

Toksisite Testleri

18.11.2019

Toksisite testleri

- İnsanlar ve diğer yaşayan organizmalar, ilaçlara, ilaç dışı çeşitli kimyasallara (yiyecek katkı maddelerine, çevresel kirleticilere, pestisitlere, kozmetiklere) maruz kalmaktadır ve bu maddelerin toksikolojik açıdan değerlendirilmesi gerekmektedir.

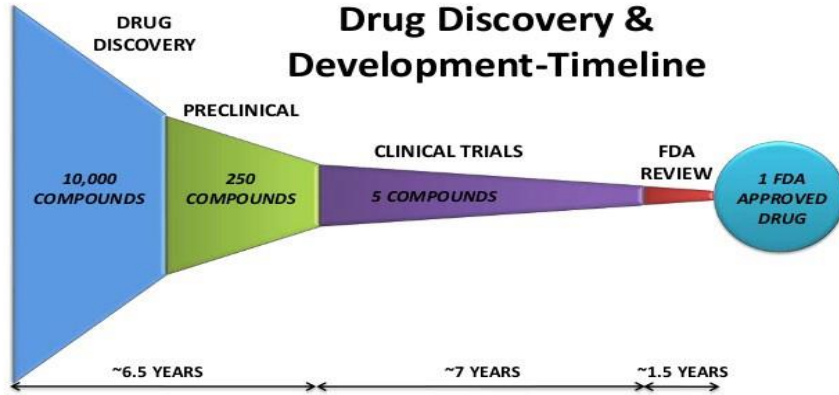
Toksisite testleri;

- İlaç dışı kimyasalların piyasaya çıkmadan önce değerlendirilmesinde
- İlaç geliştirme safhalarının prelinik araştırmalarda
- Piyasadaki ilaçların risk yarar durumlarının belirlenmesinde
- Çevresel kirleticilerin yarattığı risklerin saptanmasında kullanılır.

Preklinik Arařtırmalar

İLAÇLAR PIYASAYA ÇIKMADAN ÖNCE GENELDE ÜÇ AŞAMADAN GEÇER

- 1) **İlacın keşfi:** İlaç aday moleküller farmakolojik özelliklerine göre seçilir.
- 2) **Preklinik dönem:** Deney hayvanları ve in vitro çalışmaları içerir (toksikite testleri, farmakokinetik analizler ve formülasyon geliştirilmesi vd).
- 3) **Klinik dönem:** Sağlıklı gönüllü ve hastalarda preklinik aşamadan geçen bileşikler etkinlik ve advers etkiler açısından test edilir.



Preklinik araştırmalarda toksisite testleri

- İlaçların doz yanıt eğrilerinin hesaplanması
- Hedef organlarının belirlenmesi
- İlaçların terapötik indekslerinin hesaplanmasında
- Klinik çalışmaları dizayn etmek için gerekli ön bilgiyi edinmek için

İlaç dışı ksenobiyotiklerde toksisite testleri

- Tehlikenin tanımlanması
- Toksitenin ve doz-cevap ilişkisinin değerlendirilmesi
- Maruziyetin belirlenmesi
- Riskin tanımlanması

RİSK DEĞERLENDİRMESİ

= İncelenen kimyasalın hesaplanan miktarlardaki maruziyeti sonucu oluşabilecek toksitenin boyutunun belirlenmesi (RİSK DEĞERLENDİRMESİ)

Toksiste testleri

In vivo Toksiste Testleri

- Akut toksiste testleri
- Tekrarlanan doz toksiste testleri
 - ❖ Subakut toksiste testleri
 - ❖ Subkronik toksiste testleri
 - ❖ Kronik toksiste testleri
- Özel toksiste testleri
 - ❖ Üreme ve Gelişimsel Toksiste Testleri
 - ❖ Mutajenite,
 - ❖ Karsinojenite vb.

In vitro Toksiste Testleri

- Sitotoksiste Testleri
- Genotoksiste Testleri
- Toksiste testlerinde alternatif yöntemler

In vivo Toksikite Testleri

- Farmakolojik etkiler insanlar ve hayvanlar arasında büyük oranda aynıdır.
- Hayvanlar ile yapılan toksikolojik testler insanlarda gelişecek advers etkileri öngörmemizi sağlar.
- Hayvanlara yüksek dozlar vererek yüksek dozun etkisini görmemizi sağlar.
- Test maddesinin hayvandan elde edilen toksisite bilgisinin değerlendirilerek insan için risk değerlendirmesi yapmamıza ve bu sayede terapötik dozu belirlememize olanak sağlar.

In vivo Toksikite Testleri

Akut Toksikite Testleri

Akut toksisite testinde bir kimyasal maksimum 24 saat süreyle 1 veya 1 kaç kez yüksek dozda az sayıda hayvana uygulanır.

Genelde kemirgen türleri kullanılır.

Maddelerin toksik etki mekanizması, hedef organı, ölüm sebebi hakkında genel bir bilgi edinmemizi sağlar.

LD50 dozunun (popülasyonun %50'sini öldüren doz- Median Lethal Dose)

Tekrarlanan doz toksisite testleri için seçilecek dozların belirlenmesini sağlar.

In vivo Toksikite Testleri

Tekrarlanan Doz Toksikite Testleri **Subakut Toksikite Testleri**

14-28 gün süreyle tekrarlanan dozlar uygulanır.

Subkronik çalışmalarda kullanılmak için seçilecek dozların belirlenmesini sağlar.

In vivo Toksikite Testleri

Tekrarlanan Doz Toksikite Testleri **Subkronik Toksikite Testleri**

90 gün süreyle tekrarlanan dozlar uygulanır.

Kronik çalışmalarda kullanılmak için seçilecek dozların belirlenmesini sağlar.

In vivo Toksikite Testleri

Tekrarlanan doz toksikite testleri

Subakut-Subkronik Toksikite Testleri

Maddenin;

Sınırlı bir sürede, tekrarlanan temasın ardından test maddesinin etkilediği hedef organ veya dokular ile ortaya çıkabilecek risklerin belirlenmesini sağlar.

Maddenin birikme olasılığının değerlendirilmesine olanak sağlar.

Gözlemlenen en düşük advers etki düzeyi (**LOAEL**-lowest observed adverse effect level)

Hiçbir advers etkinin gözlenmediği en yüksek etki düzeyi (**NOAEL**-no observed adverse effect level) değerlerinin belirlenmesini sağlar.

In vivo Toksikite Testleri

Tekrarlanan Doz Toksikite Testleri Kronik Toksikite Testleri

3 aydan uzun süreyle tekrarlanan dozlar uygulanır.

Seçilecek maruziyet süresi kimyasala insanların maruz kalma durumuna göre seçilir.

Kemirgenlerde kronik toksisite testleri genellikle 6 ay 2 yıl arası sürer. (Hayvanın yaşam süresi)

Karsinojenik etkiler belirlenebilir.

In vivo Toksikite Testleri

Özel Toksikite Testleri

- Üreme ve Gelişimsel Toksikite Testleri
- Teratojenite
- Karsinojenite
- İmmüntoksikite

In vitro Toksikite Testleri

In vitro testlerin avantajları;

- Kontrollü test koşulları
- Sistemik etkinin olmaması
- Hızlı ve maliyeti düşük testler
- Test materyallerinin azlığı
- İnsan genlerini taşıyan transgenik genlerin kullanımı
- Hayvan kullanımının azalması

Alternatif ve in vitro metotların genelde kullanılmadığı durumlar;

- Farmakokinetik / Toksikokinetik
- Sistemik toksisite
- Organ sistem toksisitesi (SSS, solunum, kardiovasküler, GI ...)
- İmmunotoksikite
- Reprodüktif toksisite (fertilite, gelişim, peri- ve postnatal toksisite testleri)
- Subkronik ve kronik toksisite testleri

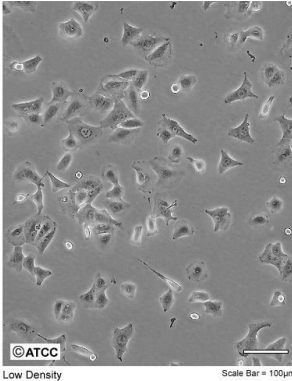
In vitro Toksikite Testleri

Hücre Kültürü

- Hücrelerin dokudan mekanik yollarla ve çeşitli enzimlerle izole edilerek besiyeri içerisinde *in vitro* olarak çoğaltılması
- Kökenine göre:
 - ❖ Primer Hücre Hatları: Direkt organizmadan alınmış hücreler
 - ❖ Sınırlı Hücre Hatları: Hücre bir kez bölündükten sonra sınırlı hücre olur ancak ölümsüz olma potansiyeli de vardır.
 - ❖ Transforme Hücre Hatları: Değişmiş işlev, büyüme özellikleri ve morfoloji sergiler.

Hücre Kültürü

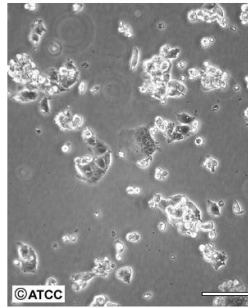
ATCC Number: **CCL-185**
Designation: **A-549**



Low Density

Scale Bar = 100µm

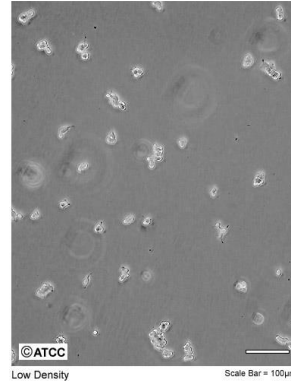
ATCC Number: **HB-8065**
Designation: **Hep G2**



Low Density

Scale Bar = 100µm

ATCC Number: **CRL-1721**
Designation: **PC-12**

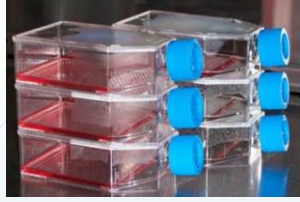


Low Density

Scale Bar = 100µm



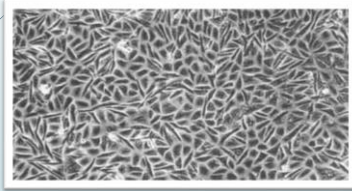
Hücre Kültürü



Flask



%5 CO₂ / nemli inkübatör



Kofluent / adherent hücre



Mikroplakalar

- Hücre Kültürü:
Cell Culture Training Video
<http://www.youtube.com/watch?v=WGKoJRNKADY>

Sık kullanılan *In vitro* Toksikite Testleri

Sitotoksikite testleri

- Tripan mavisi
- MTT, XTT, WST
- Nötral kırmızı alımı
- Sulforodamin B
- Laktat dehidrojenaz (LDH)
- Morfolojik inceleme

Genotoksikite Testleri

- Gen mutasyon testleri
 - ❖ Ames testi
 - ❖ SOS/umu-test
- Kromozomal testler
 - ❖ Kromozomal aberasyon (Chromosomal aberration)
 - ❖ Kardeş kromatid değişimi (Sister Chromatid Exchange)
 - ❖ Tek hücreli jel elektroforezi (Comet assay)
 - ❖ Mikroçekirdek testi (Micronuclei test)

Sitotoksisite Testleri

Sitotoksisite Testleri

20

- Sitotoksisite testleri, *in vitro* olarak (hücre ortamında) test maddesinin hücresel toksik potansiyelini tanımlamak için kullanılmaktadır.
- **Sitotoksisite**, hücresel aktivitenin geri dönüşümsüz olarak durdurulması ve hücresel yapının onarılamaz bozukluğu olarak tanımlanabilir.
- *In vitro* hücre topluluğunda, %50 oranında hücre ölümüne neden olan konsantrasyon **LC₅₀** olarak ifade edilir ve sitotoksisitenin gösterilme biçimidir.

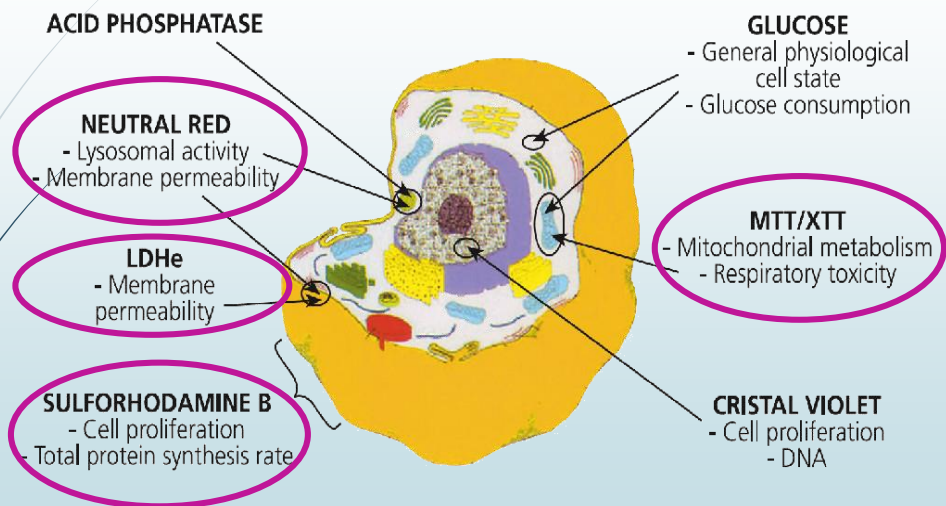
Sitotoksisite Testleri

Sitotoksik maddeye maruz kalan hücreler çeşitli şekillerde yanıt verir;

- Nekroz olabilir,
- Büyüme ve bölünme durabilir,
- Apoptoz olabilir.

Sitotoksisite Testleri

Cytotoxicity Test Systems



Sitotoksosite Testleri

Tripan Mavisi Testi



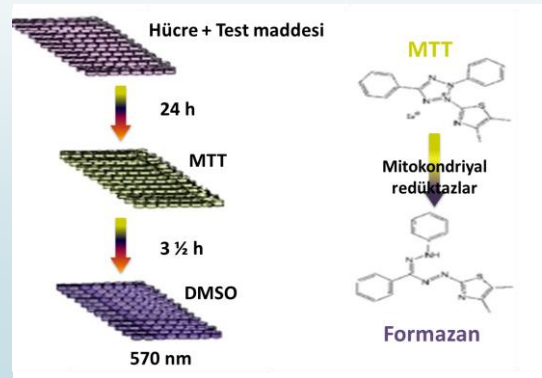
- Test, canlı hücrelerin tripan mavisi boyasını hücre içine almazken; ölü hücrelerin bozulmuş hücre membranlarından boyayı hücre içerisine alabilmeleri esasına dayanır.
- Işık mikroskobu ile incelendiğinde canlı hücrelerin sadece membranları mavi renkli gözlenirken; ölü hücreler tamamıyla mavi renge boyanmış halde gözlenirler.

Sitotoksosite Testleri

MTT, XTT, WST (WST-1, WST-8)

Tetrazolyum halkasının canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış hücrelerdeki mitokondriyal dehidrojenaz enzimi ile formazana dönüşmesi esasına dayanır.

MTT: soluk sarı renk	➡	mavi-mor renk
XTT: soluk sarı renk	➡	turuncu renk
WST-1: açık kırmızı renk	➡	koyu kırmızı renk
WST-8: soluk sarı renk	➡	turuncu renk



Sitotoksisite Testleri

- Bir veya birden fazla parametre değerlendirilebilir.
- Farklı mekanizmalar göz önünde bulundurularak birkaç test bir arada yapılabilir.

In Cytotox - XTT-NR-SRB

3 - Parameter Cytotoxicity Kit

Tetrazolium XTT	-	Mitochondrial Activity
Neutral Red NR	-	Lysosomal Activity
Sulforhodamine B SRB	-	Total Protein Content

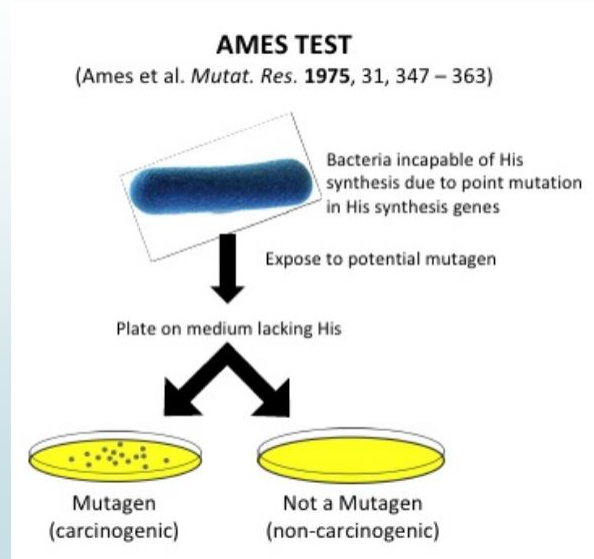
Genotoksisite Testleri

Genotoksisite Testleri

- Kimyasalların veya fiziksel ajanların hücrenin genetik materyali üzerindeki etkileri "genotoksisite testleri" ile araştırılır.
- Genotoksisite ve karsinojenite arasındaki ilişki pek çok çalışmada incelenmiş ve insanlar için karsinojen olan pek çok bileşiğin genotoksik olduğu bulunmuştur.
- Kimyasal maddelerin genotoksik etkileri ile karsinojenik potansiyelleri arasında kuvvetli bir ilişkinin saptanması ile karsinojenik risklerinin araştırılmasında kullanılmaya başlanmıştır.

Gen mutasyon testleri Ames testi

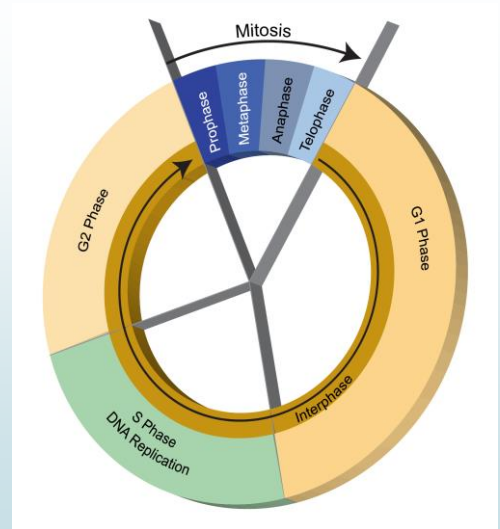
Ames ve Umu testleri maddelerin karsinojen etkilerinin canlı hayvan kullanmaya gerek olmaksızın hızlı ve ucuz bir şekilde bakteriler aracılığı ile belirlememize olanak sağlar.



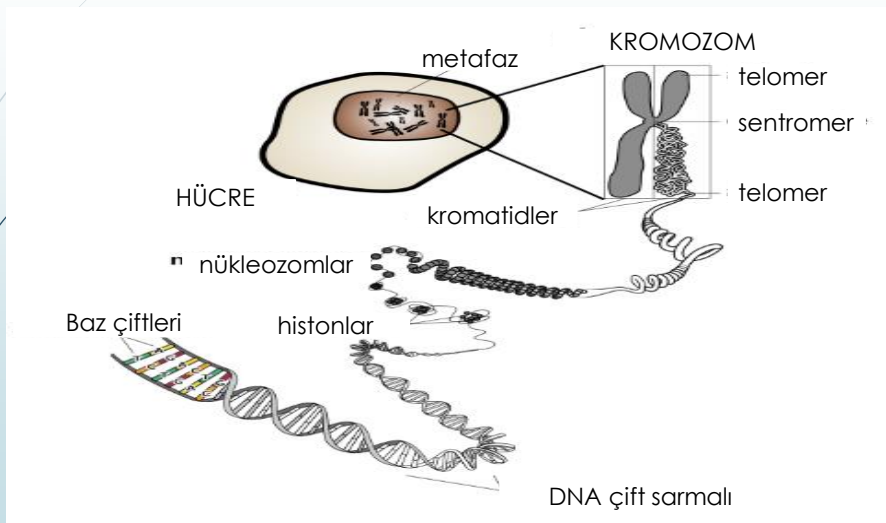
Kromozomal testler

Hücre Döngüsü

- Hücrelerin içeriklerini iki katına çıkarma/arttırma ve bölünme süreci
- Ökaryotik Hücre Döngüsü:
 - $S+G1+G2 = \text{İTERFAZ}$
 - S fazı: DNA sentezi
 - G1 (GAP1: ilk aralık): RNA ve protein sentezi, DNA için sentez hazırlığı
 - G2 (GAP2: ikinci aralık): DNA sentezi tamamlanır, RNA ve protein sentezi devam eder.



Kromozomal testler



Kromozomal testler

- Kromozomların yapısal ve sayısal hasarlarının belirlenmesini sağlayan yöntemdir
- Bir çok karsinojen ve mutajen maddeler DNA'da hasara yol açar ve DNA'nın düzgün eşleşmesini önler.
- DNA hasarının genotoksik sonuçları DNA eşlenmesi ve hücre döngüsü tamamlanıncaya kadar gözlenmez.
- Genotoksik madde zararlı etkisini göstermeden önce hasarların tamirini sağlamak üzere işleyen çeşitli biyokimyasal mekanizmalar bulunmaktadır

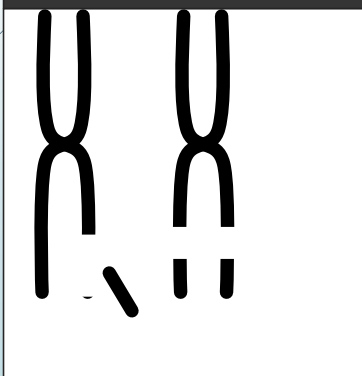
Kromozomal testler

Kromozomal Aberasyon Testi

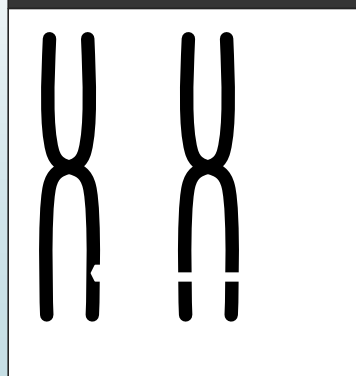
KA testi, mutajenler tarafından indüklenen çeşitli yapısal ve sayısal kromozomal anormalliklerin saptanması amacıyla sıklıkla kullanılan bir yöntemdir.

Kromozomal aberasyon tipleri

Kromatid ve kromozom kırığı



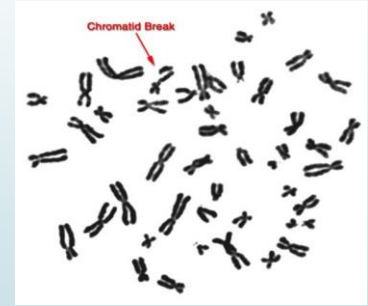
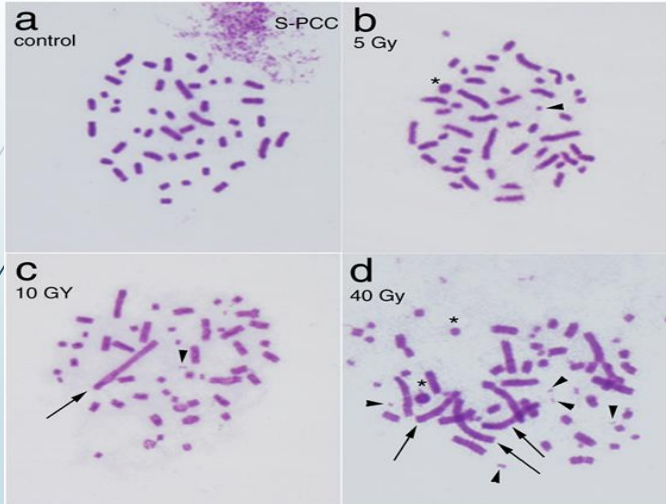
Kromatid ve kromozom gap



Kromozomal testler

Kromozomal Aberasyon Testi

Kromozomal aberasyon örnekleri



Kromozomal testler

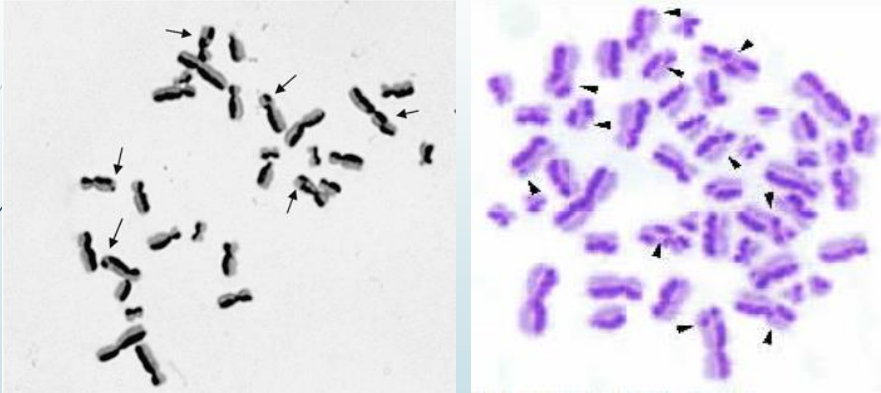
Kardeş Kromatid Değişimi Testi

- KKD, bir kromozomun 2 kardeş kromatidi arasında genetik materyalin değişiminin görülmesi esasına dayanan bir yöntemdir.
- Kardeş kromatidlerde değişim olmuşsa koyu kromatiddan bir parça, açık tonda görülen kromatiddeki parça ile yer değiştirir.

Kromozomal testler

Kardeş Kromatid Değişimi Testi

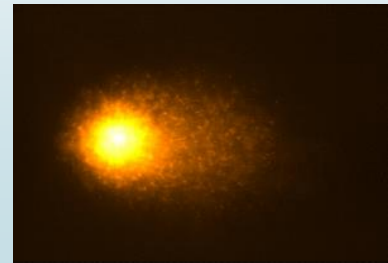
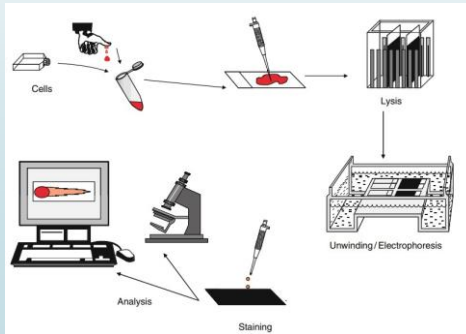
Kardeş kromatid değişimi örnekleri



Kromozomal testler

Comet Tekniği

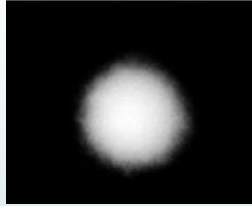
- Fiziksel ve kimyasal ajanların toksik etkileri nedeniyle hücre DNA' sında meydana gelen kırıkların (DNA fragmanları) elektroforez sisteminde agaroz jel üzerinde göç etmeleri esasına dayanır.
- DNA kırıkları negatif yüklü olduklarından dolayı anoda doğru göç ederler. Mikroskop altında bakıldığında hasarlı hücreler **kuyruklu yıldız (comet)** şeklinde görülürler.



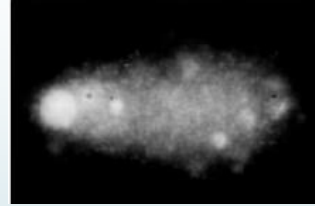
Kromozomal testler

Comet Tekniği

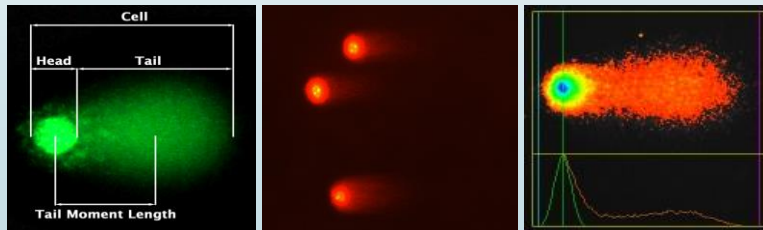
37



(a) hasarsız hücre



(b) hasarlı hücre



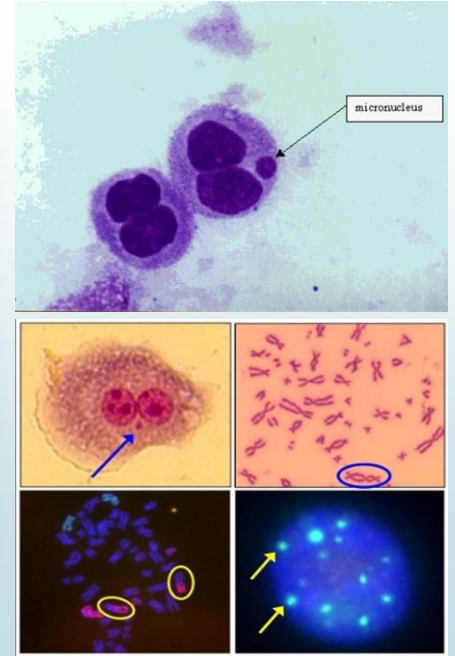
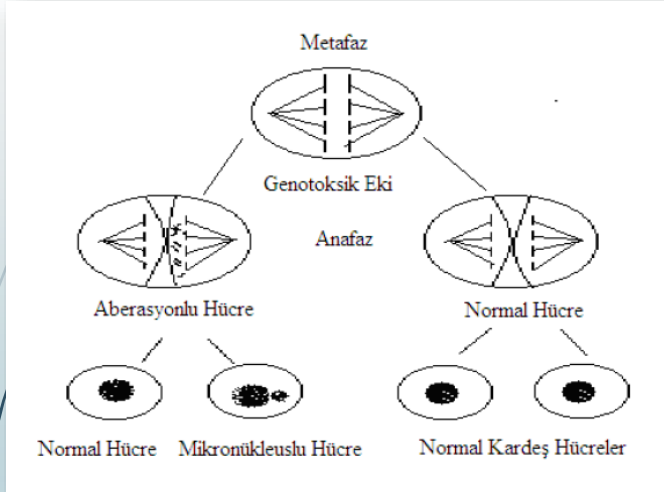
Kromozomal testler

Mikronükleus testi

- Mikronükleus (mikroçekirdek) testi, genotoksik kimyasallara maruz kalmış hücrelerdeki kromozomal hasarın tespiti için sıklıkla kullanılan genotoksisite testlerinden biridir.
- Mikronükleus, hücrenin mitoz bölünmesi esnasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan tam kromozom veya asentrik kromozom parçasıdır.
- Lam üzerine fikse edilen hücreler, bazik boyalarla boyanır ve her bir hücre ana hücre çekirdeği yanında hasar göstergesi olan mikroçekirdek varlığı açısından değerlendirilir.

Kromozomal testler

Mikronükleus testi



Toksisite testlerinde alternatif yöntemler

Maruz kalınan kimyasal sayısı ve miktarının her geçen gün artması; deney hayvanı kullanılan yöntemlerin tamamen ya da kısmen kaldırılmasını amaçlayan, güvenilirliği ve doğruluğu kanıtlanmış *in vitro* **alternatif yöntemlerin** önemini gittikçe arttırmaktadır.

2013: AB Kozmetik Yönetmeliğinin 7. maddesinde değişiklik nedeniyle hayvan testleri kullanımının yasaklanması ile

- Alternatif yöntemler için ciddi bir ihtiyaç oluşumu
- Ülkemizde de 2015 yılında yürürlüğe giren Kozmetik Kanunu ve Yönetmeliği AB ile uyumlu hale getirildi.

Toksisite testlerinde alternatif yöntemler

5R PRENSİBİ

REPLACEMENT (Yer Değiştirme)

REDUCTION (Azaltma)

REFINEMENT (İyileştirme)

RESPONSIBILITY (Sorumluluk)

RESPECT (Saygı)

Animal Ethics

<http://www.animalethics.org.au/home>

Toksisite testlerinde alternatif yöntemler

Hayvan deneylerine alternatif yöntemler

- İn vitro metotlar
 - ❖ Hücre, doku ve organ kültürleri,
 - ❖ Omurgalıları yerine omurgasız hayvanların kullanılması,
 - ❖ Embriyon içeren döllenmiş yumurta kullanılması,
 - ❖ Tek hücrelilerin kullanılması.
- İn siliko metotlar
 - ❖ Bilgisayar modelleri ve veri bankalarından faydalanma,
 - ❖ Matematiksel yöntemlerden faydalanma,
 - ❖ Eğitimde deney hayvanı yapay modellerin ve filmlerin kullanılması.
- İn vivo metotlar
 - ❖ İnsan veya insanlardan elde edilen materyallerin kullanılması.

Toksisite testlerinde alternatif yöntemler

Oküler iritasyon

Draize tesii



Toksisite testlerinde alternatif yöntemler

Oküler iritasyon

HET-CAM Tavuk Yumurtası Koryoallantoik Zar Testi

- Tavşan gözünde uygulanan göz iritasyon testi Draize testine alternatif olarak kozmetolojik ürünler vs de kullanılır.
- **Amaç,** test maddesinin oküler iritan özelliğinin, tavuk yumurtasının koryoallantoik zarının içindeki advers olayları indüklemeye yeteneğinin ölçülmesidir.
- 300 saniye süre ile CAM tepkileri gözlemlenir. Ortaya çıkan her endpoint (olay) için zaman saniye olarak kaydedilir.

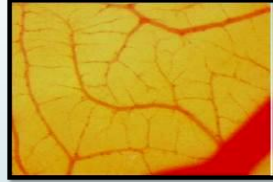
Toksisite testlerinde alternatif yöntemler

Oküler irritasyon

HET-CAM Tavuk Yumurtası Koryoallantoik Zar Testi



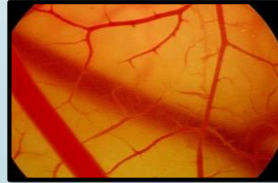
Deney Öncesi



Lizis
(Damarların Parçalanması)



Hemoraji
(Kanama)



Koagülasyon



Toksisite testlerinde alternatif yöntemler

Deri korozyon ve irritasyon testi

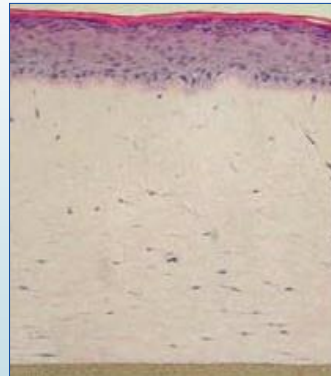
in vivo

- Tavşan derisi



in vitro

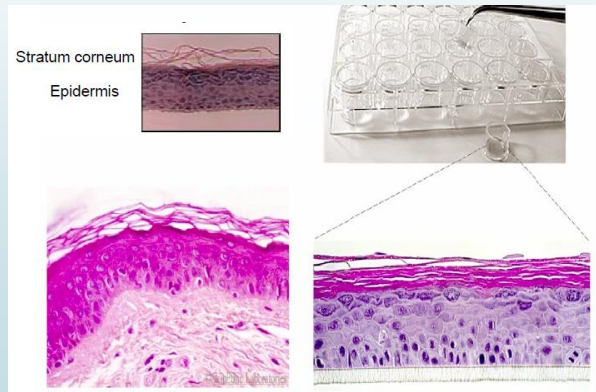
- İnsan deri hücresi



Toksisite testlerinde alternatif yöntemler

Deri korozyon ve iritasyon testi

- Model olarak insan epidermal keratinositlerinden elde edilen 3 boyutlu dokular kullanılır.
- Maddelerin korozif ve iritan etkisi MTT testi ile ölçülür.



Toksisite testlerinde alternatif yöntemler

Üreme ve gelişimsel toksisite testleri

- Model organizma olarak memeli yerine filogenetik olarak daha basit bir canlı olan Zebra Balığı (Zebrafish) kullanılır.



- Yeni döllenmiş Zebra balığı embriyoları seçilen dozlarda istenen madde maruz bırakılır.
- Hayatta kalan embriyolar ve morfolojik değişiklikler incelenir.

Kaynaklar ve İleri okumalar

- Dekant, W. and Vamvakas, S. (2004). Toxicology. In Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, (Ed.). doi:[10.1002/14356007.b07_155.pub2](https://doi.org/10.1002/14356007.b07_155.pub2)
- <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>
- Klaassen, C. D., & Amdur, M. O. (Eds.). (2013). *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons* (Vol. 1236). New York: McGraw-Hill.