

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

## Benzalkonyum Klorürün İnsan Lenfositleri Üzerindeki Genotoksik Etkisinin Araştırılması

Şener ARIKAN, Tuna GÜLTEN, Tahsin YAKUT

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Bursa.

### ÖZET

Bu çalışmada, dezenfektan ve koruyucu özelliğinden dolayı çok yaygın olarak kullanılan benzalkonyum klorürün genotoksik etkisi in vitro mikronükleus testi ile araştırıldı. Çalışmada, herhangi bir genotoksik ajana maruz kalma öyküsü bulunmayan ve sigara kullanmayan sağlıklı erkek gönüllülerden hazırlanan tam kan lenfosit kültürleri kullanıldı. Kültürlere 6 farklı konsantrasyonda (0.04 mg/L, 0.11 mg/L, 0.33 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L ve 9 mg/L) benzalkonyum klorür ilave edilerek mikronükleus oluşumuna etkisi araştırıldı. Deneyler üç sağlıklı gönüllü ile ve her konsantrasyon için ikişer kültür hazırlanarak çalışıldı. Her kültürden 1000 binükleer hücre değerlendirilerek mikronükleus analizi yapıldı. Negatif kontrol kültürlerinden elde edilen sonuçlar ile yapılan karşılaştırma sonucunda, çalışılan konsantrasyonların hiçbirinde mikronükleus değerlerinde anlamlı artış gözlenmedi. Sonuç olarak uygulanan in vitro kültür koşullarında benzalkonyum klorürün anlamlı genotoksik etkisi tespit edilmedi.

**Anahtar Kelimeler:** Benzalkonyum klorür. Genotoksosite. In vitro mikronükleus testi, Lenfosit kültürü.

### Investigation of the Genotoxic Effects of Benzalkonium Chloride on Human Lymphocytes

#### ABSTRACT

In this study, the genotoxic effects of benzalkonium chloride, widely used as a disinfective and protective agent, were investigated using micronucleus assay. Whole blood lymphocyte cultures, prepared from healthy, non-smoking male donors were used in the study. The cultures were treated with 6 different concentrations of benzalkonium chloride (0.04 mg/L, 0.11 mg/L, 0.33 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L, and 9 mg/L) and the effects on micronucleus formation were investigated. Three healthy donors were included in the study and the experiments were done using two cultures for each concentration. Micronuclei were scored examining 1000 binucleated cells for each culture. When compared to negative control, none of the tested concentrations led to a significant increase in micronucleus levels. In conclusion, benzalkonium chloride showed no significant genotoxic effects under our experimental conditions.

**Key Words:** Benzalkonium chloride. Genotoxicity. In vitro micronucleus assay. Lymphocyte culture.

Benzalkonyum klorür, dezenfektan ve koruyucu olarak çok yaygın kullanılan bir kuaterner amonyum bileşiğidir. Sürfaktan özelliği gösterir ve deterjan etkisi ile membranlar üzerinde tahrip edici bir etkiye sahiptir. Protein ve lipid yapıları denatüre ederek antibakteriyel, antifungal ve antiviral etki gösterir. Geniş etki spektrumu nedeniyle nazal<sup>1</sup> ve oküler<sup>2</sup> formülasyonlarda yaygın olarak kullanılan bir koruyucu maddedir.

Benzalkonyum klorür, genel formülü  $C_6H_5CH_2N(CH_3)_2RCl$  olarak gösterilen bir alkilbenzildimetilamonyum klorür karışımıdır (Şekil 1). İnsan-

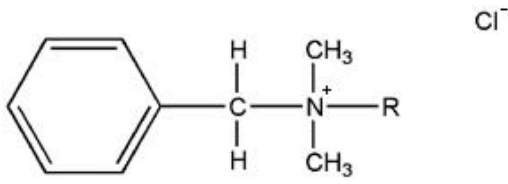
lar üzerinde doz ile ilişkili olarak sitotoksik etkiler gösterir. Özellikle glokom tedavisi gibi, topikal ilaçların uzun süre kullanımını gerektirecek klinik durumlarda sitotoksitesinden kaynaklanan etkiler son zamanlarda yapılan birçok araştırma ile değerlendirilmektedir<sup>2-4</sup>. Kornea epiteli tahribatı, goblet hücre kaybı, konjonktivada skuamöz metaplazi ve apoptozis, gözlenen sitotoksik etkilerden bazılarıdır<sup>2</sup>.

Nazal preparasyonlarda koruyucu madde olarak bulunan dozlarının toksisitesi ile ilgili yapılan birçok araştırmanın sonucu tartışmalıdır. Bu araştırmalardan bazıları in vitro koşullarda solunum epitelinde silya fonksiyonlarını etkileyen sitotoksik etkiler tespit ederken, diğerleri in vivo koşullarda aynı etkiyi saptamışlardır<sup>1</sup>.

Benzalkonyum klorürün lenfositler üzerindeki sitotoksik etkileri yakın zamanda, Jurkat hücrelerinde (ölüm-süzleştirilmiş bir T lenfosit hücre serisi) araştırılmış ve sitotoksitesinin burada epitel hücrelerine göre daha düşük konsantrasyonlarda ortaya çıktığı tespit edilmiştir<sup>5</sup>. Aynı çalışmada lenfositler üzerinde düşük konsantrasyonlarda orta derecede apoptotik ve minimal antiproliferatif etkiler tespit edilirken, yüksek konsantrasyonlarda hızlı nekrotik etkiler gözlenmiştir.

Geliş Tarihi: 21.11.2011  
Kabul Tarihi: 31.01.2012

Dr. Tuna GÜLTEN  
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı,  
Görükle/BURSA  
Tel: 0 224 295 43 51  
e-posta: tunag@uludag.edu.tr



Şekil 1.

*Benzalkonyum klorürün yapısal formülü R alkil grubunu temsil etmektedir. Alkil grupları 8, 10, 12, 14, 16 ve 18 karbon uzunluğunda olabilmekte birlikte karışım içerisinde 12, 14 ve 16 karbonlu olanlar en yoğun olarak bulunmaktadır.*

Benzalkonyum klorürün genotoksik etkileri ile ilgili çok az sayıda araştırma mevcuttur. Bakteri mutajenite testlerinde genotoksik bulunmamıştır<sup>6,7</sup>. İnsan solunum epiteli hücre serisi olan BEAS-2B hücre kültürleri ile yapılan tek hücre jel elektroforezi (comet testi) çalışmasında ise burun sprelerinde bulunan konsantrasyonlarının DNA hasarına yol açtığı gösterilmiştir<sup>8</sup>. Yakın zamanda yapılan bir çalışma ile benzalkonyum klorürün kornea epiteli hücre kültüründe hem tek zincir hem de çift zincir DNA kırıklarına yol açtığı gösterilmiştir<sup>9</sup>.

Mikronükleuslar, ilk olarak eritrosit sitoplazmasında bulunan nükleer materyal parçaları olarak tanımlanmış ve hematologlar tarafından Howell-Jolly cisimcikleri olarak adlandırılmışlardır. Mikronükleus adını diğer hücre tiplerinde gözlemlenenden sonra almışlardır.

Mikronükleuslar, nükleusa dahil olamamış kromozom ya da kromozom parçalarıdır. Bunlar klastojenik ya da anöjenik etkilerle meydana gelirler. Klastojenik etkiler DNA / kromozom yapısında hasara yol açan faktörlerdir. Anöjenik etkiler ise kromozomların kutuplara doğru çekilmesinde bozukluğa neden olarak kromozom sayısında hataya neden olurlar. Yapısal hasarlarda meydana gelen kırıklar sonucunda kromozomdan ayrılan parçalar, sayısal anomalilerde ise kromozomların kutuplara çekilmesinde meydana gelen hatalar sonucunda geride kalan kromozomlar mikronükleus içeriğini oluştururlar<sup>10</sup>.

Mikronükleusların meydana gelebilmesi için hücrenin çekirdek bölünmesi geçirmesi gerekir. Fenech ve Morley tarafından geliştirilmiş olan sitokinezis blok mikronükleus testinde kültüre sitokalazin-B adı verilen sitoplazma bölünmesini engelleyen madde eklenir. Böylece kültürde bir kez bölünmüş olan hücrelerin iki nükleuslu (binükleer) hale gelmesi sağlanır. Hiç bölünmemiş hücreler tek nükleuslu (mononükleer), birden fazla bölünme geçirmiş hücreler ise çok nükleuslu (multinükleer) olarak gözlenirler (Şekil 2). Mononükleer, binükleer ve multinükleer hücrelerin oranlarının karşılaştırılması çeşitli etkenlerin hücreler üzerindeki bölünmeyi durdurucu (sitostatik) etkisinin hesaplanabilmesini sağlamaktadır. Güvenilirliği ve tutarlılığı nedeniyle sitokinezis blok mikronükleus

testi günümüzde standart genotoksisite testlerinden biri haline gelmiştir<sup>11</sup>.

Bildiğimiz kadarıyla bugüne kadar benzalkonyum klorürün insan lenfositlerinde mikronükleus oluşumuna etkisini araştıran tek bir çalışma yayınlanmıştır<sup>7</sup>. Bu çalışma izole lenfositler kullanılarak yapılmış ve kültürler 60 dakika gibi kısa bir süre benzalkonyum klorüre maruz bırakılmıştır. Çalışma sonucunda benzalkonyum klorür 1 mg/L ve 3 mg/L konsantrasyonlarında genotoksik bulunmuş, daha düşük konsantrasyonlarda anlamlı etki gözlenmemiştir. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise sitotoksik etki nedeniyle üreme gözlenmemiştir.

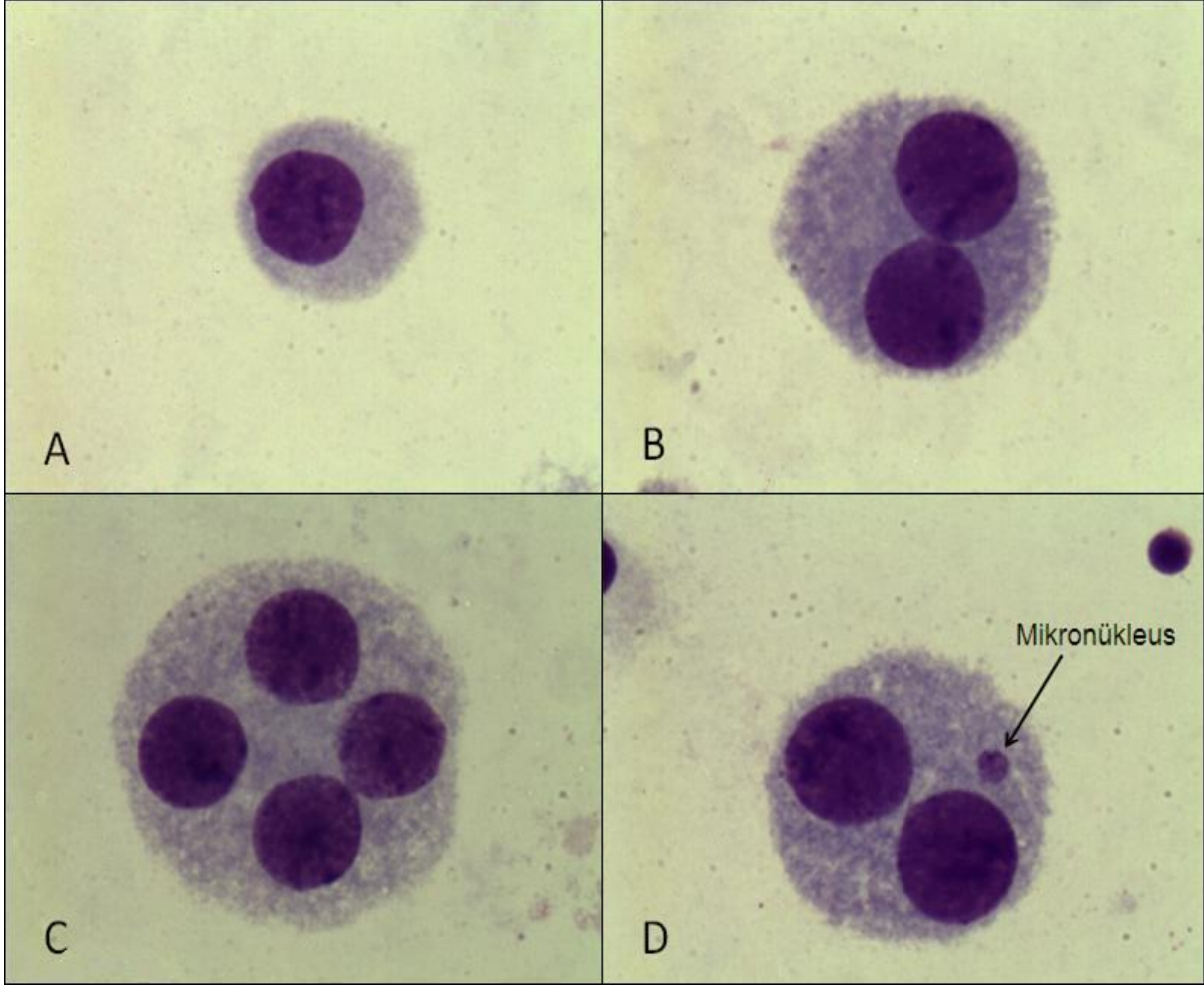
Biz, bu çalışmamızda, benzalkonyum klorürün genotoksik etkilerini biyolojik ortamı daha iyi örneklediği için tam kan lenfosit kültürlerinde araştırmayı ve kültürleri benzalkonyum klorürün 6 farklı konsantrasyonu ile daha uzun süre muamele ederek sonuçlarımızı literatür verileriyle karşılaştırmayı amaçladık.

## Gereç ve Yöntem

Araştırma, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulunun 31 Mayıs 2011 tarih ve 2011-12/8 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Bilinen bir hastalığı olmayan, herhangi bir genotoksik ajana maruz kalma öyküsü bulunmayan, sigara kullanmayan, 40 yaş altında üç erkek donörden "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu" ile yazılı onamları alındıktan sonra periferik venöz kan alındı. RPMI 1640 (L-glutaminli, Biological Industries, 01-106-1B), %16,7 fetal bovine serum (PAA, A11-151), %1 fitohemaglutinin M (Biological Industries, 12-006-1H) içeren kültür tüpü içerisindeki 4,5 ml besiyerine 0,5 ml heparinize tam kan eklenerek hücre kültürleri hazırlandı ve 37°C'deki etüvde inkübe edildi. Benzalkonyum klorür 43. saatte kültür ortamına ilave edildi. Kültürün 44. saatinde 6 µg/ml sitokalazin-B (Serva, 18015.01, CASRN: 14930-96-2) steril dimetil sülfoksit (AppliChem (A7248,0010), CASRN: 67-68-5) içerisinde çözünmüş olarak eklendi. 72 saatlik kültürün sonunda dakikada 2000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek besiyeri uzaklaştırılıp 37°C sıcaklıktaki 0,075 M KCl solusyonundan 5 ml ilave edilerek 37°C'deki etüvde 10 dakika boyunca inkübe edildi. Dakikada 2000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek KCl solusyonu uzaklaştırıldı ve hücreler 7:1 oranındaki metanol-asetik asit karışımı ile fikse edildi. Dakikada 2000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek supernatant uzaklaştırıldı. Beyaz renkli pellet elde edilinceye kadar fiksasyon aşaması tekrar edildi. Elde edilen pellet pipetle lamlara yayıldı. Lamlar kuruduktan sonra %5'lik Giemsa ile 10 dakika boyandı. Işık mikroskopunda 400X büyütmede incelendi. Bütün kültürler ikişer tüp olarak çalışıldı ve ayrı ayrı değerlendirildi.

## Benzalkonyum Klorürün Genotoksisitesi



Şekil 2:

*Sitokalazin-B ile muamale edilen lenfosit kültüründe; mononükleer (A), binükleer (B), multinükleer (C) ve mikronükleus içeren binükleer (D) hücreler.*

Test edilecek konsantrasyonlara ön deneylerle karar verildi. Benzalkonyum klorür (Benzalkonium Chloride, Aldrich, 234427-5G, CASRN: 63449-41-2), test edilecek 6 farklı konsantrasyonda (0.04 mg/L, 0.11 mg/L, 0.33 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L, 9 mg/L) kültürlerle ilave edildi. Pozitif kontrol olarak kültüre 0.05 mg/L mitomisin C (Sigma, M-0503), negatif kontrol olarak 50 µl steril distile su ilave edildi.

### Mikronükleus Skorlaması

Aşağıdaki özelliklere sahip binükleer hücreler değerlendirmeye alındı:

- Yaklaşık olarak aynı büyüklükte ve aynı kondensasyon aşamasında iki yuvarlak veya oval nükleusa sahip hücreler
- Nükleuslar üst üste binmiş veya birbirine dokunuyor ise sınırları net olarak seçilebilen hücreler

Aşağıdaki özelliklere sahip mikronükleuslar değerlendirilmeye alındı:

- Çapı ana nükleusun çapının 1/3'ü ile 1/16'sı arasında olan mikronükleuslar

- Ana nükleus ile aralarındaki sınır net olarak seçilebilen mikronükleuslar
- Ana nükleus ile benzer boyanma özelliklerine sahip olan mikronükleuslar

Her kültür için 1000 binükleer hücre değerlendirilerek mikronükleus içeren hücre sayısı ve bunların içerisindeki toplam mikronükleus sayısı tespit edildi.

### Sitotoksik Etkinin Değerlendirilmesi

Bütün kültürler için 500 hücre değerlendirilerek sitokinezis blok proliferasyon endeksi (SBPE) aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$SBPE = \frac{((\text{Mononükleer hücre sayısı}) + (2 \times \text{Binükleer hücre sayısı}) + (3 \times \text{Multinükleer hücre sayısı}))}{(\text{Toplam hücre sayısı})}$$

Aşağıdaki formül kullanılarak sitostazis yüzdesi hesaplandı:

$$\text{Sitostazis} = 100 - 100 \left\{ \frac{(\text{SBPE}_T - 1)}{(\text{SBPE}_K - 1)} \right\}$$

$T$  = Test edilen kültür

$K$  = Negatif kontrol kültürü

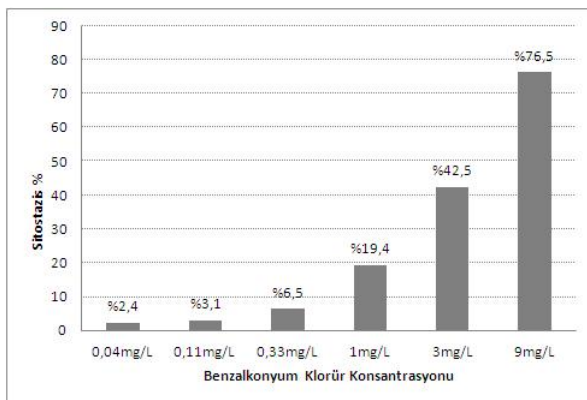
## İstatistiksel Analiz

Betimleyici istatistiksel değerler olarak medyan, minimum ve maksimum değerleri kullanıldı. Bağımlı grupların karşılaştırılması Wilcoxon İşaret Testi ile yapıldı ve anlamlılık düzeyi  $\alpha=0,05$  olarak alındı. İstatistiksel analiz için SPSS 13.0 programı kullanıldı.

## Bulgular ve Sonuçlar

Test edilecek konsantrasyonları belirlemek için ön deneylerle değişik konsantrasyonlarda (0.04 mg/L, 0.11 mg/L, 0.33 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L, 9 mg/L, 25 mg/L, 75 mg/L) benzalkonyum klorür kültür ortamına ilave edilerek hücrelerin üreme kinetiklerine etkisi incelendi. 75 mg/L'de eritrositlerde hemoliz meydana geldi ve lenfosit üremesi gözlenmedi. Hemoliz gözlenmeyen en yüksek konsantrasyon olan 25 mg/L'de ise minimal düzeyde üreme gözlendi (SBPE<1,01) ve bu değer altındaki tüm konsantrasyonlarda üreme oldu. Ferk ve ark.<sup>7</sup> tarafından yapılan çalışmada kullanılan konsantrasyonları da kapsayacak şekilde deneyler 0.04 mg/L, 0.11 mg/L, 0.33 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L, ve 9 mg/L konsantrasyonlarında, üç farklı donörle ayrı ayrı çalışıldı.

İncelemeler sonucunda hesaplanan SBPE değerleri Tablo I'de gösterilmiştir. Negatif kontrolle karşılaştırıldığında benzalkonyum klorürün 1 mg/L, 3 mg/L ve 9 mg/L konsantrasyonlarında SBPE'de istatistiksel olarak anlamlı düşüşe neden olduğu tespit edildi. Test edilen benzalkonyum klorür konsantrasyonlarına karşılık gelen sitostatik etki değerleri Şekil 3'te gösterilmiştir. En yüksek konsantrasyon olan 9 mg/L'de sitostatik etki %76.5'e ulaştı.



Şekil 3.

*Benzalkonyum klorür konsantrasyonlarının oluşturduğu medyan sitostatik etki değerleri.*

Her bir deney için 1000 binükleer hücrenin incelenmesiyle tespit edilen mikronükleuslu hücre sayıları Tablo II'de gösterilmiştir. Pozitif kontrolden elde edilen değerler negatif kontrole göre anlamlı olarak yüksek gözlenirken ( $p=0.28$ ), benzalkonyum klorür konsantrasyonlarının hiçbirinde negatif kontrole göre anlamlı fark gözlenmedi.

İncelenen diğer bir parametre olan 1000 binükleer hücre içinde tespit edilen toplam mikronükleus sayıları karşılaştırıldığına (Tablo III), mikronükleuslu hücre sayılarında da olduğu gibi pozitif kontrol negatif kontrolden anlamlı olarak yüksek gözlenirken ( $p=0.27$ ), benzalkonyum klorür konsantrasyonlarının hiçbirinde negatif kontrole göre anlamlı fark gözlenmedi.

## Tartışma

Benzalkonyum klorür, bugüne kadar yapılmış olan genotoksisite incelemelerinde bakteri mutajenite testleri olan Umu<sup>6</sup> ve Ames<sup>7</sup> testlerinde genotoksik bulunmamış ancak fare hepatositleri<sup>7</sup>, insan bronş epitel<sup>2</sup> ve kornea epitel<sup>9</sup> hücre serilerinde comet testi ile DNA kırıklarına neden olduğu gösterilmiştir. İnsan lenfositlerinde benzalkonyum klorür ile yapılan tek mikronükleus çalışması olan Ferk ve ark.nın yaptıkları çalışmada benzalkonyum klorür 1 mg/L ve 3 mg/L konsantrasyonlarında mikronükleus sayısında anlamlı artış meydana getirmiş, test edilen daha düşük konsantrasyonlar olan 0.11 mg/L ve 0.33 mg/L'de ise mikronükleus değerleri negatif kontrole göre yüksek gözlenmesine rağmen anlamlı düzeye ulaşmamıştır<sup>7</sup>. Sunulan çalışmamızda ise hem bu konsantrasyonlar hem de bir alt ve bir üst konsantrasyonlar olan 0.04 mg/L ve 9 mg/L'de inceleme yapılmış ancak hiçbirinde mikronükleus sayısında anlamlı artış gözlenmemiştir.

Maddelerin genotoksik etkilerinin belirlenmesi için yapılan birçok in vitro çalışmada birbirinden farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. Ferk ve ark.nın yaptıkları çalışma ile sunulan çalışmamız arasındaki temel farklar, izole lenfosit yerine tam kan kültürleri kullanmamızın yanısıra benzalkonyum klorürün eklenme zamanı ve kültür ortamında kaldığı toplam süredir. Ferk ve ark.nın çalışmasında kültürler fitohemaglutinin ile lenfosit üremesini indüklemeyen önce ve sadece 60 dakika süreyle benzalkonyum klorüre maruz bırakılmıştır. Çalışmamızda ise test maddesi lenfosit üremesinin fitohemaglutinin ile indüklenmesinden 43 saat sonra kültür ortamına ilave edilmiş ve kültür sonuna kadar (toplam 29 saat) muamele edilmiştir. Bölünmeyen hücrelerin genotoksik etkenlere daha dirençli oldukları belirtilmektedir<sup>12</sup>. Primer hücre kültürleri kullanılarak yapılan genotoksisite araştırmalarında, test edilecek maddenin kültür ortamına, hücre üremesinin yoğun olduğu ve senkronizasyonun bozulmaya başladığı dönemde eklenmesi

## Benzalkonyum Klorürün Genotoksitesi

**Tablo I-** SBPE değerleri

	Kültürlerin SBPE Değerleri						Medyan	Minimum	Maksimum	Negatif Kontrolle Karşılaştırma
	1A	1B	2A	2B	3A	3B				p
Negatif kontrol	1,172	1,118	1,268	1,320	1,492	1,458	1,294	1,120	1,490	-
0.04 mg/L	1,252	1,154	1,324	1,250	1,372	1,430	1,288	1,150	1,430	0,917
0.11 mg/L	1,186	1,180	1,272	1,296	1,408	1,320	1,285	1,180	1,410	0,463
0.33 mg/L	1,172	1,168	1,284	1,266	1,392	1,308	1,275	1,170	1,390	0,225
1 mg/L	1,084	1,120	1,240	1,234	1,400	1,258	1,237	1,080	1,400	0,046*
3 mg/L	1,088	1,076	1,190	1,148	1,380	1,250	1,169	1,080	1,380	0,028*
9 mg/L	1,042	1,044	1,076	1,062	1,190	1,166	1,069	1,040	1,190	0,028*
Pozitif kontrol	1,130	1,078	1,230	1,266	1,238	1,348	1,234	1,080	1,350	0,028*

A: Gönüllülerin birinci kültürü, B: Gönüllülerin ikinci kültürü, \* İstatiksel olarak anlamlı farklılık

**Tablo II-** Mikronükleuslu hücre sayıları

	Gözlenen Mikronükleuslu Hücre Sayıları						Medyan	Minimum	Maksimum	Negatif Kontrolle Karşılaştırma
	1A	1B	2A	2B	3A	3B				p
Negatif kontrol	8	14	10	5	13	16	11,500	5,000	16,000	-
0.04 mg/L	12	9	7	6	7	16	8,000	6,000	16,000	0,345
0.11 mg/L	6	14	14	11	16	14	14,000	6,000	16,000	0,223
0.33 mg/L	11	15	11	9	7	14	11,000	7,000	15,000	0,752
1 mg/L	4	11	6	9	10	12	9,500	4,000	12,000	0,194
3 mg/L	19	6	10	10	13	11	10,500	6,000	19,000	0,854
9 mg/L	18	21	9	7	13	15	14,000	7,000	21,000	0,223
Pozitif kontrol	25	34	21	20	27	24	24,500	20,000	34,000	0,028*

A: Gönüllülerin birinci kültürü, B: Gönüllülerin ikinci kültürü, \* İstatiksel olarak anlamlı farklılık

**Tablo III-** Toplam mikronükleus sayıları

	Gözlenen Toplam Mikronükleus Sayıları						Medyan	Minimum	Maksimum	Negatif Kontrolle Karşılaştırma
	1A	1B	2A	2B	3A	3B				p
Negatif kontrol	9	15	13	5	13	20	13,000	5,000	20,000	-
0.04 mg/L	12	13	8	7	7	18	10,000	7,000	18,000	0,340
0.11 mg/L	10	16	17	12	20	17	16,500	10,000	20,000	0,114
0.33 mg/L	13	17	13	9	8	18	13,000	8,000	18,000	0,785
1 mg/L	4	11	7	9	10	13	9,500	4,000	13,000	0,093
3 mg/L	22	8	11	13	13	11	12,000	8,000	22,000	0,893
9 mg/L	18	22	10	7	14	21	16,000	7,000	22,000	0,172
Pozitif kontrol	27	35	21	21	30	38	28,500	21,000	38,000	0,027*

A: Gönüllülerin birinci kültürü, B: Gönüllülerin ikinci kültürü, \* İstatiksel olarak anlamlı farklılık

önerilmektedir<sup>13,14</sup>. Bu nedenle çalışmamızda test ajanı, hücrelerin genotoksik etkilere daha duyarlı

olduğu 43. saatte kültürlerle eklenmiş ancak buna rağmen mikronükleus değerlerinde anlamlı artış tespit

edilmemiştir. Bu sonucun alınmasında izole lenfosit yerine tam kan kullanılmasının olası etkisi speküle edilebilir. Tam kan lenfosit kültürlerinde eritrositlerin varlığının promotajenlerin metabolizasyonuna yardım ettiği ya da antioksidan etkilerle genotoksositeye engel olduğu bilinmektedir<sup>14</sup>. Bu etkiler nedeniyle tam kan lenfosit kültürlerinin in vivo ortamı daha iyi temsil ettikleri ve daha uygun deneysel koşullar sağladıkları belirtilmektedir<sup>14,15</sup>.

Genotoksosite araştırılması amacıyla yapılan sitogenetik çalışmalarda sitotoksosite ölçüsü olarak ajanla muamele sonrası hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi önerildiğinden<sup>16</sup>, çalışmamızda SBPE hesaplanarak sitotoksosite ölçüsü olarak sitostazis yüzdesi kullanılmıştır. Benzalkonyumun sitotoksitesini ile ilgili elde edilen sonuçlar bugüne kadar yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Pozorowska ve Pozorowski'nin, Jurkat hücre serilerinde yaptıkları çalışmada<sup>5</sup>, 1mg/L konsantrasyonunda başlayan sitotoksik etkiler gözlenmiştir. Sunulan çalışmamızda da aynı konsantrasyondan itibaren anlamlı sitotoksik etki gözlenmeye başlanmıştır. Bu benzerlik, lenfositlerin epitel hücrelerine göre benzalkonyum klorüre daha duyarlı oldukları bulgusunu<sup>5</sup> desteklemektedir. Ferk ve ark. ise 1 mg/L'de anlamlı sitostazis gözlememekle birlikte, bir üst konsantrasyon olan 3 mg/L'de yüksek sitostatik etki gözlemlenmiştir<sup>7</sup>.

Ye ve ark.nın insan kornea epitel hücrelerinde yaptıkları çalışmada benzalkonyum klorürün düşük konsantrasyonlarda bile DNA zincir kırıklarına neden olduğu ve bu hasarın sitotoksositeyle korele olduğu gösterilmiştir<sup>9</sup>. Ferk ve ark. da anlamlı sitotoksitenin başlamadığı dozlarda genotoksik etkinin başladığını gözlemişlerdir<sup>7</sup>. Çalışmamızda ise yüksek toksisitenin gözlemlendiği 9 mg/L benzalkonyum konsantrasyonunda bile anlamlı genotoksik etki ortaya çıkmamıştır.

Sonuç olarak benzalkonyum klorürün çalışmamızda in vitro koşullarda uygulanan bazı konsantrasyonlarda sitotoksik etkisi gözlemlendiği halde genotoksik etkisi gözlenmemiştir. Sunulan çalışma benzalkonyum klorürün in vitro koşullarda insan hücrelerinde mikronükleus oluşumuna etkisini araştıran literatürdeki ikinci çalışmadır. Önceki çalışmalarda saptanan genotoksik etkinin, bu çalışmada in vivo koşullara görece yakın kültür ortamında saptanmaması, benzalkonyum klorürün insanlar üzerindeki genotoksik etkisinin araştırılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu göstermiştir.

## Kaynaklar

1. Mallants R, Jorissen M, Augustijns P. Effect of preservatives on ciliary beat frequency in human nasal epithelial cell culture: Single versus multiple exposure. *Int J Pharm* 2007;338:64-9.
2. Baudouin C, Labbé A, Liang H, Pauly A, Brignole-Baudouin F. Preservatives in eyedrops: The good, the bad and the ugly. *Prog Retin Eye Res* 2010;29:312-4.
3. Ayaki M, Iwasawa A, Inoue Y. Toxicity of antiglaucoma drugs with and without benzalkonium chloride to cultured human corneal endothelial cells. *Clin Ophthalmol* 2010;4:1217-22.
4. Ammar D A., Noecker R J, Kahook M Y. Effects of benzalkonium chloride-preserved, polyquad- preserved, and sofzia-preserved topical glaucoma medications on human ocular epithelial cells. *Adv Ther* 2010;27(11):837-45.
5. Pozarowska D, Pozarowski P. Benzalkonium chloride (BAK) induces apoptosis or necrosis, but no major influence on cell cycle of Jurkat cells. *Folia Histochem Cyto* 2011;49(2):225-30.
6. Sakagami U, Yamazaki H, Ogasawara N, Yokoyama H, Ose Y, Sato T. The evaluation of genotoxic activities of disinfectants and their metabolites by umu test. *Mutat Res* 1988;209:155-60.
7. Ferk F, Misik M, Hoelzl C et al. Benzalkonium chloride (BAC) and dimethyldioctadecyl-ammonium bromide (DDAB), two common quaternary ammonium compounds, cause genotoxic effects in mammalian and plant cells at environmentally relevant concentrations. *Mutagenesis* 2007 22(6):363-70.
8. Deuschle T, Porkert U, Reiter R, Keck T, Riechelmann H. In vitro genotoxicity and cytotoxicity of benzalkonium chloride. *Toxicol in Vitro* 2006;20:1472-7.
9. Ye J, Wu H, Zhang H, et al. Role of benzalkonium chloride in DNA strand breaks in human corneal epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011;249:1681-7.
10. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environmental Health Perspectives Supplements* 1993;101(3):101-7.
11. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2007;2(5):1084-104.
12. Katic J, Cemeli E, Baumgartner A, et al. Evaluation of the genotoxicity of 10 selected dietary/environmental compounds with the in vitro micronucleus cytokinesis-block assay in an interlaboratory comparison. *Food Chem Toxicol* 2010;48:2612-23.
13. Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat Res* 2003;540:153-63.
14. Clare MG, Lorenzon G, Akhurst LC et al. SFTG international collaborative study on in vitro micronucleus test II. Using human lymphocytes. *Mutat Res* 2006;607:37-60.
15. Migliore L, Nieri M, Amodio S, Loprieno N. The human lymphocyte micronucleus assay: a comparison between whole-blood and separated-lymphocyte cultures. *Mutat Res* 1989;227:167-72.
16. Galloway SM, Lorge E, Aardema MJ, et al. Workshop summary: Top concentration for in vitro mammalian cell genotoxicity assays; and report from working group on toxicity measures and top concentration for in vitro cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus). *Mutat Res* 2011;723:77-83.