

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YENİ SENTEZLENEN FENOKSİPROPONOL AMİN
TÜREVİ BİLEŞİĞİN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Guncha MEREDOVA

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Hüseyin AKSOY

Ocak 2020

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FENBİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YENİ SENTEZLENEN FENOKSİPROPONOL AMİN
TÜREVİ BİLEŞİĞİN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Guncha MEREDOVA

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Bu tez 14/01/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr.
Ömer BEYHAN
Jüri Başkanı

Prof. Dr.
Hüseyin AKSOY
Üye

Doç. Dr.
Nazan Deniz YÖN ERTUĞ
Üye

BEYAN

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

Guncha MEREDOVA

25.02.2020

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, araştırmanın planlanmasından yazılmasına kadar tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen, teşvik ederek programlı çalışmalarıyla beni yönlendiren değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Hüseyin AKSOY'a ve tezimin yazım aşaması dahil çalışmalarım boyunca yardımcı olan değerli Hocam Arş. Gör. Esra YILDIZ'a teşekkürlerimi sunarım. Özellikle laboratuvar çalışmalarımın başlangıç aşamalarında bilgi ve yardımı yanında manen de destekleyen değerli Hocam Arş. Gör. Merve Ayşe DOĞANCI'ya teşekkür ederim.

Çalışmam sırasında bana güç ve moral veren, sabırlı olmamı sağlayan, sevgili eşim Siaush Kilychov'a, her zaman hertürlü desteğini eksik etmeyen ve varlıklarıyla hayatımı renklendiren saygıdeğer aileme sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca bu çalışmanın maddi açıdan desteklenmesine olanak sağlayan Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (BAPK) Başkanlığına (Proje No: 2019-7-24-40) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ	ix
ÖZET	x
SUMMARY	xi
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2.	
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Timol ve Genel Özellikleri.....	8
2.2. Beta Blokerler.....	10
2.3. Test Maddesi: 1-(2-isopropyl-5-methylphenoxy)-3-((pyridine- 3ylmethyl) amino) propan-2-ol.....	12
2.4. Genotoksite Testleri ve Yeni İlaç Geliştirmede Önemi.....	14
2.4.1. Kromozomal anormallikler (KA) testi.....	15
2.4.2. Mikronukleus (MN) testi.....	16
2.5. Yeni ilaç geliştirmenin önemi ve araştırılması.....	18
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1. Materyal	20
3.1.1. Test maddesi.....	20

3.1.2. Perifal kan.....	21
3.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	21
3.1.4. Kullanılan kimyasal çözeltiler.....	23
3.2. Doz Seçimi	24
3.3. Metot.....	25
3.3.1. Kromozomal anormallik testi.....	25
3.3.1.1. Kromozomal anormalliklerin incelenmesi ve mitotik indeks hesaplamaları.....	26
3.3.2. Mikronukleus testi	26
3.3.2.1. Mikronukleus frekansının belirlenmesi.....	28
3.3.3. İstatiksel analizler.....	28
 BÖLÜM 4.	
ARAŞTIRMA BULGULARI	29
4.1. 1-(2-isopropyl-5-methylphenoxy)-3-((pyridine-3-ylmethyl) amino) propan-2-ol'un İnsan Kan Lenfositleri Üzerindeki Genotoksik Etkileri.....	29
4.1.1. Kromozomal anormallikler (CA) testinin 24 saatlik bulguları	29
4.1.2. Kromozomal anormallikler (CA) testinin 48 saatlik bulguları	36
4.1.3. Mikronukleus (MN) testinin bulguları.....	43
 BÖLÜM 5.	
TARTIŞMA VE SONUÇ	47
 KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	66

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

>	: Büyüktür
<	: Küçüktür
%	: Yüzde
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
BN	: İki nukleuslu (binukleat)
CA	: Kromozomal anormallik
Cyt-B	: Sitokalesin B
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
Ds	: Disentrik
F	: Fragment
gr	: Gram
IC ₅₀	: Yarı maksimal inhibitör konsantrasyonu
CA	: Karbonik anhidraz
CAİ	: Karbonik anhidraz inhibitörü
Ktd	: Kromatid değişimi
Ktk	: Kromatid kırığı
Kzk	: Kromozom kırığı
mg	: Miligram
M	: Molar
Mİ	: Mitotik indeks
mL	: Mililitre
MMC	: Mitomycin C
MN	: Mikronukleus
Na	: Sodyum

RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SPSS	: Statistical package for thr social sciences
ACh	: Asetilkolin
AH	: Alzimer hastalığı
İSA	: İnrinsik sempatomimetik aktivite
ATP	: Adenozin trifosfat
Camp	: Siksil adenozin monofosfat
Gi	: Adenilat siklaz enzimini inhibe eden G protein �eşıdi
DMSO	: Dimetil sülfoksit
LD ₅₀	: %50 �ld�r�c� doz
HPRT	: Hipoksantin guanin fosforibozil transferaz eksikliği gen mutasyon testi

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Karbonik anhidraz enzimi katalizasyonu.....	4
Şekil 2.2. ACh'nin AChE tarafından hidrolizi.....	6
Şekil 2.3. AChE inhibitörlerinin fonksiyonları.....	7
Şekil 2.4. Timolun kimyasal yapısı.....	8
Şekil 2.5. 1-(2-isopropyl-5-methylphenoxy)-3-(pyridine-3-ylmethylamino) propan-2 ol' bileşiğinin sentez aşaması.....	13
Şekil 3.1. 1-(2-isopropyl-5-methylphenoxy)-3-((pyridin-3-ylmethyl) amino) propan 2-ol bileşiğinin sentezi.....	20
Şekil 4.1. (3e) maddesinin yirmi dört saat uygulaması ile oluşan kromatit kırığı.....	31
Şekil 4.2. (3e) maddesinin yirmi dört saat uygulaması ile oluşan kromozom kırığı.....	31
Şekil 4.3. (3e) maddesinin yirmi dört saat uygulaması ile oluşan fragment.....	32
Şekil 4.4. (3e) maddesinin yirmi dört saat uygulaması ile oluşan kardeş kromatitlerde birleşme.....	32
Şekil 4.5. (3e) maddesinin yirmi dört saat uygulaması ile oluşan endoredublikasyon.....	33
Şekil 4.6. (3e) maddesinin yirmi dört saat uygulaması ile oluşan aşırı anormallikler.....	33
Şekil 4.7. Yirmi dört saatlik (3e) maddesi uygulamasında dozlara göre anormal hücre yüzdeleri.....	34

Şekil 4.8. (3e) maddesi ile yirmi dört saat uygulamasında uygulanan dozlara göre hücre başına düşen anormallik sayıları.....	35
Şekil 4.9. Yirmi dört saatlik (3e) maddesi uygulamasında doza göre mitotik indeks değerleri.....	36
Şekil 4.10. (3e) maddesin kırk sekiz saatlik uygulaması ile oluşan kromatit kırığı.....	38
Şekil 4.11. (3e) maddesin kırk sekiz saatlik uygulaması ile oluşan kromozom kırığı.....	38
Şekil 4.12. (3e) maddesin kırk sekiz saatlik uygulaması ile oluşan fragment.....	39
Şekil 4.13. (3e) maddesin kırk sekiz saatlik uygulaması ile oluşan kardeş kromatitlerde birleşme.....	39
Şekil 4.14. (3e) maddesin kırk sekiz saatlik uygulaması ile oluşan kardeş kromatid değişimi.....	40
Şekil 4.15. (3e) maddesin kırk sekiz saatlik uygulaması ile tahrişiyet.....	40
Şekil 4.16. Kırk sekiz saatlik (3e) maddesi uygulamasında dozlara göre anormal hücre yüzdesi.....	41
Şekil 4.17. Kırk sekiz saatlik (3e) maddesi uygulamasında dozlara göre hücre başına düşen anormallik sayıları.....	42
Şekil 4.18. Kırk sekiz saatlik (3e) maddesi uygulamasında dozlara bağlı mitotik indeks değerleri.....	42
Şekil 4.19. (3e) maddesi uygulamasıyla görülen 1 mikronukleuslu bikükleat hücre.....	44
Şekil 4.20. (3e) maddesi uygulamasıyla görülen 2 mikronukleuslu bikükleat hücre.....	44
Şekil 4.21. (3e) maddesi uygulamasıyla görülen 3 mikronukleuslu bikükleat hücre.....	45

Şekil 4.22. (3e) maddesi uygulamasıyla görülen 5 mikronukleuslu bikükleat hücre.....	46
Şekil 4.23. (3e) maddesi uygulamasında dozlara göre mikronukleus frekansları.....	46



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4.1. (3e) maddesinin yirmi dört saat uygulaması ile insan kan kültür lenfositlerinde meydana gelen, kromozomal anormallikler ve frekansları.....	30
Tablo 4.2. İnsan peripheral lenfositlerinde kırk sekiz saatlik 3e maddesi uygulaması ile oluşan kromozomal anormallikler.....	37
Tablo 4.3. (3e) maddesinin insan lenfositlerinde oluşturduğu mikronukleus frekansları.....	43

ÖZET

Anahtar kelimeler: Genotoksisite, Kromozomal Anormallik, Mikronukleus, İnsan Periferel Kan Lenfositleri, Oksiproponolamin, Timol

Bu çalışmada, ilaç etken maddeleri olarak kullanılma potansiyeline sahip olabilecekleri düşünülerek Sakarya Üniversitesi Kimya Bölümü'nde sentezlenmiş ve antibakteriyel, antikarnonikahidraz ve antişlukoliz aktif etkinliğı belirlenmiş ana yapısında timol ve oksiproponolamin grubuna ek olarak 3-picolylamin bulunduran 1-(2-isopropyl-5-methylphenoxy)-3-((pyridin-3-ylmethyl)amino)propan-2-ol bileşiklerinin genotoksik ve sitotoksik profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, insan periferel kan lenfositleri üzerinde kromozomal anormallik (CA), mikronukleus (MN) testleri uygulanmıştır. Bu bağlamda lenfosit kültürü 24 ve 48 saat süre ile test maddesinin dört farklı konsantrasyonu (6.25, 12.5, 25, 50 µg/mL) ile muamele edilmiştir. Ayrıca tüm testlerde negatif, pozitif ve çözücü kontroller kullanılmıştır.

Araştırmada elde edilen verilere göre, test maddesi ile yapılan uygulamalarda 25 ve 50 µg/mL'lik dozlarda, CA oluşumu bakımından hem negatif kontrole hem de çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlemlenmiştir. MN oluşumu bakımından ise bütün dozlarda anlamlı fark bulunmakla birlikte en yüksek 50 µg/mL'lik dozda hiçbir binükleat hücreye rastlanılmamıştır. Test maddesi ile yapılan 24 ve 48 saatlik uygulamada, mitotik indeks tüm konsantrasyonlarda hem negatif kontrol grubuna hem de çözücü kontrole göre anlamlı düzeyde azalışlar gözlemlenmiştir. Hücre başına düşen kromozomal anormallikler ve anormal hücre yüzdesi bakımından en yüksek 50 µg/mL'lik dozda her iki uygulamada hem negatif kontrole hem de çözücü kontrole göre anlamlı fark bulunmuştur. Ayrıca 24 saatlik uygulamada hücre başına düşen kromozomal anormalliklerde 25 µg/mL'lik dozda çözücü kontrol ve negatif kontrol bakımından anlamlı fark belirlenirken, anormal hücre yüzdesi bakımından ise sadece çözücü kontrolle göre anlamlı artış söz konusudur. Elde edilen sonuçlara göre, test maddesinin uygulanan konsantrasyonlarının in vitro şartlarda sitotoksik etkili olduğu, özellikle yüksek konsantrasyonlarda ise genotoksik etkili olduğu görülmüştür.

DETERMINATION OF THE GENOTOXIC PROFILES OF NEW SYNTHESIS OXIPROPANOLAMIN DERIVATIVES

SUMMARY

Keywords: Human peripheral blood lymphocytes, chromosomal aberration, micronucleus, genotoxicity, thymol, oxypropanolamine

The aim of this study was to determine the genotoxic and cytotoxic profile of the 1-(2-isopropyl-5-methylphenoxy)-3-((pyridin-3-ylmethyl)amino)propan-2-ol, which is newly synthesized in Sakarya University Chemistry Department. Chemical substances which are considered as pharmaceutical raw materials are subjected to a wide variety of toxicological researches. Some of these studies are cytotoxicity and genotoxicity studies

In this context, chromosomal abnormality (CA) and micronucleus (MN) tests were performed to determine the cytotoxic and genotoxic effects of test substance on in vitro human peripheral blood lymphocytes. For this purpose, the lymphocyte culture was treated with four different concentrations of test substance (6.25, 12.5, 25, 50 µg/mL) for 24 and 48 hours.

According to the data obtained in the study, it was observed that the test substance significantly reduced the mitotic index in all application groups compared to the negative control. According to the solvent control, significant reduces were observed in the concentration of 25 and 50 µg/mL in both 24 and 48 hours of application. The most observed chromosomal abnormality was chromatid fracture in all groups, followed by fragment and chromosome fractures. Significant increases in the maximum two concentrations were observed with respect to the percentage of abnormal cells and chromosomal abnormalities per cell. For both evaluation criteria, significant increases were observed in the highest concentration of solvent control in both application periods. However, in terms of chromosomal abnormalities per cell, a significant increase in the concentration of both 25 and 50 µg/mL was observed in 48 hours. In terms of micronucleus frequency, there is a significant increase in all concentrations and in 50 µg/mL wasn't seen any binucleats. According to the results obtained, the applied concentrations of the test substance were cytotoxic in in vitro conditions and genotoxic effect, especially at high concentrations.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

İlaç piyasasında çok çeşitli ilaçlar bulunmasına rağmen yeni ilaçların üretimi artan bir şekilde devam etmektedir. Yeni ilaç geliştirmenin amacı, var olanlardan daha güçlü, daha az toksik ve yan etkileri en aza indirilmiş yararlı terapötik bileşikler geliştirmektir (Kapucu ve ark., 2009). Bununla birlikte, kesin tedavisine ulaşılmamış hastalıklar için etkili ilaçlar da araştırılmaktadır (Çevik ve ark., 2012). Ayrıca, günümüzde antibiyotiklerin kontrolsüz ve bilinçsiz kullanımı sonucu dirençli mikro organizmaların ortaya çıkması da yeni ilaç sentezini ve araştırılmasını zorunlu kılmaktadır (Aktaş, 2014).

Yeni ilaç geliştirme yaklaşımlarından biri, fizyolojik ve patolojik olarak hastanın lehinde olacak şekilde, bazı biyolojik moleküllerin yapılarının, etkilerinin ve oluşabilecek değişikliklerin incelenmesidir. Bu, ilaç keşif işleminde ilk adım olmakla birlikte, ilacın istenilen bölgeye gönderilmesini, burada faydalı etkinin oluşmasını ve dokularda yan etkiler gibi istenmeyen reaksiyonlardan kaçınılmasını sağlar. Bu nedenle hastalığın moleküler, hücresel ve genetik seviyede hangi enzim veya reseptörler ile ilişkili bulunduğu ve bu yapıların fonksiyonunda etkili olan kimyasalların araştırılması çok önemlidir (Canefe ve Duman, 1994).

İlaç geliştirme çalışmalarında, özellikle transmembran reseptörlerinin bulunması ve bu reseptörlerin özgül ligandlarının üretilmesi önemli bir ilerlemeye neden olmuştur. Reseptörler, bir endojen madde veya ona benzer yapıda olan kimyasal maddeleri seçici bir yüksek duyarlılık ile kendine bağlayan ve hücrelerin değişik bölgelerinde bulunabilen hücre birimleridir. Birçok ilaç maddesi bu reseptörleri hedef alır ve etki mekanizması devreye girer (Tutun ve Baydan, 2019).

Yeni sentezlenen bir maddenin ilaç olarak kullanılabilmesi için, anlamlı biyolojik aktivite göstermesi yeterli değildir. Bunun yanı sıra, insanlar ve hayvanlar üzerinde kapsamlı toksisite testlerinden başarı ile geçmiş olması elzemdir. Güvenlik testi niteliğini taşıyan toksisite incelemelerinin yanı sıra, yeni sentezlenen ilaçların akut, subakut, kronik, subkronik, immunotoksik, nörotoksik, teratojenik, reproduktif toksisite, genotoksisite ve karsinojenite gibi etkileri de çalışılmalıdır. Özellikle bir kimyasalın genotoksik etkisinin belirlenmesi, ilaç geliştirmede önemli rol üstlenmektedir. Çünkü bu testler, kimyasal ve fiziksel ajanların karsinojenik potansiyellerinin belirlenmesi ve bu ajanların mutajenitelerinin araştırılması için kullanılmaktadır. Fiziksel ve kimyasal genotoksik etkili ajanlar: Kanser, doğum defektleri, infertilite, diyabet, kardiyovasküler ve dejeneratif hastalıkların oluşumunda rol oynamaktadır (Palitti ve ark., 1982; Bonassi ve ark., 1995; Hagmar ve ark., 1998).

Genotoksisitesi test edilmek istenen kimyasal veya doğal ajanların karsinojenik ve mutajenik potansiyelleri arasındaki ilişkinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden bir bölümü de *in vitro* ve *in vivo* koşulları altında, Kromozom anormallikleri (CA) testi ve Mikronukleus (MN) testidir (Carrano ve ark., 1978; Evans, 1984).

Bu tez çalışmasının amacı; ilaç etken maddesi olarak kullanılma potansiyeline sahip olabileceği düşünülerek Sakarya Üniversitesi Kimya Bölümü'nde sentezlenen ve antibakteriyal, anti α -glukosidaz, antikarbonikanhidraz ve antiasetilkinesteraz etkinlikleri belirlenmiş, fenoksipropanol amin türevi olan 1-(2-isopropyl-5-methylphenoxy)-3-((pyridin- 3-ylmethyl)amino)propan-2-ol bileşiğinin sitotoksik ve genotoksik potansiyellerinin belirlenmesidir. Bu amaçla, insan periferik kan lenfositleri üzerinde yapılan Kromozom Anormallikleri (CA) ve Mikronukleus (MN) testleri kullanılmıştır.

BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

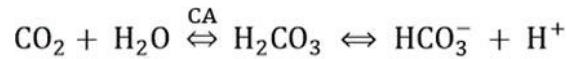
Günümüzde antibiyotikler başta olmak üzere birçok ilacın bilinçsiz kullanımı sonucunda etkinlikleri azalmakta ve yeni ilaçların geliştirilmesi elzem hale gelmiştir. Yeni ilaç etken maddeleri araştırmalarında, tek tek doğal ya da sentetik maddeler üzerine yoğunlaşılırken, aynı zamanda farklı etken maddelerin bir araya getirilmesiyle elde edilen bileşikler de incelenmektedir.

Timol ve oksipropanolamin çeşitli biyolojik aktivitelere sahip bileşiklerdir ve farklı ilaçların yapısında bulunurlar. Timol doğada, özellikle Lamiaceae familyası üyelerinin esansiyel yağlarında bulunan fenolik bir bileşiktir ve birçok aktiviteye sahip olduğu bilinir (Lambert ve ark., 2001; Pei ve ark., 2009; Giweli ve ark., 2012). Oksipropanolaminler ise başta β -blokerların yapısı olmak üzere bazı ilaçların iskelet yapılarında yer alır ve farklı biyolojik aktivitelere sahiptir (Carre ve ark., 1984; Mauleón ve ark., 1988; Bazylak ve Nagels, 2003; Wechsler ve ark., 2014).

Antibakteriyel maddeler, maya, küf, bakteri, mantar gibi mikroorganizmaların üremelerini engelleyen veya öldüren doğal, yarı sentetik veya sentetik maddeler olarak tanımlanmaktadır (Balcı, 2006). Antibiyotikler günümüzde dünya genelinde en çok kullanılan ilaçların başında gelmektedir (Istúriz ve Carbon, 2000). Hasta bakımı açısından antibakteriyel ilaçların geliştirilmesi ve klinik kullanıma girmesi, geçtiğimiz yüzyılın en önemli gelişmelerinden biri sayılmaktadır (Özgüneş, 2006). Diğer yandan, antibiyotiklerin akılcı olarak kullanılmaması; bakteriyel direnç gelişimi, tedavi başarısızlığı, yan etkilerinin çoğalması gibi sorunları getirmektedir (Öztürk, 2008). Dünya genelinde en çok tüketilen ilaç grubunun başında kalp ve damar hastalıkları ilaçları gelmektedir. 2001 yılı verisine göre dünya ilaç tüketiminin %19,3'ünü kardiyovasküler ilaç grubu, %8,9'unu antibiyotikler oluşturmaktadır (Top ve Tarcan, 2004). Antibakteriyel ajanlar ile ilgili önceki yıllarda yapılan bilimsel çalışmalara bakıldığında, çalışmaların genellikle çinko, gümüş ve bakır gibi

metallere yoğunlaştığı görülmekle birlikte, günümüzde tüketicilerin doğaya yönelmesi çeşitli bilimsel çalışmaların bitkisel kaynaklı, doğal esaslı antibakteriyel maddelerin eldesi ile ilgili çalışmalara yönelmektedir (Güler ve ark., 2015). *In vitro* ortamda bir antibiyotığın her ne kadar etken mikroorganizmaya karşı etkili olduğu bilgisi önemli olsada, bu göz önüne alınması gereken tek faktör değildir. Başarılı bir antibakteriyel tedavi; hastaya önemli bir toksik zarar vermeden, enfeksiyon bölgesinde etkili antibakteriyel biyolojik aktiviteyi sağlamasıdır (Anova, 2019). Bunun yanında, kullanılacak olan antibakteriyel madde sadece aktif biyolojik aktivitesi ile kalmamalı, aynı zamanda insan ve çevre bakımından güvenli olmalıdır (Palamutcu ve ark., 2009). Son yıllarda yeni ilaç araştırmalarının, daha az yan etki ve non-toksik olmaları sebebiyle sentetik olmayan bitki ve doğa kaynaklı ürünler üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir (Rates, 2001). Çalışmamızdaki test maddesinde biyolojik olarak aktif antibakteriyel özellik gösterme nedeni, ana iskelet yapısındaki doğal antibakteriyel uçucu yağ bileşeni olan timol kaynaklı olma olasılığı yüksektir.

Karbonik anhidraz (CA) enzimi ilk kez 1933 yılında sığır kırmızı kan hücrelerinde keşfedilmiştir (Meldrum, 1993) Karbonik anhidraz enzimi sadece memeli dokularında değil, diğer hayvan ve bitkilerde de yaygın bir şekilde bulunan ve fizyolojik öneme sahip, kataliz için aktif bölgesinde tek bir çinko atomu içeren bir metalloenzimdir (Pfeiffer, 2000; Mafra ve ark., 2004). Eritrosit CA'sının en önemli fizyolojik işlevlerinden biri, doku kılcallarında metabolizma ürünü olan karbondioksitin (CO_2) H_2CO_3 'a dönüşmesini, akciğer pulmoner kapillerde ise H_2CO_3 'in CO_2 'e dönüşmesini katalizleyip, solunum olayında rol almasıdır (Arslan, 1994). Şekil 2.3.'te bu reaksiyon gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Karbonik anhidraz enzimi katalizasyonu (Arslan,1994)

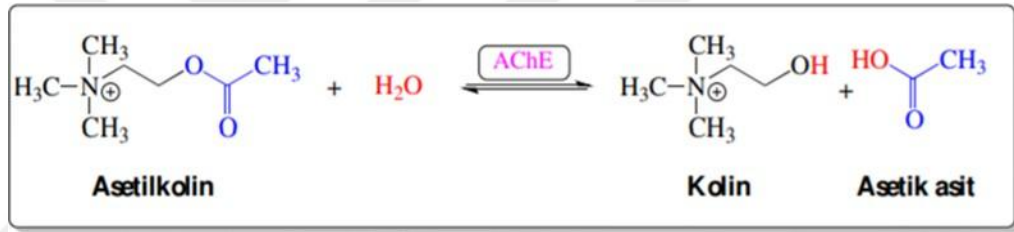
Ayrıca, karbondioksitin bikarbonat ve protona dönüşümünü katalizleme süretiyle karbonil anhidraz enzimleri hücre zarında ve hücre içindeki çeşitli olaylarda gaz değişimi, su-elektrolit dengesi, iyon transportu ve asit-baz dengesinin sağlanması gibi pek çok fizyolojik yollarda görev almaktadır (Maren, 1988; Parkkila ve Parkkila,

1996). Bu geri dönüşüm reaksiyonları, organizmalarda hücreler arası sıvı ve kan sisteminin kaydedeğer tampon sistemi olması nedeniyle önemlidir (Deutsch, 1987).

Memelilerde aktif olan 15 farklı CA izoenzimi tespit edilmiştir. Çoğu çeşitli doku ve organlarda özelleşmiş fonksiyonları yerine getirmek üzere baskın olarak farklılaşmış hücrelerle ilişkilidir. Temel olarak bu izoenzimlerden beş çeşidi hücre zarına bağlı olarak bulunurken (CAIV, CAIX, CAXII, CAXIV ve CAXV), beş çeşidi sitozolik formda (CAI, CAII, CAIII, CAVII ve CAXIII) ve bir çeşidi ise salgılanan bir enzim şeklinde bulunur (CAVI). İki çeşidinin mitokondriyal enzim olduğu tespit edilmiştir (CAVA ve CAVB). Ayrıca, henüz sınıflandırılmamış formu olan NonO/p54nrb tanımlanmıştır. CA izoenzimleri, kendi spesifik bölgelerinde farklı fonksiyonlar göstermektedir (Sly ve Hu, 1995; Hewett-Emmett ve Tashian, 1996; Karhumaa ve ark., 2000). Yokluklarında veya inaktiflik durumlarında, midedeki asit üretiminin azalmasından böbreklerin kaybına kadar uzanan hastalık komplikasyonları oluşabilmektedir (Sugrue, 1996; Arslan ve ark., 2004; Ergün, 2011).

Karbonik anhidraz enziminin fizyolojik fonksiyonları insanda bulunan CA izoenzimlerinin incelenmesi sonucu ortaya çıkarılmıştır. İnsan eritrosit hücrelerinde HCA-I ve HCA-II izoenzimi bulunmaktadır. Göz korneası, lensi ve silyer epiteryumda ise, HCA-II ve HCA-IV izoenzimleri bol miktarda bulunmaktadır. HCA-II izoenziminin önemi, glukom hastalığı tedavisi için yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır. Glukom hastalığı, anormal derecede yüksek göz içi basıncından dolayı ortaya çıkan bir hastalıktır (intraocular pressure, IOP) ve geri dönüşümsüz körlüğe sebep olmaktadır. Göz içi basıncının tek kontrol noktası göz içi sıvısıdır (hümör aköz). Karbonik anhidraz enziminin göz içi sıvısının salgılanmasında uyarıcı etkisi vardır. Bu enzimin inhibisyonu ile, %25-30 oranında silyer epitelinin salgı aktivitesinin azaldığı bilinmektedir. İnhibitörler, genellikle küçük molekül ağırlığına sahip bileşikler veya iyonlardır. CA izoenzimlerini inhibe ederek, bazı hastalıklarının tedavisini sağlayan farmakolojik ajanlara karbonik anhidraz inhibitörleri (CAİ) denir. Glukom hastalığı tedavisi için CA enzimi üzerinde yapılan inhibisyon çalışmaları sonucu CA inhibitörlerinin önemi ortaya çıkarılmıştır. Karbonik anhidraz enziminin inhibisyon mekanizmasının bilinmesi yeni bileşiklerin sentezlenmesi için büyük önem taşımaktadır (Supuran ve ark., 2004; Selen, 2018).

Asetilkolinesteraz (AChE) enzimi, majör nörotransmitter olan asetilkolini (ACh) sinapslarda hızla asetata ve koline hidrolize ederek kolinerjik sinir sisteminde etkili bir rol oynayan sinir sistemini enzimlerinden biridir (Tripathi ve Srivastava, 2010). Asetilkolinesteraz enzimi tarafından hidrolizi Şekil 2.2.'de verilmiştir. Kolinesteraz inhibitörleri klinik olarak Myastenia Gravis, Glokom ve Alzheimer Hastalığı gibi hastalıklarda kullanılmaktadır (Anonim, 2019). Miyastenia gravis, hareketle artan kas güçsüzlüğü ile karakterize olan asetilkolin reseptörlerinin (AChEi) hedef alındığı otoimmün kökenli bir hastalıktır. Asetilkolinesteraz inhibitörleri, asetilkolinesterazı inhibe edip, kavşaktaki asetilkolin miktarını artırarak kas güçsüzlüğünü tedavi etmede yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Yeğenoğlu ve ark., 2010).

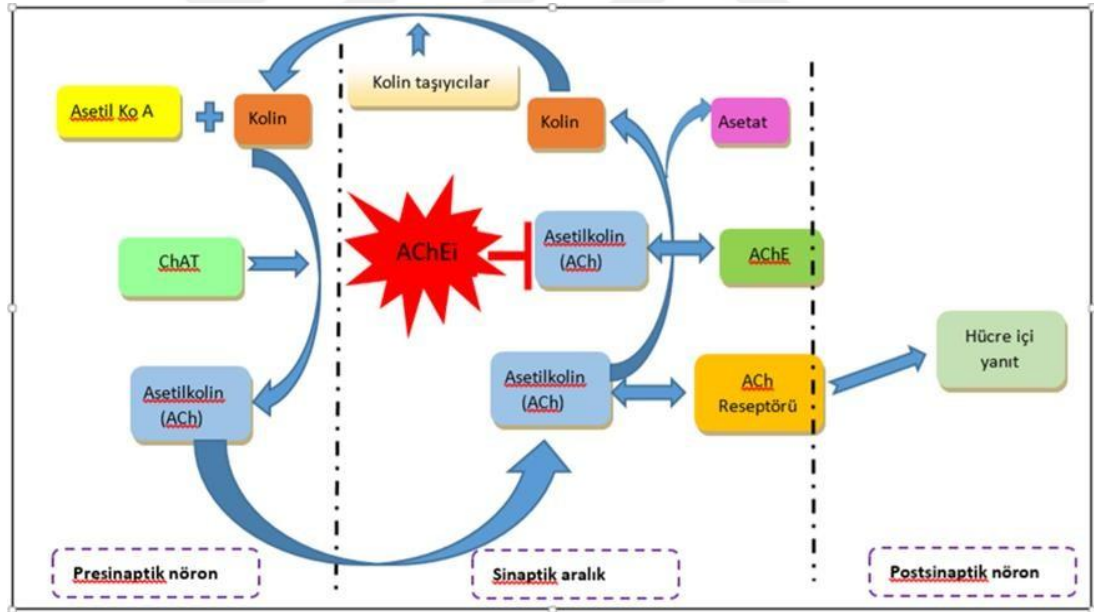


Şekil 2.2. ACh'nin AChE tarafından hidrolizi (Jeger, 2013)

Alzheimer (AH), nörodejeneratif özellikte bir hastalık olup daha çok yaşlı insanlarda görülmektedir. Hastalığın temel sorunu nöron kaybı ve kolinerjik sistemdeki sinapslardan salgılanan asetilkolin miktarının azalmasıdır (Gulçin ve ark., 2017). Asetilkolini hidroliz yoluyla parçalayan bir enzim olan asetilkolinesterazın inhibe edilerek asetilkolin miktarının artırılması hastalığın tedavi yaklaşımı olarak görülmüştür (Dickson, 1997). Ayrıca AH'li beyinlerde AChE seviyesinin arttığı tespit edilmiştir. Kolinesteraz inhibitörleri, asetilkolinin intrasynaptik yıkımını geciktirmekte ve etkisini uzatmaktadır. Kolinesteraz inhibitörleri AH hastalığının semptomatik tedavisinde kullanılan ilaçlardır, çünkü kolinesterazların inhibe edilmesiyle, nörotransmitterlerin sinaptik seviyesinin artmasına neden olurlar (Türkan ve ark., 2019). Asetilkolin, bilişsel işlevlerde ve günlük yaşam etkinliklerini sürdürme becerilerin düzenlenmesinde büyük ölçüde rol oynayan nörotransmitter maddelerden biridir. Antikolinesteraz inhibitör ilaçları AChE'yi geri dönüşümlü veya

geri dönüşümsüz şekilde inhibe ederler ve asetilkolinin hidrolizini engeller (Jeger, 2013). Şekil 2.3.'de Asetilkolinesteraz enzim inhibitörlerinin fonksiyonları gösterilmektedir.

Şu ana kadar tespit edilmiş AChEi'leri, AH için tam anlamıyla bir koruma ve tedavi sağlayamamakta, ancak semptomları yavaşlatarak hastalığın ilerlemesini geciktirmektedir (Kocançı ve Aslım, 2016). Bu sebeple, AH mekanizmasının araştırılmasına ve özellikle bu mekanizma üzerinde etkili olabilecek koruyucu ve tedavi edici potansiyeli olan yeni doğal kaynaklı AChE inhibitör ajanların tespitine yönelik çalışmalar önem kazanmaktadır (Türkan ve ark., 2019). Bu tür inhibe özellikde olan maddeler ilaç potansiyeli olma özelliğini taşır. Bu sebepten dolayı, bu çalışmada, AChE inhibitör özelliği tespit edilmiş 3e maddesinin genotoksik etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir.



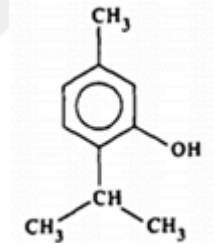
Şekil 2.3. AChE inhibitörlerinin fonksiyonları (Jeger, 2013).

α -Glikozidaz enzimi, bağırsak hücrelerinin villus yüzeyinde bulunan karbonhidrat sindirimiyle ilgili anahtar enzimdir. Bu enzim Tip 2 diabetes mellitus hastalığında terapötik bir hedef olarak kabul edilmiştir (Xu ve ark., 2014). Enzimin inhibitörleri,

diyabetik hastalarda nişastanın parçalanmasını geciktirir ve tokluk kan glikoz seviyelerini düşürür. Ayrıca α -Glikozidaz inhibitörlerinin postprandiyal hiperglisemiye %30-50 oranında azalttığı bildirilmiştir (Kaya, 2004). Ancak, diabet tedavisinde kullanılan α -glikozidaz enzim inhibitörleri, şişkinlik, karın ağrısı ve bağırsakta sindirilmemiş karbonhidrat birikimine neden olmaktadır (Zhang ve ark., 2011). Bu tür yan etkilerin giderilmesi veya daha aza indirilmesi için son çalışmalar daha çok doğal inhibitör arayışlarına ağırlık verilmesine yol açmıştır. McDougall ve ark. (2005)'nin yaptığı çalışmada bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin α -glikozidazın inhibisyonunda rol aldığını tespit etmişlerdir.

2.1. Timol ve Genel Özellikleri

Timol en çok *Thymus* sınıfına ait bitkilerden elde edilen ve kimyasal formülü 5-methyl-2- isopropylphenol ($C_{10}H_{14}O$) olan monoterpen grubuna ait, fenolik halkanın farklı lokasyonlarında hidroksil grubu içeren bir bileşiktir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.4. Timolun kimyasal yapısı (Aeschbach,1994)

Timol özellikle *Thymus vulgaris* (kekik) bitkisinin uçucu yağında yoğun miktarda bulunur (Horvathova ve ark., 2007; Baydar ve ark., 2009). Fakat timol uçucu yağ oranı, bitkinin cinsine, hangi kısmından elde edildiğine, üretim şekline, yetiştirildiği bölgenin coğrafi yapısına, iklime ve toplandığı zamana bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Masotti ve ark., 2003; Baydar, 2005).

Thymus, *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra* ve *Coridothymus* cinslerine ait türler hem yayılış olarak hem de ekonomik olarak büyük önem taşımaktadır (Başer ve ark., 1994). Bitki uçucu yağ oranı türler arasında değişmekte olup, uçucu yağında fenol

türevi olarak özellikle timol bulunmaktadır (Baytop, 1999). *Thymus vulgaris* L.'nin güçlü bir antifungal ve antiseptik olarak uçucu yağ bileşenlerinden timolün diğer fenollere göre 4 kat daha az toksik etkisi ve 30 kat daha fazla antiseptik etkisi tespit edilmiştir (Bağdat, 2006). Güçlü bir antibakteriyel ve antifungaldir (Belhattab, 2004). Ağız bakterilerine karşı antibakterisit aktivitesinden dolayı gargara bileşiminde kullanılmaktadır (Bağdat, 2006). Timolün en iyi bilinen antibakteriyel aktivitesinin yanında antioksidan, antiviral, antifungal ve antitümör aktiviteleri de vardır (Giweli ve ark., 2012).

Yine bu özelliklerinin yanında timolun gıdaları koruma potansiyeli olduğu da belirtilmiştir (Baratta ve ark., 1998). Timolün yaygın olarak kullanıldığı alanlardan biri de kozmetik, parfümeri sanayisi ve cilt hastalıklarının tedavisidir (Fakılı, 2010). Timol, hidrofobik davranışta bir molekül olmasından dolayı, membran reseptörleri ve membran proteinlerinin aktivitesi ve membran geçirgenliğinde etkili bir maddedir (Valera ve Frances, 2006).

Timolün yaygın kullanım alanından dolayı birçok çalışmada ilgi odağı olmuştur. Timolün genotoksik ve antigenotoksik özelliğini araştıran çalışmalar da literatürde mevcuttur. Maisanaba ve ark. (2015) tarafından fareler üzerinde yapılan *in vitro* genotoksisite çalışmada, timolün 5 farklı konsantrasyonu ile (15.62- 250 μ M arası) mikronükleus testi uygulandığında binükleatlarda kontrol grubuna göre anlamlı farklar kaydedilmemiştir. Başka bir çalışmada, *Lippia* cinsine ait türlerden elde edilen uçucu yağlarının UV ışınlarına karşı antigenotoksik etkileri araştırılmıştır. Türlerin bileşenleri içinden timolün antigenotoksik etki ve UV ışınlarının oluşturduğu DNA hasarına karşı koruyucu özellik gösterdiği belirlenmiştir (Quintero Ruiz ve ark., 2017). Bir başka çalışmada, timolun memeli hücreleri üzerindeki DNA koruyucu özellikleri *in vitro* incelenmiş ve sonuçta hiçbir indükleyici etkisinin olmadığı aksine koruyucu etki gösterdiği belirtilmiştir (Slamenova ve ark., 2007). Diğer bir araştırmada, insan lösemik hücre hattında (K562) esansiyel yağlardan timolün, DNA hasarı ve DNA koruyucu etkileri ile ilgili çalışma yapılmıştır. Sonuç olarak, timolün hidrojen peroksidin oluşturduğu DNA hasarlarını önemli derecede indirgeyici özellik gösterdiği belirlenmiştir. Bu özelliğinin antioksidan etkilerinden

kaynaklandığı düşünülmektedir (Horvathova ve ark., 2007). Yine başka bir çalışmada, timolün insan periferik lenfositleri üzerinde genotoksik aktivitesi HPRT gen mutasyon testi ile araştırılmıştır. Araştırma sonucunda timolün genotoksik etkisinin olmadığı aksine iyileştirici bir etkisinin olduğu belirtilmiştir (Kılıç, 2005).

2.2. Beta Blokerler

Klinik kullanıma ilk defa 1960 yılında giren beta blokerler, sempatolitik sempatik sinir sistemi ilaçları olarak bilinmektedirler. Genel olarak sempatik sinirlerinden stres sırasında salınan hormonların stimülasyonunu engelleyerek kalbin yükünü azaltan ilaçlardır. Hormon tarafından uyarılan reseptörler kalp hızını ve debisini artırırlar. Beta blokerler antagonist davranışları ile bu hormonların reseptörlerini geri dönüşümlü olarak bloke ederler ve tam tersi etki yaparak kalbi adrenalin/noradrenalinin zararlı etkilerinden korurlar. Bu ilaçların farmakodinamik ve farmakokinetik özellikleri birbirinden farklıdır. Beta blokerler olarak isimlendirilmeleri vücudun çeşitli bölgelerindeki beta reseptörlerini bloke etkilerinden dolayıdır (Yusuf ve ark., 1988; Odası, 2001; Işık ve ark., 2009; Doğan, 2012).

Beta bloker ilaçlar beta reseptörlerini etkileme durumlarına göre selektif ve non selektif olarak gruplandırılırlar (Kayaalp, 1992). Miyokardiyal selektif olan blokerler selektif olmayanlara karşı üstündürler. Bazıları ise intrinsik semptomimetik aktivite (İSA) etkisine sahip olup beta reseptörlerini duruma göre inhibe veya aktive ederler. İSA etkisi olan beta blokerler olmayanlara kıyasla kalp atım hızını düşürmede daha etkilidirler (Öğün, 2007).

Beta reseptörlerin Beta-1 (β_1) ve Beta-2 (β_2) adrenerjik reseptörler olmak üzere iki ana tipi vardır. Beta-1 adrenerjik reseptör, koroner damarlarda genişlemeye (vazodilatasyona) yol açarken, Beta-2, akciğerde oksijenlenmeyi artırır ve bronşlarda genişlemeye neden olur. Beta-1 adrenerjik reseptörler en çok kalp dokusunda yer alırlar ve uyarıldıklarında Gs (adenilat siklazı aktive eden G proteini tipi) proteinlerine bağlı bulunurlar. Adenozin trifosfatı (ATP) siklik adenozin monofosfata

(cAMP) çeviren adenilat siklaz enzimi, Gs proteininin aktivasyonunu sağlar. Hücre içinde protein kinaz A ve diğer cAMP bağımlı protein kinazları cAMP tarafından aktive edilir. Protein kinaz A; voltaj duyarlı kalsiyum kanalları, fosfolamban ve troponini de içeren önemli miyosit proteinlerini fosforilasyonundan sorumludur (Kayaalp, 1992).

Kalsiyum kanallarının fosforilasyonu, depolarizasyon boyunca kasılmayı artırır ve hücreye kalsiyum girişini sağlar. Fosfolamban, sarkoplazmik kalsiyum birikimini artırarak kasılmayı güçlendirir. Troponinin fosforilasyonu, kalsiyum bırakılmasını kolaylaştırarak kasılmayı azaltır, ancak kalp performansını artırır. Ayrıca, insülin ve renin salınımının artmasına, yağ dokusundan yağ asitlerinin oluşmasına yol açarlar (Kayaalp, 1992).

Beta-2 adrenerjik reseptörleri ise kalpte inhibitör görevi gören Gi (adenilat siklaz enzimini inhibe eden G protein çeşidi) proteinlerine bağlanırlar. Bunların aktivasyonu sonucu kalp gevşeme ve kasılması artar. Hücre zarında cAMP artış ile kalsiyum kanalları aktive olur. Beta-2 adrenerjik uyarılma; akciğerlerde bronkodilatasyona, arteriyoler düz kaslarda gevşemeye ve respiratuvar sekresyonlarda azalmaya, barsak ve mesane düz kaslarında gevşeme gerçekleşmesini sağlar (Warne, 2008).

Beta-adrenerjik antagonistler (Beta blokerler) yaygın klinik kullanımları yanında, migren profilaksisi, hipertansiyon, koroner arter bypass cerrahisi öncesi, iskemik kalp hastalıkları, miyokard infarktüsü, aritmiler, anksiyete, geniş açılı glokom, hipertrofik kardiyomiyopati gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Bökesoy ve ark., 2000). Beta blokerler, arteriyel damar direncini düşürerek antihipertansif etki meydana getirirler. Ayrıca kalbin oksijen gereksinimini, hızını, kasılma gücünü ve debisini azaltırlar. Renal renin salınımını inhibe ederler. Ayrıca, yağ dokusundan yağ asitlerinin serbestleşmesini azaltır ve insülin salınımını baskırlar (Kaya, 2004). Kaslarda vazodilasyonu engelleyerek glikozun hücre içine girişini azaltmaktadırlar (Sarafidis ve Bakris, 2006). Ayrıca, merkezi sinir sisteminin sempatik uyarılarını azaltır, kalp yetmezliğinde enerji dengesini iyileştirirler (Packer, 1988). Bunların

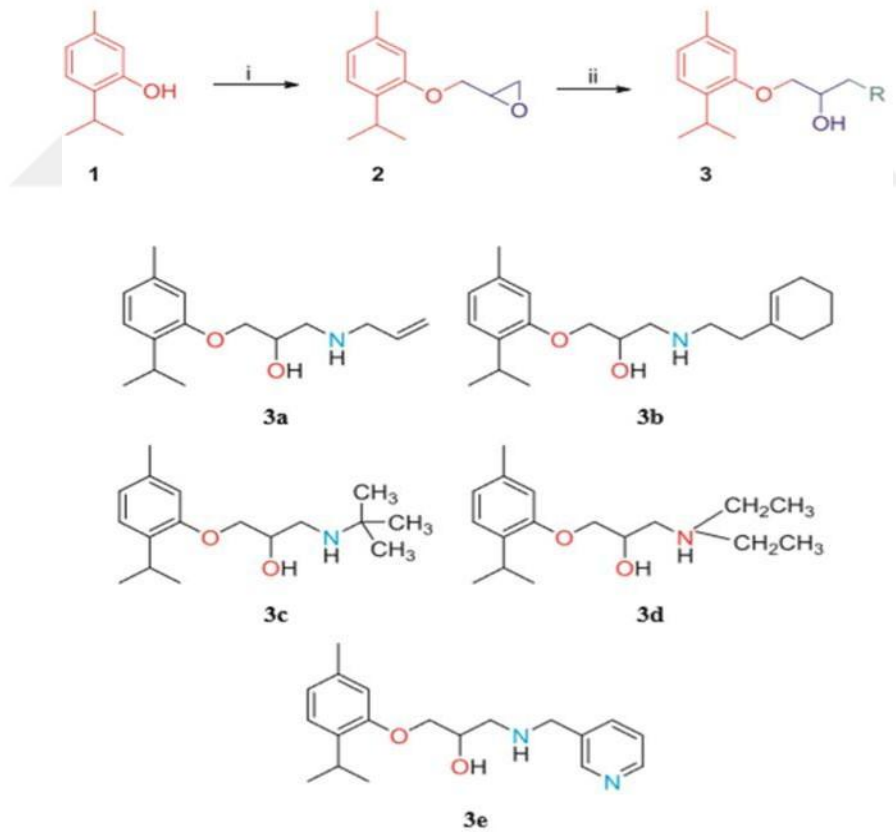
yanı sıra, böbreklerde kan akımını inhibe ederek noradrenalin salınımını azaltırlar (Kalan, 2007). Beta blokerlerin, birçok sistemde etkisi olduğu düşünüldüğünde, birçok yan etkisinin de olması kaçınılmazdır. Bu yan etkilerin başında; yorgunluk, sersemlik, bellek değişiklikleri, aşırı gaz üretimi gibi gastrointestinal semptomlar, alerjik reaksiyon, depresyon, diyabet hastalarında hipoglisemiye eğilim ve bronkospazm sayılabilir (MEB, 2011).

Telez ve ark. (2000) bir çeşit beta bloker olan atenololun uzun zaman tedavide *in vitro* ve *in vivo* insan kültür lenfositlerinde kromozomal anormalliklerini ve mikronukleus oluşumunu araştırmışlardır. Sonuç olarak atenololun *in vivo* testinde kromozom kayıplarına neden olabildiği ama klastojenik etki oluşturmadığı kaydedilmiştir. Aynı zamanda hem *in vivo* hem de *in vitro* koşullarda hücre toksisitesine neden olmadığı bildirilmiştir (Telez ve ark., 2000). Bir başka çalışmada, insan periferik kan lenfositlerinde atenololun genotoksik etkileri araştırılmış, hastalarda kontrol grubuna kıyasla kromatid kırığı ve kromozom kırığı frekansının önemli derecede yüksek olduğu ve atenololun insan lenfositlerinde yapısal kromozom anormallikleri tetiklediğini sonucuna varılmıştır. Bunun yanında, atenololun mitotik indeks değerlerine bakıldığında sitotoksik etki oluşturmadığı, mikronukleus frekansında ise önemli derecede indükleyici etki gösterdiği belirlenmiştir (Telez ve ark., 2010). Yine beta bloker ile ilgili başka bir genotoksik çalışmada, tümörlü farelere beta bloker verilerek, tümörün iyileşmesi için tedavide kullanılan cisplatin'nin böbreklerdeki genotoksik etkisine karşı karvedilol'un koruyucu etkisi araştırılmıştır. Elde edilen veriler, böbrek hasarını indükleyici olan ilacının tümör hücrelerde birikimi veya genotoksik etkileri gözlemlenmeden karvedilol'un karşı koruma sağladığını göstermektedir. Bu sonuç beta blokerlerin antitümör özelliğine sahip olduğunu göstermektedir (Rodrigues ve ark., 2016).

2.3. Test Maddesi: 1-(2-isopropyl-5-methylphenoxy)-3-((pyridin-3-ylmethyl) amino) propan-2-ol

Yeni sentezlenen 1-(2-isopropyl-5-methylphenoxy)-3-((pyridin-3-ylmethyl)amino) propan-2-ol bileşiği timol ve oksiproponol içeren temel iskelet yapısına, 3-Picolylamin bağlanarak elde edilmiştir. Maddenin sentez aşaması Şekil 2.2.'de

verilmiştir. Literatürde Timola bağlı oksiproponol grubu içeren iskelet yapısı 1-(Diethylamino)-3-(2-isopropyl-5-methylphenoxy)propan-2-ol olan bu bileşik beta bloker antagonisti olarak kendini kanıtlamış ve aynı anda beta bloker aktivite gösterdiği kanıtlanmış bir ajandır (Jindal ve ark., 2003). Bundan yola çıkarak, çalışmamızdaki maddenin benzer iskelet yapısından dolayı, beta bloker özellikte aktivite gösterebilme potansiyelinin yüksek olması düşünülerek yeni beta bloker aday olabileceği tahim edilmektedir. Ayrıca, daha önce yapılan bir çalışmada, 1-(2-isopropyl-5-methylphenoxy)-3-(pyridine-3-ylmethyl amino)propan-2-ol bileşiğinin antibakteriyel, anti α -glukosidaz, antikarbonhidraz ve antiasetilkinesteraz potansiyeli ispat edilmiş (Zengin ve ark., 2018) ve ilaç aday olma ihtimali artmıştır. Bu sebepten, maddenin genotoksik ve sitotoksik etkilerinin de araştırılması önem kazanmıştır.



Şekil 2.5. 1-(2-isopropyl-5-methylphenoxy)-3-(pyridine-3-ylmethyl amino)propan-2-ol' bileşiğinin sentez aşaması (Zengin ve ark., 2018)

2.4. Genotoksisite Testleri ve Yeni İlaç Geliştirmede Önemi

Sanayi ve kentleşme devriminin başlamasıyla teknolojinin ve endüstrileşmenin beraberinde getirdiği kimyasal kirlenme, dünya üzerindeki olumsuz etkilerde büyük rol oynamaktadır. Canlılar ve çevre ekosistemleri bu kirleticilerle her geçen gün artan bir sıklıkla karşılaşmaktadırlar. Tarımda kullanılan kimyasallar, iyileşmek amacıyla kullanılan ilaçların bileşimindeki kimyasal kirleticiler, sigara ve egzoz dumanları, endüstriyel fabrika atıkları kimyasal kirleticilerin ana havuzunu oluşturmaktadırlar (Kılıç, 2005). Bunlara ek olarak, sentetik ilaçların bilinçsiz kullanımı ve doğaya karışması, su ve tarım alanlarının kirliliğine sebep olurlar ve doğada birikim yaparak çok büyük sorunları beraberinde getirmektedir (Gustafson ve Bowen, 1997; Can ve Çelik, 2008).

Bu kirleticilerin bazıları canlıların genetik yapısında herhangi bir olumsuz etki yapmamakta veya olumsuzluklar DNA onarım mekanizması ile tamir edilmektedir. Ancak, bazı kirleticiler organizmalarda mutasyonlara sebep olmaktadır. Kirleticilerin sebep olduğu yapısal kromozom hataları üreme hücrelerinde gerçekleşir ve tamir edilemezse bu anormallik nesillere geçmektedir. Somatik hücrelerde gelişirse bu hasar canlının kendisinde sorunlara yol açmaktadır (Kılıç, 2005).

Genotoksisite; DNA, kromozom veya gen seviyesinde meydana gelen, gen mutasyonları, DNA zincir kırıkları, sayısal ve yapısal kromozom anormallikleri gibi hasarları içine alan genel bir terimdir. Genotoksisite testleri, kimyasal maddelerin, genotoksik ve kanserojenik potansiyellerinin tespitinde, ilaçların hem piyasaya sürülmeden önce hem de ilaç kullanan kişilerdeki genetik etkilerini ve güvenilirliğini araştırmada, genetik hasar ile hastalıklar arasındaki ilişkinin belirlenmesinde, kansere duyarlılığın tayininde, DNA hasarlarına sebep olup olmadığını belirlemek ve bu kimyasalların etki mekanizmalarını anlamak için uygulanmaktadır (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2014).

Toksikolojinin önemli alanlarından biride genotoksisite testleridir. Bir ilacın etkin dozunu belirlerken, mutlaka genotoksik güvenilirlik testlerinden geçmiş olması

gerekir. Bu testlerin başında bakterial mutajenite testleri (örn: Ames) ve sitogenetik testleri (*in vitro* kromozomal anormallikleri testi veya mikronükleus testi) gelmektedir. Daha sonrada *in vivo* kromozom hasarı testleri önerilmektedir. *İn vivo* ve *in vitro* çalışmalarda, araştırmanın amacına bağlı olarak, sıçan, fare veya tavşan gibi memeli hayvanlar veya onlardan elde edilen kemik iliği veya periferel kan hücrelerinin yanı sıra insan periferel kan lenfositleri de kullanılmaktadır. Kan hücreleri ile çalışmalar, çevresel faktörlerin ve ajanların insan hücrelerinde açabileceği zararlar hakkında fikir sahibi olmak ve herhangi bir tehdit oluşturup oluşturmadığını anlamak için önemlidir. *İn vitro* KA ve MN testinde, besi yerinde gelişmiş hücreler üzerinde etken maddenin anormallikleri oluşturup oluşturmadığı kontrol edilmektedir (Aksoy, 2006; Demircigil ve ark., 2009). İlaç olma potansiyelinin yüksek olduğu düşünülerek sentezlenen maddelerin genotoksitesinin belirlenmesi amacıyla en yaygın kullanılan ve kısa sürede sonuç alınabilinen testlerden biri KA testleri iken diğeri MN testidir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

2.4.1. Kromozomal anormallikler (KA) testi

Kromozomal anormallikler testi, herhangi bir ajanın genotoksik profillerinin belirlenmesi için geliştirilmiş ve sıklıkla uygulanan bir yöntemdir. Uluslararası geçerliliği olan bu test, uygulamalı olarak tüm genomdaki hasarın izlenmesine ve etken maddenin maruziyetinin değerlendirilmesine imkân tanır. Kromozomal anormallikler, spontan veya etken maddenin maruziyetinin bir sonucu olarak oluşan, kromozomun sayısındaki (sayısal anormallik) veya yapısındaki (yapısal anormallik), mikroskopik düzeyde gözlenebilen genetik değişikliklerdir. Kromozomal anormalliklerin çoğu hasar görmüş olan kromozomların tamir mekanizması tarafından onarılamaması veya yanlış tamiri ya da hücre bölünmesi esnasında kutuplara göçte oluşan anormalliklerden kaynaklanmaktadır (Hagmar ve ark., 1994).

Memeli hayvan hücrelerine *in vivo* ve *in vitro* koşullarda kromozomal anormallikler testleri uygulanmaktadır. *İn vivo* KA testinde genellikle hayvan kemik iliği hücreleri kullanılırken, *in vitro* KA testinde çoğunlukla kültüre alınmış periferel kan lenfositleri ya da çalışmanın amacına bağlı olarak sperm, kemik vb. hücreler kullanılmaktadır. *İn vivo* araştırmalarında hayvanlara sakrifiye edilmeden 2-3 saat süre

öncesinden polimerizasyon inhibitörü kolşisin uygulanır. Kolşisin kültürdeki hücrelerin bölünme aşamasında tübül oluşumunu inhibe eden kimyasaldır. *In vitro* kromozomal anormallikleri testinde ise hasat edilmeden 2 saat önce hücre kültürleri kolşisine tabii tutulmaktadır (Evans, 1984; Preston ve ark., 1987; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2016).

Kromozomal anormallik testi ile tespit edilen yapısal anormalliklere; kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom, halka kromozom, kromatid değişimi, translokasyon, inversiyon, ve sayısal anormalliklerden endoredublikasyon ya da poliploidi sayılabilmektedir. Kromozomun her iki kardeş kromatidinde aynı noktada oluşan kırılmaya kromozom kırığı, sadece bir kromatidinde meydana gelen kırığa kromatit kırığı denmektedir. Disentrik kromozomu, iki kromozomun uçlarında oluşan kırılma sonucu ve açık uçların birleşmesi şeklinde tanımlayabiliriz. Fragment ise kromozomların herhangi bir yerinden kopan parçaların ayrı bir yerde bulunması şeklinde görülmektedir (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010).

Bilinen genotoksik ajanlara, mesleki veya çevresel olarak maruziyet sonrası oluşan biyolojik etkinin erken gösterilmesinde en fazla kullanılan biyoizlem testlerinden biri olan kromozomal anormallik testi yüksek hassasiyetiyle, teknik olarak zor bir süreç olmasından ziyade, bu testin indüksiyon mekanizmalarının çok iyi bilinmesi bu testi altın standart değerinde kılar (Albertini, 2004).

2.4.2. Mikronukleus (MN) testi

Günümüzde insan sağlığına, kimyasal ve fiziksel faktörlerin yanı sıra çevresel faktörlerinde ciddi etkilere sebep olduğu vurgulanmaktadır. Dış etkenlerin başında, hastalıklara zemin hazırlayan ve ciddi hasarlara sebep olan doğal ya da sentetik kimyasal maddelerle bazen mesleki gereği bazen de günlük yaşantımızda sıklıkla karşı karşıya gelmekteyiz. Çevresel kirliliğin giderek artmasıyla, canlı organizmalar bu ajanlara daha fazla maruz kalmaktadır. Dolayısıyla, karsinojenik, mutajenik, teratojenik ve toksik faktörlerin olumsuz etkilerini tespit etmek ve önlem almak kaçınılmaz hale gelmektedir. Kalınan fiziksel ve kimyasal faktörlerin, insanlar ve diğer canlılar üzerinde genotoksik ya da mutajenik etkilerinin incelenmesinde

kullanılan temel sitogenetik metotlardan biri de mikronukleus (MN) testidir. Mikronukleus testi, daha kolay uygulanabilmesi ve daha fazla sayıda hücre incelenmesine olanak sağlamasından dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır (Demirel ve Zamani, 2002).

Mikronukleus, asentrik kromozom parçaları veya tam bir kromozom kaybına neden olan hasarlardan oluşan, hücre sitoplazmasında ışık mikroskopuyla görülebilen, ana çekirdekten ayrı olmakla birlikte ana çekirdeğe kıyasla üçte birinden büyük olmayan ve ana çekirdekle aynı ya da biraz açık pembemsi boyanan, değişebilen şekilde oval ya da yuvarlak çekirdekçiklerdir (Fenech, 2007). Mikronukleus, hasarın hücre döngüsünde nerede olursa olsun bağımsız bir şekilde mitoz bölünmenin metafaz-anafaz geçişi esnasında oluşur. Mikronukleuslar, klastojenik etki sonucu asentrik bir parçanın kırılıp kardeş hücrelerden ayrılması ya da anöjenik etki sonucu kromozomların kutuplara çekilmesi sırasında oluşan kromozomun tümüyle kayba uğraması ile oluşur (Fenech ve ark., 1999).

Mikronukleus tekniğinde kimyasal muamele görmüş hücrelere sitokalsin-B eklenerek sitoplazma bölünmesi engellenir. Sitokalsin-B, bölünen hücrenin ikiye ayrılmasını uyaran mikroflamentlerin oluşmasını sağlayan aktinin polimerizasyonunu inhibe eder. Böylelikle sitoplazma bölünmesi gerçekleşmeden çekirdek bölünmesi tamamlanmış olur. Oluşan 2 yavru nükleusun birlikte görüldüğü iki nükleuslu hücrelerin (binukleat) sitoplazmaları içinde yer alan mikronukleuslar değerlendirilirler. Mikronukleus içeren iki çekirdekli hücrelerin sayısının, toplam iki çekirdekli hücre sayısına oranı, mikronükleuslu hücrelerin frekansını verir (Yükselten, 2012). Mikronukleus sayısındaki artış, kimyasal ajanların hücrelerde oluşturduğu yapısal ve sayısal kromozom anormalliklerin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Fenech ve Morley, 1985).

In vivo mikronukleus analizinde ise, sitoplazması inhibe edilmemiş memeli eritrosit hücrelerindeki mikronukleus sıklığı belirlenir. Bu yöntemde genelde periferik kan hücrelerindeki veya kemik iliğindeki polikromatik eritrositlerin mikronukleus oluşumu bakımından tespiti yapılarak, uygulanan bileşiğin genetik bir hasar oluşturup oluşturmadığı saptanmaktadır (Krishna ve Hayashi, 2000).

2.5. Yeni ilaç geliştirmenin önemi ve araştırmalardaki yeri

Geçtiğimiz yüzyılda, klinik farmakoloji ve kimya bilim dallarının katkılarıyla ilaç geliştirme çalışmaları önemli paya sahip olmuştur. Ayrıca, moleküler biyolojide ve özellikle de genetik bilimlerdeki gelişmeler ilaç keşfinde ve gelişmesinde büyük rol oynamıştır (Drews, 2000).

İlaç piyasasında kullanıma sunulmuş binlerce ilaç molekülü bulunmasına rağmen yeni ilaç molekülleri geliştirmek için yapılan çalışmalar sürekli artmaktadır. Çünkü yeni terapötik etkileri iyileştirilmiş ilaçlar kullanıma sunulurken, eskileri bugün kullanımdan uzaklaştırılmaktadır. Yeni ilaç geliştirmesi ve değerlendirmesi birbirini izleyen klinik öncesi ve klinik çalışma şeklinde iki basamaktan oluşur. Klinik öncesi çalışmalarının amacı kimyasal bileşiğin yeni ilaç potansiyel etkinliği ve güvenilirliğinin insanlarda kullanıma sunulmadan önce değerlendirilmesidir (Kapucu ve ark., 2009). Bu dönemde gerçekteştirilen çalışmaların başında, toksikolojik araştırmalar gelir. Toksisite incelemelerinin yanında, yeni sentezlenen aday ilaçların akut, subakut, kronik, subkronik, immunotoksik, nörotoksik, teratojenik, reproduktif toksisite, genotoksisite ve karsinojenite gibi etkileri de çalışılmalıdır.

Preklinik araştırma aşamasından başarıyla geçen aktif aday ilaç daha sonra klinik araştırmaya tabii tutulur. Çalışma gönüllü sağlam ve hasta denekler üzerinde yapılır ve 4 fazda gerçekteşir. Faz I dönemi, ilacın ilk kez insan üzerinde denendiği ve 10-15 gönüllü sağlam deneklerden oluşup, ilacın uygun doz aralığının saptanması amacıyla yapılmaktadır. Yaklaşık 9-18 ay sürer ve ilacın insanda tolere edilebilen maksimum dozu belirlenir. Fazın amacı, ilacın farmakokinetik ve farmasötik şeklinin belirlenmesidir. Faz II çalışmaları, oldukça büyük kütle üzerinde yapılp belirlenen doz ile hastaların 1-3 yıl arası süren süreçte tedaviye tabi tutulmasını kapsar. Ana amacı, ilacın hastadaki etkinliğini ve hastada tedavi edici ve koruyucu dozlarını belirlemektir. Faz III çalışmaları, olası en fazla hasta üzerinde yapılan çalışma dönemini kapsar. Yeterli veriler elde edildikten sonra, ürünün ilaç olarak kullanabilmesi için onay prosedürüne başvurulur. Faz IV çalışmalar, bu dönemde

artık ilaç deneme amacıyla verilmez. Sadece ilacın uzun süreli güvenilirlik verilerinin toplanması ve ilaca bağılı gelişen ve çok nadir rastlanan ciddi, istenmeyen olguların belirlenmesi, ilaç etkileşimlerinin ve endikasyon için kullanılan ilaçlarla yeni ilacın karşılaştırılması amaçlanmaktadır (Kapucu ve ark., 2009).

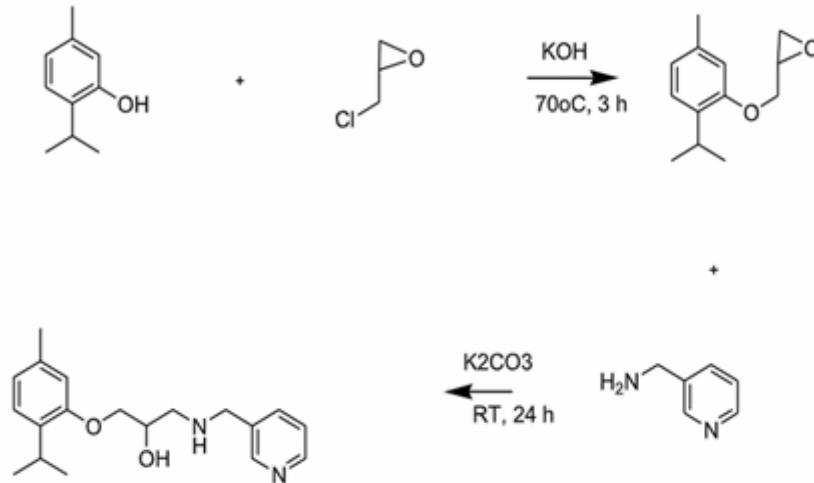


BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Test maddesi

Çalışmamızda, Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde sentezlenen fenoksipropanol amin türevi 1-(2-isopropyl-5-methylphenoxy)-3-((pyridin-3-ylmethyl) amino)propan-2-ol birleşği (3e) kullanılmıştır. Bu bileşğin sentez aşamasında, 1 mol timol oksiranı (4 g) metal alkolde çözülerek üzerine 2 mol 3-methylamino pyrine (3,94 ml) eklenmiş ve daha sonra 1 ml K_2CO_3 eklenerek 12 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Reaksiyon sonunda metal alkol çektirilmiş ve etil asetat-tuzlu su ile ekstraksiyon yapılmıştır. Ekstraksiyon sonunda ürün 4 kere hekzanla yıkanarak 4,136 g temiz ürün elde edilmiştir (Zengin ve ark., 2018) (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. 1-(2-isopropyl-5-methylphenoxy)-3-((pyridin-3-ylmethyl) amino) propan-2-ol bileşğinin sentezi (Zengin ve ark., 2018)

Yeni ilaç etken maddesi olma potansiyeli olduğu düşünülerek sentezlenen fenoksiopropanol türevi 1-(2-isopropyl-5-methylphenoxy)-3-((pyridin-3-ylmethyl) amino)propan-2-ol bileşiğinin antibakteriyel etkileri incelenmiş ve oldukça yüksek antibakteriyel etki gösterdiği bulunmuştur. Diğer yandan, antikarbonik anhidraz, anti- α -glukosidaz ve antiasetilkolinesteraz aktiviteleri de belirlenmiştir (Zengin ve ark., 2018). Yeni ilaç etken maddesi olma potansiyelinin değerlendirildiği bir sonraki aşama olan genotoksisite araştırmalarının yapılabilmesi için bu madde test maddesi olarak seçilmiştir.

3.1.2. Periferik kan

Çalışmamızda, sigara ve alkol kullanmayan, kronik hastalığı olmayan, son 2 ay içinde herhangi bir ilaç kullanmamış, son 6 ay içerisinde teşhis ve tedavi amaçlı bir ışına maruz kalmamış ve cerrahi bir operasyon geçirmemiş 20-25 yaşları arasında sağlıklı erkek ve kadın bireyler, gönüllülük esasına göre donör olarak seçilmiş ve periferik venöz kan örnekleri kullanılmıştır.

3.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Chromosomemedium B

Cat No: F 5023

Marka: Biochrom

Kan lenfosit hücrelerini kültür ortamında çoğaltmak için besiyeri olarak kullanılmıştır.

Mitomycin C ($C_{15}H_{18}N_4O$)

Cat no: 50-07-7

Marka: AppliChem

Pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Colchicine ($C_{22}H_{25}NO_6$)

Cat No: 64-86-8

Marka: Sigma

Kromozomal anormallik testinde, kromozomların metafaz plağında durdurmak amacıyla hücrelerde iğ ipliklerinin oluşumunu depolimerize etmesi için kullanılmıştır.

Potasyum klorür (KCl)

Cat No: 7447-40-7

Marka: Merck

Hipotonik solüsyon, lökositlerin izolasyonu için eritrosit hücre zarlarının patlamasını sağlar. Kromozomal anormallik ve mikronukleus testlerinde kullanılmıştır.

Metanol (CH_3OH)

Cat No: 67-56-1

Marka: Merck

Uygulanan testlerde fiksatifin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Asetik asit (CH_3COOH)

Cat No: 64-19-7

Marka: Merck

Uygulanan testlerde fiksatifin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Giemsa boyası

HS Kodu: 3204-19-00

Marka: Merck

Hazırlanan lenfosit preparatlarının boyanması işleminde kullanılmıştır.

Tampon A (KH_2PO_4)

Cat No: 7778-77-0

Marka: Sigma Aldrich

Tampon çözeltisi olarak giemsa boyasının hazırlanması esmasında kullanılmıştır.

Tampon B (Na_2HPO_4)

Cat No: 7558-79-04

Marka: Sigma Aldrich

Tampon çözeltisi olarak giemsa boyasının hazırlanması esmasında kullanılmıştır.

Entellan

HS kodu: 3208-20-10

Marka: Merck

Hücre kültüründen elde edilen preparatların daimi preparat haline dönüştürülmesinde kullanılmıştır.

Heparin ($\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{NO}_{20}\text{S}_3$) Nevparin enjektabl 25000 İ.Ü. / 5 mL

Marka: Mustafa Nevzat

Kanın pıhtılaşmasını engellemek amacıyla hücre kültüründe kullanılmıştır.

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

Cat No: 14930-96-2

Marka: Applichem

Sitokinezin oluşumunu bloke etmek amacıyla mikronukleus testinde kullanılmıştır.

3.1.4. Deneyde kullanılan çözeltiler

Tampon A KH_2PO_4 11,34 gr

Distile su 250 mL

Tampon B

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 14,83 gr

Distile su 250 mL

0,075 M KCl çözeltisi

KCl 1,398 gr

Distile su 250 mL

Kolşisin (0,06 µg/mL)

Kolkisin 0,01 gr

Distile su 10 mL

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

Mitomisin C (MMC) (0,2 µg/mL)

Mitomisin C 2 mg

Distile su 2 mL

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

Sitokalsin B (5,2 µg/mL) Sitokalsin 5 mg

DMSO 2440 µL

3.2. Doz seçimi

Fenoksiproponolamin türevi olan test maddesinin uygulama dozları IC_{50} değerine göre seçilmiştir. Çalışmadaki en yüksek uygulama dozu 50 µg/mL'dir. Diğer dozlar ise en yüksek dozun 1/2, 1/4 ve 1/8 oranında seyreltilerek, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL ve 6,25 µg/mL olarak belirlenmiştir. Ayrıca CA ve MN testlerinde pozitif kontrol olarak MMC, çözücü kontrol için DMSO ve negatif kontrol de distile su kullanılmıştır.

3.3. Metot

3.3.1. Kromozomal anormallik (CA) testi

Kromozom medium B steril tüplere 2,5 mL olacak şekilde dağıtılmıştır. Test maddesi için 4 uygulama konsantrasyonu (6.25, 12.5, 25 ve 50 µg/mL) ve negatif kontrol (steril su), çözücü kontrol (DMSO) ve pozitif kontrol (Mitomisin C) kullanılmıştır. Periferik kanlar 1/10 oranında heparin içerecek şekilde 4 sağlıklı bireyden alınmış, steril tüplerdeki 2,5 ml'lik besiyeri üzerine 0,2'şer mL aktarılmıştır. Bu besiyeri tüpleri önceden 37°C'ye getirilmiş olan etüve kaldırılarak 72 saat süreyle inkübe edilmiştir. Tüpler kültür süresince, her gün 3 defa alt üst edilmiştir. Kültür ortamına 6,25, 12,5, 25 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda 24 saatlik maruziyet için kültür süresinin 48. saatinde, 48 saatlik maruziyet için kültür süresinin 24. saatinde test maddesi uygulanmıştır. Eşzamanlı şekilde, çözücü kontrol olarak DMSO, negatif kontrol olarak steril distile su ve pozitif kontrol olarak MMC (0,2 µg/mL) eklenmiştir. Kültürün 70. saatinde bütün tüplere iğ ipliklerinin depolarizasyonunu sağlayan kolşisin (0,06 µg/mL) eklenmiştir.

Kültür süresi bitiminde, tüpler 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatantları atılan tüplere, önceden hazırlanmış ve sıcaklığı 37°C'ye getirilmiş 0,075 M KCl'den 5'er mL vorteks yapılarak damla damla ilave edilmiştir. Hipotonik solüsyon eklenen tüpler 37°C'lik etüvde 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra, tüpler tekrar 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatantları atılmış ve her tüpe daha önceden hazırlanıp +4°C'de buzdolabında bekletilen soğuk fiksasyon çözeltisinden (3 metanol:1 asetik asit) 5'er mL vorteks yapılarak yavaş bir şekilde eklenmiştir. Daha sonra, tüpler 45 dk +4°C'de beklemeye bırakılmıştır. Süre bitiminde, tüpler 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatantları atılmış ve tekrar damla damla şeklinde soğuk metanol: asetik asit (3:1) fiksatifinden 5'er mL her tüpe vorteks ile ekleme yapılmıştır.

Tüpler üçüncü kez santrifüj edilip (1200 rpm, 10 dk) süpernatantları tüplerin konik kısmına kadar atılıp, kalan kısım pastör pipeti ile homojen hale getirilmiştir. Elde edilen hücre kültürleri önceden temizlenmiş (saf suyla yıkanmış ve çalışma zamanına kadar -20 °C’de bekletilmiş) lamalar üzerine belirli bir yükseklikten damlatılarak preparat hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatlar oda sıcaklığında yaklaşık olarak 24 saat kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra, tampon A ve tampon B kullanılarak pH 6,8 olacak şekilde hazırlanmış % 5’lik giemsa ile 15-20 dk boyanmış, oda sıcaklığında kurutulan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi preparat haline getirilmiştir.

3.3.1.1. Kromozomal anormalliklerin incelenmesi ve mitotik indeks hesaplaması

Mitotik indeksin (Mİ) saptanmasında, bütün uygulamalar için her bir bireyden 3000 hücre ve toplamda her bir konsantrasyon için toplam 12000 hücre incelenmiştir. Mitotik indeks, bölünen hücre sayısının toplam hücreye oranı yüzde cinsinden hesaplanarak belirlenmiştir. Her uygulama için her bir bireye ait preparatlarda kromozomları iyi dağılmış ve 46 kromozomlu olan 100’er hücre (her bir konsantrasyon için toplam 400 hücre) değerlendirilerek kromozom anormallikleri tespit edilmiştir. İncelenen toplam hücre içindeki anormal hücrelerin yüzdesi ve hücre başına düşen kromozom anormalliği (CA/Hücre) sayısı belirlenmiştir.

3.3.2. Mikronukleus (MN) test yöntemi

Kromozomal anormallik testi metodunda olduğu gibi besi yerleri (Kromozom Medium B) steril tüplere 2,5 mL olacak şekilde dağıtılmıştır. Mikronukleus testinde 4 uygulama konsantrasyonu (6,25, 12,5, 25 ve 50 µg/mL), pozitif kontrol, negatif kontrol ve çözücü kontrol kullanılmıştır.

Sağlıklı bireylerden alınan kanlar önceden hazırlanmış olan 2,5 mL'lik besi yeri üzerine 0,2 mL olacak şekilde aktarılmıştır. Kültür tüpleri daha önceden ısıtılmış ve 37°C'ye getirilmiş olan etüvde 72 saat süreyle kültüre kaldırılmıştır. Kültür süresi boyunca tüpler her gün 3 defa alt üst edilmiştir.

Kültürün başlangıcından itibaren 24. saatte madde uygulaması yapılmıştır (6,25, 12,5, 25 ve 50 µg/mL). Aynı zamanda negatif kontrol olarak steril distile su, pozitif kontrol olarak MMC (0,2 µg/mL) ekimi ve çözücü kontrol olarak da DMSO eklenmiştir. Kültürün 44. saatinde sitokinez inhibitörü olan Cytochalasin-B 5,2 µg/mL olacak şekilde eklenmiştir.

Kültür süresi bitiminde tüpler etüvden çıkarılmış ve 1000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatantları atılarak daha önceden hazırlanan ve +4°C'ye getirilen 0,075 M KCl çözeltisinden 5'er mL vorteks üzerinde damla damla ilave edilmiştir. Hipotonik solüsyon eklemesinin ardından tüpler +4°C'de 5 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler tekrar 1000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Daha önceden hazırlanmış olan ve +4°C'de bekletilmiş soğuk fiksatif çözeltisinden (3 metanol: 1 asetik asit) 5'er mL vorteks üzerinde yavaş yavaş damlatarak tüplere eklenmiştir. Bu işlemden sonra tüpler 15 dakika buzdolabında bekletilmiş ve ardından tekrar santrifüj edilmiştir (1000 rpm, 10 dakika). Santrifüj sonrasında süpernatant atılmıştır. Tekrar damla damla soğuk metanol: asetik asit (3:1) fiksatifinden 5'er mL her tüpe vorteks üzerinde eklenip tüpler tekrar santrifüj edilmiş (1000 rpm, 10 dakika) ve süpernatant atılmıştır. Bu işlemden sonra daha önceden hazırlanmış olan ve 3:1 fiksatifine %1'lik olacak şekilde formaldehit eklenmesiyle elde edilen çözeltiden her tüpe 5'er ml eklenmiş ve tüpler tekrar santrifüj edilmiştir (1000 rpm, 10 dakika). Santrifüj işleminden sonra tüplerin konik kısma kadar olan kısmı atılmış ve kalan kısım pastör pipeti ile yavaş bir şekilde homojen hale getirilmiştir.

Elde edilen hücre kültürü önceden temizlenmiş (1 N nitrik asitte 1 gece bekletilmiş ve 25-30 dakika çeşme suyunda yıkanmış, saf sudan geçirilmiş ve çalışma zamanına kadar %70'lik alkol içerisinde -20°C 'de bekletilmiş) lamalar üzerine damlatılmıştır.

Kuruyan preparatlar kromozomal anormallik testinde olduğu gibi %5'lik Giemsa boyası ile 13-15 dakika boyanmış ve daimi preparat haline dönüştürmek için entellan ile kapatılmıştır.

3.3.2.1. Mikronukleus frekansının belirlenmesi

Daimi hale getirilmiş preparatlarda, her bir konsantrasyon için her bir bireyde 1000 olmak üzere toplamda 4000 binükleat hücre incelenerek 1, 2, 3 ve daha fazla sayıdaki mikronukleuslar belirlenerek mikronukleus frekansları belirlenmiştir.

3.3.3. İstatistiksel değerlendirme

Deney gruplarındaki anormal hücre yüzdelerinin, hücre başına düşen kromozomal anormallik sayılarının, mitotik indekslerin, mikronukleus frekanslarının ve hücre başına düşen mikronukleus yüzdelerinin, kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterip göstermediğinin belirlenmesi için z dağılım testi kullanılmıştır. Anormal hücre frekansları, mitotik indeks, mikronukleus frekans ve hücre başına düşen kromozomal anormallik sayıları doz-etki ilişkilerini ortaya koymak için SPSS 15.0 programı kullanılmıştır.

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. 1-(2-isopropyl-5-methylphenoxy)-3-((pyridin-3-ylmethyl) amino) propan-2-ol'un İnsan Kan Lenfositleri Üzerindeki Genotoksik Etkileri

4.1.1. Kromozomal anormallikler testinin yirmi dört saatlik bulguları

Gönüllü kişilerden alınan periferik kan lenfositleri ile yapılan 3e maddesinin 24 saatlik *in vitro* uygulamasında 4 farklı konsantrasyon (6,25, 12, 25 ve 50 µg/mL) kullanılmıştır. Uygulama sonucunda saptanan anormallik tipleri, hücre başına düşen anormallik sayıları, anormal hücre yüzdesi ve mitotik indeks Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Saptanan anormallik tipleri genellikle yapısal kromozom anormalliklerinden oluşurken, en yüksek konsantrasyon olan 50 µg/mL'lik uygulamada 1 tane endoredublikasyon tipinde sayısal anormalliğe rastlanmıştır. Sayısal tipte olan kromozom anormallikleri kromatit kırığı, kromozom kırığı, fragment ve kardeş kromatitlerde birleşmedir. Kromatit kırığı bütün uygulama gruplarında gözlenirken kromozom kırığı ve fragment en düşük konsantrasyon olan 6,25 µg/mL'lik uygulama dışındaki diğer uygulama gruplarında gözlenmiştir. Kardeş kromatitlerde birleşme tipindeki anormallik en yüksek uygulama grubunda gözlenmiştir. Gözlenen anormallik tiplerine ait resimler Şekil 4.1-4.5'te gösterilmiştir. Gözlenen bu anormallikler dışında en yüksek uygulama olan 50 µg/mL'lik uygulama konsantrasyonunda çok fazla sayıda anormalliğin gözleendiği bir hücreye rastlanılmış ancak bu hücrede gözlenen anormallikler istatistik hesaplamaya dahil edilmemiştir (Şekil 4.6).

Tablo 4.1. (3e) maddesinin yirmi dört saat uygulaması ile insan kan kültür lenfositlerinde meydana gelen kromozomal anormallikler ve frekansları

Test Maddesi	Uygulama		Kromozomal Anormallikler							Anormal ±SH (%)	Hücre	CA/Hücre ±SH	MI ±SH (%)
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	ktk	kzk	f	kkb	ds	ktk	er				
Kontrol	24	0,00	5	2	2	-	-	-	-	2,25±0,74		0,028±0,008	7,59±0,24
Çözücü K	24	10 µl	5	1	4	-	-	-	-	2,00±0,70		0,028±0,008	6,63±0,23
Pozitif K	24	0,20	77	25	10	23	2	5	-	28,25±2,25		0,503±0,025	3,80±0,18
		6,25	7	-	-	-	-	-	-	1,50±0,61		0,018±0,007	5,58±0,21***†††
3e	24	12,50	11	1	1	-	-	-	-	3,25±0,87		0,035±0,009	4,88±0,20***†††
		25,00	14	5	1	-	-	-	-	4,75±1,06†		0,063±0,012*†	4,55±0,19***†††
		50,00	24	3	4	1	-	-	1	7,50±1,32***†††		0,090±0,014***†††	3,23±0,16***†††

ktk: Kromatid kırığı, kzk: Kromozom kırığı, f: Fragment, kkb: Kardeş kromatidlerde birleşme, ds: Disentrik kromozom, ktd: Kromatid değişimi, er: endoredublikasyon
 KA: Kromozomal anormallik, Mİ: Mitotik indeks, SH: Standart hata. Kromozomal Anormalliklerde her doz için 400 metafaz hücresi, Mitotik indeks için 12000 hücre incelenmiştir. *Kontrolle göre p<0,05 düzeyinde anlamlı, **Kontrolle göre p<0,01 düzeyinde anlamlı, ***Kontrolle göre p<0,001 düzeyinde anlamlı, †Çözücü kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı, ††Çözücü kontrole göre p<0,01 düzeyinde anlamlı, †††Çözücü kontrole göre p<0,001 düzeyinde anlamlı



Şekil 4.1.(3e) maddesinin yirmi dört saat uygulaması ile oluşan kromatit kırığı



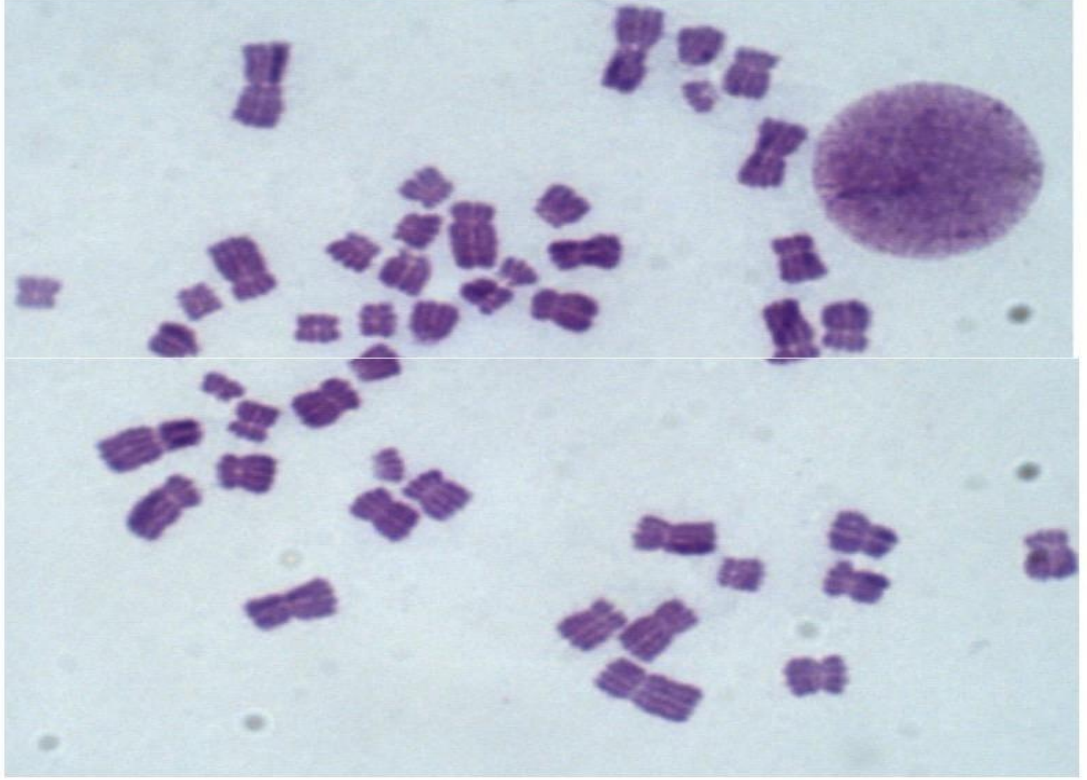
Şekil 4.2. (3e) maddesinin yirmi dört saat uygulaması ile oluşan kromozom kırığı



Şekil 4.3. (3e) maddesinin yirmi dört saat uygulaması ile oluşan fragment



Şekil 4.4. (3e) maddesinin yirmi dört saat uygulaması ile oluşan kardeş kromatitlerde birleşme

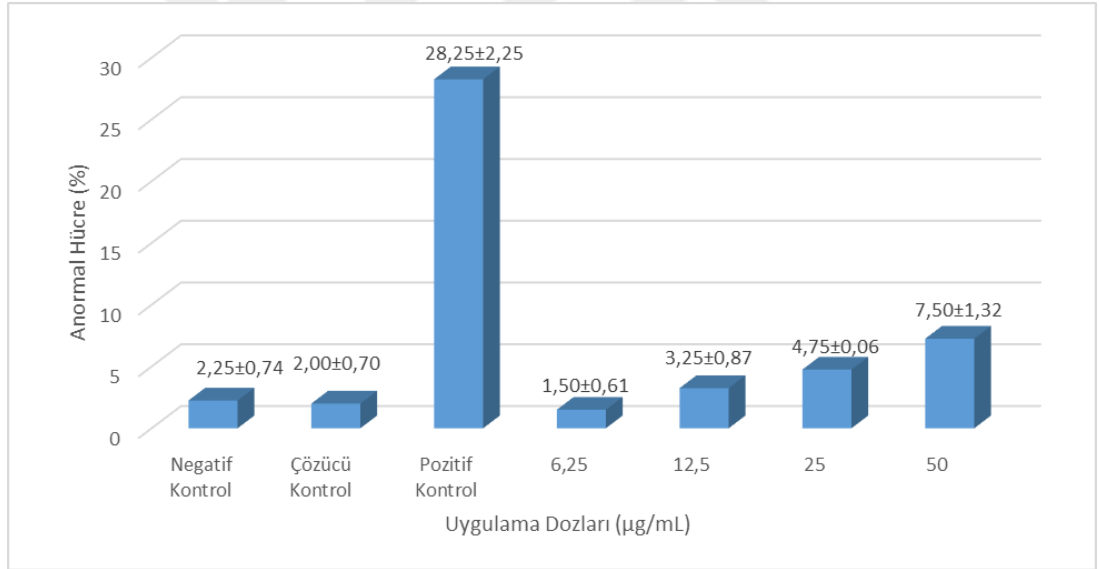


Şekil 4.5.(3e) maddesinin yirmi dört saat uygulaması ile oluşan endoredublikasyon



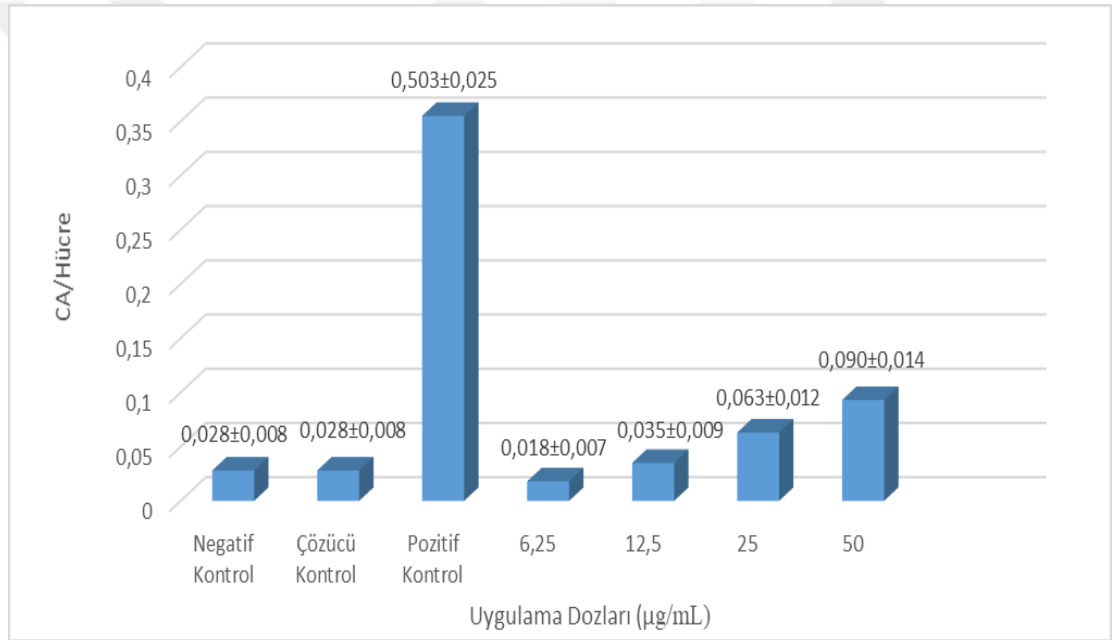
Şekil 4.6. (3e) maddesinin yirmi dört saat uygulaması ile oluşan aşırı anormallikle

24 saatlik uygulamada, 3e maddesinin anormal hücre yüzdesi değerlendirildiğinde en düşük anormal hücre yüzdesi 6,25 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonda 1,50, en yüksek anormal hücre yüzdesi 50 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonda 7,50 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.1., Şekil 4.7.). Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, en yüksek uygulama grubunun hem negatif kontrole göre hem de çözücü kontrole göre anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir. 25 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonda ise sadece çözücü kontrole göre anlamlı bir artış söz konusudur. Diğer uygulama gruplarında ise anlamlı bir farklılık söz konusu değildir. 24 saatlik muamele sonucunda oluşan kromozomal anormalliklerin konsantrasyon artışı ile doğru orantılı olarak arttığı görülmektedir. Anormal hücre yüzdesi ile doz artışı arasında hem negatif kontrole göre ($r = 0,971$) hem de çözücü kontrole göre ($r = 0,978$) kuvvetli doz-etki ilişkisi belirlenmiştir.



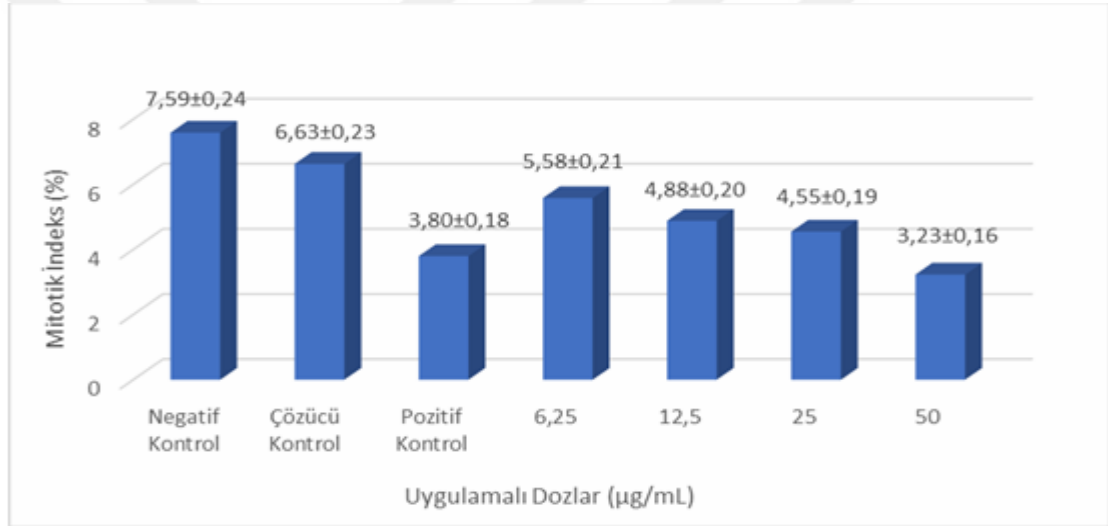
Şekil 4.7. Yirmi dört saatlik (3e) maddesi uygulamasında dozlara göre anormal hücre yüzdeleri

3e maddesine 24 saatlik maruziyet sonrası hücre başına düşen anormallik sayısının istatistiksel değerlendirilmesinde en yüksek iki uygulama grubunda (25 ve 50 $\mu\text{g/mL}$) her iki kontrole göre anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Hücre başına düşen kromozomal anormallik oranı en az 6,25 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonda 0,018 olarak belirlenirken, en fazla 50 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonda 0,090 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8.). Hücre başına düşen anormallik frekansı ile konsantrasyon artışı arasında çözücü kontrole ve negatif kontrole göre kuvvetli ilişki gözlemlenmiştir ($r=0,967$).



Şekil 4.8. (3e) maddesi ile 24 saat uygulamasında uygulanan dozlara göre hücre başına düşen anormallik sayıları

3e maddesiyle yapılan 24 saatlik uygulamada, her iki kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm dozlarda mitotik indeks oranında anlamlı bir düşüş gözlenmiştir (Tablo 4.1.). Mitotik indeks değeri 6,25 µg/mL’lik konsantrasyonda 5,58 olarak hesaplanırken, 12.5 µg/mL’lik konsantrasyonda 4,88, 25 µg/mL’lik konsantrasyonda 4,55 ve 50 µg/mL’lik konsantrasyonda 3,23 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.9.). Uygulama sonucunda, mitotik indeks konsantrasyon artışına bağlı olarak ters orantılı bir düşüş göstermiştir. Bu uygulamada, negatif kontrol ($r=-0,894$) ve çözücü kontrole ($r=-0,956$) göre mitotik indeksle konsantrasyon artışı arasında anlamlı bir negatif ilişki söz konusudur.



Şekil 4.9. Yirmi dört saatlik (3e) maddesi uygulamasında doza göre mitotik indeks değerleri

4.1.2. Kromozomal anormallikler testinin 48 saatlik bulguları

İn vitro kromozomal anormallikler testinde 3e maddesinin 48 saatlik uygulamasında 4 farklı konsantrasyon (50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL ve 6,25 µg/mL) kullanılmıştır. Uygulama sonucunda insan lenfosit kan kültüründe tespit edilen yapısal kromozomal anormallikleri, hücre başına düşen kromozomal anormallik sayıları, anormal hücre yüzdesi ve mitotik indeksleri Tablo 4.2.’de verilmiştir. Bu yapısal anormallikler kromatit kırığı, kromozom kırığı fragment, kardeş kromatidlerde birleşme ve kromatid değişimleridir (Şekil 4.10.-4.14.). Öte yandan 50 µg/mL’lik konsantrasyonda kromozomları tahriş olmuş bir hücreyede rastlanmıştır.

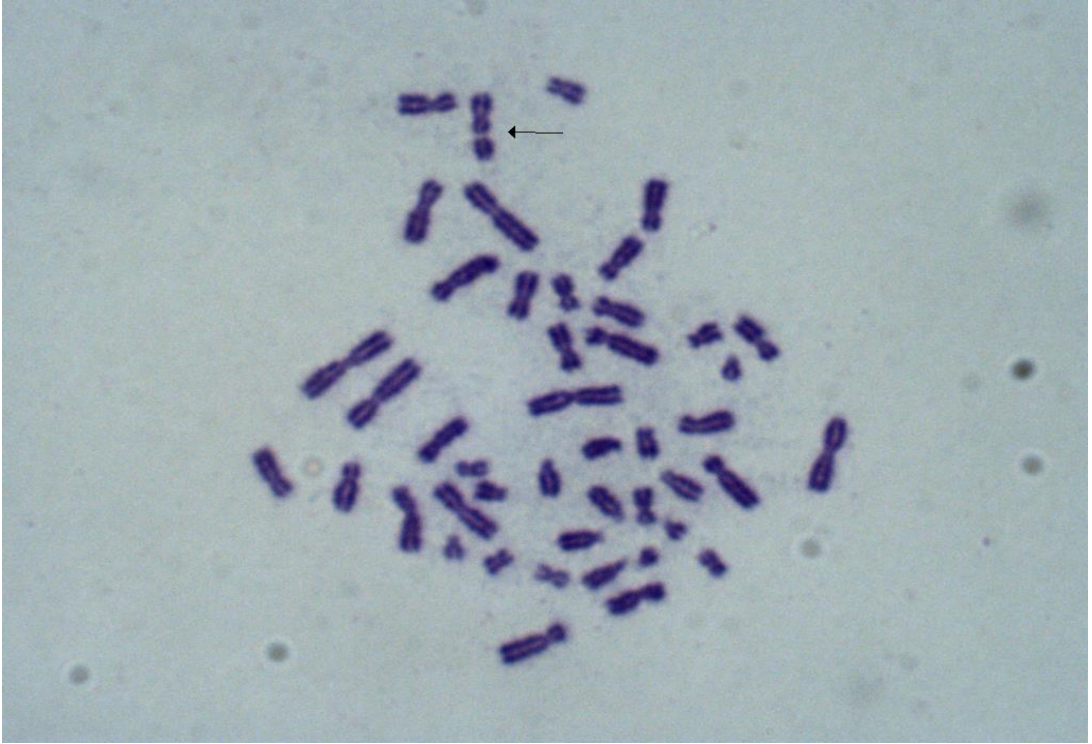
Tablo 4.2. (3e) maddesinin kırk sekiz saat uygulaması ile insan kan kültür lenfositlerinde meydana gelen kromozomal anormallikler ve frekansları

Test Maddesi	Uygulama		Yapısal Kromozomal Anormallikler						Anormal ±SH(%)	Hücre	CA/Hücre ±SH	MI ±SH (%)
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	ktk	kzk	f	kbb	ds	ktd				
Kontrol	48	0,00	5	2	2	-	-	-	2,25±0,74		0,028±0,008	7,59±0,24
Çözücü K	48	10 µl	5	2	2	-	-	-	2,25±0,74		0,028±0,008	6,40±0,22
Pozitif K	48	0,20	93	42	19	17	1	20	59,50±2,46		0,685±0,023	3,51±0,17
		6,25	6	-	-	-	-	-	1,50±0,61		0,015±0,006	5,42±0,21**†
3e	48	12,50	12	-	2	-	-	-	3,00±0,85		0,035±0,009	5,12±0,20**††
		25,00	11	1	3	1	-	1	4,00±0,98		0,050±0,011	3,03±0,16**††
		50,00	29	5	2	-	-	-	7,00±1,28*††		0,103±0,015**††	1,38±0,11**††

ktk: Kromatid kırığı, kzk: Kromozom kırığı, f: Fragment, kbb: Kardeş kromatidlerde birleşme, ds: Disentrik kromozom, ktd: Kromatid değişimi, KA: Kromozomal anormallik, Mİ: Mitotik indeks, SH: Standart hata. Kromozomal Anormalliklerde her doz için 400 metafaz hücresi, Mitotik indeks için 12000 hücre incelenmiştir. *Kontrolle göre p<0,01 düzeyinde anlamlı, **Kontrolle göre p<0,001 düzeyinde anlamlı, †Çözücü kontrole göre p<0,01 düzeyinde anlamlı, ††Çözücü kontrole göre p<0,001 düzeyinde anlamlı



Şekil 4.10. (3e) maddesin kırk sekiz saatlık uygulaması ile oluşan kromatit kırığı



Şekil 4.11. (3e) maddesin kırk sekiz saatlık uygulaması ile oluşan kromozom kırığı



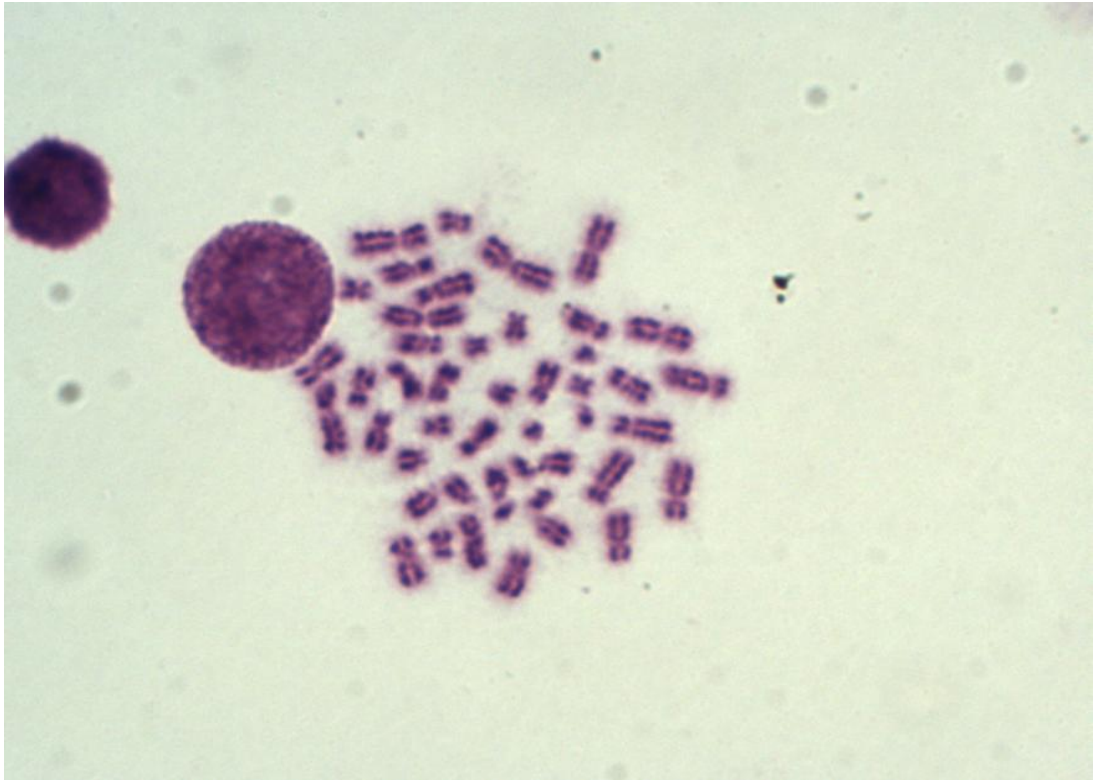
Şekil 4.12.(3e) maddesin kırk sekiz saatlık uygulaması ile oluşan fragment



Şekil 4.13. (3e) maddesin kırk sekiz saatlık uygulaması ile oluşan kardeş kromatitlerde birleşme

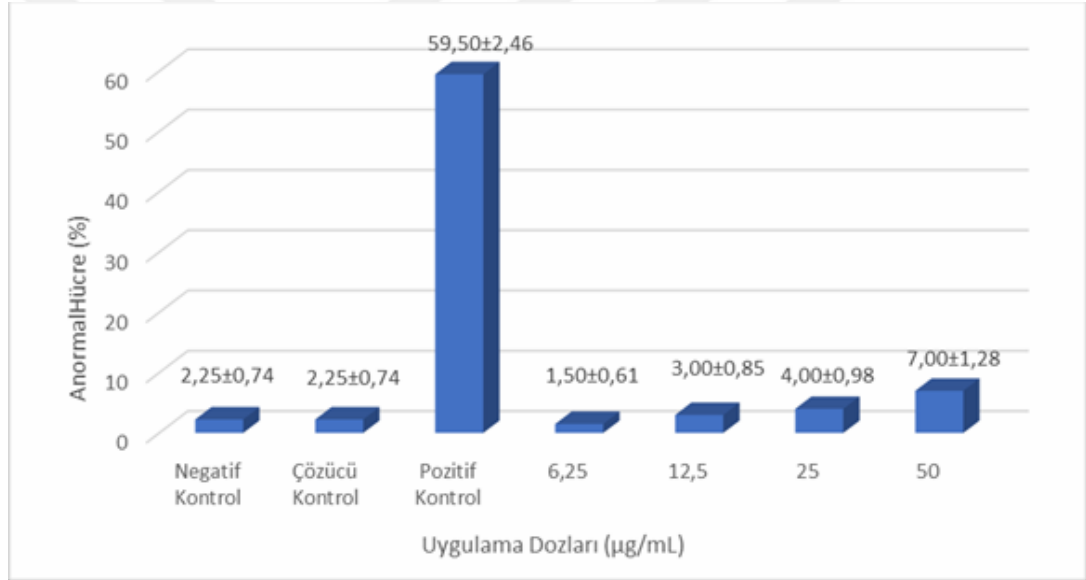


Şekil 4.14. (3e) maddesin kırk sekiz saatlik uygulaması ile oluşan kardeş kromatid değişimi



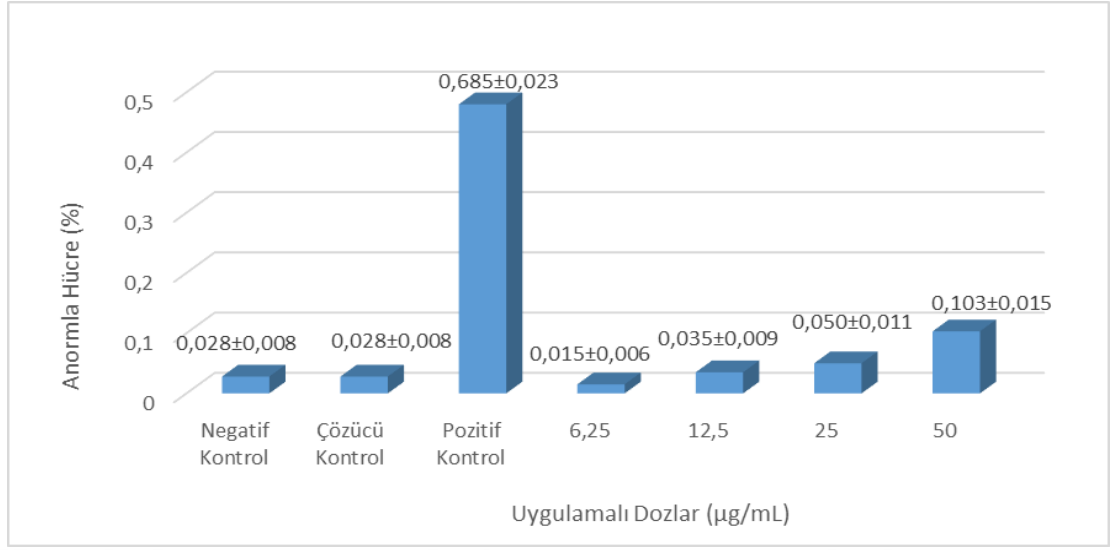
Şekil 4.15. (3e) maddesin kırk sekiz saatlik uygulaması sonucu tahriş olmuş kromozomlar

48 saatlik uygulama sonucunda hem anormal hücre yüzdesi bakımından hem de hücre başına düşen kromozomal anormallikler açısından bütün uygulama gruplarında, her iki kontrol grubuna göre farklılık gözlenmiştir. Ancak bu farklılıklar sadece en yüksek konsantrasyonda (50 $\mu\text{g/mL}$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Anormal hücre yüzdesi en düşük konsantrasyonda (6.25 $\mu\text{g/mL}$) 1,50 olarak hesaplanırken, 12,5 $\mu\text{g/mL}$ 'de 3,00, 25 $\mu\text{g/mL}$ 'de 4,00 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ 'de 7,00 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.2., Şekil 4.16.). 48 saatlik kromozomal anormallik testinde elde edilen verilerin analizi yapıldığında konsantrasyon artışı ile anormal hücre yüzdesi arasında güçlü bir ilişkinin olduğu görülmektedir (her iki kontrole göre $r=0,970$).



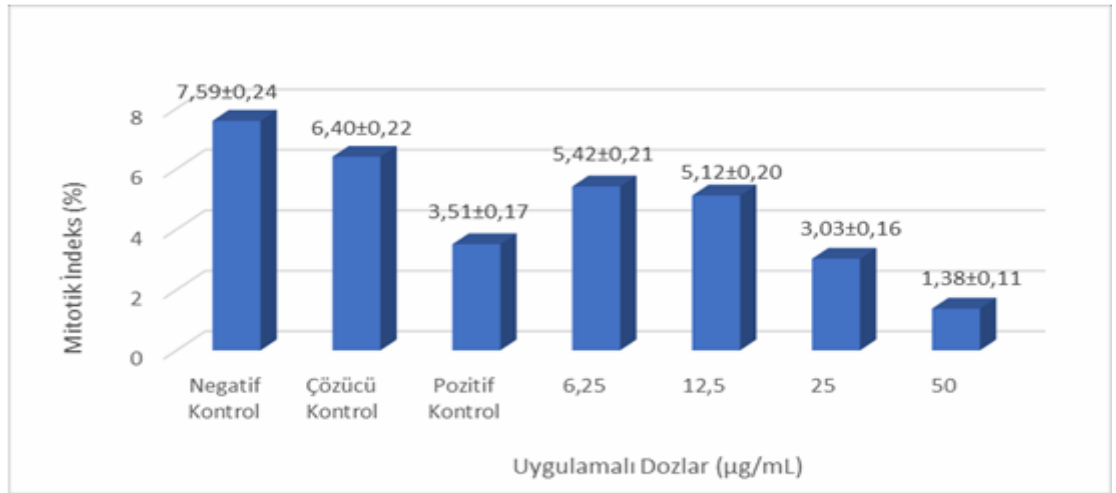
Şekil 4.16. Kiek sekiz saatlik (3e) maddesi uygulamasında dozlara göre anormal hücre yüzdesi

Hücre başına düşen anormallik frekansında da anormal hücre yüzdesi ile benzer sonuçlar tespit edilmiştir. En yüksek konsantrasyon olan 50 $\mu\text{g/mL}$ 'de her iki kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı fark bulunurken, diğer uygulama gruplarının hiçbirinde istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmamıştır. 6,25 $\mu\text{g/mL}$ 'de elde edilen değer 0,015 iken, 12,50 $\mu\text{g/mL}$ 'de 0,035, 0,25 $\mu\text{g/mL}$ 'de 0,050 olmuştur. En yüksek konsantrasyon olan 0,50 $\mu\text{g/mL}$ 'de 0,103'lük bir değer elde edilmiştir (Tablo 4.2., Şekil 4.17.). Diğer yandan, bu uygulamada da, konsantrasyon artışı ile hücre başına düşen kromozomal anormallikler arasında hem çözücü kontrole göre hem de negatif kontrole göre ($r=0,962$) kuvvetli bir ilişki bulunmuştur.



Şekil 4.17. Kırk sekiz saatlik (3e) maddesi uygulamasında dozlara göre hücre başına düşen anormallik sayıları

Her bir uygulama grubu için toplam 12000 hücrenin incelenmesiyle elde edilen mitotik indeks değerleri bütün konsantrasyonlarda her iki kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış göstermiştir. Uygulama gruplarından en düşük konsantrasyon olan 6,25 µg/mL’de mitotik indeks 5,24 olarak belirlenirken, 12,5 µg/mL’de 5,12, 25 µg/mL’de 3,03 ve en yüksek konsantrasyon olan 50 µg/mL’de 1,38 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.2., Şekil 4.18.). Test maddesi 3e ile yapılan 48 saatlik uygulamada konsantrasyon artışına bağlı olarak mitotik indeks değerleri arasında kuvvetli bir negatif ilişki söz konusudur (negatif kontrole göre $r=-0,956$, çözücü kontrole göre $r=-0,983$).



Şekil 4.18. Kırk sekiz saatlik (3e) maddesi uygulamasında dozlara bağlı mitotik indeks değerleri

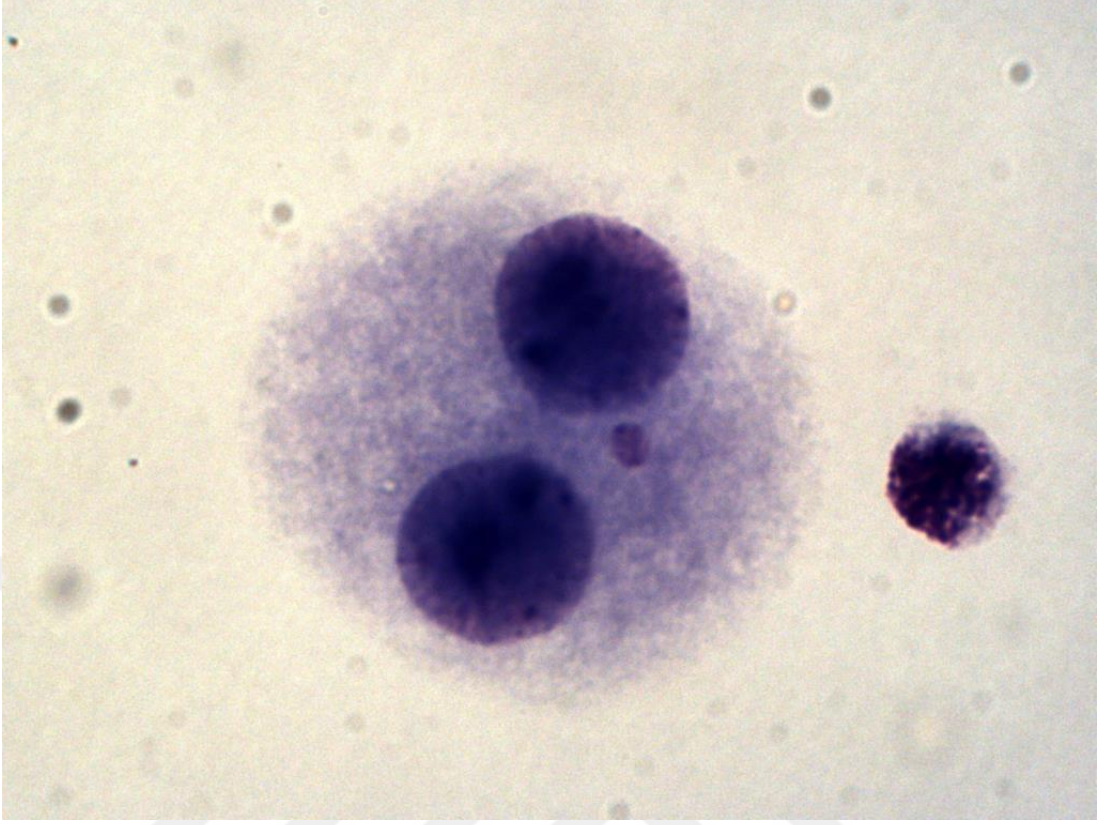
4.1.3. Mikronukleus testinin bulguları

Çalışmamızda, 3e maddesi ile yapılan mikronukleus testinde, her uygulama grubunda birey başına 1000 adet olmak üzere toplamda 4000 binükleat hücre incelenmiş ve mikronukleus frekansları belirlenmiştir (Tablo 4.3.). Elde edilen verilere göre, binükleat hücrelerin bulunduğu tüm uygulama gruplarında her iki kontrol grubuna göre mikronukleus frekanslarında istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlenmiştir. İncelenen hücrelerde en fazla 1 mikronükleuslu binükleat hücreler gözlenirken, 2, 3 ve 5’li mikronükleusa sahip binükleat hücreler de tespit edilmiştir (Şekil 4.19.- 4.22.). Bunlarla birlikte, en yüksek uygulama konsantrasyonu olan 50 µg/mL’de hiçbir binükleat hücreye rastlanmazken, 25 µg/mL’lik konsantrasyonda 2356 binükleat hücreye rastlanmıştır.

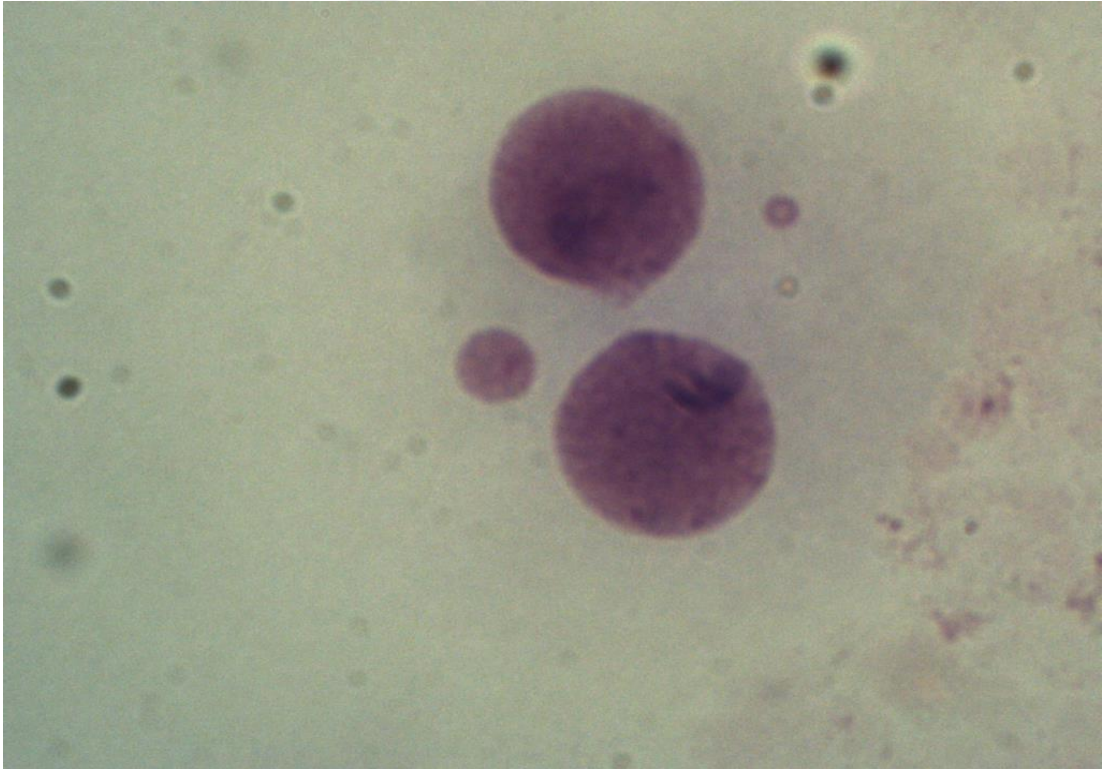
Tablo 4.3. (3e) maddesinin insan lenfositlerinde oluşturduğu mikronukleus frekansları

Test maddesi	Uygulama		Sayılan binükleat hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları			MN±SH (%)
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)		(1)	(2)	(3+)	
Kontrol	48	0,00	4000	4	1	-	0,150±0,061
Çözücü kontrol	48	10 µl	4000	10	-	-	0,250±0,079
Pozitif kontrol	48	0,20	4000	120	6	-	3,300±0,283
3e	48	6,25	4000	18	1	1(3)	0,575±0,120*†
		12,50	4000	18	3	1(5)	0,725±0,134**††
		25,00	2356	26	-	1(3)	1,231±0,174**†††
		50,00	Binükleat hücreye rastlanmadı				

BN: Binükleat, MN: Mikronukleus, SH: standart hata. *Kontrole göre anlamlı farklılık vardır (P<0,01), **Kontrole göre anlamlı farklılık vardır (P<0,001), †Çözücü kontrole göre anlamlı farklılık vardır (P<0,05), ††Çözücü kontrole göre anlamlı farklılık vardır (P<0,01), †††Çözücü kontrole göre anlamlı farklılık vardır (P<0,001)



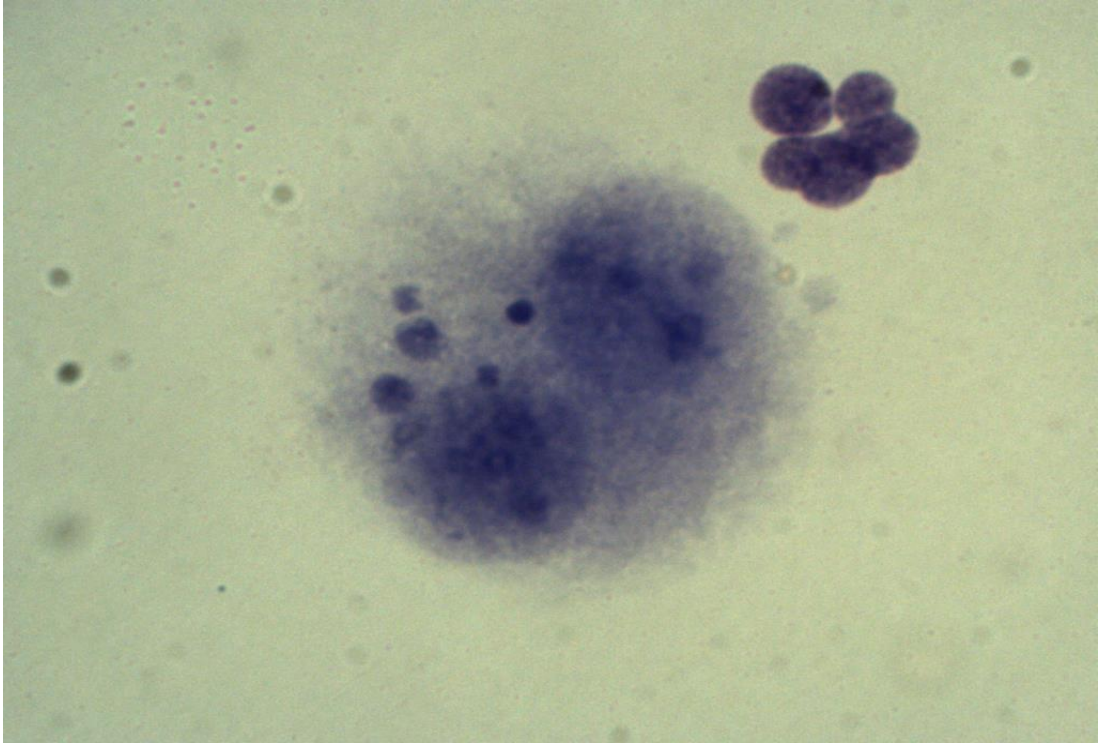
Şekil 4.19. (3e) maddesi uygulamasıyla görülen 1 mikronukleuslu bikükleat hücre



Şekil 4.20. (3e) maddesi uygulamasıyla görülen 2 mikronukleuslu bikükleat hücre

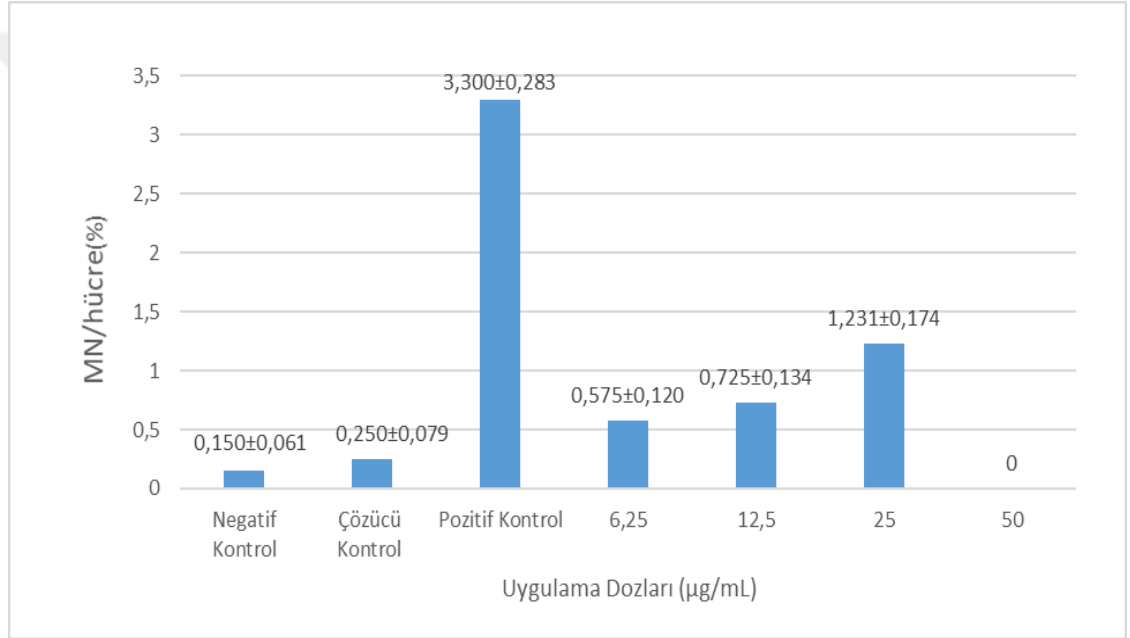


Şekil 4.21. (3e) maddesi uygulamasıyla görülen 3 mikronukleuslu bikükleat hücre



Şekil 4.22. (3e) maddesi uygulamasıyla görülen 5 mikronukleuslu bikükleat hücre

Test maddesi uygulaması sonucu 6,25 µg/mL’lik konsantrasyonda mikronukleus frekansı 0,575 olarak hesaplanmışken, 12,5 µg/mL’lik konsantrasyonda 0,725, 25 µg/mL’lik konsantrasyonda 1,231 olarak hesaplanmıştır. 25 µg/mL’lik konsantrasyonda 2356 binukleat hücre gözlenirken, en yüksek konsantrasyon olan 50 µg/mL’de hiçbir binukleat hücreye rastlanılmamıştır. Bu nedenle 50 µg/mL’lik konsantrasyonda hesaplama yapılamamıştır (Tablo 4.3., Şekil 4.23.). Bu uygulamalar sonucunda, konsantrasyon artışı ile mikronukleus frekansındaki artış arasında kuvvetli bir ilişkinin olduğu görülmüştür (negatif kontrole göre $r=0,987$, çözücü kontrole göre $r=0,995$).



Şekil 4.23. (3e) maddesi uygulamasında dozlara göre mikronukleus frekansları

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda bilim ve teknolojinin ilerlemesi ile kimyasal üretim, hızla artmakta olup, bu kimyasalların büyük bir bölümünün toksik olduğu bilinmektedir. Zararlı kimyasalların 3000'i kanserojen etkili olup, bunların 20-30 kadarı insan kanserojeni olarak tanımlanmaktadır (Güner, 2014). Kimyasal bir maddenin toksisitesini sıcaklık, ışık, nem gibi fiziksel ve bazı biyolojik etkenler etkiler. Ayrıca kimyasalın organizmaya giriş yolu, maruz kalma sıklığı ve süresi de absorpsiyon hızını ve toksisitesini belirleyen faktörler arasındadır. Organizma için yabancı olan kimyasallar ksenobiyotikler olarak da adlandırılırlar. Bu tür, organizmaya yabancı olan, kimyasal maddelerin canlılar üzerinde ne tür etkilerinin olduğunun anlaşılması için çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Bu alanda yapılan çalışmalar genel olarak toksikolojinin ilgi alanına girer. Bu etkilerin genetik yapı üzerine olan etkilerinin araştırıldığı kısmı ise genetik toksikolojinin ilgi alanındadır. Genel anlamıyla toksikoloji, “zehirlerin araştırılması, tanınması ve bunların meydana getirdikleri hastalık hallerinin, canlı hücreler ve dokular üzerine yapmış olduğu etkileri araştıran bir bilim dalı” olarak kabul edilmektedir.

16. yüzyılda Paracelsus'un zehri tanımlarken kullandığı “Her madde zehirdir, zehir olmayan madde yoktur, zehir ile ilacı ayıran dozdur.” şeklindeki ifade bu günkü modern toksikolojinin de çıkış noktasıdır. Organizma için yabancı olan bir ksenobiyotiğin ölüm meydana getirmeksizin, zehirlenmesine sebep olan miktarına toksik doz, canlıların yarısını öldüren doza ise LD₅₀ denilir. Herhangi bir maddenin toksisitesinin saptanmasında letal dozdan başka akut, subakut, subkronik ve kronik toksisite durumları da araştırılır. Burada hangi etkenin ne tür toksik etkiye sahip olduğunu araştırmada etkenin maruziyet türü ve süresi önceliklenir. Örneğin, gıda katkı maddeleri gibi bir etkenin toksisitesi araştırılırken akut etkiden kronik etkiye kadar bir dizi toksisite testleri yapılırken, daha kısa süreli maruziyete neden olan ilaç

etken maddesi gibi maddelerinin toksisitesi araştırılırken öncelikli olarak akut ve subakut toksisite testleri yapılır. Diğer yandan uzun vadede olan etkisinin anlaşılması açısından diğer toksisite testlerine de tabi tutulurlar. İster doğal olsun ister sentetik olarak üretilmiş olsun her hangi bir etken maddenin toksisitesini belirlemede çeşitli deney hayvanları ile yapılan *iv vivo* çalışmaların yanında çeşitli canlı gruplarına ait farklı doku veya hücreler üzerine yapılan *in vitro* çalışmalar da yapılmaktadır. Kromozom anormallikleri ve mikronukleus testleri, genotoksik ajanlara maruz kalan canlıların, bu ajanlardan nasıl etkilendiklerinin ortaya çıkarılmasında önemli bir gösterge olarak uzun sürelerdir kullanılmaktadır. İnsan popülasyonları üzerine yapılan çalışmalar, periferik kan lenfositlerindeki spontan kromozom anormalliklerinin frekansı ile kanser oluşumu arasında pozitif korelasyon olduğunu ortaya koymaktadır (Natarajan, 2002; Bolognesi, 2002; Doak ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda da ilaç etken maddesi olabileceği düşünülerek sentezlenmiş ve çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu belirlenmiş olan, timol ve oksipropenol içeren temel iskelet yapısına, 3-picolylamin eklenerek oluşturulan 1-(2-isopropyl-5-methylphenoxy)-3-((pyridin-3-ylmethyl)amino) propan-2-ol bileşiği'nin *in vitro* insan kan lenfositlerindeki genotoksik etkileri Kromozomal Anormallik ve Mikronukleus testleri ile incelenmiştir.

Yapılan kromozomal anormallikler çalışmasında test maddesinin özellikle yüksek konsantrasyonlarda kromozomal anormallikleri anlamlı bir şekilde arttırdığı tespit edilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda ise genotoksik etkilerde anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Hem 24 saatlik uygulamada hem de 48 saatlik uygulamada benzer sonuçların alınması bu test maddesi için maruziyetin, süreden çok dozla ilgili olduğu fikrini doğurmuştur. Bu sonuçlar da bize test maddesinin yüksek konsantrasyonlarda klastojenik ve genotoksik etkili olduğunu gösterir. Her iki uygulama sürelerindeki doz etki ilişkisine baktığımızda da bu fikri doğrulamaktadır. Diğer yandan 24 saatlik uygulama süresinde 50 µg/mL'lik en yüksek uygulama konsantrasyonunda çok fazla kromozomal anormalliklerin olduğu bir hücreye de rastlanılmıştır. Bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlara benzer şekilde, Büyükleyle ve Rencüzoğulları'nın (2009) timolün genotoksik etkileri üzerine yaptıkları çalışmada, sadece timol etkenini 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinde 25, 50, 75 ve 100 µg/mL'lik timol konsantrasyonları ile muamele edilen insan periferik

lenfositlerinde kromozomal anormallik testini kullanılmışlar ve timolün tüm konsantrasyonlarda yapısal kromozom anormallik frekansını arttırdığını belirlemişlerdir. Bu artışlar tüm uygulanan konsantrasyonlarda negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, çözücü kontrole göre, 48 saatlik 25 µg/mL'lik konsantrasyon hariç anlamlı bulunmuştur. Araştırmacıların elde ettiği sonuçlardan genel olarak 24 saatlik muameledeki anormalliklerin daha fazla olduğu görülmektedir. Bizim çalışmamızda da 24 saatlik 25 µg/mL'lik konsantrasyonda anlamlı artış varken, 48 saatlik aynı konsantrasyondaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ve aynı şekilde genel olarak 24 saatlik uygulamalardaki anormallikler 48 saatlik uygulamalara göre bir miktar yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlardan daha uzun süreli maruziyette tamir sisteminin devreye girmeye başladığı ve oluşan kromozomal anormalliklerin düzeltilmesi yoluna gidildiği düşünülebilir.

Azirak ve Rencuzogullari'nin (2008) yaptığı çalışmada, carvacrol ve timol'ün sıçanların kemik iliği hücrelerinde *in vivo* genotoksik etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada, hem karvarol (10, 30, 50 ve 70 mg / kg bw) hem timol (40, 60, 80 ve 100 mg / kg bw) intraperitoneal olarak idame edilen ratların kemik iliği hücrelerinde yapısal ve toplam kromozom anormalliklerini tüm tedavi sürelerinde (6, 12 ve 24 saat) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde indüklemiştir. Hem carvacrol hem de timol, en yüksek konsantrasyonlarda yapısal ve toplam CA yüzdesinin indüklenmesi üzerinde pozitif kontrol üretan ile benzer etkiler göstermiştir. (6 saatlik karvakrol muamelesindeki (sırasıyla 70 mg / kg bw ve 100 mg / kg bw) etkiler hariç) Ek olarak, carvacrol, kontrolle kıyaslandığında bütün konsantrasyonlarda ve çözücü kontrolle kıyaslandığında en yüksek iki konsantrasyonda (50 ve 70 mg / kg ağırlık) sayısal CA'yı indüklemiştir. Thymol ayrıca sayısal CA'yı tüm muamele sürelerinde özellikle en yüksek konsantrasyonda (100 mg / kg ağırlık) indüklemiştir. Carvacrol ve timol, kontrol ile karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlarda ve tedavi sürelerinde mitotik indeksi (MI) düşürmüştür. Timol mitotik indeksin azalmasında 6 sa'lik muamelenin (60, 80 ve 100 mg / kg, v.a konsantrasyonlarında ve 24 sa'lik muamelenin bütün konsantrasyonlarında üretan ile benzer etki göstermiştir.

İnsan hepatokarsinomu (HepG2) hücre hattı kullanılarak, timol'ün cıva klorür (HgCl_2) kaynaklı sitotoksikite ve genotoksikiteye karşı koruma kabiliyeti araştırılmıştır. MTT analizi, timol ön muamelesinin, HgCl_2 ile indüklenen sitotoksikiteyi azaltmadaki etkinliğini doğruladı. Timol ile ön muamele HgCl_2 ile indüklenen genotoksikiteyi, mitokondriyal membranın depolarizasyonunu, oksidatif stres ve mitokondriyal süperoksit seviyelerini inhibe etti. İlginç bir şekilde, timol (100 μM) tek başına hücre içi bazal glutatyon S-transferaz (GST) seviyelerini yükseltti ve timol ön muamelesi, HgCl_2 intoksikasyonundan sonra bile glutatyon, GST, süperoksit dismutaz ve katalaz seviyelerindeki düşüşü ortadan kaldırdı. Ayrıca, timol'ün HgCl_2 tarafından indüklenen apoptotik ve nekrotik hücre ölümünü inhibe etme yeteneğinde olduğu Annexin-FITC / propidium iodide ile iki kere boyanmış hücrelerin çift flowsitometrik analizi ile belirlendi. Mevcut bulgular, timol'ün HgCl_2 'nin neden olduğu toksisiteye karşı sitoprotektif potansiyelini açıkça göstermektedir. Bu durum, oksidatif stresi ve mitokondriyal hasarı azaltmayı kolaylaştırarak hücre ölümünü engelleyen serbest radikal temizleme kabiliyetine bağlanabilir (Shettigar ve ark., 2015).

Bir anti-kanser ajanı olan bleomisin (BLM), DNA'nın zarar görmesi ve hücre ölümleri aracılığıyla doku toksisitelerine neden olmaktadır. Bu çalışmanın amacı, normal insan lenfositlerinde ve over kanseri hücrelerinde timolün genotoksikite ve BLM tarafından indüklenen antiproliferasyona karşı etkilerini araştırmaktır. Periferik kan örnekleri insan gönüllülerden toplandı ve 50, 100 ve 150 μM 'lik farklı timol konsantrasyonları ile inkübe edildi. 2 saat inkübasyondan sonra, tam kan BLM ile muamele edildi. Daha sonra lenfositler, sitokinezde bloke edilmiş binukleat lenfosit içindeki mikronukleusu belirlemek için mitojenik stimülasyon ile kültürlendi. İnsan yumurtalık kanseri hücreleri (SKOV-3), çeşitli konsantrasyonlarda timol ile ve / veya BLM kombinasyonları ile muamele edildi ve daha sonra hücre canlılığı değerlendirildi. Tam kanın timol ile inkübasyonu, BLM'nin neden olduğu lenfositlerdeki mikronukleus insidansında timol içermeyen BLM ile tedavi edilen lenfositlerle karşılaştırıldığında, önemli bir azalma sergilemiştir. SKOV-3 hücreleri timol kullanılarak ön muamele edildiğinde, ne hücre ölümü artışı ne de hücre koruyucu etki gözlemlenmedi. Bu çalışma, timolün kanser hücresi üzerinde herhangi

bir koruma olmadan seçici olarak insan lenfositlerini BLM'nin neden olduğu DNA hasarına karşı koruduğunu gösterdi. Bu sonuç, bu doğal ürünün, BLM ile yumurtalık kanseri tedavisinde kullanılması için umut vericidir (Arab ve ark., 2015).

Yüksek oranda timol içeren *Zataria multiflora* bitki ekstraktının antigenotoksik etkisi insan lenfosit hücreleri üzerinde MN yöntemi ile test edilmiştir. Periferik kan farklı dozlarda ekstrakt ile muamele edildikten sonra gamma radyasyonuna maruz bırakılmıştır. Çalışmada MN sayısında en çok azalma en yüksek doz olan 50 µg/mL ekstrakt muamelesinde izlenmiştir (Hosseinimehr ve ark., 2011).

Acebutolol, oxprenolol, sotalol, metoprolol, atenolol, practolol, propranolol, pronethalol, pindolol gibi β -adrenerjik reseptör antagonisti ilaçların genotoksitesisi Ames Salmonella typhimurium ve *in vivo* fare kemik iliği MN testleri ile araştırılmıştır. Çalışılan ilaçların hiçbirisi hem metabolik aktivatör varlığında hem de yokluğunda Ames testi ile herhangi bir mutajenik cevap göstermezken, MN testinde sadece en yüksek dozda zayıf ve istatistiksel olarak anlamlı olmayan farklılıklar göstermiştir. Araştırma sonucunda β -adrenerjik reseptör antagonisti ilaçların mutajenik ve karsinojenik potansiyelinin bulunmadığı açıklanmıştır (Okine ve ark., 1983).

Diğer bir çalışmada, β -adrenerjik agonist ilaçlardan olan metoprolol ve N-nitroso türevi olan NO-metoprololün genotoksik etkisi sıçanlar üzerinde *in vivo* olarak çalışılmıştır. Suda çözülerek gavaj yoluyla 772 mg/kg metoprolol ve 1000 mg/kg NO-metoprolol verilerek, genotoksikite testi için karaciğer, dalak ve kemik iliği dokularında MN analizi yapılmıştır. Her iki madde uygulaması sonucunda da, MN oluşumu açısından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Martelli ve ark., 1994).

Beta blokerler potansiyel olarak nitrozasyona uğrayabilen sekonder aminlerdir. Bu nedenle, bunların genotoksik N-nitroso türevlerine olası intragastrik (mide içindeki) nitrozasyonları endişe kaynağıdır. Bu bağlamda Robbiano ve ark (1991) yaptığı çalışmada beta bloker olan natenolol, metoprolol, nadolol, oksprenolol, propranolol

ve sotalolün asidik koşullar altında nitrit ile reaksiyon girerek N-nitrozaminleri meydana getirdiği ve hepsinin sıçan ve insan hepatositlerinde DNA fragmentasyonunu ve DNA onarımını indüklemiş ve bunların 4'ü (NO-atenolol, NO-metoprolol, NO-oksprenolol ve NO-propranolol) N-nitroso-dimetilamin'den belirgin bir şekilde daha büyük bir genotoksik etki göstermiştir. Benzer bir çalışmada altı beta adrenerejik bloke edici ilacın (atenolol, metoprolol, nadolol, oksiprenolol, propranolol ve solalol'ün) genotoksik etkinliği Brambilla ve Martelli (2006) tarafından değerlendirilmiş ve NO-propranolol, 0,01-0,1 mM; NO-oksprenolol, 0,03-1 mM, NO-atenolol ve NO-metoprolol, 0,1-1 mM ve NO-nadolol ve NO-sotalol, 0,3-3 mM subtoksik konsantrasyonlarına 20 saat maruziyet sonrasında, hem rat hemde insan hücrelerinde doza bağlı pozitif cevaplar oluşmuştur. Ayrıca eşit veya yüksek konsantrasyonlarda, hiçbir N-nitrozamin, Çin hamsteri akciğer V79 hücrelerinde DNA fragmentasyonu oluşturmamıştır. Bu durum, bu bileşiklerin genotoksik bir etki göstermek için reaktif metabolitlere dönüştürülmeleri gereken ve dolaylı olarak rol oynayan bileşikler gibi davrandıklarını gösterir.

Yapılan bu çalışmada elde edilen mitotik indeks verilerine bakıldığında yine her iki uygulama süresinde de bütün konsantrasyonlarda mitotik indeksin anlamlı bir şekilde azaldığını görmekteyiz. Bu sonuçlar da bize test maddesinin sitotoksik etkili bir ajan olduğunu göstermektedir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde Büyükleyla ve Rencüzoğulları'nın (2009) timol ile yaptıkları *in vitro* testlerde de 50 ve 100 µg/mL'lik konsantrasyonlarda mitotik indeksin anlamlı bir şekilde düşüş gösterdiğini ve timolün sitotoksik etkili bir etken olduğunu açıklamışlardır. Aydın ve Türkez (2014) tarafından kültüre alınmış insan kan hücrelerinde timol'un genotoksik, sitotoksik ve oksidatif etkileri araştırılmıştır. Hücreler 24 ve 48 saat timol (0-200 mg/L) ile muamele edilmiş, DNA hasarı mikronukleus (MN) testi, kardeş kromatid değişimi (SCE) analizi ve ek olarak oksidatif etkileri belirlemek üzere toplam antioksidan kapasite (TAC) ve oksidatif stres (TOS) incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, timol'un insan lenfositleri üzerinde mutajenik etkisinin olmadığı, diğer yandan ise timol'un (25, 50 ve 75 mg/L'de) uygulaması kültüre alınmış insan kan hücreleri üzerinde TAC seviyelerinde istatistiksel olarak önemli bir artışa yol açmış ($p < 0,05$) ve sadece 200 mg/L'de TOS seviyesinde artış görülmüş olup, zamana ve

doza bağı bir şelikde sitotoksisiteyi indüklediğı ve timol'un (100 mg/L'nin üzerindeki konsantrasyonlarda) hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir.

Test maddesi 1-(2-isopropyl-5-methylphenoxy)-3-((pyridin-3-ylmethyl)amino) propan-2-ol bileşiğı'nin *in vitro* mikronukleus analizinde, en yüksek uygulama konsantrasyonu olan 50 µg/mL'lik uygulamada hiçbir binükleat hücreye rastlanmamıştır. Yine 25 µg/mL'lik ikinci en yüksek uygulama konsantrasyonunda incelenecek olan 4000 binükleat hücre sayısına ulaşılammıştır. Bu sonuçlar bize bu test maddesinin sitotoksik etkili bir ajan olduğunu göstermektedir. Diğer yandan incelenebilen 3 uygulama konsantrasyonunda da mikronukleus frekanslarında anlamlı artışların görünmesi, test maddesinin klastojenik/aneujenik etkili bir ajan olduğu fikrini doğurmaktadır. Ancak, kromozomal anormallik testleriyle birlikte değerlendirildiğinde yüksek konsantrasyonlarda klastojenik etkiler gösterse de aynı zamanda bütün uygulama konsantrasyonlarında aneujenik etkili bir ajan olduğu görülmektedir. Öyle ki, 24 saatlik uygulamada 50 µg/mL'lik en yüksek konsantrasyonda 1 tane endoredublikasyona rastlanılmıştır. Bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlara benzer şekilde sonuçlar elde edilen çalışmamlar da mevcuttur. Sadece timol genotoksisitesinin araştırıldığı bir çalışmada araştırmacılar uygulanan bütün konsantrasyonlarda (25, 50, 75 ve 100 µg/mL), timolün mikronukleus frekansını anlamlı bir şekilde arttırdığını ve genotoksik etkili olduğunu açıklamışlardır. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların tam tersini destekleyen Maisanaba ve ark. (2015), çalışmasında mikronükleus (MN) ve MLA testi kullanılarak, timol'un 15,62, 31,25, 62,5, 125 ve 250 µM dozlarda *in vitro* genotoksisitesi değerlendirmişlerdir. MN ve MLA testi ile elde edilen timol için negatif sonuçlar, bu bileşiğın memeli hücrelerinde genotoksik olmadığı görüşünü güçlendirmektedir. Yine başka bir çalışmada Calò ve ark. (2015), timol'un oksidadif ve genotoksik ultraviyole A ve B hasarına karşı koruyucu etkisi değerlendirilmiştir. Timol ultraviyole A ve B ışınlanmış hücrelerde reaktive oksijen türlerinin oluşumunu inhibe ederken, tespit edilen hasarın mikronukleus oluşumunu azaltmadığı tespit edilmiştir.

Yapılan bu çalışmada anormallik hesaplamalarında, daha önceki çalışmalardan farklı olarak, kromozom kırıklarını, kardeş kromatitlerde birleşme ve kromatit değişimlerini 2 anormallik olarak değerlendirilmiştir. Çünkü bu anormalliklerin ortaya çıkabilmesi için en az iki noktadan genetik materyalin kopması gerekmektedir. Kromatit kırığı ve fragmentler için yine daha önceki çalışmalarda olduğu gibi her bir anormallik için 1 değeri ele alınmıştır.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışmada test maddesinin özellikle yüksek konsantrasyonlarda kromozomal anormallikleri anlamlı bir şekilde arttırdığı, düşük konsantrasyonlarda ise genotoksik etkilerde anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür. Diğer yandan mikronukleus frekanslarında bütün dozlarda anlamlı bir artışın olduğu, en yüksek konsantrasyonda (50 µg/mL) her hangi bir binükleat hücreye rastlanmaması, 25 µg/mL'lik ikinci en yüksek konsantrasyonda toplamda 4000 binükleat hücre sayısına ulaşamaması ve mitotik indeksin yine bütün uygulama gruplarında anlamlı bir azalışa neden olduğu göz önüne alındığında, araştırılan test maddesinin uygulanan bütün konsantrasyonlarda sitotoksik bir etkiye sahip olduğu, yüksek dozlarda genotoksik etkili olduğu ve yine bütün uygulama gruplarında aneujenik etkili bir ajan olduğu söylenebilir. Bu durumda test maddesi 1-(2-isopropyl-5-methylphenoxy)-3-((pyridin-3-ylmethyl)amino) propan-2-ol bileşiğinin genel olarak sitotoksik ve aneujenik etkili bir ajan olduğu, yüksek dozlarda klastojen etkili olan genotoksik etkiler de gösterebildiği söylenebilir. İlaç etken maddesi olabileceği düşünülerek sentezlenen bu test maddesinin, amaçlanan doğrultuda kullanılıp kullanılamayacağının belirlenebilmesi için özellikle *in vivo* metotlar başta olmak üzere diğer test metotları ile de değerlendirilmelerinin yapılması ve elde edilecek sonuçlar doğrultusunda ilerlemenin doğru olacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Aeschbach, R., Löliger, J., Scott, B. C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B., Aruoma, O. I., 1994. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*, 32(1), 31-36.
- Aksoy, H., 2006. Elektromanyetik Alanların İnsan Lenfosit Kültürü ve Bazı Bitkiler Üzerine Genetik Etkileri, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Aktaş, G., 2014. Antibiyotik kombinasyonları ve sinerjistik etkileşimleri. *Türk Mikrobiyol Cem Dergi*, 44, 47-55.
- Albertini, R. J., 2004. Mechanistic insights from biomarker studies: somatic mutations and rodent/human comparisons following exposure to a potential carcinogen. *IARC scientific publications*, (157), 153-177.
- Anonim, 2011. Milli Eğitim Bakanlığı, Otonom sinir sistemi ilaçları, Ankara.
- Anonim, 2019 <https://www.turkiyeklinikleri.com/article/en-antibiyotik-tedavisinde-farmakokinetigin-onemi-35158.html>, Erişim Tarihi: 28.10.2019.
- Anonim, 2019. <https://www.turkiyeklinikleri.com/article/en-kolinesteraz-inhibitorleri-antikolinesterazlar-36339.html>, Erişim Tarihi: 26.11.2019.
- Arab, H. A., Fathi, M., Mortezaei, E., & Hosseinimehr, S. J. (2015). Chemoprotective effect of thymol against genotoxicity induced by bleomycin in human lymphocytes.
- Arslan, O., 1994. Glaucoma Hastalığı Tedavisinde Kullanılmaya Aday Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum.
- Arslan, O., 2004. Özensoy, Ö., Sinan, S. O., A new method for purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography.
- Aydın, E., 2014. Türkez, H., Keleş, M. S., The effect of carvacrol on healthy neurons and N2a cancer cells: some biochemical, anticancerogenicity and genotoxicity studies. *Cytotechnology*, 66(1), 149-157.

- Azirak, S., & Rencuzogullari, E. (2008). The in vivo genotoxic effects of carvacrol and thymol in rat bone marrow cells. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 23(6), 728-735.
- Bağdat, R. B., 2006. Tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanım alanları, tıbbi adaçayı (*Salvia officinalis* L.) ve ülkemizde kekik adıyla bilinen türlerin yetiştirme teknikleri. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 15(1-2), 19-28.
- Balcı, H., 2006. Akıllı (Fonksiyonel) Tekstiller, Seçilmiş Kumaşlarda Antibakteriyel Apre ve Performans Özellikleri. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekstil Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 251.
- Baratta, M. T., 1998. Dorman, H. D., Deans, S. G., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Ruberto, G., Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and fragrance journal*, 13(4), 235-244.
- Baser, K. H. C., Özek, T., Kürküoğlu, M., Tümen, G., 1994. The essential oil of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* of Turkish origin. *Journal of Essential Oil Research*, 6(1), 31-36.
- Baydar, H., KARADOĞAN, T., Özçelik, H., 2009. Göller Yöresinde Yayılış Gösteren Kekik (*Origanum*, *Thymus*, *Satureja* ve *Thymbra* sp.) Türlerinin Belirlenmesi ve Uçucu Yağ Özelliklerinin Saptanması. *Türkiye VIII. Tarla Bitkileri Kongresi*, 1, 91-95.
- Baydar, H., 2005. Yayla kekiği (*Origanum minutiflorum* O. Schwarz et. PH Davis)'nde farklı toplama zamanlarının uçucu yağ içeriği ve uçucu yağ bileşenleri üzerine etkisi. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18(2), 175-178.
- Baytop, T., 1999. Türkiye’de Bitkilerle Tedavi, Nobel Tıp Kitapevleri Yayını, 2. Baskı, 480s, İstanbul.
- Bazylak, G., Nagels, L. J., 2003. “A novel potentiometric approach for detection of beta-adrenergics and beta-adrenolytics in high-performance liquid chromatography”, *Il Farmaco*, 58(8), 591-603.
- Belhattab, R., Larous, L., Figueiredo, A. C., Santos, P. A., Barroso, J. G., Pedro, L. G., 2004. *Origanum glandulosum* Desf. grown wild in Algeria: essential oil composition and glycosidic bound volatiles. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(2), 209-212.
- Bolognesi, C., Filiberti, R., Neri, M., Perrone, E., Landini, E., Canessa, P. A., Puntoni, R., 2002. High frequency of micronuclei in peripheral blood lymphocytes as index of susceptibility to pleural malignant mesothelioma. *Cancer research*, 62(19), 5418-5419.

- Bonassi, S., Abbondandolo, A., Camurri, L., Dal Prá, L., De Ferrari, M., Degraffi, F., Sbrana, I., 1995. Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study. *Cancer genetics and cytogenetics*, 79(2), 133-135.
- Bökesoy, A.T., Çakıcı, İ., Melli, M., 2000. gazı Kitabevi Tic.Ltd.Şti. Türk farmakoloji derneği. Farmakoloji ders kitabı.
- Brambilla, G., Martelli, A., 2006. Genotoxicity and carcinogenicity studies of antihypertensive agents. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 612(2), 115-149.
- Büyükleyla, M., ve Rencüzoğulları, E., 2009. The effects of thymol on sister chromatid exchange, chromosome aberration and micronucleus in human lymphocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(3), 943-947.
- Calò, R., Visone, C. M., Marabini, L., Thymol and Thymus Vulgaris L., 2015. activity against UVA-and UVB-induced damage in NCTC 2544 cell line. *Mutation Research/genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 791, 30-37.
- Can, H. Y., & Çelik, T. H., 2008. Kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde antibiyotik kullanımı ve kalıntı riski. *Vet Hekim Der Derg*, 79(4), 35-40.
- Canefe, K., DUMAN, G., 1994. İlaçların seçici taşınması ve hedeflendirilmesi, *Ankara Ecz. Fak. Derg*, 23, 1-2.
- Carrano, A. V., Thompson, L. H., Lindl, P. A., Minkler, J. L., 1978. Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis. *Nature*, 271(5645), 551.
- Carre, M. C., Youlassani, A., Caubere, P., 1984. "Synthesis of a novel series of (aryloxy) propanolamines: new selective. Beta 2-blocking agents", *Journal of Medicinal Chemistry*, 27(6), 792-799.
- Çevik, Ö., Aydın, U., Gürsoy, R. N., 2012. Kanser Tedavisinde Lenfatik Hedeflendirme. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 32(1), 67-90.
- Demircigil, G. C., Emerce, E., Ulutas, O. K., 2009. Genotoxicity tests from biomarker studies to the regulations: National perspective. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34(4), 217.
- Demirel, S., Zamani, A. G., 2002. Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi*, 12(3), 123-127.
- Deutsch, H. F., 1987. Carbonic anhydrases. *International Journal of Biochemistry*, 19(2), 101-113.

- Dickson, D. W., 1997. Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: a perspective from longitudinal clinicopathological studies. *Neurobiology of aging*, 18(4), S21-S26.
- Doak, S. H., Manshian, B., Jenkins, G. J. S., Singh, N., 2012. In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 745(1-2), 104-111.
- Doğan, S., 2012. Beta blokörlerin kimyasal özellikleri ve karvedilolün analizi. Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Drews, J., 2000. Drug discovery: a historical perspective. *science*, 287(5460), 1960-1964.
- Ergün, A., 2011. Makro halkalı tiyo-crown eterlerin sentezi ve karbonik anhidraz enzimi üzerinde inhibisyon etkilerinin araştırılması. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Evans, H. J., 1984. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. In *Handbook of mutagenicity test procedures*.
- Evans, H. J., 1984. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. In *Handbook of mutagenicity test procedures*.
- Fakılı, O., 2010. Türkiye'de kekik adı ile anılan bitkiler konusunda yapılan çalışmaların envanteri. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Tarla Bitkiler Anabilim Dalı, Yüksek lisans tezi.
- Fenech, M., Crott, J., Turner, J., Brown, S., 1999. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis*, 14(6), 605-612.
- Fenech, M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature protocols*, 2(5), 1084.
- Fenech, M., Morley, A., 1985. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios*, 43(172-173), 233-246.
- Giweli, A., Džamić, A. M., Soković, M., Ristić, M. S., Marin, P. D., 2012. "Antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of *Satureja thymbra* growing wild in Libya", *Molecules*, 17(5), 4836-4850.

- Gulçin, İ., Abbasova, M., Taslimi, P., Huyut, Z., Safarova, L., Sujayev, A., Supuran, C. T., 2017. Synthesis and biological evaluation of aminomethyl and alkoxymethyl derivatives as carbonic anhydrase, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 32(1), 1174-1182.
- Gustafson, R. H., Bowen, R. E., 1997. Antibiotic use in animal agriculture. *Journal of applied microbiology*, 83(5), 531-541.
- Güler, H. K., Dönmez, İ., Aksoy, S. A., 2015. Tıbbi ve aromatik bitkilerin antibakteriyel aktivitesi ve tekstil sektöründe kullanımı. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 10(2), 27-34.
- Güner, U., 2014. Toksikoloji. *Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi*, 2, 186-189.
- Hagmar, L., Bonassi, S., Stromberg, U., Brogger, A., Knudsen, L.E., Norppa, H., Reuterwall, C., 1998. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health Cancer Research, 58 (18): 4117-4121.
- Hagmar, L., Brogger, A., Hansteen, IL., Heim, S., Hogstedt, B., Knudsen, L., Lambert, B., Linnainmaa, K., Mitelman, F., Nordenson, I., 1994. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic Study Group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res*, 54(11), 2919-22.
- Hewett-Emmett, D., Tashian, R. E., 1996. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the α -, β -, and γ -carbonic anhydrase gene families. *Molecular phylogenetics and evolution*, 5(1), 50-77.
- Horvathova, E., Turcaniova, V., Slamenova, D., 2007. Comparative study of DNA-damaging and DNA-protective effects of selected components of essential plant oils in human leukemic cells K562. *Neoplasma*, 54(6), 478-483.
- Horvathova, E., Turcaniova, V., Slamenova, D., 2007. Comparative study of DNA-damaging and DNA-protective effects of selected components of essential plant oils in human leukemic cells K562. *Neoplasma*, 54(6), 478-483.
- Hosseini-mehr, S. J., Mahmoudzadeh, A., Ahmadi, A., Ashrafi, S. A., Shafaghati, N., & Hedayati, N. (2011). The radioprotective effect of *Zataria multiflora* against genotoxicity induced by γ irradiation in human blood lymphocytes. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, 26(3), 325-329.
- Istúriz, R. E., Carbon, C., 2000. Antibiotic use in developing countries. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 21(6), 394-397.

- Işık, S., Delibaşı, T., Berker, D., Aydın, Y., Güler, S., 2013. Kalp hastalıklarında diyabet yönetimi. *Anatolian Journal of Cardiology/Anadolu Kardiyoloji Dergisi*, 9(3), 2009. Jeger, R. V., Mens sana in corpore sano revisited.
- Jindal, D. P., Coumar, M. S., Nandakumar, K., Bodhankar, S. L., Purohit, P. G., Mahadik, K. R., Massarelli, P., 2003. Synthesis, β -adrenergic blocking activity and β -receptor binding affinities of 1-substituted-3-(2-isopropyl-5-methylphenoxy)-propan-2-ol oxalates. *Il Farmaco*, 58(8), 557-562.
- Kalan, M. K., 2007. Hipertansiyon hastalarında antihipertansif ilaç değişimleri, bu değişimlerin nedenleri ve ilaç değişimleri ile hedef tedavi değerlerine ulaşma oranlarının incelenmesi. Sağlık Bakanlığı Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, Uzmanlık Tezi, 8-9.
- Kapucu, E., Kahveci, H., Susam, O., Çanta, Y., 2009. İlaçların ve Kozmetik Ürünlerin Geliştirilme Süreçleri ve Doğa Üzerine Etkileri. Dokuz Eylül Üniversitesi, Eğitim Fakültesi Yayınları.
- Karhumaa, P., Parkkila, S., Waheed, A., Parkkila, A.K., Kaunisto, K., Tucker, P.W., Huang, C.J., Sly, W.S., Rajaniemi, H., 2000. "Nuclear NonO/p54(nrb) protein is a nonclassical carbonic anhydrase." *J Biol Chem* 275,16044.
- Kaya, A., 2004. Tip 2 DM'de oral antidiyabetik tedavi. 6. İç Hastalıkları kongresi, 6-12.
- Kayaalp, O., 1992. Beta Adrenerjik Reseptör Blokerleri. Tıbbi Farmakoloji. 6.baskı, cilt 2; 1316 1.
- Kılıç, A., 2005. Bitkisel kaynaklı bazı uçucu yağ ve monoterpenlerin olası genotoksik etkilerinin araştırılması (Master's thesis, Anadolu Üniversitesi).
- Koçancı, F. G., 2016. Aslım, B., Structure and Functions of Acetylcholinesterase and Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Plants. *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences*, 6(1), 19-35.
- Krishna, G., 2000. Hayashi, M., In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 155-166.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., Nychas, G. J., 2001. "A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol", *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453-462.
- Mafra, D., Cozzolino, S. M., 2004. Erythrocyte zinc and carbonic anhydrase levels in nondialyzed chronic kidney disease patients. *Clinical biochemistry*, 37(1), 67-71.

- Maisanaba, S., Prieto, A. I., Puerto, M., Gutiérrez-Praena, D., Demir, E., Marcos, R., Cameán, A. M., 2015. In vitro genotoxicity testing of carvacrol and thymol using the micronucleus and mouse lymphoma assays. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 784, 37-44.
- Maren, T. H., 1988. The kinetics of HCO_3^- synthesis related to fluid secretion, pH control, and CO_2 elimination. *Annual Review of Physiology*, 50(1), 695-717.
- Martelli, A., Allavena, A., Sottofattori, E., & Brambilla, G. (1994). Low clastogenic activity in vivo of the N-nitroso derivatives of 5 β -adrenergic-blocking drugs proved to be potent genotoxins in vitro. *Toxicology letters*, 73(3), 185-191.
- Masotti, V., Juteau, F., Bessière, J. M., Viano, J., 2003. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(24), 7115-7121.
- Mauleón, D., Pujol, M. D., Rosell, G., 1988. "B-Adrenergic antagonists: N-alkyl and N-amidoethyl (arylalkoxy) propanolamines related to propranolol", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 23(5), 421-426.
- McDougall, G. J., Shpiro, F., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., Stewart, D., 2005. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α -amylase and α -glucosidase. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(7), 2760-2766.
- Meldrum, N. U., 1933. Roughton FJW. Carbonic anhydrase: its preparation and properties. *J Physiol*, 80, 11-42.
- Natarajan, A. T., 2002. Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504(1-2), 3-16.
- Odası, A. T., 2007. Ambulans Hekimliği El Kitabı. Güneş Kitapevi, Ankara, 2001.
- Öğün, E., Ratlara intratekal uygulanan esmololün analjezik etkinliğinin değerlendirilmesi (Doctoral dissertation, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi).
- Okine, L. K. N., Ioannides, C., & Parke, D. V. (1983). Studies on the possible mutagenicity of β -adrenergic blocker drugs. *Toxicology letters*, 16(3-4), 167-174.
- Özgüneş, İ. Antibiyotik Kontrol Politikaları: Neden Gerekli? Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Eskişehir.
- Öztürk, R., 2008. Akılcı antibiyotik kullanımı ve ülkemizde antimikrobik maddelere direnç sorunu. *Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlara Pratik Yaklaşımlar*. İÜ

- Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Sempozyum Dizisi, (61), 1-16.
- Packer, M., 1988. Neurohormonal interactions and adaptations in congestive heart failure. *Circulation*, 77(4), 721-730.
- Palamutcu, S., Keskin, R., Devrent, N., Şengül, M., Hasçelik, B., 2009. Fonksiyonel tekstiller II: antimikrobiyal tekstiller. *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3(3), 95-108.
- Palitti, F.C., Tanzarella R., Cozzi, R., Ricondy, E., Vitagliana, A., Fiori, M., 1982. Comparison of frequencies of SCEs induced by chemical mutagens in bonemarrow spleen and spermatogoneal cells of mice. *Mutation Research*, 103(2): 191-195.
- Parkkila, S., Parkkila, A. K., 1996. Roles of the Different Isozymes and Salivary Factors in the Maintenance of Optimal Conditions in the Gastrointestinal Canal. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 31(4), 305-317.
- Pei, R. S., Zhou, F., Ji, B. P., Xu, J., 2009. "Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method", *Journal of Food Science*, 74(7), M379-M383.
- Pfeiffer, N., 2000. Carbonic anhydrase: pharmacology and inhibition. *Pharmacotherapy in Glaucoma*, 137-143.
- Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F., Shelby, M., 1987. Mammalian in vivo cytogenetic assays analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 189(2), 157-165.
- Quintero Ruiz, N., Cordoba Campo, Y., Stashenko, E. E., Fuentes, J. L., 2017. Antigenotoxic Effect Against Ultraviolet Radiation-induced DNA Damage of the Essential Oils from *Lippia* Species. *Photochemistry and photobiology*, 93(4), 1063-1072.
- Rates, S. M. K., 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39(5), 603-613.
- Robbiano, L., Martelli, A., Allavena, A., Mazzei, M., Gazzaniga, G. M., Brambilla, G., 1991. Formation of the N-nitroso derivatives of six β -adrenergic-blocking agents and their genotoxic effects in rat and human hepatocytes. *Cancer research*, 51(9), 2273-2279.
- Rodrigues, M. A. C., dos Santos, N. A., da Silva Faria, M. C., Rodrigues, J. L., Kinoshita, A., Baffa, O., dos Santos, A. C., 2016. Carvedilol protects the kidneys of tumor-bearing mice without impairing the biodistribution or the genotoxicity of cisplatin. *Chemico-biological interactions*, 245, 59-65.

- Sarafidis, P. A., Bakris, G. L., 2006. Antihypertensive treatment with beta-blockers and the spectrum of glycaemic control. *Journal of the Association of Physicians*, 99(7), 431-436.
- Selen, Ş., 2018. Karbonik anhidraz inhibitörü metilenaminobenzen sülfonamid türevlerinin genotoksik profillerinin belirlenmesi. Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Doktora Tezi.
- Shettigar, N. B., Das, S., Rao, N. B., & Rao, S. B. (2015). Thymol, a monoterpene phenolic derivative of cymene, abrogates mercury-induced oxidative stress resultant cytotoxicity and genotoxicity in hepatocarcinoma cells. *Environmental toxicology*, 30(8), 968-980.
- Slamenova, D., Horvathova, E., Sramkova, M., Marsalkova, L., 2007. DNA-protective effects of two components of essential plant oils carvacrol and thymol on mammalian cells cultured in vitro. *Neoplasma*, 54(2), 108-112.
- Sly, W. S., Hu, P. Y., 1995. Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annual review of biochemistry*, 64(1), 375-401.
- Sugrue, M. F., 1996. Review the preclinical pharmacology of dorzolamide hydrochloride, a topical carbonic anhydrase inhibitor. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 12(3), 363-376.
- Supuran, C. T., Scozzafava, A., Conway, J., 2004. Carbonic anhydrase: its inhibitors and activators (Vol. 1). CRC press,
- Şekeroğlu, Z. A., Şekeroğlu, V., 2011. Genetik toksisite testleri. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 4(3), 221-229.
- Télez, M., Martínez, B., Criado, B., Lostao, C. M., Peñagarikano, O., Ortega, B., Arrieta, I., 2000. In vitro and in vivo evaluation of the antihypertensive drug atenolol in cultured human lymphocytes: effects of long-term therapy. *Mutagenesis*, 15(3), 195-202.
- Télez, M., Ortiz-Lastra, E., Gonzalez, A. J., Flores, P., Huerta, I., Ramírez, J. M., Arrieta, I., 2010. Assessment of the genotoxicity of atenolol in human peripheral blood lymphocytes: correlation between chromosomal fragility and content of micronuclei. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 695(1-2), 46-54.
- Top, M., Tarcan, M., 2004. Türkiye ilaç ekonomisi ve ilaç harcamaları: 1998-2003 dönemi değerlendirmesi.
- Topaktaş, M., Rencüzoğulları, E., 2010. Sitogenetik. Nobel Yayınevi, Ankara.
- Tripathi, A., Srivastava, U. C., 2010. Acetylcholinesterase: a versatile enzyme of nervous system. *Annals of Neurosciences*, 15(4), 106-111.

- Tutun, H., Baydan, E., 2019. İlaç geliştirmede reseptör analizinin önemi. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 4(1).
- Türkan, F., Huyut, Z., Taslimi, P., Gülçin, İ., 2019. The effects of some antibiotics from cephalosporin groups on the acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes activities in different tissues of rats. Archives of physiology and biochemistry, 125(1), 12-18.
- Türkan, F., Huyut, Z., Taslimi, P., Gülçin, İ., 2019. The effects of some antibiotics from cephalosporin groups on the acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes activities in different tissues of rats. Archives of physiology and biochemistry, 125(1), 12-18.
- Valero, M., Frances, E., 2006. Synergistic bactericidal effect of carvacrol, cinnamaldehyde or thymol and refrigeration to inhibit *Bacillus cereus* in carrot broth. Food microbiology, 23(1), 68-73.
- Warne, T., Serrano-Vega, M. J., Baker, J. G., Moukhametzianov, R., Edwards, P. C., Henderson, R., Schertler, G. F., 2008. Structure of a β 1-adrenergic G-protein-coupled receptor. Nature, 454(7203), 486.
- Wechsler, J. B., Hsu, C. L., Bryce, P. J., 2014. "IgE-mediated mast cell responses are inhibited by thymol-mediated, activation-induced cell death in skin inflammation", Journal of Allergy and Clinical Immunology, 133(6), 1735-1743.
- Xu, P., Wu, J., Zhang, Y., Chen, H., Wang, Y., 2014. Physicochemical characterization of puerh tea polysaccharides and their antioxidant and α -glycosidase inhibition. Journal of functional foods, 6, 545-554.
- Yeğenoğlu, F., Esmaoğlu Çoruh, A., Artış, T., Bayram, A., 2010. Myastenia gravisli olguda anestezi yönetimi. Erciyes Med J, 32, 49-52.
- Yusuf, S., Wittes, J., Friedman, L., 1988. Overview of results of randomized clinical trials in heart disease. I. Treatments following myocardial infarction. 14:2088-2093.
- Yükselten, Y., 2012. Isırgan otu (*urtica dioca* l.) ve ısırgan tohumunun (*fructus urtica pilulifera*) ekstraktlarının hücre kültürü ortamından genotoksisite ve oksidatif durum üzerine etkilerinin araştırılması. The effects of *urtica dioca* l. and *fructus urtica pilulifera* extracts to investigate on cell culture media the genotoxicity and oxidative status.
- Yüzbaşıoğlu, D., Yılmaz, E. A., Ünal, F., 2016. Antidepresan ilaçlar ve genotoksisite. TÜBAV Bilim Dergisi, 9(1), 17-28.
- Yüzbaşıoğlu, D., Zengin, N., Ünal, F., 2014. Gıda koruyucuları ve genotoksisite testleri. Gıda/the Journal of Food, 39(3).

Zengin, M., Genc, H., Taslimi, P., Kestane, A., Guclu, E., Ogutlu, A., Gulçin, İ., 2018. Novel thymol bearing oxypropanolamine derivatives as potent some metabolic enzyme inhibitors–Their antidiabetic, anticholinergic and antibacterial potentials. *Bioorganic chemistry*, 81, 119-126.

Zhang, L., Hogan, S., Li, J., Sun, S., Canning, C., Zheng, S. J., Zhou, K., 2011. Grape skin extract inhibits mammalian intestinal α -glucosidase activity and suppresses postprandial glycemic response in streptozocin-treated mice. *Food Chemistry*, 126(2), 466-471.



ÖZGEÇMİŞ

Guncha MEREDOVA, 10.05.1990'da Türkmenistan devletinin Magdanlı şehrinde doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Magdanlı şehrinde tamamladı. 2012 yılında Türkiye'de Sakarya Üniversitesi Biyoloji Bölümü'ne başladı ve 2016 yılında lisans eğitimini tamamladı. 2017 yılının güz dönemi yüksek lisans eğitimine başladı ve halen eğitime devam etmekte.