

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI ANTİVİRAL İLAÇLARIN *Xenopus laevis* EMBRİYOLARI ÜZERİNE TOKSİK
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Cemal LAÇİN

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ

MART 2023

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI ANTİVİRAL İLAÇLARIN *Xenopus laevis* EMBRİYOLARI ÜZERİNE
TOKSİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Cemal LAÇİN
(36183611025)

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ

Eş Danışman: Doç. Dr. Duygu ÖZHAN TURHAN

MART 2023

TEŐEKKÜR VE ÖNSÖZ

Bu tez çalıőmasının her aőamasında yardım, öneri, bilgi, tecrübe ve desteklerini esirgemededen beni her konuda yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ'ye ve eş danışman hocam Sayın Doç. Dr. Duygu ÖZHAN TURHAN'a;

Çalıőmalarımnda laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağlayan Çevre Toksikolojisi Laboratuvarı sorumlusu hocam Sayın Prof. Dr. Murat ÖZMEN'e,

Çalıőmalarımnda ayrıca tüm hayatım boyunca olduğu gibi bu çalıőmalarım süresince de benden her türlü desteklerini esirgemeyen aileme,

Tezin uygulama aőamasında FYL-2022-2946 no'lu proje ile vermiş oldukları maddi ve manevi destekten dolayı, İnönü Üniversitesi BAP birimine

teőekkür ederim.

ONUR SÖZÜ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “**Bazı Antiviral İlaçların *Xenopus laevis* Embriyoları Üzerine Toksik Etkilerinin Değerlendirilmesi**” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığına ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Cemal LAÇİN



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜRLER VE ÖNSÖZ.....	i
ONUR SÖZÜ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Çalışma Kapsamında Toksik Etkileri Test Edilen Antiviral İlaçlar.....	2
1.1.1 Favipiravir.....	3
1.1.2 Oseltamivir.....	5
1.2 Çalışmada Kullanılan Test Organizması, <i>Xenopus laevis</i>	6
1.2.1 <i>Xenopus laevis</i> 'in embriyonal gelişimi.....	8
1.3 Kurbağa Embriyo Teratogenez Testi- <i>Xenopus</i> (FETAX).....	9
1.4 Çalışmada Yapılan Biyokimyasal Analizler	14
1.4.1 Glutasyon S-transferaz.....	14
1.4.2 Glutasyon redüktaz.....	15
1.4.3 Katalaz.....	15
1.4.4 Karboksilesteraz.....	16
1.4.5 Asetilkolinesteraz.....	17
1.4.6 Malondialdehit.....	17
2. KAYNAK ÖZETİ.....	18
2.1 Favipiravir ve Oseltamivir ile İlgili Çalışmalar.....	18
2.2 FETAX ve Biyokimyasal Belirteçler ile İlgili Çalışmalar.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1 Test edilen Antiviral İlaçlar.....	22
3.2 Test Organizmalarının Sağlanması.....	22
3.3 FETAX Testi.....	23
3.4 Biyokimyasal Analizler.....	24
3.4.1 Embriyoların test maddelerine maruz bırakılması.....	24
3.4.2 Tüm vücut homojenatlarının hazırlanması.....	24
3.4.3 GST aktivitesi.....	25
3.4.4 GR aktivitesi.....	25
3.4.5 CAT aktivitesi.....	26
3.4.6 CaE aktivitesi.....	26
3.4.7 AChE aktivitesi.....	26
3.4.8 MDA düzeyi.....	27
3.4.9 Toplam protein miktarı tayini.....	27
3.5 İstatistiksel analiz ve hesaplamalar.....	27
4. BULGULAR.....	29
4.1 Favipiravir ile İlgili Bulgular.....	31
4.1.1 Favipiravir ile ilgili FETAX bulguları.....	31
4.1.2 Favipiravir ile ilgili biyobelirteç bulguları.....	34
4.2 Oseltamivir ile İlgili Bulgular.....	37
4.2.1 Oseltamivir ile ilgili FETAX bulguları.....	37

4.2.2	Oseltamivir ile ilgili biyobelirteç bulguları.....	40
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	43
5.1	Favipiravir Toksisitesi ile İlgili Değerlendirmeler.....	44
5.2	Oseltamivir Toksisitesi ile İlgili Değerlendirmeler.....	48
6.	KAYNAKLAR	52
	ÖZGEÇMİŞ	61



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1:	<i>Xenopus laevis</i> 'in sistematikteki yeri.....	8
Çizelge 1.2:	<i>X. laevis</i> 'in bazı erken gelişim evrelerinde görülen değişimler.....	11
Çizelge 4.1:	Test edilen antiviral ilaçların <i>X. laevis</i> embriyoları için LC ₅₀ , EC ₅₀ (malformasyon), TI ve MCİG verileri.....	30
Çizelge 4.2:	FETAX'ta ticari Favipiravir'e maruz kalan <i>X. laevis</i> embriyolarında zamana bağlı toksisite verileri.....	32
Çizelge 4.3:	FETAX'ta saf Favipiravir'e maruz kalan <i>X. laevis</i> embriyolarında zamana bağlı toksisite verileri.....	33
Çizelge 4.4:	Favipiravir'e maruz bırakılan 8-11. evre <i>X. laevis</i> iribaşlarının biyobelirteç düzeyleri.....	35
Çizelge 4.5:	Favipiravir'e maruz bırakılan 46. evre <i>X. laevis</i> iribaşlarının biyobelirteç düzeyleri.....	36
Çizelge 4.6:	FETAX'ta ticari Oseltamivir'e maruz kalan <i>X. laevis</i> embriyolarında zamana bağlı toksisite verileri.....	38
Çizelge 4.7:	FETAX'ta saf Oseltamivir'e maruz kalan <i>X. laevis</i> embriyolarında zamana bağlı toksisite verileri.....	39
Çizelge 4.8:	Oseltamivir'e maruz bırakılan 8-11. evre <i>X. laevis</i> iribaşlarının biyobelirteç düzeyleri.....	41
Çizelge 4.9:	Oseltamivir'e maruz bırakılan 46. evre <i>X. laevis</i> iribaşlarının biyobelirteç düzeyleri.....	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1:	Yaygın hastalıklara neden olan bazı virüslerin çizimleri	3
Şekil 1.2:	Test edilen ilaç etken maddelerinin molekül formülleri.....	4
Şekil 1.3:	Favipiravir ve oseltamivir ilaç etken maddelerinin antiviral etki şekilleri....	5
Şekil 1.4:	Fertilizasyondan erken gastrula evresine kadar <i>X.laevis</i> 'in bazı erken gelişim evreleri	9
Şekil 1.5:	Fertilizasyondan organogenez sonuna kadar <i>X.laevis</i> 'in erken gelişim evreleri.....	13
Şekil 5.1:	Favipiravir uygulanan embriyo ve iribaşlarda GST, GR ve CAT düzeyleri..	46
Şekil 5.2:	Favipiravir uygulanan embriyo ve iribaşlarda CaE, AChE ve MDA düzeyleri.....	47
Şekil 5.3:	Oseltamivir uygulanan embriyo ve iribaşlarda GST, GR ve CAT düzeyler..	49
Şekil 5.4:	Oseltamivir uygulanan embriyo ve iribaşlarda CaE, AChE ve MDA düzeyleri.....	50



SEMBOLLER VE KISALTMALAR

AChE	Asetilkolinesteraz
ASTM	Amerikan Test ve Malzeme Kurumu
CaE	Karboksilesteraz
CAT	Katalaz
CDNB	1-kloro-2,4-dinitrobenzen
COVID-19	Coronavirus disease (koronavirüs hastalığı)
DTNB	5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoik asit)
FETAX	Kurbağa Embriyo Teratogenez Testi- <i>Xenopus</i>
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Redükte Glutasyon
GS-SG	Okside glutasyon
GST	Glutasyon S-transferaz
LC₅₀	Ortalama öldürücü konsantrasyon
EC₅₀	Ortalama etkili konsantrasyon
LPO	Lipid peroksidasyonu
MDA	Malondialdehit
MS222	Trikain metansülfonat
NA	Nöraminidaz
NADP⁺	Okside nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH	Redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NF	Nieuwkoop ve Faber
OECD	Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü
OSK	Oseltamivir karboksilat
ROT	Reaktif oksijen türleri
RONT	Reaktif oksijen azot türleri
SH	Standart hata
SOD	Süperoksit dismutaz
Tİ	Teratojenik indeks
MCİG	Büyüme inhibe eden en düşük konsantrasyon (Minimum growth inhibitory concentration),

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI ANTİVİRAL İLAÇLARIN *Xenopus laevis* EMBRİYOLARI ÜZERİNE TOKSİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Cemal LAÇİN

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

61+IX sayfa
2023

Danışman: Prof. Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ

İnsanlık, 2019 yılı sonlarında başlamak üzere, nüfusunun hiç olmadığı kadar arttığı bir dönemde, tarihinin en büyük salgınlarından biriyle karşı karşıya kaldı ve salgınla mücadelede hem aşular hem de antiviral ilaçlar yoğun bir şekilde kullanıldı. Bu dönemde ülkemizde de yoğun olarak kullanılan favipiravir ve oseltamivir, yaygın viral enfeksiyonlarla mücadelede uzun yıllardır yoğun olarak kullanılan antiviral ilaçlardır. Oseltamivir, H5N1 virüsüne karşı yoğun olarak kullanılan bir antiviral ajandır, favipiravir ise COVID-19 pandemisinde yoğun olarak kullanılmıştır. Bu kimyasalların hastalık kontrolünde yoğun olarak kullanılması, çevresel sularda yüksek konsantrasyonlara ulaşmalarına ve sucul ekosisteme geçerek hedef olamayan organizmalarla etkileşime girmelerine neden olmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada, ticari antiviral ilaçların farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan *Xenopus laevis* embriyolarının letalite seviyesi, malformasyon durumu, gelişim düzeyleri ve biyokimyasal belirteç düzeyleri toksik ve teratojenik etkileri değerlendirmek için ölçüldü.

Çalışma sonuçlarına göre, antiviral ilaçlara maruz kalan *X. laevis* embriyoları için ticari ve saf favipiravirin 96 saatlik ortalama öldürücü konsantrasyonları (LC₅₀) ve teratojenik indeks (Tİ) değerleri sırasıyla 137.9 mg/L ve 4.67, 156.9 mg/L ve 6.28 olarak saptandı. Ticari ve saf oseltamivir için 96 saatlik LC₅₀ değerleri ise sırasıyla 32.3 ve 58.8 mg/L olarak belirlendi. Bu sonuçlara göre test edilen antiviral ilaçlardan favipiravir hem embriyo gelişimini sınırlamakta hem de teratojeniktir. Biyokimyasal belirteç sonuçlarına göre ise 8-11. evre embriyolarının yanıtları 46. evre iribaşlarından farklıdır. Her iki antiviral ilaç da embriyolarda şiddetleri farklı olsa da GR, CaE ve AChE inhibisyonuna neden olmuştur. Sonuç olarak, sucul çevreye girmesi muhtemel bu iki antiviral ilaç, etkileştikleri organizmalarda yüksek konsantrasyonlarda büyüme geriliği ve teratojeniteye, düşük konsantrasyonlarda ise biyokimyasal değişimlere neden olabilirler.

Anahtar Kelimeler: Antiviral ilaçlar, toksisite, *Xenopus laevis*, favipiravir, oseltamivir, biyobelirteç

ABSTRACT

Master Thesis

EVALUATION OF THE TOXIC EFFECTS OF SOME ANTIVIRAL DRUGS ON *Xenopus laevis* EMBRYO

Cemal LAÇIN

Inonu University
Graduate School of Nature and Applied Sciences
Department of Biology

61+IX pages
2023

Supervisor: Prof. Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ

Starting in late 2019, humanity faced one of the largest pandemics in its history at a time when its population increased more than ever before, and both vaccines and antiviral drugs were used extensively in the fight against the pandemic. Favipiravir and oseltamivir, which were also used extensively in our country during this period, are antiviral drugs that have been used extensively for many years in the fight against common viral infections. Oseltamivir is an antiviral agent used extensively against the H5N1 virus, while favipiravir has been used extensively in the COVID-19 pandemic. The intensive use of these chemicals in disease control causes them to reach high concentrations in environmental waters and to enter the aquatic ecosystem and interact with non-target organisms. Therefore, in this study, the lethality level, malformation status, developmental levels and biochemical marker levels of *Xenopus laevis* embryos exposed to different concentrations of commercial antiviral drugs were measured to evaluate toxic and teratogenic effects.

According to the results, the 96-hour median lethal concentrations (LC₅₀) and teratogenic index (TI) values of commercial and pure favipiravir for *X. laevis* embryos exposed to antiviral drugs were 137.9 mg/L and 4.67, 156.9 mg/L and 6.28, respectively. The 96-hour LC₅₀ values for commercial and pure oseltamivir were 32.3 and 58.8 mg/L, respectively. According to these results, among the antiviral drugs tested, favipiravir both limits embryo development and is teratogenic. According to biochemical marker results, the responses of stage 8-11 embryos were different from those of stage 46 tadpoles. Both antiviral drugs caused inhibition of GR, CaE and AChE in embryos, albeit with different severity. In conclusion, these two antiviral drugs, which are likely to enter the aquatic environment, may cause growth retardation and teratogenicity at high concentrations and biochemical changes at low concentrations in the organisms they interact with.

Keywords: Antiviral drugs, toxicity, *Xenopus laevis*, favipiravir, oseltamivir, biomarker

1. GİRİŞ

Antiviral ilaçlar, virüslerin gelişimini sınırlayarak ya da engelleyerek, viral enfeksiyonları tedavi etmek için tasarlanmış farmasötik maddelerdir. İlaç sanayindeki ilerlemelere bağlı olarak antiviral ilaçların tüketimi ve buna bağlı olarak da bu ilaç etken maddelerinin çevredeki konsantrasyonları giderek artmaktadır (Nannou ve diğ, 2019). Diğer birçok farmasötik ürün gibi, bazı antiviral ilaçlar da tedavi edilen insanlar ve hayvanlar tarafından tamamen metabolize edilemezler, vücuttan atılırlar ve nihai olarak çevresel sulara ulaşırlar (Peng ve diğ, 2014). Diğer yandan atık sulardaki organik ve inorganik bileşenler ilaç etken maddeleri ile reaksiyona girebilir böylece kalıcı ve atık sulardan arındırılması zor olabilecek ilave moleküller oluşturabilirler. İlaç etken maddelerinin ve/veya metabolitlerinin çevresel sulara ulaşmasından sonra bu tür ek moleküllerin oluşması da ciddi bir çevre sorunudur (Fernandez ve diğ, 2020). Çevresel sulara boşaltılan bu tür ilaç kalıntılarının benzeri görülmemiş miktarları, sucul yaşam üzerindeki potansiyel ekotoksikolojik etkilerinin yanı sıra yaban hayatında antiviral ilaç direnci gelişimi konusunda endişelere yol açmaktadır (Kuroda ve diğ, 2021).

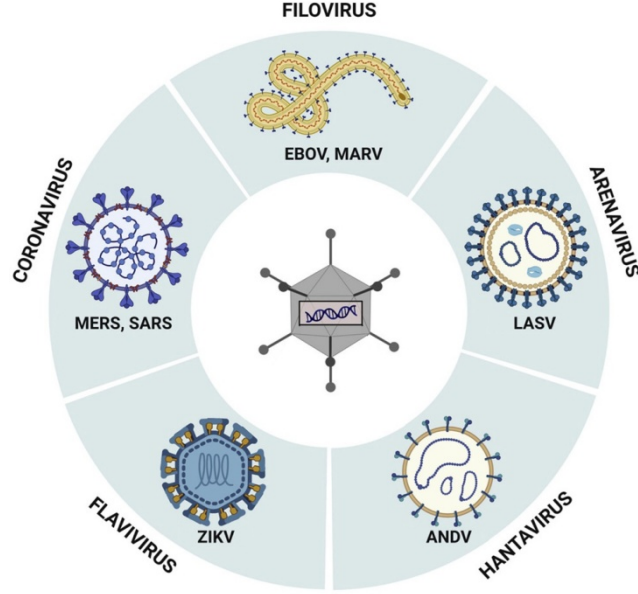
Antiviral ilaçlar dünya çapında çeşitli su sistemlerinde (atık, yüzey ve hatta içme suyunda) ng/L ila µg/L arasındaki konsantrasyonlarda tespit edilmiştir (Fernandez ve diğ, 2020; Jain ve diğ, 2013; Nannou ve diğ, 2019; Zhou ve diğ, 2020). Almanya'da Hessian Ried nehirlerinde ve akarsularında ng/L seviyesinde dokuz antiviral ilaç tespit edilirken, Güney Afrika yüzey sularında, on iki antiviral ilacın ortalama konsantrasyonları 26.5-430 ng/L aralığında belirlenmiştir. Antiviral ilaçların konsantrasyonları doğal sularda eser seviyelerde olmasına rağmen, sürekli olarak sulara verilmeleri potansiyel ekosistem değişikliği ve viral direncin gelişmesi gibi ciddi sorunlara neden olmaktadır. Ayrıca antiviral ilaçlar “*son derece tehlikeli terapötik sınıf*” olarak tanımlanmakta ve bir kısmının kanserojenik potansiyele sahip olduğu bildirilmektedir (Zhou ve diğ, 2020). Bu bileşiklerin çoğu, lipofobiktir ve genellikle günümüzde kullanılan biyolojik arıtma yöntemleri ile etkili bir şekilde atık sulardan uzaklaştırılamazlar. Aynı zamanda bu bileşiklerin çoğu toksiktir ve su sistemlerinde nispeten kalıcı olarak bulunmaları birçok nedenden dolayı endişe kaynağıdır (Jain ve

diğ, 2013). Bu nedenlerden biri bu bileşiklerin bazılarının oldukça biyoaktif olması ve ulaşabildiği sucul çevrede hedef olmayan organizmalara karşı önemli akut veya kronik toksisiteye neden olabilmesidir (Fernandez ve diğ, 2020; Nannou ve diğ, 2019). Antiviral ilaçlar çevreye girdikten sonra doğal biyolojik sistemlerin faaliyetlerini engelleyebilmekte ve sucul organizmaların homeostazisinde değişikliklere neden olabilmektedir (Fernandez ve diğ, 2020).

Sucul organizmalar arasından amfibiler, kimyasalları absorbe edebilen yüksek geçirgen derileri nedeniyle özellikle farmasötikler, metaller ve kişisel bakım ürünleri gibi bileşiklerin etkilerine karşı oldukça hassaslardır (Fernandez ve diğ, 2020). Ayrıca, yüksek konsantrasyonlardaki ilaç kalıntılarının toksik etkisi suda yaşayan organizmalar üzerinden, örneğin algler, sucul omurgasızlar, balıklar vasıtasıyla insanlara kadar ulaşabilmektedir (Fernandez ve diğ, 2020). Sonuç olarak, sucul çevreye verilen ilaçlar hem sucul organizmaları hem de ekosistemleri olumsuz etkileyebilmektedirler (Nannou ve diğ, 2019).

1.1 Çalışma Kapsamında Toksik Etkileri Test edilen Antiviral İlaçlar

Hemorajik ateşe (kanamalı ateş) yol açan, ciddi prognozlu ve güçlü yayılma kabiliyetine sahip yeni ortaya çıkan bulaşıcı hastalıklar, özellikle gelir düzeyi düşük ülkelerde önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Etiyolojik virüsler çok çeşitlidir ve Ebola virüsü (EBOV), Marburg virüsü (MARV), dang virüsü, Junin virüsü (JUNV), Kırım-Kongo kanamalı ateşi virüsü (CCHFV), Rift Vadisi ateşi virüsü (RVFV), Lassa virüsü (LASV) ve sarı ateş virüsünü (YFV) içerir (Şekil 1.1). Bu virüslerin çoğu için tedavi edici ilaçlar bulunmamaktadır ve tedavi esasen destekleyici bakıma dayanmaktadır. Örneğin, Japonya'da dirençli influenzaya karşı tedavi için geliştirilen ve onaylanan bir pirazin karboksamid türevi olan favipiravirin, COVID 19 Pandemisi ve öncesinde hemorajik ateşe neden olan farklı virüslere karşı da kullanılmıştır (Madelain ve diğ, 2017).



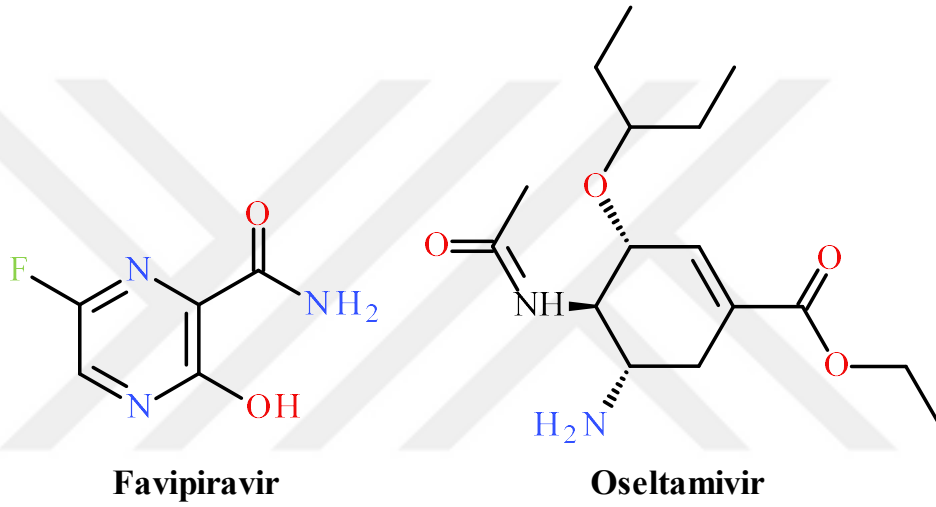
Şekil 1.1: Yaygın hastalıklara neden olan bazı virüslerin çizimleri (Coughlan ve diğ, 2022)

İnsanların pandemik salgın durumunda hastalıkları tedavi etmek için daha fazla antiviral ilaç kullanması, sucul sistemlerdeki ilaç konsantrasyonunun giderek artmasına neden olacaktır (Fernandez ve diğ, 2020). Bu durum ilaç kalıntılarının sucul türler üzerindeki toksik etkilerinin değerlendirilmesi oldukça önemli hale getirmiştir. Sucul türler için kimyasal maddelerin toksisitesini anlamamanın önemi kabul edilmiş olsa da, çoğu ilacın çevre üzerindeki etkileri hakkındaki bilgi hala sınırlıdır (Silva ve diğ, 2019).

1.1.1 Favipiravir

Yüksek ölüm oranı ve bulaşıcılığı ile COVID-19 salgını, Aralık 2019'da Çin Halk Cumhuriyeti'nin Wuhan Eyaletinde ortaya çıkmış ve dünyanın en büyük sağlık sorunlarından biri haline gelmiştir. COVID-19'a yol açan koronavirüs, taç şeklinde çıkıntılara sahip büyük ve zarflı bir RNA virüsüdür (Aktas ve diğ, 2020). Yapılan araştırmalar favipiravir, remdesivir, klorokin fosfat gibi bazı antiviral ilaçların *in vitro* olarak SARS-CoV-2'ye karşı inhibitör etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Lou ve diğ, 2021). Favipiravir ilk olarak pandeminin merkezi, Wuhan'da kullanılmıştır. Ardından İtalya, Japonya, Rusya, Ukrayna, Özbekistan, Moldova, Kazakistan, Suudi Arabistan, Bangladeş, Mısır ve Türkiye'de yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır (Agrawal ve diğ, 2020).

COVID-19 Pandemisi öncesinde Ebola virüsü de dahil olmak üzere hemorajik ateşten sorumlu çeşitli virüsler için antiviral etkinlik gösteren favipiravir (T-705; 6-floro-3-hidroksi-2-pirazinkarboksamid), bir RNA polimeraz inhibitörüdür. RNA virüslerinin ribonükleik asit (RNA) bağımlı RNA polimerazını seçici ve güçlü bir şekilde inhibe eden bir antiviral ajandır (Yamamura ve diğ, 2020). Küçük bir purin analogu olan favipiravir (Şekil 1.2) hücrede, büyüyen RNA sarmalına dahil edilebilen aktif ribofuranosil 5'-trifosfat metabolitine dönüştürülür (Lou ve diğ, 2021). Hücre içinde aktif form olan favipiravir ribozil trifosfat ise viral RNA iplikçiklerinin uzamasını önleyerek ölümcül mutajenezi indükler (Madelain ve diğ, 2017) (Şekil 1.3).

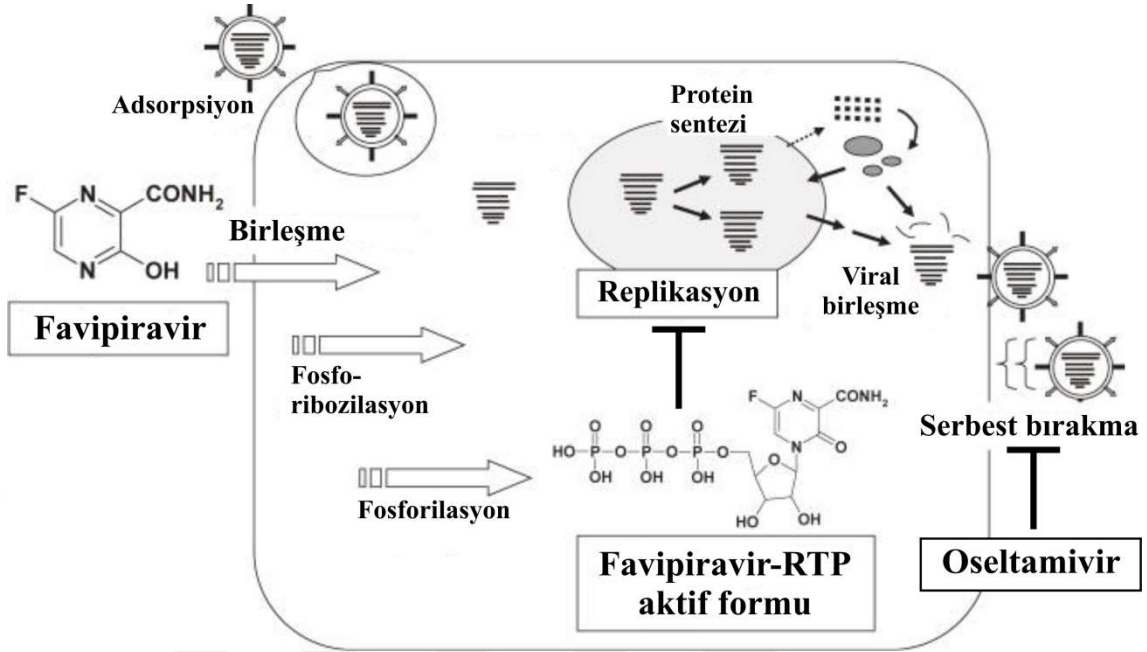


Şekil 1.2: Test edilen ilaç etken maddelerinin molekül formülleri

COVID-19 tedavisinde favipiravir ülkemizde “T.C. Sağlık Bakanlığı COVID-19 Rehberine” göre yoğun olarak kullanılmakta ve hastaların tedavisinde fayda sağlamaktadır (Bekgöz ve Şan, 2020). Ülkemizde kullanılan favipiravirin etken maddeli antiviral ilacın prospektüsünde belirtilen, insanda yan etkilerinden bazıları; alerjik reaksiyon (döküntü, yutma ve nefes almada zorluk, göz kapakları, dudaklar, boğaz veya dilde şişme), lökosit sayısında azalma, kan ürik asit düzeyinde artış ve kan AST, ALT, γ -GTP düzeylerinde artış şeklindedir (TİTCK, 2020).

Endişe verici tüketim oranları nedeniyle favipiravir gibi çeşitli antiviral ilaçlar su ortamında tespit edilmiş, ancak varlıkları sistematik olarak izlenmemiştir. Favipiravirin çevredeki konsantrasyonlarına ilişkin veriler hala çok azdır. COVID-19 Pandemisi sürecinde kullanılan ilaçların çevresel varlığı ve akıbetinin değerlendirildiği bir çalışmada, nehir ve göllerin favipiravir hidroksit metabolit düzeyinin 0.43-2.12 $\mu\text{g/L}$

olabileceği tahmin edilmiştir (Kumar ve diğ, 2021). Favipiravirin sudaki çözünürlüğü 0.69 mg/mL'dir (DrugBank, 2022).



Şekil 1.3: Favipiravir ve oseltamivir ilaç etken maddelerinin antiviral etki şekilleri. Favipiravir ribofuranosil trifosfat formuna dönüştürülür ve virüs RNA polimerazını inhibe eder. Oseltamivir virüs salınımını engeller (Furuta ve diğ, 2009).

1.1.2 Oseltamivir

Oseltamivir COVID-19 Pandemisi sırasında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından önerilen antiviral ilaçlardan biridir ve çoğu ülke acil durumda vatandaşlarını tedavi etmek için büyük bir stok bulundurmaktadır. Oseltamivir, influenza A ve B virüslerinin replikasyonu için gerekli olan nöraminidaz (NA) glikoproteininin güçlü ve seçici bir inhibitörü olan oseltamivir karboksilatın bir ön ilacıdır (McClellan ve Perry, 2001). Oseltamivir özellikle NA'nın kristalografik yapısı temelinde tasarlanmıştır. NA, influenza virüsünün membrana bağlı bir yüzey glikoproteinidir ve yapısı çeşitli virüs suşları için oldukça korunmuştur. NA, virüsün hücrelerden salınmasını sağlayan enfekte hücrelerin yüzeyinden sialik asitleri uzaklaştırmak için bir enzim görevi gördüğü için influenza virüsünün patojenitesinde önemli bir rol oynar. Böylece NA'nın inhibisyonu virüsün yayılmasını engeller ve bulaşıcılığını azaltır (Fernandez ve diğ, 2020).

Oseltamivir (oseltamivir etilester fosfat, OEP: Etil (3R, 4R, 5S) -4-asetilamino-5-amonyo-3- (1-etilpropoksi) -1-sikloheks-1-en-1-karboksilat fosfat) ağızdan uygulanır. Konjuge asidi olan oseltamivir etilester, karaciğerde esterazlar tarafından, esas olarak idrarla atılan aktif metabolit olan oseltamivir aside dönüştürülür (Mestankova ve diğ,

2012). Oseltamivir biyolojik arıtmaya ve UV radyasyon işlemine dirençli olduğu ve arıtma tesisinden çıkan atık su içinde bulunduğu tesbit edilmiştir. Oseltamivir asit orta derecede kalıcıdır, ancak çevresel etkileri hakkındaki bilgiler hala sınırlıdır. Yüzey sularında, biyotransformasyon ve fototransformasyon yoluyla oseltamivir asidin yavaş şekilde bozunduğu gözlenmiştir (Fernandez ve diğ, 2020).

Son çalışmalar, su sistemlerinde saptanabilir seviyelerde OA kalıntılarının varlığını bildirmiştir. Birçok çalışma, belediyelerin arıtım tesislerinde, OA'nın ortadan kaldırılmasının çok düşük düzeyde olduğunu göstermiştir (Fernandez ve diğ, 2020). COVID-19 Pandemisinde oseltamivir'in yoğun ve yaygın kullanımı, yüzey sularında ana ilacın ve metabolitinin yüksek konsantrasyonlarında ($\mu\text{g/L}$) bulunmasına neden olmuştur. Mestankova et al. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada oseltamivir fosfat uygulanmasının içme suyu güvenliği ve ekolojik sağlık için bir risk oluşturduğu rapor edilmiştir. Oseltamivir'in sudaki çözünürlüğü 5 mg/mL'dir (AtlantisBioscience, 2022).

Ülkemizde COVID-19 Pandemisinde kullanılan oseltamivir etken maddeli antiviral ilacın prospektüsünde belirtilen, insanda yaygın olan yan etkileri bulantı, kusma, ishal, karın ağrısı ve baş ağrısıdır. Bu yan etkiler dışında çok sayıda yaygın olmayan yan etkinin de olabileceği ilaç prospektüsünde belirtilmiştir.

1.2 Çalışmada Kullanılan Test Organizması, *Xenopus laevis*

Biyomedikal araştırmaların giderek daha az sayıda tür üzerinde yoğunlaşması, I. Dünya Savaşı sonrası dönemin çarpıcı bir genel özelliğidir. Gelişim biyolojisinde Güney Afrika pençeli kurbağası *Xenopus laevis*, *Drosophila*, fare, civciv, *Caenorhabditis elegans* ve zebra balığı ile birlikte araştırmaların büyük çoğunluğunda kullanılan yarım düzine "model" organizmadan biridir (Gurdon ve Hopwood, 2000). 1880'lerden ve Wilhelm Roux ve diğerlerinin Almanya'daki ilk çalışmalarından itibaren deneysel embriyologlar Amphibia'yı tercih etmişlerdir, ancak başlangıçta çoğunlukla *Rana* kurbağası olmak üzere yerel Avrupa ve Kuzey Amerika türlerini kullanmışlardır. Yirminci yüzyılın başlarında semenderler (Urodela-Caudata) tercih edilmeye başlanmış, Hans Spemann semender *Triton* (şimdi *Triturus*) türleri üzerinde ve Ross Harrison aksolotl *Amblystoma* üzerinde deneyler yapmıştır. Spemann'ı takiben 1930'larda Joseph Needham ve meslektaşlarının organizma'ya ilişkin biyokimyasal analizlerinde bile semenderler kullanılmıştır. *Xenopus* ancak II. Dünya Savaşı sırasında ve sonrasında hakimiyet kazanmaya başlamıştır. Avrupa ve Kuzey Amerika'daki gelişim

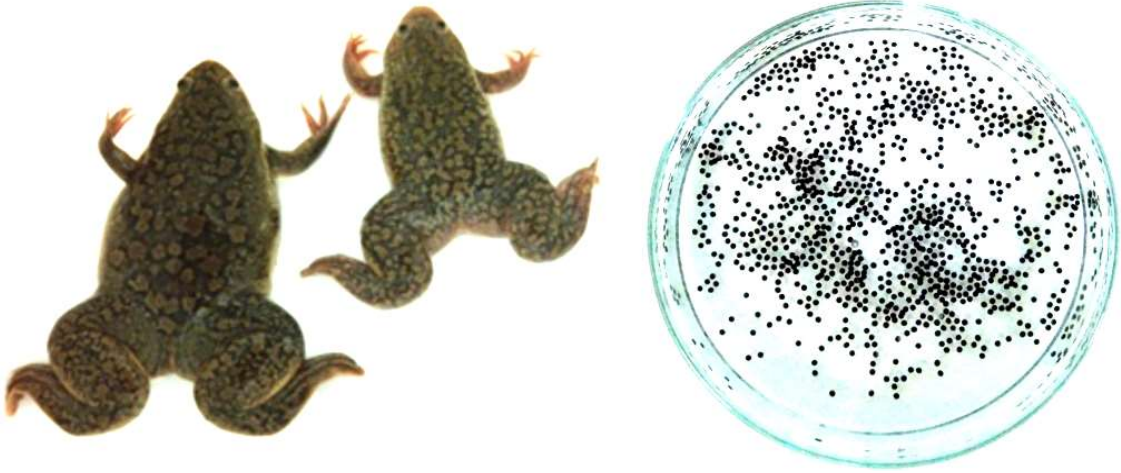
biyologlarının bir Afrika kurbağasını tercih etmelerinin nedeni, dünya faunasının bağımsız ve kapsamlı bir incelemesini yapmış olmaları değildir. *Xenopus*'un gelişim biyolojisi laboratuvarlarına girişinin daha tesadüfi ve embriyolojinin biyokimyasal yöntemlere doğru yeniden yönlendirilmesiyle olduğu düşünülmektedir (Gurdon ve Hopwood, 2000).

Embriyoloji alanındaki uzun geçmişinden genetik alanındaki son gelişmelere kadar *Xenopus*, embriyonal gelişimi anlamak için vazgeçilmez bir model olmuştur. Başlıca embriyonik şekillenme olaylarına ilişkin ilk kavrayışlarımızı sağlayan temel çalışmalar, organogenez ve organ işlevine ilişkin daha yeni araştırma yolları için çok önemli bir zemin oluşturmaktadır. Tüm gelişim aşamalarının kolayca manipüle edilebildiği ve gözlemlenebildiği tek büyük tetrapod modeli olan kurbağalar, organ gelişimini en erken aşamalardan itibaren incelemek için eşsiz bir fırsat sunmaktadır. Tüm bu özellikler *Xenopus*'u, döllenmeden organogeneze ve ötesine kadar gelişimi incelemek için önde gelen bir model haline getirmektedir (Exner ve Willsey, 2021). Gelişim biyologları *Xenopus*'u araştırmalarda kullanılma nedenleri şöyle özetlemektedirler: (1) tamamen suda yaşayan bir omurgalının laboratuvarında bakım kolaylığı; (2) hastalıklara karşı olağanüstü direnç; (3) Amfibiler arasında nispeten kısa olan yaşam döngüsü; (4) mikrocerrahiye uygun çok sayıda ve büyüklükte yumurta; ve (5) hepsinden önemlisi diğer amfibilerin sınırlı üreme mevsimlerine kıyasla ticari hormon preparatlarına yıl boyunca üreme yanıtları (Gurdon ve Hopwood, 2000).

Bu çalışma kapsamında model organizma olarak *X. laevis* embriyo ve iribaşları kullanıldı. Doğal olarak sadece Güney ve Orta Afrika'da bulunan bir Anura türü olan *X. laevis*, özellikle durgun göllerde olmak üzere farklı sucul ortamlarda yaygın olarak bulunan bir organizmadır. *X. laevis* Afrika tırnaklı kurbağası olarak da bilinir ve ilk kez 1803 yılında Daudin tarafından keşfedilmiştir. *X. laevis* adı ilk kez Wagler (1827) tarafından verilmiştir (Çizelge 1.1). Laboratuvar şartlarına oldukça iyi adapte edilmiş bu organizmanın embriyoları ve iribaşları toksikolojik çalışmalarda yoğun olarak kullanılmaktadır. *X. laevis* kullanılarak çevresel kirleticilerin, organizmaların gelişim evreleri üzerindeki etkileri belirlenmekte ve ayrıca sucul ekosistemler üzerindeki etkileri değerlendirilebilmektedir (Bacchetta ve diğ, 2012; Gungordu, 2013; Wu ve diğ, 2018).

Çizelge 1.1: *Xenopus laevis*'in sistematikteki yeri

Kategori	Takson	Otör
Regnum	Animalia	
Subregnum	Bilateria	
İnfraregnum	Deuterostomia	
Filum	Chordata	
Subfilum	Vertebrate	
İfracilum	Gnathostomata	
Superklasis	Tetrapoda	
Klasis	Amphibia	
Takım	Anura	
Familya	Pipidae	Gray, 1825
Genus	<i>Xenopus</i>	Wagler, 1827
Spesies	<i>Xenopus laevis</i>	Daudin, 1802

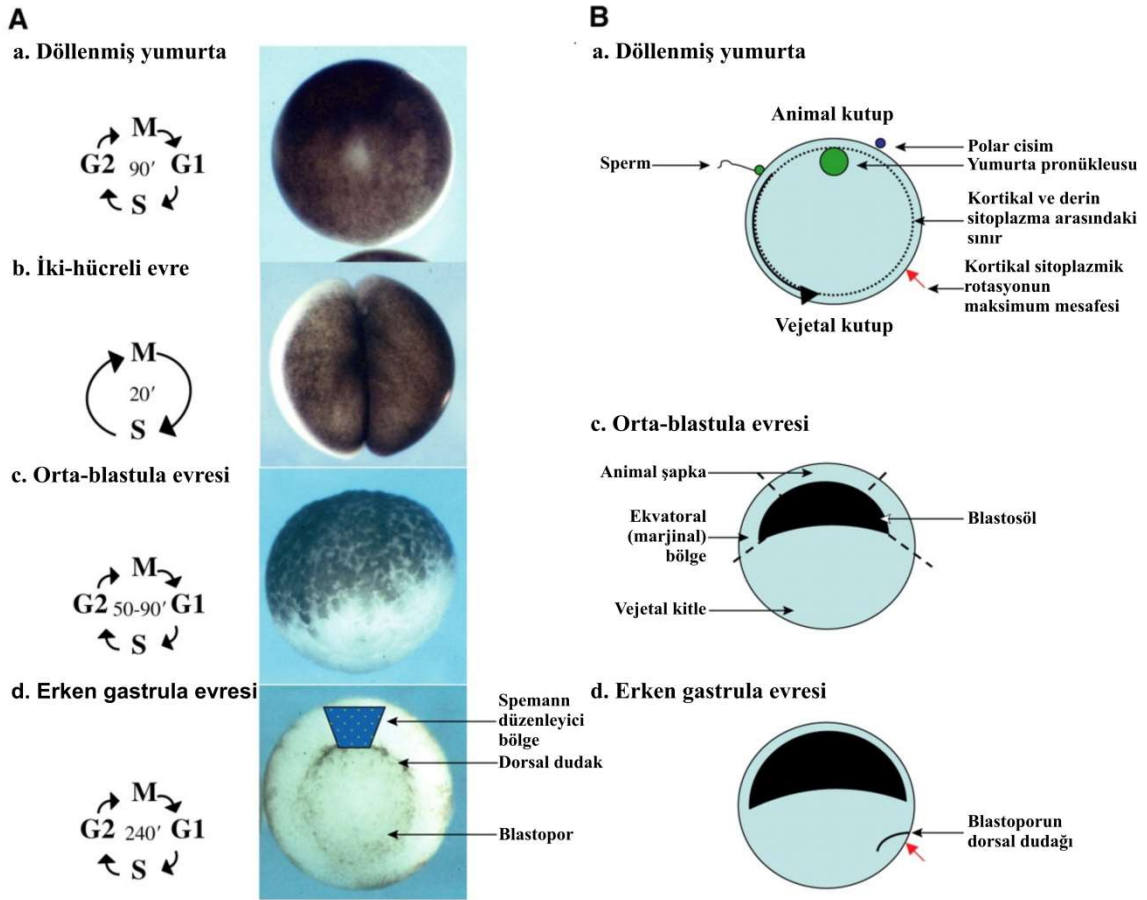


www.itis.gov internet sitesinden alınmıştır (İTİS, 2023)

1.2.1 *Xenopus laevis*'in embriyonal gelişimi

Embriyologlar amfibi modelinin embriyoloji için önemini fark etmiş ve bu modeli erken embriyo polaritesini keşfetmek, blastula ve gastrula evresi embriyolarındaki sinyal merkezlerini tanımlamak için kullanmışlardır. Döllenmeden sonra, *X. laevis* embriyoları karakteristik özelliklere sahip hücre döngülerinden geçer. İlk 90 dakikalık hücre döngüsü sırasında kortikal sitoplazmik hareketler ve erkek ve dişi pronükleer füzyon meydana gelir. Sonraki on bir bölünme 20 ila 30 dakikalık aralıklarla, GAP (Boşluk) evreleri olmaksızın gerçekleşirken, embriyo sıvı dolu bir blastosöl boşluğunu çevreleyen 4000 hücrelik bir top oluşturur. Tüm orta-blastula hücreleri pluripotenttir. On ikinci döngünün sonunda, GAP fazları yeniden ortaya çıkar, hücre döngüsü 50 dakikaya uzar ve zigotik transkripsiyon başlar (buna orta-blastula geçişi denir). 15. döngüde blastoporun dorsal dudağı oluşur, gastrulasyonun hücre hareketleri başlar ve

mitoz durur. Gastrulasyon embriyoyu üç katmana dönüştürür ve anteroposterior ve dorso-ventral eksenleri oluşturur (Şekil 1.4) (Heasman, 2006).



Şekil 1.4: Fertilizasyondan erken gastrula evresine kadar *X.laevis*'in bazı erken gelişim evreleri (Heasman, 2006)

X. laevis'in fertilizasyondan malformasyon sonuna kadar süren erken gelişim aşamaları, aşamalar arasında iç içe geçişler olsa da kısaca şu şekilde sınıflandırılabilir: fertilizasyon (evre 1), ilkin bölünmeler (evre 2-6.5), blastula (evre 7-9), gastrulasyon (evre 10-12.5), nörolasyon (evre 12-20), erken organogenez (evre 21-27), organogenez (evre 28-45), bağırsak sarmalanması (evre 41-46), premetamorfoz (evre 47-54), prometamorfoz (evre 54-61) (Şekil 1.5) ve klimaks (evre 62-66).

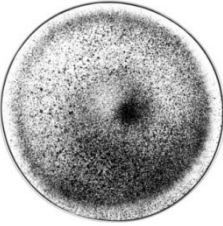
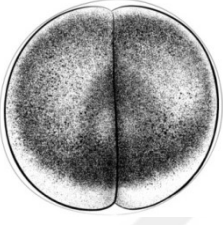
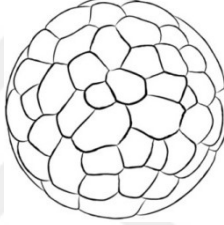
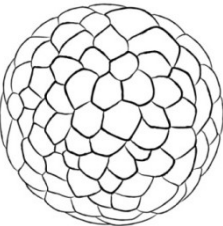
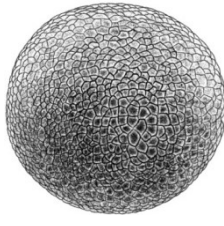
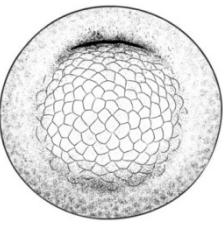
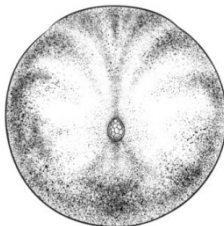
1.3 Kurbağa Embriyo Teratogenez Testi-*Xenopus* (FETAX)

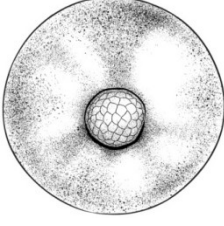
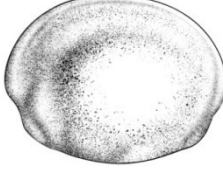
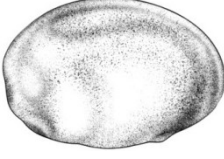
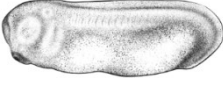


Memelilerde teratojenitenin test edilmesi yüksek gelişmişlik düzeyinde olan memelileri gerektirdiğinden ve deney hayvanı kullanımında etik gereklilikler nedeniyle, alternatif test sistemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Bu ihtiyacı karşılamak için amfibi *X. laevis* ve zebra balığı (*Danio rerio*) embriyoları, embriyonik omurgalı test

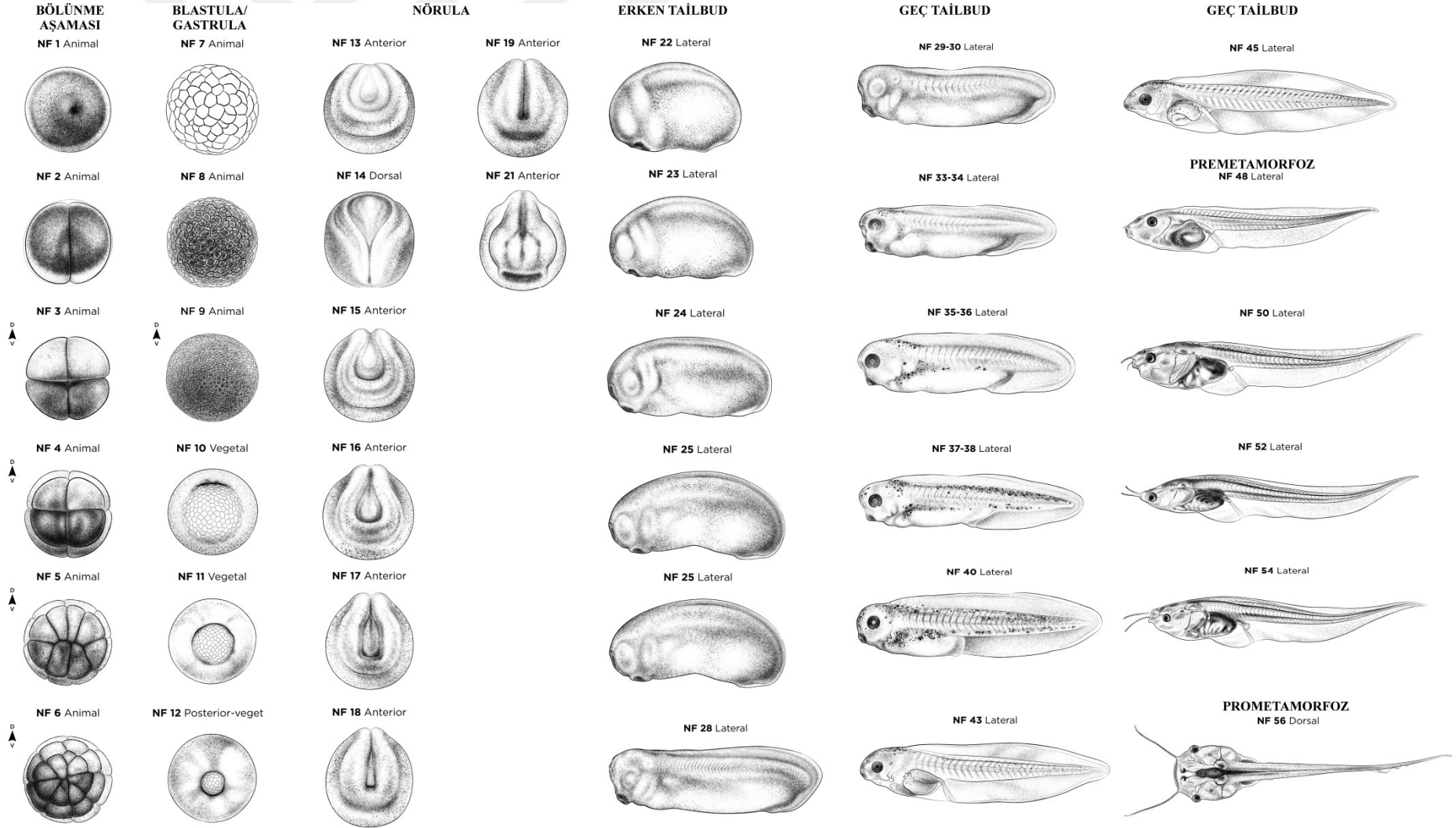
modellerinde standart test organizması haline gelmiştir (Battistoni ve diğ, 2022). Standart toksisite testlerinden biri olan Kurbağa Embriyo Teratogenez Testi-*Xenopus* (Frog Embryo Teratogenesis Assay *Xenopus*, FETAX), *X. laevis*'in gastrulasyon, nörülasyon, erken organogenez ve organogenez embriyonal gelişim dönemlerini kapsar (Çizelge 1.2).

FETAX testi bir gelişim toksisitesi tarama testidir. Gereken bileşik miktarının az olması ve organogenezi kısa bir sürede (96 saat) inceleme kabiliyeti nedeniyle FETAX, ilaç güvenliği geliştirme sürecinin başlarında uygulandığında etkili bir gelişim toksisitesi uyarı testidir. Test, organogenez dönemi boyunca, döllenmiş *X. laevis* orta-blastula evresi embriyoları üzerinde gerçekleştirilir. Bileşiğin teratojenik potansiyeli maruz kalan larvaların ölüm düzeyi ve malformasyon gözlemlerinin analizinden sonra belirlenir (Mouche ve diğ, 2011). Malformasyon tipleri şiddetli, bodurluk, bağırsak malformasyonları, ödem (kardiyak, abdominal, fasiyal, kaephalik, optik) aksiyal malformasyonlar (kuyruk, notokord, yüzgeç), hemoraji, yüz, göz, beyin ve kardiyak malformasyonlar ve kabarcıklar olarak sınıflandırılır (ASTM, 2003). Ayrıca FETAX, ksenobiyotiklerin larva uzunluğu üzerindeki etkilerine bağlı olarak maddenin büyümeyi geciktirici etkileri konusunda da bilgi sağlar (Mouche ve diğ, 2011) .

Çizelge 1.2: *X. laevis*'in bazı erken gelişim evrelerinde görülen değişimler (Zahn, 2019)

	Başlangıç	Bitiş
Fertilizasyon	<p>Evre 1:</p>  <p>Bölünme başlamamıştır; pronükleuslar kaynaşır; yumurtalar, koyu renkli animal yarımküre yukarı, açık renkli vejetal yarımküre aşağı bakacak şekilde döner; sperm giriş noktasında pigment yoğunlaşması görülür.</p>	
İlkin bölünmeler	<p>Evre 2:</p>  <p>Birinci bölünme düzlemi sağ ve sol yarıları ayıran dorso-ventral düzlem boyunca meridyoneldir; Yarılma boşluğu mevcuttur.</p>	<p>Evre 6.5 (Morulla):</p>  <p>64 hücrelidir; bölünmeler asenkron hale gelir; animal/dorsal blastomerler vejetal blastomerlerden önce bölünür.</p>
Blastula	<p>Evre 7:</p>  <p>Artık, hücreleri güvenilir şekilde saymak mümkün değildir; embriyo evresini ayırt etmek için animal hücrelerinin boyutu kullanılır.</p>	<p>Evre 9:</p>  <p>Animal hala koyu pigmentlidir; germ tabakaları belirginleşir; animalde ektoderm, ortada bir mezoderm ve vejetalde sarımsı endoderm bulunur.</p>
Gastrulasyon	<p>Evre 10:</p>  <p>Şişe hücrelerinden gelen daha koyu renkli pigment, dorsal blastopor dudak oluşumunu gösterir; hücre girişinin olduğu blastopor oluğu henüz görünmez.</p>	<p>Evre 12.5:</p>  <p>Dorsal yüzeydeki daha koyu pigment çizgileri gelecekteki nöral oluğu ve nöral plağı gösterir; blastopor yarığı hafifçe açıktır, çapı azalır ve oval şekillidir.</p>

Nörülasyon	<p>Evre 12: Blastopor bir 'yarık' şeklinde tamamen kapalıdır; dorsal taraftaki nöral plaka belirgindir.</p> 	<p>Evre 20: Nöral tüp anteriora kaynaşmıştır; faringeal çıkıntı görülmez; embriyo uzamaya başlar; optik çanak oluşur; oral evaginasyon (ağız) görülebilir.</p> 
	<p>Evre 21: Dorsal eğriliği vardır, ventral yüzeyi düzdür; nöral tüp tamamen kapalıdır; optik vezikül (gözler) çıkıntı yapmaya başlar.</p> 	<p>Evre 27: Kuyruk tomurcuğu yanal görünümde tanımlanır; yüzgeç yarı saydamdır; lens oluşmaya başlar; gözler yanal olarak düzleşir.</p> 
Erken organogenez	<p>Evre 28: Kuyruk tomurcuğu distale doğru uzar ve aşağıya kloaka doğru uzanır; yüzgeç dış (şeffaf) ve iç (yarı şeffaf) yüzgeç olarak ayrılır.</p> 	<p>Evre 45: Operkulum solungaçları kısmen örter; arka bacak tomurcuğu görünmez; dalak oluşur; böbrek mezonefriktiler</p> 
Organogenez		



Şekil 1.5: Fertilizasyondan organogenez sonuna kadar *X.laevis*'in erken gelişim evreleri (Zahn, 2019)

1.4 Çalışmada Yapılan Biyokimyasal Analizler

Ksenobiyotiklere maruz kalan organizmalarda çeşitli biyokimyasal parametreler, bu maddelere verilen yanıtın belirlenmesi açısından biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Biyobelirteçler, belirli bir organizmanın veya popülasyonun çevresel bir duruma yanıt olarak yaşayabileceği farklı biyolojik, fizyolojik ve metabolik değişiklikleri ifade etmektedir (van der Oost ve diğ, 2003). Bu parametreler vücut sıvılarında, hücrelerde veya dokularda ölçülebilir ve kirleticinin organizmaya girip girmediğini, dağılıp dağılmadığını ve üzerinde bazı toksik etkiler oluşturup oluşturmadığını belirleyen hassas yanıtlar verir (Gallego-Ríos ve diğ, 2021). Bu çalışmada antiviral ilaç uygulamasının sonunda iribaşlarda malformasyon ve boy uzunluğu gibi morfolojik değişimlerin yanı sıra glutatyon S-transferaz, glutatyon redüktaz, katalaz, karboksilesteraz ve asetilkolinesteraz enzim aktiviteleri ile malondialdehit düzeyi antiviral ilaç toksisitesini yansıtacakları varsayımı ile biyobelirteç olarak seçilmiştir.

1.4.1 Glutatyon S-transferaz

Ksenobiyotik metabolizmasında yer alan reaksiyonlar başlangıçta iki genel kategoriye ayrılmıştır. Faz I reaksiyonları oksidasyon, hidroliz ve indirgeme gibi reaksiyonları içerir. Faz II reaksiyonları ise, vücuttan atılan glukuronidler ve sülfat esterleri gibi oldukça polar türevler oluşturur. Bu dönüşümlerin neredeyse tamamı transferazlar tarafından katalize edilir (Cooper ve Hanigan, 2018). Xenobiyotik maddelerle redükte glutatyonun (GSH) konjugasyon reaksiyonu da faz II biyotransformasyon sürecinin önemli bir parçasıdır. Glutatyon S-transferaz (GST; 2.5.1.18), farklı elektrofilik bileşik türleri ile tripeptid glutatyonun (GSH) nükleofilik reaksiyonunu katalizleyen ve vücutta yaygın olarak bulunan geniş bir protein grubudur (Angelucci ve diğ, 2002). GST'ler birçok toksik elektrofilik ksenobiyotiği ve bazı endojen bileşikleri glutatyon S-konjugatına dönüştürerek detoksifiye ederler (Anila ve diğ, 2021; Tierbach ve diğ, 2018).

GST ailesi membran bağlı, mitokondriyal ve sitozolik proteinler olmak üzere 3 ana gruptan oluşur. Membranla bağlı GST'ler lökotrienlerin ve prostanoidlerin biyosentezinde rol oynarlar. Mitokondriyal GST'ler kappa sınıfını oluşturur ve bunların reaktif oksijen türlerine (ROT), alkol ve diğer toksik ajanların neden olduğu hasarlara karşı koruyucu oldukları gösterilmiştir (Raza, 2011). Yapısal ve işlevsel özelliklerinin

analizi ile şimdiki kadar en az dokuz farklı sitozolik GST (alfa, mu, pi, teta, sigma, zeta, beta, phi ve omega) tanımlanmıştır (Angelucci ve diğ, 2002). Sitozolik GST'lerin çok çeşitli olması, ksenobiyotikler dahil potansiyel olarak zararlı endojen ve eksojen bileşiklerin inaktivasyonu için geniş bir substrat özgüllüğü sağlar (Tierbach ve diğ, 2018). GST'ler organizmaların detoksifikasyon sisteminin önemli bir parçasıdır ve hücreleri reaktif oksijen metabolizmasına karşı korumak için evrimleştiği varsayılmaktadır (Angelucci ve diğ, 2002; Raza, 2011).

1.4.2 Glutasyon redüktaz

Reaktif oksijen (ROT) ve azot (RNT) türleri (ikisi birlikte RONT), hücrelerdeki diğer moleküllerle hızlı bir şekilde reaksiyona giren oksijen ve azot içeren kararsız türler olarak tanımlanmaktadır. Bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren RONT'ler serbest radikaller (*süperoksit anyon radikali, hidroksil radikali, alkoksil, nitrik oksit, ve peroksil radikalleri*) olarak bilinirken, eşleşmemiş elektron içermeyen RONT'ler serbest olmayan radikaller (*hidrojen peroksit, nitrojen dioksit ve peroksinitrit*) olarak adlandırılır. Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$) hücreler tarafından üretilen RONT'lerin başlıca öncüsüdür ve bu radikaldeki artış oksidatif strese, lipid peroksidasyonuna (LPO) ve hücre ve doku hasarına neden olmaktadır (Aranda-Rivera ve diğ, 2022).

GSH'yi de içeren antioksidanlar aşırı RONT üretimini kontrol etmek ve oksidatif hasarı önlemek için güçlü araçlardır. Antioksidan savunmada yer almasa da glutasyon redüktaz (GR; EC 1.6.4.2), oksidatif stres koşulları altında glutasyonu indirgenmiş formda tutarak, GSH/okside glutasyon (GSSG) dengesini sağladığından toksikolojik yanıtın değerlendirilmesinde dikkate değer bir enzimdir (van der Oost ve diğ, 2003). Dokularda yaygın olarak bulunan bir enzim olan GR, redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfata (NADPH) bağlı reaksiyonda glutasyon disülfidin (GS-SG) glutasyona (GSH) indirgenmesini katalizler (Anila ve diğ, 2021; Eriyamremu ve diğ, 2008).

1.4.3 Katalaz

Çeşitli enzimler serbest radikallerin oluşumunu engeller, bazıları ROT'leri temizlemede doğrudan rol oynarken (birincil enzimler), "ikincil enzimler" diğer endojen antioksidanları destekleyerek dolaylı bir rol oynar. Birincil enzimler, eksik O_2 indirgenmesinden kaynaklanan ana ROT'ler ($O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2) üzerinde doğrudan etki

gösterir. Birincil enzimlerden, bir metaloenzim olan süperoksit dismutaz (SOD) süperoksit anyonunun, H_2O_2 ve moleküler oksijene dismutasyonunu katalizler. Buna karşılık katalaz (CAT, E.C. 1.11.1.6) ve glutatyon peroksidaz H_2O_2 'i ortadan kaldırır. CAT, H_2O_2 'nin su ve gaz halindeki oksijene dismutasyonunu katalizleyen tetramerik bir ferriheme oksidoredüktazdır (Sharifi-Rad ve diğ, 2020).

CAT esas olarak peroksizomlarda bulunur ve her dokuda bulunmasına rağmen en yüksek aktivite karaciğer ve kırmızı kan hücrelerinde mevcuttur. Hidrojen peroksidin yanı sıra çeşitli lipid peroksidleri de indirgeyebilen bazı peroksidazların aksine, CAT'ler sadece H_2O_2 'yi indirgeyebilirler. CAT'ler yağ asidi metabolizmasında da yer aldığından, aktivitelerdeki değişiklikleri yorumlamak zor olabilmektedir. (van der Oost ve diğ, 2003). Öte yandan, *X. laevis* embriyonal gelişiminin 22. evresi ile 35/36. evresi arası dönemi kapsayan ilk iki gününde embriyo antioksidan metabolizmasının CAT ve SOD aktivitelerine dayandığı, GSH sisteminin- GSH ile ilgili tüm enzimlerin sonradan aktive olduğu bildirilmiştir (Rizzo ve diğ, 2007).

1.4.4 Karboksilesteraz

Aldridge (1993) tarafından yapılan esteraz sınıflandırmasına göre, serin süper esteraz ailesi, yani asetilkolinesteraz (AChE), bütirikolinesteraz ve karboksilesterazlar (CaE; EC 3.1.1.1), B-esteraz grubuna girer. CaE'ler, karboksilik asit esterlerinin karşılık gelen asit ve alkole hidrolizinden sorumlu olan ve her dokuda bulunan enzimlerdir (Satoh ve Hosokawa, 2006). Bugüne kadar, bu enzimler için hiçbir endojen substrat kesin olarak tanımlanmamıştır ve genellikle koruyucu, detoksifiye edici proteinler olarak kabul edilirler. Çok sayıda ilaç ve pestisit ester bağları içermesi, onları bu enzimler için fiili substratlar haline getirmektedir (Hatfield ve Potter, 2011). CaE'ler piretroidler, organofosfatlar ve karbamatlar dahil olmak üzere birçok kimyasalın detoksifikasyonunda ve hidrolizinde yer alan faz I enzimleri olarak sınıflandırılır ve detoksifikasyonda önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir (Wheelock ve diğ, 2005). Diğer yandan klorpirifos okson, paraokson veya metil paraokson dahil olmak üzere çok sayıda organofosfat veya karbamat pestisit esterazları (CaE ve AChE) inhibe ettiği bilinmektedir (Hatfield ve Potter, 2011).

1.4.5 Asetilkolinesteraz

Asetilkolinesteraz (AChE; EC 3.1.1.7), kolinerjik reseptörlerin aktivasyonunun geçici olması için nörotransmitter asetilkolinin (ACh) hidrolizinden sorumlu nöromusküler bağlantılarda işlev gören karakteristik bir enzimdir (Colombo ve diğ, 2005). AChE aktivitesi, sinir sinyali iletdikten sonra postsinaptik membranda asetilkolin uyarımının kesilmesine sağlar. AChE, bu enzimin enzim aktif bölgesine geri dönüşü olmayan bir şekilde bağlanan organofosfat insektisitlerinin ana hedefi olarak kabul edilir (Venturino ve diğ, 2003). AChE'nin inhibisyonu asetilkolin birikimine yol açmakta, bu da kalıcı depolarizasyona neden olarak nöbetler, solunum durması ve nihayetinde maruz kalan organizmanın ölümüyle sonuçlanmaktadır (Kaushal ve diğ, 2021).

1.4.6 Malondialdehit

Çeşitli kimyasalların, hücre zarlarında çoklu doymamış lipidlerin peroksidasyonuna, yapısal proteinlerin, enzimlerin ve ribonükleik asitlerin bozulmasına ve doku hasarına neden olduğu bilinen serbest radikalleri oluşturabileceği kabul edilmektedir. Biyomembranların peroksidasyonu, MDA'yı da içeren epoksitler ve aldehitler gibi reaktif elektrofiller dahil olmak üzere çeşitli ürünler üretir. MDA oldukça reaktif bir aldehittir ve nükleofillere karşı reaktivite sergiler ve MDA-MDA dimerleri oluşturabilir. Hem MDA hem de MDA-MDA dimerleri mutajeniktir (Klaassen ve diğ, 2013). Yüksek MDA seviyesinin, membran LPO düzeyinin ve dolayısıyla doku hasarının önemli bir belirteci olduğu bilinmektedir (Eriyamremu ve diğ, 2008). Kirleticilere maruz kalan sucül türlerde azalan MDA düzeylerinin genellikle artan antioksidan aktiviteden kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Garcia ve diğ, 2020).

2. KAYNAK ÖZETİ

X. laevis'in erken embriyonik gelişimi, Embriyolojide organogenez ve embriyogenez mekanizmasını araştırmak için kullanılabilir. Manipülasyonun kolay olması nedeniyle *X. laevis* doku ve organları üzerine yapılan çok sayıda çalışma, beyin, göz, kalp ve böbrek de dahil olmak üzere embriyo gelişimi konusunda mevcut literatüre önemli katkılar sağlamıştır. *X. laevis* pronephrik böbreğinin gelişimi, nefron oluşumunu incelemek ve insan böbrek hastalıklarını araştırmak için uygun bir modeldir. Amfibi metamorfozu, omurgalı gelişimi sırasında tiroid hormonu aracılı hücre apoptozu ve kök hücre gelişiminin araştırılmasında kullanılmaktadır (Gao ve Shen, 2021). Memelilerden farklı olarak, *X. laevis* iribaşları omurilik, kalp, epitel ve uzuvlar gibi yapılar için yüksek rejeneratif potansiyele sahiptir ve bu da *X. laevis*'u rejenerasyonu yöneten mekanizmaları ortaya çıkarmak için iyi bir model haline getirmektedir. Sucul ekosistemler üzerine insan aktivitelerinin etkisini değerlendirirken de *X. laevis* risk değerlendirme çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Weltje ve diğ, 2013).

2.1 Favipiravir ve Oseltamivir ile İlgili Çalışmalar

Literatür incelendiğinde test edilen antiviral ilaçların insan kullanımında neden olduğu çok sayıda yan etkinin bilindiği ve bu bilgilerin ilaç prospektüslerinde yer aldığı görülmektedir. Diğer yandan bu ilaçların çevresel etkilerine ve hedef olmayan organizmalar üzerine etkilerine yönelik çalışmalar oldukça azdır.

Ülkemizde dahil olmak üzere, bazı ülkelerde COVID-19 hastaları için tedavi protokolüne dahil edilmiş ve yoğun olarak kullanılmış olan favipiravir, insan vücudunda 2.5-5 saat gibi kısa bir yarılanma ömrüne sahiptir. Böbrekler tarafından hidrosillenmiş formda hızla atılan favipiravir, ev veya hastane atık sularına karışmaktadır. Favipiravir, atık arıtımının aktif çamur sürecinde çok düşük bir giderim yüzdesi ile biyolojik bozunmaya karşı dirençlidir. Geleneksel atık su arıtım tesisleri favipiravir ve metabolitlerinin gideriminde düşük etkinliğe (%20'nin altında) sahiptir. Bu özellikler favipiravirin çevreye salınmasına yol açmaktadır. Ayrıca favipiravir fotodegradasyona direnç gösterir ve bu nedenle çevrede gün boyu kalıcılık göstebilir. Yaygın kullanım, arıtıma ve fotodegradasyona direnç nedeniyle, suda yüksek konsantrasyonda (yüzlerce ile binlerce ng/L) favipiravir ve metabolitleri tespit edilmiş ve yüksek ekotoksikolojik risk oluşturduğu sonucuna varılmıştır (Kiyanmehr ve diğ, 2022).

Oseltamivir karboksilatın (OSK) bir sulama kanalından alınan su örneklerindeki kalıcılığının araştırıldığı bir çalışmada, başlangıçta konsantrasyonda hızlı düşüşün ardından, OSK konsantrasyonlarının kalan inkübasyon süresi boyunca yavaşça azaldığı gözlenmiştir. Başlangıçtaki OSK miktarının yaklaşık %65'i 36 günlük inkübasyon süresinin sonunda suda kalmıştır. Sediment ilavesiyle mikrobiyal süreçlerin uyarılması, OSK kalıcılığının azalmasıyla sonuçlanmıştır. OSK su örneklerindeki yerli mikrobiyal popülasyonun boyutunda başlangıçta geçici bir azalmaya neden olmuştur (Accinelli ve diğ, 2007).

Favipiravir, seçici bir RNA polimeraz inhibitörü ve geniş spektrumlu bir antiviral ilaç olup, Ebola, Lassa ve COVID-19 dahil olmak üzere viral enfeksiyonlarda kullanılan önemli bir ajandır. Favipiravir uygulamasının sıçanların karaciğer ve böbrek dokuları üzerindeki potansiyel toksikolojik etkilerini değerlendirdiği bir çalışmada, favipiravirin karaciğer ve böbrek serum enzimlerinde yükselmeye, oksidatif ve histopatolojik hasarlara yol açtığını gösterilmiştir (Kara ve diğ, 2022).

COVID-19 tedavisi için ilaç olarak önerilen 11 terapötik ajanın ve bunların 13 metabolitinin atık su ve çevresel sulardaki varlıkları, akıbetleri ve ekotoksikolojik riskleri, ilaç tüketimi düzeyleri, fiziksel-kimyasal özellikleri ve ilaçların ekotoksikolojik ve farmakolojik verilerine dayanarak istatistik modelleme yardımıyla tahmin edilmiştir. Sonuçlar, geleneksel atık su arıtım tesislerindeki giderim verimlerinin maddelerin yarısı için düşük (<20%) kalacağını ve sonuç olarak yüksek ilaç kalıntılarının (örn. 7.4 µg/L ribavirin, 4.2 µg/L favipiravir, 0.73 µg/L lopinavir, 0.32 µg/L remdesivir) ikincil atık sularda bulunabileceğini ve çevresel sularda kalıcı olabileceklerini göstermiştir. Alıcı nehir sularındaki ekotoksikolojik risk favipiravir, lopinavir, umifenovir ve ritonavir kullanımı ile yüksek riskli; klorokin, hidroksiklorokin, remdesivir ve ribavirin kullanımı ile orta riskli; deksametazon ve oseltamivir için düşük riskli belirlenmiştir. Tahminler, antiviral ilaçların uygun kullanımı ve atık yönetiminin yanı sıra atık sudaki ilaç kalıntılarının giderim verimliliğinin iyileştirilmesi için acil bir ihtiyaç olduğunu göstermiştir (Kuroda ve diğ, 2021).

2.2 FETAX ve Biyokimyasal Belirteçler ile İlgili Çalışmalar

Uyku bozuklukları, anksiyete ve epilepsi tedavisinde kullanılan psikotropik ilaçlar olan benzodiazepinler, yeni ortaya çıkan su kirleticilerinin önemli bir sınıfını temsil etmektedir. Benzodiazepin delorazepam içeren bir farmasötik preparatın, *X. laevis*'in

embriyogenezi üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, delorazepamın embriyo gelişimine etkilediği, kalp atış hızını ve hareketliliği azaltarak ölüme neden olduğu, belirgin sefalik ve abdominal ödemin yanı sıra bağırsak ve retina kusurlarına neden olduğu belirlenmiştir (Fogliano ve diğ, 2022).

Penkanozol pestisitinin toksik, teratojenik etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, FETAX testi uygulanmış ve maruz kalan *X. laevis* embriyolarında en sık tespit edilen malformasyon tipleri kuyruk eğriliği, abdominal ödem ve bağırsak malformasyonu (uygun olmayan bağırsak sargısı, uzun gevşek sargılı bağırsak) olduğu tespit edilmiştir (Turhan ve Gungordu, 2022).

Balık larval toksisite testi ile FETAX'ın etkinliğinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, veterinerlik ilaçları (ivermektin, oksitetrasiklin, tetrasiklin, sülfametoksazol ve trimetoprim) ve hayvancılık atıklarında bulunabilecek temel metallerin (çinko, bakır, manganez ve selenyum) balık ve kurbağa larvalar üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Çalışma sonuçları FETAX'ın ekotoksikolojik tehlikenin değerlendirmesinde faydalı olduğunu, ancak balık toksisite testlerinin amfibiler üzerine toksik etkileri değerlendirmede yeterli olmayabileceği göstermiştir. Ayrıca, geç evre amfibi larvalarının bazı kimyasallara karşı geleneksel sucul biyoindikatörlerden daha hassas olabileceği, tüm yaşam döngülerini suda geçiren amfibi türleri için (örneğin, Pipidae), çevresel etkinin değerlendirilmesinde larva maruziyetinin, FETAX testinden daha yararlı olabileceği ileri sürülmüştür (Martini ve diğ, 2012).

X. laevis'te antikanser ilaç (5-flourourasil, kapesitabin, sisplatin, etoposid ve imatinib) etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, çalışılan antikanser ilaçların hiçbiri test edilen konsantrasyonlarda (çalışılan bileşiğe bağlı olarak 0.01-50 mg/L) istatistiksel olarak anlamlı ölümlere neden olmamış ve 96 saatlik maruziyetten sonra embriyolarda büyüme inhibisyonu gözlenmemiştir. Sisplatin hariç, diğer ilaçlar, test edilen en yüksek konsantrasyonlarda (5-flourourasil için 50 mg/L; etoposid için 30 mg/L ve kapesitabin ve imatinib için 20 mg/L) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde abdominal ödem, aksiyal eğrilik, baş, göz, bağırsak ve kalp malformasyonları gibi gelişimsel malformasyonlarda artışa neden olmuştur (Isidori ve diğ, 2016).

Bir poliklorlu bifenil olan Aroclor 1254'ün *X. laevis*'in genç iribaşlarında (Evre 35/36) oksidatif strese neden olup olmadığının test edildiği bir çalışmada, maruziyet sonrası LPO, antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, CAT, GST, GPx, GR aktiviteleri) ve

toplam glutatyon düzeyleri ölçülmüştür. Uygulanan madde konsantrasyonlarına maruz kalma, hayatta kalma ve gelişim üzerinde etkili olmazken, iribaşların ortalama vücut ağırlığı azalmıştır. Diğer antioksidan enzimler ve LPO düzeyleri Aroclor 1254'e maruz kalma sonucunda değişmezken, GST aktivitesinde önemli bir artış olmuştur. Sonuç olarak, çevresel Aroclor 1254 konsantrasyonlarına maruz kalmanın *X. laevis* iribaşlarında normal büyümeyi engellediği gösterilmiştir (Gillardin ve diğ, 2009).

Sentetik tiroid hormonu levotiroksin ve bir anti-tiroid ilaç olan propiltiourasilin *X. laevis*'in embriyo ve iribaşları üzerindeki etkileri, biyokimyasal (46. evre iribaşlarında) ve morfolojik belirteçler (FETAX testi ile) kullanılarak değerlendirilmiştir. FETAX test sonuçlarına göre, propiltiourasil “şiddetli tür” malformasyonlara neden olmuştur. Test edilen ilaçlar 8. evre embriyolarında 46. evre iribaşlarına göre daha etkili büyüme geriliğine neden olmuştur. İlaçlara akut olarak maruz kalan 46. evre iribaşlarında hem metabolik (LDH, AST, AChE) hem de detoksifikasyon ve oksidatif stres ilişkili enzimlerin (GST, GR, CaE) önemli ölçüde inhibe olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada test edilen ilaçların nispeten yüksek konsantrasyonlarının öldürücü ve teratojenik olabileceğini, nispeten düşük ilaç konsantrasyonlarının ise öldürücü olmasa bile biyokimyasal tepkilere neden olabileceği sonucuna varılmıştır (Boran ve Güngördü, 2021).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Test Edilen Antiviral İlaçlar

Bu çalışmada test edilecek ticari antiviral ilaçlar Favicovir (favipiravir, 200 mg) ve Enfluvir® (oseltamivir, 75 mg) yerel eczanelerden sağlandı. Antiviral ilaçların saf halleri favipiravir (BFA-303253, $\geq\%99$) ve oseltamivirin phosphate (BOM-823518, $\geq\%98$) Bostonchem'den (USA) alındı. Belirtilen ticari ilaç ve etken maddelerinin bir seri konsantrasyonlarına maruz bırakılan 8-11. evre *X. laevis* türü kurbağa embriyolarında toksik ve teratojenik etkiler değerlendirildi. Bu amaçla test sonucunda test edilen antiviral ilaçların LC₅₀ değerleri (malformasyon düzeyleri uygunsa EC50 değerleri), malformasyon oranları belirlendi ve çeşitli biyokimyasal analizler yapıldı. Biyokimyasal analizler 46. evre iribaşları için tekrarlandı.

3.2 Test Organizmalarının Sağlanması

Çalışmada kullanılan embriyoları elde etmek için kullanılan *X. laevis* erginleri, İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Sucul Omurgalı Canlıları Deneme Ünitesi-*Xenopus* laboratuvarında yaşatılmakta olan koloniden sağlandı. Belirtilen ünite ortam sıcaklığı 22±1 °C'de tutulmakta ve foto-periyot (12:12 gündüz-gece) uygulanmaktadır. *X. laevis* yetişkin bakımı, beslenme, üreme ve embriyo toplama ve FETAX testinde kullanılan embriyoların bakımı, Amerikan Test ve Malzeme Kurumunun (ASTM American Society for Testing and Materials) E1439-98 nolu standart klavuzu ve Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü'nün (OECD) 231 nolu test kılavuzunda açıklandığı şekilde gerçekleştirildi (ASTM, 2003; OECD, 2009). Çalışmada kullanılan tüm test organizmaları (yetişkinler, iribaşlar ve döllenmiş yumurtalar) İnönü Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından incelenen ve onaylanan hayvan kullanım protokolüne (HAYBİS Kayıt No: 14391, Kayıt sayısı: 1) uygun olarak kullanıldı.

Çalışmada kullanılacak embriyoları elde etmek için; çalışma gününden iki gün önce, bir erkek ve bir dişi kurbağa ayrı akvaryumlara yerleştirildi ve hormon enjeksiyonu yapılana kadar bekletildi. İki günün sonunda, döllenmiş yumurta elde etmek için erkek ve dişi kurbağaların dorsal lenf bezinden sırasıyla 600 IU ve 500 IU insan koryonik gonadotropini (hCG) enjekte edildi (Choiromon®, 5000 IU, IBSA,

İsveç). Daha sonra her iki birey de bir akvaryumdaki standart Kurbağa Embriyo Teratojenez Testi—*Xenopus* (FETAX) çözeltisine yerleştirildi ve oda karartıldı (ASTM, 2003). Çiftleşme (amleksus) gerçekleşikten yaklaşık 4-6 saat içinde yumurtlama başladı. Bir pipet kullanılarak yumurtalar akvaryumdan Petri kaplarına alındı. Dölleniş ve normal bölünen embriyolar diseksiyon mikroskobu altında seçildi ve bir Petri kabında FETAX çözeltisinde muhafaza edildi. FETAX çözeltisi hazırlamak için 0.375 g CaCl₂, 0.75 g KCl, 1.5 g CaSO₄-2H₂O, 1,875 g MgSO₄, 2.4 g NaHCO₃ ve 15.625 g NaCl 25 L distile suda çözüldü (ASTM, 2003).

3.3 FETAX Testi

Testten önce FETAX çözeltisinin oda sıcaklığında (23±1°C) pH'sı (7.86±0.08 mS/cm) ve iletkenliği (1.47±0.01) ölçüldü. FETAX için, Nieuwkoop ve Faber (1956) evrelemesine göre 8-11. evrelerdeki embriyolar 23°C'de (±1°C) 12:12 saat aydınlık:karanlık fotoperiyodunda, statik test koşulları altında 96 saat boyunca farklı antiviral ilaç konsantrasyonlarına maruz bırakıldı. Kontrol gruplarının embriyoları FETAX çözeltisinde muhafaza edildi. Testte, yukarıda açıklandığı şekilde elde edilen embriyolardan dört tanesi rastgele seçildi ve 24 kuyulu mikroplyetlerin bir kuyusuna 2.5 mL test ortamına yerleştirildi ve bu, bir uygulama konsantrasyonu için bir tekrar olarak kullanıldı. Tüm antiviral ilaç konsantrasyonları toplam 32 embriyo için sekiz tekrarlı olarak test edildi. Test ortamı 24 saatte bir kontrol edildi, ölü embriyolar ortamdan çıkarıldı ve ölümler kaydedildi. Test sonunda, hayatta kalan embriyolara 200 mg/L tricaine methanesulfonate (sodyum bikarbonat ile ph 7-7.4'e tamponlanmış) ile ötenazi uygulandı. Ötenazi için, test edilen madde test ortamından alındıktan sonra, test ortamını değiştirir gibi, ortama 2.5 mL MS222 çözeltisi (200 mg/L) eklendi. Ötenaziden sonra, gelişimsel anomalilerin gözlemlenmesi için iribaşlar %3 formalin içinde sabitlendi. Mikroplyetlerde tutulan iribaşlar bir diseksiyon mikroskobu kullanılarak incelendi ve Bantle (1995) tarafından önerildiği gibi malformasyon türleri ve malforme embriyolar kaydedildi. İribaşların vücut uzunlukları, kamera bağlı bir diseksiyon mikroskobu ile uygun bir yazılım kullanılarak ölçüldü.

3.4 Biyokimyasal Analizler

Antiviral ilaçların subletal—biyokimyasal etkilerini değerlendirmek için yapılan testlerde kullanılacak konsantrasyonlar FETAX testinden elde edilen LC₅₀ konsantrasyonlarına göre belirlendi (Şekil 3). Buna göre testlerde 8-11. evre embriyoları antiviral ilaçların ticari ve saf formlarının LC₅₀/125, LC₅₀/25 ve LC₅₀/5 konsantrasyonlarına, 46. evre iribaşları ise antiviral ilaçların LC₅₀/25 ve LC₅₀/5 konsantrasyonlarına maruz bırakıldı. Bu konsantrasyon tercihinin nedenlerinden biri, biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere yeterli sayıda canlı iribaş kalmasını sağlamaktır.

3.4.1 Embriyoların test maddelerine maruz bırakılması

Biyokimyasal analizler için, 8-11. evredeki 15 embriyo rastgele seçildi ve 25 mL hacimli, kapaklı plastik kaplarda 10 mL test ortamına yerleştirildi ve her konsantrasyon için 5 tekrar kullanıldı (toplam 75 embriyo). Kontrol gruplarının embriyoları FETAX çözeltisinde tutuldu. Test ortamı her 24 saatte bir kontrol edildi, ölü embriyolar çıkarıldı ve ölümler kaydedildi. Biyolojik deneyler sonlandırmak için, hayatta kalan embriyolara 200 mg/L MS222 (sodyum bikarbonat ile pH 7-7.4'e tamponlanmış) ötenazi uygulandı. Ötenazi için, test edilen madde test ortamından çıkardıktan sonra, test ortamını değiştirir gibi, ortama 10 mL MS222 (200 mg/L) eklendi. İribaşlar mümkün olan en kısa sürede, buz üzerinde mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve biyokimyasal analize kadar -80 °C'de saklandı.

46. evre iribaşları ile biyokimyasal analizler için, FETAX testinde olduğu şekilde elde edilen 8-11. evre embriyoları 46. evreye kadar (ortalama 4 gün süreyle) FETAX çözeltisinde muhafaza edildi. Sürenin sonunda *X. laevis* iribaşları, her konsantrasyon (10 mL) için 5 tekrar ve her tekrarda 15 birey (her konsantrasyon için toplam 75 birey) olacak şekilde, kapaklı plastik kaplarda subletal antiviral ilaç konsantrasyonlarına 96 saat süreyle maruz bırakıldı. Bundan sonraki süreçte 8-11. evre embriyolarında yapılan işlemler 46. evre iribaşları için de tekrarlandı

3.4.2 Tüm vücut homojenatlarının hazırlanması

Mikrosantrifüj tüpleri içinde dondurulmuş iribaşlar derin dondurucudan alındı, buz üzerinde çözüldü, 0.5 mL soğuk homojenizasyon tamponu (pH 7.4, 0.1 M potasyum fosfat tamponu içinde: 0.15 M KCl; 1 mM EDTA; 0.05 mM 1,4-

Dithiothreitol (DTT) bulunmaktadır) içinde bir el homojenizatörü ile 45 saniye süreyle homojenize edildi. Homojenat 4°C'de 20 dakika boyunca 16.000×g'de santrifüj edildi (Sigma 2-16KL, ABD) ve süpernatant temiz mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Santrifüj işleminden hemen sonra, dondurma-çözme işlemi yapmadan, post-mitokondriyal fraksiyonda biyokimyasal belirteçler ölçüldü.

Katalaz hariç diğer biyokimyasal ölçüm işlemleri, mikropleyt okuyucu sistem (Versamax®, Molecular Devices Corp., USA) kullanılarak, literatürde belirtilen yöntemlerin Gungordu (2013) tarafından yapılan modifikasyonları dikkate alınarak yapıldı. Spektrofotometrik ölçümler yapılırken her numune için en az üç tekrarlı ölçüm yapıldı. Ölçümler arasında %10'dan fazla fark varsa ölçüm tekrarlandı. Ayrıca bu ölçümlerde kullanılan substrat ve tampon çözeltileri ölçümlerden hemen önce hazırlandı ve taze olarak kullanıldı.

3.4.3 GST aktivitesi

GST aktivitesinin ölçümü için Habig ve diğ. (1974) tarafından geliştirilen yöntem bazı modifikasyonlarla kullanıldı. Buna göre, önce 10 µL süpernatant 96 kuyucuklu mikropleyt kuyucuklarına pipetlendi. Süpernatant örneklerine 1 mM redükte glutatyon (GSH) içeren 200 µL potasyum fosfat tamponu (0.05 mM, 100 µL, pH 6.5) eklendi. Son olarak, reaksiyonu başlatmak için karışıma etanol içinde çözülmüş 10 µL 20 mM 1-kloro-2,4-dinitrobenzen eklendi. Absorbans değişimini 344 nm dalga boyunda 23°C'de 2 dakika boyunca izlendi. Enzim aktivitesini hesaplarken, oluşan ürün (GS-DNB konjugatı) için molar absorpsiyon katsayısı (ϵ) $9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak alındı.

3.4.4 GR aktivitesi

GR aktivitesi Cribb ve diğ. (1989) yöntemi kullanılarak bazı modifikasyonlarla ölçüldü. İlk olarak, 20 µL süpernatant 96 kuyucuklu mikropleytl kuyucuklarına pipetlendi. Ardından, süpernatant örneğinin üzerine sırasıyla 0.1 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) içeren 150 µL reaksiyon çözeltisi ve 20 µL 1.2 mM NADPH eklendi. Yukarıdaki karışıma 20 µL 3.25 mM oksitlenmiş glutatyon (GSSG) eklenerek reaksiyon başlatıldı. Tüm çözeltiler 1 mM EDTA içeren 0.1 M potasyum fosfat tamponunda (pH 7.5) hazırlandı. Absorbans değişimini 23°C'de 3 dakika boyunca 405 nm dalga boyunda izlendi. Enzim aktivitesini hesaplarken, oluşan ürün (2-nitro-5-tiyobenzoat anyonu) için molar absorpsiyon katsayısı $14.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak alındı.

3.4.5 CAT aktivitesi

Süpernatant örneklerindeki katalaz (CAT) aktivitesi Aebi'nin spektrofotometrik yöntemi ile belirlendi (Aebi, 1974). Enzim aktivitesi, substrat olarak kullanılan hidrojen peroksit (H_2O_2) seviyesindeki azalmaya bağlı olarak 240 nm dalga boyunda belirlendi. İlk olarak 20 μ L süpernatant örneği 1 mL'lik bir kuvars küvete pipetlendi. Süpernatant örneğine 50 mM potasyum fosfat tamponunda (pH 7.0) hazırlanmış 480 μ L 12.5 mM H_2O_2 çözeltisi eklenerek reaksiyon başlatıldı. Oda sıcaklığında bir dakika boyunca 240 nm dalga boyunda absorbans değişimini izlendi. Enzim aktivitesini hesaplarırken, molar absorpsiyon katsayısı $40 M^{-1}cm^{-1}$ olarak alındı.

3.4.6 CaE aktivitesi

CaE aktivitesi, Nousiainen ve Torronen (1984) tarafından geliştirilen ve Stephensen ve diğ. (2000), tarafından bazı değişikliklerle mikropleyt okuyucu sistemine uyarlanan spektrofotometrik yöntem kullanılarak belirlendi. İlk olarak 96 kuyucuklu mikropleyt kuyucuklarına 5 μ L süpernatant örneği pipetlendi. Ardından, süpernatant örneklerine 250 μ L 50 mM Trizma tamponu (pH 7.4) eklendi. Karışım 23 °C'de 3 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, etanol içinde çözülmüş 5 μ L 26 mM p-nitrofenil asetat (PNPA) eklenerek reaksiyon başlatıldı. PNPA, enzim aktivitesi ölçülürken substrat olarak kullanılır. Absorbans değişimi 23°C'de 2 dakika boyunca 405 nm dalga boyunda izlendi. Enzim aktivitesini hesaplarırken molar absorpsiyon katsayısı $1.83 \times 10^3 M^{-1}cm^{-1}$ olarak alındı.

3.4.7 AChE aktivitesi

AChE aktivitesi, Ellman ve diğ. (1961) yönteminin bazı değişikliklerle mikropleyt okuyucuya uyarlanmış hali kullanılarak test edildi. İlk olarak 96 kuyucuklu mikropleyt kuyucuklarına 10 μ L süpernatant örneği pipetlendi. Süpernatant örneklerine 100 μ L 1.47 mM asetiltiyokolün iyodid çözeltisi eklendi. Son olarak, kuyucuklara 100 μ L 0.29 mM DTNB çözeltisi eklenerek reaksiyonu başlatıldı (DTNB çözeltisi hazırlanırken DTNB, 0.56 mM $NaHCO_3$ içeren pH 8 Trizma tamponunda çözüldü). Absorbans değişimi 412 nm dalga boyunda 23°C'de 1 dakika boyunca izlendi. Enzim aktivitesini hesaplarırken, oluşan ürün için molar absorpsiyon katsayısı $13.6 \times 10^3 M^{-1}cm^{-1}$ olarak alındı.

3.4.8 MDA düzeyi

MDA düzeyi Botsoglou ve diğ. (1994) yöntemi modifiye edilerek belirlendi. İlk olarak, 100 µL supernatant 300 µL inkübasyon karışımı (toplam hacim 150 mL: 7.5 g trikloroasetik asit, 0.188 g tiyobarbitürik asit, 1.02 mL HCl ve distile su) ile kapaklı mikrosantrifüj tüplerinde (sıkıca kapatılmış) 100 °C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra örnekler 15000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüjden sonra, örneklerin süpernatantlarından her bir mikropleyt kuyucuğuna 125 µL pipetlendi. 532 nm dalga boyunda absorbans okuması yapıldı. Elde edilen absorbans değerlerinden örnekler için MDA düzeyi hesaplandı. MDA düzeyi hesaplanırken oluşan ürün için molar absorpsiyon katsayısı $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak alındı.

3.4.9 Toplam protein miktarı tayini

Süpernatant örneklerindeki toplam protein miktarları Bradford ve diğ. (1976). göre bir mikropleyt okuyucu sistemi kullanılarak belirlendi. Süpernatant örnekleri distile su ile 1/5 oranında seyreltildikten sonra kullanıldı. Ölçüm için, seyreltilmiş örneklerden 5 µL 96 kuyucuklu mikropleyt kuyucuklarına pipetlendi. Reaksiyonu başlatmak için, seyreltilmiş örneklere 250 µL Bradford çözeltisi eklendi. Dilüe süpernatant ve Bradford reaktifi içeren karışım oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Sürenin sonunda 595 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri, sıgır serum albümini (0.1-1.4 mg/mL BSA) için elde edilen standart eğri ile karşılaştırılarak örneklerdeki toplam protein düzeyi hesaplandı. Bu toplam protein miktarları, yukarıda belirtilen enzimlerin spesifik aktivitelerini hesaplamak için kullanıldı.

3.5 İstatistiksel Analiz ve Hesaplamalar

Test edilen antiviral ilaçların ortalama öldürücü ve etkili konsantrasyonları (sırasıyla LC_{50} ve EC_{50}) EPA Bilgisayar Programı (Sürüm 1.5) kullanılarak Finney'in Probit Analizine göre hesaplandı. Biyokimyasal belirteç bulgularının istatistiksel analizinde GraphPad Prism 5 (Ver. 5.0; Graph Pad Software Inc, ABD) isimli istatistik yazılımı kullanıldı. İstatistiksel analiz yapılırken, veriler için varyansların homojenliği ve normallik dağılımları sırasıyla Bartlett ve Kolmogorov-Smirnov testleri ile test edildi. Eğer ki veriler homojen ve/veya normal dağılım göstermiyorsa, parametrik olmayan Kruskal-Wallis testi ve ardından Dunn çoklu karşılaştırma testi kullanılarak

istatistiksel karşılaştırmalar yapıldı. Aksi durumda, veriler homojen ve normal dağılım gösteriyorsa, parametrik Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve ardından Dunnet testi kullanılarak istatistiksel karşılaştırmalar yapıldı.



4. BULGULAR

Bu çalışmada hem ticari antiviral ilaçlar hem de onların saf formları için eş zamanlı olarak FETAX testleri yapıldı. Çalışmada test edilecek konsantrasyonlar bir ön çalışma sonunda belirlendi. Bu ön çalışmada %100 letaliteye neden olan en düşük ve letaliteye neden olmayan en yüksek madde konsantrasyonları belirlendi ve bundan hareketle test konsantrasyonları saptandı. Ticari favipiravir için 96 saatlik LC_{50} , EC_{50} , $Tİ$ ve büyümeyi inhibe eden en düşük konsantrasyon (MCİG) değerleri sırasıyla 137.9 mg/L, 29.5 mg/L, 4.67 ve 32.9 mg/L olarak belirlendi (Çizelge 4.1). Saf favipiravirin için ise 96 saatlik LC_{50} , EC_{50} , $Tİ$ ve MCİG değerleri sırasıyla 156.9 mg/L, 25 mg/L, 6.28 ve 32.9 mg/L olarak saptandı (Çizelge 4.1).

Ticari ve saf oseltamivir için 96 saatlik LC_{50} değerleri sırasıyla 32.3 ve 58.8 mg/L olarak belirlendi (Çizelge 4.1.). Oseltamivir için yapılan FETAX testlerinde, embriyolarda konsantrasyon ilişkili büyüme geriliği ve malformasyon gözlenmediğinden bu testlerde EC_{50} , $Tİ$ ve MCİG değerleri belirlenemedi.

Çizelge 4.1: Test edilen antiviral ilaçların *X. laevis* embriyoları için LC₅₀, EC₅₀ (malformasyon), TI ve MCİG verileri

Antiviral İlaç	Kons. (mg/L)	Formu	n	C. #	LC ₅₀ (95% CI) (mg/L)				EC ₅₀ (95% CI) (mg/L)	TI (LC ₅₀ /EC ₅₀)	MCİG (mg/L)
					24 h	48 h	72 h	96 h			
Favipiravir	32.9-250	Ticari	32	6	^a	^a	159.3 (137.3-175.8)	137.9 (116.1-157.1)	29.5 (17.7-36.1)	4.67	32.9
		Saf	32	6	^a	237.9 (204.8-272.0)	216.4 (180.1-234.2)	156.9 (138.5-173.0)	25.0 (10.9-32.3)	6.28	32.9
Oseltamivir	8.2-62.5	Ticari	32	6	^a	34.1 (26.1-41.6)	32.3 (24.8-39.1)	32.3 (24.8-39.1)	^a		
		Saf	32	6	^a	61.3 (51.3-103.6)	58.8 (47.5-95.1)	58.8 (47.5-95.1)	^a		

^a Konsantrasyon-malformasyon yanıtı değerini hesaplamaya uygun değil

4.1 Favipiravir ile İlgili Bulgular

4.1.1 Favipiravir ile ilgili FETAX bulguları

FETAX sonuçlarına göre hem ticari hem de saf favipiravirin bütün uygulama konsantrasyonları büyüme geriliğine neden oldu ($p<0.05$) (Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3). Diğer yandan, hem ticari hem de saf favipiravirin en düşük malformasyon düzeyi en düşük konsantrasyon (32.9 mg/L) için sırasıyla %66 ve %70 olarak belirlendi. Ticari favipiravir uygulamasında bütün konsantrasyonlar birlikte değerlendirildiğinde yaşayan bireyler (%59) içinde malforme bireylerin oranı %85'tir. Malformasyon türlerinin sıklık düzeyi (yüksekten düşüğe) % 86 KE, %68 Gut, % 57 Mf, %57 AÖ, %42 KFÖ, %40 Ms, %29 Ka, %25 Bodurluk ve %12 Şiddetli şeklindedir (Çizelge 4.2).

Saf favipiravir uygulamasında bütün konsantrasyonlar birlikte değerlendirildiğinde yaşayan bireyler (%69) içinde malforme bireylerin oranı %90'dır. Malformasyon türlerinin sıklık düzeyi (yüksekten düşüğe) % 87 KE, %80 Gut, %75 Mf, %71 AÖ, %44 Ms, %41 Ka, %37 KFÖ, %27 Bodurluk ve %12 şiddetli şeklindedir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.2: FETAX'ta ticari Favipiravir'e maruz kalan *X. laevis* embriyolarında zamana bağlı toksisite verileri

96 saatin sonunda FETAX detayları																	
Kons. (mg/L)	n	Letalite				Yaş.# (%)	Malf.# (%)	Malformasyon Türleri									Boy (mm)
		24 s	48 s	72 s	96 s			Şiddetli	Bodur	Gut	AÖ	KFÖ	KE	Ms	Mf	Ka	
0.0	32	0	2	2	2	30 (94)	1 (3)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	7.63 ± 0.08
32.9	32	0	3	3	3	29 (91)	19 (66)	2	2	5	7	5	14	3	8	0	6.88 ± 0.09 **
49.4	32	0	4	4	4	28 (88)	21 (75)	0	4	10	9	11	16	2	11	2	6.77 ± 0.12 ***
74.1	32	3	5	6	8	24 (75)	24 (100)	1	4	18	16	16	20	12	14	2	6.41 ± 0.09 ***
111.1	32	0	6	8	11	21 (66)	21 (100)	4	9	21	17	8	21	14	12	16	5.80 ± 0.13 ***
166.7	32	1	7	18	20	12 (38)	12 (100)	5	5	12	6	1	12	8	10	8	5.44 ± 0.15 ***
250	32	1	32	32	32	0	-										

Her konsantrasyon için n: 32 birey kullanıldı. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

Malformasyon Tipleri: Sv: Şiddetli, St: Bodur, Gut, AÖ: Abdominal ödem, KFE: Kraniofasial ödem (yüz, baş ve göz ödemi), Ms: Mikrocefali, Mf: Mikroftalmi, KE: Kuyruk eğriliği, Ka: Kabarcık

Çizelge 4.3: FETAX'ta saf Favipiravir'e maruz kalan *X. laevis* embriolarında zamana bağlı toksisite verileri

Kons. (mg/L)	n	96 saatin sonunda FETAX detayları																
		Letalite				Malformasyon Türleri												Boy (mm)
		24 s	48 s	72 s	96 s	Yaş.# (%)	Malf.# (%)	Şiddetli	Bodur	Gut	AÖ	KFÖ	KE	Ms	Mf	Ka		
0.0	32	0	2	2	2	30 (94)	1 (3)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	7.63 ± 0.08	
32.9	32	0	2	2	2	30 (94)	21 (70)	1	0	6	12	8	17	1	8	1	6.87 ± 0.08 *	
49.4	32	0	2	2	2	30 (94)	27 (90)	5	3	22	19	11	18	3	19	7	6.63 ± 0.15 ***	
74.1	32	1	3	3	3	29 (91)	28 (97)	2	6	24	24	16	26	12	22	10	6.06 ± 0.12 ***	
111.1	32	0	4	4	4	28 (88)	28 (100)	9	12	28	22	6	27	22	26	21	5.74 ± 0.09 ***	
166.7	32	0	4	4	17	15 (47)	15 (100)	6	11	15	7	3	15	14	14	10	5.03 ± 0.11 ***	
250	32	1	20	27	32	0	-											

Her konsantrasyon için n: 32 birey kullanıldı. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

Malformasyon Tipleri: Sv: Şiddetli, St: Bodur, Gut, AÖ: Abdominal ödem, KFE: Kraniofasial ödem (yüz, baş ve göz ödemi), Ms: Mikrocefali, Mf: Mikroftalmi, KE: Kuyruk eğriliği, Ka: Kabarcık

4.1.2 Favipiravir ile ilgili biyobelirteç bulguları

Çalışmada ticari ve saf favipiravir uygulanan 8-11. evre embriyolarında 96 saatin sonunda kontrole kıyaslandığında GST aktivitesi ve MDA düzeyinde istatistiksel açıdan önemli bir değişik belirlenmedi ($p>0.05$) (Çizelge 4.4). Her iki favipiravir formu CAT, CaE ve AChE aktivitelerinde konsantrasyon ilişkili inhibisyonlara neden oldu ($p<0.05$). Diğer yandan her iki favipiravir formu da GR inhibisyonuna neden olurken, ticari formun neden olduğu inhibisyon konsantrasyonla ilişkilidir.

Çalışmada ticari ve saf favipiravir uygulanan 46. evre iribaşlarında 96 saatin sonunda kontrole kıyaslandığında GST aktivitesinde artış ve MDA düzeyinde azalış saptandı ($p<0.05$) (Çizelge 4.5). Her iki favipiravir formu da GR, CAT ve AChE aktivitelerinde istatistiksel açıdan önemli değişikliklere neden olmadı ($p>0.05$). Diğer yandan her iki favipiravir formu da 8-11. evre embriyolarında farklı olarak 46. evre iribaşlarında CaE aktivitesinde artışa neden oldu ($p<0.05$).

Çizelge 4.4: Favipiravir'e maruz bırakılan 8-11. evre *X. laevis* iribaşlarının biyobelirteç düzeyleri

	n	GST ^a	GR ^a	CAT ^a	MDA ^b	CaE ^a	AChE ^a
Kontrol	5	128.5 ± 10.4	6.70 ± 0.30	6.77 ± 1.05	0.099 ± 0.017	181.9 ± 7.7	25.2 ± 0.7
Ticari LC₅₀/125	5	131.9 ± 5.4	5.27 ± 0.15 *	5.71 ± 0.72	0.125 ± 0.024	187.2 ± 4.1	24.3 ± 0.7
Favipiravir LC₅₀/25	5	148.6 ± 9.3	4.87 ± 0.53 **	2.86 ± 0.33 **	0.132 ± 0.026	182.7 ± 5.1	24.1 ± 0.6
LC₅₀/5	5	121.7 ± 7.6	3.64 ± 0.10 ***	2.99 ± 0.43 **	0.149 ± 0.009	156.5 ± 7.3 *	20.4 ± 0.5 ***
Saf LC₅₀/125	5	134.3 ± 5.9	3.96 ± 1.00 **	6.79 ± 0.82	0.097 ± 0.030	172.6 ± 3.4	25.0 ± 2.2
Favipiravir LC₅₀/25	5	135.1 ± 6.2	5.65 ± 0.40	3.88 ± 0.69 *	0.119 ± 0.010	169.5 ± 7.0	26.1 ± 0.9
LC₅₀/5	5	113.9 ± 5.2	5.08 ± 0.33	3.03 ± 0.35 **	0.126 ± 0.012	121.2 ± 3.8 ***	16.9 ± 0.8 **

^a: Enzim aktivitesi nmol/dak /mg protein ± standart hata olarak ifade edildi.

^b: MDA miktarı nmol/mg protein ± standart hata olarak ifade edildi.

*, ** ve ***: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.01$ ve $p < 0.001$ düzeyinde önemliliği göstermektedir.

Çizelge 4.5: Favipiravir'e maruz bırakılan 46. evre *X. laevis* iribaşlarının biyobelirteç düzeyleri

	n	GST ^a	GR ^a	CAT ^a	MDA ^b	CaE ^a	AChE ^a	
Kontrol	5	187.6 ± 7.2	8.53 ± 0.83	3.01 ± 0.56	0.232 ± 0.018	209.8 ± 11.9	74.9 ± 4.2	
Ticari	LC₅₀/25	5	220.2 ± 10.7	8.99 ± 0.29	4.59 ± 0.82	0.189 ± 0.022	243.5 ± 14.8	86.5 ± 3.5
Favipiravir	LC₅₀/5	5	271.5 ± 7.9	** 8.14 ± 0.81	3.67 ± 0.71	0.162 ± 0.016	* 252.0 ± 5.4	* 80.6 ± 3.2
Şaf	LC₅₀/25	5	208.4 ± 8.1	8.05 ± 1.54	4.46 ± 0.79	0.191 ± 0.012	245.4 ± 7.6	* 76.8 ± 6.2
Favipiravir	LC₅₀/5	5	211.6 ± 3.9	* 8.69 ± 0.45	2.70 ± 0.53	0.182 ± 0.015	* 255.3 ± 2.6	** 80.7 ± 1.4

^a: Enzim aktivitesi nmol/dak /mg protein ± standart hata olarak ifade edildi.

^b: MDA miktarı nmol/mg protein ± standart hata olarak ifade edildi.

*, ** ve ***: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.01$ ve $p < 0.001$ düzeyinde önemliliği göstermektedir.

4.2 Oseltamivir ile İlgili Bulgular

4.2.1 Oseltamivir ile ilgili FETAX bulguları

FETAX sonuçlarına göre ticari oseltamivirin iki konsantrasyonu büyüme geriliğine neden olsa da ($p<0.05$) genel olarak hem ticari ve hem de saf oseltamivir büyüme geriliğine neden olmadı (Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.4). Ticari oseltamivirin uygulamasında bütün konsantrasyonlar birlikte değerlendirildiğinde yaşayan bireyler (%55) içinde malforme bireylerin oranı %22'dir. Malformasyon türlerinin sıklık düzeyi (yüksekten düşüğe) % 13 KE, %10 Bodurluk, %9 Gut, %4 Mf, %4 AÖ, %2 KFÖ, %2 Ms ve %2 Ka'dır.

Saf oseltamivir uygulamasında bütün konsantrasyonlar birlikte değerlendirildiğinde yaşayan bireyler (%73) içinde malforme bireylerin oranı %19'dur. Malformasyon türlerinin sıklık düzeyi (yüksekten düşüğe) %21 KE, %6 Bodurluk, %3 Gut, %3 Mf, %4 AÖ, %2 KFÖ, %1 Ms ve %1 Şiddetli'dir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.6: FETAX'ta ticari Oseltamivir'e maruz kalan *X. laevis* embriyolarında zamana bağlı toksisite verileri

96 saatin sonunda FETAX detayları																	
Kons. (mg/L)	n	Letalite				Yaş.# (%)	Malf.# (%)	Malformasyon Türleri									Boy (mm)
		24 s	48 s	72 s	96 s			Şiddetli	Bodur	Gut	AÖ	KFÖ	KE	Ms	Mf	Ka	
0.0	32	0	2	2	2	30 (94)	1 (3)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	7.63 ± 0.08
8.2	32	0	6	6	6	26 (81)	5 (19)	0	1	3	1	0	3	0	0	1	7.18 ± 0.13
12.3	32	1	6	7	7	25 (78)	3 (12)	0	3	1	1	0	2	1	0	0	7.21 ± 0.17
18.5	32	1	10	10	10	22 (68)	7 (32)	0	2	2	2	2	5	0	1	1	7.02 ± 0.15 **
27.8	32	1	11	12	12	20 (63)	5 (25)	0	2	2	0	0	3	1	3	0	7.13 ± 0.18
41.7	32	0	22	23	23	9 (28)	3 (33)	0	2	1	0	0	0	0	0	0	6.32 ± 0.22 ***
62.5	32	7	28	29	29	3 (9)	1 (33)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	6.92 ± 0.50

Her konsantrasyon için n: 32 birey kullanıldı. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

Malformasyon Tipleri: Sv: Şiddetli, St: Bodur, Gut, AÖ: Abdominal ödem, KFE: Kraniyofasiyal ödem (yüz, baş ve göz ödemi), Ms: Mikrocefali, Mf: Mikroftalmi, KE: Kuyruk eğriliği, Ka: Kabarcık

Çizelge 4.7: FETAX'ta saf Oseltamivir'e maruz kalan *X. laevis* embriolarında zamana bağlı toksisite verileri

Kons. (mg/L)	n	96 saatin sonunda FETAX detayları																
		Letalite				Malformasyon Türleri												Boy (mm)
		24 s	48 s	72 s	96 s	Yaş.# (%)	Malf.# (%)	Şiddetli	Bodur	Gut	AÖ	KFÖ	KE	Ms	Mf	Ka		
0.0	32	0	2	2	2	30 (94)	1 (3)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	7.63 ± 0.08	
8.2	32	2	5	5	5	27 (84)	8 (30)	1	3	3	2	1	5	1	2	0	7.43 ± 0.17	
12.3	32	2	5	5	5	27 (84)	4 (15)	0	1	0	0	0	4	0	0	0	7.33 ± 0.13	
18.5	32	0	5	5	5	27 (84)	6 (22)	0	1	0	1	1	5	0	1	0	7.56 ± 0.14	
27.8	32	2	6	7	7	25 (78)	4 (16)	0	1	0	0	0	3	0	0	0	7.73 ± 0.11	
41.7	32	1	8	10	10	22 (69)	4 (18)	0	0	0	1	0	3	0	0	0	7.31 ± 0.12	
62.5	32	2	19	19	20	12 (38)	3 (25)	0	0	0	0	0	3	0	0	0	7.61 ± 0.17	

Her konsantrasyon için n: 32 birey kullanıldı. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Malformasyon Tipleri: Sv: Şiddetli, St: Bodur, Gut, AÖ: Abdominal ödem, KFE: Kraniofasial ödem (yüz, baş ve göz ödemi), Ms: Mikrocefali, Mf: Mikroftalmi, KE: Kuyruk eğriliği, Ka: Kabarcık

4.2.2 Oseltamivir ile ilgili biyobelirteç bulguları

Çalışmada ticari ve saf oseltamivir uygulanan 8-11. evre embriyolarında 96 saatin sonunda kontrolle kıyaslandığında GST ve CAT aktivitelerinde ve MDA düzeyinde istatistiksel açıdan önemli bir değişiklik görülmedi ($p>0.05$) (Çizelge 4.8). Her iki oseltamivir formunun her üç uygulama konsantrasyonu da GR, CaE ve AChE aktivitelerinde inhibisyonlara neden oldu ($p<0.05$).

Çalışmada ticari oseltamivir uygulanan 46. evre iribaşlarında 96 saatin sonunda kontrolle kıyaslandığında GST, GR ve MDA düzeyinde azalış gözlemlendi ($p<0.05$) (Çizelge 4.9). Saf oseltamivir ise yanıtı ölçülen biyokimyasal belirteçler içinde MDA düzeyinde azalışa neden oldu ($p<0.05$).



Çizelge 4.8: Oseltamivir'e maruz bırakılan 8-11. evre *X. laevis* iribaşlarının biyobelirteç düzeyleri

		n	GST ^a	GR ^a		CAT ^a	MDA ^b	CaE ^a	AChE ^a	
	Kontrol	5	128.5 ± 10.4	6.70 ± 0.30		6.77 ± 1.05	0.099 ± 0.017	181.9 ± 7.7	25.2 ± 0.7	
Ticari	LC₅₀/125	5	113.6 ± 3.9	4.84 ± 0.23	**	3.62 ± 0.74	0.108 ± 0.012	115.4 ± 6.4	17.0 ± 1.0	***
Oseltamivir	LC₅₀/25		127.6 ± 4.8	4.36 ± 0.50	***	5.90 ± 1.00	0.128 ± 0.018	119.1 ± 6.5	16.9 ± 1.1	***
	LC₅₀/5	5	122.2 ± 5.0	4.50 ± 0.30	**	4.80 ± 0.82	0.068 ± 0.011	113.8 ± 4.0	15.3 ± 0.7	***
Saf	LC₅₀/125	5	120.5 ± 4.7	4.58 ± 0.26	***	5.84 ± 0.40	0.120 ± 0.034	113.3 ± 4.2	15.3 ± 1.0	***
Oseltamivir	LC₅₀/25	5	121.5 ± 4.8	4.68 ± 0.10	***	3.96 ± 0.51	0.157 ± 0.036	111.7 ± 5.1	18.2 ± 0.4	***
	LC₅₀/5	5	126.4 ± 3.5	4.79 ± 0.29	***	6.64 ± 1.23	0.155 ± 0.027	94.6 ± 3.2	16.7 ± 0.7	***

^a: Enzim aktivitesi nmol/dakika /mg protein ± standart hata olarak ifade edildi.

^b: MDA miktarı nmol/mg protein ± standart hata olarak ifade edildi.

*, ** ve ***: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.01$ ve $p < 0.001$ düzeyinde önemliliği göstermektedir.

Çizelge 4.9: Oseltamivir'e maruz bırakılan 46. evre *X. laevis* iribaşlarının biyobelirteç düzeyleri

	n	GST^a	GR^a	CAT^a	MDA^b	CaE^a	AChE^a
Kontrol	5	187.6 ± 7.2	8.53 ± 0.83	3.01 ± 0.56	0.232 ± 0.018	209.8 ± 11.9	74.9 ± 4.2
Ticari LC₅₀/25	5	172.2 ± 5.3	6.81 ± 0.64	2.08 ± 0.37	0.141 ± 0.012 **	222.9 ± 8.5	66.9 ± 4.4
Oseltamivir LC₅₀/5	5	158.8 ± 8.5 *	5.90 ± 0.36 *	2.49 ± 0.40	0.183 ± 0.021	207.3 ± 4.9	71.2 ± 3.7
Saf LC₅₀/25	5	164.7 ± 12.2	6.81 ± 0.81	5.55 ± 1.18	0.177 ± 0.008 *	251.1 ± 11.1	64.0 ± 4.8
Oseltamivir LC₅₀/5	5	178.0 ± 12.1	7.39 ± 0.61	3.24 ± 1.08	0.179 ± 0.021 *	244.7 ± 18.6	68.7 ± 4.5

^a: Enzim aktivitesi nmol/dakika /mg protein ± standart hata olarak ifade edildi.

^b: MDA miktarı nmol/mg protein ± standart hata olarak ifade edildi.

*, ** ve ***: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.01$ ve $p < 0.001$ düzeyinde önemliliği göstermektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünya genelinde yüzey ve yeraltı sularında, içme suyu kaynaklarında ve atık su çıkışlarında düşük seviyelerde farmasötik olarak aktif bileşikler ölçülmüştür. Bu bileşikler arasında antibiyotikler, analjezikler, antidepresanlar, hormonlar ve hormon taklitçileri bulunmaktadır. Bu bileşikler belirli metabolik ve biyolojik yolları hedefleyecek şekilde tasarlandığından, çevrede bulunan konsantrasyonları terapötik olarak etkili dozlardan çok daha düşük olsa da, bazı bileşiklerin çocuklar ve hamile kadınlar gibi belirli insan popülasyonları da dahil olmak üzere hedef olmayan, hassas organizmalardaki temel süreçleri bozabileceğine dair endişeler vardır (Dong ve diğ, 2013).

Bu çalışmada hem ticari antiviral ilaçlar hem de onların saf formları için eş zamanlı olarak FETAX testleri yapıldı. FETAX testi sonuçlarına göre ticari ve saf favipiravir için 96 saatlik LC₅₀ değerleri sırasıyla 137.9 ve 156.9 mg/L olarak belirlendi. Ticari ve saf oseltamivir için ise 96 saatlik LC₅₀ değerleri sırasıyla 32.3 ve 58.8 mg/L'dir (Çizelge 4.1.). Yaptığımız literatür taramasına göre, test edilen antiviral ilaçların sucul organizmalar için ortalama öldürücü konsantrasyonlarına ilişkin literatürde herhangi bir veri bulunmamaktadır.

Diğer yandan favipiravir için Tİ düzeyleri sırasıyla 4.67 ve 6.28 olarak belirlendi. Oseltamivir için yapılan FETAX testlerinde, embriyolarda konsantrasyon ilişkili büyüme geriliği ve malformasyon gözlenmediğinden bu testlerde EC₅₀, Tİ ve MCİG değerleri belirlenemedi. FETAX, çevresel kirleticilerin teratojenik ve toksik etkilerini belirlemek için kullanılmaktadır. ASTM'ye göre, Tİ değeri 1.5 ve üzerinde olan kimyasallar, teratojen olarak kabul edilmektedir (Buryskova ve diğ, 2006; Mann ve Bidwell, 2000). Öte yandan, Mouche ve diğ. (2011) FETAX'ta Tİ≥1.2'nin üzerindeki değerlerin teratojenik olduğunu öne sürmüş ve bu değer, farklı kirleticiler için sonraki çalışmalarda teratojenik olarak kabul edilmiştir (Babalola ve diğ, 2021; Chae ve diğ, 2015; Ismail ve diğ, 2019; Park ve diğ, 2015).

Bu verilere göre hem ticari hem de saf favipiravir *X. laevis* için teratojeniktir. Ancak oseltamivir için yapılan FETAX testlerinde, embriyolarda konsantrasyon ilişkili büyüme geriliği ve istatistiksel açıdan önemli düzeyde malformasyon gözlenmediğinden oseltamirin her iki formunun da teratojenik ve büyümeyi sınırlayıcı olmadıkları sonucuna varılabilir.

5.1 Favipiravir Toksisitesi ile İlgili Değerlendirmeler

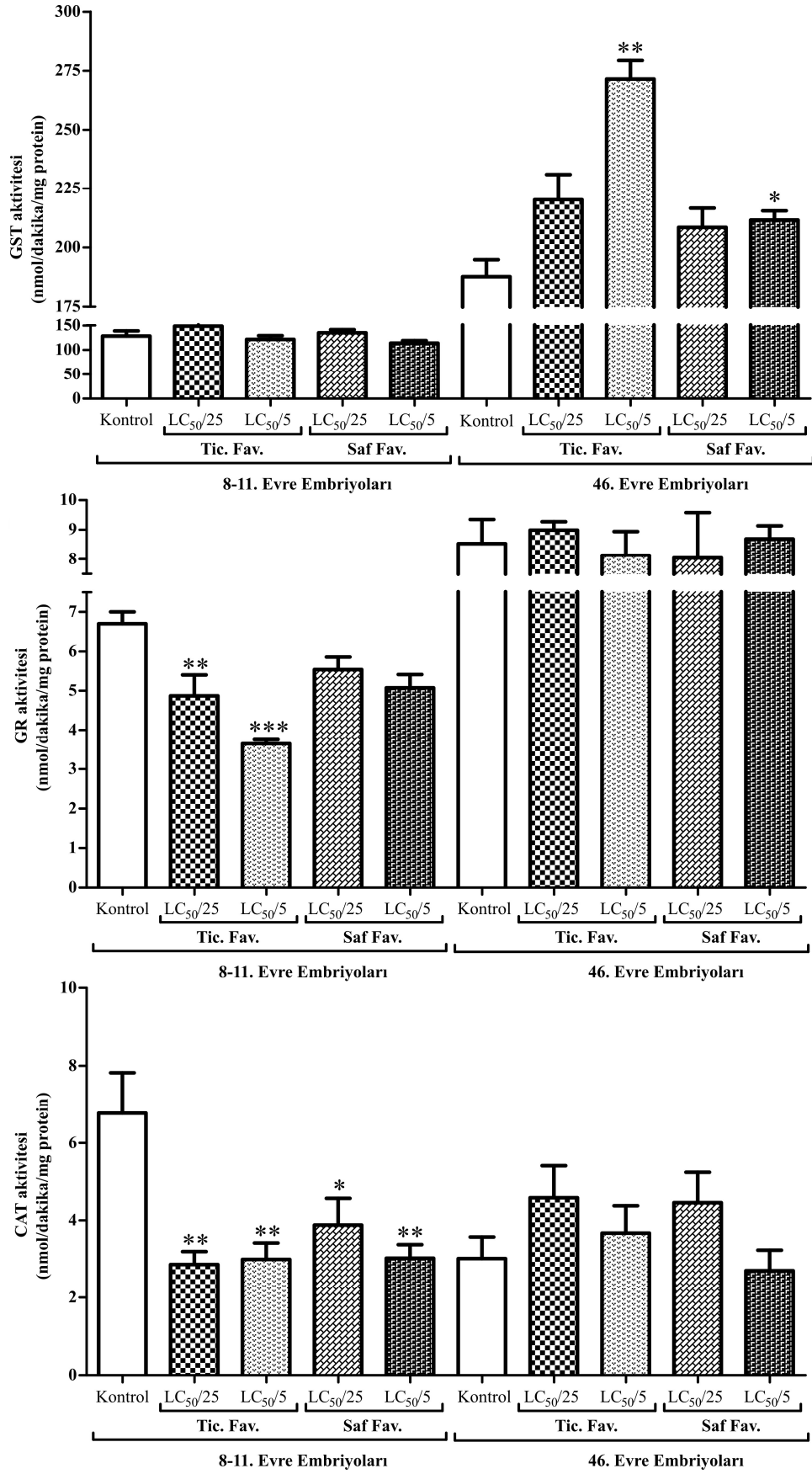
FETAX sonuçlarına göre hem ticari hem de saf favipiravirin bütün uygulama konsantrasyonları büyüme geriliğine neden oldu ($p < 0.05$). Diğer yandan, hem ticari hem de saf favipiravir in en düşük malformasyon düzeyi (en düşük konsantrasyon için) sırasıyla %66 ve %70 olarak belirlendi. Ticari ve saf favipiravir uygulamasında bütün konsantrasyonlar birlikte değerlendirildiğinde yaşayan bireylerin (sırasıyla %59-69) içinde malforme bireylerin oranı sırasıyla %85-90'dır. Ticari ve saf favipiravir uygulamasında bütün konsantrasyonlar birlikte değerlendirildiğinde malformasyon türlerin sıklık düzeyin sırasıyla % 86-87 KE, %68-80 Gut, % 57-75 Mf, %57-71 AÖ, %42-37 KFÖ, %40-44 Ms, %29-41 Ka, %25-27 Bodurluk ve %12-12 Şidetli'dir.

Bir pestisit (paraquat) FETAX testiyle toksik ve teratojenik etkilerinin değerlendiren önceki bir çalışmada, maruz kalan larvalarda anormal kuyruk veya notokord bükülmesi gözlenmiş ve malforme iribaşların histolojik incelemesinde veziküler miyositler içeren birkaç anormal somit tespit edilmiştir (Vismara ve diğ, 2000). Ayrıca, önceki çalışmalar ödemin nedeninin böbrek fonksiyon bozukluğu, bozulmuş osmoregülasyon veya maruz kalan hayvanlarda daha genel metabolik değişikliklerden kaynaklanabileceğini vurgulamıştır (Martini ve diğ, 2012; Osano ve diğ, 2002). Diklofenak, psödoefedrin, H_2O_2 , di-n-butyl ftalat, paraquat, bisfenol-A ve 17β -estradiol gibi birçok ksenobiyotik maddenin bu tür malformasyonlara neden olduğu ve bu malformasyonların teratojenitenin göstergesi olduğu gösterilmiştir (Arancio ve diğ, 2019; Cardoso-Vera ve diğ, 2017; Moser ve Rayburn, 2007; Vismara ve diğ, 2006). Bu çalışmada kuyruk eğriliği ve eksen malformasyonlarından sonra en sık görülen malformasyon GUT'tur. *X. laevis* embriyosunda bağırsak gelişimi, nöral plakaların birbirine kaynaştığı 20. evreden itibaren görülebilir. Evre 40'a gelindiğinde, bağırsağın kıvrımlı yapısı mikroskop altında net bir şekilde görülebilir. İnsanlarda, farelerde, tavuklarda ve *X. laevis*'te bağırsak gelişimi birçok açıdan farklılık gösterse de, gelişimsel süreçleri düzenleyen genler bu türlerde korunmuştur. Daha önce yapılan bir

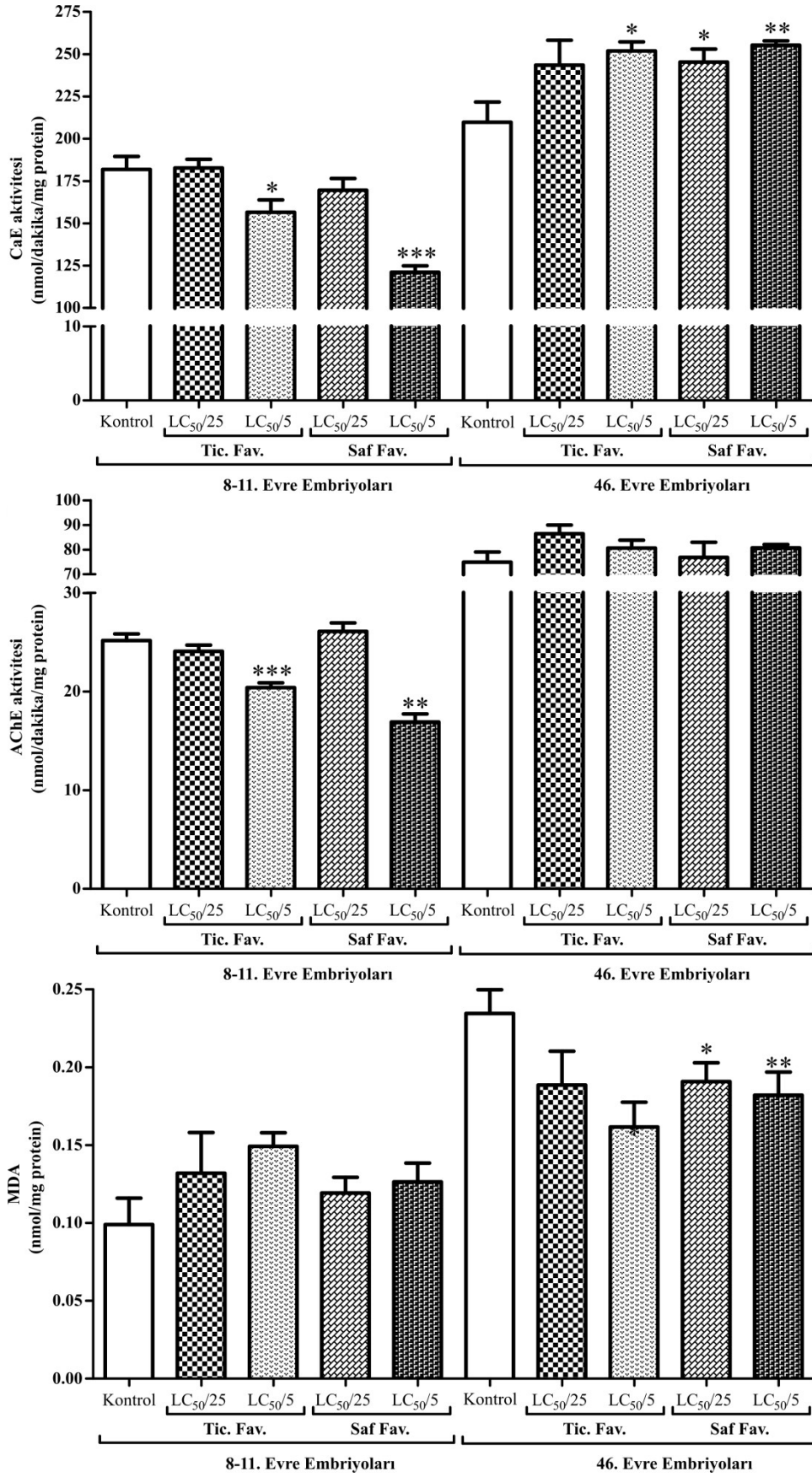
çalışmada alkole maruz kalmanın ROT üretiminin artmasına, büyüme geriliğine, bağırsak olgunlaşmasının gecikmesine ve ögöl anahtar bağırsak gelişim genlerinin aşağı regülasyonuna yol açtığını gösterilmiştir (Peng ve diğ, 2004).

Çalışmada ticari ve saf favipiravir uygulanan 8-11. evre embriyolarında 96 saatin sonunda kontrole kıyaslandığında GST aktivitesi ve MDA düzeyinde istatistiksel açıdan önemli bir değişiklikler gözlenmedi ($p>0.05$) (Şekil 5.1). Her iki favipiravir formu da CAT, CaE ve AChE aktivitelerinde konsantrasyon ilişkili inhibisyonlara neden oldu ($p<0.05$) (Şekil 5.2). Çalışmamıza benzer şekilde, malathion, endosulfan, α -cypermethrin ve chlorpyrifos gibi pestisitlere maruz kalan *X. laevis* embriyolarındaki kuyruk ve aksiyal malformasyonların AChE inhibisyonu sonrası kasların aşırı uyarılmasından kaynaklandığı düşünülmüştür (Yu ve diğ, 2013). Diğer yandan her iki favipiravir formu da GR inhibisyonuna neden olurken, ticari formun neden olduğu inhibisyon konsantrasyon ilişkilidir.

Çalışmada ticari ve saf favipiravir uygulanan 46. evre iribaşlarında 96 saatin sonunda kontrole kıyaslandığında GST aktivitesinde artışa ve MDA düzeyinde azalışa neden oldu ($p<0.05$). Her iki favipiravir formu GR, CAT ve AChE aktivitelerinde istatistiksel açıdan önemli değişikliklere neden olmadı ($p>0.05$). Diğer yandan her iki favipiravir formu da 8-11. evre embriyolarında farklı olarak 46. evre iribaşlarında CaE aktivitesinde artışa neden oldu ($p<0.05$). *X. laevis* embriyonal gelişiminde antioksidan sistem etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada, gelişimin ilk iki günü boyunca, embriyo antioksidan metabolizmasının CAT ve SOD aktivitelerine dayandığı, daha sonra glutatyon sisteminin aktive olduğu ve ilgili tüm enzimlerin aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (Rizzo ve diğ, 2007). Çalışmamızda 46. evre iribaşlarında artan GST ve CaE aktivitesi, embriyoların detoksifikasyon yanıtı olarak değerlendirilebilir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1: Favipiravir uygulanan embriyo ve iribaşlarda GST, GR ve CAT düzeyleri



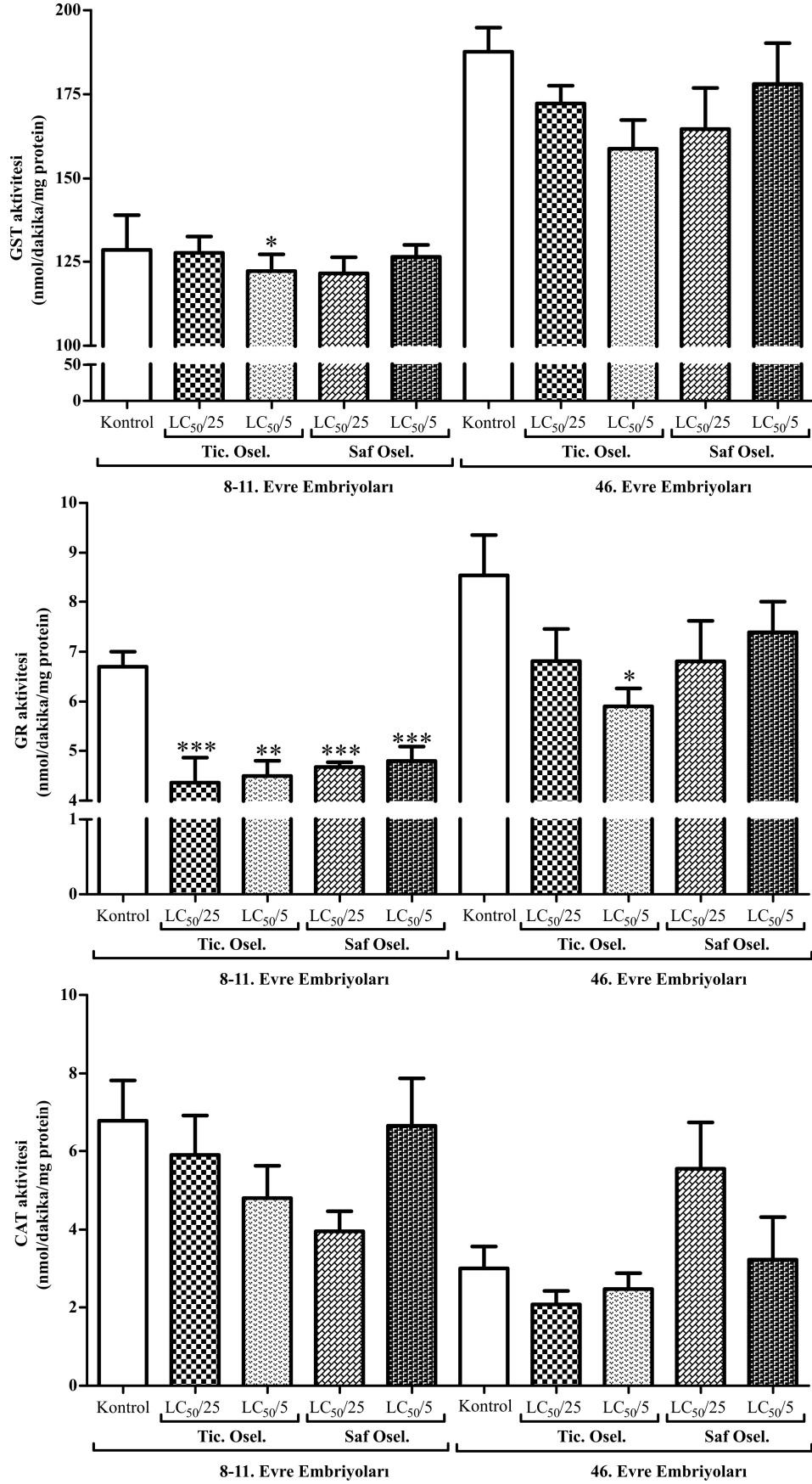
Şekil 5.2: Favipiravir uygulanan embriyo ve iribaşlarda CaE, AChE ve MDA düzeyleri

5.2 Oseltamivir Toksikitesi ile İlgili Değerlendirmeler

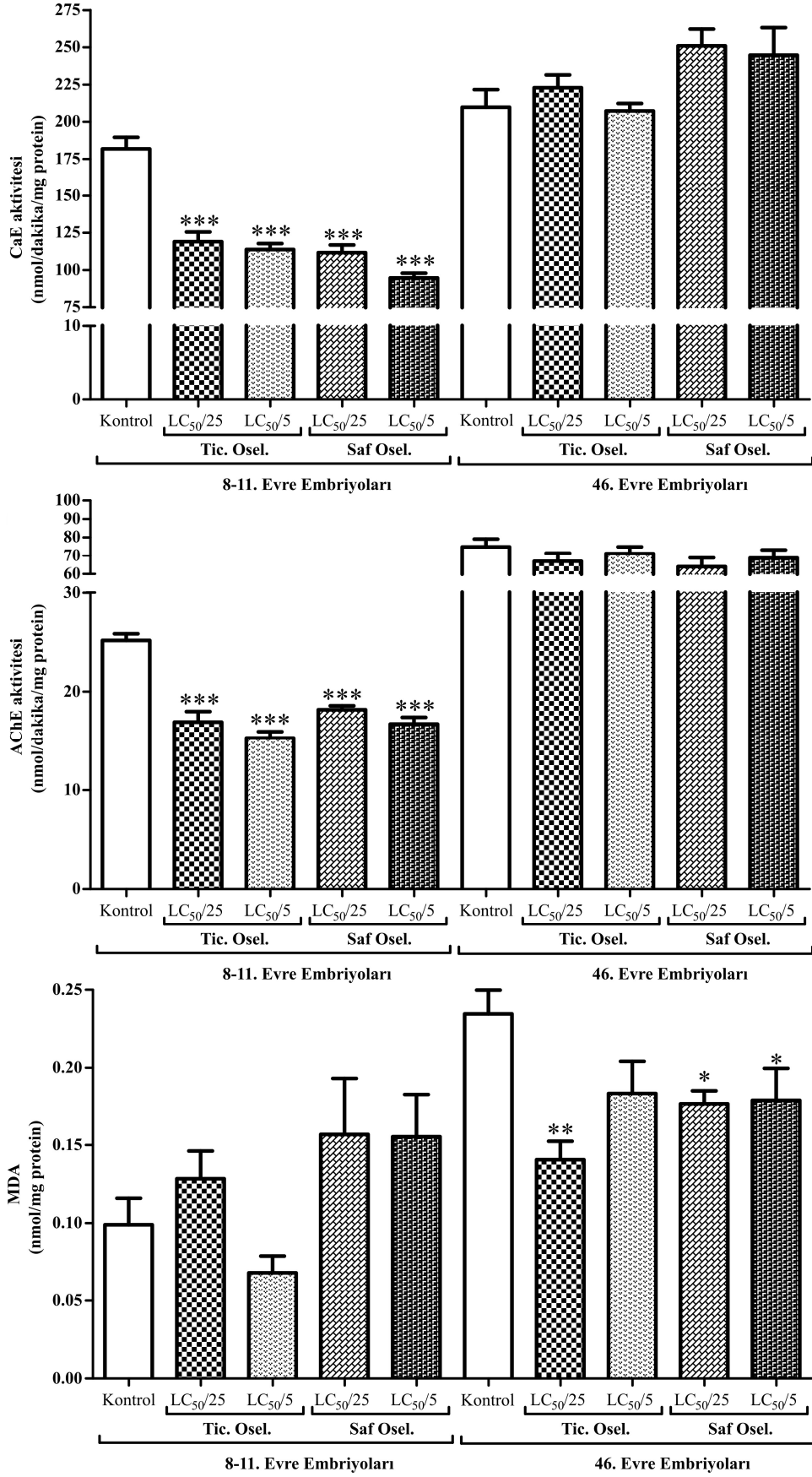
FETAX sonuçlarına göre ticari oseltamivirin iki konsantrasyonu büyüme geriliğine neden olsa da ($p<0.05$) genel olarak hem ticari ve hem de saf oseltamivir büyüme geriliğine neden olmamıştır. Ticari ve saf oseltamivir uygulamasında bütün konsantrasyonlar birlikte değerlendirildiğinde yaşayan bireylerin (sırasıyla %55-73) içinde malforme bireylerin oranı sırasıyla %22-19'dur. Ticari ve saf oseltamivir uygulamasında bütün konsantrasyonlar birlikte değerlendirildiğinde malformasyon türlerin sıklık düzeyin sırasıyla % 13-21 KE, %9-3 Gut, %4-4 AÖ, % 4-3 Mf, %2-2 KFÖ, %2-1 Ms' dir.

Çalışmada hem ticari ve hem de saf oseltamivir uygulanan 8-11. evre embriyolarında, her üç uygulama konsantrasyonu da GR, CaE ve AChE aktivitelerinde inhibisyonlara neden oldu ($p<0.05$) (Şekil 5.3 ve Şekil 5.4). Bu çalışmada, favipiravir uygulamasından daha da şiddetli olmak üzere oseltamivir uygulamaları da her iki esterazın (CaE ve AChE) inhibisyonuna neden oldu. Yu ve diğ. (2013), bu çalışmada da en sık görülen malformasyonlardan biri olan kuruk eğriliği gibi kuyruk ve aksiyal malformasyonların AChE inhibisyonu sonrası kasların aşırı uyarılmasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir

Çalışmada ticari oseltamivir 46. evre iribaşlarında GST ve GR aktivitesinde inhibisyona, her iki oseltamivir formu ise MDA düzeyinde azalışa neden oldu ($p<0.05$). Pestisite maruz bırakılan *X. laevis* iribaşlarında MDA düzeyinde azalma daha önce gösterilmiştir (Turhan ve Gungordu, 2022). MDA, ROT tarafından üretilen bir tür membran LPO ürünüdür, bu nedenle yüksek MDA seviyeleri oksidatif stres ve LPO seviyesinin, dolayısıyla doku hasarının bir göstergesidir (Eriyamremu ve diğ, 2008; Liu ve diğ, 2021). Kirleticilere maruz kalan sucul türlerde MDA seviyelerindeki azalmanın genellikle artan antioksidan aktiviteden kaynaklandığı öne sürülmektedir (Garcia ve diğ, 2020).



Şekil 5.3: Osetamivir uygulanan embriyo ve iribaşlarda GST, GR ve CAT düzeyleri



Şekil 5.4: Osetamivir uygulanan embriyo ve iribaşlarda CaE, AChE ve MDA düzeyleri

Sonuç olarak test edilen antiviral ilaçlardan favipiravirin görece yüksek konsantrasyonlarda da olsa büyüme geriliğine neden olduğu ve teratojenik olduğu belirlenmiştir. Test edilen diğer antiviral ilaç oseltamivir ise teratojeniteye ve büyüme geriliğine neden olmamıştır. Her iki antiviral ilacın saf ve ticari formları arasında kısmi yanıt farklılıkları olmakla birlikte, yanıtlardaki benzerlikler ticari formlardaki etkinin etken maddeden kaynaklandığı fikrini destekler niteliktedir. Subletal etkileri değerlendirmek için yapılan biyokimyasal analizler, ilaçların düşük konsantrasyonlarda bile biyokimyasal süreçleri etkilediklerini göstermektedir. Öte yandan 8-11. evre embriyolar ve 46. evre iribaşlarının biyobelirteç yanıtlarındaki farklılıklar organogenez ile sonrası dönemler arasında detoksifikasyon ve oksidatif stres yanıtlarının farklılaştığını göstermektedir



6. KAYNAKLAR

- Accinelli, C., Barra Caracciolo, A., & Grenni, P.** (2007). Degradation of the antiviral drug oseltamivir carboxylate in surface water samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 87(8), 579-587.
- Aebi, H.** (1974). Catalase. In H. U. Bergmayer (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. London: Academic Press.
- Agrawal, U., Raju, R., & Udawadia, Z. F.** (2020). Favipiravir: A new and emerging antiviral option in COVID-19. *Med J Armed Forces India*, 76(4), 370-376.
- Aktas, A., Tuzun, B., Aslan, R., Sayin, K., & Ataseven, H.** (2020). New anti-viral drugs for the treatment of COVID-19 instead of favipiravir. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 39(18), 7263-7273.
- Aldridge, W. N.** (1993). The esterases: Perspectives and problems. *Chemico-Biological Interactions*, 87(1), 5-13.
- Angelucci, S., Sacchetta, P., De Luca, A., Moio, P., Amicarelli, F., & Di Ilio, C.** (2002). Glutathione transferase isoenzymes from frog (*Xenopus laevis*) liver and embryo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1569(1), 81-85.
- Anila, P. A., Sutha, J., Nataraj, D., & Ramesh, M.** (2021). In vivo evaluation of Nano-palladium toxicity on larval stages and adult of zebrafish (*Danio rerio*). *Science of the Total Environment*, 765, 144268.
- Arancio, A. L., Cole, K. D., Dominguez, A. R., Cohenour, E. R., Kadie, J., & Maloney, W. C.** (2019). Bisphenol A, Bisphenol AF, di-n-butyl phthalate, and 17 beta-estradiol have shared and unique dose-dependent effects on early embryo cleavage divisions and development in *Xenopus laevis*. *Reproductive Toxicology*, 84, 65-74.
- Aranda-Rivera, A. K., Cruz-Gregorio, A., Arancibia-Hernández, Y. L., Hernández-Cruz, E. Y., & Pedraza-Chaverri, J.** (2022). RONS and oxidative Stress: An overview of basic concepts. *Oxygen*, 2(4), 437-478.
- ASTM.** (2003). *American Society for Testing and Materials, Standard guide for conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX), E1439-98. In: ASTM Standards on Biological Effects and Environmental Fate. Vol. 11.05. Philadelphia, PA, 447-457.*

- AtlantisBioscience.** (2022). Favipiravir, <https://www.atlantisbioscience.com.sg/shop/enzymes-inhibitors-and-substrates/favipiravir/> (Son erişim:15 Haziran 2022).
- Babalola, O. O., Truter, J. C., & Van Wyk, J. H.** (2021). Lethal and teratogenic impacts of imazapyr, diquat dibromide, and glufosinate ammonium herbicide formulations using Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus* (FETAX). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 80(4), 708-716.
- Bacchetta, R., Santo, N., Fascio, U., Moschini, E., Freddi, S., & Chirico, G.** (2012). Nano-sized CuO, TiO₂ and ZnO affect *Xenopus laevis* development. *Nanotoxicology*, 6(4), 381-398.
- Bantle, J. A.** (1995). FETAX-A developmental toxicity assay using frog embryos. In G. M. Rand (Ed.), *Fundamental aquatic toxicology* (pp. 207–230). Washington, DC: Taylor and Francis.
- Battistoni, M., Bacchetta, R., Di Renzo, F., Metruccio, F., Moretto, A., & Menegola, E.** (2022). Modified *Xenopus laevis* approach (R-FETAX) as an alternative test for the evaluation of foetal valproate spectrum disorder. *Reproductive Toxicology*, 107, 140-149.
- Bekgöz, B., & Şan, İ.** (2020). COVID-19 tedavisi. *Oğuztürk H, editör. Koronavirüs Hastalığı (COVID- 19) ve Acil Tıp 2020* (1. Baskı, pp.28-34). Ankara: Türkiye Klinikleri.
- Boran, F., & Güngördü, A.** (2021). Biochemical and developmental effects of thyroid and anti-thyroid drugs on different early life stages of *Xenopus laevis*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 87, 103738.
- Botsoglou, N. A., Fletouris, D. J., Papageorgiou, G. E., Vassilopoulos, V. N., Mantis, A. J., & Trakatellis, A. G.** (1994). Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric Acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(9), 1931–1937.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Buryskova, B., Hilscherova, K., Babica, P., Vrskova, D., Marsalek, B., & Blaha, L.** (2006). Toxicity of complex cyanobacterial samples and their fractions in

Xenopus laevis embryos and the role of microcystins. *Aquatic Toxicology*, 80(4), 346-354.

- Cardoso-Vera, J. D., Islas-Flores, H., SanJuan-Reyes, N., Montero-Castro, E. I., Galar-Martinez, M., & Garcia-Medina, S.** (2017). Comparative study of diclofenac-induced embryotoxicity and teratogenesis in *Xenopus laevis* and *Lithobates catesbeianus*, using the frog embryo teratogenesis assay: *Xenopus* (FETAX). *Science of the Total Environment*, 574, 467-475.
- Chae, J. P., Park, M. S., Hwang, Y. S., Min, B. H., Kim, S. H., & Lee, H. S.** (2015). Evaluation of developmental toxicity and teratogenicity of diclofenac using *Xenopus* embryos. *Chemosphere*, 120, 52-58.
- Colombo, A., Orsi, F., & Bonfanti, P.** (2005). Exposure to the organophosphorus pesticide chlorpyrifos inhibits acetylcholinesterase activity and affects muscular integrity in *Xenopus laevis* larvae. *Chemosphere*, 61(11), 1665-1671.
- Cooper, A. J. L., & Hanigan, M. H.** (2018). 10.17 - Metabolism of Glutathione S-Conjugates: Multiple Pathways. In C. A. McQueen (Ed.), *Comprehensive Toxicology (Third Edition)* (pp. 363-406). Oxford: Elsevier.
- Coughlan, L., Kremer, E. J., & Shayakhmetov, D. M.** (2022). Adenovirus-based vaccines-a platform for pandemic preparedness against emerging viral pathogens. *Molecular Therapy*, 30(5), 1822-1849.
- Cribb, A. E., Leeder, J. S., & Spielberg, S. P.** (1989). Use of a microplate reader in an assay of glutathione reductase using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal Biochem*, 183(1), 195-196.
- Dong, Z., Senn, D. B., Moran, R. E., & Shine, J. P.** (2013). Prioritizing environmental risk of prescription pharmaceuticals. *Regul Toxicol Pharmacol*, 65(1), 60-67.
- DrugBank.** (2022). Oseltamivir (<https://go.drugbank.com/drugs/DB00198>).
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr., & Feather-Stone, R. M.** (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7, 88-95.
- Eriyamremu, G. E., Osagie, V. E., Omoregie, S. E., & Omofoma, C. O.** (2008). Alterations in glutathione reductase, superoxide dismutase, and lipid peroxidation of tadpoles (*Xenopus laevis*) exposed to Bonny Light crude oil and its fractions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(1), 284-290.
- Exner, C. R. T., & Willsey, H. R.** (2021). *Xenopus* leads the way: Frogs as a pioneering model to understand the human brain. *Genesis*, 59(1-2).

- Fernandez, L. P., Brasca, R., Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., & Culzoni, M. J.** (2020). Bioaccumulation and glutathione S-transferase activity on *Rhinella arenarum* tadpoles after short-term exposure to antiretrovirals. *Chemosphere*, *246*, 125830.
- Fogliano, C., Motta, C. M., Venditti, P., Fasciolo, G., Napolitano, G., & Avallone, B.** (2022). Environmental concentrations of a delorazepam-based drug impact on embryonic development of non-target *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology*, *250*, 106244.
- Furuta, Y., Takahashi, K., Shiraki, K., Sakamoto, K., Smee, D. F., Barnard, D. L.** (2009). T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections. *Antiviral Res*, *82*(3), 95-102.
- Gallego-Ríos, S. E., Peñuela, G. A., & Martínez-López, E.** (2021). Updating the use of biochemical biomarkers in fish for the evaluation of alterations produced by pharmaceutical products. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *88*, 103756.
- Gao, J., & Shen, W.** (2021). *Xenopus* in revealing developmental toxicity and modeling human diseases. *Environmental Pollution*, *268*, 115809.
- Garcia, D., Lima, D., da Silva, D. G. H., & de Almeida, E. A.** (2020). Decreased malondialdehyde levels in fish (*Astyanax altiparanae*) exposed to diesel: Evidence of metabolism by aldehyde dehydrogenase in the liver and excretion in water. *Ecotoxicol Environ Saf*, *190*, 110107.
- Gillardin, V., Silvestre, F., Divoy, C., Thomé, J.-P., & Kestemont, P.** (2009). Effects of Aroclor 1254 on oxidative stress in developing *Xenopus laevis* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *72*(2), 546-551.
- Gungordu, A.** (2013). Comparative toxicity of methidathion and glyphosate on early life stages of three amphibian species: *Pelophylax ridibundus*, *Pseudepidalea viridis*, and *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology*, *140-141*, 220-228.
- Gurdon, J. B., & Hopwood, N.** (2000). The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes. *International Journal of Developmental Biology*, *44*(1), 43-50.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B.** (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, *249*(22), 7130-7139.

- Hatfield, M. J., & Potter, P. M.** (2011). Carboxylesterase inhibitors. *Expert Opin Ther Pat*, 21(8), 1159-1171.
- Heasman, J.** (2006). Patterning the early *Xenopus* embryo. *Development*, 133(7), 1205-1217.
- ITIS, Integrated Taxonomic Information System** (2023). https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=173549#null (Son erişim:17 Mart 2023).
- Isidori, M., Piscitelli, C., Russo, C., Smutná, M., & Bláha, L.** (2016). Teratogenic effects of five anticancer drugs on *Xenopus laevis* embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 133, 90-96.
- Ismail, T., Lee, H. K., Kim, C., Kim, Y., Lee, H., & Kim, J. H.** (2019). Comparative analysis of the developmental toxicity in *Xenopus laevis* and *Danio rerio* induced by Al₂O₃ nanoparticle exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(12), 2672-2681.
- Jain, S., Kumar, P., Vyas, R. K., Pandit, P., & Dalai, A. K.** (2013). Occurrence and removal of antiviral drugs in environment: A review. *Water Air and Soil Pollution*, 224(2), 117803.
- Kara, A., Yakut, S., Caglayan, C., Atcali, T., Ulucan, A., & Kandemir, F. M.** (2022). Evaluation of the toxicological effects of favipiravir (T-705) on liver and kidney in rats: biochemical and histopathological approach. *Drug and Chemical Toxicology*, 46(3), 546-556.
- Kaushal, J., Khatri, M., & Arya, S. K.** (2021). A treatise on Organophosphate pesticide pollution: Current strategies and advancements in their environmental degradation and elimination. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207, 111483.
- Kiyanmehr, K., Moussavi, G., Mohammadi, S., Naddafi, K., & Giannakis, S.** (2022). The efficacy of the VUV/O(3) process run in a continuous-flow fluidized bed reactor for simultaneous elimination of favipiravir and bacteria in aqueous matrices. *Chemosphere*, 304, 135307.
- Klaassen, C. D., Casarett, L. J., & Doull, J.** (2013). Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons. McGraw-Hill Education, New York.
- Kumar, M., Mazumder, P., Mohapatra, S., Kumar Thakur, A., Dhangar, K., & Taki, K.** (2021). A chronicle of SARS-CoV-2: Seasonality, environmental fate,

- transport, inactivation, and antiviral drug resistance. *Journal of Hazardous Materials*, 405, 124043.
- Kuroda, K., Li, C., Dhangar, K., & Kumar, M.** (2021). Predicted occurrence, ecotoxicological risk and environmentally acquired resistance of antiviral drugs associated with COVID-19 in environmental waters. *Science of the Total Environment*, 776, 145740.
- Liu, R., Qin, Y. A., Diao, J. L., & Zhang, H. J.** (2021). *Xenopus laevis* tadpoles exposed to metamifop: Changes in growth, behavioral endpoints, neurotransmitters, antioxidant system and thyroid development. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 220, 112417.
- Lou, Y., Liu, L., Yao, H. P., Hu, X. J., Su, J. W., & Xu, K. J.** (2021). Clinical outcomes and plasma concentrations of baloxavir marboxil and favipiravir in COVID-19 patients: An exploratory randomized, controlled trial. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 157, 105631.
- Madelain, V., Guedj, J., Mentre, F., Nguyen, T. H. T., Jacquot, F., & Oestereich, L.** (2017). Favipiravir pharmacokinetics in nonhuman primates and insights for future efficacy studies of hemorrhagic fever viruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(1), e01305-16.
- Mann, R. M., & Bidwell, J. R.** (2000). Application of the FETAX protocol to assess the developmental toxicity of nonylphenol ethoxylate to *Xenopus laevis* and two Australian frogs. *Aquatic Toxicology*, 51(1), 19-29.
- Martini, F., Tarazona, J. V., & Pablos, M. V.** (2012). Are fish and standardized FETAX assays protective enough for amphibians? A case study on *Xenopus laevis* larvae assay with biologically active substances present in livestock wastes. *Scientific World Journal*, 605804.
- McClellan, K., & Perry, C. M.** (2001). Oseltamivir: a review of its use in influenza. *Drugs*, 61(2), 263-283.
- Mestankova, H., Schirmer, K., Escher, B. I., von Gunten, U., & Canonica, S.** (2012). Removal of the antiviral agent oseltamivir and its biological activity by oxidative processes. *Environmental Pollution*, 161, 30-35.
- Moser, B., & Rayburn, J.** (2007). Evaluation of developmental toxicity of interaction between caffeine and pseudoephedrine using Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus* (Fetax). *Bios*, 78(1), 1-9.

- Mouche, I., Malesic, L., & Gillardeaux, O.** (2011). FETAX Assay for evaluation of developmental toxicity. *Drug Safety Evaluation: Methods and Protocols*, 691, 257-269.
- Nannou, C., Ofrydopoulou, A., Evgenidou, E., Heath, D., Heath, E., & Lambropoulou, D.** (2019). Analytical strategies for the determination of antiviral drugs in the aquatic environment. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 24, e00071.
- Nieuwkoop, P. D., & Faber, J.** (1956). *Normal Table of Xenopus laevis (daudin): A Systematical and Chronologica Survey of the Development From the Fertilized Egg till the End of Metamorphosis*. Amsterdam: North Holland Publishing Co.
- Nousiainen, U., & Torronen, R.** (1984). Differentiation of microsomal and cytosolic carboxylesterases in the rat liver by *in vivo* and *in vitro* inhibition. *Gen Pharmacol*, 15(3), 223-227.
- OECD.** (2009). *Test No. 231: Amphibian Metamorphosis Assay OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems*, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264076242-en> (Son erişim:17 Mart 2023).
- Osano, O., Oladimeji, A. A., Kraak, M. H., & Admiraal, W.** (2002). Teratogenic effects of amitraz, 2,4-dimethylaniline, and paraquat on developing frog (*Xenopus*) embryos. *Arch Environ Contam Toxicol*, 43(1), 42-49.
- Park, M. S., Kim, J. W., Park, I., Lee, H. K., Kim, C., & Jo, C.** (2015). Characterization of ticlopidine-induced developmental and teratogenic defects in *Xenopus* embryos and human endothelial cells. *Chemico-Biological Interactions*, 240, 172-178.
- Peng, X. Z., Wang, C. W., Zhang, K., Wang, Z. F., Huang, Q. X., & Yu, Y. Y.** (2014). Profile and behavior of antiviral drugs in aquatic environments of the Pearl River Delta, China. *Science of the Total Environment*, 466, 755-761.
- Peng, Y., Yang, P.-H., Ng, S. S. M., Lum, C. T., Kung, H.-F., & Lin, M. C.** (2004). Protection of *Xenopus laevis* embryos against alcohol-induced delayed gut maturation and growth retardation by peroxiredoxin 5 and catalase. *Journal of Molecular Biology*, 340(4), 819-827.
- Raza, H.** (2011). Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease. *FEBS J*, 278(22), 4243-4251.

- Rizzo, A. M., Adorni, L., Montorfano, G., Rossi, F., & Berra, B.** (2007). Antioxidant metabolism of *Xenopus laevis* embryos during the first days of development. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 146(1), 94-100.
- Satoh, T., & Hosokawa, M.** (2006). Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chemico-Biological Interactions*, 162(3), 195-211.
- Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N. V., Zucca, P., Varoni, E. M., Dini, L., & Panzarini, E.** (2020). Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: Back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. *Frontiers in Physiology*, 11, 694.
- Silva, S. R., Barbosa, F. A. R., Mol, M. P. G., & Magalhães, S. M. S.** (2019). Toxicity for aquatic organisms of antiretroviral tenofovir disoproxil. *Journal of Environmental Protection*, 10(12), 1565-1577.
- Stephensen, E., Svavarsson, J., Sturve, J., Ericson, G., Adolfsson-Erici, M., & Forlin, L.** (2000). Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. *Aquatic Toxicology*, 48(4), 431-442.
- Tierbach, A., Groh, K. J., Schonenberger, R., Schirmer, K., & Suter, M. J.** (2018). Glutathione S-transferase protein expression in different life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicological Sciences*, 162(2), 702-712.
- TİTCK, Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu** (2020). https://titck.gov.tr/storage/Archive/2020/kubKtAttachments/FavicovirOanylKT_998a7ad3-880f-42d8-8ea4-87b4f133ba24.pdf (Son erişim:17 Mart 2023).
- Turhan, D. O., & Gungordu, A.** (2022). Developmental, toxicological effects and recovery patterns in *Xenopus laevis* after exposure to penconazole-based fungicide during the metamorphosis process. *Chemosphere*, 303, (Pt 3):135302.
- van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P.** (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol*, 13(2), 57-149.
- Venturino, A., Rosenbaum, E., Caballero de Castro, A., Anguiano, O. L., Gauna, L., & Fonovich de Schroeder, T.** (2003). Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers*, 8(3-4), 167-186.
- Vismara, C., Bacchetta, R., Di Muzio, A., Mantecca, P., Tarca, S., & Vailati, G.** (2006). H₂O₂ induces abnormal tail flexure in *Xenopus* embryos: similarities

- with Paraquat teratogenic effects. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 77(3), 238-243.
- Vismara, C., Battista, V. V., Vailati, G., & Bacchetta, R.** (2000). Paraquat induced embryotoxicity on *Xenopus laevis* development. *Aquatic Toxicology*, 49(3), 171-179.
- Weltje, L., Simpson, P., Gross, M., Crane, M., & Wheeler, J. R.** (2013). Comparative acute and chronic sensitivity of fish and amphibians: A Critical Review of Data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(5), 984-994.
- Wheelock, C. E., Shan, G., & Ottea, J.** (2005). Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. *Journal of Pesticide Science*, 30(2), 75-83.
- Wu, S., Lei, L., Liu, M., Song, Y., Lu, S., & Li, D.** (2018). Single and mixture toxicity of strobilurin and SDHI fungicides to *Xenopus tropicalis* embryos. *Ecotoxicol Environ Saf*, 153, 8-15.
- Yamamura, H., Matsuura, H., Nakagawa, J., Fukuoka, H., Domi, H., & Chujoh, S.** (2020). Effect of favipiravir and an anti-inflammatory strategy for COVID-19. *Crit Care*, 24(1), 413.
- Yu, S. Y., Wages, M. R., Cai, Q. S., Maul, J. D., & Cobb, G. P.** (2013). Lethal and sublethal effects of three insecticides on two developmental stages of *Xenopus laevis* and comparison with other amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(9), 2056-2064.
- Zahn, N.** (2019). Zahn drawings: image sets of *Xenopus laevis* development (<https://www.xenbase.org/entry/zahn.do>).
- Zhou, C., Xie, Q., Wang, J., Chen, X., Niu, J., & Chen, J.** (2020). Effects of dissolved organic matter derived from freshwater and seawater on photodegradation of three antiviral drugs. *Environ Pollut*, 258, 113700.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad: Cemal LAÇİN

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2011, İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

