



Anabolik Steroidlerin Genotoksik ve Sitotoksik Etkilerinin İnsan Periferik Lenfosit Kültüründe Mikronükleus Test Tekniğiyle Araştırılması

Arif AYAR¹, Handan UYSAL², Deniz ALTUN ÇOLAK³

¹Sabuncuoğlu Şerefeddin Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Amasya Üniversitesi, Amasya, Türkiye

²Biyoloji Bölümü, Fen Fakültesi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, Türkiye

³Biyoloji Bölümü, Fen Edebiyat Fakültesi, Erzincan Üniversitesi, Erzincan, Türkiye

Received: 27.07.2016; Accepted: 10.10.2016

Özet. Spor tarihi boyunca genç yaşta bir çok sporcunun doping amacıyla anabolik-androjenik steroidleri yoğun olarak kullandığı bilinmektedir. Bu çalışmayla, kullanımı yasaklanmış olsa da yapılan araştırmalarda illegal olarak halen sıkça kullanılmakta olan Nandrolone Decanoate (Deca-durabolin®) ve Stanozolol (Winstrol) doping maddelerinin olası genotoksik, mutajenik ve sitotoksik etkilerinin insan kan kültüründe in vitro mikronükleus testi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla doping maddelerinin farklı konsantrasyonları (1, 10, 25, 50, 75 ve 100 mM) hazırlanmış ve kan kültürüne uygulanmıştır. Genotoksik etki için mikronükleus frekansları, sitotoksik etki için ise Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ) hesaplanmıştır. Elde edilen veriler, çözücü olarak kullanılan dimetil sülfoksit (DMSO) ile hazırlanan negatif kontrol grubuyla ve genotoksik etkisi çok iyi bilinen Etil metansülfonat (EMS) ile hazırlanmış pozitif kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Bu sonuçlara göre; çalışmamızda kullandığımız doping maddelerinden Nandrolone Decanoate özellikle son iki konsantrasyonda (75 ve 100 mM) insan periferik lenfositlerinde mikronükleus frekansını istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bir şekilde artırmıştır. Ayrıca NBİ oranlarına bakıldığında da özellikle son iki konsantrasyonda kontrol grubuna göre önemli düşüşler tespit edilmiştir. Bununla birlikte diğer doping maddesi olan Stanozolol ise sadece son konsantrasyonda (100 mM) anlamlı artışlara neden olmuşken NBİ değerini etkilememiştir. Tüm elde ettiğimiz sonuçlardan her iki doping maddesinin de yüksek konsantrasyonlarda genotoksik ve sitotoksik etkiler yaratabileceği bu nedenle kullanımlarının tehlikeli olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Genotoksisite, Lenfosit kültürü, Mikronükleus, Nandrolone Decanoate, Stanozolol

The Investigation of the Cytotoxic and Genotoxic Effects of the Anabolic Steroids in Human Peripheral Lymphocytes Culture by Micronucleus Test

Abstract. Throughout the sports history anabolic -androgenic steroids are known to be used intensively for the purpose of doping in athletes at very young age. In this study, the genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of possible doping substances, Nandrolone Decanoate (Deca-durabolin®) and stanozolol (Winstrol) that are currently being illegally widely used, though the use of them are prohibited, are used to determine in human blood culture by in vitro micronucleus test. For this purpose, different concentrations of doping substances (1, 10, 25, 50, 75 and 100 mM) were prepared and applied to the blood culture. For genotoxic effects micronucleus frequency and for to the cytotoxic effects Nuclear Fission Index (NBI) was calculated. The obtained data was compared to the negative control group that were prepared with dimethyl sulfoxide (DMSO) as solvent and a well-known genotoxic effects of Ethyl methanesulfonate (EMS) as positive control group. Based on these results; in our study the doping substances Nandrolone decanoate caused a statistically significant ($p < 0,05$) increase in human peripheral lymphocyte micronucleus frequency, especially in the last two concentrations (75 and 100 mM). Considering also NBA rate, there was a dramatic decline in the last two concentrations when compared to the control group. However, other doping agents stanozolol did not affect the result significantly, it only caused an increase in the final concentration (100 mM) and the value NB was not affected. Therefore it was concluded that both doping substances can cause genotoxic and cytotoxic effects in high concentrations and use of these substances can be dangerous.

Keyword: Genotoxicity, Lymphocyte culture, Micronucleus, Nandrolone Decanoate, Stanozolol

* Corresponding author. Email address: dnz_altun@yahoo.com

1. GİRİŞ

Anabolik-androjenik steroidler, doping maddeleri arasında en önemli grubu oluşturan sentetik testosteron türevi ilaçlardır [1]. Bu ilaç grubu özellikle büyüme geriliği, metastatik göğüs tümörleri, ergenlik gecikmesi, endometriosis ve osteoporoz gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [2, 3]. Testosteron, hem üreme hem de üreme ile ilgisi olmayan hedef dokular üzerinde androjenik ve anabolik olarak sınıflandırılan etkileri vardır. Anabolik etkiler, azotun bağlanmasını teşvik ederek protein sentezini arttırırken; adrojenik etkiler, erkek üreme sisteminin ve ikincil cinsiyet karakterlerinin gelişiminden sorumludur [4]. Özellikle protein sentezinin stimülasyonunda anabolik etkiler oluşturmak ve performans arttırmak için androjenik steroidler kullanılmaktadır [5]. Testosteron ve türevlerinin birincil derecede anabolik etkisi, daha büyük kas kitlesi ve dayanıklılık etkisi sağlamaktır. Günümüzde sporcuların kas geliştirmek ve fiziksel performanslarını arttırmak için bu ilaçları doping maddesi olarak kullandıkları bilinmektedir [6]. İşte bu şekilde ilaç kullanımının ilerlemesi ile doping yüzünden sağlığını, hatta hayatını kaybeden sporcu sayısı da gittikçe artmaktadır. Nandrolone Decanoate ve Stanozolol bu grup ilaçlardan iki tanesidir.

Bu çalışmayla, kullanımı yasaklanmış olsa da yapılan araştırmalarda illegal olarak halen sıkça kullanılmakta olduğu belirlenmiş Nandrolone Decanoate (Deca-durabolin®) ve Stanozolol (Winstrol) doping maddelerinin olası genotoksik, mutajenik ve sitotoksik etkilerinin insan kan kültüründe *in vitro* mikronükleus testi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Mikronükleus test sistemi çeşitli kimyasal maddelerin insan genomunda mutasyonlara sebep olup olmadıklarının ortaya çıkarılmasında, kromozomal bozuklukların tespitinde memelilerdeki test sistemleri arasında en ekonomik ve en kısa süreli yöntem olması nedeniyle genetik toksikoloji çalışmalarında çok geniş bir kullanım alanına sahiptir [7]. Ayrıca yapılan birçok çalışmada mikronükleus sayısının artışının kanser [8, 9] ve obezite, diyabet, kardiyovasküler bozukluklar [10], nörodejeneratif hastalıklar [11] gibi birçok kronik rahatsızlıkla bağlantılı olabileceği sonucuna varılmıştır. Kısa süreli genotoksisite testlerinden biri olan mikronükleus testinde, kimyasal madde uygulaması sonucunda meydana gelen mikronükleusların, hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan ve esas çekirdeğe dahil olmayan, asentrik kromozom fragmentlerinden ve/veya iğ ipliklerinden ayrılarak kutuplara göç edemeyen tam bir kromozomdan oluştukları belirlenmiştir [12]. Fenech [13]'e göre telofazda ayrı kalmış kromozomlar ve/veya fragmentlerin etrafında çekirdek zarı teşekkül etmekte ve böylece ana nükleustan daha küçük yapıda mikronükleuslar oluşmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda, büyük mikronükleusun, bir kromozom kaybından kaynaklanan anöjenik etkiyi, küçük mikronükleusun ise genetik materyal kaybını gösterdiği tespit edilmiştir [14].

Sigara ve alkol kullanımı [15], yaş [16], cinsiyet [17], çeşitli kronik ve enfeksiyonel hastalıklar, yaşam tarzı, ilaçlar ile fiziksel ve kimyasal ajanlara maruziyet [18, 19] gibi faktörler mikronükleus oluşumunu etkilemektedir. Bu nedenle çalışmamızda kullanılan kan örnekleri belirli kişilerden temin edilmiştir.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışmamızın tümünde materyal olarak sigara ve alkol kullanmayan, yakın zamanda enfeksiyon hastalığı geçirmemiş, X ışını gibi herhangi bir fiziksel ajana maruz kalmamış, 23-25 yaşlarında sağlıklı erkek ve kadınlardan alınan periferik kanlar kullanılmıştır.

2.1. Hücre kültürünün yapılması: Mikronükleus sayısını saptamak için Fenech [20] tarafından geliştirilen metod modifiye edilerek kullanılmıştır. Steril hücre kültür tüplerine önceden hazırlanmış ve 37°C'e getirilmiş besiyerinden (Kromozom Medyum B) (Biochrom, Berlin, Germany) 6 mL konulmuştur. Her tüpe 12 damla (0,5 mL) kan damlatılmıştır. Tüplerdeki kültürlerle belirlenen konsantrasyonlarda hazırlanan steroid çözeltilerinden 0,25 mL ilave edilmiş ve iyice karışmaları

sağlanmıştır. Tüpler 37°C'lik etüvde 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun başlangıcından 48 saat sonra sitokalazin-B (Sigma, MO, USA)'den son konsantrasyonu 3 µg/mL olacak şekilde tüm kültür tüplerine eklenmiştir. Tüpler tekrar etüve konarak (37°C'de) 72 saatlik inkübasyon süresinin tamamlanması beklenmiştir. 72 saatin sonunda etüvden çıkarılan tüpler 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Tüplerde kalan çökeltinin (pellet) üzerine 5- 6 mL hipotonik çözelti yavaş yavaş eklenmiştir. Hipotonik çözelti eklenen tüpler 37°C'ye ayarlanmış etüvde 25 dk bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler 1000 rpm'de tekrar 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant aynı şekilde atılmıştır. Süpernatant atıldıktan sonra tüplerde kalan pelletler üzerine, taze olarak hazırlanmış soğuk tespit çözeltisinden 7 mL vortekslenerek ilave edilmiş ve 1000 rpm'de 10 dk santrifüj işlemine alınıp oluşan süpernatant pastör pipeti ile çekilerek atılmıştır. Son basamak tüplerdeki görüntü iyice berrak oluncaya kadar ortalama 2-3 kez tekrarlanmıştır. Tüplerdeki süpernatant son olarak atılmış ve kalan pellet pastör pipetiyle pipetaj yapılarak karıştırılmıştır. Pipetle çekilen pellet, soğuk (+4°C) tespit çözeltisi içerisinde bekletilen lamlara yaklaşık 20- 25 cm yükseklikten damlatılmıştır. Bu şekilde hazırlanan preparatlar boyanmak üzere 3 gün kurumaya bırakılmıştır.

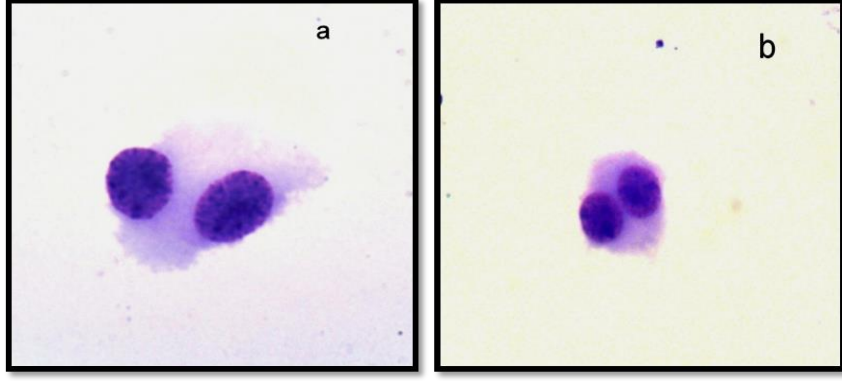
2.2. Daimi preparatların hazırlanması ve hücre sayımı: 3. günün sonunda iyice kuruyan preparatlar 15 dk Giemsa boyasında bekletilmiştir. Süre sonunda preparatlar musluk suyundan geçirilerek oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan lamalar entellan kullanılarak lamel ile kapatılmış ve incelemeye hazır daimi preparatlar hazırlanmıştır. Hazırlanan daimi preparatlar trinoküler ışık mikroskopunda incelenirken önce 10'luk objektifte saha tespiti yapılmış daha sonra 40'luk objektif ile hücreler tek tek sayılmıştır. Bu incelemeler sırasında her bir kişiden hazırlanan preparatlardan 1000 adet iki nükleuslu (binükleer) hücre sayılmış, bu iki nükleuslu hücreler içerisinde mikronükleuslu olanlar saptanmış ve kaydedilmiştir. Ayrıca Nandrolone Decanoate ve Stanozolol'ün olası sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla aynı kişiden hazırlanan preparatlardan 1000 hücre sayılmış ve bu hücreler arasından bir, iki, üç ve dört nükleuslu olanların oranı saptanmıştır. Bu orandan yola çıkarak Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ) hesaplanmıştır.

2.3. İstatistiksel analiz: Çalışmalarımızdan elde ettiğimiz MN ve NBİ değerleriyle ilgili istatistiksel analizler için, SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 13.0 programı kullanılmıştır. Elde edilen verilerin distile su kontrol ve uygulama grupları arasında karşılaştırılması için tek değişkenli varyans analizi (ANOVA) ve Tukey testleri uygulanmıştır.

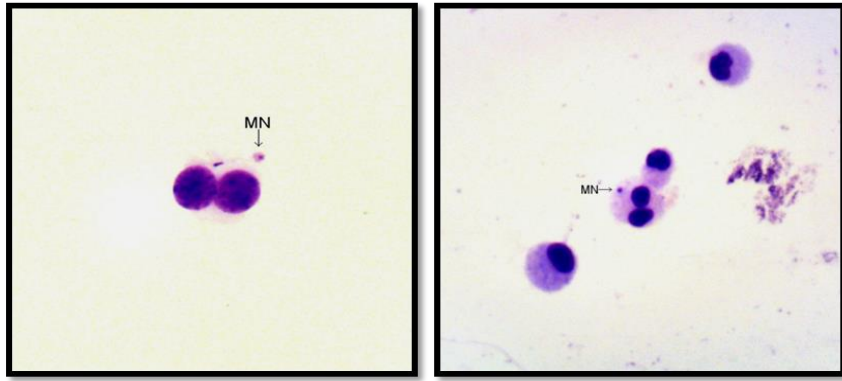
3. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dört farklı donörden alınan kan ile hazırlanan periferik kan kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (1, 10, 25, 50, 75 ve 100 mM) doping maddeleri ve EMS uygulaması sonucu elde edilen mikronükleus (MN) frekansları ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) verileri Çizelge 1 ve 2'de sunulmuştur. Ayrıca tüm uygulama gruplarının negatif kontrol grubuyla karşılaştırılması sonucu oluşan istatistiksel veriler de aynı çizelgelerde belirtilmiştir. MN frekansları elde edilirken her bir donörden 1000 adet olmak üzere dört farklı donörden toplam 4000 adet binükleuslu hücre, NBİ için ise her bir donörden rastgele seçilmiş 1000 hücre incelenmiştir. Ayrıca mikroskopik incelemeler sonucunda elde edilen mikronükleus taşımayan binükleuslu hücrelere ait fotoğraflar Şekil 1'de, mikronükleus taşıyan binükleuslu hücrelere ait fotoğraflar ise Şekil 2 ve 3'de gösterilmiştir.

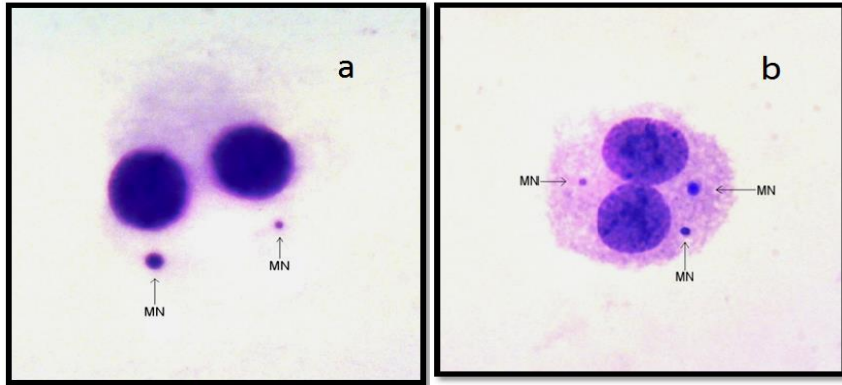
Anabolik Steroidlerin Genotoksik ve Sitotoksik Etkilerinin



Şekil 1. Mikronükleus taşımayan binükleuslu hücreler; a)10x100, b)10x40 büyütme.



Şekil 2. Tek mikronükleus (MN) taşıyan binükleuslu hücreler (10x40).



Şekil 3. a) Çift mikronükleus (MN) ve b) üç mikronükleus (MN) taşıyan binükleuslu hücreler.

Farklı konsantrasyonlarda Nandrolone Decanoate uygulamasıyla elde edilen ortalama MN miktarları sırasıyla $0,375 \pm 1,19$; $0,500 \pm 0,40$; $0,475 \pm 0,62$; $0,775 \pm 0,40$; $1,525 \pm 1,19$ ve $1,875 \pm 0,32$ iken, bu oranların pozitif kontrol grubunda $2,575 \pm 1,31$, negatif kontrol grubunda ise $0,275 \pm 0,62$ olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 1). Binükleuslu hücreler içerisinde tespit edilen MN frekanslarında meydana gelen artış aynı zamanda uygulanan maddenin de genotoksik etkisini belirlemektedir. Nandrolone Decanoate uygulaması sonrası incelenen binükleuslu hücreler içerisindeki MN frekanslarına bakıldığında, sadece

EMS pozitif kontrol grubunda ve son iki Nandrolone Decanoate uygulama gruplarında (75 ve 100 mM) 3'lü MN'lar gözlenmiştir. Diğer gruplarda (1, 10, 25 ve 50 mM) ise tekli MN'ların olduğu belirlenmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1 incelendiğinde, tüm Nandrolone Decanoate uygulama gruplarında (1, 10, 25, 50, 75 ve 100 mM) ortalama MN sayısının artmasına rağmen bu sonuçlar negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında son iki grup (75 ve 100 mM) hariç tüm gruplarda istatistiksel olarak $p > 0,01$ düzeyinde önemsiz bulunmuştur.

Çalışmamızda ayrıca, anabolik steroidlerin olası sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla nükleer bölünme indeksi (NBİ) değerleri hesaplanmıştır. Bu değer 1, 2, 3 ve 4 nükleusa sahip hücrelerin sayılıp toplam hücre sayısına bölünmesiyle elde edilmiştir. Sonuçta sitotoksik etki gösteren doping maddelerinin uygulama gruplarında 1 nükleuslu hücre sayısının artıp 2, 3 ve 4 nükleuslu hücre sayısının düşüş gösterdiği belirlenmiştir. Çizelge 1'de Nandrolone Decanoate NBİ üzerine etkisi incelendiği zaman, 1, 10, 25 ve 50 mM'lık uygulama gruplarında negatif kontrol grubuna yakın, özellikle 50, 75 ve 100 mM'lık uygulama gruplarında ise negatif kontrol grubundan çok daha düşük değerler tespit edilmiştir. Şöyle ki, NBİ oranları Nandrolone Decanoate uygulama gruplarında sırasıyla $1,50 \pm 0,25$; $1,44 \pm 0,29$; $1,46 \pm 0,21$; $1,18 \pm 0,19$; $1,20 \pm 0,21$; $1,30 \pm 0,26$ iken, pozitif kontrol grubunda bu oran $1,48 \pm 0,18$, negatif kontrol grubunda ise $1,53 \pm 0,12$ olarak belirlenmiştir (Çizelge 1). Elde edilen tüm NBİ değerleri negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında yine son iki uygulama grubu (75 ve 100 mM) hariç hiçbir uygulama grubunda sonuç anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,01$).

Çizelge 1. Farklı konsantrasyonlarda Nandrolone Decanoate uygulaması sonucu insan periferik lenfosit hücrelerinde oluşan MN ve NBİ değerleri.

Uygulama Grupları	Konsantrasyon (mM)	İncelenen Binükleuslu Hücre Sayısı	Binükleuslu Hücreler İçindeki MN Frekansları			Ortalama MN \pm S.H. (%)	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ) \pm S.H.
			(1)	(2)	(3)		
Distile su	-	4000	9	1	-	$0,275 \pm 0,62$	$1,53 \pm 0,12$
EMS	$0,7 \mu\text{g/mL}$	4000	71	10	4	$2,575 \pm 1,31^*$	$1,48 \pm 0,18$
Nandrolone Decanoate	1	4000	15	-	-	$0,375 \pm 1,19$	$1,50 \pm 0,25$
	10	4000	20	-	-	$0,500 \pm 0,40$	$1,44 \pm 0,29$
	25	4000	19	-	-	$0,475 \pm 0,62$	$1,46 \pm 0,21$
	50	4000	21	1	-	$0,775 \pm 0,40$	$1,30 \pm 0,26$
	75	4000	31	1	1	$1,525 \pm 1,19^*$	$1,20 \pm 0,21^*$
	100	4000	35	3	2	$1,875 \pm 0,32^*$	$1,18 \pm 0,19^*$

MN: Mikronükleus; S.H.: Standart hata; *: Gruplar arasındaki fark $p < 0,01$ düzeyinde önemlidir.

Çalışmamızda kullandığımız Stanozolol'un insan periferik lenfosit hücrelerine farklı konsantrasyonlarda (1, 10, 25, 50, 75 ve 100 mM) uygulanması sonucunda elde edilen ortalama MN miktarları sırasıyla $0,250 \pm 0,64$; $0,300 \pm 0,40$; $0,300 \pm 0,70$; $0,425 \pm 0,47$; $0,475 \pm 0,62$ ve $1,125 \pm 1,32$ iken bu oranlar pozitif kontrol grubunda $2,575 \pm 1,31$, negatif kontrol grubunda ise $0,275 \pm 0,62$ olarak tespit edilmiştir (Çizelge 2). İncelenen binükleuslu hücreler içerisindeki MN frekanslarına bakıldığında sadece EMS pozitif kontrol grubu ve en yüksek konsantrasyondaki (100 mM) Stanozolol uygulama grubunda

Anabolik Steroidlerin Genotoksik ve Sitotoksik Etkilerinin

3'lü MN görüldüğü, diğer uygulama gruplarında ise sadece tekli MN'ların olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2 incelendiği zaman, Stanozolol'un en düşük konsantrasyon dışında tüm konsantrasyonlarda MN miktarını artırdığı gözükmemektedir. Ancak bu artışın tüm Stanozolol uygulama grupları için negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sadece en yüksek konsantrasyonun uygulandığı 100 mM'lık grupta istatistiksel olarak önemli ($p<0,01$) olduğu gözlenmiştir. Ayrıca 1, 2, 3 ve 4 nükleuslu hücrelerin sayılmasıyla hesaplanan nükleer bölünme indeksinin (NBİ) Stanozolol'un en düşük konsantrasyonlu grubu hariç tüm konsantrasyonlarında negatif kontrol grubuna göre düştüğü ve stotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 2). NBİ oranları Stanozolol uygulama gruplarında sırasıyla 1,55±0,21; 1,46±0,25; 1,46±0,16; 1,48±0,34; 1,25±0,21 ve 1,20±0,21 iken, EMS pozitif kontrol grubunda bu oran 1,48±0,18, negatif kontrol grubunda ise 1,53±0,12 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 2). NBİ oranları istatistiksel olarak negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sadece son iki konsantrasyonda (75 ve 100 mM) anlamlı sonuç verdiği gözlenmiştir ($p> 0,01$). EMS grubu da dahil diğer tüm uygulama gruplarından elde edilen veriler istatistiksel olarak önemsiz sonuç vermiştir ($p< 0,01$).

Çizelge 2. Farklı konsantrasyonlarda Stanozolol uygulaması sonucu insan periferik lenfosit hücrelerinde oluşan MN ve NBİ değerleri.

Uygulama Grupları	Konsantrasyon (mM)	İncelenen Binükleuslu Hücre Sayısı	Binükleuslu Hücreler İçindeki MN Frekansları			Ortalama MN Sayısı ±S.H. (%)	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ) ±S.H.
			(1)	(2)	(3)		
Distile su	-	4000	9	1	-	0,275±0,62	1,53±0,12
EMS	0,7 µg/mL	4000	71	10	4	2,575±1,31*	1,48±0,18
Stanozolol	1	4000	10	-	-	0,250±0,64	1,55±0,21
	10	4000	12	-	-	0,300±0,40	1,46±0,25
	25	4000	12	-	-	0,300±0,70	1,46±0,16
	50	4000	17	-	-	0,425±0,47	1,48±0,34
	75	4000	19	1	-	0,475±0,62	1,25±0,21*
	100	4000	26	1	2	1,125±1,32*	1,20±0,21*

MN: Mikronükleus; S.H.: Standart hata; *: Gruplar arasındaki fark $p< 0,01$ düzeyinde önemlidir.

Anabolik steroidlerin bilinen birçok yan etkisi mevcuttur. Bunların başlıcaları, kardiyomiyopati, ateroskleroz, hiperkoagülopati, yükselmiş kan basıncı, miyokardiyal hipertrofi, aritmi, tromboz, dermatolojik bozukluklar, libidoda değişiklikler, subfertilite, testiküler atrofi, impotans, hepatik disfonksiyon, psikiyatrik ve davranışsal bozukluklardır. Yasal olmayan steroidler, atletler tarafından hız ve güç sağlamak için, erkekler tarafından ise kas yapmak amacıyla, önemli yan etki oluşturma risklerine rağmen güçlü bir cazibe oluşturmaktadır [21]. Anabolik steroidlerin uzun süreli ve kötü kullanımı sonucunda özellikle kardiyovasküler sistem bozukluklarının neden olduğu ani kardiyak ölümler, kalp krizleri, serum lipoprotein değerlerinde değişiklikler ve kardiyak hipertrofiyle kendini gösteren ölüm vakalarının görüldüğü belirlenmiştir [22].

Literatürde elde ettiğimiz sonuçlara paralellik gösteren ve bu sonuçların muhtemel nedenlerini vurgulayan pek çok çalışma mevcuttur. Örneğin, Nandrolone androjenik hormonunun farelerde genotoksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışma sonucunda ilacın komet ve mikronükleus testi sonuçlarına göre artan konsantrasyona bağlı olarak genotoksik ve klastojenik etki gösterdiği belirlenmiştir [23]. Yine aynı doping maddesiyle yapılan benzer bir çalışmada ratların kan, karaciğer, kalp ve böbrek gibi birçok dokusunda genetik hasara neden olduğu komet testi ile tespit edilmiştir [24]. Martins ve arkadaşları [25]

yaptıkları çalışmada mikronükleus testi ile dekadurabolin ve winstrol anabolik steroidlerinin uzun süre kullanımı sonucunda ağız mukoza hücrelerinde genotoksik etki oluşturdukları ayrıca piknozis, karyolizis ve karyoreksis gibi kromozom hasarlarını arttırdıklarını belirlemiştir.

Türkoğlu [26] yaptığı çalışma sonucunda, kimyasal madde maruziyetinden sonra mitotik aşamaların etkilendiğini, profaz indeksinde artış olurken metafaz ve anafaz- telofaz indekslerinde düşüşlerin olduğunu belirlemiştir. Benzer sonuçların elde edildiği diğer çalışmalar sonucunda gözlenen bu etkinin CHFR (profaz/metafaz arası kontrol noktası) noktasından kaynaklandığı belirlenmiştir [27]. Scolnic ve Halazonetis [28] CHFR'yi, mitotik strese yanıt olarak, hücrelerin metafaz safhasına girmesini geciktiren bir denetim noktası olarak tanımlamışlardır.

Erdoğan [29] koruyucu gıda katkı maddesi olarak kullanılan sodyum metabisülfid, potasyum metabisülfid, sodyum propionat, potasyum propionat ve kalsiyum propionatın *Allium cepa*'da mitoz bölünme, kromozomlar ve DNA miktarı üzerine olan etkilerini araştırmıştır. Araştırma sonucunda, kullanılan tüm maddelerin mitotik safhaların oranlarını değiştirdiğini ve bu değişimlerin kullanılan kimyasal maddenin dozlarına bağlı olarak S fazındaki DNA sentezinin inhibisyonundan ve/veya iğ ipliği formasyonunun bloke olmasından kaynaklanabileceği vurgulanmıştır. Bununla birlikte birçok araştırmacı, kimyasal maddelerin mitotik indeks veya rekombinasyon indeksi üzerine etkilerinin, mitoza giren hücrede G₂ aşamasının bloke edilmesinden [30] veya ATP seviyesinin düşüşüne bağlı olarak enerji üretim merkezlerinin baskılanmasından [31] ya da replikasyonda görevli DNA polimeraz ve mitotik iğ ipliklerinin sentezinde etkili olan çeşitli enzim yapılarının bozulmasından kaynaklanmış olabileceğini belirtmişlerdir [32]. Ayrıca, bölünen hücre sayısındaki azalmanın, uygulanan kimyasal maddelerin mitodepresif etkilerinden kaynaklandığı da düşünülmektedir. Schulze and Kirschner [33]'a göre, mitodepresyon aynı zamanda DNA ve çekirdek proteinlerinin sentezini de engellemektedir. Yapılan birçok araştırma sonucunda uygulanan kimyasal maddelerin daha çok interfazın S ve G₂ alt fazlarında genotoksik etki gösterdikleri ve bu nedenle diğer fazlara geçebilen hücre sayısında azalmaların olduğu belirlenmiştir [34].

Yapılan araştırmalar sonucunda, kimyasal maddelerin hücre enerji üretim merkezlerinin fonksiyonlarını baskı altında tutarak ATP sentezinin azaltıldığı ve bunun sonucunda hücre bölünmesinin yavaşlayıp sitotoksik etkilerin ortaya çıktığı tespit edilmiştir [31, 35]. Bazı araştırmacılar da kimyasal maddelerin *in vitro* sitotoksik etkilerinin DNA çift iplik kırıklarının oluşmasına bağlı olarak ortaya çıktığını bildirmişlerdir [36, 37]. Giri ve arkadaşları [38] kromozomal anormalliklerin kimyasal maddelerde bulunan alkilleyici özellikten kaynaklandığını, alkilleyici ajanların da DNA hasarına yol açtığını belirtmişlerdir. Kimyasal maddelerin mutajenik aktivitesinin onların molekül yapısındaki alkil ve fosforil gruplarını taşıyan elektrofilik kısmın DNA'daki nükleofilik kısma bağlanabilme kapasitesine bağlı olabileceği belirtilmiştir [38]. Yapılan birçok araştırma sonucunda, kromozomal anormalliklerin oluşmasında hücre siklusunun G₂ fazının çok önemli olduğu bildirilmiştir. Aslında oluşabilecek DNA hasarının büyük bir kısmı, hücre siklusunun G₂ fazında tamir edilebilmektedir [39- 41]. Ancak yapılan çalışmalar sonucunda, kromozomal anormalliklerin artması DNA tamirinin yapılmadığı, yanlış yapıldığı veya engellendiği şeklinde yorumlanmaktadır. DNA sentezi esnasında, çeşitli kimyasal maddelerin mutajenik etkilerine bağlı olarak oluşan zincir kırıkları veya G₂ fazının bloke olması kromozomal anormalliklerin oluşmasına neden olmaktadır.

Tüm elde ettiğimiz sonuçlardan her iki doping maddesinin de yüksek konsantrasyonlarda genotoksik ve sitotoksik etkiler yaratabileceği bu nedenle kullanımlarının tehlikeli olabileceği sonucuna varılmıştır.

4. TEŞEKKÜR

Bu çalışma Amasya Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi tarafından FMB-14-066 kodlu proje ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Amasya Üniversitesi BAP Birimine teşekkür ederiz.

5. KAYNAKLAR

1. van Amsterdam J., Opperhuizen A., Hartgens F. Adverse health effects of anabolic-androgenic steroids. *Regul Toxicol Pharmacol* 2010; 57 (1): 117-23.
2. Shahidi N.T. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clin Ther* 2001; 23: 1355-90.
3. Hemmersbach, P. and Grobe J. Nandrolone: a multi-faceted doping agent, *Handb Exp Pharmacol* 2010; 195: 127-54.
4. Maravelias C., Dona A., Stefanidou M., Spiliopoulou C. Adverse effects of anabolic steroids in athletes: A constant threat. *Toxicol Lett* 2005; 158: 167-75.
5. Schanzer W. and Thevis M. Doping in sport. *Med Klin* 2007; 102: 631-46.
6. Oberlander J.G., Porter D.M., Penatti C.A.A., Henderson L.P. Anabolic androgenic steroid abuse: multiple mechanisms of regulation of GABAergic synapses in neuroendocrine control regions of the rodent forebrain. *J Neuroendocrinol* 2012; 24: 202-14.
7. Battershill J.M., Burnett K., Bull S. Factors affecting the incidence of genotoxicity biomarkers in peripheral blood lymphocytes: impact on design of biomonitoring studies. *Mutagenesis* 2008; 23: 423-37.
8. Bonassi S., El-Zein R., Bolognesi C., Fenech M. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis* 2011; 26: 93-100.
9. El-Zein R., Vral A., Etzel C.J. Cytokinesis-blocked micronucleus assay and cancer risk assessment. *Mutagenesis* 2011; 26: 101-06.
10. Andreassi M.G., Barale R., Iozzo P., Picano E. The association of micronucleus frequency with obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Mutagenesis* 2011; 26: 77-83.
11. Migliore L., Coppede F., Fenech M., Thomas P. Association of micronucleus frequency with neurodegenerative diseases. *Mutagenesis* 2011; 26: 85-92.
12. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a cytome assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res* 2006; 600: 58-66.
13. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2007; 2: 1084-104.
14. Zengin N., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F. Yılmaz, S. and Aksoy, H. The evaluation of genotoxicity of two food preservatives: Sodium benzoate and potassium benzoate. *Food Chem Toxicol* 2011; 49: 763-69.
15. Maffei F., Forti G.C., Castelli E., Stefanini G.F., Mattioli S. and Hrelia P. Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. *Mutat Res* 2002; 514 (1-2): 49-58.
16. Thierens H., Vral A. and de Ridder L. A cytogenetic study of radiological workers: effect of age, smoking and radiation burden on the micronucleus frequency. *Mutat Res* 1996; 360 (2): 75-82.
17. Barale R., Chelotti L., Davini T., Del Ry, S., Andreassi M.G., Ballardini M., Bulleri M., He J., Baldacci S., Di Pede F., Gemignani F. and Landi S. Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age, and lifestyle. *Environ Mol Mutagen* 1998; 31 (3): 228-42.
18. Neri M., Fucic A., Knudsen L.E., Lando C., Merlo F. and Bonassi S. Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: a review. *Mutat Res* 2003; 544 (2-3): 243-54.

19. Pelevina I.I., Aleshchenko A.V., Gotlib Vla. Kudriashova O.V., Semenova L.P. and Serebrianyi A.M. Effect of low dose irradiation on the reaction of blood lymphocytes of individuals with the somatic diseases. *Radiat Biol Radioecol* 2005; 45 (4): 412-15.
20. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 2000; 455 (1-2): 81-95.
21. Özdemir E., Gültürk S. Anabolik- androjenik steroidlere karşı fizyolojik ve tıbbi yanıtlar. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2008; 28 (6): 923-32.
22. Frati P., Busardò F.P., Cipolloni L., Dominicis E.D., Fineschi V. Anabolic androgenic steroid (AAS) related deaths: autoptic, histopathological and toxicological findings. *Curr Neuropharmacol* 2015; 13 (1): 146-59.
23. do Carmo C.A., Gonçalves Á.L., Salvadori D.M., Maistro E.L. Nandrolone androgenic hormone presents genotoxic effects in different cells of mice. *J Appl Toxicol* 2012; 32 (10): 810-4.
24. Pozzi R, Fernandes K.R., de Moura C.F., Ferrari R.A., Fernandes K.P., Renno A.C., Ribeiro D.A. Nandrolone decanoate induces genetic damage in multiple organs of rats. *Arch Environ Contam Toxicol* 2013; 64 (3): 514-8.
25. Martins R.A., Gomes G.A., Aguiar O Jr., Medalha C.C., Ribeiro D.A. Chromosome damage and cytotoxicity in oral mucosa cells after 2 months of exposure to anabolic steroids (decadurabolin and winstrol) in weight lifting. *Steroids* 2010; 75 (12): 952-5.
26. Türkoğlu, Ş. Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Food Chem Toxicol* 2008; 46 (6): 2035-41.
27. Liman R., Ciğerci I.H., Akyıl D., Eren Y. and Konuk M. Determination of genotoxicity of fenaminosulf by *Allium* and comet tests. *Pest Biochem Physiol* 2011; 99: 61-4.
28. Scolnick D.M. and Halazonetis T.D. Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. *Nature* 2000; 406: 430-5.
29. Erdoğan Y. Çeşitli gıda katkı maddelerinin *Allium cepa* L.'de mitoz bölünme, kromozomlar ve DNA miktarı üzerine etkileri. Y. Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas. 2008.
30. Van't Hof J. The action of IAA and kinetin on the mitotic cycle of proliferative and stationary phase excised root meristem. *Exp Cell Res* 1968; 51: 167-76.
31. Epel D. The effects of carbon monoxide inhibition of ATP level and the date of mitosis in sea urching egg. *J Cell Biol* 1963; 17: 315-9.
32. Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Unal, F. and Aksoy, H., Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes. *Mutat Res* 2006; 604 (1-2): 53-9.
33. Schulze E. and Kirschner S. Microtubule dynamics in interphase cells. *J Cell Biol* 1986; 102: 1020-31.
34. Kwankua W., Sengsai S., Kuleung C. and Euawong N. Sunlight decreased genotoxicity of azadirachtin on root tip cells of *Allium cepa* and *Eurotia bicolor*. *Ecotoxicol Environ Saf* 2010; 73: 949-54.
35. Jain A.K. and Andsorbhoy R.K. Cytogenetical studies on the effects of some chlorinated pesticides. III. Concluding Remarks. *Cytologia* 1988; 53: 427-36.
36. Vock E.H., Lutz W.K., Hormes P., Hoffmann H.D. and Vamvakas, S. Discrimination between genotoxicity and cytotoxicity in the induction of DNA double-strand breaks in cells treated with etoposide, melphalan, cisplatin, potassium cyanide, triton X-100 and gamma-irradiation. *Mutat Res* 1998; 413: 83-94.
37. Kirkland D.J. and Müller L. Interpretation of the biological relevance of genotoxicity test results: the importance of thresholds. *Mutat Res* 2000; 464: 137-47.
38. Giri S., Gri A., Sharma G.D. and Prasad S.B. Mutagenic effects of carbosulfan, a carbamate pesticide. *Mutat Res* 2002; 519: 75-82.

Anabolik Steroidlerin Genotoksik ve Sitotoksik Etkilerinin

39. Rani M.V.U. and Rao M.S. *In vitro* effect of fenthion on human lymphocytes. Bull Environ Contam Toxicol 1991; 47: 316-20.
40. Burim R.V., Canalle R., Lopes J.L.C. Vichnewski W. and Takahashi C.S. Genotoxic accition of the sesquiterpene, lactone centratherin on mammalian cells *in vitro* and *in vivo* Teratog Carcinog Mutagen 2001; 21: 383-93.
41. Çelik M., Dinocap fungusitinin *Allium cepa* L. kök ucu hücreleri ve insan periferel lenfositlerinde sitogenetik etkileri. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara. 2003.