2,4 ve 2,1 kb'lık RNA'dan zarf proteinleri; 0,7 kb'lık RNA'dan da X proteini sentezlenir. Bu basamakta hücresel transkripsiyon faktörleri de rol almaktadır. 3,5 kb'lık RNA, ek olarak viral genomik DNA için kalıp olan pre-genomik RNA olarak da replikasyonda görev almaktadır (Torresi ve Locarnini 2000, Ustaçelebi ve Ergünay 2007).

Viral genomik DNA'nın sentezi için revers transkriptaz, pre-genomik RNA'nın 5' ucuna bağlanmakta, sonra bu kompleks nükleokapsid içerisine paketlenmektedir; böylelikle nükleokapsid içerisinde revers transkripsiyon ve viral DNA'nın sentezi başlamaktadır. Burada DNA sentezini başlatan viral revers transkriptazdır. Negatif iplikli DNA'nın oluşmasının ardından revers transkriptaz enzimi RNaz H aktivitesi ile pre-genomik RNA'yı parçalamakta ve pozitif ipliğin sentezine başlamaktadır. Kısmi çift iplikli DNA molekülü oluştuktan sonra nükleokapsid partikülleri, endoplazmik retikulum içerisinde tomurcuklanarak zarf yapılarını kazanmalarını sağlayacak olgunlaşma sürecine girmektedirler. Oluşan nükleokapsidlerin bir kısmı hücre çekirdeğine geri dönerek cccDNA kopya havuzunu arttırmakta rol alabilmektedir (Torresi ve Locarnini 2000, Ustaçelebi ve Ergünay 2007).

Özyapı (kor) proteinlerinin LHBsAg amino terminali kısmına bağlanmaları partiküllerin endoplazmik retikulumdan tomurcuklanmasına neden olmaktadır. Her üç

zarf proteinini de bulunduran viruslar endoplazmik retikulumdan golgi kompleksine taşınmaktadırlar. Bu aşamada zarf proteinlerinin glikozilasyonu tamamlanmakta ve olgun virus kan dolaşımına salınmaktadır (Ustaçelebi ve Ergünay 2007) (Şekil 1.3).

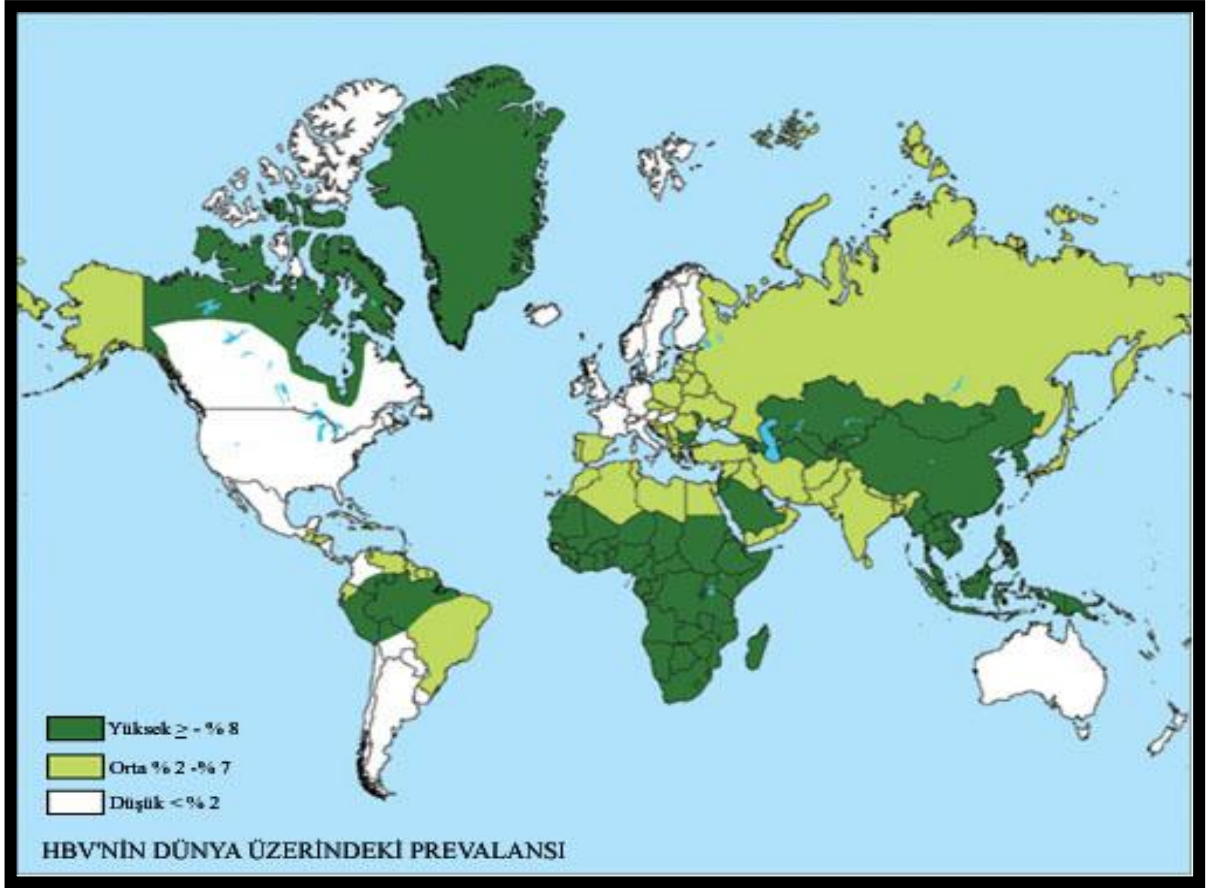


Şekil 1.3. HBV replikasyon döngüsü (Mandell, Bennet & Dolin: Principles and Practice of Infectious Disease, 6th ed., 2009)

1.3. HBV’NİN SIKLIĞI

KHB virus infeksiyonu özellikle Asya’da önemli bir halk sağlığı problemidir. Çünkü dünyada KHB virus taşıyıcılarının yaklaşık dörtte üçü Asya kökenlidir (Maynard 1990). Bunun yanı sıra Afrika gibi HBV’nin endemik olduğu ülkelerde KHB virus infeksiyonunu taşıyanların oranı % 8-25; Akdeniz bölgesinde % 3-5; batı yarımküredeki yerli halkta, Kanada ve Kuzey Amerika’da ise % 0,5’den daha azdır (McMahon 2005)

(Şekil 1.4). Türk Kızılay'ı kan vericilerinde HBV taşıyan hastaların oranının 1989-2004 yılları arasında ortalama % 4,19 olduğunu bildirmiştir (Gürol ve vd. 2006). Daha sonraları ise bu oran giderek azaldığı ve 2004'de % 2,1'e düştüğü rapor edilmiştir (Gürol ve vd. 2006). Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kan Bankası'na 1996-2010 yılları arasında başvuran kan vericilerinden HBV taşıyan hastaların oranı ise % 1,07 olarak saptanmıştır. 1996-2010 yılları boyunca HBV sıklığının azalan bir seyir gösterdiği rapor edilmiştir. (Dilsiz ve vd. 2012). Hastalarda HBV enfeksiyonunun kendini sınırlamasında özellikle CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinin cevabı önem arz etmektedir (Stoop ve vd. 2007).



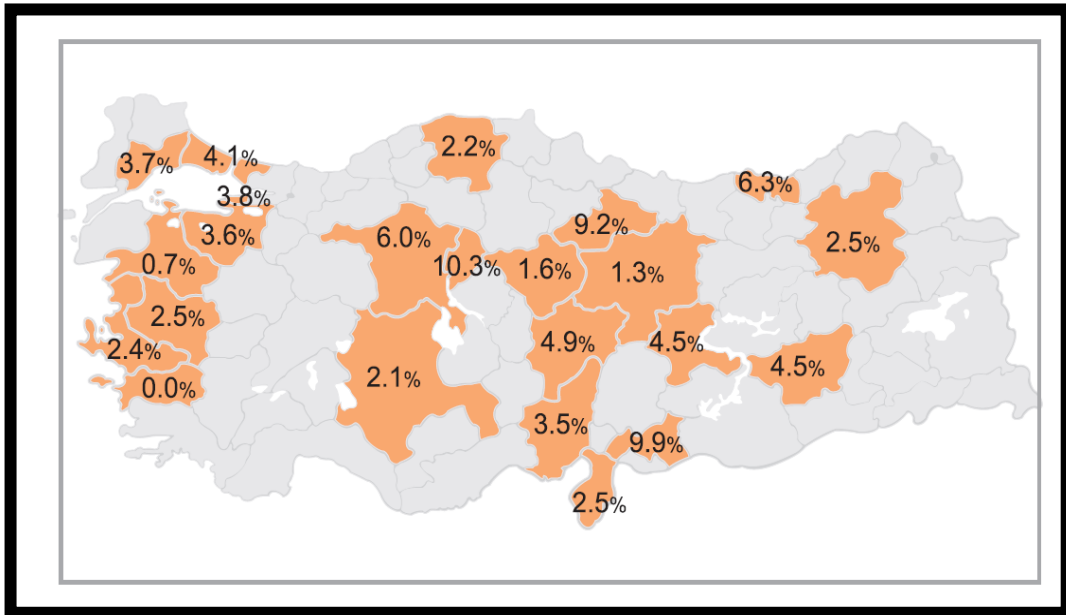
Şekil 1.4. HBV'nin dünya üzerindeki görülme sıklığı (Centers for Disease Control and Prevention, 2008)

Ülkemiz HBV sıklığı bakımından orta endemik grupta yer almaktadır. Ülkemizde bölgelere göre HBs Ag pozitifliği % 5-12 arasında değişirken, HBV ile

karşılaşma oranı ise yaklaşık % 30 civarındadır. Anti-HCV pozitifliği ise % 1 civarındadır. Bu oranlar hemato-onkolojik malignitesi olanlarda oldukça yüksektir. Epidemiyolojik çalışmaların sonuçlarına göre HBV ve HCV benzer yol ile insanları infekte etmektedir. İmmünizasyon ile HBV enfeksiyonunun bulaşması önlenirken, HCV enfeksiyonunu önleme için immünizasyon çalışmaları henüz olumlu yönde sonuçlandırılmamıştır (İdilman 2008).

Ayrıca HBV'nin erkeklerde kadınlardan daha sık görüldüğü yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (TÜRKHEP 2010).

Ülkemizde HBV taşıyıcılık oranı bölgelerimize göre farklılık göstermektedir. Özellikle batı bölgelerimizde HBV görülme sıklığı iç kesimlere ve doğu bölgesine kıyasla oldukça düşük seviyelerde seyretmektedir. Bunun nedenleri arasında doğu kesimlerinde eğitim seviyesinin düşük olması, buna bağlı olarak HBV hakkında yeterince bilgiye sahip olamama ve bilinçlendirilememiş bu kesmin HBV'den nasıl korunacağını bilmemeleri yer almaktadır (TÜRKHEP 2010) (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Ülkemizdeki HBV taşıyıcılık oranlarının bölgesel dağılımı [Türk Karaciğer Araştırmaları Derneği, Ulusal Hepatit Sıklığı Çalışması (TÜRKHEP 2010)]

1.4. HBV'DE RİSK GRUBU

HIV ve frengi gibi cinsel yolla bulaşan bir hastalığı olanlar, HBV'li hastaların çatal, kaşık, bıçak ve benzeri eşyalarını paylaşanlar, aile bireylerinde HBV taşıyıcısı olanlar, damar yoluyla ilaç kullananlar, sağlık çalışanları (doktorlar, hemşireler, dişçiler, kan ve kan ürünleri ile uğraşan laboratuvar ve kan merkezi personeli), uzun süre HBV taşıyıcısı olan bir insanla çeşitli sebeplerden dolayı aynı odayı paylaşma (hastane odası, yatakhane, hapisane, vb.), eşcinseller ve biseksüeller, temiz ve hijyenik olmayan yerlerde dövme veya piercing yaptıranlar ve buralarda çalışanlar, hijyenik şartları iyi olmayan kuaför/berberleri tercih edenler HBV açısından risk grubu içerisinde bulunmaktadır. HBV açısından yüksek riskli ülkelerde (Çin, Afrika, Asya kıtasının merkezi ve kuzey doğusu, Ortadoğu, Doğu Avrupa) uzun süre (6 aydan fazla) kalanlar da HBV sıklığının yüksek olması nedeniyle kalma süresine paralel olarak virusla karşılaşma ve virüsün bulaşma olasılığı da artmaktadır. Annenin HBV ile infekte olması yeni doğan bir çocuk için risk faktörüdür. Ancak çocuk doğar doğmaz hepatit B aşısı ve hepatit B koruyucu immünoglobulin (koruyucu serum) yapılırsa hastalığa yakalanmaz. Ayrıca, sürekli kan alan veya kanının temizlenmesi gereken hemofili veya diyaliz hastaları da HBV açısından yüksek risk taşımaktadırlar (Mast ve vd. 2006, Lok ve McMahan 2007, Anonim 2011, <http://www.hepatit.org> 2012).

1.5. HEPATİT HASTALIĞININ BELİRTİLERİ

HBV ile karşılaşmış yenidoğan bebeklerde HBV ile ilgili belirgin herhangi bir belirti yokken, yaşı ilerlemiş olan kişilerde belirgin bulgulara rastlanmaktadır. Bu bulgular arasında; tüm vücutta aşırı halsizlik, hafif derecede ateş, baş ağrısı, iştah kaybı, bulantı, kusma, karaciğer bölgesinin üzerinde ağrı ve hassasiyet yer almaktadır. Bilindiği gibi virüsün toksik etkiye neden olan ürünleri karaciğerde birikmektedir. Bu nedenle karaciğerdeki ağrılar zamanla artar ve vücuttaki herhangi bir sarsıntı ya da eğilip kalkma ile yoğun olarak hissedilir. Kabızlık veya ishal, kas ve eklemlerde yaygın

ağrı, deride kızarıklık da HBV'nin görölen belirtileri arasındadır. Bu belirtilerin çoğu gribal enfeksiyon belirtileri gibi görölmektedir. Ancak ayırt edici olan belirti karaciğerdeki ağrı ve hassasiyettir. Bu nedenle bu belirti hastalığın teşhisi açısından önem arz etmektedir (Kantarçeken 2009, Soyuer 2009, Anonim 2011, <http://www.hepatit.org> 2012).

1.6. HBV'NİN NEDEN OLDUĞU HASTALIKLAR

HBV, siroza (yaygın ve ilerleyici karaciğer iltihabı), karaciğer kanserine, karaciğer yetmezliğine, fulminan hepatite ve hepatit D hastalığına neden olmaktadır (Kantarçeken 2009, Lavanchy 2004, Saltoğlu 2005, Soyuer 2009, Anonim 2011, <http://www.hepatit.org> 2012).

1.7. HBV'DE TEDAVİ YOLLARI

KHB'nin tedavi seçenekleri interferonlar (α -IFN, β -IFN, γ -IFN), nükleozid analogları (lamivudin, adefovir dipivoksil, tenofovir, telbivudin, entekavir, vb.), immünomodölatör ilaçlar (kortikosteroidler, thymosin- α , levamisole, koloni stimüle edici faktörler, interlökinler), moleküler biyolojik yöntemler (DNA aşıları, antisens oligonükleotidler, ribozimler, DNazlar, dominant negatif mutantlar) ve ilaçların karaciğeri hedeflemesi ile yapılan tedavilerdir. Bugün için KHB'nin interferon dışı tedavisi denildiğinde akla gelen tek seçenek nükleozid analoglarıdır (Akarca 2002, Balık ve Yüksel 2009). Bunlar arasında KHB tedavisinde onaylanan ve dünyada yaygın uygulama bulanlardan biri de Entekavir'dir. *In vitro* çalışmalarda entekavirin, lamivudin ve adefovire oranla daha güçlü bir antiviral olduğu gösterilmiştir (Colonna ve vd. 2007).

Nükleozid analogları, nükleozidlerle yapısal benzerlik gösteren ve DNA sentezini bozan moleküllerdir. Nükleozid analoglarının olası etki mekanizmaları şunlardır:

- DNA polimerazın nükleozid bağlanma bölgesine bağlanıp fonksiyonunu inhibe edebilirler.
- DNA yapısına girip fonksiyon dışı DNA yapabilirler.
- Nükleozidlerle rekabete girebilirler.
- DNA sentezine girip sentezi bloke edebilirler.
- DNA polimerazın diğer enzimatik bölgelerinin fonksiyonunu bozabilirler (Akarca 2002, Torresi ve Locarnini 2000).

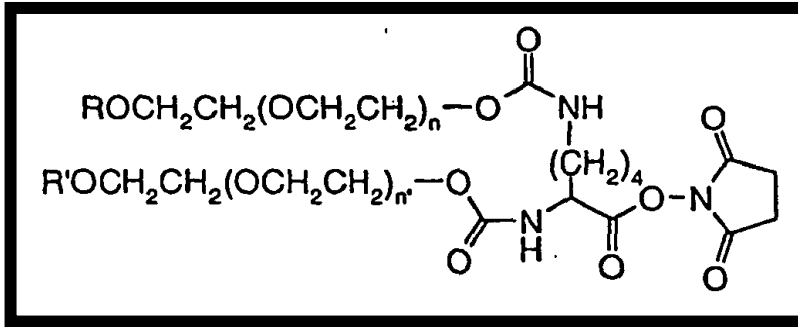
Nükleozid analogları ile yapılan genotoksisite çalışmalarında, çalışılan tüm nükleozid analoglarının mutajenik ve genotoksik oldukları, hatta bazı nükleozid analoglarının kanserojenik oldukları saptanmıştır (Cassiman ve vd. 1981, Clive ve vd. 1983, Phillips ve vd. 1991, Gonzalez ve Larripa 1994, Haynes ve vd. 1996, Rao ve vd. 1996, Agarwal ve Olivero 1997, Thust ve vd. 2000b).

Nükleozid analoglarının antiviral tedavi amaçlı kullanılmasında hastaya faydaları kadar risklerinin de iyice hesaplanması gerekmektedir. Çünkü nükleozid analogları nükleus DNA'sı ve mitokondriyal DNA ile reaksiyona girerek kalıcı tahribatlara neden olabilmektedir (Olivero ve vd. 1999, Meng ve vd. 2007). Bu tamir edilemeyen DNA hasarları nokta mutasyonlarına ve büyük DNA parçası delesyonlarına sebep olabilmektedir (Olivero 2007).

1.7.1. HBV TEDAVİSİNDE KULLANILAN İLAÇLAR

1.7.1.1. İnterferon- α (IFN- α)

Rekombinant veya lenfoblastoid interferon (IFN), KHC tedavisinde etkili olduğu kabul edilen ve en yaygın olarak kullanılan ilk ilaçtır. Interferon- α (IFN- α), viral infeksiyonlara yanıt olarak organizma tarafından üretilen ve doğal antiviral etkisi olan bir proteindir. Günümüzde rekombinant formları (IFN- α -2a, α -2b, konsensus IFN) üretilmiş olup KHC tedavisinde kullanılmaktadır (Poynard ve vd. 1996, Hoofnagle 1997, Ahmed ve Keefe 1999) (Şekil 1.6). Günümüzde standart IFN'nin yerini hem daha etkili olması hem de daha kolay uygulanabilir olması nedeniyle hızla pegIFN almıştır.



Şekil 1.6. İnterferon- α -2a

1.7.1.2. Pegile interferon- α

KHB tedavisinde pegile IFN'ler, hem daha etkili olması hem de uygulama kolaylığı nedeniyle standart IFN'lerin yerini almıştır. Tolerans ve yan etkiler standart IFN ile aynıdır. HBeAg pozitif hastalarda 6 ay, negatif hastalarda ise 12 ay olan standart kullanma süresi, antiviral tedavilere göre bir avantajdır (Fontana ve vd. 2002, Lok ve McMahon 2007).

Direkt antiviral etkinliğin yanısıra immun sistem üzerine de etkili olması nedeniyle, antiviral tedavilere göre daha yüksek oranda HBeAg kaybı ve serokonversiyonu ile HBsAg kaybı söz konusudur. Direnç gelişiminin de olmaması önemlidir. Ancak antiviral tedavilere göre HBV-DNA'yı daha düşük oranda baskılaması, subkutan enjeksiyon sıkıntısının yanında IFN kullanımına bağlı oluşan yan etkiler bu tedavinin en önemli dezavantajlarıdır (Fontana ve vd. 2002, Lok ve McMahon 2007).

Oral antivirallerle karşılaştırıldığında pegile interferon tedavilerinin daha yüksek oranda HBsAg ve HBeAg kaybı sağladığı, ancak HBV-DNA'nın saptanamaz dzeyeye düşmesinden dolayı oral antivirallerin KHB tedavisinde daha etkili olduğu grlmektedir (Lok ve McMahon 2007).

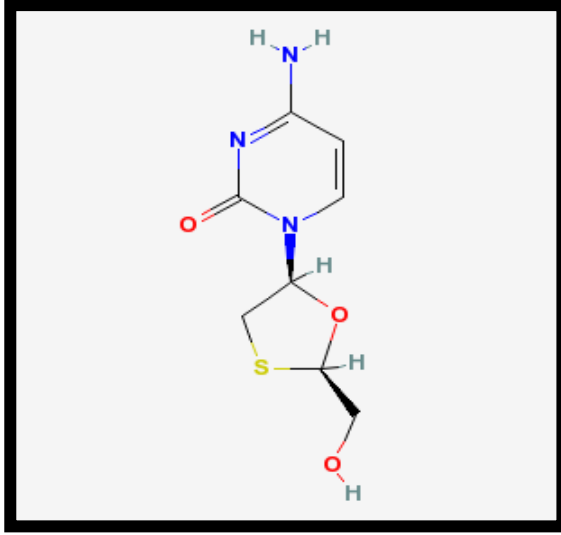
1.7.1.3. Lamivudin

Lamivudin, 1998 yılında FDA tarafından onay verilmiş ilk sentetik L-nükleozid analogudur (şekil 1.7). Bir siklik nükleozid analogu olan lamivudin, intraselüler hepatosit kinazlar tarafından fosforile edilerek aktif metaboliti olan trifosfata dönüşür. Aktif trifosfatın uzayan zincire inkorporasyonu prematür zincir sonlanmasına sebep olmakta ve böylelikle viral replikasyon baskılanmaktadır.

Lamivudinin HBeAg'i pozitif ve negatif KHB virus infeksiyonlarında, kompanze ya da dekompanze sirozlu hastalarda ve çocuklardaki KHB virus infeksiyonlarının tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir (Liaw ve vd. 2004, Kobayashi ve vd. 2006).

Lamivudin kullanan hastalarda zaman içinde bu ilaca karşı gelişen direnç, KHB tedavisinin en temel konularından birisini oluşurmaktadır. Polimeraz geninin reverse transkriptaz proteini zerindeki C ve B bölgelerindeki mutasyonlar lamivudin

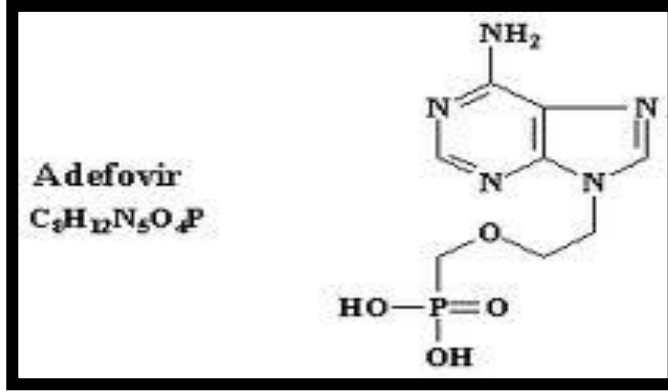
direncinden sorumlu temel mutasyonlardır. Genotipik direnç, bir yıldır lamivudin alan hastalarda % 14-32 arasında görülmekte ve tedavinin 5. yılında % 50-60'lara kadar yükselmektedir (Lok ve vd. 2003, Liaw ve vd. 2004).



Şekil 1.7. Lamivudin

1.7.1.4. Adefovir Dipivoksil

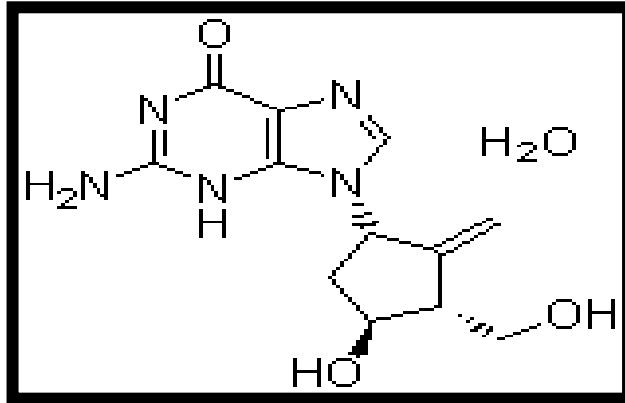
Adefovir dipivoksil, Eylül 2002'de FDA tarafından onay alan ilk nükleotid analogudur. Asiklik deoksiadenozin monofosfat analogu olan adefovir dipivoksil, lamivudin gibi nükleozid analoglarının aksine, aktif formuna ulaşmak için gereken 3 fosforlanma basamağının ilkinde gerek duymaz (Şekil 1.8). Günde 10 mg doz olmak üzere KHB tedavisinde kullanılmaktadır. Aktif formu, hem reverse transkriptazı hem de DNA polimerazı inhibe ederek HBV DNA zincirinin sonlanmasına neden olmaktadır. *In vitro* ve klinik çalışmalarda hem yaban tip virusu hem de lamivudine direnç gösteren formları inhibe ettiği gösterilmiştir (Fung ve vd. 2006).



Şekil 1.8. Adefovir dipivoksil

1.7.1.5. Entekavir

Entekavir, HBV replikasyonunu başlangıç, revers transkripsiyon ve HBV DNA pozitif zincir sentezi basamaklarında inhibe eden 2-deoksiguanozin'in karbosiklik analogudur (Seifer ve vd. 1998) (Şekil 1.9). Mart 2005' te kronik HBV tedavisi için FDA'dan onay almıştır.



Şekil 1.9. Entekavir

1.7.1.5.1. Entekavir'in Kullanım Alanları

Entekavir, HBV polimeraza karşı güçlü ve selektif aktiviteye sahip bir guanozin nükleozid analogu olup, 2005 yılında FDA tarafından KHB tedavisinde kullanılmak üzere onay almıştır. Ülkemizde ise 2007 yılında ruhsat alınarak kullanımına başlanmıştır. İntraselüler yarı ömrü 15 saat olan aktif trifosfat (TP) formuna fosforlanır. İntraselüler TP düzeyleri, ekstraselüler entekavir konsantrasyonlarıyla direkt olarak ilişkilidir ve başlangıç plato düzeylerinin ötesinde anlamlı birikim göstermez. Doğal substrat olan deoksiguanozin-TP ile rekabete giren entekavir-TP, HBV replikasyonunun üç ayrı evresinde etkilidir. HBV revers transkriptaz etkinliğinin başlamasını önler, reverse transkriptaz aktivitesini bloke eder ve DNA'ya bağımlı cccDNA sentezini ve işlevsel aktivitesini de inhibe eder (HBV polimerazın primingi, negatif sarmalın pregenomik mRNA'dan revers transkripsiyonu ve pozitif HBV DNA sarmalının sentezi). HBV DNA polimeraz için entekavir-TP'nin Ki değeri 0,0012 μM 'dir. Entekavir-TP α , β ve γ selüler polimerazların zayıf bir inhibitörü olup Ki değerleri 18-40 μM 'dir. Ayrıca, yüksek entekavir maruziyetlerinin HepG2 hücrelerindeki mitokondriyal DNA sentezi üzerinde veya DNA polimeraz üzerinde herhangi bir yan etkisi bulunmamaktadır ($K_i < 160 \mu\text{M}$) (<http://www.iegm.gov.tr>, 2012).

Ayrıca, hepatoma hücrelerinden oluşan hücre kültürlerinde entekavirin, lamivudine göre 30-2200 kat daha fazla oranda viral replikasyonu baskıladığı gösterilmiştir (Colunno ve vd. 2007, Gish ve Locarnini 2007).

1.7.1.5.2. Entekavir'in Vücuda Alınım Yolları ve Kullanım Şekli

Entekavir, 0.5-1 mg'lık tabletler halinde veya sıvı solüsyon olarak oral yolla, su dışında başka bir sıvı karıştırılmadan yemeklerden 2 saat önce veya sonra olmak üzere, genellikle gün içerisinde 1 defa alınır.

Nükleozid tedavisi almamış yetişkinler, 16 yaş ve üstü KHB virus enfeksiyonuna sahip gençlerde önerilen doz, günde bir kez 0,5 mg'dır. Hepatit B tedavi öyküsü olan yetişkinlerde (16 yaş ve üstü) önerilen doz günde bir kez 1 mg'dır.

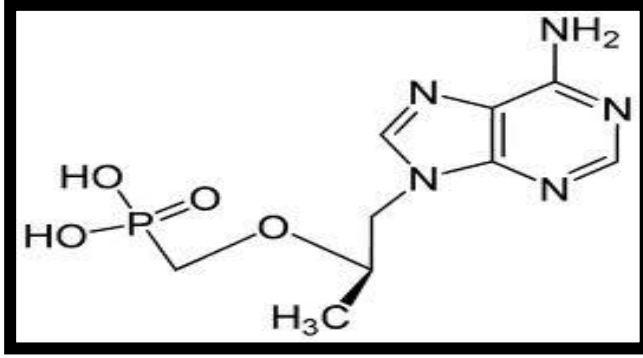
Entekavirin gıdalarla birlikte alınmasında emilimi %18-20 oranında azalmaktadır. Bu nedenle yemeklerden 2 saat önce veya yemeklerden 2 saat sonra aç karnına alınmalıdır. Entekavir başlıca böbrekler tarafından elimine edilmektedir. İdrarla %60-70 oranında atılmaktadır. Lavimudine karşı dirençli hastalarda yüksek dozda kullanılması gerekirken, adefovire dirençli hastalarda normal doz kullanımı reçete edilmektedir. Kontrolsüz kesildiğinde şiddetli HBV alevlenmesine neden olabilir. Bu nedenle tedavi bitiminden sonra birkaç ay daha yakın takip gereklidir (Balık ve Yüksel 2009, <http://www.ieg.gov.tr> , 2012).

16 yaşından küçük hastalardaki entekavir güvenliliği ve etkililiği ile ilgili çalışmalar yapılmadığından pediatrik grupta kullanımı önerilmemektedir. İlaç dozunun yaşa göre ayarlanmasına gerek yoktur. Cinsiyete ve ırka göre entekavir dozunun ayarlanması söz konusu değildir (<http://www.ieg.gov.tr> , 2012).

1.7.1.6. Tenofovir

Tenofovir nükleotid analogu olup, yapısal olarak adefovir dipivoksile benzemektedir (Şekil 1.10). Asiklik bir nükleozid analogu olup adefovire nazaran daha az nefrotoksik olması nedeniyle günde 300 mg kullanılabilmesi, daha güçlü bir antiviral olarak kullanımına imkan sağlamıştır (Van Bömmel ve vd. 2002).

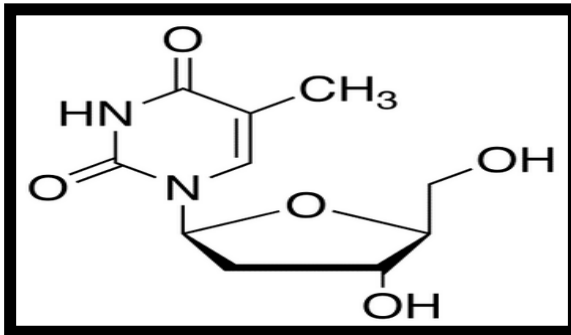
Nükleozid analoglarına karşı çapraz direnç göstermemesi ve DNA polimerazdaki mutasyonlara karşı yüksek bir genetik bariyere sahip olması, ortaya çıkabilecek direnç gelişimine neden olan mutasyonlar açısından daha az sorun yaşanacağını düşündürmektedir (Van Bömmel ve vd. 2002).



Şekil 1.10. Tenofovir

1.7.1.7. Telbivudine

Ekim 2006'da FDA'dan kullanım onayı almış ve AB ülkelerinde de onay alan bir ilaçtır. Telbivudine ya da L-deoksitimidin, timidinin L-deoksi modifikasyonu olan HBV DNA polimeraza etki eden sentetik nükleozid analogu bir antiviraldir (Şekil 1.11). Hücredeki kinazlar tarafından aktif olarak fosforile edilmekte olan telbivudine aktif trifosfat formuna dönüştürülmektedir. Yarı ömrü 14 saat olan bu antiviralin hücrede etkinliği kısa sürede gözlenebilmektedir. Fosforilasyon sonrası, aktif formu HBV-DNA polimeraz ile yarışarak replikasyonu inhibe eder. Sentezlenen DNA zincirine katılabilmek için timidin ile yarışır. Günlük onay alan dozu 600 mg'dır. Böbrek hastalarında dozu ayarlanmalıdır. İyi tolere edilir ve yan etkileri lamivudine benzerdir. Preklinik toksikolojik testlerde embriyo üzerine mutajenik ya da karsinojenik bir etkisinin olmaması telbivudine için önemli bir özelliktir. Bu nedenle gebelikte kullanımı açısından B grubunda yer alan ilaçlar içerisinde yer almaktadır (Lai ve vd. 2007).



Şekil 1.11. Telbivudine

1.7.1.8. Yeni geliştirilen ilaçlar

- Lobucavir
- Emtricitabine
- Clevudine
- Penciclovir ve oral formu famciclovir
- Ganciclovir
- L-Deoxythimidine
- Valtorsitabin
- Alamifovir
- Pradefovir
- Remofovir

Bu ilaçlara ait klinik çalışmalar sürdürülmektedir (Tosun 2004).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. HBV Tedavisinde Kullanılan İlaçların Genotoksitesi ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

Çalışmamızda kullandığımız entekavir ilacı 2005'te FDA onayı almış oldukça güçlü ve HBV DNA polimeraza selektif bir nükleozid analogu olup HBV tedavisinde kullanılmaktadır (Tosun 2004).

2.1.1. Entekavir ile Yapılan Genotoksite Çalışmaları

Entekavir ile yapılan çalışmalar sadece klinik boyutta olup kromozomal düzeyde genotoksite, mutajenite ve teratojenite açısından herhangi bir çalışmaya rastlanmadı. Hangi madde veya ilaç olursa olsun insan yaşamını doğrudan ilgilendiren, hepatit gibi çok önemli bir hastalığın tedavisinde kullanılan, entekavir de dahil tüm maddelerin mutlaka çeşitli testlerden geçirilerek hiçbir zararı olmayan ya da en az zararlı, en fazla ve doğru etkinin elde edilebileceği özelliklere sahip olan maddelerin insan yaşamında yer alması önemlidir. Bu nedenle kısa sürede yaşantımıza girmiş olan ve şu anda güvenli olduğu kanısıyla HBV hastalığı tedavisinde kullanılan entekavir ve diğer antivirallerle ilgili genotoksite, mutajenite ve teratojenite test çalışmalarının yapılması gereklidir. Bu çalışmalar hem HBV hastalarının geleceği açısından hem de gelecek nesiller açısından oldukça önemlidir.

Zhou vd. (2012) yaptığı bir çalışmada, uzun süreli entekavir kullanımının KHB'li hastalardan elde edilen periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC) mitokondriyal DNA polimeraz- γ hasarına yol açıp açmadığı araştırılmıştır. Çalışmada 3 yıla kadar entekavir ile uzun süreli tedavinin, PBMC'lerde mtDNA içeriğinin azalmasına yol açtığı saptanmıştır.

HBV tedavisinde entekavirin yanı sıra daha önce de belirttiğimiz gibi; adefovir dipivoksil, lamivudin, telbivudine, tenofovir gibi etkili nükleozid analogları da antiviral tedavide kullanılmaktadır. Bu ilaçlarla ilgili daha önce yapılan çalışmalar, ilaçların yan etkileri, ilaçlara karşı oluşan direnç gelişimleri, ilacın tedavideki etkinliği hakkında bilgi verirken, genotoksik etkileriyle ilgili yapılmış pek fazla çalışma bulunmamaktadır. Ancak lamivudin'in genotoksik etkiye sahip olup olmadığı bazı kısa süreli genotoksisite çalışmalarıyla araştırılmıştır (Tungeln ve vd. 2002, Bayram ve Topaktaş 2008).

2.1.2. Lamivudin ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Lamivudinin, fare L5178YTK+/- lenfosit hücrelerinde timidin kinaz (Tk) geninde mutasyonu uyardığı ve klastojenite deneylerinde pozitif etkili olduğu saptanmıştır (Wutzler ve Thust 2001). Ayrıca, lamivudinin MN testlerinde, *in vitro* hücre transformasyonu, kanserojenite ve bakteriyel gen mutasyon testlerinde genotoksik bir etkiye sahip olmadığı gösterilmiştir (Wutzler ve Thust 2001). Lamivudinin heterozigot fare lenfosit hücrelerinde Tk ve Hipoksantin-Guanin Fosforibozil Transferaz (HGPRT=Hypoxantine-Guanine Phosphoribosyl Transferase) genleri yönünden mutasyon frekansını arttırmadığı saptanmıştır (Tungeln ve vd. 2002). Ayrıca B6C3F1 farelerinin kemik iliği hücrelerinde lamivudinin belirgin bir MN oluşumuna neden olmadığı da bildirilmiştir (Tungeln ve vd. 2002).

Kırküç KHB hastası, 20 taşıyıcı ve 20 kontrol (83 kişi) ile yapılan bir çalışmada henüz tedaviye başlamamış hasta ve taşıyıcı gruplarında, hem virusun konak DNA'sına olan olası genotoksik etkisini saptamak amacıyla hem de farklı tedavi protokollerinin olası genotoksik etkilerini değerlendirmek için kromozom kırıkları sayımı ve MN testi uygulanmıştır. Virusun konak DNA'sına olan olası genotoksik etkilerini belirlemede tedaviye başlanmamış hasta ve taşıyıcılardan elde edilen kromozom kırıkları ve MN'ler istatistiksel olarak değerlendirilerek kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Lamivudin, interferon ve lamivudin+interferon ile tedavi programına alınan 39 hastada tedavinin 1. ve 6. aylarında kromozom kırık sayısı ve MN testi uygulanmıştır. Değerlendirmeler

sonucunda tedavi öncesi KHB hastalarının ve taşıyıcıların kromozom kırık sayıları kontrolle karşılaştırıldığında yüksek bulunurken; MN sıklığı üç grup arasında farklı bulunmamıştır. Sonuç olarak bu çalışmayla HBV'nin hem KHB'li hastalarda hem de taşıyıcılarda kromozomal instabiliteye yol açtığı ve KHB tedavisinde kullanılan farklı tedavi protokollerinin ise konak genomuna ilave genotoksik etkide bulunmadığı gösterilmiştir (İlgin 2005).

Carter vd. (2007) hücre klonlama çalışmalarında lamivudinin, hücre sağ kalımı ile iki rapörtör gendeki (HGPRT ve Tk) mutajenitesini araştırmışlardır. Araştırmacılar lamivudinin 0, 33, 100 ve 300 µmol'luk konsantrasyonlarını uygulayarak HGPRT ve Tk mutant frekanslarında artışın olduğunu saptamışlardır.

Bir diğer çalışmada ise çeşitli dozlardaki (75, 100, 125 ve 150 µg/ml) lamivudinin *in vitro* insan periferik lenfositlerinde KKD, KA ve MN oluşturma potansiyeli araştırılmıştır. En yüksek konsantrasyonda (150 µg/ml) ve 24 saat ile 48 saat lamivudin uygulamalarının 125 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarda KKD'yi indüklediği belirlenmiştir. Yapısal kromozom anormallikleri ise her iki lamivudin uygulama periyodunda ve 100, 125 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarında kontrole oranla istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bunun yanı sıra lamivudinin bütün konsantrasyonlarda ve muamele sürelerinde poliferasyon ve mitotik indeksleri azalttığı gösterilmiştir. Mitotik indeksteki düşüşün doza bağlı ters orantılı olarak azaldığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada ilacın MN etkisi ise anlamlı bulunmuştur. Sonuç olarak lamivudinin insan periferik lenfositlerinde zayıf bir genotoksik etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Bayram ve Topaktaş 2008).

Nükleot(z)id analogları ile yapılan genotoksisite çalışmalarında, çalışılan tüm nükleot(z)id analoglarının mutajenik ve genotoksik oldukları, hatta bazı nükleot(z)id analoglarının kanserojenik oldukları bildirilmiştir (Cassiman ve vd. 1981, Clive ve vd. 1983, Phillips ve vd. 1991, Gonzalez ve Larripa 1994, Haynes ve vd. 1996, Rao ve vd. 1996, Agarwal ve Olivero 1997, Thust ve vd. 2000b). Antiviral tedavi amaçlı kullanılan nükleozid analoglarının hastaya faydaları ile olası risklerinin iyice hesaplanması

gerekmektedir. Çünkü bu nükleozid analogları nükleus DNA'sı ve mitokondriyal DNA ile reaksiyona girerek kalıcı hasarlara neden olabilmektedir (Olivero ve vd. 1997, Olivero ve vd. 1999, Meng ve vd. 2007). Tamir edilemeyen bu DNA hasarları nokta mutasyonlarına ve büyük DNA delesyonlarına sebep olabilmektedir (Olivero 2007).

2.1.3. Tenofovir ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Tenofovir disoproksil fumarat, insan immün yetmezlik virusu (HIV) ile KHB tedavisi için onaylanmış bir nükleotid analogudur.

Menne vd (2005) kronik sıçan hepatit virus enfeksiyonu taşıyan akıllı ve yerleşik model hayvanlara tenofovir disoproksil fumarat tedavisi uygulamışlardır. Kontrol-plasebo ve doz-ağırlık grupları çalışma sürecince değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda tenofovirin herhangi bir toksisite etkisinin olmadığı rapor edilmiştir.

Vidal vd (2006) yaptıkları çalışmada renal proksimal tübül epitel hücreleri (RPTECs)'inde tenofovirin *in vitro* sitotoksitesini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar, tenofovir, zidovudin, didanosin, ritonavir ve lopinavir ile bunların kombinasyonlarını 22 gün boyunca test edip karşılaştırmışlar ve sitotoksitelerini tespit etmişlerdir. Bunlara ek olarak, mitokondriyal DNA (mtDNA) ve reverse transkriptaz inhibitörleri ile tedavi edilen RPTEC'lerde sitokrom oksidaz II mRNA düzeylerini değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda tenofovirin anlamlı bir sitotoksisite geliştirmedeği, didanosin ve zidavudinin tenofovire göre daha fazla sitotoksisite gösterdiği rapor edilmiştir. 10 mM konsantrasyondaki ritonavirin tenofovir ile kombinasyonunun ve 40 mM konsantrasyondaki lopinavirin tenofovir ile olan kombinasyonunun anlamlı düzeyde RPTEC canlılığını ($p < 0.0001$) düşürdüğü, ancak tenofovirin kısmen bu etkiyi azaltma eğiliminde olduğu bildirilmiştir. Tenofovirin didanosin ile olan kombinasyonunun ise mtDNA'nın azalmasına ve buna paralel olarak sitokrom oksidaz II mRNA düzeyinin azalmasına neden olduğu, oysa tenofovirin tek başına, mtDNA ve oksidaz II mRNA düzeylerine etkisinin olmadığı rapor edilmiştir.

Sonuç olarak yapılan çalışmada Tenofovirin insan RPTEC'leri üzerine *in vitro* sitotoksik etkisinin olmadığı rapor edilmiştir.

Ananworanich vd. (2008) ise yaptıkları çalışmada 35 HIV taşıyıcısı olan hastalara günde 1 defa tenofovir + lamivudin kombinasyon tedavisini 48 hafta boyunca uygulamışlar ve mtDNA içeriklerini saptamaya çalışmışlardır. Araştırmacılar, mtDNA/nükleer DNA (+1.06, p <0.0001) oranını saptadıktan sonra değerlendirme yapmışlar ve çalışma sonucunda mitokondriyal toksisitedeki artışın önceki çalışmalarla uyumlu olduğunu göstermişlerdir. Ancak bu artışın diğerlerine nazaran daha yüksek düzeyde olduğunu rapor etmişlerdir.

2.2. HBV Dışındaki Hastalıkların Tedavisinde Kullanılan İlaçların Genotoksitesisi ile İlgili Çalışmalar

2.2.1. Acyclovir, Valaciclovir, Penciclovir, Famciclovir ve Ganciclovir ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

HBV tedavisi dışında farklı viral hastalıkların tedavisinde kullanılan nükleozid analoglarıyla yapılmış genotoksisite çalışmaları mevcuttur. Ağız ve genital *Herpes simplex* virus infeksiyonlarının tedavisinde kullanılan acyclovir [9- ((2-hidrometoksi)-metil)-guanin] guanozin nükleozidinin analogudur. Clive vd. (1983), BALB/c ve 3T3 hücreleri ile yaptıkları *in vitro* hücre transformasyon testinde 50µg/ml konsantrasyonda ve 72 saat muamele periyodu sonunda acyclovirin transformasyona neden olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Tk geni bakımından heterozigot olan L5178YTk^{+/-} fare lenfosit hücrelerinde 400-2400 µg/ml konsantrasyonda ve 4 saatlik muamele periyodu sonunda acyclovirin Tk geninde mutasyonu uyardığını saptamışlardır. Aynı araştırmacıların *in vitro* insan lenfositleri ile yapmış oldukları klastojenite çalışmalarında ise 250-500 µg/ml konsantrasyon aralığında ve 48 saatlik muamele periyodu sonunda acyclovirin klastojenik etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir.

Shobukhov ve Iurchenko (1988)'in acyclovir ile yaptıkları çalışmada, 5-600 mg/kg doz aralığında acyclovirin fare kemik iliği hücrelerinde mikronükleuslu polikromatik eritrosit oluşumunu arttırdığı rapor edilmiştir. Acyclovirin genotoksik etkisinin araştırıldığı bir başka çalışma ise Haynes vd. (1996) tarafından yapılmıştır. *In vivo* mikronükleus testini kullanarak fare kemik iliği hücrelerinde mikronükleuslu polikromatik eritrositlerin acyclovirin 225 mg/kg/gün konsantrasyonunda doza bağlı olarak artış gösterdiğini bildirmişlerdir.

Thust vd. (1996) ise pürin nükleozid analogları olan acyclovir, valaciclovir, penciclovir, famciclovir ve ganciclovirin *in vitro* genotoksik etkilerini araştırmak amacıyla Çin hamster V79-E hücre hattında KKD testini uygulamışlardır. Araştırmacılar acyclovirin KKD'yi arttırdığını, bunun yanı sıra mitotik indekste düşüşe neden olduğunu ve hücre bölünmesini geciktirdiğini saptamışlardır. Ayrıca bu çalışma sonucunda valaciclovir ve penciclovirin sadece mitotik indeksi düşürdükleri ve hücre bölünmesini geciktirdikleri bulunmuştur. Famciclovirin ise herhangi bir genotoksik etkisinin olmadığı, ganciclovirin ise genotoksik etkisinin yüksek olduğu bildirilmiştir.

Jagetia ve Aruna (1999) acyclovirin 0, 0.01, 0.1, 1, 10 ve 100 µM konsantrasyonlarıyla 8 saat boyunca HeLa hücrelerini muamele etmişler ve muamele sonrası hücrelerin büyüme kinetikleri, hücrelerin sağ kalımı ve mikronükleus oluşumunu araştırmışlardır. Araştırmacılar doza bağlı olarak HeLa hücrelerinde büyüme kinetiği, hücre bölünmesi ve hücre sağ kalımının azalmış olduğunu, 100 µM konsantrasyonda hücre bölünmesinin tamamen baskılandığını ve doza bağlı olarak mikronükleus oluşumunun arttığını saptamışlardır.

Thust vd. (2000a) *Herpes simplex virus-1*'in Tk genini ifade eden Çin hamster yumurtalık hücrelerinde (CHO-HSVTk) acyclovirin KKD ve klastojenik aktivitesini araştırmışlardır. Araştırmacılar acyclovirin 10 µM dozda KKD değişimini ve KA frekansının muameleden hemen sonra kontrole oranla artmış olduğunu saptamışlardır. Ancak, bu konsantrasyonun anti-herpes tedavisi sırasında kan plazmasında acyclovirin ulaşmış olduğu konsantrasyondan çok daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Tomicic vd. (2002) ise *Herpes simplex virus-1*'in Tk genini ifade eden Çin hamster yumurtalık (CHO-HSVTk) hücre hattında acyclovirin DNA kırığı oluşumu, yapısal kromozom anomalileri ve apoptoz/nekroz oluşumu üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda acyclovirin zamana ve doza bağlı olarak güçlü bir apoptoz indükleyicisi olduğu ve çok zayıf bir oranda nekroz oluşumuna neden olduğunu, tek hücre jel elektroforez testi ile de DNA tek iplik kırıklarının ve DNA çift iplik kırıklarının oluşumunu indüklediği ve yapısal kromozom anomali frekansını arttırdığını tespit etmişlerdir.

2.2.2. Brivudin ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Uridin analogu olan brivudin [(E) – 5 – (bromovinyl) – 2' – deoksiuridin)] *Herpes simplex virus* infeksiyonunun tedavisinde kullanılan bir nükleozid analogudur.

Maquardt vd. (1988) brivudinin genotoksik olup olmadığını bakteri gen mutasyon testi (*Salmonella typhimurium*) ve Çin hamster V79 hücrelerinde klastojenite testleri ile araştırmışlardır. Çalışma sonucunda brivudinin ne bakterilerde, ne de Çin hamster V79 hücrelerinde herhangi bir genotoksik etkiye neden olmadığını rapor etmişlerdir. Ayrıca brivudinin primer sıçan hepatositlerinde DNA sentez mekanizması üzerindeki etkisi de araştırılmış, ancak primer sıçan hepatositlerinin DNA sentezi üzerinde herhangi bir olumsuz etkisine rastlanılmamıştır.

Oshiro vd. (1992) *Salmonella typhimurium* 'un TA 1537, TA 1538, TA 98 ve TA 100 suşlarını kullanarak yaptıkları çalışmada brivudinin 10–5000 µg/ml aralığındaki konsantrasyonlarında mutajenik etkisi olup olmadığını araştırmışlardır. Araştırmacılar brivudinin 10–5000 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarında S9 metabolik aktivasyon enzimi bulunan veya bulunmayan her iki durumda da mutajenik olmadığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada brivudinin Tk genindeki genotoksik etkisi L5178YTk^{+/-} fare lenfosit hücreleri kullanılarak da araştırılmıştır. Ayrıca brivudinin S9 metabolik

aktivasyon enzimi bulunmayan 500–2000 µg/ml konsantrasyon aralığında Tk geninde mutasyon sıklığının kontrole oranla anlamlı bir şekilde arttırdığını saptamışlardır. Yine aynı çalışma içerisinde Çin hamster yumurtalık hücrelerinin HGPRT lokusunda brivudinin S9 metabolik aktivasyon enzimi bulunmayan 500 – 2000 µg/ml konsantrasyon aralığında kontrole oranla anlamlı bir mutasyon sıklığı meydana getirmediği gösterilmiştir. Ancak, hem Çin hamster yumurtalık hücrelerinde hem de L5178YTk^{+/-} fare lenfosit hücrelerinde 500-1750µg/ml konsantrasyon aralığındaki brivudinin mikronükleus oluşumunu arttırdığı görülmüştür.

2.2.3. Didanosin ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Didanosin (ddI) (2',3' – dideoksinosin), HTLV-III/LAV virusunun replikasyonunu bloke etmek amacıyla kullanılan bir pürin nükleozid analogudur.

Phillips vd. (1991) 7 nükleozid analogunun genotoksik ve sitotoksik etkileri olup olmadığını B6C3F1 dişi farelerinin kemik iliği hücrelerinde *in vivo* mikronükleus testi ile araştırmışlardır. Farelere üç gün boyunca oral yolla didanosin verilmiş ve yapılan MN testi sonucunda, didanosin 200 mg/kg/gün konsantrasyonlarında mikronükleuslu polikromatik eritrositlerin oluşum frekansında belirgin bir artışın gözlemlendiğini rapor etmişlerdir.

Meng vd. (2000c) HIV enfeksiyonunda reverse transkriptaz enzimin inhibitörü olarak kullanılan didanosin ve zidovudinin genotoksik ve mutajenik etkileri olup olmadığını, insan lenfoblastoid hücrelerinde araştırmışlardır. Araştırmacılar insanların tedavisi esnasında plazmada tespit edilen konsantrasyondan 3-30 kat yüksek aralıklarda zidovudinin lenfoblastoid hücrelerin DNA'sında bulunduğunu saptamışlar, aynı zamanda didanosin ve zidovudinin HGPRT ve Tk lokuslarında mutasyon frekansını kontrole oranla arttırmadığını bildirmişlerdir.

Tungeln vd. (2004) ise HIV enfeksiyonunda reverse transkriptaz enziminin inhibitörü olarak kullanılan didanosin ve zidovudinin mutajenik aktivitelerinin olup olmadığını araştırmışlardır. Bu araştırmada C57B1/6N/Tk^{+/-} dişi fareleri ile CH3/HeNMTV erkek farelerinin çiftleştirilmesi sonucunda oluşan F1 farelerine doğum sonrasındaki 1-8. günler arasında 200 mg/kg konsantrasyonda didanosin veya 200 mg/kg konsantrasyonda didanosin + 200 mg/kg konsantrasyonda zidovudin verilmiştir. Son dozdan sonra mikronükleus oluşum frekansı fare kemik iliği hücrelerinde mikronükleuslu polikromatik eritrositler belirlenerek saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada B6C3F1/Tk^{+/-} farelerine 3 hafta boyunca 200 mg/kg konsantrasyonda didanosin veya 200 mg/kg konsantrasyonda didanosin + 200 mg/kg konsantrasyonda zidovudin verilmiş, HPRT ve Tk lokuslarında meydana gelen mutasyon sıklığı araştırılmıştır. Çalışma sonucunda didanosin ve zidovudinin birlikte kullanıldığı durumlarda belirgin mikronükleuslu polikromatik eritrosit oluşumunun gerçekleştiği ancak didanosinin tek başına kullanılması durumunda belirgin mikronükleuslu polikromatik eritrosit oluşumunun gözlenmediği bildirilmiştir. HPRT gen lokusunda didanosin + zidovudinin mutasyonu arttırmadığı, fakat Tk lokusunda arttırdığı belirlenmiştir. Sonuç olarak B6C3F1/Tk^{+/-} fareleri için didanosinin mutajenik olmadığı bildirilmiştir.

2.2.4 Ganciclovir ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Ganciclovir [9 – (1,3 – dihidroksi – 2 – propoksi – metil) –guanin], *Herpes simplex* virus enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan bir guanozin nükleozid analogudur.

Hamel vd. (1996) yaptığı kısa süreli çalışmada insan gliyom (PA317) hücre kültürleri ile sıçan 9L gliosarkom hücre kültürlerinden hücre hatları elde edilmiş ve bunlara ganciclovirin farklı konsantrasyonları uygulanmıştır. Yapılan değerlendirme sonucunda 10 saatlik kısa süreli ganciclovir muamelesinin bile *Herpes simplex*'e özgü Tk enzimini salgılayan hücrelerin ölümüne neden olduğu rapor edilmiştir.

Haynes vd. (1996) *in vivo* mikronükleus testi ile pürin nükleozid analogları olan penciclovir, acyclovir ve ganciclovirin *in vivo* genotoksik etkiye sahip olup olmadıklarını fare kemik iliği hücrelerinde araştırmışlardır. Fareler 0-24. saatlerde nükleozid analogları ile muamele edilmişlerdir. Yüzelli (150) µM/kg/gün konsantrasyonda ganciclovirin herhangi bir etkisinin olmadığı, fakat doza bağlı olarak ganciclovirin mikronükleuslu polikromatik eritrosit oluşumunu belirgin bir şekilde arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca etkileri araştırılan diğer pürin nükleozid analogları içerisinde mikronükleuslu polikromatik eritrosit oluşumunu en fazla arttıranın da ganciclovir olduğu bu çalışma ile bildirilmiştir.

Tomicic vd. (2002) *Herpes simplex* tedavisinde kullanılan pürin grubunun nükleozid analogu ganciclovirin DNA hasarı, yapısal kromozom anormallikleri ve apoptoz/nekroz artırıcı etkileri olup olmadıklarını *Herpes simplex* virus-1'in Tk genini ekspres eden Çin hamster yumurtalık hücrelerinde incelemişlerdir. Çalışma sonucunda ganciclovirin 0,5 µM konsantrasyonlarda çok etkili olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar ganciclovirin HSVTk(+) olan Çin hamster yumurtalık hücrelerinde HSVTk(-) olan hücelere göre 60 kat daha fazla etkili olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca ganciclovirin zamana ve doza bağlı olarak apoptozu uyardığı buna karşın zayıf bir oranda nekroz oluşumuna neden olduğu da rapor edilmiştir. Ganciclovirin CHO-HSVTk hücrelerinde DNA çift iplik kırıklarını ve yapısal kromozom anormalliklerini de arttırdığı bildirilmiştir.

2.2.5. Penciclovir ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Penciclovir [(9 – (4 – Hidroksimetilbut – 1 – 1) – guanin] *Herpes simplex* virus enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan bir başka nükleozid analogudur. Penciclovirin klinikte kullanıma sunulan sıvı hali famciclovirdir. Famciclovir, hızlı ve kapsamlı bir biçimde aldehit oksidazlar ve esterazlar ile *in vivo* olarak penciclovire metabolize edilir. Bundan dolayı penciclovir ile yapılan genotoksisite çalışmaları famciclovir için de kabul edilebilir (Wutzler ve Thust 2001).

Thust vd. (1996) Çin hamster V-79 hücrelerinde penciclovirin genotoksik etkisini araştırdıkları çalışmalarında, penciclovirin sadece mitotik indeksi düşürdüğü ve hücre bölünmesini geciktirdiği rapor edilmiştir. Ayrıca famciclovirin KKD, klastojenite ve hücre bölünmesi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı, bu durumun da famciclovirin penciclovire Çin hamster V-79 hücreleri tarafından metabolize edilmediğinden kaynaklandığı bildirilmiştir.

Haynes vd. (1996) ise penciclovirin, *in vivo* genotoksik etkilerini fare kemik iliği hücrelerinde araştırmış olup, penciclovirin 1078 $\mu\text{M}/\text{kg}/\text{gün}$ konsantrasyonda mikronükleuslu polikromatik eritrosit oluşumunu artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca etkileri araştırılan diğer pürin nükleozidleri içerisinde mikronükleuslu polikromatik eritrosit oluşumunu en az arttıranın da penciclovir olduğu bildirilmiştir.

Thust vd. (2000b) penciclovir ve ganciclovirin genotoksisitelerini ve apoptoz indükleyici özelliklerini *Herpes simplex* virus-1'in Tk genini eksprese eden Çin hamster yumurtalık hücrelerinde araştırmışlardır. Radyoaktif işaretleme tekniği kullanılarak yapılan çalışmada ganciclovirin, penciclovirden daha etkili bir şekilde DNA yapısına girdiği saptanmıştır. Penciclovirin equimolar ve equitoksik dozlarda KKD ve kromozom değişimlerini zayıf bir şekilde etkilediği bildirilmiştir. Penciclovirin *Herpes simplex* virus-1'in Tk genini eksprese eden Çin hamster yumurtalık hücreleri için apoptoz indükleyici özellik taşıdığı da saptanmıştır. Zayıf bir genotoksisiteye sahip olan ve apoptoz indükleyici özellik taşımasından dolayı penciclovirin gen tedavisi için alternatif bir ilaç olabileceği önerilmiştir.

Tomicic vd. (2002) penciclovir üzerine yaptıkları çalışmada ise 1 μM konsantrasyondaki penciclovirin doza ve zamana bağlı olarak apoptozu indüklediği buna karşın zayıf bir oranda nekroz oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir. Penciclovirin tek hücre jel elektroforez testinde DNA tek iplik kırıklarının ve DNA çift iplik kırıklarının oluşumunu indüklediği ve yapısal kromozom anormalliğini arttırdığı da rapor edilmiştir.

2.2.6. Zidovudin ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Zidovudin (3' – azido – 2' – 3' – dideoksitimidin) primidin nükleozidi olan deoksitimidin analogudur. HIV enfeksiyonunda reverse transkriptaz enzimi inhibitörü olarak kullanılan bir antiviral nükleozid analogudur.

Ayers (1988) zidovudinin bakteriyal mutajenite testlerinde herhangi bir mutajenik etkisinin olmadığını, ayrıca memeli hücrelerinde 1000-5000 µg/ml aralığındaki konsantrasyonlarda zayıf mutajenik etkisinin olduğunu saptamıştır. Ayrıca, 3 µg/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarda, kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kromozom anormalliklerine neden olduğunu da bildirmiştir. Bununla beraber 0,5 µg/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarda hücre transformasyonuna da neden olduğunu göstermiştir. Ancak, sıçanlarla yaptığı sitogenetik çalışmalarda 300 mg/kg konsantrasyonlardaki zidovudinin kemik iliğinde kromozomal değişimlere neden olmadığını bildirmiştir.

Phillips vd. (1991) HTLV-III/LAV virus enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan 7 nükleozid analogunun genotoksik ve sitotoksik etkilerini *in vivo* mikronükleus testi ile B6C3F1 dişi farelerinin kemik iliği hücrelerinde araştırmışlardır. Ağız yoluyla üç gün boyunca zidovudin verilen dişi B6C3F1 farelerinde mikronükleuslu polikromatik eritrositlerin oluşum frekansında belirgin bir artışın olduğu saptanmıştır.

Shafik vd. (1991) ise zidovudinin *in vivo* genotoksik etkiye sahip olup olmadığını belirlemek için Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS)'li ve zidovudin tedavisi alan ve almayan hastaların periferik lenfositlerinde meydana gelen kromozom anormalliklerini araştırmışlardır. Yedi ay boyunca 1200 mg/gün konsantrasyonda zidovudin kullanan AIDS'li hastalarla, zidovudin tedavisi almayan AIDS'li hastaların periferik lenfositlerinin 72 saat *in vitro* kültürleri sonunda her gruptan 100'er hücre incelenmiş, kromatid tipi kırıklar, kromozom tipi kırıklar ve

izokromozom oluşumları sayılmıştır. Çalışmanın sonucunda zidovudin tedavisi alan grupta kırık ortalaması $8,29 \pm 2,65$ iken, zidovudin tedavisi almayan grupta kırık ortalaması $0,5 \pm 0,29$ olarak bulunmuştur. Burada zidovudin kromozom kırıklarını arttırdığı belirlenmiştir.

Stern vd. (1994) zidovudin ile muamele edilmiş B ve T lenfositlerinde meydana gelen mikronükleus oluşumunu araştırmış ve zidovudin ile muamele edilen lenfositlerde muamele edilmeyen gruba göre belirgin bir mikronükleus oluşumunun meydana geldiğini göstermişlerdir.

Olivero vd. (1994) zidovudin dişi CD-1 farelerinin vajinal epitelyum hücrelerinde DNA hasarı oluşturup oluşturmadığını ve tümör oluşumu üzerine etkisinin olup olmadığını araştırmışlardır. Ayrıca, kemik iliği hücrelerinde sitotoksikite ile kromozom anormalliklerine de bakılmıştır. Dişi CD-1 farelerine 28 gün boyunca 180, 360, 720 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda zidovudin içme sularına ilave edilerek verilmiştir. Doza bağlı olarak zidovudin vajinal hücrelerin DNA'sına girdiği radyoimmüno deneyler ve immünohistokimyasal deneylerle belirlenmiştir. Ayrıca araştırmacılar zidovudin kemik iliğinde kromozomal anormallikleri kontrole oranla 4 kat arttırmış olduğu da saptamıştır. Sonuç olarak, zidovudin DNA hasarına yol açtığı, poliferasyonu etkilediği ve tümör oluşumunu indüklediği bu çalışma ile gösterilmiştir.

Benbrik vd. (1997) yaptığı kısa süreli bir çalışmada ise, insan kas biyopsilerinden hazırlanan kas hücresi kültürleri, didanosin (5-1000 $\mu\text{mol/l}$) ve zidovudin (4-5000 $\mu\text{mol/l}$) çeşitli konsantrasyonlarına 10 gün süreyle maruz bırakılmıştır. Sonuç olarak, zidovudin ve didanosin tüm insan kas hücreleri üzerine sitotoksik etki göstermiş ve mitokondride fonksiyonel değişikliklere neden oldukları bildirilmiştir. Çalışma sonucunda zidovudin ve didanosinin, HIV enfeksiyonlu hastalarda miyopatiye neden olabileceği rapor edilmiştir. Zidovudin kaynaklı miyopatinin, sadece saf zidovudin oluşturduğu mitokondriyal toksisitesine bağlı olduğu tespit edilmiştir.

Olivero ve çalışma ekibinin (1997) yaptığı bir başka çalışmada, gebe CD-1 farelerinin ve *Erythrocebus patas* maymunlarının yavrularında zidovudinin genotoksik tümör oluşumu üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. Gebe farelere günde 12,5 mg veya 25 mg zidovudin emzirme süresi sonuna kadar, gebe maymunlara da haftanın 5 günü 10 mg zidovudin emzirme süresince verilmiştir. Araştırmacılar zidovudinin fare ve maymun ceninlerinin ve yeni doğan yavrularının bir çok dokusunda nükleer ve mitokondrial DNA'ların telomer bölgelerine katıldığını, zidovudin ile muamele edilen farelerin yavrularında doza bağlı olarak akciğer, karaciğer ve dişi üreme organlarında tümör oluşumunun artmış olduğu, sonuç olarak zidovudinin maymun ve farelerin yavrularında genotoksik olduğu ve ayrıca fare yavruları için kanserojenik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir.

Meng vd. (2000a) insan lenfoblastoid hücre hatlarında zidovudinin DNA'ya katılımı, Tk geninde meydana gelen mutasyon frekansını ve Tk genindeki heterozigot kayıplarını araştırmışlardır. İnsan lenfoblastoid hücrelerini 300 µM konsantrasyonda zidovudin ile 0, 1, 3 ve 6 gün veya 3 gün boyunca 0, 33, 100, 300 ve 900 µM konsantrasyonlarda zidovudin ile muamele etmişlerdir. Zidovudinin lenfoblastoid hücre DNA'sına katılımı radyoimmüno testler ile Tk lokusunda meydana gelen mutasyon frekansı ise hücre koloni testi ile araştırılmıştır. Çalışma sonucunda zidovudinin DNA'ya katılımı ile Tk geninde meydana gelen mutasyon frekansı arasında pozitif bir korelasyon olduğu saptanmıştır. Southern blot analizi ile, Tk geninde meydana gelen heterozigot kayıplarının zidovudinin hücre DNA'sına katılımından sonra DNA zincir uzamasının sona ermesinden kaynaklandığı bildirilmiştir.

Meng vd. (2000b) bir diğer çalışmasında, Adenin fosforiboziltransferaz enzim (APRT=adenine phosphoribosyltransferase) geni yönünden heterozigot insan lenfoblastoid hücre hattı (AZH1) kullanılarak zidovudinin oluşturduğu mutasyon frekansı araştırılmıştır. AZH1 hücreleri 300 µM konsantrasyonda zidovudin ile 0, 1, 3 ve 6 gün veya 3 gün boyunca 0, 33, 100, 300 ve 900 µM konsantrasyonlarda zidovudin ile muamele edilmişlerdir. APRT lokusunda oluşan mutasyon frekansı hücre koloni testi ile araştırılmıştır. Çalışma sonucunda araştırmacılar, zidovudinin DNA'ya katılımı ile

APRT geninde oluşan mutasyon frekansında pozitif bir korelasyon olduğunu ve zidovudinin genotoksik olduğunu göstermişlerdir.

Olivero vd. (2002) HIV enfeksiyonunda reverse transkriptaz enzimi inhibitörü olarak kombine kullanılan zidovudin ve lamivudinin genotoksik etkisini *Erythrocebus patas* maymunlarında araştırmışlardır. Üç gebe maymuna 40 mg/kg/gün konsantrasyonda zidovudin emzirme süresinin sonuna kadar, üç gebe maymuna da 40 mg zidovudin + 24 mg lamivudin /kg/gün emzirme süresinin sonuna kadar verilmiştir. Onların kontrolü olan iki maymuna ise herhangi bir ilaç verilmemiştir. Bu araştırmada yeni doğan maymunlar ve ceninlerin bir çok dokusunda zidovudin ve lamivudinin DNA'nın yapısına katıldığı radyoimmüno testler ile araştırılmıştır. Sonuç olarak uterus içinde zidovudin ve lamivudine maruz kalan maymunların birçok dokusunun DNA'larında zidovudin ve lamivudinin DNA yapısına katıldığı, buna karşın kombine olarak zidovudin ve lamivudinin, tek başına zidovudin monoterapisinden daha fazla DNA'nın yapısına girdiği belirlenmiştir. Bu çalışmada söz konusu nükleozid analoglarının DNA'nın yapısına girmelerinin sonucunda telomer hasarına neden olduğu saptanmıştır.

Dobrovolsky vd. (2005) sitozolik Tk enziminin, zidovudinle muamele edilen yeni doğan farelerin nüklear DNA hasarı üzerine etkisini araştırmışlardır. Bunun için Tk geni yönünden homozigot Tk^{+/+}, heterozigot Tk^{+/-} ve homozigot Tk^{-/-} olan yeni doğan farelere doğum sonrası 1-8. günler arasında intraperitoneal olarak 200 mg/kg/gün konsantrasyonda zidovudin verilmiş ve son dozdan 24 saat sonra periferik kanlarda mikronükleus oluşum frekansı araştırılmıştır. Zidovudin ile muamele edilen Tk^{+/+} ve Tk^{+/-} farelerinin retikülositlerinde ve normokromatik eritrositlerinde mikronükleus oluşumunun belirgin olarak arttığı gösterilmiştir. Zidovudin ile muamele edilen Tk^{-/-} farelerinde ise retikülositlerde ve normokromatik eritrositlerde mikronükleus oluşumunda belirgin bir artışın meydana gelmediği bildirilmiştir. Çalışma sonucunda zidovudinin yeni doğan farelerde ancak Tk enziminin varlığında genotoksik bir aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir.

Lund vd. (2007) yaptığı çalışmada ise zidovudinin (10 ve 50 mM; 2,7 ve 13,4 mg/ml) farklı konsantrasyonlarını HepG2 ve H9c2 hücre hatlarında uygulamışlardır. Araştırmacılar, zidovudinin bu hücreler üzerinde yüksek toksisitesinin olduğunu, hücre ölümlerini arttırdığını ve bunun yanı sıra mtDNA oranında düşüşe neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Kiyomoto vd. (2008) yaptıkları çalışmada, AIDS hastalarında zidovudinin uzun süreli kullanımının DNA azalması ile ilişkili toksik miyopati dahil çeşitli dokularda mitokondriyal anormalliklere neden olabildiğini rapor etmişlerdir. Çalışmada, mitokondriyal süksinat dehidrogenaz (SDH) ve sıçan iskelet kası kültüründe mtDNA içeriğine zidovudinin kısa süreli (48 saat) etkisi (10, 30 ve 100 mg/ml) incelenmiştir. Ayrıca zidovudinin sitokrom c oksidaz enzimine olan etkisi de araştırılmıştır. SDH'ın histokimyasal kantitatif analizi ile zidovudinin 10, 30 ve 100 mg/ml konsantrasyonlarda mitokondriyal içeriği sırasıyla %7, %9 ve %13 oranlarda artırdığı gösterilmiştir. Kontrol değerleri ile karşılaştırıldığında, 10-100 mg/ml zidovudinin sıçan kültürlerinde, %66 ile %23 oranında mtDNA içeriğini azalttığı saptanmıştır. Spontan kasılma ve sitokrom c oksidaz enzimi aktivitesinin 100 mg/ml konsantrasyondaki zidovudin tarafından değişmediği rapor edilmiştir. Bu sonuçlar ele alındığında, zidovudin ile kısa süreli tedavinin sıçan iskelet kası kültürlerinde mtDNA düşüşüne neden olduğu ve şiddetli miyotoksisite meydana getirdiği gösterilmiş ve mitokondriyal toksisite oluşturduğu rapor edilmiştir.

Yapılmış olan bu çalışmalar doğrultusunda biz de çalışmamızda, kısa sürede yaşantımıza girmiş olan ve güvenli olduğu kanısıyla HBV tedavisinde kullanılan entekavirin genotoksik etkisinin olup olmadığını belirlemeyi amaçladık.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Yaptığımız çalışmada sağlıklı ve sigara içmeyen iki bayan ve iki erkekten (26-28 yaşlarında) alınan periferik kan ve test maddesi olarak entekavir kullanıldı.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda kullanılan kimyasallar (entekavir, MMC, kromozom medyumu, kolşisin, hipotonik çözelti, soresan tamponu, fiksatifler, giemsa boyası, entellan, nitrik asit, stokalasin b) ile ilgili bilgilere aşağıda yer verilmiştir.

3.1.1. Entekavir ve Özellikleri

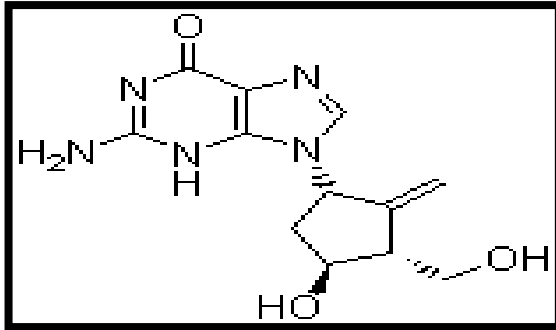
Ticari Adı: Baraclude

Ruhsat Sahibi: Bristol-Myers squibb İlaçları Inc.

Kimyasal Adı: Entekavir: 2-Amino-1,9-dihidro-9-[(1S,3R,4S)-4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)-2-methylenecyclopentyl]-6H-purin-6-one

Kapalı formülü: C₁₂H₁₅N₅O₃

Açık Formülü:



Molekül Ağırlığı: 277,2792 g/mol

3.1.1.1. Entekavir'in Hazırlanması

Baracludenin 1 tabletinde 1 mg entekavir etken maddesi bulunmaktadır. Çalışmamızda 1 tablet 2 ml steril suda çözdürülerek stok çözelti elde edildi. Elde edilen stok çözülden 3 ve 7 no'lu tüplere 9 µl, 4 ve 8 no'lu tüplere 18 µl, 5 ve 9 no'lu tüplere 36 µl eklenerek konsantrasyon hesaplamaları yapıldı (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Kültür tüplerine ilave edilen entekavir miktarları, konsantrasyonları ve süreleri

Kültür Tüpü	İlave Edilen Kimyasal	Süre [Saat(h)]	Hacim (µl)	Konsantrasyon (µg/ml)
1. Tüp	---	---	---	---
2. Tüp	MMC	24h	0,25 µg/ml	0,25 µg/ml
3. Tüp	ETV	24h	9 µl	1,66 µg/ml
4. Tüp	ETV	24h	18 µl	3,33 µg/ml
5. Tüp	ETV	24h	36 µl	6,66 µg/ml
6. Tüp	MMC	48h	0,25 µg/ml	0,25 µg/ml
7. Tüp	ETV	48h	9 µl	1,66 µg/ml
8. Tüp	ETV	48h	18 µl	3,33 µg/ml
9. Tüp	ETV	48h	36 µl	6,66 µg/ml

(MMC: Mitomycin C; ETV: Entekavir)

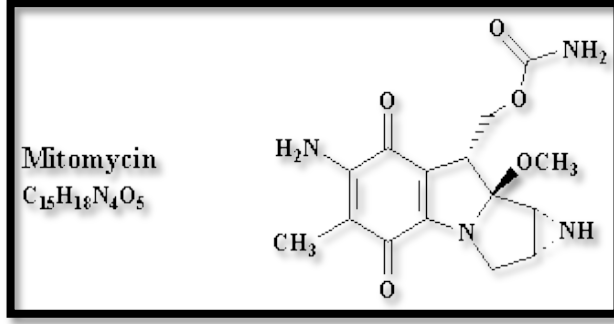
3.1.2. Mitomycin C (MMC)

Mitomycin C (Kyowa) çalışmamızda pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Kimyasal adı: Mitomycin C

Kapalı formülü: C₁₅H₁₈N₄O₅

Açık formülü:



Molekül ağırlığı: 334,327 g/mol

Erime noktası: 360 °C

3.1.3. Kromozom Medyumu

Kromozom medyumu olarak PbMax (Gibco) (Cat. no. 12552-013) kullanıldı. PbMax içerisinde hücrelerin kültür ortamında çoğalması için gerekli olan fetal bovin serum, L-glutamin, gentamicin sülfat ve fitohemmaglutinin bulunmaktadır.

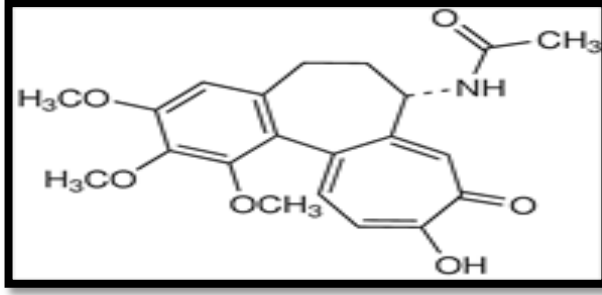
3.1.4. Kolşisin

Kolşisin (Colchicine) (Sigma, cat. no. C9754), preparatların hazırlanmasında mitozu ket vurucu madde olarak kullanıldı. Kromozom medyumunun bulunduğu her bir tüpe 20 µg/ml ilave edildi.

Kimyasal adı: Colchicine

Kapalı formülü: $C_{22}H_{25}NO_6$

Açık formülü:



Molekül ağırlığı: 399,4 g/mol

3.1.5. Hipotonik Çözelti

Hipotonik çözelti olarak %0,4'lük KCl (Merck) kullanıldı. 1 L saf suya 4 g KCl ilave edilerek hazırlanan çözelti, ağzı kapalı cam bir şişede +4 °C'de saklandı. Hasattan 2 saat önce kullanılacak kadar alınıp 37 °C'deki etüvde ısıtılarak kullanıldı.

3.1.6. Sorensen Tamponu

Sorensen tamponu, iki farklı tamponun (tampon A ve B) eşit miktarda birleştirilmesiyle elde edildi.

Tampon A: 11,34 g KH_2PO_4 + 250 ml su (pH: 4,8)

Tampon B: 14,83 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ + 250 ml su (pH: 9,2)

3.1.7. Fiksatifler

Deneylerde üç farklı fiksatif kullanıldı: KA için fiksatif 1 (1 hacim glasiyel asetik asit: 3 hacim metanol), MN için fiksatif 2 (1 hacim glasiyel asetik asit: 5 hacim metanol) ve fiksatif 3 (1 hacim fiksatif 2: 1 hacim % 0.9 NaCl).

3.1.8. Giemsa

Giemsa (Merck) boyası deneylerimizde Sorensen tamponu içinde hazırlandı. % 5'lik boya eriyiği kromozomlar ve MN testinde nükleusları boyamak için kullanıldı.

3.1.9. Entellan

Entellan (Merck), incelemeye hazır hale getirilmiş olan preparatların daimi hale getirilmesinde lam-lamel arası yapıştırıcı madde olarak kullanıldı.

3.1.10. Nitrik Asit (HNO₃)

Lamları temizlemek için 1N HNO₃ (Merck) çözeltisi hazırlandı. Bir şişede muhafaza edilerek tekrar tekrar kullanıldı.

1 N HNO₃ çözeltisi için 35,5 g HNO₃ tartılıp 1 L suda çözdürüldü.

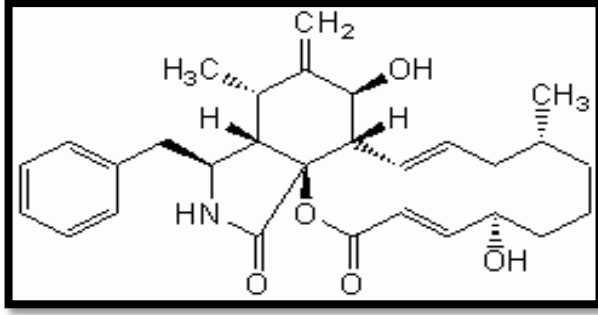
3.1.11. Sitokalsin (Cytochalasin B)

Sitokalsin (Sigma, cat. no. C6762) MN testinde, hücre bölünmesi esnasında sitokinezi engellemek ve iki nükleuslu hücreler oluşturmak amacıyla kullanıldı. Her bir tüpe 44. saatte 30 µg/ml ilave edildi.

Kimyasal adı: Cytochalasin B

Kapalı formülü: C₂₉H₃₇NO₅

Açık formülü:



Molekül ağırlığı: 479,61 g/mol

Erime noktası: 218-223 °C

Kaynama noktası: 218-223 °C

Safılık düzeyi: %98

3.2. Kullanılan Deney Ekipmanları

Çalışmamızda kullandığımız deney ekipmanlarının özellikleri ve markaları aşağıda belirtilmiştir.

3.2.1. Hassas Terazî

Kimyasalların tartılmasında hava akımlarına karşı özel cam paravanlarla korunan ve 0,0001 g hassasiyetinde ölçüm yapan “AND A8D Company Lim. Fx-300i” marka terazi kullanıldı.

3.2.2. Laminar Flow Kabin

Hücre kültürü hazırlanırken kromozom medyumunun, heparinize edilmiş kanın ve bazı kimyasalların tüplere ilavesi esnasında gerekli steril ortamın sağlanmasında “NUVE” marka laminar flow kabin kullanıldı.

3.2.3. Santrifüj

Kültür tüplerinin santrifüjü için “NUVE” marka dikey ve 16 tüp alabilen santrifüj kullanıldı.

3.2.4. Mikroskoplar

Preparatları incelemek amacıyla koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan “NIKON ECLIPTICE E 200” marka ışık mikroskobu, fotoğraf çekimleri için Leica marka fotoğraf ataçmanı olan Leica DM750 marka mikroskop kullanıldı.

3.2.5. İnkübatör

Hücre kültürünün ve bazı eriyiklerin hazırlanmasında “NUVE marka” 0–100 °C arası ayarlanabilir inkübatör kullanıldı.

3.3. Lamların Temizlenmesi

Kültür süresinin bitiminden iki gün önce rodajlı lamlar dik bir şaleye dizilip, şalenin içi lamların üzeri tamamen kapanacak şekilde 1 N HNO₃ çözeltisi ile dolduruldu. Şalenin ağzı kapatılarak 24 saat bekletildi. Sürenin sonunda lamlar, 30 dk boyunca akan su altında iyice yıkandı. Üç defa saf sudan geçirildikten sonra şale saf su ile doldurularak buzdolabında saklandı.

3.4. Kromozom Anormalliklerini (KA) Belirlemede Kullanılan Hücre Kültür Yöntemi ve Preparasyon

Sağlıklı ve sigara içmeyen 26-28 yaş aralığında iki bayan ve iki erkekten alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş periferik kan örneklerinden 6 damla (0,2 ml) her bir tüpe 2,5 ml olacak şekilde pay edilen kromozom medyumuna steril şartlarda eklendi (Topaktaş ve Rencüzoğulları 1995). Tüpler hafifçe, dikey olarak (tüpteki içerik kapaklara bulaşmayacak şekilde) avuç içine vurulup döndürülerek iyice karıştırıldı. Entekavirin genotoksik etkisini incelemek amacıyla kültür ekiminden 24 ve 48 saat sonra 1,66, 3,33 ve 6,66 µg/ml entekavir kültür tüplerine ilave edildi. Ayrıca deney için kontrol ve pozitif kontrol tüpleri de hazırlandı. Kontrol tüpüne hiç birşey ilave edilmezken, pozitif kontrol olarak MMC kullanıldı (Çizelge 3.1).

Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (kültürün 70. saatinde) her tüpe kolşisin eriyiğinden 20 µg/ml ilave edildi ve tüpler hafifçe sallanarak karıştırıldıktan sonra tekrar inkübatörde hasat süresine değin (72. saat) bekletildi.

Kültür süresinin sonunda (72. saatin bitiminde) kültür tüpleri önce 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı. Dipte kalan hücreleri içeren 0,5-0,7 ml'lik sıvı kısım ise iyice karıştırıldıktan sonra üzerine 5 ml 37 °C'ye ısıtılan hipotonik çözeltiden ilave edildi. Bu çözeltinin deney tüplerine ilavesi damla damla ve bir yandan tüpler çalkalanarak yapıldı. Hücre süspansiyonu pipetaj yapılarak homojen hale getirildi. Daha sonra ağzı kapatılan tüpler 37 °C'deki inkübatöre konuldu. Hücreler 37 °C'de 15 dk boyunca hipotonik çözelti ile muamele edildi. Sürenin sonunda hücre süspansiyonu 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant kısım atılarak hücre pelleti tüpün dip kısmına hafifçe vurarak kalan sıvı kısım içerisinde homojenize edildi. Daha sonra deney tüplerine fiksatif (Fiksatif 1) ilave edildi. Bu işlem 3 defa tekrarlandı. Üçüncü kez fiksatifle muamelenin sonunda tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görüldü. Son santrifüjden sonra dipte 0,5-0,7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant kısım atıldı ve preparat yapma işlemine geçildi.

Tüplerin diplerinde kalan hücreler pastör pipeti kullanılarak karıştırılıp homojen hale getirildi. Pastör pipetine 4-5 damla olacak şekilde hücre süspansiyonu çekildikten sonra pipet hücrelerin lam üzerine damlatılması için özel olarak hazırlanmış düzeneğe tutturuldu. Saf su içerisinde buzdolabında saklanan lamların üzerine 50 cm yükseklikten farklı alanlara birer damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lamların üzerine yayılması sağlandı. Hücre süspansiyonunun lamlara damlatılması esnasında kaliteli preparat eldesi için damlaların üstüste düşmemesine dikkat edildi. Damlatma işlemi sonrasında rodajlı lamlar üzerine hangi kültür tüpüne ait olduğu kaydedildi.

Bu işlemlerin sonunda hazırlanmış olduğumuz preparatlar kuruması için oda sıcaklığında 24 saat bekletildi. Boyama işlemi için %5'lik Giemsa boyası (5 ml soresen tampon A, 5 ml soresen tampon B ve 5 ml Giemsa, 85 ml saf su) hazırlandı ve bir şale içerisine filtre kağıdı yardımıyla süzüldü. Oda sıcaklığında 24 saat kurutulmaya bırakılmış preparatlar şale içerisinde hazırlanan Giemsa boyasına doğrudan konuldu ve 15-20 dk boya içerisinde bekletildi. Sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkartıldı ve akan sudan geçirildikten sonra 3 ayrı kaptaki saf sudan teker teker geçirilerek fazla boyadan arındırıldı. Bu işlemden sonra preparatlar tekrar oda sıcaklığında kuruması için üstlerine yapışmayacak şekilde bir örtü ile kapatılarak (toz zerreciklerinden ve kirlilikten muhafaza etmek amacıyla) 24 saat bekletildi. Kuruma işleminden sonra lamların üzerine entellan damlatıldı ve üzerine lamel kapatarak preparatlar daimi hale getirildi.

3.5. Kromozom Anormalliklerinin (KA) Saptanması İçin Hazırlanan Preparatlarda Mikroskopik İncelemenin Yapılması, Yapısal ve Sayısal Kromozomal Anormalliklerin (KA) Belirlenmesi ve Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

Hazırlanan preparatlar NIKON ECLIPTICE E200 marka mikrokopta immersiyon objektifi ile (10X100=1000 kez büyütülerek) incelenerek kromozom anormallikleri açısından tarandı.

Her birey için hazırlanan preparatlardan iyi dağılmış kaliteli 100 metafaz plağı kromozom anormalliklerini (KA) saptamak amacıyla incelendi. Gözlenen yapısal ve sayısal kromozom anormallikleri kaydedildi. İncelenen metafaz plaklarında belirlenen anormallikleri taşıyan hücrelerin yüzdesi (%) ile toplam KA sayısı hesaplandı. Ayrıca, her bir preparat için 1000 hücrede metafaz geçiren hücreler sayılarak mitotik indeks belirlendi.

Çalışmamızda “gap” lar anormallik olarak değerlendirilmedi. Gap’lar ile kromatid ve kromozom tipi kırıklar arasındaki farklar, Preston vd. (1987) çalışmaları ile Kauderer ve vd. (1991) çalışmalarına uygun olarak şu şekilde tanımlandı:

Gap’larda, kromatidin birinde (kromatid tipi gap) veya kromatidin her ikisinde (kromozom tipi gap) görülen boyanmamış bölge bir kromatidin genişliğinden daha azdır. Kromozomal kırıklarda, bir kromatiddeki (kromatid tipi kırık) veya her iki kromatiddeki (kromozom tipi kırık) boyanmamış bölge bir kromatidin genişliğinden daha fazladır. Baz alınan bu ölçülere göre gap ve kromatid kırıkları birbirinden ayırt edildi ve preparatlar kromozom anormalliği bakımından tarandı.

3.6. Mikronükleus (MN) Oluşumlarının Belirlenmesinde Kullanılan Hücre Kültür Yöntemi ve Preparasyon

In vitro MN testinde, sağlıklı ve sigara içmeyen 26-28 yaş aralığında iki bayan ve iki erkekten alınan 1/10 oranında heparinize periferik kan örneklerinden 6 damla (0,2 ml) steril şartlarda her bir tüpe 2,5 ml olacak şekilde pay edilen kromozom medyumuna eklendi (Topaktaş ve Rencüzoğulları 1995). Entekavirin mikronükleus oluşumu üzerine olan etkisini saptamak için 1,66, 3,33 ve 6,66 µg/ml konsantrasyonlardaki entekavir kültür tüplerine kültür bitiminden 24 ve 48 saat öncesinde ilave edildi (Çizelge 3.1). İnkübasyonun başlangıcından 44 saat sonra her bir tüpe konsantrasyonu 30 µg/ml olacak şekilde sitokalsin-B maddesi eklendi. İnkübasyonun sonunda (68. saat) hasat işlemi yapıldı. Kültür tüpleri önce 2000 rpm’de 5 dk sanrifüj edilerek süpernatant kısım atıldı ve hücreler hipotonik çözelti ile (%0,4 KCl) 37 °C’de 10 dk muamele edildi. Hipotonik çözelti, KA deneylerinde olduğu gibi yavaş yavaş ve pipetaj yapılarak ve bir taraftan deney tüpleri çalkalanarak yapıldı.

Hipotonik çözelti ile muamelenin ardından kültür tüpleri 1200 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısım atılarak dipteki pellet fiksatif 3 ile muamele edildi (5 hacim metanol:1 hacim glasiyel asetik asit karışımından 1 hacim alınıp 1 hacim %0,9’luk NaCl ilave edilerek hazırlandı). Birinci fiksatif ile oda sıcaklığında 20 dk muameleden sonra 1200 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatantı attıktan sonra tüpler iki kez fiksatif 2 (5 hacim metanol/1 hacim glasiyel asetik asit) ile muamele edildi. Yirmi (20) dk oda sıcaklığında fiksatif 2 ile bekletilen tüpler santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı ve kültür tüplerinin tabanında toplanmış olan hücreler resüspanse edilerek soğuk ve temiz lamlar üzerine 10 cm yükseklikten, farklı alanlara damlatılarak yayıldı. Tüplerin karışmaması açısından her yaymanın ardından lamlar üzerine birey ve tüp numaraları yazıldı. Daha sonra oda sıcaklığında 24 saat boyunca kurumaya bırakıldı.

Hazırlanan preparatlar 24 saatlik süreden sonra sorensen tamponunda hazırlanan %5'lik Giemsa boyası ile 15 dk boyandı. Üç ayrı kapta hazırlanmış olan saf sudan geçirilerek fazla boyadan arındırıldı ve tekrar kurumaya bırakıldı. Kuruma işleminden sonra lam üzerine entellan damlatıldı ve üzerine lamel kapatılarak preparatlar daimi hale getirildi.

3.7. Mikronükleus (MN) Preparatlarında Mikroskopik İncelemenin Yapılması ve Mikronükleus Sayısının Saptanması

Hazırlanan daimi preparatlar NIKON ECLIPTICE E200 marka ışık mikroskopunda 10 X 40 = 400 büyütmede incelendi.

Mikronükleus sayısını saptamak amacıyla her bir bireye ait hazırlanmış olduğumuz daimi preparatlardan her muamele grubu ve kontrollerinde iki nükleusa sahip toplam 2000 hücre incelenerek mikronükleuslu hücreler ve mikronükleus taşıyan hücrelerdeki mikronükleus sayısı kaydedildi. 2000 hücre içinde mikronükleuslu hücre sayısı yüzde cinsinden hesaplandı.

3.8. NBI (Nüklear Bölünme İndeksi) Yüzdesinin Hesaplanması

NBI (Nüklear Bölünme İndeksi) yüzdesinin hesaplanması için MN için hazırlanan preparatlardan 1000 tane hücre sayılarak her bir preparattaki mononüklear, binüklear, trinüklear ve tetranüklear hücre sayısı belirlendi. NBI hesaplanarak entekavirin hücre bölünme aktivitesi üzerine olan etkisi saptandı. Hesaplamalar aşağıda belirtilen formüle göre yapıldı:

➤ **Nüklear bölünme indeksinin hesaplanması (NBI):**
$$\frac{1N+2X2N+3X3N+4X4N}{1000}$$

3.9. Mikroskopta Fotoğraf Çekme

Leica DM750 marka kameralı mikroskopta hazırlamış olduğumuz ve incelemeler sırasında saptadığımız KA'leri, MN'ler, mononükleer, binükleer, trinükleer ve tetranükleer hücreler fotoğraflandı.

3.10. İstatistiksel Analiz

Mikroskobik inceleme sonrasında entekavirin 1,66, 3,33 ve 6,66 µg/ml dozları ile muamele edilen gruplarda saptanan KA, MN, MI ve NBI, t-test metoduna göre kontrol ve pozitif kontrol ile karşılaştırıldı. Doz-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla regresyon ve korelasyon analizleri yapıldı, regresyon denklemi ile korelasyon katsayısı bulundu ve regresyon doğrusu çizildi. Ayrıca, elde edilen sonuçlar çizelge ve grafikler şeklinde verildi. Bu amaçla SPSS 16 (Statistical Packages for the Social Sciences) paket programı kullanıldı.

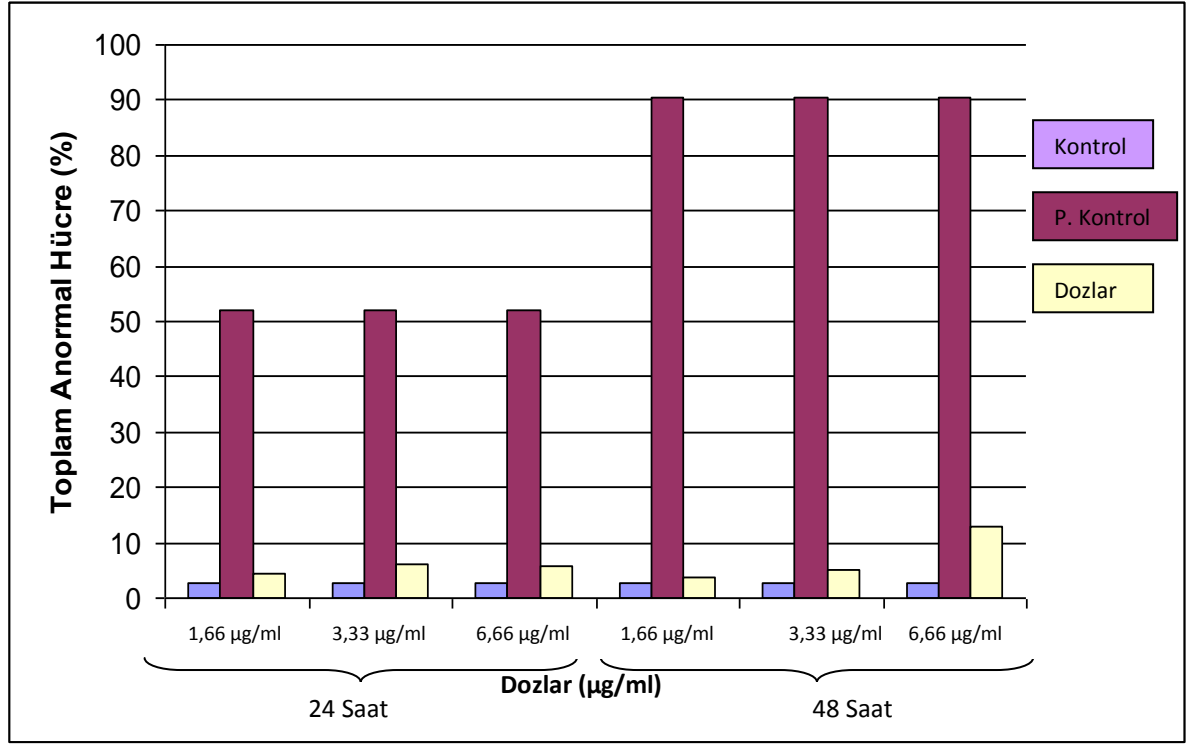
4. BULGULAR

4.1. Entekavir'in İnsan Periferik Lenfositlerinde Kromozom Anormallikleri (KA) Oluşumuna Etkisi

Çalışmamızda insan lenfositlerinde 1,66, 3,33 ve 6,66 µg/ml konsantrasyonlarındaki entekavirin 24 saatlik muamelesinin meydana getirdiği ortalama yapısal KA'lerinin kontrole göre artmadığı ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamsız olduğu belirlendi ($p>0,05$). Ayrıca her üç konsantrasyondaki (1,66, 3,33 ve 6,66 µg/ml) entekavirin oluşturduğu sayısal KA ortalamasının kontrolden farklı olmadığı da belirlendi ($p>0,05$) (Çizelge 4.1). Entekavir ile muamele edilmiş her üç dozun (1,66, 3,33 ve 6,66 µg/ml) insan lenfosit hücrelerinde yapısal KA'lerini pozitif kontrol kadar uyarmadığı ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (1,66 ve 3,33 µg/ml entekavir dozları için $p\leq 0,001$; 6,66 µg/ml için $p\leq 0,01$) (Çizelge 4.1). Toplam anormal hücre oranındaki artış da saptanan yapısal KA ortalamasına benzer bir durum gösterdi. Kontrol ile her üç doz (1,66, 3,33 ve 6,66 µg/ml) arasında fark saptanmazken ($p>0,05$), pozitif kontrol ile anlamlı düzeyde bir fark saptandı (1,66 ve 3,33 µg/ml dozları için $p\leq 0,001$; 6,66 µg/ml dozu için $p\leq 0,01$) (Çizelge 4.1, Şekil 4.1).

Entekavirin 48 saat muamele edildiği insan lenfosit hücrelerinde oluşturduğu ortalama yapısal KA'leri, entekavirin 24 saat uygulandığı kültürlerdekine benzer bir durum gösterdi. Ancak en yüksek dozun (6,66 µg/ml) oluşturduğu ortalama yapısal KA'lerin kontrole kıyasla arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p\leq 0,05$) (Çizelge 4.1). Kırk sekiz saat uygulanan her üç dozun (1,66, 3,33 ve 6,66 µg/ml) ortalama yapısal KA'lerini pozitif kontrol kadar uyarmadığı ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p\leq 0,001$) (Çizelge 4.1). Ortalama sayısal KA'leri açısından entekavir dozlarının kontrol ve pozitif kontrolden farklı olmadığı da gözlemlendi ($p>0,05$) (Çizelge 4.1). Toplam anormal hücre oranına

bakıldığında ise en yüksek dozdaki (6,66 µg/ml) entekavirin kontrole kıyasla anormal hücre oranını arttırdığı ve farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p \leq 0,05$) (Çizelge 4.1, Şekil 4.1).



Şekil 4.1. İnsan periferel lenfositlerinde 24 ve 48 saat 1,66, 3,33 ve 6,66 µg/ml konsantrasyonlarda entekavirin oluşturduğu toplam anormal hücre yüzdesi

Çizelge 4.1. Farklı dozlarda entekavir ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferal lenfositlerinde gözlenen yapısal ve sayısal kromozom anormallikleri ile toplam anormal hücre yüzdeleri

Test Maddesi	Muamele Süresi (saat)	Kons (µg/ml)	Yapısal KA		Sayısal KA	Yapısal KA ±SH (%)	Sayısal KA ±SH (%)	Toplam Anormal Hücre ±SH (%)	MI ±SH (%)
			Kromatid tipi	Kromozom tipi					
Kontrol	---	---	9	---	---	2,25±1,89	---	2,71±0,79	10,08±0,08
P. Kontrol (MMC)	24	0,25	419	36	---	113,75±5,56a ₃	---	52,15±0,50a ₃	2,93±0,90a ₁
ETV	24	1,66	8	3	---	2,75±1,26b ₃	---	4,55±0,86b ₃	6,43±0,77
ETV	24	3,33	11	2	---	3,25±1,26b ₃	---	6,26±0,44b ₃	5,03±0,64
ETV	24	6,66	12	---	3	3±1,41b ₂	0,75±0,96	5,79±0,95b ₂	4,38±0,86
P. Kontrol (MMC)	48	0,25	612	27	---	159,75±6,85a ₃	---	90,32±1,76b ₃	1,03±0,76a ₁
ETV	48	1,66	14	1	---	3,75±1,75b ₃	---	3,75±0,75b ₃	8,73±0,51b ₃
ETV	48	3,33	17	3	---	5±1,24b ₃	---	5,14±0,89b ₃	8,48±0,45b ₃
ETV	48	6,66	66	4	1	9,25±1,22a ₁ b ₃	0,25±0,5	12,88±0,86a ₁ b ₃	4,95±0,32b ₁

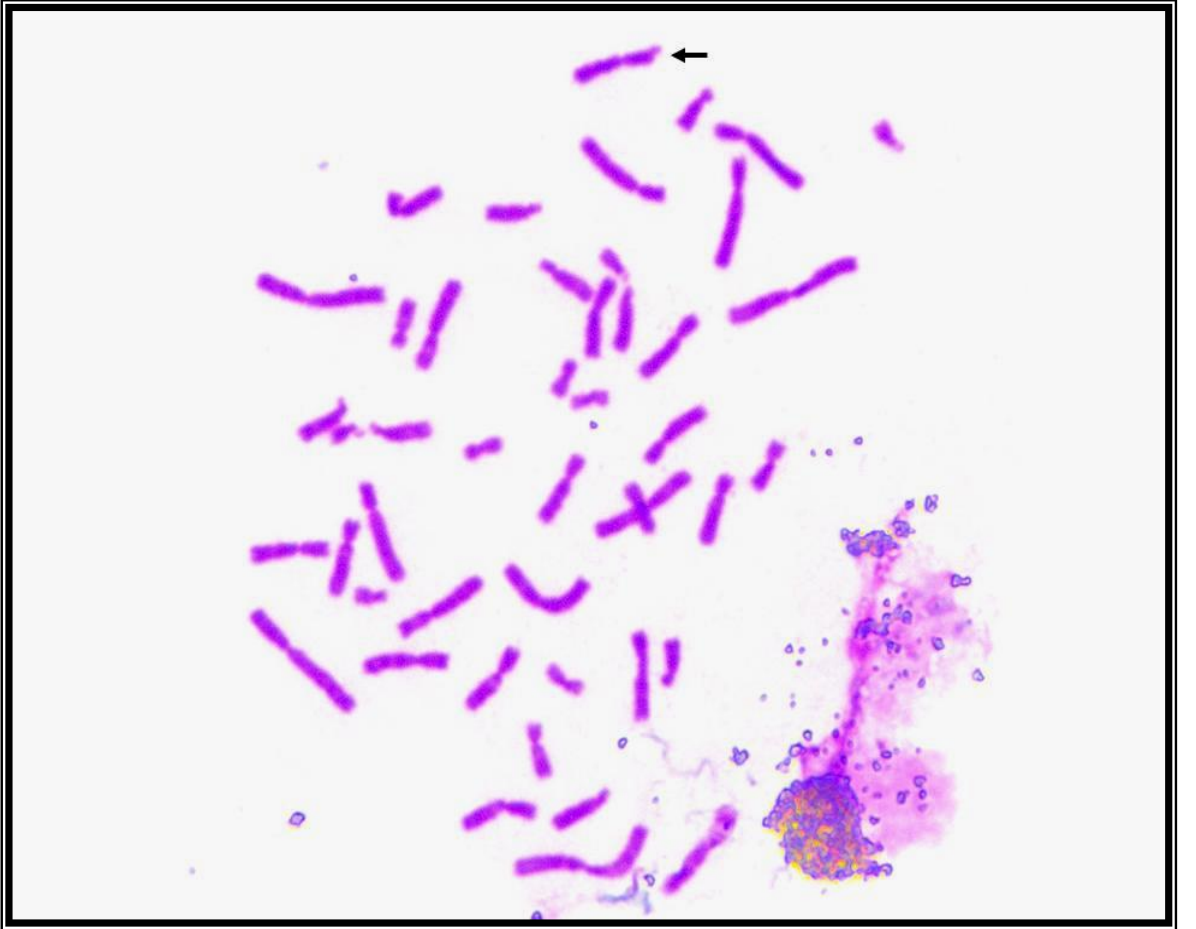
P. Kontrol= Pozitif Kontrol, ETV= Entekavir, MMC=Mitomycin C, Kons= Konsantrasyon, KA=Kromozom anormallikleri, SH= Standart hata, MI=Mitotik indeks

a: Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli

b: Pozitif kontrol ile karşılaştırmada fark önemli

1: P≤0,05 2: P≤0,01 3: P≤0,001

Entekavirin 24 ve 48 saatlik muamelelerinde saptanan anormallikler; kromatid kırıkları (Şekil 4.2, Şekil 4.3), kromozom kırıkları (Şekil 4.4), asentrik fragment (Şekil 4.5), delesyon (Şekil 4.6), disentrik kromozom (Şekil 4.7) ve poliploidi (Şekil 4.8) şeklindedir.



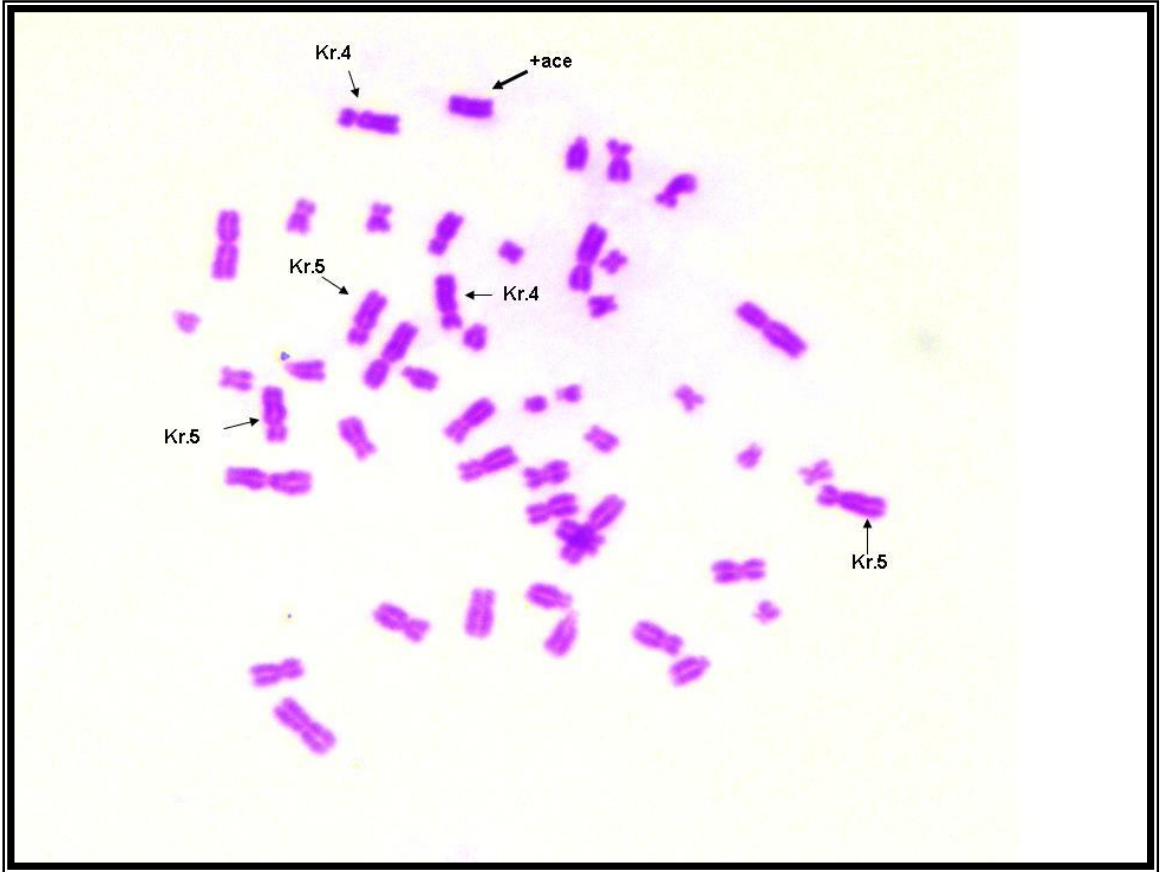
Şekil 4.2. Kromatid kırığı (6,66 µg/ml entekavir, 48 saat muamele, X1000, ♂)



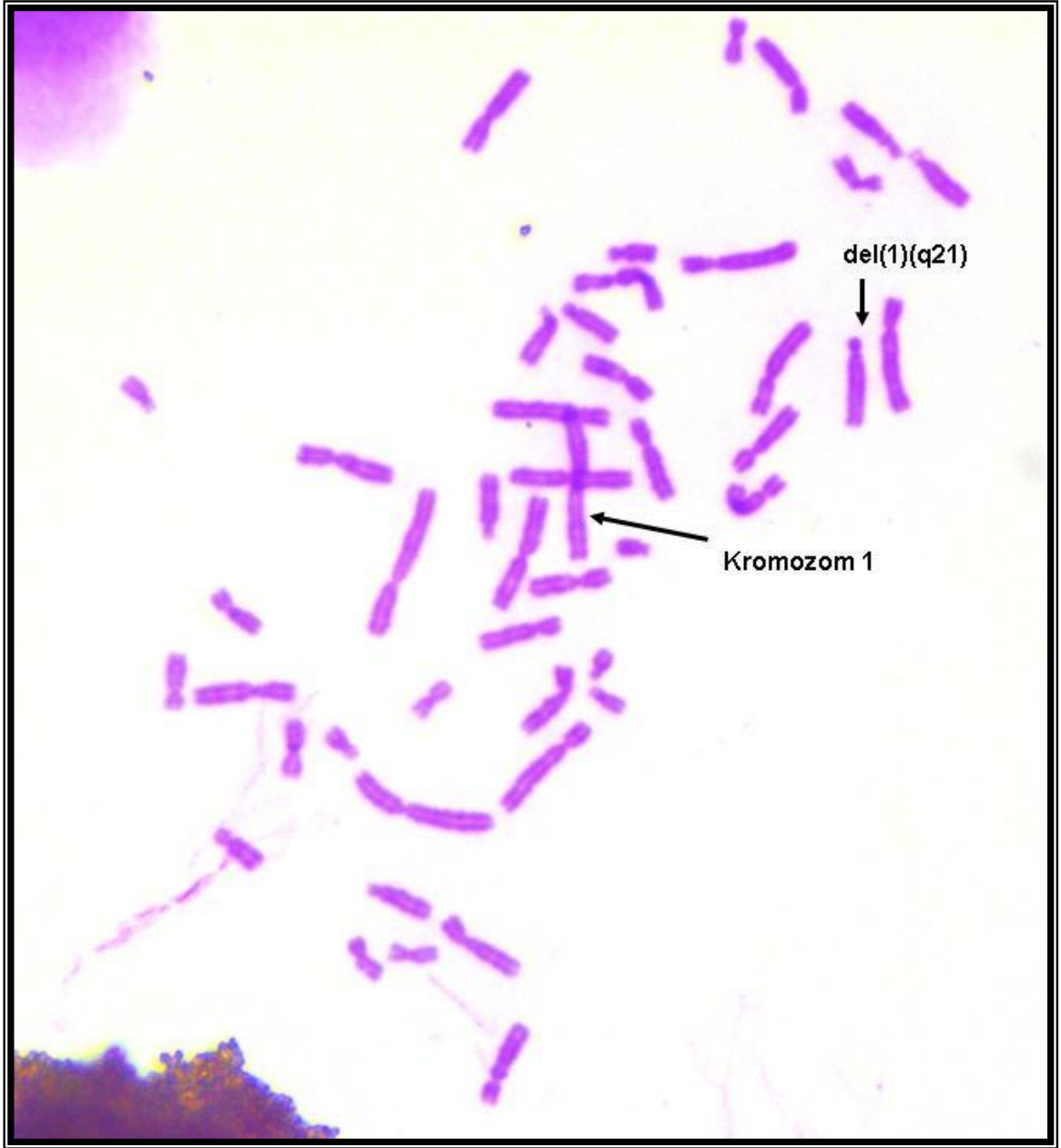
Şekil 4.3. Kromatid kırığı (6,66 µg/ml entekavir, 48 saat muamele, X1000, ♀)



Şekil 4.4. Kromozom kırığı (6,66 µg/ml entekavir, 48 saat muamele, X1000, ♀)



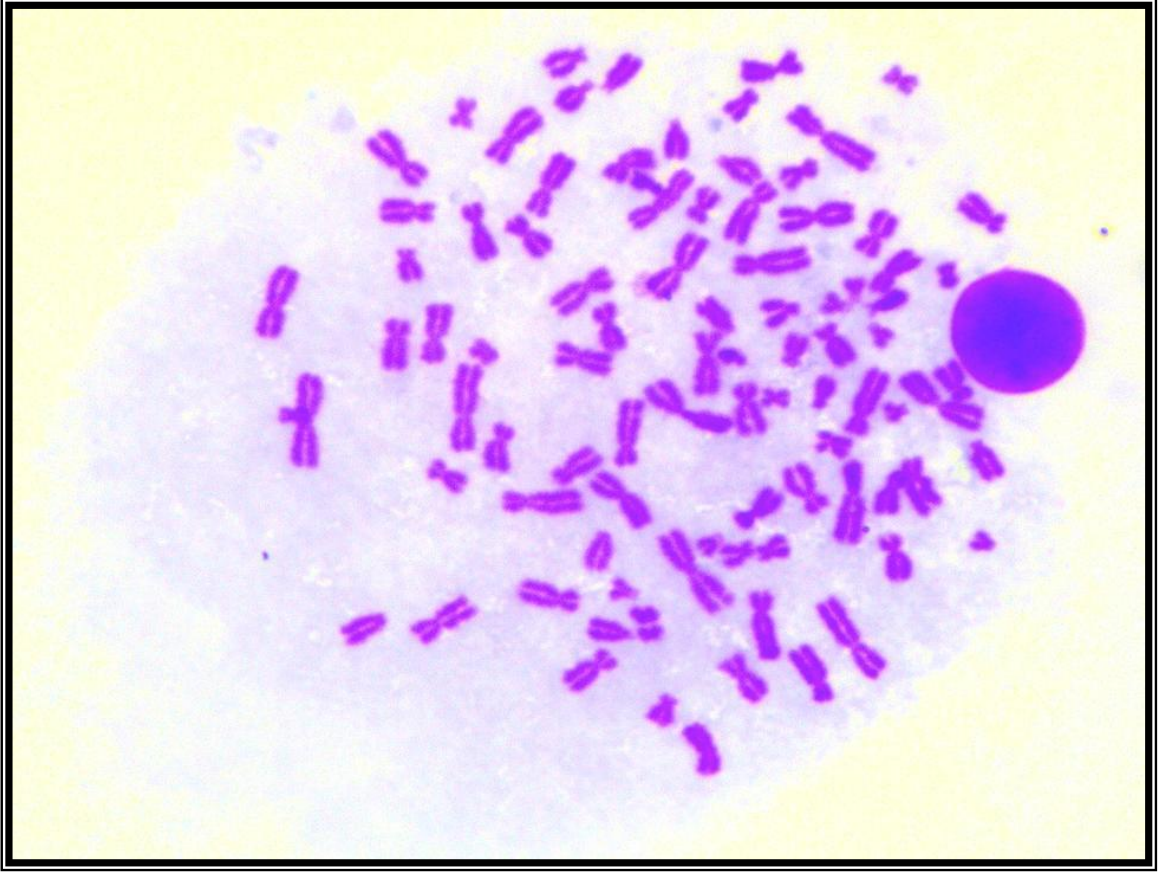
Şekil 4.5. 48,XY,+4,+ace kromozom kuruluşuna sahip bir metafaz (3,33 µg/ml, 24 saat muamele, X1000, ♂)



Şekil 4.6. Delesyon [del(1)(q21)] (6,66 µg/ml entekavir, 48 saat muamele, X1000, ♂)



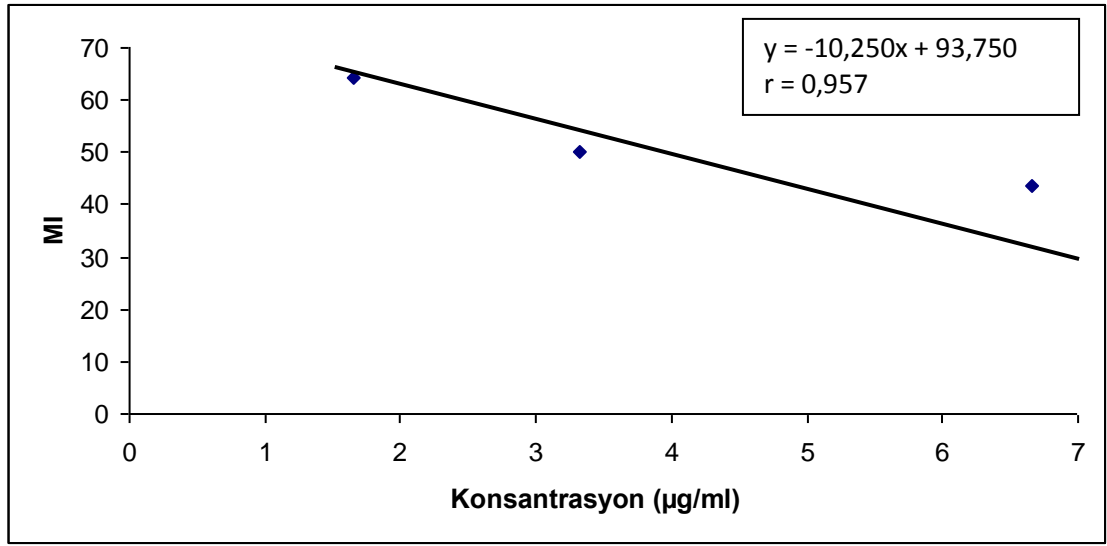
Şekil 4.7. Disentrik kromozom (3,33 µg/ml entekavir, 24 saat muamele, X1000, ♀)



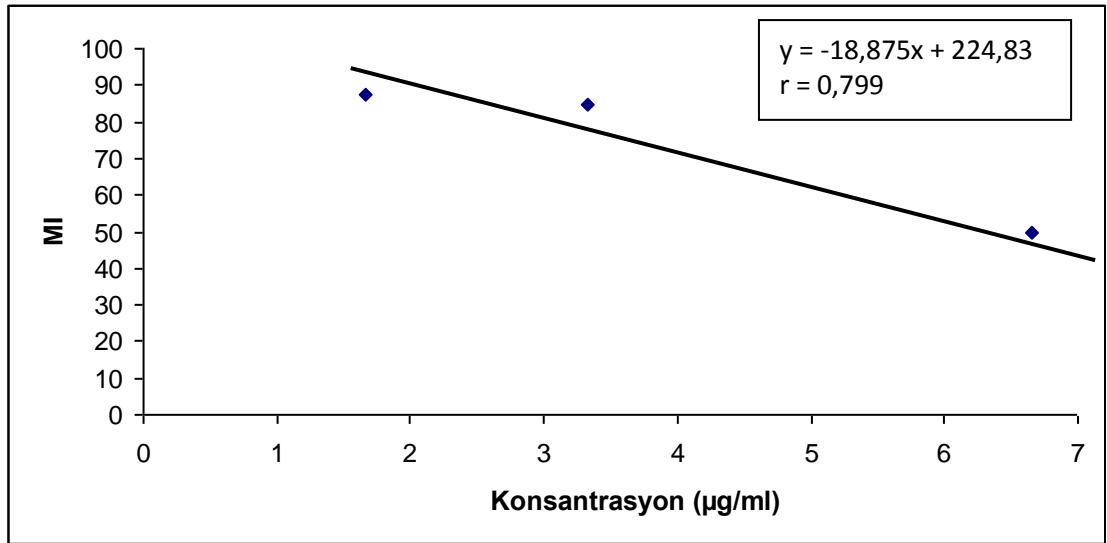
Şekil 4.8. Poliploidi (6,66 µg/ml entekavir, 48 saat muamele, X1000, ♂)

4.2. Entekavir'in Mitotik İndeks (MI) Üzerine Etkisi

İnsan lenfosit hücrelerinde entekavirin mitotik indeks üzerine olan etkisi değerlendirildiğinde, farklı entekavir dozları (1,66, 3,33 ve 6,66 µg/ml) ile 24 ve 48 saat muamele edilen hücrelerde dozun artışına bağlı olarak mitotik indeksin kontrole kıyasla azaldığı görüldü (Şekil 4.9, Şekil 4.10). Ancak aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$). Bununla beraber pozitif kontroldeki mitotik indeks düşüşün entekavirli gruplara kıyasla daha fazla oranda olduğu saptandı. Ancak 24 saat 1,66, 3,33 ve 6,66 µg/ml entekavir dozları ile muamele edilen kültürlerdeki MI düşüşü ile aralarında istatistiksel bir farkın olmadığı ($p>0,05$), 48 saat aynı dozdaki uygulama neticesindeki düşüşün ise istatistiksel olarak anlamlılık ifade ettiği saptandı (1,33 ve 3,33 µg/ml dozları için $p\leq 0,001$; 6,66 µg/ml için $p\leq 0,05$).



Şekil 4.9. Farklı dozlarda 24 saat entekavir uygulanan insan periferel lenfosit hücrelerinde MI'in doza bağlı olarak düşüşünü gösteren regresyon eğrisi ve korelasyon katsayısı ($p>0,05$)



Şekil 4.10. Farklı dozlarda 48 saat entekavir uygulanan insan periferel lenfosit hücrelerinde MI'in doza bağlı olarak düşüşünü gösteren regresyon eğrisi ve korelasyon katsayısı ($p>0,05$)

4.3. Entekavir'in Mikronükleus (MN) Oluşumu Üzerine Etkisi

İnsan lenfositlerinde 1,66, 3,33 ve 6,66 µg/ml konsantrasyonlardaki entekavirin 24 ve 48 saat uygulandığı kültürlerde meydana getirmiş olduğu MN'lu binükleer hücre sayısı kontrol ile karşılaştırıldığında önemli bir artışın olmadığı gözlemlendi (Çizelge 4.2). Ancak her üç doz (1,66, 3,33 ve 6,66 µg/ml) ve her iki sürede (24 ve 48 saat) uygulanan entekavirin pozitif kontrol kadar mikronükleus oluşumunu tetiklemediği de görüldü (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Farklı dozlarda entekavir ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan lenfositlerinde binükleer ve MN içeren hücre ortalaması (\pm SH)

Test Maddesi	Muamele Süresi (saat)	Konsantrasyon (µg/ml)	MN'li binükleer hücre ortalaması (MN \pm SH)
Kontrol	---	---	0.925 \pm 0.43
MMC (pozitif kontrol)	24	0,25	5.77 \pm 2.32a ₁
ETV	24	1,66	1.14 \pm 0.357b ₁
ETV	24	3,33	1.01 \pm 0.267b ₁
ETV	24	6,66	1.14 \pm 0.786b ₂
MMC (pozitif kontrol)	48	0,25	20.28 \pm 10.86a ₁
ETV	48	1,66	1.50 \pm 0.360b ₁
ETV	48	3,33	0.70 \pm 0.518b ₂
ETV	48	6,66	2.56 \pm 1.40b ₁

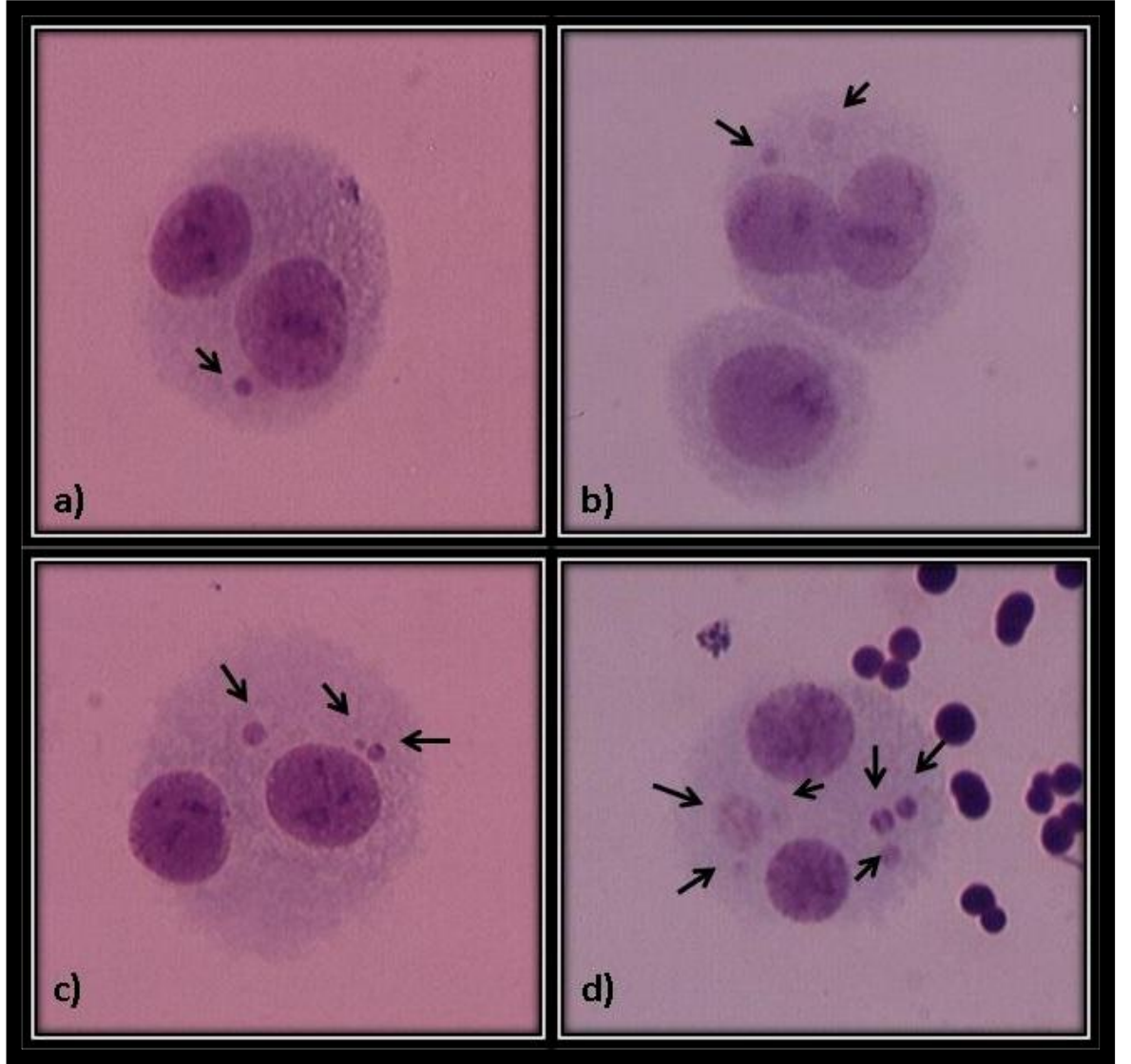
MMC= Mitomycin C, ETV= Entekavir, SH=Standart Hata, MN=Mikronükleus

a: Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli

b: Pozitif kontrol ile karşılaştırmada fark önemli

1: P \leq 0,05 2: P \leq 0,01

Entekavir ile muamele sonucu insan lenfositlerinde oluşan MN'li binüklear hücreler şekil 4.11'de gösterildi.

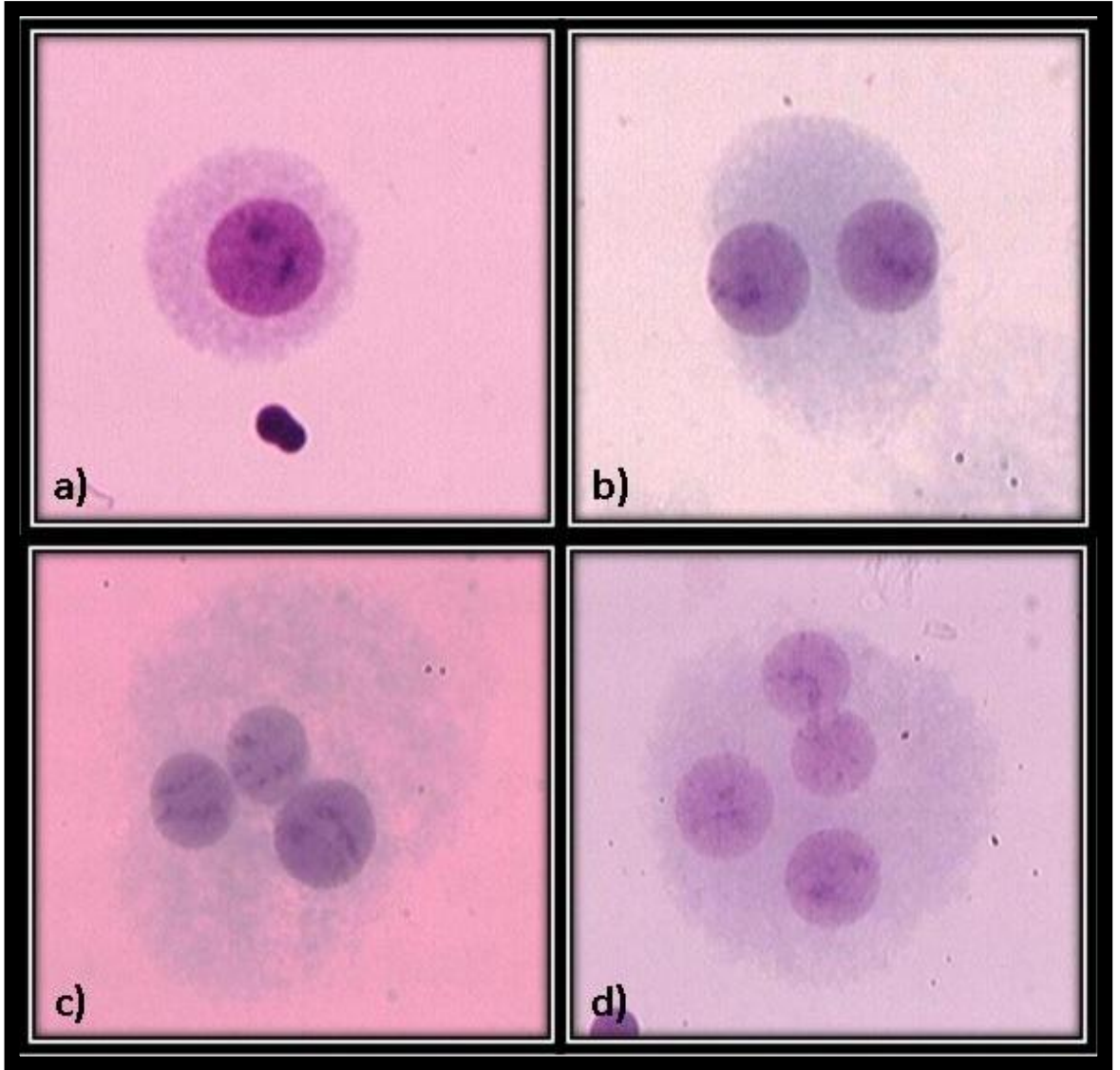


şekil 4.11. Entekavir ile muamele edilmiş insan lenfositlerinde saptanan MN'li binüklear hücreler (X400)

4.4. Entekavir'le Muamele Edilmiş İnsan Periferal Lenfositlerinde Nükleer Bölünme İndeksi (NBI)

Nükleer bölünme indeksi (NBI), entekavirin hücre bölünme aktivitesi üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığını saptamak amacıyla her bir doz (1,66, 3,33 ve 6,66 µg/ml) için 1000 tane hücre sayılarak mononükleer, binükleer, trinükleer ve tetranükleer hücre sayısı belirlendi ve $1N+2X2N+3X3N+4X4N/1000$ formülü ile hesaplandı (N = Nükleus sayısı).

İnsan lenfositlerinde 1,66, 3,33 ve 6,66 µg/ml konsantrasyonlardaki entekavirin 24 ve 48 saat uygulandığı kültürlerdeki NBI'leri kontrol ve pozitif kontrolde saptananlar ile karşılaştırıldı ve 24 saat entekavir uygulanan her üç dozdaki NBI'lerin kontrolden istatistiksel olarak farklı olduğu belirlendi ($p \leq 0,05$). Pozitif kontrol ile yapılan kıyaslamada ise entekavirin her üç dozunun pozitif kontrolden farklı olmadığı görüldü ($p > 0,05$). Entekavirin 48 saat uygulandığı kültürlerde ise saptanan NBI'i kontrol ile kıyaslandığında aradaki farkın istatistiksel olarak anlamsız olduğu ($p > 0,05$), pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında ise anlamlı sonuç elde edildiği belirlendi ($p \leq 0,05$). Entekavir ile muamele sonucu meydana gelen mononükleer, binükleer, trinükleer ve tetranükleer hücreler şekil 4.12'de gösterildi.



Şekil 4.12. Entekavir ile muamele sonucu insan lenfositlerinde oluşan (a) mononükleer, (b) binükleer, (c) trinükleer ve (d) tetranükleer hücreler (X400)

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, KHB tedavisinde kullanılan ve nükleozid analogu olan entekavirin genotoksik etkisinin olup olmadığı KA, MN, MI ve NBI ile insan periferik lenfositlerinde araştırıldı. Bu amaçla insan periferik lenfositleri *in vitro* olarak 1,66 µg/ml, 3,33 µg/ml ve 6,66 µg/ml konsantrasyonlarındaki entekavir ile 24 ve 48 saat muamele edildi ve elde edilen sonuçlar diğer araştırmacıların sonuçları ile karşılaştırıldı.

5.1. Entekavir'in Kromozom Anormalliklerinin (KA) Oluşumu Üzerine Etkisi

Çalışmamızda kullandığımız KA testleri, ilaçlardaki etken maddelerin genotoksik etkilerinin belirlenmesinde kullanılan en kısa süreli ve hassas testler arasındadır (Perry ve Evans 1975, Carrano vd. 1978). Bu çalışmada entekavirin genel olarak kontrolden farklı olarak KA oranını arttırmadığı görüldü. Ancak, entekavirin en yüksek dozda (6,66 µg/ml) 48 saat uygulandığı kültürlerde meydana gelen yapısal KA'ler ile anormal hücre yüzdesi açısından bir artışın olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p \leq 0,05$). Iğın (2005), virusun konak DNA'sına olan olası genotoksik etkilerini belirlemede HBV tedavisine başlanmamış hasta ve taşıyıcılardan elde edilen kromozom kırıkları ve MN'ler istatistiksel olarak değerlendirilerek kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Ayrıca KHB hasta ve taşıyıcılarına lamivudin, interferon ve lamivudin+interferon ile tedavi programı uygulanmış ve çalışma sonucunda, HBV'nin hem KHB'li hastalarda hem de taşıyıcılarda kromozomal instabiliteye yol açtığı ve KHB tedavisinde kullanılan farklı tedavi protokollerinin ise konak genomuna ilave genotoksik etkide bulunmadığı gösterilmiştir.

Ayers (1988)' in yaptığı bir başka çalışmada, pirimidin nükleozid analogu olan zidovudinin 3 µg/ml ve daha fazla konsantrasyonlarda kültüre edilmiş insan periferik lenfosit hücrelerinde kromozom anormalliklerine yol açtığı saptanmıştır.

Gonzalez ve Larripa (1994) ise primidin nükleozid analogu olan zidovudinin 100 µg/ml konsantrasyonda kromozom anormalliklerini istatistiksel olarak önemli oranda arttırdığını göstermişlerdir.

Thust vd. (1996) ise pürin grubunun nükleozid analogları olan acyclovir, valaciclovir, penciclovir ve ganciclovirin toksik etkilerini Çin hamster V-79 hücrelerinde araştırmışlardır. Araştırmacılar, acyclovir ve ganciclovirin yüksek oranda genotoksik olduklarını, valaciclovir ve penciclovirin ise herhangi bir genotoksik etki göstermediğini rapor etmişlerdir.

Lamivudinin KA üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmada ise lamivudinin *in vitro* insan lenfositlerinde ve fare L5178Tk^{+/-} lenfoma hücrelerinde zayıf bir genotoksik etkisinin olduğu bildirilmiştir (Wutzler ve Thust 2001). Ayrıca Bayram ve Topaktaş (2008)'in yapmış oldukları çalışmada ise lamivudinin kültüre edilmiş insan lenfosit hücrelerinde klastojenik etki gösterdiği ve kromozom anormalliklerine neden olduğu rapor edilmiştir.

Yapılan çalışmalar nükleozid ve nükleotid analoglarının DNA üzerinde hiç, az ya da çok genotoksik etkisinin olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda kullandığımız entekavirin ise ancak yüksek dozda ve uzun sürede genotoksik bir etki gösterdiği görülmektedir.

5.2. Entekavir'in Mikronükleus (MN) Oluşumu Üzerine Etkisi

Mikronükleuslar (MN) hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom ya da asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlar olarak tanımlanmaktadır. Bu oluşumlar, genellikle hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki eksikliklerden, mitotik iğdeki hatalardan, kinetokorlardan veya mitotik aygıtın diğer parçalarından ve kromozomal hasarlardan

kaynaklanmaktadır. MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Klastojen maddeler, kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Bu nedenle hücrede MN sayısında artış saptanması somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011).

Çalışmamızda 24 ve 48 saat 1,66, 3,33 ve 6,66 µg/ml konsantrasyonlardaki entekavir ile muamele edilmiş gruplar, MN içeren hücre sayısı bakımından kontrole karşılaştırıldığında farkın istatistiksel olarak bir anlam ifade etmediği belirlendi ($p>0,05$). Ne doza bağlı olarak ne de süreye bağlı olarak entekavir ile muamele edilmiş gruplarda MN içeren hücre oranında kontrole oranla bir artış söz konusu olmadı. Dolayısıyla entekavirin insan lenfosit hücrelerinde MN oluşumuna bir etkisinin olmadığı görüldü.

Haynes vd. (1996) yaptıkları çalışmada, pürin nükleozid analogları olan penciclovir, acyclovir ve ganciclovirin fare kemik iliği hücrelerinde mikronükleuslu polikromatik eritrosit oluşumunu uyardıkları tespit edilmiştir. Benzer şekilde Phillips vd. (1991) de fare kemik iliği hücrelerinde çeşitli nükleozid analoglarının mikronükleuslu polikromatik eritrosit sayısını artırdığını rapor etmişlerdir.

Aruna ve Jagetia (2001), pirimidin nükleozid analogu olan zidovudinin HeLa hücrelerinde doza bağlı olarak mikronükleuslu binükleer hücrelerin kontrole kıyasla istatistiksel olarak önemsenecek oranda arttırdığını belirtmişlerdir. Ayer vd. (1996) zidovudinin farklı dozları ile yaptıkları çalışmada ise zidovudinin fare ve sıçan kemik iliğinde MN'li eritrosit oranını arttırdığını bildirmişlerdir. Bayram ve Topaktaş (2008)'ın lamivudin ile insan periferik lenfositlerinde yaptıkları çalışmada, 100, 125, 150 µg/ml konsantrasyonlardaki lamivudinin 48 saat uygulandığı kültürlerde mikronükleus oluşumunun önemli derecede arttırdığını ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu rapor etmişlerdir.

Bu çalışmaların aksine Tungeln vd. (2002) yaptıkları bir çalışmada, B6C3F1Tk^{+/-} farelerini doğumdan sonraki 1-8. günler arasında lamivudinin 200 mg(3TC)/kg/gün konsantrasyonu ile muamele etmişlerdir. Araştırmacılar lamivudinin farelerin kemik iliğinde kontrole oranla mikronükleuslu polikromatik eritrosit oluşumunu arttırmadığını saptamışlardır.

Görüldüğü gibi bazı çalışmalarda nükleozid analoglarının MN oluşumunu indüklediği, bazılarının ise indüklemediği saptanmıştır. Çalışmamızda kullandığımız entekavirin de MN oluşumu üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı görülmektedir.

5.3. Entekavir'in Hücre Bölünmesi Üzerine Etkisi

Entekavirin insan periferik lenfositlerindeki sitotoksik etkisi mitotik indeks ve nükleer bölünme indeksi (NBI)'nin saptanmasıyla belirlenmiştir.

Çalışmamızda, 1,66, 3,33 ve 6,66 µg/ml konsantrasyonlarındaki entekavir ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş kültürlerdeki mitotik indekslerin kontrole karşılaştırıldıklarında doza bağlı olarak bir düşüş gösterdiği, ancak bu düşüşün pozitif kontrol kadar olmadığı görüldü. Bununla beraber 24 saat her üç dozdaki (1,66, 3,33 ve 6,66 µg/ml) entekavirin mitotik indeksi 48 saate göre daha fazla düşürdüğü de belirlendi. Entekavirin intraselüler yarı ömrü 15 saattir. Muhtemelen entekavir uygulama süresinin uzaması kültürde entekavir miktarının azalmasına veya entekavirin ilk 15 saatten sonra parçalanmasına ve dolayısıyla etki gösterememesine neden olmaktadır. Dolayısıyla 48 saat entekavir uygulanan kültürlerde ilk 24 saat sonrası hücrelerin bir kısmı ölmekte ve geri kalan kısmı ise son 24 saatte tekrardan mitotik aktivite kazanarak bölünüp mitotik indeksi arttırmaktadırlar.

Nükleer bölünme indeksi (NBI), kimyasal veya fiziksel bir maddenin sitotoksik etkisini göstermede önemli bilgiler sağlar (Fenech 1997). Çalışmamızda 24 ve 48 saat 1,66, 3,33 ve 6,66 µg/ml konsantrasyonlarındaki entekavire maruz bırakılan kültürlerde

NBI'nın düştüğü, bu düşüşün 24 saat entekavir uygulanan gruplarda daha belirgin olduğu ve kontrol ile kıyaslandığında aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p \leq 0,05$).

Entekavirin sitotoksitesisi ile ilgili literatürde herhangi bir bilgiye şuana kadar rastlanılmamıştır. Zhou vd. (2012) yaptığı bir çalışmada, uzun süreli entekavir kullanımının periferik kan mononüklear hücrelerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmada entekavir kullanımının mtDNA içeriğinin azalmasına yol açtığı ve böylelikle MI düşüşüne neden olarak hücre bölünmesini geciktirdiği saptanmıştır.

Benzer tedavi amacı ile kullanılan farklı nükleozid/nükleotid analogları ile yapılan çalışmalarda nükleozit/nükleotid analoglarının sitotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir. Gonzalez ve Larrippa (1994)'nın yaptıkları bir çalışmada 500 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonundaki zidovudinin lenfosit hücre kinetiğinde önemli bir gecikmeye neden olduğu ve 2500 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda ise Çin hamster yumurtalık hücrelerinin bölünmesini geciktirdiği rapor edilmiştir.

Thust vd. (1996) yaptıkları bir başka çalışmada, pürin grubu nükleozid analogları olan acyclovir, valaciclovir, penciclovir ve ganciclovirin mitotik indeksi kontrole oranla önemli oranda düşürdükleri ve hücre bölünmesini geciktirdikleri gösterilmiştir.

Lund vd. (2007) yaptığı çalışmada ise zidovudinin HepG2 ve H9c2 hücreleri üzerine yüksek toksisitesinin olduğu, hücre ölümlerini arttırdığı ve bunun yanı sıra mtDNA oranında düşüşe neden olduğu rapor edilmiştir.

Muhtemelen, nükleozid/nükleotid analogları DNA sentezini uygunsuz bir şekilde bloke ederek hücre bölünmesini baskılamaktadır. DNA yapısına girerek etkisini gösteren bu kimyasal maddeler mtDNA'sını olumsuz şekilde etkileyerek ATP oluşumunu geciktirmekte ve de böylelikle replikasyonu etkileyerek hücre bölünmesini geciktirdiği söylenebilir. Epel (1963) ile Jain ve Andsorbhoy (1988)

nükleozid/nükleotid analoglarının hücrenin enerji üretim merkezinin baskılaması ve gerekli ATP'nin üretilmemesi sonucu MI oranının düştüğünü rapor etmişlerdir.

Sonuç olarak; entekavirin insan periferik lenfosit hücreleri üzerinde yüksek dozda ve uzun süre kullanım durumunda genotoksik etkisinin olduğu ve ilk 24 saat içerisinde MI ve NBI'yi düşürerek sitotoksik etki gösterdiği söylenebilir. Ancak, entekavirin kesin genotoksitesinin tespiti için mutlaka uzun süreli kültür, *in vivo* ve gen düzeyinde çalışmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahmed, A. and Keeffe, E.B., (1999). Treatment strategies for chronic hepatitis C: update since the 1997 National Institutes of Health Consensus Development Conference. *J Gastroenterol Hepatol*, 14(suppl): 12-18.
- Agarwal, R.P. Olivero, O.A., (1997). Genotoxicity and Mitochondrial Damage in Human Lymphocytic Cells Chronically Exposed to 3'-Azido-2',3'-Dideoxythymidine. *Mutat Res.*, 390(3): 223-31.
- Akarca, U.S., (2002). Kronik B Hepatitinde İnterferon Dışı Tedaviler ve İnterferon ile Yapılan Kombinasyonlar (Tekeli, E., Balık, İ. Editörler). *Viral Hepatit 2003. Birinci Baskı, Karakter Color A.Ş.*, 156-178, Ankara.
- Ananworanich, J., Nuesch, J., Cote, H.C.F., Kerr, S.J., Hill, A., Jupimai, T., Laopraynak N., Saenawat, S., Ruxrungtham, K., Hirschel, B., (2008). Changes in metabolic toxicity after switching from stavudine/didanosine to tenofovir/lamivudine- a Staccato trial substudy. *J Antimicrob Chemother.*, 61: 1340-1343.
- Anonim, (2011). Türkiye Hepatit B yol haritası- Hepatit B çalışma grubu-.*Viral Hepatitle Şavaşım Derneği Çalışması, İstanbul.*
- Aruna, R., Jagetia, G.C., (2001). Azidothymidine Induces Dose Dependent Increase in Micronuclei Formation in Cultured HeLa Cells. *Pharmazie*, 56(6): 492-500.
- Ayers, K.M., (1988). Preclinical Toxicology of Zidovudine. An Overview. *Am J Med.*, 85(2A): 186-188.
- Balık, İ., Yüksel, Ö., (2009). Kronik B tedavisinde kullanıma yeni giren ve girecek olan antiviraller. *Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2009 sunumları, İstanbul.*
- Bayram, S., Topaktaş, M., (2008). Confirmation of the chromosome damaging effects of lamivudine in in vitro human peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen.*, 49(4): 328-333.
- Benbrik, E., Chariot, P., Bonavaud, S., Ammi-Saïd, M., Frisdal, E., Rey, C., Gherardi, R., Barlovatz-Meimon, G., (1997). Cellular and mitochondrial toxicity of zidovudine (AZT), didanosine (ddI) and zalcitabine (ddC) on cultured human muscle cells. *J Neurol Science*, 149(1): 19-25.
- Blumberg, B. S., Alter H. J., Visnich S., (1965). A "New" Antigen in Leukemia Sera. *Jama*, 191: 541-6.

- Blumberg, B. S. Gerstley, B. J. Hungerford, D. A. London, W. T. Sutnick, A.I., (1967). A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med.*, 66(5): 924-931.
- Carrano, A.V., Thompson, L.H., Lindi, P.A., Minkler, J.L., (1978). Sister Chromatid Exchanges As An Indicator Of Mutagenesis. *Nature*, 271: 551-553.
- Carter, M.M., Torres, S.M., Cook, D.L.Jr., McCash, C.L., Yu, M., Walker, V.E., Walker, D.M., (2007). 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.*, 48(3-4): 239-47.
- Cassiman, J.J., De Clercq, E., Jones, A.S., Walker, R.T., Van Den Berghe, H., (1981). Sister Chromatid Exchange Induced by Anti-Herpes Drugs. *Br. Med. J. (Clin Res Ed.)*, 283(6295): 817-818.
- Centers for Disease Control and Prevention, (2008). Travelers' health; yellow book. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services. <http://wwwn.cdc.gov.tr>, 2012.
- Chieochansin, T., Chutinimitkul, S., Payungporn, S., Theamboonlers, A., Tangkijvanich, P., Komolmit P., Poovorawan, Y., (2006). Rapid detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus mutations by PCR-based methods. *Tohoku J Exp. Med.*, 210: 67-78.
- Clive, D., Turner, N.T., Hozeir, J., Baston, A.G., Tucker W.E.J., (1983). Preclinical Toxicology Studies with Acyclovir: Genetic Toxicity Tests. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 3(6): 587-602.
- Colunno, R., Rose, R., Pokornowski, K., Baldick, C.J., Levine, S., Yu, C.F., Walsh, A., Fang, J., Hsu, M., Mazzucco, C., Eggers, B., Zhang, S., Plym, M., Tenny, D.J., Klerczawki, K., (2007). Four year assesment of ETV resistance in nucleoside naive and lamivudine refractory patients. *J Hepatol.*, 46(10): 294.
- Dane, D.S., Cameron, C.H., Briggs, M., (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*, 1(7649): 695-698.
- Dilsiz, G., Yenicesu, İ., Belen, F.B., Çelik, B. Öztürk, G., (2012). Trends in hepatitis B and hepatitis C virus seropositivity among blood donors over 15 years screened in the blood bank of a university hospital. *Transfus Apher Sci.*, 47(1): 95-100.
- Dobrovolsky, V.N., McGarrity, L.J., Tungeln, V.L.S., Mittelstaedt, R.A., Morris, S.M., Bbeland, F.A., Helfflich, R.H., (2005). Micronucleated Erythrocyte Frequency in Control and Azidothymidine-Treated Tk+/, Tk+/- and Tk-/- Mice. *Mutat. Res.*, 570(2): 227-235.
- Epel, D., (1963). The effects of carbonmonoxide inhibition of ATP level and the date of mitosis Sea Urching egg. *J. Cell. BioP.*, 17: 315-319.

- Fenech, M., (1997). The Advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat Res.*, 392: 11-18.
- Fontana, R.J., Hann, H.W., Perillo, R.P., Vierling, J.M., Wright, T., Rekela, J., Anshvets, G., Davis, R., Gardner, S.D., (2002). Determinants of early mortality in patients with decompensated chronic hepatitis B treated with antiviral therapy. *Gastroenterology*, 123(3): 719-27.
- Fung, S.K., Chae, H.B., Fontana, R.J., (2006). Virologic response and resistance to adefovir in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol*, 44(2): 283-90.
- Ganem, D., (1991). Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 168: 61-83.
- Gish, R.G., Locarnini, S., (2007). Genotyping and genomic sequencing in clinical practice. *Clin Liver Dis.*, 11: 761-795.
- Gocke, D.J., Greenberg, H.B., Kavey, N.B., (1969). Hepatitis antigen. Detection of infectious blood donors. *Lancet*, 2(7614): 248-9.
- Gonzalez, C.M., Larripa, I., (1994). Genotoxic Activity of Azidothymidine (AZT) in Vitro Systems. *Mutat Res.*, 321(1-2): 113-8.
- Gürol, E., Saban, C., Oral, O., Çiğdem, A., Armağan, A., (2006). Trends in hepatitis B and hepatitis C virus among blood donors over 16 years in Turkey. *Eur J Epidemiol.*, 21; 299-305.
- Hamel, W., Magnelli, L., Chiarugi, V.P., Israel, M.A., (1996). Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated apoptotic death of bystander cells. *Cancer Res.*, 56(12): 2697-702.
- Haynes, P. Lambert, T.R. Mitchell, I.D., (1996). Comparative in-Vivo Genotoxicity of Antiviral Nucleoside Analogues; Penciclovir, Acyclovir, Ganciclovir and the Xanthine Analogue, Caffeine, in the Mouse Bone Marrow Micronucleus Assay. *Mutat Res.*, (1-2): 65-74.
- Hoofnagle, J.H., (1997). Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 26 (3 Suppl. 1): 15-20.
- <http://www.hepatit.org>, (2012).
- <http://www.ieg.gov.tr>, (2012).
- İlgin, R.H., (2005). Hepatit B virüsünün ve tedavisinde kullanılan anti-viral ajanların konak DNA'sına olan genotoksik etkileri. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, Ankara.

- İdilman, R., (2008). Viral Hepatitli Alıcı ve Vericide Yaklaşım. 5. Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi. Belek-Antalya. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı, Ankara.
- Jagetia, G.C., Aruna, R., (1999). Effect of Various Concentrations of Acyclovir on Cell Survival and Micronuclei Induction on Cultured HeLa Cells. *Mutat Res.*, 446(2): 155-65
- Jain, A., Andsorbhoy, R.K., (1988). Cytogenetical studies on the effects of some chlorinated pesticides III. Concluding remarks. *Cytologia*, 53: 427-436.
- Kantarçeken, B., (2009). Kronik hepatit B–Doğal seyir. Viral Hepatitle Savaşım Derneği 2009 sunumları, İstanbul.
- Kaplan, P.M., Greenman, R.L., Gerin, J.L., Purcell, R.H., Robinson, W.S., (1973). DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J Virol.*, 12(5): 995-1005.
- Kauderer, B., Zamith, H., Paumgarten, F.J., Speit, G., (1991). Evaluation of The Mutagenicity of Beta-Myrcene in Mammalian Cells in Vitro. *Environ Mol Mutagen.*, 18(1): 28-34.
- Kiyomoto, B.H., Tengan, C.H., Godinho, R.O., (2008). Effects of short-term zidovudine exposure on mitochondrial DNA content and succinate dehydrogenase activity of rat skeletal muscle cells. *Brazil J Neurol Sci.*, 268(1-2): 33-9.
- Kobayashi, M., Suzuki, F., Akuta, N., Suzuki, Y., Arase, Y., Ikeda, K., Hosaka, T., Sezaki, H., Kobayashi, M., Iwasaki, S., Sato, J., Watahiki, S., Miyakawa, Y., Kumada, H., (2006). Response to long-term lamivudine treatment in patients infected with hepatitis B virus genotypes A, B and C. *J Med.*, 78(10): 1276-83.
- Lai, C.L., Gane, E., Liaw, Y.F., Hsu, C.W., Thongsawat, S., Wang, Y., Chen, Y., Heathcote, E.J., Rasenack, J., Bzowej, N., Naoumov, N.V., Di Bisceglie, A.M., Zeuzem, S., Moon, Y.M., Goodman, Z., Chao, G., Constance, B.F., Brown, N.A., (2007). Telbivudine versus lamivudine in patients with chronic hepatitis B. *N Engl J Med.*, 357(25): 2576-88.
- Lavanchy, D., (2004). Hepatitis B Epidemiology, Disease Burden, Treatment and Current and Emerging Prevention and Control Measures. *J Viral Hepatitis*, 11: 97-107.
- Lee, W.M., (1997). Hepatitis B Virus Infection. *N Engl J Med.*, 337: 1733-45.
- Liaw, Y.F., Sung, J.J., Chow, W.C., Farrell, G., Lee, C.Z., Yuen, H., Tanwandee, T., Tao, Q.M., Shue, K., Keene, O.N., Dixon, J.S., Gray, D.F., Sabbat, J., (2004). Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med.*, 351(15): 1521-31.
- Lok, A.S.F., McMahon, B.J., (2007). Chronic hepatitis B. *Hepatology*, 45: 507-539.

- Lok, A.S., Lai, C.L., Leung, N., Yao, G.B., Cui, Z.Y., Schiff, E.R., Dienstag, J.L., Heathcote, E.J., Little, N.R., Griffiths, D.A., Gardner, S.D., Castiglia, M., (2003). Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 125(6): 1714-22.
- Lund, K.C., Peterson L.L., Wallace, K.B., (2007). Absence of a Universal Mechanism of Mitochondrial Toxicity by Nucleoside Analogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(7): 2531–2539.
- Maddrey, W.C., (2000). Hepatitis B: An Important Public Health Issue. *J Med Virol.*, 61: 362-66.
- Mahoney, F.J., (1999). Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev.*, 12 (2): 351-366.
- Mandell, Bennet & Dolin: Principles and Practice of Infectious Disease, 6th ed., (2009). 2 volume, 1943 p., UK.
- Mast, E.E., Weinbaum, C.M., Fiore, A.E., Alter, M.J., Bell, B.P., Finelli, L., Rodewald, L.E., Douglas, J.M. Jr., Janssen, R.S., Ward, J.W., (2006). A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Part II: immunization of adults. *MMWR Recomm Rep.*, 55 (RR-16): 1-33.
- Maynard, J.E., (1990). Hepatitis B: Global Importance and Need for Control. *Vaccine*, 8(suppl): 18-20.
- Maquardt, H., Westendorf, J., Schaefer, A., Boldt, J. and De Clercq, E., (1988). Mutagenic And Antimutagenic Effects Of 5-Substituted 2'-Deoxyuridines Depending on the Nature of the 5-Substituent. *Arzneimittelforschung*, 38(12): 1820-4.
- McMahon, B.J., (2005). Epidemiology and natural history of hepatitis B. *Semin Liver Dis.*, 25(Suppl 1); 3-8.
- Meng, Q., Su, T., Olivero, O.A., Poirier, M.C., Shi, X., Ding, X., Walker, V.E., (2000a). Relationships Between DNA Incorporation, Mutant Frequency and Loss of Heterozygosity at TK Locus in Human Lymphoblastoid Cells Exposed to 3'-Azido-3'-Dideoxythymidine. *Toxicol Sci.*, 54(2): 322-9.
- Meng, Q., Grosovsky, A.J., Shi, X., Walker, V.E., (2000b). Mutagenicity and Loss of Heterozygosity at the APRT Locus in Human 82 Lymphoblastoid Cells Exposed to 3' Azido-3'-Dideoxythymidine. *Mutagenesis*, 15(5): 405-10.

- Meng, Q., Walker, D.M., Olivero, O.A., Shi, X., Antiochos, B.B., Poirier, M.C., Walker, V.E., (2000c). Zidovudine-Didanosine Coexposure Potentiates DNA Incorporation of Zidovudine and Mutagenesis In Human Cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(23): 12667-71.
- Meng, Q., Olivero, O.A., Fasco, M.J., Bellisario, R., Kaminsky, L., Pass, K.A., Wade, N., Abrams, E., Poirier, M.C., Walker, Protocol Team. (2007). Plasma and cellular markers of AZT metabolism as indicators of DNA damage in cord blood mononuclear cells from infants receiving prepartum NRTIs. *Environ Mol Mutagen*, 48 : 307–321.
- Menne, S., Cote, P.J., Korba, B.E., Butler, S.D., George, A.L., Tochkov, I.A., Delaney, W.E., Xiong, S., Gerin, J.L., Tennant, B.C., (2005). Antiviral Effect of Oral Administration of Tenofovir Disoproxil Fumarate in Woodchucks with Chronic Woodchuck Hepatitis Virus Infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(7): 2720–2728
- Mistik, R., Balık, İ., (2001). Türkiyede viral hepatitlerin epidemiyolojik analizi. Kılıçturgay K, Badur S (eds), *Viral Hepatit*, 2001. Birinci baskı kitabından, *Viral Hepatit Savaşım Derneği*, 9-57. İstanbul.
- Olivero, O.A., Beland, F.A., Fullerton, N.F., Poirier, M.C., (1994). Vaginal Epithelial DNA Damage and Expression of Preneoplastic Markers in Mice Uring Chronic Dosing With Tumorigenic Levels of 3'-Azido-2',3'- Dideoxythymidine. *Cancer Res.*, 54(23): 6235-42.
- Olivero, O.A., Anderson, L.M., Diwan, B.A., Haines, D.C., Harbough, S.W., Moskal, T.K., Jones, A.B., Rice, J.M., Riggs, C.W., Logsdon, D. Yuspa, S.H., Poirier, M.C., (1997). Transplacental Effects of 3'-Azido-2', 3'-Dideoxythymidine; (AZT): Tumorigenicity in Mice and Genotoxicity in Mice And Monkeys. *J Natl Cancer Inst.*, 89(21): 1601-8.
- Olivero, O.A., Shearer, G.M., Chougnet, C.A., Kovacs, A.A., Landay, A.L., Baker, R., Stek, A.M., Khoury, M.M., Proia, L.A., Kessler, H.A., Sha, B.E., Tarone, R.E., Poirier, M.C., (1999). Incorporation of zidovudine into leukocyte DNA from HIV-1 positive adults and pregnant women, and cord blood from infants exposed in utero. *AIDS*, 13(8): 919-925.
- Olivero, O.A., Fernandez, J.J., Antiochos, B.B., Wagner, J.L., Claire, S.T., Poirier M.E., (2002). Transplacental Genotoxicity of Combined Antiretroviral Nucleoside Analogue Therapy in *Erythrocebus patas* Monkeys. *J. Acquir. Immune. Defic Syndr.*, 29(4): 323-9.
- Olivero, O.A., (2007). Mechanisms of genotoxicity of nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Environ Mol Mutagen.*, 48(3-5): 215-223.
- Oshiro, Y., Piper, C.E., Soelter, S.G., Balwierz, P.S., Garriott, M.L., (1992). Genotoxic Properties of (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-Deoxyuridine (BVDU). *Fundam App Toxicol.*, 18(4): 491-8.

- Perry, P., Evans, H.J., (1975). Cytological Detection of Mutagen–Carcinogen Exposure by Sister Chromatid Exchange. *Nature*, 258: 121-125.
- Phillips, M.D., Nascimbeni, B., Tice, R.R., Shelby, M.D., (1991). Induction of Micronucleus in Mouse Bone Marrow Cells: An Evaluation of Nucleoside Analogues Used in the Treatment of AIDS. *Environ Mol Mutagen.*, 18(3): 168-83.
- Poynard, T., Leroy, V., Cohard, M., Thevenot, T., Mathurin, P., Opolon, P., Zarski, J.P., (1996). Meta-analysis of interferon randomized trials in the treatment of viral hepatitis C: effects of dose and duration. *Hepatology*, 24(4): 778-9.
- Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A.F., Shelby, M., (1987). Mammalian in vivo cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. *Mutat Res.*, 189(2): 157-65.
- Prince, A.M., (1968). An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 60(3): 814-821.
- Rao, G.N., Collins, B.J., Giles, H.D., Heath, J.E., Foley, J.F., May, R.D., Buckley, L.A., (1996). Carcinogenicity of 2',3'-Dideoxycytidine in Mice. *Cancer Res.*, 56(20): 4666-72.
- Regenstein, F., (1994). New Approaches to the Treatment of Chronic Viral Hepatitis B and C. *Am J Med*, 96(suppl 1A): 47-51.
- Saltoğlu, N., (2005). B tipi kronik hepatitin güncel tedavisi. *Viral Hepatit*. Tabak, F. Balık, İ. Tekeli, E. (eds). *Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını*, 213-32. İstanbul.
- Seifer, M., Hamatake, R.K., Colonno, R.J., Standring, D.N., (1998). *In vitro* inhibition of hepadnavirus polymerases by the triphosphates of BMS-200475 and lobucavir. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42: 3200-3208.
- Shobukhov, V.M., Iurchenko, V.V., (1988). Cytogenetic Effects of 9-(2-hydroxyethoxymethyl) Guanine. *Biull Eksp Biol Med.*, 105(5): 591-3.
- Shafik, H.M., Nokta, M.A., Pollard, R.B., (1991). Recombinant Human Interferon Beta Ser Protects Against Zidovudine-Induced Genetic Damage in AIDS Patients. *Antiviral Res.*, 16(2): 205-12.
- Soyuer, I., (2009). Kronik Viral HB patolojisi. *Viral Hepatitle Savaşım Derneği 2009 sunumları*, İstanbul.
- Stern, M., Cid, M.G., Larippa, I., Slavutsky, I., (1994). AZT-Induced of Micronuclei in Human Lymphocyte Subpopulations. *Toxicol Lett.*, 70(2): 235-42.
- Stoop, J.N., Molen, R.G., Kuipers, E.J., Kusters, J.G., Janssen, H.L., (2007). Inhibition of viral replication reduces regulatory T cells and enhances the antiviral immune response in chronic hepatitis B. *Virology*, 361: 141-148.

- Şekeroglu, V., Şekeroglu, Z.A., (2011). Genotoksik hasarların belirlenmesinde mikronükleus testi. *Türk Hij Den Biyol Derg.*, 68(4): 241-252.
- Thust, R., Schake, M., Wutzler, P., (1996). Cytogenetic Genotoxicity of Antiherpes in Chinese Hamster V79-E Cells. I. Purine Nucleoside Analogues. *Antiviral Res.*, 31(1-2): 105-13.
- Thust, R., Tomicic, M.T., Klocking, R., Voutilainen, N., Wutzler, P., Kaina, B., (2000a). Comparison of the Genotoxic and Apoptosi-Inducing Properties of Ganciclovir and Penciclovir in Chinese Hamster Ovary Cells Transfected with Thymidine Kinase Gene of Herpes Simplex Virus-1: Implications For Gene Therapeutic Approaches. *Cancer Gene Ther.*, 7(1): 107-17.
- Thust, R., Tomicic, M.T., Klocking, R., Wutzler, P., Kaina, B., (2000b). Cytogenetic Genotoxicity of Anti-Herpes Purine Nucleoside Analogues in CHO Cells Expressing The Thymidine Kinase Gene of Herpes Simplex Virus Type 1: Comparison of Ganciclovir, Penciclovir and Aciclovir. *Mutagenesis*, 15(2): 177-84.
- Tomicic, M.T., Bey, E., Wutzler, P., Thust, R., Kaina, B., (2002). Comparative Analysis of DNA Breakage, Chromosomal Aberrations and Apoptosis Induced by the Anti-Herpes Analogues Aciclovir, Ganciclovir and Penciclovir. *Mutat Res.*, 505(1-2): 1-11.
- Topaktaş, M., Rencüzoğulları, E., (1995). Sitogenetik. Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Adana.
- Torresi, J., Locarnini, S., (2000). Antiviral Chemotherapy for Treatment of Hepatitis B Virus Infections. *Gastroenterology*, 118 (2 Suppl 1): S83-103.
- Tosun, S., (2004). İnterferon ve Antiviraller. Viral Hepatitle Şavaşım Derneği 2004 sunumları, İstanbul.
- Tungeln, L.S. Hamilton, L.P. Dobrovolsky, V.N. Bishop, M.E. Shaddock, J.G. Heflich, R.H. Beland, F.A., (2002). Frequency of *Tk* and *Hprt* Lymphocyte Mutants and Bone Marrow Micronüclei in B6C3F1/*Tk*^{+/-} Mice Treated Neonatally with Zidovudine and Lamivudine. *Carcinogenesis*, 23(9): 1427-1432.
- Tungeln, L.S., Hamilton, L.P., Dobrovolsky, V.N., Bishop, M.E., Shaddock, J.G., Heflich, R.H., Beland, F.A., (2004). Frequency of *Tk* and *HPRT* Lymphocyte Mutants and Bone Marrow Micronuclei In Mice Treated Neonatally with Zidovudine and Didanosine. *Mutagenesis*, 19(4): 307-11.
- Türk Karaciğer Araştırmaları Derneği, Ulusal Hepatit Sıklığı Çalışması (TÜRKHEP), 2010.

- Ustaçelebi, Ş., Ergünay, K., (2007). Hepatit B virusunun moleküler virolojisi. Ed: Tabak, F. Balık, İ. Tekeli, E. Viral Hepatit, Birinci baskı. İstanbul: Ohan Matbaası, 96-107. İstanbul.
- Van Bömmel, E., Wünsche, T., Schürmann, D. Berg, T., (2002). Tenofovir treatment in patients with lamivudine-resistant hepatitis B mutants strongly affects viral replication, *Hepatology*, 36(2): 507-8.
- Vidal, F., Domingo, J.C., Guallar, J., Saumoy, M., Cordobilla, B., Rosa, R.S., Giralt, M., Ivarez, M.L., Lo'pez-Dupla, M., Torres, F., Villarroya, F., Cihlar, T., Domingo, P., (2006). In Vitro Cytotoxicity and Mitochondrial Toxicity of Tenofovir Alone and in Combination with Other Antiretrovirals in Human Renal Proximal Tubule Cells. *Antimicrob Agents Chemother.*, 50(11): 3824-32.
- World Health Organization (WHO). 2004. Department of Communicable diseases surveillance and response. Hepatitis B. <http://www.who.int.>, 2012.
- Wutzler, P., Thust, R., (2001). Genetic Risk of Antiviral Nucleoside Analogues—a Survey. *Antiviral Research*, 49(2): 55-74.
- Zhou, L., Liu, X.Y., Zhao, C.Y., Duan, Z.P., (2012). Entecavir treatment causes injury to the mitochondrial DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.*, 20(10): 751-4.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Çiğdem ÇELİK

Doğum Yeri: Adıyaman

Doğum Tarihi: 12.04.1986

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Lise : Adıyaman Anadolu Lisesi, 2004

Lisans : Fırat Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı, 2009

Yüksek Lisans :Adıyaman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 2013

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Vetel A.Ş. ,2010

Yayımları (SCI ve diğer):