

**UMU-MİKROPLAK TEST SİSTEMİ İLE İLAÇ ETKEN
MADDESİ OLARAK TASARLANMIŞ BİLEŞİKLERİN
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF GENOTOXIC EFFECTS OF
COMPOUNDS DESIGNED AS A DRUG USING WITH
UMU-MICROPLATE TEST SYSTEM**

ZEYNEL GÖKÇINAR

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

BİYOLOJİ (MOLEKÜLER BİYOLOJİ) Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2010

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BİYOLOJİ BÖLÜMÜ (MOLEKÜLER BİYOLOJİ)**
ANABİLİM DALI 'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan :.....

Prof.Dr. Cihan ÖNER

Üye (Danışman) :.....

Prof.Dr. Mübeccel DURUSOY

Üye :.....

Prof.Dr. Sibel SÜMER

Üye :.....

Doç.Dr. Mehtap GÖKÇE

Üye :.....

Yrd.Doç.Dr. Kamile ÖZTÜRK

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Erdem YAZGAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

EN DEĞERLİ VARLIĞIM

CANIM EŞİME...

UMU-MİKROPLAK TEST SİSTEMİ İLE İLAÇ ETKEN MADDESİ OLARAK TASARLANMIŞ BİLEŞİKLERİN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Zeynel Gökçınar

ÖZ

Bu çalışmada, ilaç etken maddesi olarak sentezlenmiş benzoik asit, benzimidazol ve β -metil- β -nitrostiren türevleri olmak üzere üç farklı gruptan nitrolu bileşiklerin genotoksik potansiyelleri umu-mikroplak test sistemi ile değerlendirilmiştir. SOS indüklenme aktivitelerinin değerlendirildiği umu-mikroplak test sisteminde, nitrolu bileşiklere hassas olarak geliştirilmiş, nitroredüktaz (NR) enzimini normalden fazla ifade eden *Salmonella typhimurium* NM1011, O-asetiltransferaz (O-AT) enzimini normalden fazla ifade eden *S. typhimurium* NM2009 ve nitroredüktaz (NR) enzimiyle O-asetiltransferaz (O-AT) enzimini birlikte normalden fazla ifade eden *S. typhimurium* NM3009 suşları kullanılmıştır. Enzim assay ortamında klorofenol-red- β -D-galaktopiranosid (CPRG) substrat olarak ve genotoksik ajan olduğu bilinen 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) de pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Tüm bileşikler için, üç ayrı suşta, *umuC* gen ifadesinin indüksiyonu hemen hemen aynı bulunmuştur. Test edilen bileşikler, nitrolu bileşiklerin metabolik aktivasyon mekanizmasında görevli nitroredüktaz ve O-asetiltransferaz enzimlerini normalden fazla ifade eden bu üç suşta belirgin bir indüksiyona neden olmamıştır. Bileşiklerin hiçbirinin genotoksik aktivitesinin olmaması ilaç adayı olarak değerlendirilmelerinde çok önemli bir veridir.

Anahtar Kelimeler: Nitrolu bileşik, ilaç, umu-mikroplak testi, genotoksisite.

Danışman: Prof.Dr. Mübeccel DURUSOY, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

INVESTIGATION OF GENOTOXIC EFFECTS OF COMPOUNDS DESIGNED AS A DRUG USING WITH UMU-MICROPLATE TEST SYSTEM

Zeynel Gökçınar

ABSTRACT

In this study, genotoxic potentials of some nitro compounds (some benzoic acid, benzimidazole and β -methyl- β -nitrostyren derivatives) which are designed as drug evaluated with umu-microplate test system. Evaluation of the SOS inducing activity of the tested compounds was examined with the umu-microplate test system using *Salmonella typhimurium* NM1011 (overexpressed nitroreductase), *S.typhimurium* NM2009 (overexpressed O-acetyltransferase) and *S.typhimurium* NM3009 (overexpressed O-acetyltransferase and nitroreductase) strains which are sensitive to nitro compounds. Chlorophenol red- β -D-galactopyranoside (CPRG) was used as substrate in the enzyme assays and also the well-known genotoxic nitro compound, 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO), was the positive control in the test.

For all compounds and for all strains, the induction of *umuC* gene expression was found to be almost the same. The derivatives tested didn't caused an evident induction in all strains overexpressed nitroreductase and O-acetyltransferase enzymes which have a role in metabolic activation mechanism of nitro compounds. None of the derivatives show genotoxic effects, a very important data, making them a potential drug candidate.

Keywords: Nitro compounds, drug, umu-microplate test, genotoxicity.

Advisor: Prof.Dr. Mübeccel DURUSOY, Hacettepe University, Department of Biology, Molecular Biology Section

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın başlangıcından sonuna kadar beni yönlendiren, çalışmalarımın yürütülmesinde değerli bilgi, tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof.Dr. Mübeccel Durusoy'a;

Çalışmalarımın her aşamasında büyük yardım ve desteklerini gördüğüm Sayın Tuğba Somay ve değerli arkadaşım Sayın Egemen Foto'ya ;

Araştırmamda kullanılan ilaç etken maddelerini sağlayan Sayın Doç.Dr. Mehtap Gökçe'ye; çalışmalarım boyunca her türlü yardım ve olanaklarını esirgemeyen Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nın tüm üyelerine;

Tez çalışmalarımda her türlü desteği ve olanağı gösteren iş yerimdeki değerli yöneticilerim ve arkadaşlarıma;

Ayrıca bu günlere ulaşmamda, tezimi tamamlamamda maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme, bana güç veren ve umudumu kaybetmememi sağlayan mutluluk kaynağım sevgili eşim Biyolog Zeynep iğdem Gökçınar'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ.....	6
2.1. Kısa Zamanlı Mutajenite Test Sistemleri.....	6
2.2. Umu Test Sistemi.....	11
2.2.1. Umu-mikroplak test sistemi.....	22
2.2.2. Umu test sisteminde kullanılan suşlar.....	23
2.3. Genotoksisite Testleri ve İlaçlar.....	28
2.4. Nitrolu Aromatik Bileşikler.....	30
2.4.1. Nitrolu aromatik bileşiklerin metabolik aktivasyon mekanizması.....	32
2.5. Çalışmada Kullanılan, İlaç Etken Maddesi Olarak Tasarlanmış Nitrolu Bileşiklerin Özellikleri.....	34
2.5.1. Benzoik asit türevi bileşikler	34
2.5.2. Benzimidazol türevi bileşikler.....	36
2.5.3. β -Metil- β -nitrostiren türevi bileşikler.....	38
3. MATERYAL VE METOD.....	39
3.1. Kimyasal Maddeler.....	39
3.2. Kullanılan Test Suşları.....	39
3.3. Besi Ortamları, Çözeltiler ve Tamponlar.....	39
3.4. Test Suşlarının Genetik İşaretlerinin Kontrolü.....	42
3.4.1. rfa mutasyonunun kontrolü.....	42

3.4.2. uvrB mutasyonunun kontrolü.....	42
3.4.3. UmuC'-lacZ füzyonunun indüklenabilirliğinin kontrolü.....	42
3.5. Test Suşlarının Saklanması.....	43
3.6. Test Edilecek Kimyasalların Hazırlanması.....	43
3.7. Umu-mikroplak Test Sistemi.....	43
3.7.1. Göreceli (Rölatif) β -galaktosidaz aktivitesinin saptanması.....	44
3.7.2. Umu-mikroplak test sonuçlarının değerlendirilmesi.....	44
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	45
4.1. Test Suşlarının Genetik İşaretlerinin Kontrolü.....	45
4.2. Benzoik asit Türevi İlaç Etken Maddeleriyle Elde Edilen Umu-mikroplak Test Sonuçları.....	48
4.3. Benzimidazol Türevi İlaç Etken Maddeleriyle Elde Edilen Umu-mikroplak Test Sonuçları.....	54
4.3. β -Metil- β -Nitrostiren Türevi İlaç Etken Maddeleriyle Elde Edilen Umu-mikroplak Test Sonuçları.....	59
KAYNAKLAR.....	63

ÖZGEÇMİŞ

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Genotoksisite, mutajenite ve karsinojenite testlerindeki stratejiler.....	10
Şekil 2.2. <i>E.coli</i> 'deki SOS cevabın moleküler mekanizması	14
Şekil 2.3. SOS onarımın indüksiyonu	15
Şekil 2.4. Umu test sisteminin moleküler düzeyde mekanizması.....	20
Şekil 2.5. CPRG substratının β -gal ile hidrolizi ve oluşan ürünler.....	21
Şekil 2.6. ONPG substratının β -gal ile hidrolizi ve oluşan ürünler.....	21
Şekil 2.7. Robotik umu test platformu.....	23
Şekil 2.8. pSK1002 plazmidi.....	24
Şekil 2.9. Nitrolu bileşiklerin metabolik aktivasyon mekanizması.....	33
Şekil 2.10. 2-[(2-Nitro-1-fenil/p-süstitüe-fenil-butil)tiyo] benzoik asit türevlerinin sentez yolu.....	34
Şekil 2.11. 2-[(2-Nitro-1-fenil/p-süstitüe-fenil-butil)tiyo]benzoik asit türevlerinin kimyasal yapısı.....	35
Şekil 2.12. 2-[(2-nitro-1-feniletıl)tiyometil]benzimidazol türevlerinin sentez yolu.....	36
Şekil 2.13. 2-[(2-nitro-1-feniletıl)tiyometil]benzimidazol türevlerinin kimyasal yapısı.....	37
Şekil 2.14. β -Metil- β -nitrostiren türevlerinin sentez yolu.....	38
Şekil 2.15. β -Metil- β -nitrostiren türevlerinin kimyasal yapıları.....	38
Şekil 3.1. CPRG substratıyla elde edilen kontrol sonuçlarındaki renk oluşumu.....	44
Şekil 4.1. <i>S. typhimurium</i> NM1011 suşunun rfa mutasyonunu taşıdığıının gösterilmesi.....	45
Şekil 4.2. <i>S. typhimurium</i> NM2009 suşunun rfa mutasyonunu taşıdığıının gösterilmesi.....	45
Şekil 4.3. <i>S. typhimurium</i> NM3009 suşunun rfa mutasyonunu taşıdığıının gösterilmesi.....	46
Şekil 4.4. <i>S. typhimurium</i> NM1011 suşunun uvrB mutasyonunu taşıdığıının gösterilmesi.....	46
Şekil 4.5. <i>S. typhimurium</i> NM2009 suşunun uvrB mutasyonunu taşıdığıının gösterilmesi.....	46
Şekil 4.6. <i>S.typhimurium</i> NM3009 suşunun uvrB mutasyonun taşıdığıının gösterilmesi.....	47
Şekil 4.7. β -Nitrostiren kimyasal yapısı.....	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. SOS-cevabın indüklenmesi ile birlikte ifade edilen genler ve bunların DNA onarımındaki rolleri.....	16
Çizelge 2.2. Umu test sisteminde kullanılan bakteriler ve içerdikleri plazmidler.....	27
Çizelge 2.3. 2-[(2-Nitro-1-fenil/p-süstitüe-fenil-butil)tiyo]benzoik asit türevlerinin fizikokimyasal özellikleri	35
Çizelge 2.4. 2-[(2-nitro-1-feniletıl)tiyometil]benzimidazol türevlerinin fizikokimyasal özellikleri	37
Çizelge 2.5. β -Metil- β -nitrostiren türevlerinin türevlerinin kimyasal özellikleri.....	38
Çizelge 4.1. Benzoik asit türevi bileşiklerle <i>Salmonella typhimurium</i> NM2009, NM3009 ve NM1011 suşlarında CPRG substratlarıyla elde edilen umu-mikroplak test sonuçları.....	51
Çizelge 4.2. Benzimidazol türevi ilaç etken maddeleriyle <i>Salmonella typhimurium</i> NM2009, NM3009 ve NM1011 suşlarında CPRG substratlarıyla elde edilen umu-mikroplak test sonuçları.....	56
Çizelge 4.3. β -Metil β -Nitrostiren türevi ilaç etken maddeleriyle <i>Salmonella typhimurium</i> NM2009, NM3009 ve NM1011 suşlarında CPRG substratlarıyla elde edilen umu-mikroplak test sonuçları.....	61

KISALTMALAR DİZİNİ

β -gal	: β -galaktosidaz
NR	: Nitroredüktaz
O-AT	: O-Asetiltransferaz
ONPG	: O-Nitrofenil- β -D-galaktopiranosid
CPRG	: Klorofenol-red- β -D-galaktopiranosid
RGA	: Rölatif (Göreceli) β -galaktosidaz Aktivitesi
4-NQO	: 4-nitroquinolin-N-oksit
DMSO	: Dimetil sülfoksit

1. GİRİŞ

Yaşadığımız yüzyılda insan sağlığında biyolojik, genetik ve fiziksel yapının yanı sıra çevresel etkenlerin de önemli bir yer tuttuğu vurgulanmaktadır. Doğadaki tüm canlılar, günlük yaşamda bir çok kimyasal maddeyle yüz yüze gelmekte ve bu maddelerin büyük bir kısmını ilaçlar oluşturmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla, çevresel kontaminatlar arasında yer alan, ilaç ve kişisel bakım ürün kalıntılarının, çok küçük dozlarının bile kaygı verecek kadar toksik etkilere neden olduğu bildirilmiştir (Hernando et al., 2006). Sürekli olarak genotoksik maddelerle yüz yüze gelmenin, canlılarda hücre yaşlanmasının hızlanmasına, değişen çevre koşullarına adaptasyon zorluklarına, mutasyon ve kanser oluşumuna neden olduğu bilinmektedir (Reifferscheid and Grummt, 2000).

Günümüzde erken tanı ve tedavi yöntemleri oldukça gelişmiş olmasına karşın kanserden ölen bireylerin sayısı oldukça fazladır. Kanser araştırmalarının en büyük hedefi, bu hastalığın etmeni olan çevresel faktörlerin ve kimyasal maddelerin belirlenmesi ve insanların bunlarla yüz yüze gelmesinin engellenmesidir (Weisburger, 1999). Endüstriyel devrimle birlikte kimyasal maddelerin türünde ve miktarında önemli bir artış gözlenmektedir. Günümüzde dünya ticaretinde en az 80.000 kimyasal vardır ve her yıl yaklaşık 2000 yeni kimyasal geliştirilmektedir. Gıda sektöründen ilaç sektörüne kadar pek çok alanda bu kimyasallar kullanılmaktadır (Kato et al., 1982 , Forman and Ames, 1991). Bu maddelerin çoğunun günlük kullanımda yer alması, özellikle karsinojenik potansiyelleri yönünden test edilmelerini gerekli kılmaktadır (Forman and Ames, 1991). Genetik kodun evrensel oluşu ve karsinojenite ile mutajenite arasında yüksek bir korelasyonun bulunması, kimyasalların taranmasında kısa zamanlı mutajenite test sistemlerinin çok yaygın olarak kullanımına neden olmuş, buna bağlı olarak, genetik toksikoloji önem kazanmıştır (Ames B.N., 1979).

Elde edilen herhangi bir ilacın, insanlarda denenmelerinden önce, belirli araştırmalardan geçmesi zorunludur. Bu nedenle madde belirleme (tarama testleri) ve farmakolojik, farmakokinetik ve farmasötik araştırmalardan sonra toksisite incelemelerine yer verilir (İskit A.B., 2007). İlaçların genotoksik potansiyellerinin araştırılması, ilaçların piyasaya sunumundan önce yapılmakta ve

dünyada belirli kuruluşlar tarafından düzenli ve yaygın bir biçimde izlenmektedir (Brambilla and Martelli, 2009).

Yeni bir kimyasalın mutajenik potansiyeli hakkında geniş kapsamlı bir yorum yapabilmek için, gen, kromozom ve genom olmak üzere 3 kademedeki bilgiye gereksinim duyulmaktadır (Shelby, 1988; Lorge et al., 2007). Kimyasal maddelerin karsinojenik risklerini ortaya çıkarmada en akılcı yöntem deney hayvanlarında tümör indüksiyonu olmasına karşın bu testlerin sonuçlanması uzun sürmekte, uygulanmaları zor ve pahalı olmaktadır (IARC, 1980; Mersch-Sundermann et. al., 1993). Yine aynı zamanda kimyasallar, son yıllarda yüksek nitelikli genotoksisite test sistemleriyle değerlendirilebilmektedir. Bu test sistemleri üç farklı teknikten oluşan yüksek görüntüleme yöntemleridir [Highthroughput screening (HTS)-GreenScreen HC, CellCiphr p53, CellSensor p53RE] (Knight e al., 2009). Buna benzer bir yöntem olan ve nitrolu bileşiklerin mutajenitesini değerlendirmek için geliştirilen ve bileşiklerin moleküler yapıları ile farmakokinetik özellikleri arasındaki ilişkiye dayanan kantitatif yapısal toksisite ilişkisi [Quantitative structure toxicity relationship (QSTR)] modelleme tekniği de uzun zamanlı, pahalı yöntemlerdendir (Nair et al., 2008).

Uzun zamanlı ve pahalı yöntemler yerine kısa zamanda sonuç verebilen, uygulanmaları kolay ve ucuz olan mutajenite testleri tercih edilmektedir (Quillardet and Hofnung, 1985; Hofnung and Quillardet, 1986). Nitekim analjezik, anti-inflamatorik ilaçlar ve anti-predikslerin genotoksisite ve karsinojenitelerinin araştırılmasında bakteriyel testler kullanılmıştır (Brambilla et al., 2009). İlaç yapımında yer alan ürünlerin antibakteriyel, antifungal ve antioksidant özelliklerinin dizaynında ve kalite kontrollerinde de bakteriyel mutajenite testleri önemli bir yer tutmaktadır (Ordoñez et al., 2009).

Bununla birlikte kısa zamanlı mutajenite test sistemlerinin hiçbiri tek başına yeterli değildir. Çünkü bu testlerin her biri sadece birkaç mutajen tipini tanımlayabilmektedir. Bu nedenle iyi bir genotoksisite değerlendirmesi için bu test sistemlerinden bir kaçının bir arada uygulandığı batarya test sistemleri kullanılmalıdır (Dizer et.al., 2002).

Oldukça fazla sayıda ve çeşitte kısa zamanlı test sistemi vardır. Bunun yanısıra, doğru sonuca ulaşmak için, test sistemi seçilirken araştırılacak örneğe en uygun olanını seçmeye özen gösterilmelidir. Yaygın olarak kullanılan Ames test sistemi transisyon ya da transversiyon şeklinde gerçekleşen nokta mutasyonları ve çerçeve kayması mutasyonlarını belirlerken, plazmid içeren *Salmonella typhimurium* suşları aromatik amin ve polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) neden olduğu mutajeniteyi belirlemektedir (Ames et al., 1973; Natarajan and Obe, 1986). Hrelia ve arkadaşlarının (1999) yaptığı bir çalışmada, bazı nitrolu aromatik bileşiklerin mutajenitesi üzerine nitroredüktaz ve O-asetiltransferaz enzimlerinin etkisi incelenmiş ve bu enzimleri normalden fazla ifade eden bakteri suşlarında mutajenitenin arttığı, defektli suşlarda ise mutajenik etkinin gözlenmediği sonucuna varılmıştır. Yine başka bir çalışmada, bazı nitroaren ve aromatik aminlerin genotoksitesisi araştırılmış, S9 karışımı içeren test ortamında mutajenite gözlenmezken, plazmidlerinde nitroredüktaz ve O-asetiltransferaz enzimlerinin çoklu kopyasını taşıyan *S. typhimurium* TGO2 suşlarında mutajenik aktivite artmıştır (Østergaard et al., 2007).

Bakteriyel mutajenite testleri son 20 yıldır genotoksik araştırmalarda yaygın bir şekilde kullanılmakta ve her geçen gün yeni mutajenite testleri geliştirilmektedir. Bakteriyel mutajenite testlerindeki bu gelişme genetik mühendisliği alanındaki çalışmalara bağlı olarak hız kazanmıştır. Mutajen maddelerin biyoaktivasyonunda görev alan N-asetiltransferaz, nitroredüktaz (NR) ve sitokrom p-450 gibi bazı enzimlerin sentezinden sorumlu genlerin bakteriler içine yerleştirilmesiyle yeni test suşları ve bu suşların kullanıldığı yeni test sistemleri geliştirilmiştir. Bu çabalar sonucu hem mutajenite testlerinin duyarlılıkları arttırılmış, hem de mutajenitenin moleküler temeline ışık tutulmuştur (Josephy et. al., 1997; Saygı, 2003).

Nitrolu bileşiklerden oluşan çok fazla sayıda ilaç vardır. Diğer taraftan, nitrolu bileşiklerin büyük bir çoğunluğunun genotoksik etki gösterdiği ve 39 hayvan türünde tümör gelişimine neden oldukları saptanmıştır (Bogovski, 1981; Schmähl and Scherf, 1984). Çevrede çok geniş bir dağılım gösteren nitroarenlerden bazılarının *Salmonella*/mikrozom test sisteminde (Tokiwa and Ohnishi, 1986; Nakagawa et al., 1987) ve memeli hücre kültürlerinde (Takayama et al., 1983; Fifer et al., 1986; Matsuoka et al., 1991) mutasyona neden oldukları ayrıca

kemirgenlerde karsinojen oldukları gösterilmiştir (Tokiwa et al., 1987; Horikawa et al., 1991). Bu kimyasalların insan sağlığı açısından potansiyel risklerinin değerlendirilmesinin son derece önemli olduğu umu test sistemi ile yaptığı çalışmalar sonucunda Oda ve arkadaşları (1993) tarafından da bildirilmiştir.

Oldukça fazla sayıda genotoksisite testi bulunmasına karşın, aromatik nitrolu bileşiklerin genotoksisite değerlendirmelerinde en çok kullanılan testlerden biri umu test sistemidir (Ohe and Nukaya, 1996; Ohe, 1997; Hamer et. al., 2000; Dizer et. al., 2002). Oda ve arkadaşları (1985) tarafından aromatik nitrolu bileşikler için özel olarak geliştirilmiş bir test sistemi olan umu test sistemi, çevresel karsinojen ve mutajenlerin genotoksik etkilerini saptamak amacıyla geliştirilmiş kolorimetrik, bakteriyel bir test sistemidir ve dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Test suşları geliştirilirken, nitrolu aromatik bileşiklerin metabolizmaları sırasında etkili olan reaksiyon basamakları göz önünde bulundurulmuş ve DNA hasarı ile indüklenen SOS-cevap esas alınarak geliştirilmiştir. Test edilen kimyasalların genotoksik etki yapıp yapmadıkları, oluşturulan umuC'-lacZ füzyon geninin ifade edilmesi sonucu sentezlenen β -galaktosidaz (β -gal) enzim miktarının saptanması ile belirlenir (Oda et. al., 1985). Alman standardizasyon enstitüsü [Deutsches institut für normung (DIN)] (38415 ve T3) ve uluslararası standardizasyon organizasyonu [International organization for standardization (ISO)] (ISO/DIS 13829, 2000) gibi kalite değerlendirme sistemleri tarafından standardize edilmiş ve kabul görmüş olan umu test sisteminin mono bileşikler, çevresel örnekler ve gıdalardaki genotoksinleri belirlemede oldukça duyarlı olduğu görülmüştür (Oda et al.,1985; 1988, Reifferscheid et.al., 1991, Ono et al.,1992). Mikroorganizmalar tarafından üretilen mikrobiyal uçucu organik maddelerin [Microbial volatile organic compounds (MVOCs)] genotoksisiteleri umu test sistemi kullanılarak belirlenmiş ve bu maddelerle uzun süre yüz yüze gelmenin sağlık açısından zararlı olabileceği bildirilmiştir (Nakajima et al., 2006).

Karsinojenite ve genotoksisite arasındaki paralellik, uluslararası toksikoloji programına dahil 83 kimyasalın umu test sistemiyle araştırılması sonucu gösterilmiştir (Yasunaga et al., 2004). Anti-tümör ilaç denemelerinin sonuçlarına göre, DNA hasar tiplerine bakılmaksızın kimyasalların genotoksisitelerinin

belirlenmesinde umu test sisteminin kullanılabileceği belirlenmiştir (Yasunaga et al; 2006).

Umu test sisteminin bir versiyonu olan umu-mikroplak test sistemi, çok az miktardaki örnekleri son derece hızlı ve duyarlı bir biçimde test etmeye olanak sağlamaktadır (Oda et al., 2004) ve sistemin çok az miktarda sentezlenen ilaç etken maddeleri için son derece uygun olduğu görülmektedir.

Diğer kimyasallar gibi ilaçlar da kullanıma sunulmadan önce toksisite potansiyelleri yönünden değerlendirilmelidir (Saygı, 2003) çünkü dünyada otoriteler yeni sentezlenen ilaçların genotoksik potansiyelleri ile ilgili verilere gereksinim duymaktadırlar (Li et al., 2007; Kram-Jacobson and Contrera, 2007; Custer and Sweder, 2008). Toksikolojik veriler, yeni ilaç uygulamalarında ilaçların güvenilirliklerinin ve etkinliklerinin değerlendirilmelerine yardımcı olarak, ilaçların risk/fayda değerlendirmelerinde kullanılır. Genotoksisite testleri, ilaçların sentezlenmeleri ve geliştirilmelerinde düzenleyici ve tamamlayıcı bilgileri sağlar (Jena et al., 2002) ve ruhsatlama başvurularında sunulması gereken veriler arasındadır (Jena et al., 2002; İskit, 2007). İlaçlar tarafından indüklenen sitotoksisite ve genotoksisite, doz ve tedavi süresinin doğru seçilmesiyle sınırlandırılabilir. Bu da hastanın yaşam kalitesini olumlu yönde etkileyecektir. İlaç etken maddelerinin genotoksik açıdan araştırılmaları, ilaç üretiminde halk sağlığının korunmasında çok önemli bir unsurdur (Brusick, 2009).

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı tarafından ilaç etken maddesi olarak sentezlenen 20 adet nitrolu bileşiğin (Benzoik asit türevleri 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g, 2h bileşikleri, benzimidazol türevleri 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g, 3h bileşikleri ve β -metil β -nitrostiren türevleri 4a, 4b, 4c, 4d bileşiklerinin) genotoksik etkileri umu-mikroplak test sistemi ile *Salmonella typhimurium* NM1011, NM2009 ve NM3009 suşları kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen veriler, bu maddelerin ilaç olarak geliştirilmelerine önemli katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Kısa Zamanlı Mutajenite Test Sistemleri

Yaşadığımız yüzyılda insan sağlığında biyolojik, genetik ve fiziksel yapı gibi etkenlerin yanı sıra çevresel etkilerin de önemli bir yer tuttuğu vurgulanmaktadır. Çevremizde biyolojik etkileri bilinmeyen ve sayıları milyonları bulan sentetik ve doğal kimyasal maddeler bulunmaktadır.

Mutajenlerle yüz yüze gelmenin çeşitli yolları vardır. Bunlardan birincisi; diyetimizde bulunan doğal kimyasalları almamız, ikincisi; endüstriyel kimyasallar, pestisitler, saç boya ları, kozmetik ve ilaçlar gibi yapay kimyasalları kullanmamız, üçüncüsü ise; sigara dumanı, su ve havadaki kirleticiler gibi karmaşık bileşiklerle yüz yüze gelmemizdir (Korkmaz, 2005).

Kimyasal maddelerin mutajenik aktivitelerini araştıran ilk çalışmalar İkinci Dünya Savaşı'ndan hemen sonra bir grup kimyasal üzerinde yapılmış ve ilk olarak hardal gazının etkili bir mutajen olduğu saptanmıştır. Dünyanın hemen her yerinde yapılan deneylerle, diğer bazı kimyasallara dikkat çekilmiş ve 1972 yılında yapılan bir araştırmada yiyecekleri renklendirme, koruma ve diğer amaçlarla kullanılan 2500 kadar katkı maddesi olduğu saptanmıştır. Yiyeceklere bulaşarak vücuda giren pestisitler ve çeşitli amaçlarla kullanılan ilaçlar üzerinde durulmuş ve bu sayede pek çok mutajenite test sistemi geliştirilmiştir (Paı, 1985).

Mutajenlerin etki mekanizmaları kesin olarak aydınlatıldıktan sonra belirli çevresel mutajenlerin insanlarda kansere neden olabileceği şüphesi doğmuştur. Mutajenite ve karsinojenite arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışma ile bilinen 175 karsinojenik maddeden 157'sinin aynı zamanda mutajen olduğu ve karsinojenite ile mutajenite arasında % 85 oranında bir bağlantı olduğu belirlenmiştir (Maron and Ames, 1983). Dolayısıyla kimyasal maddeleri "mutajen" ve "karsinojen" olarak iki grupta incelemek yerine, mutajen/karsinojen olarak incelemenin daha doğru olduğu kabul edilmiştir (Saleh, 1997). Mutasyon genetik materyallerin doğrudan etkilenmesiyle ortaya çıkarken, kanser çok basamaklı karmaşık biyolojik olaylar sonucu ortaya çıkmaktadır (Bağcı, 1985). Dolayısıyla her karsinojen mutajendir, ama her mutajen karsinojen değildir.

İnsanlarda görülen kanserlerin büyük bir çoğunluğu kimyasal karsinojenlerle yüz yüze kalmaya bağlanmaktadır. Uluslararası Kanser Araştırmaları Kuruluşu [International agency for research on cancer (IARC)] panellerinde, araştırması yapılan 300 kimyasal maddeyi karsinojen olarak sınıflandırmıştır (Mercangöz ve Tüylü, 2000). Karsinojenler genellikle DNA, RNA ve proteinlerdeki nükleofilik (elektronca zengin) gruplara kolaylıkla saldırabilen elektrofiller (elektronca fakir)'dir. Kanser oluşumunun en etkili aşaması başlangıçta kimyasallarla nükleik asitlerin karşılaşmasıdır. Kimyasallar diğer hücresel organellerle de bağlanabilirler, fakat nükleik asitlerle bağlanmaları genetik bilgiyi bozmaları bakımından önemlidir. Karsinogenez olayında madde bağlanmasından başka nükleik asitlerin onarımı, inhibisyonu ve genetik yatkınlık gibi bazı faktörlerin de etkisi vardır. Bu faktörlerin de etkisiyle kansere dönüşüm belirlenir (Singer and Gerunbeger, 1994)

Canlı hücreler üzerinde kimyasal maddelere bağlı önemli yapı ve fonksiyon değişikliklerinin saptanması ve yorumlanması amacıyla deneysel toksikolojik çalışmalar yapılmaktadır (Loomis, 1978). Toksikite testleri, kimyasal maddelerin sadece canlı organizmalar üzerindeki zararlı etkilerini açıklamak için değil, aynı zamanda bu maddelerin toksik etki göstermediği doz değerlerini saptamak amacıyla da yapılır (Öztürk and Durusoy, 1999).

Tüm ilaçlar, temizlik ve kozmetik maddeleri, pestisitler, besin katkı maddeleri ve sanayide kullanıldığında insanların yüz yüze gelebileceği kimyasal maddeler, kullanıma sunulmadan önce toksik potansiyelleri yönünden değerlendirilmelidirler. Bu nedenle günlük hayatta yaygın olarak karşılaşılan kimyasal maddelerin insanlarda güvenle kullanılabilmesi için toksisite testlerinin önemi büyüktür (Saygı, 2003).

Kimyasal maddelerin kısa, orta ya da uzun dönemde toksik etkilerini değerlendirmede kullanılan akut, subakut, subkronik ve kronik toksisite testleri dışında özel toksisite test teknikleri de vardır. Bunlar amaçlarına göre; teratojenite, karsinojenite ve mutajenite testleridir (Cohen, 1995). Bu testler genetik toksikolojinin çalışma alanlarıdır.

Kimyasal maddelerin karsinojenik risklerini ortaya çıkarmada en akılcı yöntem deney hayvanları ile yapılan testler olmasına karşın bu testlerin sonuçlanması

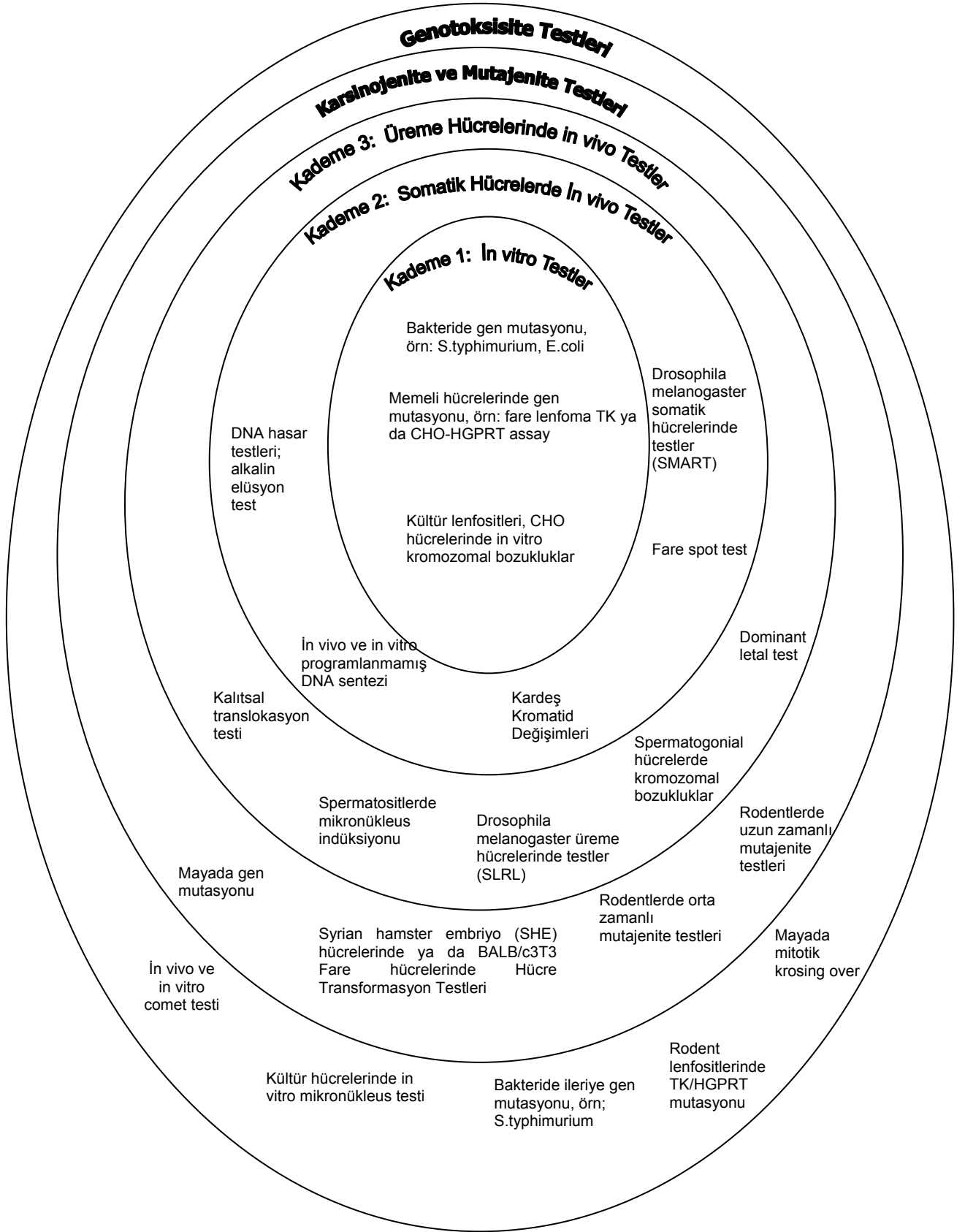
uzun sürmekte, uygulanmaları zor ve pahalı olmaktadır (IARC, 1980). Bu nedenle kısa sürede sonuç verebilen, uygulanması kolay ve düşük maliyetli kısa zamanlı mutajenite test sistemleri tercih edilmektedir.

Genetik kodun evrensel oluşu ve karsinojenite ile mutajenite arasında yüksek bir korelasyonun bulunması, kimyasalların taranmasında kısa zamanlı mutajenite test sistemlerinin çok yaygın olarak kullanımına neden olmuştur. Şekil 2.1.'de genotoksisite, mutajenite ve karsinojenite test sistemlerinde kullanılan stratejiler sunulmuştur. Mutajeniteyi saptamak için, bakteriden memeliye kadar pek çok organizmanın kullanıldığı, 200'den fazla kısa zamanlı test sistemi geliştirilmiştir (Bajpayee et al., 2005). Lizojenik gram pozitif ve gram negatif bakteriler ile real-time PCR kullanılarak genotoksisiteyi değerlendiren test sistemleri (Soberón et al., 2007), insan lenfosit hücrelerini kullanan hipoksantin-guanozin fosforibozil transferaz [Hypoxanthine-guanosine phosphoribosyl transferase (HPRT)] gen mutasyon testleri (Havla et al., 2009), insan kaynaklı değişik karaciğer hücre hatları ile tek hücreli jel elektroforezi yaparak metabolik aktivasyon gerektiren kimyasalların genotoksisitelerini değerlendirmeye olanak sağlayan comet testi (Winter et al., 2008), mikroelektronik hücre algılama tekniği ile değişik hücre hatlarında kimyasalların genotoksik etkilerini değerlendiren yeni sistemler (Boyd et al., 2008), bu test sistemlerinden sadece birkaçıdır. Bunlara ek olarak daha başka genotoksisite testleri de vardır. Örneğin p53R2 gen ifadesi üzerine geliştirilmiş genotoksisite test sistemi. p53R2 geni, DNA hasarı ile aktive olan ribonükleotid redüktazın bir alt ünitesini kopyalayan gendir. Geliştirilen bu test sisteminde insan hücreleri kullanılır ve bir p53R2 geni ile lusiferaz geni birleştirilerek test sistemi oluşturulur. Bu sistem, DNA'da değişik hasar türleri oluşturan bileşiklere göre DNA'nın çift sarmalını kıran bileşiklere karşı daha duyarlıdır. Böylece, insanlarda kimyasal genotoksisitenin ve karsinojenitenin önceden saptanmasında yardımcı bir araç olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Ohno et al., 2008).

İlaçların geliştirilmelerinin erken evrelerinde Vitotox ve Radar görüntüleme testleri kullanılır. Vitotox'da bakteriler, radar görüntüleme de ise, mayalar kullanılır. Bu testlerin uygulanması, geliştirilen ilaçların mutajenite ve klastojenite açısından genotoksisitenin saptanmasında hızlı bir seçim yapılmasını sağlar (Westerink et al., 2009).

Kısa zamanlı test sistemlerinden bir grubu oluşturan bakteriyel testler; kısa inkübasyon süreleri, küçük miktarlara ve otomasyona uygunlukları nedeniyle diğer testlere göre daha avantajlıdır (Reifferscheid et al., 2005). Bu avantajları nedeniyle, kimyasalları test etmek ve genotoksisitelerini değerlendirmek amacıyla sıklıkla kullanılmaktadırlar (ISO 13829).

Bakteriyel mutajenite testleri; genotoksisitenin saptanması, çevresel kimyasallarla yüz yüze gelmekten kaynaklanabilecek sağlık problemlerinin belirlenmesi ve denetlenmesi, mutagenesizin biyokimyasal mekanizmalarının aydınlatılması gibi pek çok amaca hizmet etmektedir. Mutagenesizin moleküler mekanizmasının anlaşılması ve biyoteknolojideki ilerlemeler, mutasyon araştırmalarında özel çalışmalara uygun bakteriyel suşların geliştirilmesine olanak sağlamaktadır (Josephy et al., 1997).



Şekil 2.1. Genotoksisite, mutajenite ve karsinojenite testlerindeki stratejiler (Bajpayee et al.,2005).

2.2. Umu Test Sistemi

Umu test sistemi, kimyasal ajanların genotoksik etkilerini saptamak amacıyla geliştirilmiş olan kolorimetrik, bakteriyel bir test sistemidir. DNA hasarı ile indüklenen SOS onarım sistemi esas alınarak geliştirilmiştir (Oda et al., 1985). Uluslararası ISO (ISO/DIS 13829,2000) kalite değerlendirme sistemi tarafından standardize edilmiş ve kabul görmüş olan umu test sisteminin genotoksinleri belirlemede oldukça duyarlı olduğu görülmüştür (Oda et al., 1985, Reifferscheid et al., 1991; Hamer et al., 2000).

Umu test sistemi mutajen maddelerin belirlenmesinde kullanılışı gibi anti-mutajen maddelerin belirlenmesinde de kullanılmıştır (Yagı et al., 2006; Hısama et al., 2008; Veschaeve et al., 2008).

Bakteriler, ökaryotik organizmalarla karşılaştırıldıklarında daha basit olmalarına karşın, onların da DNA hasarına karşı cevap oluşturabilmek için mevcut karmaşık mekanizmaları vardır. Bunlardan birisi de SOS onarım sistemidir. Regülatör bir sistem olan SOS onarım sistemi, DNA hasarı ile indüklenebilen sistemler içinde ilk karakterize edilmiş olanıdır. Bu sistem, DNA hasarı ile indüklenebilen sistemlerin en kapsamlısı, en kompleksi ve en iyi anlaşılmiş olanıdır (Walker, 1984; Yasunaga et al., 2004).

DNA'da çok sayıda hasar meydana gelmiş ve bu hasar diğer onarım mekanizmalarıyla giderilememişse, hata-eğilimli tamir (error prone repair) adını alan bir tamir sistemi devreye girer. Bu yol aktif olduğunda, DNA'nın tamiri önemli derecede düşük bir doğrulukla ve yüksek mutasyon hızıyla gerçekleşir. Bu, yoğun DNA hasarına karşı oluşan, hücresel stres yanıtının bir parçası olan hata-eğilimli tamire SOS-cevabı denir, SOS-cevabın indüklenmesiyle birlikte SOS onarımı devreye girer. Bu sırada hücrelerde DNA onarımında rol alan bazı proteinlerin miktarında bir artış gözlenir. İndüklenmiş proteinlerin bir kısmı, DNA polimeraz III'ün replike edemediği DNA lezyonlarını replike edebilen, özelleşmiş bir replikasyon sisteminin parçalarıdır.

Bu replikasyonda hata oranı yüksektir. Bununla birlikte SOS onarımı, replikasyon engelini aşan ve en azından birkaç mutant hücrenin yaşamasına izin veren

biyolojik bir kazançtır. SOS-cevabı, hücrenin potansiyel ve ölümcül stresler karşısında kendini korumasına yardımcı olan metabolik bir alarm sistemidir. SOS-cevabın mutageneze yatkınlığının uzun vadede hücreler için özellikle adaptasyon sürecinde etkili olduğu kanıtlanmış durumdadır. Zira bu onarım bakteri popülasyonunun genetik çeşitliliğinde bir patlama meydana getirerek popülasyonda değişen ortam koşullarına daha iyi adapte olabilecek yeteneklere sahip bir mutant hücrenin ortaya çıkma olasılığını arttırmaktadır. SOS-cevabın regülasyon mekanizması moleküler düzeyde açıklanmış ve bu mekanizma Şekil 2.2.'de şematik olarak gösterilmiştir.

Bakteri kromozomlarındaki aşırı DNA hasarı, birbirinden bağımsız pek çok genin uyarımını tetikler. Bu olay, koordineli gen düzenlenmesinin güzel bir örneğidir. 48 kadar farklı genin, ürünlerinin SOS-yanıtında görev yapmak üzere, DNA hasarı tarafından uyarıldığı bulunmuştur (Courcelle et al., 2001, Fernandez De Henestrosa, 2000).

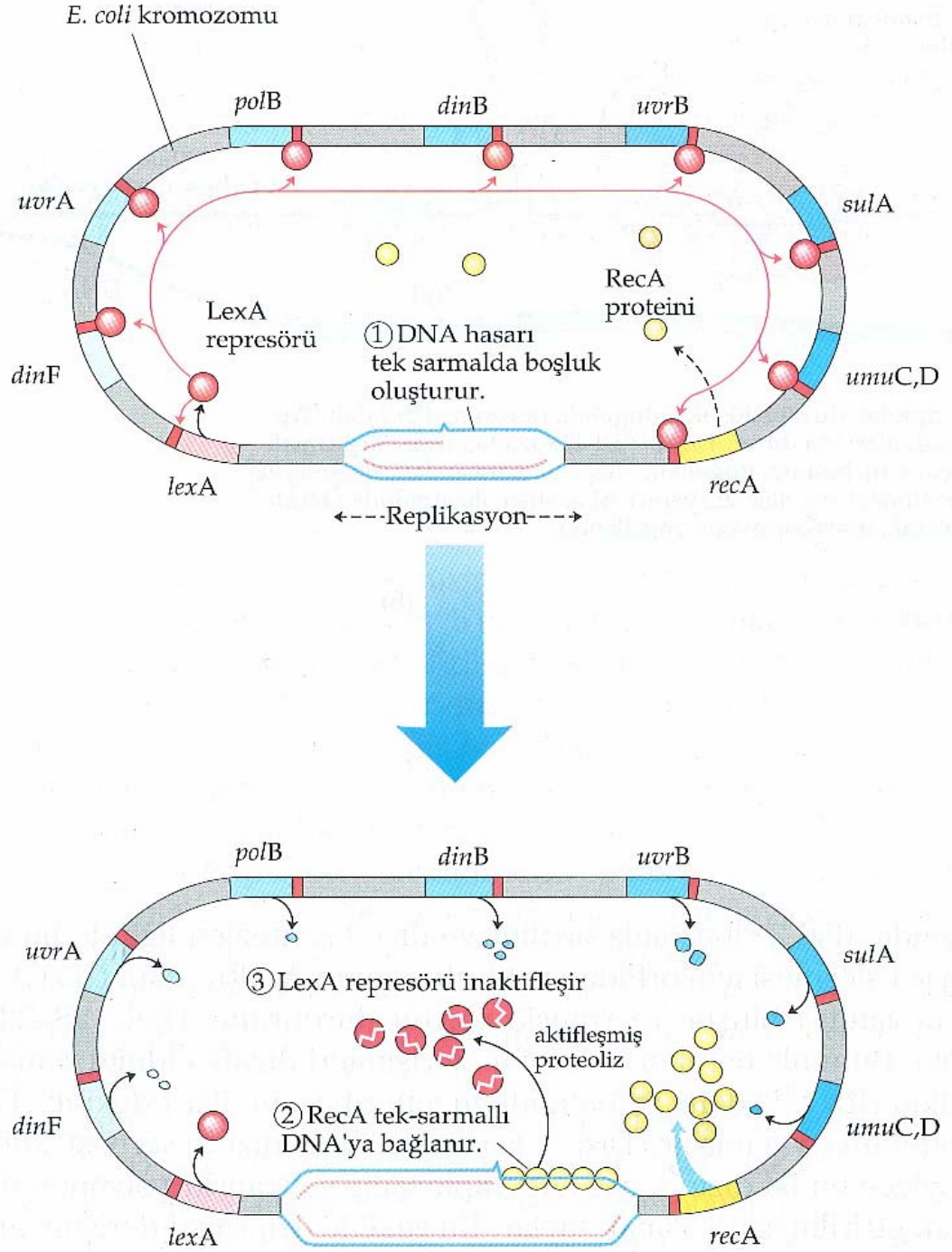
SOS-cevabın regülasyon mekanizmasının moleküler düzeyde açıklanmasında iki regülatör gen önem taşımaktadır. Bunlar recA ve lexA genleridir. Bunlardan lexA proteini normal koşullarda SOS-cevap genlerini baskılarken, RecA proteini hasarlı hücrelerde bu represörlerin parçalanmasına ve SOS-cevap genlerinin indüklenmesine olanak sağlar. Normal hücrede lexA geninin ürünü olan protein, recA ve lexA genini de içeren birbirinden bağımsız SOS genlerinin önündeki benzer operatörlere bağlanarak, represör görevi yapar. Bu SOS genlerinin birçoğu baskılanmış durumda iken belirli bir düzeyde ifade edilirler.

DNA'nın SOS-cevabı indükleyen ajanlar tarafından hasar görmesi ve DNA replikasyonunun tam olarak yapılamaması sonucu, tek zincirli DNA bölgeleri (ssDNA) oluşmaktadır. Bu bölgeler, DNA onarımı ve mutagenesis için gerekli olan birçok genin indüksiyonuna sinyal oluşturur. SOS cevabın oluşmasında anahtar rol oynayan RecA proteininin regülasyonu diğer proteinler tarafından düzenlenir. Bu proteinler RecA'nın tek zincirli DNA üzerine yerleşmesine yardımcı olur. RecA yüklemesi için iki büyük yol vardır. Birinci yol konjugasyon sırasında, rekombinasyon için RecBCD helikaz/nükleaz kullanılır ve bu yola RecBCD yolu denir. Bu yola DNA'da çift zincir kırıkları olduğu zaman ihtiyaç duyulur. DNA sonunda işlem yapabilmek için uzun bir tek iplik uzantısını ipliğin 3' sonunda

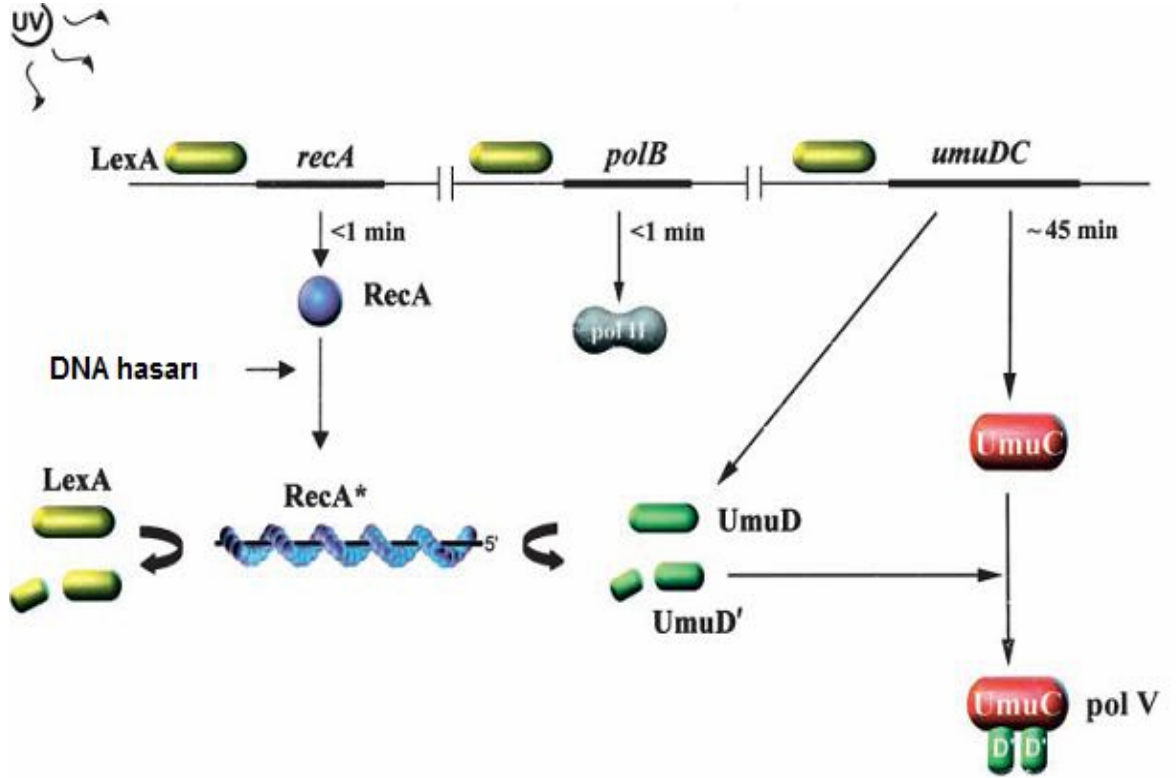
oluşturur ve böylelikle RecA üzerine yerleşebilir. (Clark et al., 1994; Horii et al., 1973; Kowalczykowski et al., 1994; Kuzminov, 1999). Diğer yol RecFOR yoludur. RecF, RecO ve RecR proteinleri, DNA'ya bağlanmış ssb kompleksinin üzerine RecA'nın yerleşmesi için gerekli yardımcı proteinlerdir. (Beernik et al., 1999; Sancar et al., 1993), (Sandler, 2001; Umezu et al., 1993; Umezu et al., 1994). RecFOR rekombinasyonel yolu RecBCD yoluna yardımcı bir yoldur. DNA boşluklarının tamirinde rol alırlar. Ayrıca konjugasyonel rekombinasyon sırasında, mutasyon sonucu kaldırılmış RecBCD yolunun yerine görev yapar. RecBCD ve RecFOR, Rec A filamentlerinin yerleşmesinde önemli fonksiyonlar gösterir. Ayrıca başka proteinlerde önemli rol oynar (Clark et al., 1994; Horii et al., 1973; Kowalczykowski et al., 1994; Kuzminov, 1999). RecA proteini bu tek zincirli bölgelere bağlandığında, RecA/ssDNA helikal multimerik nükleoprotein filamenti halini alır, RecA/ssDNA nükleoprotein filamenti, lexA represör proteinlerinin parçalanmasında koproteaz fonksiyonu gösterir. LexA represörü kendi enzimatik aktivitesiyle, özgül Ala-Gly peptit bağıncı keserek kendini iki eşit parçaya ayırdığında inaktifleşir (Şekil 2.2.). RecA klasik anlamda bir proteaz değildir, ancak bunun ssDNA ile etkileşmesi, lexA'nın proteaz aktivitesi kazanmasını sağlar (Little et al., 1981).

Represör inaktifleştiğinde, umuC'yi de içeren SOS genleri uyarılır. SOS onarımın induksiyonu Şekil 2.3.'de şematize edilmiştir. umuDC operatörünün SOS mutagenезisi için harekete geçirilmesi gereken tek kontrol lokusu olduğu söylenebilir. Çünkü umu operonunun, mutagenезisizle diğer bilinen SOS genlerinden daha direkt bir şekilde ilişkili olduğu düşünülmektedir (Kato and Shinura, 1977). Represörün parçalanması sonucunda ifade edilen genlerin ürünleri, hasara uğramış DNA'nın onarımını (translezyon DNA sentezi) gerçekleştirir. Bu onarım özel bir DNA polimeraz sınıfı tarafından katalizlenir. Bu onarım *E.coli*'de umuC ve umuD protein kompleksi tarafından yapılır. umuC, Y-ailesi DNA polimerazların bir üyesidir (Goodman, 2002). LexA kırılımına benzer bir şekilde, RecA/ssDNA nükleoprotein filamenti umuD ile etkileşime girdiğinde, umuD kendi enzimatik aktivitesiyle amino terminalinden 24 amino asiti uzaklaştırarak umuD' halini alır (Burckhardt et al., 1988; Nohmi et al., 1988; Shinagawa et al., 1988). umuC, umuD₂ ile kompleks yapar, umuD₂C nin DNA kompleksi polimeraz V olarak adlandırılmaktadır (Reuven et al., 1999; Tang et al., 1999). umuC'nin DNA

polimeraz aktivitesi ortamda umuD', recA ve ssDNA bağlayıcı protein (SSB) gerektirmektedir (Friedberg et al., 1995). umuD' ve umuC'yi içeren multiprotein kompleksi mutazom (mutasome) ya da DNA Pol V holoenzim olarak isimlendirilir (Rajagopalan et al., 1992; Tang et al., 1998; Tang et al., 1999; Sutton et al., 2000).



Şekil 2.2. *E.coli*'deki SOS cevabın moleküler mekanizması (Lehninger et al., 1993).



Şekil 2.3. SOS onarımın indüksiyonu (Goodman, 2002).

DNA hasarı giderilince indüklenmiş sinyal elimine olur ve *lexA* proteininin miktarı artmaya başlar ve SOS-cevap genleri tekrar baskılanır. SOS-cevabın indüklenmesi ile birlikte ifade edilen genler ve bunların DNA onarımındaki rolleri Çizelge 2.1.'de gösterilerek aşağıda anlatılmıştır.

***polB(dinA)* geni:** Hata oranı yüksek onarım (SOS onarım) için gerekli olan DNA polimeraz II'nin polimerizasyon alt birimini kodlar (Friedberg, 1985).

***uvrA* geni:** Bu genin ürünü olan UvrA proteini hem UV ile ışınlanmış hem de ışınlanmamış durumda tek zincirli ve çift zincirli DNA'ya bağlanabilmektedir (Friedberg, 1985).

***uvrB* geni:** Bu genin ürünü olan UvrB proteini, UvrA proteini ile birlikte olduğu zaman UV ile ışınlanmış DNA'ya daha fazla ve daha kolay bağlanabilmektedir.

Çizelge 2.1. SOS-cevabın indüklenmesi ile birlikte ifade edilen genler ve bunların DNA onarımındaki rolleri (Lehninger et al., 1993; Albert et al., 2006; Michael C., 2007).

Genin adı	DNA onarımındaki rolleri
Fonksiyonu bilinen genler <i>polB(dinA)</i>	DNA polimeraz II'nin polimerize edici alt birimini şifreler.
<i>uvrA</i>	ABC ekzinükleazı kodlar.
<i>uvrB</i>	
<i>uvrC</i>	
<i>ruvA</i>	Homolog rekombinasyonel proteinleridir.
<i>ruvB</i>	Holiday bağlantılarında görev yapar.
<i>ruvC</i>	
<i>umuC</i>	DNA polimeraz V'i şifreler.
<i>umuD</i>	
<i>sulA(sfiA)</i>	Hücre bölünmesini baskılayan proteini şifreler, olasılıkla DNA tamirine zaman kazandırır.
<i>recA</i>	Rekombinasyonel ve hata-eğilimli tamirler için gereken RecA proteinini şifreler.
<i>recF</i>	RecA'nın tek zincirli DNA üzerine yerleşmesine yardımcı olur.
<i>recD</i>	RecBCD'nin bir alt ünitesidir ve ekzonükleaz aktivitesi için gereklidir.
<i>recG</i>	Bir DNA helikazdır. Nokta mutasyonu inhibe eder.
<i>recX</i>	RecA filamentlerinin uzamasını durdurur.
<i>recO</i>	Tek ve çift zincirli DNA'ya bağlanır ve RecR ile kompleks oluşturur.
<i>recR</i>	RecA filamentlerinin kurulmasında ve kaldırılmasında düzenleyici proteindir.
<i>dinB</i>	DNA polimeraz IV'ü şifreler.
<i>dinI</i>	RecA filamentinin stabilizasyonunu sağlar.
<i>tral</i>	SOS-cevabı indükler, endonükleaz aktivitesi gösterir, rekombinasyonda rol oynar
DNA metabolizmasına katılan, fakat DNA tamirindeki rolleri bilinmeyen genler	
<i>ssb</i>	Tek zincirli DNA'ya bağlayan (SSB) proteini şifreler.
<i>uvrD</i>	DNA Helikaz II'yi şifreler. (DNA'yı çözen protein) RecA filamentlerinin ayrılmasında rol oynar.
<i>himA</i>	Yere-özümlü rekombinasyon, sentez, yer değiştirme ve gen ifadesinin düzenlenmesine katılan entegrasyon konak faktörünün alt birimini şifreler.
<i>recN</i>	Rekombinasyonel tamir için gereklidir.
İşlevi bilinmeyen genler <i>dinD</i> <i>dinF</i> <i>psiB</i> <i>rdgC</i>	

uvrC geni: Bu genin ürünü olan UvrC proteini diğer Uvr proteinlerinin yokluğunda tek zincirli DNA'ya bağlanır (Walker, 1984; 1985).

UvrA, UvrB ve UvrC proteinlerinin bir araya gelmesiyle uvrABC ekzinükleaz enzimi oluşur. UvrA proteini ilk olarak fazla miktarda baz hasarı içeren DNA'ya özgül olmayan bir bölgeden bağlanır ve daha sonra UvrB proteini UvrA proteini ile birleşir ve oluşan uvrAB kompleksi hasar bölgelerini kapatır. uvrAB kompleksi DNA ile kararlı bir ilişki kurar ve UvrC proteininin varlığında uvrABC ekzinükleaz kompleksi oluşur. uvrABC ekzinükleaz enzimi, DNA'daki hasarlı bölgeye bağlanarak prokaryotlarda DNA'nın 5'ucundan 8 baz, 3'ucundan ise 4 baz olmak üzere yaklaşık 12 bazlık hasarlı bölgeyi DNA'dan uzaklaştırır (Friedberg, 1985).

ruvA, ruvB ve ruvC genleri: Bu genlerin ürünleri olan RuvA, RuvB ve RuvC proteinleri, homolog rekombinasyonel proteinleridir. Holiday bağlantılarında görev alır (Foster et al., 1996; Harris et al., 1996). Bu proteinlerin stresle indüklenmiş mutagenesisde, gerekli olduğu gösterilmiştir (Albert et al., 2006).

tral geni: Bu genin ürünü olan Tral proteini endonükleaz görevi yapar. Konjugal plazmid üzerinde, tek zincire nik atar ve SOS indüksiyonunu uyarır (Byrd et al., 2002; Galitski et al., 1995; Foster et al., 1995). SOS indüksiyonu sırasında gerekli bir protein olduğu gösterilmiştir (Albert et al., 2006).

sfiA (sula) geni: DNA onarımı için hücreye zaman kazandırmak amacıyla hücre bölünmesini inhibe eden proteinleri kodlar. Hücre büyüyerek uzar fakat bölünmez (Walker, 1984; 1985).

recA geni: Homolog rekombinasyon, homolog rekombinasyonel onarım ve SOS onarımı için gerekli olan RecA proteinini kodlar. RecA proteini 37000 Da molekül ağırlığındadır. DNA hasarının oluşması ve SOS-cevabın indüklenmesiyle birlikte RecA proteini aktive olarak lexA proteininin proteolitik olarak kendi kendine yıkımını uyarır, koprotez görevi yapmaktadır. RecA'nın aktivasyonu için tek zincirli (ssDNA) bölgeleri gereklidir (Craig and Roberts, 1980). ssDNA'ya bağlandığında, RecA helikal multimerik nükleoprotein filamenti halini alır, bu yapısı hücredeki aktivitelerinde önemli rol oynar (Friedberg, Walker and Siede, 1995).

ssb geni: Bu gen tek zincirli DNA'ya bağlanan SSB proteinini kodlar. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalar, SSB'nin recA proteininin tek zincirli DNA'ya bağlanmasını hızlandırdığını göstermiştir (Flory and Rodding, 1982). SSB'nin SOS cevabın indüksiyonundaki asıl rolü recA proteininin aktivasyonunda görev almasıdır (Whittier and Chase, 1983; Lieberman and Witkin, 1983).

uvrD geni: Bu genin ürünü olan DNA Helikaz II proteini çift iplikli DNA sarmalının açılımını katalizler. RecA filamentlerinin ayrılmasında rol oynar (Lovett et al., 1995; Mendonca et al., 1993; Morel et al., 1993; Petranovic et al., 2001).

himA geni: Bölgeye özgül rekombinasyona katılan proteinin alt birimini kodlar.

recN geni: Rekombinasyonel DNA onarımında görev alır (Walker, 1984).

recF geni: Bu genin ürünü olan RecF proteini, DNA'daki tek zincir boşlukları üzerine RecA'nın direkt olarak bağlanmasını yaptığı öne sürülmektedir (Hegde et al., 1996; Morimatsu et al., 2003). Stress ile indüklenmiş mutasyonda rekombinasyonda gerekli olduğu gösterilmiştir (Albert et al., 2006).

recO geni: Bu genin ürünü olan RecO proteini, tek ve çift zincir kırıklı DNA'ya bağlanır ve RecR ile kompleks oluşturur (Luisi-DeLuca, 1995; Luisi-DeLuca et al., 1994; Umezu et al., 1993; Umezu et al., 1994).

recR geni: Bu genin ürünü olan RecR proteini, RecA filamentlerinin kurulmasında ve kaldırılmasında düzenleyici bir rol oynar (Shan et al., 1997).

recX geni: Bu genin ürünü olan RecX proteini, RecA filamentlerinin uzamasını durdurur (Drees et al., 2004).

recD geni: Bu genin ürünü olan RecD proteini, rekombinasyon enzimi RecBCD'nin bir alt ünitesidir. RecBCD nin ekzonükleaz aktivitesi için gereklidir (Taylor et al., 2003; Dillingham et al., 2003; Jockovich et al., 2001). Stresle indüklenmiş mutasyonu ve ayrıca nokta mutasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (Albert et al., 2006).

recG geni: Bu genin ürünü olan RecG bir DNA helikazdır (Whitby et al., 1998). Nokta mutasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (Albert et al., 2006).

dinB: DNA polimeraz IV'ü şifreler.

dinD*, *dinF genleri hasarla indüklenen genler olup fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir.

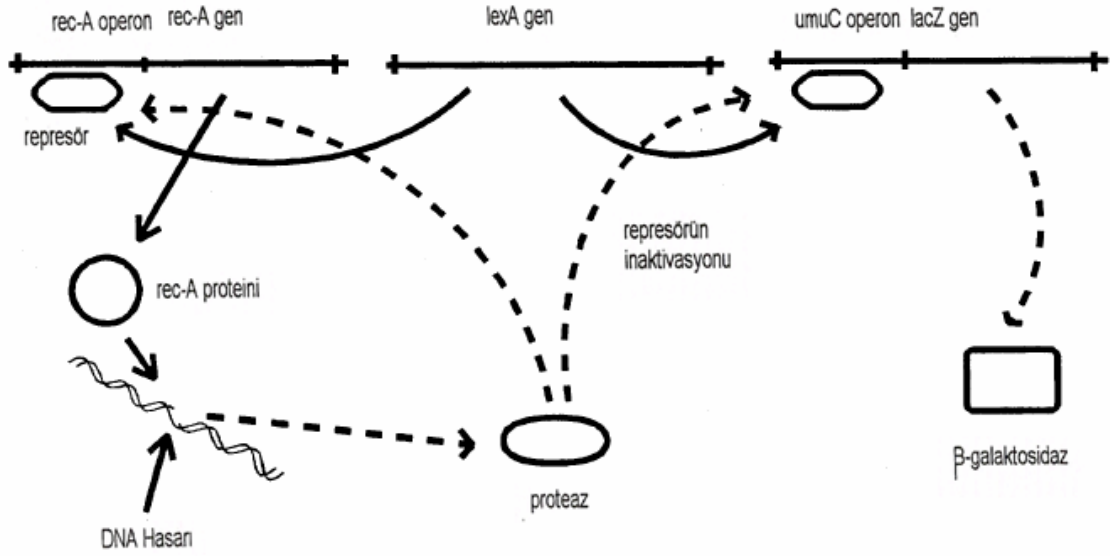
dinI: Rec A filamentinin stabilizasyonunu sağlar (Lusetti et al., 2004).

***psiB* ve *rdgC* genleri**: Bu genlerin ürünü olan PsiB ve RdgC proteinleri Rec A'nın aktivitesini bastırdığı yönünde çalışmalar devam etmektedir (Bagdasarian et al., 1992; Bailone et al., 1988; Moore et al., 2003; Ryder et al., 1996).

***lexA* geni**: SOS genlerinin represörü olan 22700 Da molekül ağırlığındaki *lexA* proteinini kodlar. *LexA* proteini genlerin promotörü yanındaki SOS kutuları denilen operatör bölgelere bağlanan represör bir proteindir ve RNA polimerazın bağlanmasını engeller (Brent and Ptashne, 1981; Little and Mount, 1982; Walker, 1984). SOS genlerinin birçoğu *lexA* için tek bir bağlanma bölgesi taşırken, *lexA* geni ve *umuDC* genleri birbirine bitişik iki *lexA* bağlanma bölgesi taşımaktadır. SOS-cevap genlerinin, *lexA* bağlanma bölgeleri arasında belirgin bir homoloji vardır. Birçok SOS cevap geni baskılanmış durumda iken de belirli bir düzeyde ifade edilir. (Walker, 1984). *LexA* tarafından düzenlenen genler vardır. Bunlardan *ysdAB*, *dinQ*, *ydjM*, *ydfE*, *yjiW* (*sosC* ya da *dinC* olarak da bilinir), *hokE*, *dinS* genlerinin fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir. Diğer genlerden olan *ydjQ* (*sosD* ya da *dinM* olarak da bilinir) ekzonükleaz aktivitesi gösterir. *molR* (*sosF* ya da *dinO* olarak da bilinir) molibdat regülatörü olarak görev yapar (Fernandez De Henestrosa et al., 2000).

***umuD* ve *umuC* genleri**: SOS onarım için gerekli olan 16000 Da molekül ağırlığındaki *UmuD* ve 45000 Da molekül ağırlığındaki *UmuC* proteinini kodlar (Walker, 1985). *umuD* ve *umuC* genleri UV ve kimyasal mutajenler tarafından indüklenmiş SOS onarım için gereklidir. *UmuD* ve *UmuC* proteinleri, *RecA* ve *SSB* proteinlerine bağlanarak üçlü bir kompleks yapar. Bu kompleks SOS replikasyonunu yapabilmektedir (Sedgwick and Goodwin, 1985; Little et al., 1989; Moran et al., 1994). *umuD*'₂*C*' nin kodladığı polimeraz enzimi DNA pol V olarak adlandırılmakta ve hata eğilimli onarımı katalizlemektedir (Sutton et al., 2000).

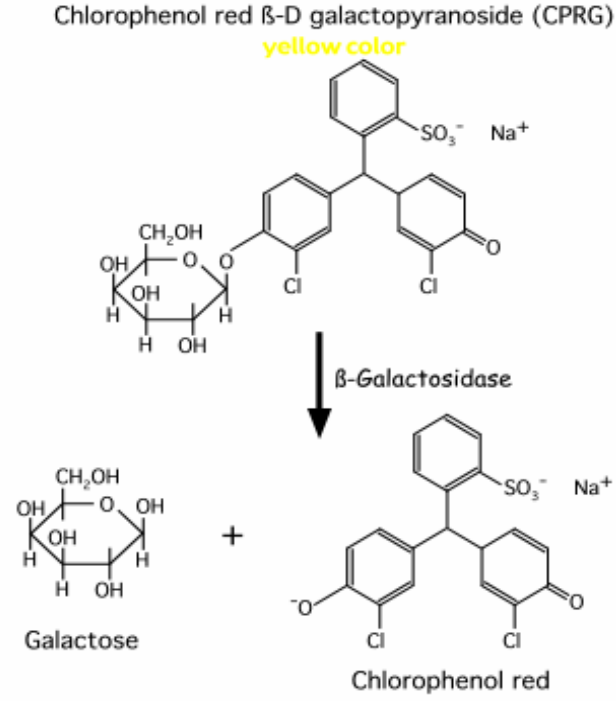
Umu test sisteminde, mutajen ve karsinojenleri taramak amacıyla umuC'-lacZ füzyonundan yararlanılmıştır (Oda et al. ,1985). Çünkü umu operonunun mutagenez olayında, diğer bilinen SOS genlerinden daha etkili bir biçimde rol aldığı düşünülmektedir (Kato and Shinura, 1977). Bu amaçla Shinagawa ve arkadaşları (1983), umu test sisteminin plazmidal haberci genini oluşturmuştur. UmuC'-lacZ füzyon geni adı verilen bu haberci gen SOS-cevap genlerinden biri olan umuC geninin operatör dizisini ve buna füzyon yapmış lacZ yapısal genini taşımaktadır. Bu füzyon geninde, umu operonu DNA hasarı yapan ajanlar tarafından indüklenmekte ve genetik olarak recA ve lexA genleri tarafından kontrol edilmektedir (Oda et.al., 1985). Test edilen kimyasalların genotoksik etki yapıp yapmadıkları, oluşturulan füzyon geninin ifade edilmesi sonucu sentezlenen β -galaktosidaz (β -gal) enzim miktarının saptanması ile belirlenir. Bu mekanizma Şekil 2.4.'de gösterilmiştir.



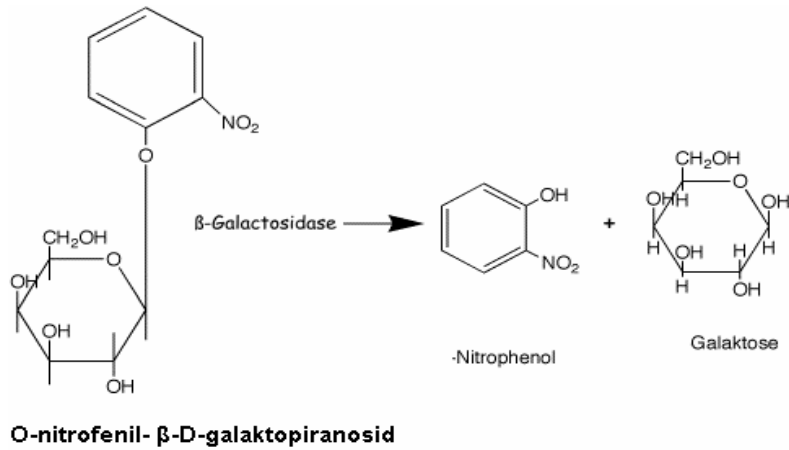
Şekil 2.4. Umu test sisteminin moleküler düzeyde mekanizması.

β -gal enziminin aktivitesi saptanırken substrat olarak ONPG ve CPRG'den biri kullanılır. β -gal, β -D-galaktosidleri hidroliz eden bir enzimdir. Bu enzimin aktivitesi ONPG ya da CPRG gibi substratların hidrolizi ile oluşan renkli ürünlerin spektrofotometrik olarak okunmasıyla kolaylıkla saptanabilir. β -gal, ONPG'yi galaktoz ve O-nitrofenol'e, CPRG'yi ise galaktoz ve klorofenol red'e dönüştürür. Oluşan O-nitrofenol sarı renktedir ve 415 nm'de absorbanans verir, klorofenol red

ise kırmızı renktedir ve 570 nm'de absorbans verir (<http://rothlab.ucdavis.edu/protocols/beta-galactosidase>).



Şekil 2.5. CPRG substratının β -gal ile hidrolizi ve oluşan ürünler.



Şekil 2.6. ONPG substratının β -gal ile hidrolizi ve oluşan ürünler.

2.2.1. Umu-mikroplak test sistemi

Umu-mikroplak test sistemi mikro plaklar kullanılarak uygulanan, umu test sisteminin bir versiyonudur ve Reifferscheid ve arkadaşlarının (1991) metodundan modifiye edilmiştir. Bu sistem, çok az miktarlardaki dezenfektanlar, kompleks karışımlar, endüstriyel atık suları, gıda maddeleri gibi pek çok maddenin genotoksik aktivitelerini son derece hızlı ve hassas bir biçimde saptamak amacıyla kullanılmaktadır (Oda et al., 2004).

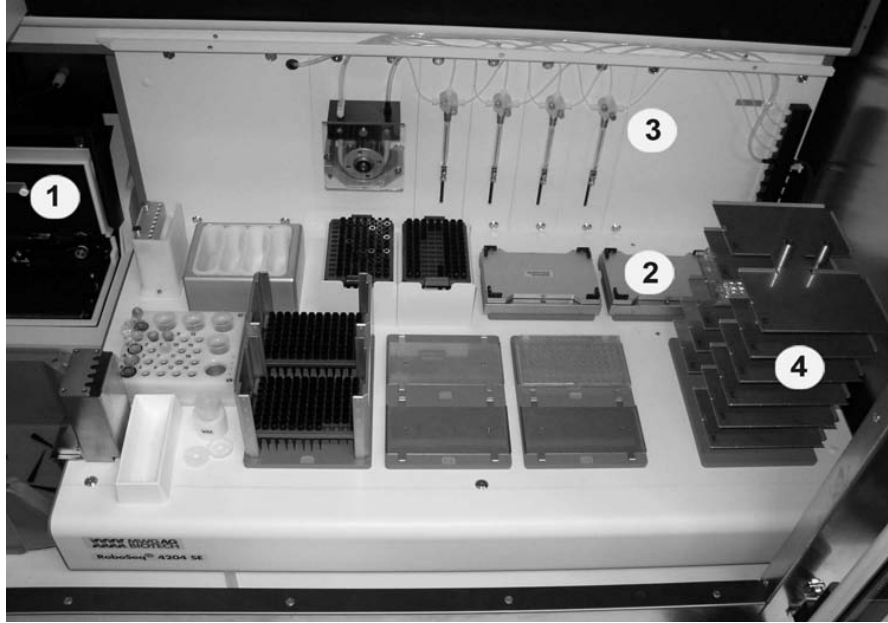
Bu indikatör test sistemlerinin bazı sınırlamaları da vardır. Gen indüksiyonunun ölçümü, genotoksinlerin özelliği, atak yapılan nükleotidler ya da DNA hasarlarının hangi dizilerde olduğu gibi konularda bilgi veremezler (Reifferscheid et al., 2005). Mutajen kimyasalların hepsi SOS indükleyicileri olmayabilirler. Örneğin, Mersch-Sundermann ve arkadaşları (1994) çalışmalarında, Salmonella mikrozom testinde mutajen bulunan 210 kimyasaldan 45'inin SOS onarımı indüklediğini gözlemişlerdir. Bu arada umu-test sisteminin nitro arenlere duyarlı olacak biçimde geliştirildiği unutulmamalıdır.

Umu-mikroplak test sistemi ile genotoksisite saptanırken, uygulamada pek çok avantajın sağlandığı bilinmektedir. Bu avantajlar şu şekilde sıralanabilir;

1. Test 2-3 saat içinde tamamlanır.
2. Sonuçlar mikroplak kuyucuklarında oluşan rengin okunması ile elde edilir. Bu renk uzun bir süre değişmeden kalır ve plaklar buzdolabında ya da derin dondurucuda daha sonraki analizler için saklanabilir.
3. Aromatik amin ve nitroarenlerin çok küçük miktarlarında dahi genotoksik aktivite saptanabilir.
4. Test sisteminde steril olmayan test materyali kullanılır.
5. Test sisteminin uygulanması oldukça kolaydır (Giuliani et al., 1996).

Çok az sayıdaki biyolojik assay sistemi otomasyona uygunluk gösterir, umu-mikroplak test sistemi otomasyona uygundur. Robotik test sistemleri geliştirilerek az miktarlardaki çok sayıda örneğin kısa sürede, hızlı ve kolay olarak taranmasına olanak sağlanmaktadır. Otomatik umu-mikroplak test sistemi (Şekil 2.7.), bir kabin içine robot platform ve mikroplak okuyucu yüklenerek oluşturulmuştur. Test

yazılımı kontrollü, standart izleme ve uygulamanın kriterlerini yerine getirmektedir (Brinkmann and Eisentraeger, 2008).



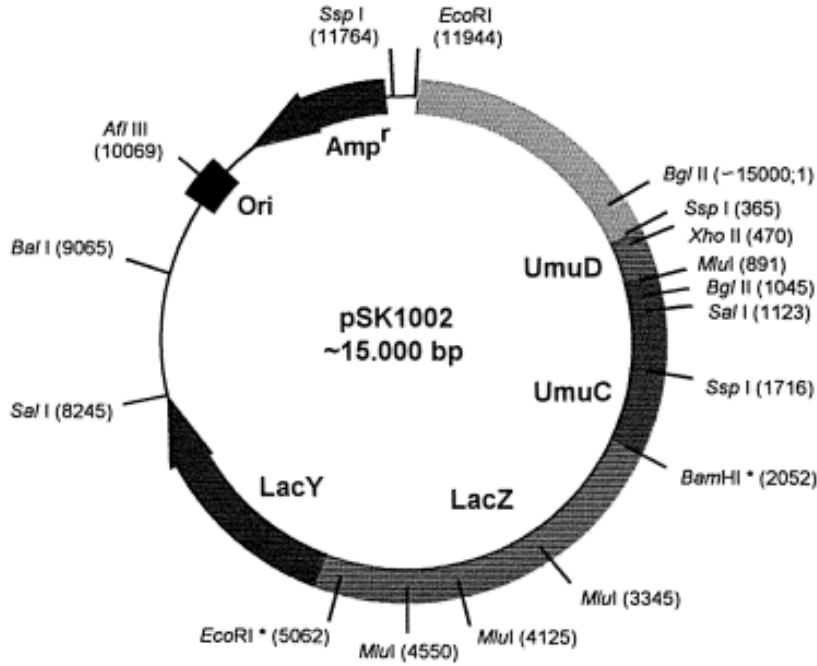
Şekil 2.7. Robotik umu test platformu. (1) Mikroplak okuyucu, (2) çalkalayıcı, (3) pipetler, (4) mikroplak kabinleri.

Son yıllarda, β -gal aktivitesinin mikrobiyal array çipler kullanılarak elektrokimyasal olarak saptanması yaygınlaşmış ve büyük bir ilgi alanı olmuştur. Bu yöntem hem daha kısa sürede sonuç vermekte hem de real-time görüntülemeye olanak sağlamaktadır (Matsui et al., 2006).

2.2.2. Umu test sisteminde kullanılan suşlar

Umu test sisteminde kullanılan bakteri suşlarının hepsi umuC'-lacZ füzyonunu taşıyan pSK1002 plazmidini içermektedir. pSK1002 plazmid (Şekil 2.8.), β -gal aktivitesini içeren hibrit bir proteini kodlar. Umu test sisteminde atasal suş oluşturmak için bu plazmid *S. typhimurium* TA1535 içine yerleştirilmiştir (Oda et al., 1985).

pSK1002



Şekil 2.8. pSK1002 plazmidini.

S. typhimurium TA1535 suşu, testin duyarlılığını artıracak bazı üstün özellikler taşımaktadır. Bunlar;

1. Bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit tabakasını kodlayan genlerinde rfa mutasyonu taşımaktadır. Bu özellik, hücre duvarında lipopolisakkarit tabakanın kısmen yok olmasına neden olduğu için birçok kimyasal için daha kolay geçirgenlik sağlamaktadır (Ames et al., 1975, Maron and Ames, 1983).
2. DNA onarım sisteminde kesip çıkarma görevini üstlenen enzimin alt birimlerinden birini kodlayan uvrB genindeki delesyon sonucu oluşan uvrB mutasyonunu taşımaktadır. Bu da, birçok mutajenin ortaya çıkarılmasında duyarlılığın artmasına neden olur (Maron and Ames, 1983).
3. Bu mutasyonlara ek olarak, β -gal enziminin ifadesinden sorumlu olan laktoz operonunda doğal bir delesyon taşımaktadır. Bu nedenle ölçülen β -gal aktivitesi kesinlikle füzyonda kullanılan genin ifadesine bağlıdır, böylece umu operonunun ifade edilme düzeyinin saptanmasına olanak sağlar.

Tehlikeli kimyasallar sınıfından olan nitroarenler ve aromatik aminlerden bazılarının hayvan deneylerinde karsinojeniteye neden oldukları ve bakteriyel testlerde de güçlü mutajen oldukları bilinmektedir (Rosenkranz and Mermelstein, 1983; Tokiwa and Ohnishi, 1986). Bu nitroarenlerin SOS-cevabı temel alan test sistemlerinde, diğer bakteriyel test sistemlerine göre daha zayıf bir genotoksik etki meydana getirdiği görülmüştür. Bu nedenle, nitrolu bileşiklere karşı umu testinin duyarlılığını artırmak için çeşitli test suşları geliştirilmiştir.

Test suşları geliştirilirken, nitrolu bileşiklerin mutajenik hale gelme mekanizmalarında etkili olan reaksiyon basamakları göz önünde bulundurulmuştur. Pek çok kimyasal karsinojen gibi bu bileşikler de mutajenik ve karsinojenik etkilerini göstermek için enzimlerce aktive olmaya ihtiyaç duymaktadırlar (Østergaard et al., 2007). Nitrolu bileşiklerin pek çoğunun genotoksik etkilerini gösterebilmeleri için bakteriyel bir nitroredüktaza (NR) gereksinimleri vardır (Maeda et al., 2007). Bu durum, umu test sistemi ile nitrolu bileşiklerin mutajenik aktivitelerini saptamak için yüksek NR aktivitesi gösteren suşların oluşturulmasını gündeme getirmiştir (Oda et al., 1992). Çünkü bakteriyel NR'lar nitrolu bileşikleri reaktif olan arilhidroksilamin ara metabolitlerine indirgerler ve onları daha mutajenik hale getirirler (Rosenkranz et al., 1980; McCoy et al., 1981; Rosenkranz and Mermelstein, 1983).

Umu testini nitroarenlere karşı daha duyarlı hale getirmek amacıyla oluşturulan ilk suş *S.typhimurium* NM1011'dir. Bu suş, yüksek NR aktivitesi gösterir. NR geninin pACYC184 plazmidi içerisine yerleştirilmesiyle oluşturulan pNM11 plazmidi, *S.typhimurium* TA1535/pSK1002 atasal suşu içerisine yerleştirilerek atasal suşa oranla nitroarenlere karşı daha duyarlı olan NM1011 suşu oluşturulmuştur (Oda et al., 1992). Bu suşun umuC genini indüklemeye açısından duyarlılığı, NR geni hatalı olan *S.typhimurium* NM1000 suşu ile mukayese edilerek anlaşılmıştır. NM1000 suşu *S.typhimurium* TA1535/pSK1002 atasal suşu ile aynı özellikleri taşır, ancak klasik nitroredüktaz geni hatalıdır.

Pek çok durumda, arilhidroksilamin ara metabolitlerine indirgenen nitrolu bileşikler daha sonra asetiltransferaz enzimlerinin (örneğin O-asetiltransferaz=O-AT) aktivitesiyle daha kuvvetli reaktif elektrofillelere yani bakteri ve memeli hücre sistemlerindeki son reaktif elektrofil hallerine dönüşürler (Einisto, 1991; Emig et al., 1996). Dolayısıyla NR ve O-AT enzimleri, nitrolu bileşiklerin mutajenik

aktivitesindeki anahtar basamakları katalizlerler. Bu basamak da göz önünde bulundurularak umu test sistemi için geliştirilen diğer bir suş *S.typhimurium* NM2009'dur. Normalin üzerinde O-AT aktivitesi gösterir. O-AT geninin pACYC184 plazmidi içerisine yerleştirilmesiyle oluşan pNM12 plazmidinin, *S.typhimurium* TA1535/pSK1002 atasal suşu içerisine yerleştirilmesiyle oluşturulmuştur (Oda et al., 1995). Bu suşun umuC genini indüklemeye açısından hassasiyeti ise, O-AT geni hatalı olan *S.typhimurium* NM2000 suşu ile mukayese edilerek anlaşılmıştır. *S.typhimurium* NM2000 suşu da *S.typhimurium* TA1535/pSK1002 atasal suşu ile aynı özellikleri taşır, ancak O-asetiltransferaz geni hatalıdır (Oda et al., 1995).

Plazmidlerinde enzim genlerinin çoklu kopyasını taşıyan suşlarda yüksek düzeyde enzim ifade edilmiştir ve böylece bu suşlar nitroarenlere karşı daha yüksek bir hassasiyet göstermişlerdir (Josephy et al., 1997). Nitrolu bileşiklerin metabolizması için gerekli enzimleri yüksek düzeyde ifade edilen suşlarla enzim genlerinde hata taşıyan suşların bir araya getirilmesiyle yapılan çalışmalar, kompleks karışımlardaki mutajenik özelliklerin tanımlanması ve metabolik aktivasyon mekanizmalarının değerlendirilmesi açısından önemli veriler sağlamaktadır (Josephy et al., 1997). Oda ve arkadaşları, insanlarda bulunan N-asetiltransferaz 1 ve N-asetiltransferaz 2 enzimlerini ifade eden *S.typhimurium* 6001 ve *S.typhimurium* 6002 suşlarını geliştirerek farklı kimyasalların genotoksitelerini değerlendirmede kullanmışlardır (Oda et al., 2006; 2008). Bu kimyasalların insanlardaki enzimlerle metabolize olmalarını da dikkate almışlardır ve böylece daha iyi genellemeler yapılabilmektedir.

Umu test sisteminde kullanılan suşlar ve onların oluşturulmasında kullanılan bakteri ve plazmidlerin özellikleri Çizelge 2.2.'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.2. Umu test sisteminde kullanılan bakteriler ve içerdikleri plazmidler (Oda et al., 1993).

Bakteri ve Plazmidler	Özellikleri
<i>S.typhimurium</i>	
SJ10002	<i>metA, metE, ilv, xyl, strA, hspLT, hspS, galE</i>
TA1535	<i>hisG46, gal, del (chl, uvrB, bio), rfa</i>
TA1535NR	TA1535 gibi, fakat klasik nitroredüktaz geni hatalı
TA1535/1,8-DNP	TA1535 gibi, fakat O-asetiltransferaz geni hatalı
TA1535/pSK1002	TA1535 gibi, fakat pSK1002 plazmidini taşır
NM1000	TA1535/pSK1002 gibi, fakat klasik nitroredüktaz geni hatalı
Nm1011	TA1535/pSK1002/pNM11: NR enzimini normalin üzerinde ifade eder
NM2000	TA1535/pSK1002 gibi, fakat O-asetiltransferaz geni hatalı
NM2009	TA1535/pSK1002/pNM12: O-AT enzimini normalin üzerinde ifade eder
NM3009	TA1535/pSK1002/pNM13: O-AT ve NR enzimlerini normalin üzerinde ifade eder
Plazmid	
pSK1002	umuD ⁺ -umuC ⁻ -lacZ, Amp ^r
pYG122	pBR322'nin BamHI bölgesine TA1538 kromozom DNA'sının 7.3-kb'lık fragmenti yerleştirilmiştir.
pYG220	Bluescript KSM13'ün BamHI bölgesine TA1538 kromozom DNA'sının 3.65-kb'lık fragmenti yerleştirilmiştir.
pYG221	Bluescript KSM13 gibi fakat pYG122'nin BamHI (7.75-kb) ve EcoRV (6.5-kb) arasına 1.35-kb'lık DNA fragmenti yerleştirilmiştir.
pACYC184	Tet ^r , Cm ^r
pNM11	pACYC184 gibi, fakat tetrasiklin geninin BamHI bölgesine 3.65 kb'lık bir fragment yerleştirilmiştir.
pNM12	pACYC184 gibi, fakat tetrasiklin geninin BamHI-EcoRI bölgesine 1.35 kb'lık bir fragment yerleştirilmiştir.
pNM13	pNM12 gibi, fakat tetrasiklin geninin BamHI bölgesine 3.65 kb'lık bir fragment yerleştirilmiştir.

2.3. Genotoksisite Testleri ve İlaçlar

Genotoksisite testleri, ilaçların sentezleri ve geliştirilmelerinde düzenleyici ve tamamlayıcıdır. Bir ilacın geliştirilme sürecinde yapılan parasal yatırım ilk sentezinden ruhsatlanma dönemine kadarki süreçte katlanarak büyümektedir (Purves et al., 1995). İlaç geliştirme sürecindeki eski değerlendirmeler teknolojinin gelişmesiyle değişmektedir. Çok sayı ve çeşitte moleküller, kombinasyonel kimya ile kısa sürede sentezlenmekte ve bunların güvenlik değerlendirmeleri yapılırken kullanılan yüksek verimli taramalarda işe karışan biyolojik assaylerin hızları ve alanları gittikçe artmaktadır (Kennedy, 1997; Jena et al., 2002). İlaç güvenlik değerlendirmelerinin başlıca amacı, insan sağlığı açısından risk değerlendirmelerinde kullanılacak, toksisiteyi gösteren biyolojik verileri öğrenmektir. Bu bilgilerin de yardımıyla, yeni ilaçların potansiyel risk ve faydaları dikkatlice gözden geçirilerek, eğer faydaları risk ve yan etkilerinden ağır basarsa ilaçların terapötik ajan olarak kullanılmasına karar verilir (Nath and Krishna, 1998; Eaton and Klaassen, 1996; Jena et al., 2002). Yeni molekülün toksisite değerlendirmesi, ilacın erken geliştirme sürecindeki farmakolojik etki değerlendirmesiyle paralel olarak yürütülür. Erken dönemde elde edilen olumsuz toksikolojik veriler, ilaç geliştirme sürecindeki gereksiz aktivitelerden ve etkililiği artırma çalışmalarından kaçınmayı sağlayarak, gereksiz harcamaları azaltır. Ciddi biyolojik yan etkilerin saptanması, ilacın geliştirilmesini durdurmak ya da ilacın temel kimyasal yapısına dönerek yeniden değişiklikler yapmakla sonuçlanabilir (Jena et al., 2002).

Genotoksisite testleri yeni kimyasal maddelerin neden oldukları DNA hasarına bakılarak, tehlikenin saptanması için kullanılırlar. Bu hasarlar gen mutasyonları, yapısal kromozomal bozukluklar ve rekombinasyon gibi sayısız değişikliklere neden olabilirler. Bunlar eşeyssel hücrelerde kalıtsal etkilerden sorumludur ve gelecek nesiller için de risk taşır. Buna ek olarak, somatik mutasyonların da malignanside önemli rol oynayabileceği bilinmektedir. Genotoksisite testleri özellikle karsinojenitenin ve genotoksisitenin tahmini için kullanılmaktadırlar. Bu testlerde pozitif sonuç veren kimyasallar, insanlarda karsinojen ve/ya da mutajen olma potansiyeline sahiptirler (Jena et al., 2002).

Son 15 yıl boyunca, birçok ülke yeni ilaçların genotoksisite testleri hakkında bir takım yönergeler yayınlamışlardır. Değişik düzenleyici otoriteler tarafından en çok önerilen yöntem uygulamada üçlü ya da dördü batarya test sistemlerinin (three or four-test battery) kullanılmasıdır (Cartwright and Mathews, 1994; Jena et al., 2002; Lorge et al., 2007; Brambilla and Martelli, 2009). Batarya test sistemleri; bakteride bir gen mutasyonu, memeli hücrelerinde in vitro kromozom bozukluğu, ökaryotik hücrelerde in vitro gen mutasyonu ve bir in vivo genetik hasar testi gibi karışık testleri içermektedir. Yeni kimyasalın mutajenik potansiyeli hakkında geniş kapsamlı bir yorum yapabilmek için, gen, kromozom ve genom olmak üzere 3 kademedeki bilgiye gereksinim duyulmaktadır (Shelby, 1988; Lorge et al., 2007). Batarya test sistemlerindeki testlerin hepsinde negatif sonuç veren kimyasallar genotoksisite testini geçmiş olmaktadır. Ancak bu testlerden farklı sonuçlar elde edilirse daha ileri ve yeni deneyler önerilmektedir (Thybaud et al., 2007). Bazı durumlarda bu standart batarya test sistemleri de yetersiz kalabilmektedir.

İnsan hücre kültürleri kullanılarak da ilaçların toksik etkileri araştırılabilir (Scrivens and Bhogal, 2007). İn vitro genotoksisite testlerinin ana problemi, kullanılan hücre tipinde ilaç metabolize eden enzimlerin eksikliği ya da azlığıdır. Bu durum yanlış sonuçlara neden olabilir. Metabolik aktivasyon gerektiren kimyasalları test ederken bu duruma dikkat edilmelidir. İnsan hücre hatlarının kullanılması daha hassas sonuçlara ulaşılmasını sağlayabilir (Winter et al., 2008). Genotoksik maddelerin metabolik aktivasyonlarının belirlenmesinde, maya hücrelerinde RAD51 promotoruna lusiferaz geni bağlayarak yeni bir sistem geliştirmişlerdir (Liu et al., 2008).

Bunun da ötesinde, ilaçların vücutta nasıl yıkıldıkları ve buna bağlı olarak aynı ilaca verilen bireysel yanıtların mekanizmaları araştırılabilir. Çeşitli insan doku kültürlerinin geliştirilme çabaları yakın gelecekte çözüm olarak önerilse de, in vitro testlerin yine de sistemik toksisiteyi araştırmakta yetersiz kalabileceği, bu nedenle in vitro testlerin ancak in vivo testler için bir ön tarama testi olarak kabul edilmeleri gerektiği şeklinde tartışmalar sürmektedir (Saygı, 2003).

Genotoksisite testleri, yeni ilaçların ön klinik değerlendirmesinin önemli bir parçasıdır. Testler faz 1, faz 2 klinik çalışmalar için gereklidir ve gen mutasyonları,

kromozomal anomalilikler gibi genetik hasarların belirlenmesine yönelik dizayn edilmiştir (Wu et. al , 2009).

Doğada reaktif olarak bulunan ve tam saf olmayan başlangıç ve ara maddeler ilaç sentezinde ilaç etken maddesi olarak kullanılırken, ilaç sentezinin güvenli ön klinik çalışmaları ve klinik deneyleri için kullanılır. Ayrıca bu maddelerin karsinojen ya da mutajen olup olmadıklarından şüphelenilebilir. Bunun için, yeni ilaç geliştirilmesi sırasında, kullanılan bu maddelerin karsinojen mi mutajen mi olduklarını anlamak için iki yönden bakmaya gereksinim vardır. Birincisi, sentez için kullanılan kimyasalların mutajenite ve karsinojenite risk potansiyellerinin belirlenmesi, ikincisi ise ilaç etken maddelerindeki genotoksik kirliliği kontrol etmek için uygulanan sentetik proseslerin yeterliliğidir (Dobo et al., 2006).

Bir ilacı geliştirmekten daha önemlisi, risk oluşturacağı düşünülen herhangi bir pozitif genetik toksikoloji mekanizmasının varlığının anlaşılmasıdır. Pek çok pozitif genotoksik sonuç, gerçek ilaç-DNA etkileşiminden ziyade, bir dizi sitotoksik olay sonucunda yapay olarak meydana gelebilir. Örneğin; sitotoksisite lizozomal bir hasar sonucu DNA endonükleazların salınımıyla, ATP'nin tüketimi ya da mitokondriyal fonksiyonların yitilmesi sonucu olabilir (Synder and Green, 2001). Genotoksisite ve rodent karsinojenitesi insan karsinojenitesinde artan bir risk teşkil etmektedir. İlaçlar tarafından indüklenen sitotoksisite ve genotoksisite, doz ve tedavi süresinin doğru seçilmesiyle sınırlandırılabilir, bu da hastanın yaşam kalitesini olumlu yönde etkileyecektir.

2.4. Nitrolu Aromatik Bileşikler

Doğal olarak meydana gelen nitrolu bileşiklerin sayısı çok azdır. Bunların ilk tanımlananı olan kloramfenikol, *Streptomyces venezuelae*'den ekstrakte edilmiştir (1949). Nitrofuran türevi bu bileşiğin antibakteriyel aktivitesinin keşfi, araştırmacıları nitro grubunun farmakolojik aktivitedeki rolü üzerinde çalışmaya yönlendirmiştir (Chung et al., 1997). Birçok bileşiğin yapılarındaki nitro grubunun, bu bileşiklerin antiviral ve antibakteriyel aktivitelerini olumlu yönde etkilediği rapor edilmiştir (Khalili et al., 2003; Allen et al., 1989). Nitro grubu taşıyan bileşikler ilaçların geliştirilmesinde önemlidirler çünkü bu bileşiklerin farmakolojik etkilerinin,

sahip oldukları bazı elektrokimyasal özelliklerinden (örneğin redüksiyon potansiyeli gibi) kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Brain-Isasi et al., 2008).

NO₂, doğada başlı başına bir kirleticidir. İn vivoda sitotoksik olmasına karşın genetik materyal üzerinde çok az etkili olduğu görülmüştür (Hine et. al., 1970; Inoue et. al., 1981). Isomura ve arkadaşları (1984) ve Kosaka ve arkadaşları (1985) *S.typhimurium* TA100 ve *S.typhimurium* umuC'-lacZ füzyonu taşıyan suşları ile yaptıkları genotoksisite testleri sonucu nitrolu aromatik bileşiklerin fonksiyonel grubu olan NO₂'nin mutajen olduğunu saptamışlardır. Diğer taraftan nitrolu aromatik bileşiklerin, nitro grubu fotodekompozisyona uğratılarak ana bileşikten ayrılabilen ve nitro grubunun ayrılması ile mutajenite kaybı görülebilmektedir (Stark et. al., 1985).

Gıda maddelerinden (Preussmann et al., 1979), çevreden (Krull et al., 1979; Hoffman et al., 1979), ilaç ve nitrit etkileşimlerinden (Lijinsky et al., 1980) elde edilen 130'dan fazla nitrolu bileşik ile yapılan çalışmalar, bu maddelerin %80'inin laboratuvar hayvanlarında karsinojenik olduğunu göstermiştir (Brambilla and Martelli, 2007). Tüm bu bulgular, nitrolu bileşiklerin insanlarda da karsinojenik etki gösterebileceğini akla getirmektedir. Uluslararası Kanser Araştırmaları Kuruluşu (IARC), nitrolu bileşiklerden dört tanesini insanlarda büyük olasılıkla karsinojen, on beş tanesini de olası karsinojen olarak sınıflandırmıştır (IARC, 1987).

Nitrolu aromatik bileşiklerin mutajeniteleri ile ilgili olarak *S.typhimurium* suşları ile pek çok çalışma yapılmıştır. Tokiwa ve Ohnishi (1986) yaptıkları derlemede bu çalışmaların verilerini değerlendirilerek bir takım sonuçlar elde etmişlerdir. Bunlar şu şekilde sıralanabilir:

1. Nitroarenlerin köken aldığı PAH'ların halka sayısı mutasyon tipini ve mutajenite potansiyelini etkilemektedir. Örneğin; bisiklik arenler (1-, 2-nitronaftalen) baz çifti mutasyonuna neden olurlarken, 3 ya da daha fazla halka içeren arenler çerçeve kayması mutasyonuna neden olurlar.

2. Nitroarenlerin yapısındaki nitro grubunun pozisyonu ve sayısı nitroarenin mutajenik potansiyelini etkiler. Örneğin, di-, tri-, tetra- nitroarenler mono

nitroarenlere oranla, para (p-) nitroarenler meta (m-) ve orto (o-) nitroarenlere oranla daha fazla mutajendirler.

3. Nitroarenlerin mutajenik potansiyelleri NR aktivitesiyle değişir. NR enzimi ile indirgenen nitroarenler daha mutajenik ara metabolitler olan arilhidroksilaminlere dönüşürler.

4. Nitroarenlerin mutajenik potansiyelleri kimyasalın yapısal özgülüğü ile de ilgilidir. Nitro fonksiyonunun elektrokimyasal indirgenmesi için 1-NP'ler (1-nitropayren) ve 1,3-diNP'ler (1,3-dinitropayren) 1e- transferi gerektirirken, 1,6- ve 1,8-diNP'ler 2e- transferi gerektirirler.

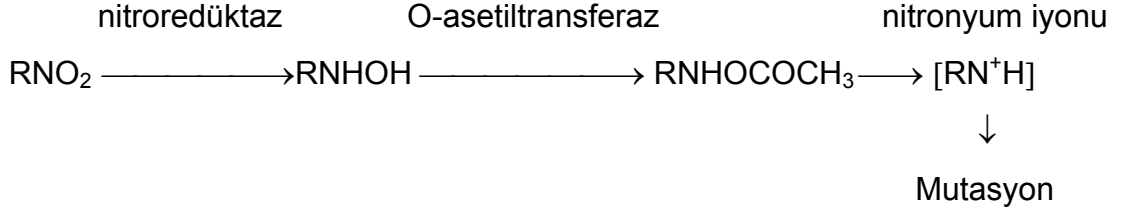
Nitrolu bileşiklerin metabolik aktivasyon sonucu oluşan reaktif ara ürünleri, tümör indüksiyonunu da içeren çeşitli olumsuz biyolojik etkiler doğurmaktadırlar. Nitrolu bileşiklerin genotoksik etkilerini saptamak amacıyla yapılan çalışmalarda insanların böyle metabolik dönüşümleri yapabildiği sonucu elde edilmiştir. İnsanların nitrolu bileşiklerle yüz yüze gelmesi; mesleki, çevresel ya da gıdasal kaynaklardan alınan nitrolu bileşik öncülleri ile bu öncüllerin in vivo'da yeniden düzenlenmesi yoluyla olmaktadır (Brambilla and Martelli, 2007). İlaçların büyük bir kısmı teorik olarak nitrolu yapıdadır ve pek çoğu uzun sürelerde günlük yüksek dozlarda kullanılmaktadır (Lijinsky et al., 1972). Kimyasal yapıdaki en ufak bir değişiklik ilacın yapısını tamamen değiştirmekte ve onu mutajenik bir hale sokabilmektedir.

2.4.1. Nitrolu aromatik bileşiklerin metabolik aktivasyon mekanizması

Aromatik nitrolu bileşikler iki adımda biyoaktif edilirler (Rosenkranz and Mermelstein, 1983). İlk adım, nitroredüktazlar (NR) tarafından katalizlenen arilhidroksilaminlere redüksiyondur. Arilhidroksilaminler kendileri DNA-reaktiflerdir fakat O-asetiltransferaz (O-AT) enzimlerince katalizlenen ek bir O-asetilasyon, hidroksilamin metabolitlerini daha reaktif türlere dönüştürür ve DNA bazlarıyla etkileşen reaktif ara ürünler olan nitronyum iyonlarını oluşturur (Mc Coy et al., 1981).

Nitroredüktaz enzimleri, bakteri ve hayvan hücrelerinde bulunmaktadır. Nitrolu bileşikler Salmonella test suşlarında doğrudan aktif mutajendirler. Bu nedenle

karaciğer mikrozomal enzimleri tarafından metabolik aktivasyon gerektirmezler (Oda et al., 1993). Bu bileşiklerdeki nitro grubunun aktivasyon mekanizması Şekil 2.9'da gösterilmiştir.



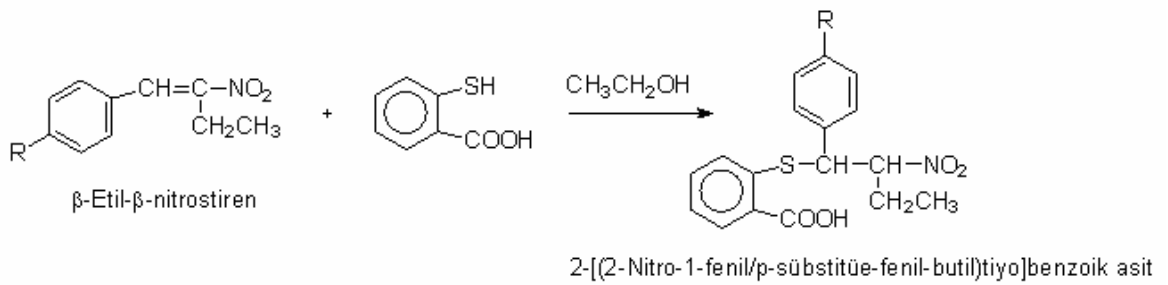
Şekil 2.9. Nitrolu bileşiklerin metabolik aktivasyon mekanizması.

Nitronyum iyonları, nitrolu bileşiklerden oluşan nihai mutajen/karsinojenlerdir. Wild ve Dirr (1989), nitronyum iyonlarının DNA ile yaptığı reaksiyon sıklığının aminoimidazoarenlerin ve nitroimidazoarenlerin mutajenik potansiyellerinin oluşmasında önemli bir adımı oluşturduğunu göstermişlerdir.

2.5. Çalışmada Kullanılan, İlaç Etken Maddesi Olarak Tasarlanmış Nitrolu Bileşiklerin Özellikleri

2.5.1. Benzoik asit türevi bileşikler

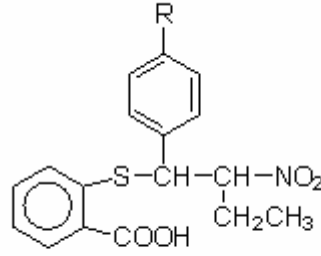
Sunduğumuz tezin hedef bileşiklerinden olan 2-[(2-Nitro-1-fenil/p-süstitüe-fenil-butil)tiyo]benzoik asit (Şekil 2.10.) türevleri β -etil- β -nitrostiren (Şekil 2.10.) türevlerinin tiyosalisilik asit ile yaptığı katılım ürünleridir ve ilk kez bu tez kapsamında sentezlenmiştir. Bileşik türevleri β -etil- β -nitrostiren türevlerinin çifte bağlarına tiyol grubunun eklenmesiyle sentezlenmiştir. Bu bir Michael tipi katılım reaksiyonudur ve tiyosalisilik asit bir Michael vercisi (donör) olarak hareket etmektedir. Reaksiyonda β -etil- β -nitrostiren türevlerinin etanol içindeki çözeltisine, etanol içindeki tiyosalisilik asit oda ısısında eklenmiştir. Reaksiyonda bileşiklerin etanol içindeki çözünürlüğünü artırmak amacıyla ısının artırılması reaksiyon veriminin düşmesine ve yan ürünlerin oluşmasına neden olmaktadır. Bu nedenle çözünürlüğün uzun süre karıştırılarak optimize edilmesi daha uygun bulunmuştur. Maksimum çözünürlüğe ulaşıldıktan sonra β -etil- β -nitrostiren ve tiyosalisilik asit çözeltilerinin karıştırılması ile önce berrak bir karışım oluşmakta sonra 2-[(2-Nitro-1-fenil/p-süstitüe-fenil-butil)tiyo]benzoik asit türevleri saf olarak ve iyi verimle elde edilmektedir. Bu reaksiyona ait denklem Şekil 2.10.'da , sentezlenen bileşikler ve fizikokimyasal özellikleri Çizelge 2.3.'de verilmiştir.



Şekil 2.10. 2-[(2-Nitro-1-fenil/p-süstitüe-fenil-butil)tiyo] benzoik asit türevlerinin sentez yolu

Çizelge 2.3. 2-[(2-Nitro-1-fenil/p-süstitüe-fenil-butil)tiyo]benzoik asit türevlerinin fizikokimyasal özellikleri

Bileşik	R	Verim %	Erime derecesi °C	Kapalı formül
2a	H	56	128	C ₁₇ H ₁₇ NO ₄ S 333
2b	Br	41	102	C ₁₇ H ₁₆ BrNO ₄ S 412
2c	Cl	48	117	C ₁₇ H ₁₆ ClNO ₄ S 367
2d	CH ₂ CH ₃	54	139	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄ S 361
2e	OCH ₂ CH ₃	55	141	C ₁₉ H ₂₁ NO ₅ S 377
2f	CH ₃	58	111	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄ S 347
2g	OCH ₃	55	141	C ₁₈ H ₁₉ NO ₅ S 363
2h	NO ₂	58	111	C ₁₇ H ₁₆ N ₂ O ₅ S 379



2-[(2-Nitro-1-fenil/p-süstitüe-fenil-butil)tiyo]benzoik asit

2a; R=H, **2b;** R= Br, **2c;** R= Cl, **2d;** R= CH₂CH₃, **2e;** R= OCH₂CH₃, **2f;** R= CH₃,
2g; R= OCH₃, **2h;** R= NO₂

Şekil 2.11. 2-[(2-Nitro-1-fenil/p-süstitüe-fenil-butil)tiyo]benzoik asit türevlerinin kimyasal yapısı.

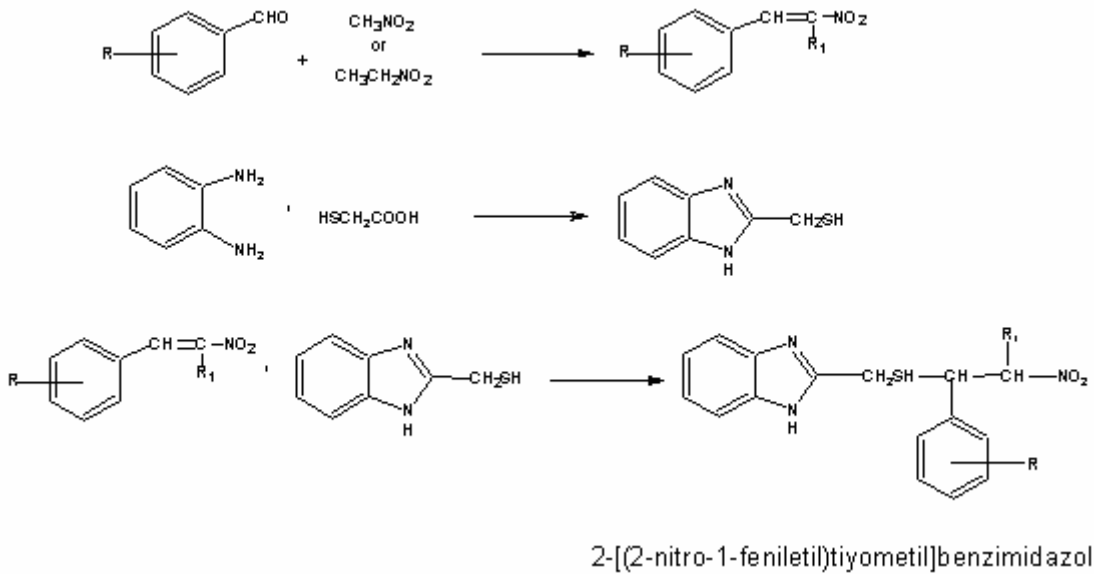
2-[(2-Nitro-1-fenil/p-süstitüe-fenil-butil)tiyo]benzoik asit türevlerinin yapısının aydınlatılmasında IR ve H-NMR spektrumlarından yararlanılmıştır.

2.5.2. Benzimidazol türevi bileşikler

2-[(2-nitro-1-feniletıl)tiyometil]benzimidazol (Şekil 2.12.) türevleri β -nitrostiren türevlerinin 2-mercaptometilbenzimidazoller ile verdiği Michael tipi katılma reaksiyonu ile sentezlenmiştir. β -nitrostiren türevlerinin değişik tiyol grupları ile verdiği Michael tipi katılma ürünlerinin farmakolojik yönden çok etkin bileşikler olduğu literatürde bildirilmiştir (Berçin et al., 1995a; 1995b; Berçin and Gökçe, 1996a; 1996b).

Benzimidazol bileşikler, fungusitlerin sistematik aktivitelerine karşı önemli gruplar içerir. Çok sayıda fungal hastalığın kontrol edilmesinde rol aldığı iyi bilinir (Foye W. O. et al., 1995). Aynı zamanda, alkiltiyo ve ariltiyo benzimidazol türevleri antimikrobiyal, antiprotozoal ve antiparazitik aktiviteler gösterir (Darafarin A. et al., 1992, Andrzejewska M. et al., 2004). Bununla birlikte, genel olarak organik bileşiklerde nitro gruplarının bulunması, antimikrobiyal aktiviteyi artırır (Arredondo Y. et al., 1997, Samosorn S. et al., 2006).

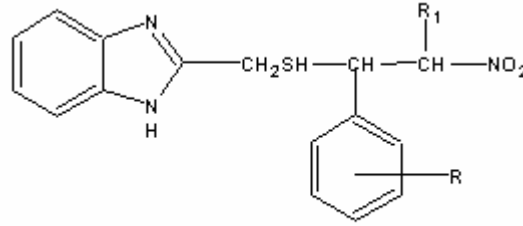
2-[(2-nitro-1-feniletıl)tiyometil]benzimidazol türevlerinin sentezi Gökçe ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiş ve reaksiyona ait şema Şekil 2.12.'de fizikokimyasal özellikleri ise Çizelge 2.4.'de verilmiştir (Gökçe et al., 1996a).



Şekil 2.12. 2-[(2-nitro-1-feniletıl)tiyometil]benzimidazol türevlerinin sentez yolu

Çizelge 2.4. 2-[(2-nitro-1-feniletıl)tiyometil]benzimidazol türevlerinin fizikokimyasal özellikleri

Bileşik	R	R1	Verim %	Erime derecesi °C	Kapalı formül
3a	H	H	85	140-141	C ₁₆ H ₁₅ N ₃ O ₂ S 313.38
3b	4-CH ₃	H	83	130-131	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₂ S 327.41
3c	4-Cl	H	78	133	C ₁₆ H ₁₄ ClN ₃ O ₂ S 347.82
3d	4-OCH ₃	H	91	153	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₃ S 344.40
3e	4-OH, 3-OCH ₃	H	71	120	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₄ S 359.40
3f	4-OC ₂ H ₅	H	88	160	C ₁₈ H ₁₉ N ₃ O ₃ S 357.43
3g	4-C ₂ H ₅	H	91	142	C ₁₈ H ₁₉ N ₃ O ₂ S 341.43
3h	4-NO ₂	H	77	104-106	C ₁₆ H ₁₇ N ₄ O ₄ S 359.38



2-[(2-nitro-1-feniletıl)tiyometil]benzimidazol

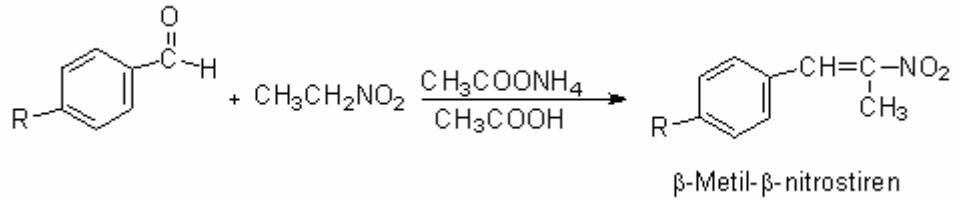
3a; R=H, **3b**; R= 4-CH₃, **3c**; R= 4-Cl, **3d**; R= 4-OCH₃, **3e**; R= 4-OH, 3-OCH₃,
3f; R= 4-OC₂H₅, **3g**; R= 4-C₂H₅, **3h**; R= 4-NO₂

Şekil 2.13. 2-[(2-nitro-1-feniletıl)tiyometil]benzimidazol türevlerinin kimyasal yapısı.

Çalışmada kullanılan 2-[(2-nitro-1-feniletıl)tiyometil]benzimidazol türevlerinin, sentezleri tamamlandıktan sonra antibakteriyal ve antifungal aktiviteleri tayin edilmiş, genel olarak çok iyi antifungal aktivite gösterdiği saptanmıştır. 3a, 3b, 3g ve 3h türevi bileşiklerin, gram pozitif bakterilere gram negatif bakterilerden daha etkili olduğu bulunmuştur. Bileşiklerden 3a türevinin diğerlerinden 10 kat daha fazla antifungal etki gösterdiği saptanmıştır (Gökçe et al., 2008).

2.5.3. β -Metil- β -nitrostiren türevlerinin sentezi

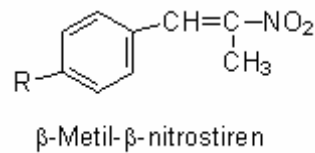
β -Metil- β -nitrostiren (Şekil 2.14.) türevleri Koremura ve arkadaşlarının (1961) metoduyla sentezlenmiştir. Bu amaçla ekimolar nitropropan ve benzaldehit türevi glasiyel asetik asit içinde ve amonyum asetat varlığında 2 saat süreyle geri çeviren soğutucu altında ısıtılmıştır. Daha sonra reaksiyon karışımı buzlu su içine boşaltılmış ve çöken madde etanolden rekristalize edilmiştir. Bileşiklerin saflık kontrolleri yapılmış ve erime dereceleri literatür verileri ile uyumlu olduğundan daha fazla analiz yapılmadan sentezde kullanılmıştır. Reaksiyona ait şema Şekil 2.14.'de kimyasal özellikleri ise Çizelge 2.5.'de verilmiştir.



Şekil 2.14. β -Metil- β -nitrostiren türevlerinin sentez yolu

Çizelge 2.5. β -Metil- β -nitrostiren türevlerinin kimyasal özellikleri

Bileşik	R	Kapalı formül
4a	H	$C_9H_9NO_2$ 163
4b	CH ₃	$C_{10}H_{11}NO_2$ 177
4c	OCH ₃	$C_{10}H_{11}NO_3$ 193
4d	Cl	$C_9H_8ClNO_2$ 197,5



4a; R=H, **4b;** R= CH₃, **4c;** R= OCH₃, **4d;** R= Cl

Şekil 2.15. β -Metil- β -nitrostiren türevlerinin kimyasal yapıları

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kimyasal Maddeler

Dimetil sülfoksit (DMSO) (CAS No: 67-71-0; saflık oranı: 99%), Sodyum klorür (NaCl), Disodyumhidrojenfosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Sodyumdihidrojenfosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), Potasyum klorür (KCl), Magnezyum sülfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Sodyum dodesil sülfat (SDS), β -merkaptotanol Merck'ten, Klorofenol red- β -D-galaktopiranosid (CPRG), 4-nitroquinolin-N-oksit (4NQO) ve D-(+)-Glukoz Sigma'dan, Bakto tripton Lab M'den, Nütrient agar Oxoid'den, Maya özütü (Yeast extract) Acumedia'dan, Ampisilin AppliChem'den, kloramfenikol Fluka'dan, Sodyum karbonat (Na_2CO_3) Riedel-de Haën'den sağlanmıştır.

Test edilen kimyasallardan (ilaç etken maddelerinden) benzoik asit türevi bileşikler, benzimidazol türevi bileşikler ve β -metil- β -nitrostiren türevi bileşikler Mehtap Gökçe'den (Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji ABD, Ankara-Türkiye) sağlanmıştır.

3.2. Kullanılan Test Suşları

Umu test sisteminde kullanılan *S.typhimurium* NM2009, *S.typhimurium* NM3009 ve *S.typhimurium* NM1011 suşları Dr. Yoshimitsu Oda'dan (Osaka Prefectural Institute of Public Health, Osaka, Japan) sağlanmıştır.

3.3. Besi Ortamları, Çözeltiler ve Tamponlar

LB Broth (sıvı ortam) : Test suşlarının gecelik kültürlerinin hazırlanmasında kullanıldı.

3 g	NaCl
3 g	Bakto tripton
1.5 g	Maya özütü
7.5 mg	Ampisilin
1.5 mg	Kloramfenikol

Yukarıdakiler distile su ile 300 ml'ye tamamlandı.

Karışım otoklavda 121 °C'de sterilize edildi.

TGA Ortamı (sıvı ortam) : Test suşlarının üretilmesinde kullanıldı.

3 g	Bakto tripton
1.5 g	NaCl
0.6 g	Glukoz
6 mg	Ampisilin

Yukarıdakiler distile su ile 300 ml'ye tamamlandı.

Karışım otoklavda 121 °C'de sterilize edildi.

Z Tamponu: β-gal enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanıldı.

16.1 g	Na ₂ HPO ₄ . 7H ₂ O
5.5 g	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O
0.75 g	KCl
0.246 g	MgSO ₄ . 7H ₂ O
2.7 ml	β-merkaptoetanol

Son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandıktan sonra pH 7'ye ayarlandı.

Nütrient Agarlı Ortam (katı ortam) : Test suşlarının genetik işaretlerinin kontrolünde kullanıldı.

15 g	Nütrient Broth
15 g	Bakto Agar

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Karışım otoklavda 121 °C'de sterilize edildi.

M63 Ortamı: UmuC'-lacZ füzyonunun indüklenebilirliğini kontrol etmek için STA ortam plaklarının hazırlanmasında kullanıldı.

15 g	Difko minimal agar
13.6 g	KH ₂ PO ₄
2 g	(NH ₄) ₂ SO ₄
0.5 g	FeSO ₄ .7H ₂ O
0.2 g	MgSO ₄ .7H ₂ O

Yukarıdakiler 1000 ml'ye tamamlanıp, KOH ile pH 7'ye ayarlandı.

STA Ortamı (Katı ortam) : UmuC'-lacZ füzyonunun indüklenebilirliğini kontrol etmek için kullanıldı.

1000 ml için:	2 ml	Laktoz	(%20'lik)
	0.5 ml	Glukoz	(%20'lik)
	2 ml	Triptofan	(%1'lik)
	2 ml	Treonin	(%1'lik)
	2 ml	Histidin	(%1'lik)
	2 ml	Urasil	(%1'lik)
	2 ml	Tiamin	(%1'lik)
	2 ml	Ampisilin	(10 mg/ml)
	2 ml	Xgal	(20 mg/ml DMSO)
	983.5 ml	M63 ortamı	

Klorofenol-red-β-D-galaktopiranosid (CPRG) Çözeltisi (4mg/ml): β-gal enziminin substratı olarak kullanıldı. 0.1 M Fosfat tamponu (pH=7) ile 4 mg /ml olacak biçimde CPRG ile hazırlandı (Her deneyde taze olarak hazırlandı).

100 ml Fosfat tamponu için:

61 ml	0.1 M	Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O
39 ml	0.1 M	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O

Kristal Viyole Çözeltisi (1mg/ml) : Test suşlarının rfa mutasyonunun kontrolünde kullanıldı.

100 ml için:	100 mg	kristal viyole distile su ile
		100 ml 'ye tamamlandı.

SDS (% 0,1'lik) : β-gal enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanıldı.

100 ml için:	0.1 g	SDS
--------------	-------	-----

Distile su ile son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

Na₂CO₃ (1M) : β-gal enzim aktivitesinin durdurulmasında kullanıldı.

1000 ml için:	105.99 g	Na ₂ CO ₃
---------------	----------	---------------------------------

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

3.4. Test Suşlarının Genetik İşaretlerinin Kontrolü

Deney öncesi sonuçların güvenilirliği açısından test suşlarının kendilerine özgü mutasyonları taşıyıp taşımadıkları kontrol edilmelidir. Bunun için aşağıdaki kontroller Ames ve arkadaşlarının (1973) yöntemleri kullanılarak yapılmıştır.

3.4.1. rfa mutasyonunun kontrolü: Bu mutasyonun kontrolü için, test suşlarının gecelik kültürlerinden 0.1 ml alınarak nütrient agarlı plaklara ekildi. Filtre kağıdından hazırlanmış ve kristal viyole çözeltisi (1 mg/ml) emdirilmiş diskler plağın ortasına yerleştirildi. Plaklar bir gece 37 °C'lik etüvde inkübe edildikten sonra kağıt disklerin etrafında inhibisyon zonu gözlemlendi. Bu inhibisyon zonunun varlığı, büyük bir molekül olan kristal viyolenin rfa mutasyonundan dolayı bakteri içine girip onun ölümüne neden olduğunu göstermekte ve mutasyonun varlığını doğrulamaktadır.

3.4.2. uvrB mutasyonunun kontrolü: Bu mutasyonun varlığı bakterilerin UV ışınlarına duyarlılıkları saptanarak kontrol edildi. Test suşlarının gecelik kültürlerinden alınan örnekler nütrient agarlı plaklara tek koloni şeklinde ekildi. 37 °C'lik etüvde gece boyu üreyen koloniler steril kürdanlarla alınarak nütrient agarlı plaklara çizgi testi yöntemiyle ekildi. Bu plaklardan birinin kapağı açılıp, 15 watt'lık germisidal UV lambası altında 33 cm uzaklıktan 8 saniye süreyle ışınlandı, diğer plak ise kontrol plağı olarak kullanıldı. 37 °C'de bir gece inkübasyon sonrası suşların kontrol plağında üreyip, UV ile ışınlanmış plaklarda üremediğinin gözlenmesi ile uvrB mutasyonunun varlığı doğrulanmış oldu.

3.4.3. UmuC'-lacZ füzyonunun indüklenebilirliğinin kontrolü: UmuC'-lacZ füzyonunun indüklenebilirliği 4-NQO gibi genotoksik bir ajan kullanılarak saptanabilir. Test suşlarının gecelik kültürlerinden alınan 0.1 ml'lik örnek, STA plaklarına ekildi ve petrinin ortasına 10 µl 4-NQO (10 mg/ml) nokta şeklinde damlatıldı. 37 °C'de bir gecelik inkübasyondan sonra, inhibisyon zonunun çevresinde mavi bir halkanın gözlenmesi umuC'-lacZ füzyonunun indüklenebilirliğini gösterdi.

3.5. Test Suşlarının Saklanması

Kontrol sonucunda genetik işaretleri doğrulanmış olan test suşlarının özelliklerini kaybetmeden uzun süre saklanabilmeleri için bu suşların donmuş örnekleri hazırlandı. Bunun için test suşlarının LB ortamındaki gecelik kültürlerine 1/10 oranında olacak şekilde DMSO eklendi ve yavaşça karıştırıldı. Daha sonra bu karışım 1.5 ml'lik soğuğa dayanıklı plastik ependorf tüplerine dağıtılarak sıvı azot içerisinde aniden donduruldu ve -70 °C'lik derin dondurucuya kaldırıldı (Oda et al., 1993).

3.6. Test Edilecek Kimyasalların Hazırlanması

Test edilecek kimyasalların hepsi, dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülmüştür. Kimyasalların maksimum çözüldükleri konsantrasyonlar saptanmıştır. Bulanıklık yaratarak absorbans okumalarında hataya neden olan konsantrasyonlar, seyreltilerek kullanılmıştır. Bulanıklığın olmadığı konsantrasyonlardan başlanarak 1/2 oranlarında seri sulandırım yapılmıştır.

3.7. Umu-mikroplak Test Sistemi

Bu sistem Oda ve arkadaşlarının (2004) çalışmalarına göre uygulanmıştır. Test suşlarının donmuş örneklerinden 0,1 ml alınarak 20 ml LB broth içeren erlenlere ekim yapıldı ve gece boyunca 37 °C'lik çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, gecelik kültürler TGA ile 1/100 oranında sulandırıldı ve 600 nm'deki absorbans değerleri 0.25-0.30 olana dek (yaklaşık 3 saat) inkübasyon sürdürüldü. Bu arada test edilecek kimyasallar DMSO da çözümlenerek seri sulandırımları yapıldı ve her bir konsantrasyondan (μM olarak) 4 μl örnek mikroplak kuyucuklarına pipetlendi. Bu kuyucuklara her bir suştan alınan 96 μl 'lik kültür eklenerek 2 saat boyunca 37 °C'lik çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Sonra bakteri yoğunlukları 595 nm'de okundu ve bu kültürlerin 10 μl 'si yeni bir mikroplağın kuyucuklarına aktararak β -gal aktivitesinin ölçülmesine geçildi. Bu kuyucuklara 90 μl Z buffer ve 50 μl % 0,1'lik SDS ve substrat olarak 10 μl CPRG eklendikten sonra plaklar 37 °C'lik çalkalamalı etüvde 20 dakika (renk oluşumu gözlenmeli) inkübe edildi. Reaksiyonu durdurmak için 100 μl 1 M Na_2CO_3 çözeltisi kullanılarak CPRG için 570 nm'de absorbanslar okundu ve elde edilen değerler enzim aktivitesinin

hesaplanmasında kullanıldı. Bu değerler, kör absobans değerlerinin çıkartılmasıyla düzeltildi.

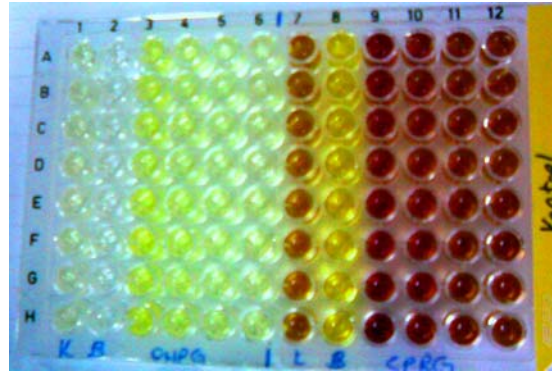
3.7.1. Göreceli (Rölatif) β -galaktosidaz aktivitesinin hesaplanması

Göreceli β -gal aktivitesi (RGA) Oda ve arkadaşları tarafından (1985) daha önce tanımlanan yöntemin ufak modifikasyonu ile elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı (Oda et al., 2004).

$$\beta\text{-gal aktivitesi (RGA)} = A_{570} (\text{CPRG}) / A_{595} (\text{büyüme miktarı})$$

3.7.2. Umu-mikroplak test sonuçlarının değerlendirilmesi

β -gal aktivitesinde kontrole göre en az 2 katlık bir artışın gözlenmesi, umu test sisteminde kimyasalın genotoksisite açısından pozitif olarak değerlendirilebileceğini gösterir (Oda et al., 2004). Pozitif kontrol olarak 10 μM , 5 μM , 2,5 μM ve 1,25 μM 4NQO kullanıldı.

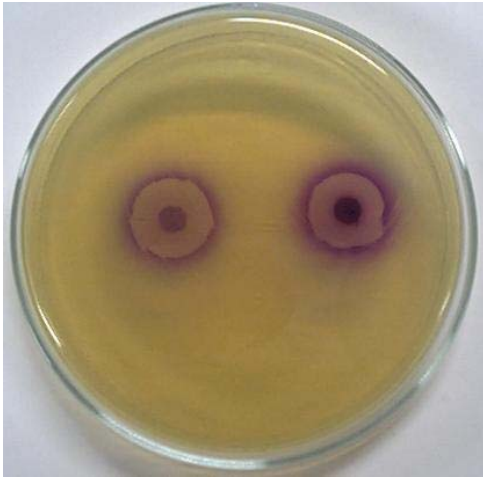


Şekil 3.1. CPRG substratıyla elde edilen kontrol sonuçlarındaki renk oluşumu.

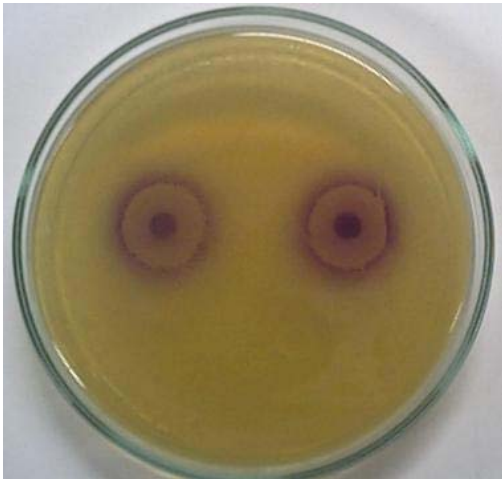
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Test Suşlarının Genetik İşaretlerinin Kontrolü

Bu çalışmada, ilaç etken maddesi olarak tasarlanmış bazı nitrolu bileşiklerin genotoksik potansiyelleri umu-mikroplak test sisteminde *S.typhimurium* NM1011, NM2009 ve NM3009 suşları kullanılarak araştırılmış ve test sonuçlarının güvenilirliğini sağlamak amacıyla, deneylere başlamadan önce test suşlarının taşımakta oldukları *rfa* ve *uvrB* mutasyonlarının kontrolleri yapılmıştır. *Rfa* mutasyon sonuçları Şekil 4.1.- 4.2. ve 4.3.'de verilmiş ve kristal viyole emdirilmiş kağıt disklerin etrafında görülen inhibisyon zonu test suşlarının *rfa* mutasyonunu taşıdıklarını göstermiştir. *uvrB* mutasyon sonuçları ise Şekil 4.4. - 4.5. ve 4.6.'da verilmiş ve UV ile ışınlanmamış kontrol plaklarında üreyen suşların UV ile ışınlanmış plaklarda ürememeleri test suşlarının *uvrB* mutasyonunu taşıdıklarını göstermiştir.



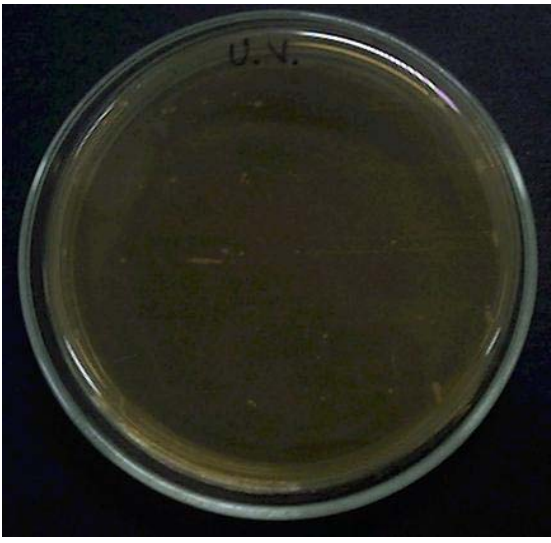
Şekil 4.1. *S. typhimurium* NM1011 suşunun *rfa* mutasyonunu taşıdığına gösterilmesi.



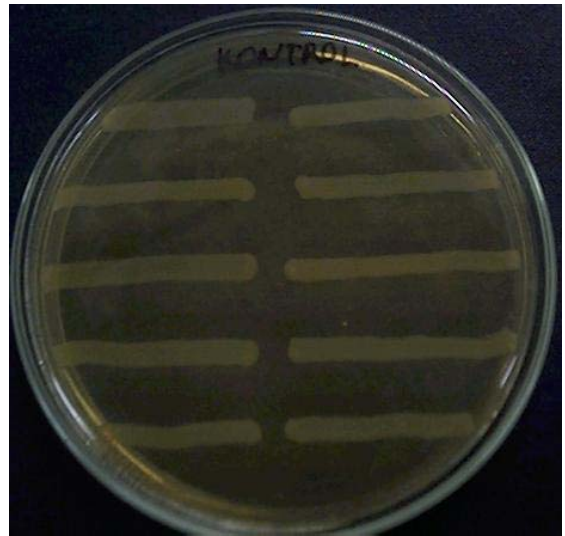
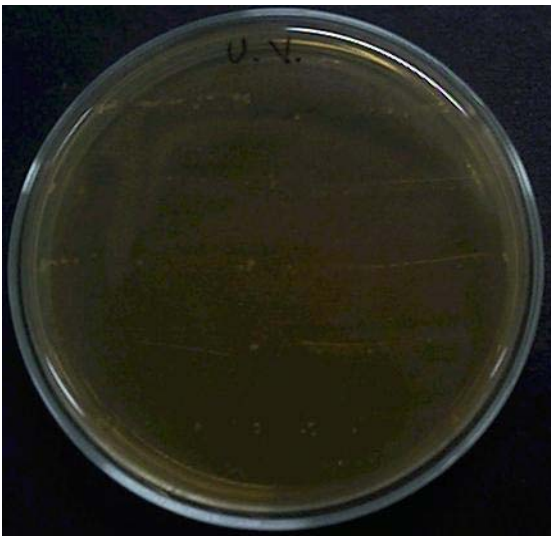
Şekil 4.2. *S. typhimurium* NM2009 suşunun *rfa* mutasyonunu taşıdığına gösterilmesi.



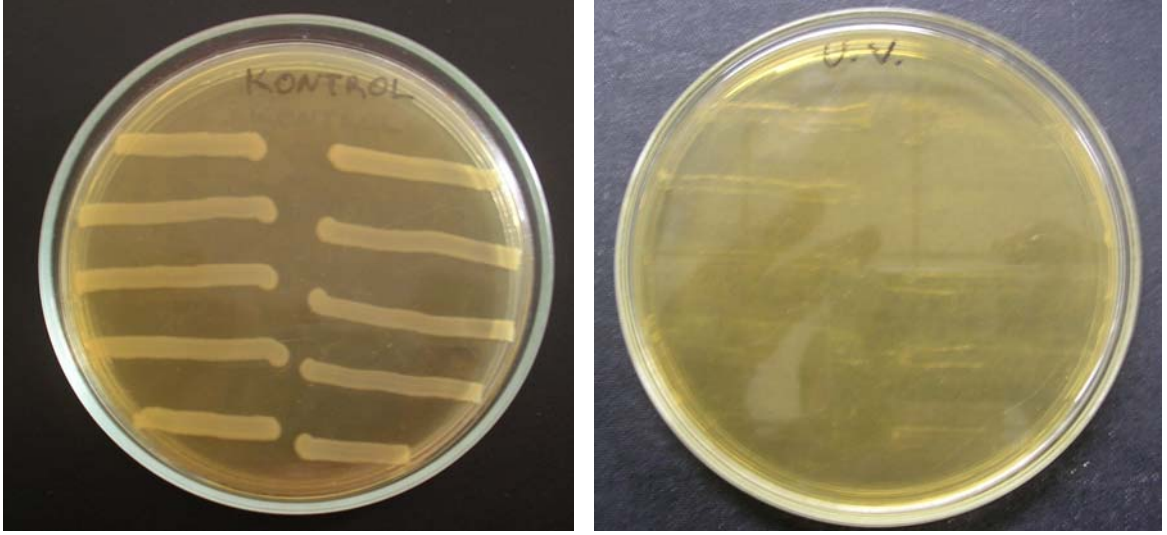
Şekil 4.3. *S. typhimurium* NM3009 suşunun rfa mutasyonunu taşıdığıının gösterilmesi.



Şekil 4.4. *S. typhimurium* NM1011 suşunun uvrB mutasyonunu taşıdığıının gösterilmesi.



Şekil 4.5. *S. typhimurium* NM2009 suşunun uvrB mutasyonunu taşıdığıının gösterilmesi.



Şekil 4.6. *S. typhimurium* NM3009 suşunun uvrB mutasyonunu taşıdığıının gösterilmesi.

4.2. Benzoik Asit Türevi İlaç Etken Maddeleriyle Elde Edilen Umu-mikroplak Test Sonuçları

Benzoik asit türevi ilaç etken maddelerinin umuC gen ifadesini, CPRG substratı ile indüklenme sonuçları Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Bilinen genotoksik ajanlar arasında; bazı kanser ilaçlarını, yüksek dozda ve uzun süre kullanılmaları halinde bazı cinsel hormonları, bazı boyaları, besinlerin yanma ürünlerini, yağın oksitlenme ürünlerini sayabiliriz. Kanserojen maddelerin birçoğunun mutajen, mutajen maddelerin birçoğu da karsinojen olduğu saptanmıştır (Güven K., 1999, Ames B., et al., 1975).

İlaç geliştirmede önemli olan genel bir yaklaşım vardır; yapılan in vitro aktivite testlerinde bir ilaç ya da ilaç grubu dikkat çekici aktiviteler gösteriyor ise mutlaka güvenilirliğinin de açığa çıkarılması gerekir. Güvenilirlik, ilaç ya da ilaç grubunun deneysel olarak dikkate alınmasında bazen etkinliğinden bile önemli olabilir. Çünkü kemoterapide önemli olan hastaya zarar vermeden tedavi edebilmektir.

Aktif bileşiğin ilaç adayı olabilmesi için en önemli gereksinimlerden birisi söz konusu bileşiğin genotoksik(mutajenik) ve buna bağlı olarak karsinojenik ve teratojenik etkilerinin olmamasıdır. Nitro grubu taşıyan bazı bileşiklerle ilgili yaygın kanı bu bileşiklerin genotoksik potansiyele sahip olmalarıdır. Bu nedenle 2-[(2-nitro-1-fenil/p-süstitüe-fenil-butil)tiyo]benzoik asit türevlerinin öncelikle genotoksik potansiyellerinin araştırılması önemlidir.

Gökçe ve arkadaşları tarafından sentezlenen ve kullanmış olduğumuz bileşiklere yapısal olarak benzeyen 2-[(2-nitro-1-fenil-alkil)tiyo]benzoik asit türevleri Vero hücre hattı üzerinde toksik etki göstermiştir (Gökçe et al., 2005). Çalışmada kullanmış olduğumuz kimyasalların mikroorganizmalar üzerindeki aktivite çalışmalarından sonra, ilaç etken maddesi olarak değerlendirilmesinde genotoksik olmayışı önemli bir sonuçtur.

İlk kez bu tez kapsamında, ilaç etken maddeleri olarak sentezlenen benzoik asit türevleri umu-mikroplak test sistemiyle genotoksik açıdan değerlendirilmiş ve bu benzoik asit türevleri (sırasıyla 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g ve 2h) NM2009,

NM3009 ve NM1011 suşlarında genotoksisite açısından hiçbir farklılık göstermemiş ve hiçbiri genotoksik bulunmamıştır.

Yapısal olarak benzerlik gösteren 1-[(2-aminofenil)tiyo]-1-fenil-2-nitrobütan türevleri ile yapılan paralel bir çalışmada elde edilen veriler (Tuğba Somay., 2009) bu çalışmayla benzerlik göstermiş ve genotoksik bulunmamıştır. 1-[(2-aminofenil)tiyo]-1-fenil-2-nitrobütan türevleri bu çalışmadaki gruplarla aynı olmakla birlikte, bizim kimyasallarımız ek olarak metoksi ve nitro grupları da içermektedir.

Grummt ve arkadaşları (2005) nitrolu benzoik asitlerle yapmış oldukları bir çalışmada nitro gruplarındaki artışın genotoksisiteyi de artırdığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da ayrı bir grup olarak nitro grubu değerlendirilmiş, ancak genotoksik bulunmamıştır.

Mercangöz ve Tüylü (2000) yaptıkları çalışmada ilaç etken maddesi olarak kullanılması amaçlanan 2, 4, 5 tri fenil imidazol ve dokuz türevinin mutajenik etkilerini Ames/Salmonella/Mikrozom test sistemiyle araştırmışlar ve metil ve metoksi gruplarının pozisyonu ile mutajenik etki arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Sonuçta metil ve metoksi gruplarının orta ve para konumlarında iken aromatik halkayı aktivelediklerini saptamışlardır. Bu kimyasallar, kuvvetli bir şekilde çerçeve kaymasına neden olurken zayıf bir biçimde de nokta mutasyonuna neden olmuşlardır. Bu durum bizim kullandığımız kimyasallardaki aromatik halkaya bağlı para konumlu metil grubuyla elde ettiğimiz sonuçlarla benzerlik göstermemektedir. Mercangöz ve arkadaşlarının çalışmalarında, aynı kimyasallar, S9 varlığında aynı suşlarda mutajen bulunmamıştır (Mercangöz ve Tüylü, 2000).

Bazı araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda, bizim sonuçlarımızla paralellik göstererek, nitrolu heterosiklik halka taşıyan bileşiklerde, halka metilasyonunun mutajeniteyi azalttığı sonucuna ulaşılmıştır (Vance et al., 1986; Klein et al., 2000; Crozet et al., 2009).

Hrelia ve arkadaşları (1999) nitrobenzothiophenamin türevlerinin mutajenitelerini test ettikleri bir çalışmada, para konumunda Cl ve meta konumunda Br taşıyan türevlerin TA98 suşunda mutajenik etki göstermediğini, para konumunda Br taşıyan türevin ise mutajenik olduğunu gözlemişlerdir. Meta ve para konumlarında

metil grubu taşıyan türevler de mutajenik etki göstermişlerdir. Bu durum, nitroredüktaz ve O-asetiltransferaz enzimlerini ifade eden Ames test suşlarıyla yapılan deneylerde de değişmemiştir (Hrelia et al., 1999). Çalışmamızdaki sonuçlar para konumundaki Cl açısından paralellik göstermiştir.

Çizelge 4.1. Benzoik asit türevi bileşiklerle *Salmonella typhimurium* NM2009, NM3009 ve NM1011 suşlarında CPRG substratlarıyla elde edilen umu-mikroplak test sonuçları^a.

Kimyasal	Konsantrasyon (µM)	NM2009			NM3009			NM1011		
		Hücre yoğunluğu (A ₅₉₅)	CPRG (A ₅₇₀)	RGA+ SD A ₅₇₀ / A ₅₉₅	Hücre yoğunluğu (A ₅₉₅)	CPRG (A ₅₇₀)	RGA+ SD A ₅₇₀ / A ₅₉₅	Hücre yoğunluğu (A ₅₉₅)	CPRG (A ₅₇₀)	RGA+ SD A ₅₇₀ / A ₅₉₅
4NQO	0	0,202	0,232	1,148 ± 0,23	0,212	0,241	1,136 ± 0,23	0,221	0,265	1,199 ± 0,32
	1,25	0,211	0,288	1,364 ± 0,21	0,216	0,298	1,379 ± 0,22	0,223	0,301	1,349 ± 0,19
	2,5	0,213	0,464	2,178 ± 0,34	0,221	0,453	2,049 ± 0,41	0,218	0,578	2,651 ± 0,29
	5	0,208	0,653	3,139 ± 0,41	0,218	0,667	3,059 ± 0,56	0,220	0,689	3,131 ± 0,28
	10	0,214	1,214	5,672 ± 0,61	0,214	1,197	5,593 ± 0,31	0,216	1,312	6,074 ± 0,68
2a	0	0,202	0,206	1,020 ± 0,38	0,211	0,238	1,126 ± 0,25	0,219	0,223	1,018 ± 0,14
	0,5	0,200	0,188	0,942 ± 0,15	0,224	0,221	0,944 ± 0,15	0,224	0,221	0,990 ± 0,52
	0,9	0,205	0,189	0,923 ± 0,34	0,222	0,203	0,915 ± 0,16	0,223	0,195	0,874 ± 0,12
	1,9	0,200	0,191	0,956 ± 0,25	0,212	0,208	0,980 ± 0,11	0,223	0,195	0,875 ± 0,39
	3,8	0,198	0,189	0,958 ± 0,05	0,214	0,235	1,100 ± 0,43	0,224	0,226	1,012 ± 0,46
	7,5	0,204	0,204	1,000 ± 0,26	0,198	0,203	1,025 ± 0,64	0,224	0,196	0,874 ± 0,54
	15	0,221	0,204	0,924 ± 0,06	0,210	0,199	0,945 ± 0,15	0,222	0,200	0,899 ± 0,11
	30	0,203	0,206	0,932 ± 0,42	0,218	0,201	0,926 ± 0,11	0,220	0,201	0,913 ± 0,19
	60	0,204	0,189	1,017 ± 0,37	0,214	0,201	0,936 ± 0,10	0,221	0,199	0,897 ± 0,11
	120	0,206	0,184	0,892 ± 0,18	0,211	0,227	1,080 ± 0,23	0,194	0,195	1,010 ± 0,49
	240	0,203	0,188	0,927 ± 0,06	0,206	0,197	0,954 ± 0,06	0,221	0,203	0,917 ± 0,18
	480	0,236	0,218	0,924 ± 0,36	0,209	0,198	0,946 ± 0,46	0,225	0,207	0,923 ± 0,08
	960	0,200	0,189	0,945 ± 0,02	0,212	0,197	0,930 ± 0,10	0,223	0,209	0,936 ± 0,44
2b	0	0,202	0,206	1,020 ± 0,38	0,211	0,238	1,126 ± 0,25	0,219	0,223	1,018 ± 0,14
	0,3	0,199	0,188	0,946 ± 0,25	0,220	0,210	0,955 ± 0,36	0,222	0,194	0,871 ± 0,34
	0,6	0,204	0,204	1,000 ± 0,38	0,220	0,213	0,947 ± 0,31	0,228	0,226	0,995 ± 0,12
	1,3	0,207	0,180	0,869 ± 0,07	0,217	0,240	1,110 ± 0,24	0,198	0,198	1,000 ± 0,24
	2,5	0,195	0,181	0,927 ± 0,09	0,212	0,209	0,986 ± 0,56	0,224	0,203	0,906 ± 0,54
	5	0,201	0,184	0,912 ± 0,26	0,220	0,208	0,946 ± 0,29	0,226	0,195	0,865 ± 0,84
	10	0,204	0,208	1,020 ± 0,29	0,207	0,207	1,000 ± 0,51	0,229	0,198	0,864 ± 0,42
	20	0,206	0,208	1,010 ± 0,27	0,216	0,206	0,956 ± 0,32	0,223	0,200	0,896 ± 0,21
	40	0,207	0,177	0,962 ± 0,39	0,212	0,211	0,995 ± 0,37	0,237	0,226	0,956 ± 0,16
	81	0,204	0,196	0,886 ± 0,18	0,216	0,207	0,955 ± 0,06	0,233	0,197	0,846 ± 0,54
	162	0,201	0,196	0,978 ± 0,41	0,212	0,224	1,060 ± 0,37	0,225	0,205	0,913 ± 0,33
	324	0,205	0,202	0,990 ± 0,37	0,215	0,198	0,923 ± 0,33	0,220	0,203	0,926 ± 0,19
	647	0,207	0,183	0,881 ± 0,08	0,215	0,203	0,947 ± 0,08	0,229	0,209	0,910 ± 0,06
2c	0	0,202	0,206	1,020 ± 0,38	0,211	0,238	1,126 ± 0,25	0,219	0,223	1,018 ± 0,14
	5,3	0,214	0,194	0,910 ± 0,43	0,215	0,203	0,946 ± 0,22	0,227	0,227	0,980 ± 0,10
	10,6	0,215	0,167	0,775 ± 0,11	0,204	0,197	0,967 ± 0,44	0,229	0,187	0,814 ± 0,32
	21,3	0,209	0,177	0,850 ± 0,18	0,213	0,234	1,102 ± 0,32	0,225	0,188	0,839 ± 0,54
	42,6	0,206	0,155	0,753 ± 0,34	0,215	0,225	1,050 ± 0,23	0,228	0,185	0,813 ± 0,73
	85	0,211	0,158	0,751 ± 0,07	0,214	0,205	0,958 ± 0,24	0,231	0,221	0,957 ± 0,30
	170	0,205	0,158	0,771 ± 0,38	0,214	0,203	0,948 ± 0,15	0,225	0,185	0,833 ± 0,52
	341	0,207	0,157	0,759 ± 0,63	0,200	0,185	0,928 ± 0,51	0,206	0,193	0,940 ± 0,36
	681	0,209	0,162	0,775 ± 0,09	0,212	0,200	0,940 ± 0,35	0,205	0,193	0,945 ± 0,46
	1362	0,205	0,162	0,814 ± 0,23	0,216	0,204	0,945 ± 0,57	0,229	0,184	0,804 ± 0,19
	2725	0,205	0,167	0,759 ± 0,43	0,212	0,198	0,932 ± 0,31	0,223	0,224	1,005 ± 0,11
	5450	0,213	0,194	0,915 ± 0,11	0,214	0,214	1,000 ± 0,14	0,228	0,187	0,821 ± 0,21
	10900	0,205	0,166	0,811 ± 0,28	0,215	0,200	0,928 ± 0,31	0,223	0,223	0,930 ± 0,12

^aCPRG ile elde edilen sonuçlar; her bir değer 3 ayrı deneyden elde edilen 12 verinin ortalama ve standart sapmasını içerir. CPRG, Klorofenol red-β-D-galaktopiranosid; RGA, rölatif β-galaktosidaz aktivitesi; 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g ve 2h; sırasıyla benzen halkasında H, Br, Cl, etil, etoksi, metil, metoksi ve nitro gruplarını içeren 2-[(2-Nitro-1-fenil/p-sübstitüe-fenil-butil)tiyo]benzoik asit türevi ilaç etken maddeleri

Çizelge 4.1. devam ediyor

Kimyasal	Konsantrasyon (μM)	NM2009			NM3009			NM1011		
		Hücre yoğunluğu (A_{595})	CPRG (A_{570})	RGA \pm SD A_{570}/A_{595}	Hücre yoğunluğu (A_{595})	CPRG (A_{570})	RGA \pm SD A_{570}/A_{595}	Hücre yoğunluğu (A_{595})	CPRG (A_{570})	RGA \pm SD A_{570}/A_{595}
2d	0	0,222	0,264	1,189 \pm 0,15	0,213	0,231	1,086 \pm 0,22	0,228	0,246	1,078 \pm 0,34
	0,5	0,208	0,218	1,051 \pm 0,33	0,226	0,216	0,954 \pm 0,12	0,209	0,219	1,050 \pm 0,19
	1,1	0,223	0,235	1,055 \pm 0,13	0,234	0,217	0,927 \pm 0,39	0,212	0,211	0,967 \pm 0,03
	2,2	0,212	0,209	0,990 \pm 0,57	0,222	0,233	1,050 \pm 0,65	0,204	0,199	0,980 \pm 0,26
	4,3	0,220	0,243	1,102 \pm 0,49	0,221	0,205	0,932 \pm 0,12	0,224	0,218	0,973 \pm 0,45
	9	0,221	0,230	1,042 \pm 0,35	0,219	0,210	0,961 \pm 0,34	0,222	0,212	0,956 \pm 0,06
	17	0,218	0,225	1,032 \pm 0,24	0,205	0,199	0,970 \pm 0,10	0,211	0,206	0,978 \pm 0,24
	35	0,229	0,232	1,012 \pm 0,25	0,221	0,208	0,943 \pm 0,26	0,222	0,222	1,000 \pm 0,34
	69	0,222	0,236	1,062 \pm 0,18	0,219	0,192	0,875 \pm 0,76	0,226	0,240	1,065 \pm 0,23
	139	0,218	0,228	1,047 \pm 0,14	0,218	0,205	0,939 \pm 0,23	0,219	0,213	0,971 \pm 0,32
	277	0,223	0,232	1,043 \pm 0,32	0,208	0,196	0,943 \pm 0,71	0,220	0,221	1,002 \pm 0,05
	554	0,223	0,234	1,048 \pm 0,19	0,210	0,210	1,000 \pm 0,41	0,221	0,221	1,000 \pm 0,45
	1108	0,220	0,234	1,065 \pm 0,65	0,215	0,198	0,922 \pm 0,42	0,224	0,209	0,936 \pm 0,35
2e	0	0,222	0,264	1,189 \pm 0,15	0,213	0,231	1,086 \pm 0,22	0,228	0,246	1,078 \pm 0,34
	0,4	0,228	0,245	1,074 \pm 0,06	0,226	0,216	0,956 \pm 0,66	0,223	0,222	0,996 \pm 0,42
	0,9	0,220	0,248	1,125 \pm 0,37	0,226	0,214	0,948 \pm 0,22	0,224	0,216	0,964 \pm 0,32
	1,7	0,229	0,241	1,055 \pm 0,63	0,228	0,207	0,905 \pm 0,11	0,219	0,224	1,024 \pm 0,57
	3,5	0,223	0,254	1,138 \pm 0,42	0,220	0,205	0,932 \pm 0,24	0,208	0,219	1,052 \pm 0,56
	7	0,218	0,248	1,137 \pm 0,69	0,217	0,208	0,962 \pm 0,24	0,222	0,219	0,986 \pm 0,23
	14	0,225	0,246	1,094 \pm 0,29	0,216	0,201	0,931 \pm 0,11	0,223	0,221	0,991 \pm 0,28
	28	0,221	0,248	1,119 \pm 0,33	0,222	0,206	0,930 \pm 0,65	0,222	0,219	0,987 \pm 0,78
	55	0,220	0,250	1,139 \pm 0,12	0,216	0,194	0,900 \pm 0,23	0,225	0,224	0,987 \pm 0,28
	111	0,226	0,243	1,076 \pm 0,71	0,217	0,205	0,944 \pm 0,46	0,226	0,219	0,967 \pm 0,54
	221	0,227	0,249	1,098 \pm 0,15	0,209	0,195	0,934 \pm 0,09	0,231	0,234	1,014 \pm 0,33
	442	0,218	0,249	1,139 \pm 0,49	0,209	0,194	0,927 \pm 0,56	0,225	0,220	0,980 \pm 0,21
	884	0,222	0,250	1,123 \pm 0,55	0,217	0,202	0,929 \pm 0,18	0,221	0,223	1,007 \pm 0,43
2f	0	0,222	0,264	1,189 \pm 0,15	0,213	0,231	1,086 \pm 0,22	0,228	0,246	1,078 \pm 0,34
	1,4	0,219	0,229	1,046 \pm 0,43	0,238	0,229	0,963 \pm 0,17	0,211	0,208	0,989 \pm 0,41
	2,8	0,216	0,233	1,077 \pm 0,27	0,198	0,190	0,960 \pm 0,22	0,222	0,221	0,993 \pm 0,34
	5,6	0,221	0,223	1,010 \pm 0,39	0,234	0,249	1,067 \pm 0,29	0,212	0,212	1,000 \pm 0,19
	11,3	0,218	0,218	1,000 \pm 0,18	0,227	0,216	0,952 \pm 0,32	0,224	0,213	0,954 \pm 0,12
	23	0,221	0,218	0,986 \pm 0,09	0,202	0,194	0,964 \pm 0,27	0,225	0,212	0,945 \pm 0,32
	45	0,224	0,211	0,940 \pm 0,41	0,218	0,216	0,991 \pm 0,31	0,224	0,214	0,954 \pm 0,21
	90	0,218	0,220	1,011 \pm 0,21	0,231	0,214	0,926 \pm 0,32	0,223	0,221	0,922 \pm 0,34
	180	0,216	0,226	1,047 \pm 0,65	0,227	0,219	0,965 \pm 0,11	0,221	0,219	0,990 \pm 0,44
	360	0,218	0,218	1,000 \pm 0,11	0,223	0,221	0,995 \pm 0,08	0,224	0,210	0,938 \pm 0,26
	720	0,217	0,224	1,030 \pm 0,61	0,221	0,214	0,968 \pm 0,10	0,221	0,208	0,945 \pm 0,51
	1441	0,221	0,228	1,033 \pm 0,34	0,232	0,215	0,929 \pm 0,32	0,223	0,223	0,999 \pm 0,34
	2882	0,219	0,218	0,998 \pm 0,56	0,232	0,226	0,974 \pm 0,15	0,223	0,216	0,969 \pm 0,65

^aCPRG ile elde edilen sonuçlar; her bir değer 3 ayrı deneyden elde edilen 12 verinin ortalama ve standart sapmasını içerir. CPRG, Klorofenol red- β -D-galaktopiranosid; RGA, rölatif β -galaktosidaz aktivitesi; 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g ve 2h; sırasıyla benzen halkasında H, Br, Cl, etil, etoksi, metil, metoksi ve nitro gruplarını içeren 2-[(2-Nitro-1-fenil/p-süstitüe-fenil-butil)tiyo]benzoik asit türevi ilaç etken maddeleri

Çizelge 4.1. devam ediyor

Kimyasal	Konsantrasyon (µM)	NM2009			NM3009			NM1011		
		Hücre yoğunluğu (A ₅₉₅)	CPRG (A ₅₇₀)	RGA± SD A ₅₇₀ / A ₅₉₅	Hücre yoğunluğu (A ₅₉₅)	CPRG (A ₅₇₀)	RGA+ SD A ₅₇₀ / A ₅₉₅	Hücre yoğunluğu (A ₅₉₅)	CPRG (A ₅₇₀)	RGA+ SD A ₅₇₀ / A ₅₉₅
2g	0	0,233	0,269	1,155 ± 0,20	0,214	0,233	1,092 ± 0,28	0,225	0,266	1,185 ± 0,31
	1,5	0,245	0,225	0,921 ± 0,15	0,228	0,225	0,988 ± 0,19	0,222	0,227	1,022 ± 0,41
	3,0	0,231	0,212	0,917 ± 0,17	0,228	0,232	1,018 ± 0,49	0,219	0,223	1,017 ± 0,35
	6,0	0,235	0,224	0,952 ± 0,24	0,220	0,216	0,980 ± 0,43	0,213	0,223	1,048 ± 0,15
	12,0	0,233	0,258	1,110 ± 0,11	0,196	0,197	1,010 ± 0,34	0,208	0,223	1,069 ± 0,16
	24	0,231	0,227	0,983 ± 0,06	0,212	0,210	0,995 ± 0,23	0,206	0,211	1,024 ± 0,32
	48	0,228	0,213	0,933 ± 0,12	0,200	0,200	1,000 ± 0,14	0,213	0,199	0,932 ± 0,17
	96	0,227	0,219	0,966 ± 0,21	0,217	0,213	0,984 ± 0,28	0,211	0,229	1,089 ± 0,19
	191	0,223	0,217	0,974 ± 0,10	0,212	0,207	0,976 ± 0,33	0,206	0,231	1,122 ± 0,11
	383	0,232	0,219	0,946 ± 0,31	0,230	0,232	1,012 ± 0,43	0,206	0,232	1,125 ± 0,09
	765	0,228	0,225	0,990 ± 0,22	0,217	0,212	0,979 ± 0,23	0,208	0,227	1,092 ± 0,23
	1530	0,236	0,237	1,006 ± 0,10	0,217	0,211	0,973 ± 0,44	0,216	0,222	1,025 ± 0,12
	3060	0,235	0,232	0,989 ± 0,34	0,206	0,206	0,999 ± 0,27	0,226	0,223	0,987 ± 0,17
	2h	0	0,233	0,269	1,155 ± 0,20	0,214	0,233	1,092 ± 0,28	0,225	0,266
1,5		0,238	0,216	0,908 ± 0,57	0,229	0,219	0,953 ± 0,29	0,223	0,216	0,969 ± 0,17
3,0		0,228	0,201	0,881 ± 0,60	0,200	0,203	1,018 ± 0,35	0,209	0,219	1,049 ± 0,12
6,1		0,224	0,203	0,903 ± 0,29	0,217	0,211	0,975 ± 0,23	0,202	0,219	1,084 ± 0,23
12,1		0,213	0,204	0,959 ± 0,18	0,210	0,214	1,016 ± 0,40	0,208	0,204	0,978 ± 0,28
24		0,230	0,210	0,913 ± 0,48	0,210	0,214	1,017 ± 0,26	0,213	0,212	0,995 ± 0,33
49		0,225	0,213	0,943 ± 0,17	0,212	0,213	1,007 ± 0,15	0,210	0,188	0,895 ± 0,10
97		0,208	0,193	0,928 ± 0,21	0,219	0,210	0,960 ± 0,26	0,208	0,216	1,041 ± 0,20
194		0,230	0,207	0,900 ± 0,27	0,198	0,199	1,006 ± 0,29	0,207	0,221	1,067 ± 0,24
388		0,237	0,230	0,968 ± 0,30	0,216	0,226	1,047 ± 0,67	0,214	0,218	1,019 ± 0,13
776		0,226	0,221	0,980 ± 0,39	0,214	0,217	1,014 ± 0,07	0,203	0,214	1,059 ± 0,48
1552		0,234	0,228	0,975 ± 0,24	0,213	0,216	1,018 ± 0,11	0,213	0,220	1,031 ± 0,17
3104		0,222	0,233	1,049 ± 0,58	0,211	0,209	0,990 ± 0,34	0,207	0,224	1,083 ± 0,54

^aCPRG ile elde edilen sonuçlar; her bir değer 3 ayrı deneyden elde edilen 12 verinin ortalama ve standart sapmasını içerir. CPRG, Klorofenol red-β-D-galaktopiranosid; RGA, rölatif β-galaktosidaz aktivitesi; 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g ve 2h; sırasıyla benzen halkasında H, Br, Cl, etil, etoksi, metil, metoksi ve nitro gruplarını içeren 2-[(2-Nitro-1-fenil/p-sübstitüe-fenil-butil)tiyo]benzoik asit türevi ilaç etken maddeleri

Umu testinden elde edilen veriler sonucunda çalışılan benzoik asit türevlerinden hiçbirinin genotoksik etki göstermemiş olması bu türevlerin ilaç olarak değerlendirilmelerinde çok önemli bir basamaktır.

4.3. Benzimidazol Türevi İlaç Etken Maddeleriyle Elde Edilen Umu-Mikroplak Test Sonuçları

Benzimidazol türevi ilaç etken maddelerinin umuC gen ifadesini, CPRG substratı ile indüklemeye sonuçları Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Kimyasal yapıdaki en ufak değişiklik ilacın özelliğini değiştirerek onu tamamen farklı bir forma sokabilmektedir. Bu nedenle de ilaç geliştirilirken, aynı halka üzerinde değişik gruplar taşıyan ya da farklı konumlarda aynı grubu taşıyan birçok ilaç etken maddesi sentezlenerek farmakolojik aktiviteleri tayin edilmekte ve en etkili ve en güvenilir olanı seçilmektedir (Ateş-Alagöz et al., 2004; 2007).

Nitro grubu taşıyan birçok bileşiğin genotoksik etkilerinin olduğu ve laboratuvar hayvanlarında tümör oluşturma potansiyellerinin bulunduğu saptanmıştır (Lawley 1989; Ames et al., 1975). Bu bileşikler arasında 5-nitro-3-tiyofenkarboksamit (Hrelia et al., 1993), N-nitro-N-nitrosoguanidin (Kelly et al., 1971; Joseph et al., 1960), 2-nitro-3-metilimidazo[4,5-f]quinoline (Lesley et al., 1993), 4-nitrophenylendiamine (James et al., 1991), nitrokinolin 1-oksit (Jin et al., 1996), 1-nitrobenzopiren (Anne et al., 2004) sayılabilir. Önemli bir ilaç grubu olan 5-nitroimidazol türevlerinin genotoksik etkileri bilinmektedir ve ayrıntılı olarak incelenmiştir (Lopez et al., 2003; 2001; Celik et al., 2006).

Gökçe ve arkadaşları tarafından (2008) değişik R gruplarına bağlı olarak farklı antifungal aktivite gösterdiği saptanan ilaç etken maddeleri umu-mikroplak test sisteminde genotoksik açıdan değerlendirilmiş ve bu benzimidazol türevleri (sırasıyla 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g ve 3h) NM2009, NM3009 ve NM1011 suşlarında genotoksisite açısından hiçbir farklılık göstermemiş ve hiçbiri genotoksik bulunmamıştır. Tüm bileşikler için, kullanılan üç suşta, umuC gen ifadesinin indüksiyonu hemen hemen aynı olmuştur.

İndol, indazole ve benzimidazollerin nitro ve N-metil-nitro türevlerinin mutajenik aktivitelerinin Salmonella TA98 ve TA100 suşları ile araştırıldığı bir çalışmada, nitro grubunu 4 ve 7 numaralı karbonlarında taşıyan bileşikler zayıf mutajenik ya da nonmutajenik etki göstermiştir. Nitro grubunu 2, 5 ve 6 numaralı karbonlarında taşıyan bileşikler ise mutajenik etki göstermiş (Vance et al., 1986). Aynı çalışmada

nitrolu heterosiklik halka taşıyan bileşiklerde, halka metilasyonunun mutajeniteyi azalttığı sonucuna ulaşılmıştır (Vance et al., 1986; Klein et al., 2000; Crozet et al., 2009) ancak bu durum 2-nitro-benzimidazol'de gözlemlenmemiş ve mutajenik aktivitesi yüksek bulunmuştur. Buna benzer bir çalışmada da 5-nitrobenzimidazol ve indol türevleri Ames testinde mutajen bulunmuştur (Hrelia et al., 1993). Bilindiği gibi, nitro grubunun konumu ve yapıdaki diğer bileşenler bileşiklere farklı özellikler katabilmektedir. Bizim çalışmamızda kullanmış olduğumuz ve nitro grubu 2 nolu karbonlarda taşıyan bileşiklerde herhangi bir mutajenik etki gözlenmemiştir.

Çalışmamızda kullanmış olduğumuz benzimidazol türevlerinin, nitroarenlere son derece duyarlı umu-mikroplak test sistemi ile genotoksik bulunmaması bu etken maddelerin ilaç olarak değerlendirilmelerinde çok önemli bir basamaktır.

Çizelge 4.2. Benzimidazol türevi ilaç etken maddeleriyle *Salmonella typhimurium* NM2009, NM3009 ve NM1011 suşlarında CPRG substratlarıyla elde edilen umu-mikroplak test sonuçları^b.

Kimyasal	Konsantrasyon (µM)	NM2009			NM3009			NM1011		
		Hücre yoğunluğu (A ₅₉₅)	CPRG (A ₅₇₀)	RGA± SD A ₅₇₀ / A ₅₉₅	Hücre yoğunluğu (A ₅₉₅)	CPRG (A ₅₇₀)	RGA+ SD A ₅₇₀ / A ₅₉₅	Hücre yoğunluğu (A ₅₉₅)	CPRG (A ₅₇₀)	RGA+ SD A ₅₇₀ / A ₅₉₅
4NQO	0	0,223	0,267	1,197 ± 0,23	0,218	0,295	1,353 ± 0,34	0,220	0,289	1,313 ± 0,21
	1,25	0,219	0,289	1,319 ± 0,61	0,215	0,311	1,446 ± 0,19	0,226	0,321	1,420 ± 0,42
	2,5	0,213	0,511	2,399 ± 0,23	0,210	0,589	2,804 ± 0,52	0,221	0,602	2,723 ± 0,19
	5	0,227	0,734	3,233 ± 0,51	0,222	0,721	3,247 ± 0,21	0,211	0,773	3,663 ± 0,72
	10	0,212	1,213	5,721 ± 0,24	0,225	1,423	6,324 ± 0,51	0,218	1,355	6,215 ± 0,43
3a	0	0,209	0,250	1,192 ± 0,27	0,216	0,289	1,338 ± 0,19	0,223	0,271	1,215 ± 0,28
	0,1	0,200	0,188	0,942 ± 0,47	0,224	0,278	1,241 ± 0,14	0,224	0,270	1,205 ± 0,12
	0,3	0,216	0,231	1,069 ± 0,14	0,207	0,250	1,212 ± 0,08	0,223	0,246	1,105 ± 0,57
	0,6	0,216	0,234	1,087 ± 0,38	0,200	0,248	1,237 ± 0,64	0,196	0,232	1,186 ± 0,07
	1,1	0,219	0,230	1,049 ± 0,11	0,216	0,243	1,127 ± 0,33	0,222	0,250	1,124 ± 0,62
	2,2	0,188	0,210	1,121 ± 0,08	0,220	0,251	1,140 ± 0,44	0,226	0,260	1,150 ± 0,10
	4	0,214	0,229	1,072 ± 0,13	0,204	0,252	1,232 ± 0,09	0,225	0,256	1,138 ± 0,22
	9	0,221	0,239	1,082 ± 0,08	0,214	0,245	1,146 ± 0,30	0,229	0,250	1,092 ± 0,61
	18	0,235	0,229	0,974 ± 0,09	0,206	0,248	1,203 ± 0,52	0,190	0,215	1,133 ± 0,08
	36	0,234	0,239	1,024 ± 0,14	0,207	0,242	1,171 ± 0,57	0,229	0,253	1,104 ± 0,56
	71	0,216	0,239	1,111 ± 0,29	0,212	0,248	1,169 ± 0,13	0,225	0,253	1,124 ± 0,14
	142	0,213	0,236	1,109 ± 0,31	0,215	0,245	1,141 ± 0,09	0,226	0,251	1,110 ± 0,42
	285	0,205	0,231	1,126 ± 0,07	0,208	0,242	1,165 ± 0,51	0,223	0,259	1,162 ± 0,61
3b	0	0,209	0,250	1,192 ± 0,27	0,216	0,289	1,338 ± 0,19	0,223	0,271	1,215 ± 0,28
	0,3	0,200	0,208	1,042 ± 0,47	0,224	0,224	0,999 ± 0,14	0,200	0,201	1,009 ± 0,12
	0,6	0,216	0,230	1,068 ± 0,10	0,211	0,247	1,176 ± 0,52	0,218	0,255	1,170 ± 0,34
	1,2	0,197	0,228	1,158 ± 0,22	0,241	0,290	1,205 ± 0,60	0,227	0,255	1,122 ± 0,83
	2,5	0,220	0,223	1,014 ± 0,10	0,210	0,242	1,151 ± 0,07	0,219	0,238	1,086 ± 0,71
	5	0,214	0,236	1,104 ± 0,33	0,198	0,244	1,233 ± 0,40	0,223	0,254	1,139 ± 0,56
	10	0,213	0,227	1,066 ± 0,11	0,233	0,281	1,208 ± 0,10	0,227	0,255	1,121 ± 0,25
	20	0,220	0,239	1,088 ± 0,10	0,213	0,244	1,149 ± 0,32	0,225	0,253	1,125 ± 0,29
	40	0,213	0,226	1,063 ± 0,07	0,205	0,245	1,195 ± 0,55	0,209	0,253	1,211 ± 0,45
	80	0,213	0,229	1,076 ± 0,63	0,215	0,245	1,137 ± 0,38	0,221	0,254	1,151 ± 0,23
	159	0,188	0,214	1,143 ± 0,41	0,238	0,269	1,132 ± 0,33	0,221	0,249	1,126 ± 0,50
	318	0,208	0,240	1,153 ± 0,24	0,210	0,247	1,174 ± 0,08	0,232	0,252	1,086 ± 0,38
	636	0,219	0,221	1,007 ± 0,10	0,215	0,254	1,182 ± 0,34	0,217	0,261	1,202 ± 0,21
3c	0	0,209	0,250	1,192 ± 0,27	0,216	0,289	1,338 ± 0,19	0,223	0,271	1,215 ± 0,28
	0,3	0,212	0,239	1,125 ± 0,22	0,210	0,250	1,193 ± 0,34	0,229	0,277	1,210 ± 0,42
	0,6	0,207	0,241	1,166 ± 0,39	0,234	0,285	1,218 ± 0,11	0,226	0,259	1,135 ± 0,75
	1,2	0,220	0,244	1,110 ± 0,45	0,213	0,251	1,176 ± 0,22	0,223	0,261	1,169 ± 0,19
	2,3	0,216	0,239	1,108 ± 0,54	0,197	0,251	1,270 ± 0,76	0,208	0,251	1,206 ± 0,41
	5	0,191	0,209	1,099 ± 0,12	0,211	0,245	1,159 ± 0,22	0,223	0,256	1,151 ± 0,28
	9	0,215	0,236	1,101 ± 0,38	0,214	0,256	1,199 ± 0,34	0,224	0,245	1,094 ± 0,35
	19	0,218	0,242	1,111 ± 0,21	0,209	0,246	1,175 ± 0,35	0,228	0,261	1,143 ± 0,08
	37	0,188	0,206	1,101 ± 0,47	0,209	0,250	1,194 ± 0,27	0,233	0,256	1,099 ± 0,60
	75	0,213	0,240	1,127 ± 0,59	0,213	0,251	1,178 ± 0,28	0,231	0,263	1,141 ± 0,23
	150	0,211	0,237	1,124 ± 0,65	0,224	0,277	1,238 ± 0,56	0,222	0,258	1,160 ± 0,32
	300	0,189	0,206	1,091 ± 0,18	0,208	0,241	1,158 ± 0,37	0,198	0,217	1,098 ± 0,71
	600	0,216	0,237	1,100 ± 0,23	0,209	0,245	1,175 ± 0,24	0,221	0,257	1,164 ± 0,31

^bCPRG ile elde edilen sonuçlar; her bir değer 3 ayrı deneyden elde edilen 12 verinin ortalama ve standart sapmasını içerir. CPRG, Klorofenol red-β-D-galaktopiranosid; RGA, rölatif β-galaktosidaz aktivitesi; 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g ve 3h; sırasıyla benzen halkasında H, CH₃, Cl, OCH₃, 4-OH 3-OCH₃, OC₂H₅, C₂H₅, NO₂ gruplarını içeren 2-[(2-nitro-1-feniletil)tiyometil]benzimidazol türevi ilaç etken maddeleri

Çizelge 4.2. devam ediyor

Kimyasal	Konsantrasyon (μM)	NM2009			NM3009			NM1011		
		Hücre yoğunluğu (A_{595})	CPRG (A_{570})	RGA \pm SD A_{570}/A_{595}	Hücre yoğunluğu (A_{595})	CPRG (A_{570})	RGA+ SD A_{570}/A_{595}	Hücre yoğunluğu (A_{595})	CPRG (A_{570})	RGA+ SD A_{570}/A_{595}
3d	0	0,209	0,250	1,192 \pm 0,27	0,216	0,289	1,338 \pm 0,19	0,223	0,271	1,215 \pm 0,28
	0,2	0,218	0,240	1,102 \pm 0,12	0,214	0,257	1,202 \pm 0,29	0,217	0,249	1,096 \pm 0,11
	0,4	0,214	0,237	1,107 \pm 0,23	0,224	0,271	1,210 \pm 0,76	0,226	0,251	1,110 \pm 0,39
	0,9	0,214	0,246	1,148 \pm 0,46	0,207	0,242	1,168 \pm 0,29	0,229	0,275	1,205 \pm 0,24
	1,8	0,241	0,239	0,991 \pm 0,30	0,216	0,251	1,163 \pm 0,11	0,222	0,254	1,143 \pm 0,53
	4	0,224	0,240	1,070 \pm 0,18	0,210	0,243	1,155 \pm 0,67	0,198	0,226	1,145 \pm 0,58
	7	0,221	0,239	1,082 \pm 0,15	0,198	0,232	1,174 \pm 0,45	0,200	0,227	1,137 \pm 0,41
	14	0,216	0,236	1,092 \pm 0,55	0,208	0,244	1,178 \pm 0,45	0,229	0,263	1,153 \pm 0,56
	28	0,217	0,237	1,093 \pm 0,28	0,213	0,243	1,141 \pm 0,40	0,222	0,250	1,127 \pm 0,31
	57	0,213	0,240	1,126 \pm 0,29	0,233	0,286	1,228 \pm 0,51	0,201	0,231	1,154 \pm 0,48
	113	0,235	0,257	1,094 \pm 0,27	0,204	0,251	1,231 \pm 0,68	0,225	0,258	1,146 \pm 0,36
	227	0,222	0,244	1,103 \pm 0,18	0,201	0,246	1,228 \pm 0,23	0,226	0,253	1,136 \pm 0,13
	454	0,207	0,239	1,152 \pm 0,35	0,207	0,254	1,225 \pm 0,37	0,222	0,258	1,160 \pm 0,64
	3e	0	0,214	0,266	1,248 \pm 0,27	0,205	0,276	1,349 \pm 0,42	0,213	0,259
0,3		0,233	0,280	1,206 \pm 0,12	0,188	0,238	1,271 \pm 0,35	0,191	0,206	1,080 \pm 0,24
0,7		0,197	0,229	1,167 \pm 0,45	0,196	0,244	1,246 \pm 0,36	0,209	0,242	1,159 \pm 0,23
1,4		0,218	0,236	1,084 \pm 0,52	0,205	0,243	1,187 \pm 0,45	0,216	0,242	1,123 \pm 0,17
2,7		0,223	0,260	1,168 \pm 0,55	0,203	0,245	1,204 \pm 0,43	0,208	0,242	1,162 \pm 0,64
5		0,212	0,240	1,131 \pm 0,12	0,205	0,242	1,184 \pm 0,30	0,212	0,242	1,144 \pm 0,42
11		0,213	0,239	1,122 \pm 0,53	0,205	0,237	1,156 \pm 0,11	0,211	0,242	1,147 \pm 0,13
22		0,210	0,247	1,173 \pm 0,29	0,196	0,247	1,256 \pm 0,26	0,208	0,234	1,122 \pm 0,28
43		0,213	0,241	1,133 \pm 0,18	0,206	0,247	1,200 \pm 0,34	0,217	0,240	1,107 \pm 0,33
87		0,210	0,260	1,238 \pm 0,19	0,206	0,242	1,174 \pm 0,27	0,211	0,239	1,136 \pm 0,37
174		0,208	0,240	1,154 \pm 0,68	0,202	0,240	1,189 \pm 0,40	0,203	0,246	1,214 \pm 0,69
348		0,209	0,242	1,160 \pm 0,69	0,196	0,243	1,241 \pm 0,32	0,209	0,239	1,142 \pm 0,15
696		0,215	0,261	1,213 \pm 0,33	0,207	0,241	1,162 \pm 0,36	0,203	0,244	1,202 \pm 0,68
3f		0	0,214	0,266	1,248 \pm 0,27	0,205	0,276	1,349 \pm 0,42	0,213	0,259
	0,4	0,206	0,248	1,203 \pm 0,10	0,201	0,242	1,216 \pm 0,39	0,208	0,235	1,130 \pm 0,24
	0,9	0,211	0,243	1,151 \pm 0,29	0,195	0,242	1,237 \pm 0,56	0,210	0,241	1,148 \pm 0,23
	1,7	0,208	0,248	1,193 \pm 0,29	0,198	0,247	1,249 \pm 0,39	0,203	0,244	1,197 \pm 0,25
	3,4	0,210	0,242	1,151 \pm 0,86	0,201	0,245	1,218 \pm 0,76	0,210	0,238	1,136 \pm 0,09
	7	0,219	0,244	1,116 \pm 0,66	0,196	0,249	1,270 \pm 0,55	0,207	0,240	1,160 \pm 0,30
	14	0,207	0,234	1,130 \pm 0,74	0,207	0,243	1,175 \pm 0,64	0,233	0,276	1,188 \pm 0,16
	27	0,224	0,265	1,187 \pm 0,12	0,205	0,249	1,212 \pm 0,46	0,211	0,250	1,183 \pm 0,35
	55	0,208	0,244	1,175 \pm 0,53	0,234	0,281	1,203 \pm 0,60	0,241	0,277	1,150 \pm 0,22
	109	0,206	0,248	1,203 \pm 0,13	0,202	0,242	1,196 \pm 0,47	0,200	0,232	1,163 \pm 0,29
	219	0,209	0,238	1,140 \pm 0,43	0,202	0,243	1,201 \pm 0,81	0,208	0,236	1,134 \pm 0,35
	437	0,223	0,270	1,214 \pm 0,28	0,212	0,246	1,158 \pm 0,65	0,221	0,267	1,208 \pm 0,39
	874	0,204	0,243	1,192 \pm 0,21	0,200	0,248	1,240 \pm 0,73	0,209	0,241	1,152 \pm 0,66

^bCPRG ile elde edilen sonuçlar; her bir değer 3 ayrı deneyden elde edilen 12 verinin ortalama ve standart sapmasını içerir. CPRG, Klorofenol red- β -D-galaktopiranosid; RGA, rölatif β -galaktosidaz aktivitesi; 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g ve 3h; sırasıyla benzen halkasında H, CH₃, Cl, OCH₃, 4-OH 3-OCH₃, OC₂H₅, C₂H₅, NO₂ gruplarını içeren 2-[(2-nitro-1-feniletıl)tiyometil]benzimidazol türevi ilaç etken maddeleri

Çizelge 4.2. devam ediyor

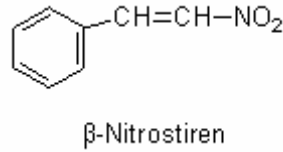
Kimyasal	Konsantrasyon (μ M)	NM2009			NM3009			NM1011		
		Hücre yoğunluğu (A_{595})	CPRG (A_{570})	RGA \pm SD A_{570}/A_{595}	Hücre yoğunluğu (A_{595})	CPRG (A_{570})	RGA+ SD A_{570}/A_{595}	Hücre yoğunluğu (A_{595})	CPRG (A_{570})	RGA+ SD A_{570}/A_{595}
3g	0	0,214	0,266	1,248 \pm 0,27	0,205	0,276	1,349 \pm 0,42	0,213	0,259	1,217 \pm 0,53
	0,3	0,210	0,243	1,159 \pm 0,80	0,196	0,246	1,257 \pm 0,27	0,213	0,241	1,130 \pm 0,12
	0,6	0,239	0,287	1,203 \pm 0,67	0,202	0,243	1,202 \pm 0,16	0,205	0,241	1,171 \pm 0,64
	1,2	0,210	0,249	1,184 \pm 0,10	0,199	0,245	1,232 \pm 0,49	0,225	0,265	1,179 \pm 0,54
	2,4	0,215	0,242	1,126 \pm 0,51	0,205	0,246	1,201 \pm 0,45	0,208	0,245	1,179 \pm 0,07
	5	0,217	0,248	1,146 \pm 0,63	0,205	0,244	1,193 \pm 0,40	0,213	0,245	1,155 \pm 0,43
	10	0,207	0,241	1,166 \pm 0,10	0,198	0,241	1,216 \pm 0,59	0,234	0,273	1,170 \pm 0,51
	19	0,216	0,263	1,217 \pm 0,22	0,202	0,216	1,069 \pm 0,43	0,216	0,240	1,114 \pm 0,33
	38	0,207	0,245	1,181 \pm 0,69	0,201	0,246	1,222 \pm 0,61	0,229	0,275	1,203 \pm 0,40
	76	0,212	0,241	1,146 \pm 0,19	0,206	0,238	1,155 \pm 0,55	0,214	0,242	1,129 \pm 0,09
	153	0,204	0,239	1,174 \pm 0,57	0,206	0,242	1,179 \pm 0,22	0,218	0,242	1,111 \pm 0,09
	305	0,203	0,246	1,213 \pm 0,46	0,197	0,236	1,002 \pm 0,64	0,213	0,234	1,099 \pm 0,46
	610	0,202	0,248	1,225 \pm 0,37	0,202	0,239	1,184 \pm 0,30	0,214	0,249	1,167 \pm 0,08
	3h	0	0,214	0,266	1,248 \pm 0,27	0,205	0,276	1,349 \pm 0,42	0,213	0,259
0,3		0,198	0,242	1,222 \pm 0,13	0,223	0,275	1,235 \pm 0,17	0,221	0,268	1,212 \pm 0,23
0,6		0,200	0,246	1,225 \pm 0,38	0,197	0,246	1,252 \pm 0,58	0,208	0,239	1,150 \pm 0,77
1,1		0,205	0,244	1,188 \pm 0,56	0,214	0,245	1,148 \pm 0,63	0,203	0,241	1,185 \pm 0,27
2,3		0,214	0,246	1,153 \pm 0,50	0,204	0,239	1,174 \pm 0,73	0,212	0,235	1,110 \pm 0,79
5		0,206	0,253	1,225 \pm 0,72	0,205	0,244	1,191 \pm 0,49	0,211	0,240	1,135 \pm 0,52
9		0,204	0,251	1,231 \pm 0,39	0,204	0,247	1,209 \pm 0,20	0,208	0,245	1,178 \pm 0,76
18		0,206	0,247	1,196 \pm 0,78	0,245	0,289	1,183 \pm 0,16	0,214	0,250	1,165 \pm 0,42
36		0,215	0,251	1,167 \pm 0,47	0,205	0,243	1,185 \pm 0,46	0,234	0,264	1,129 \pm 0,10
72		0,211	0,245	1,161 \pm 0,69	0,202	0,247	1,223 \pm 0,59	0,215	0,246	1,143 \pm 0,36
145		0,208	0,251	1,206 \pm 0,38	0,199	0,246	1,236 \pm 0,56	0,209	0,239	1,149 \pm 0,10
290		0,213	0,245	1,149 \pm 0,10	0,201	0,241	1,198 \pm 0,61	0,206	0,244	1,184 \pm 0,82
580		0,213	0,245	1,153 \pm 0,67	0,198	0,247	1,244 \pm 0,52	0,200	0,236	1,176 \pm 0,55

^bCPRG ile elde edilen sonuçlar; her bir değer 3 ayrı deneyden elde edilen 12 verinin ortalama ve standart sapmasını içerir. CPRG, Klorofenol red- β -D-galaktopiranosid; RGA, rölatif β -galaktosidaz aktivitesi; 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g ve 3h; sırasıyla benzen halkasında H, CH₃, Cl, OCH₃, 4-OH 3-OCH₃, OC₂H₅, C₂H₅, NO₂ gruplarını içeren 2-[(2-nitro-1-feniletıl)tiyometıl]benzimidazol türevi ilaç etken maddeleri

4.3. β -Metil- β -Nitrostiren Türevi İlaç Etken Maddeleriyle Elde Edilen Umu-Mikroplak Test Sonuçları

β -Metil- β -nitrostiren türevi ilaç etken maddelerinin umuC gen ifadesini, CPRG substratı ile indükleme sonuçları Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

β -Nitrostirenler (Şekil 4.7.) çok değişik farmakolojik aktivitelere sahip bileşiklerdir. Özellikle antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri dikkat çekicidir (Milhazes et al., 2006). Bundan başka β -nitrostirenlerin antikanserojen (Pettit et al., 2009), tirozinkinaz inhibitörü (Wei-ya wang et al., 2007), antiplatelet (Wei-ya wang et al., 2007), sitokin modölatör (Brian et al., 1994), antiviral (Gancedo et al., 1984), proteinkinaz inhibitörü (Parang et al., 2002) aktiviteleri literatürde rapor edilmiştir. Gökçe ve arkadaşları tarafından, β -nitrostirenlerin Michael tipi katılma ürünlerinin sentezi yapılarak antibakteriyel, antifungal, antiviral aktiviteleri araştırılmış ve çok etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Berçin et al., 1995; 1996; Gökçe et al., 1996b; 2004; 2008).



Şekil 4.7. β -Nitrostiren kimyasal yapısı.

β -Metil- β -nitrostiren türevi dört ilaç etken maddesi (4a, 4b, 4c ve 4d) NM2009, NM3009 ve NM1011 suşlarında herhangi bir genotoksisite göstermemiştir.

Bilich ve arkadaşları (1970) tarafından yapılan bir çalışmada β -nitrostirenlerin *Escherichia coli* ve *Candida albicans* üzerinde antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri değerlendirilmiştir. Başka bir çalışmada en yüksek antibakteriyel aktivite 4-kloro- β -nitrostiren türevinde gözlenmiştir. Bu çalışmada en az toksik bileşiğin 4-bromo- β -metil- β -nitrostiren olduğu belirtilmiştir (Gökçe et al., 1996).

Montganier ve arkadaşları (1971) tarafından yapılan bir çalışmada β -nitrostirenlerin sitotoksik ve antitümör aktivite çalışmaları yapılmıştır. İn vitro sitotoksik aktivite çalışmaları Rous sarcoma ile inkübasyona tabi tutulan hamster fibroblastlarında mikroskopik olarak değerlendirilmiştir. İn vivo antitümör aktivite

çalışmaları Krebs II ascites karsinomada değerlendirilmiştir. Tümör taşıyan farelere bileşiğin intraperitoneal injeksiyonundan sonra 7. günde tümörün gelişmesinin inhibe olduğu gözlenmiştir. Nitro grubunun varlığı aktivite için gereklidir. Aril çekirdeğine diğer bir nitro grubunun, alkoksi, halojen veya alkil gruplarının katılması konakçı üzerindeki toksisiteyi azaltırken antitümör aktivitenin değişmemesine ya da artmasına neden olmaktadır.

2009 yılında yapılan bir çalışmada yeni sınıf antikanserojen bileşikler sentezlenmiştir. Bileşiklerin sentezinde β -nitrostirenler ara üründür. Bileşikler lenfoma, lösemi ve meme kanserlerinde belirgin antiproliferatif etkiler göstermişlerdir (Suzanne et al., 2009).

Elektron çekici gruplar ile çifte bağlarının mezomerik olarak aktivasyonu sağlanmış stiren türevlerine 20 °C'de etilenimin katılmasının oranı spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. β -nitrostiren türevlerinin sitostatik aktivitesi ile katılma oranı arasında direkt bir ilişki gözlenmiştir. En yüksek aktivite p-nitro- β -nitrostiren bileşiğinde gözlenmiştir (Gökçe et al., 1996).

Gökçe'in (1996) yaptığı çalışmada β -nitrostiren toksisite testlerine tabi tutulmuş ve 80-110 mg dozda intravenöz olarak verildiğinde kullanılan 15 fareden hiçbiri ölmemiştir.

Zeiger ve arkadaşlarının (1992) yapmış olduğu çalışmada, β -nitrostirenlerin Ames testi sonucunda, bizim çalışmamızda da olduğu gibi mutajenik olmadıkları saptanmıştır.

Çizelge 4.3. β -metil- β -nitrostiren türevi ilaç etken maddeleriyle *Salmonella typhimurium* NM2009, NM3009 ve NM1011 suşlarında CPRG substratlarıyla elde edilen umu-mikroplak test sonuçları^c.

Kimyasal	Konsantrasyon (μ M)	NM2009			NM3009			NM1011		
		Hücre yoğunluğu (A ₅₉₅)	CPRG (A ₅₇₀)	RGA \pm SD A ₅₇₀ / A ₅₉₅	Hücre yoğunluğu (A ₅₉₅)	CPRG (A ₅₇₀)	RGA+ SD A ₅₇₀ / A ₅₉₅	Hücre yoğunluğu (A ₅₉₅)	CPRG (A ₅₇₀)	RGA+ SD A ₅₇₀ / A ₅₉₅
4NQO	0	0,207	0,261	1,262 \pm 0,30	0,205	0,267	1,302 \pm 0,42	0,214	0,271	1,271 \pm 0,44
	1,25	0,206	0,312	1,512 \pm 0,12	0,213	0,309	1,456 \pm 0,14	0,207	0,309	1,494 \pm 0,21
	2,5	0,203	0,481	2,368 \pm 0,24	0,205	0,490	2,389 \pm 0,15	0,220	0,588	2,673 \pm 0,26
	5	0,199	0,700	3,520 \pm 0,46	0,211	0,682	3,228 \pm 0,53	0,198	0,726	3,674 \pm 0,47
	10	0,206	1,168	5,679 \pm 0,69	0,208	1,266	6,080 \pm 0,71	0,203	1,304	6,439 \pm 0,77
4a	0	0,207	0,263	1,274 \pm 0,10	0,208	0,255	1,229 \pm 0,11	0,211	0,260	1,233 \pm 0,34
	1,7	0,194	0,233	1,205 \pm 0,19	0,189	0,228	1,210 \pm 0,34	0,207	0,253	1,222 \pm 0,17
	3,3	0,194	0,234	1,210 \pm 0,51	0,207	0,238	1,152 \pm 0,13	0,210	0,239	1,141 \pm 0,10
	6,7	0,209	0,226	1,082 \pm 0,38	0,210	0,244	1,162 \pm 0,11	0,211	0,244	1,157 \pm 0,22
	13,3	0,201	0,229	1,142 \pm 0,12	0,209	0,223	1,066 \pm 0,13	0,208	0,239	1,147 \pm 0,72
	27	0,208	0,234	1,125 \pm 0,88	0,210	0,248	1,185 \pm 0,15	0,210	0,257	1,223 \pm 0,89
	53	0,201	0,236	1,175 \pm 0,10	0,206	0,236	1,142 \pm 0,62	0,205	0,238	1,161 \pm 0,32
	107	0,210	0,232	1,108 \pm 0,42	0,208	0,243	1,170 \pm 0,88	0,207	0,240	1,161 \pm 0,69
	213	0,201	0,230	1,148 \pm 0,09	0,206	0,233	1,132 \pm 0,55	0,209	0,255	1,220 \pm 0,32
	426	0,201	0,236	1,175 \pm 0,10	0,208	0,235	1,131 \pm 0,09	0,207	0,241	1,161 \pm 0,52
	852	0,198	0,233	1,180 \pm 0,11	0,209	0,254	1,215 \pm 0,54	0,208	0,236	1,137 \pm 0,58
	1704	0,199	0,245	1,236 \pm 0,12	0,208	0,248	1,196 \pm 0,78	0,217	0,229	1,054 \pm 0,28
	3408	0,202	0,237	1,171 \pm 0,14	0,212	0,238	1,120 \pm 0,54	0,207	0,237	1,141 \pm 0,78
	4b	0	0,207	0,263	1,274 \pm 0,10	0,208	0,255	1,229 \pm 0,11	0,211	0,260
1,1		0,223	0,265	1,188 \pm 0,33	0,197	0,238	1,208 \pm 0,18	0,231	0,260	1,195 \pm 0,21
2,3		0,196	0,235	1,202 \pm 0,10	0,203	0,245	1,205 \pm 0,86	0,206	0,234	1,131 \pm 0,28
4,6		0,201	0,232	1,154 \pm 0,68	0,204	0,244	1,194 \pm 0,51	0,205	0,235	1,145 \pm 0,61
9,2		0,198	0,235	1,186 \pm 0,10	0,209	0,240	1,144 \pm 0,78	0,208	0,234	1,126 \pm 0,46
18		0,206	0,242	1,176 \pm 0,12	0,205	0,241	1,174 \pm 0,49	0,206	0,240	1,170 \pm 0,08
37		0,209	0,235	1,125 \pm 0,60	0,232	0,280	1,208 \pm 0,14	0,211	0,246	1,164 \pm 0,54
74		0,200	0,235	1,172 \pm 0,87	0,212	0,240	1,130 \pm 0,11	0,209	0,254	1,215 \pm 0,28
147		0,201	0,240	1,195 \pm 0,81	0,204	0,246	1,207 \pm 0,10	0,205	0,240	1,170 \pm 0,11
294		0,199	0,237	1,192 \pm 0,17	0,212	0,246	1,160 \pm 0,12	0,209	0,239	1,140 \pm 0,14
589		0,204	0,233	1,143 \pm 0,14	0,207	0,242	1,165 \pm 0,09	0,211	0,244	1,156 \pm 0,09
1177		0,206	0,234	1,135 \pm 0,72	0,205	0,241	1,175 \pm 0,59	0,211	0,238	1,128 \pm 0,62
2354		0,206	0,236	1,147 \pm 0,75	0,203	0,239	1,181 \pm 0,81	0,209	0,235	1,122 \pm 0,65
4c		0	0,207	0,263	1,274 \pm 0,10	0,208	0,255	1,229 \pm 0,11	0,211	0,260
	1,4	0,221	0,267	1,211 \pm 0,35	0,216	0,259	1,200 \pm 0,23	0,194	0,225	1,159 \pm 0,21
	2,8	0,203	0,241	1,190 \pm 0,10	0,209	0,250	1,198 \pm 0,11	0,215	0,243	1,129 \pm 0,40
	5,6	0,201	0,232	1,153 \pm 0,45	0,211	0,241	1,142 \pm 0,12	0,209	0,239	1,144 \pm 0,55
	11,0	0,211	0,235	1,115 \pm 0,10	0,206	0,252	1,223 \pm 0,78	0,198	0,238	1,202 \pm 0,10
	22	0,194	0,234	1,208 \pm 0,88	0,205	0,240	1,171 \pm 0,10	0,210	0,243	1,156 \pm 0,59
	45	0,202	0,233	1,154 \pm 0,11	0,217	0,239	1,105 \pm 0,84	0,211	0,247	1,171 \pm 0,57
	90	0,205	0,237	1,153 \pm 0,10	0,210	0,242	1,152 \pm 0,66	0,206	0,243	1,179 \pm 0,10
	180	0,208	0,236	1,139 \pm 0,39	0,214	0,251	1,174 \pm 0,62	0,209	0,244	1,168 \pm 0,64
	360	0,196	0,238	1,216 \pm 0,10	0,216	0,246	1,129 \pm 0,10	0,202	0,250	1,237 \pm 0,64
	720	0,202	0,240	1,189 \pm 0,12	0,212	0,249	1,176 \pm 0,46	0,205	0,239	1,162 \pm 0,63
	1439	0,196	0,233	1,188 \pm 0,11	0,210	0,238	1,135 \pm 0,31	0,207	0,234	1,132 \pm 0,31
	2879	0,201	0,234	1,165 \pm 0,50	0,210	0,244	1,165 \pm 0,83	0,207	0,243	1,170 \pm 0,14

^cCPRG ile elde edilen sonuçlar; her bir değer 3 ayrı deneyden elde edilen 12 verinin ortalama ve standart sapmasını içerir. CPRG, Klorofenol red- β -D-galaktopiranosid; RGA, rölatif β -galaktosidaz aktivitesi; 4a, 4b, 4c ve 4d; sırasıyla benzen halkasında H, CH₃, CH₃O ve Cl gruplarını içeren β -metil- β -nitrostiren türevi ilaç etken maddeleri

Çizelge 4.3. devam ediyor

Kimyasal	Konsantrasyon (µM)	NM2009			NM3009			NM1011		
		Hücre yoğunluğu (A ₅₉₅)	CPRG (A ₅₇₀)	RGA± SD A ₅₇₀ / A ₅₉₅	Hücre yoğunluğu (A ₅₉₅)	CPRG (A ₅₇₀)	RGA+ SD A ₅₇₀ / A ₅₉₅	Hücre yoğunluğu (A ₅₉₅)	CPRG (A ₅₇₀)	RGA+ SD A ₅₇₀ / A ₅₉₅
4d	0	0,207	0,263	1,274 ± 0,10	0,208	0,255	1,229 ± 0,11	0,211	0,260	1,233 ± 0,34
	2,1	0,221	0,269	1,215 ± 0,34	0,215	0,261	1,213 ± 0,34	0,223	0,268	1,205 ± 0,13
	4,1	0,198	0,237	1,198 ± 0,15	0,210	0,252	1,200 ± 0,82	0,209	0,235	1,125 ± 0,67
	8,2	0,196	0,232	1,184 ± 0,12	0,214	0,238	1,113 ± 0,33	0,212	0,231	1,090 ± 0,45
	16,5	0,197	0,231	1,170 ± 0,37	0,214	0,234	1,160 ± 0,13	0,200	0,238	1,186 ± 0,11
	33	0,201	0,228	1,135 ± 0,10	0,215	0,237	1,104 ± 0,73	0,216	0,235	1,089 ± 0,67
	66	0,202	0,239	1,184 ± 0,17	0,210	0,235	1,118 ± 0,48	0,207	0,236	1,140 ± 0,19
	132	0,218	0,269	1,233 ± 0,71	0,208	0,241	1,155 ± 0,09	0,214	0,235	1,099 ± 0,85
	264	0,200	0,235	1,176 ± 0,85	0,214	0,239	1,115 ± 0,13	0,210	0,241	1,143 ± 0,79
	527	0,209	0,238	1,141 ± 0,21	0,200	0,237	1,183 ± 0,63	0,206	0,235	1,143 ± 0,50
	1055	0,211	0,243	1,152 ± 0,67	0,212	0,248	1,168 ± 0,12	0,206	0,242	1,173 ± 0,58
	2110	0,200	0,233	1,163 ± 0,11	0,211	0,237	1,124 ± 0,13	0,217	0,236	1,085 ± 0,34
	4219	0,196	0,233	1,189 ± 0,10	0,204	0,241	1,177 ± 0,33	0,213	0,240	1,128 ± 0,14

°CPRG ile elde edilen sonuçlar; her bir değer 3 ayrı deneyden elde edilen 12 verinin ortalama ve standart sapmasını içerir. CPRG, Klorofenol red-β-D-galaktopiranosid; RGA, rölatif β-galaktosidaz aktivitesi; 4a, 4b, 4c ve 4d; sırasıyla benzen halkasında H, CH₃, CH₃O ve Cl gruplarını içeren β-metil-β-nitrostiren türevi ilaç etken maddeleri

Sonuç olarak, yeni bir ilaç geliştirilirken, piyasaya sunulmadan önce değişik açılardan araştırmalara gereksinim vardır. Umu-mikroplak test sisteminin uygulandığı bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, çalışılan 20 adet ilaç etken maddesinin kullanıma sunulmadan önceki klinik ön değerlendirmelerinde, işe yarayacak önemli verilerdir.

KAYNAKLAR

- Albert S.H, Pooja R.R., Megan N.H., Susan M.R., 2006, Roles of *Escherichia coli* double-strand-break-repairproteins in stress-induced mutation, DNA Repair 5., 258–273.
- Allen, L.B., Teepe, A.G., Kehoe, M. J., Holland, C.S., MC Namara, D.J., Cook, P.D., 1989, Antiviral and cytotoxicity evaluation of 3-nitro-3-deazauridine, Antiviral Research, 12, 259-267.
- Ames, B.N., Lee., F.D., Dorston, F.E., 1973, An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 70, 782-786.
- Ames, B., Mc Cann, J., Yamasaki, E., 1975, Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/Mammalian-microsome mutagenicity test, Mutation Research, 31, 347-364.
- Ames, B.N., 1979, Identifying enviromental chemicals causing mutation and cancer, Science, 204, 587-590.
- Andrzejewska, M., Yopez-Mulia, L., Tapia, A., Cedillo-Rivera, R., Laudy, A.E., Starosciak, B.J., Kazimierczuk, Z., 2004, Synthesis, and antiprotozoal and antibacterial activities of S-substituted 4,6-dibromo- and 4,6-dichloro-2-mercaptobenzimidazoles, Eur. J. Pharm. Sci., 21(2-3), 323-329.
- Anne, K.M., Olatunde, F., Peter, M., Herman, N.A., Ulla, V., Hakan, W., Lars, O.D., Steffen, L., Mona-Lise, B., 2004, DNA damage in lung after oral exposure to diesel exhaust particles in Big Blue rats, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 550, 123-132.
- Arredondo, Y., Moreno-Mañas, M., Pleixats, R., Palacín, C., Raga, M.M., Castelló, J.M., Ortiz, J.A., 1997, Preparation, antimicrobial evaluation, and mutagenicity of [2-hydroxyaryl]-[1-methyl-5-nitro-1*H*-2-midazolyl]methanols, [5-tert-butyl-2-methylaminophenyl]-[1-methyl-5-nitro-1*H*-2-midazolyl]methanol, and [2-hydroxyaryl]-[1-methyl-5-nitro-1*H*-2-imidazolyl] ketones, Bioorg. Med. Chem., 5(10), 1959-1968.
- Ateş-Alagöz, Z., 1998, Retinoidal etkili bazı benzimidazol ve/veya indol türevi bileşiklerin sentezleri ve yapı tayini çalışmaları, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Ateş-Alagöz, Z., Büyükbingöl, E., 2001, Synthesis of Some New Tetrahydronaphthalene Benzimidazole Derivatives, Heterocyclic Communications, 7, 455-461.
- Ateş-Alagöz, Z., Can-Eke, B., Çoban, T., Işcan, M., Büyükbingöl, E., 2004, Antioxidant Properties of Novel Benzimidazole Retinoids, Archive der Pharmazie, 337, 188-92.

- Ateş-Alagöz, Z., Yıldız, S., Büyükbingöl, E., 2007, Antimicrobial Activities of Some Tetrahydronaphthalene-Benzimidazole Derivatives, *Chemotherapy*, 53, 110-113.
- Bagdasarian, M., Bailone, A., Angulo, J.F., Scholz, P., Devoret, R., 1992, PsiB, an anti-SOS protein, is transiently expressed by the F sex factor during its transmission to an *Escherichia coli* K-12 recipient, *Mol Microbiol* 6, 885.
- Bağcı, H., 1985, Yaz Okulu Moleküler Biyoloji Ders Notları, Ortadoğu Teknik Üniversitesi, 25-55.
- Bailone, A., Backman, A., Sommer, S., Celerier, J., Bagdasarian, M.M., Bagdasarian, M., Devoret, R., 1988, PsiB polypeptide prevents activation of RecA protein in *Escherichia coli*, *Mol Gen Genet*, 214, 389.
- Bajpayee, M., Pandey, A.K., Parmar, D., Dhawan, A., 2005, Current status of short-term tests for evaluation of genotoxicity, mutagenicity and carcinogenicity of environmental chemicals and NCEs, *Toxic. Mech. And Methods*, 15, 155-180.
- Beernik, H.T.H., Morrical, S.W. 1999, RMPs: recombination/replication mediator proteins., *TIBS*, 24, 385.
- Berçin, E., Gökçe, M. , Abbasoğlu, U., Noyanalpan, N., 1995a, Nitroethane Derivatives as New Addition Products of β -Nitrostyrenes And Their Antimicrobial Activities, *J. Fac. Pharm.Gazi*, 12(2) 117-128.
- Berçin, E., Gökçe, M., Özçelik, B., Yurtsever, M., Noyanalpan, N., 1995b, Nitropropane Derivatives as New Addition Products of β -Metyl- β -nitrostyrenes And Their Antimicrobial Activities II, *J. Fac. Pharm. Gazi*, 12(2) 173-187.
- Berçin, E., Gökçe, M., 1996a, The products of Michael Type Addition 2-Mercaptometyl- benzimidazole on the Derivatives of β -Nitrostyrenes and Their Structure Eluidation, *J. Fac. Pharm.Gazi*, 13(1) 33-44.
- Bilich, B.E., Vladimirtsev, I.F., Cherkasov, V.M., Khripko, S.S.,1970, Antimicrobic Substances with Antibiotic Action Among β -Nitrostyrene Derivatives, *Antibiotiki (Kiev)*, 5, 31-6, Ref. C A., 75, 116062z.
- Bogovski, P., Bogovski, S., 1981, Animal species in which N-nitroso compounds induce cancer, *Int. J. Cancer*, 27, 471-474.
- Boyd, J.M., Huang, L., Xie, L., Moea, B., Gabos, S., Li X-F., 2008, A cell-microelectronic sensing technique for profiling cytotoxicity of chemicals, *Analytica Chimica Acta*, 615, 80–87.

- Brain-Isasi, S., Quezada, C., Pessoa, H., Morello, A., Kogan, M.J., Alvarez-Lueje, A., 2008, Determination and characterization of new benzimidazoles with activity against *Trypanosoma cruzi* by UV spectroscopy and HPLC, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 7622–7630.
- Brambilla, G., Martelli, A., 2009, Update on genotoxicity and carcinogenicity testing of 472 marketed pharmaceuticals, *Mut. Res.*, 681, 209–229.
- Brambilla, G., Martelli, A., 2009, Genotoxicity and carcinogenicity studies of analgesics, anti-inflammatory drugs and antipyretics, *Pharmacological Research*, 60,1–17.
- Brambilla, G., Martelli, A., 2007, Genotoxic and carcinogenic risk to humans of drug-nitrite interaction products, *Mutat.Res.*, 635, 17-52.
- Brent, R., Ptashne, M., 1981, Mechanism of action of the *lexA* gene product, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 4204-8.
- Brian, H., Stephen, P., 1994, Modulation of Cytokine Function: Therapeutic Applications, *Advances in Pharmacology*, 25, 53-115
- Brinkmann, C., Eisentraeger, A., 2008, Completely Automated Short-term Genotoxicity Testing for the Assessment of Chemicals and Characterisation of Contaminated Soils and Waste Waters, *Env Sci Pollut Res* 15 (3), 211–217.
- Brusick, D.J., 2009, A perspective on testing of existing pharmaceutical excipients for genotoxic impurities, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 55, 200–204.
- Burckhardt, S.E., Woodgate, R., Scheuermann, R.H., Echols, H., 1988, UmuD mutagenesis protein of *Escherichia coli*: over-production, purification and cleavage by RecA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 1811-15.
- Byrd, D.R., Sampson J.K., Ragonese, H.M, Matson, S.W., 2002, Structurefunction analysis of *Escherichia coli* DNA helicase I reveals nonoverlapping transesterase and helicase domains, *J. Biol. Chem.*, 277, 42645–42653.
- Cairns, J., Foster, P.L., 1991, Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli*, *Genetics.*, 128, 695–701.
- Cartwright, A.C., Mathews, B.R., 1994, *International Pharmaceutical Product Registration: Aspects of quality, safety and efficacy*. New York: Ellis Horwood Limited.
- Celik, A., Aras, A.N., 2006, The frequency of sister chromatid exchanges in cultured human peripheral blood lymphocyte treated with metronidazole in vitro, *Drug Chem Toxicol.*, 29(1),85-94

- Chung, K.T., Kirkovsky, L., Kirkovsky, A., Purcell, W.P., 1997, Review of mutagenicity of monocyclic aromatic amines: quantitative structure-activity relationships, *Mutat. Res.*, 387, 1-16.
- Clark, A.J., Sandler, S.J. 1994, Homologous genetic recombination: the pieces begin to fall into place, *Crit Review Microbiol* 20, 125.
- Cohen, S.M., 1995, Human relevance of animal carcinogenicity studies, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 21, 75-80.
- Craig, N.L. and Roberts, J.W., 1980, E.coli RecA protein directed cleavage of lambda repressor requires polynucleotide, *Nature (London)*, 283, 26-30.
- Crozet, M.D., Botta, C., Gasquet, M., Curti, C., Rémusat, V., Hutter, S., Chapelle, O., Azas, N., Méo, M.De., Vanelle, P., 2009, Lowering of 5-nitroimidazole's mutagenicity: Towards optimal antiparasitic pharmacophore, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 653-659.
- Custer, L.L., Sweder, K.S., 2008, The role of genetic toxicology in drug discovery and optimization. *Curr Drug Metab.*, 9(9):978-85.
- Darafarin, A., Abbasoğlu U., Şahin M.F., 1992, Synthesis and Antimicrobial Activities of Some 2-Mercaptobenzimidazole Derivatives” *J. Fac. Pharm. Gazi*, 9(2), 97-106.
- Dillingham, M.S., Spies, M., Kowalczykowski, S.C., 2003, RecBCD enzyme is a bipolar DNA helicase, *Nature.*, 423, 893–897.
- Dizer, H., Wittekindt, E., Fischer, B., Hansen, P.D., 2002, The cytotoxic and genotoxic potential of surface water and waste water effluents as determined by bioluminescence, umu-assays and selected biomarkers, *Chemosphere*, 46, 225-233.
- Dobo, K.L., Greene, N., Cyr, M.O., Caron S., Ku, W.W., 2006, The application of structure-based assessment to support safety and chemistry diligence to manage genotoxic impurities in active pharmaceutical ingredients during drug development, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 44, 282–293.
- Doré, J.C., Viel C., 1975, Research in antitumoral chemotherapy, X. Cytotoxic and antitumoral activity of beta-nitrostyrenes and of composed nitrovinyl derivatives. *Farmaco [Sci]*, 30(2):81-109.
- Drees, J.C., Lusetti, S.L., Chitteni-Pattu, S., Inman, R.B., Cox, M.M, 2004, A RecA filament capping mechanism for RecX protein, *Mol Cell*, 15, 789.
- Eaton, D.L., Klaassen C.D., 1996, Principles of toxicology. In: Klaassen CD, editor. Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons. 5th ed. New York: McGraw-Hill., p. 13-33.

- Emig, M., Reinhardt, A., Mersch-Sundermann, V., 1996, A comparative study of five nitro musk compounds for genotoxicity in the SOS chromotest and Salmonella mutagenicity, *Tox. Lett.* 85, 151-156.
- Einistio, P., Watanabe, M., Ishidate, J., Nohmi, T., 1991, Mutagenicity of 30 chemicals in Salmonella typhimurium strains possessing different nitroreductase or O-acetyltransferase activities, *Mut. Res.*, 259, 95-102.
- Fernandez, A.R., Ogi, T., Aoyagi, S., Chafin, D., Hayes, J.J., 2000, Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in Escherichia coli, *Mol. Microbiol.*, 35, 1560-72.
- Fifer, E.K., Heflich, R.H., Drurij, Z., Howard, P.C., Beland, F.A., 1986, Synthesis and mutagenicity of 1-nitro-6-nitrosopyrene and 1-nitro-8-nitrosopyrene, potential intermediates in the metabolic activation of 1,6- and 1,8-dinitropyrene, *Carcinogenesis*, 7, 65-70.
- Flory, J., Rodding, C.M., 1982, Visualization of RecA protein and its association with DNA: a priming effect of single-strand-binding protein, *Cell*, 28, 747-756.
- Friedberg, E.C., 1985, DNA repair, 375-457, W.H., Freeman and Company, New York.
- Forman, D., Ames, B., 1991, The Ames Test and the causes of cancer, Reprinted from the British Medical Journal, 303, 428- 429.
- Foster, P.L., Trimarchi, J.M., Maurer, R.A., 1996, Two enzymes, both of which process recombination intermediates, have opposite effects on adaptive mutation in *Escherichia coli*, *Genetics.*, 142, 25-37.
- Foster, P.L., Trimarchi, J.M., 1995, Adaptive reversion of an episomal frameshift mutation in *Escherichia coli* requires conjugal functions but not actual conjugation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92, 5487-5490.
- Foye, W.O., Lemke, T. L., Williams, D.A., 1995, Principles of medicinal chemistry, Fourth Edition, William & Wilkins USA , pp. 891-904.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., 1995, DNA repair and mutagenesis, Washington, DC:ASM Pres.
- Galitski, T., Roth, J.R., 1995, Evidence that F₊ transfer replication underlies apparent adaptive mutation, *Science.*, 268, 421-423.
- Gancedo, A.G., Gil F.C., Vilas, P., Perez, S., Rodriguez, F., Paez, E., Brana, M. F., Roldan, C.M., 1984, Antiviral action of 5-amino-2-(2-dimethylaminoethyl)benzo-[de]-isoquinolin-1,3-dione, *Antiviral Research*, 4, 201-210.

- Goodman, M.F., 2002, Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes, *Annu. Rev. Biochem.*, 71, 17-50.
- Gökçe, M., Utku, S., Özçelik, B., Berçin, E., 2008, Evaluation of antimicrobial activity of 2-[(2-Nitro-1-Phenylalkyl) Thiomethyl]Benzimidazole Derivatives, *Turk J. Pharm. Sci.* 5 (2), 107-116.
- Gökçe, M., Utku, S., Berçin, E., Özçelik, B., Karaoğlu, T., Noyanalpan, N., 2005, Synthesis and in Vitro Antimicrobial and Cytotoxicity Activities of 2-[(2-nitro-1-phenylalkyl)thio]benzoic Acid Derivatives, *Turk J. Chem.*, 29, 207-217.
- Gökçe, M., Özçelik, B., Akyon, Y., Berçin, E., Noyanalpan, N., 2004, Activity of 1-[(2-aminophenyl)thio]-1-phenyl-2-nitroalkane Derivatives Against *Helicobacter pylori*, *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1(1), 55-64.
- Gökçe, M., 1996, 2-Aminotiyofenol ile β -nitrositrenlerin verdiği yeni tipte nitroetan türevlerinin sentezi, reaksiyonları ve antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Gökçe, M., Berçin, E., 1996b, The Addition products of Thiosalicylic acide and β -Nitrostyrenes and Their NMR Studies, *J. Fac. Pharm. Gazi*, 13(2) 153-160.
- Gökçe, M., Özçelik, B., Bakır, G., Karaoğlu, T., Berçin, E., Noyanalpan, N., 2004. Antiviral and Antimicrobial Activities of New Nitrobutane Derivatives, *Arzneimittel Forschung Drug Research*, 12, 891-897.
- Giuliani, F., Koller, T., Würzler, F.E., Widmer, R.M., 1996, Detection of genotoxic activity in native hospital waste water by the umuC test, *Mut. Res.*, 368, 4-57.
- Grummt, T., Wunderlich, H.G., Chakraborty, A., Kundi, M., Majer, B., Ferk, F., Nersesyan, A.K., Parzefal, W., Knasmüller, S., 2005, Genotoxicity of nitrosulfonic acids, nitrobenzoic acids, and nitrobenzylalcohols, pollutants commonly found in ground water near ammunition facilities, *Envt. Mol. Muta.*, 47, 95-97.
- Güven, K., 1999, *Biyokimyasal ve Moleküler Toksikoloji*. I.Baskı, Diyarbakır: Dicle Üniversitesi Basımevi.
- Hamer, B., Bihari, N., Reifferscheid, G., Zahn, R.K., Muller, W.E.G., Batel, R., 2000, Evaluation of the SOS/umu-test post-treatment assay for the detection of genotoxic activities of pure compounds and complex environmental mixtures, *Mut. Res.* 466 pp. 161–171.

- Harris, R.S., Ross, K.J., Rosenberg, S.M., 1996, Opposing roles of the Holliday junction processing systems of *Escherichia coli* in recombination-dependent adaptive mutation, *Genetics.*, 142, 681–691.
- Harris, R.S., Longerich, S., Rosenberg, S.M., 1994, Recombination in adaptive mutation, *Science.*, 264, 258–260.
- Havla, J.B., Hill, C.E., Abdel-Rahman, S.Z., Richter, E., 2009, Evaluation of the mutagenic effects of myosmine in human lymphocytes using the HPRT gene mutation assay, *Food and Chemical Toxicology*, 47, 237–241.
- Hegde, S.P., Rajagopalan, M., Madiraju, M.V., 1996, Preferential binding of *Escherichia coli* RecF protein to gapped DNA in the presence of adenosine (gamma-thio) triphosphate, *J Bacteriol*, 178,184.
- Hernando, M.D., Heath, E., Petrovic, M., Barcelo, D., 2006, Trace-level determination of pharmaceutical residues by LC-MS/MS in natural and treated waters. A pilotsurvey study. *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 985–991.
- Hisama, M., Matsuda, S., Shibayama, H., Iwaki, M., 2008, Antimutagenic activity of a Novel Ascorbic Derivative, Disodium Isostearyl 2-O-L-Ascorbyl Phosphate, *The Pharmaceutical Society of Japan*, 128 (6), 933-940.
- Hine, C.H., Meyers, F.H., Wright, R.W., 1970, Pulmonary changes in animals exposed to nitrogen dioxide; effects of acute exposures, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 16, 201.
- Hoffmann, D., Adams, J.D., Brunnemann, K.D., Hecht, S.S., 1979, Assessment of tobacco-specific N-nitrosamines in tobacco products, *Cancer Res.* 39 2505–2509.
- Hofnung, M., Quillardet, P., 1986, Recent developments in bacterial short term for the detection of genotoxic agents, *Mutagenesis*, 1(5), 319-330.
- Horii, Z., Clark, A.J. 1973, Genetic analysis of the RecF pathway to genetic recombination in *Escherichia coli* K12: isolation and characterization of mutants, *J Mol Biol*, 80,327.
- Horikawa, K., Sera, N., Otofujii, T., Murakami, K., Tokiwa, H., Iwagawa, M., Izumi, K., Otsuka, H., 1991, Pulmonary carcinogenicity of 3,9- and 3,7-dinitrofluoranthene, 3-nitrofluoranthene and benzo(a)pyrene in F344 rats, *Carcinogenesis*, 12, 1003-1009.
- Hrelia, P., Fimognari, C., Maffei, F., Spinelli, D., Lamartina, L., Sarva, M.C., Forti, G.C., 1999, Influence of nitroreductase and O-acetyltransferase on the mutagenicity of substituted nitrobenzothiophenamines in *Salmonella typhimurium*, 118, 99-111.

- Hrelia, P., Vigagni, F., Morotti, M., Forti, G.C., Barbieri, C.L., Spinelli, D., Lamartina, L., 1993, Mechanism of genotoxicity and electron density distribution by NMR of 5-nitro-3-thiophenecarboxamides, a novel group of direct-acting mutagens in *Salmonella typhimurium*, *Chemico-Biological Interactions*, 86,229-254.
- IARC, 1980, Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Suppl. 2, Long-term and short-term screening assays for carcinogens: A Critical Appraisal, Lyon, 85-106.
- Inoue, H., Fukunaga, A., Okuba, S., 1981, Mutagenic effects of nitrogen dioxide combined with methylurea and ethylurea in *Drosophila melanogaster*, *Mut. Res.*, 88, 281.
- ISO/DIS 13829 (2000), Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu test, TC 147/SC 5.
- Isomura, K., Chikahira, M., Teranishi, K., Hamada, K., 1984, Induction of mutations and chromosome aberrations in lung cells following in vivo exposure of rats to nitrogen oxides, *Mut. Res.*, 136, 119.
- İskit, A.B., 2007, İlaç Araştırma Dönemleri, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 16 (2), 16-17.
- James, M.G., Glenda, J.G., 1991, The metabolic activation of 4-nitro-*o*-phenylenediamine by chlorophyll-containing plant extracts: The relationship between mutagenicity and antimutagenicity, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 250, 79-86.
- Jena, G.B., Kaul, C.L., Ramarao, P., 2002, Genotoxicity testing, a regulatory requirement for drug discovery and development: impact of ICH guidelines, *Indian Journal of Pharmacology*, 34, 86-99.
- Jin, H., Sang-Gil, K., Saburo, M., 1996, Morphological and lethal effects of mitomycin C, *n*-methyl-*n'*-nitro-*n*-nitrosoguanidine, benzo(a)pyrene and 4 nitroquinoline 1-oxide on a large unicellular indicator organism, *Closterium ehrenbergii* (green alga), *Water Science and Technology*, 33, 305-312.
- Jockovich, M.E., Myers, R.S., 2001, Nuclease activity is essential for RecBCD recombination in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.*, 41, 949-962.
- Joseph, D.M., Joseph, G., 1960, A new chemical mutagen for bacteria, 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 3, 575-577.
- Josephy, P.D., Gruz, P., Nohmi, T., 1997, Recent advances in the construction of bacterial genotoxicity assays, *Mutat. Res.*, 386, 1-23.

- Kato, T., Shinoura, Y., 1977, Isolation and characterization of mutants of *Escherichia coli* deficient in induction of mutations by ultraviolet light, *Mol. Gen. Genet.*, 156, 121-131.
- Kelly, F., Legator, M., The effects of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine and mutagen, streptozotocin on mammalian cell cultures, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 12, 183-190.
- Kennedy, T., 1997, Managing the discovery/development interface. *Drug Disc Today*, 2:436-44.
- Khalili, P., Naimi, E., Yan Sun, W., Knaus, E.E., Wiebe, L.I., 2003, Biochemical and pharmacokinetic evaluation of a novel pyrimidine nucleoside nitric oxide donor as a potential anticancer/antiviral agent, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 19, 305-313.
- Klein, M., Voigtmann, U., Haack, T., Erdinger, L., Boche, G., 2000, From mutagenic to non-mutagenic nitroarenes: effect of bulky alkyl substituents on the mutagenic activity of 4-nitrobiphenyl in *Salmonella typhimurium* Part I. Substituents ortho to the nitro group and in 2X-position, *Mut. Res.*, 467, 55–68.
- Knight, A.W., Little, S., Houck, K., Dix, D., Judson, R., Richard, A., McCarroll, N., Akerman, G., Yang, C., Birrell, L., Walmsley R.M., 2009, Evaluation of high-throughput genotoxicity assays used in profiling the US EPA ToxCast™ chemicals, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 55, 188–199.
- Koremura, M., Oku, M., Shono, T., Nakanishi, T., 1961, Synthesis of β -Alkyl- β -nitrostyrene Derivates and Their Antimicrobial and Insecticidal Activities, *Takamine Kenkyusho Nempo*, 13, 198- 204.
- Korkmaz, B., 2005, Bazı 2-Süstitüe Perimidin Bileşiklerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames Mutajenite Testi İle Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi.
- Kosaka, H., Oda, Y., Uozumi, M., 1985, Induction of *umuC* gene expression by nitrogen dioxide in *Salmonella typhimurium*, *Mut. Res.*, 142, 99.
- Kowalczykowski, S.C., Dixon, D.A., Eggleston, A.K., Lauder, S.D., Rehauer, W.M. 1994, Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*, *Microbiol Rev*, 58, 401.
- Kram-Jacobson, D., Contrera, J.F., 2007, Genetic toxicity assessment: Employing the best science for human safety evaluation Part I: Early screening for potential human mutagens. *Toxicological Sciences*, 96 (1), 16-20.

- Krull, I.S., Edwards, G. Wolf, M.H., Fan, T.Y., Fine, D.M., 1979, N-Nitrosamines in consumer products and in the workplace, Am. Chem. Soc. Symp. Ser. 101, 175–194.
- Kuzminov, A. 1999, Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda, Microbiol Mol Biol Rev, 63, 751.
- Lawley, D., 1989, Mutagens as carcinogens: development of current concepts, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 213, 3-25.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 1993, Principles of Biochemistry, Worth Publishers, Inc., 837-839, 962-963.
- Lesley, D.M., Thomas, E.E., David, J., 1993, Prostaglandin H synthase-dependent formation of the direct-acting mutagen 2-nitro-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (nitro-IQ) from IQ, Mutation Research Letters, 302, 45-52.
- Li, H.H., Aubrecht, J., Fornace Jr, A.J., 2007, Toxicogenomics: Overview and potential applications for the study of non-covalent DNA interacting chemicals. Mutat Research 623: 98-108.
- Liebermen, H.B., Witkin, E.M., 1983, DNA degradation UV sensitivity and SOS mediated mutagenesis in strains of *Escherichia coli* deficient in single-strand DNA binding protein: effects of mutations and treatments that alter levels of exonuclease V or RecA protein, Mol. Gen. Genet., 190, 92-100.
- Little, J.W., Mount, D.W., Yanisch-Perron, C.R., 1981, Purified *lexA* protein is a repressor of the *RecA* and *lexA* genes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4199-203.
- Little, J.W., Monut, D.W., 1982, The SOS regulatory system of *Escherichia coli*, Cell, 29, 11-22.
- Little, C.A., Tweats, D.J., Pinney, R.J., 1989, Studies of error-prone DNA repair in *Escherichia coli* K-12 and Ames *Salmonella typhimurium* strains using a model alkylating agent, Mutagenesis, 4, 90-94.
- Liu, X., Kramer, J.A., Swaffield, J.C., Hu, Y., Chai, G., Wilson, A.G.E., 2008, Development of a highthroughput yeast-based assay for detection of metabolically activated genotoxins Mutation Research, 653, 63–69.
- Ljinsky, W., Conrad, E., Bogart, V., 1972, Carcinogenic nitrosamines formed by drug-nitrite interaction, Nature, 239, 165-167.
- Loomis, T.A., 1978, Essentials of toxicology, 3rd edition, Philadelphia, Lea and Febiger, 157-232.
- Lopez, M.N., Palermo, A.M., Murdy, M.D., Carballo, M.A., 2003, Cytogenetic evaluation of two nitroimidazole derivatives, Toxicology in Vitro, 17, 35-40.

- Lopez, M.N., Gadano, A.N., Carballo, M.A., 2001, Evaluation of genetic damage induced by a nitroimidazole derivative in human lymphocytes: Tinidazole (TNZ) *Toxicology in Vitro*, 15, 2001, 209-213.
- Lorge, E., Gervais, V., Becourt-Lhote, N., Maisonneuve, C., Delonges, J.L., Claude, N., 2007, Genetic toxicity assessment: Employing the best science for human safety evaluation part IV: a strategy in genotoxicity testing in drug development: some examples. *Toxicological Sciences*, 98 (1), 39-42.
- Lovett, S.T., Sutera, V.A., 1995, Suppression of recJ exonuclease mutants of *Escherichia coli* by alterations in DNA helicases II (UvrD) and IV (HelD), *Genetics*, 140, 27.
- Luisi-DeLuca, C., 1995, Homologous pairing of single-stranded DNA and superhelical double-stranded DNA catalyzed by RecO protein from *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 177, 566.
- Luisi-DeLuca, C., Kolodner, R., 1994, Purification and characterization of the *Escherichia coli* RecO protein. Renaturation of complementary single-stranded DNA molecules catalyzed by the RecO protein, *J Mol Biol*, 236, 124.
- Lusetti, S.L., Voloshin, O.N., Inman, R.B., Camerini-Otero, R.D., Cox, M.M, 2004. The DinI protein stabilizes RecA protein filaments, *J Biol Chem*, 279, 30037.
- Maeda, T., Nakamura, R., Kadokami K., Ogawa H.I., 2007, Relationship between mutagenicity and reactivity or biodegradability for nitroaromatic compounds, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, 237–241.
- Maron, D.M., Ames, B.N., 1983, Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mut. Res.*, 111, 173-215.
- Matsui, N., Kaya, T., Nagamine, K., Yasukawa, T., Shiku, H., Matsue, T., 2006, Electrochemical mutagen screening using microbial chip. *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 1202-1209.
- Matsuoka, A., Sofuni, T., Miata, N., Ishidate, Jr.M., 1991, Clastogenicity of 1-nitropyrene, dinitropyrenes, fluorene and mononitrofluorenes in cultured chinese hamster cells, *Mut. Res.*, 259, 103-110.
- Mc Coy, E.C., Rosenkranz, H.S., Mermelstein, R., 1981, Evidence for the existence of a family of bacterial nitroreductase capable of activating nitrated polycyclic to mutagens, *Environ. Mutagen.*, 3, 421-427.
- McKenzie, G.J., Harris, R.S., Lee, P.L., Rosenberg, S.M., 2000, The SOS response regulates adaptive mutation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 6646–6651.

- Mendonca, V.M., Kaiser-Rogers, K., Matson, S.W., 1993, Double helicase II (uvrD)-helicase IV (hld) deletion mutants are defective in the recombination pathways of *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 175, 4641.
- Mercangöz, A., Tüylü, B.A., 2000, 2,4,5 Tri (Süstitüe) fenil imidazol ve tüevlerinin mutajenik etkilerinin Ames/Salmonella test sisteminde saptanması, *Turk J. Biol.*, 24, 57-64.
- Mersch-Sundermann, V., Schneider, U., Klopman, G., Rosenkranz, H.S., 1993, SOS induction in *Escherichia coli* and *Salmonella* mutagenicity: a comparison using 330 compounds, *Mutagen*, 9, 205-224.
- Michael, M.C., 2007, Regulation of Bacterial RecA Protein Function, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.*, 42, 41–63.
- Milhazes, N., Calheiros, R., Marques M.P., Garrido, J., Cordeiro, M.N., Rodrigues, C., Quinteira, S., Novais, C., Peixe, L., Borges, F., 2006. Beta-nitrostyrene derivatives as potential antibacterial agents: a structure-property-activity relationship study. *Bioorg Med Chem.*, 14(12):4078-88.
- Moran, L.A., Scrimgeour, K.G., Horton, H.R., Ochs, R.S., Rawn, J.D., 1994, *Biochemistry*. Moran, L.A., Scrimgeour, K.D. (Ed.), 2nd ed., Neil Patterson Publishers, Prentice Hall, pp-26.23.
- Montganier, L., Bisagn, E., Bourzat, J.D., Gruet, J., Marquet, J.P., Pepin, J.J., Rivalle, C., 1971, Cytotoxicity and Antitumor Activity of β -Nitrostyrenes", *Chim. Ther.*, 6(3), 186-91.
- Moore, T., McGlynn, P., Ngo, H.P., Sharples, G.J., Lloyd, R.G., 2003, The RdcC protein of *Escherichia coli* binds DNA and counters a toxic effect of RecFOR in strains lacking the replication restart protein PriA, *EMBO J*, 22,735.
- Morel, P., Hejna, J.A., Ehrlich, S.D., Cassuto, E., 1993, Antipairing and strand transferase activities of *E. coli* helicase II (UvrD). *Nucleic Acids Research*, 21,3205.
- Morimatsu, K., Kowalczykowski, S.C., 2003, RecFOR proteins load RecA protein onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: A universal step of recombinational repair, *Molecular Cell*, 11, 1337.
- Nagakawa, R., Horikawa, K., Sera, N., Kodera, Y., Tokiwa, H., 1987, Dinitrofluoranthene: Induction, Identification and gene mutation, *Mut.Res.*, 191, 85-91.
- Nair, P.C., Sobhia, M.E., 2008, Comparative QSTR studies for predicting mutagenicity of nitro compounds, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 26, 916–934.

- Nakajima, D., Ishii, R., Kageyama, S., Onji, Y., Mineki, S., Morooka, N., Takatori, K., Goto, S., 2006, Genotoxicity of Microbial Volatile Organic Compounds, *Journal of Health Science*, 52 (2), 148-153.
- Natarajan, A.T., Obe, G., 1986, How do in vivo mammalian assays compare to in vitro assays in their ability to detect mutagens, *Mut. Res.*, 167, 189-201.
- Nath, J., Krishna, G., 1998, Safety screening of drugs in cancer therapy. *Acta Haematol*, 99, 138-47.
- Nohmi, T., Battista, J.R., Dodson, L.A., Walker, G.C., 1988, RecA-mediated cleavage activates umuD for mutagenesis: mechanistic relationship between transcriptional derepression and posttranslational activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 1816-20.
- Oda, Y., Nakamuro, S., Oki, I., Kato, T., Shinagawa, H., 1985, Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.*, 147, 219-229.
- Oda, Y., Nakamuro, S., Oki, I., Kato, T., 1988, Harman and norharman induce SOS responses and frameshift mutations in bacteria, *Mut. Res.*, 208, 38-44.
- Oda, Y., Shimada, T., Watanabe, M., Ishidate, Jr. M., Nohmi, T., 1992, A sensitive umu test system for the detection of mutagenic nitroarenes in *Salmonella typhimurium* NM 1011 having a high nitroreductase activity, *Mutat. Res.*, 272, 91-99.
- Oda, Y., Yamazaki, H., Watanabe, M., Nohmi, T., Shimada, T., 1993, Highly sensitive umu test system for the detection of mutagenic nitroarenes in *Salmonella typhimurium* NM3009 having high O-acetyltransferase and nitroreductase activities, *Env. Mol. Mut.*, 21, 357-364.
- Oda, Y., Shimada, T., Yamazaki, H., Watanabe, M., Nohmi, T., 1995, Development of high sensitive umu test system : rapid detection of genotoxicity of promutagenic aromatic amines by *Salmonella typhimurium* strain NM2009 possessing high O-acetyltransferase activity, *Mutat. Res.*, 334, 145-156.
- Oda, Y., Funasaka, K., Kitano, M., Nakama, A., Yoshikura, T., 2004, Use of a high-throughput umu-microplate test system for rapid detection of genotoxicity produced by mutagenic carcinogens and airborne particulate matter, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 43, 10-19.
- Oda, Y., Yukari Totsuka, Y., Wakabayashi, K., Guengerich, P., Shimada, T., 2006, Activation of aminophenylnorharman, aminomethylphenylnorharman and aminophenylharman to genotoxic metabolites by human N-acetyltransferases and cytochrome P450 enzymes expressed in *Salmonella typhimurium* umu tester strains, *Mutagenesis*, 21, 411-416.

- Oda, Y., Watanabe, T., Terao, Y., Nukaya, H., Wakabayashi, K., 2008, Genotoxic activation of 2-phenylbenzotriazole-type compounds by human cytochrome P4501A1 and N-acetyltransferase expressed in *Salmonella typhimurium* umu strains, *Mut. Res.*, 654, 52–57.
- Ohe, T., 1997, Quantification of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines, MeIQx, Trp-P-1, Trp-P-2 and PhIP, contributing highly to genotoxicity of river water, *Mut. Res.*, 393, 73-79.
- Ohe, T., Nukaya, H., 1996, Genotoxic activity of 1-nitropyrene in water from the Yodo river, Japan, *Sci. Total E.*, 181, 7-12.
- Ohno, K., Ishihata, K., Tanaka-Azuma, Y., Yamada, T., 2008, A genotoxicity test system based on p53R2 gene expression in human cells: Assessment of its reactivity to various classes of genotoxic chemicals, *Mut. Res.*, 656, 27-35.
- Ono, Y., Somiya, I., Kawaguchi, T., 1992, Genotoxic evaluation on aromatic organochlorine compounds by using umu test, *Wat. Sci. Tech.*, 26, 61-69.
- Ordoñez, A.L., Ordoñez, R.M., Zampini, I.C., Isla, M.I., 2009, Design and quality control of a pharmaceutical formulation containing natural products with antibacterial, antifungal and antioxidant properties, *International Journal of Pharmaceutics*, 378, 51–58.
- Öztürk, K., Durusoy, M., 1999, The detection and comparison of the genotoxic effects of some nitro aromatic compounds by the umu and SOS chromotest systems, *Toxicology Letters*, 108, 63–68.
- Pai, C.A, 1985, *Foundation of genetics. Ascience for society*, Keffort press, Singapur.
- Parang, K., Cole, P.A., 2002, Designing bisubstrate analog inhibitors for protein kinases, *Pharmacology & Therapeutics*, 93, 145-157.
- Petranovic, M., Zahradka, K., Zahradka, D., Petranovic, D., Nagy, B., Salaj-Smic, E., 2001, Genetic evidence that the elevated levels of *Escherichia coli* helicase II antagonize recombinational DNA repair, *Biochimie*, 83, 1041.
- Pettit, R. K., Pettit, G.R., Hamel, E., Hogan, F., Moser, B.R., Wolf, S., Pon, S., Chapuis, J.C., Schmidt, J.M., 2009, E-Combretastatin and E-Resveratrol Structural Modifications: Antimicrobial and Cancer Cell Growth Inhibitory β -Nitrostyrenes, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, In Press, Accepted Manuscript, Available online 4 August 2009.
- Preussmann, R., Spiegelhalder, B., Eisenbrand, G. Janzowski, C., 1979, N-nitroso compounds in food, in: E.C. Miller, J.A. Miller, I. Hirono, T. Sugimura, S. Takayama (Eds.), *Naturally Occurring Carcinogens—Mutagens and Modulators of Carcinogenesis*, University Park Press, Baltimore, MD, 185–194.

- Price-Carter, M., 2000, β -Galactosidase Activity Assay, <http://rothlab.ucdavis.edu/protocols/beta-galactosidase-3.html>.
- Purves, D., Harvey, C., Tweats, D., Lumley, C.E., 1995, Genotoxicity testing: current practices and strategies used by the pharmaceutical industry. *Mutagenesis*, 10:297-312.
- Østergaard, T.G., Hansen, L.H., Binderup, M.L., Norman, A., Sørensen S.J., 2007, The cda Genotox assay: A new and sensitive method for detection of environmental genotoxins including nitroarenes and aromatic amines, *Mutat. Res.*, 631, 77-84.
- Quillardet, P., Hofnung M., 1985, The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures., *Mut. Res.*, 147, 65-78.
- Rajagopalan, M., Lu, C., Woodgate, R., O'Donnell, M., Goodman, M.F., Echols, H., 1992, Activity of the purified mutagenesis protein UmuC, UmuD', and RecA in replicative bypass of an abasic DNA lesion by DNA polymerase III, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 10777-81.
- Reifferscheid, G., Heil, J., Oda, Y., Zahn, R.K., 1991, A microplate version of the SOS/umu-test for rapid detection of genotoxins and genotoxic potentials of environmental samples, *Mut. Res.*, 253, 215-222.
- Reifferscheid, G., Grummt, T., 2000, Genotoxicity in German surface waters- results of a collaborative study, *Water, A. S. P.*, 123, 67-69.
- Reifferscheid, G., Arndt, C., Schmid, C., 2005, Further development of the β -lactamase mutagen assay and evaluation by comparison with ames fluctuation tests and the umu test, *Environ. Mol. Mutagen.*, 46, 126-139.
- Reuven, N.B., Arad, G., Maor-Shoshani, A., Livneh, Z., 1999, The mutagenesis protein UmuC is a DNA polymerase activated by UmuD', RecA and SSB and is specialized for translesion replication, *J. Biol. Chem.*, 274, 31763-66.
- Rice-Evans, C.A., Diplock, A.T., 1991, *Techniques in free radical research*, Elsevier, Amsterdam.
- Rosenkranz, H.S., McCoy, E.C., Sanders, D.R., Butler, M., Kiriazides, D.K., Mermelstein, R., 1980, Nitropyrens: isolation, identification and reduction of mutagenic impurities in carbon black and toners, *Science*, 209, 1039-1043.
- Rosenkranz, H.S., Mermelstein, R., 1983, Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes: all nitro-containing chemicals were not created equal, *Mut. Res.*, 114, 217-267.

- Ryder, L., Sharples, G.J., Lloyd, R.G., 1996, Recombination-dependent growth in exonuclease-depleted recBC sbcBC strains of Escherichia coli K-12, Genetics, 143, 1101
- Saleh, K., 1997, Mikronükleus Testi ile bazı kimyasal maddelerin ve çevre kirlenmelerinin neden olduğu klastojenik etkilerin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.
- Samosorn, S., Bremner, J.B., Ball, A., Lewis, K., 2006, Synthesis of functionalised 2-aryl-5-nitro-1*H*-indoles and their activity as bacterial NorA efflux pump inhibitors, Bioorg. Med. Chem., 14(3), 857-865.
- Sancar, A., Hearst, J.E., 1993, Molecular matchmakers, Science, 259, 1415.
- Saygı, Ş., 2003, Deneysel toksikolojide toksisite testleri ve test sonuçlarının önemi, Gülhane Tıp Dergisi, 45, 291-298.
- Schmähl, D., Scherf, H.R., 1984, Carcinogenic activity of N-nitrosodiethylamine in snakes (*Python reticulatus*, Schneider), in: I.K. O'Neill, R.C. Von Bortsel, C.T. Miller, J. Long, H. Bartsch (Eds.), N-Nitroso Compounds: Occurrence, Biological Effects and Relevance to Human Cancer, IARC Scientific Publications No. 57, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 677-682.
- Scrivens, M., Bhogal, N., 2007, The use of human cell line reporter gene-based assays in chemical toxicity testing, Toxicology in Vitro, 21, 1233-1240.
- Sedgwick, S.G., Goodwin, P.A., 1985, Differences in mutagenic and recombinational DNA repair in enterobacteria, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 82, 4172-4176.
- Shan, Q., Bork, J.M., Webb, B.L., Inman, R.B., Cox, M.M., 1997, RecA protein filaments: end-dependent dissociation from ssDNA and stabilization by RecO and RecR proteins, J Mol Biol, 265.
- Shelby, M., 1988, The genetic toxicity of human carcinogens and its implications. Mutat Res., 204:3-15.
- Shinagawa, H., Kato, T., Ise, T., Makino, K., Nakata, A., 1983, Cloning and characterization of the umu operon responsible for inducible mutagenesis in Escherichia coli, Gene, 23, 167-174.
- Shinagawa, H., Iwasaki, H., Kato, T., Nakata, A., 1988, RecA protein-dependent cleavage of UmuD protein and SOS mutagenesis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 1806-10.
- Singer, B., Gerunbeger, D., 1994, Molecular Biology of Mutagenesis and carcinogenesis, 335.

- Snyder, R.D., Gren, J.W., 2001, A review of the genotoxicity of marketed pharmaceutical, *Mutat. Res.*, 488, 151-169.
- Soberón, N., Martín, R., Suárez J.E., 2007, New Method for Evaluation of Genotoxicity, Based on the Use of Real-Time PCR and Lysogenic Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria, *Applied And Environmental Microbiology*, 2815–2819.
- Somay, T., 2009, İlaç Etken Maddesi Olarak Tasarlanmış Bazı Nitrolu Bileşiklerin, Umu-Test Sistemi İle Genotoksik Potansiyellerinin Saptanması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 74s.
- Stark, G., Stauff, J., Miltenburger, H.G., Stumm-Fischer, I., 1985, Photodecomposition of 1-nitropyrene and other direct-acting mutagens extracted from diesel exhaust particulates, *Mut. Res.*, 155, 27.
- Sutton, D.M., Smith, B.T., Godoy, V.G., Walker G.C., 2000, The SOS response: Recent insights into umuDC-dependent mutagenesis and DNA damage tolerance, *Annu. Rev. Genet.*, 34, 479-97.
- Suzanne, M.C., Keating, J.J., Butler, S.G., Knox, A.J.S., Anne, M., Jorgensen, A.M., Gunther, H., Peters, G.H., 2009, Synthesis and serotonin transporter activity of sulphur-substituted α -alkyl phenethylamines as a new class of anticancer agents, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 1–27 article in press.
- Sundermann, V.M., Schneider, U., Klopman, G., Rosenkranz, H.S., 1994, SOS induction in *Escherichia coli* and mutagenicity: a comparison using 330 compounds, *Mutagenesis*, 9, 205-224.
- Takayama, S., Tanaka, M., Katoh, Y., Tereda, M., Sugimura, T., 1983, Mutagenicity of nitropyrenes in Chinese hamster V79 cells, *Gann*, 74, 338.
- Tang, M., Shen, X., Frank, E.G., O'Donnell, M., Woodgate, R., Goodman, M.F., 1999, UmuD'(2)C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 8919-24.
- Tang, M., Bruck, I., Eritja, R., Turner, J., Frank, E.G., 1998, Biochemical basis of SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: reconstitution of in vitro lesion bypass dependent on the UmuD'2C mutagenic complex and RecA protein, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 9755-60.
- Taylor, A.F., Smith, G.R., 2003, RecBCD enzyme is a DNA helicase with fast and slow motors of opposite polarity, *Nature.*, 423, 889–893.

- Thybaud, V., Aardemab, M., Clements, J., Dearfield K., Galloway, S., Hayashi, M., Jacobson-Kram, D., Kirkland, D., MacGregor, J.T., Marzin, D., Ohyamaj, W., Schuler M., Suzuki, H., Zeiger, E., 2007, Strategy for genotoxicity testing: Hazard identification and risk assessment in relation to in vitro testing, *Mut. Res.*, 627, 41–58.
- Tokiwa, H., Ohnishi, Y., 1986, Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their source in the environment, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 17, 23-60.
- Tokiwa, H., Otofujii, T., Horikawa, K., Sera, N., Nakagawa, R., Maeda, T., Sano, N., Izumi, K., Otsuka, H., 1987, Induction of subcutaneous tumors in rats by 3,7- and 3,9-dinitrofluoranthene, *Carcinogenesis*, 8, 1919-1922.
- Umezumi, K., Kolodner, R.D., 1994, Protein interactions in genetic recombination in *Escherichia coli*. Interactions involving RecO and RecR overcome the inhibition of RecA by single-stranded DNA binding protein, *J Biol Chem*, 269, 30005.
- Umezumi, K., Chi, N.W., Kolodner, R.D., 1993, Biochemical interaction of the *Escherichia coli* RecF, RecO, and RecR proteins with RecA protein and single-stranded DNA binding protein, *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 3875.
- Vance, W.A., Okamoto, H.S., Wang, Yi.Y., 1986, Structure-activity relationships of nitro and methyl-nitro derivatives of indoline, indole, indazole and benzimidazole in *Salmonella typhimurium*, *Mut. Res.*, 173, 169-176.
- Verschaeve, L., Staden, V.J., 2008, Mutagenic and antimutagenic properties of extracts from South African traditional medicinal plants *Journal of Ethnopharmacology* ,119, 575–587.
- Walker, G.C., 1984, Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*, *Microbial. Rev.*, 48, 60-93.
- Walker, G.C., 1985, Inducible DNA repair systems, *Ann. Rev. Biochem.*, 54, 425-457.
- Wei-Ya, W., Pei-Wen, H., Wu, Y.C., Wu, C.C., 2007, Synthesis and pharmacological evaluation of novel β -nitrostyrene derivatives as tyrosine kinase inhibitors with potent antiplatelet activity, *Biochemical Pharmacology*, 74, 601-611.
- Weisburger, J.H., 1999, Past, present and future role of carcinogenic and mutagenic N-substituted aryl compounds in human cancer, *Carcinogenic and mutagenic responses to aromatic amines and nitroarenes*. King, C.M. et. al., (Eds.): New York, Elsevier.
- Westerink, W.M.A., Stevenson, J.C.R., Lauwers, A., Griffioen, G., Horbach, J.G., Schoonen, W.G.E.J., 2009, Evaluation of the VitotoxTM and RadarScreen assays for the rapid assessment of genotoxicity in the early research phase of drug development, *Mutation Research*, 676, 113–130.

- Whitby, M.C., Lloyd, R.G., 1998, Targeting Holliday junctions by the RecG branch migration protein of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, 273, 19729–19739.
- Whittier, R.F., Chase, J.W., 1983, DNA repair properties of *Escherichia coli* tif-1, recA 0281 and lexA AI strains deficient in single-strand DNA binding protein, *Mol. Gen. Genet.*, 190, 101-111.
- Wild, D., Dirr, A., 1989, Mutagenic nitrenes/nitrenium ions from azidoimidazoarenes and their structure-activity relationships, *Mutagenesis*, 4, 446-452.
- Winter, H.K., Ehrlich, V.A., Grusch, M., Lackner, A., Schulte-Hermann, R., Grasl-Kraupp, B., Mikulits, W., Knasmüller, S., 2008, Use of four new human-derived liver-cell lines for the detection of genotoxic compounds in the single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay, *Mut. Res.*, 657, 133–139.
- Wu, K. M., Dou, J., Ghantous, H., Chen, S., Bigger, A., Birnkrant, D., 2009, Current regulatory perspectives on genotoxicity testing for botanical drug product development in the U.S.A., *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, In press.
- Yagi, N., Ohkubo, K., Okuno, Y., Oda, Y., Miyazawa, M., 2006, Antimutagenic Compound From Yellow Batai (*Peltophorum dasyrachis*), *Journal Of Oleo science*, 55-4, 173-180.
- Yasunaga, K., Kiyonari, A., Nakagawa, M., Yoshikawa, K., 2006, Investion into the ability of the Salmonella umu test to detect DNA damage using antitumor druds, *Toxicology in Vitro*, 20, 712-728.
- Yasunaga, K., Kiyonari, A., Oikawa, T., Abe, N., Yoshikawa, K., 2004, Evaluation of the Salmonella umu test with 83 NTP chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44, 329–345.
- Zeiger, E., Anderson, B., Haworth, S., Lawlor, T., Mortelman K., 1992, Salmonella Mutagenicity Tests V. Results from the Testing of 311 Chemicals *Environ. Molec. Mutagen.*, 19, 2-141.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Zeynel GÖKÇINAR

Doğum Yeri : Karaman

Doğum Yılı : 05. 01.1979

Medeni Hali : Evli

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : 1994-1997 Alparslan Süper Lisesi

Lisans : 1998-2003 Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans : 2004-2010 Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Yabancı Dil : İngilizce

İş Tecrübesi : 2004-.... Coca Cola İçecek A.Ş. Ankara Fabrikası'nda
Kalite Güvence Bölümünde, Mikrobiyoloji Sorumlusu olarak halen
çalışmaktayım.