



**TENAFOVİR ALAFENAMİDE (TAF) İÇEREN KİTOSAN  
NANOPARTİKÜLÜ FORMÜLASYONLARININ HAZIRLANMASI,  
GENOTOKSİK VE MİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Selcen SEZER**

**TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Şengül YÜKSEL**

**Doktora Tezi -2020**

**T.C  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TENOFOVİR ALAFENAMİDE (TAF) İÇEREN KİTOSAN  
NANOPARTİKÜLÜ FORMÜLASYONLARININ  
HAZIRLANMASI, GENOTOKSİK VE MİTOTOKSİK  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Selcen SEZER**

**Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Şengül YÜKSEL**

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından  
2018/1356 Proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA  
2020**

# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ .....	xii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Hepatit B'nin Tarihçesi .....	4
2.2. Kronik Hepatit B'nin Epidemiyolojisi .....	4
2.3. HBV'nin Yapısı .....	6
2.4. HBV'nin Genom Organizasyonu .....	7
2.5. HBV'nin Yaşam Döngüsü ve Replikasyonu.....	9
2.6. HBV'nin Viral Yüğü.....	12
2.7. HBV'nin Genotiplendirmesi .....	12
2.8. Kronik Hepatit B'nin Belirtileri .....	13
2.9. Kronik Hepatit B Tanısı .....	13
2.10. Kronik Hepatit B'nin Bulaşma Yolları .....	14
2.11. Kronik Hepatit B Tedavisi .....	14
2.11.1. İnterferon Tedavisi .....	15
2.11.2. Nükleot(z)id Analoglar ile Tedavi .....	16
2.11.3. Nükleot(z)id Analoglarının Genetik ve Mitokondriyal Toksisite Üzerine Etkileri .....	24
2.12. İlaç Taşınım Sistemi: Kitosan .....	26
2.12.1. TAF'ın Kitosan ile Enkapsülasyonu .....	27
2.13. Genotoksisite ve Sitotoksisite Testleri .....	29
2.13.1. Mikronükleus Testi .....	29
2.13.2. Komet Testi (Tek Hücre Jel Elektroforezi).....	31
2.14. Mitokondriyal Toksisite Testleri.....	32
2.15. Tezin Amacı .....	33
3. MATERYAL VE METOT .....	34

3.1. Materyal .....	34
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı .....	34
3.1.2. Uygulanan İlaç Formülasyonu .....	35
3.1.3. Kullanılan Laboratuvar Ekipmanları.....	36
3.1.4. Mikronükleus ve Komet Testleri İçin Hazırlanan Solüsyonlar .....	39
3.1.5. Moleküler Analizler İçin Kullanılan Kitler.....	39
3.2. Metot .....	40
3.2.1. Taf İçeren Kitosan Nanopartiküllerin Hazırlanması .....	40
3.2.2. Genotoksisite ve Mitotoksisite Testleri.....	42
4. BULGULAR.....	56
4.1. TAF İçeren Kitosan Nanopartikül Formülasyonu Bulguları .....	56
4.1.1. Hazırlanan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	56
4.1.2. TAF'ın Spektrofotometrik Kontrolü.....	61
4.1.3. TAF'ın Enkapsülasyon Veriminin Hesaplanması.....	62
4.1.4. <i>In Vitro</i> Salım Çalışmaları .....	63
4.2. Genotoksisite ve Mitotoksisite Testlerinin Bulguları .....	63
4.2.1. Tripan Mavisi İle Hücre Sayımı.....	63
4.2.2. Hücrelerin Mikroskopik Analizi .....	64
4.2.3. Mikronükleus (Mn) Analizi .....	65
4.2.4. Komet Yöntemi İle DNA Hasar Tespiti Bulguları .....	67
4.2.5. Annexin V FITC İle Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi .....	69
4.2.6. Mitokondriyal Membran Potansiyelinin ( $\Delta\Psi_m$ ) Belirlenmesi .....	71
4.2.7. Süperoksit Radikallerin Tespiti.....	72
4.2.8. Hücrel ROS Tespiti.....	72
4.2.9. Elde Edilen DNA'nın Kontrolü .....	73
4.2.10. Mitokondriyal DNA İçeriğinin COXII Geni İle Analizi .....	74
4.2.11. Mito-Nükleer Sinyal Genlerinin (RYR1, ATF2 ve PCK1) Rölatif Ekspresyon Analizi .....	76
5. TARTIŞMA .....	79
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	89
KAYNAKLAR .....	90
EKLER.....	104

EK-1. Özgeçmiş .....	104
EK-2. Etik Kurul Onayı .....	107



## TEŞEKKÜR

Tez araŐtırman ve doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimleriyle yardım eden ve hep destek olan, değerli danıŐman hocam Sayın Prof. Dr. Şengül YÜKSEL'e İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndaki değerli öğretim üyelerine,

Tez dönemimde, zorlandığım anlarda yol gösterdiği ve tez çalışmamdaki analizlerde her zaman yardımcı olduğu için değerli hocam Prof. Dr. Ahmet KOÇ'a

Çalışmamdaki kitosan nanopartikül formülasyonlarını hazırlayan ve bu süreçte yardımcı olan İnönü Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof.Dr. Burhan ATEŞ ve Dr. Ahmet ULU'ya

Tez çalışmamın deneylerinde yardım eden ve tüm zorluklarda yanımda bulunan değerli arkadaşlarım Kübra DURMUŐ ve Özge ARSLAN'a

Son olarak, hayatım boyunca benden desteklerini, sevgilerini ve sabırlarını hiç esirgemeyen, zor zamanlarımda her zaman arkamda olan aileme,

Teşekkür ederim...

**Selcen SEZER**

## ÖZET

### **Tenofovir Alafenamide (TAF) İçeren Kitosan Nanopartikülü Formülasyonlarının Hazırlanması, Genotoksik ve Mitotoksik Etkilerinin Araştırılması**

**Amaç:** TAF, 2016 yılında kronik hepatit B tedavisi için onaylanan, nükleotid revers transkriptaz inhibitör grubu (NRTI) yeni bir ilaçtır. Bu çalışmada, TAF ilacını içeren kitosan nanopartiküllerinin hazırlanması, karakterizasyonunun yapılması, TAF ve kombinasyonlarının mitotoksik/genotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Materyal ve Metot:** 45 µM TAF ve kitosan nanopartikülü, altı gün süresince HepG2 hücrelerine uygulanmıştır. TAF ve kombinasyonlarının olası genotoksik/sitotoksik etkileri; mikronükleus (Mn), komet ve apoptoz testleri ile değerlendirilmiştir. Mitotoksik etkiler ise; mtDNA, mitokondriyal membran potansiyeli ( $\Delta\Psi_m$ ), süperoksit anyonları ile ROS seviyelerinin belirlenmesi ve RYR1, PCK1, ATF2 gen ifadelerinin değerlendirilmesi ile incelenmiştir.

**Bulgular:** Genotoksik testler bakımından Mn ve komet değerleri; TAF ve TAF içeren kitosan nanopartikül gruplarında yüksek bulunmuştur, komet testi açısından ayrıca kitosan grubu da yüksek olarak belirlenmiştir ( $p<0.05$ ). mtDNA seviyesinin göstergesi olarak COXII gen ifadesi değişiklikleri TAF grubunda düşük bulunurken; kitosan ve TAF içeren kitosan gruplarında yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ).  $\Delta\Psi_m$  için TAF ve TAF içeren kitosan uygulama gruplarının kontrole göre azaldığı görülmüştür ( $p<0.05$ ). Hücrel ROS seviyesi, tüm uygulama gruplarında yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Annexin V ile apoptoz testinde, gruplar arasında farklılık görülmemiştir. Mitokondri-nükleus sinyal yolağı ile ilişkilendirilen genlerden; ATF2'nin gen ifade seviyesi değişmemiştir. RYR1 gen ifadesinin kitosan ve TAF gruplarında azaldığı, TAF içeren kitosan grubunda ise arttığı görülmüştür. PCK1 gen ifadesinin ise; TAF grubunda arttığı, kitosan ve TAF içeren kitosan gruplarında azaldığı görülmüştür ( $p<0.05$ ).

**Sonuç:** TAF'ın çalışılan dozda HepG2 hücrelerinde, genotoksik ve mitotoksik etkileri olduğu görülmüştür. Kitosan ve kitosan ile enkapsüle TAF'ın ise birçok parametrede genotoksik ve mitotoksik etkisi bulunmamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Genotoksisite, Hepatit B, HepG2, kitosan enkapsülasyonu, mitotoksisite, TAF.

## ABSTRACT

### **Preparation of Chitosan Nanoparticle Containing Tenofovir Alafenamide (TAF) Formulations, Investigation of Genotoxic and Mitotoxic Effects**

**Aim:** TAF is a new nucleotide reverse transcriptase inhibitor group (NRTI) drug, approved for the treatment of chronic hepatitis B in 2016. In this study, it was aimed to prepare, characterize chitosan nanoparticle containing TAF drug and to investigate mitotoxic/genotoxic effects of TAF drug and its combinations.

**Material and Method:** 45  $\mu$ M TAF and chitosan nanoparticle were applied to HepG2 cells for six days. Possible genotoxic/cytotoxic effects of TAF and its combinations were evaluated by (Micronuclei) Mn, comet and apoptosis tests. Toxic effects on mitochondria were investigated by evaluating mtDNA, mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ), superoxide anions, ROS levels, and RYR1, PCK1, ATF2 genes expression.

**Results:** In terms of genotoxic tests, Mn and comet values were found higher in TAF and and chitosan nanoparticle containing TAF groups, and chitosan group was also determined for comet test ( $p < 0.05$ ). As an indicator of mtDNA level, COXII gene expression changes were found low in the TAF group, whereas chitosan and chitosan containing TAF groups were high ( $p < 0.05$ ). For  $\Delta\Psi_m$ , it was observed that chitosan containing TAF and TAF application groups decreased compared to the control ( $p < 0.05$ ). Cellular ROS level was found higher than control in all application groups ( $p < 0.05$ ). There was no difference between the groups in apoptosis test with Annexin V ( $p > 0.05$ ). Among the genes associated with the mitochondria-nucleus signal pathway, the level of gene expression of ATF2 has not changed. RYR1 gene expression increased in chitosan containing TAF group while decreased in chitosan and TAF groups. It was observed that PCK1 gene expression increased in TAF group and decreased in chitosan and chitosan containing TAF groups ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** TAF has been shown to have genotoxic and mitotoxic effects in HepG2 cells at the studied dose. TAF encapsulated with chitosan and chitosan have not been found to have genotoxic and mitotoxic effects in many parameters.

**Key Words:** Chitosan encapsulation, genotoxicity, hepatitis B, HepG2, mitotoxicity, TAF.



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ALT</b>	: Alanin amino transferaz
<b>ATF2</b>	: Aktive edici transkripsiyon faktör- 2
<b>Bç</b>	: Baz çifti
<b>CBMN</b>	: Sitokinezi bloklanmış mikronükleus
<b>cccDNA</b>	: Halkasal, kovalent, kapalı DNA
<b>cDNA</b>	: Komplementer DNA
<b>COXII</b>	: Sitokrom c oksidaz II
<b>DNA</b>	: Deoksiribo nükleik asit
<b>ECDC</b>	: Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi
<b>FTIR</b>	: Fourier dönüşümlü kızılötesi
<b>HBcAg</b>	: Hepatit B çekirdek antijeni
<b>HBsAg</b>	: Hepatit B yüzey antijeni
<b>HBV</b>	: Hepatit B Virüsü
<b>IgM</b>	: İmmünnoglobulin-M
<b>INF</b>	: İnterferon
<b>Kb</b>	: Kilobaz
<b>KKD</b>	: Kardeş kromatid değişimi
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>µM</b>	: Mikromolar
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>Mn</b>	: Mikronükleus
<b>mtDNA</b>	: Mitokondriyal DNA
<b>MVB</b>	: Multiveziküler vücut
<b>NPC</b>	: Nükleer por kompleksi
<b>NRTI</b>	: Nükleotid revers transkriptaz inhibitörü
<b>OAT</b>	: Organik anyon taşıyıcı
<b>ORF</b>	: Açık okuma çerçevesi
<b>PCK1</b>	: Fosfoenolpirüvat karboksikinas- 1
<b>PCR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>PDI</b>	: Polidispersite indeksi

<b>PgRNA</b>	: Pregenomik RNA
<b>Pol</b>	: Polimeraz
<b>rcDNA</b>	: Serbest halkasal DNA
<b>RFLP</b>	: Restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi
<b>RNA</b>	: Ribo nükleik asit
<b>RNS</b>	: Reaktif nitrojen türleri
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>RTG</b>	: Retrograd
<b>RT-PCR/qPCR</b>	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
<b>RYR1</b>	: Riyanodin reseptör- 1
<b>SEM</b>	: Taramalı elektron mikroskobu
<b>TAF</b>	: Tenofovir alafenamide (fumarat)
<b>TDF</b>	: Tenofovir disoproksil fumarat
<b>TFV</b>	: Tenofovir
<b>TPP</b>	: Tripolipofosfat
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b><math>\Delta\Psi_m</math></b>	: Mitokondri membran potansiyeli
<b>DNA<sub>T</sub></b>	: DNA kuyruk uzunluğu

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. HBsAG prevalansı .....	5
Şekil 2.2. HBV partikül yapısı .....	7
Şekil 2.3. HBV genomik yapısı .....	9
Şekil 2.4. HBV yaşam döngüsü .....	12
Şekil 2.5. Antiviral nükleoz(t)id analoglarının kimyasal yapısı .....	17
Şekil 2.6. TFV ve TDF'nin yapısı .....	21
Şekil 2.7. TAF'ın hücre için metabolize edilmesi .....	22
Şekil 2.8. TAF veya TDF'den gelen TFV'nin aktif renal eliminasyonu .....	24
Şekil 2.9. Kitinden kitosan eldesi .....	26
Şekil 2.10. Mn oluşum mekanizması .....	31
Şekil 3.1. İş akış planı .....	34
Şekil 3.2. TAF'ın açık formülü .....	35
Şekil 3.3. JC-1 membran potansiyeli, $\Delta\Psi_m$ .....	49
Şekil 4.1. Elde edilen FTIR spektrumları .....	57
Şekil 4.2. Kitosan nanopartiküllerin (a, c, e) ve TAF içeren kitosan nanopartiküllerin (b, d, f) farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri .....	58
Şekil 4.3. Kitosan nanopartiküllerin (a) ve TAF içeren kitosan nanopartiküllerin (b) EDAX spektrumları .....	59
Şekil 4.4. Kitosan nanopartiküllerin (a) ve TAF içeren kitosan nanopartiküllerin (b) EDAX-haritalama görüntüleri .....	60
Şekil 4.5. (a) TAF ilacının 200-400 nm aralığı absorbanans spektrumu ve (b) TAF ilacının belli konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltisinin kalibrasyon grafiği .....	62
Şekil 4.6. Kitosan nanopartiküllerinden TAF'ın <i>in vitro</i> salım grafiği. ....	63
Şekil 4.7. Tripan mavisi ile hücre sayımı .....	64
Şekil 4.8. Uygulama gruplarındaki hücrelerin mikroskopik görüntüsü .....	65
Şekil 4.9. Gruplar arası Mn karşılaştırmalı analizi .....	66
Şekil 4.10. Uygulama gruplarının komet analiz görüntüleri .....	67

<b>Şekil 4.11.</b> Gruplar arasında baş kısım DNA yüzdesi (% DNA <sub>H</sub> ) ve kuyruk kısım DNA yüzdesi (% DNA <sub>T</sub> ), kuyruk uzunluğu (T <sub>L</sub> ) karşılaştırılması. ....	68
<b>Şekil 4.12.</b> Gruplar arasında kuyruk yoğunluğu (Tail Intensity) ve baş yoğunluğu (Head Intensity) karşılaştırılması .....	69
<b>Şekil 4.13.</b> Uygulama gruplarından FACS analizi.....	70
<b>Şekil 4.14.</b> Gruplar arası erken ve geç apoptoz yüzdelerinin karşılaştırmalı grafiği .....	70
<b>Şekil 4.15.</b> Gruplar arası $\Delta\Psi_m$ analizi .....	71
<b>Şekil 4.16.</b> Gruplar arasındaki süper oksit radikallerinin karşılaştırması .....	72
<b>Şekil 4.17.</b> Gruplar arasındaki ROS miktarlarının karşılaştırması .....	73
<b>Şekil 4.18.</b> Agaroz jeldeki, uygulama gruplarının genomik DNA görüntüsü .....	74
<b>Şekil 4.19.</b> Kontrol DNA, COXII geninin erime eğrisi .....	75
<b>Şekil 4.20.</b> Uygulama gruplarından DNA ile COXII geninin RT-PCR'da büyüme büyüme eğrisi .....	75
<b>Şekil 4.21.</b> Uygulama gruplarındaki mtDNA miktarının COXII gen amplifikasyonu ile karşılaştırması.....	76
<b>Şekil 4.22.</b> RYR1, ATF2 ve PCK1 genlerinin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması .....	77
<b>Şekil 4.23.</b> Uygulama gruplarından elde edilen RYR1 geninin amplifikasyon eğrisi.....	77
<b>Şekil 4.24.</b> Uygulama gruplarından elde edilen ATF2 geninin amplifikasyon eğrisi.....	78
<b>Şekil 4.25.</b> Uygulama gruplarından elde edilen PCK1 geninin amplifikasyon eğrisi.....	78

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo No</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 3.1.</b> Deney cihazları listesi. ....	36
<b>Tablo 3.2.</b> Kimyasal listesi. ....	38
<b>Tablo 3.3.</b> Kit listesi ....	40
<b>Tablo 3.4.</b> Çalışmanın planı ve grupları ....	44
<b>Tablo 3.5.</b> Reaksiyon ortamı ....	51
<b>Tablo 3.6.</b> Reaksiyonun döngü koşulları.....	52
<b>Tablo 3.7.</b> Kalıp RNA- primer karışımı, birinci aşama.....	53
<b>Tablo 3.8.</b> Kalıp RNA-primer karışımı, ikinci aşama ....	53
<b>Tablo 3.9.</b> Gen primerleri.....	54
<b>Tablo 3.10.</b> RT PCR reaksiyon konsantrasyonları.....	54
<b>Tablo 3.11.</b> RT PCR döngü koşulları.....	55
<b>Tablo 4.1.</b> Hazırlanan nanopartiküllerin hidrodinamik çapları, zeta potansiyel ve PDI değerleri.....	61
<b>Tablo 4.2.</b> Tripan mavisi ile gruplardaki hücre yüzdeleri.....	64
<b>Tablo 4.3.</b> Gruplar arasında % DNA <sub>T</sub> 'nin karşılaştırması.....	68

# 1. GİRİŞ

Hepatit B hastalığı, karaciğer üzerinde etkili olan ve hem akut hem de kronik hastalık oluşturabilen viral bir enfeksiyondur (1). Viral hepatit ilk olarak M.Ö. 5. yüzyılda Hippocrates tarafından tanımlanmıştır (2). Kronik hepatit B, ciddi bir viral hepatit türüdür ve küresel ölçekte önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Dünya üzerindeki yaklaşık 2 milyar kişinin virüsle karşılaştığı ve 240 milyon kişinin ise kronik Hepatit B taşıyıcısı olduğu bildirilmiştir (1). Hastalığın prevalansı; yüksek, orta ve düşük endemisite bölgeleri şeklinde üçe ayrılmıştır, Türkiye orta endemisite içerisinde yer almaktadır (3).

Hastalık etkeni olan hepatit B virüsü (HBV), Hepadnaviridae ailesinden küçük bir DNA virüsüdür. HBV genomu, yaklaşık 3200 baz çiftine sahip, serbest, dairesel ve kısmen çift zincirli DNA içerir. Karaciğer hücrelerine girdiğinde, bu çift zincir birleşerek; kovalent olarak bağlanır ve kapalı halkasal süper sarmal DNA (cccDNA) molekülü oluşturulur. ccc DNA'dan konakçı enzimlerinin yardımı ile pregenomik RNA (pgRNA) molekülü oluşturulur ve virüsün revers transkriptaz enzimi sayesinde pgRNA'dan yeni viral DNA'lar sentezlenir (4).

Kronik hepatit B enfeksiyonunun tedavisindeki temel hedef, karaciğer hastalıklarını azaltmak için, direnç geliştirmeden virüsün baskılanmasıdır (5). Kronik hepatit B tedavisi için mevcut iki seçenek bulunmaktadır; interferonlar ve oral nükleot(z)id analogları. Daha uygun doz, daha az uzun dönem komplikasyonları ve daha başarılı viral baskılamadan dolayı öncelikle nükleot(z)id analogları tercih edilmektedir (6). Nükleot(z)id analogları, nükleotid revers transkriptaz inhibitörü (NRTI) olarak etki gösterir. Bu grup ilaçlar viral DNA'ya bağlanır ve DNA replikasyonunu bloke ederler. Böylece yeni zincir sentezi durdurulur (7). Nükleot(z)id analoglarından birisi olan Tenofovir (TFV), deoksi adenzin monofosfat analogu olarak etki gösteren NRTI grubu bir ilaçtır ve hücre içine girince; viral DNA replikasyonunda revers transkriptaz enziminin substrat bağlanma bölgesine bağlanarak, kompetitif olarak inhibe eder. Böylece bir zincir sonlandırıcısı olarak etki gösterir (8,9). TFV'nin ilk oral ön ilaç formu Tenofovir Disoproksil Fumarat (TDF)'dir. İlaç, kronik hepatit B tedavisi için 2008 yılında onay almıştır. TDF, hücre içi yarı ömrü ve zayıf biyo-uyumu ile geliştirilmeye açık olarak değerlendirilmektedir (10). Son zamanlarda TFV etken

maddeli yeni ilaç formülasyonu olarak Tenofovir Alafenamide (TAF) geliştirilmiştir ve kronik hepatit B tedavisi için 2016 yılında onaylanmıştır (11).

TAF, pasif difüzyon ve hepatik alım taşıyıcıları OATP1B1 ve OATP1B3 yoluyla primer hepatositlere girer. Primer hepatositlere alındıktan sonra, Ces 1 karboksil esteraz aracılığı ile TFV-Ala'ya dönüştürülür. Ardından, lizozomlarda asidik hidroliz ile TFV'ye hidroliz edilir. TFV, adenilat kinazlar (AMP kinaz) tarafından TFVp'ye ve NDP kinazlar tarafından TFVpp'ye fosforile edilir (12). TFVpp, TDF için olduğu gibi TAF'ın da nihai aktif metabolitidir (13). TFV'nin hücre içi konsantrasyonu TDF'ye kıyasla TAF'da altı buçuk kat fazla; serum konsantrasyonu ise %91 daha düşük bulunmuştur (14–16). Bu farmakokinetik farklılıklar göz önüne alındığında, TAF ilacı daha düşük konsantrasyon ile aynı etkinlikle kullanılabilir. TFV plazma seviyeleri açısından; günlük 25 mg TAF dozu, 300 mg TDF'ye biyo-eşdeğerdir. Yaklaşık otuz katlık bir fark ile toksisitenin de orantılı olarak azabileceği düşünülmektedir (17).

Antiviral ajanların, polimerik nanoparçacıklar ile özel taşınımı ve deneysel çalışmaların başında gelmektedir. Bu polimerik taşıyıcılardan kitosan, doğal yapısı ve biyo-uyumu ile en popüler nanotaşıyıcılardan birisidir. Kitinin deasetilasyonu sonucunda elde edilir (18). Asidik bir ortamda, yapısındaki amino grupları, protonasyon sonrasında pozitif yüklenir. Bundan dolayı kitosan, negatif yüklü moleküllerle etkileşime geçer. TAF; suda çözünebilen, küçük moleküllü bir ilaçtır, fosfat grupları içerir ve NaOH solüsyonunda negatif yüklüdür. Elektrostatik kuvvetler aracılığıyla kitosanla etkileşir. Dolayısıyla, kitosan nanopartikülleri TAF için kontrollü ilaç taşıyıcı sistem olarak tercih edilebilir.

TFV-TDF formülasyonu, etkin bir antiviraldir ancak uzun süreli kullanımda ciddi yan etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Özellikle karaciğer ve böbrek gibi organlar üzerinde toksisite gösterebilmektedir (19). İlacın hedef dışı etkilerin başında mitokondri gelmektedir. mtDNA pol $\gamma$ 'ya karşı düşük seviyede aktiviteye sahiptir ve bu durum mitokondriyal kayıp veya işlev bozukluğu ile mitokondriyal replikasyonda bozulmalara yol açabilmektedir (20). Mitokondriyal replikasyondaki inhibisyon sonucunda mtDNA seviyesinde düşüş ile birlikte iç mitokondriyal membran elektrokimyasal potansiyelinde ( $\Delta\Psi_m$ ) azalmaya neden olabilir (21). Mitokondriyal membran potansiyelindeki bozulma ve mtDNA miktarının azalması sonucunda mitokondriyal hasarlar ve ROS (reaktif oksijen türleri) ve RNS'de (reaktif nitrojen türleri) artışlar gözlenebilir. Tüm bu hasarlar hücreyi apoptoza götürebilir (20). TDF'nin ayrıca konakçı hücrelerde nükleer DNA'ya

bağlanarak, DNA kırıklarına yol açabileceği bunun sonucunda da kromozom kırılmaları, yeniden kromozomal düzenlenmeler, delesyon ve nokta mutasyonları gibi genotoksik etkilere neden olabileceği bildirilmiştir (22–24).

TDF ilacının nanopartikül formülasyonu ile ilgili çalışmalara dair literatürde az sayıda makaleye rastlanmıştır (2,25,26). TAF ilacı ise son üç yıldır klinik kullanıma başlandığı için çalışmalar yok denecek kadar az olup sadece taşıyıcı formülasyonu ile ilgili bir çalışma bulunmaktadır (27). Ayrıca TFV içeren TAF ilacının eski formülasyonunda belirtilen hücresel yan etkilerini izah eden çok az çalışma bulunmaktadır. Bu açıklığa katkı sağlaması amacıyla tez çalışmamızda; TAF içeren kitosan nanopartikülünün sentezi, karakterizasyonunun yapılması, TAF ilacı ve kombinasyonlarının mitotoksik/genotoksik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.





## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hepatit B'nin Tarihçesi

Virial hepatit ilk olarak M.Ö. 5. yüzyılda tanımlanmıştır. Hippocrates tarafından epidemik sarılık olarak tanımlanan hastalık özellikle 19 ve 20. yüzyıllardaki savaşlarda yaygın görülmüştür (2,28). “Serum hepatit” kavramını ise ilk kullanan kişi Lurman’dır. Lurman, 1885 yılında insan lenfi kullanımı ile Bremen’deki 191 gemi işçisi arasında hepatit salgını olduğunu belgelemiştir. En büyük serum hepatit salgını kanıtı, 1942 yılında, 50.000 ABD ordu personeli ve 300.000 ABD askerinin kontamine sarıhumma aşısı ile aşılmasının ardından sarılık ile hastaneye yatırılması sonucu oluşmuştur. Böylece hastalığın kan yolu ile bulaştığı belirlenmiştir (29).

Hepatit B’nin keşfi ile güvenli ve etkili aşıların geliştirilmesi, 20. yüzyılın dikkat çeken başarılarından. Blumberg ve arkadaşları, genetik polimorfizm araştırmaları sırasında Avustralyalı bir aborjinin kan serumundan, agar jelde presipitasyonu gözlemleyerek, hepatit B yüzey antijen (HBsAg) proteinini tanımlamış ve “Avustralya antijeni” adını vermişlerdir. Dane ve arkadaşları da HBV saflaştırması ile elektron mikroskopunda Dane partikülü adını verdikleri üç proteine rastlamışlardır. Bunlar; kor antijeni, DNA polimeraz ve viral DNA olarak tanımlanmıştır (30,31).

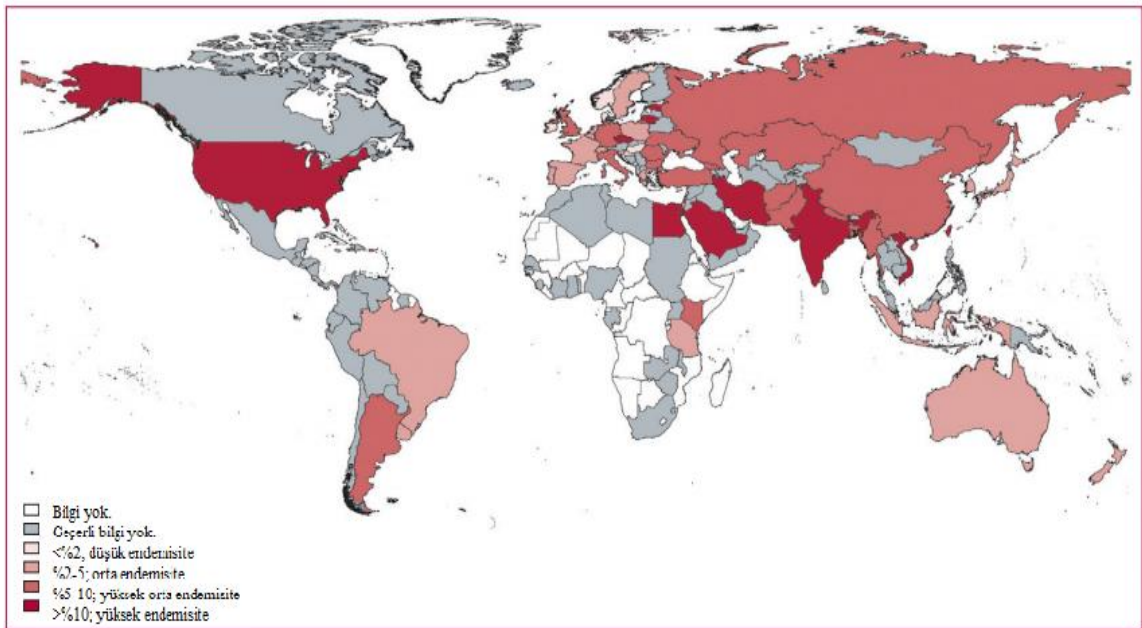
Daha sonraki yıllarda ise gönüllüler ile yapılan çalışmalarda, virüsün inaktif hale getirilmesi ile oluşturulan plazma kökenli aşılar ve son yıllarda ise geliştirilen rekombinant aşılar sayesinde hastalığı önlemek üzere büyük gelişmeler katedilmiştir (32).

### 2.2. Kronik Hepatit B'nin Epidemiyolojisi

Hepatit B, karaciğer üzerinde etkili olan ve hem akut hem de kronik hastalık oluşturabilen viral bir enfeksiyondur. Kronik hepatit B, en ciddi viral hepatit türüdür ve küresel seviyede sağlık sorunu oluşturmaktadır. Dünya üzerinde yaklaşık 2 milyar kişinin virüse maruz kaldığı ve 240 milyon kişinin ise kronik hepatit B taşıyıcısı olduğu bildirilmiştir (1). Her yıl yaklaşık olarak, 780 bin kişinin karaciğer sirozu ve karaciğer kanseri gibi karaciğer ile ilişkili hastalıklardan öldüğü tahmin edilmektedir.

Kronik hepatit B'ye karşı %98-100 koruma sağlayabilen güvenli ve etkili bir aşı mevcuttur. Hepatit B enfeksiyonunun önlenmesi, kronik hastalık ve karaciğer kanseri de dâhil olmak üzere komplikasyonların gelişimini önlemektedir (33).

Kronik hepatit B; Güneydoğu Asya, Çin, Sahra altı Afrika, Mikronezya, Polinezya, Alaska, Kuzey Kanada, Grönland, Avustralya ve Yeni Zelanda'nın yerli topluluklarında endemiktir. Yüksek prevalansa sahip bu bölgelerde, popülasyonun %7'sinden fazlası kronik olarak enfekte olmaktadır. Enfeksiyon paternleri ülkeden ülkeye, şehirden şehire, göçlere göre farklılık gösterebilir. Enfeksiyonların çoğu erken yaşlarda edinilir ve kronik olma durumu yaş ile ters orantılıdır (34). Küresel nüfusun %45'i yüksek endemisite bölgelerinde yaşamaktadır. Görülme sıklığı %2-7 olan orta endemisite bölgelerini Doğu ve Orta Avrupa'nın güney bölgeleri, Amazon havzası, Orta Doğu ve Hindistan oluşturur. Düşük endemisite bölgelerinin ise görülme sıklığı %2'den azdır ve Kuzey Amerika, Birleşik Krallık ve Kuzey Avrupa'nın çoğunluğunu içerir. Bu ülkelerdeki kronik hepatit B, yüksek prevalanslı ülkelere gelen göçmenler ile onların çocukları ve cinsel risk grubu oluşturan topluluklarda görülmektedir (29) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. HBsAG prevalansı (35).

ECDC (European Surveillance of Antimicrobial Consumption)'nin Eylül 2010 raporuna göre, Avrupa ülkeleri içerisinde en yüksek prevalansa sahip ülke Türkiye'dir. Türkiye, kronik hepatit B prevalansı %2-8 arasında bir oran ile orta endemisite bölgeleri

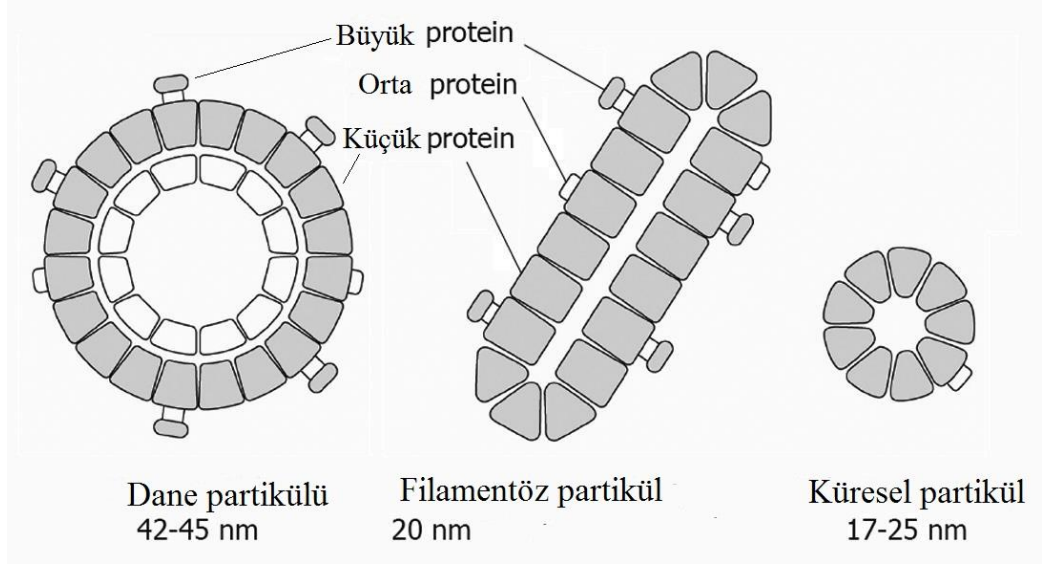
içerisinde bildirilmiştir (3). Ülkemizde yaklaşık olarak 3 milyon kişinin HBV ile enfekte olduğu düşünülmektedir (36).

Endemi derecesi ile enfeksiyonun bulaş yolları, sosyo-ekonomik ve kültürel durum arasında yakın ilişki olduğu bilinmektedir. Orta Doğu ve Akdeniz ülkelerinde özellikle horizontal geçiş vardır (37). Türkiye'de yapılan epidemiyolojik çalışmalarda HBV'nin çocukluk ve gençlik çağında aile ve toplum içinde horizontal yolla alındığı, 18-20 yaşlarında ise toplumun taşıyıcılık oranına ulaşıldığı görülmektedir (3).

Türkiye'de doğu bölgelerinin prevalansı batıdan yüksektir. Eskişehir, Adana, Erzurum ve Adana gibi illerde oldukça yüksek oranlara çıktığı hatta Diyarbakır'da HBsAg pozitiflik oranının %10'lara ulaştığı bildirilmiştir (38).

### **2.3. HBV'nin Yapısı**

Enfekte hepatit B hastalarının serumlarında elektron mikroskobu ile üç farklı viral yapı gözlemlenmiştir; dane partikülü (42 nm), küresel yapı (20 nm) ve filamentöz yapıdır (22 nm). Her üç yapıda da ortak bir HBsAg bulunmaktadır. Küresel ve filamentöz yapılar konakçıdan üretilmiş HBV genomu bulunmayan, dolayısıyla bulaşıcı olmayan yapılardır. Dane parçacığı ise HBV virionunu içerir ve bulaşıcıdır. Dane parçacığının çekirdek bölgesi nükleokapsid ile çevrilidir, dairesel ve kısmen çift zincirli bir DNA molekülü ile DNA polimerazı içerir. Hepatit B yüzey antijenlerini (HBsAg) içeren lipid yapıdaki zarf ve hepatit B çekirdek antijenlerinden (HBcAg) oluşan nükleokapsid bir zarf oluşturulmuştur (39). Kolesterolce zengin nükleokapsid zarf, viral enfeksiyon için gereklidir. Bu nükleokapsid, endoplazmik retikulumdan tomurcuklanması sırasında zarf membranında bulunan üç farklı yüzey glikoproteininin (küçük, orta ve büyük glikoproteinler) düzenlenmesini indükler (40) (Şekil 2.2). HBsAg'nin kan serumunda altı aydan uzun kalması kronik enfeksiyon olarak kabul edilir ve analiz kitleri bu antijeni saptamak üzere tasarlanmıştır (41).



Şekil 2.2. HBV partikül yapısı (42).

#### 2.4. HBV'nin Genom Organizasyonu

HBV nükleokapsidi, 3.2 kb uzunluğunda, kısmen çift sarmallı, serbest halkasal DNA (rcDNA) içeren bir genom taşır. Nükleokapsid, ikosahedral yapıda, 27 nm çapında, 240 tane viral kapsid proteininin birleşmesi ile oluşturulmuştur (40). Negatif zincirin 5' ucuna kovalent olarak eklenmiş bir viral genom ile viral polimerazın tek kopyasını içerir. Protein kinazlar gibi bazı proteinler nükleokapsidde paketlenilir (41). HBV genomunun ilginç bir özelliği olarak iki zincir asimetriktir. Negatif zincir tam boyutta olmasına karşın pozitif zincir farklı farklı uzunluklarda bulunur ve eksiktir (43).

Viral genom, dört çakışık açık okuma çerçevesini (ORF'ler: S, C, P ve X) kodlar. S ve C tek bir okuma çerçevesine sahiptir ancak başlangıç kodonları farklı olduğu için farklı ürünler sentezlenir. Viral yüzey proteinlerini (HBsAg) kodlayan S ORF bölgesi, yapısal ve fonksiyonel olarak 3 farklı AUG başlangıç kodonuna sahip preS1, preS2 ve S bölgelerine ayrılır (44). Reseptör bağlanmasında ana rolü olan L HBsAg, preS1, preS2 ve S alanlarını da içeren preS1 mRNA çevirisinin bir sonucu olarak sentezlenirken; M ve S HBsAg proteinleri, preS2/S mRNA ve S mRNA çevirilerinin sonuçları olarak sentezlenir (43). HBsAg, HBV virionunun glikolize zarf proteinidir. HBV taşıyıcılarının serumları, aşırı miktarda enfeksiyöz olmayan küresel ve tübüler HBsAg içerir. Bu subviral partiküller, olgun virionlara kıyasla aşırı salgılanır (100-100.000 kat) (45). Dane parçacıklarından binlerce kat daha fazla olan küresel ve filamentöz partikül sentezi nedeninin, bağışıklık sistemi için bir tuzak olabileceği,

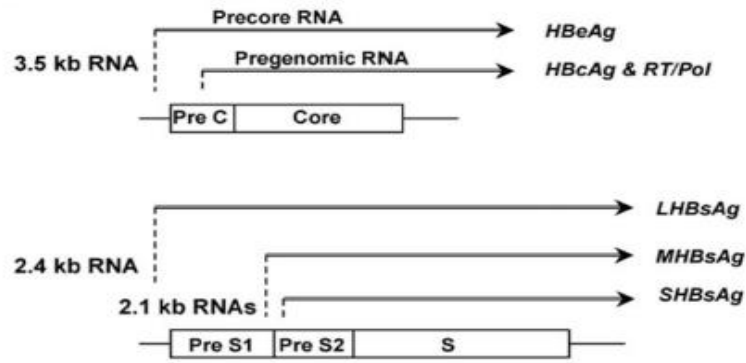
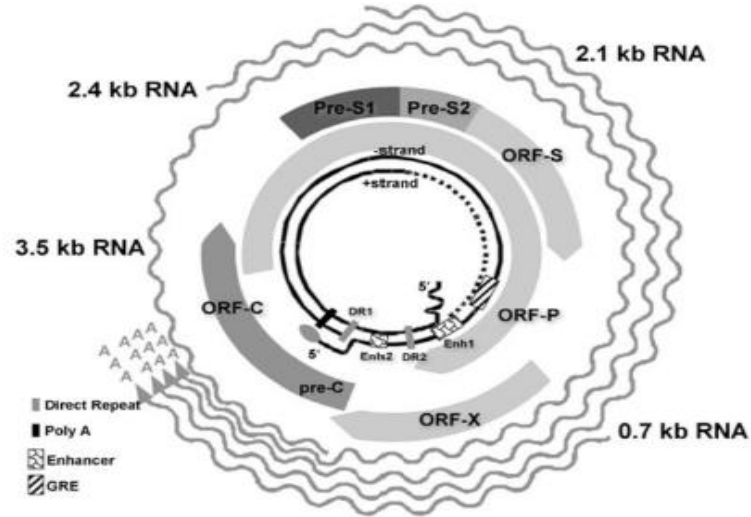
böylece kronik enfeksiyon gelişebileceği bildirilmiştir (43). HBsAg sadece cccDNA'nın mRNA'sının dönüştürülmesiyle değil, aynı zamanda entegre DNA'dan da üretilir. Bu durum, hastanın bulaştırıcılık seviyesini daha kapsamlı bir şekilde anlamamıza yardımcı olabilir (45).

Çekirdek veya C geni prekor ve kor bölgelerine sahiptir. Çoklu translasyonu başlatma, S ve C genlerinin özelliğidir. C ORF, translasyonunda kor veya prekor bölgelerinden başlatılmasına bağlı olarak viral nükleokapsid HBcAg veya hepatit B e antijeni (HBeAg) kodlanır. Kor protein, intrinsik bir özelliğe sahiptir. Kapsid benzeri yapı oluşturmak için kendiliğinden bir araya gelebilir ve RNA bağlama aktivitesine sahip, C-ucunda bazik bir amino asit kümesi içerir. Prekor ORF, translasyon ürününü endoplazmik retikuluma yönlendiren bir sinyal peptidini kodlar, burada HBeAg'ye dönüştürmek üzere işlenir. HBeAg'nin kronik enfeksiyonu başlatma etkisi belirtilse de işlevi henüz tam olarak anlaşılamamıştır (41).

Polimeraz (pol), P ORF tarafından kodlanan büyük bir proteindir (yaklaşık 800 amino asit) ve fonksiyonel olarak üç alana bölünmüştür:

1. Terminal protein alanı, eksi iplikçiğin sentezlenmesi ve enkapsülasyonu gerçekleştirilir.
2. Revers transkriptaz alanı, genom sentezini tersine olarak katalizlendiği alandır.
3. Ribonükleaz H alanı, pregenomik RNA parçalanır ve ribonükleaz H proteini ile replikasyon kolaylaştırılır (41).

HBV X ORF, sinyal iletimi, transkripsiyonel aktivasyon, DNA onarımı ve protein yıkımı da dâhil olmak üzere birçok fonksiyona sahip, 16,5 kd'lik bir protein olan HBxAg'yi kodlar. Bu proteinin mekanizması ve virüsün yaşam döngüsündeki fonksiyonu büyük ölçüde bilinmemektedir. Ancak, HBxAg'nin *in vivo* olarak üretken HBV enfeksiyonu için gerekli olduğu ve onkojenik potansiyeline katkıda bulunduğu düşünülmektedir (46) (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. HBV genomik yapısı (39).

## 2.5. HBV'nin Yaşam Döngüsü ve Replikasyonu

Viral giriş, hepatoselüler tropizm ve tür spesifitesinde önemli rol oynar, konakçı ile etkileşimin ilk adımıdır. Ayrıca giriş şekli, koruyucu immün yanıt ve aşı gelişimi için konaktaki nötralize edici antikorların ana hedefidir (40). Viral giriş, olgun dane parçacığının spesifik preS1 reseptörlerinin dış membrandaki hepatositlerin üzerinde bulunan heparan sülfat proteoglikanlar arasında düşük afiniteli ve geri dönüşümlü bağlanması sonucu başlar (43). NTCP (sodyum taurokolat cotporting polipeptid) olarak adlandırılan reseptör, giriş reseptörüdür. Son zamanlarda, ferritin hafif zincir (FTL) ve yassı hücreli karsinom antijen 1 (SCCA1), HBV-hücre bağlanması ve hepatositlere giriş için yardımcı reseptörler olarak tanımlanmıştır. Virüslerin giriş yollarının, hem endositoz hem de virüs zarfının plazma membranına füzyonu şeklinde farklı mekanizmalarla gerçekleştiği ileri sürülmektedir. Spesifik resptörlere bağlandıktan sonra virion endositoz ile hepatosite girer. Kaveolin-klatrin veya makropinozitozis

aracılı endositozun deneysel sisteme ve kullanılan hücre tipine göre ortaya çıkabildiği gösterilmiştir. Viral zarf, endositozdan sonra plazma membranı veya endozom membranına kaynaşarak sitoplazmaya gider.

HBV enfeksiyonunun gelişimi, endozom biyogenezinde etkili olan Rab5 ve Rab7 (GTPazlar) gibi konakçı faktörlerin ekspresyonuna bağlıdır (47). Polimeraza kovalent olarak bağlanan kısmi çift sarmallı rcDNA içeren viral nükleokapsid, endositoz yoluyla hepatosit çekirdeğine ulaşmadan önce sitoplazmaya salınır. Kapsidin taşınması sitoplazmadaki mikrotübüllerle kolaylaştırılır. Kapsid nükleer por kompleksi (NPC) ile rcDNA'sını çekirdeğe taşır. Bu taşıma kapsid proteinin C-terminalindeki nükleer lokalizasyon sinyalleri (NLS) ve nükleer taşıma reseptörleri (importin- $\alpha$  ve  $\beta$ ) arasındaki ilişki ile gerçekleştirilir (47).

Viral polimeraz, pozitif rcDNA zincirini tamamlar: Negatif zincirin 5' ucunda bulunan polimeraz ve kısa RNA primeri, pozitif zincir sentezi için kullanılır. Pozitif zincir tamamlandıktan sonra, negatif zincir ile birleşir, her iki uçtan da kovalent olarak bağlanır ve kapalı halkasal süper sarmal DNA molekülü (cccDNA) oluşturulur (48). cccDNA molekülü histon ve histon olmayan proteinleri içerir, kromatin benzeri bir yapıda düzenlenir. Bu yapı, tüm viral mRNA'ların transkripsiyonu için şablon görevi gören mini kromozom olarak adlandırılır. cccDNA, tüm viral RNA sentezini ve viral replikasyonda gerekli olan proteinlerin üretimi için konakçının hücresel transkripsiyonel mekanizmalarını kullanır. Transkripsiyon işlemi, konak transkripsiyon faktörleri (CREB, STAT1, STAT2, vb.), kromatin modifiye edici enzimler (PCAF, HDAC1, vb.), hepatosit nükleer faktörleri ve düzenleyici X proteini gibi faktörler tarafından düzenlenir. Ana 4 ORF bölgesi, viral promotör ile etkileşerek viral gen ekspresyonunu düzenler (49). Transkripsiyonun; cccDNA'nın metilasyonu, histon asetilasyonu, vb. epigenetik mekanizmalar tarafından da düzenlendiği bildirilmiştir (48). Viral mRNA'ların stabilizasyonu, işlenmesi ve nükleer taşınması konakçı faktörler aracılığı ile gerçekleşmektedir. HBV RNA'sının sitoplazmaya taşınmasında HBcAg'nin ve protein/nükleer eksport faktör 1'in (TAP/NFX1) rol oynadığı gösterilmiştir (49).

Pregenomik RNA (pgRNA) translasyonu sonucunda, nükleer protein ve viral polimeraz sentezlenirken, düzenleyici X proteinleri ve L, M ve S zarf proteinleri subgenomik RNA translasyonu ile oluşturulur (47). Nükleokapsidi oluşturan HBcAg, genotipe göre 183 veya 185 amino asit içerir ve iki kısmı vardır. Birinci kısım; kapsidin kendine bağlanması için 149-151 amino asite sahip N-terminali içerir. İkinci kısım; 34

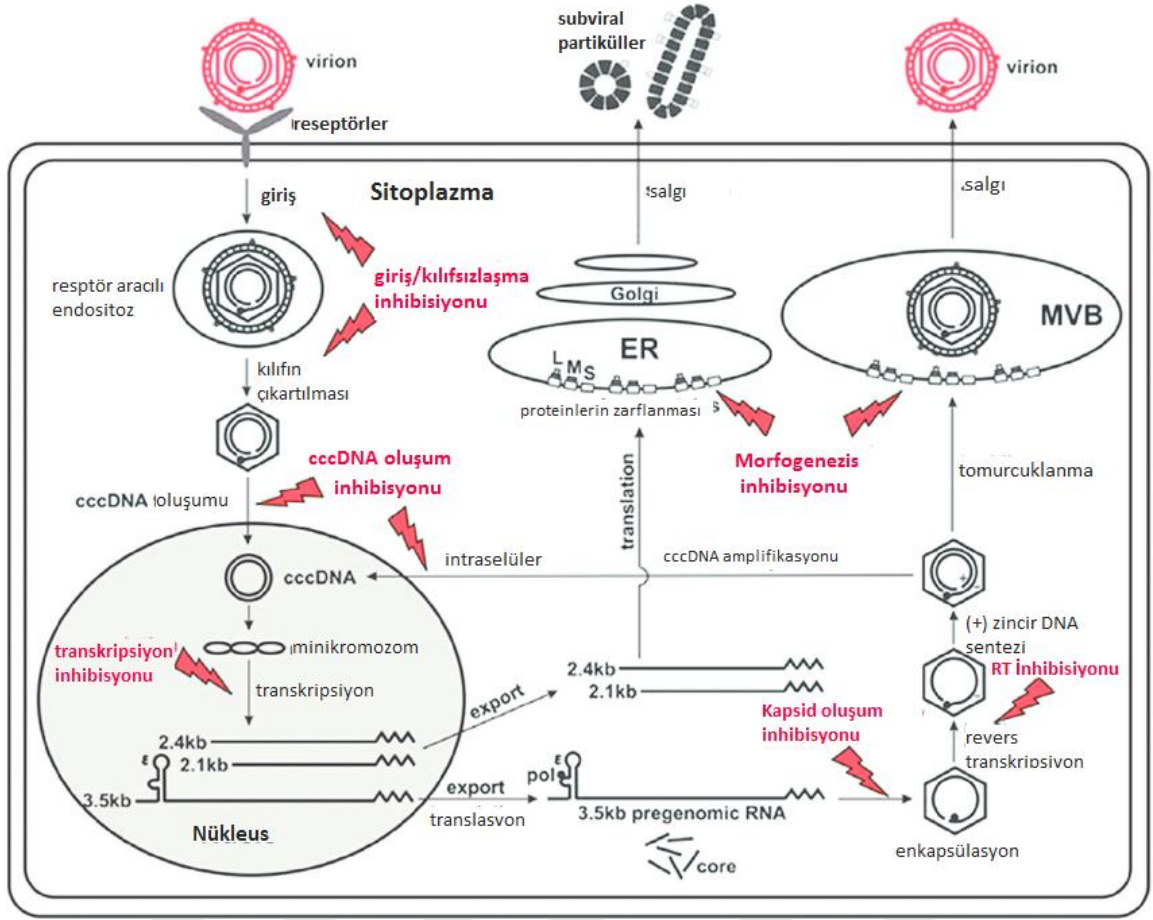
amino asit içeren C-terminal protamin alanı olarak bilinir ve arjinin açısından zengindir, bu nedenle alana pozitif yük sağlar. Protamin alanı, pregenom/HBV pol kompleksinin paketlenmesinde gereklidir (44). PgRNA, ters transkripsiyon ile yeni DNA genomlarının üretilmesi için bir şablondur. Replikasyonun tamamlanması, çekirdek proteinleri tarafından pgRNA'nın kapsüllenmesini gerektirir. HBV nükleokapsid oluşumu; pgRNA, HBV polimeraz ve HBcAg dimerleri ile kompleksler oluşturduğu anda başlar ve çekirdek proteinin C-terminalinin fosforilasyonunu gerektirir. Böylece defosforile yapıdaki olgunlaşmamış RNA içeren nükleokapsid; olgun, DNA içeren nükleokapside dönüştürülür.

Negatif DNA'dan tersine transkriptaz işleminin yapılması için HBV pol, pgRNA'nın epsilon bölgesine bağlanarak, primer görevi görür ve zinciri uzatır. Sentez tamamlanınca pgRNA şablonu, RNAz H ile parçalanır. Tamamlanan negatif zincir, pozitif zincir için şablon olarak kullanılır. Pozitif zincir genellikle tamamlanmaz ve her virionda farklı uzunlukta bulunur.

DNA'nın olgunlaşması, paketlenerek sitoplazmaya taşınınca gerçekleşir (50). Olgun nükleokapsidin zarflanması, ortamdaki viral yüzey proteinlerinin varlığına bağlıdır; özellikle L proteini gereklidir (44). Translasyon sonrası zarf proteinleri, endoplazmik retikulum membranına eklenir ve lümene tomurcuklanır. Enfeksiyöz olmayan küresel ve filamentöz zarf partikülleri veya enfeksiyöz olan dane partikülleri olarak salınırlar (50). HBV tomurcuklanması ve salınımı, multiveziküler vücut yolağına (MVB) bağlıdır. MVB, taşıma sistemi ise ESCRT, Vps4 ATPaz ve endozomal komplekse bağlıdır (51).

Viral kromozomun halkasal, kovalent bağlı formu olan cccDNA, yaşam döngüsü ve enfeksiyon kalıcılığı için gereklidir. cccDNA, mini kromozom formunda bulunur ve enfekte hepatositin çekirdeğindeki histon proteinlerine bağlanır. cccDNA oluşumu ve cccDNA havuzunun büyüklüğü henüz tam olarak tanımlanmamıştır ancak immünolojik, virolojik, transkripsiyonel ve epigenetik faktörlerin cccDNA'yı düzenlediği bildirilmiştir (52). Bir hücre için 1-50 adet cccDNA molekülünün biriktiği gözlenmektedir. İntranükleer cccDNA'nın; hücre içi taşıma, zarf oluşumu ve nükleokapsidin dışarıya salınması gibi olaylar arasındaki denge ile düzenlendiği bildirilmiştir. Antivirallerle kronik hepatitte tedavi başarısızlığındaki temel faktör, cccDNA'nın oldukça stabil olmasıdır (49) (Şekil 2.4.).





Şekil 2.4. HBV yaşam döngüsü (53).

## 2.6. HBV'nin Viral Yükü

HBV'nin HBeAg seropozitif bireylerinin kanında, yaklaşık ml'de 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> viral partikül bulunduğu bildirilmektedir. HBV DNA, akut ve kronik vakalarda kanda yüksek titrelere bulunur. Genellikle tükürük, meni ve vajinal sekresyonda orta derecede viral titrelere bulunur. HBV DNA'nın serum seviyeleri büyük ölçüde viral genotipe ve karaciğerdeki sirozun karsinoma ilerlemesini belirleyen, serumdaki HBeAg miktarına bağlıdır (54).

## 2.7. HBV'nin Genotiplendirmesi

HBV genotiplendirmesi için değişkenlik, özgüllük, geri dönüş süresi ve maliyeti ile 10'dan fazla farklı yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmleri (RFLP), tekli genotipler için spesifik primerlere sahip PCR, birçok HBV genotipi için, hibridizasyon teknolojileri veya gerçek zamanlı kantifikasyon ve genotipleme ya da kütle spektrometresi için multipleks PCR en yaygın

kullanılan yöntemlerdir. HBV genotipleme için altın standart yöntem, tam bir genom dizilimi ve ardından dizi haritalanmasının filogenetik analizidir (55–57). Sekans ve filogenetik analiz, ayrı ayrı genler üzerinde, daha çok zarf yüzey (S) geninde yapılabilir. Tek tek genlerin veya sınırlı gen dizisinin kullanılmasının güvenilirliği, hem analiz edilen dizinin boyutuna hem de dizi homolojisinin derecesine bağlı olacaktır. HBV genotipi, genotipler arasındaki sınırlı sayıda korunmuş nükleotid veya amino asit farkına dayanan diğer yöntemlerle belirlenebilir. Çizgi probu deneyi (LiPA) sekanslamaya uygun bir alternatif olabilir, ancak bu yöntem multipleks PCR, RFLP ve serotipleme gibi diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında pahalıdır. Duyarlılığa dayanarak, mikrodiziler, RT PCR, restriksiyon fragment kütle polimorfizmi (RFMP), seleksiyon testi gibi diğer yöntemler kullanılmaktadır. HBV genotiplerinin tanımlanması, enfeksiyonun kaynağını anlamak, bireysel düzeyde klinik sonuçları tahmin etmek ve popülasyon düzeyinde yeni viral suşların gelişimini izlemek için faydalı olacaktır (58).

## **2.8. Kronik Hepatit B' nin Belirtileri**

Yeni doğanlarda kronik hepatit B belirtisi gözlemlenemeyebilir. Belirtileri ilerleyen yaş ile doğru orantılıdır. Genellikle bulantı, kusma, kabızlık veya ishal, vücutta halsizlik, hafif ateş, iştah kaybı, baş ağrısı, kas ve eklemlerde ağrı, deride kızarıklık şeklindedir. Özellikle karaciğer bölgesinde yoğun ağrı görülebilir (59).

Bazı durumlarda hastalık asemptomatik ilerleyerek, tesadüfen kan testi yapıldığı kadar tanı alamayabilir. Aşılınmamış bireylerin kontrol testlerini yaptırmaları önemlidir. Çünkü tedavi edilmemiş hepatit B, siroz veya karaciğer kanseri gibi önemli hastalıklara sebep olabilmektedir (39).

## **2.9. Kronik Hepatit B Tanısı**

Kronik hepatit B'yi sadece klinik yönleri ile diğer viral ajanların neden olduğu karaciğer hastalıklarından ayırt etmek oldukça zordur. Laboratuvar testleri ile tanı konulması gerekmektedir. Kronik hepatit B teşhisi için geliştirilmiş birçok kan testi ile akut veya kronik enfeksiyonların ayırt edilmesi mümkün olabilmektedir.

Dünya sağlık örgütü, bulaşı engellemek üzere tüm kan bağıışı yapanların kronik hepatit B için kontrol edilmesini önermektedir (60). Kronik hepatit B'nin laboratuvar teşhisi için HBsAg'nin saptanması gerekmektedir. Akut HBV enfeksiyonu ise

immünoglobülin M antikorunun (IgM) çekirdek antijeni ve HBsAg ile belirlenir. Ayrıca enfeksiyonun ilk dönemlerinde, hastalar HBeAg için seropozitifdir. Bu antijen yüksek virüs belirteçidir (61).

Kronik enfeksiyon genellikle asemptomatik olarak başlar ancak HBV serum titresi  $2 \times 10^9$ 'dan yüksek olması ve HBsAg'nin en az 6 ay kalması ile karakterizedir. HBsAg'nin uzun süreli devam etmesi, sonraki yaşam sürecinde kronik karaciğer yetmezliği, siroz ve hepatoselüler karsinom geliştirme riskini taşır (62).

### **2.10. Kronik Hepatit B'nin Bulaşma Yolları**

En sık geçiş şekli yüksek endemik bölgelerdeki anneden çocuğa (perinatal transmisyon) doğum ile veya enfekte kana maruz kalınarak (yatay transmisyon/horizontal) özellikle 5 yaş altı enfekte çocuktan bir diğer çocuğa yayılarak olmaktadır.

Kronik hepatit B ayrıca tükürük, menstruel, vajinal ve semen sıvıları gibi vücut sıvılarına maruziyet sırasında da bulaşabilir. Kronik hepatit B'nin cinsel yolla bulaşması özellikle homoseksüel erkekler veya birden fazla partneri olan heteroseksüeller ve seks işçileriyle temas halinden gerçekleşebilir (63).

Yetişkinlerde enfeksiyon, %5'den daha az kronik hale geçerken, bebeklik ve erken çocukluk çağlarında vakaların %95'i kronik hepatite yol açar. Virüsün yayılımı, sağlık bakımları sırasında enjeksiyon iğneleri gibi ürünlerin tekrar kullanımı ile ortaya çıkabilir. Ayrıca, tıbbi invaziv işlemler, cerrahi müdahaleler ve diş işlemleri sırasında; dövme, delme, manikür pedikür ve benzerinde kullanılan kesici aletlerin enfeksiyonu ile de bulaş gerçekleşebilir.

HBV, vücut dışında 7 güne kadar hayatta kalabilir. Bu süre içerisinde virüs, aşı ile korunmayan insana girerse enfeksiyona neden olabilir. Virüsün inkübasyon süresi ortalama 75 gündür, ancak 30-180 gün arasında değişebilir. Virüs girişinden, 30-60 gün içerisinde tespit edilebilir ve kronik hepatit B'ye dönüşebilir (60).

### **2.11. Kronik Hepatit B Tedavisi**

#### **Amaç:**

Kronik hepatit B tedavisindeki amaç; virüs replikasyonunun tamamen bastırılmasıdır. Nihai hedef siroz, karaciğer yetmezliği ve kanser gelişimini önlemektir.

Kronik hepatit B'nin yönetimine yönelik 2000 ve 2006 yıllarındaki NIH (National Institute of Health) konferanslarında, kronik hepatit B'nin antiviral tedavisine verilen yanıtların biyokimyasal, virolojik, histolojik ve sürekli tedavi dışında primer yanıtsızlık, atılım ve nüksün standartlaştırılmış tanımları önerilmiştir. Bu kapsamda tedavinin cevabı için, serum ALT normalizasyonu, serum HBV DNA seviyesinin azalması, anti-HB saptanabilmesi, HBeAg kaybı gibi parametrelerin değerlendirilmesi ve karaciğerin histolojik olarak incelenmesi gerekmektedir.

Tüm Hepatit B hastaları tedavi gerektirmez, tedaviden en fazla faydayı görecekten hastaları belirlemek üzere klavuzlar düzenlenmiştir. Amerikan Karaciğer Hastalıkları Çalışma Derneği (AASLD) tedavi klavuzlarına göre; DNA  $\geq 10^5$  kopya/mL ve ALT  $2 \times$  ULN (normalin üst sınırı) için tedavi önerirken buna karşılık, Avrupa Karaciğer Araştırmaları Derneği (EASL) kılavuzları; HBV DNA  $\geq 10^4$  kopya/mL olanlara tedavi önermektedir. Asya Pasifik Karaciğer Çalışması Derneği (APASL) kılavuzları; HBeAg-pozitif ve HBeAg-negatif hastalarda ALT  $2 \times$  ULN ve HBV DNA  $\geq 10^5$  veya  $\geq 10^4$  kopya/mL olanlar için tedavi önermektedir. İmmün sistemi baskılanmış veya kemoterapi gören hastalar için, viral yük veya ALT seviyelerinden bağımsız olarak önleyici tedavi önerilmektedir (64).

Tedavi protokollerinde interferonlar (IFN) önceden tanımlanmış süreler boyunca uygulanırken, nükleotid analogları genellikle belirli uç noktalara ulaşılan kadar uygulanmaktadır. Tedavi yaklaşımındaki bu farklılık, IFN-'nin ek immün modülatör etkileri ile ilgilidir. HBeAg-pozitif hastalar için; HBeAg sero-konversiyonu sağlandıktan sonra tedavi kesilirse, hâlihazırda onaylanmış tedavilerle viral supresyon sürdürülebilir. HBeAg-negatif hastalar için ise; HBV DNA bir yıldan uzun bir süre boyunca PCR testleri ile tespit edilemeyen seviyelere bastırılmış olsa bile nüks sıktır; bu nedenle, tedaviyi durdurmak için son nokta belirsizdir (4,65).

### **2.11.1. İnterferon Tedavisi**

IFN-ler; antiviral, antiproliferatif ve immünomodülatör etkilere sahiptir. IFN-nin HBV replikasyonunun baskılanmasında ve karaciğer hastalığının remisyonunun uyarılmasında etkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, etkinliği yüksek oranda seçilmiş hastaların küçük bir yüzdesi ile sınırlıdır.

Pegile İnterferon alfa (pegIFN-): PegIFN- daha uygun uygulama ve daha uzun süreli viral supresyon avantajlarına sahiptir. Klinik araştırmalar, pegIFN-nin etkinliğinin standart IFN- ile benzer veya biraz daha iyi olduğunu göstermektedir (65).

İnterferon tedavisi, HBeAg miktarına göre 6-12 ay gibi kısa bir dönem için uygulanır. Bu, büyük bir avantajdır. Ayrıca, immün sistemi de etkileyerek, HBsAg ve HBeAg miktarında antiviral ilaç tedavisine oranla daha fazla düşüş sağlar. Ancak, HBV DNA miktarını azaltmadaki etkisi bu kadar başarılı değildir. Antivirallerin baskılaması ile kıyaslanamaz.

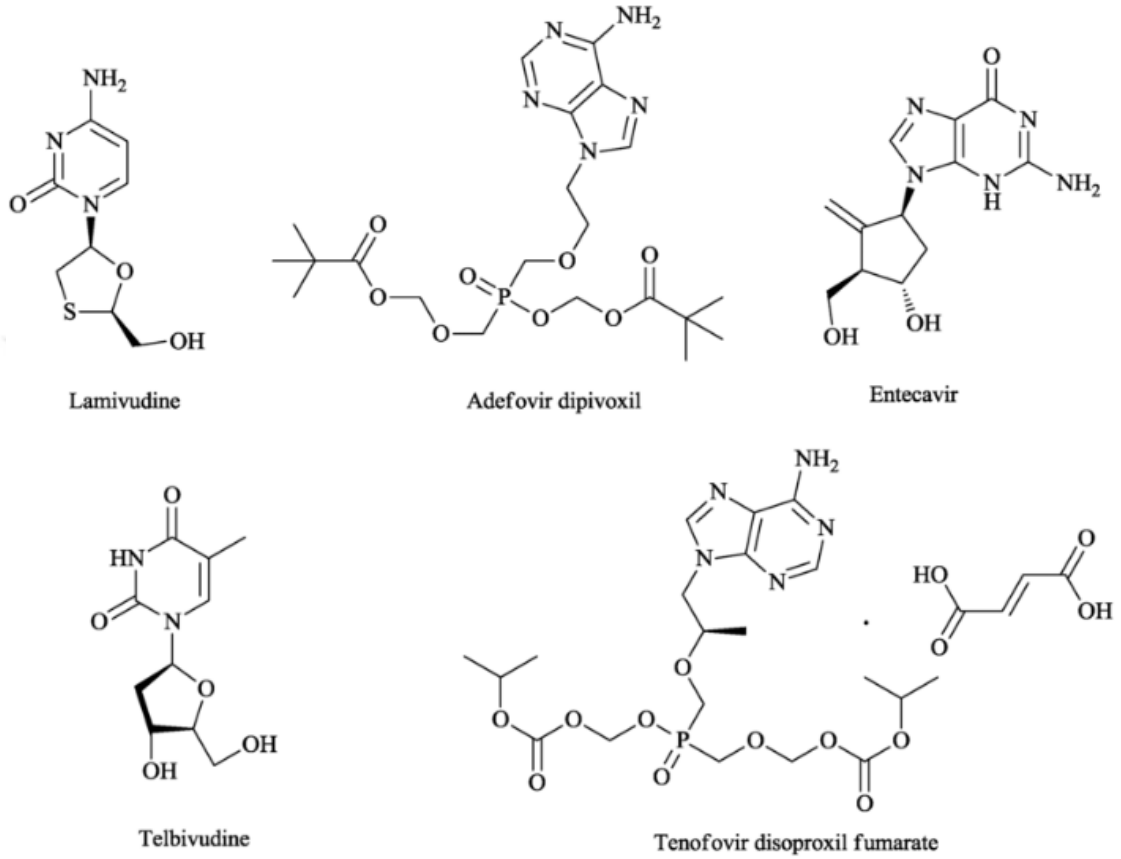
İnterferon tedavisinin enjeksiyon işlemi ile uygulanması ve yan etkilerinin olması, kullanımını sınırlamaktadır. Tedavi sonrası grip benzeri semptomlar, lökopeni, anemi ve trombositopeni gözlemlenebilir. Uzun süre kullanımı sonucunda tiroid bozuklukları, depresyon vb. psikiyatrik problemler ve saç dökülmesi de görülebilir. Cinsiyetin kadın olması, düşük HBV DNA seviyesi, yüksek ALT seviyesi ve karaciğerdeki yüksek inflamasyon gibi faktörler pegile interferon tedavisi tercihini artırmaktadır (66).

### 2.11.2. Nükleot(z)id Analoglar ile Tedavi

**Nükleot(z)id Analoglarının Etki Mekanizmaları:** Nükleot(z)id analogları, viral polimerazın aktivitesini inhibe eder. Kullanılan ilaca bağlı olarak; inhibitörleri aktive edebilir, ters transkripsiyonu, viral (-) DNA zincir sentezini veya (+) DNA zincir sentezini etkileyebilirler (67). Ancak, bu ilaçların hiçbirisi RNazH aktivitesini hedeflemez.

NRTI grubu ilaçlardan lamivudin, virüsün ters transkriptaz aktivitesini inhibe ederken; levudinin virüsün hem (-) hem (+) iplikli DNA sentezini etkilediği gösterilmiştir (68). Adefovir ve tenofovir ilaçları ise; revers transkripsiyonu ve viral (-) DNA zincirinin uzamasını durdurduğu gösterilmiştir (69). Entekavir; hem (-), hem de (+) DNA zincirinin sentezini inhibe ederken, telbivudin ise üç enzimatik aktiviteyi de inhibe etmeyi hedefler (70). *In vitro* çalışma sonuçları ilaçların kombine kullanımında, başka mekanizmaların da etkilenecek viral inhibisyon etkinliğinin arttığını göstermiştir ancak bu durumda baskın ilacın hangisi olduğu belirlenmemektedir (71). Tüm nükleot(z)id analogları, viral DNA'daki hücre içi nükleotid dahil edilmesi ile rekabet ederek çalıştığı için kompetitif polimeraz inhibitörleridir. Ayrıca zincire dâhil olduklarında, bir sonraki nükleotidin viral DNA zincire eklenmesini önleyerek de DNA sentezini sonlandırabilirler. Nükleot(z)id analoglarının viral polimeraz aktivitesi üzerindeki etkisi, enfeksiyöz viral partiküllerin üretimini azaltmasını sağlar ve böylece virüsle enfekte olmuş hepatositlerin yayılması sınırlanır (72).

Günümüzde kronik Hepatit B tedavisi için onaylanmış üç nükleozid analogu (lamivudin, telbivudin, entekavir) ve iki nükleotid analogu (tenofovir ve adefovir) dâhil olmak üzere beş nükleot(z)id analogu vardır (73). Yapıları Şekil 2.5’de gösterilmiştir



Şekil 2.5. Antiviral nükleot(z)id analoglarının kimyasal yapısı (73).

### Lamivudin

Lamivudin, kronik hepatit B tedavisi için mevcut ilk oral nükleot(z)it analogudur ve 1998 yılında günlük 100 mg tedavi önerisi ile onaylanmıştır. Lamivudin bir sitidin analogudur ve viral DNA'ya katılmak üzere yarıştıktan sonra zincir sonlandırıcı olarak hareket ederek aktif metabolitlerine fosforile edilir. Lamivudin, ALT ve HBeAg serokonversiyonunun normalleştirilmesinde, HBV DNA'sının baskılanmasında ve fibrozisin tersine çevrilmesinde etkilidir (74). Ek olarak, lamivudinin sirotik hastalarda karaciğer dekompanseasyonu ve HCC dahil komplikasyon oranını azalttığı gösterilmiştir. Tedavisi olmayan hastalarla karşılaştırıldığında, lamivudinin en büyük dezavantajı ilaç

direnç mutasyonlarının yüksek oranda olmasıdır, kullananların %76'sı sekiz yıllık tedaviden sonra genotipik dirence sahip olabilmektedir (75).

### **Adefovir**

Adenozin monofosfatın bir nükleotid analogu olan Adefovir, günde 10 mg doz ile kronik Hepatit B tedavisi için 2002 yılında onaylanmıştır. İki büyük Faz III çalışmasında, Adefovir, plasebo ile karşılaştırıldığında histolojik, virolojik ve biyokimyasal parametreleri önemli ölçüde iyileştirdiği gösterilmiştir (76). Bununla birlikte, 10 mg doz yetersizdir ve viral baskılama oranı nispeten yavaştır.

Adefovirin avantajlı özelliklerinden biri, lamivudine dirençli mutantlara karşı etkinliğidir. Ancak Adefovir, doza bağlı nefrotoksisite ile ilişkilendirilmiştir. HIV ile enfekte hastalarda kullanım için ilk gelişme, yüksek dozlarda gözlenen yüksek renal toksisite oranı nedeniyle terk edilmiştir (77). Kronik Hepatit B hastalarında ise daha düşük bir doz kullanılır. Nefrotoksisite genellikle serum kreatinininde hafif bir artış ve serum fosfat seviyelerinde bir azalma olarak kendini gösterir. Bu genellikle tedaviye başladıktan 4-12 ay sonra ortaya çıkar ve ilaç kesilmesi ile geri dönüşlüdür, bunun yanında mitokondriyal DNA'nın tükenmesi ve proksimal tübüllerde ilaca dirençli proteinin ekspresyonunda değişiklik olduğu düşünülmektedir (72).

### **Entekavir**

2005 yılında Lamivudine dirençli kronik Hepatit B tedavisi için sırasıyla günde 0,5 mg ve 1 mg dozları ile onaylanmıştır. Entekavir, hücre içi fosforilasyona uğrayarak aktif 5' trifosfat metabolitine dönüşen, guanozin analogudur. Doğal substrat deoksiguanozin trifosfat ile rekabet eder ve HBV DNA polimerazı inhibe eder. *In vitro* çalışmalar, Entekavirin, pregenomik RNA'nın ters transkripsiyonunu içeren HBV DNA polimeraz primerini de inhibe ettiğini göstermiştir (78). Zorunlu zincir sonlandırıcısı olan diğer nükleot(z)id analoglarının aksine, entekavirdeki aktif kısım zincir sonlandırılmasından önce birkaç ek nükleotidin eklenmesine izin veren 3'OH grubu içerir. Böylece entekavir zorunlu olmayan bir zincir sonlandırıcısıdır. Lamivudin ile karşılaştırıldığında, entekavir *in vitro* viral DNA replikasyonunu azaltmada otuz ila iki yüz kat etkinlik göstermiştir. Entekavirin lamivudin ile karşılaştırıldığı erken bir Faz II çalışmasında, entekavir ile tedavi edilenlerde daha yüksek virolojik baskılama oranları gözlenmiştir. Entekavirin baskı direnci yüksektir. Hastalarda direnç gelişimi nadirdir (79).

## **Telbivudine**

2006 yılında, günlük 600 mg olacak şekilde kronik hepatit B tedavisi için onaylanmıştır. Timidinin sentetik L-nükleozid analogudur. L-Nükleosidler, doğal nükleosidlere kıyasla sitokiyometrik konfigürasyonlarında, şekerleri ve baz parçaları D-konfigürasyonunda değil de L- konfigürasyonunda düzenlenmiş olarak farklılık gösterir. Telbivudin, hücrel kinazlar ile fosforile edilir ve aktif formu, timidin 5'triposfat ile rekabet ederek HBV DNA polimerazı inhibe eder. Telbivudinin DNA'ya dâhil edilmesi, erken zincir sentezi sonlandırmasına yol açar (80).

Telbivudinin, HBV'ye karşı lamivudinden daha güçlü olduğu gösterilmiştir. Erken bir Faz IIB çalışmasında, telbivudin lamivudin ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha fazla virolojik ve biyokimyasal yanıt göstermiştir. Çift kör Faz III çalışmasında, telbivudinin HBV azaltma ve baskılamada, lamivudinden daha düşük ilaç direnci oranları ile üstün olduğu gösterilmiştir. Telbivudinle tedavi edilen HBeAg pozitif hastalarda lamivudin ile tedavi edilenlere kıyasla daha yüksek terapötik ve histolojik yanıt da gözlenmiştir.

Telbivudinin, Faz III'de 560 kişi ile yapılan bir çalışmada, 2 yıllık tedaviden sonra lamivudin ile karşılaştırıldığında ciddi (3 veya 4. derece yükseklikte) kreatin fosfokinaz yükselme insidansına sahip olduğu görülmüştür. Bu olguların ikisinde miyopati de bildirilmiştir (72). Telbivudin ile tedavi edilen 105 hastanın başka bir çalışmasında en sık görülen yan etkiler miyalji ve genel halsizliktir. Bu nedenle telbivudin ile tedavi edilen hastalarda kreatinin fosfokinaz düzeylerinin ve kas-iskelet sistemi semptomlarının düzenli olarak izlenmesi önerilmektedir. Telbivudin kaynaklı miyopati ve nöropati mekanizması belirsizliğini korumaktadır. *In vitro* çalışmalarda, fosforilasyondan sonra telbivudin tarafından insan polimeraz  $\alpha$ ,  $\beta$ , veya  $\gamma$  nın inhibisyonu ve mitokondriyal toksisite kanıtı gözlenmemiştir (67).

## **Klevudin**

Klevudin, timidin analogudur ve bu nedenle yapısal olarak telbivudine benzer. Klevudinde, telbivudinde bulunan hidrojen yerine furanoz kısmının üzerinde 2' konumunda bir florür grubu mevcuttur. Aktif trifosfat metabolitine kadar kademeli olarak fosforilasyona uğrar. Sadece 6 aylık tedaviyle yapılan iki Faz III çalışmasına dayanarak, 2006 yılında Güney Kore'de ve 2009 yılında Filipinler'de tekrar onaylanmıştır. Önerilen etki mekanizmasında, HBV DNA polimeraz, ters transkriptaz



ve dönüşümünü hedeflenmektedir. cccDNA'da kısmen bir azalma görülür ve ilacın uzun yarı ömrü ile birlikte tedavi sonrasında etkisi devam edebilmektedir (81).

### **Tenofovir**

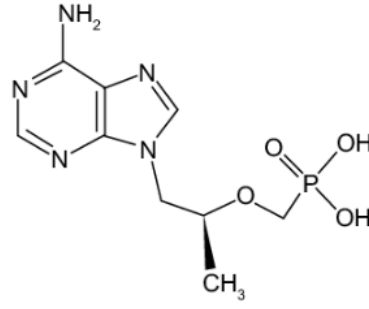
Tenofovir (TFV), ilk olarak 1993 yılında 2,6-diaminopurin ile birlikte bir anti-HIV ajanı olarak (R)-PMPA [(R) -9- (2-fosfonilmetoksipropil) adenin] adı altında tarif edilmiştir. Bir antiretroviral ajan olarak (R) -PMPA'nın azidotimidinden (AZT) çok daha etkili olduğu 1995 yılında Tsai ve arkadaşları tarafından Rhesus macacus maymunlarının SIV (Simian immün yetmezlik virüsü) enfeksiyonu sonrası gösterilmiştir (82).

(R)-PMPA'nın oral biyo-yararlanımını sağlamak için bis (izopropil-oksikarboniloksimetil) esteri tasarlanmıştır ve TFV'nin bu diesteri daha sonra TDF (Tenofovir Disoproksil Fumarat) olarak fumarat ile formüle edilmiştir (83) (Şekil 2.6). Viread firması ile ilaç 2001 yılında, HIV enfeksiyonlarının tedavisi için ve 2008'de ise hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonlarının tedavisi için pazarlanmak üzere FDA tarafından onaylanmıştır (9).

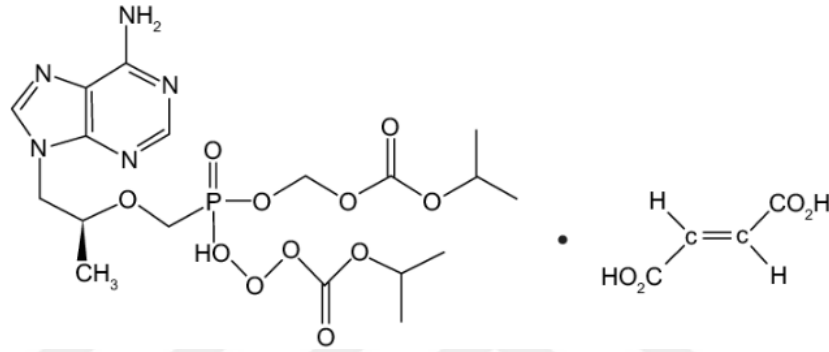
Tenofovir, adenosin 5'-monofosfatın asiklik nükleozid fosfonat bir analogudur. Oral ön ilaç formu ise ilk olarak TDF'dir. TDF, hücre içi yarı ömrü ve zayıf biyoyumu ile geliştirilmeye açıktır (10).

TDF'nin kullanım şekli günde 245 mg şeklindedir. TDF olarak alındıktan sonra adenosin 5' monofosfata ve ardından asiklik analogu TFV'ye hidroliz edilir. Hücre içine giren TFV, timidin kinaz, timidilat kinaz ve nükleozit difosfat kinazlar ile ardışık üç fosforillenme geçirerek aktif formu olan trifosfat haline dönüşür. Bu yapı, HBV ve HIV viral RNA replikasyonu sırasında revers transkriptaz enziminin substrat bağlanma bölgesine bağlanarak kompetitif olarak inhibe eder. Böylece bir zincir sonlandırıcısı olarak etki gösterir (82).

## Tenofovir



## Tenofovir disoproksil fumarat

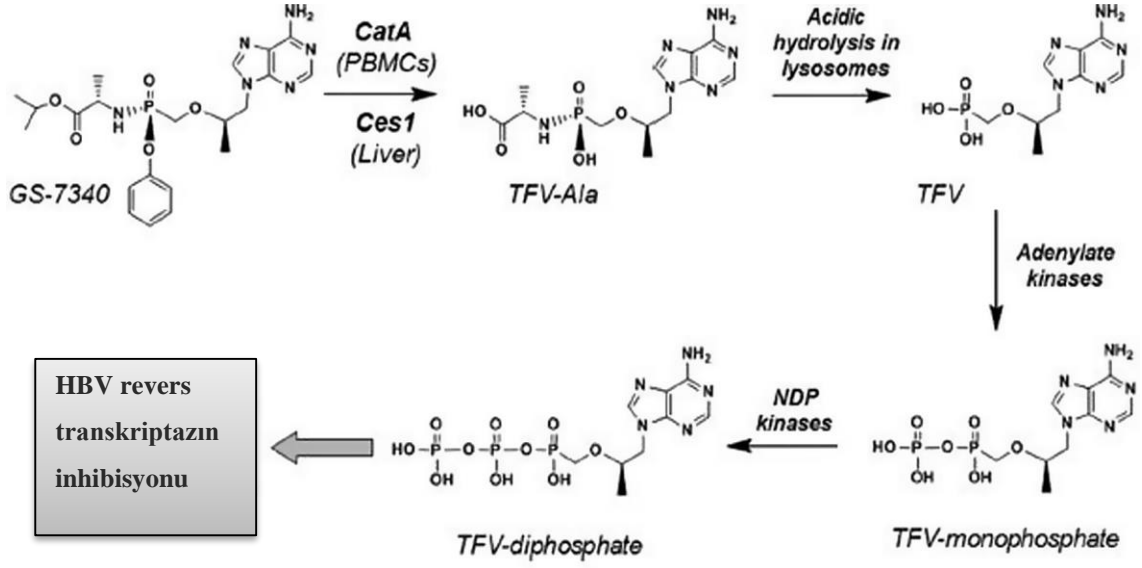


Şekil 2.6. TFV ve TDF'nin yapısı (84).

### Tenofovir Alafenamide (TAF)

TAF ilacı, Nisan 2017'de kronik hepatit B tedavisi protokolüne eklenmiştir (11). TAF, HBV ters transkriptaz nükleotid inhibitörü TFV'nin oral fosfonoamidat ön ilacıdır. TAF, pasif difüzyon ve hepatik alım taşıyıcıları OATP1B1 ve OATP1B3 yoluyla primer hepatositlere girer. Hepatositlerde, TAF'ın TFV-Ala'ya dönüşümü Ces 1 karboksilesteraz tarafından yönlendirilir. TAF, Cat A (PBMC'ler) veya Ces 1 (karaciğer hücreleri) tarafından TFV-Ala'ya dönüştürüldükten sonra, lizozomlarda asidik hidroliz ile TFV'ye hidroliz edilir. TFV, adenilat kinazlar (AMP kinaz) tarafından TFVp'ye ve NDP kinazlar tarafından TFVpp'ye fosforile edilir (12). TFVpp, TDF için olduğu gibi TAF'ın da nihai aktif metabolitidir (13) (Şekil 2.7).

Tenofovir difosfatın HBV DNA'ya HBV ters transkriptaz tarafından eklenmesi HBV replikasyonunu inhibe ederek DNA zincirinin sonlandırılmasına yol açar. DNA ters transkriptazının TFVpp tarafından inhibisyonu, HBV ve insan immün yetmezlik virüsü (HIV-1 ve HIV-2) için spesifiktir (85).



Şekil 2.7. TAF'ın hücre için metabolize edilmesi (86).

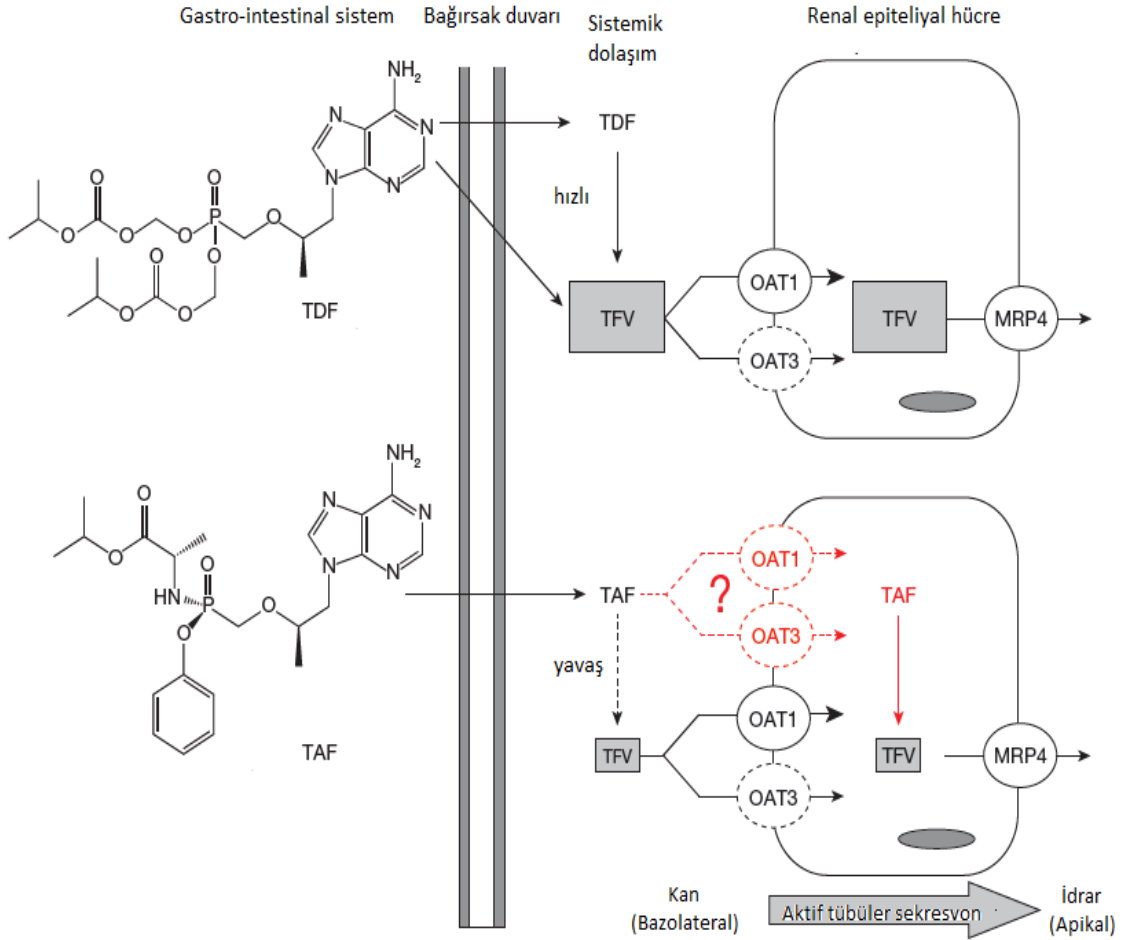
Tedavinin 4. haftasında TAF'ın değerlendirilen tüm dozlarda (8, 25, 40 veya 120 mg) TDF'nin klinik dozu (300 mg) ile HBV DNA seviyelerini benzer bir dereceye düşürdüğü bulunmuştur. HBV enfeksiyonunun tedavisinde TAF'ın klinik gelişimi için 25 mg'lık doz seçilmiştir. Bu dozda TAF, Avrupa İlaç Ajansı tarafından kronik Hepatit B tedavisinde pazarlama için doğrulanmıştır (9).

Orijinal TDF versiyonu günde bir kez 300 mg'lık bir dozda geliştirilmiştir. Müteakip ön ilaç formülasyonu olan TAF ise, Kuzey Amerika ve Avrupa'da günde bir kez 10 veya 25 mg'lık dozlarda başlatılmıştır. TAF'ın farmakokinetiği, TDF'ye kıyasla fosforile kısım Tenofovir difosfatın altı buçuk kat daha fazla hücre içi konsantrasyonuna ve TFV'nin %91 daha düşük serum konsantrasyonuna yol açar (14–16). Bu farmakokinetik farklılıklar göz önüne alındığında, TAF dozu çok daha düşük olabilmektedir; günde bir kez 25 mg TAF dozu, tenofovir plazma seviyeleri açısından günde bir kez 300 mg TDF'ye biyo-eşdeğerdir. Yaklaşık on katlık fark ile toksisitenin de orantılı olarak azabileceği düşünülmektedir (17). Farmakodinamik çalışmalar, TAF tarafından üretilen plazmada daha düşük Tenofovir konsantrasyonlarının, yan etkiler için daha olumlu olabileceğini düşündürmektedir. Örneğin böbreklerde ve kemiklerdeki hedef dışı yan etkilerde azalma gösterilmiştir. Dolayısıyla iyileştirme etkinliği bakımından TAF'ın TDF'ye göre daha tolere edilebilir potansiyele sahip olduğu tahmin edilmektedir (16).

TAF, *in vitro* renal taşıyıcıya bağlı sitotoksisite göstermemiştir ve potansiyel olarak gelişmiş bir renal güvenlik profiline sahip olduğu gözlemlenmiştir. TDF'den farklı olarak; TAF, OAT1 ve OAT3 böbrek taşıyıcıları ile etkileşime girmemektedir, insan böbrek türevinden kültüre hücrelerde null mutanti için TAF'ın hücre içi birikiminde hiçbir fark görülmemiştir. Aksine, TDF plazmada hızla tenofovire dönüştürülür ve böbrek taşıyıcıları OAT1 ve OAT3 (proksimal tübül hücrelerinde seçici olarak ifade edilir; PTC'ler) tarafından sistemik tenofovirin aktif olarak alınması, PTC'lerde doza bağlı olarak birikmeye yol açar (87). TDF ile ilişkili renal toksisiteden sorumlu mekanizma bütün yönleriyle bilinmemekle birlikte, vaka çalışmalarından elde edilen sonuçlar, proksimal tübül toksisitenin potansiyel bir patojenik mekanizma olabileceğini düşündürmektedir (88) (Şekil 2.8.).

Tenofovir difosfat, *in vitro* mitokondriyal toksisite kanıtı olmaksızın, mitokondriyal DNA pol  $\gamma$  dâhil olmak üzere memeli DNA polimerazlarının zayıf bir inhibitörüdür (85,89).

TDF'ye benzer şekilde, TAF'a da ilaç direnci çok az veya ihmal edilebilir bir düzeyde oluşmaktadır ve TDF'ye kıyasla daha düşük TAF dozu göz önüne alındığında, ilaç direncinin daha da azalması muhtemeldir. Wyatt ve Baeten, TAF'ın tedavide başka bir evrime sebep olduğuna, yani ömür boyu kullanım için tasarlanmış rejimlere, maksimum bağlanma ve minimum toksisite elde edebileceğine dair veriler sunmuşlardır. Bu durum, TDF ile ilişkili böbrek hastalığı riski ve kemik mineral yoğunluğu değişiklikleri gibi yan etkiler nedeniyle TAF'a geçişi gerektirecektir (85).



Şekil 2.8. TAF veya TDF'den gelen TFV'nin aktif renal eliminasyonu (87).

### 2.11.3. Nükleot(z)id Analoglarının Genetik ve Mitokondriyal Toksikite Üzerine Etkileri

Nükleot(z)id analoglarının çoğu HBV polimerazın aktivitesini inhibe ederken insan gen replikasyonu ve onarımından sorumlu olan nükleer DNA pol $\beta$ 'yi da zayıf seviyede inhibe ederler. Bununla birlikte, bu ajanların bazıları, mtDNA pol $\gamma$ 'ya karşı düşük seviyede aktiviteye sahiptir ve mitokondriyal kayıp veya işlev bozukluğu ile mitokondriyal replikasyonda bozulmaya yol açabilirler. Hücrelerdeki mitokondrinin ana işlevi, yağ asitlerini oksitlemek ve adenosin trifosfatı (ATP) elde etmektir. Fizyolojik koşullar altında, sitokrom oksidazlar gibi mitokondriyal enzimler tarafından yönetilen oksidasyon ve fosforilasyonun sıkı bağlantısı vardır. Mitokondri ayrıca, üretim ve hücre içi antioksidan savunmaları arasında dengesizlik varsa oksidatif strese yol açabilen reaktif oksijen türlerini üretir (90). mtDNA pol $\gamma$ 'nın, nükleot(z)id analogları tarafından

inhibisyonu; oksidatif fosforilasyonda bozulma ile hücre içi mtDNA seviyelerinin tükenmesine yol açabilir. Mitokondriyal toksisitenin klinik belirtileri etkilenen dokuya bağlı olarak değişir ancak mitokondriyal toksisite ile ilgili olarak; miyopati, nöropati, hepatik steatoz, pankreatit, makrositoz, hiperlaktemi, laktik asidoz ve nefrotoksisite gelişebilir (91). Kronik hepatit B için tedavi edilen hastalarda mitokondriyal toksisitenin en belirgin örneği, şimdi terk edilmiş ajan olan fialuridin (FIAU) ile ortaya çıkmıştır. Bu nükleozid analogu ile 8-10 haftadan uzun bir süre tedavi sonrası; laktik asidoz, hepatik steatoz, pankreatit, nöropati, miyopati ve geri dönüşümsüz karaciğer yetmezliği ile ilerlemiş klinik sonuçlara yol açmıştır (92). Sonraki çalışmalar, FIAU'nun insan mtDNA'sına etkili ve geri döndürülemez şekilde dâhil edildiğini göstermiştir (93).

HIV ve HBV enfeksiyonlarının tedavisi için onaylanan yedi antiretroviral ajan arasında, dideoksinükleozidlerin mtDNA poly'ları hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Ancak yaş, cinsiyet, genetik, tıbbi ko-morbiditeler ve beslenme durumu gibi diğer konak kofaktörleri mitokondriyal toksisite riskini ve belirtilerini etkileyebilir (90).

NRTI'ların neden olduğu yan etkilerin çoğunun mitokondriyal disfonksiyonun sonucu olduğu kabul edilmektedir. Buna karşın, NRTI'ların mitokondriyal fonksiyonu etkileyebileceği mekanizmalar başlangıçta düşünülenlerden daha karmaşıktır. İlk araştırmalar NRTI'ların mtDNA replikasyonunu inhibe edebileceğini ve böylece mtDNA tükenmesini ve OXPHOS bozulmasını indükleyebildiğini göstermiştir. Ancak, NRTI'ların mtDNA kopyalarının sayısını içermeyen mekanizmalar aracılığıyla OXPHOS'u veya mitokondri içindeki diğer metabolik süreci etkileyebileceğine dair artan kanıtlar da bulunmaktadır. Bu zararlı etkilerin bazıları, hücre metabolizması ve farklı dokulardaki hücre canlılığı üzerinde önemli sonuçlara yol açabilir (94).

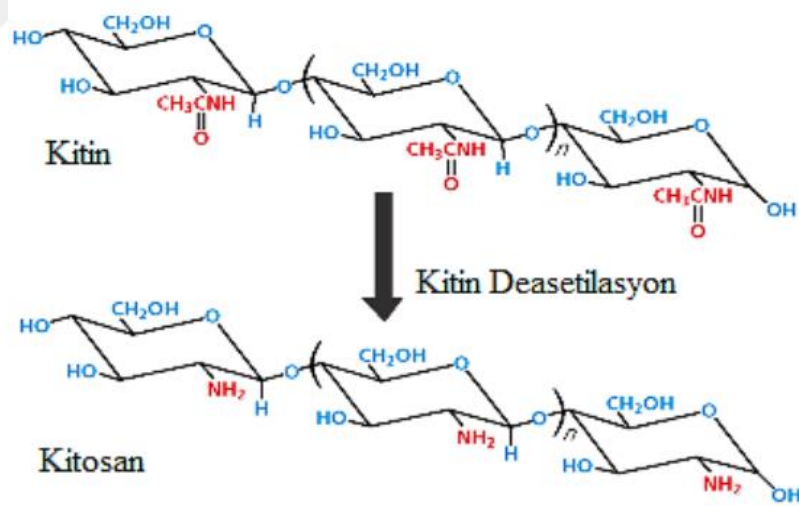
NRTI'ların mitokondriyal toksisite dışında nükleer genom üzerinde de toksik etkisi olduğu düşünülmektedir. 1994 yılında Gonzales ve arkadaşları, 1997 yılında Olivero, 2001 yılında Aruna ve 2007 yılında da Von Tungeln ve arkadaşları; NRTI'ların hücre kültürlerinde ve hayvanlarda mikronükleusu indüklediğini göstermişlerdir (95–97). Bir diğer benzeri çalışmada; Wutzler ve Thust, NRTI grubu AZT'nin insan periferik kan lenfositlerinde Mn oluşumunu artırdığını bildirmişlerdir. 2007 yılında, Olivero bir diğer çalışmada, NRTI'ların kültürlenmiş hücrelerde kromozomal anormallikleri (KA), kardeş kromatid değişimini (KKD) ve telomer kısalmasını indüklediğini göstermiştir (98). Bayram ve arkadaşları diğer bir NRTI ilaç grubu;

Lamivudin'in *in vitro* çalışmasında, insan periferik lenfositlerinde KKD, KA ve Mn oluşumunun zayıf bir indükleyicisi olduğunu bildirmişlerdir (99). Philips ve arkadaşları, çeşitli antiretroviral ajanların, fare kemik iliği hücrelerinde Mn oluşumunu indüklediğini göstermişlerdir. Görüldüğü üzere NRTI grubu ilaçların; Mn, KA ve KKD oluşumu gibi genotoksik potansiyele sahip olduklarını bildirilen birçok çalışma mevcuttur. Tedavideki nihai hedef, en az yan etki ve direnç geliştiren, ancak en fazla viral düşüşü sağlayabilen ilaca ulaşmaktır (23).

## 2.12. İlaç Taşınım Sistemi: Kitosan

Polimerik nanoparçacıklar dâhil olmak üzere ilaç taşınım sistemleri, antiviral ajanların verilmesi için en umut verici alternatiflerden biridir ve kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır. Bu polimerik nanopartikülât sistemleri uygunluğu nedeniyle ilaç verme sistemlerinin tasarımı için en popüler doğal polimerlerden biridir (100).

Kitin, dünyanın en bol bulunan ikinci doğal polimerdir ve yengeç, karides gibi kabuklu canlıların kabuğundan elde edilir. Kitosan, deasetilasyon işlemiyle kitinden yapılan bir polimerdir (Şekil 2.9) (101).



Şekil 2.9. Kitinden kitosan eldesi (102).

Birkaç saflaştırma işlemi ile kitosan elde edilebilir. Demineralizasyon, deproteinizasyon ve renk giderici işlemler, kitin deasetilasyon reaksiyonundan önce yapılır. Amino gruplarının sayısı asetil gruplarının sayısından fazla olduğunda, bu yeni polimere kitosan denir. Kitosan, deasetilasyon derecesine göre yarı kristal bir

polimerdir; deasetilasyon derecesi %0 - 100 arasında değişebilir. Deasetilasyonun orta derecesinde, kristallik de azalır, bu da biyolojik bozunma hızında artışa neden olur. Bu özelliklerin dışında kitosan; antitümöral, antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteler gösterir. Bu özellikleri nedeniyle kitosan çeşitli biyomedikal mühendisliği uygulamaları için önemli bir aday haline gelir (101). Yara iyileştirme, iskele ve doku mühendisliği, ilaç dağıtımı vb. gibi çeşitli alanlarda uygulamaları vardır. Kitosan ve türevlerine yönelik çalışmalar artarak devam etmektedir (103).

Kitosan ile ilgili ilaç taşınım çalışmaları 1990'ların başlarında başlamıştır, biyolojik olarak çözünebilir ve biyo-uyumlu tek katyonik polimer olduğu için yıllar içinde daha fazla ilgi görmüştür (104).

Kitosan katyonik doğası gereği ilaç taşınım sistemi için oldukça uygundur; kitosanın biyo-uyumluluk ve biyo-çözünürlüğü ilaç verme sisteminin terapötik etkinliğini artırır. Kitosan taşıyıcılar, tabletler, mikropartiküller, miseller, hidrojeller, nanopartiküller gibi farklı formlarda üretilebilir ve bunlar farklı yollar için enjekte edilebilir veya implante edilebilir (100).

Kitosan bazlı ilaç verme sistemleri ile anyonik veya nötr ilaçların kontrollü salınımı sağlanabilir (104). Kitosan katyonik doğası nedeniyle mukoadhesif özellik gösterir ve mukus tabakası anyonik özellik gösterdiğinden, kitosan mukus tabakası ile kolayca etkileşir böylece kitosan taşıyıcılarının kalış süresi önemli ölçüde artar. Bu, sistemin biyo-yararlanımını ve terapötik etkinliğini artırır (103). Yine kitosan katyonik yapısı sayesinde gen verme sistemleri için de uygundur. Nükleik asitleri zorlu ortamlardan korur ve birçok çalışma, kitosan taşıyıcılarının gen ekleme uygulamaları için umut verici olduğunu göstermiştir. Kitosan taşıyıcıları, katyonik kitosan ve negatif yüklü hücre zarı arasındaki etkileşime bağlı olarak geçirgenliği artırıcı etkiye sahiptir (104).

### **2.12.1. TAF'ın Kitosan ile Enkapsülasyonu**

Kitosanın nanoparçacık olarak sentezinde basit olduğu için sıklıkla iyonik olarak çapraz bağlama işlemi tercih edilir. Organik çözücüler ve zorlu deney koşulları gerektirmez, 100 nm'den küçük nanopartiküller oda sıcaklığında vorteks karıştırıcı ile kolayca sentezlenebilir. Ayrıca, bu sentez yöntemi herhangi bir toksik çapraz bağlayıcı gerektirmez ve deneyler çok kez tekrarlanabilir (105). Bu yöntemde, pozitif yüklü kitosan zincirleri, kuvvetli karıştırma altında negatif yüklü çapraz bağlayıcı (tripolifosfat veya TPP) ile elektrostatik olarak etkileşir. Pozitif yüklü kitosan ve negatif



yüklü TPP molekülleri arasındaki etkileşim, bir saat içinde elektrostatik komplekslerle sonuçlanır (106).

Nükleot(z)id analoglarından olan TFV'nin yeni versiyonu olan TAF, suda çözünebilir, küçük moleküllü bir ilaçtır, yapısında içerdiği fosfat grupları ile NaOH solüsyonunda negatif yükle yüklenir. Elektrostatik kuvvetler aracılığıyla kitosana etkileşimi kolaydır. Dolayısıyla kitosan nanopartikülleri TAF için kontrollü ilaç taşıyıcı sistem olarak tercih edilebilir.

Literatür geniş kapsamlı incelendiğinde TFV'nin önceki oral ön ilaç formu olan TDF içeren polimerik veya lipid temelli formülasyonların hazırlandığı, karakterize edildiği, *in vitro* ilaç salınım ve muko-adezyon testlerinin araştırıldığı görülmüştür. Yapılan bir çalışmada iyonik çapraz bağlanma metodu kullanılarak TFV içeren kitosan nanopartikülleri hazırlanmıştır. Çalışma ekibi, kimyasal çapraz bağlama ile karşılaştırıldığında, iyonik çapraz bağlanmanın (iyonik jelasyon), basit ve tehlikeli organik çözücüler kullanmadan, yumuşak koşullar altında gerçekleştirildiği için avantajlı bir metod olduğunu bildirmişlerdir. Böylece, kovalent olarak çapraz bağlanmış kitosana kıyasla iyonik jelasyon yöntemiyle hazırlanan kitosan nanopartiküllerinin daha iyi biyo-uyumluluk gösterdiği ve potansiyel toksisitenin azaltılabildiğini göstermişlerdir. *In vitro* salınımı, sitotoksitesite testleri ve muko-yapışkan deney sonuçları, kitosan nanopartiküllerinin; kontrollü salım, non-toksik (vajinal epiteliyal hücre hattı ve *L. Crispatus* için) ve biyo-adeziv antiviral ilaç (TFV gibi) taşıma sistemi için uygun bir malzeme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak, büyük boyutlu, kitosan nanopartikülü ile kaplanmış TFV'nin, HIV transmisyununun önlenmesi için umut verici formülasyonlar olduğu yazarlar tarafından rapor edilmiştir (107). Meng ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada, tiyol-modifiyeli kitosan nanofiberlerinin düşük molekül ağırlıklı ve suda yüksek çözünürlüğe sahip bir ilaç molekülü olan TFV'nin enkapsülasyon etkinliğini, mukoadesiv ve *in vivo* uyumluluğunu artırabileceğini hipotezlemişlerdir. Bu bağlamda, tiyol-modifiye kitosan/polilaktik asit/poli (etilen oksit) nanofiberlerin koaksiyel elektrospinning tekniği ile hazırlanmışlardır. Hazırlanan nanofiberlerin morfolojisi, ilaç yüklemesi, ilaç salınım profilleri, sitotoksitesitesi ve mukoadesiv özelliği incelenmiştir. Ayrıca, hazırlanan nanofiberlerin VK2/E6E7 ve End1/E6E7 hücre dizileri ve *Lactobacilli crispatus* üzerinde sitotoksitesitesi de araştırılmıştır (108). Zhang ve arkadaşları, TFV ve TDF yüklü poli (laktik-ko-glikolik asit)/metakrilik asit kopolimer nanopartiküllerini, emülsifikasyon difüzyon yöntemi ile

hazırlamışlardır. Hazırlanan nanopartiküllerin boyut, kapsülleme etkinliği, ilaç salınım profili, morfoloji ve sitotoksosite gibi özellikleri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre: hazırlanan TFV ve TDF yüklü nanopartiküllerin non-toksik ve taklit insan sperması sıvısı varlığında anti-HIV mikrop öldürücülerin önemli ölçüde pH-tepkisel olarak ilaç salımı olduğunu göstermişlerdir (109). Alukda ve arkadaşları, HIV/AIDS bulaşmasının önlenmesi için vajinal veya topikal ilaç dağıtımına yönelik TFV içeren katı lipid nanopartikülleri sentezlemişlerdir. Hazırlanan lipid partiküllerin morfolojisi, zeta potansiyeli, ilaç kapsülleme etkinliği yüzdesi ve insan vajinal epitelyal hücre hattında sitotoksitesini incelenmiştir. Sitotoksosite deneyleri vajinal epitel hücreleri üzerinde 48 saat boyunca lipid partikülleri kaplı TFV, sitotoksik bir etki göstermemiştir. Çalışma ekibi hazırlanan lipid nanopartiküllerin daha hidrofobik mikrop öldürücü ilaçlar için umut vadeden bir ilaç taşıma formülasyonu olduğunu belirtmişlerdir (110). Avinash ve arkadaşları, iyonik felasyon yöntemi kullanılarak TDF içeren kitosan ve laktoz modifiye kitosan nanopartikülleri hazırlamışlardır. Hazırlanan nanopartiküllerin yapısal ve morfolojik olarak karakterize edilmiştir. Aynı zamanda partiküllerin parçacık boyutu, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği ve *in vitro* ilaç salınım kinetiği belirlenmiştir. *In vivo* deneylerinde ise fare karaciğer hedefleme çalışmaları yapılmıştır. Çalışma ekibi laktoz modifiye kitosanın karaciğere özgü bir ilaç taşıyıcı olarak kullanmak için ideal bir materyal olabileceğini hipotezlemişlerdir. Elde edilen veriler ile bu hipotezi kanıtlamışlardır. *In vivo* deneyler modifiye kitosanın taşıdığı TDF ilacının fare karaciğerinde dağılımının arttığını göstermiştir (111).

### **2.13. Genotoksosite ve Sitotoksosite Testleri**

Kimyasal ajanların kanserojen ve mutajen etkilerini incelemek üzere genotoksosite testleri kullanılmaktadır. Genotoksosite testleri aracılığı ile DNA'da meydana gelen tek ve çift zincir kırıkları sonucu nokta mutasyonları, delesyonlar, mikronükleus oluşumları, kromozomal anomaliler gözlemlenebilir. Bu testler *in vivo* veya *in vitro* olarak farklı hücreler ve organizmalar üzerinde uygulanabilir. Mn, KKD, KA, Komet, Ames testleri, en yaygın tercih edilen genotoksosite testlerinin başında gelmektedir (113).

#### **2.13.1. Mikronükleus Testi**

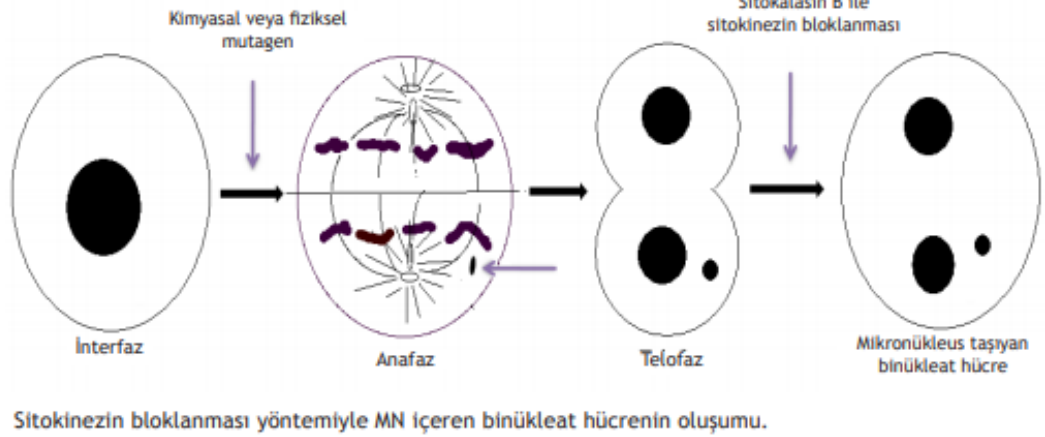
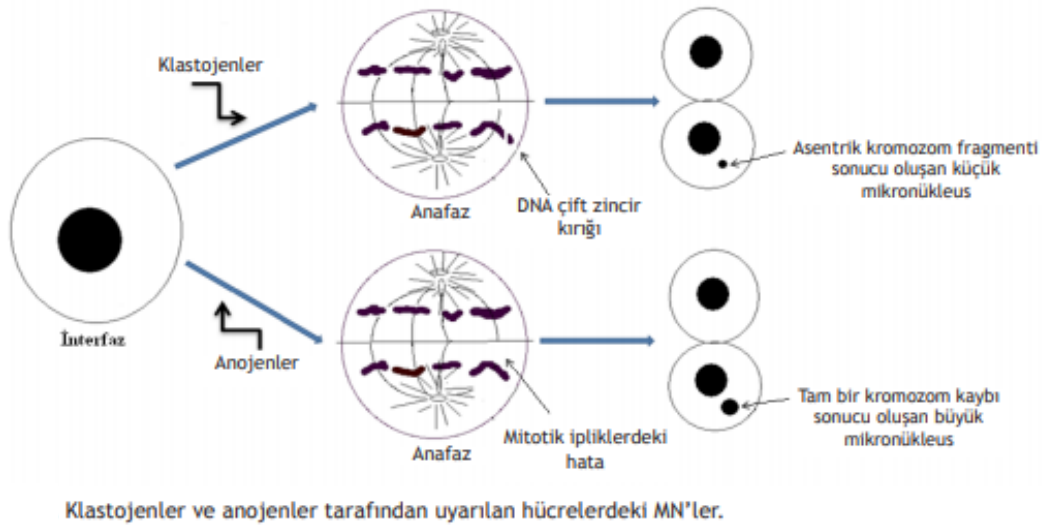
Çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu genetik hasarlar sonucu, mitoz bölünme esnasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dâhil olmayan, tam kromozom veya asentrik

kromozomal fragmanların çekirdeğe benzer oluşum göstermeleri ile ortaya çıkan yapılara Mn denir. Mn testi, toksik etkiler sonucunda nükleer bölünme sırasında anafazda geride kalan kromozom fragmanlarından veya tam kromozomlardan kaynaklanır (Şekil 2.10). Sitokinezi bloklanmış mikronükleus (SBMN) deneyi, kültürlenmiş insan ve/veya memeli hücrelerinde Mn ölçümü için tercih edilen bir yöntemdir çünkü puanlama, Mn görülebilen bir kez bölünmüş binükleer hücreler ile sınırlıdır. SBMN tahlilinde, bir kez bölünmüş hücreler, sitokinezin tamamlanması için gerekli olan mikrofilament halka düzeneğinin bir inhibitörü olan sitokalsin-B (Cyt-B) ile sitokinezi bloke ettikten sonra binükleer görünümüleriyle tanınır. SBMN testinde sadece bir kez bölünmüş binükleer hücrelerin skorlanması, değişken suboptimal hücre bölünme kinetiklerinin neden olabileceği karışıklığı önlemektedir (112).

SBMN testinde analiz için belirlenmiş kriterler vardır, şunlardır:

1. Hücreler binükleer olmalı ve sitoplazması net olmalıdır.
2. Nükleus zarı belirgin yapıda olmalıdır.
3. Oluşan Mn'nin çapı asıl nükleusun yaklaşık 1/3'ü kadar veya daha küçük olmalıdır.
4. Mn, oval yapılı olmalıdır.
5. Mn'nin asıl nükleus ile bağlantısı olmamalıdır.
6. Boya profili asıl nükleus ile aynı olmalıdır.
7. Mn sayımı için sadece sitokinezi bloke edilen binükleer hücreler değerlendirilmelidir (113).

Güvenilirliği ve iyi tekrarlanabilirliği nedeniyle SBMN testi, insan ve memeli hücrelerinde genetik toksikoloji testi için standart sitogenetik testlerden biri haline gelmiştir (112).



Şekil 2.10. Mn oluşum mekanizması (114).

### 2.13.2. Komet Testi (Tek Hücre Jel Elektrofrez)

Hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğu için sıklıkla tercih edilmektedir. DNA hasarını görüntüleme amaçlı ilk olarak 1984 yılında Johanson ve Osling tarafından uygulanmıştır.

Komet yöntemi; hücrelerin agaroz içerisinde mikroskop lamların üzerinde elektroferez tekniği ile yürütülmesini esas alır (115). DNA onarım mekanizmasındaki eksiklikler sonucunda DNA çift ve tek zincir kırıkları meydana gelir. Kırılmış ve hafiflemiş DNA fragmanları, çekirdekten hızlı göç etmesi ile kuyruklu yıldız benzer görüntü oluştuğu için Komet adı verilmiştir. Daha ileri yıllarda alkali elektroferez geliştirilmiş ve daha doğru sonuç veren şekline ulaşılmıştır (116).

DNA kırıklarının belirlemeye dayanan bu yöntem, mutajenlerin neden olduğu DNA hasarının tayininde, kanser hastalarında DNA hasarının derecesini ve tamirini tespit etmede, bazı kalıtsal hastalıkların prenatal tanısında ve bazı hastalıklarda artmış DNA hasarını belirlemede kullanılan bir testtir. Düşük hasarı dahi ölçebilmesi, hemen hemen tüm ökaryotik hücrelere uygulanabilmesi, hızlı, basit ve ucuz olması nedeniyle tercih edilmektedir. Komet tekniği DNA hasarını izlemede uygun ve etkili bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, bireyin, DNA onarım kapasitesini belirlemek içinde komet tekniğinden yararlanılmaktadır (115).

#### **2.14. Mitokondriyal Toksikite Testleri**

Mitokondri, ATP şeklinde hücreye enerji sağlanmasında görevli organeldir. ATP'nin yaklaşık %95'i mitokondri tarafından aerobik solunum sırasında üretilir, geri kalanı sitosolde glikoliz sırasında yapılır. Mitokondri ATP sentezi dışında; yağ asidi oksidasyonu, hem grubu sentezi, steroid sentezi, kalsiyum sinyali ve apoptozda da önemli rol oynar. Tüm bu işlevler için 1000'den fazla protein barındırmaktadır (117).

Mitokondri çoğu ökaryotik hücrede bulunur. Hayvan hücrelerinde çekirdek dışında kendi genomuna sahip tek organel mitokondridir. mtDNA miktarı hücre tipine göre değişir. OXPHOS için kompleks I, II, III, IV ve kompleks V'in alt birimleri olan 13 proteini kodlar (118). Mitokondrinin yapısal ve fonksiyonel karmaşıklıkları göz önüne alındığında, birçok mekanizmanın ilaca bağlı mitokondriyal toksisiteye yol açması şaşırtıcı değildir (119). Bazı ilaçlar OXPHOS'ta yer alan protein komplekslerinin aktivitesini inhibe edebilir. Ayrıca, OXPHOS kompleksleri inhibe edildiğinde ROS'da sıklıkla bir artış vardır (120).

Kompleks I, II, III ve IV boyunca elektron transferi sürecinde doğrudan oksijene verilen elektronlardan düşük sayıda kaçaklar oluşur. Bu kaçaklar; hücredeki fosfolipidler, proteinler ve DNA ile reaksiyona girebilen, bunlara zarar verebilen süperoksit gibi yüksek derecede reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olur (121). Normal fizyolojik koşullar altında, hücreler reaktif oksijen türlerinin (ROS) zararlı etkilerine, çeşitli antioksidan savunma sistemleri sayesinde karşı koyabilir. Bununla birlikte, ROS'un aşırı üretimi savunma mekanizmalarının kapasitesini aştığında, özellikle yaşlanma, enfeksiyon ve bazı ilaçların kullanımı ile ROS miktarı artar. Mitokondriyal proteinler ve mtDNA, ROS artışı nedeniyle bozulma tehlikesi altındadır (120). mtDNA azalması ve ROS artışı mitokondri membran potansiyelinde değişime sebep olur. Mitokondrinin ayrıca apoptozda çok önemli bir etkisi vardır. Apoptoz, dışsal

ve içsel yollar ile meydana gelir; içsel yol mitokondriyi içerir (122). Mitokondride hasar oluştuğunda, sitokrom c iç membran boşluğundan sitosole salınır. Burada sitosolik protein apaf-1'e bağlanarak apoptozomal kompleks oluşturulur. Böylece hücrelerde apoptozun içsel yolağı aktive edilmiş olur

Mitokondrideki hasarları ölçebilen çeşitli testler vardır. Birçok testin bir arada uygulanması ile mitokondriyal hasarların saptanmasında daha güvenilir sonuçlar elde edilebilir. Artan ROS miktarı, mitokondri membran potansiyelindeki bozulmalar, ATP miktarındaki azalma, akonitaz aktivitesindeki değişim, mtDNA miktarının veya mitokondriyal proteinlerin düşmesi ve apoptozun incelenmesi bu testlerin başında gelmektedir (123).

Mayada tarif edilen retrograd (RTG) sinyal yoluna benzer mitokondri-nükleus sinyallemesi, memeli hücrelerinde de tarif edilmiştir (124). Mitokondriyal stres sonucunda RTG sinyali; mtDNA içeriğinin tükenmesi ve değiştirilmiş membran potansiyeli sonucunda nükleustaki bazı genlerin ekspresyonunu artırarak kendini gösterir. Etkilenen mito-nükleer hedef genlerin ifadenmesi mitokondriyal hasarın göstergesi olarak değerlendirilebilmektedir (125).

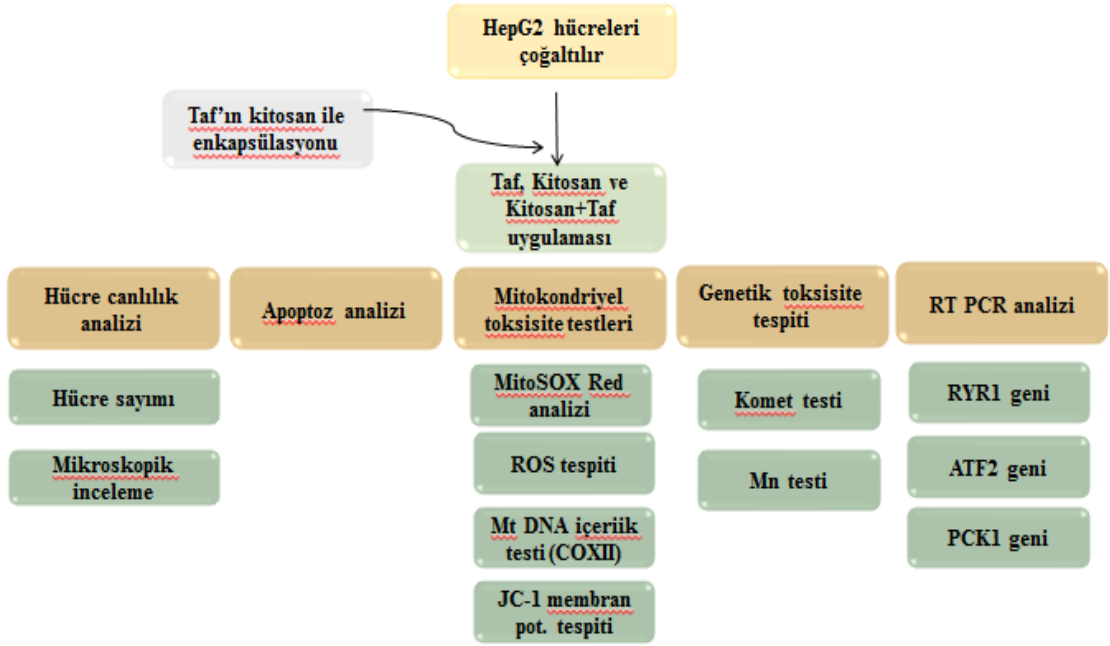
Antiretrovirallerin, özellikle NRTI'ların mitokondriyal toksisiteye neden olduğu bilinmektedir. NRTI'lar, hücrel kinazlar tarafından virüs revers transkriptazının rekabetçi inhibitörleri olarak işlev gören ve viral DNA zincirinin uzamasını sonlandıran bir trifosfat formuna fosforile edilirler. mtDNA'nın çoğaltılmasından sorumlu enzim olan DNA polimeraz, bazı NRTI'lara karşı oldukça duyarlıdır ve bu nedenle mtDNA replikasyonunun bozulması, mtDNA tarafından kodlanan proteinlerin seviyelerinin düşmesine yol açar (126).

### **2.15. Tezin Amacı**

Bütün bu literatür bilgileri ışığında, TFV etkenine sahip TDF içeren kitosan nanopartiküllerinin hazırlandığı ve biyolojik etkinliklerinin araştırıldığı birkaç çalışmaya rastlanmıştır. Ancak yine TFV içeren TAF ilacının kitosanlı formülasyonuna ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır. Bu bağlamda ilk defa mevcut tez çalışması ile TAF içeren kitosan nanopartikül sentezi, karakterizasyonunun yapılması, ayrıca TAF ve kitosan kombinasyonlarının olası mitotoksik/genotoksik etkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

### 3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada; insan hepatoselüler karsinom hücre dizisi olan HepG2 (ATCC-HB8065) hücrelerinde; TFV'nin yakın zamanda formüle edilen oral ön ilacı TAF'ı içeren kitosan nanopartikülü sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Elde edilen TAF/kitosan nanopartikül formülasyonlarının olası mitokondriyal ve genetik toksisiteyi araştırılmıştır. Çalışmanın iş akış planı ise Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. İş akış planı

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı

Çalışma için; İnsan Hepatoselüler Karsinom hücreleri (HepG2) (ATCC-HB8065) kullanılmıştır.

Hücreler, Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi, Atabey Laboratuvarı ile İnönü Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Yardımları için teşekkür ederiz.

### 3.1.2. Uygulanan İlaç Formülasyonu

#### **Tenofovir Alafenamide Fumarat (TAF):**

**Ticari Adı:** Vemlidiy, Odefsey (Gilead Sciences)

**Kimyasal Adı:** isopropyl (2S)-2-[[[(1R)-2-(6-aminopurin-9-yl)-1-methylethoxy]methyl-phenoxy-phosphoryl]amino]propanoate

**Diğer İsimleri:** GS-7340, TAF, TFV Alafenamide, Tenofovirin ön ilacı, Tenofovir Alafenamide Fumarat

**İlaç Sınıfı:** Nükleot(z)id Revers Transkriptaz İnhibitörü

**Kimyasal Sınıfı:** Pürin Nükleotidi

**Kapalı Formülü:** C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>P

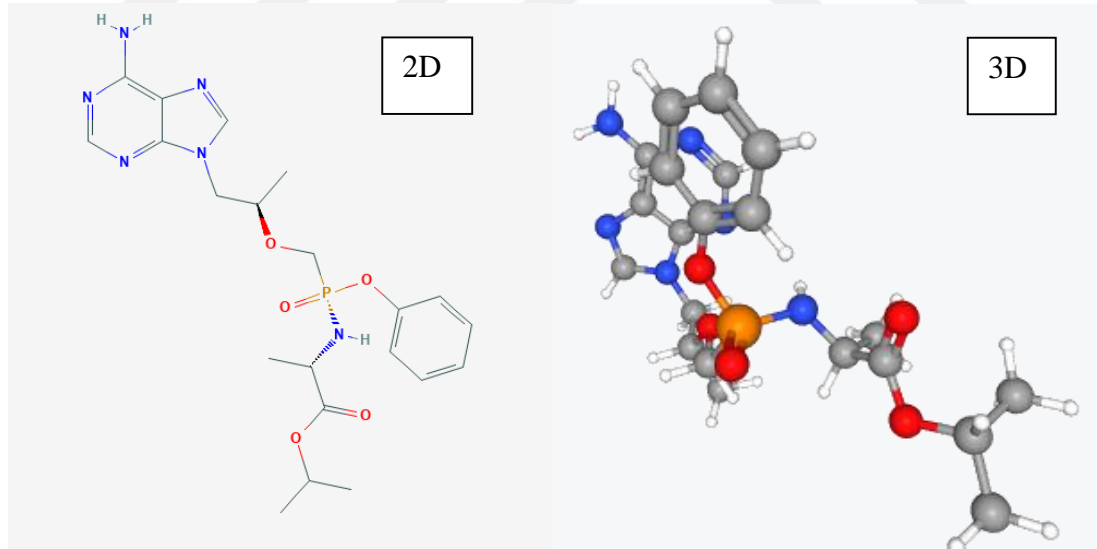
**Açık Formülü:** Şekil 3.2’de verilmiştir.

**Moleküler Ağırlığı:** 476.466 g/mol

**Eksternal ID:** GS 7340 / GS 7340 03 / GS 734003 / GS-7340 / GS-7340-03 / GS-734003 / GS7340 / GS734003

**CAS No:** 379270-37-8

**Organizasyon:** Gilead Sciences, Inc. (127).



**Şekil 3.2.** TAF’ın açık formülü



### 3.1.3. Kullanılan Laboratuvar Ekipmanları

#### Toksisite Testlerinde Kullanılan Cihazlar

Deneylerimiz sırasında kullanılan cihazlar Tablo 3.1’de listelenmiştir.

**Tablo 3.1.** Deney cihazları listesi.

<b>Cihaz</b>	<b>Marka</b>
Terazi	Kern
Hassas terazi	Shimadzu
Isıtmalı Manyetik karıştırıcı	IKA, VWR
Vorteks	VWR
Isı kontrollü çalkalamalı inkübatör	VWR
Mikrosantrifüj	VWR
Soğutmalı santrifüj	Nüve
pH ölçer	Hanna
SDS elektroforez ekipmanları	BIORAD, VWR
Güç kaynakları	VWR
Jel görüntüleme cihazı- G:Box	Syngene
Su banyosu	Nüve
İnkübatör	Nüve
-80°C buz dolabı	Thermo Scientific
Distile deiyonize su ünitesi	Millipore
Otoklav	Nüve
Soğutmalı inkübatör	Nüve
-20°C derin dondurucu	Uğur, Arçelik
PCR Cihazı, Thermal Cycler	Biorad
Spektrofotometre	Termo
Nanodrop	Biospec
Mikrodalga fırın	Vestel
Mikroskop	Olympus
Floresan spektrofotometresi	Nüve

<b>Cihaz</b>	<b>Marka</b>
FTIR/ATR Spektrofotometre	Perkin Elmer
Soğutmalı Santrifüj Cihazı	Nüve, NF 800R
Vakum Etüvü	Nüve, EV 018
Liyofilizatör	Biobase
Manyetik Karıştırıcı Isıtıcı	Daihan
Elektronik terazi	Shimadzu ATX224
Taramalı Elektron Mikroskobu	SEM, LEO, EVO 40XVP
Enerji Dağılımı X- Işını Spektroskopisi	EDX
Ultrasaf Su Cihazı	Millipore

### **Kullanılan Kimyasallar**

Tüm kimyasal maddeler analitik saflıkta olup herhangi bir saflaştırma işlemi uygulanmaksızın kullanılmıştır. Çalışmamızda kullanılan tüm kimyasallar Tablo 3.2’de verilmiştir. Ayrıca, çalışma kapsamında hazırlanan tüm sulu çözeltiler ultra saf su kullanılarak hazırlanmıştır.

**Tablo 3.2.** Kimyasal listesi.

<b>Kimyasal</b>	<b>Üretici</b>	<b>Kimyasal</b>	<b>Üretici</b>
Proteinaz K	Qiagene	KCl	Merck
Amonyum asetat	Pankreac Applichem	Methanol	Sigma
Trisma Base	Sigma	Asetik asit	Sigma
NaCl	Panreac Applichem	EtBr	Sigma
EDTA	Panreac Applichem	HCl	IsoLab
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Panreac Applichem	LMA	Acros Organics
MgCl <sub>2</sub>	Sigma	HMA	Sigma
Beta-mercaptoetanol	Panreac Applichem	Tris-HCl	Fisher Sci.
DMSO	Fisher Sci.	NaOH	Panreac Applichem
Pen/Strep.	Gibco	Etil Alkol	Sigma
DMEM (High G.)	Multicell	Giemsa	Merck
FBS	Gibco	Sit. B	Serva
Tripsin-EDTA	Capricorn	AccuPOL DNAPol	AMPLIQON
PBS	NutriCulture	1 kb DNA marker	Thermo
Agaroz	Fisher Sci.	PageRuler protein ladder	Thermo
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ChemSolute	Triton X-100,	Panreac Applichme
HBSS	Multicell	Trypan blue	BI
DMEM (Low G.)	Sigma	Histopaque 1077	Sigma
L-Glutamin	Gibco	Entellan	Merck
Asetik asit	Sigma-Aldrich	Sodyum hidroksit	Merck
Kitosan	Sigma Aldrich,	Sodyum tripolifosfat	Merck

### 3.1.4. Mikronükleus ve Komet Testleri İçin Hazırlanan Solüsyonlar

**Hipotonik Solüsyon:** 0.040 M'lık KCl kullanılmıştır. Her işlemde yaklaşık iki saat önce yeteri kadar miktar hazırlanıp kullanım amacına göre 37°C'deki inkübatörde bekletilmiştir.

**Fiksatif Solüsyon:** Bir birim glacial asetik asitin, üç birim metanol ile karıştırılması ile hazırlanmıştır. Fiksatif, taze hazırlanıp +4°C'de saklanmıştır.

**Giemsa Boyaması:** Distile su içinde %6'lık boya eriyiği olarak hazırlanmış ve Mn preparatlarının boyanmasında kullanılmıştır.

**Lizis Solüsyonu:** 2.5 M NaCl + 100 mM EDTA + 10 mM Trizma Base tartılarak 500 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır. Çözelti stok olarak kullanılmıştır. Çalışma esnasında ise; 100 ml stok lizis için, 1ml Triton X-100 ve 10 ml DMSO eklenmiştir. pH 10 a ayarlanmış ve 4°C'de saklanmıştır.

**Elektroforez Tamponu:** 300 mM NaOH + 1 mM EDTA tartılarak distile su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır. pH >13 olarak ayarlanmış ve 4°C'de saklanmıştır.

**Nötralizasyon Tamponu:** 1.82 g Tris-HCL+ 0,125 g Trizma base tartılmış ve distile su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır. Solüsyon 4°C'de saklanmıştır.

**Etidyum Bromid Stok Boyası:** 10 mg EtBr, 50 ml distile suda çözündürülür ve kullanım aşamasında on kat seyreltilerek kullanılmıştır.

### 3.1.5. Moleküler Analizler İçin Kullanılan Kitler

Çalışmamızda kullanılan moleküler test kitleri ve markaları Tablo 3.3'de verilmiştir.

**Tablo 3.3.** Kit listesi

Kit adı	Firma adı
Hücre kültürü DNA izolasyon kiti	Qiagen, DNeasy Blood & Tissue Kit
Hücre kültürü RNA izolasyon kiti	Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit
cDNA sentez kiti	Abm OneScript Plus cDNA Synthesis Kit
RT PCR için Syber Green	Ampliqon, 2X with High ROX Syber Green
RYR1, PCK1, ATF2, COX II, GapdH forward ve reverse primerleri	Macrogen
JC-1 Membran Potansiyel Ölçüm Kiti	Thermo Fisher Scientific, JC-1 Dye for Mitochondrial Membrane Potential
ROS Belirleme Kiti	BioVision, Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Assay Kit
MitoSOX Belirleme Kiti	Thermo Fisher, Invitrogen™ MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide
Apoptoz kiti	BioLegend, FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI

### 3.2. Metot

#### 3.2.1. Taf İçeren Kitosan Nanopartiküllerin Hazırlanması

##### Kitosan Nanopartiküllerin Hazırlanması

Kitosan nanopartikülleri, oda sıcaklığında sodyum tripolifosfat (TPP) ve kitosanın iyonik jelasyonuna dayanan yöntem kullanılarak hazırlanmıştır (128). İyonik jelasyon yöntemi, diğer hazırlama yöntemlerine kıyasla daha basittir. İyonik jelasyon yöntemi kitosanın pozitif yüklü amino grupları ile TPP'nin negatif yüklü fosfat grupları arasındaki moleküler içi ve moleküler arası etkileşimlere dayanır. Öncelikle, kitosan çözeltisi (2.5 mg/mL) %1'lik (v/v) asetik asit çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. Daha sonra elde edilen kitosan çözeltisinin pH değeri, 0.5 M NaOH kullanılarak, 5.5'e ayarlanmıştır. Berrak bir kitosan çözeltisi ve çözünmeyen safsızlıkları uzaklaştırmak amacıyla kitosan çözeltisi ultra santrifüj cihazı kullanılarak 14.000 rpm 15 dakika

santrifüj edilmiştir. Bu arada TPP çözeltisi 0.25 mg/mL olacak şekilde saf su ile hazırlanmış ve kullanmadan önce 0.45 m'lik bir membran filtre ile safsızlıkları gidermek amacıyla süzülmüştür. Berrak kitosan/asetik asit çözeltilerine oda sıcaklığında manyetik karıştırma altında belli miktarda TPP çözeltisinin eklenmesiyle kitosan nanopartikülleri elde edilmiştir. Elde edilen kitosan nanopartikülleri ultra-santrifüj kullanılarak 14.000 rpm'de 60 dakika santrifüj edilerek toplanmıştır. Yıkama sonrası kitosan nanopartikülleri liyofilize edilmiş ve +4°C' de saklanmıştır.

### **TAF İçeren Kitosan Nanopartiküllerin Hazırlanması**

TAF içeren kitosan nanopartiküllerini hazırlamak için TAF, 0.5 M NaOH çözeltisinde çözündürülerek TAF çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra ilaç çözeltisi, manyetik karıştırma sırasında olan kitosan çözeltisine damla damla eklenmiştir. Karışımın pH'ı, oda sıcaklığında 10 dakika boyunca sürekli karıştırma altında 5.5'e ayarlanmıştır. Elde edilen nanopartiküller, ultra-santrifüj kullanılarak 14.000 rpm'de ve +4°C'de 60 dakika santrifüj edilerek toplanmıştır. Yıkama sonrası kitosan nanopartikülleri liyofilize edilmiş ve +4°C'de saklanmıştır. Ayrıca, santrifüj aşamalarında ayrılan süpernatantlar % enkapsülasyon veriminin belirlenebilmesi amacı ile spektrofotometrik çalışmalarda kullanılmak üzere temiz bir tüpe alınarak +4°C'de muhafaza edilmiştir.

### **Hazırlanan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu**

Hazırlanan kitosan nanopartiküllerinin yapısal karakterizasyonu Förier Dönüşümlü Kızılötesi Analizi (FTIR, Perkin Elmer) cihazı ile doğrulanmıştır. Böylelikle hazırlanan kitosan nanopartiküllerinin kimyasal yapısı aydınlatılmıştır. FTIR spektrumları 400-4000 cm<sup>-1</sup> dalga sayısı aralığında alınmıştır. Hazırlanan nanopartiküllerin yüzey özelliklerinin belirlenebilmesi amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. SEM görüntülerinin çekiminde İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi'nde (İBTAM) bulunan LEO, EVO 40 XVP cihazı kullanılmıştır. EDAX spektrumları ve EDAX-haritalama görüntüleri ise SEM cihazına entegre edilen Rontec Xflash dedektör analiz cihazı ile yapılmıştır. Hazırlanan kitosan nanopartiküllerinin hidrodinamik çapları, polidispersite indeksi (PDI) değeri ve zeta potansiyel değerleri Malvern ZetaSizer cihazı ile belirlenmiştir.

### **TAF'ın Spektrofotometrik Kontrolü**

TAF ilaç yükleme etkinliği ve ilaç salım çalışmaları için TAF ilacının UV-Vis spektrofotometre cihazı ile 200-400 nm dalga boyu aralığında absorbans taraması yapılmış ve maksimum absorbans yaptığı dalga boyu belirlenmiştir. Ayrıca, TAF'ın belli konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanarak absorbans değerleri ölçülmüş ve spektrum sonuçlarına göre absorbansa (y eksen) karşı konsantrasyon (x eksen) standart grafiği çizilerek kalibrasyon grafiği elde edilmiştir.

### **TAF'ın Enkapsülasyon Veriminin Hesaplanması**

TAF'ın % enkapsülasyon verimi santrifüj sonrası toplanan süpernatantların spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile belirlenmiştir. Okunan absorbans değerinin, standart eğrisinde karşılık geldiği madde konsantrasyonu hesaplanmıştır. Bulunan konsantrasyon değerine göre başlangıçta formülasyona koyulan madde miktarı kıyaslanarak yüzde enkapsülasyon verimi aşağıdaki formülden yararlanarak hesaplanmıştır.

$$\text{Enkapsülasyon verimi (\%)} = \frac{\text{TAF miktarı (hesaplanan)}}{\text{TAF miktarı (başlangıç)}} \times 100$$

### ***İn Vitro* Salım Çalışmaları**

Kitosan nanopartiküllerden TAF ilacının *in vitro* koşullarda salım çalışmaları, 37°C'deki çalkalayıcı su banyosu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *İn vitro* salım çalışmaları için, hassas terazide tartılan TAF nanopartikül formülasyonu, 2.0 ml steril pH 7.4 - PBS tamponu ile süspanse edilerek ağzı kapalı diyaliz membranına alınmıştır ve 37°C'de çalkalayıcı su banyosunda çalkalanmaya bırakılmıştır. Belirli zaman aralıklarında örnekler alınmış ve alınan miktar kadar taze pH 7.4 - PBS tamponu eklenmiştir. Alınan örnek santrifüj edilmiş ve üst fazda serbestleşen ilaç konsantrasyonu spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.

### **3.2.2. Genotoksisite ve Mitotoksisite Testleri**

#### **Hücrelerin Çözdürülmesi**

-80°C'de saklanan kriyojenik tüplerdeki hücreler çıkartılıp su banyosunda (37°C) 1-2 dakika bekletilerek erimesi sağlanmıştır. Hızlı bir şekilde, vialdeki yaklaşık 1 ml hücre karışımı 8 ml besiyeri (DMEM) ile karıştırılarak steril falkon tüplere

aktarılmıştır. 1000 rpm'de 6 dakika santrifüj işlemi uygulanmış ve üstte kalan süpernatant uzaklaştırılmıştır. Tüpün dibinde kalan hücre pelleti üzerine 5 ml besiyeri (%10 FBS ve %1-2 pen-strep içeren High Glukoz DMEM) eklendikten sonra 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür flasklarına transfer edilmiştir.

Hücreler inverted mikroskopta (BAB-TAM-F) gözlemlenerek 37°C - %5'lik CO<sub>2</sub> inkübatörüne yerleştirilmiştir.

### **Hücrelerin Çoğaltılması ve Pasajlanması**

Kültür süresince hücrelerin tutunması, gelişimi ve kontaminasyon açısından takibi için her gün inverted mikroskop ile yapılmıştır. Flaskın yaklaşık %70-80'ini kapladığı zaman (yaklaşık üç günde bir) pasajlaması yapılmıştır. Bunun için öncelikle hücrelerin üzerindeki eski besiyeri uzaklaştırılmış, Mg<sup>+2</sup> ve Ca<sup>+2</sup> içermeyen 2 mL PBS ile yıkama işleminden sonra hücrelerin yüzeyden kalkabilmesi için her flaska (25 cm<sup>2</sup> için) %0.25'lik 1X Tripsin-EDTA solüsyonundan 2 ml eklenmiştir. İnkübatörde 5 dakika bekletildikten sonra, yüzen hücreler yavaşça pipetlenip steril falkon tüpüne aktarılmıştır. Üzerine dört katı kadar (yaklaşık 8 ml) besiyeri eklendikten sonra santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücreler istenilen hücre sayısına göre yeni flasklara dağıtılmış ve üzerine 5 ml taze besiyeri konulduktan sonra kültüre devam edilmiştir.

### **Hücrelerin Dondurulması**

Kültürdeki hücreler Tripsin-EDTA solüsyonu ile kaldırılıp santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Daha sonra elde edilen hücre pelleti 1 ml, soğuk olarak %90 FBS ve %10 DMSO içeren kriyojenik tüplere süspanse edilmiştir. Kriyovialler hızla -80°C buzdolabına konulmuştur. Uzun süreli depolama için sıvı azot tankına aktarılması gerekmektedir.

### **Hücelere Test Maddelerinin Uygulanması**

Çalışmamızda HepG2 hücrelerine uygulanacak TAF dozunu belirlemek için üretici Gilead Sciences firmasının daha önce HepG2 hücrelerinde yaptığı hücre canlılık testinde uygulanan ve CC<sub>50</sub> değerini veren, >44.4 µM konsantrasyon değeri referans alınmıştır (89). Ayrıca ön çalışmalarımız doğrultusunda altı gün boyunca 45 µM TAF uygulandığı zaman hücre canlılığında yaklaşık olarak %50 azalma olduğu tespit edilmiştir. Böylece ideal TAF ilacı uygulama dozu; altı gün süresince 45 µM olarak karar verilmiştir. Bu doza uygun olarak da kitosan enkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir.



Kültür ortamındaki hücreler pasajlandıktan sonra, bir gün süresince hücrelerin flaska tutunması beklenip mikroskop altında incelenmesini takiben test maddelerinin uygulanmasına geçilmiştir. Çalışmada 4 grup oluşturulmuştur:

1. Kontrol Grubu; hiçbir test maddesinin uygulanmadığı grup,
2. TAF Grubu; 45  $\mu$ M TAF uygulanan grup,
3. Kitosan Grubu; 45  $\mu$ M TAF'ın enkapsülasyonu ile aynı miktarda kitosan uygulanan grup,
4. TAF+Kitosan Grubu; 45  $\mu$ M TAF içeren kitosan uygulanan gruptur.

Çalışma planı ve gruplar Tablo 3.4'de gösterilmiştir.

Hücreler, test maddelerine altı gün maruz bırakılmıştır; üç günde bir kez olmak üzere aynı içeriğe sahip besiyeri ortamı ile değişim yapılmıştır. Altıncı gün sonunda, gerekli testler için anlatıldığı gibi tripsinazasyon işlemi ile kültür sonlandırılmıştır.

**Tablo 3.4.** Çalışmanın planı ve grupları



NP: Nanopartikül

TAF+Kitosan NP: TAF içeren kitosan nanopartikülü.

### **Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi**

Tripan mavisi testi, hücre canlılık testlerinde kullanılan tekniklerden birisidir. Tripan mavisi negatif yüküdür. Bu teknikte hücre membranı zarar görmemiş ise boya hücre içerisine giremez; ölü hücrelerde ise membran hasarından ötürü boya içeri girerek mikroskop altında mavi görünmesine neden olur (129).

Çalışmamızda altı günlük ilaç uygulamalarından sonra tüm çalışma gruplarındaki hücrelere tripan mavisi canlılık testi yapılmıştır. Bunun için kültürlerden elde edilen hücre pelleti besiyeri ile süspanse edilmiştir. Hücre canlılık oranını belirlemek için elde edilen hücre süspanسیونundan 50 µL bir ependorf tüpe aktarılarak üzerine 50 µL tripan mavisi çözeltisi (% 0.25 a/h) eklenerek iyice karıştırılmıştır (Dilüsyon faktör: 2). hücre süspanسیونu+Tripan mavisi karışımı Thoma sayım lamına uygulanmıştır. Işık mikroskopunda 100x büyütme de hücreler sayılmıştır ve canlılık oranı aşağıdaki formüle göre değerlendirilmiştir.

Thoma Lamı hücre sayım formülü: Hücre sayısı x 2 (dilüsyon faktörü) x 10<sup>4</sup> (ml'deki sayıyı verir.)

Canlı hücrenin ölü hücreye yüzdesi ise: (%) Canlı hücre oranı= Boya almamış hücrelerin sayısı / Toplam hücre sayısı x 100.

### **Hücrelerin Mikroskopik Olarak Değerlendirilmesi**

Kontrol ve uygulama gruplarında kimyasalların hücreler üzerindeki morfolojik değişimlerini görebilmek amacıyla altıncı gününün sonunda, inverted ışık mikroskopunda altında; 100x, 200x ve 400x büyütmelerde fotoğrafları çekilmiştir ve morfolojik olarak farklılıkları değerlendirilmiştir.

### **Mikronükleus (Mn) Testi**

*In vitro* sitokinez bloklü mikronükleus testi için, 25 cm<sup>2</sup> flasklara 1.5x10<sup>6</sup>/ 5 ml sayıda hücre ekilmiştir. Kimyasal uygulamasının beşinci gününde hücrelerdeki mitoz bölünmesini durdurmak üzere 6 ug/ml Cyt-B ilave edilmiştir. 24 saat sonra kültür ortamındaki besiyeri uzaklaştırılmış ve PBS yıkaması arkasından tripsinizasyon işlemi uygulanmıştır. Falkon tüplerine alınan hücre süspanسیونu santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Daha sonra hücre pelletinin üzerine, vorteks eşliğinde yavaşça (etüvde 37°C'de tutulan) 7 ml hipotonik solüsyonu ilave edilmiş ve ardından 10 dakika inkübatörde bekletilmiştir. Sürenin sonunda tüpler 10 dk 1000 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Hücreler üzerine yine yavaş yavaş 6 ml soğuk fiksatif solüsyonu eklenmiştir. Fiksasyon işlemi iki kez tekrar edilmiştir. Son santrifüjden sonra dipte 0.5 ml pellet kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra preparat hazırlama işlemine geçilmiştir. Hücreler çok iyi karıştırıldıktan sonra etiketlenmiş, soğuk ve nemli lamlara 3-4 damla gelecek şekilde damlatılmıştır. Damlaların üst üste

gelmemesine dikkat edilmiştir. Preparatlar 24 saat süresince oda ısısında kurumaya bırakılmıştır.

Hazırlanan preparatlar %6'lık Giemsa boyası ile 10 dakika süreyle boyanmıştır. Fazla boya distile su ile yıkandıktan sonra kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar lamel ile kapatılıp analiz için hazır hale getirilmiştir.

Her bir çalışma grubuna ait preparatlar ışık mikroskobu altında 200x büyütme ile taranarak incelenmiştir. Mn sıklığını değerlendirmek üzere her grup için; 1000 adet binükleer hücre sayılmıştır ve bu işlem her grup için üç kez tekrarlanmıştır. Aşağıdaki formüle göre Mn sayısı hesaplanmıştır.

Mn sayısı: (1 x 1 Mn içeren hücre sayısı) + (2 x 2 Mn içeren hücre sayısı) + (3 x 3 Mn içeren hücre sayısı) / Toplam hücre sayısı.

### **Komet Yöntemi ile DNA Hasarının Ölçülmesi**

Komet tekniği veya tek hücreli jel elektroforez testi, hücre seviyesinde tek veya çift zincir DNA kırılmalarını tespit eden bir yöntemdir. Geçici hasaları gösterir, bu hasarlar DNA onarım mekanizmaları ile düzeltilebilir. Bu nedenle deneylerden hemen sonra analiz yapılmalıdır (130).

Tüm çalışma gruplarındaki hücreler, altıncı günün sonunda, tripsinasyon ile kültür flasksından kaldırıldıktan sonra komet testine başlanmıştır.

Slaytların Hazırlanması: Öncelikle %1'lik yüksek erime dereceli agaroz (HMA) jel, PBS tampon içerisinde hazırlanmıştır. HMA sıvı haldeyken lamlar içine daldırılıp çıkartılarak lam üzerinde ince bir film tabaka oluşması sağlanmıştır. Daha sonra lamlar kurumaya bırakılmıştır. Benzer şekilde %0.5'lik düşük erime dereceli agaroz (LMA) jelde, PBS tamponunda 70°C'de hazırlanmıştır. Kültüre hücrelerden elde edilen hücre pelleti yoğunluğuna bağlı olarak bir miktar alınıp 37°C'ye getirilen, sıvı LMA ile karıştırılmış ve önceden hazırlanan HMA'lı lamlara, lamel yardımı ile yayılıp donması beklenmiştir. Preparat tamamen donduktan sonra lamel dikkatlice kaldırılmıştır ve bir sonraki lizis aşamasına geçilmiştir.

Lizis Aşaması: Çalışma öncesi hazırlanan lizis solüsyonu soğutulduktan sonra slaytlar bu solüsyon içerisine yatay olarak konulmuş ve lamaların üzerini kapatacak şekilde, solüsyon içerisinde 1 saat +4°C'de bekletilmiştir.

Elektroforez Aşaması: Lizis aşamasından sonra lamlar elektroforez tankına yerleştirilerek üzerine elektroforez tamponu eklenmiştir. Tankın etrafına buz kalıpları yerleştirilerek, DNA zincirinin ayrılması için alkali tamponda 20 dakika bekletilmiştir.

Bekleme süresinin ardından tampon çözeltisi içindeki hücreler, 300 mA, 25 voltluk elektriksel alanda, 25 dakika yürütülmüştür.

Nötralizasyon Aşaması: Elektroforez işleminin bitmesinin ardından preparatlar çıkarılıp +4°C'de bekleyen nötralizasyon solüsyonunda, 15 dakika bekletilmiştir. Devamında preparatlar, %70'lik etil alkol ile 3 dakika yıkanmıştır.

Boyama İşlemi: Hazırlanan % 2'lik EtBr çözeltisi on kat seyreltilerek her slayta 30 µl damlatılmış ve üzeri lamel ile kapatılmıştır. Görüntü çabuk solacağı için kısa zaman içerisinde floresan mikroskop ile incelenmiştir.

Analiz İşlemi: Boyanmış lamalar karanlık ortamda floresan mikroskopunda (BAB-TAM-F) incelenmiş ve hücreler 40x objektifte fotoğraf çekilerek analiz edilmiştir. Çalışmamızdaki hücrelerin DNA hasarını saptamak için her gruptan 50 hücrenin, % DNA<sub>T</sub> değerlerinin ortalamaları BAB-BS 200 PRO analiz programı kullanılarak Komet Assay yazılımında değerlendirilmiştir.

Komet testinde, hasar sonucu oluşan toplam DNA (DNA<sub>C</sub>); baş ve kuyruk şeklinde iki bölümden oluşmaktadır. Baş kısmındaki DNA yüzdesi (%DNA<sub>H</sub>) ve kuyruk kısmındaki DNA yüzdesi (%DNA<sub>T</sub>), kuyruk uzunluğu (T<sub>L</sub>) ve kuyruk Moment (T<sub>M</sub>) gibi parametreleri incelenerek komet testi değerlendirilir. Ortalama kuyruk DNA'sı şu şekilde hesaplanır;

$$DNA_C = DNA_H + DNA_T$$

$$\%DNA_T = 100 \times DNA_T / DNA_C$$

Kuyruk momentumunun hesaplanması ise şu şekildedir:

$$T_M = \%DNA_T \times T_L / 100$$

Komet tekniği ile DNA'daki hasarın nicel olarak belirlenebilmesi için; kuyruktaki DNA yüzdesi (%DNA<sub>T</sub>), kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu en sık tercih edilen parametrelerdir. DNA<sub>T</sub> değerlendirmesi, diğer parametrelere göre uygulama ve sonuç arasındaki ilişkiyi direkt yansıtmaması dolayısıyla özellikle kullanılmaktadır.

### **Anneksin-V FITC Yöntemi ile Apoptoz Testi**

Apoptoz testi için apoptotik ve nekrotik hücrelerin tanımlanması amacıyla tasarlanmış olan BioLegend'in Propidium İyodürlü (PI) FITC Annexin V Apoptoz Tespit Kiti kullanıldı. Annexin V, fosfatidilserine (PS) bağlanan annexin ailesinin bir üyesidir ve Ca<sup>+2</sup> bağımlıdır. PS normalde sağlıklı hücrelerin plazma zarının iç kısmında

bulunur, ancak erken apoptoz sırasında membran bütünlüğünün kaybolması ile PS'ler dış yüzeye taşınır. Böylece florokrom etkili Annexin V, apoptotik hücreleri tespit edebilir. Nekrotik ve apoptotik hücrelerin ayrımını yapmak üzere Propidium İyodür solüsyonu (PI) kullanılır. PI, DNA'ya bağlanabilen floresan bir boyadır; geç apoptotik ve nekrotik hücrelerde DNA çekirdek dışına çıkması sebebiyle pozitif olarak boyanır (131).

Çalışmamızdaki 4 uygulama grubu için de eşit şartlarda hücre ekimi yapıp altı gün süresince test maddeleri uygulanmıştır ve anlatılan şekilde hücreler tripsin ile kaldırılıp yıkandıktan sonra temiz hücre pelleti elde edilmiştir. Gruplar tripan mavisi ile sayılarak hepsinden 100.000 hücre/ml olacak şekilde işleme başlanmıştır. Kitte çıkan protokol uygulanmıştır ve akış sitometresi ile BD FACSDiva yazılımı kullanılarak değerlendirme yapılmıştır. İşlem farklı zamanlarda altı kez tekrarlanmıştır.

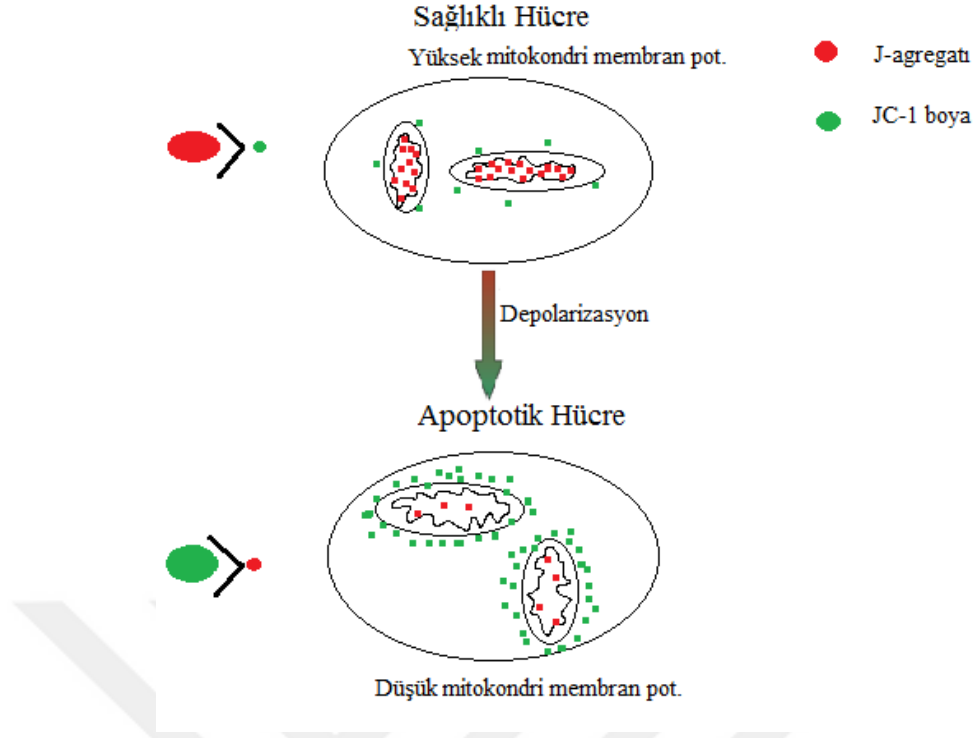
### **Mitokondri Membran Potansiyelinin Tespiti ( $\Delta\Psi_m$ )**

$\Delta\Psi_m$  incelemek için Thermo MitoProbe™ JC-1 Test Kiti kullanılmıştır. Kitte membran potansiyelinin ölçümü için, katyonik boya JC-1 (5', 6,6'-tetrakloro-1,1', 3,3'-tetraetilbenzimidazolilkarbosiyenin iyodür) ve pozitif kontrol amaçlı membran potansiyelini bozan CCCP (karbonil siyanür 3-klorofenilhidrazon) kullanılmaktadır. JC-1; mitokondri membranında potansiyele bağlı olarak, yeşilden (~ 529 nm) kırmızıya (~ 590 nm) doğru floresan emisyon kayması gösterir. Sağlıklı hücrelerde mitokondri negatif yüklüdür ve boya içeri girerek kırmızı J-agregatları oluşturur. Apoptotik hücrelerde ise membran potansiyelindeki artan geçirgenlik ile negatif yük azalarak kırmızı renk yoğunluğu düşer ve yeşil renkte artış olur. Sonuç olarak, mitokondriyal depolarizasyon ile kırmızı / yeşil floresan yoğunluk oranında bir azalma gözlenir (132) (Şekil 3.3). Test kitindeki amaç bu yoğunluğu ölçmektir.

Uygulama sonucu elde edilen hücreler her grup için  $1 \times 10^6$  hücre/ml olacak şekilde kitin protokolü uygulanmıştır.

Yeşil (monomerik form): eksitasyon 527 nm/ emisyon 590 nm,

Kırmızı (J-agregat form): eksitasyon 485 nm/ emisyon 527 nm, olacak şekilde mikropate okuyucu ile ölçülmüştür. Membran potansiyel ölçüm testi, farklı zamanlarda 3 x 3 replika şeklinde tekrarlanmıştır.



Şekil 3.3. JC-1 membran potansiyeli,  $\Delta\Psi_m$ .

### Süperoksit Radikallerin Belirlenmesi

Süperoksit oluşumunu kıyaslamak üzere Thermo MitoSOX™ Red kiti kullanılmıştır. Mitokondriyal süperoksit, oksidatif fosforilasyonun yan ürünü olarak açığa çıkar. Elektron transport zincirinde tüketilen oksijenin yaklaşık %1-3'ünde elektronlar kaçakları oluşur. Bu kaçak elektronlar, moleküler oksijen ile hızla etkileşerek süperoksit anyonu oluşturabilir.

MitoSOX™ Kırmızı, canlı hücrelerin mitokondrilerinde süperoksidin oldukça seçici tespiti için kullanılan bir boyadır. MitoSOX™ Kırmızı reaktif, hızlı ve seçici bir şekilde mitokondriye hedeflenir. Mitokondriye girdikten sonra, MitoSOX™ Kırmızı reaktif süperoksit tarafından oksitlenir ve kırmızı floresans gösterir (133).

Çalışma grupları eşit şartlarda 6'lı well plate içine ekilmiş ve kimyasal uygulamasının sonunda hücre pelleti elde edilmiştir. Grup hücreleri Tripan mavisi ile sayılarak her gruptan  $1 \times 10^6$  sayıda hücre olacak şekilde işleme başlanmıştır. MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator \*for live-cell imaging\* (M36008) kitinde çıkan protokol uygulanmıştır. Testi ve sistemi kontrol amaçlı 1 mM  $H_2O_2$  kullanılmıştır. Mikroplate okuyucu ile absorpsiyon/emisyon: ~510/580 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Değerlendirme için bu işlem 3 x 3 kez tekrar edilmiştir.

## **ROS Tespiti**

Hüresel ROS seviyesini belirleyip gruplar arasındaki farklılıkları karşılaştırmak üzere BioVision Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Assay Kit kullanılmıştır.

Düşük seviyeli reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve serbest radikallerin sürekli üretimi, tüm canlı hücrelerin temel bir özelliğidir. Düşük ROS seviyeleri sinyal yollarında önemli bir rol oynarken, oksidatif stres altında artan seviyeler, nükleik asitlere, proteinlere ve membran lipitlerine zarar verir. Oksidatif stres sırasında ROS birikimi aynı zamanda yaşlanma, apoptoz veya nekroz ile de ilişkilidir ve hastalıklar gibi patolojik durumlarda görülür. ROS'un hüresel aktivitesi; antioksidanlar ve hasarlı DNA'nın onarılması ile dengelenir. Hücre içi ROS seviyelerini ölçen probalar, oksidatif stres indükleyicilerini ve antioksidan tedavilerin etkilerini incelemek için önemli araçlar sağlar. BioVision'ın ROS Tespit Test Kiti, canlı hücrelerdeki hidroksil, peroksil veya diğer reaktif oksijen türlerinin tespiti için kullanılmaktadır. Canlı hücrelerdeki reaktif oksijen türlerini tespit etmek için fenol kırmızısı, hücreye girebilen florojenik bir prob olan H2DCFDA'yı kullanılmaktadır. Hücre girişi üzerine H2DCFDA, floresan olmayan bir H2DCF oluşturmak için hüresel esterazlarla modifiye edilir. H2DCF'nin hücre içi ROS tarafından oksidasyonu yüksek derecede bir floresan ürün verir (134).

Çalışma gruplarımızdan elde ettiğimiz canlı hücre materyali sayılarak her grup için  $1.5 \times 10^6$  hücre/ml olarak işleme başlanmıştır. Kitin adherent hücreler için uygun olan protokolü uygulanmış ve testte kontrol amaçlı kitten çıkan ROS Inducer kullanılmıştır. Sonuçlar için Microplate okuyucu ile Eksitasyon/Emisyon = 495/529 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır ve testin uygulanması üçlü replikalar ile üç kez tekrarlanarak değerlendirilmiştir.

## **Genomik DNA İzolasyonu**

Genomik DNA izolasyonu için Qiagene, DNeasy Blood & Tissue Kit'i kullanılmıştır. Her uygulama grubu için 5 ml besiyerine  $3 \times 10^6$  hücre ekimi yapılmıştır. Bir gün hücre tutunmasının ardından altı gün kimyasal muamelesi gerçekleştirilmiştir. Besiyeri uzaklaştırılarak, hücre sayıları her grup için  $2 \times 10^6$ /ml olarak tutulmuştur. PBS içerisinde süspansiyon hale getirilip kit protokolü uygulanmıştır.

DNA'nın saflığını ve miktarını belirlemek üzere en son kullanılan elüsyon solüsyonu blank olarak kullanılmıştır ve spektrofotometrik olarak O.D<sub>260</sub> ve O.D<sub>280</sub> değerleri alınmıştır. Ayrıca mikrolitredeki DNA miktarı nanogram olarak bulunmuştur.

DNA'nın Kalitatif Değerlendirilmesi: İzole edilen genomik DNA hazırlanan %1'lik agaroz jelde elektroforez ile kontrol edilmiştir. 100 ml 1X Tris Asetik asit EDTA (TAE) tamponu kullanılmıştır. Üzerine 4 µl (5 mg/ml) etidyum bromid eklenmiş ve çalkalanmıştır. Polimerleşme tamamlandıktan sonra 1 µl jel yükleme tamponu ile karıştırılan 5 µl DNA örneği 90V'da 60 dakika yürütülmüştür. Elektroforezde ayrılan DNA fragmentlerinin büyüklüklerinin belirlenmesi için farklı büyüklüklerde DNA belirteçleri kullanılmıştır. Elektroforez sonuçları G:Box görüntüleme cihazında görüntülenerek fotoğrafları çekilmiştir. DNA'nın RT-PCR kullanımına uygun olduğuna karar verilmiştir.

### **Mitokondiyal DNA İçeriğinin Ölçülmesi**

Mitokondiyal DNA'nın nispi içeriğini değerlendirmek üzere, mitokondiyal genom içinde yer alan COX II ifadesi nicel olarak gerçek zamanlı PCR (qPCR-BIO-RAD) ile ölçülmüştür (Tablo 3.5 ve 3.6). Amplifikasyon için COX II ileri primer 5'-CAG ATG CAG CGC AAG TAG GTC TAC-3' ve geri primer 5'-GGG CAT ACA GGA CTA GGA AGC AG-3' kullanılmıştır. Kontrol gen olarak Gapdh kullanılmıştır.

**Tablo 3.5.** Reaksiyon ortamı

Bileşen	Hacim	Son Konsantrasyon
2X Syber Green qPCR Mix	10 µl	1X
İleri Primer	0.8 µl	0.4 µM
Geri Primer	0.8 µl	0.4 µM
Kalıp DNA	Değişken	240 ng (her grup sabitlendi)
Su (Nükleaz bulunmayan)	20 µl'ye tamamlandı	-



**Tablo 3.6.** Reaksiyonun döngü koşulları

Faz	Zaman	Isı	Döngü
Başlama ısıtılması	10 dk	95°C	1 döngü
Denatürasyon	30 sn	95°C	40 döngü
Annealing	60 sn	60°C	
Elongasyon	15 sn	72°C	
Erime eğrisi	1 dk	80°C	

Çalışma hücre grupları arasında, mitokondriyal DNA içeriğinin nispi ölçümünü analiz etmek için  $2^{-\Delta\Delta CT}$  yöntemi uygulanmıştır. Dört hücre hattında her biri için üç replika ile üçlü ölçüm yapılmıştır.

### **Total RNA İzolasyonu**

Çalışma için kültürdeki HepG2 hücrelerine, TAF ve kitosan uygulamaları için belirlenen inkübasyon süreleri sonunda elde edilen hücrelerden sayım yapılarak her grup için  $4 \times 10^6$  hücre/ml olacak şekilde Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit (#K0731, #K0732) protokolü takip edilerek RNA izolasyonu yapılmıştır.

İzole edilen RNA'ların saflığı spektrofotometre cihazından 260/280 nm'deki absorbans oranı ile kontrol edilmiştir. DNA ve protein kontaminasyonu taşımayan kaliteli RNA'nın absorbans aralığı 1.8-2.1'dir. En son içinde bulunduğu nükleazdan arınmış su blank olarak kullanılarak okuma yapılmıştır. Elde ettiğimiz RNA'ların 260/280 nm absorbans oranı 1.9-2.1 olarak ölçülmüştür. Ayrıca mikrolitreye denk gelen RNA miktarı belirlenmiştir.

### **Komplementer (cDNA) Sentezi**

İzole ettiğimiz total RNA'dan cDNA sentezi için, abm's OneScript® Plus Reverse Transcriptases, OneScript® Plus cDNA Syntehisis Kit kullanılmıştır. İşlem süresince buz üzerinde ve steril malzemeler ile çalışılmıştır. Her tüp için hazırlanan kalıp-primer karışımı aşağıdaki tabloya göre hazırlanmıştır (Tablo 3.7).

**Tablo 3.7.** Kalıp RNA- primer karışımı, birinci aşama

Komponent	Hacim	Son Konsantrasyon
Random primer	1 µl	0.5 µM
10mM dNTP Mix	1 µl	500 µM
Nükleaz bulunmayan su	14.5 µl	-
Total RNA		1.5 µg

Kalıp ve primer karışımı 65°C'de 5 dakika bekletilerek denatüre edilmiştir. İnkübasyon sonunda tekrar buz üzerinde çalışmaya devam edilmiştir. Ters transkriptaz reaksiyonu tablodaki protokole göre hazırlanarak kalıp-primer karışımına eklenmiştir (Tablo 3.8).

**Tablo 3.8.** Kalıp RNA-primer karışımı, ikinci aşama

Komponent	Hacim	Son Konsantrasyon
5X Reaksiyon tamponu	4 µl	1X
RNAseOFF Rübönükleaz İnhibitörü	0.5 µl	20 U/reaks.
OneScript Plus RTaz	1 µl	200 U/reaks.

Karışım kısa bir santrifüj yapıldı ve 25°C'de 10 dakika, 50°C'de 50 dakika ve 85°C'de 5 dakika bekletilerek enzim inaktivasyonu sağlanmıştır. Isı uygulamaları termal döngü cihazında yapılmıştır. Bir haftalık saklama için -20°C, daha uzun saklama için -80°C'ye kaldırılmıştır.

### **Mito-Nükleer Sinyal Genlerinin RT-PCR (qPCR) ile Analizi**

Mayada tarif edilen retrograd (RTG) sinyal yoluna benzer mitokondri-nükleus retrograd sinyalleme, memeli hücrelerinde de tarif edilmiştir (135). Çalışmamız kapsamında, RTG sinyal yolağında etkin olduğu düşünülen genlerden; RYR1 (Riyanodin reseptör 1), ATF2 (Aktive edici transkripsiyon faktör 2) ve PCK1 (sitosolik fosfoenol piruvat karboksikinas) çalışılmıştır. Üç temsili mito-nükleer sinyalinin

“RZR1, ATF2 ve PCK1” ifadesi qPCR aracılığı ile analiz edilmiştir. Genlerin qPCR ile analizi için aşağıdaki tabloda verilen primerler tasarlanmıştır (Tablo 3.9).

**Tablo 3.9.** Gen primerleri

Gen	İleri Primer	Geri Primer
RZR1	5'-TCTTCCAGAGTAT CCAGGCAGTGATG-3'	5'-TGATGACAGTGCCAT CCTCATTCAC-3'
ATF2	5'-CCACAGACCCAA AGTACAAGTG-3'	5'-TCTTCTCTAAAGACT GAACCCAG-3'
PCK1	5'-TGTCGCTCCTGG GACTTCAGTG-3'	5'-GCTCATCAATGCCTT CCCAGTAAACG-3'

Kontrol amaçlı standart gen olarak Gapdh kullanılmıştır. Çalışma gruplarından izole edilen total RNA'lerden elde edilen cDNA kullanılarak aşağıda tabloda gösterilen miktarlar ve döngü koşulları ile RT PCR reaksiyonu hazırlanmıştır (Tablo 3.10 ve Tablo 3.11).

**Tablo 3.10.** RT PCR reaksiyon konsantrasyonları

Bileşen	Hacim	Son Konsantrasyon
2X Syber Green qPCR Mix	10 µl	1X
İleri Primer	0.8 µl	0.4 µM
Geri Primer	0.8 µl	0.4 µM
cDNA	1.5 µl	75 ng
Su (Nükleaz bulunmayan)	6.9 µl	-

**Tablo 3.11.** RT PCR döngü koşulları

Faz	Zaman	Isı	Döngü
Başlangıç ısıtılması	10 dk	95°C	1 döngü
Denatürasyon	30 sn	95°C	40 döngü
Annealing	60 sn	60°C	
Elongasyon	15 sn	72°C	
Erime eğrisi	1 dk	78,80,84°C	

Çıkan erime eğrileri ve CT değerleri standardize edilip ve sinyal genlerinin nispi ekspresyonu  $2^{-\Delta\Delta CT}$  yöntemi ile ölçülmüş ve test üç kez tekrarlanmıştır.

### İstatistiksel Analiz

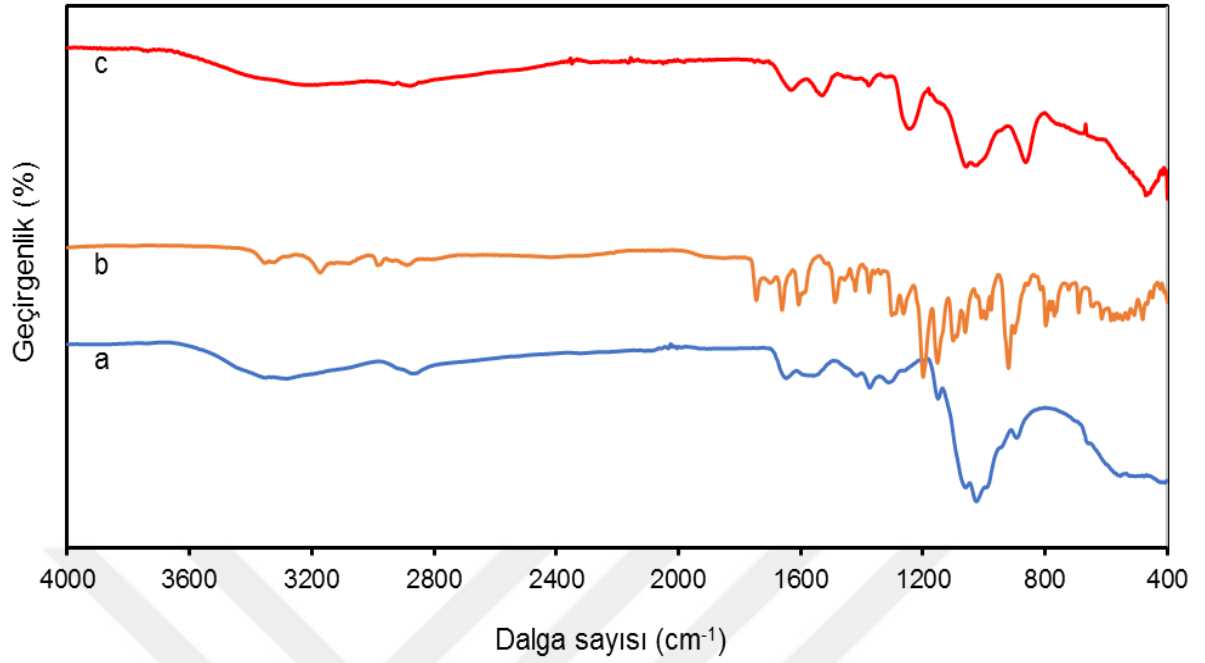
Verilerin istatistiki analizinde “Windows for SPSS Version 21” yazılım programı ve İnönü Üniversitesi, Biyoistatistik Bölümünün interaktif web yazılımı kullanılmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken; gruplar arasındaki karşılaştırmalar için; One Way Anova, Kruskal-Wallis ve ikili karşılaştırmalar için; Conover ve Tukey testleri kullanılmıştır. Testlerin istatistiki değerlendirmesinde anlamlılık farkı  $p < 0.05$  ise, sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. TAF İçeren Kitosan Nanopartikül Formülasyonu Bulguları

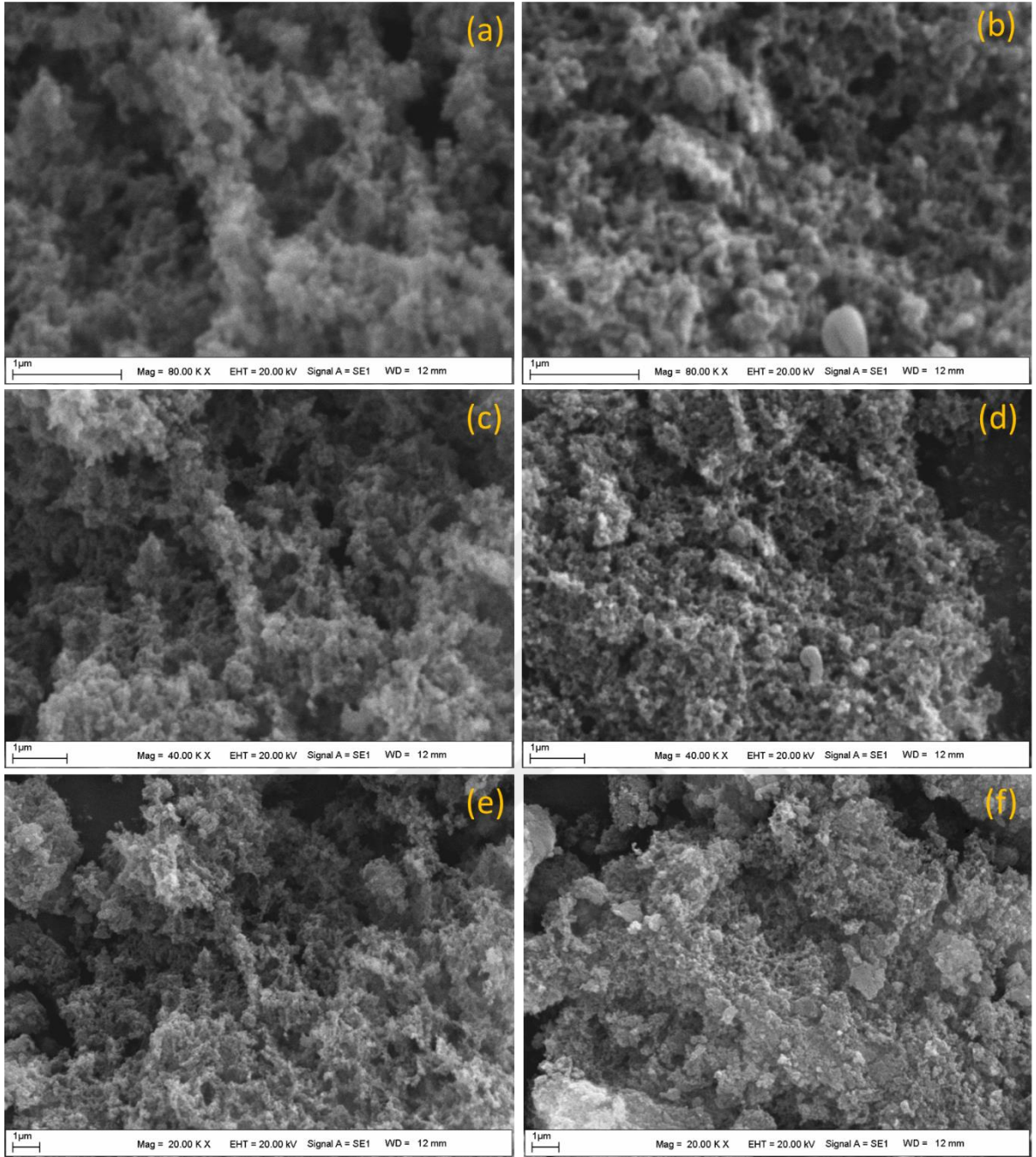
#### 4.1.1. Hazırlanan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Kitosan nanopartiküller, TAF ve TAF içeren kitosan nanopartiküllerin FTIR spektrumları Şekil 4.1'de gösterilmiştir. 3000-3600  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki geniş band kitosanın yapısında bulunan  $-\text{NH}_2$  ve  $-\text{OH}$  grupların titreşiminden kaynaklanmaktadır. 2858 ve 2910  $\text{cm}^{-1}$ 'deki bantlar kitosan nanopartiküllerinde bulunan  $\text{CH}_3$  ve  $\text{CH}_2$ 'nin asimetrik germe titreşimine karşılık gelmektedir. 1648  $\text{cm}^{-1}$ , 1598  $\text{cm}^{-1}$  ve 1306  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pikler ise, sırasıyla Amid I,  $-\text{NH}_2$  bükme ve Amid III gruplarına atfedilmektedir. Son olarak, 1121  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülen  $\text{P}=\text{O}$ 'nun bandı kitosanın amonyum iyonları ile TPP'nin fosfat grupları arasındaki iyonik etkileşimi doğrulamaktadır. Bu sonuçlar doğrultusunda kitosan nanopartikülleri başarıyla hazırlanmıştır ve elde edilen spektrumlar literatürle uyumaktadır (136,137). Şekil 4.1.b, saf TAF ilacının FTIR spektrumunu göstermektedir. 3169  $\text{cm}^{-1}$ 'de aromatik  $\text{C}-\text{H}$  gerilmesi, 3336  $\text{cm}^{-1}$ 'de zayıf  $\text{O}-\text{H}$  bandı, 691  $\text{cm}^{-1}$ 'de  $\text{P}=\text{O}$  gerilmesi, 1423 ve 1485  $\text{cm}^{-1}$ 'de çiftler halinde aromatik  $\text{C}=\text{N}$  gerilmesi, 1263  $\text{cm}^{-1}$ 'de  $\text{C}-\text{N}$  deformasyonu, 1550 ve 1570  $\text{cm}^{-1}$ 'de  $\text{NH}_2$ -makaslama bandının gerilmesi, 1660-921  $\text{cm}^{-1}$ 'de çeşitli  $\text{N}-\text{H}$  sallama bantları ve 900-600  $\text{cm}^{-1}$ 'de çeşitli  $\text{C}-\text{H}$  bantları TAF ilacının tipik bantlarıdır (138). Şekil 4.1.c ise TAF içeren kitosan nanopartiküllerinin FTIR spektrumunu göstermektedir. Bu spektrum hem kitosan nanopartiküllerinin hem de TAF'ın karakteristik absorpsiyon bantlarını yansıtmaktadır. Özellikle, 466 ve 1244  $\text{cm}^{-1}$ 'deki TAF'a ait pikler TAF ilacının başarılı bir şekilde kitosan nanopartiküllerine enkapsüle edildiğini doğrulamaktadır.



**Şekil 4.1.** Elde edilen FTIR spektrumları; (a) kitosan nanopartiküller, (b) TAF ve (c) TAF içeren kitosan nanopartiküller

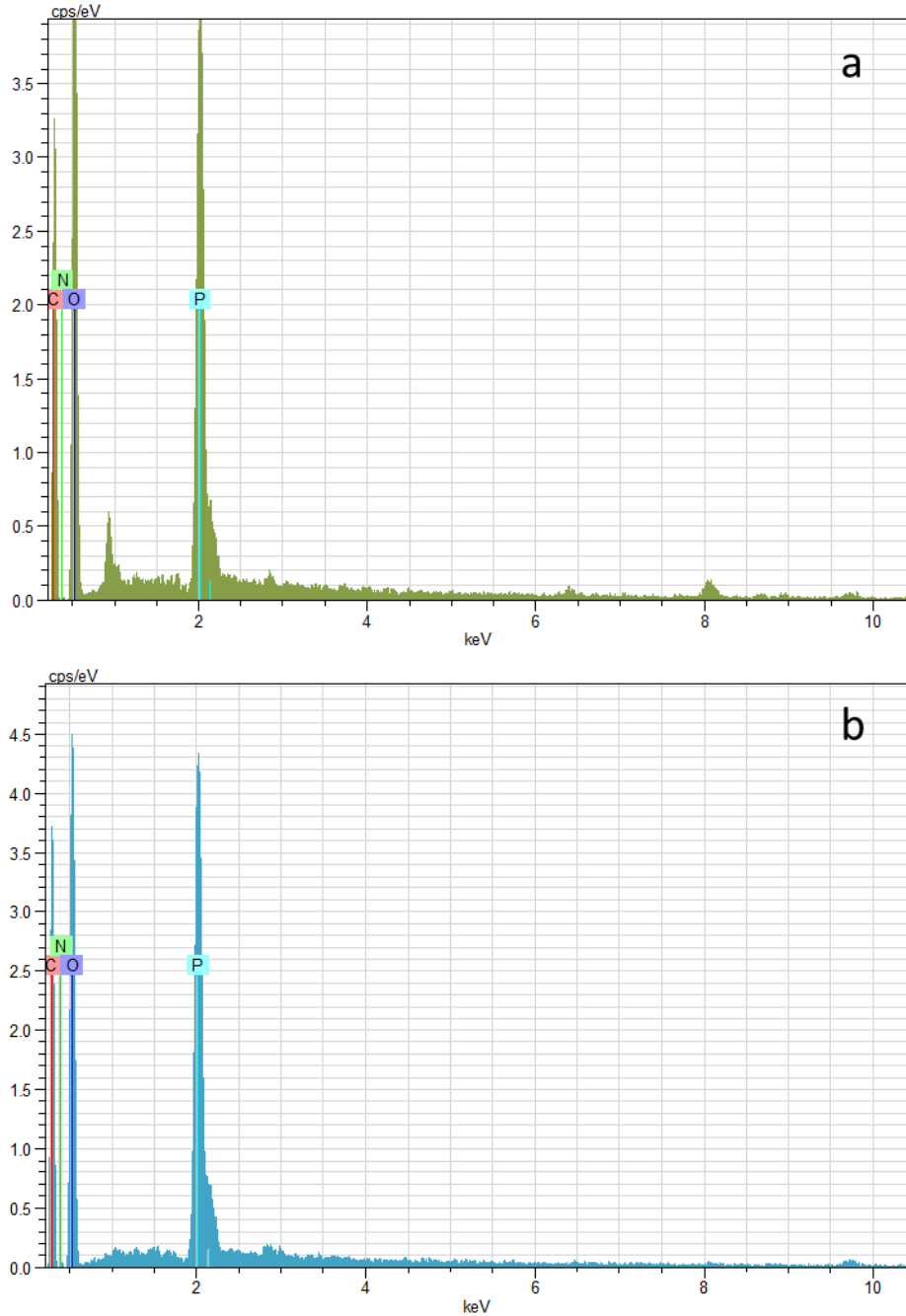
Kitosan nanopartiküllerin ve TAF içeren kitosan nanopartiküllerin mikro fotoğrafları ve parçacık boyutu Şekil 4.2'de gösterilmektedir. SEM görüntüleri, hazırlanan kitosan nanopartiküllerinin küresel bir şekle sahip olduğunu ve dış yüzeylerin pürüzsüz görüldüğü açıkça ortaya koymaktadır. Tüm nanopartiküllerin ortalama tanecik boyutu 200 ila 400 nm arasında değişmektedir. Kitosan nanopartiküllerine TAF ilacının enkapsüle edilmesinden sonra nanopartiküllerin yüzeyinde önemli bir morfolojik değişim gözlemlenmemiştir.



**Şekil 4.2.** Kitosan nanopartiküllerin (a, c, e) ve TAF içeren kitosan nanopartiküllerin (b, d, f) farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri

Şekil 4.3, kitosan nanopartiküllerin ve TAF içeren kitosan nanopartiküllerin EDX spektrumlarını göstermektedir. Şekil 4.3.a incelendiğinde, karbon (C), azot (N), oksijen (O) ve fosfor (P) elementlerinin pikleri görülmektedir. C, N ve O pikleri kitosanın doğal moleküler yapısından kaynaklanmaktadır. P piki ise TPP çapraz bağlayıcıdan kaynaklanmaktadır. P pikinin varlığı kitosan-TPP iyonik etkileşiminin var

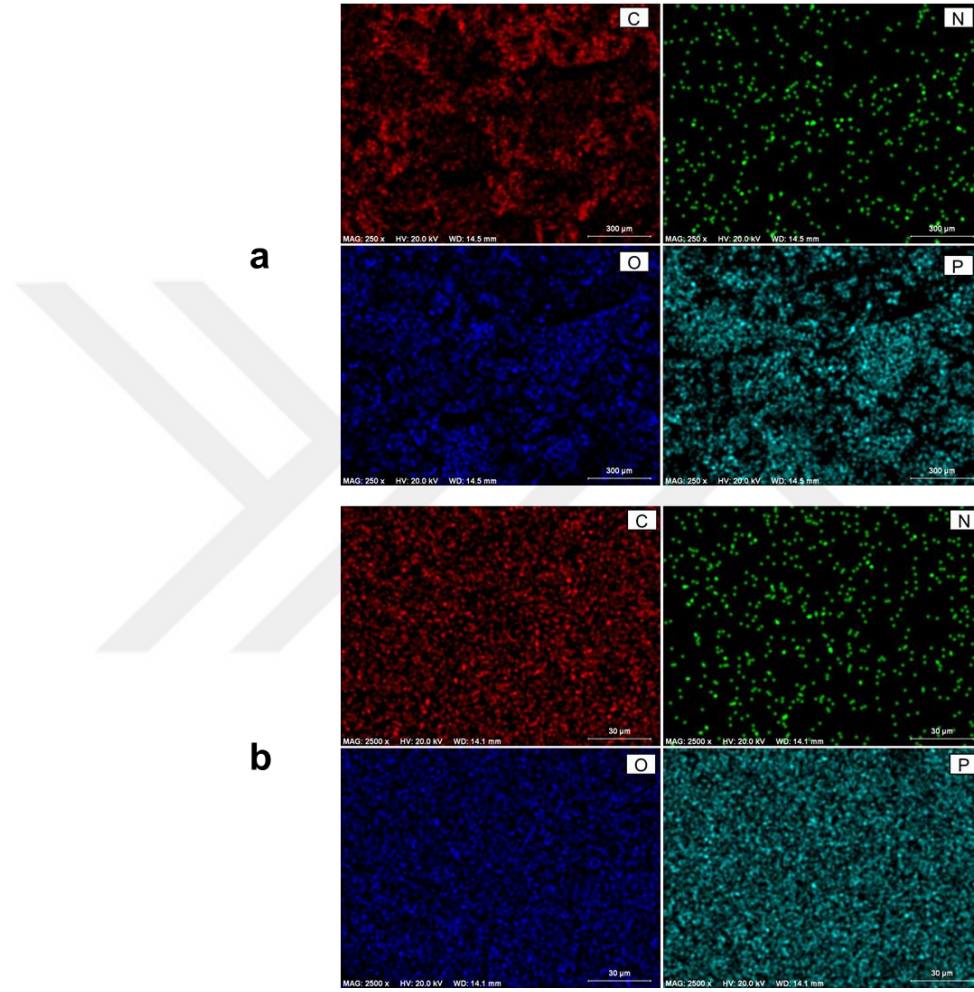
olduğunu açıkça göstermektedir. Şekil 4.3.b ise TAF içeren kitosan nanopartiküllerine aittir. TAF'ın kimyasal yapısı C, N, O ve P elementlerinden oluşmaktadır. Bundan dolayı EDAX spektrumlarında farklı bir element piki görülmemiştir. Ancak, Şekil 4.3.a ile kıyaslandığında elementlere ait piklerin şiddeti artmıştır. Pik şiddetlerindeki bu artış TAF ilacının enkapsüle edildiğini doğrulayan diğer bir veridir.



**Şekil 4.3.** Kitosan nanopartiküllerin (a) ve TAF içeren kitosan nanopartiküllerin (b) EDAX spektrumları



Ayrıca, EDAX spektrumlarında ortaya çıkan elementlerin EDAX-haritalama görüntüleri de Şekil 4.4’de sunulmuştur. Şekil 4.4.a ve 4.4.b incelendiğinde; Şekil 4.4.b görüntülerindeki elementlerin yoğunluğu daha fazladır. Elde edilen bu görüntülerde EDAX spektrum verileriyle uyumludur ve TAF ilacının başarılı enkapsilasyonunu göstermektedir.



**Şekil 4.4.** Kitosan nanopartiküllerin (a) ve TAF içeren kitosan nanopartiküllerin (b) EDAX-haritalama görüntüleri

Hazırlanan kitosan nanopartiküllerinin hidrodinamik çapları ölçülmüş ve Tablo 4.1’de sunulmuştur. Hazırlanan kitosan nanopartiküllerinin hidrodinamik çapı 255 nm olarak ölçülürken, TAF ilacı içeren kitosan nanopartiküllerinin hidrodinamik çapı 340 nm olarak kaydedilmiştir. Ayrıca, boyut analizi sonuçlarının SEM verileriyle tutarlı olduğu görülmüştür.

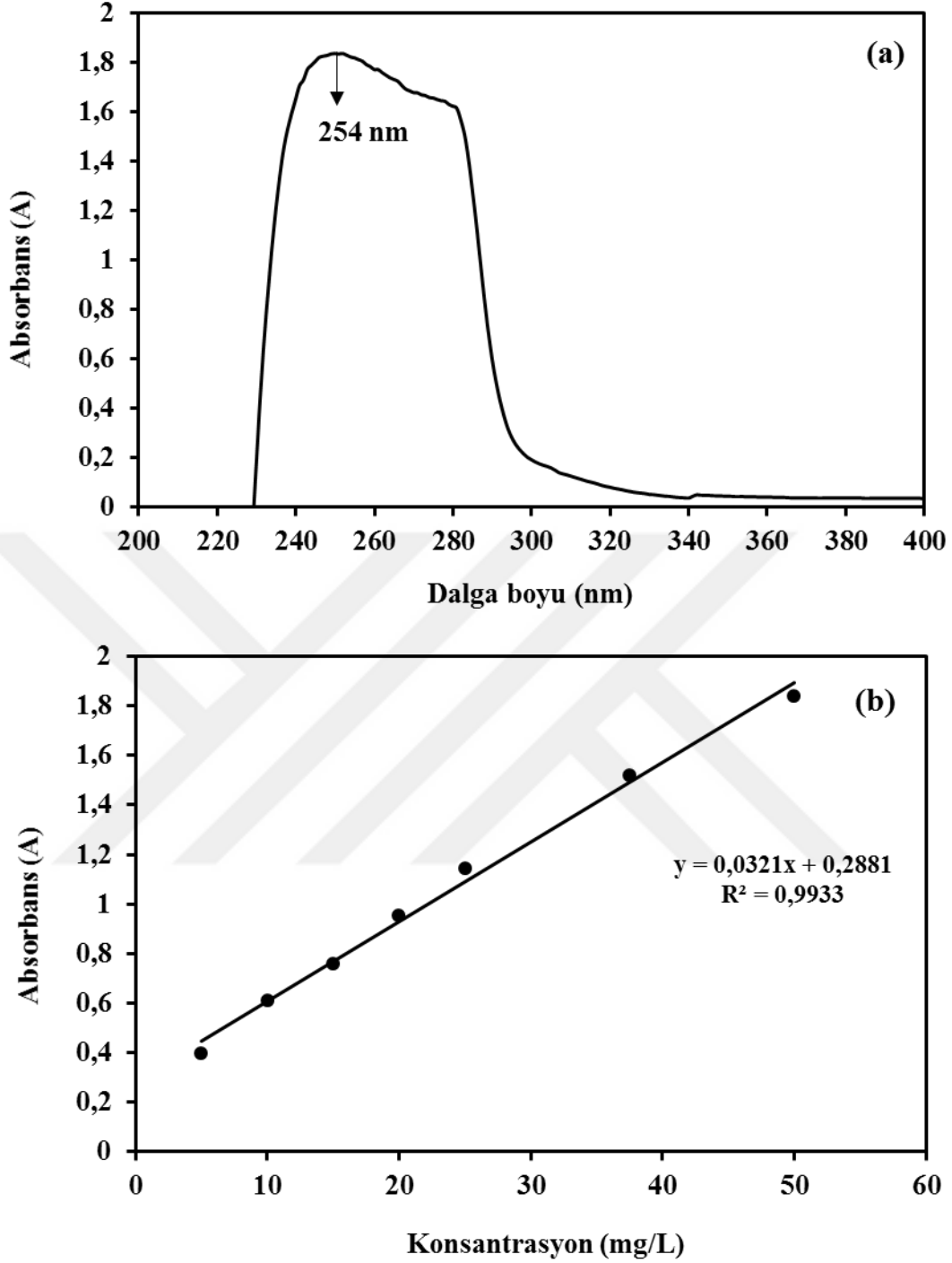
Hazırlanan nanopartiküllerin hidrodinamik çapları, zeta potansiyel ve PDI değerleri karşılaştırmalı olarak Tablo 4.1’de sunulmuştur. Zeta potansiyeli değerleri kitosan nanopartiküller için  $42.8 \pm 1.08$  mV, TAF içeren nanopartiküller için  $48.9 \pm 1.82$  mV olarak bulunmuştur. Pozitif zeta potansiyeli değeri kitosanın amino gruplarından kaynaklanmaktadır. Hazırlanan nanopartiküllerin PDI değerleri kitosan nanopartiküller için  $0.44 \pm 0.00$ , TAF içeren nanopartiküller için  $0.65 \pm 0.02$  olarak ölçülmüştür. Düşük PDI değerleri, homojen bir dağılıma sahip kararlı nanopartiküllerin oluşumunu gösterir.

**Tablo 4.1.** Hazırlanan nanopartiküllerin hidrodinamik çapları, zeta potansiyel ve PDI değerleri

	Hidrodinamik çap (nm)	Zeta Pot. (mV)	PDI değeri
Kitosan nanopartiküller	255	$42.8 \pm 1.08$	$0.44 \pm 0.00$
TAF içeren nanopartiküller	340	$48.9 \pm 1.82$	$0.65 \pm 0.02$

#### 4.1.2. TAF’ın Spektrofotometrik Kontrolü

TAF ilacının *in vitro* salım çalışmalarından önce maksimum absorbans yaptığı dalga boyunu belirlemek için TAF ilacının 200-400 nm arasında absorbans değerleri ölçülmüş ve maksimum absorbans yaptığı dalga boyu değeri 254 nm olarak bulunmuştur (Şekil 4.5.a). Bunun yanı sıra, TAF ilacının 5-50 mg/L konsantrasyonlarına sahip çözeltileri hazırlanmış ve  $R^2$  değeri yüksek (0,9933) bir standart kalibrasyon grafiği elde edilmiştir (Şekil 4.5.b).



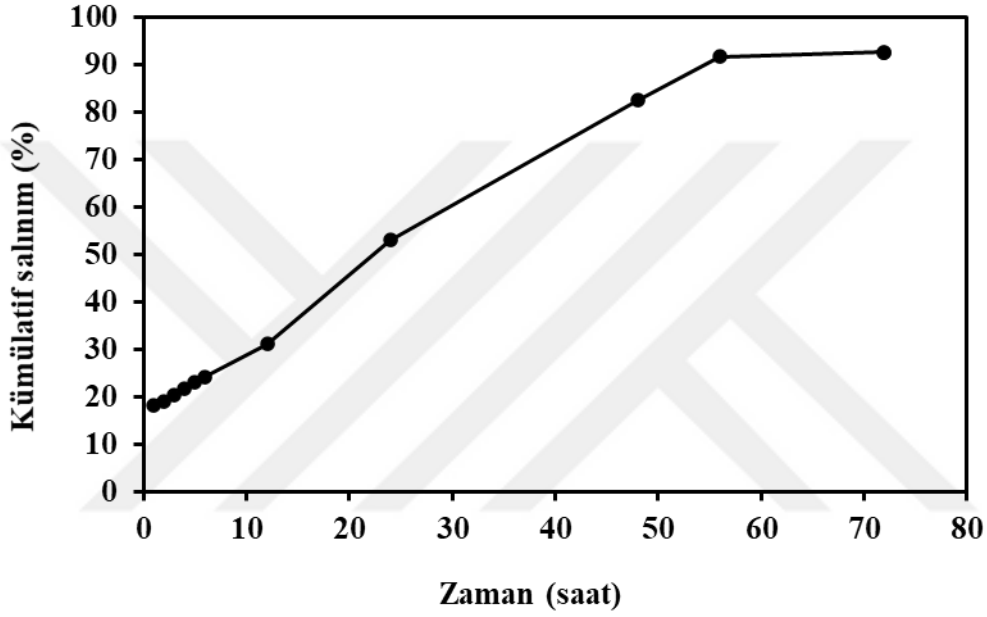
Şekil 4.5. (a) TAF ilacının 200-400 nm aralığı absorbans spektrumu ve (b) TAF ilacının belli konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltilisinin kalibrasyon grafiği

#### 4.1.3. TAF'ın Enkapsülasyon Veriminin Hesaplanması

TAF ilacının kitosan nanopartiküllerine enkapsülasyon verim değeri materyal ve metotta belirtilen formül kullanılarak hesaplanmıştır. TAF'ın enkapsülasyon verimi  $50.1 \pm 1.0$  olarak hesaplanmıştır.

#### 4.1.4. *In Vitro* Salım Çalışmaları

*In vitro* salım çalışması diyaliz membranı kullanılarak yapılmıştır ve TAF'ın kitosan nanopartiküllerinden salım profili Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Sonuçlar, kitosan nanopartiküllerinden ilacın salımının 72 saate kadar uzandığını göstermiştir. Toplam TAF miktarının %53'ü 24 saat içinde kitosan nanopartiküllerinden salınmıştır. Kitosan nanopartiküllerde TAF'ın kümülatif salınım yüzdesi 48 ve 56 saat için sırasıyla %82.5 ve %91.7'dir. 72 saat içinde ise TAF ilacının neredeyse tamamı (%92.7) salınmıştır.

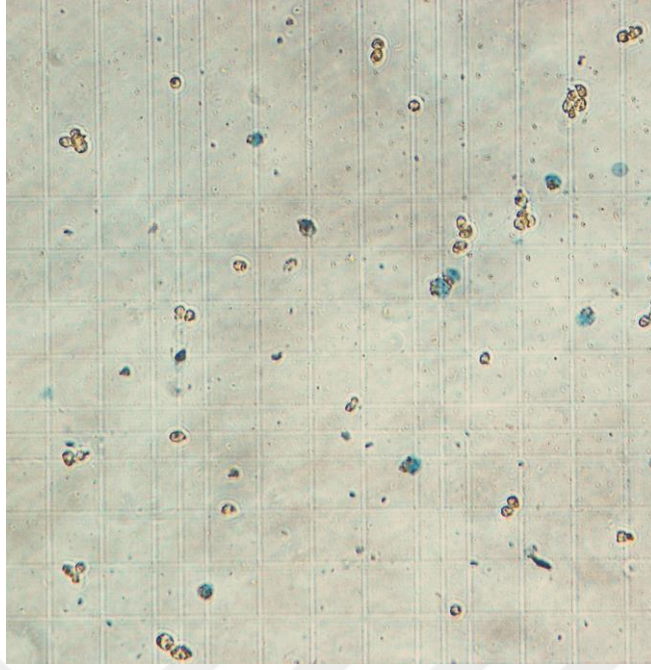


Şekil 4.6. Kitosan nanopartiküllerinden TAF'ın *in vitro* salım grafiği.

## 4.2. Genotoksisite ve Mitotoksisite Testlerinin Bulguları

### 4.2.1. Tripan Mavisi İle Hücre Sayımı

Çalışma gruplarında canlı ve ölü hücre yüzdeleri belirlemek üzere Tripan mavisi ile boyama yapılmıştır. Ölü olan hücreler mavi olarak gözlemlenirken, canlı hücreler sarı renkte görülmüştür (Şekil 4.7). Kontrol dâhil olmak üzere 4 uygulama grubu bir gün hücrelerin flaska tutunması ve altı gün de test maddelerinin uygulanması ile beraber yedi gün sonunda hücreler Thoma lamında sayılmış ve tablodaki ortalamalar bulunmuştur (Tablo 4.2). Buna göre; 45 µM TAF uygulanan grupta hücre canlılığında düşüş olduğu gözlemlenmiştir.



**Şekil 4.7.** Tripan mavisi ile hücre sayımı

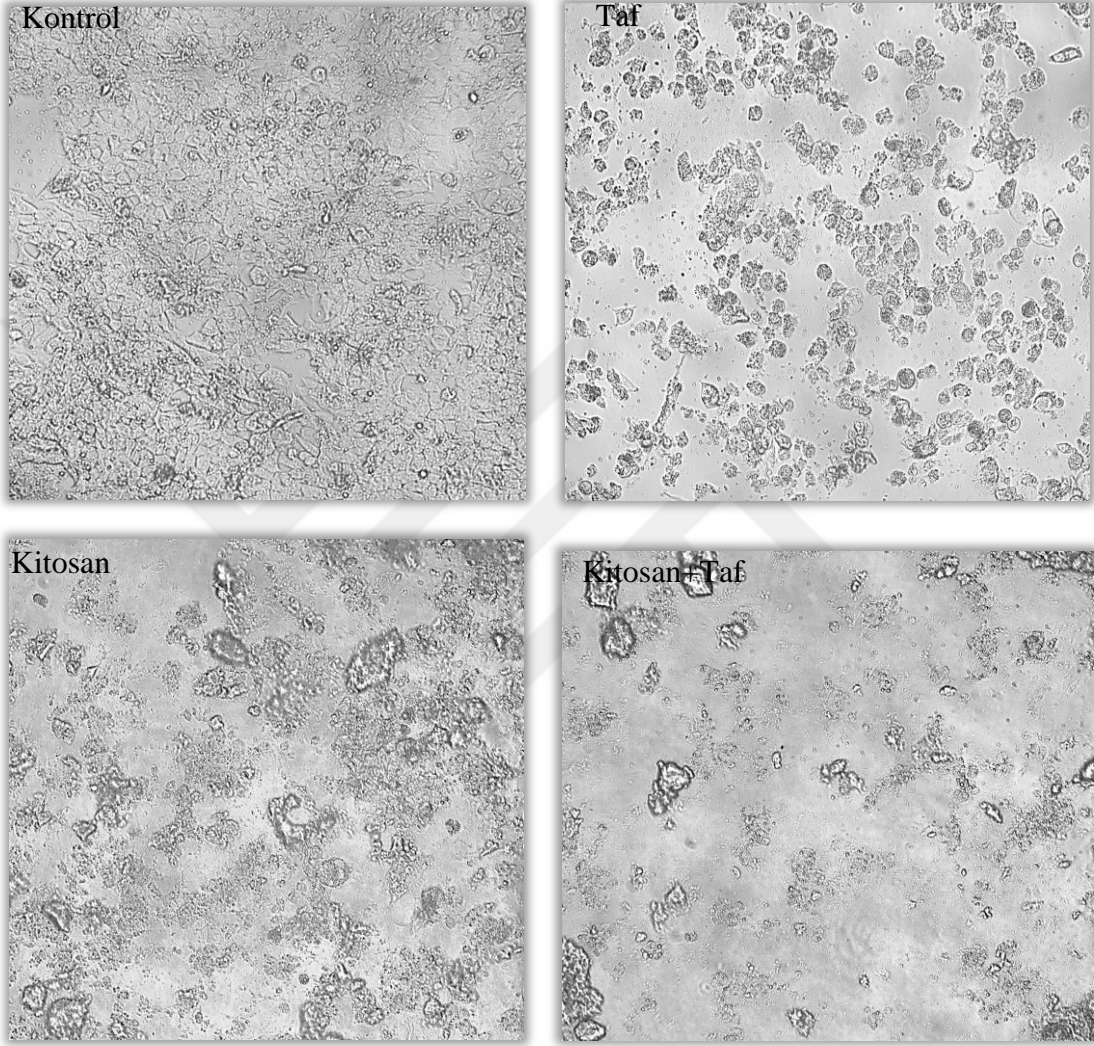
**Tablo 4.2.** Tripan mavisi ile gruptaki hücre yüzdeleri

Gruplar	Canlı hücre % ortalaması	Ölü hücre % ortalaması
Kontrol	86.1	14.9
Taf	10.4	89.6
Kitosan	91.7	8.30
Kitosan + Taf	77.5	22.5

#### 4.2.2. Hücrelerin Mikroskopik Analizi

TAF ve kitosanın HepG2 hücrelerinin yapısını kalitatif olarak etkileyip etkilemediğini incelemek üzere gruplar yedinci gün sonunda 100x, 200x ve 400x büyütme ile inverted mikroskopta incelenip kıyaslanmıştır. Hücre sayısındaki farklılığın dışında morfolojik olarak da farklılıklar olduğu görülmüştür. Kontrol grubundaki hücreler parlak, büyük, küresel, agregatlar halinde birbirlerine yakın temas içinde gözlemlenirken; 45  $\mu$ M TAF uygulanan hücrelerde; membranın büzülmesi ile

küçülmüş, birbirlerinden bağımsız, izole ve rengi daha koyulaşmış hücreler gözlemlenmiştir. Kitosan içeren hücrelerin de kontrole benzer olduğu görülmüştür. Kitosan kaplı TAF içeren hücrelerde ise; TAF uygulamasındaki benzer hücrelerin bulunduğu ancak daha seyrek olduğu görülmüştür (Şekil 4.8).

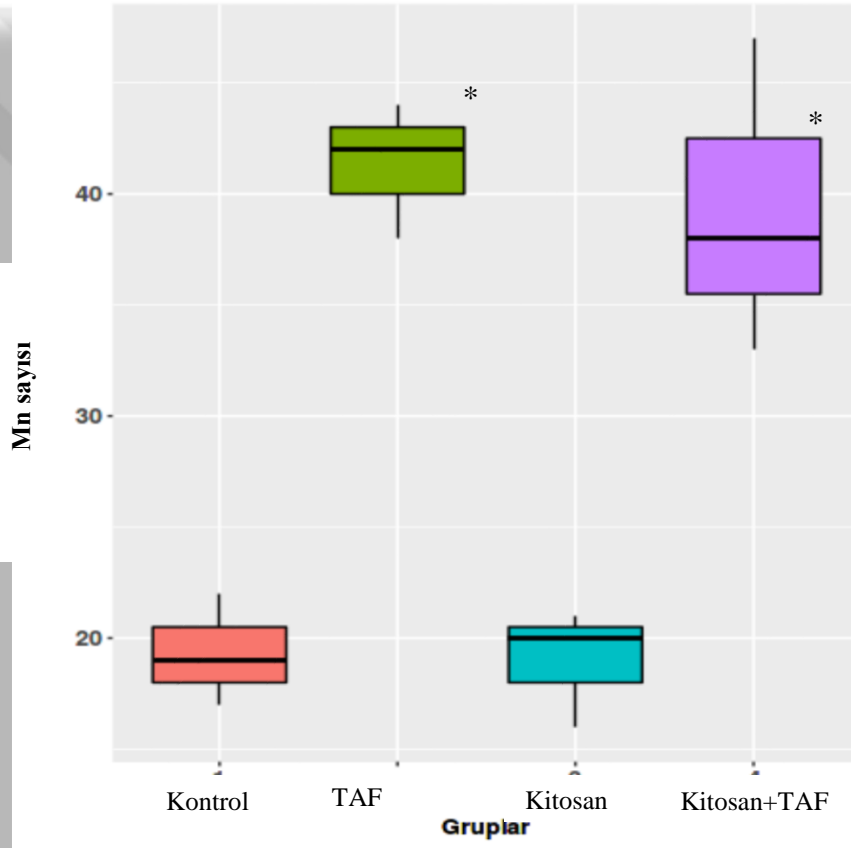
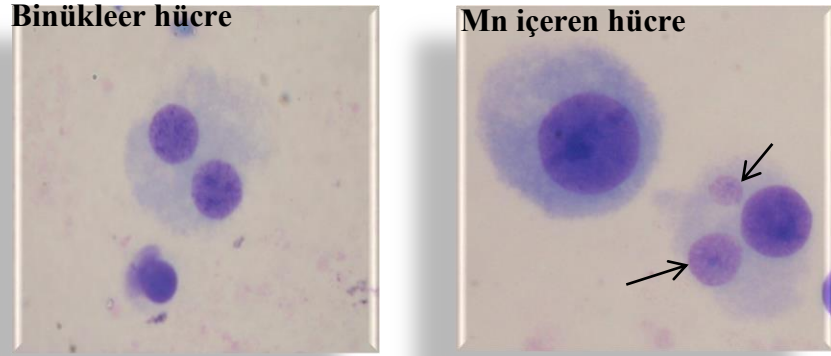


**Şekil 4.8.** Uygulama gruplarındaki hücrelerin mikroskopik görüntüsü

#### **4.2.3. Mikronükleus (Mn) Analizi**

Mn analizi için her gruptan üçer tekrarlı olarak 1000 adet binükleer hücre sayılmış ve istatistiki olarak karşılaştırma yapılmıştır. Tüm gruplar arasındaki farkın anlamlı olmasından dolayı ( $p < 0.05$ ) kontrol ile ikili karşılaştırmalar yapılmıştır. TAF ve kitosan+TAF içeren gruplarda Mn frekansı kontrole göre anlamlı oranda yüksek bulunurken kitosan grubu ile kontrol arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Yine

uygulama grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında kitosan grubunun TAF ve kitosan+TAF gruplarından daha düşük sayıda Mn içerdiği gözlemlenmiştir ( $p<0.05$ ). Gruplara ait Mn içeren hücrelerin görüntüleri Şekil 4.9'da gösterilmektedir.



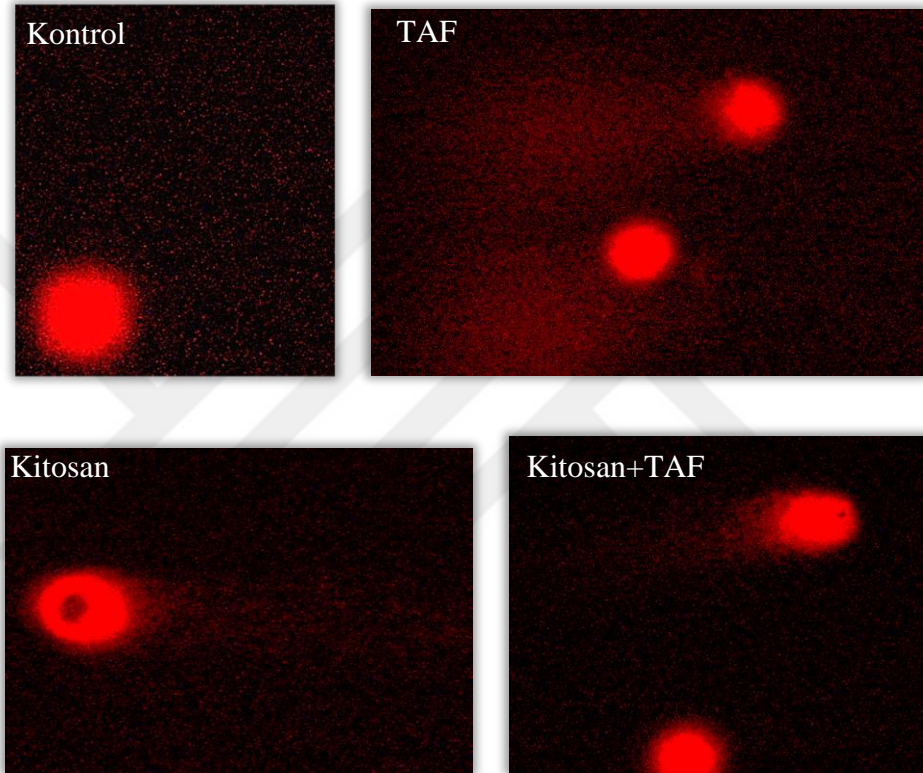
(\* Kontrol ile karşılaştırmada fark anlamlı  $p<0.05$ ).

**Şekil 4.9.** Gruplar arası Mn karşılaştırmalı analizi



#### 4.2.4. Komet Yöntemi İle DNA Hasar Tespiti Bulguları

Genotoksisitenin belirlenmesi için sıkça tercih edilen yöntemlerden birisi olan komet tekniği, çalışma gruplarımızdaki hücelere altı günlük TAF ve kitosan uygulamalarının sonunda yapılmıştır. Şekil 4.10'da TAF ve kitosanın ayrı ayrı ve kombine halde, HepG2 hücelerine muamelesi sonucu oluşan komet resimleri görülmektedir.



Şekil 4.10. Uygulama gruplarının komet analiz görüntüleri

Çalışmamızda test maddelerine maruz kalmış hücelerdeki DNA hasarını saptamak için her gruptan 50 hücrenin % DNA<sub>T</sub> değerlerinin ortalamaları karşılaştırılmıştır. Buna göre tüm uygulama gruplarında, kontrolden anlamlı seviyede yüksek oranda % DNA<sub>T</sub> değerleri olduğu saptanmıştır (p<0.05). Gruplar arasında ise TAF grubun, kitosan ve kitosan+TAF içeren gruplardan daha yüksek oranda % DNA<sub>T</sub> ortalamasına sahip olduğu ve bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (p<0.05). Kitosan ile kitosan+TAF grupları arasında ise anlamlı farklılık görülmemiştir (p<0.05). Çalışma gruplarının % DNA<sub>T</sub> ortalamaları Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

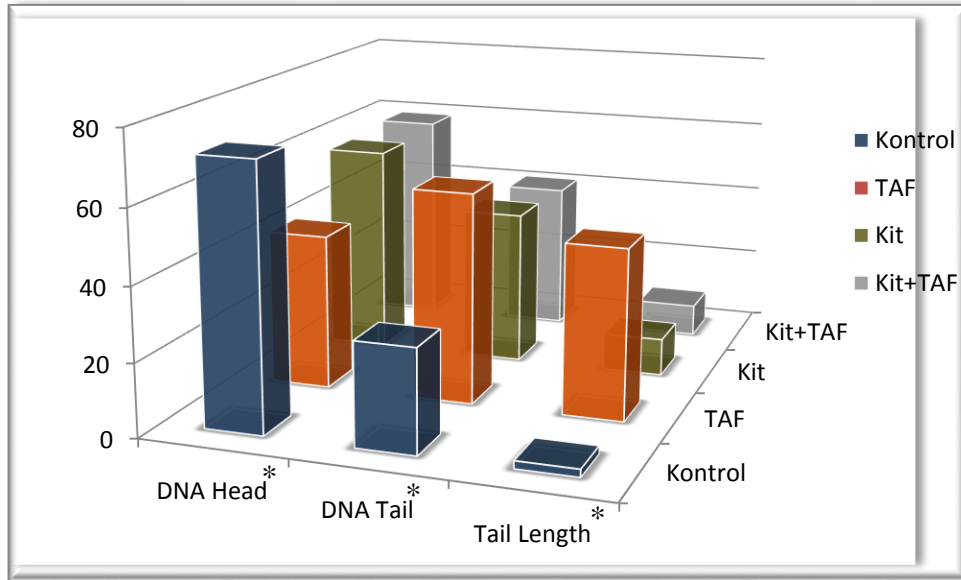


**Tablo 4.3.** Gruplar arasında % DNA<sub>T</sub>'nin karşılaştırması

Gruplar	% DNA <sub>T</sub>	
	Ortalama	Min-Max
Kontrol	28.10	8.28-47.98
TAF	57.50*	24.78-99.50
Kitosan	42.40*	19.00-85.29
Kitosan+TAF	41.04*	21.97-71.24

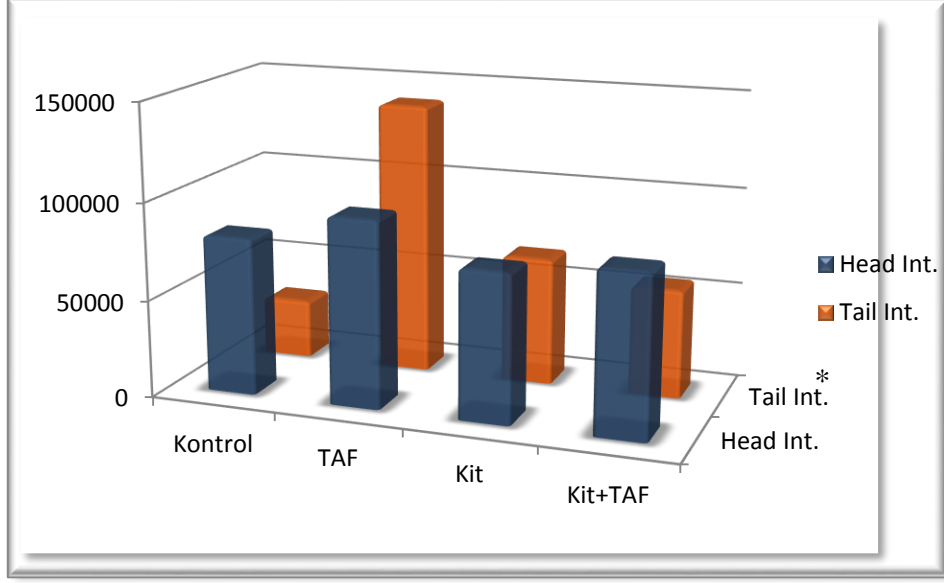
\* Kontrol ile karşılaştırmada fark anlamlı (p<0.05).

Çalışmamızda deney gruplarında 6 günlük uygulamalardan sonra oluşabilecek genetik hasarları saptayabilmek için yaptığımız komet analizinde %DNA<sub>T</sub> verileri dışında diğer parametreler de değerlendirilmiştir. Çalışma grupları arasındaki söz konusu komet parametrelerine ilişkin ortalama veriler Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de gösterilmiştir. Buna göre bütün uygulama grupları; baş kısım DNA yüzdesi (%DNA<sub>H</sub>), kuyruk kısım DNA yüzdesi (%DNA<sub>T</sub>) ve kuyruk uzunluğu (T<sub>L</sub>) açısından kontrolden anlamlı seviyede farklı bulunmuştur (p<0.05)



\* % DNA<sub>H</sub>, % DNA<sub>T</sub> ve T<sub>L</sub> için kontrol ile karşılaştırmada tüm gruplar anlamlı seviyede farklıdır.

**Şekil 4.11.** Gruplar arasında baş kısım DNA yüzdesi (% DNA<sub>H</sub>) ve kuyruk kısım DNA yüzdesi (% DNA<sub>T</sub>), kuyruk uzunluğu (T<sub>L</sub>) karşılaştırılması.

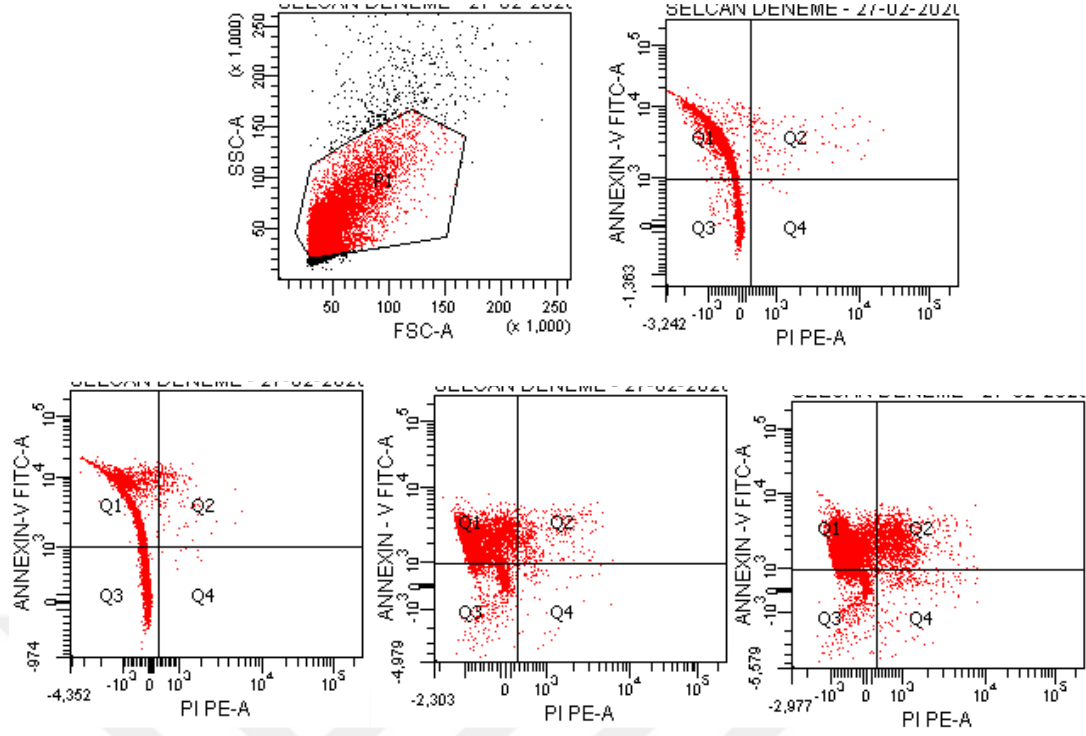


\* Kuyruk yoğunluğu için tüm gruplar kontrolden anlamlı seviyede farklı bulunmuştur.

**Şekil 4.12.** Gruplar arasında kuyruk yoğunluğu (Tail Intensity) ve baş yoğunluğu (Head Intensity) karşılaştırılması

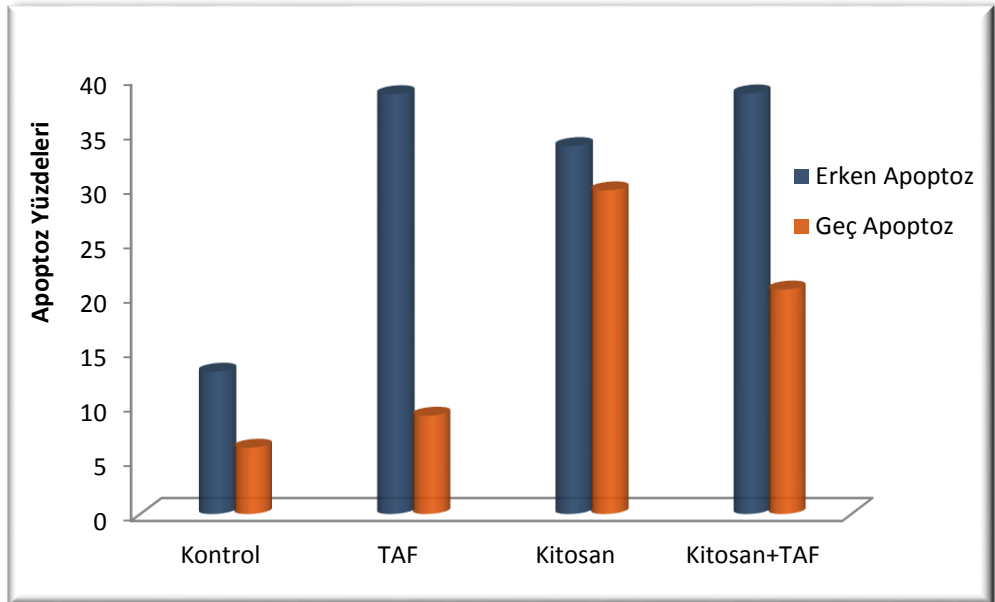
#### 4.2.5. Annexin V FITC İle Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi

Çalışmamızda erken ve geç apoptotik evrelerdeki hücreleri belirlemek için uygulama gruplarından elde edilen hücre materyallerine, Annexin V FITC testi uygulanmıştır. Flow sitometrede elde edilen veriler karşılaştırılmıştır. Buna göre kontrol arasında apoptotik hücre oranı bakımından anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ) (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14).



Q3, canlı hücrelerin bulunduğu alan; Q4, erken apoptoz evredeki hücreler ve Q2 ise geç apoptozdaki hücreleri göstermektedir.

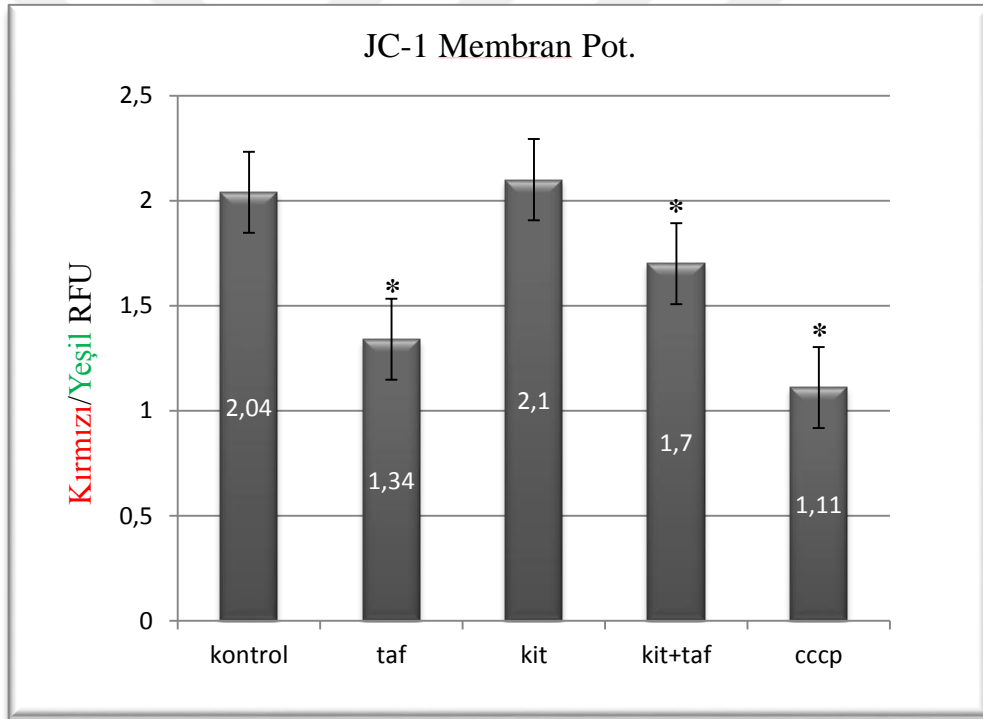
Şekil 4.13. Uygulama gruplarından FACS analizi.



Şekil 4.14. Gruplar arası erken ve geç apoptoz yüzdelerinin karşılaştırmalı grafiği

#### 4.2.6. Mitokondriyal Membran Potansiyelinin ( $\Delta\Psi_m$ ) Belirlenmesi

Uygulama grupları arasında  $\Delta\Psi_m$ , JC-1 kiti ile analiz edilmiştir.  $\Delta\Psi_m$ , nispeten düşük olduğunda monomerler oluşur ve mitokondriye girerek yeşil floresan yayar.  $\Delta\Psi_m$  yüksek olduğunda ise kırmızı floresan verir. Gruplar arasındaki  $\Delta\Psi_m$  kıyaslamak için; kırmızı floresanın yeşil floresana oranı hesaplanmış ve TAF ile kitosan+TAF içeren grupların potansiyelinde kontrole kıyasla anlamlı bir düşüş olduğu görülmüştür. Kitosan grubunda ise kontrol grubundan anlamlı seviyede farklılık görülmemiştir ancak TAF ve kitosan+TAF içeren gruplardan anlamlı oranda daha yüksek  $\Delta\Psi_m$ 'e sahip olduğu belirlenmiştir. Test içerisinde pozitif kontrol amaçlı kullanılan CCCP ile TAF dışında tüm grupların anlamlı oranda yüksek  $\Delta\Psi_m$ 'ne sahip olduğu görülmüştür ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.15).

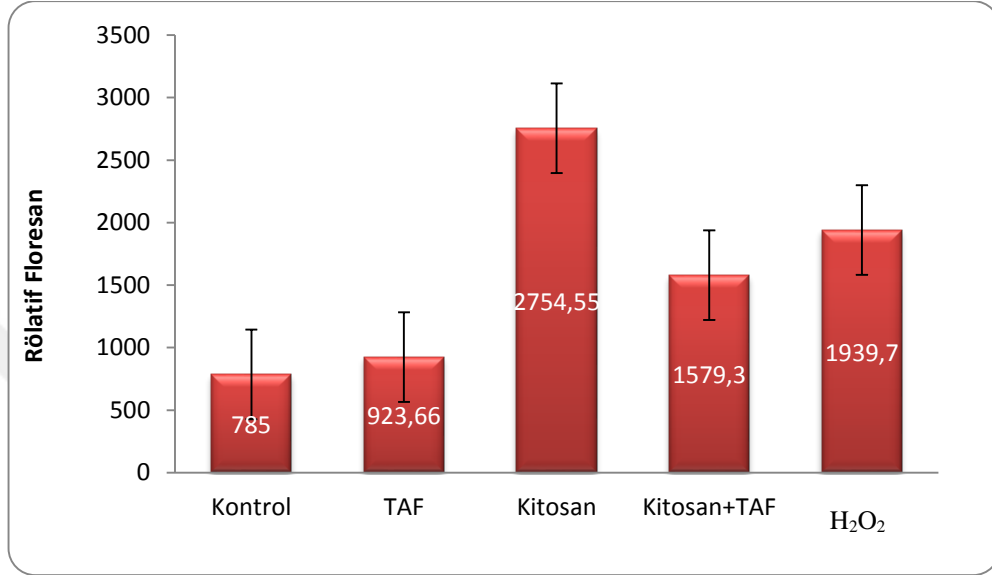


\*: Kontrole göre anlamlı ( $p<0.05$ ) farklı çıkanlar.

Şekil 4.15. Gruplar arası  $\Delta\Psi_m$  analizi

#### 4.2.7. Süperoksit Radikallerin Tespiti

Altı gün kimyasal uygulanması sonunda, hücrelerden süperoksit radikallerini tespit etmek üzere yapılan ölçümlerde, negatif ve pozitif kontroller de dâhil gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.16).

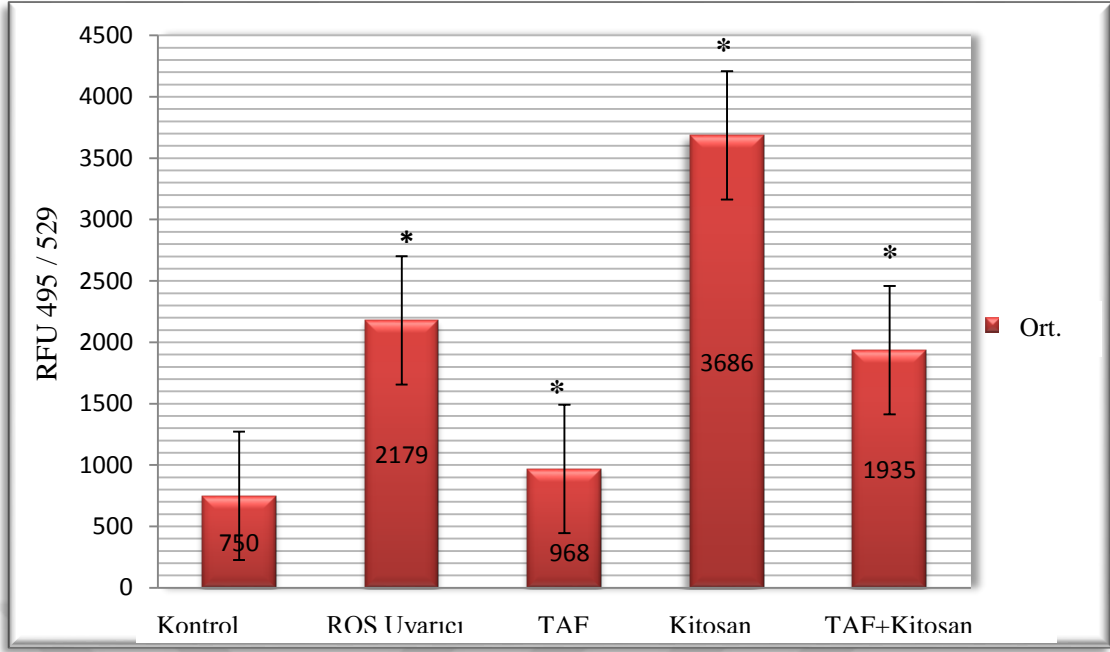


Şekil 4.16. Gruplar arasındaki süper oksit radikallerinin karşılaştırması

#### 4.2.8. Hücresel ROS Tespiti

Hücresel ROS oluşumu gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Bu araştırmada, yaygın olarak kullanılan ROS'a özgü boya H2DCFDA yardımıyla canlı hücreler tarafından üretilen endojen ROS, kullanılan kitle floresan yoğunluğu ile orantılıdır. Floresan seviyesini ölçmek üzere mikropate okuyucu ile analiz yapılmıştır.

Kontrol grubumuz ile pozitif amaçlı uyguladığımız ROS Inducer uygulaması arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Tüm uygulama gruplarımızın, kontrol grubumuzdan anlamlı oranda yüksek miktarda endojen ROS içerdiği görülmüştür. Ayrıca kitosan içeren grubun TAF içeren gruptan anlamlı oranda daha yüksek seviyede ROS içerğine sahip olduğu belirlenmiştir ( $p<0.05$ )(Şekil 4.17).



\* Kontrolden anlamlı oranda yüksek  $p < 0.05$ .

**Şekil 4.17.** Gruplar arasındaki ROS miktarlarının karşılaştırması

#### 4.2.9. Elde Edilen DNA'nın Kontrolü

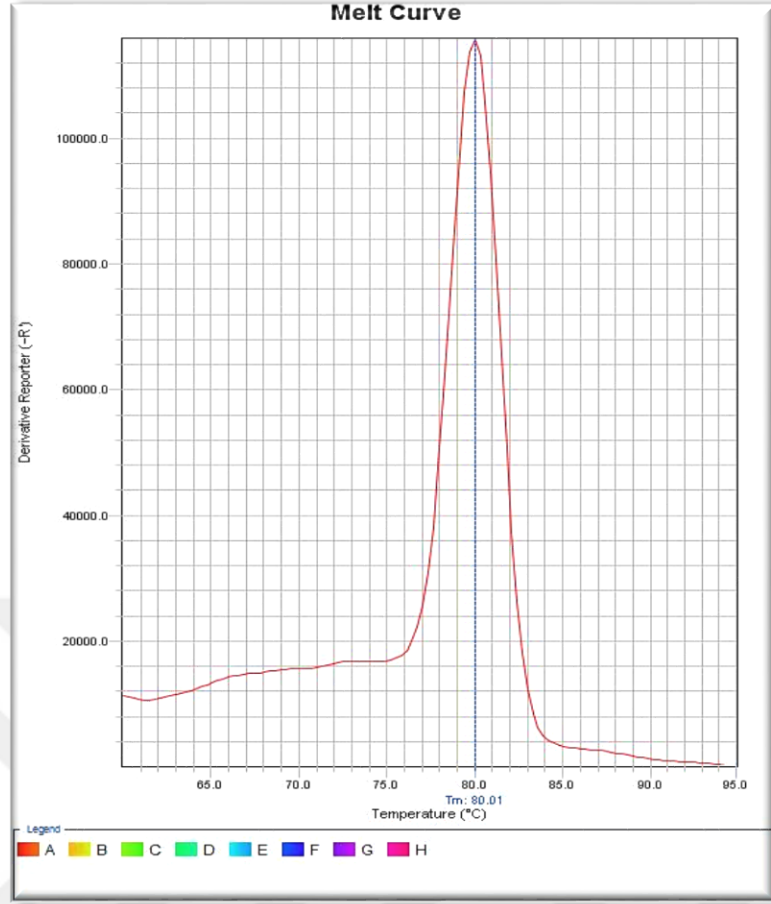
Çalışma gruplarından elde edilen DNA'ların saflıklarını belirlemek için spektrofotometrik olarak  $O.D_{260}/O.D_{280}$  değerleri alınmış ve 1.6 ila 2.2 arasında değerlerde bulunmuştur. Ayrıca mikrolitredeki DNA miktarları da tespit edilmiştir. DNA bütünlüğünü kontrol etmek üzere DNA'lar %1'lik agaroz jelde yürütülmüş ve gruplardan elde edilen genomik DNA görüntüsü incelenmiştir (Şekil 4.18). Elde edilen DNA'lar testler için yeterli uygunlukta bulunmuştur.



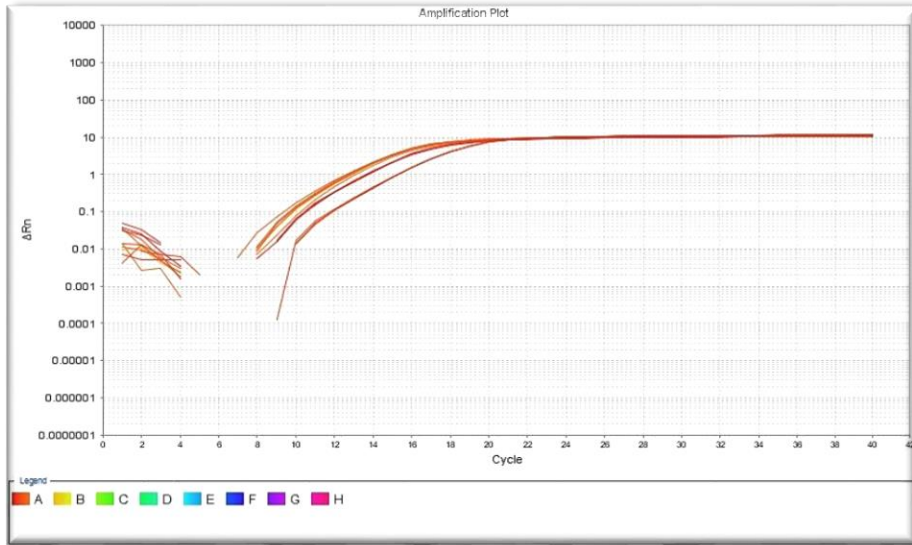
**Şekil 4.18.** Agaroz jeldeki, uygulama gruplarının genomik DNA görüntüsü

#### **4.2.10. Mitokondriyal DNA İçeriğinin COXII Geni İle Analizi**

Çalışmamızda uygulama gruplarımızdan elde edilen genomik DNA'lar ile rölatif mitokondriyal DNA içeriği, mitokondriyal genom içinde yer alan COXII genini amplifiye ederek kantitatif RT PCR analizi ile ölçülmüştür. Tüm gruplar arasında anlamlı bir farklılık olduğu görülmüştür. TAF içeren grup kontrolden anlamlı seviyede daha az COXII geni eksprese ediyorken; kitosan ve kitosan+TAF grupları anlamlı şekilde daha yüksek miktarda COXII gen ekspresyonuna sahip olduğu görülmüştür ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.19, 4.120 ve 4.21).

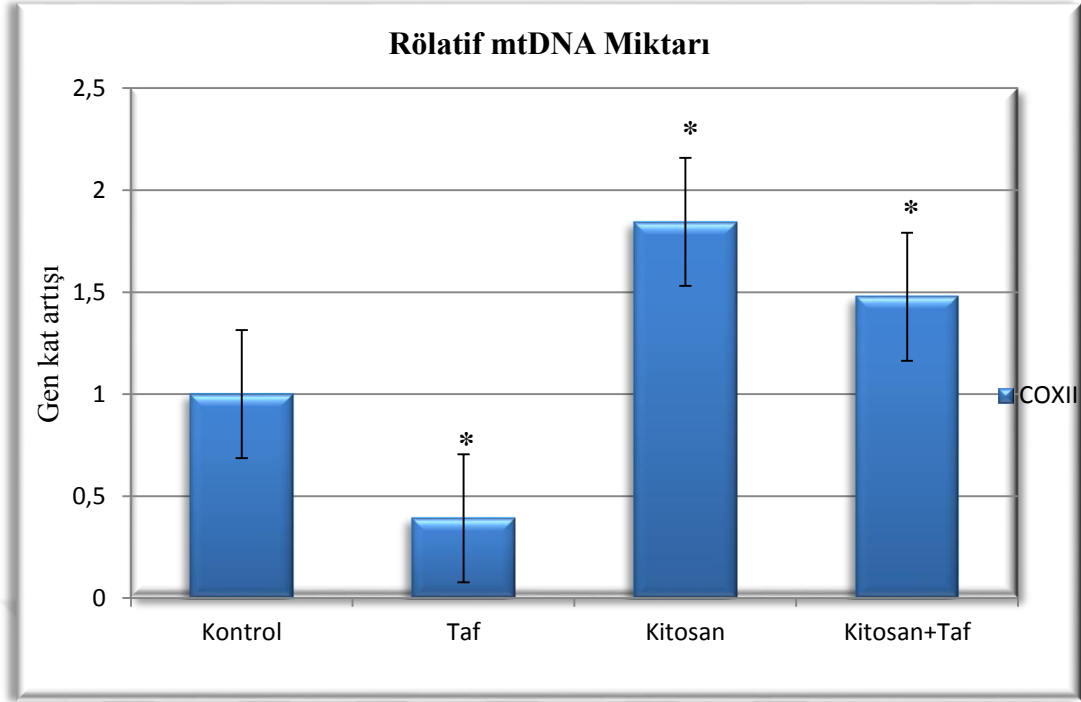


Şekil 4.19. Kontrol DNA, COXII geninin erime eğrisi



Şekil 4.20. Uygulama gruplarından DNA ile COXII geninin RT-PCR’da büyüme büyüme eğrisi



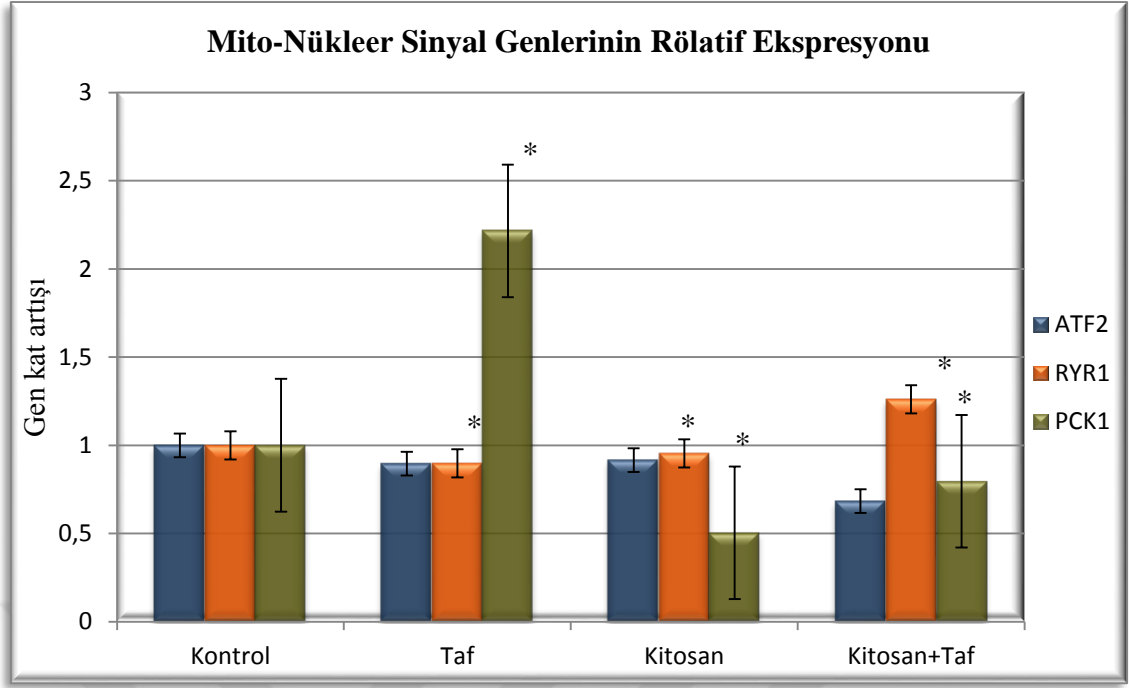


\* Kontrolden anlamlı seviyede farklı ( $p < 0.05$ ).

**Şekil 4.21.** Uygulama gruplarındaki mtDNA miktarının COXII gen amplifikasyonu ile karşılaştırması

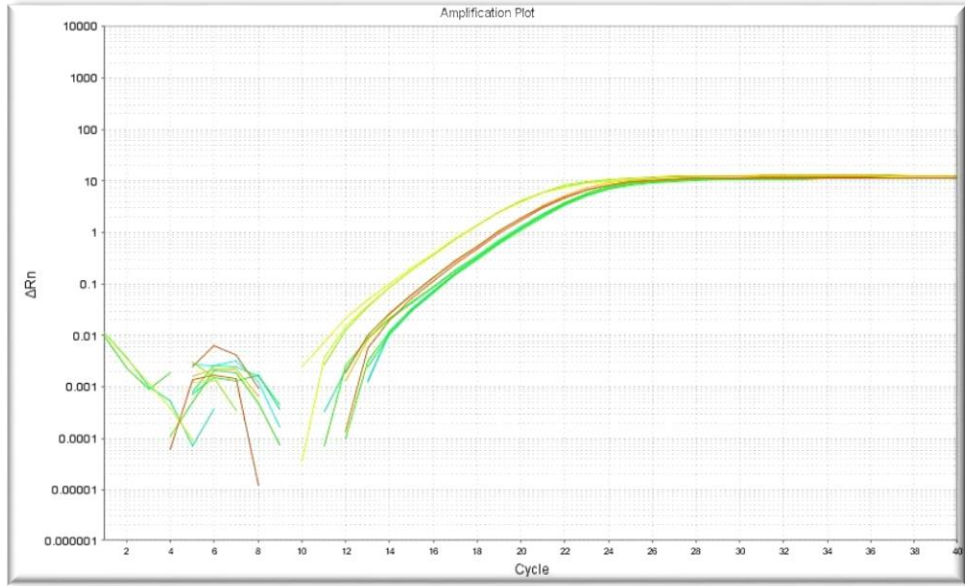
#### 4.2.11. Mito-Nükleer Sinyal Genlerinin (RYR1, ATF2 ve PCK1) Rölatif Ekspresyon Analizi

Çalışmamızda mitokondriyi etkileyen hasarlar sonucunda etkilendiği düşünülen nükleer genlerden RYR1, ATF2 ve PCK1 seçilmiştir. Uygulama gruplarından elde edilen RNA'lar cDNA'ya çevrilmiş ve bu genler kantitatif amaçlı değerlendirmek üzere RT PCR aracılığıyla ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. ATF2'nin ekspresyonu gruplar arasında önemli seviyede farklı bulunmamıştır ancak RYR1 ve PCK1 genlerinde gruplar arasında anlamlı seviyede farklılık olduğu görülmüştür. Özellikle PCK1 geninde TAF içeren grup kontrolden iki kattan fazla miktarda ifade artışı bulunmuştur. Buna karşın, kitosan ve kitosan+TAF içeren gruplarda kontrolden anlamlı miktarda daha düşük ekspresyon seviyesi olduğu görülmüştür ( $p < 0.05$ ) (Şekil 4.22, 4.23, 4.24 ve 4.25).

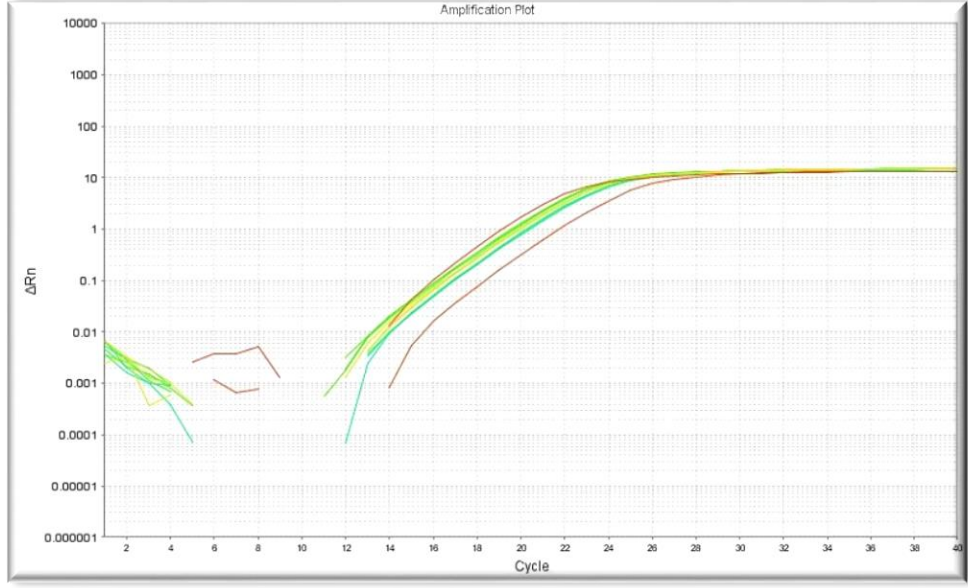


\* Kontrolden anlamlı seviyede farklı bulunmuştur (p<0.05).

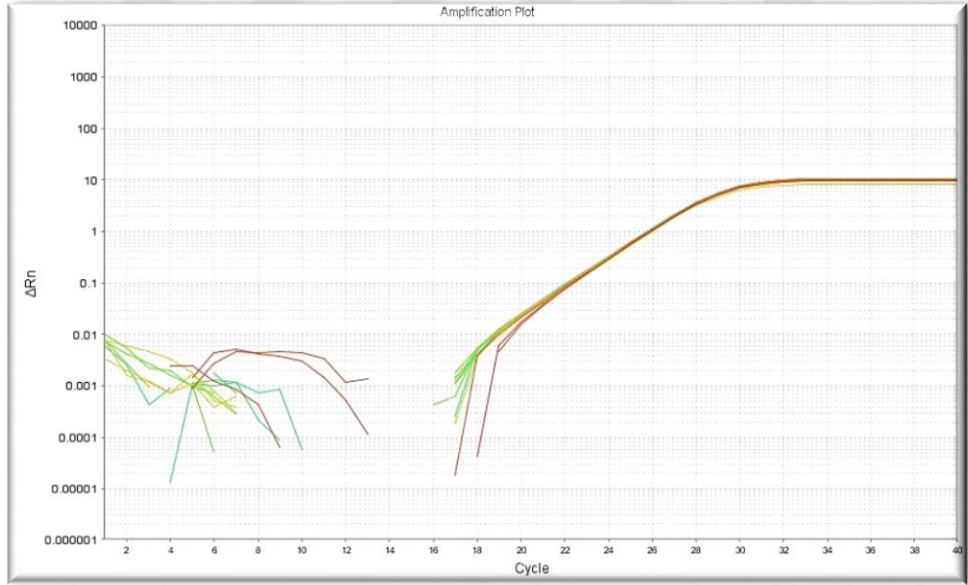
**Şekil 4.22.** RYR1, ATF2 ve PCK1 genlerinin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması



**Şekil 4.23.** Uygulama gruplarından elde edilen RYR1 geninin amplifikasyon eğrisi



Şekil 4.24. Uygulama gruplarından elde edilen ATF2 geninin amplifikasyon eğrisi



Şekil 4.25. Uygulama gruplarından elde edilen PCK1 geninin amplifikasyon eğrisi

## 5. TARTIŞMA

TAF ilacı kronik hepatit B tedavisinde kullanılmak üzere 2016 yılında onay almıştır. Bu çalışma, klinik uygulamaya başlanan TAF ilacı ile birlikte TAF'ın biyoyararlanımını artırıp toksisitesini azaltmak üzere ilacı içeren kitosan nanopartikül formülasyonu hazırlayarak sitotoksosite, genotoksosite ve mitotoksosite potansiyelini ortaya koymak üzere planlanmıştır. Yapılan literatür taramalarında TAF ve TAF içeren kitosan nanopartikül formülasyonlarının hücrel etkilerine ilişkin benzeri çalışmaya rastlanmamıştır. Araştırmamız söz konusu çalışmalar bakımından ilk niteliğindedir

Hepatit B hastalığı küresel bir sağlık sorunudur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), %75'i Asya ve Batı Pasifik'de yaşayan, 400 milyondan fazla hepatit B taşıyıcısı bulunduğunu bildirmiştir (139). Yaklaşık 240 milyon insanın ise kronik hepatit B hastası olduğu belirtilmektedir (140). Hepatit B hastalığı, dünya genelinde karaciğer kanserinin temel sebeplerinden biri sayılabilir, erken yaşlarda edinilmesi durumunda siroz ve karaciğer yetmezliğine yol açabilir. Dünya genelinde aşılama henüz evrensel seviyeye ulaşmamıştır bu nedenle hastalık ile mücadelede etkili antiviral tedaviler gerekmektedir (60).

Hastalık etkeni olan HBV, Hepadnaviridae ailesinden küçük bir DNA virüsüdür. HBV genomu, yaklaşık 3200 baz çiftine sahip, serbest, dairesel ve kısmen çift zincirli DNA içerir. HBV DNA; viral zarfı, nükleokapsidi, polimeraz ve X proteinini kodlayan, kısmen çakışık 4 açık okuma çerçevesine sahiptir. Polimeraz geni; ters transkriptaz, DNA polimeraz ve RNaz aktiviteleri ile çok fonksiyonlu bir enzimi kodlar. Virüs DNA'sındaki asimetrik olan zincirler birleşerek; kovalent olarak bağlanır ve kapalı halkasal süper sarmal DNA (cccDNA) molekülü oluşturulur. cccDNA'nın transkripsiyonu ile viral pgRNA molekülü oluşturulur ve virüsün ters transkriptaz enzimi sayesinde bu pgRNA'dan yeni viral DNA'lar sentezlenir (4).

Hepatit B hastalığının tedavisindeki amaç; siroz, kanser gibi komplikasyonların önüne geçilmesi ve uzun süreli sağ kalımdır. Bu amaca; virüs replikasyonu engellenerek, düşük seviyede HBV DNA seviyesine sahip kalıcı virolojik yanıt ile ulaşılabilir (141). Mevcut kronik hepatit B tedavisi için iki seçenek vardır; interferonlar ve oral nükleot(z)id analogları. Daha uygun doz, daha az uzun dönem komplikasyonları ve daha başarılı viral baskılamadan dolayı nükleot(z)id analogları öncelikle tercih edilir (6). Nükleot(z)id analogları, kullanılan ilaca bağlı olarak; inhibitörleri aktive edebilir,

ters transkripsiyonu, viral eksi DNA zincirin sentezini veya artı DNA zincir sentezini etkileyebilirler (67). Tüm nükleot(z)id analogları, viral DNA'daki hücre içi nükleotid dahil edilmesi ile rekabet ederek çalıştığı için kompetitif polimeraz inhibitörleridir. Ayrıca zincire dâhil olduklarında, bir sonraki nükleotidin viral DNA zincire eklenmesini önleyerek de DNA sentezini sonlandırabilirler (72). Nükleot(z)id analoglarından birisi olan TFV, deoksi adenzin monofosfat analogu olarak etki gösteren nükleotid ters transkriptaz inhibitör (NRTI) grubu bir ilaçtır ve hücre içine girince; HBV'deki viral DNA replikasyonu sırasında revers transkriptaz enziminin substrat bağlanma bölgesine bağlanarak, kompetitif olarak inhibe eder. Böylece bir zincir sonlandırıcısı olarak etki gösterir (8,9). TFV'nin oral ön ilaç formu ilk olarak TDF'dir. İlaç, kronik hepatit B tedavisi için 2008 yılında onay almıştır. TDF, hücre içi yarı ömrü ve zayıf biyo-uyumu ile geliştirilmeye açık olarak değerlendirilmektedir (10). TFV etken maddeli yeni ilaç formülasyonu olarak TAF geliştirilmiştir ve FDA tarafından 2016 yılında onaylanmıştır (19). TAF, TDF'ye kıyasla fenol ve alanin izopropil ester içerir; farmakokinetik çalışmalar ile TFV metabolize olarak plazmada daha düşük konsantrasyonda ancak artmış kararlılıkta bulunur (142). TDF'ye kıyasla TAF'daki TFV'nin hücre içi konsantrasyonu altı buçuk kat fazla; serum konsantrasyonu ise %91 daha düşük bulunmuştur (14–16). Bu farmakokinetik farklılıklar göz önüne alındığında, klinik TAF dozu çok daha düşük kullanılabilir: TFV plazma seviyeleri açısından 25 mg'lık günlük TAF dozu, 300 mg'lık günlük TDF dozuna biyo-eşdeğerdir. Yaklaşık on katlık bu farklılık ile ilaca bağlı toksisitenin ve yan etkilerin de orantılı olarak azabileceği düşünülmektedir (17).

Son yıllarda, hastalıkların tedavisi için kullanılan ilaçların nano-taşıyıcılar ile formülasyonları, ilaçların toksik etkilerini azaltılıp, biyo-yararlanımın artırılması bakımından oldukça güncel yaklaşımlardır. En çok umut veren ilaç taşıma sistemlerinden biri olan polimerik nanopartiküller dâhil olmak üzere ilaç taşınım sistemleri, antiviral ajanların hedefe yönelik verilmesi için alternatiflerden biridir ve kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır. Bu polimerik nanopartikül sistemleri arasında, fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri nedeniyle kitosan dikkate değer, doğal bir polimerik materyaldir. Kitinin deasetilasyon ürünü olan kitosan, yapısında bir dizi serbest amin grubunu ihtiva eder; bu da onun ilaç taşıma uygulamalarında kapsamlı olarak kullanımını sağlar (18). Asidik ortamda amino grupları, protonasyon sonrasında pozitif yüklenir. Bundan dolayı, kitosan negatif yüklü moleküllerle rahatça etkileşime

geçebilir. TAF suda çözünebilen, küçük molekülü bir ilaçtır, fosfat grupları içerir ve NaOH solüsyonunda negatif yüklüdür. Elektrostatik kuvvetler aracılığıyla kitosanla rahatça etkileşir. Dolayısıyla, kitosan nanopartikülleri TAF için kontrollü ilaç taşıyıcı sistem olarak tercih edilebilir.

TFV içeren TDF ilacının formülasyon çalışmalarına dair literatürde çok az sayıda makale bulunmuştur (107–111). Yapılan çalışmalara bakıldığında TDF içeren kitosan nanopartikülleri hazırlanmış, karakterize edilmiş ve *in vitro* ilaç salınım kinetikleri incelenmiştir. Ama bu partiküllerin mitotoksik ve genotoksik etkilerine dair net bir bilgi tespit edilememiştir. TAF ilacı ise son üç yıldır klinik kullanıma başlandığı için, TAF'ın kontrollü ilaç taşıyıcı sistemleri ile ilgili sadece bir çalışmaya rastlanmıştır. Bu çalışmada Mandal ve arkadaşları, TAF ve elvitegraviri, nanopartiküller ile kaplayarak subkütanöz taşınımdaki istenmeyen yayılımını önlenmeyi hedeflemişlerdir (27). Bu nedenle bu ilacın ve kombinasyonlarının, etkinlik ve yan etki profilinin ortaya konması oldukça önemlidir. Bu bağlamda tez çalışmamız; TAF içeren kitosan nanopartikülünün sentezi ve karakterizasyonun yapılması yanı sıra TAF ilacı ve kitosan kombinasyonlarının mitotoksik/genotoksik etkilerinin incelenmesi üzerine kurgulanmıştır.

TAF ilacını içeren kitosan nanopartikülü İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde hazırlanmıştır. Kitosan nanopartikülleri iyonik jelyasyon yöntemine göre başarı ile hazırlanmıştır (128). FTIR analizine göre elde edilen spektrumlar literatür ile uyushmaktadır (136,137). TAF ilacı kitosan nanopartiküllerine başarı ile enkapsüle edilmiştir. SEM görüntülerine göre parçacık boyutu ve şekli literatürde belirtilen kitosan nanopartiküllerine benzerdir (143). EDAX spektrumlarındaki pikler, TAF ilacının enkapsüle edildiğini doğrulamaktadır. Hazırlanan kitosan nanopartiküllerinin hidrodinamik çapı 255 nm, TAF içeren kitosan nanopartiküllerinin hidrodinamik çapı ise 340 nm olarak ölçülmüştür. Meng ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada TFV içeren kitosan nanopartikülleri hazırlamışlar ve partikül boyutlarını 260-450 nm arasında olduğunu rapor etmişlerdir (107). Zhang ve arkadaşları ise yine TFV içeren kitosan nanopartikülleri hazırlamışlar ve partikül boyutlarını 200-400 nm arasında olduğunu rapor etmişlerdir (109). Çalışmamızda boyut analizi sonuçlarının SEM verileriyle tutarlı olduğu görülmüştür. Zeta potansiyeli değerleri kitosan nanopartiküller için  $42.8 \pm 1.08$  mV, TAF içeren nanopartiküller için  $48.9 \pm 1.82$  mV olarak bulunmuştur. Pozitif zeta potansiyeli değeri kitosanın amino

gruplarından kaynaklanmaktadır. Bulunan bu pozitif değer literatürde belirtilen değerlerle benzerlik göstermektedir. Örneğin, Shailender ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada kitosan nanopartiküller için zeta potansiyel değerini  $32.33 \pm 1.1$  mV olarak bildirmişlerdir (144). Hazırlanan nanopartiküllerin PDI değerleri kitosan nanopartiküller için  $0.44 \pm 0.00$ . TAF içeren nanopartiküller için  $0.65 \pm 0.02$  olarak ölçülmüştür. Düşük PDI değerleri, homojen bir dağılıma sahip kararlı nanopartiküllerin oluşumunu gösterir. TAF'ın enkapsülasyon verimi  $50.1 \pm 1.0$  olarak hesaplanmıştır. Literatürdeki daha önceki çalışmalar incelendiğinde benzer sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Örneğin, Shailender ve arkadaşları, TAF'ın benzer bir ilacı olan TDF'nin enkapsülasyonu için kitosan nanopartikülleri hazırlamışlar ve karakterize etmişlerdir (144). İlacın enkapsülasyon verimini %48.2 olarak bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada, Meng ve arkadaşları, tenofovir yüklü kitosan nanopartikülleri hazırlamışlar ve karakterize etmişlerdir (107). Bu çalışmada üç farklı molekül ağırlığına sahip kitosan (düşük, orta ve yüksek) kullanmışlardır. Düşük, orta ve yüksek kitosandan hazırlanan kitosan nanopartiküllerine enkapsüle edilen tenofovir ilacı için verim olarak sırasıyla %2.1, %6.9 ve %23.5 gibi çok düşük enkapsülasyon verimleri elde etmişlerdir.

Enkapsülasyon işleminden sonra TAF ilacının *in vitro* salım profili değerlendirilmiş ve 72 saat içinde ilacın neredeyse tamamı (%92.7) salınmıştır. İlgili literatür çalışmaları incelendiğinde benzer sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Örneğin, Meng ve arkadaşları, düşük, orta ve yüksek molekül ağırlığına sahip kitosan kullanarak elde ettikleri nanopartikülleri, TFV salımı için kullanmışlardır (107). Yaptıkları *in vitro* salım çalışmalarında, düşük molekül ağırlıklı kitosandan hazırlanan nanopartiküllerden ilacın neredeyse tamamı 48 saat içinde salınmıştır. Bu salım profili orta ve yüksek molekül ağırlıklı kitosan kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerden ilacın yaklaşık %50-70'i 120 saat içinde salınmıştır. Bir başka çalışmada, Meng ve arkadaşları, tiyol fonksiyonel kitosan nanofiberleri hazırlamışlar ve TFV salımında kullanmışlardır (108). Salım çalışmaları sonucunda çalışma ekibi TFV ilacının 50 saat içinde %80-100 arası salındığını rapor etmişlerdir. Bir diğer çalışmada ise TFV ve TDF içeren poli (laktik-koglikolik asit) ve metakrilik karışımı ile hazırlanan yüklü nanopartiküller hazırlanmıştır (109). Bu çalışmada ise 72 saat içinde her iki ilacında yaklaşık %80'ninin salındığı bildirilmiştir. Rapor edilen bu çalışmalar doğrultusunda, tez kapsamında elde ettiğimiz ilaç salım sonucu literatürle uyum göstermektedir. Tüm bu doğrulanmış veriler ile çalışma grupları oluşturularak, genotoksisite ve mitotoksisite testleri yapılmıştır.

TAF ile ilgili çalışma konseptimize uygun literatür bilgisine ulaşamadığımız için çalışmada uygulanacak ilaç dozunu belirlemek için; TAF üretici firması Gilead Sciences'ın HepG2 hücrelerinde canlılık oranını veren CC<sub>50</sub> değeri (>44.4 µM) referans alınmıştır (89). Ayrıca HepG2 hücrelerinde ön çalışma olarak uyguladığımız altı günlük, 45 µM TAF dozunun benzer sitotoksik etki göstermesi üzerine ilaç dozu olarak bu değere karar verilmiştir. Çalışma gruplarımız için; 45 µM TAF ilacı uygulanan, 45 µM TAF içeren kitosan nanopartikülü uygulanan, kontrol amaçlı enkapsülasyonla aynı miktarda kitosan uygulanan ve aynı şartların sağlandığı ancak sadece taze besiyeri içeren kontrol grubu olmak üzere 4 grup oluşturulmuştur.

Öncelikle altı günlük deney sonucunda çalışma gruplarındaki hücreler morfolojik olarak değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı bakımında, TAF grubunun kontrolden neredeyse sekiz kat daha az canlı hücreye sahip olduğu gözlemlenmiştir. TAF içeren kitosan uygulamasında ise kontrolden yaklaşık bir buçuk katlık düşüş olduğu görülmüştür. Sayısal hücre değişikliğinin yanı sıra, morfolojik olarak yapılan değerlendirmede de kontrol grubundaki hücrelerin parlak, büyük ve küresel görünüm, hücreler agregatlar halinde birbirlerine yakın temaslı gözlemlenirken; TAF'a maruz kalan hücrelerin membranının büzüşerek daha küçülmüş, birbirlerinden bağımsız ve daha koyu renkli oldukları gözlemlenmiştir. Bu bulgular Barathan ve arkadaşlarının bildirdiği üzere, HepG2 hücrelerinin apoptoz morfolojisi olarak değerlendirilmektedir (145). Kitosana maruz kalan hücrelerin morfolojileri kontrole benzer izlenirken; TAF içeren kitosan nanopartikülüne maruz kalan hücrelerde ise; TAF uygulamasındaki benzer hücrelerin bulunduğu ancak anormalleşmiş hücrelerin daha seyrek olduğu görülmüştür. Bu morfolojik farklılıkların kitosandan TAF'ın yaklaşık üç gün sonra salınmaya başlaması ve böylece daha düşük toksisite göstermiş olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

TAF ilacı ve kombinasyonlarının genotoksik etkilerini belirlemenin önemli belirteçlerinden birisi de mikronükleus (Mn) analizidir. Mn, membran ile çevrelenmiş interfaz hücrelerinde görülebilen kromatin cisimleridir (146). Mn oluşumu, sağlam kromozomları yanlış ayıran mitotik hatalar, DNA replikasyonu ve onarımındaki hatalardan kaynaklanan asentrik kromozom fragmanları dahil olmak üzere birçok hücre bölünmesi kusurunun ortak bir sonucudur. Yanlış ayrılmış kromozomlar, DNA hasarının sitolojik bir kanıtı olarak değerlendirilmektedir (147). Mn frekansındaki artış, klastojenitenin bir göstergesidir. Klastojenite ise genetik hastalıklar ve kanser riskini



artırır. Epidemiyolojik çalışmalara göre, Mn sıklığındaki artış ile kanser oluşumu arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur (148). Yaptığımız araştırmada, TAF ve TAF içeren kitosan nanopartikül grupları kontrol ve sadece kitosan içeren gruplara göre önemli seviyede yüksek ( $p<0.05$ ) Mn içeriğine sahip bulunmuştur. Kontrol ile kitosan grubu arasında anlamlı farklılık bulunamamıştır. Literatür taraması yapıldığında incelediğimiz TAF ile benzer etki mekanizmasına sahip yine NRTI grubundan olan ilaçlara dair Mn analizleri yapıldığı görülmüştür. Daha önce yaptığımız bir çalışmada tenofoviri 6 ve 12 ay kullanan hepatit B tanısı almış hastalarda Mn sıklığının, sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli seviyede yüksek olduğunu tespit etmiştik (149). Benzer şekilde Gonzales ve Larippa, Çin hemstir ovaryum hücrelerinde (96); Stern, CD4 lenfositlerinde (150); Aruna ve Jagetia ise HeLa hücrelerinde azidotimidinin kontrolden anlamlı seviyede MN sıklığını artırdığını bildirmişlerdir (151). Benzer bir çalışma ile Ayer ve arkadaşları, fare ve sıçan kemik iliği üzerinde zidovudinin farklı dozları ile çalıştıklarında, eritrositlerde Mn frekansının arttığını bildirmişlerdir (152). Bayram ve Topaktaş ise; aynı gruptan lamivudininin insan lenfositleri üzerinde iki gün süresince uygulandığında, önemli ölçüde Mn artışına neden olduğunu rapor etmişlerdir (99). Bu çalışmaların aksine Tungeln ve arkadaşları, lamivudininin *in vivo* fare eritrositlerinde Mn sıklığını etkilemediğini saptamışlardır (97). Görüldüğü üzere çalışmaların bazıları NRTI'ların Mn oluşumunu indüklediği, bazıları ise etki oluşturmadığını göstermektedir. Kullanılan doz, uygulama süresine ve hücre tipine bağlı olarak çalışma sonuçları değişkenlik göstermektedir. İncelenen benzeri NRTI grubu ilaç çalışmalarının çoğunda olduğu gibi bizim çalışmamızda belirtilen dozda TAF ilacının ve TAF içeren kitosan nanopartiküllerinin, Mn oluşumunu anlamlı olarak yükselttiği görülmüştür

Çalışmamızda TAF'ın ve kitosanlı formülasyonunun olası genotoksik etkileri komet yöntemi ile ayrıca araştırılmıştır. Komet testi ile DNA'da hasar sonucu oluşan tek ve çift zincir kırılmaları tespit edilebilir. DNA hasar tespitinde yaygın olarak tercih edilen bu test; hızlı, basit ve duyarlıdır. Teknikte; DNA fragmanlarının migrasyonunun görüntüye yansımaları değerlendirilir. Bu zincir kırılmaları, kromozomal anormallikler ve genomik instabilite ile ilişkilidir. Genomik instabilite de doğrudan malignite ile ilişkilendirilir (153,154). DNA hasarı olan hücreler florasan mikroskop altında hasarın şiddetine göre kuyruklu yıldız (komet) şeklinde görülürler. Hasarsız, parçalanmamış genetik materyal çekirdek içinde kalırlar. Kuyruktaki DNA yüzdesinin belirlenmesi

(%DNA<sub>T</sub>), gözle dahi değerlendirilebilir olması ve diğer parametrelere göre uygulamaya cevap ilişkisini daha iyi yansıtması sebebiyle özellikle tercih edilmektedir (155). Yaptığımız çalışmada tüm uygulama gruplarında % DNA<sub>T</sub> ortalamaları kontrolden anlamlı seviyede daha yüksek bulunmuştur. Hatta TAF uygulanan grubun komet parametreleri, kitosan ve TAF içeren kitosan uygulanan grupların değerlerinden anlamlı seviyede yüksek bulunmuştur. Kitosan grubundaki %DNA<sub>T</sub> artışı, benzeri hücre hattı çalışmalarında da görülmüştür. Kitosanın uzun süreli muamelesi, DNA fragmentasyonu oluşturabilmektedir (156). Bildiğimiz kadarıyla TAF ile ilişkili genotoksisite çalışmaları bulunmamakla birlikte, NRTI grubu diğer ilaçlar ile yapılan komet çalışmaları mevcuttur. De Filhoa ve arkadaşları, fare kemik iliği hücrelerinde, TFV de dahil bazı NRTI'ların komet analizi ile genotoksik etkilerini çalışmışlar ve anlamlı bir farklılık bulamamışlardır (157). Yine de Filhoa ve arkadaşları, yaptıkları bir başka komet çalışmasında ise; TFV ve entekavirin, *Drosophila melanogaster* üzerinde anlamlı seviyede komet oluşturduğunu bildirmişlerdir (158). Komet testi ile NRTI grubu ilaçlar ile yapılan çalışmalarda, ilacın çeşidine ve uygulama şartlarına bağlı olarak farklı sonuçlar bulunduğu görülmektedir. Komet testinde %DNA<sub>T</sub> değerlerinde artış olması; nükleot(z)id analoglarının, pürinlerin yapısında olmaları ve replikasyon sırasında yeni DNA zincirine dâhil edilerek mutasyonlara, kromozomal sapmalara veya araya girdiği zaman -OH grubu eksikliği ile sentezin sonlamasına sebep olmalarından kaynaklanabilir (159).

Kronik hepatit B tedavisinde kullanılan oral antiviraller nükleozid veya nükleotidlerin kimyasal olarak modifiye edilmiş analoglarıdır. Nükleot(z)id analogları, insanlarda DNA replikasyonu ve onarımında sorumlu olan DNA pol  $\beta$ 'nin zayıf inhibitörleridir. Ancak bu ajanlar insan mtDNA pol  $\gamma$  inhibisyonuna karşı daha yüksek affiniteye sahiptirler. Bu nedenle mitokondriyal disfonksiyon veya mtDNA replikasyonunda bozulmaya sebep olabilirler. NRTI, DNA pol  $\gamma$  tarafından, uzayan zincire 5'OH grubu ile dâhil edilir. Bu analog, DNA polimerazın proof reading aktivitesi ile giderilemezse, 3'OH ucu olmadığı için başka nükleotid dâhil edilemez ve zincir sonlanır. Yani, nükleot(z)id analoglarının mtDNA replikasyonunu bloke etme yeteneği, mitokondri genomundaki eklenme ve çıkarılma oranının net sonucudur (20).

Çalışmamızda, mtDNA miktarının göstergesi olarak COXII geninin ekspresyon seviyesi ölçülmüştür. Buna göre; TAF uygulanan grubun kontrolden anlamlı seviyede daha düşük mtDNA içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. Kitosan ve TAF içeren

kitosan nanopartikülleri uygulama gruplarında ise kontrolden anlamlı seviyede daha yüksek mtDNA miktarı içerdiği görülmüştür. TAF'ın dahil olduğu NRTI grubu ile yapılan benzeri çalışmalar mevcuttur: Örneğin Walker ve arkadaşları, HepG2 hücrelerinde NRTI kombinasyonlarının mitokondriyal toksisiteyi indüklemeye potansiyelini çalışmışlar ve anlamlı çıkan toksisite miktarının dizilimini; zalkitabin > didanozin > stavudin > zidavudin > TFV şeklinde bildirmişlerdir. Pan-Zhou ve arkadaşları, COX II geni ile mtDNA içeriğini araştırdıkları bir çalışmada, NRTI ilaçlarının tümünde anlamlı bir düşüş olduğunu göstermişlerdir (160,161). Benzer bir diğer çalışmada Birkus ve arkadaşları, didanozin ve zalkitavinin mtDNA içeriğini azalttığını göstermişlerdir (162). Çalışmalar NRTI grubu ilaçların, mtDNA miktarını önemli oranda azalttığını ancak TAF'ın eski formülasyonu olan TDF'nin gruptaki diğer ilaçlara oranla mtDNA içeriğini daha düşük seviyede azalttığını göstermektedir (157).

MtDNA replikasyonu uzun süre inhibe edilirse hücre içi mtDNA seviyesi düşebilir. Bu durum da solunum zincirinde yer alan eksik proteinlere ve artan ROS nedeniyle bozulmuş oksidatif fosforilasyona yol açarak laktik asidoza ve hücre ölümüne sebep olabilir (20). Çalışmamızda ilaç uygulamalarına bağlı olarak ROS ve süperoksit miktarlarını ölçerek mitokondriyal ve hücrel oksidatif hasar seviyesi belirlenmeye çalışılmıştır. Ölçümler sonucunda; süperoksit testinde anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Ancak ROS testinde; TAF, kitosan ve TAF içeren kitosan nanopartikül grupları kontrolden anlamlı seviyede daha fazla ROS içeriğine sahip bulunmuştur. Hatta kitosan grubunda TAF grubundan daha yüksek seviyede ROS birikimi görülmüştür. Kitosanın hücrede ROS artışını Zubareva vd., kitosanın pozitif yükü nedeniyle hücreye penetrasyonunun yüksek olması dolayısıyla mitokondriyal membran potansiyelinin bundan etkilenmesi ile açıklamışlardır (165). TAF ile ROS artışını, benzeri bir çalışma ile Hayakawa, NRTI grubundan zidovudin'in kas ve karaciğerde mtDNA'da 8-OH-dG artışına neden olduğunu göstermişlerdir. Oksitlenmiş bazlar da mtDNA'da mutasyonlara sebep olabilirler (94). Ramamoorthy ve arkadaşları, sıçanlarda *in vivo* TDF uygulaması ile ROS ve reaktif nitrojen türleri (RNS) üretiminin etkilendiğini ve böbreklerde artmış mitokondriyal hasara sebep verdiğini bildirmişlerdir (163). Oksidatif stres, NRTI tarafından tetiklenen zararlı etkilerin arkasındaki önemli bir itici güçtür ve mtDNA, NRTI'lara maruz kaldığında reaktif oksijen türlerinin oluşumundan büyük ölçüde etkilenir (164).

Tez çalışmamızda incelenen bir diğer parametre ise mitokondriyal membran potansiyel ölçümüdür. Mitokondride oksitlenebilir substratlar kullanılarak, elektrokimyasal gradient oluşturulur ve ATP üretilir. Mitokondriyal membran potansiyeli, katyonların içe; anyonların dışarı taşınmasını teşvik edecek şekildedir. Böylece oluşan elektrokimyasal gradient ATP sentezini yönlendirir. mtDNA kaybı, iç mitokondriyal membran elektrokimyasal potansiyelinin azalmasına neden olur (132). Yaptığımız çalışmada TAF ve TAF içeren kitosan nanopartikül uygulamaları sonucu mitokondriyal membran potansiyeli, kontrolden anlamlı seviyede daha düşük bulunmuştur. Ancak kitosan nanopartikülü uygulamasının, membran potansiyelini olumlu etkilediği görülmüştür. Mitokondriyal membran potansiyelindeki bozulma, mtDNA'nın azalması gibi mitokondriyal hasarları ve ROS / RNS (reaktif nitrojen türleri) artışların sonucunda hücreler apoptoza gidebilir (20). Çalışmamızda Annexin V ile apoptoz incelememizde; uygulama gruplarında anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Ancak morfolojik olarak apoptotik görünüme sahip oldukları görülmüştür. TFV'nin apoptozu uyardığı yönünde çalışmalar bulunmaktadır. Lu ve arkadaşları, PC-12 hücrelerinde TDF uygulaması sonucu, apoptotik görünümüne hücrelerin arttığını ve BAX ekspresyonundaki artışın da apoptozun oluşumunu artırdığını bildirmişlerdir. Doz bağımlı olarak BAX gibi proapoptatik proteinlerin artışının ROS oluşumunu tetiklediği ve intrinsik yolağı aktive ederek apoptozu uyardığı düşünülmektedir (166). Murphy ve arkadaşları, HK-2 hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda TDF maruziyeti sonucunda ROS miktarındaki artışın; hücre canlılığında azalmaya, mitokondride fonksiyonel bozulmaya ve kaspaz 3 ile kaspaz 9 ekspresyonunda yükselişe neden olduğunu göstermişlerdir (167). Apoptoz enerji bağımlı, kontrollü bir hücre ölüm tipidir. Sistein proteazları içeren kaspazlar, proteolitik aktivasyondan sorumludurlar ve apoptotik sinyalleri başlatırlar. Memeli hücrelerinde, sitokrom c tarafından başlatılan kaspaz aktivasyonu etkili bir aktivasyon yoludur. Bu yolda ROS artışı ve mitokondri hasarı gibi uyaranlar ile sitokrom c salınır ve kaspaz aktivasyonu indüklenerek, apoptoz başlar (163).

Mayada tarif edilen retrograd (RTG) sinyal yoluna benzeri, mitokondri-nükleus sinyal yolağı memeli hücrelerinde de tarif edilmiştir. Mitokondri stres sinyali olarak da bilinen RTG yolağı mtDNA tükenmesine sebep olan mitokondri membran potansiyeli ve  $Ca^{+2}$  seviyesindeki artış ile aktifleşir. RTG sinyali sonucu,  $Ca^{+2}$  depolanması ve salınması (RyR1, RyR2, kalretikulin, kalsequestrin), glikoz alımı ve metabolizması

(Glut 4, IGF1R, heksokinaz, fosfoenol piruvat karboksikinaz (PCK1 ve PCK2), IRS1), hücre döngüsü, ölümü ve DNA hasar yanıtı gibi gen ekspresyon programlarını düzenleyen ATF2/CREB dâhil olmak üzere nükleer genomdaki geniş bir gen spektrumunun ekspresyonu etkilenir (124,125). Çalışmamız kapsamında, RTG yolağı ile ilişkilendirilmiş genlerden RYR1 (Riyanodin resptör-1), ATF2 (Aktive edici transkripsiyon faktörü-2) ve PCK1 (sitosolik fosfoenol piruvat karboksikinaz-1) çalışılmıştır. Çalışma bulgularımıza göre; tüm gruplarda ATF2 geninin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişim görülmemiştir. RYR1 gen ifadesinde kitosan ve TAF gruplarında kontrolden istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük bulunurken, TAF içeren kitosan grubunda ise diğer gruplardan daha yüksek seviyede bulunmuştur. PCK1 geni ise, kitosan ve TAF içeren kitosan nanopartikül gruplarında düşük ekspresyon seviyesinde bulunurken, TAF grubunda gen ifadesi anlamlı seviyede yüksek bulunmuştur.

Tüm bu bulgulardan; HepG2 hücreleri üzerinde yapılan 45 µM TAF uygulamasının, mitotoksik ve genotoksik etkileri olduğu söylenebilir. Kitosan ile enkapsülasyon yapılması durumunda, TAF'ın moleküler toksisite potansiyeli bazı testlerde azalırken bazı testlerde etkilenmemiştir. Ayrıca kitosan nanopartikülünün de genotoksikite/mitotoksikite testlerindeki bulguları değişkendir. Dolayısıyla kitosan enkapsülasyonunun TAF'ın toksisitesini azalttığına dair net bir sonuca ulaşılamamıştır. İlacın ve kitosan kombinasyonlarının etkilerini daha net belirtebilmek için ek toksisite testleri ve farklı dozlar ile farklı hücrelerde uygulamalar yapılması gerekmektedir.

Literatür incelendiğinde, kitosan ve TAF ile ilgili olarak yaptığımız çok yönlü testleri içeren sınırlı sayıda makale mevcuttur. Kitosan ile enkapsülasyonu yapılan TAF'ın sitotoksik, genotoksik ve mitokondriyal toksisitesine dair çalışmalara ise rastlanmamıştır. Bu bağlamda tez çalışmamız literatüre yeni bilgiler kazandırmıştır.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

TAF ilacı, 2016 yılında FDA tarafından hepatit B tedavisi için onaylanmış NRTI grubuna dahil bir ilaçtır. TAF ilacının da içinde bulunduğu NRTI grubu ilaçların, hücresel ve mitokondriyal boyutta hasarlara neden olduğu bilinmektedir. TAF'ın önceki formülasyonu olan ve aynı etkene (TFV) sahip TDF için de benzer sonuçları olan toksisite çalışmaları mevcuttur. Ancak literatür taraması yapıldığında TAF ile ilgili sitotoksik ve genotoksik çalışmalarının kısıtlı olduğu görülmüştür. TAF içeren kitosan nanopartikül formülasyonuna yönelik sitotoksik ve genotoksik çalışmaya ise rastlanmamıştır. Bu kapsamda tez çalışmamızda, TAF ilacını içeren kitosan nanopartiküllerinin hazırlanması, karakterizasyonunun yapılması, TAF ilacı ve kombinasyonlarının mitotoksik/genotoksik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

TAF'ın uygulaması; Mn ve komet testlerine göre genotoksik hasara neden olmuştur. İlaç, mtDNA içeriğini düşürmüş ve  $\Delta\Psi_m$  üzerinde olumsuz etkilere sebep olmuştur. Ayrıca hücrelerde ROS miktarının yükselmesine neden olmuştur. Kitosan enaksülasyonun uygulandığı durumda, bazı testlerde genetik hasarlar azalmıştır ancak bazı testlerde ise genotoksik etkisi olabildiği görülmüştür.

Sonuç olarak; çalışılan dozda TAF'ın HepG2 hücreleri üzerinde genotoksik ve mitotoksik etkileri olduğu görülmüştür. Kitosan ve kitosan enaksülasyonunun ağırlıklı olarak olumlu etkilerine karşın, bazı parametlerde ise olumlu sonuçlarına ulaşamamıştır. Ancak, yeni bir ilaç olan TAF'ın, hücresel düzeyde moleküler etkilerine yönelik literatüre katkı sağlayacağı ve yapılacak olan benzeri ilaç formülasyonlarının hazırlanmasına yardımcı olacağı öngörülmektedir.

Çalışmamızdaki uygulama, *in vitro* ve tek doz ile yapılmıştır. İlacın ve kitosan kombinasyonlarının etkilerini daha net belirleyebilmek için farklı dozlar ile farklı hücrelerde hatta *in vivo* olarak ek toksisite testleri ile yapılması önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

- 1 Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, Krause G, Ott JJ. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: A systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet* 2015, 386: 1546–55.
- 2 Mahoney FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1999, 12: 351–66.
- 3 ECDC TECHNICAL REPORT. Hepatitis B and C in the EU neighbourhood: prevalence, burden of disease and screening policies, 2010, 1-51.
- 4 Suk-Fong Lok A. Hepatitis B Treatment: What We Know Now and What Remains to Be Researched. *Hepatol Commun* 2019, 3: 8–19.
- 5 Dursun H, Albayrak A. Kronik Hepatit B Tedavisinde Mevcut Tedavilerle Geline Son Durum ve Ufuktaki Yeni Hedefler. *Güncel Gastroenteroloji* 2016, 20: 145-56.
- 6 Sorrell MF, Belongia EA, Costa J. National Institutes of Health consensus development conference statement: Management of hepatitis B. *Hepatology* 2009, 49: 4–12.
- 7 De Clercq E. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *Int J Antimicrob Agents* 2009, 33: 307–20.
- 8 Grim SA, Romanelli F. Tenofovir disoproxil fumarate. *Ann Pharmacother* 2003, 37: 849–59.
- 9 De Clercq E. Tenofovir alafenamide (TAF) as the successor of tenofovir disoproxil fumarate (TDF). *Biochem Pharmacol* 2016, 119: 1–7.
- 10 Kearney BP, Flaherty JF, Shah J. Tenofovir disoproxil fumarate: Clinical pharmacology and pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 2004, 43: 595–612.
- 11 Abdul Basit S, Dawood A, Ryan J, Gish R. Tenofovir alafenamide for the treatment of chronic hepatitis B virus infection. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2017, 10: 707–16.
- 12 Mitra S, Priscilla R, Karthik R, Sarkar S, Rajkumar S, Cherian AO. Renal tubular dysfunction associated with Tenofovir therapy. *J Assoc Physicians India* 2014, 62: 580–2.
- 13 Scott LJ, Chan HLY. Tenofovir Alafenamide: A Review in Chronic Hepatitis B. *Drugs* 2017, 77: 1017–28.

- 14 Vitoria M, Hill AM, Ford NP, Doherty M, Khoo SH, Pozniak AL. Choice of antiretroviral drugs for continued treatment scale-up in a public health approach: What more do we need to know? *J Int AIDS Soc* 2016, 19: 1–9.
- 15 Imaz A, Podzamczar D. Tenofovir alafenamide, emtricitabine, elvitegravir, and cobicistat combination therapy for the treatment of HIV. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2017, 15: 195–209.
- 16 Ray AS, Fordyce MW, Hitchcock MJM. Tenofovir alafenamide: A novel prodrug of tenofovir for the treatment of Human Immunodeficiency Virus. *Antiviral Res* 2016, 125: 63–70.
- 17 Hill A, Hughes SL, Gotham D, Pozniak AL. Tenofovir alafenamide versus tenofovir disoproxil fumarate: is there a true difference in efficacy and safety? *J virus Erad* 2018, 4: 72–9.
- 18 Timur SS, Şahin A, AYTEKIN E. Design and in vitro evaluation of tenofovir-loaded vaginal gels for the prevention of HIV infections. *Pharm Dev Technol* 2018, 23: 301–10.
- 19 Ingiliz P, Valantin MA, DuVivier C. Liver damage underlying unexplained transaminase elevation in human immunodeficiency virus-1 mono-infected patients on antiretroviral therapy. *Hepatology* 2009, 49: 436–42.
- 20 Fontana RJ. Side effects of long-term oral antiviral therapy for hepatitis B. *Hepatology* 2009, 49: 185–95.
- 21 Zhang Q, Cao G. Genotypes, mutations, and viral load of hepatitis B virus and the risk of hepatocellular carcinoma. *Hepat Mon* 2011, 11: 86–91.
- 22 Hashiguchi K, Bohr VA, de Souza-Pinto NC. Oxidative stress and mitochondrial DNA repair: Implications for NRTIs induced DNA damage. *Mitochondrion* 2004, 4: 215–22.
- 23 Lourenço ED, do Amaral VS, Lehmann M, Dihl RR, Schmitt VM, Cunha KS, Reguly ML, de Andrade, Heloisa HR. Micronuclei induced by reverse transcriptase inhibitors in mononucleated and binucleated cells as assessed by the cytokinesis-block micronucleus assay. *Genet Mol Biol* 2010, 33: 756–60.
- 24 Moura M De, Houten B Van. Review Article. *Environ Mol Mutagen* 2010, 405: 391–405.



- 25 Dhillon VS, Thomas P, Iarmarcovai G, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Fenech M. Genetic polymorphisms of genes involved in DNA repair and metabolism influence micronucleus frequencies in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 2011, 26: 33–42.
- 26 Asci Z, Tünay H, Demirtürk N. Tenofovir disoproksil fumarata bağılı nadir bir yan etki: Kaşıntı. *Klimik Derg* 2015, 28: 126–8.
- 27 Mandal S, Prathipati PK, Kang G. Tenofovir alafenamide and elvitegravir loaded nanoparticles for long-acting prevention of HIV-1 vaginal transmission. *Aids* 2017, 31: 469–76.
- 28 Thomas E, Yoneda M, Schiff ER. Viral hepatitis: Past and future of HBV and HDV. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015, 5: 1–11.
- 29 Burns GS, Thompson AJ. Viral Hepatitis B: Clinical and Epidemiological Characteristics. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014, 4: 1–14.
- 30 Purcell RH. The discovery of the hepatitis viruses. *Gastroenterology* 1993, 104: 955–63.
- 31 Akhan S, Aynioğlu A, Çağatay A. Kronik Hepatit B Virusü İnfeksiyonunun Yönetimi: Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği Viral Hepatit Çalışma Grubu Uzlaş Raporu. *Klimik Derg* 2014, 27: 2–18.
- 32 Chen F, Pattullo V. Viral Hepatitis, Type B (MS-2 Strain). *J Gastroenterol Hepatol* 2011, 26: 93–108.
- 33 World Health Organisation, WORLD HEALTH STATISTICS: 2016. [https://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/2016/en/](https://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2016/en/) 10 Mart 2020.
- 34 Gust ID. Epidemiology of hepatitis B infection in the Western Pacific and South East Asia. *Gut* 1996, 38: 18–23.
- 35 Nelson P, Mathers B, Cowie B, Hagan H, Jarlais D Des, Degenhardt L. The epidemiology of viral hepatitis among people who inject drugs: Results of global systematic reviews. *Lancet* 2011, 378: 571–83.
- 36 Akarca US. Chronic hepatitis B a guideline to diagnosis, approach, management, and follow-up 2007 Turkish association for the study of liver. *Turkish J Gastroenterol* 2008, 19: 207–30.
- 37 Değertekin H, Güneş G. Horizontal transmission of hepatitis B virus in Turkey. *Public Health* 2008, 122: 1315–7.

- 38 *Türk Karaciğer Araştırmaları Derneği*. Hepatit B Çalışma Grubu-Türkiye Hepatit B Yol Haritası, 1-30.
- 39 Liang TJ. National Institute of Health - Hepatitis B: The Virus and Disease. *Hepatology* 2009, 49: 1–17.
- 40 Baumert TF, Meredith L, Ni Y, Felmlee DJ, McKeating JA, Urban S. Entry of hepatitis B and C viruses - Recent progress and future impact. *Curr Opin Virol* 2014, 4: 58–65.
- 41 Block TM, Guo H, Guo JT. Molecular Virology of Hepatitis B Virus for Clinicians. *Clin Liver Dis* 2007, 11: 685–706.
- 42 Lee JM, Ahn SH. Quantification of HBsAg: Basic virology for clinical practice. *World J Gastroenterol* 2011, 17: 283–9.
- 43 Doo EC, Ghany MG. Hepatitis B virology for clinicians. *Clin Liver Dis* 2010, 14: 397–408.
- 44 Schädler S, Hildt E. HBV life cycle: Entry and morphogenesis. *Viruses* 2009, 1: 185–209.
- 45 Tseng TC, Kao JH. Clinical utility of quantitative HBsAg in natural history and nucleos(t)ide analogue treatment of chronic hepatitis B: New trick of old dog. *J Gastroenterol* 2013, 48: 13–21.
- 46 Mark A, Feitelson A, Helena MGPV, Jie L, Zhaorui LJP. Hepatitis B Virus X Antigen (Hbxag) And Cell Cycle Control In Chronic Infection And Hepatocarcinogenesis. *Front Biosci* 2005, 10: 1558–72.
- 47 Sayeh E, Makoto O, Michinori KNE, Soumaya BKT-K. Recent Insights into Hepatitis B Virus–Host Interactions. *J Med Virol* 2014,.
- 48 Zhang X, Hou J, Lu M. Regulation of hepatitis B virus replication by epigenetic mechanisms and microRNAs. *Front Genet* 2013, 4: 1–7.
- 49 Urban S, Schulze A, Dandri M, Petersen J. The replication cycle of hepatitis B virus. *J Hepatol* 2010, 52: 282–4.
- 50 Yan H, Zhong G, Xu G. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* 2012, 2012: 1–28.
- 51 Prange R. Host factors involved in hepatitis B virus maturation, assembly, and egress. *Med Microbiol Immunol* 2012, 201: 449–61.

- 52 Schulze A, Gripon P, Urban S. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology* 2007, 46: 1759–68.
- 53 Rajbhandari R, Chung RT. Treatment of Hepatitis B: A Concise Review. *Clin Transl Gastroenterol* 2016, 7: e190.
- 54 Jayalakshmi MK, Kalyanaraman NRP. Hepatitis B Virus Genetic Diversity: Disease Pathogenesis. *Intech*, 2013,;68–82.
- 55 Mizokami M, Nakano T, Orito E. Hepatitis B virus genotype assignment using restriction fragment length polymorphism patterns. *FEBS Lett* 1999, 450: 66–71.
- 56 Welzel TM, Miley WJ, Parks TL, Goedert JJ, Whitby D, Ortiz-Conde BA. Real-time PCR assay for detection and quantification of hepatitis B virus genotypes A to G. *J Clin Microbiol* 2006, 44: 3325–33.
- 57 Liu WC, Lindh M, Buti M. Genotyping of hepatitis B virus - Genotypes a to G by multiplex polymerase chain reaction. *Intervirol* 2008, 51: 247–52.
- 58 Guirgis BSS, Abbas RO, Azzazy HME. Hepatitis B virus genotyping: Current methods and clinical implications. *Int J Infect Dis* 2010, 14: e941–53.
- 59 Hepatit B Hastalığı Belirtileri, Teşhis ve Tedavisi. <https://www.hepatit.org/hepatit-b/> 10 Nisan 2019.
- 60 World Health Organization. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b> 18 Temmuz 2019.
- 61 Krajden M, McNabb G, Art B, Petric M, Krajden M, McNabb G. The laboratory diagnosis of hepatitis B virus Diagnostic l'hépatite B en laboratoire. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2005, 16: 65–72.
- 62 Tu T, Budzinska MA, Shackel NA, Urban S. HBV DNA integration: Molecular mechanisms and clinical implications. *Viruses* 2017, 9: 1-18.
- 63 Idilman R. The summarized of EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *Turkish J Gastroenterol* 2017, 28: 412–6.
- 64 Terrault NA, Lok ASF, McMahon BJ. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. *Hepatology* 2018, 67: 1560–99.

- 65 Terrault NA, Bzowej NH, Chang KM, Hwang JP, Jonas MM, Murad MH. AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology* 2016, 63: 261–83.
- 66 Yamazhan T. Kronik Hepatit B Tedavisinde Güncel Durum. *Ankem Derg* 2011, 25: 18–22.
- 67 Zoulim F. Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic Hepatitis B virus infection. *Antiviral Res* 2004, 64: 1–15.
- 68 Seignères B, Pichoud C, Martin P, Furman P, Trépo C, Zoulim F. Inhibitory activity of dioxolane purine analogs on wild-type and lamivudine-resistant mutants of hepadnaviruses. *Hepatology* 2002, 36: 710–22.
- 69 Delaney IV WE, Ray AS, Yang H. Intracellular metabolism and in vitro activity of tenofovir against hepatitis B virus. *Antimicrob Agents Chemother* 2006, 50: 2471–7.
- 70 Seifer M, Hamatake RK, Colonno RJ, Standring DN. In vitro inhibition of hepadnavirus polymerases by the triphosphates of BMS-200475 and lobucavir. *Antimicrob Agents Chemother* 1998, 42: 3200–8.
- 71 Delaney IV WE, Yang H, Miller MD, Gibbs CS, Xiong S. Combinations of adefovir with nucleoside analogs produce additive antiviral effects against hepatitis B virus in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2004, 48: 3702–10.
- 72 Zoulim F, Perrillo R. Hepatitis B: Reflections on the current approach to antiviral therapy. *J Hepatol* 2008, 48: 2–19.
- 73 Liu N, Zhao F, Jia H. Non-nucleoside anti-HBV agents: Advances in structural optimization and mechanism of action investigations. *Medchemcomm* 2015, 6: 521–35.
- 74 Yu MW, Yeh SH, Chen PJ. Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: A prospective study in men. *J Natl Cancer Inst* 2005, 97: 265–72.
- 75 Zhou JY, Zhang L, Li L, Gu GY, Zhou YH, Chen JH. High hepatitis B virus load is associated with hepatocellular carcinomas development in Chinese chronic hepatitis B patients: A case control study. *Virology* 2012, 9: 16.
- 76 Liaw YF, Sung JJY, Chow W. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* 2004, 351: 1521–31.

- 77 Peters M, Walling DM, Waggoner J, Avigan MI, Sjogren M, Hoofnagle JH. Immune effects of  $\alpha$ -interferon in chronic liver disease. *J Hepatol* 1986, 3: 283–9.
- 78 Nair S, Perrillo RP. Serum alanine aminotransferase flares during interferon treatment of chronic hepatitis B: Is sustained clearance of HBV DNA dependent on levels of pretreatment viremia? *Hepatology* 2001, 34: 1021–6.
- 79 Marcellin P, Lau GKK, Bonino F. Peginterferon Alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2004, 351: 1206–17.
- 80 Wursthorn K, Lutgehetmann M, Dandri M. Peginterferon alpha-2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2006, 44: 675–84.
- 81 Lok ASF, Lai CL, Leung N. Long-Term Safety of Lamivudine Treatment in Patients with Chronic Hepatitis B. *Gastroenterology* 2003, 125: 1714–22.
- 82 Fung HB, Stone EA, Piacenti FJ. Tenofovir disoproxil fumarate: A nucleotide reverse transcriptase inhibitor for the treatment of HIV infection. *Clin Ther* 2002, 24: 1515–48.
- 83 Yu D, Heathcote J. Tenofovir in the treatment of chronic hepatitis B. *Therapy* 2011, 8: 527–44.
- 84 Grigsby IF, Pham L, Mansky LM, Gopalakrishnan R, Mansky KC. Tenofovir-associated bone density loss. *Ther Clin Risk Manag* 2010, 6: 41–7.
- 85 De Clercq E. Clinical Potential of the Acyclic Nucleoside Phosphonates Cidofovir, Adefovir, and Tenofovir in Treatment of DNA Virus and Retrovirus Infections. *Clin Microbiol Rev* 2003, 16: 569–96.
- 86 Birkus G, Bam RA, Willkom M. Intracellular Activation of Tenofovir Alafenamide and the Effect of Viral and Host Protease Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2016, 60: 316–22.
- 87 Bam RA, Yant SR, Cihlar T. Tenofovir alafenamide is not a substrate for renal organic anion transporters (OATs) and does not exhibit OAT-dependent cytotoxicity. *Antivir Ther* 2014, 19: 687–92.
- 88 Woodward CLN, Hall AM, Williams IG. Tenofovir-associated renal and bone toxicity. *HIV Med* 2009, 10: 482–7.

- 89 *European Medicines Agency*. Vemlidy 25 mg film-coated capsules: summary of product characteristics, 2003, 1–36.
- 90 Graziewicz MA. The mitochondrial DNA polymerase as a target of oxidative damage. *Nucleic Acids Res* 2002, 30: 2817–24.
- 91 Stanley TL, Grinspoon SK. Body composition and metabolic changes in HIV-infected patients. *J Infect Dis* 2012, 205: 383–90.
- 92 McKenzie R, Fried MW, Sallie R, Conjeevaram H, Di Bisceglie AM, Park Y, Savarese B, Kleiner D, Tsokos M, Luciano C, Pruett T, Stotka JL, Straus SE. Transplacental effects of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT): tumorigenicity in mice and genotoxicity in mice and monkeys. *New England Journal of Medicine* 1995, 333: 1099-105.
- 93 Lewis W, Levine ES, Griniuviene B, vd. Fialuridine and its metabolites inhibit DNA polymerase  $\gamma$  at sites of multiple adjacent analog incorporation, decrease mtDNA abundance, and cause mitochondrial structural defects in cultured hepatoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93: 3592–7.
- 94 Igoudjil A, Begriche K, Pessayre D, Fromenty B. Mitochondrial, metabolic and genotoxic effects of antiretroviral nucleoside reverse-transcriptase inhibitors. *Antiinfect Agents Med Chem* 2006, 5: 273–92.
- 95 Olivero OA, Anderson LM, Diwan BA. Transplacental effects of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT): tumorigenicity in mice and genotoxicity in mice and monkeys. *J Natl Cancer Inst* 1997, 89: 1602–8.
- 96 González Cid M, Larripa I. Genotoxic activity of azidothymidine (AZT) in in vitro systems. *Mutat Res Toxicol* 1994, 321: 113–8.
- 97 VonTungeln LS, Williams LD, Doerge RD, Shaddock JG, McGarrity LJSM, Mittelstaedt RA, Heflich RH. Transplacental drug transfer and frequency of Tk and Hprt lymphocyte mutants and peripheral blood micronuclei in mice treated transplacentally with zidovudine and lamivudine. *Environ Mol Mutagen* 2007, 48: 258–69.
- 98 Olivero OA. Mechanisms of Genotoxicity of Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors. *Environ Mol Mutagen* 2006, 48: 215–23.
- 99 Bayram SMT. Confirmation of the Chromosome Damaging Effects of Lamivudine in In Vitro Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 2008, 49: 328–33.

- 100 Cheung RCF, Ng TB, Wong JH, Chan WY. Chitosan: An update on potential biomedical and pharmaceutical applications. *Marine Drugs* 2015, 13: 5156-86.
- 101 Kumar MNVR, Muzzarelli RAA, Muzzarelli C, Sashiwa H, Domb AJ. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem Rev* 2004, 104: 6017-84.
- 102 Üçgül İ, Aras S, Küçükçapraz DÖ. Farklı Hammadde Kaynaklarından Kitinin Saflaştırılması ve Tekstil Uygulamaları: Purification of the Chitin from Different Sources Material and Textile Applications. *J Sci Technol* 2016, 9: 46-56.
- 103 Ways TMM, Lau WM, Khutoryanskiy VV. Chitosan and its derivatives for application in mucoadhesive drug delivery systems. *Polymers (Basel)* 2018, 10: 1-37.
- 104 Bernkop-Schnürch A, Dünnhaupt S. Chitosan-based drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm* 2012, 81: 463-9.
- 105 Banerjee T, Mitra S, Kumar Singh A, Kumar Sharma R, Maitra A. Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles. *Int J Pharm* 2002, 243: 93-105.
- 106 Fan W, Yan W, Xu Z, Ni H. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2012, 90: 21-7.
- 107 Meng J, Sturgis TF, Youan BBC. Engineering tenofovir loaded chitosan nanoparticles to maximize microbicide mucoadhesion. *Eur J Pharm Sci* 2011, 44: 57-67.
- 108 Meng J, Agrahari V, Ezoulin MJ. Tenofovir Containing Thiolated Chitosan Core/Shell Nanofibers: In Vitro and in Vivo Evaluations. *Mol Pharm* 2016, 13: 4129-40.
- 109 Zhanga T, Timothy F. Sturgisb, Youan B-BC. PH-Responsive Nanoparticles Releasing Tenofovir for The Prevention of HIV Transmission. *Eur J Pharm Biopharm* 2011, 79: 526-36.
- 110 Alukda BD, Sturgis T, Youan B-BC. Formulation of Tenofovir-Loaded Functionalized Solid Lipid Nanoparticles Intended for HIV Prevention. *J Pharm Sci* 2011, 100: 3345-56.
- 111 Avinash C, Rao KP, Rama NR. Liver targeted functionalized chitosan nanoparticles for the delivery of tenofovir against hepatitis-B. *Int J PharmTech Res* 2015, 7: 668-74.

- 112 Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2007, 2: 1084–104.
- 113 Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 2000, 455: 81–95.
- 114 Şekeroğlu V. Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi  
Micronucleus test for determining genotoxic damage. *Türk Hij ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 2011, 68: 241–52.
- 115 Tice RR, Agurell E, Anderson D, vd. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000, 35: 206–21.
- 116 Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988, 175: 184–91.
- 117 Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B. *Disease Biology* 2009, 134: 112–23.
- 118 Dykens JA, Will Y. The significance of mitochondrial toxicity testing in drug development. *Drug Discov Today* 2007, 12: 777–85.
- 119 Wallace KB. Mitochondrial off targets of drug therapy. *Trends Pharmacol Sci* 2008, 29: 361–6.
- 120 Adam-Vizi V, Chinopoulos C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci* 2006, 27: 639–45.
- 121 Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003, 552: 335–44.
- 122 Parsons MJ, Green DR. Mitochondria in cell death. *Essays Biochem* 2010, 47: 99–114.
- 123 Nadanaciva S, Will Y. New Insights in Drug-Induced Mitochondrial Toxicity. *Curr Pharm Des* 2011, 17: 2100–12.
- 124 Biswas G, Adebajo OA, Freedman BD. Retrograde Ca<sup>2+</sup> signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: A novel mode of inter-organelle crosstalk. *EMBO J* 1999, 18: 522–33.
- 125 Biswas G, Guha M, Avadhani NG. Mitochondria-to-nucleus stress signaling in mammalian cells: Nature of nuclear gene targets, transcription regulation, and induced resistance to apoptosis. *Gene* 2005, 354: 132–9.



- 126 Lewis W, Day BJ, Copeland WC. Mitochondrial toxicity of NRTI antiviral drugs: An integrated cellular perspective. *Nat Rev Drug Discov* 2003, 2: 812–22.
- 127 U.S. Department of Health and Human Services. AIDSinfo. [https://aidsinfo.nih.gov/drugs/514/tenofovir-alafenamide/0/patient erişim](https://aidsinfo.nih.gov/drugs/514/tenofovir-alafenamide/0/patient) 10 Mart 2020.
- 128 Rampino A, Borgogna M, Blasi P, Bellich B, Cesàro A. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *Int J Pharm* 2013, 455: 219–28.
- 129 Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol* 2001, 21: 2–3.
- 130 Beedanagari SR, Vulimiri SV, Bhatia SP, Mahadevan B. Genotoxicity biomarkers: Molecular basis of genetic variability and susceptibility. In: Gupta R (eds). *Biomarkers in Toxicology*, 1<sup>st</sup>ed. Elsevier Inc., 2014, 729-742.
- 131 Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP, Waterhouse NJ. Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. *Cold Spring Harb Protoc* 2016, 2016: 953–7.
- 132 Sivandzade F, Bhalerao A, Cucullo L. Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. *Bio-Protocol* 2019, 9: 1–13.
- 133 Kauffman ME, Kauffman MK, Traore K. MitoSOX-Based Flow Cytometry for Detecting Mitochondrial ROS. *React Oxyg Species* 2016, 2: 361–70.
- 134 Keller A, Mohamed A, Dröse S, Brandt U, Fleming I, Brandes RP. Analysis of dichlorodihydrofluorescein and dihydrocalcein as probes for the detection of intracellular reactive oxygen species. *Free Radic Res* 2004, 38: 1257–67.
- 135 Butow RA, Avadhani NG. Mitochondrial signaling: The retrograde response. *Mol Cell* 2004, 14: 1–15.
- 136 Lustriane C, Dwivany FM, Suendo V, Reza M. Effect of chitosan and chitosan-nanoparticles on post harvest quality of banana fruits. *J Plant Biotechnol* 2018, 45: 36–44.
- 137 Mohammadpour Dounighi N, Damavandi M, Zolfagharian H, Moradi S. Preparing and characterizing chitosan nanoparticles containing hemiscorpius lepturus scorpion venom as an antigen delivery system. *Arch Razi Inst* 2012, 67: 145–53.

- 138 Zidan AS, Spinks C, Fortunak J, Habib M, Khan MA. Near-infrared investigations of novel anti-HIV tenofovir liposomes. *AAPS J* 2010, 12: 202–14.
- 139 Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat* 2004, 11: 97–107.
- 140 Tung-Hung Su C-JL. Combination therapy for chronic hepatitis C. *Gut Liver*, 2017, 31: 1–14.
- 141 Fattovich G. Natural history of hepatitis B. *J Hepatol* 2003, 39: 50–8.
- 142 Novick TK, Choi MJ, Rosenberg AZ, McMahon BA, Fine D, Atta MG. Tenofovir alafenamide nephrotoxicity in an HIV-positive patient. *Med (United States)* 2017, 96: 1-4.
- 143 Su Z, Tao Y, Zhang H, Gao B, Guo J, Hu Y. Water-soluble chitosan nanoparticles inhibit hypercholesterolemia induced by feeding a high-fat diet in male Sprague-Dawley rats. *J Nanomater* 2011,1: 1-5.
- 144 Shailender J, Ravi PR, Sirukuri RM, Dalvi A, Keerthi PO. Chitosan nanoparticles for the oral delivery of tenofovir disoproxil fumarate: formulation optimization, characterization and ex vivo and in vivo evaluation for uptake mechanism in rats. *Drug Dev Ind Pharm* 2018, 44: 1109–19.
- 145 Barathan M, Mariappan V, Shankar EM, Abdullah BJ, Goh KL, Vadivelu J. Hypericin-photodynamic therapy leads to interleukin-6 secretion by HepG2 cells and their apoptosis via recruitment of BH3 interacting-domain death agonist and caspases. *Cell Death Dis* 2013, 4: e697-10.
- 146 Russo A, Degrossi F. Molecular cytogenetics of the micronucleus: Still surprising. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 2018, 836: 36–40.
- 147 Zhang C, Spektor A, Cornils H. Chromothripsis From Dna Damage In Micronuclei. *Nature* 2015, 522: 179–84.
- 148 Bhatia A, Kumar Y. Cancer Cell Micronucleus: An Update On Clinical And Diagnostic Applications. *Apmis* 2013, 121: 569–81.
- 149 Korkmaz S, Yuksel S, Ersoy Y. The genotoxicity of Tenofovir disoproxil fumarate in HBV-infected patients. *Med Sci / Int Med J* 2018, 1-4.
- 150 Stern M, González Cid M, Larripa I, Slavutsky I. AZT-induction of micronuclei in human lymphocyte subpopulations. *Toxicol Lett* 1994, 70: 235–42.

- 151 Aruna R JG. Azidothymidine induces dose dependent increase in micronuclei formation in cultured HeLa cells. *Die Pharm* 2001, 56: 492–500.
- 152 Greene JA, Ayers KM, Tucker WE, De Miranda P. Nonclinical toxicology studies with zidovudine: Reproductive toxicity studies in rats and rabbits. *Fundam Appl Toxicol* 1996, 32: 140–7.
- 153 Araldi RP, de Melo TC, Mendes TB. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomed Pharmacother* 2015, 72: 74–82.
- 154 Pfeiffer P. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* 2000, 15: 289–302.
- 155 Kumaravel TS, Vilhar B, Faux SP, Jha AN. Comet Assay measurements: A perspective. *Cell Biol Toxicol* 2009, 25: 53–64.
- 156 Qi LF, Xu ZR, Li Y, Jiang X, Han XY. In vitro effects of chitosan nanoparticles on proliferation of human gastric carcinoma cell line MGC803 cells. *World J Gastroenterol* 2005, 11: 5136–41.
- 157 De Moraes Filho AV, De Carvalho CJS, Carneiro CC. Genotoxic and cytotoxic effects of antiretroviral combinations in mice bone marrow. *PLoS One* 2016, 11: 1–12.
- 158 De Moraes Filho AV, de Jesus Silva Carvalho C, Verçosa CJ. In vivo genotoxicity evaluation of efavirenz (EFV) and tenofovir disoproxil fumarate (TDF) alone and in their clinical combinations in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 2017, 820: 31–8.
- 159 Placidi L, De Meo M, Gosselin G. Evaluation of the mutagenic and genotoxic activities of anti-hepatitis B analogs of  $\beta$ -L-adenosine by the Ames test and the Comet assay. *Antiviral Res* 2001, 50: 139–45.
- 160 Walker UA, Setzer B, Venhoff N. Increased long-term mitochondrial toxicity in combinations of nucleoside analogue reverse-transcriptase inhibitors. *Aids* 2002, 16: 2165–73.
- 161 Walker UA, Venhoff N, Koch EC, Olschewski M, Schneide J, Setzer B. Uridine abrogates mitochondrial toxicity related to nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors in HepG2 cells. *Antivir Ther* 2003, 8: 463–70.
- 162 Höschele D. Cell culture models for the investigation of NRTI-induced mitochondrial toxicity. Relevance for the prediction of clinical toxicity. *Toxicol Vitr* 2006, 20: 535–46.

- 163 Ramamoorthy H, Abraham P, Isaac B, Selvakumar D. Mitochondrial pathway of apoptosis and necrosis contribute to tenofovir disoproxil fumarate-induced renal damage in rats. *Hum Exp Toxicol* 2019, 38: 288–302.
- 164 Smith RL, Tan JME, Jonker MJ. Beyond the polymerase- $\gamma$  theory: Production of ROS as a mode of NRTI-induced mitochondrial toxicity. *PLoS One* 2017, 12: 1–23.
- 165 Zubareva A, Shagdarova B, Varlamov V, Kashirina E, Svirshchevskaya E. Penetration and toxicity of chitosan and its derivatives. *Eur Polym J* 2017, 93: 743–9.
- 166 Lu M, Dong H, Bao D, Liu B, Liu H. Tenofovir disoproxil fumarate induces pheochromocytoma cells apoptosis. *Eur J Pharmacol* 2019, 844: 139–44.
- 167 Murphy RA, Stafford RM, Petrasovits BA, Boone MA, Valentovic MA. Establishment of HK-2 cells as a relevant model to study tenofovir-induced cytotoxicity. *Int J Mol Sci* 2017, 18: 1-15.

## **EKLER**

### **EK-1. Özgeçmiş**

#### **Kişisel Bilgiler**

**Adı Soyadı:** Selcen Sezer

**Doğum Yeri:** Sivas

**Doğum Tarihi:** 02.09.1987

**İletişim:** selcen.korkmaz@inonu.edu.tr

#### **Eğitim Bilgileri**

**Lisans:** Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2006-2011)

**Y. Lisans:** İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D. (20011-2014)

**Doktora:** İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D. (2014-2020)

**Y.L. Tezi:** Tenofovir'in Mikronükleus Sıklığına Etkileri Ve Ap1, Xrcc1 Ve Xpd DNA Tamir Genlerindeki Polimorfizm İle İlişkisinin Araştırılması

**Y.L. Tez Danışmanı:** Prof.Dr. Şengül YÜKSEL

**D. Tezi:** Tenofovir Alafenamide (Taf) İçeren Kitosan Nanopartikülü Formülasyonlarının Hazırlanması, Genotoksik Ve Mitotoksik Etkilerinin Araştırılması

**D. Tez Danışmanı:** Prof.Dr. Şengül YÜKSEL

**Yabancı Dil:** İngilizce

#### **Akademik Görevler**

İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi (2013-2020)

#### **Eserler Listesi**

##### **Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler**

1. Ekici C., Esener Z., **Korkmaz S.**, Saltürk N., Yüksel Ş., Koç A., ". A rare mosaic karyotype of 45,X/46,X,psu idic(Y)(p11.32)/46,XY with SHOX

haploinsufficiency, external male genitalia and short stature", *Sexual Development*, vol.12, pp.1-6, 2018.

2. Yüksel Ş., Taşdemir S., **Korkmaz S.**, "Protective effect of thymoquinone against cyclophosphamide-induced genotoxic damage in human lymphocytes", *Bratislava Medical Journal-Bratislavské Lekárske Listy*, vol.118, pp.208-211, 2017.

3. Yüksel Ş., **Korkmaz S.**, Kurtoğlu E.L. , Gözükara Bağ H.G., "Protective effect of extracts of Teucrium polium and Rumex crispus against cyclophosphamide-induced genotoxic damage in human lymphocytes", *Ecological Genetics*, vol.17, pp.93-100, 2019.

4. Yüksel Ş., Savaci S.S., Ekici C., Kurtoğlu E.L., **Korkmaz S.**, Yeşilada E., ". Prevalence of Pericentric Inversion of Chromosome 9 in Malatya Province and Environs and Its Relation with reproductive efficiency", *Eurasian Journal Of Medicine*, vol.2, pp.40-42, 2018.

5. **Korkmaz S.**, Yüksel Ş., Ersoy Y., "The genotoxicity of Tenofovir disoproxil fumarate in HBV-infected patients", *Medicine Science International Medical Journal*, vol.7, pp.600-603, 2018.

#### **Hakemli Kongre / Sempozyumların Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar**

1. Yüksel Ş., Taşdemir S., **Korkmaz S.**, "Protective effect of thymoquinone against cyclophosphamide-induced genotoxic damage in human lymphocytes", 4th International Symposium of Medicinal and aromatic plants, İzmir, Türkiye, 2-4 Ekim 2018, pp.1-1.

2. Ekici C., **Korkmaz S.**, Yüksel Ş., Koç A., "Cytogenetic and Molecular Cytogenetic Analyses of a Case with 47, X, idic (Y) (q11.22)x2, Associated with Neuromotor Delay and Dysmorphology", 13th National Congress of Medical Genetics with International Participation, Antalya, Türkiye, 7-11 Kasım 2018, ss.99-99.

3. Yüksel Ş., **Korkmaz S.**, Kurtoğlu E.L., "Protective effect of extracts of Teucrium polium and Rumex crispus against cyclophosphamide-induced genotoxic damage in human lymphocytes", 4th International Symposium of Medicinal and aromatic plants, İzmir, Türkiye, 2-4 Ekim 2018, pp.2-2.

4. Yüksel Ş., **Korkmaz S.**, Savaci S.S., Kurtoğlu E.L., "Pediatrik hastalarda sitogenetik sonuçların on yıllık değerlendirmesi", XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Muğla, Türkiye, 26-29 Ekim 2017, ss.271-271.

5. Yüksel Ş., Savaci S.S., Kurtoğlu E.L., **Korkmaz S.**, "Tekrarlayan gebelik kayıpları olan çiftlerde gözlenen translokasyonların on yıllık değerlendirmesi", XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Muğla, Türkiye, 26-29 Ekim 2017, ss.270-270.

6. Yüksel Ş., Yeşilada E., Savaci S.S., **Korkmaz S.**, Gülbay G., "Prenatal tanıda kantitatif floresan polimeraz zincir reaksiyonu ile konvansiyonel sitogenetik bulgularının restrospektif değerlendirmesi", XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Muğla, Türkiye, 26-29 Ekim 2017, ss.272-272.

7. Ekici C., Kurtoğlu E.L., Savaci S.S., Yüksel Ş., **Korkmaz S.**, Yeşilada E., "Prevalence of Klinefelter Syndrome in Malatya between 2014-2015", Medical Genetics and Clinical Applications Congress, Kayseri, Türkiye, 11-13 Şubat 2016, ss.1-1.

8. Ekici C., Kurtoğlu E.L., Yüksel Ş., Savaci S.S., **Korkmaz S.**, Yeşilada E., "Distribution of pericentric inversion chromosome 9 and association with certain diseases in city of Malatya and around", Medical Genetics and Clinical Applications Congress, Kayseri, Türkiye, 11-13 Şubat 2016, ss.2-2.

9. **Korkmaz S.**, Yüksel Ş., Yeşilada E., Ersoy Y., "Tenofovir'in genotoksisitesi ve DNA tamir gen polimorfizmleri ile ilişkisi", XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Muğla, Türkiye, 27-30 Ekim 2015, ss.PS1011-PS1011.

#### **Projelerde Yaptığı Görevler**

1. Tenofovir Alafenamide (TAF) İçeren Kitosan Nanopartikülü Formülasyonlarının Hazırlanması, Genotoksik ve Mitotoksik Etkilerinin Araştırılması", BAP Araştırma Projesi, TCD-2018-1356, Araştırmacı, Devam Ediyor.

2. Tenofovir'in Mikronükleus Sıklığına Etkileri ve APE1, XRCC1 ve XPD DNA Tamir Genlerindeki Polimorfizm ile İlişkisinin Araştırılması", BAP Y.Lisans, 2012-81, Araştırmacı, 2016.

## EK-2. Etik Kurul Onayı

### KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Tenofovir Alafenamide TAF İçeren Kitosan Nanopartikülü Formülasyonlarının Hazırlanması, Genotoksik ve Mitotoksik Etkilerinin Araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2017/99

ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	MALATYA KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İnönü Üniversitesi Merkez Kampüsü, 44280, Malatya, Türkiye
	TELEFON	+90 422 341 06 60 / 1219
	FAKS	+90 422 341 00 36
	E-POSTA	inu.dhkek@inonu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Şengül YÜKSEL			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	MALATYA			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>			
İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma	<input type="checkbox"/>				
Diğer ise belirtiniz					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanı  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Saim YOĞLU  
İmza:

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.



KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Tenofovir Alafenamide TAF İçeren Kitosan Nanopartikülü Formülasyonlarının Hazırlanması, Genotoksik ve Mitotoksik Etkilerinin Araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2017/99

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	DİL
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ		
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BİRCÖRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	ILAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
	DİĞER:	<input type="checkbox"/>		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2017/99	Tarih:12.12.2018		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekeceği, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplanmış olan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Saim YOLOĞLU

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Ünvan	Oran	Araştırma ile ilişkisi	Katılım *	İmza		
Prof. Dr. Saim YOLOĞLU	Biyoistatistik	İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Metin GENÇ	Halk Sağlığı	İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. İbrahim ŞAHİN	İç Hastalıkları	İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Sedat YILDIZ	Fizyoloji	İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Banu ÖTLÜ	Mikrobiyoloji	İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Mahmut GÖL	Histoloji	İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Cemal AYDIN	Genel Cerrahi	İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	KATILMADI

Etik Kurul Başkanı  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Saim YOLOĞLU  
İmza:

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Tenofovir Alafenamide TAF İçeren Kitosan Nanopartiküllü Formülasyonlarının Hazırlanması, Genotoksik ve Mitotoksik Etkilerinin Araştırılması								
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2017/99								
Prof. Dr. Hakan HARPUTLUOĞLU	Onkoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Yılmaz TABER	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Seda TAŞDEMİR	Tıbbi Farmakoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	KATILMADI
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KARATAŞ	Tıp Tarihi ve Etik	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Sedat AKBAŞ	Anesteziyoloji ve Rea.	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Necla DENİZ	Eczacı	Serbest Eczacı	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	KATILMADI
Abdullah DEMİREL	Hukuk	Serbest Avukat	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	KATILMADI
Hasan KONAN	Sivil Öye	MSD Ltd. Şti.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanı  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Saim YOLOĞLU  
İmza:

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.