

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YENİ SENTEZLENMİŞ β -LAKTAM TÜREVLERİNİN
GENOTOKSİK PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Betül AYGÜN

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Hüseyin AKSOY

Haziran 2019

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

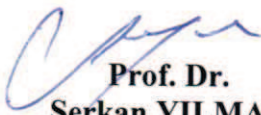
**YENİ SENTEZLENMİŞ β -LAKTAM TÜREVLERİNİN
GENOTOKSİK PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ


Betül AYGÜN

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

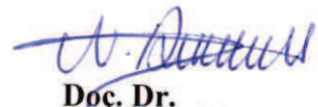
Bu tez 12.7.19 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.


**Prof. Dr.
Serkan YILMAZ**

Jüri Başkanı


**Doç. 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.

Betül AYGÜN

30.04.2019



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi birikimlerinden ve deneyimlerinden yararlandığım Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Hüseyin AKSOY'a, tezimin yazılması dahil her konuda desteğini ve yardımını esirgemeyen Değerli Hocam Öğr. Gör. Dr. Selen ŞEN'e ve tez yazımı sırasındaki yardımlarından dolayı Sayın Arş. Gör. Tarık DİNÇ'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tez çalışmamda kullandığım test maddesini sentezleyen SAÜ Kimya Bölümü'nden Sayın Prof. Dr. Mustafa ARSLAN ve ÇOMÜ Gıda İşleme Bölümü'nden Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nurcan BERBER'e, araştırmamın gerek laboratuvar kısmında gerekse yazım kısmında, manen de desteğini esirgemeyen çalışma arkadaşım Arş. Gör. Merve Ayşe DOĞANCI'ya teşekkür ederim. Tüm hayatım boyunca maddi manevi desteğini eksik etmeyen sevgili aileme sonsuz şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | |
|----------------------------------------------------------------|------|
| TEŞEKKÜR..... | i |
| İÇİNDEKİLER | ii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ..... | iv |
| ŞEKİLLER LİSTESİ | vi |
| TABLolar LİSTESİ | vii |
| ÖZET..... | viii |
| SUMMARY | ix |
| BÖLÜM 1. | |
| GİRİŞ | 1 |
| BÖLÜM 2. | |
| GENEL BİLGİLER..... | 4 |
| 2.1. Ftalazin İçerikli Heterosiklik Bileşikler..... | 4 |
| 2.2. Karbonik Anhidrazlar ve İnhibitörleri | 5 |
| 2.3. β -Laktamlar | 6 |
| 2.3.1. β -laktam antibiyotiklerin etki mekanizması | 9 |
| 3.4. Genotoksisite Testleri | 11 |
| 2.4.1. Kromozomal anormallik testi (CA)..... | 14 |
| 2.4.2. Mikronukleus testi (MN)..... | 15 |
| BÖLÜM 3. | |
| MATERYAL ve METOT | 17 |
| 3.1. Materyal..... | 17 |
| 3.1.1. Test maddesi | 17 |
| 3.1.2. Periferel kan..... | 18 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasallar..... | 18 |
| 3.1.4. Kullanılan kimyasal çözeltiler..... | 18 |
| 3.1.5. Doz seçimi..... | 19 |
| 3.2. Metot..... | 20 |
| 3.2.1. Kromozomal anormallik testi..... | 20 |
| 3.2.1.1. Mitotik indeks ve kromozomal anormalliklerin incelenmesi..... | 21 |
| 3.2.2. Mikronukleus testi..... | 21 |
| 3.2.2.1. Mikronukleus frekansı..... | 22 |
| 3.3. İstatistiksel Analiz..... | 22 |
| | |
| BÖLÜM 4. | |
| ARAŞTIRMA BULGULARI..... | 23 |
| 4.1. IV-b' nin İnsan Periferal Kan Lenfositlerindeki Genotoksik Ekileri..... | 23 |
| 4.1.1. Kromozomal anormallik (CA) testinin bulguları..... | 28 |
| 4.1.2. Mikronükleus (MN) testinin bulguları..... | 23 |
| | |
| BÖLÜM 5. | |
| TARTIŞMA ve SONUÇ..... | 30 |
| | |
| KAYNAKLAR..... | 36 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 48 |

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 |
| KA | : Karbonik anhidraz |
| KAI | : Karbonik anhidraz inhibitörü |
| KARP | : Karbonik anhidraz ilişkili protein |
| Ktd | : Kromatid değişimi |
| Ktk | : Kromatid kırığı |
| Kzk | : Kromozom kırığı |
| M | : Molar |
| mg | : Miligram |
| 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



ŞEKİLLER LİSTESİ

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1. Hermann staundinger'in β -laktam sentezi..... | 6 |
| Şekil 2.2. Bazı β -laktam grubu antibiyotiklerin kimyasal yapıları | 8 |
| Şekil 2.3. Bazı β -laktamaz inhibitör yapıları | 11 |
| Şekil 3.1. IV-b'nin molekül formülü..... | 17 |
| Şekil 4.1. 24 saat IV-b test maddesi ile muamele sonucunda oluşan kromatit kırığı | 29 |
| Şekil 4.2. 24 saat IV-b test maddesi ile muamele sonucunda oluşan kromozom kırığı | 29 |
| Şekil 4.3. 24 saat IV-b test maddesi ile muamele sonucunda oluşan fragment | 26 |
| Şekil 4.4. 48 saat IV-b test maddesi ile muamele sonucunda oluşan kromatit kırığı | 26 |
| Şekil 4.5. 48 saat IV-b test maddesi ile muamele sonucunda oluşan kromozom kırığı | 26 |
| Şekil 4.6. 48 saat IV-b test maddesi ile muamele sonucunda oluşan fragment | 27 |
| Şekil 4.7. Bir mikronukleuslu binükleat hücre | 27 |
| Şekil 4.8. İki mikronükleuslu binükleat hücre..... | 27 |

TABLULAR LİSTESİ

- Tablo 4.1. IV-b'nin 24 ve 48 saat uygulaması ile insan periferal lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallik frekansları ve mitotik indeksler 28
- Tablo 4.2. Yeni sentezlenen β -laktam türevinin (IV-b) insan lenfositlerinde mikronükleus frekansları 24



ÖZET

Anahtar kelimeler: Genotoksisite, Kromozomal Anormallik, Mikronukleus, İnsan Periferel Kan Lenfositleri, Ftalazin, β -Laktam, Karbonik Anhidraz İnhibitörü

Bu çalışmada, ilaç hammaddesi olma potansiyeli düşünülerek Sakarya Üniversitesi Kimya Bölümü'nde yeni sentezlenen ve insan karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerini inhibe ettiği belirlenen ftalazin içerikli β -Laktam türevi (IV-b)'nin genotoksik ve sitotoksik profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. İlaç hammaddesi olarak sunulması düşünülen kimyasal maddeler çok çeşitli toksikolojik araştırmalardan geçirilir. Bu araştırmalardan bir kısmı da sitotoksisite ve genotoksisite çalışmalarıdır.

Bu bağlamda *in vitro* insan periferel kan lenfositleri üzerine test maddesi IV-b'nin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi için kromozomal anormallik (CA) ve mikronukleus (MN) testleri uygulanmıştır. Bu amaçla lenfosit kültürü 24 ve 48 saat süre ile test maddesinin dört farklı konsantrasyonu (3,75, 7,5, 15, 30 $\mu\text{g/mL}$) ile muamele edilmiştir.

Araştırmada elde edilen verilere göre, test maddesinin bütün uygulama gruplarında negatif kontrole göre mitotik indeksi anlamlı bir şekilde azalttığı gözlenmiştir. Çözücü kontrole göre ise, 24 saatlik uygulamada sadece 3,75 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyon ile 48 saatlik uygulamada 7,5 ve 15 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarda anlamlı azalışlar gözlemlenmiştir. Bütün uygulama gruplarında en fazla gözlemlenen kromozomal anormallik tipi kromatid kırığı iken, bunu fragment ve kromozom kırıkları izlemiştir. Anormal hücre yüzdesi ve hücre başına düşen kromozomal anormallikler bakımından negatif kontrole göre her iki uygulama süresinde de en yüksek iki konsantrasyonda anlamlı artışlar gözlenmiştir. Ayrıca 24 saatlik uygulamada 7,5 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonda da anlamlı artış söz konusudur. Her iki değerlendirme kriteri açısından her iki uygulama süresinde çözücü kontrole göre en yüksek konsantrasyonda anlamlı artışlar görülmüştür. Bununla birlikte hücre başına düşen kromozomal anormallikler bakımından 48 saatlik uygulamada 15 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonda da anlamlı bir artış görülmüştür. Mikronukleus frekansı bakımından, en düşük konsantrasyon hariç bütün konsantrasyonlarda çözücü kontrole göre anlamlı artışlar 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 β -LACTATE DERIVATIVES

SUMMARY

Keywords: Human peripheral blood lymphocytes, chromosomal aberration, micronucleus, phthalazine, genotoxicity, carbonic anhydrase inhibitory, β -lactam

The aim of this study was to determine the genotoxic and cytotoxic profile of the phthalazine-containing β -lactam derivative (IV-b), which is newly synthesized in Sakarya University Chemistry Department and inhibited the isoenzymes of human carbonic anhydrase I and II. 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 IV-b on *in vitro* human peripheral blood lymphocytes. For this purpose, the lymphocyte culture was treated with four different concentrations of test substance (3,75, 7,5, 15, 30 $\mu\text{g/mL}$) 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 7,5 and 15 $\mu\text{g/mL}$ in 48 hours with only 3,75 $\mu\text{g/mL}$ concentration in 24 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. There is also a significant increase in the concentration of 7,5 $\mu\text{g/mL}$ in 24 hours. 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 15 $\mu\text{g/mL}$ was observed in 48 hours. In terms of micronucleus frequency, there is a significant increase in all concentrations except the lowest concentration compared to solvent control. 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

Günümüzde değişik nedenlerle yeni ilaçlara ihtiyaç duyulmakta ve bu nedenle yeni ilaç geliştirme çalışmaları artarak devam etmektedir. Bununla birlikte, halen kullanılmakta olan binlerce ilacın yan etkileri de azaltılmaya çalışılmaktadır. Ayrıca bir takım hastalıklara spesifik veya farklı mekanizmalarla etki edebilen türevleri de geliştirilerek yeni ilaçlar sentezlenmeye çalışılmaktadır. Çağımızın en yaygın problemlerinden biri olan antibiyotik direnci ve hastalıkların sıklıkla tekrarı da mevcut ilaçların yetersizliğini göstermektedir. Ek olarak en önemlisi hala kanser gibi ölümcül bazı hastalıkların tedavisinde kullanılacak etkili ilaçların piyasada mevcut olmayışından dolayı da bu arayış çalışmaları yoğun bir şekilde sürmektedir (Barrios ve ark., 2002; Scozzafava ve ark., 2003; Mondelli ve ark., 2008).

Yeni ilaç geliştirme çalışmalarına dahil olan gruplardan birisi de Beta-laktam (β -laktam) halkası içeren bileşiklerdir. β -laktam halka sistemi, penisilin, sefalosporin, karbapenem, monobaktam gibi yaygın olarak kullanılan antibakteriyel moleküllerin bir parçasıdır (Mehta ve Pathak, 2011; Thomas ve ark., 2016). β -laktam halkasını içeren bileşikler ayrıca antiinflamatuvar (Veinberg ve ark., 1998; Kumar ve Rajput, 2009), antiparkinsoniyen (Srivastava ve ark., 1999), antihiperlipidemik (Wu ve ark., 1999; Leach ve ark., 2001), antiviral (Küçükgüzel ve ark., 1999; Sperka ve ark., 2005), antidiyabetik (Goel ve ark., 2004), apoptozis indüktör aktivitesi (Kazi ve ark., 2004), merkezi sinir sistemi aktivatörü (Goelab ve ark., 2005), vazopressin V1a antagonisti (Guillon ve ark., 2007) gibi özelliklere sahip olduğu görülmüştür. β -laktam türevlerinin geniş ve güçlü biyoaktivite özellikleri, bunların ilaç geliştirmede biyolojik olarak oldukça önemli bir noktaya getirmiştir (Thomas ve ark., 2016). Özellikle son dönemlerde yapılan çalışmalarda, β -laktam substratlarının trombin (Han ve ark., 1995), kimaz (Aoyama ve ark., 2001), serin proteazlar (Koteva ve ark., 2001; Konaklieva, 2002; Turan ve ark., 2016), matriks metaloproteazları (Cainelli ve

ark., 2003), triptaz (Bisacchi ve ark., 2004) ve karbonik anhidraz (Berber ve ark., 2015; Turan ve ark., 2016) gibi bazı enzimlerin güçlü inhibitörleri olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Karbonik anhidraz enzim inhibitör ajanları da farmasötik kimyada her zaman dikkat çekmiştir. Karbonik anhidraz enzimleri, karbondioksidin geri döndürülebilir hidrasyonunu katalize eder: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$. Bu reaksiyon, insan vücudunda pH kontrolü, sıvı sekresyonu, iyon taşınması, şiddetli biyosentez reaksiyonları, kemik rezorpsiyonu, kalsifikasyon, epileptogenez ve tümörözenez gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreci destekler (Supuran ve Scozzafava, 2000; Supuran, 2001; Supuran ve Scozzafava, 2007; De Simone ve ark., 2013).

Günümüze kadar insanlarda farklı dokulardan 12 aktif karbonik anhidraz izozimi (I, II, III, IV, VA, VB, VI, VII, IX, XII, XIII, XIV) izole edilmiştir. Karbonik anhidraz I ve II fizyolojik olarak bol ve yaygın olarak bulunan izozimlerdir (Supuran ve Scozzafava, 2007; Wilkinsin ve ark., 2007; Supuran, 2008).

Karbonik anhidraz inhibitörü (KAİ) ilaçlar, diüretikler, antişlakoma ve antiepileptik ajanlar olarak 50 yıldan uzun süredir klinik kullanımdadır. Bununla birlikte, kullanılabilir KAİ'lerin izoenzim seçiciliği yoktur ve sistemik yan etkilere neden olurlar. Bu nedenle, belirli karbonik anhidraz izozimlerini hedefleyen yeni KAİ'lerin geliştirilmesi ile ilgili araştırmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Ayrıca, kanser, obezite, osteoporoz ve enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek KAİ'lerinin sentezi üzerine araştırmalar da devam etmektedir (Supuran, 2001).

Öte yandan, yeni nitrojen içeren heterosiklik bileşiklerin sentezi, geniş klinik uygulamalarından ötürü, son yıllarda ilaç geliştirilmesinde büyük bir ilgi konusu olmuştur. Çok çeşitli nitrojen içeren heterosiklik bileşikler arasında, ftalazin parçasını içeren heterosiklikler çeşitli biyolojik aktiviteleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür (Sayyafi ve ark., 2008; Shaterian ve ark., 2008). Ftalazin türevlerinin antihistaminik (Tatsumi ve ark., 1980), antikonvülsan (Nomoto ve ark., 1990; Grasso ve ark., 2000), vasorelaksan (Watanabe ve ark., 1998; Demirayak ve ark., 2004),

antibakteriyel, antifungal (Sinkkonen ve ark., 2002; Sönmez ve ark., 2006), antiinflamatuvar (Dogruer ve ark., 2004; Sharma ve ark., 2014), antitümör (Zhang ve ark., 2010; Wasfy ve ark., 2013), antihiperglisemik (Davis ve ark., 2013) ve sitotoksik (Rodriguez-Ciria ve ark., 2003; Kim ve ark., 2008; Zhai ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2010; Xue ve ark., 2014) aktivite gibi çok sayıda aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. β -laktam ve ftalazin türevleri, çeşitli biyolojik aktivitelere sahip ve yıllarca eczacılığın kullandığı ana iskelet olan bileşikler olduğu için bu grupları aynı yapı içinde taşıyan bileşiklerin güçlü biyolojik etkiler göstermesi muhtemeldir.

Belirtilen bu bilgiler ışığında aynı yapı içinde etkili biyolojik aktivitelere sahip hem ftalazin hem de β -laktam işlevlerini içeren moleküllerin sentezlenmesi oldukça ilgi çekmiştir. Bu amaçla, ilaç hammaddesi olarak kullanılabilmesi düşünüldüğü Sakarya Üniversitesi Kimya Bölümü'nde yeni bir dizi ftalazin içerikli β -laktam türevleri sentezlenmiş ve yeni sentezlenen bu bileşikler arasından 1-(4-(3,3-dimetil-1,6-dioxo-2,3,4,6,11,13-hekzahidro-1H-indazolo[1,2-b]ftalazin-13-yl)fenil)-2-fenilazetid-3-yl asetat (IV-b)'in, insan KAI ve KAII enzim inhibisyonu için daha etkili olduğu bulunmuştur (Berber ve ark., 2015). Ancak, yeni sentezlenen bir bileşiğin ilaç hammaddesi olarak önerilebilmesi için, öncelikle bir çok testten geçirilmesi gerekmektedir. Bu testlerden önemli bir kısmı toksisite testleridir ve bunlar içinde sitotoksik ve genotoksik testleri önemli bir yer tutmaktadır (Şen, 2018). Bu çalışmada; yeni sentezlenen β -laktam türevi bileşiğin genotoksik potansiyelinin *in vitro* insan periferik kan lenfosit kültüründe kromozomal anormallik (CA) ve mikronükleus (MN) testleri ile araştırılması amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ftalazin İçerikli Heterosiklik Bileşikler

Büyük çoğunluğu doğada meydana gelen heterosiklik bileşiklerin hayatımızda oldukça önemli bir yeri vardır. Bu bileşikler arasında; özellikle ftalazin parçacıklı heterosiklik yapılar farmakolojik ve biyolojik aktivite göstermelerinden dolayı ayrı bir öneme sahiptirler (Berber ve ark., 2015). Son yıllarda da geniş uygulama alanına sahip olmaları ve ftalazin parçacıklı olanların yaşamsal birçok aktivitede rol oynamaları dolayısıyla heterosiklik komponentlerin sentezi büyük önem kazanmıştır. Ftalazin içerikli yapılar, tedavi edici özellik göstermekle beraber, sitotoksik, antikonvülzan, kardiyotonik, antimikrobiyal, antifungal, antikanser gibi pek çok biyolojik aktivitelere sahiptirler (Katritky ve ark., 1979; Grasso ve ark., 2000; Sinkkonen ve ark., 2002; Rodríguez-Ciria ve ark., 2003; Kim ve ark., 2008; Zhai ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2010; Xue ve ark., 2014; Sabitha ve ark., 2010).

Ayrıca antitümör ajanı olarak, anti-anksiyete ilaçlarda kullanılmış ve GABA reseptörünün seçici bağlayıcılığında, diyabet fareleri ile yapılan çalışmalarda ftalazin türevlerinin antibakteriyel etkisinin yanı sıra anti-hiperglisemik ve anti-hiperlipidemik etki gösterdiği de gözlemlenmiştir (Imamura ve ark., 2003; Carling ve ark., 2004; Kim ve ark., 2004; Abd El-Ghaffar ve ark., 2011).

Azelastin, alerjik rinit tedavisinde antihistamin olarak, Hidralazin, bir hidrazin türevi olup tansiyon düşürücü ve damar genişletici ajan olarak kullanılırken, şeker hastalığında; retinopati, nörapati ve katarakt oluşmasını engellemek amacıyla Zopolrestat, analitik uygulamalarda kimyasal ışımaya verdiği bilindiğinden kriminal çalışmalarda ortamda kan varlığını tespit etmek amacıyla kullanılmakta olan Luminol birer ftalazin türevidir (Ito ve ark., 1992; Campos-Toimil ve ark., 1994;

Kikuchi ve ark., 1999; Napoletano ve ark., 2001). Bunların yanında, parkinson, alzheimer, epilepsi, felç, tümör, romatik hastalıklar ve kalp hastalıklarının da tedavisinde bazı ftalazin türevleri kullanılmaktadır (Korea Patent, 2001).

Ftalazin içerikli bileşiklerin geniş ve güçlü biyoaktivite özelliklerine sahip olmaları ve bazı hastalıkların tedavisinde halen kullanılıyor olmasından dolayı, türevlerinin araştırılması konusuna ilgi günümüzde halen devam etmektedir (Şen, 2018).

2.2. Karbonik Anhidrazlar ve İnhibitörleri

Günümüzde biyolojik moleküller arasında ilaç hedefi olması sebebiyle de araştırmalara sıkça konu olan en önemli moleküllerden biri de enzimlerdir. Çünkü enzim aktivitesinin düzenlenmesiyle günümüzde birçok hastalık tedavi edilebilmektedir. Bu sebeple ilaç hedeflerinin % 40'ını enzimler oluşturmaktadır (Winum ve ark., 2009).

Onaylanmış ilaç hedefi olarak 66 adet insan enzimi bilinmektedir (Winum ve ark., 2009). Bu enzimler içinde en dikkat çeken grup ise karbonik anhidrazlardır (KA). Aktif bölgelerinde Zn^{+2} iyonu içeren, insanda KA izoenzimi ve 3 KA bağlantılı proteini tanımlanan KA'lar metaloenzimlerdir (Supuran, 2001; Anzelotti ve Farrel, 2008; Simone ve ark., 2008; Thiry ve ark., 2008; Pastorekova ve ark., 2008; Supuran, 2010; Supuran, 2012; Aggarwal ve ark., 2013).

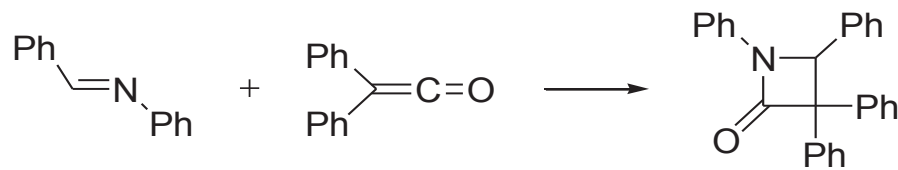
İnsan vücudunda birçok kritik süreçte fizyolojik ve patolojik rol üstlenen KA'lar akciğer, eritrosit, göz, böbrek, beyin, pankreas, tükrük bezleri, kaslar, kolon, prostat gibi çeşitli dokulardan izole edilmektedir. Günümüze kadar 12 farklı aktif karbonik anhidraz enzimi izole edilmiş olup, fizyolojik olarak en yaygın olan karbonik anhidraz I ve II'dir. Solunum, vücut sıvısı üretilmesi, tümörleşme, elektrolit sekresyonu, pH ve CO_2 homeostazisinin sağlanması gibi insan vücudu için çok önemli olan bu olaylarda KA'ların katalizledikleri karbondioksitin bikarbonata geri dönüşümlü hidratasyonu sayesinde KA izoenzimleri yukarıda sayılan kritik süreçlerde rol oynamaktadır (Mohanty ve ark., 1998; Supuran ve Scozzafava, 2000;

Leppilampi, 2006; Supuran ve Scozzafava, 2007; Wilkinsin ve ark., 2007; Thiry ve ark., 2008; Supuran, 2008; Ekinci, 2008; Gümüş, 2008). Bu gibi kritik süreçlerde önemli derecede rol oynamaları ve insan dokularında yaygın dağılım göstermeleri sebebiyle de KA izoenzimleri, ilaç tasarımında dikkat çeken hedeflerden biri haline gelmişlerdir. Dolayısıyla KA izoenzimlerini inhibe eden ajanlar da, KA inhibitörleri, farmakolojik önem kazanmıştır ve bu inhibitörler arasında β -laktam substratları en güçlü gruplardan biri olarak görülmektedir. Son yıllarda bazı KA izoenzimleri kanser, obezite ve osteoporoz tedavisinde rol aldığı anlaşılmış olup bu izoenzimlere spesifik yeni ilaç etken maddeleri sentezleme çalışmaları yapılmaktadır (Winum ve ark., 2009; Supuran, 2010; Lee, 2010; Berber ve ark., 2015; Turan ve ark., 2016).

Karbonik anhidraz inhibitörü ilaçlar ajan olarak yaklaşık 50 yıldır klinik olarak çeşili alanlarda kullanılmaktadır fakat izoenzim seçiciliği olmayışı ve sistemik yan etkilerinden dolayı spesifik yeni KAI'lerin geliştirilmesine halen devam edilmektedir (Supuran, 2001).

2.3. β -Laktamlar

Keten ve iminlerin tepkimesi sonucunda ortaya farmakolojik öneme sahip çeşitli maddeler çıkmış ve sentez edilmiştir. Bu maddelerden birisi de Şekil 2.1'de gösterilen imin ve difenilketen kullanılarak sentezlenmiş β -laktamlardır.



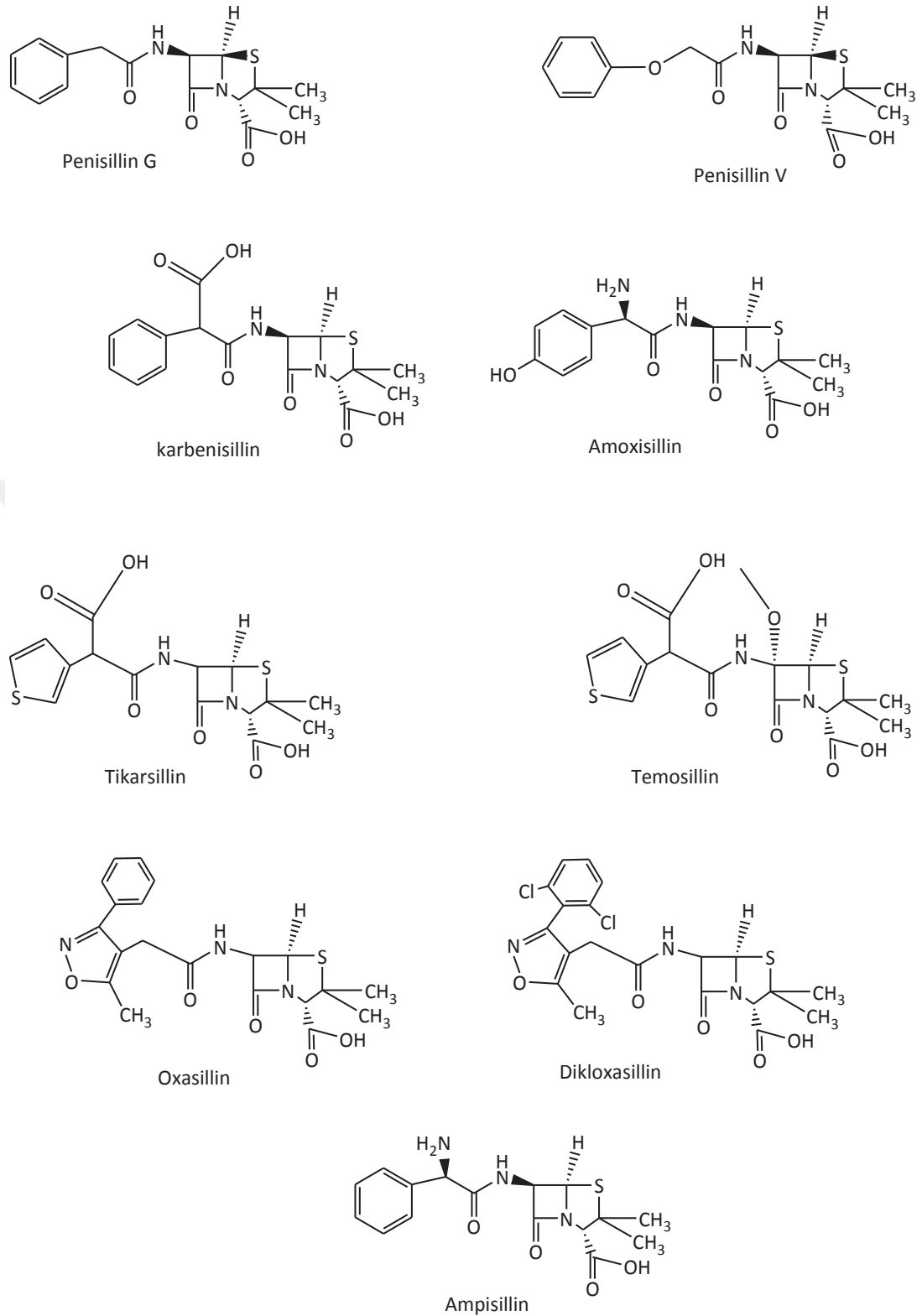
Şekil 2.1. Hermann Staudinger' in β -laktam sentezi (Staudinger, 1905).

Farmakolojik önemi, sentezlenmesinden yıllar sonra fark edilen β -laktamlar imin ve keten birleşiminden oluşmaktadır. Bu keşif süreci, 1929 yılında, Alexander Fleming tarafından yapılan bir çalışmada potansiyel antibiyotik olan penisilini bulması ile sonuçlanmıştır (Woodward ve ark., 1949). Yapılan bu çalışmada penisillium

kolonisinin çevresinde bulunan *Staphylococcus aureus* kolonilerinin üremesinin durmuş olduğunu fark etmiş ve bu etkiyi yapan maddeye penisilin adını verdiğini bildirmiştir. Çalışmada elde edilen bulgular ışığında penisilin antibiyotik özelliğe sahip olduğu gösterilmiş olup, kültürden elde edilen penisilin miktar olarak yetersiz ve saklama koşulları açısından da dayanıksız olması sebebiyle tedavi amaçlı kullanılamamıştır. İlerleyen süreçte Alexander Fleming ve arkadaşları penisilin daha dayanıklı, tedavi amaçlı kullanabilmek için aktif şeklini bol miktarda elde etmiş ve 1940 yılında kullanıma sunmuşlardır. Akabindeki ilk yirmi yıl içerisinde yeni bazı penisilin türevleri sentezlenirken, ikinci yirmi yılda da penisilin türevleri geliştirilerek sentezi gerçekleştirilmiş ve birçok bakteriyel hastalıkların tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Kimyasal yapılarında β -laktam halkası içeren bütün antibiyotik maddeler β -laktam antibiyotikler olarak adlandırılmaktadır ve bazı β -laktam grubu antibiyotiklerin kimyasal yapıları Şekil 2.2’de gösterilmiştir (Berber ve ark., 2015).

β -laktam halkasını içeren bileşiklerin ayrıca antiinflamatuvar (Veinberg ve ark., 1998; Kumar ve Rajput, 2009), antiparkinsoniyen (Srivastava ve ark., 1999), antihiperlipidemik (Wu ve ark., 1999; Leach ve ark., 2001), antiviral (Küçükgül ve ark., 1999; Sperka ve ark., 2005), antidiyabetik (Goel ve ark., 2004), apoptozis indüktör aktivitesi (Kazi ve ark., 2004), merkezi sinir sistemi aktivatörü (Goelab ve ark., 2005), vazopressin V1a antagonisti (Guillon ve ark., 2007) gibi özelliklere de sahip olduğu görülmüştür.

Önceki yıllarda β -laktam içerikli antibiyotikler; penisilinler, sefolosporinler, karbapenemler ve monobaktam grubu β -laktamlar olmak üzere 4 grup altında toplansa da son yıllarda β -laktamaz inhibitörleri de (klavulonat, sulbaktam, tazobaktam) bu gruba dahil edilerek 5 grup altında toplanmıştır (Bradford, 2001). Bazı β -laktam grubu antibiyotiklerin kimyasal yapıları Şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Bazı β -laktam grubu antibiyotiklerin kimyasal yapıları (Berber ve ark., 2015)

2.3.1. β -laktam grubu antibiyotiklerin etki mekanizması

β -laktamlar bakterisid olarak yani bakterilerin hücre duvarını inhibe ederek antibakteriyel özellik göstermektedirler (Çetin, 1986). Bu antibiyotiklerin asıl hedefi, “penisilin bağlayan protein (PBP)” adı verilen enzimlerdir. Bu enzimler hücre duvar sentezinin transpeptidasyon evresini katalizlemektedir. β -laktam antibiyotikler PBP enzimleri ile bağlanarak enzimin asıl substratına bağlanmasına engel olur, böylece duvar sentezi engellenmiş olur ve bakterinin hücre duvarı inhibisyona uğradığı için duvar sentezi gerçekleşemez (Öncül, 2002).

β -laktam antibiyotiklerin en sık kullanılan antibiyotik grubu olmalarının başında yan etkilerinin azlığı ve yukarıda da bahsedildiği gibi bakterisid olmaları gelmektedir. Bu antibiyotik grubu, bakterilerin hücre duvarında bulunan ve mikroorganizma bütünlüğünü koruyan peptidoglikan tabakasının sentezini bozarak etki eder. Peptidoglikan tabakası, N-asetil muramik asitin yapısında bulunan D-alanin–D-alanin moleküllerinin transpeptidasyon reaksiyonu sayesinde çapraz bağlanan kısa peptid zincirleri ile sağlamlaşır. Bu transpeptidasyon reaksiyonunu gerçekleştiren enzimler olan penisilin bağlayan proteinler β -laktam antibiyotiklerinin asıl hedefidir. β -laktam grubu antibiyotiklerin yapısı D-alanin–D-alanin molekülüne çok benzediğinden, bu antibiyotikler PBP ile reaksiyona girer ve D-alanin–D-alanin molekülünün yerine geçer. Böylelikle transpeptidasyonu engeller. Hücre duvarının yapısı bozulduğu için bakteri ozmotik direnç kaybı yaşar ve ölür (Gür ve ark, 2001).

Günümüze kadar tanımlanan 350’ye yakın β -laktamaz enzimi vardır. β -laktamazlar moleküler yapılarına göre 1980’de Ambler tarafından 4 sınıfa ayrılmışlardır (Bush ve ark., 1995). Bunlar;

- Sınıf A: Önceliği penisilinleri hidrolize etmek olan enzim grubu,
- Sınıf B: Metallo- β -laktamaz olarak bilinen, karbapenemazlardan oluşan grup,
- Sınıf C: AmpC geni tarafından kodlandığı için AmpC enzimler olarak da anılan, öncelikle sefalosporinazlardan oluşan enzim grubu,
- Sınıf D: Oksasilinazlardan oluşan enzim grubu.

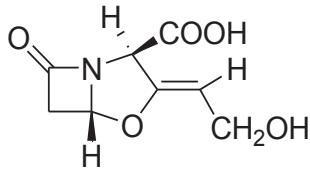
β -laktam halkasındaki amid bağlarını parçalayıp, β -laktam ajanlarını inhibe ederek antibiyotiğe karşı direnç etkisi gösteren β -laktamazlar, anaerob, gram negatif ve gram pozitif bakteriler tarafından sentezlenen enzimlerdir ve PBP'lere de yapısal olarak benzemektedirler. Stafilokoklar, bu enzimleri oluşturan en önemli gram pozitif patojenlerdendir (Jayanthi ve ark., 2004; Sari, 2005). Gram negatifler diğerlerine nazaran daha çok β -laktamaz enzimi üretmektedir ve bu bakteriler arasında β -laktam direncindeki en önemli mekanizma üretimdir. *Enterobacteriaceae* üyeleri güçlü β -laktamaz üreticileri olarak gram negatiflere örnek verilmektedir. Anaerobik bakterilerde farklı etki mekanizmaları vardır. *Clostridium* ve *Fusobacterium*'ların ürettiği β -laktamazlar penisilini parçalayarak etki ederken *Bacteriodes*'ler ise genellikle sefalosporinaz etkinliği göstermektedir (Pool, 2004).

Son yıllarda bazı β -laktamaz inhibitörleri ile penisilin türevlerini birleştirip kombine penisilinler elde edilmiştir. Bu kombinasyonlarda ampisilin, piperasilin, tikarsilin, amoksilin gibi penisilin türevleri kullanılırken, β -laktamaz inhibitörü olarak da sulbaktam, klavulanik asit ve tazobaktam gibi inhibitörler kullanılmıştır. Bu inhibitörlerin yapıları Şekil 2.3'te gösterilmiştir. β -laktamaz salgılayan bakterilere de etki gösteren β -laktamaz inhibitörlü kombine penisilinler elde etmek amacıyla geliştirilen bu kombine preparatların genellikle *Staphylococcus*, *Haemophilus*, *Bacteriodes*, *Klebsiella* türleri ve *E. coli*'nin basit β -laktamazları dışında kalan β -laktamazları inhibe edemediği görülmüştür (Chambers ve ark., 2005).

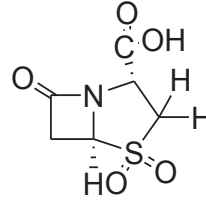
Son yıllarda tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de kokutucu düzeyde artış gösteren antibiyotik direncinin en önemli sebebi kontrolsüz ve bilinçsizce antibiyotik kullanımınıdır. Kullanılan antibiyotiğin aktif halde dışarı atılması, tedavideki hedef bölgenin yapısal değişime uğraması, plazmidlerle kromozomların aracı olduğu direnç faktörleri, β -laktamaz veya aminoglikozidleri değiştirecek enzim oluşturma ve hücre geçirgenliklerindeki değişiklikler gibi çeşitli mekanizmalarla antibiyotik direnci ortaya çıkmaktadır (Itokazu ve ark., 1996; Archibald ve ark., 1997).

Dirençli bakterilerin ortaya çıkmasında en büyük rol R-plazmidleri tarafından sentezlenen β -laktamazlara aittir. Bu plazmidler bakteriler arasında yüksek oranla

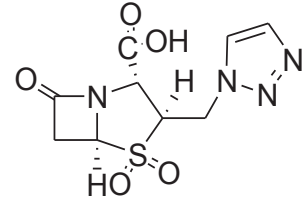
aktarılmaktadır. Plazmitten sentezlenen bu enzime *Enterobacteriaceae* üyelerinin yaklaşık %25-75'inde bu plazmitin bulunması örnek olarak verilmektedir (Gutmann ve ark., 1988).



Klavulanik asit



Sulbaktam



Tazobaktam

Şekil 2.3. Bazı β -laktamaz inhibitör yapıları (Berber ve ark., 2015)

β -laktam enzim inhibisyon mekanizmasından bir tanesi; klavulanik asitin karbonil grubuna geri dönüşümsüz olarak bağlanması sonucu, hidroksil (Ser-70) sebebiyle savunmasız kalıp açıl ara ürününe dönüşür ve beşli azot halkasının da açılmasıyla imin ara ürününe dönüşür. İmin izomerizasyonlar geçirerek kararlı hale gelir ve reaksiyonu takip eden birkaç saat sonrasında β -laktam enzimi klavulanik asitin bu değişimiyle yok edilmiş olur (Chen ve Herzberg, 1992; Padayatti ve ark., 2005; Berber ve ark., 2015).

β -laktam ve ftalazin türevleri, çeşitli biyolojik aktivitelere sahip ve yıllarca eczacılığın kullandığı ana iskelet olan bileşikler olduğu için, bu grupları aynı yapı içinde taşıyan bileşiklerin güçlü biyolojik etkiler göstermesi muhtemeldir. Bu sebeple ilaç hammadesi olması düşünülerek iki yapıyı içeren türev bileşiklerin sentezlenmesine olan ilgi oldukça artmıştır (Thomas ve ark., 2016).

3.4. Genotoksisite Testleri

Günümüzde radyoaktif kirlilik ve çevre kirliliğinin gelişen teknoloji ile beraber artmasından tüm canlılar ve özellikle de insanlar çok sık etkilenmektedir. Her ne kadar tedavi edici amaçlı da olsa, farklı süre ve dozda kimyasal maddelere maruz kalan insanlar, bunların yanı sıra gerek zararlı alışkanlıklarla (sigara, alkol vb.),

gerek gıdalarla ve hatta solunan havanın kirliliği de eklenince maruziyetin etkisi düşündürücü boyutlara varmaktadır. Adeta kirlilik çemberi haline gelen bu maruziyetlerin canlıların genetik yapısında herhangi bir hasara sebep olup olmadığını araştırmak için çeşitli test metotları geliştirilmiştir. Bazı kirleticiler hiçbir anormalliğe yol açmazken, bazı kirleticilerin sebep oldukları organizma hasarları ise DNA tamir mekanizması sayesinde düzeltilebilmektedir. Fakat bu her zaman mümkün olamamakla birlikte yapısal kromozom hataları, gen mutasyonları gibi geri dönüşümsüz hasarlara sebep olabilmektedir ki şayet üreme hücrelerinde meydana gelirse sonraki nesillere aktarılmaktadır (Kılıç, 2005).

Kısaca genotoksisite; gen mutasyonları, yapısal veya sayısal kromozom anormalliği, DNA zincir kırıkları ya da DNA eklentileri gibi hasarların tümüne verilen isimdir. Gen, kromozom, genomun bütünü veya DNA ile ilişkili hücresel yapıların hepsinde meydana gelebilecek olan hasarların sebebi genotoksik etkili ajanlardır (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

Genotoksik ajanların yol açtığı hasarların tespiti için çeşitli yöntemler kullanılıp geliştirilmekle beraber kısa süreli mutajenite ve kanserojenite testleri günümüzde hala kullanılmaktadır ve bu test metotlarının başında bakteriyel mutajenite testleri gelmektedir. Bir etkenin mutajen ya da kanserojen olup olmadığını anlamak için yapılan test metotlarında özellikle de gen mutasyonu tespiti için kullanılan bu metotlarda çabuk bölünebilen tek hücreli bakteriler tercih edilmektedir ve Ames testi günümüzde bilinen en iyi bakteriyel mutajenite testlerinin başında gelir.

Son yıllarda insanların maruz kaldığı bu kimyasalların hem kişide hem de gelecek nesilde meydana getirdiği ve getireceği hasarların boyutuna şöyle bakacak olursak; öncelikle kanser, kısırlık, doğum sorunları gibi oldukça önemli ve endişe verici olduğu görülmektedir. Genotoksik ajanların sebep olduğu bu hasarların sonucunda meydana gelen hastalıkların başında gelen kanserin genotoksisite ile yüksek derecede ilişkili olduğu ve karsinojen ajanların insanlarda kanser oranını % 90'a ulaştırdığı görülmüştür (Kılıç, 2005; Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

Tüm bu bilgiler ışığında ve ortaya çıkan tabloyla birlikte artan kimyasal kullanımının yol açtığı ve açacağı ciddi sağlık sorunlarının anlaşılması genotoksisite testlerinin geliştirilmesine sebep olmuştur (Tarhan, 2006; Yırtıcı, 2007). Yukarıda bahsedilen bakteriyel mutajenite testi dışında *in vitro* testler de oldukça etkili, çalışma amacına göre çeşitli ve yaygın kullanım alanına sahiptir. Herhangi bir etkenin kromozom seviyesinde anormalliğe sebep olup olmadığını araştırmak için kullanılan *in vitro* testlerde deney materyali olarak sperm, periferik kan, kemik iliği gibi materyalleri fare, tavşan, sıçan, insan veya balıktan elde edilmektedir. Ancak sıklıkla insan kaynaklı hücreler deneylerde kullanılmaktadır (Berber ve ark., 2014). Genotoksik etkilerin tamamını gösterebilecek yeterlilikte olduğu düşünülmeyen kısa süreli genotoksisite testlerinin tek tek değil ancak bir arada seri olarak değerlendirilmesi ile geçerliliğini arttırdığı düşünülmektedir. Bu seri testler uzun süreli testlerin sonuçları ile benzerlik göstermektedir (Tarhan, 2006; Yırtıcı, 2007).

Genotoksisite testleri, ilaç üretiminde de oldukça önemli bir yere sahiptir ve ilaçların kullanıma sunulmadan önce mutlaka genotoksik güvenilirlik testi için kısa süreli test sisteminde standarda oturtulmuş olan üç basamaklı seriden geçmesi gerektiği bildirilmektedir. Bu üç basamaklı seride bakteriyel mutajenite testleri (örn: Ames) ilk basamak için önerilirken, ikinci basamakta memeli hücrelerinde gen mutasyonu veya kromozom hasarı ölçmek için *in vitro* sitogenetik testlerin (örn: *in vitro* CA veya MN) yapılması tavsiye edilmektedir. Sonradan oluşabilecek genotoksik ajanların belirlenmesi oldukça önemli olup bu amaçla da serinin son basamağında *in vivo* kromozom hasarı testleri önerilmektedir. Çünkü ilaç olarak kullanılması düşünülerek sentezlenmiş herhangi bir kimyasal maddenin dağılımı, emilimi ve vücuttan atılmasında izlediği yollar hakkında istediğimiz bilgileri bu testler sayesinde elde edebileceğimiz verilerden değerlendirme yaparak bulabileceğimiz önerilmektedir (OECD, 2008; Demircigil ve ark., 2009; Brambilla ve ark., 2012).

İlaç olması öngörülerek sentezlenen maddelerin genotoksisitesinin belirlenmesi amacıyla en yaygın kullanılan kısa süreli testlerden biri CA ve diğeri ise MN testleridir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011). Bu çalışmada da kısa süreli genotoksisite testleri olarak *in vitro* insan kan lenfosit kültüründe CA ve MN testleri uygulanmıştır.

2.4.1. Kromozomal anormallik testi (CA)

Kromozomal anormallik testi (CA), genotoksik ajanlara çeşitli sebeplerle maruziyetin sonucunda oluşan genetik hasarın izlemi ve tespitinde kullanılan en etkili yöntem olarak hatta altın standart olarak tanımlanmakta ve birçok mutajen ya da karsinojenin de kromozomal anormalliğe dolaylı veya doğrudan etki ettiği gösterilmektedir (Albertini, 2003).

Hasar gören kromozomların tamir edilememesi veya yanlış tamiri ile olabileceği gibi hücre bölünürken kutuplara gidemeyen veya giderken oluşan anormalliklerin sonucunda oluşan kromozomal anormallikler, sayısal veya yapısal olarak kromozomlarda görülen mikroskobik değişikliklerdir. Kısa süreli genotoksikite testlerinden biri olan kromozomal anormallikler testi, *in vitro* ve *in vivo* olarak yapılabilme özelliğine sahip genotoksik risk tespiti için oldukça hassas bir testtir. *In vivo* CA'da genellikle kemik iliği hücreleri kullanılırken, *in vitro* yöntemde memeli hücreleri olan fibroblast, sperm ve çoğunlukla periferal kan lenfositleri kültüre edilerek kullanılmaktadır. Her iki uygulamada da kültüre veya kemik iliğine tübülün polimerizasyonunu inhibe ederek bölünmeyi metafaz evresinde durdurma özelliğine sahip olan kolşisin ilavesi yapılmakta ve elde edilen metafaz plaklarındaki kromozomlar incelenmektedir. Bu yöntemle incelenen kromozomlarda sayısal ve yapısal anormallikler tespit edilmektedir (Hagmar ve ark., 1994; Norppa ve ark., 2006; Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2016).

Kromozomal anormallik testi ile belirlenebilen yapısal anormalliklere; kromozom kırığı, kromatid kırığı, kardeş kromatidlerde birleşme, disentrik kromozom, halka kromozom, inversiyon, translokasyon ve fragment örnek olarak verilmektedir (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010).

İnsan periferal kan lenfositleri ile yapılan kromozomal anormallik çalışmalarında saptanan anormallik sıklığının hem maruz kalınan karsinojenler dolayısıyla genotoksik etkilerin hem de bireysel hassaslık veya yatkınlığın göstergesi olarak kanser riski açısından önemli bir belirteç olduğu gösterilmektedir ve kromozom

anormallik frekansı ile kanser oluşumu arasında kuvvetli bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Ji ve ark., 2001; Najataryan, 2012; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2014; Santovito ve ark., 2014; Ginzkey ve ark., 2014; Zemanova ve ark., 2014). Bunlara ek olarak kanser riskinin CA testi ile erken dönemde saptanabileceği belirtilmektedir. Çünkü bu teknik tüm genomdaki hasarın izlenmesini mümkün kılmaktadır (Brusick, 1987; Hagmar ve ark., 1994; Bonassi ve ark., 2000; Au, 2007).

2.4.2. Mikronukleus testi (MN)

Kimyasal ve fiziksel ajanların genotoksik ve kanserojenik etkisinin ölçülmesi amacıyla sıklıkla kullanılan kısa süreli testlerden biri olan MN testinde, kromozomal anormallik testine göre sitogenetik hasar tespiti daha kolay uygulanmaktadır. Hemen hemen mitoz bölünme geçiren her hücrede *in vitro* ve *in vivo* olarak uygulanmakla beraber kolay ve hızlı sonuç verdiği belirtilmektedir (Şekeroğlu ve Atlı-Şekeroğlu, 2011).

İnsanların genotoksik kimyasallara maruz kalması sonucu oluşabilecek klastojenik ve/veya anojenik etkilerin ortaya çıkarılmasında hem hızlı hem de güvenilir olarak kabul gören bir test metodu olan MN testi yaygın olarak kullanılmaktadır (Brambilla ve ark., 2012). Kanser hastası olan kişilerden temin edilen periferik kan lenfositleri ile yapılan birçok çalışmada, kanserli dokudaki MN frekansı ile lenfositlerdeki MN frekansının aynı düzeyde olduğu saptanmış ve bazı epidemiyolojik çalışmalarda da MN frekansı artışı ve kanser arasında oldukça dikkat çeken bir ilişki olduğu ortaya koyulmuştur (Cheng ve ark., 1996; Uffaud ve ark., 1997; Fenech ve ark., 1999; Bonassi ve ark., 2007; Parry ve Kirsch-Volders, 2010; Preston ve ark., 2010; Ginzkey ve ark., 2014; Nersesyan ve ark., 2014).

Hücrenin mitoz geçirdiği sırada esas çekirdeğe dahil olamayan kromozom veya kromozom parçası olan mikronukleusun hücredeki artışının bir genomik kararsızlık olduğu ifade edilmektedir. Çeşitli ajanların kromozom kırığı oluşumuna, iğ iplikçiklerinde fonksiyon kaybı veya bozukluklarına, sentromerin bölünme hatasına sebep olması sonucunda hücredeki MN sayısında artış görülmesi indirekt olarak

genomik kararsızlık göstergesi olarak kabul görmüştür (Vanparys ve ark., 1990; Kirsch-Volders ve ark., 1997; Stopper ve Müler, 1997; Choy, 2001; Demirel ve Zamani, 2002).

MN'ler DNA sentez hataları sonucu veya DNA kırıklarından kaynaklanabilen kromozomal fragmentler içerebilir. Onarılamamış kromozom kırıkları, disentrik kromozom ve asentrik fragment oluşumu ile kendini yeniden düzenleme yoluna gidebilir. Bunun sonucunda disentrik kromozomların sentromerleri genelde anafazda nükleuslar arasında nükleoplazmik köprü oluştururken asentrik fragment ise MN oluşumuna sebep olur. Anafazda geri kalan asentrik fragmentler ve kromatid veya kromozom kırıkları veya tam bir kromozom sonucunda MN'ler oluşur. Telofazda da nükleusların dışında kalan MN'ler, küçük nükleuslar olarak görülür. (Surralles ve ark., 1995; Aardema ve Kirsch-Volders, 2001; Şekeroğlu ve Atlı-Şekeroğlu, 2011).

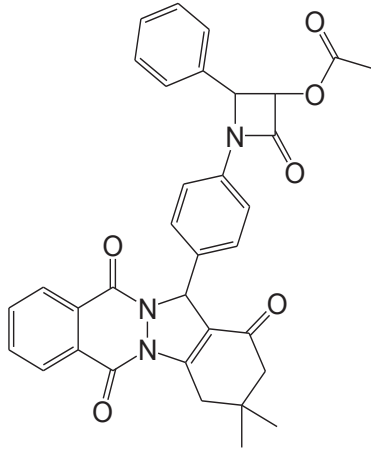
In vitro MN testinde en önemli nokta uygun şartlarda inkübe edilen hücre kültürlerine sitokalsin B (Cyt-B) eklenmesidir. Kültürün 44. saatinde ilave edilen Cyt-B, sitokinez esnasında mikrofilament oluşumunu bozar ve karyokinezi gerçekleşen hücrenin sitokinezi gerçekleşemez. Sitokinezi bloke olan bu hücrelerde karyokinez gerçekleştiği için çift çekirdek (binukleat) elde edilmiş olur ki amaç da bunu elde etmektir. Test maddesi ile muamele edilen hücrelerin kültür süresi bitiminde hazırlanan preparatlardan yapılan binukleat hücrelerdeki MN sayımı ile hem hücrenin bölünmüş olduğu ispatlanırken hem de en az bir kere bölünerek yavru hücreye nakledilen genetik hasar gösterilerek saptanır (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

BÖLÜM 3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Test maddesi

Sakarya Üniversitesi Kimya Bölümü'nde sentezlenen ve bu çalışmada kullanılan β -laktam türevi olan 1-(4-(3,3-dimetil-1,6-dioxo-2,3,4,6,11,13-hekzahidro-1H-indazolo[1,2-b]ftalazin-13-yl)fenil)-2-fenilazetidin-3-yl asetat (IV-b) test maddesinin karakterizasyonu yapılmış, insan KAI ve KAIİ izoenzimlerini inhibe edici etkisi Berber ve arkadaşları (2015) tarafından belirlenmiştir. Araştırmamızda kullanılan bu test maddesinin (IV-b) kimyasal yapısı Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. 1-(4-(3,3-dimetil-1,6-dioxo-2,3,4,6,11,13-hekzahidro-1H-indazolo[1,2-b]ftalazin-13-yl)fenil)-2-fenilazetidin-3-yl asetat'ın kimyasal yapısı

3.1.2. Periferel kan

Sigara içmeyen, alkol kullanmayan, son 6 ay içerisinde herhangi bir ışına maruz kalmayan, son 2 yıl içerisinde herhangi bir mutajenik ajan ve ilaç tedavisi almayan, kronik bir hastalığı olmayıp son bir hafta içinde de herhangi bir viral ya da bakteriyel enfeksiyon geçirmeyen ve ilaç kullanmayan, 20-25 yaşları arasında sağlıklı 2 erkek 2 bayan donörden alınan periferel kanlar çalışmamızda kullanılmıştır.

3.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasallar

- Chromosome medium B (Cat no: F 5023, Biochrom)
- Mitomycin C ($C_{15}H_{18}N_4O$, Cas no: 50-07-7, Applichem)
- Colchicine ($C_{22}H_{25}NO_6$, Cat no: 64-86-8, Sigma)
- Cytocalasin B ($C_{29}H_{37}NO_5$, Cat no: 14930-96-2, Applichem)
- Heparin ($C_{12}H_{19}NO_{20}S_3$, Mustafa Nevzat)
- Giemsa (HS Kodu: 3204-19-00, Merck)
- Entellan (HS Kodu: 3208-20-10, Merck)
- Dimetilsülfoksit (DMSO, Cas no: 67-68-5, Applichem)
- Nitrik Asit (HNO_3 , Cas no:7697-37-2, Merck)
- Potasyum klörür (KCl, Cat no: 7447-40-7, Merck)
- Metanol (CH_3OH , Cat no: 67-56-1, Merck)
- Asetik Asit (CH_3COOH , Cat no: 64-19-7, Merck)
- Tampon A (KH_2PO_4 , Cat no: 7778-77-0, Sigma Aldrich)
- Tampon B (Na_2HPO_4 , Cat no: 7558-79-04, Sigma Aldrich)

3.1.4. Kullanılan kimyasal çözeltiler

-Tampon A

KH_2PO_411,34 gr

Distile su.....250 mL

-Tampon B

Na₂HPO₄12H₂O.....14,83 gr

Distile su.....250 mL

-0,075 M KCl çözeltisi

KCl.....1,398 gr

Distile su.....250 mL

-Kolkisin (0,06 gr/mL)

Kolkisin.....0,01 gr

Distile su.....10 mL

Stok olarak hazırlanan bu çözeltden 87,47 µL alınmış ve 10 mL'ye tamamlanmıştır.

-Mitomisin C (MMC) (0,2 µg/mL)

Mitomisin C.....2 mg

Distile su.....2 mL

Stok olarak hazırlanan bu çözeltden 110 µL alınmış ve 1 mL'ye tamamlanmıştır.

-Sitokalsin B (5,2 µg/mL)

Sitokalsin.....5 mg

DMSO.....2240 µL

3.1.5. Doz seçimi

β-laktam türevi olan test maddesinin IC₅₀ değerine göre uygulama dozlarının seçimi yapılmış olup, çalışmamızdaki tüm genotoksisite testleri için en yüksek uygulama dozu 30 µg/mL olarak belirlenmiştir. Diğer uygulama dozları en yüksek uygulama dozunun 1/2, 1/4 ve 1/8 oranında seyreltilmesi ile hazırlanmıştır. Sonuç olarak test maddesinin uygulama konsantrasyonları 30, 15, 7,50 ve 3,75 µg/mL şeklinde belirlenmiştir. Ayrıca pozitif, negatif ve çözücü kontrol de uygulamada kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Kromozomal anormallik testi

Steril tüplerin her birine 2,5 mL olacak şekilde dağıtılmış olan besiyerlerine 2 dişi 2 erkek olmak üzere toplamda 4 sağlıklı donörden alınan 0,2 mL heparinize edilmiş periferik kan ekimi yapılmıştır. Kan tüpleri 37 °C olan etüve kaldırılarak 72 saatlik inkübasyon başlatılmıştır. İnkübasyon boyunca her gün düzenli aralıklarla tüpler yavaşça alt üst edilmiştir. Test maddesinin kültürdeki kan tüplerine ekimi, maruziyet süresine bağlı olarak gerçekleştirilmiştir. 24 saatlik maruziyet uygulaması için kültürün 48. saatinde, 48 saatlik maruziyet için kültürün 24. saatinde kan kültürü tüplerine 30, 15, 7,50 ve 3,75 µg/mL olacak şekilde test maddesinin uygulama dozlarının ekimi yapılmıştır. Aynı zamanda pozitif kontrol olarak 0,2 µg/mL MMC (mitomycin C), negatif kontrol olarak steril distile su, çözücü kontrol olarak da DMSO (dimetilsülfoksit) eklenmiştir. İnkübasyonun 70. saatinde kültür tüplerine iğ ipliklerinin depolarizasyonunu sağlamak amacıyla kolkisin (0,06 µg/mL) ekimi yapılmıştır.

Kültür süresi bitiminde etüvden çıkarılan tüpler 10 dk boyunca 1200 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj bitiminden sonra konik kısma kadar süpernatantları atılmış olan tüplere, 37 °C'deki hipotonik solüsyon olan 0,075 M KCl'den 5'er mL damla damla vortex eşliğinde eklenmiştir. Hipotonik solüsyon eklenmesinden sonra tüpler 37 °C etüvde 30 dk bekletilmiştir. Süresi dolan tüpler tekrar 10 dk 1200 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantları atılan tüplere daha önceden hazırlanıp +4 °C'de bekletilmiş olan fiksasyon çözeltisinden (3 birim methanol:1 birim asetik asit) 5'er mL olmak üzere her bir tüpe vortex eşliğinde eklenmiştir. Sonrasında 45 dk bekletilmek üzere +4 °C'ye kaldırılmıştır. Bekleme süresi dolan tüpler tekrar santrifüj edilmiş ve süpernatantı atılmıştır. Bu işlemde sonra tekrar soğuk fiksatiften 5'er mL her bir tüpe vortex üzerinde damlatılmış ve santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatantı atılan tüplere tekrar soğuk fiksatif çözeltisi 5'er mL eklenmiş, tüpler tekrar ve son kez santrifüj edilmiş süpernatantı konik kısma kadar atılmıştır. Kalan kısım pastör pipeti yardımıyla homojenize edilmiştir. Elde ettiğimiz hücre

kültürlerini önceden temizlenmiş (çeşme suyu altında 10-15 dk yıkanmış, saf sudan geçirilmiş -20°C 'de bekletilmiş) lamlar üzerine damlatarak preparatlar hazırlanmış ve preparatlar 1 gün boyunca kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar, pH 6,8 olacak şekilde tampon A ve tampon B ile hazırlanan % 5'lik giemsa boyası ile 15-20 dk kadar boyanmış ve 1 gün sonra entellanla daimi preparat haline getirilmiştir.

3.2.1.1. Mitotik indeks ve kromozomal anormalliklerin incelenmesi

Mitotik indeks (MI) hesaplanması için bütün uygulama dozlarında her bir birey için 3000 hücre olmak üzere her bir doz için toplamda 12000 hücre incelenmiştir. Bölünen hücre sayısının, toplam hücreye oranının yüzde cinsinden değerinin hesaplanmasıyla mitotik indeks belirlenmiştir. Kromozomal anormallikler, her bir doz için 46 kromozomlu ve kromozomları düzgün dağılmış 100'er hücre olmak üzere her bir bireyin uygulama dozları toplamında 400'er hücre incelenerek değerlendirilmiştir. İncelenen toplam hücre içindeki anormal hücre yüzdeleri ve hücre başına düşen anormallik sayıları da belirlenmiştir.

3.2.2. Mikronukleus testi

Heparinli enjektörle donörlerden alınan kanlardan 0,2'şer mL olacak şekilde tüplerdeki 2,5 mL'lik besiyerlerine eklenmiştir. 37°C 'lik etüve kaldırılan tüpler 72 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresince tüpler düzenli olarak yavaşça alt üst edilmiştir. Kültürün başlangıcından itibaren 24. saatinde tüplere β -laktam türevi olan test maddemizin 30, 15, 7,50, 3,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak uygulama dozları eklenmiştir. Aynı zamanda pozitif kontrol olarak MMC (mitomycin C), çözücü kontrol olarak DMSO (dimetilsülfoksit) ve negatif kontrol olarak da steril distile su eklenmiştir. Kültürün 44. saatinde tüplere sitokinezi bloke etmek amacıyla Cytochalasin B (5,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) eklenmiştir.

Kültür süresi biten tüpler etüvden çıkarılmış, 10 dk 1000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi biten tüplerin süpernatantı atılmış ve her bir tüpe vortex eşliğinde damla damla 5'er mL olacak şekilde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekleyen hipotonik solüsyondan

(0,075 M KCl) eklenmiştir. Ardından tüpler +4 °C'de 5 dk bekletilmiş ve süre sonunda 10 dk 1000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjü tamamlanan tüplerin süpernatantı atılmıştır. Önceden hazırlanıp +4 °C'de bekletilen soğuk fiksatiften (3 methanol:1 asetik asit) tüplere vortex üzerinde 5'er mL olarak eklenmiş ve 15 dk buzdolabında +4 °C'de bekletilmiştir. Süresi biten tüplerin tekrar santrifüj işleminden sonra süpernatantları atılmış ve soğuk fiksatiften 5'er mL damla damla vortex üzerinde eklenmiştir. Tekrar santrifüj edilen tüplerin süpernatantları atılmıştır. Bu işlemden sonra önceden hazırlanmış olan soğuk 3:1 fiksasyon çözeltisine % 1'lik olacak şekilde formaldehit eklenmesiyle elde edilen son fiksatiften her bir tüpe vortex üzerinde damla damla 5'er mL ilave edilmiştir. Formaldehitli son fiksatiften sonra tüpler tekrar santrifüj edilmiş ve süpernatantı konik kısma kadar atılmıştır. Kalan kısım patör pipeti ile yavaşça homojenize edilmiştir.

Elde edilen hücre kültürleri önceden temizlenmiş (1N nitrik asitte 1 gece bekletilmiş, 15-20 dk çeşme suyunda yıkanmış, saf sudan geçirilip % 70'lik alkol içerisinde -20 °C'de çalışma zamanına kadar bekletilmiş) lamalar üzerine damlatılmıştır. 1 gün boyunca kurumaya bırakılan preparatların süre bitiminde pH'ı 6,8 olacak şekilde hazırlanmış % 5'lik giemsa boyası ile 13-15 dk boyanmış ve 1 gün sonra entellanla kapatılarak daimi preparat haline getirilmiştir.

3.2.2.1. Mikronukleus frekansının incelenmesi

Kalıcı hale gelmiş preparatlarda her bir bireyde her bir doz için 1000 binükleat hücre olmak üzere her bir doz için toplam 4000 binükleat hücre incelenmiş ve mikronükleus frekansları belirlenmiştir.

3.3. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda deney gruplarının mitotik indekslerinde, mikronükleus frekanslarında ve kromozomal anormalliklerinde kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık olup olmadığının saptanmasında z dağılım testi kullanılmıştır. Doz-etki ilişkisini belirleyebilmek için SPSS.11 programı kullanılmıştır.

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. (IV-b)'ın İnsan Periferik Kan Lenfositlerindeki Genotoksik Ekileri

Test bileşiminin (IV-b) genotoksik potansiyelini değerlendirmek amacıyla *in vitro* insan periferik kan lenfositlerinde CA ve MN testleri uygulanmış sitotoksik potansiyelin değerlendirilmesi için mitotik indeks (MI) incelenmiştir.

4.1.1. Kromozomal anormallik (CA) testinin bulguları

Yeni sentezlenen β -laktam türevi test maddesi IV-b ile yapılan kromozomal anormallik testi sonucunda gözlenen kromozomal anormallik tipleri ve analiz sonucunda elde edilen anormal hücre %'si, kromozomal anormallik/hücre sayısı ve mitotik indeksler Tablo 4.1.'de gösterilmiştir. Test maddesi (IV-b) ile 24 ve 48 saatlik *in vitro* uygulamalarda her doz için toplamda 400 metafaz plağı incelenmiş ve üç tip yapısal anormalliğe sebep olduğu görülmüştür. Bu anormallikler kromatit ve kromozom kırıkları ve fragmentlerdir. Gözlenen bu anormallikler Şekil 4.1-4.6'da gösterilmiştir. Her iki uygulama süresinde de en sık görülen anormallik tipi kromatit kırıkları iken bunu fragment takip etmiştir. Kromozom kırıkları en az gözlenen anormallik tipidir.

Tablo 4.1. IV-b'nin 24 ve 48 saat uygulaması ile insan periferik lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallik frekansları ve mitotik indeksler

| Test maddesi | Uygulama | | Anormallikler | | | | | | Anormal hücre ± SH (%) | KA/Hücre ± SH | Mİ ± SH (%) |
|-----------------|----------------|--------------------|---------------|-----|----|-----|----|-----------|---------------------------|-------------------|-----------------|
| | Süre (saat) | Doz (µg/ ml) | Ktk | kzk | f | kkb | h | ds | | | |
| Kontrol | 24 | 0,00 | 5 | 2 | 1 | - | - | - | 1,75±0,66 | 0,020±0,007 | 7,09±0,23 |
| Çözücü Kontrol | 24 | 10 µl | 10 | 2 | 2 | - | - | - | 3,50±0,92 | 0,035±0,009 | 6,28±0,22 |
| Pozitif Kontrol | 24 | 0,20 | 113 | 29 | 15 | 1 | 10 | 2 | 29,00±2,27 | 0,425±0,025 | 3,27±0,16 |
| IV-b | 24 | 3,75 | 5 | 2 | 3 | - | - | - | 2,50±0,78 | 0,025±0,008 | 5,49±0,21***†† |
| | | 7,5 | 11 | 2 | 4 | - | - | - | 4,25±1,01* | 0,043±0,010 | 5,99±0,22*** |
| | | 15 | 12 | 4 | 7 | - | - | - | 5,00±1,09** | 0,058±0,012** | 6,25±0,22** |
| | | 30 | 22 | 7 | 8 | - | - | - | 8,75±1,41***††† | 0,093±0,015***††† | 6,17±0,22** |
| Kontrol | 48 | 0,00 | 4 | 1 | - | - | - | 1,50±0,67 | 0,013±0,006 | 5,70±0,21 | |
| Çözücü Kontrol | 48 | 10µl | 7 | - | 4 | - | - | 2,75±0,82 | 0,028±0,008 | 5,23±0,20 | |
| Pozitif Kontrol | 48 | 0,10 | 74 | 41 | 7 | - | 10 | 1 | 25,75±2,19 | 0,333±0,024 | 2,44±0,14 |
| IV-b | 48 | 3,75 | 4 | 1 | 1 | - | - | - | 1,50±0,67 | 0,015±0,006 | 4,81±0,20** |
| | | 7,5 | 8 | 1 | 3 | - | - | - | 3,00±0,85 | 0,030±0,009 | 3,56±0,17***††† |
| | | 15 | 11 | 5 | 8 | - | - | - | 5,00±1,09** | 0,060±0,012***† | 4,48±0,19***†† |
| | | 30 | 25 | 5 | 11 | - | - | - | 9,25±1,45***††† | 0,103±0,015***††† | 4,75±0,19** |

ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, f: fragment, kkb: kardeş kromatidlerde birleşme, h: haç, ds: disentrik kromozom, e: endoreduplikasyon, p: poliploidi

*Kontrolle göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

**Kontrolle göre $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi)

***Kontrolle göre $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)

†Çözücü kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

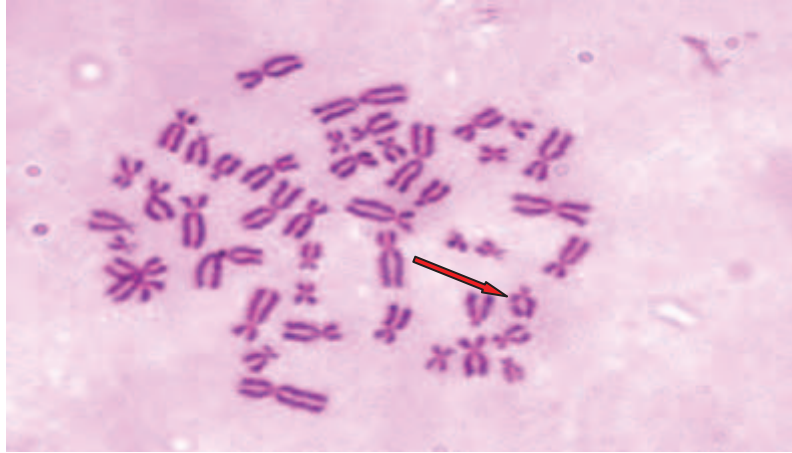
††Çözücü kontrole göre $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi)

†††Çözücü kontrole göre $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)

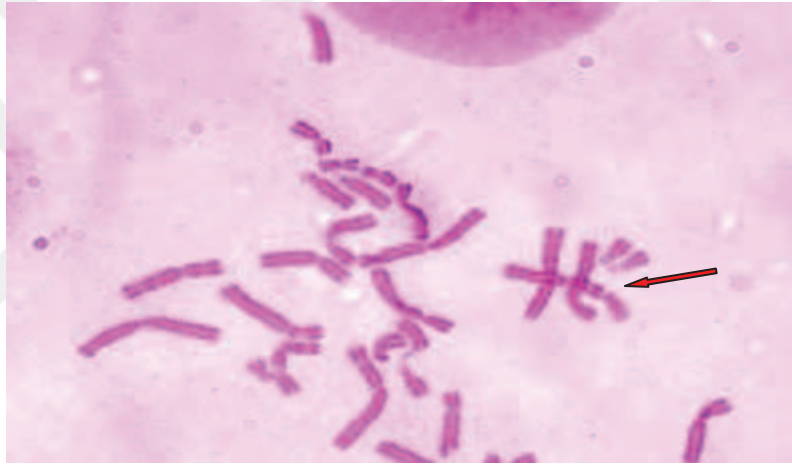
Test maddesi IV-b, hem 24 saat hem de 48 saatlik uygulama periyotlarında anormal hücre yüzdesini doza bağlı olarak arttırmıştır (sırasıyla, $r = 0,99$ ve $r = 00,97$, negatif ve çözücü kontrole göre). 24 saatlik muameledeki bu artış, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında en düşük konsantrasyon hariç diğer uygulama konsantrasyonlarında (30, 15, 7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Çözücü kontrol ile kıyaslandığında ise test maddesinin anormal hücre yüzdesini sadece en yüksek uygulama konsantrasyonunda (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) anlamlı bir şekilde arttırdığı gözlenmiştir. 48 saatlik uygulamada bu artış, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında en yüksek iki uygulama konsantrasyonunda (30, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, çözücü kontrolü ile karşılaştırıldığında; 24 saatlik muamele ile aynı olduğu görülmüştür.

Tablo 4.1.'deki sonuçlara göre test maddesi, 24 ve 48 saatlik muamele periyotlarında doza bağlı bir şekilde hücre başına düşen kromozomal anormallik sayısını (sırasıyla, $r = 0,99$ ve $r = 00,97$, negatif ve çözücü kontrole göre) arttırmıştır. Bu artışlar, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında en yüksek iki uygulama konsantrasyonunda (30, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Çözücü kontrolle kıyaslandığında ise, 24 saatlik uygulamada en yüksek uygulama konsantrasyonunda (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 48 saatlik uygulamada ise en yüksek iki uygulama konsantrasyonunda (30, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Test maddesi, 24 ve 48 saatlik muamele periyotlarında, negatif kontrole göre tüm uygulama konsantrasyonlarında mitotik indeksi anlamlı bir şekilde azaltmıştır. Bununla birlikte, çözücü kontrol ile kıyaslandığında, test maddesi 24 saatlik uygulamada 3,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik konsantrasyonda, 48 saatlik uygulamada 15 ve 7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik konsantrasyonlarda mitotik indeksi anlamlı şekilde düşürmüştür. Bu düşüşler, her iki uygulama süresinde de doza bağlı değildir (sırasıyla, $r = -0,16$ ve $r = -0,21$; $r = 0,31$ ve $r = -0,08$; 24 saat, 48 saat, negatif ve çözücü kontrol).



Şekil 4.1. 24 saat IV-b test maddesi ile muamele sonucunda oluşan kromatit kırığı



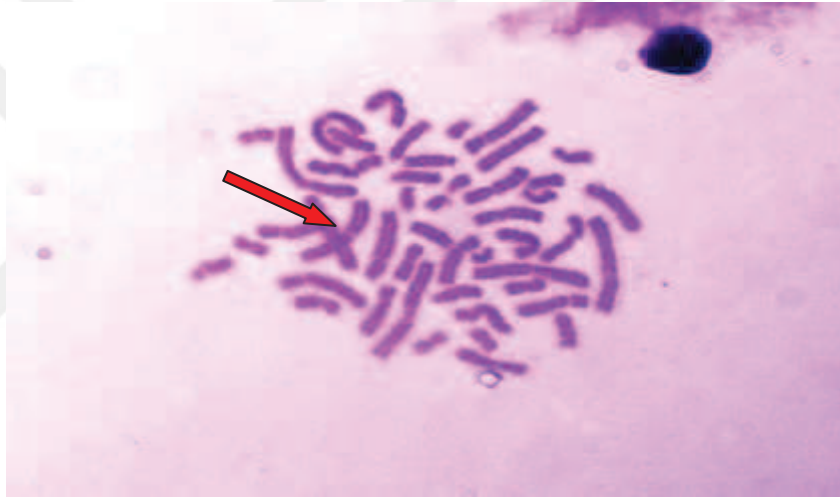
Şekil 4.2. 24 saat IV-b test maddesi ile muamele sonucunda oluşan kromozom kırığı



Şekil 4.3. 24 saat IV-b test maddesi ile muamele sonucunda oluşan fragment



Şekil 4.4. 48 saat IV-b test maddesi ile muamele sonucunda oluşan kromatit kırığı



Şekil 4.5. 48 saat IV-b test maddesi ile muamele sonucunda oluşan kromozom kırığı



Şekil 4.6. 48 saat IV-b test maddesi ile muamele sonucunda oluşan fragment

4.1.2. Mikronükleus (MN) testinin bulguları

Yeni sentezlenen β -laktam türevi olan test maddesi IV-b ile mikronükleus testi yapılmış ve toplamda 4 bireyde 4000 binükleat hücre incelenmiştir. Hücre başına düşen MN sayıları ile MN frekansları tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.2.'de verilmiş olup mikronükleus içeren binükleat hücreler Şekil 4.7. ve 4.8.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Yeni sentezlenen β -laktam türevinin (IV-b) insan lenfositlerinde oluşturduğu mikronükleus frekansları

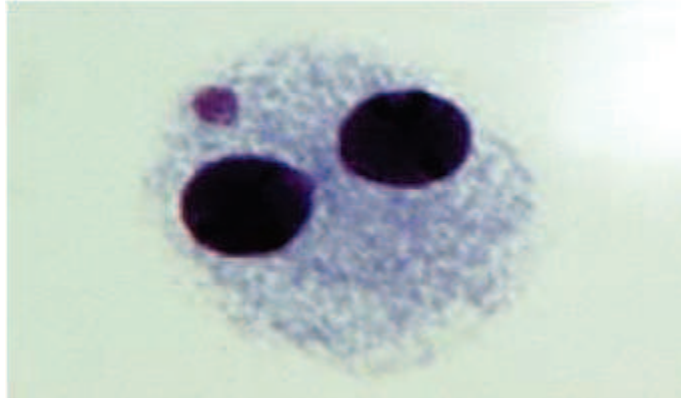
| Test maddesi | Uygulama | | Sayılan binükleat hücre sayısı | BN hücreler içinde mikronükleus frekansları | | | MN \pm SH (%) |
|-----------------|-------------|-------------------|--------------------------------|---------------------------------------------|-----|-----|---------------------|
| | Süre (saat) | Doz (μ g/ml) | | (1) | (2) | (3) | |
| Negatif Kontrol | 48 | 0,00 | 4000 | 4 | 1 | - | 0,150 \pm 0,055 |
| Çözücü kontrol | 48 | 0,10 | 4000 | 2 | - | - | 0,050 \pm 0,035 |
| Pozitif kontrol | 48 | 0,20 | 4000 | 164 | 5 | 1 | 4,425 \pm 0,318 |
| IV-b | | 3,75 | 4000 | 2 | - | - | 0,050 \pm 0,035 |
| | | 7,5 | 4000 | 10 | - | - | 0,250 \pm 0,079† |
| | | 15 | 4000 | 10 | - | - | 0,250 \pm 0,079† |
| | | 30 | 4000 | 12 | 1 | - | 0,350 \pm 0,089†† |

SH: Standart Hata.

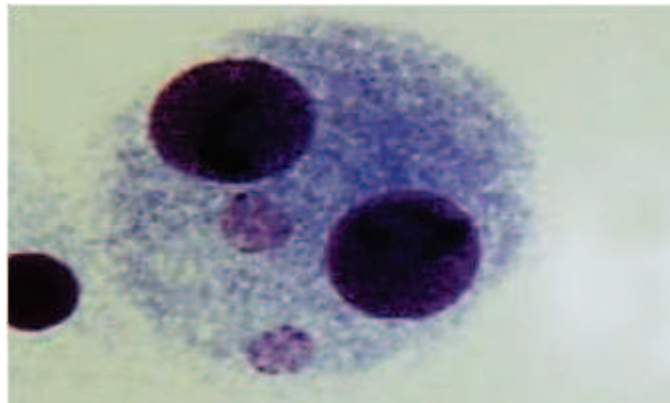
†Çözücü kontrole göre anlamlı fark vardır. ($p < 0,05$).

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

Muhtemel klastojenik ve/veya aneujenik etkileri değerlendirmek için sitokinez bloklama ile gerçekleştirilen MN testinin Tablo 4.2.'de sunulan sonuçlarına göre; test maddesi (IV-b)'nin MN frekansını arttırdığını ancak bu artışlar negatif kontrol ile karşılaştırıldığında, mikronükleus frekansında anlamlı bir farklılığın olmadığı görülmüştür. Çözücü kontrol ile karşılaştırıldığında ise en düşük konsantrasyon (3,75 μ g/mL) hariç tüm konsantrasyonlarda test maddesinin mikronükleus frekansını anlamlı ölçüde arttırdığı görülmüştür. Bununla birlikte, bu artışlar doza bağlı olarak gerçekleşmiştir (sırasıyla, $r = 0,83$ ve $r = 0,88$; negatif ve çözücü kontrol).



Şekil 4.7. Bir mikronükleuslu binükleat hücre



Şekil 4.8. İki mikronükleuslu binükleat hücre

BÖLÜM 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yeni farmasötik hammaddelerin biyolojik aktivitelerini (örn: enzim inhibisyonu) tespit etmek, bunları ilaç adayları olarak önermek için yeterli değildir. Kemoterapi de dahil hastalıkların iyileştirilmesinde, sağlık riski oluşturmadan hastaları tedavi etmek önemlidir ve ilaçların güvenliği, etkinliklerinden daha elzemdir. Bu bağlamda, farmasötik hammadde olarak sunulması amaçlanan kimyasal maddeler, insana uygulanmadan önce kapsamlı toksikolojik incelemelere tabi tutulmalıdır. Toksikolojik araştırmaların bir aşaması olan genotoksisite araştırmalarında, farmasötik adayların genetik materyal üzerindeki olası zararları değerlendirilmektedir. Bu amaçla, *in vivo* veya *in vitro* koşullarda kısa süreli genotoksisite testleri kullanılır. Genotoksik ajanların neden olduğu DNA hasarları ciddi sağlık sorunlarına yol açabileceğinden, ilaç geliştirme sürecinin başlangıcında genotoksisite testlerinin uygulanması çok önemli bir ilkedir (Şen, 2018). Bu çalışma, kullanılan test maddesinin, karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerini inhibe etme kabiliyeti nedeniyle farmasötik bir hammadde olma potansiyeline sahip bir bileşik olduğundan, genotoksik potansiyelinin araştırılması amacıyla yapılmıştır.

Kimyasal maddelerin genotoksisitesinin değerlendirilmesi için en yaygın kullanılan test sistemleri kromozomal anormallik (CA) ve mikronükleus (MN) test sistemleridir. Bu sitogenetik yöntemlerle yapısal veya sayısal kromozom anormallikleri belirlenebilir (Albertini ve ark., 2000). Birçok bilimsel çalışmada, tek bir genotoksisite testinin kullanılmasının sadece genotoksik etkileri tespit etmek için yeterli olmadığı bildirilmiştir. Çünkü genotoksisite çeşitli mekanizmalarla oluşturulabilir ve farklı yöntemlerle yapılan testlerin uygulanması veya farklı organizmalarda uygulanması farklı sonuçlar elde edilmesine sebep olabilir (Au, 2007; Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011). Bu nedenle, bu çalışmada yeni sentezlenen karbonik anhidraz inhibitörü olan ve ftalazin içerikli β -laktam türevinin genotoksik

potansiyellerini belirlemek için iki test sistemini birden (CA ve MN testi) kullanılmıştır.

Bu test sistemlerinde genotoksik ajanları tanımlamak için en çok tercih edilen model hücreler lenfositlerdir. Lenfositler uzun ömürlü ve tüm vücudu dolaşan hücrelerdir. Böylece, herhangi bir dokuya/organa zarar verebilecek çevresel toksik ajanlardan etkilenebilirler (Beceran, 2011). Farklı dokularda kromozomal hasar oluşum mekanizmaları benzer olduğundan, lenfositlerdeki hasar seviyeleri, kansere eğilimli dokulardaki hasar seviyelerini yansıtır. Bunun için, genotoksisiteyi veya kanser riskini belirlemek amacıyla lenfositlerdeki DNA hasarlarını baz alıp değerlendirmek uygundur (Albertini, 2003; Bonassi ve ark., 2000; Norppa ve ark., 2006). Bu sebeple bu çalışmada da insan periferik kan lenfositleri kullanılarak CA ve MN testlerini gerçekleştirilmiştir.

Literatürde, Cloxacillin, Ampicillin, Amoxicillin, Carbenicillin, Seftriakson, Sefalosporin gibi antibakteriyelleri içeren β -laktam halkasının genotoksik değerlendirilmesi için CA testi kullanılarak yapılan birçok çalışma vardır. Bu çalışmaların çoğunda, sadece orta ve çok yüksek β -laktam konsantrasyonlarında görülen pozitif *in vitro* etkiler bildirilmiştir (İstifli ve Topaktaş, 2010). Oysaki yapılan bu çalışmada düşük konsantrasyonlar uygulanmış ve bunun etkileri belirlenmiştir.

Zavarise ve ark. (1984), farklı konsantrasyonlarda Cloxacillin'e maruz kalan lenfosit kültürlerindeki kromozom anormalliklerini araştırmışlardır. Araştırmacılar, uygulamalarının yüksek konsantrasyonlarında Cloxacillin insan lenfosit kültürlerinde kromozomal aberasyonlara neden olduğunu açıklamışlardır. Bununla birlikte, terapötik seviyelere benzer konsantrasyonlar insan lenfosit kültürlerinin DNA'sına etki etmemiştir. Stemp ve ark. (1989), kültüre alınmış insan lenfositleri kullanarak üç β -laktam antibiyotiğin (Ampisilin, Karbenisilin ve Penisilin VK) *in vitro* klastojenik potansiyelini araştırmışlardır. Araştırma sonucuna göre, Ampisilin ve Carbenicillin test konsantrasyonları 10 $\mu\text{g/mL}$ 'ye kadar kromozom hasarında önemli artışlara neden olmamıştır. Diğer taraftan, *in vitro* Penicillin VK'nin 1,25 $\mu\text{g/mL}$ 'ye kadar olan

konsantrasyonları, kromozom ve kromatid gapları ve kırılmaları ile doza bağılı bir artışa neden olmuştur. Jaju ve ark. (1984), insan lenfositlerinde ampisilin ve karbenisilin *in vitro* genotoksik etkilerini araştırmışlardır. Bu ilaçlar, 72 saatlik kültür periyodu boyunca çeşitli konsantrasyonlarda ve zamanlarda eklenmiştir. Her iki ilaç da plazma seviyesindeki konsantrasyonlarda kromozom sapmaları, mitotik indeks ve hücre döngüsü hızını etkilememiş ancak tüm bu parametreler daha yüksek konsantrasyonlardan etkilenmiştir. Metovic ve ark. (2013) standart CA testi ile 48 saatlik insan periferik kan lenfosit kültüründe Seftriakson genotoksitesini analiz etmişlerdir. Lenfosit kültüründe artan seftriakson konsantrasyonları ile kromozomal aberasyonların sıklığı artmıştır. Yapısal aberasyonların sıklığı ve seftriakson konsantrasyonları arasında pozitif bir korelasyon gözlenmiştir. Lenfosit kültürlerinde farklı konsantrasyonlarda (0,15, 0,25, 0,50 mg/mL) seftriakson ile *in vitro* muameleden sonra 0,25 mg/mL ve 0,50 mg/mL konsantrasyonlarında sayısal ve yapısal aberasyonlar tespit edilmiş fakat bu farklılıklar kontrol grubuna kıyasla anlamlı bulunmamıştır. Bizim çalışmamızda ise negatif kontrole göre her iki uygulama süresinde de en yüksek iki konsantrasyonda anlamlı artışlar gözlenmiş, ayrıca 24 saatlik uygulamada 7,5 µg/mL'lik konsantrasyonda da anlamlı bir artış gözlenmiştir. Çalışmamızın her iki uygulama süresinde de en çok görülen anormallik tipi kromatid kırığıdır. Test maddesinin, bölünmenin S fazının sonlarına ya da G fazına etki ederek bu anormalliğe neden olabileceği düşünülmektedir (Natarajan, 2002). Yine her iki uygulamada da kromatid kırığından sonra en sık gözlenen bir diğer anormallik tipi olan kromozom kırığı, kromozomun her iki kolunda da tamir edilememiş olan bozukluğu ifade ederken, çalışmamızda gözlenen fragmentlerin ise kromozom veya kromatidlerde meydana gelen delesyonlar sonucunda oluştuğu düşünülmektedir (Yılmaz ve ark., 2008).

Donya (2002), iki Sefalosporin antibiyotiği olan Cefadroxil ve Cefaclor'un fare spermatoitlerinde kromozomal anormallikleri indüklemeye kabiliyetini araştırmıştır. Erkek İsviçre fareleri, 40, 80, 160 mg/kg'lık dozlarla tek doz gavaj yoluyla muamele edilmiştir. Diyakinez-metafaz I spermatoitlerde kromozomal aberasyonların yüzdesi doza bağılı olarak artmış, yüksek ve tekrarlı dozlardan sonra istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Spermatoitlerle yapılan bir diğer çalışmada ise Fahmy ve ark.

(2009), fare spermatoitlerinde Cefotaxime'nin (Sefalosporin türevi) genotoksik etkisini kromozomal aberasyon testi kullanarak değerlendirmiştir. Farelere, 4, 7 ve 10 gün boyunca günlük 260, 520 ve 1040 mg/kg'lık dozlarda Cefotaxime enjekte edilmiştir. Daha sonra, farelerin primer spermatoitlerinde kromozomal aberasyonlar belirlenmiştir. 520 ve 1040 mg/kg'lık Cefotaxime ile muamele edilen farelerin spermatoitlerinde yapısal ve sayısal kromozomal aberasyonların yüzdesinde anlamlı artışlar gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda, yukarıdaki araştırmalarda anlamlı anormalliklerin bulunduğu dozlardan daha düşük konsantrasyonlarda anlamlı anormallikler tespit edilmiştir. Bunun temel nedeni, bu araştırmaların *in vivo*, bizim çalışmamızın ise *in vitro* şartlarda yapılmasından kaynaklanıyor olabilir.

Literatürde, MN testi kullanılarak β -laktam içeren antimikrobiyallerin genotoksitesini hakkında da çalışmalar mevcuttur. Stemp ve ark. (1989), *in vivo* sıçan mikronükleus testi kullanılarak üç β -laktam antibiyotiğin (Ampisilin, Karbenisilin ve Penisilin VK) klastojenik potansiyelini araştırmıştır. Ampisilin ve Karbenisilin'in, *in vivo* sıçan mikronükleus testinde, tek veya çift dozlama rejimleri (Ampisilin 5 g/kg oral olarak; Karbenisilin 500 mg/kg i.m., ya kemik iliği preparatından 30 saat önce tek doz ya da 48 saat ve 24 saat önce iki doz uygulama) kullanılmış olup anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Isitifli ve Topaktaş (2010), insan periferik kan lenfositlerinde SCE, CA ve MN testleri ile 400, 600, 800, 1000 μ g/mL Amoksisilin genotoksitesini metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda değerlendirmiştir. Amoksisilin, hem metabolik aktivatörün varlığında hem de yokluğunda CA'ları ve MN oluşumunu indüklememiş ve buna ek olarak Amoxicillin ile 24 saat muamele edilmiş kültürlerde, mitotik indeksin negatif kontrol ile karşılaştırıldığında azalmadığı belirtilmiştir, ancak araştırmacılar bu çalışmada çözücü kontrolü ile bir karşılaştırma yapmamışlardır. Anlas ve ark. (2016), gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) eritrositlerinde Amoksisilin'in genotoksitesini araştırmışlardır. Amoksisilin'in 80 ve 160 mg/kg'lık konsantrasyonları *Oncorhynchus mykiss* eritrositlerinde genotoksik etkilere neden olmadığı görülmüştür. Yaptığımız bu çalışmada, MN frekanslarının, en düşük konsantrasyon haricinde, çözücü kontrolü ile karşılaştırıldığında, önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, sitotoksitenin değerlendirilmesi için kullanılan bir parametre olan mitotik indeks (MI) bakımından

test maddesinin tüm uygulama süreleri (24 ve 48 saat) ve konsantrasyonlarındaki negatif kontrol ile karşılaştırıldığında mitotik indeksi önemli ölçüde azalttığını gözlemledik. Bu azalmalar her iki uygulama süresinde de doza bağlı değildir. Test maddesinin sitotoksik etkisinin hücre bölünmesindeki G2 evresini engelleyerek gerçekleşebileceği düşünülmektedir (Van't Hof, 1968). Zira DNA polimeraz enzimi gibi hücre bölünmesinde etkili enzimlerin yapısının bozulmasına veya ATP seviyesinin düşmesi bu etkinin gerçekleşmesine neden olabilir (Epel, 1963). Bununla birlikte, çözücü kontrol ile karşılaştırıldığında, tüm grupların mitotik indeksinde önemli bir azalma olmadığını gözlemledik.

Yapılan literatür incelemelerinde, ftalazin türevlerinin genotoksisitesi hakkında herhangi bir araştırma bulunamazken birkaç ftalazin türevinin sitotoksisitesi hakkında birçok araştırma mevcut olup, bu araştırmaların kanser hücre hatları üzerinde yapıldığı görülmüştür (Rodríguez-Ciria ve ark., 2003; Kim ve ark., 2008; Zhai ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2010; Xu ve ark., 2014). Kim ve ark. (2004), bir dizi ftalazin türevini sentezlemiş ve birkaç insan tümör hücre hattına karşı *in vitro* sitotoksisitesini değerlendirmişlerdir. Test edilen bileşiklerin çoğu, referans bileşiklerden daha yüksek potansiyel sitotoksik aktivite göstermiştir. Arif ve ark. (2006) insan meme kanseri hücre hatlarında bakır ve platin kompleksleri dahil yeni sentezlenmiş ftalazin türevlerinin sitotoksisitesini değerlendirmişlerdir. Hücreler, 72 saat boyunca bileşikler (100 µM) ile inkübe edilmiş, sitotoksisite, apoptoz ve DNA içeriği, akış sitometrisi ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlarda, ebeveyn (H1-2), bakır (C1-2) ve platin (P1-2)'den türevlendirilmiş bileşiklerin, hem insan meme kanseri hücre hatlarında, hem de apoptoz ve hücre ölümünü indüklemeye nispeten daha aktif olduğunu göstermiştir. Daha hassas olan MDA-MB-231 hücrelerinde % 40 apoptozise neden olan H-5 hariç diğer bileşikler bu parametrelere karşı ya zayıf ya da hiç tepki göstermemiştir.

Literatürde, β-laktam antibiyotiklerin sitotoksik olduğunu gösteren araştırmalar da vardır. Marie ve ark. (1986), Piperracilin, Cefprozidime ve Ceftriaxone ve Mezlocilin'in *in vitro* granülositler üzerinde antiproliferatif etkilerini göstermiştir. Neftel ve Hübscher (1987), kültüre alınmış sıçan karaciğeri, insan fibroblast ve insan

lenfoid hücrelerinde β -laktam antibiyotiklerin antiproliferatif etkilerini vurgulamıştır. Bizim çalışmamızda da β -laktam türevi test maddesinin *in vitro* periferik insan lenfositlerinde kullandığımız konsantrasyonların sitotoksik olduğunu gözlemledik.

Sonuç olarak, incelenen literatür ve elde edilen tüm sonuçlar, bu bileşiğin periferik insan lenfositleri kültüründe özellikle yüksek konsantrasyonlarda genotoksik ve sitotoksik etkiler gösterebileceğine yönelik veriler sağlamaktadır. Dolayısıyla, bu yeni sentezlenen β -laktam türevi bileşiğin daha güvenli farmasötik üretimi için geniş kapsamlı *in vitro* ve *in vivo* genotoksisite çalışmalarının yapılmasının gerektiğini söyleyebiliriz. Yapılacak yeni çalışmalarla bu bileşiğin sitotoksik ve genotoksik profili tam olarak tanımlanmalı ve elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

- Aardema, J.M., Kirsch-Volders, M., 2001. The *in vitro* micronucleus assay. In Choy WN, eds. Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment. New York. Marcel Dekker, 163-86.
- Abd El-Ghaffar, N.F., Mohamed, M.A., Ghanem, H.M., Zaki, H.M., 2011. Synthesis and biochemical evaluation of some substituted phthalazines, Journal of American Science, 7(4): 771-781.
- Aggarwal, M., Kondeti, B., McKenna, R., 2013. Anticonvulsant/antiepileptic carbonic anhydrase inhibitors: a patent review. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 23(6): 717-724.
- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, Mutation Research, 463(2): 111-172.
- Albertini, R.J., 2003. Mechanistic insights from biomarker studies: somatic mutations and rodent/human comparisons following exposure to a potential carcinogen, IARC Scientific Publication, 157: 153-177.
- Anlas, C., Ustuner, O., 2016. Genotoxic assessment of amoxicillin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by comet assay and micronucleus test, Fresenius Environmental Bulletin, 25(12): 5358-5364.
- Anzelotti, A.I., Farrel, N.P., 2008. Zinc metalloproteins as medicinal targets. Chemical Society Reviews, 37(8): 1629-1651.
- Aoyama, Y., Uenaka, M., Kii, M., Tanaka, M., Konoike, T., 2001. Design, synthesis and pharmacological evaluation of 3-benzylazetidone-based human chymase inhibitors, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 9(11): 3065-3075.
- Archibald, L., Phillips, L., Monnet, D., McGowan, J.E., Tenover, F., Gaynes, R., 1997. Antimicrobial resistance in isolates from inpatients and outpatients in the United States: increasing importance of the intensive care unit. Clinical Infectious Diseases, 24: 211-215.
- Arif, J.M., Kunhi, M., Bekhit, A.A., Subramanian, M. P., El-Hüseyin, K., 2006. Evaluation of apoptosis-induction by newly synthesized phthalazine derivatives in breast cancer cell lines, Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 7(2): 249-252.

- Au, W.W., 2007. Usefulness of biomarkers in population studies: From exposure to susceptibility and to prediction of cancer, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210(3): 239-246.
- Barrios, I.A., Brunu, I.A., Estiu, G.L., 2002. Pharmacophoric pattern of antiepileptic sulfonamides and sulfamates. Theoretical study of the associated requirements, *Journal of Molecular Structure (Theochem.)*, 580(1): 243-250.
- Beceran, A., 2011. Investigation of DNA damages in patients with colorectal cancer and their first degree relatives, *Journal of Marmara University Institute of Health Sciences*, 1: 155- 161.
- Berber A.A., Celik M., Aksoy H., 2014. Genotoxicity evaluation of HMG CoA reductase inhibitor rosuvastatin, *Drug And Chemical Toxicology*, 37: 316-321.
- Berber, N., Arslan, M., Bilen, Ç., Sackes, Z., Gençer, N., 2015. Synthesis and evaluation of new phthalazine substituted β -lactam derivatives as carbonic anhydrase inhibitors, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 41(4): 414-420.
- Bisacchi, G.S., Slusarchyk, W.A., Bolton, S.A., Hartl, K.S., Jacobs, G., 2004. Synthesis of potent and highly selective nonguanidine azetidinone inhibitors of human tryptase, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14(9): 2227-2231.
- Bonassi, S., Hagmar, L., Strömberg, U., Montagud, A.H., Tinneberg, H., 2000. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens, *Cancer Research*, 60(6): 1619-1625.
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W.P., Holland, N., 2007. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28(3): 625-631.
- Bradford, P.A., 2001. Extended Spectrum beta-lactamases in the 21st Century. Characterization, Epidemiology and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, s : 45-54.
- Brambilla, G., Mattioli, F., Rbiano, L., Martelli, A., 2012. Update carcinogenicity studies in animals and humans of 535 marketed pharmaceuticals. *Mutation Research*, 750(1): 1-51.
- Brusick D., 1987. Screening Chemicals for Genotoxic Properties. In: *Principles of Genetic Toxicology*, Springer US, 79-120.
- Bush, K., Jacoby, G. A., Medeiros, A. A., A., 1995. Functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, 39: 1211-33.
- Cainelli, G., Galletti, P., Garbisa, S., Giacomini, D., Sartor, L., 2003. 4-Alkylidene-azetidin-2-ones: novel inhibitors of leukocyte elastase and gelatinase, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11(24): 5391-5399.

- Campos-Toimil, M., Verde, I., Gil-Longo J., Fdez-Grandal, D., Orallo, F., 1994; Influence of CaCl_2 concentration and hydralazine on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx in isolated aorta of normotensive (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 72 (1):183.
- Carling, R.W., Moore K.W., McKernan, R.M., Sohal, B., Cook, S., 2004. Synthesis and biological evaluation of 3-heterocyclyl-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolo[3,4-*a*]phthalazines and analogues as subtype-selective inverse agonists for the $\text{GABA}_A\alpha 5$ benzodiazepine binding site. *Journal of Medicinal Chemistry*. 47: 3642-3657.
- Chambers, H. F. Penicillins. In: Mandell, G. L., Bennett, J. E., Dolin, R., 2005. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Sixth edition, Pennsylvania: Elsevier Churchill Livingstone Inc., pp. 281-93.
- Chen, C.C., Herzberg, O., 1992. Inhibition of beta-lactamase by clavulanate. Trapped intermediates in cryocrystallographic studies. *Journal of Molecular Biology*, 224: 1103-1113.
- Cheng, M.T.J., Christiani, D.C., Xu, X., Wain, J.C., Wiencke, J.K., Kelsey, K.T., 1996. Increased micronucleus frequency in lymphocytes from smokers with lung cancer. *Mutation Research*, 349(1): 43-50.
- Choy W.N. 2001. *Genetic toxicology and cancer risk assessment*. New York: Marcel Dekker, 163-86.
- Çetin, E. T., 1986. Beta-laktam antibiyotikler. *Kükem Derg.* 9:104-112.
- Davis, J.L., Mayer M.J., Josien H.B., 2013. Phthalazine-containing antidiabetic compounds, U.S. Patent No. 8,575,166.
- De Simone, G., Alterio, V., Supuran, C.T., 2013. Exploiting the hydrophobic and hydrophilic binding sites for designing carbonic anhydrase inhibitors, *Expert Opinion on Drug Discovery*, 8(7): 793-810.
- Demirayak, S., Karaburun, A.C., Kayagil, I., Erol, K., Sırmagül, B., 2004. Some pyridazinone and phthalazinone derivatives and their vasodilator activities, *Archives of Pharmacal Research*, 27(1): 13-18.
- Demircigil, C.G., Emerce, E., Ulutaş, O.K., 2009. Genotoxicity tests from biomarker studies to the regulations: National perspective. *FABAD Journal of Pharmaceutical Science*, 34(4): 217-232.
- Demirel, S., Zamani, A., 2002. MN tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi*; 12(3): 123-7.

- Dogan, N., Nihan B.D., 2017. İlaçların ve kozmetik ürünlerin geliştirilme süreçleri ve doğa üzerindeki etkileri içinde: *Biyolojide Özel Konular Editör(ler) : Fikriye Polat*, 4.Baskı, Pegem Akademi Yayıncılık. 178-202. DOI: 10.14527/9786053189596.08. Erişim adresi: kisi.deu.edu.tr/bulent.cavas/ders/bok5.pdf. Erişim tarihi 22.04.2019.
- Dogruer, D.S., Kupeli, E., Yesilada, E., Sahin, M. F., 2004. Synthesis of New 2-[1 (2H)-Phthalazinon-2-yl] acetamide and 3-[1 (2H)-Phthalazinon-2-yl] propanamide derivatives as antinociceptive and anti-inflammatory agents, *Archiv der Pharmazie*, 337(6): 303-310.
- Donya, S.M., 2002. Cytogenetic studies of some cephalosporines antibiotics on mouse germinal cells, *Cytologia*, 67(1): 33-39.
- Ekinci, D., 2008. Fare genomunda bulunan karbonik anhidraz ve karboksilaz enzim genlerinin c DNA' larının üretilmesi, antisens m RNA sentezi ve in sitü hibridizasyonu ile gen ekspresyon analizi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Epel, D., 1963. The effects of carbon monoxide inhibition of ATP level and the date of mitosis in sea urching egg, *The Journal of Cell Biology*, 17(2): 315-319.
- Fahmy, M.A., Diab, K.A., 2009. In vivo genotoxicity studies of cefotaxime, *Cytologia*, 74(4): 417-425.
- Fenech, M., Holland, N., Chang, W.P., Zeiger, E., Bonassi, S., 1999. The human micronucleus Project-an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research*, 428(1): 271-283.
- Ginzkey, C., Steussloff, G., Koehler, C., 2014. Nicotine derived genotoxic effects in human primary parotid gland cells as assessed in vitro by comet assay, cytokinesis-block micronucleus test and chromosome aberrations test. *Toxicology*, 28(5): 838-846.
- Goel, R.K., Mahajan, M.P., Kulkarni, S.K., 2004. Evaluation of antihyperglycemic activity of some novel monocyclic beta lactams, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(1): 80-83.
- Goelab, R.K., Singha, A., Naidua, P.S., Mahajanb, M.P., Kulkarnia, S.K., 2005. PASS assisted search and evaluation of some azetid-2-ones as CNS active agents, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(2): 182-189.
- Grasso, S., De Sarro, G., De Sarro, A., Micale, N., Zappala, M., 2000. Synthesis and anticonvulsant activity of novel and potent 6,7-methylenedioxyphthalazin-1(2H)-ones, *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(15): 2851-2859.

- Guillon, C.D., Koppel, G.A., Brownstein, M.J., Chaney, M.O., Ferris, C.F., 2007. Azetidiones as vasopressin V1a antagonists, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(5): 2054-2080.
- Gutmann, L., Kitsiz, M. D., Billot-Klein, D., Goldstein, F., Tran Van Nhieu, G., 1988. Plasmid Mediated Beta-Lactamase (TEM-7) Involved in Resistance Ceftazidime and Aztreonam, *Reviews of Infectious Diseases*, 10: 860-866.
- Gümüş, M., 2008. Yeni karbonik anhidraz inhibitörleri sentezi ve in vitro inhibitör aktivitelerinin incelenmesi. Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Gür, D., Tutar, İ., Vardar Ünlü G., 2001. "İsepamisin Hastane İzolatı Gram Negatif Bakterilere Karşı İn vitro Etkisi" *Hastane Enfeksiyon Dergisi*, 5(1): 19.
- Han, W.T., Trehan, A.K., Wright, J.J.K., Federici, M.E., Seiler, S.M., 1995. Azetidin-2-one derivatives as inhibitors of thrombin, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 3(8): 1123-1143.
- Hagmar, L., Brogger, A., Hansteen, I.L., Heim, S., Högstedt, B., 1994. Cancer risk in human predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage, *American Association for Cancer Research*, 54(11): 2919- 2922
- Imamura, Y., Noda, A., Imamura, T., Ono, Y., Okawara, T., Noda, H., 2003. A novel methylthio metabolite of *s*-triazolo[3,4-*a*]phthalazine, a lead compound for the development of antianxiety drugs, in rats. *Life Sciences*, 74: 29-36.
- Ito, S., Yamaguchi, K., Komoda, Y., 1992. Structural confirmation of the nitration product of the 1(2H)-phthalazinone as the 2-nitro-1(2H)-phthalazinone. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 40: 3327-3329.
- Itokazu, G. S., Quinn, J. P., Bell-Dixon, C., Kahan, F. M., Weinstein, R. A., 1996. Antimicrobial resistance rates among aerobic gram-negative bacilli recovered from patients in intensive care units: evaluation of a national postmarketing surveillance program. *Clinical Infectious Diseases*, 23: 779-84.
- İstifli, S. E., Topaktaş, M., 2010. Cytogenetic Genotoxicity of Amoxicillin, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51: 222-228.
- Jaju, M., Ahuja, Y.R., 1984. Evaluation of genotoxicity of ampicillin and carbenicillin on human lymphocytes in vitro: chromosome aberrations, mitotic index, cell cycle kinetics, satellite associations of acrocentric chromosomes and sister chromatid exchanges, *Human Toxicology*, 3(3): 173-191.
- Jayanthi, A., Puranik, V. G., Deshmukh, A. R. A. S., 2004. Synthesis of novel polycyclic β -Laktams from D-glucose via unusual substrate-controlled radical cyclization. *Synlett*, 7: 1249–1212.

- Ji, B.T., Silverman, D.T., Stewart P.A., Blair, A., Swanson, G.M., 2001. Occupational exposure to pesticides and pancreatic cancer. *American Journal of Industrial Medicine*, 39(1): 92-99.
- Katritky, A.R., Barton D., Ollis W.D., 1979. *Comprehensive organic chemistry*. Pergamon Press-Oxford Journal, 4: 85.
- Kazi, A., Hill, R., Long, T.E., Kuhn, D.J., Turos, E., 2004. Novel N-thiolated β -lactam antibiotics selectively induce apoptosis in human tumor and transformed, but not normal or nontransformed cells, *Biochemical Pharmacology*, 67(2): 365-374.
- Kılıç, A., 2005 itkisel kaynaklı bazı uçucu yağ ve monoterpenlerin olası genotoksik etkilerinin araştırılması. Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Kikuchi, K., Nagano, T., Hayakawa, H., Hirata, Y., Hirobe, M., 1999. Detection of nitric oxide production from a perfused organ by a luminol-hydrogen peroxide system. *Analytical Chemistry*, 22: 5131-5136.
- Kim, J.S., Rhee, H.K., Park, H.J., Lee, S.K., Lee, C.O., 2008. Synthesis of 1-/2-substituted-[1, 2, 3] triazolo [4, 5-g] phthalazine-4, 9-diones and evaluation of their cytotoxicity and topoisomerase II inhibition, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(8): 4545-4550.
- Kim, S., Lee, H.J., Suh, M.E., Choo, H.Y.P., Lee, S.K., 2004. Synthesis and cytotoxicity of 1-substituted 2-methyl-1H-imidazo[4,5-g]phthalazine-4,9-dione derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12: 3683-3686.
- Kirsch-Volders M., Elhajouji A., Cundari E., Van Hummelen P. 1997. The *in vitro* micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutation Research*, 392(1-2): 19-30.
- Konaklieva, M.I., 2002. Beta-lactams as inhibitors of serine enzymes, *Current Medicinal Chemistry Antiinfective Agents*, 1(3): 215-238.
- Korea Patent, 2001. Use of phthalazine derivatives. Korean Intellectual Property Office. 1020017014342.
- Koteva, K.P., Cantin, A.M., Neugebauer, W.A., Escher, E., 2001. Synthesis and evaluation of novel β -lactam inhibitors of human leukocyte elastase, *Canadian Journal of Chemistry*, 79(4): 377-387.
- Kumar, A., Rajput, C.S., 2009. Synthesis and anti-inflammatory activity of newer quinazolin-4-one derivatives, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(1): 83-90.

- Küçükgül, S.G., Rollas, S., Erdeniz, H., Kiraz, M., 1999. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of ethyl 2-arylhydrazono-3-oxobutyrate, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 34(2): 153-160.
- Leach, C. A., Hickey, D.M., Ife, R.J., Macphee, C.H., Smith, S.A., 2001. Lipoprotein-associated PLA 2 inhibition—a novel, non-lipid lowering strategy for atherosclerosis therapy, *II Farmaco*, 56(1): 45-50.
- Lee, C.C., 2010. Synthetic Approaches to biologically active sulfonates and sulfonamides. University College London, Chemistry Department, Doctoral Thesis.
- Leppilampi, M., 2006. Functional and immunohistological studies on cancer associated carbonic anhydrase IX. Oulu University, Faculty of Medicine, Department of Clinical Chemistry, Department of Pathology, Ph.D Thesis.
- Marie, J.P., Thevenin, D., Zittoun, R., 1986. *In vitro* inhibition of granulopoiesis by beta-lactam antibiotics, Comparison of piperacillin, mezlocillin, ceftriaxone and ceftazidime, *Presse Medicale*, 15(46): 2358-2361.
- Mehta, P.D., Pathak, A.K., 2011. Antimicrobial activity of novel 4, 4'-bis [3-chloro-4-aryl-azetidino-2-one-1-yl] diphenyl sulphones, *Bulletin of Pharmaceutical Research*, 1(3): 38-48.
- Metovic, A., Mackic-Djurovic, M., Ibrulj, S., 2013. Analysis of chromosome aberrations contained *in vitro* human peripheral blood lymphocytes after treatment with ceftriaxone, *Medical Archives*, 67(4): 228-232.
- Mohanty, A.K., Kannan, K.K., Mahajant, S.K., 1998. Human Carbonic Anhydrase I: Effect of Specific Site Mutations on Its Function. *Journal of Biosciences*, 23(3): 235-146.
- Mondelli, M., Brune, V., Borthagaray, G., Ellena, J., Nascimento, O.R., 2008. New Ni(II)-sulfonamide complexes: Synthesis, structural characterization and antibacterial properties. X-ray diffraction of [Ni(sulfisoxazole)₂(H₂O)₄].2H₂O and [Ni(sulfapyridine)₂]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102(2): 285-292.
- Najataryan, A.T., 2002. Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutation Research*, 504(1): 3-16.
- Napoletano, M., Norcini, G., Pellacini, F., Morazzoni, G., Ferlenga, P., Pradella, L., 2001. Phthalazine PDE4 inhibitors. Part 2: The synthesis and biological evolution of 6-methoxy-1,4-disubstituted derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11:33-37.
- Neftel, K.A., Hübscher, U., 1987. Effects of beta-lactam antibiotics on proliferating eucaryotic cells, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31(11): 1657-1661.

- Nersesyan, A., Kundi, M., Fenech, M., Bolognesi, C., Misik, M., 2014. Micronucleus assay with urine derived cells (UDS): A review of its application in human studies investigating genotoxin exposure and bladder cancer risk. *Mutation Research*, 762: 37-51.
- Nomoto, Y., Obase, H., Takai, H., Teranishi, M., Nakamura, J., 1990. Studies on cardiotoxic agents. II.: synthesis of novel phthalazine and 1, 2, 3-benzotriazine derivatives, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 38(8): 2179-2183.
- Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I.L., Hagmar, L., Strömberg, U., 2006. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk, *Mutation Research*, 600(1): 37-45.
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), 2008. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Health Effects. 4: 471-486.
- Öncül, O., 2002. Akılcı antibiyotik kullanımı ve erişkinde toplumdan edinilmiş enfeksiyonlar sempozyumu antibiyotikler. 1.İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, 31:23-28.
- Padayatti, P. S., Helfand, M. S., Totir, M. A., Carey, M. P., Carey, P. R., 2005. High resolution crystal structures of the trans-enamine intermediates formed by sulbactam and clavulanic acid and E166A SHV-1 {beta}-lactamase. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 34900-34907.
- Parry, J.M., Kirsch-Volders, M., 2010. Special issue on in vitro MN trial. *Mutation Research*, 702(2): 132-134.
- Pastorekova, S., Zatovicova, M., Pastorek, J., 2008. Cancer-associated carbonic anhydrases and their inhibition. *Current Pharmaceutical Design*, 14(7): 685-698.
- Pool, K., 2004. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61: 2200-23.
- Preston, R. J., Skare, J.A., Aardema, M.J., 2010. A review of biomonitoring studies measuring genotoxicity in humans exposed to hair dyes. *Mutagenesis*, 25(1): 17-23.
- Rodriguez-Ciria, M., Sanz, A.M., Yunta, M.J., Gomez-Contreras, F., Navaro, P., 2003. Synthesis and Cytotoxic Activity of N, N-bis-{3-[N-(4-Chlorobenzo [g]-phthalazin-1-yl)] aminopropyl}-N-methylamine: A New Potential DNA Bisintercalator, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11(10): 2143-2148.
- Sabitha G., Srinivas, C., Raghavendar, A., Yadav, J.S., 2010. Phosphomolybdic acid (PMA)-SiO₂ as a heterogeneous solid acid catalyst for the one-pot synthesis of 2*H*-indazolo[1,2-*b*]phthalazine-triones. *Helvetica Chimica Acta*. 93:1375-1379.

- Santovito, A., Cervella, P., Delperio, M., 2014. Increased frequency of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes of radiology technicians chronically exposed to low levels of ionizing radiations. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37(1): 396-403.
- Sari, H., 2005. Karbapenemlere dirençli gram-negatif basil izolatlarında imipenem-EDTA/meropenem-EDTA disk yöntemi ve modifiye hodge testi ile metallo-beta- laktamaz varlığının araştırılması. Uzmanlık Tezi, İstanbul.
- Sayyafi, M., Seyyedhamzeh, M., Khavasi, H. R., Bazgir, A., 2008. One-pot, three-component route to 2H-indazolo [2, 1-b] phthalazine-triones, *Tetrahedron*, 64(10): 2375-2378.
- Scozzafava, A., Owa, T., Mastrolorenzo, A., Supuran, C.T., 2003. Anticancer and antibacterial sulfonamides. *Current Medicinal Chemistry*, 10(11): 925-95.
- Şen S, 2018. Karbonik anhidraz inhibitörü metilenaminobenzen sülfonamid türevlerinin genotoksik profillerinin belirlenmesi. Sakarya Üniversitesi: Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Doktora Tezi.
- Sharma, D., Kumar, D., Bansal, R., 2014. Synthesis of 6-(4-methanesulphonamidophenyl)-substituted dihydropyridazinone/phthalazinone derivatives as potent anti-inflammatory and analgesic agents, *Medical Research Archives*, (1).
- Shaterian, H.R., Ghashang, M., Feyzi, M., 2008. Silica sulfuric acid as an efficient catalyst for the preparation of 2H-indazolo [2, 1-b] phthalazine-triones, *Applied Catalysis A: General*, 345(2): 128-133.
- Simone, G., Fiore, A., Supuran, C.T., 2008. Are carbonic anhydrase inhibitors suitable for obtaining antiobesity drugs?, *Current Pharmaceutical Design*, 14(7): 655-660.
- Sinkkonen, J., Ovcharenko, V., Zelenin, KN., Bezhan, I.P., Chakchir, B.A., 2002. H and ¹³C nmr study of 1-hydrazino-2,3-dihydro-1H-pyrazolo[1,2-a]pyridazine 5,8-diones and -1H-pyrazolo[1,2-b]phthalazine-5,10-diones and their ring-chain tautomerism *European Journal of Organic Chemistry*, 13: 2046-2053.
- Sönmez, M., Berber, İ., Akbaş, E., 2006. Synthesis, antibacterial and antifungal activity of some new pyridazinone metal complexes, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 41(1): 101-105.
- Sperka, T., Pitlik, J., Bagossi, P., Tozser, J., 2005. Beta-lactam compounds as apparently uncompetitive inhibitors of HIV-1 protease, *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 15(12): 3086-3090.
- Srivastava, S.K., Srivastava, S., Srivastava, S.D., 1999. Synthesis of new carbazoyl-thiazol-2-oxo-azetidines antimicrobial, anticonvulsant and anti-inflammatory agents, *Indian Journal Chemistry B*, 38B: 183-187.

- Srivastava, S.K., Srivastava, S., Srivastava, S.D., 1999. Synthesis of new carbazoyl-thiazol-2-oxo-azetidines antimicrobial, anticonvulsant and anti-inflammatory agents, *Indian Journal Chemistry B*, 38B: 183-187.
- Staudinger, H., 1905. Ketene, eine neue körperklasse. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 38: 1735–1739.
- Stemp, G., Pascoe, S., Gatehouse, D., 1989. *In vitro* and *in vivo* cytogenetic studies of three β -lactam antibiotics (penicillin VK, ampicillin and carbenicillin), *Mutagenesis*, 4(6): 439-445.
- Stopper H, Müller O.S. 1997. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A Minireview. *Toxicology In Vitro*, 11: 661-7.
- Supuran, C.T., 2001. Bacterial carbonic anhydrases as drug targets: toward novel antibiotics, *Frontiers in Pharmacology*, 2(34): 1-6.
- Supuran, C.T., 2008. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators, *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(2): 168-181.
- Supuran, C.T., 2010. Carbonic anyhdrase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 20(12): 3467-3474.
- Supuran, C.T., 2012. Inhibition of carbonic anyhdrase IX as a novel anticancer mechanism. *Word Journal of Clinical Oncology*, 3(7): 98-103.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., 2000. Carbonic anhydrase inhibitors and their therapeutic potential. *Expert Opinion on Therapeutic Patents.*, 10(5): 575-600.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., 2007. Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(13): 4336-4350.
- Surralles J., Xamena N., Creus A., Catalan J., Norppa H., Marcos R. 1995. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Reserach*, 341: 169-84.
- Şekeroğlu V., Atlı-Şekeroğlu Z. 2011a. Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 68(4): 241-52.
- Şekeroğlu, Z.A., Şekeroğlu, V., 2011b. Genetik toksisite testleri. *TÜBAV Bilim Dergisi.*, 4(3): 221-229.
- Tarhan, G.H., 2006. Antidepresan olarak kullanılan paxil ve prozac ilaçlarının insan lenfosit kültürlerindeki genotoksik etkileri. *Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.*

- Tatsumi, K., Ou, T., Yamada, H., Yoshimura, H., 1980. Studies on metabolic fate of a new antiallergic agent azelastine (4-(p-chlorobenzyl)-2-[N-methylperhydroazepinyl-(4)]-1-(2H)-phthalazinone hydrochloride), *The Japanese Journal of Pharmacology*, 30(1): pp. 37-48.
- Thiry, A., Supuran, C.T., Masereel, B., Dogne, M.J., 2008. Recent developments of carbonic anhydrase inhibitors as potential anticancer drugs. *Journal of Medical Chemistry*, 51(11): 3051-3056.
- Thomas, A.B., Nanda, R.K., Kothapalli, L.P., Hamane, S.C., 2016. Synthesis and biological evaluation of Schiff's bases and 2-azetidiones of isonocotinyldiazotone as potential antidepressant and nootropic agents, *Arabian Journal of Chemistry*, 9: 79-90.
- Topaktaş, M., Rencüzoğulları, E., 2010. *Sitogenetik*. Nobel Yayınevi, Ankara.
- Turan, B., Şendil, K., Şengül, E., Gütekin, M.S., Taslimi, P., 2016. The synthesis of some β -lactams and investigation of their metal-chelating activity, carbonic anhydrase and acetylcholinesterase inhibition profiles, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(1): 79-88.
- Uffaud, F., Orsiere, T., Villani, P., Pelissier, A.L., Volot, F., 1997. Comparison between micronucleated lymphocytes rates observed in healthy subject and cancer patients. *Mutagenesis*, 1(4): 227-231.
- Vanparrys P., Vermeiren F., Sysmans M., Temmerman R. 1990. The micronucleus assay as a test for the detection of aneuploid activity. *Mutation Research*, 244: 95-103.
- Van't Hof, J., 1968. The action of IAA and kinetin on the mitotic cycle of proliferative and stationary phase excised root meristem, *Experimental Cell Research*, 51: 167-176.
- Veinberg, G., Bokaldere, R., Dikovskaya, K., Vorona, M., Mucel, D., 1998. Synthesis of penicillin derivatives and study of their cytotoxic properties, *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 34(11): 1266-1275.
- Wasfy, A.F., Aly, A.A., Behalo, M.S., Mohamed, N.S., 2013. Synthesis of novel series of phthalazine derivatives as potential antitumor agents, *Synthesis*, 10: 20-32.
- Watanabe, N., Kabasawa, Y., Takase, Y., et al., 1998. 4-Benzylamino-1-chloro-6-substituted phthalazines: synthesis and inhibitory activity toward phosphodiesterase 5, *Journal of Medicinal Chemistry*, 41(18): 3367-3372.
- Wilkinsin, L.B., Bornaghi, F.L., Houston, A.T., Innocenti, A., Vullo, D., 2007. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of Isozymes I, II and IX with triazole-linked O-Glycosides of benzene sulfonamides, *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(7): 1651-1657.

- Winum, J.Y., Montero J.L., Scozzafava A., Supuran C.T., 2009. Zinc binding functions in the design of carbonic anhydrase inhibitors. Wiley: Hoboken, 39-72.
- Woodward, R.B., Johnson, J. R., Robinson, R., 1949. The chemistry of penicillin. Princeton University Press, Princeton, 15: 440-454.
- Wu, G., Wong, Y., Chen, X., Ding, Z., 1999. A novel one-step diastereo-and enantioselective formation of trans-azetidiones and its application to the total synthesis of cholesterol absorption inhibitors, The Journal of Organic Chemistry, 64(10): 3714-3718.
- Xue, D.Q., Zhang, X.Y., Wang, C. J., Ma, L.Y., Zhu, N., 2014. Synthesis and anticancer activities of novel 1, 2, 4-triazolo [3, 4-a] phthalazine derivatives, European Journal of Medicinal Chemistry, 85: 235-244.
- Yılmaz, S., Aksoy, H., Ünal, F., Çelik, M., Yüzbaşıoğlu, D., 2008. Genotoxic action of fungicide Conan 5FL on mammalian cells *in vivo* and *in vitro*, Russian Journal of Genetics, 44(3): 273-278.
- Yırtıcı, Ü., 2007. Tartrazin'in cyprinus carpio' daki genotoksik etkisinin mikronukleus yöntemi ile araştırılması. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Yüzbaşıoğlu D., Zengin, N., Ünal, F., 2014. Gıda koruyucuları ve genotoksisite testleri. GIDA, 39(3): 179-186.
- Yüzbaşıoğlu, D., Yılmaz, E.A., Ünal, F., 2016. Antidepresan ilaçlar ve genotoksisite. TÜBAV Bilim, 9(1): 17-28.
- Zavarise, G., Ghiazza, G., Grillo, G., Morino P., Mondavio, M., 1984. Evaluation of the effect of cloxacillin on human lymphocyte chromosomes through the study of karyotypic changes and sister chromatid exchanges, Bollettino Della Societa Italiana Di Biologia Sperimentale, 60(11): 2143-2148.
- Zemanova, Z., Michalova, K., Buryova, H., Brezinova, J., Kostylkova, K., 2014. Involvement of deleted chromosome 5 in complex chromosomal aberrations in newly diagnosed myelodysplastic syndromes (MDS) is correlated with extremely adverse prognosis. Leukemia Research, 238(5): 537-544.
- Zhai, X., Li, J., He, L., Zheng, S., Zhang, Y.B., Gong, P., 2008. Synthesis and *in vitro* cytotoxicity of novel 1, 4-disubstituted phthalazines, Chinese Chemical Letters, 19(1): 29-32.
- Zhang, S., Zhao, Y., Liu, Y., Chen, D., Lan, W., 2010. Synthesis and antitumor activities of novel 1, 4-disubstituted phthalazine derivatives, European Journal of Medicinal Chemistry, 45(8): 3504-3510.

ÖZGEÇMİŞ

Betül AYGÜN, 10.09.1990'da Almanya'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini İstanbul'da tamamladı. 2007 yılında Fatih Kız Lisesi'nden mezun oldu. 2009 yılında başladığı Sakarya Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nü 2013 yılında bitirdi. Aynı yıl Sakarya Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başladı ve halen eğitimine devam etmektedir.