

**BAZI BENZOKSAZOL TÜREVİ BİLEŞİKLERİN AMES TEST
SİSTEMİ İLE MUTAJENİK POTANSİYELLERİNİN
BELİRLENMESİ**

**DETECTION OF MUTAGENIC POTENTIALS OF SOME
BENZOXAZOLE DERIVATIVES BY AMES TEST SYSTEM**

ZELİHA SOYSAL

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

BİYOLOJİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2009

BAZI BENZOKSAZOL TÜREVİ BİLEŞİKLERİN AMES TEST SİSTEMİ İLE MUTAJENİK POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

Zeliha Soysal

ÖZ

Bu çalışmada, Ames testi kullanılarak, ilaç etken maddesi olarak kullanılması düşünülen 2 ile 5 konumlarından süstitüe 15 adet benzoksazol türevi kimyasal maddenin mutajenik potansiyelleri araştırıldı.

Ames test sistemi, kısa zamanlı bakteriyel geri dönüşüm test sistemlerinden birisidir. Deney sisteminde kullanılan *Salmonella typhimurium* TA98, *hisD3052* geninde; TA100 *hisG46* geninde; TA102 ise *hisG428* geninde mutasyon taşımaktadır. Bu gen bölgelerinde meydana gelecek geri mutasyon sonucu atasal forma dönüş frekansı, o kimyasal maddenin mutajenik aktivitesini belirler.

SPSS 16.0 programı yardımıyla yapılan ANOVA çözümlerine göre ($p < 0,05$), test edilen kimyasal maddelerinin hiçbiri, bu deney sisteminde mutajenik etkili bulunmamıştır.

Anahtar kelimeler: Ames testi, benzoksazol, mutajenite

Danışman: Prof. Dr. Nuran DİRİL, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

DETECTION OF MUTAGENIC POTENTIALS OF SOME BENZOXAZOLE DERIVATIVES BY AMES TEST SYSTEM

Zeliha Soysal

ABSTRACT

In this study, mutagenic activities of newly synthesised 2 and 5 disubstituted 15 benzoxazole derivatives, which are believed to have some chemotherapeutic activity, are evaluated by Ames test.

Ames test is one of the bacterial short-term mutagenicity tests. The tester strains used in this test carry different kinds of mutations. TA98 carries a mutation on *hisD3052* gene; TA100 on *hisG46* gene and TA102 on *hisG428* gene. A reversion to wild type frequency appoints to the mutagenic activity of that substance.

The results analysed with ANOVA by SPSS 16.0 ($p < 0,05$). It was found that none of the test compounds have mutagenic effects in this study.

Keywords: Ames Test, benzoxazole, mutagenicity

Advisor: Prof.Dr. Nuran Diril, Hacettepe University, Department of Biology, Molecular Biology Section

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında maddi manevi desteğini esirgemeyen her ihtiyacım olduğunda bana yol gösteren danışman hocam sayın Prof. Dr. Nuran Diril'e;

Güler yüzü, esirgemediği bilgi ve yardımlarından ötürü Prof. Dr. Çervin Çırakoğlu'na;

Yanlarında her zaman kendimi iyi hissettiğim, güler yüzlerini her zaman görmek istediğim ve manevi destekleriyle hep yanımda olan Prof. Dr. Nevin Keskin, Yrd. Doç. Dr. Cahit Doğan ve çok değerli insan Uzm. Sinan Kaynaş'a;

Tez çalışmam süresince yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen sevgili çalışma arkadaşlarım Çiğdem Özen ve Fatma Zilifdar'a, H.Ü Diş Hekimliği Fakültesi'nden geçici bir süre için aramıza katılan Tuğba Toz'a;

Çalışmalarımın deneysel kısmının aksamadan devam etmesini sağlayan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen güzel insan Vedat Mutlu'ya;

Çalışmamda kullandığım kimyasal maddelerin sağlanmasında yardımcı olan Doç. Dr. Özlem Temiz Arpacı'ya, Prof. Dr. İlkay Yıldız ve çalışma arkadaşlarına;

Kendisini tanımasam da, ihtiyacım olduğu anda, telefonun ucundaki içten sesi ve samimi yardımıyla Öğr. Gör. Dr. Ferhan Korkmaz'a, istatistik değerlendirmelerinde yardımcı olan Doç. Dr. Tülay Saraçbaşı'na;

Sıkıntılı olduğum anlarda beni yargılamadan dinleyen, her koşulda yanımda olduklarını hissettiren arkadaşlarım Hülya Mutlu, Demet Töre ve Çiğdem Özenirler'e;

Hayatım boyunca yanımda duran, beraber aynı yöne baktığımız canım ailem; huysuz ve tatlı kadın, canım annem Sevim Soysal, canım kardeşim Fatma Soysal ve canım babam Celal Soysal'a;

Bilgileri ve tecrübeleriyle yolumu aydınlatan insanlara ve varlıklarıyla çevrelerine ışık saçan tüm insanlara;

Ve beni anlaması için konuşmama hiç gerek kalmayan can Hakan'a...Teşekkür ederim... Varlıklarından ötürü...

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	2
2.1. Antimikrobiyal Kemoterapi ve Antibiyotik Dirençliliği.....	2
2.2. Risk Değerlendirme	6
2.3. Benzoksazol Türevi Bileşikler	7
2.4. Kısa Zamanlı Mutajenite Test Sistemleri	8
2.4.1. Ames Test Sistemi.....	13
2.4.1.1. Ames Test Sistemindeki Gelişmeler	19
3. MATERYAL VE METOD.....	22
3.1. Kullanılan Test Suşları	22

3.2.	Kimyasal Maddeler	22
3. 2.1.	Test Edilen Kimyasal Maddeler	22
3.2.2.	Pozitif Mutajenler	24
3.2.3.	Diğer Kimyasal Maddeler.....	25
3.3.	Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddelerin Hazırlanması.....	25
3.4.	Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Besi Ortamları	25
3.5.	Çalışmada Kullanılan Test Suşlarının Üretilmesi	29
3.6.	Çalışmada Kullanılan Suşların Genetik İşaretlerinin Kontrolü.....	30
3.6.1	Histidin Gereksiniminin Kontrolü	30
3.6.2.	Biyotin Gereksiniminin Kontrolü	30
3.6.3.	pKM101 Plazmid Varlığının Kontrolü	30
3.6.4.	pAQ1 Plazmid Varlığının Kontrolü	31
3.6.5	rfa Mutasyonu Varlığının Kontrolü	31
3.6.6	uvrB Mutasyonunun Kontrolü.....	31
3.6.7.	Kendiliğinden Geriye Dönen Koloni Sayısının Kontrolü	31
3.7.	Çalışmada Kullanılan Test Suşlarının Saklanması	32
3.7.1.	Donmuş Kültürlerin Hazırlanması	32
3.8.	Master Plakların Hazırlanması.....	33
3.9.	Ames Test Sistemi.....	33
3.9.1	Sitotoksik Etkinin Saptanması.....	33
3.9.2.	Mutajenite Testi (Plak İnkorporasyon Testi).....	33

3. 9. 2. 1. Mutajenik Etkinin Belirlenmesi.....	34
4. SONUÇLAR.....	35
4.1 Test Suşlarının Üreme Durumları	35
4.2. Ames Testi Sonuçları.....	35
5. TARTIŞMA.....	42
6. KAYNAKLAR	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. İntrinsik dirençlilik faktörleri.....	5
Şekil 2. 2. Dirençlilik kazanım mekanizmaları.....	5
Şekil 2. 3. Heterosiklik halka yapısındaki bazı bileşikler.....	8
Şekil 2. 4. Genotoksisite, mutajenite ve karsinojenite test stratejileri.....	12
Şekil 2. 5. pAQ1 plazmidi.....	17

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. İntrinsik ve kazanılmış dirençliliğin orijini	3
Çizelge 2.2. Yaygın olarak kullanılan Salmonella test suşlarının genotipik özellikleri	14
Çizelge 2. 3. Bazı Salmonella test suşlarının DNA dizi özgüllükleri	15
Çizelge 3.1. Deney sisteminde test edilen kimyasal maddeler	22
Çizelge 4.1. 1-5 numaralı kimyasal maddelerin <i>S. typhimurium</i> TA98, TA100 ve TA102 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkileri.....	36
Çizelge 4. 2. 6 -10 numaralı kimyasal maddelerin <i>S. typhimurium</i> TA98, TA100 ve TA102 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkileri....	37
Çizelge 4. 3. 11-15 numaralı kimyasal maddelerin <i>S. typhimurium</i> TA98, TA100 ve TA102 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkileri.....	38

KISALTMALAR DİZİNİ

LPS Lipopolisakkarit

TK Timidin Kinaz

HGPRT Hipoksantin-Guanin Fosforibozil Transferaz

CHO Chinese Hamster Ovary (Çin Hamster Yumurtalıkları)

SMART Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi

1. GİRİŞ

Benzoksazol halkası, farmasotik kimyada en yaygın kullanılan heterosiklik yapılardan biridir. Bir benzen halkası ve bir oksazol halkasının bileşiminden oluşur. Oksazol halkası yapısal olarak imidazol halkasına benzer. Daha önceden yapılan çalışmalar sübstitüe benzoksazollerin antimikrobiyal, antiviral, antitümör aktivitelerinin olduğunu, ayrıca topoizomeraz 1 ve 2 enzim inhibitörü olduklarını göstermiştir (Elnima et al, 1981;Arpacı et al., 2008; Arısoy et al., 2008).

Günümüzde bir ilaç piyasaya sürülmeden önce, güvenlik testlerinden geçmesi ve ilacın biyolojik etkinliği hakkında kapsamlı bilgi sahibi olunması; bu bilgilerin kapsamlı veri tabanlarında toplanması öngörülmektedir (Gollapudi and Krishna, 2000; <http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/InvestigationalNewDrugINDApplication/default.htm>).

Bu amaçla çeşitli toksisite testleri uygulanmaktadır. Son yıllarda çeşitli ülkeler, yeni ilaçların genotoksisite testlerinin yürütülmesi konusunda bazı kılavuzlar hazırlamaktadırlar. Bu kılavuzlar genellikle üçlü bateri testleri önermektedirler. Bu testlerden birinci grup bakteriyel geri mutasyon testleri; ikinci grup, kromozomal hataları belirleyebilmek amacıyla in vitro'da memeli hücreleriyle yapılacak testler (örn: metafaz analizleri, mikronükleus testi) ve üçüncü grup ise in vivo'da memeliler kullanılarak yapılacak testlerdir.

Çalışma kapsamında, Ames test sistemi ile 2 ve 5 konumundan sübstitüe 15 adet benzoksazol türevi bileşiğin, *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 ve TA102 suşları üzerindeki mutajenik potansiyelleri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Antimikrobiyal Kemoterapi ve Antibiyotik Dirençliliği

Antimikrobiyal kemoterapi, patojenlerin biyokimyasal yapılarının konakçının biyokimyasal yapısından farklı olması, dolayısıyla bu özellikleri neticesinde konakçıya hiç zarar vermeyen ya da en az zararı veren kimyasal maddelerin patojene atak yapmasıyla ortadan kaldırılabileceği temeline dayanır (Salmond and Welch, 2008).

Patojen bakteri suşları hızla ilaçlara karşı direnç kazanmaktadır. Direnç kazanma pek çok mekanizmanın işe karışmasıyla meydana gelmektedir. Bu nedenle araştırmacılar, bu organizmalara karşı yeni bileşikler sentezleme yoluna gitmektedirler. Yeni etken ilaçların bulunması, saf ya da modifiye, eski veya hala kullanımda olan ilaçların yüzleştiği bu sorunun üstesinden gelmelidir. İlaç şirketleri ve araştırma merkezleri çeşitli kaynakları ve farklı teknikleri kullanarak bu ihtiyacı karşılamaya çalışmaktadırlar (Kreander, 2006).

Bakteriyel antibiyotik direnci ya intirinsik ya da kazanılmış mekanizmalarla sağlanır. Bu mekanizmalarla ilgili bilgiler Çizelge 2. 1, Şekil 2. 1 ve Şekil 2. 2'de verilmiştir. İntrinsik mekanizmalar konak kromozomunda bulunan, Gram negatif bakterilerin AmpC β -laktamaz enzimlerini kodlayan genler ve MDR (multidrug resistance= çoklu ilaç dirençliliği) sızıntı (efflux) genleri ile ifade edilir (Aleksun and Levy, 2007). Ayrıca bakteriyel ribozomlar, ökaryotik ribozomlardan farklıdır. Bu farklılık temel alınarak hazırlanan etken maddeler, seçici olarak bakteriyel ribozomlarla etkileşime girerek etkinliklerini gösterebileceklerdir. Bakteriyel ribozomlar 30S ve 50S alt birimlerine sahip ribozomlar taşırlar. Streptomisin, gentamisin gibi antibiyotikler 30S alt birimine bağlanarak etkinliklerini gösterirlerken; eritromisin ve kloramfenikol gibi örnekler 50S ünitesine bağlanırlar. Bu antibiyotiklerden hiçbirinin ökaryotik ribozomlara ilgisi yoktur (Hayes and Wolf, 1990).

Antibakteriyel ilaçları modifiye eden enzimler β -laktamazlar gibi antibiyotikleri degrade eden enzimleri içeren bir grup ve makrolid ve aminoglikozidleri modifiye eden proteinlerini de içine alan diğer bir grup olmak üzere iki grup altında incelenirler

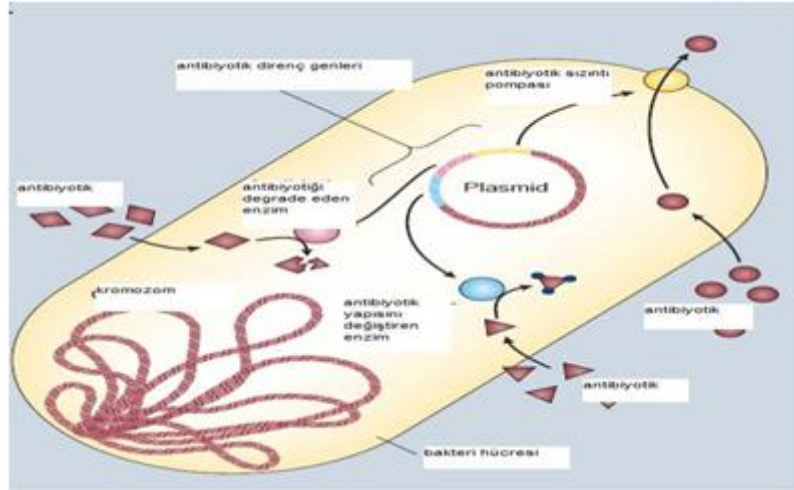
(Aleksun and Levy, 2007). Yapılan modifikasyonlar ilacın hedefe olan ilgisini azaltır (McKeegan et al., 2002) .

Çizelge 2. 1. İntrinsik ve kazanılmış dirençliliğin orijini (Hayes and Wolf, 1990).

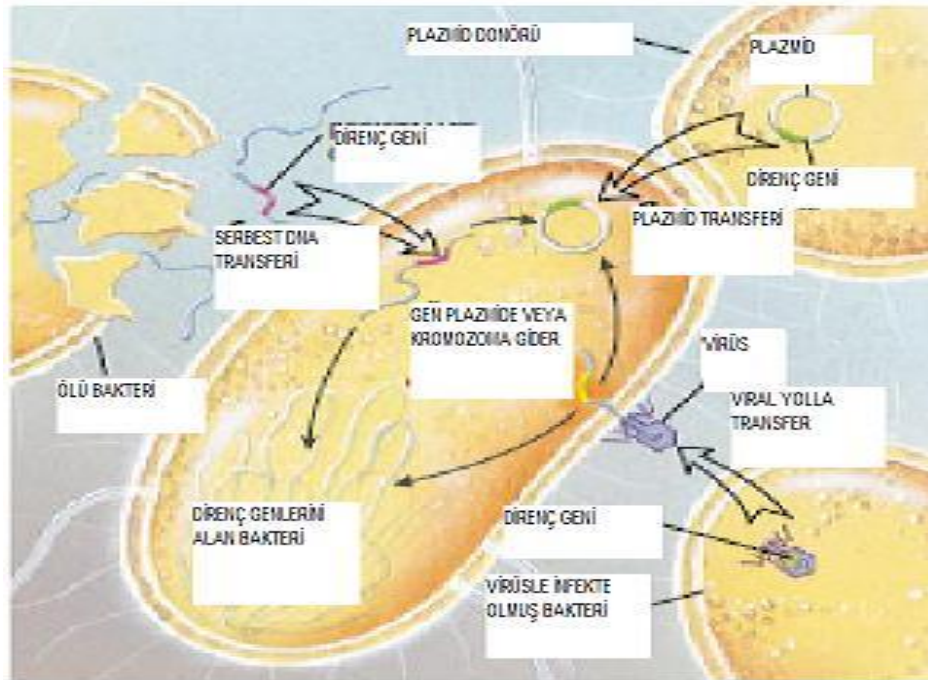
<u>Dirençlilik</u>		
<u>tipi</u>	<u>Dirençliliğin süresi</u>	<u>Populasyondaki dirençliliğin frekansı</u>
<i>Intrinsik dirençlilik</i>		
1. Hedef bölgenin yokluğu	Kalıcı	Tüm hücrelerde
2. Türe özgü hedef bölge yapısı	Kalıcı	Tüm hücrelerde
3. Yüksek detoksifikasyon kapasitesi		
a) Dokuya özgü fonksiyonlar	Kalıcı	Tüm hücrelerde
b) Ontogenik varyasyonlar	Değişken	Tüm hücrelerde
c) Cinsiyete özgü farklılıklar	Kalıcı	Tüm hücrelerde
d) Populasyon polimorfizmi	Kalıcı	Değişken
e) Kendini savunma mekanizması	Kalıcı	Tüm hücrelerde
f) Onarım kapasitesi	Kalıcı	Tüm hücrelerde
4. İlaç iletiminin azlığı	Değişken	Değişken
5. Hücre döngüsünün etkileri	Değişken	Değişken
6. Adaptif değişiklik	Geçici	Tüm hücrelerde
7. Stres cevabı	Geçici	Tüm hücrelerde
<i>Kazanılmış dirençlilik</i>		
1. Doğal seçim	Kalıcı	Ender
2. Konstütif adaptif değişiklik	Kalıcı	Ender
3. Konstütif stres cevabı	Kalıcı	Ender
4. Gen transferi	Sürekli seçim gerektirir	Ender
5. Gen amplifikasyonu	Sürekli seçim gerektirir	Ender

Bireysel savunma mekanizmaları da intrinsik faktörler arasında sayılabilir. Birçok organizma, predatörlerinden ve rekabet halinde bulunduğu canlılardan kendi ürettiği toksik veya karşı taraf için hoş olmayan kimyasallar salgılayarak savunma sağlayabilirler. Dolayısıyla canlıların kendi ürettikleri bu kimyasallardan etkilenmemek için bir mekanizmaları olmalıdır. Antibiyotik üreten mikroorganizmalarla yapılan çalışmalar, örneğin çeşitli *Streptomyces* türleri, bu konularda aydınlatıcı bilgiler vermektedir. İntrinsik olarak kazanılan dirençlilik mekanizmalarından, adaptif olarak kazanılan direnç, diğer intrinsik mekanizmalardan farklıdır. Çünkü bu direnç kısa ömürlüdür ve toksik ajan ortamdaki kaldırıldığında, dirençlilik kaybolabilir (Hayes and Wolf, 1990).

Daha önce ilaç hassasiyeti bulunan bir hücre popülasyonundan zaman içerisinde dirençli hale gelen hücreler için kazanılmış mekanizmalardan bahsedilebilir (Hayes and Wolf, 1990). Kazanılmış mekanizmalar antibiyotik hedeflediği gende meydana gelen mutasyonlar ile plazmid, bakteriyofaj, transpozonlar ve diğer genetik mobil elementlerle taşınan antibiyotik direnç belirteçleri ile gerçekleşir. Genelde bu değişim süreçleri transdüksiyon (bakteriyofajlar aracılığı ile), konjugasyon (plazmidler ve konjugatif transpozonlar aracılığı ile) ve transformasyon aracılığıyla gerçekleşir. Aynı cins içerisindeki organizmalar arasında gen transferi yaygın olmakla birlikte, bu mekanizma birbirinden oldukça farklı cinsler arasında da meydana gelmektedir. Bir bakteri içerisinde birden fazla plazmid bulunabilir. Plazmidler dirençlilik genleriyle beraber pek çok özel gen de taşırlar; konakçı genomundan bağımsız bir şekilde replike olurlar ve replikasyon orijinleri ile de tanımlanabilirler. Transpozonlar, mobil genetik elementlerdir ve plazmid üzerinde bulunabildikleri gibi diğer transpozonlara veya konakçı genomuna katılabilirler (Aleksun and Levy, 2007).



Şekil 2. 1. İntrensik dirençlilik faktörleri (Levy and Marshall, 2004).



Şekil 2. 2. Dirençlilik kazanım mekanizmaları (Levy, 1998).

Bir ilaç direnç mekanizması birbirinden farklı pek çok gen tarafından düzenlenebilir. Bununla birlikte, birden fazla farklı mekanizma aynı antibiyotiğe karşı direnç sağlayabilir (Levy and Marshall, 2004).

Antimikrobiyal kemoterapi için potansiyel hedeflerden biri de, ki bu hedef yalnızca patojenlere özgü değildir, quorum sensing mekanizmasıdır. Bazı patojenler, bakteriyel hücre populasyon yoğunluğuyla orantılı olarak, virülans genlerini kontrol etmek amacıyla bu mekanizmayı kullanırlar. Bu mekanizmada hücre içi sinyal molekülleri görevlidir. Eğer bu sistem kimyasallarla inhibe edilirse, patojenler etkisiz hale getirilebilir. Çünkü bu durumda hücreler virülans genlerini etkin bir şekilde ifade edemeyeceklerdir. Quorum sensing, aynı zamanda, bakterilerde biofilm oluşumunu da kontrol eder. Biofilm oluşturan bakteriler, antibiyotiklere karşı daha dirençlidirler. Dolayısıyla quorum sensing mekanizmasını inhibe edecek olan bir kimyasal, biofilm oluşumuyla ilgili meydana gelen kronik bakteriyel hastalıkların tedavisinde kullanılabilir. Antibiyotiklerin aksine, bu kimyasallar kommensal floraya zarar vermezler; dolayısıyla konakçı üzerinde daha az yan etki oluştururlar (Salmon and Welch, 2002).

Bu bilgiler ışığında antibakteriyel ajanların hücre duvarı sentezine engel olarak, protein sentezini, nükleik asit sentezini ve/veya bir metabolik yolu inhibe ederek etkilerini gösterdikleri söylenebilir (Tenover, 2006). Antibakteriyel ilaçların geliştirilmesinde kullanılacak yeni etken maddelerin, bu anahtar noktalar göz önünde bulundurularak sentezlenmesi gerekir.

2.2. Risk Değerlendirme

Risk matematiksel bir terimdir ve herhangi bir kimyasal maddeye maruziyetten kaynaklanan beklenmeyen yan etkileri ifade eder. Ayrıca herhangi bir tehlikeli maddenin özgül maruziyet koşullarında göstereceği yan etkiler olarak da değerlendirilebilir. Risk= tehlikeli madde x maruziyet olarak formüle edilebilir; güvenlik ise, madde önerilen şekilde ve dozda kullanıldığında yan etkilerin gözlenmeyecek olması olarak tanımlanabilir (Timbrell, 2002).

Yeni ilaçlar geliştirilirken güvenilirliği konusu mümkün olduğunca erken çözümlenmelidir. En önemli güvenlik yaklaşımları farmakoloji (ilaç-hedef etkileşimlerine dayanan toksisite), kimya (yapı), toksikoloji (*in vivo* hücre kültürleri) , ilaç metabolizması ve farmakokinetik ve risk faktörleridir (fizyolojik, çevresel ve genetik) (Kreander, 2006).

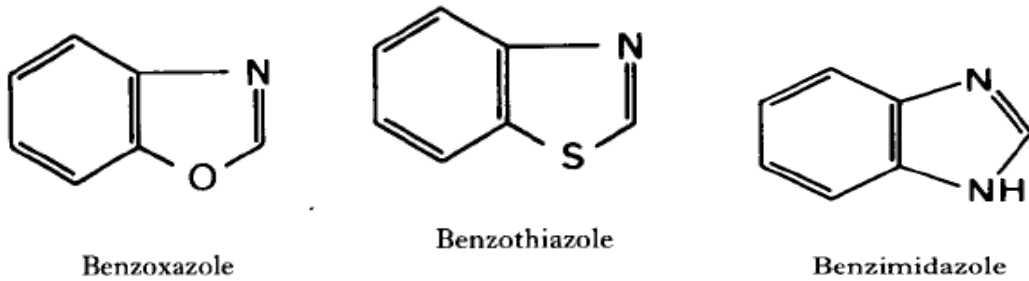
Sonuç olarak, yeni ilaçların geliştirilmesi sırasında *in vitro* toksikolojik yöntemler kullanılarak en az toksikolojik özellik gösteren kimyasalların seçimi yapılmalıdır. Kimyasal yapıdan kaynaklı toksikolojik problemler araştırılırken test edilen kimyasalın iskelet yapısının bilinen bir yan etkisi olup olmadığı, yan zincirlerin bilinen bir toksik etkisinin olup olmadığı, toksikoforlar ile farmakoforların *in vitro* ve *in vivo* modeller kullanılarak birbirinden ayrılıp ayrılmadığı incelenmelidir. İlaç metabolizması incelenirken ise test edilecek kimyasalların biyotransforme olup olmadığı, insanlarda meydana gelebilecek metabolitlerin hayvan sistemlerindeki metabolitlerden farklı olup olmadığı, hangi hayvan modelinin insan modeline daha çok benzediği, kimyasal maddenin vücuttan ne kadar sürede tamamen atıldığı, kimyasal maddenin veya metabolitlerinin özgül bir organda birikip birikmediği ve farmakokinetik ilaç-ilaç etkileşimlerinin muhtemel olup olmadığı araştırılmalıdır (Li, 2004).

2. 3. Benzoksazol Türevi Bileşikler

Bir benzen halkası ile füzyon yapmış olan azoller biyolojik olarak aktif ve yaygın olarak kullanılan, medikal anlamda oldukça önemli iskeletlerdir (Evindar and Batey, 2005). Benzoksazoller, C_7H_5NO formülüne sahip, bir benzen halkası ile bir oksazol halkasının füzyonu ile oluşan aromatik organik bileşiklerdir. Bu organooksijen bileşikler oksijenasyon derecelerine, oksijen ve hidrokarbonların buldukları yere, hidrokarbon yapısında bulunan doymamış bağların varlığına ve aromatik halkaların olup olmama durumuna göre sınıflandırılırlar (Manahan, 2003). Benzoksazoller, nükleik asitlerin yapısında yer alan pürin bazlarının yapısal eşdeğerleridir (Vinšová et al., 2005). Nükleik asit sentezinin inhibisyonu da kemoterapötik etki yollarından biridir. Bu şekilde etki gösteren bileşikler deoksiguanozin kalıntılarına bağlanırlar. DNA- ilaç kompleksleri sonucu DNA bağımlı RNA polimeraz inhibe olur ve mRNA

oluşumu gerçekleşmez (Meyers et al., 1976). Son yıllarda benzoksazol ve ilişkili heterosiklik yapı benzimidazollerin antitümör, antiviral, antibiyotik etkileri ile topoizomeraz 1 ve 2 enzimleri, revers transkriptaz ve/veya potansiyel DNA giraz inhibitörü oldukları konusunda bilgiler elde edilmiştir (Kaplancıklı et al., 2004; Tekiner-Gülbaş et al., 2005; Öksüzoğlu et al., 2007; Temiz- Arpacı et al., 2008). Yapılan çalışmalar, heterosiklik çekirdek taşıyan yapıların oldukça güçlü antimikrobiyal etkiye sahip olduklarını göstermiştir. 2 konumundan süstitüsyonun biyolojik aktivite, 5 konumdan süstitüsyonun ise aktivitenin gücü konusunda önemli oldukları yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Temiz-Arpacı et al., 2002; Tekiner-Gülbaş, 2005).

Doğal nükleotitlerin yapısal izosterleri olan benzoksazol ve benzimidazoller, biyopolimerlerle kolayca interaksiyona girerler (Ören et al., 1998). Benzoksazol halka sistemi ve analogları olan benzimidazol, benzothiazol gibi halka sistemlerinin, heterosiklik DNA bazlarının yapısal benzerleri olmaları nedeniyle, kemoterapötik etkinliklerini bu yolla gerçekleştirecekleri düşünülmektedir. Benzoksazol, benzothiazol ve benzimidazol halka yapıları Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Heterosiklik halka yapısındaki bazı bileşikler (Gristwood ve Wilson, 1988).

2. 4. Kısa Zamanlı Mutajenite Test Sistemleri

Karsinogenez üzerine çalışma yapılırken, öncelikle kanserin moleküler süreçte izlediği yolu veya yolları bilmek gerekmektedir. Bu süreçleri anlamak için kullanılacak *in vitro* ve *in vivo* test sistemleri bulunmaktadır. Karsinogenez araştırmalarında en akılcı yaklaşımın uzun zamanlı testler kullanarak, laboratuvar

hayvanları üzerinde çalışmalar yapmaktır. Fakat bunların, kalifiye elemanların yetişmesi ve sürecin uzun olması gibi dezavantajları vardır (Ramel, 1983; Milman, 1983; Tennant et al., 1987). Ayrıca 2013 yılından itibaren hayvan deneylerinde kemirgenlerin kullanılması yasaklanacaktır. Bu da araştırmacıları yeni model organizmalar bulmaya ve/veya yeni *in vitro* test teknikleri geliştirmeye veya halihazırda bulunan tekniklerin geliştirilmesi konusunda çalışmalar yapmaya itmektedir.

Karsinojenitenin taranmasında mutajenite esas alınmaktadır. Bunun nedenleri arasında karsinojenitenin biriken mutasyonlar sonucu ortaya çıkması, dolayısıyla kanserleşmede önemli bir etken olması yer almaktadır. Bununla birlikte genetik kod temelde tüm organizmalarda aynıdır. Dolayısıyla bu kodda meydana gelebilecek herhangi bir değişiklik, diğer organizmalarda da benzer etkiler meydana getirebilir. Mutajenite ve karsinojenite arasındaki ilişkinin yüksek olması göz önüne alınarak, model sistemler ile kimyasal bileşiklerin etkinliklerini belirleyebilmek amacıyla kısa zamanlı mutajenite test sistemleri geliştirilmiştir (Ames et al., 1973; McCann et al., 1975; Benedict et al., 1977; Bartsch and Tomatis, 1983; Ramel, 1983; Weisburger, 1999; Butterworth, 2006). McCann ve Ames 300 kimyasalla yaptıkları bir araştırmada (1976) 175 kanserojen maddenin 157 tanesini mutajenik bulmuşlardır. Bu da karsinojente ve mutajenite arasındaki yüksek ilişkiyi gösteren çalışmalardan birisidir. Kısa zamanlı mutajenite test sistemleri kısa zamanda, daha düşük maliyetlerde ve yüksek güvenilirlikte sonuçlar vermektedirler (Bajpayee et al., 2005).

Bu testlerin yapılma amaçları 3 grup altında toplanabilir:

1. Kimyasalları erken gelişimleri süresince potansiyel karsinojenik aktiviteleri bakımından incelemek ve/veya potansiyel liderlerin seçiminde yardımcı olmak,
2. Evrensel düzenleyici gereksinimleri destekleyecek, umut veren yeni moleküllerin genotoksik potansiyelleriyle ilgili kapsamlı bir veri tabanı oluşturabilmek,
3. Elde olan verileri daha iyi anlayabilmemize yarayacak tamamlayıcı verilerin elde edilmesi (Gollapudi and Krishna, 2000).

Bakterilerde, memeli hücre kültürlerinde, böceklerde ve memelilerde mutajeniteyi tanımlayabilmek amacıyla geliştirilmiş 200'den fazla kısa zamanlı test sistemi bulunmaktadır. Bu sistemler in vitro veya in vivo'da, DNA'da, mutasyonları indükleyerek karsinojenik ajanların taranmasını amaçlar. Yaygın olarak kullanılan kısa zamanlı mutajenite testleri arasında *S. typhimurium* kullanılarak gerçekleştirilen ve bir revers mutasyon testi olan Ames test, lenfoma hücreleri, memeli hücreleri ve Çin hamster yumurtalık hücreleri (CHO= Chinese Hamster Ovary Cells) veya fibroblast hücreleri (V79) kullanılarak gerçekleştirilen ileri (forward) mutasyon testi, in vitro sitogenetik değerlendirme testleri (kromozomal hata testleri, mikronukleus testi) ve knockout transgenik fare modelleri bulunur (Bajpayee et al., 2005).

Mutajenite testlerine başlamadan önce göz önünde bulundurulması gereken noktalar vardır:

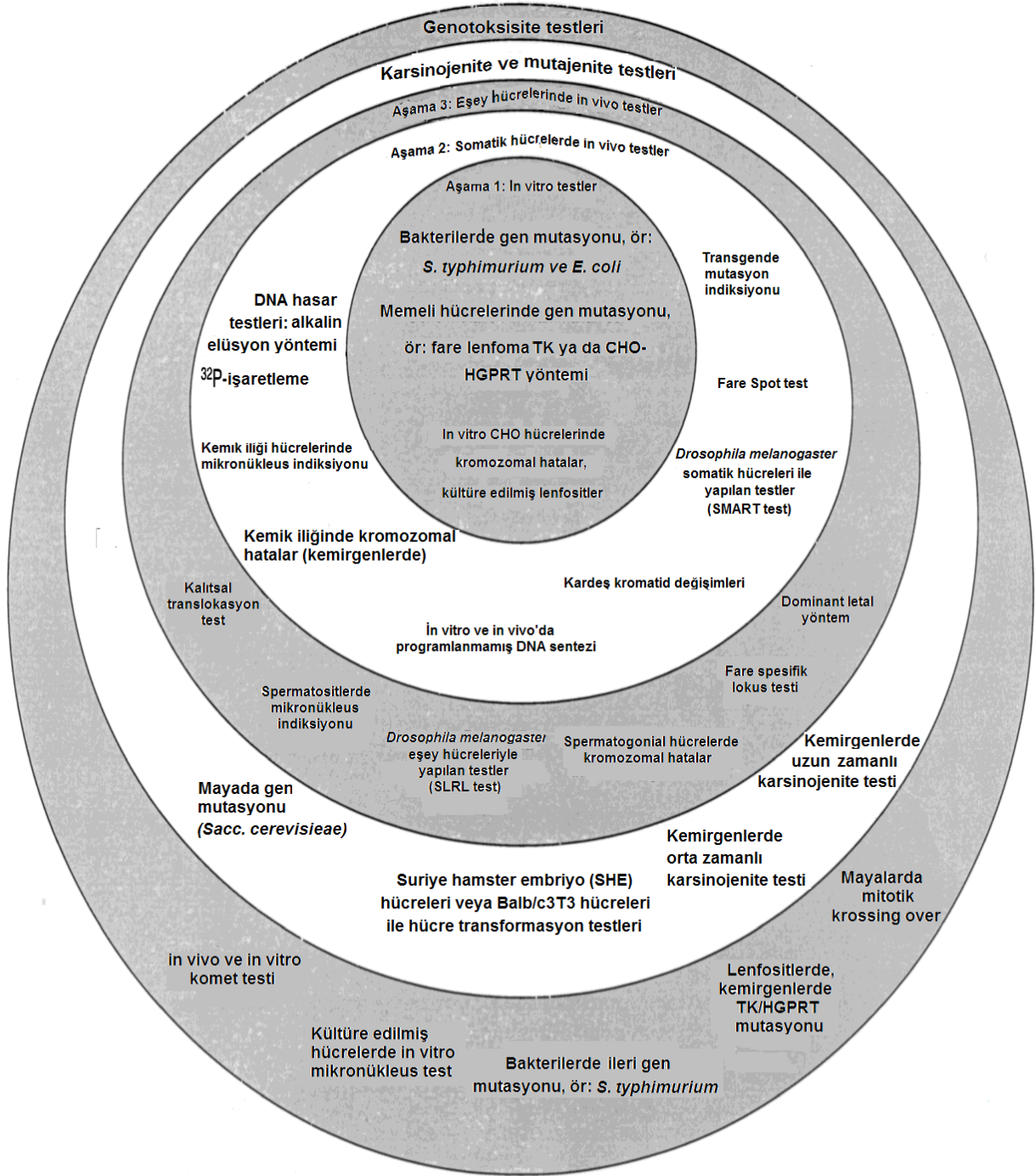
1. Test edilecek kimyasalın veya maddenin kimyasal yapısı (olası yapı aktivite ilişkileri) ile çözünürlük ve kararlılık gibi fizyokimyasal özellikleri,
2. Tahmin edilen metabolik yol ile kimyasal ve biyolojik reaktivite/aktivitesi ve bilinen genotoksik maddelerle olan etkileşimleri,
3. Maruz kalma yolları, biyoayarlanımı ve genotoksisite için hedef organlar.

Bu parametreler göz önünde bulundurularak, test sistemleri arasından en uygun olanı seçilmelidir (Eastmond et al., 2009).

Kısa zamanlı test sistemlerini tek başlarına kullanmak yerine, birkaç tanesini gruplayarak kullanmak daha akılcı bir yaklaşımdır. Çünkü kullanılan bir bileşiğin etkisi bir sistemde gözlenemeyebilir, fakat bir başka sistemde gözlenebilir. Herbir test sistemi belirli bir etkiyi veya farklı etki biçimlerini göstermek amacıyla tasarlanır. Önemli olan uygun test yöntemlerini arka arkaya kullanarak çeşitli etkinlikleri hakkında bilgi sahibi olabilmektir. Böyle bir yaklaşımla karsinojenik eğilimi olan mutajenler daha etkin bir şekilde taranmış olur (De La Iglesia et al., 1980; Tennant and Zeiger, 1993).

ICH (International Conference on Harmonization) hazırladığı 13 güvenlik kılavuzundan iki tanesini genotoksisite testlerine ayırmıştır. ICH'ye göre, yeni bir kimyasal bileşik piyasaya sürülmeden önce, ilk adım olarak üçlü bateri test sistemlerinin uygulanması gerekmektedir. Bunlar: bir bakteriyel geri mutasyon testi, geri mutasyon testi ile belirlenemeyecek, örneğin kromozomal hataların taranabilmesi amacıyla in vitro'da memeli hücreleriyle yapılacak bir test ve in vivo'da memeliler kullanılarak yapılacak bir testtir. Son testin amacı ise kimyasalın absorpsiyon, dağılım, metabolizma gibi ilgili parametreler üzerinde etkisini gözleyebilmektir (ICH S2B, 1998).

Kısa zamanlı mutajenite test sistemleri ile bir kimyasalın mutajenik potansiyeli belirlenebileceği gibi, antimutajenik etkisi de belirlenebilmektedir (Gomes-Carneiro et al., 2006; Bulmer et al., 2007). Ayrıca metabolizma sonucunda oluşabilecek ara ürünlerin mutajenik potansiyellerinin belirlenmesinde de kullanılabilirler. Bu nedenle kısa zamanlı mutajenite test sistemleri, çeşitli alanlarda oldukça yaygın bir biçimde kullanılmaktadırlar.



Şekil: 2. 4. Genotoksisite, mutajenite ve karsinogenite test stratejileri (Bajpayee, 2005).

2. 4. 1. Ames Test Sistemi

Tez kapsamında kullanılan test sistemi, gen düzeyinde meydana gelen mutasyonları tespit eden, oldukça hassas bir test olan Ames test sistemidir. Ames test sistemi atasal bir suştan (LT2) indüklenme yoluyla elde edilen çeşitli histidin oksotrofu bakterilerin, sonradan kazanılan bu karakterlerinin geri atasal formuna dönüşümü ile ilgilidir. Geriye dönüşüm testi olarak da tanımlanmaktadır. Bruce N. Ames tarafından geliştirildiği için Ames testi olarak anılmaktadır (Mortelmans and Zeiger, 2000).

Pek çok kimyasal madde mutajenik olmayabilir, fakat metabolik aktivasyon sonucu mutajenik ara ürünlere dönüşebilir. İn vivo etkileşimi kopya edebilmek amacıyla, deney sistemine çoğunlukla memeli karaciğerinden elde edilen metabolik aktivasyon sistemi eklenir. Sonuçta metabolitlerinin mutajenik potansiyeli hakkında da sonuçlar elde edilebilir (Maron and Ames, 1983; Mortelmans and Zeiger, 2000; Kho et al., 2005). Ortama mikrozomal enzim fraksiyonları eklendiğinden literatürde *Salmonella*/mikrozom testi olarak da geçmektedir. En geniş veri tabanlarından biri olan Science Direct veri tabanı 1999- 2009 tarihleri arasında Ames test sistemi bakımından tarandığında 2000'den fazla veriye ulaşılmaktadır.

Test sisteminde kullanılan suşlar *S. typhimurium* LT2 atasal suşundan in vitro mutasyonlar ile indüklenerek elde edilen TA1535, TA100, TA1538, TA98, TA1537, TA97, TA104, TA102...gibi mutant suşlardır. Bu suşlardan her biri, histidin operonundaki çeşitli genlerden birinde mutasyona sahiptir.

Yaygın olarak kullanılan *Salmonella* test suşlarının genotipik özellikleri Çizelge 2. 2'de, bazı mutant suşların DNA dizi özgüllükleri ise Çizelge 2. 3'te verilmiştir.

Çizelge 2. 2. Yaygın olarak kullanılan Salmonella test suşlarının genotipik özellikleri (Mortelmans and Zeiger, 2000).

<u>Mutasyon</u> (suş)	<u><i>bio chID uvrB gal</i></u>	<u>LPS hasarı</u>	<u>Plasmid</u>
<i>hisG46</i>			
TA1535	Delesyon mutasyonu	<i>rfa</i>	Plasmid yok
TA100	Delesyon mutasyonu	<i>rfa</i>	pKM101
<i>hisD3052</i>			
TA1538	Delesyon mutasyonu	<i>rfa</i>	Plasmid yok
TA98	Delesyon mutasyonu	<i>rfa</i>	pKM101
<i>hisC3076</i>			
TA1537	Delesyon mutasyonu	<i>rfa</i>	Plasmid yok
<i>hisD6610</i>			
	Delesyon mutasyonu	<i>rfa</i>	pKM101
<i>hisO1242</i>			
TA97			
<i>hisG428</i>			
TA104	Delesyon mutasyonu	<i>rfa</i>	Plasmid yok
TA102	Atasal suş	<i>rfa</i>	pKM101, pAQ1

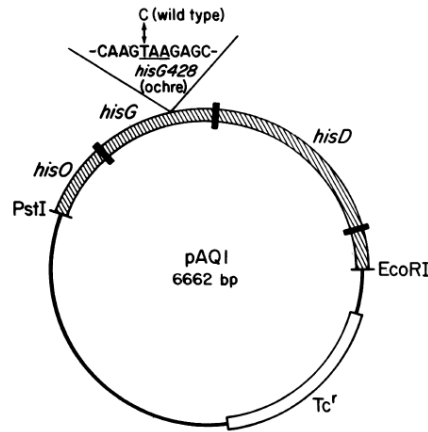
Çizelge 2. 3. Bazı Salmonella test suşlarının DNA dizi özgüllükleri (Mortelmans and Zeiger, 2000).

<u>Alel/suş</u>	<u>DNA'daki hedef bölge</u>	<u>Geri dönüşüm mekanizması</u>
hisG46 TA1535 TA100	-G-G-G-	Baz çifti değişimi
hisD3052 TA1538 TA98	-C-G-C-G-C-G-C-G-	Çerçeve kayması
hisC3076 TA1537	+1 çerçeve kayması (C-C-C- dizisinin yakınına)	Çerçeve kayması
hisD6610 TA97	-C-C-C-C-C-C- (C dizisinin sonuna +1 sitozin)	Çerçeve kayması
hisG428 TA102 TA104	TAA (ochre)	Transisyon/transversiyon

TA1535 ve TA100'de bulunan *hisG46* mutasyonu, histidin biyosentezinden sorumlu ilk enzimi kodlayan *hisG* geni üzerinde bulunur (Ames,1973) ve lösin aminoasitinin (GAG/CTC) prolin aminoasitine (GGG/CCC) dönüşmesi ile tanımlanır. Bu değişime neden olan kimyasallar histidin oksotrofu olan TA1535 ve TA100 suşlarının, histidin prototrofu olmalarına olanak sağlayacaktır (Barnes et al., 1982; Maron and Ames, 1983; Mortelmans and Zeiger, 2000).

hisD3052 mutasyonu, histidinol dehidrogenaz (EC 1.1.1.23) enzimini kodlayan *hisD* geni üzerinde bulunmaktadır (Isono ve Yourno, 1974). Bu mutasyonu taşıyan TA98 ve TA1538 suşları mutasyon bölgesinde –C-G-C-G-C-G-C-G- şeklinde devam eden, 8 tane GC tekrarından oluşan bir dizinin yanından -1 çerçeve kayması mutasyona sahiptir ve bu da okuma çerçevesini kaydırmaktadır. *hisD3052* mutasyonunun, atasal forma geri dönüşü çerçeve kayması mutasyona neden olan danomisin, 2-nitrofloren ve amin karsinojenlerin aromatik nitroso türevleri gibi çerçeve kayması şeklinde mutasyona neden olan mutajenler (frameshift mutajenler) tarafından gerçekleştirilebilir (Maron and Ames, 1983; Mortelmans and Zeiger, 2000).

hisG428 mutasyonu taşıyan TA102 suşu ise, GC baz çiftinde bir hasara neden olan mutajenlerin taranmasında kullanılan suşların aksine, AT baz çiftinde hasara neden olan mutajenlerin tanımlanmasında kullanılan bir suştur. TA102'de 839-853 pozisyonları arasında A-G-A-G-C-A-A-G-T-A-A-G-A-G-C- bulunurken, atasal suшта aynı pozisyonda A-G-A-G-C-A-A-G-C-A-A-G-A-G-C- bulunmaktadır. Bu suşun diğer suşlardan bir diğer farkı da mutasyon bölgesinin çok kopyalı pAQ1 plazmidine tanıtılmış olmasıdır. Bu tanıtımın amacı, hedef bölge sayısını artırmaktır (yaklaşık 30 kat). TA102 suşunun, *uvrB* geninde delesyon taşımaması çapraz bağlanma yapan ajanların taranmasında oldukça önemli bir noktadır (Levin et al., 1982; Mortelmans and Zeiger, 2000). Yapılan bir çalışmada *hisG428* mutasyonunu kromozom üzerinde taşıyan TA104 ve TA2638 suşları kullanılmıştır; sonuçlar karşılaştırıldığında kendiliğinden geriye dönen koloni sayısının TA 102'de yaklaşık 6 kat fazla olduğu görülmüştür (Levin et al., 1982).



Şekil 2. 5. pAQ1 plazmidi (Levin et al., 1982).

Bu suş ile x- ışınları, bleomisin, hidrojen peroksit ve diğer hidroperoksitler; streptonigrin ve diğer kinonlar; fenilhidrazinler; formaldehit, glyoxal, kethoxal, gluteraldehit ve malondialdehit gibi çeşitli aldehitler, ve UV ışığı varlığında veya yakınlarında bazı prosalenlerin, mitomisin C, neocarziostatin ve gibi maddelerin ve UV ışığının mutajenik etkilerin taranmasında kullanılabilir (Levin et al., 1982; Maron and Ames, 1983)

hisG428 ve *hisG46* hedef bölgeleri muhtemel 6 baz çifti değişiminin taranmasında kullanılabilir (Koch et al., 1996).

Bu test suşlarının kimyasal maddeler duyarlılıklarını artırmak amacıyla başka mutasyonlar da eklenmiştir. Bunlar ;

rfa mutasyonu: Bir maddenin toksik veya mutajenik etkisinden bahsetmek istiyorsak, öncelikle bu madde biyolojik sistemle yüz yüze getirilmelidir. Bir bileşiğin toksisitesi veya mutajenitesi üzerinde, maddenin absorpsiyon hızı ve absorbe edildiği bölgeler önemli parametreler olabilir. Bir bileşik ile biyolojik sistem yüz yüze geldiğinde pek çok absorpsiyon bölgesi olabilir, fakat neticede absorpsiyon bir membrandan geçişi içermektedir. Bu nedenle, maddelerin geçiş mekanizmalarını anlayabilmek için, biyolojik membranların yapısı ve karakteristik özelliklerini dikkate almak gerekmektedir.

Biyolojik membranların en önemli özelliklerinden birisi seçici geçirgen olmalarıdır. Maddeler büyüklük, yağda çözünürlük, polarite/yük ve endojen moleküllere benzerlikleri gibi parametrelere göre biyolojik membranı geçerek hücre içerisine girebilirler. Yabancı maddelerin hücreye girişleri ise porlardan filtrasyon, membrandan pasif difüzyon, aktif taşıma, kolaylaştırılmış difüzyon ve fago/pinositoz yoluyla gerçekleşmektedir (Timbrell, 2002).

rfa mutasyonu bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit tabakasını kodlayan genlerde meydana gelir (Ames at al., 1973; Mortelmans and Zeiger, 2000). Sonuçta hücre duvarının seçici geçirgen yapısı ortadan kaldırılmış olacağından, test bileşiğinin organizmaya alınımı hızlanmış olur.

uvrB mutasyonu: uvrB geni, nükleotit kesip çıkarma onarım sisteminde görevli uvrB proteinini kodlayan gen bölgesidir. uvrB mutasyonu birçok kimyasala karşı, suşun hassasiyetini artırmaktadır. uvrB geninde mutasyon meydana getirilirken biyotin geninde de bir delesyon olmuştur. Dolayısıyla suşlar H vitamini de denilen, biyotin geninde de hasar taşımaktadırlar. uvrB gen bölgesindeki bu hasar, nükleotit kesip çıkarma onarım sisteminin doğruluğunu ortadan kaldırmaktadır (Mortelmans and Zeiger, 2000).

pKM101 plazmidi: TA1538 suşuna bu plazmidin eklenmesi sonucu TA98; TA1535 suşuna eklenmesi sonucu ise TA100 suşu elde edilmiştir. Mutajenik olduğu belirlenen ajanlara karşı plazmidi taşıyan suşların hassasiyetinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Çünkü bu plazmid üzerinde, hataya meyilli onarım sistemi olan SOS onarım sistemine ait genler bulunmaktadır. Bu plazmidin eklenmesi sonucu SOS onarımı ve rekombinasyonel onarım daha fazla devreye gireceğinden kimyasal ve fiziksel mutajenlerle indüklenen mutajenite de artmış olacaktır. Mutajenik özgülüğü TA1537 suşu ile aynı olan, fakat pKM101 plazmidi taşıdığı için çerçeve kayması tipinde mutasyonlara neden olan mutajenlere karşı daha hassas olan TA97 suşu da geliştirilmiştir (Mortelmans and Zeiger, 2000).

pAQ1 plazmid: *S. typhimurium* TA102 ve 104 suşları diğer suşlardan farklı olarak mutasyon bölgesinde AT baz çifti taşımaktadırlar. Dolayısıyla bu suşlar, diğerlerinden farklı olarak AT baz çifti değişimine neden olan kimyasallar ile geri döndürülebilmektedir. Ayrıca TA102 suşu ile oksidatif hasara neden olan mutajenler de belirlenebilmektedir (Levin et al., 1982; Koch et al., 1996). TA102 suşunda, hedef bölge, *hisG428*, çoklu kopya halinde bulunan (yaklaşık 30 kopya) pAQ1 plazmidine insersiyonla takılmıştır. Bu insersiyon ile hedef bölgenin artırılması amaçlanmıştır (Levin et al., 1982; Mortelmans and Zeiger, 2000). Bunlara ek olarak pAQ1 plazmidini üzerinde tetrasiklin direnç geni bulunmaktadır. Bu direnç geni, plazmidin varlığının belirlenmesinde belirteç olarak kullanılabilir.

2. 4. 1. 1 Ames Test Sistemindeki Gelişmeler

Ames test sisteminde standart olarak kullanılan bu suşlara yeni özellikler taşıyan suşlar da eklenmiştir. Klasik nitroredüktaz, mutajenik nitroarenlerin hücre içi metabolik aktivasyon sürecinde görevli bir enzimdir. *S. typhimurium* TA1538'in nitroredüktaz geni pBR322 genine klonlanarak TA98 ve TA100 suşlarına aktarılmıştır. Sonuçta oluşan YG1021 ve YG1026 suşları, pBR322 plazmidini taşıyan TA1538 suşu ile kıyaslandığında 50 kat fazla nitrofurazon-redüktaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Çalışmalar göstermektedir ki bu yeni suşlar mutajenik nitroarenlerin taranmasında oldukça etkili araçlardır (Watanabe et al., 1989). *S. typhimurium*'da, asetiltransferaz da nitroarenlerin ve/veya aromatik aminlerin hücre içi metabolik aktivasyonlarından sorumludur. Bu her iki enzimi kodlayan genlerin bir plazmide aktarılarak TA98 ve TA100 suşlarına eklenmesi sonucu YG1041 ve YG1046 suşları elde edilmiştir. Bu suşlarda her iki enzim aktivitesi de yüksektir (Hagiwara et al., 1993).

Ayrıca nitroredüktaz enzimini kodlayan genlerinde bir hasar oluşturulan TA98NR ve TA100NR gibi suşlar da aromatik aminlerin taranmasında kullanılmıştır (Hughes et al., 1997; Yamada et al., 1997).

Ames test sisteminde, özgül baz değişim mutasyonları belirlenememektedir. Bu baz değişimlerini kolayca tanımlayabilmek amacıyla, yine his⁻, 6 adet suş geliştirilmiştir. Bunlar TA7001, TA7002, TA 7003, TA7004, TA 7005 ve TA7006'dır. Bu suşlardan herbiri 6 olası baz değişiminden yalnızca birisini tanımlayabilmektedir. Dolayısıyla bu suş seti mutajenik ajanın mutasyonel spektrumu hakkında bilgi edinebilmek amacıyla kullanılabilir (Gee et al., 1998). Bu suşların belirleyebildiği özgül baz değişimi mutasyonları Çizelge 2.4'te verilmiştir.

Çizelge 2.4 : Kullanılan bakteri suşları ve karışımlar (Flückier- Isler et al., 2004).

Suş	Genotipler	Suşun mutasyon	taradığı
TAMix	TA7001, TA7002, TA7003, TA7004, TA7005, TA7006		
TA7001	<i>hisG1775 Dara9 Dchl004 (bio chlD uvrB chlA)galE503 rfa1041/pKM101</i>	A:T--> G:C	
TA7002	<i>hisC9138 Dara9 Dchl004 (bio chlD uvrB chlA)galE503 rfa1041/pKM101</i>	T:A--> A:T	
TA7003	<i>hisG9074 Dara9 Dchl004 (bio chlD uvrB chlA)galE503 rfa1041/pKM101</i>	T:A--> G:C	
TA7004	<i>hisG9133 Dara9 Dchl004 (bio chlD uvrB chlA)galE503 rfa1041/pKM101</i>	G:C--> A:T	
TA7005	<i>hisG9130 Dara9 Dchl004 (bio chlD uvrB chlA)galE503 rfa1041/pKM101</i>	C:G--> A:T	
TA7006	<i>hisC9070 Dara9 Dchl004 (bio chlD uvrB chlA)galE503 rfa1041/pKM101</i>	C:G--> G:C	

Ames test sisteminde plak inkorporasyon testinin kullanılamayacağı durumlar için bazı modifikasyonlar önerilmiştir. Bunlar;

1. Öninkübasyon deneyi; kimyasal, bakteri ve kimyasal karışımı tampon veya metabolik aktivasyon sisteminin 20 dakika boyunca bir arada tutulması ve daha sonra plaklara dökülmesi esasına dayanır.
2. Desikatör yöntemi; genellikle uçucu ve gaz halindeki bileşikler için kullanılan bir yöntemdir.
3. Spiral mutajenite yöntemi; bakteriyel mutajenite testine otomatize olmuş bir yaklaşım kazandırır.

4. Kado mikrosüspansiyon yöntemi; kompleks karışımların test edilmesinde kullanılır.
5. Miniscreen yöntemi ise genellikle daha düşük madde miktarı kullanarak daha fazla maddenin mutajenik etkisinin taranmasında kullanılır (Flamand et al., 2001). Bu özelliği nedeniyle farmasötik endüstrisinde tercih edilir (Mortelmans and Rupa, 2004).

3. MATERYAL METOD

3. 1. Kullanılan Test Suşları

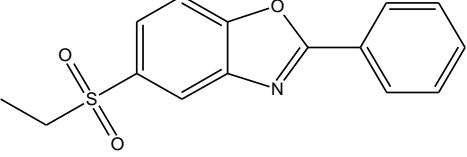
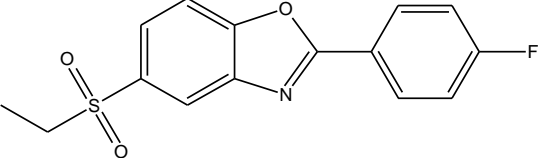
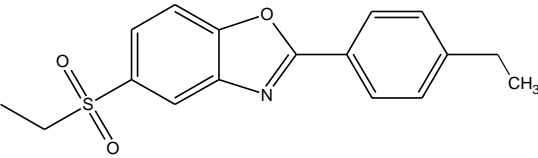
Ames test sisteminde kullanılan *S. typhimurium* TA98, TA100 ve TA102 suşları Dr. Bruce N. Ames'ten (California Üniversitesi, Berkeley) sağlanmıştır. Tüm çalışmalarda, her bir bakteri suşu, her 10 mililitreye 100µl gecelik kültür ekilerek, çalkalamalı etüvde, 37°C' de, $1-2 \times 10^9$ bakteri/ml olacak şekilde üretilmiştir.

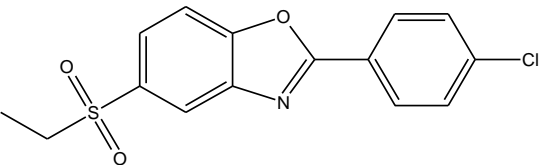
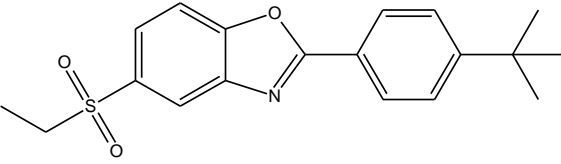
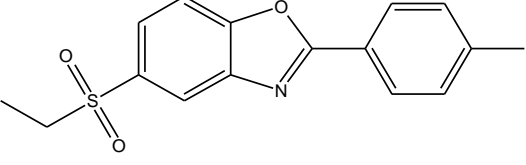
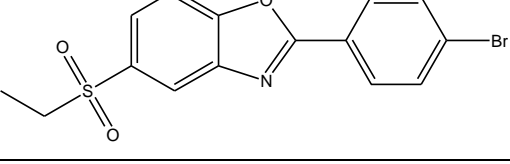
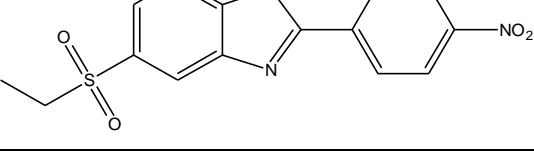
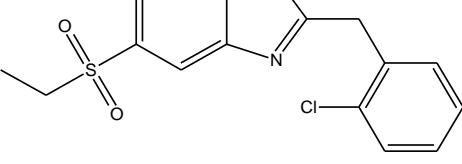
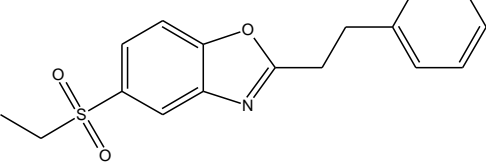
3. 2. Kimyasal Maddeler

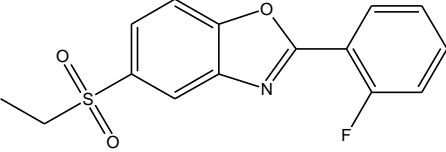
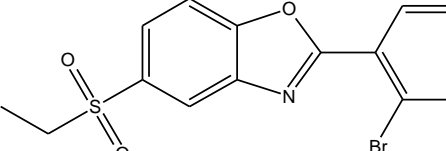
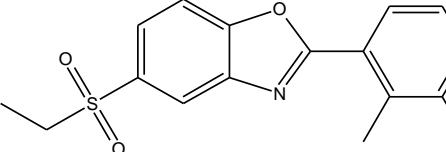
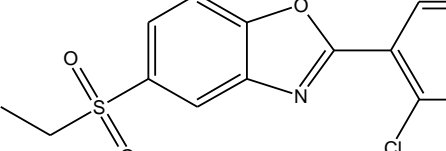
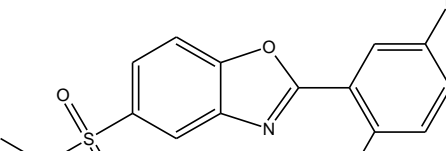
3. 2. 1. Test Edilen Kimyasal Maddeler

2 ile 5 konularından sübtitüe benzoksazol türevi bileşikler Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasotik Kimya Anabilimdalı tarafından sentezlenmiştir. Maddelerin formülleri Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Deney sisteminde test edilen kimyasal maddeler.

No	Kod	Formül
1	DS1	
2	DS2	
3	DS3	

4	DS4	 <chem>CCS(=O)(=O)c1ccc2nc(c1O2)C3=CC=C(C=C3)Cl</chem>
5	DS5	 <chem>CCS(=O)(=O)c1ccc2nc(c1O2)C3=CC=C(C=C3)C(C)(C)C</chem>
6	DS6	 <chem>CCS(=O)(=O)c1ccc2nc(c1O2)C3=CC=C(C=C3)C</chem>
7	DS7	 <chem>CCS(=O)(=O)c1ccc2nc(c1O2)C3=CC=C(C=C3)Br</chem>
8	DS9	 <chem>CCS(=O)(=O)c1ccc2nc(c1O2)C3=CC=C(C=C3)[N+](=O)[O-]</chem>
9	DS12	 <chem>CCS(=O)(=O)c1ccc2nc(c1O2)CC3=CC=C(C=C3)Cl</chem>
10	DS13	 <chem>CCS(=O)(=O)c1ccc2nc(c1O2)CC3=CC=CC=C3</chem>

11	DS14	
12	DS15	
13	DS16	
14	DS18	
15	DS23	

3. 2. 2. Pozitif Mutajenler

Ames test sisteminde, rat karaciğer S9 fraksiyonu yokluğunda, TA 98 ve TA102 suşları için pozitif mutajen olarak 6 µg/plak danomisin (daunomicina) (Deva Holding A.Ş), TA100 suşu için ise 1,5 µg/plak sodyum azid (NaN₃) (Sigma) kullanılmıştır.

3. 2. 3. Diğer Kimyasal Maddeler

D- biyotin, L- histidin- HCl monohidrat, kristal viyole, tetrasiklin, sitrik asit monohidrat, sodyum amonyum fosfat ve D- glukoz Sigma'dan; ampicilin trihidrat ve etanol (% 99 saflıkta) Fluka' dan; Oxoid agar, Oxoid nütrient broth no:2 Oxoid'den; NaCl ve potasyum fosfat Merck'ten; magnezyum sülfat Riedel- de Haën'den sağlanmıştır.

3. 3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddelerin Hazırlanması

8 numaralı kimyasal madde hariç denenen tüm kimyasal maddeler etanol (%96) içerisinde çözüldü. 8 numaralı kimyasal propilen glikolde çözüldü. Öncelikle kimyasal maddelerin sitotoksik dozları belirlendi, sonrasında ise toksik olmayan dozlarda mutajenik etki denemeleri yapıldı. Ayrıca 8 numaralı kimyasal maddenin etanolde süspansiyon edilmiş hali de deney sisteminde kullanıldı.

3. 4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Besi Ortamları

Vogel- Bonner- E Tuz Çözeltisi (50x VB)

1000 ml için:

Distile su	670 ml
Magnezyum sülfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	10 g
Sitrik asit monohidrat	100 g
Potasyum fosfat, dibazik (susuz, K_2HPO_4)	500 g
Sodyum amonyum fosfat ($NaNH_4PO_4 \cdot 4H_2O$)	175 g

45°C sıcaklıktaki ılık suya tuzlar sırası ile eklendi. Ekleme işlemi yapılırken, bir önceki eklenen kimyasalın tamamen çözünmesi beklendi. Toplam hacim, distile su ile, 1000 ml'ye tamamlandı. Tuz çözeltisi minimal glukoz agar, histidin-biyotin-ampicilin-tetrasiklin içeren besi yerlerinin hazırlanmasında kullanıldı.

Minimal Glukoz Agarlı Besi Yeri1000 ml için;

Distile su	880 ml
Bacto agar	15 g
50X VB tuzları	20 ml
% 20 glukoz çözeltisi	100 ml

50xVB tuz çözeltisi ve glukoz çözeltisi ayrı ayrı steril edildi. Mutajenite deneylerinde kullanıldı.

Ampisilin Çözeltisi (8 mg/ml)100 ml için;

Ampisilin trihidrat	0,8 g
0,02 N NaOH	100 ml

pKM101 plazmidi (R faktör) taşıyan suşların genetik işaretlerinin kontrolünde ve master plakların hazırlanmasında kullanıldı.

Tetrasiklin Çözeltisi (8 mg/ml)100 ml için;

Tetrasiklin	0,8 g
0,02 N HCl	100 ml

pAQ1 plazmidi taşıyan TA102 suşunun genetik işaretlerinin kontrol edilmesi ve master plaklarının hazırlanmasında kullanıldı.

Histidin- Biotin- Ampisilin ve Tetrasiklinli Besi Yeri

1000 ml için:

Distile su	860 ml
Bacto agar	15 g
50X VB tuzları	20 ml
% 20 glukoz çözeltisi	100 ml
Steril histidin HCl (% 0,5)	10 ml
Steril 0,05 mM biyotin	6 ml
Steril ampisilin çözeltisi	3,15 ml
Steril tetrasiklin çözeltisi	0,25 ml

pKM101 ve pAQ1 plazmidi taşıyan suşların dirençlilik özelliklerinin test edilmesi ve master plaklarının hazırlanmasında kullanıldı.

0.05 mM Histidin-Biyotin Çözeltisi

250 ml için:

D-biyotin (MA: 244,3)	30,9 mg
L-histidin HCl (MA: 191,7)	24 mg
Distile su	250 ml

100 ml'lik üst agara 10 ml olacak şekilde eklendi. Deney sisteminde kullanılan suşlar histidin oksotrofu olduklarından, ortama histidin-biyotin çözeltisi eklenmediği takdirde üreyemeyeceklerdir. Ortama eser miktarda eklenen 0.05 mM histidin-biyotin çözeltisi, bakterilerin birkaç bölünme geçirmesine olanak sağlayacak miktardadır.

Üst Agar (Top Agar)

100 ml için;

NaCl	0.5 g
Bacto agar	0.6 g
Distile su	100 ml

Mutajenite deneylerinde test edilen kimyasal, bakteri ve 0.05 mM histidin-biyotin çözeltisi karışımının homojen olarak karıştırılmasına olanak sağlayıp, minimal glukoz agarlı plaklar üzerine ikinci bir tabaka olarak eklenmesinde kullanıldı.

Kristal Viyole Çözeltisi (% 0,1'lik)

100 ml için ;

Kristal viyole	0,1 g
Distile su	100 ml

Suşların rfa mutasyonu taşıyıp taşımadıklarının kontrol edilmesi sırasında kullanıldı.

Sıvı Ortam (Nütrient Broth)

1000 ml için;

Oxoid nütrient broth No:2	15 g
Distile su	1000 ml

Gecelik kültürlerin hazırlanmasında kullanıldı.

Nütrient Agarlı Besi Yeri

1000 ml için:

Oxoid nütrient broth No:2	15 g
Bacto agar	15 g
Distile su	1000 ml

Bu besi yeri, bakteri üretmek için kullanılan katı ortamdır. Deney sisteminde kullanılacak suşların uvrB, rfa mutasyonlarının kontrolünde ve sitotoksik etkinin belirlenmesinde kullanıldı.

Glukoz çözeltisi hariç tüm besi yerleri 120°C'de, 20 dakika otoklavda steril edildi. Glukoz çözeltisini karamelize olmasını önlemek için 110°C'de, 20 dakika otoklavda steril edildi.

3. 5. Çalışmada Kullanılan Test Suşlarının Üretilmesi

-80°C'de saklanan *S. typhimurium* TA98, TA100 ve TA102 suşlarından alınan örneklerin nütrient agarlı plaklara tek koloni ekimleri yapıldı. 37°C'de bir gecelik inkübasyonun ardından üreyen tek koloniler alınarak histidin, biyotin, suşuna göre ampisilin ve tetrasiklin ile desteklenmiş minimal glukoz agarlı plaklara ekimleri yapıldı. Nütrient plaklar yerine histidin ve biyotin ile zenginleştirilmiş minimal glukoz agarlı besi yerleri de kullanılabilir. Bu, kontaminasyon riskini azaltır (Mortelmans and Zeiger, 2000).

Ames test sisteminde, sitotoksosite ve mutajenite deneylerinde 1-2x10⁹ bakteri/ml olması öngörülmektedir. Üreme durumu, nütrient agarlı plaklar üzerinde canlı hücre sayımı yapılarak kontrol edildi.

3. 6. Çalışmada Kullanılan Suşların Genetik İşaretlerinin Kontrolü

3. 6. 1. Histidin Gereksiniminin Kontrolü

Kullanılan test suşlarının hepsi histidin oksotrofudurlar (*his⁻*). Suşların bu karakterleri aynı koloninin hem minimal glukoz agarlı plağa ekilmesi hem de histidin ile desteklenmiş minimal agarlı plaklara ekilerek, üremeleri bakımından karşılaştırıldı. Suşların minimal glukoz agarlı ortamda üremeyip, histidin ile desteklenen ortamda üremeleri bu karakteri doğrulamıştır.

3. 6. 2. Biyotin Gereksiniminin Kontrolü

TA102 suşu haricinde tüm suşlar aynı zamanda biyotine de ihtiyaç duymaktadırlar. Çünkü deney sisteminde kullanılan diğer suşlarda *uvrB* delesyonu vardır ve bu delesyon *bio* genini de kapsamaktadır. Suşlar hem histidin-biyotin ile zenginleştirilmiş minimal glukoz agarlı ortama hem de yalnızca biyotin ile zenginleştirilmiş minimal glukoz agarlı ortama ekildi. Yalnızca biyotin ile zenginleştirilen ortamda üreme gözlenmemesine rağmen diğer plakta üreme gözlemlenmesi, bu karakteri doğrular. Biyotin ihtiyacının kontrolü çok gerekli değildir. Çünkü *bio* geninde meydana gelen mutasyon geri döndürülemez (Maron and Ames,1983).

3. 6. 3. pKM101 Plazmid Varlığının Kontrolü

Deney sisteminde kullanılan tüm suşlar ampisilin direnç faktörünü taşıma durumları bakımından kontrol edildi. Dirençlilikten sorumlu bu plazmid oldukça kararsızdır ve hücre plazmidini kaybedebilir. pKM101 plazmidi, hataya meyilli bir onarım sistemi olan SOS onarım sistemine ait genler taşıdığından kimyasal mutajenlere ve UV ile indüklenen mutasyonlara karşı hassasiyeti artırır. Plazmid üzerinde bir belirteç olarak kullanılabilecek ampisilin direnç geni bulunmaktadır. Dolayısıyla daha önceden his karakteri doğrulanan koloniler histidin-biyotin-ampisilin ile desteklenmiş minimal glukoz agarlı plaklara ekildi. Bu plaklarda üremenin gözlenmesi, kolonilerin plazmidi taşıdıklarını gösterir.

3. 6. 4. pAQ1 Plazmid Varlığının Kontrolü

TA102 suşunda bulunan pAQ1 plazmidi, belirteç olarak tetrasiklin direnç geni taşıyan, çoklu kopya halinde bulunan bir plazmidir. Bu plazmidin bakteriye tanıtılmasının amacı hedef bölge sayısını artırmaktır. Plazmidin varlığını test etmek amacıyla daha önceden his karakteri doğrulanan koloniler histidin- biyotin- ampisilin tetrasiklin ile desteklenmiş minimal glukoz agarlı ortama ekildi. Üremenin gözlenmesi, kolonilerin plazmidi taşıdıklarını gösterir.

3. 6. 5. rfa Mutasyonu Varlığının Kontrolü

Daha önceden *his* ve plazmid taşıma özellikleri doğrulanan kolonilerin gecelik kültürlerinden bir miktar alınıp (yaklaşık 0,1 ml) nütrient agarlı plaklara aktarıldı. Yayma ekim tekniği ile agar üzerine iyice yayıldı. Plağın orta kısmına, filtre kağıdından hazırlanmış, 10 µl kristal viyole çözeltisi emdirilmiş (1mg/ml) diskler yerleştirildi. Plaklar bir gece 37°C'de inkübe edildikten sonra diskler etrafında inhibisyon zonu gözlemlendi. Diskin çevresinde kalan bu inhibisyon zonu, oldukça büyük bir molekül olan kristal viyolenin hücre içerisine girip, bakterinin ölümüne neden olduğunu gösterir.

3. 6. 6. uvrB Mutasyonunun Kontrolü

Daha önce *his*, *rfa*, plazmid taşıma karakterleri doğrulanan koloniler nütrient agarlı plaklara ekildi. Her bir suş için aynı kolonilerden 2 set hazırlandı. Bu plaklardan bir tanesinin kapağı açılarak 15 watt'lık germisidal UV lambası altında 33 cm uzaklıktan 8 saniye boyunca ışınlandı. Her bir suş için hazırlanan diğer set ise kontrol plağı olmak üzere, ışınlanan plaklar ile 37°C'de gecelik inkübasyona kaldırıldı. Kontrol plaklarında üreme olmasına rağmen, ışınlanan plaklarda üreme olmaması *uvrB* mutasyonunu doğrular.

3. 6. 7. Kendiliğinden Geriye Dönen Koloni Sayısının Kontrolü

Deney sisteminde test suşlarının kendiliğinden geriye dönüş frekansları kontrol edildi. Her suşun kendine özgü bir geriye dönüş frekansı vardır. Bu değerler, S9 fraksiyonu

yokluğunda, TA98 için 30-50, TA100 için 120-200, TA102 için 240-320 olabilmektedir. Bu değerler, S9 fraksiyonu varlığında değişim gösterebilmektedir (Maron and Ames, 1983).

Geriye dönen koloni sayısının hesaplanması amacıyla, 100 ml steril üst agara 10 ml 0,05 mM steril histidin-biyotin çözeltisi eklendi. Daha sonra bu karışım, herbir steril deney tüpünde 2,5 ml olacak şekilde dağıtıldı. Üst agar çok çabuk donma eğiliminde olduğundan çalışmalar sırasında sıcak su banyosu 37°C'ye ayarlandı ve tüpler deney sırasınca orada bekletildi. Bu tüplere son olarak her suşun gecelik kültüründen ($1-2 \times 10^9$ bakteri/ml) 0,1 ml eklendi ve minimal glukoz agarlı plaklara dökülerek tüm yüzeye yayılması sağlandı. 37°C'de 48-72 saat inkübasyonun ardından geriye dönen kolonilerin sayımı yapıldı. Eser miktarda üst agara eklenen histidin ve biyotin, his⁻ durumdaki kolonilerin yalnızca birkaç kez bölünme geçirmesine olanak sağlayacak miktardadır. Ortamdaki histidin ve biyotin tükendikten sonra, üremesine devam eden koloniler, his⁺ karakterli koloniler olarak değerlendirildi (Maron and Ames, 1983). Geriye dönüş testi, her suş için herbir deneyde yapıldı ve ortalama değerler alındı.

3. 7. Çalışmada Kullanılan Test Suşlarının Saklanması

3. 7. 1. Donmuş Kültürlerin Hazırlanması

Suşlar genetik işaretleri doğrulandıktan sonra, bu işaretlerini uzun süre kaybetmemesini sağlamak amacıyla dondurulmuş örnekler hazırlandı. Bu amaçla suşlar $1-2 \times 10^9$ bakteri/ml olacak şekilde gece boyunca üretildi. Daha sonra bakteri kültürünün her 1 ml'si için spektrofotometrik saflıkta 0,09 ml DMSO eklendi ve yavaşça karıştırıldı. Hazırlanmış kültürler 1-2 ml'lik soğuğa dayanıklı ependorf tüplere dağıtıldı. Tüpler, donmadan kaynaklanacak hacim değişimi dengeleyebilecek şekilde dolduruldu. Bu da meydana gelebilecek hava boşluğunun önüne geçerek oksidatif hasar olasılığını en aza indirmektedir. Dağıtımdan hemen sonra tüpler kuru buz kullanılarak donduruldu ve -80°C'lik derin dondurucuya kaldırıldı. Dondurulmuş örneklerin, genetik özelliklerini kaybetmeden, hazırlanan şekilde üç yıl saklanabileceği belirtilmektedir (Maron and Ames, 1983).

3.8. Master Plakların Hazırlanması

Mutajenite çalışmalarında kullanılmak üzere, daha önce tüm genetik işaretleri kontrol edilmiş TA98, TA100 ve TA102 suşları için master plaklar hazırlandı. En az 5 tek koloninin uygun çözelti ve besinlerle desteklenmiş plaklara ekimleri yapıldı. TA98 ve TA100 için histidin-biyotin-ampisilin ile desteklenmiş minimal glukoz agarlı plaklar, TA102 için ise histidin-biyotin-ampisilin ve tetrasiklin ile desteklenmiş olan minimal glukoz agarlı plaklar kullanıldı. Master plaklar TA98 ve TA100 için iki ay süreyle, TA102 için ise iki hafta süreyle genetik işaretleri kontrol edilmeksizin kullanılabilir. Master plaklar +4°C'de saklandı.

3. 9. Ames Test Sistemi

Öncelikle Ames test sisteminde kullanılacak olan test bileşiklerinin bakteri için öldürücü olmayan dozları belirlendi, ardından mutajenik potansiyelleri test edildi.

3. 9. 1. Sitotoksik Etkinin Saptanması

Sitotoksik olmayan dozların belirlenebilmesi amacıyla, üst agar her bir steril tüpe 2,5 ml olacak şekilde dağıtıldı. Bu agara uygun derişimdeki gecelik kültürden 0,1 ml ve test edilecek kimyasalın belirlenen konsantrasyonlarından en fazla 0,1 ml olacak şekilde eklendi. Karışım nütrient agarlı plaklar üzerine yayıldı ve 37°C'de gecelik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda test bileşikleri eklenen plaklardaki koloni sayıları ile kontrol plaklarındaki koloni sayıları karşılaştırılarak bileşiklerin sitotoksik dozları belirlendi.

3. 9. 2. Mutajenite Testi (Plak İnkorporasyon Testi)

Mutajenite testinde, test bileşiği ve bakteriyel test suşu bir araya getirilerek, homojen bir şekilde minimal glukoz agarlı plaklar üzerinde yayılması sağlandı. Her bir suş için ayrıca pozitif ve negatif kontrol plakları da hazırlandı. TA98 ve TA102 için pozitif kontrol olarak danomisin, TA100 için ise sodyum azid her deneyde pozitif kontrol olarak kullanıldı. Kontrol plakları ile birlikte bütün plaklar 37°C'de 72 saat inkübe edildi ve his⁻ karakteri geriye dönen, yani his⁺ hale gelen, koloniler sayıldı.

Çalışma sırasında her bir steril tüpe 0,5 mM histidin-biyotin çözeltisi eklenmiş 2,5 ml üst agar, test edilecek kimyasalın uygun dozundan en fazla 0,1 ml, test suşunun uygun derişimdeki gecelik kültüründen 0,1 ml eklenerek vorteks yardımı ile karışması sağlandı. Üst agar hızlı bir şekilde donma eğiliminde olduğundan, tüm bu işlemler kısa bir zamanda tamamlanarak minimal glukoz agarlı plaklar üzerine yayıldı. Test bileşiminin her bir dozu için üç plak kullanıldı. Deneyde test suşlarının geriye dönme frekanslarını kontrol etmek amacıyla kullanılan negatif kontrol plakları ve geriye dönme özgüllüklerini kontrol etmek amacıyla kullanılan pozitif kontrol plaklarından da üçer adet hazırlandı.

3. 9. 2. 1. Mutajenik Etkinin Belirlenmesi

Çalışma sonucunda elde edilen geri dönen koloni sayıları kaydedildi. Mutajenik etkiden söz edebilmek için negatif kontrol plakları ile deney plakları arasındaki oranın iki veya ikiden büyük olması gerekmektedir. Bununla birlikte doza bağlı bir artış olduğu durumlarda da mutajenik etkiden söz edilebilir (Maron and Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000). İstatistiksel değerlendirmelerin yapılmasında, SPSS 16.0 paket programı yardımıyla, tek yönü varyans analizi kullanıldı. Kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermesine rağmen, bahsedilen iki kriterden birine uyulmadığı durumlarda, bu farklılık mutajenik etki olarak değerlendirilmedi.

4. SONUÇLAR

Tez çalışması kapsamında, ilaç etken maddesi olarak kullanılması düşünülen, 2 ile 5 konumlarından süstitüe, 15 adet benzoksazol türevi bileşiğin mutajenik potansiyelleri Ames test sistemi kullanılarak incelendi. Bu amaçla çalışmaya başlamadan önce bütün test suşlarının genetik işaretleri kontrol edildi.

4. 1. Test Suşlarının Üreme Durumları

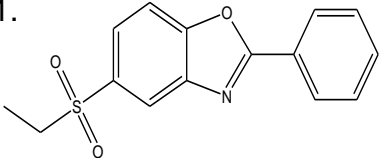
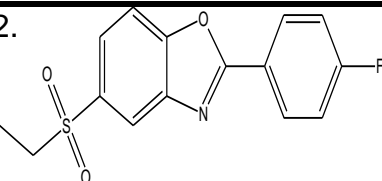
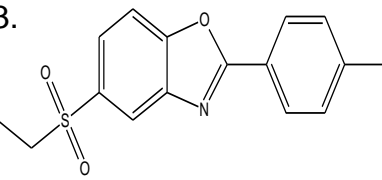
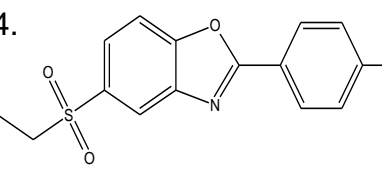
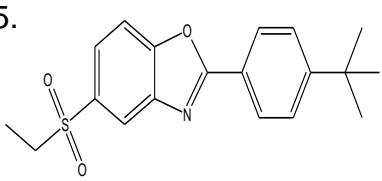
Ames test sisteminde kullanılacak olan suşların gecelik kültürlerinin yoğunluğunun $1-2 \times 10^9$ bakteri/mililitre olması önerilmektedir. *S. typhimurium* TA98 suşunun mililitresinde bulundurması gereken canlı bakteri sayısına inkübasyonun yaklaşık olarak 5. saatinde ulaşmaktadır (Öksüzöğlü, 1997). Bu nedenle, gece boyu üretilen TA98, TA100 ve TA102 suşlarının kültürleri, sabah taze ortama aktarılarak 5 saat boyunca çalkalamalı etüvde inkübe edildikten sonra % 0,9'luk NaCl çözeltisi ile uygun oranlarda seyreltme işlemi yapılarak nütrient agarlı plaklara 0,01ml'lik hacimler halinde nokta ekimleri yapıldı. 24 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra plaklardaki koloniler sayıldı ve her bir suş için gecelik kültürlerin beklenen yoğunluğa ulaştıkları doğrulandı.

4. 2. Ames Testi Sonuçları

Mutajenite çalışmalarına başlanmadan önce, tüm kimyasal bileşiklerin sitotoksik değerleri belirlendi. Sitotoksik gelmeyen en yüksek dozdan başlamak üzere, belirlenen dört farklı dozda mutajenite deneyleri yapıldı. Bu değerler arasında sitotoksisite bakımından en etkin bileşiklerin 1 ve 4 numaralı kimyasallar olduğu gözlemlendi. 1 numaralı kimyasal madde üzerinde denenen 200 µg/plak dozunun bakteri için %60; 4 numaralı kimyasal madde ise 150 µg/plak dozunda %50 toksik olduğu bulunmuştur. Bir bileşik ne kadar düşük dozda sitotoksik etki gösteriyorsa, toksisite bakımından o derece etkindir. 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14 ve 15 numaralı kimyasallar için 50- 150 µg/plak; 3 ve 13 numaralı kimyasalların ise 25- 100 µg/plak dozlardaki etkisi incelendi. TA98, TA100 ve TA102 ile yapılan mutajenite deney sonuçları Çizelge 4.1, 4. 2 ve 4. 3'te verilmiştir.

Çizelge 4. 1. 1-5 numaralı kimyasal maddelerin *S. typhimurium* TA98, TA100 ve TA102 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkileri.

Geriye dönen koloni sayısı \pm standart sapma, n=3

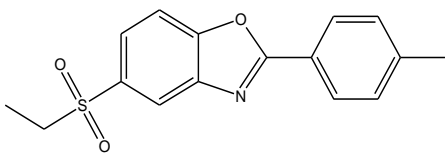
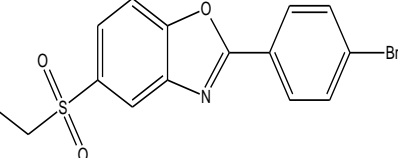
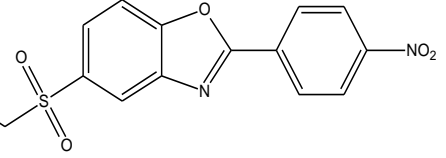
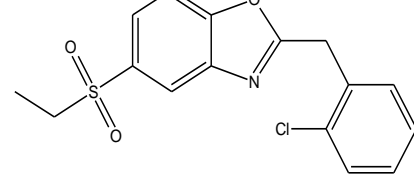
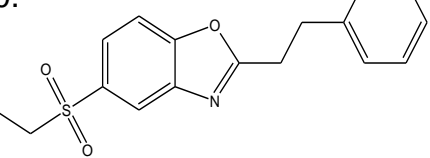
Kimyasal yapı	Dozlar(μ g/plak)	TA98	TA100	TA102	
	0	31 \pm 1	131 \pm 28,1	378 \pm 20,2	
	20	31,3 \pm 4,1	138 \pm 15,8	368,3 \pm 46,4	
	30	37 \pm 5,5	140,3 \pm 15,9	336,3 \pm 25,1	
	40	32,6 \pm 6,1	109,6 \pm 5,6	410,3 \pm 10	
	50	41,6 \pm 7,5	113,6 \pm 18,3	453 \pm 13,5*	
	0	31 \pm 1	131 \pm 28,1	344,6 \pm 39,3	
	50	24 \pm 1*	119,6 \pm 40,3	295,6 \pm 66,1	
	75	34,6 \pm 0,5*	113,3 \pm 6,4	344,3 \pm 41,8	
	100	30 \pm 2,6	137,6 \pm 10,6	309,6 \pm 16,7	
	150	35 \pm 1*	113,6 \pm 11,8	325,3 \pm 66,7	
	0	25,3 \pm 6,5	99,3 \pm 11,3	404 \pm 14,4	
	25	32,3 \pm 7,5	121,3 \pm 10	442 \pm 71	
	50	37 \pm 6	145,3 \pm 16,1	525,3 \pm 103,1	
	75	34,6 \pm 5,8	117,3 \pm 10	453,3 \pm 61,1	
	100	29,6 \pm 2	95,6 \pm 8,1	566,6 \pm 50,3*	
	0	24 \pm 0	131,6 \pm 7,3	346,6 \pm 47,7	
	10	30 \pm 10	120,6 \pm 22	356 \pm 66,8	
	20	32,3 \pm 9,5	128 \pm 5,5	424,6 \pm 67,3	
	30	22,3 \pm 5,5	114,3 \pm 4,6	314,6 \pm 48,2	
	40	37 \pm 15,1	131 \pm 9,5	432 \pm 21,1	
	0	36,3 \pm 4,1	184,6 \pm 26,1	297,3 \pm 28	
	50	51,6 \pm 11,5*	177,3 \pm 8,1	266,6 \pm 47,2	
	75	47 \pm 1	156 \pm 4,3	278,3 \pm 70,6	
	100	44 \pm 1	156,3 \pm 22	260 \pm 26,4	
	150	49 \pm 0^	142,3 \pm 22,5	254 \pm 17	
Pozitif kontroller:	Danomisin	6 μ g/plak	288,1 \pm 157,3	-	749,3 \pm 103
	Sodyum azid	1,5 μ g/plak	-	1438,2 \pm 334,9	-

*: Dunnet t testine göre anlamlı farklılık yaratan grup ($p < 0,05$).

^: Dunnet C testine göre anlamlı farklılık yaratan grup ($p < 0,05$).

Çizelge 4. 2. 6-10 numaralı kimyasal maddelerin *S. typhimurium* TA98, TA100 ve TA102 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkileri.

Geriyeye dönen koloni sayısı ± standart sapma, n=3

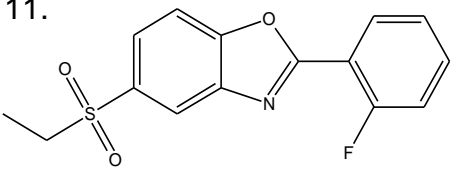
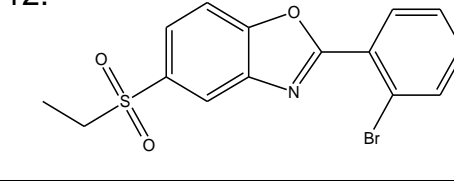
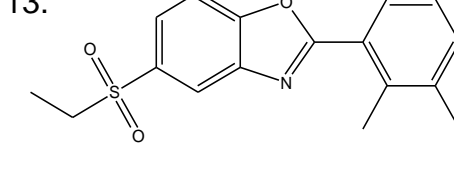
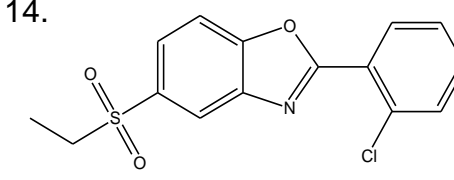
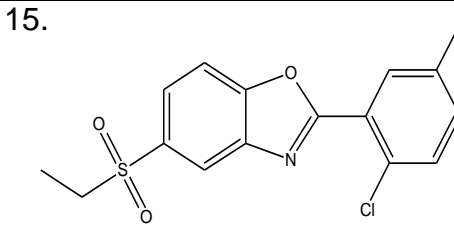
	Kimyasal yapı	Dozlar(µg/plak)	TA98	TA100	TA102
6.		0	36,3± 4,1	154,3± 16	297,3± 28
		50	39± 1	163± 20,4	241± 8,7
		75	34± 4	164,3± 21,1	262,3± 4
		100	29,3± 0,5	158,6± 8,1	272,6± 37
		150	31± 4,3	150,6± 14,9	267± 24
7.		0	36,3± 4,1	154,3± 16	297,3± 28
		50	35,6± 5	130,6± 25,5	282,6± 24,1
		75	33± 8,5	147,3± 8,1	294± 14
		100	32,6± 7	133± 17	269,3± 25,7
		150	28,3± 1,5	113±21,7	248± 28,8
8.		0	24,3±5	141,3± 26,6	281,3± 22,7
		50	24±4	125,3± 9,2	342,6± 18,9
		75	29±2	153,3±26,6	312± 47,1
		100	29,3±5,5	130± 2	345,3± 18,9
		150	29,6±3	130,6± 2,3	317,3± 40,2
9.		0	28,6± 8,7	197,3± 15	297,3± 28
		50	29,3± 3,5	134,6± 20,5*	284± 38,1
		75	36,3± 8,5	134,6± 10,1*	284± 40,5
		100	30,3± 7,2	126± 8,5*	284± 46,1
		150	35,3± 4	126,6± 15*	329,3± 22
10.		0	29,6± 2,5	106,6± 2	304± 34,1
		50	30,6± 1,5	94± 5,2*	308± 30,1
		75	24,6± 4,1	126,3± 21	371± 50
		100	29,3± 4	135± 7*	360,6±45,7
		150	29,3± 1,5	113,6± 7,7	280± 34,8
Pozitif kontroller:	Danomisin	6 µg/plak	288,1± 157,3	-	749,3± 103
	Sodyum azid	1,5 µg/plak	-	1438,2± 334,9	-

*: Dunnet t testine göre anlamlı farklılık yaratan grup (p< 0,05)

^: Dunnet C testine göre anlamlı farklılık yaratan grup (p< 0,05).

Çizelge 4. 3. 11-15 numaralı kimyasal maddelerin *S. typhimurium* TA98, TA100 ve TA102 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkileri.

Geriyeye dönen koloni sayısı ± standart sapma, n=3

Kimyasal yapı	Dozlar (µg/plak)	TA98	TA100	TA102	
11. 	0	29,6± 2,5	106,6± 2	304± 34,1	
	50	31± 5,5	129,3± 5	321,3± 54,4	
	75	46,6± 11*	152,6±20,2*	277,3± 40,2	
	100	30,6± 1,1	118,6± 7	281,3± 33,5	
	150	30± 1	129,3± 5,1	294,6± 14	
12. 	0	29,6± 2,5	106,6± 2	304± 34,1	
	50	29,3± 10,1	144± 14,4*	248± 10,5*	
	75	33,3± 2	100± 15,5	273,3± 23	
	100	26,6± 3,2	148,6± 12*	277,3± 20,5	
	150	27,6± 5,6	111± 6	257,3± 15,1	
13. 	0	20,3± 2,5	107,3± 14,1	242,6± 20,1	
	25	25± 0	83± 19,9	279,3± 74,6	
	50	23,6± 0,5	75± 10	243± 40,3	
	75	23,6± 2,5	93± 1	233,3± 6,1	
	100	22,6± 4,5	81,6± 17,6	276± 74	
14. 	0	24± 0	131,6± 7,3	346,6± 47,7	
	50	35,6± 1,5*	103± 2,6*	292± 56	
	75	31,3± 3,5	98,6± 18,1*	306,6± 18	
	100	30,3± 4,6	89± 13,8*	276± 20	
	150	38,3± 6*	112,3± 6,8	321,3± 32	
15. 	0	25,3± 8	131,6± 7,3	346,6± 47,7	
	50	30,6± 3	100± 5*	317,3± 28	
	75	32± 1	93,3± 11,3*	352± 27,7	
	100	36,6± 4	93,6± 10,9*	366,6± 51,5	
	150	33,6± 5,1	103,3± 5,5*	328± 56	
Pozitif Kontroller:	Danomisin Sodyum azid	6µg/plak 1,5 µg/plak	288,1± 157,3 -	- 1438,2± 334,9	749,3± 103 -

*: Dunnet t testine göre anlamlı farklılık yaratan grup (p< 0,05).

^: Dunnet C testine göre anlamlı farklılık yaratan grup (p< 0,05).

SPSS 16.0 paket programı kullanılarak yapılan ANOVA çözümlemesine göre;

1 numaralı kimyasal madde için, TA102 suşunda 50 µg/plak konsantrasyonda, geriye dönen koloni sayısında kontrol grubuna göre anlamlı bir artış görülmüştür ($p < 0,05$). Fakat bu artış mutajenik etki olarak değerlendirilmemiştir. Dunnet C testi kullanılarak yapılan değerlendirmeye göre ise dozlar arasında anlamlı herhangi bir farklılık gözlenmemiştir.

2 numaralı kimyasal madde için; TA98 suşunda 50 µg, 100µg ve 150 µg/plak dozlarında, kontrol grubu ile deney grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p < 0,05$). Fakat bu farklılık mutajenik etki olarak değerlendirilmemiştir. Dolayısı ile 2 numaralı kimyasalın da TA98, TA100 ve TA102 suşları üzerinde mutajenik etkisi olmadığı söylenebilir.

3 numaralı kimyasal madde için; TA98 suşunda, denenen hiçbir dozun, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık içermediği gözlenmiştir. TA100 suşu için ise 50 µg/plak dozda kontrol grubu ile kıyaslandığında, geriye dönen koloni sayısında anlamlı bir artış görülmektedir. TA102 suşu için bakıldığında ise eş çözümlenmeler sonucu elde edilen verilere göre 100 µg/plak dozunda, kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık görülmüştür. Fakat bu farklılıklar mutajenik etki olarak değerlendirilmemiştir.

5 numaralı kimyasal madde için; TA 98 suşunda denenen dozlar arasında farklılık vardır. Dunnet C testine göre 50 µg/plak dozunda, kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık görülmüştür. Fakat bu fark mutajenite olarak yorumlanmamıştır. TA100 ve TA102 suşları için ise Dunnet t testine göre kontrol grupları ile deney gruplarındaki geriye dönen koloni sayıları ortalamaları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.

9 numaralı kimyasal madde için; TA98 ve TA102 suşu için dozlara verilen cevaplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmezken; TA100 suşu için kimyasala karşı verilen cevaplar arasında farklılıklar bulunmaktadır. Dunnet t testi uygulandığında TA100 suşu denenen tüm konsantrasyonlarda istatistiksel bakımdan kontrol grubuna göre

anlamli bir farklılık gözlenmiştir. Fakat bu farklılık geriye dönen kolonilerin artması şeklinde olmadığı için mutajenik etkiden söz edilemez.

10 numaralı kimyasal maddenin, TA98 ve TA102 suşu için denenen dozlarına verilen cevaplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. TA100 suşunda ise, Dunnet t testinden alınan sonuçlara göre, 50 ve 100 µg/plak dozlarında geriye dönen koloni sayısında kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık bulunmaktadır. Fakat bu farklılıklar mutajenik etki olarak yorumlanmamıştır.

12 numaralı kimyasal maddenin TA98 suşu üzerinde denenen dozlar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. TA100 suşu, Dunnet t testine göre 50 ve 100µg/plak dozlarında kontrole göre anlamlı bir farklılık göstermiştir. Ama bu farklılık mutajenik etki olarak değerlendirilmemiştir. TA102 suşu ise 50 µg/plak dozunda kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermektedir. Fakat bu farklılık geriye dönen koloni sayısının azalması bir sonucudur. Dolayısıyla 12 numaralı kimyasalın mutajenik etkisi olduğu söylenemez.

14 numaralı kimyasal maddede, TA98 suşu için, 50 ve 150 µg/plak dozunda kontrole göre anlamlı bir fark göstermiştir. Bu farklılık en az iki kat artış veya doza bağlı artış kurallarını desteklemediği için, mutajenik etkiden söz edilemez. TA100 suşu için yapılan Dunnet C analizine göre gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktur. Aynı sonuç TA102 suşu için Dunnet t analizi yapıldığında da söylenebilir. 14 numaralı kimyasalın, suşlar üzerinde, mutajenik etkisi tespit edilmemiştir.

15 numaralı kimyasal madde TA 100 suşunda, denenen konsantrasyonlar arasında fark vardır. Fakat bu anlamlılık geriye dönen kolonilerin azalması şeklinde olduğu için mutajenik etkiden söz edilemez. TA98 ve TA102 suşlarında ise konsantrasyonlar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.

4, 6, 7, 8, 11 ve 13 numaralı kimyasal maddeler için, dozların etkinlikleri arasında bir farklılık olmadığı ve kontrol grubu ile deney grupları arasında geriye dönen koloni sayısı açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık olmadığı gözlenmiştir.

8 numaralı kimyasal maddenin etanolde süspanse edilmiş formu, herbir konsantrasyon için n=9 plak ile çalışılmıştır. İstatistiksel analiz sonucunda TA98 için 150,100 ve 75 µg/plak dozlarında kontrole göre anlamlı farklılıklar bulunurken, TA100 ve TA102 suşu ise denenen dozlarda kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermemiştir. TA98 suşundaki farklılık mutajenik etki olarak değerlendirilmemiştir. Bununla birlikte, bu sonuçlara çizelgelerde yer verilmemiştir.

5. TARTIŞMA

Bir benzen halkası ile füzyon yapmış olan azoller biyolojik olarak aktif ve yaygın olarak kullanılan medikal anlamda oldukça önemli iskeletlerdir (Evindar and Batey, 2005). Benzoksazoller, benzimidazol ve benzothiazol gibi yapılarla birlikte bu grup içerisinde yer alır. Benzoksazoller heterosiklik halka yapısındadırlar ve nükleik asitlerin yapısında yer alan bazların yapısal eşdeğerleridir (Vinšová et al., 2005). Dolayısıyla biyopolimerlerle kolayca etkileşime girebildikleri belirtilmektedir (Ören et al.,1998). Ayrıca, benzoksazollerin organizmaya alındıkları zaman toleransları daha yumuşak ve terapötik indeksleri daha geniştir. Bu nedenle ikili halkalı sistemlerde oksazol yapısının yer alması daha çok tercih edilmektedir (Yalçın and Şener, 1993).

Çalışma kapsamında ilaç etken maddesi olarak kullanılması düşünülen 2 ile 5 konumundan süstitüe 15 benzoksazol türevi bileşiğin mutajenik potansiyelleri, Ames test sistemi kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır.

Çeşitli organizmalar ilaçlara karşı hızla direnç kazanabilmektedirler. Direnç kazanma, intrinsik mekanizmalarla veya kazanılmış mekanizmalarla meydana gelmektedir. Örneğin ilaç iletiminin yetersizliği intrinsik mekanizmalar arasında sayılırken; konstüitif stres cevabı kazanılmış mekanizmalardan sayılmaktadır. Organizmaların ilaçlara karşı hızla direnç kazanmasıyla birlikte, araştırmacılar yeni ilaçların sentezlenmesi ve/veya elde bulunan ilaçların modifiye edilmesi üzerinde çalışmalarını artırmışlardır (Kreander, 2006).

Son yıllarda benzoksazol ve ilişkili heterosiklik yapı benzimidazollerin antitümör, antiviral, antibiyotik etkileri ile topoizomeraz 1 ve 2 enzimleri, revers transkriptaz ve/veya potansiyel DNA giraz inhibitörü oldukları konusunda bilgiler elde edilmiştir (Kaplancıklı et al., 2004; Tekiner-Gülbaş et al., 2005; Öksüzoğlu et al., 2007; Arpacı et al., 2008;). Bunların yanı sıra farklı biyolojik aktiviteleri olduğu da yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

Örneğin, Bywater ve arkadaşları (1945) sentetik antikonvülzan yapımında kullanmak için benzoksazolleri seçmişlerdir. Benzoksazolleri seçmelerinin nedeni ise

benzoksazolunun (2-hidroksibenzoksazol) fareye hipodermik olarak uygulandığında bir uyku durumu yaratıyor olması fakat ağız yoluyla verildiğinde böyle bir etki yaratmıyor olmasıdır. İkinci nedeni ise köpekleri formanilid veya asetanilid ile indükledikten sonra ürünlerinden bilinmeyen bir maddenin hidrolitik ürünü olarak izole edildiğinden, benzoksazolunun kısmen non-toksik olmasıdır. Üçüncü neden olarak ise 2- etilbenzoksazolün az miktarda hipnotik etki göstermesini belirtmişlerdir. Çalışmaları sonucunda test edilen 13 bileşikten 8 tanesinin yüksek dozlarda uygulandığında antikonvülzan etki gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Arpacı ve Onurdağ (2006) yaptıkları bir çalışmada sentezledikleri 2-(*p*-klorofenoksi)metil-5-(*p*-klorofenoksi)asetamidobenzoksazol'ün *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarına karşı ampisilinden daha etkili olduğunu, ayrıca bileşiğin *C. albicans*'a karşı standart ilaç olan flukonazolden daha az etkili iken ilaca dirençli izolatına karşı standart ilaç ile kıyaslanabilir aktiviteye sahip olduğunu göstermişler, dolayısıyla yeni antimikrobiyal ilaçların geliştirilmesinde ışık tutacağını rapor etmişlerdir. Arısoy ve arkadaşları ise (2008) 2-(*p*-substitutedbenzyl)-5-(2-substitutedacetamido)benzoksazollerin antimikrobiyal etkileri olduğunu rapor etmişlerdir.

Öksüzoğlu ve arkadaşları (2008) benzoksazoller ve benzimidazollerle yaptıkları bir çalışmada, test sisteminde kullandıkları 2-fenoksimetilbenzimidazol, 5-amino-2-(*p*-fluorofenil)benzoksazol, 5-amino-2-(*p*-bromofenil)benzoksazol, 5-nitro-2-fenoksimetil-benzimidazole, 2-(*p*-klorobenzil)benzoksazol ve 5-amino-2-fenilbenzoksazolün, ökaryotik topoizomera 1 enzimi üzerinde, referans inhibitör olan kamptotesinden daha etkin olduklarını belirlemişlerdir. Ayrıca 5-kloro-2-(*p*-metilfenil)benzoksazol, 2-(*p*-nitrobenzil)benzoksazol ve 5-nitro-2-(*p*-nitrobenzil)benzoksazolün ökaryotik topoizomera 2 enzimi üzerinde, referans inhibitör etoposite ile karşılaştırıldığında, önemli bir etki gösterdiğini ve bu etkinin referans molekülden daha fazla olduğunu belirtmişlerdir.

Farmasotik kimyada uygulamada yaşanan problemlerden biri substitüsyonların ve yer değiştirmelerin yapılmasıdır. Belirli bir fonksiyonel grubun veya iskeletin yapısının

değiştirilmesi kimyasalın toksikolojik, fizyokimyasal veya farmakokinetik yapılarının değişmesine neden olmaktadır (Kho et al., 2005). Tez kapsamında 2 ile 5 konumundan süstitüe benzoksazol türevleri kullanılmıştır. 2 konumundan süstitüsyonun biyolojik aktivite, 5 konumundan süstitüsyonun ise aktivitenin gücü konusunda önemli oldukları yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Arpacı et al., 2002; Tekiner-Gülbaş, 2005).

Ören ve arkadaşları (1998) 2,5- ve/veya 6-süstitute benzoksazol ve benzimidazol türevleri ile yaptıkları çalışmada test ettikleri kimyasalların yapı- etki ilişkilerinin incelenmesi sonucunda, heterosiklik sistemde 2 konumundan eklenmiş olan sikloheksil grubunun, aynı konumdan eklenmiş siklopentil grubu ile kıyaslandığında, antimikrobiyal etkiyi yükselttiği rapor edilmiştir. 2-sikloheksil veya 2-sikloheksilmetil ile süstitüe edilmiş benzoksazol çekirdeğine 5 konumundan nitro grubunun eklenen türevleri *B. subtilis* üzerinde daha etkin bulunmuştur.

Ames test sistemi, çeşitli kimyasal maddelerin mutajenik potansiyellerinin taranmasında yaygın olarak kullanılan kısa zamanlı bakteriyel mutajenite test sistemlerinden birisidir. Yaygın olarak kullanılma nedenleri arasında, bu sistemde belirlenen bir mutajenik etkinin, kemirgen karsinojenitesi hakkında gerçeğe yakın bir bilgi veriyor olması yer almaktadır (Maron and Ames, 1983; Mortelmans and Zeiger, 2000).

Pratikte genetik toksikoloji ile ilgilenen araştırmacılar, sadece bir deneye bağlı kalmazlar. Genellikle bir deney aynı koşullar altında ve/veya değişen koşullar altında tekrarlanır. Bunu yapmaktaki amaç önceki sonuçlarla uyumluluğu kontrol etmek ve/veya genotoksisitenin farklı koşullar altında ifade olup olmadığı hakkında bilgi sahibi olmak olabilir. Bu amaçla Ames test sisteminde farklı mutasyonlar taşıyan farklı test suşları kullanılır. Dolayısıyla çoklu veya tekrarlı genotoksisite deneyleri sonuçları toparlanmış olur (Edler, 1994). Bu anlamda Ames test sistemi, kendi içinde çoklu bir deney sistemi sayılabilir.

İstatistiksel değerlendirme yapılırken toksisitenin varlığı veya hayatta kalan hücre sayısının azalıp azalmadığı, negatif kontrollerin homojen dağılıp dağılmadığı, literatürdeki negatif ve pozitif kontrollerle deney sonucunda elde edilen negatif ve pozitif kontrol değerleri karşılaştırıldığında durumun ne olduğu, deney gruplarının kontrol gruplarından daha yüksek değerlerde veya eş değerlerde olup olmadığı, deney gruplarının doz- cevap ilişkisi gösterip göstermediği, aynı deneyde, bir laboratuvarında veya farklı laboratuvarlarda yapılan farklı deneylerde üretilen farklı kültürlerin tekrar edilebilir olup olmadığı kontrol edilmelidir.

Tez çalışması kapsamında sitotoksik etki değerlendirmesi mutajenite deneylerine başlamadan yapıldı. 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14 ve 15 numaralı kimyasallar için 150 µg/plak; 3 ve 13 numaralı kimyasalların 100 µg/plak; 1 numaralı kimyasal için 50 µg/plak; 4 numaralı kimyasal için ise 40 µg/plak etkinliği incelenen en yüksek dozlardır.

Eldeki negatif kontroller istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, değerlerin homojen dağılım gösterdiği belirlendi. Literatür tarandığında deney sisteminde kullanılan suşlardan TA98 suşunun geriye dönme frekansı 20-30, TA100 için 75-200, TA102 için ise 100-300'dür (Maron and Ames, 1983; Mortelmans and Zeiger, 2000). Yapılan deneyler sonucunda negatif kontrollerin ortalamaları değerlendirilecek olursa, bu değerler TA98 suşu için $29,22 \pm 5,9$; TA100 suşu için $141,82 \pm 26,9$ ve TA102 suşu için $323,64 \pm 48,5$ kolonidir. Bu rakamlar literatürde belirtilen aralıkta yer almaktadır. Danomisin 6 µg/plak dozunda TA98 ve TA102 suşu için; sodyum azidin 1,5 µg/plak dozunda TA100 suşu için mutajenik etkiye sahip oldu literatürde belirtilmektedir (Maron and Ames, 1983). Deney sonuçlarında elde edilen verilere bakıldığında; danomisin varlığında TA98 suşu için ortalama $288,1 \pm 157,3$ koloni, TA102 suşu için ise ortalama $749,3 \pm 103$ koloni, TA100 suşu için, sodyum azid varlığında, ortalama $1438,2 \pm 334,9$ koloni geri dönmüştür. Bu değerler negatif kontrol plakları ile karşılaştırıldığında literatürdeki veriyi doğrulamaktadır.

Sonuç olarak SPSS 16.0 paket programı kullanılarak ANOVA çözümlenmesi ile değerlendirilen kimyasalların tümü Ames test sisteminde, metabolik aktivasyon

yokluğunda, negatif sonuç vermiştir. Ames test sisteminde nokta mutasyonlar tespit edilebildiğinden, bu kimyasalların *hisD3052*, *hisG46* ve *hisG428* gen bölgelerinde çerçeve kayması ve baz değişimi mutasyonuna neden olmadıkları söylenebilir.

Bir kimyasal maddenin Ames test sisteminde negatif bulunması onun karsinogenik ve mutajenik olmadığı konusunda kesin bir bilgi vermez. Örneğin Tennant ve arkadaşları (1987) 3-kloro-2-metilpropan ve dimetil hidrojen fosfitin Ames test sisteminde hem S9 fraksiyonu varlığında hem de yokluğunda negatif olduğunu fakat kromozom hata testinde pozitif sonuç verdiğini rapor etmişlerdir. Nunoshiba ve arkadaşlarının (2007) yaptıkları bir çalışmada ise Ames negatif olan orto-fenil fenolün mesanede tümör oluşumuna yol açan bir kimyasal olduğunu ve tomurcuklanarak çoğalan mayalarda tübülünlere bağlandığını ve anöploidiye neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Ames test sistemi bakteriyel kısa zamanlı bakteriyel bir test sistemi olduğundan, memelilerdeki metabolik aktivasyon sistemini deney ortamında taklit edebilmek amacıyla ortama metabolik aktivasyon sistemi eklenir. Böylelikle kimyasalın metabolitlerinin mutajenik potansiyelleri hakkında da bilgi sahibi olunur (Maron and Ames, 1983; Mortelmans and Zeiger, 2000).

Benzoksazol türevi bileşiklerin metabolize edildikleri bilinmektedir. Akı- Şener ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2002) antihelmintik, antihistaminik, antifungal ve antibakteriyel gibi çeşitli biyolojik özelliklere sahip benzamid türevlerinin benzoksazollerin muhtemel metabolitleri olduğunu belirtmişlerdir. Aminofenoller, o-formamidofenol, benzoksazol, 2- metil ve 2-fenil benzoksazoller ve benzoksazolonların metabolize olmalarıyla ilgili tavşanlar üzerinde yapılan bir çalışmada o-aminofenolün benzoksazol, 2-metil benzoksazol ve 2-fenil benzoksazolün bir türevi olduğunu, çünkü o-aminofenolün hidroliz sonucu bu bileşiklerden türevlendiği rapor edilmiştir (Bray et al., 1952).

Dolayısıyla test sisteminde kullanılan benzoksazol türevlerinin metabolitlerinin mutajenik potansiyelleri hakkında bilgi sahibi olabilmek amacıyla, metabolik aktivasyon sistemi varlığında testleri yapılarak, sonuçlar değerlendirilmelidir.

Ames test sisteminde negatif sonuç veren bileşiklerin etkinlikleri, herbir iskelet için, sübstütientlerine ve halkasal sistemin topolojik yapısına göre önemli ölçüde değişebilir. Örneğin pyridin'in quinolin'e dönüşümü, Ames test sisteminde negatif sonuç veren bileşiklerin oranını sırasıyla %34-43'ten %27-38'e düşürdüğü rapor edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında, yapısında quinolin iskeleti taşıyan bileşiklerin, pyridin iskeleti taşıyan bileşiklere nazaran Ames test sisteminde pozitif sonuç verme olasılığı artmaktadır (Kho et al., 2005). Dolayısıyla test edilen kimyasal maddelerin yapılarının ve biyolojik aktiviteleri birlikte değerlendirilerek oluşturulacak veri tabanları ve/veya halihazırda bulunan veri tabanlarının geliştirilmesi, yeni sentezlenecek kimyasal maddelerin belirlenmesinde ve biyolojik aktivitelerinin tahmin edilmesinde araştırmacılara önemli bir kolaylık sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Akı-Şener, E., Bingöl, K. K., Temiz-Arpacı, Ö., Yalçın, İ., Altanlar, N., 2002, Synthesis and microbiological activity of some *N*-(2-hydroxy-4 substitutedphenyl)benzamides, phenylacetamides and furamides as the possible metabolites of antimicrobial active benzoxazoles, *Il Farmaco*, 57, 451–456.
- Alekshun, M. N., Levy, S. B., 2007, Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance, *Cell*, Volume 128, Issue 6, pp. 1037-1050.
- Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E., Lee, F. D., 1973, Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 70, No. 8, pp. 2281-2285.
- Ames, B. N., Lee, F. D., Durston, W. E., 1973, An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 70, No. 3, pp. 782-786.
- Arisoy, M., Temiz-Arpacı, Ö., Yıldız, İ., Kaynak-Onurdağ, F., Akı, E., Yalçın, İ., Abbasoğlu, U., 2008, Synthesis, antimicrobial activity and QSAR studies of 2,5-disubstituted benzoxazoles, SAR and QSAR in *Environmental Research*, Vol. 19, Issue, pp. 589 – 612.
- 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, *Toxicology Mechanisms and Methods*, Vol. 15, No. 3, pp. 155-180.
- Barnes, W., Tuley, E., Einsenstadt, E., 1982, Base sequence analysis of his⁺ revertants of the hisG46 missense mutation in *Salmonella typhimurium*, *Environ. Mutagen.*, 4, 297.
- Bartsch, H., Tomatis, L., 1983, Comparison between carcinogenicity and mutagenicity based on chemicals evaluated in the IARC monographs, *Environ. Health Perspect.*, 47: 305–317.
- Benedict, W. F., Baker, M. S., Haroun, L., Choi, E., Ames, B. N., 1977, Mutagenicity of cancer chemotherapeutic agents in the *Salmonella* microsome test, *Cancer Research*, 37, 2209-2213.

- Bray, H. G., Clowes, R. C., Thorpe, W. V., 1952, The metabolism of aminophenols, *o*-formamidophenol, benzoxazole, 2-methyl- and 2-phenyl-benzoxazoles and benzoxazolone in the rabbit, *Biochem. J.*, 51(1): 70–78.
- Bulmer, A. C., Ried, K., Coomes, J. S., Blanchfield, J. T., Toth, I., Wagner, K. H., 2007, The antimutagenic and antioxidant effects of bile pigments in the Ames *Salmonella* test, *Mutation Research*, 629, 122- 132.
- Butterworth, B. E., 2006, A classification framework and practical guidance for establishing a mode of action for chemical carcinogens, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 45, 9-23.
- Bywater, W. G., Coleman, W. R., Kamm, O., Merritt H.H., 1945, Synthetic anticonvulsants. the preparation and properties of some benzoxazoles, *J. Am. Chem. Soc.*, 67 (6), pp 905–907.
- De La Iglesia, F.A., Lake, R.S., Fitzgerald. J.E., 1980, Short-term tests for mutagenesis and carcinogenesis in drug toxicology: how to test and when to test is the question, *Drug Metab. Rev.*, 11(1):103-46.
- Eastmond, D. A., Hartwig, A., Anderson, D., Anwar, W. A., Cimino, M. C., Dobrev, I., Douglas, G.R., Nohmi, T., Philips, D. H., Vickers, C., 2009, Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS harmonized scheme, *Mutagenesis*, Vol. 24, No. 4 pp. 341–349.
- Edler, L., 1994, Biostatistical issues in the design and analysis of multiple or repeated genotoxicity assays, *Environ. Health Perspect. Supplements*, Vol. 102 Suppl., 1:53-59.
- Elnima, E. I., Zubair, M. U., Al-badr, A. A., 1981, Antibacterial and antifungal activities of benzimidazole and benzoxazole derivatives, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, Vol. 19, No. 1, p. 29-32.
- Evindar G., Batey, R. A., 2006, Parallel synthesis of a library of benzoxazoles and benzothiazoles using ligand-accelerated copper-catalyzed cyclizations of *ortho*-halobenzanilides, *J. Org. Chem.*, 71, 1802-1808.
- Flamand, N., Meunier, J.-R., Agapakis-Caussé, C., 2001, Mini mutagenicity test: a miniaturized version of the Ames test used in presecreening assay for oint mutagenesis assessment, *Toxicology in Vitro*, 15, 105-114.

- Flückiger-Isler, S., Baumeister, M., Braun, K., Gervais, V., Hasler-Nguyen, N., Reimann, R., Gompel, J. V., Wunderlich, H. G., Engelhardt, G., 2004, Assessment of the performance of the Ames II™ assay; a collaborative study with 19 coded compounds, *Mutat. Res.*, 558, 182-197.
- Gee, P., Sommers, C. H., Melick, A. S., Gidrol, X. M., Todd, M. D., Burris, R.B., Nelson, M. E., Klemm, R.C., Zeiger, E., 1998, Comparison of responses base-specific *Salmonella* tester strains with the traditional strains for identifying mutagens: the results of a validation study, *Mutat. Res.*, 412, 115-130.
- Gollapudi, B. B., Krishna, G., 2000, Practical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective, *Mutat. Res./Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Volume 455, Issues 1-2, pp. 21-28.
- Gomes-Carneiro, M. R., Dias D. M. M., Paumgarten, F. J. R., 2006, Study on the mutagenicity and antimutagenicity of β -ionone in the *Salmonella*/microsome assay, *Food and Chemical Toxicology*, 44, 522-527.
- Gristwood, W., Wilson, K., 1988, Kinetics of some benzothiazoles, benzoxazoles, and quinolines as substrates and inhibitors of rabbit liver aldehyde oxidase, *Xenobiotica*, Vol. 18, No. 8, 949-654.
- Hagiwara, Y., Watanabe, M., Oda, Y., Sofuni, T., Nohmi, T., 1993, Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity, *Mutat. Res.*, Vol. 291, no. 3, pp. 171-180.
- Hamada, C., Wada, T., Sakamoto, Y., 1994, Statistical characterisation of negative control data in the Ames *Salmonella*/Microsome test, *Environ. Health Perspect. Supplements*, Vol. 10 Suppl 1:115-119
- Hayes, J. D., Wolf, C. R., 1990, Molecular mechanisms of drug resistance, *Biochem. J.*, 272(2): 281–295.
- <http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/InvestigationalNewDrugINDApplication/default.htm>).
- Hughes, T. J., Lewtas, J., Claxton, L.D., 1997, Development of a standart reference material for diesel mutagenicity in the *Salmonella* plate incorporation assay, *Mutat. Res.*, 391, 243-258.

- ICH Topic, S2B, 1998, Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals
- Isono, K., Yourno, J., 1974, Chemical carcinogens as frameshift mutagens: Salmonella DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 71, No. 5, pp. 1612-1617.
- Jena, G.B., Kaul, C. L., Ramaro, P., 2002, Genotoxicity testing, a regulatory requirement for drug discovery and development: impact of ICH guidelines, Indian Journal of Pharmacology, 34: 86-99.
- Kaplancıklı, Z. A., Turan-Zitoui, G., Revial, G., Güven, K., 2004, Synthesis and study of antibacterial and antifungal activities of novel 2-[[Benzoxazole/benzimidazole-2-yl) sulfanyl]acetylamino]thiazoles, Arch. Pharm. Res., Vol. 27, No. 11, 1081-1085.
- Kho, R., Hodges, J. A., Hansen, M. R., Villar, H. O., 2005, Ring systems in mutagenicity databases, J. Med. Chem., 48, 6671-6678.
- Koch, W. H., Henrikson, E. N., Cebula, T. A., 1996, Molecular analyses of *Salmonella hisG428* ochre revertants for rapid characterization of mutational specificity, Mutagenesis, Vol. 11, No. 4, pp. 341-348.
- Kreander, K., 2006, A study on bacteria-targeted screening and in vitro safety assesment of natural products, Academic dissertation, To be presented with the permission of the Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki for public criticism in Confrence Room 511 at Viikki Infocentre (Viikinkaari 11), on April 21st, 2006, at 12 noon, Helsinki.
- Levin, D. E., Hollstein, M., Christman, M. F., Schwiers, E. A., Ames, B. N., 1982, A new Salmonella tester strain (TA102) with A X T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. , 79(23): 7445–7449.
- Levy, S. B., Marshall B., 2004, Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses, Nature Medicine, 10, S122 - S129.
- Levy, S.B., 1998, The challenge of antibiotic resistance, Scientific American, March 1998.
- Li, A. P., 2004, A comprehensive approach for drug safety assessment, Chemicobiological Interactions, 150, 27–33.
- Manahan, S. E., 2003, Toxicological chemistry and biochemistry, 3rd Edition, Lewis Publishers.

- Maron, D. M., Ames, B. N., 1983, Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat. Res.*, 113(3-4):173-215.
- McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., Ames, B. N., 1975, Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 72(12): 5135–5139.
- McKeegan, K. S., Borges-Walmsley, M. I., Walmsley A. R., 2002, Microbial and viral drug resistance mechanisms, *Trends in Microbiology*, Volume 10, Issue 10, pp. s8-s14.
- Meyers, F. H., Jawetz, E., Goldfien, A., 1976, Part VII. Chemotherapeutic agents, *Review of medical pharmacology*, 5th ed. S., 470-522.
- Milman, H. A., Hurley, P. M., Auletta, A., 1983, An overview of current efforts in short-term carcinogen testing, *Environ. Health Perspect.*, 50: 355–357.
- Mortelmans, K., Zeiger, E., 2000, The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay, *Mutat. Res.*, 455, 29-60.
- Mortelmans, K., Rupa, D. S., 2004, Current issues in genetic toxicology testing for microbiologists, *Adv. Appl. Microbiol.*, 56: 379-401.
- Nunoshiba, T., Watanabe, E., Takahashi, T., Daigaku, Y., Ishikawa, S., Mochizuki, M., Uic, A., Enomoto, T., Yamamoto, K., 2007, Ames test-negative carcinogen, *ortho*-phenyl phenol, binds tubulin and causes aneuploidy in budding yeast, *Mutat. Res.*, 617, 90–97.
- Öksüzoğlu, E., Temiz-Arpacı, Ö., Tekiner-Gülbaş, B., Eroğlu, H., Şen, G., Alper, S., Yıldız, İ., Diril, N., Akı-Şener, E., Yalçın, İ., 2007, A study on genotoxic activities of some new benzoxazoles, *Med. Chem. Res.*, 16: 1-14.
- Öksüzoğlu, E., Tekiner-Gülbaş, B., Alper, S., Temiz-Arpacı, Ö., Ertan, T., Yıldız, İ., Diril, N., Şener-Akı, E., Yalçın, İ., 2008, Some benzoxazoles and benzimidazoles as DNA topoisomerase I and II inhibitors, *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.*, 23(1):37-42.
- Ören, İ., Temiz, Ö., Yalçın, İ., Şener, E., Altanlar, N., 1998, Synthesis and antimicrobial activity of some novel 2,5- and/or 6-substituted benzoxazole and benzimidazole derivatives, *European Journal of Pharm. Sci.*, 7, 153-160.

- Ramel, C., 1983, Advantages of and problems with short-term mutagenicity tests for the assessment of mutagenic and carcinogenic risk, *Environ.Health Perspect.*, Vol. 47, pp. 153-159.
- Salmon, G. P.C., Welch, M., 2008, Antibiotic resistance: adaptive evolution, *The Lancet*, Volume 372, pp. S97 - S103.
- Tekiner- Gülbaş, B., 2005, Bazı antibakteriyel etkili 5-sübstitüe karbonilamino- 2-(*p*- sübstitüebenzil)benzoksazol türevlerinin *Staphylococcus aureus*'a karşı kantitatif yapı-etki ilişkileri analizleri, *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 34 (4) 219-230.
- Tekiner-Gülbaş, B., Temiz-Arpacı, Ö., Yıldız, İ., Altanlar, N., 2007, Synthesis and *in vitro* antimicrobial activity of new 2-[*p*-substituted-benzyl]-5-[substituted-carbonylamino]benzoxazoles, *European Journal of Medicinal Chemistry*, Volume 42, Issue 10, pp. 1293-1299.
- Temiz-Arpacı, Ö., Akı-Şener, E., Yalçın, İ., Altanlar, N., 2002, Synthesis and antimicrobial activity of some 2-[*p*-Substituted-phenyl]benzoxazol-5-yl-arylcarboxyamides, *Arch. Pharm. Med. Chem.*, 6, 283-288.
- Temiz-Arpacı, Ö., Kaynak-Onurdağ, F., 2006, Antimikrobiyak etkili yeni bir benzoksazol bileşiği, *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 35 (3) 189-196.
- Temiz-Arpacı, Ö.,Yıldız, İ., Özkan, S., Kaynak F., Akı-Şener, E., Yalçın, İ., 2008, Synthesis and biological activity of some new benzoxazoles, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43, 1423-431
- Tennant, R. W., Spalding, J. W., Stasiewicz, S., Caspary, W. D., Mason, J. M., Resnick, M. A., 1987, Comperative evaluation of genetic toxicity patterns of carcinogens and noncarcinogens: strategies for predictive use of short-term assays, *Environ. Health Perspect.*, Vol. 75, pp. 87-95.
- Tennant, R. W., Zeiger, E., 1993, Genetic toxicology: current status of methods of carcinogen identification, *Environ. Health Perspect.*, Vol. 100, pp. 307-315.
- Tenover, F. C., 2006, Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria, *American Journal of Infection Control*, Volume 34, Issue 5, Supplement 1, pp. S3-S10.
- Timbrell, J., 2002, Introduction to toxicology, Chapter 12, 3. Basım, ISBN 0-203-37395-2.
- Timbrell, J., 2002, Introduction to toxicology, Chapter 2, 3. Basım, ISBN 0-203-37395-2.

- Vinsová , J., Horák, V., Buchta, V., Kaustová J., 2005, Highly lipophilic benzoxazoles with potential antibacterial activity, *Molecules*, ISSN 1420-3049.
- Watanabe, M., Ishidate, M. Jr., Nohmi, T.,1989, Method for the detection of mutagenic nitroarenes: construction of nitroreductase-overproducing derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100, *Mutat. Res.*, Vol. 216. Issue 4, pp. 211-220.
- Yalçın, İ., Şener, E., 1993, QSARs of some novel antibacterial benzimidazoles, benzoxazoles, and oxaloyridines against an enteric gram negative rod *K. pneumoniae*, *Int. J. Pharm.*, 98, 1-8.
- Yamada, M., Espinoza-Aguirre, J.J., Watanabe, M., Matsui, K., Sofuni, T., Nohmi, T., 1997, Targeted disruption of the *gebe* encoding the classical nitroreductase enzyme in *Salmonella typhimurium* Ames test strains TA1535 and TA1538, *Mutat. Res.*, 375, 9-17.