

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*IN SILICO* TOKSİKOLOJİ YÖNTEMLERİ VE UYGULAMALARI  
ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Ecz. Gökhan Egemen KARACA

Farmasötik Toksikoloji Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2024



**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***IN SILICO* TOKSİKOLOJİ YÖNTEMLERİ VE UYGULAMALARI  
ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

**Ecz. Gökhan Egemen KARACA**

**Farmasötik Toksikoloji Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU**

**ANKARA  
2024**

**ONAY SAYFASI****IN SILICO TOKSİKOLOJİ YÖNTEMLERİ VE UYGULAMALARI ÜZERİNE  
ARAŞTIRMALAR****Öğrenci: Gökhan Egemen KARACA****Danışman: Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU**

Bu tez çalışması 13 Ağustos 2024 tarihinde jürimiz tarafından "Farmasötik Toksikoloji Programı"nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı:** *Prof. Dr. Aylin GÜRBAY*  
(Hacettepe Üniversitesi)

**Tez Danışmanı:** *Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU*  
(Hacettepe Üniversitesi)

**Üye:** *Prof. Dr. Özge CEMİLOĞLU ÜLKER*  
(Ankara Üniversitesi)

**Üye:** *Prof. Dr. Ülfet Pınar ERKEKOĞLU*  
(Hacettepe Üniversitesi)

**Üye:** *Doç. Dr. Güzde GİRGİN*  
(Hacettepe Üniversitesi)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

14 Ağustos 2024.

*Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN***Enstitü Müdürü**

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

O Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>

O Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>

O Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

13/08/2024

**GÖKHAN EGEMEN KARACA**

<sup>1</sup>“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

\* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

## **ETİK BEYAN**

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Prof. Dr. Suna SABUNCUOğLU danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığımı beyan ederim.

Ecz. Gökhan Egemen KARACA

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın tüm aşamalarında benden bilgisini esirgemeyen, uzakta olmanın verdiği zorluğu büyük bir profesyonellikle yöneten ve bana desteklerini bir an bile esirgemeyen sayın Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Hacettepe Üniversitesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim dalındaki tüm hocalarıma ve asistanlara takıldığım her ne konu olursa olsun destekleri için teşekkürlerimi sunarım.

Saygıdeğer hocam Doç. Dr. Sezen YILMAZ SARIALTIN'a yardımlarından, heyecanıma ortak olmasından ve fikirlerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Saygıdeğer hocam Arş. Gör. Naile Merve GÜVEN'e araştırmalarımda yardımını esirgememesinden ve moralman her zaman yanımda olmaya çalışmasından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimimin her aşamasında benimle olan, desteklerini ve sevgisini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili annem ve babama (Kurthanım – İsmet KARACA), tezim süresince bana destek ve yardımcı olan çok sevgili arkadaşlarıma (Anıl AKSU, Egemen ŞAHİN, Emine Aytuğ ÇALIŞKAN, Furkan Berk OĞUZER, İmer Arda ÖZDEMİR, Oğuzhan ŞAHİN) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Karaca, G.E., *In silico* Toksikoloji Yöntemleri Ve Uygulamaları Üzerine Araştırmalar, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2024.**Bilgisayarla desteklenen toksikoloji yöntemlerinin (*in silico* toksikoloji, bilgisayar temelli toksikoloji vb.), prelinik toksikolojik son noktaların, klinik yan etkilerin ve farmasötik maddelerin metabolizmasının tahmininde kullanımı, bilimsel topluluk ve kamu için büyük ilgi görmektedir. Bu teknolojilerin bilim insanlarına daha erişilebilir hale gelmesi ve kimyasal risk değerlendirmesi için kullanılmalarına izin veren düzenlemeler bu ilgiyi desteklemektedir. *In silico* toksikoloji ürün geliştirme ve farmasötiklerin hazırlanması yanı sıra uzun ve maliyetli hayvan testlerinin de azaltılmasında güvenilir bir yöntem olarak görülmektedir. Tez çalışmasında öncelikle *in silico* toksikoloji hakkında genel bir bilgilendirilme ve bu teknolojinin temel kavramları ile mevcut yetenekleri ve sınırlamaları ele alınmış olup, bu teknoloji ile yapılmış deneysel çalışma ile bahsedilen son nokta kavramlarından LD50 ve NOAEL değerleri için hesaplanan ve deneysel karşılaştırılmaları sunulmuştur. Bu karşılaştırma için literatürde halihazırda LD50 ve NOAEL değerleri olan ilaç etken maddeleri seçilmiş, QSAR Toolbox programı ile LD50 değeri hesaplanırken 48 ile 96 saat aralığındaki süreler seçilmiştir. Tür olarak literatürde bu etken maddeler ile yaygın verileri bulunan sıçan ve fare seçilmiştir. NOAEL için belirli bir zaman aralığı seçilmemiş, mevcut veritabanlarından en çok karşılaştırmalı veri bulunan sürelerin karşılaştırılması sağlanmıştır. Literatürde LD50 ve NOAEL değerleri olmayan Baklofen etken maddesi için hesaplamalar yapılmıştır. LD50 değeri olarak oral fare için 940 mg/kg, *IP* yol için sıçan da 300 mg/kg bulunmuştur. NOAEL değeri içinse 20,1 mg/kg/gün bulunmuştur. Sonuçlarımız, deneysel verilerin QSAR ve *Read-Across* yöntemleri ile hesaplanması sonucu ortaya çıkmış olup doğrulanması için kapsamlı laboratuvar çalışmaları ile elde edilen sonuçlar ile karşılaştırması tavsiye edilmektedir. Bu çalışma bir ön çalışma niteliğinde olup, yeni yöntemlerin stratejilerinin geliştirilmesine bir katkı sağlayacaktır.

**Anahtar kelimeler:** Hesaplamalı toksikoloji, NOAEL, QSAR, SAR, akut toksisite



## ABSTRACT

**Karaca, G.E., Research on *In silico* Toxicology Methods and Applications, Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences, Pharmacy Department of Pharmaceutical Toxicology Master of Science Thesis, Ankara, 2024.** The use of computer-assisted toxicology methods (in silico toxicology, computer-based toxicology etc.) in predicting preclinical toxicological endpoints, clinical side effects, and the metabolism of pharmaceutical substances has gained significant interest from the scientific community and the public. The increasing accessibility of these technologies for scientists and the regulations allowing their use for chemical risk assessment have further fueled this interest. In silico toxicology is seen as a reliable method not only in product development and pharmaceutical preparation but also in reducing lengthy and costly animal testing. An overview of in silico toxicology has been provided, and the fundamental concepts, current capabilities, and limitations of this technology have been discussed, experimental study using this technology has been presented, comparing the calculated LD50 and NOAEL values for the mentioned endpoints with experimental data. In this comparison, drug compounds with existing LD50 and NOAEL values in the literature were selected. The LD50 value was calculated using the QSAR Toolbox program, selecting time periods between 48 and 96 hours. Rats and mice, which have extensive data in the literature for these compounds, were chosen as the species. For NOAEL, no specific time range was selected, the most comparable data from existing databases were used for the comparison. For the compound Baclofen, which does not have existing LD50 and NOAEL values in the literature, calculations were performed. The LD50 value was found to be 940 mg/kg for oral administration in mice and 300 mg/kg for intraperitoneal (IP) administration in rats. The NOAEL value was found to be 20.1 mg/kg/day. Our results, obtained from QSAR and *Read-Across* methods, suggest that these values should be verified by comparing them with results obtained from comprehensive laboratory studies. This study serves as a preliminary investigation and is expected to contribute to the development of new strategies in this field.

**Keywords:** Computational toxicology, NOAEL, QSAR, SAR, acute toxicity

## İÇİNDEKİLER

<b>ONAY SAYFASI</b>	<b>iii</b>
<b>YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI</b>	<b>iv</b>
<b>ETİK BEYAN</b>	<b>v</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>vi</b>
<b>ÖZET</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>viii</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b>	<b>xi</b>
<b>ŞEKİLLER</b>	<b>xiii</b>
<b>TABLolar</b>	<b>xiv</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. Genel Bilgiler</b>	<b>5</b>
2.1. <i>In Silico</i> Toksikoloji ve Kullanım Avantajları	5
2.1.1. <i>In Silico</i> Toksikolojide İlaç ve Kimyasal Veritabanları ve Standardizasyonu	7
2.1.2. <i>In Silico</i> Toksikolojide Kimyasal Temeller ve Kemoinformatik	14
2.1.3 Bilgisayar Destekli Kimya (Hesaplamalı Kimya)	18
2.1.4. Moleküler Simülasyon	19
2.2. Toksikoloji için Biyolojik Modeller ve Biyoanalizler	20
2.2.1. Akut Oral Toksikite Testi	21
2.2.2. Akut Oral Testlerinin İyileştirilmesi	22
2.2.3. Deney Hayvanları ile Yapılan Akut Toksikite Testlerinin Yerine Geçilmesi	23
2.2.4. 3R Prensipleri	24
2.3. Toksikolojide Kullanılan <i>In Silico</i> Yöntemler	40
2.3.1. QSAR	40
2.3.2. Moleküler Tanımlayıcılar	42
2.3.3. Model Oluşturma	43
2.3.4. QSAR Metotları	45
2.3.5. <i>Read-Across</i> Yöntemi	53
2.4. <i>In Silico</i> Modelleri ile Tekrarlanan Doz Toksikitesi (RDT): İlaçlar için Advers Etki Gözlenen En Düşük Düzey (LOAEL) ve Advers Etki Gözlenmeyen Düzey (NOAEL) Tahmini	55

2.4.1. NOAEL ve LOAEL Veritabanları	59
2.4.2. NOAEL ve LOAEL için Yayınlanmış Örnek Modeller	62
2.5. Tez Kapsamında Kullanılan Kimyasal Maddeler	65
<b>3.GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>81</b>
3.1. GEREÇLER	82
3.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	82
<b>4. BULGULAR</b>	<b>89</b>
4.1. LD50 Değerlerinin QSAR Toolbox ile Deneysel Veriler Arasında Karşılaştırılması	89
4.2. NOAEL Değerlerinin QSAR Toolbox ile Deneysel Veriler Arasında Karşılaştırılması	92
4.3.Baklofen için LD50 ve NOAEL Değerlerinin QSAR Toolbox ile Hesaplanması	95
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>97</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	<b>105</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>110</b>
<b>8.EKLER</b>	<b>120</b>
EK:1 QSAR Toolbox Tahmin Raporları	121
EK 2: Turnitin Raporu	129
EK 3: Turnitin Dijital Makbuzu	130
<b>9.ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>131</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>ATS</b>	<i>Acute Toxic Class</i> , Akut Toksik Sınıf
<b>BTS</b>	<i>British Toxicology Society</i> , İngiliz Toksikoloji Derneği
<b>DDP</b>	Düzeltilmiş Doz Prosedürü, <i>Fixed Dose Procedure</i>
<b>EC50</b>	Etki Konsantrasyonu
<b>ECVAM</b>	<i>The European Centre for the Validation of Alternative Methods</i> , Avrupa Alternatif Yöntemlerin Doğrulanması Merkezi
<b>EPA</b>	<i>Environmental Protection Agency</i> , Çevre Koruma Ajansı
<b>FDA</b>	<i>U.S. Food and Drug Administration</i> , Amerika İlaç ve Gıda Dairesi Başkanlığı
<b>IC50</b>	İnhibitör konsantrasyonu
<b>ICH</b>	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i> , İnsan Kullanımına Yönelik İlaçlara İlişkin Teknik Gerekliliklerin Uyumlaştırılmasına İlişkin Uluslararası Konsey
<b>ICVAM</b>	<i>Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods</i> , Alternatif Yöntemlerin Değerlendirilmesi İçin Kurumlararası Merkezi
<b>IUPAC</b>	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> , Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
<b>LD50</b>	Hayvanların yarısını öldüren medyan doz/ölümcül doz
<b>InChI</b>	<i>International Chemical Identifier</i> , Uluslararası Kimyasal Tanımlayıcı
<b>LOAEL</b>	İlaçlar için Advers Etki Gözlenen En Düşük Düzey
<b>MCS</b>	Monte Carlo Simülasyonu
<b>MDS</b>	Moleküler Dinamik Simülasyonu
<b>MM</b>	Moleküler Mekanik Modelleme
<b>MRSD</b>	<i>Maximum Recommended Starting Dose</i> , Maksimum Tavsiye Edilen Başlangıç Dozu
<b>NOAEL</b>	<i>No Observed Adverse Effect Level</i> , Advers Etki Gözlenmeyen Düzey
<b>NRC</b>	<i>National Research Council</i> , Ulusal Araştırma Konseyi
<b>NTP</b>	<i>National Toxicology Program</i> , Ulusal Toksikoloji Programı
<b>OECD</b>	<i>Organisation for Economic Co-Operation and Development</i> , Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü

<b>PBBK</b>	<i>Physiology-Based Biokinetics</i> , Fizyolojiye Dayalı Biyokinetik
<b>PBPK</b>	<i>Physiology-Based Pharmacokinetics</i> , Fizyolojiye Dayalı Farmakokinetik
<b>PCA</b>	<i>Principal Component Analysis</i> , Temel Bileşen Analizi
<b>PTCC</b>	<i>Pharmacology/Toxicology Coordinating Committee</i> , Farmakoloji/Toksikoloji Koordinasyon Komitesi Bilişimsel Toksikoloji Alt Komitesi
<b>QSAR</b>	<i>Quantitative Structure-Activity Relationships</i> , Kantitatif Yapı – Etki İlişkisi
<b>QSPR</b>	<i>Quantitative Structure-Property Relationship</i> , Niceliksel Yapı – Özellik İlişkisi
<b>RDT</b>	<i>Repeated-dose Toxicity</i> , Tekrarlanan Doz Toksisitesi
<b>REACH</b>	<i>Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals</i> , Kimyasalların Kaydı, Değerlendirilmesi, İzni ve Kısıtlanması
<b>SDF</b>	<i>Structure Data Format</i> , Yapı Veri Formatı
<b>SMILES</b>	<i>Simplified Molecular Input Line Entry Specification</i> , Basitleştirilmiş Moleküler Girdi Doğrusal Kayıt Belirtimi
<b>YAP</b>	Yukarı ve Aşağı Prosedürü, <i>Up – and – Down Procedure</i>

## ŞEKİLLER

ŞEKİL	SAYFA
2.1. 2- metilbütanin komşuluk matrisinin gösterimi. Matristeki “1” değeri, ilgili karbon atomları arasında bağın varlığını gösterirken, “0 “ değeri bağ olmadığını göstermektedir. Matris, bağlar bu gösterimde yönlendirilmemiş olduğundan simetriktir.	15
2.2. 2-metilbütan İçin a) Kimyasal Formül b) SMILES c)3D Konformer Yapı Gösterimi (Çizgi gösterimleri için ChewDrawer programı kullanılmıştır.)	17
2.3. LD50 Doz-Yanıt Eğrisi Gösterimi	39
2.4. İlaç geliştirilmesi aşamaları.	57
2.5. Amoksisilin Kimyasal Gösterimi	66
2.6. İsetretinoin Kimyasal Gösterimi	69
2.7. Risperidon Kimyasal Gösterimi	72
2.8. Doksorubisin Kimyasal Gösterimi	74
2.9. Guafenesin Kimyasal Gösterimi	77
2.10. Baklofen Kimyasal Gösterimi	79
3.1. QSAR Toolbox üzerinde molekül tanıtılması.	84
3.2. Son Nokta (Endpoint) seçimi.	85
3.3. Profilleme metotlarının listesi.	87
3.4. Metabolizma ve Transformasyon simülatörlerinin listesi.	87
4.1. QSAR Toolbox ekranından alınmış Mandipropamid kimyasal yapısı.	96

**TABLÖLAR**

<b>TABLO</b>	<b>SAYFA</b>
<b>2.1.</b> Toksikoloji Veritabanları	10
<b>2.2.</b> Matris Gösterimi	15
<b>2.3.</b> 2-metilbutan İçin SMILES, Formül ve Çizgi Gösterimi	17
<b>2.4.</b> OECD Akut Oral Toksikite Rehberlerinin Karşılaştırılması [3]	25
<b>2.5.</b> QSAR Metodları	46
<b>2.6.</b> NOAEL ve LOAEL Veritabanları [109]	59
<b>2.7.</b> LOAEL ve NOAEL Hesaplanması için Yapılmış Deneysel Çalışmalar	63
<b>3.1.</b> Hesaplanması yapılan maddelerin isimleri ve CAS numaraları	86
<b>4.1.</b> QSAR Toolbox uygulaması ile hesaplanmış LD50 değerlerinin deneysel verilerle Karşılaştırılması (Deneysel değerler ECHA, PubChem ve Çalışma Raporları ile Sağlanmıştır. ).	91
<b>4.2.</b> QSAR Toolbox ile Hesaplanmış NOAEL Değerlerinin Deneysel NOAEL Değerleri ile Karşılaştırılması	94
<b>4.3.</b> Baklofen Maddesinin Hesaplanmış NOAEL ve LD50 Değerleri	95

## 1. GİRİŞ

Toksikoloji, kimyasal maddelerin biyolojik sistemler üzerindeki etkilerini incelerken, bu maddelerin aynı zamanda güvenliliğini ve olası risklerini de değerlendiren multidisipliner bir bilim dalıdır. Geleneksel toksikolojik yöntemler, genellikle zaman alıcı, maliyetli ve etik kaygılar taşıyan hayvan deneylerini içermektedir. Bu sorunlara alternatif olarak, son yıllarda toksikolojide bilgisayar tabanlı program yaklaşımları—bilinen adıyla *in silico* toksikoloji—ön plana çıkmıştır. *In silico* toksikoloji, kimyasal maddelerin potansiyel zararlarını ve maruziyet durumunda ortaya çıkabilecek olası riskleri belirlemek için bilgisayar modelleme yöntemleri ve simülasyonları kullanmaktadır. Bu yöntemler, daha hızlı ve maliyet etkin toksisite değerlendirmeleri yapılmasını sağlayarak, aynı zamanda hayvan kullanımını azaltmaktadır [1].

*In silico* toksikoloji bir kimyasalın moleküler yapısından toksisitesini tahmin etmek için farklı metodolojilere (istatistiksel temelli veya uzman kuralına dayalı modeller gibi) dayanan hesaplamalı modellerin kullanımını kapsar. *In silico* toksikoloji, öncelikli araştırma alanları arasında yer almakta, farmasötik safsızlıklar da dahil pekçok kimyasal maddenin toksisitesinin değerlendirilmesi, maddenin sınıflandırılması ve etiketlenmesi gibi giderek artan sayıda düzenleyici ve endüstriyel uygulamayı desteklemek için kullanılmaktadır. Bu artan kullanım, hayvan testlerini azaltma isteği, veri bulunmayan kimyasalların değerlendirilmesinin gerekliliği ve yeni kimyasal ürünlerin pazara sunulma sürecinin verimliliğini ve genel kullanım güvenliğini artırma ihtiyacı gibi çeşitli faktörler tarafından yönlendirilmektedir [1].



“3R” ilkesi, hayvan çalışmalarının geçerli alternatif yöntemlerle (*In silico* gibi) iyileştirilmesi, azaltılması ve yer değiştirilmesini ifade etmektedir [2]. Eşdeğer bir tahmin düzeyi alternatif bir yöntemle sağlanabildiğinde, bu testin kabul edilmesi ve tercih edilmesi gerektiğini belirtir. *In silico* yaklaşımlarının hayvan deneylerine alternatif olarak kullanılmasının ek bir faydası, *in silico* yaklaşımlarının *in vivo* alternatiflerine göre daha hızlı ve daha ucuz olmasıdır. Örneğin, test maddesini sentezleme veya analitik bir test geliştirme ihtiyacını ortadan kaldırmak genellikle önemli bir finansal fayda sağlar [3].

*In silico* modellerin kullanımına yönelik önerilerin geliştirilmesi, *in silico* toksikoloji yöntemlerinin kabul edilmesine katkıda bulunmuştur. Bu öneriler, Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Teşkilatı (Organisation for Economic Co-Operation and Development-OECD) doğrulama ilkelerinin geliştirilmesini [4, 5] ve düzenleyici danışma grupları tarafından belirlenen *in silico* toksikoloji için en iyi uygulamaları içermektedir [6, 7]. Ayrıca read-across [8] ve modellerin ve tahmin sonuçlarının nasıl raporlanacağına dair öneriler de bilgisayarlı yöntemlerin daha geniş kabulüne katkıda bulunmuştur [8, 9]. Tahmin sonuçlarının ve ilişkili bilgilerin uzman incelemesi, *in silico* toksikolojinin uygulanmasında kritik bir bileşen olarak görülmektedir [10].

Geçerli *in silico* yöntemlerin kabul edilmiş kullanımını açıklayan yönergeler, bu yöntemlerin kullanımının yaygınlaşmasında önemli bir faktördür. Avrupa Birliği'nin (AB) Kimyasalların Kaydı, Değerlendirilmesi, İzni ve Kısıtlanması (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals-REACH) düzenlemesi, geçerli read-across ve (Q)SAR yaklaşımlarının kullanımına atıfta bulunan ilk bölgesel düzenlemelerden birisidir [11]. Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu'nun (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use - ICH) M7 yönergesi olan “Farmasötiklerde Potansiyel Kanserojen Riskini Sınırlamak için DNA Reaktif Safsızlıkların Değerlendirilmesi ve Kontrolü” yönergesi, DNA’da reaktiflere bağlı oluşabilecek mutajenitelerin tahmini ve ilaç maddelerindeki safsızlıkların miktarının belirlenmesi için bilgisayar modellerinin kullanımını tanımlayan ilk uluslararası düzenleyici yönergedir [12]. ICH M7 yönergesinde belirtilen kavramlar arasında hayvan

sağlığı ürünlerindeki safsızlıkların değerlendirilmesi, pestisit kalıntıları ve ekstre olabilen yahut sızdırılabilen etken maddeler de bulunmaktadır[13-15]. Düzenleyici uygulamaları destekleyen yönergeler listesi ve farklı uygulamalar ve düzenleyici yetki alanları arasında *in silico* yaklaşımların benimsenmesini destekleyen belge sayısı artmaktadır [16, 17][7, 18].

*In silico* yöntemler, kimyasal araştırma ve geliştirme çalışmaları süreçlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Farmasötik geliştirme sürecinin erken keşif aşamasında, ayrıca potansiyel toksisiteyi tahmin edilen adayları önceliklendirmek için sıkça uygulanmaktadır [19, 20]. Bu aşama da, güvenilirlik farmakolojisi ve çeşitli toksikolojik son noktaları (örneğin organ toksisitesi) tahmin eden *in silico* yöntemler giderek daha önemli hale gelmektedir. Pre-klinik değerlendirmede *in silico* toksikoloji tahmin edilen toksisiteye dayalı olarak deneysel tasarımı destekleyerek ve deneysel bulguların yorumlanmasını sağlayarak test stratejilerinin geliştirilmesini destekleyebilir, *in vivo* çalışmalara ihtiyacı azaltabilir, ortadan kaldırabilir [20]. Bu yöntemler özellikle test materyalinin temin edilmesinin zor olduğu durumlar da, safsızlıkların, bozunma ürünlerinin, metabolitlerin ve yardımcı maddelerin güvenliğini sağlamak için aktif olarak kullanılmaktadır [21].

Bu tezin amacı, toksikolojide kullanılan *in silico* yöntemlerin, maddelerin toksikolojik değerlendirmelerinde ki rollerini, avantaj ve dezavantajlarını açıklamının yanısıra bu değerlendirmelerin yapılmasında kullanılan Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri (Quantitative Structure-Activity Relationships, QSAR) ve Read-Across yöntemlerinin genel bir açıklamasını sunar. Aynı zamanda kullanılan bu yöntemlerin bilgisayar modelleri üzerinde çalışılırken olan yazılımsal bilgilendirmeyi ve karşılaştırmanın örneklerini içermektedir. Toksikolojide kullanılan *in silico* yöntemlerin nasıl uygulandığını, hangi veri tabanları ve yazılım araçlarının kullanıldığını ve bu tekniklerin kimyasal maddelerin toksisite tahminlerinde ki etkinliği tez kapsamında değerlendirilecektir. Ayrıca, tez kapsamında seçilmiş belirli örnekler üzerinden bu yöntemlerin geleneksel laboratuvar testleri ve sıçanlar üzerinde yapılan çalışmaları ile karşılaştırmalı olarak risk değerlendirme de kullanımını ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu değerlendirme

yapılırken farklı patolojilerin tedavisinde aktif olarak kullanılan, deneysel verilerinin *in silico* toksikoloji test yöntemleri ile karşılaştırılmasına izin verecek yeterli veriye sahip olan Amoksisilin, İstretionin, Risperidon, Doksorubisin ve Guaifenesin etken maddeleri seçilmiştir. Bu etken maddelerin hayvan çalışmalarının sırasında sıçanlar üzerinde elde edilmiş LD50 ve NOAEL değerleri, QSAR Toolbox programının da hesaplanmış tahmini sonuçlar ile karşılaştırılarak *in silico* tahminlerin doğruluklarının belirlenmesi planlanmıştır.

## 2. Genel Bilgiler

### 2.1. *In Silico* Toksikoloji ve Kullanım Avantajları

*In silico* toksikoloji, bir maddenin toksikolojik etkinliğini analiz etmek için bilgisayar teknolojilerinin uygulanmasıdır [22]. Bu alan kimyasal ve biyolojik ilaç dahil ksenobiyotiklerin vücudun işlevlerini nasıl etkileyebileceğini anlamak amacıyla bilgisayar destekli yöntemlerin kullanımını içermektedir. ABD Çevre Koruma Ajansı (Environmental Protection Agency - EPA), bilişimsel toksikoloji (*in silico* toksikoloji) için bir tanım sunmuştur. EPA bu alanı “moleküler biyoloji ile modern bilgisayar ve bilgi teknolojilerinin entegrasyonu, veri gereksinimlerinin önceliklendirilmesini ve kimyasallara ilişkin risk değerlendirmesini geliştirmek için kullanımını” iyileştirmek olarak tanımlamaktadır. Bu tanım EPA'nın misyonu ile uyumlu bir uygulama kullanımını hedeflemektedir. EPA dışında kullanım düşünüldüğünde tanım kolayca olası tüm kullanıcılar (endüstri, kar amacı gütmeyen kuruluşlar ve akademi gibi) tarafından anlaşılabilir ve geniş bir uygulama yelpazesi için de kullanılabilir. ABD Gıda ve İlaç İdaresi (U.S. Food and Drug Administration - FDA) ilaç olarak yayınlanmış bir bilişimsel toksikoloji tanımı geliştirmemiştir ve bu konuya özel bir rehber de tanımlamamıştır. Bu sorunları ele almak için FDA bünyesinde bir Farmakoloji/Toksikoloji Koordinasyon Komitesi Bilişimsel Toksikoloji Alt Komitesi (*Pharmacology/Toxicology Coordinating Committee - PTCC*) kurulmuştur. Bu komite *in silico* toksikoloji ile ilgili prosedürler geliştirmek, konuyla ilgili olası rehberleri hazırlamak, ortaya çıkan teknik sorunları ele almak, PTCC inceleme bölümlerinden gelen bilimsel sorulara yanıt vermek, inceleme ve araştırma personelinin *in silico* toksikolojin güncel gelişmeleri konusunda bilgilendirmekle sorumludur [23].

Ulusal Araştırma Konseyi (National Research Council - NRC), "Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy" (21. Yüzyılda Toksikoloji Testleri: Bir Vizyon ve Strateji) başlıklı önemli bir rapor yayınlamıştır. Bu rapor, kurulmuş toksikoloji yöntemlerini gözden geçirerek, toksisite testlerinin verimliliğini ve risk değerlendirmesiyle ilgisini artırmak için alternatif yaklaşımlar ve yeni teknolojilerin kullanımını ele almaktadır. NRC, kimyasal risk değerlendirmesi ile *in silico* toksikolojinin

kullanımını artırma stratejileri arasında sistem biyolojisi, yüksek veri kapasiteli *in vitro* tarama, bilişimsel toksikoloji ve yüksek içerikli toksikolojik testlerin yanı sıra omik yaklaşımlar gibi teknolojilerin yaygın bir şekilde kullanılmasını öngörmektedir. Rapor toksikogenomik, biyoinformatik, sistem biyolojisi, epigenetik ve bilişimsel toksikolojideki ilerlemelerin, toksisite testlerinin, mevcut bütün hayvan sistemlerine dayalı modellere dayalı bir yaklaşımdan "alternatif yöntemler" olarak adlandırılan bir modele dönüştürebileceğini kabul etmektedir. İlaç endüstrisi, aday moleküllerin toksik potansiyellerini erken aşamada değerlendirmek için *in silico* teknolojilerini kullanmayı birincil bir araç olarak rapor etmiştir. Bu yaklaşım, etken farmasötik bileşenler veya son kullanıcıya herhangi bir fayda sağlamayan metabolitler ile kullanıldığında, toksisite endişelerinin erken aşamada tanımlanmasına ve bu nedenle risk yönetimi için bir önceliklendirme aracı olarak hizmet etmesine yardımcı olabileceğini ortaya koymaktadır [24].

*In silico* toksikoloji kullanımının, kullanım alanları açısından üç temel yararından bahsedilmektedir:

- a) **Hız ve Maliyet Etkinliği:** *In silico* yöntemler, kimyasal maddelerin potansiyel toksisitelerini değerlendirme de geleneksel yöntemlere kıyasla önemli zaman ve maliyet avantajları sunmaktadır. Yapılan araştırmalar QSAR modellerinin, yeni kimyasal bileşiklerin biyolojik aktivitelerini tahmin etmek için kullanıldığını ve bu sürecin maliyetlerini önemli ölçüde azalttığını belirtmektedir. Geleneksel yöntemlerle haftalar sürebilecek testler, *in silico* modeller kullanılarak günler içinde tamamlanabilir, bu da araştırma ve geliştirme süreçlerinde önemli bir zaman tasarrufu sağlayabilir [25].
- b) **Hayvan Deneylerinin Kullanımının Azaltılması:** *In silico* modeller, hayvan deneylerine etik ve sürdürülebilir alternatifler sağlamaktadır. Bu yaklaşımlar özellikle kozmetik sanayi gibi hayvan deneylerinin yasaklandığı veya kısıtlandığı sektörler için büyük önem taşır.

- c) **Geniş Kapsamlı Veri Analizi:** Modern *in silico* teknikler, büyük kimyasal ve biyolojik veri setlerini işleyebilir ve karmaşık veri analizleri yapabilir. Bu modeller geniş kimyasal uzayları tarama ve potansiyel toksisiteler hakkında öngörüler de bulunma kapasitesine sahiptir. Bu yetenek, özellikle çevresel toksikoloji ve ilaç geliştirme gibi alanlar için değerlidir çünkü araştırmacılar büyük veri setleri üzerinden hızlı ve doğru sonuçlar elde edebilir [26].

*In silico* yöntemlerin toksikoloji alanına sunmuş olduğu avantajlar, bu teknolojinin araştırma ve endüstriyel uygulamalarda giderek daha fazla benimsenmesini sağlamıştır. Hızlı ve maliyet-etkin analizler sunması, hayvan kullanımını azaltarak etik avantajlar sağlaması ve geniş veri analiz yetenekleri, *in silico* yaklaşımlarını toksisite değerlendirme çalışmalarının ayrılmaz bir parçası haline getirmiştir. Bu yöntemler, özellikle yeni kimyasal maddelerin güvenliğinin değerlendirilmesi ve potansiyel toksik etkilerin öngörülmesi için kritik bir role sahiptir.

### 2.1.1. *In Silico* Toksikolojide İlaç ve Kimyasal Veritabanları ve Standardizasyonu

*In silico* toksikoloji genellikle tahmin etmeye dayalı bir bilimdir. Terapötik bileşiklerin keşfi ve güvenliliğine ilişkin sorunları çözmeye yardımcı olmak için kullanılan yaklaşımlar, kimyasal ve biyolojik bilgi tabanlı birçok özelliğin sanal ortamda simüle edilerek analiz edilmesine dayanır.

Toksikolojik değerlendirmeye dayalı *in silico* yaklaşımlar genellikle toksisite veritabanları oluşturmayı, QSAR modelleme yöntemlerini, insan kural tabanlı yöntemleri, son nokta tanımlayıcı tabanlı yöntemleri ve ligand ve hedef tabanlı yöntemlerin kullanılmasını içermektedir. Farmasötik bilimler kapsamında tüm bu yöntemler, prelinik ilaç toksisitesini ve insanlarda ortaya çıkabilecek olası advers etkileri doğru bir şekilde tahmin etme amacını paylaşmaktadır. Yazılımlar tarafından üretilen tahminler, test önceliklendirme stratejilerini veya geleneksel toksisite testi yöntemlerini desteklemekte kullanılabilmektedir [27].

Toksisite veritabanları, ilaçların ve diğer ksenobiyotiklerin olumsuz etkilerini tahmin etmek için güvenlik değerlendirmesinde, optimizasyon desteği sağlamak ve ideal olarak, türev yapılarından yüksek kaliteli test verileriyle bir güvenlik veya risk değerlendirmesine katkı da bulunmak için kullanılmaktadır. İlaç ve kimyasal toksisite veritabanı gelişiminin ana konsepti, önceki toksisite çalışmalarından kabul edilebilir bilimsel verileri kullanarak, yapısal olarak ilişkili bileşiklerle "read across" stratejilerinde kullanılacak elektronik bir kaynak oluşturma yeteneğidir. Toksisite veritabanları genellikle tahmin modelleri olarak veya doğrulanmış yapılarla, maddeye bağlı toksisite deneyleri veya benzer bilimsel dayanaklı kanıtlar, hiyerarşik veri ilişkileri veya ontolojiler içeren ve kontrollü kelime dağarcığı ile ilişkisel "read across" kemoinformatiği kapsayan gereken zengin veri "madenleri" olarak hizmet verir. Toksisite veritabanlarının tanımı, *in silico* toksikoloji ve farmakoloji tanımları gibi değişken bulunabilir. Önerilen tanım bir toksisite veritabanının, bilgisayar tarafından erişilebilen, yazılım tarafından organize edilen ve kimyasalların, ürün keşfi ve gelişimi veya biyomedikal ve toksikolojik bilimlerin alanında ki ayarlar için güvenlik ve risk analizi için kullanılabilen elektronik bilgi için değerli bir veri seti olduğudur. Bu nedenle toksisite veritabanları yalnızca tarihsel verilerin durgun anlık görüntüleri olmamalı aynı zamanda QSAR toksisite eğitim veri setleri gibi takip veritabanları için de kullanışlı güncellenmiş kemoinformatik kaynaklar olmalıdır. Veritabanlarından gelen kimyasal toksisite bilgilerinin büyük bir kısmı son yıllar da genişlemiş olup halka açıktır. Sonuç olarak, toksisite verilerinin kamu kaynakları hesaplamalı modelleme ve *in silico* toksikoloji yazılım programları için ilk olarak başvuru yerleridir. Yine de bu veritabanları, endüstride ki ilaç keşif kütüphaneleriyle karşılaştırıldığında çok küçüktür [27].

Risk değerlendirmesi, güvenlik değerlendirmesi ve tehlike karakterizasyonunda yararlı olan, maddelerin insan sağlığı etkilerini tanımlayan birçok halka açık toksisite veritabanını ve elektronik kaynağı Tablo 2.1'de özetlenmektedir. Özel toksisite veritabanları, temsil ettikleri moleküler yapıların genişletilmiş kimyasal alanı veya "tahmin edilebilir doğruluk" teması ile kamu veritabanlarına kıyasla avantaj sunabilir. Kimyasal alan birçok Şekil ile tanımlanabilir ama genellikle "prensipte oluşturulabilecek tüm küçük karbon bazlı molekülleri kapsayan toplam moleküler tanımlayıcı alanı belirten bir bölge" olarak açıklanmaktadır [28]. Tanımlayıcılar molekülün basit atom sayımı özelliklerini örneğin halojen sayısı, hidrojen bağ alıcıları/vericileri, heterosiklik halka sayısı veya moleküler bağlantı indeksleri gibi iki boyutlu yapısal bilgileri veya daha karmaşık olanları,  ve dört boyutlu moleküler Őeklini temsil edebilir. Moleküler tanımlayıcılar sayısal bir temsil oluşturarak hesaplama modelinin yapı-aktivite ilişkilerini kurma açısından önemlidir. Bu nedenle, molekülün toksisitesini etkileyen yönleri yansıtmayan tanımlayıcılar seçilirse modelin verimsiz bir performans göstermesi beklenir [29, 30].



**Tablo.2.1.** Toksikoloji Veritabanları

Veritabanı Adı	Link	Açıklama
AERS	<a href="http://www.fda.gov/drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Surveillance/AdverseDrugEffects/Default.htm">http://www.fda.gov/drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Surveillance/AdverseDrugEffects/Default.htm</a>	ABD FDA/CDER'in onaylanmış tüm ilaç ve terapötik biyolojik ürünler raporlama sistemidir.
ACToR	<a href="http://actor.epa.gov/actor/faces/ACToRHome.jsp">http://actor.epa.gov/actor/faces/ACToRHome.jsp</a>	ABD EPA'nın kimyasal yapı, fizikokimyasal değerler dahil aranabilir ve <i>in vitro</i> ve <i>in vivo</i> toksikoloji için veritabanıdır.
BDSM	<a href="http://systemsanalysis.louisville.edu/">http://systemsanalysis.louisville.edu/</a>	Louisville Üniversitesi'nden gelişimsel toksikanları keşfetmek için <i>in silico</i> toksikoloji veritabanıdır.
Cal/EPA	<a href="http://www.oehha.ca.gov/risk/ChemicalDB/index.asp">http://www.oehha.ca.gov/risk/ChemicalDB/index.asp</a>	California EPA Toksikite Kriterleri Veritabanıdır.
CCRIS	<a href="http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?CCRIS">http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?CCRIS</a>	Kimyasal karsinogenez veritabanıdır.
CEBS	<a href="http://cebs.niehs.nih.gov/cebs-browser/cebsHome.do;jsessionid=E604E0061D6B156B29F9525F1B86BEA8">http://cebs.niehs.nih.gov/cebs-browser/cebsHome.do;jsessionid=E604E0061D6B156B29F9525F1B86BEA8</a>	Kimyasal Etkilerin Biyolojik Sistemler üzerindeki veritabanıdır.
CEDI/ADI	<a href="http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/FoodContactSubstancesFCS/CEDIADIDatabase/default.htm">http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/FoodContactSubstancesFCS/CEDIADIDatabase/default.htm</a>	ABD FDA'nın Gıda Teması Maddeleri için Kabul Edilebilir Günlük Alım veritabanıdır.
CPDB	<a href="http://potency.berkeley.edu/">http://potency.berkeley.edu/</a>	Kaliforniya Üniversitesi'nin karsinojenik potansiyel veritabanıdır.
Danish (Q)SAR	<a href="http://ecbqsar.jrc.ec.europa.eu/">http://ecbqsar.jrc.ec.europa.eu/</a>	Danimarka EPA, 166,072 kimyasal için 70'den fazla QSAR modelinden tahminler ve sağlık etkileri içeren veritabanıdır.
DevTox	<a href="http://www.devtox.org/">http://www.devtox.org/</a>	Alman endüstrisi ve hükümeti tarafından geliştirilen çeşitli laboratuvar hayvanı türleri için gelişimsel toksisite çalışma verileri içeren veritabanıdır.
DITOP	<a href="http://bioinf.xmu.edu.cn/databases/ADR/index.html">http://bioinf.xmu.edu.cn/databases/ADR/index.html</a>	İlaç Kaynaklı Toksikite İlişkili Protein veritabanıdır.

**Tablo 2.1.(Devam)**

DSSTox	<a href="http://www.epa.gov/ncct/dsstox/index.html">http://www.epa.gov/ncct/dsstox/index.html</a>	İndirilebilir, yapı aramalı, standartlaştırılmış kimyasal yapı dosyalarını toksisite verileri ile ilişkilendiren toksisite veritabanıdır.
EAFUS	<a href="http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/ucm115326.htm">http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/ucm115326.htm</a>	ABD FDA'nın "Gıdaya Eklenen Her Şey" veritabanıdır.
ECOTOX	<a href="http://cfpub.epa.gov/ecotox/">http://cfpub.epa.gov/ecotox/</a>	ABD EPA, sucul ve karasal yaşam için kimyasal toksisite bilgileri içeren veritabanıdır.
ESIS	<a href="http://ecb.jrc.ec.europa.eu/esis/">http://ecb.jrc.ec.europa.eu/esis/</a>	Risk ve güvenlikle ilgili kimyasallar hakkında bilgi sağlayan veritabanıdır.
EXTOXNET	<a href="http://extoxnet.orst.edu/ghindex.html">http://extoxnet.orst.edu/ghindex.html</a>	Pestisit toksikolojisi ile ilgili bilgiler içeren veritabanıdır.
FDA Poisonous Plant	<a href="http://www.accessdata.fda.gov/scripts/plantox/index.cfm">http://www.accessdata.fda.gov/scripts/plantox/index.cfm</a>	Bitkilerin toksik özelliklerini tanımlayan bilimsel literatüre atıflar içeren veritabanıdır.
GAC	<a href="http://www.niehs.nih.gov/research/resources/databases/gac/index.cfm">http://www.niehs.nih.gov/research/resources/databases/gac/index.cfm</a>	Çevresel kimyasallar tarafından indüklenen kanserlerde bulunan spesifik mutasyonları belirten veritabanıdır.
Gene-Tox	<a href="http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?GENETOX">http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?GENETOX</a>	3000'den fazla kimyasal için akran değerlendirmeli genetik toksikoloji test verileri içeren veritabanıdır.

**Tablo 2.1. (Devam).**

Household Products Database	<a href="http://hpd.nlm.nih.gov/">http://hpd.nlm.nih.gov/</a>	Ev ürünlerine ait güvenlik formlarını, sağlık etkileri derecelendirmelerini ve kimyasal bilgileri içeren veritabanıdır.
IARC Monograph	<a href="http://monographs.iarc.fr/">http://monographs.iarc.fr/</a>	İnsanlara karşı karsinojenik risklerin değerlendirilmesi üzerine monografları içeren veritabanıdır.
IRIS	<a href="http://cfpub.epa.gov/ncea/iris/index.cfm">http://cfpub.epa.gov/ncea/iris/index.cfm</a>	Çevresel maddeler ve insan sağlığı üzerindeki potansiyel etkileri hakkında elektronik raporların derlemesini içeren veritabanıdır.
ISSCAN	<a href="http://www.iss.it/ampp/dati/content.php?id=233&amp;lang=1&amp;tipo=7">http://www.iss.it/ampp/dati/content.php?id=233&amp;lang=1&amp;tipo=7</a>	Kemirgenlerde (sıçan, fare) uzun süreli karsinojeniklik biyodenyi ile test edilen kimyasal bileşikler hakkında bilgi içeren veritabanıdır.
ITER	<a href="http://www.tera.org/iter/">http://www.tera.org/iter/</a>	600'den fazla çevresel kimyasal için insan sağlığı risk değerleri ve kanser sınıflandırmaları içeren veritabanı.
JECDB	<a href="http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/jsp/SearchPageENG.jsp">http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/jsp/SearchPageENG.jsp</a>	Çevresel kimyasalların toksisite test raporlarını içeren veritabanıdır.
JRC QSAR	<a href="http://ecb.jrc.ec.europa.eu/qsar/background/">http://ecb.jrc.ec.europa.eu/qsar/background/</a>	QSAR çalışmaları içeren veritabanıdır.
LAZAR	<a href="http://www.in-silico.de/">http://www.in-silico.de/</a>	Karaciğer toksisitesi, mutajenite ve karsinojenite için QSAR tahminleri içeren veritabanıdır.
MRTD	<a href="http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/CDER/ucm092199.htm">http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/CDER/ucm092199.htm</a>	1220 farmasötik ürün için maksimum önerilen terapötik doz bilgisi içeren veritabanıdır.
NPIC	<a href="http://npic.orst.edu/">http://npic.orst.edu/</a>	Toksisite dahil olmak üzere pestisitler hakkında bilimsel temelli bilgiler sağlayan veritabanıdır.
NTP	<a href="http://ntp.niehs.nih.gov/">http://ntp.niehs.nih.gov/</a>	Kamu sağlığı açısından ilgi çeken ABD'de kayıtlı ajanların test durumu ve bilgilerini içeren veritabanıdır.

**Tablo 2.1. (Devam).**

Oncology Tools	<a href="http://www.fda.gov/CDER/cancer/oncrefto.htm">http://www.fda.gov/CDER/cancer/oncrefto.htm</a>	Onaylanmış endikasyonlara sahip onaylı kanser ilaçları üzerine veritabanıdır.
PAN Pesticide	<a href="http://www.pesticideinfo.org/">http://www.pesticideinfo.org/</a>	6500 pestisit, insektisit ve herbisit hakkında toksisite, su kirliliği, ekolojik toksisite bilgileri içeren veritabanıdır.
RITA	<a href="http://www.item.fraunhofer.de/reni/public/rita/index.php">http://www.item.fraunhofer.de/reni/public/rita/index.php</a>	Kemirgen karsinojenite çalışmalarını ve tümör verilerini içeren veritabanıdır.
STITCH	<a href="http://stitch.embl.de/">http://stitch.embl.de/</a>	Proteinler ve küçük molekül kimyasallar arasındaki bilinen ve tahmin edilen etkileşimleri keşfetmek için bilgi veritabanıdır.
TEXTRATOX	<a href="http://www.vet.utk.edu/TETRA TOX/index.php">http://www.vet.utk.edu/TETRA TOX/index.php</a>	Tennessee Tarım Enstitüsü. 2400'den fazla endüstriyel organik bileşik için oluşturulmuş veritabanıdır.
TOXNET	<a href="http://toxnet.nlm.nih.gov/">http://toxnet.nlm.nih.gov/</a>	Tehlikeli kimyasallar, çevresel sağlık ve toksik salgımlar üzerine bilgiler içeren veritabanıdır.
ToxRefDB	<a href="http://www.epa.gov/ncct/toxref db/">http://www.epa.gov/ncct/toxref db/</a>	ToxCast programını desteklemek amacıyla pestisitler ve diğer çevresel kimyasallar için standart toksisite test sonuçlarını içeren veritabanıdır.

### 2.1.2. *In Silico* Toksikolojide Kimyasal Temeller ve Kemoinformatik

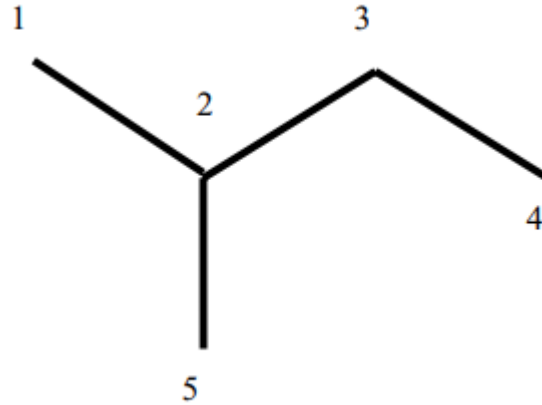
Bir yeni disiplin olan kemoinformatik, son yirmi yıldır varlığını sürdürmektedir. Kemoinformatikle yapılan pek çok aktivite bir molekülün ilgi çekiçi bir kısmı bulunduğunda bu molekül üzerinden türetilebilecek yeni moleküller için bilgi akışını sağlamaktadır. Yine de kemoinformatik “kimyasal bilgi” dediğimiz durumdan fazlası olarak algoritmik gelişmeleri de içermektedir [31].

Thomson 1897 yılında atomu, pozitif elektrik yüklü bir küre içinde negatif parçacıklar olarak modellemiştir; Rutherford 1909’da güneş sistemi modelini, yoğun pozitif yüklü bir çekirdek ile çevrili negatif elektronlarla tanımlamıştır. Son olarak 1920’lerde elektron bulutu modeli tanımlanmıştır. Bu model de bir atom protonlar ve nötronlardan oluşan yoğun bir çekirdek ve etrafında elektronlardan oluşmaktadır. Bir molekül kovalent bağlarla bir arada tutulan elektriksel olarak nötr iki veya daha fazla atom grubudur ve bu grup elektronları paylaşır. Değerlik modeli bir molekülü doğal olarak bir grafa (çizgiye) dönüştürür ve burada düğümler atomları kenarlar ise bağları temsil eder. Bu grafik temsili genellikle 2D kimyasal yapı adını alır. *Graf teorisi*, temel tanımı on sekizinci yüzyılda oluşturulmuş olani başlangıçta kimya aracılığı ile gelişme göstermiştir. Alexander C. Brown ve James J. Sylvester adlı iki bilim insanı molekülleri temsili düğümler halinde bağlar olarak göstermiştir. Kenarlara ise tekli, çiftli, üçlü veya aromatik bağlara göre ağırlık değerleri atanır [32].

Grafiğin yaygın bir temsili, atom sayısına eşit N boyutlu kare bir dizi olan komşuluk matrisidir. Matrisin (I, j) konumu, I ve j atomlarını birleştiren ağıın varlığını veya yokluğunu belirtir ve 1,2,3 ile doldurulur. 4 amit bağları için ve 5 aromatik bağlar için kullanılır. Matris için temsili bir örnek Tablo 2.2.’de gösterilmiştir. Ayrıca yine bir örnek olarak 2-metilbütanın komşuluk matrisinin gösterimi Şekil 2.1.’de verilmiştir. Bu gösterim molekülün bahsedilebilmesini sağlayan temsillerinden sadece biridir.

**Tablo.2.2.** Matris Gösterimi

	C1	C2	C3	C4	C5
C1	0	1	0	0	0
C2	1	0	1	0	1
C3	0	1	0	1	0
C4	0	0	1	0	0
C5	0	1	0	0	0



**Şekil 2.1.** 2- metilbütanın komşuluk matrisinin gösterimi. Matristeki “1” değeri, ilgili karbon atomları arasında bağın varlığını gösterirken, “0” değeri bağ olmadığını göstermektedir. Matris, bağlar bu gösterimde yönlendirilmemiş olduğundan simetriktir.

Yapı Veri Formatı (*Structure Data Format - SDF*) dosyaları molekülü iki blok halinde temsil etmektedir: Atom bloğu ve bağ bloğu. Basitleştirilmiş Moleküler Girdi Doğrusal Kayıt Belirtimi (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification - SMILES*), veritabanı kayıt girişleri için oldukça popüler bir formattır. Moleküler yapıyı kısa bir dizi de temsil eder, bağ ve atomları sıralar, dallar için de parantezler ekler. Hidrojen atomları bu temsile dahil edilmez. Tablo 2.3.'te farklı moleküller için bazı örnekler gösterilmektedir [33]. SMILES moleküllerin yapısını basit ve anlaşılır bir formatta ifade etmek için kullanır. Molekülü bir dizi şekil de temsil ederken bağları, atomları ve dalları anlaşılabilir bir şekilde ifade etmeye odaklanır. Bu nedenle bir molekülün kimyasal yapısını hızlı bir şekilde anlamak için oldukça sık kullanılan bir araçtır. SMILES dizisi kimyasal algoritmalar ve veri analizi için verileri hızlı ve etkili bir şekilde işlemeyi sağlar. SMILES gösterimi, bir molekülün herhangi bir yerden başlanarak kodlanabilmesinden dolayı molekül temsili için aslında bir eksiklidir. Tablo 2.3.'te bulunan etanol için dört adet doğru SMILES dizisi gösterilmektedir. Bu nedenle bir molekülü kodlamak için değişmez bir SMILES gösterimi bulunmaktadır ve bu SMILES gösterimine “kanonik SMILES” denilmektedir. Çizgi gösterimindeki gelişmeler Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (*International Union of Pure and Applied Chemistry - IUPAC*) tarafından desteklenen Uluslararası Kimyasal Tanımlayıcı (*International Chemical Identifier - InChI*) kodlarını ortaya çıkarmıştır. Bu kodlar farklı detay seviyelerinde ki bir molekülü tanımlayabilse de insanların okuması için tasarlanmamıştır. Bunun yanısıra moleküllerin gerçek şekilleri üç boyutludur ve bu şekil de temsil edilmesi gerekmektedir. Tablo 2.3.'de 2-metilbütanın SMILES gösterimi ve 3D konformasyonu gösterilmiştir. Bir molekülün 3D şeklinde tanımlanması, bizi hesaplamalı kimyanın temel yöntemlerini kullanmaya zorlamaktadır [34].

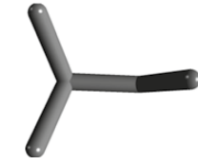
**Tablo.2.3.** 2-metilbutan İçin SMILES, Formül ve Çizgi Gösterimi

SMILES	ADI	FORMÜL	ÇİZGİ GÖSTERİMİ
CC	Ethan	CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	<pre>       H H               H-C-C-H                 H H           </pre>
C=O O=C	Formaldehit	CH <sub>2</sub> O	<pre>       O              H-C-H           </pre>
CCO OCC C(C)O C(O)C	Ethanol	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	<pre>       H H O                 H-C-C-O                 H H           </pre>

a) C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>

b) CCC(C)C

c)

**Şekil 2.2.** 2-metilbütan İçin a) Kimyasal Formül b) SMILES c)3D Konformer Yapı Gösterimi (Çizgi gösterimleri için ChewDrawer programı kullanılmıştır.)



### 2.1.3 Bilgisayar Destekli Kimya (Hesaplamalı Kimya)

Bilgisayar destekli kimya ya da hesaplamalı kimya, kimyasal problemleri çözenin yanısıra katıların, sıvıların elektronik yapısını incelemeye ve yeni maddeler ile ilaçlar tasarlamaya yardımcı olmak için bilgisayarları kullanan bir kimya alt dalıdır. Teorik kimyanın sonuçları, programlara dahil edilerek moleküllerin yapılarını ve özelliklerini hesaplamak için kullanılır. Bu yöntemler hem statik hem de dinamik durumları kapsar; doğru yöntemler “*ab initio* yöntemler” ve daha az doğru yöntemler –yarı deneysel yöntemler- olarak adlandırılır. Bu alanda son 50 yılda önem arz eden gelişmelerin sıralaması şu şekil de özetlenebilir:

- 1) İlk yarı deneysel atomik orbital hesaplamaları 1950’lerin başında yapılmıştır.
- 2) İlk *ab initio* hesaplamaları 1956’da MIT’de gerçekleştirilmiştir.
- 3) 1998 yılında Kimya Nobel Ödülü, Hesaplamalı Kimya alanına katkılarından dolayı John People ve Walter Kohn’a verilmiştir.
- 4) 2013 yılında Kimya Nobel Ödülü, karmaşık kimyasal sistemler için çok ölçekli modellerin geliştirilmesi nedeniyle Martin Karplus, Michael Levitt ve Arieh Warshel’e verilmiştir.

Hesaplamalı Kimya bilimsel problemleri yalnızca doğrudan deneyimlere dayanarak çözüme olan gelenekselleşmiş yaklaşımdan uzaklaşmanın bir yolu olsa da deneyimlemeyi tamamen ortadan kaldırmamaktadır. Teorinin burdaki rolü, tüm bu yeni verileri matematik kurallarına dayalı bir çerçeveye oturtmaktan geçmektedir. Hesaplamalı kimya gerçek deneylere benzer bir şekilde teorileri kullanarak yeni gerçekleri üretmektedir. Artık bir deneyi laboratuvar ortamında gerçekleştirmeden bilgisayar üzerinde simüle etmek mümkün hale gelmektedir. Kimyasal süreçleri modellemek için zaman ve sıcaklık olmak üzere iki değişken önemlidir. Dinamik simülasyonlar yapmak ve atomlar arasındaki kuvvet alanlarını modellemek, bağların kırılmasını açıklamak için gereklidir. Ampirik parametrelerin tanıtılmadan yapılan temel özelliklerin incelenmesine “*ab initio* yöntemler” denir. Bu hesaplamalar molekülün elektronik ve yapısal özelliklerini mutlak sıfır sıcaklıkta incelemeyi içermektedir [35].

#### 2.1.4. Moleküler Simülasyon

Bilgisayarları kullanarak ara moleküler kuvvetleri hesaplamak ve moleküllerin kuvvet geçmişini hesaplamak mümkündür. Bu geçmiş istatistiksel mekaniğin yöntemleri ile analiz etmek, maddenin davranışı hakkında detaylı bir açıklama sağlamaktadır. Üç teknik mevcuttur:

- Moleküler Dinamik Simülasyonu (MDS): Bu teknikte moleküller arasındaki kuvvetler açıkça hesaplanmaktadır ve moleküllerin hareketleri sayısal entegrasyon yöntemleri kullanılarak hesaplanır. Başlangıç koşulları atomların pozisyonları ve hızlarıdır. Newton'un denklemlerine göre atomların başlangıç pozisyonları hızları ve kuvvetlerinden hesaplanabilir. Yeni pozisyonlardan başlayarak kuvvetler tekrar hesaplanır. Molekülün bir önceki pozisyonunun kaydı tutularak yeni pozisyonlara doğru ilerlenir ve her hesaplama döneminde sıfırdan bir pozisyon hesabı yapmaya gerek kalmaz. Bu durum simülasyonda ki hesaplama için geçen sürenin önemli bir ölçüde azaltılmasına fırsat verir.
- Monte Carlo Simülasyonu (MCS): Moleküler dinamik yöntemine benzer şekilde bir sistemde ki moleküllerin geçmişi oluşturulur ve ardından istatistiksel yöntemler kullanılarak sistemin genel özellikleri hesaplanır. MDS'den farklı olarak atomların rastgele konum ve hızları termodinamikle beraber entegre edilerek anlamlı konfigürasyonlar çıkartılmaya çalışılır.
- Moleküler Mekanik Modelleme (MM): Karmaşık moleküllerin yapılarını deneysel olarak elde edilen potansiyel enerji fonksiyonunun veya kuantum kimyasının yöntemleriyle elde edilen enerji fonksiyonunun enerji minimizasyonu temel alarak tahmin etme yöntemidir. Enerji minimizasyon yöntemi, yakınsama hızını optimize etmek için gelişmiş bir algoritmadır. Yöntemin temel avantajı, hesaplama açısından daha ucuz olmasıdır [36].

## 2.2. Toksikoloji için Biyolojik Modeller ve Biyoanalizler

Kimyasalların akut sistemik oral, dermal ve inhalasyon toksisiteyi, cilt ve göz irritasyonu ve cilt duyarlılaştırma potansiyelinin değerlendirilmesi, dünya çapındaki düzenleyici prosedürler kapsamında gereklidir. Akut oral ve inhalasyon toksisite testlerinin zorunluluklarının atlanmasına olanak veren bu testler, gereksiz *in vivo* çalışmaların önüne geçmek için kullanılabilir. *In vitro* irritasyon modellerinin daha yaygın kabul görmesi ve düzenleyici kuruluşların ihtiyaçlarını karşılamak için kullanılması gerekmektedir [37]. Kimyasalların ve kimyasal karışımların akut oral, dermal ve inhalasyon toksisiteyi, deri ve göz irritasyonunu ve cilt duyarlılık potansiyellerini değerlendirmek için gerçekleştirilen *in vivo* toksikolojik testler, dünya genelinde ki düzenleyici kurumlar tarafından maddelerin sınıflandırılması, etiketlenmesi, risk değerlendirmesi ve risk yönetimi amaçlarıyla halk sağlığını korumak için zorunludur. Ancak akut toksisite çalışmalarında elde edilen bazı verilerin değeri özellikle aynı madde için birden fazla maruz kalma yolu ve birden fazla tür varsa sınırlı olabilir. Akut toksisite testleri, dünya genelindeki düzenleyici kurumlar tarafından zorunlu tutulmaktadır. Bu testlerin ana amacı, kimyasalların ve kimyasal preparatların tehlikeli özelliklerine dayalı olarak sınıflandırılması ve etiketlenmesidir. Ancak belirli akut çalışmalarından elde edilen veriler, risk değerlendirmesi ve risk yönetimi unsurlarına da katkıda bulunmaktadır. Sınıflandırma ve etiketleme gerektiren maddeler arasında endüstriyel kimyasallar, biyositler, aktif pestisit bileşenleri ve nihai formülasyonlar, izole edilmiş ilaç ara ürünleri, yeni gıda katkı maddeleri, kozmetik bileşenler ve tüketici ürünleri yer almaktadır. Dünyadaki yasalar, gereksinimleri ve geniş tehlike kategorileri açısından biraz farklılık gösterse de, akut toksisite testlerinin temel amacı maddelerin potansiyel tehlikelerine ve toksisiteye neden olan doza göre kategorize edilmesini sağlamaktır [38].

Test gereksinimleri uluslararası düzey de değişiklik gösterebilir ve aynı zamanda düzenlenen kimyasalın türüne de bağlıdır. Örneğin, AB ve ABD'deki pestisitler için düzenlemeler, oral, dermal ve inhalasyon yollarıyla akut sistemik toksisite, ayrıca deri ve göz irritasyonu ve cilt duyarlılık potansiyeli için verilerin üretilmesini gerektirir. Ancak endüstriyel kimyasallar için AB'nin REACH düzenlemesi (Kimyasalların Kaydı, Değerlendirilmesi, İzni ve Kısıtlanması), ilgili kimyasalın üretim hacmine bağlı olarak gerekli toksikolojik bilgileri belirtir. Yılda bir tondan fazla üretilen tüm kimyasallar için akut oral toksisite çalışması ve cilt duyarlılık potansiyelinin değerlendirilmesi, ayrıca cilt irritasyonu ve korozyonu ile göz irritasyon potansiyeli için *in vitro* çalışmalar gereklidir. Yıllık üretim hacmi on tondan fazla olan kimyasallar içinse ikinci bir maruz kalma yoluyla akut toksisite testi ve *in vivo* cilt ve göz irritasyonu testi de gereklidir [39].

### 2.2.1. Akut Oral Toksisite Testi

Akut sistemik toksisite testi, belirli bir yolla (oral, dermal veya inhalasyon) kısa süreli maruziyet sonrası ortaya çıkabilecek olumsuz sağlık etkileri hakkında bilgi sağlamak için gereklidir. Birçok kimyasal için önemli sistemik maruziyete yol açabilecek en olası yol oral olabilir. Bu tür maruziyetler kazara veya kasıtlı olabilir.

Akut oral toksisite verileri, bir kimyasalın oral maruziyetine karşı olası sonuçları uyarıcı bir sınıflandırma ve etiketleme sağlamak için dünya çapındaki birçok düzenleyici çerçeve kapsamında yaygın bir gerekliliktir. Akut oral toksisite testi, tek bir doz (veya 24 saatlik bir süre içinde birden fazla doz sonrasında bir test grubundaki hayvanların yarısını öldüren medyan dozu (ölümcül doz (LD50)) belirlemek amacıyla tasarlanmıştır ve bu sayede maddeler arası da basit bir nokta tahmini ile sayısal karşılaştırma yapılmasına ve etkinlik sıralaması yapılmasına olanak tanır. 1981 yılına gelindiğinde LD50 testi, gereken hayvan sayısını azaltmak için değiştirilmiş ve yeni bir OECD test yönergesi olan TG 401 haline getirilmiştir [40]. Tarihsel veriler kullanılarak, LD50'yi belirlemek için grup başına en az 5 hayvandan oluşan üç doz grubu seçilmiştir. Ayrıca gereksiz hayvan kullanımını sınırlamak için bu yeni yönergeye 5000 mg/kg üst doz limiti getirilmiştir. 1987 yılında yöntemin daha da iyileştirilmesiyle sadece tek bir cinsiyetin kullanılması, diğer cinsiyette

sadece LD50 dozunda test yapılması ve limit testinin olağanüstü durumlar dışında 2000 mg/kg'a düşürülmesi sağlanmıştır. 1981 OECD test yönergesinin uygulanmasından kısa bir süre sonra, İngiliz Toksikoloji Derneği'nin (*British Toxicology Society - BTS*) bir çalışma grubu, daha az sayı da hayvan kullanarak ve ölüm yerine belirgin klinik toksisite belirtilerinin gözlemlenmesiyle LD50'nin tahmin aralığını sağlayan yeni bir akut oral toksisite değerlendirme yöntemi önermiştir [41]. Önerilen yöntem, bileşiklerin Avrupa Birliği sınıflandırma sistemine göre sıralanması ve sınıflandırılması amacıyla doğrulanmıştır [42]. Yeni test yönergesi, Düzeltilmiş Doz Prosedürü (*Fixed Dose Procedure - DDP*) [43], 1992 yılında kabul edilmiştir ve LD50 testine ilk kabul edilen alternatif olmuştur. Bunu takiben, hayvan sayısını azaltmayı amaçlayan iki yöntem daha, Akut Toksik Sınıf (*Acute Toxic Class - ATS*) [44] ve Yukarı ve Aşağı Prosedürü (*Up – and – Down - YAP*) [45] kabul edilmiştir. Çoğu Sabit Doz testinin 5-7 hayvan kullanılarak tamamlanacağı belirtilmiştir. ATS yöntemi ortalama 7 hayvan ve YAP ise yaklaşık 6-9 hayvan kullanmaktadır. Bu son iki yöntem de LD50 tahminini belirlemek için ölüm veya yaklaşan ölümü bir son nokta olarak kullanılmaktadır. Sonuç olarak, 1970'lerden bu yana toksisite testleri için kullanılan hayvanların büyük bir kısmı akut toksisite testlerince kullanıldığından, test başına hayvan sayısı yaklaşık 100'den 5-9'a kadar dramatik bir şekilde azaltılmıştır [46].

### 2.2.2. Akut Oral Testlerinin İyileştirilmesi

Yukarıda belirtildiği gibi, akut oral toksisite için tehlike sınıflandırması ya LD50 tahminiyle ya da belirgin toksisite üreten doza dayanır. Bu bir test maddesinin uygulanmasından sonra açık toksisite belirtileri gösteren dozu ifade eder. Bu nedenle, bir sonraki en yüksek doza artışın ciddi toksik belirtilerin gelişmesine ve muhtemelen ölüme yol açması beklenir [46]. ATS ve YAP, ölüm veya yaklaşan ölümü bir son nokta olarak kullanır. Ölmek üzere olan veya açıkça acı içinde olan ve şiddetli ve kalıcı sıkıntı belirtileri gösteren hayvanlar, insancıl son noktalar hakkında ki bir OECD rehber belgesince belirtildiği gibi, insancıl bir şekilde öldürülmelidir ve insancıl bir şekilde öldürülen hayvanlar tedaviye bağlı ölümler olarak kabul edilir [47]. Bazı bölgelerde, belirgin klinik toksisite belirtilerinin ölümden ziyade tanımlanması ile ilgili algılanan daha büyük

belirsizlik nedeniyle DDP, ATS yönteminden daha az yaygın olarak kullanılır. Ayrıca, ölümcül olmayan son noktanın kullanılmasının, yalnızca klinik belirtilere dayalı olarak toksisitenin fazla tahmin edilmesine yol açabileceği endişesi vardır. Bununla birlikte, ölüm yerine toksisiteye neden olan dozlar hakkında bilgi, risk değerlendirmesi ve yönetiminde muhtemelen daha büyük değere sahiptir ve akut toksisite durumlarında insanlarda ki belirtilerin tahmin edilmesi, önlenmesi, tanınması ve tedavisini destekler. Ayrıca deneysel ve diğer bilimsel amaçlar için hayvanların kullanımı konusunda Avrupa yönergesi de dahil olmak üzere birçok düzenleyici kılavuz, hayvanlar üzerinde test yapılmasının gerekli olduğu durumlarda, en az şiddet içeren yöntemin seçilmesini gerektirir [48].

### 2.2.3. Deneysel Hayvanları ile Yapılan Akut Toksikite Testlerinin Yerine Geçilmesi

Akut oral toksisite testlerinin de hayvan kullanımını azaltmak veya yerine başka yöntemler kullanmak için birçok yaklaşım önerilmiştir. Bu yaklaşımlardan biri, akut toksisitenin bir dizi biyokinetik, hücresel ve moleküler elemana ayrılabilmesi ve her birinin uygun model sistemlerince tanımlanıp nicelendirilebileceği varsayımına dayanan kademeli *in vitro* testlerin başlatılmasıdır [49]. ABD Ulusal Toksikoloji Programı (*National Toxicology Program - NTP*) ve Alternatif Yöntemlerin Değerlendirilmesi İçin Kurumlararası Merkezi (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods - NICEATM*) akut oral toksisite testinin yerine geçecek iki adet önerilen *in vitro* sitotoksikite yöntemini değerlendirmiştir. 3T3 (fare fibroblastları) nötral kırmızı alımı yöntemi (NRU) ve NHK (insan keratinositleri) yöntemi, sitotoksikite değerlendirmelerinin de yaygın kullanımları nedeniyle seçilmiştir. Çalışma 3T3, NHK ve NRU test yöntemlerinin, düzenleyici tehlike sınıflandırması amacıyla akut oral toksisiteyi tahmin etmek için bağımsız yöntemler olarak kabul edilebilir doğru sonuçlar vermediğini göstermiştir. Ancak bu çalışma da test edilen referans maddeler için yapılan bilgisayar simülasyonlarına dayanarak, bu iki *in vitro* bazal sitotoksikite test yönteminden birinin, birçok bileşiğin kemirgenler üzerinde ki akut oral toksisite testleri için başlangıç dozlarının seçiminde kullanılabileceğini gösterilmiştir. Bu durum ciddi toksisite nedeniyle ölen veya insancıl bir şekilde öldürülen hayvanların sayısını azaltabilmiştir [50].

### 2.2.4. 3R Prensibi

Toksisite testleri endüstriyel kimyasallar, ilaçlar ve tüketici bakım ürünleri gibi çeşitli maddelerin güvenliğini veya tehlikelerini değerlendirmek için yapılır. Mevcut toksisite test yöntemlerinin birçoğu laboratuvar hayvanlarının kullanımını içersede, son otuz yılda daha az hayvan kullanma ve biyolojik bilimlerde yeni seçenekler sunabilecek yeni yöntemler gerçekleştirme eğilimi olmuştur. Alternatif testler, hayvan kullanımını azaltan, iyileştiren ve yerine geçen yöntemlerdir [51]. Azaltma, iyileştirme ve yerine koyma yaygın olarak "Alternatiflerin 3R'si" olarak adlandırılır ve bunlar ilk olarak William Russell ve Rex Burch (1959) tarafından "İnsancıl Deneysel Teknik İlkeleri"nde tanımlanmıştır [52]. Bu alternatiflere Rehabilitasyon eklenmesi ile 4R olarak da adlandırılmaktadır [53]. Son yıllarda "Tekrar Kullan" prensibinin eklenmesi ile 5R olarak da anılmaktadır [54].

#### A. Reduction (Azaltma)

Azaltma, geçerli sonuçlar elde etmek için gerekli bilimsel uygulamalarla tutarlı kalarak bir test yöntemi için gereken hayvan sayısını azaltmaktır. Bu durum iyi bir deneysel tasarımla değişkenlerin sayısını azaltılması, genetik olarak homojen hayvanların kullanılması veya deneyin koşullarının titizlikle kontrol edilmesi sağlanarak başarılabılır [55].

LD50 testi, ilk olarak 1927'de Trevan tarafından insan kullanımını için tasarlanan maddelerin test edilmesi amacıyla tanıtılmıştır. Bu test, bir maddeyi test grubunda ki hayvanların yarısını öldüren tek bir ölümcül dozu belirlemeyi amaçlamıştır. Zamanla kimyasalların toksisitelerini karşılaştırmak ve sınıflandırmak için genel olarak kabul görmüş ve yeni ilaçlar, gıda katkı maddeleri, kozmetik bileşenler, ev ürünleri, endüstriyel kimyasallar ve pestisitlerle ilgili çeşitli düzenleyici kurumlar tarafından zorunlu bir test haline gelmiştir. Her bir maddenin her biri için o dönem de 100'e kadar hayvan (genellikle sıçan ve ikinci bir tür gerektiğinde fare) kullanılmasını gerektiriyordu [56]. OECD'nin 1981 tarihli akut oral toksisite kılavuzu, her cinsiyet için her bir doz grubunda beş hayvanın kullanılmasını gerektirmiş ve test için üç doz grubu seçilmiştir. Ayrıca üst doz

seviyesi sınırı olarak 5000 mg/kg'lık bir limit de getirilmiştir [40]. Temel olarak toksik olmayan maddeler için bir "Limit Testi" konsepti de dahil edilmiştir. Benzer kılavuzlar akut dermal [57] ve inhalasyon [58] toksisitesi için de yayımlanmıştır. LD50 testi, uzun yıllar süren tartışma ve görüşmelerin ardından 2002 yılında sonunda yürürlükten kaldırılmıştır. LD50'nin kaldırılmasının ardından, "DDP", "ATS" ve "YAP" adlı üç alternatif hayvan testi tanıtılmıştır. Bu testler, hayvan refahında önemli iyileştirmeler sağlamıştır. Son zamanlarda, bilimsel performanslarını iyileştirmek ve düzenleyici kuruluş tarafından kabulü artırmak amacıyla revize edilmişlerdir. Bu özel testlerin yanı sıra, *in vitro* sitotoksosite testleri, doz seviyesi seçimini iyileştirmek ve böylece kullanılan hayvan sayısını azaltmak için kullanılabilir [59]. OECD tarafından onaylanmış Akut Oral Toksikite Kılavuzları Tablo 2.4.'te karşılaştırılmıştır.

**Tablo.2.4.** OECD Akut Oral Toksikite Rehberlerinin Karşılaştırılması [3]

<b>Klavuz</b>	<b>TG 420 (2001)</b>	<b>TG 423(2001)</b>	<b>TG 425(2001)</b>
<b>Metot</b>	DDP	ATS	YAP
<b>Ana Son Nokta</b>	Açıkça Görülen Toksikite	Ölüm	Ölüm
<b>Ana Hedef</b>	LD50 Aralık Tahmini	LD50 Aralık Tahmini	LD50'nin Nokta Tahmini ve Güven Aralıkları
<b>Kullanılan Veri</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sınıflandırma ve Etiketlendirme</li> <li>Risk Değerlendirmesi</li> <li>Tekrarlanan doz çalışmaları için doz seçimi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sınıflandırma ve Etiketlendirme</li> <li>Risk Değerlendirmesi</li> <li>Tekrarlanan doz çalışmaları için doz seçimi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sınıflandırma ve Etiketlendirme</li> <li>Risk Değerlendirmesi</li> <li>Tekrarlanan doz çalışmaları için doz seçimi</li> </ul>
<b>Test Edilen Hayvan Sayısı</b>	5 Hayvana Kadar	6 Hayvana Kadar	5 Hayvana Kadar
<b>Gözlem Çalışması</b>	Her doz adımında 1 hayvan	-	-
<b>Ana Çalışma</b>	Her doz adımında 5 hayvan	Her doz adımında 3 hayvan	Her doz adımında tek hayvan
<b>Limit belirlenmemiş bir çalışmada kullanılan ortalama hayvan sayısı</b>	5 – 7	7	6 - 9



### a. Düzeltilmiş Doz Prosedürü

DDP, ilk kez 1984 yılında İngiliz Toksikoloji Derneği tarafından önerilmiştir ve akut oral toksisite testi olarak kabul edilmiştir. Bu yöntem, eski LD50 testi ile karşılaştırıldığında benzer sonuçlar üretirken daha az hayvan kullanılmasını ve daha az acı ve sıkıntıya neden olur. Hem ulusal hem de uluslararası doğrulama çalışmalarının ardından 1990 yılında yayınlanmıştır [42]. Bu yeni test, gereken hayvan sayısını 30'dan 20'ye indirmiştir. Sonuç olarak, 1992 yılında OECD tarafından OECD Test Kılavuzu 420 altında LD50 testine alternatif olarak önerilmiştir [60]. Bu prosedürde, test maddesi beş erkek ve beş dişi sıçana oral olarak dört sabit doz seviyesinden birinde (5, 50, 500 ve 2000 mg/kg) verilir. Amaç, ölümcül olmayan açık belirtiler üreten en düşük dozu belirlemektir. Çıktılar LD50'nin aralık tahmini, akut toksisite belirtilerinin tahmini ve hedef organları tahmin etmektir. İlk testin sonuçlarına bağlı olarak ya daha fazla test gerekmez ya da daha yüksek veya daha düşük bir doz uygulanır. Eğer ölüm meydana gelirse, daha düşük bir doz seviyesinde yeniden test yapılması gerekmektedir. Başlangıç dozunda toksisite belirtileri görülmezse, daha yüksek bir doz seviyesinde yeniden test yapılması gereklidir. Sonuçlar böylece hayatta kalma ve açıkça görülen toksisite ile ilişkilendirilir. DDP, maddelerin LD50 değerlerine dayanarak klasik akut oral toksisite testlerinden elde edilen sonuçlara genel olarak uyumlu bir şekilde, onları Avrupa Birliği sınıflandırma sistemi doğrultusunda sıralayabilecek sonuçlar sağlayabilmektedir [49].

## b. Akut Toksik Sınıf Metodu

Ağızdan uygulanan ATS yönteminin geliştirilme amacı, bir kademe test prosedürüne dayanarak ve her adımda bir cinsiyetten üç hayvanın kullanımıyla, oral LD50 testinin kullanımını önemli ölçüde azaltmaktır [61]. Bu test yönteminin prensibi, hayvan deneyleri başlatılmadan önce biyometrik hesaplamalarla değerlendirilmiştir ve bu ilk kez yapılan bir uygulamadır. ATS yönteminin biyometrik hesaplamaları, sadece AB sınıflandırma kategorileri için değil, aynı zamanda şu an da kullanılan çeşitli ülkeler ve organizasyonların sınıflandırma kriterleri için de yapılmıştır. Oral ATS yöntemi, ulusal ve uluslararası bir halka çalışmasıyla hayvan deneyleri ve biyometrik değerlendirmelerle doğrulanmıştır [62, 63]. Biyometrik değerlendirmeler ile hayvan deneyleri sonuçları arasında mükemmel bir uyum belgelenmiş ve LD50 testine kıyasla %70'e kadar daha az hayvan kullanılmıştır. Ölüm oranına bağlı olarak her doz seviyesinde altı hayvan kullanılmaktadır. OECD, 1996 yılında ATS yöntemini LD50 testine alternatif olarak kabul etmiş ve kılavuzu 2001 yılında yayınlamıştır[44]. ATS yöntemi Almanya'da başarıyla kullanılmış ve 2003 yılında tüm akut oral toksisite testlerinin % 85'inden fazlası oral ATS testleri olarak gerçekleştirilmiştir. AB üye devletlerinde, tüm yapılan testlerin %50'sinde ATS yöntemi kullanılmaktadır [63]. ATS yöntemi ayrıca sabit doz seviyeleri kavramını kullanır ancak temel bir son nokta olarak da "ölümlülük" kullanır. Oral ATS yöntemi, her adımda bir cinsiyetten üç hayvanın kullanıldığı bir kademe test prosedürüdür. Yeni çalışma protokolünün geliştirilmesi sırasında, başlangıç dozları (25, 200 veya 2000 mg/kg vücut ağırlığı) o zamanki AB sınıflandırma sınırlarından seçilmiştir [64] ve daha sonra Küresel Uyumlu Sınıflandırma ve Etiketleme Sistemi (GHS) sınırlarına dayanarak 5, 50, 300 veya 2000 mg/kg vücut ağırlığı olarak değiştirilmiştir [3, 65].

### c. Yukarı ve Aşağı Prosedürü

YAP, LD50 akut toksisite testi için başka bir alternatif yöntemdir. Klasik LD50 prosedürüne kıyasla YAP, LD50 ve aynı zamanda çeşitli diğer indekslerin LD50 değerlerinin belirlenmesi için gereken hayvan sayısını önemli ölçüde azaltmaya izin verir [66]. LD50 tahmin etmek için YAP deneysel tasarımının çeşitli varyasyonları bulunmaktadır. Bu prosedür de hayvanlara bir kez doz verilir. Bir hayvan hayatta kalırsa, bir sonraki hayvan için doz artırılır; eğer hayvan ölürse, doz azaltılır (33). Sıçanlar üzerinde yapılan 48 akut toksisite testinin bir incelemesi, hayvanların büyük çoğunluğunun 1 veya 2 gün içinde öldüğünü göstermiştir. Bu nedenle, bu prosedürde her hayvanın doz verilmeden önce 1 veya 2 gün gözlemlenmesi gerekmektedir. Ayrıca hayatta kalan hayvanların 7 gün boyunca gecikmiş ölüm açısından izlenmesi önerilmektedir. Anket çalışmalarında dişilerin genellikle daha hassas olduğu göz önüne alındığında, testler genellikle sadece dişilerde yapılmalıdır, ancak bazen erkekler için seçmeli izleme gerekebilir. Bu yöntem, daha uzun sürelerde ölümlerin gözlemlendiği materyaller için önerilmemektedir [67]. YAP ile elde edilen "etkin doz 50 (ED50)" değerleri, geleneksel en küçük kareler doğrusal regresyon yöntemi kullanılarak elde edilen doz-tepki deneyleri ile neredeyse aynıdır. YAP'ın başlıca faydası, ED50 değerlerini belirlemek için gereken hayvan sayısını önemli ölçüde azaltmasıdır. Hayvan refahı endişesi yanı sıra, özellikle cerrahi prosedürler gerektiğinde hayvan, işgücü ve malzeme maliyetlerinde önemli tasarruflar sağlanabilir. YAP, özellikle analjeziklerde ED50 değerlerini belirlemek için kullanılabilir ve tam doz-tepki çalışmalarında gereken hayvan sayısından daha az sayıda hayvan kullanır [3, 68].

## B. İyileştirme (Refinement)

"İyileştirme" alternatifinin bakış açısı, hayvanlara daha az acı veya sıkıntı getiren prosedürlerin kullanılmasıdır [69]. Yerine koyma alternatifi, hayvan deneylerinde genel olarak acıyı azaltmayı gerektirir ve "hayvanların hayatlarının herhangi bir zamanında tecrübe ettikleri gerçek veya potansiyel acı, sıkıntı ve diğer olumsuz etkileri önleyen veya en aza indiren ve onların refahını artıran herhangi bir yaklaşım" olarak tanımlanır. Bilimsel topluluk genellikle sağlık ve tıp bilgisini ileriye taşımak için hayvan deneylerinin gerekliliğini kabul etse de, hala test ederken hayvanları iyileştirmeye yönelik alternatiflerin gerekliliğini vurgular. Acı veya sıkıntının ortadan kaldırılması ve potansiyel olarak acı veya sıkıntıya neden olabilecek bir çalışmada erken müdahale noktalarının belirlenmesi, iyileştirmenin güzel örnekleridir. İyileştirme, sonuçların daha az değişkenlik göstermesini ve iyileştirilmesini sağlayacaktır [3].

Hayvanlarda acı ve sıkıntıyı azaltmak için kullanılan birkaç yöntem bulunmaktadır:

- a. **Uygun Çevre Sağlama ve Psikolojik Sıkıntıyı Azaltma:** Psikolojik sıkıntının azaltılması, iyileştirmenin diğer bir amacıdır. Endişeli bir hayvan, kullanışlı laboratuvar verisi sağlamayacaktır. Bu yüzden araştırmacılar hayvanın ve başarılı deneyin çıkarları için stresi en aza indirmelidirler. Bu amacı gerçekleştirmenin bir yolu, hayvanların işbirliği yapmaları durumunda ödüllendirilmesidir. Bu sadece hayvanlara potansiyel stresin azaltılmasına yardımcı olmakla kalmaz, aynı zamanda kan basıncı ve kalp hızında ki değişikliklerle gösterilen stresin azalmasıyla elde edilen verilerin kalitesini artırır [70]. Hayvan refahını artırmak için başka bir yöntem de, hayvanların özel ihtiyaçlarını karşılayan bir ortam sağlamaktır [71]. Hayvanların aslında neye önem verdiğini tahmin etmek oldukça zordur. Fareler yuva yapmayı sevdiği gibi, primatlar da ahşap oturaklardan hoşlanır. Tutsaklıkta doğal davranışlarını sergileyebilmeleri hayvanların refahı için kritik öneme sahiptir. Eğer bu davranışsal ihtiyaçlar karşılanmazsa, hayvanlar zihinsel ve fiziksel stres yaşayabilirler, bu da yapılan deneylerin sonuçlarını olumsuz etkileyebilir [72].

- b. Ağrı Kesicilerin Uygulanması:** Ağrı temel olarak subjektif bir deneyimdir. Bu nedenle, hayvan teknisyenleri ve diğer ilgili personelin, hayvanlardaki rahatsızlık veya ağrıyı tespit etmek için eğitilmiş olmaları önemlidir. Hayvanların davranışlarına ve klinik ağrı belirtilerine dayanarak bu konuyu doğru bir şekilde değerlendirmeleri gerekmekte olup bu değerlendirme genellikle zorlu bir görevdir. Genelde bir prosedürün insanlarda ağrıya neden olabileceği varsayılır ve bu durum da hayvanlarda da benzer ya da daha fazla ağrıya yol açabileceği düşünülür. Bu nedenle, araştırmacıların amacı mümkün olduğunca ağrının oluşmasını önlemektir, bu da mümkün olduğunda ilaç kullanımıyla sağlanır. Anestezi, analjezikler ve diğer tedavi önlemlerinin uygun kullanımı invaziv çalışmalarda hayati önem taşır. İlaç uygulaması sırasında hayvanları advers etkiler açısından yakından izlemek, hafif değişiklikleri tespit etmeye yardımcı olabilir. Modern anestezi ilaçları, yalnızca daha iyi anestezi sağlamakla kalmaz (örneğin, daha iyi kas gevşemesi, öngörülebilir etki süresi, daha az tahriş, daha az fizyolojik yan etki), aynı zamanda daha güvenlidir ve daha az hayvan kaybına yol açar. Trankilizanlar da deneyler sırasında hayvanları sakinleştirerek rahatlatılabilir [73]. Ancak ağrıyı hafifleten ilaçların test edilen ilaçla etkileşime girebileceğini ve yanlış sonuçlara yol açabileceğini unutmamak önemlidir. Bu nedenle genellikle araştırmanın en iyisi ağrıyı mümkün olduğunca azaltmaktır [69].
- c. Teknolojinin Kullanımı:** Daha az invazif teknolojilerin kullanımı, hayvan üzerinde hem fiziksel hem de psikolojik rahatsızlığı en aza indirdiği için bir rafine teknik olarak kabul edilir. Örneğin, ultrason ve Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG), bu tür rafine teknikler arasında yer alabilir [69].

- d. Yetiştirme:** Geçmişte hayvanlar genellikle tek başlarına küçük kafeslerde tutulmakta ve bu durum genç tavşanların kas ve kemiklerinin olgunlaşma sürecinde sıçrayamamalarına ve iskelet anormallikleri geliştirmelerine yol açmaktaydı. Çoğu araştırma hayvanı sosyal davranış gösterir ve izolasyon onları strese sokabilmektedir. Hayvanların genellikle sosyal gruplar halinde ve normal davranışlarını sergileyebilecekleri karmaşık ortamlarda tutulması önerilmektedir. Bu tür bir yetiştirme yönteminin faydalı etkilerini belgeleyen birçok rapor bulunmaktadır. Örneğin, sosyal ve fiziksel olarak zenginleştirilmiş bir ortam da yaşayan fareler, izole edilenlere kıyasla daha kalın bir beyin korteksine ve daha fazla dendrit bağlantısına sahip olabilirler [71].
- e. Daha Önce Kullanılan Kan Örnekleme Tekniklerine Alternatif Uygulamalar:** Her ne kadar bazı küçük türlerin (özellikle kemirgenlerin) retro-orbital sinüsü oldukça büyük kan numunelerinin toplanması için uygun bir bölge olsada, prosedürün riskleri bulunmakta olup (örneğin, numuneler tekrar tekrar alınırsa göz zarar görebilir) prosedür hayvan için acı verici olabilmektedir. Kuyruk damarından, Safen damarından ve şah damarından örnekleme dahil olmak üzere çeşitli alternatifler geliştirilmiştir. Bunları verimli bir şekilde gerçekleştirmek için biraz beceri gerekmesine rağmen, hayvana ciddi zarar verme riski büyük ölçüde azalır [74].
- f. İnsancıl Öldürme:** Hayvanların ölmeden önce insanca öldürülmesi, daha anlamlı bilimsel sonuçlar sağlar [75].

### C.Replacement (Yerine Koyma)

"Replacement" ilkesi, hayvanların yerine alternatif sistemlerin kullanılması veya canlı hayvanların filojenetik olarak daha alt türlerinin kullanılması anlamına gelmektedir. Tüm yaklaşımlar arasında, hayvanların yerine alternatif tekniklerin kullanılması gelecekteki araştırmalar için önemli bir potansiyel oluşturmaktadır. "Yerine Koyma" tam, kısmi veya görelidir. Tam yerine koyma durumunda hayvan kullanımına gerek yoktur ve *in vivo* yöntem tamamen *in vitro* yöntemle değiştirilir. Kısmi yerine koymada ise, *in vitro* testlerden sonra en az bir onaylama çalışması hayvanlar üzerinde gerçekleştirilmelidir. Görelidir yerine koyma ise hayvanların insancıl bir şekilde öldürülmesiyle elde edilen *ex vivo* dokular/organlar kullanılarak *in vitro* çalışmalar yapılmasıdır [76]. Yüksek sınıftaki hayvanların, düşük türler veya hücre kültürleri/dokuları ile değiştirilmesi, şu anda kimyasalların lokal toksisite, genotoksisite, çeşitli tarama testleri gibi tehlike belirleme süreçlerinde, kozmetik hammaddeler ve ürünlerin testlerinde, aşıların kalite kontrolü ve etkinlik testlerinde, monoklonal antikor üretiminde kullanılmaktadır [3, 76]. "Yerine Koyma" ilkesi aşağıdaki şekillerde uygulanabilir:

#### a.Daha Düşük Hayvanlarla/Türlerle Yer Değiştirme

Kabul edilmektedir ki, birçok temel süreç omurgasızlar da dahil olmak üzere geniş bir organizma yelpazesinde ortaktır. Omurgalıları ve yüksek hayvanları yerine geçebilecek bir alternatif olarak, daha düşük duyu kapasiteli hayvanların kullanımı düşünülebilir. Omurgasızlar, yüksek hayvanların araştırma konusu olarak değiştirilmesinde kabul edilebilir bir yöntem olarak özellikle değerlendirilir [3]. Örneğin, *Caenorhabditis elegans* adlı nematod, temel sinirsel işlevleri incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu organizmanın sinir sisteminde 302 nöron bulunmaktadır, bu nedenle her bir nöronun işlevini ve diğer nöronlarla etkileşimini incelemek için uygun bir model olarak görülmektedir [77]. Benzer şekilde, genetik alanında araştırmacılar yıllardır meyve sineklerini kullanmaktadır [78]. Araştırmada diğer önemli yerine koyma alternatifleri de

bulunmaktadır. Bunlardan biri, fare tabanlı yöntemlerin monoklonal antikor üretimi için *in vitro* yöntemlerle değiştirilmesidir [79].

### **b. Eğitimde Yerine Koyma**

Hayvanlar, araştırma yanısıra eğitimde de kullanılmıştır. Basit tekniklerden kan örneği alma gibi becerilerden laparoskopik cerrahi gibi karmaşık cerrahi işlemlere kadar öğrenilen beceriler, tıp ve veteriner personelinin eğitiminin önemli bir parçasını oluşturur. Ancak dikiş teknikleri gibi bazı beceriler hayvan kullanmadan da geliştirilebilir. Atıl plasentalar mikrocerrahi tekniklerini pratik yapmak için kullanılabilir. Öte yandan, pratik beceri eğitimi için artık prosedürleri pratik yapmak için kullanılacak cansız modeller bulunmaktadır. Bu cansız nesnelere eğitim için kabul edilmesi, eğitimin dokunma ve hissetme deneyiminin canlı bir organizma kullanıldığında yaşanan deneyimle benzer olduğu zaman gerçekleşir [69]. "Koken sıçan modeli" eğitim ve pratik için önemli bir modeldir. Bu modelde, larinks, trakea, mide ve kuyruk damarı anatomik olarak doğru bir şekilde sıçan modeli içinde çoğaltılmıştır. Canlı bir sıçanın dokusuna benzer bir dokuya ulaşmak için orijinal silikon ve yumuşak vinil klorür kullanılır. Pozisyonlandırıldığında, duruş canlı bir sıçanın duruşuyla aynıdır. Karın bölümünün bir kısmı saydam olduğundan mide içindeki dozaj doğrulanabilir. Kuyruk damarına iğne yerleştirme, taklit kanın geri akışıyla doğrulanabilir. Bu model, bir öğrencinin canlı bir hayvan üzerinde denemeden önce birçok kez kuyruk damarı enjeksiyonlarını pratik yapmasına izin verir. Koken sıçanı ile retansiyon, dozaj, kuyruk damarına dozaj ve kan toplama ile endotrakeal entübasyon teknikleri uygulanabilir. Öte yandan, bilgisayar tabanlı teknolojiler cerrahların laparoskopik cerrahileri pratik yapmasına izin vermek için mevcuttur [3].



### **c.Güvenlik ve Etkililik Testlerinde Yerine Koyma**

Yeni ürünlerin güvenlik ve etkililik testlerinde özellikle de tıbbi ürünlerde hayvan kullanımını son kırk yılda büyük ölçüde yaygınlaştırmıştır. Ürünlerin güvenliği konusundaki halkın endişeleri, artan test ihtiyacını tetiklemiştir ve alternatif yöntemlere olan ihtiyacı ortaya çıkarmıştır. Yeni bileşiklerin test edilmesinde hayvan temelli testleri yerine koymayı amaçlayan alternatif metodları savunanlar için en büyük zorluklardan biri, bu metodların hayvanlar üzerinde yapılan testler kadar etkili olduğunu kanıtlamaktır. Alternatif Yöntemlerin Doğrulanması için Validasyon Yöntemleri (*The European Centre for the Validation of Alternative Methods* - ECVAM) ve Alternatif Yöntemlerin Doğrulanmasına İlişkin Kurumlar Arası Koordinasyon Komitesi (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods - ICVAM), hayvan kullanımını azaltma yollarında yeni önerilen alternatifleri doğrulamaya çalışmaktadır. Dünya genelinde düzenleyici kurumlar bu alternatifleri kabul etmekte temkinli olsalar da, ilerleme kaydedilmeye devam edilmektedir [3].

### **d. Yeni Teknolojiler ve Yeni Modeller Kullanarak Yerine Koyma**

Biyomedikal araştırmalarda ve toksisite testlerinde hayvan testlerinin kullanımının yerine koymak için birçok yeni yükselen alan ve teknik önemli yeni perspektifler sunmaktadır.

**1. Bilgisayarlı Modelleme:** *In silico* teknolojiler, biyomedikal araştırmalarda ve toksisite testlerinde duygusal kapasiteli hayvan kullanımının yerini almak için önemli bir rol oynamaktadır. Bu teknikler veri analizi, yeni fırsatların değerlendirilmesi ve sistem biyolojisinin incelenmesi ile ilaç adayı moleküllerin geliştirilmesinde son yıllar da kullanılmaya başlanmıştır. *In silico* yöntemler, laboratuvar ve klinik çalışmaların maliyetlerini azaltmıştır. Ancak kimyasal maddelerin ve ilaçların sistemik toksisitelerini tahmin etmek için *in vitro* bulgularının bilgisayar modelleriyle *in vivo*'ya uyarlanması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu amaçla, bilgisayar programlarıyla kantitatif yapı-özelliik ilişkileri (*Quantitative Structure-Property Relationship* - QSPR) ve QSAR belirlenmelidir. Bu *in silico* tekniklerin, en azından bazı hayvan testlerinin yerini alabileceğini ve insanlar için toksisite tahminlerinin yapılabileceğini göstermektedir [3, 80, 81]

**2. Farmakokinetik ve Toksikokinetik Modelleme:** ADME parametreleri, metabolik yollar, metabolik stabilite, sitokrom P450 substratları ve fizyolojiye dayalı farmakokinetik (*Physiology-Based Pharmacokinetics* - PBPK) veya fizyolojiye dayalı biyokinetik (*Physiology-Based Biokinetics* - PBBK) modellemesi yapmak mümkündür. Bu teknikler, ilaçların vücutta nasıl davrandığını anlamak ve insanlarda farmakolojik etkilerini tahmin etmek için kullanılır [3, 82].

**3. Mikroarray Teknolojisi:** İnsan vücudunda ki hücrelerde aynı genetik materyal bulunmasına rağmen, farklı hücre tiplerinde farklı genlerin etkin olduğu bilinmektedir. Bu çeşitlilik, hücrelerin işlevlerinin değerlendirilmesi ve takibi açısından büyük önem taşır. Önceden sadece birkaç genin analizi yapılabiliyorken, günümüzde mikroarray teknolojisi sayesinde binlerce genin aynı an da analizi mümkün hale gelmiştir. Mikroarray teknolojisi, DNA, protein ve dokular üzerinde yüksek miktar da biyolojik materyal işleyerek özellikle diyabet, kanser, kardiyovasküler ve zihinsel hastalıklar gibi karmaşık durumlar hakkında derinlemesine bilgi sağlar [3, 83].

**4. Omiks Teknolojisi:** Omiks teknolojileri, günümüzde birçok mekanizma ve olası toksik etkiyi öngörmek için sağladığı bilgiler nedeniyle önem kazanmaktadır. Bunlar arasında yer alan "Genomiks" teknolojisinde organizmaların tüm DNA dizilerinin belirlenmesi, genetik haritalama ve lokuslar arası allel varyasyonları gibi genomda ki olayların detaylı olarak incelenmesi mümkün olmaktadır [3]. "Proteomiks", özellikle proteinlerin yapısını ve işlevlerini aydınlatmak için kullanılan bir omik teknolojidir [84]. "Metabonomiks" ise metabolit oluşumuna yol açan kimyasal süreçleri ve hücresele olayların bıraktığı sistemik kimyasal izleri incelemeyi amaçlamaktadır [85]. "Metabolom", hücrelerde, dokularda, organlarda veya organizmalarda gerçekleşen hücresele olayların son ürünü olan tüm metabolitleri içerir. mRNA ekspresyon verileri ve proteomik analizler, hücrede gerçekleşen tüm olayları tam olarak aydınlatamazken, metabolik profillemeye hücre işlevleri hakkında anlık ve kapsamlı bilgi sağlayabilir. "Metabonomiks", canlı sistemlerin biyolojik tepkilerini ve genetik olaylara karşı bütünsel ve dinamik metabolik cevaplarını analitik olarak ölçmeyi hedefler ve çok hücreli karmaşık sistemlerde ki değişimlere odaklanır [3, 86]. "Transkriptom", belirli bir hücre grubunda protein sentezinde önemli rol oynayan mRNA moleküllerini ifade eder. "Transkriptomiks", transkriptomu inceleyerek, biyolojik işlemlerde rol alan genlerin ve ilgili yolların daha iyi anlaşılmasını sağlar [3]. "Glikomiks", vücutta serbest veya karmaşık moleküller içinde bulunan şekerlerin, yani glikomun genetik, fizyolojik ve patolojik yönlerini incelemeyi içerir [3, 87]. "Lipidomiks", biyolojik sistemlerde bulunan hücresele lipidlerin ve bu lipidler arası yolların değerlendirilmesidir. Bu alan obezite, ateroskleroz, inme, hipertansiyon ve

diyabet gibi metabolik hastalıklarda lipitlerin rolünü anlamak için kullanılan yeni bir araştırma alanıdır [3, 88].

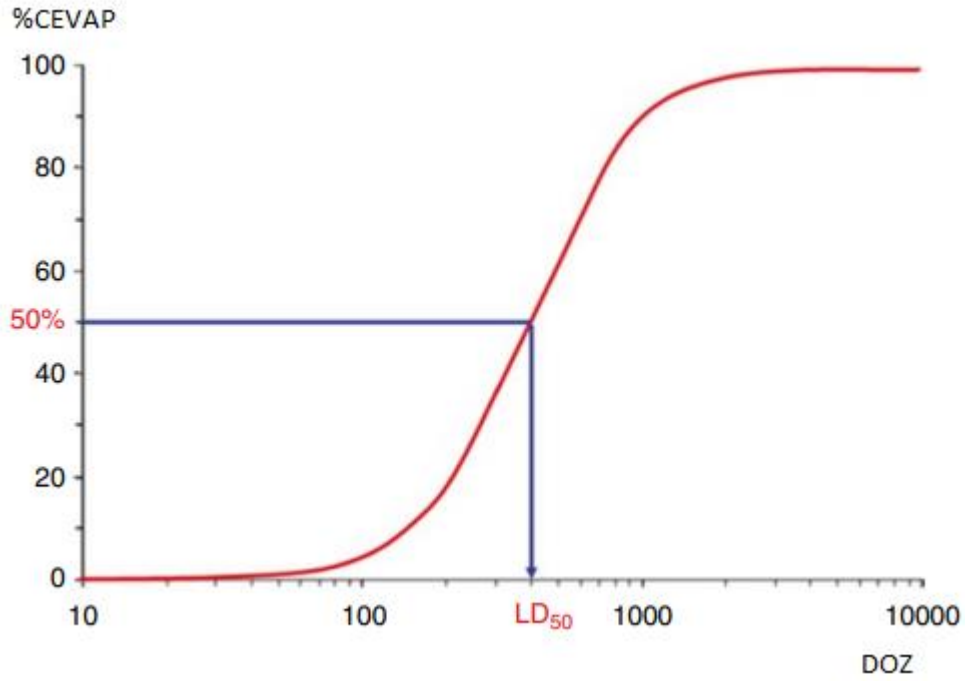
**5. *In vitro* modeller:** *In vivo* koşullarını taklit eden *in vitro* modeller, pek çok ilaç ve çevresel kimyasal maddenin etkilerini belirlemek için kullanılmaktadır. Ancak bu modeller de test koşullarının standartlaştırılması ve kontrolü kolay olmasına rağmen, sistemik ve kronik etkilerin tam olarak değerlendirilmesi zordur. Özellikle ilaç etkinliği ve kimyasal maddelerin toksik etkilerinin incelendiği çalışmalar da hücre, doku veya organ kültürleri araştırmanın amacına uygun olarak kullanılabilir. Hücre kültürleri, özellikle toksisite çalışmaları için kritik öneme sahiptir, çünkü *in vitro* testlerin kullanılabilirliği ve geçerliliği artmaktadır. Bu yöntemler, gelecekte düzenleyici kuruluşlar tarafından önerilen testler arasında *in vivo* testlerin yerini alabilirler [3, 89].

On dokuzuncu yüzyıldan beri hayvan deneyleri uygulamaları fizyoloji, mikrobiyoloji ve cerrahi alanlarda kullanılmaktadır. Yirminci yüzyılın ikinci yarısında ki moleküler biyolojide ki patlama, *in vivo* modellerin önemini arttırmıştır. Tüm modellerin sınırlamaları bulunmaktadır. Tahminler zayıf olabilir ve modeller gerçek olaylara transfer edilirken yetersiz kalabilirler. Dolayısıyla hayvan modellerinden elde edilen verilerin çevre ve insan sağlığına uygunluğu, hayvan modelinin araştırılan durum için uygun kriterlere sahip olması gerekliliğini doğrurur. Ancak bu sınırlamalar tüm modelleme yaklaşımlarının önemli bir parçasıdır. Hayvan modelleri hakkındaki çoğu soru bilimsel değil etik sorulardır. Kamu sağlığında hayvan modellerinin kullanımı sıkı düzenlemelerle zorunlu kılınmıştır ve yeni ilaçların destekleyici hayvan verileri olmadan onaylanması da olası değildir [90]. Toksikite bir maddenin bir organizmaya zarar verebilme derecesidir ve her kimyasal madde için endişe verici bir özelliktir. Doz ile maruz kalan organizma üzerindeki etkileri arasındaki ilişki, toksikolojide büyük öneme sahiptir. Kimyasalların toksisitesini değerlendirmek için hayvan deneylerinin kullanılma süreci aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır:

- Toksikite hedef üzerindeki etkilerine göre ölçülebilir.
- Bireyler aynı toksinin dozuna farklı tepki düzeylerine sahip olduklarından dolayı, toksisitenin popülasyon düzeyinde bir ölçüsü kullanılır. Bu ölçü bir popülasyonda ki bireyler için belirli bir sonucun olasılıklarını ilişkilendirir. En çok kullanılan ölçü LD50'dir. (popülasyonun %50'sinin ölümüne neden olan doz)
- Dozu belirledikten sonra, verilerdeki belirsizlikleri ve türler arasındaki farklılıkları hesaba katmak için bir "güvenlik faktörü" ile çarpılır. Örneğin veriler memelilerden ise 10, diğer hayvanlardan geliyorsa 100 kullanılır.

Bu süreç oldukça basit varsayımlara dayanır ve birçok açık sorunu da içermektedir. Örneğin kimyasal karışımların (benzin, sigara dumanı) toksisitesini belirlemek daha zordur çünkü kimyasalların yüzdeleri değişebilmekte ve etkilerin kombinasyonu sadece onların toplamından ibaret değildir. Biyolojik aktivitenin en yaygın ölçüsü inhibitör konsantrasyonu (log (IC50)) olabilmektedir. İncelenen biyolojik aktivitenin %50'sini engellemek için belirli bir bileşiğin gereken konsantrasyonunu ifade eder. Benzer şekilde LD50, belirli bir test süresi sonunda test edilen popülasyonun yarısını öldürmek için gereken dozdur. J.W. Trevan tarafından 1927 yılında oluşturulmuş olup genellikle vücut ağırlığına göre milligram cinsinden ifade edilir. Doz-yanıt ilişkisi, belirli bir maruz kalma süresinden sonra bir kimyasala farklı düzeylerde verilen dozların bir organizma üzerindeki etkisini açıklar. Doz – yanıt eğrisi, dozun organizmanın tepkisine olan ilişkisini gösteren x-y grafiğidir.

- Ölçülen doz X ekseninde çizilir ve yanıt Y ekseninde çizilir. (Şekil 2.3)
- Yanıt fizyolojik veya biyokimyasal bir tepkidir.
- LD50 toksikolojisinde kullanılır; IC50 ve etki konsantrasyonu (EC50) ise farmakolojide kullanılan birimlerdir.



**Şekil 2.0.3.** LD50 Doz-Yanıt Eğrisi Gösterimi

Genellikle dozun logaritması X ekseninde çizilir ve böyle durumlarda eğri tipik olarak sigmoidaldır ve en dik kısmı ortada bulunur.

*İn vitro* testler, kültüre edilmiş bakteri veya memeli hücreleri üzerinde bir kimyasal etkinin bilimsel analizidir. *İn vitro* sistemlerini kullanan deneyler, büyük sayıda potansiyel tedavi adayının taranması gereken tıp çalışmalarının erken aşamalarında veya olası kirleticiler için hızlı testler yapmak için kullanılırdırlar. Bununla birlikte *in vitro* sistemler non-fizyolojiktir ve önemli sınırlamalara sahiptirler. *İn vitro* ve *in vivo* sonuçlar zayıf bir ilişkiye sahip olsa da *in vitro* sistemlerin toksik etkinliklerinin mekanistik anlayışını iletme ve insana özgü toksik etkilerini tanımlamak için insan hücrelerini kullanma konusunda önemli avantajlara sahiptirler.

### 2.3. Toksikolojide Kullanılan *In Silico* Yöntemler

Dünya genelinde hayvan deneyleri için yıllık olarak kullanılan omurgalı hayvan sayısının on milyonlar düzeyinde olduğu tahmin edilmektedir. Toksisitede, hayvan deneyleri *in vivo* modeller olarak adlandırılır. Türler için belirlenen dozlar verilir ve bu dozların sonucunda elde edilen veriler insan sağlığı veya çevresel toksikoloji için kullanılır. Yine de yukarıda belirtildiği gibi türler arasında ki veri uyumluluğu her zaman tutarlı olmayabilir. Örneğin fareler için ölümcül dozlar başka canlılar için çok farklı olabilir. Kimyasal yapının etki ile ilişkilendirildiği bir modelin nasıl oluşturulacağı bilgisayarlar henüz mevcut olmadan önce bile araştırılmıştır. Bugün “*in silico*” terimi bu amaç için kullanılan yöntemleri kapsar. En çok kullanılan *in silico* yöntemler QSAR yöntemleridir ve moleküler yapının tüm etkinliklerinden sorumlu olduğu ilkesine dayanır [91].

Bu bölümde toksikolojide kullanılan *in silico* yöntemler özetlenmiştir:

#### 2.3.1. QSAR

Toksisite temelli QSAR'lar, bilinen aktiviteye sahip kimyasalların ve tanımlanmış kimyasal bir alanın modeli temel alınarak yeni kimyasalların toksisitesini tahmin etmek için kullanılan matematiksel denklemlerdir. Eğitim seti moleküler açıdan büyük ve çeşitliyse bu küresel bir QSAR olarak adlandırılır. Eğer veri seti yapısal açıdan birbirine benzer bileşiklerden oluşuyorsa, buna yerel QSAR denir. QSAR, yeni kimyasal yapının özelliklerini nicelendirerek, eğitim setinden elde edilen toksisite bilgisi kullanılarak yapı ve aktivite arasındaki ilişkiye dayanarak bileşiğin genel toksik özelliklerinin tahmin edilmesini sağlar. Geleneksel anlamda QSAR bilgisayar kullanılmadan yapılabilir. Toksikoloji için modern zaman QSAR kavramının gerçekleştiği en bilinen örnek, Corwin Hansch ve Fujita'nın 203 mono- ve di-süstitüe benzen yapıları ile 1-oktanol ve su bölünme katsayıları arasındaki ilişkiyi kullanarak oluşturdukları denklemdir [92].

$$\text{Log}1/C = ap + bs + cEs + \text{const}$$

Bu denklemde;

- C = Etki konsantrasyonu
- p = oktanol – su bölünme katsayısı (2.1.)
- s = Hammett ikame sabiti
- Es = Taft ikame sabiti

LogP yani oktanol – su bölünme katsayısı, iki karışmayan çözücünün karışımının iki fazında ki bileşiğin konsantrasyonlarının dengede ki oranıdır. Bileşiğin bu iki çözücüdeki çözünürlük farkını ölçer. Genellikle çözümlerden biri su iken diğeri hidrofobik bir çözücüdür (örneğin oktanol). Yüksek oktanol/su bölünme katsayısına sahip kimyasal maddeler hidrofobiktir ve hücre zarı gibi hidrofobik bölgelere tercihen dağılırken, hidrofilik maddeler kan serumu gibi hidrofilik bölgelerde bulunur. Bazı durumlarda QSAR yöntemleri daha spesifik isimler almaktadır, örneğin kantitatif yapı özellik ilişkisi QSPR bunlardan en yaygın olanlardandır [93]. Bilgisayar destekli QSAR'ların ortaya çıkışı ile birlikte daha yüksek hesaplama gücü, daha yüksek verim ve yeni moleküler özelliklerin keşfi sağlanmıştır. Böylece SAR ilişkisinin nicelendirilmesinde daha yüksek bir çeşitlilik elde edilmiştir. Toksikolojide en sık modellenen QSAR son noktası birkaç nedenden dolayı kanserojenite olarak verilmiştir. Bunun birkaç nedeni vardır. Karsinojenite bulgularının geliştirilmekte olan yeni bir ilaç ürünü için düzenleyici onayı engelleyebilmesi, ek inceleme döngüleriyle daha fazla zaman ve yatırım gerektirebilmesi veya ilaç etiketlemesinde değişikliklere yol açması nedeniyle ürün pazarlamasını kısıtlayabilir ve rekabeti etkileyebilir. Diğer önemli hususlar arasında, bir ilacın karsinojenik potansiyelinin kritik bir etken olması, insanlarda test edilememesi, testin kendisinin zaman ve mali kaynaklar açısından maliyetli olması yer alır. Bu maliyetler ilaç ürünü için düzenleyiciden onay kazanmaya çalışan sponsor şirket tarafından karşılanmalıdır. Ancak sonuçlar maliyetten daha da önemli olabilir. Düzenleyici otoriteler, insan sağlığını korumakla yükümlüdür ve potansiyel karsinojenlerin mümkün olan en erken aşama da, örneğin 1. ve 2. faz klinik deneylerinden önce tespit edilmesi arzu edilir. Buradaki önemli nokta ilaca tekrarlanan (günlük) olarak maruz kalacak olan kişileri



korumaktır çünkü yeni bir ilaç için karsinojenite verileri genellikle yeni ilaç başvurusu yapılmadan önce sunulmaz [94].

### 2.3.2. Moleküler Tanımlayıcılar

Moleküler yapıdan bilgilendirici verilerin elde edilmesi, kemoinformatik alanında yüksek öneme sahiptir. Çünkü sıklıkla moleküllerin istatistiksel analizlerinde kullanılmaktadırlar. Moleküler tanımlayıcıları hesaplamak için birçok olası yaklaşım bulunmaktadır:

- **Yapısal Tanımlayıcılar:** Atomların, bağların ve fonksiyonel grupların sayısına ve türüne bağlı olarak oluşturulur.
- **Geometrik Tanımlayıcılar:** Molekülün yüzey alanı, hacmi, atalet momentleri, gölge alan projeksiyonları ve yerçekimi indislerini ifade eder.
- **Topolojik İndisler:** Moleküler grafinin topolojisine dayanır. Sadece yapısal bilgi oluşturur. Örneğin Weiner indisi (moleküler grafin tüm düğümleri arasındaki bağ sayısının toplamı) ve Randic indisidir (bir molekülün dallanma özelliği).
- **Fizikokimyasal Tanımlayıcılar:** Moleküllerin fiziksel özelliklerini tahmin etmeye çalışır. Örneğin; moleküler ağırlık, hidrojen bağı alıcıları, hidrojen bağı vericileri ve logP gibi bölünme katsayılarıdır. LogP'nin hesaplanması, bir maddenin oktanol ve su arasında ki bölünme katsayısının logaritmasını tahmin eder ve maddenin lipofilikliğini (veya hidrofobisini) gösterir.
- **Elektrostatik Tanımlayıcılar:** Kısmi atomik yükler gibi elektrostatik özelliklere dayanır ve hidrojen bağı oluşumu ihtimaline bağlı olarak değişebilir.
- **Kuantum Kimyasal Tanımlayıcılar:** Moleküler yörüngelere ve özelliklerine bağlıdır.
- **Parmak İzleri (fingerprints):** Önceden belirlenmiş yapıların varlığı veya yokluğunu kodlayan ikili dizilerdir. Önceden belirlenmiş yapıların alt yapı araması için zaman alıcı bir alt yapı izomorfizma algoritması gerektirmesi nedeniyle, hızlı bir alt yapı tarama yöntemi geliştirilmiş ve yapı anahtarlı parmak izleri oluşturulmuştur. Parmak izi, bir molekülü kodlayan ikili bir dizedir ve belirli bir konumda bulunan alt yapının varlığını (1) veya (0) olarak gösterir [95].

### 2.3.3. Model Oluşturma

Tanımlayıcıların seçimi yapılan metodun (örneğin her seferinde bir tane ekleme ile ya da çıkarma) üzerinde deneme ve optimizasyonu ile sağlanır. Hangi metod seçilirse seçilsin, seçimden sonra öngörü modelleri geliştirmek için model kalitesinin istatistiklerine dikkat edilmeli ve doğru modelleme yönteminin seçildiğinden emin olunmalıdır. Modelin dışında oluşturulan verilere uygulandığında modelin genellenmesi (extrapolasyon) önemli bir konudur.

Kemoinformatik ve toksikolojide model oluşturmak için geniş çapta uygulanan iki tür denetimli öğrenme yöntemi bulunmaktadır: sınıflandırma ve regresyon. Sınıflandırma yöntemleri molekülleri, biyolojik olarak en yaygın etkiye sahip veya etkisiz olarak iki veya daha fazla sınıfa ayırır. Regresyon yöntemleri ise ölçülen bir biyolojik tepki değışkeni gibi sürekli verileri kullanır. Molekülleri bu verilerle ilişkilendirerek oluşturulan modeli de kullanarak yeni ve görünmeyen moleküller için sürekli sayısal bir değıeri tahmin etmeye çalışır [96]. Sınıflandırma için en sık kullanılan yöntemler: Kısmi En Küçük Kareler (Partial Least Squares), Doğrusal Diskriminant Analizi (Linear Discriminant Analysis), Naïve Bayes Sınıflandırıcısı (Naïve Bayesian Classifier), Karar Ağaçları (Decision Trees), Yinelemeli Bölütleme (Recursive Partitioning) ve Destek Vektör Makineleri (Support Vector Machines) iken, regresyon modellemesi için sıkça kullanılan yöntemler Çoklu Doğrusal Regresyon (Multiple Linear Regression), Kısmi En Küçük Kareler (Partial Least Squares ), Destek Vektör Makineleri (Support Vector Machines ) ve Yapay Sinir Ağları (Artificial Neural Networks) olarak bilinmektedir [97].

Model yorumlama insanların modelleri bilinen temel prensiplerden anlamalarının faydalı olacağı düşünüldüğünde önemli olarak kabul edilir. Az sayıda kullanılan tanımlayıcı ve onların basit bir denklemde ki rolü, genellikle bir QSAR sonucunu kabul etmek için gerekli görülür. Genellikle tahmin kalitesi ile yorumlama kalitesi arasında bir denge bulunmaktadır. Yorumlanabilir modeller, modelin problem alanı hakkında bilgi sağlaması ve kullanıcının bilinçli kararlar almasına yardımcı olması beklenen durumlarda tercih edilir. Ancak bu modellerden elde edilen bilgi daha yorumlanabilir hale geldikçe tahmin kalitesi düşmektedir. Tahmin edici modellerde ise durum tersidir yani tahmin kalitesi arttıkça yorumlama zorlaşır. Yüksek derecede tahmin edici modeller genellikle kullanıcı tarafından kolayca yorumlanamayan moleküler tanımlayıcılar kullanmaktadır.

Ancak hem SAR hemde QSAR tahminsel istatistiksel modellerdir ve bu nedenle istatistiksel öğrenme kuramının problemlerini yaşar. İstatistiksel öğrenme kuramı, veri kümesinden bilgi edinmenin ve tahmin yapmanın nasıl olduğu hakkında bir teorik çerçeve sunar. Bir modelin oluşturulması görevini yerine getirebilecek birçok fonksiyon arasından performans ve basitlik gibi özelliklerini nicelendirmemiz gerekmektedir. İstatistik alanında insanlar az sayıda serbest parametreye sahip modelleri, fizikte az sayıda sabite sahip modelleri, QSAR da ise yorumlanabilir tanımlayıcılar içeren modelleri tercih ederler. Herhangi bir özelliğin tanımı, incelenen özel olgununun özelliğine bağlıdır. Başka bir deyişle veri bilgiyi yerine koyamaz.

#### 2.3.4. QSAR Metotları

**Hiyeraşik Kümeleme Yöntemi:** Belirli bir sorgu bileşiğinin toksisitesi birkaç farklı modelden elde edilen tahminlerin ağırlıklı ortalaması kullanılarak tahmin edilir. Eğitim setini yapısal olarak benzer kümelere bölmek için Ward yöntemi kullanılarak farklı modeller elde edilir. Her küme için model oluşturmak amacıyla genetik algortima tabanlı bir teknik kullanılır.

**Tek Model Yöntemi:** Tahminler genetik algoritma tabanlı bir yaklaşım kullanılarak eğitim setine uygun çok doğrusal bir regresyon modeli kullanılarak yapılır. Regresyon modeli çalışma zamanından önce oluşturulur.

**Grup Katkısı Yöntemi:** Tahminler eğitim setine uygun çok doğrusal bir regresyon modeli kullanılarak yapılır.

**En Yakın Komşu Yöntemi:** Tahmin edilen toksisite eğitim setinde test kimyasalına en çok benzeyen 3 kimyasalın ortalaması alınarak tahmin edilir.

**Konsensüs Yöntemi:** Tahmin edilen toksisite yukarıdaki QSAR yöntemlerinden tahmin edilen toksisitelerin ortalaması alınarak tahmin edilir.

QSAR metotları Tablo 2.5.'te özetlenmiştir.

**Tablo.2.5.** QSAR Metodları

<b>METOT</b>	<b>AVANTAJLAR</b>	<b>DEZAVANTAJLAR</b>
<b>Hiyeraşik Kümeleme Metodu</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tahminler birden fazla modelden yapıldığından daha güvenilir tahminler üretebilir.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Eğitim setindeki bileşikler için harici toksisite tahminleri sağlayamaz.</li> </ul>
<b>Tek Model Yöntemi</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tek şeffaf model kolaylıkla görüntülenebilir ve dışa aktarılabilir.</li> <li>Modelin kimyasalların doğru şekilde kümelenmesine dayanmasına gerek yoktur.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Model tüm veri setleri ile uygunluk sağladığından (seçiciliğin olmaması) belirli kimyasal sınıflar için toksisite eğilimleri yanlış tahmin edilebilir.</li> <li>Eğitim setindeki bileşikler için harici toksisite tahminleri sağlayamaz.</li> </ul>
<b>Grup Katkısı Yöntemi</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tek şeffaf model kolaylıkla görüntülenebilir ve dışa aktarılabilir.</li> <li>Toksosite tahminleri bir bilgisayar programı kullanılmadan yapılabilir.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Model bitişik kimyasalar yapıların etkileşimlerini düzeltemez.</li> <li>Model tüm veri setine uygun olduğundan belirli kimyasal sınıflar için toksisite eğilimlerini yanlış tahmin edebilir.</li> <li>Eğitim setindeki bileşikler harici toksisite tahminleri sağlanamaz.</li> </ul>
<b>En Yakın Komşu Yöntemi</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hızlı bir toksisite tahmini sağlar.</li> <li>Belirli bir test bileşiği için yapısal analogların belirlenmesine olanak sağlar.</li> <li>Her zaman toksisiteye ilişkin harici bir tahmin sağlar.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Test bileşiği ile en yakın komşular arasındaki farkları ilişkilendirmek için bir QSAR modeli kullanmaz.</li> <li>Harici doğrulama sırasında en kötü tahmin sonuçlarını elde ettiği gösterilmiştir.</li> </ul>
<b>Konsensüs Yöntemi</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Harici doğrulama sırasında en iyi tahmin sonuçlarını elde ettiği gösterilmiştir.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Eğitim setindeki bileşikler için harici toksisite tahminleri sağlanamaz.</li> </ol>

**Hiyeraşik Kümeleme Metodu:** Hiyeraşik kümeleme yöntemi eğitim setinden bir dizi küme üretmek için Ward Yönteminin bir varyasyonunu kullanılır [98].

- (1)  $n$  kimyasaldan oluşan bir eğitim seti için başlangıçta  $n$  küme (her küme bir kimyasal içerecek şekilde) olacaktır. Belirli bir  $l$  adımındaki sistemdeki genel varyans, bireysel kümelerin varyanslarının toplamı olarak tanımlanır:

$$V(l) = \sum_{k=1}^m v(k, l) \quad (2.2)$$

- (2) Burada  $v(k, l)$   $l$  adımdaki  $k$  kümesinin varyansıdır:

$$v(k, l) = n_k + \sum_{i=1}^{n_k} \sum_{j=1}^d (x_{ij} - C_j)^2 \quad (2.3)$$

- (3)  $n_k$   $k$ . Kümedeki kimyasalların,  $d$  genel tanımlayıcı havuzdaki tanımlayıcıların sayısıdır.  $x_{ij}$  kimyasal  $i$  için  $j$  tanımlayıcının normalize edilmiş değeridir ve  $C_j$   $k$ . Küme için  $j$ . tanımlayıcının merkezi veya ortalama değeridir.

$$C_j = \frac{1}{n_k} \sum_{i=1}^{n_k} X_{ij} \quad (2.4)$$

(4) Bu yöntemin her adımı sistemin tüm kümelerinde ki varyansın artışını en aza indirmek amacıyla iki kümeyi birleştirir.

$$\min \Delta V(l+1) \equiv V(l+1) - V(l) = v(k', l+1) - v(k_1, l) - v(k_2, l) \quad (2.5)$$

Kümeler  $k_1$  ve  $k_2$ ,  $l$  adımımda bir araya gelerek  $l+1$  adımımda bir araya gelerek  $k'$  kümesini oluştururlar. Kümelerinin birleştirilme işlemi, tüm kimyasallar tek bir kümeye toplanana kadar devam eder. Kümeleme işlemi tamamlandıktan sonra her bir küme kabul edilebilir bir QSAR'ın geliştirilip geliştirilemeyeceğini belirlemek amacıyla analiz edilir. Her bir küme bu kümede ki kimyasalların toksiste değerlerini tanımlamak için en uygun tanımlayıcı kümesini belirlemek için genetik algoritma tekniği kullanılarak değerlendirilmeye tabi tutulur. Belirli bir küme için izin verilen maksimum tanımlayıcı sayısı, bileşiklerin değişkenlerinin oranının, tesadüfi korelasyonlar için makul bir olasılık için en az 5 olması gereken önerilen oranı olan  $n_k/5$  olacaktır [99].

Genetik algoritma düzeltilmiş beş katlı dışarı bırakma çapraz doğrulama katsayısını maksimize etmek için kullanılır ( $q^2_{adj, LMO}$ ):

$$(5) \quad q^2_{adj, LMO} = 1 - \frac{\sum_{i=0}^{n_k} (y_i - y_{exp,i})^2 / (n_k - p - 1)}{\sum_{i=0}^{n_k} (y_{exp,i} - y_{exp})^2 / (n_k - 1)} \quad (2.6)$$

$y_i$  ve  $y_{exp}$  kimyasal için tahmini ve deneysel toksisite değerleridir.  $y_{exp}$  ise kümede ki kimyasalların ortalama deneysel toksisitesidir ve  $p$  modeldeki parametre sayısıdır. Tahmini toksisite değerleri veri kümesini beş katlı dışarı bırakma yöntemi kullanarak hesaplanır. Her bir katmanda ki kimyasalların toksisiteleri ( $y_i$ ) diğer katlarda ki kimyasallara uyan çoklu doğrusal regresyon modeli kullanılarak tahmin edilir. Büyük küme boyutları için önemli derecede hesaplama tasarrufu sağladığı için genetik algoritma içinde geleneksel  $q^2$ LOO (LEAVE ONE OUT/ BİRİNİ ÇIKAR) yerine beş katlı  $q^2$  kullanılır.  $n_k - p - 1$  terimi modelin tahmin gücünü önemli ölçüde arttırmayan fazla parametreleri içeren modelleri denklemden çıkartır. Optimizasyon süresi sırasında modeller aykırı değerler açısından kontrol edilir. Eğer bir kimyasal madde aykırı olarak

belirlenirse, bu kimyasal madde kümeden çıkarılı ve genetik algoritma tanımlayıcı seçimi tekrarlanır. Genetik algoritma ile model oluşturma ve aykırı değerlerin kaldırılma süresi optimize edilmiş modelde aykırı değer tespit edilene kadar tekrarlanır.

Optimum model için süreç tamamlandığında modelin  $q^2$  LOO değeri hesaplanır. Eğer  $q^2$  LOO değeri 0.5 veya daha büyükse model geçerli kabul edilir. Eğer  $q^2$  LOO değeri 0.5'ten küçükse model, test bileşikleri için tahminler de bulunmak için kullanılmaz. İkili sonuçlar için bir modelin geçerliliği  $q^2$  LOO yerine Concordance LOO ile belirlenir. Concordance, doğru tahmin edilen tüm bileşiklerin oranıdır ( yani deneysel olarak aktif olan bileşiklerin aktif olarak tahmin edilenleri ve deneysel olarak aktif olmaan bileşiklerin aktif olmayanları olarak tahmin edilenleri). Eğer Concordance LOO değeri 0,8 veya daha büyükse, model geçerli kabul edilir [100]. Bir test kimyasalı için tahmini toksisite ( $\hat{y}$ ) tüm geçerli tahminlerin ağırlıklı ortalaması ile verilir:

$$(6) \hat{y}^j = \frac{\sum_{j=1}^{nvc} w_j y^j}{\sum_{j=1}^{nvc} w_j} \quad (2.7)$$

$y^j$  ve  $w_j$  sırasıyla modelin tahmini ve ağırlıdır. “nvc” geçerli küme modeli tahminlerinin sayısıdır. Eğer ortalama toksisite olasılık dağılımlarının ortalama için maksimum olabilir tahminleyici tarafından verilmekteyse ağırlık değerleri aşağıdaki gibidir:

(7) Burada  $se_{j,j}$  tahmini hesaplanan standart hata anlamına gelmektedir.

$$w_j = \frac{1}{se_j^2} \quad (2.8.)$$

(8)  $\sigma_j^2$  değeri burada;

$$se_j = \sqrt{\sigma_j^2 (1 + h_{00})} \quad (2.9)$$



(9) Burada  $n_j$  model  $j$ 'deki kimyasalların sayısıdır ve  $p_j$  model  $j$  için parametre sayısıdır. Test kimyasal için etki  $h_{00}$  aşağıdaki gibidir:

$$\sigma_j^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n_j} (\hat{y}_i - y_{\text{exp},i})^2}{n_j - p_j - 1} \quad (2.10.)$$

(10) Burada  $X_0$  test bileşiği için model tanımlayıcı değerlerin vektörüdür. Ames mutajenliği gibi ikili sonuçlar için tahminler bireysel tahminlerin eşit ağırlıklı olarak yapılması ile gerçekleştirilir.

$$h_{00} = X_o^T (X^T X)^{-1} X_0 \quad (2.11.)$$

(11) Çoklu modellerin gelen tahminin standart sapmasının karesi ( $\sigma^2$ ) yaklaşık olarak aşağıdaki şekilde hesaplanabilir:

$$\sigma_\mu^2 = \frac{\overline{\sigma^2}}{nvc} = \frac{\left(\frac{1}{nvc}\right) \sum_{j=1}^{nvc} w_j se_j^2}{\sum_{j=1}^{nvc} w_j} = \frac{\left(\frac{1}{nvc}\right) \sum_{j=1}^{nvc} \left(\frac{1}{se_j^2}\right) se_j^2}{\sum_{j=1}^{nvc} \left(\frac{1}{se_j^2}\right)} = \frac{1}{\sum_{j=1}^{nvc} \left(\frac{1}{se_j^2}\right)} \quad (2.12)$$

**Tek Model Yöntemi:** Tek model yaklaşımında tüm eğitim setine tek bir çoklu doğrusal regresyon modeli uygulanır. Model hiyerarşik kümeleme yöntemi için kullanılan teknikler ve kısıtlamalar kullanılarak oluşturulur. Bu yaklaşımın avantajı, kimyasalları doğru bir şekilde kümeleştirmeye dayanmayan basit ve şeffaf bir model geliştirebilmesidir. Bu yaklaşımın dezavantajı ise bazen genel bir modelin her kimyasal sınıf için toksisiteyi doğru bir şekilde ilişkilendiremeyebilmesidir. Örneğin tek model normal alkol serisi için (örneğin, 1 – propanol, 1- butanol, 1-pentanol, ) doğrusal olarak artan toksisite eğilimini doğru bir şekilde açıklayabilsede, doğrusal olarak artmayan bir asit serisi (örneğin propanoik asit, butanoik asit, pentanoik asit) için eğilimi yanlış bir şekilde açıklayabilir [101].

**Grup Katkısı Yöntemi:** Grup katkı yöntemi, Martin ve Young'un grup katkı yaklaşımına dayanmaktadır. Bir bileşiğin içerdiği grupların sayısı (örneğin metil ve hidroksi gruplarının sayısı) tüm veri setine çoklu doğrusal regresyon modeli uydurmak için kullanılır. Modelde ki parametre sayısını azaltmak için genetik algoritma yaklaşımı kullanılmaz çünkü bu yaklaşım eğitim setinde görünen tüm grupların katkısını tanımlamayı amaçlar. Eğitim setinde her bir grup içeren en az üç molekül bulunmalıdır. Eğitim setinde bir grup üç kezden az görünüyorsa bu grup farmanlar listesinden çıkartılır ve bu grubu içeren tüm kimyasallar eğitim setinden çıkartılır. Çoklu doğrusal regresyon yapıldıktan sonra model aykırı değerler açısından kontrol edilir. Aykırı değerler tespit edilirse bunlar çıkarılır ve regresyon yeniden yapılır. Bu süreç aykırı değer kalmayana kadar tekrarlanır. Bu yaklaşımın avantajı, görsel inceleme ile test bileşiğinin moleküler yapısından belirlenebilen tanımlayıcıları olan tek bir şeffaf model geliştirebilmesidir. Bu yaklaşımın dezavantajı ise her bir fragmanın katkısının molekül içindeki yakındaki diğer fragmanların varlığına bağlı olmadığını varsaymasıdır [102].

**En Yakın Komşu Yöntemi:** Bu yaklaşım da tahmini toksisite basitçe eğitim setindeki en benzer kimyasalın (yapısal analogların) toksisitesinin ortalamasıdır. Bir tahmin yapmak için her bir yapısal analogun belirli bir minimum kosinüs benzerlik katsayısını (*Similarity coefficient* – *Scmin*) aşması gerekir.

$$SC_{i,k} = \frac{\sum_{j=1}^{\#descriptors} x_{ij} x_{kj}}{\sqrt{\sum_{j=1}^{\#descriptors} x_{ij}^2 \cdot \sum_{j=1}^{\#descriptors} x_{kj}^2}}$$

(2.13.)

Bu denklem de  $x_{ij}$  kimyasal i için j'nci normalize edilmiş tanımlayıcı değeridir ve  $x_{kj}$  kimyasal k için j'nci tanımlayıcı değeridir. *Scmin* tahmin kapsamının diğer QSAR yöntemlerine benzer olması için 0,5 olarak ayarlanmıştır. En yakın komşu yöntemi toksiste hakkında hızlı bir dış tahmin sağlar (test kimyasalı seçilen analogların kümesinde hiç bulunmaz). En yakın komşu yönteminin dezavantajı test kimyasalı ile yapısal benzerlikler arasındaki farkların hesaba katılmamasıdır [103].

### 2.3.5. Read- Across Yöntemi

*Read-across* yöntemi, kimyasalların toksikolojik ve ekotoksikolojik özelliklerinin tahmin edilmesi sırasında kullanılan bir yaklaşım olup, benzer yapı veya özelliklere sahip kimyasallardan elde edilen verilerin eksik verilere sahip kimyasallara transfer edilmesi prensibine dayanır. *Read-across*, bilgi boşluğunu doldurmak için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, bir veya daha fazla kimyasaldan elde edilen bilgiler, aynı son nokta için hedef kimyasalın tahmin edilmesinde kullanılır. *Read-across* yöntemiyle veri boşluklarını doldururken iki ana sorunla karşılaşılabilir. Bunlardan ilki, toksisite yokluğunu değerlendirmede ki zorluktur, bu da doğru bir sonuç için daha fazla veri yükü gerektirir. İkincisi ise belirsizlikle nasıl başa çıkılacağı ve sonuçların ne ölçüde güvenilir kabul edileceğidir. Güvenilirliğe katkıda bulunan çeşitli unsurlar vardır: *read-across* gerçekleştirmek için kullanılan deneysel verilerin kalitesi ve sayısı, kullanılan kimyasal benzerlik ölçütleri, kimyasalların biyolojik sistemlerle nasıl etkileştiği hakkında ki bilgi ve diğer özelliklerden veya *in vitro* testlerden elde edilen tamamlayıcı verilerin doğrulukları bunlardan birkaçıdır. *Read-across* yaklaşımı, gereksiz testlerden kaçınmak amacıyla ancak Annex XI'de belirtilen aşağıdaki kriterleri karşılaması halinde kullanılması REACH'e göre uygun kabul edilmektedir [104].

1. Sonuçların sınıflandırma ve etiketleme de risk değerlendirmesi amacı için yeterli olmalıdır.
2. Sonuçların ilgili test yöntemlerince ele alınan anahtar parametrelerin yeterli ve güvenilir bir kapsama sahip olmalıdır.
3. Uygulanan yöntemin yeterli ve güvenilir belgesi sağlanmış olmalıdır.

*Read-across* tabanlı tahminleri gerçekleştirmek için temelde dört strateji bulunmaktadır:

1. Birinci strateji, bir analog kullanarak tek bir kimyasal için bir tahmin yapmak olarak adlandırılabilir.
2. İkinci strateji, bir analogun kullanılarak birden fazla kimyasal için tahminler yapılması olarak adlandırılabilir.

3. Üçüncü strateji, bir kimyasal için tahminler yapmak için iki veya daha fazla analogun kullanılmasıdır.
4. Dördüncü strateji ise, iki veya daha fazla analogun kullanılarak birden fazla kimyasal için tahminler yapılmasıdır [8].

*Read-across*'un kritik adımı, benzer bileşiklerin belirlenmesidir. Bu aşağıdaki yaklaşımlar aracılığıyla gerçekleştirilir [104]:

- **Analog yaklaşımı:** Çok sınırlı sayıda kimyasala dayalıdır (örneğin, hedef madde + kaynak madde).
- **Kategori yaklaşımı:** Daha geniş bir analog aralığına dayalıdır (örneğin, üç veya daha fazla üye) ve özellikte belirgin bir görüntünün seçilmesidir.

Kimyasalları benzerlik açısından gruplandırma stratejisi, kimyasal yapıya veya ortak özelliklere (örneğin, ortak öncü veya parçalanma ürünleri) dayanabilir. Hedef bileşiğin analoglarını bulmanın basit bir yolu, var olan kategorilere göz atmak veya uzman bilgisini kullanarak bu bileşiği mevcut bir kategoriye bağlamaktır. Gruplama da analogların yapısal benzerlikleri, başta temel bileşen analizi (*Principal Component Analysis* - PCA) veya desen tanıma yaklaşımları (örneğin, Kohonen sinir haritaları gibi) gibi istatistiksel yaklaşımlarla keşfedilebilir. Tüm analoglar için çeşitli tanımlayıcılar oluşturulur (temel, topolojik ve geometrik tanımlayıcılar, moleküler bağlantı indisleri, fizikokimyasal özellikler), ardından uygun bir grafik (örneğin, PCA grafiği) benzerlikleri, trendleri ve olası aykırılıları görselleştirmeye olanak tanır. Bir diğer gruplama türü olan son nokta tabanlı gruplama, tüm analoglar için üretilen farklı deneysel verileri ve QSAR tahminlerini kullanır ve hedef alanındaki son noktaları içerir. Analogları belirlemek için birçok mevcut araç bulunmaktadır. Bunlar arasında ToxRead, OECD QSAR Toolbox, AMBIT, ToxMatch, Leadscope, AIM ve ChemIDplus bulunmaktadır. İlgili analoglar için deneysel verilerin bir veri matrisinde toplanması, sonra ki *read-across* yaklaşımları için bir önadımdır. Hedef bileşik için son nokta bilgileri, ilgili analogların karşılık gelen bilgileri kullanılarak elde edilebilir. Kimyasal yapının benzerliği, fonksiyonel grupların varlığı, belirli uyarıların uygulanabilirliği, ebeveyn bileşiklerin veya metabolitlerinin

dikkate alınma nedenleri ve diğer yaklaşımlar açısından en benzer vakaların belirlenmesi zaman alıcı bir süreçtir. Bu süreci iyileştirmek için bazı otomatik sistemler geliştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan QSAR Toolbox'ın *read-across* fonksiyonu kullanımı üç adımda gerçekleşmektedir:

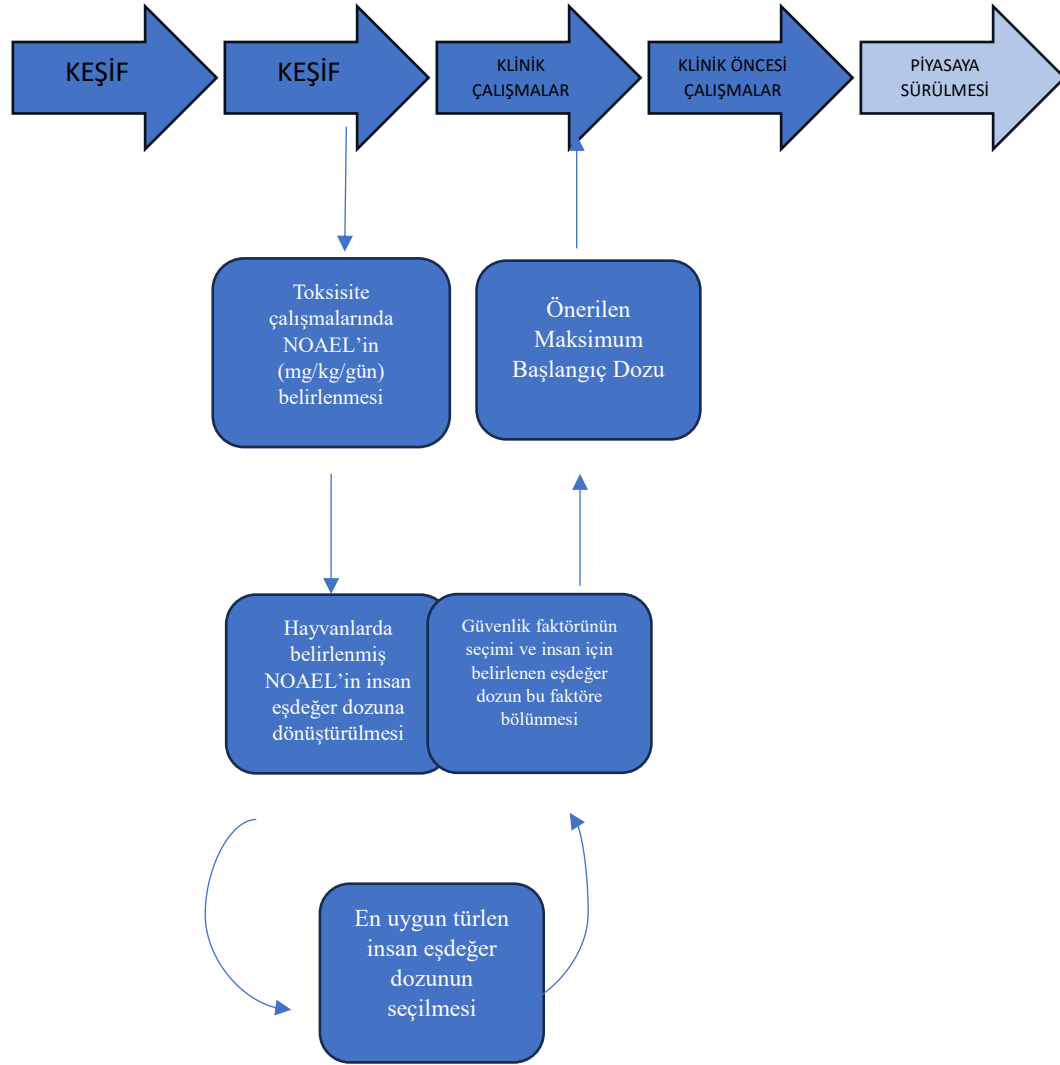
1. Profil oluşturma: Hedef maddenin ilgili yapısal özelliklerinin tanımlanması ve potansiyel mekanizmaların veya etki tarzının belirlenmesine dayanır.
2. Gruplandırma: Hedef için tanınan yapısal özellikleri ve mekanizma tarzını paylaşan diğer kimyasalların belirlenmesine dayanır.
3. Veri boşluğu doldurma: Mevcut deneysel verilerin kullanılmasını içerir.

QSAR Toolbox, deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlarla birlikte düzenleyici envanterler ve tehlikeli ve diğer özelliklerin varlığını gösterebilen yapısal uyarılar için birikmiş bilgiler içeren veritabanları içerir. Bu uyarılar, "profilciler" olarak adlandırılan SAR türü bilgilerini kodlar. "DNA Bağlanma", "Protein Bağlanma", "Sukul toksisite mekanizmaları" gibi bazı örnek profiller bulunmaktadır. *Read-across* tabanlı tahminler için araçlarının yanı sıra, QSAR Toolbox ayrıca trend analizi yapmak ve eksik deneysel değerleri tahmin etmek için (Q)SAR modelleri içeren araçlar da içermektedir[105].

#### **2.4. İn Silico Modelleri ile Tekrarlanan Doz Toksisitesi (RDT): İlaçlar için Advers Etki Gözlenen En Düşük Düzey (LOAEL) ve Advers Etki Gözlenmeyen Düzey (NOAEL) Tahmini**

İlaç geliştirme sürecinin ön klinik aşamasında, hayvan modellerinde ilaç molekülünün tekrarlanan doz toksisitesi (*Repeated-dose Toxicity* - RDT) değerlendirilir. RDT çalışmalarının hedefi NOAEL ve LOAEL tespit edilmesidir. NOAEL insanlarda klinik çalışmalara başlamak için güvenli olan maksimum tavsiye edilen başlangıç dozunun (*Maximum Recommended Starting Dose* - MRSD) hesaplanmasına yardımcı olur. *In vivo* RDT çalışmaları pahalı ve zaman alıcı olduğundan, *in silico* yaklaşımlar değerli bir alternatif olarak kullanılabilir. RDT çalışmaları, belirli bir süre boyunca bir maddeye oral, dermal veya inhalasyon yoluyla tekrarlanan maruziyetin etkilerini belirlemek amacıyla tasarlanmıştır. Test maddesinin tekrarlanan maruziyet sonrası toksikolojik profilinin karakterize edilmesi, RDT çalışmasının temel amacıdır. RDT

testleri olumsuz etkileri, potansiyel hedef organları veya sistemleri (üreme sistemi, karaciğer, böbrek, merkezi sinir sistemi, endokrin sistem) ve etkilerin kalıcılığını veya tersine çevrilebilirliğini belirlemek için detaylı bilgiler sağlar. İlaç geliştirme uzun, karmaşık ve pahalı bir süreçtir. Tipik prosedür üç ana adımdan oluşur: keşif, prelinik faz ve klinik fazdır. Klinik denemeler, günlük kronik dozlama içerdiğinde, ön klinik aşamada hayvan modelleri üzerinde RDT çalışmalarının gerçekleştirilmesini gerektirir. Bu çalışmaların ana sonuçları olan NOAEL ve LOAEL, klinik dışı risk değerlendirmesinde son derece önemlidir. NOAEL, biyolojik olarak önemli olumsuz etkilerin olmadığı en yüksek doz olarak, LOAEL ise olumsuz etkilerin görüldüğü en düşük maruziyet olarak tanımlanır. En uygun hayvan türünde yapılan klinik dışı güvenlik çalışmalarında belirlenen NOAEL, insanlarda ilk doz için önemli bilgiler verir. NOAEL, ilk insan çalışmasında (klinik deneme) MRSD hesaplanması için gereklidir [106][Şekil 2.4 ].



**Şekil 2.4.** İlaç geliştirilmesi aşamaları.



İlaçlar dışında, diğer düzenleyici kimyasallar da bir maddenin potansiyel risklerini değerlendirmek için de RDT testlerinin yapılması gerekir. Bunlara örnek olarak endüstriyel kimyasallar, tarım kimyasalları, biyositler ve kozmetikler verilebilir. Geliştirme sürecince tespit edilen toksisitenin neden olduğu ilaç başarısızlığı ve geri çekilmenin yüksek maliyeti göz önüne alındığında bir ilacın potansiyel toksisitesi mümkün olan en kısa sürede belirlenmelidir. Kimyasalların güvenliğinin değerlendirilmesinde RDT çalışmalarının sonuçlarının önemi inkar edilemez ancak *in vivo* testler zaman alıcı ve çok pahalıdır [107].

### 2.4.1. NOAEL ve LOAEL Veritabanları

Bilgisayar temelli programlarda kullanılan NOAEL ve LOAEL değerlerini içeren veritabanları mevcuttur ve farklı kaynaklar arasında yüksek oran da benzerlik bulunmaktadır (Tablo 2.6). Genellikle NOAEL ve LOAEL için ölçüm birimi mg/kg vücut ağırlığı/gün olarak ifade edilir. Doğru hesaplamalı modeller oluşturabilmek için, kimyasal yapıların ve verilerin kalitesi büyük önem taşımaktadır. Ayrıca LOAEL ve NOAEL için sadece nihai doz değil, maruz kalma yolu ve süresi, kullanılan tür ve suş, dozlama sıklığı gibi diğer destekleyici bilgiler de önemlidir. Bu bilgilerin modelleme için kalitesini ve potansiyel kullanımını doğru bir şekilde değerlendirmek gereklidir [108].

**Tablo.2.6.** NOAEL ve LOAEL Veritabanları [109]

Veritabanı Adı	Sahip Olduğu Etken Madde Sayısı	Geliştiricisi	Maruz Kalma Yolları	Maruz Kalma Süresi	Kullanılan Hayvan Modelleri	Kaynak
RepDosc	655	Fraunhofer ITEM	Oral İnhalasyon	En az 14 gün	Kemirgenler	fraunhofer - repdose.de
Munro	613	Munro ve ark.	Oral	910 güne kadar	Kemirgenler Tavşan	QSAR OECD Toolbox
HESS	500	NITE	Oral	28-120 gün arası	Kemirgenler	QSAR OECD Toolbox
IRIS	>500	US EPA	Birçok	Uzun Süreler	Kemirgenler	www.epa.gov
COSMOS	1660	COSOS project	Birçok	Uzun Süreler	Kemirgenler	www.cosmosdb.cosmostox.eu
ToxRef	310	US EPA	Birçok	Uzun Süreler	Kemirgenler	QSAR OECD Toolbox

*Fraunhofer ITEM* tarafından Avrupa Kimya Endüstrisi Konseyi (*European Chemical Industry Council* - CEFIC) tarafından finanse edilen bir proje kapsamında geliştirilen RepDose veritabanı, kemirgenlerde en az 14 gün süreyle maruz kalınan maddeye ilişkin oral (gavaj, besleme ve içme suyu) veya inhalasyon çalışmaları için 655 kimyasal maddeye ait deneysel NOAEL ve LOAEL değerlerini içermektedir. Ayrıca veri kalitesini gösteren bir puanlama (A, B, C, D) da sağlanmaktadır. Kullanılan hayvanlar hakkında bilgiler (suş, cinsiyet, doz grubu başına sayı) ve maruziyet (süre ve uygulama yolu, maruziyet sonrası gözlem süresi ve doz grupları) da verilmektedir. Veritabanı, toksikolojik (hedef organların tümü ile ilişkili etkiler ve LOAEL gibi doz verileri) ve fizikokimyasal (molekül ağırlığı, suda çözünürlük, fiziksel durum, kaynama noktası, ayrışma sabiti, oktanol-su bölünme katsayısı ve buhar basıncı) veriler içermektedir. RepDose veritabanı <http://fraunhofer-repdose.de/> adresinde mevcuttur ve kullanıcı kaydıyla ücretsiz erişim sağlanmaktadır. Kullanıcı dostu bir sorgulama ekranı LOAEL, hedef organlar ve etkiler üzerinde yapısal özelliklerin ve fizikokimyasal verilerin etkisine ilişkin bilgileri içerir. Munro ve arkadaşları, kemirgenler ve tavşanlar üzerinde yapılan sub-kronik, kronik, üreme toksisitesi ve teratojenik çalışmalarla ilgili 613 organik bileşik için NOAEL ve LOAEL değerlerini içeren bir veritabanı oluşturmuştur. Her bileşik için kimyasal ad, CAS numarası, tür, cinsiyet, maruz kalma yolu, test edilen dozlar, çalışma türü, süre, son noktalar(endpoint), NOAEL ve LOAEL referansları bildirilmiştir. Veriler dört farklı kaynaktan elde edilmektedir [110, 111]:

- ABD Ulusal Toksikoloji Programı (*National Toxicology Program* - NTP) teknik raporları (1984 sonrası),
- Gıda Katkı Maddeleri Konusunda FAO/WHO Uzman Komitesi tarafından hazırlanan toksikolojik monograflar (JECFA)
- Entegre Risk Bilgi Sistemi (*Integrated Risk Information System* - IRIS) veritabanı
- Gelişimsel ve Üreme Toksikolojisi (*Developmental and Reproductive Toxicology* - DART) veritabanı

Munro veritabanında ki bileşikler çeşitli kimyasalları (pestisitler, gıda katkı maddeleri) temsil eder. Bir çalışmanın toksik etkileri saptayacak kadar titiz olduğunu gösterebilmek ve bileşenin veritabanına dahil edilmesi için hem NOAEL hem de LOAEL değerlerine sahip olması gereklidir. Ancak bazı durumlar için LOAEL mevcut değildir çünkü maddeler ana gıda bileşenleri olup iyi yürütülen çalışmalarda test edilen en yüksek doz da toksisitesi göstermemiştir [110]. Tehlike Değerlendirme Sistemi (*Hazard Evaluation Support System - HESS*) veritabanı, Japonya'nın Sağlık, Çalışma ve Refah Bakanlığı, Ulusal Teknoloji ve Değerlendirme Enstitüsü (*National Institute of Technology and Evaluation - NITE*) ve Ekonomi, Ticaret ve Sanayi Bakanlığı (*Ministry of Economy, Trade and Industry - METI*) tarafından üretilen raporlardan elde edilen 500 kimyasal için RDT verilerini içermektedir. Bu veritabanı, sıçanlar da oral yolla sub-kronik ve kronik (28-120 gün) maruziyetle ilgili detaylı RDT verilerini içerir. HESS veritabanı, QSAR OECD Toolbox'tan ücretsiz olarak indirilebilir ve hedef bileşenler için CAS numarası, kimyasal ad, SMILES, maruz kalma yolu ve çalışmaların süresi, kullanılan hayvan (suş, cinsiyet), toksikolojik veriler (organ, doku, etkiler, kullanılan en büyük ve en küçük dozlar) ve NOAEL/LOAEL değerleri gibi bilgiler sağlar [112]. IRIS, EPA tarafından geliştirilen ve çevrede bulunan 500'den fazla kimyasal hakkında bilgi içeren halka açık bir veritabanıdır. Çevresel kimyasallar hakkında tanımlayıcı ve nicel kronik sağlık bilgileri sağlayarak risk karar verme süreçlerini destekler. IRIS veritabanında iki ana etki kategorisi bulunur: kanser dışı (oral referans dozları ve inhalasyon referans konsantrasyonları: RfDs ve RfCs) ve kanser etkileri. NOAEL ve LOAEL, kullanılan türler, maruziyet yolu ve süresi, test edilen konsantrasyonlar ve hedef organlar hakkında bilgi içeren çalışmaların detaylı özetleri ile raporlanmıştır. Kullanıcılar, EPA web sitesinden verilere erişebilmektedir [113]. COSMOS veritabanı, 1660 bileşik için 12,538 toksikolojik çalışma içerir. İki veri seti mevcuttur: Amerikan Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (*Food and Drug Administration - US FDA*) ve oRepeatToxDB. İlk veri seti tekrarlanan doz ve genetik toksisite verileri dahil olmak üzere 12,198 çalışma içerir [114].

#### 2.4.2. NOAEL ve LOAEL için Yayınlanmış Örnek Modeller

Bu başlık altında bahsedilecek modeller başta ilaçlar için NOAEL ve LOAEL tahmin etmek üzere oluşturulmamıştır. Modelleme için kullanılan bileşikler farklı endüstriyel ve çevresel çalışmalardan oluşturulmuştur. Performanslar kabul edilebilirliğe yakındır ve disiplinlerarası bir bağlam da kullanılabilen güvenilir bir modelin geliştirilmesi için iyi bir başlangıç noktası gösterir. Tablo 2.7., literatüre dayalı modelleri özetlemektedir. RDT'nin tahmini için en son modellerden biri Toropov ve ark. tarafından açıklanmıştır [41]. Monte Carlo yöntemi ve üç moleküler tanımlayıcı kullanarak 113 organik bileşik için NOAEL hesaplaması yapılmıştır. Veri ve eğitim setinde ki (97 bileşik) ortalama performansları sırasıyla  $R^2$  ve RMSE (kök kare hatası) için 0.52 ve 0.61 olarak hesaplanmıştır. Test setinde (16 bileşik),  $R^2$  ve RMSE (kök kare hatası) açısından performansları sırasıyla 0.62 ile 0.73 ve 0.44 ile 0.52 arasında değişmiştir.

**Tablo.2.7.** LOAEL ve NOAEL Hesaplanması için Yapılmış Deneysel Çalışmalar

<b>Kaynak</b>	<b>Hesaplanan Son Nokta (Endpoint)</b>	<b>Yöntem</b>	<b>Süre</b>	<b>Veri Seti Sayısı</b>	<b>Reelde Kullanılan Denek Sayısı</b>
Toropov ve ark. (2015)	NOAEL	Monte Carlo	28 ila 90 gün arasında sıçanlar üzerinde oral olarak	97	16
Gadaleta ve ark. (2014)	LOAEL	<i>k</i> -NN	90 gün sıçanlara oral olarak	254	179
Toropova ve ark. (2014)	NOAEL	Monte Carlo	28 gün sıçanlara oral olarak	180	21
Sakuratani ve ark. (2013)	LOAEL	Read-across	28 ila 90 gün arasında sıçanlar üzerinde oral olarak	500	Hiç
Mazzatorta ve ark. (2008)	LOAEL	GA-PLS for selecting descriptors and LOO-SMLR for model generating	180 günden fazla olmak üzere sıçanlar üzerinde	19	Hiç
Garcia-Domenech ve ark. (2006)	LOAEL	Furnival-Wilson algorithm for selecting descriptor; MLR for (LOO crossvalidation) model generating	Sıçanlar üzerinde kronik çalışmalar	87	16
De Julián-Ortiz et al. (2005)	LOAEL	Adım adım prosedür tanımlayarak	Kronik çalışmalar	86	17
Matthews ve ark.	NOAEL	SA	İnsanlarda oral yolla 3 ila 12 ay arasında	1309	0

Toropova ve diğeri [115], Monte Carlo yöntemi kullanarak sıçanlar da 28 gün süren oral maruziyet için 218 NOAEL verisini modellemiştir [115]. Eğitim ve test setleri için  $R^2$  sırasıyla 0,679 ile 0,718 ve 0,61 ile 0,66 arasında değişmiştir. Gadaleta ve diğeri, benzerlik kavramına dayanan bir hesaplamalı teknik olan en yakın komşular (k-NN) algoritmasını kullanarak LOAEL tahmini için bir model geliştirmişlerdir [116]. Modelin eğitim ve test setleri sırasıyla 254 ve 174 organik bileşikten oluşmaktadır ve iki set için  $R^2$ , farklı k değerleri göz önünde bulundurularak 0,632 ile 0,769 ve 0,552 ile 0,682 arasında kullanılmıştır. Bu model VEGA (<http://www.vega-qsar.eu/>) uygulaması kullanılarak çalışılmıştır. Sakuratani ve ark., mekanistik bilgiye dayanarak, sıçanlar da 28 ile 120 gün arasında oral maruziyetle ilgili RDT verilerine sahip 500 kimyasal ile başlayan bir eğitim setinden yola çıkarak, bireysel toksisite türleriyle ilgili 33 kimyasal kategori belirlemiştir [117]. Kimyasallar belirli bir kategoriye ayrıldıktan sonra kategori içindeki diğer kimyasallara read-across (veri boşluğunu doldurma yaklaşımı) ile LOAEL türetilmiştir. Bu model LOAEL için rakamlar sağlamamakta ancak hedef kimyasal tarafından etkilenme olasılığı en yüksek olan hedef organı belirlemek için kullanılabilir. Çalışma HESS platformu üzerinden erişilebilir durumdadır. Mazzatorta ve diğeri tarafından, genetik algoritma ve kısmi en küçük kareler entegre yaklaşımı uygulanarak LOAEL tahmini için bir model geliştirilmiştir. Seçilen tanımlayıcılar 445 kronik toksisite verisi (sıçanlar da 180 gün veya daha fazla oral maruziyet) çeşitli kaynaklardan seçilerek çoklu lineer regresyon (LOO-SMLR) aracılığıyla bir LOAEL tahmin modeli geliştirmek için kullanılmıştır [118]. Son veri seti pestisitler, ilaçlar ve doğal ürünler içermektedir. Bu modelin gerçekleştirdiği performanslar  $R^2$  0,570 ve RMSE 0,700 olarak hesaplanmıştır.

## 2.5. Tez Kapsamında Kullanılan Kimyasal Maddeler

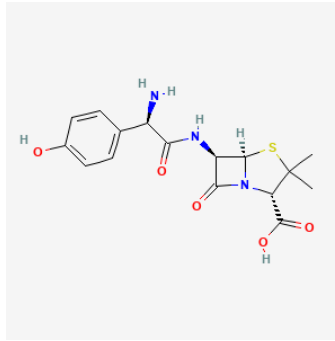
Bu tez kapsamında aşağıda zet bilgileri verilen etken maddelerin QSAR Toolbox zerinde LD50 ve NOAEL değerleri hesaplanmıştır. Maddelerin seçilmesinde hesaplama sonrası çıkan sonuçların, gerçek deneysel veriler ile karşılaştırılması yapılabilmesi için halihazırda mevcut LD50 ve NOAEL değeri olanların seçilmesine öncelik verilmiştir. Sonuç benzerliklerinin karşılaştırılmasından sonra literatürde halihazırda toksisite verisi bulunmayan Baklofen isimli etken madde seçilerek değerleri hesaplanmaya çalışılmıştır.



## AMOKSİSİLİN

Amoksisilin, geniş spektrumlu bir beta-laktam antibiyotik olup, penisilin ailesine aittir. Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılır. Amoksisilin, gram-pozitif ve bazı gram-negatif bakterilere karşı etkilidir ve bakterilerin hücre duvarı sentezini inhibe ederek işlev görür.

### Kimyasal ve Fiziksel Özellikler:



Şekil 2.5. Amoksisilin Kimyasal Gösterimi

- **Kimyasal Formül:** C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S
- **Molekül Ağırlığı:** 365,4 g/mol
- **Hidrojen Bağı Dönor Sayısı:** 4
- **Tam Kütle:** 365,10454189 g/mol
- **Ağır Atom Sayısı:** 25
- **Kaynama Noktası:** 194 °C
- **pH:** 7.4

### Farmakolojik Özellikleri

Amoksisilin tek başına, kulak, burun, boğaz, genitoüriner sistem, deri ve alt solunum yolu gibi hassas bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde endikedir. Amoksisilin, akut bakteriyel sinüzit, toplum kaynaklı pnömoni, alt solunum yolu enfeksiyonları, akut bakteriyel otitis media, deri ve deri yapısı enfeksiyonları ve idrar yolu enfeksiyonlarını

tedavi etmek için klavulanik asit ile birlikte verilir. Amoksisilin, *Helicobacter pylori* (H. pylori) enfeksiyonunun tedavisinde omeprazol ile birlikte kullanılır [119].

### **Farmakodinamik Özellikleri**

Amoksisilin, penisilin bağlayıcı proteinleri rekabetçi olarak inhibe eder, bu da otolitik enzimlerin yukarı regülasyonuna ve hücre duvarı sentezinin inhibisyonuna yol açar. Amoksisilin, genellikle günde iki kez verildiği için uzun bir etki süresine sahiptir. Amoksisilin geniş bir terapötik aralığa sahiptir çünkü hafif doz aşımı durumlarında önemli bir toksisite ile ilişkilendirilmez [120].

### **Toksisite Verileri**

Amoksisilin dahil olmak üzere penisilin tedavisi gören hastalar da ciddi ve bazen ölümcül olabilen aşırı duyarlılık (anafilaktik) reaksiyonlar bildirilmiştir. Bu reaksiyonlar, penisilin aşırı duyarlılık öyküsü olan ve birden fazla alerjene duyarlılık öyküsü olan bireyler de daha olasıdır. Bu ilaçların kullanımı ile doğumsal malformasyonların insidansı veya türü arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır. Bu ilaçların kullanımı ile intrauterin büyüme geriliği veya perinatal ölüm arasında bir ilişki bulunmamış, ancak kullanıcılar arasında erken doğum oranında (%8,9) kullanıcı olmayanlara (%6,5) kıyasla anlamlı bir fark olduğu gözlemlenmiştir.

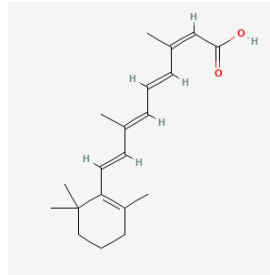
Fareler ve sıçanlarda 2000 mg/kg'a kadar olan dozlar ile üreme çalışmaları yapılmıştır. Amoksisilin'in fetüse zarar verdiğine dair bir kanıt bulunmamıştır. Ancak 100 µg/mL amoksisilin, *in vitro* ortam da sıçanların böbrek gelişimini etkilemiştir. Amoksisilin'in uzun süreli kullanımı, implantların çevresindeki kemik oluşumu üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olabilir. Amoksisilin'in tek başına mutajenik potansiyelini tespit etmek için çalışmalar yapılmamıştır ancak amoksisilin ve potasyum klavulanatın 4:1 karışımı üzerinde yapılan testlerden elde edilen bilgiler mevcuttur. Amoksisilin ve potasyum klavulanat, Ames bakteri mutasyon testinde ve maya gen dönüşüm testinde mutajenik bulunmamıştır. Amoksisilin ve potasyum klavulanat, fare lenfoma testinde zayıf bir pozitif sonuç vermiştir. Amoksisilin ve potasyum klavulanat, fare mikronükleus testinde ve farelerde dominant letal testinde negatif sonuç vermiştir [121].

- **LD50 (oral, sıçan):** 1500 mg/kg
- **LD50 (oral, fare):** 2500 mg/kg
- **NOAEL (sıçan):** 2450 mg/kg/günlük [122]

Amoksisilin seçilmesindeki başlıca neden tıp dünyasında yaygın olarak kullanılan bir antibiyotiktir. Bu nedenle toksikolojik profili ve güvenlik marjinleri iyi olarak bilinir. Bu tür yaygın olarak kullanılan bir madde üzerinde yapılan deneysel çalışmalar, hesaplamalar üzerinde yapılan çalışmada güvenilir bir karşılaştırma örneği olur. Geniş spektrumlu etkisi sayesinde çeşitli bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılır. Bu durum, hem insan sağlığı hem de veterinerlik açısından önemli bir antibiyotik olmasını sağlar. Geniş spektrumlu etkisi, toksikolojik değerlendirmeler için çeşitli biyolojik sistemlerle etkileşimini anlamak açısından önemlidir. LD50 ve NOAEL gibi parametrelerin belirlenmesi, Amoksisilin'in güvenli doz aralıklarını ve potansiyel toksik etkilerini anlamak için önemlidir. Bu tür veriler, özellikle yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi sırasında karşılaştırma yapmak için kullanılabilir.

## İSOTRETİNOİN

İsotretinoin, şiddetli akne tedavisinde kullanılan bir retinoid türevidir. Cilt hücrelerinin döngüsünü düzenleyerek çalışır ve yağ bezlerinin küçülmesine yardımcı olur.



Şekil 2.6. İsoetretinoin Kimyasal Gösterimi

### Kimyasal ve Fiziksel Özellikler

- **Kimyasal Formül:** C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>
- **Molekül Ağırlığı:** 300,44 g/mol
- **Hidrojen Bağı Donör Sayısı:** 1
- **Tam Kütlesi:** 300,208930132 g/mol
- **Ağır Atom Sayısı:** 22
- **Kaynama Noktası:** 437,5°C
- **pH:** 4.0

### Farmakolojik Özellikler

İsotretinoin, şiddetli dirençli nodüler akne tedavisinde 12 yaş ve üzeri hastalar için endikedir.

## Farmakodinamik Özellikler

İsotretinoin hücre döngüsünü, hücre farklılaşmasını, hayatta kalmayı ve apoptozu değiştirerek etkilerini gösterir. Bu etkiler sebum üretimini azaltır, gözeneklerin tıkanmasını ve akneye neden olan bakterilerin çoğalmasını engeller. İstretinoin ve 4-okso-isotretinoin, sebum üretimini önemli ölçüde azaltır. İstretinoinin, retinol bağlayıcı proteinlere (RBP'ler) ve retinoik asit nükleer reseptörlerine (RAR'lar) çok az ya da hiç afinitesi yoktur. Tretinoin ve 4-okso-tretinoin, isotretinoinin akne tedavisindeki etkisinin bir parçası olduğu düşünülen RAR- $\gamma$  reseptörüne bağlanır. İstretinoin, sebositlerde apoptozu indükleyerek sebum üretimini azaltır. Ayrıca bilinmeyen bir mekanizma ile hiperkeratinizasyonu azaltarak komedon oluşumunu da engeller. İstretinoin, doğrudan bakterileri öldürmez ancak sebum kanallarının boyutunu küçültür ve mikroçevreyi akneye neden olan bakteriler için daha az elverişli hale getirir [123].

## Toksisite Verileri

Deri alerjik reaksiyonları ve genellikle ekstremitelerde purpura (morarmalar ve kırmızı lekeler) ve ekstradermal etkilenim (böbrek dahil) ile ciddi alerjik vaskülit vakaları doz aşımında gözlenmiştir. İstretinoin tedavisi gören hastalarda yükselmiş veya normal serum trigliserid konsantrasyonları ile akut pankreatit, nadir vakalarda ölümcül hemorajik pankreatit gözlenmiştir. Yüksek dozda sistemik olarak verilen vitamin A ile benzer şekilde iskelet anormallikleri görülmüştür. Uzun süreli, yüksek doz da veya birden fazla isotretinoin tedavi kürünün, tek bir tedavi küründen daha fazlası iskelet sistemi üzerinde etkili olabileceğine dair bazı kanıtlar mevcuttur. Ekim 1982 ile Haziran 1985 arasında, Advers İlaç Reaksiyon Raporlama Sistemi (*Adverse Drug Reaction Reporting System - ADRRS*) isotretinoin kullanan 93 hastada 104 şüpheli advers reaksiyon raporu almıştır. Deri ve mukoz membranlar, merkezi sinir sistemi, iskelet sistemi, gebelik ve gözlerle ilgili advers reaksiyonlar en yaygın olarak bildirilenler arasındadır. Şiddetli baş ağrısı en sık rapor edilen advers reaksiyon olmuştur. İstretinoin, FDA'nın depresyon ve intihar girişimleri ile ilişkilendirilen ilaçlar veritabanında ilk 10'da yer almaktadır. Ancak bu ilişki tartışmalıdır çünkü orta derecede aknesi olan hastaların %5.6'sında mevcut intihar düşünceleri bulunabilir, akne tedavisinin iyileşmesi genellikle ilişkili depresyonu azaltır

ve isotretinoin kullanıcılarının depresyon yaşama veya intihar etme olasılığı, akne için antibiyotik kullananlarla aynı değildir. İlk gebelik ayında isotretinoin kullanan bir annenin bebeğinde asimetrik ağlayan yüz ve diğer anormallikler bildirilmiştir. İlk trimesterde isotretinoin kullanan annelerin doğurduğu iki bebekte belirgin frontal çıkıntı, hidrosefali, mikroftalmi ve küçük, deforme olmuş, düşük yerleşimli, farklılaşmamış kulaklar gözlemlenmiştir. Ayrıca Dandy-Walker malformasyonu, mikroensefali, hipertelorizm, küçük kulak kanalları, yarık damak, küçük ağız ve doğumsal kalp hastalığı da gözlemlenmiştir. İsoetretinoin, insanlarda güçlü bir teratojendir [123].

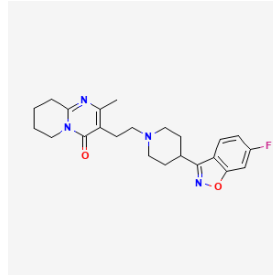
Oral isotretinoin verilen erkek ve dişi sıçanlarda 8 veya 32 mg/kg/gün dozlarında 18 aydan uzun süre tedavi devam edilmiştir. Dozla ilişkili olarak kontrol gruplarına göre pheochromocytoma insidansında artış gözlemlenmiştir. Daha yüksek doz da adrenal medüller hiperplazi insidansı da her iki cinsiyette artmıştır. Köpeklerde, oral isotretinoin tedavisinden sonra testis atrofi gözlemlenmiştir. Tedavi 30 hafta boyunca 20 veya 60 mg/kg/gün dozlarında yapılmıştır. Sıçanlar da gonadal fonksiyon, doğurganlık, gebelik oranı, gestasyon veya doğum üzerinde advers etkiler gözlemlenmemiştir. Farelerde klinik doz (1 mg/kg/gün), hipokampüste ve subventriküler bölgede hücre proliferasyonunu önemli ölçüde azaltır, hipokampal nörojenezisi baskılar ve mekansal radial labirent görevini öğrenme kapasitesini ciddi şekilde bozduğu gözlenmiştir [124].

- **LD50 (Oral, Fare):** 3500 mg/kg
- **LD50 (Oral, Sıçan):** 1000 mg/kg
- **NOAEL (Sıçan):** 0,4 mg/kg/gün [125]

Isotretinoin'in şiddetli akne tedavisinde kullanımı sebebi ile ergenlik döneminde başlayarak toplum içerisinde artan bir kullanım ivmesi yakalamıştır. Bu denli yüksek kullanıma sahip bir ilacın toksikolojik değerlerinin doğruluğunun iyileştirilmesinin sağlanması önemli bir adımdır. Isotretinoin'in bilinen yan etkileri ve güvenlik profili, karşılaştırmalar için değerli veriler sağlar.

## RİSPERİDON

Risperidon, antipsikotik bir ilaçtır ve şizofreni, bipolar bozukluk gibi psikiyatrik hastalıkların tedavisinde kullanılır. Dopamin ve serotonin reseptörlerini bloke ederek çalışır.



Şekil 2.7. Risperidon Kimyasal Gösterimi

### Kimyasal Ve Fiziksel Özellikler

- **Kimyasal Formül:** C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>
- **Molekül Ağırlığı:** 410,49 g/mol
- **Hidrojen Bağı Donör Sayısı:** 0
- **Tam Kütlesi:** 410,21180428 g/mol
- **Ağır Atom Sayısı:** 30
- **Kaynama Noktası:** 215°C
- **pH:** 4.0 – 6.0

### Farmakolojik Özellikler

Risperidon, şizofren tedavisi ve otistik bozuklukla ilişkili huzursuzluk için endikedir. Akut mani veya bipolar I bozukluk ile ilişkili karmaşık durumların tedavisinde monoterapi olarak veya lityum veya valproik asit ile ek tedavi olarak endikedir [126].

### Farmakodinamik Özellikler

Risperidonun temel etkisi, beyinde ki dopaminerjik ve serotonerjik yolların aktivitesini azaltmak ve bu sayede şizofreni ve ruh hali bozukluklarının semptomlarını

azaltmaktır. Risperidon, beyin içindeki serotonerjik 5-HT<sub>2A</sub> reseptörlerine, dopaminerjik D<sub>2</sub> reseptörlerine kıyasla yüksek bağlanma afinitesine sahiptir. Risperidon, D<sub>2</sub> reseptörlerine birinci kuşak antipsikotik ilaçlara göre daha düşük bir afiniteye sahiptir [127].

### **Toksisite Verileri**

Uzun süreli risperidon tedavisinde, hasta popülasyonunun %30'u kadarında karaciğer testlerinde anormallikler görülebilir ve bu genellikle tedavinin ilk 8 haftasında ortaya çıkar. ALT yükselmeleri genellikle hafif, geçici olup, ilaç kullanımına devam edilse bile devam edebilir. Daha belirgin ALT ve alkalen fosfataz yükselmeleri, semptomlarla ya da semptomsuz, sarılık olup olmadığına bağlı olarak rapor edilmiştir. Risperidona başlanmasından birkaç ay veya hatta yıl sonra ortaya çıkan sarılıklı akut karaciğer hasarı vakaları da bildirilmiştir. Serum enzim yükselmeleri genellikle kolestatik bir desen gösterir ancak hepatoselüler ve karmaşık desenler de tanımlanmıştır. İmmunoalerjik belirtiler (döküntü, ateş, eozinofili) nadirdir; risperidon tedavisinin tetiklediği otoimmün hepatit vakası yayınlanmış olsa da çoğu vaka otoimmün özellikler göstermez [128].

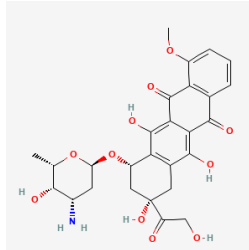
- **LD<sub>50</sub> (oral, fare):** 215 mg/kg
- **LD<sub>50</sub> (oral, sıçan):** 135 mg/kg
- **NOAEL(sıçan):** 0,63 mg/kg/gün [129]

Risperidonun dopamin ve serotonin reseptörleri ile etkileşimi ona geniş bir etki spektrumu sağlamaktadır. Bilinen yan etki ve güvenlik profili, yüksek biyoyararlanım ve protein bağlanma oranı karşılaştırma verilerinde zengin bir kaynak oluşturur.



## DOKSORUBİSİN

Dokсорubisin, kanser tedavisinde kullanılan bir kemoterapi ajanıdır. DNA interkalasyonu ve topoizomeraз II inhibisyonu yoluyla çalışır.



Şekil 2.8. Dokсорubisin Kimyasal Gösterimi

### Kimyasal ve Fiziksel Özellikler

- **Kimyasal Formül:** C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>11</sub>
- **Molekül Ağırlığı:** 543,52 g/mol
- **Biyoyararlanım:** %5-10 (intravenöz)
- **Hidrojen Bağı Donör Sayısı:** 6
- **Tam Kütle:** 543,17406074 g/mol
- **Ağır Atom Sayısı:** 39
- **Kaynama Noktası:** 768°C
- **pH:** 4.5 – 5.5

### Farmakolojik Özellikler

Dokсорubisin, akut lenfoblastik lösemi, akut miyeloblastik lösemi, Hodgkin ve Hodgkin dışı lenfoma, metastatik meme kanseri, metastatik Wilms tümörü, metastatik nöroblastom, metastatik yumuşak doku ve kemik sarkomları, metastatik over kanseri, metastatik geçiş hücreli mesane kanseri, metastatik tiroid kanseri, metastatik mide kanseri ve metastatik bronşojenik kanser gibi neoplastik durumların tedavisinde endikedir.

Liposomal formülasyon için doksorubisin, platin bazlı kemoterapiden sonra ilerleyen veya nükseden over kanseri, önceki sistemik kemoterapi başarısızlığı veya bu tedaviye intoleransı olan AIDS ile ilişkili Kaposi sarkomu ve daha önce bortezomib almamış ve en az bir ön tedavi almış hastalarda bortezomib ile kombinasyon halinde çoklu myelomun tedavisinde endikedir [130].

### **Farmakodinamik Özellikler**

Doksorubisin, sitotoksik ve hücre döngüsü spesifik olmayan bir antrasiklin antibiyotığıdır. Genellikle antitümör etkisini DNA yapısını destabilize ederek ve DNA iplikçiklerinde kırılmalar ve hasarlar oluşturarak gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca hücrelerin transkriptomlarını değiştirir ve DNA yapılarının onarılamaması sebebiyle apoptotik yolları başlatabilir. Ek olarak, doksorubisin interkale olma özelliği, topoisomerez II, DNA polimeraz ve RNA polimeraz gibi hayati enzim aktivitelerini de etkileyerek hücre döngüsü duraklamalarına yol açabilir. Son olarak, doksorubisin sitotoksik reaktif oksijen türlerini üretebilir ve bu şekilde hücre hasarlarına yol açabilir [131].

### **Toksisite Verileri**

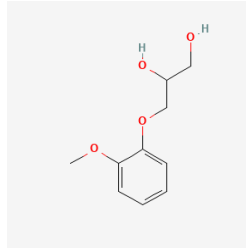
Doksorubisin, antimitotik ve sitotoksik aktiviteye sahip olup, çeşitli önerilen etki mekanizmaları aracılığıyla bu etkilerini gösterir. Doksorubisin, DNA ile baz çiftleri arasında interkale olarak kompleksler oluşturur ve topoisomerez II aktivitesini inhibe eder. Bu inhibitör etki, DNA-topoisomerez II kompleksini stabilize ederek, topoisomerez II'nin katalize ettiği ligasyon-religasyon reaksiyonunun religasyon kısmının engellenmesine yol açar [128, 132].

- **LD50 (oral, fare):** 570 mg/kg
- **LD50 (oral, sıçan):** 100 mg/kg
- **NOAEL(sıçan):** 8 mg/kg/gün [133]

Doksorubisin'in kanser tedavilerinde kullanılması ve DNA bazında bir etki mekanizması bu etken maddeyi toksikolojik anlamda önemli kılmaktadır. Yüksek protein bağlanma oranı ve düşük biyoyararlanım toksikolojik çalışmalarda dikkate alınmıştır.

## GUAİFENESİN

Guaifenesin, balgam söktürücü olarak kullanılan bir ilaçtır. Solunum yollarındaki balgamı inceltir ve öksürükle atılmasını kolaylaştırır.



Şekil 2.9. Guaifenesin Kimyasal Gösterimi

### Kimyasal ve Fiziksel Özellikler

- **Kimyasal Formül:** C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>
- **Molekül Ağırlığı:** 198,22 g/mol
- **Biyoyararlanım:** %85 (oral)
- **Hidrojen Bağı Donör Sayısı:** 2
- **Tam Kütlesi:** 198,08920892 g/mol
- **Ağır Atom Sayısı:** 14
- **Kaynama Noktası:** 215-216°C
- **pH:** 5.0 – 7.0

### Farmakolojik Özellikler

Guaifenesin, soğuk algınlığı, bronşit ve diğer solunum yolu hastalıklarına bağlı olabilecek göğüs ve öksürüğün geçici semptomatik rahatlama için belirtilen bir balgam söktürücüdür [134].

### Farmakodinamik Özellikler

Guaifenesin, balgamın ve bronşiyal salguların yapışkanlığını ve yüzey gerilimini azaltarak bu maddelerin çıkışını artıran bir balgam söktürücü olarak sınıflandırılır. Ayrıca guaifenesin, daha az viskoz olan mide salgularının akışını artırarak siliyer hareketi teşvik

eder. Bu eylemler sonucunda kuru ve verimsiz öksürükleri daha verimli ve daha az sık görülen öksürüklere dönüştürür. Temel olarak bu salgıların viskozitesini ve yapışkanlığını azaltarak, üst ve alt solunum yolundan biriken salgıların çıkarılmasında mukosilyer aktivitenin etkinliğini artırır.

### **Toksisite Verileri**

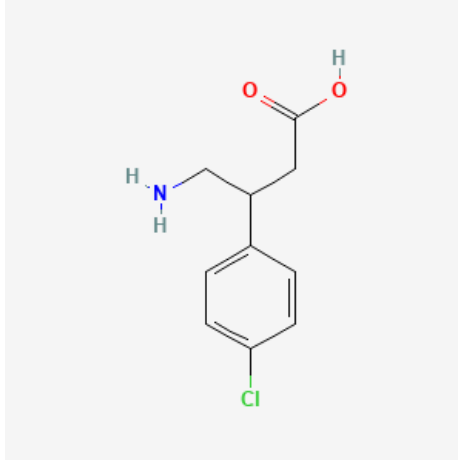
Guaifenesin doz aşımıyla ilişkili en yaygın belirti ve semptomlar bulantı ve kusma olmuştur. Gebelerde yeterli ve iyi kontrollü çalışmalar yapılmamış olmasına rağmen, ilk trimesterde guaifenesine maruz kalan 197 anne-çocuk çiftini izlemiştir. Yenidoğanlar da kasık fitiği görülme sıklığının arttığı tespit edilmiştir. Ancak, iki büyük anne-çocuk çift grubunda guaifenesin kullanımının gebelik sırasında doğuştan gelen kusurlarla güçlü bir şekilde ilişkili olmadığı bulunmuştur. Ayrıca guaifenesin küçük miktarlarda anne sütüne geçmektedir. Bu nedenle tedavinin olası yararlarını olası risklere karşı dengeleyerek dikkatli olunmalıdır [135].

- **LD50 (oral, fare):** 1510 mg/kg
- **LD50 (oral, sıçan):** 2500 mg/kg
- **NOAEL (sıçan):** 500 mg/kg/gün

Yüksek biyoyararlanım ve kısa yarı ömür toksisite değerlendirmelerinde dikkata alınması gereken önemli faktörlerdendir.

## BAKLOFEN

Baklofen, merkezi sinir sistemini etkileyen bir kas gevşetici ve antispastik ajandır. Genellikle, kas spazmlarını ve kas sertliğini tedavi etmek için kullanılır.



Şekil 2.10. Baklofen Kimyasal Gösterimi

### Kimyasal ve Fiziksel Özellikler

- **Kimyasal Formül:** C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>ClNO<sub>2</sub>
- **Molekül Ağırlığı:** 213,66 g/mol
- **Biyoyararlanım:** %70-80 (oral)
- **Hidrojen Bağı Donör Sayısı:** 2
- **Tam Kütlesi:** 213,0556563 g/mol
- **Ağır Atom Sayısı:** 14
- **Kaynama Noktası:** 285°C
- **pH:** 4.5 – 6.5

### Farmakolojik Özellikler

Ağız yoluyla kullanılan baklofen, multipl skleroz sonucu gelişen spazmın tedavisinde endikedir ve özellikle fleksör spazmlarını, bu spazmlarla birlikte gelen ağrı, klonus ve kas sertliğini hafifletmede kullanışlıdır. Ayrıca omurilik yaralanmaları ve diğer

omurilik hastalıkları olan hastaları tedavi etmek için de kullanılabilir. Baklofen, romatizmal hastalıklardan kaynaklanan iskelet kası spazmlarını tedavi etmek için kullanılmamalıdır. İntratekal baklofen ise 4 yaş ve üzeri hastalarda beyin veya omurilik kaynaklı şiddetli spazmın yönetimi için endikedir ve ağız yoluyla baklofen tedavisine yanıt vermeyen veya etkili dozlarda merkezi sinir sistemi yan etkilerini tolere edemeyen hastalar için ayrılmıştır [136].

### **Farkodinamik Özellikler**

Baklofen, kas gevşetici bir ajandır ve kas gevşemesi sağlar. Presinaptik nöronlarda uyarıcı nörotransmitterlerin salınımını azaltır ve postsinaptik nöronlarda inhibitör sinirsel sinyalleri uyarır. Baklofen, merkezi sinir sistemi depresyon özelliklerine sahiptir ve sedasyon, uyuklama, ataksi, solunum ve kardiyovasküler depresyon gibi yan etkilere neden olabilir. Baklofen ayrıca bazı antinokiseptif etkiler gösterir ve mide asidi salgısını uyarır [137].

### 3.GEREÇ ve YÖNTEM

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farnasötik Toksikoloji Yüksek Lisans Programı kapsamında yapılan “*IN SILICO* TOKSİKOLOJİ YÖNTEMLERİ VE UYGULAMALARI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR” başlıklı tez çalışması için Hacettepe Üniversitesi Kütüphaneleri’nin erişimine açık olan veri tabanları kullanılarak gerekli kaynak taramaları yapılmıştır. Öncelikli olarak kütüphanelere uzaktan erişime olanak sağlayan internet sayfasından yararlanılmıştır. Tezin ilk altı aylık sürecinde öncelikle “*in silico* toksikoloji”, “QSAR”, “prediktiv akut toksisite testleri”, “read-across”, “preklinik çalışmalar”, “QSAR Toolbox”, “T.E.S.T”, “hayvan deneyleri”, “3R” ve “kılavuz” anahtar kelimeleri farklı kombinasyonlarla İngilizce ve Türkçe olarak Google Akademik başta olmak üzere PubMed, ScienceDirect, YÖK Tez Veritabanı ve ECHA gibi veri tabanlarında kaynak taraması yapılmıştır. Anahtar kelime kombinasyonları ile yukarıda bahsedilen veri tabanlarında 1990 ve 2024 yılları arasında yayımlanmış pek çok makaleye erişim sağlanmıştır. İlgili makaleler, başlıklarıyla EndNote uygulamasına yerel kütüphane oluşturularak kaydedilmiştir. Başlıkları ile arandığında bulunamayan makaleler yazar isimleriyle aranarak kaydedilmiştir. Her iki yöntemle EndNote uygulamasında aranan kaynak bulunamadıysa, ilgili kaynak bir makale ise başlık, yazar, dergi adı, yayınlanma yılı, sayfa sayısı, doi numarası, PMCID, URL; bir kitap ise başlık, yazar, editör, yayınevi, yayınlanma yılı, sayfa gibi bilgiler kaydedilerek yerel kütüphanede arşivlenmiştir. Tezin hazırlanmasında, ulusal ve uluslararası kabul edilen yayınevleri tarafından basılmış olan konu ile ilgili kitaplar ve dünya sağlık otoriteleri tarafından referans alınan kılavuzlardan da yararlanılmıştır. Sağlık otoriteleri olan EMA, ICH, FDA gibi kuruluşların resmi internet sitelerinde yer alan halka açık verilere ve kılavuzlara başvurulmuştur. Ulusal ve uluslararası makaleler ile incelenen resmi internet siteleri dahil olmak üzere 152 adet kaynaktan yararlanılmasına karar verilmiştir. Tez içinde kaynak eklenmesi için EndNote programından yararlanılmıştır. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzunda verilen kurala uygun olarak "Vancouver" kaynak gösterme biçimi kullanılmıştır.



### 3.1. GEREÇLER

#### 3.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Bu çalışmanın amacına uygun olarak *in silico* sistemlerin tahminsel doğruluğunu göstermek amacıyla QSAR Toolbox sürüm 4.6 yazılımı kullanılmıştır. QSAR Toolbox, OECD websitesinden ücretsiz bir şekilde araştırmacıların kullanımına açık durumdadır. OECD ile ECHA işbirliğiyle geliştirilen QSAR Toolbox, kimyasalların potansiyel tehlikelerini *in silico* modellerle değerlendirmek için kullanılan bir yazılım uygulamasıdır. Bu (Q)SAR yaklaşımlarının düzenleyici kurumların yer aldığı devletler ve endüstri kuruluşları tarafından laboratuvar uygulamalarını kolaylaştırmak ve kabul edilerek yaygınlaştırmak amacıyla kullanılmaktadır. Bu yazılımın kullanımı ile farklı son noktaların tahmininde genişletilmiş bir seçenek sunmakta ve laboratuvar hayvanlarıyla yapılan çalışmaları azaltma veya en iyi durum da tamamen yerine geçmeye imkanı sağlamaktadır. QSAR Toolbox, çalışma yapılan kimyasal yapıların özelliklerini belirlemek için QSAR denklemlerini tanımlamak üzere deneysel çalışmaların sonuçlarını içeren 250,000'den fazla kimyasalın veritabanıyla birlikte kullanılan çok sayıda veritabanını içermektedir. Profillerin temel işlevi deneysel değerleri çıkarmak ve LD50, En Düşük Gözlenen Advers Etki Seviyesi (*Lowest observed adverse effect level* - LOAEL), NOAEL, En Düşük Gözlenen Etki Seviyesi (*Lowest Observed Effect Level* - LOEL) ve En Düşük Gözlenen Etki Seviyesi (*Non Observed Effect Level* - NOEL) gibi belirli hedeflere veya son noktalara yönelik QSAR değerlerini hesaplamaktır. Bu çalışma için hesaplanan son noktalar LD50 ve NOAEL değerleridir. Yazılım uygulamaları içinde bulunan 100'den fazla tanımlayıcı, optimal tahmin denklemlerini kullanmak için dikkate alınmıştır.

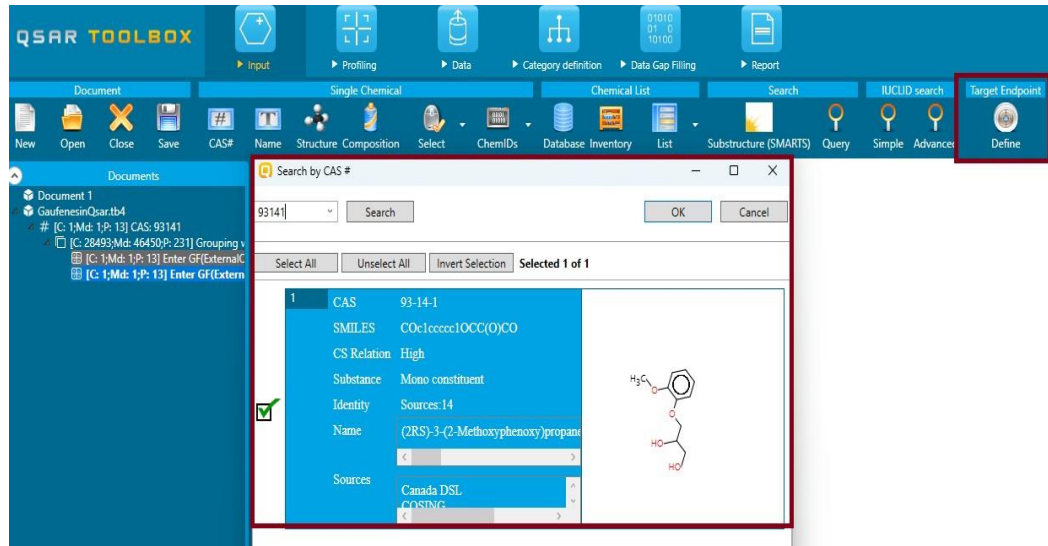
## 3.2. YÖNTEMLER

### 3.2.1. QSAR Toolbox İş Akışı ve Son Nokta Tanımlanması

Toolbox ile bir tahmin gerçekleştirmek için gereken işlevler ve kaynaklar, altı ana modüle ayrılmıştır: Giriş, Profillemeye, Veri, Kategori tanımlama, Veri boşluklarını doldurma ve Rapor. Bu modüller, bir iş akışı takip edilerek yürütülmelidir.

İş akışı, “Giriş” aşamasıyla başlar. Bu aşama, hedef kimyasal ya da kimyasalların ve ilgilenilen sonucun seçilmesine olanak tanır. İkinci modül “Profillemeye” modülüdür. Sistem içerisindeki mevcut bilgi, maddelerin kimyası ve olası kimyasal ve biyolojik reaktiviteleri, farklı profillere kodlanmıştır. Profillemeye, yapıların kimyasal ve parametrik özelliklerine bağlı olarak kimyasallara farklı etiketler atar. Bu etiketler, belirli veritabanlarına aidiyeti veya sonuca özgü yapısal uyarıları gösterebilir. Sonraki “Kategori” tanımlama modülünde, profillemeye sonuçları uygun benzerleri belirlemek için arama kriteri olarak kullanılır. Benzerler için deneysel veriler “Veri” modülünde aranır. Mevcut verilerle benzerler, hedef kimyasalın veri boşluklarını doldurmak için Veri boşluklarını doldurma modülünde kullanılır. Tahminin nasıl elde edildiğini detaylandıran bir rapor dosyası, iş akışının son aşaması olan “Rapor” modülünde oluşturulur.

QSAR Toolbox uygulamasını çalıştırılmasından sonra çalışılacak molekülü programa tanımlamak ilk adımdır. Bu adımdan sonra molekül üzerinde odaklanılmak istenen hedef son nokta (target endpoint) seçilir. Molekül tanımlanırken isim, CAS numarası ya da elle yapının çizilmesini sağlayan özellikler kullanılarak hedef molekül program üzerinde tanımlanmaktadır. QSAR Toolbox programında molekül tanımlanması işlemi Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. QSAR Toolbox üzerinde molekül tanıtılması.

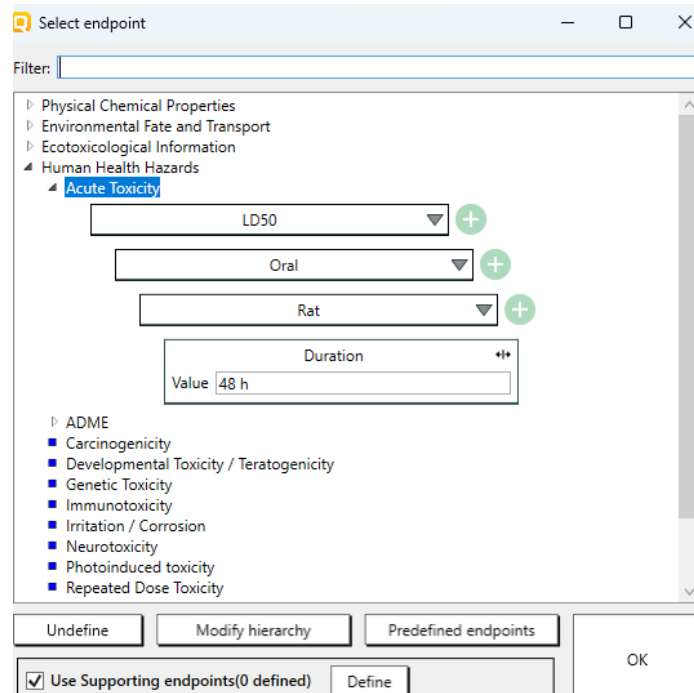
*Endpoint* tanımlanması alanında ADME, genetik toksisite, karsinojenite gibi temel toksikoloji alanları da dahil olmak üzere istenen endpoint üzerinde detaylı bir filtreleme yapılması gerekmektedir.

Tez çalışması kapsamında *endpoint* tanımlama alanında Akut Toksikite seçildikten sonra 48 saat ile 96 saat aralığı belirtilerek, LD50 değeri hesaplanması seçilmiştir. Tür olarak fare ve sıçan türleri filtreleme içerisine alındıktan sonra uygulama yolları olarak oral, intravenöz ve intraperitoneal seçilmiştir. Oral uygulama yollarının (gavaj, kapsül vb. gibi) türleri program içerisinde en çok veriye sahip olanların verilerinin değerlendirilmesi istendiği için “Oral Genel” olarak bırakılmıştır.

NOAEL değeri hesaplanmasında yazılım içerisinde *endpoint* kısmından Tekrarlayan Doz Toksikitesi (*Repeated Dose Toxicity* - RDT) seçimi yapılarak fare ve sıçan türleri seçilmiştir. Uygulama yolu olarak oral genel, intravenöz ve intraperitoneal seçimi yapıldıktan sonra zaman seçiminde kriter belirlenmemiştir. Zaman seçiminde kriter belirlenmemesinin sebebi NOAEL değeri hesaplamaları program içerisinde hesaplanırken 24 saat ile 96 saat aralığında (kimi zaman bu süreler arasında) bulunan tüm verilerin alınmasını istenmesidir. Eğer belirli bir seçim yapılmaz ise yazılım bu seçeneği sunmaktadır. QSAR Toolbox programında *endpoint* seçimi Şekil 3.2.’de gösterilmiştir.

Tez çalışmasının son nokta hesaplanmalarında LD50 ve NOAEL seçimleri kullanılmıştır. LD50, bir maddenin test edilen bir popülasyonda denenen organizmanın %50'sini öldüren doz miktarını ifade eder. Genellikle miligram madde başına kilogram vücut ağırlığı (mg/kg) olarak ifade edilir. LD50 değeri, bir maddenin akut toksisitesini ölçmek için kullanılır ve bir maddenin ne kadar zehirli olduğunu anlamak için gereklidir.

NOAEL, belirli bir madde için deneklerde hiçbir advers etki gözlenmeyen en yüksek dozu temsil etmektedir. NOAEL, genellikle kronik toksisite çalışmalarında kullanılır. NOAEL değeri, düzenleyici kurumlar tarafından güvenli maruziyet sınırlarını belirlerken temel alınır.



**Şekil 3.2.** Son Nokta (*Endpoint*) seçimi.

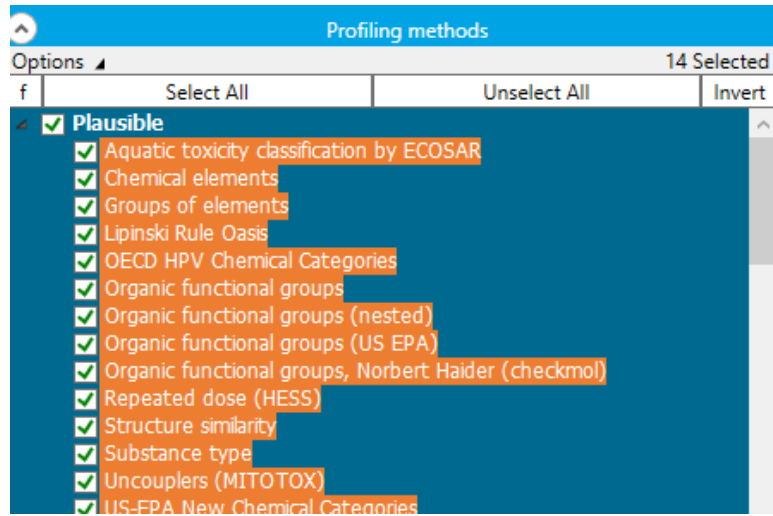
Yapılan tez çalışmasında kapsamında akut toksisitenin temel göstergesi olarak LD50 değerleri 48 saatlik periyotlar için hesaplanmaya çalışılmıştır. Süre seçilirken deneysel verilerden elde edilen kaynaklara göre karşılaştırılma yapılabilmesi için veriler göz önünde bulundurulmuştur. Karşılaştırmanın yapılabilmesi için literatürde çıkan verilerine ulaşabildiğimiz Amoksisilin, İsoetreionin, Risperidon, Doksorubisin ve

Guaifenesin maddeleri seçilmiş ve programda LD50 ve NOAEL değerleri hesaplanarak hem akut hem de subkronik toksisitesi için karşılaştırma yapılmıştır. Literatürde sıçan LD50 ve NOAEL değerleri bilinen maddelerin seçilmesine ek olarak, programda sıçan türü için LD50 ve NOAEL değerleri bulunmadığı tespit edilen Baklofen için de program üzerinde hesaplama yapılmıştır. Tablo 2.8.'de çalışmada kullanılmak üzere seçilen maddeler ve CAS numaraları gösterilmiştir.

**Tablo.3.1.** Hesaplaması yapılan maddelerin isimleri ve CAS numaraları

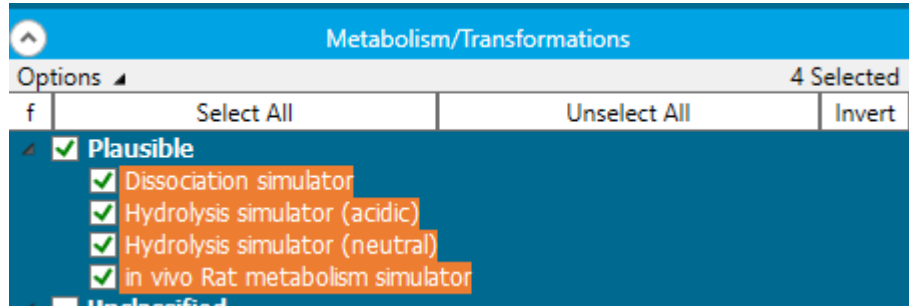
Çalışılan madde	CAS no
Amoksisilin	26787-78-0
İzotretinoin	4759-48-2
Risperidon	106266-06-2
Dokсорubisin	23214-92-8
Guaifenesin	93-14-1
Baklofen	1134-47-0

Profilleme metodlarının seçilmesi sırasında QSAR Toolbox'ın sunduğu metotlardan hesaplanmak istenen LD50 ve NOAEL uygunluk derecesi yüksek olan metotlar seçilir. Bu metotlar arasında yüksek benzerlik oranı veren “*Aquatic Toxicity Classification by ECOSAR*”, “*Lipinski Rule Oasis*”, “*Organic functional groups (US EPA)*” gibi metotlar da dahil olmak üzere toplam da on dört adet proffileme metodu seçilmiştir (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Profileleme metotlarının listesi.

Profileleme metotlarının seçiminden sonra simüle edilmek üzere “Metabolizma/Dönüşümler (*Metabolism/Transformations*)” kategorisinden LD50 ve NOAEL değerlerinin hesaplamasında kullanılacak olan seçenekler belirlenmiştir. Bu seçimler Şekil 3.3.’de gösterilmiştir. Bu seçimlerden ana simüle parçası olarak “*in vivo Rat Metabolism simulator*” çalışma sırasında öne çıkartılmıştır.



Şekil 3.4. Metabolizma ve Transformasyon simülatörlerinin listesi.

Molekül tanımlanması ve endpoint seçilmesinden sonra programın tarama yapması istenilen ECHA ya da *Open Food Tox Hazar* EFSA gibi geniş deneysel veriye sahip veritabanları seçilmiştir. Bu veritabanlarından %90 ve üzeri benzerlik gösteren yapılar filtrelenerek bir karşılaştırma yapılması sağlanır. Bu yapılar üzerinde bahsedilen

QSAR hesaplama yöntemleri çalışılarak deneysel verilerle karşılaştırılması sağlanabilecek veriler elde edilir.

Veri boşluklarını doldururken, daha tutarlı sonuçlar elde etmek için belirli bir tür ve test süresi ile seçimi daraltılması yazılım tarafından önerilmektedir. Tez çalışmasında LD50 ve NOAEL değerlerinin hesaplanması istenen etken maddelerin, zaman aralığı olarak 48 saat aralığında simüle süresi seçilmiş olmasının sebebi yazılım tarafından önerilen en yüksek doğruluk payına sahip değerleri içermesidir. Bu değerlere ek olarak uygulama yolu olarak oral, intravenöz ve intraperitoneal yollar da seçilerek bu değerlerin gerçek laboratuvar deney verilerine en yakın değerleri hesaplayabilmesini sağlamak istenmiştir. Çalışma içerisinde kullanılan etken maddeler de hangi yolların seçildiği tablo 4.1 de belirtilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. LD50 Değerlerinin QSAR Toolbox ile Deneysel Veriler Arasında Karşılaştırılması

Akut toksisitenin önemli bir birimi olan LD50 değerleri QSAR Toolbox programı kullanılarak Amoksisilin, İstretionin, Risperidon, Doksorubisin, Guaifenesin ve Baklofen için hesaplanmış ve deneysel veriler ile karşılaştırılmıştır. Söz konusu çalışmada deneysel verilerine ulaşabildiğimiz maddelerden Amoksisilin, İstretionin ve Guaifenesin için oral uygulama yolundan sıçan türü için hesaplama yapılmıştır. Farklı olarak uygulama yolu Doksorubisin için intraperitoneal iken, Risperidon için tür sıçan olarak seçilmiştir. Karşılaştırmalı çalışma verileri Tablo 4.1. 'de özetlenmiştir.

Amoksisilin için yapılan hesaplamada uygulama yolu olarak oral yol ve sıçan türü seçilmiş olup, Amoksisilin'in için hesaplanan LD50 değeri 7300 mg/kg bulunmuştur. Deneysel değer 15000 mg/kg'dır. QSAR modeli olarak Danish QSAR DB ACDLabs kullanılmıştır. Hesaplanan değer ile deneysel değer arasında ki benzerlik oranı %48 olarak bulunmuştur. Benzerlik oranının yükseltilmesi için kriter seçiminde filtreleme noktasında detaylandırma, daha yüksek bir sonuç elde edilmesini sağlayacaktır. Filtreleme seçiminde çalışma kapsamında uygulama yolu olarak "Genel Oral" seçilmiştir. Uygulama yolunun detaylandırılması daha net ve yüksek sonuçlar verme ihtimalini arttırır.

İstretionin için hesaplamada uygulama yolu olarak oral gavaj yol ve sıçan türü seçilmiş olup, İstretionin'in için hesaplanan LD50 değeri 280 mg/kg bulunmuştur. Deneysel değer 400 mg/kg'dır. QSAR modeli olarak Danish QSAR DB ACDLabs kullanılmıştır. Hesaplanan değer ile deneysel değer arasında ki benzerlik oranı %70 olarak bulunmuştur. Benzerlik oranının Amoksisilin'e göre yüksek çıkmasında filtreleme seçiminde "Oral Gavaj" yol seçilmesi olarak düşünülmektedir. Aynı şekilde benzerlik oranının daha fazla yükseltilmesi için seçilen filtreleme tipindeki verilerin arttırılması yardımcı olacaktır.



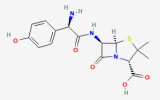
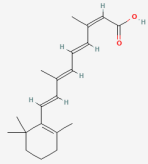
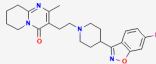
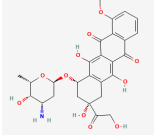
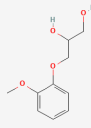
Risperidon için hesaplamada uygulama yolu olarak oral genel yol ve fare türü seçilmiş olup, Risperidon için hesaplanan LD50 değeri 190 mg/kg bulunmuştur. Deneysel değer 63,1 mg/kg'dır. QSAR modeli olarak Danish QSAR DB ACDLabs kullanılmıştır. Hesaplanan değer ile deneysel değer arasında ki benzerlik oranı %33 olarak bulunmuştur. Benzerlik oranının Amoksisilin ve İsoetreionin'e göre düşük çıktığı gözlenmiş olup, bu değerde fare türünün seçilmiş olmasından kaynaklandığı ve uygulama yolu olarak da genel oral yol seçiminin yapıldığı düşünülmektedir. Veri seti bakımından da Risperidon, diğer etken maddelere göre daha az içerik bulundurmaktadır. Benzerlik oranının artırılması ileri çalışmalar gerektirmektedir.

Doksorubisin için hesaplamada uygulama yolu olarak intraperitoneal yol ve sıçan türü seçilmiş olup, Doksorubisin için hesaplanan LD50 değeri 13,6 mg/kg bulunmuştur. Deneysel değer 16 mg/kg'dır. QSAR modeli olarak Danish QSAR DB ACDLabs kullanılmıştır. Hesaplanan değer ile deneysel değer arasında ki benzerlik oranı %86 olarak bulunmuştur. Diğer etken maddeler arasında en yüksek benzerlik oranına sahip olan Doksorubisin'in, uygulama yolu olarak intraperitoneal yol seçilmesi ve verilerin bu filtrelemelere göre yapılan çalışmalarla kıyaslanarak yapılması olumlu bir değer sağlamıştır.

Guaifenesin için hesaplamada uygulama yolu olarak oral gavaj yol ve sıçan türü seçilmiş olup, Guaifenesin için hesaplanan LD50 değeri 2000 mg/kg bulunmuştur. Deneysel değer 1510 mg/kg'dır. QSAR modeli olarak Danish QSAR DB ACDLabs kullanılmıştır. Hesaplanan değer ile deneysel değer arasında ki benzerlik oranı %75.5 olarak bulunmuştur. Yüksek bir benzerlik oranı veren Guaifenesin için, veri tabanı bilgisi kısıtlı olduğundan yüksek benzerlik oranı değişme ihtimali var olarak gözü alınmalıdır. Daha doğru ve güvenilir bilgi için Guaifenesin'in literatür bilgisinin artırılması gerekmektedir.

Hesaplanan değerlerde 1000 ve üstü için yapılan benzer molekül karşılaştırmalarında sadece Guaifenesin 1000 molekül altında kalmış olup, diğerleri için bu değer sağlanmıştır.

**Tablo.4.1.** QSAR Toolbox uygulaması ile hesaplanmış LD50 değerlerinin deneysel verilerle Karşılaştırılması (Deneysel değerler ECHA, PubChem ve Çalışma Raporları ile Sağlanmıştır.).

Kimyasal Yapı	Tür	Uygulama Yolu	Hesaplanan LD50	Deneysel LD50	Hesaplanan ve Deneysel LD50 Benzerlik Yüzdesi
<p><b>Amoksisilin</b></p> 	Sıçan	Oral	7300 mg/kg	15000 mg/kg	%48
<p><b>İsotretinoiin</b></p> 	Sıçan	Oral (gavaj)	280 mg/kg	400 mg/kg	%70
<p><b>Risperidon</b></p> 	Fare	Oral	190 mg/kg	63,1 mg/kg	%33
<p><b>Doksorubisin</b></p> 	Sıçan	İntraperitonal	13,6 mg/kg	16 mg/kg	%85
<p><b>Guaifenesin</b></p> 	Sıçan	Oral (gavaj)	2000 mg/kg	1510 mg/kg	%75,5

#### 4.2. NOAEL Değerlerinin QSAR Toolbox ile Deneysel Veriler Arasında Karşılaştırılması

Subkronik toksisite çalışmalarından elde edilen ve toksikolojide risk değerlendirme çalışmalarında çok önemli bir veri olan NOAEL değerleri QSAR Toolbox programı kullanılarak Amoksisilin, İsoetreionin, Risperidon, Doksorubisin ve Guaifenesin için hesaplanmış ve deneysel veriler ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmalı çalışma verileri Tablo 4.2.'de özetlenmiştir.

Amoksisilin için yapılan hesaplamada uygulama yolu olarak oral yol ve sıçan türü seçilmiş olup, Amoksisilin'in için hesaplanan NOAEL değeri 2450 mg/kg/gün olarak bulunmuştur. Deneysel değer 2450 mg/kg/gün'dür. *Read-Across* kullanılmıştır. Hesaplanan değer ile deneysel değer arasında ki benzerlik oranı %100 olarak bulunmuştur. Benzerlik oranının yüksek olmasında Amoksisilin'in yaygın ve eski bir etken madde olmasından kaynaklı literatürde hatırı sayılır bir veriye sahip olması etkilidir. *Read-Across* ile birbirine %80'den daha fazla yapı benzerliği olan moleküller seçilmiş olup bu seçim sonucunda ortaya birebirlik bir sonuç çıkmıştır.

İsoetreionin için hesaplamada uygulama yolu olarak oral gavaj yol ve sıçan türü seçilmiş olup, İsoetreionin'in için hesaplanan NOAEL değeri <2,69 mg/kg/gün olarak bulunmuştur. Deneysel değer 0,4 mg/kg/gün'dür. *Read-Across* kullanılmıştır. Hesaplanan değer ile deneysel değer arasındaki benzerlik oranı %15 olarak bulunmuştur. Benzerlik oranının düşük çıkmasında yapı benzerliği olarak yakın moleküllerin karşılaştırılmaması ve veri azlığı düşünülebilir. Bu nedenle tam bir değer bulunamamış bunun yerine yaklaşık olarak ve "azdır" ifadesi kullanılmıştır.

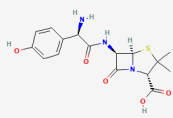
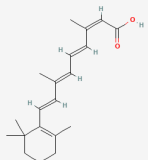
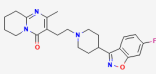
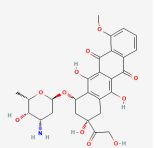
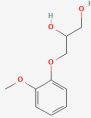
Risperidon için hesaplamada uygulama yolu olarak oral genel yol ve fare türü seçilmiş olup, Risperidon için hesaplanan NOAEL değeri <2,69 mg/kg/gün olarak bulunmuştur. Deneysel değer 0,63 mg/kg/gün'dür. *Read-Across* kullanılmıştır. Hesaplanan değer ile deneysel değer arasında ki benzerlik oranı %23,42 olarak bulunmuştur. İsoetreionin ile benzer bir değer bulunmasında yapı benzerliği için

karşılaştırmaların yeterli olmaması ve veri azlığı düşünülebilir. Bu nedenle tam bir değer bulunamamış olup yaklaşık bir değer bulunmuştur.

Doksozubisin için hesaplamada uygulama olarak intraperitoneal yol ve sıçan türü seçilmiş olup, Doksozubisin için hesaplanan NOAEL değeri >5 mg/kg/gün olarak bulunmuştur. Deneysel değer 8 mg/kg'dır. Read-Across kullanılmıştır. Hesaplanan değer ile deneysel değer arasında ki benzerlik oranı %60 olarak bulunmuştur. Diğer etken maddelere göre literatür içerisinde daha fazla veriye sahip olsada QSAR Toolbox ile yine de tam bir değer bulunamamıştır.

Guaifenesin için hesaplamada uygulama yolu olarak oral gavaj yol ve sıçan türü seçilmiş olup, Guaifenesin için hesaplanan NOAEL değeri >350 mg/kg/gün olarak bulunmuştur. Deneysel değer 250 – 500 mg/kg/gün aralığındadır. *Read-Across* kullanılmıştır. Hesaplanan değer ile deneysel değer arasında ki benzerlik oranı %70 olarak bulunmuştur. Yüksek bir benzerlik oranı veren Guaifenesin için, veri tabanı bilgisi kısıtlı olduğundan yüksek benzerlik oranı değişme ihtimali var olarak gözü alınmalıdır. Daha doğru ve güvenilir bilgi için Guaifenesin'in literatür bilgisinin artırılması gerekmektedir.

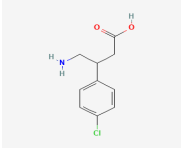
**Tablo.4.2.** QSAR Toolbox ile Hesaplanmış NOAEL Değerlerinin Deneysel NOAEL Değerleri ile Karşılaştırılması

Kimyasal Yapı	Tür	Uygulama Yolu	Deneysel NOAEL Değeri	Hesaplanan NOAEL Değeri	Hesaplanan ve Deneysel NOAEL Benzerlik Yüzdesi
<p><b>Amoksisilin</b></p> 	Sıçan	Oral	2450 mg/kg/gün	2450 mg/kg/day	%100
<p><b>İsotretinoiin</b></p> 	Sıçan	Oral (gavaj)	0,4 mg/kg/gün	< 2,69 mg/kg/day	%15
<p><b>Risperidon</b></p> 	Fare	Oral	0,63 mg/kg/gün	<2,69 mg/kg/day	%23,42
<p><b>Doksorubisin</b></p> 	Sıçan	İntraperitoneal	8 mg/kg/gün	>5 mg/kg/day	%60
<p><b>Guaifenesin</b></p> 	Sıçan	Oral(gavaj)	250 ila 500 mg/kg/gün dozlarda	>350 mg/kg/day	%70

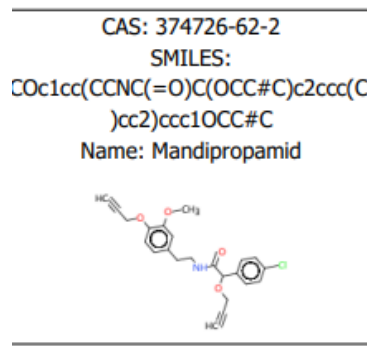
### 4.3. Baklofen için LD50 ve NOAEL Değerlerinin QSAR Toolbox ile Hesaplanması

Bulunan bu değerlere ek olarak sıçan ve fare türü için LD50, fare türü için NOAEL değerlerine ulaşılamayan Baklofen isimli etken madde için QSAR Toolbox programı ile hesaplama gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada hesaplama oral yol için fare türünde, intraperitoneal yol için ise sıçan türünde yapılmıştır. Elde edilen veriler Tablo 4.3. 'te gösterilmiştir.

**Tablo.4.3.** Baklofen Maddesinin Hesaplanmış NOAEL ve LD50 Değerleri

Bileşik	Hesaplanan Tür	Hesaplanan LD50	NOAEL Değeri
Baklofen 	Oral (gavaj) Fare İçin 48 Saat	940 mg/kg	20,1 mg/kg/gün
	Intraperitoneal Sıçan İçin 48 Saat	300 mg/kg	

Bulunan NOAEL değerinde en yakın yapı benzerliği olarak Mandipropamid bulunmuş olup, bu etken maddenin yapısı Şekil 4.1 'de gösterilmiştir. Baklofen için yapılan NOAEL hesaplamasında saat, tür ve uygulama yolu filtrelenerek seçilmiş olup en yakın 10 molekül arasından *Read-Across* yapılmıştır. Bu kıyaslamada mantar hastalıklarından korunma da kullanılan Mandipropamid ile yakın yapısal benzerlik göstermiştir (tekrarlanan benzer gruplarda bu yakınlığa dahildir.) NOAEL değerinin hesaplanmasına yardımcı olmuştur. Bu değer hesaplanmasında *Open Food Tox Hazard* EFSA veritabanı kullanılmıştır. Yine de hesaplanan bu değer doğrulanması için laboratuvar çalışmasına gerek vardır. Unutulmamalıdır ki bu sadece hesaplanmış bir değer olup, doğrulanması gereklidir.



**Şekil 4.1.** QSAR Toolbox ekranından alınmış Mandipropamid kimyasal yapısı.

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışma, LD50 ve NOAEL değerlerinin hesaplanmasında *in silico* yöntemlerin kullanılabilirliğini değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Elde edilen sonuçlar, literatürde rapor edilen gerçek LD50 verileri ile tutarlılık göstermiş olsada, NOAEL değerleri için daha fazla veritabanı bilgisi gerekli görülmektedir. QSAR Toolbox ile ekolojik toksikoloji alanında daha doğrusal bilgilere ulaşılabilir olsada NOAEL değerleri için aynı şey şuanlık söylenememektedir. LD50 değerlerinin hesaplamasında seçilen 5 etken maddenin 3'ünde %50'den fazla bir benzerlik oranı bulunmuştur. NOAEL değerlerinin hesaplamasında Amoksisilin dışındaki değerlerden sadece 2 tanesi %50'den fazla benzerlik oranı göstermiş olsada bu değerler *Read-Across* yöntemi ile hesaplanmış olup, bu yöntemle hesaplanan verilerin karşılaştırılma sayısı benzerlik oranına göre daha fazla dikkate alınmalıdır. Karşılaştırılma yapılan değer arttıkça bu oranlar düşse de, tek bir atomun ya da yapısal farklılığın etki mekanizmasında büyük değişikliklere yol açtığı düşünüldüğünde, daha fazla karşılaştırmalı örnek ile çalışmak her zaman daha doğrudur. Yine de *in silico* toksikoloji yöntemlerinin güvenilirliği ve potansiyeli LD50 değerlerinin hesaplanması sırasında desteklenmiştir. *In silico* toksikoloji yöntemleri, özellikle hayvan deneylerinin etik sorunları ve maliyetleri nedeniyle giderek daha fazla ilgi çekmektedir. Bu yöntemler, hayvan deneylerinin yerine geçebilecek potansiyele sahip olup, aynı zamanda zaman ve maliyet açısından da daha ekonomik olabilir. Özellikle yeni kimyasal bileşiklerin hızla değerlendirilmesi ve mevcut verilerin derinlemesine analizi için önemli bir araç olarak öne çıkmaktadır. Çalışmamızda kullanılan *in silico* yöntemlerin doğruluğu ve güvenilirliği, elde edilen sonuçların literatürde rapor edilen değerlerle karşılaştırıldığında büyük oranda tutarlılık göstermektedir.



Arianna Bassan ve ark. yaptığı bir başka çalışma olan “Organ Toksisitesi Risk Değerlendirmesinde *In Silico* Yaklaşımlar: Karaciğer Toksisitesini Tahmin Etmede ki Mevcut Durum ve Gelecekteki İhtiyaçlar” [4] hepatotoksisite çalışmalarında *in silico* toksikolojinin önemini ele almıştır. Bir ksenobiyotiğe maruz kalmanın en sık gözlemlenen yan etkilerinden biri olan hepatotoksisite, klinik başarısızlıklar ve ilaç adaylarının durdurulmasına sebep olan başlıca nedenlerden biridir. Yapılan çalışmada *in silico* ve deneysel bilgilerin entegrasyonuna önerilerde bulunmuş ve hepatotoksisitenin sebep olduğu zaman ve maliyet kaybının önüne *in silico* toksikoloji ile önüne geçilebileceğine dair örnek bir vaka örneği sunmuştur. Tez çalışması sonucunda hesaplanan maddelerin daha doğrusal değerlere sahip olması için önerilen nokta olan veritabanının genişletilmesi fikri aynı şekilde bu çalışmada da bildirilmiştir. C Johnson ve ark. yapmış olduğu bir başka çalışma olan “*In Silico* Protokoller ile Cilt Sensibilizasyonu Değerlendirilmesi” [138], cilt sensibilizasyonunun değerlendirilmesinde *in vitro* değerlendirmelerini içermiş ve hayvan testleri yapmadan delil ağırlıklı bir değerlendirmeyi desteklemek için *in silico* yöntemlerin güçlü yönlerinden faydalanmıştır. *In silico* yöntemler amaçları ve formatları açısından büyük farklılıklar gösterse de, bu tür modellerin geliştirilmesinde kullanılan temel ilkelerin standartlaştırılması ve genel değerlendirmede ki belirsizlikler için etkilerin şeffaf bir şekilde ortaya konması gerekmektedir. Bu çalışmada cilt sensibilizasyonu ile ilgili etkiler, mekanizmalar ve uç noktaların bir risk değerlendirmesi bildirilmiş olup mekanizmaların ve etkilerin geçerliliği ile bunları tanımlamak için kullanılan deneysel sistemlerin güçlü ve sınırlı yönleri temelinde, cilt sensibilizasyonunun *in silico* değerlendirmeleri için kurallar ve ilkeler tanımlanmıştır. Değerlendirmenin genel gücünü yansıtan güvenilirlik ve güven puanlarının atanması tezimizde olan benzerlik oranı şeklinde eklenmiştir. Çalışma sonucunda cilt sensibilizasyonunun tahmini için *in silico* yaklaşımların uygulanmasını ve kabulünü desteklemiş olup *in silico* toksikolojinin ana adımlarından biri olan hayvan deneylerinin sonlandırılmasına yönelik protokol ve çalışmalar tez çalışmasında olduğu gibi bildirilmiştir. Son olarak C Rakers, F Schumacher ve ark. yapmış olduğu bir diğer çalışma olan “*In Silico* İnsan Sülfat Transferaz 1E1

Aktivitesinin Tahmini: Moleküler Dinamik Simülasyonlardan Elde Edilen Farmakoforlar Rehberliğinde”[139], faz II metabolizması sırasında çalışan sülfat transferazlar ilaç, besin veya çevresel kaynaklardan gelen geniş bir bileşen yelpazesini daha kolay atılabilir metabolitlere dönüştürerek detoksifikasyonunu sağladığından bahseder ancak sülfat transferazların aktivitesinin reaktif metabolitlerin oluşumunu teşvik edebileceği ve bunların genotoksik etkilerin olabileceği de gözlenmiştir. Bu süreçte etkili olan SULT1E1 enzimi tanımlanmış olup, liganları için bir *in silico* model tahmini geliştirilmiştir. Enzim esnekliği ve protein konformasyonlarının örneklenmesi için moleküler simülasyonlar gerçekleştirilmiş olan bu çalışmada, makine öğrenim teknikleri kullanımı *in silico* toksikoloji ile birlikte kullanılmıştır. Tahmin edilen ligandlar DrugBank veritabanı ile karşılaştırıldığında %28’inin SULT1E1 ligandı olduğu bildirilmiştir. Kalan kısımdan dokuz molekül ise biyokimyasal testlere tabi tutulmuş ve deneysel sonuçlar, SULT1E1 inhibitörleri ve substratlarının *in silico* tahmini ile uyumlu bulunmuştur. Aynı şekilde bizim tezimiz içerisinde hesaplaması yapılan moleküllerinin tez bazında bir laboratuvar çalışması olmadan yapılsa bile halihazırda verilerle en azından LD50 bazında uyumlu olduğu gözlenmiştir. Bu çalışma aynı zamanda akut toksisite ya da tekrarlanan toksisite dışında da *in silico* yöntemlerin ADME boyutunda da kullanılabilmesine dair iyi bir örnektir.

Dengeli bir değerlendirme sunmak için mevcut *in silico* öngörü araçlarının toksikoloji de kullanımına dair birçok sınırlamaya dikkat edilmelidir. Öngörüsül QSAR modellemesi için sınırlayıcı faktörler, eğitim veri setini oluşturmak için kullanılan yüksek kaliteli deneysel verilerin güvencesi ve şeffaflığı ile QSAR modelinin kullanıcı tabanı için neyin tam olarak modellendiğinin bilgisini içermesi gerekir. Basitlik adına, modele hata (örneğin yanlış moleküler yapı veya bir kimyasalın toksikoloji çalışmalarından elde edilen hatalı veri) içeren veri tanıtıldığında, bu hatanın amplifikasyonu üretilir ve tahminlerde bu yanlış değerler görülür. Amplifikasyon, yanlış bir veri noktasının yanlış bir tahmine yol açtığı durumları ifade eder [140]. Bu nedenle modele en iyi ve kaliteli deneysel verilerin eklenmesini sağlamak için dikkatli ve titiz çabalar gösterilmelidir. Veri kalitesinin tanımlanması birçok şekilde açıklanabilir. FDA perspektifinden bakıldığında, ürün

incelemeleri ve onayları için bir delil gerekmektedir. Bu yönetmeliklerde yer alan delil standartları, rehberlik önerileri, iyi laboratuvar çalışmaları ve doğru ve standartlaştırılmış çalışma protokolü uyumluluklarını içermektedir. Bunlar çalışma verileri ve protokolünün belirli parametrelere uyup uymadığını ve çalışmanın risk değerlendirmesi ve yönetim yaklaşımlarını kabul edilebilir kılmak için uygun olup olmadığını belirlemek için dikkate alınır. Başka bir örnek olarak, bir modelin bir son noktayı tahmin etmek için tanımlanması durumunda; örneğin "hepatotoksisite" veya "karaciğer hasarı", bu bilginin tahmin edilen karaciğer hasarının, modelleme sırasında dikkate alınan karmaşık faktörler veya karaciğer hasarına neden olan doza dair gerekli ve yeterli bilgi de sisteme tanımlanmalıdır [141]. “Patoloji açısından, bu nekroz mu, fibroz mu vb. modelin oluşturulmasında hangi veriler kullanıldı?” sorularını cevapsız bırakmayacak düzeyde veri girişi sağlanmalıdır. Veri kaynakları, verilerin nasıl değerlendirildiği ve verilerin sıralanmasında kullanılan yöntemler dikkatle düşünülmelidir. Bu nedenle çok özel mekanistik değerlendirmeler veya klinik tanısal ölçümler (örneğin yükselmiş serum transaminazları ve bilirubin tahmini) daha değerli ve yararlı olarak düşünülmelidir, aksi takdirde *in silico* QSAR'ın neyi tahmin ettiğine dair çok fazla belirsizlik vardır. Mevcut QSAR'larla ilgili diğer sınırlamalar, organometalikler, karmaşık karışımlar (örneğin botanik özler) ve polimerler gibi yüksek moleküler ağırlıklı moleküller için modellerin eksikliği olsada [142], Maciej Noga ve ark. yaptığı “Novichoklar için Akut Toksisite (LD50) Tahmini Amacıyla *In Silico* Toksikoloji Yöntemlerinin Uygulanması” adlı çalışmada [143], Sovyetler Birliği tarafından Soğuk Savaş sırasında gizli bir şekilde üretilmiş Novichok adlı kimyasal savaş ajanlarının LD50 değerlendirmesi *in silico* yöntemler ile yapılmıştır. Kimyasal Savaş Ajanları arasında 10000'den fazla Novichok yapısı bileşik listelenmektedir. Bu 10000 bileşik için deneysel araştırma yapmak uzun ve zorlu bir süreçtir. Temasın yüksek risk getirdiği bu durumda *in silico* toksikoloji ile bu tehlikeli bileşiklerin değerlendirilmesi yapılmıştır. Bu sayede bileşenlerin sentezinden önce tehlikeleri belirlemek için *in silico* toksikoloji bir avantaj sağlamış olup boşlukları doldurmuş ve riski azaltmıştır. Aynı zamanda bu yaklaşım bu tehlikeli maddelerin hayvanlar üzerinde deneylerinin yapılmadan riskini anlamamıza yardımcı olmuştur. Tez genelinde bahsedilen *in silico* toksikolojinin riskli maddeler için ya da hayvan deneylerine gerek kalmadan riski

anlayabilmemizi sağlayabileceği ve bunun için LD50 değerlerinin hesaplanabileceği bu çalışma da ayrı bir şekilde belirtilmiştir.

Diğer önemli sorular, molekülün tümör başlatıcı yoksa destekleyici olarak mı davrandığı, hangi doz da, hangi dokulardan ve ne sıklıkla malign tümörlerin ortaya çıkmasının beklendiği gibi sorulardır. Ayrıca bir model toksisitenin mekanizmasını ele almak üzere tasarlanmış olsa bile, tek bir QSAR denklemi içinde toksisite veya karsinogenezde birden fazla mekanizmayı modellemek zordur. Bu durumun üstesinden gelmek için ilaç metabolit yapılarının *in silico* tahmini ile sıvı kromatografi/kütle spektrometresi (*Liquid Chromatography - LC/Mass Chromatography - MC*) spektrumlarının raporlanması istenmektedir. Bir çalışma da, hesaplama yazılım programları, karaciğer mikrozom inkübasyonlarından elde edilen deneysel LC/MC verileriyle tahmin edilen ilaç metabolit yapıları üretmek için kullanılmıştır. Bu veriler, *in vitro* karaciğer mikrozomal örneklerinden elde edilen LC/MC verileriyle karşılaştırılan ilaç metabolitleri için moleküler iyon spektrumu ve parçalanma spektrumu tahmin eden başka bir yazılım aracına aktarılır, böylece ampirik ilaç metabolitlerinin otomasyonu ve tanımlanmasını sağlar [144]. Başka bir temel soru, toksisiteyi modellemek için kullanılan verilerin kalitesi ve tekrarlanabilirliğidir. Örneğin, kemirgen prelinik testleri QSAR modellemesi için güvenilir bir temel midir? İlaç endüstrisi, küçük moleküllerin ilaç keşfi için kimyasal alanları incelemek amacıyla  $10^6$  molekül içeren bileşik kütüphanelerini kullanmakta ve yine de tüm olası organik bileşiklerin sadece yüzeysel bir temsilini sunmaktadır [145]. Veri kalitesi açısından, standartlaştırılmış protokollerden elde edilen prelinik testleri kullanmak ideal yaklaşım olacaktır ve uzmanlar bu karsijonite değerlerinin verimli bir şekilde modellenebileceğini bildirmiştir [146]. Ancak protokollerin veri kaynakları arasında değişiklik gösterdiği gerçeği ortada durmaktadır. Tüm kavramın temelinde yatan gerçek, ilaçların prelinik güvenlik analizine uygulanan QSAR'ın gerçekten bir tahminin tahmini olduğudur. QSAR, kimyasal alanın modellenmesine ve insan toksisitesi için son derece saygın modellerden elde edilen verilere dayanan teorik bir analiz temsil eder. Ancak güvenlik değerlendirmesine başka bir modelleme katmanı eklenmesi nedeniyle belirsizlik kaçınılmazdır. QSAR tahminleri,

riskin genel analizinde birçok önemli bilgi parçası (örneğin maruz kalma süresi ve seviyesi, karmaşık faktörler, risk) ile birlikte sadece bir tür kanıt olarak değerlendirilmelidir.

Bir modelin uygulanabilirlik alanı, toksikoloji ve farmakolojide QSAR'ların kullanımında önemli bir kriter ve sınırlama olarak kabul edilmektedir [147]. Eğer bir molekül *in silico* olarak taranmış bir farmasötik uygulanabilirlik alanı içinde değilse, tahmin geçersizdir. Yeni moleküler farmasötik varlıkların geliştirilmesinin, yeni terapötik hedefler için tasarlandıkça ve moleküler anlamda yenilikçi olmaları gerektiğinden kimyasal alanda yeni boyutlara doğru ilerlemesi beklenebilir, bu nedenle yeni QSAR modelleri, yeni keşfedilen moleküller için genişleyen uygulanabilirlik alanına ayak uydurmalıdır. Bunu yaparak, bu sınırlamanın üstesinden gelmek ve böylece daha doğru ve bilimsel olarak kabul edilebilir tahminler sağlamak mümkündür. *In silico* toksikoloji, artık araştırma öncelikleri hakkında karar almak ve çeşitli durumlarda düzenleyici test olarak uygulanmak için rutin olarak kullanılmaktadır. Tehlike tanımlama için *in silico* modellere artan güvenin iyi bir örneği, ICH M7 kılavuzunda açıklandığı gibi ilaç maddelerinin mutajenik safsızlıklarının tahmin edilmesidir. Bu yöntemlerin kullanımını için standartlar geliştirmek, *in silico* yaklaşımların diğer deneysel bilgilerle birleştirildiğinde savunulabilir, şeffaf, tekrarlanabilir ve iyi belgelenmiş olmasını sağlayacaktır. Bilim ilerledikçe, ek mekanizmaların tanımlanmasında yapılan sürekli ilerleme, *in silico* model geliştirme için ilgili son noktaların setini genişletmek ve daha büyük, giderek daha çeşitli kimyasal yapı setleri için yüksek kaliteli verilerin dahil edilmesini sağlamak için bir temel oluşturabilir. Anında bir fayda, halihazırda modellenmiş olan son noktalar için tahmin doğruluğunu ve kapsamını iyileştirme fırsatıdır. Bir bütün olarak, bu faktörler, toksikolojik değerlendirmeler için *in silico* yöntemlerin uygulanmasına olan ilgiyi ve heyecanı artırmaktadır. Gerçek dünya deneyimi, *in silico* tabanlı tahminlerin tehlike tanımlama ve güvenlik değerlendirmesine uygun bir şekilde uygulanması için durumları belirlemeye devam ettikçe, düzenleyici otoritelerin *in silico* yöntemlere olan güveni ve kabulü artacaktır [148].

REACH ve dünya genelindeki benzer yasaların hayvan testlerini azaltma gereklilikleri, hızlı teknolojik ilerleme ve ekonomik teşvikler, *in silico* yöntemlerinin kullanımını teşvik eden ana etkenlerdir. Bu yöntemler, mekanistik bilgiler sağlayarak temel sistemleri açıklamakla kalmaz, aynı zamanda test ihtiyaçlarını belirleme ve test önceliklerini belirlemede de rol oynar. *In silico* yöntemlerinin düzenleyici kullanıma entegrasyon süreci hızla gelişmektedir. Kısa vadede, risk değerlendirme belgelerinde destekleyici veri olarak daha fazla *in silico* yöntemi sonucuna rastlayabiliriz. Kimyasal maddelerin insan toksisitesi ve çevresel toksikolojideki son noktalarına yönelik mevcut risk değerlendirme metodolojileri genellikle farmasötiklerin prelinik çalışmalarından türetilmiştir. Tehlike değerlendirme yöntemleri endüstriyel kimyasallar, pestisitler ve ilaç adayları için büyük ölçüde benzerdir. İlgili ve güvenilir modeller mevcut oldukça ve kullanım deneyimi arttıkça, *in silico* yöntemlerinin test verilerinin doğrudan yerine kullanılmasının artması muhtemeldir [149].

İnsan farmasötik bileşiklerinin güvenlik değerlendirmesinde bilimsel hesaplamayı geçerli bir araç olarak daha da geliştirmek için, odaklanılabilecek çeşitli alanlar bulunmaktadır. Bu alanlar arasında modele girilen toksisite verilerinin kalitesinin ele alınması ve değerlendirilmesi, uzman incelemesi, yoğun insan kaynakları ve veri paylaşımı durumunda daha doğru modeller yapılabilecek bilgilere ulaşılabilir. Tahmin modellerinin kabulünden önce daha fazla bağımsız ve titiz laboratuvar testlerine açıkça ihtiyaç vardır. Standart araçların ve yazılım yaklaşımlarının benimsenmesi ve bu tahmin araçlarının kimyasal bilgi işleme motorlarını inceleyen bağımsız teknoloji değerlendirmeleri de önemli bir adım olacaktır. FDA'nın ilerleme yolu, bu teknolojilerin durumu, doğruluğu ve sınırlamaları konusunda komite tabanlı düzenleyici değerlendirmeleri ve endüstri ve hesaplama yazılımı geliştiricilerinden alınan dersleri içerecektir. Şu anda, bu araçların kullanımı için özel bir FDA rehberi bulunmamaktadır. Hesaplamalı toksikoloji verileri gönüllü olarak sunulmaktadır ve zorunlu değildir. Ancak daha önce belirtildiği gibi, mevcut bazı rehberler, prelinik toksisite testlerinde SAR/QSAR yaklaşımlarının kullanımına işaret etmektedir. Rehber geliştirilmesi, bu teknolojilerin uygun şekilde kullanılmasını sağlamak için güvenlik değerlendirme

paradigmalarında etkili bir şekilde uygulanmasına yardımcı olacaktır ve bu da insan sağlığını korumaktadır.[150]

*In silico* toksikoloji alanı, yeni yöntemlerin tanıtılması, mevcut yöntemlerin geliştirilmesi veya bazı yöntemlerin terk edilmesi yoluyla sürekli bir gelişim içindedir. Maalesef belirli toksisite son noktaları veya kimyasallar için uygun olan bir yöntem, diğerleri için düzgün çalışmayabilir. Doğru kullanıldığında, *in silico* araçlar kimyasalların toksisitesini değerlendirmede çok etkili olabilir. Bu nedenle, *in silico* modellerinin doğru ve etkili bir şekilde uygulanmasını sağlamak için [151] yöntemlerin güçlü yönlerini, sınırlamalarını, uygulama kapsamını ve yorumlamayı anlamak; mevcut sorun için en etkili yöntemi seçmek ve gerekirse bu yöntemleri her probleme özel olarak uyarlamak gereklidir. Toksisite tahmin modellerini kullananlar, yalnızca veriler ve model geliştirme süreçleri şeffaf olduğunda, uygulanabilirlik alanları iyi tanımlandığında, modellerin çıktıları açıkça açıklandığında ve modeller basitleştirildiğinde bu üç adımı takip edebilirler [152].

Alternatif test yöntemlerinin artan sayısı ve çeşitliliği ile bu bilgilerin toksisite değerlendirmesi ve karar verme için akıllıca bir şekilde birleştirilmesi ve kullanılması gereklidir. Açıkça *in silico* toksikoloji, toksisite değerlendirme sürecinin faydalı bir bileşenidir. Geleceğe bakıldığında, hesaplamalı yöntemlerin özel ve yeni toksisite son noktaları ve kimyasallar için modeller içerecek şekilde genişlemesi, toksikolojik yollar hakkında bilgi sağlama, farklı modellerden elde edilen sonuçları birleştirme ve karşılaştırması, modelleri kullanıcı beklentilerini karşılayacak şekilde özelleştirme ve yeni veriler elde edildikçe modelleri geliştirme bilimsel çalışma olarak büyük bir fayda sağlar. Bu değişen ve gelişen sürece adapte olunmalı ve yeni, zararsız ve hızlı yöntemlerin destekçisi olunmalıdır. Zaman kavramının gelişimsel süreç içerisindeki yerini doğrulanmış, pratikleşmiş ve onaylanmış veriler ile kısaltmamız da *in silico* toksikoloji bir fırsat sunmaktadır. Bu fırsat değerlendirilerek bu yöntemin geliştirilmesi ana ilkelerimizden biri olmalıdır.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez kapsamında *in silico* yöntemlerin toksikolojik değerlendirmelerde ki kullanımı, avantaj ve dezavantajları da göz önüne alınarak, bu yöntemlerle elde edilen verilerin yorumlanması, *in vivo* testlerden elde edilen verileri kıyaslanabilirliği özetlenmiştir. Ayrıca, toksikolojik verileri bulunan seçilmiş belirli örnekler üzerinden bu yöntemlerin uygulanması ve geleneksel laboratuvar testleri ile karşılaştırılması da amaçlanmıştır. Bu kapsamda varılan sonuç ve öneriler aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- *In silico* toksikoloji yöntemleri ile halihazır da uygun ve doğru verileri bulunan bir bileşik için zaman ve maddi kayıplara sebep olan uzun süreli laboratuvar çalışmalarına gerek kalmadan eldeki bilimsel veriler kullanılarak toksikolojik verilerin üretilmesi sağlanır.
- Bugüne kadar, *in silico* yaklaşımlarıyla elde edilen olumlu deneyimler genellikle mutajenite, hassasiyet ve sucul toksisite gibi mekanizmaları içersede hepatotoksisite, nörotoksisite ve gelişimsel toksisite *in silico* yöntemlerle doğru bir şekilde tahmin edilebilmesinde dikkatli ve titiz davranılması gereklidir. Bu noktadaki bakış açısı, karmaşık son noktaların seçiminde birden çok filtrelenmiş yolak kullanılarak çalışılması ve bu süreçlerin doğrulanması ile birleştirilerek tek bir tahmin oluşturulması gerekmektedir.
- İnsan dahil canlı türleri her yıl farklı pekçok bileşiğin eklendiği kimyasallara maruz kalabilmektedir. Ortaya çıkan pekçok sağlık problem de bu maruz kalma durumları ile ilişkilendirmektedir. Toksikolojik özellikleri değerlendirmek için kimyasalların geleneksel yöntemler ile test edilmesi, büyük ölçüde hayvan deneylerine dayanmaktadır. Bu tür testler, zaman alıcı, maliyeti yüksek ve uzman alt yapısı gerektiren uygulamalardır. Bu tür testlerin tahminlerin yapılmasını sağlayan veritabanlarına her geçen gün daha fazla ve doğruluğu daha yüksek veriler eklenerek, elde edilen verilerin kesinliği arttırılmaktadır.



- REACH ve dünya genelinde ki benzer yasalar kapsamındaki hayvan testlerini azaltma gereksinimleri, hızlı teknolojik ilerleme ve ekonomik teşvikler, *in silico* yöntemlerin kullanımını teşvik eden ana etmenlerdir. Şu anda, bu yöntemler mekanistik bilgi sağlayarak temel sistemleri açıklama da ve test ihtiyaçlarını belirleyip test önceliklerini belirlemede rol oynamaktadır. *In silico* yöntemlerin düzenleyici kullanıma entegrasyon süreci hızla gelişmektedir. Yakın gelecekte, *in silico* yöntemlerin sonuçlarının risk değerlendirme belgelerinde destekleyici veriler olarak daha fazla yer aldığını göreceğiz.
- Avrupa Birliği'nin kimyasal maddeler için REACH Tüzüğü ve Kozmetik Tüzüğü, küresel olarak ise Kanada'daki Yurtiçi Maddeler Listesi ve Japonya'daki Kimyasal Maddeler Kontrol Listesi gibi mevcut pekçok mevzuatta, *in silico* toksikolojinin sunmuş olduğu toksikolojik ve farmakolojik kolaylıklar nedeniyle, maddelerin risk değerlendirmelerinde yaygın şekilde uygulanması beklentisini ortaya çıkarmıştır.
- Bileşiklerin yapılarında bulunan parçaların aktiviteleri üzerindeki etkilerinin yorumlanmasında kullanılan *in silico* toksikoloji kapsamında yer alan SAR'lar, belirli bir toksisitenin spesifik bir molekül ile ilişkilendirilmesinde kullanıldığından, yeni bir molekülde bu parçaların bulunması aynı toksisitenin ortaya çıkacağı tahminini sağlayabilir.
- *In silico* toksikoloji içerisinde büyük bir yer kaplayan QSAR, bir kimyasalın biyolojik etkileri, fizikokimyasal özellikleri ve yapısal karakteristikleri arasında istatistiksel bir ilişki kurulmasını sağlayan önemli bir programdır. Bu istatistiksel veriler toksisite çalışmaları için kurulan modellerin toksikolojik olarak rahatlıkla yorumlanmasına yardımcı olur.
- *In silico* toksikolojide kullanılan yazılım sistemlerinin çoğu, kullanıcılar için SAR, QSAR ve *Read-Across* gibi bu alanın temel yöntemlerinin basit ve kullanıcı dostlu arayüzlerine ulaşım imkanı sunar. Bu sayede ulaşılabilirlik düzeyinin yüksek olması, bu alana yönelmek isteyen bilim insanları için rahat bir başlangıç noktası oluşturur. *In silico* toksikoloji için

üretilen bu yazılımların bir çoğu ücretsiz eğitim ve öğretim araçları sağlayabilir ve alanda yeni olan kişilerin *in silico* toksikoloji kavramları ve uygulamalarıyla tanışmalarına olanak tanır.

- Kimyasal mevzuatlara uyma gereksinimiyle bağlantılı olarak, eczacılık ve kimya alanında uzun süredir yapıya dayalı olarak toksikolojik özellikleri tahmin etme ihtiyacı bulunmaktadır. Bu durum, geliştirme sürecinin erken aşamalarında toksik bileşikler belirlenmesi, yeni moleküllerde toksisiteyi ortadan kaldırma, daha az hayvan kullanımı ve dolayısıyla daha düşük maliyetle ürünlerin kaydedilmesi ve test prosedürlerinin rasyonelleştirilmesi gibi birçok gereksinim sağlar. *In silico* yaklaşımlar, özellikle farmasötiklerin geliştirilmesine vurgu yapılarak birçok endüstride geniş çapta uygulanmaktadır. Yukarıda bahsedilen gereksinimlerin *in silico* toksikoloji ile yapılabilme fırsatı rekabetsel olarak büyük bir avantaj sağlar.
- Aynı *in silico* toksikoloji gibi globalde “yapay zeka” üzerine oluşan ilgi artmaktadır. Makine Öğrenimi Algoritmaları (*Machine Learning Algorithms* – ML), kimyasal maddelerin moleküler yapısına dayanarak toksisiteyi tahmin eden modeller geliştirmede kullanılır. Karar ağaçları, destek vektör makineleri ve sinir ağları gibi algoritmalar, büyük veri setlerini analiz eder ve toksikolojik sonuçları tahmin eder.
- Yapay zekanın kullanımının artması ile büyük veritabanları, bilimsel literatür ve deneysel sonuçlar gibi çeşitli kaynaklardan gelen büyük miktar da veri işlenebilir ve analiz edilebilir. Bu büyük veri setlerinin işleme ve entegre etme yeteneği ile yapay zeka *in silico* modellerin doğruluğunu ve güvenilirliğini artırabilir.
- *In silico* toksikoloji, ilaç formülasyonlarının geliştirilmesi ve optimizasyonunda önemli bir rol oynar. Bu yöntemler, daha güvenli ve etkili formülasyonlar tasarlamaya, geliştirme sürecini hızlandırmaya ve geleneksel deney yöntemlerine olan bağımlılığı azaltmaya yardımcı olabilir.

- Bilgisayar modelleri genellikle hayvan testlerinin yerini almak için önerilen bir yöntem olarak gösterilmektedir. Bu durum bu alanda ki bilimsel çalışmaların artması, kullanımın yaygınlaştırılması ve veri tabanlarının iyileştirilmesi ile söz konusu olabilir. Bilimsel olarak doğru ve güvenilir verilerin *in silico* yöntemlerle elde edilebildiğinin gösterilmesi bilim insanları ve sağlık otoriteleri tarafından da kabul edilmesine katkı sunacaktır.
- Birçok endüstri ve düzenleyici kurumları *in silico* toksikoloji için ticari yazılım sistemleri geliştirmiştir. Birçok yazılım ürünü 'tamamlanmış ürün' olarak değerlendirilmediğinden, bu ürünler her zaman güncellenmeli ve iyileştirilmelidir.
- Avrupa Birliği gibi uluslararası düzenleyici organlar, kozmetik ve kimyasal ürünler için hayvan testlerinin sınırlanması veya yasaklanması yönünde adımlar atmıştır. Ülkemizin de uyum sürecine katılımı ile bu testler ülkemiz içerisinde de yasaklanmıştır. Yasaklanmış bu testlere alternatif yollar bulmak ülkemiz için zaman ve maliyet anlamında büyük bir katkı sağlayacaktır. Bu sürece en kolay şekilde uyum sağlanabilmesinde *in silico* toksikoloji yardımcı olabilir.

Tez kapsamında OECD QSAR Toolbox kullanılarak, literatürden LD50 ve NOAEL değerlerine ulaşabildiğimiz 5 molekül (Amoksisilin, İsetretionin, Risperidon, Doksorubisin, Guaifenesin) ile herhangi bir toksisite verisi bulunmayan Baklofen için LD50 ve NOAEL değerleri tahmin edilmiştir. Bilinen moleküllerden elde edilen verilerin, laboratuvar verileri ile çoğunlukla uyumlu olduğu, *in silico* yöntemlerle doğru kestirimlerde bulunulabildiği gösterilmiştir. Literatürde benzer şekilde bu tür verilerin elde edildiği çalışmalar ile de verilerin uyumlu olduğu görülmüştür. Yine de Guaifenesin gibi literatür dağarcığı kısıtlı olan maddeler de *in silico* yöntemlerle yapılan hesaplamalarda yüksek derece uyumlu sonuçlar bulunamamıştır. Tez kapsamında LD50 değerleri hesaplanan maddelerden sadece 3 tanesi %50 üzerinde sonuç vermiş olup, NOAEL değerlerine bakıldığında Amoksisilin'in sahip olduğu geniş veritabanı bilgisi

sayılmazsa sadece 2 adet diğer %50 değerinde benzerlik oranı vermiştir. Çalışma sonuçlarımız önceki bazı çalışma sonuçları ile tutarlı iken bazı çalışmalar ile tutarsız gözükmektedir. *In silico* toksikoloji de, bir benzerlik oranının yüksek olması her zaman destekleyici ve güvenilir bir bilgi anlamına gelmediği unutulmamalıdır. Bu oranların tamamıyla doğru ve güvenilir sonuçlar vermesi için veri setleri iyi tanımlanmalı ve genişletilmelidir. Ne kadar fazla karşılaştırma verisi olursa, ister en yakın atom ister yapısal benzerlik yöntemi ile olsun hesaplama yöntemlerinin tutarlığı o denli artacaktır. Bu alandaki çalışmalara ne kadar fazla veri katkısı sağlanırsa, uzun zaman alan süreçler bir o kadar kısılacaktır. Deneysel değerler ile hesaplama yapılmış değerler karşılaştırılması, bulunan sonuçların ne kadar yakın ya da uzak olduğu yorumlanmalıdır. Veri setine olan bilgi girişi arttıķça zaman alıcı ve maliyetli deneysel verilere ise ihtiyaın azalağı düşünülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Raies, A.B. and V.B. Bajic, *In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science, 2016. **6**(2): p. 147-172.
2. Myatt, G.J., et al., *Increasing the acceptance of in silico toxicology through development of protocols and position papers*. Computational Toxicology, 2022. **21**: p. 100209.
3. Erkekoglu, P., B.K. Giray, and N. Basaran, *3R principle and alternative toxicity testing methods*. Fabad J Pharm Sci, 2011. **36**(1): p. 101-17.
4. Tice, R.R., et al., *In silico approaches in carcinogenicity hazard assessment: current status and future needs*. Computational Toxicology, 2021. **20**: p. 100191.
5. Co-operation, O.f.E. and Development, *Guidance document on the validation of (quantitative) structure-activity relationship [(Q) SAR] models*. 2014: Organisation for Economic Co-operation and Development.
6. Amaral, R., et al., *Report for the International Cooperation on Cosmetics Regulation*. Silico Approaches for Safety Assessment of Cosmetic Ingredients, 2014: p. 2014-07.
7. Gad, S.C. and J.L. Bettis, *An Introduction to (Q) SAR with Respect to Regulatory Submissions*. Integrated Safety and Risk Assessment for Medical Devices and Combination Products, 2019: p. 321-337.
8. ECHA, *Read-across assessment framework (RAAF)*. ECHA-17-R-01-EN., 2017.
9. Patlewicz, G., A.P. Worth, and N. Ball, *Validation of computational methods*. Validation of Alternative Methods for Toxicity Testing, 2016: p. 165-187.
10. Amberg, A., et al., *Principles and procedures for handling out-of-domain and indeterminate results as part of ICH M7 recommended (Q) SAR analyses*. Regulatory toxicology and pharmacology, 2019. **102**: p. 53-64.
11. Team, E.G., *Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R. 7a: Endpoint specific*. 2017.
12. Guideline, I., *M7 (R1) on Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk*. European Medicines Agency: London, UK, 2015: p. 1-110.
13. Woodward, K.N., *Veterinary medicinal products*. 2018.
14. Authority, E.F.S., *Administrative guidance on submission of dossiers and assessment reports for the peer-review of pesticide active substances*. 2019, Wiley Online Library.

15. Coleman, K., W. Christian, and W. Zhang, *Accelerating medical device biocompatibility evaluation: An industry perspective*, in *Biocompatibility and Performance of Medical Devices*. 2020, Elsevier. p. 223-262.
16. Organization, W.H., *Case study: Chemicals Management Plan (CMP) Science Committee in Canada*. 2020: World Health Organization.
17. Schmidt, C.W., *TSCA 2.0: A new era in chemical risk management*. 2016, National Institute of Environmental Health Sciences.
18. Additives, E.P.o.F., et al., *Scientific Guidance on the data required for the risk assessment of flavourings to be used in or on foods*. EFSA Journal, 2022. **20**(12): p. e07673.
19. Hillisch, A., N. Heinrich, and H. Wild, *Computational chemistry in the pharmaceutical industry: from childhood to adolescence*. ChemMedChem, 2015. **10**(12): p. 1958-1962.
20. Myatt, G., L. Beilke, and K. Cross, *In silico tools and their application*. 2017.
21. Harvey, J., et al., *Management of organic impurities in small molecule medicinal products: Deriving safe limits for use in early development*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2017. **84**: p. 116-123.
22. Ashby, J., *Fundamental structural alerts to potential carcinogenicity or noncarcinogenicity*. Environmental mutagenesis, 1985. **7**(6): p. 919-921.
23. Ekins, S., *Computational toxicology: risk assessment for pharmaceutical and environmental chemicals*. Vol. 1. 2007: John Wiley & Sons.
24. Krewski, D., et al., *Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy*. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 2010. **13**(2-4): p. 51-138.
25. Cherkasov, A., et al., *QSAR modeling: where have you been? Where are you going to?* Journal of medicinal chemistry, 2014. **57**(12): p. 4977-5010.
26. Fourches, D., E. Muratov, and A. Tropsha, *Trust, but verify: on the importance of chemical structure curation in cheminformatics and QSAR modeling research*. Journal of chemical information and modeling, 2010. **50**(7): p. 1189.
27. Jolivet, L.J. and S. Ekins, *Methods for predicting human drug metabolism*. Advances in clinical chemistry, 2007. **43**: p. 131-176.
28. Dobson, C.M., *Chemical space and biology*. Nature, 2004. **432**(7019).
29. Hong, H., et al., *Mold2, molecular descriptors from 2D structures for chemoinformatics and toxicoinformatics*. Journal of chemical information and modeling, 2008. **48**(7): p. 1337-1344.
30. Kortagere, S., M.D. Krasowski, and S. Ekins, *The importance of discerning shape in molecular pharmacology*. Trends in pharmacological sciences, 2009. **30**(3): p. 138-147.

31. Brown, N., *Cheminformatics—an introduction for computer scientists*. ACM Computing Surveys (CSUR), 2009. **41**(2): p. 1-38.
32. Balaban, A.T., *Applications of graph theory in chemistry*. Journal of chemical information and computer sciences, 1985. **25**(3): p. 334-343.
33. Weininger, D., *SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules*. Journal of chemical information and computer sciences, 1988. **28**(1): p. 31-36.
34. Weininger, D., A. Weininger, and J.L. Weininger, *SMILES. 2. Algorithm for generation of unique SMILES notation*. Journal of chemical information and computer sciences, 1989. **29**(2): p. 97-101.
35. Marsden, S.A.J., et al., *Interdisciplinary Applied Mathematics*. 2002.
36. Adam, D., *Chemists synthesize a single naming system*. Nature, 2002. **417**(6887): p. 369-370.
37. Creton, S., et al., *Acute toxicity testing of chemicals—opportunities to avoid redundant testing and use alternative approaches*. Critical reviews in toxicology, 2010. **40**(1): p. 50-83.
38. Robinson, S., et al., *A European pharmaceutical company initiative challenging the regulatory requirement for acute toxicity studies in pharmaceutical drug development*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2008. **50**(3): p. 345-352.
39. Borycka, B. and J. Borycki, *Labelling of chemicals as an instrument ensuring chemical safety*. Towaroznawcze Problemy Jakości, 2017(2): p. 34-44.
40. Koeter, H., *Guidance on the application of three alternative test methods for acute oral toxicity to OECD Test Guideline 401*. Rapporti Istisan, 2002(41): p. 6-7.
41. Van den Heuvel, M., *A new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity: a report by the British toxicology society\* working party on toxicity*. Human Toxicology, 1984. **3**(2): p. 85-92.
42. Van den Heuvel, M., et al., *The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD50 test*. Food and Chemical Toxicology, 1990. **28**(7): p. 469-482.
43. Sewell, F., et al., *New supporting data to guide the use of evident toxicity in acute oral toxicity studies (OECD TG 420)*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2024. **146**: p. 105517.
44. Schlede, E., *Oral acute toxic class method: OECD Test Guideline 423*. Rapporti istisan, 2002. **41**: p. 32-36.
45. McCall, D., *An overview of Up-and-Down Procedure*. RAPPORTI ISTISAN, 2002(41): p. 37-40.
46. OECD, *OECD Annual Report 2001*. 2001.
47. OECD, *OECD Annual Report 2000*. 2000.

48. Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. 1986. p. 1-28.
49. Walum, E., *Acute oral toxicity*. Environmental health perspectives, 1998. **106**(suppl 2): p. 497-503.
50. Stokes, W.S., et al., *Neutral red uptake cytotoxicity tests for estimating starting doses for acute oral toxicity tests*. Current Protocols in Toxicology, 2008. **36**(1): p. 20.4. 1-20.4. 20.
51. Schrage, A., et al., *Refinement and reduction of acute oral toxicity testing: a critical review of the use of cytotoxicity data*. Alternatives to laboratory animals, 2011. **39**(3): p. 273-295.
52. Russell, W.M.S., R.L. Burch, and C.W. Hume, *The principles of humane experimental technique*. Vol. 238. 1959: Methuen London.
53. Pereira, S. and M. Tettamanti, *Ahimsa and alternatives-the concept of the 4th R. The CPCSEA in India*. ALTEX-Alternatives to animal experimentation, 2005. **22**(1): p. 3-6.
54. Kumar, A.H., *Effectively communicating the 5R's (replace, reduce, refine, reuse, and rehabilitate) of research ethics, biomedical waste, personalized medicines and the rest*. Journal of Natural Science, Biology, and Medicine, 2012. **3**(1): p. 1.
55. Deichmann, W. and T. LeBlanc, *Determination of the approximate lethal dose with about six animals*. J. Ind. Hyg. Toxicol, 1943. **25**(9): p. 415-417.
56. Botham, P.A., *Acute systemic toxicity—prospects for tiered testing strategies*. Toxicology in vitro, 2004. **18**(2): p. 227-230.
57. Mielke, H., et al., *Biometrical evaluation of the performance of the revised OECD Test Guideline 402 for assessing acute dermal toxicity*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2017. **89**: p. 26-39.
58. OECD., *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*. 1994: Oecd.
59. Co-operation, O.f.E. and Development, *Test No. 425: acute oral toxicity: up-and-down procedure*. 2008: OECD publishing.
60. Ridgway, P., *Revised fixed dose procedure: OECD Test Guideline 420*. Rapporti Istisan, 2002. **41**: p. 27-31.
61. Guideline, O., *FOR Testing, and OF Chemicals, "Acute Oral Toxicity—Acute Toxic Class Method," no. 2001*, December.
62. Schlede, E., et al., *A national validation study of the acute-toxic-class method—An alternative to the LD 50 test*. Archives of toxicology, 1992. **66**: p. 455-470.
63. Schlede, E., et al., *The international validation study of the acute toxic class method (oral)*. Archives of toxicology, 1995. **69**: p. 659-670.



64. Schlede, E., et al., *Oral acute toxic class method: A successful alternative to the oral LD50 test*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2005. **42**(1): p. 15-23.
65. Winder, C., R. Azzi, and D. Wagner, *The development of the globally harmonized system (GHS) of classification and labelling of hazardous chemicals*. Journal of hazardous materials, 2005. **125**(1-3): p. 29-44.
66. Lipnick, R., et al., *Comparison of the up-and-down, conventional LD50, and fixed-dose acute toxicity procedures*. Food and chemical toxicology, 1995. **33**(3): p. 223-231.
67. Bruce, R.D., *An up-and-down procedure for acute toxicity testing*. Fundamental and Applied Toxicology, 1985. **5**(1): p. 151-157.
68. Lichtman, A.H., *The up-and-down method substantially reduces the number of animals required to determine antinociceptive ED50 values*. Journal of pharmacological and toxicological methods, 1998. **40**(2): p. 81-85.
69. Griffin, G., *Establishing a three Rs programme at the Canadian council on animal care*. Alternatives to Laboratory Animals, 2009. **37**(2\_suppl): p. 63-67.
70. Party, R.R.W., *Refining rodent husbandry: the mouse*. Lab Anim, 1998. **32**: p. 233-59.
71. Jennings, M., M.J. Prescott, and J.W.G.o. Refinement, *Refinements in husbandry, care and common procedures for non-human primates: Ninth report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement*. Laboratory Animals, 2009. **43**(1\_suppl): p. 1-47.
72. Robinson, V., *Finding alternatives: an overview of the 3Rs and the use of animals in research*. School Science Review, 2005. **87**(319): p. 111.
73. Smaje, L.H., et al., *Advancing refinement of laboratory animal use*. Laboratory Animals, 1998. **32**(2): p. 137-142.
74. Morton, D.B., et al., *Refinements in rabbit husbandry: Second report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW joint working group on refinement*. Laboratory Animals, 1993. **27**(4): p. 301-329.
75. Brown, M.J. and W.J. White, *Reflections on improved health status of rodents bred for research: contributions to the reduction and refinement of animal use*. Alternatives to Laboratory Animals, 2009. **37**(2): p. 187-189.
76. Balls, M., *Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing*. Laboratory animals, 1994. **28**(3): p. 193-211.
77. Chiu, H., et al., *C. elegans as a genetic model to identify novel cellular and molecular mechanisms underlying nervous system regeneration*. Cell Adhesion & Migration, 2011. **5**(5): p. 387-394.

78. Lionakis, M.S., *Drosophila and Galleria insect model hosts: new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology*. Virulence, 2011. **2**(6): p. 521-527.
79. Yamada, T., *Therapeutic monoclonal antibodies*. The Keio journal of medicine, 2011. **60**(2): p. 37-46.
80. Rossi, A., *A roadmap for the development of alternative (non-animal) methods for repeated dose testing*. ALTEX-ALTERNATIVES TO ANIMAL EXPERIMENTATION, 2012. **29**(1): p. 33-40.
81. Basketter, D., et al., *A roadmap for the development of alternative (non-animal) methods for systemic toxicity testing*. 2012.
82. Wishart, D.S., *Improving early drug discovery through ADME modelling: an overview*. Drugs in R & D, 2007. **8**: p. 349-362.
83. Schena, M., et al., *Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray*. Science, 1995. **270**(5235): p. 467-470.
84. Wilkins, M.R., *Proteome research: new frontiers in functional genomics*. 1997: Springer Science & Business Media.
85. Nicholson, J.K. and J.C. Lindon, *Metabonomics*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1054-1056.
86. Wishart, D.S., *Computational strategies for metabolite identification in metabolomics*. Bioanalysis, 2009. **1**(9): p. 1579-1596.
87. Srivastava, S., *Move over proteomics, here comes glycomics*. 2008, ACS Publications.
88. Wenk, M.R., *The emerging field of lipidomics*. Nature reviews Drug discovery, 2005. **4**(7): p. 594-610.
89. Kandárová, H. and S. Letašiová, *Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods*. Interdisciplinary toxicology, 2011. **4**(3): p. 107-113.
90. Chow, P.K., R.T. Ng, and B.E. Ogden, *Using animal models in biomedical research: a primer for the investigator*. 2008: World Scientific.
91. Livingstone, D.J., *The characterization of chemical structures using molecular properties. A survey*. Journal of chemical information and computer sciences, 2000. **40**(2): p. 195-209.
92. Hansch, C., et al., *Correlation of biological activity of phenoxyacetic acids with Hammett substituent constants and partition coefficients*. Nature, 1962. **194**(4824): p. 178-180.
93. Ghose, A.K. and G.M. Crippen, *Atomic physicochemical parameters for three-dimensional-structure-directed quantitative structure-activity relationships. 2. Modeling dispersive and hydrophobic interactions*. Journal of chemical information and computer sciences, 1987. **27**(1): p. 21-35.

94. Jacobson-Kram, D. and J.F. Contrera, *Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation part I: early screening for potential human mutagens*. Toxicological sciences, 2007. **96**(1): p. 16-20.
95. Karelson, M., V.S. Lobanov, and A.R. Katritzky, *Quantum-chemical descriptors in QSAR/QSPR studies*. Chemical reviews, 1996. **96**(3): p. 1027-1044.
96. Hastie, T., R. Tibshirani, and J. Friedman, *The elements of statistical learning: data mining, inference, and prediction*. 2017, Springer.
97. Gini, G. and A.R. Katritzky, *Predictive toxicology of chemicals: Experiences and impact of AI tools*. AI Magazine, 1999. **21**(3): p. 81-84.
98. Romesburg, C., *Cluster analysis for researchers*. 2004: Lulu. com.
99. Eriksson, L., et al., *Methods for reliability and uncertainty assessment and for applicability evaluations of classification-and regression-based QSARs*. Environmental health perspectives, 2003. **111**(10): p. 1361-1375.
100. Eriksson, L., et al., *Multi-and megavariate data analysis basic principles and applications*. Vol. 1. 2013: Umetrics Academy.
101. Benigni, R. and A.M. Richard, *QSARS of mutagens and carcinogens: two case studies illustrating problems in the construction of models for noncongeneric chemicals*. Mutation Research/Genetic Toxicology, 1996. **371**(1-2): p. 29-46.
102. Martin, T.M. and D.M. Young, *Prediction of the acute toxicity (96-h LC50) of organic compounds to the fathead minnow (*Pimephales promelas*) using a group contribution method*. Chemical Research in Toxicology, 2001. **14**(10): p. 1378-1385.
103. Martin, T.M., et al., *A hierarchical clustering methodology for the estimation of toxicity*. Toxicology mechanisms and methods, 2008. **18**(2-3): p. 251-266.
104. Gini, G., et al., *ToxRead: a tool to assist in read across and its use to assess mutagenicity of chemicals*. SAR and QSAR in Environmental Research, 2014. **25**(12): p. 999-1011.
105. OECD, *Environment Directorate Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology*. 2013.
106. Volunteers, A.H., *Guidance for industry and reviewers*. Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), 2002.
107. Marchand, P.A. and D. Robin, *Evolution of Directive (EC) No 128/2009 of the European Parliament and of the Council establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides*. Journal of Regulatory Science, 2019: p. 1-7.
108. Przybylak, K., et al., *Assessing toxicological data quality: basic principles, existing schemes and current limitations*. SAR and QSAR in Environmental Research, 2012. **23**(5-6): p. 435-459.

109. Benfenati, E., *In silico methods for predicting drug toxicity*. 2016: Springer.
110. Munro, I.C., et al., *Correlation of structural class with no-observed-effect levels: a proposal for establishing a threshold of concern*. Food and Chemical Toxicology, 1996. **34**(9): p. 829-867.
111. Bitsch, A., et al., *REPDOSE: A database on repeated dose toxicity studies of commercial chemicals—A multifunctional tool*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2006. **46**(3): p. 202-210.
112. Hayashi, M. and Y. Sakuratani, *Development of an evaluation support system for estimating repeated-dose toxicity of chemicals based on chemical structure*. 2011.
113. Persad, A.S. and G.S. Cooper, *Use of epidemiologic data in Integrated Risk Information System (IRIS) assessments*. Toxicology and applied pharmacology, 2008. **233**(1): p. 137-145.
114. Anzali, S., et al., *Development of computational models for the risk assessment of cosmetic ingredients*. 2012.
115. Toropov, A.A., et al., *CORAL: model for no observed adverse effect level (NOAEL)*. Molecular diversity, 2015. **19**: p. 563-575.
116. Gadaleta, D., et al., *A k-NN algorithm for predicting oral sub-chronic toxicity in the rat*. ALTEX-Alternatives to animal experimentation, 2014. **31**(4): p. 423-432.
117. Sakuratani, Y., et al., *Hazard Evaluation Support System (HESS) for predicting repeated dose toxicity using toxicological categories*. SAR and QSAR in environmental research, 2013. **24**(5): p. 351-363.
118. Mazzatorta, P., et al., *Modeling oral rat chronic toxicity*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2008. **48**(10): p. 1949-1954.
119. Kandula, R.K. and R. Sundararajan, *Novel Development of RP-HPLC Method to Quantify Amoxicillin, Omeprazole and Rifabutin in Combination*. International Journal of Pharmaceutical Investigation, 2020. **10**(4).
120. Thambavita, D., et al., *Biowaiver monograph for immediate-release solid oral dosage forms: amoxicillin trihydrate*. Journal of pharmaceutical sciences, 2017. **106**(10): p. 2930-2945.
121. Siciliano, A., et al., *Amoxicillin in water: insights into relative reactivity, byproduct formation, and toxicological interactions during chlorination*. Applied Sciences, 2021. **11**(3): p. 1076.
122. Huttner, A., et al., *Oral amoxicillin and amoxicillin–clavulanic acid: properties, indications and usage*. Clinical Microbiology and Infection, 2020. **26**(7): p. 871-879.
123. Layton, A., *The use of isotretinoin in acne*. Dermato-endocrinology, 2009. **1**(3): p. 162-169.

124. Chien, D., R.B. Sandri, and D. Tang-Liu, *Systemic pharmacokinetics of acitretin, etretinate, isotretinoin, and acetylenic retinoids in guinea pigs and obese rats*. Drug metabolism and disposition, 1992. **20**(2): p. 211-217.
125. Eckhoff, C. and C.C. Willhite, *Embryonic delivered dose of isotretinoin (13-cis-retinoic acid) and its metabolites in hamsters*. Toxicology and applied pharmacology, 1997. **146**(1): p. 79-87.
126. Faden, J., et al., *An overview of the currently available and emerging long-acting formulations of risperidone for schizophrenia and bipolar disorder*. Expert Review of Neurotherapeutics, 2024: p. 1-11.
127. Yamanouchi, Y., et al., *Effect of DRD2, 5-HT2A, and COMT genes on antipsychotic response to risperidone*. The pharmacogenomics journal, 2003. **3**(6): p. 356-361.
128. Szarfman, A., et al., *Atypical antipsychotics and pituitary tumors: a pharmacovigilance study*. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy, 2006. **26**(6): p. 748-758.
129. Böker, H., M. Brandenberger, and C. Schopper, *Neurotoxicity related to lithium-risperidon combination treatment in a patient with schizoaffective disorder*. Psychiatrische Praxis, 2006. **34**(1): p. 38-41.
130. Barenholz, Y.C., *Doxil®—The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned*. Journal of controlled release, 2012. **160**(2): p. 117-134.
131. Minotti, G., et al., *The secondary alcohol metabolite of doxorubicin irreversibly inactivates aconitase/iron regulatory protein-1 in cytosolic fractions from human myocardium*. The FASEB journal, 1998. **12**(7): p. 541-552.
132. Altschuler, E.L. and R.E. Kast, *The atypical antipsychotic agents ziprasidone [correction of ziprasidone], risperdone and olanzapine as treatment for and prophylaxis against progressive multifocal leukoencephalopathy*. Medical hypotheses, 2005. **65**(3): p. 585-586.
133. Kratz, F., et al., *Acute and repeat-dose toxicity studies of the (6-maleimidocaproyl) hydrazone derivative of doxorubicin (DOXO-EMCH), an albumin-binding prodrug of the anticancer agent doxorubicin*. Human & experimental toxicology, 2007. **26**(1): p. 19-35.
134. Gianturco, S.L., et al., *Guaifenesin: Summary Report*. 2020.
135. Milne, G.W., *Drugs: Synonyms and Properties: Synonyms and Properties*. 2018: Routledge.
136. Sehdev, J., *Intrathecal Drug Delivery Systems*. Urogenital Pain: A Clinicians Guide to Diagnosis and Interventional Treatments, 2017: p. 187-206.
137. de Saldanha Simon, E., et al., *Development, quality by design-based optimization, and stability assessment of oral liquid formulations containing baclofen for hospital use*. AAPS PharmSciTech, 2022. **23**(8): p. 301.

138. Johnson, C., et al., *Skin sensitization in silico protocol*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2020. **116**: p. 104688.
139. Rakers, C., et al., *In silico prediction of human sulfotransferase 1E1 activity guided by pharmacophores from molecular dynamics simulations*. Journal of Biological Chemistry, 2016. **291**(1): p. 58-71.
140. Helma, C., et al., *Data quality in predictive toxicology: identification of chemical structures and calculation of chemical properties*. Environmental Health Perspectives, 2000. **108**(11): p. 1029-1033.
141. Jacobs, A., *Prediction of 2-year carcinogenicity study results for pharmaceutical products: how are we doing?* Toxicological Sciences, 2005. **88**(1): p. 18-23.
142. Bailey, A.B., et al., *The use of structure–activity relationship analysis in the food contact notification program*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2005. **42**(2): p. 225-235.
143. Noga, M., A. Michalska, and K. Jurowski, *Application of toxicology in silico methods for prediction of acute toxicity (LD50) for Novichoks*. Archives of Toxicology, 2023. **97**(6): p. 1691-1700.
144. Stranz, D.D., et al., *Combined computational metabolite prediction and automated structure-based analysis of mass spectrometric data*. Toxicology Mechanisms and Methods, 2008. **18**(2-3): p. 243-250.
145. Lipinski, C. and A. Hopkins, *Navigating chemical space for biology and medicine*. Nature, 2004. **432**(7019): p. 855-861.
146. Richard, A.M., *Structure-based methods for predicting mutagenicity and carcinogenicity: are we there yet?* Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1998. **400**(1-2): p. 493-507.
147. Dimitrov, S., et al., *A stepwise approach for defining the applicability domain of SAR and QSAR models*. Journal of chemical information and modeling, 2005. **45**(4): p. 839-849.
148. Guideline, I.H. *Assessment and control of dna reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk M7*. in *International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH): Geneva*. 2014.
149. Raunio, H., *In silico toxicology–non-testing methods*. Frontiers in pharmacology, 2011. **2**: p. 33.
150. Valerio Jr, L.G., *In silico toxicology for the pharmaceutical sciences*. Toxicology and applied pharmacology, 2009. **241**(3): p. 356-370.
151. Rowe, P., *Statistical methods for continuous measured endpoints in in silico toxicology*. In *Silico Toxicology: Principles and Applications*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 2010: p. 228-251.

152. de Bruin, Y.B., et al., *Testing methods and toxicity assessment (Including alternatives)*, in *Information Resources in Toxicology*. 2009, Elsevier. p. 497-513.

## EK:1 QSAR Toolbox Tahmin Raporları

### Amoksisilin

### QSAR prediction report

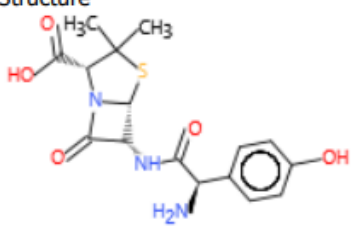
Toolbox version: 4.6

Date: 9 Jun 2024

Author(s):

Contact details:

Danish (Q)SAR Database, Division of Diet, Disease Prevention and Toxicology, National Food Institute, Technical University of Denmark, <http://qsar.food.dtu.dk>

Target information		
Structural information	Numerical identifiers	Chemical names
SMILES: <chem>CC1(C)S[C@@H]2[C@H](NC(=O)[C@H](N)c3ccc(O)cc3)C(=O)N2[C@H]1C(O)=O</chem>  Structure 	CAS#: 26787-78-0 Other: EC Number:2480038	(2S,5R,6R)-6-[(2R)-2-amino-2-(4-hydroxyphenyl)acetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo [3.2.0]heptane-2-carboxylic acid (2S,5R,6R)-6-[(R)-2-Amino-2-(4-hydroxy-phenyl)-acetyl-amino]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid (2S,5R,6R)-6-[[[(2R)-2-amino-2-(4-hydroxyphenyl)acetyl]amino]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid

Prediction summary
<b>Predicted endpoint:</b> Human health hazards -> Acute Toxicity -> LD50 -> Oral -> Rat -> 48 h <b>Predicted value:</b> 7.3E+03 [mg/kg bdwt/d] (equal to 7.3E+03 [mg/kg/d]) <b>Data gap filling method:</b> SAR/QSAR prediction <b>Name of the QSAR model:</b> Acute toxicity in Rat, Oral - Danish QSAR DB ACDLabs model <b>QSAR applicability domain:</b> In domain

İsotretionin



## QSAR prediction report

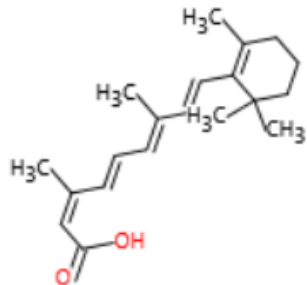
Toolbox version: 4.6

Date: 9 Jun 2024

Author(s):

Contact details:

Danish (Q)SAR Database, Division of Diet, Disease Prevention and Toxicology, National Food Institute, Technical University of Denmark, <http://qsar.food.dtu.dk>

<b>Target information</b>		
<b>Structural information</b>	<b>Numerical identifiers</b>	<b>Chemical names</b>
SMILES: <chem>C\C(C=C\C1=C(C)CCCC1(C)C)=C/C=C/C(C)=C\C(O)=O</chem>  Structure 	CAS#: 4759-48-2 Other: EC Number:2252960	(13cis)-retinoic acid 13-cis Retinoic acid 13-cis-Retinoic acid

<b>Prediction summary</b>
<p><b>Predicted endpoint:</b> Human health hazards -&gt; Acute Toxicity -&gt; LD50 -&gt; Oral -&gt; Rat -&gt; 48 h</p> <p><b>Predicted value:</b> 2.8E+03 [mg/kg bdwt/d] (equal to 2.8E+03 [mg/kg/d])</p> <p><b>Data gap filling method:</b> SAR/QSAR prediction</p> <p><b>Name of the QSAR model:</b> Acute toxicity in Rat, Oral - Danish QSAR DB ACDLabs model</p> <p><b>QSAR applicability domain:</b> In domain</p>

## Risperidon

### QSAR prediction report

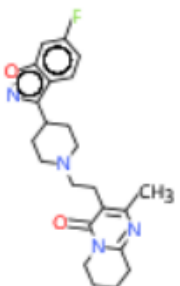
Toolbox version: 4.6

Date: 10 Jun 2024

Author(s):

Contact details:

Danish (Q)SAR Database, Division of Diet, Disease Prevention and Toxicology, National Food Institute, Technical University of Denmark, <http://qsar.food.dtu.dk>

Target information		
Structural information	Numerical identifiers	Chemical names
SMILES: <chem>CC1N=C2CCCCN2C(=O)C=1CCN1CC(C(C1)c1noc2cc(F)ccc12</chem>    Structure	CAS#: 106266-06-2 Other: N/A	4H-Pyrido(1,2-a)pyrimidin-4-one, 3-(2-(4-(6-fluoro-1,2-benzisoxazol-3-yl)-1-piperidinyl)ethyl)-6,7,8,9-tetrahydro-2-methyl-4H-Pyrido[1,2-a]pyrimidin-4-one, 3-[2-[4-(6-fluoro-1,2-benzisoxazol-3-yl)-1-piperidinyl]ethyl]-6,7,8,9-tetrahydro-2-methyl-Risperidone

Prediction summary
<b>Predicted endpoint:</b> Human health hazards -> Acute Toxicity -> LD50 -> Oral -> Mouse -> 48 h <b>Predicted value:</b> 190 [mg/kg bdwt/d] (equal to 190 [mg/kg/d]) <b>Data gap filling method:</b> SAR/QSAR prediction <b>Name of the QSAR model:</b> Acute toxicity in Mouse, Oral - Danish QSAR DB ACDLabs model <b>QSAR applicability domain:</b> In domain

## Doksorubisin

### QSAR prediction report

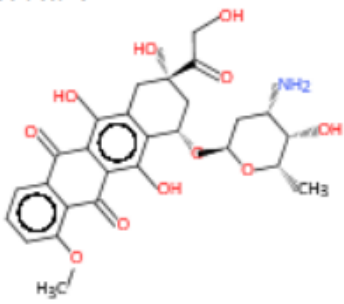
Toolbox version: 4.6

Date: 10 Jun 2024

Author(s):

Contact details:

Danish (Q)SAR Database, Division of Diet, Disease Prevention and Toxicology, National Food Institute, Technical University of Denmark, <http://qsar.food.dtu.dk>

Target information		
Structural information	Numerical identifiers	Chemical names
SMILES: <chem>COc1cccc2C(=O)c3c(O)c4C[C@](O)(C[C@H](O[C@H]5C[C@H](N)[C@H](O)[C@H](C)O5)c4c(O)c3C(=O)c12)C(=O)CO</chem>  Structure 	CAS#: 23214-92-8 Other: EC Number:2454956	(1S,3S)-3,5,12-trihydroxy-3-(hydroxyacetyl)-10-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotetracen-1-yl 3-amino-2,3,6-trideoxy-alpha-L-lyxo-hexopyranoside (8S,10S)-10-((2R,4S,5S,6S)-4-Amino-5-hydroxy-6-methyl-tetrahydro-pyran-2-yloxy)-6,8,11-trihydroxy-8-(2-hydroxyacetyl)-1-methoxy-7,8,9,10-tetrahydro-naphthacene-5,12-dione (8S,10S)-10-[(3-Amino-2,3,6-trideoxy-alpha-L-lyxo-hexopyranosyl)oxy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-8-(2-hydroxyacetyl)-1-methoxy-5,12-naphthacenedione

### Prediction summary

**Predicted endpoint:** Human health hazards -> Acute Toxicity -> LD50 -> Intraperitoneal -> Rat -> 48 h

**Predicted value:** 13.6 [mg/kg bdwt/d] (equal to 13.6 [mg/kg/d])

**Data gap filling method:** SAR/QSAR prediction

**Name of the QSAR model:** Acute toxicity in Rat, Intraperitoneal - Danish QSAR DB ACDLabs model

**QSAR applicability domain:** In domain

## Guaifenesin

QSAR prediction report

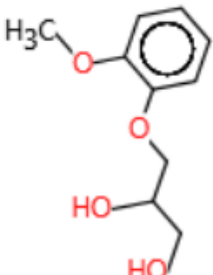
Toolbox version: 4.6

Date: 9 Jun 2024

Author(s):

Contact details:

Danish (Q)SAR Database, Division of Diet, Disease Prevention and Toxicology, National Food Institute, Technical University of Denmark, <http://qsar.food.dtu.dk>

Target information		
Structural information	Numerical identifiers	Chemical names
SMILES: <chem>COc1ccccc1OCC(O)CO</chem>    Structure	CAS#: 93-14-1 Other: EC Number:2022225	(2RS)-3-(2-Methoxyphenoxy)propane-1,2-diol 1,2-Propanediol, 3-(2-methoxyphenoxy)- 1,2-Propanediol, 3-(o-methoxyphenoxy)-

Prediction summary
<b>Predicted endpoint:</b> Human health hazards -> Acute Toxicity -> LD50 -> Oral -> Rat -> 48 h <b>Predicted value:</b> 2E+03 [mg/kg bdwt/d] (equal to 2E+03 [mg/kg/d]) <b>Data gap filling method:</b> SAR/QSAR prediction <b>Name of the QSAR model:</b> Acute toxicity in Rat, Oral - Danish QSAR DB ACDLabs model <b>QSAR applicability domain:</b> In domain

## Baklofen

### QSAR prediction report

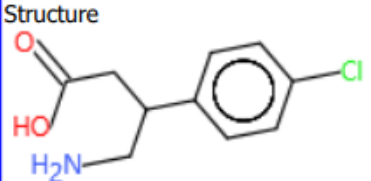
Toolbox version: 4.6

Date: 12 Jul 2024

Author(s):

Contact details:

Danish (Q)SAR Database, Division of Diet, Disease Prevention and Toxicology, National Food Institute, Technical University of Denmark, <http://qsar.food.dtu.dk>

Target information		
Structural information	Numerical identifiers	Chemical names
SMILES: <chem>NCC(CC(O)=O)c1ccc(Cl)cc1</chem>	CAS#: 1134-47-0 Other: EC Number:2144869	4-amino-3-(4-chlorophenyl)butanoic acid Baclofen Benzenepropanoic acid, ?-(aminomethyl)-4-chloro-
Structure 		

Prediction summary
<b>Predicted endpoint:</b> Human health hazards -> Acute Toxicity -> LD50 -> Oral -> Mouse -> 48 h <b>Predicted value:</b> 940 [mg/kg bdwt/d] (equal to 940 [mg/kg/d]) <b>Data gap filling method:</b> SAR/QSAR prediction <b>Name of the QSAR model:</b> Acute toxicity in Mouse, Oral - Danish QSAR DB ACDLabs model <b>QSAR applicability domain:</b> In domain

## QSAR prediction report

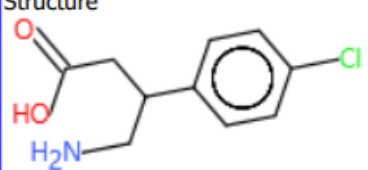
Toolbox version: 4.6

Date: 12 Jul 2024

Author(s):

Contact details:

Danish (Q)SAR Database, Division of Diet, Disease Prevention and Toxicology, National Food Institute, Technical University of Denmark, <http://qsar.food.dtu.dk>

<b>Target information</b>		
<b>Structural information</b>	<b>Numerical identifiers</b>	<b>Chemical names</b>
SMILES: <chem>NCC(CC(O)=O)c1ccc(Cl)cc1</chem>	CAS#: 1134-47-0 Other: EC Number:2144869	4-amino-3-(4-chlorophenyl)butanoic acid Baclofen Benzenepropanoic acid, ?-(aminomethyl)-4-chloro-
Structure 		

<b>Prediction summary</b>
<b>Predicted endpoint:</b> Human health hazards -> Repeated Dose Toxicity -> Maximum Recommended Daily dose -> Homo sapiens -> Undesirable Adverse Effects
<b>Predicted value:</b> Positive [Repeated dose toxicity]
<b>Data gap filling method:</b> SAR/QSAR prediction
<b>Name of the QSAR model:</b> MRDD in Humans $\leq$ 2.69 mg/kg-bw/d - Danish QSAR DB battery model
<b>QSAR applicability domain:</b> In domain

## QSAR prediction report

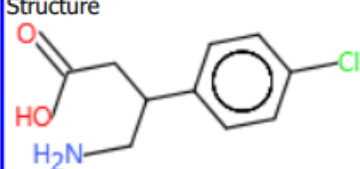
Toolbox version: 4.6

Date: 12 Jul 2024

Author(s):

Contact details:

Danish (Q)SAR Database, Division of Diet, Disease Prevention and Toxicology, National Food Institute, Technical University of Denmark, <http://qsar.food.dtu.dk>

<b>Target information</b>		
<b>Structural information</b>	<b>Numerical identifiers</b>	<b>Chemical names</b>
SMILES: <chem>NCCC(=O)Oc1ccc(Cl)cc1</chem> Structure 	CAS#: 1134-47-0 Other: EC Number:2144869	4-amino-3-(4-chlorophenyl)butanoic acid Baclofen Benzenepropanoic acid, ?-(aminomethyl)-4-chloro-

<b>Prediction summary</b>
<b>Predicted endpoint:</b> Human health hazards -> Acute Toxicity -> LD50 -> Intraperitoneal -> Rat -> 48 h <b>Predicted value:</b> 300 [mg/kg bdwt/d] (equal to 300 [mg/kg/d]) <b>Data gap filling method:</b> SAR/QSAR prediction <b>Name of the QSAR model:</b> Acute toxicity in Rat, Intraperitoneal - Danish QSAR DB ACDLabs model <b>QSAR applicability domain:</b> In domain

**EK 2: Turnitin Raporu****Gökhan Egemen tez**

## ORIGINALITY REPORT

<b>2</b> %	<b>0</b> %	<b>2</b> %	<b>2</b> %
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

## PRIMARY SOURCES

<b>1</b>	<b>"In Silico Methods for Predicting Drug Toxicity", Springer Nature, 2016</b>	<b>2</b> %
	Publication	

Exclude quotes  On  
Exclude bibliography  On

Exclude matches  < 2%



**EK 3: Turnitin Dijital Makbuzu****Digital Receipt**

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Gökhan Egemen Karaca  
Assignment title: Gökhan Egemen tez  
Submission title: Gökhan Egemen tez  
File name: G\_khan\_E\_Karaca\_-\_Y\_KSEK\_L\_SANS\_TEZ.pdf  
File size: 2.96M  
Page count: 148  
Word count: 27,736  
Character count: 189,122  
Submission date: 13-Aug-2024 02:34PM (UTC+0300)  
Submission ID: 2431491932

Y.  
BACETTEN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

IV. DÜZGÜN TOXİKOLOJİ YÖNTEMLERİ VE  
UYGULAMALARI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Doç. Dr. Gökhan Egemen KARACA

Farmakoloji, Toksikoloji Programı  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANKARA  
2024

Y.  
BACETTEN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

## 9.ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

---

- **Adı Soyadı:** Gökhan Egemen Karaca