

**BENZOKSAZOL TÜREVİ 12 BİLEŞİĞİN *SALMONELLA*  
*TYPHIMIRIUM* TA98, TA100 ÜZERİNE MUTAJENİK  
AKTİVİTELERİ**

**THE MUTAGENIC ACTIVITIES OF 12 BENZOXAZOLE  
DERIVATIVES UPON *SALMONELLA TYPHIMIRIUM* TA98,  
TA100**

**DERYA AKKURT**

**PROF. DR. NURAN DİRİL**  
**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
BİYOLOJİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2014

**DERYA AKKURT'** un hazırladığı "**BENZOKSAZOL TÜREVİ 12 BİLEŞİĞİN SALMONELLA TYPHIMIRIUM TA98, TA100 ÜZERİNE MUTAJENİK AKTİVİTELERİ**" adlı çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI' NDA** yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan

(Prof. Dr. Erol AKSÖZ)

Danışman

(Prof. Dr. Nuran DİRİL)

Üye

(Prof. Dr. Sibel SÜMER)

Üye

(Yrd. Doç. Dr. Özden KORKMAZ)

Üye

(Yrd. Doç. Dr. Emine ÖKSÜZOĞLU)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

***Canım ANNEME***

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

30/01/2014



Derya AKKURT

## ÖZET

### BENZOKSAZOL TÜREVİ 12 BİLEŞİĞİN *SALMONELLA TYPHIMIRIUM* TA98 TA100 SUŞLARI ÜZERİNDE MUTAJENİK AKTİVİTELERİ

DERYA AKKURT

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. NURAN DİRİL

Ocak 2014, 57 sayfa

Çalışmada kemoterapötik etkili olabileceği düşünülen 12 adet benzoksazol türevi bileşiğin kısa zamanlı bakteriyel test sistemlerinden biri olan Ames test sistemi ile mutajenik potansiyelleri araştırılmıştır.

Pozitif kontrol olarak *S. typhimurium* TA98 için danomisin (6 µg/plak), *S. typhimurium* TA100 için sodyum azit (1,5 µg/plak) kullanılmıştır. *S. typhimurium* TA98 suşu (*hisD3052*, *rfa*, *uvrB*, *pkm101*) çerçeve kaymasına yol açan mutajenlerin, *S. typhimurium* TA100 suşu (*hisG46*, *rfa*, *uvrB*, *pkm101*) ise baz çifti değişimine yol açan mutajenlerin belirlenmesi için kullanılmıştır.

Verilerin istatistiksel farklılıkları SPSS 16. 0 programında tek yönlü varyans analizi kullanılarak test edildi. Sonuç olarak, 11 numaralı bileşik 50, 100, 200 µg/plak dozlarda, 13 numaralı bileşik 100, 200 µg/plak dozlarda *S. typhimurium* TA98 suşu için mutajenik etki göstermiştir ( $p < 0,05$ ). 12 ve 14 numaralı bileşik 200 µg/plak dozunda mutajenik etkiliyken, 11 ve 13 no'lu bileşikler test edilen tüm dozlarda *S. typhimurium* TA100 suşu için mutajenik etkili bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Test edilen diğer kimyasal bileşikler, bu deney sisteminde mutajenik etkili bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ).

**Anahtar kelimeler:** Ames testi, benzoksazol, mutajenite.

## ABSTRACT

### THE MUTAGENIC ACTIVITIES OF BENZOXAZOLE DERIVATIVES OF 12 COMPOUNDS UPON *SALMONELLA TYPHIMIRIUM* TA98 TA100

DERYA AKKURT

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. NURAN DİRİL

January 2014, 57 pages

In this study, the mutagenic potentials of 12 benzoxazole derivatives, thought to have chemotheropatic effect, were investigated by Ames test system which was one of short time bacterial mutagenicity test systems.

Daunomicina (6 µg/plate) was used as a positive control for *S. typhimurium* TA98 and sodium azide (1,5 µg/plate) was used for *S. typhimurium* TA100. *S. typhimurium* TA98 (*hisD3052*, *rfa*, *uvrB*, *pkm101*) strain was used to detect frameshift mutagens and *S. typhimurium* TA100 (*hisG46*, *rfa*, *uvrB*, *pkm101*) was used to detect base-pair substitution mutagens.

Statistical differences of the data were tested by one way ANOVA in SPSS. In conclusion, 11 coded compound showed mutagenic effect in the doses of 50, 100, 200 µg/plate and 13 coded compound showed mutagenic effect in the doses of 100, 200 µg/plate doses for *S. typhimurium* TA98 ( $p < 0,05$ ). While 12 and 14 coded compounds were found mutagenic in the dose of 200 µg/plate, 11 and 13 coded compounds were mutagenic at all doses tested in *S. typhimurium* TA100 ( $p < 0,05$ ). The other compounds were not mutagenic effects in this test system ( $p > 0,05$ ).

**Keywords:** Ames Test, benzoxazole, mutagenicity

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca maddi manevi her türlü desteğini esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Nuran Diril'e;

Çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen sayın Prof. Dr. Erol Aksöz'e

Çalışmamda test ettiğim kimyasal maddelerin sağlanmasında yardımcı olan Prof. Dr. Esin Akı Şener, Arş. Gör. Tuğba Bolelli ve değerli çalışma arkadaşlarına;

Çalışmada deneylerin istatistiksel olarak planlanması ve değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Tülay Saraçbaşı'na;

Çalışmalarım süresince her türlü desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Egemen Foto, Fatma Zilifdar, Zeliha Aydoğan'a

Deneylerim aksamadan devam etmesini sağlayan Vedat Mutlu'ya;

Çalışmamın başından sonuna her türlü desteği sağlayan yakın dostlarım Gözde Karabulut ve Sevcan Aldemir'e

Bugünlere ulaşmamı sağlayan iyi ve kötü günlerimde hep yanımda olan canım annem Zeynep Akkurt'a hayatım boyunca desteğini hissettiğim babam Tahir ve abim Onur Akkurt'a; sonsuz Teşekkürler...

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ÇİZELGELER.....	vi
ŞEKİLLER.....	vii
KISALTMALAR.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kemoterapotikler .....	1
1.1.1 Antibakteriyel Kemoterapotiklerin Etki Mekanizması .....	1
1.1.2. Antitüberküloz Kemoterapotiklerin Etki mekanizması .....	2
1.1.3. Antifungal Kemoterapotiklerin Etki Mekanizması.....	2
1.1.4. Antimalaryal Kemoterapotiklerin Etki Mekanizması .....	3
1.1.5. Antihelmintik Kemoterapotiklerin Etki Mekanizması .....	3
1.1.6. Antiviral Kemoterapotiklerin Etki Mekanizması .....	3
1.2. Benzoksazol Türevi Bileşikler .....	6
1.2.1. Antibakteriyel Etkisi .....	7
1.2.2. Antiviral Etkisi .....	8
1.2.3. Antihelmintik Etkisi.....	8
1.2.4. Antineoplastik Etkisi.....	8
1.3. Kısa Zamanlı Test Sistemleri.....	9
1.3.1. Mikroçekirdek Testi .....	10
1.3.2. Komet Testi .....	11
1.3.3. Kardeş Kromatit Değişimi Testi .....	11
1.3.4. umu (SOS) testi.....	12
1.3.5. rec Yöntemi .....	12
1.3.6. Ames II testi.....	12
1.3.7. Yes Testi .....	13
1.3.8. Ames Testi .....	13
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	19



2.1. Kullanılan Test Suşları.....	19
2.2. Kimyasal Maddeler.....	19
2.2.1. Test Edilen Kimyasal Bileşikler.....	19
2.2.2. Çözücüler.....	21
2.2.3. Pozitif Mutajenler.....	21
2.2.4. Diğer Kimyasal Maddeler.....	21
2.2.5. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Bileşiklerin Hazırlanması.....	21
2.2.6. Çalışmada Kullanılan Besi Ortamları ve Çözeltiler.....	21
2.3. Çalışmada Kullanılacak Test Suşlarının Üretilmesi.....	25
2.4. Çalışmada Kullanılacak Test Suşlarının Genetik İşaretlerinin Kontrolü.....	26
2.4.1. Histidin Gereksinimi Kontrolü.....	26
2.4.2. pKM101 Plazmit Varlığının Kontrolü.....	26
2.4.3. rfa Mutasyonu Kontrolü.....	26
2.4.4. uvrB Mutasyonu Kontrolü.....	26
2.4.5. Kendiliğinden Geri Dönen Koloni Sayısının Kontrolü.....	27
2.5. Çalışmada Kullanılacak Test Suşlarının Dondurulması ve Saklanması.....	27
2.6. Master Plakların Hazırlanması.....	27
2.7. Ames Test Sistemi.....	27
2.7.1. Sitotoksik Etkinin Saptanması.....	28
2.7.2. Mutajenik Etkinin Saptanması.....	28
2.7.2.1 Sonuçların Değerlendirilmesi.....	29
3. SONUÇLAR.....	29
3.1. Test Suşlarının Üreme Durumları.....	29
3.2. Ames Testi Sonuçları.....	29
4. TARTIŞMA.....	44
KAYNAKLAR.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	57

## ÇİZELGELER

### Sayfa

Çizelge 1.1. <i>S. typhimurium</i> mutant suşlarının genetik özellikleri.....	18
Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan benzoksazol türevi kimyasal bileşikler.....	19
Çizelge 3.1. 1 numaralı bileşiğin <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında mutajenik aktivitesi .....	30
Çizelge 3.2. 2 numaralı bileşiğin <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında mutajenik aktivitesi .....	31
Çizelge 3.3. 3 numaralı bileşiğin <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında mutajenik aktivitesi .....	32
Çizelge 3.4. 4 numaralı bileşiğin <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında mutajenik aktivitesi .....	33
Çizelge 3.5. 5 numaralı bileşiğin <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında mutajenik aktivitesi .....	34
Çizelge 3.6. 6 numaralı bileşiğin <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında mutajenik aktivitesi .....	35
Çizelge 3.7. 7 numaralı bileşiğin <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında mutajenik aktivitesi .....	36
Çizelge 3.8. 10 numaralı bileşiğin <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında mutajenik aktivitesi .....	37
Çizelge 3.9. 11 numaralı bileşiğin <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında mutajenik aktivitesi .....	38
Çizelge 3.10. 12 numaralı bileşiğin <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında mutajenik aktivitesi .....	39
Çizelge 3.11. 13 numaralı bileşiğin <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında mutajenik aktivitesi .....	40
Çizelge 3.12. 14 numaralı bileşiğin <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında mutajenik aktivitesi .....	41

## ŞEKİLLER

### Sayfa

Şekil 1.1. S-Adenozil Homosistein (SAH) hidrolaz inhibitörleri mekanizması.....	4
Şekil 1. 2. Non-nükleozit ters transkriptaz inhibitörleri mekanizması .....	6
Şekil 1. 3. Benzoksazol yapısı .....	7
Şekil 1. 4. Benzoksazol, Adenin ve Guanin azotlu bazlarının yapısı .....	7
Şekil 1. 5. Histidin operonu.....	16
Şekil 1. 6. Histidin biyosentez metabolik yolu .....	16
Şekil 2. 1. Negatif ve pozitif kontrol plaklarında <i>S.typhimirium</i> TA100 suşu için <i>his</i> <sup>+</sup> dönen koloniler .....	28

## KISALTMALAR

DMSO	Dimetilsülfoksit
HA	Hıyaluranik Asit
HSV	Herpes Simplex Virüs
HIV	Human Immunodeficiency Virus
hER $\alpha$	Östrojen Reseptörleri
K	Potasyum
Mg	Magnezyum
MA	Minimal Agar
MÇ	Mikroçekirdek
NDP	Nükleozit difosfat
NRTI	Nükleozid Olan Ters Transkriptaz İnhibitörleri
NNRTI	Nükleozid Olmayan Ters Transkriptaz İnhibitörleri
OMP	Oratidilik Asit hER $\alpha$
ONPG	O-Nitrophenyl - Beta-D-Galactoside
PAA	Fosfoasetik Asit
PABA	Para Amino Benzoik Asit
PFA	Fosfonofomik Asit
RT	Ters Transkriptaz (Reverse Transcriptase)
SAH	S Adenozin Homosistein
Tbc	Tüberküloz
TK	Timidin Kinaz
UDP	Üridilik Asit
UDP-glcN	Uridin-Difosfat N-Asetilglukozamin

# 1. GİRİŞ

Benzoksazoller aromatik organik bileşikler olup daha çok endüstride ve araştırmalarda kullanılır. Heterosiklik yapıda olması kemoterapötik etkili ilaç yapımında kullanılmasına olanak sağlamıştır [1].

Günümüzde gerek endüstri gerek ilaç yapımı olsun birçok yerde kullanılan bu bileşiklerin piyasaya sürülmeden önce toksikolojik testlerden geçmesi ve biyolojik etkinliği hakkında kapsamlı bilgi sahibi olunması gerekmektedir. Bu amaçla çeşitli toksisite testleri geliştirilmiştir. Bu testlerden birinci grubu bakteriyel testler, ikinci grubu in vitro'da memeli hücreleriyle yapılacak testler, üçüncü grubu ise in vivo'da memeliler kullanılarak yapılacak testler oluşturmaktadır [2].

Bu çalışma kapsamında 12 adet benzoksazol türevi bileşiğın birinci grup bakteriyel test sistemlerinden olan Ames testi kullanılarak, *S. typhimurium* TA98, TA100 suşları üzerindeki mutajenik aktiviteleri araştırılmıştır.

## 1.1. Kemoterapötikler

Kemoterapotik madde vücutta bulunan mikroorganizmaları konakçıya zarar vermeden yok edebilen ilaçlardır [3]. Kemoterapotikler kullanıldığı patojen etkenin cinsine göre sınıflara ayrılır. Antibakteriyel, antiviral, antineoplastik, antihelmintik olanlar bunlardan bazılarıdır [4]. Bu maddeler etkilerini değişik şekillerde gösterebilirler. Bunlardan bazıları aşağıda kısaca özetlenmiştir:

### 1.1.1. Antibakteriyel Kemoterapotiklerin Etki Mekanizmaları

Antibakteriyel etkili kemoterapotikleri beş grupta toplayabiliriz: Birinci grubu bakteri hücre duvarının sentezini inhibe eden kemoterapotik bileşikler oluşturmaktadır. Bu bileşikler bakteri hücre duvarının ana maddesi olan **murein** sentezini, **peptidoglikan** yan zincirleri çapraz bağlayan **transpeptidaz** enzimlerini geri dönüşümsüz olarak inhibe ederek etki gösterirler. Gelişmesini tamamlamış bakteri üzerinde etkili değildir. Bu gruptaki kemoterapotiklere penisilin örnek olarak verilebilir. İkinci grubu sitoplazma membranının geçirgenliğini artıran kemoterapotik bileşikler oluşturmaktadır. Bu bileşikler deterjan etkisi ile sitoplazma membranının geçirgenliğini artırıp, hücre içinde bulunan ve yaşamsal önemi olan bazı maddelerin hücre dışına sızmasına yol açarak bakterisit etki oluştururlar. Gelişmesini tamamlamış bakterileri de öldürürler. Bu gruptaki kemoterapotiklere

nistatin, amfoterisin B örnek olarak verilebilir. Üçüncü grubu hücre içinde protein sentezini inhibe eden kemoterapotik bileşikler oluşturmaktadır. Etki ettiği alanlar çok geniştir. Protein sentezini, çeşitli basamaklarında etkiler. Bu gruptaki kemoterapötiklere tetrasiklin, kloramfenikol örnek olarak verilebilir. Dördüncü grubu intermediyer metabolizmayı bozan kemoterapotik bileşikler oluşturmaktadır. Bakterinin metabolizması için gerekli olan bir maddenin sentezini önlerler. Bu gruptaki kemoterapötiklere sülfonamidler örnek olarak verilebilir [ 4 ]. Beşinci grubu genetik materyal içinde DNA sentezinin veya DNA kontrolü altında yapılan mRNA sentezinin bozulmasına neden olan bileşikler oluşturmaktadır [5]. Bu ilaçların büyük bir kısmı memeli hücrelerinin çekirdeğini de etkilediklerinden sitotoksik ilaçlardır. Memeli hücreleri üzerinde fazla toksik olmayan nalidiksik asit antibakteriyel ilaç olarak kullanılır. Sitotoksik olanlar ise antineoplastik ilaç olarak malign tümörlerin tedavisinde kullanılır [6].

### **1.1.2. Antitüberküloz Kemoterapötiklerin Etki Mekanizmaları**

Tüberküloz (Tbc) etkeni olan *Mycobacterium tuberculosis* yavaş büyüyen, çoğalmaksızın uzun süre canlı kalabilen, hücre içerisine yerleşme eğilimi gösteren bir bakteridir. Bu nedenle tüberküloz enfeksiyonlarının tedavisi uzun sürer. Etki mekanizması kesin olarak bilinmemektedir [7]. Bir görüşe göre bakteri içine giren izoniazid orada bir peroksidazın etkisi altında hidrazin ve izonikotinic aside dönüşür. Sonucu madde bakteride bir koenzim A türünün sentezini bozar. Sonuçta hücrede hidrojen peroksit yıkımı yapılamaz ve fazla miktarda biriken bu madde öldürücü etki yapar. Etki mekanizması ile ilgili diğer bir bulgu, *M. tuberculosis* kültürlerine izoniazid uygulandığında mikobakterilerin NAD içeriğinin düşmesi ve işaretli öncü metabolitlerin mikolik asit yapısına katılmasının azalmasıdır. Bunun nedeni mikolik asid sentezinin önemli bir enzimi olan C-24 asid delta-5 desatüraz enziminin izoniazid tarafından inhibisyonudur. Mikolik asid, mikobakterilerin hücre duvarının önemli bir yapı taşı olduğu için, onun sentezinin bozulması mikobakteriler için ölümcül etki göstermesine neden olmaktadır [8].

### **1.1.3. Antifungal Kemoterapötiklerin Etki Mekanizmaları**

Bu gruptaki kemoterapotik ilaçlar, cilt ve mukozalardaki lokal mantar enfeksiyonları ve sistemik mantar enfeksiyonlarında kullanılırlar [9]. Bu kemoterapotik bileşikler hücre membranındaki ergosterole bağlanıp, porların açılmasını sağlayarak membran bütünlüğünde bozulma ve geçirgenliğinde artmaya neden olurlar. Hücre

içi  $K^{+1}$ ,  $Mg^{+2}$ , ve metabolitlerin hücre dışına çıkışı mantar hücrelerinde enerji üretimini bozar. Bunun sonucunda mantar hücresinde ölüm gerçekleşir. Diğer bir mekanizma ise nitroimidazolların nitro grubunu enzimatik olmayan reaksiyonla indirgeyerek onları aktif metabolitlere dönüştürürler. Bu aktif metabolitler mantar hücresinin DNA'sına bağlanıp DNA sentezini inhibe ederler ve hücrenin ölümüne neden olur [10].

#### **1.1.4 Antimalaryal Kemoterapötiklerin Etki Mekanizmaları**

Malarya (sıtma), Plazmodyum türü protozoonlar tarafından meydana getirilen, nöbet şeklinde ateş yükselmesi ile kendini gösteren bir enfeksiyon hastalığıdır [11]. Anofel türü sivrisinekler ve kan transfüzyonları ile yayılır. Bu hastalığın tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçlardan kinin, 4-aminokinolin türevleri, 8-aminokinolin türevleri ve akridin türevleri hücre çekirdeğine etki yaparlar ve orada DNA metabolizmasını bozarlar. Bu gruptaki kullanılan diğer ilaçlar Proguanil ve Pirimetamin, Plasmodium türlerinde para amino benzoik asitten (PABA) tetrahidrofolat sentezi ile ilgili biyokimyasal zincirini etkilerler. Dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe ederek dihidrofolik asidin tetrahidrofolik aside dönüşmesini engellerler [12].

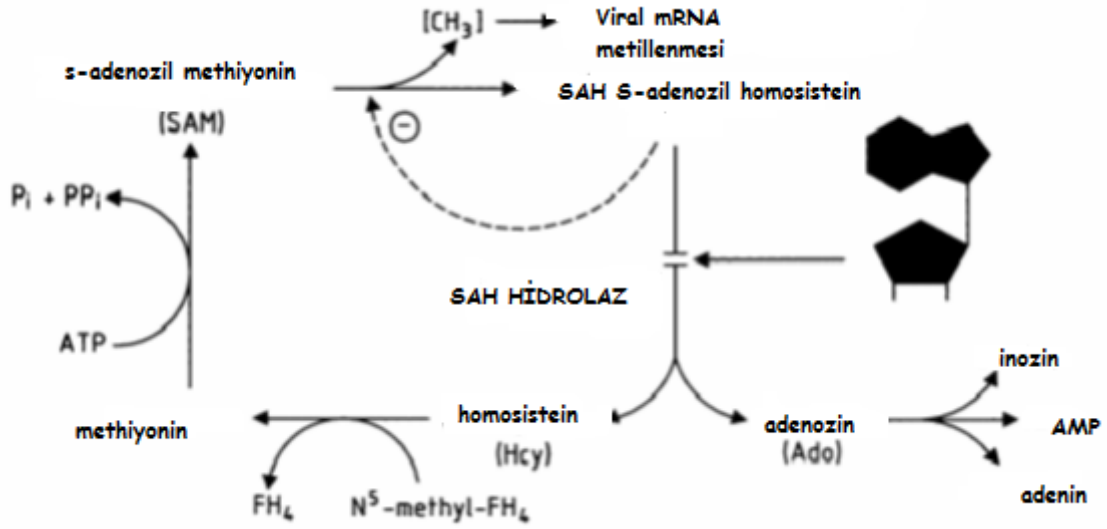
#### **1.1.5. Antihelmintik Kemoterapötiklerin Etki Mekanizmaları**

Helmintiyazis adı verilen hastalığa neden olan organizmalar, insan vücudunda parazit olarak gastrointestinal kanal lümeni, lenfatik sistem, kan damarları ve bazı dokulara yerleşirler. Barsak helmintiyazisinde kullanılan kemoterapötik ilaçlar ya helminti öldürerek (helmintisit) ya da onu felç edip barsak çeperinden ayrılmasını sağlayarak hastalık etkenini yok ederler [13].

#### **1.1.6. Antiviral Kemoterapötiklerin Etki Mekanizmaları**

Antiviral kemoterapötik ilaçlar diğer kemoterapötiklere oranla daha az gelişmiştir. Bunun nedeni, virüslerin büyük ölçüde konakçı hücrelerine bağımlı olmasıdır. Kemoterapötiklerin etki yerine ulaşması için hücre içine girmesi gerekir. Bu nedenle seçiciliği yüksek ilaçlar geliştirmek güçtür. Yani virüsü etkileyen ilaç konakçı hücreye de zarar verir. Ayrıca virüslerle in vitro çalışmalar yapmak zordur. Virüsler üç tip enfeksiyona neden olur. Bunlar litik tip enfeksiyon, persistent tip enfeksiyon ve latent tip enfeksiyondur. Antiviral ilaçlar latent virüslere etki edemezler [14]. Antiviral ilaçların etki mekanizmalarından birkaçı aşağıda özetlenmiştir:

**S-Adenozil Homosistein (SAH) Hidrolaz İnhibitörleri:** SAH, S-adenozil homosisteinden başlayan ve metil transferazlarla katalize edilen metilleme reaksiyonlarının inhibitörüdür. Bu metilleme reaksiyonları virüs yaşamı için gereklidir. Viral SAH hidrolaz enziminin inhibe edilmesiyle hücre içinde SAH konsantrasyonunun artması sonucunda metilleme reaksiyonları ve buna bağlı olarak viral RNA inhibisyonu gerçekleşir. Bu mekanizma Şekil1.1'de gösterilmektedir [15].



**Şekil1.1.:** S-Adenozil homosistein (SAH) hidrolaz inhibitörleri mekanizması

**Orotidilik Asit (OMP) Dekarboksilaz İnhibitörleri:** Orotidilik asit dekarboksilaz, pirimidin bazlarının biyosentezinde orotidilik asidin üridilik aside dönüşümünü katalize eder. Bu grup kemoterapotikler RNA ve bazı DNA virüslerine karşı antiviral etki gösterirler [16].

**Guanozin türevleri:** Guanozin türevlerinin ilk örneği olan Asiklovir, seçici anti-herpes etkisi ve düşük toksisitesi ile önemli bir yere sahip olmuştur. Bileşiğin seçiciliği, ilk basamakta viral timidin kinazlar (HSV-1 TK) tarafından fosforillenmesine dayanmaktadır. Daha sonra hücresel kinazlar tarafından sırasıyla di- ve trifosfat türevlerine dönüştürülen Asiklovir, viral DNA polimerazlarla etkileşerek DNA zincir sonlandırıcısı olarak rol oynar. Asiklovir, HSV-1, *Herpes labialis*, *H.genitalis* virüslerine karşı etkilidir [15].



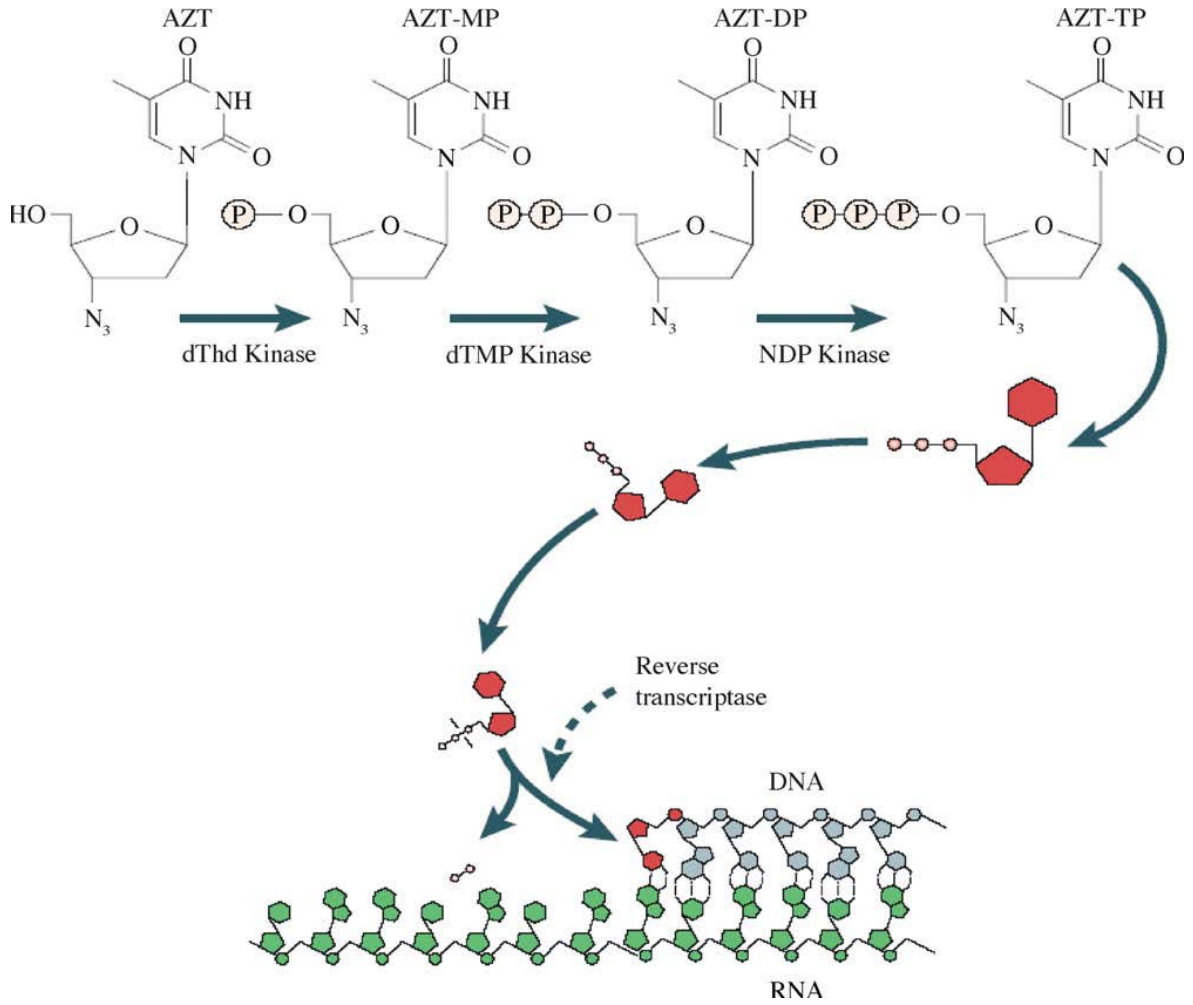
**Timidin Türevleri:** Bu gruptaki bileşikler, viral timidin kinazlarla 5'-monofosfat türevlerine dönüştükten sonra DNA sentezini engellerler. HSV-1 ve HSV-2'ye karşı oldukça etkilidir [15, 16].

**Asiklik Nükleozid Fosfonatlar:** Fosfonoasetik asit (PAA) ve fosfonoformik asit'in (PFA) HSV gelişimini durdurmaktadır. Bu iki ajan, viral DNA polimerazlar üzerine etkili olup, özellikle HSV replikasyonunu seçici olarak durdururlar [16].

**Dideoksinükleozit Türevleri:** Bu grupta bulunan kemoterapötik ilaçlar, nükleozit ters transkriptaz inhibitörleri olarak da bilinir. Söz konusu ilaçlar, hücre içinde sırasıyla Timidin kinaz, Timidilat kinaz ve Nükleozit difosfat (NDP) kinaz tarafından gerçekleştirilen ardışık üç fosforilleme sonucunda etkin olan trifosfat şekline dönüşürler [16]. Bu trifosfat yapısı, HIV virüsünün replikasyon döngüsünde viral RNA'dan hareketle proviral DNA sentezini gerçekleştiren ters transkriptaz enziminin substrat bağlama bölgesine bağlanıp onu yarışmalı olarak inhibe etmek suretiyle bir zincir sonlandırıcısı olarak etki eder [15,16,17] .

#### **Nükleozit Analoğu Olmayan Ters Transkriptaz İnhibitörleri (NNRTI)**

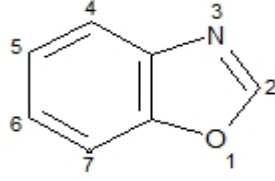
NNRTI nükleozit yapısı taşımazlar. Kimyasal yapı olarak birbirlerinden oldukça farklı yapıdaki bileşiklerin HIV-1 replikasyonunu seçici olarak inhibe edebilirler [16]. Bu türevler, RT enziminde substrat bağlanma bölgesi yerine allosterik bağlanma bölgesine yarışmasız olarak bağlanıp enzimin konformasyonunu bozarak etki gösterirler. Şekil 1. 2' de nükleozit olmayan ters transkriptaz inhibitörleri mekanizması gösterilmiştir [15,16,17].



**Şekil 1.2** Nükleozit Olmayan Ters Transkriptaz İnhibitörleri Mekanizması

### 1.2. Benzoksazol Türevi Bileşikler

Benzoksazol türevi bileşikler moleküler formülü  $C_7H_5NO$  olan aromatik organik bileşiklerdir. Benzen ve oksazol halka yapısının birleşmesiyle oluşur. Benzoksazol halkasının kimyasal yapısı Şekil 1. 3' de gösterilmiştir. Yapılan araştırmalar benzoksazol türevleri ve analoglarının kemoterapötik aktiviteleri yönünden kayda değer sonuçlar veren bileşikler olduğunu göstermektedir [18]. Daha önceden yapılan çalışmalar benzoksazol türevi bileşiklerin antifungal, antibakteriyel, antiviral, antitümör ve antitüberküloz aktiviteleri gibi birçok aktiviteye sahip kemoterapötik madde olduğunu göstermektedir [19]. Bunlardan bazıları aşağıda özetlenmiştir:

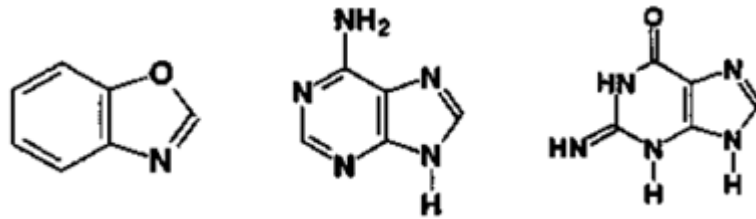


**Şekil 1.3** Benzoksazol Yapısı

### 1.2.1. Antibakteriyel Etkisi

Benzoksazol türevi bileşiklerin antibakteriyel etkisi, insan ve bakteri arasındaki etkilenen biyokimyasal yolların farklı olmasından yola çıkılarak konakçıya hiç zarar vermeyen ya da en az zarar veren kimyasal maddelerin patojene atak yapmasıyla ortadan kaldırılabileceği temeline dayanır [20]. Benzoksazoller antibakteriyel etkilerini birçok şekilde gösterebilirler. Antibakteriyel etkiyi bakteri hücresinin gelişmesini ve üremesini önleyen bakteristatik etki ile bakteri hücresinin yok eden bakterisit etki şeklinde gösterirler. Bunlardan bazıları aşağıda özetlenmiştir [21].

**DNA sentezi veya mRNA sentezine engel olanlar:** Benzoksazol halka sistemi nükleik asitlerin yapısında bulunan heterosiklik yapıda bulunan adenin ve guaninine yapısal olarak benzer. Şekil 1. 4' te benzoksazol, adenin ve guanin azotlu bazlarının moleküler yapısı gösterilmiştir. DNA sentezini inhibe etme etkisi gösteren bu bileşikler DNA ile kompleks oluşturarak deoksiguanozin kalıntısına bağlanırlar. Bu şekilde oluşan DNA ilaç kompleksleri DNA'ya bağımlı RNA polimerazı inhibe eder [ 18, 22 ].



**Şekil 1. 4** Benzoksazol, Adenin ve Guanin Azotlu Bazlarının Yapısı

**Glikozamin-6-P sentaz inhibitörü olanlar:** Glukozamin-6 fosfat sentaz, UDP-N -asetil glukozamin içeren kompleks bir enzimdir. Hem ökaryotik, hem de prokaryotik hücrelerde makromolekül içeren bütün amino şekerlerin biyosentezinde önemli rol oynamaktadır. Bu enzim peptidoglikan yapısını

oluşturmaktadır. Memelilerde UDP-glcNAc, glikoproteinlerin ve mukopolisakkaritlerin biyosentezinde kullanılır. GlcN-6-P sentaz enziminin kısa süreli inhibisyonu bile mikroorganizmalar için öldürücüken memeliler için öldürücü değildir. Bu özelliğinden dolayı 5,7-Dikloro-1,3-benzoksazol-2-tiyol türevi bileşikler GlcN-6-P sentaz inhibitörü olarak kullanılır. Sonuç olarak bu enzimin inhibisyonu kemoterapotik öneme sahip olup antibakteriyel etki gösterebilir [23].

**Bakteriyel Hyaluran liyaz inhibitörü olanlar:** Bakteriyel hyaluran liyaz ekstrasellular matriksin önemli bir ögesi olan hyaluranı parçalar. Doku inşası için hyaluran önemli rol oynar. HA fertilizasyon, embriyonik gelişme hücre göçü ve farklılaşması, yaraların iyileşmesi, yangı olayları ve tümör hücrelerinin metastazı ve büyümesinde önemli role sahiptir. Hyaluran, ökaryotlarda hyaluranglikoaminidaz, prokaryotlarda ise prokaryotik hyaluran liyaz enzimi tarafından parçalanır. HA degradasyonu sonucu oluşan disakkaritleri bakteriler karbon kaynağı olarak kullanmaktadır. Bu durum patojenlerin yayılmasını ve dokularla ilişkilendirilmesini kolaylaştırmaktadır. Bu enzimin inhibitörleri antibakteriyel tedavi için güçlü adaylardır. Benzoksazol-2-tiyon *Streptococcus agalactiae* suşunun hyaluran inhibisyonu için türetilmiştir [ 24 ].

### 1.2.2. Antiviral Etkisi

1948 yılında Cutting ve ark., [ 19 ] tarafından yapılan çalışmada nonsüstitüe benzoksazol yapısının düşük, fakat uzun süreli antiviral aktivite gösterdiği saptanmıştır. Akbay ve ark., [25] yaptığı çalışmada ise 2,5,6-trisubstitue benzoksazol, benzotiyazol, benzimidazol ve oksazol (4,5-b) piridin türevlerinin HIV-1 Revers transkriptaz inhibitor aktivitesine sahip olduğunu gözlemlenmiştir.

### 1.2.3 Antihelmintik Etki

Satyendra ve ark., [26] tarafından yapılan çalışmada 5,7-dikloro-2-hidrazinil-1,3-benzoksazolden sentezlenen 6,8-dikloro [1,2,4]triazol [3,4-b] [1,3]benzoksazol - 3(2H)-tiyonin ve onun türevlerinin bir antihelmintik etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bu bileşikler parazitlerin barsak hücrelerindeki emilim mekanizmasını engelleyerek etki gösterir.

### 1.2.4. Antineoplastik Etkisi

Proteinkinaz büyüme hormonları ile aktive olan intraselluler bir sinyal transdüksiyon proteindir. Hücre büyümesi ve farklılaşması, hücre döngüsü, transkripsiyon, translasyon ve hücre metabolizması gibi çeşitli hücresel işlevleri

düzenleyen protein kinaz, çeşitli kanser tiplerinde sıklıkla aktive olmaktadır. Geçmiş yıllarda, kanser gelişiminden sorumlu moleküler mekanizmalar üstüne ayrıntılı şekilde çalışılmış ve protein kinazın sinyali tümörün büyümesi, devamlılığı ve katkıda buldukları detaylı olarak belgelenmiştir. Berta ve ark., [27] tarafından yapılan çalışmada 2-(3-fenil-1H-pirizol-4-yl)-1,3-benzoksazolün protein kinaz inhibitörü olduğu görülmüştür. Protein kinaz inhibitörü olan bileşiklerin antitümör etkisi vardır.

**DNA topoizomeraz inhibitörü olanlar:** DNA' da süper kıvrımlaşma, DNA metabolizmasının pek çok yönünü etkileyen bir işlemdir. Her bir hücre, özgün işlevi DNA' yı kısmen açmak ya da gevşetmek olan enzimlere sahiptir. DNA kısmi açılım uzantısını arttıran ya da azaltan enzimlere **topoizomerazlar** denir [28]. Bunlar DNA' nın bağlantı sayısını değiştirir. Bu enzimler özellikle replikasyon ve DNA paketlenmesi gibi önemli işlemlerde önemli rol oynar. İki izomeraz sınıfı vardır. Tip I izomerazlar, iki sarmaldan birini kısa süreli olarak kırıp, kırık olmayan uçlardan birini döndürmek ve kırık olan uçları yeniden birleştirmek şeklinde etki gösterirler. Tip II izomerazlar her iki sarmalı da kırar. Bu işlemi gerçekleştirirken ATP' ye gereksinim duyar. Topoizomeraz aktivitesi replikasyon, transkripsiyon ve kromozom yoğunlaşması gibi hücrel işlemlerde önemli olduğundan dolayı antikanser ilaçların gelişmesinde yaygın olarak kullanılır. Topo II enzimi insanlarda kanser tedavisinde kullanılan ilaçların belirlenmesinde önemli bir parametredir [29]. Yapılan araştırmalarda heterosiklik halka taşıyan benzoksazol türevlerinin ökaryotik DNA topoizomeraz inhibitörü olduğu belirtilmiştir [30].

### 1.3. Kısa Zamanlı Test Sistemleri

Her geçen gün artarak devam eden teknolojik gelişmeler, birçok avantajın yanı sıra birçok sorunu da beraberinde getirmektedir. Başta kanser vakaları olmak üzere astım, alerji gibi birçok hastalığın sıklığındaki artış; ilaçlar, kozmetik ürünleri, gıda katkı maddeleri ve sanayide kullanılan kimyasal maddelerin güvenli kullanımı için toksik etki potansiyelleri yönünden incelenmelerini gerekli kılmaktadır [31].

Kimyasal maddelerin kısa, orta ve uzun dönemde toksisitelerini değerlendirmede akut, subakut, subkronik ve kronik toksisite testleri dışında teratojenite, karsinojenite ve mutajenite testleri gibi test sistemleri de kullanılmaktadır. Toksik etki risklerinin değerlendirilmesinde en iyi yöntem deney hayvanları ile yapılan

testler olmasına karşın sonuçlanmaları uzun sürmekte, uygulanmaları zor ve pahalı olmaktadır [ 32 ].

Maruz kalınan kimyasalların gerek nitelik gerekse nicelik olarak fazla olması, çok sayıda deney hayvanı kullanımının gerekliliği, deney hayvanının toksik dozlarda acı çekmesinin azaltılması, çoğu zaman hızlı değerlendirme ve otomasyon yapılma gereği, alternatif kısa süreli *in vitro* testleri ön plana çıkarmıştır. Bununla birlikte *in vitro* testlerin ancak *in vivo* testler için bir ön tarama testi olarak kabul edilmesi gerektiği şeklindeki tartışmalar da sürmektedir [33].

Genelde kabul edilen bir görüşe göre, direkt veya biyotransformasyon sonrası karsinojenik etki gösteren tüm maddeler %100 oranında mutajenik etki gösterebilirken, mutajenik etki gösteren bileşiklerin %77-98 oranında karsinojenik etki gösterdiği bilinmektedir [34]. Mutajenite ile karsinojenite arasında bulunan bu paralel durumun başlıca sebebi, mutasyonların genetik materyalin doğrudan etkilenmesiyle ortaya çıkabilmeleri, ancak kanserin çok basamaklı karmaşık biyolojik olaylardan oluşmasıdır. Ancak genetik kodun evrensel olması, karsinojenite ile mutajenite arasında yüksek bir ilişkinin bulunması kimyasalların taranmasında kısa zamanlı mutajenite test sistemlerinin yaygın kullanımına neden olmuştur [31].

Mutajenik etki potansiyelini saptamak için bakteriden memeliye kadar pek çok organizmanın kullanıldığı, 200'den fazla kısa zamanlı test sistemi geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

### **1.3.1. Mikroçekirdek Testi**

Mikroçekirdek (MÇ), kromozom fragmentleri veya tüm kromozomun hücre bölünmesi sırasında yavru çekirdek olarak ana çekirdek dışında kalmasıdır. MÇ tespiti için sitokinezi küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan sitokalsin-B ile durdurulmuş mikroçekirdek testi tercih edilir. Sayım, bir kez bölünmüş hücrelerle sınırlıdır [35]. Bu test teorik olarak bölünebilme özelliğine sahip her hücre tipinde uygulanabilir. MÇ'ler genellikle hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki eksiklerden, mitotik iğdeki hatalardan, kinetokordan veya mitotik aygıtın diğer parçalarından ve kromozomal hasarlardan kaynaklanan, hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır. MÇ sayısındaki artış, somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın göstergesidir [36, 37].

Mikronükleus testinde kromozom kırığı, kromozom kaybı, disentrik kromozom, gen amplifikasyonu, nekrozis, apoptozis, non-disjunction, sentrozom anormalileri tespit edilen hasar tipleridir [37].

### **1.3.2. Komet Testi**

Komet testi, çeşitli ajanların yol açtığı DNA tek ve çift zincir kırıklarının tespiti için kullanılan hassas, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Tek hücre jel elektroforez tekniği olarak da adlandırılmaktadır. DNA kırıklarının tayini prensibine dayanan bu yöntem, pek çok fiziksel ve kimyasal mutajenin özellikle insanlarda yol açtığı DNA hasarının tayininde, DNA hasarının derecesini ve tamirini tespit etmede kullanılan bir biyoizlem testidir. Komet testi tüm ökaryotik hücrelere uygulanabilmesi, düşük hasar seviyesini ölçebilmesi, az sayıda hücre örneği gerektirdiği için hızlı, basit ve ucuz bir yöntem olmasından dolayı geniş bir kullanım alanına sahiptir [38].

Bu yöntem, hücrelerin DNA'larını tek tek inceler. Genel olarak, izole edilen çekirdek içindeki DNA, ince bir agaroz jel içine fikse edilip elektroforetik ortamda yürütülür. Eğer çeşitli genotoksik ajanlarla hasara uğrayan DNA'lar tamir mekanizmaları ile tamir edilememiş, tek veya çift DNA zincirlerinde kırılmalar oluşmuş ise kırılan farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip kırılmış DNA molekülleri elektroforetik ortamda farklı hızlarda göç ederler. DNA molekülleri etidyum bromür gibi DNA spesifik boyalarla boyanıp floresan mikroskop altında incelendiğinde hasarın derecesine göre DNA'lar dairesel formdan kuyruklu yıldız benzer forma kadar görüntüler oluşturduklarından dolayı yönteme "Comet Assay" adı verilmiştir [39, 40].

### **1.3.3. Kardeş Kromatid Değişim Yöntemi**

Kardeş kromatit testi, kardeş kromatitlerin homolog lokusları arasında DNA replikasyon ürünlerinin simetrik değişimini gösteren bir testtir. Bu yöntemin temel prensibi, kardeş kromatitlerin birbirine kontrast sağlayacak şekilde boyanmasına dayanır [41]. Kardeş kromatitlerde meydana gelen bu parça değişimi, boyanma farklılığından hemen anlaşılır. Bu test, çeşitli ajanların mutajenik ve karsinojenik etkilerinin, özellikle kromozomlarda oluşan yapısal değişimlerin araştırılmasını sağlar. KKD yöntemi ile çok düşük konsantrasyonlarda zayıf mutajenik etki gösteren kimyasalların etkileri kromozom düzeyinde incelenebilmektedir [42].

#### 1.3.4. umu (SOS) Test Sistemi

Uluslararası Kalite Değerlendirme Sistemi (International Organization for Standardization İSO) tarafından kolorimetrik bakteriyel testi olarak kabul edilen umu-testi, DNA hasarları ile indüklenen SOS onarım sistemi esas alınarak geliştirilmiştir. *S. typhimurium* TA 1535/pSK1002 suşları genotoksik etkili bir kimyasala maruz kaldığında oluşan genotoksik hasar bakteri SOS cevabının bir parçası olan *umuC-lacZ* genini indükler. *lacZ* β galaktozidazı kodlar. β galaktozidaz, β galaktosit yapısındaki renksiz ONPG substratını parçalayarak sarı renkli o-nitrofenole dönüştürür. Test *lacZ* indüksiyonunun kolorimetrik ölçümüne dayanır [43].

#### 1.3.5. rec Yöntemi

Bu yöntem DNA rekombinasyon sistemi hasarlı bir suş ile hasarsız bir suş arasındaki hayatta kalma oranlarındaki nispi farklılığa dayanmaktadır. DNA'da hasar olduğunda her iki suşta da kesip çıkarma onarım sistemi indüklenir. Hasar miktarı arttığında replikasyon sonrası onarım sistemleri *rec*<sup>+</sup> suşunda indüklenirken *rec*<sup>-</sup> suşunda *rec* E proteini eksikliği nedeniyle indüklenmez. Bu durumda *rec*<sup>+</sup> suşu hayatta kalabilirken *rec*<sup>-</sup> suşu ölür. Böylece kimyasallarla muamele edilen suşların üreme oranları karşılaştırıldığında kimyasalların DNA'yı hasara uğratma potansiyelleri gözlenebilir. Yöntem interkalasyon, DNA kırıkları, DNA bazlarındaki kimyasal değişimler, çapraz bağlanmalar ile geniş spektrumdaki DNA hasarlarını belirleyebilir [44].

#### 1.3.6. AMES-II Test Sistemi

Gee ve arkadaşları [45] tarafından geliştirilen bu test sistemine mikroplak formatında mutajenite test sistemi de denir. Bu test sisteminde *S. typhimurium* TA98, TA1537, TA7001, TA7002, TA7003, TA7004, TA7005, TA7006 mutant suşları kullanılmaktadır. Bu suşlardan;

TA7001 AT → GC

TA7002 TA → AT

TA7003 TA → GC

TA7004 GC → AT

TA7005 CG → AT



baz çiftlerindeki değişimleri saptamaktadır. TA7001-7006 suşları sisteme tek tek uygulandığında kendiliğinden geri dönüş frekansı çok düşük olduğu için AMES-II test sisteminde bu suşların tümünün karışımı olan TAMIX uygulanır [45]. Bu yöntemde kimyasal maddelerin mutajenik etkileri çok kuyucuklu plaklarda, sıvı fazda kolorimetrik okuyucu kullanılarak test edilir. Ames-II test sisteminin birçok avantajı vardır [46]. Bunların başında: maliyetinin düşük olması, daha kısa sürede sonuç alınması, daha az test kimyasalı kullanılması, daha az reaksiyon bileşeni gerektirmesi, birden fazla dozu aynı zamanda inceleme olanağı sunması, Ames testi ile yüksek oranda uyum göstermesi gelmektedir [47].

### 1.3.7. Yes Testi

Test için kullanılan organizma *Saccharomyces cerevisiae* olup, insan östrojen (hER $\alpha$ ) reseptörleri ile etkileşebilen bileşikleri tanımlamak için genetik olarak modifiye edilmiştir. hER $\alpha$  DNA dizileri maya hücresi ana kromozomuna sabit bir şekilde entegre edilmiştir. Maya hücreleri aynı zamanda  $\beta$  galaktosidaz enzimini kodlayan haberci *lacZ* gen plazmidi ile östrojene duyarlı elementleri de içermektedir. Bu ligand bağlandığında hER $\alpha$ , plazmid DNA ekspresyonundaki uygun cevabı veren elementlerle etkileşir ve haberci gen *lacZ*'nin transkripsiyonunu aktive eder. Ortama  $\beta$  galaktozidaz salınır.  $\beta$  galaktozidaz, sarı renkli klorofenol kırmızı- $\beta$ -D-galaktopiranozid substratını kırmızı-mor renkli 570 nm'de ölçülebilen ürüne dönüştürür. Ölçülen OD<sub>570</sub> ortama salınan  $\beta$ -galaktozidaz miktarı ve dolayısıyla da ilgili reseptöre bağlanan test maddesinin aktivitesi ile doğrudan korelasyon gösterir. YES yöntemi ile test maddesinin hem agonist hem de antogonist etkileri saptanabilmektedir [48].

### 1.3.8. Ames Testi

Salmonella / mikrozom test sistemi olarak da adlandırılan ve Bruce Ames tarafından geliştirilmiş olan Ames testi mutajen-karsinojen etkisi bilinen kimyasallar ile geçerliliği açıkça kabul edilmiş, Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Organizasyonu (Organisation for Economic Co-Operation and Development, OECD) tarafından standardize edilmiş bir testtir.

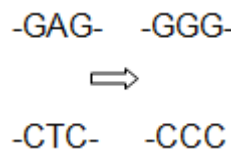
Bu test sisteminde, *S. typhimurium* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlar ile elde edilmiş bir seri *S. typhimurium* mutant suş kullanılmaktadır. Bunlar *S. typhimurium* TA1535, TA1537, TA1538, TA98, TA100, TA102, TA104 suşlarıdır

[49]. Salmonella suşları histidin operonundaki çeşitli genlerde farklı mutasyonlara sahiptir. Farklı mekanizmalar ile etki gösteren mutajenlere cevap oluşturmak için dizayn edilmiştir [50]. Ames testi yapay olarak mutasyona uğratarak histidin (his) sentezleme yeteneğini kaybetmiş (*his<sup>-</sup>*, oksotrofik, his gerektiren) *S. typhimurium* suşlarının test edilen kimyasal madde ile maruziyetinden sonra ikinci mutasyon geçirip, yabani tip (*his<sup>-</sup>*, prototrofik, his üreten) hale dönüşmeleri temeline dayanır. Prototrofik suşlar his aminoasidi sentezleme yeteneğine sahipken, mutant (oksotrofik) suşlar *his* operonundaki yapay olarak oluşturulan nokta mutasyonundan dolayı his aminoasidini sentezleme yeteneklerini kaybederler ve bu yüzden de ortamda hazır amino asidi bulunmadığı durumlarda çoğalamazlar [51]. Mutajenik bir olay söz konusu olduğunda *his* geninde baz çifti veya çerçeve kayması mutasyonu olur ve *his<sup>-</sup>* suşları ikinci bir mutasyon geçirip *his<sup>+</sup>* suşları haline dönüşür. Ames testinde bir kimyasalın mutajenik etki potansiyeli kimyasalın çeşitli konsantrasyonlarına maruz bırakılan *his<sup>-</sup>* suşlarının davranışının değerlendirilmesi ile ölçülebilir [52].

### Histidin mutasyonu

*S. typhimurium his<sup>-</sup>* mutantların DNA baz dizilimi analizi yapılarak mutasyonların yerleri ve karakterleri saptanmıştır. Her test suşu, histidin operonunun değişik bölgelerinde çeşitli mutasyonlar içermektedir [53]. Şekil1.5' te histidin operonu gösterilmiştir. Bunlar bir pirimidinin bir pirimidinle yer değiştirmesi veya bir pürinin bir pürinle yer değiştirmesi sonucu oluşan transisyon, bir pürin ile pirimidinin karşılıklı yer değiştirmesi sonucu oluşan transversiyon mutasyonlarıdır. Diğer bir tip değişiklik ise gen içinde herhangi bir noktaya bir ya da daha fazla bazın girmesi sonucu insersiyon bir ya da daha fazla bazın çıkması sonucu oluşan delesyondur. Bu mutasyonlar üçlü okuma çerçevesi değiştiği için çerçeve kayması mutasyonu olarak adlandırılır [54].

*S. typhimurium* TA 100 ve *S. typhimurium* TA1535 suşlarında bulunan *his* G46 mutasyonu, histidin biyosentezindeki ilk enzim olan pirofosforilazı kodlayan PRATP *his* G geni üzerindedir [55].



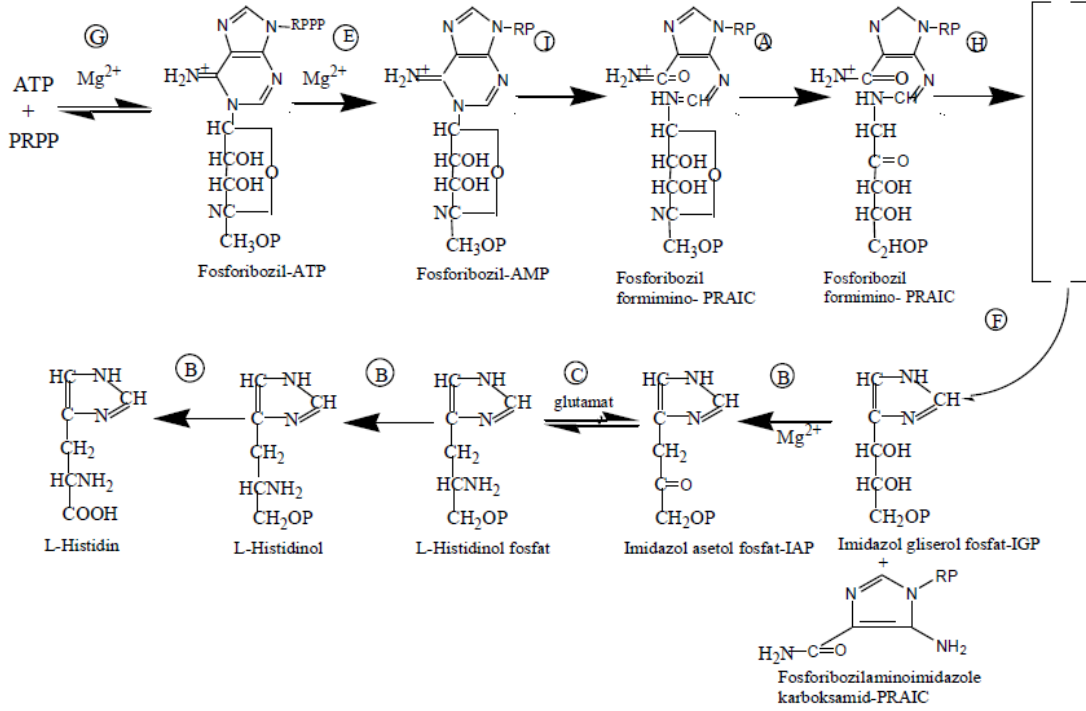
Bu mutasyon lösin aminoasidinin kodonu yerine prolin aminoasidinin kodonunun gelmesine neden olur. Bir genin protein kodlayan kısımdaki bir tripletteki bir nükleotitin değişmesi protein ürününde farklı bir aminoasidi kodlayan yeni bir tripletin oluşumuna yol açabilir. Bu mutasyon yanlış anlamlı mutasyon olarak bilinir. *S. typhimurium* TA 100 ve *S. typhimurium* TA 1535 suşu baz çifti değişimi sonucu atasal forma geri döner [54] .

*S. typhimurium* TA 1538 ve *S. typhimurium* TA 98 *hisD3052* mutasyonu, histidin biyosentezindeki histidinölü histidine çeviren son enzim histidinol dehidrogenazı kodlayan *hisD* geni üzerindedir. Histidin biyosentez metabolik yolu Şekil.1.6' da gösterilmiştir. Bu mutasyon tek bir nükleotitin eksikliği sonucu oluşan çerçeve kayması mutasyonudur. DNA'da çerçeve kaymasına neden olan bu mutasyonlar ya DNA'nın tekrarlanan dizileri ya da sıcak noktalar denilen bölgelerinde görülen kodon kaymalarını geri dönüştürerek bu kodonların yeniden doğru okunmalarını sağlarlar [53]. *S. typhimurium* TA1538 ve *S. typhimurium* TA98 suşları, çerçeve kayması tipi mutasyonlara neden olan 2- nitrofloren ve amino türevleri, çeşitli aromatik nitroz türevleri gibi farklı mutajenler tarafından indüklenmesi ile tekrar his<sup>+</sup> hale geri dönüştürülmektedir [55, 56].

L	hisG	hisD	hisC	hisB	hisH	hisA	hisF	his I
---	------	------	------	------	------	------	------	-------

Phosphoribosylpyrophosphate  $\xrightarrow{G} \xrightarrow{E} \xrightarrow{I} \xrightarrow{A} \xrightarrow{H} \xrightarrow{F} \xrightarrow{B} \xrightarrow{C} \xrightarrow{B} \xrightarrow{B}$   
+ ATP

Şekil.:1.5 Histidin Operonu



Şekil.1.6 Histidin Biyosentez Metabolik Yolu

*S.typhimurium* TA1535 ve TA1538 suşları TA100 ve TA98 suşlarıyla yapılan deneylerin sonuçlarını desteklemek için kullanılır. *S. typhimurium* TA 1535 ve TA 1538 suşları TA 98 ve TA 100 suşlarının yerini tutan izogenik suşlardır [55]. PKM101 plazmidi kimyasal ve UV mutasyonu sonucu oluşan hata meyilli rekombinasyonel onarıma sokarak duyarlılığı artırır. *S.typhimurium* TA 1535 ve TA 1538 suşları oldukça az kendiliğinden mutasyon sıklığına sahip olduğundan dolayı araştırmacılar arasında pek tercih edilmemektedir [55].

Bir diğer grubu oluşturan *S. typhimurium* TA1537 ve TA97 suşlarında ise; histidin biyosentezinden sorumlu gen bölgelerinden *hisC* ve *hisD* gen bölgelerinde, insersiyon tipinde gen mutasyonları meydana gelmiştir [55]. Bu suşlardan *S.typhimurium* TA1537, *hisC3076* olarak tanımlanan bir mutasyon taşımaktadır.

Bu mutasyon *his C* geni içinde bulunan -CCCCC-/-GGGGG- nükleotit dizisine sahip DNA bölgesinde +1 baz insersiyonu ile meydana gelmiş ve bu olay çerçeve kayması ile sonuçlanmıştır. *S. typhimurium* TA97 suşunda ise bu olay, *his D* geni içinde bulunan -CCCCC-/-GGGGG- nükleotid dizisine sahip DNA bölgesinde +4 baz insersiyonu ile meydana gelmiş ve öncesine benzer şekilde, yine çerçeve kayması ile sonuçlanmıştır. Buna bağlı olarak, *S.typhimurium* TA1537 ve TA97 bakteri suşlarının kullanıldığı deneylerde; insersiyonlar ve çerçeve kaymaları ile ilişkilendirilebilen kimyasal maddelerin mutajenik potansiyelleri araştırılabilmektedir [50].

Bunlardan farklı olan *S. typhimurium* TA102 ve TA104 suşları, *his G428* olarak adlandırılan bir ochre mutasyonu taşımaları ile diğer mutant suşlardan ayrılmaktadır. *hisG* gen bölgesinde meydana gelip, glutamin amino asidini sentezleyen -GTT/CAA- kodonunu stop kodonu olan -ATT/TAA- kodonuna dönüştüren baz çifti değişimi (transisyon/transversiyon) ile oluşan bu mutasyonun, oksidatif mutajenler tarafından geriye döndürülebilmesi karakteristiktir. Bu mutasyon aynı zamanda oksidatif mutajenler, X ışınları, U.V. ışığı, hidrojen peroksit, streptonigrin ve çeşitli aldehitler tarafından da geri döndürülebilir [49, 50].

*S. typhimurium'* un bu mutant suşlarına ek olarak, farklı genetik özellikler taşıyan yeni suşlar da kullanılmaktadır. *S.typhimurium* YG1041 ve YG1042 suşları sırasıyla *S.typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarından köken almaktadırlar. Her iki suş da taşıdıkları nitroredüktaz ve Oasetiltransferaz enzim aktiviteleri sebebiyle nitroaren ve aminoarenlere karşı oldukça hassas suşlardır [56].

### **rfa Mutasyonu**

Bu mutasyon bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit tabakasını kodlayan *gal 503* geninde meydana gelir. Oluşan bu mutasyon epimeraz aktivitesini azaltıp, UDP galaktoz ve UDP glikoz dönüşümünde etkilidir. Bu dönüşüm hücre duvarının sentezi için gereklidir. Böylece hücre duvarının geçirgenliğinin artmasına ve büyük moleküllerin geçişine neden olur. Böylece kimyasalların toksik etkisi ve mutajenitesi artmış olur [50].

### **uvrB Mutasyonu**

DNA onarım sisteminde kesip çıkarma görevini üstlenen enzimi kodlayan *uvrB* genindeki delesyon sonucu oluşur. *uvrB* delesyonu, kesip çıkarma mekanizmasını saf dışı bıraktığı için hata oranı yüksek onarım mekanizması (SOS) tarafından

daha fazla DNA lezyonunun onarılması mümkün olur. Böylece uvrB mutasyonu, birçok mutajenin ortaya çıkarılmasında duyarlılığın artmasına neden olur. Bu delesyon biyotin sentezinde rol oynayan genleri de kapsar. Bu nedenle, bakteriler üreyebilmek için histidin yanında biyotine de gereksinim duyarlar [57].

### R Faktörü

*S. typhimurium* TA 98 suşu TA1538'e TA 100 suşu ise TA1535 suşuna ampisiline dirençlilik genini taşıyan pKM 101 plazmidinin eklenmesiyle elde edilmiştir. Bu plazmid hataya meyilli DNA onarımını arttırarak mutajene karşı hassasiyeti arttırır [49, 50].

### pAQ1 Plazmid

Tetrasiklin dirençlilik geni taşır ve *S. typhimurium* TA102 suşunda bulunur. *S. typhimurium* TA1535 ve TA100 suşları ile saptanamayan ve baz çifti değişimine neden olan mutajenleri tespit edebilmek amacı ile geliştirilmiştir [49, 50].

**Çizelge 2. 2.** Salmonella Mutant Suşlarının Genetik Özellikleri

Suş	Histidin Mutasyonu	LPS	Onarım	Mutasyon Niteliği	Belirlenecek Bileşik Sınıfları
TA1535	hisG46	rfa	$\Delta$ uvrB	AT-->GC transisyon	Baz çifti yer değişimine neden olan mutajenler
TA1537	hisC3076	rfa	$\Delta$ uvrB	C...C yanına +1	Çerçeve kaymasına neden olan kimyasallar
TA1538	hisD3052	rfa	$\Delta$ uvrB	CG...CG yanından +1	Çerçeve kaymasına neden olan kimyasallar
TA98	hisD3052	rfa	$\Delta$ uvrB	CG yanından -1	Çerçeve kaymasına neden olan kimyasallar
TA100	hisG46	rfa	$\Delta$ uvrB	AT-->GC transisyon	Baz çifti yer değişimine neden olan mutajenler
TA97	hisD6610	rfa	$\Delta$ uvrB	CCC yanından + 4	Çerçeve kaymasına neden olan kimyasallar
TA102	PAQ1 hisG428	rfa	-	G ochreAT	Oksidantlar, X ışınları, UV, Mitomisin c, Bleomisin, HO ve kinonlar

## 2. MATERYAL ve YÖNTEM

### 2.1. Kullanılan Test Suşları

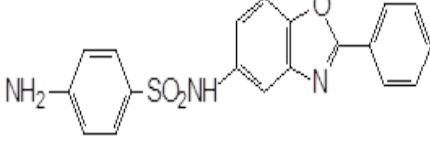
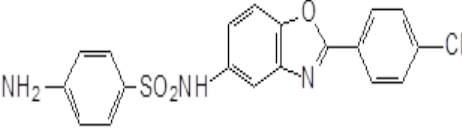
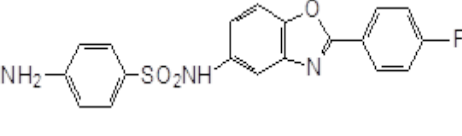
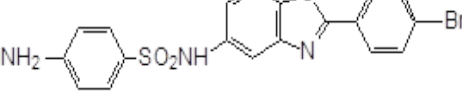
Ames test sisteminde kullanılan *S. typhimurium* TA100 ve TA98 suşları Dr. Bruce N. Ames'den (Biochemistry Department, University of California, Berkeley, CA, U.S.A.) sağlanmıştır.

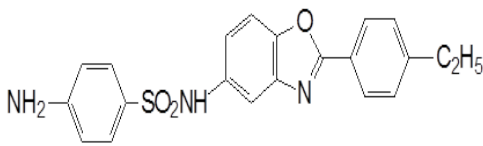
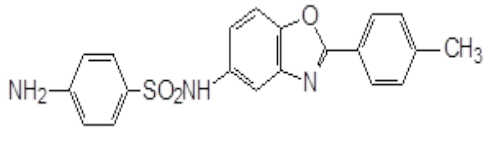
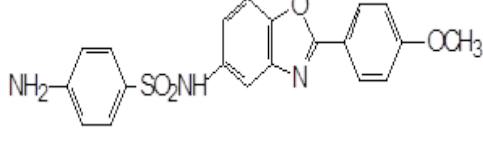
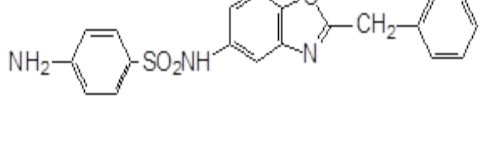
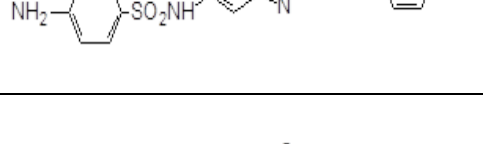
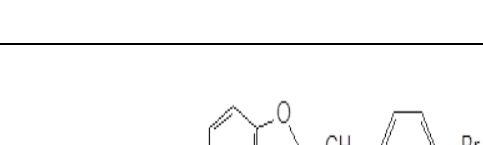
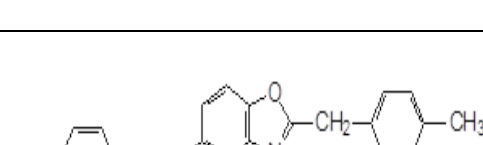
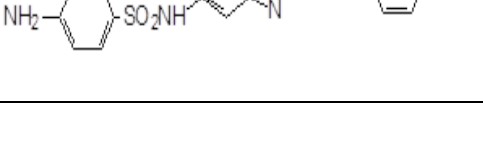
### 2.2. Kimyasal Maddeler

#### 2.2.1. Test Edilen Kimyasal Bileşikler

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasotik Kimya Ana Bilim Dalı tarafından sentezlenen 2 ve 5 konumdan süstitüe edilmiş benzoksazol türevi bileşiklerin formülleri Çizelge 2. 1' de verilmiştir.

**Tablo 2.1.** Çalışmada Kullanılan Benzoksazol Türevi Kimyasal Bileşikler

BİLEŞİK KODU	KAPALI FORMÜLÜ	BİLEŞİĞİN ADI	M.A
TD1		2-Fenil – 5 - (4-aminofenilsülfonamido) benzoksazol	365.41
TD2		2- (4-Klorofenil)-5-(4-aminofenilsülfonamido) benzoksazol	399.85
TD3		2-(4-Florofenil)-5-(4-aminofenilsülfonamido) benzoksazol	383.40
TD4		2-(4-Bromofenil)-5-(4-aminofenilsülfonamido) benzoksazol	444.30

TD5		2-(4-Etilfenil)-5-(4-aminofenilsulfonamido) benzoksazol	393.46
TD6		2-(4-Metilfenil)-5-(4-aminofenilsulfonamido) benzoksazol	379.43
TD7		2-(4-Metoksifenil)-5-(4-aminofenilsulfonamido) benzoksazol	395.43
TD10		2-Benzil-5-(4-aminofenilsulfonamido) benzoksazol	379.43
TD11		2-(4-Klorobenzil)-5-(4-aminofenilsulfonamido) benzoksazol	413.88
TD12		2-(4-Florobenzil)-5-(4-aminofenilsulfonamido) benzoksazol	397.42
TD13		2-(4-Bromobenzil)-5-(4-aminofenilsulfonamido) benzoksazol	458.33
TD14		2-(4-Metilbenzil)-5-(4-aminofenilsulfonamido) benzoksazol	393.46



### 2.2.2. Çözücüler

Ames test sistemine uyumlu organik çözücü dimetilsülfoksit (DMSO) kullanılmıştır.

### 2.2.3. Pozitif Mutajenler

Ames test sisteminde metabolik aktivasyon yokluğunda *S. typhimurium* TA100 suşu için sodyum azit (1,5 µg/plak) (Sigma) *S. typhimurium* TA98 suşu için danomisin (6 µg/plak) (Deva Holding A.Ş.) kullanılmıştır

### 2.2.4. Diğer Kimyasal Maddeler

D-biyotin, L-histidin-HCl monohidrat, kristal viyole, sitrik asit monohidrat, D- glukoz, ve sodyum amonyum fosfat Sigma'dan; Oxoid agar, Oxoid broth No: 2 Oxoid' den; ampisilin trihidrat ve DMSO Fluka'dan; magnezyum sülfat Riedel-de Haën' den, potasyum fosfat ve NaCl Merck'ten sağlanmıştır.

### 2.2.5. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Bileşiklerin Hazırlanması

Test edilen kimyasal maddelerin tümü % 100 DMSO içerisinde çözüldü. İlk olarak kimyasal maddelerin sitotoksik dozları belirlendi. Sonrasında toksik olmayan en yüksek doz esas alınarak mutajenik etki denemeleri yapıldı.

### 2.2.6. Çalışmada Kullanılan Besi Ortamları ve İçerikleri

#### Vogel Bonner Tuz Çözeltisi (50 X VB)

Minimal agar ortamının tuzu olarak kullanılır.

#### 1000 ml için

Distile su	650 ml
Magnezyum sülfat (MgSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O)	10 g
Sitrik asit monohidrat (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> .H <sub>2</sub> O)	100 g
Potasyum fosfat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	500 g
Sodyum amonyum fosfat (NaH <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O)	175 g

Malzemelerin tabloda verilen sırayla sıcak olan distile suya eklenip manyetik karıştırıcı kullanılarak iyice çözünmesi sağlanır. Otoklavda 121°C'de 30 dakika steril edilip oda sıcaklığında karanlık ortamda saklanır [ 49, 50 ].

### **Glukoz Çözeltisi ( 20 % w/v )**

Minimal agarlı ve his/bio/ampilisini ortamlarda karbon kaynağı olarak kullanılır.

#### 1000 ml için

Distile su	800 ml
Glukoz	200 g

Erlene belirtilen miktarda glukoz eklenir. Distile su eklenerek son hacime tamamlanır. Karışım berraklaşana kadar manyetik karıştırıcıyla karıştırılır. Etiketlenip tarihlendikten sonra otoklavda 121°C'de 20 dakika steril edilip +4 °C'de saklanır [49, 50].

### **Histidin / Biyotin Çözeltisi ( 0,5 mM )**

Üst agara eser miktarda histidin ve biyotin eklemek için kullanılır.

#### 1000 ml için

Distile su	1000 ml
D-Biyotin	124 mg
L – Histidin-HCl	96 mg

Maddeler ilk önce biyotin daha sonra histidin olmak üzere distile suyun içinde çözülür. Daha sonra karışım otoklav edilip +4°C'de saklanır. Mutajenite deneylerinde 100 ml'lik yumuşak agara 10 ml his/bio çözeltisi eklendi. Çünkü bakteriler stres koşullarında örneğin mutajenik kimyasallar varlığında veya besin eksikliğinde üreyemezler. Bu nedenle ortama konan çok az miktardaki his/bio bakterilerin birkaç bölünme geçirmelerine izin verir [49, 50].

### **Yumuşak Agar**

#### 1000 ml için

Distile su	1000 ml
Agar	6 g
Sodyum klorür	5 g

Karışım 20 dakika 121°C 'de otoklovda steril edilir. Mutajenite ve sitotoksite deneylerinde kullanılır [49, 50].

#### **Ampisilin Çözeltisi ( 0,8 %, w/v )**

Bu çözelti pKM101 plazmidi taşıyan *S.typhimirium* TA98, TA100 suşlarının doğrulanması ve plazmid taşıyan suşların master plakların hazırlanması için kullanılır [50].

##### 100 ml için

NaOH (0.02 N)	100 ml
Ampisilin trihidrat	8 mg

Ampisilin trihidrat 65 °C 'deki sıcak suda çözülür. 0,45 mikrometre filtre kullanılarak steril edilip + 4°C 'de saklanır [49, 50].

#### **Kristal Viyole Çözeltisi ( 0,1% w/v )**

Tüm suşlarda rfa mutasyonunu doğrulamak için kullanılır.

##### 100 ml için

Distile su	100 ml
Kristal viyole	100 mg

Kristal viyole 100 ml su içerisinde iyice çözünür. Karışım +4°C' de ışığa karşı korumak için koyu renkli cam şişede saklanır [49, 50].

#### **Biyotin Çözeltisi ( % 0.01 w/v )**

Master plak ve suş tayini için hazırlanan minimal ortamın zenginleştirmek için kullanılır.

##### 100 ml için

Distile su	100 ml
D-Biyotin	100 mg

Sıcak distile suya biyotin eklenip iyice çözüldükten sonra 0,45 mikrometre filtre kullanılarak steril edilip + 4°C 'de saklanır [49, 50].

### **Histidin Çözeltisi ( % 0.5 w/v )**

Master plak ve suş tayini için hazırlanan minimal ortamın zenginleştirmek için kullanılır.

#### 100 ml için

Distile su	100 ml
L-Histidin	500 ml

Histidin suda çözüldükten sonra elde edilen karışım 15 dakika 121°C 'de otoklav'da steril edilir. + 4°C 'de saklanır [49, 50].

### **Histidin / Biotin / Ampisilinli Katı Ortam**

#### 1000 ml için

Distile su	860 ml
Agar	15 g
50 x VB Tuzları	20 ml
%20 Glukoz	100 ml
Steril Histidin.HCl.H <sub>2</sub> O (%5)	10 ml
Steril 0.5 mM Biotin	6 ml
Steril Ampisilin çözeltisi	3,15 ml

Agar ve su karışımı otoklavlanır. 45 C'ye soğutulup, %20 glukoz, 50xVB tuzları, histidin, biotin, ampisilin bu çözeltiliye eklenir. Bakteriler bu plaklarda +4 C'de 2 ay süreyle saklanabilir. R faktörü taşıyan suşların dirençlilik özelliklerin test edilmesi amacıyla kullanılır [49, 50].

### **Minimal Glukoz Agar Plakları**

#### 1000 ml için

Distile su	880 ml
Agar	15 g
50 x VB Tuz	20 ml
% 20 glukoz	100 ml

Bu ortam, suşların kendiliğinden geri dönen koloni sayılarının saptanması ve mutajenite deneylerinde kullanılır [49, 50].

### **Nutrient Agar Plakları**

Tek koloni ekimi, kristal viyole hassasiyetinin test edilmesi veya bakterinin canlılığının test edilmesi için kullanılır.

#### 100 ml

Distile su	1000 ml
Agar	15 mg
Oxoid Nutrient Broth	15 mg

Agara su eklenip çözülmesi sağlanır. Ardından toz nutrient broth eklenip çözülünceye kadar karıştırılır. 121 °C'de 20 dakika otoklovlanır. Agar 65°C'e soğutulduğunda 25 ml olarak plaklara dağıtılır. +4°C'de saklanır [49, 50].

### **Nutrient Broth**

Gecelik kültürde test suşlarını üretmek için kullanılır.

#### 1000 ml için

Distile su	1000 ml
Oxoid Nutrient Broth	15 mg

Toz halinde bulunan nutrient broth distile suyla iyice çözülünceye kadar karıştırılır. Otoklavda 121°C'de 20 dakika steril edilip oda sıcaklığında karanlık ortamda saklanır [49, 50].

### **2.3. Çalışmada Kullanılacak Test Suşlarının Üretilmesi**

*S.typhimirium* TA 98 ve TA 100 mutant suşları dondurulmuş örneklerinden nutrient agar plağına tek koloni ekimi yapıldı. 37 °C'de gecelik inkübasyonun ardından sağlıklı görünen bir koloni alınarak yeterli histidin, biyotin ile desteklenmiş minimal glukoz agarlı plaklara çizgi ekim yöntemiyle ekildi. Bu işlem her deneyde tekrar edildi. Donmuş stok kültürlerin hazırlanması için kullanılacak saf bir kültürün üretilmesi için en azından iki saflaştırma basamağı gereklidir. Saflaştırma işlemi için uygun olarak desteklenmiş minimal agar plakları kullanılır. Fakat desteklenmiş minimal agar plakları yerine nutrient agar plakları da kullanılır. Bunun tek dez

avantajı kontaminasyon riskinin fazla olmasıdır. Bu yüzden nutrient agar plakları saflaştırma işleminde fazla tercih edilmez. Minimal agar plaklarında yeterli üreme gözlenebilmesi için 37°C'de 48 saat inkübasyon gereklidir.

## **2.4. Çalışmada Kullanılacak Test Suşlarının Genetik İşaretlerinin Kontrolü**

### **2.4.1. Histidin Gereksinimi Kontrolü**

Test suşlarının his karakteri suşların minimal plaklara ekilmeleri yoluyla kontrol edildi. Tüm test suşları *uvrB* delesyonu nedeniyle histidine ek olarak biyotine de gereksinim duymaktadır. Suşlar, histidin biyotin içeren ve sadece biyotin içeren histidinsiz minimal plaklara ekildi. Suşların histidin varlığında üreyip, his yokluğunda ürememeleri his karakterini doğrulamaktadır.

### **2.4.2. pKM101 Plazmit Varlığının Kontrolü**

Histidin, biyotin, ampisilin içeren minimal agarlı plaklara R faktörü test edilecek suşların ekimi yapıldı. Ampisilin aktivitesini kontrol etmek için aynı plakta R faktörü içermeyen suşlar da test edildi [54]. 37 °C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından R faktörü içeren suşlar ampisilinli ortamda ürerken, R faktörü içermeyen suşların aynı plaklarda üremediği gözlemlendi. Böylelikle koloniler, ampisiline dirençlilik açısından test edilmiş oldu.

### **2.4.3. *rfa* Mutasyonu Kontrolü**

Test suşlarının gecelik kültüründen alınan 0,1 ml 'lik örnekler nutrient agarlı plaklara yayıldı. Filtre kağıdından hazırlanmış ve (1 mg/ ml) 10 kristal viyole çözeltisi emdirilmiş diskler, plağın ortasına yerleştirildi. Plaklarda 37 °C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından diskin üzerinde inhibisyon zonu gözlemlendi. Diskin çevresindeki şeffaf bölge, büyük bir molekül olan kristal viyolenin bakteri içerisine girip, onu öldürmesine izin veren *rfa* mutasyonu varlığının göstergesidir [49].

### **2.4.4. *uvrB* Mutasyonu Kontrolü**

Nutrient agar plaklarına steril kürdanla çizgi ekim yöntemiyle ekim yapıldı. Bu plaklardan bir tanesi kontrol plağı olarak kullanıldı, diğeri ise kapağı açılıp 15 watt'lık germisidal UV lambası altında 33 cm uzaklıktan 8 sn süreyle ışınlandı [55]. Kontrol plağı ve UV'ye maruz bırakılan plak 37°C'de bir günlük inkübasyonun ardından *uvrB* delesyonu taşıyan suşların kontrol plağında üreyip, UV ile ışınlanmış plaklarda ise üremediği gözlemlendi.

#### **2.4.5. Kendiliğinden Geri Döner Koloni Sayısının Kontrolü**

Test suşlarının histidinsiz ortamda üremelerine yol açan kendiliğinden geriye dönüş, her mutajenite deneyinde ölçüldü. Bu oksotrofik bakterilerin oluşturduğu düzenli dağılım gösteren her test suşu kendine özgü bir frekansla kendiliğinden geriye döner [52]. Kendiliğinden geriye döner frekansları saptayabilmek için minimal agar plaklar kullanıldı. %0,6 oksoid bakto agar, %0,5 NaCl içeren 100 ml'lik üst agar 48<sup>o</sup>C'lik su banyosunda eritilerek üzerine steril 0,5Mm L-Histidin HCl / 0,5Mm biyotin çözeltisinden 10 ml eklendi ve tüplere 2,5 mililitre olacak şekilde dağıtıldı. Bu tüplere her suşun gecelik kültüründen 0,1 ml eklendi ve minimal agarlı plaklara dökülüp dağılması sağlandı. 37<sup>o</sup>C'de 48-72 saatlik inkübasyondan sonra, geriye döner kolonilerin sayımı yapıldı. Bu deney her suş için, tekrarlandı ve ortalama değerler alındı.

#### **2.5. Çalışmada Kullanılacak Test Suşlarının Dondurulması ve Saklanması**

Genetik işaretleri doğrulanan test suşlarını genetik işaretleri uzun süre kaybolmaksızın saklanabilmesi için dondurulmuş örnekler hazırlanır. Bu amaçla test suşları, sıvı üreme ortamında 1 ml'de 1-2 x10<sup>9</sup> bakteri bulunacak şekilde üretildi. Bakteri kültürlerine, kültürün her ml'si için 0,09 ml olacak şekilde DMSO eklendi ve yavaşça karıştırıldı. Bu şekilde hazırlanmış kültürler, 1,5 ml 'lik soğuğa dayanıklı plastik ependorf tüplere aseptik koşullarda dağıtıldı. Tüpler hemen kuru buz içine yerleştirilerek dondurulup, -80 <sup>o</sup>C'lik derin dondurucuya kaldırıldı. Test suşları genetik özellikleri bozulmadan bu şekilde 3 yıl saklanabildiği rapor edilmektedir [50].

#### **2.6. Master Plakların Hazırlanması**

Mutajenite deneylerinde kullanılmak üzere genetik işaretleri kontrol edilen *S.typhimurium* TA98, TA100 suşları için master plaklar hazırlandı. En az 5 tek koloni ikinci saflaştırma plağından alınıp histidin biyotin ampisilin ile desteklenen bir MA plağı üzerine ekim yapıldı. Bu plaklar +4<sup>o</sup>C' de iki ay süre saklanabilmektedir [49, 50].

#### **2.7. Ames Test Sistemi**

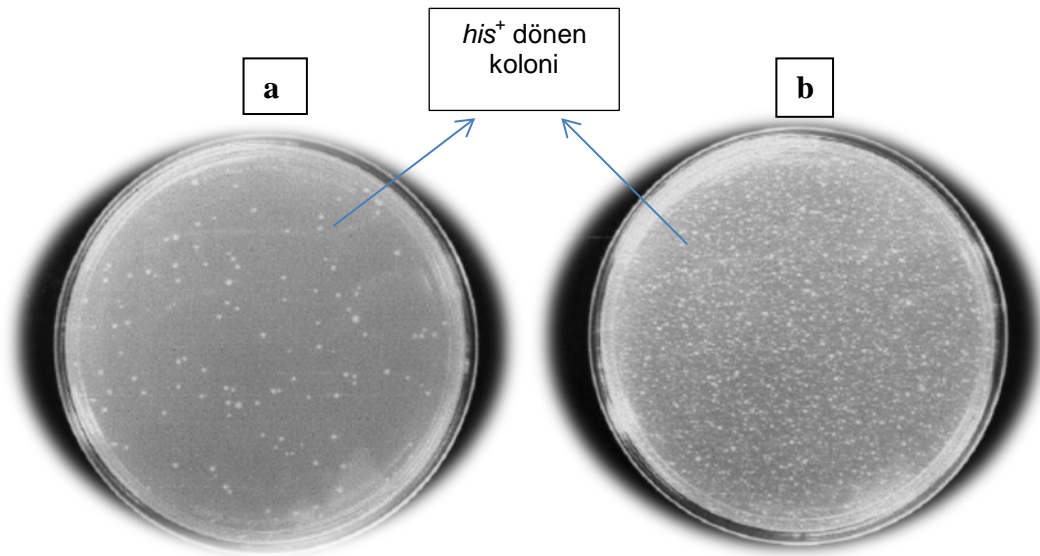
Ames testinde kullanılan test bileşiklerinin bakteri için öldürücü olmayan dozları belirlenip, öldürücü olmayan dozlarda mutajenik potansiyelleri test edildi.

### 2.7.1. Sitotoksik Etkinin Saptanması

Ames test sisteminde kullanılan test bileşiklerinin, bakteri için öldürücü olmayan dozlarının saptanabilmesi amacıyla 2,5 ml'lik üst agara 0,1 ml uygun bakteri derişiminde bakteri kültürü ve en fazla 0,1 ml olacak şekilde değişik konsantrasyonlarda test bileşii çözeltisi eklendi. Karışım, nutrient agarlı plaklara dökülerek plaklar 37 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra koloni sayımları yapıldı. Kontrol plağındaki koloni sayısıyla, test edilen kimyasal bileşiklerin sitotoksik olup olmadığı belirlendi. Sitotoksik olmayan dozlar ile mutajenite deneyleri gerçekleştirildi.

### 2.7.2. Mutajenik Etkinin Saptanması

Mutajenite testinde test bileşii ve bakteriyel test suşu, üst agar ortamında bir araya getirilerek minimal glukoz agarlı plaklar üzerine homojen bir şekilde yayılması sağlandı. Her bir suş için pozitif ve negatif kontrol plakları hazırlandı. *S.typhimurium* TA98 suşu için pozitif kontrol olarak danomisin, *S.typhimurium* TA100 suşu için pozitif kontrol olarak sodyum azid kullanıldı. Bu plaklar 37°C'de 72 saat inkübe edildikten sonra okzotrof halinden prototrof hale gelen koloniler sayıldı. Test bileşiiğinin her bir dozu için üç plak kullanıldı. Deneyler 2 kez tekrar edildi.



**Şekil 2. 1. :** Negatif (a) ve pozitif (b) kontrol plaklarında *S.typhimirium* TA100 suşu için *his<sup>+</sup>* dönen koloniler



### 2.7.2.1. Sonuçların Değerlendirilmesi

Test bileşiklerinin mutajenik etkili olarak değerlendirilmesi için *his*<sup>+</sup> 'ya dönen koloni sayılarının negatif kontrol plaklarındaki koloni sayılarının iki kat ve üstü artış göstermesi gerekmektedir. Ancak *his*<sup>+</sup> 'ya dönen koloni sayısında doza bağlı olarak bir artış gözleniyorsa mutajenik olarak değerlendirilebilir [50]. Bu çalışmanın istatistiksel analizi SPSS 16.0 paket programı ile ANOVA testi kullanılarak yapıldı.

## 3. SONUÇLAR

Tez çalışması kapsamında, yeni sentezlenmiş 12 adet benzoksazol türevi bileşiğin mutajenik potansiyelleri Ames test sistemi ile değerlendirildi.

### 3.1. Ames Test Sisteminde Kullanılan Suşların Üreme Durumları

Ames test sisteminde kullanılan suşlara ait kültürlerin mililitresinde  $1-2 \times 10^9$  canlı bakteri sayısı olması öngörülmektedir. *S.thyhimurium* TA98 suşunun mililitresinde bulunması gereken canlı bakteri sayısına, inkübasyonun yaklaşık 5. saatinde ulaşılmaktadır. Gece boyunca üretilen *S.thyhimurium* TA98, TA100 suşları sabah taze ortama alınıp 5 saatlik inkübasyondan sonra örnekler serum fizyolojikle belirli miktarda sulandırılarak 0,01 ml bakteri kültürü nutrient agarlı plaklara spot şeklinde ekildi. Ertesi gün koloni sayımı yapılarak *S. thyhimurium* TA98, TA100 suşları için kültürlerin mililitresinde  $1-2 \times 10^9$  canlı bakteri olduğu doğrulandı.

### 3.2. Ames Testi Sonuçları

Plak inkorporasyon testi öncesinde, test edilen kimyasal bileşiklerin sitotoksik etkisine bakıldı. Yapılan bu testte maddelerin çözünebildikleri, sitotoksik olmayan en yüksek doz tüm kimyasal bileşikler için 300 µg/plak olarak belirlenmiştir. Fakat elimizde yeterli miktarda kimyasal bileşik olamamasından dolayı mutajenite testleri sitotoksik olmayan 25, 50, 100, 200 µg/plak dozlarında gerçekleştirildi. Bu deneylerin sonuçları Çizelge 3. 1- 12' de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.1.** :1 Numaralı Bileşğin *S. typhimurium* TA98 ve TA100 Suşlarında Mutajenik Aktivitesi

TD1 Denenen Doz (µg/plak)	Geriye Dönen Koloni Sayısı ± Standart Sapma	
	TA98	TA100
0	38,2 ± 3,4	167,5 ± 20,6
25	38,3 ± 4,2	164,5 ± 20,8
50	36,2 ± 4,9	163,0 ± 16,7
100	36,3 ± 6,4	160,8 ± 16,1
200	36,3 ± 6,5	160,3 ± 16,7
<b>Pozitif Kontroller</b>		
Danomisin (6 µg/plak)	173,3 ± 37,2	-
Sodyum azit (1,5 µg/plak)	-	1948 ± 135,5

\* : p < 0, 05 (Dunnet C testine göre farklılık yaratan gruplar)

**Çizelge 3.2.** : 2 Numaralı Bileşimin *S. typhimurium* TA98 ve TA100 Suşlarında Mutajenik Aktivitesi

TD2 Denenen Doz (µg/plak)	Geriye Dönen Koloni Sayısı ± Standart Sapma	
	TA98	TA100
0	35,5 ± 1,0	157,0 ± 9,7
25	33,5 ± 5,5	134,3 ± 6,7
50	31,0 ± 2,9	108,3 ± 3,8
100	32,1 ± 5,4	130,0 ± 8,5
200	33,5 ± 2,8	100,3 ± 9,0
<b>Pozitif Kontroller</b>		
Danomisin (6 µg/plak)	216,3± 65,2	-
Sodyum azit (1,5 µg/plak)	-	803,7±105,9

\* : p < 0, 05 (Dunnet C testine göre farklılık yaratan gruplar)

**Çizelge 3.3.** :3 Numaralı Bileşimin *S. typhimurium* TA98 ve TA100 Suşlarında Mutajenik Aktivitesi

TD3 Denenen Doz (µg/plak)	Geriye Dönen Koloni Sayısı ± Standart Sapma	
	TA98	TA100
0	38,2± 3,4	148,7 ± 23,9
25	34,7± 4,3	140,8 ± 11,4
50	32,8 ± 2,5	141,2 ± 11,9
100	32,8 ± 4,4	138,8 ± 6,0
200	35,8 ± 4,4	139,3 ± 2,5
<b>Pozitif Kontroller</b>		
Danomisin (6 µg/plak)	173,3 ± 37,2	-
Sodyum azit (1,5 µg/plak)	-	866 ±191,2

\* : p < 0, 05 (Dunnet C testine göre farklılık yaratan gruplar)

**Çizelge 3.4.** :4 Numaralı Bileşğin *S. typhimurium* TA98 ve TA100 Suşlarında Mutajenik Aktivitesi

TD4 Denenen Doz (µg/plak)	Geriye Dönen Koloni Sayısı ± Standart Sapma	
	TA98	TA100
0	37,8 ± 6,7	172,2 ± 29,17
25	33,7 ± 3,6	152,3 ± 27,56
50	36,3 ± 6,6	158,8 ± 14,65
100	36,9 ± 7,5	153,0 ± 28,61
200	37,8 ± 7,2	162,8 ± 22,95
<b>Pozitif Kontroller</b>		
Danomisin (6 µg/plak)	152,5 ± 25,2	-
Sodyum azit (1,5 µg/plak)	-	1437 ± 407,3

\* : p < 0, 05 (Dunnet C testine göre farklılık yaratan gruplar)

**Çizelge 3.5.:** 5 Numaralı Bileşimin *S. typhimurium* TA98 ve TA100 Suşlarında Mutajenik Aktivitesi

TD5 Denenen Doz (µg/plak)	Geriye Dönen Koloni Sayısı ± Standart Sapma	
	TA98	TA100
0	37,8 ± 6,7	172,0 ± 29,4
25	34,5 ± 7,5	163,0 ± 17,6
50	36,2 ± 3,9	141,2 ± 26,2
100	36,2 ± 3,5	138,8 ± 18,2
200	39,8 ± 4,2	139,3 ± 17,8
<b>Pozitif Kontroller</b>		
Danomisin (6 µg/plak)	152,5± 25,2	-
Sodyum azit (1,5 µg/plak)	-	1431,6 ±352,9

\* : p < 0, 05 (Dunnet C testine göre farklılık yaratan gruplar)

**Çizelge 3.6.** :6 Numaralı Bileşğin *S. typhimurium* TA98 ve TA100 Suşlarında Mutajenik Aktivitesi

TD6 Denenen Doz (µg/plak)	Geriye Dönen Koloni Sayısı ± Standart Sapma	
	TA98	TA100
0	37,0 ± 1,0	147,5 ± 13,5
25	37,3 ± 0,5	157,5 ± 25,2
50	33,6 ± 2,5	148,5 ± 18,4
100	34,7 ± 3,5	129,7 ± 12,8
200	33,0 ± 2,0	145,8 ± 18,2
<b>Pozitif Kontroller</b>		
Danomisin (6 µg/plak)	182,3 ± 35,1	-
Sodyum azit (1,5 µg/plak)	-	989,6 ± 356,3

\* :  $p < 0,05$  (Dunnet C testine göre farklılık yaratan gruplar)

**Çizelge 3.7. :** 7 Numaralı Bileşimin *S. typhimurium* TA98 ve TA100 Suşlarında Mutajenik Aktivitesi

TD7 Denenen Doz (µg/plak)	Geriye Dönen Koloni Sayısı ± Standart Sapma	
	TA98	TA100
0	37,0 ± 1,0	166,5 ± 14,1
25	37,0 ± 2,8	159,3 ± 11,4
50	35,0 ± 3,8	145,2 ± 14,2
100	33,2 ± 3,7	155,2 ± 23,1
200	35,2 ± 4,6	132,5 ± 17,1*
<b>Pozitif Kontroller</b>		
Danomisin (6 µg/plak)	182,3 ± 35,1	-
Sodyum azit (1,5 µg/plak)	-	950,4 ± 390,1

\* :  $p < 0,05$  (Dunnet C testine göre farklılık yaratan gruplar)



**Çizelge 3.8.** : 10 Numaralı Bileşimin *S. typhimurium* TA98 ve TA100 Suşlarında Mutajenik Aktivitesi

TD10 Denenen Doz (µg/plak)	Geriye Dönen Koloni Sayısı ± Standart Sapma	
	TA98	TA100
0	34,5 ± 4,7	143,6 ± 23,0
25	27,5 ± 4,9	169,2 ± 14,2
50	35,3 ± 5,9	160,2 ± 20,0
100	31,3 ± 5,6	128,3 ± 17,1
200	23,2 ± 5,6*	146,7 ± 18,8
<b>Pozitif Kontroller</b>		
Danomisin (6 µg/plak)	155,7 ± 23,0	-
Sodyum azit (1,5 µg/plak)	-	1149,6 ± 366,8

\* :  $p < 0,05$  (Dunnet Ctestine göre farklılık yaratan gruplar)

**Çizelge 3.9.** : 11 Numaralı Bileşimin *S. typhimurium* TA98 ve TA100 Suşlarında Mutajenik Aktivitesi

TD11 Denenen Doz (µg/plak)	Geriye Dönen Koloni Sayısı ± Standart Sapma	
	TA98	TA100
0	30,6 ± 2,5	159,3 ± 8,0
25	33,0 ± 3,0	770,7 ± 134,6*
50	1390,2±314, 5*	663,7 ± 35,9*
100	1663,5± 354,6*	659,3 ± 38,9*
200	1854,3± 117,9*	649,3 ± 18,5*
<b>Pozitif Kontroller</b>		
Danomisin (6 µg/plak)	159,5± 25,6	-
Sodyum azit (1,5 µg/plak)	-	1375 ± 275,4

\* : p < 0, 05 (Dunnet C testine göre farklılık yaratan gruplar)

**Çizelge 3.10. :** 12 Numaralı Bileşğin *S. typhimurium* TA98 ve TA100 Suşlarında Mutajenik Aktivitesi

TD12 Denenen Doz (µg/plak)	Geriye Dönen Koloni Sayısı ± Standart Sapma	
	TA98	TA100
0	32,6± 2,1	174,5 ± 5,3
25	31,3 ± 1,2	171,7 ± 17,1
50	30,7 ± 3,1	139,2 ± 26,9
100	36,3 ± 2,5	266,5 ± 96,4
200	32,3 ± 2,9	426,0 ± 142,6*
<b>Pozitif Kontroller</b>		
Danomisin (6 µg/plak)	181 ± 23,4	-
Sodyum azit (1,5 µg/plak)	-	1457,3 ± 360,9

\* :  $p < 0,05$  (Dunnet C testine göre farklılık yaratan gruplar)

**Çizelge 3.11.** : 13 Numaralı Bileşimin *S. typhimurium* TA98 ve TA100 Suşlarında Mutajenik Aktivitesi

TD13 Denenen Doz (µg/plak)	Geriye Dönen Koloni Sayısı ± Standart Sapma	
	TA98	TA100
0	32,0 ± 2,3	154,7 ± 7,5
25	27,2 ± 4,9	358,0 ± 79,7*
50	28,2 ± 6,2	591,0 ± 30,1*
100	584,6 ± 327,1*	489,3 ± 58,3*
200	484,3 ± 189,3*	510,0 ± 55,1*
<b>Pozitif Kontroller</b>		
Danomisin (6 µg/plak)	244,3± 62,5	-
Sodyum azit (1,5 µg/plak)	-	970,4 ± 454,5

\* : p < 0, 05 (Dunnet C testine göre farklılık yaratan gruplar)

**Çizelge 3.12. :** 14 Numaralı Bileşğin *S. typhimurium* TA98 ve TA100 Suşlarında Mutajenik Aktivitesi

TD14 Denenen Doz (µg/plak)	Geriye Dönen Koloni Sayısı ± Standart Sapma	
	TA98	TA100
0	35,8 ± 1,5	147,5 ± 7,76
25	30,8 ± 2,8*	153,2 ± 26,8
50	31,8 ± 4,2	194,5 ± 39,4
100	32,8 ± 4,8	264,8 ± 150,9
200	33,0 ± 3,6	423,5 ± 281,6*
<b>Pozitif Kontroller</b>		
Danomisin (6 µg/plak)	211,3± 83,2	-
Sodyum azit (1,5 µg/plak)	-	2650,3±574,2

\* : p < 0, 05 (Dunnet C testine göre farklılık yaratan gruplar)

SPSS16.0 paket programı kullanılarak yapılan ANOVA çözümlemesine göre;

1, 3, 4, 5, 6 numaralı kimyasal bileşikler için hem *S. typhymirium* TA98 suşu, hem *S. typhymirium* TA100 suşu üzerinde denenen dozların etkinlikleri arasında farklılık olmadığı söylenebilir ( $p>0,05$ ). Kontrol grubu ve deney grupları arasında geriye dönen koloni sayısı açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Dolayısıyla bu bileşikler tüm dozlarda mutajenik etki göstermemiştir denilebilir.

2 numaralı kimyasal için *S. typhymirium* TA98 suşu üzerinde denenen dozlarına ait geriye dönen koloni sayılarının ortalamaları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). *S. typhymirium* TA100 suşu Dunnet C testine göre 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g/plak}$  dozlarında geriye dönen koloni sayılarının ortalamaları kontrole göre anlamlı bir farklılık göstermektedir ( $p<0,05$ ). Fakat bu geriye dönen koloni sayısının azalması sonucudur. Dolayısıyla 2 numaralı kimyasalın mutajenik etkili olduğu söylenemez.

7 numaralı kimyasal bileşik için *S. typhymirium* TA98 suşunda denenen bütün dozların geriye dönen koloni sayılarının ortalamaları ile kontrol grubu ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamsal farklılık gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ). *S. typhymirium* TA 100 suşu için ise 200  $\mu\text{g/plak}$  dozun geriye dönen koloni sayılarının ortalamaları ile kontrol grubu kıyaslandığında geriye dönen koloni sayısında anlamlı bir farklılık görülmektedir ( $p<0,05$ ). Fakat bu farklılıklar mutajenik olarak değerlendirilmemiştir

10 numaralı kimyasal bileşik için *S. typhymirium* TA100 suşunda denenen bütün dozların geriye dönen koloni sayılarının ortalamaları ile kontrol grubu ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ). *S. typhymirium* TA 98 suşu için 200  $\mu\text{g/plak}$  dozda geriye dönen koloni sayıları ortalamaları kontrol grubu ile kıyaslandığında geriye dönen koloni sayısında anlamlı bir farklılık görülmektedir ( $p<0,05$ ). Fakat bu farklılıklar mutajenik olarak değerlendirilmemiştir.

11 numaralı kimyasal bileşik için *S. typhymirium* TA98 suşunda denenen 50, 100, 200  $\mu\text{g/plak}$  dozlarının geriye dönen koloni sayıları ortalamaları ile kontrol grubu ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ( $p<0,05$ ). Bu farklılıklar mutajenik olarak değerlendirilmiştir. *S. typhymirium* TA 100 suşu için

25, 50,100, 200 µg/plak dozlarının geriye dönen koloni sayıları ortalamaları, kontrol grubu ile kıyaslandığında geriye dönen koloni sayısında anlamlı bir farklılık görülmektedir ( $p<0,05$ ). Bu farklılık mutajenik olarak değerlendirilmiştir.

12 numaralı bileşiğin *S. typhimurium* TA98 suşunda denenen tüm dozlarının geriye dönen koloni sayıları ortalamaları, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında bütün dozlarında anlamlı farklılık olmadığı gözlenmiştir ( $p>0,05$ ). *S. typhimurium* TA100 suşunda ise denenen dozların geriye dönen koloni sayıları ortalamaları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık olduğu gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). 200 µg / plak derişiminde gözlenen bu farklılık mutajenik etki olarak değerlendirilmiştir.

13 numaralı kimyasal için *S. typhymirium* TA98 suşunda denenen 100, 200 µg/plak dozlarının geriye dönen koloni sayıları ortalamaları, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında dozlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ( $p<0,05$ ). Bu farklılık mutajenik etki olarak değerlendirilmiştir. *S.typhymirium* TA 100 suşu için 25, 50, 100, 200 µg/plak dozlarının geriye dönen koloni sayıları ortalamaları, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında dozlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir. Bu farklılıklar mutajenik olarak değerlendirilmiştir. Oluşan mutajenitenin doza bağlı olarak arttığı söylenebilir.

14 numaralı kimyasal için *S.typhymirium* TA98 suşunda denenen 25 µg/plak dozun geriye dönen koloni sayıları ortalamaları, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ( $p<0,05$ ). Fakat bu farklılık geriye dönen koloni sayısının azalması sonucudur. Dolayısıyla 14 numaralı kimyasalın TA98 bakterisi mutajenik olduğu söylenemez. *S.typhymirium* TA 100 suşu için 200 µg/plak dozun geriye dönen koloni sayıları ortalamaları, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ( $p<0,05$ ). Bu farklılık mutajenik olarak değerlendirilmiştir.

## 4. TARTIŞMA

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması, invaziv nitelik kazanması, metastaz yapmasıyla kendini gösteren ciddi bir hastalıktır. Çağın vebası olarak bilinen bu hastalığın tanı ve tedavisinde önemli gelişmeler kaydedilmesine karşın giderek daha fazla insanda ortaya çıkmaktadır. Bu ölümcül hastalık, her yaş grubundan insanı etkilese de daha çok ileri yaş hastalığı olarak karşımıza çıkıyor [58]. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı tarafından yayınlanan raporda 2012 yılında Dünya'da toplam 14,1 milyon yeni kanser vakası gelişmiş ve 8,2 milyon kansere bağlı ölüm olduğu bildirilmiştir [59].

Bu kadar yaygın görülen bu hastalıkta kullanılan tedavi yöntemleri cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir. Bu tedaviler tek başına veya birlikte uygulanmaktadır. Yapılan bu tedavilere rağmen kansere karşı henüz kesin sonuç bulunamamıştır [60]. Gerek hücrelerin ilaçlara gösterdiği direnç gerekse yan etkilerinin fazla olması yeni ilaçların sentezlenmesini gerekli kılmaktadır [61]. Son yıllarda gelişen teknoloji ile birlikte tümör hücrelerine karşı seçicilik özelliği gösteren bileşikler tasarlanmaktadır. Benzoksazol türevi bileşikler bu bileşikler arasındadır. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda heterosiklik bir yapıya sahip olan benzoksazollerin antitümör, antibakteriyel, antiviral, antihelmintik, antibiyotik etkileri ile topoizomeraz 1 ve 2, revers ters transkriptaz, bakteriyel hyaluran liyaz inhibitörü oldukları konusunda bilgiler elde edilmiştir [22, 23, 24, 25, 26, 27]. Bunların yanı sıra farklı biyolojik aktivitelere de sahiptirler.

Cameron ve ark. [62] 2-arilbenzoksazol bileşiklerini kolesterol ester transfer protein inhibitörü olarak tanımlamıştır. Yapılan çalışmada benzoksazol halkasının 5 ve 7 konumdan süstitüe olması inhibisyonunu arttırmıştır.

Paramashivappa ve ark. [63] 2-arilideneamino benzoksazol-5 karboksilat bileşiğini sentezlemişlerdir. Yaptıkları çalışmalar bu bileşiğin COX-2 inhibitörü aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir.

Patil ve ark. [64]. N-1,3 benzoksazol 5 karbonhidroksid bileşiğini sentezleyip, yaptığı çalışmalarla bu bileşiğin antiinflamasyon aktivitesine sahip olduğunu göstermişlerdir.



Singh ve ark. [65] tarafından 2 aminofenol ve p-aminobenzoik asitten üretilen 2-4 aminofenil benzoksazol sentezlenmiştir. Bu bileşiğin *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*'e karşı antibakteriyel ve *Aspergillus niger*, *Candida albicans*'a karşı antifungal etkili olup olmadığı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, bu yeni bileşiklerin önemli antibakteriyel etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

Yapılan çalışmalarda benzoksazol türevi bileşiklere, seçilen mikroorganizmaların direnç gösterememesi ve bazı bileşiklerin kullanılan diğer ilaçlarla karşılaştırıldığında aynı bazen yüksek etki göstermesi bu bileşiklerin önemini arttırmaktadır. Yapılan çalışmada 5. konumda nitro taşıyan, ya da nonsübstitüe şeklindeki 2-fenilbenzoksazol türevlerinin bir kısmı Gram pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı kloramfenikol ile, 5. konumda klor, amino veya metil grubu taşıyan türevlerin bir kısmı da eritromisinle aynı etkiyi göstermektedirler. Ayrıca 5-nitro-2-(p-aminofenil) benzoksazol ve 5-nitro-2-(p-bromofenil) benzoksazol kloramfenikolden daha etkilidirler [66].

Araştırmalar, kemoterapötik etki gösteren benzoksazol halka sisteminin genellikle 2. ve 5. konumdan sübstitüe edildiğini göstermektedir. Benzoksazol türevlerinde 2. konumdaki sübstitüent, etki şekli üzerinde, 5. Konumda sübstitüent ise etki şiddeti üzerinde etkilidir. Sonuç olarak, uygun konumda gerekli substitüenti taşıyan benzoksazol türevleri güçlü antimikrobiyal aktivite gösterir [66].

Benzoksazol halka sistemi, kalsimisin gibi semisentetik türevlerin yapısında da yer almaktadır. Polieter antibiyotikler sınıfına giren kalsimisinin üzerine yapılan çalışmalar sonucunda kasimisinin iyonofor özellik gösterdiği ve Gram pozitif bakterilere karşı inhibitör etkili olduğu sonucuna varılmıştır [67].

Yaygın olarak kullanılan pek çok özelliğe sahip olan bu bileşikler laboratuvar koşullarında ilaç öncül maddesi olarak sentezlenmektedir. Laboratuvarda sentezlenen çok sayıda aday bileşikten çok azı insanda denenebilecek aşamaya gelebilir. Bunun dışında kalanlar klinik öncesi araştırmalar dediğimiz aşamada elenir. Bu aşamanın amacı tasarlanan bileşiklerin etkinlik ve güvenilirliğinin insanda denenmeden önce değerlendirilmesidir. Bu çalışmalar hayvanlar ve laboratuvar modellerinde gerçekleştirilir. Güvenilirlik çalışmalarında akut, subakut,

kronik toksisite çalışmaları, genel ve spesifik organlara olan etkileri, reprodüktüf ve toksisite testleri, mutajenite ve karsinojenite araştırmaları yapılır [68].

Klinik öncesi faz çalışmaları sonrasında geliştirilmesine karar verilen ürünler klinik geliştirme fazına geçerler. Klinik geliştirme fazı 4 aşamada yapılır. Bu aşamaların ilki olan faz I aşamasında amaç ürünle ilgili güvenilirlik verilerinin toplanması, doz aralığının saptanması, tolerans ve farmokokinetik verilerinin incelenmesidir. Bir seri olarak tek doz uygulamaları yapılır. Denek sayısı 20-80 arasındadır. alışmalar genellikle sağlıklı gönüllülerde yapılır. Ortalama 1-1,5 yılda tamamlanır. İkinci basamak olan faz II aşamasında amaç ilaç etkinliğinin hastalarda belirlenmesi, yan etki profillerinin araştırılması, doz cevap verilerinin toplanmasıdır. alışmalar hedef hastalığı olan 100-300 hasta gönüllülerde yapılır. Bu fazdaki çalışmaların tamamlanması ortalama 2 yıl alır. Faz III basamağında amaç ürünün klinik etkinliğinin daha geniş bir hasta popölasyonunda değerlendirilmesidir. Hedef hastalığı olan 1000-3000 hasta gönüllü bu çalışmalarda yer alır. alışmalar genellikle çok merkezli, çok uluslu yapılır. Bu fazın tamamlanması 3-4 yıl sürer. Bu çalışmalardan yeterli veriler elde edildikten sonra ilaç öncül maddesinin ilaç olarak kullanılması için onay alması gerekir. Onay alma süresi 1,5 yıldır. Ürün ilaç olarak kullanılmaya başladıktan sonra yapılan klinik çalışmalar faz IV alışmaları olarak kabul edilir. Bütün bu aşamaları geçtikten sonra bir ilaç öncül maddesi ilaç olarak kullanılmaktadır. [68].

Bu tez çalışmasında Ankara Üniversitesi farmasötik kimya laboratuvarlarında tasarlanıp sentezlenen 12 ilaç öncül maddesinin Ames test sistemi ile mutajenik potansiyelleri araştırılmıştır. Ames test sistemi, klinik öncesi aşamada yapılması önerilen toksikolojik testlerden bir tanesidir.

Ames test sistemi yapay olarak mutasyona uğratılarak histidin sentezleme yeteneğinin kaybetmiş okzotrof *S. typhimirium* suşlarının test edilen kimyasal madde ile maruziyetinden sonra ikinci mutasyon geçirip yabanıl hale dönüşmeleri temeline dayanır. Bu test sisteminde farklı mutasyonlara sahip test suşları kullanılmaktadır. *S. typhimirium* TA98 suşu hisD3052 gen bölgesinde çerçeve kayması, *S. typhimirium* TA100 suşu ise hisG46 gen bölgesinde baz çifti değişimine neden olan mutajenleri tanımlamak için kullanılır. Bu test sisteminde mutajenik potansiyel prototrofların sayısı ile ölçülür [49]. Mutajenik potansiyellerin gösteren en önemli etken prototrofların sayısı olmasına karşın bu sayıyı etkileyen

birden fazla parametre bulunmaktadır. Bu yüzden çeşitli laboratuvarlar arasında ya da aynı koşullarda farklı zamanlarda yapılan çalışmalarda aynı sayıyı bulmak güçtür. Bu nedenle her mutant suş için kendiliğinden geri dönen koloni sayısı belli bir aralıkta verilir [69]. Çok sayıda araştırmacı kendiliğinden geri dönen koloni sayılarına etki eden etkenleri denemek üzere çeşitli çalışmalar yapmışlardır. Bu parametreler; minimal ortamın tipi, petrilere ekilen bakteri sayısı, petrilereki minimal ağarın hacmi, üst agarın yayılma şekli, etüvdeki nem oranı, üst ağarın sıcaklığı gibi parametrelerdir [69, 70].

Literatür tarandığında deney sisteminde kullanılan suşlarda *S. typhimirium* TA98 suşunun geriye dönme frekansı 20-50 *S. typhimirium* TA100 için 75-200 olarak belirtilmektedir [50]. Bu çalışmada da kendiliğinden geriye dönüş frekansının genel ortalaması *S. typhimirium* TA98 için  $35,68 \pm 2,69$  *S. typhimirium* TA100 suşu için  $159,25 \pm 11,04$  olarak bulunmuştur. Elde edilen bu sayılar literatürde belirtilmiş değerlerle uyumludur [50]. *S. typhimirium* TA98 için danomisin, *S. Typhimirium* TA 100 için sodyum azid pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Danomisin varlığında *S. typhimirium* TA98 suşu için geriye dönüş frekansının genel ortalaması  $182,05 \pm 28,61$  sodyum azid varlığında *S. typhimirium* TA 100 suşu için ise  $1335,74 \pm 529,05$  olarak bulunmuştur. Bu değerler de literatürdeki verilerle uyumludur [50].

Test edilen 12 kimyasal bileşiğin sonuçları 16.0 paket programı kullanılarak yapılan ANOVA çözümlenmesi ile değerlendirilmiştir.

Test edilen bileşiklerden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 numaralı bileşikler *S. typhimirium* TA98 ve TA100 suşlarında herhangi bir mutasyona neden olmadıkları, 11, 12, 13, 14 numaralı bileşiklerin metabolik aktivasyon yokluğunda mutajenik etkili oldukları bulunmuştur. Bu bileşiklerden 11 ve 13 numaralı bileşikler *S. typhimirium* TA98 ve TA 100 suşlarında, 12 ve 14 numaralı bileşikler ise sadece *S.typhimirium* TA100 suşunda mutajenik etki göstermiştir. Mutajenik etki açısından değerlendirildiğinde 11, 13, 12, 14 şeklinde sıralama yapılabilir.

11 numaralı bileşik, *S. typhimirium* TA98 suşunda 50, 100, 200 µg/plak dozlarında negatif kontrole oranla yaklaşık 60 kat, pozitif mutajen olan danomisinle karşılaştırıldığında ise yaklaşık 10 kat daha fazla etki göstermiştir. Dolayısıyla bu bileşik kaynaklarda pozitif kontrol olarak kullanılan danomisinden daha fazla mutajenik potansiyele sahiptir denilebilir. *S. typhimirium* TA100 suşunda ise,

denenen tüm dozlarda geri dönen koloni sayıları negatif kontrole oranla yaklaşık 4 kat, pozitif mutajen olan sodyum azitle karşılaştırıldığında ise sodyum azitin gösterdiği etkinin yarısı kadar etki göstermiştir. Mutajenik etki gösteren bileşikler arasında en düşük dozda en yüksek aktivite gösteren 11 numaralı bileşiktir. Bu bileşik *S. typhimirium* TA100 suşunda 25 µg/plakta mutajenik etki göstermiştir (770 his<sup>+</sup> koloni).

12 numaralı bileşik *S. typhimirium* TA100 suşunda tek dozda (200 µg/plak) negatif kontrole oranla yaklaşık 3 kat daha fazla etki göstermiştir. Pozitif olarak kullanılan sodyum azitle karşılaştırıldığında, sodyum azitin gösterdiği etkinin üçte biri kadar etki göstermiştir.

13 numaralı bileşik, *S. typhimirium* TA98 suşunda 100, 200 µg/plak dozlarında negatif kontrole oranla yaklaşık 18 kat, pozitif mutajen olan danomisine karşılaştırıldığında ise yaklaşık 2 kat daha fazla etki göstermiştir. Dolayısıyla bu bileşik kaynaklarda pozitif kontrol olarak kullanılan danomisinden daha fazla mutajenik potansiyele sahiptir denilebilir. *S. typhimirium* TA100 suşunda ise, denenen tüm dozlarda geri dönen koloni sayıları negatif kontrole oranla yaklaşık 4 kat, pozitif mutajen olan sodyum azitle karşılaştırıldığında ise sodyum azitin gösterdiği etkinin yarısı kadar etki göstermiştir. Mutajenik etki gösteren bileşikler arasında *S. typhimirium* TA100 suşunda denenen en küçük dozda (25 µg/plak ) mutajenik aktivite göstermiştir (358 his<sup>+</sup> koloni).

14 numaralı bileşik *S. typhimirium* TA100 suşunda tek dozda (200 µg/plak) negatif kontrole oranla yaklaşık 3 kat daha fazla etki göstermiştir. Pozitif olarak kullanılan sodyum azitle karşılaştırıldığında sodyum azitin gösterdiği etkinin beşte biri kadar etki göstermiştir.

Bu bileşiklerin kimyasal yapılarına bakıldığında 5.konumda p-aminofenilsulfonamido grubu taşıyan benzoksazol yapısının, 2. konumunda p-sübstitüefenil grubu taşıyan bileşikler ile 2. konumunda nonsübstitüe benzil yapısı taşıyan bileşiklerin mutasyon oluşturmadıkları söylenebilir. Ancak 2. konumuna fenil yerine p-sübstitüebenzil (p-sübstitüefenilmetil) grubunun getirilmesi ile mutajenik aktivitenin ortaya çıktığı gözlenmiştir. Sonuçlara göre; 11 ve 13 numaralı bileşiklerin hem hisD3052 gen bölgesinde çerçeve kayması mutasyonu, hem de hisG46 gen bölgelerinde baz çifti değişimi mutasyonu oluşturmalarına rağmen, 12

ve 14 numaralı bileşiklerin ise ancak yüksek konsantrasyonlarda sadece hisG46 gen bölgesinde baz çifti değişim mutasyonu yaptığı görülmüştür. Dolayısıyla, 5-(p-aminofenilsülfonamido) benzoksazol yapısının 2. konumundaki benzil bölümünün para konumundan Cl ve Br ile süstitüe edilmesinin mutajenik aktiviteyi arttırdığı ifade edilebilir. Aynı konumdan F ve CH<sub>3</sub> gruplarının bağlanması ile ancak yüksek konsantrasyonlarda (200 µg/plak) sadece *S. typhimirium* TA100 suşu için mutajenik etkinin ortaya çıkmasından dolayı; benzil yapısının para konumundan bağlı süstitüentin elektronik ve hidrofobik özelliklerinden ziyade sterik özelliğinin mutajenik etkiden sorumlu olabileceği söylenebilir.

Özetle; bu grup incelenen bileşiklerde daha aktif mutajenik etki gösteren bileşiklerin tasarlanması aşamasında; benzoksazol yapısının 2. konumunda fenil yerine benzil grubunun olması ve benzil grubunun para konumundan daha hacimli gruplarla süstitüe edilmesi önerilebilir.

Karsinojenik etkinin taranmasında genetik kodun ve genetik sistemin evrensel oluşu, kanserojenik etki ile mutajenik etki arasındaki ilişkinin yüksek olması sebebiyle mutajenite esas alınır. Yaptığımız bu çalışmada pozitif sonuç veren bileşikler için insan ve diğer memelilerde hem mutajenik hem de kanserojenik etki yapar demek doğru değildir. Ancak Ames test sistemi, histidin gen bölgesinde meydana gelen nokta mutasyonlarının saptanmasını sağlayan bir sistem olmasından dolayı önemlidir. Nokta mutasyonu sağlıklı hücrenin büyüme ve farklılaşmasında görev alan protoonkogenlerde veya hücre döngüsünün kontrol noktalarını düzenleyen ve apoptoz sürecini başlatan tümör baskılayıcı genlerde de meydana gelebilir. Böyle bir gendeki çok önemli bir mutasyon, proto-onkogeni etkinleştirebilir ve bundan dolayı hücrede büyüme uyarıcı etkinin aşırı ifadesine yola açan onkogen haline, tümör baskılayıcı genler ise aktif durumdan inaktif hale geçebilir. Bu durum sonucunda hücre döngüsünün düzeninin bozulmasına ya da hücreler arası temasın üzerindeki kontrolün kaybedilmesine neden olan kanserleşme görülebilir. Fakat bu genlerde kimyasal bileşiklerin oluşturduğu nokta mutasyonları kanserli hücreyi apoptoza gönderecek nitelikte de olabilir. Kanserli hücrelerin apoptoza gönderilmesi kötü huylu hücreleri yok edeceğinden bu kimyasal bileşiklerin antitümör etki gösterdiği söylenebilir. Dolayısıyla yaptığımız bu çalışma kimyasal bileşiklerin potansiyel etkisi konusunda ön, fakat önemli

olabilecek uyarı ile yüksek organizmalarda yapılacak kapsamlı çalışmaları yönlendirecek bir gösterge niteliği taşımaktadır.

## KAYNAKLAR

- [1] Akı-Şener, E., Bingöl, K. K., Temiz-Arpacı, Ö., Yalçın, İ., Altanlar, N., , Synthesis and microbiological activity of some *N*-(2-hydroxy-4 substitutedphenyl)benzamides, phenylacetamides and furamides as the possible metabolites of antimicrobial active benzoxazoles, *Il Farmaco*, 57, 451–456 **2002**.
- [2] Başaran, N., Baydar, T., Giray, B., Gürbay, A., Özgüneş, H., Şahin, G., *Farmostatik toksikoloji*, Nobel Tıp Yayıncılık, Ankara, **2013**
- [3] Meyers, F. H., Jawetz, E., Goldfien, A., Part VII. Chemotherapeutic Agents, 5th ed, Review of Medical Pharmacology, 470-522, **1976**.
- [4] Kayaalp, O., *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, Pelikan Yayıncılık, **2009**.
- [5] Brownlee, G., Chemotherapeutic Drugs : a Review, Royal College of Surgeons of England, **1948**.
- [6] Dax, S, L., Antibacterial Chemotherapeutic Agents, *Blackie Academic & Professional*, **1997**.
- [7] Mandell, GL., Petri, WA., Drugs used in the chemotherapy of tuberculosis, mycobacterium avium complex disease *In: Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill: 1155-1169, **1996**.
- [8] Çilli, A., Antitüberküloz İlaçlar ve Etki Mekanizmaları, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Antalya (Ocak - **2014**)
- [9] Papadaku, G., Antifungals: Mechanism of Action and Resistance, Established and Novel Drugs, *Current Opinion in Microbiology*, 1:547-557, **1998**.
- [10] Odds, F., Alistair, J.P., Gow, B., Antifungal agents: mechanisms of action, *Trends in Microbiology* Vol.11 No.6 June **2003**.
- [11] Olliaro, P., and Yuthavong, Y., An Overview of Chemotherapeutic Targets for Antimalarial Drug Discovery, *Pharmacol. Ther.* Vol. 81, No. 2, pp. 91–110, **1999**.
- [12] Winstanley, P., Stephen Ward, S., Malaria Chemotherapy (Ocak - **2014**).
- [13] Mottier, L., Alvarez, L., Ceballos, L., Lanusse, C., Drug transport mechanisms in helminth parasites: Passive divusion of benzimidazole anthelmintics, *Experimental Parasitology* 113 49–57, **2006**.
- [14] Ustaçelebi, Ş., Antiviral ilaçlar ve etki mekanizmaları, *Ankem Dergisi*, 13 (no.3): 282-285, **1999**.
- [15] Clercq, E., Hamao Umezawa Memorial Award Lecture: An Odyssey in the viral chemotherapy field, *International journal of antimicrobial agents*, 18 309–328, **2001**.
- [16] Clercq, E., Antiviral drug discovery and development: Where chemistry meets with biomedicine, *Antiviral Research* 67, 56–75, **2005**.

- [17] Clercq, E., In Search of a Selective Antiviral Chemotherapy, *Clinical Microbiology Reviews* 674–693, **1997**.
- [18] Ertan, T., *2-fenil / benzilbenzoksazol Türevlerinin ve Olası Metabolitlerin Sentezi, Yapılarının Aydınlatılması ve Mikrobiyolojik Aktivite Çalışmaları v ve Moleküler Modelleme Çalışmaları*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2005**.
- [19] Ramalingan, C., Balasubramanian, S., Kabilan, S., Vasudevan, M., Synthesis and Study of Antibacterial and Antifungal Activities of Novel 1-[2-(benzoxazol-2-yl) ethoxy]- 2,6-diarylpiperidin-4-ones, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 39, 527–533, **2004**.
- [20] Ouyang, L., Huang, Y., Zhao, Y., Gu Hea, G., Xie, Y., Liu, J., He, J., a, Bo Liu, B., Wei, Y., Preparation, Antibacterial Evaluation and Preliminary Structure Activity Relationship (SAR) Study of Benzothiazol and Benzoxazol-2-Amine Derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22 3044–3049, **2012**.
- [21] Ören, Ü., Yalçın, İ., Kemoterapötik Etkili Benzoksazol Türevleri ve Halka Analogları Üzerinde Gerçekleştirilmiş Yapı Etki İlişkileri, *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara Üniversitesi*, Vol.25 No:2, **1996**.
- [22] Jiang, J., Tang, X., Dou, W., Zhang, H., Liu, W., Wang, C., Zheng, J., Synthesis and Characterization of the Ligand Based on Benzoxazole and Its Transition Metal Complexes: DNA-Binding and Antitumor Activity, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 104 583–591, **2010**.
- [23] Satyendra, R., Vishnumurthy, K., Vagdevi, H., Rajesh, K, P- G., Manjunatha, H., Shruthi, A., In vitro antimicrobial and molecular docking of dichloro substituted benzoxazole derivatives, *Med Chem Res*, 21:4193–4199, **2012**.
- [24] Braun, S., Botzki, A., Salmen, S., Textor, C., Bernhardt, G., Dove, S., Buschauer, A., Design of Benzimidazole- and Benzoxazole-2-thione Derivatives as Inhibitors of Bacterial Hyaluronan Lyase, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 4419-4429, **2011**.
- [25] Akbay, A., Ören, A., Temiz-Arpaci, Ö ., Aki-Sener, E., Yalcın, I., Synthesis and HIV-1 reverse transcriptase inhibitor activity of some 2,5,6-substituted benzoxazole, benzimidazole, benzothiazole and oxazolo(4,5-b)pyridine derivatives, *Arzneim. Forsch./Drug Res.* 53 266–271, **2003**.
- [26] Satyendra, R., Vishnumurthy, A., Vagdevi, M., Rajesh, P., Manjunatha, H., Shruthi, A., Synthesis, in vitro antioxidant, anthelmintic and molecular docking studies of novel dichloro substituted benzoxazole-triazolo-thione derivatives, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46 3078-3084, **2011**.
- [27] Berta, D., Villa, M., Vulpetti, A., and Felder, E., Pyrazolyl–benzoxazole derivatives as protein kinase inhibitors. Design and validation of a combinatorial library, *Tetrahedron* 6110801–10810, **2005**.
- [28] Nelson, D ., Cox, M., *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, Palme Yayıncılık, **2005**.



- [29] Öksüzoğlu, E., Tekiner-Gülbaş, B., Alper, S., Temiz-Arpaci, Ö., Ertan, T., Yıldız, İ., Diril, N., Şener-Akı, E., Yalçın, I., Some benzoxazoles and benzimidazoles as DNA topoisomerase I and II inhibitors, *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.*, 23(1):37-42, **2008**.
- [30] Pinar, A., Yurdakul, P., Yıldız, İ., Temiz-Arpaci, Ö., Acan, L., Aki-Sener, E., and Yalcin, I., Some Fused Heterocyclic Compounds as Eukaryotic Topoisomerase II Inhibitors, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317, 670–674, **2004**.
- [31] Anonim.; Toksikite Test Sistemleri Uygulamalı Eğitim Programı İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, **2013**.
- [32] İmre, Z., *Toksikoloji*, İstanbul üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, İstanbul, **1988**.
- [33] Vural, N., *Toksikoloji*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, İstanbul, **1988**.
- [34] Paolini, M., Forti, G.C., On the metabolizing systems for short-term genotoxicity assays: a review, *Mutation Research*, 387, 17-34, **1997**.
- [35] Kirsch-Volders, M., Decordier, I., Elhajouji, A., Plas, G., Aardema, M., Fenech, M., In vitro genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models, *Mutagenesis* vol. 26 no. 1 pp. 177–184, **2011**.
- [36] Guérard, M., Zeller, A., Singer, T., Gocke, E., In vitro genotoxicity of neutral red after photo-activation and metabolic activation in the Ames test, the micronucleus test and the comet assay, *Mutation Research*, 746, 15– 20, **2012**.
- [37] Şekeroğlu, V., Şekeroğlu, Z., Genetik Toksikite Testleri, *Tübav Bilim* 4(3) 221-229, **2011**.
- [38] Dikilitaş, M., Koçyiğit, A., Canlılarda “Tek Hücre Jel Elektroferez ” Yöntemi ile DNA Hasar Analizi, *J.ASgric. Fac. HR.U.*, , 14(2): 77-89, **2010**.
- [39] Fairbairn, D., Olive, P., O'Neill, K., Fairbairn, W., The comet assay: a comprehensive review, *Mutation Research* 339, 37-59, **1995**.
- [40] Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., Ahnstrijm, G., The comet assay: mechanisms and technical considerations, *Mutation Research* 363 89-96, **1996**.
- [41] Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., Kirsch-Volders, M., Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring, *Biochimie*, 88, 1515–1531, **2006**
- [42] Iliakis, G., Wang, H., Perrault, A., Boecker, W., Rosidi, B., Windhofer, F., Wu, W., Guan, J., Terzoudi, G., and Pantelias, G., Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation, *Cytogenet Genome Res* 104:14–20, **2004**.
- [43] Hamer, B., Bihari, N., Reifferscheid, G., Zahn, R., Muller, W., Batel, R., Evaluation of the SOS/umu-test post-treatment assay for the detection of

- genotoxic activities of pure compounds and complex environmental mixtures, *Mutation Research* 466, 161–171, **2000**.
- [44] Takigami, H., Matsui, S., Matsuda, T., Shimizu, Y., The Bacillus subtilis rec-assay: a powerful tool for the detection of genotoxic substances in the water environment. Prospect for assessing potential impact of pollutants from stabilized wastes, *Waste Management*, 22 209–213, **2002**.
- [45] Gee, P., Maron, D. M. and Ames, B. N. Detection and classification of mutagens: a set of base-specific Salmonella tester strains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 91, 11606–11610, **1994**.
- [46] Baumeister, M., Brau, K., Gervais, V., Hasler-Nguyen, N., Reimann, R., Van Gompel, J., Wunderlich, H-G., Engelhardt G., Assessment of the performance of the Ames II™ assay: a collaborative study with 19 coded compounds., *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Volume 558, 181-199, **2004**.
- [47] Gee, P., Sommers, C.H., Melick, A.S., Gidrol, X.M., Todd, M.D., Burris, B., Nelson, M.E., Klemm, R.C., Zeiger, E., Comparison of responses of base-specific Salmonella tester strains with the traditional strains for identifying mutagens: the results of a validation study., *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Volume 412, 115-130, **1998**.
- [48] Rajapakse, N., Silva, E., and Kortenkamp, A., Combining Xenoestrogens at Levels below Individual No-Observed-Effect Concentrations Dramatically Enhances Steroid Hormone Action, *Environmental Health Perspectives* Volume 110, Number 9, September **2002**.
- [49] Zeiger, E., Mortelmans, K., The Salmonella (Ames) test for mutagenicity, *Current Protocols in Toxicology* 3.1.1-3.1.29, **1999**.
- [50] Mortelmans, K., Zeiger, E., The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay, *Mutation Research*, 455, 29-60, **2000**.
- [51] Ames, B.N., Lee, F.D., Durston, W.E., An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70, 782-786, **1973**.
- [52] Maron, D. M., Ames, B. N., Revised methods for the mutagenicity test, *Mutation Research*, 113, 173-215, **1983**.
- [53] Erdinger, L., Haack, T., Boche, G., Mutagenicity in Salmonella typhimurium TA 98 and TA 100 of nitro and respective hydroxylamine compounds, *Mutation Research*, 491, 183-193, **2001**.
- [54] Pounikar, R., Dawande, A.Y., Detection of potential carcinogens by Ames test, *Asiatic Journal of Biotechnology Resources*, 01, 57-64, **2010**
- [55] Özbek, T., *Doğu Anadolu Tıbbi Bitkilerine Ait Bazı Türlerin Ames/Salmonella Mikrozom Testi Kullanılarak Antimutajenik Özelliklerinin Saptanması*, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2006**.

- [56] Azuma, S. I., Kishino, S., Katayama, S., Akahori, Y., Matsushita, H., Highly sensitive mutation assay for mutagenicity monitoring of indoor air using *Salmonella typhimurium* YG1041 and a microsuspension method, *Mutagenesis*, 12, 5, 373-377, **1997**.
- [57] Korkmaz, B., *Bazı 2 Sübstitüe Perimidin Bileşiklerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames Mutajenite Testleri ile Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2005**.
- [58] Boyle, P., ve Levin, B., *Dünya Kanser Raporu*, Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu (IARC), **2008**.
- [59] T.C.S.B. Kanser Savaş Daire Başkanlığı 1998 yılı Kanser İstatistikleri, **2002**.
- [60] Symonds, R. P., Foweraker, K., Principles of chemotherapy and radiotherapy, *Current Obstetrics & Gynaecology*, 16, 100–106, **2006**
- [61] Gordon, R. R., Nelson, P.S., Cellular senescence and cancer chemotherapy resistance, *Drug Resistance Updates* 15, 123–131, **2012**.
- [62] Cameron, J., S., Amjad, A., Liya C., Milton L. H., Matt S. A., Ying C., Suzanne S. E., Qiu G., Sheryl A. H., Denise P. M., Carl P. S., Samuel D. W., Peter J. S., 2-Arylbenzoxazoles as CETP inhibitors: Substitution of the benzoxazole moiety, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20, 346–349, **2010**.
- [63] Paramashivappa, R., Kumar, P., P. V. Subba R and A. Srinivasa Rao., Design, Synthesis and Biological Evaluation of Benzimidazole / Benzothiazole and Benzoxazole Derivatives as Cyclooxygenase Inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13 657–660, **2003**.
- [64] Patil, S., Bhatt, P., Synthesis and pharmacological screening of some benzoxazole derivatives as anti-inflammatory agents, *International Journal of Pharma Research Development*, **2010**.
- [65] Singh, M., Singh, P., Singh, S., Synthesis of Benzoxazole-2-ones, Benzothiazoles-2-ones and their 2-thione Derivatives: Efficient conversion of 2-thione to oxo derivatives, *Indian Journal of Chemistry* Vol 46B, October pp. 1666-1671, **2007**.
- [66] Temiz, Ö., Şener, E., Mikrobiyolojik Etkili Benzoksazol, Benzimidazol, Benzotiyazol ve Oksazol (4,5-b) Piridin Türevleri, *J. Fac. Pharm.* Ankara 21, 1-2 **1991-1992**.
- [67] Ören, İ., Yalçın, İ., Yeni Bir Antibiyotik, Kalsimisin, *Ankara Ecz. Fak. Der.* 21, 1-2 (**1991-1992**).
- [68] Anonim, İlaç Geliştirme Aşamaları, <http://www.itam.org.tr/ilac-gelistirme-sureci.aspx> ( Ocak, **2014**).
- [69] Öksüzoğlu E, Diril N, Durusoy M., Mutagenic effects of plant growth hormones with the salmonella/microsome test and the SOS chromotest, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 65, 6:691-8, **2000**.

- [70] Boath, S.C., Welch, A.M., Garner, R.C., Some factors affecting mutant numbers in the Salmonella/microsome assay, *Carcinogenesis*, 1, 11, 911-923, **1980**.

# ÖZGEÇMİŞ

## Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Derya AKKURT  
Doğum Yeri : Ankara  
Medeni Hali : Bekar  
E-Posta : deryaakkurt@hacettepe.edu.tr  
Adresi : Tepebaşı Mahallesi Cura sok 9/12 Keçiören- Ankara

## Eğitim

Lise : Anıttepe Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi  
Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü

## Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : ileri (Advanced)

## İş Deneyimi

## Deneyim Alanları

## Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

## Tezden Üretilmiş Yayınlar

## Tezden Üretilmiş Tebliğ ve /veya Poster Sunumu İle Katıldığı Toplantılar