

**BİR SERİ 1,4-BENZOKSAZİN-3-ON TÜREVİ BİLEŞİĞİN
SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK, MUTAJENİK
POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE
FARMAKOFOR MODELLEMESİ**

**INVESTIGATION OF CYTOTOXIC, GENOTOXIC,
MUTAGENIC POTENTIALS OF A SERIAL
1,4-BENZOXAZINE-3-ONE DERIVATIVE COMPOUNDS
AND PHARMACOPHORE MODELLING**

EGEMEN FOTO

PROF. DR. NURAN DİRİL
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2016

EGEMEN FOTO' nun hazırladığı “**Bir Seri 1,4-Benzoksazin-3-on Türevi Bileşiğın Sitotoksik, Genotoksik, Mutajenik Potansiyellerinin Araştırılması ve Farmakofor Modellemesi**” adlı bu çalışma aşığıdaki juri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI'** nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ayşe Nurşen BAŞARAN

Başkan

.....

Prof. Dr. Nuran DİRİL

Danışman

.....

Prof. Dr. Afife İZBIRAK

Üye

.....

Prof. Dr. İsmet ÇOK

Üye

.....

Prof. Dr. İsmail YALÇIN

Üye

.....

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

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Gelişimimdeki asıl lider

Canım Aileme....

ETİK

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

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

beyan ederim.

07/01/2016

EGEMEN FOTO

ÖZET

BİR SERİ 1,4-BENZOKSAZİN-3-ON TÜREVİ BİLEŞİĞİN SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK, MUTAJENİK POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE FARMAKOFOR MODELLEMESİ

Egemen FOTO

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nuran DİRİL

Ocak 2016, 276 sayfa

Bu çalışmada insan DNA topoizomeraaz I enzimi (hTopoI) üzerindeki inhibisyon etkileri bilinen 18 adet 2H-3,4-dihidro-1,4-benzoksazin-3-on türevi bileşiğin sitotoksik, genotoksik ve mutajenik potansiyelleri incelenmiş, sonuçlar yapı-aktivite ilişkileri açısından değerlendirilmiştir.

Test edilen bileşiklerin L929 ve Hela hücreleri üzerindeki sitotoksik potansiyelleri sülforodamin B (SRB) testi ile, genotoksik potansiyelleri alkali komet yöntemi ile, genotoksik aktiviteye neden olabilecek DNA hasarlarının tipi modifiye komet yöntemi ile, *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerindeki mutajenik potansiyelleri ise Ames *Salmonella*/mikrozom testi ile araştırılmıştır. Ames test sisteminde mutajenik etkili bileşiklerin minimum mutajenik dozları (d) regresyon analizi ile hesaplanmıştır. Farmakofor modelleme analizlerinde sitotoksisite sonuçları HypoGen ile, mutajenite sonuçları HipHop ile değerlendirilmiş, aktiviteden sorumlu bölgeler tanımlanmaya çalışılmıştır.

Araştırma sonucunda **BS3** (IC₅₀:17.84 µM) ve **BS10** (IC₅₀:52.53 µM) bileşiklerinin sadece HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin ve seçicilik indekslerinin (Sİ) yüksek olduğu belirlenmiştir (Sİ_{BS3}:15.6 ve Sİ_{BS10}:8.8). Bu bileşiklerden **BS3**'ün

genotoksik ve mutajenik potansiyel taşımadığı görülürken, hTopol üzerine zehir etkisi gösteren **BS10**'nun DNA'da zincir kırıklarına sebep olduğu, ancak mutajenik potansiyel taşımadığı saptanmıştır. Her iki hücre üzerinde güçlü sitotoksik etki gösteren **BS11** ($IC_{50(HeLa)}$:24.31 μ M, $IC_{50(L929)}$: 16.7 μ M) bileşiğinin ise HeLa hücreleri için seçici olmadığı (SI_{BS11} :0.2) belirlenmiştir. Ayrıca bu bileşiğin her iki hücre üzerinde güçlü genotoksik etki gösterdiği, ancak mutajenik aktiviteye sahip olmadığı görülmüştür.

HeLa hücrelerinde güçlü genotoksik etki gösteren bileşiklerden **BS1**, **BS4**, **BS16** 'nın formamidopirimidin DNA glikozilaz (Fpg) ve endonükleaz III (Endo III) duyarlı bölge sıklığını artırırken, **BS11**'in sadece Fpg, **BS10**'nun ise Fpg ve insan alkil adenin DNA glikozilaz (hAAG) duyarlı bölge sıklığını artırdığı belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan bileşiklerden sadece **BS12**, **BS13**, **BS16** ve **BS17** bileşiklerinin metabolik aktivasyon varlığında [S9(+)] ve yokluğunda [S9(-)] hem TA98 hem de TA100 suşları için güçlü mutajenik aktiviteye sahip oldukları ve özellikle TA100 suşunda S9 varlığında pozitif kontrol olarak kullanılan 2-aminoflorenden (d:14.9 μ g/plak) bile daha güçlü mutajenik aktiviteye sahip oldukları görülmüştür [**BS12** (d:3 μ g/plak), **BS13** (d:0.58 μ g/plak), **BS16** (d:3.5 μ g/plak), **BS17** (d:0.95 μ g/plak)].

HypoGen farmakofor analiz sonuçlarına göre benzoksazin yapısındaki benzen halkasına süstitüe hafif elektron çeken grupların ($COOC_2H_5$, Cl) sitotoksik aktiviteyi artırdığı, halkayı aktive eden grupların (CH_3 , NH_2) aktiviteyi düşürdüğü gözlemlenmiştir. Benzoksazin halkasına R2 veya R3 konumunda hidrofobik aromatik özellik taşıyan bir yapının eklenmesi durumunda sitotoksik aktivitenin artabileceği tahmin edilmektedir. HipHop farmakofor analiz sonuçlarına göre ise R3 konumunda hidrojen bağı yapabilen ve R2 konumunda hidrofobik özellik gösteren fonksiyonel grupların varlığının mutajenik etkiyi artırdığı belirlenmiştir. Bu konumlarda özellikle aromatik halkayı dezaktive eden grupların (R3 konumu için $-NO_2$ ve R2 konumu için $-Cl$) mutajenik etkiyi artırdığı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Benzoksazin türevleri, SRB testi, Komet testi, Fpg, Endo III, hAAG, Ames *Salmonella*/mikrozom testi, farmakofor analizi, HipHop, HypoGen

ABSTRACT

INVESTIGATION OF CYTOTOXIC, GENOTOXIC, MUTAGENIC POTENTIALS OF A SERIAL 1,4-BENZOXAZINE-3-ONE DERIVATIVE COMPOUNDS AND PHARMACOPHORE MODELLING

Egemen FOTO

Doctor of Philosophy, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nuran DİRİL

January 2016, 276 pages

In this study, cytotoxic, genotoxic and mutagenic potentials of 18 of 2*H*-3,4-dihydro-1,4-benzoxazin-3-one derivatives which of their inhibitory effects on human DNA topoisomerase I enzyme (hTopoI) were known, were investigated. Results were then evaluated in the view of the structure activity relationship.

Tested compounds were investigated for their cytotoxic potentials on L929 and HeLa cells with sulphorhodamine B (SRB) assay, for their genotoxic potentials with alkaline comet assay, for the type of DNA damage which caused genotoxic activity with modified comet assay, for their mutagenic potentials on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 strains with the Ames *Salmonella*/microsome assay. Regression analysis was used to calculate minimum mutagenic doses (d) of the mutagenic compounds in the Ames test system. For pharmacophore analysis, cytotoxicity and mutagenicity results were evaluated by using HypoGen and HipHop, respectively. Finally, it was strived to identify regions that might be responsible for the activity.

As a result of research, It was determined that cytotoxic and selectivity indexes (SI) of compounds, **BS3** (IC_{50} :17.84 μ M) and **BS10** (IC_{50} :52.53 μ M), were high only against HeLa cells (SI_{BS3} :15.6 and SI_{BS10} :8.8). Furthermore, it was revealed that of these compounds, **BS3** did have no genotoxic and mutagenic potentials, whereas **BS10**, which was hTopoI poison, caused DNA strand breaks but did have no mutagenic potential. It was also determined that compound **BS11** which showed strong cytotoxic activity ($IC_{50(HeLa)}$:24.31 μ M, $IC_{50(L929)}$: 16.7 μ M) against both of the cell lines was not selective for HeLa cells (SI_{BS11} :0.2). Moreover, this compound showed strong genotoxic effect against both cell lines but did have no mutagenic activity.

It was identified that compounds **BS1**, **BS4** and **BS16** which showed strong genotoxic effect on HeLa cells, increased formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg) and endonuclease III (EndoIII)- sensitive sites, whereas **BS11** increased only Fpg-sensitive sites and, **BS10** caused to increase both Fpg and human alkaline adenine DNA glycosylase (hAAG)-sites.

It was shown that only compounds **BS12**, **BS13**, **BS16**, and **BS17** among all tested compounds, had strong mutagenic activities on TA98 and TA100 strains in the presence of metabolic activation [S9(+)] and in the absence of [S9(-)]. Furthermore, they had more mutagenic activity on TA100 strains than positive control 2-aminofluorene (d:14.9 μ g/plaque) in the presence of S9 [**BS12** (d:3 μ g/plaque), **BS13** (d:0.58 μ g/plaque), **BS16** (d:3.5 μ g/plaque), **BS17** (d:0.95 μ g/plaque)].

According to the results derived from HypoGen pharmacophore analysis, electron-withdrawing groups ($COOC_2H_5$, Cl) substituted to benzene ring in the structure of benzoxazine increased the cytotoxic activity and the ring activating groups (CH_3 , NH_2) decreased the activity. It was estimated that cytotoxic activity might be increased in the case of addition of such a structure having hydrophobic aromatic feature through the benzoxazine ring at the position of R2 and R3. According to the results derived from HipHop pharmacophore analysis, it was detected that mutagenic activity increased in the presence of functional groups which might form hydrogen bonds at the position of R3 and hydrophobic groups at the position of R2. Hence, it was anticipated that aromatic ring deactivating groups at these positions increased the mutagenic activity.

Keywords: Benzoxazine derivatives, SRB assay, comet assay, Fpg, Endo III, hAAG, Ames *Salmonella*/microsome assay, pharmacophore analysis, HipHop, HypoGen

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında ilgi ve deneyimi ile bana her zaman yol gösteren danışman hocam Prof.Dr. Nuran DİRİL'e, verilerinin değerlendirilmesi ve yapıcı eleştirileriyle çalışmaya yön ve destek veren Tez İzleme Komitesi üyelerinden değerli hocalarım Prof.Dr. İsmet ÇOK'a ve Prof.Dr. Afife İZBIRAK'a, çalışmada kullandığım bileşiklerin sentezlenmesi ve elde edilen verilerin yapı-etki ilişkilerinin incelenmesi aşamasında destekleri için Prof.Dr. İsmail YALÇIN'a, Arş.Gör. Serap YILMAZ'a, istatistiksel değerlendirilme aşamasında bilgi ve destekleri için Prof.Dr. Tülay SARAÇBAŞI'na, hücre kültürü çalışmalarında destekleri için Doç.Dr. Aylin GÜRPINAR'a, Prof.Dr. Şayeste DEMİREZEN, Uzm. Remma GÜLSOY'a, Arş.Gör. Hanife Güler Dönmez'e ve Arş.Gör. Handan SEVİM'e, komet tekniğinin validasyonu aşamalarında destekleri için Uzm.Dr. Esra EMERCE, Uzm.Dr. Onur Kenan ULUTAŞ ve Arş. Gör. Emre DURMAZ'a, spektrofotometrik analizlerde teknik destek sağlayan Arş.Gör. Aysun KILIÇ SÜLOĞLU'na ve Arş.Gör. Elif KARACAOĞLU'na, teknik destekleri ile çalışmamı hızlandıran Vedat MUTLU'ya, Ahmet KARABABA'ya ve Ahmet TEKE'ye, güler yüzleri ile moral kaynağım olan değerli dostlarım Zeliha AYDOĞAN, Derya AKKURT, Mehmet Kürşat ŞAHİN, Derya Kalelioğlu, Gülcan KUYUCUKLU'ya ve moleküler biyoloji anabilim dalındaki diğer değerli arkadaşlarıma,

Tezin yoğun çalışma temposunun yarattığı sıkıntılarda hiçbir zaman desteğini, değerli zamanını, motivasyonunu ve güler yüzünü esirgemeyip, tezimin tüm aşamalarında teknik desteği, değerli bilgi ve fikirlerinden yararlandığım değerli sırdaşım/meslektaşım Arş.Gör.Dr. Fatma ZİLİFDAR'a,

Tez çalışmasının gerçekleştirilebilmesi için 0801601009, 012D0660107, 014D03 601001 ve 013D10601 nolu projeler ile finansal destekleri için Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne,

Bugünlere gelebilmemde her türlü bilgi, maddi ve manevi desteğini hiç esirgemeyen sevgili eniştem Haşım ŞAHİN'e ve adını her daim sevgi, rahmet ve dua ile andığım ve her daim anacağım canım ananem Dilber KILBASANLI'ya,

Hayatım boyunca eksikliğini hissettirmeyen, maddi manevi desteklerini hiç eksik etmeyen, gelişimimin asıl lideri canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER	x
ŞEKİLLER	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xxi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	5
2.1. Benzoksazinler	5
2.1.1. Doğal Benzoksazin Türevleri ve Biyolojik Aktiviteleri	5
2.1.2. Sentetik Benzoksazin Türevleri ve Biyolojik Aktiviteleri	8
2.1.3. İn Vitro Antikanser Aktivite Gösteren Benzoksazin Türevleri	10
2.1.4. FDA Onaylı Benzoksazin Türevi İlaçlar	15
2.2. Antikanser Terapi	17
2.3. Antikanser Terapide Kullanılan İlaçlar	18
2.3.1. Sitotoksik İlaçlar	19
2.3.2. Hormonal İlaçlar	24
2.3.3. İmmünolojik İlaçlar	25
2.4. İlaçların Metabolize Edilmesi (Biyotransformasyon)	26
2.4.1. İn Vitro Test Sistemlerinde Metabolik Aktivasyon	30
2.5. Antikanser İlaçların Etkinliğini Kısıtlayıcı Faktörler	30
2.5.1. Tümör Biyolojisi ile İlgili Faktörler	30
2.5.2. İlacın Farmakokinetiği ve Farmakolojisi ile İlgili Faktörler	31
2.5.3. Hasta ile İlgili Faktörler	32
2.5.4. Antikanser İlaçlara Karşı Gelişen Direnç	32
2.6. İlaç Araştırma ve Geliştirme Çalışmaları	36
2.7. İlaç Tasarımı Sürecinde Kullanılan Yöntemler	40
2.7.1. Sülfürodamin B (SRB) Yöntemi	44
2.7.2. Komet Yöntemi	46
2.7.3. Modifiye Komet Yöntemi	48

2.7.4. Ames <i>Salmonella</i> /Mikrozom Testi	54
2.8. Antikanser İlaç Tasarımlarında Yapı-Aktivite Çalışmaları	57
2.8.1. Ligand (Referans İlaç) Temelli Yaklaşımlar	57
2.8.2.Yapı (Reseptör) Temelli Yaklaşımlar	60
3. MATERYAL ve YÖNTEM	61
3.1.Test Edilen Bileşikler	61
3.2. Test Bileşiklerinin Hazırlanması	62
3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	62
3.3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	62
3.3.2. Kültür Ortamının Hazırlanması ve Hücre Dizilerinin Çoğaltılması	62
3.3.3. Hücrelerin Pasajlanması.....	63
3.3.4. Canlı Hücre Sayımı (Tripın Mavisı Boya Atılım Testi):.....	63
3.3.5. Hücrelerin Dondurularak Saklanması	64
3.4. Sülförödamın B (SRB) Testi	65
3.4.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	65
3.4.2. Yöntemin Aşamaları	65
3.5. Test Bileşiklerinin Hücre Morfolojisi Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi	67
3.6. Test Bileşiklerinin SRB Testi Sonuçlarına Ait Farmakoför Analizi	68
3.7. Alkali Komet Testi.....	69
3.7.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	69
3.7.2. Kullanılan Çözeltilerinin İçerikleri ve Hazırlanışı	69
3.7.3. Yöntemin Aşamaları	71
3.8. Modifiye Komet (FLARE= Fragment Length Analysis with DNA Repair Enzymes) Testi.....	74
3.9. Ames <i>Salmonella</i> /Mikrozom Testi	75
3.9.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	75
3.9.2. Kullanılan Test Suşları ve Özellikleri	76
3.9.3. Kullanılan Pozitif Mutajenler	76
3.9.4. Kullanılan Ortamların İçerikleri ve Hazırlanmaları	76
3.9.5. Yöntemin Aşamaları	80
3.10. Test Bileşiklerinin Ames Testi Sonuçlarına Ait Farmakoför Analizi.....	89
3.11. İstatistiksel Analiz	90
4. BULGULAR	92

4.1. Sülforodamin B (SRB) Testine Ait Bulgular	92
4.2. Test Bileşiklerinin Hücre Morfolojisi Üzerindeki Etkilerine Ait Bulgular	115
4.3. SRB Testi Sonuçlarına Göre Yapılan Farmakofor Analizine Ait Bulgular	136
4.4. Alkali Komet Testine Ait Bulgular	145
4.5. Modifiye Komet (FLARE) Testine Ait Bulgular	163
4.6. Ames Salmonella/Mikrozom Testine Ait Bulgular	174
4.7. Ames Testi Sonuçlarına Göre Yapılan Farmakofor Analizine Ait Bulgular ..	201
5. TARTIŞMA.....	206
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	227
KAYNAKLAR.....	231
ÖZGEÇMİŞ	247

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 2.1. FDA onaylı 1,4-benzoksazin türevi ilaçlar ve özellikleri	16
Çizelge 2.2. Biyotransformasyon tepkimeleri ve değişime uğratılan fonksiyonel gruplar	28
Çizelge 2.3. Bitki ve mikroorganizma kökenli kemoterapötik ilaçlar	37
Çizelge 2.4. Düzenleyici kuruluşların önerdiği <i>in vitro/ in vivo</i> genotoksosite testlerine ait kılavuzlar	43
Çizelge 2.5. Farklı pH'larda komet yöntemi ile belirlenebilen DNA hasarları	47
Çizelge 2.6. Modifiye komet yönteminde kullanılan glikozilazlar ve özellikleri	52
Çizelge 2.7. Modifiye komet yönteminde kullanılan DNA glikozilazların tek ve çift zincirli DNA'da çeşitli hasarlı bazları onarabilme kapasiteleri	53
Çizelge 2.8. Ames testinde yaygın olarak kullanılan mutant suşların genotipik özellikleri [177].....	55
Çizelge 2.9. HipHop ve HypoGen yöntemlerinin farklı parametreler açısından karşılaştırılması	59
Çizelge 3.1. Test edilen benzoksazin türevi bileşiklere ait ortak halka yapıları, molekül ağırlıkları ve partiyon katsayıları	61
Çizelge 3.2. <i>S.typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarının genotipleri.....	76
Çizelge 3.3. HipHop analizinde kullanılan çalışma serisi.....	89
Çizelge 4.1. BS1 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri	93
Çizelge 4.2. BS2 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri	94
Çizelge 4.3. BS3 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri	95
Çizelge 4.4. BS4 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri	96

Çizelge 4.5. BS5 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri	97
Çizelge 4.6. BS6 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri	98
Çizelge 4.7. BS7 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri	99
Çizelge 4.8. BS8 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri	100
Çizelge 4.9. BS9 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri	101
Çizelge 4.10. BS10 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri	102
Çizelge 4.11. BS11 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri	103
Çizelge 4.12. BS12 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri	104
Çizelge 4.13. BS13 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri	105
Çizelge 4.14. BS14 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri	106
Çizelge 4.15. BS15 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri	107

Çizelge 4.16. BS16 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri	108
Çizelge 4.17. BS17 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri	109
Çizelge 4.18. BS18 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri	110
Çizelge 4.19. Kamptotesin ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri	111
Çizelge 4.20. Etoposit ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri	112
Çizelge 4.21. Amsacrin ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri	113
Çizelge 4.22. 18 adet benzoksazin türevi bileşiğin SRB testine ait toplu sonuçları.....	114
Çizelge 4.23. Test edilen benzoksazin türevlerinin yapısındaki fonksiyonel grup sayıları.....	138
Çizelge 4.24. L929 hücre dizisi için geliştirilen HypoGen farmakofor hipotezlerinin istatistiksel analiz sonuçları	139
Çizelge 4.25. HeLa hücre dizisi için geliştirilen HypoGen farmakofor hipotezlerinin istatistiksel analiz sonuçları	139
Çizelge 4.26. L929 hücre dizisi için yapılan HypoGen farmakofor analizinde en uygun bulunan hipoteze ait sonuçlar	141
Çizelge 4.27. HeLa hücre dizisi için yapılan HypoGen farmakofor analizinde en uygun bulunan hipoteze ait sonuçlar	142
Çizelge 4.28. Benzoksazin türevlerinin L929 hücre dizisi üzerindeki sitotoksik aktivitelerine göre en uygun hipotez ile haritalanması	143
Çizelge 4.29. Benzoksazin türevlerinin HeLa hücre dizisi üzerindeki sitotoksik aktivitelerine göre en uygun hipotez ile haritalanması	144

Çizelge 4.30. Benzoksazin türevlerinin; L929 hücre dizisinde, IC ₅₀ dozlarında 24 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen alkali komet testi DNA hasar parametrelerine ait sonuçları	148
Çizelge 4.31. Benzoksazin türevlerinin, L929 hücre dizisinde, IC ₅₀ dozlarında 48 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen alkali komet testi DNA hasar parametrelerine ait sonuçları	150
Çizelge 4.32. Benzoksazin türevlerinin, HeLa hücre dizisinde, IC ₅₀ dozlarında 24 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen alkali komet testi DNA hasar parametrelerine ait sonuçları	152
Çizelge 4.33. Benzoksazin türevlerinin, HeLa hücre dizisinde, IC ₅₀ dozlarında 48 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen alkali komet testi DNA hasar parametrelerine ait sonuçları	154
Çizelge 4.34. Alkali komet testinde IC ₅₀ 'e yakın dozlarda 24 ve 48 saatlik inkübasyonlarda L929 ve HeLa hücre dizileri üzerinde genotoksik etki gösteren bileşikler	156
Çizelge 4.35. BS1 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi	177
Çizelge 4.36. BS2 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi	178
Çizelge 4.37. BS3 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi	179
Çizelge 4.38. BS4 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi	180
Çizelge 4.39. BS5 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi	181
Çizelge 4.40. BS6 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi	182

Çizelge 4.41. BS7 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi	183
Çizelge 4.42. BS8 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi	184
Çizelge 4.43. BS9 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi	185
Çizelge 4.44. BS10 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi	186
Çizelge 4.45. BS11 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi	187
Çizelge 4.46. BS12 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi	188
Çizelge 4.47. BS13 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi	189
Çizelge 4.48. BS14 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi	190
Çizelge 4.49. BS15 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi	191
Çizelge 4.50. BS16 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi	192
Çizelge 4.51. BS17 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi	193

Çizelge 4.52. BS18 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi	194
Çizelge 4.53. Benzoksazin türevlerinin TA98 suşundaki ANOVA ve Dunnett-C testine ait istatistik sonuçları.....	195
Çizelge 4.54. Benzoksazin türevlerinin TA100 suşundaki ANOVA ve Dunnett-C testine ait istatistik sonuçları.....	196
Çizelge 4.55. TA98 suşunda mutajenik etki gösteren benzoksazin türevlerinin regresyon model kestirim testine ait istatistik sonuçları.....	197
Çizelge 4.56. TA100 suşunda mutajenik etki gösteren benzoksazin türevlerinin regresyon model kestirim testine ait istatistik sonuçları.....	198
Çizelge 4.57. Ames testinde kullanılan pozitif kontrollerin T-testine ait betimsel istatistik sonuçları	199
Çizelge 4.58. Ames testinde kullanılan pozitif kontrollerin regresyon analizine ait istatistik sonuçları	199
Çizelge 4.59. 18 Adet benzoksazin türevi bileşiğin Salmonella/mikrozom testine ait toplu değerlendirme sonuçları	200
Çizelge 4.60. Mutajenik aktivite için geliştirilen HipHop farmakofor hipotezlerinin istatistiksel analiz sonuçları	202
Çizelge 4.61. Mutajenik aktivite verileri ile yapılan HipHop farmakofor analizinde en uygun hipoteze ait sonuçlar.....	203
Çizelge 4.62. Benzoksazin türevlerinin <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşları üzerindeki mutajenik aktivitesinin en uygun hipotez ile haritalanması	204
Çizelge 4.63. Test edilen bileşiklerin sitotoksik, genotoksik ve mutajenik etkilerine ait toplu değerlendirme	205

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1. Oksazin izomerleri, 1,4-benzoksazin halka yapısı ve okso türevleri	5
Şekil 2.2. 1,4-Benzoksazin-3-on türevli hidroksamik asitlerin bitkilerdeki enzimatik ve kimyasal transformasyonu	6
Şekil 2.3. 1,4-Benzoksazin türevleri ile ilgili yayınlanan makale sayısının yıllara göre dağılımı	7
Şekil 2.4. Doğal 1,4-benzoksazin türevleri	8
Şekil 2.5. İlaç olma potansiyeli olan 1,4 benzoksazin ve 1,4 benzoksazinon türevli bileşikler	10
Şekil 2.6. Kanseri hücrelerinin karakteristik özellikleri	17
Şekil 2.7. Antikanser terapide kullanılan ilaçlar	19
Şekil 2.8. Sitotoksik ilaçların DNA ile etkileşimleri	20
Şekil 2.9. Antikanser ilaçlara karşı gelişen direnç mekanizmaları	33
Şekil 2.10. SRB testinin uygulanışı.....	45
Şekil 2.11. Alkali ve modifiye komet yönteminin aşamaları	49
Şekil 2.12. Baz hasarının BER sistemi ile onarımı	50
Şekil 2.13. İlaç etken madde tasarımında kullanılan stratejiler	57
Şekil 3.1. Tripan mavisi boya atılım testi	64
Şekil 3.2. SRB yönteminde kullanılan plak düzeni ve deney sonrası plak görünümü	67
Şekil 3.3. Komete testine ait değerlendirme parametreleri	74
Şekil 3.4. <i>S. typhimurium</i> TA98 suşunun genetik işaretlerinin kontrolü	82
Şekil 3.5. <i>S. typhimurium</i> TA100 suşunun genetik işaretlerinin kontrolü	83
Şekil 3.6. <i>S. typhimurium</i> TA98 ve TA100 suşlarının kendiliğinden geriye dönüş frekanslarının kontrolü	85
Şekil 4.1. Farklı dozlarda BS1 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri	116
Şekil 4.2. Farklı dozlarda BS2 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri	117
Şekil 4.3. Farklı dozlarda BS3 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri	118

Şekil 4.4. Farklı dozlarda BS4 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri	119
Şekil 4.5. Farklı dozlarda BS5 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri	120
Şekil 4.6. Farklı dozlarda BS6 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri	121
Şekil 4.7. Farklı dozlarda BS7 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri	122
Şekil 4.8. Farklı dozlarda BS8 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri	123
Şekil 4.9. Farklı dozlarda BS9 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri	124
Şekil 4.10. Farklı dozlarda BS10 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri	125
Şekil 4.11. Farklı dozlarda BS11 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri	126
Şekil 4.12. Farklı dozlarda BS12 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri	127
Şekil 4.13. Farklı dozlarda BS13 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri	128
Şekil 4.14. Farklı dozlarda BS14 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri	129
Şekil 4.15. Farklı dozlarda BS15 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri	130
Şekil 4.16. Farklı dozlarda BS16 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri	131
Şekil 4.17. Farklı dozlarda BS17 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri	132
Şekil 4.18. Farklı dozlarda BS18 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri	133
Şekil 4.19. Farklı dozlarda CPT uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri	134

Şekil 4.20. Farklı dozlarda ETOP uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri	135
Şekil 4.21. L929 hücre dizisine ait HypoGen farmakofor modellemesi için en uygun bulunan hipotez	140
Şekil 4.22. HeLa hücre dizisine ait HypoGen farmakofor modellemesi için en uygun bulunan hipotez	140
Şekil 4.23. Benzoksazin türevlerinin L929 hücre dizisinde, IC50 dozlarında, 24 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen alkali komet testi sonuçları	149
Şekil 4.24. Benzoksazin türevlerinin L929 hücre dizisinde, IC50 dozlarında, 48 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen alkali komet testi sonuçları	151
Şekil 4.25. Benzoksazin türevlerinin HeLa hücre dizisinde, IC50 dozlarında, 24 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen alkali komet testi sonuçları	153
Şekil 4.26. Benzoksazin türevlerinin HeLa hücre dizisinde, IC50 dozlarında, 48 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen alkali komet testi sonuçları	155
Şekil 4.27. Farklı konsantrasyonlarda BS2 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 hücrelerinde oluşan DNA hasar düzeylerine ait alkali komet testi sonuçları.....	157
Şekil 4.28. Farklı konsantrasyonlarda BS7 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 hücrelerinde oluşan DNA hasar düzeylerine ait alkali komet testi sonuçları.....	157
Şekil 4.29. Farklı konsantrasyonlarda BS16 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 hücrelerinde oluşan DNA hasar düzeylerine ait alkali komet testi sonuçları.....	157
Şekil 4.30. Farklı konsantrasyonlarda BS1 bileşiği ile 48 saat muamele edilen HeLa hücrelerinde oluşan DNA hasar düzeylerine ait alkali komet testi sonuçları.....	158
Şekil 4.31. Farklı konsantrasyonlarda BS4 bileşiği ile 48 saat muamele edilen HeLa hücrelerinde oluşan DNA hasar düzeylerine ait alkali komet testi sonuçları.....	158
Şekil 4.32. Farklı konsantrasyonlarda BS10 bileşiği ile 48 saat muamele edilen HeLa hücrelerinde oluşan DNA hasar düzeylerine ait alkali komet testi sonuçları.....	158

Şekil 4.33. Farklı konsantrasyonlarda BS11 bileşiği ile 48 saat muamele edilen HeLa hücrelerinde oluşan DNA hasar düzeylerine ait alkali komet testi sonuçları.....	159
Şekil 4.34. Farklı konsantrasyonlarda BS16 bileşiği ile 48 saat muamele edilen HeLa hücrelerinde oluşan DNA hasar düzeylerine ait alkali komet testi sonuçları.....	159
Şekil 4.35. Farklı konsantrasyonlarda H202 ile 5 dakika muamele edilen L929 ve HeLa hücrelerinde oluşan DNA hasar düzeylerine ait alkali komet testi sonuçları.....	160
Şekil 4.36. Farklı konsantrasyonlarda kamptotesin ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücrelerinde oluşan DNA hasar düzeylerine ait alkali komet testi sonuçları.....	161
Şekil 4.37. Farklı konsantrasyonlarda etoposid ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücrelerinde oluşan DNA hasar düzeylerine ait alkali komet testi sonuçları.....	162
Şekil 4.38. BS10 bileşiğinin farklı konsantrasyonları ile muamele edilen HeLa hücrelerinde oluşan DNA hasarının mikroskopik görüntüsü.....	163
Şekil 4.39. BS2 ile muamele edilen L929 hücre dizisinde Fpg, Endo III ve hAAG enzimleri varlığında modifiye komet testi sonuçları	166
Şekil 4.40. BS7 ile muamele edilen L929 hücre dizisinde Fpg ve Endo III varlığında modifiye komet testi sonuçları	166
Şekil 4.41. BS16 ile muamele edilen L929 hücre dizisinde Fpg ve Endo III varlığında modifiye komet testi sonuçları	166
Şekil 4.42. BS1 ile muamele edilen HeLa hücre dizisinde Fpg ve Endo III varlığında modifiye komet testi sonuçları	167
Şekil 4.43. BS4 ile muamele edilen HeLa hücre dizisinde Fpg ve Endo III varlığında modifiye komet testi sonuçları	167
Şekil 4.44. BS10 ile muamele edilen HeLa hücre dizisinde Fpg, Endo III ve hAAG varlığında modifiye komet testi sonuçları	167
Şekil 4.45. BS11 ile muamele edilen HeLa hücre dizisinde Fpg, Endo III ve hAAG varlığında modifiye komet testi sonuçları	168
Şekil 4.46. BS16 ile muamele edilen HeLa hücre dizisinde Fpg ve Endo III varlığında modifiye komet testi sonuçları	168

Şekil 4.47. Etoposit ile muamele edilen L929 hücre dizisinde Fpg, Endo III ve hAAG varlığında modifiye komet testi sonuçları	169
Şekil 4.48. Etoposit ile muamele edilen HeLa hücre dizisinde Fpg, Endo III ve hAAG varlığında modifiye komet testi sonuçları	169
Şekil 4.49. MMS ile muamele edilen L929 hücre dizisinde Fpg, Endo III ve hAAG varlığında modifiye komet testi sonuçları	170
Şekil 4.50. MMS ile muamele edilen HeLa hücre dizisinde Fpg, Endo III ve hAAG varlığında modifiye komet testi sonuçları	170
Şekil 4.51. CPT ile muamele edilen L929 hücre dizisinde Fpg, Endo III ve hAAG varlığında modifiye komet testi sonuçları	171
Şekil 4.52. CPT ile muamele edilen HeLa hücre dizisinde Fpg, Endo III ve hAAG varlığında modifiye komet testi sonuçları	171
Şekil 4.53. H ₂ O ₂ ile muamele edilen L929 hücre dizisinde Fpg ve Endo III varlığında modifiye komet testi sonuçları	172
Şekil 4.54. H ₂ O ₂ ile muamele edilen HeLa hücre dizisinde Fpg ve Endo III varlığında modifiye komet testi sonuçları	172
Şekil 4.55. L929 hücre dizisinde genotoksik etkili BS2, BS7 ve BS16 bileşiklerinin Fpg, Endo III ve hAAG duyarlı bölge sıklıkları	173
Şekil 4.56. HeLa hücre dizisinde genotoksik etkili BS1, BS4, BS10, BS11 ve BS16 bileşiklerinin Fpg, Endo III ve hAAG duyarlı bölge sıklıkları	173

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

µg	Mikrogram
µM	Mikromolar
µL	Mikrolitre
ml	Mililitre
mA	Miliamper
V	Volt
rpm	Dakikadaki Dönüş Sayısı
gr	Gram
C°	Santigrat Derece

Kısaltmalar

3D QSAR	Üç Boyutlu Kantitatif Yapı-Aktivite İlişkisi
ABC	Adenozil Üç Fostat (ATP) Bağlayan Kaset
ADME	Absorbsiyon-Dağılım-Metabolizasyon-Atılım (Ekstraksiyon)
AlkA	Alkil Adenin DNA Glikozilaz
ALL	Akut Lenfoblastik Lösemi
ANOVA	Tek Yönlü Varyans Analizi
AP	Apürünik/Apürimidinik
AraC	Sitozin-β-D-Arabinosit-C
ATP	Adenozin Üç Fosfat
BCRP	Meme Kanseri Direnç Proteini
BSA	Sığır Serum Albumin
COPD	Kronik Obstrüktif Pulmoner Hastalığı
CPT	Kamptotesin
CYP450	Sitokrom Proteini-450
d	Minimum Mutajenik Doz
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol
DIBOA	2,4-dihidroksi-1,4-benzoksazin-3-on
DIMBOA	2,4-dihidroksi-7-metoksi-1,4-benzoksazin-3-on
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DNA-PK	DNA Bağımlı Serin/Treonin Protein Kinaz
DNMT	DNA Metiltransferaz
dTTP	Deoksi Timidin Üç Fosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EMA	Avrupa İlaç Ajansı (European Medicine Agency)
EndoIII	Endonükleaz III
EPA	Avrupa Çevre Ajansı (European Environment Agency)
EtBr	Etidyum Bromür
ETOP	Etoposit
Fapy	Formamidopirimidin (Açık Halkalı)
FBS	Fetal Sığır Serumumu
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi
FISH	Floresan İn Situ Hibridizasyonu
FLARE	DNA Onarım Enzimleri Varlığında Parça Uzunluk Analizi
Fpg	Formamidopirimidin DNA Glikozilaz
GLP	İyi Laboratuvar Uygulamaları (Good Laboratory Practice)
GMP	İyi Üretim Uygulamaları (Good Manufacturing Practice)
hAAG	İnsan Alkil Adenin DNA Glikozilaz
HBA	Hidrojen Bağı Alıcısı
HBD	Hidrojen Bağı Vericisi
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetanisülfonik asit
HGPRT	İnsan Hipoksantin-Guanin Fosforibozil Transferaz
hOOG	İnsan 8-Oksoguanin DNA Glikozilaz
hTopoI	İnsan DNA topoizomeraz I
HUVEC	Umblikal Ven Endotel Hücreleri
IC ₅₀	İnhibisyon Konsantrasyonu 50
ICH	Uluslararası Hormonizasyon Konferansı
IND	Yeni Araştırma İlacı (Investigational New Drug)
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LMA	Düşük Erime Dereceli Agaroz

LRP	Akciğer Direnç Proteini
LTUS154	2-((3-metoksibut-3-en-2-il)amino)-8metil-4H-benzo[1,3]oksazin-4-on
MDRAP	Çoklu İlaç Direnç Proteini İle İlişkili Protein
MGA	Minimal Glukoz Agar
MMS	Metil Metan Sülfonat
MRP	Çoklu İlaç Direnç Proteini
MRS	Metiyonil-tRNA Sentetaz
MTT	3-(4, 5-Dimetil-2-tiyazolil) -2, 5-difenil -2H- tetrazolyum bromür
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NB	Nütrient Broth
NCA	Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Kanser Örgütü
NCI	Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Kanser Enstitüsü
NDA	Yeni İlaç Başvurusu (New Drug Application)
NMA	Normal Erime Dereceli Agaroz
NR	Nötral Kırmızı
OAT	Organik Anyon Transport
OATP	Organik Anyon Transport Proteini
OD	Optik Dansite
OECD	Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü
PBS	Fosfatla Tamponlanmış Salin
PPAR	Peroksizom Proliferatör Aktive Edici Reseptör
RMS	Karekök Ortalama (Kuadratik Ortalama)
RNA	Ribonükleik Asit
S9	İn Vitro Metabolik Aktivasyon Sistemi
SCFM	Çözünür Taşıyıcı protein Ailesi Üyesi
SCGE	Tek Hücre Jel Elektroforezi
Si	Seçicilik İndeksi
SLC	Çözünür Taşıyıcı (Solute Carrier)
SOS	Hataya Meyilli Onarım Sistemi
SRB	Sülforodamin B
TCA	Trikloro Asetik Asit
Tris	2-Amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
UDG	Urasil DNA Glikozila

1. GİRİŞ

Dünya genelinde ölümcül hastalıklar içinde kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada yer alan ve son yıllarda üzerinde en çok araştırma yapılan, kısmen tedavi edilebilen hastalıklardan biri olarak tanımlanan kanser; belirli genlerdeki mutasyonlar sonucu gen ifadesinin miktarında veya zamanlamasında meydana gelen değişikliklerle ortaya çıkan çok yönlü genetik bir bozukluktur [1]. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) istatistiklerine göre 2015 yılında dünyada 15,2 milyon insana farklı türde kanser teşhisi konulmuş ve 8,9 milyon kişinin yaşamını yitirdiği belirtilmiştir. 2015 yılında Türkiye'de ise 1,7 milyon insanın kansere yakalandığı, 107 bin hastanın kanserden yaşamını yitirdiği rapor edilmiştir. İlerleyen yıllarda ise bu rakamların artacağı (2030 yılında yaşayan kanser hastası sayısının 75 milyona, ölenlerin sayısının ise 17 milyona çıkacağı) tahmin edilmiştir [2]. Bu rakamların da gösterdiği gibi dünyada kanser teşhisi ve tedavisinin ne kadar önemli olduğu açıkça görülmektedir. Bu nedenle gerek ilaç firmaları gerekse ulusal sağlık örgütleri kanserle mücadele araştırmaları için her yıl büyük bütçeler ayırmaktadırlar. Bu araştırmalar bir yandan kanserin moleküler ve hücresel mekanizmalarını aydınlatmaya yönelik olarak ilerlerken, diğer yandan hastalığın tedavisi ile ilgili yeni ilaç ve tedavi yöntemlerinin bulunmasını kapsamaktadır. Bunlar arasında en yoğun olarak çalışma yapılan grubun yeni kemoteropatik ajanların keşfi olduğu görülmektedir [3-5].

Her yıl milyonlarca yeni bileşik kanser ilacı olma potansiyeli açısından değerlendirilmekte, ancak toksisite ve istenmeyen yan etkilerin görülmesi nedeniyle onay alamamaktadır. Ayrıca rutinde kullanılan ilaçların, kanser hücrelerinin kısa sürede çeşitli mekanizmalarla geliştirdiği direnç nedeniyle kullanımlarının kısıtlanması yaygın bir durumdur [6-8]. Bu nedenle bu tip kısıtlayıcı faktörlerin üstesinden gelebilecek yeni antikanser ilaçların keşfi ile ilgili araştırmalar hız kesmeden devam etmektedir.

Kanser hücrelerinin hızlı bölünme, apoptozdan kaçınma, invazyon gibi karakteristik özelliklerini hedef alan ajanlar, antikanser terapinin temelini oluşturmaktadır. Dolayısıyla bunların kanserli hücre büyümesini durdurabilen, farklılaşmasını indükleyebilen, apoptoza yönlendirebilen, metastazı ve anjiyogenezi önleyebilen ajanlar olduğu bilinmektedir. Antikanser ajanlar, hücrede

özellikle DNA, RNA ve proteinleri hedef almaktadırlar [9]. Hedeflenmiş terapilerde sadece kanser tipine özgül biyomoleküller veya hücreyi kanserleşmeye götüren yollar hedef alınırken, klasik kemoteropatik ajanların ise genel olarak kanser hücrelerini öldürmeye ve büyümesini durdurmaya yönelik sitotoksik/sitostatik yolları tetiklediği bilinmektedir [10].

Yeni ilaç etken madde keşfi ile ilgili araştırmalar, genel olarak doğal kaynaklardan izole edilen ya da şimdiye kadar etkin bileşikler olarak kullanılan ilaçlardan esinlenerek sentezlenen yeni sentetik ya da yarı sentetik bileşikler üzerinden yapılmaktadır. Doğal kaynaklardan izole edilen bileşiklerin veya bu bileşiklerden esinlenilerek sentezlenen türevlerinin başta antimikrobiyal etkileri olmak üzere çok çeşitli biyolojik fonksiyonları belirlenmiştir. Bitkilerde doğal savunma mekanizmasında görevli benzoksazin türevi bileşikler de başlarda bakteri ve funguslardaki toksik etkileri nedeniyle antibakteriyel ve antifungal ilaçlar olarak kullanılmışlardır. Zaman içerisinde sentezlenen yeni türevlerinin biyolojik sistemlerdeki çeşitli biyomoleküllerin inhibisyonunu, aktivasyonunu ya da modülasyonunu sağladığı görüldükten sonra farklı hastalıklarda ajan olarak kullanılan benzoksazin türevi ilaçlar da sentezlenmiştir [11, 12]. Benzoksazinler biyolojik öneme sahip pek çok heteroksiklik bileşiğin sentezi için öncül bileşikler olarak da kullanılmaktadır. Platelet agregasyonu, tromboz ve miyokardial enfarktüs gibi trombinle ilişkili pek çok hastalığın tedavisi için bazı N-substitue benzoksazin türevleri önerilmektedir [13].

Benzoksazin türevleri içinde özellikle 2H-1,4-benzokazin-3-(4H)-on iskeleti; doğal ve tasarlanacak sentetik bileşiklerin oluşturulmasında önemli bir heterosiklik sistemdir [14]. 2H-1,4-benzoksazin-3-(4H)-on ve 3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin türevi bileşikler biyolojik olarak aktif bileşiklerin tasarımında sıklıkla başvuru yapı iskeletleridir. Bu iskeletleri taşıyan bileşikler çok çeşitli biyolojik özelliklere sahiptir. Antibakteriyel [15], bakteriyel histidin protein kinaz inhibitörü [16], *Mycobacterium* türlerinin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde [17], kardiyovasküler hastalıkların, miyokardiyal nekroz ve aritmi tedavisinde [18], peroksizom proliferatör aktive edici reseptör (PPAR) agonisti olarak diyabet ve hiperlipidemi hastalıklarının tedavisinde [19], nöroprotektan etkisi [20], nitrik oksit sentaz inhibitörü olarak inflamatuvar, otoimmün ve kardiyovasküler

bozuklukların tedavisinde [21,22] koagölasyon serin proteaz inhibitörü [23], anksiyete ve depresyon tedavisi için [24] kullanılan çok sayıda benzoksazin türevi bileşik rapor edilmiştir.

Özellikle 1,4 benzoksazin halka sistemi içeren bir antibiyotik olan ofloksazin bileşiğinin antimikrobiyal etkisinin bakteriyel topoizomeraz II enzimini inhibe ederek gösterdiğinin belirlenmesinden sonra benzoksazinlerin olası topoizomeraz inhibitörleri olabileceği düşünülmüştür. Literatürde hem topoizomeraz I hem de II enzimlerini hedefleyen benzoksazin türevleri ile ilgili çalışmalara sıklıkla rastlanmaktadır [25, 26]. Bununla birlikte zamanla değişik biyolojik aktiviteleri de araştırılmaya başlanan benzoksazin türevlerinden cappamensin A bileşiğinin antikanser aktivitesinin bulunması, antikanser ajan tasarımlarında benzoksazin halka sistemi içeren türevlere daha sıklıkla yer verilmesine sebep olmuştur [27-33]. Benzoksazin türevi bileşikler bitkilerde yaygın olarak bulunmalarına karşın, hem endüstriyel hem de farmasötik amaçlarla kullanımları nedeniyle her gün yeni türevleri sentezlenmektedir.

Bu bağlamda Ankara Üniversitesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı tarafından, bitkilerde savunma mekanizmasından sorumlu doğal 1,4-benzoksazin türevleri olan DIBOA ve DIMBOA bileşiklerinin yapısı baz alınarak bir grup benzoksazin türevi bileşik sentezlenmiştir [34, 35]. Daha önceki çalışmalarda bu bileşiklerin antimikrobiyal [34, 35] ve topoizomeraz I enzimi üzerindeki aktiviteleri [25, 26] araştırılmış ve aktif olan bileşikler belirlenmiştir.

Antikanser ilaçların kimyasal yapıları incelendiğinde, biyomoleküller ile etkileşime girme potansiyelleri yüksek olan heterosiklik bileşiklerin önemli bir grubu oluşturduğu görülmektedir. Bu tez çalışması kapsamında da benzoksazinon türevi bileşiklerin *in vitro* antikanser aktivitelerinin hücre kültürü temelli çalışmalar ile değerlendirilmesi planlanmıştır.

Bu amaçla ilk olarak bileşiklerin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik aktiviteleri araştırılmış, sonrasında sitotoksik aktiviteye neden olabilecek mekanizmaların aydınlatılması için ek çalışmalar yapılmıştır.

Klasik kemoterapide kanser hücrelerinin DNA'larında büyük miktarda hasar oluşturmak suretiyle kanser hücrelerini apoptoza yönlendiren genotoksik ajanların kullanıldığı görülmektedir. Çalışmamızda sitotoksik aktivitelerini değerlendirdiğimiz

bileşiklerin etkilerini, genotoksik aktivitesi ile bağlantılı olarak oluşturup oluşturmadığı komet yöntemi ile değerlendirilmiştir. Güçlü genotoksik aktiviteye sahip olduğu belirlenen bileşiklerin temelde hangi DNA hasarlarını oluşturduklarını bulmak için de modifiye komet yöntemi kullanılmıştır.

Kemoterapide karşılaşılan en büyük problemlerden birinin ilaçların yan etkileri olduğu düşünülürse kanser hücrelerinde sitotoksik olması istenen bileşiklerin normal hücrelere en az oranda zarar vermesi tercih edilen durumdur. Bu nedenle test edilen bileşiklerin normal hücreler üzerindeki sitotoksik ve genotoksik potansiyelleri de araştırılmıştır.

Kemoteropatik uygulamalar sırasında istenilen şekilde iyileşme sağlansa bile hastada ikincil tümörlerin olduğu gözlenmiştir. Bunların kemoteropatiklerin mutajenik potansiyelleri nedeniyle ortaya çıkabileceği bilinen bir gerçektir. Bu nedenle ilaç geliştirme çalışmaları sırasında etkin bileşiklerin mutajenik potansiyellerinin de değerlendirilmesi zorunlu kılınmıştır. Bu amaçla en çok kullanılan yöntem, ilaçların hem kendileri hem de metabolitlerinin mutajenik potansiyellerinin test edilebileceği Ames test sistemidir. Bu nedenle çalışmamızda benzoksazin türevlerinin mutajenik potansiyel taşıyıp taşımadıkları da metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda Ames testi ile araştırılmıştır.

Sonuç olarak yapılan çalışmada,

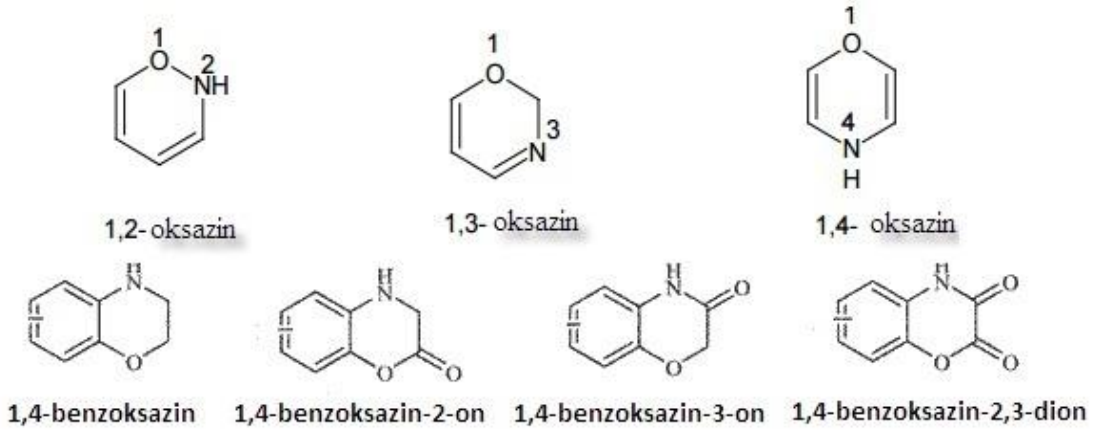
- elde edilen tüm veriler bir arada değerlendirilerek, antikanser ajan olarak aday olabilecek güvenli ve etkin 1,4-benzoksazin-3-on türevi bileşiklerin belirlenmesi,
- biyolojik aktivite verileri kullanılarak bileşiklerdeki biyoaktif grupların tespiti ile antikanser ilaç tasarımında temel alınabilecek bir kimyasal yapı modeli oluşturulması,
- oluşturulan model kullanılarak yeni ve daha aktif bileşiklerin sentezlenmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Benzoksazinler

Farmasötikler ve biyolojik olarak aktif moleküllerin çoğunluğu heterosiklik yapıdadırlar. Ana yapısında azot ve oksijen içeren oksazinler; pek çok biyolojik aktiviteye sahip 6 üyeli heterosiklik bileşiklerin önemli bir sınıfıdır. Bu sınıfın önemli bir türevi ise oksazin halkasına benzen halkası eklenmiş benzoksazinlerdir [36].

Benzoksazinlerin 3 tane izomeri vardır ve genel olarak oksazin halkasında bulunan hetero atomların halkadaki konumlarına göre 1,2-, 1,3-, ve 1,4-benzoksazinler olarak adlandırılırlar. 1,4-benzoksazinlerde ise oksazin halkasındaki 2., 3. ve hem 2. hem de 3. karbon atomuna çift bağlı oksijenin varlığına göre 1,4-benzoksazin -2-on, -3-on ve -2,3-dion olarak adlandırılan 3 farklı okso türevi mevcuttur [36] (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Oksazin izomerleri, 1,4-benzoksazin halka yapısı ve okso türevleri

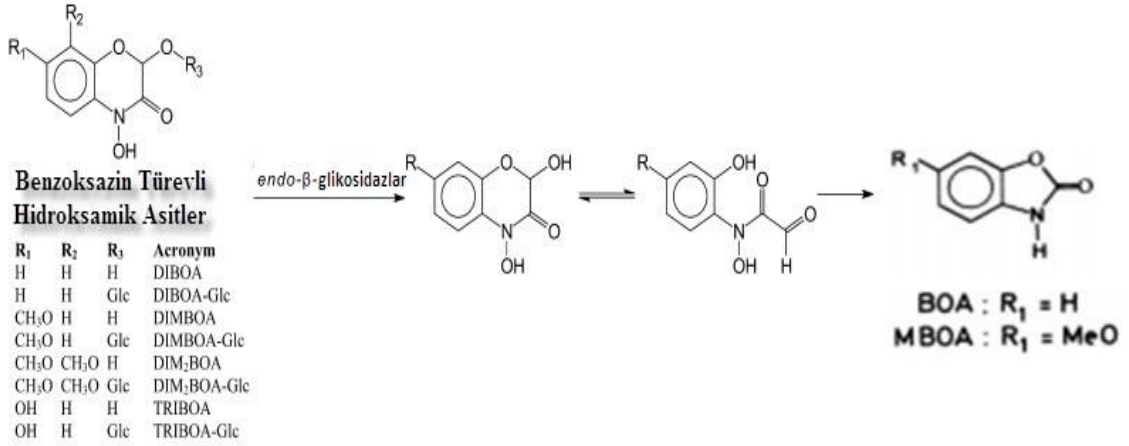
2.1.1. Doğal Benzoksazin Türevleri ve Biyolojik Aktiviteleri

Benzoksazin halkası taşıyan bileşiklerin biyolojik önemi 1960'li yılların başında çavdar bitkisinden izole edilen glikozitin enzimatik parçalanması sonucunda 1,4-benzoksazin-3-on halkası taşıyan DIBOA (2,4-dihidroksi-1,4-benzoksazin-3-on) bileşiğinin elde edilmesiyle başlamıştır [37]. Daha sonra Gramineae familyasında yer alan buğday bitkisinde DIMBOA (2,4-dihidroksi-7-metoksi-1,4-benzoksazin-3-on) ve mısır bitkisinde DIM₂BOA (2,4-dihidroksi-7,8-dimetoksi-1,4-benzoksazin-3-on) oldukları belirlenen aynı bisiklik halka sistemini (1,4-benzoksazin-3-on) içeren bileşiklere rastlanmıştır [38, 39].

Aktif 2-hidroksi-2H-1,4-benzoksazin-3(4H)-on iskeleti içeren bir hidroksamik asit türevleri olan DIBOA ve DIMBOA bileşikleri, tahılların hastalıklara ve yabancı otlara karşı geliştirdikleri doğal savunma yapan ikincil metabolitleridir [38,40] (Şekil 2.2).

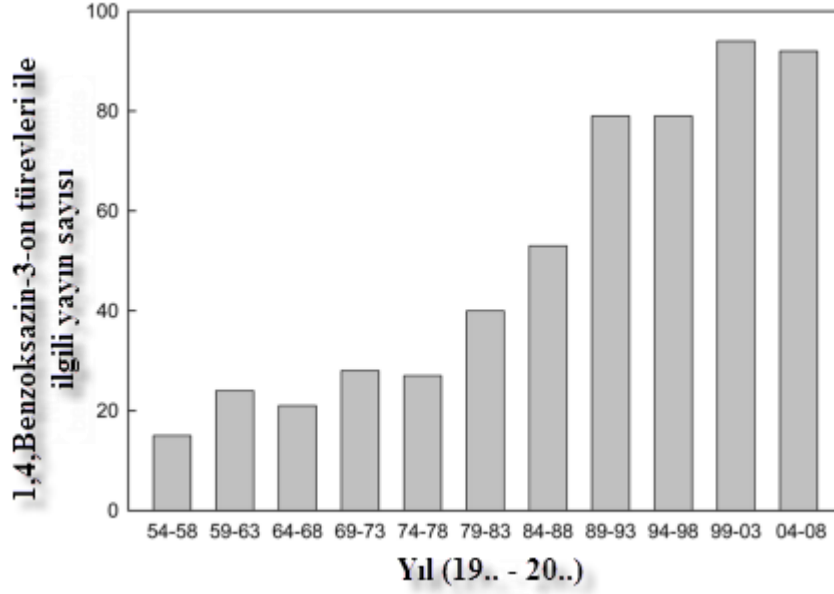
Bir diğer doğal benzoksazin türevi ise blepharin-1'dir (Şekil 2.4). Bu bileşik; 2-hidroksi-2H-1,4-benzoksazin-3(4H)-on iskeleti taşıyan HBOA-Glc'in literatürdeki sinonimidir. Buğdaygillerde doğal olarak bulunan ve bitki savunmasından sorumlu antimikrobiyal etkiye sahip benzoksizanoid hidroksamik asitlerdendir [38,40].

Heterosiklik azot atomuna bağlı bir hidroksil (-OH) grubu içeren benzoksazinoid türevli hidroksamik asitler; bitkilerde pek çok dokuda ana yapı olarak glikozitler (2- β -O-D-glikopiranositler) halinde doğal olarak bulunur. Bitki dokusu; yabancı otlar, bakteri ve funguslar ile hasar gördükten sonra bu tip bileşikler ortama salınan glukosidazlar tarafından hidrolize ederek biyolojik olarak aktif olan farklı tiplerde aglikon (2-benzoksazolinon) yapılarını oluşturur (Şekil 2.2) [40-42].



Şekil 2.2. 1,4-Benzoksazin-3-on türevli hidroksamik asitlerin bitkilerdeki enzimatik ve kimyasal transformasyonu [41,42]

Bitkilerde heterosiklik hidroksamik asitlerin hastalık ve böcek direnci [39], herbisit toleransı [43,44] ve çeşitli minerallerin metabolize edilmesi [45] gibi çok çeşitli biyolojik etkilerinin belirlenmesiyle 1,4-benzoksazin-3-on türevleri önem kazanmıştır. Ayrıca bu tip bileşiklerin antimikrobiyal [46,47], antikanser [48] ve anti-inflamatuvar [39] aktiviteleri gibi geniş farmakolojik özelliklerinin varlığı da belirlenmiştir. Bu tip bileşiklerin kimyasal ve biyolojik özelliklerine ve önemine dair 550 bilimsel makale yayınlanmış ve ileride yayınlanacak makalelerin miktarı artarak devam edeceği düşünülmektedir (Şekil 2.3) [40].



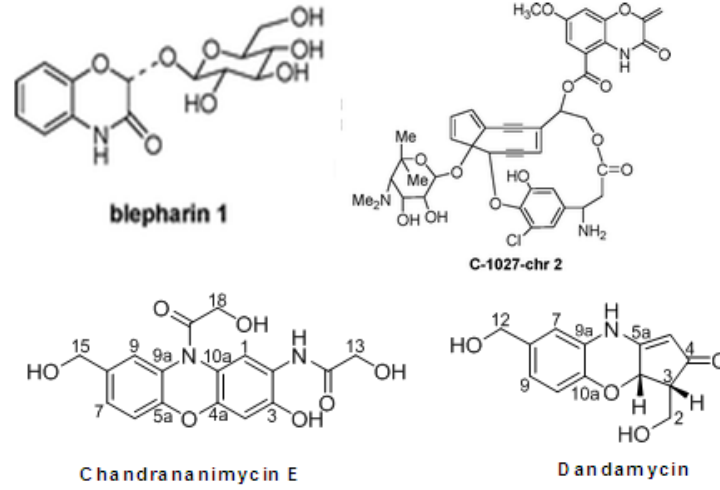
Şekil 2.3. 1,4-Benzoksazin türevleri ile ilgili yayınlanan makale sayısının yıllara göre dağılımı [40]

Doğal benzoksazin türevlerine genellikle bitkilerde çok rastlanmış olsa da son yıllarda yapılan çalışmalarda farklı organizmalarda da bulunan örnekleri mevcuttur [15,49-51].

C1027-*chr2*: C1027 1980’li yıllarda *Streptomyces globisporus*’un metaboliti olarak izole edilen peptid yapılı antitümöral bir antibiyotiktir (Şekil 2.4). Gram pozitif bakterilere karşı güçlü antibakteriyal, hepatoma BEL-7402, L1210 ve P388 gibi pek çok hücre dizisi üzerinde çok güçlü antiproliferatif etkisi yanında *in vivo* antitümöral etkilerinin olduğu bilinmektedir. Auromisin, makromomisin ve neokarzinostatin vb. antitümöral antibiyotiklerde de görüldüğü gibi, C1027’nin yapısında da hem peptid yapısı hem de protein olmayan bir kromofor grubu vardır. Kromofor-2(Chr-2) olarak adlandırılan gruba 1,4 benzoksazin halkası içermektedir. Yapılan birçok çalışmada C1027’nin hem protein kısmı hem de içerdiği kromofor kısmı ayrı ayrı incelendiğinde protein kısmının hiçbir biyolojik etkisinin olmadığı fakat, antimikrobiyal ve antitümöral etkinin benzoksazin halkasını içeren koromofor kısmından kaynaklandığı bildirilmiştir [15, 49, 50].

Dandamycin ve chandranamycin E: Yakın bir zamanda *Streptomyces griseus* (HKI 0545)’un sekonder metabolitleri olarak izole edilen antibiyotik etki gösteren 1,4-benzoksazin türevleridir (Şekil 2.4). Doğal heterosiklik bileşikler arasında kimyasal yapıları bakımından emsalsizdirler. Bu iki bileşiğin biyolojik aktiviteleri

incelendiğinde Chandrananimycin E'nin HUVEC hücreleri üzerinde orta derecede antiproliferatif etkisi (IC_{50} : 35.3 μ M), HeLa hücreleri üzerinde ise zayıf sitotoksik etkisi (IC_{50} : 56.9 μ M) olduğu görülmüştür. Dandamycin'nin ise her iki hücre tipinde etkisiz olduğu belirtilmiştir [51].



Şekil 2.4. Doğal 1,4-benzoksazin türevleri

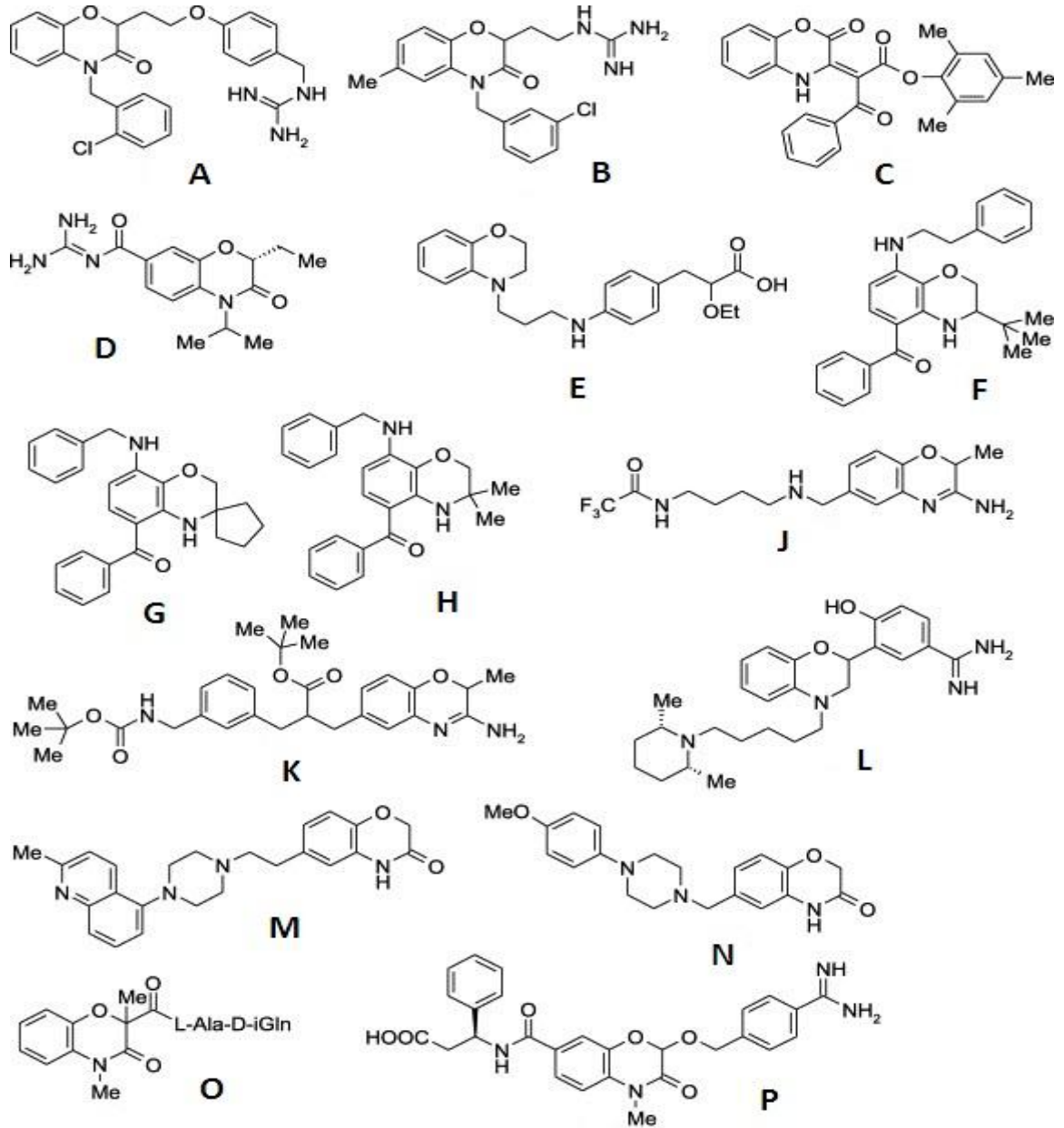
2.1.2. Sentetik Benzoksazin Türevleri ve Biyolojik Aktiviteleri

Benzoksazinler ilk olarak 1944 yılında fenol, primer amin ve formaldehitin Mannich kondensasyonu ile sentezlenmiştir [52]. Benzoksazin halkası içeren bileşiklerin kolayca polimerize olabilmeleri, çok düşük hacimde su absorpsiyonu, çok küçük ölçekte hacimsel değişim gösterebilmeleri, camdan transisyonu yüksek sıcaklıkta gösterebilmeleri, yüksek kimyasal ve termal dayanıklılığa sahip olmaları, gerilme mukavemetine sahip oldukları için esnek yapılı olmaları ve yan ürün salınımı yapmamaları gibi özellikleri nedeniyle özellikle kompozit materyallerde destek yapılar olarak endüstride sıklıkla tercih edilmektedir [53]. Ancak biyolojik olarak aktif bileşiklerin sentezi için uygun iskelet yapısına sahip olmaları nedeniyle sentetik ilaç tasarım çalışmalarında son zamanlarda üzerinde çok çalışılan bileşiklerdir.

Biyolojik olarak aktif yeni bileşiklerin tasarımı için uygun iskeletler olarak sıklıkla çalışılan benzoksazinlerle ilgili literatür taraması yapıldığında, birçok 1,4-benzoksazin ve 1,4-benzoksazin-on yapısını içeren bileşiğin potansiyel yeni ilaçlar olarak ilaç geliştirme basamağında olduğu görülmektedir. Bunlara örnek vermek gerekirse, yeni bir antibakteriyal ajan olarak sentezlenen Şekil 2.5.A [54] ve Şekil 2.5.B'deki [16,17] benzoksazin türevleri bakteriyal histidin protein kinazın

inhibitörüken, 2-okso-1,4-benzoksazin türevi bileşik (Şekil 2.5.C) [18] *Mycobacterium* sp. türlerinin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde ilaç olma potansiyeli taşıdıkları rapor edilmiştir. 1,4-benzoksazin-3-on türevi bileşik (Şekil 2.5.D) [19] kalp, miyokardial nekroz ve aritmi gibi hastalıkların tedavisinde potansiyel ilaç olarak kullanılırken, 1,4-benzoksazin türevi olan bileşik (Şekil 2.5.E) [20] ise peroksizom proliferatör-aktif reseptör α (PPAR α) ve PPAR γ 'nin agonist aktivitesi ile şeker hastalığı, hiperlipidemi ve şeker hastalığına bağlı diğer komplikasyonların tedavisinde kullanılmaktadır.

Araştırmacılar son zamanlarda yeni 8-arilalkilamino-1,4-benzoksazin türevleri olan 3 adet bileşiği (Şekil 2.5.F,G,H) [55] nöroprotektan olarak sunmuşlardır. Bir alman ilaç firması olan Schering ise diğer bir 1,4-benzoksazin türevi olan Şekil 2.5.J (Hoelscher, 2001) ve Şekil 2.5.K'de görülen [24] bileşikler; nörodejeneratif, inflamator, otoimmün ve kardiyovasküler bozuklukların tedavisinde nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörleri olarak potansiyel ilaçlar olarak tanıtmıştır. 1,4-benzoksazinon türevi olan bileşik (Şekil 2.5.L) [23] koagülasyon serin proteaz faktör Xa, trombin ve faktör VIIa'yı inhibe etmektedir. Şekil 2.5.M'de görülen bileşik [56] ise anksiyete ve depresyon tedavisinde potansiyel ilaç olarak kullanılmaktadır. 1,4-benzoksazin-3-on türevi olan bileşik (Şekil 2.5.N) [57] D2 reseptör antagonistik aktivitesi sahiptir ve bu etkisi nedeniyle potansiyel bir antifizyotik ajan olarak kullanılmaktadır. 2-metil-3-okso-3,4-dihidro-2H-1,4 benzoksazin-2-karboksilik asit türevi olan bileşik (Şekil 2.5.O) [58] ise potansiyel bir immünostimülan olarak bulunmuştur. Yapısında karboksilat ve benamidin yan zinciri içeren 2H-1,4 benzoksazin 3(4H)-on türevi bileşikler [12] ise fibrinojen reseptör antagonisti iken Şekil 2.5.P'de görülen bileşik [59] hem trombin inhibitörü hem de fibrinojen reseptör antagonistik etkiye sahip bir antitrombotik bileşik olarak saptanmıştır. Bunların dışında biyolojik olarak aktif pek çok 1,4 benzoksazin türevi bileşik literatüre girmiştir [60-64].



Şekil 2.5. İlaç olma potansiyeli olan 1,4 benzoksazin ve 1,4 benzoksazinon türevli bileşikler [32]

2.1.3. İn Vitro Antikanser Aktivite Gösteren Benzoksazin Türevleri

Benzoksazin halkası içeren heteroksiklik bileşiklerin başta antimikrobiyal etkileri olmak üzere çok sayıda biyolojik aktivitesi yanında antikanser aktivitesi ile ilgili çalışmalara da literatürde sıklıkla rastlanmaktadır [14, 27, 29, 64-68]. Literatür incelendiğinde özellikle 1,4-benzoksazin ve 1,3-benzoksazin halkası içeren bileşiklerle ilgili çalışmaların yoğunlukta olduğu görülmektedir.

1,3-benzoksazin türevleri ile ilgili çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Etkili antikanser bileşikler araştırarak için günümüzde hedef olarak seçilen biyomoleküllerden biri metiyonil-tRNA sentetazdır (MRS). Bu enzim, protein sentezi sırasında metiyoninin aktivasyonunu ve kendilerine özgü tRNA'ya kovalent bağlarla bağlanmasını katalizleyen bir enzimdir. Protein sentezi sırasında başlangıç kodonu metiyoninle başladığı için, kanser hücrelerinde translayonel başlangıcın hedeflenmesi kanser hücresinin büyümesi, çoğalması ve metastaz yapmasını önlemek için düşünülen stratejilerden biridir [69]. Bu amaç doğrultusunda bu enzimin inhibisyonunu gerçekleştirebilecek etkili antikanser ajanlar araştırılmaktadır. Yakın zaman önce, MRS'nin aktivasyonunu inhibe edeceği düşünülerek farklı heterosiklik yapılardan oluşan bir dizi bileşik sentezlenmiştir. Etkili bulunan bileşiklerin çeşitli kanser hücre dizileri (HCT116 ve A549) üzerindeki *in vitro* antikanser potansiyelleri araştırılan bu çalışma sonunda, 1,3-benzoksazin halkası taşıyan bileşiklerin hem insan hem de bakteriyal MRS için aday bileşikler olduğu saptanmış ve 17.7–41.9 μM IC_{50} aralığında antikanser etkileri olduğu rapor edilmiştir [28]. Topoizomera I enzim inhibitör etkisi bilinen ve yapısında 1 tane benzoksazin halkası içeren pentasiklik yapıdaki kamptotesin (CPT) türevleri (topotekan, irrinotekan), klinikte antikanser ilaç olarak kullanılmaktadır. İlaça karşı gelişen direnç veya tedavi sonrası görülen yan etkiler nedeniyle her geçen gün daha etkili türevleri araştırılmaktadır. Bu amaçla son yıllarda yapılan bir çalışmada, heksasiklik kamptotesin türevi bileşikler sentezlendikten sonra 9. ve 10. pozisyonlara ikinci bir 1,3-benzoksazin halkası eklenmiştir. Çift benzoksazin halkası taşıyan bileşikler 9 farklı kanser hücre dizisi (BXPC-3, NCI-446, MCF-7, HEPG-2, A549, A2780, Bel7402, HT-29 ve KB) üzerinde antiproliferatif etkileri açısından incelenmiştir. Çalışma sonucunda benzoksazin halkası sayısı artırılan kamptotesin türevlerinin hem CPT'den hem de rutinde kanser ilacı olarak kullanılan topotekan'dan çok daha etkili (IC_{50} :0.03–17 μM) olduğu rapor edilmiştir [29].

Kanser tedavisi için geliştirilen ilaçların hedeflerinden bir diğeri ise, epidermal büyüme faktör reseptör (EGFR) protein kinazdır. EGFR'nin kinaz aktivitesini inhibe eden ajanlar antitümöral aktivite gösteren bileşikler olarak görülmektedir. Gefitinib ve lapatinib ise küçük hücreli akciğer kanserinin tedavisi için bu tip etkilerinden dolayı sık kullanılan ilaçlardır. Bu tip etki gösteren ilaçlardan daha etkili bileşikler sentezlenmek istenmektedir. Yapılan bir çalışmada bu iki ilacın

analoğu olacak şekilde sentezlenmiş 1,3 benzoksazin-2-on türevi olan bir dizi bileşiğin EGFR tirozin kinazı %19.3- 49.3 oranında inhibe ettiği belirlenmiştir [30].

Antikanser bileşiklerin bir diğer hedefi ise hücre çoğalması, hücre ölümü, hücre hareketi ve hücre invazyonu gibi süreçlerde hücrel sinyal iletiminden sorumlu fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) ailesinin önemli bir üyesi olan DNA bağımlı serin/treonin protein kinazlardır (DNA-PK). Bu enzimler özellikle DNA'da oluşan çift zincir kırıklarının onarımında anahtar bir rol oynar. Birçok kanser türünde tedavi amaçlı kullanılan kemoterapötikler çift zincir kırıkları oluşturarak kanser hücrelerini öldürmeyi hedefler. Fakat bu enzimler sayesinde çift zincir kırıkları onarılır ve ilaca karşı direnç başlar. Bu enzimleri inhibe edebilen ajanlar ile bu direncin azaltılması amaçlanmaktadır. Son yıllarda yapılan bir çalışmada; PI3K ailesine özgü inhibitörler olan kromonlara yapısal benzerlik gösteren 1,3-benzoksazin-4-on türevi bir bileşik (benzoksazin, 2-((3-metoksibut-3-en-2-il)amino)-8metil-4H-benzo[1,3]oksazin-4on (LTUS154)) sentezleyerek DNA-PK'ları ve dolayısıyla kanser hücreindeki DNA onarım mekanizmasını inhibe ederek kanser hücrelerini kemoterapötik ilaçlara karşı daha duyarlı hale getirmeyi amaçlamışlardır. Bunun için yapılan çalışma sonucunda, LTUS154 bileşiğinin kendisi DNA-PK veya PI3K inhibisyonu yapmazken, topoizomera II enziminin zehir etkisi ile inhibe eden ve rutinde de antikanser terapide referans ilaç olarak kullanılan etoposid ile birlikte kullanıldığında sinerjistik etki göstererek HeLa hücrelerinde apoptozun uyarıldığı görülmüştür. Bu etkisinin p38α yolağını aktive ederek yaptığı düşünülmektedir. Ayrıca LTUS154 bileşiğinin kendisi HeLa hücreleri üzerinde anlamlı derecede sitotoksik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir [31].

Son yıllarda 1,3-benzoksazin türevi bir seri bileşiğin *in vitro* antitümör aktivitesi ile ilgili yapılan bir çalışmada, benzoksazin halkasının 3. pozisyonunda flavon grubu içeren bileşiklerin insan göğüs adenokarsinom hücrelerine (MCF7) karşı güçlü sitotoksik etki gösterdikleri (IC₅₀:8.01-17.1 µM) bildirilmiştir [66].

Bir başka çalışmada, 1,3-benzoksazin-4-on türevi diğer bir seri bileşiğin MCF-7 hücre bölünmesini yaklaşık %90 oranda inhibe ettiği rapor edilmiştir. En etkili bileşiklerin 0.89-1.2 µg/ml aralığında IC₅₀ değerleri olduğu görülmüştür [67]. Yakın bir zamanda Rudyanto ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka araştırmada ise, bir dizi 1,3-benzoksazin türevi bileşiğin insan göğüs adenokarsinom hücre

dizisi (MCF-7) üzerinde sitotoksik aktivitelerinin olduğu bulunmuştur (IC₅₀: 21.7-96.9 µg/ml). En iyi aktivitenin ise 6-allil-3-(furan-2-il-metil)-8-metoksi-3,4-dihydro-2H-benzo[e][1,3]oksazin bileşiğinin gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca çalışma sonucunda direkt olarak N atomuna bağlı aromatik grubun aktiviteyi artırdığı rapor edilmiştir [68].

1,4-benzoksazin türevleri ile ilgili çalışmalar ise aşağıda özetlenmiştir.

Cappamensin A (2H-1,4-benzoksazin-3(4H)-on, 6-metoksi-2-metil-4 karbaldehit), *Capparis sikkimensis*'den izole edilmiş ve *in vitro* çalışmalarla tümör hücre replikasyonunun inhibitörü olduğu saptanmış yeni bir 1,4-benzoksazin türevidir. Bu bileşiğin yumurtalık (1A9), akciğer (A549), ileoceal (HCT-8), göğüs (MCF-7), nazofaranjiyal (KB) ve vinkristin dirençli (KB-VIN) insan tümör hücre dizilerine karşı *in vitro*'da önemli antikanser aktivite (IC₅₀:15.1 µM) gösterdiği saptanmıştır [27]. Cappamensin A'dan elde edilen bu sonuçlar, diğer 1,4-benzoksazin türevlerinin potansiyel antitümör ajanları olabileceğini göstermektedir.

Metastatik kanser tedavisinde kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkili bileşikler önemli olsa da, bu tip kanser hastalarında bir diğer hedef ise anjiyogenezi durduran bileşiklerdir. Vasküler endotel hücreleri (VEC) anjiyogenezde önemli bir rol oynar. Bu rolü aynı zamanda embriyogenez ve yaraların iyileşmesi gibi normal fizyolojik süreçler için de önemli olduğu gibi, tümör gelişimini de uyarabilmektedir. Endotel hücrelerde gerçekleşen apoptozunun düzenlenmesi kan damar hastalıkları için terapötik hedeflerdir. Son yıllarda benzoksazin türevi bileşiklerin biyolojik önemi göz önüne alınarak, antianjiyogenezik bileşikler tasarlanmaktadır. Bu tip benzoksazin çalışmalarına bir örnek ise yakın bir zaman içinde Ilıc ve arkadaşlarının sentezlediği 3,4-dihidro-2H-1,4 benzoksazin ve 1,4-benzodioksin türevi bileşiklerdir. Biyolojik aktiviteleri incelendiğinde trombin inhibitör etkisi ile glikoprotein IIb/IIIa (GP IIb/IIIa) antagonistik etkiyi tek bir molekülde içeren bu bileşiklerin endotel hücre göçünü ve *in vitro* tüp oluşumunu inhibe ettiği rapor edilmiş ve bu tip dual etki ile anjiyogenezin durdurulabileceği öne sürülmüştür [33, 60, 61].

Anjiyogenezi hedef alan benzoksazin türevi bileşiklerle yapılan bir başka çalışmada ise, bir dizi 2,3-dihidro-3-hidroksimetil-1,4-benzoksazin türevi bileşiğin insan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) üzerinde apoptotik etki gösterdiği ve

insan akciğer adenokarsinom epitelyum hücrelerinin büyümesini durdurduğu belirlenmiştir. Test edilen bu dizi içerisinde her iki hücre için en etkili bileşiğin 6,8,dikloro-grubu ekli 1,4benzoksazin türevi olduğu ve mikrovezükül oluşumunu indükleyebileceği rapor edilmiştir [70].

P53; hücre büyümesi, sağ kalımı, yaşlanma ve hücre içinde oluşan strese cevap verme gibi çeşitli biyolojik süreçlerde kilit rolü oynar [71]. İnsan kanserlerinin %50'si ise *p53*'den yoksundur [72]. Bu fikirden yola çıkarak yapılan bir çalışmada, 3,4-dihidro-2H-1,4-benzoksazin türevi bir bileşik olan 1,4(6-t-butil-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-3-il) metanol (TBM) bileşiğinin yabancı tip *p53* içeren pulmoner adenokarsinom (A549 ve H460) hücrelerinin çoğalmasını engellediği ve hücre döngüsünü önemli derecede durdurduğu, buna karşılık *p53* gen bölgesi delesyona uğramış akciğer adenokarsinom (H1299) hücrelerine etkisi olmadığını rapor etmişlerdir. *P53*'ün hücre döngüsünün düzenlenme sürecinde çok önemli bir rolü olduğu için, araştırmacılar TBM bileşiği ile muamele edilen hücrelerdeki *p53* protein seviyesinde önemli bir artış olduğunu, bu nedenle *p53* yabancı tip kansinom hücrelerine özgü *p53* bağımlı hücre döngüsü yolağı aracılığı ile bir inhibisyon yapmış olabileceğini belirtmişlerdir. Bunu ise *p53*'ü upregüle ederek yaptığını söylemektedirler. Sonuç olarak, TBM'nin özellikle *p53* ile regüle edilen biyolojik süreçlerde akciğer kanserli hücrelerde büyüme ve hücre döngüsünün araştırılmasında yararlı bir bileşik olabileceğini bildirmişlerdir [73].

Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü'nün (NCA, Bethesda) seçtiği ve 1,4-benzoksazin halkasını içeren bir dizi bileşiğin beyin, meme, kolon, hemotopoietik hücre, böbrek, akciğer, melanosit, ovaryum ve prostat gibi 9 farklı kanser tipine ait 60 farklı hücre dizisini içeren NCI60 paneli ile *in vitro* antikanser aktiviteleri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda test edilen benzoksazin türevlerinin yaklaşık %20-25 oranında küçük hücreli akciğer kanseri (HOP-92), kolon kanseri (HCT-15), prostat (PC-3) ve böbrek kansinom (A498) hücre dizileri üzerinde sitotoksik açıdan seçici olduğu görülmüştür [74].

Beş farklı kanser hücre dizisinin (Glioblastoma (U373-MG), akciğer kanseri (A549), prostat kanseri (PC-3), kolon kanseri (LoVo), göğüs kanseri (MCF-7)) kullanıldığı bir başka çalışmada, yapısında 1,4 benzoksazin halkası taşıyan, klinikte antibiyotik olarak kullanılan levoflaksazin benzeri ve lipofilik etkili bir seri

bileşiğın sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda levofloksazinin *in vitro* antiproliferatif etkisi IC_{50} :70-622 μ M arasında değişirken, test edilen bileşikler arasında en etkili benzoksazin türevlerinin IC_{50} değerleri 0.2 – 2.2 μ M arasında olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada da >100 μ M üzerindeki IC_{50} değerlere sahip olan bileşikleri zayıf sitotoksik olarak bildirmişlerdir [65].

Son zamanlarda yapılan bir başka çalışmada ise, klinik denemeleri süren triazol tabanlı kanser ajanlarının sübstitüe edildiği bir dizi 1,4- benzoksazin türevi bileşiğın servikal (HeLa), pankreatik (MIAPACA), göğüs (MDA-MB-231) ve nöroblastoma (IMR32) kanser hücre dizileri üzerinde önemli derecede (IC_{50} :0.1–2.5 μ M) antiproliferatif etki gösterdikleri rapor edilmiştir [14].

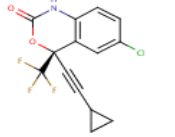
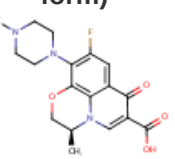
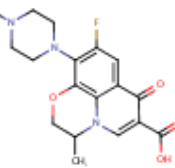
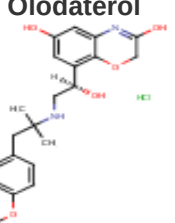
Yine son yıllarda yapılan bir çalışmada ise 2H-1,4-benzoksazin-3-on türevi bileşiklerin iskelet yapısının biyolojik önemi gözetilerek triazoil benzoksazin türevleri sentezlemişler ve bu bileşiklerin farklı insan kanser hücre dizilerinde [servikal kanser (HeLa), kolorektal adenokarsinoma (HT-29) ve overyan adenokarsinom (SKOV-3)] antiproliferatif etkilerini incelediklerinde bu tip bileşiklerin kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiklerini rapor etmişlerdir [64].

2.1.4. FDA Onaylı Benzoksazin Türevi İlaçlar

Benzoksazinler, başlarda bakteri ve funguslardaki toksik etkileri nedeniyle antibakteriyel ve antifungal ilaç olarak kullanılmışlardır. Daha sonraları sentezlenen yeni türevlerinin biyolojik sistemlerdeki çeşitli biyomoleküllerin inhibisyonunu, aktivasyonunu ya da modölasyonunu sağladığı görüldükten sonra farklı hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçlar da sentezlenmiştir.

Uluslararası ilaç bankası (DrugBank) veritabanı incelendiğinde, benzoksazin yapısında toplam 10 tane ilacın olduğu görülmektedir. Bunlardan 4 tanesi ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA)'dan onay almıştır. Bu ilaçlardan anti-HIV etkisi olan Efifrenz ve bir antibiyotik olan Levofloksazin, geliştirilebilecek tipteki ilaçlardandır. Daha onaylanmamış diğer 6 ilacın ise deneme aşamasında olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca bu 10 ilacın 8 tanesi 1,4-benzoksazin halka yapısına sahip olup, pek çoğu 1,4-benzoksazin-3-on yapısındadır [11]. Benzoksazin yapılı ilaçların çeşitli özellikleri Çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

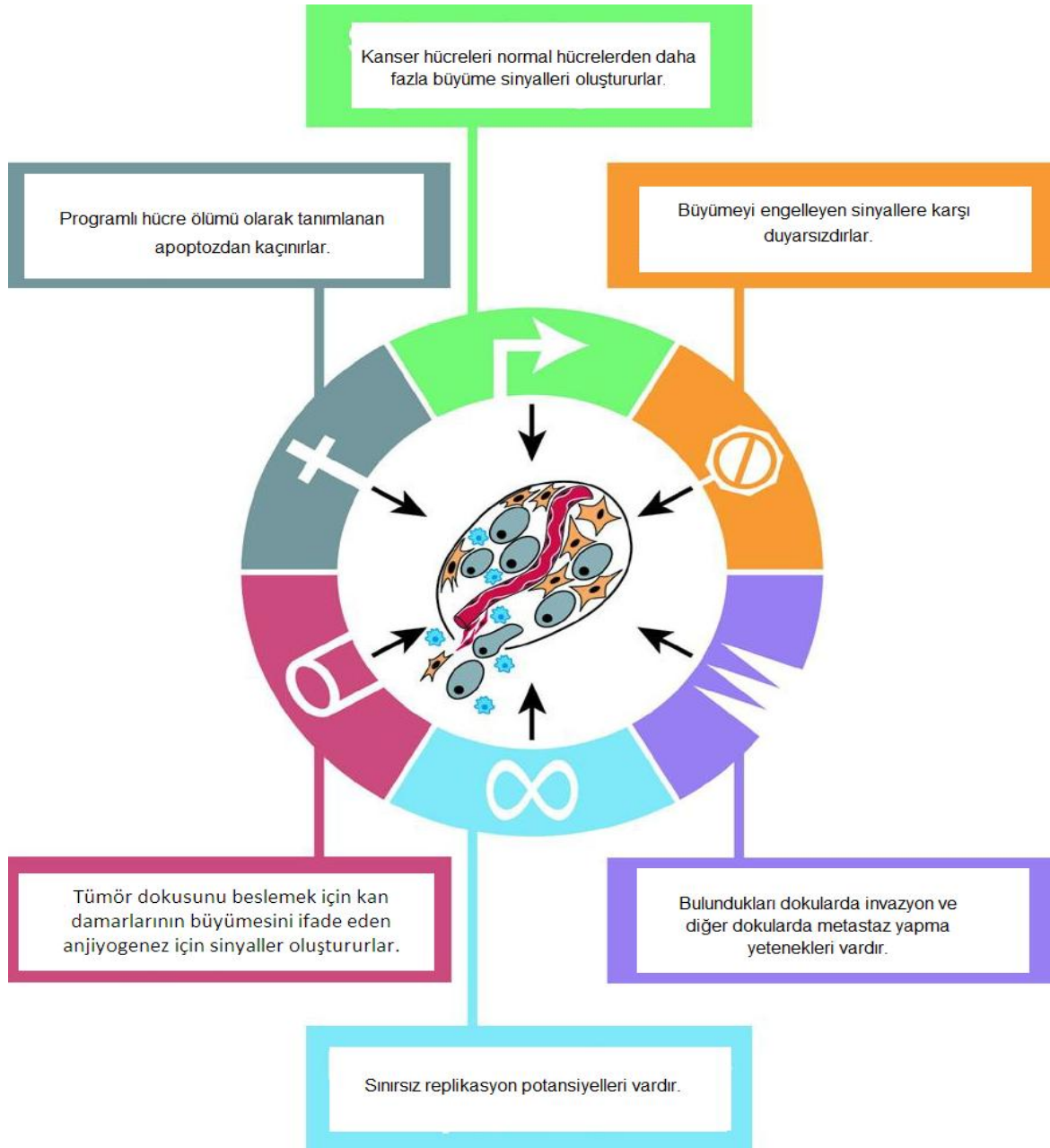
Çizelge 2.1. FDA onaylı 1,4-benzoksazin türevi ilaçlar ve özellikleri [11]

İlaç İsmi	DrugBank No	Grubu	Özellği	Taşıyıcı Proteinleri	Hedefleri	İlişkili Olduğu Enzimler	Ames Test	Genotoksisite /Karsinojenite	Uygulamaları
Efavirenz (Sustiva® Stocrin®) 	DB00625 (APRD00059, DB07709)	Onaylı, (G)	Nükleosit olmayan RT inhibitörü	nt	Reverse Transkriptaz (RT)	CytP450 2B6, 3A4,2C19, 2C9,1A2, 2D6	(-)	(-)	HIV enfeksiyonları (AIDS) için kombinasyonel terapide
Levofloxacin (Ofloxacin s-(-)-form) 	DB01137 (APRD00477, DB06085)	Onaylı, (G)	Sentetik bir fluorokuinolon, Bakteriyal DNA çayraz aktivitesini inhibe ederek replikasyonu durduran antibakteriyel ajan	-MDR1 -SCFM2,4, 6	<i>H. influenzae</i> : DNA gyrase subunit A, DNA topo 4 subunit A <u>İnsan</u> : DNA topo 2α	CytP450-1A2 3A4	nt	nt	Bakteriyel konjunktivitis tedavisinde
Ofloxacin 	DB01165 (APRD00502)	Onaylı	Sentetik bir fluorokuinolon, Bakteriyal DNA çayraz aktivitesini inhibe ederek replikasyonu durduran antibakteriyel ajan.	-SCFM 4,5,6 -MDRAP 1 -CMOAT1	<i>H. influenzae</i> : DNA gyrase subunit A, DNA topo 4 subunit A <u>İnsan</u> : DNA topo 2α	CytP450 1A2	(+)	(-)	Üretral ve servikal gonere ve solunum sistemi, böbrek, deri yumuşak doku enfeksiyonlarının tedavisinde
Olodaterol 	DB09080	Onaylı	Long-acting beta2-adrenerjik(LABA) agonisti	nt	Beta-2 adrenerjik reseptör (agonist)	CytP450 2C9 2C8	nt	nt	Kronik obstrüktif pulmoner hastalığı (COPD) tedavisinde

(G): Geliştirme aşamasında, nt:kayıt yok, MDR: Çoklu ilaç direnç proteini, SCFM:Solute Carrier Family membran proteini, CytP450:Sitokrom P-450, CMOAT: ABCC2 üyesi

2.2. Antikanser Terapi

Kanser, hücrelerin hızlı ve kontrolsüz bir şekilde bölünmesi ile karakterize olan bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Bugüne kadar 200'den fazla farklı çeşidi olduğu rapor edilmiş bu hastalık üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda kanser hücrelerinin Şekil 2.6'da belirtilen 6 karakteristik özelliğe sahip olduğu belirtilmiştir [75]. Daha sonraki yıllarda kanser hücresine ait bu özelliklere, kanser hücrelerinin anormal metabolik yollar bulundurmaları ve immün sistemden kaçabilmeleri olarak belirtilen iki yeni özellik daha eklenmiştir [76].



Şekil 2.6. Kanser hücrelerinin karakteristik özellikleri [75]

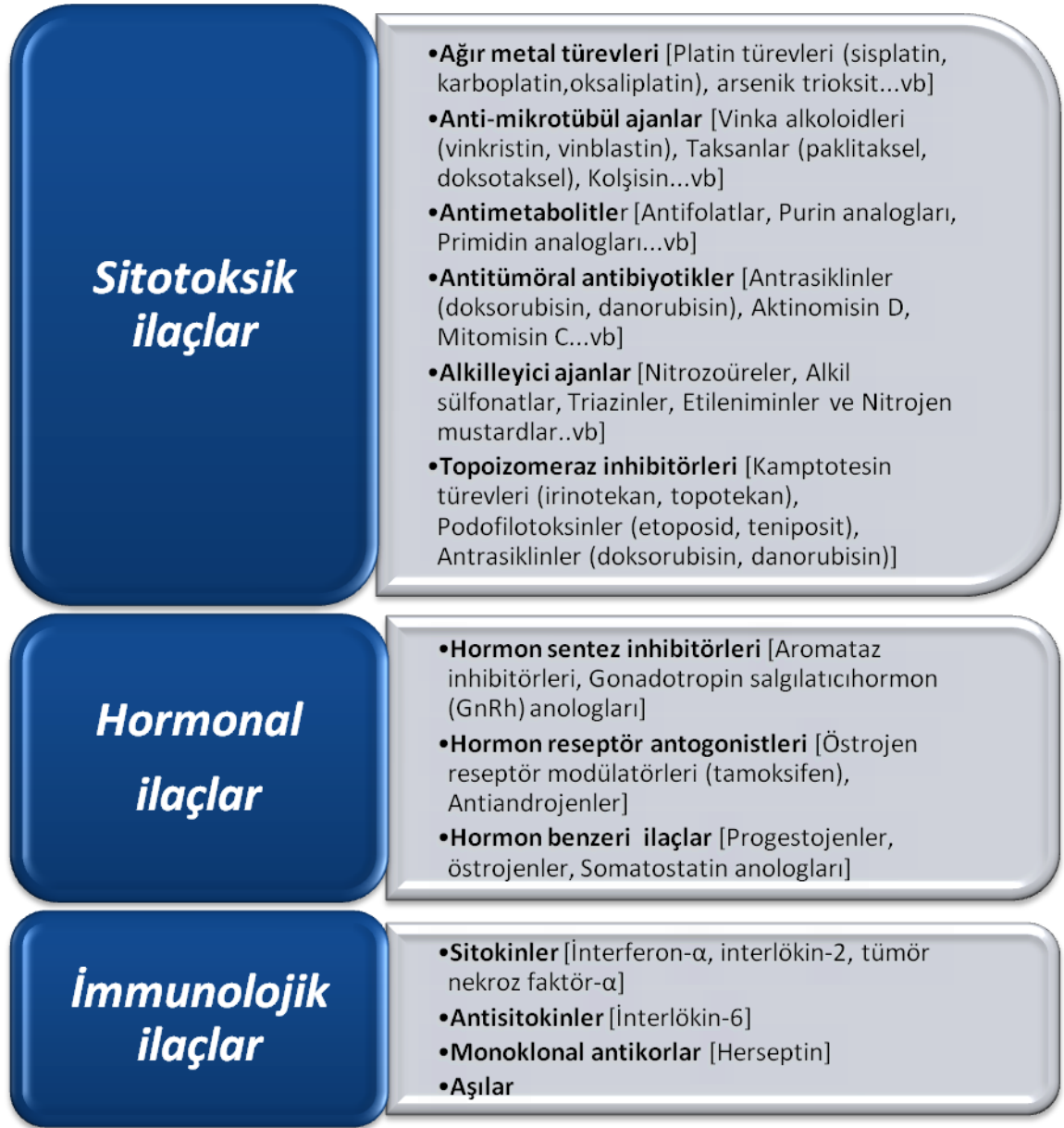
Kanserin başlaması ve ilerlemesinde etkili olan hücresel, genetik ve çevresel faktörler hakkında bilgilerimiz artıkça, bunlarla ilgili mekanizmaları hedefleyen tedaviler ile ilgili çalışmalar bilim adamlarının gözdesi haline gelmiştir. Her yıl gerek araştırmacılar gerek ulusal sağlık örgütleri, gerekse ilaç firmaları kansere yönelik araştırmalar için büyük bütçeler ayırmaktadırlar. Buna rağmen hala kanseri tedavi edecek kesin bir tedavi yöntemi geliştirilememiştir. Bunun en büyük nedeni hastalığın çok faktörlü olması ve hücrelerin tedaviye karşı direnç geliştirmeleridir.

Sebepler ne olursa olsun, nihai sonuç her kanser tipi için kontrolsüz hücre bölünmesi nedeniyle tümör doku oluşması olduğu için cerrahi yöntemle tümörün uzaklaştırılması, radyoterapi ve kemoterapötik ajanlar ile tümör hücrelerinin öldürülmesi ya da dokunun büyümesinin engellenmesi tedavide uygulanan temel seçeneklerdir. Bunun yanında tümör dokunun çevresel faktörlerden etkilenmesi ve sistemik bir hastalık olması araştırmacıları bu temel tedavi yöntemleri yanında destek tedavileri uygulamaya da yönlendirmiştir. Hormonal terapiler ve immün sistemi güçlendirmek için uygulanan tedaviler destek tedaviler kapsamındadır.

Elbette bu denli karmaşık bir hastalığın tedavisinde tek bir yöntemin tamamen yeterli olması söz konusu değildir. Bu nedenle kanserin tipine, hastanın yaşına, hastalığın hangi fazda olduğuna göre tedavi seçeneklerinin kombine bir şekilde akılcı bir yaklaşımla uygulandığı görülmektedir. Bu aşamada, tedaviden önce hastalığın teşhisi ve genotipik özelliklerinin iyi bir şekilde tanımlanmış olması büyük önem taşımaktadır [10, 77].

2.3. Antikanser Terapide Kullanılan İlaçlar

Kanser terapisinde kullanılan ilaçlar, sitotoksik ilaçlar, hormonal ilaçlar ve immünolojik ilaçlar olmak üzere üç sınıfta incelenebilir. Antikanser terapide kullanılan ilaç sınıfları Şekil 2.7’de özetlenmiştir.

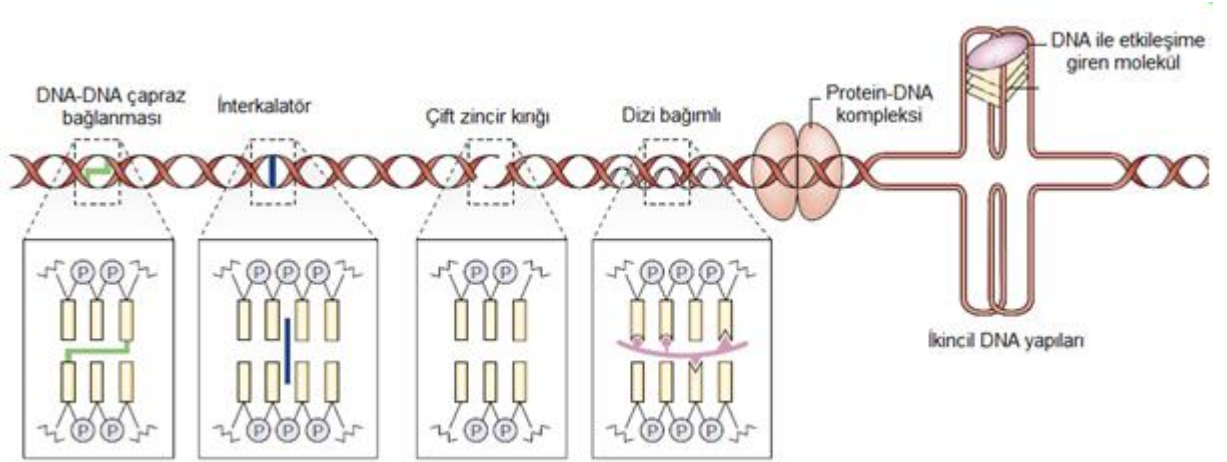


Şekil 2.7. Antikanser terapide kullanılan ilaçlar

2.3.1. Sitotoksik İlaçlar

Sitotoksik ilaçlar genel olarak kanser hücresinde DNA sentezini önleyen ve/veya kanser hücre DNA'sında hasara neden olan genotoksik ajanları ifade etmektedir. Kansere yönelik klasik kemoterapide kullanılan bu ajanlar kanser hücrelerinin öldürülmesi ya da büyümesinin durdurulmasını amaçlamaktadır. DNA ile etkileşim kuran bu ajanların hem kovalent bağlanmalar hem de zayıf etkileşimleri kullandıkları görülmektedir. (Şekil 2.8) Sisplatin, mitomisin C gibi bazı ilaçlar DNA-DNA çapraz bağlanmalarına neden olabilirler [78]. Aynı zincirde oluşan çapraz bağlanmalar nükleotid kesip çıkarma onarım sistemlerince tanınır

uzaklaştırılabilirken, zincirler arası oluşan lezyonlar replikasyon ve transkripsiyon gibi süreçleri engellerler ve hücreyi ölüme götürürler [79]. Özellikle topoizomerez inhibitörleri gibi ajanlar ise DNA ile interkalasyon yaparak etkilerini gösterirler [9, 80]. İnterkalasyon, genel olarak düzlemsel aromatik yapıların DNA'nın ardışık baz çiftlerinin arasına, sarmalın eksenine dikey olarak girmesiyle gerçekleşen geri dönüşümlü bir olay olarak tanımlanmaktadır [9]. DNA ile bağlanma sonucu temel olarak meydana gelen sterik engel DNA'nın konformasyonunda değişikliklere neden olmaktadır. Bu değişiklikler DNA omurgasının uzaması, sarmal yapısında eğilme ve açılma şeklindedir. Dolayısıyla etkisinin DNA ile ilişki kuran moleküllerin fonksiyonlarını engellemek olduğu söylenebilir. Bu nedenle DNA ile ilgili replikasyon, transkripsiyon, rekombinasyon, onarım gibi temel süreçleri baskılayarak hücreyi öldürmektedirler. Bununla birlikte bazı ilaçların DNA'nın küçük veya büyük oluşuna (dizi bağımlılar), bazılarının da DNA'daki özgül ikincil yapıya bağlanarak etki gösterdikleri bilinmektedir. Bunlar da çapraz bağlayıcılar ve interkalasyon ajanları gibi DNA ile etkileşen moleküllerin aktivitesini engelleyerek hücreyi ölüme götürebilmektedirler [9,81, 82].



Sekil 2.8. Sitotoksik ilaçların DNA ile etkileşimleri [9]

Sitotoksik ilaçların kullanımı 1900'lü yılların başında arsenik gibi toksik kimyasallar ile başlamıştır. Ancak zamanla kanser hücresine özgül olmayan bu ilaçların yerine normal hücrelere daha az zarar verecek ajanlar bulunması için çalışmalar devam etmiştir. Özellikle kanser oluşumu ve gelişimi ile ilgili bilgilerimiz arttıkça bu ilaçların zaman içerisinde daha da çeşitlendiğini görmekteyiz. Ancak yine de kanser hücrelerine özgüllük problemi aşılabilmiş değildir. Hedef aldığı mekanizma

hücre büyümesi ve gelişmesi olduğu için replikasyon sırasında aktif olan bu bileşiklerin kanser hücreleri gibi hızlı bölünen hücrelere bir miktar seçiciliği bulunmasına karşın kan, kıl folikülleri, bağırsak epitelisi gibi sürekli kendini yenileyen dokulara ait hücrelerde de etkili olması kullanımlarını kısıtlayan en önemli faktördür. Buna karşın hala kanser terapisinde en çok başvurulan yollardan biri sitotoksik kemoterapötiklerin kullanımıdır. Bunun en büyük nedeni radyoterapi ve cerrahi yöntemlerin her kanser tipi için olumlu sonuçlar vermemesi yanında yeni nesil hedeflenmiş terapilerin kullanımlarındaki kısıtlılıklardır. Bu nedenle diğer yöntemler ve destekleyici tedaviler ile birlikte sitotoksik ajanların kombine bir şekilde kullanımı yaygındır. Bu şekilde kanser hücrelerinin çok yönlü hedeflenmesiyle sitotoksik ajanların dozları düşürülerek yan etkilerinin azaltılması mümkündür [77].

Ağır metal türevleri: Barnett Rosenberg [83] tarafından 1969 yılında sisplatinin kemoterapötik bir ajan olarak kullanımı metal bazlı bileşikler yeni bir antikanser ajan grubu olarak ortaya çıkarmıştır. Bu tarihten sonra araştırmacılar sisplatin benzeri platin ve diğer ağır metaller içeren bileşikler ile ilgili çalışmalara yönelmişlerdir. Platin bazlı ilaçlar hücreye girdikten sonra DNA ile bağlanabilen aktif formlarına dönüştürülür. DNA'da zincir-içi ve zincirler-arası çapraz bağlanmalara neden olur ve DNA, RNA ve protein sentezinin inhibe olmasıyla sonuçlanır. Sisplatinin yan etkilerinin çok oluşu, etki ettikleri kanser tiplerinin sınırlı olması, toksisitesinin yüksek olması ve sisplatine karşı gelişen direnç mekanizmaları ilacın kullanımını kısıtlamaktadır. Bu kısıtlamaları ortadan kaldırmaya yönelik yeni sisplatin türevleri sentezlenerek antikanser etkileri araştırılmaktadır. Örneğin suda çözünürlüğü sisplatinden daha yüksek olan karboplatinin toksik etkilerinin daha az olduğu görülmüştür. Yan etkilerine rağmen tedavide olumlu sonuçlar alınması ve kararlılığı nedeniyle günümüzde çok sayıda yeni platin bazlı ön ilaçların sentezi devam etmektedir [84,85]. Bunun yanında altın, titanyum, arsenik, demir, rutenyum ve osmiyum gibi diğer ağır metallerin kullanıldığı ilaçlar üzerindeki çalışmalar devam etmektedir. Örneğin 2000 yılında akut promyelositik lösemilerde arsenik trioksit kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır [86].

Anti-mikrotübül ajanlar: Mikrotübüller hücre iskeletinin temel bileşenleridir ve hücre bölünmesi, hareketi gibi önemli hücresel faaliyetlerde işe karışırlar. Uzun yıllardır mikrotübüllere bağlanan ajanların antikanser özellikleri bilinmektedir. Bu ilaçların en büyük avantajı çok sayıda farklı kanser tipinde kullanılabilmesidir. Mikrotübüllere bağlanarak mitotik ipliklerin oluşmasını engelleyen bu ajanlar temel olarak hücre bölünmesini G2/M fazında durduran mitotik zehirlerdir. Bunlar mikrotübülleri stabilize eden ve destabilize edenler olarak 2 grupta incelenirler. β -tübülün alt ünitelere bağlanarak mikrotübülleri stabilize eden ajanlar mikrotübül yapımını engelledikleri için, mikrotübüllerin çeperlerine tutunarak onları destabilize edenler ise, mikrotübül yıkımı ile ilgili dinamikleri bozduğu için hücre döngüsünü mitoz aşamasında durdurup hücreyi ölüme sevk ederler. Mikrotübülleri stabilize eden gruptan en iyi bilinenlerden biri taksanlar grubunda bulunan ve farklı tipte kanserlerde kullanılan paklitaksel 1992 yılında FDA tarafından onaylanmıştır. Yine monoterapide kullanılmak üzere 2006 yılında FDA onayı almış kolşisin, hücre bölünmesini inhibe etmektedir. Vinka alkaloidleri ise mikrotübülleri destabilize eden grupta yer alırlar. Bu gruptan vinkristin 1960'lı yıllarda FDA onayı almıştır [87].

Antimetabolitler: Kanser terapilerinde doğal nükleositler, amnioasitler, vitaminler gibi doğal metabolitlerin yapısal analogları olan antimetabolitler de temel bir grubu oluşturmaktadır. Bu bileşikler içinde DNA'daki bazların yapısal analogları ve folat metabolizmasını etkileyen ajanlar en çok kullanılanlardır. Bunlar antifolatlar, antiprimidinler ve antipurinler olarak 3 sınıfta incelenebilmektedirler. Etkilerini hücre döngüsünün S fazına özgül olarak gösterirler. 5-fluorodeoksiuridin kolorektal kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan bir timidilat sentaz inhibitörüdür. Bu enzimin inhibe olması sonucu hücrede dTTP açlığı ortaya çıkar ve hücre döngüsü S fazında durdurularak apoptotik yollarla hücre ölümü gerçekleşir [88]. Bir pürin analogu olan 6-thioG 1953 yılında FDA onayı ile çocuklarda ALL tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Bu analog vücuda girdikten sonra hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz (HGPRT) enzimi ile metabolize edilir. Oluşan toksik metabolit de DNA'nın yapısına katıldıktan sonra kardeş kromatid değişimi, zincir kırıkları, çapraz bağlanmalar gibi DNA hasarlarına neden olduğu için replikasyonu durdurur [89]. Bir demetilasyon ajanı olarak bilinen sitozin analogu 5-Aza-C de bazı kanserlerde ortaya çıkan hipermetilasyonu geriye döndürmek için kemoterapötik ajan olarak kullanılan bir antimetabolittir. 5-Aza-C DNA

metiltransferaz (DNMT) enzimini inhibe ederek hücrede çeşitli genlerde metilasyon düzeyini değiştirdiği için hücresel birçok yolağı etkileyerek genom instabilitesine neden olmaktadır [90].

Antitümoral antibiyotikler: Bu ajanlar mikroorganizmalardan doğal olarak elde edilirler ve etkilerini değişik yollarla nükleik asit sentezini ve DNA metabolizmasını inhibe ederek gösterirler. Doxorubicin, daunorubicin gibi antrasiklinler DNA'ya interkale olarak topoizomeraaz II enzimlerinin aktivitesini engelleyici etki yaparlar. Bu durumda DNA'da oluşan zincir kırıkları genomik karasızlığa neden olur. Actinomycin D antibiyotiği DNA'ya sitozin ve guanin bazları arasından interkale olur ve transkripsiyonu bloklar. Mitomycin C ise DNA'da çapraz bağlanmalara neden olarak replikasyonu bloklar. Tüm bu olaylar sonucu hücrede genomik bütünlük bozulacağı için sonuç olarak hücre ölüme gider [85].

Alkilleyici ajanlar: Kemoterapide sıklıkla kullanılan en eski ajanlardan biridir. Kanser terapilerinde ilk olarak kullanımı 1940'lı yıllara rastlamaktadır. DNA'daki bazlara alkil grupları takabilen bileşikler olarak etki mekanizmaları oldukça karakteristiktir. Etkilerini genel olarak DNA zincirinde çapraz bağlanmalar ve hücresel onarım sonrasında zincir kırıkları yaparak gösterirler. DNA 'da mutasyonlara neden olarak hücresel tamir yolaklarını harekete geçiren sonuçta da replikasyon ve transkripsiyon gibi temel süreçleri etkileyerek kanser hücrelerini ölüme götüren ajanlardır. Hücreler üzerindeki öldürücü etkisini 3 yolla gösterirler. İlkinde DNA bazına alkil grubu takılması o bölgede DNA tamir enzimlerinin neden olduğu DNA fragmentasyonu ile sonuçlanır. İkinci yolda iki DNA bazı arasında çapraz bağlanma söz konusudur. Bu durumda DNA zincirleri açılmadığından replikasyon ve transkripsiyon önlenmiş olur. Üçüncü yolda ise DNA bazlarında meydana gelen mutasyonlar sonucu gerçekleşen yanlış eşleşmeler nedeniyle bu bölgelerdeki genlerin aktivitesinde değişiklikler meydana gelir. Bunlar hem sağlıklı hem de kanser hücrelerini etkilerler. Etkilerini hücre döngüsünün tüm fazlarında gösterdikleri için çok çeşitli kanser tipleri için kullanılabilir. Ancak özellikle solid tümörler ve lösemi gibi yavaş ilerleyen tümörlerde daha etkili oldukları bilinmektedir. Alkilleyici ajanların kullanımını kısıtlayan en önemli faktör ise ikincil tümörlerin oluşumunu tetikleyebilmeleridir. Alkilleyici ajanlar nitrozoüreler, alkil sulfonatlar, triazinler, etileniminler ve nitrojen mustardlar olarak farklı grupları

bulunmaktadır [91]. Siklolofofamid, ifosfamid, melphalan ve klorambusil gibi ilaçlar antikanser ajan olarak kullanılan alkilleyici ajanlara örnek olarak verilebilir.

Topoizomeraz inhibitörleri: Antikanser tedavide kullanılan sitotoksik ajanların moleküler hedeflerinden birisi de DNA metabolizmasında görev alan topoizomeraz I ve II enzimleridir. Bu enzimler replikasyon, transkripsiyon, rekombinasyon ve kromozom yoğunlaşması gibi hücresel süreçlerde; süper sarmal yapıdaki DNA'nın gevşetilmesi, veya gevşek (relaks) haldeki DNA'nın yeniden süper sarmal hale döndürülmesi gibi topolojik değişimleri yürütürler. Topoizomeraz enzimleri; katalitik aktivitesi ile DNA zincirinde geçici bir kırık oluşturup, kırılmamış zinciri kırık zincir içerisinden geçirilmesini sağladıktan sonra, ligaz aktivitesi ile kırık uçları tekrar bağlayarak fonksiyonlarını yerine getirirler. Topoizomeraz I enzimleri DNA'da geçici tek zincir kırıkları oluştururken, topoizomeraz II'ler çift zincir kırığı oluştururlar [92,93].

Hızlı bölünen kanser hücrelerinde normal hücrelere göre daha çok ifade olan bu enzimlerin katalitik aktivitesinin veya ligaz aktivitesinin inhibisyonu kanser hücrelerinin büyüme ve bölünmesini durdurabileceği düşüncesi, bu enzimleri antikanser ajanların hedefleri haline getirmiştir. Topoizomeraz enzim aktivitesini DNA ya da proteine bağlanarak engelleyen moleküller “katalitik inhibitörler”, enzim zincirde kırık oluşturduktan sonra DNA-enzim kompleksine bağlanarak enzimin yeniden birleştirme aktivitesini engelleyen moleküller ise “topoizomeraz zehirleri” olarak bilinmektedir [80]. Zehir etkili antineoplastik ajanlar, replikasyon esnasında tek zincir kırıklarını çift zincir kırıklarına döndürebildikleri için rutinde katalitik inhibitörlere göre daha sık tercih edilmektedirler. Klinikte pek çok kanserin tedavisinde kullanılan kamptotesin türevleri (irinotekan, topotekan) topoizomeraz I'i [94], podofilotoksin (etoposid, teniposid) ve antrasiklin (doksorobusin, daunorubisin, epirubusin) türevleri ise topoizomeraz II'yi hedef alan zehir etkili topoizomeraz inhibitörleridir [95].

2.3.2. Hormonal ilaçlar

Hormonlar, salgı bezlerinden salınıp farklı dokulardaki hücrelerin büyümesi, gelişimi ve bölünmesi ile ilgili süreçleri yöneten sinyal molekülleridir. Hormonlar, sinyal iletimini hücre membranındaki veya hücre içindeki reseptörlere bağlanarak yaparlar. Steroid (östrojen, progesteron) ve kortikosteroid hormonlar gibi bazı

hormonlar da DNA ile bağlanma bölgeleri içeren transkripsiyon faktörleridir. Bu nedenle kanser hücrelerinde özellikle büyüme ile ilgili sinyalleri ileten moleküller olarak aktiviteleri önemlidir. Sinyal iletiminde hormonları kullanan meme, prostat, endometriyum ve adrenal korteks gibi dokularda özgül hormonlar ya da hormon reseptörlerinin hedef alındığı terapiler hormonal terapiler olarak bilinmektedir. Aromataz inhibitörleri, gonadotropin uyarıcı hormon analogları gibi hormon sentezini inhibe eden ajanlar ve östrojen ve androjen reseptör modülatörleri gibi reseptör antagonistleri hormonal sinyalin iletilmesini önleyerek kanser hücresinde gelişmeyi engellerken, bazı durumlarda hormonlar direkt olarak uygulandığında etki gösterdiği de görülmektedir. Hormonal terapide en iyi bilinen ilaçlardan biri östrojen reseptör pozitif [ER (+)] meme kanserlerinde kullanılan FDA onaylı bir ilaç olan östrojen reseptör antagonisti tamoksifen'dir [6, 96] .

2.3.3. İmmünolojik İlaçlar

İmmün sistem vücuda yabancı organizmalar ya da faktörlere karşı korumada görevli olduğu kadar, normal olmayan vücut hücreleri olan kanser hücrelerine karşı da faaliyet gösterir. Bu nedenle kanser gelişiminde immün sistem elemanları büyük önem taşır. Ancak kanser hücrelerinin de immün sistemi baskılayarak ya da yüzey reseptörlerini değiştirerek bu faaliyetlerden kaçtığı gözlenmiştir. Bu nedenle immün sistemi hedef alan antikanser terapiler özellikle diğer tedavi yöntemlerinin etkinliğini artırmada kullanılan bir seçenek olarak gündeme gelmiştir [97].

İlk immünolojik ilaçlar büyüme faktörleri ve interlökinleri içeren sitokinlerdir. İnterferon- α , interlökin-2, tümör nekroz faktör- α sitokinleri FDA tarafından onaylanan ve özellikle çeşitli solid tümörler için kullanılan ilaçlardır. Tam tersi bazı sitokinlerin fazlalığının da immün sistemi baskıladığı bilinmektedir. Bu durumda bu sitokinleri hedef alan anti-sitokinlerin kullanıldığı tedaviler de vardır. Örneğin kolorektal kanserlerde bir tümör başlatıcı faktör olarak bilinen interlökin-6 (IL6) sitokinine karşı anti-IL6 tedavisi uygulanmaktadır [77].

Sitokinlerin kullanımı yanında monoklonal antikorların da immünolojik terapide önemli bir yeri vardır. Bunlar kanser hücrelerini immün sisteme yönlendirmek ve kanser hücrelerinin hızlı büyüme potansiyellerini önlemek amacıyla kullanılırlar. Büyüme faktörlerinin ve reseptörlerinin bazı kanserlerde oldukça yüksek seviyede ifade edildiği bilindiğinden, bunlara karşı geliştirilen monoklonal antikorlar

tedavide umut verici olmuştur. Örneğin meme kanseri hastalarının %20-30'unda insan epidermal büyüme faktör reseptör-2 (HER-2) ifadesi oldukça fazladır. Bu tip kanserlerin tedavisinde FDA tarafından onaylanan bir monoklonal antikör olan herseptin kullanılmaktadır. Yine kanser aşısı olarak bilinen aşının kullanımı da immünolojik terapi yöntemlerinden biridir. Bu aşılar ya hastalık oluşmadan koruyucu amaçla ya da hastalığın oluşumundan sonra tedavi amacıyla kullanılabilirler. Servikal ve hepatoselüler kanserler gibi bazı kanser tiplerinde virüslerin rolünün önemi bilinmektedir. Bu kanserlerin önlenmesi için virüsler ile vücut tanışmadan uygulanan aşılar immün sistemin uyarılması için önemlidir. Tedavi amacıyla kullanılan aşılar ise özellikle hastalığın tekrar etmemesi için uygulanır; ancak bu çalışmalar çok yenidir ve henüz tam olarak aktif bir uygulaması bulunmamaktadır [77, 97].

2.4. İlaçların Metabolize Edilmesi (Biyotransformasyon)

Bütün organizmalar biyolojik işlevi olan moleküller dışındaki kimyasal maddelerin hepsini vücuttan uzaklaştırma eğilimindedir. Memelilerde kimyasallar vücut içerisine ağız, deri, solunum ve enjeksiyon gibi yollarla girip, pek çok organ ve dokuya ulaşmakta ve bazı durumlarda kimyasalın özelliğine, dozuna ve bulunduğu dokuya bağlı olarak organizmada toksisiteye neden olabilmektedir [98, 99].

Bir kimyasal maddenin öncelikle biyolojik membran sistemlerini geçip, kan dolaşımı ile vücutta dağılarak etki yerine ulaşması gerekmektedir. Bu dağılım oldukça hızlı olmasına rağmen, kimyasalın membran sistemleri geçebilme yeteneğine ve vücut bileşenlerine ilgisine bağlı olarak da dağılım hızı değişmektedir. Düşük moleküler ağırlıklı, suda iyi çözünen polar moleküller ve iyonlar vücut sıvılarında kolaylıkla dağılıp, membrandan filtrasyon ile geçerken, bazı kimyasallar membran sistemlerini geçemezler. Yağda çözünen nötr moleküller membran lipitleri arasından kolaylaştırılmış difüzyon yolu ile membranı geçerken, büyük moleküler ağırlıklı polar moleküller ise ancak aktif taşıma ile biyolojik membranları geçerler [100]. Kimyasal maddeler; molekül büyüklüğü ve yağda çözünbilme özelliklerine göre de vücut içindeki dağılımları sırasında vücudun belirli bölgelerinde birikebilirler. Toksik madde birikimi genellikle karaciğer ve böbrekte gözlenmektedir.

Yağda çözünen bir kimyasalın vücut sıvıları ile atılabilmesi için çeşitli enzimlerin katalitik etkisi ile metabolitlere dönüştürülmesi gerekmektedir. Metabolitler, orijinal kimyasal maddeye göre suda daha iyi çözünürler ve organizmadan daha rahat uzaklaştırılırlar. Absorbsiyon ve dağılıma uğrayan polar yapıdaki maddeler ya da metabolize edilme sonucu polar hale çevrilen maddeler, çeşitli yollarla organizmadan atılır. En önemli atılım yollarından biri böbreklerdir. Bunun yanı sıra bazı toksik maddeler safra yoluyla, bazıları akciğerden solunum yoluyla atılırken bazıları ise tükürük, ter ve gözyaşı gibi çeşitli vücut sıvıları ile dışarı atılır [98, 100].

Biyotransformasyon sonucu biyolojik olarak aktif olan bir ilaç inaktif bir metabolite dönüştürüldüğü gibi, inaktif formdaki bir ön ilaç (prodrug) ise aktif bir formuna dönüştürülebilmektedir [101].

İlaçların biyotransformasyonu genellikle özgül olan kompleks enzimlerle gerçekleştirilir. Bu enzimlerin büyük bir kısmı karaciğer başta olmak üzere akciğer, bağırsak, böbrek, beyin ve deride yerleşmiştir [102]. Vücut sıvılarına dağılan ilaç, dolaşım sistemi ile doğrudan karaciğere taşındığı için biyotransformasyonu gerçekleştiren kompleks enzim sistemleri bu organda daha aktif olarak çalışmaktadır.

Metabolizma reaksiyonları ilaçların enzimatik olarak uğradığı kimyasal değişimlerin türüne göre üç gruba ayrılır. Bunlardan birincisi; ilacın oksidasyon, redüksiyon ve hidrolitik reaksiyonları ile daha polar bir metabolite dönüştürülmesini sağlayan 1. faz, ikincisi ise konjugasyon enzimleri ile ilaçlara polar yapıların bağlanmasını kapsayan 2.faz reaksiyonlarıdır (Çizelge 2.2). Üçüncü metabolizma reaksiyonları ise 2.faz reaksiyonları sonucu oluşan konjugatlara, membrandaki taşıyıcı proteinler için afinitesini artıran anyonik grupların takıldığı 3. faz reaksiyonlarıdır [103].

Çizelge 2.2. Biyotransformasyon tepkimeleri ve değişime uğratılan fonksiyonel gruplar

FAZ I TEPKİMELERİ		FAZ II TEPKİMELERİ
Yükseltgenme	Değişime Uğrayan Fonksiyonel Gruplar	
	Aromatik, alifatik, heterosiklik alisiklik hidroksilasyon	Glutasyon konjugasyonu
	Azotun ve kükürtün yükseltgenmesi	Glukuronik asit konjugasyonu
	N-hidroksilasyon	Sülfat konjugasyonu
	N-,S-, O-dealkilasyon	Amino asit konjugasyonu
İndirgenme	Desülfürasyon	Asetilasyon
	Deaminasyon	Metilasyon
Hidroliz	Azo, nitro, diazo, karbonil, disülfür, sülfoksit ve alken	
Hidroliz	Ester, amid, hidrazid, karbomat	
Hidrasyon	Alken ve aren	

I.Faz reaksiyonları ile yapıya –OH, -NH₂, -COOH, -SH gibi polar fonksiyonel gruplar sokulur ve böylece farmakolojik aktivitede azalma (deaktivasyon), artma (aktivasyon) ve toksisite de artma (intoksikasyon) meydana gelebilir. Bir ilaçta bu tip yapı değişikliğine neden olan tepkimelerin önemli bir kısmını indirgenme-yükseltgenme tepkimeleri oluşturmakta ve bu tepkimeler çeşitli enzimler tarafından katalizlenmektedir. Biyotransformasyonun I.fazında önemli bir yer tutan yükseltgenme olaylarını özgül mikrozomal enzimler gerçekleştirmektedir. Bu mikrozomal enzimlerden hücre içinde başta düz endoplazmik retikulum mebranı (mikrozom), mitokondri ve sitozolde yerleşmiş karma fonksiyonlu oksidazların bir üyesi olan sitokrom P-450 (CYP450) monooksijenazlar, biyotransformasyon katalizlenmesinde önemli bir rol oynarlar [99, 100]. CYP450 indirgenmiş durumdayken, [CYP450 (Fe⁺⁺)] karbonmonoksit (CO) ile oluşturduğu kompleks 450 nm dalgaboyundaki ışıkta maksimum absorpsiyon gösterdiği için, bu enzimlere CYP450 adı verilmiştir. Bu enzim sistemi; NADPH-sitokrom c redüktaz (NADPH-CYP450 redüktaz), hem grubu içeren CYP450 ve fosfolipit bileşenlerinden meydana gelmektedir. İndüklenebilir tipteki bu enzim sistemi, yükseltgenme tepkimeleri esnasında NADPH, moleküler oksijen (O₂) ve Mg⁺² iyonuna gereksinim duyar. Sübstratın yükseltgenmesi sırasında moleküler oksijenin bir atomu sübstratı yükseltgerken (SOH), diğer oksijen atomu ise suya

indirgenir. O₂'nin tek bir atomunu kullanarak sübstratı yükseltgedikleri için bu enzimler CYP450 monooksijenazlar olarak adlandırılmaktadırlar [7, 99, 100].

I. faz tepkimlerinde yükseltgenme reaksiyonlarını katalizleyen mikrozomal olmayan enzimler ise alkol ve aldehit dehidrogenazlardır. Ayrıca nitro, diazo, karbonil, disülfür, sülfoksit gibi fonksiyonel grupların indirgenmesi, ester, hidrazit, amid veya sübstitüe fosfat ester bağlarını taşıyan moleküllerin hidrolizi; bazı alken ve aren bileşiklerin hidrasyonu da I. faz taşımada gerçekleşen tepkimlerdendir [99,100, 103].

Biyotransformasyondaki genel amaç ilacın suda çözünürlüğünün artırılması ile vücuttan atılımının kolaylaştırılmasıdır. Ancak I.faz tepkimleri sonunda oluşan metabolitler biyolojik olarak aktif olan elektrofilik, nükleofilik ya da serbest radikal yapısındaki moleküllerdir. Biyolojik olarak aktif yapıdaki bu moleküller; hücredeki biyomoleküllere (DNA, RNA, protein, lipit) atak yaparak, bunların yapısını değiştirerek çeşitli hasarlara (lipit peroksidasyonu, DNA hasarları) neden olabilmektedirler [99, 100].

Konjugasyon reaksiyonları olarak bilinen II.faz tepkimleri ile de ilaca glutatyon, amino asit, sülfat gibi polar endojen moleküller eklenerek suda daha iyi çözünmesi, vucüttan daha hızlı temizlenmesi ve daha az toksik etki göstermesi sağlanmış olur. Bu mekanizma yüksek enerjili ara ürünlerin değişimini kapsamaktadır; ya sübstrat ya da endojen metabolit yüksek enerjili bir türevine aktive edilmektedir [99, 103].

2.faz reaksiyonlarından sonra ksenobiyotik konjugatların, membranda bulunan taşıyıcı proteinler ile tanınıp uzaklaştırılması için 3. faz reaksiyonları ile yeniden metabolize edilebileceği bilinmektedir. 3.faz tepkimelerinin en iyi bilinen örneği glutatyon konjugatlarının asetil sisteine (merkaptürik asit) dönüştürülmesidir. Bu fazda, glutatyon molekülünde bulunan γ -glutamat ve glisin amino asitleri γ -glutamil transpeptidaz ve dipeptidaz enzimleri tarafından uzaklaştırıldıktan sonra sistein amino asidi asetillenir. Böylece, konjugatlarda oluşturulan anyonik gruplar sayesinde dışarı atılacak kimyasal maddelerin taşıyıcı proteinlere afinitesi artırılmış olur [103].

2.4.1. *In Vitro* Test Sistemlerinde Metabolik Aktivasyon

İlaç metabolizmasındaki asıl amaç detoksifikasyon olmasına karşın, ön ilaçlar metabolize olduktan sonra aktivite kazanarak etkisini göstermektedir. Bunun yanı sıra çoğu ilacın; biyotransformasyonun 1. fazında oluşan metabolitleri genellikle elektrofilik hale dönüştüğünden DNA gibi makromoleküllere bağlanma eğilimi göstermektedir. Dolayısı ile metabolik aktivasyon sistemi içermeyen *in vitro* test sistemlerinde gerek ön ilacın etkisini, gerekse aktif metabolitin zararlı etkisini inceleyebilmek için yaygın olarak memeli metabolizmasının önemli elementleri (mikrozomal enzimler ve kofaktörleri) dışarıdan sağlanmaktadır [101,104].

In vitro test sistemlerinde en yaygın kullanılan metabolik aktivasyon sistemi karaciğer homejenatının 9000xg'de santrifüj edilmesi ile elde edilen süpernatant (S9) fraksiyonudur. Bu karışım, kimyasalları hepatik metabolizma ile reaktif ürüne dönüştüren mikrozomal ve sitozolik enzimleri içermektedir. S9 fraksiyonu elde edilmesinde, genellikle kemirgen (fare, sıçan gibi) karaciğerleri kullanılır. Aktivasyon süreçlerine katılan mikrozomal enzim seviyelerinin miktarını artırmak için hayvanlar öncelikle araclor 1254 (poliklorlu bifenil karışım) veya fenobarbital ve 3-metil kolanteren karışımı gibi enzim indükleyicilerine maruz bırakılmaktadırlar. Karaciğer homojenatları sıçan, fare ve hamsterlerden elde edilebilmekte birlikte, sıçan ve insan S9 fraksiyonları en çok kullanılan ve tavsiye edilen türlerdendir. İndüklenmiş karaciğer S9 fraksiyonu glukoz-6 fosfat, NADPH gibi uygun kofaktörlerle birlikte "S9 karışımı" olarak *in vitro* testlerde sıklıkla kullanılmaktadır [101,104,105].

2.5. Antikanser İlaçların Etkinliğini Kısıtlayıcı Faktörler

2.5.1. Tümör Biyolojisi ile İlgili Faktörler

Antineoplastik ilaçların etkinliğini kısıtlayan en önemli etmenlerin başında tümör dokusunun heterojen (tek tip hücrelerden oluşmaması) yapısı gelmektedir. Bu yüzden ilaç sitotoksik etkisini aynı dokudaki farklı tipteki kanser hücreleri üzerinde logaritmik nitelikte gösterir. Başka bir deyişle, uygulanan ilaç konsantrasyonu, hücre sayısında belirli bir miktarda azalma yapmaz, belirli bir oranda azalma yaptığı için tümör dokusundaki hücrelerin tümünü etkileyememektedir. Bu nedenle tümör hücrelerinin tümünü ilaçla öldürmek çok zordur. Bunun yanı sıra tümör boyutu da ilacın etkililiğini kısıtlayan faktörlerdendir. Tümör boyutu büyüdükçe ilacın etkinliğinin azaldığı bilinmektedir [106].

Tümör dokunun mikro çevresi ise tedaviye yanıtı etkileyen önemli bir diğer faktördür. Özellikle anjiyogenez ve metastaz aşamalarının ilerlemesi tümörün mikroçevre ile olan ilişkisi ile belirlenmektedir. Burada işe karışan anjiyogenik ve metastatik faktörlerin düzeyi ile ekstrasellüler matriks proteinlerinin aktivitesinin değişimi kanser hücrelerinde görülen direnç mekanizmalarından biridir. Yine çevredeki büyüme faktörleri ve sitokinlerin miktarındaki artış da direncin ortaya çıkmasında önemli bir faktördür [8].

2.5.2.İlacın Farmakokinetiği ve Farmakolojisi ile İlgili Faktörler

İlacın etki yerindeki konsantrasyonunun yeterli derecede olması, ilacın farmakokinetik özelliklerine bağlıdır. Antineoplastik ilaçların çoğu kan-beyin bariyerini aşamadığı için, beyinde yerleşmiş tümör ve metastaza etkili olamazlar. Antineoplastik ilaçların çoğunun etki yerinin hücre içinde olması ve malign hücre membranının ilaca geçirgen olmaması, ilacın etkinliğini azaltan bir diğer kısıtlayıcı faktördür. Örneğin osteojenik sarkom hücrelerine metotreksatın girmesi zordur, bu nedenle yüksek konsantrasyonda verilmesi gerekir [107].

Antineoplastik ilaçların terapötik etkinliğinin kısıtlayan önemli bir faktör de toksisitedir. Tümör hücrelerinin yapısı ve biyokimyasal özellikleri ile normal hücreler arasında kalitatif bakımdan pek farkın olmaması ilaçların kanser hücresine karşı seçiciliğini düşürmektedir. Bu nedenle, antineoplastik ilaçlar, kanser hücrelerini yok ettikleri gibi, hızlı çoğalan normal hücreleri de öldürebilirler. En fazla etkilenen hücreler kemik iliği, gonadlar, gastro-intestinal kanal, cilt (özellikle kıl folikülü hücreleri)'dir. Ayrıca böbrek, karaciğer gibi, nispeten yavaş çoğalan hücreleri de etkilerler. Toksik etkilerin başında, ilacın kemik iliği üzerinde baskı yapması (myelotoksik etki) gelir [106-108].

İlacın veriliş yolu da ilacın etkinliğini kısıtlayan önemli parametrelerdendir. İlaçların uygulama yerlerinden absorpsiyonlarının hız ve derecesi farklı olduğundan, dozun buna göre ayarlanması gerekir. Örneğin oral verilen bir ilaç parenteral verilene oranla daha az ve geç absorbe edilebilir. Ayrıca bir ilacın veriliş zamanı da etki şiddetini ve süresini değiştirebilir. Çünkü vücuttaki birçok biyolojik olayda olduğu gibi, ilaçları inaktive eden enzim sistemlerinin de gün-içi ritmi vardır. Bu enzimlerle inaktive olan ilaçların etkilerinde de değişiklik meydana gelebilir [107].

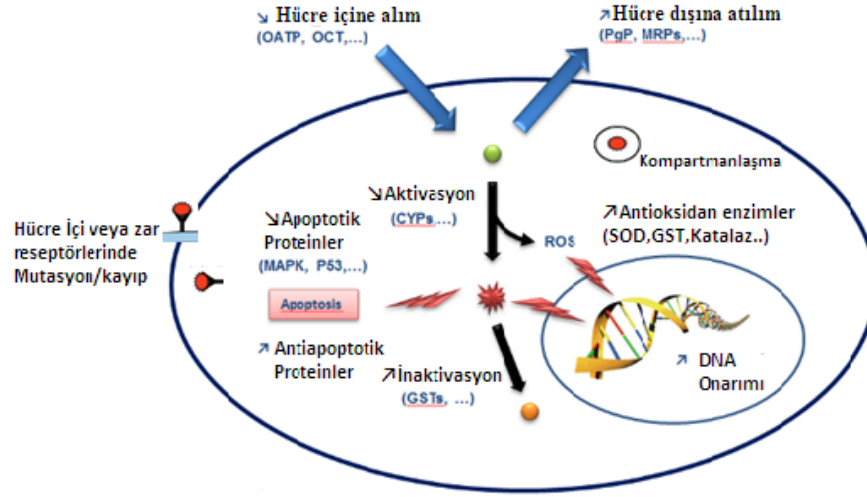
2.5.3.Hasta ile İlgili Faktörler

Tümör dokusunun yapısı ve ilacın farmakokinetik özellikleri dışında hastanın yaşı, ağırlığı, cinsiyeti, immün durumu ve genetik yapısı da ilaç etkinliğini etkilemektedir [107].

2.5.4.Antikanser İlaçlara Karşı Gelişen Direnç

Antineoplastik ilaçların kullanıldığı terapilerde genel olarak karşılaşılan iki tip direnç söz konusudur. Bunlardan bir tanesi daha ilaç ile etkileşime girmeden önce kanser hücrelerinin yapısında zaten var olan birincil (primer) dirençtir. Bu tip direnç malign melanom, renal hücreli kanser, hepatoma, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve beyin kanserlerinde daha sıklıkla görülür. Primer direncin kaynağı tam olarak aydınlatılmamış olsa da üzerinde en çok durulan sebepler arasında tümör dokusunun heterojenliği, *P53* gibi tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlara bağlı fonksiyon kayıpları ile oluşan genomik kararsızlık ve yanlış eşleşme onarım sistemindeki aksamalar ve/veya bu onarım sisteminde yer alan enzim ailelerindeki hasarlar yer almaktadır. Floropirimidinler, tiyopürinler ve sisplatin türevleri gibi antikanser ilaçlar bu tip bir direnç ile sıklıkla karşılaşmakta ve terapötik etkilerini kaybetmektedirler [106-108].

İlaç tedavilerinde karşılaşılan direnç tiplerinden ikincisi ise ilaç ile etkileşime girdikten sonra kanser hücrelerinin uygulanan ilaca karşı geliştirdiği ikincil (kazanılmış) dirençtir. Tedavide uygulanan tek tip bir ilaca karşı kazanılmış direnç, aynı tümör dokusunda farklı ilaçların da etkisizleştirildiği çapraz dirence sebep olmaktadır. Bu tip direnç pek çok kanser tipinde görülse de, en çok küçük hücreli akciğer kanseri ve over kanserlerinde görülmektedir. Antrasiklinler, vinka alkaloidleri, taksanlar, epifilotoksinler, imatinib gibi geniş bir ilaç grubunun kazanılmış dirence sebep olduğu bilinmektedir [106, 109, 110].



Şekil 2.9. Antikanser ilaçlara karşı gelişen direnç mekanizmaları [7]

Antikanser ilaç direncine neden olduğu belirlenen temel mekanizmalar Şekil 2.9’da özetlenmiştir. Bu hücrel mekanizmalar; en temel hali ile hücre içi ilaç konsantrasyonunda azalmaya neden olan faktörler, ilaç metabolizmasındaki değişiklikler ve ilacın etkinliğini azaltan faktörler gibi üç ana başlık altında incelenebilir [106].

Hücre içi ilaç konsantrasyonunda azalmaya neden olan faktörler:

Antikanser ilaçlar etkinliklerini gösterebilmek için, kendilerine ait hedef bölgelerine gitmek zorundadır. Bunun için öncelikle hücre zarını geçebilmesi gerekmektedir. İlaçlar genellikle difüzyon veya taşıyıcı proteinler ile hücre içine girebilmektedir. Dolayısı ile hücre içine girişi sağlayan bu yollardaki değişiklikler ilacın hücreye girememesini ve böylece etki gösterememesine neden olmaktadır. Membran lipitlerindeki değişiklikler nedeniyle ilacın hücre içine girişinin kısıtlandığı bilirse de üzerinde en çok çalışılan direnç mekanizması hücre içine alım (inflüks) ve hücre dışına atım (efluks) pompalarının aktivitelerindeki değişiklikler nedeniyle ortaya çıkan dirençtir. Bu tip bir direnç, organik anyon/kasyon transport proteinleri [OATP, OAT, OCT...vb SLC (Solute carier) ailesi üyeleri] gibi hücre içine alımı sağlayan transmembran yapıdaki alım pompalarının aktivitesinin/ifadesinin azalması ve/veya hücre dışına atımı sağlayan ATP-bağımlı taşıyıcı proteinler (ABC taşıyıcılar: P-gp, MRP, BCRP, LRP...vb.) gibi atım pompalarının aktivitesinin/ifadesinin artışı ile ilacın hücre içindeki konsantrasyonun azalması ile sağlanmaktadır. Pompa sistemini oluşturan proteinlerin gen bölgelerinde ortaya

ıkan mutasyonlar, ifade düzeylerindeki değişimler, çalışma mekanizmasını etkileyen kofaktör ya da ATP gibi elemanların etkilenmesi gibi faktörler direnci ortaya çıkarmaktadır. Efluks pompalarından ABC transporter sistemi ile ilgili çalışmalar yaygındır [8, 106].

İlaç metabolizmasındaki değişiklikler:

Bazı ilaçlar (n ilaçlar,prodrug) vücuda alındığında etki göstermezken metabolik aktivasyon sistemleri yoluyla işlendikten sonra ortaya çıkan formlarının kemoterapötik olduğu bilinmektedir. Kanser hücreleri bu metabolik aktivasyon sistemlerinde görevli faktörlerin aktivitesini azaltarak ilacın etkisini azaltmayı başarabilmektedirler. Özellikle sitokrom P450 ve glutatyon-S-transferaz (GST) sistemlerinde ortaya çıkan bozuklukların ilaç direnciyle bağlantılı olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Metabolik aktivasyon sistemlerindeki bazı proteinlerin ifade düzeyinin ya da hücre içi glutatyon miktarının arttığı durumlarda da bunun tam tersi olarak ilacın metabolize edilerek etkisiz hale getirilmesi söz konusudur [106, 111].

Örneğin topoizomera z I inhibitörü olan kamptotesin analogları ile yapılan çalışmalarda ilacın metabolize edilmesinin hücre içerisindeki aktif formunda azalmaya sebep olduğu da bildirilmiştir. İrinotekanın aktif formu olan SN-38'e dönüşümü hücre içi karboksiesterazlar tarafından yapıldığı için, bu enzimin ifade ve aktivitesindeki azalmanın direncin kaynağı olduğu belirtilmiştir [112]. Yine irinotecan ile yapılan başka bir çalışmada SN-38'in difosfoglukurunosil transferaz (UGT) enzimi ile glukuronillenmesinin hücre dışına atılmasının kolaylaştığı ve bazı kanser tiplerinde görülen direncin bu enzimin ifadesinin artışı nedeniyle olduğu bildirilmiştir [113].

İlacın etkinliğini azaltan faktörler:

İlaç direncine sebep olan faktörlerden bir diğeri ise, hücre yüzeyinde ilaca özgü hedef reseptörlere veya taşıyıcılarına ait yapısal veya sayısal değişiklikleridir. Antineoplastik bir ilacın hedef proteininin yapısındaki bazı değişiklikler ile ilacın ilgili hedefe afinitesi azaldığı için direnç gelişebilmektedir. Örneğin, yapılan çalışmalarda topoizomera z enzimini kodlayan gen bölgesinde meydana gelen çeşitli mutasyonlarla dirençli hücrelerde mutant topoizomera z proteinleri tanımlanmıştır [106, 114, 115]. Hedef moleküllerin yapısındaki değişikliklerin yanı

sıra sayısındaki değişiklikler de ilaç direnci ile sonuçlanabilmektedir. Çoğu antikanser ilaç hücre yüzeyindeki proteinleri hedef almakta veya bu yüzey proteinleri ile hücre içine alınmaktadır. Hücre yüzey reseptörlerinin sayısında azalma veya reseptörlerin tamamının kaybolması ilacı etkisizleştiren direnç mekanizmalarından biridir. Ayrıca bu durumun tam tersi olarak, hücre içi hedef protein miktarının artması ile de direnç gelişebilmektedir. Örneğin, dihidrofolat redüktaz enzim inhibitörü olan metotreksatın, bu enzimi kodlayan genin amplifikasyonu veya enzimi sentezleyen mRNA seviyesindeki artış nedeni ile etkisini kaybettiği bilinmektedir [106, 108].

Çoğu antikanser ilacın hedefi DNA'da çeşitli hasarlar oluşturarak, hücreyi apoptoza yönlendirmektir. Kanser hücresi böyle bir durumda ise, ya DNA onarım sistemlerinin kapasitesini artırarak ya da apoptozu engelleyen sistemleri aktive ederek (p53, MAPK gibi) apoptotik proteinlerin yıkılması/ifadesinin baskılanması ya da antiapoptotik protein ifadesinin indüksiyonu ile ilaca direnç kazanabilmektedir [116]. Örneğin topoizomerez I hasarlarında oluşan tek zincir kırıklarına özgü kesip çıkarma onarım sistemi ve yanlış eşleşmiş baz onarımı sistemlerinin, topo II hasarlarında da çift zincir kırık onarımında devreye giren homolog rekombinasyon başta olmak üzere etkili onarım sistemlerinin aktivitesindeki artışın dirençle bağlantılı olduğu görülmüştür. Yine topo I ile DNA arasındaki kovalent kompleksin tirozin DNA fosfodiesteraz ile uzaklaştırılabildiği rapor edilmiştir [117]. Bunun yanı sıra, bcl-2 gibi proapoptotik genlerin ifadesindeki artışın neden olduğu direnç de hücresel cevaptaki değişime örnek olarak verilebilir. CPT uygulaması sonucunda Topo I enziminin translasyon sonrası modifikasyonlarla değiştirildiği rapor edilmiştir. Yapılan bir çalışmada dirençli hücrelerde Topo I'in ubikitinlendiği ve degrade edildiği gösterilmiştir [118].

Yukarıda bahsedilen direnç mekanizmalarındaki tüm faktörlerin, hücrelerde ortaya çıkan genetik değişimlerin yanı sıra kanser hücrelerinin epigenetik yollarla yaptıkları düzenlemelerden kaynaklandığından bahsetmek mümkündür. Yapılan çalışmalar, ifadesi artan genlerin promotorlarında metilasyon kaybı olduğunu, azalan proteinlerin ise metilasyon düzeyinin arttığını göstermiştir. Yine histon modifikasyonlarının etkisiyle gen ifadesinin değiştirilebildiği ve miRNA'ların

sentezindeki değişikliklerle özel proteinlerin ifadesinin mRNA düzeyinde engellendiği görölmektedir [119].

Direnç mekanizmalarıyla ilgili bilgilerimiz arttıkça kemoterapide ortaya çıkan bu engellerin aşılması için çeşitli tedavi stratejileri geliştirilmiştir. Özellikle yan etki profili farklı birden fazla ilacın kullanıldığı kombinasyon terapileri kanser hücresinin kaçındığı birden fazla yolu hedefleyerek hem heterojen hücre popölasyonunun neden olduğu seçiciliği önlemede hem de hedef sayısını artırarak etkinliği artırmayı sağladığı için tercih edilen stratejilerden biridir. Ayrıca kullanılan ilaca karşı gelişen direnç mekanizmalarında rol oynayan enzimlere karşı geliştirilen inhibitörler (GST, DNMT inhibitörleri..vb) ile birlikte uygulanan kombinasyon ilaç tedavisi ile kanser hücresinin ilaca duyarlılığının arttığını rapor eden çok sayıda çalışma bulunmaktadır [111].

2.6. İlaç Araştırma ve Geliştirme Çalışmaları

İlaçlar insanları hastalıklardan korumak, tedavi etmek, teşhis koymak, fizyolojik bir fonksiyonu düzeltmek veya insan yararına değiştirmek amacı ile kullanılan veya bir veya birden çok kombinasyon şeklinde doğal veya sentetik maddelerden formüle edilmiş, etkin madde içeren, uygulanacağı doza göre hazırlanmış ürünlerdir [120]. İlaç üretilmesi ise ilaç etken maddelerinin, yardımcı katkı maddeleri ile belirli miktarlarda karıştırılarak, çeşitli ürün formlarında kullanıcıya sunulması olarak isimlendirilir [121].

Teknolojik gelişmelerin ilerlemesine paralel olarak, tedavisi olan hastalıklara karşı daha etkin ve daha az yan etkili ilaçların geliştirilmesi söz konusu iken, tedavisi olmayan ya da çeşitli nedenlerle kısmen tedavi edilebilmiş hastalıklara karşı yeni ilaç etken maddelerinin araştırılması önem kazanmaktadır.

İlaç geliştirmede öncelikli amaç, insanların yaşamında daha iyiye doğru bir değişiklik yapabilmektir. Geliştirilen her ilaç ile koruyucu, tedavi edici veya hastalığın belirti ve bulgularını azaltıcı bir etkinin elde edilmesi gerekmektedir. İlaç geliştirme süreci yenilikçi ilaçların etkin, güvenli ve mümkün olan en kısa sürede hastaların kullanımına sunulabileceğini garanti edecek şekilde tasarlanmaktadır. Bu bağlamda ilaç araştırma ve geliştirme süreci başlıca dört aşamadan oluşmaktadır [122,123].

- 1-Keşif ve araştırma
- 2.Klinik öncesi çalışmalar
- 3.Klinik çalışmalar
- 4.Onay ve pazarlama

1. Keşif ve araştırma: İlaç araştırmasının ilk ve en önemli aşaması bir hastalığı tedavi edebilecek veya önleyebilecek en iyi hedeflerin tespit edilmesidir. Bu hedefler genellikle hastalığın gelişiminde rol oynayan mekanizmalarda görevli biyomoleküllerdir. Bu aşamada en önemli sorun hangi moleküllerin hastalıkla ilişkili ve daha önemli olduğunu bulmaktır. Hedef molekülün işlev gördüğü metabolik yollarda nasıl çalıştığını ve bu yolaklardaki etkileşime girdiği diğer moleküllerin yapısının ve fonksiyonunun bilinmesi, bir ilaç için uygun hedeflerin seçilmesine yardımcı olmaktadır. Bu bilgi ve karşılanmamış medikal ihtiyaçlara çözüm bulma arzusu birleştiğinde biyolojik hedeflerin keşfi gerçekleştirilebilmektedir [122].

Keşif aşamasında, hastalığa neden olan hedeflerin bulunması ve bu hedeflerle en iyi şekilde etkileşime girecek etken maddelerin tespit edilmesi gerekmektedir. İlaç etken madde keşfi genel olarak aşağıda sıralanan şekillerde olabilmektedir [121].

- Doğal kaynaklardan faydalanılarak
- Doğal kaynaklı ilaçların yapılarını değiştirmek suretiyle (yarı sentetik)
- Klinikte kullanılan ilaçlar taklit edilerek eşdeğerlerinin (jenerik) sentezlenmesi ile
- Yan etkisi olan ilaçlardan yenilerinin geliştirilmesi ile
- Tasadüfen bulunması

Klinikte kullanılan ilaçların büyük bir çoğunluğu doğal kaynaklıdır. Doğal kaynaklı etken maddeler bitkilerden, mikroorganizmalardan ve sucül organizmalardan elde edilenler olmak üzere üç ana grupta toplanabilir. Bitki, mikroorganizma gibi doğal kaynaklardan izole edilen ya da izolasyon sonrasında semisentez yoluyla geliştirilen ilaçlar (Çizelge 2.3), antikanser terapide kullanılan sitotoksik ilaçların önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Dünyada 1940-2000 yılları arasında onay alan 155 antikanser ilacın %47'sinin doğal kaynaklı ve bunların yarı sentetik türevlerden oluştuğu rapor edilmiştir [124].

Çizelge 2.3. Bitki ve mikroorganizma kökenli kemoterapötik ilaçlar [124]

	Sınıfı	İlaçlar	Kaynağı
Mikroorganizma Kökenli	Antrasiklin antibiyotikler	Daunorubusin, Doksorubusin ve semisentetik türevleri (epirubisini idarubisin)	<i>Streptomyces peucetius</i>
	Glikopeptit antibiyotikler	Bleomisin A2 ve B2	<i>Streptomyces verticillus</i>
	Polipeptit antibiyotikler	Daktinomisin	<i>Streptomyces parvulus</i>
	Mitosanlar	Mitomisin-C	<i>Streptomyces caespitosus</i>
Bitki Kökenli	Vinka alkaloidleri	Vinblastin ve semisentetik türevleri (vindesin, vinorelbin)	<i>Vinca rosea</i> (<i>Catlahantrus roseus</i>)
	Taksanlar	Paklitaksel ve semisentetik türevleri (dosetaksel)	<i>Taxus brevifolia</i>
	Kamptotesinler	Semisentetik kamptotesin türevleri (topotekan, irinotekan)	<i>Camptotheca acuminata</i>
	Epipodofilotoksinler	Semisentetik podofilotoksin türevleri (etoposid, teniposid)	<i>Podophyllum peltatum</i>

İlaç keşfi tarama testleri ile yapılmaktadır. Yapılan taramalar rastgele olabildiği gibi bilgisayar destekli tasarımların kullanıldığı yüksek girdili çıktı taramalar şeklinde de olabilmektedir. Bu taramalar sonrası bir bileşik hastalık etmenini ya da hastalığı etkileyebilecek şekilde değiştirebilirse “isabetli vuruş (hit) olarak adlandırılır. Bunlar ilaç adayları olmak üzere etkinlik ve güvenlik geliştirilerek ikincil tarama sistemleri ile tekrar gözden geçirilirler.

Bir ilacın keşfedilerek tıbbın hizmetine sunulması; yaklaşık 14 yıllık bir araştırma-geliştirme süreci ile ortalama 2 milyar dolarlık bir yatırım gerektirmektedir. İlaç keşfinin ilk aşamalarında tarama testlerinde saptanan 10.000 isabetli vuruştan 1’i tıbbın hizmetine sunulan bir ilaç haline gelebilir [122].

2. Klinik öncesi çalışmalar: Bu aşamada; keşif aşamasında seçilen lider bileşiklerin insanlarda denenmeden önce etkinlik ve güvenilirliklerinin denenmesi amaçlanmaktadır. Bu aşamada kullanılan deneyler insanlar üzerindeki riski en az indirebilmek için olağanüstü bir hassasiyetle gerçekleştirilir. Her ne kadar birçok araştırma ve geliştirme aşaması *in vitro* olarak ve bilgisayar aracılığı ile yapılabilir olsa da, kompleks hastalık mekanizmaları çoğunlukla hayvan çalışmaları yapılarak anlaşılmaktadır. Bu aşamada en az iki farklı tür hayvan kullanılır. Bunlardan biri fare, hamster, sıçan gibi kemiriciler diğeri ise genellikle köpeklerin kullanıldığı modellerdir. Bu modellerde etkin maddenin, absorpsiyonu, vücut içinde dağılımı, metabolizması ve atılımı (ADME) gibi farmakokinetik özellikleri araştırılmaktadır. Ayrıca güvenilirlik çalışmalarında akut, subakut ve kronik toksisite çalışmaları, genel ve spesifik organlara olan etkileri, reproduktif toksisite testleri, mutajenite ve

karsinojenite araştırmaları yapılır. Hem klinik öncesi hem de klinik çalışma aşamalarının ilerleyişi düzenleyici kuruluşların (OECD, ICH, EPA) nerdiği kılavuzlara ve etik kurallara uygun olarak yürütülmektedir [125-127]. Örneğin; deney hayvanları üzerinde ilacın farmakolojik özelliklerinin belirlenmesi için yapılan alışmalar “İyi Laboratuvar Uygulamaları (GLP: Good Laboratory Practice)” kılavuzuna, üretim aşamasında ise ilacın kararlılığı, formülasyonu, kalitesi, ambalajlanması gibi teknik çalışmalar ise “İyi retim Uygulamaları (GMP: Good Manufacturing Practice)” kılavuzlarındaki kurallara uygun olarak yürütülmelidir. Bütün bu aşamalardan başarı ile geçen ilaç için ülkelerde ilaç onayı veren kurumlara “Yeni araştırma ilacı (IND: Investigational New Drug)” başvurusu yapılır. Bu başvuru değerlendirilip onay aldığı zaman ilaç için klinik çalışmalar başlar [122, 128].

3. Klinik alışmalar: Klinik ncesi çalışmaları başarı ile geçen herhangi bir ilaç adayının insanlar üzerinde denenmesi, amaç ve kapsamaları birbirinden farklı dört evrede gerçekleştirilmektedir. Bu evreler ilaç denemesinin dönemleri (fazları) olarak bilinir. Bu evreler birbirinden tamamen ayrı basamaklar gibi görünse de genellikle i içe geçmiş, aynı anda birden fazla dönemin yürütüldüğü çalışmalardır [122].

Faz I alışmaları: İn vitro ve *in vivo* alışmalar sonrasında pozitif sonuçlara sahip ilaç adayının ilk defa insanlar üzerinde denendiği aşamadır. Bu aşamada 20-100 kişilik gönüllü sağlıklı insanlarda ilacın güvenilirliği, uygulanabilir doz ayarı ve yan etkileri tespit edilmeye çalışılır.

Faz II alışmaları: İlaç adayının ilk kez hasta grubu (100-500 kişi) zerinde denendiği aşamadır. İki temel amacı vardır: 1) Daha nceki çalışmalarda belirlenen etkili dozu kullanılarak ilaç adayının etkinliğinin kanıtlanması 2) İlacın güvenirliği hakkında ek bilgi elde edilmesi

Ayrıca aday bileşiğin hedefi gerçekten etkileyip etkilemediği veya hastalık üzerinde faydalı bir etki oluşturup oluşturmadığı hakkında ön bilgi edinerek değerlendirme yapabilmek için “teorininin kanıtlanması” adı verilen faz I ve II çalışmalarının karışımı olan ve ilaç ile tedavi edilen çok iyi tanımlanmış hasta gruplarının dahil olduğu çalışmalar da yürütülür. Bu alışmalar kullanılan kaynakların hızlı, etkili ve

güvenli ilaç moleküllerine aktarılmasını sağlar. Bu sayede faydalı ilaçlar hastalara daha kısa sürede ulaşabilmektedir.

Faz I ve faz II çalışmalarından elde edilen veriler daha geniş klinik çalışmalarla ilacın geliştirilmesine devam etmek için gerekli olan bilimsel kanıtları sağlar [122].

Faz III çalışmaları: Bu aşamada ilaç adayı 1000-5000 kişiden oluşan büyük bir hasta grubu üzerinde denenmektedir. Bu çalışmaların amacı ise ilaç etkinliğini doğrulamak, yan etkileri gözlemlemek, elde edilen sonuçları diğer tedavi yöntemleri ile karşılaştırmak ve ilaç adayının güvenilir bir şekilde kullanılması için bilgi toplamaktır. Bu aşamadan başarı ile geçen ilaç adayının, “yeni ilaç başvurusu (NDA)” süreçlerini tamamlaması gerekmektedir [122, 128].

Onay ve pazarlama: Yeni bir ilacın tıbbın hizmetine sunulabilmesi için sağlık otoriteleri tarafından onaylanması gerekmektedir. Tüm klinik çalışma verilerinin bulunduğu başvuru dosyası işlenerek ruhsat alınır.

Ayrıca ilacın pazara çıktıktan sonra hastalar üzerindeki risk/yarar oranlarının izlendiği ve en iyi ve uygun şeklinin saptandığı **faz IV** çalışmaları devam eder. Bu aşamaların her birinden başarıyla geçen ilaçların kullanımına devam edilirken, aşamaların herhangi birinde beklenmeyen etkilerin gözlenmesi sonucu ilaç/ilaç adayının kullanımına son verilir [122].

2.7. İlaç Tasarımı Sürecinde Kullanılan Yöntemler

İlaç araştırmalarında hücre kültürü temelli çalışmalar, klinik öncesi araştırmaların temelini oluşturur. Kanser hücrelerini taklit eden hücre dizilerinin kullanımı test edilen ilaçların ilk olarak kanser hücreleri üzerindeki seçici etkisinin gösterilmesi sonrasında da etki mekanizmasının aydınlatılması, direnç mekanizmalarının belirlenmesi, hücresel cevabın tespit edilmesi açısından faydalı çalışmalar olarak değerlendirilmektedirler. Ancak yapılan çalışmalarda efektif sonuçlar alınması için kullanılan hücre dizilerinin genetik, morfolojik ve fizyolojik açılardan iyi bir şekilde tanımlanmış olması şarttır [4].

İlaç araştırmalarında kanser hücre dizilerinin kullanımının çeşitli avantaj ve dezavantajları aşağıda özetlenmiştir.

Avantajlar

- Bu hücreler araştırılmak istenen kritere göre genetik ya da epigenetik olarak çeşitli ajanlar kullanılarak kolay bir şekilde manipüle edilebilirler.
- Primer tümörlerde ortaya çıkan heterojen hücre popülasyonu yapılan çalışmalarda hedefe yönelmeyi zorlaştırdığından tanımlanmış hücre dizilerindeki homojenlik bir avantaj yaratır.
- Kanseri örneklerinde hücreler kanserin ilerlemesi nedeniyle değişime uğramışken, bu hücreler ilkin tümörlerdeki genetik özelliklerle çok benzer özellikler gösterirler.
- Çok farklı özelliklere sahip çok sayıda hücre dizisi geniş bir tarama spektrumu oluşturur.
- İyi tanımlanmış hücre dizilerinin kullanıldığı çalışmalar bilimsel otoriteler tarafından kabul gören çalışmalardır.
- Hücrelerin çok sayıda pasaj yapılabilir olması, çalışmalar için bitmeyen bir kaynak oluşturur.
- Elde edilen sonuçların tekrar edilebilir olması da bir avantaj sağlar.

Dezavantajlar

- Hücre dizileri arasında çıkabilecek çapraz kontaminasyonlar hatalı sonuçlara neden olabilir.
- Kültür koşulları ve çalışma ortamı hücrelerin morfoloji ve genetik özelliklerinde beklenmeyen değişimlere neden olabilir.
- Hücre kültürlerinde sıklıkla karşılaşılan mikoplazma kontaminasyonu hücrelerde değişikliklere neden olabilir.
- Bazı hücre tiplerinde uzun süreli kültür yapmak zordur.
- Kültür ortamı özellikleri ve hücre popülasyonları *in vivo*'dan farklıdır [129].

Antikanser ilaçları ile ilgili biyolojik aktivite değerlendirilmesinde ilk olarak, test edilecek bileşiklerin kanser hücrelerine sitotoksik etkileri olup olmadığına bakılır. Bir antikanser ajandan hücresel aktiviteleri ne olursa olsun temelde beklenen etki, kanser dokusunun büyümesi ve gelişimini önleyebiliyor olması hatta, kanser hücrelerini öldürebilmesidir. Bu amaçla test edilen bir dizi bileşiğin çok sayıda kanser hücresi üzerindeki etkisinin toplu bir şekilde değerlendirilmesini esas alan yöntemler kullanılmaktadır. Literatürde çeşitli kanser hücre dizisinin kullanıldığı çeşitli panellere rastlanmaktadır. Bunlar arasında en sık kullanılanı Amerika Ulusal

Kanser Enstitüsü'nün (NCI) bu amaçla kullandığı, 9 farklı kanser tipine (beyin, meme, kolon, hemotopoiyetik hücre, böbrek, akciğer, melanosit, ovaryum ve prostat) ait 60 farklı hücre dizisini içeren NCI60 panelidir [130]. 1990 yılında kullanılmaya başlanan bu panelde; ilaç etken maddelerinin, proteomik ve genomik özellikler iyi karakterize edilmiş hücre dizileri üzerindeki sitotoksik, genotoksik taramalarının ve mekanistik çalışmalar sonucu pek çok aday bileşiğin ilaç onayı aldığı ve yine pek çoğunun klinik çalışmalarının sürdüğü rapor edilmiştir [130, 131]. Bu panel sistemindeki etkili sonuçların görülmesi üzerine buna ek olarak ilerleyen zamanda Japonya Kanser Araştırma Kuruluşu'nun geliştirdiği JFRC39 (39 hücre dizisi) ve JFRC45 (45 hücre dizisi) paneller de ilaç araştırma geliştirme çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır [132, 133]. Bu şekilde test edilecek çok sayıda bileşik hızlı bir taramadan geçirilmekte ve kanser hücre proliferasyonu üzerindeki etkisine bakılarak düşük konsantrasyonda güçlü sitotoksik etki gösteren bileşikler seçilmektedir. Ayrıca panellerdeki farklı tipteki hücrelerin verileri toplu bir şekilde değerlendirilerek elde edilen profilin daha önceden mekanizması bilinen bileşikler ile bilgisayar ortamında karşılaştırılması yapılır. Bu karşılaştırma test bileşiğinin etki mekanizması hakkında araştırmacıya öncül bir veri sağlayabilir. Sonuçta etkili görülen bileşiklerin etki mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik *in vitro* ve *in vivo* ek çalışmalar da yapılarak bileşiğin klinik öncesi çalışmaları yapılmış olur. *In vitro* çalışmalar kapsamında, bileşiğin hücre içerisinde hangi moleküller ile etkileştiğini bulmaya yönelik enzim aktivite deneyleri, genotoksik etki değerlendirmeleri, hücre ölüm şeklinin ve hücre döngüsünün hangi fazında etkili olduğunun belirlenmesi gibi çalışmalar yapılabilmektedir [134, 135]. Bileşiklerin genotoksik etkilerini değerlendirmek için kullanılması gereken yöntemler ve izlenmesi gereken stratejiler düzenleyici kuruluşlar tarafından yayınlanan kılavuzlarda belirtilmektedir (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. Düzenleyici kuruluşların önerdiği *in vitro/ in vivo* genotoksisite testlerine ait kılavuzlar [127]

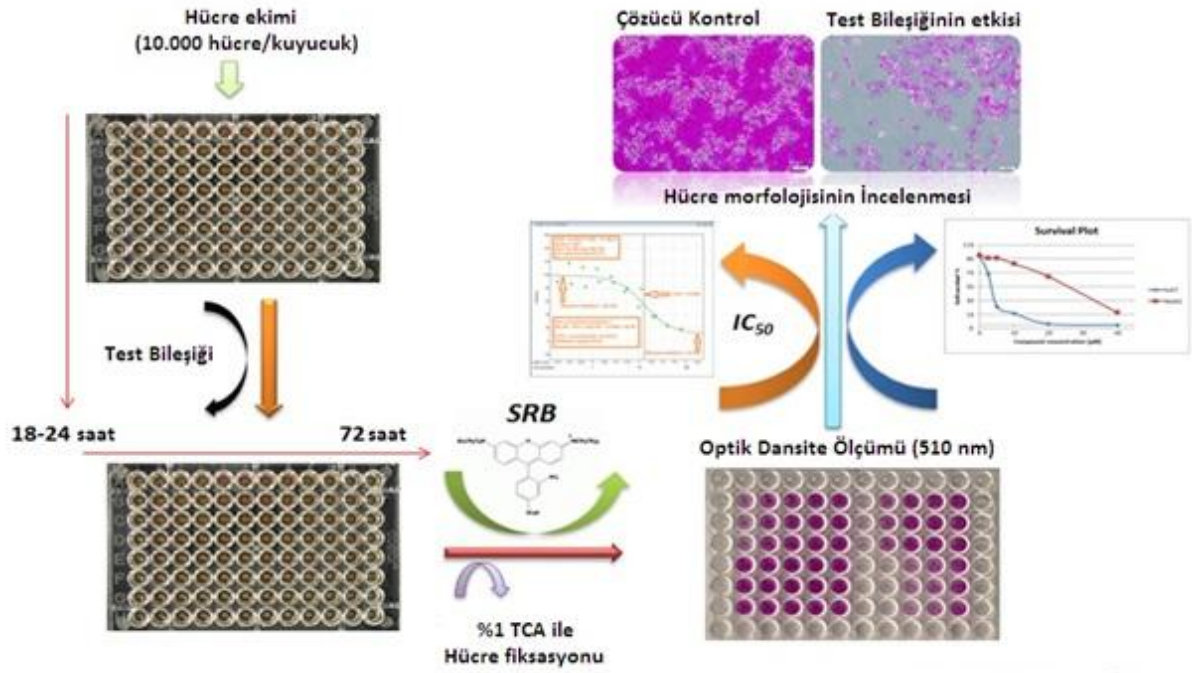
	Hindistan	İngiltere	Avrupa Birliği	Japonya	Kanada	ICH*
1.	İlaç ya da metaboliti bilinen bir karsinojenle ilişkisi değerlendirilmeli	Mikrobiyal bir mutajenite testi	Bakterilerde bir <i>in vitro</i> gen mutasyon testi	Bakteriyel geriye dönüş testi	<i>Salmonella</i> /mikrozom yöntemi	Bakterilerde bir <i>in vitro</i> gen mutasyon testi
2.	Karsinojenite çalışmaları için 2 farklı tür kullanılmalı	<i>In vitro</i> memeli hücrelerinde mutajenite testi	Ökaryotik bir <i>in vitro</i> gen mutasyon testi	<i>In vitro</i> kromozomal aberasyon testi	Memeli <i>in vitro</i> kromozom aberasyon testi	<i>In vitro</i> TK testi ya da memeli hücrelerinde kromozomal hasarı gösteren bir <i>in vitro</i> test
3.	Test maddesinin en az 3 dozu kullanılmalı	<i>In vitro</i> memeli hücrelerinde transformasyon testi	Bir <i>in vitro</i> kromozomal aberasyon testi	<i>In vivo</i> mikronükleus testi	Memeli <i>in vivo</i> testler (mikronükleus ya da metafaz testi)	Rodent hematopoietik hücrelerde kromozomal hasarlar gösteren bir <i>in vitro</i> test
4.	Kontrol grubu kullanılmalı	<i>In vivo</i> sitogenetik testler (mikronükleus, UDS test gibi)		Ek testler: S9 karışımı varlığında ve yokluğunda 24 ve 48 saatlik sürekli muamele II. 24 saatlik muameleyi takiben 6 saatlik ek maruziyet (S9 karışımı varlığında ve yokluğunda) III. poliploid hücrelerin varlığının tespiti için kromozom analizleri IV. tek eşeyin (erkek) kullanımıyla rodent mikronükleus testi	Pozitif <i>in vivo</i> sonuçlar için ek <i>in vivo</i> gen hücre testleri	Ek testler: I. DNA-katım ürünlerinin ölçülmesi II. DNA zincir kırıkları III. DNA tamiri ve rekombinasyonu
5.		İleri <i>in vivo</i> testler (test seçimi araştırmacıya bırakılmış)				

*ICH: Beşeri ilaçların ruhsatlandırılmasında teknik gerekliliklerin uyumlaştırılması konusunda uluslararası kurul (Türkiye bu kurulun yönergelerini izlemektedir.)

2.7.1. Sülforodamin B (SRB) Yöntemi

1990 yılında Skehan ve arkadaşları tarafından geliştirilen SRB yöntemi *in vitro* sitotoksisite taramalarında kullanılan metotlar arasında son zamanlarda en sık kullanılanıdır [136]. Bu yöntem hücresel proteinlerin SRB ile boyanıp toplam biyokütlenin kolorimetrik olarak hesaplanması esasına dayanır. Yöntemin çalışma prensibi kullanılan boyanın özelliği ile ilişkilidir. Yapısında iki adet sülfonik grup ($S(=O)_2$) içeren ve asit red-52 olarak da bilinen SRB, anyonik bir aminoksanten boyadır. Açık pembe renkteki bu boya hafif asidik ortamlarda proteinlerin bazik amino asitleri ile elektrostatik kompleksler oluştururken, bazik ortamlarda çözünmektedir. Bu esasa dayanarak hücreler çok kuyucuklu plaklara sitotoksisitesi test edilmek istenen bileşik varlığında veya yokluğunda ekilir. İstenilen inkübasyon süresi sonunda kuyucuklardaki hücreler, hücre tipine uygun yoğunluktaki bir fiksatif (trikloroasetik asit=TCA) ile kuyucuk tabanına fikse edilirler. Test bileşiğinin toksik etkisi nedeniyle oluşan hücre parçacıkları ve parçalanmış hücrelere ait proteinler plakların yıkanması ile uzaklaştırılır. Uygun miktarda eklenen boyanın kuyucukların tabanına yapışmış hücrelerdeki proteinlere bağlanması sağlanır. Ortamdaki proteinlere bağlanmayan boya ikinci bir yıkama aşaması ile uzaklaştırıldıktan sonra proteine bağlanmış boyanın bazik bir ortam kullanılarak çözünmesi sağlanır. Test bileşiğinin sitotoksik etkisine bağlı hücre sayısındaki değişiklik (toplam biyokütle) kültür ortamında hücresel proteinlere bağlanmış boya miktarındaki değişiklik ile doğru orantılı olduğu için, ortamdaki protein miktarına bağlı renk şiddeti mikropak okuyucu altında okunur. Sonuç olarak test bileşiği ile muamele edilmiş kuyucuklardan elde edilen optik dansite değerleri, kontrol kuyucuklarından elde edilen değerlerle karşılaştırılarak test edilecek bileşiğin sitotoksik etkisi değerlendirilmiş olur (Şekil 2.10). Yöntemde boyanın bağlanabilmesi için gerekli zayıf asidik ortam %1'lik asetik asit kullanılarak sağlanırken, boyanın çözülmesi için gerekli bazik ortam ise Tris (pH:10) ile sağlanmaktadır.

Sülforodamin B (SRB) Testi



Şekil 2.10. SRB testinin uygulanışı

Membran bütünlüğüne, mitokondriyal ve lizozomal aktiviteye dayalı diğer *in vitro* sitotoksikite yöntemlerine (MTT, XTT, WST-1; NR, LDH) göre çok daha hassas olduğuna dair son yıllarda yapılan çokça çalışma bulunmaktadır [137-140]. Hücresel metabolik faaliyetlerden bağımsız olarak boyama yapıldığı için kültür koşullarından daha az etkilenmesi nedeniyle deney tekrarları sonrasında elde edilen ölçümlerde farkın olmaması yöntemin hassasiyetini artırmaktadır. Ayrıca az sayıda (1000-2000) hücre ile çalışılsa bile, hücre sayısına bağlı olarak proteine bağlanan boya miktarı ile hücre proliferasyonu arasında lineer bir grafik elde edilebilmesi hassasiyeti artıran bir diğer etmendir. Bunlardan başka yöntem basamaklarının kolaylığı, belirli aşamalarda durdurulabilmesi ve ekonomik olması da yöntemin tercih edilme sebepleri arasındadır [137, 138, 141]. Bütün bu sebeplerden dolayı SRB yöntemi Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) tarafından anti-kanser ilaç etken maddesi tarama çalışmaları için elverişli bir yöntem olarak öngörülmüştür.

2.7.2. Komet Yöntemi

Komet yöntemi hücre düzeyinde tek veya çift zincir kırıkları, çapraz bağlanma, alkali duyarlı bölgeler, kesip-çıkarma onarım bölgelerindeki hatalar gibi DNA hasarlarını saptamak ve miktarını belirlemek için uygulanan, hızlı ve hassas bir floresan mikroskopik yöntemdir. DNA'daki hasarın mikroskopik görünümü baş ve kuyruktan oluşan bir kuyruklu yıldıza benzediği için yöntem ismini de buradan almıştır. Ayrıca tek bir hücredeki DNA hasarları, lam üzerindeki mini bir jel elektroforezi kullanılarak belirlenebildiği için, "Tek Hücre Jel Elektroforezi (Single Cell Gel Electrophoresis= SCGE)" olarak da adlandırılmaktadır [142].

Bu yöntem, genotoksisite, DNA onarımı, apoptoz, beslenme toksikolojisi, biyoizleme, hücre döngüsü analiz çalışmaları ve klinik uygulamalar gibi pek çok alanda sıkça kullanılmaktadır. Genotoksisite araştırmalarında kullanılan diğer tekniklerle karşılaştırıldığında komet yöntemi, DNA hasarlarının çok düşük seviyelerinin belirlenebilmesi, her bir örnek için çok az sayıda hücre ile çalışılabilmesi, düşük maliyetli olması, uygulanabilirliğinin kolay olması, kısa zamanda sonuç vermesi gibi nedenlerden dolayı oldukça avantajlıdır. Yöntemin en büyük avantajlarından biri de hücre kaynağı olabilecek her türlü dokuyla çalışılabilir olmasıdır. Hem *in vivo* kaynaklı hem de kültüre edilmiş hücreler, hücre kaynağı olarak kullanılabilir. Ancak gerek uygulanma gerekse elde edilme kolaylığı açısından kan dokusunun kullanılması yaygındır [142].

Yöntemde; hücreler izole edildikten sonra agar içine gömülerek mikroskopik lamlara yayılır, farklı pH'larda (7-13) hücre membranlarının parçalanması (lisis) aşamasından sonra elektroforeze bırakılıp floresan boya ile boyanmak suretiyle DNA hasarları ve miktarı mikroskopik olarak değerlendirilir. Hasarın şiddetine bağlı olarak, baştaki DNA uzunluğu ve yoğunluğu azalırken, kuyrukta bulunan DNA uzunluğu ve yoğunluğu artmaktadır.

DNA zincir kırıklarının tipi ve dolayısı ile yöntemin adı, lisis ve elektroforez aşamalarında kullanılan pH'a göre değişiklik göstermektedir. Nötral pH'larda (pH:7-8) DNA çift zinciri arasındaki hidrojen bağları kopmadığı için, sadece çift zincir kırıkları belirlenebildiği için yöntemin adı "**nötral komet**" adını alırken, alkali koşullarda (pH>12) uygulanan "**alkali komet**" yönteminde ise zincirler arasında hidrojen bağlarının kopması nedeniyle çift zincir kırıkları yanında, tek zincir kırıkları

da belirlenebilmektedir [143,144]. Ayrıca farklı pH aralıklarında farklı DNA hasarları da bu yöntem ile belirlenebilmektedir (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5. Farklı pH'larda komet yöntemi ile belirlenebilen DNA hasarları

pH=7-8	pH=12.1	pH>13
Çift zincir kırıkları Çağraz bağlanmalar	Tek zincir kırıkları Çift zincir kırıkları Çağraz bağlanmalar Kesip-çıkarma onarımı tamamlanmamış bölgeler	Alkali duyarlı bölgeler Tek zincir kırıkları Çift zincir kırıkları Çağraz bağlanmalar Kesip-çıkarma onarımı tamamlanmamış bölgeler

Yöntemin lizis aşamasında yoğun tuz ve deterjan içeren lizis çözeltisi, boyama aşamasında ise DNA'yı boyayabilen EtBr, DAPI, akridin oranj, gibi çeşitli boyalar yanında gümüş boyama tekniği de kullanılabilmektedir. DNA hasar miktarlarının belirlenmesi aşamasında ise, ya görsel analiz ya da bilgisayar destekli analiz programları kullanılmaktadır. Görsel analizlerde araştırmacının kendisi hasarı, oluşan hasar şiddetine göre sınıflandırmaktadır. Ancak hassasiyetinin, kantitatif ve daha güvenilir verilerin elde edilebildiği analiz programlarına göre daha düşük olması sebebiyle tercih edilmemektedir. Analizlerde kullanılan DNA hasar parametreleri ise, baş ve kuyruk uzunluğu, kuyruk ve baş kısmında bulunan nispi floresan yoğunluğu (%DNA) ve kuyruk momenti ölçümleridir. Literatürde en sık kullanılan hasar parametresi ise, hem kuyruk uzunluğu hem de kuyruktaki DNA yoğunluğunu tek bir parametrede barındıran kuyruk momentidir (=kuyruk uzunluğu x kuyrukta bulunan DNA yoğunluğu) [145,146].

İlk olarak 1984 yılında Östling ve Johanson tarafından geliştirilen komet yöntemi, nötral pH'daki lizis ve elektroforez şartlarında uygulanarak DNA çift zincir kırıklarını tayin etmekteydi [143]. İlerleyen yıllarda Singh ve arkadaşları tarafından protokolde bir takım değişiklikler yapılarak yöntem alkali koşullarında uygulanmıştır [144]. Singh ve arkadaşlarının geliştirdiği bu yöntem, dünya genelinde yaygın olarak kullanılmakla birlikte, yöntemin farklı alanlarda da uygulanması için pek çok araştırmacı tarafından halen geliştirilmektedir. Örneğin, belirli DNA dizilerine özgü floresan işaretli probalar kullanılarak yapılan Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) tekniği komet yöntemi ile birleştirilerek, araştırılan hasarın DNA'daki yerleşimi (gen veya bölgeye özgü hasar) tek bir hücrede bile belirlenebilmektedir [147-149]. Bunun yanı sıra, DNA'da hasar yapan fiziksel,

kimyasal ve biyolojik ajanlarla yüz yüze kalmış canlılardan alınan biyolojik örneklerle yapılan biyoizleme çalışmalarında da bu yöntem sıklıkla kullanılmaktadır.

Klasik komet yöntemi mikroskop lamları üzerinde uygulanabildiği için, tek bir lamda ancak bir veya iki tane örnek incelenebilmektedir. Fakat son yıllarda şeffaf, esnek polyester tabakaların (GelBond film) kullanıldığı bu yöntemde, çok sayıda örnek aynı anda ve hızlı bir şekilde incelenebilmektedir [145,150].

Ayrıca komet yönteminin belirli aşamalarında ortama DNA sentezini inhibe eden ajanlar [hidroksiüre, sitozin- β -D-arabinosit (AraC)] eklenerek DNA onarımı ile ilgili çalışmalarda, farklı tamir basamaklarındaki hasarlar ve ara ürünler belirlenebilmektedir [151]. Bunun yanı sıra, genotoksitesisi incelenen etmenin ortamdan uzaklaştırılıp hücreye onarımı için ek süre tanınması ile DNA tamir kinetiği de bu yöntem ile çalışılabilmektedir [152,153].

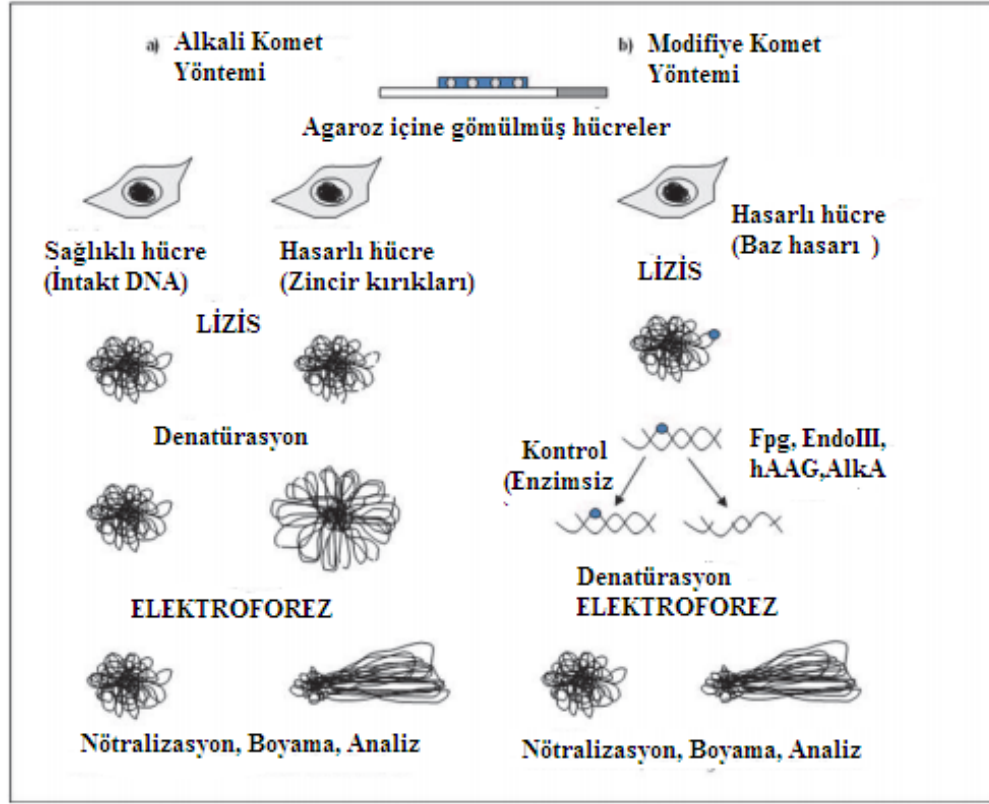
Bu yöntemin bir diğer modifiye çeşidi ise, 2010 yılında Wentzel tarafından geliştirilen metilasyon özgül komet yöntemidir. Test edilecek etmenin hücredeki global metilasyon durumunu değiştirip değiştiremeyeceği hakkında fikir edinilebilen bu yöntemde test sistemine ek olarak metilasyon özgül endonükleazların (MspI, HpaII) eklendiği görülmektedir [154].

2.7.3. Modifiye Komet Yöntemi

Komet yöntemi, çalışma prensibi gereği genel anlamda DNA'daki tek ve çift zincir kırıklarını tespit etmede kullanılan bir yöntemdir. Nötral komet yöntemi ile sadece çift zincir kırıkları tespit edilebilirken, alkali komet yöntemi ile hem çift zincir hem de tek zincir kırıkları tespit edilebilmektedir. Fakat pH bağımlı olarak DNA zincir kırıklarını tespit edebilen bu yöntemler, DNA zincir kırığına neden olan hasarların özgül tipi ile ilgili bilgi vermemektedir. Özgül hasar tipini belirleyebilmek için, belirli hasarları özgül olarak tanıyan ve bu bölgelerde kırık oluşturabilen onarım enzimlerinin alkali komet yöntemine dahil edildiği modifiye komet yöntemlerinin geliştirilmesi ile yöntemin hassasiyeti artırılmıştır [146,155,156].

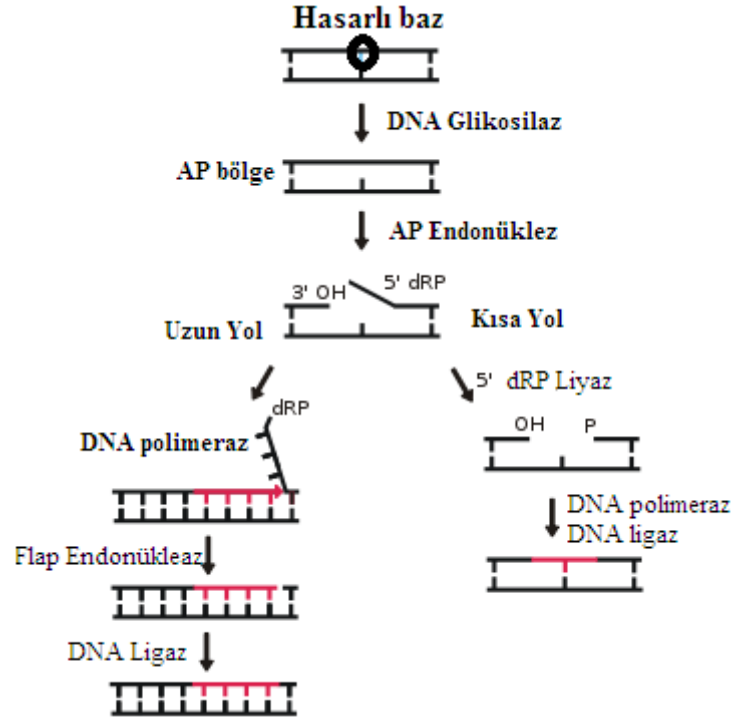
Bu yöntemdeki temel mantık, alkali komet yönteminde uygulanan lizis işleminden sonra, DNA hasarına özgül onarım enzimleri ile jellerin inkübasyonu sonrasında özgül hasarın bulunduğu bölgelerde enzim aktivitesine bağlı ek zincir kırıklarının belirlenmesidir. Böylece onarım enzimleri varlığında uygulanan modifiye komet

yöntemi ile eksojen veya endojen kaynaklı çeşitli ajanların DNA'da hangi tip hasarı oluşturabileceği belirlenebilmektedir (Şekil 2.11) [146,157,158].



Şekil 2.11. Alkali ve modifiye komet yönteminin aşamaları [159]

Bu yöntemde kullanılan onarım enzimleri, baz kesip-çıkarma onarım sisteminin (BER) ilk aşamasında devreye giren DNA glikozilazlardır [160]. BER, çeşitli nedenlerle okside/alkile olmuş modifiye bazlar, apürinik/apirimidinik (AP) bölgeler veya DNA yapısında normalde bulunmayan urasil türevi bazlar gibi DNA'nın üç boyutlu yapısında değişikliğe neden olmayan küçük baz hasarlarının onarıldığı DNA tamir mekanizmasıdır. Bu sistemde ilk olarak, modifiye bazın özgül DNA glikozilazlar tarafından tanınıp uzaklaştırılması ile AP bölgenin oluşumu sağlanır. AP bölgedeki fosfodiester bağı AP endonükleazlar tarafından kesilir. Tek zincir kırığının olduğu bölgede açık uçlar DNA polimeraz I'in aktivite görebileceği şekilde (3'OH ve 5'PO₄) işlenir. Boşluk DNA polimeraz I tarafından doldurulduktan sonra, zincir kırığı DNA ligaz ile kapatılır (Şekil 2.12) [161].



Şekil 2.12. Baz hasarının BER sistemi ile onarımı [161]

DNA glikozilazların monofonksiyonel ve bifonksiyonel olmak üzere iki tipi vardır. Monofonksiyonel olanlar sadece glikozilaz aktivitesine sahipken, bifonksiyonel olanlar hem glikozilaz hem de liyaz aktivitesine sahiptir [159]. Modifiye komet yönteminde en çok kullanılan bifonksiyonel glikozilazlar formamidopirimidin DNA glikozilaz (Fpg) ve endonükleaz III (Endo III), monofonksiyonel endonükleazlar ise alkil (3-metil) adenin DNA glikozilaz (AlkA veya hAAG) ve urasil DNA glikozilaz (UDG)'dir.

Formamidopirimidin (Fapy)-DNA glikozilaz (Fpg); DNA'da imidazol halkası açılmış fapy-guanin, metil-fapy-guanin, fapy-adenin gibi hasarlı fapy pürin bazlarını ve 7, 8-dihidro-8-oksoguanin (8-oksoguanin), 8-oksoadenin gibi okside pürin bazlarını tanıyıp uzaklaştıran onarım enzimidir [157,162,163]. Hasarlı pürin bazlarını tanıma özgüllüğü yüksek olsa da, nadir olarak 5-hidroksi-sitozin, 5-hidroksi-urasil gibi okside pirimidinleri de tanıyıp uzaklaştırabildiği bilinmektedir. Enzimin substrat yelpazesi geniş olsa da, 8-okso-guanine ilgisi diğer sübstratlara göre daha yüksek olduğu için 8-oksoguanin DNA glikozilaz olarak da adlandırılmaktadır [155,157]. Hem N-glikozilaz hem de AP-liyaz aktivitesine sahip olan Fpg; N-glikozilaz aktivitesi ile hasarlı bazı DNA'dan uzaklaştırarak AP bölge

oluştururken, AP liyaz aktivitesi ile AP bölgenin hem 3' hem de 5' ucunu keserek DNA zincirinde 1 bazlık boşluk bırakır [160,162,163]. Fpg, *E.coli*'ye ait bir glikozilaz enzimi iken bu enzimin insandaki homoloğu insan 8-oksoguanin DNA glikozilaz (hOOG1)'dir [164].

Endonükleaz III (Nth, Endo III): Bu enzim de Fpg gibi hem N-glikozilaz hem de AP-liyaz aktivitesine sahip bifonksiyonel glikozilaz enzim ailesinin bir üyesidir. N-glikozilaz aktivitesi ile çift zincirli DNA'dan hasarlı pirimdinleri uzaklaştırarak bir AP bölge oluştururken, Ap-liyaz aktivitesi ile AP bölgenin 3' ucunu keserek 5' fosfat ve 3' halkası açılmış deoksiriboz şeker oluşumuna neden olmaktadır. Endo III'ün tanıyıp uzaklaştırabildiği hasarlı bazlara ait substrat yelpazesi ise timin glikol, 6-hidroksi-5, 6-dihidrotimin, 5, 6 dihidroksitimin, 5-hidroksi-5 metilhidanton, urasil glikol, üre, metiltartronilüre gibi okside pirimidinlerden oluşmaktadır [163,165].

İnsan alkil adenin DNA glikozilaz (hAAG): Metil purin DNA glikozilaz (MPG) veya 3-metil adenin DNA glikozilaz (ANPG) olarak da bilinen hAAG enzimi 3-metiladenin, 7-metilguanin gibi alkillenmiş veya 1,N⁶-etenoadenin ve hipoksantin gibi okside bazları tanıyıp N-glikozidik bağı hidrolize ederek DNA'dan uzaklaştıran monofonksiyonel bir onarım enzimidir [166-168]. Bu enzimin bakterideki homoloğu ise AlkA'dır.

Modifiye komet yöntemi ile tespit edilmek istenen hasar tipleri ise çalışmanın amacına bağlı olarak kullanılan enzimin sübstrat özgüllüğüne ve çeşidine bağlıdır. Örneğin, okside olmuş pirimidinlerin sıklığı endonükleaz III enzimi, 8-OH-dG hasarının sıklığı, formamidopirimidin DNA glikozilaz, 3-metiladeninlerin sıklığı ise 3-metiladenin DNA glikozilaz kullanılarak gösterilebilmektedir [155,156,169,170]. Bu yöntemde sıklıkla kullanılan enzimlere ait özellikler Çizelge 2.6 ve Çizelge 2.7'de özetlenmiştir.

Sonuç olarak çeşitli onarım enzimleri kullanılarak uygulanan alkali komet testi (modifiye komet testi) ile eksojen veya endojen kaynaklı oksidatif hasarlı bazlar, apürinik veya apirimidinik (AP) bölgeler (alkali duyarlı bölgeler) ve alkillenmiş modifiye bazlar modifiye komet yöntemi ile belirlenebilmektedir. Özellikle oksidatif stres ve alkilleyici ajanların etkisi sonucu oluşan modifiye DNA bazların seçici enzimlerce tanınması ile ilgili çok sayıda güncel yayına rastlanmaktadır [169].

Çizelge 2.6. Modifiye komet yönteminde kullanılan glikozilazlar ve özellikleri [164,171,172]

Organizmalardaki homologları			Tipi	Substratları		Kesim Bölgeleri	Kesim sonrası Zincir Uçlarının Durumu	
Bakteri (<i>E.coli</i>)	Maya (<i>S.cerevisiae</i>)	İnsan					3' Ucu	5' Ucu
Fpg (=MutM)	Ogg1	hOOG1	Bifonksiyonel	Okside pürinler	7, 8-dihidro-8-oksoG (8-oksoG), 8-oksoA	Lezyonun hem 5' hem de 3' ucundaki 1. fosfodiester bağı (FPg için)	P	P (Fpg için) PA(hOOGG1 için)
				Fapy pürinler	fapyG, metilfapyG, fapyA			
				Okside pirimidinler	5-hidroksi-C, 5-hidroksi-U			
				AP bölgeler	Apürinik/Apirimidinik			
Endo III (=Nth)	Ntg1 Ntg2	hNTH1	Bifonksiyonel	Okside pirimidinler	timin glikol, 6-hidroksi-5, 6-dihidrotimin, 5, 6-dihidroksitimin, 5-hidroksi-5 metilhidanton, urasil glikol, üre, metiltartronilüre	Lezyonun 3' ucundaki 1. fosfodiester bağı (Endo III için)	P	PA
				AP bölgeler	Apürinik/Apirimidinik			
Endo VIII (=Nei)	?	hNEIL1	Bifonksiyonel	Timin glikol, 5-hidroksiU,5-hidroksiC, üre, fapyG,fapyA		Lezyonun hem 5' hem de 3' ucundaki 1. fosfodiester bağı	P	P
		hNEIL2		AP bölgeler, 5-hidroksiU				
		hNEIL3		Bilinmiyor				
AlkA	Mag1	hAAG (=MPG)	Monofonksiyonel	3-metilA, 7-metilG ,hipoksantin, 1,N6-etenoadenin		N-glikozidik bağ	AP bölge (kırık oluşmaz)	
UDG	Ung1	UNG	Monofonksiyonel	Urasil ve Urasil türevleri		N-glikozidik bağ	AP bölge (kırık oluşmaz)	

AP Apürinik/apirimidinik bölgeler U Urasil
P Fosfat PA 3' fosfo-α, β-doymamış aldehit
OH Hidroksil G Guanin
A Adenin C Sitozin
Fapy Açık halkalı

Çizelge 2.7. Modifiye komet yönteminde kullanılan DNA glikozilazların tek ve çift zincirli DNA'da çeşitli hasarlı bazları onarabilme kapasiteleri [172]

Enzimler	34-mer'lik Çift Zincirli DNA'da											34-mer'lik Tek Zincirli DNA'da							
	AP:A	DHT:A	5-hmU:A	5-hmU:G	I:T	6-MeA:T	8-OG:C	8-OG:G	U:A	U:G	Timin Glikol:A	AP	DHT	5-hmU	I	6-MeA	8-OG	U	Timin Glikol:A
Endo III	++++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-
Endo VIII	++++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-
Fpg	+	+	-	-	-	-	++++	++++	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
hAAG	-	-	-	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
hNEIL1	++++	++	-	-	-	-	+	+	-	-	++	+	+	-	-	-	-	-	+
hOGG1	++	-	-	-	-	-	++++	+	-	-	-	++	-	-	-	-	+	-	-
UDG	N/A	-	-	-	-	-	-	-	++++	+	-	N/A	-	-	-	-	-	++++	-

AP	Apürinik/apirimidinik bölge
DHT	5,6-dihidrotimin
5HMU	5-hidroksimetil urasil
I	İnozin
6MeA	6-metiladenin
8-OG	8-oksoguanin
U	Uridin
AP:A	Adenin ile eşleşen apürinik/apirimidinik bölge
DHT:A	Adenin ile eşleşen 5,6-dihidrotimin
5HMU:A	Adenin ile eşleşen 5-hidroksimetil urasil
5HMU:G	Guanin ile eşleşen 5-hidroksimetil urasil
I:T	Timin ile eşleşen İnozin
6MeA:T	Timin ile eşleşen 6 metiladenin
8-OG:C	Sitozin ile eşleşen 8-oksoguanin
8-OG:G	Guanin ile eşleşen 8-oksoguanin
U:A	Adenin ile baz eşleşmesi yapmış Urasil

Onarım seviyesi

++++	100%
++	10% –25%
+	<10%
-	Tespit edilebilecek enzim aktivitesi yok (<0.7%)
N/A	uygulanamaz

2.7.4. Ames *Salmonella*/Mikrozom Testi

“Bakteride geri mutasyon testi” olarak da adlandırılan Ames *Salmonella*/mikrozom testi, gen düzeyinde mutasyonlara sebep olan potansiyel genotoksik ajanların (çevresel kirleticiler, kozmetik ürünler, ilaç katkı ve etken maddeleri..vb) belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan kısa zamanlı mutajenite testlerinden birisidir. 1973’de Dr. Bruce Ames [173] tarafından geliştirilen yöntem; kolay uygulanabilir ve düşük maliyetli olması, mutajenlere karşı yüksek hassasiyet göstermesi ve test sisteminde kullanılan parametreler açısından çok iyi standartize edilmiş olması gibi avantajları nedeniyle pek çok araştırma laboratuvarlarında kullanılmaktadır. Ayrıca geçerliliği birçok araştırma ile gösterildiği için OECD, ICH ve EPA gibi düzenleyici kuruluşların araştırma-geliştirme aşamasında olan ilaç öncül bileşiklerin, insan sağlığı üzerindeki olası karsinogenik potansiyellerinin tahmininde ilk sırada uygulanması önerilen ön tarama testi olması açısından da önemlidir (Çizelge 2.4) [125,126,174]. Bunun yanı sıra, test sisteminde mutajen/karsinogen etkisi bilinen kimyasallar ile birlikte uygulandığında antimutajenik/antikarsinogenik maddelerin saptanmasında da yöntem sıklıkla kullanılmaktadır [175-177].

Ames testinin temel mantığı histidin aminoasidi sentezleme yeteneklerini kaybetmiş (okzotrofik) bakteri suşlarının test bileşeni ile muamelesi sonucu oluşan mutasyonlarla yeniden histidin sentezleyebilen (prototrofik) duruma geri döndürülmesi esasına dayanır. Mutajenite, histidinsiz ortamda üreyen bakteri kolonilerinin sayılması ile belirlenirken, test bileşeninin bu etkiyi yaratan mutasyon tipi ise sistemde kullanılan bakteri suşunun genotipi ile ilgilidir. Bu test sisteminde *Salmonella typhimurium*’ un atasal LT2 suşundan *in vitro* mutasyonlar sonucu elde edilen histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş (his⁻) mutant suşlar (TA97, TA98, TA100, TA102, TA104, TA1535, TA1537, TA1538...v.b.) kullanılmaktadır. *S. typhimurium*’ un yaygın olarak kullanılan mutant suşlarının genetik özellikleri Çizelge 2.8’de verilmiştir [177].

Çizelge 2.8. Ames testinde yaygın olarak kullanılan mutant suşların genotipik özellikleri [177]

Suş	Genotipik Özellikleri				DNA Dizi Özgüllükleri	
	Mutasyon	Bio chIO uvrB gal	LPS Hasarı	Plasmid	DNA'daki Hedef Bölge	Geri dönüşüm Mekanizması
TA1535	hisG46	Delesyon	rfa	Plasmid Yok	_G-G-G_	Baz Çifti Değişimi
TA100				pKM101		
TA1538	hisD3052			Plasmid Yok	_C-G-C-G-C-G-C-G_	Çerçeve Kayması
TA98				pKM101		
TA1537	hisC3076			Plasmid Yok	_C-C-C_ yakınına (+1 ç.k.)	
TA104	hisG428			Atasal	Plasmid Yok	TAA (ochre)
TA102		pKM101 + pAQ1				
TA97	hisD6610	Delesyon		pKM101	_C-C-C-C-C-C_ (sonuna+1C)	Çerçeve Kayması
	hisO1242					

Her bir test suşu, histidin operonunda bulunan çeşitli genlerden birinde ya DNA'daki tek bir bazın değişimi sonucu oluşan nokta mutasyona (baz değişimleri) ya da bir bazın eklenmesi ya da çıkarılması ile kendini gösteren çerçeve kayması mutasyonuna sahiptir. Örneğin test sisteminde en çok kullanılan suşlardan biri olan TA100 suşunda; histidin biyosentezindeki ilk enzim olan pirofosforilazı kodlayan PR-ATP hisG genindeki hisG46 mutasyonu, gende lösini kodlayan kodon (-GAG-) yerine prolini kodlayan kodonun (-GGG-) gelmesine neden olmuştur. Aynı şekilde TA98 suşunda, histidin biyosentezindeki son enzim olan ve histidinolu histidine çeviren L-histidinol dehidrogenazı kodlayan hisD genindeki hisD3052 mutasyonu, 8 kez tekrarlanan GC dizisine (-GCGCGCGC-) sahiptir ve dolayısıyla tek bir nükleotidin eksikliği sonucu okuma çerçevesinde çerçeve kaymasına neden olmaktadır. Histidin amino asidinin biyosentezini kodlayan gen bölgesinde veya yakınında meydana gelen yeni mutasyonlar, ilgili gen bölgesinin fonksiyonunun düzelmesine ve histidin amino asidi sentezleyen kolonilerin oluşumuna olanak tanımaktadır. Bu nedenle baz çifti değişimine neden olan mutajenlerin belirlenmesi için TA100 suşu, çerçeve kayması mutasyonlarına sebep olan mutajenlerin belirlenmesi için TA98 tercih edilmektedir. İlgili mutasyon test bileşeni etkisi ile geri döndürüldüğü için Ames testi sıklıkla bir geri mutasyon testi olarak da adlandırılmaktadır [175,177].

Ayrıca bahsedilen his- mutata suşlarının etken maddeye karşı hassasiyetinin artırılması amacıyla içerdikleri histidin mutasyonlarına ek olarak farklı mutasyonlar da eklenmiştir. Bunlar;

rfa mutasyonu: Bu mutasyon bakterinin lipopolisakkarit tabasının oluşumundan sorumlu genlerde oluşturulmuş olup, hücre duvarının büyük moleküllere karşı geçirgenliğinin artırılmasına sebep olur [175, 177].

uvrB mutasyonu: DNA onarım sisteminde nükleotit kesip-çıkarma onarımında görev alan uvrB genindeki delesyon sonucu oluşturulmuştur. Böylece nükleotit kesip çıkarma onarımını çalıştıramayan bakteri, hata oranı yüksek (SOS) onarım sistemini devreye soktuğu ve daha fazla lezyonun onarımını sağladığı için birçok mutajenin belirlenmesi mümkün olur. Ancak bu mutasyonun oluşturulması için kullanılan teknikte uvrB geninin kesilerek uzaklaştırılması sırasındaki delesyon H vitamini olarak bilinen biyotini kodlayan gene kadar uzanmaktadır. Dolayısıyla test sisteminde kullanılan suş, üremek için histidin yanında biyotine de ihtiyaç duymaktadır.

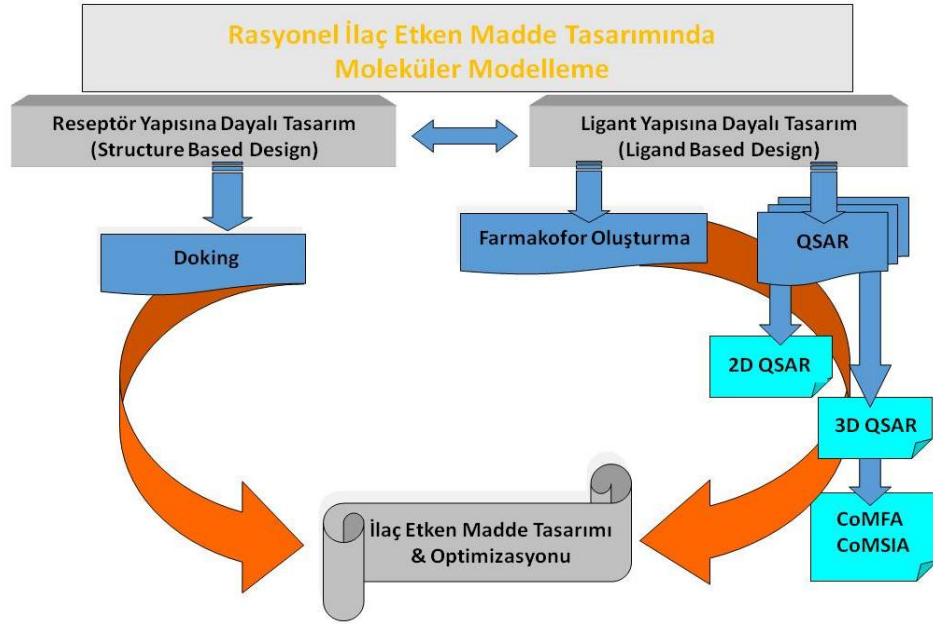
pKM101 plazmidinin eklenmesi: Ampisilin direnç geni ve SOS onarım istemine ait genleri içeren bu plazmidin bakteriye eklenmesi ile SOS ve rekombinasyonel onarım daha fazla çalışacağından, fiziksel veya kimyasal ajanlarla indüklenen mutajenite artırılmış olacaktır.

Ames test sisteminde standart olarak kullanılan bu suşlara, nitroarenler ve aromatik aminlerin hücre içindeki metabolik aktivasyonunu sağlayan asetil transferaz ve nitroredüktaz enzimlerin sentezinden sorumlu genleri içeren plazmitlerin eklenmesiyle yeni suşlar (YG1021, YG1026, YG1041 VE YG1042), bu suşlara ek olarak da TA98 ve TA100 suşlarında nitroredüktazı kodlayan genlerinde hasar taşıyan TA98NR ve TA10NR suşları geliştirilmiştir [178]. Böylelikle test sisteminin nitroaren veya aromatik aminlere karşı hassasiyeti artırılmıştır. Ayrıca A:T baz değişim mutasyonlarını daha kolay tanımlayabilmek amacıyla TA7001, TA7002 ve TA7003, G:C baz çifti mutasyonlarını tanımlayabilmek için TA7004, TA7005 ve TA7006 his- özellikteki yeni *S. typhimurium* suşları geliştirilmiştir. Böylece her bir test suşu 6 farklı baz çifti değişiminden birini tespit ederek daha hassas bir tarama gerçekleştirilmektedir [179].

Ayrıca bu yöntemde, memeli karaciğerinden elde edilen mikrozomal enzimleri içeren metabolik aktivasyon sisteminin kullanılması ile test bileşenlerinin olası metabolitlerinin mutajenik potansiyelleri de belirlenebildiği için, yöntem “*Salmonella*/mikrozom testi” olarak da bilinir [175, 177].

2.8. Antikanser İlaç Tasarımlarında Yapı-Aktivite Çalışmaları

Antikanser ilaç tasarımlarında aday olarak belirlenecek moleküllerin seçiminde benimsenen ve çoğu zaman birbiriyle ilişkili 2 temel yöntem kullanılmaktadır (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. İlaç etken madde tasarımında kullanılan stratejiler

2.8.1. Ligand (Referans İlaç) Temelli Yaklaşımlar

Bu yaklaşımda belirlenen hedef molekülle etkileşime girdiği bilinen referans ilaçlara benzer yeni ilaçların sentezlenmesi ve bunların biyolojik aktivitelerinin değerlendirilmesi söz konusudur. Bu yaklaşım genellikle hedef molekülün yapısının bilinmediği durumlarda tercih edilir ve etki gösteren bileşiklerin yapısından hedef molekülün yapısının yorumlanmasına olanak sağlar.

Ligand temelli yaklaşımlarda elde edilen biyolojik aktivite verileri ile bileşiklerin yapılarının değerlendirilmesinde yapı-aktivite ilişkisi (SAR), nicel yapı-aktivite ilişkisi (QSAR) ve farmakofor oluşturma gibi yöntemler kullanılabilir [180].

SAR, bir dizi bileşiğin yapısındaki çeşitli grupların biyolojik aktiviteye etkisinin kalitatif olarak yorumlanmasıdır. Burada bileşikte değiştirilen herhangi bir grubun

aktivitede meydana getirdiği pozitif ya da negatif değişikliğin sebep sonuç ilişkisine bağlı olarak değerlendirilmesi esas alınır. QSAR ise bileşiklerin biyolojik aktiviteleri ile kimyasal ve geometrik özellikleri arasındaki matematiksel ilişkileri ifade eder. Belirlenen bu kantitatif veriler yeni bileşiklerin sentezi için bir kılavuz oluşturur [180].

Farmakofor, belli bir biyolojik aktivite için gerekli olan yapısal elemanların uzaysal düzenlemesi olarak ifade edilmektedir. Farmakofor analizlerinde ligand üzerindeki hidrojen alıcısı veya vericisi gruplar, hidrofobik, hidrofilik ya da aromatik gruplar ile bu grupların sterik olarak molekül içindeki yerleşimleri gibi parametreler esas alınır. Hedefe yönelik bir dizi aday bileşik için oluşturulan en uygun farmakofor modeli hedef için en uygun moleküler düzenlenmeyi ifade eder ve bileşiklerin her birinin bu düzene uygunluğu test edilmiş olur. Etkili olan lider bileşiğin önce en düşük enerjili yapısı oluşturulur, sonra diğer bileşiklerin lider bileşik ile akışabilen konformasyonları bulunarak çakıştırma yapılır. Böylece etkili bileşiklerin sentezi için bir kılavuz oluşturulmuş olur [5,181,182].

Günümüzde, farklı algoritmaları baz alarak alışan DISCO, GASP, Catalyst, Discovery Studio gibi bilgisayar programlarından yararlanarak ve HipHop, HypoGen gibi teknikler kullanılarak farmakofor hipotezleri oluşturulabilmektedir.

HipHop yöntemi ile özgül bir terapötik alanda aktif olduğu tespit edilen bir dizi bileşikten, biyolojik aktiviteleri göz önünde bulundurulmadan farmakofor modelleri oluşturulmaktadır. Bu modeller reseptör olarak belirlenen bölgelere bağlanma için gerekli olan karakteristikleri belirleyen özelliklerin genelleştirilmiş fonksiyonlardan oluşmaktadır. Ortaya ıkarılan üç boyutlu farmakofor hipotezi de diğer olası bileşik adaylarını saptamak amacıyla kullanabilmektedir.

HipHop yöntemi kullanılarak farmakofor hipotezlerinin oluşturulması için biyolojik aktivitesi belirlenmiş olan bir seri bileşik programa aktarılır ve moleküllerin konformerleri oluşturulur, sonrasında moleküllerin yapısına göre ortak özellikler belirlenir. Moleküller st üste çakıştırılır ve seçilen ortak özelliklere göre hipotezler oluşturulur, oluşan hipotezler de uyum değerlerine göre sıralanırlar. Hipotezler arasından en fazla özelliği taşıyan, uyum değerleri yüksek olan ve moleküllerle en iyi haritalanmayı sağlayan hipotez seçilir. Seçilen hipotezle biyolojik aktivitesi test edilmiş bileşikler ya da başka aday bileşikler taranır. İdeal bir HipHop alışması

gerçekleştirebilmek için, 2-32 molekülden oluşan bir çalışma serisi oluşturulmalı (en ideali 6 molekül), moleküller özellik bakımından zengin olmalı ve moleküllerin biyolojik aktiviteleri yüksek olmalıdır [183, 184].

HypoGen yönteminde ise, bileşiklerin biyolojik aktiviteleri ile moleküler yapıları arasındaki ilişkiyi tanımlayan farmakofor modelleri oluşturur. Ortaya çıkarılan farmakofor modeli aracılığıyla ilaç adayı olabilecek önder bileşiklerin tahmini biyolojik aktivite değerleri hesaplanabilir. Biyolojik aktivite değerlerine göre inaktiften aktife doğru bileşikler sıralanır. HypoGen algoritması aktif moleküllerin tamamında bulunan ortak özellikleri içeren, inaktif moleküllerde bulunan ortak özellikleri ise içermeyen bir hipotez oluşturmaya çalışır [185].

Sistem ilk olarak aktif bileşiklerin tümünde bulunan ortak hipotezleri taradıktan sonra burada elde edilen sonuçlardan inaktif bileşiklerin tümünde bulunan ortak hipotezleri çıkarır. Son olarak elde edilen sonuçlar optimize edilir. Tahmini aktiviteleri, ölçülen aktiviteler ile en iyi uyumu yakalayan 10 hipotez değerlendirilir ve en uygun olanı seçilir. İdeal bir Hypogen çalışması gerçekleştirebilmek için hem aktif, hem de inaktif olan bileşikler içeren 18-25 molekülden (en az 15 molekül) oluşan bir çalışma serisi oluşturulmalıdır. Bileşiklerin biyolojik aktivite değerleri 4 log birimlik bir aralığa yayılmış olmalı, her biyolojik aktivite aralığını temsil eden en az 3 bileşik olmalı, benzer yapı taşıyan bileşiklerin biyolojik aktivite sıralamasına göre aktiviteleri farklı olmalı ve benzer aktivite gösteren bileşikler yapısal olarak farklı olmalıdır [183-185].

.HipHop ve HypoGen yöntemleri arasındaki farklar Çizelge 2.9'da özetlenmiştir.

Çizelge 2.9. HipHop ve HypoGen yöntemlerinin farklı parametreler açısından karşılaştırılması

	HipHop	HypoGen
Bileşik Sayısı	2-32	10'dan fazla
Bileşiklerin aktivitesi	Aktif	Aktif ve inaktif
Aktivite değeri	Kullanılmaz	Kullanılır
Modelin şekli	Özelliğe dayalı	Tahmini aktiviteye dayalı
Modeller arasındaki farklar	Yapısal farklılıklara bağlı	Aktivite değerleri arasındaki büyüklüğe bağlı
Hipotez sayısı	Kullanıcı tanımlı	En fazla 10 hipotez
Tahmini aktivite sonucu	Vermez	Verir

2.8.2.Yapı (Reseptör) Temelli Yaklaşımlar

Yapı temelli yaklaşımlar hedef olarak belirlenen molekülün yapısal özellikleri esas alınarak bu yapılar ile etkileşime girebilecek aday moleküllerin tasarlanmasını baz alır. Dolayısıyla hedef molekülün üç boyutlu yapısının detaylı bir şekilde bilinmesine gereksinim duyar. Hedef olarak seçilen biyomoleküller çoğunlukla nükleik asitler ve proteinlerdir.

DNA'yı hedef alan moleküller genel olarak genotoksik ajanlar olarak ifade edilebilir. Proteinleri hedef alanlar arasında çoğunlukla özgül olarak kanser oluşumu, ilerlemesi ve yayılmasında görev alan yolaklarda işe karışan enzimlerin inhibitörleri önemli bir yer tutar.

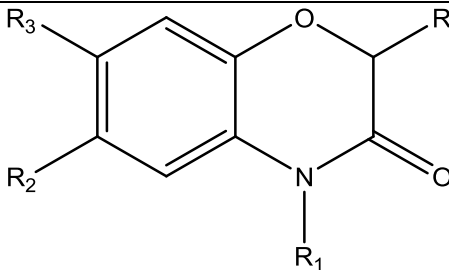
Hedef molekül temelli tasarımlarda moleküler doking çalışmaları önemli yer tutar. Teknolojik gelişmelerin hızlı olduğu günümüzde hedef biyolojik moleküller ile ilgili bilgilerimizin artması bu çalışmaların ilgi çekici olmasının en büyük nedenidir. Doking çalışmalarında yapısı bilinen reseptör molekülün aktif bölgeleri ile uyum gösterebileceği tahmin edilen moleküller tasarlanıp bilgisayar simülasyonları ile uyumları değerlendirilmektedir. Bu şekilde elde edilen ligand dizileri biyolojik aktivite verileri ile değerlendirilerek uyumları karşılaştırılmaktadır [186,187].

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Test Edilen Bileşikler

Tez çalışmasında kullanılan 18 adet benzoksazin türevi bileşik Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nda sentezlenmiştir [34, 35]. Bu çalışmada kullanılan kimyasal bileşikler mikrodalga yöntemi ile Serap Yılmaz tarafından yeniden sentezlenmiştir. Çalışmada test edilen bileşiklerin açık formülleri, moleküler ağırlıkları ve partisyon katsayıları (LogP) Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Test edilen benzoksazin türevi bileşiklere ait ortak halka yapıları, molekül ağırlıkları ve partisyon katsayıları

						
Kod	R	R ₁	R ₂	R ₃	Molekül Ağırlığı (g/mol)	LogP
BS1	CH ₂ COOC ₂ H ₅	H	H	H	235	1,059
BS2	CH ₂ COOC ₂ H ₅	H	CH ₃	H	249	1,545
BS3	CH ₂ COOC ₂ H ₅	H	Cl	H	269	1,723
BS4	CH ₂ COOC ₂ H ₅	H	COOC ₂ H ₅	H	307	1,263
BS5	CH ₂ COOC ₂ H ₅	H	H	NO ₂	280	0,953
BS6	CH ₂ COOC ₂ H ₅	H	H	NH ₂	250	0,312
BS7	CH ₂ COOC ₂ H ₅	H	Cl	NO ₂	314	1,618
BS8	CH ₂ COOC ₂ H ₅	CH ₃	H	H	249	1,265
BS9	CH ₂ COOC ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	H	263	1,751
BS10	CH ₂ COOC ₂ H ₅	CH ₃	Cl	H	283	1,929
BS11	CH ₂ COOC ₂ H ₅	CH ₃	COOC ₂ H ₅	H	321	1,469
BS12	CH ₂ COOC ₂ H ₅	CH ₃	H	NO ₂	294	1,159
BS13	CH ₂ COOC ₂ H ₅	CH ₃	Cl	NO ₂	328	1,824
BS14	CH ₂ COOC ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H	H	263	1,614
BS15	CH ₂ COOC ₂ H ₅	C ₂ H ₅	Cl	H	297	2,278
BS16	CH ₂ COOC ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H	NO ₂	308	1,508
BS17	CH ₂ COOC ₂ H ₅	C ₂ H ₅	Cl	NO ₂	342	2,173
BS18	OH	H	H	H	165	0,499

LogP: Bileşiklerin lipofilite göstergesi [Partisyon katsayısı = Log[X]_(Oktanol) / Log[X]_(Su)]

3.2. Test Bileşiklerinin Hazırlanması

Test bileşikleri, dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek stok çözeltileri hazırlanmış ve kullanılıncaya kadar -20°C' de saklanmıştır. Her çalışma öncesinde donmuş haldeki bu stok çözeltiler oda sıcaklığında çözündürüldükten sonra, her bir bileşiğe ait farklı konsantrasyonları DMSO ile her seferinde taze olarak hazırlanmıştır.

Çözücü olarak kullanılan DMSO 'nun çalışmada kullanılan test sistemlerine etkisi "çözücü kontrol" olarak her bir test sisteminde incelenmiş ve test sistemlerine etkisi olmadığı bulunmuştur.

3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

Sülforodamin B (SRB) testi, komet testi ve modifiye komet test sistemlerinde L929 (fare deri altı gevşek (areolar) bağ doku (adipoz) fibroblast) ve HeLa (insan serviks epitelyal adenokarsinom) hücre dizileri kullanılmıştır. Bu hücre dizileri Prof. Dr. Mehmet Ali Onur ve Doç. Dr. Aylin Gürpınar'dan (Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Fizyoloji A.B.D.) temin edilmiştir. Hücre kültürü ile yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

3.3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) (HyClone, Utah,USA), fetal bovine serum (FBS) (Lonza, Belçika), penisilin- streptomisin çözeltisi (Lonza, Belgium), tripsin-EDTA (Gibco-BRL, Gaithersburg, USA) ve %0.4'lük Tripan mavisi (Sigma, USA) ticari olarak temin edilmiştir.

3.3.2. Kültür Ortamının Hazırlanması ve Hücre Dizilerinin Çoğaltılması

Kültür Ortamı (10 ml)

Fetal Bovine Serum.....	1 ml
Penicilin-Streptomisin.....	100 µl
DMEM.....	8.9 ml

L929 ve HeLa hücreleri; %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin ile desteklenmiş yüksek glukozlu DMEM ile hazırlanmış kültür ortamında, 37°C sıcaklık, %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatörde, aseptik koşullarda üretilmiştir. Bu amaçla 25 cm² ve 75 cm²'lik hücre kültürü kapları kullanılmıştır.

24-72 saat inkübasyon boyunca; hücre yoğunluğu ve hücrelerin kültür kabı yüzeyine tutulumu, alttan aydınlatmalı ışık mikroskopunda (Olympus) incelenmiştir.

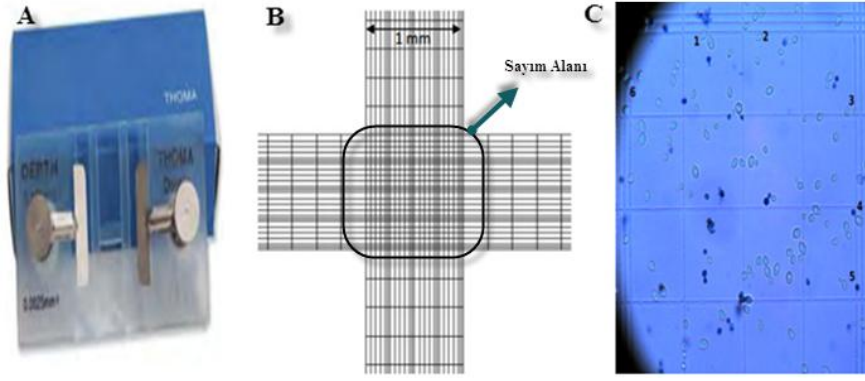
3.3.3. Hücrelerin Pasajlanması

%80-90 hücre yoğunluğuna ulaşmış hücreler, pasajlanarak çoğaltılmıştır. Bu amaçla besiyeri, hücrelerin tutunmadığı yüzeyden pipetör ile toplanarak atık kabına boşaltıldıktan sonra hücreler PBS ile 2 kez yıkanmıştır. 1 ml tripsin kültür kabına eklenip, hücrelerin yüzeyden ayrılması için 5 dak. 37°C'lik etüvde inkübe edilmiştir. Hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra; 5 ml DMEM kültür kabına eklenip, 5 dak. 800 rpm'de santrifüje edildikten sonra süpernatant atılıp, santrifüj tübü alt çeperinde peleti oluşturan hücreler hafifçe kaldırılmıştır. 10 ml kültür ortamı içinde süspanse edilmiştir. Daha sonra hücre süspansiyonu eşit olarak 2 ayrı kültür kabına bölünüp, kültür kapları %95 nem ve %5 CO₂ içeren 37°C sıcaklıktaki etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Bir sonraki pasajlama işlemine kadar kültür kabı içerisindeki kültür ortamı 2-3 günde bir tazelenmiştir.

3.3.4. Canlı Hücre Sayımı (Tripın Mavisı Boya Atılım Testi):

Çalışmada kullanılan hücrelerin canlılığı ve sayımı tripan mavisı boya atılım yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu yöntemle göre, hücre süspansiyonu % 0.4'lük tripan mavisı ile 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra thoma lamı üzerine yüklenerek mikroskop altında hücre sayımı yapılmıştır. Ölü hücreler hücre membranlarını kaybettikleri için boyayı içine alarak mavi renkte, canlı hücreler ise boya almadığı için şeffaf şekilde görülmüştür (Şekil 3.1).

Sayım alanındaki tüm bölmeler sayılarak, hücre konsantrasyonu (hücre/ml) $A \times SF \times 10^4$ formülüne göre hesaplanmıştır. (A: Sayım alanında sayılan hücre sayısı; SF: Sulandırma faktörü)



Şekil 3.1. Tripan mavisi boya atılım testi, A: Thoma lamının genel görünüşü, B: Thoma lamındaki sayım alanının büyütülmüş görüntüsü, C: Tripan mavisi boya atılım yönteminin mikroskopik görüntüsü (Canlı hücreler şeffaf, ölü hücreler ise mavi renkte görülmektedir.)

3.3.5. Hücrelerin Dondurularak Saklanması

Hücrelerin dondurulma aşamasında, kriyoprotektif madde varlığında kademeli dondurma işlemi uygulanmıştır. Bu amaçla hücreler tripsinizasyon ile toplanmıştır. Daha sonra 800 rpm'de 5 dak. santrifüleme ile tripsin ortamdan uzaklaştırılmıştır. Peleti oluşturan hücreler %5 DMSO + % 95 FBS içinde süspanse edilerek, buz üzerindeki 1,5 ml' lik kriyojenik tüplere aktarılıp hızlıca - 70 °C'lik derin dondurucuya alınmıştır. Dondurulmuş hücreler - 70 °C' de 1-2 ay saklanabilir. Uzun süreli saklamalar için ise hücreler - 70 °C'de 2-4 saat bekletilip sıvı azot içerisine (-196 °C) alınmıştır.

DMSO, hücrelerin etrafında hiper ozmotik çevre oluşturmaktadır. Böylelikle viskozitesi düşük olduğu için hemen kristalize olma özelliği olan suyun, hem kristalleşmeden katı hale geçmesini (vitrikasyonu) sağlar, hem de hücrelerin dehidrasyonunu önler. Aynı zamanda hücre içi suyu ile yer değiştirip, buz kristallerinin oluşumunu önleyerek, hem hücre zarını kararlı kılar hem de hücre zarı ve hücre içi organellerini buz kristallerinin zararlı etkilerinden korumuş olur.

-196°C'deki sıvı azot tankında saklanan L929 ve HeLa hücreleri, tanktan çıkarılıp önceden 37°C' ye ayarlanmış su banyosuna alınarak hücrelerin hızlı bir şekilde çözünmesi sağlanmıştır. Seri bir şekilde çözünen hücreler, 5 ml DMEM içerisinde süspanse edilmiştir. 1000 rpm' de 5 dak. santrifügasyon sonrasında DMSO içeren süpernatant uzaklaştırılmıştır. Böylelikle, dondurma işlemi sırasında kullanılan %5'lik DMSO'nun olası toksik etkisi önlenmiştir. Pelet 1 ml kültür ortamı içinde

tekrar süspanse edildikten sonra hücre canlılığı ve sayımı mikroskopik olarak gerçekleştirilmiştir. % 95-99 canlılıkta olduğu tespit edilen hücre süspanasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.

3.4. Sülförödamın B (SRB) Testi

Test bileşiklerinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla SRB yöntemi; Vichai ve Kirtikara'nın [138] 2006 yılında önerdiği yöntem üzerinde bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır.

Yöntem, anyonik sülförödamın B boyasının, fikse edilmiş hücrelerdeki bazik proteinlere bağlanmasını esas alır. 96 kuyucuklu mikrolaklarda her bir kuyucukta canlı kalan hücrelerin toplam protein miktarları kolorimetrik olarak ölçülmüştür [136].

3.4.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tris (Sigma, USA), trikloroasetik asit (TCA)(Sigma, USA), asetik asit (Sigma, USA) ve sülförhodamine B (SRB) (Sigma, USA) ticari olarak temin edilmiştir.

3.4.2. Yöntemin Aşamaları

Yöntem; mikrolaklara hücrelerin ekimi, test bileşikleri ile muamele edilmesi, fiksasyon ve yıkama, boyama, spektrofotometrik ölçüm sonrası analiz aşamalarından oluşmaktadır. Her bir aşama birçok parametre açısından [hücre yoğunluğu (1×10^3 , 5×10^3 , **1×10^4** *, 2×10^4 hücre/kuyucuk), fiksatif konsantrasyonu (**%10***, %16, %18, %20 TCA), fiksatif miktarı (50, 75, **100 µl*** TCA), fiksasyon süresi (30, **60***, 90 dakika), boya miktarı (50, 75, **100 µl***), boyama süresi (**30***, 60, 90 dakika)] optimize edilmiştir. Sonuç olarak 1×10^4 hücre yoğunluğu, 60 dakika %10'luk TCA ile fiksasyon, 100 µl SRB ile 30 dakika boyama ile deneylere devam edilmiştir.

Negatif kontrol olarak (%0,5 son konsantrasyonda) DMSO kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak rutinde kemoterapötik ajan olarak kullanılan kamptotesin (CPT), etoposid (ETOP) ve amsakrin kullanılmıştır.

A. Hücrelerin Hazırlanması

Test sisteminde kullanılan hücre dizileri; “hücre kültürü çalışmaları” bölümünde ayrıntılı şekilde belirtildiği gibi çoğaltılıp, thoma lamında hücre sayımı yapıldıktan sonra 10^5 hücre/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan bu hücre süspansiyonundan, 96 kuyucuklu mikrolaplardaki her bir kuyucuğa 100µl (10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde) eklenmiştir. Hücrelerin yüzeye tutunması için mikrolaplar; %5 CO₂ ve %95 nem içeren, 37 °C'deki etüvde 24 saat inkübe edilmiştir.

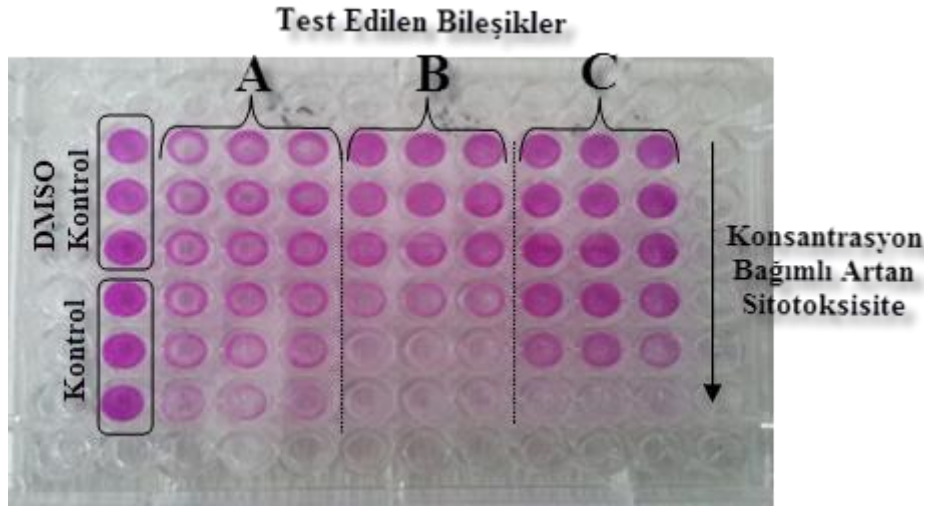
24 saat inkübasyondan sonra kuyucuklardaki besiyerleri mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldıktan sonra 6 farklı son konsantrasyonda (12.5-25-50-100-200 ve 400µM) benzoksazin türevlerini içeren kültür ortamı ile tazelenmiştir. Hazırlanan plaklar 48 saat inkübe edildikten sonra fiksasyon ve boyama işlemlerine geçilmiştir.

B. Fiksasyon ve Boyama

72 saatlik total inkübasyondan sonra, kuyucuklardaki besiyeri, plakların ters çevrilmesi ile uzaklaştırılmıştır. Her bir kuyucuğa 100µl %10 luk soğuk TCA dikkatlice eklenip 4°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Bu şekilde hücrelerin kuyucuklara fiksasyonu sağlanmıştır. Plak ters çevrilerek TCA uzaklaştırıldıktan sonra her bir kuyucuk 5 kez distile su ile yıkanarak kuyucuklarda kalan TCA ve hücre parçaları tamamen uzaklaştırılmıştır. Plaklar oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra her bir kuyucuğa %0.057 (g/ml) SRB'den 100 µL eklendikten sonra oda sıcaklığında 30dk bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası plaklar, kuyucuklardaki fazla boyanın uzaklaştırılması amacıyla 4 kez 1%'lik asetik asit ile yıkanmış ve sonra kurumaya bırakılmıştır (Şekil 3.2).

C. Spektrofotometrik Ölçüm ve Analiz

Boyanan proteinlerin çözünmesi için her bir kuyucuğa 200 µl tris (10mM pH:10,5) eklenip, 30 dakika beklendikten sonra 510 nm'de kuyucukların absorbansları ölçülmüştür.



Şekil 3.2. SRB yönteminde kullanılan plak düzeni ve deney sonrası plak görünümü

Bileşiklerle muamele edilen kuyucuklardaki optik dansite (OD) değerleri kontrol kuyucukların OD değerleri ile karşılaştırılarak bileşiklerin her bir konsantrasyonu için aşağıda verilen formüle göre % canlılık değerleri elde edildi.

$$\% \text{ Canlılık} = \text{OD}_{(\text{Örnek})} / \text{OD}_{(\text{Kontrol})} \times 100$$

Son olarak, bileşiklerin her bir konsantrasyondaki % canlılık değerleri, S-probit analizi ile değerlendirilerek hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyonlar (IC₅₀) hesaplanmıştır.

Her bir test bileşiğinin; her bir konsantrasyonu için 3 kuyucuk kullanılmış olup deneyler 3 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen verilerin ortalamaları ile analizler gerçekleştirilmiş, test edilen her konsantrasyon için hesaplanan % canlılık değerleri standart sapmaları ile birlikte değerlendirilmiştir.

3.5. Test Bileşiklerinin Hücre Morfoloji Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

Kültür kabı yüzeyini %80-90 oranında dolduran, %99 canlılığa sahip olduğu saptanan HeLa ve L929 hücreleri, tripsinizasyon ile kültür kaplarından toplandıktan sonra hücre sayımları yapılmıştır. Daha sonra hücreler, %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM içerisinde süspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonu, 96 kuyucuklu mikrolaktaki her kuyucuğa $1-2 \times 10^4$ hücre olacak şekilde çok kanallı pipet kullanılarak dağıtılmıştır. %5 CO₂ içeren 37°C'lik etüvde 24 saat hücrelerin yüzeye tutunmaları için beklenmiştir. İnkübasyon sonrasında, kuyucuklardaki besi yerleri uzaklaştırılarak, sitotoksosite çalışmalarında belirlenen IC₅₀ değerlerinin

altındaki 3 farklı konsantrasyonda bileşik içeren kültür ortamı her bir kuyucuğa eklenmiştir. Test bileşiklerinin hazırlanması için kullanılan oranda DMSO eklenmiş kuyucuklar “negatif kontrol”, kamptotesin ve etoposid bileşiklerinin 3'er konsantrasyonu eklenen kuyucuklar ise “pozitif kontrol” olarak kullanılmıştır. 24 saat ve 48 saat sonrası hücrelerin morfolojik görüntüleri, alttan aydınlatmalı mikroskop (OLYMPUS) ile 10x büyütmede incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

3.6. Test Bileşiklerinin SRB Testi Sonuçlarına Ait Farmakofor Analizi

Çalışmada test edilen benzoksazin türevlerinin L929 ve HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitelerinden sorumlu bölgeleri “HypoGen farmakofor modelleme analizi” ile incelenmiştir. Test bileşiklerine ait farmakofor analiz çalışmaları Serap Yılmaz (Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya A.B.D.) tarafından gerçekleştirilmiştir.

HypoGen analizinde, çalışma serisi olarak 18 adet 2*H*-3,4-dihidro-1,4-benzoksazin-3-on türevi bileşiklerle birlikte referans olarak kullanılan kamptotesin (CPT), etoposid (ETOP) ve amsakrin bileşiklerine ait Çizelge 4.22'de özetlenen SRB testinden elde edilen veriler kullanılmıştır.

Bileşikler Accelrys Discovery Studio 3.5. programında bulunan dahili 2D/3D görselleştirmeci kullanılarak hazırlanmıştır. Catalyst programı, her bir bileşik için konformasyonel modelleri Poling Algoritması kullanarak otomatik bir şekilde oluşturmuştur. “En iyi konformer oluşturulması” işlemi enerji değeri 0-20 kcal/mol'lük bir sınır içerisinde, maksimum sayıda konformer oluşumu için önerilen 255 değeri seçilerek uygulanmıştır. Oluşturulan konformasyonlar ‘3D QSAR Farmakofor Oluşturma’ yöntemi kullanılarak ortak moleküler özellikleri karşılaştırmak ve farmakofor hipotezi oluşturmak için kullanılmıştır.

HypoGen yöntemi, çalışılan setteki moleküllerde ortak olan ve kimyasal açıdan önem taşıyan fonksiyonel grupları karşılaştırırken konformasyonlardan yararlanmıştır. Bu karşılaştırılan yapılar üzerinden farmakoforik bir hipotez ortaya konulmuştur.

Farmakofor hipotezinin oluşturulması için hem HeLa hem de L929 hücre dizileri için hidrojen bağı alıcısı (HBA), hidrojen bağı vericisi (HBD), hidrofobik alifatik, hidrofobik aromatik ve aromatik halka özellikleri seçilmiş ve bu işlem sırasında tüm konformerler kullanılmıştır. Sonuçta elde edilen 10 hipotez incelenip, bu hipotezler

içerisinde korelasyon katsayısı (R^2) ve uyum değerleri en yüksek, aynı zamanda RMS (Root Mean Square= Karekök ortalama) değeri en düşük olanı en uygun hipotez olarak belirlenmiştir.

Oluşturulan hipotezler ile biyolojik aktiviteleri arasındaki korelasyona göre bileşiklerin tahmini aktivite sonuçları hesaplanmıştır. Elde edilen en uygun hipoteze göre test bileşiklerinin hipoteze uygunlukları değerlendirilmiştir.

3.7. Alkali Komet Testi

Alkali komet testi, Singh ve ark. [144] tarafından geliştirilen metot esas alınarak ve yöntem üzerinde bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır.

Çalışmada öncelikle test bileşiklerinin genotoksik potansiyelleri, IC_{50} konsantrasyonlarında zamana bağlı (24 ve 48 saat) olarak incelenmiş, etkili bulunan bileşiklerin doza bağlı deneyleri yapılmıştır.

3.7.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan sodyum hidroksit (NaOH) (Sigma, USA), dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma, USA), düşük erime dereceli agaroz (LMA) (Sigma, USA), normal erime dereceli agaroz (NMA) (Sigma, USA), trizma baz (Tris) (Sigma, USA), Triton X-100 (Sigma, USA), etidyum bromür (EtBr) (Sigma, USA), potasyum klorür (KCl) (Sigma, USA), disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) (Sigma, USA), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (Sigma, USA), etilendiamin tetra asetik asit disodyum tuzu dihidrat (Na_2EDTA) (Sigma, USA), sodyum klorür (NaCl) (Sigma, USA) ticari olarak temin edilmiştir.

3.7.2. Kullanılan Çözeltilerinin İçerikleri ve Hazırlanışı

1×PBS (10mM, pH 7.4, 1000 mL)

137 mM NaCl.....	8 g
2.7 mM KCl.....	0.2 g
10 mM Na_2HPO_4	1.44 g
2 mM KH_2PO_4	0.24 g

Tuzlar tartılıp 800 ml distile suya sırasıyla eklendikten sonra karıştırılarak ve ısıtılarak çözünmeleri sağlanmıştır. Çözelti pH'sı 7.4' e ayarlanarak son hacim distile su ile 1L'ye tamamlanmıştır. Kullanılincaya kadar 2-8 °C'de saklanmıştır.. Uzun süreli saklamalar için çözelti 10× olarak hazırlanmalıdır.

Stok Lizis Çözeltisi (pH 10, 1000 mL)

2.5 M NaCl.....	146.1 g
100 mM EDTA.....	37.2 g
10 mM Tris.....	1.2 g

Kimyasallar 700 ml ılık distile su içinde çözülmüştür. 8g NaOH çözelti içerisine eklenerek, 15 dakika manyetik karıştırıcı yardımı ile çözünmesi sağlanmıştır. Çözeltinin pH'sı 10 olana kadar 10 M NaOH eklendikten sonra distile su ile son hacim 890 mL'ye tamamlanmıştır. Kullanılincaya kadar oda sıcaklığında saklanmıştır.

Deneylerde kullanılan taze lizis çözeltisi son konsantrasyonu %1 olacak şekilde Triton X-100 ve %10 olacak şekilde DMSO eklenerek hazırlanmıştır. +4°C'de saklanmıştır.

Elektroforez Tamponu (pH 13.1, 500 mL)

10 M NaOH.....	15 mL
200 mM EDTA.....	2.5 mL

Deneylerde kullanılan elektroforez çözeltisi her defasında taze olarak hazırlanmış ve kullanılincaya kadar +4°C'de saklanmıştır.

Nötralizasyon Tamponu (pH 7.5, 1000 mL)

0.4 M Tris.....	48.5 g
Distile Su.....	1000 mL

Tris manyetik karıştırıcı yardımı ile çözüldükten sonra konsantre HCl ile çözelti pH'sı 7.5 'e ayarlanmıştır. Kullanılincaya kadar +4°C'de saklanmıştır. Ayda bir yeni çözelti hazırlanmıştır.

Düşük Erime Dereceli Agaroz (LMA) (%0.8)

80 mg düşük erime dereceli agaroz üzerine 10 ml PBS (10 mM, pH 7.5) eklenerek 400 watt mikrodalga fırında agaroz çözünene kadar kaynatılmıştır. Hücrelerin agaroz içene gömülüp lam yüzeyine yayılması basamağında kullanılmıştır. LMA her deney öncesinde taze hazırlanmıştır.

Normal Erime Dereceli Agaroz (NMA) (%1)

1 gr normal erime dereceli agaroz üzerine 100 ml distile su eklenerek 400 watt mikrodalga fırında agaroz çözünene kadar kaynatılmıştır. NMA lamaların agaroz ile kaplanması basamağında kullanılmıştır.

10×Stok Boyama Çözeltisi (20 µg/ml EtBr)

EtBr.....10 mg

Distile Su.....50 mL

10× stok boyama çözeltisi yukarıda belirtilen miktarda hazırlanıp +4°C'de saklanmıştır. Deneylerde stok boya çözeltisi 1/10 oranında seyreltilmiş ve her defasında 1× olarak taze hazırlanmıştır.

3.7.3. Yöntemin Aşamaları

Alkali komet yöntemi, lamaların kaplanması, hücrelerin hazırlanması, hücrelerin agaroz içine gömülmesi, lizis, alkali ile muamele, elektroforez, nötralizasyon, boyama, görüntüleme ve analiz aşamalarından oluşmaktadır.

Her bir aşama birçok parametre açısından [NMA yoğunluğu (% 0.5-%0.65-%0.8 ve %1'lik agaroz), LMA yoğunluğu (% 0.5-%0.65-%0.8 ve %1'lik agaroz), hücre yoğunluğu (1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 1×10^5 ve 2×10^5 hücre/kuyucuk)] optimize edilmiştir. Sonuç olarak %1'lik NMA yoğunluğu, %0.8'lik LMA yoğunluğu, 1×10^5 hücre/kuyucuk hücre yoğunluğu ile deneylere devam edilmiştir. Optimum şartlardaki deney aşamaları aşağıda ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.

Negatif kontrol olarak (%0,5 son konsantrasyonda) DMSO kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak H_2O_2 , kamptotesin ve etoposit kullanılmıştır. Kamptotesin ve etoposit hücreler ile 24 ve 48 saat 37°C'de, H_2O_2 ise 5 dakika 4°C'de inkübe edilmiştir.

A. Lamaların Hazırlanması:

Beher içindeki çözünmüş %1'lik NMA solüsyonuna lamalar tek tek batırıldıktan sonra, lamın kullanılmayan yüzü silindi ve yatay olarak düz bir zemine serilerek oda sıcaklığında 2-4 saat bekletilerek kurutulmuştur. Kurutulan lamalar üzerleri çizilmeyecek şekilde lam saklama kutularında 1-2 ay süreyle saklanabilir.

B. Hücrelerin Hazırlanması

Tez çalışması kapsamında hem normal (sağlıklı) hem de kanser hücrelerine örnek teşkil etmesi açısından L929 fibroblast ve HeLa serviks adenokarsinom hücreleri kullanılmıştır. Hücreler; “hücre kültürü çalışmaları” kısmında ayrıntılı şekilde belirtildiği gibi üretilmiş, tripsin-EDTA ile toplanmış ve thoma lamında hücre sayımları yapıldıktan sonra 10^6 hücre/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan bu hücre süspansiyonundan 500µl (10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde) 24

kuyucuklu mikroplaklardaki her bir kuyucuğa eklenmiştir. Mikroplaklar hücrelerin yüzeye tutunması için %5 CO₂ ve %95 nem içeren etüvde 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

24 saat inkübasyondan sonra kuyucuklardaki besiyerleri mikropipet yardımı ile uzaklaştırılmıştır. Daha sonra kuyucuklar her bir test bileşiğinin IC₅₀ konsantrasyonlarını içeren besiyeri ile tazelenmiştir. Bu aşamada aynı değişkenleri içeren iki mikroplak hazırlanmıştır. Hazırlanan bu plaklardan biri 24 saat, diğeri 48 saat 37 °C'de %5 CO₂ etüvde inkübe edilmiştir.

İnkübasyondan sonra kuyucukların içindeki besiyeri pipet yardımı ile uzaklaştırılmış ve 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra kuyucuklarda bulunan hücreler 100 µL tripsin-EDTA ile kaldırılarak üzerlerine 500 µL serum içeren besiyeri eklenmiştir. Her kuyucuk içindeki hücre süspansiyonu ayrı endorf tüplere toplanıp, 1500 rpm'de 5 dakika santrifüje edilmiştir.

C. Hücrelerin Agaroz İçerisine Gömülmesi

Santrifüj sonrasında süpernatant mikropipet yardımı ile pelete zarar vermeyecek şekilde yavaşça uzaklaştırılarak, tüp dibinde kalan pelet 50 µL PBS ile süspanse edilmiştir. Daha sonra her bir tüpteki hücre süspansiyonu üzerine 37°C sıcaklıktaki %0.8'lik LMA'dan 750 µl konulmuş, hafifçe pipetaj yapılarak hücre ve LMA karışımının 100 µl'si mikroskop lamaları üzerine damlatılmıştır. Bekletilmeden 24*60 mm boyutundaki lamel ile kapatılan lamalar, hücreleri ışıktan koruma amacıyla kutulara yatay olarak dizildikten sonra buzdolabına kaldırılmıştır. Agarın katılaşması için en az 30 dakika beklenmiştir. Agar katılaştıktan sonra lameller tek seferde lamaların üzerinden uzaklaştırılıp, lamalar şalelere dizilerek ve lizis aşamasına geçilmiştir.

D. Lizis

Taze hazırlanan ve +4°C'de muhafaza edilen lizis çözeltisi lamaların dizili olduğu şalelere aktarılmıştır. Lamalar +4°C'de bir gece boyu lizis çözeltisinde bekletilmiştir. Bu aşamada hücreler lizise uğradığı için ekstra hasarların önlenmesi için yöntemin diğer aşamaları karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

E. Alkali ile Muamele ve Elektroforez

Lizis çözeltisi içindeki lamalar şalelerden çıkartıldıktan sonra filtre kağıdı üzerine konularak lam üzerindeki fazla lizis çözeltisi uzaklaştırılmıştır. Lamalar; buzlu kısmı

eksi kutba gelecek şekilde ışık geçirmeyen elektroforez tankı içerisine sırayla yatay olarak dizilmiştir. Taze hazırlanmış 500 µL soğuk elektroforez tamponu (pH>13) yavaşça tanka aktarılmıştır. Lamlar DNA denatürasyonu için bu tampon içinde 1 saat bekletilmiştir. Bu esnada lam üzerindeki agaroz, elektroforez süresince açığa çıkacak ısı nedeniyle erimemesi için, tankın altı, etrafı ve üstü buz aküleri ile kapatılmıştır. Daha sonra 200 mA, 25V'da 40 dakika elektroforez gerçekleştirilmiştir.

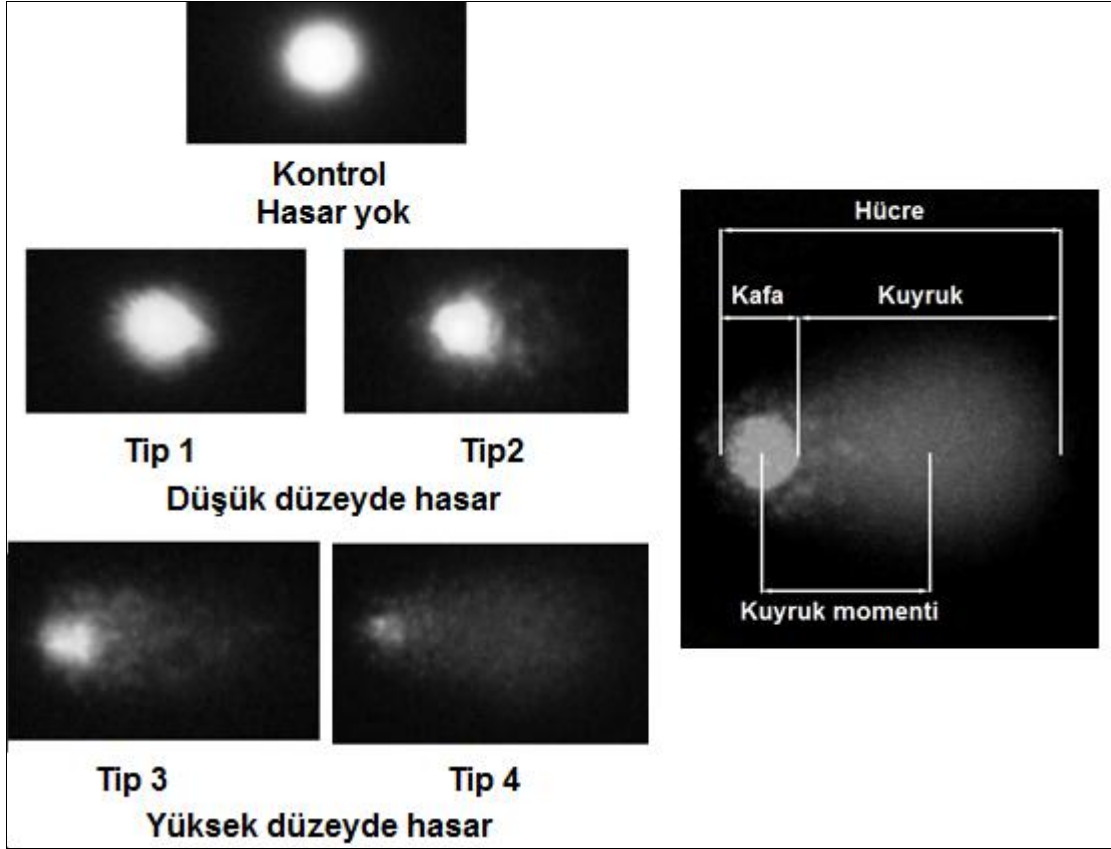
F. Nötralizasyon ve Boyama

Elektroforez sonrası lamlar tanktan çıkartılıp, lam üzerindeki fazla elektroforez tamponu filtre kağıdı ile emdirilerek uzaklaştırıldıktan sonra yeniden temiz şalelere dizilmiştir. Daha önce soğuk hazırlanan nötralizasyon tamponu ile lamlar 3 kez 5'er dakika yıkanmıştır. Şaleler bu bekleme aşamalarında buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Nötralizasyon tamponunda bekletilen lamlar şalelerden çıkartılıp, üzerine 2 µg/ml EtBr boya çözeltisinden 70 µL damlatılmıştır. Üzeri 24×60 mm'lik lamel ile kapatıldıktan sonra saklama kutuları içine yatay şekilde dizilmiştir. Kutular buzdolabına kaldırılarak lamların 30 dakika boyanması sağlanmıştır.

G. Görüntüleme ve Analiz

Boyanan lamlar; 565 nm eksitasyon filtresi ve 590 nm bariyer filtresi içeren, CCD kamera ataçmanlı floresan mikroskopta 20× büyütmede incelenmiştir. Görüntüleme aşamasında her lam için; rastgele seçilen farklı bölgelerin hem 20× hem de 10× büyütmede fotoğrafları çekilmiştir. Her doz için ikişer lam kullanılmış, her lamda 50 hücre incelenmiş, her deney iki kez tekrar edilmiştir. Her bir hücredeki DNA hasarı; bilgisayar destekli Comet Assay IV (Perceptive Instruments Ltd.,USA) görüntü-analiz programı ile analiz edilmiştir. Analizlerde her bir hücre için; baş uzunluğu (µm), baş yoğunluğu (% DNA), kuyruk uzunluğu(µm), kuyruk yoğunluğu (% DNA), kuyruk momenti ve kuyruktaki DNA göçü (kuyruk migrasyonu) gibi DNA hasar parametreleri ölçülmüştür (Şekil 3.3). Genotoksik etkili bileşiğin belirlenmesi için yapılan istatistiksel analizlerde ise literatürün önerdiği; hem kuyruk uzunluğu hem de kuyruk yoğunluğunu tek bir parametrede değerlendirebilen “kuyruk momenti” hasar parametresi esas alınmıştır [142, 188, 189].



Şekil 3.3. Komet testine ait değerlendirme parametreleri

3.8. Modifiye Komet (FLARE= Fragment Length Analysis with DNA Repair Enzymes) Testi

Modifiye komet yöntemi Collins ve ark. [155] tarafından geliştirilen metot esas alınarak uygulanmıştır. Pozitif kontrol olarak H_2O_2 , kamptotesin, etoposid ve metil metan sülfonat (MMS) kullanılmıştır.

Modifiye komet yönteminde, alkali komet yöntemindeki aşamaların her biri aynı şekilde uygulanmıştır. Bu yöntemdeki tek fark; lizis aşamasından sonra lamların, araştırılacak hasara özgü onarım enzimleri (Fpg, EndoIII ve hAAG) ile muamele edilmesidir.

Endo III, Fpg ve hAAG (New England Biolabs)(Acton, MA, USA) ticari olarak temin edilmiştir. Enzim muamelesi ile ilgili aşama aşağıda özetlenmiştir.

Lizis aşamasından sonra lamlar elektroforeze konulmadan önce, enzim reaksiyon tamponu (40 mM HEPES, 0.1 M KCl, 0.5 M EDTA, 0.2 mg/ml BSA, pH:8) ile 3 kez yıkanmıştır. Aynı tamponla enzimlerin dilüsyonu yapılmış ve bu enzimlerden 75 µl

lamalara eklenmiş ve lamelle üzerleri kapatılmıştır. 37°C'lik nemli inkübatörde 30-45 dak. inkübe edilmiştir. Daha sonra alkali komet yöntemindeki elektroforez, nötralizasyon, boyama ve değerlendirme işlemleri aynı şekilde uygulanmıştır.

Modifiye komet testi analizlerinde, etkili bileşiklere ait kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu, kuyruk göçü ve kuyruk momenti hasar parametreleri ölçülmüş, istatistiksel analizler de ise kuyruk momenti verileri esas alınmıştır. Enzime özgü net hasar miktarı (enzime duyarlı bölge sıklığı) ise, enzimle muamele edilmiş hücrelerde oluşan hasar miktarından, muamele edilmeyen hasar miktarı çıkartılarak hesaplanmıştır.

3.9. Ames *Salmonella*/Mikrozom Testi

Salmonella/mikrozom yöntemi, Mortelmans ve Zeiger' in [177] kullandığı metot esas alınarak, metabolik aktivasyon sistemi varlığında ve yokluğunda uygulanmıştır.

3.9.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan magnezyum sülfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (Riedel, Germany), sitrik asit monohidrat ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) (Merck, Germany), di-potasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4) (Merck, Germany), sodyum amonyum hidrojen fosfat ($NaNH_4HPO_4$) (Merck, Germany), L-histidin.HCl (Sigma, USA), D- biyotin (Sigma, USA), sodyum klorür (NaCl) (Merck, Germany), dimetil sülfoksit (DMSO) (C_2H_6OS) (Sigma-Aldrich, France), bakteriyolojik agar (Agar No.1, LP0011) (Oxoid,England), nurient agar (Difco, USA), nutrient broth (Broth No:2, CM0067) (Oxoid,England), D- glukoz monohidrat ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$) (Sigma-Aldrich, France), ampisilin trihidrat (Sigma, USA), potasyum klorür (KCl) (Merck, Germany), magnezyum klorür ($MgCl_2$) (Merck, Germany), sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) (Merck; Germany), disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) (Merck, Germany), β -Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat sodyum tuzu (β -NADP) (N0505, F.W.765.4) (Sigma, USA), D-glukoz-6-fosfat sodyum tuzu ($C_6H_{12}O_9P \cdot Na$) (Sigma, USA), sodyum hidroksit (NaOH) (Merck), kristal viyole (Sigma-Aldrich, France), etanol (Sigma-Aldrich, France), 3-metil kolantren (Sigma, USA), fenobarbital (Sigma, USA), 2- aminofluorene (Aldrich, Germany), danomisin (Sigma-Aldrich, France), sodyum azid (Sigma, USA) ticari olarak temin edilmiştir.

3.9.2. Kullanılan Test Suşları ve Özellikleri

Çalışmada *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşunun *in vitro* mutasyonlarla geliştirilmiş TA98 ve TA100 suşları kullanılmıştır. Farklı genotiplere sahip test suşları Dr. Bruce N. Ames' ten (California Üniversitesi, Biyokimya, Berkeley, USA) temin edilmiştir. Test edilen suşların genotipleri Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. *S.typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının genotipleri [177]

Suşlar	Mutasyon	Ek Mutasyonlar			Hedef	Mutasyon Tipi
		DNA Onarımı	rfa	pKM101		
TA98	hisD3052	uvrB	+	+R	GCGCGCGC	Çerçeve kayması
TA100	hisG46	uvrB	+	+R	GGG	Baz çifti değişimi

3.9.3. Kullanılan Pozitif Mutajenler

Salmonella/mikrozom testinde metabolik aktivasyon sistemi yokluğunda (S9 (-)); TA100 suşu için sodyum azid (1.5 µg/plak) ve TA98 suşu için danomisin (6 µg/plak), metabolik aktivasyon sistemi varlığında (S9 (+)) ise hem TA98 hem de TA100 suşları için 2-aminofloren (2AF) (50 µg/plak) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.9.4. Kullanılan Ortamların İçerikleri ve Hazırlanmaları

50×Vogel Bonner E Tuz Çözeltisi (50×VB) (100 ml)

Distile su	67 ml
Mağnezyum sülfat (MgSO ₄ .7H ₂ O).....	1 g
Sitrik asit monohidrat (C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O).....	10 g
Dipotasyum hidrojen fosfat (K ₂ HPO ₄).....	50 g
Sodyum amonyum hidrojen fosfat (NaNH ₄ HPO ₄).....	17.5 g

Tuzlar sıcak distile suya sırası ile eklenip, manyetik karıştırıcı yardımı ile bir önceki kimyasalın tamamen çözünmesi beklenerek çözülmüştür. Toplam hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlanarak otoklavda steril edilmiştir. Bu ortam minimal agar (MA) ve Histidin/Biyotin/Ampisilinli (HBA) ortamlarını hazırlamak için kullanılmıştır.

Histidin / Biyotin Çözeltisi (0.5 mM) (250 ml)

D-Biyotin (MA: 273.3).....	30,9 mg
L- Histidin.HCl (MA: 273.3).....	24 mg
Distile su.....	250 ml

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülmüştür. Daha sonra histidin ilave edilerek karışım otoklavda steril edilmiştir. Histidin / biyotin (HB) hazırlandıktan sonra +4 °C de kullanılabilecek kadar saklanmıştır. Deney sisteminde

bakterinin birkaç bölünme geçirmesine izin vermek için 100 ml'lik üst agara 10 ml histidin/biyotin çözeltisi son konsatrasyon 0.05 mM olacak şekilde eklenmiştir.

Ampilisin Çözeltisi (% 0.8 / 0.02 N NaOH) (100 ml)

Ampisilin trihidrat.....0,89 g
0,02 M Sodyum Hidroksit.....100 ml

Ampisilin trihidrat, 0,02M NaOH içinde çözülüp 0,22 µm çaplı filtreden geçirilerek steril edildikten sonra kullanılıncaya kadar + 4 °C' de saklanmıştır. Bu çözelti R faktör plazmidi taşıyan suşların master plakları için kullanılmıştır.

Kristal Viyole Çözeltisi (% 0.1) (100 ml)

Kristal viyole..... 0,1g
Distile su.....100 ml

Boya ve su karıştırılıp, solüsyon ışık geçirmeyen bir kaba konulduktan sonra kullanılıncaya kadar + 4 °C' de saklanmıştır. Bu ortam suşların kristal viyoleye duyarlılıklarını, dolayısıyla rfa mutasyonu taşıyıp taşımadıklarını kontrol etmek için kullanılmıştır.

Biyotin Çözeltisi (% 0.01) (50 ml)

D-Biyotin.....5 mg
Distile su.....50 ml

D-Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülüp, otoklavda steril edildikten sonra kullanılıncaya kadar + 4 °C' de saklanmıştır. Bu çözelti genotip kontrolü ve HBA plaklarının hazırlanmasında kullanılmıştır.

Histidin Çözeltisi (% 0.5) (50 ml)

L-Histidin.HCl (F.W.91,7).....250 mg
Distile su.....50 ml

Histidin distile su içinde çözüldükten sonra otoklavda steril edilmiştir. Bu ortam suşların genetik işaretlerinin kontrolünde ve HBA plaklarının hazırlanmasında kullanılmıştır.

Yumuşak (Üst) Agar (100 ml)

Bakteriyolojik Agar No:1.....0.6 gr
NaCl.....0.5 gr
Distile su.....100 ml

Maddeler su içinde çözülerek, 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Mutajenite deneylerinde kullanılmıştır.

Serum Fizyolojik (% 0.9) (1000 ml)

Sodyum klorür (NaCl).....9 gr
Distile su.....1000 ml

NaCl distile su içinde çözülerek otoklavda steril edildikten sonra kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklanmıştır. Bakteri sayımı için gerekli seri sulandırım aşamasında kullanılmıştır.

Glukoz çözeltisi (% 20) (100 ml)

Glukoz.....20 gr
Distile su.....100 ml

Glukoz distile su içinde çözülerek otoklavda steril edilmiştir. Bu ortam MGA ve HBA plaklarının hazırlanmasında kullanılmıştır.

Nutrient Agar Plakları (NA) (1000 ml)

Oxoid Nutrient Broth No:2.....15 gr
Agar.....15 gr
Distile su.....1000 ml

Agar, broth ve su karıştırılıp otoklavda steril edildikten sonra steril petrilere dökülmüştür. Zengin bir besiyeri olan bu ortam, hem test suşlarının kristal viyole ve UV'ye duyarlılıklarını test etmek amacıyla genetik işaretlerin kontrolü basamağında hem de sitotoksik etkinin belirlenmesi basamağında kullanılmıştır.

Minimal Glukoz Agar Plakları (MGA) (1000 ml)

Bakteriyolojik Agar No:1 15 gr
Distile su.....880 ml
50XVB tuz.....20 ml
% 20 Glukoz.....100 ml

Agar ve su karıştırılıp çözülüp otoklavda steril edilmiştir. Çözelti 45°C'ye kadar soğutulup % 20 glukoz ve 50XVB tuzları yavaş yavaş karıştırılarak eklenmiş ve steril petrilere dökülmüştür. Bu ortam suşların kendiliğinden geriye dönen koloni sayılarının saptanması ve mutajenite deneylerinde kullanılmıştır.

Histidin / Biyotin Plakları (HB) (100 ml)

Agar.....1.5 gr
Distile su.....86.4 ml
50 XVB tuzları.....2 ml
% 20 Glukoz.....10 ml
Steril histidin.HCl.H₂O (%0.5).....1 ml
Steril biyotin çözeltisi (%0.01).....0.6 ml

Agar ve su karıştırıldıktan sonra otoklavda steril edilmiştir. Çözelti 45 °C'ye kadar soğutulup, % 20 glukoz ve 50XVB tuzları eklenmiştir. Histidin içeren plaklar için sadece histidin, biyotin içeren plaklar için sadece biyotin ve histidin+biyotin içeren besiyerleri için histidin ve biyotin çözeltilerinden yukarda belirtilen miktarlarda eklendikten sonra karışım steril petrilere dökülmüştür. Bu ortamlar suşların genetik işaretlerinin kontrolü basamağında kullanılmıştır.

Histidin / Biyotin / Ampisilin Plakları (HBA) (100 ml)

Agar.....	1.5 gr
Distile su.....	86 ml
50 XVB tuzları.....	2 ml
% 20 Glukoz.....	10 ml
Steril histidin.HCl.H ₂ O (%0.5).....	1 ml
Steril biyotin çözeltisi (%0.01).....	0.6 ml
Steril ampisilin çözeltisi (%0.8).....	0.315 ml

Agar ve su karışımı otoklavda steril edildikten sonra 45 °C'ye soğutulup, üzerine % 20 glukoz, 50XVB tuzları ve steril histidin çözeltisi eklenmiştir. Sıcaklık biraz daha azalınca biyotin ve ampisilin eklenerek steril petrilere dökülmüştür. Bu ortam, R faktörü taşıyan suşların genetik işaretlerinin kontrolü basamağında ve master plakların hazırlanmasında kullanılmıştır.

Nutrient Broth Sıvı Kültür Ortamı (NB) (1000 ml)

Oxoid Nutrient Broth No:2.....	15 gr
Distile su.....	1000 ml
Ampisilin çözeltisi (%0.8).....	3.15 ml

Broth ve su karıştırılıp otoklavda steril edildikten sonra üzerine steril ampisilin çözeltisi eklenmiş ve kullanılıncaya kadar +4°C'de saklanmıştır. Bakteri kültürü gerektiren aşamalarda kullanılmıştır.

Tuz Çözeltisi (1.65 M KCl + 0.4 M MgCl₂) (100 ml)

Potasyum klorür (KCl).....	12,3 g
Magnezyum klorür (MgCl ₂ .6H ₂ O).....	8.14 g
Distile su	100 ml

Distile suda çözülen tuzlar, otoklavda steril edildikten sonra kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı. Bu ortam S9 karışımının hazırlanmasında kullanılmıştır.

Sodyum Fosfat Tamponu (0.2 M) (pH 7.4) (100 ml)

0,2 M Sodyum dihidrojen fosfat (NaH ₂ PO ₄ H ₂ O).....	2.764 gr
0,2 M Disodyum hidrojen fosfat (Na ₂ HPO ₄).....	2.84 gr
Distile Su.....	100 ml

Karışım hazırlanıp pH: 7.4' e ayarlandıktan sonra otoklavda steril edilmiştir. Bu ortam S9 karışımının hazırlanmasında kullanılmıştır.

β-NADP Çözeltisi (0.1 M) (1 ml)

β-NADP (M.A.:765.4).....	76.54 mg
Steril distile su.....	1 ml

S9 karışımının hazırlanmasında kullanılmıştır.

Glukoz-6-Fosfat Çözeltisi (1M) (1ml)

Glukoz-6-Fosfat.....	282 mg
Steril distile su.....	1 ml

S9 karışımının hazırlanmasında kullanılmıştır.

S9 Karışımı (Mikrozomal Enzimler + Kofaktörler) (% 4) (25 ml)

Rat karaciğeri S9 fraksiyonu.....	1 ml
1.65 M MgCl ₂ - 0.4 M KCl tuz çözeltisi.....	0,5 ml
1 M Glukoz-6-fosfat.....	0,125 ml
0,1 M β-NADP.....	1 ml
0,2 M fosfat tamponu (pH 7.4).....	12.5 ml
Steril distile su.....	9.875 ml

S9 karışımı; çözeltiler aşağıdan yukarıya doğru sırasıyla eklenip yavaşça pipetlenerek karıştırılmış ve deney süresince buz içinde tutulmuştur. Metabolik aktivasyon sistemi varlığındaki mutajenite deneylerinde kullanılmıştır.

3.9.5. Yöntemin Aşamaları

1. Test Suşlarının Üretilmesi

Liyofilize halde temin edilen suşlar, aseptik şartlarda 1 ml nutrient broth içerisine eklenip, dikkatlice pipetlendikten sonra, kültür 5 ml nutrient broth içerisine aktarılmıştır. Bu kültürden nutrient agar (NA) plağına, steril öze yardımı ile tek koloni ekimi yapılmıştır. 37⁰C'de 24 saat inkübasyondan sonra plak üzerinde tek tek üremiş koloniler, genetik işaretlerin kontrolü aşamasında kullanılmıştır.

2. Test Suşlarının Genetik İşaretlerinin Kontrolü

Test sisteminin güvenilirliği açısından; çalışmada kullanılan *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının sahip olduğu genetik işaretler (his⁻, bio⁻, uvrB⁻, pKM101⁺, rfa⁻) seçici agar plakları kullanılarak kontrol edilmiştir. Genetik işaretlerin kontrolüne ait aşamalar aşağıda sırasıyla özetlenmiştir.

A. Histidin ve Biotin Gereksiniminin Kontrolü

Histidin oksotrofu (his⁻) olan test suşları, üremeleri için histidine gereksinim duymaktadırlar. Dolayısıyla suşların his⁻ karakterleri, aynı koloninin hem histidin içeren hem de içermeyen MGA plaklarına ayrı ayrı ekilmeleri ile kontrol edilmiştir. Suşların, histidin varlığında üreyip, histidin yokluğunda ürememeleri his⁻ karakterini doğrulamaktadır (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5'de A,C).

Ayrıca test suşlarındaki *uvrB* delesyonu, *bio* genini de kapsamaktadır. Dolayısı ile suşlar, üremeleri için histidine ek olarak biyotine de gereksinim duymaktadırlar.

bio⁻ karakterlerinin kontrolü için ise suşlar; hem sadece biyotin içeren, hem de histidin+biyotin içeren MGA plaklara ayrı ayrı ekilmiştir. Yalnızca biyotin içeren ortamda üreme gözlenmezken, histidin+biyotin içeren ortamda üremenin gözlenmesi bu karakteri doğrulamaktadır (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5’de A, B, D).

B. pKM101 Plazmid Varlığının Kontrolü

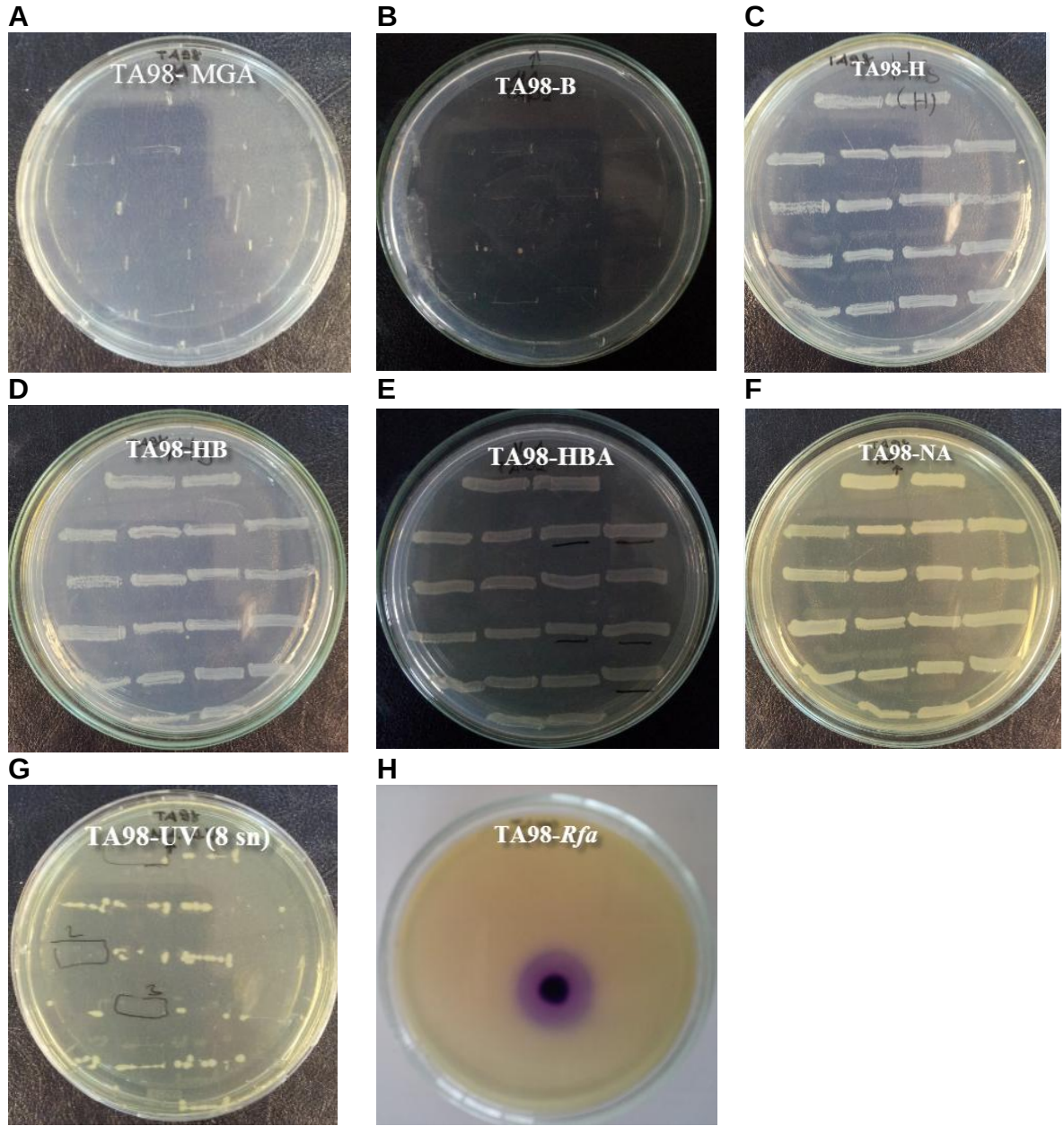
Suşlar, ampiciline karşı direnç geni taşıyan, kararsız yapıdaki pKM101 plazmidini içermektedir. Dolayısıyla his⁻ karakteri doğrulanan kolonilerin, ampiciline karşı dirençlilikleri kontrol edilmiştir. Bu amaçla suşlar, histidin+biyotin+ampisilin içeren MGA plaklarına ekilmiştir. 37⁰C’de 24-48 saatlik inkübasyon sonucu, ampisilin içeren HBA plaklarında üremenin gözlenmesi, suşların bu plazmidi taşıdığını doğrulamaktadır (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5’de E).

C. rfa Mutasyonunun Kontrolü

his⁻ ve amp^r karakterleri doğrulanan kolonilerin gecelik kültürlerinden alınan 0.1 ml’lik örnekler, nutrient agarlı plakalara steril cam baget yardımı ile yayılarak ekilmiştir. Daha sonra, 10 µl kristal viyole çözeltisi (1 mg/ml) emdirilmiş filtre kâğıdından hazırlanmış diskler plağın ortasına yerleştirilmiştir. Plaklar 37⁰C’de bir gece inkübe edildikten sonra diskin etrafında inhibisyon zonu gözlenmiştir. Diskin çevresindeki şeffaf bölge, büyük bir molekül olan kristal viyolenin bakteri içerisine girip, bakterinin ölümüne neden olan rfa mutasyonu varlığının göstergesidir (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5’de H).

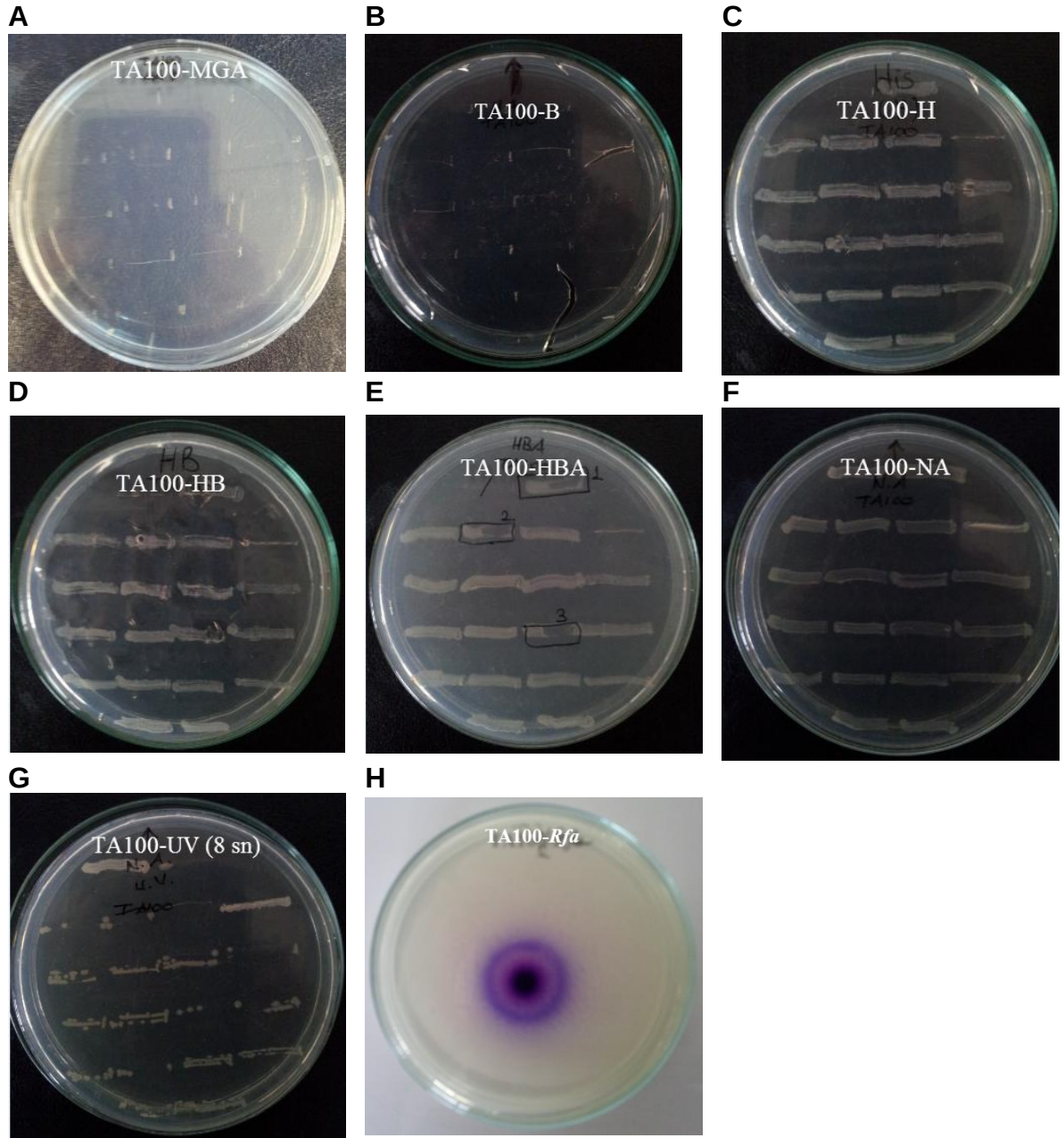
D. uvrB Mutasyonunun Kontrolü

Diğer genetik işaretleri (his⁻, amp^r ve rfa⁺) doğrulanan koloniler, steril kürdanlarla alınarak çizgi ekim yöntemi ile nutrient agarlı iki plağa ekilmiştir. Bu plaklardan bir tanesi kontrol plağı olarak kullanılırken, diğerinin kapağı açılıp 15 watt’lık germisidal UV lambası altında 33 cm. uzaklıktan 8 saniye süreyle ışınlanmıştır. Kontrol ve UV’ye maruz bırakılan plaklar, 37⁰C’de 1 gece inkübe edilmiştir. uvrB delesyonu taşıyan suşlar; kontrol plağında ürerken, UV’ye maruz kalmış plaklarda ise üremediği gözlenmiştir (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5’de F,G).



Şekil 3.4. *S. typhimurium* TA98 suşunun genetik işaretlerinin kontrolü

(A:Minimal glukoz agar (MGA), B:Biyotin eklenmiş MGA, C:Histidin eklenmiş MGA, D:Histidin+Biyotin eklenmiş MGA, E:Histidin+Biyotin+Ampisilin eklenmiş MGA, F:Nütrient agar (NA), G:8 saniye UV'ye maruz bırakılan NA, H:Kristal viyole ile muamele edilen NA plağındaki üreme durumu)



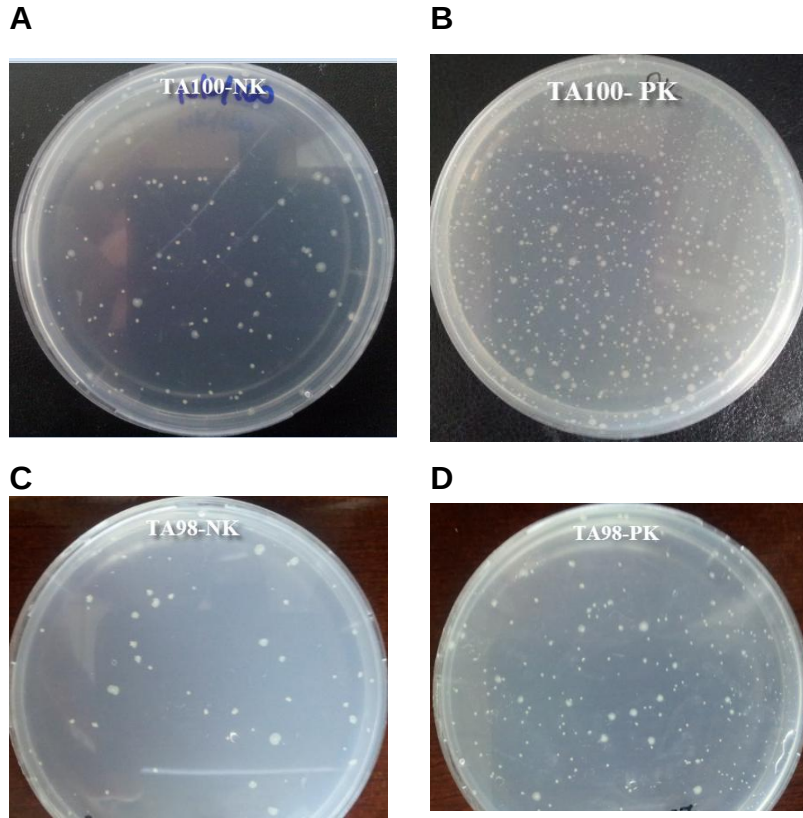
Şekil 3.5. *S. typhimurium* TA100 suşunun genetik işaretlerinin kontrolü

(A:Minimal glukoz agar (MGA), B:Biyotin eklenmiş MGA, C:Histidin eklenmiş MGA, D:Histidin+Biyotin eklenmiş MGA, E:Histidin+Biyotin+Ampisilin eklenmiş MGA, F:Nütrient agar (NA), G:8 saniye UV'ye maruz bırakılan NA, H:Kristal viyole ile muamele edilen NA plağındaki üreme durumu)

E. Kendiliğinden Geriye Dönüş Frekansının Kontrolü

Histidin oksotrofu (his^-) olan test suşları, spontan (fiziksel veya kimyasal ajanlar ile muamele edilmeksizin oluşan) mutasyonlar sonrasında histidinsiz ortamda, belirli frekanslarda prototrof (his^+) hale geçebilmektedir. Bu durum “geri mutasyon” olarak, bu durumun oluşma sıklığı ise “kendiliğinden geriye dönüş frekansı” olarak isimlendirilir. Her test suşu; kendine özgü bir frekansla his^- durumdan his^+ duruma kendiliğinden geriye dönmektedir (Şekil 3.6). Bu değerler; metabolik aktivasyon sisteminin varlığında veya yokluğunda TA98 ve TA100 suşları için farklılık göstermemektedir [190].

Kendiliğinden geriye dönüş frekansları mutajenite deneylerinde rutin olarak ölçülmüş ve her plaktaki “kendiliğinden geri dönen bakteri sayısı” olarak ifade edilmiştir. Kendiliğinden geriye dönen bakteri sayısını saptamak için öncelikle MGA plakları hazırlanmıştır. Daha sonra yaklaşık 45°C’deki 100 ml’lik üst agar içerisine, steril histidin/biyotin çözeltisinden 10 ml eklenerek steril deney tüplerine 2.5 ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Tüpler 37°C’ye soğutulduktan sonra tüplere her suşun gecelik kültüründen 0.1 ml eklenip, MGA plakları üzerine dökülerek yayılması sağlanmıştır. 37°C’de 48 saatlik inkübasyondan sonra, geriye dönen koloniler sayılarak, sayının yukarıda belirtilen frekanslara uygunluğu kontrol edilmiştir. Sayının belirtilen frekans aralıklarında olmaması durumunda ise daha önceden dondurularak saklanan stok kültürler tekrar genetik işaretleri doğrulandıktan sonra deneyler tekrar edilmiştir. Test sisteminin kontrolü açısından, her aşamada pozitif kontrollerle paralel deneyler yapılmıştır.



Şekil 3.6. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının kendiliğinden geriye dönüş frekanslarının kontrolü

(A:*S. typhimurium* TA100, B:*S. typhimurium* TA100+sodyum azit C:*S. typhimurium* TA98, D:*S. typhimurium* TA100+danomisin)

3. Test Suşlarının Saklanması

Genetik işaretleri doğrulanan test suşlarını, genotiplerini kaybetmeden uzun süreli saklayabilmek için dondurulmuş örnekler hazırlanmıştır. Bu amaçla, test suşları sıvı üreme ortamında $1-2 \times 10^9$ hücre/ml bulunacak şekilde üretilmiştir. Bakteri kültürlerine son konsantrasyonu %9 olacak şekilde spektrofotometrik saflıktaki DMSO eklenerek yavaşça karıştırılmıştır. Bu şekilde hazırlanmış kültürler, 1-2 ml'lik soğuğa dayanıklı plastik ependorf tüplere aseptik koşullarda dağıtılmıştır. Tüpler hızlı bir şekilde sıvı azot içerisinde dondurulup -80°C 'lik derin dondurucuya kaldırılmıştır. Test suşları genotiplerini kaybetmeksizin bu şekilde 3 yıl saklanabilmektedir [190].

Genetik işaretleri doğrulanan TA98 ve TA100 suşları, HBA plaklarına ekilerek master plaklar hazırlanmıştır. Bu plaklar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bu şekilde iki ay saklanabilmektedir.

4. Memeli Karaciğer Fraksiyonun Hazırlanması

Test bileşiklerinin olası metabolitlerinin de mutajenik etki gösterip göstermediğini belirlemek amacıyla, sıçan karaciğerinden elde edilen enzimler ile magnezyum-potasyum tuzları ve sodyum fosfat tamponunun kombinasyonundan oluşan karışım kullanılmıştır.

Sıçan karaciğer fraksiyonu Garner ve ark.'nın [104] önerdiği metoda göre elde edilmiş olup Hacettepe Üniversitesi Etik Kurulu'nun onayı alınmıştır. İlgili etik kurul raporu EK'de belirtilmiştir. Sıçan karaciğer fraksiyonunun elde edilmesi ve kullanılacak karışımının hazırlanması ile ilgili aşamalar aşağıda özetlenmiştir.

A-Sıçan Karaciğer Enzimlerinin İndüklenmesi

Çalışmada Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Yetiştirme Ünitesi'nden temin edilen, ağırlıkları 290-330 gr olan Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlar kullanılmıştır. Karaciğer enzimlerini indüklenmesi için 3-metilkolantren; mısır yağında çözdürülüp, 125 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde sıçanlara intraperitoneal olarak ilk gün tek doz uygulanmıştır. Ayrıca sıçanlar 5 gün boyunca normal besin ve % 0.1'lik fenobarbital içeren içme suyu ile beslenmiştir. Öldürülmeden 12 saat önce sıçanlara sadece su verilmiş, besin verilmemiştir. Süre sonunda sıçanlar boynuları kırılarak (servikal dislokasyon yöntemiyle) öldürülmüştür [173,191].

B-Karaciğerin Çıkarılması

Servikal dislokasyon ile öldürülen hayvanların göğüs bölgesi tıraş edilmiştir. Tıraş edilen bölge %70'lik etanol ile silinmiştir. Steril aletlerle göğüs bölgesindeki deri açılmış ve iyice gerdirilmiş, tekrar alkol ile temizlendikten sonra göğüs bölgesi steril makas ile açılmıştır. Kontaminasyonu engellemek için göğüs kafesi açılırken özofagus ve bağırsakların yırtılmamasına dikkat edilerek karaciğer aseptik koşullar altında çıkarılmıştır.

C-Karaciğer Homojenatının Elde Edilmesi

Çalışmanın bütün aşamaları 0-4°C'de steril ortamda ve steril ekipmanlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çıkarılan karaciğer; darası alınmış petri kabına konulmuş, tartılmış ve her bir gramına 1 ml olacak şekilde soğuk 0.15 M KCl ilave edilmiştir. Sıçan karaciğeri yaklaşık 10-15 g civarındadır. Karaciğer soğuk KCl ile birkaç defa yıkanmıştır. Yıkanan karaciğer, 3 ml/gr olacak şekilde 0.15 M KCl

içeren bir kaba aktarılmış, steril makas ile parçalanıp buz içerisinde teflon pistonlu cam homojenizatörde 4 vuruşta homojenize edilmiştir. KCl ile yapılan yıkama, steril doku eldesi ve hemoglobinin uzaklaştırılması için gereklidir. Hemoglobin, sitokrom P450 enzimlerinin aktivitelerini yok edebilir.

Homojenat; 9000 g'de 10 dakika santrifüje edilmiş ve süpernatant (S9= Supernatan, 9000 g) 1 ml olacak şekilde steril ependorf tüplere aktarılmıştır. -20°C'de dondurulup kullanılıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

Elde edilen S9 fraksiyonundan alınan örnek, sterilit kontrolü için hem nutrient agarlı plaklara hem de histidin+biyotin içeren MGA plaklarına ekimi yapılarak herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığı kontrol edilmiştir.

D- Protein Miktarının Saptanması

S9 fraksiyonu içerisindeki protein miktarı; Bradford (Coomassie Brilliant Blue G250) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir [192]. Bu yöntem G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki proteinlere bağlanarak, değişik renk şiddetinde mavi renkli çözeltiler ortaya çıkarması prensibine dayanmaktadır.

Bu yöntem için dana sığır albumin (BSA) standart olarak kullanılmıştır. 1 mg/ml BSA stoğu hazırlanıp, bu stoktan seri sulandırım ile 7 farklı BSA konsantrasyonu (0.02 – 0.5 mg/ml) içeren tüpler 595 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbanları ölçülüp standart grafik çizilmiştir. Elde edilen S9 fraksiyon örneği ile farklı konsantrasyonlarda BSA içeren tüplerden 300 µl alınıp üzerine 3 ml reaktif eklenmiştir. Renk oluşumu için 5 dakika bekledikten sonra 595 nm'de ölçüm yapılmıştır. Standart grafikten okunan absorban değerine karşılık gelen protein konsantrasyonu hesaplanmıştır. Elde edilen S9 fraksiyonundaki protein miktarı 19.3 mg/ml olarak belirlenmiştir.

E- Standart S9 Karışımının Hazırlanması:

Metabolik aktivasyon sistemi gerektiren mutajenite çalışmaları için; dondurularak saklanmış S9 fraksiyonu içeren tüpler, oda sıcaklığında çözülerek kuru buz içerisine alınmıştır. 3.3.1.4.'de açıkladığı şekilde magnezyum-potasyum tuzları ve sodyum fosfat tamponu kombinasyonundan oluşan % 4'lük S9 karışımı hazırlanmıştır. S9 karışımı taze hazırlanmalıdır.

Aseptik şartlarda çalışıldığı için kontaminasyon olması son derece zayıf bir ihtimal olmasına karşın, olası bir kontaminasyonu önlemek için; S9 karışımı 0.45 µm'lik membran filtre ile steril edilmiştir. Vakum ile yapılan filtrasyon S9 enzimlerini denatüre edebilmektedir. Dolayısı ile çalışmada basınç ile filtrasyon uygulanmıştır. Fakat filtre ile sterilizasyonda enzimlerin kaybolma riski vardır ve zorunlu olmadıkça uygulanmamalıdır. Eğer sterilizasyon gerekiyorsa, S9 fraksiyonunun kendisi değil de S9 karışımı filtre edilmelidir, aksi takdirde filtreyi tıkar.

5. Sitotoksik Etkinin Saptanması

Mutajenik etkinin belirlenmesi amacı ile yapılacak olan plak inkorporasyon testine başlamadan önce, test edilecek kimyasal bileşiklerin ve çözücünün sitotoksik olmayan dozlarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla; suşların 0,1 ml gecelik kültürleri ve 0,1 ml belirli derişimlerde hazırlanmış bileşikler, her biri 2,5 ml üst agar içeren tüplere eklenmiştir. Bu karışımlar vortekslendikten sonra nutrient agarlı plaklar üzerine yayılmıştır. 37°C'de 1 gecelik inkübasyondan sonra test bileşiği eklenen plaklardaki koloni sayısı ile kontrol plaklarındaki koloni sayıları karşılaştırılarak bileşiklerin sitotoksik etkileri saptanmıştır. Sitotoksik olmayan dozlar mutajenite deneylerinde kullanılmıştır [190].

6. Mutajenik Etkinin Saptanması (Plak İnkorporasyon Testi)

Test bileşiklerinin mutajenik potansiyelleri, S9 varlığında ve yokluğunda yapılan plak inkorporasyon yöntemi ile değerlendirilmiştir. Çalışma süresince logaritmik üreme fazındaki bakteri kültürleri kullanılmıştır. Bu kültürden alınan 0,1 ml örnek ve 0,1 ml sitotoksik olmayan dozdaki test bileşikleri, eser miktarda histidin-biyotin çözeltisi içeren 2,5 ml üst agar taşıyan tüplere eklenmiştir. Metabolik aktivasyon sistemi varlığında yapılan deneylerde ise bu ortama 0.25 ml S9 karışımı eklenmiştir. Hazırlanan bu ortam vorteks yardımıyla karıştırıldıktan sonra, MGA'lı plaklara homojen bir şekilde yayılarak, 37°C'de 2 gece inkübasyona bırakılmıştır. Üst agarın plağın bütün yüzeyine donmadan yayılmasını sağlamak için karıştırma, dökme ve yayma işlemlerinin tümü 20 saniyeden az bir sürede yapılmıştır. İnkübasyonun ardından; test bileşiği içermeyen "kontrol plaklarında", sadece çözücü içeren "çözücü kontrol plaklarında", belirli konsantrasyonda referans bileşikleri içeren "pozitif kontrol plaklarında" ve farklı dozlarda test bileşiği içeren plaklarda oluşan koloniler sayılmıştır.

Metabolik aktivasyon sistemi varlığında veya yokluğunda yapılan plak inkorparasyon deneylerinde, her değişken için 3'er plak kullanılmış olup deneyler birbirinden bağımsız günlerde 2 kez tekrarlanmıştır.

7. Sonuçların Değerlendirilmesi

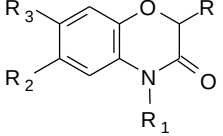
Çalışma sonunda, test bileşiği ile muamele edilmemiş kontrol plaklarındaki kendiliğinden geriye dönen koloni sayıları ile test bileşiklerinin farklı dozları ile muamele edilmiş plaklardaki geriye dönen koloni sayıları karşılaştırılmıştır. Ames testinde bir maddeye mutajen denilebilmesi için, deney plaklarındaki koloni sayısının kontrol plağındaki koloni sayısına oranı en az 2 olması ya da 2 olmadığı durumlarda doza bağlı bir artış göstermesi gerekmektedir [177,190]. Test sisteminden elde edilen veriler istatistiksel açıdan değerlendirilerek kontrol grubuna göre anlamlı farklılık gösteren ve yukarda bahsedilen iki kritere uyan durumlarda test bileşiği mutajen olarak değerlendirilmiştir. Mutajen olduğu belirlenen bileşikler için mutajenik etkiyi yaratan en küçük mutajenik doz regresyon analizi ile hesaplanmıştır.

3.10. Test Bileşiklerinin Ames Testi Sonuçlarına Ait Farmakofor Analizi

Çalışmada test edilen benzoksazin türevlerinin TA98 ve TA100 suşları üzerindeki mutajenik aktivitelerinden sorumlu bölgeleri “HipHop farmakofor modelleme analizi” ile incelenmiştir.

HipHop analizinde çalışma serisi olarak Ames testinde güçlü mutajenik etki gösteren dört adet 2H-3,4-dihidro-1,4-benzoksazin-3-on türevi bileşik (Çizelge 3.3) kullanılarak farmakofor model belirlenmiştir.

Çizelge 3.3. HipHop analizinde kullanılan çalışma serisi

KOD					Minimum Mutajenik Doz (d) (µg/plak)	
	R	R ₁	R ₂	R ₃	TA98 S9 (-)	TA100 S9 (-)
BS12	CH ₂ COOC ₂ H ₅	CH ₃	H	NO ₂	33	2.5
BS13	CH ₂ COOC ₂ H ₅	CH ₃	Cl	NO ₂	4.4	0.85
BS16	CH ₂ COOC ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H	NO ₂	55	1.6
BS17	CH ₂ COOC ₂ H ₅	C ₂ H ₅	Cl	NO ₂	9	0.075

Bileşikler Accelrys Discovery Studio 3.5. programı kullanılarak çizilmiş ve konformerleri belirlenmiştir. “En iyi konformer oluşturulması” işlemi enerji değeri 0-20 kcal/mol’lük bir sınır içerisinde, maksimum sayıda konformer oluşumu için önerilen 255 değeri seçilerek uygulanmıştır. Oluşturulan konformasyonlar ‘Common Feature Pharmacophore Generation’ yöntemi kullanılarak ortak moleküler özellikleri çıkartmak ve farmakofor hipotezi oluşturmak için kullanılmıştır.

Bileşikler içerisinde; metabolik aktivasyon yokluğunda hem TA98 hem de TA100 suşları üzerinde en güçlü mutajenik aktivite gösteren BS13 ve BS17 referans bileşik olarak seçilmiş ve bu bileşikler için MaxOmitFeat (en fazla kaçırabileceği özellik sayısı) değeri 0, Principal (aktivite derecesi) değeri 2 olarak girilmiştir. Diğer bileşiklerin ise MaxOmitFeat değerleri 2, Principal değerleri 1 olarak girilmiştir.

HipHop yöntemi, çalışılan setteki moleküllerde ortak olan ve kimyasal açıdan önem taşıyan fonksiyonel grupları karşılaştırırken konformasyonlardan yararlanmıştır. Bu karşılaştırılan yapılar üzerinden farmakoforik bir hipotez ortaya konulmuştur. Farmakofor hipotezinin oluşturulması için hidrojen bağı alıcısı (HBA), hidrojen bağı vericisi (HBD), hidrofobik özellik (aromatik ve alifatik) ve aromatik halka özellikleri seçilmiştir ve bu işlem sırasında tüm konformerler kullanılmıştır. Sonuçta elde edilen 10 hipotezden en uygun olanı belirlenmiştir. Seçilen hipotez benzoksazin yapısındaki diğer bileşiklerle karşılaştırılarak kontrol edilmiştir.

3.11. İstatistiksel Analiz

Ames *Salmonella*/mikrozom testinden elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmeleri IBM SPSS.20. programı kullanılarak yapılmıştır. Test edilen benzoksazin türevlerine ait veriler üzerinde uygulanan tek yönlü varyans çözümlemesi (ANOVA) ile varyansların homojenliği kontrol edilmiştir. Homojen olan durumlarda ($p > 0.05$) ANOVA çözümlemesine ait F ve p değerleri, varyansların homojen olmadığı durumlarda ($p < 0.05$) Robust testinden elde edilen Brown-Forsythe F ve p değerleri değerlendirilmiştir. Test sisteminde kullanılan pozitif kontrollere ait veriler ise bağımsız iki örneklem T-test ile değerlendirilmiştir. $p < 0.01$ yanılma düzeyinde anlamlı farklılık bulunan bileşiklerde; farklılığı yaratan doz grup/grupları belirlemek amacıyla Dunnet’s-C testi uygulanmıştır. Kontrolde anlamlı düzeyde farklılık gösteren bileşikler için DozXGeriye dönen koloni sayıları

için fonksiyon yapısı “regresyon model kestirim yöntemi” ile belirlenmiştir. Test sisteminde kullanılan pozitif kontroller için yapılan regresyon denklem kestiriminde verilere $\ln(\hat{y})$ dönüşümü uygulanmıştır. En uygun fonksiyon yapısı lineer olan modellerde $\hat{y} = b_0 + b_1d$, kübik olan modellerde $\hat{y} = b_0 + b_1d + b_2d^2 + b_3d^3$, büyüme (gelişim=growth) modellerinde ise $\ln(\hat{y}) = b_0 + b_1t$ denklemleri kullanılmıştır. Belirlenen model denkleminin yapısı dikkate alınarak kontrol grurubu verilerinin ortalamasının (X) iki katını veren ($\hat{y}=2X$) en küçük mutajenik doz değerleri (d) MATLAB R2012b (8.0.0.783) programı kullanılarak hesaplanmıştır. Denklem eşitlikleri ve bunlara karşılık gelen regresyon katsayı değerleri (R^2) çizelgelerde özetlenmiştir. KontrolXDoz gruplarında anlamlı farklılık bulunamayan (mutajen olmadığı istatistiksel olarak belirlenen) bileşikler için uygun regresyon kestirim denklemi oluşturulamamıştır.

Alkali komet ve modifiye komet test sistemlerinden elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmeleri Graphpad Prism5 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Verilerin normal dağılıp dağılmadığı Kolmogorov Smirnov testi ile değerlendirilmiştir. Gruplar arasında ortalamalar yönünden farkın önemliliği bağımsız grup sayısı iki olduğunda Student's t testi ile; ikiden fazla grup arasındaki farkın önemliliği ise Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Gruplar arasında ortanca değerler yönünden farkın önemliliği bağımsız grup sayısı iki olduğunda Mann Whitney U testi ile ikiden fazla grup arasındaki farkın önemliliği ise Kruskal Wallis testi ile değerlendirilmiştir. Kruskal Wallis test istatistiği sonucunda anlamlı farkın ($p < 0.05$) görülmesi halinde Dunn's çoklu karşılaştırma testi kullanılarak anlamlı farklılığa neden olan doz grup/grupları belirlenmiştir. Tanımlayıcı istatistikler; sürekli değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Sülforodamin B (SRB) Testine Ait Bulgular

18 adet benzoksazin türevi bileşiğin L929 ve HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik potansiyelleri SRB yöntemi ile araştırılmıştır. Her bir test bileşiğinin 6 farklı konsantrasyonu ile hücreler 48 saat muamele edilmiş ve her bir kuyucukta canlı kalan hücrelerin toplam protein miktarı kolorimetrik olarak ölçülerek % canlılık değerleri hesaplanmış ve doz cevap eğrileri çizilmiştir. Elde edilen veriler S-probit analizinde kullanılarak her bir bileşiğe ait IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca bileşiklerin her iki hücre için seçiciliklerinin karşılaştırılabilmesi için her bir test bileşiğine ait “seçicilik indeksi (Sİ)” oluşturulmuştur. Seçicilik indeksi $IC_{50(L929)} / IC_{50(HeLa)}$ oranı ile hesaplanmıştır.

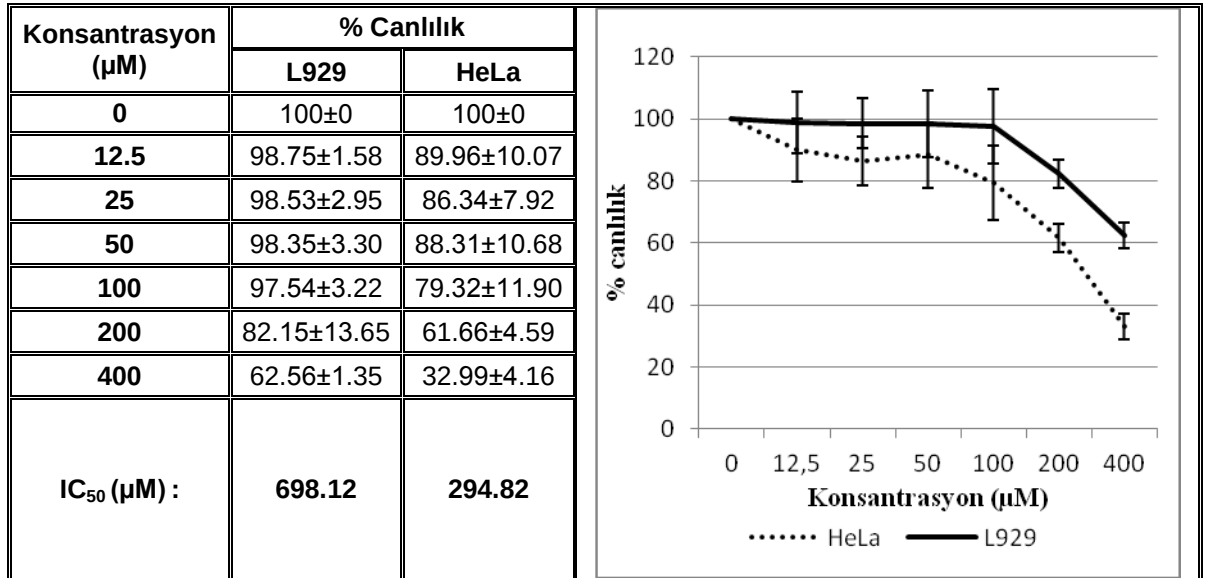
Test bileşiklerinin denenen konsantrasyonlarında elde edilen % canlılık değerleri, doz-cevap eğrilerine ait grafikler ve her bir bileşiğe ait IC_{50} değerleri Çizelge 4.1 ile Çizelge 4.18 arasında gösterilmiştir. Pozitif kontrollere ait sonuçlar ise Çizelge 4.19 ile Çizelge 4.21 arasında gösterilmiştir. Test bileşiklerinin SRB testinden elde edilen sonuçları (IC_{50} ve Sİ) ise topluca Çizelge 4.22’de özetlenmiştir.

Çizelgeler ve grafikler incelendiğinde; her bir test bileşiğinin hem L929 hem de HeLa hücre dizileri için kuyucuklardaki toplam protein miktarını doza bağlı olarak azalttığı görülmüştür. Protein miktarlarındaki bu düşüş, L929 ve HeLa hücrelerinin sitotoksosite sonucu oluşan canlılık yüzdelerindeki düşüş olarak yorumlanmıştır.

Test bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarına karşılık gelen % canlılık verileri, kontrol grubuna göre Dunn's çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırıldığında;

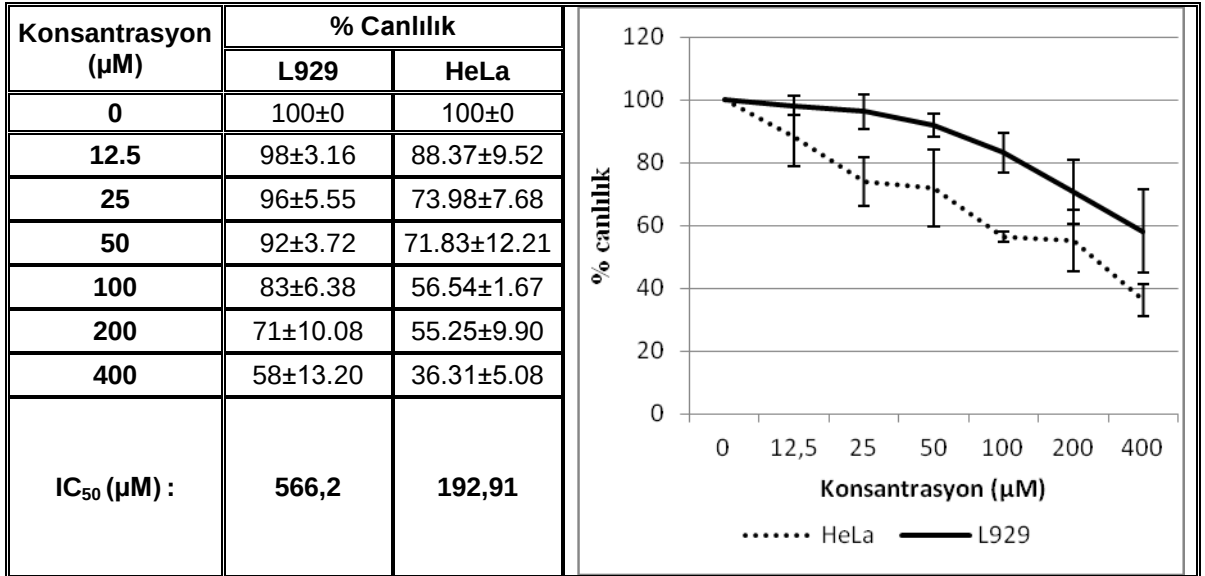
BS1 bileşiğinin; % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığı yaratan ilk dozunun L929 hücre dizisi için 200 μ M, HeLa hücre dizisi için ise 50 μ M olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). Farklılığı yaratan bu dozlarda hücre canlılığının; kontrole göre L929 hücrelerinde %18, HeLa hücrelerinde ise %12 oranında azaldığı görülmektedir. Bu dozlardan itibaren; her iki hücre dizisinde hücre canlılığının, doza bağlı olarak logaritmik olarak azaldığı görülmektedir. Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC_{50} değeri; L929 için 698.12 μ M iken HeLa için 294.82 μ M olarak saptanmıştır. Sonuç olarak BS1 bileşiğinin; HeLa hücre dizisindeki sitotoksik etkisinin, L929 hücre dizisine göre 2.4 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. BS1 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri



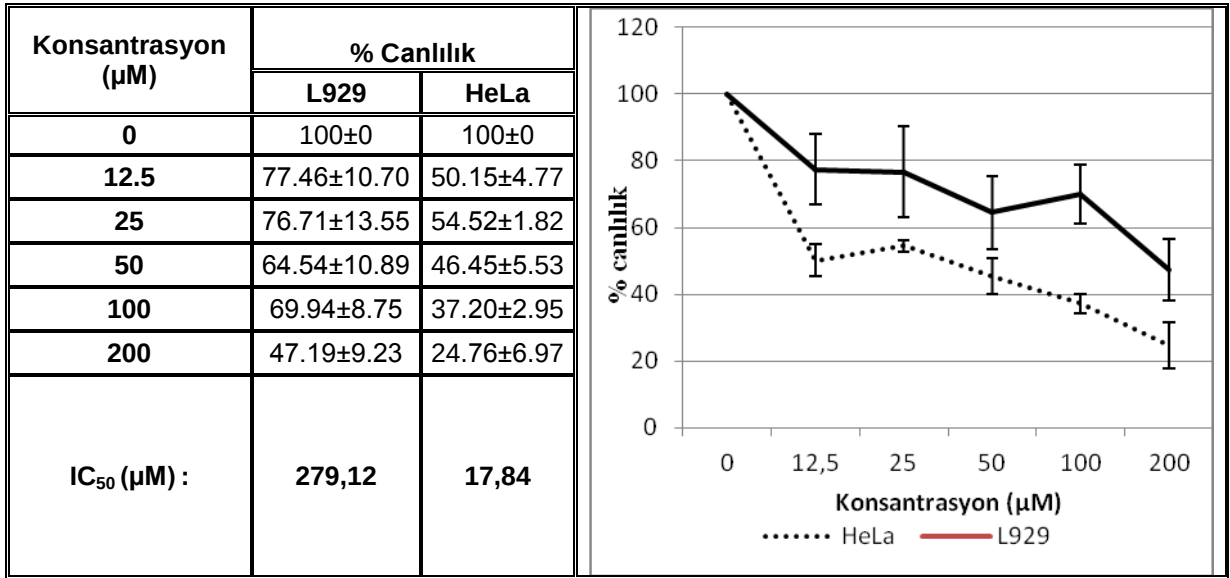
BS2 bileşiğinin; % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığı yaratan ilk dozunun L929 hücre dizisi için 100 μ M, HeLa hücre dizisi için ise 25 μ M olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Farklılığı yaratan bu dozlarda hücre canlılığının; kontrole göre L929 hücrelerinde %17, HeLa hücrelerinde ise %27 oranında azaldığı görülmektedir. Bu dozlardan itibaren; her iki hücre dizisinde hücre canlılığının, doza bağlı bir şekilde logaritmik olarak azaldığı görülmektedir. Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC_{50} değeri; L929 için 566.2 μ M iken HeLa için 192.91 μ M olarak saptanmıştır. Sonuç olarak BS2 bileşiğinin; HeLa hücre dizisindeki sitotoksik etkisinin, L929 hücre dizisine göre 1.9 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. BS2 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri



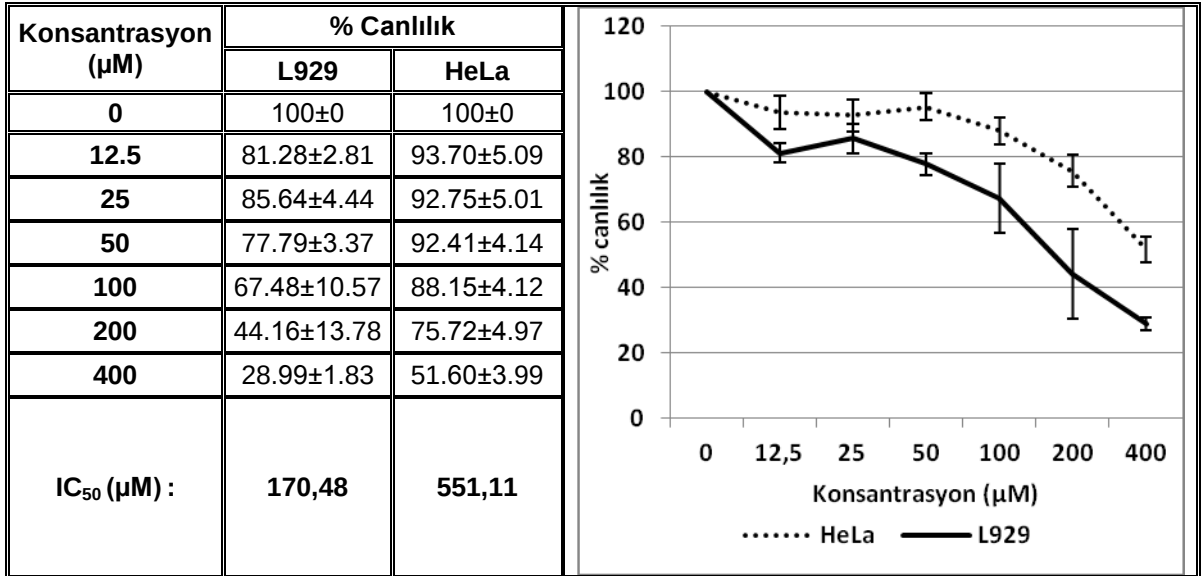
BS3 bileşiğinin; % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığı yaratan ilk dozunun L929 ve HeLa hücre dizilerinin her ikisi için 12.5 μM olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Farklılığı yaratan bu dozda hücre canlılığının; kontrole göre L929 hücrelerinde %23, HeLa hücrelerinde ise %50 oranında azaldığı görülmektedir. Bu dozlardan itibaren; her iki hücre dizisinde hücre canlılığının, doza bağlı bir şekilde logaritmik olarak azaldığı görülmektedir. Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC_{50} değeri; L929 için 279.12 μM iken HeLa için 17.84 μM olarak saptanmıştır. Sonuç olarak BS3 bileşiğinin; HeLa hücre dizisindeki sitotoksik etkisinin, L929 hücre dizisine göre 15.6 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. BS3 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri



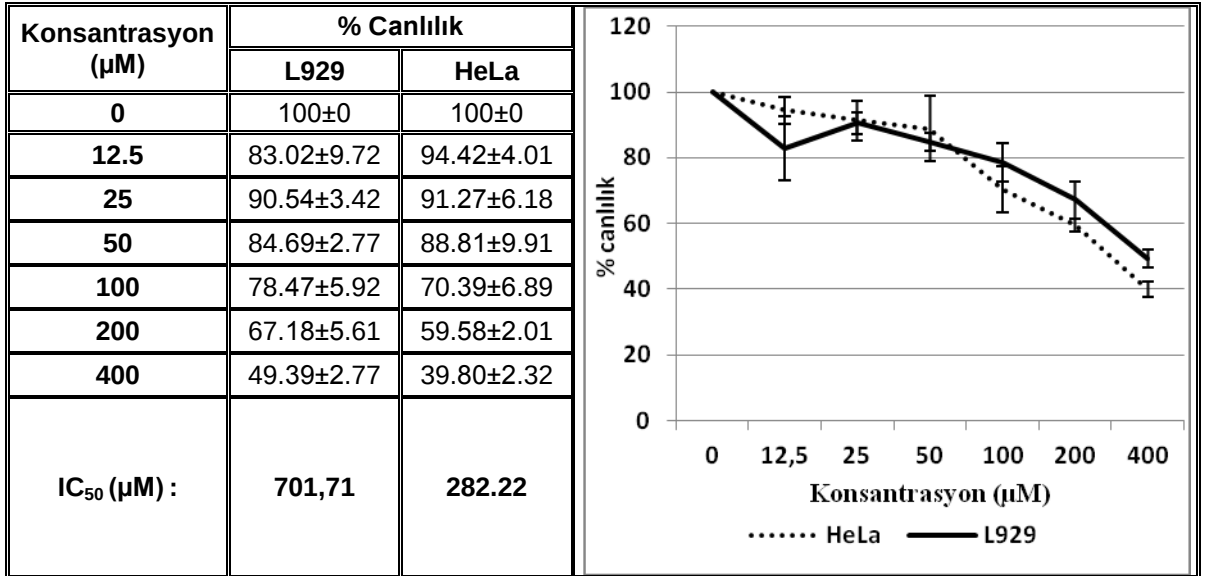
BS4 bileşiğinin; % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığı yaratan ilk dozunun L929 hücre dizisi için 12.5 µM, HeLa hücre dizisi için ise 100 µM olduğu saptanmıştır (p<0.05). Farklılığı yaratan bu dozlarda hücre canlılığının; kontrole göre L929 hücrelerinde %19, HeLa hücrelerinde ise %12 oranında azaldığı görülmektedir. Bu dozlardan itibaren; her iki hücre dizisinde hücre canlılığının, doza bağlı bir şekilde logaritmik olarak azaldığı görülmektedir. Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC₅₀ değeri; L929 için 170.48 µM iken HeLa için 551.11 µM olarak saptanmıştır. Sonuç olarak BS4 bileşiğinin; L929 hücre dizisindeki sitotoksik etkisinin, HeLa hücre dizisine göre 3.2 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. BS4 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri



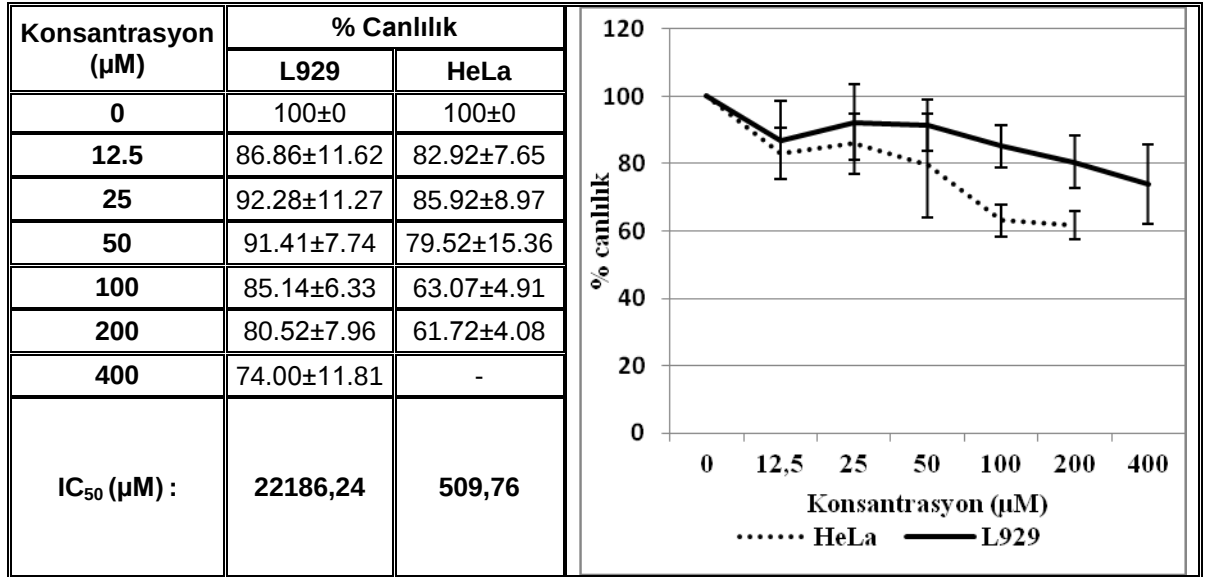
BS5 bileşiğinin; % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığı yaratan ilk dozunun L929 hücre dizisi için 12.5 µM, HeLa hücre dizisi için ise 50 µM olduğu saptanmıştır (p<0.05). Farklılığı yaratan bu dozlarda hücre canlılığının; kontrole göre L929 hücrelerinde %17, HeLa hücrelerinde ise %12 oranında azaldığı görülmektedir. Bu dozlardan itibaren; her iki hücre dizisinde hücre canlılığının, doza bağlı bir şekilde logaritmik olarak azaldığı görülmektedir. Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC₅₀ değeri; L929 için 701.71 µM iken HeLa için 282.22 µM olarak saptanmıştır. Sonuç olarak BS5 bileşiğinin; HeLa hücre dizisindeki sitotoksik etkisinin, L929 hücre dizisine göre 2.5 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. BS5 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri



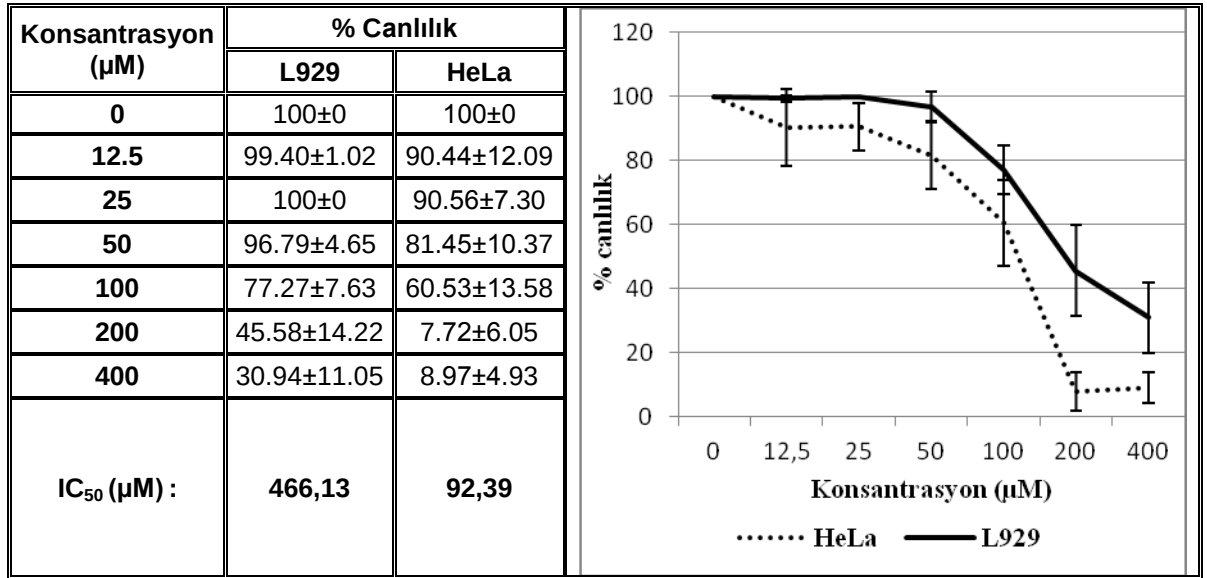
BS6 bileşiğinin; % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığı yaratan ilk dozunun L929 hücre dizisi için 100 μ M, HeLa hücre dizisi için ise 12.5 μ M olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Farklılığı yaratan bu dozlarda hücre canlılığının; kontrole göre L929 hücrelerinde %15, HeLa hücrelerinde ise %17 oranında azaldığı görülmektedir. Bu dozlardan itibaren; her iki hücre dizisinde hücre canlılığının, doza bağlı bir şekilde logaritmik olarak azaldığı görülmektedir. Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC_{50} değeri; L929 için 22186,24 μ M iken HeLa için 509,76 μ M olarak saptanmıştır. Sonuç olarak BS6 bileşiğinin; HeLa hücre dizisindeki sitotoksik etkisinin, L929 hücre dizisine göre 43.5 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. BS6 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri



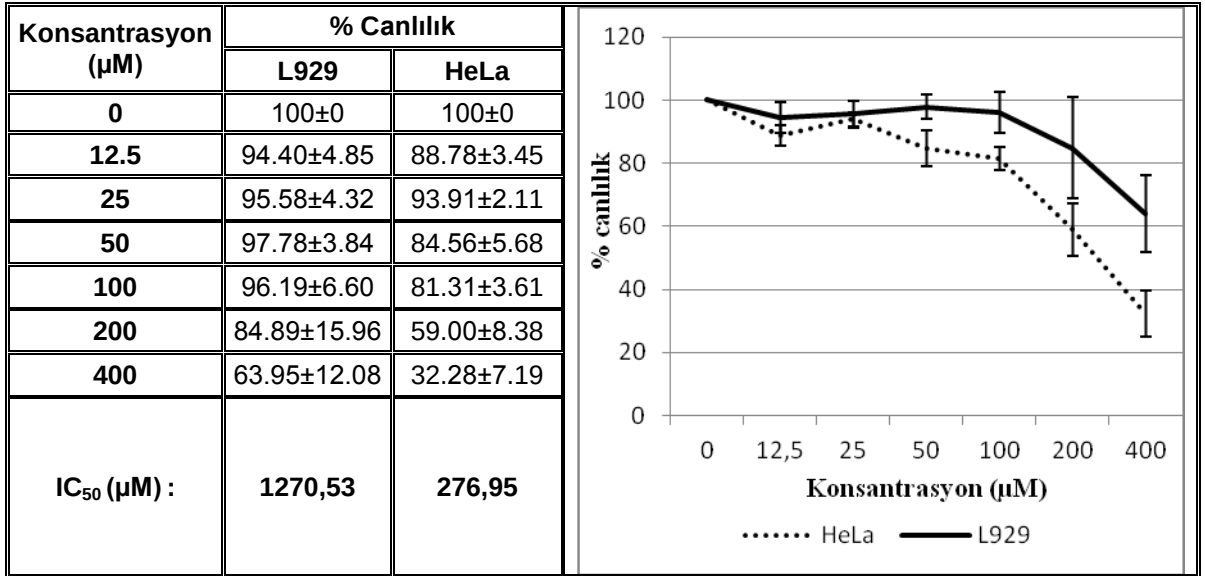
BS7 bileşiğinin; % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığı yaratan ilk dozunun L929 hücre dizisi için 100 µM, HeLa hücre dizisi için ise 50 µM olduğu saptanmıştır (p<0.05). Farklılığı yaratan bu dozlarda hücre canlılığının; kontrole göre L929 hücrelerinde %23, HeLa hücrelerinde ise %19 oranında azaldığı görülmektedir. Bu dozlardan itibaren; her iki hücre dizisinde hücre canlılığının, doza bağlı bir şekilde logaritmik olarak azaldığı görülmektedir. Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC₅₀ değeri; L929 için 466,13 µM iken HeLa için 92,39 µM olarak saptanmıştır. Sonuç olarak BS7 bileşiğinin; HeLa hücre dizisindeki sitotoksik etkisinin, L929 hücre dizisine göre 5 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.7. BS7 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri



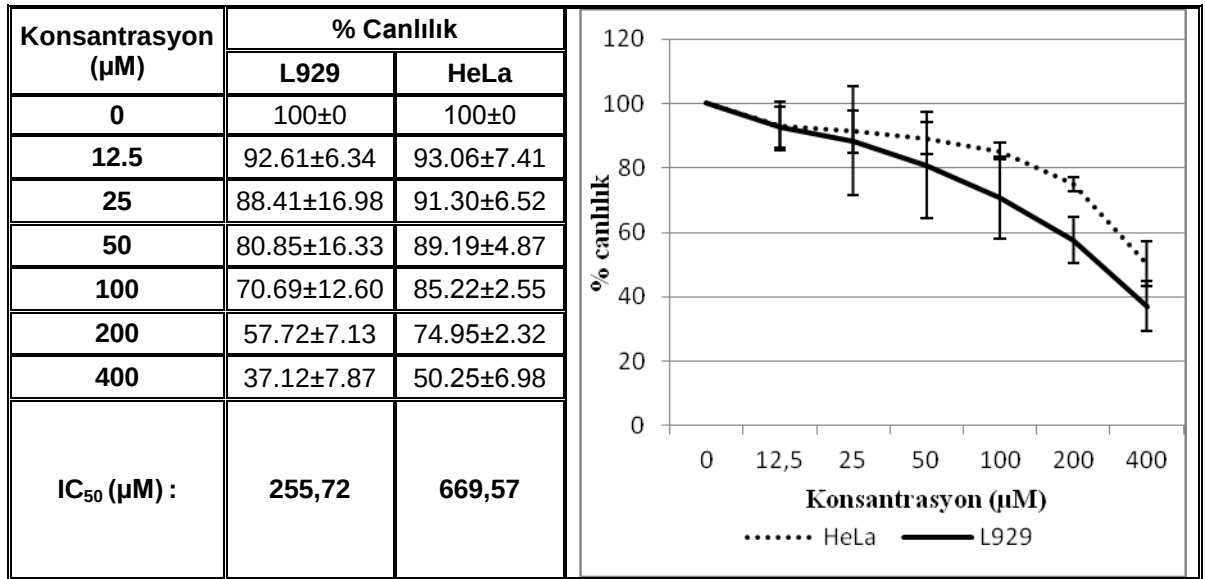
BS8 bileşiğinin; % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığı yaratan ilk dozunun L929 hücre dizisi için 200 μ M, HeLa hücre dizisi için ise 12.5 μ M olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Farklılığı yaratan bu dozlarda hücre canlılığının; kontrole göre L929 hücrelerinde %17, HeLa hücrelerinde ise %27 oranında azaldığı görülmektedir. Bu dozlardan itibaren; her iki hücre dizisinde hücre canlılığının, doza bağlı bir şekilde logaritmik olarak azaldığı görülmektedir. Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC_{50} değeri; L929 için 1270,53 μ M iken HeLa için 276,95 μ M olarak saptanmıştır. Sonuç olarak BS8 bileşiğinin; HeLa hücre dizisindeki sitotoksik etkisinin, L929 hücre dizisine göre 4.6 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.8. BS8 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri



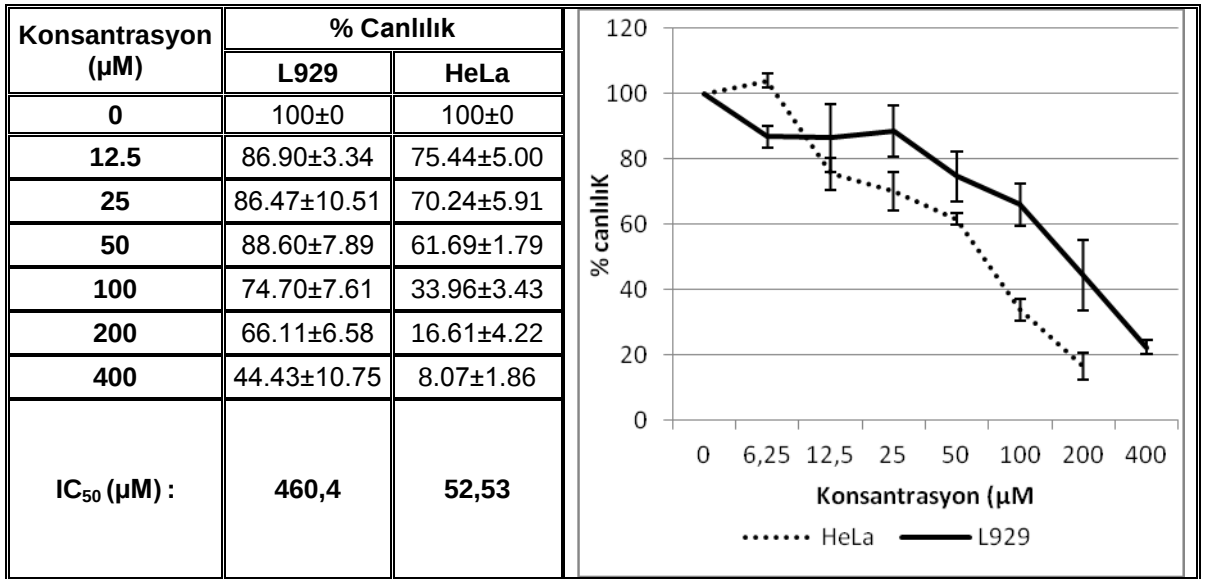
BS9 bileşiğinin; % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığı yaratan ilk dozunun L929 hücre dizisi için 25 µM, HeLa hücre dizisi için ise 50 µM olduğu saptanmıştır (p<0.05). Farklılığı yaratan bu dozlarda hücre canlılığının; kontrole göre L929 hücrelerinde %12, HeLa hücrelerinde ise %11 oranında azaldığı görülmektedir. Bu dozlardan itibaren; her iki hücre dizisinde hücre canlılığının, doza bağlı bir şekilde logaritmik olarak azaldığı görülmektedir. Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC₅₀ değeri; L929 için 255,72 µM iken HeLa için 669,57 µM olarak saptanmıştır. Sonuç olarak BS9 bileşiğinin; L929 hücre dizisindeki sitotoksik etkisinin, HeLa hücre dizisine göre 2.6 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.9. BS9 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri



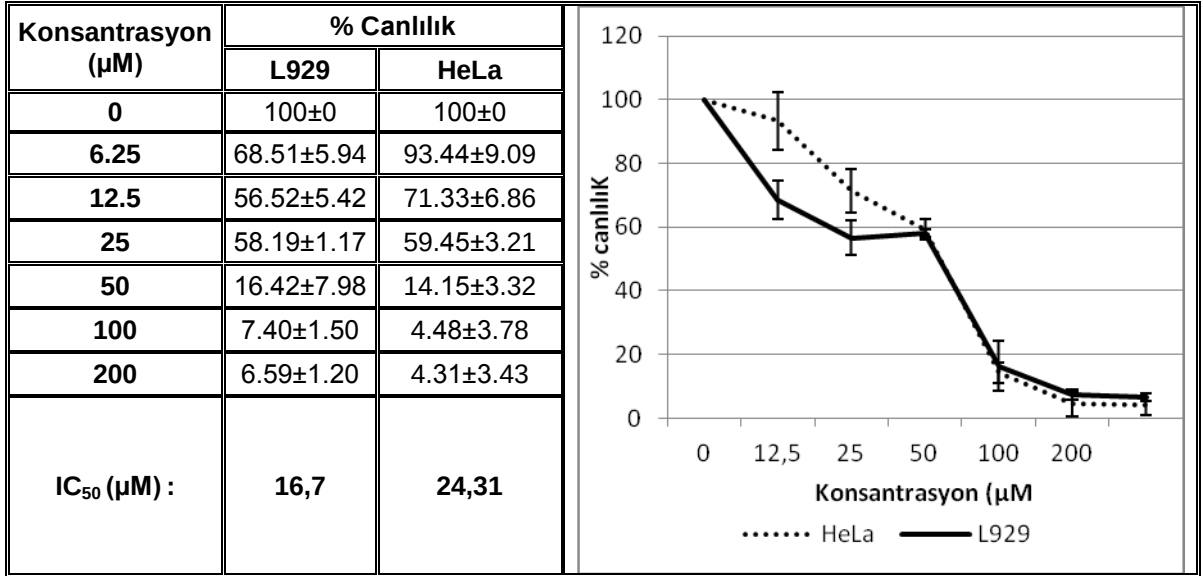
BS10 bileşiğinin; % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığı yaratan ilk dozunun L929 hücre dizisi için 100 μ M, HeLa hücre dizisi için ise 12.5 μ M olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Farklılığı yaratan bu dozlarda hücre canlılığının; kontrole göre L929 hücrelerinde %26, HeLa hücrelerinde ise %25 oranında azaldığı görülmektedir. Bu dozlardan itibaren; her iki hücre dizisinde hücre canlılığının, doza bağlı bir şekilde logaritmik olarak azaldığı görülmektedir. Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC_{50} değeri; L929 için 460,4 μ M iken HeLa için 52,53 μ M olarak saptanmıştır. Sonuç olarak BS10 bileşiğinin; HeLa hücre dizisindeki sitotoksik etkisinin, L929 hücre dizisine göre 8.8 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.10. BS10 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri



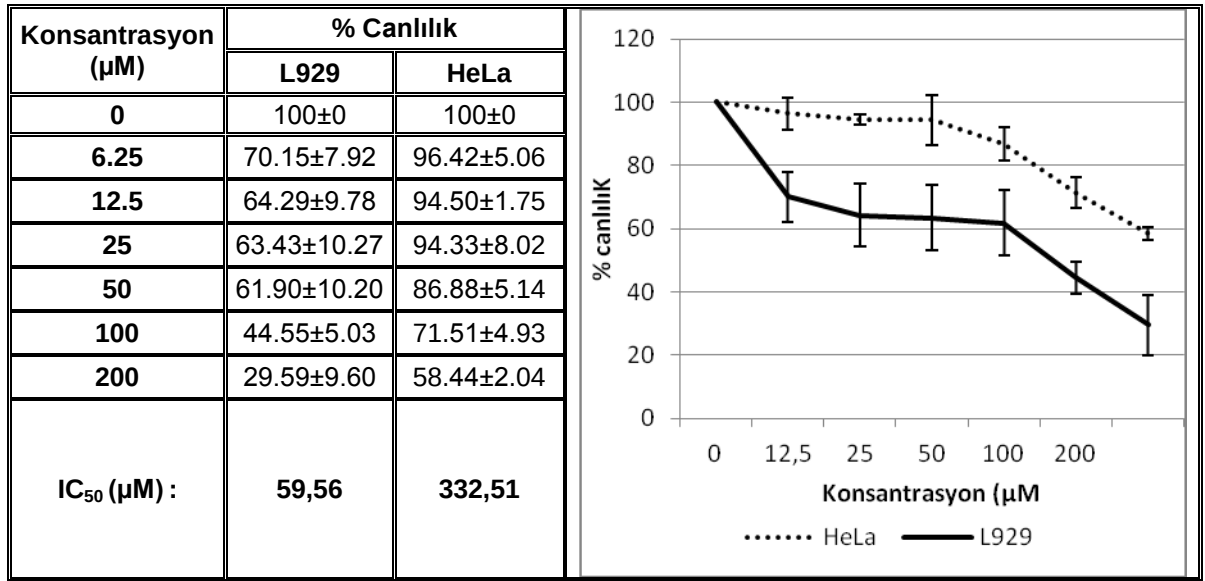
BS11 bileşiğinin; % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığı yaratan ilk dozunun L929 hücre dizisi için 6.25 μ M, HeLa hücre dizisi için ise 12.5 μ M olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Farklılığı yaratan bu dozlarda hücre canlılığının; kontrole göre L929 hücrelerinde %32, HeLa hücrelerinde ise %29 oranında azaldığı görülmektedir. Bu dozlardan itibaren; her iki hücre dizisinde hücre canlılığının, doza bağlı bir şekilde logaritmik olarak azaldığı görülmektedir. Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC_{50} değeri; L929 için 16,7 μ M iken HeLa için 24,31 μ M olarak saptanmıştır. Sonuç olarak BS11 bileşiğinin; L929 hücre dizisindeki sitotoksik etkisinin, HeLa hücre dizisine göre 1.5 kat daha fazla olduğu görülmesine rağmen her iki hücre için sitotoksik olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.11. BS11 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri



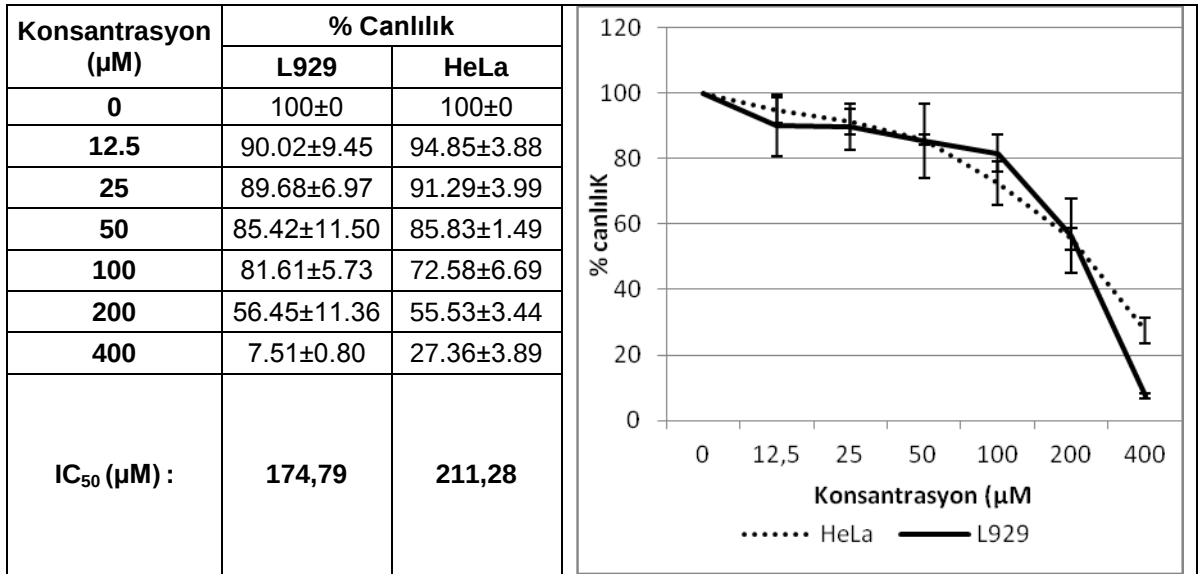
BS12 bileşiğinin; % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığı yaratan ilk dozunun L929 hücre dizisi için 6.25 μ M, HeLa hücre dizisi için ise 50 μ M olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). Farklılığı yaratan bu dozlarda hücre canlılığının; kontrole göre L929 hücrelerinde %30, HeLa hücrelerinde ise %24 oranında azaldığı görülmektedir. Bu dozlardan itibaren; her iki hücre dizisinde hücre canlılığının, doza bağlı bir şekilde logaritmik olarak azaldığı görülmektedir. Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC_{50} değeri; L929 için 59,56 μ M iken HeLa için 332,51 μ M olarak saptanmıştır. Sonuç olarak BS12 bileşiğinin; L929 hücre dizisindeki sitotoksik etkisinin, HeLa hücre dizisine göre 5.6 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.12. BS12 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri



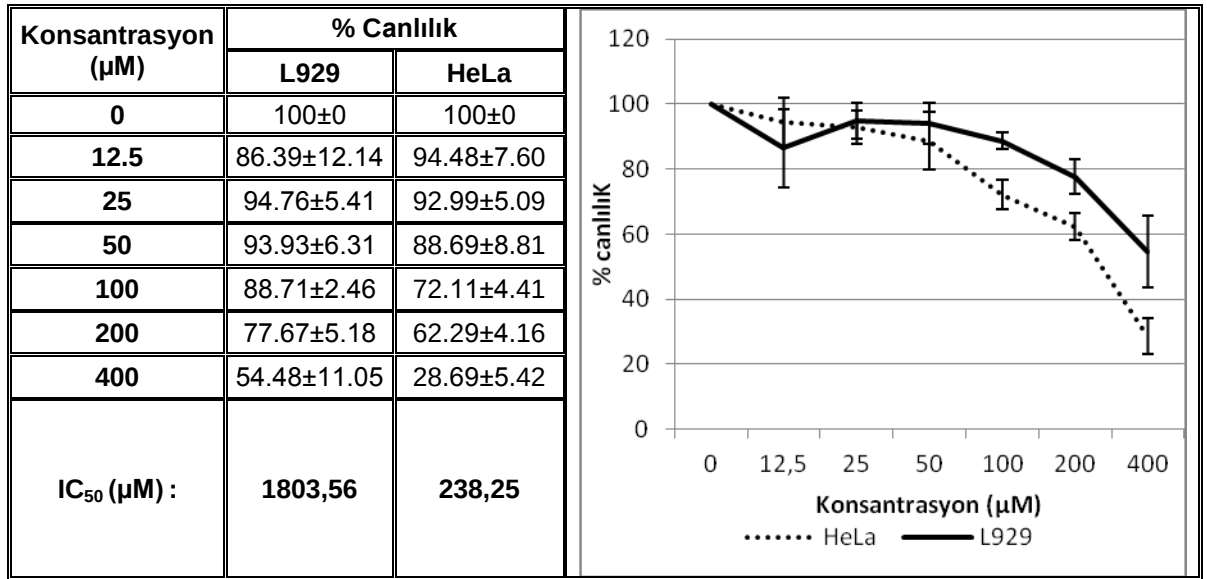
BS13 bileşiğinin; % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığı yaratan ilk dozunun L929 hücre dizisi için 25 μM , HeLa hücre dizisi için ise 50 μM olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Farklılığı yaratan bu dozlarda hücre canlılığının; kontrole göre L929 hücrelerinde %11, HeLa hücrelerinde ise %15 oranında azaldığı görülmektedir. Bu dozlardan itibaren; her iki hücre dizisinde hücre canlılığının, doza bağlı bir şekilde logaritmik olarak azaldığı görülmektedir. Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC_{50} değeri; L929 için 174,79 μM iken HeLa için 211,28 μM olarak saptanmıştır. Sonuç olarak BS13 bileşiğinin; L929 hücre dizisindeki sitotoksik etkisinin, HeLa hücre dizisine göre 1.2 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.13. BS13 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri



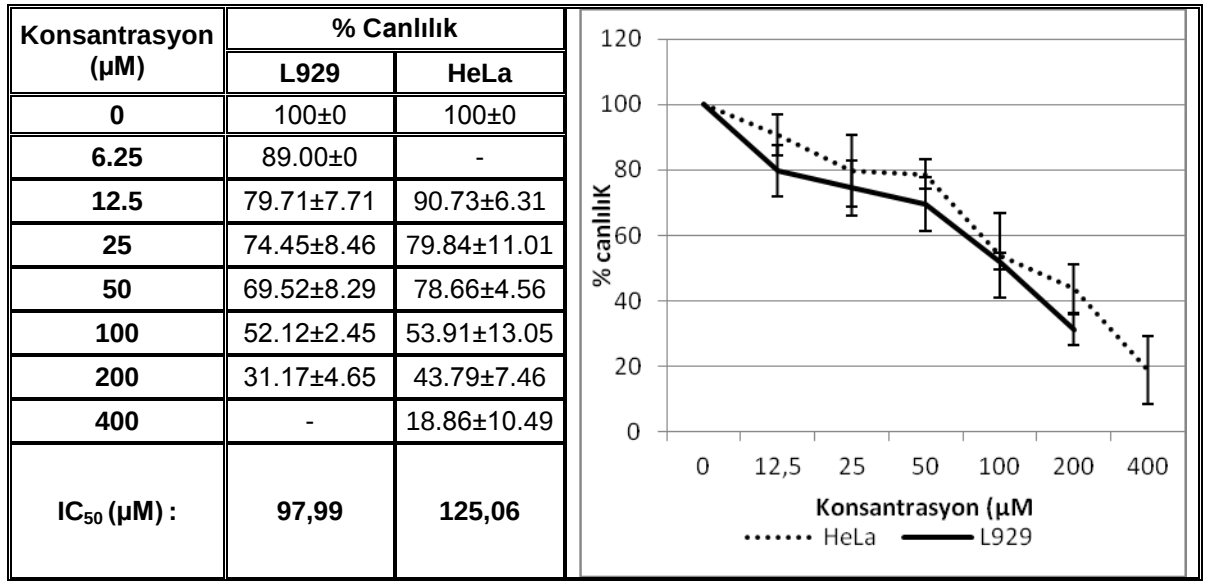
BS14 bileşiğinin; % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığı yaratan ilk dozunun L929 hücre dizisi için 12.5 μM , HeLa hücre dizisi için ise 50 μM olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Farklılığı yaratan bu dozlarda hücre canlılığının; kontrole göre L929 hücrelerinde %14, HeLa hücrelerinde ise %12 oranında azaldığı görülmektedir. Bu dozlardan itibaren; her iki hücre dizisinde hücre canlılığının, doza bağlı bir şekilde logaritmik olarak azaldığı görülmektedir. Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC_{50} değeri; L929 için 1803,56 μM iken HeLa için 238,25 μM olarak saptanmıştır. Sonuç olarak BS14 bileşiğinin; HeLa hücre dizisindeki sitotoksik etkisinin, L929 hücre dizisine göre 7.6 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.14. BS14 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri



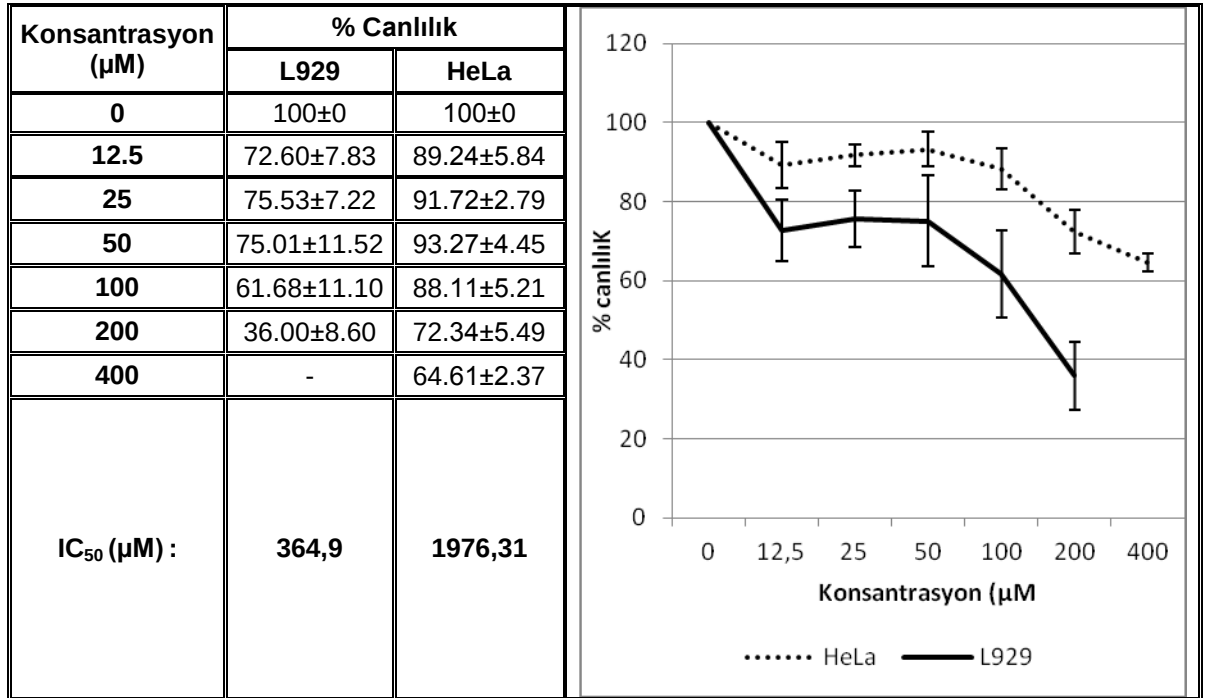
BS15 bileşiğinin; % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığı yaratan ilk dozunun L929 hücre dizisi için 6.25 μ M, HeLa hücre dizisi için ise 25 μ M olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Farklılığı yaratan bu dozlarda hücre canlılığının; kontrole göre L929 hücrelerinde %11, HeLa hücrelerinde ise %21 oranında azaldığı görülmektedir. Bu dozlardan itibaren; her iki hücre dizisinde hücre canlılığının, doza bağlı bir şekilde logaritmik olarak azaldığı görülmektedir. Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC_{50} değeri; L929 için 97,99 μ M iken HeLa için 125,06 μ M olarak saptanmıştır. Sonuç olarak BS15 bileşiğinin; L929 hücre dizisindeki sitotoksik etkisinin, HeLa hücre dizisine göre 1.3 kat daha fazla olduğu görülmeye rağmen her iki hücre için sitotoksik olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.15. BS15 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri



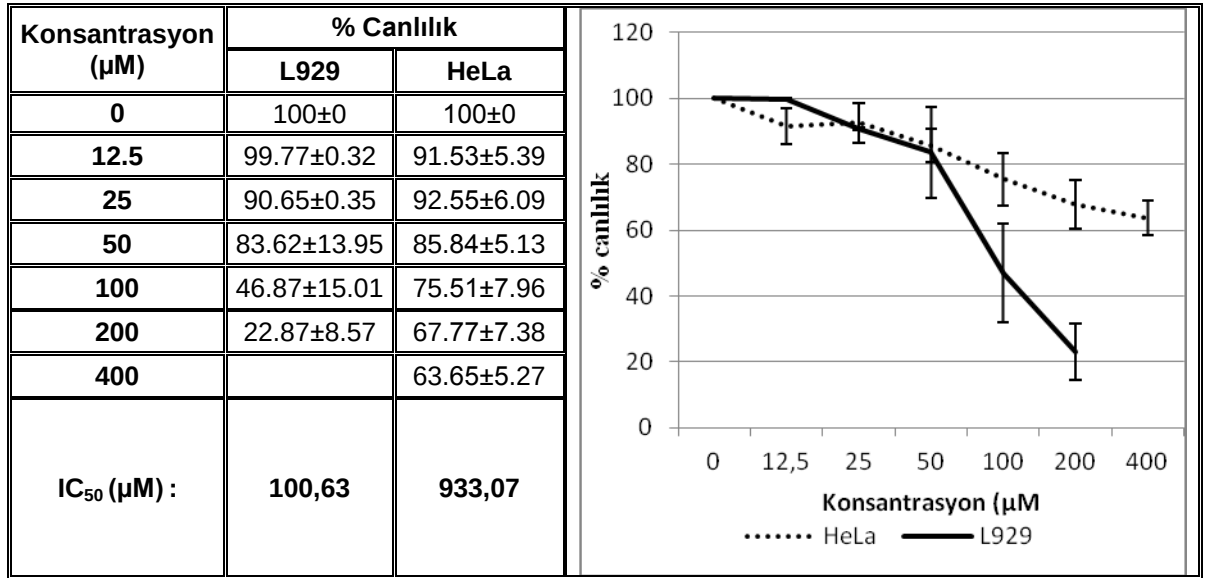
BS16 bileşiğinin; % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığı yaratan ilk dozunun hem L929 hem de HeLa hücre dizilerinin her ikisi için 12.5 µM olduğu saptanmıştır (p<0.05). Farklılığı yaratan bu dozda hücre canlılığının; kontrole göre L929 hücrelerinde %28, HeLa hücrelerinde ise %11 oranında azaldığı görülmektedir. Bu dozlardan itibaren; her iki hücre dizisinde hücre canlılığının, doza bağlı bir şekilde logaritmik olarak azaldığı görülmektedir. Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC₅₀ değeri; L929 için 364,9 µM iken HeLa için 1976,31 µM olarak saptanmıştır. Sonuç olarak BS16 bileşiğinin; L929 hücre dizisindeki sitotoksik etkisinin, HeLa hücre dizisine göre 5.4 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.16. BS16 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri



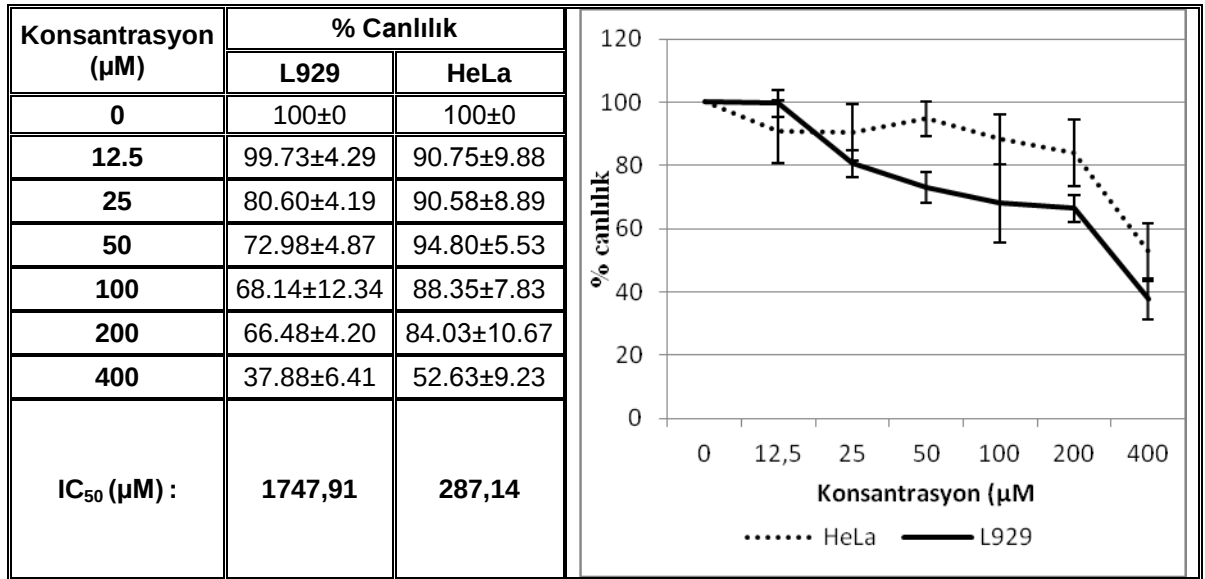
BS17 bileşiğinin; % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığı yaratan ilk dozunun hem L929 hem de HeLa hücre dizilerinin her ikisi için 50 µM olduğu saptanmıştır (p<0.05). Farklılığı yaratan bu dozlarda hücre canlılığının; kontrole göre L929 hücrelerinde %17, HeLa hücrelerinde ise %15 oranında azaldığı görülmektedir. Bu dozlardan itibaren; her iki hücre dizisinde hücre canlılığının, doza bağlı bir şekilde logaritmik olarak azaldığı görülmektedir. Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC₅₀ değeri; L929 için 100,63 µM iken HeLa için 933,07 µM olarak saptanmıştır. Sonuç olarak BS17 bileşiğinin; L929 hücre dizisindeki sitotoksik etkisinin, HeLa hücre dizisine 9.3 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.17. BS17 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri



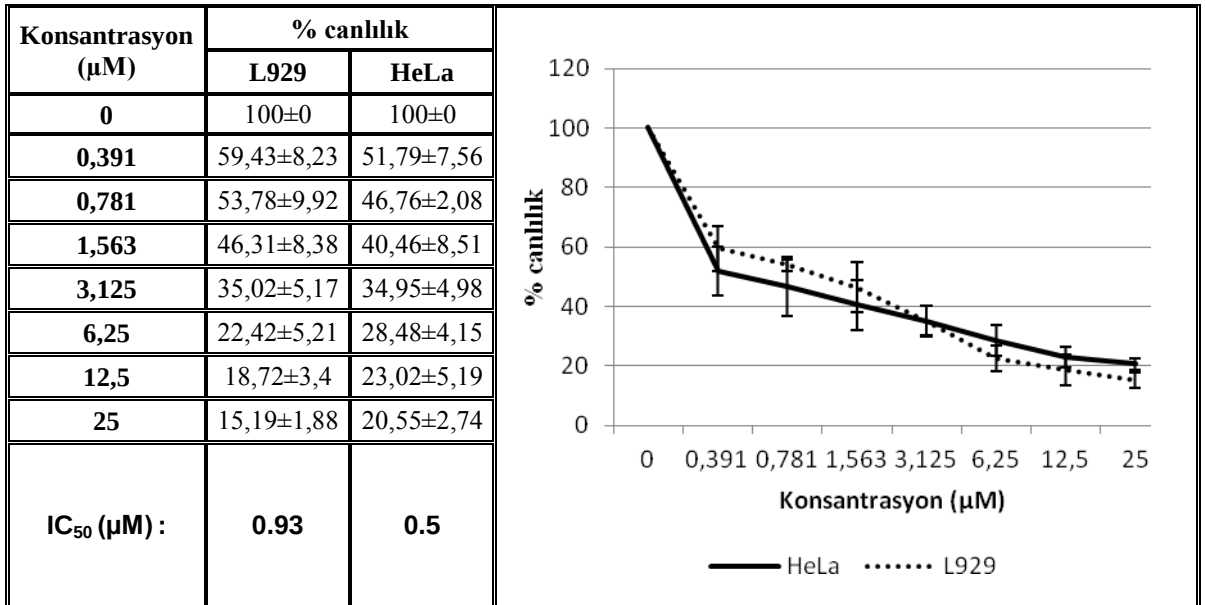
BS18 bileşiğinin; % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığı yaratan ilk dozunun L929 hücre dizisi için 25 µM, HeLa hücre dizisi için ise 100 µM olduğu saptanmıştır (p<0.05). Farklılığı yaratan bu dozlarda hücre canlılığının; kontrole göre L929 hücrelerinde %20, HeLa hücrelerinde ise %12 oranında azaldığı görülmektedir. Bu dozlardan itibaren; her iki hücre dizisinde hücre canlılığının, doza bağlı bir şekilde logaritmik olarak azaldığı görülmektedir. Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC₅₀ değeri; L929 için 1747,91 µM iken HeLa için 287,14 µM olarak saptanmıştır. Sonuç olarak BS18 bileşiğinin; HeLa hücre dizisindeki sitotoksik etkisinin, L929 hücre dizisine göre 6.1 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.18. BS18 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri



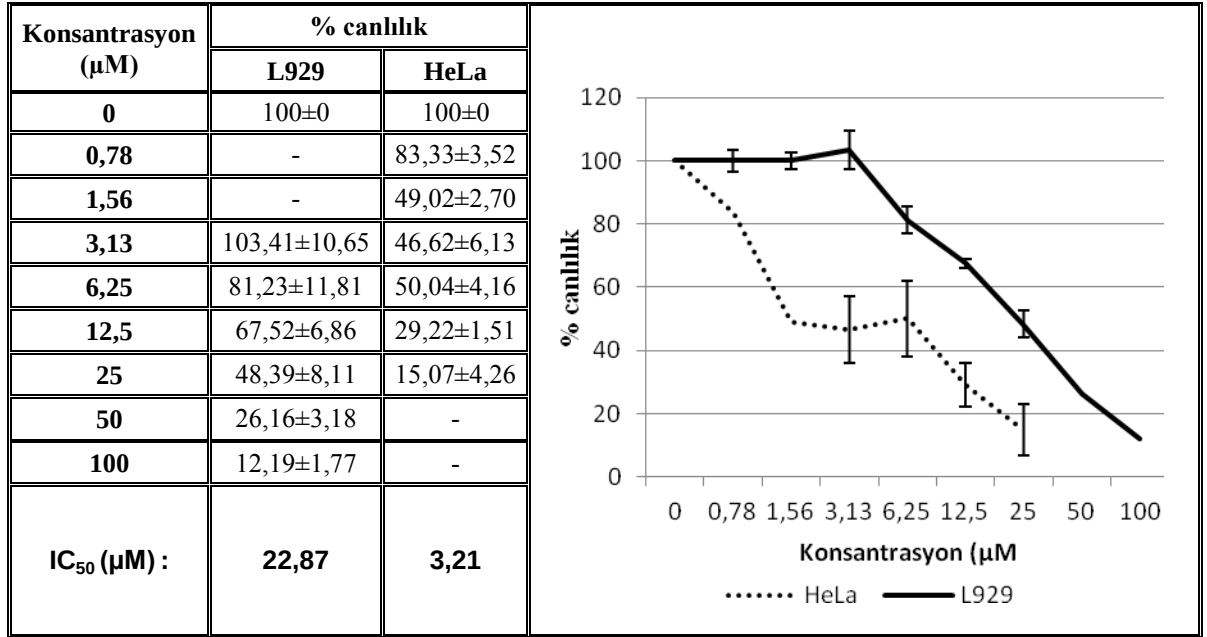
Test sisteminde pozitif kontrol olarak kullanılan kamptotesin bileşiğinin % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığı yaratan ilk dozunun hem L929 hem de HeLa hücre dizilerinin her ikisi için 0.391 μM olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Farklılığı yaratan bu dozda hücre canlılığının; kontrole göre L929 hücrelerinde % 41, HeLa hücrelerinde ise %49 oranında azaldığı görülmektedir. Bu dozlardan itibaren, her iki hücre dizisinde hücre canlılığının, doza bağlı bir şekilde logaritmik olarak azaldığı görülmektedir. Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC_{50} değeri, L929 için 0.93 μM iken, HeLa için 0.5 μM olarak saptanmıştır. Sonuç olarak, kamptotesinin HeLa hücre dizisindeki sitotoksik etkisinin, L929 hücre dizisine göre 1.9 kat daha fazla olduğu görülmesine rağmen her iki hücre için sitotoksik olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.19. Kamptotesin ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri



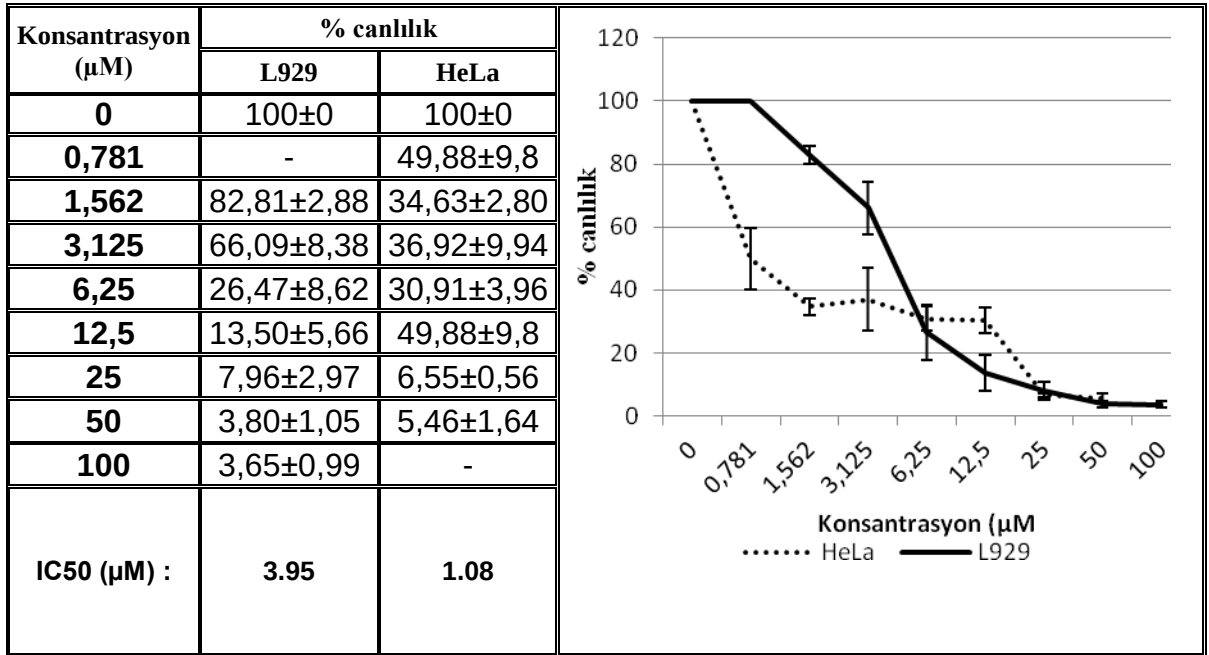
Test sisteminde pozitif kontrol olarak kullanılan etoposit bileşiğinin % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığı yaratan ilk dozunun L929 hücre dizisi için 6.25 μM , HeLa hücre dizisi için ise 0.78 μM olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Farklılığı yaratan bu dozlarda hücre canlılığının; kontrole göre L929 hücrelerinde % 19, HeLa hücrelerinde ise %17 oranında azaldığı görülmektedir. Bu dozlardan itibaren, her iki hücre dizisinde hücre canlılığının, doza bağlı bir şekilde logaritmik olarak azaldığı görülmektedir. Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC_{50} değeri, L929 için 22.87 μM iken HeLa için 3.21 μM olarak saptanmıştır. Sonuç olarak, etopositin HeLa hücre dizisi üzerindeki sitotoksik etkisinin, L929 hücre dizisine göre 7.1 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.20. Etoposit ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri

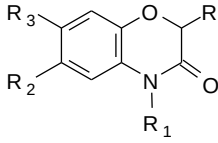
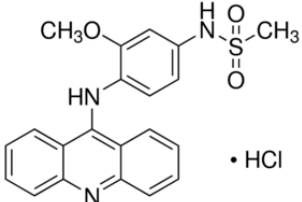
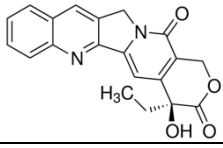
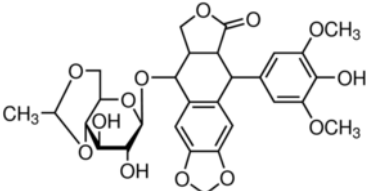


Test sisteminde pozitif kontrol olarak kullanılan amsacrin bileşiğinin % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığı yaratan ilk dozunun L929 hücre dizisi için 1.56 μM , HeLa hücre dizisi için ise 0.78 μM olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Farklılığı yaratan bu dozlarda hücre canlılığının; kontrole göre L929 hücrelerinde % 18, HeLa hücrelerinde ise %51 oranında azaldığı görülmektedir. Bu dozlardan itibaren, her iki hücre dizisinde hücre canlılığının, doza bağlı bir şekilde logaritmik olarak azaldığı görülmektedir. Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC_{50} değeri, L929 için 3.95 μM iken HeLa için 1.08 μM olarak saptanmıştır. Sonuç olarak, amsacrinin HeLa hücre dizisindeki sitotoksik etkisinin, L929 hücre dizisine göre 3.7 kat daha fazla olduğu görülmesine rağmen her iki hücre için sitotoksik olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.21. Amsacrin ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücre dizilerinde SRB testi sonrasında elde edilen % canlılık değerleri ve doz-cevap eğrileri



Çizelge 4.22. 18 adet benzoksazin türevi bileşiğin SRB testine ait toplu sonuçları

Test Bileşikleri					IC ₅₀ (µM)		Seçicilik İndeksi (Sİ)
	R	R ₁	R ₂	R ₃	HeLa	L929	
BS1	CH ₂ COOC ₂ H ₅	H	H	H	294,82	698,12	2,4
BS2	CH ₂ COOC ₂ H ₅	H	CH ₃	H	192,91	566,2	2,9
BS3	CH ₂ COOC ₂ H ₅	H	Cl	H	17,84**	279,12	15,6
BS4	CH ₂ COOC ₂ H ₅	H	COOC ₂ H ₅	H	551,11	170,48	0,3
BS5	CH ₂ COOC ₂ H ₅	H	H	NO ₂	282,22	701,71	2,5
BS6	CH ₂ COOC ₂ H ₅	H	H	NH ₂	509,76	22186,24	43,5
BS7	CH ₂ COOC ₂ H ₅	H	Cl	NO ₂	92,39**	466,13	5,0
BS8	CH ₂ COOC ₂ H ₅	CH ₃	H	H	276,95	1270,53	4,6
BS9	CH ₂ COOC ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	H	669,57	255,72	0,4
BS10	CH ₂ COOC ₂ H ₅	CH ₃	Cl	H	52,53**	460,4	8,8
BS11	CH ₂ COOC ₂ H ₅	CH ₃	COOC ₂ H ₅	H	24,31**	16,7**	0,7
BS12	CH ₂ COOC ₂ H ₅	CH ₃	H	NO ₂	332,51	59,56**	0,2
BS13	CH ₂ COOC ₂ H ₅	CH ₃	Cl	NO ₂	211,28	174,79	0,8
BS14	CH ₂ COOC ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H	H	238,25	1803,56	7,6
BS15	CH ₂ COOC ₂ H ₅	C ₂ H ₅	Cl	H	125,06	97,99**	0,8
BS16	CH ₂ COOC ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H	NO ₂	1976,31	364,9	0,2
BS17	CH ₂ COOC ₂ H ₅	C ₂ H ₅	Cl	NO ₂	933,07	100,63	0,1
BS18	OH	H	H	H	287,14	1747,91	6,1
AMSACRIN					1,08**	3,95**	3,7
CPT					0,5**	0,93**	1,9
ETOP					3,21**	22,87**	7,1

Seçicilik İndeksi (Sİ) = IC₅₀(L929) / IC₅₀(HeLa)

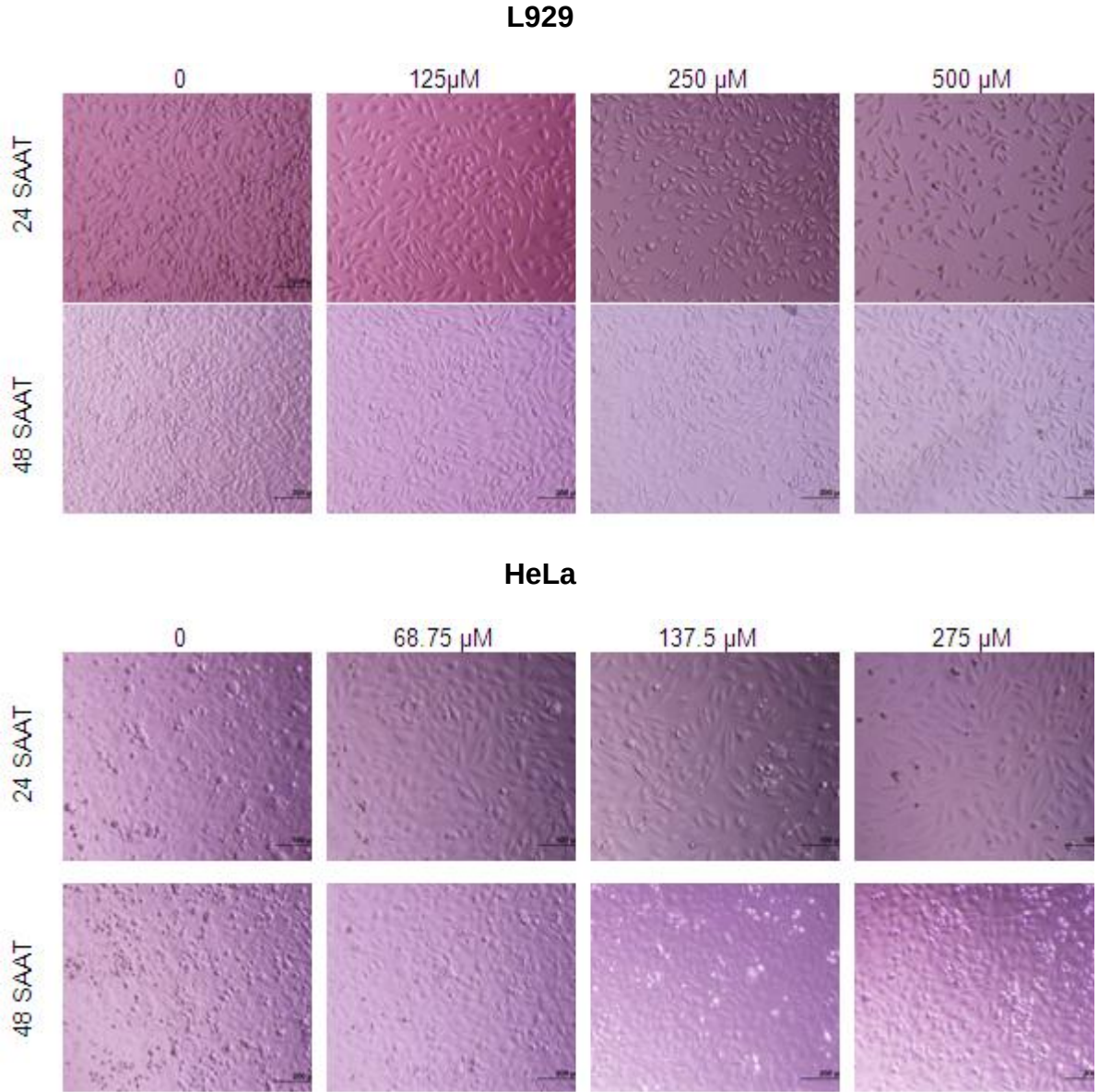
** : Her iki hücre dizisinde 100 µM altındaki IC₅₀ değerleri

4.2. Test Bileşiklerinin Hücre Morfolojisi Üzerindeki Etkilerine Ait Bulgular

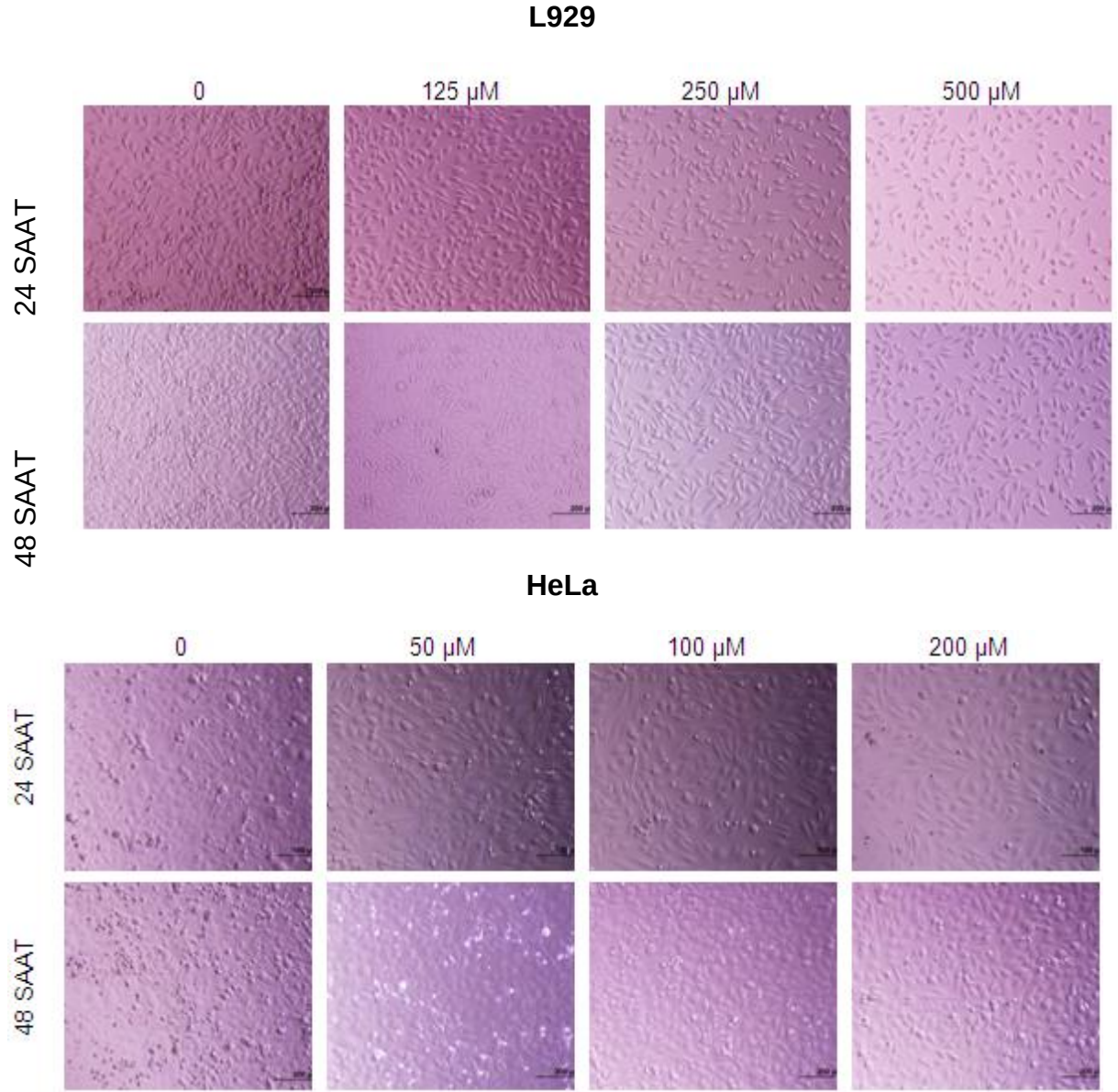
L929 ve HeLa hücreleri; sitotoksosite çalışmalarında belirlenen test bileşiklerine ait IC_{50} değerlerine yakın 3 farklı konsantrasyonda 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. 24. saat ve 48. saat sonrası test bileşikleri ile muamele edilen ve edilmeyen hücreler alttan aydınlatmalı mikroskop ile 10x büyütmede incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

Test bileşiklerinin hücre morfolojisi ve proliferasyonu üzerindeki etkilerine ait mikroskopik görüntüleri Şekil 4.1 ile Şekil 4.20 arasında gösterilmiştir.

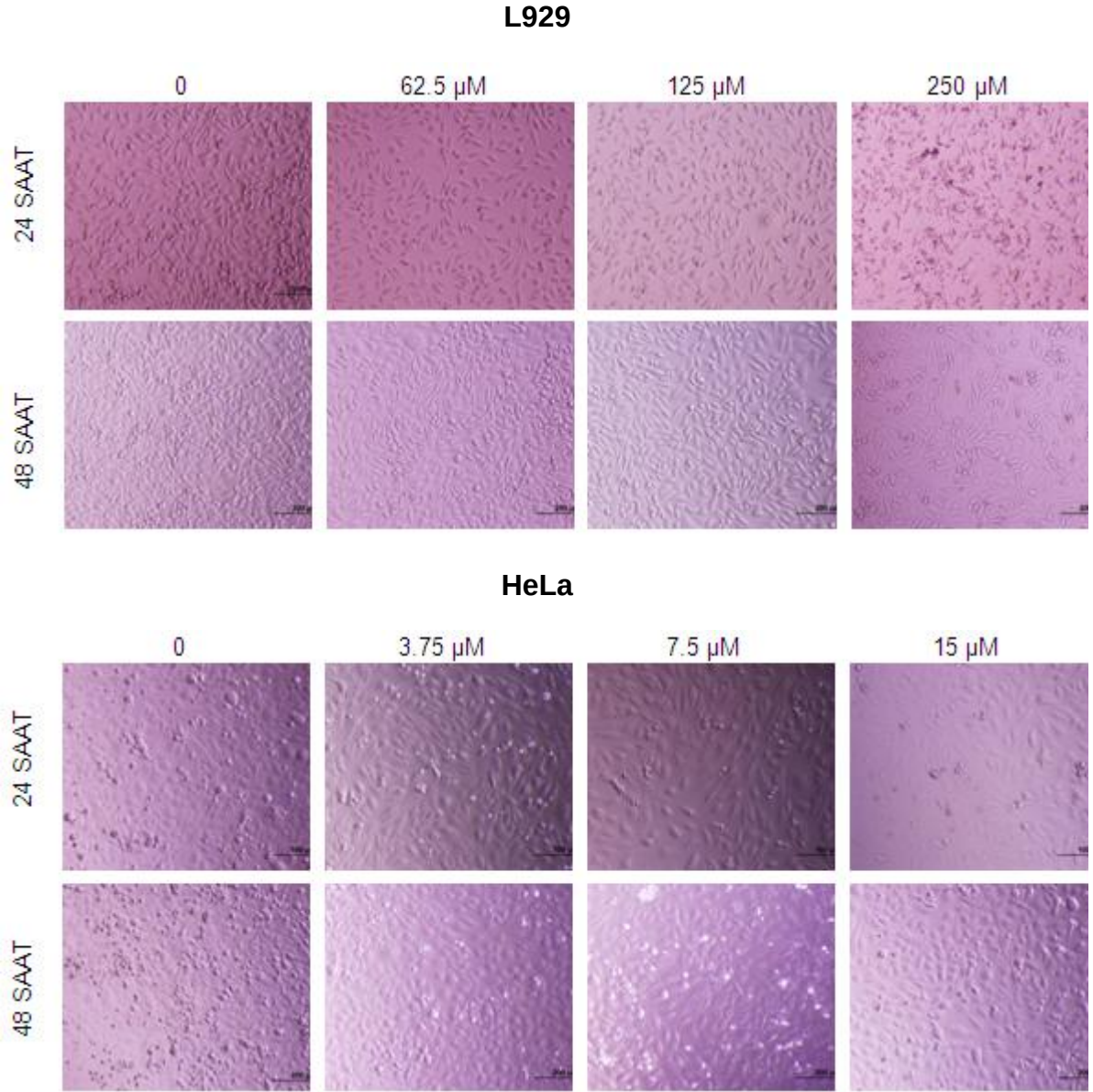
BS1, BS3, BS5 ve BS11 bileşikleri ile muamele edilen hücrelerin mikroskop görüntüleri incelendiğinde her iki hücre dizisi için de doza bağlı olarak hücre sayısında azalma olduğu tespit edilmiştir. Diğer bileşiklerin de tümünde aynı durum gözlenmesinin yanı sıra, BS4, BS9, BS13, BS14 ve BS15 bileşikleri ile muamele edilen hücrelerde, en yüksek bileşik dozunun hücrelerin yüzeye tutunmalarını büyük ölçüde azalttığı gözlenmiştir. BS6 bileşiği ile muamele edilen HeLa hücrelerinde uygulanan en yüksek konsantrasyonda, yine BS7, BS8, BS16 ve BS17 bileşikleri ile muamele edilen her iki hücrede en yüksek ilk iki konsantrasyonda hücre zarlarının yapılarındaki bozulmalar açıkça görülmektedir. BS10, BS12 ve BS18 bileşikleri ile muamele edilen hücrelerde ise L929 hücrelerinde dozla birlikte hücre sayısında azalmalar ve hücrelerin yüzeye tutunmalarındaki azalmaya karşılık HeLa hücrelerinde özellikle ilk dozda hücre zarlarındaki bozulma net bir şekilde görülmektedir. Özellikle BS10 bileşiğinde denen tüm dozlarda hücrelerin doğal morfolojilerinin oldukça bozulduğu tespit edilmiştir.



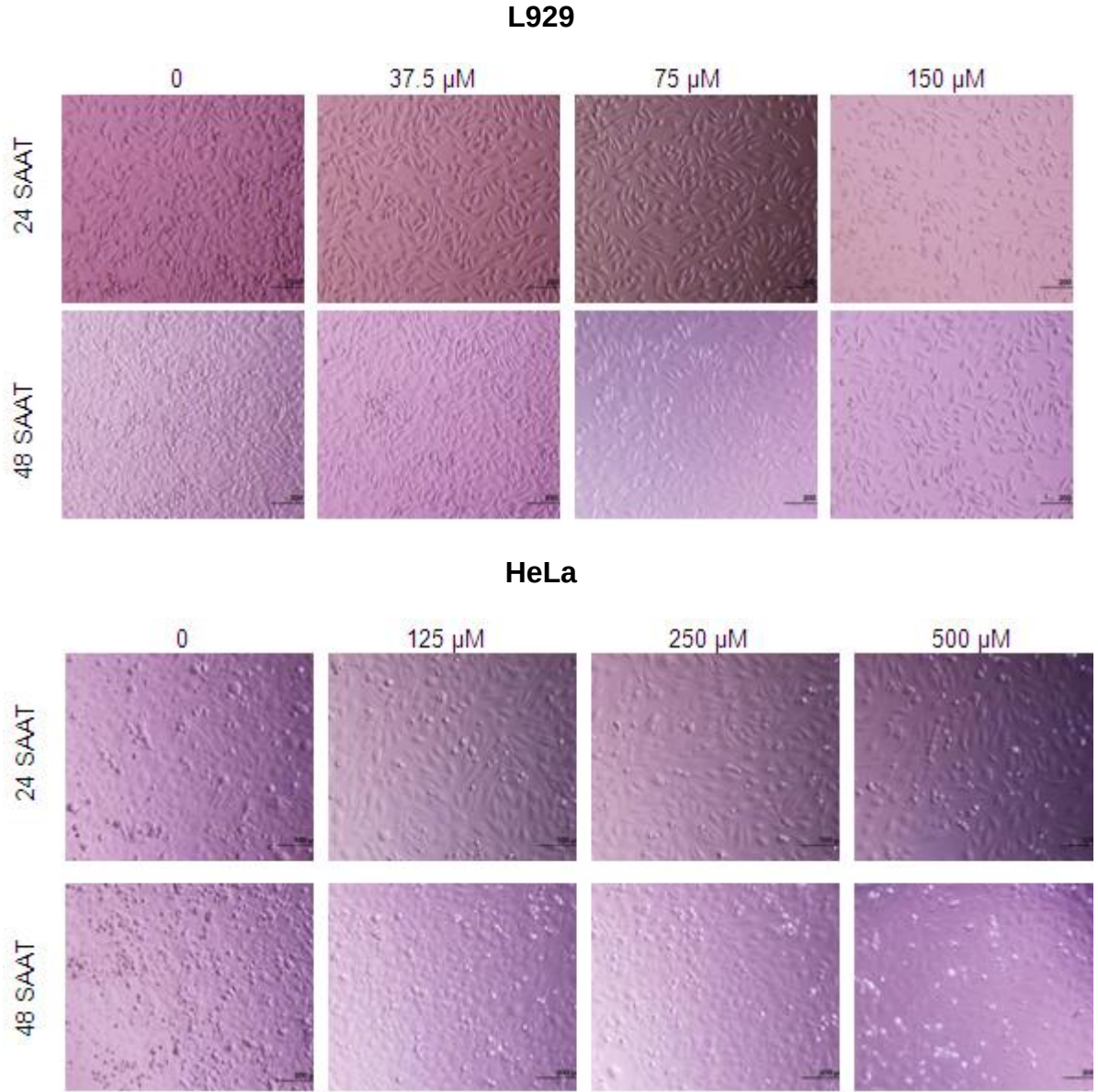
Şekil 4.1. Farklı dozlarda BS1 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri



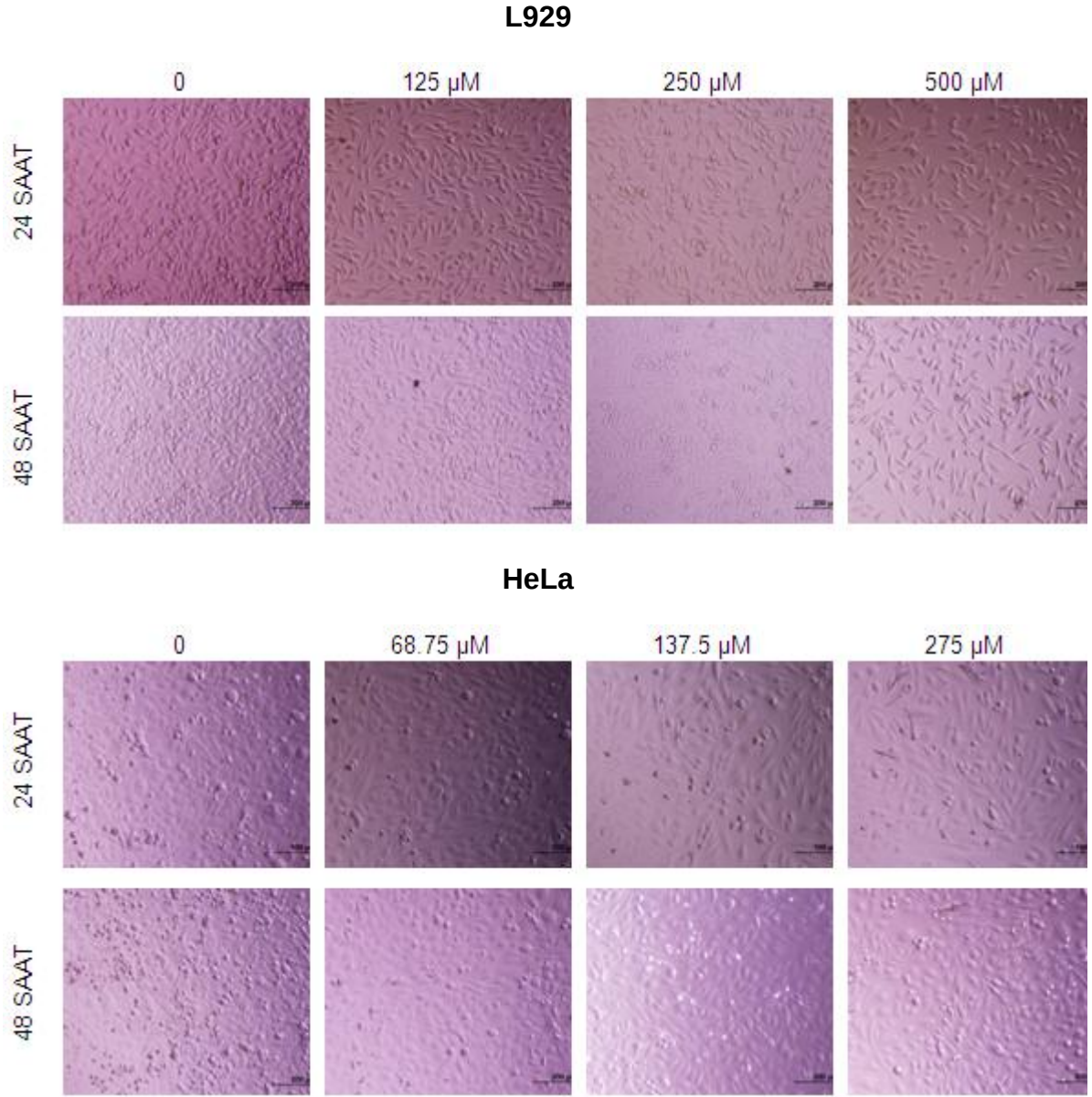
Şekil 4.2. Farklı dozlarda BS2 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri



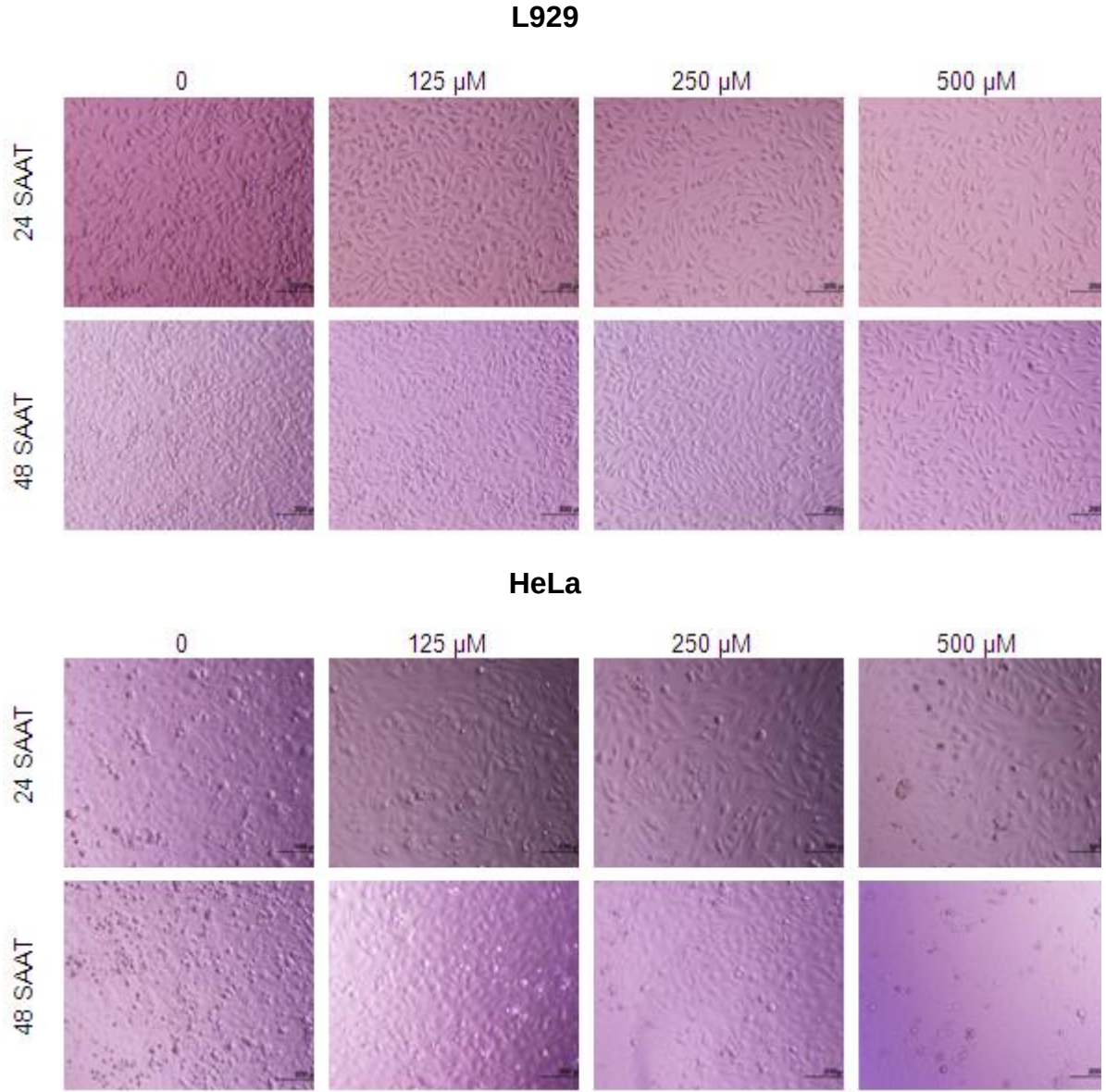
Şekil 4.3. Farklı dozlarda BS3 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri



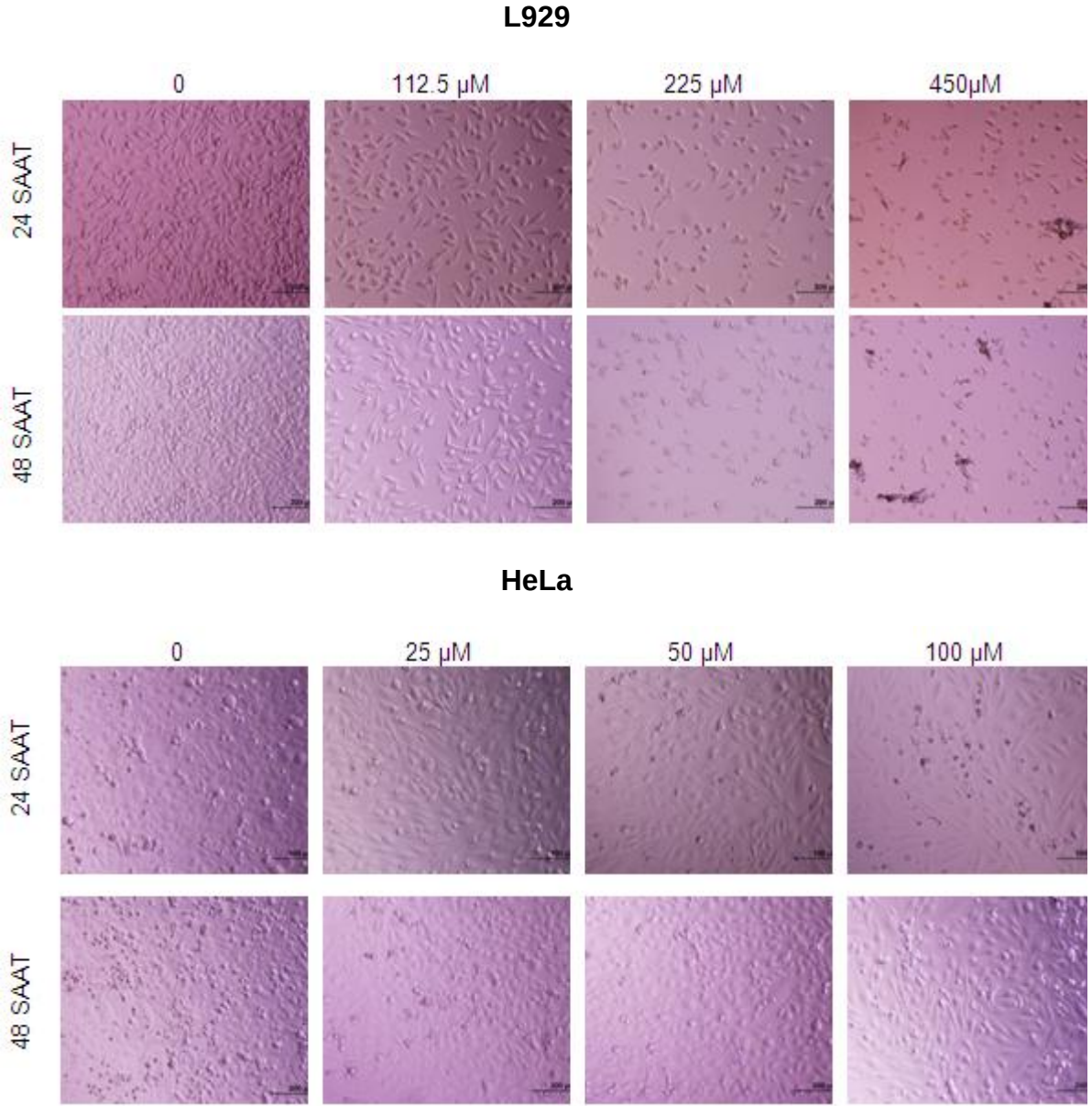
Şekil 4.4. Farklı dozlarda BS4 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri



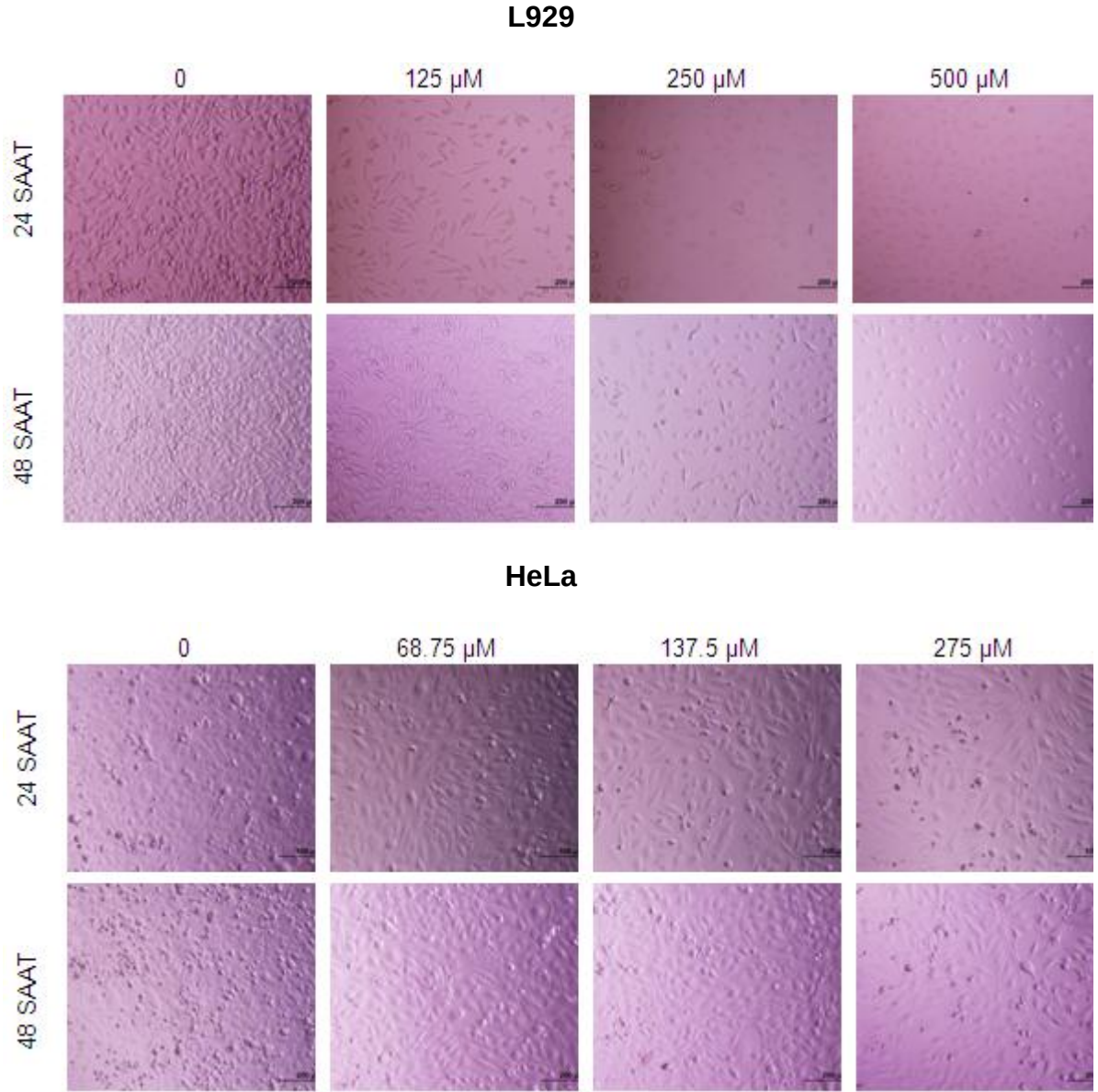
Şekil 4.5. Farklı dozlarda BS5 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri



Şekil 4.6. Farklı dozlarda BS6 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri

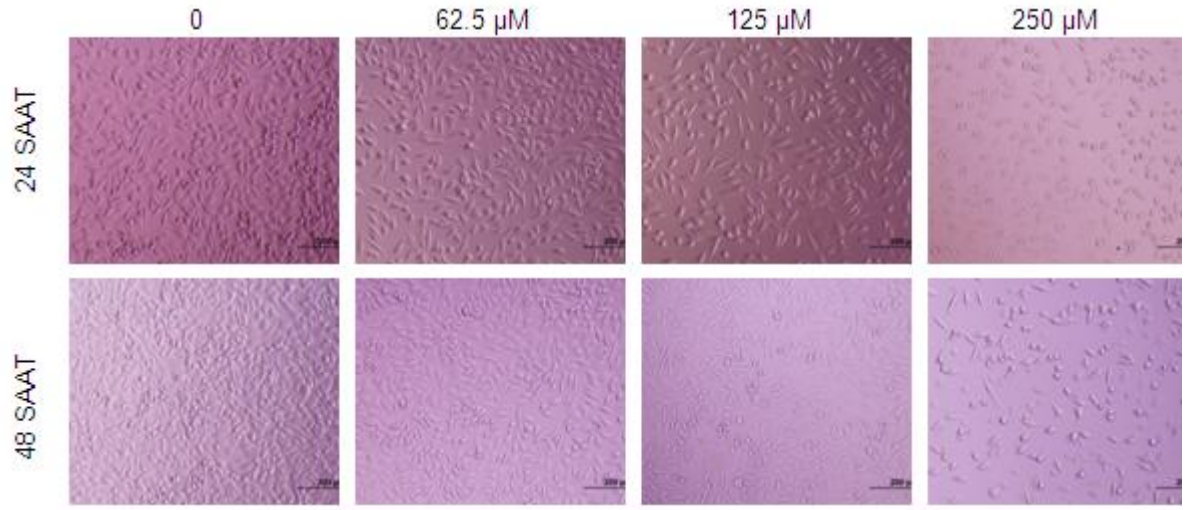


Şekil 4.7. Farklı dozlarda BS7 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri

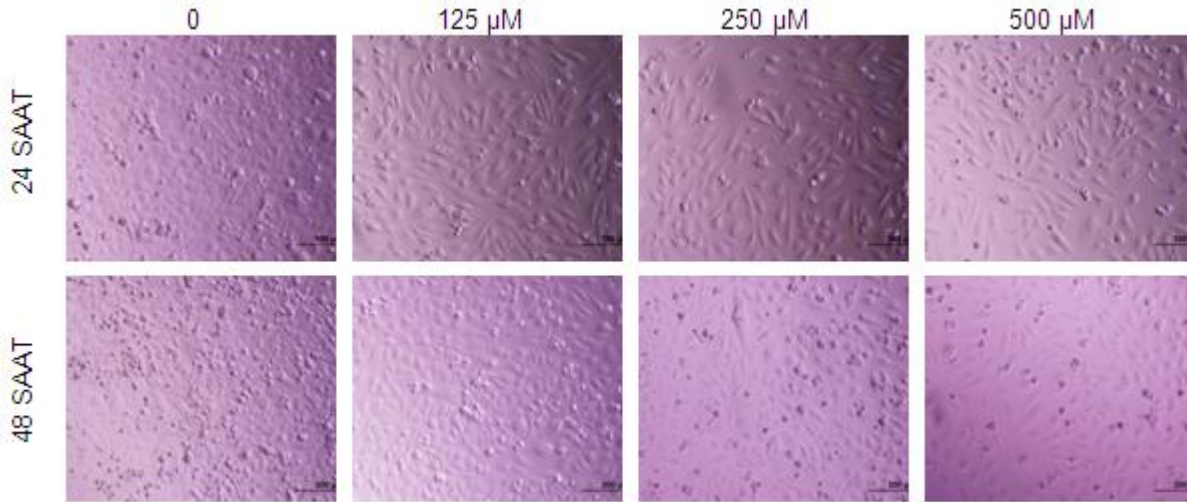


Şekil 4.8. Farklı dozlarda BS8 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri

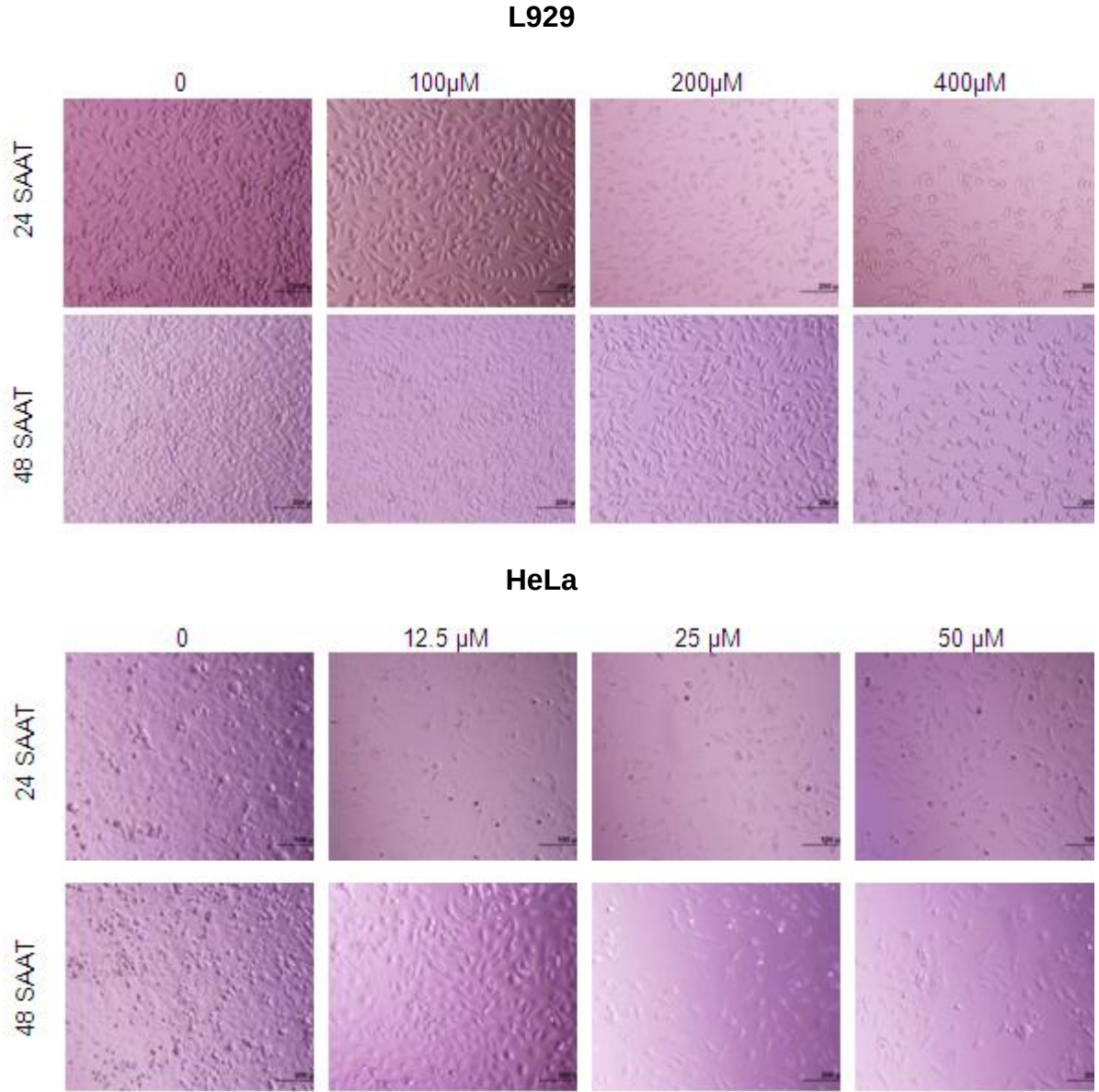
L929



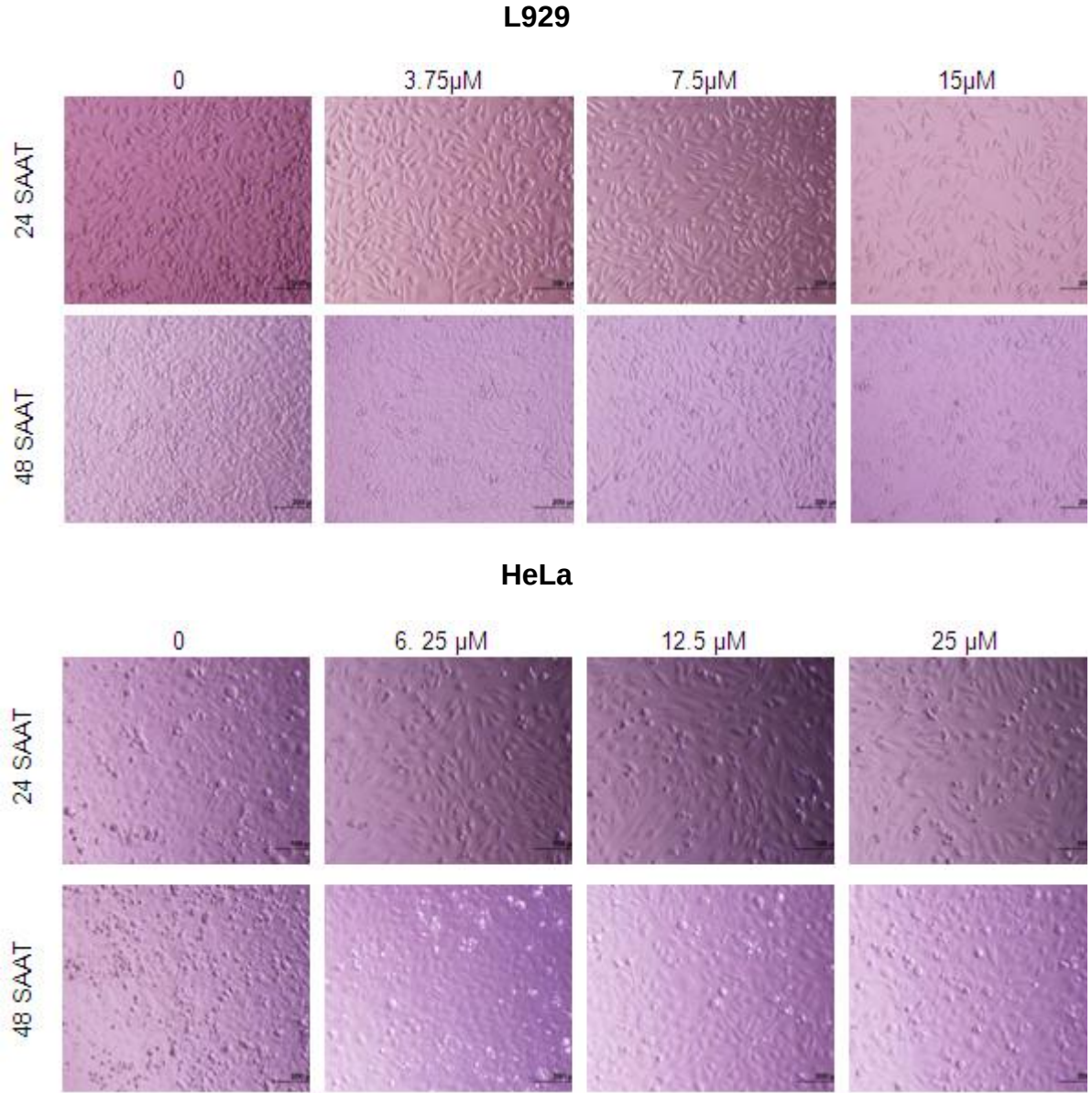
HeLa



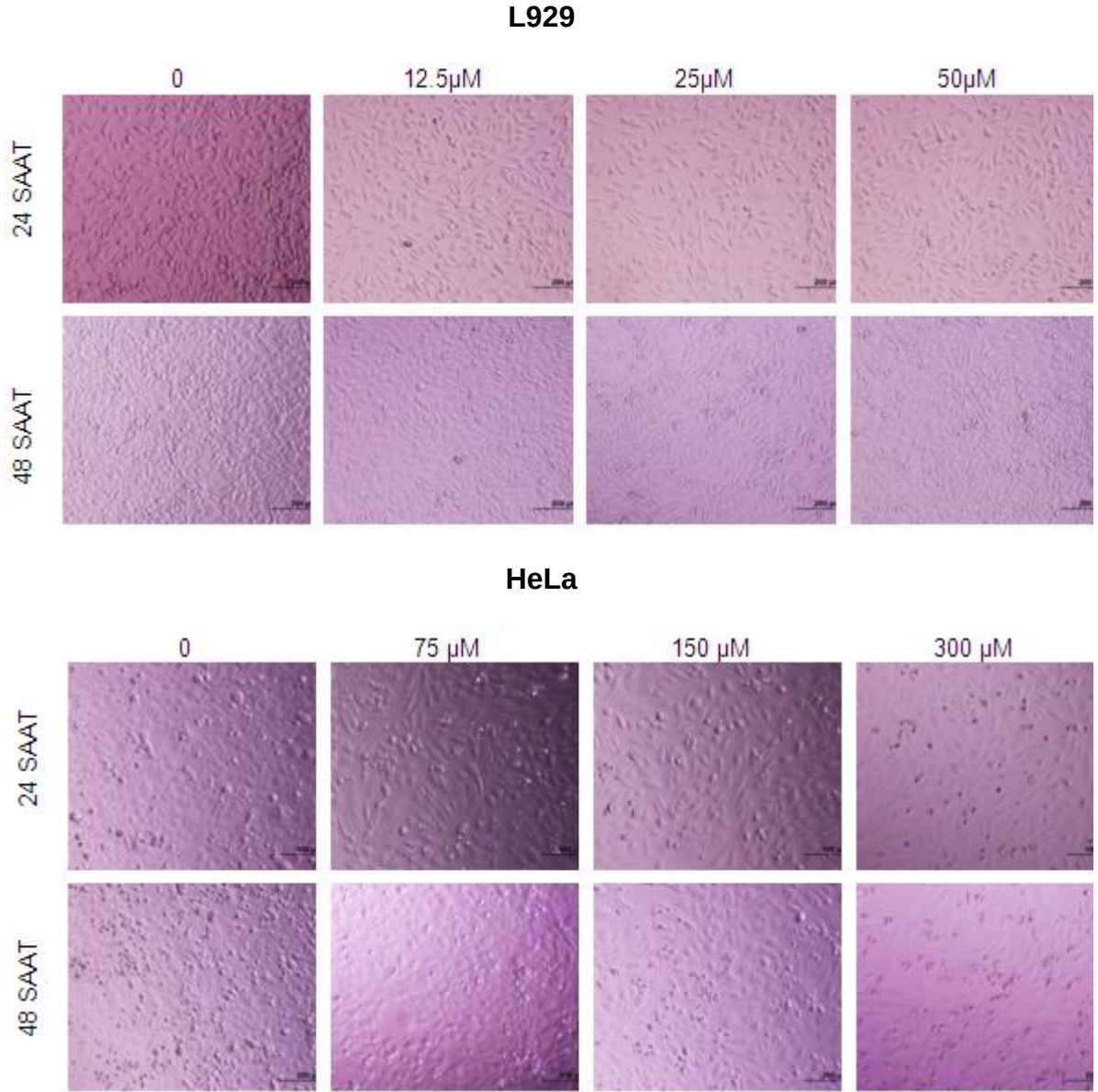
Şekil 4.9. Farklı dozlarda BS9 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri



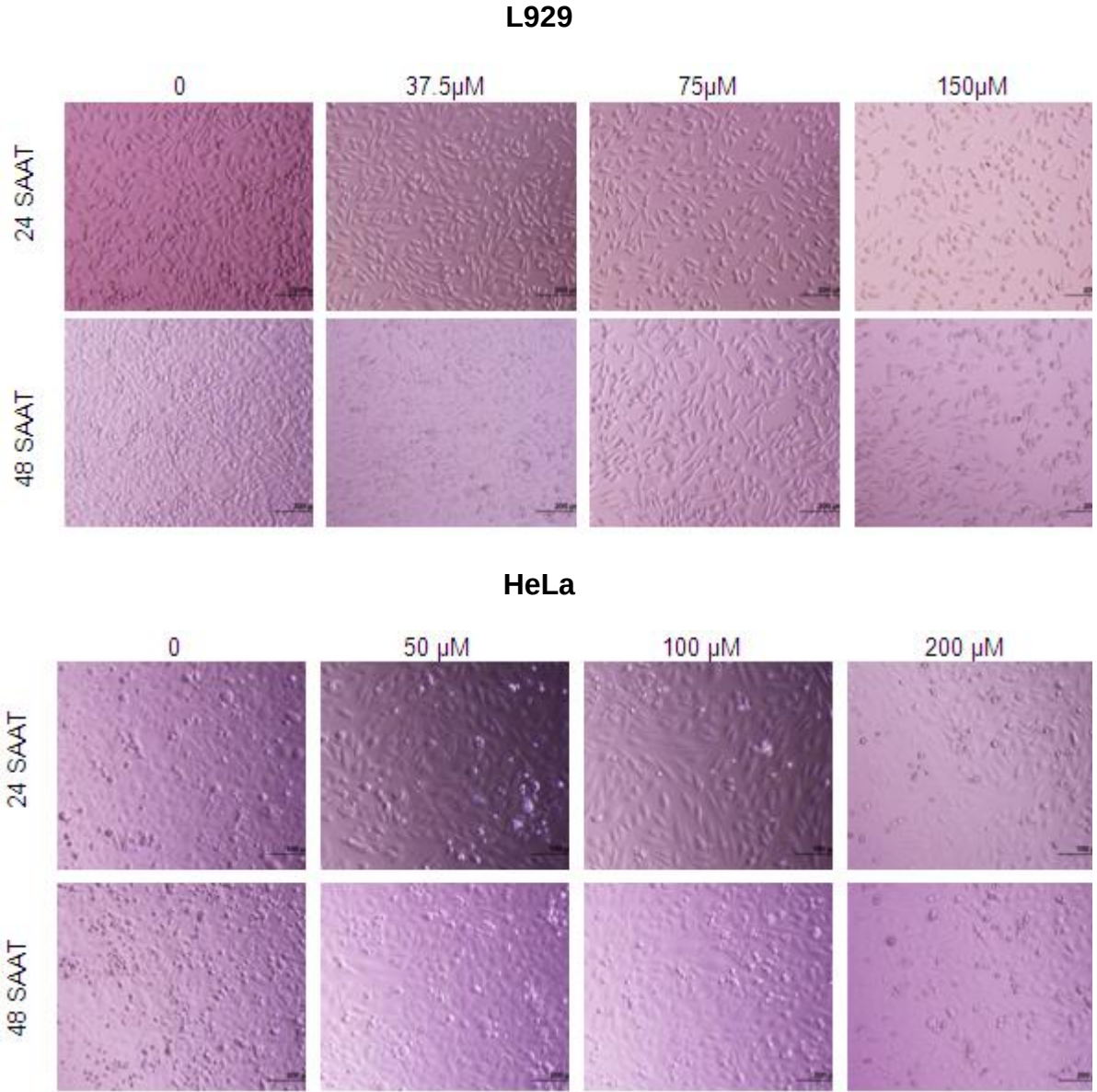
Şekil 4.10. Farklı dozlarda BS10 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri



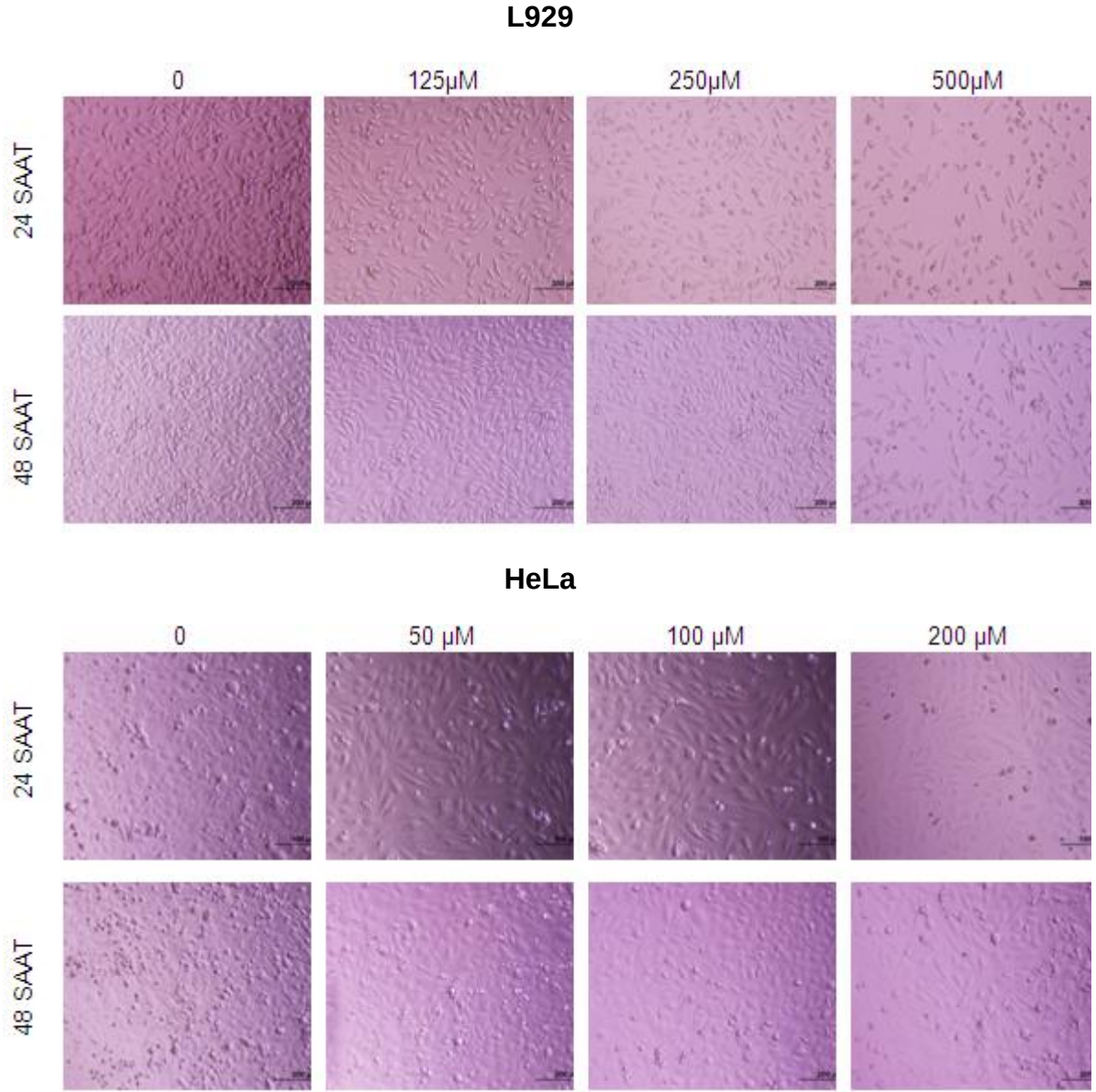
Şekil 4.11. Farklı dozlarda BS11 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri



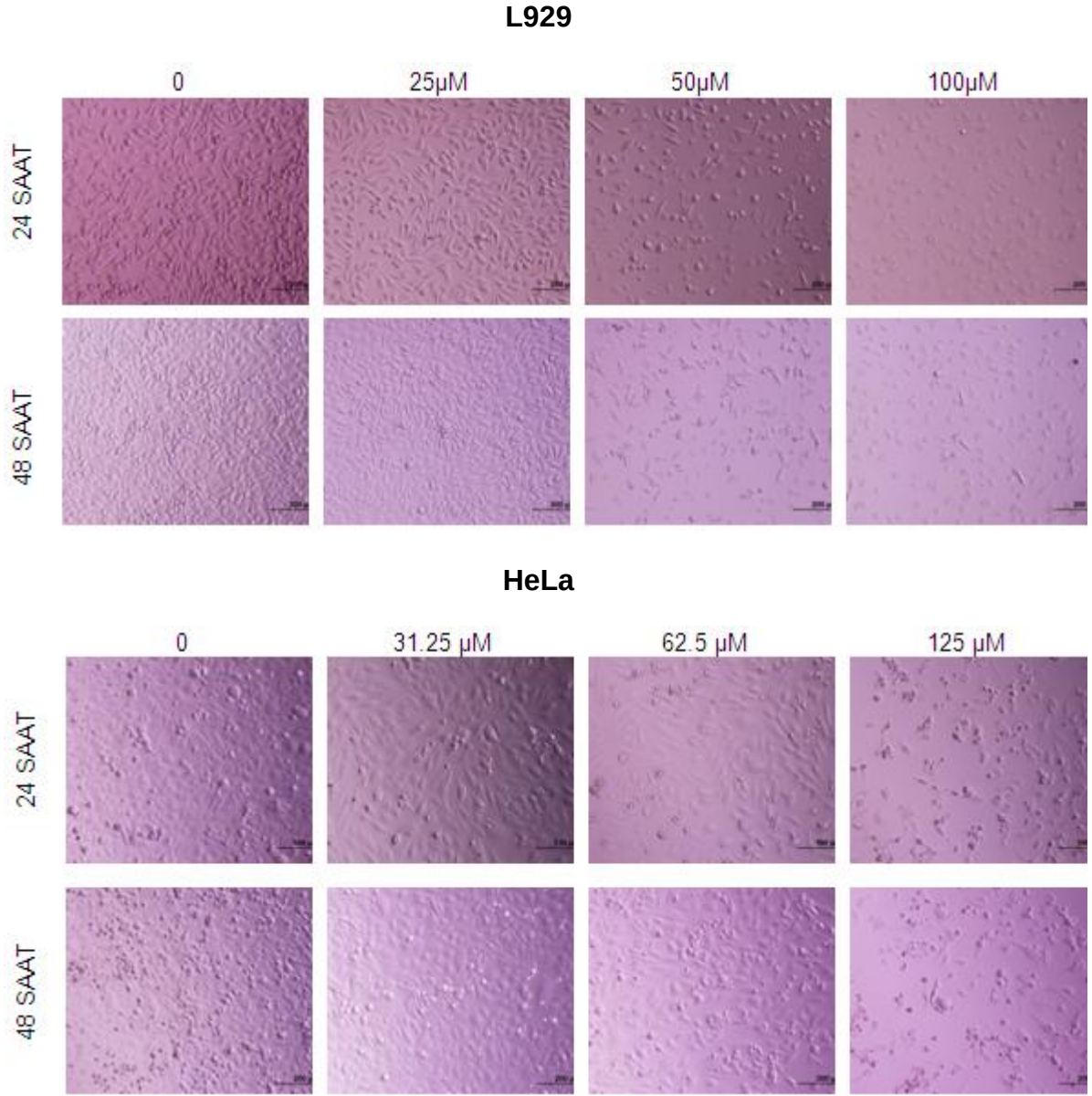
Şekil 4.12. Farklı dozlarda BS12 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri



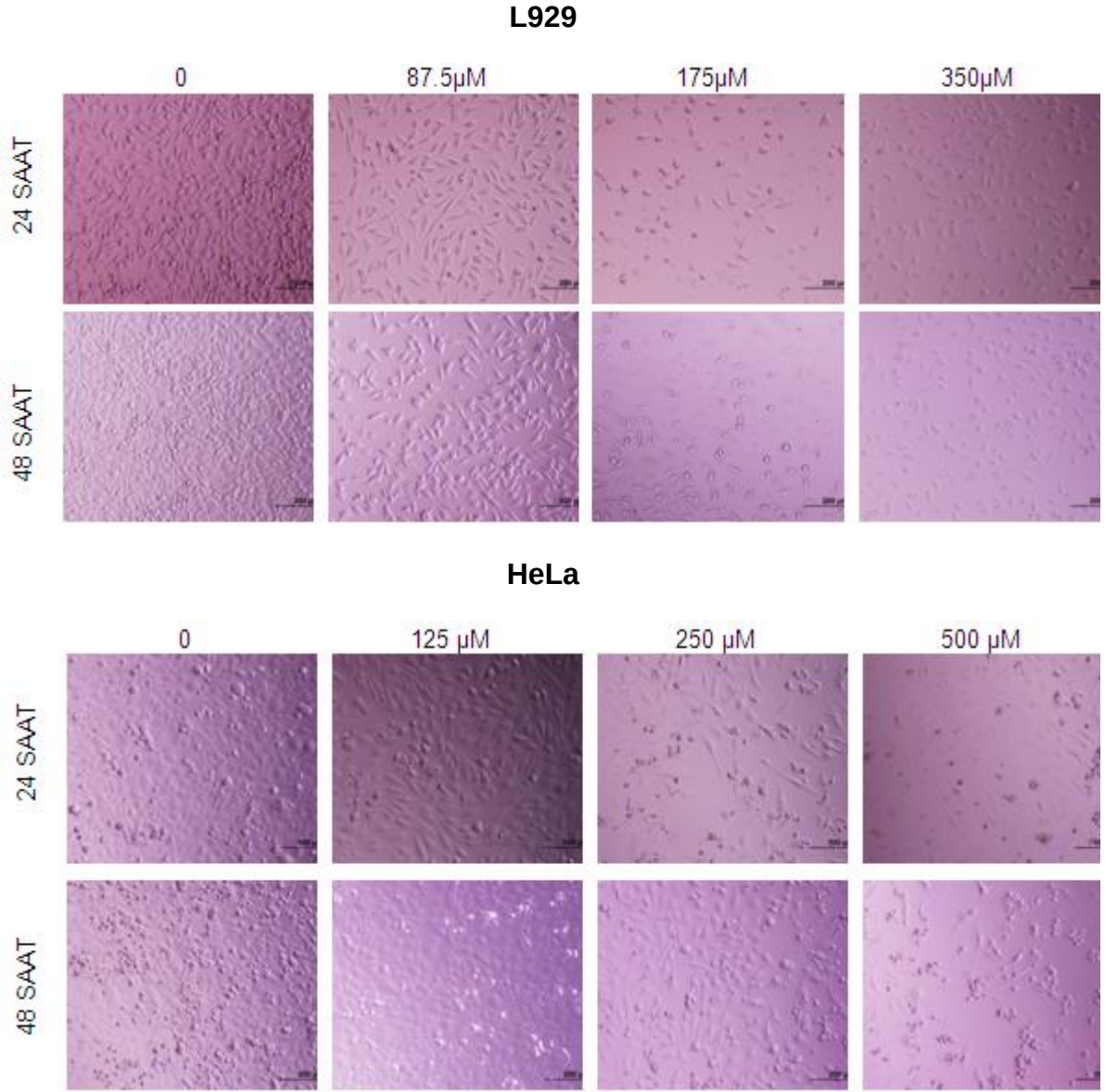
Şekil 4.13. Farklı dozlarda BS13 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri



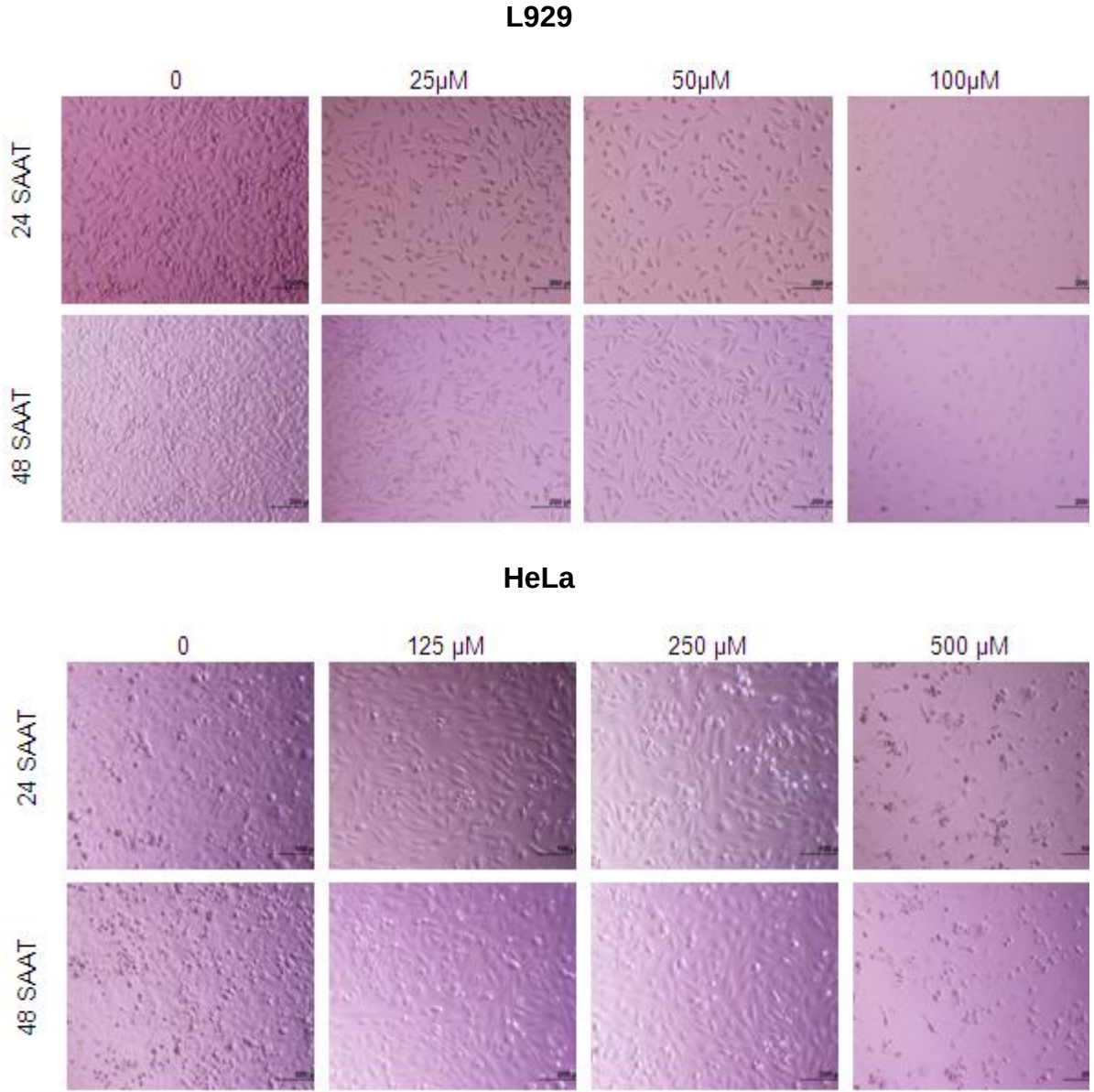
Şekil 4.14. Farklı dozlarda BS14 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri



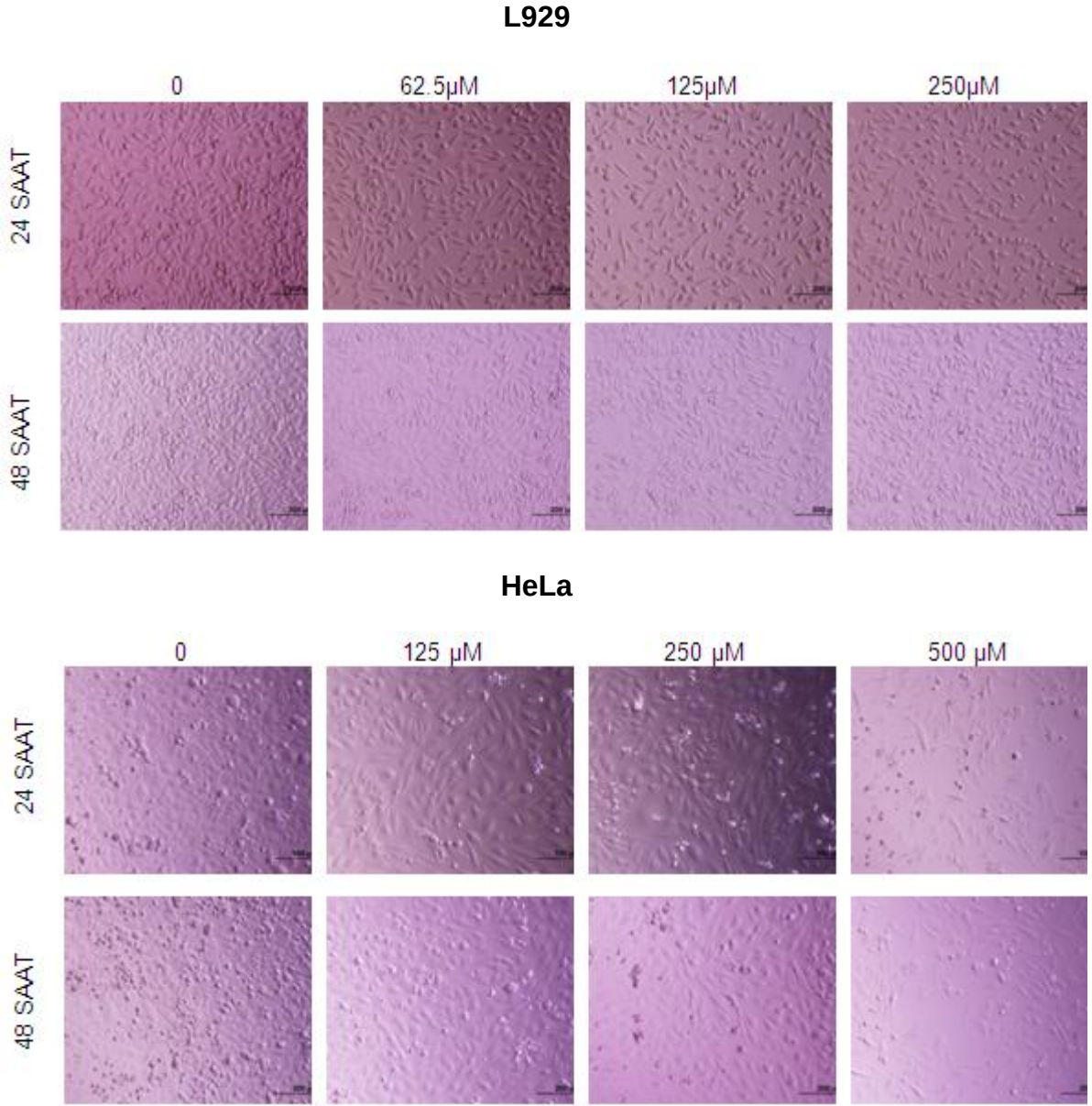
Şekil 4.15. Farklı dozlarda BS15 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri



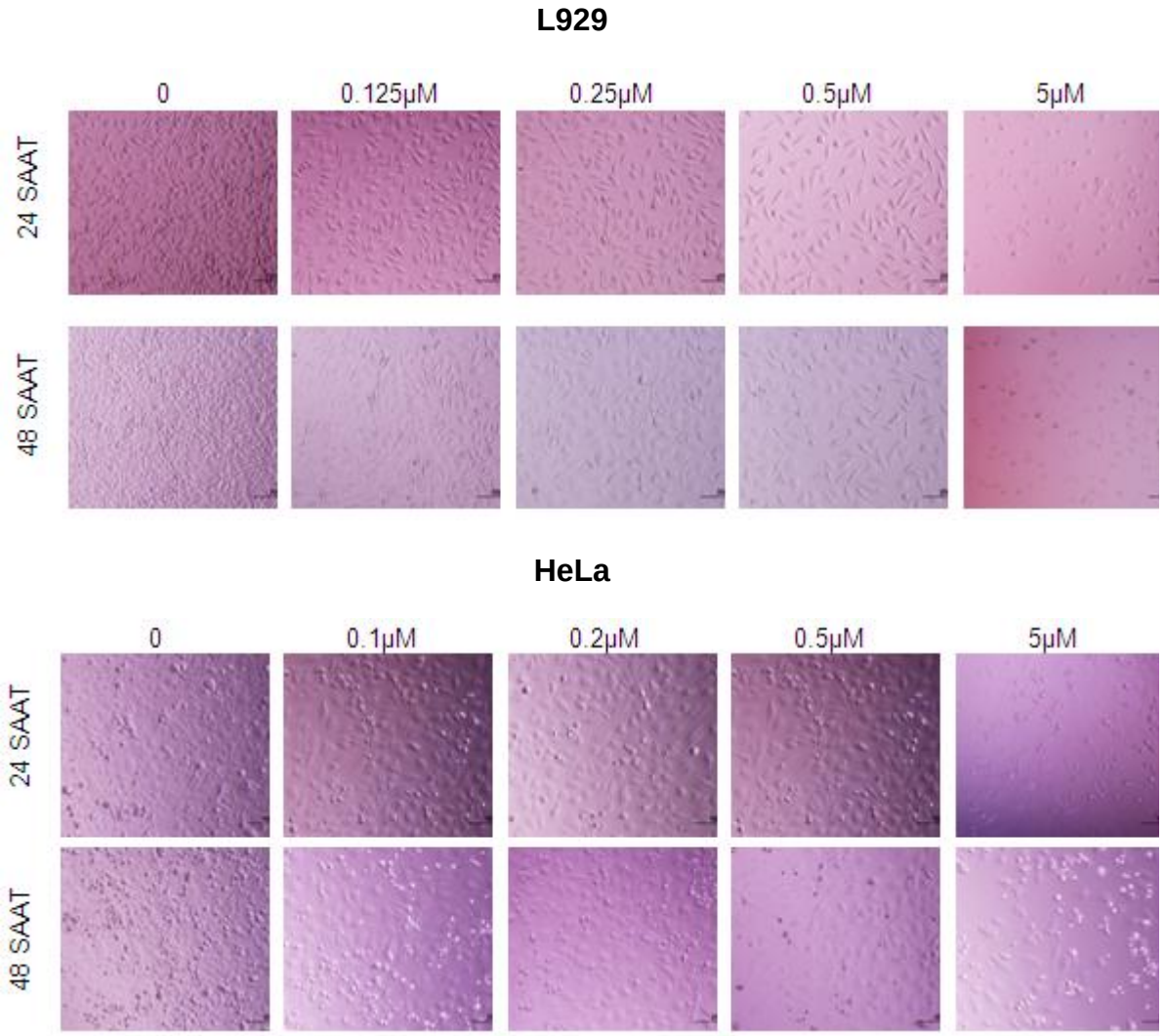
Şekil 4.16. Farklı dozlarda BS16 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri



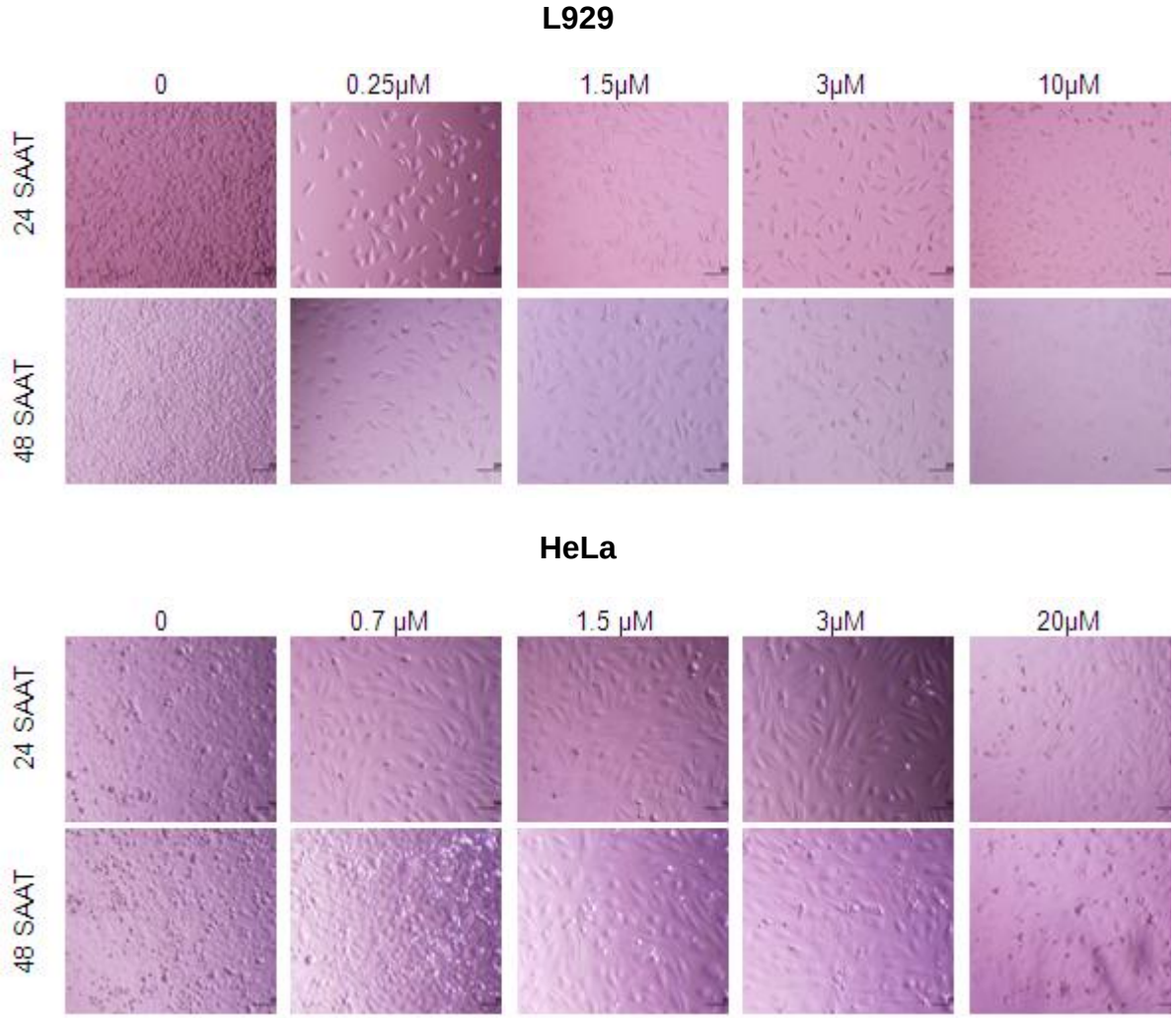
Şekil 4.17. Farklı dozlarda BS17 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri



Şekil 4.18. Farklı dozlarda BS18 uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri



Şekil 4.19. Farklı dozlarda CPT uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri



Şekil 4.20. Farklı dozlarda ETOP uygulanan L929 ve HeLa hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri

4.3. SRB Testi Sonuçlarına Göre Yapılan Farmakofor Analizine Ait Bulgular

Farmakofor hipotezinin oluşturulması için hidrojen bağı alıcısı (HBA), hidrojen bağı vericisi (HBD), hidrofobik özellik ve aromatik halka özellikleri seçilmiştir. Test bileşiklerinin yapısındaki hidrojen bağı alıcısı, hidrojen bağı vericisi ve aromatik halka içeren fonksiyonel grupların sayısı Çizelge 4.23'de özetlenmiştir.

Test edilen benzoksazin türevlerinin L929 ve HeLa hücre dizileri üzerindeki sitotoksik aktiviteleri için yapılan HypoGen farmakofor analizinden elde edilen 10 hipotez L929 hücre dizisi için Çizelge 4.24'de, HeLa hücre dizisi için Çizelge 4.25'de özetlenmiştir. Hipotezlerden en uygun olanı istatistiksel parametrelere bakılarak belirlenmiş ve her iki hücre dizisi için geliştirilen hipotezlerden en uygun olanı;

L929 hücre dizisi için; korelasyon katsayısı 0.904204 ve RMS değeri 0.845771 olan birinci hipotez olarak belirlenmiştir. Hipotezin korelasyon grafiği Şekil 4.21.B.'de gösterilmiştir. En uygun olarak seçilen birinci hipotez, iki hidrojen bağı alıcısı, bir hidrofobik aromatik ve bir aromatik halka özelliği olmak üzere toplam dört özelliği tanımlamaktadır (Şekil 4.21.A).

HeLa hücre dizisi için; korelasyon katsayısı 0.917075 ve RMS değeri 0.777717 olan birinci hipotez olarak belirlenmiştir. Hipotezin korelasyon grafiği Şekil 4.22.B.'de gösterilmiştir. En uygun olarak seçilen birinci hipotez, iki hidrojen bağı alıcısı ve iki hidrofobik aromatik özellik olmak üzere toplam dört özelliği tanımlamaktadır (Şekil 4.22.A).

Oluşturulan hipotezler ile biyolojik aktiviteleri arasındaki korelasyona göre bileşiklerin tahmini aktivite sonuçları ve uyum değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar L929 hücre dizisi için Çizelge 4.26 ve Çizelge 4.28'de, HeLa hücre dizisi için Çizelge 4.27 ve Çizelge 4.29'da özetlenmiştir.

Sonuç olarak; test edilen benzoksazin türevlerinin her iki hücre dizisi üzerindeki sitotoksik aktiviteleri açısından yapı-etki ilişkileri HypoGen farmakofofor analizlerinde belirlenen en uygun hipoteze göre değerlendirildiğinde;

L929 hücre dizisinde en iyi etki gösteren **BS11** bileşiği 2. konumunda taşıdığı ester yapısının oksijen atomları üzerinden oluşturulan bu hipotezdeki hidrojen bağı alıcısı özellikleriyle iyi bir şekilde haritalanmaktadır. Ayrıca bileşikteki benzen halkası da aromatik halka özelliği ile iyi bir uyum sağlamıştır. Bu sayede hipotezdeki dört özellikten üç tanesiyle haritalanabilmesiyle iyi bir uyum ve tahmini aktivite değeri yakalamıştır. Bu hücre dizisinde yüksek aktivite gösteren **BS12** ve **BS15** bileşikler de **BS11** bileşiği gibi ester yapısındaki oksijen atomları üzerinden hidrojen bağı alıcısı özellikleriyle iyi bir şekilde haritalanmış ve benzen halkası üzerinden de aromatik halka özelliğiyle kısmen bir uyum yakalamışlardır.

L929 hücre dizisi üzerinde aktivitesi düşük olan **BS6** bileşiği ise ester yapısındaki oksijen atomları üzerinden hidrojen bağı alıcısı özelliklerle ve benzen halkası da aromatik halka özelliği ile kısmen uyum göstererek dört özellikten üçü ile kısmen haritalanabilmiştir. Bu bileşik daha düşük bir uyum değeriyle birlikte daha düşük tahmini aktivite değeri vermiştir.

HeLa hücre dizisinde en iyi etki gösteren **BS3** bileşiği ester yapısının oksijen atomları üzerinden oluşturulan bu hipotezdeki hidrojen bağı alıcısı özellikleriyle iyi bir şekilde haritalanmaktadır. Ayrıca bileşikteki benzen halkası da hidrofobik aromatik özellik ile kısmen bir uyum sağlamıştır. Bu sayede hipotezdeki dört özellikten üç tanesiyle haritalanabilmesiyle iyi bir uyum ve tahmini aktivite değeri yakalamıştır. Bu hücre dizisinde yüksek aktivite gösteren **BS11** ve **BS10** bileşikler de **BS3** bileşiği gibi ester yapısındaki oksijen atomları üzerinden hidrojen bağı alıcısı özellikleriyle iyi bir şekilde haritalanmış ve benzen halkası üzerinden de hidrofobik aromatik özelliğiyle kısmen bir uyum yakalamışlardır.

HeLa hücre dizisi üzerinde aktivitesi düşük olan **BS16** bileşiği ise ester yapısındaki oksijen atomu üzerinden bir hidrojen bağı alıcısı ile uyum sağlamış, benzen halkası hidrofobik aromatik halka özelliği ile kısmen uyum göstererek dört özellikten ikisi ile haritalanabilmiştir. Bu bileşik daha düşük bir uyum değeriyle birlikte daha düşük tahmini aktivite değeri vermiştir.

Çizelge 4.23. Test edilen benzoksazin türevlerinin yapısındaki fonksiyonel grup sayıları

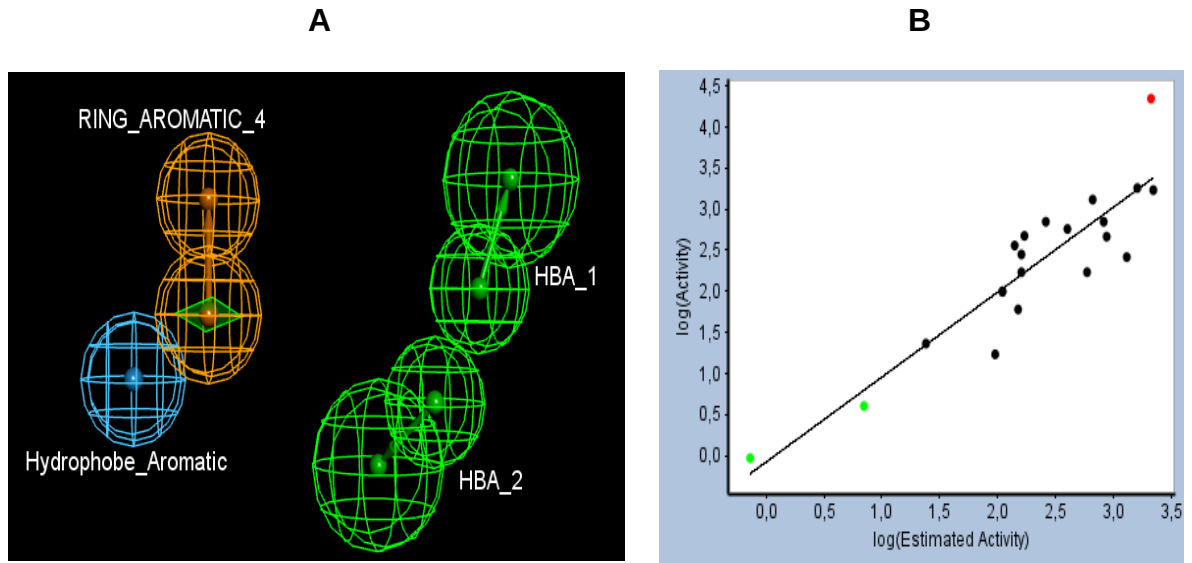
Bileşik Kodu	Hidrojen bağı alıcısı sayısı	Hidrojen bağı vericisi sayısı	Aromatik halka sayısı	Halka sayısı
BS1	4	1	1	2
BS2	4	1	1	2
BS3	4	1	1	2
BS4	6	1	1	2
BS5	6	1	1	2
BS6	5	2	1	2
BS7	6	1	1	2
BS8	4	0	1	2
BS9	4	0	1	2
BS10	4	0	1	2
BS11	6	0	1	2
BS12	6	0	1	2
BS13	6	0	1	2
BS14	4	0	1	2
BS15	4	0	1	2
BS16	6	0	1	2
BS17	6	0	1	2
BS18	3	2	1	2

Çizelge 4.24. L929 hücre dizisi için geliştirilen HypoGen farmakofor hipotezlerinin istatistiksel analiz sonuçları

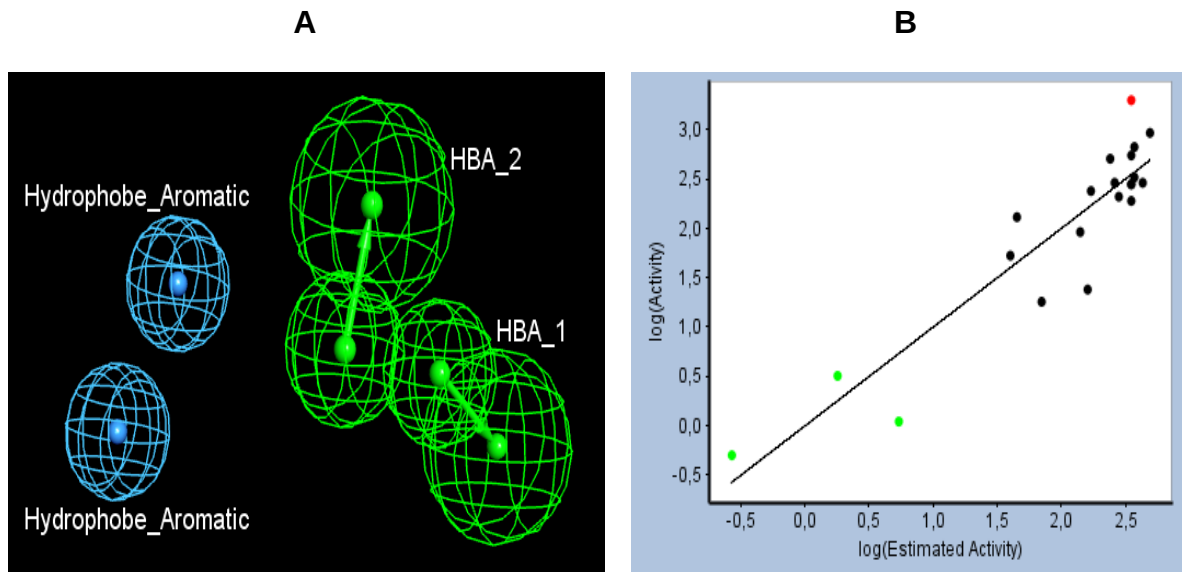
	Maksimum uyum	Totalcoast	RMS	Korelasyon katsayısı
Hipotez 1	8.72861	94.4263	0.845771	0.904204
Hipotez 2	8.28156	95.4906	0.911831	0.887144
Hipotez 3	5.80692	97.5876	1.01566	0.857728
Hipotez 4	7.80586	98.6418	1.06438	0.842431
Hipotez 5	6.63764	99.3007	1.08319	0.83716
Hipotez 6	7.83614	100.083	1.12717	0.821223
Hipotez 7	9.00147	100.365	1.12496	0.823414
Hipotez 8	7.7908	101.351	1.17928	0.802267
Hipotez 9	7.16983	101.637	1.18191	0.801788
Hipotez 10	6.69445	101.736	1.17185	0.806159

Çizelge 4.25. HeLa hücre dizisi için geliştirilen HypoGen farmakofor hipotezlerinin istatistiksel analiz sonuçları

	Maksimum uyum	Totalcoast	RMS	Korelasyon katsayısı
Hipotez 1	8.05209	93.0798	0.777717	0.917075
Hipotez 2	7.38482	94.1313	0.832304	0.904636
Hipotez 3	7.54321	95.3181	0.824591	0.912971
Hipotez 4	6.67396	95.5433	0.901779	0.887635
Hipotez 5	6.53863	95.6386	0.912033	0.884511
Hipotez 6	6.76556	95.7881	0.910423	0.885639
Hipotez 7	6.77351	95.8835	0.915011	0.884431
Hipotez 8	7.39134	96.0651	0.936567	0.877444
Hipotez 9	5.4443	96.0795	0.934188	0.878219
Hipotez 10	7.62374	96.4698	0.960818	0.870372



Şekil 4.21. L929 hücre dizisine ait HypoGen farmakofor modellemesi için en uygun bulunan hipotez, A.Hipoteze ait haritalama (Yeşil renkte gösterilenler hidrojen bağı alıcısı, mavi renkte gösterilen hidrofobik aromatik ve turuncu renkte gösterilen aromatik halka özelliğini belirtmektedir.) B. Hipotezin korelasyon grafiği



Şekil 4.22. HeLa hücre dizisine ait HypoGen farmakofor modellemesi için en uygun bulunan hipotez, A.Hipoteze ait haritalama (Yeşil renkte gösterilenler hidrojen bağı alıcısını ve mavi renkte gösterilenler hidrofobik aromatik özelliği belirtmektedir.) B. Hipotezin korelasyon grafiği

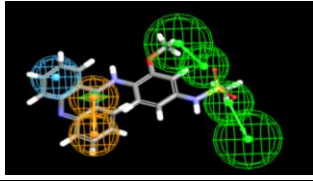
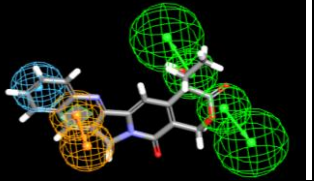
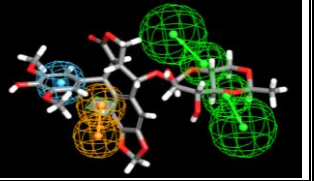
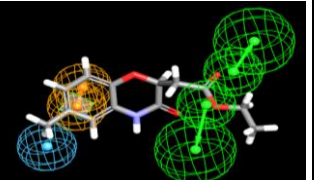
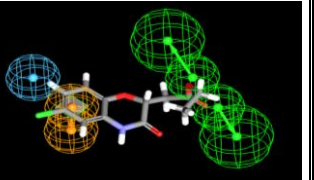
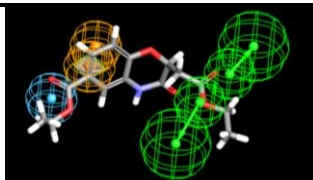
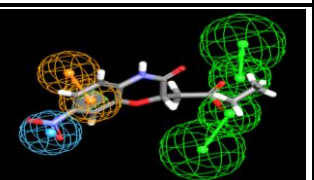
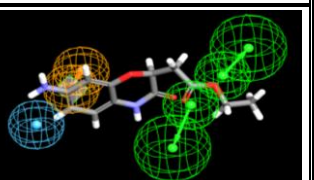
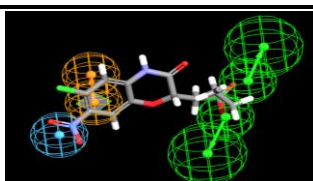
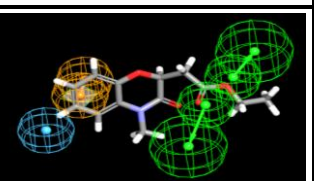
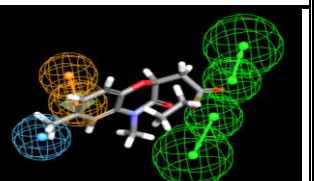
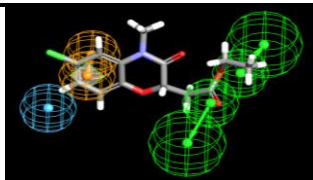
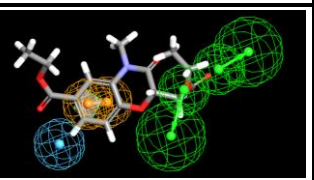
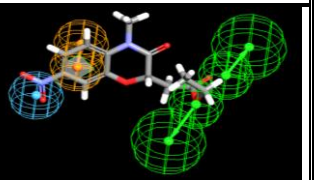
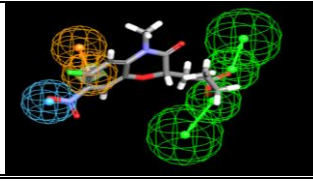
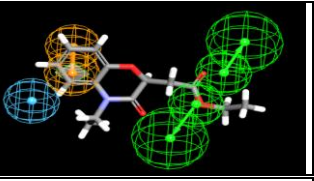
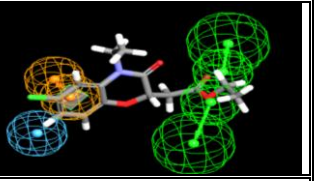
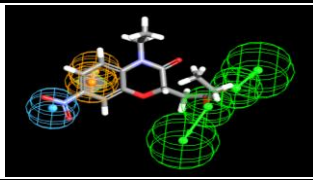
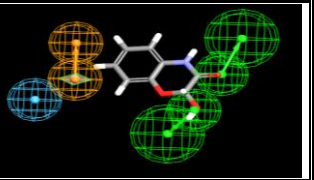
Çizelge 4.26. L929 hücre dizisi için yapılan HypoGen farmakofor analizinde en uygun bulunan hipoteze ait sonuçlar

Kod	Uyum değeri	Tahmini Aktivite	Aktivite	Hata
Kamptotesin	7.74	0.73	0.93	-1.3
Amsakrin	6.76	7	4	+1.8
BS11	5.63	95	17	+5.7
Etoposit	6.23	24	23	+1
BS12	5.44	150	60	+2.5
BS15	5.57	110	98	+1.1
BS17	5.58	110	100	+1.1
BS04	4.84	590	170	+3.5
BS13	5.41	160	170	-1.1
BS09	4.50	1300	260	+5.1
BS03	5.40	160	280	-1.7
BS16	5.45	140	360	-2.6
BS10	4.67	870	460	+1.9
BS07	5.38	170	470	-2.8
BS02	5.01	400	570	-1.4
BS01	4.69	820	700	+1.2
BS05	5.19	260	700	-2.7
BS08	4.79	660	1300	-1.9
BS18	4.26	2200	1700	+1.3
BS14	4.39	1600	1800	-1.1
BS06	4.28	2100	22000	-10

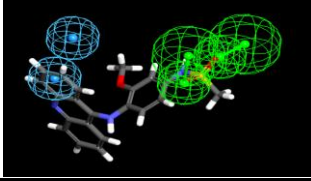
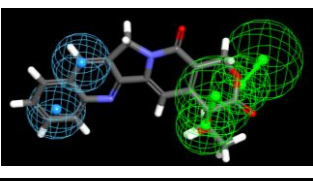
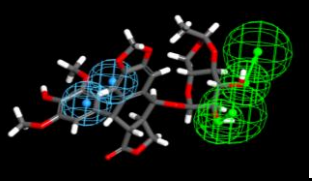
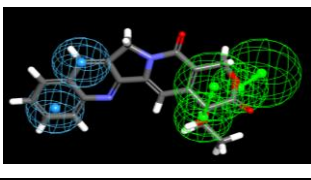
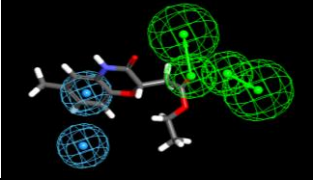
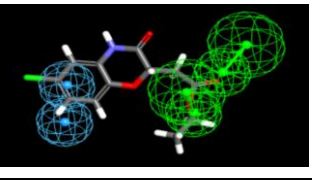
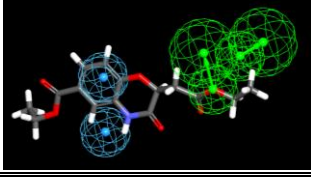
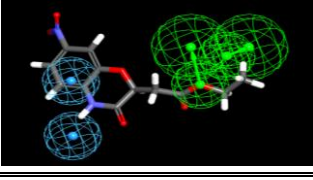
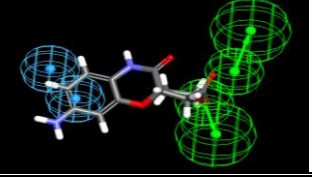
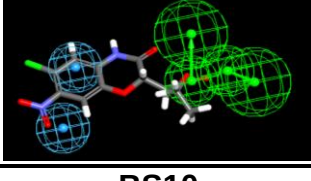
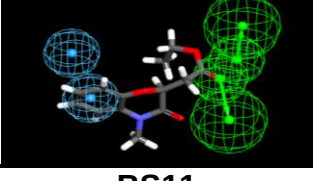
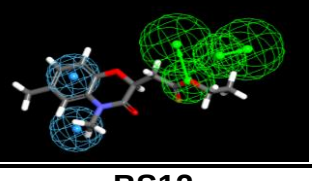
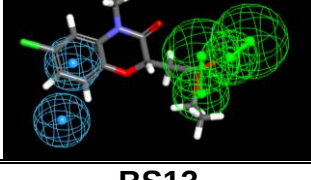
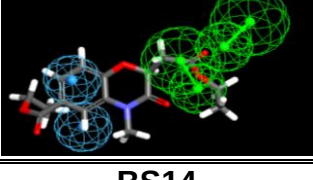
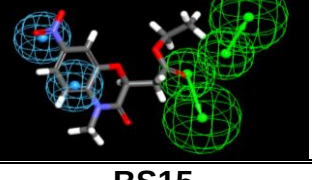
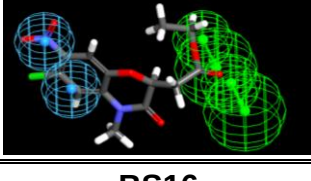
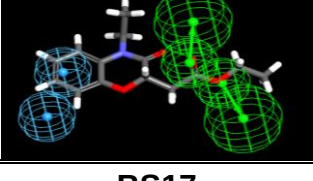
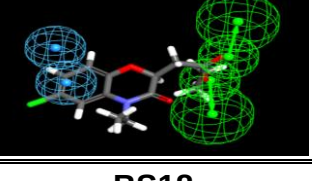
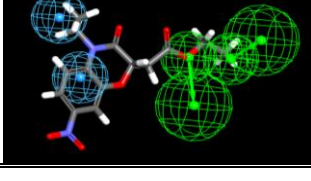
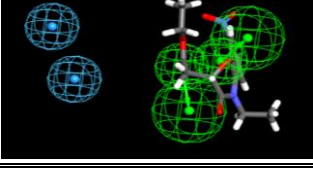
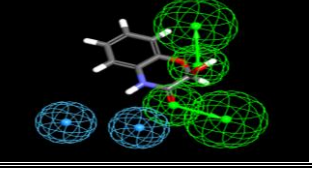
Çizelge 4.27. HeLa hücre dizisi için yapılan HypoGen farmakofor analizinde en uygun bulunan hipoteze ait sonuçlar

Kod	Uyum değeri	Tahmini Aktivite	Aktivite	Hata
Kamptotesin	7.14	0.27	0.5	-1.9
Amsakrin	5.83	5.4	1.1	+5
Etoposit	6.32	1.8	3.2	-1.8
BS03	4.72	70	18	+3.9
BS11	4.37	160	24	+6.5
BS10	4.97	40	53	-1.3
BS07	4.43	140	92	+1.5
BS15	4.91	45	130	-2.8
BS02	4.02	350	190	+1.8
BS13	4.11	280	210	+1.3
BS14	4.33	170	240	-1.4
BS08	4.02	350	280	+1.3
BS05	4.03	350	280	+1.2
BS18	3.94	430	290	+1.5
BS01	4.16	260	290	-1.1
BS12	3.99	370	330	+1.1
BS06	4.18	240	510	-2.1
BS04	4.02	350	550	-1.6
BS09	4.00	370	670	-1.8
BS17	3.88	490	930	-1.9
BS16	4.02	350	2000	-5.6

Çizelge 4.28. Benzoksazin türevlerinin L929 hücre dizisi üzerindeki sitotoksik aktivitelerine göre en uygun hipotez ile haritalanması

Amsakrin	Kamptotesin	Etoposit
		
BS1	BS2	BS3
		
BS4	BS5	BS6
		
BS7	BS8	BS9
		
BS10	BS11	BS12
		
BS13	BS14	BS15
		
BS16	BS17	BS18
		

Çizelge 4.29. Benzoksazin türevlerinin HeLa hücre dizisi üzerindeki sitotoksik aktivitelerine göre en uygun hipotez ile haritalanması

Amsakrin	Kamptotesin	Etoposit
		
BS1	BS2	BS3
		
BS4	BS5	BS6
		
BS7	BS8	BS9
		
BS10	BS11	BS12
		
BS13	BS14	BS15
		
BS16	BS17	BS18
		

4.4. Alkali Komet Testine Ait Bulgular

18 adet benzoksazin türevi bileşiğin, L929 ve HeLa hücre dizileri üzerindeki genotoksik potansiyelleri, 24 ve 48 saatlik inkübasyonlarda, SRB testinde her bir bileşik için saptanan IC₅₀ konsantrasyonunda alkali komet testi ile taranmıştır. 48 saat inkübasyon sonunda etkili bulunan bileşiklerin farklı dozları ile doza bağlı deneyleri yapılmıştır. Deneyler sonrasında hasar parametrelerine ait verilerin ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Zamana ve doza bağlı taraması yapılan her bir test bileşiğinin kuyruk momenti verileri kontrol grubu ile karşılaştırılmış, istatistiksel açıdan önemli fark yaratan ($p < 0.05$ ve/veya $p < 0.001$) grup/gruplar saptanmıştır.

24 saatlik inkübasyondan sonra elde edilen tarama sonuçları; L929 hücre dizisi için Çizelge 4.30'da, HeLa hücre dizisi için Çizelge 4.32'de özetlenmiştir. Test bileşiklerinin, kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk göçü parametrelerinde, kontrol ve pozitif kontrollere göre durumları ise grafiklerle L929 hücre dizisi için Şekil 4.23'de, HeLa hücre dizisi için Şekil 4.25'de gösterilmiştir.

48 saatlik inkübasyondan sonra elde edilen tarama sonuçları; L929 hücre dizisi için Çizelge 4.31'de, HeLa hücre dizisi için Çizelge 4.33'de özetlenmiştir. Test bileşiklerinin, kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk göçü parametrelerinde, kontrol ve pozitif kontrollere göre durumları ise grafiklerle L929 hücre dizisi için Şekil 4.24'de, HeLa hücre dizisi için Şekil 4.26'da gösterilmiştir.

Zamana bağlı taramalar sonrası etkili bulunan bileşiklere ait toplu değerlendirme ise Çizelge 4.34'de özetlenmiştir.

Ayrıca 48 saatlik inkübasyonda yapılan tarama sonrası etkili bileşikler için doza bağlı çalışmalara ait kuyruk uzunluğu, kuyruk göçü, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti hasar parametrelerinden elde edilen bulgular L929 hücre dizisi için Şekil 4.27 ile Şekil 4.29 arasında, HeLa hücre dizisi için Şekil 4.30 ile Şekil 4.34 arasında belirtilmiştir.

Pozitif kontrol olarak kullanılan CPT, ETOP, H₂O₂ için doza ve zamana bağlı alkali komet sonuçları ise Şekil 4.35 ile Şekil 4.38 arasında belirtilmiştir.

Test bileşiklerinin IC₅₀ dozlarında 24 ve 48 saat inkübasyonda yapılan taramada, kuyruk momenti verilerinin ortalamaları ile kontrol grubuna (NK) ait verilerin ortalamaları Dunn's çoklu karşılaştırma yöntemi ile karşılaştırıldığında;

24 saatlik inkübasyon ile yapılan taramada:

L929 hücre dizisi için BS3, BS6, BS7, BS9, BS12, BS14 ve BS17 bileşiklerinin p<0.05 düzeyde, BS11'in ise p<0.001 düzeyde farklılığı yaratan gruplar olduğu saptanmıştır.

HeLa hücre dizisi için yalnızca BS14 bileşiğinin p<0.05 düzeyde farklılığı yaratan grup olduğu saptanmıştır.

48 saatlik inkübasyon ile yapılan taramada:

L929 hücre dizisi için BS10, BS11, BS12, BS14, BS15 ve BS17 bileşiklerinin p<0.05 düzeyde, BS2, BS7 ve BS16'nın ise p<0.001 düzeyde farklılığı yaratan gruplar olduğu saptanmıştır.

HeLa hücre dizisi için BS7, BS12, BS14, BS15, BS17 ve BS18 bileşiklerinin p<0.05 düzeyde, BS1, BS4, BS10, BS11 ve BS16' nın ise p<0.001 düzeyde farklılığı yaratan gruplar olduğu saptanmıştır.

24 ve 48 saatlik inkübasyonlarda yapılan tarama sonrası elde edilen bulgulara göre; p<0.05 düzeyde anlamlı fark yaratan bileşiklerin genotoksik etkili, p<0.001 düzeyde anlamlı fark yaratan bileşiklerin güçlü genotoksik etki gösteren bileşikler olduğu sonucuna varılmıştır.

Buna göre; 48 saatlik inkübasyonda yapılan taramalar sonucunda, 2 tane bileşiğin (**BS2** ve **BS7**) L929 hücre dizisi için, 4 tane bileşiğin (**BS1**, **BS4**, **BS10** ve **BS11**) HeLa hücre dizisi için, 1 tane bileşiğin (**BS16**) ise her iki hücre dizisinde güçlü genotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (p<0.001). Etkili bulunan bu bileşiklerin doz bağlı deneyleri sonrası elde edilen kuyruk momenti verileri, kontrol grubu ile Dunn's çoklu karşılaştırma analizi ile karşılaştırıldığında;

L929 hücre dizisi üzerinde; **BS2** bileşiğinin 250 ve 500 µM, **BS7** bileşiğinin 225 ve 450 µM ve **BS16** bileşiğinin 350 µM dozda kontrol grubuna göre anlamlı fark yarattığı saptanmıştır (p<0.05).

HeLa hücre dizisi üzerinde ise, güçlü genotoksik etki gösteren her bir bileşiğin, denenen tüm konsantrasyonlarına ait verilerin kontrol grubuna göre farkı istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). Anlamlı farkı yaratan doz grupları ise **BS4** ve **BS16** bileşikleri için 125, 250 ve 500 μM , **BS1** için 68.75, 137.5 ve 275 μM , **BS10** için 12.5, 25 ve 50 μM , **BS11** için 6.25, 12.5 ve 25 μM 'dir.

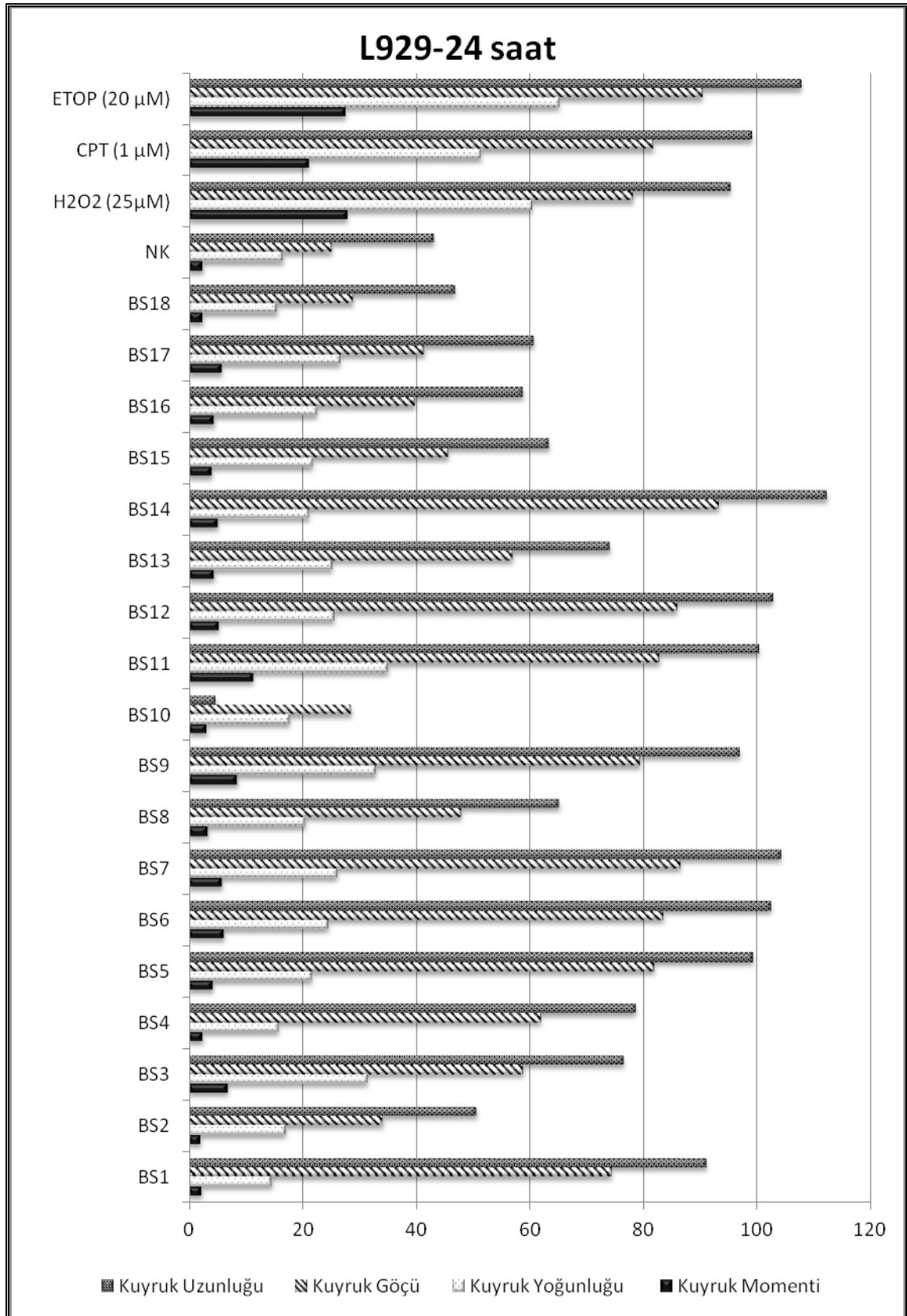
Doza bağlı deneyler sonucunda elde edilen veriler topluca değerlendirildiğinde; her bir test bileşiğinin her iki hücre dizisi üzerinde hasar parametrelerinin (kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu, kuyruk göçü ve kuyruk momenti) tamamında genotoksisiteyi doza bağlı olarak artırdığı sonucuna varılmıştır.

Sitotoksisite çalışmalarında test bileşiklerinin sadece 48 saatlik inkübasyonda IC_{50} dozları belirlendiği için, alkali komet testinde de 48 saatlik inkübasyonlu taramalar sonucunda genotoksik etkili bulunan bileşiklerin doza bağlı deneyleri yapılmıştır.

Çizelge 4.30. Benzoksazin türevlerinin; L929 hücre dizisinde, IC₅₀ dozlarında 24 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen alkali komet testi DNA hasar parametrelerine ait sonuçları

Test Bileşikleri	Kafa Uzunluğu (µm)	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kafa Yoğunluğu (%DNA)	Kuyruk Yoğunluğu (%DNA)	Kuyruk Momenti	Kuyruk Göçü (µm)
BS1	33,510± 5,494	91,192± 39,283	85,365± 10,900	14,635± 10,900	2,296± 1,660	74,437± 38,347
BS2	33,287± 6,031	50,738± 37,348	82,964± 15,666	17,036± 15,666	2,062± 1,865	34,210± 36,988
BS3	35,275± 7,093	76,557± 23,129	68,607± 19,598	31,393± 19,598	*6,865± 5,267	58,920± 23,089
BS4	33,449± 4,111	78,697± 37,639	84,244± 11,875	15,756± 11,875	2,468± 1,946	61,972± 37,099
BS5	34,818± 5,284	99,373± 28,962	78,375± 12,556	21,625± 12,556	4,263± 2,722	81,964± 28,280
BS6	37,924± 5,538	102,584± 36,785	75,469± 15,061	24,531± 15,061	*6,182± 4,999	83,622± 36,313
BS7	35,298± 5,900	104,283± 30,987	73,867± 13,757	26,133± 13,757	*5,899± 4,611	86,634± 30,542
BS8	34,554± 5,218	65,275± 31,210	79,471± 13,934	20,529± 13,934	3,435± 2,682	47,998± 30,986
BS9	35,059± 7,047	97,066± 34,950	67,066± 20,204	32,934± 20,204	*8,557± 7,890	79,537± 35,075
BS10	37,534 ±4,734	47,386 ±21,096	82,252 ±13,945	17,748 ±13,945	3,158 ±2,992	28,619 ±20,322
BS11	34,914± 6,612	100,394± 40,786	64,905± 19,717	35,095± 19,717	**11,33± 8,333	82,937± 39,954
BS12	33,775± 4,490	102,866± 46,593	74,416± 14,463	25,584± 14,463	*5,258± 3,913	85,979± 46,020
BS13	34,302± 5,140	74,198± 38,723	74,801± 14,496	25,199± 14,496	4,471± 3,111	57,047± 38,116
BS14	38,039± 6,645	112,434± 29,017	78,827± 14,851	21,173± 14,851	*5,109± 4,047	93,414± 29,380
BS15	35,548± 5,086	63,472± 33,391	78,199± 11,377	21,801± 11,377	4,056± 2,585	45,698± 32,783
BS16	38,247± 6,007	58,904± 26,707	77,453± 15,611	22,547± 15,611	4,522± 3,332	39,781± 26,691
BS17	38,503± 5,511	60,757± 24,016	73,402± 17,611	26,598± 17,611	*5,783± 4,829	41,506± 24,386
BS18	35,972± 4,271	46,857± 24,136	84,449± 12,100	15,551± 12,100	2,518± 2,211	28,901± 23,608
NK	35,923± 5,726	43,122± 19,174	83,396± 12,816	16,604± 12,816	2,532± 1,857	25,160± 18,291
H ₂ O ₂ (25µM)	34,347± 19,985	95,441± 38,425	39,583± 34,152	60,417± 26,934	**27,878± 15,150	78,267± 34,233
CPT (1 µM)	34,648± 7,187	99,170± 30,832	48,531± 18,675	51,469± 18,675	**21,097± 8,272	81,845± 30,774
ETOP (20 µM)	34,856± 5,985	107,878± 21,689	34,805± 16,680	65,195± 16,680	**27,608± 7,414	90,450± 22,160

(*: p<0.05, **: p<0.001, NK: negatif kontrol)

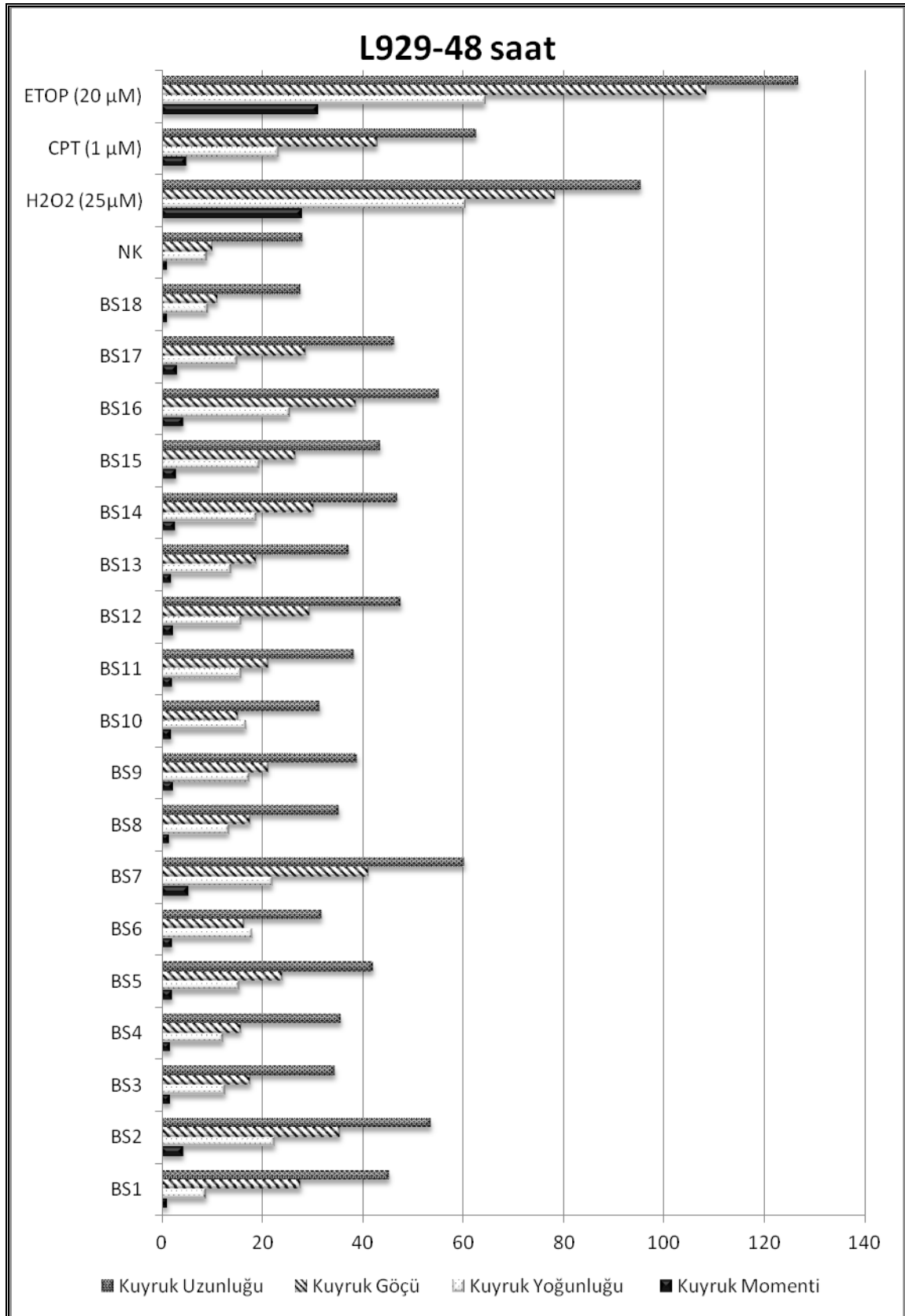


Şekil 4.23. Benzoksazin türevlerinin L929 hücre dizisinde, IC50 dozlarında, 24 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen alkali komet testi sonuçları

Çizelge 4.31. Benzoksazin türevlerinin, L929 hücre dizisinde, IC₅₀ dozlarında 48 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen alkali komet testi DNA hasar parametrelerine ait sonuçları

Test Bileşikleri	Kafa Uzunluğu (µm)	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kafa Yoğunluğu (%DNA)	Kuyruk Yoğunluğu (%DNA)	Kuyruk Momenti	Kuyruk Göçü (µm)
BS1	35,405± 4,335	45,371± 25,383	91,082± 8,881	8,918± 8,881	1,184± 1,069	27,777± 25,133
BS2	36,181± 5,942	53,697± 29,910	77,447± 15,628	22,553± 15,628	**4,321± 3,833	35,645± 29,016
BS3	33,841± 3,888	34,591± 6,020	87,257± 8,242	12,743± 8,242	1,799± 0,968	17,757± 5,642
BS4	39,839± 5,900	35,755± 7,499	87,695± 9,217	12,305± 9,217	1,856± 1,319	15,836± 7,640
BS5	36,097± 4,601	42,205± 17,628	84,435± 10,287	15,565± 10,287	2,154± 1,385	24,157± 17,292
BS6	30,930± 4,861	31,907± 7,969	81,966± 12,760	18,034± 12,760	2,134± 1,795	16,465± 8,149
BS7	38,369± 6,137	60,351± 35,827	77,950± 17,579	22,050± 17,579	**5,518± 5,674	41,176± 35,137
BS8	35,414± 4,899	35,438± 11,756	86,628± 14,214	13,372± 14,214	1,703± 1,760	17,731± 11,968
BS9	35,473± 4,251	39,032± 14,150	82,614± 10,991	17,386± 10,991	2,047± 1,373	21,295± 13,715
BS10	32,809± 5,289	31,630± 7,773	83,196± 12,568	16,804± 12,568	*2,311± 1,634	15,226± 7,896
BS11	34,106± 5,202	38,42±6± 18,156	84,103± 10,285	15,897± 10,285	*2,249± 1,317	21,373± 17,803
BS12	36,217± 7,119	47,705± 16,442	84,184± 10,358	15,816± 10,358	*2,447± 1,370	29,596± 14,766
BS13	37,038± 6,404	37,344± 15,153	86,160± 10,438	13,840± 10,438	2,020± 1,537	18,866± 14,926
BS14	33,343± 4,823	47,007± 16,661	81,183± 9,783	18,817± 9,783	*2,910± 1,437	30,336± 15,837
BS15	33,672± 4,969	43,606± 14,721	80,544± 9,817	19,456± 9,817	*2,938± 1,271	26,770± 13,906
BS16	32,825± 4,472	55,199± 38,268	74,538± 10,841	25,462± 10,841	**4,357± 2,714	38,786± 37,314
BS17	35,470± 4,939	46,409± 35,314	84,928± 14,154	15,072± 14,154	*3,302± 2,630	28,756± 34,865
BS18	33,126± 3,665	27,682± 8,195	90,735± 7,849	9,265± 7,849	1,116± 0,917	11,191± 7,868
NK	36,094± 3,926	28,135± 6,586	90,958± 6,664	9,042± 6,664	1,148± 0,815	10,163± 6,045
H ₂ O ₂ (25 µM)	34,347± 19,985	95,441± 38,425	39,583± 34,152	60,417± 26,934	**27,878± 15,150	78,267± 34,233
CPT (1 µM)	39,423± 4,857	62,710± 26,043	76,684± 11,405	23,316± 11,405	**4,996± 3,327	42,999± 25,871
ETOP (20 µM)	36,770± 10,107	126,863± 9,466	35,571± 15,339	64,429± 15,339	**31,052± 9,331	108,478± 11,697

(*: p<0.05, **: p<0.001, NK: negatif kontrol)

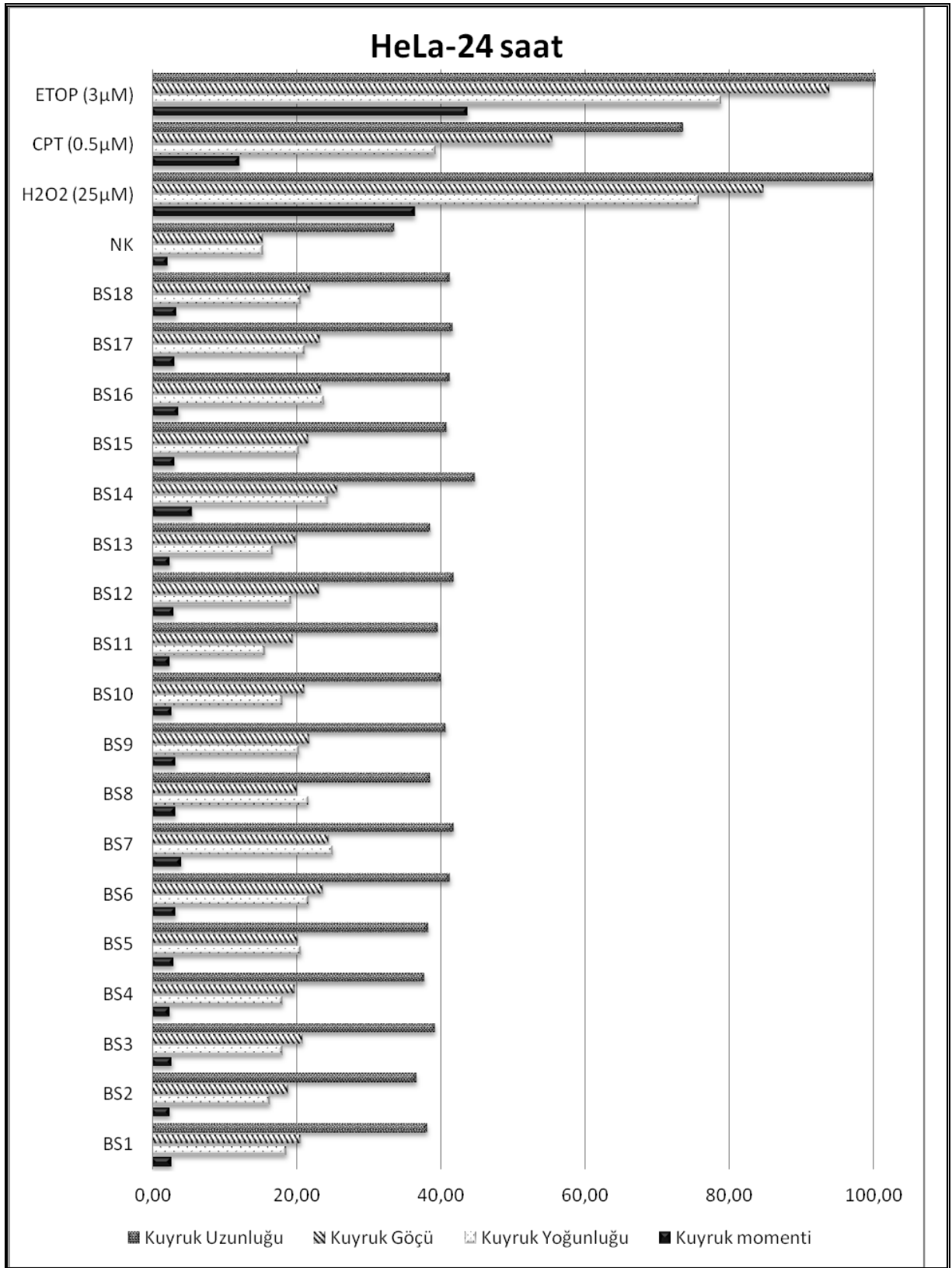


Şekil 4.24. Benzoksazin türevlerinin L929 hücre dizisinde, IC₅₀ dozlarında, 48 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen alkali komet testi sonuçları

Çizelge 4.32. Benzoksazin türevlerinin, HeLa hücre dizisinde, IC₅₀ dozlarında 24 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen alkali komet testi DNA hasar parametrelerine ait sonuçları

Test Bileşikleri	Kafa Uzunluğu (µm)	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kafa Yoğunluğu (%DNA)	Kuyruk Yoğunluğu (%DNA)	Kuyruk Momenti	Kuyruk Göçü (µm)
BS1	35,258± 5,896	38,175± 12,835	81,333± 12,905	18,667± 12,905	2,762± 2,177	20,642± 12,147
BS2	35,477± 6,647	36,702± 13,403	83,626± 12,367	16,374± 12,367	2,559± 2,307	18,963± 12,193
BS3	36,712± 7,094	39,279± 12,413	81,867± 13,775	18,133± 13,775	2,861± 2,603	20,923± 11,592
BS4	35,979± 6,077	37,821± 7,164	81,864± 12,652	18,136± 12,652	2,578± 1,890	19,831± 6,978
BS5	36,125± 7,523	38,343± 10,810	79,331± 13,533	20,669± 13,533	3,035± 2,307	20,281± 9,678
BS6	35,179± 6,542	41,340± 12,871	78,218± 13,403	21,782± 13,403	3,356± 2,237	23,750± 11,824
BS7	34,638± 6,831	41,850± 15,661	74,910± 17,254	25,090± 17,254	4,107± 4,019	24,531± 14,720
BS8	37,218± 6,821	38,688± 7,844	78,300± 15,013	21,700± 15,013	3,365± 2,363	20,079± 8,527
BS9	38,019± 6,256	40,802± 12,501	79,574± 15,906	20,426± 15,906	3,371± 3,155	21,803± 11,915
BS10	37,814± 6,443	40,052± 14,398	81,859± 13,763	18,141± 13,763	2,875± 2,614	21,146± 14,349
BS11	40,309± 6,543	39,673± 12,174	84,345± 12,643	15,655± 12,643	2,533± 2,166	19,523± 11,508
BS12	37,319± 5,784	41,814± 12,137	80,669± 13,367	19,331± 13,367	3,113± 2,209	23,155± 11,761
BS13	37,324± 4,960	38,604± 6,469	83,173± 14,314	16,827± 14,314	2,609± 2,147	19,942± 6,714
BS14	38,394± 5,881	44,823± 16,901	75,527± 20,486	24,473± 20,486	*5,619± 2,452	25,804± 17,061
BS15	38,495± 6,952	40,982± 7,608	79,602± 12,077	20,398± 12,077	3,190± 1,869	21,734± 6,964
BS16	35,697± 6,085	41,275± 10,442	76,072± 14,308	23,928± 14,308	3,755± 3,162	23,427± 10,401
BS17	36,826± 6,630	41,734± 7,429	78,799± 13,599	21,201± 13,599	3,216± 2,147	23,321± 6,848
BS18	38,893± 6,645	41,384± 8,046	79,393± 13,339	20,607± 13,33	3,455± 2,501	21,938± 7,448
NK	39,216± 8,304	33,610± 7,345	82,437± 10,627	15,430± 10,627	2,219± 1,500	15,370± 6,076
H ₂ O ₂ (25 µM)	30,565± 11,940	100,000± 11,315	24,252± 17,245	75,748± 17,245	**36,458± 16,842	84,717± 14,369
CPT (0.5 µM)	36,094± 6,924	73,589± 29,83	60,643± 16,129	39,357± 16,129	**12,220± 9,616	55,542± 28,86
ETOP (3 µM)	32,710± 7,474	110,242± 15,85	21,130± 13,13	78,870± 13,130	**43,784± 13,07	93,887± 16,79

(*: p<0.05, **: p<0.001, NK: negatif kontrol)

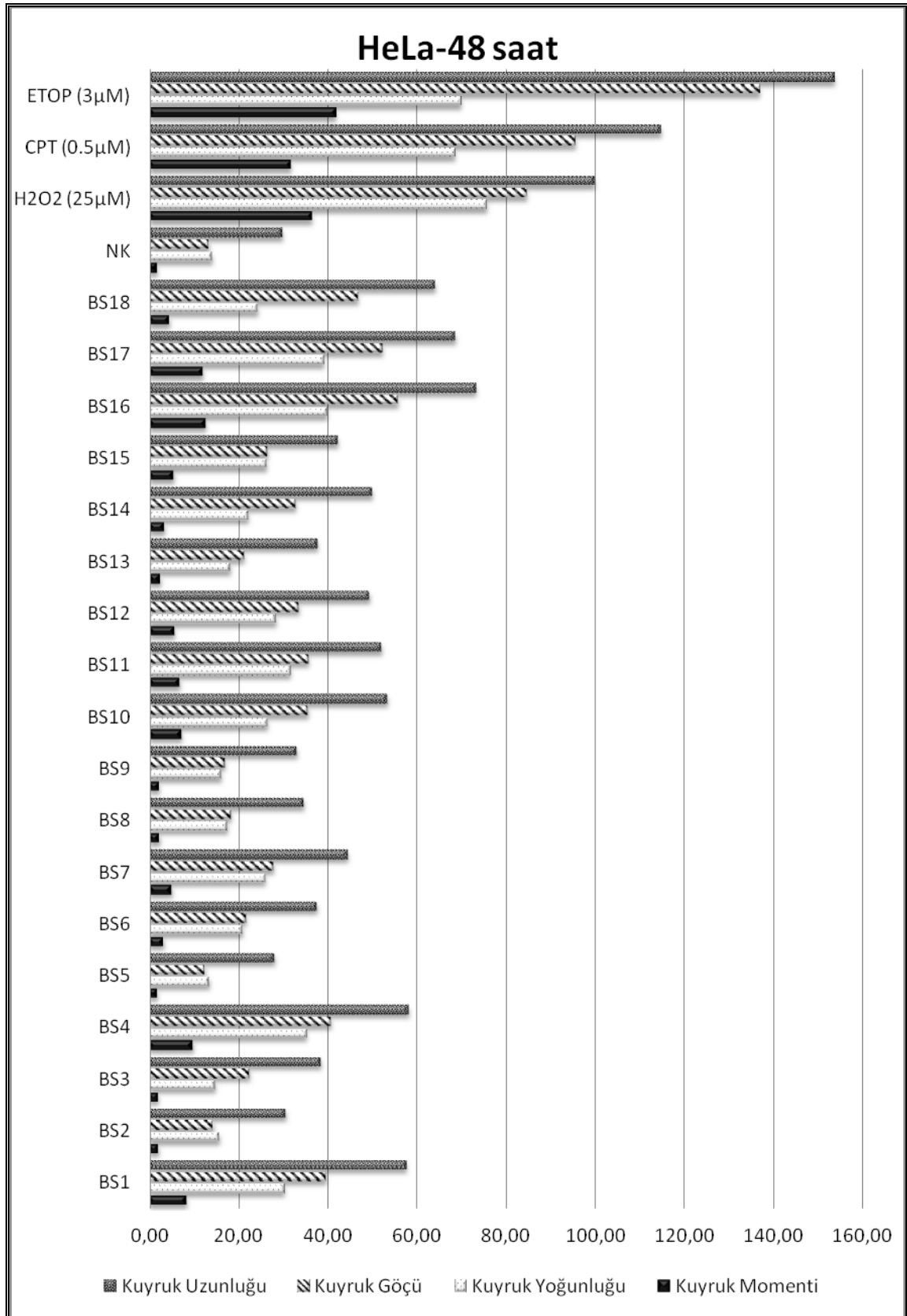


Şekil 4.25. Benzoksazin türevlerinin HeLa hücre dizisinde, IC50 dozlarında, 24 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen alkali komet testi sonuçları

Çizelge 4.33. Benzoksazin türevlerinin, HeLa hücre dizisinde, IC₅₀ dozlarında 48 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen alkali komet testi DNA hasar parametrelerine ait sonuçları

Test Bileşikleri	Kafa Uzunluğu (µm)	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kafa Yoğunluğu (%DNA)	Kuyruk Yoğunluğu (%DNA)	Kuyruk Momenti	Kuyruk Göçü (µm)
BS1	36,056± 7,102	57,670± 30,303	69,742± 22,886	30,258± 22,886	**8,339± 10,947	39,642± 30,490
BS2	32,680± 4,357	30,661± 12,772	84,291± 13,792	15,709± 13,792	2,079± 2,150	14,381± 13,140
BS3	32,013± 5,471	38,504± 23,028	85,229± 9,841	14,771± 9,841	1,970± 1,453	22,504± 22,409
BS4	34,990± 7,704	58,264± 29,735	64,761± 24,494	35,239v 24,494	**9,848± 11,777	40,769± 29,831
BS5	31,273± 4,296	28,127± 12,120	86,534± 10,693	13,466± 10,693	1,768± 1,554	12,497± 11,287
BS6	32,014± 4,531	37,660± 20,687	79,100± 16,983	20,900± 16,983	3,238± 4,002	21,653± 21,242
BS7	33,584± 8,112	44,541± 23,501	74,050± 18,998	25,950± 18,998	*5,088± 5,183	27,847± 22,991
BS8	32,769± 4,616	34,685± 15,665	82,490± 12,565	17,510± 12,565	2,357± 1,857	18,323± 15,667
BS9	32,564± 4,489	33,149± 17,689	83,936± 13,228	16,064± 13,228	2,208± 2,241	16,913± 17,177
BS10	35,686± 6,994	53,478± 30,594	73,519± 22,710	26,481± 22,710	**7,250± 10,861	35,666± 30,501
BS11	32,893± 8,269	52,181± 31,084	68,386± 22,042	31,614± 22,042	**6,850± 7,755	35,735± 31,316
BS12	31,766± 4,172	49,490± 27,304	71,618± 19,561	28,382± 19,561	*5,610± 5,592	33,608± 28,065
BS13	33,039± 5,088	37,728± 16,303	81,836± 13,685	18,164± 13,685	2,547± 2,407	21,220± 16,424
BS14	34,427± 5,636	50,056± 24,510	77,821± 12,998	22,179± 12,998	*3,449± 2,436	32,843± 23,786
BS15	31,648± 5,888	42,335± 26,331	73,725± 24,261	26,275± 24,261	*5,497± 7,657	26,528± 27,326
BS16	34,978± 7,024	73,304± 33,552	60,158± 21,854	39,842± 21,854	**12,687± 13,276	55,815± 33,568
BS17	32,760± 5,988	68,739± 36,795	60,879± 24,845	39,121± 24,845	*5,203± 2,697	52,359± 36,811
BS18	34,666± 5,880	64,169± 30,474	75,697± 15,156	24,303± 15,156	*4,558± 3,840	46,836± 30,222
NK	32,998± 5,080	29,902± 5,572	85,909± 10,678	14,091± 10,678	1,717± 1,242	13,403± 5,546
H2O2 (25µM)	30,565± 11,940	100,000± 11,315	24,252± 17,245	75,748± 17,245	**36,458± 16,842	84,717± 14,369
CPT (0.5µM)	38,478± 13,440	114,879± 23,009	31,450± 19,998	68,550± 19,998	**31,765± 12,926	95,640± 24,445
ETOP (3 µM)	33,649± 10,355	153,85± 16,814	30,025± 18,900	69,975± 18,900	**41,858± 20,736	137,025± 19,070

(*: p<0.05; **: p<0.01, NK: negatif kontrol)



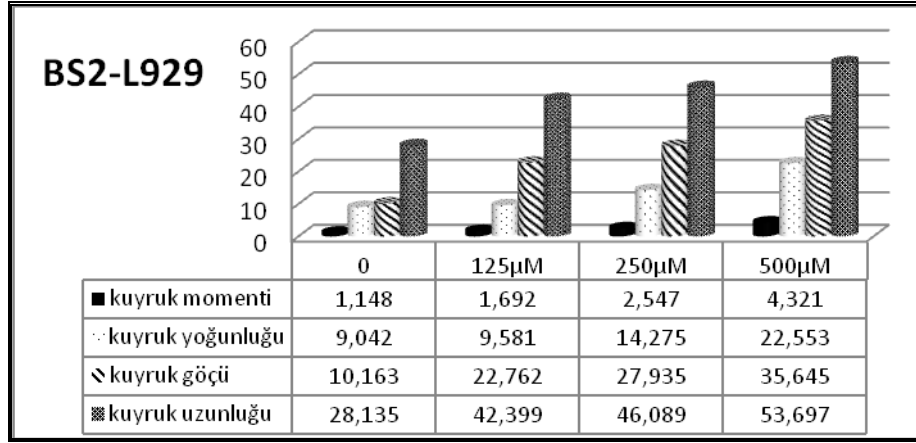
Şekil 4.26. Benzoksazin türevlerinin HeLa hücre dizisinde, IC50 dozlarında, 48 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen alkali komet testi sonuçları

L929 ve HeLa hücre dizileri üzerinde, IC₅₀'e yakın dozlarda, zamana bağlı (24 ve 48 saat) tarama sonrası genotoksik etkili bulunan bileşikler toplu bir şekilde Çizelge 4.34'de özetlenmiştir.

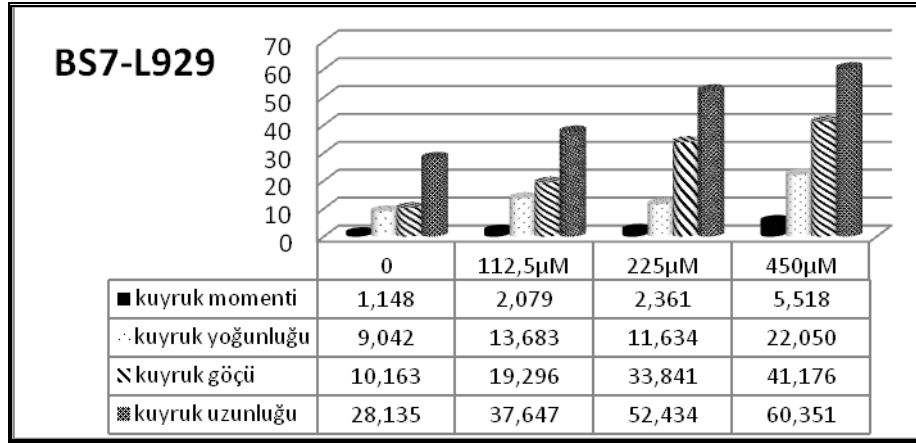
Çizelge 4.34. Alkali komet testinde IC₅₀'e yakın dozlarda 24 ve 48 saatlik inkübasyonlarda L929 ve HeLa hücre dizileri üzerinde genotoksik etki gösteren bileşikler

Test Edilen Bileşikler				L929			HeLa		
KOD	R ₁	R ₂	R ₃	DOZ (µM)	24 saat	48 saat	DOZ (µM)	24 saat	48 saat
BS1	H	H	H	400	-	-	300	-	**
BS2	H	CH ₃	H	400	-	**	200	-	-
BS3	H	Cl	H	250	*	-	15	-	-
BS4	H	COOC ₂ H ₅	H	150	-	-	400	-	**
BS5	H	H	NO ₂	400	-	-	250	-	-
BS6	H	H	NH ₂	400	*	-	400	-	-
BS7	H	Cl	NO ₂	400	*	**	100	-	*
BS8	CH ₃	H	H	400	-	-	250	-	-
BS9	CH ₃	CH ₃	H	250	*	-	400	-	-
BS10	CH ₃	Cl	H	400	-	*	50	-	**
BS11	CH ₃	COOC ₂ H ₅	H	15	**	*	25	-	**
BS12	CH ₃	H	NO ₂	60	*	*	300	-	*
BS13	CH ₃	Cl	NO ₂	150	-	-	200	-	-
BS14	C ₂ H ₅	H	H	400	*	*	200	*	*
BS15	C ₂ H ₅	Cl	H	100	-	*	125	-	*
BS16	C ₂ H ₅	H	NO ₂	350	-	**	400	-	**
BS17	C ₂ H ₅	Cl	NO ₂	100	*	*	400	-	*
BS18	H	H	H	400	-	-	250	-	*
CPT				1.0	**	**	0.5	**	**
ETOP				20	**	**	3.0	**	**
H ₂ O ₂				25	**	**	25	**	**

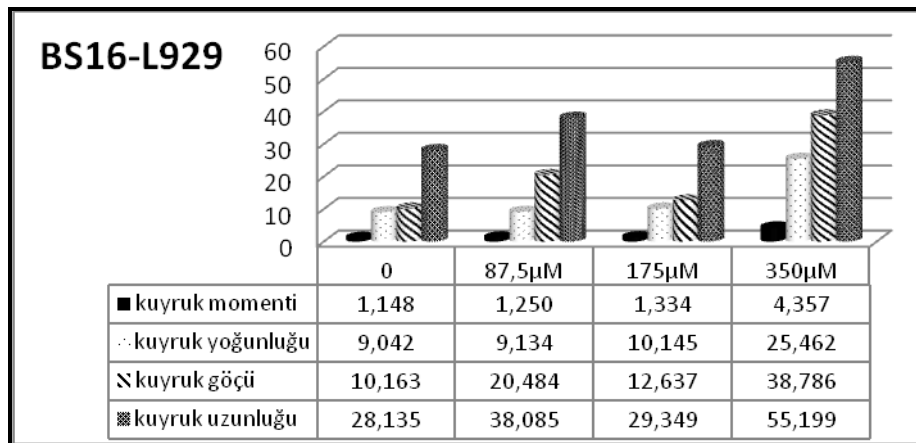
(-: Etkisiz; *: p<0.05; **:p<0.001)



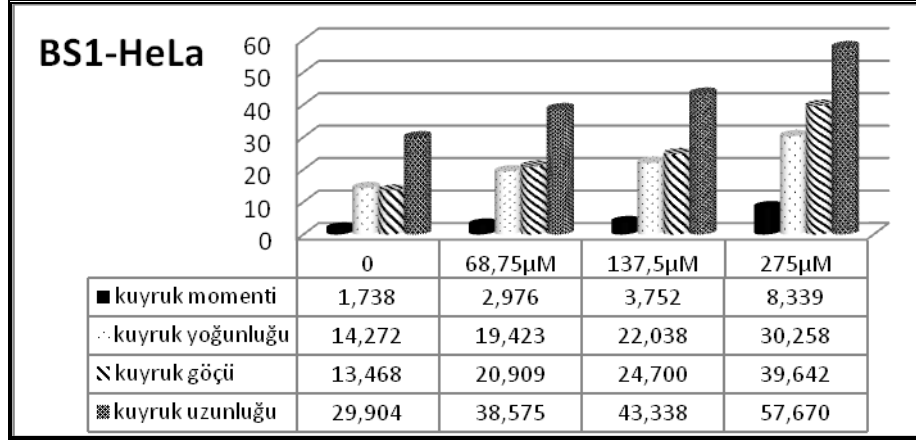
Şekil 4.27. Farklı konsantrasyonlarda BS2 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 hücrelerinde oluşan DNA hasar düzeylerine ait alkali komet testi sonuçları



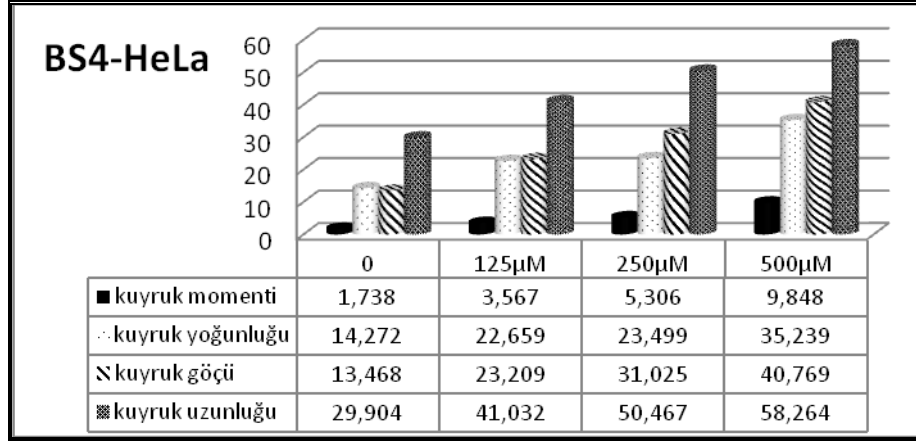
Şekil 4.28. Farklı konsantrasyonlarda BS7 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 hücrelerinde oluşan DNA hasar düzeylerine ait alkali komet testi sonuçları



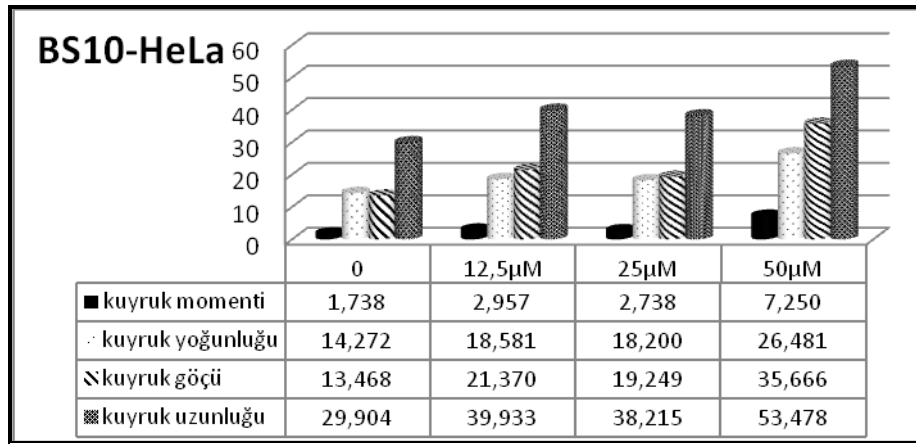
Şekil 4.29. Farklı konsantrasyonlarda BS16 bileşiği ile 48 saat muamele edilen L929 hücrelerinde oluşan DNA hasar düzeylerine ait alkali komet testi sonuçları



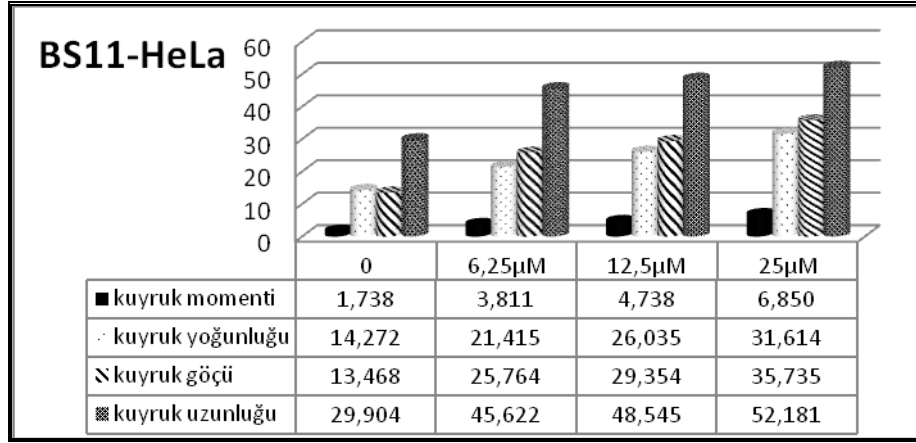
Şekil 4.30. Farklı konsantrasyonlarda BS1 bileşiği ile 48 saat muamele edilen HeLa hücrelerinde oluşan DNA hasar düzeylerine ait alkali komet testi sonuçları



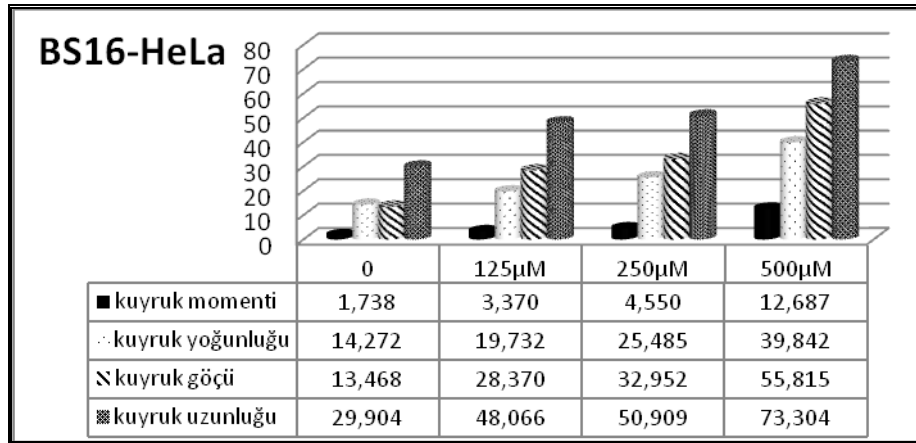
Şekil 4.31. Farklı konsantrasyonlarda BS4 bileşiği ile 48 saat muamele edilen HeLa hücrelerinde oluşan DNA hasar düzeylerine ait alkali komet testi sonuçları



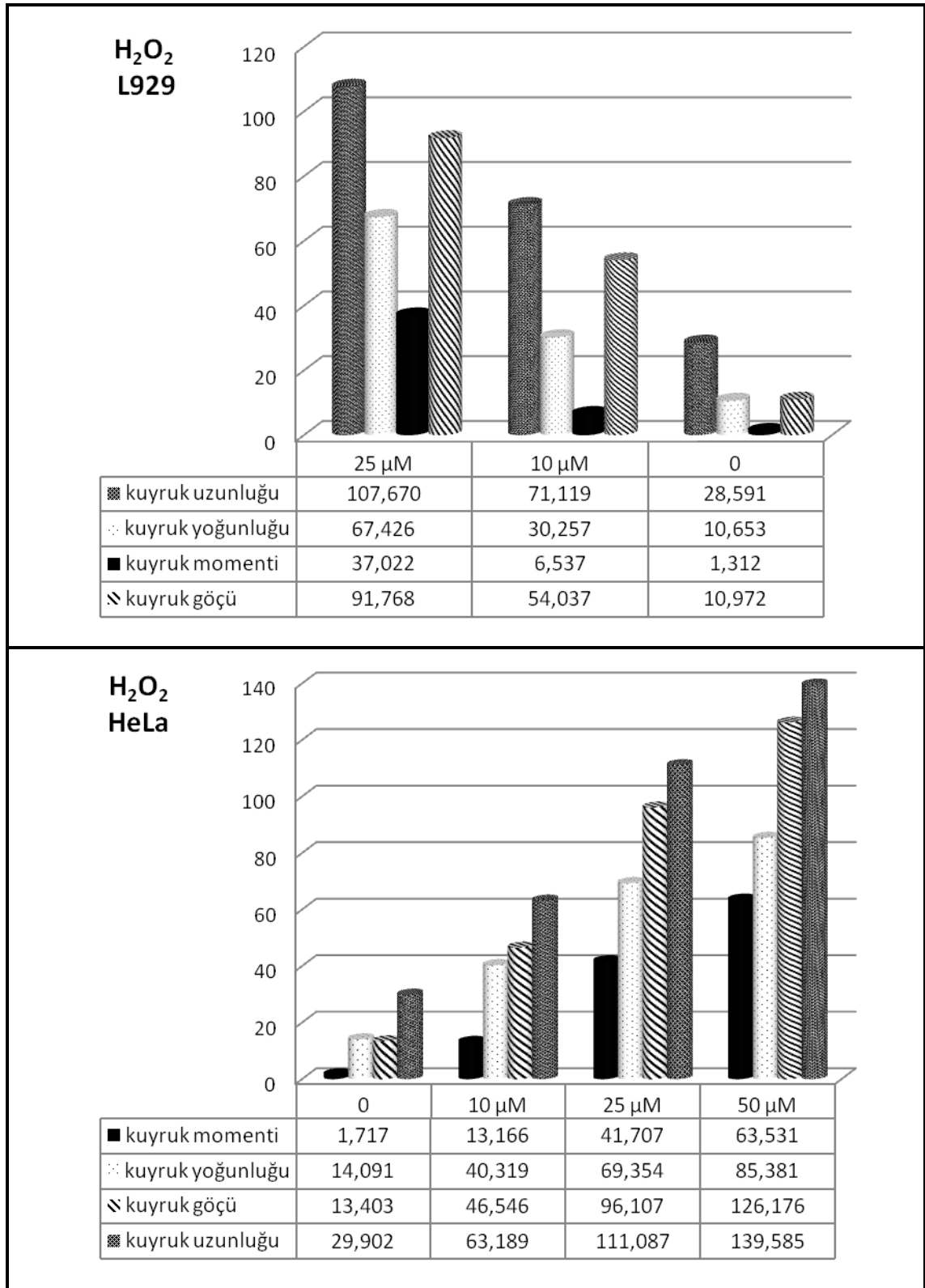
Şekil 4.32. Farklı konsantrasyonlarda BS10 bileşiği ile 48 saat muamele edilen HeLa hücrelerinde oluşan DNA hasar düzeylerine ait alkali komet testi sonuçları



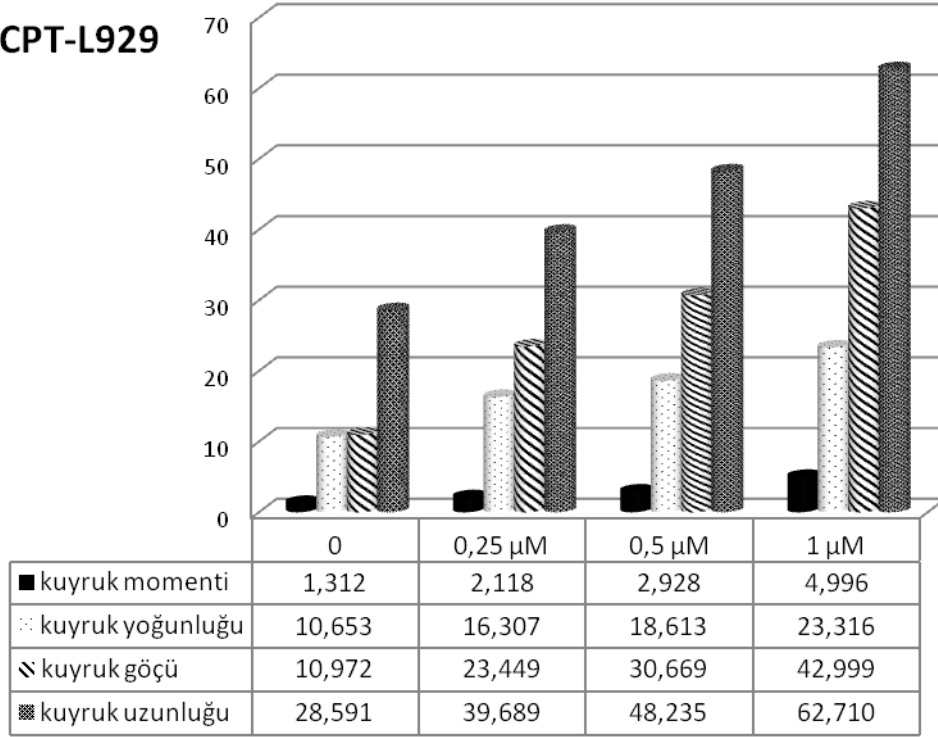
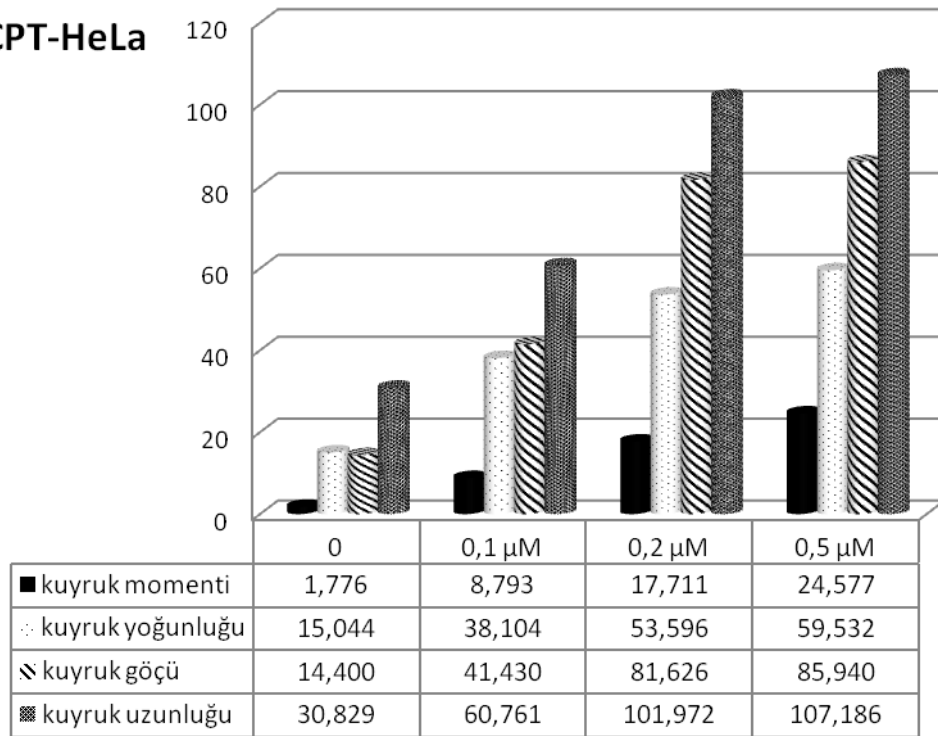
Şekil 4.33. Farklı konsantrasyonlarda BS11 bileşiği ile 48 saat muamele edilen HeLa hücrelerinde oluşan DNA hasar düzeylerine ait alkali komet testi sonuçları



Şekil 4.34. Farklı konsantrasyonlarda BS16 bileşiği ile 48 saat muamele edilen HeLa hücrelerinde oluşan DNA hasar düzeylerine ait alkali komet testi sonuçları

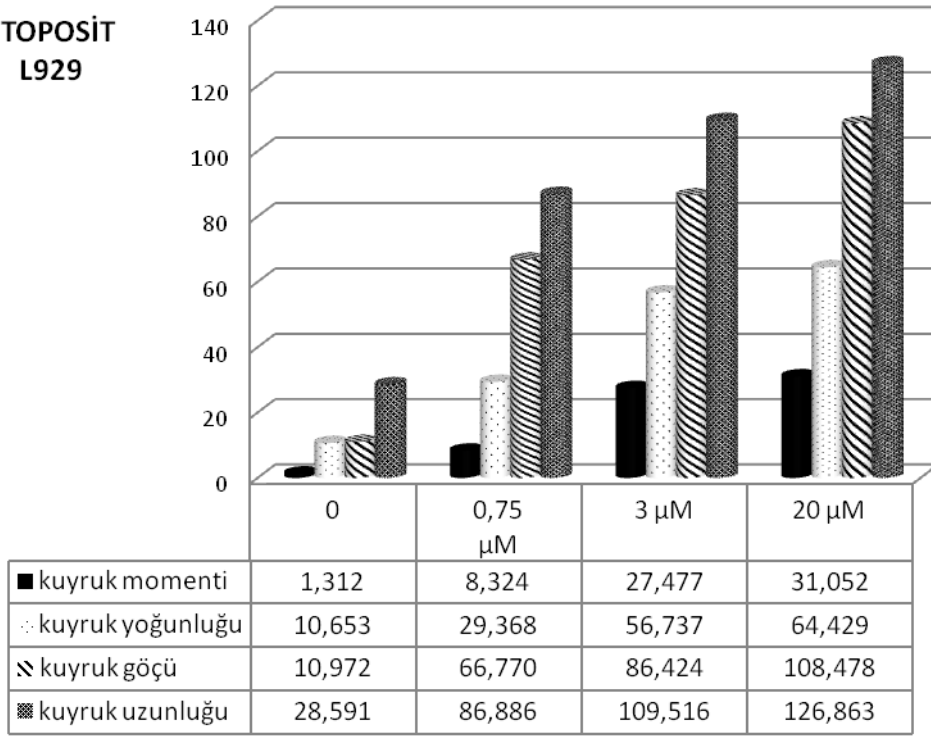


Şekil 4.35. Farklı konsantrasyonlarda H₂O₂ ile 5 dakika muamele edilen L929 ve HeLa hücrelerinde oluşan DNA hasar düzeylerine ait alkali komet testi sonuçları

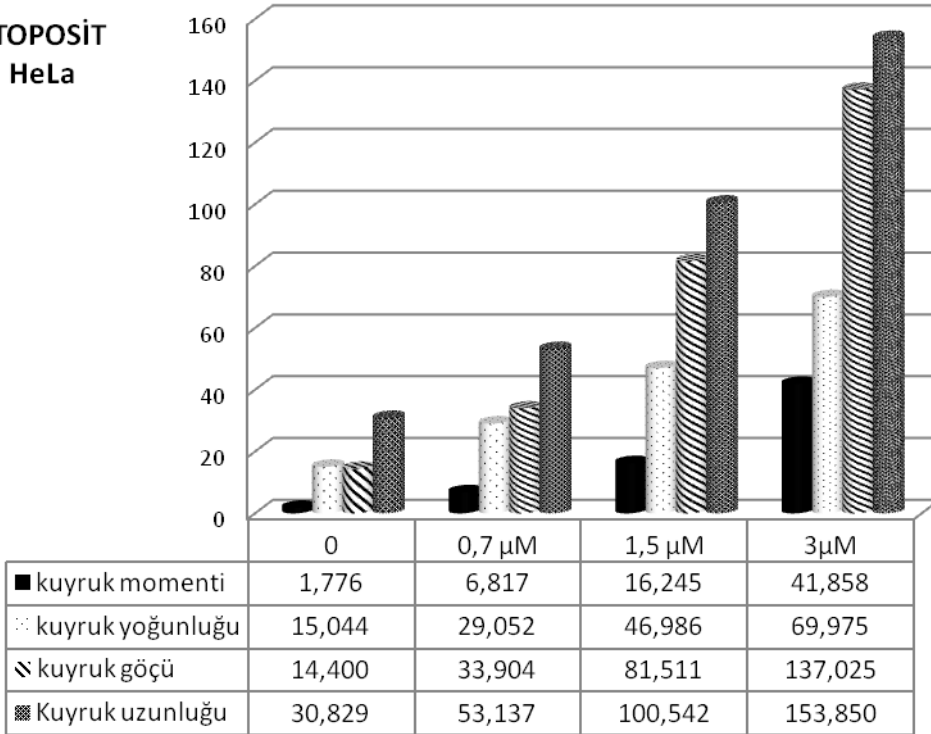
CPT-L929**CPT-HeLa**

Şekil 4.36. Farklı konsantrasyonlarda kamptotesin ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücrelerinde oluşan DNA hasar düzeylerine ait alkali komet testi sonuçları

**ETOPOSİT
L929**

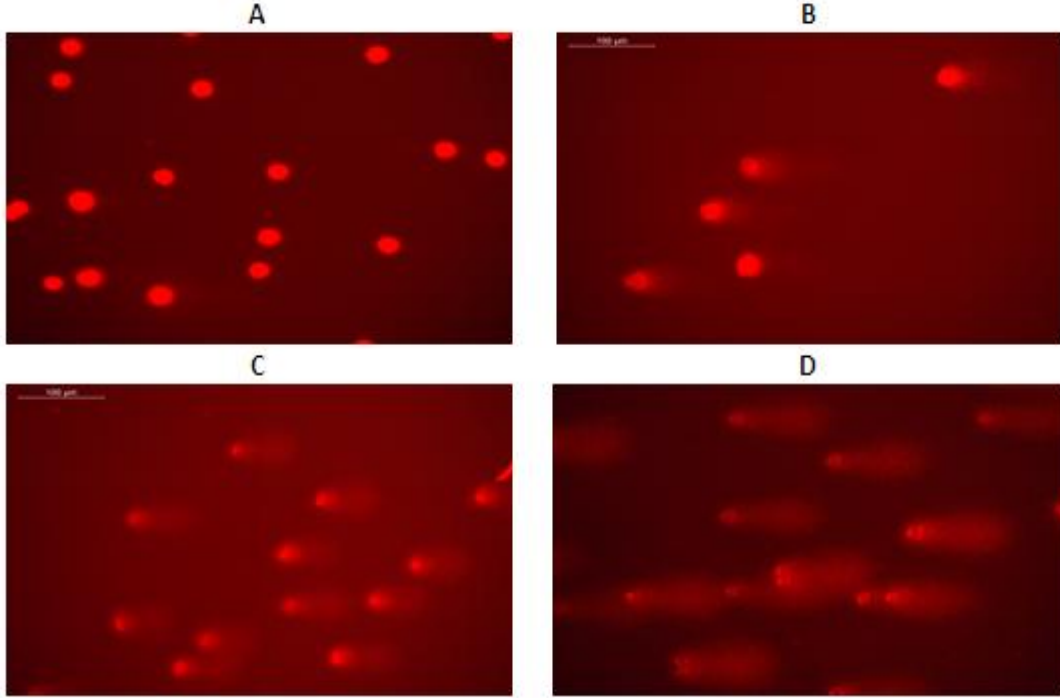


**ETOPOSİT
HeLa**



Şekil 4.37. Farklı konsantrasyonlarda etoposیت ile 48 saat muamele edilen L929 ve HeLa hücrelerinde oluşan DNA hasar düzeylerine ait alkali komet testi sonuçları

Alkali komet testinde HeLa hücreleri üzerinde güçlü genotoksik etki gösteren BS10 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarının hücrelerde oluşturduğu DNA hasarına ait mikroskop görüntüleri Şekil 4.38’de gösterilmiştir.



Şekil 4.38. BS10 bileşiğinin farklı konsantrasyonları ile muamele edilen HeLa hücrelerinde oluşan DNA hasarının mikroskopik görüntüsü. A.Çözücü (DMSO) kontrol, B. 12.5 µM BS10, C. 25 µM BS10, D. 50 µM BS10

4.5. Modifiye Komet (FLARE) Testine Ait Bulgular

Alkali komet testinde IC₅₀ dozlarda güçlü genotoksik etki gösteren (p<0.001) bileşiklerin (L929 hücre dizisi için **BS2**, **BS7** ve **BS16**; HeLa hücre dizisi için **BS1**, **BS4**, **BS10**, **BS11** ve **BS16**) her biri için Fpg ve Endo III onarım enzimleri varlığında ve bu bileşikler içinde yapısında metil (CH₃) grubu taşıyan bileşikler (**BS2**, **BS10** ve **BS11**) için ise hAAG enzimi varlığında yapılan modifiye komet testi sonuçları Şekil 4.39 ile Şekil 4.46 arasında verilmiştir.

Onarım enzimleri varlığında yapılan modifiye komet testinde pozitif kontrol olarak kullanılan CPT, ETOP, MMS ve H₂O₂’e ait sonuçlar ise Şekil 4.47 ile Şekil 4.54 arasında verilmiştir.

Modifiye komet test sisteminde kullanılan onarım enzimlerine özgü net hasar bulguları (enzim duyarlı bölge sıklıkları) ise topluca Şekil 4.55 ve Şekil 4.56’da özetlenmiştir.

Etkili bileşiklerin, onarım enzimleri (Fpg, Endo III ve yapısında metil grubu taşıyorsa hAAG) varlığında elde edilen kuyruk momenti verilerinin ortalaması ile kontrol grubu (sadece enzimlere özgü reaksiyon tampounu (RB) ile muamele edilmiş) sonuçları Dunn's çoklu karşılaştırma analizi kullanılarak karşılaştırıldığında;

L929 hücre dizisinde;

BS2 bileşiği için, Fpg ve hAAG enzim uygulamalarının kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı fark ($p<0.05$) yarattığı ve Fpg ile hAAG birbirleri ile karşılaştırıldığında bu farkın eşit düzeylerde olduğu saptanmıştır. Endo III uygulamasında ise anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$). Sonuç olarak **BS2** bileşiğinin genotoksik etkisini DNA'da eşit düzeyde Fpg ve hAAG duyarlı bölgeler oluşturarak gösterdiği belirlenmiştir.

BS7 bileşiği için, sadece Fpg enzim uygulamasının kontrole göre istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı fark ($p<0.001$) yarattığı saptanmıştır. Endo III uygulamasında ise anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$). Sonuç olarak **BS7** bileşiğinin genotoksik etkisini DNA'da sadece Fpg duyarlı bölgeler oluşturarak gösterdiği belirlenmiştir.

BS16 bileşiği için, sadece Fpg enzim uygulamasının kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı fark ($p<0.05$) yarattığı saptanmıştır. Endo III uygulamasında ise anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$). Sonuç olarak **BS16** bileşiğinin genotoksik etkisini DNA'da sadece Fpg duyarlı bölgeler oluşturarak gösterdiği belirlenmiştir.

HeLa hücre dizisinde ise;

BS1 bileşiği için, Fpg ve Endo III enzim uygulamalarının kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı fark ($p<0.05$) yarattığı ve Fpg ile Endo III birbirleri ile karşılaştırıldığında bu farkın eşit düzeylerde olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak **BS1** bileşiğinin genotoksik etkisini DNA'da eşit düzeyde Fpg ve Endo III duyarlı bölgeler oluşturarak gösterdiği belirlenmiştir.

BS4 bileşiği için, Fpg ve Endo III enzim uygulamalarının kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı fark ($p<0.05$) yarattığı ve Fpg ile Endo III birbirleri ile karşılaştırıldığında bu farkın Fpg uygulamasında daha yüksek olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak **BS4** bileşiğinin genotoksik etkisini DNA'da Fpg ve

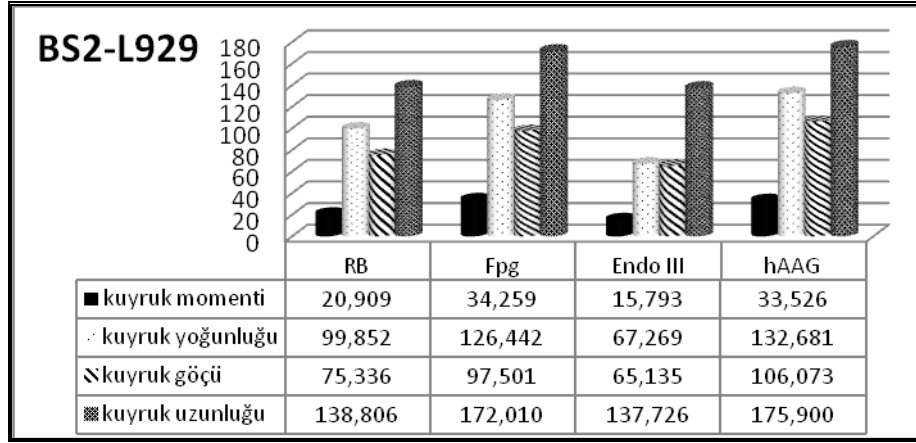
Endo III duyarlı bölgeler oluşturarak gösterdiği ve Fpg duyarlı bölge sıklığının Endo III'ten daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

BS10 bileşiği için, Fpg ve hAAG enzim uygulamalarının kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı fark ($p<0.05$) yarattığı ve Fpg ile hAAG birbirleri ile karşılaştırıldığında bu farkın Fpg uygulamasında daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0.001$). Endo III uygulamasında ise anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$). Sonuç olarak **BS10** bileşiğinin genotoksik etkisini DNA'da Fpg ve hAAG duyarlı bölgeler oluşturarak gösterdiği ve Fpg duyarlı bölge sıklığının hAAG'den yaklaşık 2 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

BS11 bileşiği için, sadece Fpg enzim uygulamasının kontrole göre istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı fark yarattığı saptanmıştır ($p<0.001$). Endo III ve hAAG uygulamalarında ise anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$). Sonuç olarak **BS11** bileşiğinin genotoksik etkisini DNA'da sadece Fpg duyarlı bölgeler oluşturarak gösterdiği belirlenmiştir.

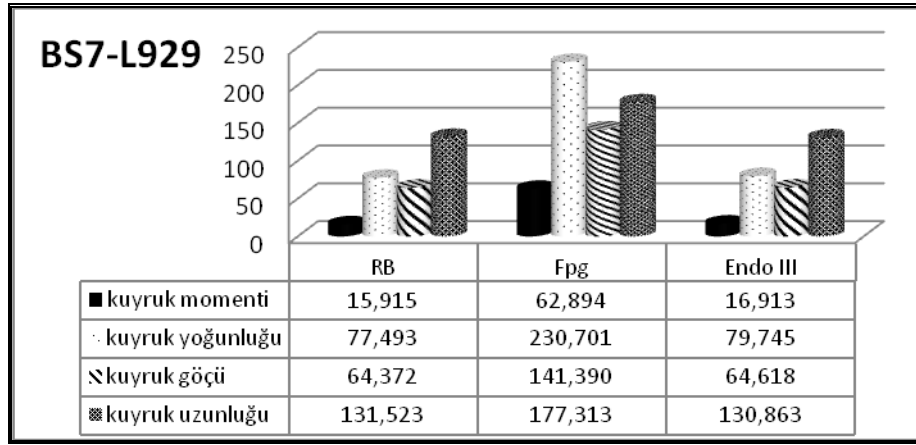
BS16 bileşiği için, Fpg ve Endo III enzim uygulamalarının kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı fark ($p<0.05$) yarattığı ve Fpg ile Endo III birbirleri ile karşılaştırıldığında bu farkın eşit düzeylerde olduğu saptanmıştır ($p>0.05$). Sonuç olarak **BS16** bileşiğinin genotoksik etkisini DNA'da eşit düzeyde Fpg ve Endo III duyarlı bölgeler oluşturarak gösterdiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak, etkili bileşikler ile muamale edilen L929 ve HeLa hücre DNA'sında Fpg ve Endo III duyarlı bölgelerde oksidatif hasarlı bazların, hAAG duyarlı bölgelerde ise hasar oluşturacak şekilde metillenmiş bazların olduğu saptanmıştır.



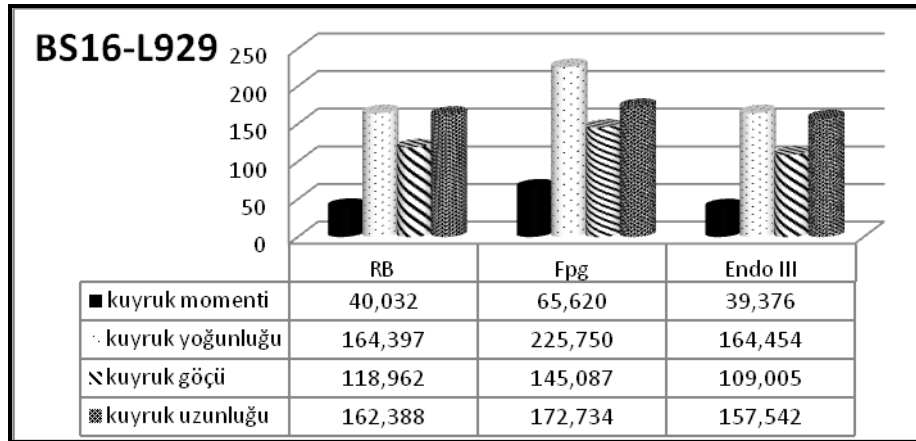
*RB:Reaksiyon tamponu

Şekil 4.39. BS2 ile muamele edilen L929 hücre dizisinde Fpg, Endo III ve hAAG enzimleri varlığında modifiye komet testi sonuçları



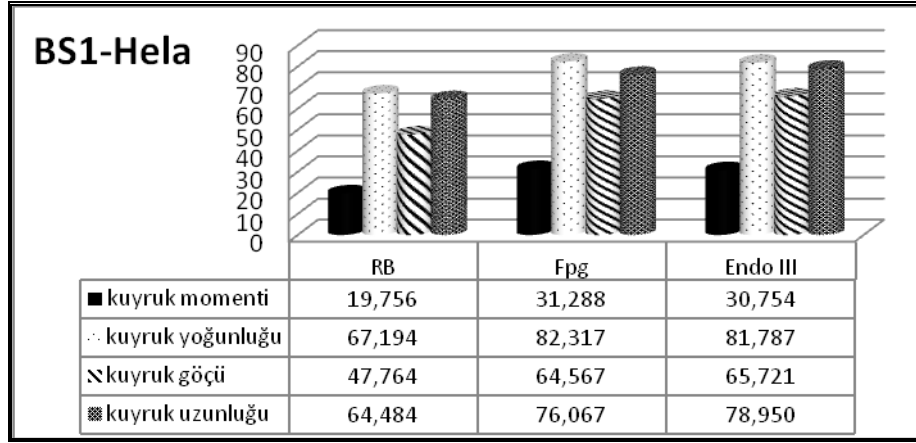
*RB:Reaksiyon tamponu

Şekil 4.40. BS7 ile muamele edilen L929 hücre dizisinde Fpg ve Endo III varlığında modifiye komet testi sonuçları



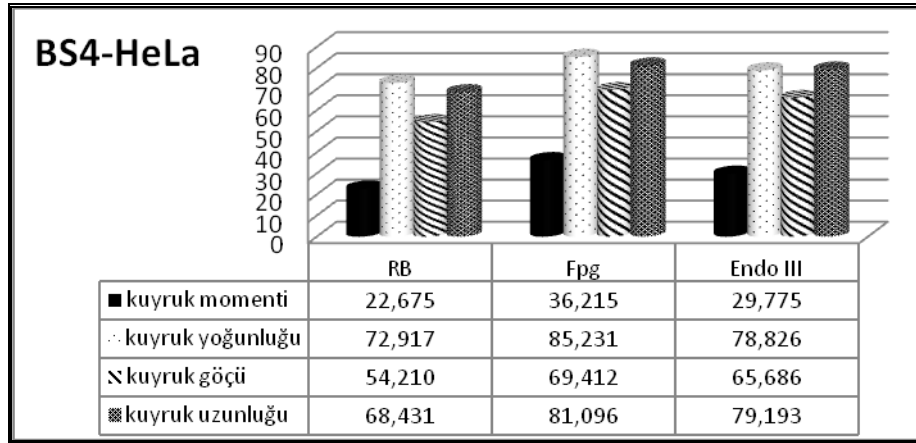
*RB:Reaksiyon tamponu

Şekil 4.41. BS16 ile muamele edilen L929 hücre dizisinde Fpg ve Endo III varlığında modifiye komet testi sonuçları



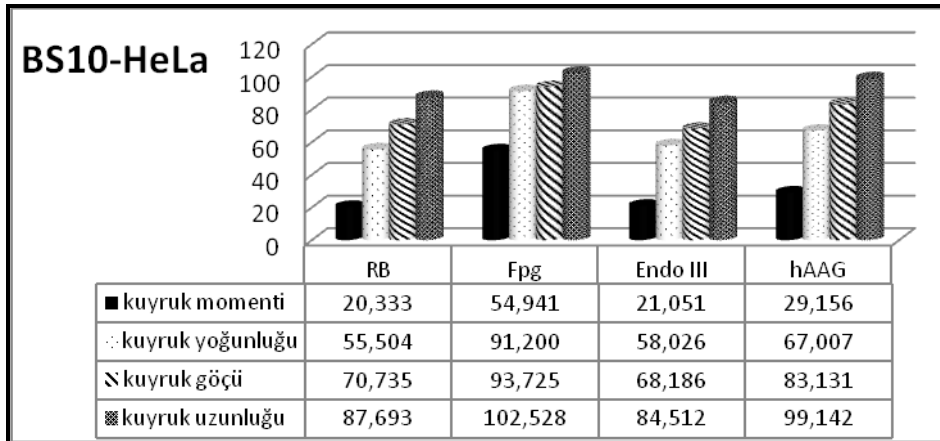
*RB:Reaksiyon tamponu

Şekil 4.42. BS1 ile muamele edilen HeLa hücre dizisinde Fpg ve Endo III varlığında modifiye komet testi sonuçları



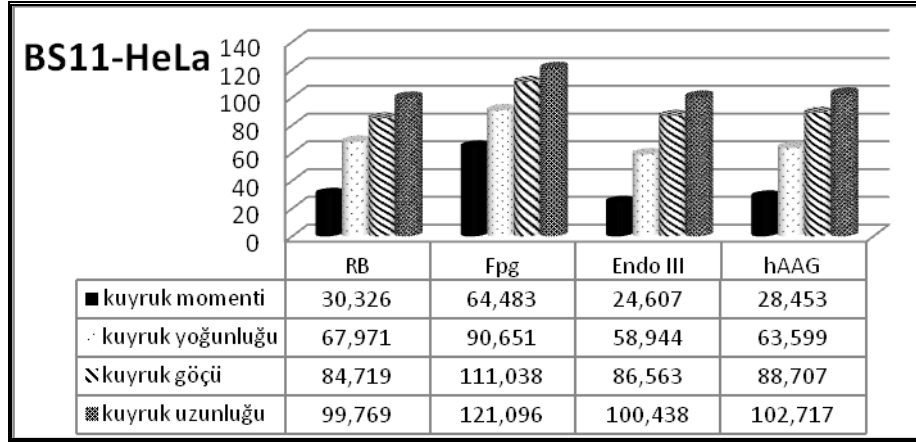
*RB:Reaksiyon tamponu

Şekil 4.43. BS4 ile muamele edilen HeLa hücre dizisinde Fpg ve Endo III varlığında modifiye komet testi sonuçları



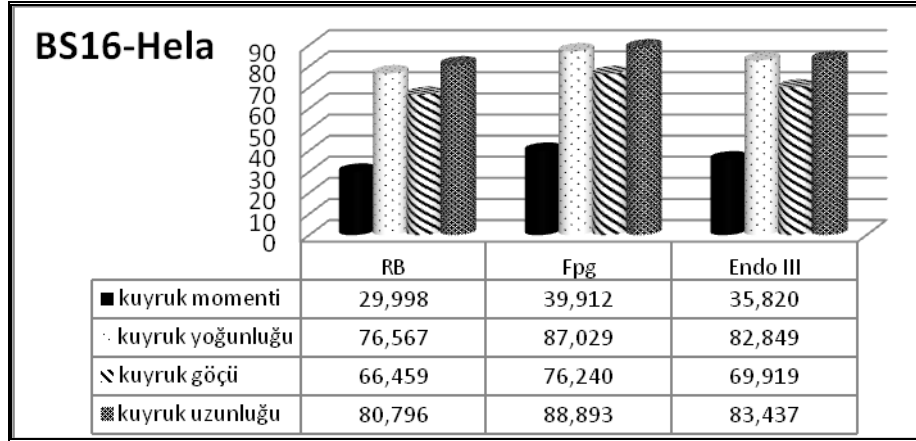
*RB:Reaksiyon tamponu

Şekil 4.44. BS10 ile muamele edilen HeLa hücre dizisinde Fpg, Endo III ve hAAG varlığında modifiye komet testi sonuçları



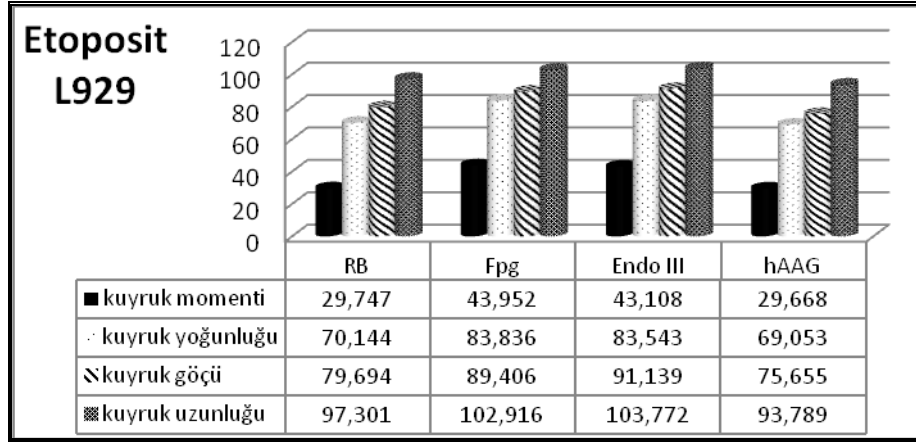
*RB:Reaksiyon tamponu

Şekil 4.45. BS11 ile muamele edilen HeLa hücre dizisinde Fpg, Endo III ve hAAG varlığında modifiye komet testi sonuçları



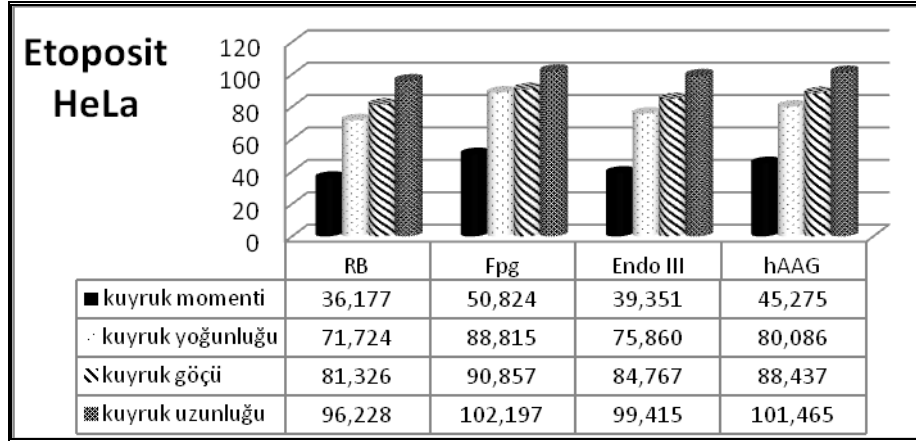
*RB:Reaksiyon tamponu

Şekil 4.46. BS16 ile muamele edilen HeLa hücre dizisinde Fpg ve Endo III varlığında modifiye komet testi sonuçları



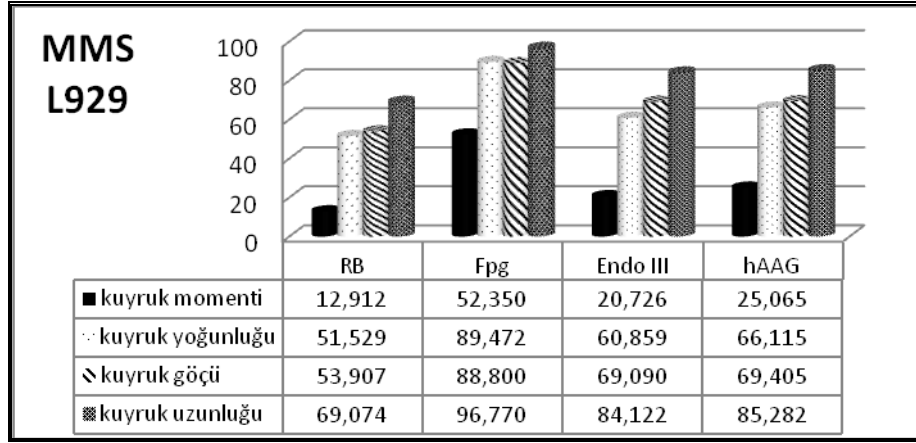
*RB:Reaksiyon tamponu

Şekil 4.47. Etoposit ile muamele edilen L929 hücre dizisinde Fpg, Endo III ve hAAG varlığında modifiye komet testi sonuçları



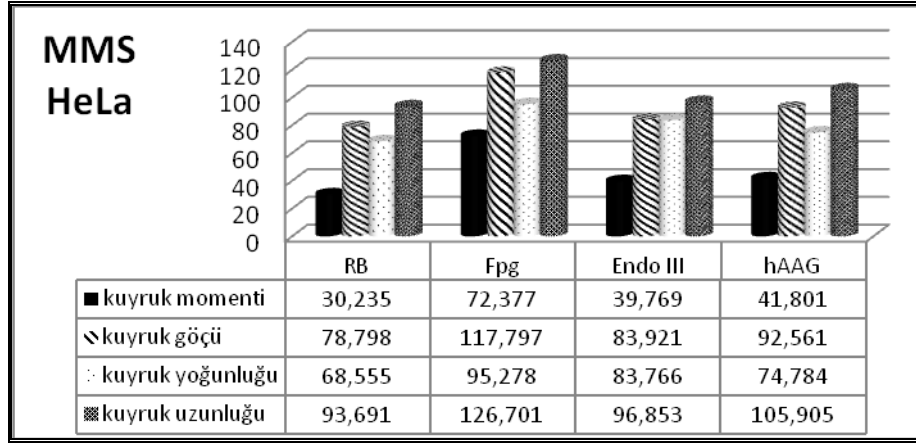
*RB:Reaksiyon tamponu

Şekil 4.48. Etoposit ile muamele edilen HeLa hücre dizisinde Fpg, Endo III ve hAAG varlığında modifiye komet testi sonuçları



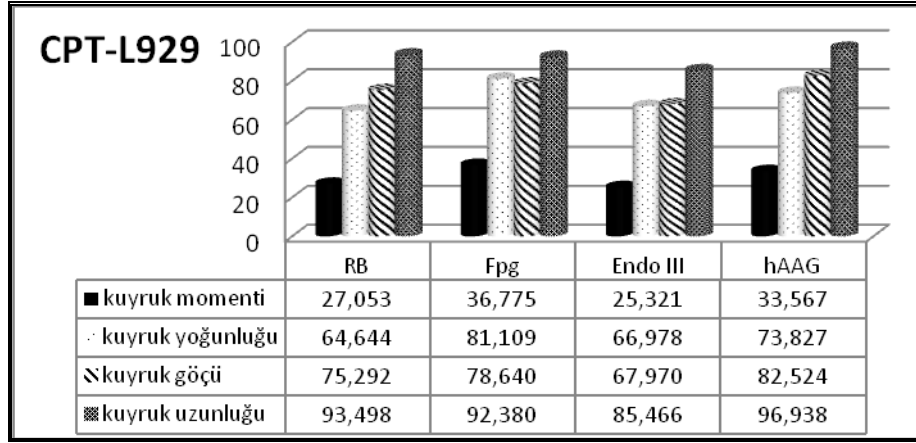
*RB:Reaksiyon tamponu

Şekil 4.49. MMS ile muamele edilen L929 hücre dizisinde Fpg, Endo III ve hAAG varlığında modifiye komet testi sonuçları



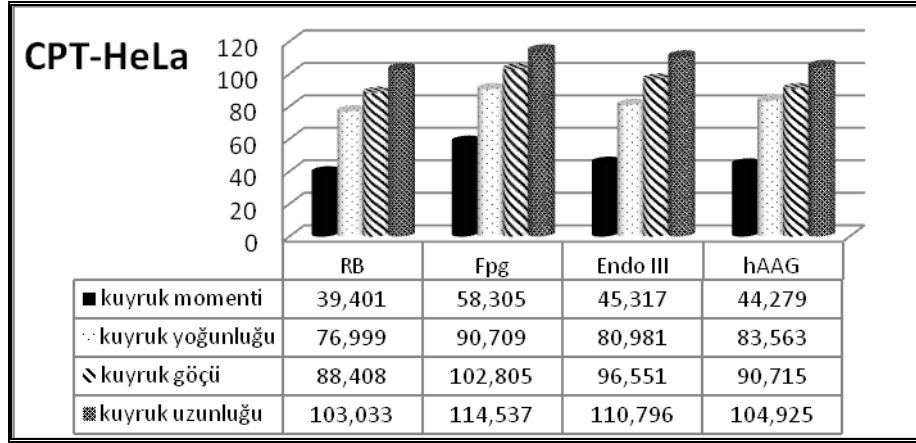
*RB:Reaksiyon tamponu

Şekil 4.50. MMS ile muamele edilen HeLa hücre dizisinde Fpg, Endo III ve hAAG varlığında modifiye komet testi sonuçları



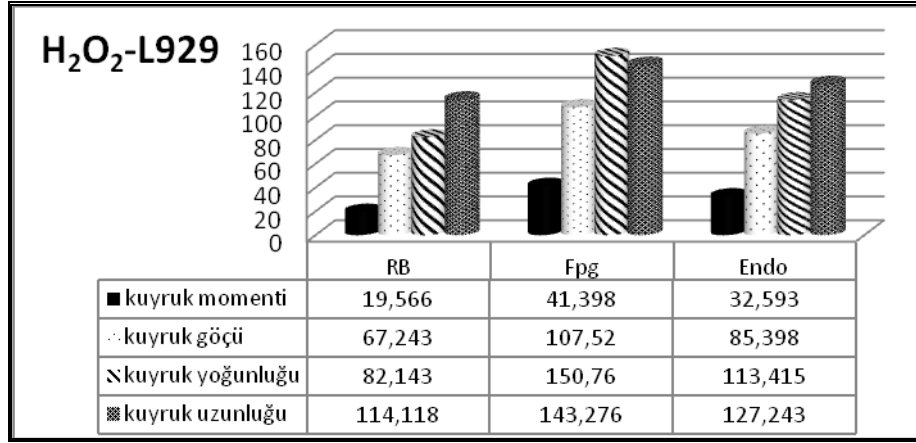
*RB:Reaksiyon tamponu

Şekil 4.51. CPT ile muamele edilen L929 hücre dizisinde Fpg, Endo III ve hAAG varlığında modifiye komet testi sonuçları



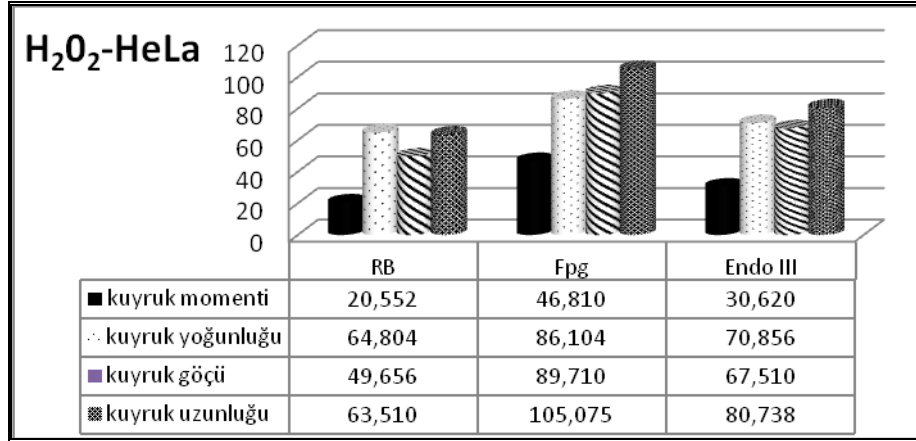
*RB:Reaksiyon tamponu

Şekil 4.52. CPT ile muamele edilen HeLa hücre dizisinde Fpg, Endo III ve hAAG varlığında modifiye komet testi sonuçları



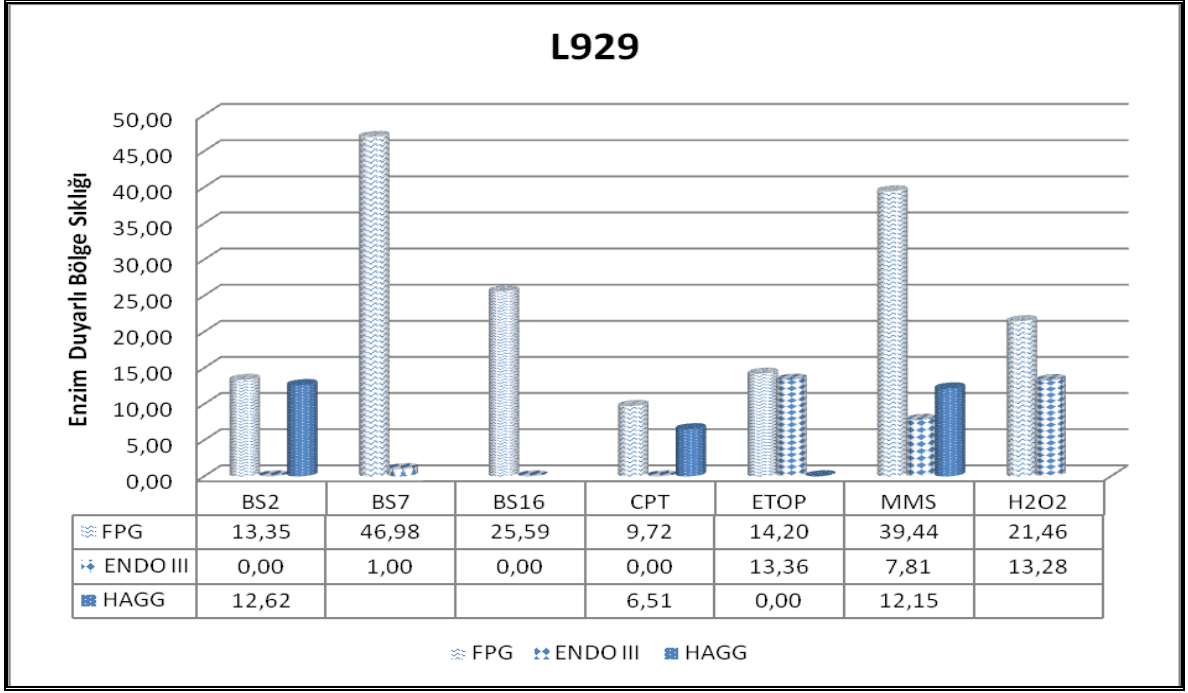
*RB:Reaksiyon tamponu

Şekil 4.53. H₂O₂ ile muamele edilen L929 hücre dizisinde Fpg ve Endo III varlığında modifiye komet testi sonuçları



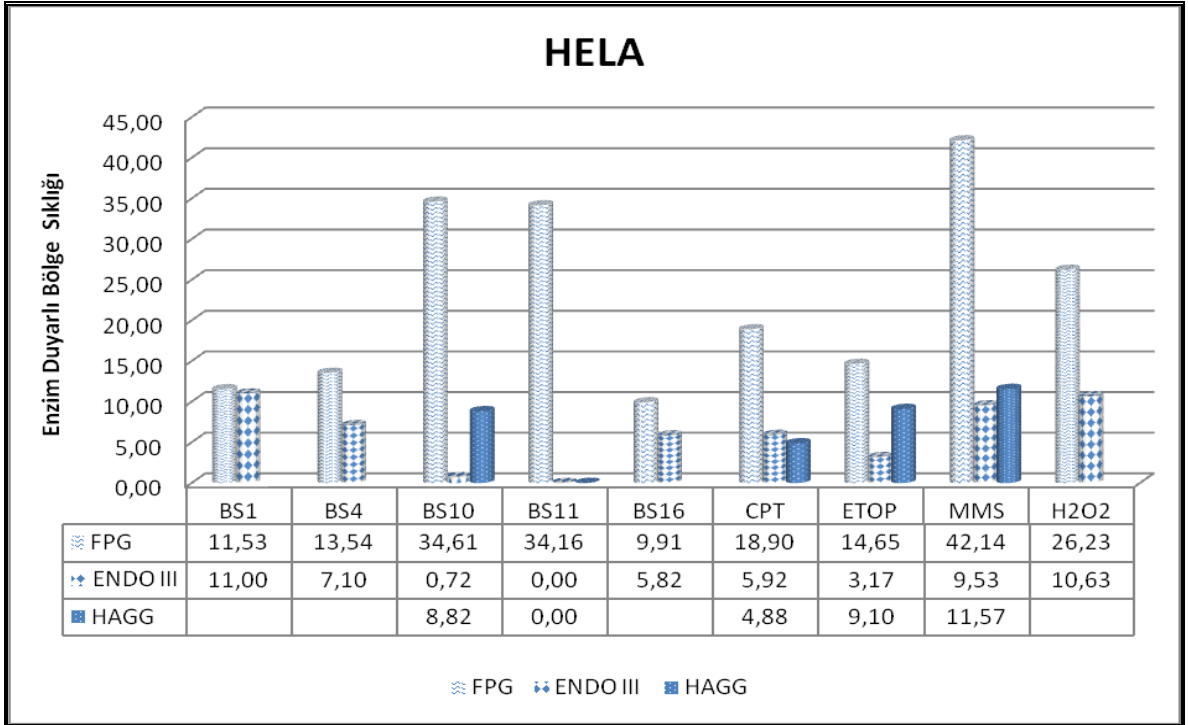
*RB:Reaksiyon tamponu

Şekil 4.54. H₂O₂ ile muamele edilen HeLa hücre dizisinde Fpg ve Endo III varlığında modifiye komet testi sonuçları



*Çizelgedeki veriler kuyruk momenti esas alınarak hesaplanmıştır.

Şekil 4.55. L929 hücre dizisinde genotoksik etkili BS2, BS7 ve BS16 bileşiklerinin Fpg, Endo III ve hAAG duyarlı bölge sıklıkları



*Çizelgedeki veriler kuyruk momenti esas alınarak hesaplanmıştır.

Şekil 4.56. HeLa hücre dizisinde genotoksik etkili BS1, BS4, BS10, BS11 ve BS16 bileşiklerinin Fpg, Endo III ve hAAG duyarlı bölge sıklıkları

4.6. Ames *Salmonella*/Mikrozom Testine Ait Bulgular

Salmonella typhimurium TA98 ve TA100 suşları kullanılarak metabolik aktivasyon sistemi (S9) varlığında ve yokluğunda 18 adet benzoksazin türevi bileşiğin, plak inkorporasyon testine ait sonuçlar Çizelge 4.35 ile Çizelge 4.52 arasında gösterilmiştir.

Test bileşiklerinin Ames testinden elde edilen verileri ile yapılan istatistiksel değerlendirmelere ait sonuçlar Çizelge 4.53 ile Çizelge 4.58 arasında gösterilmiştir.

Ames *Salmonella*/mikrozom testine ait toplu sonuçlar ise Çizelge 4.59'da özetlenmiştir.

Graphpad Prism 5 programı kullanılarak yapılan Dunn's çoklu karşılaştırma testine göre;

BS2, BS3, BS6. BS8, BS9, BS11 ve BS14 bileşiklerinin; metabolik aktivasyon sistemi varlığında ve yokluğunda, hem *S. typhimurium* TA98 suşu hem de *S. typhimurium* TA100 suşu üzerinde denenen tüm dozları (50, 100, 200 µg/plak), geriye dönen koloni sayısı açısından kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, istatistiksel bakımdan anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($p>0.05$). Dolayısıyla bu 7 bileşiğin, hem metabolik aktivasyon varlığında hem de yokluğunda her iki suş için mutajenik olmadığı saptanmıştır. Dolayısıyla bu bileşikler için regresyon analizi ile uygun denklem oluşturulamadığı için minimum mutajenik etkili doz hesaplanamamıştır.

BS1 ve BS15 bileşiklerinin, TA100 suşunda hem S9 varlığında hem de yokluğunda ve TA98 suşunda S9 varlığında denenen tüm dozlarının kontrole karşı anlamlı bir fark yaratmadığı gözlenirken ($p>0.05$), her iki bileşiğin TA98 suşunda, S9 yokluğunda, sadece en yüksek dozunda (200 µg/plak) anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p<0.05$). Regresyon model kestirim analizlerinden elde edilen bulgular sonucunda, BS1 bileşiğinin 255.2 µg/plak dozunda ve BS15 bileşiğinin 716.5 µg/plak dozunda S9 yokluğunda TA98 suşunda çerçeve kayması mutasyonuna neden oldukları saptanmıştır.

BS4 ve BS18 bileşiklerinin, TA100 suşunda hem S9 varlığında hem de yokluğunda ve TA98 suşunda S9 yokluğunda denenen tüm dozlarının kontrole

karşı anlamlı bir fark yaratmadığı gözlenirken ($p>0.05$), her iki bileşiğin TA98 suşunda, S9 varlığında sadece en yüksek dozunda (200 µg/plak) anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p<0.05$). Regresyon model kestirim analizlerinden elde edilen bulgular sonucunda, BS4 bileşiğinin 333 µg/plak dozunda ve BS18 bileşiğinin 217µg/plak dozunda S9 varlığında TA98 suşunda çerçeve kayması mutasyonuna neden olduğu saptanmıştır.

BS5 bileşiğinin, TA98 suşunda hem S9 varlığında hem de yokluğunda ve TA100 suşunda S9 yokluğunda denenen tüm dozlarının kontrole karşı anlamlı bir fark yaratmadığı gözlenirken ($p>0.05$); TA100 suşunda, S9 varlığında, sadece en yüksek dozda (200 µg/plak) anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p<0.05$). Regresyon model kestirim analizlerinden elde edilen bulgular sonucunda; BS5 bileşiğinin S9 varlığında 839.3 µg/plak dozunda TA100 suşunda baz çifti değişimi mutasyonuna sebep olduğu saptanmıştır.

BS7 bileşiğinin, TA100 suşunda hem S9 varlığında hem de yokluğunda denenen tüm dozlarının kontrole karşı anlamlı bir fark yaratmadığı gözlenirken ($p>0.05$); TA98 suşunda S9 varlığında, 100, 200 µg/plak dozlarında ve S9 yokluğunda denenen tüm dozlarında (50, 100, 200 µg/plak) anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p<0.05$). Regresyon model kestirim analizlerinden elde edilen bulgular sonucunda; BS7 bileşiğinin; S9 yokluğunda 168.6 µg/plak dozunda ve S9 varlığında 426.6 µg/plak dozunda TA98 suşunda çerçeve kayması mutasyonuna neden olduğu saptanmıştır.

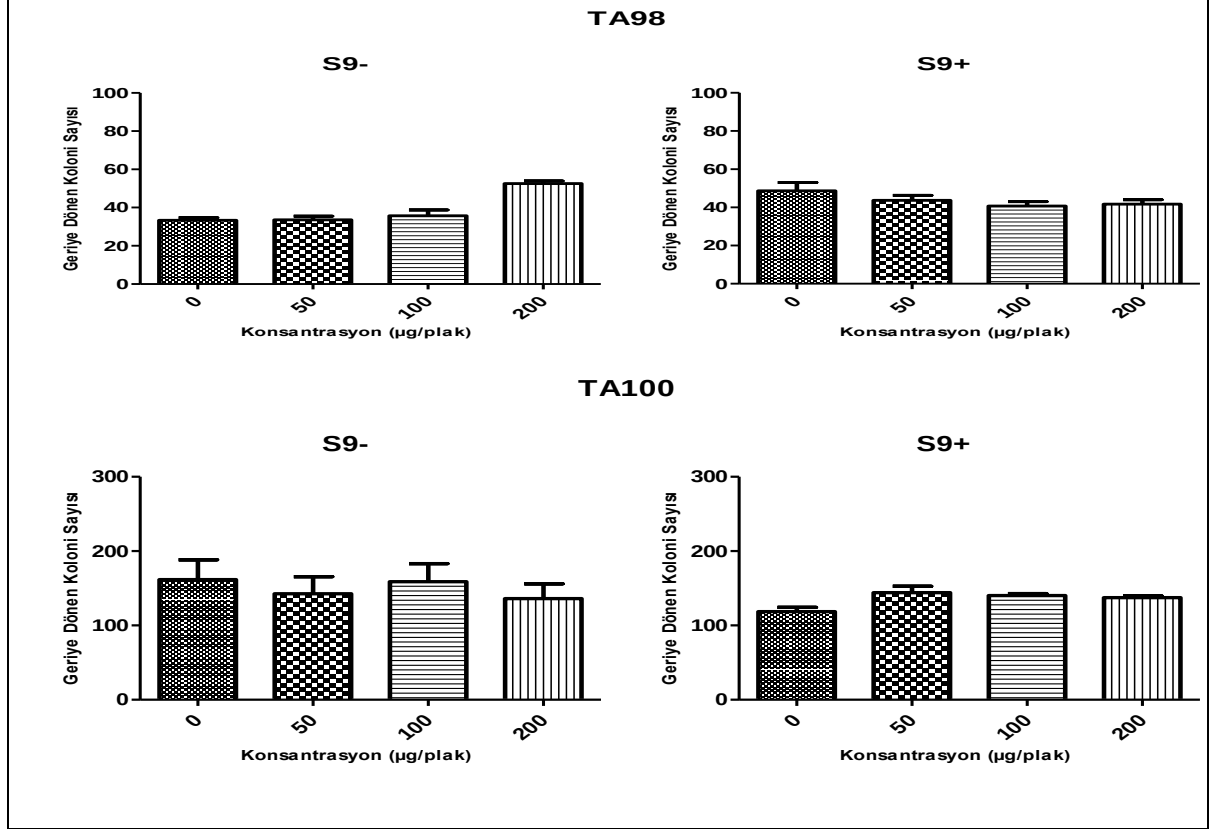
BS10 bileşiğinin, TA100 suşunda hem S9 varlığında hem de yokluğunda ve TA98 suşunda S9 varlığında denenen tüm dozlarının (50, 100, 200 µg/plak) kontrole karşı anlamlı bir fark yaratmadığı gözlenirken ($p>0.05$); TA98 suşunda, S9 yokluğunda 100, 200 µg/plak dozlarında anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p<0.05$). Regresyon model kestirim analizlerinden elde edilen bulgular sonucunda, BS10 bileşiğinin S9 yokluğunda 156 µg/plak dozunda TA98 suşunda çerçeve kayması mutasyonuna neden olduğu saptanmıştır.

BS12, BS13, BS16 ve BS17 bileşiklerinin ise metabolik aktivasyon sistemi varlığında ve yokluğunda, hem *S. typhimurium* TA98 suşu hem de *S. typhimurium* TA100 suşu üzerinde denenen tüm dozları, geriye dönen koloni sayısı açısından kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, istatistiksel bakımdan yüksek anlamlı bir

farklılık göstermiştir ($p<0.001$). Dolayısıyla bu 4 bileşiğin hem metabolik aktivasyon varlığında, hem de yokluğunda her iki suşta çok güçlü mutajenik etki gösterdiği saptanmıştır. Regresyon model kestirim analizlerinden elde edilen bulgular sonucunda, metabolik aktivasyon sistemi yokluğunda, TA98 suşunda **BS12** bileşiğinin 33 µg/plak, **BS13** bileşiğinin 4.4 µg/plak, **BS16** bileşiğinin 55 µg/plak, **BS17** bileşiğinin 9 µg/plak dozunda çerçeve kayması mutasyonuna sebep olduğu, TA100 suşunda **BS12** bileşiğinin 2.5 µg/plak, **BS13** bileşiğinin 0.85 µg/plak, **BS16** bileşiğinin 1.6 µg/plak ve **BS17** bileşiğinin 0.075 µg/plak dozlarından başlayarak baz çifti değişimi mutasyonuna sebep olduğu, metabolik aktivasyon varlığında ise, TA98 suşunda **BS12** bileşiğinin 45 µg/plak, **BS13** bileşiğinin 5.5 µg/plak, **BS16** bileşiğinin 95 µg/plak, **BS17** bileşiğinin 6 µg/plak dozundan başlayarak çerçeve kayması mutasyonuna sebep olduğu, TA100 suşunda; **BS12** bileşiğinin 3 µg/plak, **BS13** bileşiğinin 0.58 µg/plak, **BS16** bileşiğinin 3.5 µg/plak ve **BS17** bileşiğinin 0.95 µg/plak dozlarından başlayarak baz çifti değişimi mutasyonuna sebep olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.35. BS1 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi

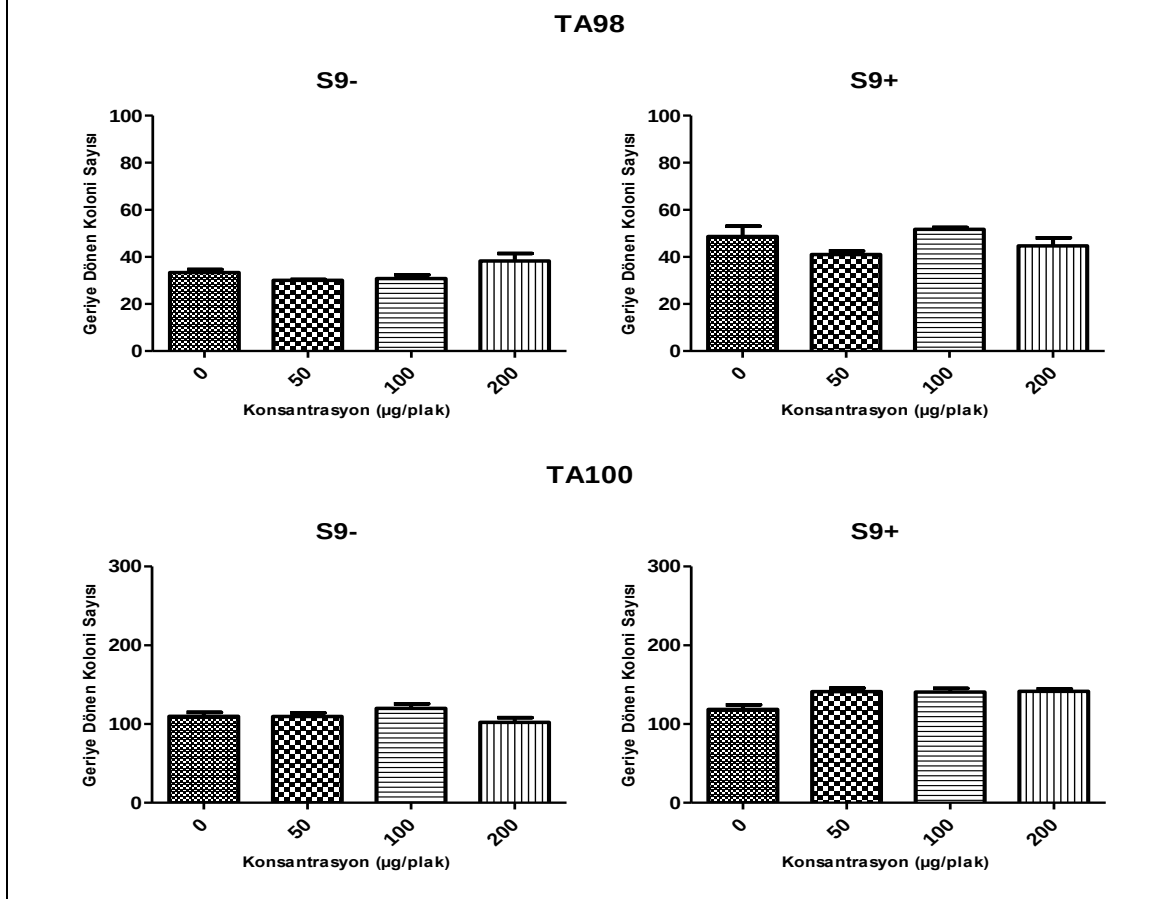
Doz (µg/plak)	Geriye Döner Koloni Sayısı±Standart Sapma (n=6)			
	TA98		TA100	
	S9-	S9+	S9-	S9+
0	33±3	49±8	162±66	119±10
50	34±4	44±5	143±57	144±15
100	36±7	41±4	159±59	140±5
200	53±4*	42±4	136±49	137±4
Sodyum azid (1,5 µg/plak)	-	-	> 1000	-
Danomisin (6 µg/plak)	155±29	-	-	-
2-Aminofloren (50µg/plak)	-	1105±210	-	1287±188



*Dunn's çoklu karşılaştırma testine göre anlamlı farklılığı yaratan grup (p<0.05)

Çizelge 4.36. BS2 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi

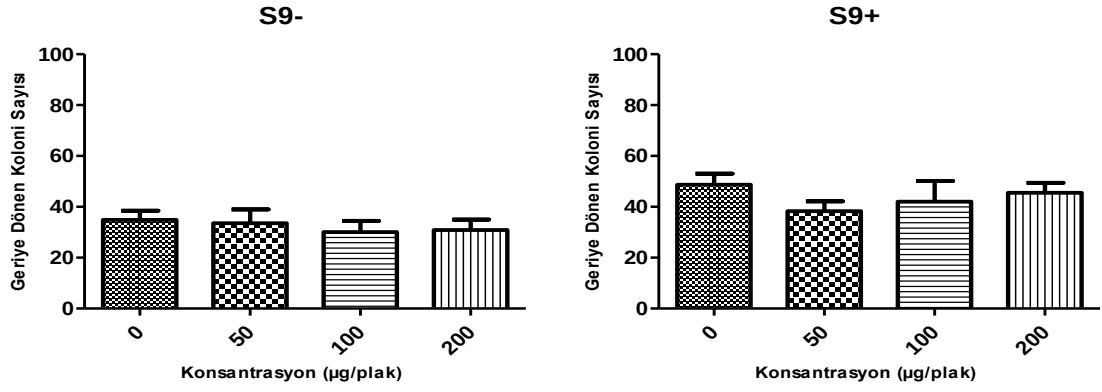
Doz (µg/plak)	Geriye Dönen Koloni Sayısı±Standart Sapma (n=6)			
	TA98		TA100	
	S9-	S9+	S9-	S9+
0	34±4	49±8	110±13	119±10
50	30±1	41±3	110±12	141±8
100	31±4	52±2	120±15	141±8
200	38±8	45±6	102±15	142±5
Sodyum azid (1,5 µg/plak)	-	-	> 1000	-
Danomisin (6 µg/plak)	155±29	-	-	-
2-Aminofloren (50 µg/plak)	-	1105±210	-	1287±188



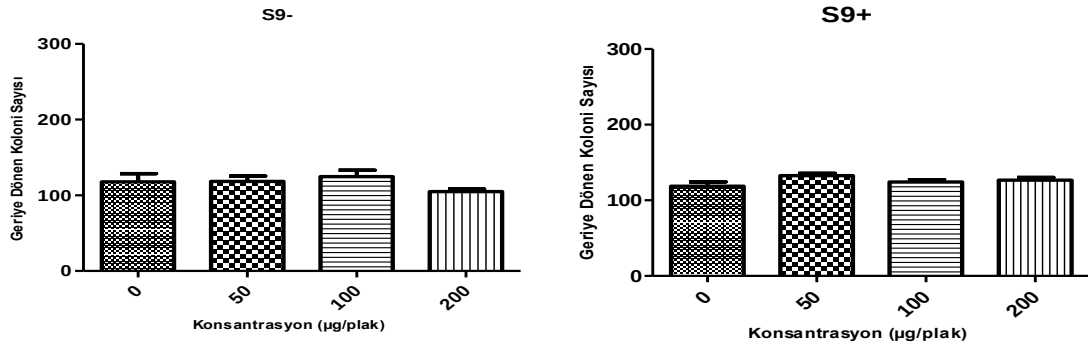
Çizelge 4.37. BS3 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi

Doz (µg/plak)	Geriye Dönen Koloni Sayısı±Standart Sapma (n=6)			
	TA98		TA100	
	S9-	S9+	S9-	S9+
0	35±9	49±2	118±27	119±10
50	34±13	38±7	118±17	132,67
100	30±11	42±14	125±21	124±5
200	31±10	46±8	105±8	127±5
Sodyum azid (1,5 µg/plak)	-	-	> 1000	-
Danomisin (6 µg/plak)	276±37	-	-	-
2-Aminofloren (50 µg/plak)	-	1105±210	-	1287±188

TA98

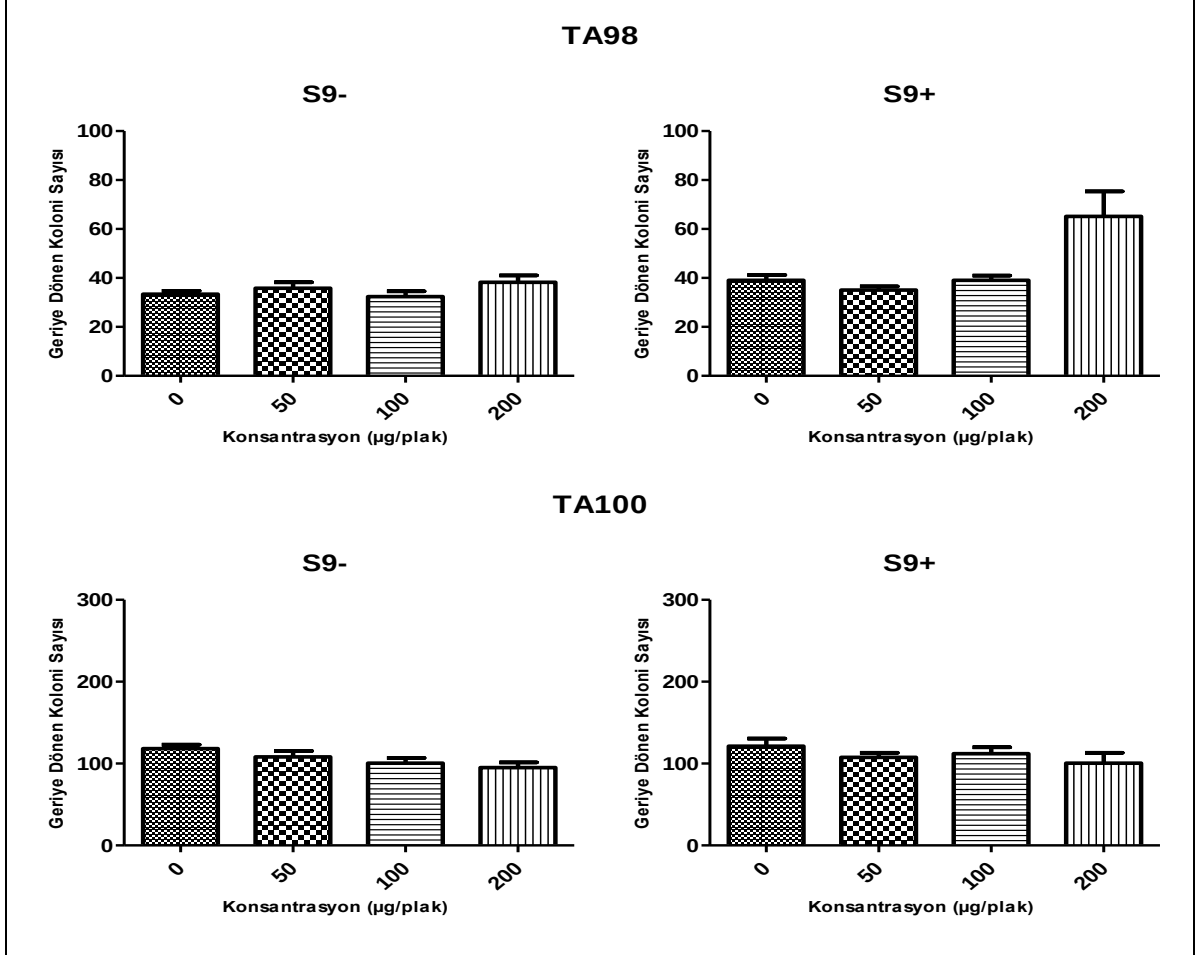


TA100



Çizelge 4.38. BS4 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi

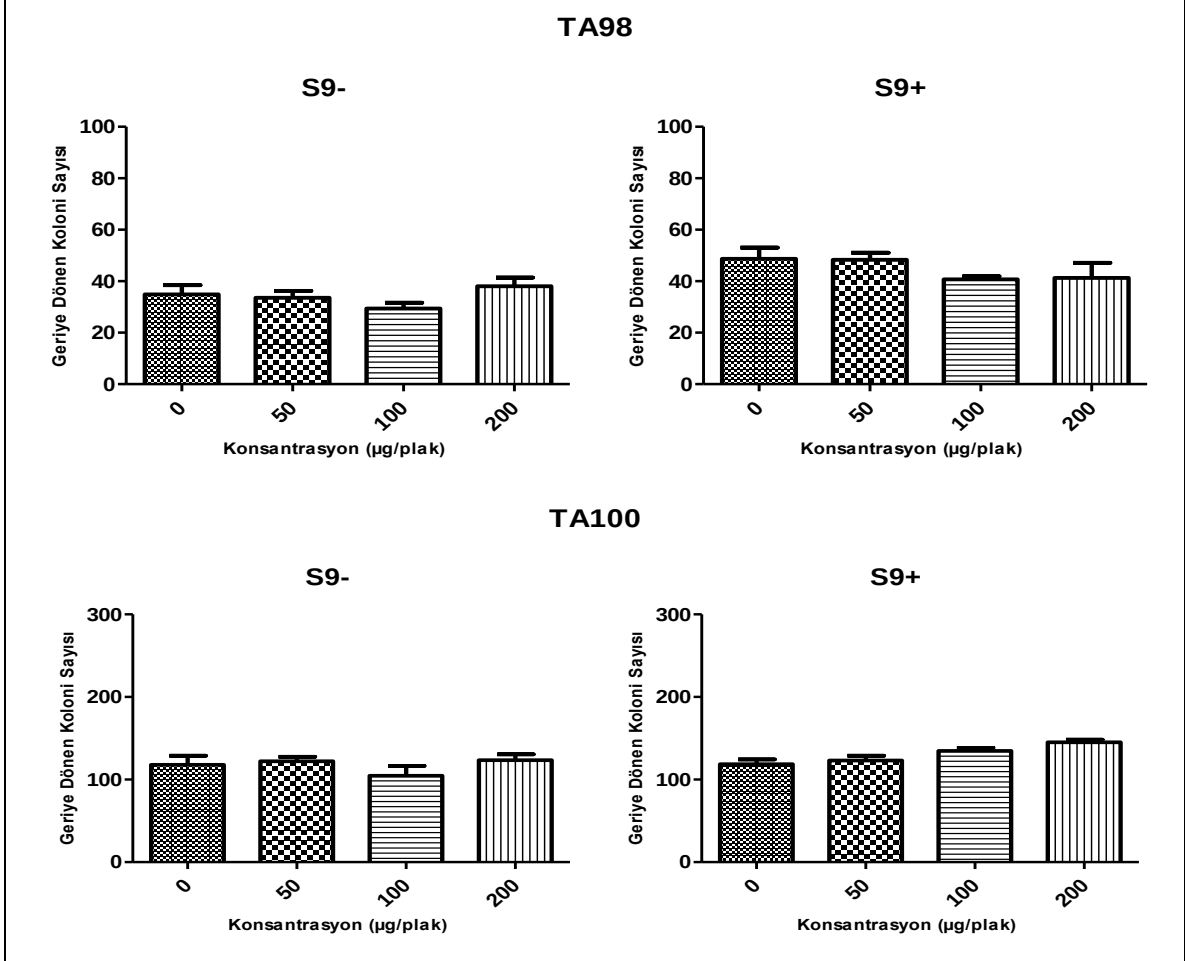
Doz µg/plak	Geriye Dönen Koloni Sayısı±Standart Sapma (n=6)			
	TA98		TA100	
	S9-	S9+	S9-	S9+
0	33±4	39±5	118±13	121±20
50	36±5	35±3	108±18	108±9
100	33±5	39±4	100±16	112±13
200	38±7	66±25*	96±15	100±22
Sodyum azid (1,5 µg/plak)	-	-	> 1000	-
Danomisin (6 µg/plak)	155±29	-	-	-
2-Aminofloren (50 µg/plak)	-	1105±210	-	1287±188



*Dunn's çoklu karşılaştırma testine göre anlamlı farklılığı yaratan grup (p<0.05)

Çizelge 4.39. BS5 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi

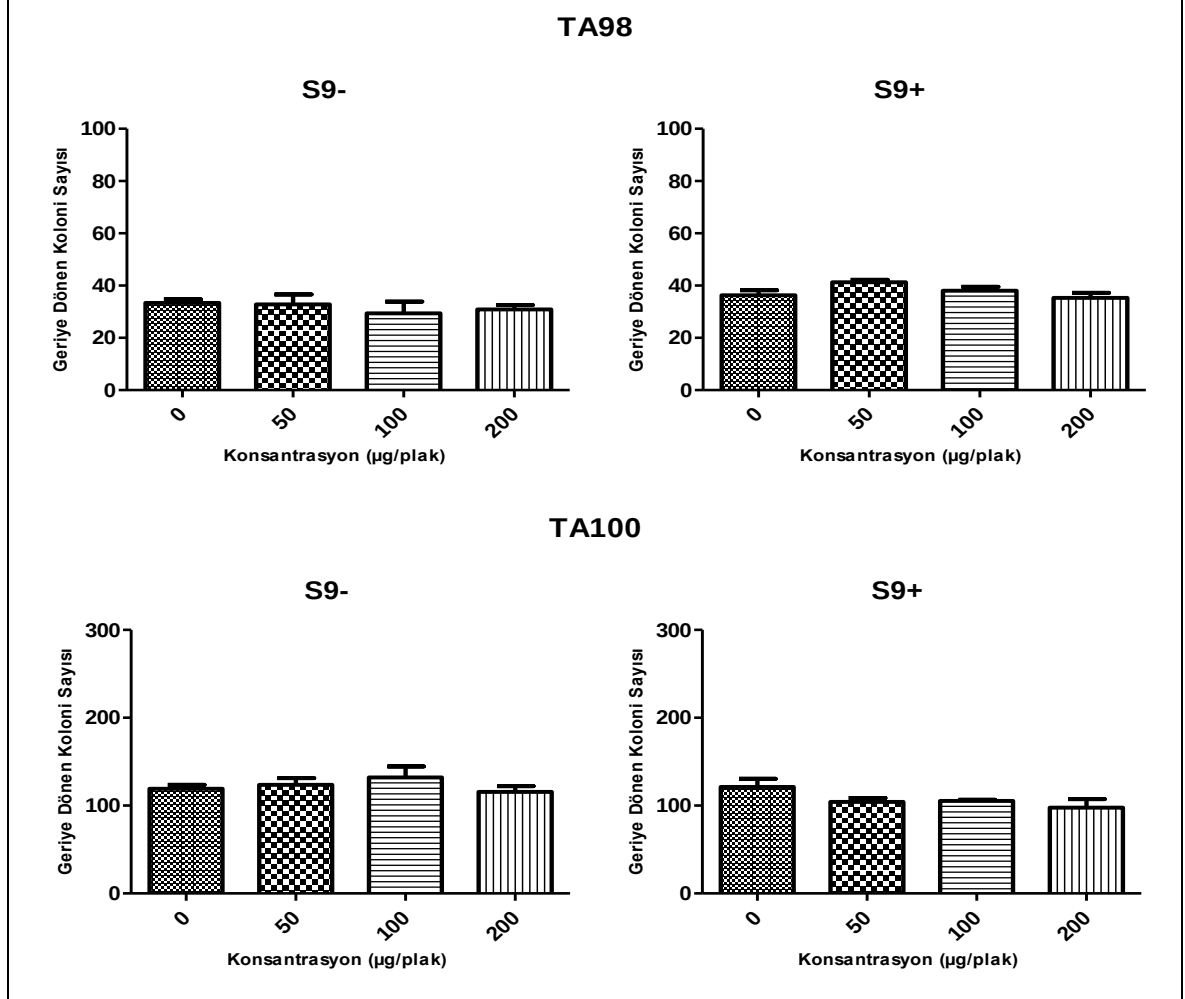
Doz µg/plak	Geriye Döner Koloni Sayısı±Standart Sapma (n=6)			
	TA98		TA100	
	S9-	S9+	S9-	S9+
0	35±10	49±8	118±27	119±10
50	34±7	48±5	122±13	123±10
100	29±6	41±2	105±30	135±6
200	38±8	41±10	124±16	145±6*
Sodyum azid (1,5 µg/plak)	-	-	> 1000	-
Danomisin (6 µg/plak)	166± 39	-	-	-
2-Aminofloren (50 µg/plak)	-	1105±210	-	1287±188



*Dunn's çoklu karşılaştırma testine göre anlamlı farklılığı yaratan grup (p<0.05)

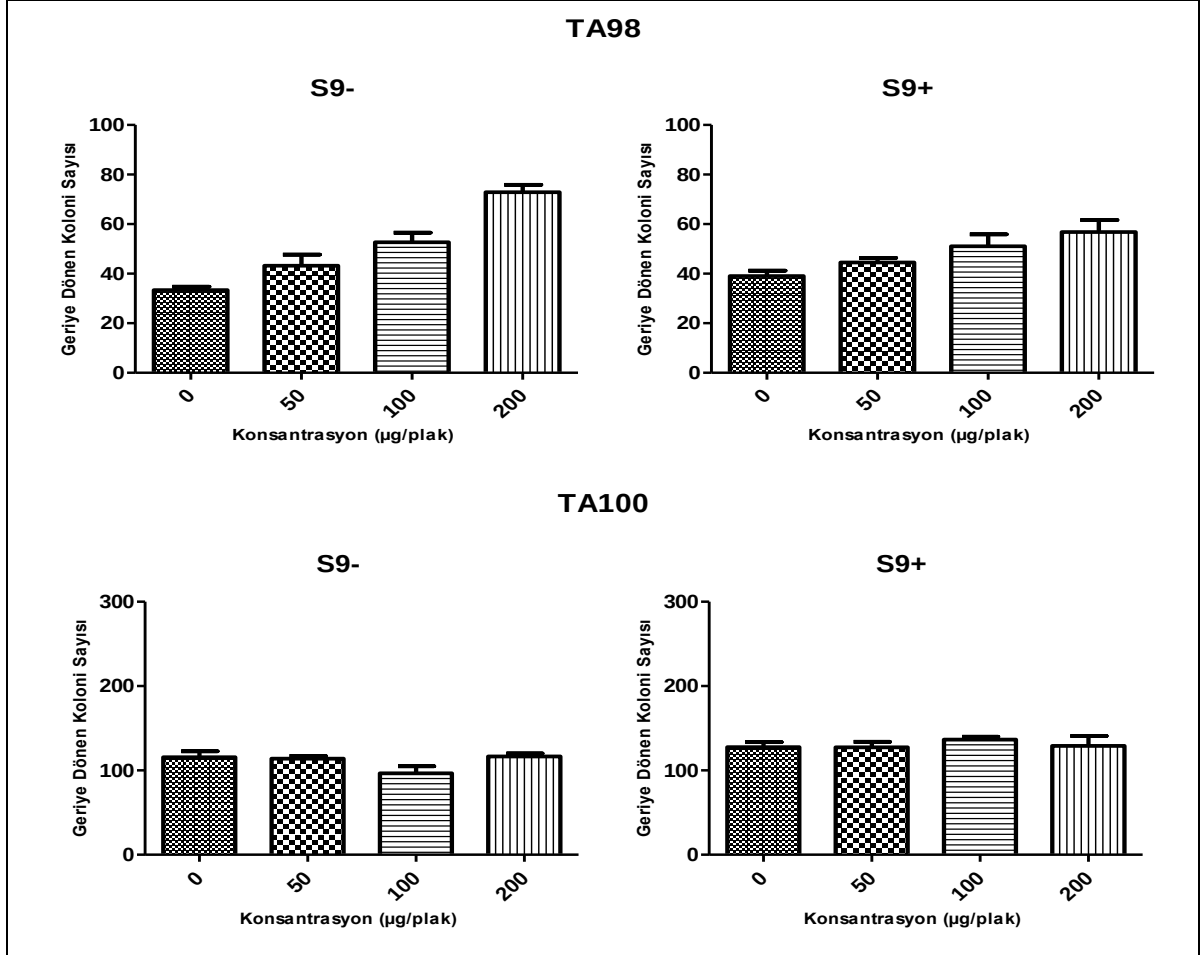
Çizelge 4.40. BS6 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi

Doz µg/plak	Geriye Dönen Koloni Sayısı±Standart Sapma (n=6)			
	TA98		TA100	
	S9-	S9+	S9-	S9+
0	33±4	36±3	120±13	121±19
50	33±8	41±2	124±19	104±8
100	29±10	38±3	122±21	105±2
200	31±4	35±3	116±16	98±17
Sodyum azid (1,5 µg/plak)	-	-	> 1000	-
Danomisin (6 µg/plak)	166± 39	-	-	-
2-Aminofloren (50 µg/plak)	-	1105±210	-	1287±188



Çizelge 4.41. BS7 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi

Doz µg/plak	Geriye Dönen Koloni Sayısı±Standart Sapma (n=6)			
	TA98		TA100	
	S9-	S9+	S9-	S9+
0	33±4	39±5	116±17	128±16
50	43±10*	45±4	114±9	127±16
100	53±9*	51±12*	96±21	137±8
200	73±7*	57±12*	117±11	129±29
Sodyum azid (1,5 µg/plak)	-	-	> 1000	-
Danomisin (6 µg/plak)	309 ± 40	-	-	-
2-Aminofloren (50 µg/plak)	-	1105±210	-	1287±188

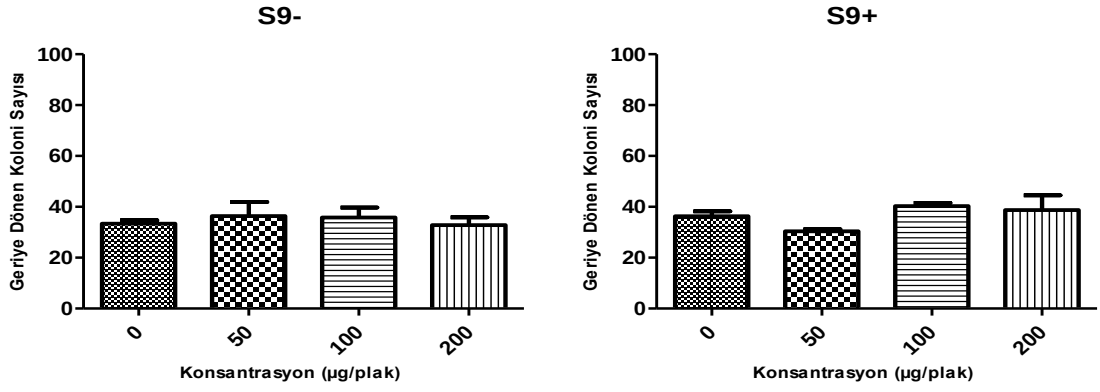


*Dunn's çoklu karşılaştırma testine göre anlamlı farklılığı yaratan grup (p<0.05)

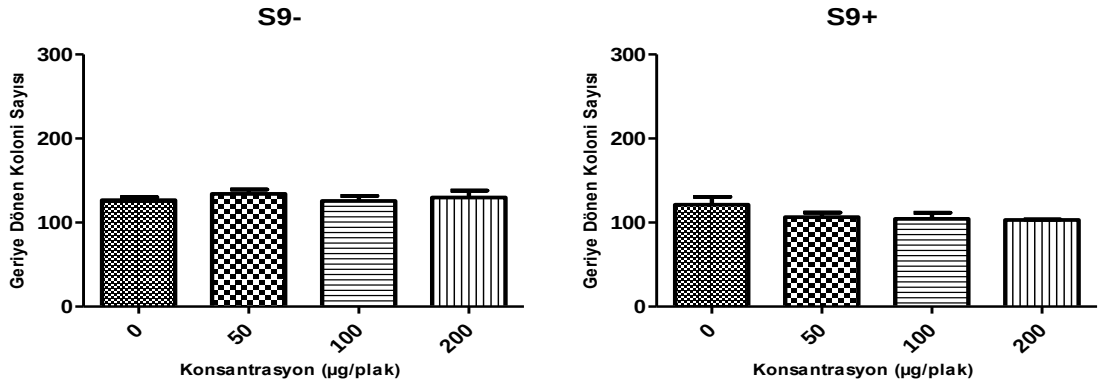
Çizelge 4.42. BS8 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi

Doz µg/plak	Geriye Dönen Koloni Sayısı±Standart Sapma (n=6)			
	TA98		TA100	
	S9-	S9+	S9-	S9+
0	33±4	36±3	127±9	121±19
50	36 ±12	30±2	134±13	106±9
100	36±9	40±2	126±15	104±13
200	33±7	39±10	129±19	103±1
Sodyum azid (1,5 µg/plak)	-	-	> 1000	-
Danomisin (6 µg/plak)	166±39	-	-	-
2-Aminofloren (50 µg/plak)	-	1105±210	-	1287±188

TA98



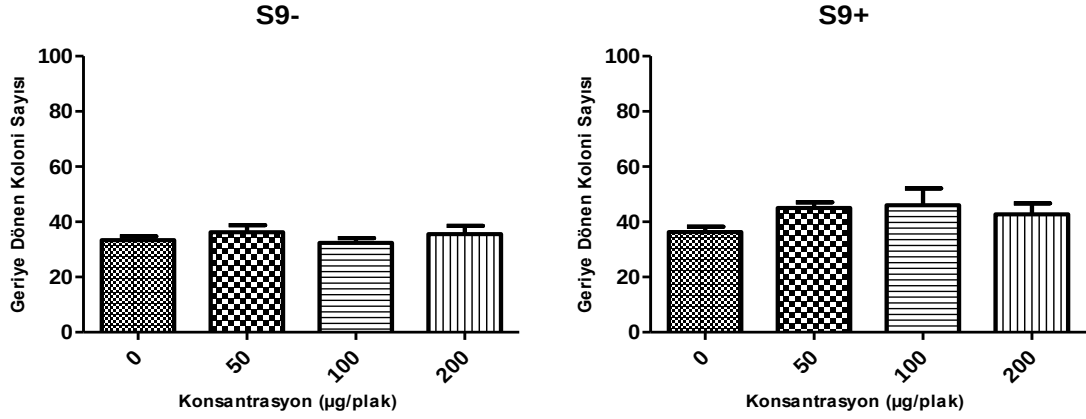
TA100



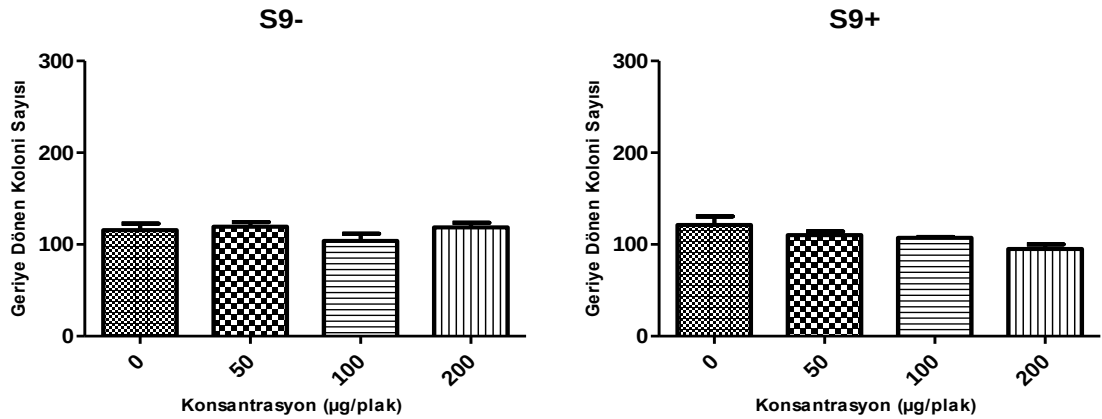
Çizelge 4.43. BS9 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi

Doz µg/plak	Geriye Dönen Koloni Sayısı±Standart Sapma (n=6)			
	TA98		TA100	
	S9-	S9+	S9-	S9+
0	33±3	36±3	116±17	121±19
50	36±5	45±4	119±11	110±7
100	32±4	46±11	104±18	107±2
200	35±7	43±7	119±11	95±9
Sodyum azid (1,5 µg/plak)	-	-	> 1000	-
Danomisin (6 µg/plak)	155±29	-	-	-
2-Aminofloren (50 µg/plak)	-	1105±210	-	1287±188

TA98

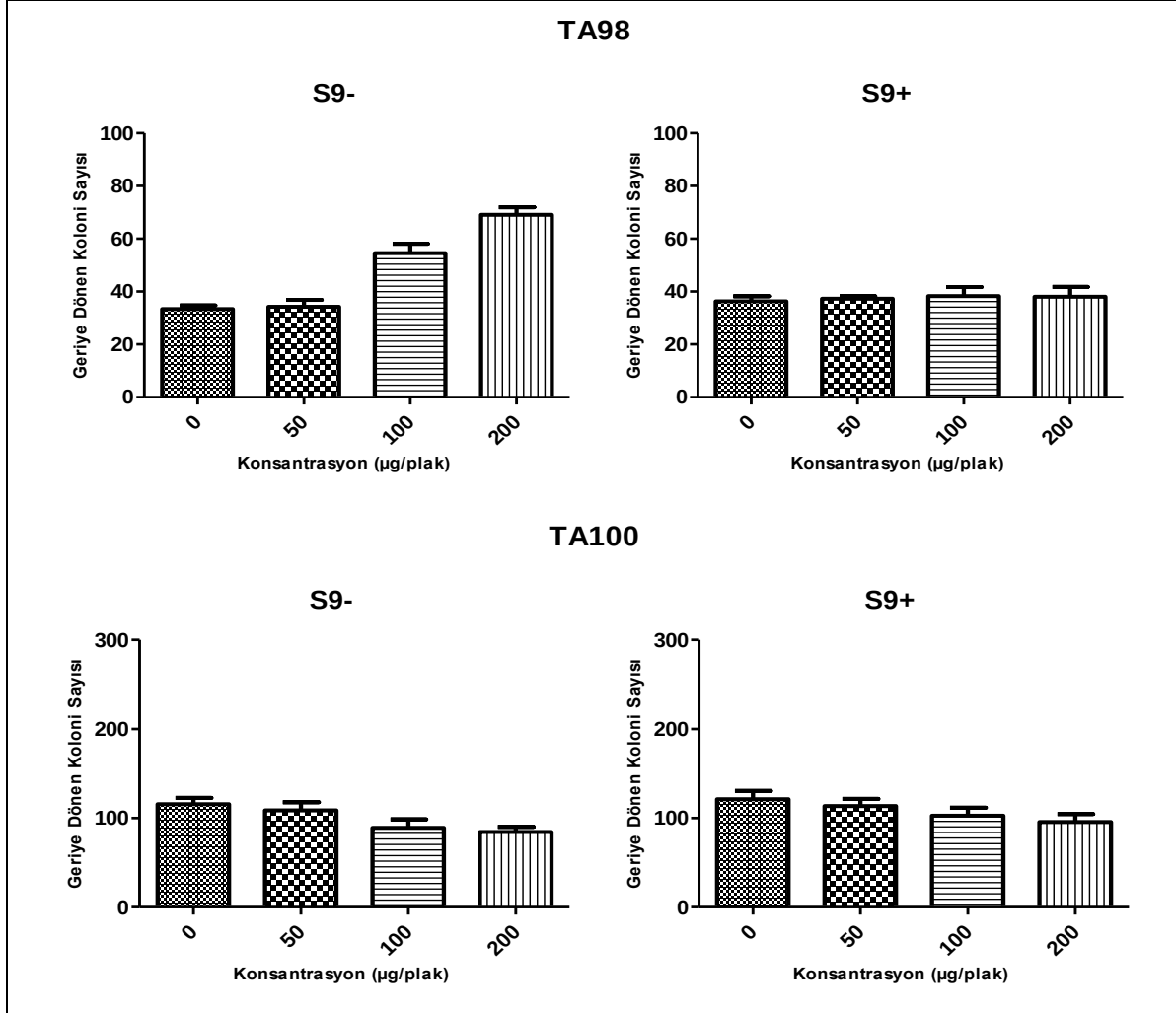


TA100



Çizelge 4.44. BS10 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi

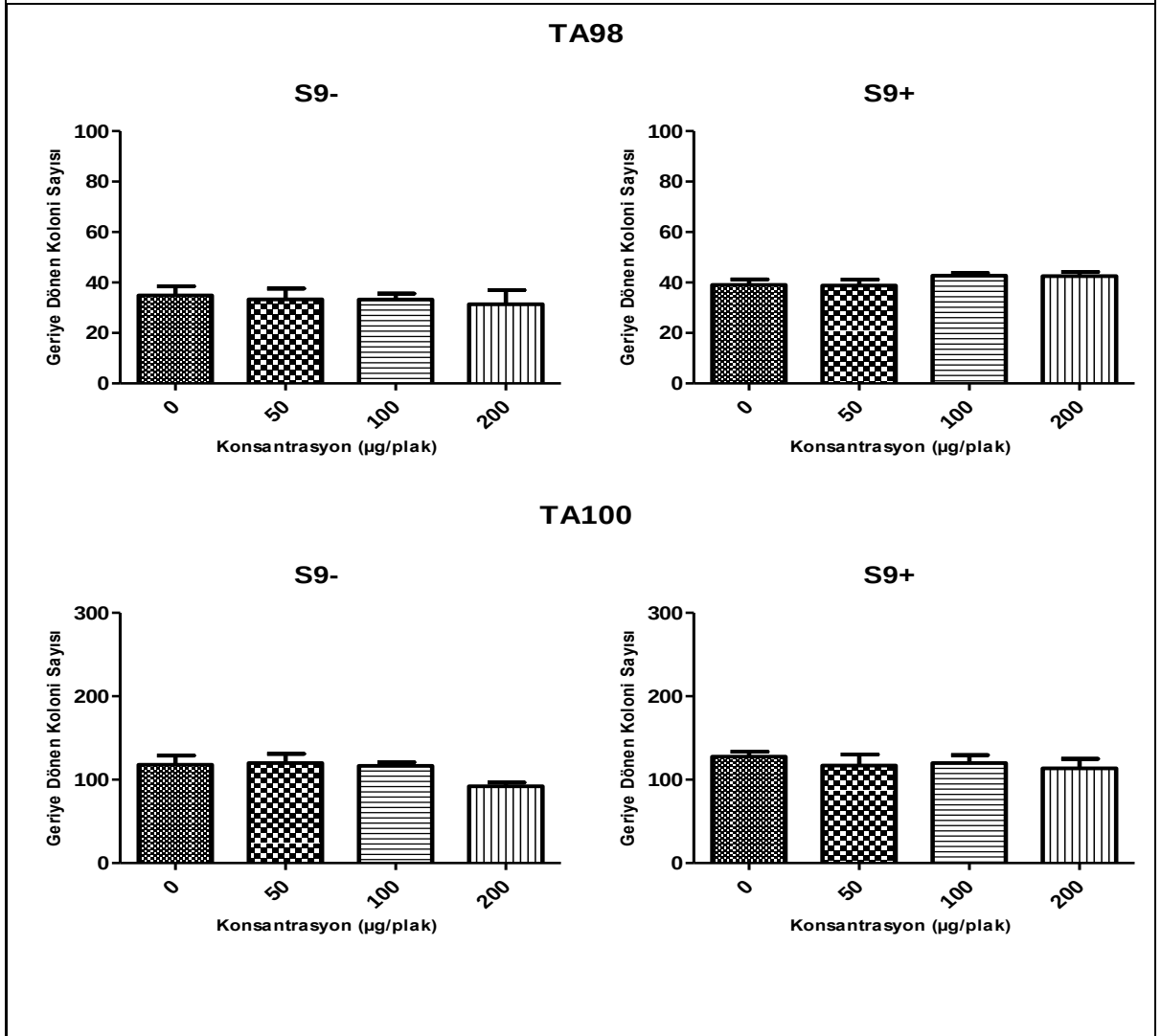
Doz µg/plak	Geriye Dönen Koloni Sayısı±Standart Sapma (n=6)			
	TA98		TA100	
	S9-	S9+	S9-	S9+
0	33±4	36±3	116±17	121±19
50	34±6	37±2	109±23	114±14
100	54±9*	38±6	89±23	103±15
200	69±7*	38±6	84±14	96±16
Sodyum azid (1,5 µg/plak)	-	-	> 1000	-
Danomisin (6 µg/plak)	155±29	-	-	-
2-Aminofloren (50 µg/plak)	-	1105±210	-	1287±188



*Dunn's çoklu karşılaştırma testine göre anlamlı farklılığı yaratan grup (p<0.05)

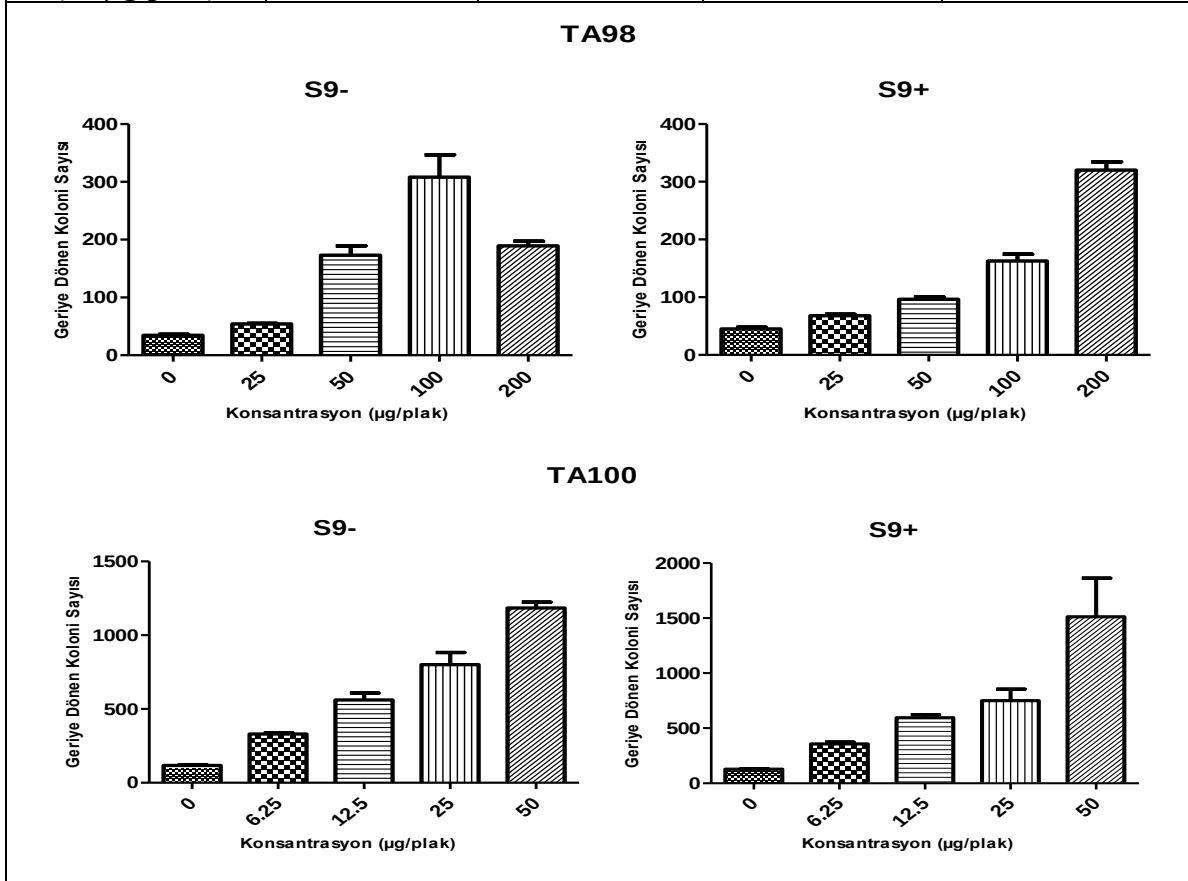
Çizelge 4.45. BS11 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi

Doz µg/plak	Geriye Dönen Koloni Sayısı±Standart Sapma (n=6)			
	TA98		TA100	
	S9-	S9+	S9-	S9+
0	35±9	39±5	118±27	128±16
50	33±10	39±6	120±22	117±32
100	33±6	42±2	117±10	119±23
200	31±14	42±4	92±10	114±28
Sodyum azid (1,5 µg/plak)	-	-	> 1000	-
Danomisin (6 µg/plak)	310± 40,2	-	-	-
2-Aminofloren (50µg/plak)	-	1105±210	-	1287±188



Çizelge 4.46. BS12 bileşiminin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi

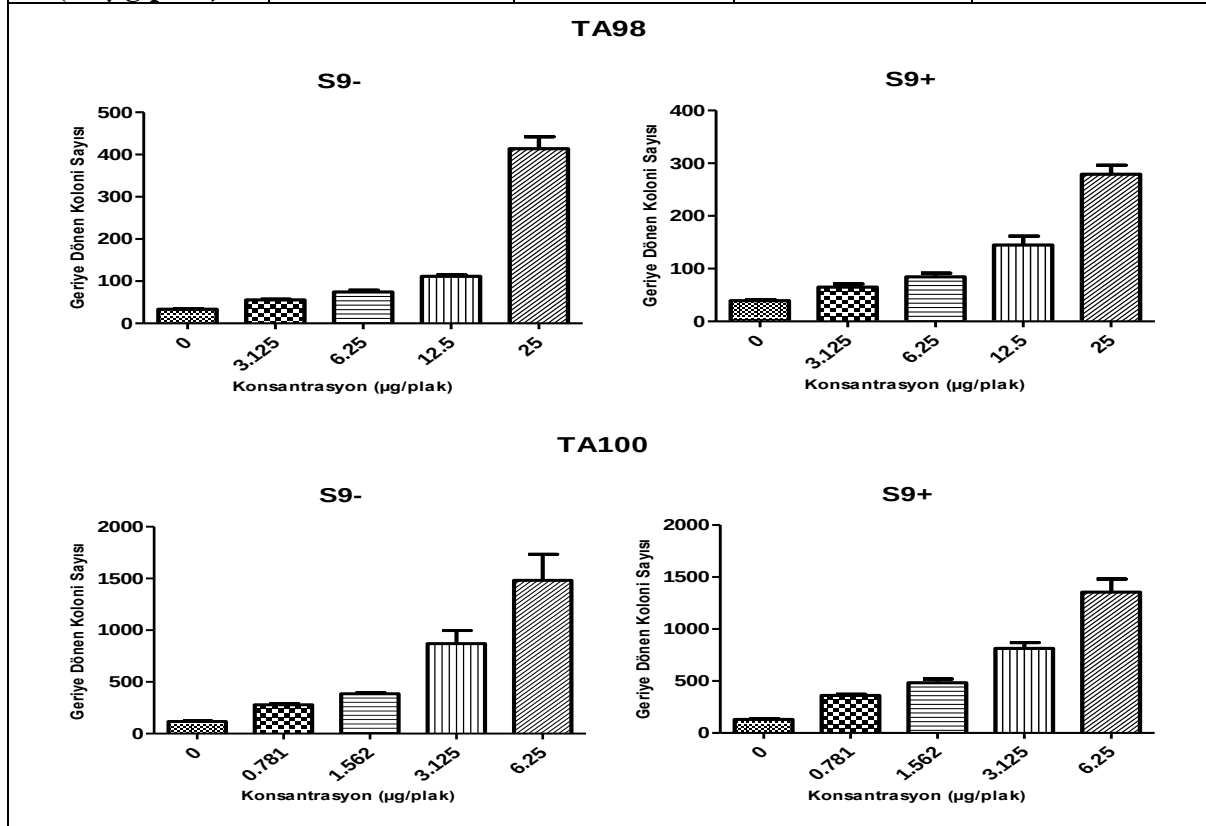
Doz µg/plak	Geriye Döner Koloni Sayısı±Standart Sapma (n=6)			
	TA98		TA100	
	S9-	S9+	S9-	S9+
0	34±5	45±7	118±13	127±12
6,25			331±14*	358±39*
12,5			561±81*	595±68*
25	54±23*	68±6,*	800±144*	750±256*
50	173±39*	97±10*	1184±71*	1512±856*
100	343±48*	163±29*	2580±174*	
200	189±14*	320±35*		
Sodyum azid (1,5 µg/plak)	-	-	> 1000	-
Danomisin (6 µg/plak)	155±29	-	-	-
2-Aminofloren (50 µg/plak)	-	1105±210	-	1287±188



*Dunn's çoklu karşılaştırma testine göre anlamlı farklılığı yaratan grup (p<0.05)

Çizelge 4.47. BS13 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi

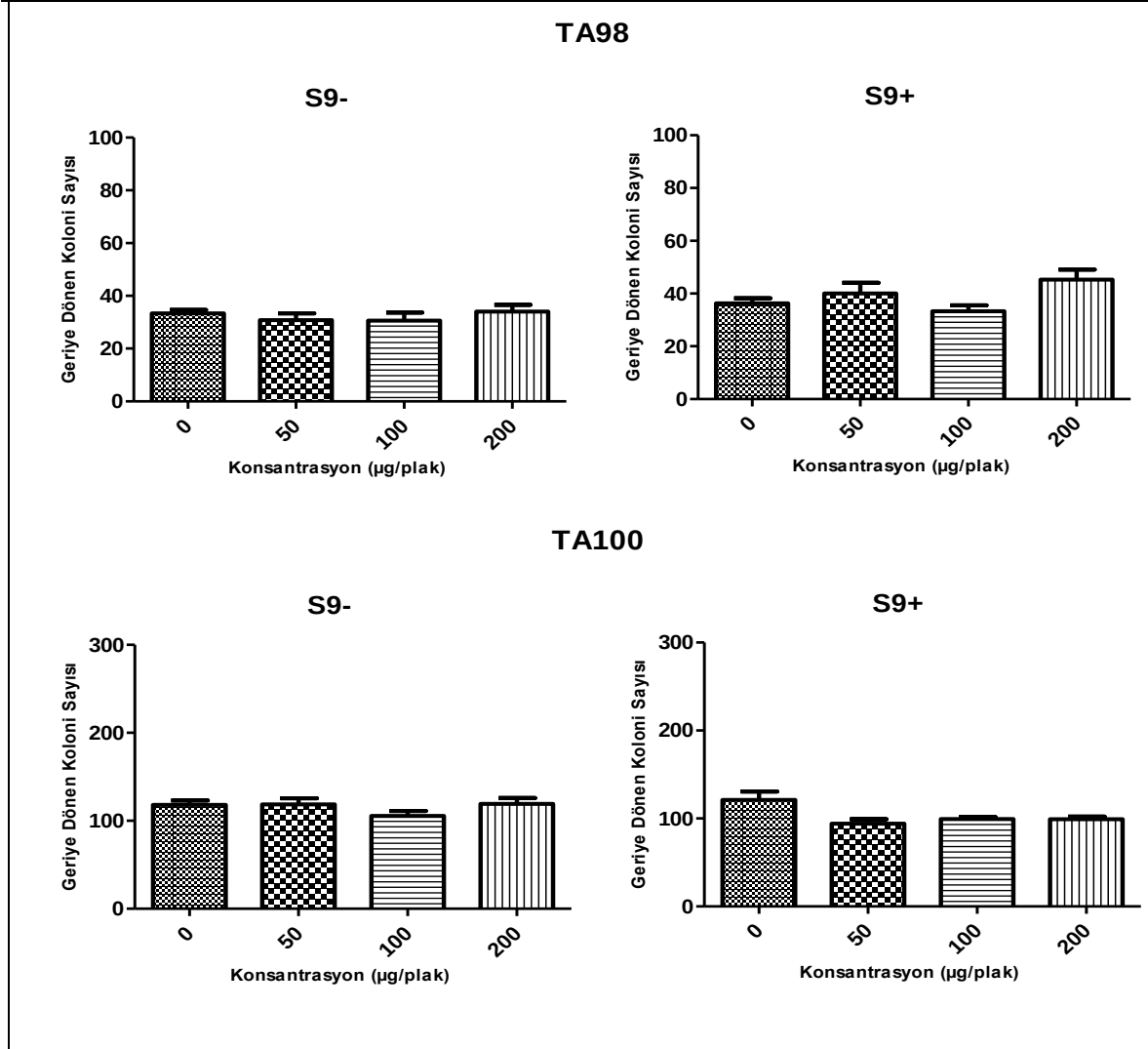
Doz µg/plak	Geriye Dönen Koloni Sayısı±Standart Sapma (n=6)			
	TA98		TA100	
	S9-	S9+	S9-	S9+
0	33±4	39±5	115±9	132±14
0,78			279±25*	361±20*
1,56			368±21*	484±84*
3,12	56±6*	65±13*	871±311*	815±138*
6,25	76±12*	85±16*	1483±616*	1356±307*
12,5	111±9*	145±41*	2572±153*	1627±110*
25	414±49*	279±42*	5831±624*	
50	329±57*			
100	584±136*			
200	1427±280*			
Sodyum azid (1,5 µg/plak)	-	-	> 1000	-
Danomisin (6 µg/plak)	155±29	-	-	-
2-Aminofloren (50 µg/plak)	-	1105±210	-	1287±188



*Dunn's çoklu karşılaştırma testine göre anlamlı farklılığı yaratan grup (p<0.05)

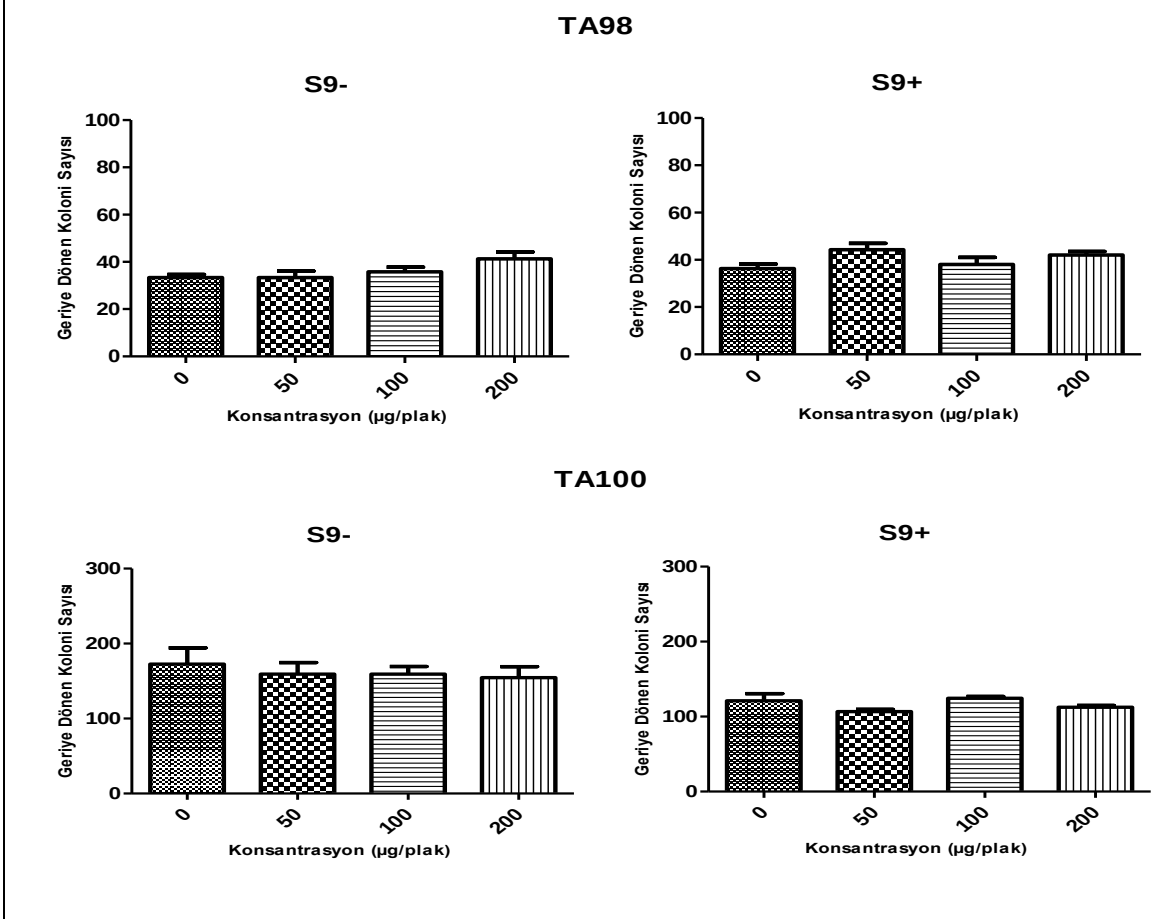
Çizelge 4.48. BS14 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi

Doz µg/plak	Geriye Dönen Koloni Sayısı±Standart Sapma (n=6)			
	TA98		TA100	
	S9-	S9+	S9-	S9+
0	33±4	36±3	118±13	121±19
50	31±6	40±7	119±17	94±8,8
100	35±4	33±4	106±14	99±4
200	34±6	45±6	119±17	99±6
Sodyum azid (1,5 µg/plak)	-	-	> 1000	-
Danomisin (6 µg/plak)	155±29	-	-	-
2-Aminofloren (50 µg/plak)	-	1105±210	-	1287±188



Çizelge 4.49. BS15 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi

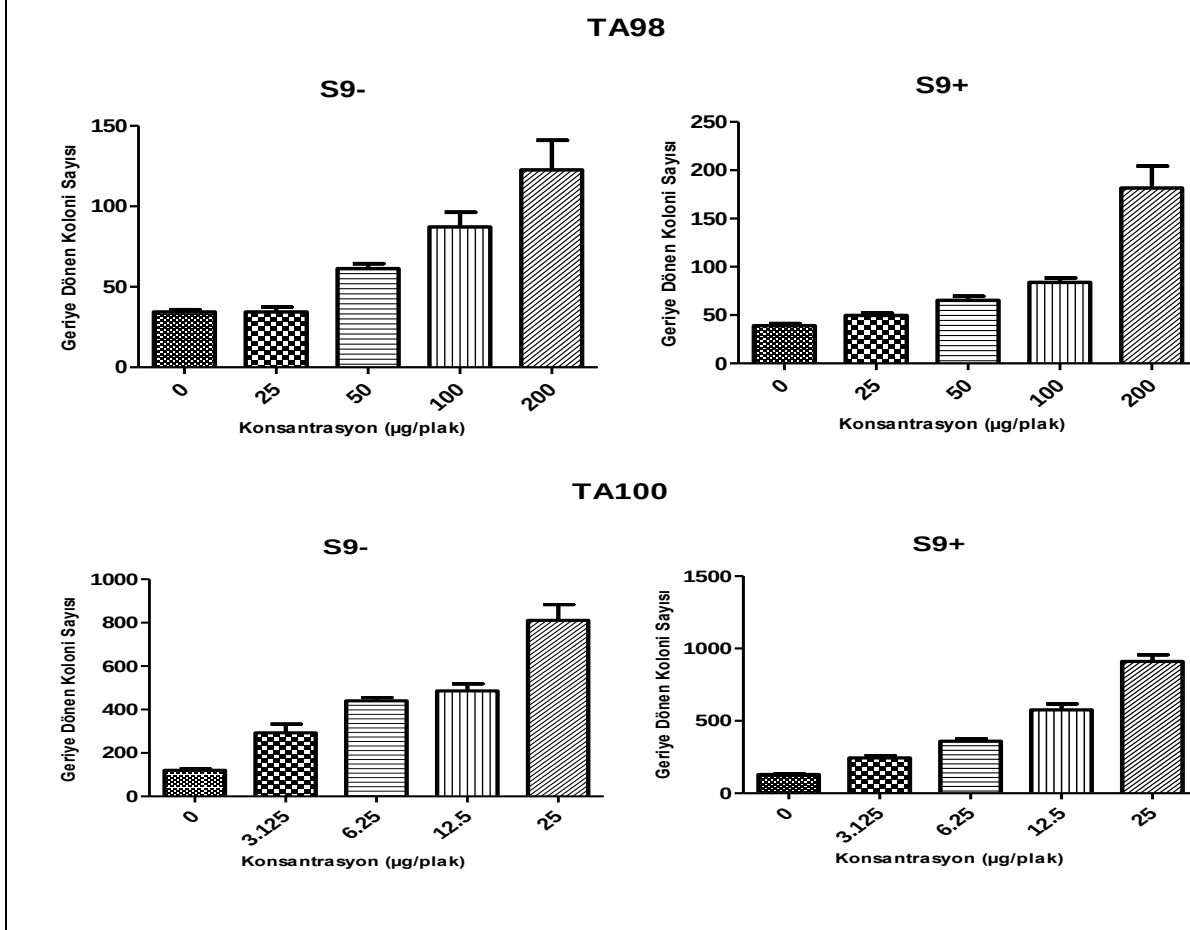
Doz µg/plak	Geriye Döner Koloni Sayısı±Standart Sapma (n=6)			
	TA98		TA100	
	S9-	S9+	S9-	S9+
0	32±3	36±3	173±54	121±10
50	33±6	44±5	159±38	107±5
100	34±8	38±5	160±25	124±5
200	42±7*	42±3	155±36	112±5
Sodyum azid (1,5 µg/plak)	-	-	> 1000	-
Danomisin (6 µg/plak)	155±29	-	-	-
2-Aminofloren (50 µg/plak)	-	1105±210	-	1287±188



*Dunn's çoklu karşılaştırma testine göre anlamlı farklılığı yaratan grup (p<0.05)

Çizelge 4.50. BS16 bileşiminin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi

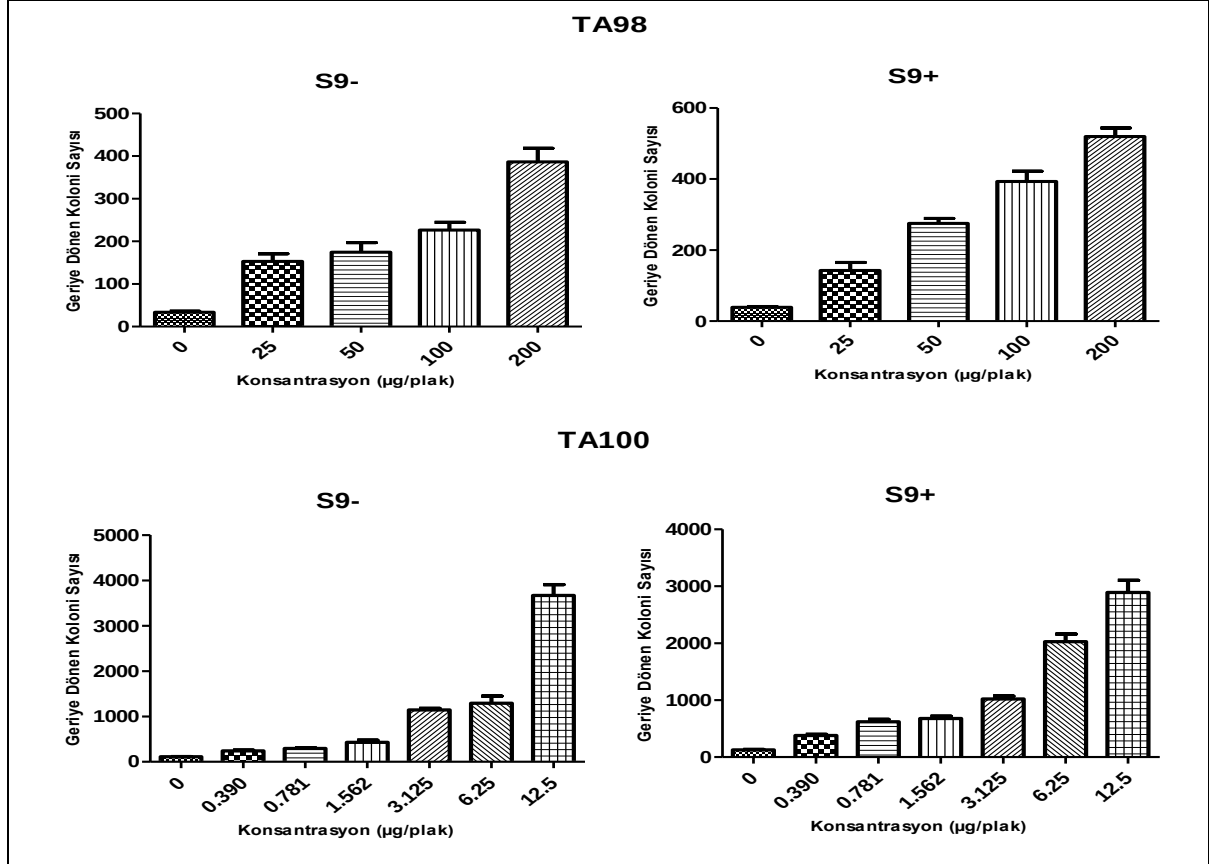
Doz µg/plak	Geriye Dönen Koloni Sayısı±Standart Sapma (n=6)			
	TA98		TA100	
	S9-	S9+	S9-	S9+
0	34±4	39±5	120±20	129±13
3,12			293±90*	244±39*
6,25			441±34*	359±42*
12,5			486±81*	576±100*
25	34±6	50±7*	743±66*	910±114*
50	62±8*	66±9*	1777±663*	
100	87±22*	84±11*	3150±593*	
200	123±32*	182±56*		
Sodyum azid (1,5 µg/plak)	-	-	> 1000	-
Danomisin (6 µg/plak)	310 ± 40	-	-	-
2-Aminofloren (50 µg/plak)	-	1105±210	-	1287±188



*Dunn's çoklu karşılaştırma testine göre anlamlı farklılığı yaratan grup (p<0.05)

Çizelge 4.51. BS17 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi

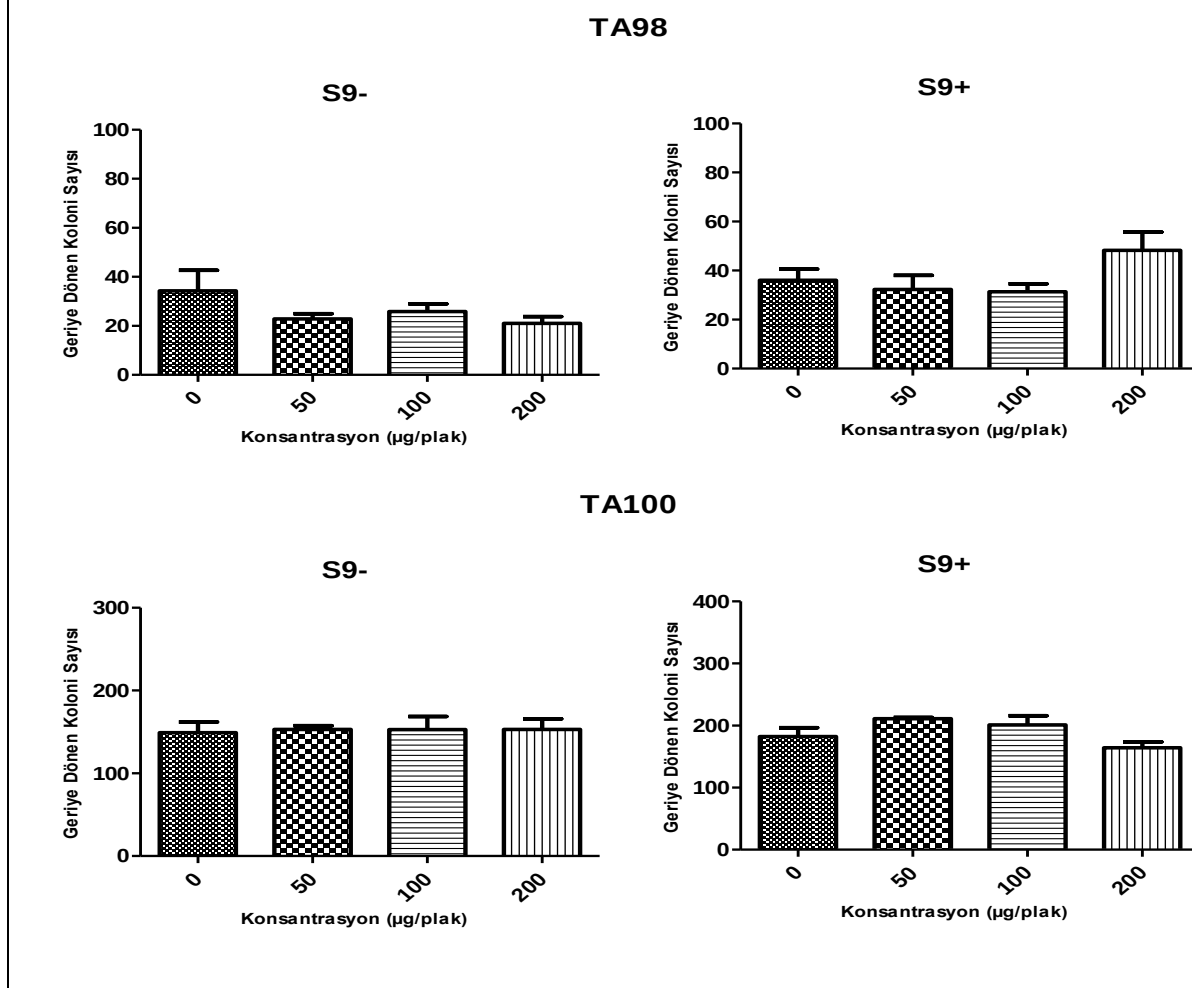
Doz µg/plak	Geriye Dönen Koloni Sayısı±Standart Sapma (n=6)			
	TA98		TA100	
	S9-	S9+	S9-	S9+
0	34±6	39±5	107±19	128±16
0,39			240±31*	
0,78			293±24*	
1,56			428±100*	677±98*
3,12			1143±60*	1021±128*
6,25			1289±271*	2029±229*
12,5			3667±416*	2892±371*
25	153±44*	143±56*	5383±226*	
50	175±55*	275±37*	7117±1750*	
100	227±45*	393±77*	7110±1977*	
200	387±79*	520±48*	8422±896*	
Sodyum azid (1,5 µg/plak)	-	-	> 1000	-
Danomisin (6 µg/plak)	310±40	-	-	-
2-Aminofloren (50 µg/plak)	-	1105±210	-	1287±188



*Dunn's çoklu karşılaştırma testine göre anlamlı farklılığı yaratan grup (p<0.05)

Çizelge 4.52. BS18 bileşiğinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında geriye dönen koloni sayılarına etkisi

Doz µg/plak	Geriye Dönen Koloni Sayısı±Standart Sapma (n=6)			
	TA98		TA100	
	S9-	S9+	S9-	S9+
0	34±15	36±8	128±4	183±25
50	24±5	32±10	150±12	211±3
100	32±4	31±6	135±17	201±25
200	34±9	48±13*	127±18	164±17
Sodyum azid (1,5 µg/plak)	-	-	> 1000	-
Danomisin (6 µg/plak)	310± 40	-	-	-
2-Aminofloren (50 µg/plak)	-	1105±210	-	1287±188



*Dunn's çoklu karşılaştırma testine göre anlamlı farklılığı yaratan grup (p<0.05)

Çizelge 4.53. Benzoksazin türevlerinin TA98 suşundaki ANOVA ve Dunnett-C testine ait istatistik sonuçları

Kod	TA98									
	S9(-)					S9(+)				
	Varyans Homojenliği		Kontrol ve Doz grupları arasındaki fark			Varyans Homojenliği		Kontrol ve Doz grupları arasındaki fark		
			Anova		sonuç			Anova		sonuç
	p	sonuç	F	p		p	sonuç	F	p	
BS1	0.089	Homojen	22.141	0.0001	fark var*	0.684	Homojen	3.39	0.038	fark var
BS2	0.015	Homojen Değil	4.194^	0.043^	fark var	0.11	Homojen	4.204	0.018	fark var
BS3	0.77	Homojen	0.162	0.921	fark yok	0.483	Homojen	2.436	0.095	fark yok
BS4	0.278	Homojen	1.967	0.152	fark yok	0	Homojen Değil	6.535^	0.023^	fark var*
BS5	0.791	Homojen	1.285	0.307	fark yok	0.066	Homojen	3.487	0.035	fark var
BS6	0.363	Homojen	0.364	0.78	fark yok	0.004	Homojen Değil	13.846^	0.001^	fark var
BS7	0.274	Homojen	29.658	0	fark var*	0.032	Homojen Değil	4.34^	0.024^	fark var*
BS8	0.385	Homojen	0.434	0.731	fark yok	0.059	Homojen	3.513	0.034	fark var
BS9	0.425	Homojen	0.965	0.429	fark yok	0.599	Homojen	4.416	0.015	fark var
BS10	0.116	Homojen	43.267	0	fark var*	0.923	Homojen	0.352	0.788	fark yok
BS11	0.369	Homojen	0.057	0.981	fark yok	0.434	Homojen	1.254	0.317	fark yok
BS12	0.005	Homojen Değil	124.315^	0^	fark var***	0.004	Homojen Değil	165.017^	0^	fark var***
BS13	0.001	Homojen Değil	533.614^	0^	fark var***	0.005	Homojen Değil	72.377^	0^	fark var***
BS14	0.56	Homojen	0.392	0.76	fark yok	0.786	Homojen	5.121	0.009	fark var
BS15	0.559	Homojen	3.497	0.035	fark var*	0.386	Homojen	4.747	0.012	fark var
BS16	0.022	Homojen Değil	41.376^	0^	fark var***	0	Homojen Değil	28.793^	0^	fark var***
BS17	0.047	Homojen Değil	37.028^	0^	fark var***	0.001	Homojen Değil	91.443^	0^	fark var***
BS18	0.143	Homojen	3.873	0.025	fark var	0.955	Homojen	6.982	0.002	fark var*

^: KontrolXDoz grupları arasındaki farka ait Robust testine ait istatistiksel değerler

*: KontrolXDoz grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark (p<0.01)

***: KontrolXDoz grupları arasında istatistiksel açıdan güçlü anlamlı fark (p<0.001)

Çizelge 4.54. Benzoksazin türevlerinin TA100 suşundaki ANOVA ve Dunnett-C testine ait istatistik sonuçları

Kod	TA100									
	S9(-)					S9(+)				
	Varyans Homojenliği		Kontrol ve Doz grupları arasındaki fark			Varyans Homojenliği		Kontrol ve Doz grupları arasındaki fark		
			Anova		Sonuç			Anova		Sonuç
	p	Sonuç	F	p		p	Sonuç	F	p	
BS1	0.731	homojen	0.278	0.841	fark yok	0.319	homojen	7.343	0.002	fark var
BS2	0.914	homojen	1.671	0.205	fark yok	0.931	homojen	8.274	0.001	fark var
BS3	0.032	homojen değil	1.071^	0.392^	fark yok	0.568	homojen	3.429	0.037	fark var
BS4	0.349	homojen	1.91	0.16	fark yok	0.263	homojen	2.496	0.089	fark yok
BS5	0.032	homojen değil	0.888^	0.47^	fark yok	0.832	homojen	12.275	0	fark var*
BS6	0.142	homojen	0.705	0.56	fark yok	0.082	homojen	4.007	0.022	fark var
BS7	0.143	homojen	2.028	0.142	fark yok	0.082	homojen	0.342	0.795	fark yok
BS8	0.543	homojen	0.496	0.689	fark yok	0.52	homojen	3.559	0.033	fark var
BS9	0.615	homojen	1.71	0.197	fark yok	0.737	homojen	5.992	0.004	fark var
BS10	0.668	homojen	3.556	0.033	fark var	0.904	homojen	4.635	0.013	fark var
BS11	0.008	homojen değil	3.407^	0.055^	fark yok	0.536	homojen	0.291	0.831	fark yok
BS12	0.003	homojen değil	145.382^	0^	fark var***	0.001	homojen değil	204.943^	0^	fark var***
BS13	0	homojen değil	110.97^	0^	fark var***	0	homojen değil	55.772^	0^	fark var***
BS14	0.498	homojen	1.109	0.369	fark yok	0.504	homojen	9.773	0	fark var
BS15	0.091	homojen	0.233	0.873	fark yok	0.189	homojen	8.644	0.001	fark var
BS16	0.023	homojen değil	90.88^	0^	fark var***	0.001	homojen değil	107.326^	0^	fark var***
BS17	0	homojen değil	342.979^	0^	fark var***	0	homojen değil	196.22^	0^	fark var***
BS18	0.081	homojen	0.029	0.993	fark yok	0.035	homojen değil	14.419^	0^	fark var

^: KontrolXDoz grupları arasındaki farka ait Robust testine ait istatistiksel değerler

*: KontrolXDoz grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark (p<0.01)

***: KontrolXDoz grupları arasında istatistiksel açıdan güçlü anlamlı fark (p<0.001)

Çizelge 4.55. TA98 suşunda mutajenik etki gösteren benzoksazin türevlerinin regresyon model kestirim testine ait istatistik sonuçları

TA98									
Bileşik Kodu	S9 (-/+)	Denklem Modeli	X _{Kontrol}	R ²	b0	b1	b2	b3	d
BS1	S9 (-)	C	33.375	0.746	33.375	-0.002	0.00001	0.000002	255.2
BS4	S9 (+)	C	38.788	0.492	39	-0.18	0.002	-0.000003	333
BS7	S9 (-)	L	33.38	0.82	33.285	0.197	-	-	168.96
	S9 (+)	L	39	0.38	40.033	0.089	-	-	426.6
BS10	S9 (-)	C	33.37	0.86	33.375	-0.319	0.008	-0.00003	156
BS12	S9 (-)	C	33.5	0.941	27.284	0.769	0.048	0	33
	S9 (+)	C	45.17	0.964	45.051	-0.832	-0.004	-0.001	45
BS13	S9 (-)	C	33.33	0.988	32.003	10.052	-0.799	0.04	4.4
	S9 (+)	C	39	0.92	39.895	-6.641	-0.154	0.001	5.5
BS15	S9 (-)	L	32.33	0.34	31.7	0.046	-	-	716.5
BS16	S9 (-)	C	33.5	0.855	31.278	0.292	0.005	-0.00002	55
	S9 (+)	C	39	0.82	41.6	-0.243	-0.002	0	95
BS17	S9 (-)	C	35.17	0.849	40.63	4.867	-0.045	0	9
	S9 (+)	C	39	0.931	32.148	5.879	-0.026	0.00004	6
BS18	S9 (+)	C	36.17	0.512	36.167	-0.072	0	0.000005	217

C: Kübik model denklemi ($\hat{y}=bo+b1d+b2d^2+b3d^3$) L: Lineer model denklemi ($\hat{y}=bo+b1d$)
X_{Kontrol}: Kontrol grubu ortalaması; R²: Regresyon katsayısı; d: Minimum mutajenik doz (µg/plak)

Çizelge 4.56. TA100 suşunda mutajenik etki gösteren benzoksazin türevlerinin regresyon model kestirim testine ait istatistik sonuçları

TA100									
Bileşik Kodu	S9 (-/+)	Denklem Modeli	X_{Kontrol}	R^2	b0	b1	b2	b3	d
BS5	S9 (+)	L	117.6667	0.633	117.5	0.14	-	-	839.29
BS12	S9 (-)	C	114.5	0.96	107.343	43.999	-0.837	0.008	2.5
	S9 (+)	C	127.5	0.97	123.455	42.992	-0.636	0.012	3
BS13	S9 (-)	C	131.5	0.945	126.674	100.213	67.92	-7.876	0.85
	S9 (+)	C	131.5	0.96	140.014	262.939	-20.387	1.512	0.575
BS16	S9 (-)	C	120	0.932	115.331	81.949	-6.056	0.151	1.6
	S9 (+)	C	129	0.945	128.826	36.956	0.039	-0.011	3.5
BS17	S9 (-)	C	126.83	0.975	34.235	465.818	-68.273	4.339	0.075
	S9 (+)	C	126.83	0.962	252.573	254.549	11.29	-1.18	0.95

C: Kübik model denklemi ($\hat{y}=b_0+b_1d+b_2d^2+b_3d^3$) L: Lineer model denklemi ($\hat{y}=b_0+b_1d$)
 X_{Kontrol} : Kontrol grubu ortalaması; R^2 : Regresyon katsayısı; d: Minimum mutajenik doz ($\mu\text{g/plak}$)

Çizelge 4.57. Ames testinde kullanılan pozitif kontrollerin T-testine ait betimsel istatistik sonuçları

Pozitif Kontroller	Doz (µg/Plak)	n	Ortalama (X)	Standart Sapma	F	p	t	p (two-tailed)
Sodyum azid (TA100)	0	12	138.0833	50.96248	16.691	0***	-6.733	0
	1.5	12	1410.5	652.6669				
Danomisin (TA98)	0	12	31.9167	4.48144	27.665	0***	-6.83	0
	6	12	225.1667	97.90889				
2- Aminofloren(TA98)	0	12	43.6667	7.88939	12.715	0.002***	-18.234	0
	50	12	1102.083	200.9235				
2- Aminofloren(TA100)	0	12	120.3333	12.8935	19.898	0***	-22.189	0
	50	12	1281.667	180.8482				

Çizelge 4.58. Ames testinde kullanılan pozitif kontrollerin regresyon analizine ait istatistik sonuçları

Pozitif Kontroller	R ²	F	Denklem Modeli	b0	b1	Ln(2X _{Kontrol})	Denklem	p	d
Sodyum azid (TA100)	0.918	246.549	G	4.876	1.531	5.621	Ln(276.1666)=4.876+1.531d	0.000***	0.5
Danomisin (TA98)	0.91	221.143	G	3.454	0.314	4.156	Ln(63.8334)=3.454+0.314d	0.000***	2.2
2- Aminofloren (TA98)	0.989	1968.589	G	3.762	0.065	4.470	Ln(87.3334)=3.762+0.065d	0.000***	10.9
2- Aminofloren (TA100)	0.991	2337.523	G	4.785	0.047	5.483	Ln(240.6666)=4.785+0.047d	0.000***	14.9

G: Regresyon Analizinde Büyüme (Growth) tipi Model; ***: p<0.0001; d: Minimum mutajenik doz; R²: Regresyon Katsayısı

Çizelge 4.59. 18 Adet benzoksazin türevi bileşiğin Salmonella/mikrozom testine ait toplu değerlendirme sonuçları

Test Bileşikleri	TA98		TA100	
	S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)
BS1	255.2	-	-	-
BS2	-	-	-	-
BS3	-	-	-	-
BS4	-	333	-	-
BS5	-	-	-	839.3
BS6	-	-	-	-
BS7	168.6	426.6	-	-
BS8	-	-	-	-
BS9	-	-	-	-
BS10	156	-	-	-
BS11	-	-	-	-
BS12	33	45	2.5	3
BS13	4.4	5.5	0.85	0.58
BS14	-	-	-	-
BS15	716.5	-	-	-
BS16	55	95	1.6	3.5
BS17	9	6	0.075	0.95
BS18	-	217	-	-
Pozitif Kontroller				
Sodyum Azid	-	-	0.5	-
Danomisin	2.2	-	-	-
2-Aminofloren	-	10.9	-	14.9

* Tablo içindeki rakamlar regresyon analizi ile elde edilen minimum mutajenik doz ($\mu\text{g/plak}$) değerlerini (d) belirtmektedir ($p < 0.001$).

-: Mutajenik etki saptanmamıştır.

4.7. Ames Testi Sonuçlarına Göre Yapılan Farmakofor Analizine Ait Bulgular

Farmakofor hipotezinin oluşturulması için hidrojen bağı alıcısı (HBA), hidrojen bağı vericisi (HBD), hidrofobik özellik (aromatik ve alifatik) ve aromatik halka özellikleri seçilmiş ve bu işlem sırasında tüm konformerler kullanılmıştır.

Test edilen benzoksazin türevlerinin metabolik aktivasyon yokluğunda *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerindeki mutajenik aktiviteleri için yapılan HipHop farmakofor analizinden elde edilen, 57,318 – 55,922 arasında değişen skora sahip 10 hipotez Çizelge 4.60’da özetlenmiştir.

Sonuçta elde edilen 10 hipotezden en uygun olanı birinci (1 No’lu) hipotez olarak belirlenmiştir. En uygun hipotez ile oluşturulan farmakofor model, 3 tane hidrojen bağı alıcısı, 2 tane hidrofobik ve 1 tane aromatik halka özelliği olmak üzere toplam 6 özelliği içermektedir (Sekil 4.57). Seçilen hipoteze ait farmakofor model, benzoksazin yapısındaki diğer bileşiklerle karşılaştırılarak kontrol edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.61 ve Çizelge 4.62’de gösterilmiştir.

Yapılan farmakofor analiz çalışmaları sonucunda benzoksazin yapısındaki bu bileşiklerin R3 konumuna getirilen hidrojen bağı yapabilme yetisi olan ve R2 konumunda hidrofobik özellik gösteren fonksiyonel grupların mutajenik etkiyi artırdığı tespit edilmiştir. Bu konumlarda özellikle aromatik halkayı dezaktive eden grupların (R3 konumu için -NO₂ ve R2 konumu için Cl) mutajenik etkiyi artırdığı düşünülmektedir. NO₂ ve Cl gruplarının her ikisinin de bulunduğu benzoksazin türevi bileşikler (BS13 ve BS17) yapılan *Salmonella*/mikrozom testine’ne göre de en güçlü mutajenik etki gösteren bileşikler olarak saptanmışlardır.

HBA6 (hidrojen bağı akseptörü özellik) ve Hydrophobic-21 (hidrofobik özellik) moleküller üzerindeki farklılıklara (R2 ve R3 konumlarına gelen sübstitüentlere) göre hipoteze olan uyumları farklılık gösteren özelliklerdir.

Diğer özellikler (HBA4, HBA5, Hydrophobic-22, Ring_aromatic_1) bütün bileşiklerde ortak olduğu için mutajenik etkiden sorumlu olduğu söylenemez.

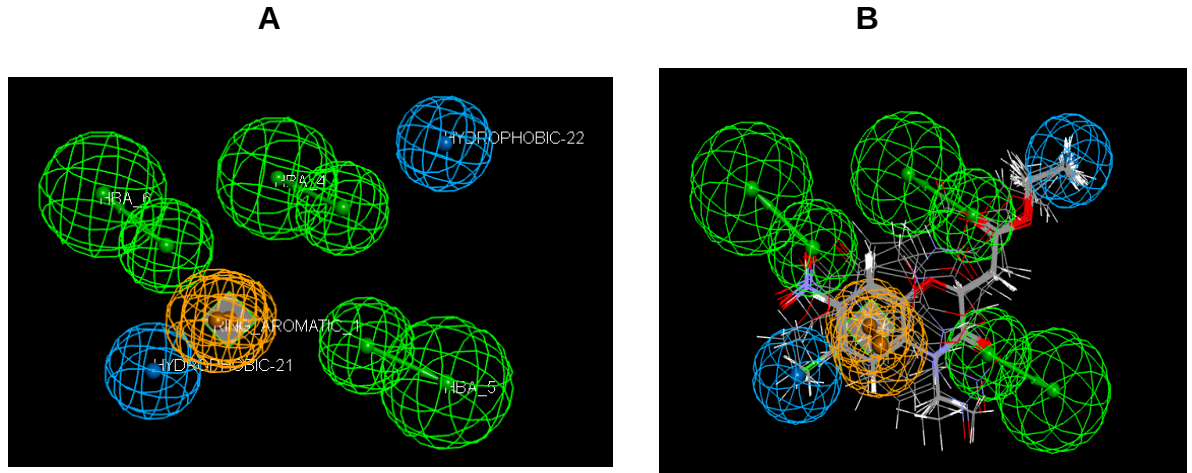
Çizelge 4.60. Mutajenik aktivite için geliştirilen HipHop farmakofor hipotezlerinin istatistiksel analiz sonuçları

	Özellikler	Sıralama	Direkt Hit	Kısmi Hit	Maksimum uyum
Hipotez 1	RHHAAA	57.318	1110	0001	6
Hipotez 2	RHHAAA	56.621	1110	0001	6
Hipotez 3	HHAAAA	56.295	1110	0001	6
Hipotez 4	RHHAAA	56.238	1110	0001	6
Hipotez 5	RHHAAA	56.238	1110	0001	6
Hipotez 6	RHHAAA	56.192	1110	0001	6
Hipotez 7	RHHAAA	56.030	1110	0001	6
Hipotez 8	RHHAAA	55.966	1110	0001	6
Hipotez 9	RHHAAA	55.922	1110	0001	6
Hipotez 10	RHHAAA	55.922	1110	0001	6

H: Hidrofobik; A: Hidrojen bağı alıcısı; R: Aromatik Halka

Direkt Hit (1 evet anlamına gelmektedir.): Hipotezin tüm özellikleri haritalanmıştır.

Kısmi Hit (0 hayır anlamına gelmektedir.): Hipotezin kısmi olarak haritalanmıştır.

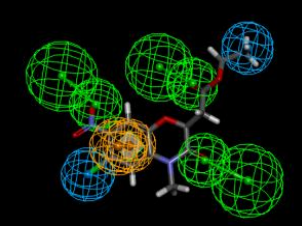
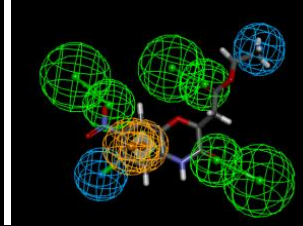
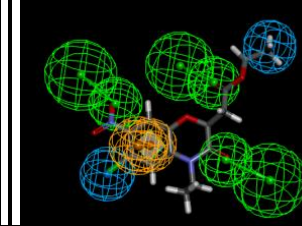
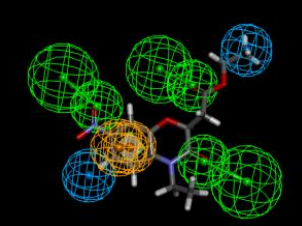
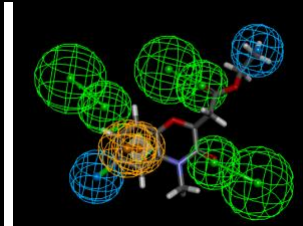
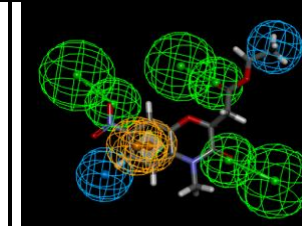
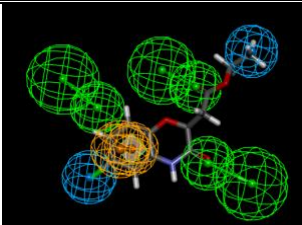
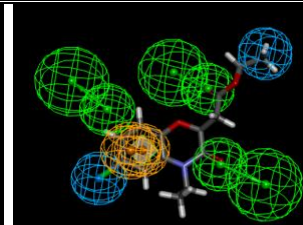
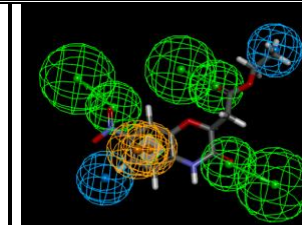
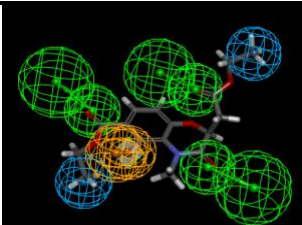
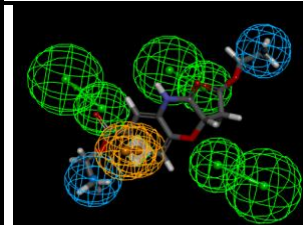
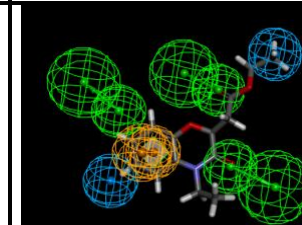
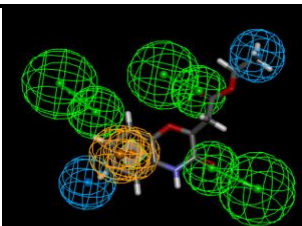
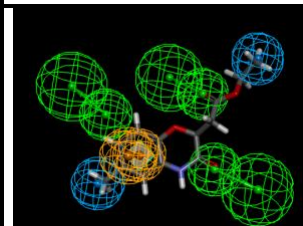
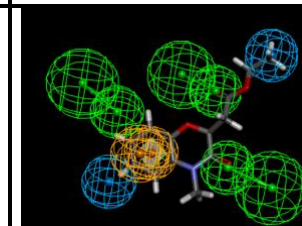
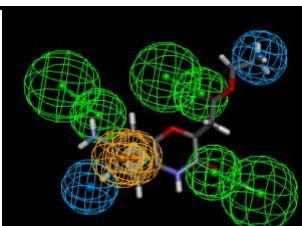
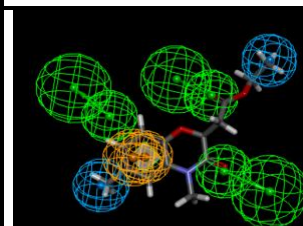
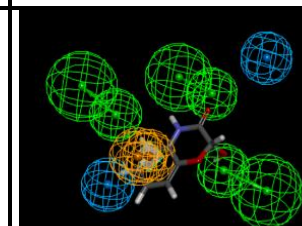


Şekil 4.57. Ames testi verilerine ait HipHop farmakofor modellemesi için en uygun bulunan hipotez A. Oluşturulan farmakofor model [Yeşil renkte gösterilenler hidrojen bağı alıcısı (HBA-4, HBA-5 ve HBA-6), mavi ile gösterilenler hidrofobik (Hydrophobic-21 ve Hydrophobic-22), turuncu ile gösterilen ise aromatik (Ring-aromatic-1) halka özelliklerini tanımlamaktadır.] B. Test edilen benzoksazin türevi bileşiklerin üst üste çakıştırılmış hali

Çizelge 4.61. Mutajenik aktivite verileri ile yapılan HipHop farmakofor analizinde en uygun hipoteze ait sonuçlar

Kod	Uyum Değeri	Pharmprint	R1	H2	H3	A4	A5	A6
BS13	5,90412	'111111'	1	1	1	1	1	1
BS07	5,89884	'111111'	1	1	1	1	1	1
BS17	5,89527	'111111'	1	1	1	1	1	1
BS16	4,93579	'101111'	1	0	1	1	1	1
BS10	4,93097	'111110'	1	1	1	1	1	0
BS12	4,93086	'101111'	1	0	1	1	1	1
BS03	4,92874	'111110'	1	1	1	1	1	0
BS15	4,92347	'111110'	1	1	1	1	1	0
BS05	4,92261	'101111'	1	0	1	1	1	1
BS11	4,86188	'011111'	0	1	1	1	1	1
BS04	4,62061	'111101'	1	1	1	1	0	1
BS14	3,95637	'101110'	1	0	1	1	1	0
BS01	3,95237	'101110'	1	0	1	1	1	0
BS02	3,95084	'101110'	1	0	1	1	1	0
BS08	3,94884	'101110'	1	0	1	1	1	0
BS06	3,94595	'101110'	1	0	1	1	1	0
BS09	3,94441	'101110'	1	0	1	1	1	0
BS18	2,13231	'100110'	1	0	0	1	1	0

Çizelge 4.62. Benzoksazin türevlerinin *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerindeki mutajenik aktivitesinin en uygun hipotez ile haritalanması

BS13	BS07	BS17
		
BS16	BS10	BS12
		
BS03	BS15	BS05
		
BS11	BS04	BS14
		
BS01	BS02	BS08
		
BS06	BS09	BS18
		

Çizelge 4.63. Test edilen bileşiklerin sitotoksik, genotoksik ve mutajenik etkilerine ait toplu değerlendirme

Test Bileşikleri				SRB Testi Sonuçları			Komet Testi Sonuçları								Ames Testi Sonuçları (d)			
Kod	Halka Yapıları			IC ₅₀ (µM)		Sİ	L929				HeLa				TA98		TA100	
	R ₁	R ₂	R ₃	L929	HeLa		24 saat		48 saat		24 saat		48 saat		S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)
BS1	H	H	H	698,12	294,82	2	0,9	-	0,7	-	1,2	-	4,9	**Fpg/EndoIII	255,2	-	-	-
BS2	H	CH ₃	H	566,20	192,91	3	0,8	-	3,8	**Fpg/hAAG	1,2	-	1,2	-	-	-	-	-
BS3	H	Cl	H	279,12	17,84 [‡]	16	2,7	*	1,6	-	1,3	-	1,1	-	-	-	-	-
BS4	H	COOC ₂ H ₅	H	170,48	551,11	0	1	-	1,6	-	1,2	-	5,9	**Fpg/EndoIII	-	333,0	-	-
BS5	H	H	NO ₂	701,71	282,22	2	1,7	-	1,9	*	1,4	-	1	-	-	-	-	839,3
BS6	H	H	NH ₂	22186,24	509,76	44	2,5	*	1,9	*	1,5	-	1,9	*	-	-	-	-
BS7	H	Cl	NO ₂	466,13	92,39 [‡]	5	2,3	*	5,5	** Fpg	1,9	*	3	*	168,6	426,6	-	-
BS8	CH ₃	H	H	1270,53	276,95	5	1,4	-	1,5	-	1,5	-	1,4	-	-	-	-	-
BS9	CH ₃	CH ₃	H	255,72	669,57	0	3,4	*	2	*	1,5	-	1,3	-	-	-	-	-
BS10	CH ₃	Cl	H	460,40	52,53 [‡]	9	1,2	-	1,7	-	1,3	-	4,2	**Fpg/hAAG	156,0	-	-	-
BS11	CH ₃	COOC ₂ H ₅	H	16,70 [‡]	24,31 [‡]	1	4,5	**	2	*	1,1	-	4	** Fpg	-	-	-	-
BS12	CH ₃	H	NO ₂	59,56 [‡]	332,51	0	2,1	*	2,1	*	1,4	-	3,3	*	33,0	45,0	2,5	3,0
BS13	CH ₃	Cl	NO ₂	174,79	211,28	1	1,8	-	1,8	-	1,2	-	1,5	-	4,4	5,5	0,85	0,58
BS14	C ₂ H ₅	H	H	1803,56	238,25	8	2	*	2,5	*	2,5	*	2	*	-	-	-	-
BS15	C ₂ H ₅	Cl	H	97,99 [‡]	125,06	1	1,6	-	2,6	*	1,4	-	3,2	*	716,5	-	-	-
BS16	C ₂ H ₅	H	NO ₂	364,90	1976,31	0	1,8	-	3,8	**Fpg	1,7	-	7,4	**Fpg/EndoIII	55,0	95,0	1,6	3,5
BS17	C ₂ H ₅	Cl	NO ₂	100,63 [‡]	933,07	0	2,3	*	2,9	*	1,4	-	3	*	9,0	6,0	0,075	0,95
BS18	H	H	H	1747,91	287,14	6	1	-	1	-	1,6	-	2,7	*	-	217,0	-	-
Ams				3,95	1,08	4												
CPT				0,93	0,50	2	8,3	**	4,35	**	5,50	**	18,50	**				
ETOP				22,87	3,21	7	11,01	**	24,40	**	19,70	**	24,37	**				
H ₂ O ₂							10,90	**	24,28	**	16,42	**	21,20	**				
SA															-	-	0,5	-
DAU															2,2	-	-	-
2AF															-	10,9	-	14,9

Sİ:Seçicilik indeksi [IC₅₀(L929)/IC₅₀(HeLa)], d:Minimum mutajenik doz, ‡:IC₅₀<100 µM, *:p<0.05, **:p<0.001, -:Etkisiz, Ams: Amsakrin, CPT:Kamptotesin, ETOP: Etoposit, SA:Sodyum azit, DAU:Daunomisin, 2AF:2-aminofloren, L929:Fare fibroblast hücre dizisi, HeLa: İnsan serviks adenokarsinoma hücre dizisi, Fpg:Formamidopirimidin DNA glikozilaz, EndoIII:Endonükleaz III, hAAG:İnsan alkil adenin DNA glikozilaz, Çizlegede komet sonuçları kısmındaki veriler; hücre dizilerinde IC₅₀ dozlarında uygulanan bileşiklere ait kuyruk momentleri verilerinin kontrole göre oranlarını (kat) belirtmektedir. p<0.001 düzeyde güçlü genotoksik etki gösteren bileşiklerle onarım enzimleri varlığında yapılan modifiye komet testi sonrasında sadece aktivite gösteren enzimler çizelgede belirtilmiştir.

5. TARTIŞMA

Çok faktörlü bir hastalık olan kanser, tedavisi için üzerinde çok sayıda araştırma yapılan hastalıkların başında gelmektedir. Tedaviye yönelik çok sayıda doğal, yarı sentetik ve sentetik ilaç kullanılmasına rağmen, yan etkileri ve ilaçlara karşı gelişen direnç bu ilaçların kullanımlarını kısıtlayan en önemli faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle literatüre bakıldığında her geçen gün antikanser etkisi olabileceği düşünülen yeni heterosiklik bileşiklerin ilaç ön maddesi olarak tasarlandığı ve biyolojik etkinlikleri açısından değerlendirildiği görülmektedir.

Biyolojik olarak aktif heterosiklik bileşik gruplarından biri de halka yapısında azot ve oksijen içeren benzoksazinlerdir. Benzoksazin halkası içeren bileşikler kolaylıkla polimerize olabilmeleri, kimyasal ve termal tepkimelerde dayanıklı olmaları, gerilme mukavemetine sahip oldukları için esnek yapıda olmaları gibi pek çok fizikokimyasal özellikleri nedeniyle endüstriyel materyallerde destek yapılar olarak sıklıkla tercih edilse de, biyolojik olarak aktif bileşiklerin sentezi için uygun iskelet yapısına sahip olmaları nedeniyle sentetik ilaç tasarım çalışmalarında son zamanlarda üzerinde yoğun olarak kullanılmaktadır [193].

Literatür taraması yapıldığında, 1,2-, 1,3- ve 1,4-benzoksazin halkası içeren bileşiklerin ve bunların okso türevlerinin potansiyel yeni ilaç öncülleri olarak ilaç geliştirme basamağında olduğu görülmektedir [32]. Bununla birlikte uluslararası ilaç bankası (DrugBank) veritabanı incelendiğinde, bugüne kadar benzoksazin halkası içeren toplam 10 tane biyoaktif bileşiğin FDA'dan onay aldığı ve bu bileşikler içerisinde 4 tanesinin klinikte ilaç olarak kullanıldığı görülmektedir [11]. Bu ilaçlar AIDS tedavisinde kullanılan Efavirenz, kronik obstrüktif pulmoner hastalığının (COPD) tedavisinde kullanılan Olodaterol ve mikrobiyal kaynaklı hastalıkların tedavisinde antibiyotik olarak kullanılan ofloksazin ve levofloksazindir. FDA onaylı bu 10 ilacın yapısı incelendiğinde ise, bunlardan 8 tanesinin 1,4-benzoksazin halka yapısına sahip olduğu ve hatta pek çoğunun 1,4- benzoksazin-3-on yapısında olduğu görülmektedir. Gerek biyolojik olarak aktif halka yapılarına sahip olmaları, gerekse pek çok çeşitte biyolojik aktivite gösterebilmeleri nedeniyle araştırmacıları özellikle 1,4-benzoksazin-3-on türevi bileşiklerin kullanıldığı ilaç araştırma-geliştirme çalışmalarına yönlendirmektedir.

Antimikrobiyal [47,194], anti-inflamatuvar [39], antitüberküloz [195], antiviral [196], gibi pek çok biyolojik etkilerinin yanı sıra son yıllarda bu bileşiklerin antikanser aktivitelerinin de araştırıldığı görülmektedir [27]. Bu araştırmalarda hedef olarak seçilen metiyonil-tRNA sentetaz, topoizomera, EGFR protein kinaz, DNA bağımlı protein kinaz (DNA-PK), trombin, glikoprotein IIb/IIIa gibi pek çok enzim ya da protein üzerinden, bileşiklerin hücre çoğalması, anjiyogenez ve apoptoz üzerinde etkileri rapor edilmiştir [28-31,33,60,61].

Bu bağlamda tez çalışması kapsamında 18 adet 1,4-benzoksazin-3-on türevi bileşiğin biyolojik aktivitelerinin sitotoksik, genotoksik ve mutajenik açılardan *in vitro* çalışmalarla incelenmesi amaçlanmıştır, elde edilen veriler ışığında antikanser ajan olmaya aday etkili bileşikler belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmada test edilen bileşiklerin SRB, alkali komet, modifiye komet ve Ames testlerine ait veriler topluca Çizelge 4.63'de özetlenmiştir.

Yeni ilaç tasarımlarında sentezlenen ajanların normal ve kanser hücreleri üzerinde biyolojik aktivitelerinin çok yönlü değerlendirildiği *in vitro* çalışmalar büyük önem taşımaktadır. Böylece hipotetik olarak sentezlenen çok sayıda ajandan eleme yöntemi ile ümit vadedenlerin seçilmesi mümkün olmaktadır. Bu amaçla hücre dizileri kullanılarak yapılan *in vitro* ön tarama çalışmaları sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmalarda bileşiklerin gerek sitotoksik ve genotoksik özellikleri, gerekse moleküller hedefleri üzerindeki etkinlikleri test edilebilmektedir. Hücre dizileriyle yapılan bu tarama çalışmaları hem kısa zamanda sonuç vermesi, yüksek ölçekli ve ucuz olması nedeniyle, hem de daha az sayıda deney hayvanı kullanımı sağlaması yönünden faydalı çalışmalar olarak görülmektedir [3]. *In vitro* ön tarama çalışmaları klinikte kullanım için kesin bilgi vermemesi nedeniyle yeterli görülmemesine rağmen, klinik öncesi fikir vermesi açısından tavsiye edilen yöntemlerdir [197].

Biyolojik hedefi ne olursa olsun antikanser bir ajandan beklenenin kanser hücrelerinde ölüm mekanizmalarının tetiklenmesi olduğu düşünüldüğünde tez çalışması kapsamında test edilen bileşiklerin *in vitro* antikanser aktivitelerinin değerlendirilmesinde ilk olarak hücre dizilerinde sitotoksik etki çalışmalarının yapılması planlanmıştır. Bu amaçla çalışmada kanser hücrelerine örnek teşkil etmesi açısından HeLa (İnsan serviks adenokarsinom) hücre dizisi seçilmiş, aynı zamanda bileşiklerin biyolojik etkilerinin normal (malignant olmayan) hücreler üzerindeki

etkilerinin de incelenmesi amacı ile biyoyumluluk çalışmalarında sıklıkla kullanılan ve primer hücrelere göre daha hassas olduğu rapor edilen L929 (fare fibroblast) [198,199] hücre dizisi kullanılmıştır. NCI'nın da ilaç taramaları için en çok tercih ettiği ve araştırmacılara tavsiye ettiği [131] SRB yöntemi ile bileşiklerin her iki hücre dizisinde sitotoksik aktiviteleri değerlendirilmiş, elde edilen verilerle bileşikler ile muamele edilen hücrelerde %50 ölüm görülen IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca bileşiklerin, kanser hücresine örnek olarak seçilmiş HeLa hücre dizisi üzerindeki sitotoksik etkisinin, sağlıklı L929 hücre dizisine göre kaç kat daha etkili (seçici) olduğunun belirlenmesi için her bir test bileşiğine ait "seçicilik indeksi ($SI = IC_{50(L929)} / IC_{50(HeLa)}$)" hesaplanmıştır.

Literatürde hücre dizileri üzerinde yapılan sitotoksik aktivite ile ilgili çalışmalarda gerek kullanılan yöntemler gerekse laboratuvar koşullarındaki değişiklikler nedeniyle aynı bileşikler için farklı IC_{50} değerleri belirlendiği görülmektedir. Örneğin tez çalışmasında pozitif kontrol olarak kullanılan bileşiklerden biri olan CPT'nin HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi için literatür incelendiğinde, değişik çalışmalarda farklı IC_{50} değerleri rapor edilmiştir. Zare-Mirakabadi ve arkadaşlarının [200] yaptığı çalışmada CPT için IC_{50} değeri 0.23 μM bulunurken, Chang ve arkadaşlarının [201] yaptığı çalışmada 0.014 μM olduğu rapor edilmiştir. Bunun yanında bileşiklerin farklı kanser hücre dizilerinde sitotoksik aktivitesinin değiştiği de görülmektedir. CPT ve etopositin 663 farklı hücre dizisi üzerindeki sitotoksik aktivite verilerinin depolandığı bir ilaç bankası veri tabanında bu bileşiklere ait IC_{50} değerlerinin sırasıyla 7.18×10^{-8} -15.7 μM ve 0.017 - 5.35×10^3 μM arasında değiştiği rapor edilmiştir [202]. Tez çalışmasında ise HeLa hücreleri üzerinde pozitif kontrol olarak kullanılan CPT, Etop ve amsakrin için hesaplanan IC_{50} değerlerinin ($IC_{50(CPT)}$: 0.5 μM , $IC_{50(Etop)}$: 3.21 μM , $IC_{50(Ams)}$: 1.08 μM) literatürde rapor edilen veriler ile uyumlu olduğu görülmüştür. Bu denli geniş aralıkta IC_{50} değerleri olmasına rağmen, literatürde ilaç olarak kullanılan CPT, etoposit gibi bileşiklerin sitotoksik dozlarının nM ve μM düzeyinde olduğu ve bu çalışmalar sırasında denenen en yüksek konsantrasyonun ise 100 μM civarında olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle tez çalışmasında sitotoksik aktivite verileri değerlendirilirken test edilen seri içerisinde 100 μM 'ın altında IC_{50} değerine sahip olan bileşikler sitotoksik etkili bileşikler olarak nitelendirilmiştir.

Bu bağlamda, çalışmada test edilen bileşiklerin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktiviteleri incelendiğinde; sadece **BS11**, **BS12**, **BS15**, **BS17** bileşiklerinin 100µM'ın altında IC₅₀ değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Geriye kalan bileşiklerden yedi tanesinin (**BS3**, **BS4**, **BS7**, **BS9**, **BS10**, **BS13**, **BS16**) 100-500 µM arasında, diğer yedi tanesinin (**BS1**, **BS2**, **BS5**, **BS6**, **BS8**, **BS14**, **BS18**) ise 500-22000 µM arasında değişen yüksek IC₅₀ değerine sahip olduğu için L929 hücre dizisinde kayda değer bir sitotoksik aktivite göstermediği kabul edilmiştir. Sitotoksik aktiviteye sahip olduğu görülen bileşikler etki sırasına göre **BS11** (16,7 µM) > **BS12** (59,5 µM) > **BS15** (97,9 µM) > **BS17** (100,6 µM) şeklinde sıralanabilir. Bu 4 bileşik, test edilen bileşikler arasında en yüksek sitotoksik etkiye sahip olarak değerlendirilmelerine rağmen, pozitif kontrollerle (IC₅₀(CPT):0.93 µM, IC₅₀(Etop):22.87 µM, IC₅₀(Ams):3.95 µM) karşılaştırıldığında yalnızca **BS11** bileşiğinin; test edilen seri içerisinde güçlü sitotoksik aktivite gösterdiği, diğer 3 türevin ise pozitif kontrollere göre etkisinin oldukça düşük olduğu görülmektedir.

Test edilen bileşiklerin HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik aktiviteleri incelendiğinde ise, 100µM'ın altında IC₅₀ değerine sahip olan 4 bileşiğin (**BS3**, **BS7**, **BS10**, **BS11**) HeLa hücreleri üzerinde kayda değer derecede sitotoksik aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır. Bu seri içerisinde geriye kalan dokuz tanesinin (**BS1**, **BS2**, **BS5**, **BS8**, **BS12**, **BS13**, **BS14**, **BS15**, **BS18**) 100-500 µM arasında, diğer beş tanesinin (**BS4**, **BS6**, **BS9**, **BS16**, **BS17**) ise 500 µM'ın üzerinde IC₅₀ değerlerine sahip olduğu için bu hücre dizisi için zayıf sitotoksik etki gösterdikleri düşünülmüştür. Sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlenen bileşikler etki sırasına göre **BS3** (IC₅₀:17,84 µM) > **BS11** (IC₅₀:24,3 µM) > **BS10** (IC₅₀:52,53µM) > **BS7** (IC₅₀:92,39µM) şeklinde sıralanabilir. Fakat bileşikler pozitif kontrol bileşikleriyle karşılaştırıldığında (IC₅₀(CPT): 0.5 µM, IC₅₀(Etop): 3.21 µM, IC₅₀(Ams): 1.08 µM) sitotoksik aktivitelerinin düşük olduğu görülmektedir.

Literatürde bir dizi bileşiğin *in vitro* antikanser aktivitelerinin farklı hücre dizileri ile değerlendirildiği çalışmalar incelendiğinde; hesaplanan IC₅₀ değerleri ile bileşiklerin sitotoksik aktivitelerinin birbiri ile karşılaştırılmasının yanı sıra, bu tez çalışmasında olduğu gibi, incelenen serinin normal hücreler üzerindeki etkisinin ve belirtilen seçicilik indekleri ile de kanser hücreleri üzerine seçiciliklerinin karşılaştırıldığı görülmektedir [203]. Ayrıca literatürdeki bu tip çalışmalarda seçicilik indekslerinin en

az 3 (3-100) olduğu bulunan bileşiklerin antikanser aday bileşikler olabileceği ve seçicilik indeksi ne kadar yüksek olursa aday bileşiğin o kadar etkili olabileceği belirtilmiştir [204]. Bu bağlamda bu tez çalışmasında test edilen bileşiklerin sitotoksik aktivitelerinin hücre tipine bağlı olup olmadığı incelendiğinde, benzoksazin serisinin genel olarak herhangi bir hücreyi özgül olarak etkilemediği görülmüştür. Bileşiklerin IC_{50} değerleri, L929 hücre dizisi için 16,70-22186 μ M, HeLa hücre dizisi için 17,84-1976 μ M gibi geniş bir aralığa dağılmış durumdadır. Ancak bileşiklerin seçicilik indeksleri incelendiğinde; **BS1**, **BS2**, **BS3**, **BS5**, **BS6**, **BS7**, **BS8**, **BS10**, **BS14**, **BS18** bileşiklerinin HeLa hücre için seçici etki gösterdiği (SI :2-43.5) görülmektedir. Özellikle HeLa hücrelerini L929' a göre daha düşük dozda etkilediği görülen **BS6** (SI :43.5), **BS3** (SI :16), **BS10** (SI :8.8) ve **BS14** (SI :7,6) bileşiklerinin seçiciliği dikkat çekicidir. Pozitif kontrol olarak kullanılan etopositin de normal hücreye göre kanser hücrelerini 7 kat daha fazla etkilediği görülmektedir. **BS6** seçicilik indeksi en yüksek bileşik olarak belirlenmiş olsa da, sitotoksik aktivitesinin her iki hücre dizisi için de oldukça düşük olması ($IC_{50(HeLa)}$:509.79 μ M, $IC_{50(L929)}$:22 mM) bu seri içerisinde kılavuz etken madde olarak seçilebilmesini kısıtlamaktadır. Aynı durumun **BS14** için de geçerli olduğu görülmektedir ($IC_{50(HeLa)}$:238.25 μ M, $IC_{50(L929)}$:1.8 mM).

Test bileşiklerinin IC_{50} değerleri incelendiğinde, yalnızca **BS11** bileşiğinin sitotoksik aktivitesinin her iki hücre dizisi için de ($IC_{50(HeLa)}$:24.31 μ M, $IC_{50(L929)}$:16.7 μ M) diğer bileşiklere oranla oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Sitotoksikite çalışmalarında pozitif kontrol olarak kullanılan CPT, etoposin ve amsakrin bileşiklerinin de **BS11**'de olduğu gibi düşük konsantrasyonlarda her iki hücre dizisi için (L929 hücre dizisi için 1-20 μ M, HeLa hücre dizisi için 0.5-3 μ M) sitotoksik olduğu görülmektedir. Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan bileşikler FDA tarafından onaylanmış ve antikanser etkileri belirlenmiş bileşiklerdir. Ayrıca bunlardan başka literatürde klinikte kullanılan biyoaktif bileşiklerin de sitotoksik aktivitelerinin yüksek (IC_{50} değerlerinin düşük) olduğu görülmektedir [202]. Bu bağlamda **BS11**'in HeLa hücrelerini seçici olarak öldürmediği görülse de, literatürde ve test edilen pozitif kontrol bileşiklerinde de görüldüğü üzere sitotoksik aktivitesinin her iki hücre dizisi için oldukça yüksek olması nedeniyle bu bileşiğin başka kanser ve normal hücre dizilerinin kullanıldığı panellerde değerlendirilmesi ve etki mekanizmasının ileri çalışmalarla aydınlatılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Test edilen bileşiklerin aynı çekirdek halka yapısının çeşitli pozisyonlarına değişik grupların eklenmesi ile farklı türevleri elde edilmiştir. Bu nedenle elde edilen biyolojik aktivite verilerinin hangi yapılardan kaynaklandığının değerlendirilmesi, daha etkili yeni türevlerin sentezlenmesi için aydınlatıcı olacaktır. Sitotoksik etkisi her iki hücre dizisi için oldukça düşük ama seçicilik indeksi en yüksek olan **BS6** bileşiğinin halka yapısı incelendiğinde, incelenen seri içerisinde R3 pozisyonunda NH₂ grubu bulunduran tek türev olması dikkat çekicidir. Bu özelliğin benzoksazin halkasının R3 pozisyonundaki NH₂ grubunun sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu yapıda yeni sentezlenecek başka türevlerin de bu açıdan test edilip değerlendirilmesi önerilmektedir.

Çalışmada incelenen seri içerisinde benzoksazin halka yapısının R2 ve R3 pozisyonlarında -H bulunan tüm türevlerin HeLa hücreleri üzerinde seçici sitotoksik etki gösterdikleri görülmektedir. Ayrıca düşük dozlarda (<100 µM) HeLa hücrelerine seçici sitotoksik etki gösteren **BS3**, **BS7** ve **BS10** bileşiklerinin ortak yapısının R2 pozisyonunda Cl grubu içermesi de dikkat çekicidir. Bu durum antikanser ajan olmaya aday bir bileşik için istenen bir durumdur. Çünkü ilaç olarak kullanılacak bileşiğin normal hücrelere mümkün olan en az zararı vermesi ve kanser hücreleri üzerinde düşük dozlarda seçici olarak aktivite göstermesi *in vivo*'da ilacın yan etkisinin minimum düzeye indirilmesi demektir. Bu bağlamda **BS3**, **BS7** ve **BS10** bileşikleri antikanser ajan olma yolunda ön plana çıkmakla birlikte yapılan çalışma sınırlı sayıda hücre dizisini içerdiği için bir ön değerlendirme niteliği taşımaktadır. Ayrıca hücre dizilerinin köken aldığı doku ve organizmanın farklı olması göz önünde bulundurularak, seçiciliğin kullanılan hücre tiplerinden mi yoksa kanser hücrelerine özgü olup olmadığı hakkında bir genellemenin yapılabilmesi için farklı tipteki kanser hücre dizilerinin kullanıldığı panel sistemlerinde de değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir. Yine de yapılan bu ön çalışma, bu bileşiklerin diğer bileşiklere göre sitotoksosite açısından kayda değer etki gösterdiğinin ve HeLa hücreleri için seçici olduğunun belirlenmesi ile daha ileri çalışmaların konusunu oluşturabileceğini ortaya koyması açısından önemlidir.

Bileşiklerin yapıları ile biyolojik aktiviteleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi, bu çalışmada olduğu gibi ortak bir yapının belli kısımlarının türevlendirilmesiyle şekillendirilmiş bir grup bileşiğin ortak olarak değerlendirilmesi açısından önemlidir.

Yapıya katılan ya da çıkarılan aynı konumdaki fonksiyonel grupların ya da çekirdek yapıdaki değişik konumlara eklenen grupların biyolojik aktiviteyi ne şekilde değiştirdiğinin belirlenmesi daha etkili yeni türevlerin sentezi açısından faydalı bilgiler sağlamaktadır. Bu bağlamda çalışmamızda bileşiklerin yapı etki ilişkileri farmakofofor analizi ile değerlendirilmiş ve hangi değişimlerin etkiyi artırdığı belirlenmeye çalışılmıştır. HypoGen yöntemi kullanılarak yapılan farmakofofor analizi çalışması sonucunda benzoksazin yapısının 2. konumunda bulunan ester grubundaki oksijen atomları hidrojen bağı alıcısı özelliklerini karşıladığından aktivite üzerinde olumlu bir etkisi olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca bileşiklerin yapısında bulunan benzen grubu hidrofobik aromatik ve aromatik halka özelliklerini karşılamaktadır. Bu nedenle bu grubun da aktivite üzerinde olumlu bir etkisi olduğu düşünülmektedir.

Bileşiklerin yapıları incelendiğinde benzoksazin yapısındaki benzen halkasına sübstitüe hafif elektron çeken grupların (COOC_2H_5 , Cl) varlığı aktivite üzerinde olumlu etki yaparken, halkayı aktive eden grupların (CH_3 , NH_2) varlığında aktivitenin düştüğü gözlemlenmiştir.

Farmakofofor analizi sonucunda HeLa ve L929 hücre dizileri üzerinde daha yüksek aktivite gösteren bileşikler, oluşturulan hipotezlerdeki hidrofobik aromatik özelliklerden biri ile çakışmamaktadır. Bu nedenle benzoksazin yapısının 6. veya 7. konumunda hidrofobik aromatik özelliği karşılayabilecek bir yapı (örneğin benzen) olmasının HeLa hücre dizileri üzerindeki aktiviteyi artırabileceği tahmin edilmektedir.

Antikanser terapide hedef alınan yollardan biri de, hızlı bölünen kanser hücre DNA'sında hasar yaratarak, kanser hücresinde ölüm mekanizmalarının devreye sokulmasıdır. Ancak bu tip ajanların kullanıldığı terapilerde sıklıkla gözlenen durumlardan biri kullanılan sitotoksik ajanların özellikle hızlı bölünen normal hücreleri de etkilemesidir. Bu etkinin çoğunlukla ajanın DNA ile etkileşimi sonucu oluşan genotoksik etkileri nedeniyle olduğu bilinmektedir [9]. Dolayısıyla etkili terapi için normal hücreleri en az oranda etkileyen, genotoksik olmayan ajanların kullanımı tercih edilir. Bu nedenle çalışmamızda test edilen bileşiklerin hem kanser hem de normal hücre dizilerinde genotoksik potansiyelleri, ICH, OECD gibi düzenleyici kuruluşların da önerdiği [127,125,174] kısa zamanlı genotoksisite test sistemlerinden biri olan komet testi ile araştırılmıştır. Bileşiklerin her iki hücre dizisinde IC_{50}

konsantrasyonlarında zamana bağılı olarak genotoksik aktiviteleri taranmış ve etki gözlenen bileşiklerin doza bağılı etkileri incelenmiştir.

IC₅₀ konsantrasyonlarında L929 hücreleri ile muamele edilen bileşiklerin genotoksik potansiyelleri genel olarak değerlendirildiğinde, **BS7, BS9, BS11, BS12, BS14 ve BS17** bileşiklerinin süreden bağımsız olarak genotoksik potansiyel gösterdikleri belirlenmiştir. Bileşiklerin genotoksik potansiyelleri 24 saatlik inkübasyon süresinde **BS11>BS9>BS3>BS6> BS7> BS17> BS12> BS14**; 48 saatlik inkübasyon süresinde ise **BS7>BS16>BS2>BS17>BS15>BS14>BS12>BS9** şeklinde sıralanabilir. Bu sonuçlara göre, **BS7** bileşiğinin kontrole göre, 48 saatlik inkübasyon süresinde 5.5 kat, **BS11** bileşiğinin ise 24 saatlik inkübasyon süresinde 4.5 kat daha fazla zincir kırığına neden olduğu için incelenen seri içerisinde en genotoksik bileşikler olduğu söylenebilir. Bunun yanında bazı bileşiklerin genotoksik etkilerinin zamana bağılı olarak değiştiği izlenmiştir. **BS3 ve BS6** bileşikleri yalnızca 24 saatte etkiliyken; **BS2, BS15 ve BS16** bileşiklerinin genotoksik etkilerini ancak 48 saatte gösterebildikleri görülmektedir. **BS1, BS4, BS5, BS8, BS10, BS13 ve BS18** bileşiklerinin ise denenen sürelerde IC₅₀ konsantrasyonlarında genotoksik potansiyel taşımadıkları belirlenmiştir.

Test bileşiklerinin HeLa hücreleri üzerindeki genotoksik aktiviteleri incelendiğinde ise, **BS2, BS3, BS5, BS6, BS8, BS9, BS13** bileşiklerinin IC₅₀ konsantrasyonlarında ne 24 ne de 48 saatlik inkübasyonda genotoksik potansiyel taşımadığı görülmektedir. **BS14** (24 saat: 2.5 kat, 48 saat: 2 kat) dışında diğer tüm bileşiklerin yalnızca 48 saatlik inkübasyonda değişen oranlarda genotoksik olduğu belirlenmiştir. Buna göre IC₅₀ konsantrasyonlarında 48 saatlik inkübasyonda HeLa hücreleri üzerindeki etkili bileşiğin kuyruk momentindeki 7.4 katlık artışla **BS16** bileşiği olduğu görülürken, diğer bileşikler **BS4(5.9 kat)>BS1(4.9 kat)>BS10(4.2 kat)>BS12(4 kat)>BS13(3.3 kat)>BS16(3.2)>BS17(3 kat)>BS7(3 kat)>BS18(2.7 kat)>BS14(2 kat)** şeklinde sıralanabilir.

Test bileşiklerinin sitotoksik aktiviteleri 48 saatlik inkübasyon süresinde değerlendirildiği için komet testi sonuçlarının hücre dizilerine göre karşılaştırılmaları da 48 saatlik inkübasyon sürelerindeki sonuçlar baz alınarak yapılmıştır.

Genotoksik aktivite gösteren bileşikler incelendiğinde bazılarının (**BS7, BS11, BS12, BS14, BS15, BS16 ve BS17**) her iki hücre dizisinde de, bazılarının (**BS1, BS4, BS10**

ve **BS18**) ise yalnızca tek bir hücre dizisi için genotoksik olduğu görülmektedir (Çizelge 4.63).

Antikanser ajan adayı olabilecek bir bileşikten beklenen düşük dozlarda kanser hücrelerini etkilerken normal hücrelerde en az oranda hasar meydana getirmesi olduğuna göre yalnızca HeLa hücre DNA'larını düşük dozda etkileyen bileşiklerin iyi adaylar olabileceği varsayılabilir. Genotoksik potansiyelleri açısından bu profile uyduğu gözlenen **BS1**, **BS4**, **BS10** ve **BS18** bileşiklerinin etkili oldukları dozlar (**BS10**: 50µM < **BS18**: 250µM < **BS1**: 300µM < **BS4**: 400µM) karşılaştırıldığında yalnızca **BS10** bileşiğinin düşük dozda (50 µM) HeLa hücrelerinde etki gösterdiği söylenebilir. Diğer 3 bileşik genotoksosite açısından kanser hücrelerinde seçici etki gösteriyor olsa da etki dozlarının yüksek olması kullanımlarını kısıtlamaktadır.

Her iki hücre dizisi için de genotoksik etki gösteren bileşiklerin (**BS7**, **BS11**, **BS12**, **BS14**, **BS15**, **BS16**, **BS17**) HeLa hücrelerindeki sitotoksik dozları baz alınarak bir değerlendirme yapıldığında, en düşük konsantrasyonda etki gösteren bileşiklerin **BS11** (20 µM) ve **BS7** (100 µM) olduğu görülmektedir. **BS7** bileşiği her iki hücre dizisi için de genotoksik olmasına rağmen, L929 hücre dizisi için bu etkisini yüksek dozda göstermektedir. Daha düşük dozlarda genotoksik etkinin azalacağı varsayıldığından **BS7**'nin genotoksik etkisinin de HeLa hücrelerine özgü olacağı öngörülmüştür. Bu bileşik ile yapılan doza bağlı deneylerde etkinin doz azaldıkça azalması ve HeLa hücreleri için genotoksik olan doza inildiğinde etkinin gözlenmemesi bu varsayımı doğrulamıştır. HeLa hücrelerinde oldukça düşük dozda genotoksik aktiviteye sahip olduğu görülen **BS11** (IC₅₀: 24.31µM) bileşiğinin ise L929 hücreleri için genotoksik olduğu dozun da düşük olması bu bileşiğin normal hücrelerde de DNA kırığına sebep olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle tedavide yan etkilere sebep olma ihtimali kullanımlarını kısıtlayacaktır. Aynı şekilde kanser hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda genotoksik aktivitenin gözlemlendiği **BS12**, **BS14**, **BS15**, **BS16** ve **BS17** bileşiklerinin etki dozlarında normal hücrelerde de DNA hasarı yarattığının belirlenmiş olması bu bileşiklerin etken madde olarak uygun olmayacağı düşünülmüştür.

Sonuç olarak, komet yöntemi ile elde edilen veriler bir arada değerlendirildiğinde kanser hücrelerini öldürmeye yönelik genotoksik etkinliği baz alınarak antikanser aday olabilecek bileşiklerin **BS10** ve **BS7** olduğu sonucuna varılmıştır.

BS3, BS5, BS6, BS8 ve BS13 bileşiklerinin ise her iki hücre dizisinde de IC_{50} konsantrasyonlarında genotoksik potansiyel taşımadığı görülmektedir. Dolayısıyla bunların hücrede DNA'da kırığa neden olabilecek bir hasar yaratmadığı sonucuna varılmıştır. Bu bileşiklerin genotoksik etkisi zamana bağlı olarak değerlendirildiğinde **BS5, BS8 ve BS13** bileşiklerinin denenen inkübasyon sürelerinin her ikisinde de etki göstermezken, **BS3 ve BS6** bileşiklerinin sadece L929 hücre dizisinde 24 saatlik inkübasyonda etkili olduğu belirlenmiştir. **BS3 ve BS6**'nın zamana bağlı olarak etkisinin azalmasının bileşiğin kültür ortamı içerisinde yapısının değişmesinden ya da bileşiklerin hücrede DNA onarım kapasitesinde artışa neden olabilecek bir etki yapmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. HeLa hücrelerinde bu iki bileşiğin etkisinin zamana bağlı olarak da görülmüyor olması da bu düşüncemizi destekler niteliktedir. Genotoksik açıdan etkili olmayan bu bileşiklerin sitotoksik aktiviteleri incelendiğinde **BS3** bileşiği ($IC_{50(HeLa)}:17.84 \mu M$) dışında hepsinin etkisinin her iki hücre için de oldukça düşük ($>100 \mu M$) olduğu görülmektedir. Dolayısı ile **BS3** bileşiğinde görülen yüksek sitotoksitenin kaynağının DNA hasarı ile ilişkili olmadığı sonucuna varılabilir. Yine de **BS3** bileşiğinin normal hücrelerde genotoksik aktiviteye sahip olmaması sitotoksik dozu HeLa kanser hücreleri için oldukça düşük olan bu bileşiğinin kullanımı sırasındaki yan etkileri azaltacağı için faydalı bir veri olarak değerlendirilmiştir. Bu bileşiğin sahip olduğu *in vitro* antikanser aktivitesinin kaynağı olabilecek hücresel mekanizmaların aydınlatılması için ileri çalışmaların yapılması planlanmaktadır.

Komet yöntemi, alkali duyarlı (AP) bölgeler, çapraz bağlanmalar, DNA onarımı tamamlanmamış bölgeler gibi tek ya da çift zincir kırığı ile sonuçlanan geniş bir çerçevedeki DNA hasarlarının tespit edilebildiği bir yöntemdir [159]. Dolayısıyla komet yönteminde pozitif sonuç gözlenen bileşikler bu hasarlardan en az birini yapabilen ajanlar olarak değerlendirilebilmektedir. DNA'da zincir kırıkları doğrudan ya da dolaylı yollarla ortaya çıkabilmektedir. Doğrudan zincir kırıkları ancak fosfodiester bağını kırabilecek enerjiye sahip ajanlar yoluyla oluşabilmektedir. İyonize ışınların tek ve çift zincir kırıklarına, UV'nin ise tek zincir kırıklarına doğrudan sebep oldukları bilinmektedir. Dolaylı olarak oluşan kırıklar ise DNA'da çeşitli sebeplerle oluşabilen modifiye bazlar, çapraz bağlanmalar gibi hataların onarımı sırasında iş gören DNA onarım sistemlerinin aktiviteleri sonucu oluşmaktadır [142].

Bu bağlamda tez çalışmasında alkali komet yönteminde güçlü genotoksik aktivite gösteren bileşiklerde görülen DNA zincir kırıklarının hangi tip hasarlar nedeniyle ortaya çıktığı modifiye komet yöntemi ile araştırılmıştır. DNA'da meydana gelen modifiye bazlar, büyük ölçüde baz kesip-çıkarma onarım sistemi tarafından uzaklaştırılmaktadır. Bu sırada modifiye bazları özgül olarak tanıyan DNA glikozilaz enzimleri işe karışmaktadır. DNA'da imidazol halkası açılmış fapy-guanin, metil-fapy-guanin, fapy-adenin gibi hasarlı fapy pürin bazlarını ve 8-oksoguanin, 8-oksoadenin gibi okside pürin bazları Fpg enzimi ile, timin glikol, 6-hidroksi-5, 6-dihidrotimin, 5, 6 dihidroksitimin, 5-hidroksi-5 metilhidanton, urasil glikol gibi okside pirimidin bazları Endo III enzimi ile ve 3-metiladenin, 7-metilguanin gibi alkillenmiş veya 1,N⁶-etenoadenin ve hipoksantin gibi okside bazlar ise hAAG enzimi ile tanınıp uzaklaştırılmaktadır [155,156]. Bu enzimlerin tanıyabildiği modifiye bazlar çok çeşitli olmasına rağmen bazı substratları daha özgül olarak tanıdığı da bilinmektedir. Örneğin Fpg enziminin 8-oksoguanini, Endo III'ün timin glikolü, hAAG enziminin ise metilenmiş bazları daha özgül tanıdığı rapor edilmiştir [155,160,167]. Dolayısı ile modifiye komet yönteminde bu enzimler ile muamele edilen hücrelerde DNA kırığındaki artış, enzime özgül hasarların oluştuğunun göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Çalışmada test edilen bileşiklerin sebep olduğu DNA zincir kırıklarının kaynağının belirlenebilmesi için hücreler bu özgül endonükleazlar ile muamele edilmiştir. Kuyruk momentlerindeki artış; test bileşiğinin kullanılan enzime duyarlı bölgelere sebep olma sıklığını göstermiştir.

Çalışmamızda alkali komet yönteminde L929 hücrelerinde genotoksik aktivitesi yüksek bulunan **BS2**, **BS7** ve **BS16** bileşikleri ile inkübe edilen hücreler, HeLa hücrelerinde ise **BS1**, **BS4**, **BS10**, **BS11** ve **BS16** bileşikleri ile inkübe edilen hücreler Fpg ve Endo III enzimleri ile muamele edilmiş ve kuyruk momentlerinde artış olup olmadığı değerlendirilmiştir.

Elde edilen verilere göre Fpg ile muamele edilen hücrelerde tüm bileşiklerin Fpg kaynaklı zincir kırıklarını değişik oranlarda artırdığı dolayısıyla okside pürin bazları oluşumuna neden oldukları belirlenmiştir. L929 hücreleri için **BS7** bileşiğinin, HeLa hücreleri için **BS10** ve **BS11** bileşiklerinin Fpg-duyarlı bölge sıklığında en fazla artışa neden olan bileşikler olduğu görülmektedir.

L929 hücrelerinde güçlü genotoksik aktivite gösteren bileşiklerin hiç birinin Endo III kaynaklı hasarlara neden olmadığı, HeLa hücrelerinde güçlü genotoksik potansiyel taşıyan **BS16**, **BS17**, **BS1** ve **BS4** bileşiklerinin ise Endo III kaynaklı kırıklara neden olduğu görülmektedir. Bunlar arasında **BS1** bileşiğinin DNA'da EndoIII-duyarlı bölge sıklığını en fazla artıran bileşik olduğu belirlenmiştir.

Modifiye komet yöntemiyle en çok çalışılan enzimler okside bazıları tanıyan Fpg, Endo III gibi enzimler olmasına karşın alkilleyici ajanların oluşturduğu metilenmiş modifiye bazıları tanıyabilen AlkA enzimi ile de yapılan çalışmalara da literatürde sıklıkla rastlanmaktadır [170, 142]. Test bileşikleri içerisinde yapısında metil grubu içeren bileşiklerin bulunması nedeniyle sisteme bakteriyel AlkA'nın insandaki homologu olan hAAG enzimi de eklenerek bunların alkilleyici etkisinin olup olmadığı da incelenmiştir. Çalışma hAAG enziminin modifiye komet yöntemi ile kullanıldığı ilk çalışma olması açısından önemlidir.

L929 hücrelerinde **BS2**, HeLa hücrelerinde ise **BS10** ve **BS11** bileşikleriyle inkübe edilen hücreler hAAG enzimi ile muamele edilmiştir. **BS2** ve **BS10** bileşiklerinin hAAG enzimi kaynaklı kırıklara neden olduğunun tespit edilmesi bu bileşiklerin bir şekilde (ya kendisinin ya da hücrede başka mekanizmaları tetikleyerek) DNA'da metillenmiş modifiye baz oluşturabileceklerini düşündürmüştür. **BS2** ve **BS10** bileşiklerinde görülen kuyruk momentleri artışının pozitif kontrol olarak kullanılan MMS bileşiği ile karşılaştırıldığında benzer oranlarda olduğu görülmektedir. Yine yapısında metil grubu bulunduran **BS11** bileşiğinin ise kırık miktarını artırmadığı dolayısıyla herhangi bir alkilleyici etkisi olmadığı düşünülebilir.

Sonuç olarak L929 hücreleri için DNA kırığı yaratarak güçlü genotoksik aktiviteye sahip olduğu belirlenen **BS2** bileşiğinin DNA'da okside purin ve metilenmiş modifiye baz oluşumuna sebep olduğu görülmektedir. **BS7** bileşiğinin ise yalnızca DNA'da okside purin miktarını artırdığı görülmektedir. **BS1** ve **BS4** bileşikleri HeLa hücrelerinde hem okside purin hem de okside pirimidinlere sebep olurken, **BS11** bileşiğinin yalnızca purinleri hedef aldığı ve metilenmiş modifiye baz oluşturmadığı belirlenmiştir. Yapısında metil grubu bulunduran **BS10** bileşiğinin ise HeLa hücrelerinde okside purin ve metilenmiş bazların oluşumunu tetiklediği görülmektedir. Her iki hücre dizisi için de güçlü genotoksik potansiyel taşıyan **BS16** bileşiğinin ise

L929 hücrelerinde okside purinlerin, HeLa hücrelerinde ise hem okside purin hem de okside pirimidinlerin oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir.

Bunun yanı sıra her ne kadar hAAG enziminin alkillenmiş bazlara ilgisinin yüksek olduğu bilinse de çok daha az afinite ile bile olsa okside bazları da tanıyıp uzaklaştırabileceği göz önüne alındığında, hAAG duyarlı bölge sıklığını artıran **BS10** bileşiğinin genotoksik etkisini ROS'u tetikleyerek mi yoksa halka içerisinde N'e bağlı CH₃ nedeniyle bir şekilde bazları alkilleyerek mi gösterdiğinin spektrofotometrik ya da alkali elüsyon gibi alkilleme potansiyelinin ölçüldüğü testlerin kullanıldığı ileri çalışmalarla doğrulanması gerekmektedir.

Antikanser ajanların etki mekanizmalarından biri de kanser hücrelerinde reaktif oksijen türelerinin (ROS) oluşumu ile oksidatif stres düzeyini artırarak hücreyi ölüme götürmektir. Bu stratejiyi temel alan FDA onaylı ilk ilaç olan Procarbazine'in fizyolojik ortamda okside olarak H₂O₂ oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. Yine akut miyelositik lösemilerde kullanılan arsenik oksit (As₂O₃), süperoksit radikali oluşumuna, tiyoredoksin redüktaz (TrxR) enziminin inhisyonu ve mitokondrial fonksiyonların bozulmasına sebep olarak antikanser etkisini gösterdiği bilinen diğer bir ilaçtır [205]. Bazı antikanser ajanların ise hücrede glutatyon (GSH) sistemini hedef alarak oksidatif strese neden olduğu bilinmektedir. Onaylı bir ilaç olan melphalan gibi ajanlar kanser hücresinde GSH seviyesini düşürerek ve glutatyon peroksidaz aktivitesini inhibe ederek etkilerini göstermektedirler [206]. ROS oluşumunu tetikleyerek antikanser etkisini gösteren bileşiklerin sıralandığı, FDA tarafından hazırlanan listede, bu tez çalışmasında pozitif kontrol olarak kullanılan CPT ve etoposid bileşiklerinin de bulunduğu görülmektedir. Ayrıca bu bileşiklerin hücresel ROS'u tetikleyerek DNA'da oksidatif hasarlı bazları oluşturduğunu kanıtlayan çok sayıda çalışma vardır [207]. Yakın bir zamanda yapılan bu çalışmalardan biri de etopositin fare kemik iliği hücrelerinde ROS'u indükleyerek oluşturduğu oksidatif DNA hasarlarının Fpg ve Endo III enzimleri varlığında yapılan modifiye komet testi ile araştırıldığı çalışmadır. Araştırmada DNA hasar parametresi olarak kuyruk momenti verileri esas alınmış ve sonuç olarak etopositin Fpg ve Endo III duyarlı bölge sıklığını artırdığı ve net hasar miktarı açısından enzim duyarlı bölge sıklıklarının sırası ile 14 ve 3 olduğu rapor edilmiştir [207]. Bu bakımdan tez çalışmasında etoposid için elde edilen değerler ve değerlendirmelerin (Fpg-duyarlı bölge sıklığı: 14.3, Endo III duyarlı

bölge sıklığı 3.17) bu çalışma ile birebir uyumlu olduğu görülmüştür. Ayrıca tez çalışmasında modifiye komet yönteminde etopositin yanında pozitif kontrol olarak kullanılan CPT ve MMS gibi genotoksinlerin etkilerinin yine modifiye komet yöntemi ile incelendiği diğer çalışmalardan elde edilen verilerin de [208, 209] tez çalışmasından elde edilen verilerle gayet uyumlu olduğunun gözlenmesi nedeniyle, çalışmanın bu açıdan da literatürü desteklediği sonucuna varılmıştır.

CPT'nin topoizomera I üzerinde, etopositin ise topoizomera II enzimi üzerinde DNA-kesim kompleksini kararlı hale getirerek zehir etki gösterdiği ve bu özelliği ile FDA onaylı antikanser ilaç olarak klinikte kullanıldığı bilinmektedir [92, 93, 95, 113]. Yukarıda bahsedilen çalışmada da belirtildiği gibi CPT ve etopositin topoizomera enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi dışında kanser hücrelerini ROS indüklü de öldürdüğü düşünülürse, tez çalışmasında daha önceki çalışmamızda hTopoI üzerinde zehir etki gösterdiği saptanan **BS10** ve **BS11**'in de benzer şekilde hem enzim inhibitör etkisi ile hem de Fpg ve Endo III-duyarlı bölge sıklığını artırdığı için ROS'u indükleyerek kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiği düşünülmüştür. Bu öngörünün diklorofloresin-diasetat (DCFH-DA), Cell-ROX ya da kütle spektrometresi temelli (LC-MS, GC-MS) çeşitli *in vitro* ROS ölçen testlerin kullanıldığı ileri çalışmalarla doğrulanması gerekmektedir.

İlaç etken madde araştırmalarında dikkat edilmesi gereken bir diğer önemli faktör de; etken maddenin etkinliğinin yanı sıra insan sağlığı için güvenilir öngörüye sahip olmasıdır. Kısa zamanlı bir bakteriyel test sistemi olan Ames testi, kimyasal maddelerin mutajenik potansiyellerinin taranmasında kullanılan en temel mutajenite yöntemlerinden biridir. Yöntemin kolay, ucuz ve kısa sürede sonuç vermesi gibi avantajlarının yanı sıra kemirgen ve insan karsinogenitesi hakkında güçlü öngörü değeri taşıması test sistemini pek çok laboratuvarı yaygın olarak kullanılmasını sağlamaktadır [175,177]. Ayrıca ilaç geliştirme süreçlerini düzenleyici otoritelerin (EMA, FDA, ICH vb) yönergelerinde, klinik öncesi çalışmalarda bu testin ilk basamakta zorunlu olarak yapılması istenir [174]. Çeşitli ilaç veri bankalarında FDA'dan onaylı bir ilaç hakkındaki bilgiler incelendiğinde mutajenite/karsinogenite belirteci olarak Ames testi sonuçlarının negatif olarak belirtildiği görülmektedir [11]. Bu test, bakteriyel bir test olmasına rağmen; genetik kodun evrensel oluşu ve mutajenite ve karsinogenite arasındaki korelasyonun yüksek olması (%72-90)

nedeniyle test edilen madde için insandaki olası karsinogenik etkisi hakkında bilgi verdiği literatürde açıkça belirtilmiştir [173,175,177]. Bu bağlamda, çalışmada *in vitro* antikanser aktivitelerini gözlediğimiz ve genotoksik potansiyellerini değerlendirdiğimiz benzoksazin türevi bileşiklerin mutajenik potansiyelleri Ames testi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca çalışmada; sisteme eklenen metabolik aktivasyon sistemi ile bileşiklerin olası metabolitlerinin mutajenik etkisinin de incelenmesi sağlanmıştır [210].

Literatür incelendiğinde; Ames test sisteminde kullanılan mutant bakteri suşlarının his- durumdan his+ duruma kendiliğinden belirli frekanslarda döndüğü bilinmektedir. Metabolik aktivasyon varlığında veya yokluğunda TA98 suşunun geriye dönme frekansının 20-50 ve TA100 için 75-200 koloni olduğu rapor edilmiştir [177]. Bu çalışmada yapılan deneyler sonucunda negatif kontrollerin ortalamaları değerlendirilecek olursa; bu değerler TA98 suşu için 33 ± 3 , TA100 suşu için 118 ± 4 kolonidir. Bu rakamlar literatürde belirtilen aralıklarda yer almaktadır. Aynı uyum test sisteminde kullanılan pozitif kontroller için de geçerlidir.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, **BS12**, **BS13**, **BS16** ve **BS17** bileşiklerinin hem S9 varlığında hem de yokluğunda çok düşük konsantrasyonlarda TA98 ve TA100 suşları üzerinde mutajenik potansiyelleri olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla bu bileşiklerin hem kendisinin hem de olası metabolitlerinin DNA'da hem çerçeve kayması hem de baz değişimi mutasyonlarına neden olduklarını söylemek mümkündür. Ancak bu dört bileşik için de TA100 suşundaki etki dozunun daha düşük olduğu görüldüğünden esas etkisinin baz değişimi mutasyonlarıyla ilişkili olduğu söylenebilir. Bu bileşiklerin sitotoksik aktivitelerine bakıldığında hepsinin de normal hücreleri kanser hücrelerine oranla daha fazla etkilediği dikkat çekmektedir.

Bununla birlikte TA98 suşunda zayıf mutajenik olduğu görülen bileşikler S9 yokluğunda etkilerine göre **BS10>BS7>BS1>BS15** şeklinde, S9 varlığında ise **BS18>BS4>BS7** şeklinde sıralanabilir. Aynı şekilde TA100 suşunda S9 yokluğunda bileşiklerin hiçbiri mutajenik potansiyel taşımazken, yalnızca **BS5** bileşiği S9 varlığında zayıf mutajenik etkili olarak belirlenmiştir. Zayıf etkili görülen bileşiklerin dozları pozitif kontrollerle karşılaştırıldığında ilaç öncülü olarak kullanımlarını kısıtlayacak düzeyde bir mutajenik potansiyel taşımadıkları söylenebilir.

Ames testinin geliştirildiği ilk günden beri yapılan çalışmalarda bu test ile mutajenik potansiyelin değerlendirilmesi için bileşiklerle muamele edilen bakteri kültürlerinde belirlenen kendiliğinden geriye dönen koloni sayılarının, kontrol kültürlerden elde edilen sayıların en az 2 katına ulaşmış olması gerektiği öngörülmektedir [177]. Sonuç olarak elde edilen veriler bileşiklerin yalnızca kontrol ile karşılaştırılması sonucu mutajenik potansiyeli var/yok değerlendirmesi ile yapılmaktadır. Test edilen bir grup bileşiğin mutajenik potansiyellerinin birbirleriyle istatistiksel olarak karşılaştırılarak yapı aktivite ilişkisinin incelenmesi ile ilgili literatürde yeterince veri bulunmamaktadır. Bu çalışmada test edilen benzoksazin türevlerinin mutajenik potansiyelleri ile ilişkili ortak yapılarının belirlenmesini sağlayan farmakofor analizi kullanılmıştır. Bunun için ise değişik dozlarda test bileşikleri ile muamele edilen kültürlerdeki geriye dönen koloni sayılarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığı bir regresyon analizi yapılmıştır. Bu analiz ile her bir bileşik için mutajenik aktivitenin görüldüğü minimum doz belirlenmiş ve veriler test bileşiklerinin mutajenik aktivitesinden sorumlu ortak yapıların değerlendirildiği farmakofor analizi için kullanılmıştır. Çalışmamızda Ames testinden elde edilen ham veriler ile minimum mutajenik dozun hesaplanabildiği istatistiksel yöntem ve bu yöntemden elde edilen verilerin yapı aktivite değerlendirilmesinde kullanıldığı ilk çalışma olması açısından önemlidir.

Ames test sisteminden elde edilen veriler baz alınarak yapılan HipHop yönteminin kullanıldığı farmakofor analiz çalışmaları sonucunda, test edilen benzoksazin türevlerinin R3 konumuna getirilen hidrojen bağı yapabilme yetisi olan ve R2 konumunda hidrofobik özellik gösteren fonksiyonel grupların mutajenik etkiyi artırdığı tespit edilmiştir. Bu konumlarda özellikle aromatik halkayı dezaktive eden grupların (R3 konumu için -NO₂ ve R2 konumu için Cl) mutajenik etkiyi artırdığı düşünülmektedir. NO₂ ve Cl gruplarının her ikisinin de bulunduğu benzoksazin türevi bileşikler (**BS13** ve **BS17**) yapılan çalışmada da en yüksek mutajenik etki gösteren bileşikler olarak saptanmışlardır. Literatür incelendiğinde nitrolu (yapısında -NO₂ taşıyan) bileşiklerin, çok çeşitli farmakolojik aktivite gösteren ilaçlar da dahil olmak üzere biyolojik olarak aktif bileşiklerin önemli bir kısmını oluşturduğu görülmektedir [211]. Bu bileşiklerin yapılarındaki nitro gruplarının varlığı, bileşiklerin fiziko-kimyasal ve elektronik özelliklerini değiştirdiği ve bunun sonucu olarak mutajenik ve genotoksik etkisini artırdığı bildirilmiştir [211,212]. Nitro grubunun metabolik aktivasyon sistemlerince indirgenmesi sonucunda ya da oksidatif süreçler sonucunda oluşan

bileşiğın reaktif türevlerinin DNA ile bağlantı kurmayı kolaylaştırdığı ve dolayısıyla bu durumun biyolojik aktiviteleriyle bağlantılı olduğu bilinmektedir [213-215]. Tez çalışmasında da mutajenik aktivitesi yüksek bulunan tüm türevlerin yapısında nitro grubu bulunması bu veriyi destekler niteliktedir.

Literatür incelendiğinde benzoksazin türevlerinin genellikle farklı metotlarla sentezlenmesi [32] ve farklı biyolojik aktivitelerinin araştırılması [33,193] ile ilgili çalışmalara sıklıkla rastlanmasına rağmen bu türevlerin genotoksik ve mutajenik etkilerinin incelendiğı çalışmalarda kısıtlı sayıda olduğu görölmektedir. Bu kısıtlı genotoksisite çalışmaları çoğunun, ya benzoksazin halkası içeren ve klinikte kullanılan onaylı ilaçlarla (Oladetrol, ofloksazin, Efavirenz) ya da bitkilerde doğal savunma mekanizmasından sorumlu benzoksazinonlarla (DIBOA ve DIMBOA) yapıldığı görölmektedir [11,216,217]. Benzoksazin halkası taşıyan ilaçların onay alabilmesi için zaten olası genotoksik ve mutajenik etkileri klinik öncesi aşamalarda incelenen bu türevlerin, düzenleyici kuruluşların yönergeleri doğrultusunda *in vitro* ve *in vivo* genotoksisite testlerinden ya negatif ya da tolere edilebilir seviyede etki gösteren sonuçlara ulaşılması gerektiğı bilinmektedir. Bu bağlamda klinikte kullanılan ilaçların farmakokinenik, farmakodinamik ve biyogüvenliğı ile ilgili bilgilere ulaşılacak ilaç veri tabanları (DrugBank) incelendiğinde, benzoksazin halkası taşıyan ilaçların Ames testi çalışmaları negatif olduğu ve *in vivo* karsinojenik etkisi olmadığı rapor edilmiştir [11]. Diğer taraftan bitkilerde (özellikle tahıllarda) doğal savunma mekanizmasından sorumlu benzoksazin türevli bileşiklerin yapılarının, etki mekanizmalarının, bitkilerdeki metabolizasyonunun incelendiğı çalışmalara sık rastlanılmasına rağmen bu tip bileşiklerin genotoksik potansiyellerinin incelendiğı çalışmaları çok daha az olduğu görölmektedir. Bu tip çalışmalardan bir tanesi Buchmann ve ark. 'nın [216] benzoksazin türevi DIBOA ve DIMBOA bileşiklerinin HepG2 hücreleri üzerindeki mutajenik potansiyellerinin Ames testi ile ve genotoksik potansiyellerinin komet, mikronükleus ve sentromerik problemlerin kullanıldığı FISH yöntemi ile incelediğı çalışmadır. Bu çalışmada DIBOA ve DIMBOA bileşiklerinin metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda TA98, TA100 ve YG1024 mutant suşları üzerindeki mutajenik potansiyelleri Ames testi ile araştırılmış. S9(-)'de DIBOA bileşiğının kullanılan üç suşta da 0.02 µg/plak ve 0.5 µg/plak konsantrasyonlarda mutajenik etkili olduğu, TA100 suşunda bu etkinin daha çok görüldüğü rapor edilmiştir. YG1024 de ise TA98 suşundaki etkilere benzer etkiler görölmüş. DIMBOA

bileşiğinin ise sadece TA100 suşunda DIBOA'ya göre daha zayıf mutajenik etkisi görülmüştür. Aynı çalışmada ortama S9'un eklenmesi ile her iki bileşik için mutajenik aktivitenin 2 kat arttığı belirtilmiştir. Her ne kadar kontrol plağına göre mutajenik aktivite gözlene de pozitif kontrole göre bu değerlerin çok düşük olduğu için genel olarak bu iki bileşiğin mutajenik etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Yine bu çalışmada bu iki bileşiğin denenen farklı dozlarının (1-250 µM) HepG2 hücreleri üzerinde sitotoksik bir etkisinin olmadığı ve bu dozlarda uygulanan komet yönteminde kuyruk uzunluğu hasar parametresinde anlamlı bir farkın olmadığı rapor edilmiştir. Komet testi sonucu negatif olan bu bileşiklerin mikronükleus testinde ise HepG2 hücrelerinde güçlü anojenik etki gösterdiği ayrıca mikroçekirdeklerin yaklaşık %80'i sentromerik bölgeleri içerdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonucu olarak bu iki bileşiğin potansiyel anojen olabileceği ilk kez rapor edilmiştir. İlerleyen zamanda bu çalışmadan esinlenerek yapılan bir başka çalışmada; DIBOA ve DIMBOA'nın 18 adet yeni sentetik türevlerinin HeLa hücreleri üzerinde çok düşük konsantrasyonlarda (0.5-1µM) mikronükleus testinde güçlü genotoksik etki taşıdığının görülmesi üzerine benzoksazinoidlerin genotoksik potansiyel taşıyabileceği rapor edilmiştir [217]. Bu çalışmada kullanılan benzoksazin türevlerin yapısının bu tez çalışmasında kullanılan benzoksazin yapılarına benzer nitelikte olduğu görülmektedir. Her ne kadar iki test sistemi de genotoksik potansiyeli ölçse de literatürde genotoksisite testlerinin sonuçlarının birbirini desteklemeyebileceğine dair çok fazla örnek vardır. Bunun nedeni her sistemin genotoksik potansiyele neden olan farklı parametreleri ölçmesidir. Yukarıda bahsedilen çalışmayı da baz alarak tez çalışmasında kullandığımız bileşiklerin genotoksik potansiyellerinin mikronükleus, kromozom aberasyon, kardeş kromatit değişimi gibi farklı genotoksite testleriyle de değerlendirilmesinin faydalı olacağı düşünülmektedir.

Yeni sentezlenen 1,4 benzoksazin türevlerinin genotoksik etkileri ile ilgili kısıtlı çalışmalardan bir diğeri ise yakın bir zamanda Okabe ve ark'nın [218] aldesteron reseptör antagonist etkisi olduğu keşfedilen ve yeni bir sentez metodu ile gerçekleştirildiği için patentlenen 1,4 benzoksazin türevi bileşiklerin mutajenik etkisinin Ames testi ile incelendiği çalışmadır. Bu çalışma sonucunda; sentez yolunda elde edilmek istenen son ürün olan benzoksazin türevinin güçlü mutajenik etkisi

olduğunun saptanması üzerine olası karsinojenik etkisi olabileceği düşüncesi ile bu bileşiğin mutajenik olmayan yeni türevlerinin sentezleneceği rapor edilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan benzoksazin türevi bileşiklerden 16 tanesi, daha önce yaptığımız bir diğer çalışmada bakteriyel kısa zamanlı bir genotoksisite test sistemi olan rec yöntemi ile de değerlendirilmiştir [25]. Yöntem bileşiklerin rekombinasyonel onarım sistemi hasarlı ve hasarsız iki bakteri suşu ile muamele edilmesi sonucu bakterilerin hayatta kalma oranlarının karşılaştırılmasını esas almaktadır. Bu çalışmaya göre; **BS5** bileşiğinin en genotoksik bileşik olduğu belirlenmesine rağmen etki dozunun oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Bu tez çalışmasında; bileşiklerin genotoksik aktivitesini değerlendirdiğimiz komet yöntemine göre **BS5**'in genotoksik potansiyel taşımadığı saptanmıştır. Her iki test sisteminde kullanılan bileşik konsantrasyonlarına bakıldığında, Rec yönteminde genotoksik potansiyelin gözlemlendiği dozların (RC50:12 mM) komet yönteminde kullanılan hücreler için sitotoksik dozlar olduğu görülmektedir. Bu nedenle komet yönteminde genotoksik aktivitenin **BS5** bileşiği için denenen dozlarda (IC_{50(L929)}: 400 µM, IC_{50(HeLa)}:250 µM) gözlenmemiş olması olasıdır.

Ayrıca Rec yöntemi sonuçlarına göre **BS4**, **BS7** ve **BS9** bileşiklerinin ise daha düşük konsantrasyonlarda genotoksik potansiyel taşıdığı görülmüştür [25]. Bu çalışmada da benzer şekilde **BS7** bileşiğinin her iki hücre için, **BS4** bileşiğinin sadece HeLa, **BS9** bileşiğinin ise sadece L929 hücrelerinde genotoksik potansiyelleri olduğu görülmektedir. Komet yönteminde genotoksik potansiyel açısından pozitif olduğu belirlenen **BS1**, **BS10**, **BS12**, **BS14**, **BS15**, **BS16**, **BS17** ve **BS18** bileşiklerinin rec yöntemine göre genotoksik olmadığı belirlenmiştir. Her ne kadar iki sistem de bileşiklerin hücrede neden olduğu genotoksik potansiyeli belirlemek için kullanılsa da özellikle bakteriyel ve ökaryotik onarım sistemlerindeki farklılıklar nedeniyle farklı sonuçlar görülebildiği, ayrıca komet yönteminin düşük miktardaki hasarları tanıyabilen bir yöntem olup diğer genotoksisite testlerine göre daha hassas olduğuna dair görüşler literatürde belirtilmektedir [142].

Kanser tedavisinde kullanılan antineoplastik ajanların moleküler hedeflerinden birisi de DNA topoizomerez enzimleridir. Bu enzimler replikasyon, transkripsiyon, rekombinasyon ve kromozom yoğunlaşması gibi önemli hücresel süreçlerde DNA topolojisinin değiştirilmesinde görev alırlar. Dolayısı ile hücre çoğalmasında gerekli

olan bu enzimlerin inhibe olması, kontrolsüz ama hızlı bölünen kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurabileceği düşüncesi, bu enzimleri antikanser ajanların hedefleri haline getirmiştir [80, 92-94]. Literatürde bu enzimleri hedef alan bileşiklerle ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur. Çalışmamızda test edilen benzoksazin türevi bileşiklerin ökaryotik DNA topoizomera I enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri de daha önceki yaptığımız çalışmalarda incelenmiştir [25,26]. Buna göre test edilen 18 benzoksazin türevi bileşikten 10 tanesinin sadece katalitik inhibitör, 4 tanesinin sadece zehir etkili ve 4 tanesinin ise doza bağlı olarak hem katalitik hem de zehir etkili oldukları görülmüştür. Ancak **BS10** bileşiği dışındaki diğer bileşiklerin inhibitör etkilerini mM düzeyde gösterdikleri için etkili birer topoizomera I inhibitörü olarak değerlendirilmemişlerdir. **BS10** bileşiğinin ise çok düşük konsantrasyonda (IC_{50} :0.6 μ M) kovalent DNA-enzim kompleksini kararlı hale getirerek zehir etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Literatürde zehir etkili bileşiklerin sitotoksik etkilerinin yüksek olduğu rapor edilmiştir [92,94]. Dolayısı ile önceki çalışmamızda **BS10** için elde edilen bu sonuca göre kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstereceği beklenen bir durumdur. Bu tez çalışmasında **BS10**'nun kanser hücreleri üzerinde normal hücreye göre yaklaşık 9 kat daha sitotoksik bulunması bu ön görüşümü doğrulamıştır. Enzim inhibisyon çalışmaları hücre dışı (cell-free) yani sadece enzim, DNA ve test edilen bileşiğin tüp içerisinde bir araya getirildiği ortamda uygulanırken, *in vitro* sitotoksik aktivitenin belirlendiği çalışmalarda bileşiğin enzim ve DNA ile etkileşebilmesi için öncelikle hücre içerisine girebilmesi ve yeterli konsantrasyona ulaşabilmesi gerekmektedir. Dolayısı ile enzim inhibisyon çalışmalarından elde edilen IC_{50} değerlerinin daha düşük olması muhtemeldir. Bu durum **BS10** için enzim inhibisyon çalışmalarından elde edilen IC_{50} konsantrasyonunun (IC_{50} :0.6 μ M) HeLa hücreleri için belirlenen sitotoksik konsantrasyondan ($IC_{50(HeLa)}$: 52.53 μ M) daha düşük olmasını açıklamaktadır.

Kovalent enzim-DNA kompleksinin kararlı hale getirilmesi sonucu DNA'da oluşan zincir kırıkları, topoizomera zehirlerinin sitotoksik aktivitesinin kaynağı olarak gösterilmektedir. Dolayısıyla zehir etkili bileşiklerle muamele edilen hücrelerde DNA zincir kırıklarının gözlenmesi beklenen bir durumdur. Literatürde topoizomera zehirlerinin neden olduğu zincir kırıklarının komet testi ile belirlendiği çalışmalara sıklıkla rastlanmaktadır [219,220]. Bu çalışmada da **BS10** bileşiği ile muamele edilen hücrelerde komet testi ile DNA zincir kırıklarının tespit edilmesi, bu bileşiğin zehir

etkisini doğrular niteliktedir. Bununla birlikte, komet testinde HeLa hücrelerinde topoizomeraz kaynaklı DNA zincir kırıkları gözlenirken, L929 hücrelerinde gözlenmemesi, kanser hücrelerinde topoizomeraz ifadesinin normal hücrelere göre yüksek olması ile açıklanabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Tez çalışması kapsamında daha önce sentezi yapılan orijinal bir dizi 1,4 benzoksazin-3-on türevi bileşiğin biyolojik aktiviteleri ilk kez çok yönlü olarak hücre kültürü sistemlerinde değerlendirilmiştir. Ayrıca yapı-aktivite ilişkileri dikkate alınarak hangi yapıların aktiviteden sorumlu olduğu belirlenerek daha etkili olabilecek yeni türevlerin tasarlanabilmesi için yapısal modeller oluşturulmaya çalışılmıştır.
- Çalışmada amacımız, incelenen seri içerisinde antikanser ajan olmaya aday etkili bileşiklerin belirlenmesidir. Bu bağlamda kanser hücrelerinde düşük dozlarda sitotoksik ve genotoksik aktivite gösterirken bu dozlarda normal hücreleri en az oranda etkileyen bileşikler, “etkili aday bileşikler” olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca mutajenite/karsinojenite arasındaki korelasyonun yüksek olduğu düşünüldüğünde, aday bileşiklerin mutajenik potansiyel taşımamaları da göz önünde bulundurulmuştur. Bu bağlamda tez çalışmasından elde edilen tüm veriler bir arada değerlendirildiğinde;

➤ **BS3, BS7 ve BS10** bileşiklerinin yukarıda bahsedilen etkili bir bileşikten beklenen özelliklerin tümünü taşıdıkları için birer antikanser ajan adayı olabilecekleri sonucu çıkarılabilmektedir. Bu bileşiklerin sadece kanser hücrelerini temsilen HeLa hücrelerinde seçici bir etkisi olduğu yapılan çalışma ile tespit edilse de etkinin sadece HeLa hücrelerine mi yoksa kanser hücrelerine mi özgül olduğu hakkında bir genellemenin yapılabilmesi için bu bileşiklerin daha fazla hücre dizilerinin kullanıldığı panellerde farklı parametreler açısından değerlendirilmeleri ve sonrasında *in vivo* kanser modeli çalışmalarında da etkilerinin incelenmesi önerilmektedir.

➤ Düşük dozlarda her iki hücre dizisinde de güçlü sitotoksik ve genotoksik etki gösteren **BS11** bileşiğinin HeLa hücresi üzerinde seçici olmadığı belirlenmiştir. Bu özellikleri açısından klinikte antikanser ilaç olarak kullanılan ve çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan bileşikler gibi davrandığı dikkat çekicidir. Bu nedenle **BS3, BS7 ve BS10** bileşiklerinde olduğu gibi **BS11** ile ilgili daha ileri çalışmalarla etki mekanizmasının aydınlatılması planlanmıştır.

- Daha önceki çalışmamızda topoizomeraaz I enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi hücresiz ortamda değerlendirilen ve enzim üzerinde kamptotesinden çok daha güçlü inhibisyon (zehir) etki gösterdiği görülen **BS10** bileşiğinin; bu çalışma ile *in vitro* ortamda sitotoksik, genotoksik ve mutajenik etkileri hakkında bilgi sahibi olunmuştur. Bu bileşiğin kanser hücrelerini temsilen sadece HeLa hücre dizisinde düşük konsantrasyonda seçici sitotoksik etki gösterdiği ve topoizomeraaz zehirlerinden beklendiği gibi DNA'da zincir kırıklarına sebep olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle enzim üzerindeki inhibisyon mekanizmasının aydınlatılması için topoizomeraaz DNA kırma (cleavage), elektromobilité (EMSA), T4 DNA ligaz sarmal açma gibi çeşitli testlerle ileri çalışmaların yapılması düşünülmektedir.
- Çalışmada komet yöntemi ile güçlü genotoksik etki gösterdiği saptanan bileşiklerin genotoksik etkilerinin nedeni Fpg, Endo III ve hAAG onarım enzimleri varlığında modifiye komet yöntemi ile kısmen belirlenmeye çalışılmıştır. HeLa hücreleri üzerinde güçlü genotoksik etki gösteren **BS1**, **BS4** ve **BS16**'nın Fpg ve Endo III duyarlı bölge sıklığını artırırken, **BS11**'in sadece Fpg, **BS10**'nun ise Fpg ve hAAG duyarlı bölge sıklığını artırdığı belirlenmiştir. Oksidatif hasarlı bazların Fpg (okside pürin) ve Endo III (okside pirimidin) için, alkilenmiş modifiye bazların ise hAAG için sübstrat olduğu göz önüne alındığında,
 - Çalışmada etkili aday bileşikler olarak öngörülen ve topoizomeraaz üzerinde zehir etkisi bilinen **BS10** ve **BS11** bileşiklerinin sitotoksik etkisini, enzim inhibisyonu dışında hücrede bir şekilde (ya kendisinin ya da tetiklediği başka mekanizmalar tarafından) hücrede reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturarak gösterdiği düşünülmüştür. Bu öngörünün diklorofloresin-diasetat (DCFH-DA), Cell-ROX ya da kütle spektrometresi temelli (LC-MS, GC-MS) çeşitli *in vitro* ROS ölçen testlerin kullanıldığı ileri çalışmalarla doğrulanması gerekmektedir.
 - Ayrıca her ne kadar hAAG enziminin alkilenmiş bazlara ilgisinin yüksek olduğu bilirse de daha az afinite ile okside bazları da tanıyıp uzaklaştırabileceği göz önüne alındığında, hAAG duyarlı bölge sıklığını artıran **BS10** bileşiğinin genotoksik etkisini ROS'u tetikleyerek mi yoksa

halka içerisinde N'e bağılı CH₃ nedeniyle bir şekilde bazları alkilleyerek mi gösterdiğinin spektrofotometrik ya da alkali elüsyon gibi alkilleme potansiyelinin ölçüldüğü testlerin kullanıldığı ileri çalışmalarla doğrulanması gerekmektedir.

- Benzoksazin türevlerinin çeşitli biyoaktiviteleri ile ilgili literatürde çok sayıda çalışma bulunmasına karşın bu türevlerin genotoksik ve mutajenik aktivitesi ile ilgili çalışmaların sınırlı olduğu görülmektedir. Bu nedenle çalışmanın benzoksazin türevlerinin genotoksik ve mutajenik potansiyelleri ile ilgili bilgi vermesi açısından literatüre katkıda bulunacağı düşünülmektedir.
- Literatürde mutajenik aktiviteleri test edilen bileşiklerin birbirleri ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilemediği görülmektedir. Ames testi sonuçları ile yapı-etki ilişkisini ortaya çıkarmakta yaşanan bu sorun çalışmada kullanılan farklı bir istatistiksel modelleme (regresyon model kestirim yöntemi) ile aşılmıştır. Bu açıdan literatüre katkıda bulunacağı düşünülmektedir. Ayrıca oluşturulan bu modelin geliştirilmesi için üst çalışmaların yapılması planlanmaktadır.
- **BS12, BS13, BS16 ve BS17** bileşiklerinin Ames testinde metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda hem TA98 hem de TA100 suşları üzerinde test edilen diğer bileşiklere göre oldukça yüksek mutajenik aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca bu bileşiklerin TA100 suşu için pozitif kontrol olarak kullanılan 2-aminoflorenden bile daha mutajenik olduğu görülmüştür. Test edilen seride bileşiklerin yapı olarak birbirine çok benzediği düşünüldüğünde, bu bileşiklerin diğer bileşiklerden farklı olarak DNA ile ilişkili hangi mekanizmaları etkilediklerinin belirlenmesi için ek çalışmalar yapılması önerilmektedir.
- Sitotoksik aktivite verileri baz alınarak yapılan yapı aktivite analizleri sonucunda ortaya çıkarılan farmakofor modellere göre, benzoksazin yapısının 6. veya 7. konumunda hidrofobik aromatik özelliği karşılayabilecek benzen gibi bir yapının eklenmesi ile kanser hücrelerinde sitotoksik aktivitenin artırabileceği tahmin edilmiştir. Aktivite için belirlenen bu ortak özellikler, sentezlenmesi planlanan daha etkili yeni benzoksazin türevi bileşiklerin tasarlanması için bir kılavuz olacaktır. Bu bağlamda sentezlenecek yeni bileşiklerin de aktivitelerinin yeniden değerlendirilmesi önerilmektedir.

- Literatürde benzoksazin türevlerinin antikanser ajan olarak kullanılabilmesi için apoptozu tetikleyen ve hücre döngüsünü durduran sitotoksik/sitostatik etkilerinin yanı sıra bu bileşiklerin anjiyogenez ve metastazı önleyen mekanizmalar üzerindeki etkilerinin de farklı moleküller hedeflenerek incelendiği görülmektedir. Bu bağlamda çalışmada sadece sitotoksik etkileri incelenen test bileşiklerinin farklı biyolojik aktivitelerinin de olabileceği düşünülerek farklı parametrelerin incelendiği çalışmaların da yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] World Health Organization (WHO), Globocan 2012:Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide 2015. <http://globocan.iarc.fr/default.aspx> (Aralık 2015).
- [2] World Health Organization (WHO), The top 10 causes of death, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index2.html> (Aralık 2015).
- [3] Hughes, J.P., Rees, S., Kalindjian, S.B., Philpott, K.L., Principles of early drug design, *British Journal of Pharmacology*, 162, 1239-1249, **2011**.
- [4] Gonzalez-Nicolini, V., Fussenegger, M., *In vitro* assays for anticancer drug discovery—a novel approach based on engineered mammalian cell lines, *Anti-Cancer Drugs*, 16:223–228, **2005**.
- [5] Gao, Q., Yang L., Zhu Y., Pharmacophore Based Drug Design Approach as a Practical Process in Drug Discovery, *Current Computer-Aided Drug Design*, 6, 37-49, **2010**.
- [6] Weinberg, O.K., Marquez-Garban D.C., Pietras, R.J., New approaches to reverse resistance to hormonal therapy in human breast cancer, *Drug Resistance Updates*, 8, 219–233, **2005**.
- [7] Akhdar, H., Legendre, C., Aninat, C., More F., Anticancer Drug Metabolism: Chemotherapy Resistance and New Therapeutic Approaches, *Topics on Drug Metabolism*, (ed:Paxton J.), InTech, **2012**.
- [8] Zahreddine, H., Borden, K.L., Mechanisms and insights into drug resistance in cancer, *Frontiers in Pharmacology*, 4, 28, **2013**.
- [9] Hurley, L.H., DNA and its associated processes as targets for cancer therapy, *Nature Reviews Cancer*, 2, 188-200, **2002**.
- [10] Goldwein, J.W., Vachani, C., Chemotherapy: The Basics, OncoLink com, <http://www.oncolink.org/treatment/article.cfm?c=2&s=9&id=319>, (Aralık 2015).
- [11] Drugbank (DB), <http://www.drugbank.ca/> (Aralık 2015).
- [12] S̃tefanić, P., Anderluh, M., Ilaš, J., Mravljak, J., Sollner Dolenc, M., Stegnar, M., Kikelj, D.J., Toward a novel class of antithrombotic compounds with dual function. Discovery of 1,4-benzoxazin-3(4H)-one derivatives possessing thrombin inhibitory and fibrinogen receptor antagonistic activities, *Journal of Medicinal Chemistry*, 48, 3110–3113, **2005**.
- [13] Mizar, P., Myrboh, B., Synthesis of Substituted 4-(5-Alkyl-thiazol-2-ylmethyl)-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazines and 5-(2,3-Dihydro-1,4-benzoxazin-4-ylmethyl)-4-methyl-1-phenyl-]-1H-pyrazol -3-ylamine, *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 46, 39-43, **2009**.
- [14] Bollu, R., Palem, J.D., Bantu, R., Guguloth, V., Nagarapu, L., Polepalli, S., Jain, N., Rational design, synthesis and anti-proliferative evaluation of novel 1,4-benzoxazine-[1,2,3]triazole hybrids, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 89, 138-46, **2015**.

- [15] Sugimoto, Y., Otani, T., Oie, S., Wierzba, K., Yamada, Y., Mechanism of action of a new macromolecular antitumor antibiotic, C-1027, *Journal of Antibiotics*, 43, 417–421, **1990**.
- [16] Frechette, R., Beach, M., 2-substituted amino and thioalkylbenzoxazine antimicrobial agents, *WO Patent Application*, 972816, **1997**.
- [17] Frechette, R., Weidner-Wells, M.A., Benzoxazine antimicrobial agents, *WO Patent Application*, 9717333, **1997**.
- [18] Miles, D.H., Petrovna, K.O., Naser, S., Yurjevich, S.S., Goun, E.A., Michailovich, S.V., 2-Oxo-1,4- benzoxazine compounds for treatment of tuberculosis. *US Patent*, 6,649,610, **2003**.
- [19] Tsutsui, H., Hori, M., Watanabe, I., Harada, K., Maruo, J., Morita, T., Ohtaka, H., Yamamoto, T., 1,4-Benzoxazine derivative, pharmaceutical composition containing the same and use thereof, *European Patent Application*, 719766, **2000**.
- [20] Madhavan, G.R., Iqbal, J., Bhuniya, D., Chakrabarti, R., Das, S.K., Benzoxazine and benzothiazine derivatives and pharmaceutical compositions containing them, *WO Patent Application*, 03033481, **2003**.
- [21] Largeron, M., Lockhart, B., Pfeiffer, B., Fleury, M-B., Synthesis and *in vitro* evaluation of new 8-amino-1,4-benzoxazine derivatives as neuroprotective antioxidants, *Journal of Medicinal Chemistry*, 42:5043–5052, **1999**.
- [22] Hoelscher, P., Jautelat, R., Rehwinkel, H., Jaroch, S., Suelzle, D., Hillmann, M., Burton, G.A., McDonald, F.M., Benzoxazine derivatives and benzothiazine derivatives having nos-inhibitory and antioxidant properties, *WO Patent Application*, WO0181324, **2001**.
- [23] Dudley, D.A., Edmunds, J.J., Narasimhan, L.S., Rapundalo, S.T., Berryman, K.A., Downing, D.M., Benzoxazinones/benzothiazinones as serine protease inhibitors, *WO Patent Application*, 9950257, **1999**.
- [24] Burton, G.A., Rehwinkel, H., Jaroch, S., Hoelscher, P., Suelzle, D., Hillmann, M., McDonald, F.M., Benzoxazine and benzothiazine derivatives and their use in medicines, *WO Patent Application*, 0017173, **2000**.
- [25] Zilifdar, F., Tekiner-Gulbas, B., Alper-Hayta, S., Kaplan-Ozen, C., Foto E., Aydoğan, Z., Yildiz, I., Aki, E., Yalcin, I., Diril, N., Genotoxic Potentials and Eukaryotic DNA Topoisomerase I Inhibitory Effects of Some Benzoxazine Derivatives, *Medicinal Chemistry Research*, 23:1, 480-486. **2014**.
- [26] Foto, E., Ozen, C., Zilifdar, F., Yilmaz, S., Alper-Hayta, S., Yildiz, I., Aki-Yalçın, E., Yalçın, I., Diril, N., Inhibitory Effects of Some Benzoxazine Derivatives on Human DNA Topoisomerase I, *2nd International BAU-drug design symposium, Novel Methods and Emerging Targets in Drug Discovery & Patented Drug Development*, 17-19 April, Istanbul/Turkey, **2014**.
- [27] Wu, J.H., Chang, F.R., Hayashi, K.I., Shiraki, H., Liaw, C.C., Nakanishi, Y., Bastow, K.F., Yu, D., Chenb, I.S.,; Lee, K.H., Antitumor agents. Part 218: Cappamensin A, a new *In vitro* anticancer principle, from *Capparis sikkimensis*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13, 2223-2225, **2003**.

- [28] Bharathkumar, H., Mohan, C.D., Rangappa, S., Kang, T., Keerthy, H.K., Fuchs, J.E., Kwon, N.H., Bender, A., Kim, S., Basappa, Rangappa, K.S., Screening of quinoline, 1,3-benzoxazine, and 1,3-oxazine-based small molecules against isolated methionyl-tRNA synthetase and A549 and HCT116 cancer cells including an in silico binding mode analysis, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 13(36), 9381-7, **2015**.
- [29] Wang, S., Li, Y., Liu, Y., Lu, A., You, Q., Novel hexacyclic camptothecin derivatives. Part 1: synthesis and cytotoxicity of camptothecins with an A-ring fused 1,3-oxazine ring, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18(14), 4095-7, **2008**.
- [30] Chen, S., Li, X., Wan, S., Jiang, T., Synthesis of novel benzoxazinone compounds as epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors, *Synthetic Communications*, 42, 2937, **2012**.
- [31] Fitzgibbon, C., Ihmaid. S., Al-Rawi, J., Meehan-Andrews, T., Bradley, C., Chemo-sensitisation of HeLa cells to etoposide by a benzoxazine in the absence of DNA-PK inhibition, *Investigational New Drugs*, 31(6), 1466-75, **2013**.
- [32] Ilaš, J., Anderluh, P.Š., Dolenc, M.S., Kikelj, D., Recent advances in the synthesis of 2H-1, 4-benzoxazin-3-(4H)-ones and 3, 4-dihydro-2H-1, 4-benzoxazines, *Tetrahedron*, 61(31), 7325-7348, **2005**.
- [33] Ilić, M., Ilaš, J., Dunkel, P., Mátyus, P., Boháč, A., Liekens, S., Kikelj, D., Novel 1,4-benzoxazine and 1,4-benzodioxine inhibitors of angiogenesis, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 58, 160-170, **2012**.
- [34] Alper-Hayta, S., Aki-Sener, E., Tekiner-Gulbas, B., Yildiz, I., Yalcin, I., Alanlar, N., Synthesis of New ethyl-3, 4- dihydro-3-oxo-4, 6, 7-trisubstituted-2H-1, 4-benzoxazine-2-acetate derivatives and antimicrobial evaluation, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 41, 1398-1404, **2006**.
- [35] Yalcin, I., Tekiner-Gulbas, B., Yildiz, I., Temiz-Arpaci, O., Akı-Sener, E., Altanlar, N., Synthesis and antimicrobial activity of some novel 2,6,7-trisubstituted-2H-3,4-dihydro-1,4-benzoxazin-3-one derivatives, *Indian Journal of Chemistry*, 42B, 905-909, **2003**.
- [36] Smist, M., Kwiecien, H., Synthesis of 3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazines and their Oxo Derivatives: A Review, *Current Organic Synthesis*, 11(5), 676-695, **2014**.
- [37] Virtanen, A.I., Hietala, P.K., Precursor of benzoxazolinon in rye plants I. Precursor II The Aglucone, *Acta Chemica Scandinavica*, 14(2), 499-502, **1960**.
- [38] Niemeyer, H.M., Hydroxamic acids (4-hydroxy 1,4-benzoxazin-3-ones), defence chemical in the Gra mineae, *Phytochemistry*, 27, 3349-3358, **1988**.
- [39] Otsuka, H., Hirai, Y., Nagao, T., Yamasaki, K.I., Anti-inflammatory activity of benzoxazinoids from roots of Coix lacryma-iovivar Ma-Yuen, *Journal of Natural Products*, 51, 74-79, **1988**.
- [40] Niemeyer, H.M., Hydroxamic Acids Derived from 2-Hydroxy-2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-one: Key Defense Chemicals of Cereals, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1677-1696, **2009**.

- [41] Hofman, J., Hofmanova, O., 1,4-Benzoxazine derivatives in plants. Absence of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3-(4H)-one from uninjured *Zea mays* plants, *Phytochemistry*, 10, 1441-1444, **1971**.
- [42] Bravo, H.R., Niemeyer, H.M., Decomposition in aprotic solvents of 2,4-dihydroxy-7-methoxy 1,4-benzoxazin-3-one a hydroxamic acid from cereals, *Tetrahedron*, 41, 4983-4986, **1985**.
- [43] Hamilton, H.R., A corn mutant deficient in 2,4- dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one with an altered tolerance of atrazine, *Weeds*, 12, 27-30, **1964**.
- [44] Tipton, C.L., Husted, R.R., Tsao, F.H-C., Catalysis of simazine hydrolysis by 2,4-dihydroxy-7- methoxy-1,4-benzoxazin-3-one, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 19, 484-486, **1971**.
- [45] Tipton, C.L., Buell, E.L., Ferric iron complexes of hydroxamic acids from maize, *Phytochemistry*, 9, 1215-1217, **1970**.
- [46] Bravo, H.R., Lazo, W., Antimicrobial activity of cereal hydroxamic acids and related compounds, *Phytochemistry*, 33, 569-571, **1993**.
- [47] Bravo, H.R., Lazo, W., Antialgal and antifungal activity of natural hydroxamic acids and related compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1569-1571, **1996**.
- [48] Roberts, K.P., Iyer, R.A., Prasad, G., Liu, L.T., Lind, R.E., Hanna, P.E., Cyclic hydroxamic acid inhibitors of prostate cancer cell growth: Selectivity and structure activity relationships, *The Prostate*, 34, 92-99, **1998**.
- [49] Zhen, Y.S., Ming, X.Y., Yu, B., Otani, T., Saito, H., Yamada, Y., A new macromolecular antitumor antibiotic, C-1027. III. Antitumor activity, *Journal of Antibiotics*, 42, 1294–1298, **1989**.
- [50] Xu, Y.J., Li, D.D., Zhen, Y.S., Mode of action of C-1027, a new macromolecular antitumor antibiotic with highly potent cytotoxicity, on human hepatoma BEL-7402 cells, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 27(1), 41-6, **1990**.
- [51] Barnes, E.C., Bezerra-Gomes, P., Nett, M., Hertweck, C., Dandamycin and chandrananimycin E, benzoxazines from *Streptomyces griseus*, *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 68(7), 463-8, **2015**.
- [52] Holly, F.W., Cope, A.C., Condensation products of aldehydes and ketones with o-aminobenzyl alcohol and o-hydroxybenzylamine, *Journal of the American Chemical Society*, 66, 1875–1879, **1944**.
- [53] Takeichi, T., Agag, T., High performance polybenzoxazines as novel thermosets, *High Performance Polymers*, 18, 777–797, **2006**.
- [54] Beach, M., Frechette, R., 2-Substituted amino and thioalkylbenzoxazine antimicrobial agents, *WO Patent Application*, 9728167, **1997**.
- [55] Lestage, P., Lockhart, B., Fleury, M.B., Largeron, M., Novel 8-amino-1,4-benzoxazine compounds, preparation method and pharmaceutical compositions containing them, *WO Patent Application*, 9962889, **1999**.

- [56] Serafinowska, H.; Stasi, L.; Vong, A.; Borriello, M.; Zucchelli, V.; Granci, E.; Bertani, B.; Bozzoli, A.; Leslie, C.; Bromidge, S. M. Benzoxazinone derivatives, preparation thereof and uses in the treatment of cns and other disorders, *WO Patent Application*, 2004046124, **2004**.
- [57] Wise, L.D. Wustrow, D.J., Belliotti, T., Benzoxazinone dopamine d4 receptor antagonists, *WO Patent Application*, 9745419, **1997**.
- [58] Kikelj, D., Suhadolc, E., Rutar, A., Pec̃ar, S., Punc̃uh, A., Urleb, U., Leskovs̃ek, V., Marc, G., Sollner Dolenc, M., Krbavc̃ic̃, A., Sers̃a, G., Novakovic̃, S., Povs̃ic̃, L., S̃talc, A., Novel heterocyclic acyldipeptides, processes for the preparation thereof and pharmaceutical compositions containing the same, *European Patent Application*, EP0695308, **1996**.
- [59] S̃tefanic̃, P., Simonc̃ic̃, Z., Breznik, M., Plavec, J., Anderluh, M., Addicks, E., Giannis, A., Kikelj, D., Conformationally tailored N-(2-methy-3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazin-2-yl)carbonylproline templates as molecular tools for the design of peptidomimetics. Design and synthesis of fibrinogen receptor antagonists, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2, 1511–1517, **2004**.
- [60] Ilaš, J., Tomašić, T., Kikelj, D., Novel potent and selective thrombin inhibitors based on a central 1,4-benzoxazin-3(4H)-one scaffold, *Journal of Medicinal Chemistry*, 51, 2863-2867, **2008**.
- [61] Ilaš, J., Jakopin, Ž., Borštnar, T., Stegnar, M., Kikelj, D., 3,4-Dihydro-2H-1,4-benzoxazine derivatives combining thrombin inhibitory and glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonistic activity as a novel class of antithrombotic compounds with dual function, *Journal of Medicinal Chemistry*, 51, 5617-5629, **2008**.
- [62] Achari, B., Mandal, S.B., Dutta, P.K., Chowdhury, C., Perspectives on 1,4-benzodioxins, 1,4-benzoxazines and their 2,3-dihydro derivatives, *Synlett*, 2449–2467, **2004**.
- [63] Anderluh, M., Cesar, J., Stefanic, P., Kikelj, D., Janes, D., Murn, J., Nadrah, K., Tominc, M., Addicks, E., Giannis, A., Stegnar, M., Dolenc, M.S., Design and synthesis of novel platelet fibrinogen receptor antagonists with 2H-1,4-benzoxazine-3(4H)-one scaffold. A systematic study, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 40, 25, **2005**.
- [64] Khan, A., Prasad, S., Parmar, V.S., Sharma, S.K., Design and Synthesis of Novel Triazolyl Benzoxazine Derivatives and Evaluation of Their Antiproliferative and Antibacterial Activity, *Journal of Heterocyclic Chemistry*, JHET-14-0378, **2015**.
- [65] Korolyov, A., Dorbes, S., Azéma, J., Guidetti, B., Danel, M., Lamoral-Theys, D., Gras, T., Dubois, J., Kiss, R., Martino, R., Malet-Martino, M., Novel lipophilic 7H-pyrido[1,2,3-de]-1,4-benzoxazine-6-carboxylic acid derivatives as potential antitumor agents: improved synthesis and *in vitro* evaluation, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18(24), 8537-48, **2010**.
- [66] Garg, V., Kumar, A., Chaudhary, A., Agrawal, S., Tomar, P., Sreenivasan, K.K., Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Docking Studies of 1,3-Benzoxazine Derivative as Potential Anticancer Agents, *Medicinal Chemistry Research*, 22, 5256-5266, **2013**.

- [67] Kandale, A.N., Ohlyan, R., Kumar, G., Synthesis and in-vitro antiproliferative activity of 2, 3-aryl substituted 1, 3-benzoxazin-4-one derivatives, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 (7), **2014**.
- [68] Rudyanto, M., Widiandani, T., Syahrani, A., Some benzoxazine and aminomethyl derivatives of eugenol: cytotoxicity on MCF-7 cell line, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7:5, 229-232, **2015**.
- [69] Bhat, M., Robichaud, N., Hulea, L., Sonenberg, N., Pelletier, J., Topisirovic, I., Targeting the translation machinery in cancer, *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(4), 261-78, **2015**.
- [70] Jiao, P.F., Zhao, B.X., Wang, W.W., He, Q.X., Wan, M.S., Shin, D.S., Miao, J.Y., Design, synthesis, and preliminary biological evaluation of 2,3-dihydro-3-hydroxymethyl-1,4-benzoxazine derivatives, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 16(11), 2862-7, **2006**.
- [71] Vazquez, A., Bond, E.E., Levine, A.J., Bond, G.L., The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy, *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(12), 979–987, **2008**.
- [72] Shangary, S., Wang, S., Targeting the MDM2-p53 interaction for cancer therapy, *Clinical Cancer Research*, 14(17), 5318–5324, **2008**.
- [73] Su, H., Su, L., He, Q., Zhao, J., Zhao, B., Zhang, S., Miao, J., A benzoxazine derivative specifically inhibits cell cycle progression in p53-wild type pulmonary adenocarcinoma cells, *Frontiers in Biology*, 5(2), 180–186, **2010**.
- [74] El-Ansary, S.L., Hussein, M.M., Abdel Rahman, D.E., Abdel Ghany, L.M.A., Synthesis, docking and *in vitro* anticancer evaluation of some new benzopyrone derivatives, *Bioorganic Chemistry*, 53, 50–66, **2014**.
- [75] Hanahan, D., Weinberg, R.A., The Hallmarks of Cancer, *Cell*, 100:1, 57–70, **2000**.
- [76] Hanahan, D., Weinberg, R.A., Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, 144(5):646-74, **2011**.
- [77] Sharma, P., Allison, J.P., Immune Checkpoint Targeting in Cancer Therapy: Toward Combination Strategies with Curative Potential, *Cell*, 161:2, 205–214, **2015**.
- [78] Brulikova, L., Hlavac, J., Hradil, P., DNA Interstrand Cross-Linking Agents and their Chemotherapeutic Potential, *Current Medicinal Chemistry*, 19, 364-385, **2012**.
- [79] Huang, Y., Li, L., DNA crosslinking damage and cancer - a tale of friend and foe, *Translational Cancer Research*, 2(3):144-154, **2013**.
- [80] Deweese, J.E., Osheroff, M.A., Osheroff, N., DNA Topology and Topoisomerases: Teaching a “Knotty” Subject, *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 37(1): 2–10, **2009**.
- [81] Mišković, K., Bujak, M., Lončar, M.B., Glavaš-Obrovac L., Antineoplastic dna-binding compounds: intercalating and minor groove binding drugs, *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 64:593-602, **2013**.

- [82] Goftar, M.K., Kor, N.M., Kor Z.M., DNA intercalators and using them as anticancer drugs, *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(3):811-822, **2014**.
- [83] Rosenberg, B., VanCamp, L., Trosko, J.E., Mansour, V.H., Platinum compounds: A new class of potent antitumour agents, *Nature*, 222, 385–386, **1969**.
- [84] Wong, D.Y.Q., Ang, W.H., Development of platinum (IV) complexes as anticancer prodrugs: The story so far, *Cosmos*, 8:1, 121-134, **2012**.
- [85] Payne, S., Miles, D., Mechanisms of anticancer drugs, *Scott-Brown's Otorhinolaryngology: Head and Neck Surgery* (Ed. by Gleeson, M.), Chemical Rubber Company Press, 34–46, **2008**.
- [86] Liu, J. X., Zhou, G.B., Chen, S.J., Chen, Z., Arsenic compounds: revived ancient remedies in the fight against human malignancies, *Current Opinion in Chemical Biology*, 16(1-2),92-8, **2012**.
- [87] Pasquier, E. and Kavallaris, M., Microtubules: a Moving Target in Cancer Therapy, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 60(3), 165-70, **2008**.
- [88] Tiwari, M., Antimetabolites: Established cancer therapy, *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 8:4, 510-9, **2012**.
- [89] Munshi, P. N., Lubin M., Bertino J. R., 6-Thioguanine: A Drug With Unrealized Potential for Cancer Therapy, *The Oncologist*, 19:760–765, **2014**.
- [90] Stresemann, C., and Lyko F., Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine, *International Journal of Cancer*, 123, 8–13, **2008**.
- [91] Taşkın-Tok T., Gowder S., Pharmacology and Therapeutics, (chapter 9): *Anticancer Drug-Friend or Foe*, (Ed:Gowder S.), InTech Publisher, Europe, **2014**.
- [92] Bailly, C., Topoisomerase I Poisons and Suppressors as Anticancer Drugs, *Current Medicinal Chemistry*, 7, 39. **2000**.
- [93] Burden, D.A., Osheroff, N., Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drug targeted to the enzyme, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1400, 139-154, **1998**.
- [94] Bailly, C., Homocamptothecins: potent topoisomerase I inhibitors and promising anticancer drugs, *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 45, 91-108, **2003**.
- [95] Hande, R. K., Clinical application of anticancer drugs targeted to topoisomerase II, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1400, 173-184, **1998**.
- [96] Abdulkareem, I.H., Zurmi, I.B., Review of hormonal treatment of breast cancer, *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 15:1, 9-14, **2012**.
- [97] Snook, A.E., Waldman, S.A., Advances in cancer immunotherapy, *Discovery Medicine*, 15:81, 120-5, **2013**.

- [98] Vural, N., *Toksikoloji*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No:56, Ankara, **1984**.
- [99] Rollas, S., *İlaçların metabolizması (Biyotransformasyon)*, Marmara Üniversitesi Yayınevi, İstanbul, **1992**.
- [100] Sipes, I.G., Gandolfi, A.J., McQueen, C.A., *Comprehensive Toxicology: General Principles*, (ed. in chief: McQueen, C.A.), Pergamon, **1997**.
- [101] Paolini, M., Forti, G.C., On the metabolizing systems for short-term genotoxicity assays:a review, *Mutation Reserch*, 387,17-34. **1997**.
- [102] Ballantyne, B., *General and Applied Toxicology*, 1. Cilt, (Eds:Ballantyne B., Marrs T.C., Syversen T.L.M.), Macmillan, **1999**.
- [103] Xu, C., Li, C.Y., Kong, A.N., Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics, *Archives of Pharmacal Research*, 28(3):249-68, **2005**.
- [104] Garner, R.C., Miller, E.C., Miller, J.A., Liver microsomal metabolism of aflatoxin B 1 to a reactive derivative toxic to *Salmonella typhimurium* TA 1530, *Cancer Research*, ;32(10):2058-2066, **1972**.
- [105] Park, B.K., Kitteringham, N.R., Maggs, J.L., Pirmohamed, M., Williams, D.P., The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45:177-202, **2005**.
- [106] Tozkoparan, B., Aytaç, S.P., Kanser Kemoterapisinde Terapötik Hedef Olarak Glutasyon S-Transferazlar, *Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 27:2, 139-164, **2007**.
- [107] Cingi, İ., Erol K., Kemoterapötikler. *Farmakoloji* (Ed: Erdoğan M.), Anadolu Üniversitesi Açık Öğretim Fakültesi, Ders Kitapları, Yayın no: 108/F, **1996**.
- [108] Aksoy, Y., Kanserde İlaç Direncinin Üstesinden Gelmenin Yolları: Yeni İlaçların Tasarımı, *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 30(6), 2011-6, **2010**.
- [109] Gottesman, M.M., Mechanism of Cancer Drug Resistance, *Annual Review of Medicine*, 53, 615-627, **2002**.
- [110] Stavrovskayai, A.A., Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells, *Biochemistry*, 65(1), 95-106, **2000**.
- [111] Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., Sarkar, S., Drug resistance in cancer: an overview, *Cancers*, 6(3),1769-92, **2014**.
- [112] Guichard, S.M., Morton, C.L., Krull, E.J., Stewart, C.F., Danks, M.K., Potter, P.M., Conversion of the CPT-11 metabolite APC to SN-38 by rabbit liver carboxylesterase, *Clinical Cancer Research*, 4(12), 3089-94, **1998**.
- [113] Cummings, J., Boyd, G., Ethell, B. T., Macpherson, J. S., Burchell, B., Smyth, J. F., Jodrell, D. I., Enhanced clearance of topoisomerase I inhibitors from human colon cancer cells by glucuronidation, *Biochemical Pharmacology*, 63, 607-613, **2002**.

- [114] Parchment, R.E., Pessina, A., Topoisomerase I inhibitors and drug resistance, *Cytotechnology*, 27, 149–164, **1998**.
- [115] Rashed, Z., A., Rubin, E. H., Mechanisms of resistance to topoisomerase I-targeting drugs, *Oncogene*, 22, 7296–7304, **2003**.
- [116] Kaufmann, S. H., Vaux, D. L., Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance, *Oncogene*, 22, 7414–7430, **2003**.
- [117] Pouliot, J. J., Yao, K.C., Robertson, C. A., Nash, H. A., Yeast gene for a Tyr-DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase I complexes, *Science*, 286(5439), 552-5, **1999**.
- [118] Desai, S.D., Li, T. K., Rodriguez-Bauman, A., Rubin, E. H., Liu, L.F., Ubiquitin/26S proteasome-mediated degradation of topoisomerase I as a resistance mechanism to camptothecin in tumor cells, *Cancer Research*, 61, 5926–5932, **2001**.
- [119] Wilting, R. H., Dannenberg, J. H., Epigenetic mechanisms in tumorigenesis, tumor cell heterogeneity and drug resistance, *Drug Resistance Updates*, 15(1-2), 21-38, **2012**.
- [120] Sağlık Bakanlığı, Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. SKS ve İlaç Güvenliği, Ankara: Sağlıkta Kalite ve Akreditasyon Başkanlığı, **2012**.
- [121] Kapucu, E., Kahveci, H., Susam, O., Canta, Y., İlaçların ve kozmetik ürünlerin geliştirme süreçleri ve doğa üzerine etkileri, <http://kisi.deu.edu.tr/bulent.cavas/ders/bok5.pdf> (Aralık **2015**).
- [122] Pfizer, Yeni ilaç geliştirme süreci, http://www.pfizer.com.tr/sites/tr/ar-ge/pfizer_bilgi_uretir/Pages/YenillacGelistirmeSureci.aspx (Aralık **2015**).
- [123] Yarsan, E., Yeni İlaçların Geliştirilmesi, <http://www.enderyarsan.net/ilacgelistirme.php> (Aralık **2015**).
- [124] Temel, M.K., Sitotoksik kemoterapötiklerin yirminci yüzyıldaki gelişimi, *Türk Onkoloji Dergisi*, 30:2, 96-108, **2015**.
- [125] Organisation for economic co-operation and development (OECD), Guidelinefor testing of chemicals: No:471-Bacterial reverse mutation test, **1997**.
- [126] Environmental Protection Agency (EPA)., Health effects test guidelines OPPTS 870.5100-Bacterial reverse mutation test., **1998**.
- [127] Jena, G.B., Kaul, C.L., Ramarao, P., Genotoxicity Testing: A Regulatory Requirement for Drug Development: Impact of ICH guidelines, *Indian Journal of Pharmacology*, 34:86- 99, **2002**.
- [128] Cakir N., Deney tübünden eczane rafına: bir antimikrobiyal nasıl geliş(tiril)ir?, *ANKEM Dergisi*, 24(3):174-181, **2010**.
- [129] Ferreira, D., Adeg, F., Chaves, R., The Importance of Cancer Cell Lines as *in vitro* Models in Cancer Methylome Analysis and Anticancer Drugs Testing, *Oncogenomics and Cancer Proteomics - Novel Approaches in Biomarkers Discovery and Therapeutic Targets in Cancer* (eds: López-Camarillo, C., Aréchaga-Ocampo, E.), INTECH, 953-978, **2013**.

- [130] Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, C., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., Boyd, M., Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines, *Journal of the National Cancer Institute*, 83, 757–66, **1991**.
- [131] Shoemaker, R.H., The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen, *Nature Reviews Cancer*, 6, 813-823, **2006**.
- [132] Nakamura, T., Nakatsu, N., Yoshida, Y., Yamazaki, K., Dan, S., Sadahiro, S., Makuuchi, H., Yamori, T., Identification of candidate genes determining chemosensitivity to anti-cancer drugs of gastric cancer cell lines, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 32(11), 1936-9, **2009**.
- [133] Nakatsu, N., Yoshida, Y., Yamazaki, K., Nakamura, T., Dan, S., Fukui Y., Yamori, T., Chemosensitivity profile of cancer cell lines and identification of genes determining chemosensitivity by an integrated bioinformatical approach using cDNA arrays, *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(3), 399-412, **2005**.
- [134] Suggitt, M., Bibby, M. C., 50 Years of Preclinical Anticancer Drug Screening: Empirical to Target-Driven Approaches, *Clinical Cancer Research*, 11(3), 971–981, **2005**.
- [135] Moorthi, C., Kathiresan, K., Krishnan, K., Manavalan, R., *In-vitro* cell based assay: a preferred anticancer drug screening techniques for the academic researchers, *Journal of Pharmacy Research*, 4(3), 671-675, **2011**.
- [136] Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M. R., New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1107-12, **1990**.
- [137] van Tonder, A., Joubert, A. M., Cromarty, A. D., Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays, *BMC Research Notes*, 8, 47, **2015**.
- [138] Vichai, V., Kirtikara, K., Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening, *Nature Protocols* 1, 1112 – 1116, **2006**.
- [139] Haselsberger, K., Peterson, D.C., Thomas, D.G., Darling, J.L., Assay of anticancer drugs in tissue culture: comparison of a tetrazolium-based assay and a protein binding dye assay in short-term cultures derived from human malignant glioma, *Anticancer Drugs*, 7(3), 331-8, **1996**.
- [140] Keepers, Y. P., Pizao, P. E., Peters, G. J., van Ark-Otte, J., Winograd, B., Pinedo, H. M., Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for *in vitro* chemosensitivity testing, *European Journal of Cancer*, 27(7), 897-900, **1991**.
- [141] Voigt, W., Sulforhodamine B assay and chemosensitivity, *Methods in Molecular Medicine*, 110, 39-48, **2005**.
- [142] Collins, A.R., The comet assay. Principles, applications, and limitations, *Methods in Molecular Biology*, 203, 163-77, **2002**.

- [143] Ostling, O., Johanson, K.J., Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123, 291–298, **1984**.
- [144] Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, 175, 184-191, **1998**.
- [145] Azqueta, A., Gutzkow, K.B., Priestley, C.C., Meier, S., Walker, J.S., Brunborg, G., Collins, A.R., A comparative performance test of standard, medium- and high-throughput comet assays, *Toxicology In Vitro*, 27(2), 768-73, **2013**.
- [146] Collins, A.R., Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay, *Mutation Research*, 681, 24–32, **2009**.
- [147] Pérez-García, C., Rouxel, J., Akcha, F., Development of a comet-FISH assay for the detection of DNA damage in hemocytes of *Crassostrea gigas*, *Aquatic Toxicology*, 161,189-95, **2015**.
- [148] Laubenthal, J., Anderson, D., Fluorescence in situ hybridization on electrophoresed cells to detect sequence specific DNA damage, *Methods In Molecular Biology*, 1054, 219-35, **2013**.
- [149] Glej, M., Hovhannisyan, G., Pool-Zobel, B.L., Use of Comet-FISH in the study of DNA damage and repair: review, *Mutation Research*, 681(1), 33-43, **2009**.
- [150] McNamee, J.P., McLean, J.R., Ferrarotto, C.L., Bellier, P.V., Comet assay: rapid processing of multiple samples, *Mutation Research*, 466(1), 63-9, **2000**.
- [151] Kawaguchi, S., Nakamura, T., Yamamoto, A., Honda, G., Sasaki, Y.F., Is the comet assay a sensitive procedure for detecting genotoxicity?, *Journal of Nucleic Acids*, 541050, **2010**.
- [152] Jannuzzi, A.T., Alpertunga, B., Evaluation of DNA damage and DNA repair capacity in occupationally lead-exposed workers, *Toxicology & Industrial Health*, pii: 0748233715590919, **2015**.
- [153] Bausinger, J., Speit, G., DNA repair capacity of cultured human lymphocytes exposed to mutagens measured by the comet assay and array expression analysis, *Mutagenesis*, pii: gev040, **2015**.
- [154] Wentzel, J.F., Gouws, C., Huysamen, C., Dyk, Ev., Koekemoer, G., Pretorius, P.J., Assessing the DNA methylation status of single cells with the comet assay, *Analytical Biochemistry*, 400(2),190-4, **2010**.
- [155] Collins, A.R., Duthie, S.J., Dobson, V.L., Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA, *Carcinogenesis*, 14(9), 1733-5, **1993**.
- [156] Collins, A.R., Dusinská, M., Gedik, C.M., Stětina, R., Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environmental Health Perspective*, 104(3), 465-9, **1996**.
- [157] Fang, L., Neutzner, A., Turttschi, S., Flammer, J., Mozaffarieh, M., Comet assay as an indirect measure of systemic oxidative stress, *Journal of Visualized Experiment*, (99):e52763, **2015**.

- [158] Gedik, C.M., Ewen, S.W., Collins, A.R., Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells, *International Journal of Radiation Biology*, 62(3), 313-20, **1992**.
- [159] Azqueta, A., Collins, A.R., The Comet Assay: A Sensitive and Quantitative Method for Analysis of DNA Damage. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, (Ed: Meyers R.A.), John Wiley and Sons, Inc., **2011**.
- [160] Jacobs, A.L., Schär, P., DNA glycosylases: in DNA repair and beyond, *Chromosoma*, 121(1), 1-20, **2012**.
- [161] Liu, Y., Prasad, R., Beard, W.A., Kedar, P.S., Hou, E.W., Shock, D.D., Wilson, S.H., Coordination of Steps in Single-nucleotide Base Excision Repair Mediated by Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 and DNA Polymerase β , *Journal of Biological Chemistry*, 282(18), 13532–13541, **2007**.
- [162] Tchou, J., Bodepudi, V., Shibutani, S., Antoshechkin, I., Miller, J., Grollman, A.P., Johnson, F., Substrate specificity of Fpg protein. Recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA, *Journal of Biological Chemistry*, 269(21), 15318-24, **1994**.
- [163] Hatahet, Z., Kow, Y.W., Purmal, A.A., Cunningham, R.P., Wallace, S.S., New substrates for old enzymes. 5-Hydroxy-2'-deoxycytidine and 5-hydroxy-2'-deoxyuridine are substrates for Escherichia coli endonuclease III and formamidopyrimidine DNA N-glycosylase, while 5-hydroxy-2'-deoxyuridine is a substrate for uracil DNA N-glycosylase, *Journal of Biological Chemistry*, 269(29), 18814-20, **1994**.
- [164] Ide, H., Kotera, M., Human DNA glycosylases involved in the repair of oxidatively damaged DNA, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27 (4), 480–5, **2004**.
- [165] Dizdaroglu, M., Laval, J., Boiteux, S., Substrate specificity of the Escherichia coli endonuclease III: excision of thymine- and cytosine-derived lesions in DNA produced by radiation-generated free radicals, *Biochemistry*, 32(45), 12105-11, **1993**.
- [166] O'Brien, P.J., Ellenberger, T., Human alkyladenine DNA glycosylase uses acid-base catalysis for selective excision of damaged purines, *Biochemistry*, 42(42), 12418-29, **2003**.
- [167] Abner, C.W., Lau, A.Y., Ellenberger, T., Bloom, L.B., Base excision and DNA binding activities of human alkyladenine DNA glycosylase are sensitive to the base paired with a lesion, *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 13379-87, **2001**.
- [168] Lau, A.Y., Schärer, O.D., Samson, L., Verdine, G.L., Ellenberger, T., Crystal structure of a human alkylbase-DNA repair enzyme complexed to DNA: mechanisms for nucleotide flipping and base excision, *Cell*, 95(2), 249-58, **1998**.
- [169] Azqueta, A., Slyskova, J., Langie, S.A., O'Neill Gaivão, I., Collins, A., Comet assay to measure DNA repair: approach and applications, *Frontiers in Genetics*, 5, 288, **2014**.

- [170] Blasiak, J., Gloc, E., Wozniak, K., Czechowska, A., Genotoxicity of acrylamide in human lymphocytes, *Chemical-Biological Interactions*, 149(2-3), 137-49, **2004**.
- [171] Alseth, I., Osman, F., Korvald, H., Tsaneva, I., Whitby, M.C., Seeberg, E., Bjørås, M., Biochemical characterization and DNA repair pathway interactions of Mag1-mediated base excision repair in *Schizosaccharomyces pombe*, *Nucleic Acids Research*, 33 (3), 1123–31, **2005**.
- [172] New England Biolabs Inc. (NEB), DNA repair enzymes, <https://www.neb.com/tools-and-resources/selection-charts/dna-repair-enzymes> (Aralık **2015**).
- [173] Ames, B.N., Lee, F.D., Durston, W.E., An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(3), 782-6, **1973**.
- [174] International conference on harmonization of technical requirements of pharmaceuticals for human use (ICH), Safety guidelines S2(R1), Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use (Step4), **2011**.
- [175] Ames, B.N., McCann, J., Yamasaki, E., Methods for detecting carcinogens and mutagens with *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutation Research*, 31(6), 347-64, **1975**.
- [176] Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E., Lee, F.D., Carcinogens are Mutagens: A Simple Test System Combining Liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70, 2281–2285, **1973**.
- [177] Mortelmans, K., Zeiger, E., The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay, *Mutation Research*, 455(1-2), 29-60, **2000**.
- [178] Hughes, T.J., Lewtas, J., Claxton, L.D., Development of a standard reference material for diesel mutagenicity in the *Salmonella* plate incorporation assay, *Mutation Research*, 391(3), 243-58, **1997**.
- [179] 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., Comparison of responses of base-specific *Salmonella* tester strains with the traditional strains for identifying mutagens: the results of a validation study, *Mutation Research*, 412(2), 115-30, **1998**.
- [180] Aki-Şener, E., Yalçın, İ., *Farmasötik/Medisinal Kimya'da İlaç Etken Madde Tasarım Yöntemleri-I, Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri Analizleri (QSAR)*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara Üniversitesi Basımevi, 86: 2, **2003**.
- [181] Cohen, N.C., *Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design*. (Ed: Cohen, N.C.), Academic Press Inc., (Edited) XIII, **1996**.
- [182] Wermuth, C.G., Ganellin C.R., Lindberg, P., Mitscher, L.A., Glossary of Terms Used in Medicinal Chemistry, *Pure & Applied Chemistry*, 70:5, 1129-1143, **1998**.

- [183] Barnum, D., Greene, J., Smellie, A., Sprague, P., Identification of Common Functional Configurations Among Molecules." *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 36(3), 563-571, **1996**.
- [184] Hahn, M., Three-Dimensional Shape-Based Searching of Conformationally Flexible Compounds, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 37(1), 80-86, **1997**.
- [185] Li, H., Sutter, J., Hoffman, R., HypoGen: An automated system for generating 3D predictive pharmacophore models, *Pharmacophore perception, development, and use in drug design*, (ed: Guner, O. F.) 173-189, IUL, San Diego, **2000**.
- [186] Meng, X-Y., Zhang, H-X., Mezei, M., Cui, M., Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery, *Current Computer-Aided Drug Design*, 7(2), 146–157, **2011**.
- [187] Mahajan, A., Gill, N.S., Arora, R., A review on molecular docking, *International Journal of Recent Advances in Pharmaceutical Research*, 4(2), 64-70, **2014**.
- [188] Moller, P., Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA, 2006, *Mutation Research*, 612, 84–104, **2006**.
- [189] Moller, P., The Alkaline Comet Assay: Towards Validation in Biomonitoring of DNA Damaging Exposures, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 98:4, 336–345, **2006**.
- [190] Maron, D.M., Ames, B.N., Revised methods for the mutagenicity test, *Mutation Research*, 113, 173-215, **1983**.
- [191] Kier, L.D., Brusick, D.J., Auletta, A.E., Von Halle, E.S., Brown, M.M., Simmon, V.F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M.J., Rao, T.K., Ray, V.A., The Salmonella typhimurium/mammalian microsomal assay. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Research*, 168(2), 69-240, **1986**.
- [192] Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M., Determination of Serum Proteins by means of the Biuret Reaction, *Journal of Biological Chemistry*, 177(2), 751-66, **1949**.
- [193] Siddiqui, N., Ali, R., Alam, M.S., Ahsan, W., Pharmacological Profile of Benzoxazines: A Short Review, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2(4):309-316, **2010**.
- [194] Pamerla, M., Reddy, D.R.S., Rao, B.S., Bodipati, N., Murthy, Y.L.N., Antimicrobial evaluation of 1,4-benzoxazine derivatives, *Medicinal Chemistry Research*, 24:2, 611-615. **2015**.
- [195] Nemecek, P.; Mocak, J.; Lehotay, J.; Waisser, K. Prediction of anti-tuberculosis activity of 3-phenyl-2H-1,3-benzoxazine-2, 4(3H)-dione derivatives, *Chemical Papers*, 67, 305, **2013**.
- [196] Young, S.D., Tran, L.O., Bricher, S.F., Lumma, W.C. Jr., Payne, L.S., Preparation of benzoxazinones as inhibitors of HIV reverse transcriptase, *European. Patent Application*, Ep. 582, 455, **1994**.

- [197] Gillet, J.P., Varma, S., Gottesman, M.M., The clinical relevance of cancer cell lines, *Journal of the National Cancer Institute*, 105(7), 452-8, **2013**.
- [198] International Organization for Standardization, (ISO) 10993–5, Biological Evaluation of Medical Devices-Part 5, Tests for Cytotoxicity: *In vitro* Methods; ISO: Geneve, Switzerland, **1992**.
- [199] Schedle, A., Samorapoompichit, P., Rausch-Fan, X.H., Franz, A., Fureder, W., Sperr, W.R., Sperr, W., Ellinger, A., Slavicek, R., Boltz-Nitulescu, G., Valent, P., Response of L-929 fibroblasts, human gingival fibroblasts, and human tissue mast cells to various metal cations, *Journal of Dental Research*, 74(8), 1513–1520, **1995**.
- [200] Zare-Mirakabadi, A., Sarzaeem, A., Moradhaseli, S., Sayad, A., Negahdary, M., Necrotic Effect versus Apoptotic Nature of Camptothecin in Human Cervical Cancer Cells, *Iran Journal of Cancer Prevention*, 5(3): 109–116, **2012**.
- [201] Chang, J. Y., Guo, X., Chen, H. X., Jiang, Z., Fu, Q., Wang, H. K., Bastow, K. F., Zhu, X. K., Guan, J., Lee, K. H., Cheng, Y. C., Unique biochemical, cytotoxic, and antitumor activity of camptothecin and 4beta-amino-4'-O-demethylepipodophyllotoxin conjugates, *Biochemical Pharmacology*, 59(5), 497-508, **2000**.
- [202] Wellcome^{trust}, *Genomics of drug sensitivity in cancer*, <http://www.cancerrxgene.org/translation/Drug/1003> (Aralık **2015**).
- [203] Muscella, A., Vetrugno, C., Fanizzi, F.P., Manca, C., De Pascali, S.A., Marsigliante, S., A new platinum (II) compound anticancer drug candidate with selective cytotoxicity for breast cancer cells, *Cell Death & Disease*, 4:e796, **2013**.
- [204] Syarifah, M.M.S., Nurhanan, M.Y., Haffiz, J.M., Ilham, A.M., Getha, K., Asiah, O., Norhayati, I., Sahira, H.L., Suryani, S.A., Potential anticancer compound from *Cerbera odollam*, *Journal of Tropical Forest Science*, 23(1), 89-96, **2011**.
- [205] Shen, Z.X., Chen, G.Q., Ni, J.H., Li, X.S., Xiong, S.M., Qiu, Q.Y., Zhu, J., Tang, W., Sun, G.L., Yang, K.Q., Chen, Y., Zhou, L., Fang, Z.W., Wang, Y.T., Ma, J., Zhang, P., Zhang, T.D., Chen, S.J., Chen, Z., Wang, Z.Y., Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients, *Blood*, 89(9):3354-60, **1997**.
- [206] Gupta S.C., Hevia, D., Patchva, S., Park, B., Koh, W., Aggarwal, B.B., Upsides and Downsides of Reactive Oxygen Species for Cancer: The Roles of Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis, Prevention, and Therapy, *Antioxidant & Redox Signaling*, 16:11, 1295-1322, **2012**.
- [207] Attia, S.M., Ahmad, S.F., Harisa, G.I., Mansour, A.M., El Sayed el, S.M., Bakheet, S.A., Wagonin attenuates etoposide-induced oxidative DNA damage and apoptosis via suppression of oxidative DNA stress and modulation of OGG1 expression, *Food and Chemical Toxicology*, 59:724-30, **2013**.
- [208] Ordoñez, p., Thorne D., Dalrymple, A., Sierra, A.B., Vila-Coro A., Prieto, P., Dillon, D., Meredith, C., Determination of the optimal protocol for single-cell gel

- electrophoresis assay (COMET assay) in cultured NCI-H292 human mucoepidermoid pulmonary carcinoma cells, *British Toxicology Society Annual Congress*, 7-10 April, Solihull, **2013**.
- [209] Azqueta, A., Arbillaga, L., López de Cerain, A., Collins, A., Enhancing the sensitivity of the comet assay as a genotoxicity test, by combining it with bacterial repair enzyme FPG, *Mutagenesis*, 28(3):271-7, **2013**.
- [210] Brandon, E.F., Raap, C.D., Meijerman, I., Beijnen, J.H., Schellens, J.H., An update on *in vitro* test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 189(3):233-46, **2003**.
- [211] Chung, M.C., Bosquesi, P.L., dos Santos J.L., A Prodrug Approach to Improve the Physico-Chemical Properties and Decrease the Genotoxicity of Nitro Compounds. *Current Pharmaceutical Design*, 17(32):3515-26, **2011**.
- [212] Suter, W., Hartmann, A., Poetter, F., Sagelsdorff, P., Hoffmann, P., Martus, H.J., Genotoxicity assessment of the antiepileptic drug AMP397, an Ames-positive aromatic nitrocompound, *Mutation Research*, 518(2), 181-94, **2002**.
- [213] Tocher, J.H., Reductive activation of nitroheterocyclic compounds, *General Pharmacology*, 28, 485–487, **1997**.
- [214] Pederson, T.C., Siak, J.S., The activation of mutagens in diesel particle extract with rat liver S9 enzymes, *Journal of Applied Toxicology*, 1, 61–66, **1981**.
- [215] Debnath, A.K., Lopez de Compadre, R.L., Debnath, G., Shusterman, A.J., Hansch, C., Structure-activity relationship of mutagenic aromatic and heteroaromatic nitro compounds. Correlation with molecular orbital energies and hydrophobicity, *Journal of Medicinal Chemistry*, 34(2):786-97, **1991**.
- [216] Buchmann, C.A., Nersesyan, A., Kopp, B., Schauburger, D., Darroudi, F., Grummt, T., Krupitza, G., Kundi, M., Schulte-Hermann, R., Knasmueller, S., Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) and 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIBOA), two naturally occurring benzoxazinones contained in sprouts of Gramineae are potent aneugens in human-derived liver cells (HepG2), *Cancer Letters*, 246 290–299, **2007**.
- [217] Arroyo, E., Chinchilla, N., Molinillo, J.M.G., Macias, F.A., Astola, A., Ortiz, M., Valdivia, M.M., Aneugenic effects of benzoxazinones in cultured human cells, *Mutation Research*, 695, 81–86, **2010**.
- [218] Okabe, T., Hamada, T., Tomikawa, K., Okamoto, Y., Iijima, T., Akatsuka, H., Toyama, K., Moroda, A., Sugiura, Y., Method for producing 1,4-benzoxazine compound, *WO Patent Application*, WO-024950, **2014**.
- [219] Salti, G.I., Das Gupta, T.K., Constantinou, A.I., A novel use for the comet assay: detection of topoisomerase II inhibitors, *Anticancer Research*, 20(5A):3189-93, **2000**.
- [220] Godard, T., Deslandes, E., Sichel, F., Poul, J.M., Gauduchon, P., Detection of topoisomerase inhibitor-induced DNA strand breaks and apoptosis by the alkaline comet assay, *Mutation Research*, 520(1-2):47-56, **2002**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı soyadı : Egemen FOTO

Doğum Yeri : Karaman

Medeni Hali : Bekar

E-posta : egemenfoto@yahoo.com

Adresi : Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji A.B.D.

Eğitim

Lise : Karaman Süper Lisesi (1997)

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü (2003)

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Mol. Biyoloji A.B.D. (2007)

Doktora: Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji A.B.D. (2015)

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce / ÜDS : 80

İş Deneyimi

Farma – İnterlab Lab.Malzemeleri Ltd.Şti.'de moleküler biyolojik ürün danışmanlığı,aplikasyon ve presentasyon uzmanlığı / İç Anadolu Bölge sorumlusu (2005-2006)

Deneyim Alanları

Kısa zamanlı mutajenite, sitotoksikite ve genotoksikite test sistemleri, Bakteri genetiği, DNA Topoizomerazlar, Antikanser ilaç dizaynı ve geliştirilmesi, DNA hasarı ve Onarımı, Hücre Kültür Teknikleri, Moleküler Genetik Teknikleri

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

1. Bazı Benzoksazin Türevlerinin Rec Yöntemi,Komet Yöntemi Ve Mikronükleus Yöntemi Ile Genotoksik Potansiyellerinin Araştırılması, 2009-2013, Hacettepe BAP Araştırma projesi (0801601009- Bütçesi: 82.066 TL).

2. Bazı Benzotiyazol Türevi Bileşiklerin *Salmonella*/Mikrozom Yöntemi ile Mutajenik Potansiyellerinin Belirlenmesi, 2012-2013, Hacettepe BAP Hızlı Destek projesi **(012 D06 60107- Bütçesi: 11.238 TL)**.

3. Bazı Benzotiyazol Türevi Bileşiklerin *Salmonella*/Mikrozom Yöntemi ile Mutajenik Potansiyellerinin Belirlenmesi, 2014, Hacettepe BAP Kritik Destek projesi **(014 D03 601001- Bütçesi: 4.764 TL)**.

4. Benzazol Halka Sistemi İçeren Bazı Heterosiklik Bileşiklerin Genoksik Potansiyellerinin Ve Etki Mekanizmalarının Komet Testi İle Araştırılması, 2012-halen, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi, **(013 D10 601 006, Bütçesi: 18.500 TL)**.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

1. **Foto, E.**, Zilifdar, F., Diril, N., Yilmaz, S., Aki-Yalcin, E., Mutagenicity of 4-Ethyl-6-Substituted-2H-3,4-Dihydro-1,4-Benzoxazin-3-One Derivatives and Their Metabolites That Inhibited Human Topoisomerase I, *11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-11)*, 9-12 June, Ankara/Turkey, **2015**.

2. **Foto, E.**, Zilifdar, F., Yilmaz, S., Diril, N., Yalcin, I., Yildiz, I., Aki-Yalcin, E., Evaluation of *In Vitro* Genotoxic Potentials of 4-Methyl-6-Substituted-2H-3,4-Dihydro-1,4-Benzoxazin-3-One Derivatives on HeLa cells, *11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-11)*, 9-12 June, Ankara/Turkey, **2015**.

3. **Foto, E.**, Zilifdar, F., Diril, N., Yildiz, I., Yalcin, I., Aki-Yalcin, E., In-vitro antiproliferative activity of 4-methyl-6-substituted-2H-3,4-dihydro-1,4-benzoxazine-3-one derivatives that inhibited human topoisomerase I, *EACR-Sponsored 3rd Anticancer Agent Development Congress*, 18-19 May, Izmir, Turkey, **2015**.

4. **Foto, E.**, Zilifdar, F., Diril, N., Yalcin, I., Yildiz, I., Aki-Yalcin, E., Mutagenicity of 4-Methyl-6-Substituted-2H-3,4-Dihydro-1,4-Benzoxazine-3-One Derivatives and Their Metabolites That Inhibited Human Topoisomerase I, *5th. International congress of Molecular Medicine*, 20-22 May, Izmir, Turkey, **2015**.

5. Foto, E., Zilifdar, F., Yıldız, İ., Diril, N., Yeni Sentezlenmiş Benzoksazin Türevi Bazı Bileşiklerin Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması, *XXV. Ulusal Biyokimya Kongresi*, 3-6 Eylül, İzmir, Türkiye, **2013**.

6. Zilifdar, F., **Foto, E.,** Diril, N., Antikanser İlaç Ön Maddesi Olarak Tasarlanan 1,4-Benzoksazin Türevlerinin Mutajenik Potansiyellerinin Değerlendirilmesi, *Türk Toksikoloji Derneği II. Bölgesel Toksikoloji Sempozyumu- Toksikolojide Güncel Konular*, 3-4 Mayıs, Eskişehir, Türkiye, **2013**.

7. Zilifdar, F., Aydoğan, Z., **Foto, E.,** Alper-Hayta, S., Diril, N., Mutagenic activity of 3 newly synthesized benzoxazine derivative, *8. Uluslararası Katılımlı Türk Toksikoloji Derneği Kongresi*, 14-18 Kasım, Antalya, Türkiye, **2012**.

Aldığı Ödüller

- XXV. Ulusal Biyokimya Kongresi, ikinci en iyi poster ödülü, 2013, İZMİR.
- 1st. International Congress and Workshop of Forensic Toxicology, ikinci en iyi poster ödülü, 2014, ANKARA.