

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



BAZI ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇ VE KARIŞIMLARININ RATLARDA
GENOTOKSİK ETKİLERİ

Proje Kodu
TSA-10-3262

Proje Türü
Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Yrd.Doç.Dr.Korhan ARSLAN
Veteriner Fakültesi/Zootekni Ve Hayvan Besleme

Doç.Dr. Murat KANBUR
Yrd.Doç.Dr.Mürsel KARABACAK
Dr.Zeynep SOYER SARICA
Dr.Nazife TAŞÇIOĞLU
Prof.Dr.Kaan M.İŞCAN
Prof.Dr.Munis DÜNDAR
Yrd.Doç.Dr.Aytaç AKÇAY

Nisan 2013

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Bu projeye maddi destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Başkanlığına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ	7
2.GEREÇ VE YÖNTEM	13
3. BULGULAR	18
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	21
5.KAYNAKLAR	25

ÖZET

BAZI ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇ VE KARIŞIMLARININ RATLARDA GENOTOKSİK ETKİLERİ

Bu çalışmada izoniazid (INH), pirazinamid (PYR), rifampisin (RIF) ve bunların karışımlarının ratlarda DNA ve kromozomal düzeyde genotoksik etkilerinin araştırılması amaçlandı. Çalışmada 40 adet 1.5 aylık Wistar Albino ırkı erkek sıçan kullanıldı; kontrol ve deneme grubu olmak üzere 5 grup oluşturuldu. Kontrol grubundaki ratlara (grup 1) 90 gün boyunca gavajla mideye izotonik sodyum klorür çözeltisi verildi. Deneme grubundaki ratlara 90 gün boyunca sırasıyla 31.5 mg/kg INH , 189 mg/kg PYR , 54 mg/ kg RIF ve aynı dozlarda INH+PYR+RIF karışımı gavajla mideye uygulandı. Çalışmanın sonunda hafif eter anestezisi altındaki hayvanlardan kalbe punksiyon yapılarak heparinli tüplere kan örnekleri alındı. Ratlar kan örnekleri alımını takiben servikal dislokasyonla ötenazi edildi; karaciğer ve böbrek dokuları alındı. Örnekler Komet ve Mikronükleus(MN) teknikleri ile değerlendirildi. Kontrol grubuna göre deneme grupları değerlendirildiğinde tam kan örneklerinde INH, RIF ve karışım gruplarında kafa yoğunluğunda azalma ve kuyruk yoğunluğunda artış, kuyruk göçünde ise tüm deneme gruplarında artış; karaciğer dokusunda PYR ve karışım verilen gruplarda baş yoğunluğunda azalma, kuyruk yoğunluğunda artış, kuyruk göçü değerlerinde ise PYR, RIF ve karışım gruplarında yükselme; böbrek dokusunda INH, PYR ve karışım verilen gruplarda baş yoğunluğunda azalma kuyruk yoğunluğunda artış, karışım grubu kuyruk göçü değerinde ise yükselmenin olduğu belirlendi ($p<0,001$). Tam kanda yapılan mikronükleus analizinde kontrol grubuna göre yalnızca RIF verilen grupta yükselmenin olduğu gözlemlendi ($p<0,001$). Biyokimyasal parametreler incelendiğinde kontrol grubuna göre RIF, INH ve karışım grupları plazma, karaciğer, böbrek MDA düzeylerinde anlamlı yükselmenin olduğu ($p<0,05$); kontrol grubuna göre kıyaslandığında diğer grupların plazma NO düzeylerinin yükseldiği, karaciğer ve böbrek NO düzeylerinde ise PYR haricindeki gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı bir artışın olduğu ($p<0,05$) gözlemlendi. Çalışma sonucunda sıçanlara 90 gün boyunca verilen antitüberküloz ilaçların ve ilaç karışımlarının ratlarda kan, karaciğer ve böbrek hücrelerinde farklı derecelerde DNA hasarına yol açtığı belirlendi.

Anahtar kelimeler: Antitüberküloz ilaç, Rat, Genotoksisite, Komet, Mikronükleus

ABSTRACT

GENOTOXIC EFFECTS OF SOME ANTITUBERCULOSIS DRUG AND MIXTURES IN RATS

In this study 1.5 months age 40 male albino Wistar rats were used, five groups were formed for one control and four experimental groups. Rats in the control group 90 days isotonic sodium chloride solution were administered by gastric gavage. The treatment group 90 days in the 31.5 mg/kg INH, 54 mg/ kg RIF, 189 mg/kg PYR and mixture of the same doses of INH+PYR+RIF administered into the stomach with gavaj. At the end of the study, under light ether anesthesia blood samples were collected into heparinized tubes by heart puncture. Following the ingestion of blood samples; rats were euthanized by cervical dislocation, liver and kidney tissue samples were collected. Samples were evaluated by Comet assay and Micronucleus (MN) techniques. When experimental groups compared to control groups INH, RIF and groups of the mixture head intensity decreased and tail intensity increased and tail migration increased in all treatment groups in the blood samples. PYR and mixture groups; head intensity decreased, tail intensity increased and PYR, RIF and mixture groups tail migration increased In the liver samples. In kidney samples head intensity levels of INH, RIF, and mixture groups decreased, tail intensity increased and tail migration of mixture group increased ($p < 0.001$). According to cotrol group micronucleus analysis of whole blood only RIF group MN rate increased ($p < 0.001$). Analysis of biochemical parameters in the control group RIF, INH and the mixture groups plasma, liver, kidney MDA levels was significantly rise ($p < 0.05$). Plasma NO levels increased in the control group compared to the other groups. All groups except PYR, the liver and kidney NO levels were significantly high compared to control group ($p < 0.05$) were observed. The result of this study was decided that antituberculosis drugs and their combinations implementation of rats for 90 days caused to double strande breake of DNA at different degrees in blood, kidney and liver cell damage.

Key words: Antituberculosis Drugs, Rat, Genotoxicity, Comet, Micronucleus

GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Dünyada enfeksiyon hastalıklarına bağlı ölümlerde tüberküloz halen en önemli neden olarak güncelliğini korumaktadır. *Mycobacterium avium*'un yavaş çoğalması, hücre duvarını pek çok ilacın geçememesi ve direnç gelişiminin yaygın olması; hastanın tedaviye uyumu ve kullanılan ilaçların toksik etkileri gibi nedenler bu hastalıkların kronik bir seyir izlemesine ve tedavinin uzun sürmesine sebep olmaktadır. Bu nedenle tedavide genellikle en az iki değişik ilacın uzun süreli kullanılması gerekmektedir. Tüberküloz tedavisinde isoniazid, RIF, PYR, etambutol ve streptomisin olduğu kombinasyonlar sıklıkla kullanılmakla birlikte, bu ilaçlarla yapılan tedavi rejimlerinde başta hepatotoksik ve ototoksik etkiler olmak üzere pek çok istenmeyen etkilerin oluşabildiği de bildirilmektedir. Ancak tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçların ve ilaç kombinasyonlarının gen düzeyinde etkilerine yönelik bilgiler sınırlıdır. Bu çalışmayla tüberküloz tedavisinde yaygın olarak kullanılan INH, PYR, RIF ve bu ilaçların karışımının ratlarda DNA düzeyindeki olası genotoksik etkilerinin ortaya konulması amaçlanmaktadır.

GENEL BİLGİLER

TÜBERKÜLOZ VE TEDAVİSİ

Tüberküloz, insanlık tarihinin bilinen en eski hastalıklarından biri olup, dünya ülkelerinde morbidite ve mortalitesi en yüksek olan, yavaş ve sinsi gelişen kronik bir hastalıktır (Akyol 1994, Akyol 1997, Cohen 1997). Önlenebilir ve tedavi edilebilir bir hastalık olmasına karşın ülkemizde ve tüm dünyada halen sorun olmaya devam etmektedir (Arpaz 2001). Dünyadaki tüm ölümlerin %7'sinden ve gelişmekte olan ülkelerdeki önlenebilir yetişkin ölümlerinin %26'sından tüberkülozun sorumlu olduğu bildirilmektedir (Topçu 1996). Tüberküloz hayvanlarda da gözlenen ve ruminatlarda önemli ekonomik kayıplara yol açan, zoonotik karakterli bir hastalıktır. Tüberküloz tedavisinde temel ilkeler bakterinin duyarlı olduğu en az iki değişik ilacın kullanılması ve hastalığın tekrarlanmasını önlemek için tedavi süresinin yeterli tutulmasıdır (Liebert 2004). Tüberküloz tedavisinde enfeksiyona karşı en güçlü düzeyde etki gösteren ancak toksik etkileri olduğu bilinen INH, PYR, RIF, etambutol ve streptomisin yaygın olarak kullanılmaktadır (Bass 1994).

Kemoterapi dönemi, 1944'de streptomisinin bulunması ile başlamıştır. Başlangıçta çok etkili

sonuçlar alınmasına rağmen kısa bir süre sonra yüksek oranda görülen nüksler nedeniyle dirençli basil kavramı ortaya çıkmıştır. 1950’de INH’in bulunması sonucu ikili ve üçlü ilaç kombinasyonlarıyla, etkili kemoterapi dönemi başlamıştır. ‘Standart Kemoterapi’ olarak adlandırılan bu tedavi rejimlerinin 18-24 ay kullanımı ile hastalığın tedavi edilebildiği anlaşılmıştır. Bu dönemde yeni ilaçlar bulunmuş (1954’te PYR, 1961’de etambutol), intermittant ve ayaktan tedavinin etkinliği anlaşılmış ve 12 aylık tedavi süresinin yeterli olduğu görülmüştür. 1967 yılında RIF’in bulunması ile kısa süreli kemoterapi dönemi başlamıştır (Karagöz 1998, Topçu 1996).

Antitüberküloz tedavisinde kullanılan INH, PYR, RIF grubu ilaçların en önemli yan etkisinin hepatotoksisite olduğu bildirilmektedir (Petri 2001). Panchabhai ve ark (2008) tarafından yapılan çalışmada 31.5 mg/kg INH, 54 mg/kg RIF, 189 mg/kg PYR kombinasyonunu 90 gün süre ile gavaj yolu ile ratlara uygulamış; deney sonunda yapılan histopatolojik değerlendirmede karaciğerde nekroz, dejenerasyon ve fibroz oluşumu görüldüğü bunun yanında yapılan biyokimyasal değerlendirmede serum bilirubin ve karaciğer enzim değerlerinde herhangi bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir. Saraswathy ve ark (2001) tarafından yapılan diğer bir çalışmada 15 mg/kg INH, 20 mg/kg RIF, 35 mg/kg PYR kombinasyonu 6 hafta süre ile intragastrik olarak uygulanmış; deney sonunda yapılan analizlerde antitüberküloz ilaçlarının NADP-sitokrom p-450 redüktaz ve NADP-sitokrom-b5 redüktaz değerlerinde artışa sebep olduğu ve kombinasyonun hepatotoksik olduğu bildirilmiştir.

İzoniazid

INH günümüzde tüberküloz kemoterapisi kombinasyonlarda öncelikle bulunması istenen ilaçlardan birisidir. İstenmeyen etkilerini tolere edebilen hastalarda INH duyarlı tüberküloz basili türlerinin neden olduğu tüm hastalıklarda kullanımı önerilmektedir. Bir ön ilaç olan INH mikobakterinin katalaz-peroksidaz enzimi tarafından aktif bir metabolitine dönüştürülür. Bakteri içine giren INH, orada bir peroksidazın etkisiyle hidrazine ve nikotinik asidin antimetaboliti olarak etki yapan ve bir koenzim A türünün sentezini bozan izonikotinik aside dönüşür (Bruton 2009). Karaciğerde N-asetillenerek, kısmen de izonikotinik aside dönüşerek metabolize edilir, asetil metaboliti inaktif, diğeri ise aktiftir. Asetillenme en önemli biyotransformasyon mekanizmasını oluşturur. INH metabolitlerinden monoacetyl-hydrazine,

N-hydroxilasyona uğrayarak reaktif ve hepatotoksik özelliği olan asetil serbest radikallerini oluşturur (Küçüker, 2005).

İstenmeyen etki olarak genellikle akut hepatoselluler tipte hasar yapar. Bunun yanında kolestatik hasara da neden olduğu bildirilmiştir. İdiosinkrotik tipteki (önceden tahmin edilemeyen) bu reaksiyonlarda metabolitlerinin, özellikle monoasetilhidrazinin (MAH) rol oynadığı öne sürülmektedir. MAH, mikrozomal P-450 enzimleriyle hepatotoksik olan diğer bileşiklere çevrilmektedir (İseman, 2002).

Rifampisin

Tüberküloz tedavisinde önemli bir ilaçtır. Hızlı çoğalan basillere karşı erken bakterisidal etkili ve yarı-dormant basillere karşı da sterilizan etkilidir. Hücre içi ve hücre dışındaki mikobakterilere karşı bakterisid etki gösterir. RIF'ler (RIFampin, RIFabutin, RIFapentin) *Amycolatopsis mediterranei* tarafından üretilen ve yapısal benzerlik gösteren kompleks makrosiklik antibiyotiklerdir (Farr, 2000). Mikobakterilerde ve diğer mikroorganizmalarda DNA'ya bağımlı RNA polimeraz enzimini stabil bir ilaç-enzim kompleksi oluşturarak INHibe eder. Böylece RNA sentezinde zincir oluşumunun başlangıç aşamasını (zincir elangasyonu etkilemez) baskılar. RIF yalnızca holoenzime bağlanır, ancak asıl etki yeri bu kompleks enzim β alt birimidir. Değişik ökaryotik hücrelerden elde edilen nükleer RNA polimerazlar RIFampine bağlanmazlar. Bu nedenle ökaryotik hücrelerde RNA sentezini etkilemezler. İlacın oral uygulamalar için tek başına ve diğer ilaçlarla kombine preparatları vardır (Bruton ve ark, 2009). RIF karaciğer hücrelerinden bilirubin itrahını azaltarak bilirubinemiye yükseltebilir. Hepatoselluler zedelenmeye neden olarak serum transaminazlarının düzeyini yükseltir. Hepatit oluşturabilir. Daha önce karaciğer yetmezliği olan olgularda bu hasarı artırabilir (Kayaalp, 2002). INH ile birlikte kullanıldığında additif toksik etkileşmeyle hepatotoksisite riski artar; ayrıca INH hidrolaz enzimini indükleyerek INH'in toksik metabolitlerinin düzeyini de artırır (İseman, 2002). Tubuler nekroz, interstisyel nefrit, glomerulit, damar içi hemoliz, immunglobulin depolanması, akut renal yetmezlik meydana gelebilir. Nadiren miyelomayı taklit eden hafif zincir nefropatisi de bildirilmiştir (Edward 2004). Hemolitik anemi, şok ve akut renal yetmezliğe neden olabilir (Kayaalp, 2002).

Pirizinamid

Tedavi süresini kısaltma özelliği nedeniyle INH ve RIF'den sonra en önemli üçüncü major ilaçtır. İlk defa 1950'lerde etkisi gösterilmiş olan ilaç yakın zamana kadar minor tedavide kullanılırken artık günümüzde major ilaç şeklinde INH ve RIF'le kombine olarak kullanılmaktadır. PYR etkisini hem çoğalma halindeki, hem de dormant duruma geçmiş mikobakteriler üzerinde gösterir. INH kadar olmasa da tuberkulisid etkisi yüksek olan PYR kombinasyona dâhil edilmediği tedaviler sonrası nüks oranının, PYR'in bulunduğu kombinasyon ile yapılan tedavilere oranla yüksek bulunduğu bildirilmiştir (Küçükler, 2005). PYR tüberkülozun kısa süreli çoklu ilaçlı tedavisinde sıklıkla kullanılan bir ilaçtır. PYR gastrointestinal sistemden iyi emilir ve tüm vücutta geniş bir dağılım gösterir. Vücuttan böbreklerden, ağırlıklı olarak da glomeruler filtrasyon ile atılır. PYR en ciddi yan etkisinin karaciğer hasarı olduğu; belirgin karaciğer hasarının ortaya çıkması durumunda tedavinin durdurulması gerektiği bildirilmektedir (Bass ve ark 1994).

GENOTOKSİSİTE

Fiziksel ya da kimyasal ajanlarla genetik materyalde oluşan hasar genotoksisite olarak adlandırılmaktadır (Kramer 1998). Genotoksik olarak isimlendirilen kimyasallar, yan etkilerini genetik materyalle etkileşime girerek gösterirler (Gallway 1994). Genetik materyalde oluşan hasar, hemen tamir edilmediğinde DNA sekansında değişiklikler oluşur. Eğer değişiklikler ölümcül değilse mutasyon gibi kalıtsal değişiklikler oluşur. Bu değişiklikler gen düzeyinde olabildiği gibi, kromozom aberasyonları şeklinde de olabilmektedir (Kramer, 1998).

Gen düzeyinde toksisitenin ortaya konulmasında komet, mikronükleus, floresan insitu hibridizasyon (FISH) ve RNA ekspresyon analizleri yanında biyolojik sıvılarda malondialdehit (MDA) (Esterbauer ve ark 1991), nitrik oksit (NO) (Liu 1995) ve 4-hidroksinonenal (Esterbauer ve ark, 1991) gibi parametreler kullanılmaktadır.

Komet Tekniği

Tek hücre jel elektroforezi (SCGE) olarak da bilinen komet yöntemi DNA hasarının ölçümü için kullanılan hızlı, basit ve hassas bir yöntemdir (Collins,1997). Bu teknik klinik araştırmalardan genetik toksikoloji ve moleküler epidemiyoloji gibi toksikolojinin pek çok alanında önemli uygulama alanlarına sahiptir (Donnelly, 2001). Diğer genotoksisite testlerine

oranla düşük düzeylerdeki DNA hasarının tayininde daha hassas olması, az sayıda hücrenin yeterli olması, çeşitli doku hücre tiplerinde uygulanabilmesi (standart maus lenfoma L5178Y kültür hücresi, insan lenfosit ve lökositleri, hepatosit, bukkal epitelyum hücresi, sperm hücresi vb) ucuz olması, güvenilir olması, uygulanabilirliğinin kolay olması ve kısa sürede testin tamamlanması, yöntemin avantajlarındandır (Tice 1990, McNamee 2000, Hartmann 2003, Giovanelli 2003).

Komet tekniği ilk olarak, Östling ve Johanson (1984) tarafından geliştirilmiştir. Yöntem temel olarak düşük kaynama noktalı agaroz ile kaplanmış lamlara hücrelerin gömülmesini takiben parçalama tamponu ile muamele edilip elektroforez işleminin gerçekleştirilmesi ve floresans özellikli boyama solüsyonları ile boyanarak floresan mikroskopta değerlendirilmesi esasına dayanır (Collins, 1997). Östling ve Johanson'ın geliştirdikleri teknikte kullanılan lizis şartları nötral pH' da olduğu için DNA baz çiftleri ayrılmadığından sadece çift DNA sarmal kırıklarının belirlenmesi mümkündür. Teknik daha sonra Singh ve arkadaşları tarafından lizis işlemi bazik koşullarda yapılarak değiştirilmiş ve sadece sarmal kırıklarının değil bazik koşullarda belirlenebilen hasarların, DNA çapraz bağlarının ve tamamlanmamış kesip-çıkarma onarımının gerçekleştiği bölgelerin belirlenmesine de olanak sağlamıştır (Singh 1988).

Komet tekniğinde ilk aşamada deterjan ve yüksek tuz konsantrasyonları ile hücrelerin zarları patlatılır, protein bağları çözülür ve DNA açığa çıkarılır. Böylece DNA'nın negatif yüklü kırık uçları hasarlı DNA elektroforez sırasında pozitif yüklü uca yani anoda doğru göç ederler. Bunun sonucunda da kuyruklu yıldız görünümü (komet) oluşur. Hasarsız DNA'ya sahip hücreler değişmeden kalır. Elektroforez işlemi, düşük elektrik akımında yapılır; lamalar akridin oranj, etidyum bromür gibi floresan boyalar ile boyanır. Floresan boyama sonucunda hasarlı, az hasarlı ve hasarsız DNA'ya sahip hücreler, bas bölgesinde hare ile floresan boyanmanın çapına göre değerlendirilir. DNA göçü hem DNA'nın büyüklüğüne hem de DNA'daki kırık sayısına bağlıdır. Kuyruk uzunluğu hasara bağlı olarak artar ancak elektroforez şartlarına bağlı olarak en yüksek düzeye ulaşır. Düşük hasar düzeylerinde DNA'da göçten çok yayılma görülürken, kırık sayısının artmasıyla DNA parçaları kuyruğa doğru göç etmeye başlar ve çok hasarlı hücrelerde (apoptotik) baş ve kuyruk tamamen ayrılmıştır (Duty 2002). Kuyruktaki floresan şiddetinin hücrenin baş tarafına göre karşılaştırılmasıyla sarmal kırıkların sayısı hakkında bilgi edinilebilir (Morris 2002).

Hasarsız hücrelerde çekirdek parlaktır ve floresan şiddeti baş tarafta yoğunur, ancak DNA'da kırıklar söz konusu olduğunda floresan çekirdekten anoda doğru yayılarak kuyrukta şiddetlenir. Komet tekniği, hasarlı hücrelerde floresanın baş taraftan kuyruğa geçişini yansıttığından DNA hasarının kantitatif olarak belirlenmesinde kuyruk moment, kuyruktaki DNA yüzdesi ve kuyruk uzunluğu önemli parametrelerdir (Bauch 1999).

Mikronükleus Tekniği

Laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan genotoksisite çalışmalarında DNA düzeyinde oluşan hasarın tesbiti için kullanılan yöntemlerden birisi de mikronükleus tekniğidir (Recio 2010). Mikronükleuslar (MN) hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır. MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Zijno 1994). Mikronükleus mitotik hücrelerdeki kromozom fragmentlerinden ya da anafazda geç kalarak her 2 kardeş çekirdeğe dahil olamayan kromozomlardan kaynaklanır. Mikronükleusun içerdiği kromozomal fragmentler; öncelikli iç ipliği kinetokor ya da diğer mitotik aparatların fonksiyon kaybından, kromozom alt birimlerinde oluşan hasarlardan, hücresel fizyolojideki değişimlerden ve mekanik parçalanmalardan kaynaklanmaktadır. Mikronükleus içeren hücre sayısındaki artış, maruz kalınan klastojenik (DNA'yı hedefler, kromozom kırılmalarına sebep olur) veya anöjenik (kromozom sayısının değişimine etkilidir, genellikle DNA'yı hedef almaz) ajanların genotoksik etkilerini yansıtan bir parametredir (Fenech 2000).

MN testi 1950'lerde bitki hücrelerinde kromozom hasarının ölçülmesinde 1970'lerde hayvan lenfositlerinde kimyasal karsinojenleri belirlemeye yönelik bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır (Widel 2001, Jagetia 2001). Mikronükleus tekniğinde küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan Cytochalasin-B (Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanmaktadır. Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cyt-B ilavesiyle, çekirdek bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücreler kolaylıkla tanınarak ayrılabilen ve MN bulunduran hücrelerin oranı saptanabilmektedir. İncelenen alanda, kültür süresi içinde ikinci bölünmesini tamamlamış 4 çekirdekli hücrelere de rastlanmaktadır (Demirel, 2002).

Genotoksisite ve Lipid peroksidasyon

Genel bir tanımlama ile lipid peroksidasyon; membran lipidlerinin oksidatif hasarla bozulmasıdır. Hücre membranındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerce kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluşturur. Organizmada serbest radikallerce oluşturulan lipid peroksidasyonun belirlenmesi amacıyla biyolojik örneklerde lipidlerin peroksidasyonu sonucu oluşan son ürünlerin (MDA gibi), kendisi de bir serbest radikal olan NO düzeylerinin ölçümüyle yapılabilmektedir (Altınışik 2001, Chessman 1993, Cross 2007, Gutteridge 1995, Halliwell 2001).

İlaç ve kimyasal maddelerin toksik etki mekanizmalarından birisi de serbest radikal oluşumunu tetiklemeleri ve dolayısıyla organizmada lipid peroksidasyona yol açmalarıdır. Lipid peroksidasyonun son ürünü olarak açığa çıkan malondialdehit (MDA) (Esterbauer ve ark 1991) ve nitrik oksit (NO) (Liu, 1995)'nun gen hasarına da yol açtığı bilinmektedir. Nitrik oksitten kaynaklanan reaktif türler DNA ve proteinlerin içerdiği nükleofil gruplar tepkimeye girerek bu makromoleküllerin yapılarında ve neticede fonksiyonlarında değişmelere neden olurlar. Reaktif nitrojen oksit türleri DNA'da zincir kırılmaları ve baz modifikasyonlarına neden olabildiklerinden doğrudan DNA aktivitesi üzerinde etkili olabilirler (Kılınç 2003). 4-hidroksi nonenal de lipid peroksidasyon kaynaklı gen hasarının belirlenmesinde kullanılan bir parametredir (Esterbauer ve ark, 1991).

GEREÇ VE YÖNTEM

Deneyisel Çalışma

Çalışma E.Ü. Yerel Etik Kurulundan (EÜ HADYEK) alınan onay sonrası etik kurul yönergesine uygun bir şekilde yürütüldü. Çalışmada 40 adet 1.5 aylık Wistar Albino ırkı erkek rat kullanıldı; kontrol, INH, PYR, RIF ve karışım (INH+PYR+ RIF) grubu olmak üzere 5 grup oluşturuldu. Kontrol grubundaki ratlara (grup 1) 90 gün boyunca gavajla mideye izotonik sodyum klorür çözeltisi verildi. Deneme grubundaki ratlara 90 gün boyunca izotonik sodyum klorür çözeltisi içinde sırasıyla 31.5 mg/kg INH, 189 mg/kg PYR, 54 mg/ kg RIF ve aynı dozlarda INH, PYR, RIF karışımı gavajla mideye uygulandı. Çalışma süresi sonunda ratlardan

ketamin-ksilazin anestezisi altında kalpten heparinli ve kuru tüplere kan örnekleri alındı. Kan örnekleri alınan ratların servikal dislokasyonu takiben dokuları alındı.

Heparinli tüplere alınan kan örneklerinin bir kısmı mikronükleus ve komet analizleri için alındı ve aynı gün komet analizleri ve MN için kan numunelerinin ekim işlemleri yapıldı. Kalan kan örnekleri 3000 devirde 10 dakika sanRIFüj edilerek serum ve plazmalarına ayrıldı. Serum ve plazmalar analiz zamanına kadar – 80 C’lik derin dondurucuda muhafaza edildi. Doku örneklerinin bir kısmı komet tekniği için taze olarak alındı ve gün içinde komet analizleri yapıldı. Dokuların kalan kısmı lipid peroksidasyon analizlerinde kullanılmak üzere – 80 C’lik derin dondurucuya alındı.

Biyokimyasal analizlerde kullanılacak dokulara 1:5 oranında pH 7 fosfat tampon katıldı ve dokular soğuk ortamda mekanik homojenizatörde (20 000 devirde 30 sn) homojenize edildi. Homojenatlar soğutmalı yüksek devirli sanRIFüjde (20 000 devirde 1 saat) sanRIFüj edildi ve süpernatantlar endorf tüplerine alındı. Numunelerde MDA ve NO analizleri yapıldı.

Genotoksisite testleri

Komet deneyi öncesinde mikroskop lamaları Ca ve Mg ari DPBS ile hazırlanan % 1’lik normal kaynama noktalı agar (NMP) çözeltisi ile kaplandı ve oda ısısında bekletilerek agar tabakasının jelleşmesi sağlandı. Alınan örneklerde komet çalışması Tice ve ark (2000)’ınca belirtilen yöntem kullanılarak yapıldı. Yönteme göre deney öncesi hazırlanan % 1’lik NMP çözeltisi kaplı lamlara 75 µL % 0.5’lik düşük kaynama noktalı (LMP) agar çözeltisi ile 20µL’lik tam kan ve homojenize edilmiş karaciğer ve böbrek doku örnekleri karıştırılarak eklendi. Lamalar + 4 °C’de 10 dk. bekletilerek agarın jelleşmesi sağlandı. Lamaların üzerine 75 µL % 0.5’lik düşük kaynama noktalı (LMP) agar çözeltisi ile ikinci tabaka oluşturuldu. İkinci kat agarın jelleşmesi sağlandıktan sonra lamalar 1 saat süreyle + 4 °C’de soğutulmuş lizis çözeltisinde (2.5 m NaCl, 100 mM EDTA, % 1triton-x ve % 10 DMSO bulunan, pH 10) bekletilerek hücre membranlarının erimesi ve hücre çekirdeklerinin açığa çıkması sağlandı. Lize edilmiş lamalar elektroforez tamponunda (pH 13 ,300 mM NaOH ve 1 mM EDTA) 25 dakika bekletildikten sonra 20 dk süreyle 25 volt ve 300 mA’de elektroforez işlemine tabii tutuldu. İşlemin sonunda lamalar karanlık ortamda 5’er dk süreyle nötralizasyon tamponu (pH 7.5 , 0.4 M tris-HCl) ile üç set muamele edildi. Nötralizasyon sonrası metanolde 5 dk bekletilen örnekler oda ısısında kurutuldu ve boyama işlemine geçildi. Etidyum bromide ile

boyanan preparatlar Leica DM-1000 floresan mikroskop altında bilgisayar destekli komet görüntü analiz programı (KOMET Assay IV, Perceptive Instruments Ltd., UK) kullanılarak incelendi. Her numune için hazırlanan prepratlarda 100 komet sayıldı ve sonuçlar kafa yoğunluğu, kuyruk kuyruk yoğunluğu kuyruk göçü parametreleri yönünden istatistiksel olarak değerlendirildi.

MN tekniği uygulanacak örneklerin işlenmesi Fenech ve ark. (2000) bildirdiği yöntemle yapıldı. Heparinli enjektöre alınmış kan örnekleri RPMI 1640 medyum içerisine (%20 Fetal bovine serum, % 2 fitohemaglutinin, 1 ml penisilin-streptomisin) steril kabin içerisinde 0,5 ml olacak şekilde ekildi ve 37 °C lik CO₂'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Ekilen numunelere ekimin 21. saatinde 50 µl Mitomisin-C, 42. saatte ise 75µl Sitohalozin-B ilave edildi ve 62. saatte çıkarım aşaması başlatıldı. Çıkarım prosedüründe 1000 rpm de 8 dakika sanRIFüj edilen örneklerin süpernatant kısmı atılarak hipotonik KCL çözeltisi (0,075 M) eklendi. 2000 rpm de 3 dakika sanRIFüj edilen örneklerin süpernatant kısım atılarak 5 ml fiksatif ilave edildi ve preparasyon aşamasına kadar -20 °C de muhafaza edildi. Preparasyon aşamasında 2000 rpm de 3 dakika sanRIFüj edilen örneklerin süpernatant kısmı atılarak fiksatif (6 ml metanol + 1 ml asetik asit) ilave edildi ve preparatlar hazırlandı. Hazırlanan preparatlar giemza boyası ile boyandı ve ışık mikroskobu altında 1000 adet binükleer hücre sayılarak sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Biyokimyasal Analizler

Plazma ve doku örneklerinde MDA ve NO analizleri yapıldı. İstatistiksel analizler tek yönlü varyans analizi ve ardından Duncan testi ile yapıldı. Sonuçlar aritmetik ortalama±standart sapma şeklinde verildi.

MDA tayinlerinde Yoshioka ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem (1979) kullanıldı (Tablo 1). Metodun prensibi iki molekül TBA'nın bir molekül MDA ile asit ortamda sitokiyometrik olarak reaksiyona girerek pembe renkli bir ürün oluşturması esasına dayanır. Oluşan bu bileşik 532–535 nm'de maksimum absorbands verir.

Tablo 1. MDA analizi

Kullanılan maddeler	Kör	Numune
	Vida kapaklı cam tüpler kullanıldı	
Numune	--	0.5 ml
TCAA çözeltisi	3.0 ml	2.5 ml
TBA çözeltisi	1.0 ml	1.0 ml
Tüpler 30 sn vortekslendi ve kapakları kapatıldı.		
Tüpler 30 dakika 90 °C' lik su banyosunda tutuldu, süre sonunda tüpler buzlu soğuk suda soğutuldu.		
n- Butanol	4.0 ml	4.0 ml
Tüpler 3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi.		
Üst tabaka (n-butanol) kuvartz küvete alındı ve 535 nm'de köre karşı okundu.		
Değerler 1.1.3.3. tetraetoksipropan çözeltisi ile hazırlanan kalibrasyonlara göre plazma örneklerinde nmol/ml, doku örneklerinde ise nmol/mg protein şeklinde hesaplandı.		

NO tayinide Griess reaksiyonu olarak bilinen diazotizasyon yöntemi (Tracey, 1995) kullanıldı (Tablo 2). Griess reaksiyonu, nitrit iyonlarına duyarlı olduğundan, ortamdaki nitratın nitrite indirgenmesi in vivo olarak oluşan NO'nun gerçeğe yakın miktarlarda ölçümünü sağlar. Bu yöntemle göre NO ve sülfanilamidin asit ortamda N(1-naftil) etilendiamin ile reaksiyon vererek pembe renkli kompleks oluşturması ve bunun 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbansın ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu reaksiyon sadece NO_2^- ile oluşur. NO oksidasyon ürünleri olan NO_2^- ve NO_3^- ise karışım halde bulunur, bu nedenle reaksiyon ortamına nitrat redüktaz ilave edilerek NO_3^- , NO_2^- ye dönüştürülür.

Tablo 2. NO aktivitesi tayini için çalışma şeması

Kullanılan maddeler	Stok çözeltiler	Alınan miktar (μl)
Plazma, fosfat tamponu ya da standart	-	18
Distile su	-	132
Fosfat tamponu	pH 7.5, 0.33 M	60
NADPH	0.86 mM	30
FAD	0.11 mM	30
Nitrat redüktaz	1 U/ml	30
Karanlıkta, oda ısısında 1 saat inkübe edildi.		
Griess reaktifi	-	600
Toplam hacim	-	900
10 dk oda ısısında inkübasyonun ardından numunelerin 540 nm'deki absorbansı köre karşı okundu.		
Sonuçlar NaNO ₃ standart çözeltileri ile hazırlanan kalibrasyona göre plazma örneklerinde nmol/ml, doku örneklerinde ise nmol/mg protein olarak hesaplandı.		

BULGULAR

Komet analizlerinde kontrol grubuna göre deneme grupları değerlendirildiğinde tam kan örneklerinde INH, RIF ve karışım gruplarında kafa yoğunluğunda azalma ve kuyruk yoğunluğunda artış, kuyruk göçünde ise tüm deneme gruplarında artış; karaciğer dokusunda PYR ve karışım verilen gruplarda baş yoğunluğunda azalma, kuyruk yoğunluğunda artış, kuyruk göçü değerlerinde ise PYR, RIF ve karışım gruplarında yükselme; böbrek dokusunda INH, RIF ve karışım verilen gruplarda baş yoğunluğunda azalma kuyruk yoğunluğunda artış, karışım grubu kuyruk göçü değerinde ise yükselmenin olduğu belirlendi ($p<0,001$) (Tablo 1, 2, 3).

Tablo1. Kan örneklerine ait komet analizi sonuçları

	Grup	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	Min	Max	Önem Kontrolü
Kafa Yoğunluğu	KONTROL	99,00 $\pm$ 0,15 ^c	98,25	99,46	$p<0,001$
	INH	97,60 $\pm$ 0,23 ^a	96,34	98,29	
	PYR	98,8 $\pm$ 0,18 ^{bc}	97,85	99,52	
	RIF	97,97 $\pm$ 0,24 ^{ab}	96,63	98,69	
	INH+PYR+RIF	97,57 $\pm$ 0,26 ^a	96,31	98,47	
Kuyruk Yoğunluğu	KONTROL	1,00 $\pm$ 0,15 ^b	0,54	1,75	$p<0,001$
	INH	2,63 $\pm$ 0,25 ^a	1,88	3,90	
	PYR	1,66 $\pm$ 0,24 ^b	0,81	3,04	
	RIF	2,23 $\pm$ 0,25 ^a	1,41	3,55	
	INH+PYR+RIF	2,65 $\pm$ 0,26 ^a	1,60	3,85	
Kuyruk Göçü	KONTROL	0,86 $\pm$ 0,21 ^b	0,38	1,89	$p<0,001$
	INH	2,87 $\pm$ 0,15 ^a	2,18	3,36	
	PYR	2,60 $\pm$ 0,17 ^a	1,77	3,42	
	RIF	2,76 $\pm$ 0,13 ^a	1,99	3,25	
	INH+PYR+RIF	3,16 $\pm$ 0,10 ^a	2,67	3,61	

Üst İndis a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

Tablo2. Karaciğer dokusuna ait komet analizi sonuçları

	Grup	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	Min	Max	Önem Kontrolü
Kafa Yoğunluğu	KONTROL	97,67±0,15 ^a	97,15	98,25	p<0,001
	INH	98,99±0,17 ^a	98,38	99,83	
	PYR	92,96±0,83 ^b	88,39	96,33	
	RIF	98,69±0,29 ^a	97,38	99,61	
	INH+PYR+RIF	91,58±0,23 ^b	90,35	92,29	
Kuyruk Yoğunluğu	KONTROL	2,33±0,15 ^a	1,75	2,85	p<0,001
	INH	1,82±0,31 ^a	0,29	3,03	
	PYR	7,22±0,80 ^b	3,93	11,61	
	RIF	1,79±0,32 ^a	0,64	3,14	
	INH+PYR+RIF	8,57±0,20 ^b	7,95	9,65	
Kuyruk Göçü	KONTROL	2,03±0,28 ^a	0,96	3,30	p<0,001
	INH	3,09±0,29 ^{ab}	2,19	4,12	
	PYR	5,38±0,42 ^c	3,97	7,35	
	RIF	3,56±0,21 ^b	2,86	4,74	
	INH+PYR+RIF	7,35±0,50 ^d	4,90	9,22	

Üst İndis a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

Tablo3. Böbrek dokusuna ait komet analizi sonuçları

	Grup	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	Min	Max	Önem Kontrolü
Kafa Yoğunluğu	KONTROL	99,13 ± 0,13 ^c	98,53	99,50	p<0,001
	INH	86,53 ± 1,76 ^a	77,15	93,28	
	PYR	99,21 ± 0,15 ^c	98,42	99,67	
	RIF	92,31 ± 0,93 ^b	89,56	97,65	
	INH+PYR+RIF	88,74 ± 1,65 ^{ab}	78,62	92,95	
Kuyruk Yoğunluğu	KONTROL	0,87 ± 0,13 ^b	0,50	1,47	p<0,001
	INH	13,63 ± 1,73 ^a	7,07	22,85	
	PYR	1,87 ± 0,38 ^b	0,74	4,17	
	RIF	7,95 ± 0,95 ^c	2,47	10,65	
	INH+PYR+RIF	16,89 ± 2,18 ^a	9,79	30,55	
Kuyruk Göçü	KONTROL	0,35 ± 0,02 ^a	0,28	0,44	p<0,001
	INH	5,72 ± 0,74 ^a	3,32	10,19	
	PYR	2,23 ± 0,34 ^a	1,41	4,41	
	RIF	4,80 ± 0,39 ^a	3,66	7,02	
	INH+PYR+RIF	17,58 ± 3,08 ^b	8,75	33,33	

Üst İndis a,b,c,d: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

Tam kanda yapılan mikronükleus analizinde mikronükleus sayısında kontrol grubuna göre karışım grubu ve özellikle de RIF verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı bir yükselmenin olduğu gözlemlendi ($p<0,001$) (Tablo 4).

Tablo 4. Kan ve doku örneklerinde mikronükleus analizi sonuçları

	Grup	Ortalama	Medyan	Yüzdelik (%25-%75)	Önem Kontrolü (KruskalWallis test)
MN	KONTROL	5,0	5,0 ^a	4,0-6,5	P<0,001
	INH	5,5	4,0 ^a	3,0-9,3	
	PYR	4,3	4,0 ^a	2,0-4,0	
	RIF	15,0	14,5 ^c	11,3-19,5	
	INH+PYR+RIF	9,0	8,5 ^b	8,0-10,5	

Üst İndis a,b,c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir ($p<0,005$).

Biyokimyasal parametreler incelendiğinde kontrol grubuna göre RIF, INH ve karışım grupları plazma, karaciğer, böbrek MDA düzeylerinde anlamlı yükselmenin olduğu ($p<0,05$) (Tablo 5); kontrol grubuna göre kıyaslandığında diğer grupların plazma NO düzeylerinin yükseldiği, karaciğer ve böbrek NO düzeylerinde ise PYR haricindeki gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı bir artışın olduğu ($p<0,05$) gözlemlendi (Tablo 6).

Tablo 5. Plazma, karaciğer ve böbrek numunelerinde MDA düzeyleri

Parametre	MDAplazma (nmol/ml)	MDkc (nmol/mg-protein)	MDAböb (nmol/mg-protein)
KONTROL	4,650±1,098 ^a	0,637±0,187 ^a	1,933±0,511 ^a
INH	7,693±1,411 ^{bc}	2,315±0,056 ^b	6,644±1,704 ^c
PYR	5,336±0,693 ^a	0,945±0,293 ^a	1,979±0,714 ^a
RIF	6,829±0,881 ^b	1,748±0,445 ^b	4,678±1,154 ^b
INH+PYR+RIF	8,557±1,303 ^c	3,002±1,032 ^c	8,336±2,193 ^d

Üst İndis a,b,c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir ($p<0,05$).

Tablo 6. Plazma, karaciğer ve böbrek numunelerinde NO düzeyleri

Parametre	MDAplazma (nmol/ml)	MDkc (nmol/mg-protein)	MDAböb (nmol/mg-protein)
KONTROL	0,101±0,014 ^a	12,157±4,419 ^a	13,314±2,010 ^a
INH	0,193±0,012 ^c	35,569±9,498 ^{bc}	47,764±12,610 ^b
PYR	0,161±0,052 ^b	13,339±1,928 ^a	22,309±2,593 ^a
RIF	0,158±0,013 ^b	32,561±6,252 ^b	39,064±13,747 ^b
INH+PYR+RIF	0,223±0,017 ^d	40,338±7,5136 ^c	59,261±15,984 ^c

Üst İndis a,b,c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir ($p<0,05$).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünyada enfeksiyon hastalıklarına bağlı ölümlerde tüberküloz halen en önemli neden olarak güncelliğini korumaktadır. *Mycobacterium avium*'un yavaş çoğalması, hücre duvarını pek çok ilacın geçememesi ve direnç gelişiminin yaygın olması; hastanın tedaviye uyumu ve kullanılan ilaçların toksik etkileri gibi nedenler bu hastalıkların kronik bir seyir izlemesine ve tedavinin uzun sürmesine sebep olmaktadır. Bu nedenle tedavide genellikle en az iki değişik ilacın uzun süreli kullanılması gerekmektedir. Tüberküloz tedavisinde isoniazid, RIF, PRY, etambutol ve streptomisin olduğu kombinasyonlar sıklıkla kullanılmakla birlikte, bu ilaçlarla yapılan tedavi rejimlerinde başta hepatotoksik ve ototoksik etkiler olmak üzere pek çok istenmeyen etkilerin oluşabildiği de bildirilmektedir (Petri, 2001). Ancak tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçların ve ilaç kombinasyonlarının gen düzeyinde etkilerine yönelik bilgiler sınırlıdır.

Anitha ve ark (1994) PRY nin farelerde genotoksik etkilerini araştırdıkları çalışmada PYRin zayıf genotoksik etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada PYR verilen grupta kan ve böbrek dokusu komet sonuçlarında kontrol grubuna göre önemli bir değişim gözlenmezken, PYRin karaciğer dokusunda DNA hasarı oluşturduğu gözlenmiştir. Çalışma sonuçları genel anlamda Anita ve ark (1994) bulgularını desteklemektedir. Diğer çalışmadan farklı olarak PYRin karaciğerde komet oluşumunu artırması, ilacın verilme süresinin uzunluğu ile ilişkilendirilebilir.

Yue ve ark (2009) 21 gün boyunca INH uygulanan ratlarda serum ALT ve AST düzeyinde yükselme, CYP2E1 aktivitesinde artış ve GSH-s-transferaz aktivitesinde azalma ile birlikte karaciğer kesitlerindeki histopatolojik incelemelerde serbest radikal kaynaklı doku hasarı ve reaktif moleküllerin DNA'ya bağlanma kapasitesinde artışın olduğunu bildirmişlerdir. INH'in karaciğerdeki toksik etkilerinin ilacın biyotransformasyonu sonucu oluşan hepatotoksik metabolitlerle (asetilasyonu sonucu oluşan asetil INH, hidrolizi ile şekillenen izonikotinik asit ve asetilhidrazin, oluşan asetilhidrazinin asetilasyonu veya mikrozomal oksidasyonu ile şekillenen diasetilhidrazin) ilişkili olduğu bildirilmektedir (Baldan ve ark 2007; Timbrell ve ark, 1980). Bu çalışmada INH'in kan ve böbrekte komet oluşumunu artırdığı; plazma, böbrek ve karaciğer MDA ve NO düzeylerini yükselttiği gözlenmektedir. Çalışma sonuçları diğer çalışmalarda olduğu gibi INH'in hepatotoksik etkilerinin karaciğerde oluşan metabolitler ve

serbest radikallerle ilişkili olabileceğini ortaya koymaktadır. INH'nin böbrek ve kanda komet oluşumunu tetikleyici etkisi, ilacın bu dokularda daha ziyade alkali labil gen bölgelerinde hasar oluşturuucu etkisi olduğunu düşündürmektedir.

Aboul-Ela (1995) farelere 80-310 mg/kg arasında değişen dozlarda ve 1-7 gün süresince verilen RIF'in doza ve verilme süresine bağlı olarak kardeş kromatid değişimi ve kromozom aberasyonu sıklığını artırdığını bildirmiştir. Bizim çalışmamızda ise RIF'in plazma, karaciğer ve böbrek MDA ve NO düzeylerini yükselttiği; mikronükleus ve tüm dokularda komet oluşumunu artırdığı görülmektedir. RIF'in güçlü bir mikronükleus indükleyicisi olduğu bilinmektedir. Attia ve ark (2007) RIF'in ratlarda 160 ve 320 mg/kg dozlarında eritrosit mikronükleus oluşma sıklığını artırdığını bildirmişler, bu durumu RIF'in lipid peroksidatif etkileri ile ilişkilendirmişlerdir. Bu çalışma sonuçları da RIF'in lipid peroksidatif ve genotoksik etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

Antitüberküloz ilaç ve karışımlarının lipid peroksidasyon üzerine etkilerine yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Panchabhai ve ark (2008) tarafından yapılan çalışmada 31.5 mg/kg INH, 54 mg/kg RIF, 189 mg/kg PRY kombinasyonunu 90 gün süre ile gavaj yolu ile ratlara uygulamış; deney sonunda yapılan histopatolojik değerlendirmede karaciğerde nekroz, dejenerasyon ve fibroz oluşumu görüldüğü, bunun yanında yapılan biyokimyasal değerlendirmede serum bilirubin ve karaciğer enzim değerlerinde herhangi bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir. Sarawathy ve ark (2001) tarafından yapılan çalışmada ratlara ağızdan 6 hafta süre ile verilen INH+RIF+PRY kombinasyonunun NADP-sitokrom p-450 redüktaz ve NADP-sitokrom-b5 redüktaz değerlerinde artışa sebep olduğunu, karışımın muhtemelen CYP-450 kaynaklı serbest radikal üretimini artışıyla ilişkili olarak hepatotoksisiteye yol açtığını bildirmişlerdir. Tasduq ve ark (2007) ratlara 90 gün boyunca ağızdan INH, RIF, PRY ve bunların karışımlarının verildiği çalışmalarında karaciğer GSH düzeyi ile GSH-Px ve CAT aktivitelerinde azalma, CYP2E1 aktivitesi ile MDA, ALT, ALP ve bilirubin düzeylerinde yükselmeye neden olduğunu; karaciğerdeki oksidan/antioksidan savunma sisteminin oksidanlar lehine bozulduğunu; oksidatif hasar kaynaklı hepatotoksik etkinin en fazla RIF+INH uygulanan grupta gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Eminzade ve ark (2008) ratlara 14 gün boyunca ağızdan verilen INH, RIF, PYR ve bunların karışımlarının karaciğer üzerine etkilerini inceledikleri çalışmada INH-RIF ve INH-RIF-PYR verilen gruplarda hepatotoksisitenin oluştuğunu, PYR'nin INH-RIF kaynaklı hepatotoksisiteyi şiddetlendirici

etkisinin bulunmadığını bildirmişlerdir. Çalışmada hepatotoksisitenin ilaçların CYP2E1 tarafından aktive edilmesi, ilaç ve CYP2E1 aktivasyonu kaynaklı serbest radikal ve reaktif ilaç metabolitlerinin oluşumu, oksidan-antioksidan dengenin bozulması, hücre membranlarının peroksidasyonu sonucu hücrelerin bütünlüğünün bozulması ve karaciğer fonksiyonlarının yavaşlaması ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Pari ve Kumar (2002) ratlarda INH, RIF ve PRY karışımının lipid peroksit oluşumunu artırdığını; vitamin C, GSH ve redükte GSH düzeyleri ile SOD, CAT, GSH-Px ve GSH-s-transferaz aktivitelerinde azalmaya yol açtığını bildirmişlerdir.

Genel bir tanımlama ile lipid peroksidasyon membran lipidlerinin oksidatif hasarla bozulmasıdır. Hücre membranındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerce kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluşturur. Organizmada serbest radikallerce oluşturulan lipid peroksidasyonun belirlenmesi amacıyla biyolojik örneklerde lipidlerin peroksidasyonu sonucu oluşan son ürünlerin (MDA gibi) ve kendisi de bir serbest radikal olan NO düzeylerinin ölçümüyle yapılabilmektedir (Cross 2007, Gutteridge 1995, Halliwell 2001). Bu çalışmada da lipid peroksidasyonun belirlenmesinde MDA ve NO ölçümlerinden yararlanılmıştır. Çalışma sonucunda 90 gün boyunca ratlara verilen INH+PYR+RIF karışımının plazma, karaciğer ve böbrek dokularında MDA ve NO düzeylerinde yükselmeye neden olduğu; lipid peroksidasyonun karışım verilen grupta bireysel ilaç verilen gruplara göre daha şiddetli seğrettiği görülmektedir. Çalışma sonuçları diğer çalışmalarla uyumlu olarak antitüberküloz ilaç karışımlarının hepatotoksik ve nefrotoksik etkileri olduğunu göstermektedir.

Antitüberküloz ilaç karışımlarının in vivo genotoksik etkilerine yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Shayakhmetova ve ark (2012) erkek ratlara 60 gün boyunca ağızdan etambutol, RIF, INH ve PYR karışımı verilmesini takiben testis dokusu ve sperm MDA düzeylerinde yükselme ve GSH düzeyinde azalmanın gözlemlendiğini, ayrıca spermde DNA kırılmaları olduğunu bildirmişler, sonuç olarak antitüberküloz ilaç karışımlarının direk ya da indirekt mekanizmalarla spermde genotoksik etkilere yol açtığını ve bu durumun reproduktivitede bozulmalara yol açabileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada INH+PYR+RIF karışımının mikronükleus ve komet oluşumunu önemli derecede yükselttiği ve değişimlerin ilaç karışımı verilen gruplarda daha belirgin olduğu görülmektedir. Karışım gruplarında MDA ve NO düzeyindeki yükselmelerle birlikte, komet ve mikronükleus oluşum sıklığını artırması,

90 gün boyunca ratlara uygulanan INH+PYR+RIFin serbest radikal kaynaklı genotoksik etkilere yol açtığını düşündürmektedir.

Lipid peroksidasyonun son ürünü olarak açığa çıkan malondialdehit (MDA) (Esterbauer ve ark 1991) ve nitrik oksit (NO) (Liu, 1995)'nin gen hasarına da yol açtığı bilinmektedir. Bu çalışmada gruplardaki MDA ve NO düzeylerindeki yükselme ile birlikte kan, karaciğer ve böbrekte belirlenen değişik derecedeki gen hasarının MDA ve NO kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir.

İlaç karışımlarının toksik etkilerinin ortaya çıkmasında, ilaçların birbirinin farmakokinetik özelliklerini değiştirmesinin önemli olduğu bildirilmektedir (Farmakoloji kitapları). Antitüberküloz ilaçların birbirlerinin farmakokinetiklerini değiştirdikleri bilinmektedir. Baldan ve ark (2007) ratlarda tekrarlı PYR uygulamalarının INH'in dağılım hacmi, atılma yarı ömrü ve klerens değerlerinde artışa neden olduğunu, eğrinin altında kalan alanı azalttığını; tekrarlı RIF uygulamalarının INH'in klerens değerini yükselttiği ve eğrinin altında kalan hacmini azalttığını; INH-RIF-PYR karışımının verilmesi durumunda ise INH'in klerens değerinin yükseldiği ve eğri altında kalan alanın azaldığını; sonuç olarak INH'in klerensindeki artışın hepatotoksik metabolitlerin oluşumunu artırabileceği bildirilmiştir. Rosa ve ark (2007) da ratlarda PYR ve RIFin INH metabolizması üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmada, RIF, PYR ve RIF+PYR nin INH ın eğrinin altında kalan alanını azalttığını; tekrarlı PYR uygulamasının hidrazinin AUC değerini artırdığını, asetilhidrazinin AUC değerini ise azalttığını; sonuç olarak INH metabolizmasındaki hızlanmanın hidrazin üretimini artırabileceği ve ilaç kaynaklı hepatotoksisiteyi şiddetlendirebileceğini belirtmişlerdir. Tüberkülozun başarılı olarak tedavisi INH, RIF ve PYRin birlikte kullanılması ile gerçekleşmektedir. Ancak bu durumun hepatotoksik etkileri artırabileceği de bildirilmektedir. Karışım tedavilerinde PYRin hepatotoksik etkileri şiddetlendirdiğine dair bir bulgu bulunmamakla birlikte, RIF'in özellikle CYP3A ve CYP2E1 olmak üzere çeşitli CYP enzimlerinde indüksiyonu yaptığı bilinmektedir. Bu nedenle bu enzimlerdeki indüksiyon INH kaynaklı serbest radikal üretimini tetikleyebileceği için, hepatotoksik etkileri güçlendirebilir (Douglas ve Mcleod, 1999; Nishimura ve ark, 2004; Sharma, 2004). Bu çalışmada karışım gruplarındaki lipid peroksidatif ve genotoksik etkilerin daha şiddetli seğretmesi, PYR ve RIFin INH'in farmakokinetiğini değiştirmesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak 90 gün boyunca 31.5 mg/kg INH, 189 mg/kg PYR, 54 mg/ kg RIF ve aynı dozlarda INH+RIF+PYR karışımı verilen ratlarda, belirtilen ilaç ve ilaç karışımının değişik

derecelerde hepatotoksik, nefrotoksik ve genotoksik etkileri olduğunu; bu etkilerin ilaçların farmakokinetiklerindeki değişimlerle oluşturdukları zararlı metabolitler ve serbest radikal üretimi ile ilişkili olabileceği kanaatine varıldı.

KAYNAKLAR

- 1- Altınışik M.(2001). Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar, AMU Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı semineri, <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf>.
- 2- Anitha B, Sudha S, Gopinath PM, Durairaj G. (1994). Genotoxicity evaluation of pyrazinamide in mice Mutat Res. Apr;321(1-2):1-5.
- 3- Atay T.(1997). Akciğer tüberkülozu olan hastaların tedavilerini uygulama durumları. T.C. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Hemşirelik Programı Yayınlanmamış Bilim Uzmanlığı Tezi. Ankara.
- 4- Attia SM. (2007). Chromosomal composition of micronuclei in mouse bone marrow treated with RIFampicin and nicotine, analyzed by multicolor fluorescence in situ hybridization with pancentromeric DNA probe. Toxicology. 3;235(1-2):112-8.
- 5- Akyol AD. (1994).Tüberküloz ve hemşirelik bakımı. Ege Üniversitesi Hemşirelik Yüksek Okulu Dergisi 10: 85-94.
- 6- Arpaz S, Keskin S, Kıter G, Sezgin N, Uçan ES.(2001). Tüberkülozlu Çocuk Hastalarımızın Geriye Dönük Olarak Değerlendirilmesi.Torak Dergisi 2(1):27-34.
- 7- Aydın SA, Keles O. (2009). Evaluation of Flunixin Meglumine genotoxicity using in vitro and in vivo/in vitro micronucleus test. Acta Veterinaria (Beograd), Vol.59, No. 5-6, 601-611.
- 8- Bass JB, Farer LS, Hopewell PC, et. al. (1994).Treatment of tuberculosis and tuberculosis imfections in adults and children. American Thoracic Society and The Centers for Disease Control and Prevention. Am. J.Respir. Crit. Care. Med. ,149:1359-1374.
- 9- Bauch T, Bocker W, Mallek U, Muller WU, Streffer C. (1999). Optimization and standardization of the "Comet Assay" for analyzing the repair of DNA damage in cells. Strahlenther Onkol.175(7):333-40.
- 10- Bruton LL, Lazo JS, Parker KL. (2009). Goodman&Gilman: Tedavinin Farkolojik Temelleri. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, s.1204-1205.

- 11-Chessman K. H, Slater T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. British Medical Bulletin; 149: 481-93
- 12-Cohen FL. (1997). Adherence to therapy in tuberculosis. Annu Rev Nurs. Res;15: 153-84
- 13-Collins AR, Dobson VL, Dusinská M, Kennedy G, Stetina R. (1997). The comet assay: What can it really tell us? Mutat. Res. 375: 183–193.
- 14- Cross CE, Halliwell B, Borish E, Pryor W, Ames B. N., Saul R., McCord J. M., Hardman D. (2007). Oxygen radicals and human disease. Annals of Internal Medicine, 526- 545.
- 15- Demirel S, Zamani AG.(2002). Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. Genel Tıp Derg 12(3):123-127
- 16- Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. (2001). Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. Fertil Steril. :76(5):892-900.
- 17-Douglas JG, McLeod MJ. (1999). Pharmacokinetic factors in the modern drug treatment of tuberculosis. Clin Pharmacokinet; 37: 127–146.
- 18-Duty SM, Singh NP, Ryan L ve ark. (2002). Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm. Hum Reprod 17: 1274-1280.
- 19-Edward D. C et al.(2004). Treatment And Outcome Analysis Of 2005 Patients With Multidrug Resistant Tuberculosis. AJR CCM: 35-44
- 20-Eminzade S, Uraz F, Izzettin FV. (2008). Silymarin protects liver against toxic effects of anti-tuberculosis drugs in experimental animals. Nutr Metab Lond. 5;5:18. doi: 10.1186/1743-7075-5-18.
- 21-Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes Free Radic Biol Med.11(1):81-128.
- 22-Farr BF. Rifamycins. (2000). In, Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed.(Mandell GL, Bennett JE and Dolin R eds.) Churchill Livingstone, Philadelphia, pp.348-361.
- 23-Fenech, M. (2000), the in vitro micronucleus technique, Mutation Research, Fund. Mol. Mec. Mut. , 455, 81-95.
- 24-Galloway SM. (1994). Commentary. Mutation Research. 312:201-203.

- 25- Giovanelli L, Pitozzi V, Riolo S, Dolara P. (2003). Measurement of DNA breaks and oxidative damage in polymorphonuclear and mononuclear white blood cells: a novel approach using the comet assay. *Mutation Research*; 538: 71-80.
- 26- Gutteridge JMC. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*, 41,12: 1819-28.
- 27- Halliwell B, Gutteridge J. M. C. (2001). *Free radicals in Biology and medicine*, Third Edition, Oxford Science Publication; 22-24.
- 28- Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR. (2003). Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18: 45-51.
- 29- Heddle JA, Countryman RI.(1976). The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res* 41: 321-32.
- 30- Iseman MD. (2002). *Klinisyenler için tüberküloz kılavuzu*. Nobel Tıp Kitabevleri İstanbul.
- 31- Jagetia GC, Jayakrishnan A, Fernandes D, Vidyasagar MS. (2001). Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment. *Mutat Res* 491:9-16.
- 32- Kayaalp O. (2002). *Tıbbi Farmakoloji*, Ankara. Feryal Matbaacılık 313-324.
- 33- Kılınç A, Kılınç K. (2003). *Nitrik Oksit biyolojik fonksiyonları ve toksik etkileri*. PalmeYayıncılık, Ankara
- 34- Krmaer PJ. (1998). *Genetic Toxicology*. J. Pharm. Pharmacol. 50: 395-405.
- 35- Küçük F. (2005). *Tüberküloz Tedavisi Sırasında Görülen Yan Etkiler*. Tıpta UzmanlıkTezi, İstanbul.
- 36- Leibert W, Rom WN. (2004). Principles of tuberculosis management. in *tuberculosis*, 2nd ed.(Rom WN and Gray SM eds.)Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia pp.713-728.
- 37- Liu RH, Hotchkiss JH.(1995). Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: A review. *Mutat Res*. 339 (2):73-89.
- 38- McNamee JP, McLean JRN, Ferrarotto CL, Bellier PV. (2000). Comet Assay: Rapid Processing of Multiple Samples. *Mutation Research* p.63-69.
- 39- Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR. (2002). The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod*;17(4):990-8.

- 40- Nishimura Y, Kurata N, Sakurai E, Yasuhara H. (2004). Inhibitory effect of antituberculosis drugs on human cytochrome P450-mediated activities. *J Pharmacol Sci*; 96: 293–300.
- 41- Ostling, O. ve Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 291-298.
- 42- Panchabhai TS, Ambarkhane SV, Joshi AS, Samant BD, Rege NN. (2008). Against Antitubercular Drugs Induced Hepatic Damage: An Experimental Study. *Phytother. Res.* 22: 646-650.
- 43- Pari L, Kumar NA. 2002 Hepatoprotective activity of *Moringa oleifera* on antitubercular drug-induced liver damage in rats. *J Med Food.* ;5(3):171-7.
- 44- Petri WA. (2001). Drugs use in chemotherapy of tuberculosis, *Mycobacterium avium* complex disease, and leprosy. In Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG (eds), 10th edn. McGraw-Hill, Medical Publishing Division: New York, 1273–1294.
- 45- Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt K.L. (2010). Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined Mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol. *The Journal of Toxicological Science (J. Toxicol. Sci.)* Vol. 35, No. 2, 149-169
- 46- Sarawathy SD, Shyamala Devi CS. (2001). Modulating Effect of Liv.100, an Ayurvedic formulation on antituberculosis drug-induced alterations in rat liver microsomes. *Phytother. Res.* 12, 501-505.
- 47- Sharma SK. Antituberculosis drugs and hepatotoxicity. (2004). *Infect Genet Evol*; 4: 167–170.
- 48- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schnider EL. (1988). A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*; 175: 184-91.
- 49- Tice RR, Andrews PW, Singh NP. (1990). The single cell gel assay: A sensitive technique for evaluating intracellular differences in DNA damage and repair. *Basic Life Sci.* 53: 291-301.
- 50- Timbrell JA, Mitchell JR, Snodgrass WR, Nelson SD. Isoniazid hepatotoxicity: the relationship between covalent binding and metabolism in vivo. *Pharmacol Exp Ther* 1980; 213: 364–369.

- 51-Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (1996). Akciger tüberkülozu. Enfeksiyon Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri: 37-42.
- 52-Tracey WR, Tse J, Carter G. (1995) Lipopolysaccharide-induced changes in plasma nitrite and nitrate concentrations in rats and mice: pharmacological evaluation of nitric oxide synthase INHibitors. J. Pharmacol Exp. Ther, 272(3):1011-5.
- 53-Widel M, Kolosza Z, Jedrus S, Lukaszczyk B, Raczek-Zwierzycka K, Swierniak A. (2001). Micronucleus assay in vivo provides significant prognostic information in human cervical carcinoma: The updated analysis. Int J Radiat Biol 77: 631-6.
- 54-Yoshioka T, Kawada K, Shimada T. (1979). Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. Am J Obstet Gynecol, 135: 372-6.
- 55-Yue J, Dong G, He C, Chen J, Liu Y, Peng R.(2009). Protective effects of thiopronin against isoniazid-induced hepatotoxicity in rats.Toxicology, 29;264(3):185-91.
- 56-Zijno A, Marcon F, Leopardi P, Salvatore G, Carere A, Crebelli R. (1994). An assessment of the in vivo clastogenicity of erythrosine. Fd Chem Toxic 32: 159-63.