

## DERLEMELER

# DENEYSEL TOKSİKOLOJİDE TOKSİSİTE TESTLERİ VE TEST SONUÇLARININ ÖNEMİ

Dr. Şahan SAYGI (\*)

Gülhane Tıp Dergisi 45 (3) : 291 - 298 (2003)

### ÖZET

*Tüm ilaçlar, temizlik ve kozmetik maddeleri, pestisitler, besin katkı maddeleri ve sanayide kullanıldığında insanların maruz kalabileceği kimyasal maddeler, kullanıma sunulmadan önce toksik potansiyelleri yönünden değerlendirilir. Bu maddelerin kullanım amaçları, maruziyet yolları ve süreleri göz önüne alınarak toksisite testleri dizayn edilir. Muhtemel toksik etkiler in vivo koşullarda deney hayvanlarında veya in vitro koşullarda hücre kültürlerinde araştırılır. Elde edilen test sonuçlarının insanlara uyarlanması çok çeşitli faktörler nedeniyle her zaman mümkün olamamaktadır. Bu makalede, toksisite testlerinde deney hayvanları ve insan doku kültürlerinin deneysel toksikolojideki önemi değerlendirilmiştir.*

**Anahtar Kelimeler:** Toksikite, in Vivo Testler, in Vitro Testler, İnsan Hücre Kültürleri.

### SUMMARY

#### **Toxicity Testings and the Importance of Test Results in Experimental Toxicology.**

*All the drugs, household cleaning substances, cosmetics, pesticides, food additives and the industrial chemicals those might have harmful effects to human, are evaluated for their possible toxic potentials before public usage. Toxicity tests are designated for those chemicals with the consideration of their target usage, exposure ways, and the duration of exposures. Their possible toxic effects are investigated via in vivo or in vitro tests by using laboratory animals or cell lines. Obtained test results may not be adaptable to humans because of several factors. In this review article, the importance of laboratory animals and human cell lines in experimental toxicology have been evaluated.*

**Key Words:** Toxicity, in Vivo Tests, in Vitro Tests, Human Cell Lines.

### GİRİŞ

Toksikoloji zehir bilimidir. Zehir ise, canlı organizmada zararlı etki gösteren herhangi bir madde olarak tanımlanabilir. Uygun yol ve dozda alınmayan her madde zehir etkisi yapabilir. Bu etki bir yapı değişik-

liği şeklinde olabileceği gibi biyokimyasal lezyon şeklinde de olabilir. Ortaya çıkan etki, reversibl olabileceği gibi hücre ölümü şeklinde de olabilir (1). Canlı hücreler üzerinde kimyasal maddelere bağlı önemli yapı ve fonksiyon değişikliklerinin saptanması ve yorumlanması amacıyla deneysel toksikolojik çalışmalar yapılır (2).

Toksisite testleri plânlanırken ortaya çıkan ürünlerin çözünübilirlik özellikleri ve toksik aktivite kazanım kazanmadıklarının göz önüne alınması gerekir. Önemli toksik etkileri olan kimyasal maddeler, genellikle biyolojik sistemin sıvı fazında çözünebilir özellik taşırlar. Bu çözünübilirlik, o maddenin hücreler tarafından alınmasını sağlar. Her ne kadar biyolojik sistemlerin sıvı fazının büyük bir porsiyonunu su oluştursa da, bu sıvı faz içinde protein, yağ veya benzeri materyal ile pek çok inorganik iyonlar da bulunur. Bu nedenle hücre sıvısının yanında proteinler ve lipidler de kimyasal maddelerin taşınmasında önemli rol oynarlar. Gerçekten de, ilaçların çoğu zayıf organik baz veya asit özelliğinde olup, fizyolojik ortamdaki pH durumuna göre yağda veya suda çözünübilirlik (lipofil, hidrofil) özelliği taşırlar. Lipofil maddelerin biyotransformasyonu sonunda ortaya çıkan ürünler ise, genelde ana moleküle göre daha hidrofil özellik kazanırlar (3).

Benzer metabolik yolağa sahip hücreler, maruz kaldığı kimyasal maddeden genellikle benzer şekilde etkilenirler. Bir kimyasal maddenin biyolojik etkisinin ortaya çıkabilmesi için, spesifik reseptör alanlarına fizikokimyasal reaksiyonlar ile bağlanabilmesi gerekir. Bu bağlanma özelliği, o maddenin moleküler yapısı ile ilişkilidir. Yapı aktivite ilişkisi diye adlandırılabilen bu kavrama göre kimyasal maddelerin molekülleri üzerindeki minör değişiklikler biyolojik cevaplarda büyük farklılıklara, veya moleküler benzerliklerin benzer etkiler ortaya çıkarmasına neden olabilir. Örneğin, amfetaminin optik izomeri olan D-amfetamin, santral sinir sisteminde L-izomerine göre üç ile dört kat daha potent etki gösterir. Buna karşılık L-izomeri kalp üzerine, D-izomerine göre iki kat daha potent etkiye sahiptir (2).

### TOKSİSİTE TESTLERİNİN SINIFLANDIRILMASI

Toksisite testleri, sadece kimyasal maddelerin

(\*) GATA Analitik Toksikoloji BD.

Reprint Request: Dr. Şahan SAYGI, GATA Analitik Toksikoloji BD, 06018 Etlik - ANKARA

Kabul Tarihi: 03.07.2003

canlı organizmalar üzerindeki zararlı etkilerini açıklamak için yapılmaz. Bu maddelerin toksik etkilerinin görülmeyeceği doz, değerlerini saptamak için yapılır. Eğer, uzun süreli madde maruziyetine bağlı toksik etkiler araştırılacak ise, deneyin yapıldığı zaman periyodu içinde de aynı özellikte maddelerin ve koşulların uygulanması gerekir. Beklenen toksik etkinin görülmesine yönelik testlerde, bu etkiyi oluşturduğu bilinen bir kimyasal maddenin, pozitif kontrol grubuna uygulanması ve deneyin sağlıklı işlediğinin test edilmesi gerekir (4,5). Tüm ilaçlar, tarımsal ve zirai amaçlı maddeler, temizlik maddeleri, bazı kozmetikler vs. kullanıma sunulmadan önce toksisite testlerinden geçirilirler (1,6,7,8). Toksikite testleri, test süresinin uzunluğuna göre sınıflandırılabilirler.

Bunlar;

1. Akut toksisite testleri,
2. Subakut toksisite testleri,
3. Subkronik toksisite testleri,
4. Kronik toksisite testleri,
5. Özel toksisite testleridir.

#### **Akut Toksikite Testleri**

Bir kimyasal maddenin toksisite potansiyelini öğrenmek için akut toksisite testlerini yapmak zorunluluğu vardır. En yaygın kullanılan akut toksisite testi letalite testidir. Bu testin amacı, bir kimyasal maddeye maruziyetin sonucu ortaya çıkabilecek toksik semptomları, beyin, böbrek, karaciğer gibi belli başlı organların etkileniş derecesi veya öldürücü doz (letalite) değerini saptamaktır. Letal doz değeri, o maddenin ne kadar güvenli kullanılabileceğinin de bir göstergesi olarak kabul edilir. Test genellikle fare veya sıçan gibi temini kolay ve maliyeti düşük deney hayvanları üzerinde yapılır. Bu hayvanlardan alınacak sonuçlara göre, test kobay veya tavşan üzerinde de tekrarlanabilir (9). Testte kullanılacak deney hayvanlarının oldukça sağlıklı olmaları, test işlemlerinden önce laboratuvar ortamında fare ve sıçanların 1, köpeklerin ise 3-4 hafta gözetim altında tutulması gerekir (2,5,10).

Bir defada verildiğinde test grubundaki hayvanların % 50'sini öldüren doza, o maddenin letal dozu (LD50) denir. Kimyasal maddelerin kısa süreli maruziyetine bağlı akut toksik etkilerini değerlendirmek açısından LD50 değeri önemlidir. LD değeri verilirken kullanılan deney hayvanı ve maruziyet yolunun da belirtilmesi gerekir. Örneğin, evlerde de kullanılan bir pestisid maddesi olan diklorvos'un sıçanlarda oral, dermal ve intraperitoneal LD50 değerleri

sırasıyla 50, 75 ve 15 mg/kg'dır. Aynı maddenin oral LD50 değerleri tavşan, güvercin, sıçan, fare, köpek ve domuzda sırasıyla 10, 23,7, 56, 61, 100 ve 157 mg/kg'dır. Bir maddenin LD50 değeri ne kadar düşükse, insanlar için toksisitesi o denli büyük demektir (7). Deney gruplarında 1980'li yıllarda 80-100 hayvan kullanılırken, günümüzde in vitro tarama test sonuçları baz alınarak 6-10 sıçan veya tavşanın yeterli olacağı kabul edilmektedir. Deneysel letalite verileri, potansiyel kemoterapötik ajanların taranmasında veya pestisitlerin etkinlik derecesinin tayininde, ilaçların tedavi indeksleri (TI = LD50 / ED50), güvenlik derecesi [Margin Of Safety (MOS) = LD1 / ED99] ile kronisite faktörü (CF= Akut LD50 / 90 günlük LD50) hesaplamalarında kullanılmaktadır (ED: efektif veya etkin doz) (1,8,11). Kimyasal maddelerin hava veya sudaki öldürücü doz değerleri ise, letal konsantrasyon (LC50) ile ifade edilir ve belli zaman periyodunda (genellikle hava için 1-4 saat) maruz bırakıldığında deney hayvanlarının % 50'sini öldüren dozu ifade eder. Belli bir zaman periyodunda, solunum yolu ile verildiğinde deney hayvanlarının yarısını öldüren madde miktarı ise LCt50 ile ifade edilir (7).

Deney hayvanları ile yapılan akut toksisite testlerinden elde edilen sonuçlar, insanlarda ortaya çıkabilecek riskleri öngörmeye her zaman güvenle kullanılabilir veriler olamamaktadır. Zira, aynı maddenin bir türdeki LD50 değeri bir başka türde on kat daha yüksek olabilmektedir. Örneğin, metilfloroasetat'ın LD50 değeri köpek için 0.15 mg/kg, maymunda ise 11.00 mg/kg'dır (2). Bu farklılık birbirine çok yakın türler arasında da görülebilmektedir. Parasetamol'ün LD50 değeri, fare ve hamster için 250-400 mg/kg, ölüm nedeni karaciğer harabiyeti iken, sıçanlarda 1000 mg/kg ve karaciğere etkisi yoktur. Tiyoüre'nin LD50 değeri, Hopkins sıçanlarda 4 mg/kg, Norwegian sıçanlarda ise 1340 mg/kg'dır. Deney hayvanlarındaki tür farkının yanında yaş, cinsiyet, besin, sosyal ortam, sıcaklık ve nem gibi fiziksel ortamlar da LD50 değerini değiştirebilmektedir. Sayılan bu faktörler nedeniyle, laboratuvarlar arasında birbirinden 8-14 katı farklı sonuçlar alınabilmektedir. O nedenle, deneysel edilen LD50 sonuçları insanlara uyarlanırken, güvenlik faktörünün 1.000 hatta 10.000 olarak seçilmesi önerilmektedir. Kısaca, LD50 test sonuçlarının insanlarda akut zehirlenmelerin semptomlarının öngörülmesinde veya letal dozunun saptanmasında kullanım güvenilirliği tartışmalıdır (3) (Tablo 1).

**TABLO-I**  
**Bazı Kimyasal Maddelerin İnsan ve Kemirgenlerdeki Letal Doz Değerleri**

Madde	İnsan için letal doz	Sıçan LD50	Fare LD50	Tavşan LD50
Lindan	840 mg/kg	125 mg/kg	-	130 mg/kg
Kafein	192 mg/kg	192 mg/kg	620 mg/kg	-
Borik asid	640 mg/kg	2660 mg/kg	3450 mg/kg	-
Amital	43 mg/kg	560 mg/kg	-	575 mg/kg

**TABLO-II**  
**Hodge ve Sterner Skalasına Göre Toksisitenin Derecelendirilmesi**

	Oral LD50	Inhalasyon LC50	Dermal LD50	İnsanlar için
Toksisite derecesi	mg/kg (sıçan, tek doz)	ppm (sıçan, 4 saat maruziyet)	mg/kg (tavşan, deriye tek uygulama)	muhtemel öldürücü doz
1 Son derece toksik	<1	<10	<5	Bir damla veya
2 Şiddetli toksik	1-50	10-100	5-43	4 ml
3 Orta derecede toksik	50-500	100-1000	44-340	30 ml
4 Az toksik	500-5000	1000-10.000	350-2810	600 ml
5 Pratik olarak toksik değil	5000- 15.000	10.000- 100.000	2820-22.590	1 litre
6 Rölatif olarak zararsız	>15.000	>100.000	>22.600	1 litre

Deney hayvanlarından elde edilen LD50 ve LC50 sonuçlarına göre, kimyasal maddelerin toksisite derecelerini ifade etmede yaygın olarak kullanılan skala, Tablo 2'de verilmiş olan "Hodge ve Sterner Skalası"dır (7).

Akut toksisite testine alınacak kimyasal maddenin doz aralığını belirlerken, az sayıda sıçan veya fare üzerinde maddenin molekül yapısına bakarak muhtemel yapı aktivite ilişkisinden veya önceki literatür verilerinden faydalanarak, birbirinin logaritmik katlarında üç doz değeri seçilir. Deney grubu hayvanlara, kimyasal maddenin tek dozda, iki ayrı yoldan verilmesi ve bu yollardan birinin o maddenin insanların muhtemel maruz kalacağı yol olması önerilir. Kimyasal maddenin kullanım amacı topikal ise, deney hayvanları olarak tavşan seçilir ve deri üzerindeki etkiler değerlendirilir. Akut toksisite testlerinde hayvanlarda ortaya çıkacak etkiler 24 saat süre ile gözlemlenir. Daha sonra gecikmiş toksik etkilerin ortaya çıkabileceği göz önüne alınarak hayvanlar 14 gün boyunca izlemeye devam edilir. Elde edilen veriler esas alınarak final denemeye geçilir. Bu aşamada her bir gruba aynı yaş, kilo ve cinsiyetten en az 10 deney hayvanı alınır. Aynı şekilde hayvanlar 1-14 gün boyunca gözlemlenir, ölen hayvan ve semptomlar düzenli olarak kaydedilir. Bu periyodun sonunda ölmemiş hayvanlar sakrifiye edilerek organları histopatolojik incelemeye tâbi tutularak akut toksik etkilerin doku

düzeylerinde değerlendirilmesi sağlanır (2,5,7). Kimyasal maddenin LD50 doz değerini saptamak için ise, bir önceki deneyde %10-90 mortaliteye neden olan aralıktan üç farklı doz, her bir deney grubu hayvana verilerek ölen hayvan sayısı ile doz değerleri grafiğe geçirilir, istatistiksel hesaplama yöntemleri ile LD50 değeri bulunur (7).

Sıçan ve farelerde değerlendirilmesi gereken en önemli akut toksik semptomlar; lokomotor aktivite, garip davranışlar, anormal ses çıkarma, ağrıya duyarlılık, sese duyarlılık, dokunmaya duyarlılık, sosyal etkileşim, anormal kuyruk pozisyonları, saldırgan davranışlar, konvülziyonlar, ataksi, kas tonüsü, paraliz, somatik cevaplar, postural refleksler, yorgunluk belirtileri, titremeler, ekzoftalmi, göz irritasyonu, korneal refleksler, göz yaşarması, nistagmus, pupil refleksinin ışığa duyarlılığı, fotofobi, pupil genişliği, defekasyon, salivasyon, ürinyasyon, apne, dispne, solunum fonksiyonları, kardiyak fonksiyonlar, burun akıntısı, vücut sıcaklığı, siyanoz, piloereksiyon ve ölüm gibi gözlem bulgularıdır.

#### Subakut Toksisite Testleri

Kimyasal madde, deney hayvanlarına her gün bir veya daha fazla tekrarlanan şekilde verilir. Bu amaçla kimyasal madde besin veya içme suyuna ilâve edilir. Deney hayvanı olarak tercihen kemirgenler (sıçan, tavşan), bunun yanında kemirgen olmayan türler

(köpek) de kullanılabilir. Test süresi 1-3 hafta arasındadır. Üç farklı doz seviyesi iki farklı hayvan türü üzerinde denir. Dozların saptanmasında daha önce bulunmuş olan LD50 değerinden yararlanılmalıdır. Bu şekilde seçilecek üç farklı dozun deney hayvanları için emniyetli olduğu değerler saptanabilir. Uygulama yolu olarak o maddenin günlük hayatta muhtemel kullanım yolu seçilir. Deney hayvanlarının sağlık durumları, deneyde kullanılan hayvanlarının vücut ağırlıkları haftalık kaydedilerek, Haftalık komple fiziksel muayeneleri yapılarak, hasta hayvanların biyokimyasal kan, idrar ve diğer fonksiyon testleri yapılarak kayda geçirilir. Ölen hayvanların tüm organlarına histopatolojik incelemeler yapılarak bulgular kaydedilir (2,12). Bu test ile toksisitede hedef organlar saptanabilmekte, subkronik ve kronik toksisite testleri için ön veriler oluşturulmaktadır.

### Subkronik Toksikite Testleri

Sıçan ve köpek gibi deney hayvanlarının tercih edildiği bu testte, test süresi üç aydır. Kimyasal maddelerin verilmiş yolu genellikle oraldır. Madde özelliğine göre su içinde, besine karıştırılmış veya oral gavaj şeklinde verilebilir. Bu test ile kimyasal maddenin karaciğer, böbrekler, beyin ve idrar kesesi gibi pek çok organlar üzerindeki genel toksisitesi hakkında bilgi edinmek mümkün olur. Deney süresince hayvanların çok iyi gözlemlenmesi ve deney sonunda da detaylı histopatolojik incelemeler sonunda, günlük hayatta kullanılacak besin haricindeki maddelerin final toksisitesi subkronik testler ile tamamlanabilmektedir. Subakut ve subkronik toksisite testleri ile günlük hayatta maruz kalacağımız maddelerin sağlığımız üzerindeki potansiyel toksisite risklerini de saptamak mümkündür. Risk tayini, kimyasal maddenin tanımlanması, doz cevap ilişkisi, maruziyet tayini ve risk karakterizasyonu olmak üzere 4 basamakta gerçekleştirilir (1). Subakut ve subkronik toksisite testlerinde doz cevap ilişkisinden yararlanılarak gözlemlenen en düşük etki düzeyi (LOEL) veya en düşük advers etki düzeyi (LOAEL), hiçbir advers etkinin gözlenmediği en yüksek düzey (NOEL veya NOAEL) hesaplanabilir (13). Ancak, deney hayvanlarında elde edilen bu verileri insanlara uyarlamak oldukça zordur. Kronik toksisite testlerinden elde edilen veriler ile toplumun kimyasal maddeye maruziyeti sonucu hiçbir sağlık sorunu yaşamayacağı konsantrasyon değerini (BMC: Benchmark Concentration), günlük tolere edilebilir maruziyet derecesini (TDI: Tolerable Daily Intake= NOAEL x 0.5/UF) saptamak da mümkündür (UF:Belirsizlik faktörü: Uncertainty Factor) (11,14). Yine bu testlerden faydalanılarak, insan popülasyonunda hassas bireyler de dahil, kişilerin ömür boyu

maddeye maruziyetinde hiçbir zararlı etki riskinin görülmeyeceği doz değeri RfC veya RfD (Reference Concentration / Reference Dose) saptamak da mümkündür. Son yıllarda RfC saptanmasında NOAEL yerine BMC'den yararlanılmaktadır. BMC değeri NOAEL ile LOAEL arasında bir değer olarak da kabul edilmektedir (15,16).

### Kronik Toksikite Testleri

Uzun dönemde kimyasal madde maruziyetinin neden olabileceği toksik etkilerin saptanması için dizayn edilen toksisite testidir. Eğer, söz konusu kimyasal maddenin insanlar tarafından ömür boyunca kullanılması bekleniyorsa, deneysel kronik toksisite testinin süresi deneyde kullanılan hayvanın tüm ömrünce, örneğin, bu süre sıçanlarda yaklaşık iki yıl, köpekte ise beş ile yedi yıl kadar olabilir (2). İki yıllık kronik karsinojenite testinin maliyetinin oral uygulamalarda iki milyon dolar, inhalasyon uygulamalarda da üç milyon dolar olduğu göz önüne alınacak olursa, bu sürenin hem ekonomik ve hem de hayvan etiği açısından kısaltılmasını zorunlu hale getirmiştir (8). Bu nedenle kemirgenler ile yapılacak toksisite testlerinin 6 ay, kemirgen olmayan hayvanlar ile yapılacak testlerin de 9 aylık periyotta olması görüşü kabul görmektedir (17). Deney hayvanlarına test edilecek kimyasal madde günlük olarak belli dozlarda besine veya içme sularına karıştırılarak ağızdan, solvent, krem veya pomad şeklinde deriden, gaz halinde solunum havasına karıştırılarak veya enjeksiyon şeklinde verilebilir. Testte uygulanan doz, maksimum tolere edilebilir doz (MTD) olarak ifade edilir. MTD'nin deneyde kullanılan hayvanların yaşam süresini kısaltıcı olmaması, bariz toksisite semptomları ortaya çıkarmaması ve %10'dan fazla kilo kaybına neden olmaması esastır (8). Test süresinin sonunda hayvanlar sakrifiye edilerek histopatolojik incelemeler yapılır. Hayvanların sağlık durumları haftalık ağırlık kontrolleri ve fiziki muayeneleri yapılarak, 3-6 aylık periyotlarda da biyokimyasal ve hematolojik kan, idrar ve diğer fonksiyon testleri yapılarak kayda geçirilir. Test süresinin sonunda kalan hayvanlar sakrifiye edilerek komple histopatolojik incelemelerden geçirilir (2,4).

### Özel Toksikite Testleri

Kimyasal maddelerin kısa, orta veya uzun dönemde maruziyetine bağlı toksik etkilerini değerlendirmede kullanılan, yukarıdaki testler dışında özel toksisite test teknikleri de vardır. Bunlar amaçlarına göre; diğer kimyasal madde ile etkileşim, üreme üzerine etki, teratojenite, karsinojenite, mutajenite testi, akut dermal ve göz iritasyon testleri, deri duyarlılık testleri ve davranış üzerine etki testleridir (18).

## DENEY HAYVANLARININ İLÂÇ GELİŞTİRMEDEKİ YERİ VE ÖNEMİ

Deney hayvanları, yeni geliştirilen bir ilâcın etkinliğinin araştırılmasında, o ilâcın spesifik bir hastalıkta kullanım etkinliğinin saptanması ve hastada güvenli kullanım derecesinin ortaya konulması amacıyla kullanılırlar (19). Bu amaçla, deney hayvanlarında hastalık oluşturulur ve yeni sentezlenmiş bir madde, o hayvanlara verilerek etkili olup olmadığı araştırılır. Bunun yanında, yeni keşfedilen bir ilâç klinik kullanıma sunulmadan önce, deney hayvanları kullanılarak kısa ve uzun süreli toksisite testlerine alınırlar. Söz konusu maddenin, tedavi edici etkisinin ortaya konulabilmesi için, öncelikle o hastalık modelinin bir takım kimyasal maddeler verilerek deney hayvanlarında oluşturulması gerekir (6). Örneğin, sıçanların eklemelerine zararlı olduğu bilinen kimyasal maddeler enjekte edilerek artrit oluşturulur (20,21), immün yetmezliği olan farelere kanser yapıcı kimyasallar verilerek veya insan tümör hücreleri implante edilerek tümör oluşturulur (3), hayvanlar, herpes, hepatit veya HIV virüsü ile enfekte edilirler (22), kimyasal maddeler verilerek hayvanların pankreasları tahrip edilerek diyabet benzeri hastalıklar oluşturulur. Oluşturulan bu deneysel hastalık modelleri ise, hayvanlarda çok ciddi acılara neden olurlar. Hayvanlar ağrı, kramplar, kusma, diyare, paraliz, solunum güçlüğü ve mide kanaması gibi toksik etkilerden acı çekerler (23,24).

Yapılan tüm klinik öncesi ve klinik testlere rağmen ilâçların insanlarda kullanım emniyeti tam olarak belirlenememektedir. Zira ilâcın yaygın kullanımı sonunda bir takım ciddi yan etkilerin ve hatta ölümlerle sonuçlanan olguların olabildiği çeşitli örneklerde belirtilmektedir (25). İzoprenalin astımda inhaler şeklinde kullanılan bir ilâç iken, 3500 kişinin kalp yetmezliğinden ölümüne neden olmuştur (26). Antidiyareik bir ilâç olan clinoquinol, en az 10.000 kişide yürüme güçlüğü, felç veya subakut myelo-optik nöropatiye neden olması nedeniyle Japonya'da kullanımdan kalkmıştır (27). Benoxaprofen artrit için kullanılan bir ilâç olup, İngiltere'de karaciğer harabiyetine bağlı 61 ölüme sebep olması sonucu yasaklanmıştır (28,29). Yine artrit ilâçları olan zomax, flosint, alclofenac, ibufenac ve osmosin, ciddi yan etkilere ve ölümlere neden olmaları sonucu piyasadan kaldırılmışlardır. Antidepresan ilâç zimelidine, İngiltere'de 7 tanesi ölümlerle sonuçlanan yan etkileri nedeniyle yasaklanmış bulunmaktadır (30). Bir kalp ilâcı olan practolol, aynı ülkede körlük dahil görme problemlerine ve 23 kişinin ölümüne neden olmuş, 1000 kişi de gördükleri zarar nedeniyle ilâç firmasına karşı tazminat davası açmışlardır (31). Zayıflama ilâcı olan dexfenfluramine ve fenfluramine'in ciddi pulmoner hipertansiyon ve

kalp rahatsızlıklarına ve hatta ölümlere neden olduğu, ancak bu etkilerin deney hayvanı modelleri ile gösterilemediği ifade edilmektedir (32). Saman nezlesinde kullanılan ilâç terfenadin'in İngiltere'de 33 kişide ciddi kardiyak aritmi ve 14 ölüme neden olması nedeniyle kullanımdan kaldırıldığı ifade edilmektedir (33). Tarihte en önemli ilâç faciası da talidomit'in teratojenik etkisinden kaynaklanan doğum anomalileridir. 1962 Yılına kadar talidomit kullanımına bağlı Avrupa, Kanada ve İngiltere'de toplam 7 bin, Amerika BD'de ise 17 adet doğum defektli bebek saptanmıştır (8). Tüm bunların nedeni, canlı türlerinin bir kimyasal maddeye karşı farklı mekanizmalar ile cevap verebilmesidir.

## ALTERNATİF TOKSİSİTE TESTLERİ

Herhangi bir ilâcın belli organ veya dokular üzerine zararlı etkileri, kanserojen, mutajen veya teratojen etkilerinin olup olmadığını saptamaya yönelik alternatif testler geliştirilmektedir (23,34,35,36,37). Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü kanser araştırmalarında fare kullanımından vazgeçerek, 60 çeşit insan, kanser hücre kültürü üzerinde bağırsak, akciğer, melanoma, böbrek, beyin ve kan kanseri için haftada 300 yeni kimyasal maddenin antikanser etkinliğini araştırabilmekte, hücre kültürlerinden alınan sonuçların daha gerçekçi ve daha spesifik olduğu ifade edilmektedir (24). AIDS tedavisi ile ilgili ilâç araştırmalarında eskiden immün sistemi çöktürmüş şempanze, maymun, kedi ve fareler kullanılırken, HIV virüsünün hücre kültürlerinde geliştirilmesi üzerine, artık bu tür araştırmalar insan hücre kültürleri üzerinde sürdürülmeye başlanmıştır. Ayrıca hepatit ve herpes gibi virüslere karşı test edilen ilâçlar da hücre kültürleri ile denenebilmektedirler (38). Epilepsi veya beyin tümörlü hastaların ameliyatlarından elde edilen beyin kesitleri ile in vitro koşullarda yeni ilâçların antiepileptik etkileri saptanmaktadır (39,40,41). İnsan snoviyal membran ve umbilikal kord hücre kültürleri de, artrit ve diğer enflamasyonlar için etkili olabilecek ilâç araştırmalarında kullanılabilir (42).

### Hücre kültürlerinin kullanım alanları

- İlâç metabolizmasından sorumlu enzim sisteminin saptanması,
- İlâç metabolize edici enzim aktivitesini etkileyebilecek faktörlerin saptanması,
- İlâç metabolitleri ve bu maddelerin toksik etki potansiyellerinin saptanması,
- İlâcın metabolik yıkılma süresinin saptanması,
- İlâçların birbirleri üzerine olan etkileşim derecesinin saptanması,

f. İlaç metabolizmasında genetik, yaş, çevre ve hastalık faktörlerinin araştırılması,

g. Bireylerin ilaç allerjisi potansiyeline sahip olup olmadığının öngörülmesi (43).

Yukarıda sayılan ilaç metabolizmasıyla ilgili hususları araştırmada insan karaciğer hücre kültürleri son derece önemli bir kaynaktır (44).

#### **İnsan hücre kültürlerinin toksisite araştırmalarındaki avantajları**

- Tür farklılığını ortadan kaldırır,
- Kimyasal maddelerin muhtemel toksik etki yapacağı düşünülen deri, karaciğer gibi spesifik doku hücreleri üzerinde araştırma yapılmasını sağlar,
- Toksisite mekanizmalarının hücreler üzerinde aydınlatılmasına imkân verir,
- Deneyde kullanılan hayvanların acı çekmesi veya ölmesi söz konusu değildir.

#### **İnsan hücre kültürlerinin toksisite araştırmalarındaki dezavantajları**

- Tekli sistemdir. Multifaktöriyel ilaç metabolizması için uygun değildir.
- Teknolojik alt yapı maliyeti ve deneyimi gerektirir.
- İn vitro ortamda hücrelerin yaşam siklusu kısadır.
- Enzim stabilitesi kısıtlıdır.
- Kültür ortamının penetrasyon kabiliyeti kısıtlıdır.
- Ko-faktörlere gereksinim duyar (45).

Günümüzde 2300'den fazla insan ve hayvan hücre kültür modeli mevcuttur. Hücre kültürleri ticari olarak firmalardan sağlanabildiği gibi, araştırmacıların kendi özel hücre kültürlerini gönüllülerden veya cerrahi operasyonlardan çıkacak doku örneklerinden yararlanarak oluşturmaları da mümkündür (10,43,46,47).

### **SONUÇ**

İlaçlar başta olmak üzere, yeni geliştirilen ve günlük hayatta yaygın olarak kullanılacak kimyasal maddelerin insanlarda emniyetli kullanımı için toksisite testlerinin önemi büyüktür. İnsan hücre kültürleri kullanılarak ilaçların toksik etkileri araştırılabilir. Bunun da ötesinde, ilaçların vücutta nasıl yıkıldıkları, buna bağlı olarak aynı ilaca verilen bireysel yanıtların değişkenlik mekanizmaları araştırılabilir. Ancak, deney hayvan testlerinden elde edilen sonuçların insanlar arasındaki bireysel değişkenliklere bağlı cevapların öngörülmesinde kullanılmaları mümkün değildir. Bu amaçla yapılacak testlerde deney hayvanlarından

elde edilecek test sonuçlarının insanlara uyarlanması da her zaman gerçekleri yansıtmamaktadır. Bunun yanında testlerde kullanılan binlerce deney hayvanı da, kimyasal maddelerin toksik dozlarda verilmesine bağlı olarak ciddi acılar çekmektedirler. Tüm bu olumsuzluklara çözüm olabilecek çeşitli insan doku kültürlerinin geliştirilme çabaları yakın gelecekte çözüm olarak önerilse de, in vitro testlerin yine de sistemik toksisiteyi araştırmakta yetersiz kalabileceği, bu nedenle in vitro testlerin ancak in vivo testler için bir ön tarama testi olarak kabul edilmesi gerektiği şeklinde tartışmalar sürmektedir.

### **KAYNAKLAR**

- Vural, N.: Toksikoloji, A.Ü.Ecz.F. Yayınları No: 73, Ankara, A.Ü. Basımevi, s. 1-20, 1996.
- Loomis, T.A.: *Essentials of Toxicology*, 3rd edition, Philadelphia, Lea and Febiger, pp.157-232, 1978.
- Dimitrov, N.V., Saygı, Ş., Charamella, L.G., Gardiner, J.H., Ullrey, D.E.: *Effect of Selenium on Transplantable Tumors*. *J Trace Elements Exp Med* 1: 191-198, 1988.
- Saygı, Ş., Deniz, G., Kutsal, O., Vural, N.: *Chronic Effect of Cadmium on Kidney, Liver, Testes and Fertility of Male Rats*. *Biol Trace Elem Res* 31: 209-214, 1991.
- Committee for Proprietary Medicinal Products, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: *Evaluation of Medicines for Human Use. Note for Guidance on Repeated Dose Toxicity*. CPMW/SWP/1042/99, London, 2000, pp 1-9.
- Stoewsand GS, Anderson JL, Robinson RW: *Safety assessment of a nematode-resistant tomato by a simple, short-term rat feeding study*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 24(1): 6-8, 1996.
- Canadian Centre for Occupational Health and Safety: *What does LD50 mean? What does LC50 mean? Why study LD50's?* [www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/ld50.html](http://www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/ld50.html). (Erişim tarihi : 28.02.2003).
- Weideman, M.: *Toxicity Tests in Animals: Historical Perspectives and New Opportunities*. *Environ Health Perspect* 101(3): 222-5, 1993.
- Lorke D, Machemer L: *Studies of embryo toxicity in rats and rabbits*. *Environ Qual Saf Suppl* 4: 223-9, 1975.
- Eaton, D., Klaassen, C.: *Principles of Toxicology, in C Klaassen (ed), Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons (5th ed)*, New York: McGraw-Hill, 1996.

11. Benchmark Concentration (BMC) Modeling Versus the NOAEL/LOAEL Approach: A Case Study With Methylene Diphenyl Diisocyanate. Society for Risk Analysis 1998 Annual Meeting. <http://www.riskworld.com/Abstract/1998/SRAam98/ab8acl43.htm> (Erişim tarihi: 16 05 2003).
12. Saygı, Ş., Konuklugil, B., Kutsal, O., Uzbay, İ.T., Deniz, G., Gören, Z.: Assessment of Therapeutic Effect of Inula heterolepis Boiss in Alcoholic Rats. *Phytotherapy Research* 17, 683-83, 2003.
13. M375/M394C/CAM394C: Introduction to Risk Analysis. Dose-Response for Noncancer effects (Instructor: Smith, RLM 10.136, 471-6142). <http://www.ma.utexas.edu/users/mks/RA/non-cancer.pdf> (Erişim tarihi :16 05 2003).
14. EPA. Risk Assessment for Noncancer Effects. <http://www.epa.gov/ttn/atw/toxsource/noncarcinogens.html> (Erişim tarihi: 16 05 2003).
15. Acute Inhalation Toxicity Data Using Benchmark Concentration Methodology. <http://www.inhalation.net/benchmark.htm> (Erişim tarihi: 26 05 2003).
16. Minnesota Pollution Control Agency. Cumulative Exposure Project Air Toxics Analysis. <http://www.pca.state.mn.us/air/at-q&a.html> (Erişim tarihi 26 05 2003).
17. EPA: Withdrawal of Certain Testing Requirements for Office of Water Chemicals. Rules and Regulations, Federal Register: Vol.60 (183): 48902-48904, 1995.
18. Cohen, S.M.: Human relevance of animal carcinogenicity studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 21(1), 75-80, 1995.
19. Saygı, Ş., Deniz, G., Kutsal, O.: Concomitant Usage of High Dose of Acetaminophen with Therapeutic Dose of Ketorolac, and Their Toxic Effects in Rats. *ACTA Pharmaceutica Turcica* XXXIX (4): 149-153, 1997.
20. Ounissi-Benkhalha, H., Pelltier, J.P., Tardif, G., Mineau, F., Jolicœur, F.C., Ranger, P., Martel-Pelletier, J.: In vitro effects of 2 antirheumatic drugs on the synthesis and expression of proinflammatory cytokines in synovial membranes from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1996 23(1): 16-23, 1996.
21. Roca-Ferrer, J., Mulo, L., Lopez, E., Xaubet, A., Pujols, L., Fernandez, J.C., Picado, C.: Effect of topical anti-inflammatory drugs on epithelial cell-induced eosinophil survival and GM-CSF secretion. *Eur Respir J* 10(7): 1489-95, 1997.
22. Weiss, L., Hildt, E., Hofschneider, P.H.: Anti-hepatitis B virus activity of N-acetyl-L-cysteine (NAC): new aspects of a well-established drug. *Antiviral Res* 32: 43-53, 1996.,
23. Robinson, M.K., Cohen, C., de Fraissinette, Ade, B., Ponc, M., Whittle, E., Fentem, J.H.: Non-animal testing strategies for assessment of the skin corrosion and skin irritation potential of ingredients and finished products. *Food Chem Toxicol* 40 (5): 573-92, 2002.
24. Davila, J.C., Rodriguez, R.J., Melchert, R.B., Acosta, D.: Predictive value of in vitro model systems in toxicology. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 38: 63-96, 1998.
25. Abraham, J.: Regulating the cancer-inducing potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs: some lessons from the 1970s and 1980s. *Soc Sci Med* 46(1): 39-51, 1998.
26. Collins, J.M., McDevitt, D.G., Shanks, R.G., Swanton, J.G.: The cardio-toxicity of isoprenaline during hypoxia. *Br J Pharmacol* 36(1): 35-45, 1969.
27. Hess, R., Keberle, H., Koella, W.P., Schmid, K., Gelzer, J.: Clonidine: absence of neurotoxicity in laboratory animals. *Lancet* 2 (7774): 424-529, 1972.
28. Lewis, D.F., Ioannides, C., Parke, D.V.: A retrospective study of the molecular toxicology of benoxaprofen. *Toxicology* 65(1-2): 33-47, 1990.
29. Shadforth, M.F., Hothersall, T.E., Fowler, P.D.: Side effects of benoxaprofen. *Br Med J* 285 (6342): 645-6, 1982.
30. Heel, R.C., Morley, P.A., Brongden, R.N., Carmine, A.A., Speight, T.M., Avery, G.S.: Zimelidine: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in depressive illness. *Drugs* 24(3): 169-206, 1982.
31. Venning, G.R.: Identification of adverse reactions to new drugs. I: What have been the important adverse reactions since thalidomide? *Br Med J* 286 (6360): 199-202, 1983.
32. Curfman, G.D.: Diet pills redux. *N Engl J Med* 337(9): 629-30, 1997.
33. Estelle, F., Simons, R.: H1-receptor antagonists: safety issues. *Ann Allergy Asthma Immunol* 83(5): 481-8, 1999.
34. Ehrlich, M., Veronesi, B.: Esterase comparison in neuroblastoma cells of human and rodent origin. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995 22 (5) : 385-6.
35. Zoli, W., Flamigni, A., Frassinetti, G.L., Bajorko, P., De Paola, F., Milandri, C., Amadori, D., Gasperi-Campani, A.: In vitro activity of taxol and taxotere in comparison with doxorubicin and cisplatin on primary cell cultures of human breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 34(1): 63-9, 1995.
36. Liebmann, J.E., Cook, J.A., Lipschultz, C., Teague, D., Fisher, J., Mitchell, J.B.: Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol) in human tumour cell lines. *Br J Cancer* 68(6): 104-9, 1993.
37. Banerjee, S., Fallis, A.G., Brown, D.L.: Differential effects of taxol on two human cancer cell lines. *Oncol Res* 9(5): 237-48, 1997.
38. Parang, K., Wiebe, L.I., Knaus, E.E., Huang, J.S., Tyrrel, D.L., Csizmadia, F.: In vitro antiviral activities of myristic acid analogs against human immunodeficiency and hepatitis B viruses. *Antiviral Research* 34: 75-90, 1997.
39. Zhang, Y., Coulter, D.A.: Anticonvulsant drug effects on spontaneous thalamocortical rhythms in vitro: Phenytoin, carbamazepine, and phenobarbital. *Epilepsy Res* 23:55-70, 1996.

40. Zhang, Y., Gibbs, J.W., Coulter, D.A.: Anticonvulsant drug effects on spontaneous thalamocortical rhythms in vitro: Valproic acid, clonazepam, and  $\alpha$ -methyl- $\alpha$ -phenylsuccinimide. *Epilepsy Research* 23: 37-53, 1996.
41. Ali, R., Tabatabaei, A.R., Thies, R.L., Kevin Farrell and Frank, S.: Abbott a rapid in vitro assay for evaluation of metabolism-dependent cytotoxicity of antiepileptic drugs on isolated human lymphocytes. *Fundamental and Applied Toxicology* 37: 181-89, 1997.
42. Fee, E.: Improving the people's health: some Hopkins' contributions. *Am J Epidemiol* 134 (10): 1014-22, 1991.
43. Wooster, R., Ebner, T., Sutherland, L., Douglas, C.D., Brian, B.: Drug and xenobiotic glucuronidation catalysed by cloned human liver UDP-Glucuronosyltransferases stably expressed in tissue culture cell lines. *Toxicology* 82 (1-3): 119-29, 1993.
44. Guillouzo, A., Morel, F., Fardel, O., Meunier, B.: Use of human hepatocyte cultures for drug metabolism studies *Toxicology* 82 (1-3): 209-219, 1993.
45. Guanaratna, C.: Drug metabolism and pharmacokinetics in drug discovery: A primer for bioanalytical chemists, Part I. *Current Separations* 19 (1): 17-23, 2000.
46. Crespi, C.L., Langenbach, R., Penman, B.W.: Human cell lines, derived from AHH-1 TK $\pm$  human lymphoblasts, genetically engineered for expression of cytochromes P450. *Toxicology* 82 (1-3): 89-104, 1993.
47. Sun, W., Wu, R., Last, J.A.: Effects of exposure to environmental tobacco smoke on a human tracheobronchial epithelial cell line. *Toxicology* 100 (1-3): 163-74, 1995.