

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

**ASETİLKOLİNESTERAZ İNHİBİTÖRÜ DONEPEZİL
HCl'İNİN GENOTOKSİSİTESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nihal KOÇ

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Tez Danışmanı : Yrd.Doç.Dr.Hüseyin AKSOY

Eylül 2010

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ


ASETİLKOLİNESTERAZ İNHİBİTÖRÜ DONEPEZİL
HCI'NİN GENOTOKSİSİTESİ


YÜKSEK LİSANS TEZİ

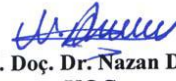
Nihal KOÇ

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Bu tez 06 / 09 /2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.


Yrd. Doç. Dr. Serkan
Yılmaz
Jüri Başkanı


Yrd. Doç. Dr. Hüseyin
AKSOY
Üye


Yrd. Doç. Dr. Nazan Deniz
KOÇ
Üye

ÖZET

Anahtar Kelimeler: İnsan Periferal Lenfositleri, Donepezil HCl, Kromozom Anormalliği, Mikronukleus

Bu çalışmanın amacı, asetilkolinesteraz inhibitörü olan Donepezil HCl'nin muhtemel genotoksik etkisini *in vitro* insan periferal lenfositlerinde kromozom anormalliği (KA) ve mikronukleus (MN) testleri ile araştırmaktır. Hücresler, 0,05, 0,1, 0,5, 1 ve 2 µg/ml konsantrasyonlarındaki Donepezil HCl ile KA için 24 ve MN için 48 saat muamele edilmiştir.

Bu alışmada, Donepezil HCl'nin en yüksek üç dozu, hem anormal hücre yüzdesini hem de hücre başına düşen kromozom anormalliklerini her iki kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırırken, mikronukleus frekansı bütün dozlarda anlamlı derecede artmıştır. Donepezil HCl uygulamasına bağlı olarak kromatid kırığı, kromozom kırığı ve fragment oluşumlarına rastlanmıştır.

GENOTOXICITY OF ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITOR DONEPEZIL HCl

SUMMARY

Key Words: Human Peripheral Lymphocytes, Donepezil Hydrochlorur, Chromosome Aberration , Micronucleus

The aim of this study was to investigate the possible genotoxic effects of donepezil hydrochloride, which used as inhibitor of the enzyme acetylcholinesterase, by determining *in vitro* schromosome aberration (CA) and micronucleus (MN) tests in human peripheral lymphocytes. The cells were treated with 0.05, 0.1, 0.5, 1, and 2 µg/ml Donepezil HCl for 24 h for CA and 48 h MN treatment periods.

In this study highest three dose of Donepezil HCl significantly increased both percentage of abnormal cells and chromosomal abnormalities than the both two control groups, all doses significantly increased the frequency of micronuclei. Depending on the application of Donepezil HCl chromatid break, chromosome break and fragment formation were found.

TEŞEKKÜR

Tez alıŐmalarım sűresince bilgisini, tecrűbelerini, ilgisini ve desteęini esirgemeyen saygıdeęer Hocam Yrd. Do. Dr. Hűseyin AKSOY'a; laboratuvar çalıŐmalarım sırasında yardımlarımı gűrdűęűm yűksek lisans űęrencisi arkadaŐım Duygu GŪMŪŐ, AraŐtırma Gűrevlisi Hatice TUNCA ve yűksek lisans űęrencisi Merve A. DOęANCI'ya teŐekkűr ederim.

Maddi ve manevi desteklerini bir an olsun benden esirgemeyen çok kıymetli Aileme sonsuz teŐekkűrlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
SUMMARY.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Demans.....	3
2.2.1. Demansta risk faktörleri.....	3
2.2.2. Demansların epidemiyolojisi.....	4
2.2.3. Demansların sınıflandırılması.....	5
2.2.4. Demansta öykü özellikleri.....	7
2.2. Alzheimer Hastalığı.....	7
2.2.1. Alzheimer’da risk faktörleri.....	8
2.2.2. Alzheimer’da nöropatolojik bulgular.....	9
2.2.3. Alzheimer hastalığının moleküler biyolojisi.....	10
2.2.4. Alzheimer hastalığının tedavisi.....	11
2.2.5. Donepezil HCl.....	11
2.3. Genotoksitite Çalışmaları.....	13
2.3.1. Genetik araştırma ve uygulama alanları.....	14

2.3.1.1. Genetik araştırma.....	14
2.3.1.2. Genetik tanı (teşhis).....	14
2.3.2 Sito genetik tanı yöntemleri.....	15
BÖLÜM 3.	
MATERYAL METOD.....	18
3.1. Materyal.....	18
3.1.1. Kromozom incelemesi için materyal.....	18
3.1.2. Test materyali.....	18
3.2. Metot.....	19
3.2.1. Kromozom anormalliği testi.....	19
3.2.2. Mikronukleus testi.....	20
3.2.3. Preparatların boyanması.....	21
3.2.4. Kromozom anormalliklerinin ve mitotik indeksin saptanması	21
3.2.5. Mikronukleus frekansı ve nükleer bölünme indeksinin hesaplanması.....	21
3.2.6. İstatistiksel analizler.....	22
BÖLÜM 4.	
BULGULAR.....	23
4.1. Donepezil HCl uygulamasının kromozom anormalliği ve mitotik indeks üzerine etkisi.....	23
4.2. Donepezil HCl uygulamasının mikronukleus ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi.....	28
BÖLÜM 5.	
TARTIŞMA.....	31
KAYNAKLAR.....	36
ÖZGEÇMİŞ.....	41

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Demansların görülme oranları	4
Şekil 2.2. Sitoplazma içinde uzun pembe iplikler halinde görülen nörofibril yumaklar.....	9
Şekil 2.3. Kongo kırmızısı ile boyanmış amiloid protein içeren plaklar.....	10
Şekil 3.1. Donepezil HCl'nin kimyasal formülü.....	18
Şekil 4.1. Donepezil HCl uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler	25
Şekil 4.2. Donepezil HCl uygulanan in vitro insan lenfositlerinde anormal hücre yüzdesi doz etki ilişkisini gösterir grafik.....	26
Şekil 4.3. Donepezil HCl uygulanan in vitro insan lenfositlerinde hücre başına düşen kromozomal anormallik doz etki ilişkisi.....	27
Şekil 4.4. Donepezil HCl uygulamasıyla insan lenfosit kültüründe mitotik indeks yüzdesinin doza bağlı ilişkisi.....	27
Şekil 4.5. Donepezil HCl uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan bir mikronukleuslu binokleat.....	29
Şekil 4.6. Donepezil HCl uygulamasıyla insan lenfosit kültüründe mikronukleus frekansının doza bağlı ilişkisi.....	29

Şekil 4.7. Donepezil HCl uygulamasıyla insan lenfosit kültüründe nükleer bölünme indeksinin doza bağlı ilişkisi.....	30
--	----

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Demans hastalıklarının sınıflandırılması	6
Tablo 4.1. Donepezil HCl uygulaması ile invitro insan lenfositlerinde oluşan KA ve Mitotik indeks	24
Tablo 4.2. Donepezil HCl uygulaması ile in vitro insan lenfositlerinde oluşan mikronukleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi ..	28

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AB	: Amiloid peptid
AH	: Alzheimer hastalığı
ach	: Asetilkolin
AChE	: Asetilkolinesteraz
AKEI	: Asetilkolinesteraz inhibitörleri
AP	: Amiloid plak
APP	: Amiloid prekürsör protein
DLB	: Lewy cisimcikli demans
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EBAH	: Erken başlangıçlı Alzheimer hastalığı
GBAH	: Geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı
HNO ₃	: Nitrik asit
KA	: Kromozom anormalliği
KCl	: Potasyum klorür
MI	: Mitotik indeks
MMC	: Mitomycin C
MN	: Mikronukleus
NBI	: Nükleer bölünme indeksi
NFY	: Nörofibriler yumaklar
PHF	: Paired helical filament
PS1	: Presenilin 1
PS2	: Presenilin 2
VaD	: Vasküler demans
SH	: Standart hata
°C	: Santigrat derece

%	: Yüzde
$\mu\text{g/mL}$: Mikrogram / Mililitre
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
cm	: Santimetre
mL	: Mililitre
N	: Normalite
mg	: Miligram
kg	: Kilogram

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Demans sözcüğü latince olup, kişinin aklını yitirmesi anlamına gelmektedir. Sözcük, bir sendrom karşılığı olarak kullanılmakta ve açık bir bilinç düzeyinde başta bellek olmak üzere zihinsel ve sosyal yeteneklerin kişinin günlük yaşam aktivitelerini etkileyecek derecede yıkılması şeklinde tanımlanmaktadır. Kişide başta bellek bozulurken, dikkat, lisan, görsel-alansal beceriler, algılama, problem çözme gibi fonksiyonlarda bozulur. Bu tabloya kişilik değişiklikleri, davranış ve psikiyatrik semptomlar da (hezeyanlar, hallüsinasyonlar, duygulanım bozuklukları vs.) eklenir [1]. Demans sendromuna neden olan hastalıklar günümüzde özellikle yaşlanan toplumlarda büyük bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. 2001 yılında dünya üzerinde 24 milyon olarak tahmin edilen demanslı hasta sayısının eğer tedavi ve önleme konusunda büyük bir gelişme olmazsa 2050 yılında 81 milyona yükselmesi beklenmektedir [2].

Alzheimer hastalığı (AH), demansın en sık görülen tipidir. Tüm demans tiplerinin % 50-60'ını oluşturur. Yaşla doğru orantılı olarak prevalansı artmaktadır. 65 yaş ve üzeri için prevalansı % 10,3, 80 yaş ve üzeri için % 47'dir [3]. Amiloid plaklar (AP), nörofibriller yumaklar (NFY), nöropatolojik ve nörotransmitter düzeylerinde azalmalar ise elde edilen nörobiyokimyasal bulgulardır [4].

Alzheimer hastalığında patogenezi ve fizyopatoloji tam olarak aydınlatılmadığı için bugün için yeterli ve tam önleyici tedavi bulunmamaktadır. Asetilkolinesteraz inhibitörleri (AKEİ) kanıtlanmış en etkili tedavi ajanlarıdır. AKEİ'leri kolinesteraz ile asetilkolin (ach) yıkılmasını önler ve nöronal sinapta ach miktarını arttırarak ach'nin beyin içersindeki biyokimyasal ve fonksiyonel etkisini uzatırlar [5]. Asetilkolinesteraz inhibitörleri olarak Donepezil, Rivastigmine, Galantamine ve Tacrin kullanılır [6].

1900 hasta üzerinde dört kolinesteraz inhibitörünün karşılaştırıldığı bir çalışmada hastaların % 79'unun donepezili iyi tolere ettikleri, Donepezil'in bu hastalarda organ toksisitesi göstermediği, laboratuvar testlerinde herhangi bir anomaliye rastlanmadığı bildirilmiştir [7]. 205 hasta üzerinde yürütülen başka bir çalışmada da donepezilin Tacrine göre etkinliğinin daha iyi olduğu saptanmıştır [8].

Bu çalışmanın amacı, bir asetilkolinesteraz inhibitörü olan Donepezil hidroklorürün *in vitro* şartlarda muhtemel genotoksik etkilerini belirlemektir.

BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

2.1. Demans

Demans, bilişsel ve entelektüel işlevlerde azalma sonucu bellek, konuşma, algılama, hesaplama, yargılama, soyut düşünme ve problem çözme gibi bilişsel işlevlerden en az ikisinde bozukluk olmasıdır. Demanslı hasta popülasyonunun artması ile birlikte, demans, önemli bir halk sağlığı problemi haline almıştır. Demansların görülme sıklığı ile ilgili çalışmalar sınırlıdır, çünkü özellikle orta derecede bilişsel bozukluğu bulunan hastalar olmak üzere vaka saptanmasında standart teşhis kriterleri yoktur. Ancak son yıllarda hem Alzheimer tipi demansın, hem de diğer demans gruplarının tanımlanmasına yönelik çalışmalar bulunmaktadır [9]. 65 yaş üzerindeki kişilerin % 5'inde demansiyel belirtiler izlenir. Yaşla birlikte bu oran artar ve 80 yaş civarında % 20'ye ulaşır. Demans riski 65-85 yaşları arasında her beş yılda bir iki katına çıkmaktadır [10].

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tahminlerine göre Türkiye'nin toplam nüfusu bu yüzyılın ilk yarısına doğru artmaya devam edecek, 2050 yılına kadar 103 milyonu geçecektir. Bu süre zarfında 65 yaş üzerindeki nüfusun oranı nüfusun diğer kesimlerinden daha hızlı bir şekilde artacaktır. Böylece 1997'de Türkiye nüfusunun sadece % 4,5'i 65 yaş üzerinde olmasına karşın bu oran 2050 yılına kadar % 20,2'ye yükselecektir [11].

2.1.1. Demansta risk faktörleri

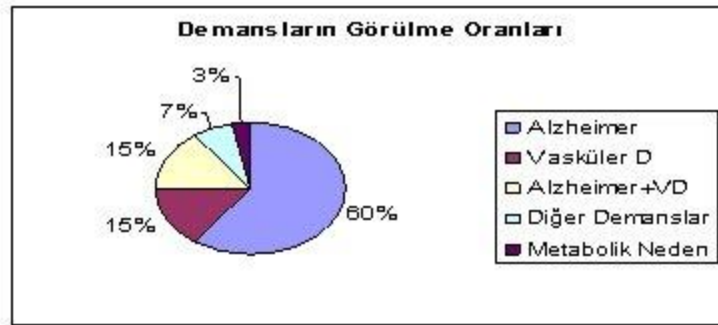
Demansın olası risk faktörleri; ileri yaş, ailede diğer demanslı kişilerin varlığı, apolipoprotein E4 allelinin varlığı, 14. ve 21. kromozomdaki bazı otozomal dominant

geçişli mutasyonlar, kafa travmaları, kişilik bozukluğu, depresyon, düşük sosyo-ekonomik düzey şeklinde sıralanabilir [3].

Düşük eğitim düzeyi olan populasyonda demans prevalans ve insidansının, yüksek eğitim düzeyi bulunan popülasyonla karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Amsterdam çalışma grubunca 4051 kişilik hasta grubunda eğitim ve demans prevalansı arasında doza bağlı bir ilişki tespit edilmiştir. Bu durum düşük eğitim düzeyli kişilerde hafıza kaybının hızlı ve erken yaşlarda geliştiğini göstermektedir [9, 12].

2.1.2. Demansların epidemiyolojisi

Her yıl 100 bin kişiden 75'inde demans hastalığı görülür. Yaş arttıkça hastalığın görülme riski de artar. Batı Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde yapılan çalışmalarda demansların % 50-70'inin Alzheimer hastalığı olmasına karşılık, Japonya ve Rusya'da damarsal nedenli demansın daha fazla olduğu bildirilmiştir [13]. Afrika'da yapılan çalışmalarda zencilerde Alzheimer hastalığının nispeten az olduğu bildirilirken, ABD' de yapılan çalışmalar siyah ırkdaki oranın beyaz ırktan daha fazla olduğunu göstermiştir [13]. Genel olarak demanslar içinde en sık görüleni Alzheimer hastalığı'dır [13] (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Demansların görülme oranları [14]

2.1.3. Demansların sınıflandırılması

Demanslar öncelikle primer ve sekonder olarak sınıflandırılır. Alzheimer hastalığının (AH) da dahil olduğu ve en büyük bölümü oluşturan primer demanslar, demansa neden olan merkezi sinir sisteminin nörodejeneratif hastalıklarını içerir. Nörodejeneratif hastalık, zihinsel işlevlerin alt yapısını oluşturan alanlarda sıklıkla kendine özgü iz bırakarak (örneğin Alzheimer'da senil plak ve nörofibriler yumaklar) buralarda nöron ve sinaps kaybıyla dejenerasyona yol açar ve işlevini bozar. Bu patogeneze kliniğe demans olarak yansır. Nörodejenerasyon, AH'da olduğu gibi anılan alanlara sınırlı kalma eğilimindeyse demans izole ya da ağırlıklı klinik tablo olarak kalır. Oysa ki, motor sistem dejenerasyonuna dahil olursa Lewy Cisimcikli Demans (DLB)'ta olduğu gibi parkinsonizm ve Huntington hastalığında olduğu gibi, demansla birlikte, bazen daha da önünde klinik tablonun ağırlıklı bir parçasıdır. Dolayısıyla, primer demanslar klinik görünüşlerine göre, kendi içlerinde primer izole demanslar ve motor bozuklukla birlikte olan primer demanslar olarak sınıflandırılabilirler. Sekonder demansların en sık nedeni vasküler demanstır (VaD). Orta çaplı beyin atardamarlarının birbirini izleyen tıkanmaları, beyin damarlarındaki yüksek tansiyon hastalığı, stratejik bölgelerdeki enfaktüsler (dokunun O₂'siz kalmasıyla hücre ölümlerinin gerçekleşmesi) VaD nedeni olabilir. Normal nöronal işlevin gerektirdiği, ekstraselüler ortamın glukoz içeriği, oksijenizasyon düzeyi, hormonal durumu ve elektrolit dengesini bozabilecek herhangi bir sistemik veya metabolik bozukluk sebebiyle (diabet, kalp yetmezliği, hipotiroidi, kronik akciğer hastalığı, böbrek yetmezliği, karaciğer yetmezliği) ya da normal sinaptik iletimi bozabilecek herhangi bir terapi amaçlı ilaç alma, ağır metallerle maruz kalma gibi durumlarda beyinde dejenerasyona neden olan hastalıklar ortaya çıkar. Dejenerasyona neden olan hastalıklar, yavaş seyirli tabloyla demansa benzeyebilirler. İnflammatuar (iltihap kurutucu, ateş düşürücü) süreçler (Nörobehçet sendromu gibi) enfeksiyonlar (Herpes simplex gibi), nörolojik hastalıklar içinde multipl skleroz, primer ya da sekonder beyin tümörleri, kronik subdural hematoma (beyin zarlarının altında kanama), normal basınçlı hidrosefali (beynin içi ve çevresinde sıvı toplanması) gibi yer kaplayıcı lezyonlar (niteliği tespit edilememiş bozukluk) demansa neden olabilir [15]. Demans hastalıklarının sınıflandırılması (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Demans Hastalıklarının Sınıflandırılması

Primer (Dejeneratif)	Sekonder
Alzheimer hastalığı	Vasküler demans
Lewy Cisimciği'yle İlişkili Demans	Multi- infarkt demans
Fronto-temporal Demans	Binswanger hastalığı
Non-spesifik fokal atrofiler	Stratejik infarkt demansı
Pick hastalığı	CADASIL
Kromozom 17-FTD	Normal basınçlı hidrosefali
ALS ile birlikte	Toksik-Metabolik demanslar
Motor bozuklukla birlikte (Subkortikal)	Wernicke-Korsakoff hastalığı
Progresif supranükleer paralizisi	B12 vitamin eksikliği
Huntington hastalığı	Hipotiroidi
Talamik demans	Kronik karaciğer hastalığı
Kortiko-basal dejenerasyon	Organik çözücülere maruz kalma
Multi sistem atrofiler	İlaçlar
Progresif subkortikal gliozis	İnfeksiyonlar
ALS-Parkinson-Demans kompleksi	Herpes simplex ansefaliti
Wilson hastalığı	Nörosifilis
Hallervorden-Spatz hastalığı	Kronik menenjitler
Prion hastalıkları	HIV-demans kompleksi
Creutzfeldt-Jacob hastalığı	Whipple hastalığı
Gerstmann-Sträussler-Scheinker	Kafa içi yer kaplayıcı hastalıklar
Fatal familial insomni	Neoplastik durumlar
Çeşitli pediyatrik demanslar	Subdural hematoma
Kufs hastalığı	

Tablo 2.1 (devam). Demans Hastalıklarının Sınıflandırılması

Primer (Dejeneratif)	Sekonder
Gaucher hastalığı	Otoimmün-inflammatuar hastalıklar
Niemann-Pick hastalığı	Multipl skleroz
Diğerleri	Behçet hastalığı
Diğer ender demanslar	Diğer sistemik vaskülitler
Limbik demans	Paraneoplastik limbik ansefalit
Poliglugosan cisimcik hastalığı	Granulatoz anjeitis
“Argyrophilic grain” hastalığı	Primer sinir sistemi vaskuliti
	NAIM sendromu

2.1.4. Demansta öykü özellikleri

Demans sendromunun belirtileri üç ana kategoride sınıflandırılabilir. Kognitif, davranışsal, işlevsel. Demans öyküsü, bu alanların sorgulanması ile alınır [10].

Kognitif kategori için, bellek, dikkat, dil, görsel-mekansal işlevler, yürütücü işlevler, davranışsal kategori için, kişilik değişiklikleri, duygu durum bozuklukları, algı bozuklukları, düşünce bozuklukları, işlevsel kategori için, dışarıda günlük yaşam aktiviteleri, evde günlük yaşam aktiviteleri, kendine bakım yetenekleri dikkate alınır [15].

2.2. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı (AH) ilk kez, yaklaşık 100 yıl önce, ilerleyici zihinsel işlev bozukluğu ve davranış değişikliği yakınmaları ile hastaneye yatırılıp beş yıl boyunca izlenen ve ölümü ardından otopsi yapılan Auguste D. isimli hastadan elde edilen verilere göre tanımlanmıştır. Auguste D'nin beyin dokusunun mikroskopik incelemesinde görülen nörofibriler yumaklar ve senil plaklar kesin tanı koydurucu

patolojik belirleyicileri olarak kabul edilmiştir. Hastalık, o günden bu yana, Auguste D.'yi izleyen ekipte yer alan Alois Alzheimer adıyla anılmaktadır [16].

Sinir sisteminin anatomisi ve fizyolojisine ilişkin bilgi birikiminin yıllar içinde artması, elektronörofizyolojik, nöropsikolojik, genetik ve nörogörüntüleme tekniklerindeki gelişmeye rağmen AH hala gizemini korumaktadır. Hastalığın nedeni belirsizdir, kesin tedavisi yoktur. Hasta yaşarken kesin tanı koymayı mümkün kılacak bir yöntem geliştirilememiştir ve kesin tanı patolojik incelemeyi gerektirmektedir. Dahası, patolojik incelemede tanı koşulu, bir asır önce ortaya konduğu gibi, nörofibriler yumak ve senil plakların varlığının gösterilmesidir [4].

İlerleyici demansın en sık nedeni olan AH 40 yaşından sonra görülen bilişsel bozuklukların % 60'ını oluşturur. Yaşlı nüfusun artmasıyla sıklığı giderek artmaktadır. Sinsi başlayıp ilerlemesinden dolayı ve ülkemizde yaşlanmaya bağlı doğal bir süreç olarak değerlendirildiğinden, ancak hastalığın geç dönemlerinde tanı konabilmektedir [17].

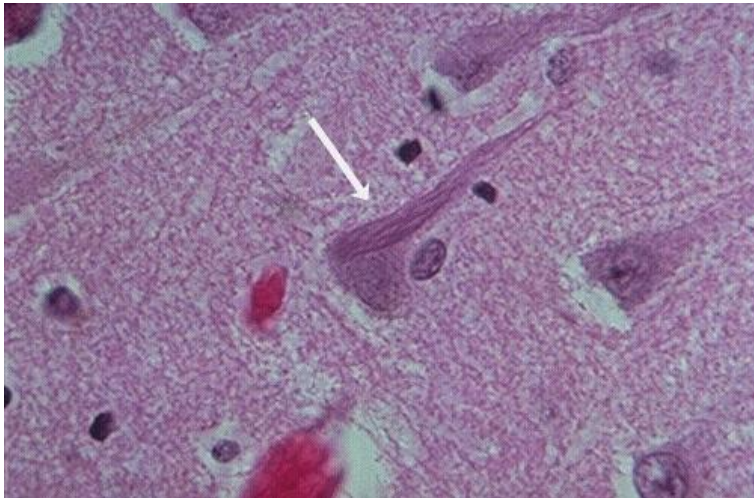
2.2.1. Alzheimer Hastalığı'nda risk faktörleri

AH ve diğer tüm demanslarda en önemli risk faktörü yaştır. 40 yaşın üzerinde başlar ve yaş ilerledikçe hastalık prevalansı artış gösterir [18, 19]. Kadınlarda AH insidansı daha fazladır. Erkeklerde ise vasküler demans riski daha yüksektir. Kadınlarda daha sık görülmesi, hastalığın gelişmesinde hormonların rolünün olabileceğini düşündürür. Düşük eğitim düzeyinin ileri yaşlarda AH gelişmesi için risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Eğitimsiz bir kişinin demansa yakalanma riski sekiz yıllık eğitim görmüş birine oranla en az iki kat fazladır [18, 20]. Birinci derece yakınlarında AH olanlarda demans gelişme riski ortalama 2-4 kat artmıştır. Ancak genetiğin yanında diğer etmenler de etkilidir. Çünkü tek yumurta ikizlerinde yapılan bir çalışmada her iki kardeşte birlikte AH görülme oranı %40'ı bulunmuştur [16]. Down sendromlu hastalarda 35 yaşına kadar yaşadıklarında AH'nin nöropatolojik değişiklikleri görülmektedir. Ancak AH'de 21.kromozom normal bulunmuştur. Östrojen alan kadınlarda riskin kullanmayanlara göre yarı yarıya az olduğu bulunmuştur. Kafa travması geçirenlerde riskin arttığı saptanmıştır [17]. İskandinav

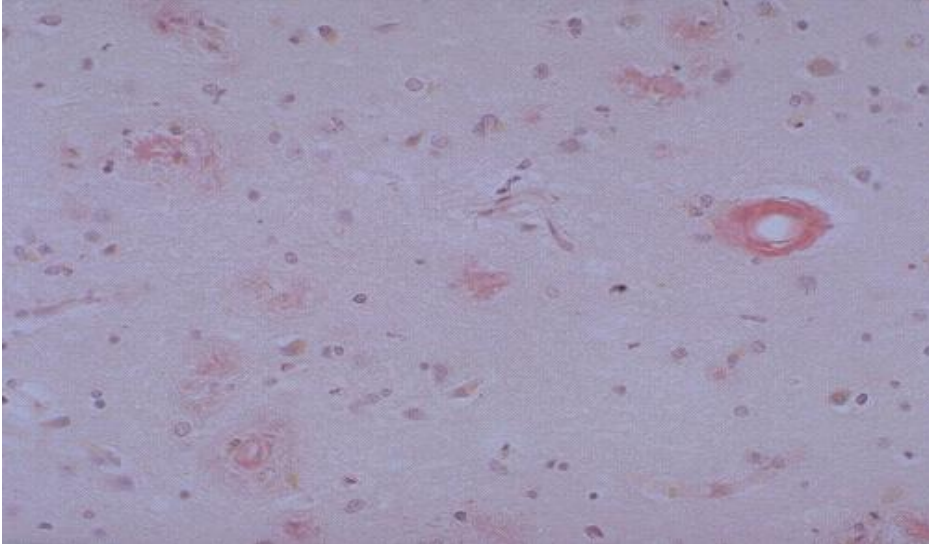
ülkelerinde organik solvent ve endüstriyel boya larla kronik uğraşanlarda yüksek oranlarda demans rapor edilmiştir. Sigara ve alkol vasküler demansa eğilimi arttırmaları yönüyle önemlidir. Sosyokültürel seviyesi yüksek olanlarda AH'nin oranının daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bekar kişilerde ileri yaşlarda AH gelişme riski evlilerden 3 kat daha fazladır [5].

2.2.2. Alzheimer hastalığı'nda nöropatolojik bulgular

Alzheimer hastalığının patogenezi ile ilgili gelişmelere hastalığın patoloji bulguları yol gösterici olmuştur. Makroskobik patoloji bulguları, özellikle korteks ve hipokampustaki rastlanan düzleşmedir. Histolojik olarak ise hücre içinde biriken nörofibriller yumaklar (Şekil 2.2), ekstrasellüler yerleşimli nörotik (amiloid) plaklar, granülovakuolar dejenerasyon, sinaptik kayıp ve Meynert'in bazal nükleusu, hipokampus, asosiasyon korteksinde kolinerjik hücre kaybı patoloji bulgularını oluşturur. Nörofibriller yumaklar, ikili helikal filamentlerden oluşup, bu filamentleri hiperfosforilize tau proteini oluşturmaktadır. Amiloid plakların ana komponenti ise "B sheet" konformasyonu ile biriken 39-43 aminoasitlik fibriller beta amiloid peptiddir (AB). Amiloid plakların diğer komponentleri patolojik "chaperonlar" olarak adlandırılmakta ve amiloid plakların diğer komponentlerinin AB'nin agregasyonunu, çökmesini ve toksisitesini artırdığı ileri sürülmektedir [21]. (Şekil 2.3) [22].



Şekil 2.2. Sitoplazma içinde uzun pembe ip likçikler halinde görülen nörofibriler yumaklar [22].



Şekil 2.3. Kongo kırmızısı ile boyanmış amiloid protein içeren plaklar [22].

2.2.3. Alzheimer hastalığının moleküler biyolojisi

Alzheimer olgularının büyük yüzdesi düzensiz olarak ortaya çıkar, ancak hastalığın genetik etiyojisi olduğunu gösteren yeterince kanıt vardır. AH olgularının görüldüğü ailelerin büyük çoğunluğunda, AH'nin kalıtım şekli yeterince açık değildir. Ancak bazı ailelerde, hastalığın otozomal dominant bir şekilde kalıtıldığı görülmektedir. Bugüne kadar mutasyona uğradığında erken başlangıçlı Alzheimer hastalığına (EBAH) neden olan üç gen tanımlanmıştır; amiloid prekürsör protein (APP), Presenilin 1 (PS1) ve Presenilin 2 (PS2) genleri. Bu genlerin kodlayıcı bölgelerinde oluşan mutasyonlar EBAH oluşturmaya yeterlidir. PS1 mutasyonları en sık görülür ve ailesel EBAH olgularının %18-50'sini oluşturur [23, 24]. APP (%5) ve PS2 mutasyonları (<%1) daha seyreklerdir. Bu üç gene bağlı mutasyonlar tüm AH olgularının %2-10'unu kapsar [25].

Bugüne kadar hiçbir geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı (GBAH) olgusunda APP, PS1 ve PS2 genlerinin kodlayıcı bölgelerinde mutasyon görülmemiştir. Bu olgularda hastalığın kalıtım türünün belirgin olmaması, GBAH oluşumunun genetik ve çevresel nedenlerin etkileşiminden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir [25]. Hastalık için kabul edilen risk faktörlerinin başında gelen Apolipoprotein E geni, kolesterolün taşınması ve sinir hücrelerini kaplayan miyelin bütünlüğünün korunmasında rol

oyun. Apolipoprotein E (APOE) hem normal beyinde, hem de Alzheimer hastalarının beyinde rastlanan patolojik yapılarda bulunur. Populasyonda en sık görülen üç APOE allelinden E4 aleli Alzheimer olgularında sağlıklı populusyona göre yaklaşık iki kat daha sık görülmektedir. Buna karşın E2 alelinin ise bu hastalığa karşı koruyucu bir etkisi olduğu savunulmaktadır [26]. Hastalığın başlama yaşının çok değişken olabilmesi, hangi bireyin risk altında olduğunu ya da hangi bireyin hastalık riski taşımadığını belirlemede zorluk yaratmaktadır [25].

2.2.4. Alzheimer hastalığının tedavisi

AH'nin kesin tedavisi yoktur. Günümüzde kullanılan tedaviler hastalığın belirtilerini ortadan kaldırmaya yöneliktir. Nörofibril yumak (NFY) ve amiloid plak (AP) oluşumunu engelleyen ya da var olanları ortadan kaldıran tedavi uygulaması bulunmamaktadır [27].

Güncel tedavi, hastalık süresince kolinerjik innervasyon olması gerçeğinden hareket ederek, kolinerjik rezervin desteklenmesine dayanmaktadır. Bu amaca yönelik olarak asetilkolinesteraz inhibitörleri (Donepezil, Rivastigmin, ve Galantamin) tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Kolinesteraz inhibitörlerine ek olarak Memantine de AH tedavisinde kullanılır. Memantin, aşırı glutamaterjik uyarımla hücreyi apoptozise götüren süreci baskılayarak etki gösterdiği varsayılmaktadır [4].

2.2.5. Donepezil HCl

Donepezil HCl beyinde predominant kolinesteraz olan asetilkolinesterazın spesifik ve reversibl bir inhibitörüdür. Donepezil hidroklorür, esas olarak santral sinir sisteminin dışında bulunan bir enzim olan butirilkolinesteraza kıyasla asetilkolinesterazın 1000 kat daha güçlü bir inhibitörüdür. Donepezil bu etkisiyle Alzheimer hastalığında kolinerjik transmisyon yetmezliğinin neden olduğu semptomlarda etkili olabilmektedir [28]. Yapılan bir çalışmada 5 mg ve 10 mg'lık Donepezil HCl'nin günde tek doz alınması, dozu takiben sırasıyla % 63,6 ve % 77,3'lük asetilkolinesteraz aktivitesinin (eritrosit membranlarında ölçülen) kararlı hal inhibisyonunu ortaya çıkardığı belirlenmiştir. Alyuvarlardaki asetilkolinesterazın

Donepezil HCl tarafından inhibisyonunun, kognitif fonksiyonun seçilmiş özelliklerini inceleyen, hassas bir ölçek olan ADAS-cog'daki değişmelerle uyumlu olduğu gösterilmiştir. Donepezil HCl'nin, altta yatan nöropatolojinin seyrini değiştirme potansiyeli üzerine çalışma yapılmamıştır. Bu sebeple, Donepezil HCl'nin, hastalığın ilerleyişine bir etkisi olduğu düşünülemez [29].

Beyaz kristal toz şeklinde olan Donepezil HCl kloroform, su ve glasiyelasetikasitle çözünebilir. Yarılanma ömrü yaklaşık 70 saattir. Cinsiyet, ırk sigara alışkanlığının Donepezil HCl'nin plazma konsantrasyonları üzerinde önemli sayılabilecek bir etkisi yoktur. Alınan dozun % 57'si idrarla atılırken (% 17'si değişmeden atılır), % 15'i dışkı ile atıldığı tespit edilmiş olup, bu da biyotransformasyon ve idrarla itrahın esas atılım yolları olduğunu göstermektedir [28]. Plasebo kontrollü bir çalışmada hastaların % 40'ında bir iyileşme sağladığı, % 27'sinde değişme yapmadığı, % 28'inde kötüleşmeye neden olduğu bildirilmiştir [6].

Donepezil, Tacrinle karşılaştırıldığında merkezi sinir sistemine seçicidir, kalp kası, bağırsak düz kası gibi perifer dokularda etkinliği yoktur. İlacın boşaltımı hem renal hem de sitokrom P450 sistemi yoluyla gerçekleşir, ancak karaciğer ve böbrek yetmezliği olan hastalarda doz ayarlamasına gerek yoktur [22].

Donepezilin AH üzerindeki etkinliği üzerine yapılan çalışmada; 14 haftalık sürede ilacın 1, 3, ve 5 mg/gün dozları plaseboyla karşılaştırılmış ve ADAS-Cog değerlerinde 3 mg/gün için $p < 0.036$ ve 5mg/gün için $p < 0.002$ değerleri ile doza bağımlı bir cevap alınmıştır, global değerlendirmede ilacın tedavi başarısındaki plaseboya üstünlüğü gösterilmiştir ve daha yüksek bir dozdaki etkisi araştırılmıştır. Bunun için yapılan 24 haftalık, randomize ve çok merkezli bir çalışmada 5 ve 10 mg/gün donepezilin etkinliği plaseboyla karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda ADAS-Cog değerlerindeki plaseboya fark hem 5 hem de 10 mg/gün doz için anlamlı ($p < 0.0001$) bulunmuştur. 5 ve 10 mg/gün Donepezilin plaseboya üstünlüğü CIBIC karşılaştırmasında (sırasıyla $p < 0.047$ ve $p < 0.0008$) gösterilmiştir, ancak hayat kalitesi ölçeklerindeki fark anlamlı bulunmamıştır [22].

Donepezil ve Rivastigminle yapılan bilişsel ve fonksiyonel kaybı yavaşlatmaya yönelik yapılan çalışmada rivastigminin günlük yaşam aktivitelerinde Donepezile,

Donepezilin ise daha az yan etki oluşturma konusunda Rivastigmine üstün olduğu sonucu elde edilmiştir [30].

Yapılan bir diğer çalışmada Donepezil'in beyinde siyah madde (substantia nigra) adı verilen ve dopamin üretiminden sorumlu olduğu bilinen bölgenin çalışmasını düzenlediği belirlenmiştir [31]. Substantia nigra da ki düzensizliğin Parkinson hastalığına neden olduğu ve Donepezil'in Parkinson hastalığının tedavisinde de etkili olabileceği görülmüştür [32].

Donepezil'in Alzheimer üzerindeki etkilerini incelemek için yapılan başka bir çalışmada, günde 10 mg Donepezil verilen 5 hastadan 1'inde, 5 mg ilaç verilen 5 hastadan 1'inde iyileşme meydana gelmiştir. Tedavi uygulanan her 12 hastadan 1'inde yan etkiler sonucu tedaviye devam edilememiştir [33].

Alkolün yol açtığı kalıcı amnestik bozukluk olarak adlandırılmakta olup kronik alkol kullanımının neden olduğu beslenme yetersizliğine bağlı tiamin eksikliği sonucu gelişen önemli klinik durum olan Korsakoff Sendromlu bireylere Donepezil ekleme tedavisi uygulanmış ve bilişsel yetilerinde iyileşme gözlenmiştir [34].

2.3. Genotoksitite Çalışmaları

Yakın geçmişte genetik hastalıklar Mendel kurallarına göre kalıtılan ve doğumlarda anomalilerle seyreden küçük bir grup sendrom olarak nitelendirilmiştir. Kanser, diabet, mental retardasyon ve kalp hastalıkları gibi hastalıkların genetik temeli olduğu düşünülürdü. DNA'nın yapısının Watson ve Crick tarafından keşfedilmesi ile genetik araştırmalar büyük ivme kazanmıştır [35]. Son yıllarda genlerin dizilimlerinin, yapılarının ve fonksiyonlarının anlaşılmasıyla da genetiğin tıptaki yeri hızla değişmeye başlamıştır. İnsan genom projesi 1986 yılında başladığında bu noktaya gelineceğini tahmin etmek mümkün değildi. Hatta 2005 yılında bitirilmesi planlanan bu proje teknolojideki hızlı gelişmeler sonucunda hedeflenenden dört yıl önce tamamlanmıştır [36].

Yapılan araştırmalar doğal çevremize bulaştırdığımız pek çok kimyasal maddenin karsinogenik veya mutajenik etkiye sahip oldukları gerçeğini ortaya koymuştur. Kanserojen (karsinogen) kansere neden olan, mutajen mutasyona yani kalıtsal materyalde (DNA) herhangi bir değişikliğe neden olan anlamına gelir. Genler üzerinde toksik (zehir) etkisi olan kimyasal maddelere genotoksik denir. Toksikoloji kimyasallarla biyolojik sistem arasındaki etkileşimleri, zararları ve zararsızlık limitleri yönünden inceler. Kimyasalların çeşitli hücre genetiği teknikleriyle elde edilen kromozomlar üzerindeki etkisini inceleyen bilim dalına genotoksikoloji denir [37].

2.3.1. Genetik araştırma ve uygulama alanları

2.3.1.1. Genetik araştırma

Kalıtsal bir hastalık üzerinde yapılacak genetik araştırmanın ilk aşaması hastalıktan sorumlu genin belirlenmesidir. Gen belirlendiğinde, genin işlevi kabaca anlaşılmış olur. Halen genlerimizin çok azının işlevi bilinmektedir. Kalıtsal hastalıktan etkilenmiş aileler üzerine yapılan genetik araştırmalar, hangi genin yapısı bozulduğunda o hastalığın ortaya çıktığını gösterir. Araştırma doğrudan uygulamaya yönelik olmamakla birlikte, ilerde sonuçlarının hem araştırmanın yapıldığı aileye, hem de benzer hastalık taşıyan diğer ailelere yararının dokunacağı beklenir. Genin bilinmesi aile bireyleri için genetik tanıyı mümkün kılar. Ayrıca gen tedavisi dahil, etkin bir tedavi aranmasının yolunu açar [38].

2.3.1.2. Genetik tanı

Belli bir hastalıktan sorumlu gende bireyin gen kusuru (mutasyon) taşıyıp taşımadığının dolaylı ya da doğrudan araştırılmasıdır. Bu birçok amaca yönelik yapılabilir; hastada genetik teşhis, taşıyıcılık testi, doğum öncesi embriyonun kontrolü, toplum taraması, kimlik belirleme, babalık testi, adli tıpta kimlik testi, gen tedavisi [38].

2.3.2. Sitogenetik tanı yöntemleri

İnsan kromozomları ilk kez 1857 yılında Virchow tarafından görülmüştür, kromozom sözcüğü ise 1888 yılında Waldeyer tarafından kullanılmıştır [39, 40]. Tijo ve Levan 1956 yılında, insan fetal akciğer fibroblastları ile yaptıkları kültürlerden elde ettikleri hücrelerde insan kromozomlarının sayısının 46 olduğunu ve cinsiyet kuruluşunun XX ve XY olduğunu kesin olarak açıklamışlardır [41].

Sitogenetik, kromozom adı verilen hücre organellerinin işlev ve morfolojilerini mitotik/mayotik sürecinde inceleyen bilim dalıdır. Sitoloji ve genetik bilimlerinin birleşmesiyle ortaya çıkmıştır. Genetik materyalin hücresel düzeyde incelenmesidir. Amaç, kromozomal evreye girmiş olan DNA'da meydana gelen yapısal (translokasyon, delesyon, insersiyon, duplikasyon, vs.), sayısal (anöploidi, poliploidi vs.) değişiklikleri ve köken farklılıklarını (kimerizm, mosaisizm, vs) saptamak, elde edilen sonuçla fenotip ile genotip arasındaki ilişkiyi değerlendirmektir [42, 43]. Klasik sitogenetik tanı yöntemlerinde kromozom eldesi ve preparatların hazırlanması için spontan bölünme hızı yüksek olan hücrelerden (kemik iliği, lenf nodülleri, fetus, yenidoğan kanı gibi) direkt olarak çalışma yapılır. Spontan bölünme hızı düşük olan hücreler ise önce kültüre edilerek yapay uyarıcılarla (fitohemaglutinin, forbol ester gibi) mitoz bölünmeye sokulur, çoğaltılır ve daha sonra sitogenetik çalışmalar için kullanılır. Özelleşmiş sitogenetik tanı yöntemlerinde ise çoğunlukla kardeş kromatid değişimi ve mikronukleus tekniği ile frajil bölge tespiti yöntemi kullanılır [35].

Mikronukleus (MN) hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya sentrik/ asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır [41]. Günümüzde, MN indeksi insan hücrelerinde genetik toksikoloji araştırmalarında kullanılan standart sitogenetik testlerden biri haline gelmiştir. MN testi kültüre edilmiş insan hücrelerinde MN ölçümünde, skorlanmanın özellikle bir kez bölünen hücrelerle sınırlı olmasıyla tercih edilen bir metod olmuştur. Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Sitokalsin- B (Cyt-B) ilavesiyle, ilk nukleus bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş binukleuslu (BN) hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte ve MN'ye sahip hücrelerin oranı saptanabilmektedir. MN skorlanmasının sadece

binukleuslu hücrelerde yapılması, optimal olmayan hücre bölünme kinetiği nedeniyle oluşabilecek yanıtıcı etkinin önüne geçmekte, testin duyarlılığını ve güvenilirliğini arttırmaktadır. Böylece geçen yıllar içinde, MN testi kromozom kırıklarını, kromozom kaybını, kromozomlarda ayrılmamayı, nekrozu, apoptozu ve sitositazi (lökosit birikimi sonucu kılcıl damar lümenlerinin tıkanması) ölçmek için geliştirilen kapsamlı bir metod olmuştur. Ayrıca bu teknik sayesinde ağız, burun, bronş, ve ürotelyal eksofoliyatif hücrelerinde de çeşitli kimyasal ve fiziksel ajanların sitogenetik etkilerini değerlendirmek mümkün hale gelmiştir [44]. MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Anöploidiyi uyaran ajanlar, sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna katkıda bulunmaktadır [41].

Genotoksik maddeler, uygulanan doz ve süreye bağlı olarak, mitoz bölünme halinde olan hücrelerin toplam hücre sayısına % cinsinden oranı olan mitotik indeksi etkilemektedir. Kimyasalların mitoz bölünme üzerindeki olumsuz etkileri mitotik indeksin saptanmasıyla belirlenmektedir. Bu etki sitotoksitenin göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Kromozom anormallikleri ise genotoksitite testlerinde kullanılan önemli bir parametredir. Kromozom anormallikleri (KA) oldukça çeşitlidir. Tek bir kromatitte olan kırık yani kromozomu teşkil eden DNA maddesinin kendini eşlemesi sonucu oluşan ve sentromerle bağlı durumdaki iki iplikten birinde olan kırık, kromatid kırığı olarak adlandırılır. Kromozomun her iki kromatidinde kırık varsa bu, kromozom kırığıdır.

Kromozomlardan kopmuş parçalara fragment denir. Kimyasalların etkisiyle kromozomlar iki sentromerli hal alabilir, buna disentrik kromozom adı verilir. Bunlardan poliploidi ikiden fazla kromozom takımı bulundurma durumudur. Farklı kromozomların bir araya gelerek kromatidlerinde değişme görüldüğü durumsa kromatid değişimi olarak tanımlanır.

Kromatid değişimi sonunda haç şeklinde yapıların ortaya çıkması, bu değişimin resiprokal translokasyon olduğunun göstergesidir. Kromatidlerin uçlarında oluşan

kırıkların birleşmesiyle oluşan kardeş kromatitlerdeki birleşmeye sister union anormallikleri denir [36].

BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOT

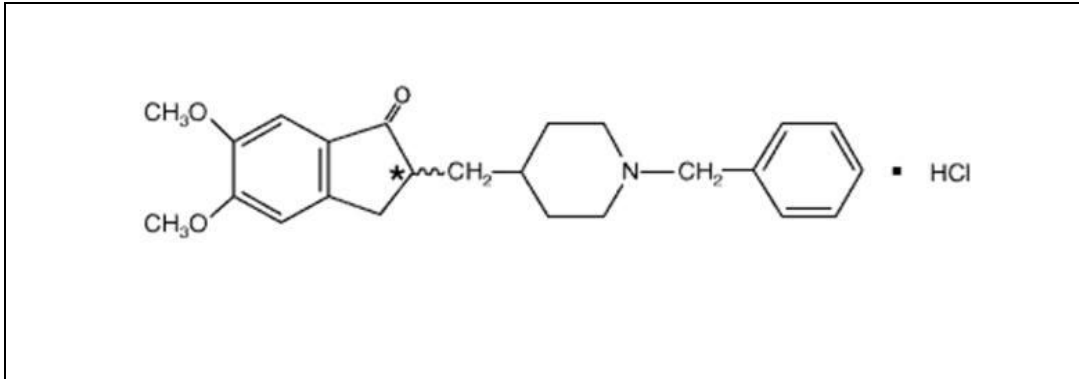
3.1. Materyal

3.1.1. Kromozom incelemesi için materyal

Bu araştırmada Donepezil HCl'in genotoksik etkilerini incelemek amacıyla insan periferik kan kültürü kullanılmıştır. Test materyali için kullanılacak olan periferik kan, sigara, alkol ve ilaç kullanmayan, herhangi bir sağlık problemi olmayan 24-25 yaşlarında bir bayan ve bir erkek donörden sağlanmıştır.

3.1.2. Test Materyali

Test materyali olarak Donepezil HCl etken maddesini içeren ilaçlar piyasadan alınarak, Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü laboratuvarında ayrıştırılıp saf hale getirildikten sonra kullanılmıştır. Donepezil HCl'nin kimyasal formülü $C_{24}H_{29}NO_3$ 'tür [45] (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Donepezil HCl'nin kimyasal formülü [45].

Çalışmada kullanılan diğer maddeler; Mitomisin-C (Katolog No: M-0503) Sigma, Kolkisin (Katolog No: C 9754) Sigma, Sitokalsin B (Katolog No: 14930-96-2),

KCL (Katolog No: 104936) Merck, Heparin (Katolog No:100467411), Metanol (Katolog No: 1.06008.2500), Asetik asit (Katolog No:64-19-7) Tekkim, Giemsa (Katolog No: 10920C1), Etil alkol (Katolog No: 64-17-5) Kimetsan, Kromozom medium B (Katolog No: F 5023), DPX (Katolog No: 44581) Biochrom'dan alınmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Kromozom anormalliği testi

Lenfosit kültürlerinin hazırlanmasında sağlıklı sigara içmeyen 24-25 yaşlarında bir bayan ve bir erkek donörden alınan kan kullanılmıştır. Bireylerden alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş 0,2 mL'lik periferik kanlar, steril şartlarda 2,5 mL'lik besiyerine (Kromozom medium B) ekilmiştir. Ekim sonunda kültür tüpleri, 37 °C'deki inkübatörde 72 saat inkübasyona alınmıştır. Kültür süresinin başlangıcından 48 saat sonra Donepezil HCl'nin önceden belirlenmiş olan 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2 µg/mL'lik dozları kültür ortamına ilave edilmiştir. Ayrıca bir pozitif (MMC, 0,20 µg/mL), bir negatif ve birde çözücü kontrol (etil alkol 85 µg/mL) kullanılmıştır. Daha sonra kültürün 70. saatinde her bir tüpe, 0,06 µg/mL olacak şekilde kolkisin çözeltisi ilave edilmiştir. Böylece hücreler 2 saat boyunca inkübatörde kolkisin ile ön işleme tabi tutulmuştur.

72 saatlik inkübasyon sonunda tüpler 1200 rpm'de (dakikadaki devir sayısı) 10 dakika santrifüj edilmiş ve üstte kalan sıvı (süpernatant) atılmıştır. Tüpün dibinde kalan ve hücreleri içeren 0,5-0,7 mL'lik kısmı vorteks yardımıyla iyice karıştırılarak homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır. Daha sonra tüplere, her bir tüpe 5 mL olacak şekilde 37 °C'de bekletilen hipotonik solüsyondan (0,075 M KCl) vorteks üzerinde damla damla ilave edilmiştir. Tüpler 37 °C'de 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra, önceden hazırlanan ve buzdolabında soğutulan 3:1 metanol:asetikasitten oluşan fiksatif, tüplere vorteks üzerinde damla damla her tüpe 5 mL olacak şekilde ilave edilmiştir, ve buzdolabında 45 dakika bekletilen tüpler, süre sonunda 1200 rpm de

santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı atılmıştır. Fiksatifle yıkama işlemi 3 kez tekrarlanmıştır.

Son fiksasyondan sonra tüpün dibinde kalan 0,5-0,7 mL'lik çökelti pipetajla homojen hale getirilmiştir. Pastör pipetine çekilen çökelti önceden 1N HNO₃ (Nitrik asit)'te temizlenmiş ve % 70'lik etil alkolde buzdolabında bekletilen nemli lamalar üzerine 15-20 cm yükseklikten farklı alanlara gelecek şekilde damlatılmıştır. Bu sayede hücrelerin patlatılmaları ve kromozomların dağılmaları sağlanmış olur. Hazırladığımız bu preparatlar 24 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

3.2.2. Mikronukleus testi

Mikronukleus (MN) testi için, lenfosit kültürlerinin hazırlanması amacıyla sağlıklı, sigara içmeyen 24-25 yaşlarında bir bayan ve bir erkek bireyden alınan ve 1/10 oranında heparinize edilmiş 0,2 mL periferik kan, steril şartlarda 2,5 mL'lik besi yerine (Chromosome Medium B) ekilmiştir. Ekimi takiben tüpler, 37 °C'deki inkübatöre yerleştirilerek, burada 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kültür süresinin başlangıcından 24 saat sonra (48 saat muamele olacak şekilde), Donepezil HCl'nin 0,05, 0,1, 0,5, 1 ve 2 µg/mL'lik dozları kültür tüplerine ekilmiştir. Uygulamada bir negatif, bir pozitif kontrol (MMC, 0,20 µg/mL) ve bir çözücü kontrol (etilalkol 85 µg/mL) kullanılmıştır. Sitokinezi bloke etmek için, inkübasyonun 44. saatinde kültür ortamına 5,2 µg/mL sitokalsin B ilave edilmiştir. Tüpler, inkübasyon süresi tamamlandığında 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve ardından üstte kalan süpernatant atılmıştır. Tüpün dibinde kalan ve hücreleri ihtiva eden 0,5-0,7 mL'lik kısmı vorteks yardımıyla homojenize edilmiştir. Sonraki aşamada tüplere, vorteks üzerinde her bir tüpe 5 mL olacak şekilde önceden hazırladığımız 4 °C'de bekletilen 0,075 M KCl hipotonik solüsyondan damla damla ilave edilmiş ve sonra tüpler buzdolabında 5 dakika bekletilmiştir. Süre bitiminde tüpler etüvden çıkarılarak, 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant atılmıştır. Daha sonra tüplere, önceden buzdolabında soğutulan soğuk fiksatif (3:1 metanol:asetik asit) yine her tüpe 5 mL olacak şekilde vorteks üzerinde damla damla ilave edilmiş ve buzdolabında 15 dakika bekletilmiştir. Soğuk fiksatifle yıkama işlemi toplam üç kez gerçekleştirilmiş ve her fiksasyon işleminden sonra tüpler buzdolabında 5 dk bekletilmiştir.

Sitoplazmaların korunması amacıyla üçüncü fiksatifte % 1'lik formaldehit eklenmiştir. Son santrifüj işleminden sonra tüplerdeki süpernatant atılmış, geriye tüpün dibinde kalan 0,5-0,7 mL'lik çökelti pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Daha önceden 1 N HNO₃ (Nitrik asit)'te temizlenmiş ve % 70'lik etil alkolde buzdolabında bekletilen nemli lamalar üzerine, bu süspansiyon 10-15 cm yükseklikten pastör pipeti ile farklı alanlara damlatılarak yayılması sağlanmıştır. Hazırladığımız bu preparatlar 24 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılmışlardır.

3.2.3. Preparatların boyanması

Kromozomal anormallik ve mitotik indeks için; preparatlar kuruduktan sonra Sorensen tamponu ile hazırlanmış % 5'lik Giemsa ile (pH=6,8) 15-20 dakika, MN preparatları 13- 14 dakika boyanmıştır. Giemsa boyasından çıkarılan preparatlar, saf sudan geçirilerek fazla boyanın akması sağlanmış ve dik bir şekilde kurumaya bırakılmıştır. Oda sıcaklığında kurutulan preparatlar, DPX ile daimi hale getirilmiş ve mikroskopik incelemeye alınmıştır.

3.2.4. Kromozom anormalliklerinin ve mitotik indeksin saptanması

Kromozom anormalliklerinin (KA) saptanmasında, her bir uygulama için kromozomları iyi dağılmış olan 100'er metafaz plağı (dişi ve erkek toplam 200 metafaz) değerlendirilmiştir. İncelenen toplam hücre içindeki anormal hücrelerin yüzdesi ve hücre başına düşen kromozom anormalliği sayısı belirlenmiştir. Mitotik indeksin (Mİ) saptanmasında ise; tüm uygulamalar için hazırlanan preparatlardan 3000'er hücre (dişi ve erkek toplam 6000 hücre) değerlendirilmiştir. Mitotik indeks, bölünen hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı yüzde cinsinden hesaplanarak belirlenmiştir.

3.2.4. Mikronükleus frekansı ve nükleer bölünme indeksinin saptanması

Dişi ve erkek bireye ait her bir preparattan 1000 tane (toplam 2000 tane) binükleat hücre değerlendirilmiş ve hücre başına düşen MN sayısı (MN/hücre = MN frekansı) belirlenmiştir. Nükleer bölünme indeksinin belirlenmesinde ise, her bir donörden 500

hücre (dişi ve erkek toplam 1000 hücre) değerlendirilmiştir. Hücreler 1, 2, 3, 4 çekirdekli hücreler şeklinde sayılmış nükleer bölünme indeksi $1x(1N)+2x(2N)+3x(3N)+4x(4N)/n$ (n incelenen toplam hücre sayısı) formülü ile hesaplanmıştır.

3.2.6. İstatistiksel analizler

Bu çalışmada, anormal hücre frekansı, hücre başına düşen kromozom anormalliği, mitotik indeks, mikronükleus frekansı, nükleer bölünme indeksi için doz-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla SPSS 13.0 bilgisayar programıyla regresyon analizi uygulanmıştır.

Deney gruplarındaki kromozomal anormallikler, mitotik indeks, mikronükleus frekansının ve nükleer bölünme indeksinin kontrol grupları ile farklılık gösterip göstermediğinin belirlenmesinde z dağılım testi kullanılmıştır.

BÖLÜM 4. BULGULAR

4.1. Donepezil HCl Uygulamasının Kromozom Anormallikleri (KA) ve Mitotik İndeks Üzerine Etkisi

Donepezil HCl'nin 0,05, 0,1, 0,5, 1 ve 2 µg/mL'lik dozlarının insan lenfosit kültürüyle muamelesi sonucunda kromatid kırığı ve fragment oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.1, Şekil 4.1). Yapılan analizler, anormal hücre yüzdesinin ve hücre başına düşen anormalliklerin, tüm uygulamalarda, hem negatif hem de çözücü kontrole göre arttığını göstermiştir, ancak 0,5 µg/mL'lik konsantrasyondan itibaren görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 4.1). Her iki grupta da artışlar doza bağlıdır (sırasıyla, $r = 0,79$, $r = 0,87$) (Şekil 4.2, 3).

Tablo 4.1. Donepezil HCl Uygulamasý ile in vitro İnsan Lenfosit Kùltürlerinde Oluřturduđu Kromozom Anormallikler ve Mitotik İndeks

Test maddesi	Uygulama		Anormallikler						Anormal Hücre \pm SH (%)	KA/Hücre \pm SH*	Mitotik İndeks (%)
	Süre (Saat)	Doz (μ g/mL)	Ktk	F	Kzk	Dk	Kkb	Ktd			
Kontrol	24	0,00	-	3	-	-	-	-	1,00 \pm 0,70	0,015 \pm 0,009	5,35 \pm 0,29
Çözücü Kontrol	24	85,00	1	2	-	-	-	-	1,50 \pm 0,86	0,015 \pm 0,009	5,09 \pm 0,28
Pozitif kontrol	24	0,20	15	17	8	13	11	5	29,50 \pm 1,60	0,345 \pm 0,033	4,20 \pm 0,45
Donepezil HCl	24	0,05	1	3	-	-	-	-	2,00 \pm 0,99	0,020 \pm 0,010	4,60 \pm 0,27
		0,10	2	7	-	-	-	-	4,00 \pm 1,39	0,045 \pm 0,015	3,65 \pm 0,24*++
		0,50	1	18	-	-	-	-	8,00 \pm 1,92*+	0,095 \pm 0,021*++	3,08 \pm 0,22*++
		1,00	7	18	1	-	-	-	10,00 \pm 2,12*++	0,130 \pm 0,024*++	2,84 \pm 0,22*++
		2,00	6	20	-	-	-	-	9,00 \pm 2,02*++	0,130 \pm 0,024*++	2,64 \pm 0,21*++

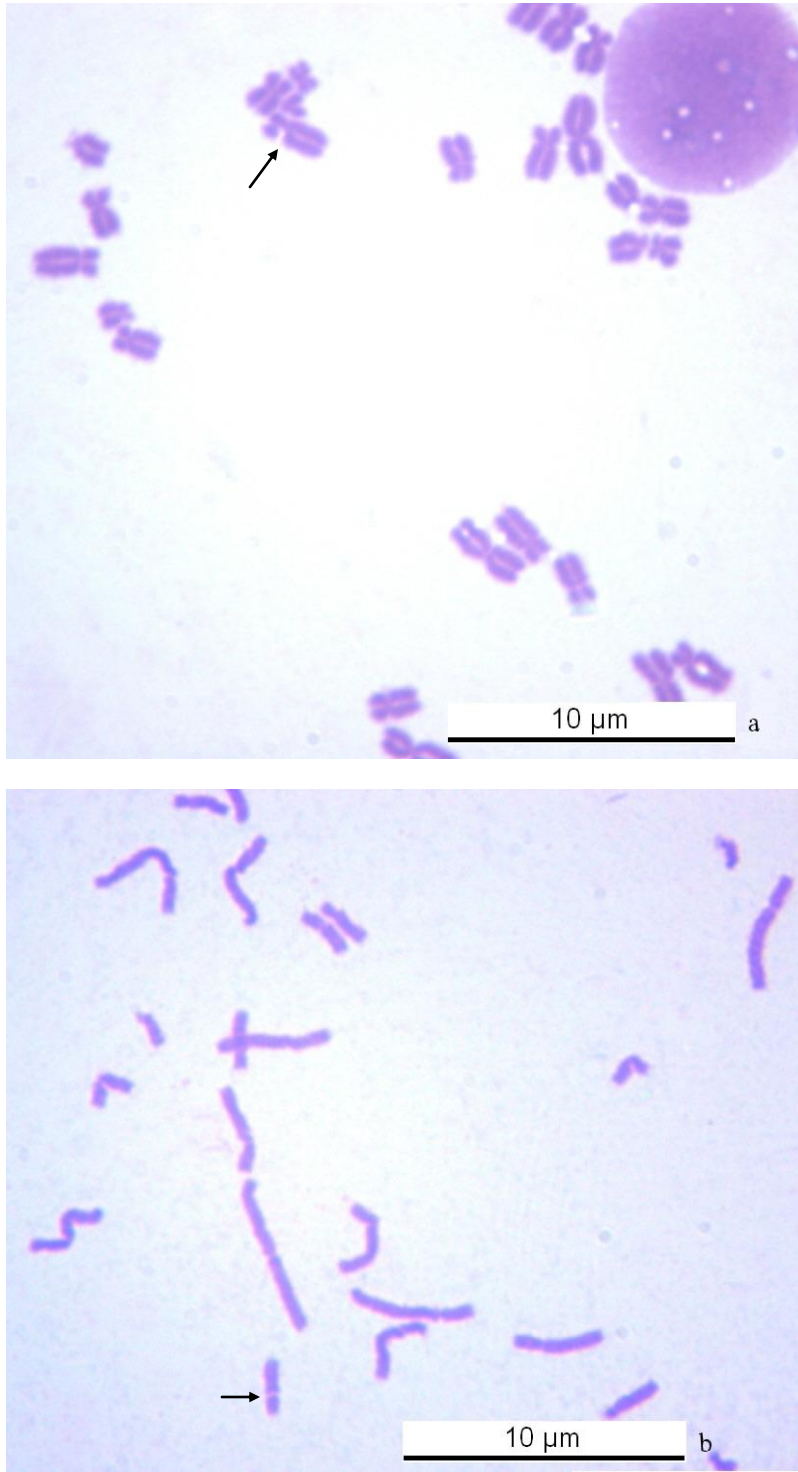
Anormal Hücre %'si ve KA/Hücre Değerlendirilmesinde her uygulanan dozda 200 metafaz hücre kromozomu incelenmiştir. MI için 6000 hücre sayılmıştır.

Ktk: Kromatid kırığı, F: Fragment, Kzk: Kromozom kırığı, Dk: Disentrik kromozom, Kkb: Kardeş kromatidlerde birleşme, Ktd: Kardeş kromatidlerde değişme, KA: Kromozomal anormallik

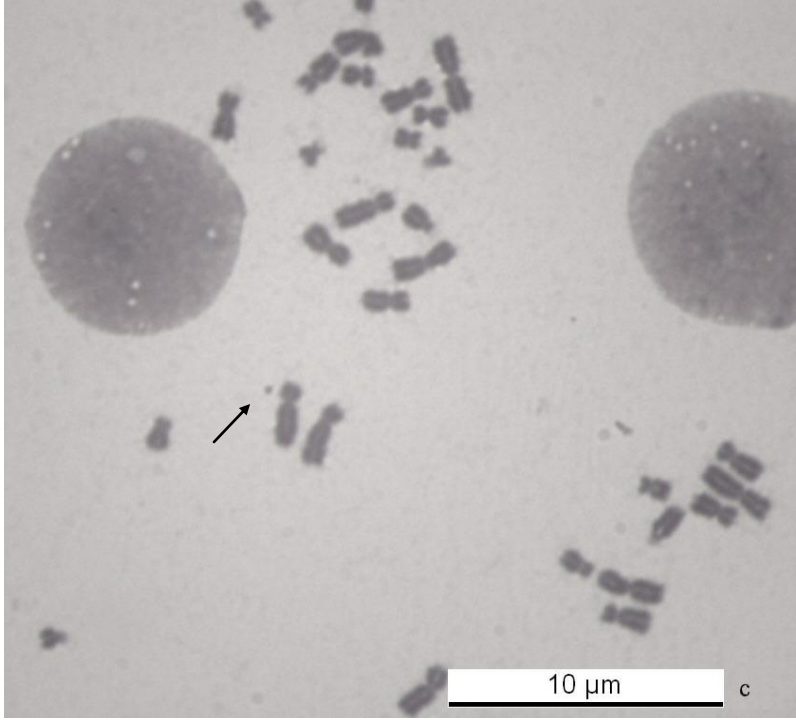
* Kontrole göre P<0,001 düzeyinde anlamlı

+ Çözücü kontrole göre P<0.01 düzeyinde anlamlı

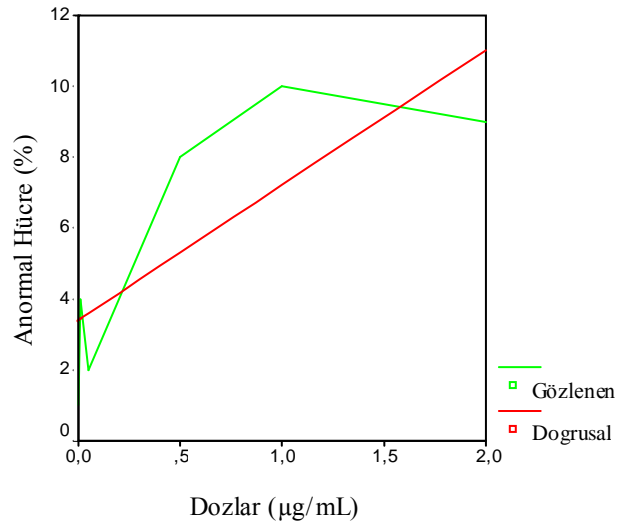
++ Çözücü kontrole göre P<0.001 düzeyinde anlamlı



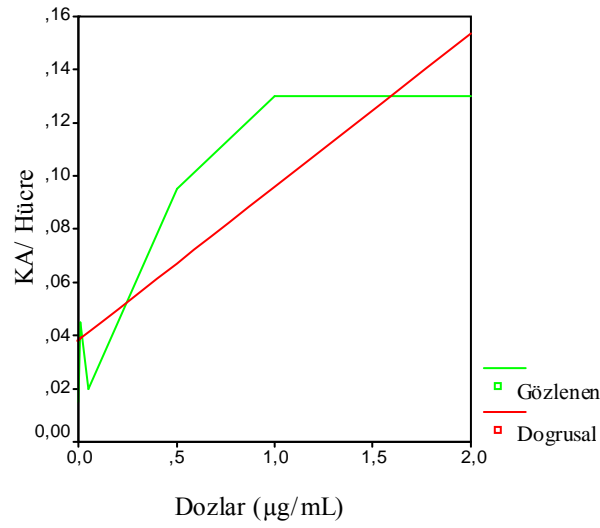
Şekil 4.1. Donepezil HCl uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler. a) Kromatid kırığı b) Kromozom kırığı



Şekil 4.1. devam Donepezil HCl uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anomallikler.
c) Fragment

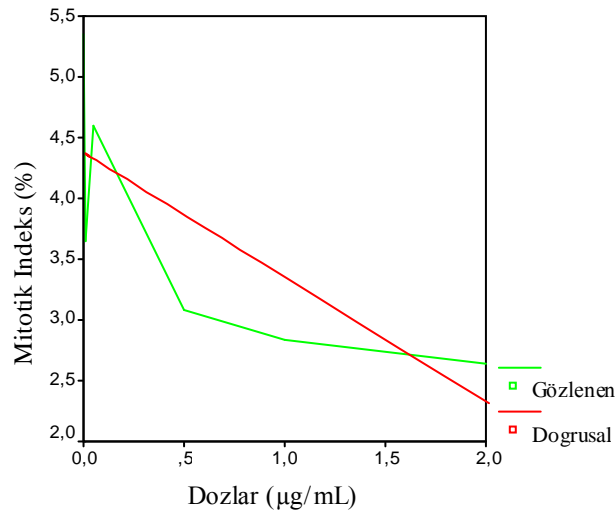


Şekil 4.2. Donepezil hidroklorür uygulanan in vitro insan lenfositlerinde anormal hücre yüzdesi doz etki ilişkisi



Şekil 4.3. Donepezil hidroklorür uygulanan in vitro insan lenfositlerinde hücre başına düşen kromozomal anormallik doz etki ilişkisi

Yapılan çalışmalarda mitotik indeks tüm uygulamalarda kontrol ve çözücü kontrolle kıyasla doza bağlı ($r = -0,76$) ve istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir (Tablo 4.1, Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Donepezil HCl uygulamasıyla insan lenfosit kültüründe mitotik indeks yüzdesinin doza bağlı ilişkisini gösterir grafik.

4.2. Donepezil HCl Uygulamasının Mikronukleus (MN) ve Nükleer Bölünme İndeksi (NBI) Üzerine Etkisi

Donepezil HCl'nin bütün uygulama gruplarında, mikronukleus taşıyan binukleat hücrelerin sayısında kontrol ve çözücü kontrole göre anlamlı artışlar gözlenmiştir (Tablo 4.2, Şekil 4.5). Ancak bu artışlar doza bağlı değildir ($r=0,39$) (Şekil 4.6). nükleer bölünme indeksinde doza bağlı olarak çok az bir artış gözlenirse de ($r =0,42$), oluşan farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4.7)

Tablo 4.2. Donepezil HCl'in insan lenfositlerinde mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi

Test maddesi	Uygulama		Sayılan binukleat hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları			MN±SH (%)	Nükleer bölünme indeksi±SH (NBI)
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)		(1)	(2)	(3)		
Kontrol	48	0,00	2000	6	-	-	0,30±0,12	2,06±0,05
Çöz Kontrol	48	85,00	2000	7	-	-	0,35±0,13	1,92±0,04
Poz Kontrol	48	0,20	2000	72	8	2	4,70±0,47	1,58 ±0,03
Donepezil HCL	48	0,05	2000	17	-	-	0,85±0,21*+	1,97±0,04
		0,10	2000	17	-	-	0,85±0,21*+	1,91±0,04
		0,50	2000	20	-	-	1,00±0,22**+	2,23±0,05
		1,00	2000	17	-	-	0,85±0,21*+	2,13±0,05
		2,00	2000	18	-	-	0,90±0,21*+	2,09±0,05

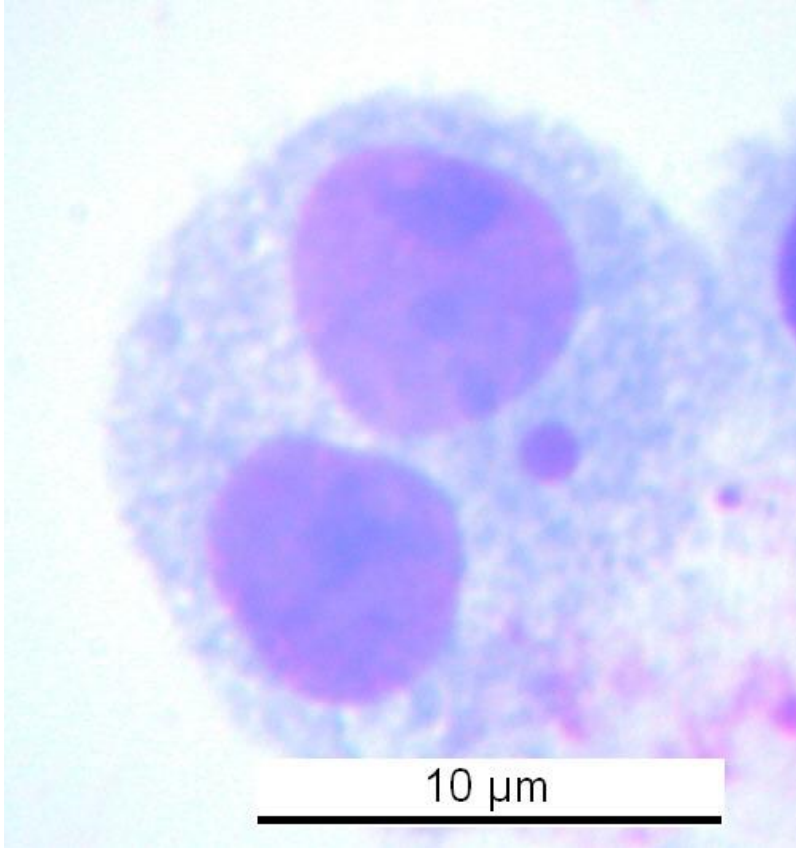
MN değerlendirilmesinde her uygulama grubu için 2000 binukleat hücre, NBI için 6000 hücre incelenmiştir.

Çöz Kontrol: Çözücü Kontrol, Poz Kontrol: Pozitif kontrol

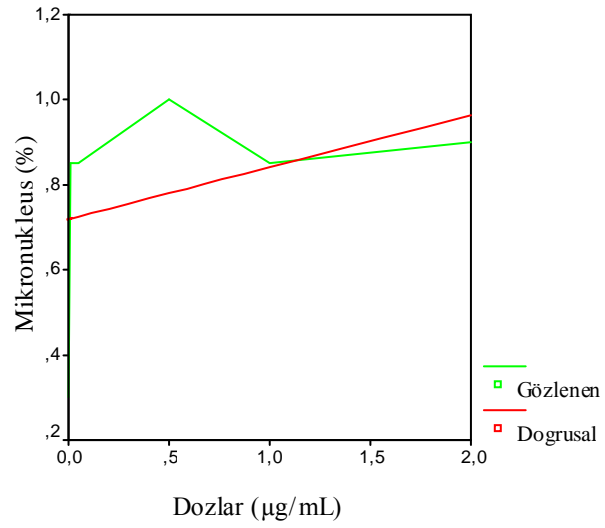
* Kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı

** Kontrole göre $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı

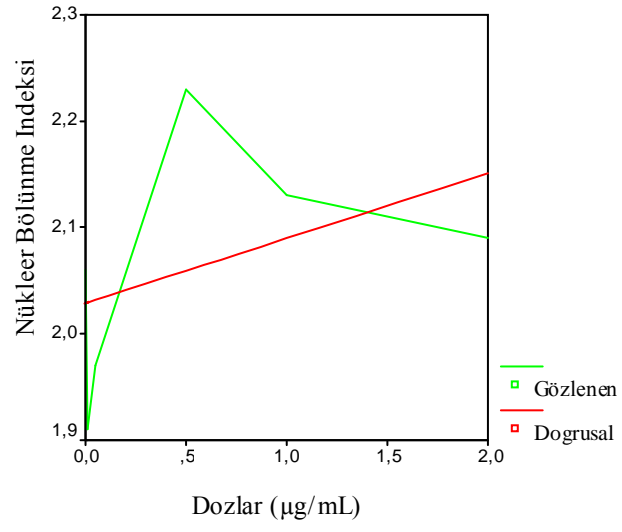
+ Çözücü Kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı



Şekil 4.5. Donepezil HCl uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan bir mikronukleuslu binukleat hücre



Şekil 4.6. Donepezil HCl uygulamasıyla insan lenfosit kültüründe mikronukleus frekansının doza bağlı ilişkisi



Şekil 4.7. Donepezil HCl uygulamasıyla insan lenfosit kültüründe nükleer bölünme indeksinin doza bağlı ilişkisi

BÖLÜM 5. TARTIŞMA

Demans, birbiriyle örtüşen çok sayıda entellektüel becerinin kaybından oluşan ve klinik olarak farklı bileşimlerde sunulabilen bir sendromdur [46]. Alzheimer en sık rastlanan demans tipidir. Alzheimer hastalığı, dikkat ve oryantasyon kaybı ile seyreden, kavramanın, hafıza, motor ve sensör yeteneklerin yavaş yavaş kaybedildiği, progresif bir dejeneratif hastalıktır [47, 48]. Asetilkolinesteraz inhibitörleri (Donepezil, Galantamin, Rivastigmin) Alzheimer hastalığının en sık kullanılan tedavi ajanı olarak bilinirler [22].

Fizyolojik bozuklukları düzeltmek, yani hastalıkları tedavi etmek amacıyla kullanılan ilaçlar ancak belirli bir dozda (tedavi dozu: *dosis therapeutica*) verildiği zaman beklenen biyolojik etkiyi gösterir. Ancak bu dozun üstüne çıkıldığında, ilacın toksik etkisi (toksik dozda) ve öldürücü etkisi (letal dozda) görülür [49].

Alzheimer hastalığı'nın histopatolojik bulgularını oluşturan senil plaklar, nörofibriller yumaklar, nöron kaybı artmış AB oluşumunda ikincil olarak gelişmektedir. AB'nin fibriller oluşturarak lokal mikroglia ve astrositleri aktive ettiği, bu hücrelerden salınan moleküllerin nöronlarda nörotoksik ve nörotropik etkiler oluşturduğu düşünülmektedir. Bu nörotoksik etkilere maruz kalan nöronlarda dejeneratif değişiklikler oluşmaktadır. Örneğin, tau proteini hiperfosforilize olarak "paired helical filament"leri (PHF) oluşturmaktadır. Böylece nöron, soma ve nöritlerinde gelişen yapısal ve fonksiyonel değişiklikler (örneğin sinaptik disfonksiyon), nöron kaybı, birçok nörotransmitter eksikliğine ve biyokimyasal değişikliklere neden olmaktadır. Ayrıca AB'nin kalsiyum ve sodyum iyonlarına permeabilitesi artmış iyon kanalları gibi davranarak sitotoksositeye neden oldukları düşünülmektedir [21]. Sonuçta tüm nöronlar programlanmış hücre ölümü ile sonlanmaktadır

Donepezil'in Alzheimer hastalığı'na karşı iyileştirici etkisi olduğunu açıklayan birçok çalışma yapılmıştır [50, 51].

Donepezil'in beyin sarsıntısına bağlı olarak gelişen yumuşak beyin dokusu yaralanmasındaki (MTBI) nöron koruyucu ve hafıza kaybını engelleyici etkisinin olup olmadığının araştırıldığı çalışmada; MTBI'nın neden olduğu nörodejenerasyon ve davranışsal zayıflık üzerinde engelleyici etkisi olduğu saptanmıştır. Bahsedilen çalışmada, sıçanlarda önce beyin travması yaratılmış, 1, 3, 6 ve 12 mg/kg dozlar uygulanmış, 12 mg/kg'lık dozun uygulandığı tedavide MTBI'nın neden olduğu nöron ölümleri ve ruhsal, sinirsel çöküntünün etkisinin azaldığı ve hipokampusün CA1 bölgesindeki nöronları koruduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda bu nöron koruyucu etki nikotinik asetilkolin reseptör antagonisti olan Mecamylamine'nin enjeksiyonu ile ortadan kalkmıştır. Araştırmacılar bu koruyucu etkinin, asetilkolin reseptörlerinin aktive edilmesiyle oluştuğunu açıklamışlardır [52]. Olszewska (2007), yaptığı araştırma sonucunda Donepezil'in koruyucu etkisinin H1R ve H2R arasındaki histamin sinyalizasyon boşluğuyla ilişkili olduğu yönündeki düşüncelerinin kuvvetlenmeye başladığını açıklamıştır [53, 54]. Donepezil H1R ile H2R arasındaki sinyalizasyon dengesini kendine özgü bir şekilde tekrar onarmaktadır [55].

Davranışsal çalışmalar Donepezil'in 0,5-2,0 mg/kg doz aralığında sıçanlarda önemli öğrenme ve hafıza işlevlerinde önemli iyileştirici etkisi olduğunu göstermiştir [50]. Diğer yandan Donepezilin sıçanlarda beyin atardamarlarındaki tıkanma yoğunluğunu kayda değer şekilde azalttığı belirlenmiştir [50].

Donepezil ağızdan hızla emilir ve 30 dakika sonra plazma ve beyin konsantrasyonu maksimum seviyeye ulaşır. Bu süre içinde dokularda herhangi bir değişikliğe uğramaz. Donepezil metabolitleri büyük oranda karaciğer sirkülasyonu, safra ve oradan da dışkı yoluyla dışarı atılır [56].

Matsui ve arkadaşlarının (1999), ¹⁴C ile işaretlenmiş Donepezil ile ratlarda yaptıkları çalışmada, glukuronid kongugasyonu tarafından izlenen O-demetilasyon ve piperidin halkasındaki N-dealkilasyon gibi iki büyük metabolit yolun yanında piperidin

halkasındaki N-oksidasyon ve sülfat konjugasyonunun takip ettiği aromatik hidroksilasyon metabolit yollarını izleyerek metabolitlerine ayrıldığını belirlemişlerdir [56]. Araştırmacılar ikincil metabolitlerin oluşmasında, insan karaciğer mikrozomlarında bulunan CYP3A4'ün önemli rol oynadığını, bunun yanında bazı metabolitlerin oluşmasında CYP2C9'un da etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Donepezil, bahsedilen bu metabolit yolları izleyerek 15'den fazla metabolite dönüşür. Ancak, beyinde değişikliğe uğramış Donepezil veya Donepezil metabolitlerine rastlanmamıştır [56].

Oral yoldan 1 mg/kg'lık tek doz halindeki uygulama sonucunda, plazmadaki metabolize olmamış donepezilin, toplam radyoaktivite seviyesine oranı, doz alımından itibaren 0,5, 4 ve 8 saat sonra sırasıyla, % 32,70, 9,42 ve 4,31 olarak tespit edilmiştir. Beyinde ise bu oran aynı süreler için sırasıyla, % 93,00, 87,90 ve 86,90 olarak ölçülmüştür. 48 saat sonunda birçok dokuda gözlenmeyen radyoaktiviteye, 148 saat sonra testis ve karaciğer dışında hiçbir dokuda rastlanmamıştır [56].

Yapılan literatür araştırmasında bu etken maddeyle ilgili fazla genotoksisite çalışmasına rastlanmamıştır. Ancak bu etken maddeyi ilk olarak piyasaya süren firmanın yayınladığı çalışma sonuçlarına göre; Donepezil HCl'nin LD₅₀'si sıçanlarda ağız yoluyla yapılan uygulamalarda 32,6 mg/kg, damar yoluyla yapılan uygulamalarda 7,6 mg/kg, farelerde ağız yoluyla yapılan uygulamalarda 45,2 mg/kg, damar yoluyla uygulamalarda 3,7 mg/kg olarak bulunmuştur [57]. Embriyo/Fetal gelişimi üzerine yapılan çalışmada günde 1 mg/kg donepezil verilen sıçanlarda ve 3 mg/kg donepezil verilen tavşanlarda teratojenik olmadığı tespit edilmiştir [57]. Bakteriyel mutajenite testi (ames) uygulamasında *Salmonella* ve *E.coli*'de sonuç negatif çıkmıştır. Çin hamsterı yumurtalık hücrelerinde in vitro kromozom anormalliği pozitif, fare de in vivo mikronukleus testi negatif sonuç vermiştir [57].

Çalışmamızda 0,05, 0,1 0,5, 1 ve 2 µg/mL'lik dozlarda uygulamalar yapılmıştır. Mitotik indeks 0,1 µg/mL'lik dozdan itibaren hem negatif hem de çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı azalış göstermiştir. Mitotik indeksteki bu azalma Donepezil'in 0,1 µg/mL'lik konsantrasyondan sonra sitotoksik etkili olduğu anlamına gelmektedir.

Kosasa ve arkadaşlarının (2000) beyin ve plazma kolinesteraz aktivitelerini incelendiği çalışmada donepezilin minimum etkili dozunun 0,63 mg/kg olduğu tespit etmişlerdir [58]. Bizim çalışmamızın sonuçları incelendiğinde de 0,5 1 µg/mL'lik dozdan itibaren kromozom anormalliği artışlarının anlamlı olduğu belirlenmiştir [58]. Kosasa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan elde ettiği sonuçlar ile bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar arasında benzerlik görülmektedir.

Kimyasal maddelerin canlılar üzerindeki zararlı etkilerinin incelenmesi için çeşitli testlerden yararlanılmaktadır. Kromozom anormalliği, mikronukleus oluşumu gibi sitogenetik testler genotoksik hasarın incelenmesinde kullanılan testlerden bazılarıdır [49].

Bu çalışmada Asetilkolinesteraz inhibitörü Donepezil HCl'in genotoksik etkileri insan periferal lenfositlerinde in vitro şartlarda incelenmiştir. Lenfositler DNA hasarları, kromozomal anormallikler ve MN oluşumu gibi genotoksik etki mekanizmalarını araştırmak için uygun hücreler olarak kabul edilmektedir [59].

Yapılan çalışma ile Donepezil HCl'in insan periferal lenfositlerinde KA oluşumunu indüklediği ve anormal hücre frekansını arttırdığı saptanmıştır. Bu anormallikler kromatid ve kromozom kırıkları ile fragmentlerdir. Artışların özellikle 0,5 µg/mL'lik dozdan itibaren hem kontrole hem de çözücü kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Kromozom anormalliği testleri, kimyasal maddelerin genotoksik risklerinin belirlenmesinde kullanılan en hassas kısa süreli mutajenite testleri arasında yer almaktadır [60, 61].

Mikronukleus çalışmasının sonuçları incelendiğinde tüm konsantrasyonlarda kontrol ve çözücü kontrole kıyasla anlamlı artışlar gözlenmiştir. Mikronukleus, hücre bölünmesinin anafaz evresinde kromozomların geri kalmasından ya da kromozom fragmentlerinden köken almaktadır. MN testi, mitoz geçiren tüm insan, hayvan ve bitki hücrelerinde, fiziksel ve kimyasal ajanların meydana getirdiği genotoksik etkilerin belirlenmesinde güvenli olarak kullanılabilir [62]. Çalışma sonuçlarına göre insan periferal lenfositlerinde mikronukleus oluşumunun indüklenmesinin Donepezil HCl'nin klastojenik etkisinden kaynaklandığını

söyleyebiliriz. Çünkü Donepezil HCl yapısal kromozom anormalliklerini de uyarmıştır. Bu konuda kesin yargıya ulaşmak için diğer genotoksitite testlerine ve in vivo çalışmalara da ihtiyaç vardır.

Donepezilin nöron kaybını engellenmesi, asetilkolin reseptörlerini aktive etmesi, buna bağlı olarak gerçekleşen ve mekanizması tam olarak açıklanamayan moleküler basamakların aktivasyonu, nöron koruyucu etkinin ortaya çıkması ve bu sayede nöronal apoptozisin ortadan kalkması şeklinde ifade edilmiştir [52]. Ancak çalışmamız sonucunda etken maddenin klastojenik etkisi göz önüne alındığında bu nörodejenerasyon kaybını engelleyen mekanizmanın tam olarak açıklanması çok daha fazla önem kazanmıştır.

Yapılan bu çalışma sonucunda, Donepezil HCl'nin insan periferik lenfositlerinde in vitro şartlarda 24 saatlik muamelesinde 0,5 µg/mL'lik dozdan sonra genotoksik etkiye neden olduğu saptanmıştır. Kromozomal anormallik frekansında saptanan artış, bu etken maddeyi içeren ilaçlarla tedavi gören Alzheimer hastalarının genotoksik risk altında olduklarını işaret etmektedir.

Bu ve benzeri etken maddeye sahip ilaçların muhtemel yan etkilerinin ortaya çıkarılabilmesi için benzer çalışmaların yanısıra in vivo çalışmaların da yapılmasına ihtiyaç vardır. Bu ve benzeri etken maddeli ilaçların tedavi amaçlı kullanımında da benzer çalışmaların sonuçlarının dikkate alınması daha sağlıklı sonuçların alınmasına yardımcı olacaktır. Bu araştırma aynı zamanda, bu alanda çalışma yapacak diğer bilim insanlarına kaynak oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] EKER, E., Alzheimer hastalığı. Türkiye’de Sık Karşılaşılan Psikiyatrik Hastalıklar. Sempozyum Dizisi. 62:85-100, 2008.
- [2] FERRI, CP., ve ark.Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. Lancet. 2112-2117, 2005.
- [3] KOÇER, B., Demans epidemiyolojisi. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı, Ankara. Demans Dizisi. 1:41-44, 1999.
- [4] ŞAHİN, H., YAZICI, T., Alzheimer hastalığı. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı, Samsun. Klinik Gelişim Dergisi; 48-52, 2007.
- [5] IŞIK, A., Alzheimer hastalığı. GATA İç Hastalıkları AD Geriatri BD. <http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/geriatri/.../Alzheimer%20Hast.doc> (14.10.2009).
- [6] ERCAN, S., Alzheimer hastalığında tedavisinde kullanılan kolinesteraz inhibitörleri. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara. Demans Dergisi. (2):5-9, 2002.
- [7] KNOPMAN, DS., Management of cognition and function: New results from the clinical trails programme of Aricept® (Donepezil HCl). The International Journal of Neuropsychopharmacology. 3(7):13-20, 2000.
- [8] DOODY, RS., DUNN, JK., CLARK, CM., ve ark. Chronic donepezil treatment is associated with slowed cognitive decline in Alzheimer’s Disease. Demnet Geriatr Cogn Disord, 12(4):295- 300, 2001.
- [9] GREEN, RC.,Alzheimer’s disease and other dementing disorders in adults. Clinical Neurology, RJ Joynt (Ed), Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, s.2-3,16-21, 1995.
- [10] ROSSOR, M., Primary degenerative dementia. Neurology In Clinical Practice. The Neurological Disorders, Cilt 2, WG Bradley (Ed), Butterworth- Heinmann, s.1416-1418, 1991.
- [11] CLARK, G., CUMMINGS., Demans tanısı ve tedavisi. UCLA David Geffen Tıp Okulu, Nöroloji, Psikiyatri ve Biyodavranışsal Bilimler Bölümü, Los Angeles, CALIFORNIA. Demans Dergisi. (1): 21-29, 2005.

- [12] SCHMAND, B., SMITH, J., LINDEBOOM, J., ve ark. Low education is a genuine risk factor for accelerated memory decline and dementia. *Journal of Clinical Epidemiology*. 50:1025- 1033, 1997.
- [13] <http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/noroloji/demans.htm> (13.04.2010).
- [14] <http://www.psikiyatri-psikoterapi.com/yasli-psikiyatrisi/58-demans.html> (1.5.2010).
- [15] GURVİT, İ, H., Demans sendromu, Alzheimer Hastalığı ve Alzheimer dışı demanslar. *Nöroloji Ders Kitabı. Güneş Kitabevi*. 367-415, 2002.
- [16] BICK, KL., Alzheimer hastalığının başlangıç öyküsü. Çeviri editor; Gürvit, İH. *Alzheimer hastalığı. Yelkovan Yayıncılık*. 1-10, 2001.
- [17] İŞERİ, P., Demanslı hastaya klinik yaklaşım ve tedav. *Sted*. 12:458, 2008.
- [18] GURVIT, H., EMRE, M., TINAZ, S., ve ark. The prevalence of dementia in an urban Turkish population. *American Journal Alzheimers Disease Other Dementia*. 23(1): 67-76, 2008.
- [19] BICKEL, H., KURZ, A., Education, occupation, and dementia: the Bavarian school sisters study *Dementia Geriatric Cognitive Disorders*. 27(6): 548-556, 2009
- [20] Rocca WA, Hofman A, Brayne C ve ark. The prevalence of vascular dementia in Europe: facts and fragments from 1980-1990. *Annals of Neurology*; 30(6):817-824, 1991.
- [21] TOPÇUOĞLU, E., Alzheimer hastalığı. *Geriatrici*. (1):2:63, 1998.
- [22] YALGIN, Ç., Alzheimer hastalığında kolinomimetik tedavisi. 2001 <http://www.bilimfeneri.gen.tr/kitaplik/pdf/kolinomimetik.pdf> (7.03.2008).
- [23] HUTTON, M., BUSFIELD, F., WRAGG, M., CROOK, R., PEREZ-TUR, J., CLARK, RF., PRIHAR, C., TALBOT, C., PHILLIPS, H., WRIGHT, K., BAKER, M., LENDON, C., DUFF, K., MARTINEZ, A., HOULDEN, H., NICHOLS, A., KARRAN, E., ROBERTS, C., VENTER, JC., ADAMS, MD., CLINE, RI, PHILLIPS, CA., FULDNER, RA., HARDY, J. GOATE, A., Complete analysis of the presenilin 1 gene in families with early onset Alzheimer's disease. *Neuroreport*.7:801-805, 1996.
- [24] SHERRINGTON, R., FROELICH, S., SOTBI, S., CAMPION, D., CHI, H., ROGAEVA, BA., LEVESQUE, G., ROGAEV, EI., LIN, C., LIANG, Y., IKEDA, M., MAR, L., BRICE, A., AGID, Y., PERCY, MB., CLERGET-DARPOUX, F., PIACENTINI, S., MARCON, G., NACMIAS, B., AMADUCCI, L., FREBOURG, I., LANNFET, L., ROMMENS, JM., ST GEORGE-HYSLOP, PH., Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant. *Human Molecular Genetics*

- (5)985-988, 1996.
- [25] YOKEŞ, B., Alzheimer hastalığının moleküler biyolojisi. Türk Nöroloji Dergisi. 11(3):201-222, 2005.
- [26] HOCAOĞLU, S., Alzheimer hastalığının moleküler patogenezi. I. Tıbbi Biyolojik Bilimler Kongresi. İstanbul. (10) Ocak 2005.
- [27] WALDEMAR, G., DUBOIS, B., EMRE, M., ve ark. Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline. European Journal of Neurology. 14(1): 1-26, 2007.
- [28] Dozly Prospektüs. Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş. 209/67, 2006
- [29] Aricept Prospektüs. Pfizer. Mayıs 2005.
- [30] İŞERİ, P., EFENDİ, H., Alzheimer Hastalığında Donepezil ve Rivastigmin'in Etkinliği ve Güvenilirliği. Geriatri 6(4):119 -123, 2003.
- [31] ANGELANTONIO, S., Donepezil modulates nicotinic receptors of substantia nigra dopaminergic neurones. British Journal of Pharmacology. 141(4): 644-652, 2004.
- [32] AARSLAND, D., LAAKE, K., LARSEN, J.P., JANVIN, C., Donepezil for cognitive impairment in Parkinson's disease: a randomised controlled study. Journal of Neurology and Neurosurgery. Psychiatry. 72:708-712, 2002.
- [33] STEELE, L., GLAZIER, R., Is donepezil effective for treating Alzheimer Disease. Canadian Family Physician. 1068, 1999
- [34] BİNBAŞ, Z., MIRSAL, H., KALYONCU, A., PEKTAŞ, Ö., GENÇ, Y., ÜNSALAN, N., BEYAZYÜREK, M., Alkolle bağlı oluşan korsakoff sendromlu iki olguda donepezilin etkinliği. Klinik Psikofarmakoloji Bülteni. 18(1), 2008 .
- [35] WATSON, JD., CRICK, FH., Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. Nature. 171: 737-8, 1953.
- [36] BAGCI, H., İnsan genom projesi. DEU Tıp Fakültesi Dergisi Özel Sayısı. 11-9, 2002.
- [37] AKBABA, G., Genotoksikoloji. Bilim ve Teknik Kulübü. (10), 2004.
- [38] Genetik araştırma ve uygulama alanları. <http://www.genbilim.com/content/view/4309/32> (24.4.2009).
- [39] VOGEL, F., MOTULSKY, AG., Human genetics. 3rd ed. New York:

Springer- Verlag, 1998.

- [40] WALDEYER, W., Ueber karyokine und ihre Beziehung zu den Befruchtungsvorgängen. Arch Mikr Anat. 32: 1, 1988.
- [41] TIJO, JH., LEVAN, A., The chromosome number of man. Hereditas 42: 1-6, 1956.
- [42] BOZKURT, G., TABAKCIOGLU, K., Psikiyatrik genetik araştırmalarda kullanılabilir genetik yöntemler: III. Psikiyatri ve sitogenetik. 3P Dergisi. 20-30, 2004.
- [43] BAŐARAN, N., Tıbbi genetik. İstanbul: Nobel tıp kitabevleri, 1999.
- [44] ZAMANI, A., DEMİREL, S., Mikronukleus tekniği ve kullanım alanları. Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Konya. Genel Tıp Dergisi. 12(3):123-127, 2002.
- [45] Aricept Prospektüs. Pfizer Inc, New York, NY 10017.
- [46] VAN, H. G., Dementia. Am J Med 83(1): 101-10, 1988.
- [47] ROLOFF, E., Platt B: Biochemical dysfunction and memory loss: the case of Alzheimer's dementin. Cell. Mol. Life Sci. 55: 601-616, 1999.
- [48] SMITH, MA., ROTTKAMP, CA., NUNOMURA, A., RAİNA, AK., PERRY, G., Oxidative stress in Alzheimer's disease. Biochemistry Biophys Acta. 1502: 139-144, 2000.
- [49] VURAL, N., Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları; 33, 2005.
- [50] FUJIKI, M., ve ark. Neuroprotective effect of donepezil, a nicotinic acetylcholine-receptor activator, on cerebral infarction in rats. Science direct Brain Research (1043) :236-241, 2005.
- [51] AKASOFU, S., ve ark. Protective effect of donepezil in a primary culture of rat cortical neurons exposed to oxygen-glucose deprivation. European Journal of Pharmacology. (472): 57- 63, 2003.
- [52] GÜVEN, G., Mikronukleus Tekniği ve kullanım alanları. I. Tıbbi Biyolojik Bilimler Kongresi. (9):50-52, 2005.
- [53] FUJIKI, M., Neuroprotective and anti-amnesic effect of donepezil, a nicotinic acetylcholine-receptor activator, on rats with concussive mild traumatic brain injury. Journal of Clinical Neuroscience. 15(7):791-796, 2008.
- [54] OLSZEWSKA, Z. B., Mechanisms of over-activated innate immune system

regulation in autoimmune and neurodegenerative disorders.
Neuropsychiatric Disease and Treatment. 3(3) 365–372, 2007.

- [55] Leszek J, Basinski T, Kiejna A, et al. Donepezil protects monocytes from Beta-amyloid-induced death. *Neurobiological Aging*. P3–281, 2004.
- [56] MATSUI, K., MISHIMA, M., NAGAI, Y., YUZURIHA, T. YOSHIMURA, T., Absorption, distribution, metabolism, and excretion of donepezil (Aricept) after a single oral administration to rat. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. Drug Metabolism and Disposition*. (27)12, 1999.
- [57] Pfizer data sheet. 02-Sep-2010.
- [58] KOSASA, T., ve ark. Inhibitory effect of orally administered donepezil hydrochloride _E2020/, a novel treatment for Alzheimer’s disease, on cholinesterase activity in rats. *European Journal of Pharmacology*. 389 173–179, 2000.
- [59] ERADI, L. A., “Evaluation of genotoxic damage in wild rodents from a polluted area in the Czech Republic” *Folia Zoo*. 52, 1, 57–6, 2006.
- [60] GÜLGÜN, G., ve ark. 17 – β Estradiole ile indüklenen insane lenfositlerindeki mikronukleus sıklığının incelenmesi. *İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı. Cerrahpaşa Tıp Dergisi*. 37:10-13, 2006.
- [61] PERRY, P. and EVANS, H.J., Cytological Detection of Mutagen Carcinogen Exposure by Sister Chromatid Exchange. *Nature*.258: 121-125, 1975.
- [62] CARRANO, A.V., ve ark. Sister Chromatid Exchanges As An Indicator Of Mutagenesis. *Nature*. 271551-553, 1978.

ÖZGEÇMİŞ

Nihal KOÇ 1979 yılında Kocaeli’de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Kocaeli’de tamamladı. 1998 yılında Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimine başladı ve 2003 yılında Biyolog ünvanı alarak mezun oldu. 2003-2009 yılları arasında çeşitli özel öğretim kurumlarında öğretmen olarak görev aldı.