

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARBONİK ANHİDRAZ İNHİBİTÖRÜ
METİLENAMİNOBENZEN SÜLFONAMİT
TÜREVLERİNİN GENOTOKSİK PROFİLLERİNİN
BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Selen ŞEN

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Hüseyin AKSOY

Şubat 2018

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KARBONİK ANHİDRAZ İNHİBİTÖRÜ
METİLENAMİNOBENZEN SÜLFONAMİT
TÜREVLERİNİN GENOTOKSİK PROFİLLERİNİN
BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

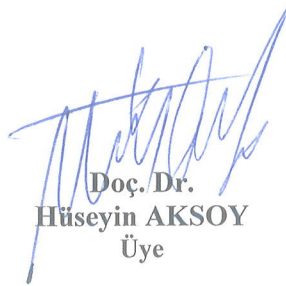
Selen ŞEN

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Bu tez 13/02/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.



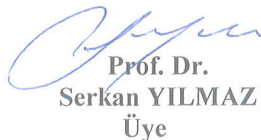
Prof. Dr.
Mustafa ARSLAN
Jüri Başkanı



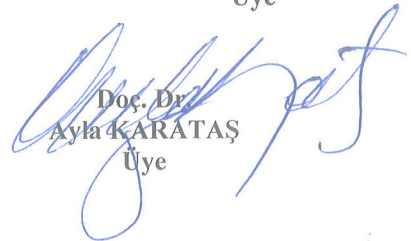
Doç. Dr.
Hüseyin AKSOY
Üye



Doç. Dr.
Nazan Deniz YÖN ERTUĞ
Üye



Prof. Dr.
Serkan YILMAZ
Üye



Doç. Dr.
Ayla KARATAŞ
Üye

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Selen ŞEN

13.02.2018

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren Danışman Hocam Doç.Dr. Hüseyin AKSOY'a ve çalışmamda kullandığım test maddelerini sentezleyerek temin etmemi sağlayan SAÜ Kimya Bölümü Organik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Mustafa ARSLAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında, destek ve yardımlarını gördüğüm Yrd.Doç.Dr. Ahmet Ali BERBER'e, yüksek lisans öğrencileri Betül AYGÜN'e ve Nihal GÜZEL'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında bana moral ve güç veren eşim Sinan ŞEN'e, varlığı hayatıma anlam katan biricik oğlum Kağan ŞEN'e ve her zaman yanımda olan değerli aileme teşekkür ederim.

Ayrıca bu çalışmanın maddi açıdan desteklenmesine olanak sağlayan Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje no: 2012-02-04-033) Komisyonu'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	xiii
SUMMARY	xiv
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2.	
GENEL BİLGİLER	4
2.1. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri.....	4
2.1.1. İnsan vücudunda katalizledikleri reaksiyonlar ve fizyolojik işlevleri.....	5
2.1.2. Üç boyutlu yapıları ve CO ₂ hidrataz aktivitelerinin mekanizması	8
2.1.3. Karbonik anhidraz inhibitörleri.....	10
2.2. Sülfonamidler	11
2.2.1. Kimyasal yapıları ve biyolojik aktiviteleri.....	12
2.2.2. Karbonik anhidraz inhibisyon mekanizmaları	13
2.2.3. Karbonik anhidraz inhibitörü sülfonamidler ve klinik kullanım alanları.....	15
2.3. Genotoksisite Testleri.....	22
2.3.1. Yeni ilaç geliştirme çalışmalarındaki yerleri ve önemleri	23
2.3.2. Kromozomal anormallikler (CA) testi	28

2.3.3. Mikronukleus (MN) testi.....	30
2.3.4. Tek hücre jel elektroforezi (komet) testi.....	31

BÖLÜM 3.

MATERYAL VE METOT	34
3.1. Materyal	34
3.1.1. Test maddeleri	34
3.1.2. Periferel kan	35
3.1.3. Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler	35
3.1.4. Çalışmalarda kullanılan çözeltiler.....	40
3.2. Metot	43
3.2.1. Kromozomal anormallik testi.....	43
3.2.1.1. Mitotik indeks ve kromozomal anormalliklerin incelenmesi	44
3.2.2. Mikronukleus testi.....	46
3.2.2.1. Mikronukleus frekansı ve nukleer bölünme indeksinin belirlenmesi.....	47
3.2.3. Tek hücre jel elektroforezi (komet) testi.....	49
3.2.4. İstatistiksel değerlendirme.....	51

BÖLÜM 4.

BULGULAR.....	52
4.1. 4-((4,4-Dimetil-2,6-dioksosikloheksiliden)metilamino)benzen Sülfonamit'in (2b) İnsan Periferel Kan Lenfositleri Üzerindeki Genotoksik Etkileri.....	52
4.1.1. Kromozomal anormallikler testinin bulguları.....	52
4.1.2. Mikronukleus testinin bulguları	62
4.1.3. Komet testinin bulguları.....	65
4.2. 4-((1,3-Dimetil-2,4,6-trioksotetrahidropirimidin-5(6H)-iliden) metilamino)benzen Sülfonamit (2e)'in İnsan Periferel Kan Lenfositleri Üzerindeki Genotoksik Etkileri.....	71
4.2.1. Kromozomal anormallikler testinin bulguları.....	71

4.2.2. Mikronukleus testinin bulguları	81
4.2.3. Komet testinin bulguları	84

BÖLÜM 5.

TARTIŞMA VE SONUÇ	89
-------------------------	----

KAYNAKLAR	101
-----------------	-----

ÖZGEÇMİŞ	121
----------------	-----



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

>	: Büyüktür
<	: Küçüktür
%	: Yüzde
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
AIDS	:Kazanılmış immün yetmezlik sendromu
AKK	: Asetil koenzim A karboksilaz
ATP	: Adenozin trifosfat
BN	: Binukleat)
CA	: Kromozomal anormallik
CBMN	: Sitokinezi bloklanmış mikronukleus
COM	: Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment
Cyt-B	: Sitokalsin B
dk	: Dakika
dL	: Desilitre
DNA	: Deoksiribonükleik asit
Ds	: Disentrik
DSB	: Çift zincir kırığı
F	: Fragment
gr	:Gram
HIV	: İnsan immün yetmezlik virüsü (Human Immunodeficiency Virus)
IC ₅₀	:Yarı maksimal inhibitör konsantrasyonu
ICH	: Uluslararası Uyum Konferansı

IR	: İnfared (kızılötesi)
KA	: Karbonik anhidraz
KAI	: Karbonik anhidraz inhibitörü
KARP	: Karbonik anhidraz ilişkili protein
Kkb	: Kardeş kromatidlerde birleşme
KKD	: Kardeş kromatid değişimi
Ktd	: Kromatid değişimi
Ktk	: Kromatid kırığı
Kzk	: Kromozom kırığı
M	: Molar
mg	: Miligram
Mİ	: Mitotik indeks
mL	: Mililitre
mm Hg	: Milimetre civa
MMC	: Mitomycin C
MN	: Mikronukleus
MSS	: Merkezi sinir sistemi
N	: Normal
Na	: Sodyum
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
OECD	: Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü
PK	: Piruvat karboksilaz
PT	: Piruvat taşıyıcı
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakikadaki devir sayısı (revolution per minute)
SMART	: Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi
SPSS	: Statistical package for the social sciences
SSB	: Tek zincir kırığı
Thr	: Treonin
TT	: Trikarboksilat taşıyıcı
Zn	: Çinko

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. KA izoenzimlerinin hücresel yerleşimleri ve aktivite düzeyleri.....	4
Şekil 2.2. KA izoenzimlerinin üç boyutlu yapısı	8
Şekil 2.3. KA izoenzimlerinin aktif bölgelerinin yapısı	9
Şekil 2.4. KA enziminin hidrataz aktivitesi	10
Şekil 2.5. Prontosil (4-[(2,4 diaminofenil)azo]benzen sülfonamit)'in kimyasal yapısı	11
Şekil 2.6. Prontosil'den sülfonilamit oluşum reaksiyonu	11
Şekil 2.7. Antibakteriyel sülfonamitlerin genel yapıları	12
Şekil 2.8. Sülfonamitlerin karbonik anhidraz inhibisyon mekanizması	14
Şekil 2.9. Gözün anatomik yapısı ve humör aközün gözdeki dolaşımı	15
Şekil 2.10. KA II ve IV izoenzimlerinin böbrek tübüllerindeki etki mekanizmaları	16
Şekil 2.11. Kanser hücrelerindeki pH regülasyonu ile iyon transportunun moleküler mekanizması	18
Şekil 2.12. Osteoklastik kemik rezorpsiyonunda KA II'nin rolü.....	20
Şekil 2.13. De novo lipogenez sürecine (HCO_3^-) sağlanmasında KA II, VA ve VB'nin rolü	21
Şekil 3.1. Metilenaminobenzen sülfonamit türevlerinin sentezi.....	34
Şekil 3.2. Kromozomal anormallikler tekniğinin uygulanışı.....	44
Şekil 3.3. Mikronukleus tekniğinin uygulanışı	47
Şekil 3.4. Komet tekniğinin uygulanışı.....	49
Şekil 4.1. 2b maddesinin 24 saat uygulaması ile oluşan kromatit kırığı.....	52
Şekil 4.2. 2b maddesinin 24 saat uygulaması ile oluşan fragment.....	52
Şekil 4.3. 2b maddesinin 24 saat uygulaması ile oluşan kromozom kırığı.....	52
Şekil 4.4. 24 saatlik 2b maddesi uygulamasında dozlara göre anormal hücre yüzdeleri.....	53

Şekil 4.5. 24 saatlik 2b maddesi uygulamasında anormal hücre yüzdelerinin doza bağlı ilişkisi.....	53
Şekil 4.6. 24 saatlik 2b maddesi uygulamasında dozlara göre hücre başına düşen anormallik sayıları	54
Şekil 4.7. 24 saatlik 2b maddesi uygulamasında hücre başına düşen anormallik sayılarının doza bağlı ilişkisi.....	54
Şekil 4.8. 24 saatlik 2b maddesi uygulamasında dozlara göre mitotik indeks değerleri.....	55
Şekil 4.9. 24 saatlik 2b maddesi uygulamasında mitotik indeks değerlerinin doza bağlı ilişkisi.....	55
Şekil 4.10. 2b maddesinin 48 saat uygulaması ile oluşan kromatit kırığı.....	56
Şekil 4.11. 2b maddesinin 48 saat uygulaması ile oluşan fragment	57
Şekil 4.12. 2b maddesinin 48 saat uygulaması ile oluşan kromozom kırığı.....	57
Şekil 4.13. 2b maddesinin 48 saat uygulaması ile oluşan kardeş kromatidlerde birleşme	57
Şekil 4.14. 2b maddesinin 48 saat uygulaması ile oluşan disentrik kromozom.....	58
Şekil 4.15. 48 saatlik 2b maddesi uygulamasında dozlara göre anormal hücre yüzdeleri	58
Şekil 4.16. 48 saatlik 2b maddesi uygulamasında anormal hücre yüzdelerinin doza bağlı ilişkisi.....	59
Şekil 4.17. 48 saatlik 2b maddesi uygulamasında dozlara göre hücre başına düşen anormallik sayıları	59
Şekil 4.18. 48 saatlik 2b maddesi uygulamasında hücre başına düşen anormallik sayılarının doza bağlı ilişkisi	60
Şekil 4.19. 48 saatlik 2b maddesi uygulamasında dozlara göre mitotik indeks değerleri.....	60
Şekil 4.20. 48 saatlik 2b maddesi uygulamasında mitotik indeks değerlerinin doza bağlı ilişkisi.....	61
Şekil 4.21. 2b maddesi uygulamasıyla oluşan 1 mikronukleuslu binukleat hücre	62
Şekil 4.22. 2b maddesi uygulamasıyla oluşan 2 mikronukleuslu binukleat hücre	62

Şekil 4.23. 2b maddesi uygulamasında dozlara göre mikronukleus frekansları	63
Şekil 4.24. 2b maddesi uygulamasında mikronukleus frekanslarının doza bağlı ilişkisi	63
Şekil 4.25. 2b maddesi uygulamasında dozlara göre nukleer bölünme indeksi değerleri.....	64
Şekil 4.26. 2b maddesi uygulamasında nukleer bölünme indeksi değerlerinin doza bağlı ilişkisi.....	64
Şekil 4.27. 2b maddesi ile muamele edilen insan lenfositlerinde hasarsız DNA'nın komet testi ile görünümü	65
Şekil 4.28. 2b maddesi ile muamele edilen insan lenfositlerinde az hasarlı DNA'nın komet testi ile görünümü	65
Şekil 4.29. 2b maddesi ile muamele edilen insan lenfositlerinde orta hasarlı DNA'nın komet testi ile görünümü	66
Şekil 4.30. 2b maddesi ile muamele edilen insan lenfositlerinde çok hasarlı DNA'nın komet testi ile görünümü	66
Şekil 4.31. 2b maddesi uygulamasında dozlara göre komet kuyruk uzunluğu değerleri.....	67
Şekil 4.32. 2b maddesi uygulamasında kuyruk uzunluğu değerlerinin doza bağlı ilişkisi	67
Şekil 4.33. 2b maddesi uygulamasında dozlara göre komet kuyruk momenti değerleri.....	68
Şekil 4.34. 2b maddesi uygulamasında kuyruk momenti değerlerinin doza bağlı ilişkisi	68
Şekil 4.35. 2b maddesi uygulamasında dozlara göre komet kuyruk yoğunluğu değerleri.....	69
Şekil 4.36. 2b maddesi uygulamasında kuyruk yoğunluğu değerlerinin doza bağlı ilişkisi	69
Şekil 4.37. 2e maddesinin 24 saat uygulaması ile oluşan kromatit kırığı	71
Şekil 4.38. 2e maddesinin 24 saat uygulaması ile oluşan fragment.....	71
Şekil 4.39. 2e maddesinin 24 saat uygulaması ile oluşan kromozom kırığı	71
Şekil 4.40. 2e maddesinin 24 saat uygulaması ile oluşan disentrik kromozom.....	72

Şekil 4.41. 24 saatlik 2e maddesi uygulamasında dozlara göre anormal hücre yüzdeleri	72
Şekil 4.42. 24 saatlik 2e maddesi uygulamasında anormal hücre yüzdelерinin doza bağlı ilişkisi.....	73
Şekil 4.43. 24 saatlik 2e maddesi uygulamasında dozlara göre hücre başına düşen anormallik sayıları	73
Şekil 4.44. 24 saatlik 2e maddesi uygulamasında hücre başına düşen anormallik sayılarının doza bağlı ilişkisi	74
Şekil 4.45. 24 saatlik 2e maddesi uygulamasında dozlara göre mitotik indeks değerleri.....	74
Şekil 4.46. 24 saatlik 2e maddesi uygulamasında mitotik indeks değerlerinin doza bağlı ilişkisi.....	75
Şekil 4.47. 2e maddesinin 48 saat uygulaması ile oluşan kromatit kırığı	76
Şekil 4.48. 2e maddesinin 48 saat uygulaması ile oluşan fragment.....	76
Şekil 4.49. 2e maddesinin 48 saat uygulaması ile oluşan kromatid değişimi	76
Şekil 4.50. 48 saatlik 2e maddesi uygulamasında dozlara göre anormal hücre yüzdeleri	77
Şekil 4.51. 48 saatlik 2e maddesi uygulamasında anormal hücre yüzdelерinin doza bağlı ilişkisi.....	77
Şekil 4.52. 48 saatlik 2e maddesi uygulamasında dozlara göre hücre başına düşen anormallik sayıları.....	78
Şekil 4.53. 48 saatlik 2e maddesi uygulamasında hücre başına düşen anormallik sayılarının doza bağlı ilişkisi.....	78
Şekil 4.54. 48 saatlik 2e maddesi uygulamasında dozlara göre mitotik indeks değerleri.....	79
Şekil 4.55. 2e maddesi uygulamasında mitotik indeks değerlerinin doza bağlı ilişkisi	79
Şekil 4.56. 2e maddesi uygulamasıyla oluşan 1 mikronukleuslu binukleat hücre.	80
Şekil 4.57. 2e maddesi uygulamasında dozlara göre mikronukleus frekansları	81
Şekil 4.58. 2e maddesi uygulamasında mikronukleus frekanslarının doza bağlı ilişkisi	81

Şekil 4.59. 2e maddesi uygulamasında dozlara göre nukleer bölünme indeksi değerleri.....	82
Şekil 4.60. 2e maddesi uygulamasında nukleer bölünme indeksi değerlerinin doza bağlı ilişkisi.....	82
Şekil 4.61. 2e maddesi ile muamele edilen insan lenfositlerinde hasarsız DNA'nın komet testi ile görünümü	83
Şekil 4.62. 2e maddesi ile muamele edilen insan lenfositlerinde az hasarlı DNA'nın komet testi ile görünümü	84
Şekil 4.63. 2e maddesi ile muamele edilen insan lenfositlerinde orta hasarlı DNA'nın komet testi ile görünümü	84
Şekil 4.64. 2e maddesi ile muamele edilen insan lenfositlerinde çok hasarlı DNA'nın komet testi ile görünümü	84
Şekil 4.65. 2e maddesi uygulamasında dozlara göre komet kuyruk uzunluğu değerleri.....	85
Şekil 4.66. 2e maddesi uygulamasında dozlara göre komet kuyruk uzunluğu değerlerinin doza bağlı ilişkisi	85
Şekil 4.67. 2e maddesi uygulamasında dozlara göre komet kuyruk momenti değerleri.....	86
Şekil 4.68. 2e maddesi uygulamasında dozlara göre komet kuyruk momenti değerlerinin doza bağlı ilişkisi	86
Şekil 4.69. 2e maddesi uygulamasında dozlara göre komet kuyruk yoğunluğu değerleri.....	87
Şekil 4.70. 2e maddesi uygulamasında dozlara göre komet kuyruk yoğunluğu değerlerinin doza bağlı ilişkisi	87

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 4.1. 2b maddesinin 24 saat uygulaması ile insan periferal lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler	51
Tablo 4.2. 2b maddesinin 48 saat uygulaması ile insan periferal lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler	56
Tablo 4.3. 2b maddesinin mikronukleus frekansları ve nukleer bölünme indeksi üzerine etkileri.....	61
Tablo 4.4. İnsan lenfositlerinin 2b maddesine <i>in vitro</i> maruziyeti sonrası oluşan DNA hasarı	65
Tablo 4.5. 2e maddesinin 24 saat uygulaması ile insan periferal lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler	70
Tablo 4.6. 2e maddesinin 48 saat uygulaması ile insan periferal lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler	75
Tablo 4.7. 2e maddesinin mikronukleus frekansları ve nukleer bölünme indeksi üzerine etkileri.....	80
Tablo 4.8. İnsan lenfositlerinin 2e maddesine <i>in vitro</i> maruziyeti sonrası oluşan DNA hasarı	83

ÖZET

Anahtar kelimeler: Genotoksisite, İnsan Periferal Kan Lenfositleri, Karbonik Anhidraz İnhibitörü, Kromozomal Anormallik, Mikronukleus, Sülfonamit, Tek Hücre Jel Elektroforezi

Bu çalışmada, ilaç etken maddeleri olarak kullanılma potansiyeline sahip olabilecekleri düşünülerek sentezlenmiş ve insan karbonik anhidraz I, II izoenzimlerini inhibe ettikleri tespit edilmiş 4-((4,4-dimetil-2,6-dioksosikloheksiliden)metilamino)benzen sülfonamit (2b) ve 4-((1,3-dimetil-2,4,6-trioksotetrahidropirimidin-5(6H)-iliden)metilamino)benzen sülfonamit (2e) bileşiklerinin genotoksik profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, insan periferal kan lenfositlerinde kromozomal anormallik (CA), mikronukleus (MN) ve komet testleri uygulanmıştır.

Bu *in vitro* testlerde, 2b'nin 2,12, 1,06, 0,53 µg/mL'lik konsantrasyonları ve 2e'nin 2,52, 1,26, 0,63 µg/mL'lik konsantrasyonları kullanılmıştır. Ayrıca tüm testlerde negatif, pozitif ve çözücü kontroller kullanılmıştır. 2b ve 2e ile yapılan uygulamalarda, CA ve MN oluşumu bakımından hem negatif kontrole hem de çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmemiştir. 2b ile 48 saatlik uygulamada, mitotik indeks tüm konsantrasyonlarda her iki kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşmüştür. 2e ile 48 saatlik uygulamada, mitotik indeks tüm konsantrasyonlarda çözücü kontrole göre anlamlı düzeyde düşmüş; negatif kontrole göre ise sadece 2,52 µg/mL'lik konsantrasyonda anlamlı düzeyde düşmüştür. Komet testinde, 2b ve 2e'nin kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti bakımından farklı cevaplar oluşturduğu gözlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, yeni sülfonamit türevlerinin yüksek konsantrasyonlarda ve uzun süre maruziyette insan periferal lenfositleri üzerinde sitotoksik olduğunu ancak genotoksik olmadığını göstermektedir.

DETERMINATION OF GENOTOXIC PROFILES OF METHYLAMINO BENZENE SULFONAMIDE DERIVATIVES AS CARBONIC ANHYDRASE INHIBITOR

SUMMARY

Keywords: Genotoxicity, Human Peripheral Blood Lymphocytes, Carbonic Anhydrase Inhibitor, Chromosomal Aberration, Micronucleus, Sulfonamid, Single Cell Gel Electrophoresis

In the present study, it was aimed to assess the genotoxic profiles of 4-((4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene) methylamino)benzene sulfonamide (2b) and 4-((1,3-dimethyl-2,4,6-trioxo-tetrahydropyrimidin-5(6H)ylidene)methylamino)benzene sulfonamide (2e) compounds which were synthesized considering that they may have utilisation potentials as drug basic matters and detected to inhibit human carbonic anhydrase I, II isoenzymes. For this purpose, chromosomal aberration (CA), micronucleus (MN) and comet tests were implemented on the human peripheral blood lymphocytes.

In these *in vitro* assays: 2,12, 1,06, 0,53 $\mu\text{g/mL}$ concentrations of 2b and 2,52, 1,26, 0,63 $\mu\text{g/mL}$ concentrations of 2e were used. Additionally, negative, positive and solvent controls were used in all assays. In treatments which were performed with 2b and 2e, no statistically significant differences was observed in terms of CA and MN formation compared to both negative control and the solvent control. In 48 hour treatment with 2b, mitotic index has significantly decreased in all concentrations when compared to both control groups. In 48 hour treatment with 2e, mitotic index significantly decreased in all concentrations compared to solvent control; however when compared to negative control it significantly decreased in only 2,52 $\mu\text{g/mL}$ concentration. In comet assay, it was observed that 2b and 2e have elicited different responses regarding the tail length, tail intensity and tail moment.

Obtained results show that novel sulfonamide derivatives are cytotoxic on human peripheral lymphocytes at high concentrations and in long-term exposure but they are not genotoxic.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Günümüz ilaç pazarında binlerce ilaç mevcut olmasına rağmen, yeni ilaç geliştirme çalışmaları sürekli olarak artmaktadır. Bir yandan, piyasadaki bazı ilaçların terapötik etkileri iyileştirilmiş ve yan etkileri azaltılmış varyantları sentezlenmeye çalışılmaktadır. Diğer yandan, bazı hastalıklar için farklı farmakolojik mekanizmalarla etki eden yeni ilaçlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Ayrıca, bakteriler mevcut antibiyotiklere karşı zamanla direnç kazandığından ve hayatı tehdit eden enfeksiyonların sıklığı ile çeşidi gün geçtikçe arttığından, antimikrobiyal aktivite gösteren yeni ilaçlar aranmaktadır. Bunların yanısıra, kanser ve AIDS gibi henüz kesin tedavisi olmayan hastalıklarda kullanılacak etkili ilaçlar da aranmaktadır [1, 2, 3, 4].

Yeni ilaçların geliştirilmesinde kullanılan yaklaşımlardan biri, hastanın yararı için vücudunda değiştirilmesi gereken fizyolojik veya patolojik süreçlerde rol oynayan biyolojik moleküllerin ilaç hedefi olarak seçilmesi, kimyasal yapılarının incelenmesi ve inceleme sonuçlarına göre bunlarla etkileşebilecek kimyasal maddelerin tasarlanıp sentez edilmesidir [5]. İnsan vücudunda, ilaç hedefi olarak seçilebilen biyolojik moleküller: enzimler, substratlar, metabolitler, proteinler, reseptörler, iyon kanalları, transport proteinleri, DNA/RNA, ribozom ve monoklonal antikorlardır. Bu hedeflerin en değerlisi enzimlerdir. Çünkü, insan genomu tarafından kodlanan yüzlerce enzim vardır ve enzimlerin aktivitelerinin düzenlenmesiyle birçok hastalık tedavi edilebilmektedir. Günümüzde, onaylanmış ilaçların hedefi olan 66 tane insan enzimi vardır. Enzimler, bilinen ilaç hedeflerinin yaklaşık % 40'ını oluşturmaktadır [6].

Geçmişten günümüze, ilaç hedefi olarak çok ilgi çeken enzim ailelerinden biri, karbonik anhidraz (KA)'lardır. KA'lar aktif bölgelerinde çinko (Zn^{+2}) iyonu içeren

metaloenzimlerdir [7, 8, 9]. Bugüne kadar, insanlarda 12 KA izoenzimi (KA I, II, III, IV, VA, VB, VI, VII, IX, XII, XIII, XIV) ve 3 KA bağlantılı protein (KARP VIII, X, XI) tanımlanmıştır [10, 11, 12, 13, 14]. Eritrosit, akciğer, böbrek, göz, gastrik mukoza, tükürük bezleri, ince bağırsak, kolon, kaslar, beyin, pankreas, prostat ve endometrium gibi birçok insan dokusundan izole edilen KA'ların katalizledikleri en önemli reaksiyon, karbondioksitin (CO_2) geri dönüşümlü olarak bikarbonata (HCO_3^-) hidratasyonudur: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ [15, 16, 17, 18, 19, 20, 21]. Katalizledikleri bu reaksiyon sayesinde KA izoenzimleri; solunum, $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ 'ün dokular ile akciğer arasında taşınması, pH ve CO_2 homeostazisinin sağlanması, çeşitli doku ve organlardan elektrolit sekresyonu yapılması, bazı biyosentetik reaksiyonlar için HCO_3^- sağlanması, vücut sıvılarının üretilmesi, kemik yıkımı ve tümörleşme gibi insan vücudundaki birçok kritik fizyolojik veya patolojik sürecin gerçekleşmesinde rol oynarlar [12, 15, 16, 22].

İnsan dokularında, önemli fizyolojik/patolojik süreçlerde rol oynamaları ve yaygın dağılım göstermeleri gibi sebeplerle ilaç tasarımında dikkat çekici terapötik hedefler olan KA izoenzimlerini inhibe eden farmakolojik ajanlara, karbonik anhidraz inhibitör (KAİ)'leri denir. Bilinen en güçlü organik KAİ'leri, sülfonamid fonksiyonel grubunu ($-\text{SO}_2\text{NH}-$) içeren ve sülfonamidler olarak adlandırılan ilaç sınıfıdır [6, 23]. KAİ sülfonamidler diüretik, antiglokoma ve antiepileptik ajan olarak uzun yıllardır klinik kullanımda olan oldukça etkili ilaçlardır. Ancak, bu ilaçların KA izoenzim seçicilikleri olmadığından, insanlar üzerinde ciddi sistemik yan etkiler oluşturmaktadırlar. Bu nedenle, ödem, glokoma ve epilepsi tedavisinde kullanılabilecek, izoenzim seçiciliği olan yeni KAİ sülfonamid türevi ilaçların senteziyle ilgili çalışmalar günümüzde halen devam etmektedir. Ayrıca son yıllarda, bazı KA izoenzimlerinin kanser, obezite, osteoporoz gibi hastalıklarının patofizyolojisi ile patogeneğinde rol oynadığı anlaşılmıştır. Dolayısıyla, bu hastalıklarla ilişkili KA izoenzimlerine spesifik olan yeni KAİ sülfonamid türevi ilaç etken maddelerinin senteziyle ilgili çalışmalar da yapılmaktadır [6, 9].

Yeni sentezlenen sülfonamid türevleri gibi bileşiklerin *in vitro* testlerde KA enzim inhibisyonu gibi anlamlı biyolojik aktiviteler göstermesi, bunların ilaç olarak

önerilebilmeleri için yeterli değildir. Kemoterapide esas, hastayı sağlık riskleri oluşturmadan tedavi etmek olduğundan, ilaçların güvenilirlikleri etkinliklerinden daha önemlidir. Bu nedenle, ilaç olarak kullanılması düşünülen kimyasal bileşikler, insanlar üzerinde kullanılmadan önce kapsamlı toksisite incelemelerinden geçirilir. Canlı deney hayvanları, izole organlar ve hücre kültürleri üzerinde yürütülen ve birer güvenlik testi niteliğinde olan toksisite incelemeleri ile aday ilaçların akut, subakut, kronik, subkronik, immunotoksik, nörotoksik, teratojenik, reproduktif toksisite, genotoksisite ve karsinojenite gibi etkileri araştırılır. Toksikolojik incelemelerin basamaklarından biri olan genotoksisite araştırmalarında, ilaçların genetik materyal üzerindeki olası zararları değerlendirilir. Genotoksisite araştırmalarının yapılması, ilaç geliştirmede çok önemli bir ilkedir. Çünkü, genotoksik etkili ajanların neden olduğu genetik hasarlar doğum defektleri, infertilite, kanser, diyabet, kardiyovasküler, immun sistem ve dejeneratif hastalıkların oluşumunda rol oynamaktadır [24, 25, 26, 27, 28, 29].

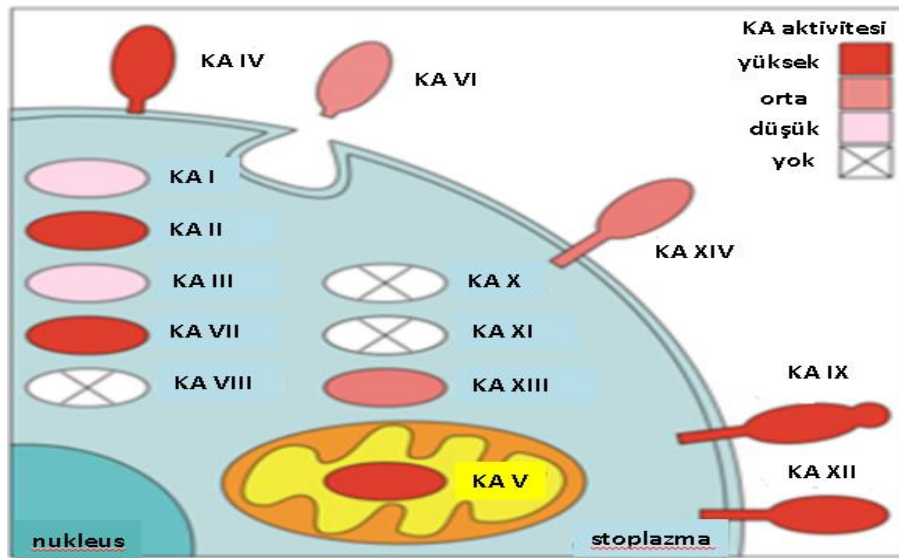
İlaçların, insanlar üzerinde kullanılmadan önceki genotoksik ve karsinojenik profillerinin belirlenmesinde *in vivo* veya *in vitro* olarak uygulanabilen kısa süreli genotoksisite testlerinden yararlanılır. Bu testler arasında kromozomal anormallikler (CA), mikronukleus (MN) ve komet testleri bulunmaktadır. *İn vitro* koşullarda yapılan CA, MN ve komet testlerinde, model hücre olarak çoğunlukla insan kanından izole edilen periferik kan lenfositleri kullanılmaktadır [26, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37].

Yukarıda verilen bilgiler doğrultusunda, bu tez çalışması kapsamında; ilaç etken maddeleri olarak kullanılma potansiyeline sahip olabilecekleri düşünülerek sentezleri ile KA I ve KA II enzim inhibitör aktivite belirlemeleri Sakarya Üniversitesi Kimya Bölümü'nde yapılmış metilenaminobenzen-sülfonamid türevlerinden 4-((4,4-dimetil-2,6-dioksosikloheksiliden)metilamino)benzen sülfonamid (2b) ve 4-((1,3-dimetil-2,4,6-triokso-tetrahidropirimidin-5(6H)-iliden) metilamino)benzen sülfonamid (2e) bileşiklerinin genotoksik potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, insan periferik kan lenfositleri üzerinde yapılan CA, MN ve komet testleri kullanılmıştır.

BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri

İnsanlarda bulunan KA'lar içinde aynı reaksiyonu katalizleyen ancak farklı kimyasal ve fiziksel özellikleri olan izoenzimler bulunur [38, 39, 40, 41, 42, 43]. İnsanlarda 12 KA izoenzimi ve 3 KA bağlantılı protein (KARP) tanımlanmıştır. KA I, II, III, IV, VA, VB, VI, VII, IX, XII, XIII ve XIV katalitik olarak aktif; KARP VIII, X ve XI katalitik olarak inaktif olan izoenzimlerdir. KARP'lerin inaktif olmaları, enzim aktivitesi için gerekli olan histidin bakiyelerini yapılarında bulundurmamalarından kaynaklanır. Aktif KA'ların substratlarına ve inhibitörlerine karşı ilgileri, katalitik aktiviteleri, aminoasit sayıları/sıraları, dokulardaki dağılımları ve hücresel yerleşimleri birbirinden farklıdır. KA I, II, III, VII, XIII sitozolde, KA IV, IX, XII, XIV membrana bağlı, KA VA ve VB mitokondride bulunur (Şekil 2.1.). Salgısal olan KA VI, tükürük ve süte salgılır. Genellikle bir dokuda birçok KA izoenzimi birlikte bulunur [8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16].



Şekil 2.1. KA izoenzimlerinin hücresel yerleşimleri ve aktivite düzeyleri [44]

2.1.1. İnsan vücudunda katalizledikleri reaksiyonlar ve fizyolojik işlevleri

Bugüne kadar, birçok insan dokusundan izole edilen KA izoenzimlerinin katalizledikleri en önemli reaksiyonlar, CO₂'nin hidratasyonu ve HCO₃⁻ iyonunun dehidratasyonudur: CO₂ + H₂O → HCO₃⁻ + H⁺ → H₂CO₃ → CO₂ + H₂O [19,20, 21]. Katalizledikleri bu reaksiyonlar sayesinde KA izoenzimleri; solunum, pH dengesinin kontrolü, CO₂ ve HCO₃⁻'ün dokular ile akciğer arasındaki transportu, CO₂ homeostazisinin sağlanması, sıvı dengesinin korunması, bazı dokulardan elektrolit sekresyonu yapılması, substrat olarak HCO₃⁻ gerektiren biyokimyasal reaksiyonların (glukoneogenez, lipogenez, ürojeniz, pirimidin ve aminoasit biyosentezi) gerçekleşmesi, vücut sıvılarının (humör aköz, beyin-omurilik sıvısı, gastrik sıvı) üretimi, kemik yıkımı, kalsifikasyon ve tümörleşme gibi insan vücudundaki birçok kritik fizyolojik veya patolojik sürecin gerçekleşmesinde rol oynarlar [12, 15, 16, 45, 46]. Ayrıca KA'lar; karbamik asitin siyanata, siyanamitin üreye, aldehitin geminal diole hidratasyonu; aldehit, piruvat ve alkil piruvatların hidratasyonu; karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizi gibi süreçleri de kataliz ederler. Ancak KA'ların katalizlediği bu reaksiyonların fizyolojik öneminin ne olduğu henüz bilinmemektedir [46].

KA I izoenzimi, eritrositlerde hemoglobinden sonra en bol bulunan proteindir. Eritrositlerde KA II 'ye göre beş kat daha fazla bulunmasına rağmen, katalitik aktivitesi KA II 'nin sadece % 15'i kadardır [47]. KA I, eritrositler dışında; kapiller ve korneal endotel, göz lensi, ince bağırsak ve özofagus epitel, adipöz doku, pankreas, ter bezleri, nötrofiller, adrenal bezler, plsentta ve fetal membranlarda da bulunmuştur. İzoenzimler arasında katalitik aktivitesi ve ifade düzeyi en yüksek olan KA II ise, hemen hemen tüm insan dokularında saptanmıştır [46]. Eritrositlerde bulunan KA II, KA I ve IV ile birlikte, doku kılcallarında metabolizma sonucu oluşan CO₂'nin H₂CO₃'e dönüşmesi, akciğer kılcallarında ise H₂CO₃'ün CO₂'ye dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek solunumda görev alır [48]. Sindirim sisteminde bulunan KA II, parotis ve submandibuler bezlerin seröz asiner hücrelerinden, özofagus, mide ve duodenumun yüzey epitel hücrelerinden HCO₃⁻ salınımını sağlayarak mukozaların asit sindiriminden korunmasında rol oynar.

Hepatositlerde ve safra kanallarını döşeyen epitelde bulunan KA II, HCO_3^- sekresyonunu sağlayarak safra sıvısının nötralizasyonunda rol oynar [46]. Beynin koroid pleksusunda bulunan KA II, beyin omurilik sıvısı (BOS)'nın iyonik bileşiminin ve pH'sının ayarlanmasında rol oynar. Renal tübül hücreleri ile toplayıcı kanalların interkalar hücrelerinde bulunan KA II, vücut sıvı hacminin ve asit-baz dengesinin regülasyonunda görev alır. Kemik dokudaki osteoklastlarda bulunan KA II, kemik yıkımı için gerekli olan H^+ iyonlarını tedarik ederek demineralizasyon sürecini uyarır [6, 49].

KA III, CO_2 hidrataz aktivitesi en düşük olan (KA I izoenziminin % 3'ü kadar) izoenzimidir [50]. KA III geni, KA I ve KA II genleri gibi 8. kromozom üzerindedir [51]. İnsanlarda, iskelet kası ve yağ doku hücrelerinde bulunmuştur. Katalitik aktivitesinin çok düşük olması nedeniyle, bu izoenzimin birincil görevinin pH'ın düzenlenmesi olmadığı bildirilmiştir. Geni, 17. kromozomda olan KA IV eritrositlerde, ince ve kalın bağırsağın epitel hücrelerinin apikal plazma zarlarında, gastrointestinal sistemin bütün segmentlerinin mukoza altı kapiller endotelinde ve erkek üreme sistemindeki epididimal kanalda bulunmuştur. Bu bölgelerdeki KA IV, iyon ve H_2O transportunda görev alır. Gözün koriokapillerinin endotel hücrelerinde de bulunan KA IV, KA II ve XII ile birlikte göz içi sıvısının oluşumunda; böbrekteki proksimal tübülde ve henle kulbunda bulunan KA IV ise HCO_3^- reabsorbsiyonunda rol oynar [46].

Mitokondriyel matrikste lokalize olması ile KA'lar içerisinde farklı bir yere sahip olan KA V geni 16. kromozom üzerindedir. KA V'in iki farklı izoformundan biri olan KA VA karaciğer ve çizgili kaslarda; KA VB ise beyin, kalp, karaciğer, akciğer, böbrek, dalak, bağırsak, testis, çizgili kaslarda bulunmuştur [52, 53]. Bu izoenzimler, adipositler ve sinir sisteminde de saptanmıştır [54]. KA V izoenzimleri, KA II ile birlikte; lipogenez, ürogenez, pirimidin sentezi, glukoneogenez ve aminoasit biyosentezi gibi metabolik süreçlerdeki karboksilasyon olaylarını katalizleyen enzimler için gerekli olan HCO_3^- iyonlarını sağlar [55]. Geni, 1. kromozom üzerinde bulunan KA VI tükürük, meme, lakrimal, nasal, trakebronşial bezlerde, özofagus, sindirim sistemi ve serumda bulunur. KA VI'nın fizyolojik rolü henüz net olarak

anlaşılamamıştır. Ancak, tükürük bezlerindeki KA VI'nın dişlerin çürükten korunmasında; gastrointestinal kanaldaki KA VI'nın ise özofagus ve gastrik epitelin yüksek asit seviyesinden korunmasında rol oynadığı bildirilmiştir [46]. Geni 16. kromozom üzerinde bulunan KA VII, en az incelenen ve anlaşılan izoenzimidir. KA VII ifadesi, insan tükürük bezlerinde saptanmıştır [56].

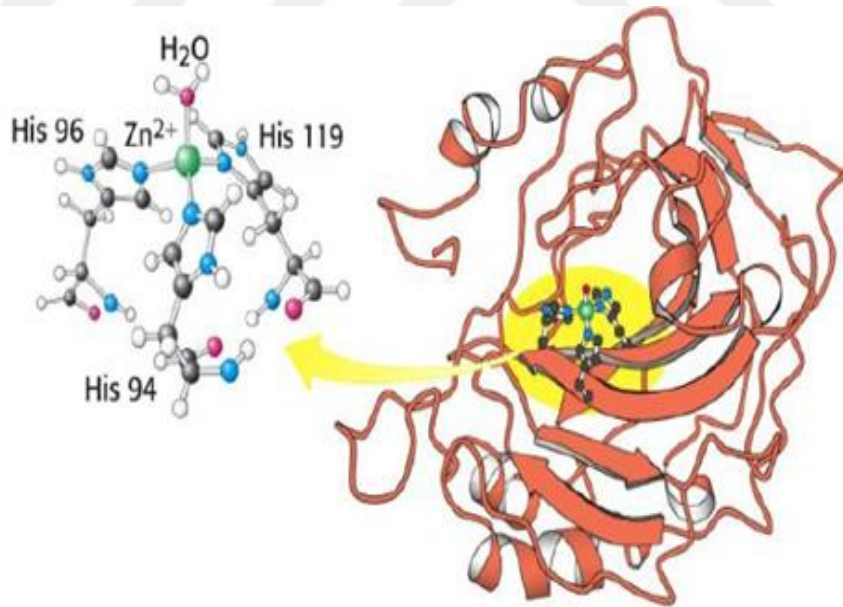
KA IX geni, 17. kromozom üzerindedir. Mide, safra kesesi, bağırsak, pankreas, safra kanalları, özofagus, serviks ve erkek üreme organlarında KA IX'un ifadesi normal düzeyde bulunmuştur [46]. Tümör hücre serileri üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda özofagus, akciğer, böbrek, kolon ve rektum, göğüs, serviks, baş ve boyun ve mesane gibi çeşitli organlardan türeyen karsinomlarda KA IX ifadesinin aşırı yüksek olduğu belirlenmiştir [57, 58, 59, 60, 61]. Ayrıca beyin dokusundaki normal ekspresyonu ihmal edilecek kadar az olan KA IX'un, malign beyin tümörlerinde de ifadesi yüksek bulunmuştur [62, 63]. KA XII geni, 15. kromozom üzerindedir. Böbrek, kolon, pankreas, over, akciğer, prostat, testis, beyin, erkek üreme sistemi, endometriyum, serviks ve rektum hücrelerinde KA XII'nin ifadesi normal düzeyde bulunmuştur. Tümör hücre serileri üzerinde yapılan çalışmalarda böbrek, over ve kolorektal kanserlerde KA XII ifadesinin aşırı yüksek olduğu gözlenmiştir. Günümüzde, KA IX ve KA XII'nin onkogenез ve tümör gelişiminde rol oynadığı aydınlatılmıştır [64, 65, 66].

Timüs, ince bağırsak, dalak, prostat, yumurtalık, kolon, testis, serviks, endometriyum gibi insan dokularında saptanmış ve son yıllarda karakterize edilmiş bir izoenzim de KA XIII'tür. Bu izoenzimin fonksiyonu hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır [46, 67]. Ancak, üreme sisteminde yoğun olarak bulunması nedeniyle, fertilizasyon sürecinde rol oynadığı sanılmaktadır [46]. Geni 1. kromozom üzerinde olan KA XIV de böbrek, kalp, beyin, iskelet kası ve karaciğer gibi birçok insan dokusunda bulunmuştur. Böbrekte bulunan KA XIV'ün, KA IV ve KA II ile birlikte idrar asidifikasyonunda rol oynadığı bildirilmiştir [68, 69]. İmmunohistokimyasal çalışmalar, beyinde özellikle aksonlarda ve nöronal membranlarda lokalize olan KA XIV'ün, sinaptik geçişlerde etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca, santral sinir

sisteminde bulunan KA XIV'ün KA II ile IV ile birlikte miyelin ve BOS sentezi, salgısı ile nöronal aktivitenin kontrolünde rol oynadığı bildirilmiştir [70,71].

2.1.2. Üç boyutlu yapıları ve CO₂ hidrataz aktivitelerinin mekanizması

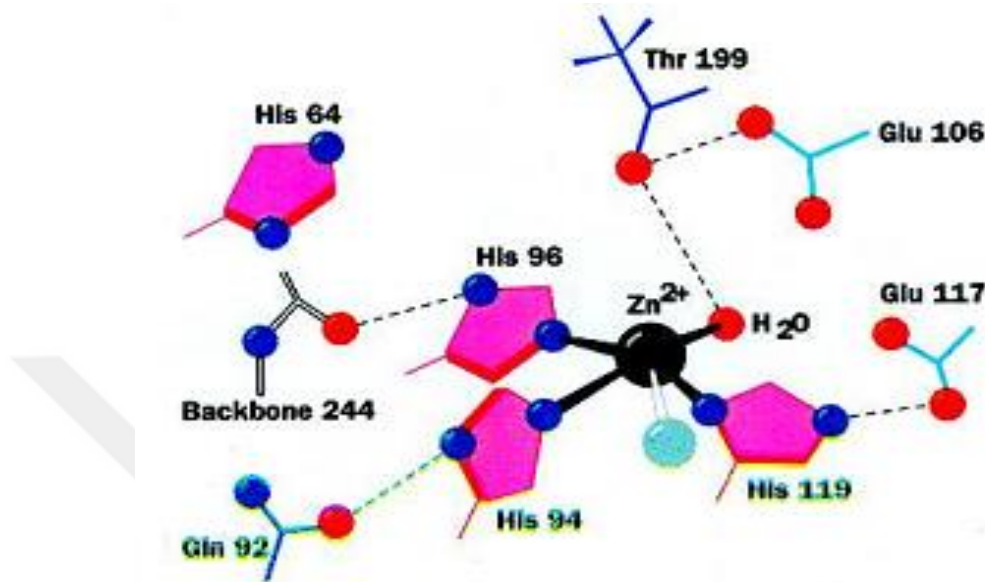
KA izoenzimlerinin üç boyutlu yapıları, X ışını kristallografi çalışmaları aracılığıyla aydınlatılmıştır. Yapısı en ayrıntılı şekilde aydınlatılan KA II olmuştur. Bu çalışmalar sonucunda, tüm KA izoenzimlerinin üç boyutlu yapıları yönünden birbirine çok benzediği ve hepsinin aktif bölgelerinde hemen hemen aynı katalitik grupların bulunduğu ortaya konmuştur [72]. Tüm KA izoenzimlerinin aktif bölgelerinde, bir Zn²⁺ iyonu bulunur. Enzimatik olarak aktif olan tüm KA izoenzimlerinde Zn²⁺ iyonu, bir tane H₂O veya OH⁻ iyonu ile üç tane histidin aminoasit rezidüsü (His 94, His 96, His 119) tarafından koordine edilir (Şekil 2.2.). Aktif bölge yakınında bulunan aminoasitler, proton verici ve proton gradienti oluşturacak şekilde düzenlenir [73].



Şekil 2.2. KA izoenzimlerinin 3 boyutlu yapısı [74]

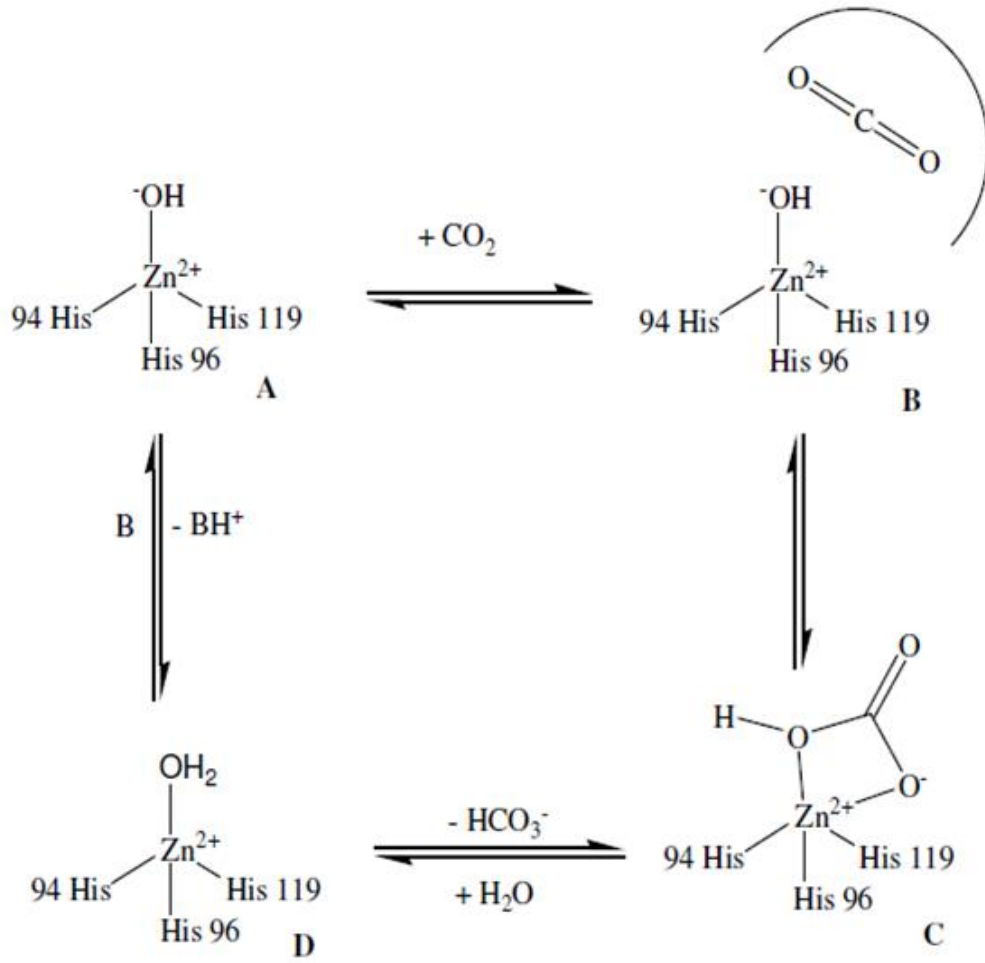
Enzimin aktif bölgesinde Zn²⁺ iyonu ile koordine olan H₂O, aynı zamanda Treonin (Thr) 199 aminoasit bakiyesinin hidroksil kısmı ile hidrojen bağı oluşturur. Thr 199, glutamik asit (Glu) 106 aminoasit bakiyesinin karboksilat kısmı ile de bağlıdır (Şekil

2.3.). Bu etkileşimler, Zn^{2+} ile koordine olan H_2O molekülünün nükleofil karakterini artırması ve karbonik anhidrazın substratı olan CO_2 'yi nükleofilik atak için uygun konuma yönlendirmesi açısından önemlidir [73].



Şekil 2.3. KA izoenzimlerinin aktif bölgelerinin yapısı [75]

KA'ların CO_2 hidrataz aktivitelerinin mekanizması, KA II izoenzimi üzerinde yapılmış enzim kinetiği çalışmalarıyla ayrıntılı bir şekilde aydınlatılmıştır. Bütün izoenzimlerin, genellikle bu mekanizma ile çalıştığı bildirilmiştir. Şekil 2.4.'de verilen mekanizmaya göre; KA'nın aktif bölgesinde bulunan Zn^{+2} katyonuna bağlı H_2O molekülünün protonlarından (H^+) biri, KA'nın baz olarak davranan kısmı tarafından koparılır. Bu reaksiyonun gerçekleşmesine, His 64 gibi aktif bölgedeki proton yakalayan bakiyeler ve ortamdaki tampon bölgeler yardımcı olur. Böylece, H_2O bir H^+ kaybeder ve hidroksit (OH^-) iyonu oluşur. Zn^{+2} iyonuna bağlı OH^- iyonunun oluşmasıyla, KA enziminin aktif formu meydana gelir (Şekil 2.4.A). Enzimin aktif formu, güçlü neofilik yapısı nedeniyle CO_2 molekülü ile tepkimeye girer (Şekil 2.4.B). Bu etkileşim, Zn^{+2} 'ye bağlanmış HCO_3^- iyonunun oluşmasını sağlar (Şekil 2.4.C). Bu HCO_3^- iyonu, bir H_2O molekülü ile yer değiştirir ve çözeltiliye geçer. Böylece, Zn^{+2} iyonuna tekrar H_2O molekülü bağlanır. Bu durum, enzimin katalitik olarak inaktif olan formuna dönüşmesini sağlar (Şekil 2.4.D) [73, 74, 75].



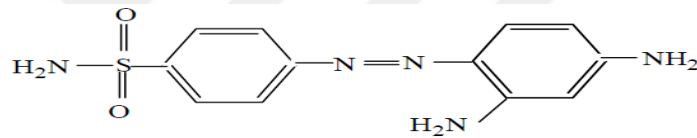
Şekil 2.4. KA enziminin hidrataz aktivitesi [76]

2.1.3. Karbonik anhidraz inhibitörleri

İnsan vücudunda yaygın dağılım göstermeleri, önemli fizyolojik/patolojik süreçlerde rol oynamaları ve kataliz mekanizmalarının iyi aydınlatılması gibi nedenlerle KA izoenzimleri geçmişten günümüze ilaç tasarımında dikkat çekici hedefler olmuşlardır [77]. KA izoenzimlerini inhibe ederek, bazı insan hastalıklarının tedavi edilmesini sağlayan farmakolojik ajanlara karbonik anhidraz inhibitörleri (KAİ) denir [78]. Bilinen en güçlü organik KAİ'leri, sülfonamidlerdir. Bu nedenle, KAİ ilaçların senteziyle ilgili çalışmalarda motif olarak en çok sülfonamidler kullanılmıştır. Günümüzde, uzun yıllardır klinik kullanımda olan sülfonamid türevi ilaçlar mevcut olmasına rağmen, yeni KAİ sülfonamidlerin sentezine yönelik çalışmalar halen devam etmektedir [23].

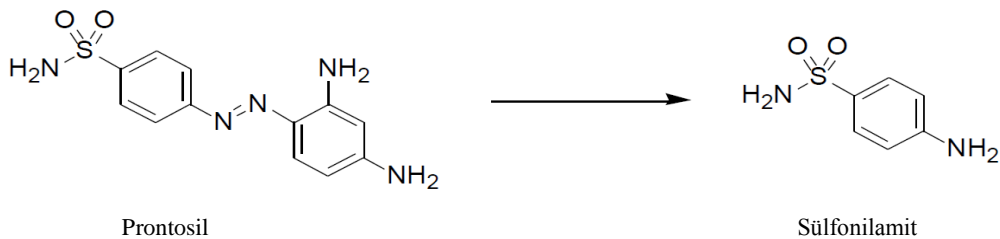
2.2. Sülfonamitler

1900'lerin başlarında, tekstil sektöründe kullanılan bazı azo boyalarının konak dokularındaki zararlı mikroorganizmaları yok ettiği anlaşılmıştır. Bu doğrultuda süren araştırmalar sonucunda, 1909 ve 1935 yılları arasında çeşitli boyaları içeren binlerce kimyasal madde antimikrobiyal özellikleri açısından test edilmiştir. 1932'de, Bayer firmasından Gerhard Domagk, aynı firmanın kimyacılarından Klarer ve Mietzsch'in sentezlediği azo boyalarından Prontosil rubrum'un antibakteriyel etkisini araştırmıştır. Bu boyanın hücre kültürlerinde etkisiz olduğunu; ancak *in vivo* koşullarda farelerdeki bazı bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde etkili olduğunu bulmuştur. Bazı bakteriyel enfeksiyonları etkili bir şekilde yok eden bu ilk ilaca, Bayer Firması Prontosil adını vermiştir (Şekil 2.5.) [78, 79, 80].



Şekil 2.5. Prontosil (4-[(2,4 diaminofenil)azo]benzenesülfonamid)'in kimyasal yapısı [81]

Prontosil'in *in vivo* olarak aktif, ancak *in vitro* olarak aktif olmaması, onun aktif ilaç olmadığını düşündürmüştür [82]. 1936'da, prontosil'in N=N bağının biyotransformasyon sonucu kırıldığı ve organizmada para-amino benzen sülfonamid (sülfonilamid)'e dönüşerek antibakteriyel etkinlik gösterdiği saptanmıştır. Böylece, prontosil içindeki aktif maddenin para-amino benzen sülfonamid (4-aminobenzenesülfonamid, sülfonilamid) olduğu anlaşılmıştır. Sülfonilamid, benzen halkası üzerinde amino grubu (-NH₂) ve sülfonamid grubu (-SO₂NH₂) içermektedir (Şekil 2.6.) [81].

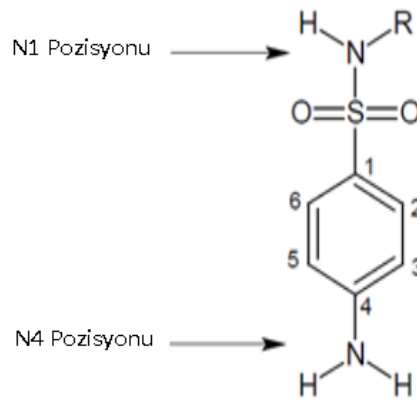


Şekil 2.6. Prontosil'den sülfonilamid oluşum reaksiyonu [83]

Bu keşiften sonra, daha etkili kemoterapötikler bulmak amacıyla sülfonilamit benzeri bileşiklerin senteziyle ilgili yoğun çalışmalar başlamıştır. Bu çalışmalar sonucunda, birçok sülfonamit türevi sentezlenmiştir [84]. Yapısal modifikasyonlar ile gerçekleştirilen bu sentezler sonucunda elde edilen yeni sülfonamit türevlerinin, antibakteriyel aktiviteden başka biyolojik aktivitelere de sahip olduğu belirlenmiştir. Bu durum, sülfonamitlerin ilaç endüstrisinde daha çok ilgi çekmesine neden olmuştur [85]. Günümüzde, sülfonamitler: antibakteriyel [3, 86], antikonvulsan [22, 87], hipoglisemik [88, 89], antihipertansif [90], diüretik [91], antitümör [92, 93], antiinflamatuvar, analjezik [94], anti epileptik [2], antimigren [95], antiempotans [96], antiroid [97] ve antiviral [98] gibi farklı biyolojik aktivitelere sahip olan birçok farmakolojik ajanı kapsayan önemli bir ilaç sınıfıdır.

2.2.1. Kimyasal yapıları ve biyolojik aktiviteleri

Sülfonamit fonksiyonel grubu, birçok ilacın temelini oluşturur. Bu grubu içeren ilaçlara sülfonamitler denir. Sülfonamit grubu içeren ilaçlar, antibiyotikler ve antibiyotik olmayanlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Tüm sülfonamit antibiyotikler, iki yapısal özellik gösterir. Bu özelliklerden birincisi, benzen halkasının para pozisyonunda (N4) serbest bir amino (-NH₂) grubunun bulunmasıdır. İkincisi ise, sülfonamit fonksiyonel grubunun N1 azotunda heterosiklik bir halkanın (R) bulunmasıdır (Şekil 2.7.). Bu yapısal konfigürasyon, antibiyotik olmayan sülfonamitlerde yoktur. Ancak KAI'ler gibi antibiyotik olmayan sülfonamitler de, antibakteriyel sülfonamitler üzerine yapılandırılmışlardır [99].



Şekil 2.7. Antibakteriyel sülfonamitlerin genel yapıları [100]

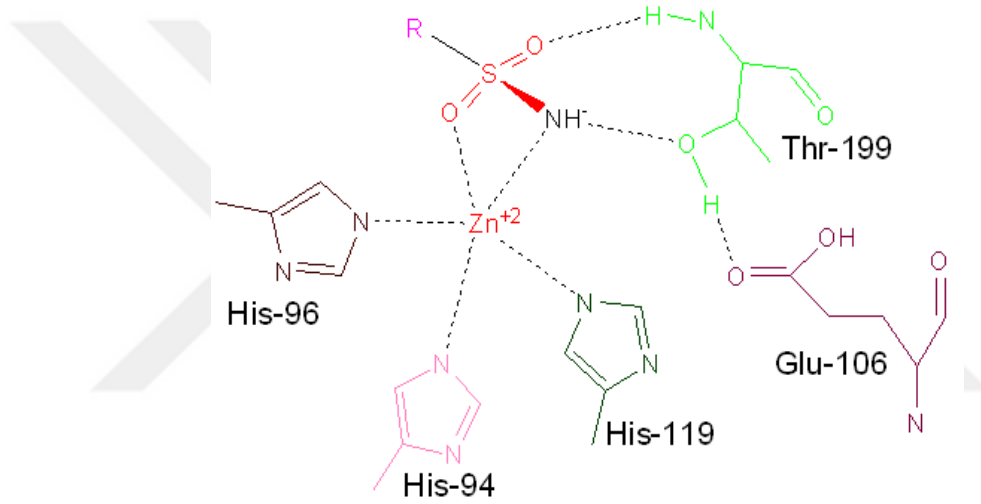
Günümüzde, sülfonamidler: KAI olarak glokom, epilepsi ve ödem [101, 102, 103, 104, 105]; insülin sekretuarı olarak tip II diyabet [106]; fosfodiesteraz tip 5 inhibitörü olarak erektil disfonksiyon [107]; siklooksijenaz tip 2 inhibitörü olarak ağrı kesme [108]; HIV₁ aspartil proteaz inhibitörü olarak AIDS [109]; histamin tip 2 reseptör antagonisti olarak peptik ülser [110]; direkt trombin inhibitörü olarak tromboz [111]; nonpeptid glikoprotein IIB/IIA inhibitörü olarak miyokart enfarktüsü, inme ve pulmoner emboli [112]; endotelin reseptör antagonisti olarak hipertansiyon ve konjestif kalp yetmezliği [113]; 5-hidroksi triptamin reseptör agonisti olarak migren [114, 115, 116]; tip 2 dopamin reseptör antagonisti olarak şizofreni ve major depresif bozukluk [117, 118]; beta adrenerjik reseptör antagonisti olarak kardiyak aritmi ve miyokard infarktüsü [119] tedavilerinde kullanılmaktadır.

Klinik kullanımda olan bazı sülfonamid türevi ilaç etken maddeleri şunlardır: glokomda kullanılan asetazolamid, metazolamid, etokzolamid ve dorzolamid [120]; enfeksiyonlarda kullanılan topikal antimikrobiyal mafenid [121]; diyabette kullanılan glibenklamid ve glimepirid [122, 123]; diüretik olarak kullanılan torasemid, bumetanid, furosemid [124]; gut ve hiperürisemide kullanılan probenesid [125]; romatoid artrit, ülseratif kolitte kullanılan sulfasalazin [126, 127]; migrende kullanılan sumatriptan [128]; peptik ülserde kullanılan famotidin [129]; kardiyak aritmi ve hipertansiyonda kullanılan sotalol [130]; ağrı kesici ve antiinflamatuvar ajan olarak kullanılan celoxib [131]; epilepside kullanılan topiramet, sultiam, zonisamid [132, 133]; erektil disfonksiyonda kullanılan sildenafil sitrat [134]; HIV'de kullanılan amprenavir, tipranavir [135]; hipertansiyonda kullanılan sitaxsentan, bosentan [136]; miyokart enfarktüsü, inme ve pulmoner embolide kullanılan tirofiban [112]; tromboz tedavisinde kullanılan argatroban [111]; şizofreni ve major depresif bozuklukta kullanılan sülpirid [117, 118].

2.2.2. Karbonik anhidraz inhibisyon mekanizmaları

Bilinen en güçlü organik KAI'leri olan sülfonamidlerin, KA izoenzimlerini inhibisyon mekanizması Şekil 2.8.'de görülmektedir. Bu etkileşimde, ilk olarak, sülfonamid (-SO₂NH-) grubundaki azot (N) atomu, KA'nın aktif bölgesinde bulunan

Zn^{+2} iyonuna bağlanır. İkinci olarak, sülfonamitin azota bağlı protonu (-NH), KA'nın aktif bölgesinde bulunan Thr 199 aminoasit bakiyesinin hidroksil (-OH) grubu ile hidrojen bağı yapar. Glu 106 aminoasit bakiyesinin karboksil (-COOH) grubu da, Thr 199'un yan zinciri ile hidrojen bağı yapar. Üçüncü olarak, Zn^{+2} 'ye koordine olan sülfonamit oksijenlerinden biri Thr 199'un -NH grubu ile bir hidrojen bağı yaparken, diğeri Zn^{+2} iyonuyla kısmi koordinasyonda bulunur. Son olarak, sülfonamitlerin yan zincirleri (R) KA enziminin aktif bölgesindeki hidrofilik ve hidrofobik rezidüer ile etkileşir. Sülfonamitlerin KA enzimine güçlü bir şekilde bağlanması bu etkilerin toplamının bir sonucudur [137].

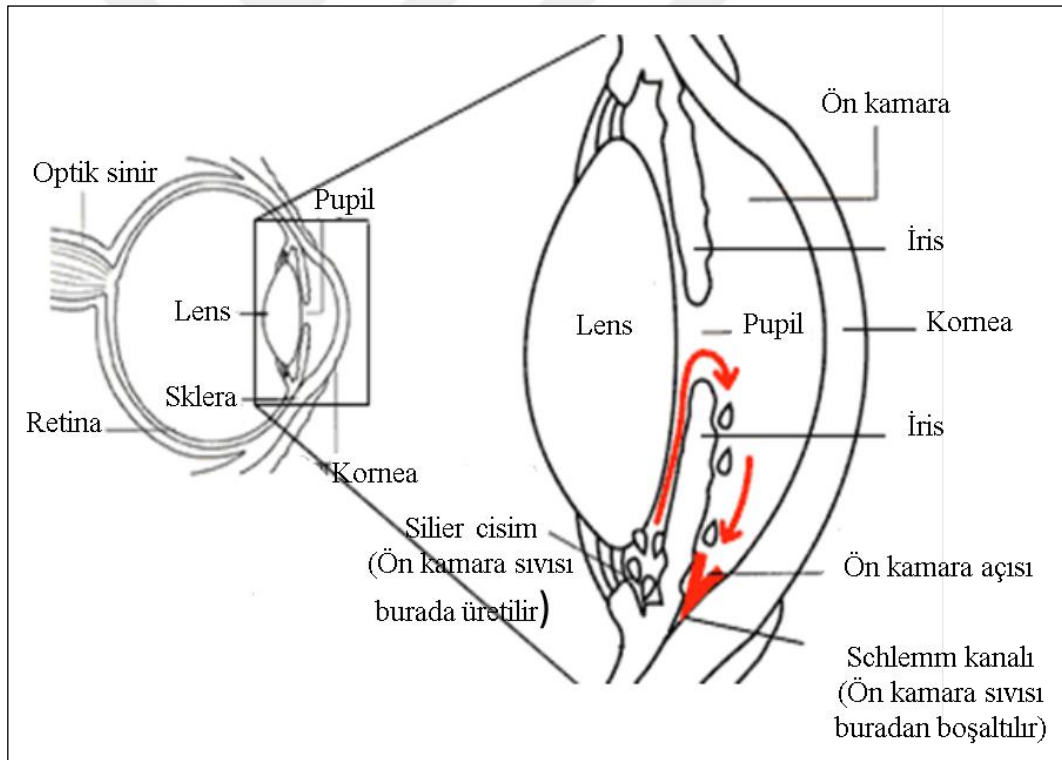


Şekil 2.8. Sülfonamitlerin karbonik anhidraz inhibisyon mekanizmaları [18]

KAİ sülfonamitler diüretik, antiglokoma ve antiepileptik ajan olarak uzun yıllardır kullanımda olan oldukça etkili ilaçlardır. Ancak bu amaçlarla kullanılan mevcut KAİ sülfonamitlerin izoenzim seçicilikleri olmadığından, insanlar üzerinde ciddi sistemik yan etkileri vardır. Bu bakımdan, glokoma, ödem ve epilepsi tedavisinde kullanılabilecek, izoenzim seçiciliği olan yeni KAİ sülfonamitlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar günümüzde devam etmektedir. Ayrıca, bazı KA'ların (KA IX, KA XII) kanser, bazılarının (KA II, KA VA, KA VB) obezite, bazılarının da (KA II) osteoporoz patofizyolojisi ve patogenezi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir [6]. Dolayısıyla son yıllarda, bu hastalıklarla ilişkili izoenzimlere spesifik olan ve kanser, obezite, osteoporoz tedavisinde kullanılabilecek KAİ'lerinin sentezi ile ilgili çalışmalar da yapılmaktadır [9].

2.2.3. Karbonik anhidraz inhibitörü sülfonamidler ve klinik kullanım alanları

Asetazolamid, metazolamid, etokzolamid ve diklorfenamid gibi KAİ sülfonamidler, glokomda görülen yüksek göz içi basıncını düşürmek için yıllardır kullanılan sistemik etkili ilaçlardır. Antiglokomatöz etkilerini, gözün arka kamarasındaki silier cismin epitelinde bulunan KA II, IV ve XII'yi inhibe ederek gösterirler. Bu izoenzimlerin inhibisyonuyla, hüner aköz yapımı azalır ve göz içi basınç düşer. Çünkü KA II, IV ve XII'nin katalizledikleri reaksiyonla, silier cismin epitel membranını aktif olarak geçen ve gözün arka kamarasında ozmotik gradient oluşturan HCO_3^- iyonları oluşur. HCO_3^- iyonları, suyun plazmadan arka kamaraya pasif olarak difüzyonunu ve böylece hüner aközün yapımını sağlar [138]. Gözün anatomik yapısı ve hüner aközün gözdeki dolaşımı Şekil 2.9.'da görülmektedir.

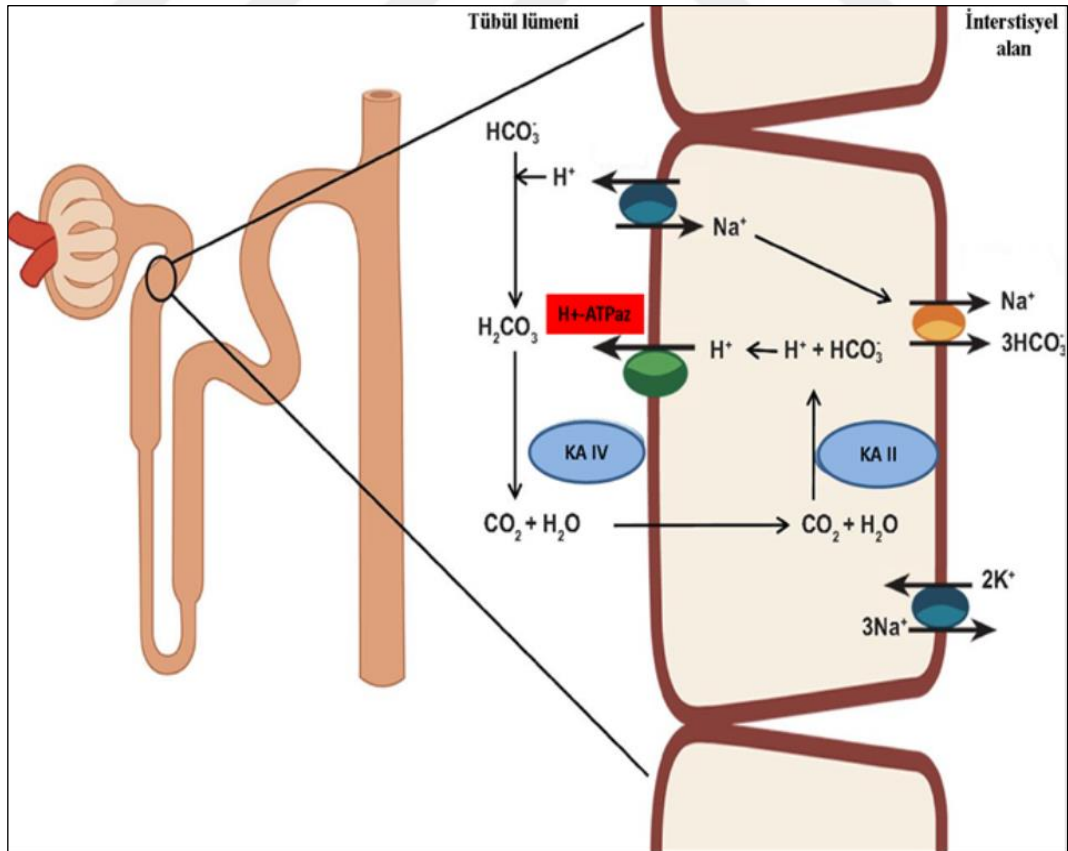


Şekil 2.9. Gözün anatomik yapısı ve hüner aközün gözdeki dolaşımı [139]

Glokom tedavisinde kullanılan sistemik etkili KAİ sülfonamidler, göz dışındaki dokularda bulunan KA II, IV ve XII'yi de inhibe ettiklerinden insanlarda ciddi sistemik yan etkiler oluştururlar. Yan etkileri kullanımlarını sınırladığından ve

tedavinin sonlandırılmasına neden olduğundan, son yıllarda dorzolamid ve brinzolamid gibi topikal KAİ sülfonamidler geliştirilmiştir. Ancak, bunlar da uygun idame edildiklerinde etkili ilaçlardır. Sonuç olarak, antiglokoma ajanı olabilecek yeni KAİ sülfonamidlerin sentezine ilişkin çalışmalar günümüzde devam etmektedir [140, 141, 142, 143, 144].

Asetazolamid, metazolamid, etokzolamid ve diklorfenamid gibi KAİ sülfonamidler, konjestif kalp yetmezliği, akut dağ hastalığı ve ödem tedavisinde diüretik olarak da kullanılmaktadır [145]. Diüretik etkilerini, böbreğin proksimal tübülünde bulunan KA II, IV ve XIV izoenzimlerini inhibe ederek gösterirler. Normal şartlarda, proksimal tübülün lümeni içinde, H^+ ile HCO_3^- iyonları birleşir ve H_2CO_3 (karbonik asit) oluşur. Oluşan H_2CO_3 , KA IV katalizörlüğünde CO_2 ve H_2O 'ya dönüşür. CO_2 , tübül lümeninden diffüzyon yoluyla proksimal tübül hücreleri içine geçerek, KA II katalizörlüğünde H_2O ile birleşir ve H_2CO_3 oluşur. KA II ve IV izoenzimlerinin böbrek tübülündeki etkisi Şekil 2.10.'da verilmiştir [146].



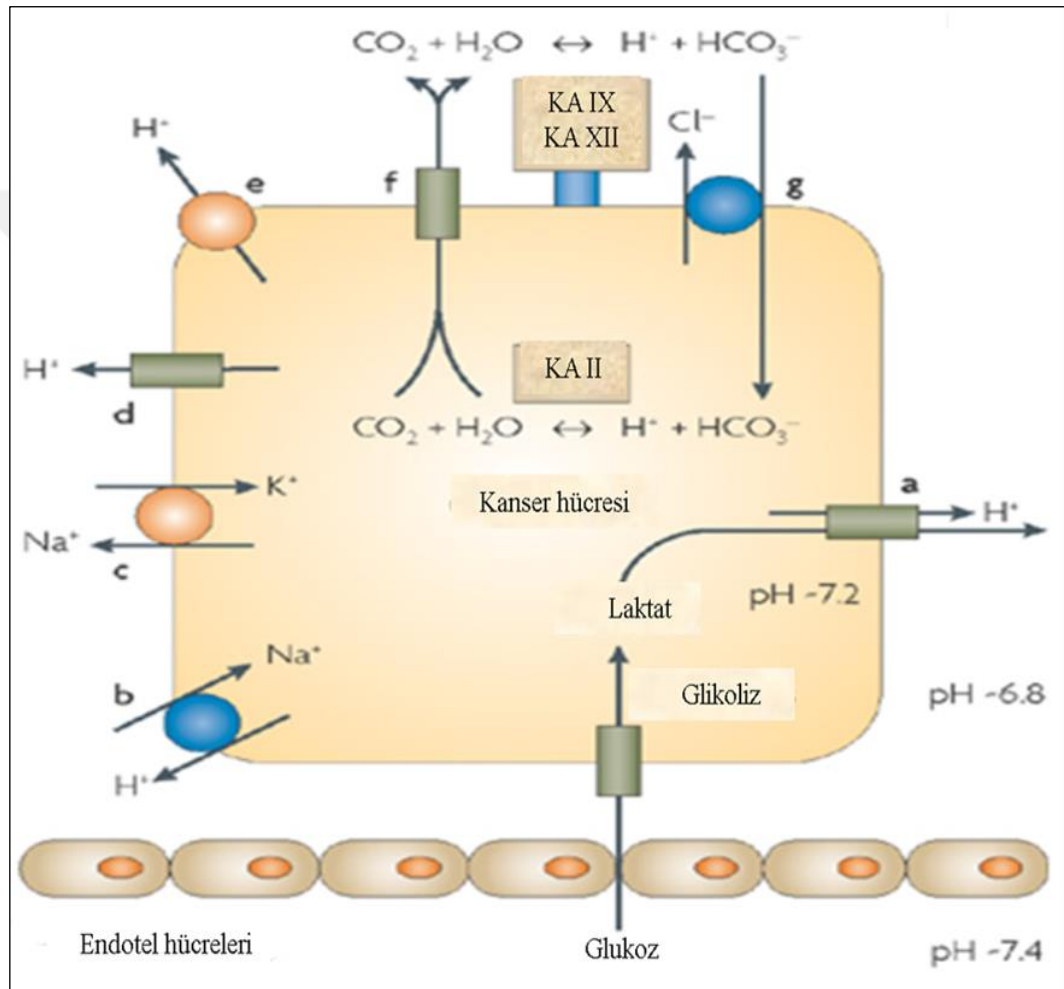
Şekil 2.10. KA II ve IV izoenzimlerinin böbrek tübülündeki etki mekanizmaları [147]

Tübül hücreleri içinde oluşan H_2CO_3 , H^+ ve HCO_3^- iyonlarına ayrışır [146]. Tübül hücreleri içinde oluşan HCO_3^- iyonları, peritübüler kapiller ağ içine geçerek, plazmaya emilir. H^+ iyonları ise, tübül lümenine salgılanarak tübüler filtrata geçer. Bunun karşılığında ise, Na^+ iyonları tübül lümeninden tübül hücrelerine alınırlar. Tübül hücrelerine alınan Na^+ , beraberinde H_2O 'yu da lümeneye sürükler. KAI sülfonamitlerin KA II ve IV'ü inhibe etmesiyle, Na^+ iyonlarının H^+ iyonları ile değiş tokuşu azalır. Böylece tübül lümeninden tübül hücrelerine Na^+ ile beraberinde H_2O reabsorpsiyonu azalır ve vücuttan H_2O kaybı artar. KAI sülfonamitler, asidoza neden olmaları ve böbrek dışındaki organlarda KA inhibisyonu yapmalarına bağlı olarak oluşan yan etkileri nedeniyle diüretik olarak eski önemlerini kaybetse de bazı hallerde kullanımları devam etmektedir [146].

KAI sülfonamitler, epilepsi tedavisinde antikonvulzan ilaç olarak da kullanılmaktadır. Antikonvulzan olarak kullanımları, ilk olarak asetazolamid ve metazolamid ile başlamıştır. Sonradan sultiam, zonisamid ve topiramat klinik kullanıma girmiştir. Bu ilaçların, beyindeki KA II, IV, XIV izoenzimlerini inhibe ederek antikonvulzan etki gösterdikleri belirlenmiştir [8]. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar asetazolamid, metazolamid ve topiramat gibi sülfonamitlerle KA inhibisyonunun, beyinde CO_2 düzeyini artırarak serebral kan akımında artışa yol açtığını ve epileptik nöbet oluşumunu azalttığını göstermiştir. Beyindeki CO_2 düzeyinin düşmesinin, nöronların asenkronize ateşlenmesi ve yüksek nöbet eğilimi ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca KAI'lerin, nöronlarda aksiyon potansiyelinin iletilmesi için gerekli olan iyon kanallarını inhibe ederek, bu hücrelerdeki uyarılabilirliği azalttığı ve epileptik nöbet oluşumunu engellediği de ileri sürülmüştür. Tedaviye direnç ve yan etkilere neden olma gibi problemler, epilepside kullanılan KAI sülfonamitler için de geçerli olduğundan, antikonvulzan olarak kullanılacak daha etkili ve yan etkisi olmayan yeni KAI'ler ile ilgili arayışlar devam etmektedir [8].

Son yıllarda, KAI sülfonamitlerin kanser ilacı olarak kullanılabileceğini bildiren çalışmalar da yayınlanmıştır [11, 12, 148, 149]. Kanser hücrelerinde, bozulmuş mikrodolaşım ve kötüleşmiş O_2 difüzyon sürecinin patofizyolojik sonucu olarak

oluşan hipoksi nedeniyle oksidatif fosforilasyon baskılanır ve enerji ihtiyacı glikolitik metabolizma ile sağlanır. Glikolitik metabolizma sonucu oluşan laktik asit (laktat) ise, tümör hücrelerinde birikir. Bu durumda, tümör hücreleri çoğalmak ve yaşamak için iyon transportu ile ilgili komponentlerinin aktivitelerini ve asit-baz kontrolünü maksimize ederler [13,14]. Kanser hücrelerindeki pH regülasyonu ve iyon transportunun mekanizması Şekil 2.11.'de görülmektedir.



Şekil 2.11. Kanser hücrelerindeki pH regülasyonu ile iyon transportunun moleküler mekanizması [16, 150]

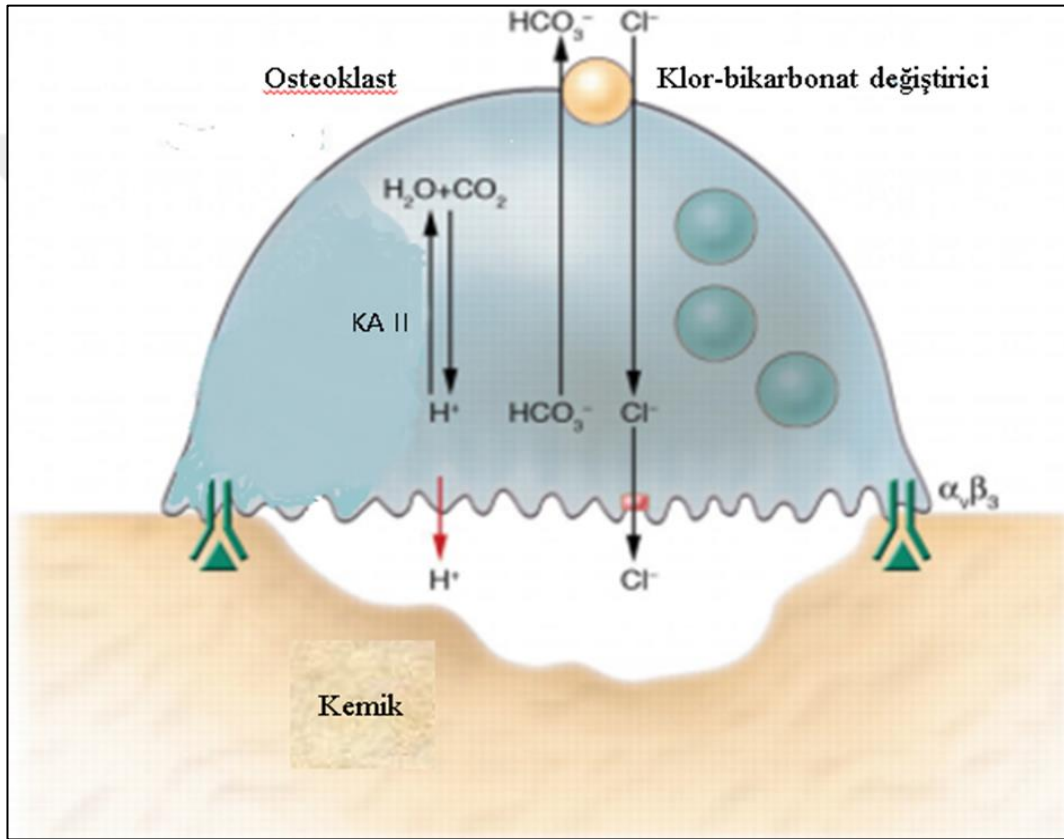
Bu mekanizmaya göre, kanser hücreleri laktat ve protonlar (H⁺) gibi asidik metabolitleri hücre dışına atarak hücre içi pH'ı normal sınırlar içerisinde tutmaya çalışırlar [14]. Laktat ve H⁺ iyonları, monokarboksilat taşıyıcısı ile ekstraselüler sıvıya atılır (Şekil 2.11.a). Transforme olmuş hücrelerde aktif olan Na⁺-H⁺ antiporterleri H⁺ iyonlarını hücre dışına, Na⁺ iyonlarını hücre içine taşır (Şekil 2.11.b). Hücre içi

nötraliteyi sürdürmek için, kanser hücreleri tarafından kullanılan diğer protein makineleri ATP bağımlı Na^+ - K^+ antiporteri (Şekil 2.11.c), H^+ kanalları (Şekil 2.11.d) ve plazma membranı proton pompası H^+ -ATPaz'dır (Şekil 2.11.e). Sitozolik izoenzim olan KA II tarafından oluşturulan H_2O ve CO_2 , akuaporinler aracılığıyla hücre dışına atılır (Şekil 2.11.f). Akuaporinler ile hücre dışına atılan H_2O ile CO_2 , hücre membranına lokalize olmuş KA IX ve KA XII tarafından H^+ ve HCO_3^- üretmek için kullanılır. KA IX ve KA XII'nin katalizörlüğünde hücre dışında oluşan HCO_3^- iyonları, HCO_3^- - Cl^- anyon değiştiricileri ile hücre içine alınır (Şekil 2.11.g) ve sitozoldeki KA II tarafından kullanılır. H^+ iyonları ise, hücre dışında birikir. Sonuç olarak, tüm bu süreçlerin sonunda hücre dışı asidoz gelişir [150].

Normalde az sayıda dokuda çok düşük miktarlarda ifade edilen ancak tümör hücrelerinde aşırı ifade edildikleri saptanan KA IX ve XII'nin, hücre dışında CO_2 ve H_2O 'nun, HCO_3^- ve H^+ 'ya dönüşümünü katalizleyerek tümör çevresindeki asidifikasyona katkıda bulunduğu anlaşılmıştır. Hücre dışı asidoz, tümör progresyonunu destekleyen bir faktördür. Çünkü ekstrasellüler matris bozulmasını, migrasyon ve invazyonu, hücre büyüme faktörlerinin ifadesini ve proteaz aktivasyonunu indükler [13]. Böylece tümörlerin agresifleşmesine, metastatik yayılım yapmasına ve tedaviye yanıt vermemesine neden olur [150]. KA II izoenziminin de, hücre içinde lipogenez, ürogenez, glukoneogenez, pirimidin sentezi ve aminoasit sentezi gibi hücrenin büyümesini sağlayan metabolik süreçlere HCO_3^- sağlayarak tümör hücrelerinin çoğalmasını indüklediği bildirilmiştir [150, 151].

Literatürde, KA I sülfonamidlerin osteoporoz tedavisinde kullanılabileceği de bildirilmektedir [16]. KA II, kemiğin yeniden modellenme sürecindeki kemik yıkımında rol oynar. KA II'nin kemik yıkımındaki rolü Şekil 2.12.'de verilmiştir. Kemik yıkımını gerçekleştiren osteoklastların stoplazmalarında bol miktarda lizozomal enzimlerle dolu transport vezikülleri ve KA II bulunur. KA II, osteoklast stoplazmasında CO_2 'nin hidrasyonunu kataliz ederek, protonlar (H^+) oluşturur. Bu, H^+ 'lar veziküllerin membranında yerleşmiş vakuolar tip ATPaz proton pompası ile veziküllerin içine iletilir. Bu veziküllerin migrasyonu ve ardından hücre membranı ile kaynaşması sonucu rezorpsiyon lakününün üzerinde osteoklastın buruşuk kenarı

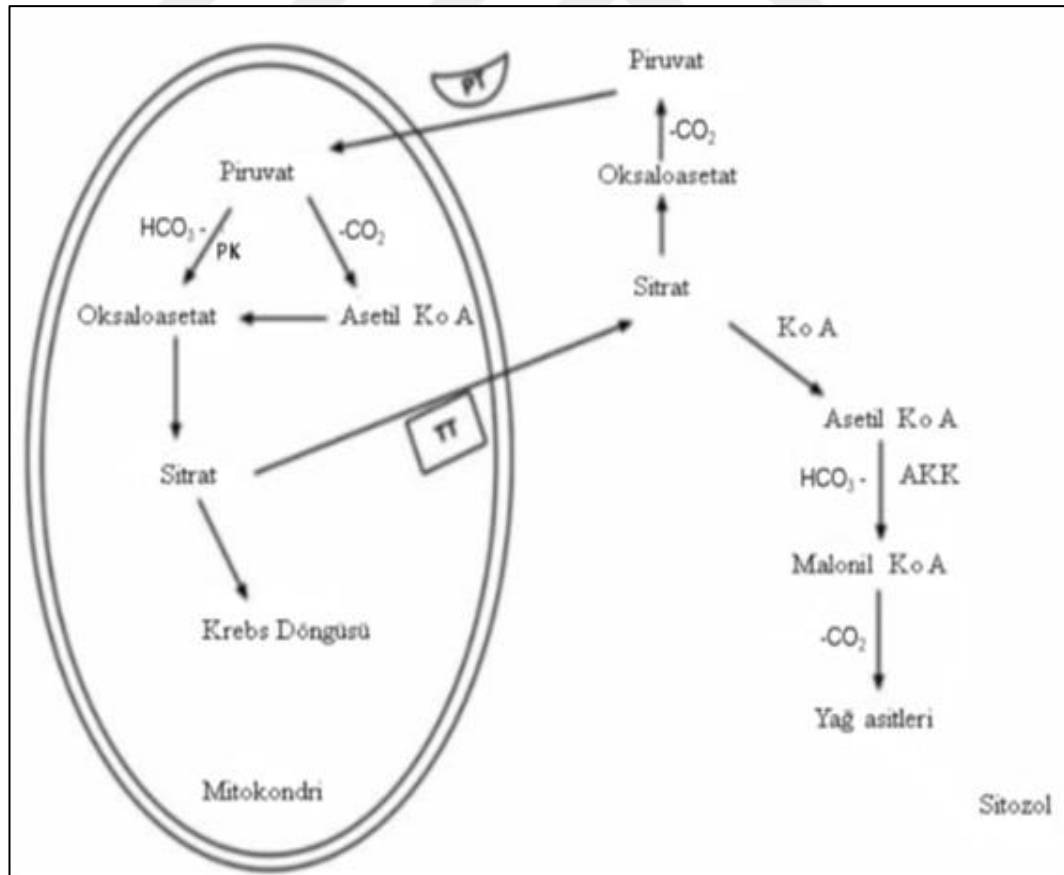
oluşur. Veziküllerin içerdiği H^+ iyonları, osteoklastların buruşuk kenarından yine ATP bağımlı proton pompası (vakuolar H^+ -ATPaz'lar) ile rezorpsiyon lakününün içine pompalanır. Böylece rezorpsiyon lakününün asidifikasyonu sağlanır. Asidifikasyon sürecine, osteoklast membranındaki Cl^- kanalları ve Cl^-/HCO_3^- iyon değiştircileri de katılır. Sonuçta, ekstraselüler pH düşürülür. pH'daki bu düşme kemik mineralini çözer. Ayrıca, organik matriksi yıkan proteazların aktivitesi için gerekli olan optimum pH'ı sağlar [152].



Şekil 2.12. Osteoklastik kemik rezorpsiyonunda KA II'nin rolü [152]

Son yıllarda, epilepsi tedavisi için KAI olan topiramet ve zonisamid'i kullanan obez bireylerde kilo kaybının gözlenmesiyle KAI sülfonamidlerin obezite tedavisinde de kullanabileceği ortaya çıkmıştır. Bu ilaçların, de novo lipogenez sürecindeki bazı reaksiyon kademelerine HCO_3^- sağlayan KA II, VA ve VB'yi inhibe ederek kilo kaybına neden oldukları belirlenmiştir. Şekil 2.13.'de görüldüğü gibi, aerobik glikoliz sonucu oluşan piruvatın bir kısmı, mitokondride HCO_3^- ve piruvat karboksilaz (PK) varlığında oksaloasetata karboksillenir. Bu reaksiyon için gerekli

HCO_3^- , mitokondriyal KA VA, VB'nin katalizörlüğünde oluşur. Aerobik glikoliz sonucu oluşan piruvatın bir kısmı ise, dekarboksilasyonla asetil koenzim A'ya dönüşür. De novo lipogenezin ilk aşaması, mitokondride bulunan asetil koenzim A'ların stoplazmaya taşınmasıdır. Ancak, mitokondrial membran asetil koenzim A'ya geçirimsizdir. Bu nedenle, asetil koenzim A oksaloasetat ile reaksiyona girip, sitrata dönüşükten sonra trikarboksilik asit taşıyıcısı (TT) aracılığıyla sitozole geçer. Sitozolda, sitrattan yeniden asetil koenzim A ve oksaloasetat oluşur. Oksaloasetat da, mitokondri membranını geçemediğinden, dekarboksilasyonuyla piruvat oluşur. Piruvat ise, piruvat taşıyıcısı (PT) aracılığıyla mitokondriye geçer. Sitozolda oluşan asetil koenzim A, de novo lipogenez sürecinde kullanılır. Asetil Ko A, asetil koenzim A karboksilaz (AKK) ve HCO_3^- varlığında karboksillenerek, malonil koenzim A'ya dönüşür. Bu reaksiyon için gerekli olan HCO_3^- , KA II tarafından sağlanır. Bunu izleyen diğer reaksiyon kademelerinde gerçekleşen asetil gruplarının transferi sonucunda, uzun zincirli yağ asitleri sentezlenir [10].



Şekil 2.13. De novo lipogenez sürecine (HCO_3^-) sağlanmasında KA II, VA ve VB'nin rolü [10]

2.3. Genotoksisite Testleri

Son yüzyılda dünya üzerindeki kimyasal kirlenme, sanayi devrimiyle gelişen teknolojinin en büyük yan etkisidir. Canlılar da bu kirlilikle her geçen gün artan bir sıklıkla yüz yüze gelmektedir. Gıdaların, sigaranın, solunan havanın ve hatta iyileşmek adına kullanılan ilaçların içindeki kimyasal maddeler bir kimyasal kirlilik havuzu oluşturmaktadır. Bu kirleticilerin bazıları organizmanın genetik yapısında herhangi bir değişikliğe sebep olmamakta ya da ortaya çıkan hasarlar DNA onarım enzimleri ile tamir edilebilmektedir. Ancak, bazıları gen mutasyonlarına, yapısal kromozom hatalarına veya rekombinasyonel değişimlere sebep olabilmektedir. Bu değişimler üreme hücrelerinde meydana geldiğinde, daha sonraki nesillere aktarılmaktadır. Somatik hücrelerde meydana geldiğinde ise, bireyin kendisinde çeşitli sağlık sorunlarına yol açmaktadır [153, 154].

DNA ile ve DNA ilişkili hücresel komponentler (ör: mitotik ve mayotik iğ iplikleri, replikasyon enzimleri, DNA onarım sistemi enzimleri, hücre döngüsünü kontrol eden proteinler, apoptozis ile ilişkili gen ürünleri, oksidatif hasara karşı savunma sağlayan proteinler) ile etkileşime giren veya genomda, kromozomlarda ya da genlerde hasarlara yol açan fiziksel ve kimyasal ajanlar genotoksik etkilidir. Genotoksisite; DNA, gen veya kromozom yapısında meydana gelen DNA eklentileri, DNA zincir kırıkları, gen mutasyonları, yapısal ve sayısal kromozom anormallikleri gibi hasarları kapsayan genel bir terimdir [32, 153, 154].

Genotoksik etkili ajanların hem bireyin kendisinde hem de gelecek nesillerde neden olduğu genetik hasarların yol açtığı sağlık sorunları; doğum defektleri, yaşlanma, infertilite, kanser, kardiyovasküler, immun sistem, dejeneratif, genetik ve multifaktoriyel hastalıklardır. Özellikle, genotoksisite ile kanser arasında kuvvetli bir ilişki olduğu ve insanlar için karsinojen olan ajanların % 90'ının genotoksik etkili olduğu belirlenmiştir. Karsinojenlerin çoğu, protoonkogenleri onkogenlere dönüştüren ve tümör baskılayıcı genleri inaktif hale getiren gen mutasyonlarına ve/veya kromozomal değişikliklere neden olarak karsinogenezin başlangıcında ve gelişmesinde rol oynamaktadır [32, 153, 154].

Son yüzyılda, insanların kullanımına sunulan kimyasal maddelerin sayısında artış gözlenmesi ve genotoksik etkili olanların ciddi sağlık sorunlarına yol açtığı belirlenmesi, bu tip ajanların tespit edilmesini sağlayan genotoksisite testlerinin geliştirilmesine neden olmuştur [155, 156]. Günümüzde bu testler; pestisitler, endüstriyel kimyasallar, çözücüler, gıda katkı maddeleri ve ilaçlar gibi kimyasal maddelerin genotoksik ve karsinojenik potansiyellerinin tespitinde yaygın kullanım alanı bulmuştur [32].

2.3.1. Yeni ilaç geliştirme çalışmalarındaki yerleri ve önemleri

Doğal kaynaklardan elde edilen veya laboratuvarında sentezlenen aday ilaçlar, piyasaya sunulmadan önce prelinik ve klinik araştırma dönemlerinden geçirilir. Prelinik araştırma dönemi; yeni ilaçların etkinlikleri ile güvenilirliklerinin sağlıklı canlı hayvanlar, izole organ preparatları ve hücre kültürleri üzerinde değerlendirildiği çalışmaları içeren ve 2-3 yıl süren dönemdir [157, 158]. Bu dönemde yürütülen çalışmaların başında, insanlar için güvenli bileşikler bulmayı amaçlayan toksikolojik araştırmalar gelir. Toksikolojik araştırmalar, toksikokinetik çalışmaları ve toksisite testlerini içerir. Toksikokinetik çalışmalarda, incelenen maddenin organizmada emilimi, dağılımı, metabolizması, biyotransformasyonu ve atılımı incelenir. Toksisite testlerinde ise akut, subakut, kronik, subkronik ve özel toksisite incelemeleri yapılır [159].

Akut toksisite testleriyle, kimyasal maddeye 24 saatten az bir süre içinde bir veya birçok kere maruz kalma sonrasında meydana gelebilecek ani zehirlenme etkileri incelenir. Subakut toksisite testleriyle, maddeye bir ay veya daha az sürede maruz kalma sonrasında meydana gelebilecek etkiler incelenir. Subkronik toksisite testleriyle, maddeye 1-3 ay arasında maruz kalma sonrasında meydana gelebilecek etkiler araştırılır. Kronik toksisite testlerinde, maddenin akut toksisiteye yol açmayacak düşük dozlarının 3 ay veya daha uzun süre ile günlük veya sık dozlar şeklinde verilmesiyle oluşan etkiler incelenir. Özel toksisite testlerinde ise, aday ilaç molekülünün genotoksik, karsinojenik, teratojenik, transplental, immunotoksik, nörotoksik ve üremeye ilgili toksik etkileri araştırılır [159].

Preklinik araştırma döneminden başarıyla geçen aktif ilaç maddeleri için, daha sonra klinik araştırma dönemi başlar. Bu dönemde yapılan çalışmalar, insanlar üzerinde gerçekleştirilir ve 4 fazda yapılır. Faz I çalışmaları, genellikle 20-80 sağlıklı gönüllü üzerinde güvenilirlik ve etkinlik yönünden uygun doz aralığının saptanması amacıyla yapılır. Yaklaşık 9-18 ay sürer. İlacın belirli bir uygulama yolundan verilmesiyle, insanda maksimum tolere edilebilen doz belirlenir. Bu fazın amaçları, ilacın insanlardaki güvenilirliğinin, doz sınırlayıcı istenmeyen etkilerinin, toksisitesinin, etki mekanizmasının, yapı aktivite ilişkisinin, farmakokinetik profilinin ve faz II çalışmalar için insanlara verilecek farmasötik şeklinin belirlenmesidir. Faz II çalışmaları, 100-300 hasta gönüllüde ve faz I'de saptanan tolere edilebilir doz ile 1-3 yıl devam eden çalışmalardır. Ana amacı, ilacın etkinliğini incelemektir. Diğer amaçları, ilacın hedef hasta grubundaki terapötik ve profilaktik dozunu belirlemektir. Faz III çalışmalar, 1000-3000 hasta gönüllüde 3-4 yıl süren genellikle çok merkezli, çok uluslu, randomize, çift kör nitelikteki çalışmalardır. Bu çalışma süreci, ilacın klinik etkinliğinin ve yan etkilerinin daha geniş bir hasta popülasyonunda değerlendirilmesini sağlar. Faz III çalışmaları ile yeterli veriler elde edildikten sonra, ürünün ilaç olarak kullanılabilmesi için onay alınması gerekir. Her ülkenin yeni ilaçlarla ilgili yapılmış araştırmaları onaylayacak ve ilaca ruhsat verecek resmi makamları vardır. Faz IV çalışmalar, ruhsat almış bir ilaç ile yapılan pazarlama sonrası izlem çalışmalarıdır. İlacı kullanmakta olan geniş hasta topluluklarının söz konusu olduğu bu çalışmaların ana amacı, uzun süreli güvenilirlik verilerinin toplanmasıdır. Ayrıca, ilacın maliyet-yarar-risk oranlarının analiz edilmesi, etkinliğinin daha geniş hasta gruplarında gösterilmesi, ilaca bağlı gelişen ve ender rastlanan ciddi istenmeyen reaksiyonların ve ilaç etkileşimlerinin belirlenmesi, ilaçla ilgili cevaplanmamış soruların cevaplanması ve aynı endikasyon için kullanılan ilaçlarla yeni ilacın karşılaştırılması da amaçlanır [158].

Yeni geliştirilen bir ilacın onay alabilmesi için, preklinik ve klinik araştırma dönemlerinde elde edilen ilaca ait kalite, emniyet ve etkinlik ile ilgili ayrıntılı bilgilerin düzenleyici makamlara sunulması gerekir. Toplanması yıllarca süren ve elde edilmesi milyonlarca dolara mal olan bu bilgilerin, farklı ülkelerin makamları tarafından değişik formatlarda ve standartlarda istenmesi yeni ilaçların kullanıma

çıkmasını geciktirmekte ve araştırmalarda gereksiz gönüllü, deney hayvanı veya test materyali kullanımına neden olmaktadır. Dolayısıyla, bu bilgileri elde etmek için yapılacak deneysel araştırmaların, uluslararası geçerliliği olan Uluslararası Uyum Konferansı (ICH) ile Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü (OECD) kılavuzlarında basamaklandırılmış standart bir yaklaşımla uygulanması kabul görmektedir. Bu kılavuzlar, üye ülkeler için bağlayıcı olsa da, üye ülkelere ilaç ihraç edebilmek ve uluslararası ilaç araştırmalarında daha çok yer alabilmek için bu kılavuzlardan haberdar olmak ve bunlara uyum sağlamak gerekmektedir [160].

ABD, Avrupa Birliği ve Japonya'nın düzenleyici makamları ile ilaç endüstrisi derneklerinin katılımı ile kurulmuş ICH'nin kılavuzları kalite, emniyet, etkinlik ve multidisipliner olmak üzere 4 ana başlık altında toplanır. İnsanlar üzerinde yapılan klinik araştırmalara ait kılavuzlar, etkinlik başlığı altındadır ve sayıları oldukça fazladır. Emniyet ile ilgili kılavuzlar arasında toksikokinetik, farmakokinetik, akut/kronik toksisite, üreme toksisitesi, karsinojenite ve genotoksisite testlerine, yani *in vivo* ve *in vitro* prelinik çalışmalara ilişkin kılavuzlar vardır [160]. Türkiye'nin dahil olduğu 31 üye ülkeden oluşan OECD'nin de, ilaçlar, endüstriyel kimyasallar, pestisitler ve kozmetikler gibi kimyasal maddelerin insan sağlığı üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde kullanılabilecek standardize edilmiş toksikolojik test metotlarını tarif ettiği kılavuzları vardır [161].

Kemoterapide hastaları sağlık riski oluşturmadan tedavi etmek esas olduğundan, prelinik araştırma döneminde genotoksisite ve karsinojenite gibi güvenlik testlerinin yapılması ilaç geliştirmede çok önemli bir ilkedir. Bu testlerin sonuçları, ilacın deneysel koşullardaki etkinliğinden bile daha fazla önem taşımaktadır [162]. İlaçların genotoksik ve karsinojenik etkilerini belirlemek için uzun zamanlı, orta zamanlı ve kısa zamanlı testler kullanılabilmektedir. Uzun zamanlı testlerin temeli, deney hayvanlarının ömürlerinin uzun bir periyodu boyunca belirli aralıklarla ve belirli dozlarda kimyasal maddeye maruz bırakılmasına dayanmaktadır. Bu testler, iyi bir tasarım, yürütme, analiz, rapor, planlama, iyi hayvan bakımı, yüksek standartlarda patolojik ve istatiksiksel analiz gerektirir. Orta zamanlı testler, genellikle sıçanlar kullanılarak yapılmaktadır. Denenecek kimyasal maddenin hedef organı olarak

karaciğer kullanılabilirdiği gibi bütün vücut da kimyasal maddenin hedefi olabilir. Uzun zamanlı testlerdeki zaman kaybını aza indirmek için geliştirilmişlerdir. Kimyasal karsinogenlerin taranmasında etkili olan İto modeli (8 hafta) ve yeni doğan fare modeli (yaklaşık 12 ay) bilinen orta zamanlı testlerdir. Orta zamanlı ve uzun zamanlı testler maliyetlerinin fazla olması, sonuçların hemen elde edilememesi, kullanılacak deney hayvanının fizyolojik şartları ve kalifiye eleman yetersizliği gibi sebeplerden dolayı daha az tercih edilmektedir. Kolay uygulanabilen, maliyeti daha düşük olan ve daha az zaman alan kısa zamanlı testlerin kullanımı daha yaygındır. Günümüzde artık tüm dünyanın geçerliliğini kabul ederek rutin olarak uyguladığı kısa süreli testlerin kullanımı, sentez edilerek gıda, sağlık, kozmetik, temizlik ve sanayi gibi alanlarda piyasaya sunulacak kimyasal bileşiklerin genotoksisite ve karsinogenite potansiyellerinin öngörülmesinde en akılcı yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Farklı hücre tipleri üzerinde yapılabilen 200'den fazla kısa zamanlı test sistemi geliştirilmiştir [163, 164].

Kısa süreli genotoksisite testleriyle ilgili genel kanı, genotoksik etkilerin tamamı hakkında bilgi sağlayabilecek geçerlilikte bir testin olmadığı yönündedir. Çünkü, farklı yöntemler ya da organizmalar kullanılarak yapılan testlerle farklı sonuçlar alınabilmektedir [155]. Bu nedenle, bir kimyasal maddenin genotoksik potansiyelinin birkaç kısa zamanlı genotoksisite testinin bir arada kullanıldığı seri test sistemleri ile değerlendirilmesi önerilmektedir. Seri testlerin sonuçlarının, uzun zamanlı testlerin sonuçlarıyla paralel olduğu bildirilmiştir. Farklı modellemeler olmakla beraber, bu testlerde model hücre olarak genellikle bakteriler ve memeli hücreleri kullanılmaktadır [156].

ICH ve OECD'nin genotoksisite ile ilgili kılavuzlarında, ilaç üretiminde kullanılacak bir etken maddenin piyasaya sürülmeden önce mutlaka üç basamaktan oluşan standart seri kısa süreli test sistemi kullanılarak genotoksik açıdan güvenilirliğinin test edilmesi gerektiği bildirilmektedir. Üçlü seri olarak adlandırılan bu sistemin ilk basamağında, bakteriler üzerinde gerçekleştirilen bir gen mutasyon testi (Ör: *Salmonella typhimurium* suşları ile AMES testi) yapılması önerilmektedir. Serinin ikinci basamağında, memeli hücrelerinde *in vitro*

kromozomik hasarları belirleyebilen sitogenetik bir test (ör: *in vitro* CA testi veya MN testi) veya memeli hücrelerinde *in vitro* gen mutasyon testi (ör: fare lenfoma timidin kinaz testi) yapılması önerilmektedir. Serinin son basamağında ise, bir *in vivo* kromozomal hasar testi (genellikle rodent hematopoietik hücreleri üzerinde *in vivo* MN veya CA testi) yapılması önerilmektedir. Bu basamak, bir kimyasal maddenin genotoksik aktivitesinin yanı sıra emilimi, dağılımı, metabolizması ve uzaklaştırılması hakkında da bilgi verir. Böylelikle, *in vivo* testler ile bazıları organizmada biyotransformasyon sonrasında oluşan genotoksik ajanların belirlenmesinde kullanılabilir [161, 165, 166].

ICH ve OECD kılavuzlarında, standartlara uygun olarak yapılan ve değerlendirilen üçlü seri test sistemi ile negatif sonuçlar veren kimyasal bileşiklerin genotoksik olmadıkları ve güvenilir oldukları belirtilmektedir. Standart seri testlerden biri veya daha fazlasıyla ile pozitif sonuç veren herhangi bir bileşiğin ise genotoksik olduğu ve risk değerlendirmesi için daha fazla test yapılması gerektiği belirtilmektedir [153]. Literatürde ilaç etken maddelerinin veya yeni sentezlenen aday ilaçların genotoksisite profilini araştırmış çok sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda yaygın kullanılan standart kısa süreli genotoksisite testleri arasında kromozomal anormallikler (CA), mikronukleus (MN) ve komet (tek hücre jel elektroforezi) testleri vardır [32].

İngilteredeki COM (The Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment) da 2011 yılında yayınladığı kılavuzda gıdalardaki, tüketici ürünlerindeki ve çevredeki kimyasal maddelerin genotoksik potansiyellerinin belirlenmesinde izlenilmesi gereken bir strateji yayınlamıştır. Bu stratejiye göre, kimyasal madde piyasaya sürülmeden önce üç aşamalı bir değerlendirmeden geçmek zorundadır. Bu kılavuza göre, birinci aşamada, kimyasal maddenin fizikokimyasal özelliklerinin, yapı-aktivite ilişkisinin incelenmesi ve tarama testlerinin yapılması önerilmektedir. İkinci aşamada, *in vitro* genotoksisite testleri (*in vitro* bakteriyel gen mutasyon testi (AMES), klastojenite ve anöploidi için *in vitro* memeli hücresi MN testi) yapılması önerilmektedir. Üçüncü aşamada da, *in vivo* genotoksisite testleri (klastojenite ve anöploidi için rodent MN ve CA testi), gen

mutasyonu için transgenik rodent mutasyon (TGR) testi ve DNA hasarı için rodent komet testi yapılması önerilmektedir [167].

2.3.2. Kromozomal anormallikler (CA) testi

Genotoksisite riskini belirlemek için kullanılan en hassas yöntemlerden biri *in vitro* ve *in vivo* koşullarda uygulanabilen kromozomal anormallikler (CA) testidir. *In vitro* CA testinde; kültüre edilmiş sperm, fibroblast, kemik iliği ya da sıklıkla periferik kan lenfositleri gibi memeli hücreleri kullanılır. *In vivo* CA testinde ise genellikle vaskülarizasyonu fazla ve hızlı sirkülasyona sahip olan kemik iliği hücreleri kullanılır. *In vitro* CA testinde, hücre kültürleri hasat edilmeden 2 saat önce; *in vivo* çalışmalarda ise hayvanlar sakrifiye edilmeden 2-4 saat önce bir tübülün polimerizasyon inhibitörü olan ve hücre bölünmesini metafaz safhasında durduran kolşisin uygulanır. Daha sonra, kültürlerden veya kemik iliği hücrelerinden elde edilen metafaz hücrelerinin kromozomlarında ortaya çıkan sayısal ve yapısal anormallikler tespit edilir. Kromozomal anormallikler, kromozomlarda mikroskobik düzeyde gözlenebilen genetik değişikliklerdir. Kromozomal anormalliklerin çoğu hasar görmüş olan kromozomların tamir edilememesinden, yanlış tamirinden ya da hücre bölünmesi esnasında kutuplara göçte oluşan anormalliklerden kaynaklanmaktadır [26, 32, 37, 168, 169].

Bu yöntem ile belirlenebilen yapısal kromozom anormallikleri: kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom, halka kromozom, kardeş kromatid birleşmesi, kromatid değişimi, translokasyon, inversiyon, izokromozom ve endoreduplikasyondur. Kromatid kırığı, bir kromozoma ait iki kromatitten bir tanesinin kırık olması durumudur. Kromozom kırığı ise, bir kromozomun her iki kromatidinde aynı noktada oluşan kırılma sonucu meydana gelir. İki kromozomun uçlarındaki kırılma ve sonra bu iki kromozomun kırılan uçlarının birleşmesiyle disentrik kromozom oluşur. Bir kromozomun her iki kromatidinin uçlarındaki kırılma sonrasında, bu kromatidlerin birleşmesi ile de kardeş kromatidlerde birleşme adı verilen kromozomal anormallik oluşur. Fragment, kromozomlardan kopan parçaların kromozomdan ayrı bir yerde bulunması durumudur [170].

Translokasyon, kromozomal bir kopma sonucu oluşan kopuk bir uca homolog olmayan kromozomlardan başka bir kopuk parçanın yapışmasıdır. Kromozom parçası yer değişimleri, tek taraflı veya karşılıklı (resiprokal) olabilir. İnversiyon, bir kromozomun içinden kopan parçanın 180° ters dönerek tekrar aynı yere yapışmasıdır. İzokromozom, kromozomal bir kopma sonucu primer boğumda meydana gelen, kardeş kromatidlerin birleşmesiyle oluşan ve kromozom kollarının her ikisinin de birbiriyle aynı olduğu kromozomlardır. Halka kromozom, bir kromozomun iki ucunda da meydana gelen kromozomal kopma sonucu oluşan kırık uçların birleşmesi ile meydana gelir. Kromatid değişimi, triradyal (üçlü) ve quadriradyal (dörtlü) şekillerde kromozom kollarının yan yana gelmesiyle ve kromatidlerin birbiriyle değişmesiyle oluşur. Bazı durumlarda bölünmeyen hücrelerin DNA'sı tekrar replike olur ve bunun sonucunda önceki kromozomun her bir kromatitinden iki kromatitli birer kromozom meydana gelir. Birbirinden ayrılmayıp bir arada kalan kromozomlar metafaz plağında iki kromozom ve dört kromatitden oluşmuş olarak görülen yapılar oluşturur. Bu yapılar endoreduplikasyon adı verilir [170].

Bilinen veya şüphelenilen genotoksik ajanlara, çevresel veya mesleki olarak maruziyet sonrası oluşan erken biyolojik etkinin gösterilmesinde en fazla kullanılan biyoizlem testlerinden biri olan CA, diğer biyoizlem testleri arasında altın standart olarak tanımlanmıştır. Çünkü kromozomal aberasyonun indüksiyon mekanizmaları çok iyi bilinmektedir. Ayrıca çoğu mutajen veya karsinojenin kromozomal aberasyonunu indüklediği gösterilmiştir [35]. Tüm genomdaki hasarın izlenmesini mümkün kılan CA tekniği ile kanser riskinin erken dönemde belirlenmesi mümkündür [26, 33, 36,169, 171]. İnsan popülasyonları üzerinde yapılan çalışmalar, periferel kan lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallik sıklığının, hem genotoksik karsinojenlere maruz kalmanın erken biyolojik etkilerini, hem de kansere bireysel duyarlılığı yansıttığını dolayısıyla insanlarda kanser riskiyle ilgili bir biyolojik gösterge olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca bu çalışmalar, periferel lenfositlerdeki spontan kromozom anormalliklerinin frekansı ile kanser oluşumu arasında doğru orantı olduğunu bildirmiştir [172, 173, 174, 175, 176, 177].

2.3.3. Mikronukleus (MN) testi

Genotoksisite ve kanserojenitenin belirlenmesinde kullanılan geleneksel sitogenetik metodlardan bir diğeri de mikronukleus (MN) yöntemidir [178]. Bu yöntem, sitogenetik harabiyetin tespitinde kromozom analizine göre daha kolay uygulanabilmektedir. Ayrıca, daha fazla sayıda hücre sayılmasını ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır. Bu avantajlarından dolayı yaygın kullanım alanı bulmuştur [176, 179]. Günümüzde mitoz geçiren tüm bitki, hayvan ve insan hücrelerinde *in vivo* ve *in vitro* olarak uygulanabilen MN testi, çevresel maruziyetlere bağlı oluşan genotoksik etkinin gösterilmesinde en az kromozomal aberasyon tekniği kadar sık kullanılmaktadır [35]. MN testi, *in vitro* çalışmalarda nukleer bölünme indeksinin, *in vivo* çalışmalarda ise polikromatik eritrositler ile normokromatik eritrositler arasındaki oran kullanılarak sitotoksisitenin tahmin edilmesini de sağlamaktadır [180].

In vitro MN testinde, uygun ortamlarda inkübasyona bırakılan hücre kültürlerine, ilk mitozdan önce kültürün yaklaşık 44. saatinde küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan sitokalsin B (Cyt-B) ilave edilir. Cyt-B, sitokinez sırasında kardeş nükleuslar arasındaki sitoplazmayı daraltan mikrofilament halkanın oluşması için gerekli olan aktinin polimerizasyonunu inhibe eder. Böylece, çekirdek bölünmesini tamamlamış ancak stoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli (binükleat) hücreler elde edilir. İnkübasyon süresi sonunda, hazırlanan preparatlarda binükleat hücrelerdeki MN'ler sayılır. Binükleat hücrelerdeki MN'lerin sayılması ile hücrenin bir kez bölünmüş olduğu ispatlanmış olur. Test maddesi ile muamele edilmiş hücrelerden oluşan binükleat hücrelerdeki MN'ler, en az bir hücre bölünmesi yoluyla yavru hücrelere geçen genetik hasarı ifade eder. *In vivo* MN testinde ise, sitokinezi bloke edilmemiş memeli eritrosit hücrelerindeki MN sıklığı belirlenir. Bu yöntemde genellikle kemik iliğindeki ve/veya periferik kan hücrelerindeki olgunlaşmamış (polikromatik) eritrositlerin MN oluşumu bakımından analizi yapılarak, test edilen bileşiğin genetik bir hasar oluşturup oluşturmadığı saptanır [32].

MN'ler, spontan ya da indüklenmiş olarak ya asentrik kromozom fragmentlerinin ya da bütün kromozomların hücre bölünmesi sırasında ana çekirdek dışında kalmasıyla ayrı bir yavru çekirdek şeklinde oluşmaktadır. Mitozun anafazında sentrik elementler kutuplara çekilirken, klastojenik ve/veya anojenik etkiler sonucu ortaya çıkmış asentrik elementler ve iç ipliklerine bağlanamamış kromozomlar kutuplara gidemezler. Böylece hücre bölünmesi sonunda, aynı hücre sitoplazması içinde ana nukleusların yanında, onunla aynı şekil, yapı ve boyanma özelliği gösteren küçük küresel yapılar olarak gözlenirler. Bu yapılar anafaz evresinde geri kalan kromozomlar, asentrik kromozom fragmentleri veya yavru nukleusa girmeyen kromozomların yoğunlaşmasıyla oluşmaktadır [35, 181]. Anojenler, sentromer bölünme hatalarına ve iç iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenler ise kromatid veya kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna katkıda bulunurlar [181].

Mikronukleus testi, mutajenik ve/veya anojenik etkilerin belirlenmesinde hızlı ve güvenilir bir test olarak kabul görmektedir. Bu nedenle, insanların genotoksik kimyasallara maruziyetinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır [165]. Yapılan çalışmalarda, kanser hastalarından alınan periferal kan lenfositlerindeki MN frekansında belirlenen artışın, kanser oluşan hedef dokudaki MN frekansı kadar olduğu bulunmuştur. Epidemiyolojik çalışmalar ve bazı kimyasalların genotoksisitenin araştırıldığı çalışmalar, insan periferal lenfositlerinde artmış MN frekansı ile kanser insidansı arasında önemli bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur [176, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188].

2.3.4. Tek hücre jel elektroforezi (komet) testi

Tek hücre jel elektroforezi veya yaygın olarak kullanılan diğer adı ile komet analizi, kimyasal veya fiziksel ajanların canlı hücreler üzerindeki genotoksik etkilerinin göstergesi olan DNA hasar oranını ölçen floresan mikroskopik bir metottur. Bu metot, düşük düzeydeki DNA hasarlarını gösterebilmesi, fazla ekipman gerektirmemesi, farklı hücre tipleri üzerinde uygulanabilmesi, basit, hızlı, duyarlı, güvenilir ve ekonomik olması gibi nedenlerle son yıllarda yaygın bir kullanım alanı

bulmuştur. Komet analizi ilk olarak, insan ve hayvan hücreleri üzerinde uygulanmıştır. Daha sonra bitkiler, bakteriler, funguslar üzerinde de denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu teknikte insan hücreleri olarak, en sık lenfositler kullanılmaktadır. Ayrıca, bu teknikte nasal veya gastrik mukoza, lens, deri, kolon, fibroblast, pankreas, üreme ve adenokarsinom gibi insan hücreleri de kullanılabilir [29, 189].

Tek bir hücredeki DNA zincir kırıklarının belirlenmesini sağlayan komet testi, DNA hasarının hücresel seviyede gözlemlenmesini sağlar. Ayrıca DNA tamir aktivitesinin, alkali şartlarda tayin edilebilen hasarların, çapraz bağlanmaların ve tamamlanamamış eksizyon tamir bölgelerinin tayinine de olanak sağlar [190, 191]. Komet analizinin ayrı amaçlara yönelik olan ve genellikle kullanılan iki farklı uygulaması vardır [192]. Bu uygulamalardan biri, çözülme ve elektroforez aşamalarının nötral koşullar altında gerçekleştirildiği nötral komet tekniğidir. Nötral komet tekniği ile sadece DNA çift sarmal kırıkları tayin edilebilmektedir. Halbuki, DNA'da hasar oluşturan ajanların çoğu, DNA çift sarmalından çok DNA tek sarmalında hasarlar meydana getirmektedir. Teknikteki çözülme ve elektroforez aşamalarının alkali koşullar altında gerçekleştirildiği alkali komet tekniğiyle ise çift zincir kırıklarının yanı sıra tek zincir kırıkları da tanımlanabilmektedir [193, 194].

Günümüzde en çok kullanılan metot olan Singh ve ark.'nın geliştirdiği alkali komet tekniğinde ilk olarak, canlı dokulardan izole edilen hücreler mikroskop lamı üzerindeki agaroz jel içerisine gömülür. Daha sonra, bu lamlar yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren lizis solüsyonunda bekletilir. Lizis solüsyonu, hücre ve çekirdek zarlarını eriterek, çekirdekteki süperkoil DNA'nın agaroz içinde serbest kalmasını sağlar. Lizis aşamasından sonra, sarmal yapıda olan DNA zincirlerinin çözülüp gevşemesi ve kırıkların ortaya çıkması için lamlar yüksek alkali özellikteki (pH>13) elektroforez tampon çözeltisine daldırılır ve inkübasyona bırakılır. İnkübasyon tamamlandıktan sonra, DNA'lar bu tampon çözelti içerisinde elektriksel alanda elektroforeze tabi tutulur. Elektroforezi takiben oluşan alkali ortamı nötrleştirmek ve lamlardan mikroskop altında net görüntü alınmasını sağlamak için, preparatlar nötralizasyon tamponu ile yıkanır. Nötralizasyon

aşamasından sonra ise, DNA molekülleri ethidyum bromür gibi DNA'ya spesifik boyalarla boyanıp, görüntüleri floresan mikroskop altında incelenir [189].

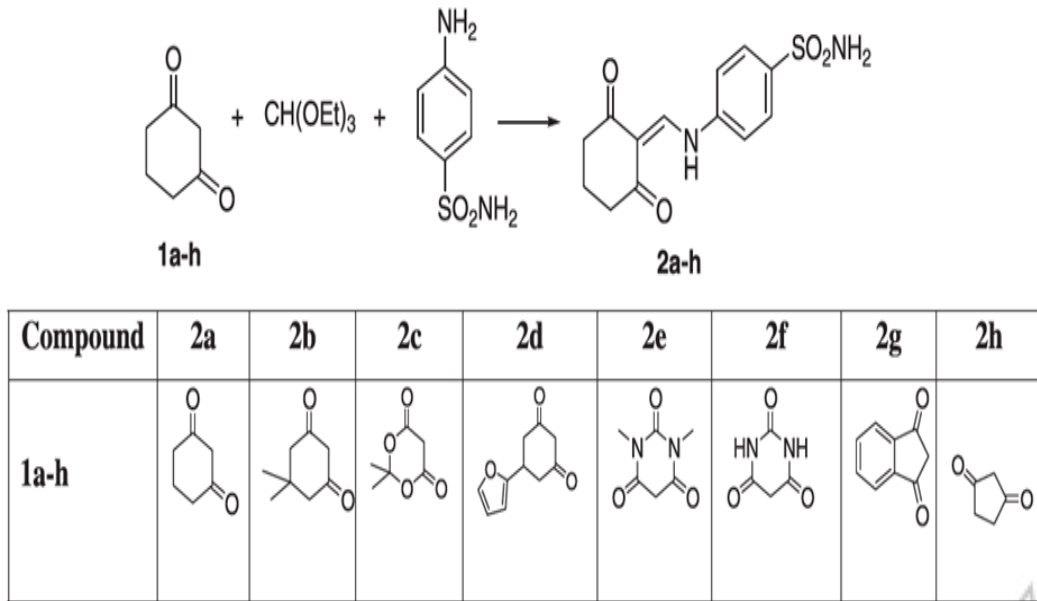
Boyanmış preparatların mikroskopik incelemesinde, DNA'lar içerdikleri hasarın derecesine göre, dairesel formdan kuyruklu yıldız benzer forma kadar çeşitli derecelerde görüntüler oluştururlar. Hasarsız DNA'lar, elektroforez esnasında bütünlüklerini kaybetmeden anota doğru yürüdüklerinden dairesel şekilde görülürler. Genotoksik ajanlarla hasarlanmış, tamir mekanizmaları ile tamir edilememiş ve tek veya çift zincirlerinde kırılmalar oluşmuş DNA zincirleri ise, farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüklerine sahip olduklarından elektroforez aşamasında anota doğru farklı hızlarda göç ettiklerinden kuyruklu yıldız şeklinde görüntüler oluştururlar. Yönteme İngilizce "kuyruklu yıldız" anlamına gelen komet adının verilmesi bu sebeptendir [189]. Karakteristik komet görüntülerinin analizi, floresan mikroskop üzerine monte edilen kapalı sistem dijital kamera bağlantısı ile yapılır. Bu analizler için, birçok şirket tarafından geliştirilmiş olan yazılımlar kullanılmaktadır. Programlar komet başını kuyruktan ayırt edebilecek ve kuyruk uzunluğu, kuyruktaki DNA yoğunluğu, kuyruk momenti gibi parametreleri belirleyebilecek şekilde tasarlanmıştır.

BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Test maddeleri

Sakarya Üniversitesi Kimya Bölümü'nde; sülfonilamit (18,25 gr, 0,106 mol), 1,3 dikarbonil bileşikleri (0,127 mol) ve trietil [ortoformat] (16 mL) karışımının 100 mL etanol içerisinde 3 saat reflukse edilmesiyle sentezlenmiş ve H NMR, C NMR, IR, elemental analizle karakterizasyonları yapılmış metilenaminobenzen sülfonamit türevleri Şekil 3.1.'de görülmektedir. İlaç etken maddeleri olarak kullanılma potansiyeline sahip olabilecekleri düşünülerek sentezlenmiş bu bileşiklerin, insan vücudunda en bol bulunan ve en yaygın dağılım gösteren insan kanından saflaştırılmış KA I ile KA II izoenzimleri üzerindeki inhibitör etkileri de Balıkesir Üniversitesi Kimya Bölümü'nde incelenmiştir [195].



Şekil 3.1. Metilenaminobenzen sülfonamit türevlerinin sentezi [195]

KA inhibisyonu incelemeleri sonucunda, yeni sentezlenen metilenaminobenzen sülfonamid türevlerinden 4-((4,4-dimetil-2,6-dioksosikloheksiliden) metilamino)benzen sülfonamid'in (2b) KA I'i diğer maddelere göre daha kuvvetli inhibe ettiği ($IC_{50}=2,12 \mu M$); 4-((1,3-dimetil-2,4,6-triokso-tetrahidropirimidin-5(6H)-iliden) metilamino)benzen sülfonamid'in (2e) de KA II'yi diğer maddelere göre daha kuvvetli inhibe ettiği ($IC_{50}=2,52 \mu M$) tespit edilmiştir [192]. Bu nedenle, 2b ve 2e bileşikleri, bu tez çalışmasında genotoksik profilleri araştırılan test maddeleri olarak seçilmiştir.

3.1.2. Periferel kan

Çalışmamızda sigara içmeyen, alkol kullanmayan, kronik hastalığı olmayan, son 1 hafta içinde herhangi bir ilaç kullanmayan, son 6 ay içerisinde teşhis ya da tedavi amacıyla herhangi bir ışına maruz kalmamış, 20-25 yaşları arasında sağlıklı iki erkek iki bayan donörden alınan periferel kanlar kullanılmıştır.

3.1.3. Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler

- Kromozom medium B

Cat No: F 5023

Marka: Biochrom

Kromozomal anormallik ve mikronukleus testlerinde, kan hücrelerinin çoğaltılması için besiyeri olarak kullanılmıştır.

-Mitomisin C ($C_{15}H_{18}N_4O$)

Cat No: 50-07-7

Marka: Applichem

Kromozomal anormallik ve mikronukleus testlerinde, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

- Kolşisin ($C_{22}H_{25}NO_6$)

Cat No: 64-86-8

Marka: Sigma

Kromozomal anormallik testinde, hücrelerde iğ ipliklerini depolimerize ederek, kromozomların metafaz plağında kalmasını sağlamak için kullanılmıştır.

-Potasyum klorür (KCl)

Cat No: 7447-40-7

Marka: Merck

Kromozomal anormallik ve mikronukleus testlerinde, hipotonik solüsyonun hazırlanmasında kullanılmıştır. Hipotonik solüsyon, eritrosit hücre zarlarının patlamasını sağlar ve bu şekilde lökositlerin izolasyonuna yardım eder.

-Metanol (CH_3OH)

Cat No: 67-56-1

Marka: Merck

Kromozomal anormallik ve mikronukleus testlerinde, fiksatifin hazırlanmasında kullanılmıştır.

-Asetik asit (CH_3COOH)

Cat No: 64-19-7

Marka: Merck

Kromozomal anormallik ve mikronukleus testlerinde, fiksatifin hazırlanmasında kullanılmıştır. 3 birim metanol ve 1 birim asetik asitten oluşan fiksatif, lökositlerin canlı hallerine en yakın şekilleriyle kalmasını sağlar.

-Giemsa boyası

HS Kodu: 3204-19-00

Marka: Merck

Preparatların boyanması işleminde kullanılmıştır.

-Tampon A (KH_2PO_4)

Cat No: 7778-77-0

Marka: Sigma Aldrich

Giemsa boyasının hazırlanması esnasında, tampon çözelti olarak kullanılmıştır.

-Tampon B: (Na_2HPO_4)

Cat No: 7558-79-04

Marka: Sigma Aldrich

Giemsa boyasının hazırlanması esnasında, tampon çözelti olarak kullanılmıştır.

-Entellan

HS kodu: 3208-20-10

Marka: Merck

Hazırlanan preparatların daimi preparat haline dönüştürülmesinde kullanılmıştır.

-Heparin ($\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{NO}_{20}\text{S}_3$)

Adı: Nevparin enjektabl 25000 İ.Ü. / 5 mL

Marka: Mustafa Nevzat

Hücre kültürlerinde kanın pıhtılaşmasını engellemek amacıyla kullanılmıştır.

-Sitokalsin-B ($\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{NO}_5$)

Cat No: 14930-96-2

Marka: Applichem

Mikronukleus testinde, sitokinezin oluşumunu bloke etmek amacıyla kullanılmıştır.

-Fosfat tamponu (PBS)

Cat No: L1825

Marka: Biochrom

Komet testinde, tampon olarak kullanılmıştır.

-Sodyum klorür (NaCl)

Cat No: 7647-14-5

Marka: Merck

Komet testinde, lizis çözeltisinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

-Hidrojen peroksit (H₂O₂)

Cat No: 7722-84-1

Marka: AppliChem

Komet testinde, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

-Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)

Cat No: 6381-92-6

Marka: AppliChem

Komet testinde, elektroforez tamponunun ve lizis çözeltisinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

-Tris-hidroksimetil-aminometan (Tris)

Cat No: 77-86-1

Marka: AppliChem

Komet testinde, lizis çözeltisinin ve nötralizasyon tamponunun hazırlanmasında kullanılmıştır.

-Sodyum hidroksit (NaOH)

Cat No: 13-10-73-2

Marka: AppliChem

Komet testinde, elektroforez tamponunun hazırlanmasında ve lizis stoğunun pH'ının ayarlanmasında kullanılmıştır.

-Triton X

Cat No: 9002-93-1

Marka: AppliChem

Komet testinde, lizis solüsyonunun hazırlanmasında kullanılmıştır.

-Dimetilsülfoksit (DMSO)

Cas No: 67-68-5

Marka: Applichem

Komet testinde, lizis solüsyonunun hazırlanmasında kullanılmıştır.

-Düşük erime ısıly agar (LMA)

Cat No: 9012-36-6

Marka: Applichem

Komet testinde, lenfositlerin içine gömüldüğü ortam olarak kullanılmıştır.

-Yüksek erime ısıly agar (NMA)

CaT No: 9012-36-6

Marka: Applichem

Komet testinde, lamaların kaplanması için kullanılmıştır.

-Etidyum bromür (EtBr)

Cat No: 1239-45-8

Marka: Applichem

Komet testinde, DNA'nın boyanmasını ve floresan mikroskobu altında gözlenmesini sağlamak için kullanılmıştır

-Tripan mavisi

Cat No: L 6323

Marka: Biochrome

Komet testinde, hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

-Biocoll

Cas No: L 6115

Marka: Biochrome

Komet testinde, lenfosit ayırıcı solüsyon olarak kullanılmıştır.

3.1.4. Çalışmalarda kullanılan çözeltiler

-Tampon A

KH₂PO₄11,34 gr
Distile su 250 mL

-Tampon B

Na₂HPO₄12H₂O14,83 gr
Distile su250 mL

-0,075 M KCl çözeltisi

KCl1,398 gr
Distile su250 mL

-Kolşisin (0,06 µg/mL)

Kolkisin0,01 gr
Distile su10 mL

Hazırlanan bu çözeltiden 87,47 µL alınmış ve 10 mL'ye tamamlanmıştır.

-Mitomisin C (MMC) (0,2 µg/mL)

Mitomisin C2 mg
Distile su2 mL

Hazırlanan stok çözeltiden 110 µL alınmış ve 1 mL'ye tamamlanmıştır.

-Sitokalsin B (5,2 µg/mL)

Sitokalsin5 mg
DMSO2440 µL

-10 M NaOH çözeltisi

NaOH40 gr
Distile su100 mL

-0, 2 M EDTA çözeltisi

EDTA1, 488 gr

Distile su20 mL

-Stok 100 µg/mL etidyum bromür çözeltisi

EtBr5 mg

Distile su50 mL

Hazırlanan stok çözelti + 4 °C'de saklanmıştır. Lamlar boyanacağı zaman çözelti 1:4 oranında distile su ile seyreltilip kullanılmıştır.

-Stok lizis çözeltisi

2,5 M NaCl.....43,83 gr

10 mM Tris.....0,36 gr

100 mM EDTA11,16 gr

Distile su270 mL

Çözeltinin pH'sı 10 M NaOH ile 10'a ayarlanmıştır. Hazırlanan stok lizis çözeltisi oda sıcaklığında saklanmıştır. Kullanmadan önce her 100 mL çözelti için 1 mL Triton X ve 10 mL DMSO ilave edilmiştir.

-Elektroforez tamponu

10 M NaOH.....40,50 mL

0,2 M EDTA7,29 mL

Distile su1350 mL

-Nötralizasyon tamponu

0,4 M Tris.....15,55 gr

Distile su300 mL

Çözeltinin pH'sı konsantre HCl ile p H=7,5'e ayarlanmıştır.

-Düşük erime sıcaklığına sahip agar

Agar.....0,065 gr

PBS.....10 mL

-Yüksek erime sıcaklığına sahip agar

Agar.....0,65 gr

Distile su100 mL



3.2. Metot

3.2.1. Kromozomal anormallik testi

Besiyerleri (Kromozom medium B) steril tüplere 2,5 mL olacak şekilde dağıtılmıştır. Çalışmamızda 2b maddesi için 3 uygulama dozu (0,53, 1,06 ve 2,12 µg/mL) ve pozitif kontrol, negatif kontrol, çözücü kontrol kullanılmıştır. 2e maddesi için de 3 uygulama dozu (0,63, 1,26 ve 2,52 µg/mL) ve pozitif kontrol, negatif kontrol, çözücü kontrol kullanılmıştır. Sağlıklı 4 bireyden 1/10 oranında heparinli periferik kanlar alınmıştır. Donörlerden alınan bu kanlardan 0,2'şer mL, tüplerdeki 2,5 mL'lik besiyerlerine aktarılmıştır. Tüpler önceden 37 °C'ye getirilmiş olan etüve kaldırılarak 72 saat süreyle inkübe edilmiştir. Kültür süresi boyunca, tüpler hergün 3 defa alt üst edilmiştir. Kültürdeki tüplere, ilaç uygulama süresine göre madde ekimi yapılmıştır. 24 saatlik maruziyet için kültür süresinin 48. saatinde, 48 saatlik maruziyet için kültür süresinin 24. saatinde kültür ortamına 0,53, 1,06, 2,12 µg/mL'lik konsantrasyonlarda 2b maddesi ve 0,63, 1,26, 2,52 µg/mL'lik konsantrasyonlarda 2e maddesi uygulanmıştır. Aynı zamanda negatif kontrol olarak steril distile su, çözücü kontrol olarak dimetilsülfoksit (DMSO), pozitif kontrol olarak mitomisin C (MMC) (0,2 µg/mL) eklenmiştir. Çalışmanın 70. saatinde tüplere iğ ipliklerinin depolarizasyonunu sağlayan kolşisin (0,06 µg/mL) eklenmiştir.

Kültür süresi sonunda, tüpler 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatantları atılan tüplere, sıcaklığı önceden 37 °C'ye getirilmiş 0,075 M KCl'den 5'er mL vorteks üzerinde ilave edilmiştir. Hipotonik solüsyonun eklemesinin ardından, tüpler 37 °C'lik etüvde 30 dk bekletilmiştir. Süre sonunda, tüpler tekrar 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatantları atılmıştır. Sonrasında, her tüpe daha önceden hazırlanmış ve +4 °C'de buzdolabında bekletilmiş soğuk fiksasyon çözeltisinden (3 metanol:1 asetik asit) 5'er mL vorteks üzerinde eklenmiştir. Bu işlemden sonra, tüpler 45 dk buzdolabında bekletilmiştir. Ardından, tüpler tekrar santrifüj edilerek (10 dk, 1200 rpm) süpernatantları atılmış ve tekrar damla damla soğuk metanol:asetik asit (3:1) fiksatifinden 5'er mL her tüpe vorteks üzerinde eklenmiştir. Bu işlemden sonra, tüpler tekrar santrifüj edilip (1200 rpm, 10

dk) süpernatantları atılmış ve fiksatif ekleme işlemi bir kez daha yapıldıktan sonra tüplerin içindeki konik kısma kadar olan kısım atılmıştır. Kalan kısım pastör pipeti ile pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Elde edilen hücre kültürleri önceden temizlenmiş (saf suyla yıkanmış ve çalışma zamanına kadar -20 °C'de bekletilmiş) lamlar üzerine damlatılarak preparat hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatlar 1 gün kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar, tampon A ve tampon B kullanılarak pH 6,8 olacak şekilde hazırlanmış % 5'lik giemsa boyası ile 15-20 dk boyanmış ve daimi preparat haline getirmek için entellan ile kapatılmıştır.

3.2.1.1. Mitotik indeks ve kromozomal anormalliklerin incelenmesi

Mitotik indeks (Mİ)'in saptanmasında, bütün uygulama dozlarında her bir birey için 3000 hücre (toplam 12000 hücre) incelenmiştir. Bölünen hücre sayısının, toplam hücreye oranının yüzde cinsinden hesaplanmasıyla mitotik indeks belirlenmiştir. Kromozomal anormallikler, bütün uygulama dozlarında her bir birey için 46 kromozomlu ve kromozomları iyi dağılmış 100'er hücre (toplam 400 hücre) değerlendirilerek saptanmıştır. İncelenen toplam hücre içindeki anormal hücre yüzdeleri ve hücre başına düşen kromozomal anormallik (CA/Hücre) sayıları da belirlenmiştir. Şekil 3.2.'de kromozomal anormallik testinin 24 saatlik uygulamasını gösteren bir diyagram yer almaktadır. 48 saatlik uygulamada, 24 saatlik uygulamadan farklı olarak sadece etüvdeki kültüre 24. saatte madde ekimi yapılmıştır. Diğer tüm protokol 24 saatlik uygulama metodu ile aynıdır.

3.2.2. Mikronukleus testi

Besiyerleri (Kromozom medium B) steril tüplere 2,5 mL olacak şekilde dağıtılmıştır. Bu testte, 2b maddesi için 3 uygulama dozu (0,53, 1,06 ve 2,12 µg/mL) ve pozitif kontrol, negatif kontrol, çözücü kontrol kullanılmıştır. 2e maddesi için 3 uygulama dozu (0,63, 1,26 ve 2,52 µg/mL) ve pozitif kontrol, negatif kontrol, çözücü kontrol kullanılmıştır. Alınan kanlardan 0,2'şer mL, tüplerdeki 2,5 mL'lik besiyerlerine aktarılmıştır. Tüpler önceden 37 °C'ye getirilmiş etüve kaldırılarak, 72 saat kültüre alınmıştır. Kültür süresince, tüpler hergün 3 defa alt üst edilmiştir. Kültürün başlangıcından itibaren 24. saatte, kültür ortamına 0,53, 1,06, 2,12 µg/mL'lik dozlarda 2b maddesi ve 0,63, 1,26, 2,52 µg/mL'lik dozlarda 2e maddesi uygulanmıştır. Aynı zamanda negatif kontrol olarak steril distile su, çözücü kontrol olarak dimetilsülfoksit (DMSO) ve pozitif kontrol olarak mitomisin C (MMC) (0,2 µg/mL) eklenmiştir. Kültürün 44. saatinde, tüplere sitokinez inhibitörü olan sitokalsin B (5,2 µg/mL) eklenmiştir.

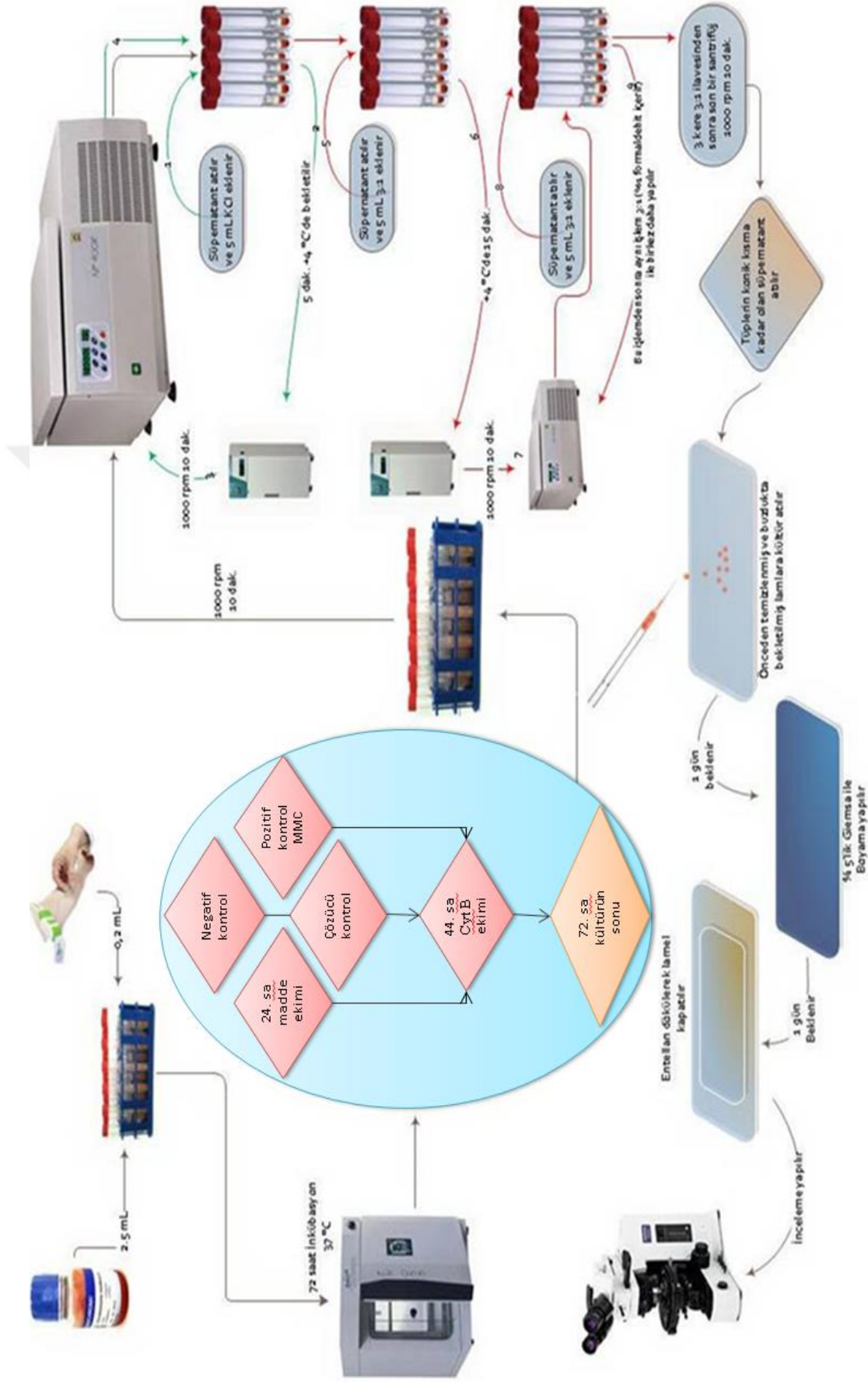
Kültür süresi bitiminde, tüpler etüvden çıkarılmış ve 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra tüplerdeki süpernatantlar atılmış ve tüplere önceden hazırlanıp +4 °C'ye getirilmiş 0,075 M KCl çözeltisinden (hipotonik solüsyon) 5'er mL vorteks üzerinde ilave edilmiştir. Ardından, tüpler +4 °C'de buzdolabında 5 dk bekletilmiştir. Süre sonunda, tüpler tekrar 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatantları atılmıştır. Sonrasında, daha önceden hazırlanmış ve +4 °C'de buzdolabında bekletilmiş, soğuk fiksatif çözeltisinden (3 metanol : 1 asetik asit) 5'er mL her tüpe vorteks üzerinde eklenmiştir. Bu işlemde sonra, tüpler +4 °C'de 15 dk buzdolabında bekletilmiş ve ardından tekrar santrifüj edilmiştir (10 dk, 1000 rpm). Santrifüj sonrasında süpernatant atılmıştır. Tekrar damla damla soğuk metanol:asetik asit (3:1) fiksatifinden 5'er mL her tüpe vorteks üzerinde eklenip, tüpler tekrar santrifüj edilmiş (1000 rpm, 10 dk) ve süpernatantlar atılmıştır. Bu işlemde sonra, daha önceden hazırlanmış olan 3:1 fiksatifine % 1'lik olacak şekilde formaldehit eklenmesiyle elde edilen fiksatiften, her tüpe 5'er mL eklenmiştir. Son fiksatif eklendikten sonra, tüpler tekrar santrifüj edilmiştir (10 dk. 1000 rpm). Santrifüjden

sonra, tüplerin konik kısma kadar olan içerikleri atılmış ve kalan kısım pastör pipeti ile yavaş bir şekilde homojen hale getirilmiştir.

Elde edilen hücre kültürleri önceden temizlenmiş (1 N nitrik asitte 1 gece bekletilmiş ve 25-30 dk çeşme suyunda yıkanmış, sonra saf sudan geçirilip % 70'lik alkol içerisinde -20 °C'de çalışma zamanına kadar bekletilmiş) lamalar üzerine damlatılmıştır. Kuruyan preparatlar pH'ı 6,8 olacak şekilde hazırlanmış % 5'lik giemsa boyası ile 13-15 dk boyanmış ve daimi preparat haline getirmek için entellan ile kapatılmıştır. Şekil 3.3.'de mikronukleus testinin uygulamasını gösteren bir diyagram yer almaktadır.

3.2.2.1. Mikronukleus frekansı ve nukleer bölünme indeksinin belirlenmesi

Daimi hale getirilmiş preparatlarda, her bir doz için her bir bireyde 1000 binukleat hücrede (toplamda 4000 binükleat hücre) mikronukleus frekansları belirlenmiştir. Nukleer bölünme indeksi (NBI) belirlenirken, her bir doz için her bir donörden 500 hücre (toplamda 2000 hücre) sayılmış ve $1xN1+2xN2+3x(N3+N4)/N$ formülünden yararlanılarak 1, 2, 3 ve daha fazla çekirdekli hücrelerin sayısına göre nukleer bölünme indeksleri tespit edilmiştir.



Şekil 3.3. Mikronukleus tekniğinin uygulaması [196]

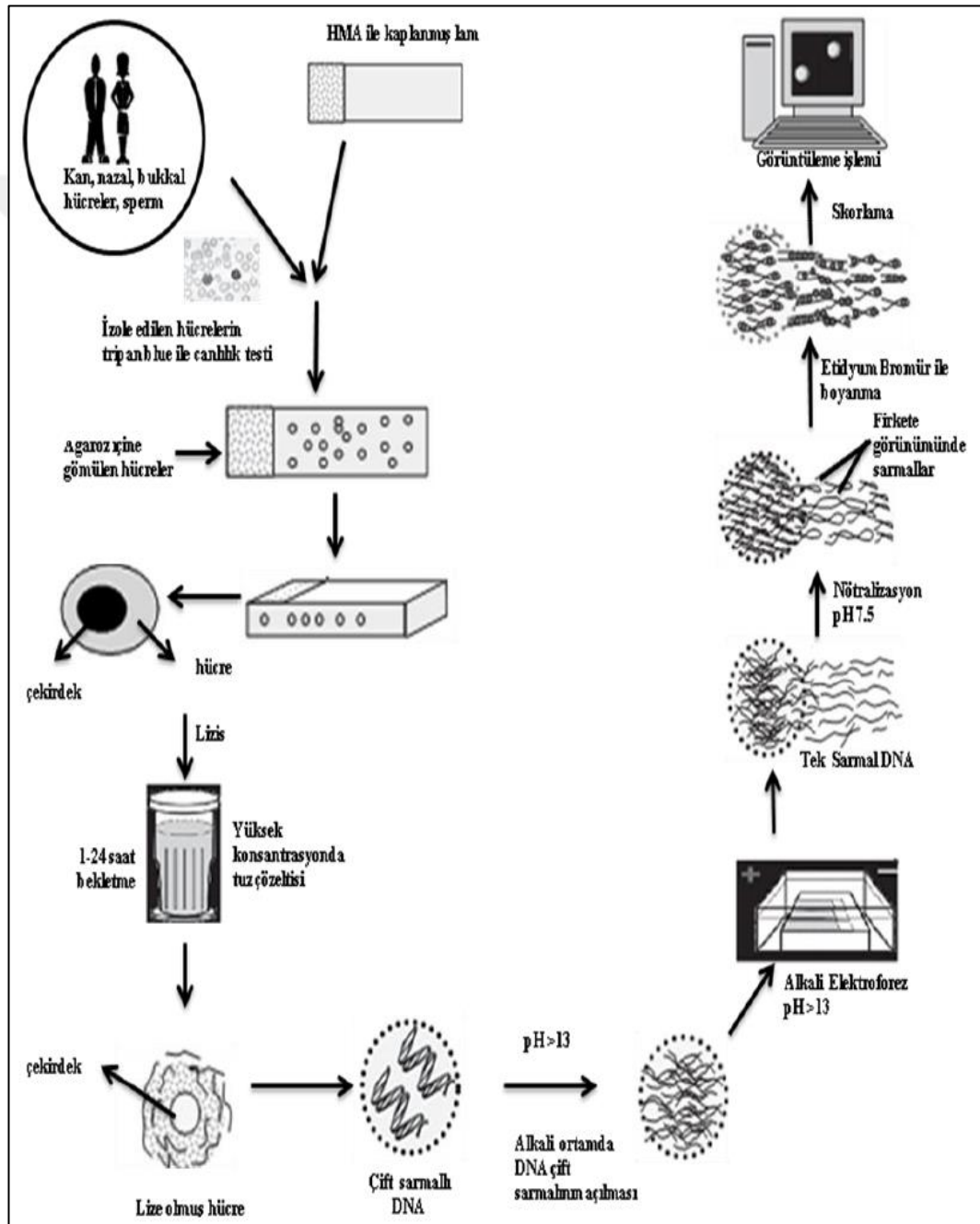
3.2.3. Tek hücre jel elektroforezi (komet) testi

900'er μL PBS, ependorflara konmuş ve her bir ependorfa 100'er μL kan ilave edilmiştir. Kan ve PBS süspansiyonu edilip, 10 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Ardından, ependorfların dip kısmına 100'er μL lymphoprep (biocoll) ilave edilmiştir. Sonra, tüpler $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 1060 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası, ependorflar tekrar buz içerisine alınmıştır. Ependorflarda en altta kırmızı, onun üzerinde pembe bir katman görülür. En üst pembe katmanın üzerindeki şeffaf katmanın 100 μL 'si ayrı ependorflara aktararak, lenfositler toplanmış ve buz üzerine yerleştirilmiştir. Elde edilen lenfositler, 180'er μL olarak ependorflara dağıtılmıştır. Bu ependorflara 0,53, 1,06 ve 2,12 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde 2b maddesi, 0,63, 1,26 ve 2,52 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde 2e maddesi, negatif kontrol olarak steril saf su, çözücü kontrol olarak DMSO, pozitif kontrol olarak H_2O_2 eklenip $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 1 saat kültüre alınmıştır. Kültür sonrasında, ependorflar 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrası, ependorflardan 100'er μL süpernatantlar atılmış ve 100 μL PBS eklenerek resüspansiyonu edilmiştir. Düşük erime ısıları agarın 75 μL 'si alınarak, 100 μL lenfositlerle hızlı bir şekilde karıştırılmış ve önceden yüksek erime dereceli agarla kaplanmış lamalar üzerine yayılmıştır. Üzerleri 24x60 mm'lik lamellerle kapatılmıştır. Kapatılan lamalar, kapalı kutu içinde 20-25 dk buzdolabında bekletilmiştir. Süre sonunda, üzerindeki lamelleri kaldırılan lamalar, alüminyum folyo ile kaplı lizis solüsyonu içeren şalelere yerleştirilmiştir. Bu şekilde, preparatlar 1 saat buzdolabında bekletilmiştir. Lizisten sonra, lamalar elektroforez tankında bulunan alkali tampon içerisine yerleştirilmiş ve burada 20 dk bekletilmiştir. Süre sonunda, preparatlar 1 V/cm 300 mA'de 20 dk süreyle elektroforeze tabi tutulmuştur. Elektroforezden sonra, lamalar içerisinde nötralizasyon tamponu bulunan şalelere alınıp burada $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 5 dk bekletilmiş ve aynı işlem 2 kez tekrarlanmıştır.

İşlemler sonunda, her bir lama 50 μL EtBr eklenerek üzerlerine lamel kapatılmıştır. Boyanan preparatlar, 15-20 dk buzdolabında bekletilmiştir. Sonra buharının uçması için 5 dk oda sıcaklığında bekletilip, preparatlarda sayım yapılmıştır. Bütün işlemler, karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Boyanan preparatlar, BAB marka florasan

ataçmanlı mikroskop altında x40 büyütmede incelenmiştir. 2b ve 2e bileşiklerinin her bir dozu için her bir donörden 100'er hücre olmak üzere (bir bileşik için toplam 400 hücre) "BAB Bs200ProP/BsComet DNA Comet Assay" kullanılarak incelenmiş ve sonuçlar kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti cinsinden değerlendirilmiştir. Şekil 3.4.'de komet tekniğinin uygulanışını gösteren bir diyagram yer almaktadır.



Şekil3.4. Komet tekniğinin uygulanışı [34]

3.2.4. İstatistiksel değerlendirme

Deney gruplarındaki anormal hücre yüzdelerinin, hücre başına düşen kromozomal anormallik sayılarının, mitotik indekslerin, mikronukleus frekanslarının, hücre başına düşen mikronukleus yüzdelerinin ve nukleer bölünme indekslerinin, kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterip göstermediğinin belirlenmesi için z dağılım testi kullanılmıştır. Komet analizinde belirlenen kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti değerlerinin kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak farklılık gösterip göstermediğinin belirlenmesi için de, student-t testi kullanılmıştır. Anormal hücre frekansları, hücre başına düşen kromozomal anormallik sayıları, mitotik indeksler, mikronukleus frekansları, hücre başına düşen mikronukleus yüzdeleri, nukleer bölünme indeksleri, kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti değerlerini doz-etki ilişkileri bakımından ortaya koymak için SPSS 15.0 yazılımı ile regresyon katsayıları (r) hesaplanmıştır.

BÖLÜM 4. BULGULAR

4.1. 4-((4,4-Dimetil-2,6-dioksosikloheksiliden)metilamino)benzen Sülfonamit'in (2b) İnsan Periferal Kan Lenfositleri Üzerindeki Genotoksik Etkileri

4.1.1. Kromozomal anormallikler testinin bulguları

24 saatlik *in vitro* CA testinde, 2b maddesinin 3 farklı dozu (0,53, 1,06 ve 2,12 µg/mL) kullanılmıştır. Bu uygulama sonucunda insan lenfositlerinde saptanan yapısal kromozomal anormallik çeşitleri, anormal hücre yüzdeleri, hücre başına düşen kromozomal anormallik sayıları ve mitotik indeksler Tablo 4.1.'de verilmiştir. Bu uygulamada, lenfositlerde gözlenen yapısal kromozomal anormalliklerinin çeşitleri görülme sıklıklarına göre sırasıyla kromatit kırığı, fragment ve kromozom kırığı şeklindedir. Bu anormalliklerin fotoğrafları Şekil 4.1.-4.3.'de gösterilmiştir.

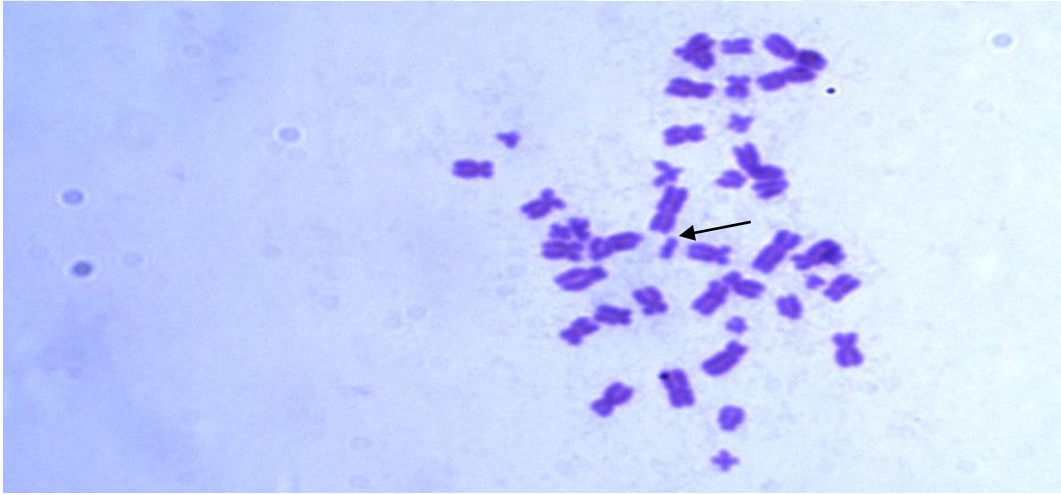
Tablo 4.1. 2b maddesinin 24 saat uygulaması ile insan periferal lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler

Test maddesi	Uygulama		Yapısal Anormallikler				Anormal hücre (%) ± SH	CA/Hücre ± SH	Mitotik İndeks (%) ± SH
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	Ktk	Kzk	F	Ds			
N.Kontrol	24	0,00	3	2	2	-	1,75±0,65	0,0175±0,006	6,27±0,22
Ç.Kontrol	24	20 µL	7	-	1	-	2,00±0,70	0,0200±0,007	5,90±0,21
P.Kontrol	24	0,20	54	24	20	2	20,75±2,02	0,2500±0,021	3,10±0,16
2b	24	0,53	3	-	1	-	1,00±0,50	0,0100±0,005	5,95±0,22
		1,06	2	-	5	-	1,75±0,65	0,0175±0,006	5,77±0,21
		2,12	5	1	4	-	2,50±0,78	0,0250±0,008	6,00±0,22

Ktk: kromatid kırığı, Kzk: kromozom kırığı, F: fragment, Ds: Disentrik kromozom, SH: standart hata. Kromozomal anormalliklerde her doz için 400 metafaz hücresi, Mitotik indeks için 12000 hücre incelenmiştir.



Şekil 4.1. 2b maddesinin 24 saat uygulaması ile oluşan kromatit kırığı

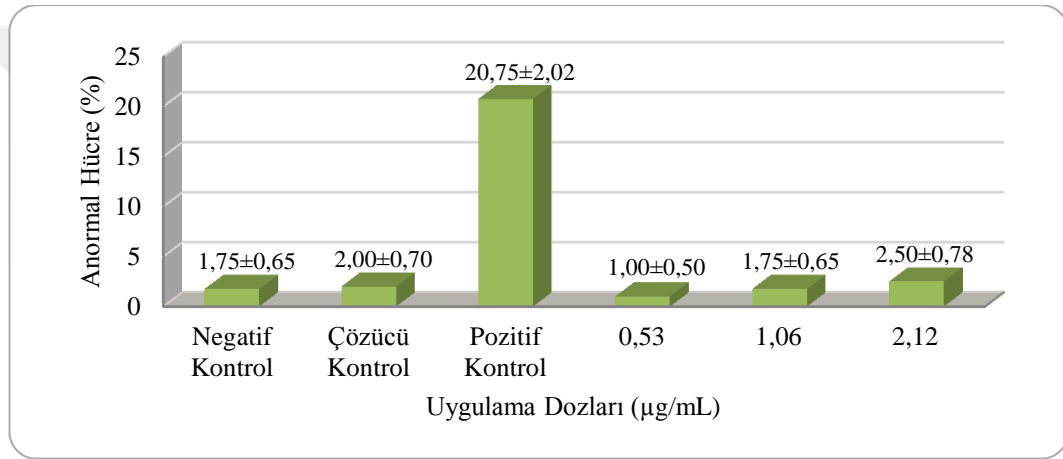


Şekil 4.2. 2b maddesinin 24 saat uygulaması ile oluşan fragment

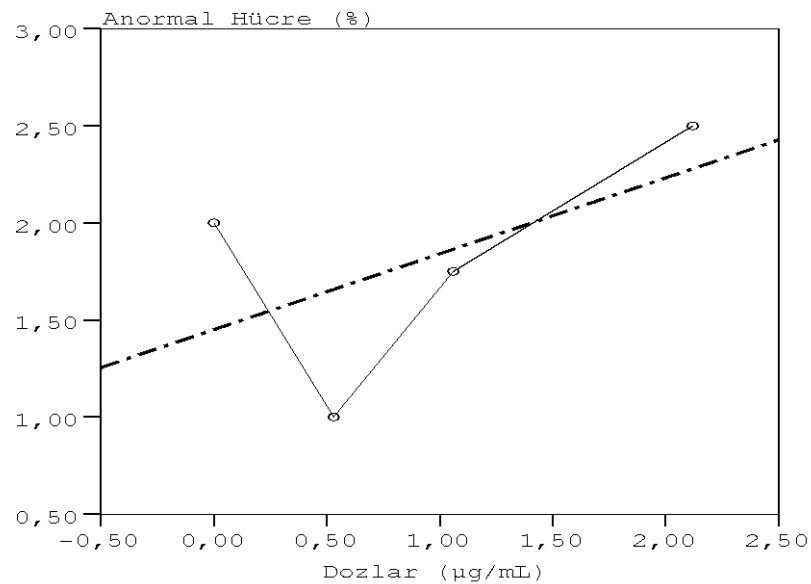


Şekil 4.3. 2b maddesinin 24 saat uygulaması ile oluşan kromozom kırığı

2b maddesiyle yapılan 24 saatlik muamele sonucunda, en düşük anormal hücre yüzdesi 0,53 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda 1,00, en yüksek anormal hücre yüzdesi 2,12 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda 2,50 olarak belirlenmiştir. 1,06 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozdaki anormal hücre yüzdesi 1,75 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4.). Bu veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, hiçbir uygulama dozunda hem negatif kontrole göre hem de çözücü kontrole göre anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (Tablo 4.1.). Diğer yandan, bu uygulamada anormal hücre yüzdesi ile doz artışı arasında hem negatif kontrole göre kuvvetli bir ilişki tespit edilmiş ($r=0,71$), hem de çözücü kontrole ($r=0,57$) göre çok kuvvetli olmayan bir ilişki tespit edilmiştir (Şekil 4.5.).

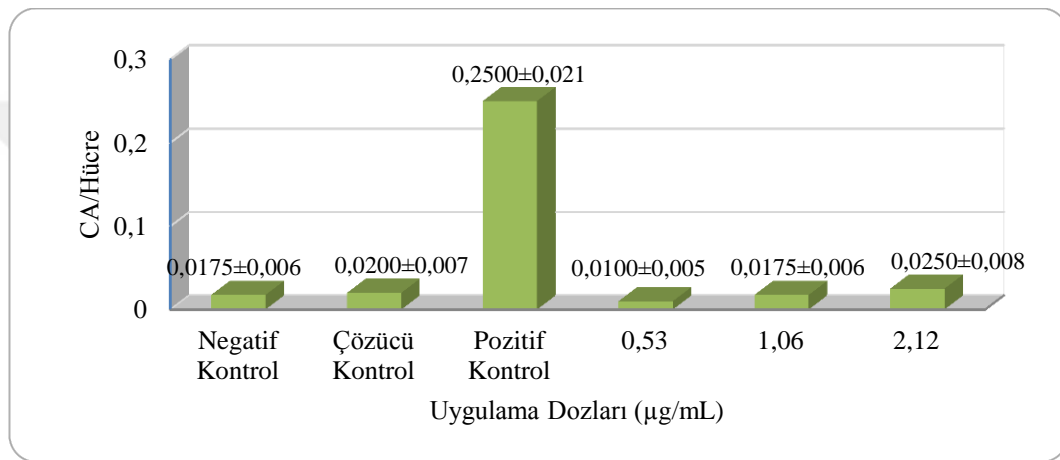


Şekil 4.4. 24 saatlik 2b maddesi uygulamasında dozlara göre anormal hücre yüzdeleri

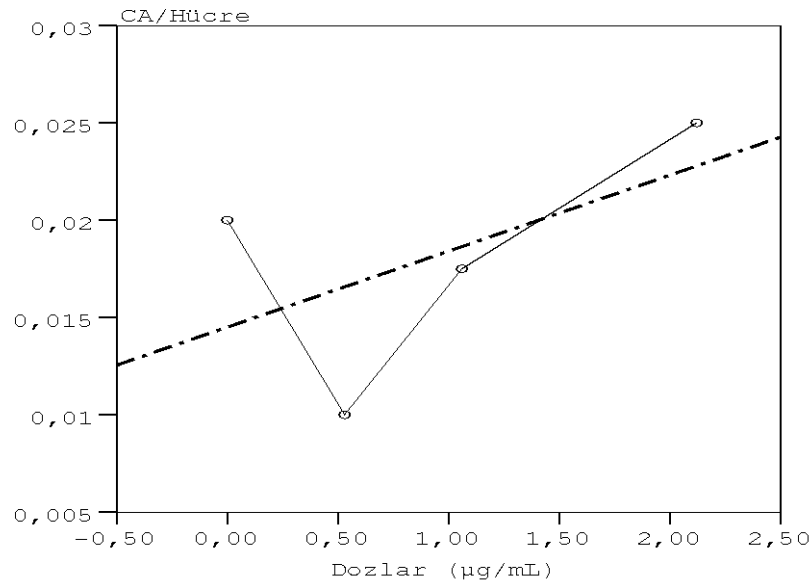


Şekil 4.5. 24 saatlik 2b maddesi uygulamasında anormal hücre yüzdelерinin doza bağılı ilişkisi

24 saat 2b maddesiyle muamele edilen kültürlerde, hücre başına düşen kromozomal anormallik sayısı $0,53 \mu\text{g/mL}$ 'lik dozda $0,0100$ olarak, $1,06 \mu\text{g/mL}$ 'lik dozda $0,0175$ ve $2,12 \mu\text{g/mL}$ 'lik dozda $0,0250$ olarak saptanmıştır (Şekil 4.6.). Bu veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, hücre başına düşen kromozomal anormallik sayısında hiçbir uygulama dozunda her iki kontrol grubuna göre de anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir (Tablo 4.1). Bu uygulamada da, CA/Hücre frekansı doz-etki ilişkisi bakımından değerlendirildiğinde, hem negatif kontrole göre ($r=0,71$) hem de çözücü kontrole göre zayıf bir ilişki ($r=0,57$) gözlenmiştir (Şekil 4.7.).

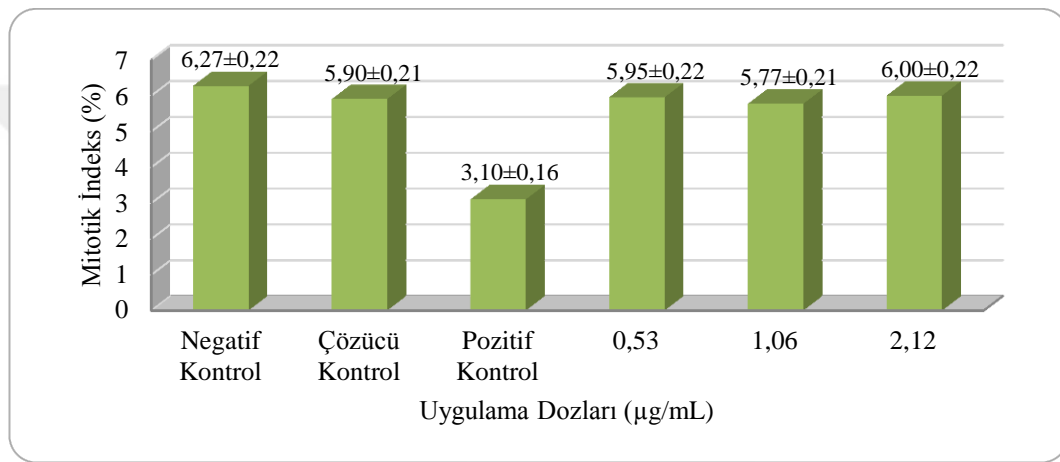


Şekil 4.6. 24 saatlik 2b maddesi uygulamasında dozlara göre hücre başına düşen anormallik sayıları

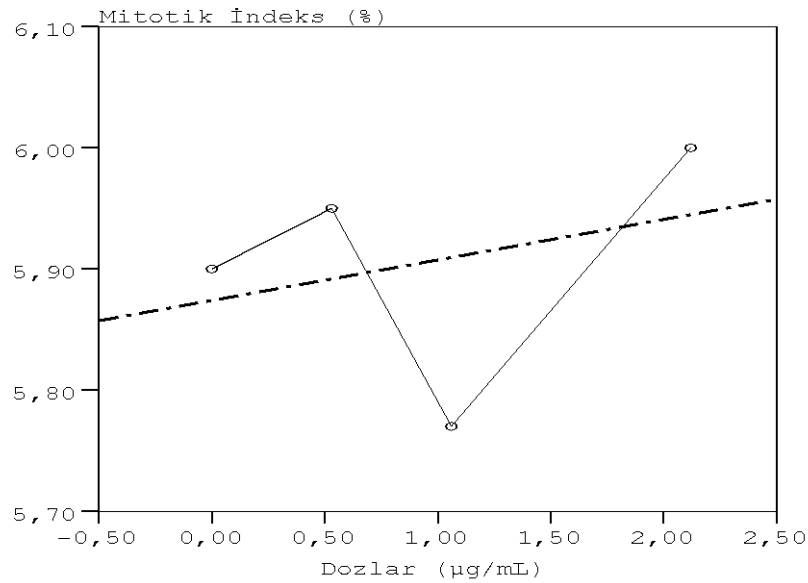


Şekil 4.7. 24 saatlik 2b maddesi uygulamasında hücre başına düşen anormallik sayılarının doza bağlı ilişkisi

2b maddesiyle yapılan 24 saatlik uygulama sonucunda, mitotik indeks 0,53 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda 5,95 olarak, 1,06 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda 5,77 ve 2,12 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda 6,00 olarak bulunmuştur (Şekil 4.8.). Bu veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, mitotik indeks değerlerinde hiçbir dozda hem negatif kontrole hem de çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Tablo 4.1.). Bu uygulamada, mitotik indeks ile doz artışı arasında negatif kontrole göre zayıf bir ilişki ($r=-0,46$) saptanmış, çözücü kontrole göre ($r=0,30$) herhangi bir ilişki saptanmamıştır (Şekil 4.9.).



Şekil 4.8. 24 saatlik 2b maddesi uygulamasında dozlara göre mitotik indeks değerleri



Şekil 4.9. 24 saatlik 2b maddesi uygulamasında mitotik indeks değerlerinin doza bağlı ilişkisi

48 saatlik *in vitro* CA testinde, 2b maddesinin 3 farklı dozu (0,53, 1,06 ve 2,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) kullanılmış ve uygulama sonucunda insan lenfositlerinde saptanan kromozomal anormalliklerin çeşitleri, anormal hücre yüzdeleri, hücre başına düşen kromozomal anormalliklerin sayıları ve mitotik indeksler Tablo 4.2.'de verilmiştir. Tespit edilen yapısal tipteki kromozomal anormallikleri görülme sıklıklarına göre sırasıyla kromatit kırığı, fragment, kromozom kırığı, kardeş kromatidlerde birleşme ve disentrik kromozom şeklindedir. Bu anormalliklerin fotoğrafları Şekil 4.10.-4.14.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. 2b maddesinin 48 saat uygulaması ile insan periferik lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler

Test maddesi	Uygulama		Yapısal Anormallikler						Anormal hücre (%) \pm SH	CA/Hücre \pm SH	Mitotik İndeks (%) \pm SH
	Süre saat	Doz $\mu\text{g}/\text{ml}$	Ktk	Kzk	F	Ktd	Kkb	Ds			
N.Kontrol	48	0,00	3	-	1	-	-	1	1,25 \pm 0,55	0,0125 \pm 0,005	5,93 \pm 0,21
Ç.Kontrol	48	20 μL	3	-	1	-	-	-	1,00 \pm 0,50	0,0100 \pm 0,005	6,00 \pm 0,21
P.Kontrol	48	0,20	65	25	27	4	1	-	23,75 \pm 2,13	0,3050 \pm 0,023	2,71 \pm 0,15
2b	48	0,53	5	2	-	-	-	-	1,75 \pm 0,65	0,0175 \pm 0,006	5,20 \pm 0,20 ^{*+}
		1,06	2	-	3	-	-	-	1,25 \pm 0,55	0,0125 \pm 0,005	5,13 \pm 0,20 ^{**+}
		2,12	2	-	1	-	1	1	1,25 \pm 0,55	0,0125 \pm 0,005	5,20 \pm 0,20 ^{*+}

Ktk: kromatit kırığı, Kzk: kromozom kırığı, F: Fragment, Ktd: Kromatid değişimi, Kkb: Kardeş kromatidlerde birleşme. Ds: Disentrik kromozom. Kromozomal anormalliklerde her doz için 400 metafaz hücresi, Mitotik indeks için 12000 hücre incelenmiştir.

*Negatif kontrole göre anlamlı fark vardır. ($p<0,05$)

**Negatif kontrole göre anlamlı fark vardır. ($p<0,01$)

+Çözücü kontrole göre anlamlı fark vardır. ($p<0,01$)



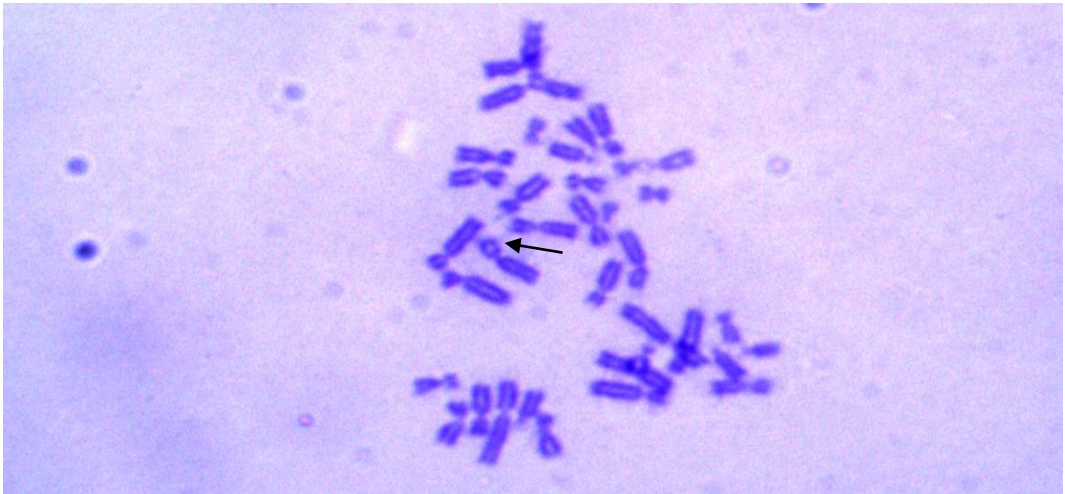
Şekil 4.10. 2b maddesinin 48 saat uygulaması ile oluşan kromatit kırığı



Şekil 4.11. 2b maddesinin 48 saat uygulaması ile oluşan fragment



Şekil 4.12. 2b maddesinin 48 saat uygulaması ile oluşan kromozom kırığı

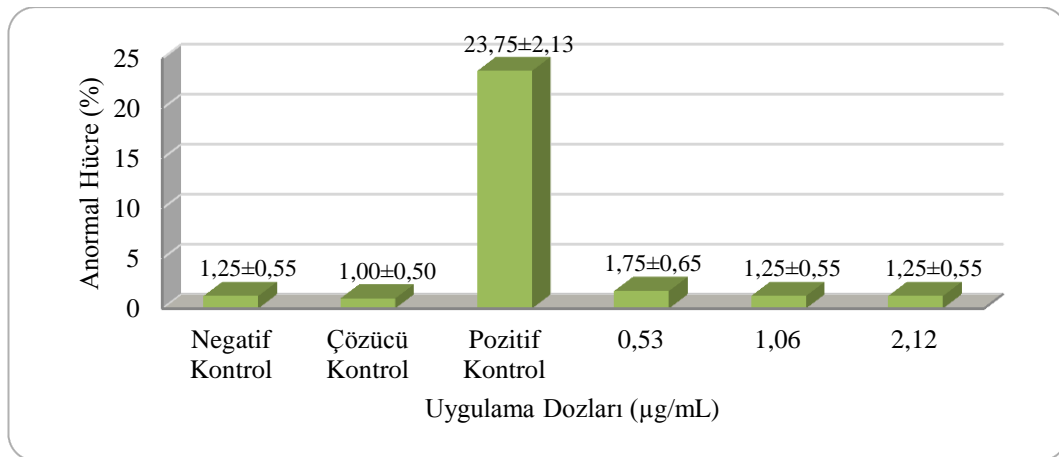


Şekil 4.13. 2b maddesinin 48 saat uygulaması ile oluşan kardeş kromatidlerde birleşme

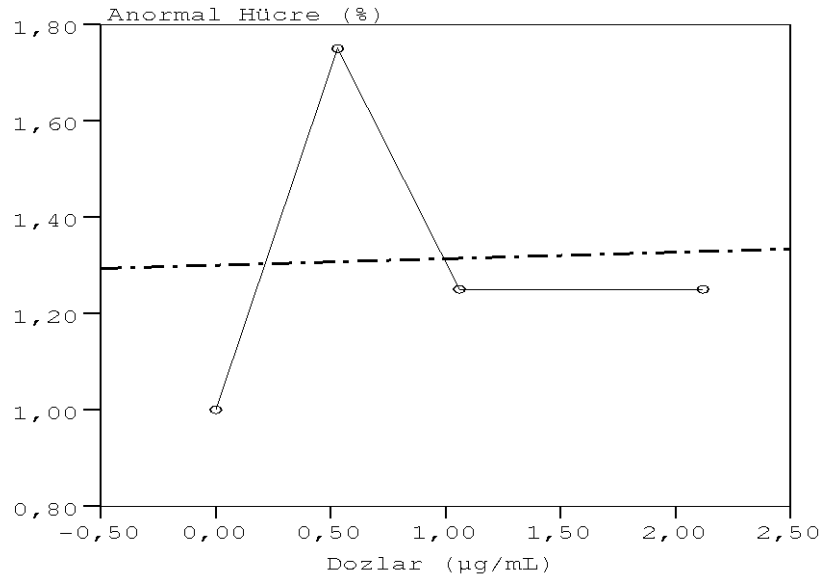


Şekil 4.14. 2b maddesinin 48 saat uygulaması ile oluşan disentrik kromozom

2b maddesi ile yapılan 48 saatlik muamele sonucunda, anormal hücre yüzdesinde hiçbir dozda hem negatif kontrole göre hem de çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Tablo 4.2.). Bu uygulamada, anormal hücre yüzdeleri 0,53 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik dozda 1,75 olarak, 1,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik ve 2,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik dozlarda 1,25 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.15.). Bu uygulama sonucunda, anormal hücre yüzdesi ile doz artışı arasında hem negatif kontrole göre ($r=-0,29$), hem de çözücü kontrole göre ($r=0,04$) herhangi bir doz-etki ilişkisi belirlenmemiştir (Şekil 4.16.).

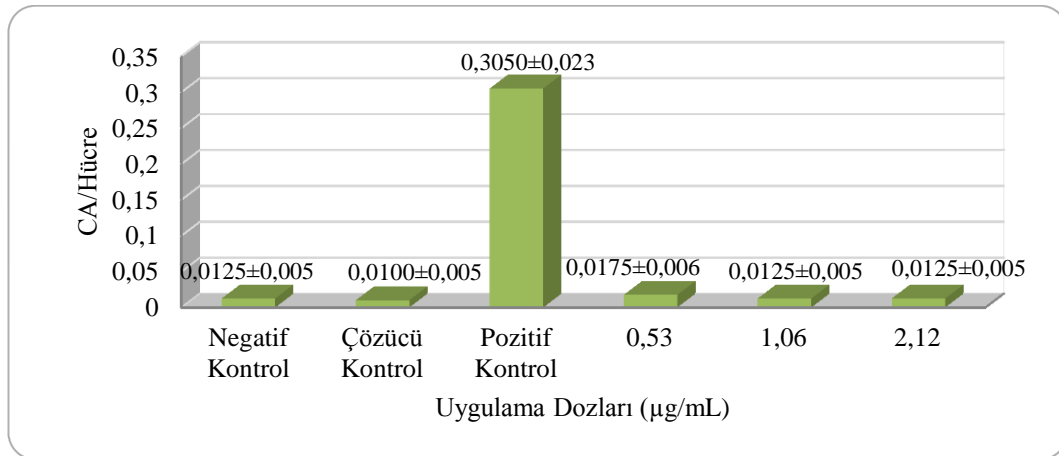


Şekil 4.15. 48 saatlik 2b maddesi uygulamasında dozlara göre anormal hücre yüzdeleri

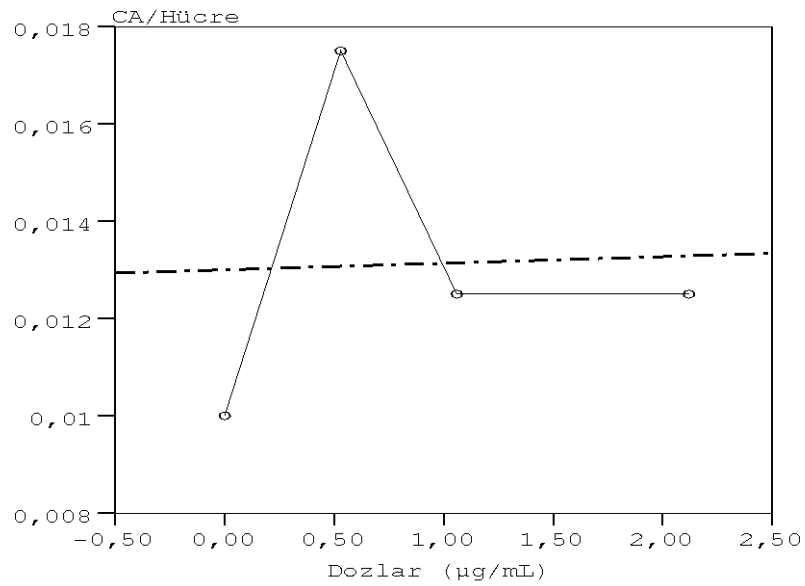


Şekil 4.16. 48 saatlik 2b maddesi uygulamasında anormal hücre yüzdelerinin doza bağlı ilişkisi

2b maddesiyle yapılan 48 saatlik uygulama sonucunda, CA/Hücre sayısı 0,53 µg/mL'lik dozda 0,0175 olarak, 1,06 µg/mL'lik ve 2,12 µg/mL'lik dozların her ikisinde de 0,0125 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.17.). Bu veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, CA/Hücre sayısı bakımından hiçbir dozda her iki kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (Tablo 4.2.). Ayrıca bu uygulamada, CA/Hücre sayısı ile doz artışı arasında hem negatif kontrole göre ($r=-0,29$), hem de çözücü kontrole göre ($r=0,04$) herhangi bir doz-etki ilişkisi belirlenmemiştir (Şekil 4.18.).

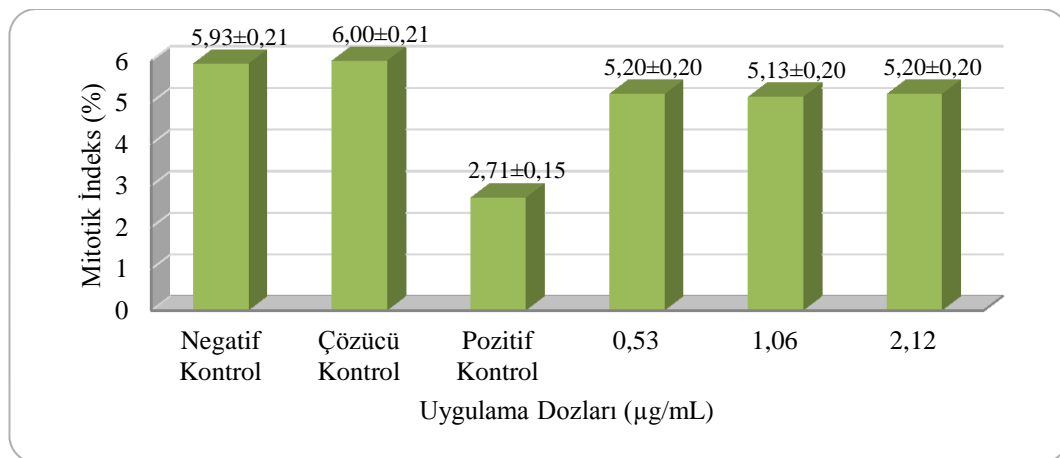


Şekil 4.17. 48 saatlik 2b maddesi uygulamasında dozlara göre hücre başına düşen anormallik sayıları

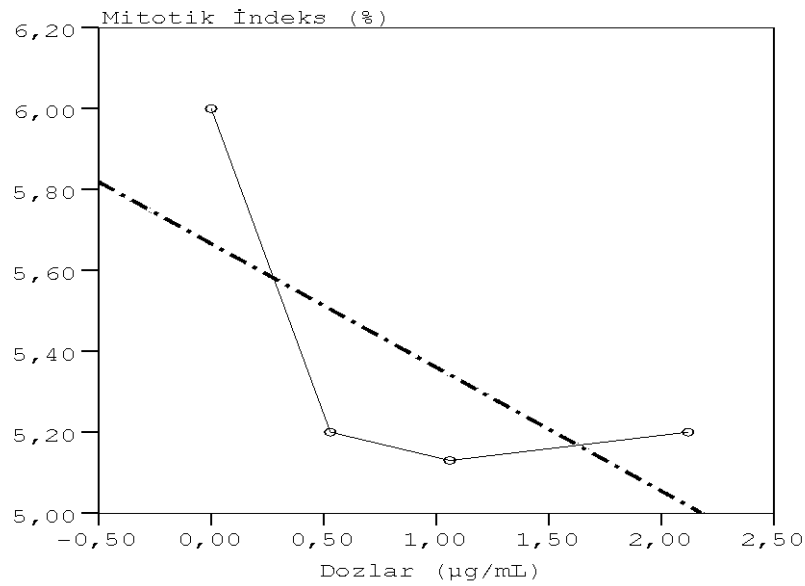


Şekil 4.18. 48 saatlik 2b maddesi uygulamasında hücre başına düşen anormallik sayılarının doza bağlı ilişkisi

2b maddesiyle 48 saatlik muamelede, Mİ 1,06 µg/mL'lik dozda 5,13 olarak, 0,53 µg/mL ve 2,12 µg/mL'lik dozlarda 5,20 olarak bulunmuştur (Şekil 4.19.). Bu uygulamada, 2b maddesi Mİ'yi tüm uygulama dozlarında her iki kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşürmüştür. 0,53 µg/mL ve 2,12 µg/mL'lik dozlardaki düşüşler negatif kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde, çözücü kontrole göre $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur. 1,06'lık dozdaki düşüş ise her iki kontrol grubuna göre de $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur (Tablo 4.2.). Bu uygulamada, Mİ ile doz artışı arasında hem negatif kontrole ($r = -0,66$) hem de çözücü kontrole göre ($r = -0,67$) kuvvetli olmayan negatif bir ilişki gözlenmiştir (Şekil 4.20.).



Şekil 4.19. 48 saatlik 2b maddesi uygulamasında dozlara göre mitotik indeks değerleri



Şekil 4.20. 48 saatlik 2b maddesi uygulamasında mitotik indeks değerlerinin doza bağlı ilişkisi

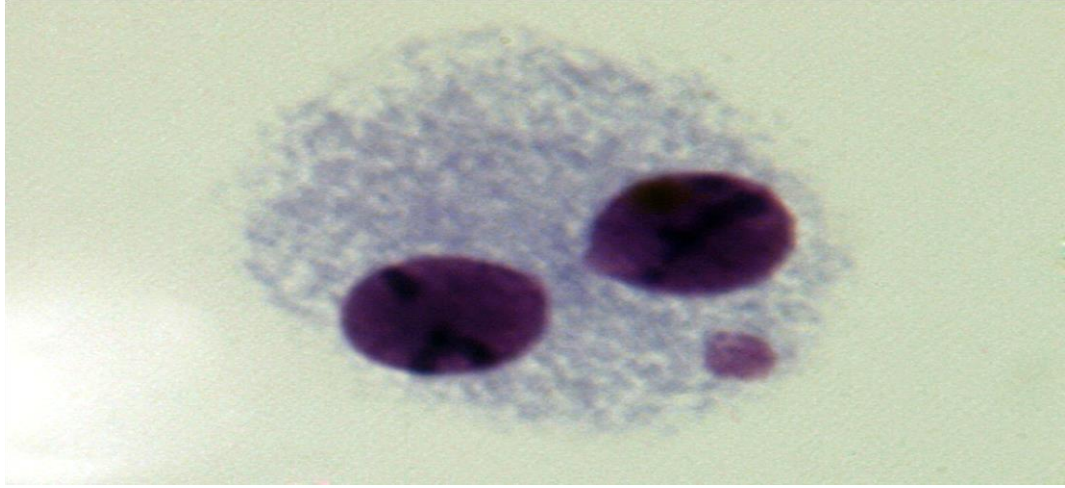
4.1.2. Mikronukleus testinin bulguları

2b maddesiyle yapılan mikronukleus testinde her dozda bir birey için 1000, toplamda ise 4000 (4 birey) binokleat hücre incelenerek MN frekansları, hücre başına düşen MN sayıları ve nukleer bölünme indeksleri tespit edilmiştir. Tespit edilen MN frekansları, hücre başına düşen MN sayıları ve nukleer bölünme indeksleri ile ilgili veriler Tablo 4.3.'de verilmiştir. Bu uygulama sonucunda gözlenen 1 ve 2 mikronukleusa sahip binokleat hücrelerin fotoğrafları Şekil 4.21.-4.22.'de verilmiştir.

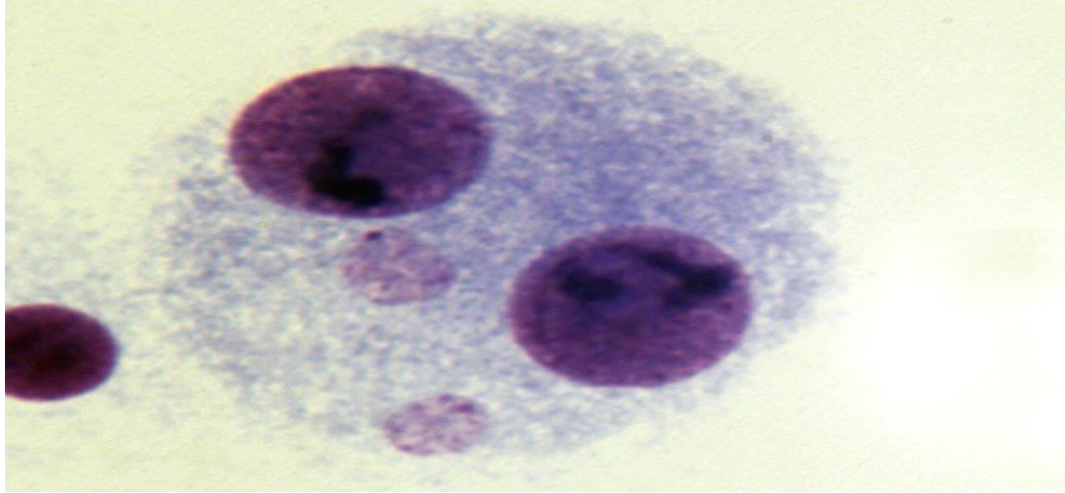
Tablo 4.3. 2b maddesinin mikronukleus frekansları ve nukleer bölünme indeksi üzerine etkileri

Test maddesi	Uygulama		Sayılan BN hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronukleus frekansları		MN/ Hücre (%) ± SH	Nukleer bölünme indeksi ± SH
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)		(1)	(2)		
N.Kontrol	48	0,00	4000	7	-	0,18±0,07	1,64±0,28
Ç.Kontrol	48	20 µL	4000	9	-	0,22±0,07	1,58±0,28
P.Kontrol	48	0,20	4000	260	10	7,00±0,40	1,33±0,25
2b	48	0,53	4000	11	-	0,27±0,08	1,57±0,28
		1,06	4000	10	1	0,30±0,09	1,57±0,28
		2,12	4000	10	-	0,25±0,08	1,56±0,28

BN: Binokleat, SH: Standart Hata.

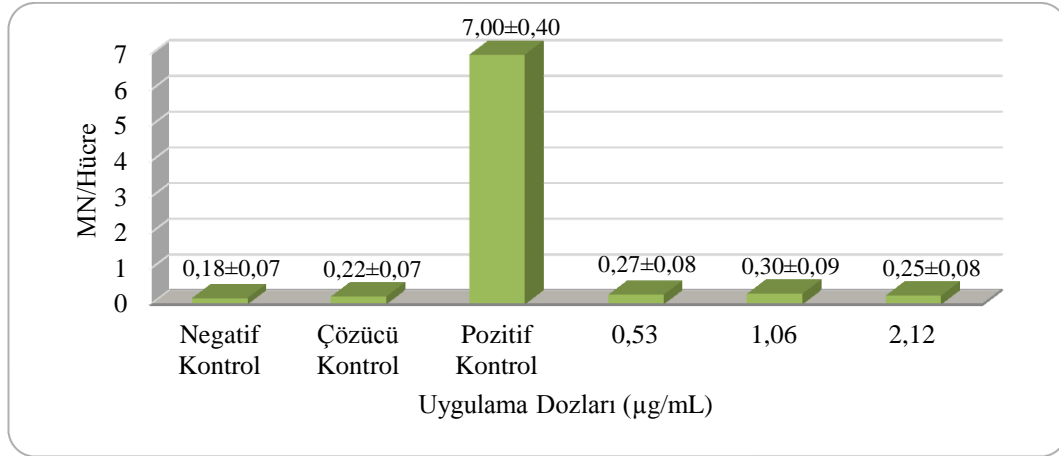


Şekil 4.21. 2b maddesi uygulamasıyla oluşan 1 mikronukleuslu binukleat hücre

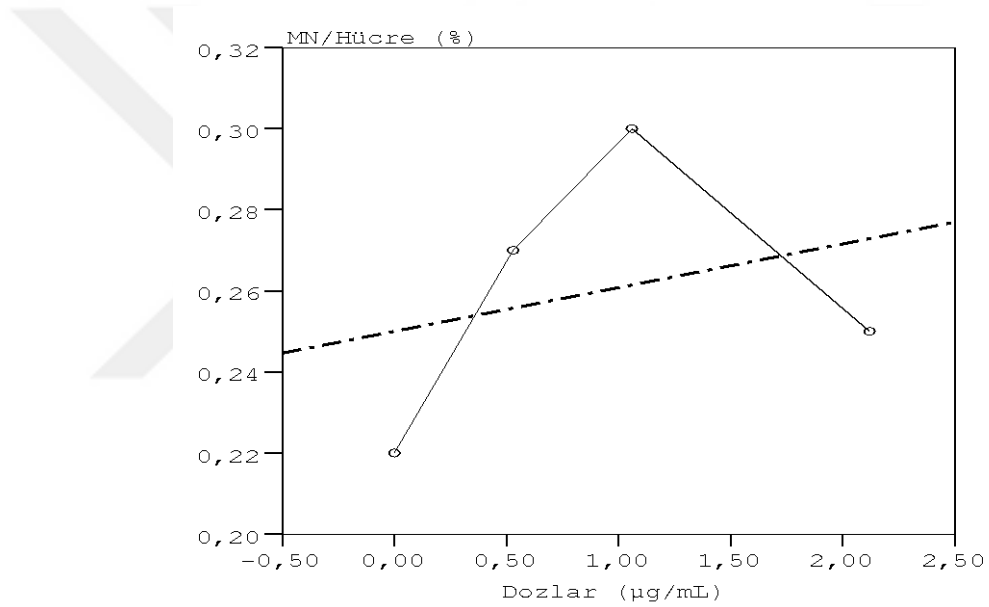


Şekil 4.22. 2b maddesi uygulamasıyla oluşan 2 mikronukleuslu binukleat hücre

2b maddesiyle yapılan muamele sonucunda, hücre başına düşen mikronukleus sayıları 0,53 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda 0,27 olarak, 1,06 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda 0,30 ve 2,12 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda 0,25 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.23.). Bu veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, MN/Hücre %'si bakımından hiçbir uygulama dozunda her iki kontrol grubuna göre de anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Tablo 4.3.). Bu uygulamada, MN/Hücre sayısı doz-etki ilişkisi bakımından değerlendirildiğinde negatif kontrole göre zayıf bir ilişki belirlenmiş ($r=0,46$), çözücü kontrole göre herhangi bir ilişki ($r=0,30$) belirlenmemiştir (Şekil 4.24.).

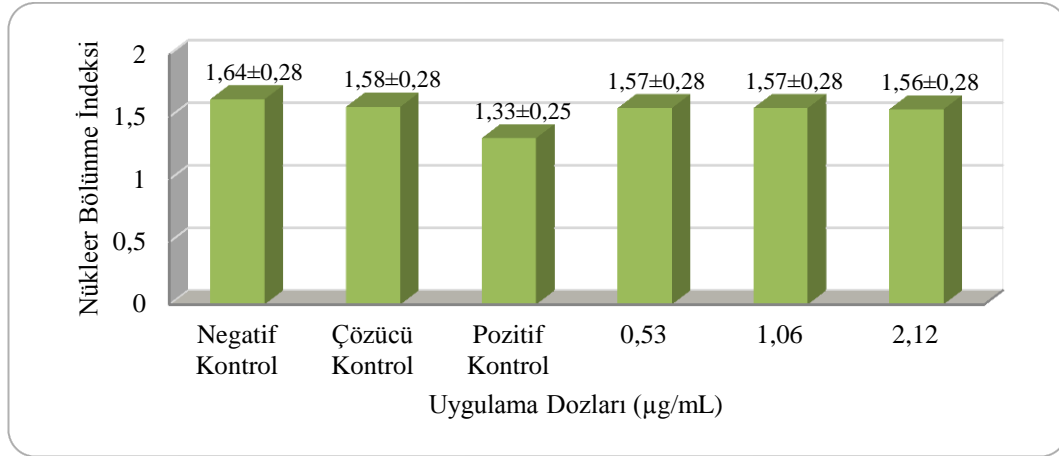


Şekil 4.23. 2b maddesi uygulamasında dozlara göre mikronucleus frekansları

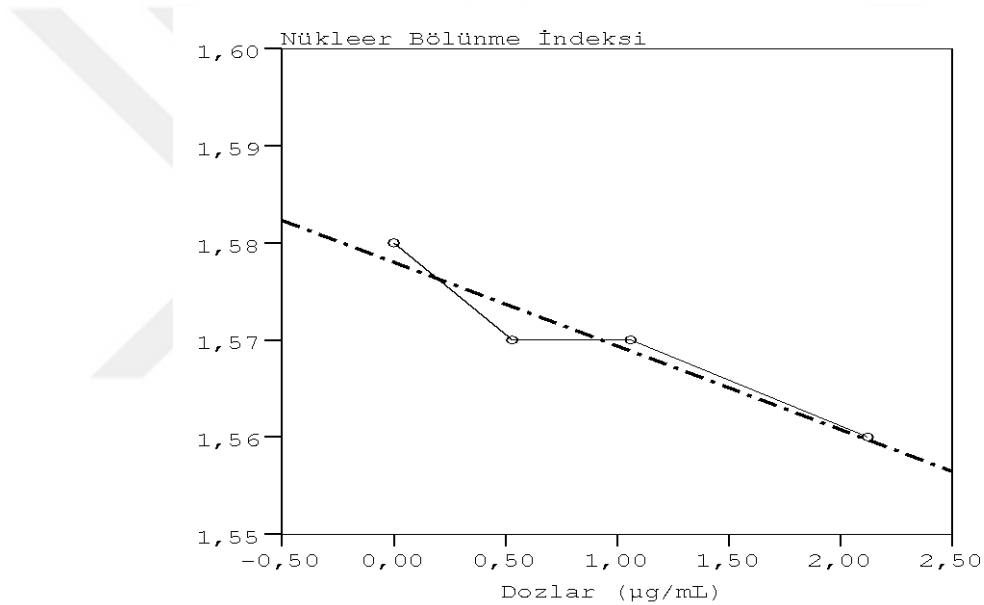


Şekil 4.24. 2b maddesi uygulamasında mikronucleus frekanslarının doza bağlı ilişkisi

2b maddesi muamelesi sonucunda, en düşük nukleer bölünme indeksi 2,12 µg/mL'lik dozda 1,56 olarak belirlenmiştir. 0,53 µg/mL'lik ve 1,06 µg/mL'lik dozlardaki nukleer bölünme indeksleri 1,57 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.25.). Bu uygulamada, nukleer bölünme indeksi hem negatif kontrole göre ($r=-0,77$) hem de çözücü kontrole göre ($r=-0,95$) doza bağlı olarak azalmıştır (Şekil 4.26.). Ancak bu azalmalar, hiçbir konsantrasyonda her iki kontrol grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildir (Tablo 4.3.).



Şekil 4.25. 2b maddesi uygulamasında dozlara göre nukleer bölünme indeksi değerleri



Şekil 4.26. 2b maddesi uygulamasında nukleer bölünme indeksi değerlerinin doza bağlı ilişkisi

4.1.3. Komet testinin bulguları

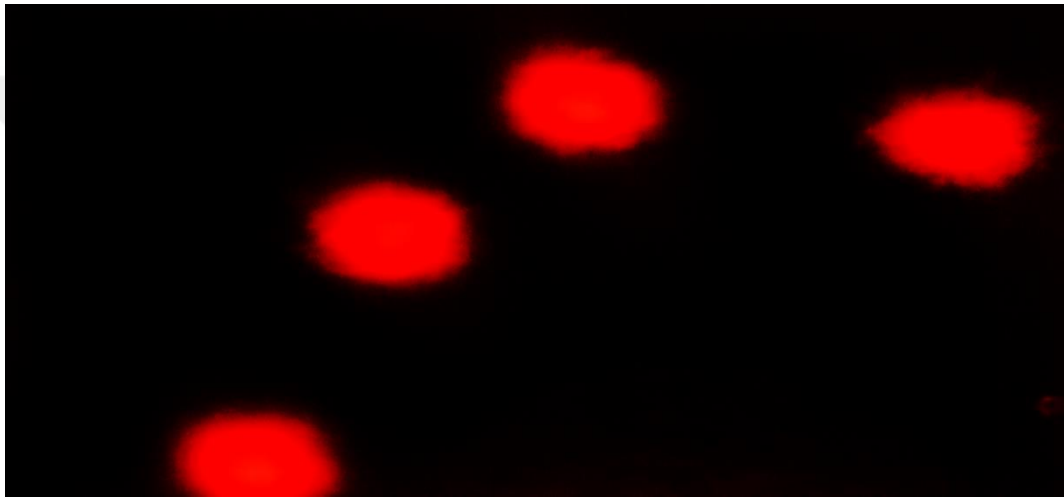
Bu çalışmada, 2b maddesinin genotoksik etkisinin olup olmadığını belirlemek için kullanılan yöntemlerden biri olan komet analizinde, her dozda her bir birey için 100 toplamda ise 400 (4 birey) hücre incelenmiş ve genotoksik hasarın göstergesi olarak seçilen kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametreleri değerlendirilmiştir. Bu parametrelere ilişkin elde edilen veriler Tablo 4.4.'de gösterilmiştir. 2b maddesiyle yapılan komet analizi sonucunda gözlenen hasarsız ve hasarlı DNA görüntüleri Şekil 4.27.-4.30.'da gösterilmiştir.

Tablo 4.4 . İnsan lenfositlerinin 2b maddesine *in vitro* maruziyeti sonrası oluşan DNA hasarı

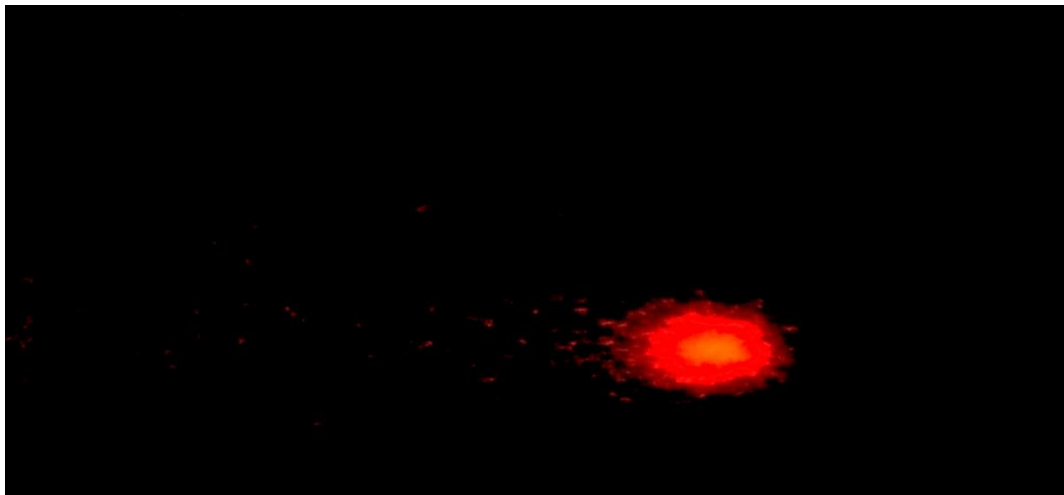
Test Maddesi	Süre (saat)	Dozlar ($\mu\text{g/ml}$)	Kuyruk Uzunluğu (μm)	Kuyruk Momenti	Kuyruk Yoğunluğu (%)
N.Kontrol	1	0	5,622 \pm 0,07	2,831 \pm 0,05	211,659 \pm 0,10
Ç.Kontrol	1	20 μL	5,796 \pm 0,09	3,082 \pm 0,08	211,215 \pm 0,05
2b maddesi	1	0,53	5,713 \pm 0,10	2,874 \pm 0,08	211,762 \pm 0,16 ⁺
		1,06	5,631 \pm 0,10	2,862 \pm 0,09	211,835 \pm 0,06 ⁺
		2,12	5,376 \pm 0,09 ^{*+}	2,658 \pm 0,07 ⁺	211,430 \pm 0,06 ⁺
P.Kontrol	1	3,4	25,123 \pm 0,58	21,518 \pm 0,56	223,490 \pm 1,14

*Negatif kontrole göre anlamlı fark vardır. ($P<0,05$)

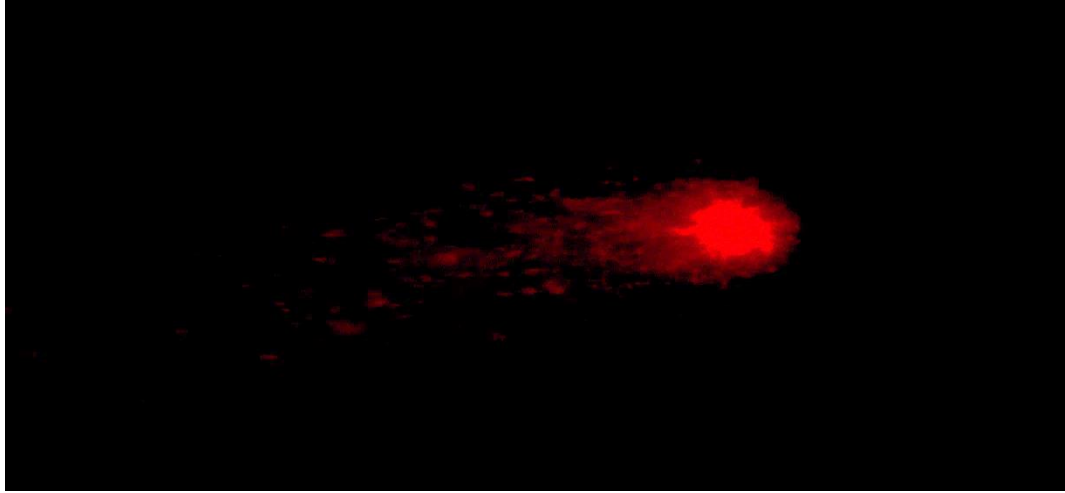
+Çözücü kontrole göre anlamlı fark vardır. ($P<0,01$)



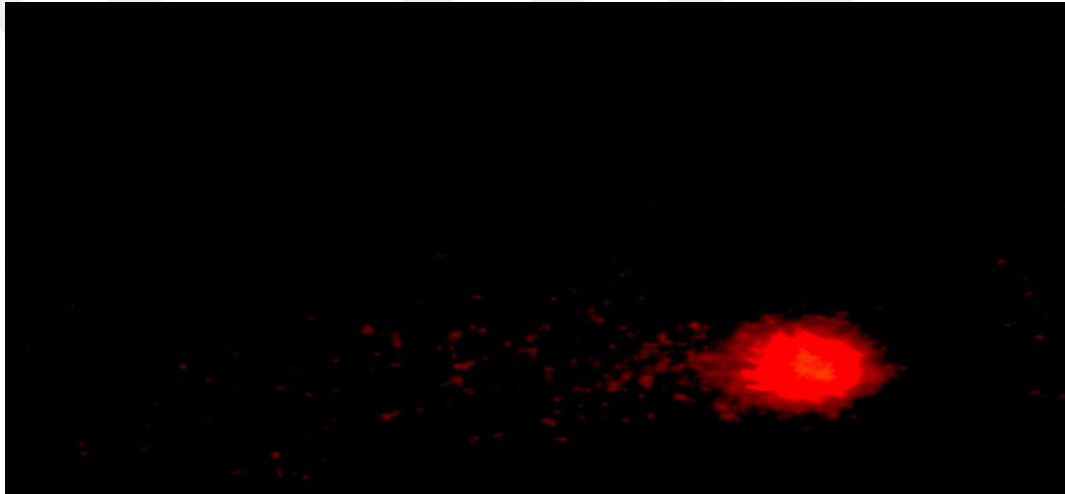
Şekil 4.27. 2b maddesi ile muamele edilen insan lenfositlerinde hasarsız DNA'nın komet testi ile görünümü



Şekil 4.28. 2b maddesi ile muamele edilen insan lenfositlerinde az hasarlı DNA'nın komet testi ile görünümü

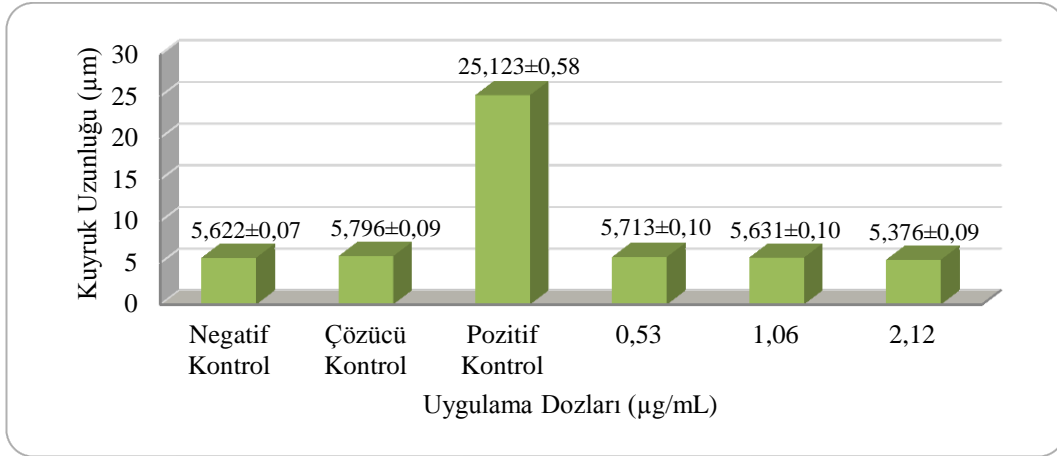


Şekil 4.29. 2b maddesi ile muamele edilen insan lenfositlerinde orta hasarlı DNA'nın komet testi ile görünümü

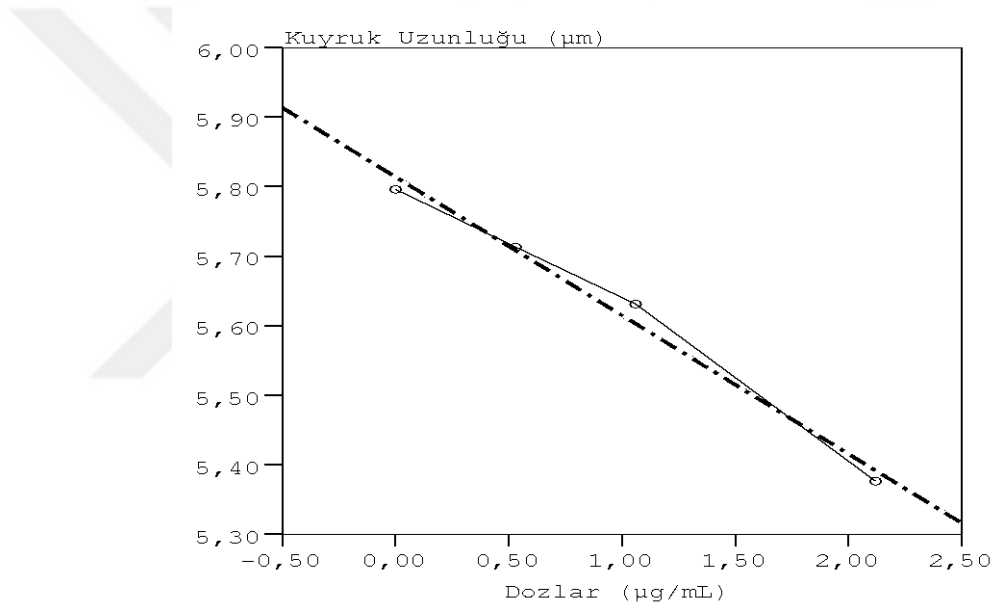


Şekil 4.30. 2b maddesi ile muamele edilen insan lenfositlerinde çok hasarlı DNA'nın komet testi ile görünümü

2b maddesi ile muamele edilen lenfositlerde en yüksek doz olan 2,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'de 5,376 olarak belirlenen kuyruk uzunluğunun, hem negatif kontrole göre ($p < 0,05$) hem de çözücü kontrole göre ($p < 0,01$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı belirlenmiştir (Tablo 4.4.). Diğer yandan, 0,53 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik dozda 5,713 ve 1,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik dozda 5,631 olarak belirlenen kuyruk uzunluklarının, her iki kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği belirlenmiştir (Şekil 4.27.). Bu uygulamada kuyruk uzunluğu ile doz artışı arasında hem negatif kontrole göre ($r = -0,83$), hem de çözücü kontrole göre kuvvetli bir doz-etki ilişkisi ($r = -0,99$) tespit edilmiştir (Şekil 4.28.).

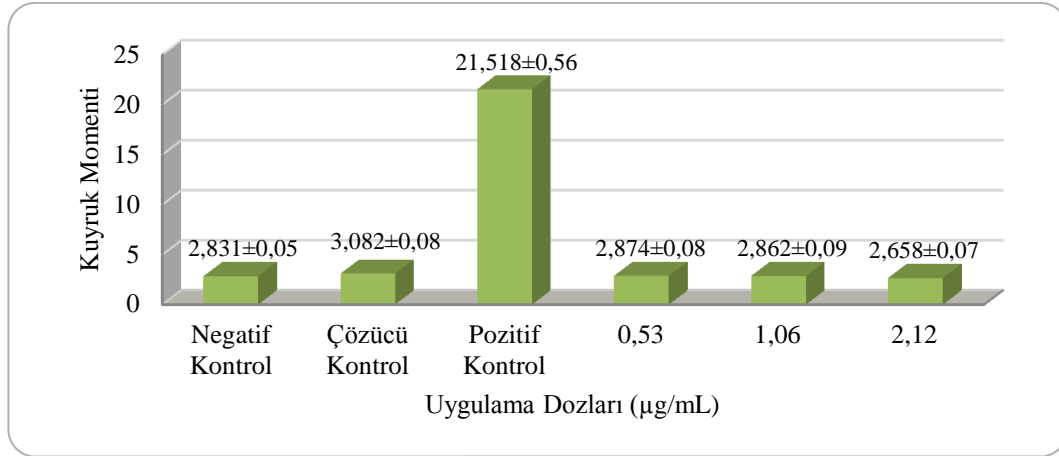


Şekil 4.31. 2b maddesi uygulamasında dozlara göre komet kuyruk uzunluğu değerleri

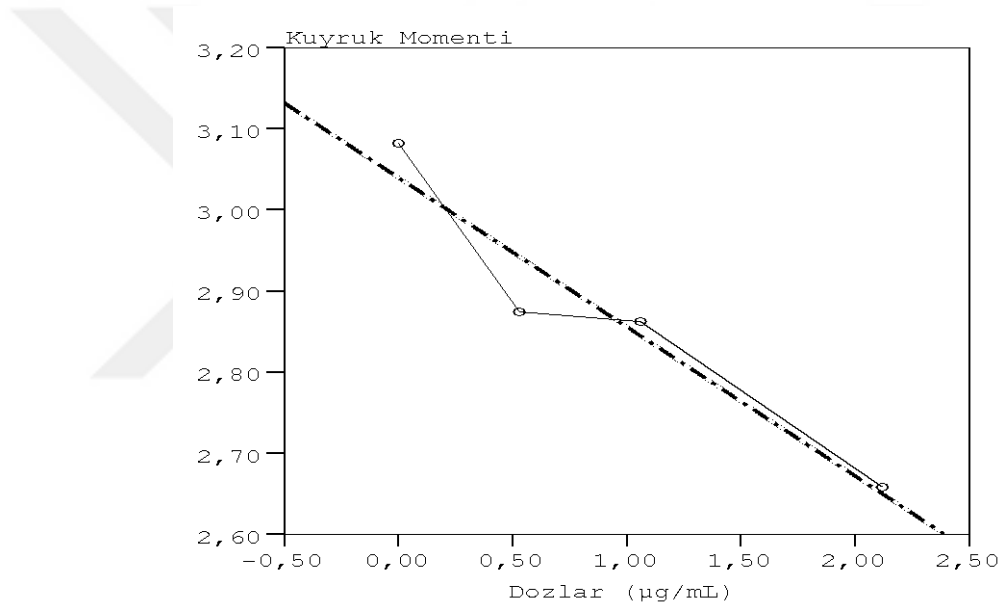


Şekil 4.32. 2b maddesi uygulamasında kuyruk uzunluğu değerlerinin doza bağlı ilişkisi

2b maddesi muamelesi sonucunda, kuyruk momentinde sadece en yüksek doz olan 2,12 µg/mL’de çözücü kontrole göre anlamlı bir azalma ($p<0,01$) gözlenmiştir. 0,53 µg/mL’lik ve 1,06 µg/mL’lik dozlarda tespit edilen kuyruk momenti değerlerinde, her iki kontrol grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (Tablo 4.4.). Kuyruk momentleri 0,53 µg/mL’lik dozda 2,874 olarak, 1,06 µg/mL’lik dozda 2,862 ve 2,12 µg/mL’lik dozda 2,658 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.29.). 2b maddesi uygulamasında, kuyruk momentleri hem negatif kontrole göre ($r=-0,80$), hem de çözücü kontrole göre ($r=-0,96$) doza bağlı olarak azalmıştır (Şekil 4.30.).

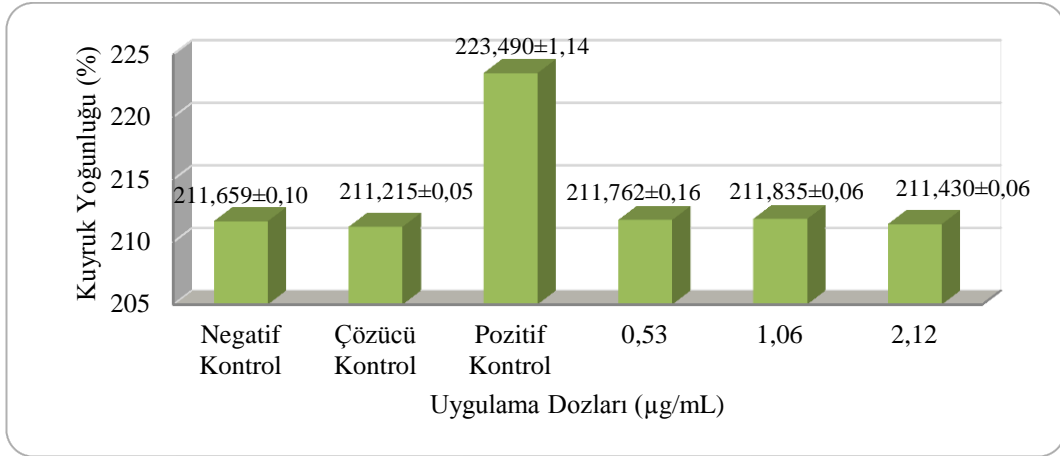


Şekil 4.33. 2b maddesi uygulamasında dozlara göre komet kuyruk momenti değerleri

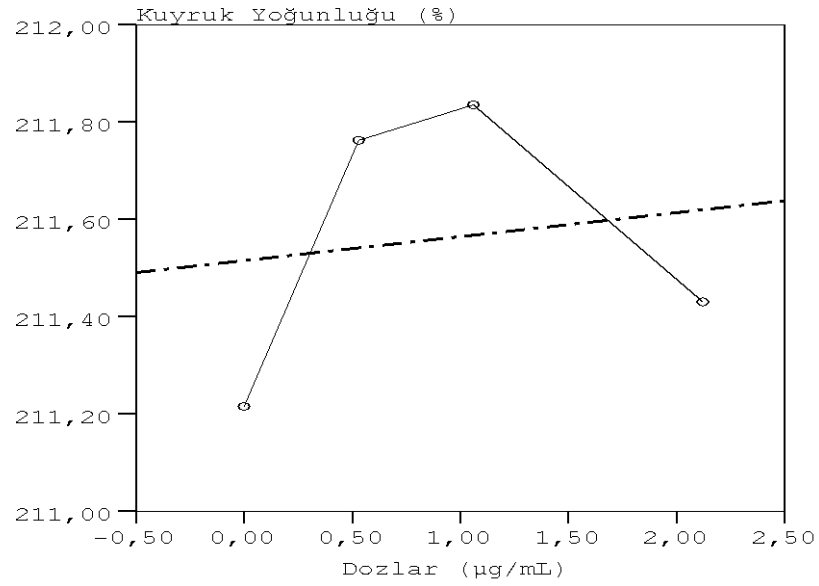


Şekil 4.34. 2b maddesi uygulamasında kuyruk momenti değerlerinin doza bağlı ilişkisi

2b maddesiyle yapılan uygulamada, kuyruk yoğunluğunun tüm dozlarda çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p<0,01$) gösterdiği, negatif kontrole göreyse anlamlı bir farklılık göstermediği gözlenmiştir (Tablo 4.4.). Kuyruk yoğunlukları 0,53 µg/mL'lik dozda 211,762 olarak, 1,06 µg/mL'lik dozda 211,835 ve 2,12 µg/mL'lik dozda 211,430 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.31.). Bu uygulama sonucunda, kuyruk yoğunluğu ile doz artışı arasında çözücü kontrole göre herhangi bir doz-etki ilişkisi gözlenmezken ($r=0,15$), negatif kontrole göre zayıf bir doz-etki ilişkisi ($r=-0,60$) gözlenmiştir (Şekil 4.32.).



Şekil 4.35. 2b maddesi uygulamasında dozlara göre komet kuyruk yoğunluğu değerleri



Şekil 4.36. 2b maddesi uygulamasında kuyruk yoğunluğu değerlerinin doza bağlı ilişkisi

4.2. 4-((1,3-Dimetil-2,4,6-triokso-tetrahidropirimidin-5(6H)-iliden)metilamino)benzen Sülfonamit'in (2e) İnsan Periferal Kan Lenfositleri Üzerindeki Genotoksik Etkileri

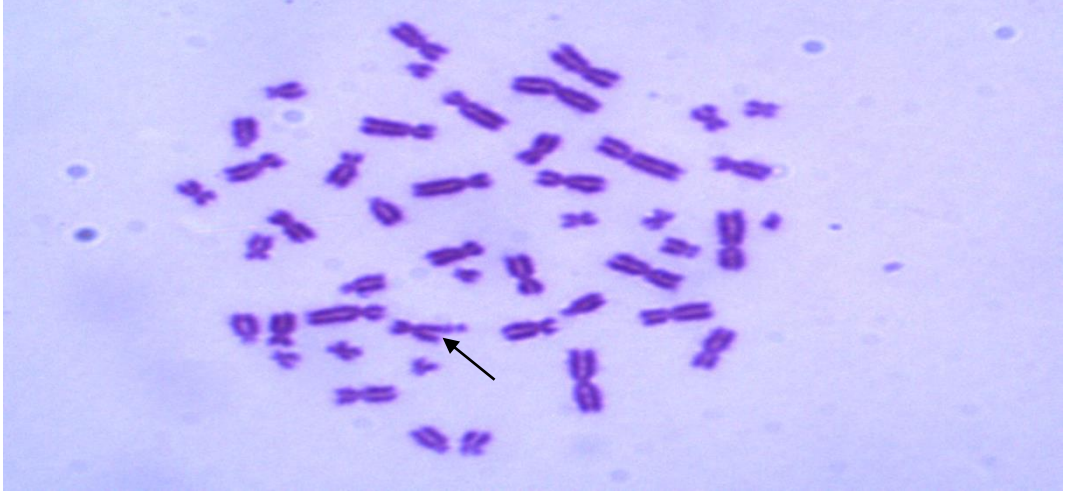
4.2.1. Kromozomal anormallikler testinin bulguları

24 saatlik *in vitro* CA testinde, 2e maddesinin 3 farklı dozu (0,63, 1,26 ve 2,52 µg/mL) kullanılmış ve tespit edilen kromozomal anormalliklerin çeşitleri, anormal hücre yüzdeleri, hücre başına düşen kromozomal anormalliklerin sayıları ve mitotik indeksler Tablo 4.5.'de verilmiştir. Tespit edilen yapısal tipteki kromozomal anormallikler görülme sıklıklarına göre sırasıyla kromatit kırığı, fragment, kromozom kırığı ve disentrik kromozom şeklindedir. Bu uygulamada gözlenen anormalliklerin fotoğrafları Şekil 4.37.-4.40.'da gösterilmiştir.

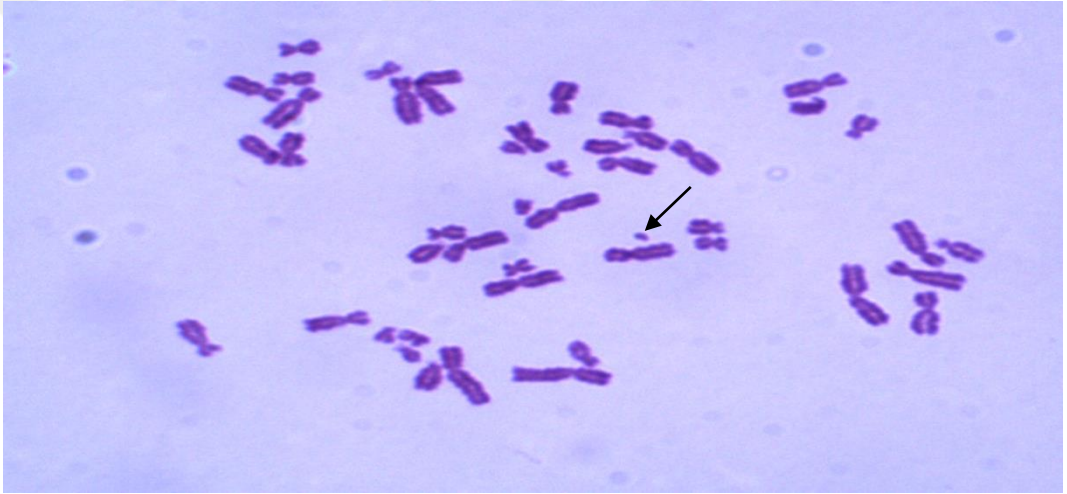
Tablo 4.5. 2e maddesinin 24 saat uygulaması ile insan periferal lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler

Test maddesi	Uygulama		Yapısal Anormallikler				Anormal hücre (%) ± SH	CA/Hücre ± SH	Mitotik İndeks (%) ± SH
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	Ktk	Kzk	F	Ds			
N.Kontrol	24	0,00	3	2	2	-	1,75±0,65	0,0175±0,006	6,27±0,22
Ç.Kontrol	24	20 µL	7	-	1	-	2,00±0,70	0,0200±0,007	5,90±0,21
P.Kontrol	24	0,20	54	24	20	2	20,75±2,02	0,2500±0,021	3,10±0,16
2e	24	0,63	3	1	5	-	2,25±0,74	0,0225±0,007	5,90±0,21
		1,26	5	1	3	-	2,25±0,74	0,0225±0,007	5,96±0,22
		2,52	3	-	2	2	1,75±0,65	0,0175±0,006	5,70±0,21

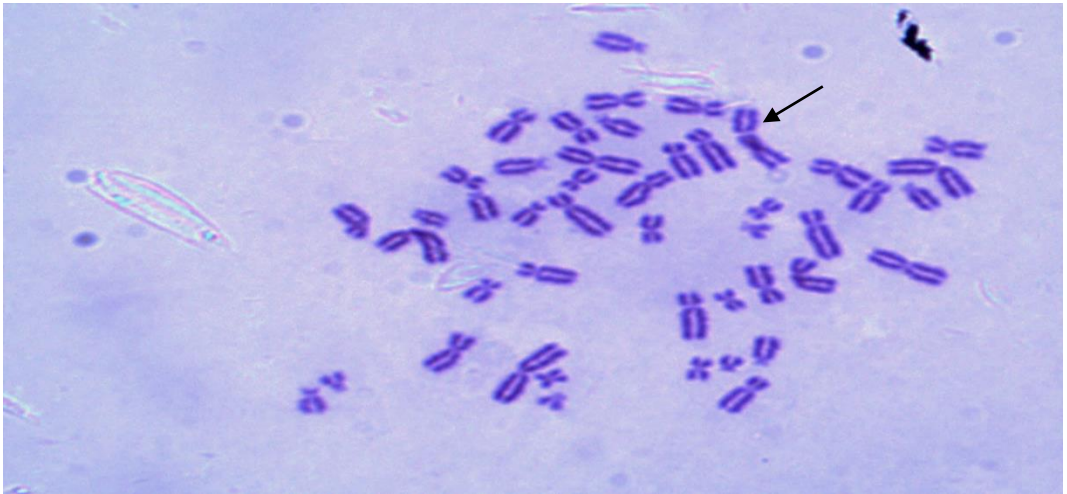
Ktk: kromatid kırığı, Kzk: kromozom kırığı, F: fragment. Ds: Disentrik kromozom. SH: Standart hata. Kromozomal anormalliklerde her doz için 400 metafaz hücresi, Mitotik indeks için 12000 hücre incelenmiştir.



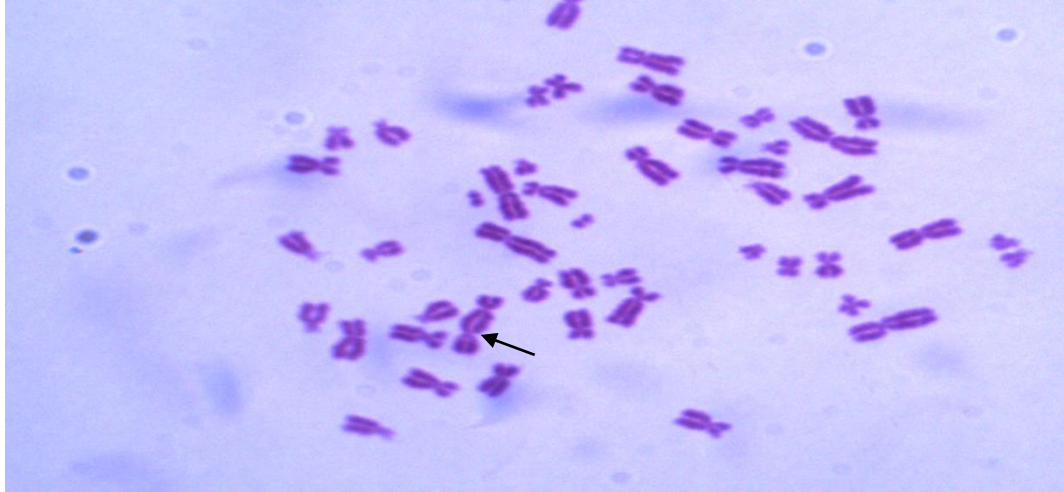
Şekil 4.37. 2e maddesinin 24 saat uygulaması ile oluşan kromatit kırığı



Şekil 4.38. 2e maddesinin 24 saat uygulaması ile oluşan fragment

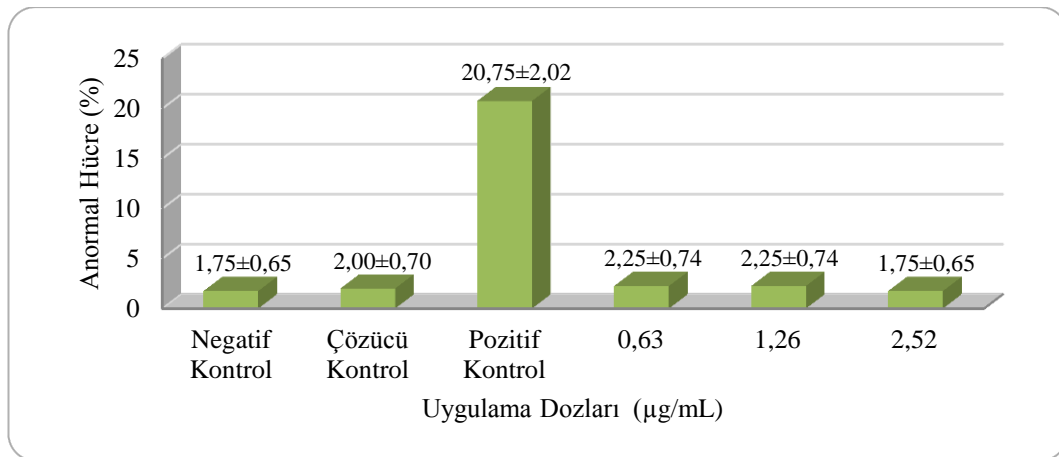


Şekil 4.39. 2e maddesinin 24 saat uygulaması ile oluşan kromozom kırığı

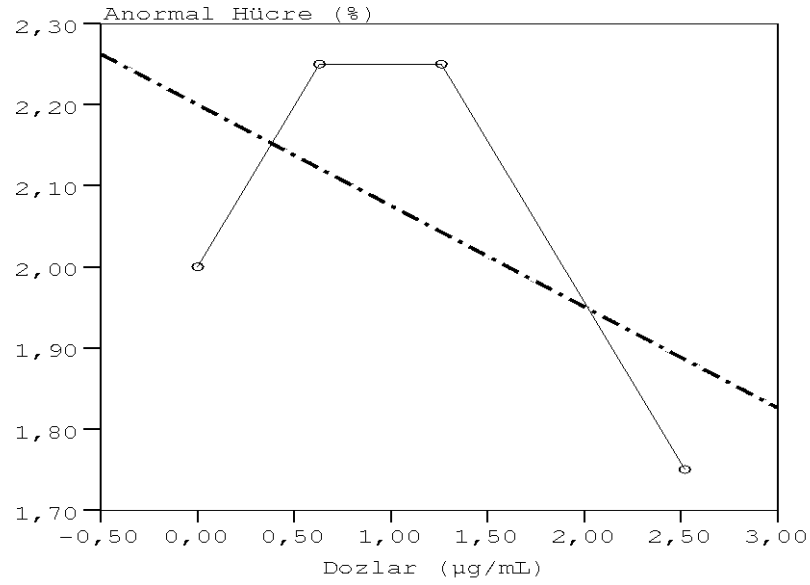


Şekil 4.40. 2e maddesinin 24 saat uygulaması ile oluşan disentrik kromozom

2e maddesi ile yapılan 24 saatlik muamele sonucunda, anormal hücre yüzdeleri 0,63 $\mu\text{g/mL}$ 'lik ve 1,26 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozlarda 2,25, en yüksek doz olan 2,52 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda 1,75 olarak bulunmuştur (Şekil 4.41.). Bu veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, anormal hücre yüzdesinde hiçbir dozda her iki kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir (Tablo 4.5.). Bu uygulamada, anormal hücre yüzdesi ile doz artışı arasında negatif kontrole göre herhangi bir ilişki belirlenmemiş ($r=-0,17$), çözücü kontrole göre zayıf bir ilişki ($r=-0,56$) belirlenmiştir (Şekil 4.42.).

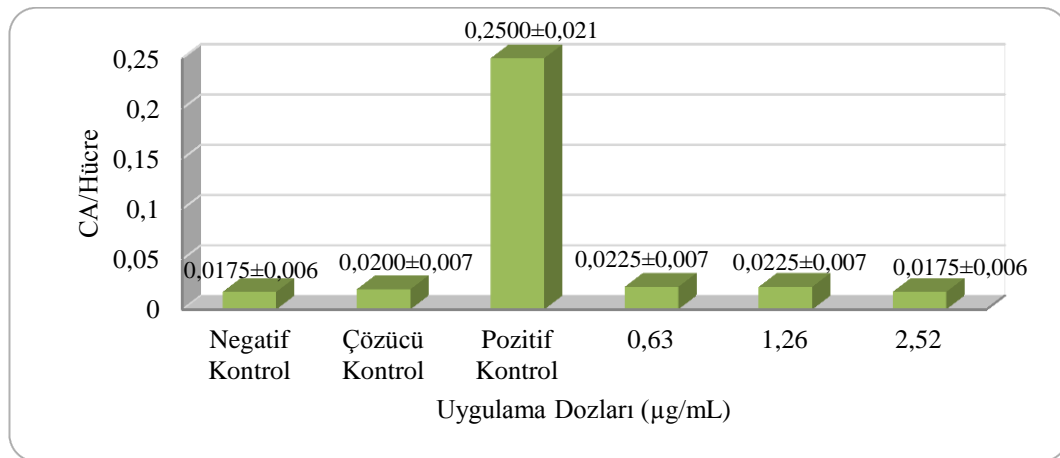


Şekil 4.41. 24 saatlik 2e maddesi uygulamasında dozlara göre anormal hücre yüzdeleri

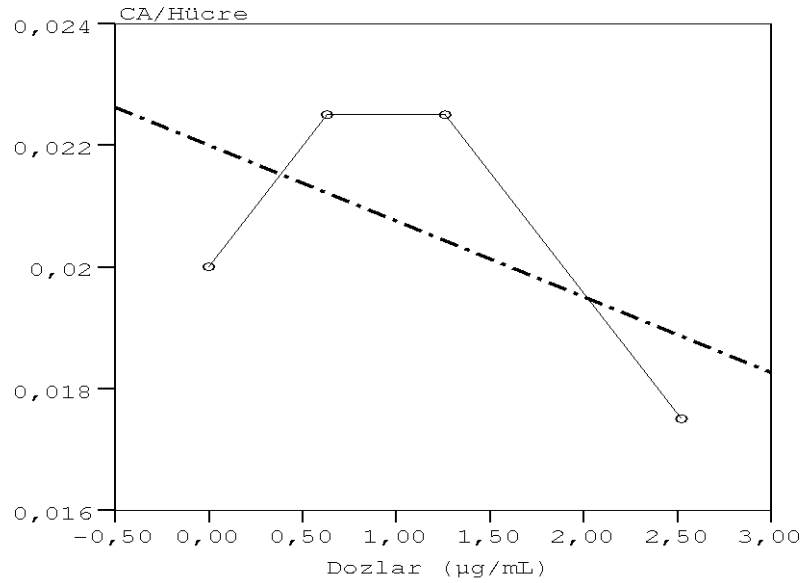


Şekil 4.42. 24 saatlik 2e maddesi uygulamasında anormal hücre yüzdelerinin doza bağlı ilişkisi

24 saatlik 2e maddesi muamelesi sonucunda, hücre başına düşen kromozomal anormallik sayısında tüm dozlarda her iki kontrol grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Tablo 4.5.). Hücre başına düşen kromozomal anormallik sayısı 0,63 µg/mL'lik ve 1,26 µg/mL'lik dozlarda 0,0225 olarak, 2,52 µg/mL'lik dozda 0,0175 olarak bulunmuştur (Şekil 4.43.). Bu uygulama sonucunda, hücre başına düşen anormallik sayısı ile doz artışı arasında negatif kontrole göre herhangi bir ilişki belirlenmezken ($r=-0,17$), çözücü kontrole göre zayıf bir ilişki ($r=-0,56$) belirlenmiştir (Şekil 4.44.).

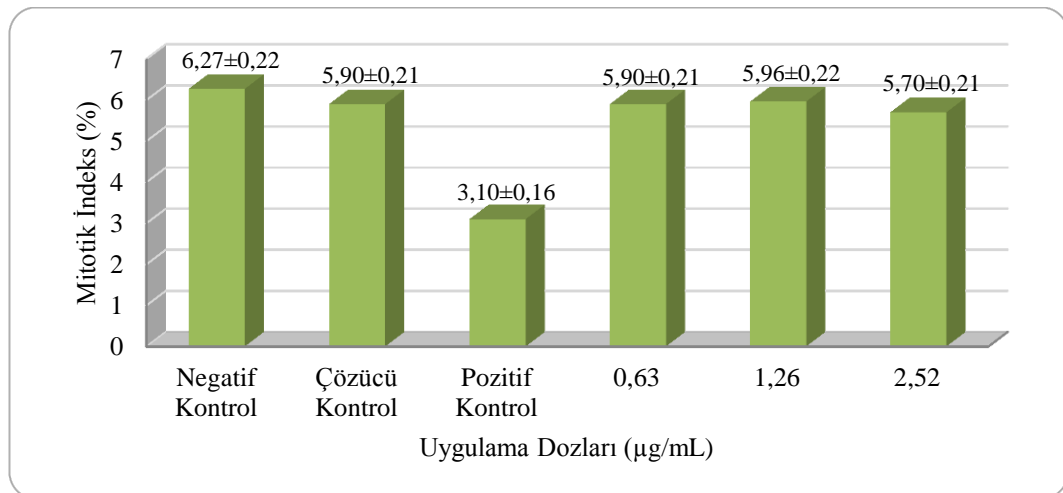


Şekil 4.43. 24 saatlik 2e maddesi uygulamasında dozlara göre hücre başına düşen anormallik sayıları

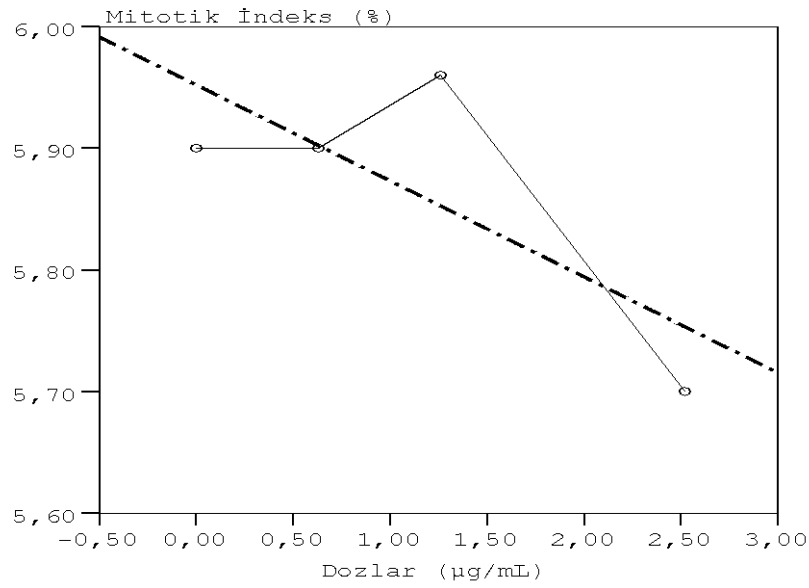


Şekil 4.44. 24 saatlik 2e maddesi uygulamasında hücre başına düşen anormallik sayılarının doza bağlı ilişkisi

24 saatlik 2e maddesi uygulaması sonucunda, mitotik indeks değerleri 0,63 µg/mL'lik dozda 5,90 olarak, 1,26 µg/mL'lik dozda 5,96 ve 2,52 µg/mL'lik dozda 5,70 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.45.). Bu uygulama sonucunda, mitotik indeksin hem negatif kontrole göre ($r=-0,89$), hem de çözücü kontrole göre ($r=-0,75$) doza bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.46.). Ancak bu azalmalar, hiçbir dozda her iki kontrol grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildir.



Şekil 4.45. 24 saatlik 2e maddesi uygulamasında dozlara göre mitotik indeks değerleri



Şekil 4.46. 24 saatlik 2e maddesi uygulamasında mitotik indeks değerlerinin doza bağlı ilişkisi

3 farklı dozdaki (0,63, 1,26 ve 2,52 µg/mL) 2e maddesiyle yapılan 48 saatlik *in vitro* CA testi sonucunda tespit edilen kromozomal anormallik çeşitleri, anormal hücre yüzdeleri, hücre başına düşen kromozomal anormallik sayıları ve mitotik indeksler Tablo 4.6.'da verilmiştir. Bu uygulamada tespit edilen yapısal kromozomal anormallikleri görülme sıklıklarına göre sırasıyla kromatit kırığı, fragment ve kromatid değişimi şeklindedir. Bu anormalliklerin fotoğrafları Şekil 4.47.-4.49.'da verilmiştir.

Tablo 4.6. 2e maddesinin 48 saat uygulaması ile insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler

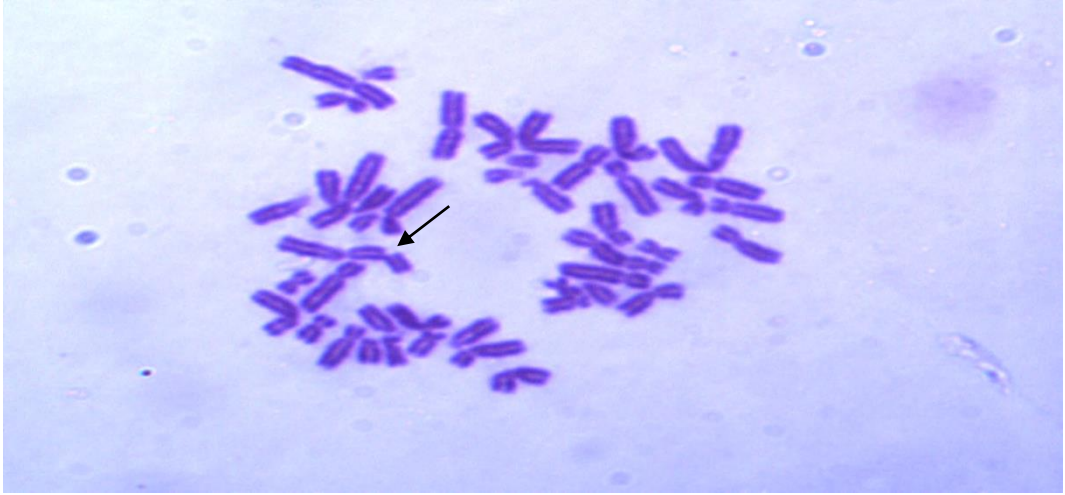
Test maddesi	Uygulama		Yapısal Anormallikler						Anormal hücre (%) ± SH	CA/Hücre ± SH	Mitotik İndeks (%) ± SH
	Süre (saat)	Doz (µg/m)	Ktk	Kzk	F	Ktd	Kkb	Ds			
N.Kontrol	48	0,00	3	-	1	-	-	1	1,25±0,55	0,0125±0,005	5,93±0,21
Ç.Kontrol	48	20 µL	3	-	1	-	-	-	1,00±0,50	0,0100±0,005	6,00±0,21
P Kontrol	48	0,20	65	25	27	4	1	-	23,75±2,13	0,3050±0,023	2,71±0,15
2e	48	0,63	3	-	2	-	-	-	1,25±0,55	0,0125±0,005	5,36±0,20 ⁺
		1,26	4	-	1	1	-	-	1,50±0,60	0,0150±0,006	5,35±0,20 ⁺
		2,52	6	-	1	-	-	-	1,75±0,65	0,0175±0,006	5,15±0,20 ^{***}

Ktk: kromatid kırığı, Kzk: kromozom kırığı, F: fragment, Ktd: Kromatid değişimi, Kkb: Kardeş kromatidlerde birleşme, Ds: disentrik. SH: standart hata. Kromozomal anormalliklerde her doz için 400 metafaz hücresi, mitotik indeks için 12000 hücre incelenmiştir.

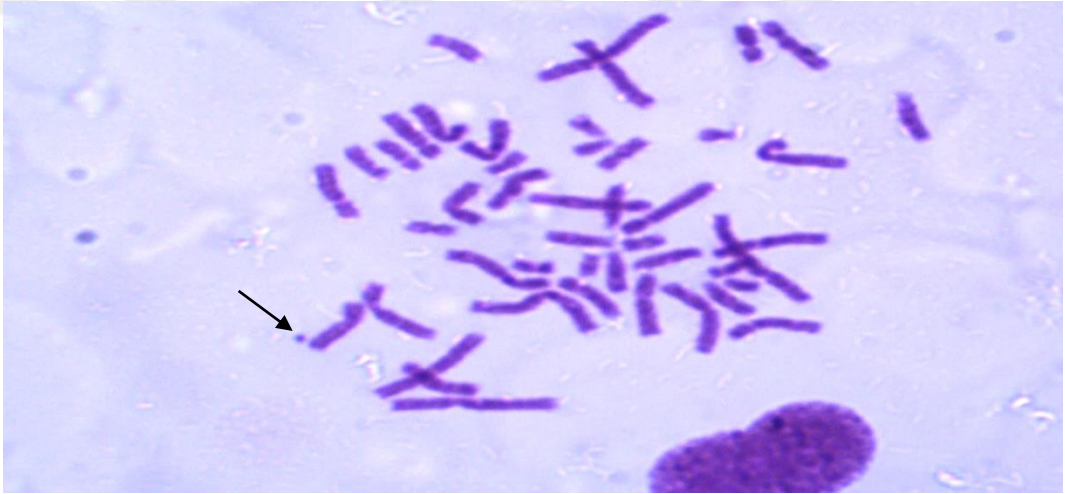
*Negatif kontrole göre anlamlı fark vardır. (p<0,01)

⁺Çözücü kontrole göre anlamlı fark vardır. (p<0,05)

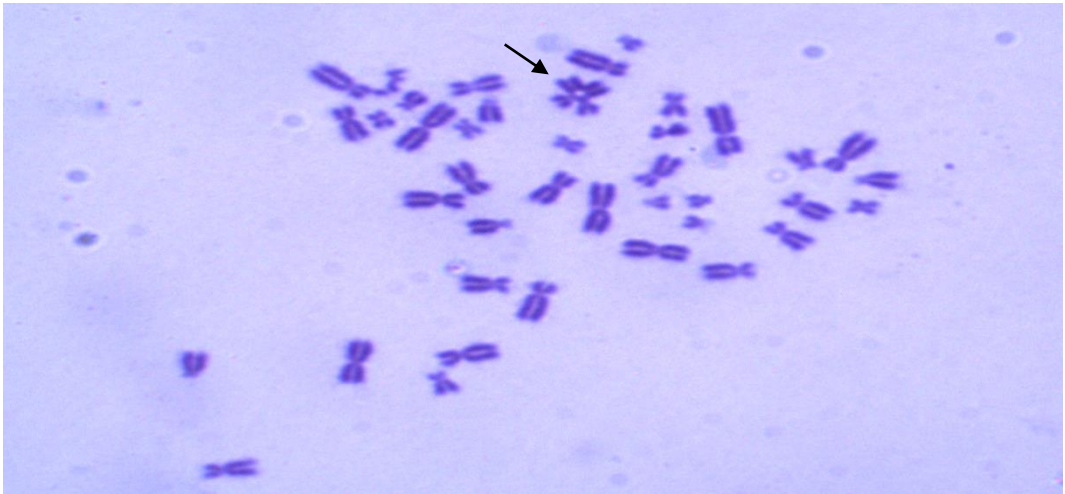
⁺⁺Çözücü kontrole göre anlamlı fark vardır. (p<0,01)



Şekil 4.47. 2e maddesinin 48 saat uygulaması ile oluşan kromatit kırığı

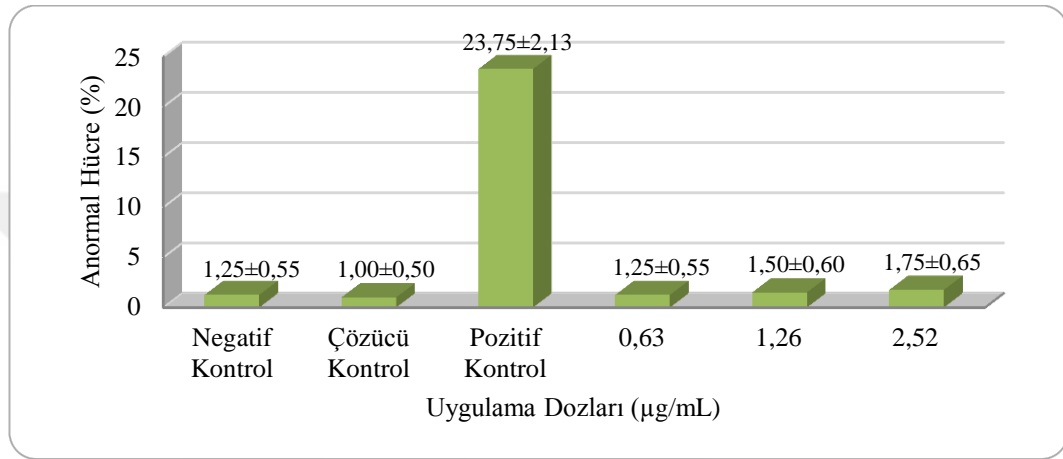


Şekil 4.48. 2e maddesinin 48 saat uygulaması ile oluşan fragment

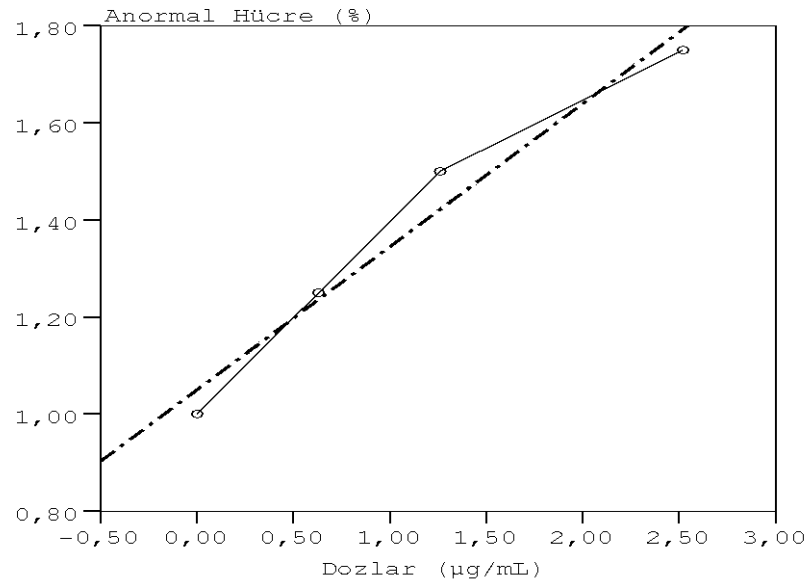


Şekil 4.49. 2e maddesinin 48 saat uygulaması ile oluşan kromatid değişimi

2e maddesiyle yapılan 48 saatlik uygulama sonucunda, anormal hücre yüzdeleri 0,63 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda 1,25 olarak, 1,06 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda 1,50 ve 2,52 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda 1,75 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.50.). Bu uygulamada, hücre başına düşen anormallik yüzdesinde hem çözücü kontrole göre ($r=0,98$) hem de negatif kontrole göre ($r=0,96$) doza bağlı artış gözlenmiştir (Şekil 4.51.). Ancak bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildir.

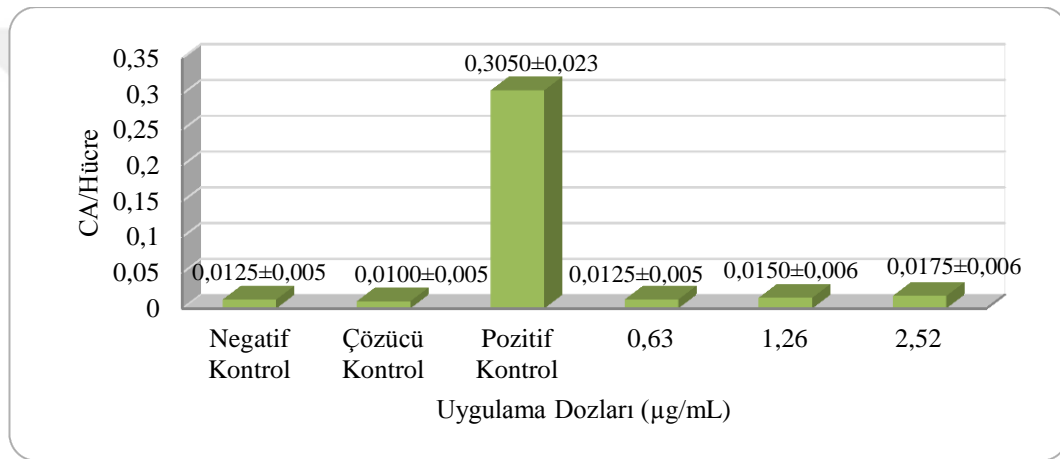


Şekil 4.50. 48 saatlik 2e maddesi uygulamasında dozlara göre anormal hücre yüzdeleri

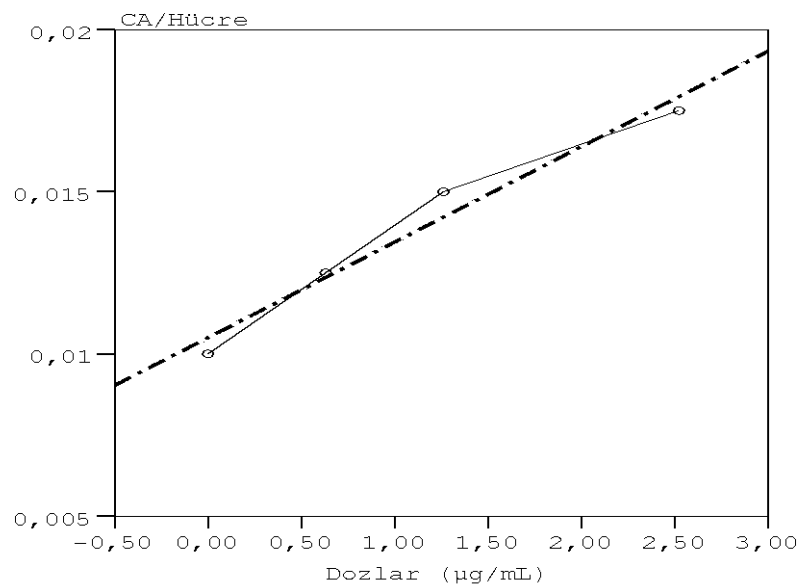


Şekil 4.51. 48 saatlik 2e maddesi uygulamasında anormal hücre yüzdelerinin doza bağlı ilişkisi

48 saatlik 2e maddesi uygulamasında, en düşük hücre başına düşen kromozomal anormallik sayısı 0,63 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda 0,0125 olarak, en yüksek hücre başına düşen anormallik sayısı 2,52 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda 0,0175 olarak tespit edilmiştir. 1,06 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozdaki hücre başına düşen anormallik sayısı ise 0,0150 olarak saptanmıştır (Şekil 4.52.). Bu veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, CA/Hücre sayısında hiçbir uygulama dozunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Bu uygulamada, hücre başına düşen anormallik yüzdesinde hem çözücü kontrole göre ($r=0,98$) hem de negatif kontrole göre ($r=0,96$) doza bağlı artış gözlenmiştir (Şekil 4.53.).

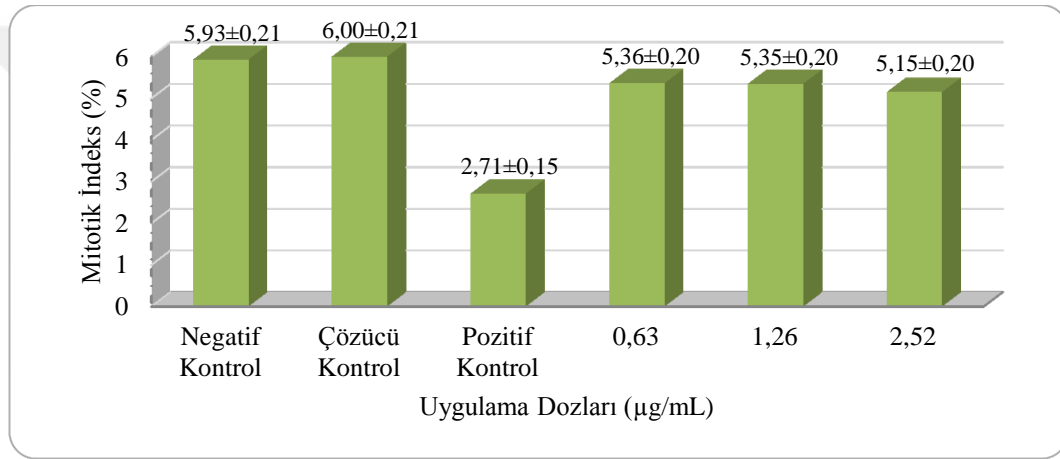


Şekil 4.52. 48 saatlik 2e maddesi uygulamasında dozlara göre hücre başına düşen anormallik sayıları

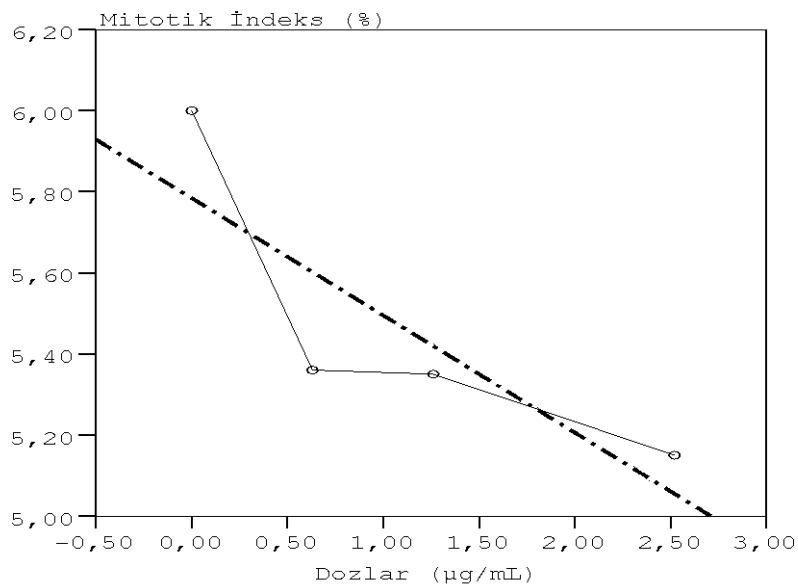


Şekil 4.53. 48 saatlik 2e maddesi uygulamasında hücre başına düşen anormallik sayılarının doza bağlı ilişkisi

2e maddesiyle yapılan 48 saatlik uygulamada, Mİ değerleri 0,63 $\mu\text{g/mL}$ 'lik ve 1,26 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozlarda sırasıyla 5,36 ve 5,35, en yüksek doz olan 2,12 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda 5,15 olarak bulunmuştur (Şekil 4.54.). Bu uygulamada Mİ, hem negatif kontrol grubuna ($r=-0,86$) göre hem de çözücü kontrol grubuna göre ($r=-0,84$) doza bağlı olarak azalmıştır (Şekil 4.55.). Bu veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde: 0,63 $\mu\text{g/mL}$ ve 1,26 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozlarda gözlenen azalmalar sadece çözücü kontrole göre anlamlı ($p < 0,05$) bulunurken; 2,52 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda gözlenen azalma hem negatif kontrole hem de çözücü kontrole göre anlamlı ($p < 0,01$) bulunmuştur (Tablo 4.6.).



Şekil 4.54. 48 saatlik 2e maddesi uygulamasında dozlara göre mitotik indeks değerleri



Şekil 4.55. 2e maddesi uygulamasında mitotik indeks değerlerinin doza bağlı ilişkisi

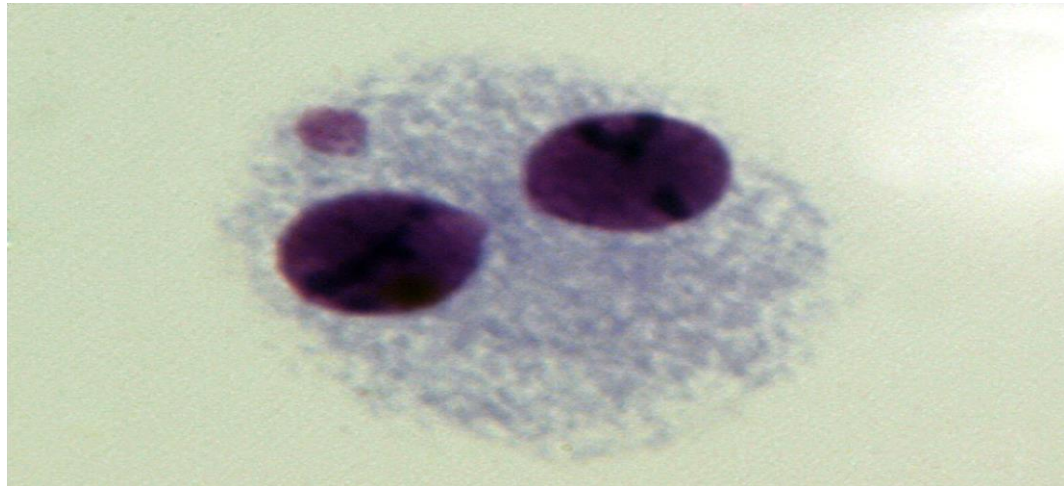
4.2.2. Mikronukleus testinin bulguları

2e maddesi muamelesiyle yapılan MN testinde tespit edilen mikronukleus frekansları, hücre başına düşen mikronukleus sayıları ve nukleer bölünme indeksleri Tablo 4.7.'de verilmiştir. Bu uygulama sonucunda gözlenen, 1 mikronukleusa sahip binükleat bir hücrenin fotoğrafı Şekil 4.56.'da gösterilmiştir.

Tablo 4.7. 2e maddesinin mikronukleus frekansları ve nukleer bölünme indeksi üzerine etkileri

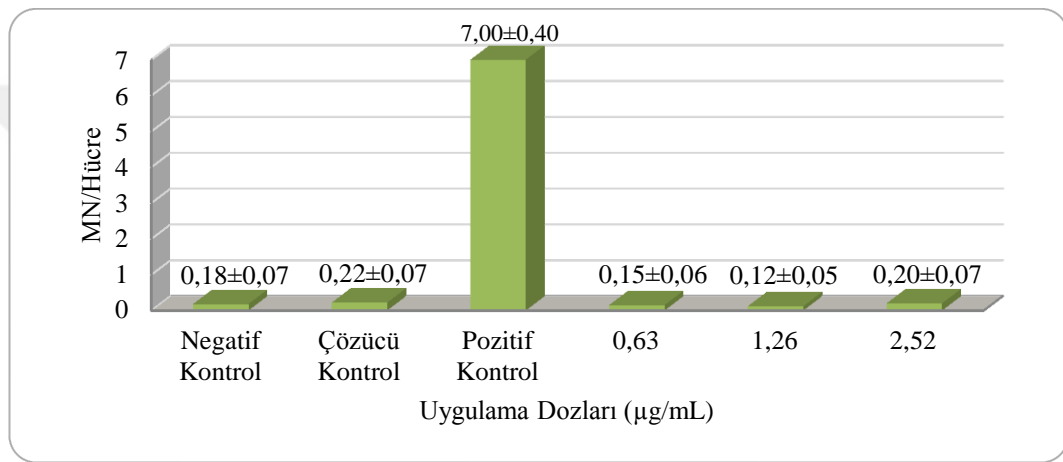
Test maddesi	Uygulama		Sayılan BN hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronukleus frekansları		MN/ Hücre (%) \pm SH	Nukleer bölünme indeksi \pm SH
	Süre (saat)	Doz (μ g/ml)		(1)	(2)		
N.Kontrol	48	0,00	4000	7	-	0,18 \pm 0,07	1,64 \pm 0,28
Ç.Kontrol	48	20 μ L	4000	9	-	0,22 \pm 0,07	1,58 \pm 0,28
P.Kontrol	48	0,20	4000	260	10	7,00 \pm 0,40	1,33 \pm 0,25
2e	48	0,63	4000	6	-	0,15 \pm 0,06	1,53 \pm 0,27
		1,26	4000	5	-	0,12 \pm 0,05	1,53 \pm 0,27
		2,52	4000	8	-	0,20 \pm 0,07	1,52 \pm 0,27

BN: Binükleat, SH: standart hata.

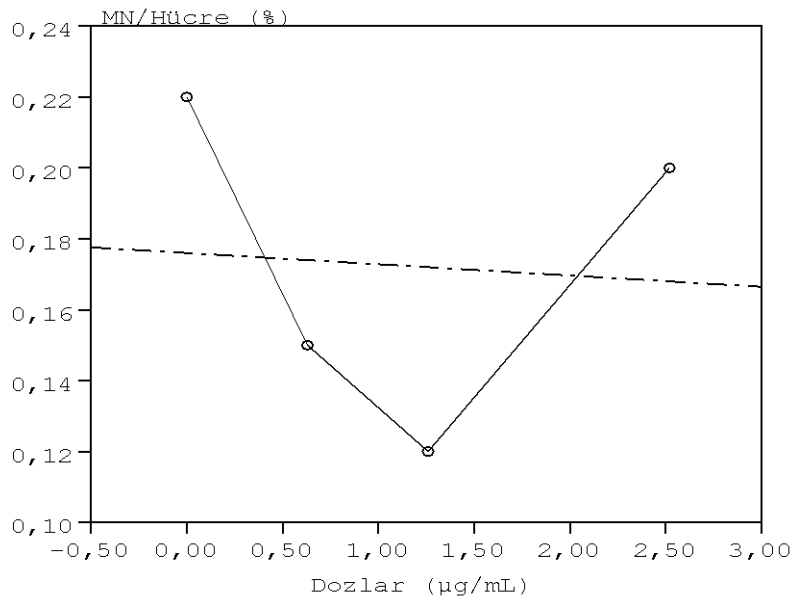


Şekil 4.56. 2e maddesi uygulamasıyla oluşan 1 mikronukleuslu binükleat hücre

2e maddesiyle yapılan MN testi sonucunda, en yüksek hücre başına düşen MN frekansı 2,52 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda 0,20 olarak belirlenmiştir. 0, 63 $\mu\text{g/mL}$ 'lik ve 1,26 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozlardaki hücre başına düşen MN frekansı sırasıyla 0,15 ve 0,12 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.57.). Bu veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, hücre başına düşen MN frekansında hiçbir uygulama dozunda her iki kontrol grubuna göre de anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Bu uygulamada, MN/Hücre frekansı ile doz artışı arasında, hem negatif kontrole ($r=0,29$) hem de çözücü kontrole göre ($r=-0,08$) herhangi bir doz-etki ilişkisi tespit edilmemiştir (Şekil 4.58.).

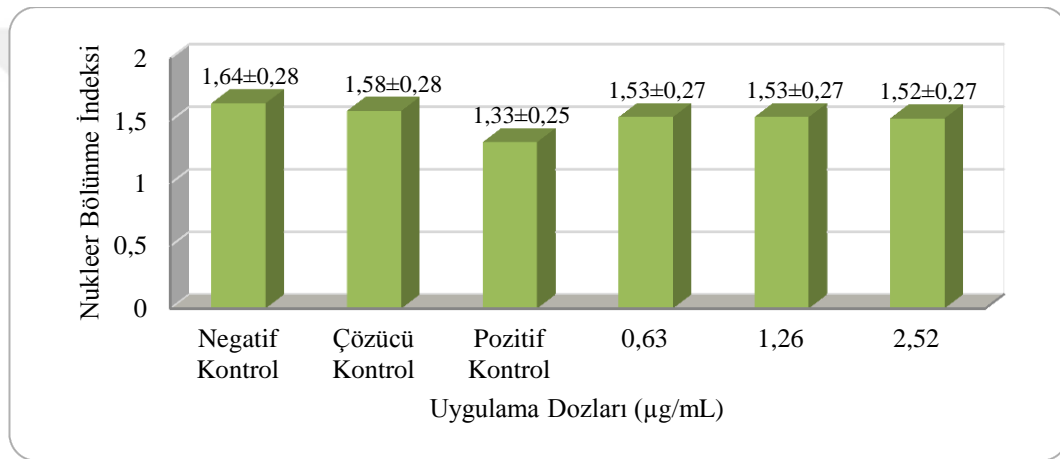


Şekil 4.57. 2e maddesi uygulamasında dozlara göre mikronukleus frekansları

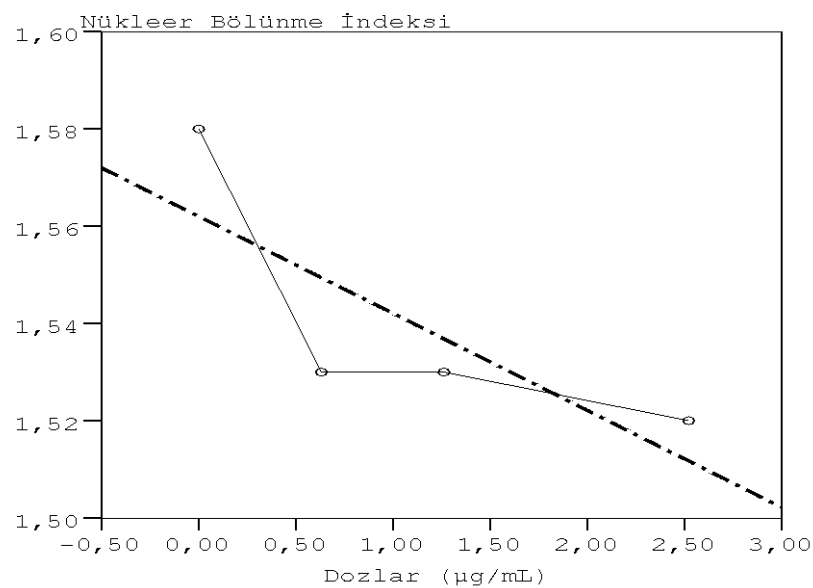


Şekil 4.58. 2e maddesi uygulamasında mikronukleus frekanslarının doza bağlı ilişki

2e maddesi ile yapılan MN testi sonucunda saptanan nukleer bölünme indeksi değerleri, tüm uygulama dozlarında birbirine çok yakın bulunmuştur. Nukleer bölünme indeksi değerleri, en yüksek doz olan 2,52 $\mu\text{g/mL}$ 'de 1,52 olarak, 0,63 $\mu\text{g/mL}$ 'lik ve 1,26 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozlarda 1,53 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.59.). Bu veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, nukleer bölünme indeksinde hiçbir uygulama dozunda her iki kontrol grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Bu uygulama sonucunda, nukleer bölünme indeksi ile doz artışı arasında hem negatif kontrol grubuna göre ($r=-0,74$) hem de çözücü kontrol grubuna göre ($r=-0,79$) doz-etki ilişkisi gözlenmiştir (Şekil 4.60.).



Şekil 4.59. 2e maddesi uygulamasında dozlara göre nukleer bölünme indeksi değerleri



Şekil 4.60. 2e maddesi uygulamasında nukleer bölünme indeksi değerlerinin doza bağlı ilişkisi

4.2.3. Komet testinin bulguları

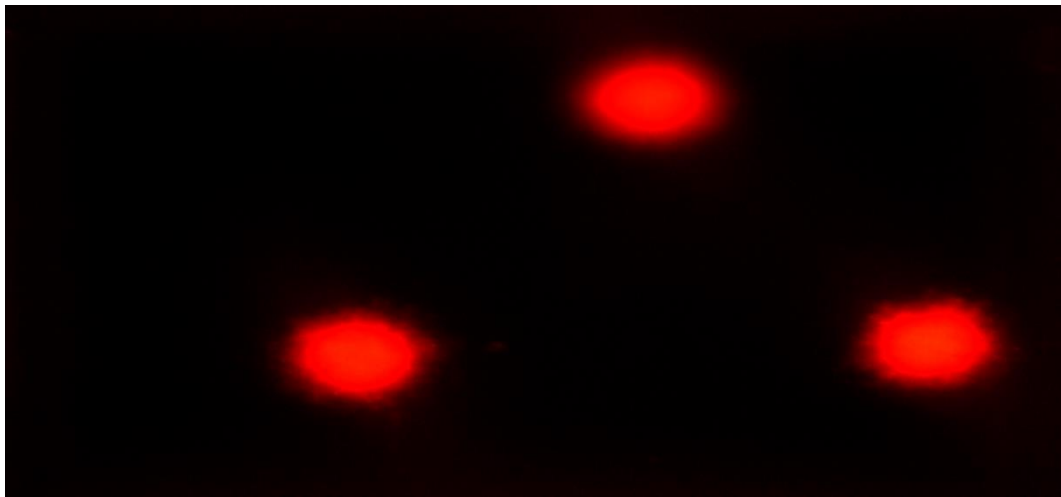
Bu çalışmada, 2e maddesi maruziyetinin insan lenfositlerindeki genotoksisite potansiyelini belirlemek için kullanılan yöntemlerden biri olan komet analizinde, her dozda her bir birey için 100 toplamda ise 400 (4 birey) hücre incelenmiş ve genotoksik hasarın göstergesi olarak seçilen kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametreleri değerlendirilmiştir. Bu parametrelere ilişkin elde edilen veriler Tablo 4.4.'de gösterilmiştir. 2e maddesi uygulaması sonrasında insan lenfositlerinde saptanan hasarsız ve hasarlı DNA görüntüleri Şekil 4.61.-4.64.'de verilmiştir.

Tablo 4.8. İnsan lenfositlerinin 2e maddesine *in vitro* maruziyeti sonrası oluşan DNA hasarı

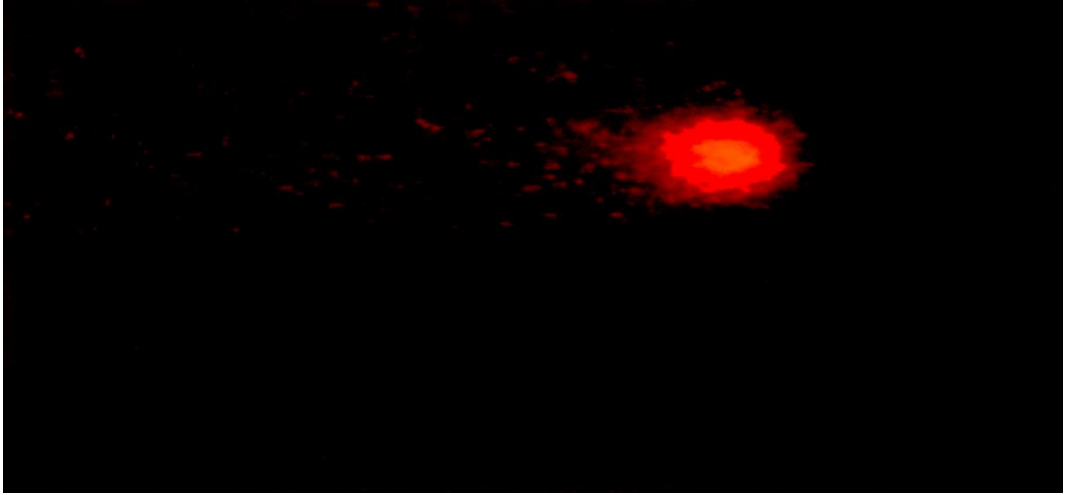
Test Maddesi	Süre (saat)	Dozlar ($\mu\text{g/mL}$)	Kuyruk Uzunluğu (μm)	Kuyruk Momenti	Kuyruk Yoğunluğu (%)
N.Kontrol	1	0	5,622 \pm 0,070	2,831 \pm 0,054	211,659 \pm 0,104
Ç.Kontrol	1	20 μL	5,796 \pm 0,085	3,089 \pm 0,079	211,215 \pm 0,054
2e	1	0,63	5,690 \pm 0,083	2,809 \pm 0,063 ⁺	211,813 \pm 0,149 ⁺
		1,26	5,921 \pm 0,189	3,146 \pm 0,172 [*]	210,865 \pm 0,173 [*]
		2,52	5,702 \pm 0,076	2,877 \pm 0,585	211,525 \pm 0,157
P.Kontrol	1	3,4	25,123 \pm 0,584	21,518 \pm 0,561	223,490 \pm 1,138

⁺Negatif kontrole göre anlamlı fark vardır. ($p<0,01$)

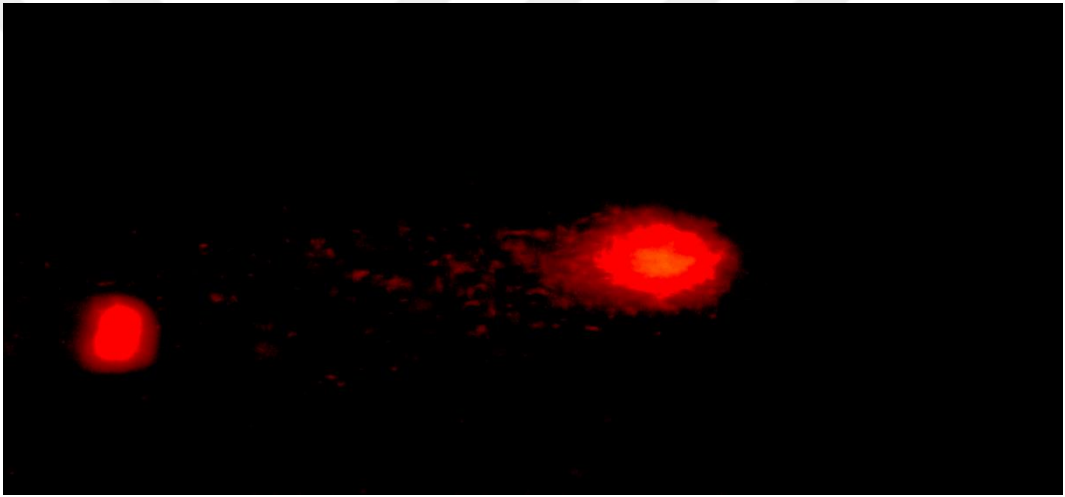
^{*}Çözücü kontrole göre anlamlı fark vardır. ($p<0,01$)



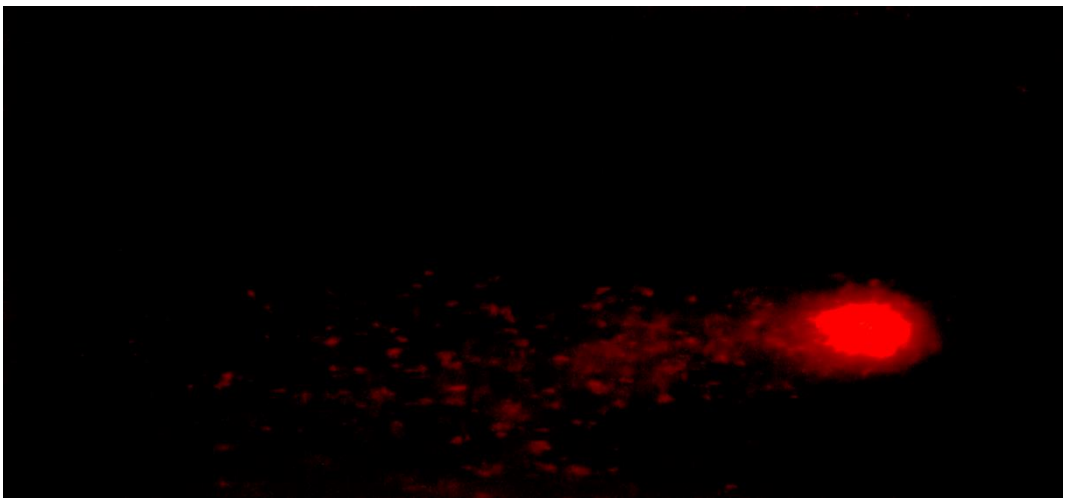
Şekil 4.61. 2e maddesi ile muamele edilen insan lenfositlerinde hasarsız DNA'nın komet testi ile görünümü



Şekil 4.62. 2e maddesi ile muamele edilen insan lenfositlerinde az hasarlı DNA'nın komet testi ile görünümü

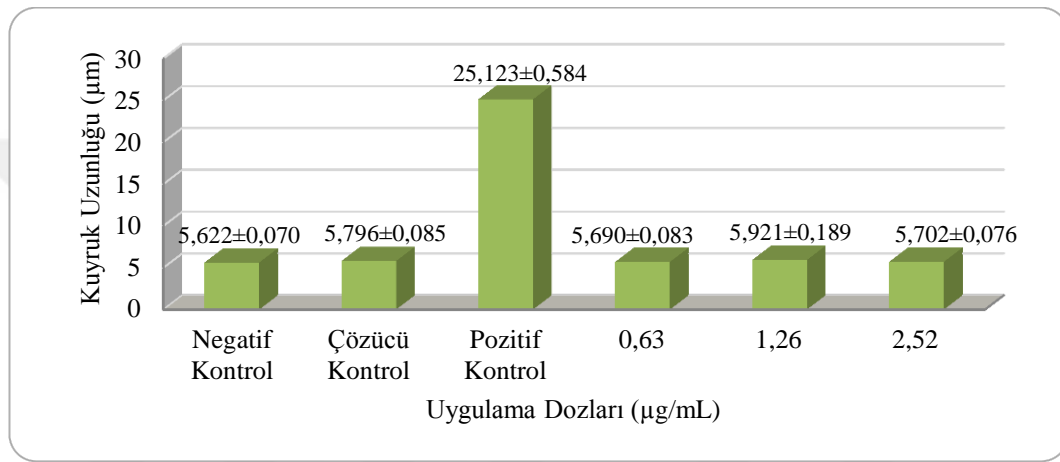


Şekil 4.63. 2e maddesi ile muamele edilen insan lenfositlerinde orta hasarlı DNA'nın komet testi ile görünümü

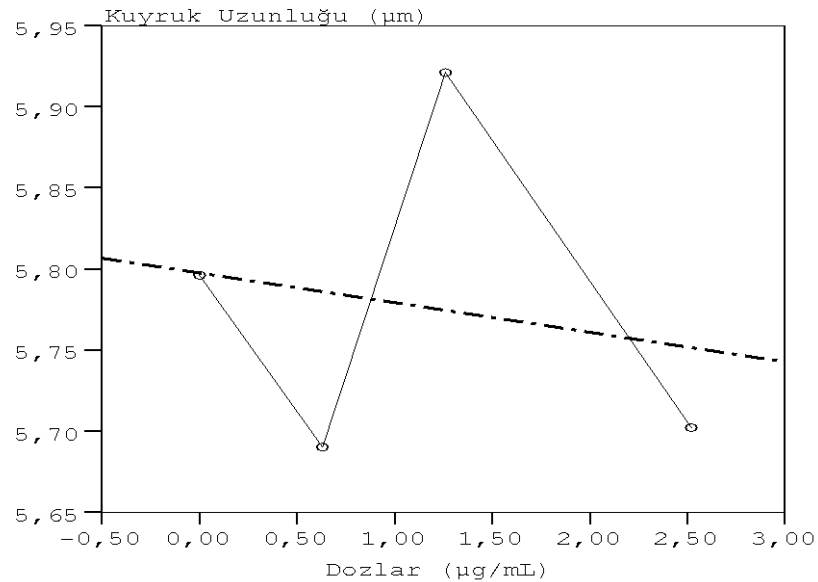


Şekil 4.64. 2e maddesi ile muamele edilen insan lenfositlerinde çok hasarlı DNA'nın komet testi ile görünümü

2e maddesiyle yapılan komet analizi sonucunda, kuyruk uzunluğunda tüm uygulama dozlarında her iki kontrol grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (Tablo 4.8.). Kuyruk uzunluğu değerleri 0,63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik dozda 5,690 olarak, 1,26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik dozda 5,921 ve 2,52 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik dozda 5,702 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.65.). Bu uygulamada, doz artışı ile kuyruk uzunluğu arasında hem negatif kontrole göre ($r=0,31$) gözlenirken, hem de çözücü kontrole göre herhangi bir ilişki ($r=-0,19$) gözlenmemiştir (Şekil 4.66.).

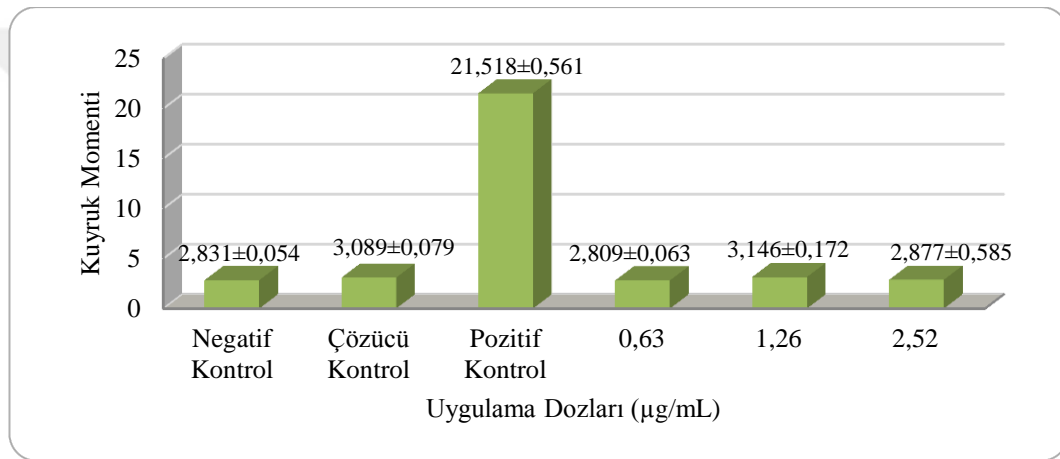


Şekil 4.65. 2e maddesi uygulamasında dozlara göre komet kuyruk uzunluğu değerleri

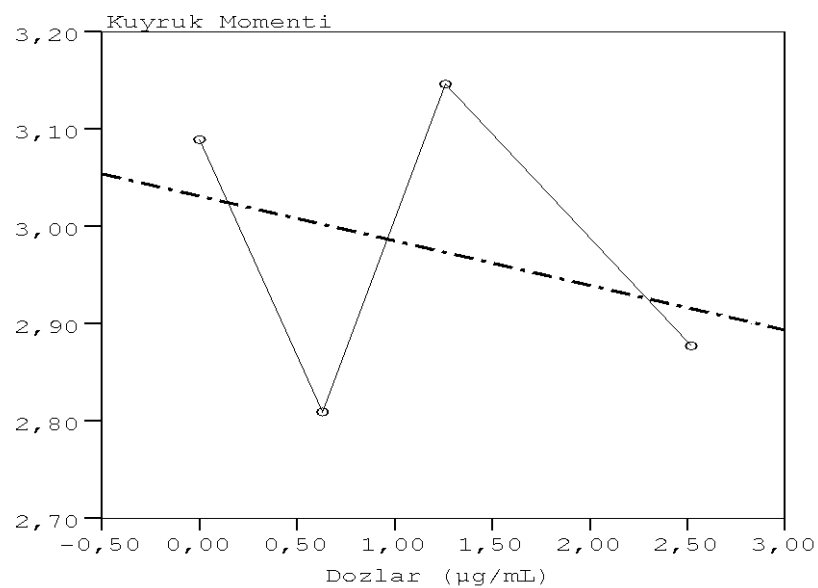


Şekil 4.66. 2e maddesi uygulamasında dozlara göre komet kuyruk uzunluğu değerlerinin doza bağlı ilişkisi

2e maddesiyle yapılan komet analizi sonucunda, kuyruk momenti $0,63 \mu\text{g/mL}$ 'lik dozda $2,809$, $1,26 \mu\text{g/mL}$ 'lik dozda $3,146$ ve $2,52 \mu\text{g/mL}$ 'lik dozda $2,877$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.67.). Bu uygulamada, 2e maddesinin kuyruk momentini $1,26 \mu\text{g/mL}$ 'lik dozda negatif kontrole göre anlamlı derecede arttırdığı ($p < 0,01$), $0,63 \mu\text{g/mL}$ 'lik dozda çözücü kontrole göre anlamlı derecede azalttığı ($p < 0,01$) ve $2,52 \mu\text{g/mL}$ 'lik dozda anlamlı bir farklılık oluşturmadığı belirlenmiştir (Tablo 4.8.). Diğer yandan, kuyruk momentiyle doz artışı arasında hem negatif kontrole göre ($r = 0,25$), hem de çözücü kontrole göre ($r = -0,30$) herhangi bir ilişki tespit edilmemiştir (Şekil 4.68.).

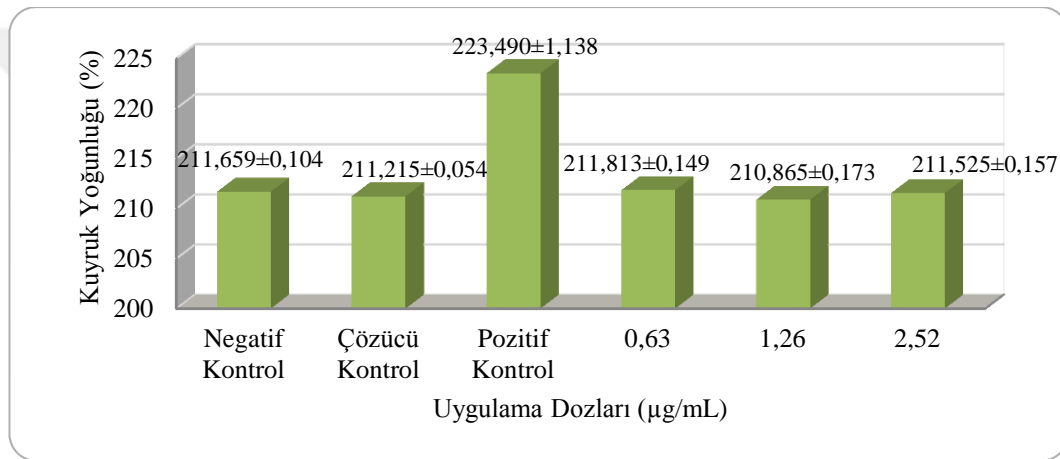


Şekil 4.67. 2e maddesi uygulamasında dozlara göre komet kuyruk momenti değerleri

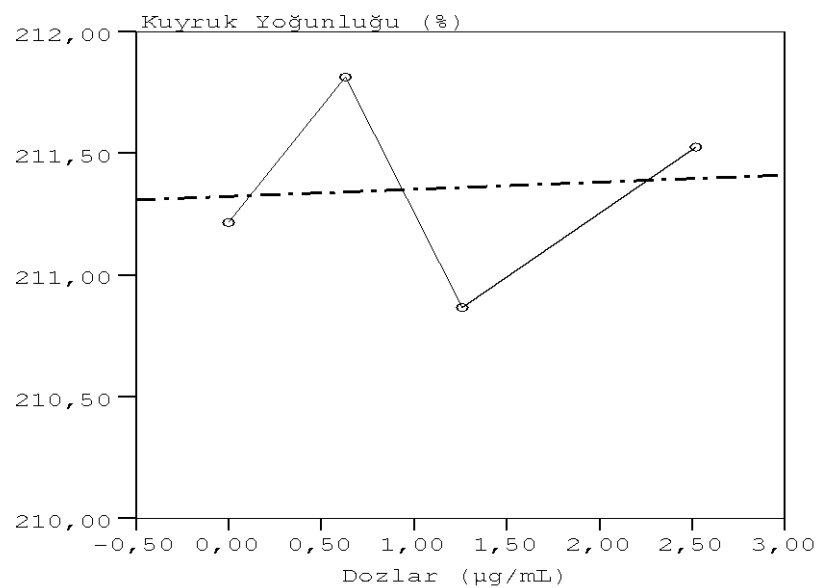


Şekil 4.68. 2e maddesi uygulamasında dozlara göre komet kuyruk momenti değerlerinin doza bağlı ilişkisi

2e maddesi uygulaması sonucunda oluşan kuyruk yoğunluğu 0,63 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda 211,813, 1,26 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda 210,865 ve 2,52 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda 211,525 olarak bulunmuştur (Şekil 4.69.). Bu uygulamada, kuyruk yoğunluğunda 0,63 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda çözücü kontrole göre anlamlı bir artış ($p<0,01$), 1,26 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda negatif kontrole göre anlamlı bir azalış ($p<0,01$) olduğu belirlenmiştir. 2,52 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozdaki kuyruk yoğunluğundaysa, her iki kontrol grubuna göre de anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Tablo 4.8.). Bu uygulamada, kuyruk yoğunluğuyla doz artışı arasında hem negatif kontrole göre ($r=-0,29$) hem de çözücü kontrole ($r=0,08$) herhangi bir doz-etki ilişkisi belirlenmemiştir (Şekil 4.70.).



Şekil 4.69. 2e maddesi uygulamasında dozlara göre komet kuyruk yoğunluğu değerleri



Şekil 4.70. 2e maddesi uygulamasında dozlara göre komet kuyruk yoğunluğu değerlerinin doza bağlı ilişkisi

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İlaç endüstrisinde, yeni ilaçların geliştirilme sürecinin önemli bir kısmını oluşturan toksikolojik araştırmalar, kullanıma sunulacak ilaç etken maddelerinin etkinlikleri ile güvenilirlikleri arasındaki dengenin kurulmasını sağlar [197]. Ayrıca bu araştırmalar sonucunda yeni ilaçlarla ilgili yarar-zarar, güvenilirlik-toksisite, en yüksek tolere edilebilen doz-toksik olmayan etkili doz, LD₅₀-ED₅₀ ile ilgili soruların cevapları deney hayvanları, izole organlar veya *in vitro* koşullarda hücre kültürleri üzerinde belirlenmiş olur. Toksikolojik araştırmaların aşamalarından biri olan özel toksisite çalışmalarında, ilaç etken maddelerinin karsinojenik, immunotoksik, nörotoksik, teratojenik ve genotoksik etkileri araştırılır [158].

Genotoksik etki araştırmalarında, ilaç adayı kimyasal bileşiklerin genetik materyal üzerinde değişiklik oluşturup oluşturmadığı değerlendirilir. Genetik yapıda meydana gelen değişiklikler, temas eden bireylerin somatik hücrelerinde meydana gelirse ve protoonkogenlerin etkinleşmesine veya tümör baskılayıcı genlerin etkisizleşmesine yol açarsa, tümör gelişim riskini arttırabilir. Fetal somatik hücrelerinde meydana gelirse doğuştan anormallik riskinde bir artışa yol açabilir. Üreme hücrelerinde meydana gelirse, daha sonraki kuşaklarda genetik hastalıkların görülmesi riskini arttırabilir [197]. Bu gibi nedenlerle, ilaç etken maddeleri olarak önerilmesi düşünülen kimyasal maddelerin insanların kullanımına sunulmadan önce genotoksisite testleri gibi güvenlik testlerinden geçirilmesi ilaç geliştirmede çok önemli bir ilkedir [198, 199]. Bu çalışmada, test maddeleri olarak kullanılan insan KA I ve KA II inhibitörü yeni sülfonamid türevleri (2b ile 2e) de ilaç etken maddeleri olarak kullanılma potansiyelleri olabileceği düşünülerek sentezlenmiş olduklarından genotoksisite testlerinden geçirilmeleri önemlidir.

İlaç etken maddelerinin piyasaya sunulmadan önce veya piyasaya sunulduktan sonra kullanan kişilerdeki genotoksik etkilerinin belirlenmesinde kullanılan, *in vivo* veya *in vitro* olarak uygulanabilen kısa süreli genotoksisite testleri arasında AMES testi, somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART), fare lenfoma timidin kinaz testi, programlanmamış DNA sentezi testi, rodentlerde yapılan dominant letalite testi, kromozomal anormallikler (CA) testi, kardeş kromatit değişimi (KKD) testi, mikronukleus (MN) testi ve tek hücre jel elektroforezi (komet) testi bulunur [168]. Bunlar arasında yaygın kullanılan kromozomal anormallikler (CA) ve mikronukleus (MN) testleri, yapısal veya sayısal kromozom anormalliklerinin belirlenebildiği sitogenetik metotlardır [30]. Bu metotlar güvenilir olmalarına rağmen, genetik hasarları ve değişimleri belirlemede zahmet ve uzun süre gerektiren çalışmalardır. Üstelik DNA seviyesindeki minör değişiklikler, bu kromozomal metotlar aracılığıyla belirlenmemektedir [31]. Bu nedenle, son yıllarda moleküler metotlar geliştirilmiştir. Moleküler metotlardan biri olan tek hücre jek elektroforezi (komet) analizi ile DNA eklentileri, zincir kırıkları, çapraz bağlanmaları ve alkali-labil bölgeler gibi minör DNA hasarları belirlenebilmektedir [30].

Hem OECD, ICH ve COM gibi uluslararası kuruluşlar tarafından yayınlanmış yönergelerde hem de birçok bilimsel çalışmada, kimyasal veya fiziksel ajanların genotoksik etkilerini belirlemek için bir kısa süreli genotoksisite testinin tek başına kullanımının yeterli olmadığı ve farklı testlerin birlikte kullanımı ile daha güvenilir sonuçların elde edildiği bildirilmiştir [30, 32, 33]. Çünkü, farklı test yöntemleri ya da farklı organizmalar kullanılarak yapılan testlerle farklı sonuçlar alınabilmektedir [164]. Bu bilgiler doğrultusunda, bu çalışmada 2b ve 2e bileşiklerinin genotoksik potansiyellerini belirlemek için uluslararası kuruluşlar tarafından güvenilirliği onaylanmış ve geçerliliği halen devam eden kromozomal anormallikler, mikronukleus ve komet testi olarak bilinen üç farklı kısa süreli genotoksisite testi kullanılmıştır.

İlaçlar gibi kimyasal maddelerin insanlar üzerinde oluşturabileceği genotoksik etkiler, bu kısa süreli test sistemleri ile belirlenmek istendiğinde, model hücre olarak genellikle insan kanından izole edilen periferal kan lenfositleri kullanılmaktadır.

Lenfositler tüm vücutta dolaşan, uzun ömürlü olan ve herhangi bir doku/organa spesifik bir çevresel toksik ajan ile kolaylıkla zarar görebilen hücreler olmalarından dolayı, hedef organlardaki biyolojik etkileri en iyi şekilde temsil ettikleri ileri sürülmektedir [34]. Birçok bilimsel çalışmada, DNA hasarları, genotoksisite veya kanser riskini değerlendirme çalışmalarında periferik kan lenfositlerinin kullanımının uygun olduğu bildirilmiştir. Ayrıca kromozomal hasar oluşum mekanizması farklı dokularda benzer olduğundan, lenfositlerdeki hasar seviyesinin kansere eğilimli dokulardaki hasar seviyesini yansıttığı da belirtilmiştir [35, 36, 37, 38]. Bu çalışmada da, 2b ve 2e maddelerinin genotoksik profillerini belirlemek için kullanılan CA, MN ve komet testleri sağlıklı bireylerden alınan periferik kan lenfositlerinde uygulanmıştır.

Bu araştırmada kullanılan CA, MN ve komet testlerinde, test maddeleri olan 2b ve 2e maddelerinin insan lenfosit kültürlerine uygulanacağı dozlar belirlenirken IC_{50} değerleri dikkate alınmıştır. 2b maddesi için IC_{50} , $IC_{50}/2$ ve $IC_{50}/4$ 'lük dozlar 0,53, 1,06, 2,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak belirlenmiştir. 2e maddesi için IC_{50} , $IC_{50}/2$ ve $IC_{50}/4$ 'lük dozlar 0,63, 1,26, 2,52 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak belirlenmiştir. Negatif kontrol için kültürler hiçbir madde eklenmemiş, çözücü kontrol için DMSO eklenmiş ve pozitif kontrol için ise MMC eklenmiştir. CA ve MN testlerinde, kültürdeki memeli hücrelerinin hücre siklusu yaklaşık 24 saat olduğundan, ikinci ve üçüncü mitozların gözlenebilmesi amacıyla inkübasyon süresi 72 saat olarak uygulanmıştır. 2b ve 2e maddeleri için CA testindeki muamele süreleri, hücre siklusu dikkate alınarak 24 ve 48 saat olarak uygulanmıştır. Böylece ilaç etken maddelerinin sırasıyla 1 ve 2 hücre siklusu boyunca kültürde kalması sağlanmıştır. MN çalışması için ise, muamele süresi 48 saat olarak uygulanmıştır.

Bu çalışmada kullanılan metotlardan biri olan *in vitro* CA testi, tüm genomdaki hasarın izlenmesine imkan tanınması bakımından önemlidir. Ayrıca, genotoksik maruziyetleri değerlendirmede en fazla kullanılan yöntemdir. Çeşitli etkenlere maruziyetin kromozomal anormalliklere yol açma riskinin saptanmasında ve kimyasalların klastojenik aktivitesinin değerlendirilmesinde kromozomlarda görülen değişikliklerin incelenmesi önemlidir [199]. CA testi, sitogenetik yöntemler arasında

altın standart olarak kabul edilmektedir. Çünkü kromozomal aberasyonun indüksiyon mekanizmaları çok iyi bilinmektedir ve çoğu çevresel toksik maddenin kromozomal aberasyonu indüklediği gösterilmiştir [34]. Bu testle, kromozom veya kromatid kırıklarının, değişimlerinin, yeniden düzenlenmelerinin, translokasyon, inversiyon köprülerinin frekansı belirlenir. Hücrelerde ortaya çıkan kromozom anormalliklerindeki artış, klastojenitenin bir göstergesi olup, genetik hastalıklar ve kanser oluşma riskini artırır [156].

Test maddelerinden biri olan 2b bileşiği ile yapılan CA testi sonucunda, insan lenfositlerinde beş çeşit kromozomal anormallik çeşidi gözlenmiştir. Bu anormallik çeşitleri kromatid ve kromozom kırıkları, fragmentler, kardeş kromatitlerde birleşme ve disentrik kromozom şeklindedir. Kromatid kırıkları en fazla gözlenen anormallik tipidir ve bunu fragmentler izlemiştir. Kardeş kromatitlerde birleşme ve disentrik kromozom gibi anormallik çeşitleri sadece 48 saatlik uygulamada görülmüştür. Bu çalışmada, 2b maddesi ile yapılan 24 ve 48 saatlik muameleler sonucunda ortaya çıkan anormal hücre yüzdeleri ve hücre başına düşen kromozomal anormallik sayıları, hiçbir uygulama dozunda her iki kontrol grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Diğer yandan, 2b maddesi 24 saatlik uygulamada, anormal hücre yüzdesini ve hücre başına düşen anormallik sayısını hem negatif kontrole ($r=0,71$) hem de çözücü kontrole ($r=0,57$) göre doza bağlı olarak arttırmıştır. 48 saatlik 2b uygulamasında ise, anormal hücre yüzdesi ve hücre başına düşen anormallik sayısı ile doz artışı arasında her iki kontrol grubuna göre de herhangi bir doz-etki ilişkisine rastlanmamıştır.

Diğer test maddesi olan 2e bileşiği ile yapılan CA testi sonucunda da, insan lenfositlerinde de beş çeşit kromozomal anormallik çeşidi tespit edilmiştir. Bu anormallik çeşitleri kromatid ve kromozom kırıkları, fragmentler, kromatid değişimi ve disentrik kromozomdur. Kromozom kırıkları ve disentrik kromozom sadece 24 saatlik uygulamada gözlenirken, kromatid değişimi sadece 48 saatlik uygulamada gözlenmiştir. 2e maddesiyle yapılan her iki muamele süresi sonunda da tespit edilen anormal hücre yüzdeleri ve hücre başına düşen kromozomal anormallik sayıları, hiçbir uygulama dozunda her iki kontrol grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı

bulunmamıştır. Diğer yandan, 48 saatlik 2e uygulamasında, anormal hücre yüzdesi ve hücre başına düşen kromozomal anormallik sayısı hem negatif kontrole ($r=0,98$) hem de çözücü kontrole ($r=0,96$) göre doza bağlı olarak artmıştır.

Bu araştırmada, test maddelerinin olası klastojenik ve/veya anojenik etkileri saptamak için kullanılan metotlardan biri olan mikronukleus testi de genotoksisite testleri arasında önemli yer tutmaktadır. Ayrıca insanların maruz kaldığı birçok ajanın güvenlik değerlendirmesinde dünya çapında önerilen geçerli bir yöntemdir. Bu yöntem, bir veya birkaç kromozomun ya da kromozomdan kopan parçaların mitoz esnasında ana çekirdekten ayrı bir şekilde hücre içinde oluşturdukları küçük çekirdekleri belirler. Ayrıca, genotoksisite ve sitotoksisite çalışmalarında kromozom kırığı, kromozom kaybı ve hücre bölünmesinin inhibe edilmesinin basit morfolojik kriterlerle ölçümünü sağlar. MN yönteminde kullanılan Cyt B, aktin polimeraz inhibitörü olup nükleer bölünmeyi durdurmadan, mitotik sitokinezi yani stoplazmanın bölünmesini durdurur. Cyt B etkisiyle, hücre çekirdeği bölünürken, stoplazma bölünmesi (sitokinez) durur ve binukleat hücreler ortaya çıkar. Ayrıca, bu yöntem sayesinde nükleer bölünme indeksi de hesaplanır [180].

2b maddesi ile yapılan MN testi sonucunda, 1 veya 2 mikronukleuslu binukleat hücreler gözlenirken; 2e maddesi ile yapılan MN testi sonucunda, sadece 1 MN'lu binukleat hücreler gözlenmiştir. 2b ve 2e maddeleri, hem negatif kontrole hem de çözücü kontrole göre hücre başına düşen mikronukleus sayılarında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar oluşturmamıştır. MN testi sonucunda, sadece 2b uygulamasında hücre başına düşen MN frekansı ile doz artışı arasında negatif kontrole göre ($r=0,46$) zayıf bir doz-etki ilişkisine rastlanmıştır. Bu sonuçlar, 2b ve 2e maddelerinin MN oluşumunu önemli düzeyde arttırmadığını göstermektedir.

Yapılan literatür araştırması sonucunda, günümüzde ilaç etken maddeleri olarak klinik kullanımda olan asetazolamid, dorzolamid, brinzolamid, zonisamid ve topimarat gibi KAİ sülfonamid türevlerinin genotoksisiteleri ile ilgili Ghosh ve arkadaşları (2010)'nın komet analizini kullanarak yaptıkları çalışma dışında araştırmaya rastlanmamıştır. Ancak, bu ilaç etken maddelerinin genotoksik

profillerine ilişkin FDA tarafından bildirilmiş pazarlama öncesi yapılmış çalışmalarının sonuçlarına ulaşılmıştır. FDA'nın raporlarında, asetazolamid'in bir bakteriyel mutajenite testinde metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda mutajenik etkisinin bulunmadığı bildirilmiştir [200]. Dorzolamid'in *in vivo* fare sitogenetik analizi, *in vitro* kromozomal anormallik testi, alkalın elüsyon testi, V 79 ve AMES testlerinde negatif sonuçlar verdiği bildirilmiştir [201]. Zonisamid'in CHL hücreleri ile yapılan *in vitro* kromozomal anormallik testinde mutajenik etkili bulunduğu, ancak diğer *in vitro* testlerde (AMES, fare lenfoma timidin kinaz testi, insan lenfositlerindeki kromozomal anormallik testi) ve *in vivo* rat kemik iliği sitogenetik testinde mutajenik ve klastojenik etkilerinin bulunmadığı bildirilmiştir [202]. Brinzolamid'in mutajenik potansiyelle ilgili *in vivo* fare mikronukleus testi, *in vivo* kardeş kromatid değişimi testi ve AMES *E.coli* testlerinde negatif sonuçlar verdiği, ancak *in vitro* fare lenfoma ileri mutasyon testinde aktivasyon yokluğunda negatif, mikrozomal aktivasyon varlığında pozitif sonuç verdiği bildirilmiştir [203]. Topimarar'ın AMES testinde ve *in vitro* fare lenfoma testinde mutajenik etkili bulunmadığı, rat hepatositlerinde *in vitro* koşullarda tamamlanmamış DNA sentezini arttırmadığı ve insan lenfositlerinde *in vitro* olarak rat kemik iliğinde *in vivo* olarak kromozomal anormallikleri arttırmadığı bildirilmiştir [204]. Bu çalışmaların sonuçları, büyük ölçüde bizim sonuçlarımızla uyumludur. Bu çalışmada da, yeni sentezlenen KAİ sülfonamid türevleri olan 2e ve 2b maddeleri *in vitro* koşullarda insan periferik lenfositlerinde CA ve MN frekansını istatistiksel olarak anlamlı derecede etkilememiştir.

Literatürde KAİ olmayan sülfonamidlerin genotoksisiteleri ile ilgili iki tane çalışmaya rastlanmıştır. Abou-Eisha ve arkadaşları (2004), antibiyotik olarak kullanılan bir sülfonamid türevi sulfametoksazol'un 10 µg/mL ile 500 µg/mL arasındaki farklı konsantrasyonları ile yaptıkları *in vitro* KKD ve MN testleri sonucunda, bu etken maddenin sadece en yüksek konsantrasyonunun insan periferik kan lenfositlerindeki KKD ile MN frekansında hafif bir artışa neden olduğunu ve zayıf genotoksik etkiye sahip olduğu bildirmiştir [205]. Silva ve arkadaşları (2015), antitümör aktiviteye sahip olabileceklerini ve ilaç etken maddesi olarak kullanılabileceklerini düşünerek sentezledikleri şalkon N-{4-[3-(4-nitrofenil)prop-2-enol]fenil} benzen sülfonamid

türevlerinin genotoksitesini *in vivo* fare kemik iliği MN testiyle araştırdıkları çalışmada, bu bileşiğin polikromatik eritrositlerdeki MN frekansını önemli derecede arttırdığını ve bu sonucun genotoksik etkinin bir göstergesi olduğunu bildirmiştir. Diğer yandan, aynı çalışmada şalkon N-{4-[3-(4-nitrofenil)prop-2-enol]fenil} benzen sülfonamid türevlerinin aynı dozlarının MMC ile birlikte idame edildiği uygulamalarda, tüm dozlarda polikromatik eritrositlerdeki MN frekansının önemli derecede düştüğü ve bunun antigenotoksik aktivitenin bir göstergesi olduğu da bildirilmiştir [206].

Bu çalışmada, test maddelerinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde kullanılan parametrelerden biri mitotik indekstir. Mitotik indeksler, 2b ve 2e maddelerinin belirlenen uygulama dozlarıyla 24 ve 48 saatlik sürelerle muamele edilen hücre kültürlerinden izole edilen insan lenfositlerinden hazırlanan erkek ve dişi bireylere ait preparatlarda, her bir doz için toplam 12000 hücre sayılarak, bölünen hücre sayısının toplam hücre sayısına oranının yüzde cinsinden hesaplanmasıyla belirlenmiştir. 2b ve 2e maddeleriyle yapılan 24 saatlik muameleler sonucunda, mitotik indeks değerlerinde hiçbir dozda her iki kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmamıştır. Ancak, 2b maddesinin 48 saatlik uygulamasında, mitotik indeks tüm uygulama dozlarında hem negatif kontrole hem de çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşmüştür. Ayrıca bu düşüşler, doza bağlı ($r=-0,66$ ve $r=-0,67$) bulunmuştur. Diğer yandan, 2e maddesinin 48 saatlik uygulamasında, mitotik indeks tüm uygulama dozlarında çözücü kontrole göre anlamlı düzeyde düşmüş, negatif kontrole göreyse sadece en yüksek doz olan 2,52'lik $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda anlamlı düzeyde düşmüştür. Bu düşüşler de doza bağlı ($r=-0,86$ ve $r=-0,84$) bulunmuştur. 24 ve 48 saatlik muamelelerde mitotik indeksteki düşüşlerin farklı derecelerde olması, test maddelerinin uygulama dozunun ve süresinin artışına bağlı olarak farklı sitotoksik etkilere neden olduğunun göstergesi olarak kabul edilebilir.

Sitotoksitenin göstergesi olan mitotik indeksteki azalma, hücre döngüsünün G2 safhasının engellenmesine ya da ATP seviyesinde azalmaya bağlı olarak enerji üretim merkezlerinin baskılanmasına bağlanmaktadır. Mitotik indeksteki düşüşün

diğer nedenleri arasında DNA sentezi ve iğ ipliklerinin oluşumu için gerekli olan enzimlerin baskılanması ve G2 safhasının uzaması da gösterilmektedir [207]. Literatürde, insanlarda terapötik amaçla kullanılan KAİ sülfonamid türevi ilaç etken maddelerinin sitotoksitesine ilişkin yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, KAİ olmayan bazı sülfonamid türevi ilaç etken maddelerinin uygulama dozunun ve süresinin artışına bağlı olarak mitotik indeksi düşürdüğünü ve sitotoksik aktivite gösterdiğini bildiren çalışmalar mevcuttur. Badr (1982), Allium testi ile yaptığı çalışmasında, sulfadiazin, sulfadimidin ve sulfafenazol gibi sülfonamid türevi antibiyotiklerin 24 ve 48 saatlik muamelelerinin mitotik indeksi düşürdüğünü bildirmiştir [208]. Silva ve arkadaşları (2015) da, şalkon N-{4-[3-(4-nitrofenil)prop-2-enol]fenil} benzen sülfonamid türevlerinin 24 ve 48 saatlik uygulamalardaki yüksek dozlarının polikromatik eritrosit/normokromatik eritrosit oranında önemli derecede azalmaya sebep olarak sitotoksik aktivite gösterdiğini bildirmiştir. Diğer yandan, aynı çalışmada şalkon N-{4-[3-(4-nitrofenil)prop-2-enol]fenil} benzen sülfonamid türevlerinin aynı dozlarının MMC ile birlikte idame edildiği uygulamalarda, bu bileşiklerin bütün uygulama dozlarında polikromatik eritrosit/normokromatik eritrosit oranında önemli derecede artışa neden olarak antisitotoksik aktiviteye sahip olduğu da bildirilmiştir [206].

Bu çalışmada, test maddelerinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde kullanılan diğer bir parametre de nukleer bölünme indeksidir. NBI, uygulanan kimyasal maddenin çekirdek bölünmesi üzerindeki etkisini gösterir. Bu çalışmada kullanılan test maddelerinin her ikisi de, nukleer bölünme indeksini doza bağlı olarak ($r=-0,77$ ve $r=-0,95$) düşürmüştür. Ancak her iki madde için de gözlenen bu düşüşler, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Mİ ve NBI ile ilgili elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, 2b ve 2e bileşiklerinin mitozu ve nukleus bölünmesini inhibe etmek suretiyle sitotoksik etki yaptıkları söylenebilir. Literatürde, klinik kullanımda olan KAİ sülfonamid türevi ilaçların nukleer bölünme indeksi üzerindeki etkisini araştırmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, Abou-Eisha ve arkadaşları (2004), antibakteriyel bir sülfonamid türevi olan sulfametoksazol'un nukleer bölünme indeksini düşürdüğünü ve sitotoksik etkili olduğunu bildirmiştir [205].

Antikanser ajan olarak kullanılan ve ilaç diye tanımlanan kimyasalların sitotoksik etkileri sonucu kanseri önledikleri bilinmektedir. Literatürde, sülfonamid türevlerinin antikanser aktiviteye sahip olduğunu bildiren çok sayıda çalışma vardır. Kim ve arkadaşları (2005), 2-amino-N-kinolin-8-il-benzen sülfonamid türevlerinin, tümör hücrelerinde siklin B1 artışına, cdc-2 aktivitesinde azalmaya neden olarak hücre siklusunu G2 fazında durdurduğunu ve uzun süreli muamelede sitokrom c salınımına yol açarak apoptozu indüklediklerini bildirmiştir [209]. Villar ve arkadaşları (2004), benzo[*b*]tiyofen 1,1-dioksit'in lipofilik yapıdaki sülfonamid türevlerinin insan tümör hücre hatları üzerinde sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir [210]. Yoshimatsu ve arkadaşları (1997), faz I aşamasındaki bir antitümör ajanı olan (N-[2-[(4-hidroksifenil)amino]-3piridinil]-4-metoksibenzen sülfonamid)'in, insan kanser hücre serileri üzerinde tübülün polimerizasyonunu inhibe ederek hücre çoğalmasını inhibe ettiğini bildirmiştir [211]. Mohan ve arkadaşları (2006), indol sülfonamid türevlerinin kanser hücrelerindeki iğ iplikleri mikrotübüllerinin toplanma dinamiklerini bozarak mitoz hücre bölünmesini engellediklerini ve ayrıca apoptozu indüklemek suretiyle kanser hücrelerini öldürdüklerini bildirmiştir [212]. Luo ve arkadaşları (2011), sentezledikleri aril sülfonamid türevlerinin *in vitro* koşullarda kanserli hücre serileri üzerinde hidrofobik etkileşimler aracılığıyla tubulin polimerizasyonunu inhibe ederek antimitotik aktivite gösterdiğini bildirmiştir [213]. Ayrıca, literatürde sülfonamidlerin KA II, IX ve XII izoenzimlerini inhibe etmek suretiyle tümör hücrelerinin çoğalmasını sınırladığını bildiren çok sayıda çalışma mevcuttur [11, 12, 13, 14, 148, 149, 150, 151].

FDA tarafından yayınlanmış pazarlama öncesi çalışmaların sonuçlarına ilişkin raporlarda, ilaç etken maddesi olarak kullanımda olan KAİ sülfonamidlerin karsinojenik profillerine ilişkin çalışmaların sonuçları da mevcuttur. FDA raporlarında, asetazolamid'in karsinojenik potansiyelini değerlendirmek için hayvanlar üzerinde yapılmış uzun süreli çalışmalar olmadığını bildirilmiştir [200]. Dorzolamid'in dişi ve erkek Sprague Dawley ratlarına 20 mg/kg/gün'lük yüksek dozlarda 2 yıl süreyle oral olarak verilmesinin ardından, erkek ratlarda idrar kesesi papillomaları görüldüğü, 1 mg/kg/gün'lük oral dozların verildiği ratlarda ise papillomaların görülmediği bildirilmiştir. Ayrıca, dorzolamid'in 75 mg/kg/gün'e

kadar oral dozların verildiği dişi ve erkek fareler üzerinde yapılan 21 haftalık çalışmada, tedaviyle ilişkili tümörlerin görülmediği bildirilmiştir. 2 mg/kg/gün dorzolamid hidroklorid'in bir yıl süre ile oral olarak verildiği köpeklerde ve göze topikal olarak uygulandığı maymunlarda, mesane epitelinde herhangi bir değişiklik gözlenmediği de belirtilmiştir [201]. 80 mg/kg/gün'lük dozlarda zonisamid'in 2 yıl boyunca beslenme yolu ile verildiği fare ve ratlarda karsinojeniteye ilişkin bir kanıt bulunmadığı bildirilmiştir [202]. Brinzolamid ile ilgili yapılmış karsinojenite çalışması bulunmadığı bildirilmiştir [203].

Bu araştırmada kullanılan metotlardan bir diğeri olan tek hücre jel elektroforezi ya da popüler adıyla komet tekniği, çeşitli maddelerin etkisiyle meydana gelen DNA sarmal kırıklarının ölçülmesinde son yıllarda yoğun bir şekilde kullanılan hızlı ve kolay bir tekniktir. Elektroforetik bir alanda hasarlı DNA fragmanları ve DNA kırıklarının sağlam DNA'dan ayrılması esasına dayanır [34]. Hasarsız DNA büyük olduğundan elektroforezde akım uygulaması ile kuyruk bırakmadan göç ederken hasar nedeniyle parçalanmış DNA küçük parçalar halinde geride kalıp kuyruk oluşturur. Komet analizinin temel prensibi, kimyasal ve fiziksel nedenlerle oluşan genotoksik ve sitotoksik ajanların canlı hücreleri üzerindeki etkilerini, hücrelerin DNA'larını tek tek inceleyerek tespit etmektir [214]. Komet yönteminde, sonuçların değerlendirilmesinde genel olarak kuyruktaki % DNA, baş kısmındaki % DNA, kuyruk momenti, kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu gibi değerler kullanılır. Kuyruk uzunluğu, başın merkezinden ya da uç kısmından kuyruğun sonuna kadar olan uzunluk ve kuyruk yoğunluğu tüm komet yoğunluğuna kıyasla kuyruktaki yoğunluktur. En çok kullanılan komet parametresi kuyruk momentidir. Bu parametre kuyruk uzunluğu ve kuyruktaki DNA yoğunluğunun bir sonucudur [215].

Belirlenen DNA hasarının derecesi birçok fiziksel ve teknik faktöre bağlıdır. Lizis koşulları (tuz konsantrasyonu, pH, lizis süresi vb.) sonuçları etkileyebilir. Lizis çözeltisindeki tuz kalıntıları DNA göçünü engelleyebilir, tuzun hiç olmaması da daha düşük elektroforez voltajı kullanılmasını gerektirebilir. Agar konsantrasyonunu arttırma ve elektroforez süresini azaltma DNA hasarının belirlenme olasılığını yükseltir [215]. Komet tekniğinde herhangi bir ökaryotik hücre kullanılabildiği gibi

en fazla kullanılan insan lenfosit hücre süspansiyonudur. Ancak, pek çok parametrenin lenfosit cevabını etkilediği ve donörün yaşı, fiziksel aktivitesi, alışkanlıkları (sigara ve alkol vb) gibi olası faktörlerin hücre cevabında farklılık yaratabileceği ve bireysel farklılıklara neden olabileceği önemle vurgulanmaktadır. *İn vivo* hayvan çalışmalarında karaciğer ve nasal mukoza hücreleri kullanılabildiği gibi *in vitro* toksikokinetik incelemelerde lenfositler, lenfoblastoit, akciğer, kemik iliği, gastrointestinal kanal ve beyin hücreleri de incelenebilir [216].

Komet oluşum şekillerini değerlendirmek ve tayinini yapmak için pek çok farklı çalışma yapılmaktadır. Değerlendirme tekniklerinden en basiti hasar boyutuna dayalı bir şekilde “kuyruklu yıldız” görünümündeki hücrelerin ampirik olarak gözle belirlenmesine dayanmaktadır. Hücrelerdeki DNA yapısı en basit şekliyle görünümlerine göre hasarsız (0), az hasarlı (1), orta derecede hasarlı (2), yüksek derecede hasarlı (3) ve hasarlı (4) olmak üzere beş kategoride değerlendirilir. Günümüzde ayrıca daha detaylı ve geniş incelemeye otomatik olarak imkân sağlayan görüntülü analiz sistemleri (Comet Assay IV, Andor Comet 6.0R gibi) floresan mikroskopta elde edilen görüntülerin bilgisayar ortamında incelenmesine olanak sağlamaktadır. Görüntülerde izlenen kometlerin kuyruk kısmındaki DNA, maruz kalınan mutajen dozu ile orantılıdır. Kırıklar elektroforez işleminde DNA göçünü artırırken, DNA protein bağlanmaları ya da çapraz bağlanmalar DNA göçünü azaltır. Artmış kuyruk göçü zincir kırıklarını, alkali hareketli bölgelerin ve tam olmayan eksizyon (kesip çıkarma) onarım bölgelerinin varlığını gösterir. Azalmış göç de DNA–DNA ve DNA–protein çapraz bağlanmalarına işaret eder [216].

Bu çalışmada kullanılan komet testinden elde edilen sonuçlara bakıldığında, 2b maddesi uygulamasında kuyruk yoğunluğu tüm uygulama dozlarında çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır. 2e maddesi uygulamasındaysa, kuyruk yoğunluğu sadece en düşük doz olan 0,63 µg/mL’lik dozda çözücü kontrole göre anlamlı düzeyde artmış, 1,26 µg/mL’lik dozda negatif kontrole göre anlamlı düzeyde azalmıştır. 2b maddesi uygulamasında, kuyruk uzunluğu sadece en yüksek doz olan 2,12 µg/mL’lik dozda her iki kontrol grubuna göre de anlamlı düzeyde azalırken; 2e maddesi uygulamasında, kuyruk uzunluğunda

tüm dozlarda her iki kontrol grubuna göre de anlamlı bir farklılık oluşmamıştır. 2e maddesi uygulamasında, kuyruk momentinde 1,26 µg/mL'lik dozda negatif kontrole göre anlamlı bir artış ve 0,63 µg/mL'lik dozda çözücü kontrole göre anlamlı bir azalma olmuştur. 2b maddesi uygulamasındaysa, kuyruk momenti sadece 2,12 µg/mL'lik dozda çözücü kontrole göre anlamlı düzeyde azalmıştır. Komet testinde standart artışlar ile azalışlar yoktur ve bir paradoks söz konusudur. Örneğin, düşük ve yüksek dozlar kuyruk momentini azaltırken, orta doz kuyruk momentini arttırmıştır. Komet testi açısından bütün kriterler birlikte değerlendirildiğinde 2b maddesi ile ilgili kısmen daha tutarlı sonuçlar alınsa da, ne 2b maddesinin ne de 2e maddesinin kesin olarak genotoksik ya da klastojenik etkili bir ajan olduğu söylenemez. Ghosh ve ark (2010) da, komet analizini kullanarak yaptıkları çalışmalarında ilaç etken maddesi olarak klinik kullanımda olan KAİ sülfonamid türevi asetazolamid'in insan lenfositleri üzerinde genotoksik etkisinin olmadığını bildirmiştir [217].

Sonuç olarak, bu çalışmada test maddeleri olarak kullanılan KA I ve KA II inhibitörü metilenaminobenzen sülfonamid türevleri (2b ve 2e) *in vitro* koşullarda kromozomal anormallikleri ve mikronukleus oluşumunu arttırmamış, özellikle uzun süreli maruziyette mitotik indeksi düşürmüştür. Dolayısıyla, bu maddelerin kullanılan uygulama konsantrasyonlarında *in vitro* koşullarda insan periferik lenfositleri üzerinde klastojenik veya mutajenik etkili ajanlar olmadıkları, ancak yüksek konsantrasyonlarda ve uzun süreli maruziyette sitotoksik etkili ajanlar oldukları görülmektedir. Kullanılan konsantrasyonlar ve elde edilen sonuçlar dikkate alındığında, 2b maddesinin 2e maddesine göre bir kademe daha etkili olduğu söylenebilir. Ancak, ilaç etken maddeleri olarak kullanılma potansiyelleri olabileceği düşünülerek sentezlenen bu bileşiklerin genotoksik ve sitotoksik açıdan güvenli bileşikler olduklarını ileri sürebilmek için daha fazla *in vitro* ve *in vivo* çalışmanın yapılarak, bunların sitotoksik ve genotoksik profillerinin tam olarak belirlenmesi ve elde edilen tüm sonuçların birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Kapucu, E., Kahveci, H., Susam, Ö., Çanta, Y., İlaçların ve Kozmetik Ürünlerin Geliştirilme Süreçleri ve Doğa Üzerine Etkileri. Erişim adresi: <http://kisi.deu.edu.tr/bulent.cavas/ders/bok5.pdf>, Erişim tarihi: 20.06.2015
- [2] Barrios, I.A., Brunu, I.A., Estiu, G.L., Pharmacophoric pattern of antiepileptic sulfonamides and sulfamates. Theoretical study of the associated requirements, *Journal of Molecular Structure (Theochem.)*, 580(1): 243-250, 2002.
- [3] Scozzafava, A., Owa, T., Mastrolorenzo, A., Supuran, C.T., Anticancer and antibacterial sulfonamides. *Current Medicinal Chemistry*, 10(11): 925-953, 2003.
- [4] Mondelli, M., Brune, V., Borthagaray, G., Ellena, J., Nascimento, O.R., Leite, C.Q., Batista, A.A., Torre, M.H., New Ni(II)-sulfonamide complexes: Synthesis, structural characterization and antibacterial properties. X-ray diffraction of [Ni(sulfisoxazole)₂(H₂O)₄].2H₂O and [Ni(sulfapyridine)₂]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102(2): 285-292, 2008.
- [5] Imming, P., Sinning, C., Meyer, A., Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. *Nature Review Drug Discovery*, 5(10): 821-834, 2006.
- [6] Winum, J.Y., Montero J.L., Scozzafava A., Supuran C.T., Zinc binding functions in the design of carbonic anhydrase inhibitors. Wiley: Hoboken, 39-72, 2009.
- [7] Anzelotti, A.I., Farrel, N.P., Zinc metalloproteins as medicinal targets. *Chemical Society Reviews*, 37(8): 1629-1651, 2008.
- [8] Aggarwal, M., Kondeti, B., McKenna, R., Anticonvulsant/antiepileptic carbonic anhydrase inhibitors: a patent review. *Expert Opinion Therapeutic Patents*, 23(6): 717-724, 2013.
- [9] Supuran, C.T., Carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 20(12): 3467-3474, 2010.
- [10] Simone, G., Fiore, A., Supuran, C.T., Are carbonic anhydrase inhibitors suitable for obtaining antiobesity drugs? *Current Pharmaceutical Design*, 14(7): 655-660, 2008.

- [11] Supuran, C.T., Briganti, F., Tilli, S., Chegwidde R.W., Scozzafava, A., Carbonic Anhydrase Inhibitors: Sulfonamides as antitumor agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 9(3): 703-714, 2001.
- [12] Thiry, A., Supuran, C.T., Masereel, B., Dogne, M.J., Recent developments of carbonic anhydrase inhibitors as potential anticancer drugs. *Journal of Medical Chemistry*, 51(11): 3051-3056, 2008.
- [13] Supuran, C.T., Inhibition of carbonic anhydrase IX as a novel anticancer mechanism. *World Journal of Clinical Oncology*, 3(7): 98-103, 2012.
- [14] Pastorekova, S, Zatovicova, M., Pastorek, J., Cancer-associated carbonic anhydrases and their inhibition. *Current Pharmaceutical Design*, 14(7): 685-698, 2008.
- [15] Supuran, C.T., Scozzafava, A., Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 15(13): 4336-4350, 2007.
- [16] Supuran, C.T., Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Review Drug Discovery*, 7(2): 168-181, 2008.
- [17] Ekinci, D., Fare genomunda bulunan karbonik anhidraz ve karboksilaz enzim genlerinin c DNA'larının üretilmesi, antisens m RNA Sentezi ve in situ hibridizasyonu ile gen ekspresyon analizi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2006.
- [18] Gümüş, M., Yeni karbonik anhidraz inhibitörleri sentezi ve in vitro inhibitör aktivitelerinin incelenmesi. Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2008.
- [19] Wilkinsin, L.B., Bornaghi, F.L., Houston, A.T., Innocenti, A., Vullo, D., Supuran, C.T., Poulsen, A.S., Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of isozymes I, II and IX with triazole-linked *O*-glycosides of benzene sulfonamides. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(7): 1651-1657, 2007.
- [20] Leppilampi, M., Functional and immunohistological studies on cancer associated carbonic anhydrase IX. Oulu University, Faculty of Medicine, Department of Clinical Chemistry, Department of Pathology, Ph.D Thesis, 2006.
- [21] Mohanty, A. K., Kannan, K.K., Mahajant, S.K., Human Carbonic Anhydrase I: Effect of Specific Site Mutations on Its Function. *Journal of Biosciences*, 23(3): 235-146, 1998.
- [22] Supuran, C.T., Scozzafava, A., Carbonic anhydrase inhibitors and their therapeutic potential. *Expert Opinion Therapeutic Patents*, 10(5): 575-600, 2000.

- [23] Lee, C.C., Synthetic Approaches to biologically active sulfonates and sulfonamides. University College London, Chemistry Department, Doctoral Thesis, 2010.
- [24] Duydu, Y., Özden, S., Yıldız, S., Alp, M., Üstündağ, A., Yeni bazı substitüe guanido ya da aminobenzimidazol türevlerinin sentezi, antimikrobiyal etkileri, sitotoksik ve genotoksik etkilerinin incelenmesi. Ankara Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu, 2009.
- [25] Palitti, F.C., Tanzarella R., Cozzi, R., Ricondy, E., Vitagliana, A., Fiori, M., Comparison of frequencies of SCEs induced by chemical mutagens in bone-marrow spleen and spermatogoneal cells of mice. *Mutation Research*, 103(2): 191-195, 1982.
- [26] Bonassi, S., Abbondandolo, A., Camurri, L., Dalpra, L., Deferrari, M., Degrassi, F., Forni, A., Lambertini, L., Lando, C., Padovani, P., Sbrana, I., Vechhio D., Puntoni R., Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? *Cancer Genetics*, 79(2): 133-135, 1995.
- [27] Hagmar, L., Bonassi, S., Stromberg, U., Brogger, A., Knudsen, L.E., Norppa, H., Reuterwall, C., Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health Cancer Research, 58 (18): 4117-4121, 1998.
- [28] Cardoso, R.S., Takahashi, H.S., Peitl, Jr.P., Ghilardi, N.T., Sakamoto, E.T., Evaluation of chromosomal aberrations, micronuclei, and sister chromatid exchanges in hospital workers chronically exposed to ionizing radiation. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis*, 21(6): 431-439, 2001.
- [29] Fidan, A.F., DNA hasar tespitinde tek hücre jel elektroforezi. *AKÜ-Fen Bilimleri Dergisi*, 8(1): 41-52, 2008.
- [30] Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E.G., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A., IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research*, 463(2): 111-172, 2000.
- [31] Noel, S., Kumr, R.S., Randomly amplified polymorphic DNA as a tool for genotoxicity: an assessment. *Toxicology and Industrial Health*, 22(6): 267-275, 2006.
- [32] Şekeroğlu, Z.A., Şekeroğlu, V., Genetik toksisite testleri. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 4(3): 221-229, 2011.
- [33] Au, W.W., Usefulness of biomarkers in population studies: From exposure to susceptibility and to prediction of cancer. *International Journal of Hygiene Environmental Health*, 210(3): 239-246, 2007.

- [34] Beceren, A., Kolorektal kanser tanılı olgularda ve birinci derece yakınlarında DNA hasarının ve onarım kapasitesinin araştırılması. Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2011.
- [35] Albertini, R.J., Mechanistic insights from biomarker studies: somatic mutations and rodent/human comparisons following exposure to a potential carcinogen. IARC Scientific Publications, 157: 153-177, 2004.
- [36] Bonassi, S., Hagmar, L., Stromberg, U., Montagud, A.H., Tinnerberg, H., Forni, A., Heikkila, P., Wanders, S., Wilhardt, P., Hansteen, I.L., Knudsen, L.E., Norppa, H., Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. Cancer Research, 60(6): 1619-1625, 2000.
- [37] Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I.L., Hagmar, L., Stromberg, U., Rossner, P., Bofnetta, P., Lindholm, C., Gudy, S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilevska, A., Fabia-Nova, E., Sram, R.J., Knudsen, L.E., Barale, R., Fucic, A., Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. Mutation Research, 600(1-2): 37-45, 2006.
- [38] Tripp, B.C., Smith, K., Ferry, J.G., Carbonic anhydrase: new insights for an ancient enzyme. Journal of Biological Chemistry, 276(52): 48615-48618, 2001.
- [39] Winum, J., Scozzafava, A., Montero, J., Supuran, C.T., Sulfamates and their therapeutic potential. Medicinal Research Reviews, 25(2): 186-228, 2005.
- [40] Smith, K.S., Ferry J.G., A plant type (beta class) carbonic anyhydrase in the thermophilic methanoarchaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Journal of Bacteriology, 181(20): 6247-6253, 1999.
- [41] Tripp, B.C., Bell, C.B., Cruz, F., Krebs, C., Ferry, J.G., A role for iron in an ancient carbonic anhydrase. Journal of Biological Chemistry, 279(8): 6683-6687, 2004.
- [42] Xu, Y., Feng, L., Jeffrey, P.D., Shi, Y., Morel, F.M., Structure and metal exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms. Nature, 452(7183): 56-62, 2008.
- [43] So, A.K., Espie, G.S., Williams, E.B., Shively, J.M., Heinhorst, S., Cannon, G.C., A novel evolutionary lineage of carbonic anhydrase (epsilon class) is a component of the carboxysome shell. Journal of Bacteriology, 186(3): 623-630, 2004.
- [44] Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., Supuran, C.T., Carbonic anhydrase inhibitors and activators and their use in therapy. Expert Opinion Therapeutic Patents, 16(12): 1627-1664, 2006.

- [45] Supuran, C.T., Scozzafava, A., Applications of carbonic anhydrase inhibitors and activators in therapy. *Expert Opinion Therapeutic Patents*, 12(2): 217-242, 2002.
- [46] Kallio, H., Regulation and Roles of Carbonic Anhydrases IX and XII. University of Tampere, Institute of Biomedical Technology, Academic Dissertation, 2011.
- [47] Aydın, M., İnsan karbonik anhidraz I geninin klonlanması, E.coli'de ekspresyonu ve Phe91Asn yönlendirilmiş mutageneziyle elde edilen mutant enzimin inhibitörlere karşı ilgisinin araştırılması. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2007.
- [48] Fisher, S.Z., Structural insights into the active site of alpha-carbonic anhydrases. University of Florida, Doctoral thesis, 2006.
- [49] Booterabi, F., Production and characterization of carbonic anhydrase. VII. University of Tampere, Institute of Biomedical Technology and School of Medicine, Academic Dissertation, 2011.
- [50] Kim, G., Lee, T.H., Wetzel, P., Geers, C., Robinson, M. A., Myers, T., Owens, J.W., Wehr, N.B., Eckhaus, M.W., Gros, G., Boris, A.W., Levine, R.L., Carbonic Anhydrase III is not required in the mouse for normal growth, development, and life span. *Molecular Cell Biology*, 24(22): 9942–9947, 2004.
- [51] Parkkila, S., Parkkila A.K., Juvonen, T., Rajaniemi, H., Distribution of the carbonic anhydrase isoenzymes I, II, and VI in the human alimentary tract. *Gut*, 35(5): 646-650, 1994.
- [52] Fujikawa-Adachi, K., Nishimori, I., Tagychi, T., Onishi, S., Human mitochondrial carbonic anhydrase VB. c DNA cloning, m RNA expression, subcellular localization and mapping to chromosome X. *Journal of Biological Chemistry*, 274(30): 212-228, 1999.
- [53] Shah, G.N., Hewett-Emmet, D., Grub, J.H., Migas, M.C., Fleming, R.E., Waheed, A., Sly, W.S. Mitochondrial carbonic anhydrase VB: Differences in tissue distribution and pattern of evolution from those of CA VA suggest distinct physiological roles. *Proceedings of National. Academy of Sciences*, 97(4): 1677-1682, 2000.
- [54] Venta, P.J., Montgomery, J.C., Tashian, R.E., Molecular genetics of carbonic anhydrase isozymes. *Isozymes*, 14: 59-72, 1987.
- [55] Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A., Carbonic anhydrase inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 23(2): 146–189, 2003.

- [56] Montgomery, J.C., Venta, P.J., Eddy, R.L., Fukushima, Y.S., Shows, T.B., Tashian, R.E., Characterization of human gene for newly discovered carbonic anhydrase, CA VII, and its localization to chromosome 16. *Genomics*, 11(4): 835-848, 1991.
- [57] Ivanov, S., Liao, S.Y., Ivanova, A., Danilkovitch-Miagkova, A., Tarasova, N., Weirich, G., Merrill, M.J., Proescholdt, M.A., Oldfield, E.H., Lee, J., Zavada, J., Waheed, A., Sly, W., Lerman, M.I., Stanbridge, E.J., Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *The American Journal of Pathology*, 158(3): 905-919, 2001.
- [58] Saarnio, J., Parkkila, S., Parkkila, A.K., Haukipuro, K., Pastorekova, S., Pastorek, J., Kairaluoma, M.I., Karttunen, T.J., Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation. *The American Journal of Pathology*, 153(1): 279-285, 1998.
- [59] Hussain, S.A., Ganesan, R., Reynolds, G., Gross, L., Stevens, A., Pastorek, J., Murray, P.G., Perunovic, B., Anwar, M.S., Billing, H.L., James N.D., Spooner, D., Poolw, C.J., Rea, D.W., Palmer, D.H., Hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX expression is associated with poor survival in patients with invasive breast cancer. *British Journal of Cancer*, 96(1): 104-109, 2007.
- [60] Beasley, N.J., Wykoff, C.C., Watson, P.H., Leek, R., Turley, H., Gatter, K., Pastorek, J., Cox, G.J., Ratchliffe, P., Harris, A.L., Carbonic anhydrase IX, an endogenous hypoxia marker, expression in head and neck squamous cell carcinoma and its relationship to hypoxia, necrosis, and microvessel density. *Cancer Research*, 61(13): 5262-5267, 2001.
- [61] Chia, S.K., Wykoff, C.C., Watson, P.H., Han, C., Leek, R.D., Pastorek, J., Gatter, K.C., Ratchliffe, P., Harris, A.L., Prognostic significance of a novel hypoxia-regulated marker, carbonic anhydrase IX, in invasive breast carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 19(6): 3660-3668, 2001.
- [62] Haapasalo, J.A., Nordfors, K.M., Hilvo, M., Rantala, I.J., Soini, Y., Parkkila, A.K., Pastorekova, S., Pastorek, J., Parkkila, S.M., Haapasalo, H.K., Expression of carbonic anhydrase IX in astrocytic tumors predicts poor prognosis. *Clinical Cancer Research*, 12(2): 473-477, 2006.
- [63] Jarvela, S., Parkkila, S., Bragge, H., Kahkonen, M., Parkkila, A.K., Soini, Y., Pastorekova, S., Pastorek, J., Haapasalo, H., Carbonic anhydrase IX in oligodendroglial brain tumors. *BMC Cancer*, 8(1): 1, 2008.
- [64] Ivanov, S.V., Kuzmin, I., Wei, M.H., Pack, S., Geil, L., Johnson, B.E., Stanbridge, E.J., Lerman, M.I., Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes. *Proceedings of the National Academy of Science*, 95(21): 12596-12601, 1998.

- [65] Türeci, O., Şahin, U., Vollmar, E., Siemer, S., Göttert, E., Seitz, G., Parkkila, A.K., Shah, G.N., Grub, J.H., Pfreundschuh, M., Sly, W.S., Human Carbonic anhydrase XII: c DNA cloning, expression and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cancers. *Proceedings of the National Academy of Science*, 95(13): 7608-7613, 1998.
- [66] Kivela, A.J., Saarnio, J., Karttunen, T.J., Kivela, J., Parkkila, A.K., Pastoreka, S., Pastorek, J., Waheed, A., Sly, W.S., Parkkila, T.S., Rajaniemi, H., Differential expression of cytoplasmic carbonic anhydrases, CA I and CA II and membrane-associated isozymes CA IX and XII, in normal mucosa of large intestine and in colorectal tumors. *Digestive Diseases and Sciences*, 46(10): 2179-2186, 2001.
- [67] Lehtonen, J., Shen, B., Vihinen, M., Casini, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Parkkila, A.K., Saarnio, J., Kivela, A.J., Waheed, A., Sly, W.S., Parkkila, S.J., Characterization of CA XIII, a novel member of the carbonic anhydrase isozyme family. *Journal of Biological Chemistry*, 279(4): 2719-2727, 2004.
- [68] Fujikawa-Adachi, K., Nishimori, I., Taguchi, T., Onishi, S., Human carbonic anhydrase XIV (CA14): cDNA cloning, mRNA expression, and mapping to chromosome 1. *Genomics*, 61(1): 74-81, 1999.
- [69] Shah, G.N., Ulmasov, B., Waheed, A., Becker, T., Makani, S., Svichar, N., Chesler, M., Sly, W.S., Carbonic anhydrase IV and XIV: roles of the respective carbonic anhydrases in buffering the extracellular space in brain. *Proceedings of the National Academy of Science*, 102(46): 16771-16776, 2005.
- [70] Parkkila, S., Parkkila, A.K., Rajaniemi, H., Shah, G.N., Grubb, J.H., Waheed, A., Sly W.S., Expression of membrane-associated carbonic anhydrase XIV on neurons and axons in mouse and human brain. *Proceeding of National Academy of Science*, 98(4): 1918-1923, 2001.
- [71] Ruusuvoori, E, Kaila, K., Carbonic anhydrases and brain pH in the control of neuronal excitability. In: *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications*. Springer Netherlands, 271-290, 2014.
- [72] Okuyan, D., İnsan karbonik anhidraz promotorunun klonlanması ve genin ekspresyon profilinin analizi. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2011.
- [73] Supuran, C.T., Scozzafava, A., Conway, J.,(Eds.) *Carbonic Anhydrase: Its inhibitors and activators*. Vol. 1, CRC Press, 2004.
- [74] Aydoğan, S., Yönlendirilmiş mutagenез ile mutant Hca II geninin eldesi ve mutant genlerin inhibitörlere karşı ilgisinin araştırılması. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2006.

- [75] Fiore, A., De Simone, G., Menchise, V., Pedone, C., Antel, J., Wurl, M., Casini, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Carbonic anhydrase inhibitors: X-ray crystal structure of a benzene sulfonamide strong CA II and CA IX inhibitor bearing a pentauro phenyl aminothioureido tail in complex with isozyme II. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 15(7): 1937-1942, 2005.
- [76] Şahin A., Bazı karbonik anhidraz izoenzimlerinin saflaştırılması için yeni bir afinite jelinin hazırlanması. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2008.
- [77] Geldeard, L.J., *Fundamental Studies on 2,4,6-trichlorophenyl sulfonate esters*. University College London, Faculty of Mathematical and Physical Sciences, Doctoral thesis, 2009.
- [78] Babu, M.S.C., *Synthesis, characterization and anticancer activity of novel sulfonamides*. SRM University, Faculty of Science and Humanities, PhD thesis, 2012.
- [79] Özalp, E.A.D., *Farmakoloji, Nobel Tıp Kitabevleri*, 2002.
- [80] Aktuğlu, Y., Geçmişten günümüze antibiyotikler. Akılcı antibiyotik kullanımı ve erişkinde toplumdan edinilmiş enfeksiyonlar sempozyum dizisi, 31: 9-22, 2002.
- [81] Aslan, G.H., Çeşitli sülfonamid türevleri ve bunların bazı geçiş metal komplekslerinin sentezi, antimikrobiyal etkilerinin incelenmesi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2008.
- [82] Hansch, C., Sammes, P.G., Taylor, J. B., *Comprehensive Medicinal Chemistry: the rational design, mechanistic study and therapeutic applications of chemical compounds*. Pergamon Press, Vol 5: 1- 255, 1990.
- [83] Elliot, O.E., *Vinyl sulfonates: a platform for novel substrates of biological importance*. University College of London, Doctoral thesis, 2010.
- [84] Pres, N., Chavez, V.M., Ticona, E., Calderon, M., Apolinario, I.S., Culotta, A., Arevalo, J., Gilman, R.H., Screening for sexually transmitted diseases in human immunodeficiency virus-positive patients in Peru reveals an absence of *Chlamydia trachomatis* and identifies *Trichomonas vaginalis* in pharyngeal specimens. *Clinical Infectious Diseases*, 32(5): 808-814, 2001.
- [85] Venugopala, B., *Synthesis of several fused heterocycles using 1-(4 aminophenyl)-N-substituted methane/ethane sulfonamides*. Jawaharlal Nehru Technological University, Doctoral thesis, 2011.

- [86] Tella, A.C., Obaleye, J.A. Synthesis of some novel N-acetyl derivative of sulpha drugs and their biological activities. *International Journal of Chemical and Analytical Science*, 1(9): 202-204, 2010.
- [87] Supuran, C.T., Scozzafava, A., Ilies, M.A., Iorga, B., Cristea, T., Briganti, F., Chiraleu, F., Banciu, M.D., Carbonic anhydrase inhibitors. Part 53. Synthesis of substituted-pyridinium derivatives of aromatic sulfonamides: The first non-polymeric membrane-impermeable inhibitors with selectivity for isozyme IV. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 33(7-8): 577–594, 1998.
- [88] Boyd, A.E., Perspectives In Diabetes: Sulfonylurea receptors, ion channels and fruit flies. *Diabetes*, 37(7): 847-850, 1998.
- [89] Loubatieres-Mariani M.M., The discovery of hypoglycemic sulfonamides. *Journal de la Societe de Biologie*, 201(2): 121-125, 2007.
- [90] Hartman, J.C., Brouwer, K., Mandagere, A., Melvin, L., Gorczynski, R., Evaluation of the endothelin receptor antagonists ambrisentan, darusentan, bosentan, and sitaxsentan as substrates and inhibitors of hepatobiliary transporters in sandwich-cultured human hepatocytes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 88(6): 682-691, 2010.
- [91] Supuran, C.T., Conroy, C.W., Meren, T.H., Carbonic anhydrase inhibitors. Synthesis and inhibitory properties of 1,3,4-thiadiazole-2,5-bissulfonamide. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 31(11): 843–846, 1996.
- [92] Supuran, C.T., Casini, A., Mastrolorenzo, A., Scozzafava, A., COX-2 selective inhibitors, carbonic anhydrase inhibition and anticancer properties of sulfonamides belonging to this class of pharmacological agents. *Mini Review Medicinal Chemistry*, 4(6): 625-632, 2004.
- [93] Owa, T., Nagasu, T., Novel sulphonamide derivatives for the treatment of cancer. *Expert Opinion On Therapeutic Patients*, 10(11): 1725-1740, 2000.
- [94] Sondhi, S.M., Johar, M., Singhal, N., Dastidar, S.G., Shukla, R., Raghbir, R., Synthesis and anticancer, antiinflammatory and analgesic activity evaluation of some sulfa drug and acridine derivatives. *Monatshefte für Chemie*, 131(5): 511–520, 2000.
- [95] Humphrey, P.P.A., Feniuk, W., Perren, M. J., Connor, H.E., GR43175, a selective agonist for the 5-HT₁-like receptor in dog isolated saphenous vein. *British Journal of Pharmacology*, 94(4): 1123–1132, 1988.
- [96] Moreland, R.B., Goldstein, I., Traish, A., Sildenafil, a novel inhibitor of phosphodiesterase type 5 in human corpus cavernosum smooth muscle cells. *Life Science*, 62(20): 309-318, 1998.

- [97] Doerge, D.R., Decker, D.J., Inhibition of peroxidase-catalyzed reactions by arylamines: Mechanism for the anti-thyroid action of sulfamethazine. *Chemical Research in Toxicology*, 7(2): 164–169, 1994.
- [98] Supuran, C.T., Cassini, A., Scozzafava, A., Protease inhibitors of the sulfonamide type: Anticancer, antiinflammatory and antiviral agents. *Medicinal Research Reviews*, 23(5): 535-558, 2003.
- [99] Rashida, M. Aromatic/Heterocyclic sulfonamides containing chromone moieties and their transition metal complexes: synthesis, structural elucidation and evaluation of biological activities. University of Punjab, Chemistry Department, Doctoral thesis, 2011.
- [100] <http://en.wikipedia.org/wiki/Sulfonamide> Erişim tarihi: 20.06.15.
- [101] Hanson, P.R., Probst, D.A., Robinson, R.E., Yau, M. Cyclic sulfonamides via the ring-closing metathesis reaction. *Tetrahedron Letters*, 40(26): 4761-4764, 1999.
- [102] March, W.F., Ochsner, K.I., The long-term safety and efficacy of brinzolamide 1.0 % (azopt) in patients with primary open-angle glaucoma or ocular hypertension. *American Journal of Ophthalmology*, 129(2): 136–143, 2000.
- [103] Koeppe, M.J., Patsalos, P.N., Sander, J.W., Sulthiame in adults with refractory epilepsy and learning disability: an open trial. *Epilepsy Research*, 50(3): 277-282, 2002.
- [104] Leaf, D.E., Goldfarb, D.S., Mechanisms of action of acetazolamide in the prophylaxis and treatment of acute mountain sickness. *Journal of Applied Physiology*, 102(4): 1313–1322, 2007.
- [105] Çelebisoy, N., Gökçay, F., Şirin, H., Akyürekli, O., Treatment of idiopathic intracranial hypertension: topiramate vs acetazolamide, an open-label study. *Acta Neurologica Scandinavica*, 116(5): 322–327, 2007.
- [106] Davis, S.N., The role of glimepiride in the effective management of Type 2 diabetes. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 18(6): 367–376, 2004.
- [107] Boolell, M., Allen, M.J., Ballard, S.A., Gepi-Attee, S., Muirhead, G.J., Naylor, A.M., Osterloh, I.H., Gingell, C., Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *International Journal of Impotence Research*, 8(2): 47–52, 1996.
- [108] Shi, S., Koltz, U., Clinical use and pharmacological properties of selective COX-2 inhibitors. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 64(3): 233-252, 2008.

- [109] Doyon, L., Tremblay, S., Bourgon, L., Wardrop, E., Cordingley, M., Selection and characterization of HIV-1 showing reduced susceptibility to the non-peptidic protease inhibitor tipranavir. *Antiviral Research*, 68 (1): 27–35, 2005.
- [110] Miyake, K., Effect of long-term H₂-blocker treatment on carbonic anhydrase in rat gastroduodenal mucosa. *Nihon Ika Daigaku Zasshi*, 59(2): 129-35, 1992.
- [111] Dhillon, S., Argatroban: A review of its use in the management of heparin induced thrombocytopenia. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 9(4): 261-82, 2009.
- [112] Hartzman, G.D., Egbertson, M.S., Halezenko, W., Laswell, W.L., Duggan, M.E., Smith, R.L., Naylor, A.M., Manno, P.D., Lynch, R. J., Zhang, G., Chang, C.T., Gouls, R.J., Non-peptide fibrinogen receptor antagonists. 1. Discovery and design of exosite inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 35(24): 4640–4642, 1992.
- [113] Barst, R.J., Langleben, D., Frost, A., Sitaxsentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, 169(4): 441–447, 2004.
- [114] Ferrari, M.D., Goadsby, P.J., Roon, K.I., Lipton, R.B., Triptans (serotonin, 5-HT_{1B/1D} agonists) in migraine: detailed results and methods of a meta-analysis of 53 trials. *Cephalalgia*, 22(8): 633-658, 2002.
- [115] Havanka, H, Dahlöf, C., Pop, P.H., Diener, H.C., Winter, P., Whitehouse, H., Hassani, H Efficacy of naratriptan tablets in the acute treatment of migraine: A dose-ranging study. *Clinical Therapeutic*, 22(8): 970-980, 2000.
- [116] Saxena, P.R., DeVries, P., Wang, W., Heiligers, W., Maassen VanDenBrink A., Bax W.A., Yocca F.D., Effects of avitriptan, a new 5-HT_{1B/1D} receptor agonist, in experimental models predictive of antimigraine activity and coronary side-effect potential. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 355(2): 295–302, 1997.
- [117] Chia-Cheng, L.E., Chang, C.H., Yang, Y.H.K., Lin, S.J., Lin C.Y., Effectiveness of sulpiride in adult patients with schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 39(3): 673–683, 2013.
- [118] Uchida, H., Takeuchi, H., Suzuki, T., Nomura, K., Watanebe, K., Kashima, H., Combined treatment with sulpiride and paroxetine for accelerated response in patients with major depressive disorder. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 25(6): 545–551, 2005.
- [119] Cruickshank, J.M., Beta blockers in hypertension. *The Lancet*, 376(9739): 415-416, 2010.

- [120] Schwartz, G.F., Patel, V.D., Burk, C., Bennett, T. Patient persistency with topical glaucoma therapy is higher with fixed dose brimonidine/timolol than with two-bottle combinations. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(13): 185, 2010.
- [121] Mohan, K.R.S., Rameshraj, R., Reddy, J.R.S., Novel synthesis of mafenide and other amino sulfonamides by electrochemical reduction of cyano sulfonamides. *Helvetica Chimica Acta*, 89(6): 1254–1257, 2006.
- [122] Loubatieres, A., Mariani, M.M., Ribes, G., Demalbose, H., Chapal, J., Experimental study of a new especially active hypoglycemic sulfonamide, HB-419 or glibenclamide. *Diabetologia*, 5(1): 1-10, 1969.
- [123] Campbell, R.K., Glimepiride: Role of a new sulfonylurea in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *The Annals of Pharmacotherapy*, 32(10): 1044-1052, 1998.
- [124] Puschett, J., Pharmacological classification and renal actions of diuretics. *Cardiology*, 84:4–13, 1994.
- [125] Fanelli, G.M., Uricosuric agents. *Arthritis & Rheumatism*, 18(1): 853-858, 1975.
- [126] Klotz, U., Karlernst, M.K., Fischer, C., Heinkel, K., Therapeutic efficacy of sulfasalazine and its metabolites in patients with ulcerative colitis and crohn's disease. *New England Journal of Medicine*, 303(26): 1499-1500, 1980.
- [127] Brooks, C.D., Sulfasalazine for the management of juvenile rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 28(4): 845-853, 2001.
- [128] Lipton, B.R., Stewart, F.W., Cady, R., Hall, C., O'qinn, S., Kuhn, T., Gutterman, D., Sumatriptan for the range of headaches in migraine sufferers: results of the spectrum study. *The Journal of Head and Face Pain*, 40(10): 783–791, 2000.
- [129] Taha, S.A., Hudson, N., Hawkey, J.C., Swannell, J.A., Trye, N.P., Cottrell, J., Mann, G.S., Simon, T.J., Sturrock, D.R., Russell, I.R. Famotidine for the prevention of gastric and duodenal ulcers caused by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *New England Journal of Medicine*, 334(22): 1435-1439, 1996.
- [130] Simon, A., Berman, E. Long-Term Sotalol Therapy in patients with arrhythmias. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 19(8-9): 547–556, 1979.

- [131] Amgad, G., Habeeb, P.N., Praveen, R., Edward, E. K., Design and synthesis of celecoxib and rofecoxib analogues as selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: Replacement of sulfonamide and methylsulfonyl pharmacophores by an azido bioisostere. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(18): 3039-3042, 2001.
- [132] Simone, G., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Which carbonic anhydrases are targeted by the antiepileptic sulfonamides and sulfamates? *Chemical Biology And Drug Design*, 74(3): 317-321, 2009.
- [133] Barrios, A.I., Blanch, B.E.L., Estiu, L.G., Pharmacophoric pattern of anti-epileptic sulfonamides and sulfamates. Theoretical study of the associated requirements. *Journal of Molecular Structure: Theochem.*, 580(1): 243–250, 2002.
- [134] Kim, K.D., Lee, Y.J., Park, H., Thai, M.K., Synthesis and phosphodiesterase 5 inhibitory activity of new sildenafil analogues containing a phosphonate group in the 5'-sulfonamide moiety of phenyl ring. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14(9): 2099–2103, 2004.
- [135] Mastrolorenzo, A., Rusconi, S., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Inhibitors of HIV-1 protease: 10 years after. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 16(8): 1067-1091, 2006.
- [136] Hartman, J.C., Kenneth, B.K., Arun, M.A., Melvin, L., Gorezynski, R., Evaluation of the endothelin receptor antagonists ambrisentan, darusentan, bosentan and sitaxsentan as substrates and inhibitors of hepatobiliary transporters in sandwich-cultured human hepatocytes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 88(6): 682-691, 2010.
- [137] Işık, S., Maya Karbonik anhidrazının ekspresyonu, saflaştırılması, elektroforetik ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2008.
- [138] Açıkgöz, S., Yeni tanı konmuş primer açık açılı glokom hastalarında kullanılan antiglokomatöz ilaçların oküler yüzey üzerine olan etkileri. Fatih Sultan Mehmet Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Göz Hastalıkları Kliniği, Uzmanlık Tezi, 2009.
- [139] <https://faculty.washington.edu/chudler/glaucoma.html>, Erişim tarihi:12.02.2015.
- [140] Masini, E., Carta, F., Supuran, C.T., Scozzafava, A., Novel therapies for glaucoma: a patent review 2007-2011. *Expert Opinion Therapeutic Patents*, 22(1): 79-88, 2012.
- [141] Doğanay, S., Fırat, P.G., Karbonik anhidraz inhibitörleri. *Glaucoma-Cataract*, 2(3): 213-218, 2007.

- [142] Sugrue, F.M., Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors. *Progress in Retinal and Eye Research*, 19(1): 87-112, 2000.
- [143] Lavik, E., Kuehn, M.H., Kwon, Y.H., Novel drug delivery systems for glaucoma. *Eye (Lond.)*, 25(5): 578-586, 2011.
- [144] Arslan, O., Çakır, Ü., Uğraş, H.İ., Synthesis of new sulfonamide inhibitors of carbonic anhydrase. *Biochemistry*, 67(9): 1055-1057, 2002.
- [145] Supuran, C.T., Diuretics: From classical carbonic anhydrase inhibitors to novel applications of the sulfonamides. *Current Pharmaceutical Design*, 14(7): 641-648, 2008.
- [146] Erdemli, İ., Diüretik ilaçlar. *MİEP Dergisi*, 2: (177-180), 1991.
- [147] Petrovic, S., DuBose T.D., Missense mutations and proximal RTA. Have we reached a new threshold? Focus on "missense mutation T485S alters NBCe1-A electrogenicity causing proximal renal tubular acidosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 305(4): 373-374, 2013.
- [148] Teicher, B.A., Liu, S.D., Liu, J.T., Holden, S.A., Herman, T.S., A carbonic anhydrase inhibitor as a potential modulator of cancer therapies. *Anticancer Research*, 13(5A): 1549-1556, 1993.
- [149] Chegwiddden, W.R., Spencer, I.M., Sulphonamide inhibitors of carbonic anhydrase inhibit the growth of human lymphoma cells in culture. *Inflammopharmacology*, 3(3): 231-239, 1995.
- [150] Thiry, A., Dogne, J.M., Masereel, B., Supuran, C.T., Targetting tumor associated carbonic anhydrase IX in cancer therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(11): 566-573, 2006.
- [151] Butgereit, B.L., Gregel, C., Knolle, A., Hasilik, A., Arnold, R., Göke, R., Pcd4 inhibits growth of tumor cells by supression of carbonic anhydrase type II. *Molecular and cellular endocrinology*, 214(1): 149-153, 2004.
- [152] Melhus, G., Molecular studies on bone with focus on fracture healing in experimental osteoporosis. PhD thesis, Oslo University Hospital Rikshospitalet, Institute of Pathology, 2010.
- [153] <https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5991-1876EN.pdf>, Erişim tarihi: 05.06.2015.
- [154] Kılıç, A., Bitkisel kaynaklı bazı uçucu yağ ve monoterpenerin olası genotoksik etkilerinin araştırılması. *Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 2005.

- [155] Yırtıcı, Ü., Tartrazinin cyprinus carpio'daki genotoksik etkisinin mikronukleus yöntemi ile araştırılması. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2007.
- [156] Tarhan, G.H., Antidepresan olarak kullanılan paxil ve prozac ilaçlarının insan lenfosit kültürlerindeki genotoksik etkileri. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2006.
- [157] <http://www.universite-toplum.org/summary.php3?id=247.>, Erişim tarihi: 05.06.2015.
- [158] İskit, A.B., Bir ilaç yaratmak. Klinik (ilaç) araştırma dönemleri. İKU Dergisi, 13: 10-13, 2006.
- [159] http://www.e-kutuphane.teb.org.tr/pdf/raporlar/ilac_risk/11.pdf. Erişim tarihi: 20.07.2016.
- [160] Topaloğlu, H., International conference on harmonisation (ICH) nedir? Ne değildir? İKU Dergisi, 6: 7-11, 2014.
- [161] Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Health Effects, 4: 471–486, 2008.
- [162] Doğan, T.S., Durusoy, M., Gökçe, M., Öztürk, K., Genotoxicity of potent antiviral 1-[(2-aminophenyl)thio]-1-phenyl-2-nitrobutane derivatives designed as drug agents. Turkish Journal of Biochemistry, 39(3): 328–335, 2014.
- [163] Bajpayee, M., Pandey, A. K., Parmar, D., Dhawan, A., Current status of short-term tests for evaluation of genotoxicity, mutagenicity and carcinogenicity of environmental chemicals and NCEs. Toxicology Mechanisms and Methods, 15(3): 155-180, 2005.
- [164] Bostancı Ş.Ö. Determination of mutagenic potentials of some benzothiazole derivatives by AMES test system. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2014.
- [165] Brambilla, G., Mattioli, F., Rbiano, L., Martelli, A., Update carcinogenicity studies in animals and humans of 535 marketed pharmaceuticals. Mutation Research, 750(1): 1-51, 2012.
- [166] Demircigil, C.G., Emerce, E., Ulutaş, O.K., Genotoxicity tests from biomarker studies to the regulations: National perspective. FABAD Journal of Pharmacology Science, 34(4): 217-232, 2009.
- [167] https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/315799/in_vitro_assessment_of_the_genotoxicity_of_chemicals.pdf, Erişim tarihi, 20.05.2016.

- [168] Yüzbaşıoğlu D., Yılmaz, E.A., Ünal, F., Antidepresan ilaçlar ve genotoksisite. TÜBAV Bilim, 9(1): 17-28, 2016.
- [169] Hagmar, L., Brogger, A., Hansteen, I.L., Heim, S., Höstedt, B., Knudsen, L., Lambert, B., Linnainmaa, K., Mitelman, F., Nordenson, I., Reutarwall, C., Salomaa, S., Skerfving, S., Sorsa, M., Cancer risk in human predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic Study Group on the Health Risk of Chromosome Damage. *Cancer Research*, 54(11): 2919-2922, 1994.
- [170] Topaktaş, M., Rencüzoğulları, E., Sitogenetik. Nobel Yayınevi, Ankara, 2010.
- [171] Brusick D., Screening Chemicals for Genotoxic Properties. In: Principles of Genetic Toxicology, Springer US, 79-120, 1987.
- [172] Yüzbaşıoğlu, D., Zengin, N., Ünal, F., Gıda koruyucuları ve genotoksisite testleri. *GIDA*, 39(3): 179-186, 2014.
- [173] Natarjan, A.T., Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutation Research*, 504(1): 3-16, 2002.
- [174] Ji, B.T., Silverman, D.T., Stewart, P.A., Blair, A., Swanson, G.M., Baris, D., Greenberg, R.S., Hayes, R.B., Brown, L.M., Lillemoe, K.D., Schoenberg, J.B., Pottern, L.M., Schwartz, A.G., Hoover, R.N., Occupational exposure to pesticides and pancreatic cancer. *American Journal of Industrial Medicine*, 39(1): 92-99, 2001.
- [175] Santovito, A., Cervella, P., Delpero, M., Increased frequency of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes of radiology technicians chronically exposed to low levels of ionizing radiations. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37(1): 396-403, 2014.
- [176] Ginzkey, C., Steussloff, G., Koehler, C., Burghartz, M., Scherzed, A., Hackenberg, S., Hagen, R., Kleinsasser, N.H., Nicotine derived genotoxic effects in human primary parotid gland cells as assessed in vitro by comet assay, cytokinesis-block micronucleus test and chromosome aberrations test. *Toxicology in vitro*, 28(5): 838-846, 2014.
- [177] Zemanova, Z., Michalova, K., Buryova, H., Brezinova, J., Kostylkova, K., Bystricka, D., Novakova, M., Sarova, I., Izakova, S., Lizcova, L., Ransdorfova, S., Krejcik, Z., Merkerova, M.D., Dohnalova, A., Siskova, M., Jonasova, A., Neuwirtova, R., Cermak, J., Involvement of deleted chromosome 5 in complex chromosomal aberrations in newly diagnosed myelodysplastic syndromes (MDS) is correlated with extremely adverse prognosis. *Leukemia Research*, 238(5): 537-544, 2014.
- [178] Fenech, M., Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *toxicology*, 181: 411-416, 2002.

- [179] Demirel, S., Zamani, A.G., Mikronukleus tekniği ve kullanım alanları. Genel Tıp Dergisi, 12(3): 123-127, 2002.
- [180] Şekeroğlu, V., Şekeroğlu, Z.A., Genetik hasarın belirlenmesinde mikronukleus testi. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 68(4): 241-252, 2011.
- [181] Kirsch-Volders, M., Towards a validation of the micronucleus test. Mutation Research, 392(1): 1-4, 1997.
- [182] Cheng, M.T.J., Christiani, D.C., Xu, X., Wain, J.C., Wiencke, J.K., Kelsey, K.T., Increased micronucleus frequency in lymphocytes from smokers with lung cancer. Mutation Research, 349(1): 43-50, 1996.
- [183] Uffaud, F., Orsiere, T., Villani, P., Pelissier, A.L., Volot, F., Favre, R., Botta, A., Comparison between micronucleated lymphocytes rates observed in healthy subject and cancer patients. Mutagenesis, 12(4): 227-231, 1997.
- [184] Fenech, M., Holland, N., Chang, W.P., Zeiger, E., Bonassi, S., The human micronucleus project-an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. Mutation Research, 428(1): 271-283, 1999.
- [185] Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Bqn, S., Barale, R., Bigatti, M. P., Bolognesi, C., Cebulka-Wasilevska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M.R., Zijno, A., Norppa, H., Fenech, M., An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. Carcinogenesis, 28(3): 625-631, 2007.
- [186] Parry, J.M., Kirsch-Volders, M., Special issue on in vitro MN trial. Mutation Research, 702(2): 132-134, 2010.
- [187] Preston, R.J., Skare, J.A., Aardema, M.J., A review of biomonitoring studies measuring genotoxicity in humans exposed to hair dyes. Mutagenesis, 25(1): 17-23, 2010.
- [188] Nersesyán, A., Kundi, M., Fenech, M., Bolognesi, C., Misik, M., Wultsch G., Hartmann, M., Knasmueller, S., Micronucleus assay with urine derived cells (UDC): A review of its application in human studies investigating genotoxin exposure and bladder cancer risk. Mutation Research/Review in Mutation Research, 762: 37-51, 2014.
- [189] Dikilitaş, M., Koçyiğit, A., Canlılarda tek hücre jel elektroforez yöntemi ile DNA hasar analizi (teknik not): Comet analiz yöntemi. Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 14(2): 77- 89, 2010.

- [190] Mcart, D.G., Mckerr, G., Saetzler, K., Howard, C.V., Downes, C.N., Wasson, G.R., Comet sensitivity in assessing DNA damage and repair in different cell cycle stages. *Mutagenesis*, 25(3): 299-303, 2010.
- [191] Sukumaran, S., Grant, A., Differential responses ok sexual and asexual *Artemia* to genotoxicity by a reference mutagen: Is the comet assay a reliable predictor of population level responses? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91: 110-116, 2013.
- [192] Rojas, E., Lopez, M.C., Valverde, M., Single cell gel electrophoresis assay: Methodology and applications. *Journal of Chromatography B*, 722(1): 225-254, 1999.
- [193] Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Expert Cell Research*, 175(1): 184-191, 1988.
- [194] Kassie, F., Parzefall, W., Knasmüller, S., Single cell gel electrophoresis assay: A new technique for human biomonitoring studies. *Mutation Research*, 463(1): 13-31, 2000.
- [195] Demirci, T., Arslan, M., Bilen, Ç, Demir, D., Gençer, N., Arslan, O., Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of 1,3-dicarbonyl derivatives of methylaminobenzene-sulfonamide. *Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chemistry*, 29(1), 132-136, 2014.
- [196] Berber, A.A., Statin grubu kolesterol ilaçlarından Rosuvastatin'in Genotoksitesisi. Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, 2013.
- [197] Mulder, G.J., Dencker, L., *Farmasotik Toksikoloji*. Nobel Tıp Kitapevleri, 2013.
- [198] Joosten, H.F.P., Van Acker, F.A.A., Dobbela, D.J.V., Horbach, G.J.M.J., Krajnc, E.I., Genotoxicity of hormonal steroids. *Toxicology Letters*, 151(1): 113-134, 2004.
- [199] Dorn, S.B., Degen, G.H., Müller, T., Bonacker, D., Joosten, H.F., Louw, J.V., Van Acker, F.A.A., Bolt, H.M., Proposed criteria for specific and non-specific chromosomal genotoxicity based on hydrophobic interactions. *Mutation Research*, 628(2): 67-75, 2007.
- [200] FDA (U.S. Food and Drug Administration) (2005). Full prescribing information, www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2005/12945s037,0381bl.pdf. Erişim tarihi: 10.07.2015.

- [201] FDA (U.S. Food and Drug Administration). (2014). Full prescribing information. www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/020408s0501bl.pdf. Erişim tarihi: 10.07.2015.
- [202] FDA (U.S. Food and Drug Administration). (2012). Full prescribing information. www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/020789s0121bl.pdf. Erişim tarihi: 10.07.2015.
- [203] FDA (U.S. Food and Drug Administration). (2011). Full prescribing information. www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/020816s0121bl.pdf. Erişim tarihi: 10.07.2015.
- [204] FDA (U.S. Food and Drug Administration). (2014). Full prescribing information. www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/020505s054,020844s0451bl.pdf. Erişim tarihi: 10.07.2015.
- [205] Abou-Eisha, A., Marcos, R., Creus, A., Genotoxicity studies on the antimicrobial drug sulfamethoxazole in cultured human lymphocytes. *Mutation Research*, 564(1): 51-56, 2004.
- [206] Silva, C.R.E., Borges, F.F.V., Bernardes, A., Perez, C.N., Silva, D.M., Chen-Chen, L. Genotoxic, cytotoxic, antigenotoxic, and anticytotoxic effects of sulfonamide chalcone using the AMES test and the mouse bone marrow micronucleus test. *PLoS ONE*, 10(9): e0137063, 2015.
- [207] Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F., Aksoy, H., Clastogenicity of fungicide afugan in cultured human lymphocytes. *Mutation Research*, 604(1): 53-59, 2006.
- [208] Badr, A., Cytogenetic activities of 3 sulphonamides. *Mutation Research Letters*, 104(1-3): 95-100, 1982.
- [209] Kim, Y.H., Shin, K.J., Lee, T.G., Kim, E., Lee, M.S., Ryu, S.H., Suh, P.G., G2 arrest and apoptosis by 2-amino-N-quinoline-8-ylbenzenesulfonamide (QBS), a novel cytotoxic compound. *Biochemical Pharmacology*, 69(9): 1333-1341, 2005.
- [210] Villar, R., Encio, I., Migliaccio, M., Gila, M.J., Martinez-Merinoa, V., Synthesis and cytotoxic activity of lipophilic sulphonamide derivatives of the benzo[b]thiophene 1,1-dioxide. *Bioorganic&Medicinal Chemistry*, 12(5): 963-968, 2004.
- [211] Yoshimatsu, K., Yamaguchi, A., Yoshino, H., Koyanagi, N., Kitoh, K., Mechanism of action of E7010, an orally active sulfonamide antitumor agent: Inhibition of mitosis by binding to the colchicine site of tubulin. *Cancer Research*, 57(15): 3208-3213, 1997.

- [212] Mohan, R., Banerjee, M., Ray, A. Manna, T., Wilson, L., Owa, T., Bhattacharyya, B., Panda, D., Antimitotic sulfonamides inhibit microtubule assembly dynamics and cancer cell proliferation. *Biochemistry*, 45(17), 5440–5449, 2006.
- [213] Lou, Y, Qiu, K. M, Lu, X, Liu, K, Fu J, Zhu, H. L,. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of cinnamic acyl sulfonamide derivatives as novel antitubulin agents. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 19(16): 4730–4738, 2011.
- [214] Hiraali, M.C., Keratokonus Hastalarında Comet Assay Analizi İle DNA Hasarının Araştırılması. Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 2015.
- [215] Bacanlı, M., Bitkisel kaynaklı fenolik yapıdaki bileşiklerin olası sitotoksik ve genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, 2014.
- [216] Abak, E.S., Antidiyabetik olarak kullanılan sitagliptin'in ratlarda genotoksitesinin değerlendirilmesi. Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 2010.
- [217] Ghosh, M., Biswas, D., Mukherjee, A., High-altitude medicines: A short-term genotoxicity study. *Toxicology and Industrial Health*, 26(7): 417-424, 2010.

ÖZGEÇMİŞ

Selen ŞEN, 20.07.1980 tarihinde Sakarya'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Sakarya'da tamamladı. 2002 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden biyolog ünvanı ile mezun oldu. 2003 yılında Sakarya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi'nde öğretim görevlisi olarak göreve başladı. 2007 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisansını tamamladı. 2010 yılında aynı enstitüde Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora programına başladı. Evli ve bir çocuk annesidir.