

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YENİ SENTEZLENEN BAZI İLAÇ ADAYI ETKEN  
MADDELERİNİN SİTOTOKSİK VE  
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Memduha ERZURUM

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Yalçın DUYDU

2011 – ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
**Farmasötik Toksikoloji Tezli Yüksek Lisans Programı**  
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından  
**Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 17 / 08 / 2011

Prof. Dr. Asuman KARAKAYA  
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
(Jüri Başkanı)

Prof. Dr. Nurşen BAŞARAN  
Hacettepe Üniversitesi  
Eczacılık Fakültesi

Prof. Dr. Benay CAN EKE  
Ankara Üniversitesi  
Eczacılık Fakültesi

Prof. Dr. Sinan SÜZEN  
Ankara Üniversitesi  
Eczacılık Fakültesi

Prof. Dr. Yalçın DUYDU  
Ankara Üniversitesi  
Eczacılık Fakültesi  
(Danışman)

## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÖNSÖZ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER	viii
ÇİZELGELER	xii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
1.1. Yeni İlaç Geliştirilmesi	2
1.2. Hücre Kültürü	5
1.2.1. Hücre Kültürü Teknolojisinin Tarihçesi	7
1.2.2. Hücre Kültürlerinin Kullanım Alanları	7
1.2.3. İnsan Hücre Kültürlerinin Toksikite Araştırmalarındaki Avantajları	8
1.2.4. İnsan Hücre Kültürlerinin Toksikite Araştırmalarındaki Dezavantajları	8
1.2.5. Başlıca Hücre Kültür Tipleri	8
1.2.5.1. HeLa Hücre Serisi	9
1.2.6. Hücre Kültürü Çalışmalarında Dikkat Edilmesi Gerekenler	10
1.2.7. Hücre Kültür Ortamının Genel Özellikleri	11
1.2.7.1. Besiyeri Geliştirme	14
1.2.8. Antibiyotikler	20
1.2.9. Tripsin	21
1.3. Sitotoksikite Testleri	22
1.3.1. Nötral Kırmızı Alımı Sitotoksikite Testi	23
1.4. Comet Testi (Tek Hücre Jel Elektroforezi, Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE)	24
1.4.1. Comet Testinin Kullanım Alanları	27
1.4.2. Comet Testinin Avantajları	28
1.5. Tezin Amacı	29

<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	30
2.1. Gereç	30
2.1.1. Kullanılan Maddeler	30
2.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler	31
2.2. Yöntem	32
2.2.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	32
2.2.2. HeLa Hücrelerinin Sıvı Azottan Çıkarılmaları	35
2.2.3. HeLa Hücrelerinde Yeni Pasajın Yapılması	35
2.2.4. Hücre Sayımı	36
2.2.5. Hücrelerin Düzenli Çoğalmasının Kontrolü	38
2.2.6. Sitotoksisite Testinin Uygulanması	39
2.2.6.1. SDS'nin Sitotoksisite Testinde Pozitif Kontrol Olarak Kullanılması	39
2.2.6.2. Test Edilecek Kimyasal Maddelerin Sitotoksisite Testleri	39
2.2.6.3. Sitotoksisite Testi (Nötral Kırmızı Alımı – Neutral Red Uptake)	40
2.2.6.4. Sitotoksik Dozun Belirlenmesi	42
2.2.7. Genotoksisite Testi	44
2.2.7.1. HeLa Hücrelerinde DNA Hasarı Tespiti (Comet Testi - Comet Assay)	44
2.3. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	47
<b>3. BULGULAR</b>	51
3.1. Nötral Kırmızı Alımı Sitotoksisite Testi ile Elde Edilen Sonuçlar	51
3.1.1. SDS (Pozitif Kontrol) İçin Elde Edilen Sonuçlar	51
3.1.2. Sitotoksisite Testlerinde Kullanılan Test Kimyasalları	53
3.1.3. Test Edilen Kimyasal Maddelerin Sitotoksisite Test Sonuçları	56
3.1.4. Nötral Kırmızı Alımı Sitotoksisite Testi Toplu Sonuçları	82
3.2. Alkali Comet Testi Uygulamaları ile Elde Edilen Sonuçlar	83
3.2.1. Pozitif Kontrol Olarak Kullanılan H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ile Elde Edilen Sonuçlar	84
3.2.2. Kimyasal Maddelerden Elde Edilen Sonuçlar	87
<b>4. TARTIŞMA</b>	95
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	99
<b>ÖZET</b>	102
<b>SUMMARY</b>	103
<b>KAYNAKLAR</b>	104

**ÖZGEÇMİŞ**

109

## ÖNSÖZ

“Yeni sentezlenen bazı ilaç adayı etken maddelerinin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması” başlıklı yüksek lisans tezimde hocam Prof. Dr. Yalçın DUYDU danışmanlığında Ankara Üniversitesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı tarafından yeni sentezlenen kimyasal maddeler HeLa hücre kültürü ile incelenmiştir. Bu kimyasal maddelerin sitotoksik ve genotoksik etkileri sırasıyla nötral kırmızı alımı sitotoksiste testi ve Comet testi ile araştırılmıştır.

Yüksek lisans tezimin deney kurgusu, deneysel çalışmaları ve tezin hazırlanması sırasında bana yol gösteren, her konuda benden yardım, hoşgörü ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Yalçın DUYDU’ya sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında her türlü olanağı sağlayan, destek ve yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalımız Öğretim Üyesi hocalarıma saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Tezim sırasında benden yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞA’a ve her türlü yardımları için arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisansa devam etmem konusunda benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen Osman ATAMER’e, sevgili aileme ve eşim Zafer ERZURUM’a teşekkür ederim.

**SİMGELER ve KISALTMALAR**

CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
Comet testi	Tek hücre jel elektroforezi (Single cell gel electrophoresis, SCGE)
DMSO	Dimetilsülfoksit
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
HeLa hücresi	Henrietta Lacks hücresi
IC <sub>50</sub>	Hücrelerin yarısını öldüren kimyasal madde konsantrasyonu
LMA	Düşük erime dereceli agar
µg	Mikro gram
µl	Mikro litre
NK	Negatif kontrol
NMA	Yüksek erime dereceli agar
NR	Nötral kırmızı
NR desorb	Etanol / asetik asit çözeltisi
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Ortalama kuyruk momenti	Tail Moment
Ortalama kuyruk yoğunluğu (%)	Tail % Intensity

## ŞEKİLLER

Şekil 1. 1. DNA hasarı çeşitleri	25
Şekil 1. 2. Comet testi ile belirlenen DNA lezyonlarının olası yazgısı	26
Şekil 1. 3. Floresans mikroskop Comet görüntüleri. Hasarsız DNA (0), az hasarlı DNA (1), orta hasarlı DNA (2), hasarlı DNA (3) ve çok hasarlı DNA (4) ile gösterilir (Collins, 2004).	27
Şekil 2. 1. Hücre sayım lamı (Improved Noubauer)	37
Şekil 2. 2. HeLa hücreleri	38
Şekil 2. 3. HeLa hücrelerinin düzenli çoğalma grafiği	38
Şekil 2. 4. Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testinde kullanılan plaka	42
Şekil 2. 5. Sitotoksisite çalışmalarında kullanılan plakalar. A,B,C: Test edilen her kimyasal madde için kullanılan dublikat mikropalakalar. D: Herbir set ile birlikte kullanılan pozitif kontrol (SDS) mikropalakası. N: Herbir plakadaki negatif kontroller.	43
Şekil 2. 6. Alkali Comet tekniğinde kritik basamakların şematik gösterimi (Tice ve ark., 2000)	47
Şekil 2. 7. A: Buzdolabında korunan çözeltiler, B: 37 °C de bekletilen çözeltiler, C: CO <sub>2</sub> li inkübatör, D: İnkübatörde bekletilen mikropalaka ve reaktifler, E: Hücrelerin laminar hava akımlı kabininde çoğaltılması, F: Hücrelerin tripan mavisi ile muamelesi, G: Hücrelerin sayım için Improved Neubauer lamına yerleştirilmesi, H: Kullanılan mikroskoplar, I: Test edilen kimyasal maddelerin seri dilüsyonları.	48
Şekil 2. 8. A: HeLa hücreleri, B: Nötral kırmızısı çözeltisi, C: Mikropalakaların yıkanması ve aspirasyonu, D: Nötral kırmızı çözeltisi uygulanmış bir plaka, E: Mikropalakadaki fazla çözeltilerin aspirasyonunda kullanılan vakum, F: Mikropalaka çalkalayıcı.	49
Şekil 2. 9. A: Mikropalaka okuyucu, B: Okunan sonuçlar, C: Otoklav, D: Comet testi slaytları, E: Slaytların elektroforez işlemi, F: Floresan mikroskop ve Comet okuma istasyonu.	50
Şekil 3. 1. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan SDS - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.	52
Şekil 3. 2. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan SDS - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık	

- sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği. 53
- Şekil 3. 3. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu 13 - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği. 56
- Şekil 3. 4. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu 13 - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği. 57
- Şekil 3. 5. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu 19 - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği. 58
- Şekil 3. 6. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu 19 - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği. 59
- Şekil 3. 7. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu 20 - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği. 60
- Şekil 3. 8. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu 20 - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği. 61
- Şekil 3. 9. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu 21 - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği. 62
- Şekil 3. 10. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu 21 - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği. 63
- Şekil 3. 11. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu 22 - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği. 64
- Şekil 3. 12. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu 22 - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği. 65

- Şekil 3. 13. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu 23 - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği. 66
- Şekil 3. 14. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu 23 - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği. 67
- Şekil 3. 15. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C8 - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği. 68
- Şekil 3. 16. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C8 - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği. 69
- Şekil 3. 17. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C10 - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği. 70
- Şekil 3. 18. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C10 - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği. 71
- Şekil 3. 19. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C11 - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği. 72
- Şekil 3. 20. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C11 - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği. 73
- Şekil 3. 21. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C13 - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği. 74
- Şekil 3. 22. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C13 - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği. 75
- Şekil 3. 23. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C14 - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen

- konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği. 76
- Şekil 3. 24. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C14 - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği. 77
- Şekil 3. 25. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C26 - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği. 78
- Şekil 3. 26. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C26 - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği. 79
- Şekil 3. 27. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C31 - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği. 80
- Şekil 3. 28. A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C31 - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği. 81
- Şekil 3. 29. HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan  $H_2O_2$  ile alkali Comet testi sonuçları. 85
- Şekil 3. 30.  $H_2O_2$  ile muamele edilen HeLa hücrelerinde oluşan DNA hasarının alkali Comet testi ile görünümü ( 1-  $H_2O_2$  Kontrol, 2-  $H_2O_2$  25  $\mu M$ , 3-  $H_2O_2$  75  $\mu M$ , 4-  $H_2O_2$  100  $\mu M$ , 5-  $H_2O_2$  150  $\mu M$  ). 86
- Şekil 3. 31. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 13'ün değişik konsantrasyonlarından elde edilen alkali Comet testi sonuçları. 88
- Şekil 3. 32. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 20'nin değişik konsantrasyonlarından elde edilen alkali Comet testi sonuçları. 90
- Şekil 3. 33. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 21'in değişik konsantrasyonlarından elde edilen alkali Comet testi sonuçları. 92
- Şekil 3. 34. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C8'in değişik konsantrasyonlarından elde edilen alkali Comet testi sonuçları. 94

## ÇİZELGELER

Çizelge 1. 1. Memeli Hücre Sistemleri için Esansiyel ve Esansiyel Olmayan Amino Asitler	12
Çizelge 1. 2. Memeli hücre kültürlerinde kullanılan temel besiyeri formülasyonları	17
Çizelge 3. 1. HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan SDS - 1 ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları.	51
Çizelge 3. 2. HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan SDS - 2 ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları.	52
Çizelge 3. 3. Toksisite testlerinde kullanılan ve antibakteriel ve antifungal etkili olması amacıyla sentezlenen kimyasal maddelerin formülleri	54
Çizelge 3. 4. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 13 – 1 (13 nolu kimyasal maddenin ilk test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları.	56
Çizelge 3. 5. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 13 – 2 (13 nolu kimyasal maddenin ikinci test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları	57
Çizelge 3. 6. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 19 – 1 (19 nolu kimyasal maddenin ilk test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları.	58
Çizelge 3. 7. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 19 – 2 (19 nolu kimyasal maddenin ikinci test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları.	59
Çizelge 3. 8. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 20 – 1 (20 nolu kimyasal maddenin ilk test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları.	60
Çizelge 3. 9. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 20 – 2 (20 nolu kimyasal maddenin ikinci test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları.	61
Çizelge 3. 10. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 21 – 1 (21 nolu kimyasal maddenin ilk test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları.	62
Çizelge 3. 11. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 21 – 2 (21 nolu kimyasal maddenin ikinci test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları.	63

- Çizelge 3. 12. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 22 – 1 (22 nolu kimyasal maddenin ilk test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları. 64
- Çizelge 3. 13. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 22 – 2 (22 nolu kimyasal maddenin ikinci test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları. 65
- Çizelge 3. 14. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 23 – 1 (23 nolu kimyasal maddenin ilk test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları. 66
- Çizelge 3. 15. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 23 – 2 (23 nolu kimyasal maddenin ikinci test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları. 67
- Çizelge 3. 16. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C8 – 1 (C8 nolu kimyasal maddenin ilk test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları. 68
- Çizelge 3. 17. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C8 – 2 (C8 nolu kimyasal maddenin ikinci test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları. 69
- Çizelge 3. 18. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C10 – 1 (C10 nolu kimyasal maddenin ilk test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları. 70
- Çizelge 3. 19. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C10 – 2 (C10 nolu kimyasal maddenin ikinci test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları. 71
- Çizelge 3. 20. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C11 – 1 (C11 nolu kimyasal maddenin ilk test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları. 72
- Çizelge 3. 21. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C11 – 2 (C11 nolu kimyasal maddenin ikinci test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları. 73
- Çizelge 3. 22. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C13 – 1 (C13 nolu kimyasal maddenin ilk test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları. 74
- Çizelge 3. 23. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C13 – 2 (C13 nolu kimyasal maddenin ikinci test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları. 75
- Çizelge 3. 24. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C14 – 1 (C14 nolu kimyasal maddenin ilk test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları. 76
- Çizelge 3. 25. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C14 – 2 (C14 nolu kimyasal maddenin ikinci test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları. 77

- Çizelge 3. 26. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C26 – 1 (C26 nolu kimyasal maddenin ilk test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları. 78
- Çizelge 3. 27. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C26 – 2 (C26 nolu kimyasal maddenin ikinci test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları. 79
- Çizelge 3. 28. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C31 – 1 (C31 nolu kimyasal maddenin ilk test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları. 80
- Çizelge 3. 29. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C31 – 2 (C31 nolu kimyasal maddenin ikinci test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları. 81
- Çizelge 3. 30. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal maddelerin nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçlarından elde edilen  $IC_{50}$  değerleri. 82
- Çizelge 3. 31. HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan  $H_2O_2$  ile alkali Comet testi sonuçları. 84
- Çizelge 3. 32. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 13'ün değişik konsantrasyonlarından elde edilen alkali Comet testi sonuçları. 87
- Çizelge 3. 33. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 20'nin değişik konsantrasyonlarından elde edilen alkali Comet testi sonuçları. 89
- Çizelge 3. 34. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 21'in değişik konsantrasyonlarından elde edilen alkali Comet testi sonuçları. 91
- Çizelge 3. 35. HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C8'in değişik konsantrasyonlarından elde edilen alkali Comet testi sonuçları. 93

## 1. GİRİŞ

İnsanlar günlük hayatlarında birçok kimyasala bilerek ya da bilmeyerek maruz kalmaktadırlar. Tüm ilaçlar, temizlik ve kozmetik maddeleri, pestisitler, besin katkı maddeleri ve sanayide kullanıldığında insanların maruz kalabileceği kimyasal maddeler, kullanıma sunulmadan önce toksik potansiyelleri yönünden değerlendirilirler. Muhtemel toksik etkiler in vivo koşullarda deney hayvanlarında, in vitro koşullarda hücre kültürlerinde araştırılır.

Toksisite testleri, sadece kimyasal maddelerin canlı organizmalar üzerindeki zararlı etkilerini açıklamak için yapılmaz. Bu maddelerin toksik etkilerinin görülmeyeceği doz değerlerini saptamak için de yapılır (Saygı, 2003).

Yeni geliştirilen bir ilaç etken maddesinin etkisi bilgisayar ortamında teorik olarak hesaplanmış olsa dahi bu bileşik sentezlendikten sonra bazı testlerden geçirilmelidir. Bu testlerden bir tanesi de toksisite testidir.

Bu çalışma ile bölüm 1. 5.'de anlatıldığı gibi Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı tarafından antibakteriel ve antifungal etkili olacağı düşünülen sentezlenmiş olan ilaç aday adaylarının sitotoksik etki göstermediği konsantrasyonlarda genotoksik etkilerinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Bu ilaç adayı olarak sentezlenmiş bir kimyasal maddenin ilaç adayı olabilmesi sürecinde önemli bir kriterdir.

Toksisite testleri test süresinin uzunluğuna göre akut toksisite testleri, subakut toksisite testleri, subkronik toksisite testleri, kronik toksisite testleri olarak sınıflandırılmaktadır. Buradaki her bir test bir sonraki basamağa geçiş için temel oluşturmaktadır.

Bu testler in vivo şartlarda deney hayvanlarında yapılabileceği gibi in vitro şartlarda hücre kültürlerinde de yapılabilmektedir. İn vitro koşullarda yapılan deneyler in vivo

koşulların yerini tutmasa dahi daha sonra yapılacak olan çalışmalara ışık tutması açısından vazgeçilemezdir. İn vitro testlerde insan hücre kültürlerinin kullanılması ile tür farklılığı ortadan kalkmaktadır.

Toksik olduğu düşünülen maddenin, uygun hücre kültüründe, hücre büyüme oranı ve hücre tahribatı üzerindeki etkisi dikkate alınarak değerlendirme yapılan testlere sitotoksikite testleri denir.

DNA ile toksik kimyasal maddelerin (genotoksinler) etkileşmesi sonucunda DNA molekülü üzerinde ortaya çıkan olumsuz etkilere genel olarak genotoksik etki denir. Kimyasalların genotoksik etkileri çeşitli testlerle incelenmektedir.

Yeni bir kimyasal maddenin kullanıma sunulmadan önce toksik açıdan araştırılması gereklidir.

Bir kimyasalın ilaç olarak kullanılabilmesi için kimyalin sentezlenme aşamasında ve sentezlenmesinden sonra çeşitli bölümlerin bir arada çalışması gerekmektedir. Bilgisayarda yapılan yapı – aktivite çalışmalarında bileşiğin etkili çıkmasının ardından kimyasal sentezlenir. Sentezlenen bileşiğin teorikte olan etkisinin yanında pratikte de etkili olup olmadığı test edilmelidir. Bileşiğin pratikte de etkili çıkması onun gerçekten etkili olduğunu göstermek için yeterli değildir. Etkili çıktığı dozun, ilacı kullanacak olan canlı üzerinde toksik etkisinin de olmaması gereklidir.

### **1.1. Yeni İlaç Geliştirilmesi**

Yeni ilaç geliştirilmesi, uzun, zahmetli ve oldukça yüksek harcamaları gerektiren bir süreçtir. Son zamanlarda yapılan bir hesaplama göre, yeni ilaç geliştirilmesi yaklaşık 12 - 15 yılı ve 500 - 800 milyon USD harcamayı gerektirmektedir. Sürecin bu kadar uzun olması, yeni ilaç geliştirilmesinin zorluğu hakkında ipucu vermektedir.

Yeni ilaçların geliştirilme süreci üç bölümde incelenmektedir:

- Etkin maddenin bulunması
- Preklinik geliştirme
- Klinik geliştirme

### **Etkin Maddenin Bulunması**

#### *Hedef seçimi*

İlaçların hedefleri (bazı istisnalar dışında) reseptörler, enzimler, transport proteinleri gibi fonksiyonel proteinlerdir. Geçmişte, ilaç geliştirme programları genellikle in vivo yanıtın ölçülmesi temeline dayanıyordu; ancak günümüzde hedef proteinleri belirlemeden ilaç geliştirme programına başlanması nadirdir. Bunun için de, biyolojik yanıt mekanizmasının çok iyi bilinmesi gerekmektedir.

#### *Etkin maddenin bulunması*

Biyokimyasal hedef belirlendikten sonraki basamak etkin bileşenin bulunmasıdır. Bunun için ilk yaklaşım hedef proteinin klonlanması, daha sonra hedef proteinin fonksiyonel aktivitesini ölçecek testlerin geliştirilmesidir. Bu testlerin hızlı ve ekonomik olması bakımından otomatize olması gerekir. Yeni etkin bileşen bilinen moleküllerin modifikasyonu ile, doğal kaynakların rasgele taranması ile, biyolojik mekanizmaların ve kimyasal yapının anlaşılması ile, biyoteknoloji ve peptid/protein oluşturan genlerin klonlanması ile bulunur. Ancak, günümüz farmasötik endüstrisinde kombinatorial kimya teknolojisi kullanımı eğilimi artmaktadır. Bu teknoloji, reaksiyon ortamına konan çok sayıda farklı kimyasal maddenin karıştırılarak rastgele kombine olmaları sonucu, çok sayıda (binlerce) yeni kimyasal maddenin sentez edilmesidir. Kombinatorial kimya; yüksek girip çıktılı tarama yöntemleri (high throughput) ile birlikte kullanılmaktadır. Bu yöntem maddelerin

otomatize tarama sistemleri kullanılarak farmakolojik etki taramalarından geçirilmesidir.

### *Etkin maddenin optimizasyonu*

Buradaki amaç rastgele tarama yöntemi ile bulunmuş olan etkin maddenin, hedef üzerindeki potensini arttırmaktır. Ayrıca etkin maddenin selektivite, metabolik stabilite gibi özelliklerini de en elverişli hale getirmektir.

### **Prelinik Geliştirme**

Elde edilmiş olan etkin kimyasal maddelerin, klinik denemeler yapılmadan önce mutlaka klinik olmayan değerlendirme aşamalarından geçirilmeleri gerekmektedir. Klinik öncesi güvenlik değerlendirmeleri hedef organlarda toksik etkilerin tanımlanması, doza bağımlılığı, maruz kalım süresi ile ilişkisi ve geri dönüşümlü olup olmadığının araştırılmasını içermektedir. Bu bilgiler, insanlara uygulanacak ilk dozu ve yan etkilerin takibinde kullanılacak parametreleri belirleme açısından önemlidir.

Prelinik çalışmalar dört başlık altında incelenmektedir:

- 1) ***Farmakolojik testler:*** Tarama testlerinde istenen etkiyi gösteren maddelerin in vivo farmakolojik deneylerle etkisi, yan etkileri, toksik etkileri incelenir.
- 2) ***Farmakokinetik incelemeler:*** Hayvanlarda yapılan emilim, dağılım, eliminasyon çalışmalarını içermektedir.
- 3) ***Toksisite deneyleri:***

*Akut toksisite deneyleri:* Tek dozda verilen etkin maddeye bağlı olarak ortaya çıkan toksisiteyi ve bundan en fazla etkilenen organları saptamayı amaçlar. Etkin madde, en az iki hayvan türüne (sıçan / fare ve köpek), iki farklı uygulama yolundan verilir.

*Subakut ve kronik toksisite deneyleri:* İlaç insanlarda kronik olarak kullanılacaksa yapılır. Tekrarlanan dozlarda uygulanan etkin maddenin dayanç gösterilen maksimum dozunu ve toksisite halinde en fazla etkilenen organı belirlemeyi amaçlar. Hayvanlardan biri kemirici olmayacak şekilde 2 memeli türü seçilir (sıçan, köpek). İlaçların hayvanlara uygulanma süresi, klinik araştırmalar ile insanlara uygulanması öngörülen süre kadar veya daha uzun (subakut, 2 - 4 hafta; kronik 6 - 24 ay) olmak zorundadır.

**4) Kimyasal ve farmasötik geliştirme:** Saflaştırma, stabilite ve uygun formülasyon geliştirme çalışmalarıdır.

Preklinik geliştirme çalışmaları, iyi laboratuvar uygulamaları ile belirlenmiş olan kurallara göre yapılır. Bu kurallar ile deneyi yapan kişiye bağlı hatalar olabildiğince ortadan kaldırılır ve düzenleyici otoriteler tarafından verilerin kabulünü sağlar.

## **Klinik Geliştirme**

Preklinik değerlendirme döneminde uygun bulunan etkin maddeler daha sonra klinik çalışmalar ile sağlıklı ve hasta gönüllüler üzerinde belirli protokollere göre incelenir (Gelal, 2005).

### **1.2. Hücre Kültürü**

Hücre kültürü, hücrelerin belirli bir besi ortamında çoğaltılmasıdır. Hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarının günümüzde önemli bir yeri vardır. Çeşitli patolojik durumlarda belli bir maddenin etkisini belirlemek, bir hücre ya da dokuda üretilen belli bir maddenin işlevini belirlemek amacıyla belli bir hücre serisinden çoğaltılan hücrelerde çalışmalar yapılarak in vitro sonuçlar elde edilebilir.

Geçen 30 yıl hücre kültürü teknolojisinin büyük gelişimine şahit olmuştur. Bu alan oldukça gelişmiş ve biyoteknolojinin önemli bir parçası olmuştur (Das, 2001).

Gelişimi sırasında hücre kültürü teknolojisi hücre biyolojisi, genetik mühendisliği, protein kimyası, genomik ve kimya mühendisliğini içeren çeşitli disiplinlerle entegre olmuştur. Hücre kültürü teknolojisi önemli proteinlerin üretiminde kabul görmüş bir metottur.

Hücre kültürü teknolojisi ve ürünleri kanseri, viral enfeksiyonları, kalıtsal bozuklukları ve çeşitli kronik hastalıkları önlemek ve tedavi etmek için kullanılmaktadır. Bu ürünler güvenli, etkili ve ekonomik olmaktadır.

Hücre kültürü teknolojisi başlangıç noktasından ticarileşmeye doğru hızlı bir gelişim göstermektedir. Hücre kültürü teknolojisi bize in vitro ortamda hücre ve doku davranışlarını inceleme olanağı vermiştir (Griffiths, 2000; Finter ve ark., 1990). Terapötik amaçlarla hücre kültürlerinin kullanımı hücrelerin aşı üretimi için kullanılmasıyla başlamıştır. Kültür hücreleri virüsleri çoğaltmada, büyük ölçekli aşı imalatında başarıyla kullanılmıştır.

Hücre kültürü teknolojisinde daha sonraki büyük adım düzenleyici kurumların sürekli hücre hatlarını kabul etmesidir. Sürekli hücre hatları devamlı olarak çoğalabilmekte, büyüme faktörlerine daha az ihtiyaç duymakta ve en önemlisi süspansiyon içinde kültüre edilebilmektedirler.

Genetik mühendisliği ve rekombinant DNA teknolojisinin kullanımı hücre kültüründe birçok ürünün üretilmesini olanaklı kılmıştır. Çeşitli hücre serilerinde birçok vektör, doğal ve modifiye insan proteinlerinin üretiminde kullanılmaktadır. Hücre mekanizması mühendisliği protein ürünlerinin stabilitesinde, etkinliğinde ve biyolojik aktivitesinde modifikasyona izin vermektedir. Hücre kültürü teknolojisindeki gelişmeler doku mühendisliği ile sonuçlanmıştır (Hu, 2006).

### 1.2.1. Hücre Kültürü Teknolojisinin Tarihçesi

Hücre (doku) kültürü çalışmalarının geçmişi yüz yılı aşkın bir süreyi kapsamakta ve kökeni 1885 yılına kadar dayanmaktadır. 1852’de Wilhelm Roux embriyonik tavuk hücrelerinin birkaç gün boyunca vücut dışında, bir tuz çözeltisinde canlılıklarını sürdürebildiğini göstermiştir. Daha sonra 1898 yılında Ljunggren insan dokusunun kullanıldığı ilk deneyi yaparak, insan derisininin in vitro ortamda asidik sıvıda canlılığını sürdürebildiğini göstermiştir. 1913’te Alexis Carol hücrelerin düzenli olarak beslenmeleri halinde kültür ortamında çoğalabildiklerini belirlemiştir. Wilton Earle ve arkadaşları 1943’te L hücre serisinden izole ettikleri hücrelerin hücre kültüründe klonlar oluşturduklarını gözlemlemişlerdir. 1951’de George Gay ilk sürekli insan hücre serisi olan HeLa hücre serisini geliştirmiştir; ki bugün bile hala bu hücre serisi yaygın olarak kullanılmaktadır. 1950’li ve 1960’lı yıllarda Eagle, Fischer, Parker, Healy, Morgan, White ve Waymounth adlı araştırmacıların da içinde bulunduğu birçok bilim adamı kültürde bulunan hücrelerin gelişmeleri için gerekli olan besin maddelerini belirlemişlerdir (Langdon 2004).

### 1.2.2. Hücre Kültürlerinin Kullanım Alanları

- İlaç metabolizmasından sorumlu enzim sisteminin saptanması,
- İlaç metabolize edici enzim aktivitesini etkileyebilecek faktörlerin saptanması,
- İlaç metabolitleri ve bu maddelerin toksik etki potansiyellerinin saptanması,
- İlacın metabolik yıkılma süresinin saptanması,
- İlaçların birbirleri üzerine olan etkileşim derecesinin saptanması,
- İlaç metabolizmasında genetik, yaş, çevre ve hastalık faktörlerinin araştırılması,
- Bireylerin ilaç alerjisi potansiyeline sahip olup olmadığının öngörülmesi amacıyla kullanırlar (Wooster ve ark.,1993).

### 1.2.3. İnsan Hücre Kültürlerinin Toksikite Araştırmalarındaki Avantajları

- Tür farklılığını ortadan kaldırır.
- Kimyasal maddelerin muhtemel toksik etki yapacağı düşünülen deri, karaciğer gibi spesifik doku hücreleri üzerinde araştırma yapılmasını sağlar.
- Toksikite mekanizmalarının hücreler üzerinde aydınlatılmasına imkân verir.
- Deneyde kullanılan hayvanların acı çekmesi veya ölmesi söz konusu değildir.

### 1.2.4. İnsan Hücre Kültürlerinin Toksikite Araştırmalarındaki Dezavantajları

- Tekli sistemdir. Multifaktöriyel ilaç metabolizması için uygun değildir.
- Teknolojik alt yapı maliyeti ve deneyimi gerektirir.
- İn vitro ortamda hücrelerin yaşam siklusu kısadır.
- Enzim stabilitesi kısıtlıdır.
- Kültür ortamının penetrasyon kabiliyeti kısıtlıdır.
- Ko-faktörlere gereksinim duyar (Gunaratna, 2000).

Günümüzde 2300'den fazla insan ve hayvan hücre kültür modeli mevcuttur. Hücre kültürleri ticari olarak firmalardan sağlanabildiği gibi, araştırmacıların kendi özel hücre kültürlerini gönüllülerden veya cerrahi operasyonlardan çıkacak doku örneklerinden yararlanarak oluşturmaları da mümkündür (Eaton ve ark., 1996; Wooster ve ark., 1993; Crespi ve ark., 1993; Sun ve ark., 1995; Saygı, 2003).

### 1.2.5. Başlıca Hücre Kültür Tipleri

Çok çeşitli kaynaklardan sağlanan ve dokulardan elde edilen hücre kültür türleri üç bölümde incelenir (Çiçek ve Bilgiç, 2006):

- Primer (birincil) hücre kültürleri
- Sekonder veya diploid hücre kültürleri

➤ Sürekli veya heteroploid hücre kültürleri

*Primer hücre kültürü:* Dokulardan tripsin ile ayrıştırılarak elde edilen hücrelerin in vitro ortamlarda üretilmeleri ile elde edilen kültürlerdir. İn vitro koşullarda pasajları kısıtlı olup, bir kaç pasajdan sonra üreyebilme yeteneklerini kaybederler. Örneğin: İnsan embriyonu böbreği (HEK), insan amniyonu (HAM), Rezüs maymun böbreği (RhMK), yeşil maymun böbreği (GMK), tavşan böbreği (RK) vb.

*Sekonder hücre kültürü:* Normal kromozom sayısına sahip diploid hücrelerden elde edilirler. En fazla 50 kez pasajları yapılabilir. Örneğin: WI-38, MRC-5 vb.

*Sürekli hücre kültürü:* Teorik olarak sonsuz sayıda pasajları yapılabilir. Genellikle habis tümörlerden elde edilirler. Laboratuvar koşullarında değişime uğrarlar ve kromozom sayıları sabit değildir. Örneğin: İnsan larenks epidermoid karsinomu (Hep-2), insan nazofarenks karsinomu (KB), insan serviks karsinomu (HeLa), yeşil maymun böbreği (Vero) vb.

### 1.2.5.1. HeLa Hücre Serisi

Bu hücre serisi oldukça yaygın kullanılan insan serviks adenokarsinomundan çıkartılmıştır (Gey ve ark., 1952). HeLa hücreleri bilimsel araştırmalarda kullanılan ölümsüz hücre serisidir. Bu hücre serisi en eski ve en sık kullanılan insan hücre serisidir (Rahbari ve ark.,2009). Bu seri 1951 yılında kanserden ölen Henrietta Lacks'dan alınan servikal kanser hücrelerinden geliştirilmiştir. Bu hücreler morfolojik olarak epiteldir.

Hücreler George Otto Gey tarafından Lacks'ın ölümünden kısa bir süre önce yayılmıştır. Bu in vitro ortamda başarıyla kanıtlanmış ilk insan hücresidir. Bu hücreler daha sonra ticarileştirilmiştir.

HeLa hücreleri laboratuvar hücre kültür plaklarında, yaşamaları için gerekli bileşenlere sahip oldukça, sınırsız sayıda bölünebildiği için ölümsüz olarak isimlendirilmiştir.

HeLa hücreleri kolay kültüre edilebildikleri için in vitro sistemlerde oldukça yaygın kullanılmaktadır. Bu hücre serisinin dezavantajı diğer hücre serileriyle yaygın kontaminasyonudur (Nelson-Rees ve ark., 1981).

HeLa hücreleri 1950'lerde Jones Salk tarafından ilk polio aşısının testi için kullanılmıştır ve o zamandan beri kanser, AIDS, radyasyonun etkileri ve toksik bileşikler, gen haritası ve birçok diğer bilimsel çalışmaları içeren araştırmalarda kullanılmışlardır.

#### **1.2.6. Hücre Kültürü Çalışmalarında Dikkat Edilmesi Gerekenler**

Hücre kültürlerinde asepsinin sağlanması ve hücre hattının içeriğinin korunması için bazı temel kurallara uyulması gerekir (Freshney, 2008),

- Her hücre hattı için ayrı bir vasat ve tripsin gibi reagenler ayrı olarak kullanılmalıdır.
- Hücre kültür flaskaları, vasatları ve reagen şişeleri aynı anda birden fazla hücre hattı için açık tutulmamalıdır.
- HeLa gibi hızlı büyüyen hücre hatları yalnız başına işleme alınmalı ve çalışmaları diğer hücre hatlarının sonrasında gerçekleştirilmelidir.
- Hiçbir zaman aynı pipet farklı hücreler için kullanılmamalıdır.
- Hücre içeren bir flaska sokulan pipet asla vasat şişelerine geri konulmamalıdır.
- Her zaman tıkaçlı pipetler kullanılmalıdır.
- Tıkaçlı uçlar olmadan pipetleyiciler kullanılmamalıdır.
- Subkültür öncesinde ve sonrasında hücrelerin yapısı değerlendirilmeli, standart fotoğraflar ile kıyaslanmalıdır.

- Hücre hatları mikoplazma kontaminasyonu açısından kontrol edilmelidir.
- Hücre hattının içeriği dondurulmadan önce ve çözülmeden önce mutlaka doğrulanmalıdır.

### **1.2.7. Hücre Kültür Ortamının Genel Özellikleri**

Ana kurallarla kültür hücreleri steril bir çevreye ve bazı besin öğelerine ihtiyaç duyarlar. Kültür ortamı, pH ve sıcaklık bakımından da kararlı olmalıdır.

#### ***Besi Ortamının Ana Bileşenleri***

- İnorganik tuzlar
- Karbonhidratlar
- Aminoasitler
- Vitaminler
- Yağ asidi ve lipitler
- Protein ve peptitler
- Serum

#### ***İnorganik tuzlar***

Besi ortamında inorganik tuzların birçok görevi vardır. Sodyum, kalsiyum ve potasyum iyonları ile hücrenin osmotik basıncını sağlarlar.

#### ***Tampon Sistemleri***

Hücrelerin çoğu 7,2 - 7,4 pH aralığında gelişebilirler. Fibroblastlar daha yüksek pH'ya, sürekli dönmüş hücreler ise daha asidik ortama ihtiyaç duyarlar. Yeni kültür oluşturulması sırasında pH çok önemlidir ve iki ayrı sistemle dengelenir. Bunlar;

- Doğal tampon sistemi CO<sub>2</sub> gazı CO<sub>3</sub> / HCO<sub>3</sub> ile dengelenir,
- Yine HEPES adı verilen özel bir kimyasal tamponu ile dengelenebilir.

Doğal bikarbonat (HCO<sub>3</sub>) - CO<sub>2</sub> tampon sisitemleri CO<sub>2</sub> inkübatöründe %5 - 10'luk CO<sub>2</sub> atmosfer ile birlikte kullanılır. Bikarbonat - CO<sub>2</sub> maliyetsizdir ve hücreler için toksik değildir. HEPES ise, çok yüksek tampon kapasitesine sahip olmasına rağmen 7,2 - 7,4 pH değerindedir ve yüksek konsantrasyonları toksik etki yapabilir. Bu tampon sisteminde, ayrıca gaz atmosfere gerek yoktur.

### *Karbonhidratlar*

Karbonhidratlardan açığa çıkan enerji genellikle şekerlerden meydana gelir. Ana şekerler glukoz ve galaktozdur; ancak besi ortamında maltoz ve fruktoz da bulunabilir. Bazal şeker, besi ortamında 1 g / l ve daha karmaşık besi ortamında 4,5 g / l konsantrasyona kadar çıkabilir. Yüksek şeker konsantrasyonu daha geniş aralıktaki hücre tiplerinin gelişmesine olanak sağlar.

### *Aminoasitler*

**Çizelge 1. 1.** Memeli Hücre Sistemleri için Esansiyel ve Esansiyel Olmayan Amino Asitler

<i>Esansiyel Amino Asitler</i>	<i>Esansiyel Olmayan Amino Asitler</i>
Glutamin	Alanin
İzolösin	Arjinin
Lösin	Asparajin
Lizin	Aspartik asit
Metiyonin	Sistin
Fenilalanin	Glutamik asit
Triptofan	Glisin
Valine	Histidin
	Proline
	Serin
	Tirozin

### *Vitaminler*

Serum, hücre kültüründe çok önemli bir vitamin kaynağıdır. Çoğu besi ortamı çeşitli besin öğeleri ile zenginleştirilir. B grubu vitaminler, hücre gelişiminde çok önemlidirler. Bazı besi ortamları, A ve E vitamini de gerektirebilirler.

### *Yağ Asitleri ve Lipidler*

Protein ve lipid gibi besi öğeleri serum içermeyen ortamlarda çok önemlidirler ve serum içerisinde de bulunurlar. Kolesterol ve steroidler, özelleşmiş hücreler için gerekli olabilmektedirler.

### *Proteinler ve Peptitler*

Bunlar serum içermeyen besi ortamı için gereklidirler. En yaygın protein ve peptitler, albumin, transferrin, fibronektin ve fetuindir. Bunlar besi ortamına serum ile eklenirler.

### *Eser Elementler*

Çinko, bakır, selenyum ve trikarboksilik asit gibi maddelerdir.

### *Serum*

Memeli hücrelerinin kültürü için kullanılan temel besi yerine vitaminler, amino asitler, tuzlar ve bazen protein ilaveleri gibi kimyasal yapısı belirli bileşenler ilave edilir. Pıhtılaşmış kanın üst fazı olan serum genellikle hayvan hücrelerinin yaşaması için gerekli olan diğer bileşenlerle kullanılır. Birçok durumda kültür besi yerine % 5 - 10 konsantrasyonda serum ilave edilene kadar büyüme gereksinimi karşılanamamıştır.

Sığır ya da at, serum için en çok kullanılan hayvanlar olana kadar çeşitli hayvansal kaynaklardan serum elde edilmiştir. Hücre büyümesi için en etkili ilave, yüksek embriyonik büyüme faktörü içeriğinden dolayı, fetal sığır serumudur (Hu, 2006). Serumun kalitesi, tipi ve konsantrasyonu hücrelerin gelişimi üzerinde etkilidir.

Serum üretimi pahalı ve zahmetli bir süreçtir. Sığır embriyolarının kanlarının toplanmasıyla hazırlanan serumların üretiminde bir standart yoktur. Farklı hayvanlardan elde edilen serumlar birbirlerinden farklılık gösterirler. Bu da deneylerin sonuçlarını etkilemektedir. Bu dezavantajlarından dolayı bazı laboratuvarlar serumsuz besiyerlerini kullanmaktadırlar. Serum kullanılmayan bir besiyerinin çeşitli büyüme ve tutunma faktörleriyle desteklenmesi gerekir, bu da çalışmaya göre serumdan daha pahalı olabilir.

#### **1.2.7.1. Besiyeri Geliştirme**

Memeli hücrelerinin kültürü için besi yeri geliştirilmesi üzerinde 50 yıldan fazla süredir çalışılmaktadır. İn vitro ortamda hayvan hücrelerinin kültür çalışmaları serum, kan ve doku ekstraktı gibi biyolojik sıvılar kullanılarak yapılmıştır. Bunu, içeriği analiz edilmiş biyolojik sıvılardan oluşan besiyerlerinde hayvan hücrelerinin kültüre edilmesi çalışmaları takip etmiştir (Morgan ve ark., 1950). Bir diğer gelişme Eagle tarafından gerçekleştirilmiştir. Büyümek için minimum içerikten oluşan Eagle'in minimum esansiyel besiyeri (Eagle's minimal essential medium – EMEM)'nin bulunması ile olmuştur (Eagle, 1955). Bu besi yeri 13 amino asit, 8 vitamin, 6 iyonik parça ve büyüme için gerekli bileşikleri içeren serumdan oluşmaktadır.

Bilim çevresi yeni hücre hatlarına ulaştıkça, besi yeri için yeni formüller geliştirilmiştir. Bunlar Dulbecco'nun Eagle'nin besi yerinden modifiye ettiği (Dulbecco's modification of Eagle's medium –DMEM) besi yeri (Dulbecco ve Freeman, 1959), F12 (Ham, 1965) besi yeri ve Roswell Park Memorial Institutue

(RPMI) besi yeridir (Moore ve ark., 1967). Hücre metabolizması ve büyüme faktörü gereksinimleri anlaşıldıkça, serum içermeyen çeşitli formülasyonlar geliştirilmiştir.

Günümüzde hayvan hücrelerinin kültürü için birçok formülasyona ulaşılabilmektedir. Hangi formülasyonun kullanılacağına karar verilmesi kültürün yapılış amacıyla ilgilidir. Virüs üretmek ya da diğer özel olmayan molekülerin çalışmaları için serum içeren MEM gibi temel formüller sıklıkla kullanılmaktadır.

Hücre kültüründe serum gibi içeriği belirsiz bileşenler birçok dezavantaja yol açmaktadır. Bu durum araştırma ve endüstri çevresinde serum içermeyen besi yerlerine ihtiyaç duyulmasına neden olmuştur ve yeni formülasyonlar araştırılmaya başlanmıştır (Hu, 2006).

### **Temel Besiyeri**

Bu besi yeri formülasyonundaki bileşenler karbonhidrat, aminoasitler, tuzlar, vitaminler, hormonlar ve büyüme faktörlerini içeren kompleks karışımlardır.

Besi yeri, plazma ve embiryonik ekstraktlar gibi biyolojik sıvılarda hayvan hücrelerinin büyütülmesine dayanmaktadır. Kimyasal olarak içeriği belirli olmayan besi yerlerinin kullanılması çeşitli ve duyarlı kontaminasyonlar açısından dezavantajlara neden olduğundan, bu durum kimyasal içeriği belli olan kültür besi yerlerinin geliştirilmesine yol açmıştır.

Hücre çoğalması için gerekli olan esansiyel bileşiklerin bulunması besiyeri araştırmalarında alternatif gelişmelere yol açmıştır. Böylece fare-L hücreleri ve HeLa hücreleri için optimal büyümeyi sağlayan Eagle'ın temel besi yeri (Eagle's basal medium – BME) bulunmuştur. BME'nin, çeşitli hücre hatlarını çoğaltmak için EMEM gibi sonradan modifiye edilmiş çok sayıda versiyonu vardır.

- BME, fare-L ve HeLa hücrelerini çoğaltmak için geliştirilmiştir ve sonra insan diploid hücrelerini de içeren hücre hatlarının çoğaltılmasında kullanılmıştır. Bu besi yeri hücre çoğalmasını desteklemek için değişikliklere ihtiyaç duymuştur (Eagle, 1955).
- EMEM, klonlanmış kültürleri içeren geniş çeşitlilikteki hücre hatlarının optimal büyümesi için BME’de yapılan değişikliklerle geliştirilmiştir. EMEM, BME’den daha yüksek konsantrasyonda aminoaside sahiptir. Bu besi yeri Earle’nin dengeli tuz solusyonunu içermektedir. Buna alternatif olarak Hanks’ın tuz çözeltisi kullanılabilir. Bu besi yeri birkaç günde hücre çoğalmasını desteklemektedir (Eagle, 1959).
- Glasgow’un Eagle’dan modifiye besi yeri (Glasgow’s modification of Eagle’s medium- GMEM), BME’nin bir modifikasyonu ve fazladan glukoz ve bikarbonat ile iki katı konsantrasyonda amino asit ve vitamin içermektedir. Bu besi yeri yavru hamster böbreği 21 (baby hamster kidney 21- BHK 21) /C13 hücrelerini çoğaltmak için geliştirilmiştir.
- Joklik’in Eagle’dan modifiye besi yeri (Joklik’s modified of Eagle’s medium), kültür süspansiyonu için genel amaçlı büyüme besi yeridir (Yamane ve ark., 1968).
- Alpha’nın Eagle’dan modifiye besi yeri, melez fare - hamster hücrelerinin ribozomunda çalışmak için kullanılmaktadır. Hem esansiyel hem de esansiyel olmayan aminoasitleri içeren bu besi yeri genel amaçlı büyüme besiyeri olarak kullanılabilir (Stanners ve ark., 1971).
- DMEM, yüksek konsantrasyonda besin değerine sahiptir ve BME’den 4 kat konsantrasyonda amino asit ve vitamin içermektedir. Esansiyel olmayan aminoasitler ve eser elementler ilave edilmiştir.
- RPMI 1628 ya da McCoy’un 5A besi yeri, besi yeri 199’dan aminoasit ve vitamin karışımı ile BME’den temel alınmıştır. Bu besi yeri McCoy ve arkadaşları tarafından formüle edilmiştir (McCoy ve ark., 1959) ve sonra Hsu ve Kellogg (1960) ile Iwakata ve Grace (1964) modifiye etmiştir . Sonraki modifikasyonlarda L-alanin yerine D-alanin kullanılmıştır. McCoy’un besi yeri klonlanmış hücrelerin standart besi yeri olarak kullanılmıştır (McCoy ve ark., 1959; Park ve ark., 1974).

- RPMI 1630, Moore ve Kitamura tarafından 1968 de geliştirilmiştir (Moore ve Kitamura, 1968).
- RPMI 1640, periferel kan lenfositlerinin uzun süreli kültürleri için geliştirilmiştir. Modifiye RPMI 1640'ın iki genel kullanımı vardır, bunlar çoğalmayı arttırmak ya da lenfosit uyarımıdır.

**Çizelge 1. 2.** Memeli hücre kültürlerinde kullanılan temel besiyeri formülasyonları

Bileşenler	Molarite(mM)			
	BME	GMEM	DMEM	RPMI (1640)
<b><i>İnorganik tuzlar</i></b>				
Kalsiyum klorür (CaCl <sub>2</sub> )	1,8	4,5	1,8	
Kalsiyum nitrat (Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O)				0,424
Bakır sülfat (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)				
Demir nitrat ((Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O)		0,25	0,25	
Demir sülfat (FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)				
Potasyum klorür (KCl)	5,3	37,33	5,3	5,3
Potasyum nitrat (KNO <sub>3</sub> )				
Magnezyum klorür (MgCl <sub>2</sub> susuz)	0,5	11,26		
Magnezyum sülfat (MgCl <sub>4</sub> )	0,81		0,813	0,407
Magnezyum sülfat (MgCl <sub>4</sub> susuz)		11,31		
Sodyum Klorür (NaCl)	117	110	110,34	103,44
Sodyum Bikarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	26,2	4,17	44,1	23,8
Sodyum Fosfat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O)				5,63
Sodyum Fosfat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O)	1,01	7,43	0,906	
<b><i>Enerji Metabolizması</i></b>				
D-Glukoz	5,55	3,88	25	11,1
Sükroz		78		
D-Fruktoz		2,22		
Fumarik asit		0,474		
α-Ketoglutarik asit		2,53		
Malik asit		5		
Süksinik asit		0,508		
<b><i>Amino asitler</i></b>				
β-alanin		2,2		
L-Alanin		2,5		
L-Arjinin HCl	0,1	3,3	0,398	1,1

**Çizelge 1. 2. Devam** Memeli hücre kültürlerinde kullanılan temel besiyeri formülasyonları

Bileşenler	Molarite(mM)			
	BME	GMEM	DMEM	RPMI (1640)
L-Asparajin		2,65		0,379
L-Aspartik asit		2,63		0,15
L-Sistin 2HCl	$5,0 \times 10^{-2}$	$9,2 \times 10^{-2}$	0,2	0,206
L-Glutamik asit		4,08		0,136
L-Glutamin		4,11	4	2,05
Glisin		8,67	0,399	0,133
L-Histidin	$5,2 \times 10^{-2}$	16,2	0,2	$9,7 \times 10^{-2}$
L-Hidroksiproline				0,153
L-İzolösin	0,198	0,382	0,802	0,382
L-Lösin	0,198	0,573	0,802	0,382
L-Lizin HCl	0,2	3,42	0,798	0,219
L-Metiyonin	0,05	0,336	0,201	0,101
L-Fenilalanin	0,1	0,909	0,4	$9,1 \times 10^{-2}$
L-Prolin		3,04		0,174
L-Serin		10,5	0,4	0,286
L-Treonin	0,202	1,47	0,078	0,168
L-Triptofan	$2,0 \times 10^{-2}$	0,49	0,078	$2,5 \times 10^{-2}$
L-Tirozin 2Na·2H <sub>2</sub> O	$10,0 \times 10^{-2}$	0,276	0,398	0,11
L-Valin	0,2	0,855	0,803	0,171
<b>Vitaminler</b>				
Biyotin	$4,0 \times 10^{-3}$	$4,1 \times 10^{-5}$		$8,0 \times 10^{-3}$
D-Kalsiyum pantotenik	$2,0 \times 10^{-3}$	$4,2 \times 10^{-5}$	$8,3 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-4}$
Kolin klorür	$7,1 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-3}$	$2,9 \times 10^{-2}$	$2,1 \times 10^{-2}$
Folik asit	$2,2 \times 10^{-3}$	$4,5 \times 10^{-5}$	$9,1 \times 10^{-3}$	$2,2 \times 10^{-3}$
<i>i</i> -İnositol	$1,1 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-2}$	$1,9 \times 10^{-1}$
Nikotinik asit (Niasin)		$1,0 \times 10^{-4}$		
Nikotinamid	$8,1 \times 10^{-3}$		$3,3 \times 10^{-2}$	$8,1 \times 10^{-3}$
<i>p</i> -Aminobemzoik asit		$1,0 \times 10^{-4}$		$7,2 \times 10^{-3}$
Piridoksal HCl	$4,9 \times 10^{-3}$	$9,7 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-2}$	$4,8 \times 10^{-3}$
Piridoksin Hidroklorid				
Riboflavin	$2,7 \times 10^{-4}$	$5,3 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-4}$
Tiamin HCl	$2,9 \times 10^{-3}$	$5,9 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-2}$	$2,9 \times 10^{-3}$
Vitamin B <sub>12</sub>				$3,7 \times 10^{-6}$
<b>Lipit ve Türevleri</b>				
<i>i</i> -İnositol	$1,1 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-2}$	$1,9 \times 10^{-1}$
Glutatyon (İndirgenmiş)				$3,2 \times 10^{-3}$
<b>İndikatörler</b>				
Fenol kırmızısı	$2,5 \times 10^{-2}$		$3,5 \times 10^{-2}$	$1,3 \times 10^{-2}$
Fenol kırmızısı	$2,5 \times 10^{-2}$		$3,5 \times 10^{-2}$	$1,3 \times 10^{-2}$

## Serum İçermeyen Formülasyonların Kullanımı için Kompleks Besi Yerleri

- Biggers' besi yeri kültürde izole hepatositlerin gelişimi için dizayn edilmiştir (Biggers ve ark., 1961). Aminoasitler ve vitaminler ilave edilerek Fitton-Jackson modifiye etmiştir.
- Connaught İlaç Araştırma Laboratuvarları (Connaught Medical Research Laboratories-CMRL) 1066 besi yeri, serum ilave edilmeden hücre çoğaltmak için düzenlenmiş kompleks bir besi yeridir. Bu formülasyon, besi yeri 199'un kapsamlı modifikasyonunu temsil etmektedir (Parker ve ark., 1957; Morgan ve ark., 1950).
- eRDF, RPMI 1640 : DMEM : F12 (2 : 1 : 1) karışımıdır. Hücre kültüründe farklı tür hücrelerin birleşmesiyle oluşan melez hücre klonlarını desteklemek için bulunmuş serum içermeyen formülasyondur (Murakami, 1989).
- F12 Ham's besi yeri tavuk embryosundan klonlanmış çeşitli hücrelerin çoğaltılmasında geliştirilmiştir.
- F12 Ham's besi yeri çeşitli eser elementleri içeren kompleks bileşenlere sahip ve diploid hamster over hücrelerini klonlamak için dizayn edilmiştir (Ham, 1965). Serum içermeyecek şekilde formüle edilmiştir; fakat şu an çeşitli normal ve dönüştürülmüş hücrelerin büyümesini desteklemek için genellikle serum bileşenleri ile kullanılıyor. Serum içermeyen formülasyonların temelinde F12, DMEM (1 : 1) ile kombine edilmiştir (Barner ve Sato, 1980). Böylece yüksek besin konsantrasyonundaki DMEM ile zengin F12 birleştirilmiştir.
- Iscove'un Dulbecco'dan modifiye edilmiş besi yeri (Iscove's modified Dulbecco's medium - IMDM), DMEM içeriğine amino asitler, vitaminler selenyum, sodyum piruvat, Heps ve demir nitrat yerine potasyum nitrat ilave edilmiş modifikasyonudur.
- MCDB 104, klonlanarak büyütülmüş insan diploid fibroblastları için Ham's F12 besi yerinden geliştirilmiştir.
- MCDB 110, insan diploid fibroblastlarını büyütme için MCDB 104'den geliştirilmiştir (Bettger ve ark., 1981). Yağ asitleri, fosfolipitler, büyüme

faktörleri, hormonlar ve serum aktivasyonunu uyarma için diğer bileşenler eklenerek modifiye edilmiştir (Ryan ve ark., 1987).

- Medium 199, bazı hücre serisi büyüme serumları hala içerse de, protein içermeyen büyüme besiyeri üretmek amacıyla formüle edilmiştir. Bu besiyeri Earle'nin tuz solüsyonunu ve aminoasitleri, vitaminleri, nükleik asit türevlerini, büyüme faktörlerini ve lipitleri içeren geniş yelpazeli son derece karmaşık bir ortamdır. (Morton, 1970; Morgan ve ark., 1950; Morgan ve ark., 1955).

Standart besi yeri formülasyonları hem sıvı hem de toz olarak ticari üreticilerden satın alınabilir. Sıvı formları  $\times 1$  ya da  $\times 10$  konsantrasyonlarda gelebilir ve ihtiyaç duyulan sonraki seyretme steril deiyonize distile su ile yapılır. Alternatif olarak özellikle fazla miktarda besi yerine ihtiyaç duyulduğunda toz besi yeri tercih edilebilir. Bu durumda toz besi yeri distile suda çözülmeli ve 0,22  $\mu\text{m}$  filtre ile steril hale getirilmelidir. Steril sodyumbikarbonat, antibiyotikler ve glutamin genellikle besi yerinin sterilizasyonundan sonra ilave edilir. Besi yeri otoklavlanıyorsa bu bileşenler stabil değildir (Hu, 2006).

### 1.2.8. Antibiyotikler

Antibiyotikler kısa süreli kültürler için besi yerine sıklıkla ilave edilirler. Antibiyotikler ileri günlerde problem yaratabilecek düşük seviyeli kontaminasyonları önlemek için kullanılmaktadır (Hu, 2006).

Antibiyotik kullanımında şu karışım tavsiye edilmekte;

- Penisilin (100 IU/ml) gram pozitif bakterilerin gelişimini önler.
- Streptomycin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) gram negatif bakterilerin gelişimini önler.
- Amphoteresin-B (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) antifungal bir maddedir.

### 1.2.9. Tripsin

Tripsin hücre pasajlamalarında kullanılan temel enzimdir. Tripsin, bir serin proteaz tipi enzim olup, lizin ve arjinin aminoasitlerinden peptidleri yıkar.

Tripsin kullanımında dikkat edilmesi gereken bazı noktalar şunlardır (Arat ve ark.,2008):

- Tripsin -20 °C'de saklanmalıdır. Daha yüksek sıcaklıklarda bekleyen tripsinin aktivitesi düşer, bu yüzden oligotlanarak saklanması en uygundur.
- Serum tripsin inhibitörlerini içerir. Bu yüzden hücrelere tripsin uygulanmadan önce hücreler mutlaka bir kere Ca ve Mg içermeyen PBS ile yıkanmalı ve yüzeylerindeki serum uzaklaştırılmalıdır.
- Tripsin hücrelerin yüzeyini örtecek kadar uygulanmalıdır.
- Tripsin sıcaklık arttıkça daha etkili çalışır. Tripsin uygulanan hücreler inkübatöre konduklarında yüzeylerden daha çabuk ayrılırlar, oda sıcaklığındaysa daha yavaş ayrılırlar.
- Hücreler yüzeyden ayrılır ayrılmaz tripsinin inhibe edilmesi önemlidir. Tripsin hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra, hücre membranlarına zarar vermeye başlar.
- Hücrelerin yüzeylerden ayrılma hızı değişebilir. Besiyerindeki serum oranı, hücre tipi, petrideki hücre yoğunluğu, tripsinin aktivitesi ve son pasaj üzerinden geçen zamana göre hücreler petri yüzeyinden farklı zamanlarda ayrılırlar.
- Farklı şişelerdeki tripsinler birbirlerine her zaman eş değerde olmayabilir.
- Tripsini inhibe etmek için tripsin hacminin en az iki katı kadar % 10 fetal sığır serumlu besiyeri uygulanmalıdır. Daha sonra hücreler pipetlenerek birbirlerinden ayrılırlar.

### 1.3. Sitotoksisite Testleri

Geçmişten bugüne hücre kültürü çalışmalarında hücre canlılığını ve çoğalmasını belirlemek için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden en kullanışlı olanlar, 96 kuyucuklu plakaların kullanıldığı modern deneylerdir. Bu deneylerle birçok örnek aynı anda ve hızlı analiz edilebilmektedir. Sitotoksisite deneyleri değişik parametreleri kullanarak hücre ölümünü ve çoğalmasını belirler (Weyermann ve ark.,2005).

Toksik olduğu düşünülen maddenin, uygun hücre kültüründe, hücre büyüme oranı ve hücre tahribatı üzerindeki etkisi dikkate alınarak değerlendirme yapılan testlere sitotoksisite testleri denir. Bu test sistemleri;

- Morfolojik olarak hücresel hasarın gözlenmesi,
- Hücresel hasarın çeşitli ölçüm yöntemleri ile belirlenmesi,
- Hücresel büyümenin belirlenmesi,
- Hücresel metabolizmadaki herhangi bir değişikliğin belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır.

İn vitro testler sitotoksisiteyi değerlendirenler, metabolik veya diğer hücre fonksiyonunu değerlendirenler ve hücredeki genetik materyal üzerindeki etkiyi değerlendirenler (mutajenezis testleri) olmak üzere alt gruplara ayrılabilirler.

Sitotoksisite, kimyasalların hücreler ve dokular üzerindeki aktivasyon mekanizmasının anlaşılmasında önemli bir faktördür. Sitotoksisitenin karsinogenesis ve inflasyonun da içinde bulunduğu patolojik proseslerde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Sitotoksisite serbest radikaller, iritanlar ve genotoksinlerinde içinde bulunduğu diğer ajanların aktivitelerinde etkilidir (Putnam ve ark., 2002).

İn vitro sitotoksisite testleri, hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, membran seçici geçirgenliği, DNA sentezi ya da hücresel metabolizma gibi toksisiteyi belirleyen

gösterge parametrelerin ölçülmesine dayanır (Gad, 2000). Sitotoksisite deneyleri in vitro çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır. Nötral Kırmızı (Neutral Red - NR) ve MTT (tetrazolyum tuz redüksiyon) deneyleri monolayer kültürlerde sitotoksisite ölçümleri ya da toksik madde varlığında hücre canlılığının belirlenmesinde sık kullanılan yöntemlerdir (Fotakis ve Timbrell, 2005; Fent, 2001).

Sitotoksisitenin in vitro testler ile ölçülmesinin birçok faydası bulunmaktadır. Bunlardan biri, toksisite testleri için kullanılan hayvanların sayısını en aza indirmesidir. İn vitro testlerin bir diğer avantajı hücre ya da organın toksik etkiye karşı mekanizmasının belirlenebilmesidir. Yeni ürünlerin toksisitesinin in vitro yöntemlerle üretimin erken evrelerinde belirlenebilmesi harcanan paradan, zamandan ve deney hayvanlarından kazanç sağlayabilir (Putnam ve ark., 2002).

İn vivo testler memeli bir organizmayı kullanarak, biyolojik çevre ile materyal arasında oluşan birçok karmaşık etkileşimin gerçekleşmesine izin verirler. Bu nedenle, in vivo testlerden elde edilen biyolojik cevap in vitro testlerle elde edilen cevaptan daha kapsamlı ve uygundur; fakat hayvan testlerinde değişkenleri kontrol etmek ve çok karmaşık olduklarından biyolojik cevabı kantitatif olarak değerlendirmek sıklıkla zordur. Bu tip testlerde etik endişeler ve hayvan sağlığı ile ilgili sorunlar giderek önem kazanmaktadır. Ayrıca bu testler zaman alıcı ve pahalıdır. Bununla birlikte bir hayvan türündeki cevabın; insandaki cevaba ne derece benzerlik gösterebileceği hakkında her zaman şüpheler vardır (Wataha, 2001).

İn vitro testlerin başlıca dezavantajları, organizmanın dışında gerçekleştirildikleri için, vücutta biyolojik cevabı oluşturan birçok etkileşimin mevcut olmamasıdır (Wataha, 2001).

### **1.3.1. Nötral Kırmızı Alımı Sitotoksisite Testi**

Kolorometrik bir yöntem olan nötral kırmızı alımı sitotoksisite deneyi, lizozomlarda biriken, elektrostatik olarak lizozomal matriksteki anyonik bölgelere bağlanan,

kationik süpravital bir boya olan nötral kırmızının (3-amino-7-dimetilamino-2-metil fenozin hidroklorid) canlı hücrelerce alımına dayanmaktadır (Bulychev ve ark., 1978; Weyermann ve ark., 2005; Andreoli ve ark., 2003).

Hücre yüzeyindeki veya hassas lizozomal membrandaki hasar, nötral kırmızının alımını ve bağlanmasını azaltarak canlı / sağlam hücrelerle hasarlı / ölü hücreleri birbirinden ayırmayı mümkün kılmaktadır (Komissarova ve ark., 2005; Barileve ark., 1994).

Nötral kırmızı boyası canlı, hasar görmemiş hücrelerin lizozomlarında birikmektedir (Fotakis ve ark., 2006; Yano ve ark., 2005).

Nötral kırmızı alımı sitotoksisite deneyi, oldukça basit, güvenilir ve diğer pahalı deneylerin yerini alabilecek nitelikte bir test yöntemidir (Popiolkiewicz ve ark., 2005).

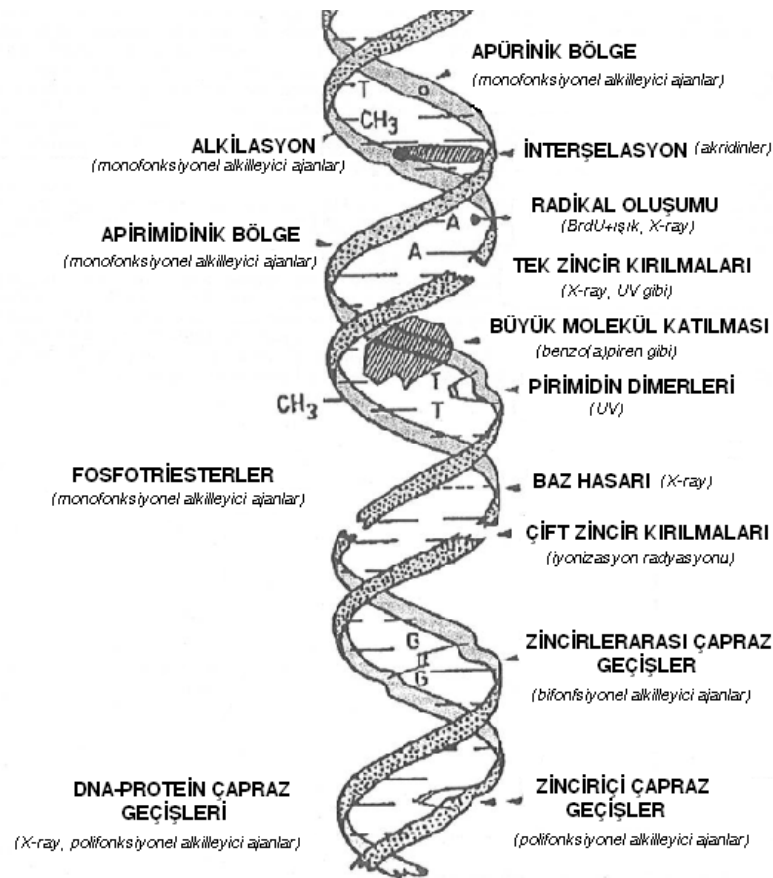
#### **1.4. Comet Testi (Tek Hücre Jel Elektrofrez, Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE)**

Comet testi, ökaryotik ve bazı prokaryotik hücreler olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerinde in vivo ve in vitro uygulanabilen, DNA hasarını ve onarımını belirlemek amacıyla kullanılan, oldukça gelişmiş bir yöntemdir. Bu yöntem hızlı, hassas, kolay görülebilen bir yöntem olup, diğer yöntemlere kıyasla daha ucuzdur (Collins, 2004). Özellikle genetik toksikolojide ve insan biyoizlemeleri çalışmalarında önem kazanmıştır ve hızla yaygınlaşmıştır.

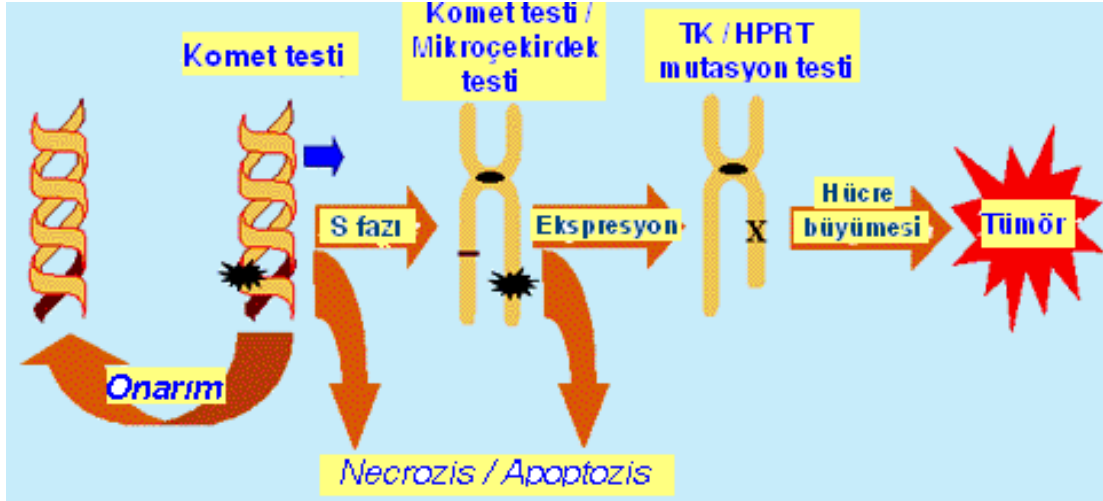
Tek hücre jel elektrofrez veya Comet tekniği, ilk olarak Rydberg ve Johanson (1978) tarafından DNA sarmal kırıklarının ölçülmesi amacıyla kurulmuştur. Daha sonra Östling ve Johanson (1984) tarafından geliştirilen teknik nötral pH'daki lizing ve elektrofrez şartlarında uygulanmıştır. Bu yöntemle yalnızca alkali oynak bölgeler tayin edilememektedir. Mikroskopta görülen kuyruğun kuyruklu yıldız benzemesi

nedeniyle yönteme “Comet” ismi verilmiştir. Singh ve ark. (1988) tarafından protokolde birtakım değişiklikler yapılarak yöntem alkali lizing koşullarında uygulanmıştır. Bu protokol, bugün küçük değişikliklerle dünya genelinde en yaygın kullanılan genotoksisite protokolüdür.

Alkali koşullarda yapılan (pH>13) Comet testi ile şekil 1. 1’de gösterilen DNA hasarlarından çift zincir kırılmaları, tek zincir kırılmaları, alkali oynak bölgeler (alkali Comet şartlarında tek zincir kırıklarına dönüşürler) (Collins ve ark., 1997), oksidatif DNA baz hasarı, DNA – DNA / DNA – protein / DNA –ilaç çapraz geçişleri tayin edilebilir ve DNA onarımı ölçülebilir (Speit ve ark., 2004). Nötral Comet testi (pH: 7 - 10) kullanıldığında ise alkali koşullarda yapılan Comet testinden farklı olarak alkali oynak bölgeler tayin edilemez. Bu bakımdan alkali Comet testi daha hassastır ve daha fazla DNA hasarı tayin etme olanağı verir.

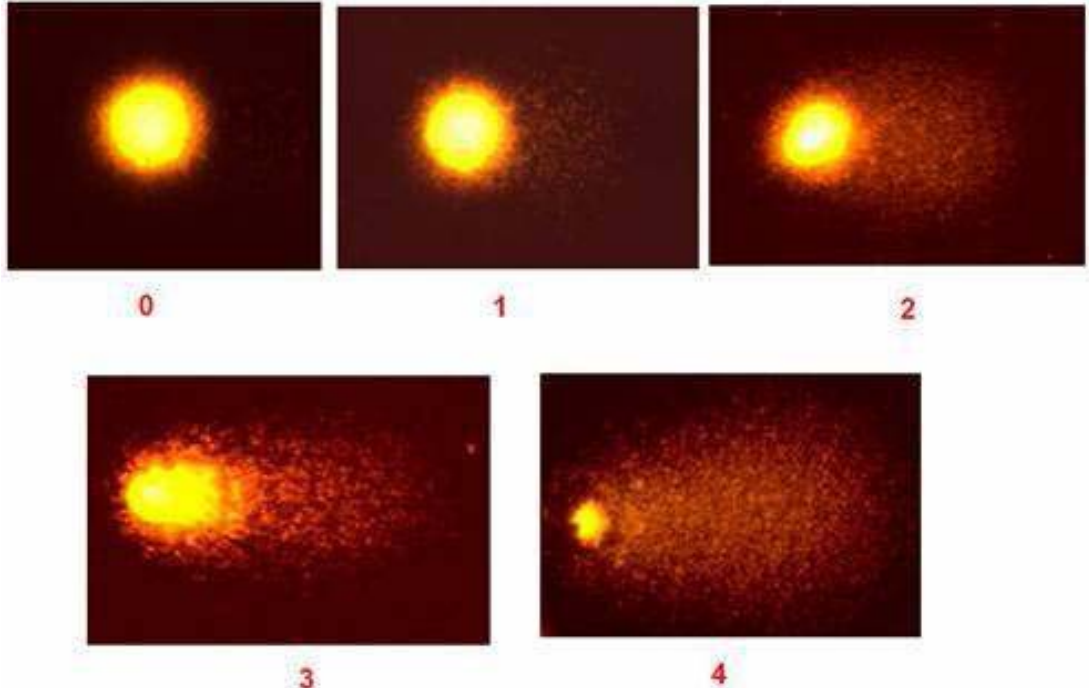


Şekil 1. 1. DNA hasarı çeşitleri



Şekil 1. 2. Comet testi ile belirlenen DNA lezyonlarının olası yazgısı

Hasarsız bir DNA, çekirdekdeki matriks proteinlerle oldukça organize bir yapıya sahiptir; fakat DNA'da bir hasar meydana geldiğinde bu yapı bozulur. Hasarlı DNA sarmalındaki zincirler kompakt yapılarını kaybeder ve gevşeyerek agar içindeki boşluklara yayılır. Elektroforezde akım uygulanması ile negatif yüklü DNA anoda doğru hareket eder. Hasarsız DNA oldukça büyüktür ve bu akım ile kuyruk bırakmadan geç eder. Hasar nedeniyle parçalanan daha küçük kısımlar ise geride kalarak kuyruk oluştururlar (Mcart ve ark., 2009). Bu nedenle DNA'daki kuyruk miktarı hücredeki hasarın derecesini gösterir. Etidium bromür ile boyanan hücreler, floresan mikroskop altında hasarsız - çok hasarlı arasında şekil 1. 3.'de gösterildiği gibi toplam 5 sınıfa ayrılarak değerlendirilir.



**Şekil 1. 3.** Floresans mikroskop Comet görüntüleri. Hasarsız DNA (0), az hasarlı DNA (1), orta hasarlı DNA (2), hasarlı DNA (3) ve çok hasarlı DNA (4) ile gösterilir (Collins, 2004).

#### 1.4.1. Comet Testinin Kullanım Alanları

Comet testi pek çok alanda yaygın olarak kullanılır. Bu alanlardan başlıcaları;

- Genetik toksikoloji; Genotoksik kimyasalların in vivo ve in vitro değerlendirilmesi
- DNA hasarı; Tek zincir kırıkları, DNA çapraz geçişleri, alkali oynak bölgeler
- DNA onarımı; Zincir kırığı onarımı, kesip çıkarma onarımı
- Ekotoksikoloji
- Beslenme
- Genotoksisite biyoizlemesi
- Çevresel biyoizleme; Tehlikeli atık bölgelerindeki genotoksik kirleticilerin değerlendirilmesi
- Hipoksi tayini

- İnsan epidemiyolojisi; Mesleksel, klinik ve çevresel maruziyetlerde DNA hasarının belirlenmesi veya kontrol ile maruz gruplar arasındaki DNA onarım farklılığının değerlendirilmesi
  - Sperm bankası
  - Kan bankası
  - Kanser hastalarında radyoterapi ve kemoterapi izlemeleri

#### 1.4.2. Comet Testinin Avantajları

Comet testinin pek çok avantajı vardır. Bunlar;

- Girişimsel olmayan bir yöntemdir.
- Az miktarda hücre ile çalışılabilir (<10.000).
- Kişi başına sadece 50 - 100 hücre saymak yeterlidir. Özellikle bilgisayar programı kullanıldığında sağlam istatistiksel sonuçlar elde edilir.
- DNA hasarını ve onarımını belirlemede oldukça hassastır.
- Çok çeşitli hücrelerde analiz yapmak için uygun bir yöntemdir.
- Birkaç saat içinde yöntem tamamlanabilir, birkaç gün süren diğer sitogenetik yöntemlerle kıyaslandığında bu önemli bir avantajdı; çünkü hücre proliferasyonuna ihtiyaç duymamaktadır.
- Tek zincir kırıkları, çift zincir kırıkları, alkali oynak bölgeler tayin edilebilir.
- İnsan çalışmalarında sadece 5 - 10 µl kan, burun veya ağız mukoza hücreleri, epitel hücreleri, sperm hücresi kullanmak yeterlidir.

Bu özelliklerinin yanında Comet testinin tek bir dezavantajı bulunur. Aslında Comet testi yalnız onarım hızını (iplik kırıklarının yeniden birleşme kinetiği) ölçer; fakat DNA onarımının doğruluğunu ölçmez. Yanlış onarılan DNA kırıkları, Comet testinde DNA göçüne neden olmaz (Üstündağ, 2010).

### 1.5. Tezin Amacı

Ortak projemiz kapsamında, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı tarafından antibakteriel ve antifungal etkili olacağı düşünülmüş olan (Çizelge 3. 3.) 13 kimyasal maddenin HeLa hücrelerinde sitotoksik oldukları konsantrasyonların ( $IC_{50}$ ) nötral kırmızı alımı sitotoksikite testi ile hesaplanması amaçlanmıştır. Bu kimyasal maddelerin sitotoksik oldukları dozlarının belirlenmesinin ardından en yüksek dozlarda sitotoksik etki gösteren kimyasal maddeler için genotoksik (Comet testi) oldukları dozların tespit edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla  $IC_{50}$  değerleri yüksek bulunan kimyasal maddelerin DNA hasarı oluşturabilme potansiyelleri, aynı hücrelerde (HeLa) Comet testi uygulanarak araştırılmıştır.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Gereç

#### 2.1.1. Kullanılan Maddeler

PBS tablet (Fosfat Tampon Çözeltisi) (Sigma, ABD)

Kalsiyum klorür ( $\text{CaCl}_2$ ) (Merck, Almanya)

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Almanya)

Sodyum klorür ( $\text{NaCl}$ ) (Merck, Almanya)

Potasyum klorür ( $\text{KCl}$ ) (Merck, Almanya)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck, Almanya)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Almanya)

$\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Ambresco, ABD)

Tripsin ( 10 X Solusyonu T.4549 ) (Sigma, ABD)

F12 HAM ( 11-095-1 ) (Biological Industries, İsrail)

$\text{NaHCO}_3$  (Sigma, ABD)

Penicilin - Streptomycin Çözeltisi (Biological Industries, İsrail)

Fötal Sığır Serumumu (Sigma, ABD)

Nötral kırmızı boyası (Sigma, ABD)

Glasiyal asetik asit çözeltisi (Merck, Almanya)

Ethanol (Merck, Almanya)

Hidrojen klorür ( $\text{HCl}$ ) (Merck, Almanya)

Sodyum hidroksit ( $\text{NaOH}$ ) (Ambresco, ABD)

Sodyum dodesil sülfat ( SDS ) (Sigma, ABD)

Düşük erime dereceli agar (LMA) (Sigma, ABD)

Normal erime dereceli agar (NMA) (Ambresco, ABD)

Hidrojen peroksit (  $\text{H}_2\text{O}_2$  ) (Riedel-de Haen, ABD)

Tris.  $\text{HCl}$  (Ambresco, ABD)

Sodyum lauril sarkosinat (Ambresco, ABD)

Triton X-100 (Ambresco, ABD)

Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma, ABD)

Ethidium bromür (Sigma, ABD)

Trypan mavisi (Biological Industries, İsrail)

HeLa hücreleri (Technische Universität Berlin, Institut für Lebensmitteltechnologie und Lebensmittelchemie)

### **2.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler**

Laminar hava akımlı kabin (Clean Air, Biohazard EN 12469)

CO<sub>2</sub> inkübatörü (Sanyo, Japonya)

Soğutmalı santrifüj (Sigma, ABD)

Su banyosu (Boeco, Almanya)

Mikroskop (CETİ, Belçika)

İnverted mikroskop (Micros MCXL600, Avusturya)

Fluoresan mikroskop (Leica DM 1000, Almanya)

Comet Assay IV programı (Perceptive Instruments)

Hassas terazi (Sartorius, Türkiye)

Otoklav (Sanyo, Japonya)

Vorteks (Boeco, Almanya)

Spektrofotometre (SpectraMAX, Molecular Devices Inc., ABD)

Manyetik karıştırıcı ısıtıcılı (Heidolph MR Hei Standard, Almanya)

pH metre (WTW pH330i / SET, Almanya)

Vakum pompası (Neo Lab)

Lam ve lamel (Menzel Glaser, Almanya)

Membran filtre (0,22 µM, Corning)

Sayım lamı (Neubauer improved) (Marienfeld, Almanya)

Çalkalayıcı (96 kuyucuklu plakalar için ) (BDECO, Almanya)

Buz makinası (Hoshizaki, Japonya)

Santrifüj (Rotina 38, Hettich, ABD)

Elektroforez tankı (C.B.S., ABD)

Güç kaynağı (Thermo EC250-90, ABD)

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

**Tripsin Çözeltisi:** PBS / EDTA çözeltisi hazırlandı. Bunun için 584 mg NaCl, 33,5 mg KCl, 99,3 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40,8 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 22,14 mg EDTA tartıldı ve 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. pH 7,4'e ayarlandı. pH sı ayarlanan bu PBS / EDTA çözeltisi steril koşullarda süzüldü. Buradan 90 ml alındı, üzerine 10 ml Tripsin (Sigma T4549 ) steril koşullarda ilave edildi. Buzdolabında +4 °C'de saklandı. Kullanılmadan önce su banyosunda 37 °C'ye getirildi.

**F12 HAM Medyum (% 10'luk medyum):** F12 HAM'dan 5,318 g tartılıp üzerine 440 ml steril su ilave edildi ve manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Bu çözelti üzerine 0,588 g NaHCO<sub>3</sub> ilave edilip karıştırmaya devam edildi. pH metre yardımı ile pH'nın 7,0 olması sağlandı. Hazırlanan bu çözelti steril koşullarda süzüldü, üzerine 10 ml antibiyotik çözeltisi (Streptomisin / Penisilin) ve 50 ml fötal sığır serumu ilave edildi. (pH ayarlamak için kullanılan çözelti miktarı kullanılan steril su miktarından düşüldü.) Buzdolabında +4 °C'de saklandı. Kullanılmadan önce su banyosunda 37 °C'ye getirildi.

**F12 HAM Medyum (% 5 lik medyum):** F12 HAM'dan 5,318 g tartılıp üzerine 470 ml steril su ilave edildi ve manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Bu çözelti üzerine 0,588 g NaHCO<sub>3</sub> ilave edilip karıştırmaya devam edildi. pH metre yardımı ile pH'nın 7,0 olması sağlandı. Hazırlanan bu çözelti steril koşullarda süzüldü, üzerine 5 ml antibiyotik çözeltisi (Streptomisin / Penisilin) ve 25 ml fötal sığır serumu ilave edildi. (pH ayarlamak için kullanılan çözelti miktarı kullanılan steril su miktarından düşüldü.) Buzdolabında +4 °C'de saklandı. Kullanılmadan önce su banyosunda 37 °C'ye getirildi.

**PBS Çözeltisi:** 1 adet PBS tablet üzerine 0,01 g CaCl<sub>2</sub> ve 0,01 g MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O tartılıp distile su ile 100 ml'ye tamamlandı, manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Steril

koşullarda süzüldü. Buzdolabında +4 °C'de saklandı. Kullanılmadan önce su banyosunda 37 °C'ye getirildi.

**Nötral Kırmızı (NR) Stok Çözeltisi:** 0,4 g nötral kırmızı boyası 100 ml distile su içerisinde çözüldü. Oda sıcaklığında saklandı.

**Nötral Kırmızı (NR) Medyum:** 1 ml NR stok çözeltisi 79 ml medyum (Streptomisin / Penisilin çözeltisi ve fetal sığır serumu içermeyen) içerisinde çözüldü. 37'de 1 gün bekletildi. Oluşan NR kristallerini uzaklaştırmak için 22 µm'lik membran filtreden süzüldü.

**Nötral Kırmızı (NR) Medyumda Kullanılan F12 HAM Medyum:** F12 HAM'dan 5,318 g tartılıp üzerine 500 ml steril su ilave edildi ve manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Bu çözelti üzerine 0,588 g NaHCO<sub>3</sub> ilave edilip karıştırmaya devam edildi. pH metre yardımı ile pH'nın 7,0 olması sağlandı. Hazırlanan bu çözelti steril koşullarda süzüldü. (pH ayarlamak için kullanılan çözelti miktarı kullanılacak su miktarından düşüldü). Buzdolabında +4 °C'de saklandı. Kullanılmadan önce su banyosunda 37 °C'ye getirildi.

**Etanol / AsetikAsit Çözeltisi (NR Desorb):** 1 ml glasiyal asetik asit çözeltisi, 50 ml etanol, 49 ml distile su cam mezur içerisinde deneyin yapıldığı gün hazırlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi. 1 saatten daha fazla saklanmadı.

**% 2 DMSO Çözeltisi:** 0,2 ml steril DMSO 9,8 ml % 5 protein içeren medyum içerisinde çözüldü ve laminar hava akımlı kabinde süzülerek steril hale getirildi.

**1 N HCl:** 8,3 ml konsantre HCl çözeltisi alınıp 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

**1 N NaOH:** 4 gr NaOH tartılıp 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

**1 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Stok Çözeltisi:** 113,4 µl % 30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1000 µl'ye +4 °C deki distile su ile tamamlandı. Buzdolabında +4 °C'de saklandı.

**Lizing Stok Çözeltisi:** 146,1 g NaCl, 37,2 g EDTA, 1,2 g Tris tartıldı ve 500 ml distile su eklendi. 10 gr NaOH eklenerek pH 10'a ayarlandı. Kimyasallar tamamen çözüldükten sonra 10 g Na-laurilsarkosinat eklenip çözününceye kadar karıştırıldı. 890 ml' ye distile su ile tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

**Lizing Çözeltisi:** 0,7 ml Triton x-100, 7 ml DMSO, 63 ml lizing stok çözeltisi deneyin yapılacağı gün taze olarak karıştırıldı ve buzdolabında soğuyuncaya kadar bekletildi.

**10 N NaOH:** 200 g NaOH tartılıp 500 ml distile suda çözüldü. 2 hafta oda sıcaklığında saklandı.

**200 mM EDTA:** 14,89 g EDTA tartıldı, 200 ml suda çözüldü. pH 10'a ayarlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

**Elektroforez Çözeltisi:** 1254,5 ml soğuk su, 39 ml 10 N NaOH, 6,5 ml 200 mM EDTA deneyin yapılacağı gün karıştırıldı. Buzdolabında +4 °C'de saklandı.

**Nötralize Lizing Çözeltisi:** 48,5 g Tris tartılıp 750 ml distile suda çözüldü. pH 7,5'e ayarlandı. Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

**Ethidium Bromür Çözeltisi:** 10 mg ethidium bromür tartılıp 50 ml distile suda çözüldü (200 µg / ml ). Bu stok çözeltiden boyama sırasında 1ml alınıp, 9 ml distile su ilave edildi (20 µg / ml ). Her bir lama 20 µl damlatılarak kullanıldı. Oda sıcaklığında saklandı.

**Normal Erime Noktalı Agar ( NMA ) Çözeltisi:** % 1'lik çözeltisi PBS (Na ve K içermeyen) ile çözülerek hazırlandı. Çözelti henüz sıcak iken lamalar bu çözeltinin içine daldırılarak agar ile kaplandı ve kurutuldu.

**Düşük Erime Noktalı Agar ( LMA ) Çözeltisi:** % 0,75' lik çözeltisi PBS (Na ve K içermeyen) ile çözülerek hazırlanıp buzdolabında + 4 °C' de saklandı. Kullanılmadan önce su banyosunda 37 °C'ye getirildi.

### 2.2.2. HeLa Hücrelerinin Sıvı Azottan Çıkarılmaları

Azot içerisinde -196 °C'de saklanmakta olan HeLa hücreleri (1-3 milyon hücre/1,5 ml) alındı ve 37 °C'de çözünmesi sağlandı (HeLa hücrelerinin temininde sağladığı yardımlar için Prof. Dr. Andrea Hartwig'e teşekkür ederiz). Laminar hava akımlı kabinde sterilite koşullarına dikkat edilerek 15 ml'lik steril santrijüf tüpünde 10 ml (37 °C) medyum içerisine aktarıldı. Tüp 26 °C'de, 1500 rpm'de, 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üst fazda medyum ile DMSO, alt fazda ise hücreler bulunuyordu. Üst faz pastör pipeti yardımıyla steril koşullarda vakumla atıldıktan sonra alt fazdaki hücrelerin üzerine 10 ml medyum ilave edildi. Hücreler medyum içerisine pipetle çek-bırak yöntemi kullanılarak homojen olarak dağıtıldı. Hücrelerin hepsi alınıp içerisinde 10 ml medyum bulunan 75 cm<sup>2</sup>'lik flaskla inkübatöre kaldırıldı (37°C, % 5 CO<sub>2</sub>). Azottan çıkan hücrelerin ürememe, çoğalmama olasılığına karşı pasajlama işlemini birkaç kez tekrarladıktan sonra hücrelerin düzenli çoğalıp çoğalmadığına bakıldı.

### 2.2.3. HeLa Hücrelerinde Yeni Pasajın Yapılması

CO<sub>2</sub> inkübatöründe (37°C, % 5 CO<sub>2</sub>) flask içerisinde duran hücrelerden yaşamaya devam edenler flask yüzeyine yapışıp mekik şeklini alırken, ölmüş olan hücreler medyum içerisinde yüzerler.

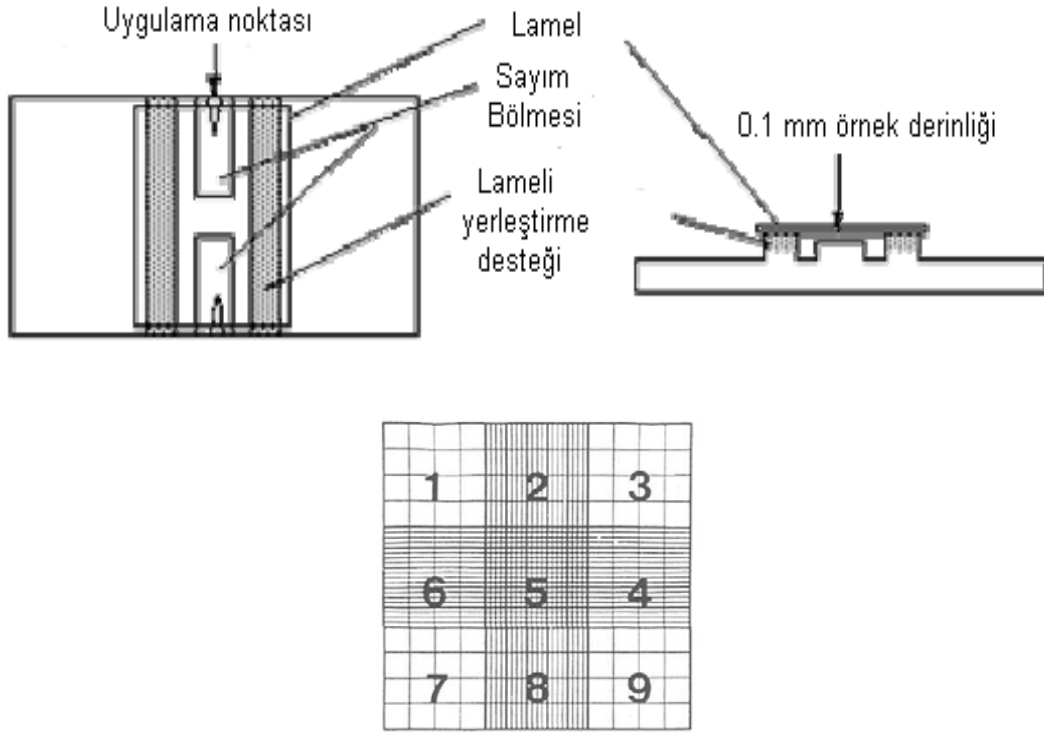
CO<sub>2</sub> inkübatöründe flask içerisinde beklemiş olan hücrelere mikroskop altında bakıldı ve hücrelerin yaşamaya devam ettiğine karar verdikten sonra hücrelerin yeni medyum içerisine alınması için gerekli işlemlere başlandı.

Steril flask, laminar hava akımlı kabinde sterilitesi bozulmadan açıldı. Steril pastör pipeti yardımı ile flask içerisindeki medyum aspire edildi. Daha önceden su banyosunda ısıtılıp 37 °C'ye getirilmiş olan steril tripsin çözeltisi uygun şekilde açılıp flaskın hacmine göre hesaplanmış olan miktardaki çözelti flask içerisine konuldu. Tripsin çözeltisi hücrelerin bulunduğu yüzeyin hepsine temas edecek şekilde 2 - 3 saniye boyunca flask yüzeyinde gezdirildi. Tripsin çözeltisi flask içerisinden aspire edilip hesaplanmış miktardaki tripsin çözeltisi tekrar konulup 20 saniye boyunca flask yüzeyinde gezdirildi. Flaskın sterilitesi sağlandıktan sonra kapatılıp 2 dakika 37 °C'ye ayarlı olan CO<sub>2</sub> inkübatöründe bekletildi. Flask yüzeyine yapışmış olan hücreler mekanik yardımıyla (gerekliyse) yüzeyden koparıldı. Mikroskop ile bakarak hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edildi. Flask laminar hava akımlı kabinde uygun koşullarda açılıp hücreler daha önceden hesaplanmış miktardaki medyum içerisinde steril tüpe alındı. Medyum içerisindeki hücrelerin sayıları belirlendi (detay için bölüm 2.2.4.'e bakınız) ve CO<sub>2</sub> inkübatöründe kaç gün bekletileceğine bağlı olarak uygun sayıdaki hücre uygun miktardaki medyumla uygun hacimdeki flask içerisine konuldu. Hücrelerin homojen dağılması sağlanıp flask yüzeyine tarih, saat, hücre adı, pasaj sayısı ve hücre sayısı yazılarak 37 °C'ye ayarlı olan CO<sub>2</sub> inkübatörüne kaldırıldı.

#### **2.2.4. Hücre Sayımı**

Flask içerisindeki hücreler yeni medyuma alınıp steril tüp içerisine konulduktan sonra 100 µl hücre eppendorf içerisine alınıp üzerine 100 µl trypan mavisi ilave edildi (dilasyon faktörü = 2). Trypan mavisi ile hücreler homojen olarak karıştırıldıktan sonra karışımın 100 µl'si bekleme yapılmadan üzerine lamel kapatılmış improved Neubauer sayım lamına uygulandı. Lamın 4 köşesindeki ve ortasındaki karelerde bulunan hücreler sayıldı. Beş bölgenin ortalaması alındı ve

dilüsyon faktörüyle her karenin hacminin çarpımı olan 20.000 ile çarpılarak 1 ml'deki hücre sayısı bulundu.



Şekil 2. 1. Hücre sayım lamı (Improved Noubauer)

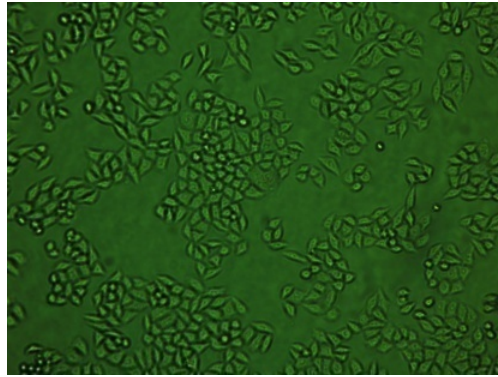
1, 3, 5, 7 ve 9 numaralı karelerdeki hücreler sayıldı. 1, 3, 7 ve 9 numaralı karelerin (köşe kareler) içerisinde 16 adet küçük kare, 5 numaralı karenin (merkez kare) içerisinde ise 25 adet küçük kare bulunmaktadır. 9 büyük kareden her biri  $1\text{mm}^2$ 'dir ve derinlik  $0,1\text{ mm}$ 'dir, buna göre her karedeki hacim  $0,1\text{ mm}^3$ 'tür ( $0,0001\text{ml}$ ).

Sayım yapılırken soldan sağa, yukarıdan aşağıya gidildi. Aynı hücreyi iki kez saymamak amacıyla, karelerin sol ve üst çizgilerine temas eden hücreler sayıldı, alt ve sağ çizgilere temas eden hücreler sayılmadı. Sayılan 5 karedeki hücrelerin ortalaması alındı, dilüsyon faktörü ve  $10^4$  ile çarpılarak 1 ml'deki hücre sayısı hesaplandı.

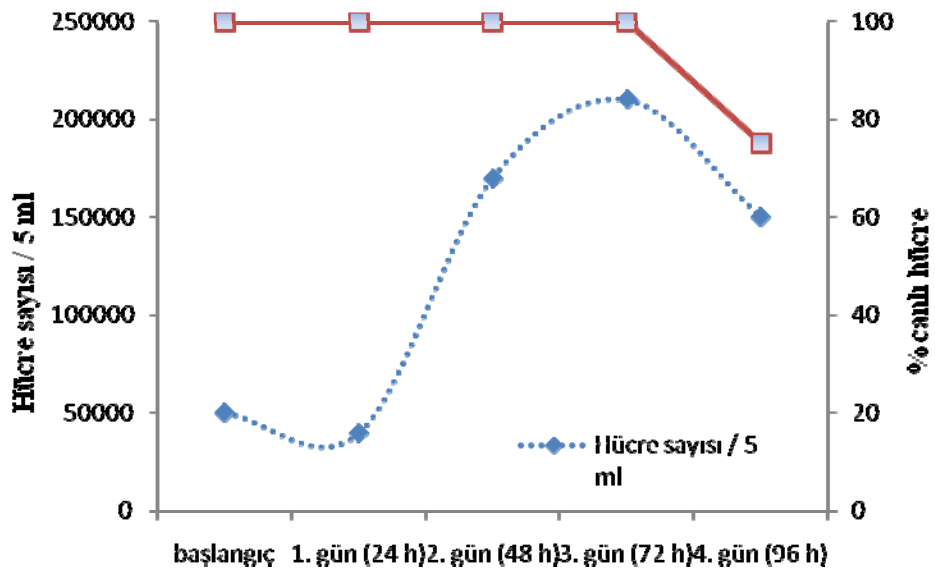
$$\frac{\text{Toplam Hücre Sayısı}}{5} \times 10^4 \times 2 \text{ (dilüsyon faktörü)} = 1 \text{ ml'deki hücre sayısı}$$

### 2.2.5. Hücrelerin Düzenli Çoğalmasının Kontrolü

Steril 8 petriye 1. gün uygun sayıdaki hücre uygun hacimdeki medyum içerisinde konuldu. Petriyer CO<sub>2</sub> inkübatörüne kaldırıldı. Petri üzerine tarih, saat, hücre adı, hücre sayısı yazıldı ve kaçınıcı gün sayımın yapılacağını belirten bir işaret konuldu. Petriyelerden 2 şer tanesinde 2., 3., 4. ve 5. günlerde hücre sayımı yapıp sonuçları grafiğe geçirildi. Uygun bir çoğalma eğrisi elde edildiğinde hücrelerin düzenli olarak çoğaldıklarına karar verilmiştir. Düzenli çoğaldığı gözlenen hücreler daha sonraki deneylerde kullanılmıştır.



Şekil 2. 2. HeLa hücreleri



Şekil 2. 3. HeLa hücrelerinin düzenli çoğalma grafiği

### **2.2.6. Sitotoksisite Testinin Uygulanması**

Kimyasal maddelerin sitotoksisite testleri yapılırken toksisite değerleri daha önceden bilinen sodyum dodosil sülfat (SDS) ile testin doğruluğu kontrol edildi. Bir başka deyişle SDS yapmış olduğumuz sitotoksisite testlerinde pozitif kontrol olarak kullanıldı.

#### **2.2.6.1. SDS'nin Sitotoksisite Testinde Pozitif Kontrol Olarak Kullanılması**

Kültürü yapılan hücreler ml'de 10.000 hücre olacak şekilde % 10 protein içeren medyum içerisine alınıp her bir kuyucuğa 100 µl konuldu ve CO<sub>2</sub> inkübatöründe 24 saat inkübe edildi. SDS'nin % 5 protein içeren medyum içerisinde 200 µg/ml'lik çözeltisi hazırlandı ve 0,2 µm por genişliğindeki süzgeçten süzülerek steril hale getirildi. SDS'nin 8 farklı konsantrasyonu hazırlanarak (200 µg/ml, 100 µg/ml, 68,1 µg/ml, 46,4 µg/ml, 31,6 µg/ml, 21,5 µg/ml, 14,7 µg/ml, 10 µg/ml) toksik dozu belirlendi.

Kullanılacak olan 96 kuyucuklu plağın 1. ve 12. sütunları blank olarak, 2. ve 11. sütunları kontrol grubu olarak (içerisinde sadece hücre olan % 5 lik medyum konuldu) kullanıldı. Diğer sütunlara ise SDS azalan konsantrasyonlarda ilave edildi. SDS ile yapılan sitotoksisite deneylerinde 2 ayrı plaka ile çalışılarak deneyin kendi içindeki uyumluluğu (tekrarlanabilirliği) kontrol edildi.

#### **2.2.6.2. Test Edilecek Kimyasal Maddelerin Sitotoksisite Testleri**

SDS için yapılan sitotoksisite testinde olduğu gibi kültürü yapılan hücreler ml'de 10.000 hücre olacak şekilde % 10 protein içeren medyum içerisine alınıp her bir kuyucuğa 100 µl konuldu ve CO<sub>2</sub> inkübatöründe 24 saat inkübe edildi. Test edilecek kimyasal maddelerin 5 mg'ını 1 ml dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözüp 0,2 µm por genişliğindeki filtreden geçirerek steril hale getirildi. Bu steril çözeltiden 0,2

ml alınıp 5 ml'ye % 5'lik medyum ile tamamlanarak 200 µg/ml'lik çözelti elde edildi. Kimyasal maddeleri çözmek için kullanılan DMSO % 2 konsantrasyonun üzerinde toksik etki gösterdiğinden ilk konsantrasyon 100 µg/ml olacak şekilde 8 farklı konsantrasyon (100 µg / ml, 56,23 µg/ml, 31,62 µg/ml, 17,78 µg/ml, 10 µg/ml, 5,62 µg/ml, 3,16 µg/ml, 1,78 µg/ml) hazırlandı ve toksik doz belirlendi.

Kullanılacak olan 96 kuyucuklu plağın 1. ve 12. sütunları blank olarak, 2. sütunu kontrol grubu olarak (içerisinde sadece hücre olan % 5 lik medyum konuldu), 11. sütunu DMSO'nun % 2 konsantrasyonunun HeLa hücreleri için toksik olup olmadığını gözlemek için kullanıldı. Diğer sütunlara ise kimyasal maddeler azalan konsantrasyonlarda ilave edildi. Her bir kimyasal maddenin sitotoksisite deneyinde 2 ayrı plaka ile paralel çalışılarak deneyin kendi içindeki uyumluluğu (tekrarlanabilirliği) kontrol edildi.

Test edilen kimyasal maddelerin sitotoksisitesi araştırılırken herbir set içinde pozitif kontrol olarak SDS'ninde sitotoksisitesi test edildi. Bu sayede testin doğru işleyip işlemediği her deney setinde kontrol edilmiş oldu.

### **2.2.6.3. Sitotoksisite Testi (Nötral Kırmızı Alımı – Neutral Red Uptake)**

#### *1. Gün*

- Kültürü yapılan hücrelerin ml'deki sayısı belirlenip ml de 10.000 hücre olacak şekilde % 10'luk medyum içerisinde hücre süspansiyonu hazırlandı. Homojen hale getirilen çözülden 96 kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna 100 µl konuldu. Plakalar 24 saat boyunca 37 °C'lik CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübe edildi.
- PBS çözeltisi hazırlanıp buzdolabında muhafaza edildi.
- SDS'nin % 5 protein içeren medyum içerisindeki 200 µg/ml'lik çözeltisi hazırlandı.
- Test edilecek olan kimyasal maddeler DMSO içerisinde çözüldü.

## 2. Gün

- Hazırlanan SDS ve test kimyasalları filtreden süzülüp steril hale getirildi ve konsantrasyonları ayarlandı.
- Kuyucuklar içerisindeki % 10 protein içeren medyum aspire edildi. Plakanın 1., 2. ve 12. sütunlarına % 5 protein içeren medyumdan 100 µl eklendi, 11. sütuna 100 µl % 2 DMSO çözeltisi ilave edildi (SDS ile yapılan çalışmalarda 11. sütuna da medyum eklendi). Plakanın diğer sütunlarına SDS ya da test kimyasalları azalan konsantrasyonlarda eklendi. Plakalar 24 saat boyunca 37 °C'lik CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübe edildi.
- NR medyum hazırlandı ve 37 °C'lik CO<sub>2</sub> inkübatörüne kaldırıldı.

## 3. Gün

- Buzdolabında saklanmakta olan PBS su banyosunda 37 °C'ye getirildi.
- Kuyucuklar içerisindeki % 5 protein içeren medyum aspire edildi.
- Artıkları temizlemek için kuyucuklar 150 µl PBS ile yıkandı ve ardından PBS aspire edildi.
- Süzülerek kristalleri uzaklaştırılmış olan NR medyumdan 100 µl ilave edildi ve 37 °C'lik CO<sub>2</sub> inkübatöründe 3 saat inkübe edildi.
- Plakaların CO<sub>2</sub> inkübatöründen çıkarılmasına 1 saatten az bir süre kala etanol/asetik asit çözeltisi (NR desorb) hazırlandı.
- Belirtilen saatin sonunda CO<sub>2</sub> inkübatöründen çıkartılan plakalar içerisindeki NR medyum aspire edilip kuyucuklar 150 µl PBS ile yıkandı ve ardından PBS aspire edildi. Plakalar 2500 g 'de 5 dakika santrifüj edilerek kurutuldu.
- Bekletilmeden 150 µl NR desorb ilave edildi. Bu aşamada renklenme gözlemlendi.
- Homojenliği sağlamak amacıyla plakalar 10 dakika boyunca mikropilaya çalkalayıcısında çalkalandı.
- Her bir kuyucuk 540 nm dalga boyunda okundu ve okunan absorbans değerine göre sitotoksosite düzeyi belirlendi.

### 2.2.6.4. Sitotoksik Dozun Belirlenmesi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
B	b	NK	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	DMSO	b
C	b	NK	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	DMSO	b
D	b	NK	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	DMSO	b
E	b	NK	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	DMSO	b
F	b	NK	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	DMSO	b
G	b	NK	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	DMSO	b
H	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b

**Şekil 2. 4.** Nötral kırmızı alımı sitotoksosite testinde kullanılan plaka

- b = Blank
- NK = Negatif kontrol (Hücrelerin bu kuyucuktaki canlılık oranı % 100 kabul edilecektir)
- DMSO = Dimetilsülfoksit
- K1 - K8 = Test edilen kimyasal maddelerin yüksekten düşüğe doğru 8 farklı konsantrasyonu.

SDS ile yapılan çalışmalarda 11. Sütun da negatif kontrol olarak kullanıldı.

$$\text{Ortalama}_{\text{NK}} = (2C+2D+2E+2F) / 4$$

$$\text{Ortalama}_{\text{Blank}} = (1C+1D+1E+1F+12C+12D+12E+12F) / 8$$

$$\text{Ortalama}_{\text{K1}} = (3C+3D+3E+3F) / 4$$

$$\text{Ortalama}_{\text{K2}} = (4C+4D+4E+4F) / 4$$

$$\text{Ortalama}_{\text{K3}} = (5C+5D+5E+5F) / 4$$

$$\text{Ortalama}_{\text{K4}} = (6C+6D+6E+6F) / 4$$

$$\text{Ortalama}_{\text{K5}} = (7C+7D+7E+7F) / 4$$

$$\text{Ortalama}_{K6} = (8C+8D+8E+8F) / 4$$

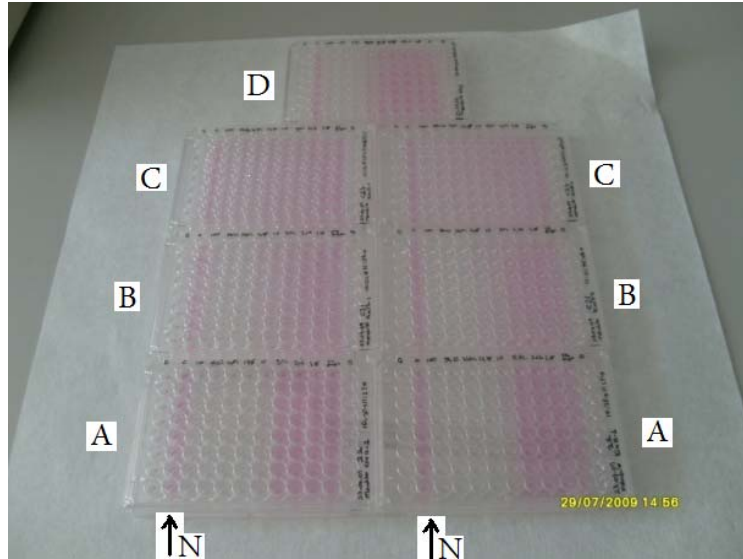
$$\text{Ortalama}_{K7} = (9C+9D+9E+9F) / 4$$

$$\text{Ortalama}_{K8} = (10C+10D+10E+10F) / 4$$

$$\% \text{ Canlilik} = \left( \frac{\text{Ortalama}_{K} - \text{Ortalama}_{\text{Blank}}}{\text{Ortalama}_{NK} - \text{Ortalama}_{\text{Blank}}} \right) \times 100$$

$$IC_{50} = \frac{(50 - \text{Düşük } \%)}{(\text{Yüksek } \% - \text{Düşük } \%)} \times \left( \text{Yüksek Konsantrasyon} - \text{Düşük Konsantrasyon} \right) + \text{Düşük Konsantrasyon}$$

- Düşük % = % 50'den daha düşük dozdaki inhibisyonun yüzdesi
- Düşük Konsantrasyon = Test kimyasalı ya da pozitif kontrolün düşük dozdaki konsantrasyonu
- Yüksek % = % 50'den daha yüksek dozdaki inhibisyonun yüzdesi
- Yüksek Konsantrasyon = Test kimyasalı ya da pozitif kontrolün yüksek dozdaki konsantrasyonu
- $IC_{50}$  = Kontrole göre % 50 oranında sitotoksik etki gösteren konsantrasyon



**Şekil 2. 5.** Sitotoksisite çalışmalarında kullanılan plakalar. A,B,C: Test edilen her kimyasal madde için kullanılan dublikat mikroplakalar. D: Herbir set ile birlikte kullanılan pozitif kontrol (SDS) mikroplakası. N: Herbir plakadaki negatif kontroller.

## 2.2.7. Genotoksisite Testi

### 2.2.7.1. HeLa Hücrelerinde DNA Hasarı Tespiti (Comet Testi - Comet Assay)

Sitotoksisite test sonuçlarına göre IC<sub>50</sub> değerleri kabul edilebilir seviyede bulunan kimyasal maddeler için DNA hasarı testi (Comet) uygulanmıştır. Bu test neticesinde test edilen kimyasal maddelerin IC<sub>50</sub> değerinin altındaki konsantrasyonlarda DNA hasarı oluşturma potansiyeline sahip olup olmadığı (genotoksik olup olmadığı) tespit edilmiştir.

Deneyin doğruluğunu kontrol etmek amacıyla test ilk olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> maruz bırakılan HeLa hücreleri ile yapıldı. Genotoksisitesine bakılacak her bir kimyasal madde için toksisite testi yapılırken H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile maruz bırakılmış HeLa hücreleri pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Test edilen her kimyasal madde için 2 ayrı paralel test yürütülerek yapılan testlerin doğruluğu kontrol edildi.

#### 1. Gün

- Yapılacak olan Comet testi için 25 cm<sup>2</sup> lik flask içerisine yeterli sayıda hücre alındı (genelde ml de 500.000 kullanıldı) ve CO<sub>2</sub> inkübatöründe (37 °C, % 5 CO<sub>2</sub>) 48 saat inkübe edildi.

#### 2. Gün

- Hücreler CO<sub>2</sub> inkübatöründe tutulmaya devam edildi.

### 3. Gün

- Hücrelerin yaşadığı mikroskopta gözle yapılan kontrolden sonra genotoksitesine bakılacak olan kimyasal maddelerin hesaplanan miktarları petri içerisine ilave edildi ve petriler bu şekilde 2 saat inkübe edildi ( $H_2O_2$  ile yapılan testlerde bu aşamada kimyasal ilave edildikten sonra 5 dakika beklendi).
- Belirtilen sürelerin sonunda flask içerisindeki medyum aspire edildi, tripsin yardımıyla hücreler yapıştıkları yüzeyden kaldırıldı.
- Flask içerisine 5 ml soğuk PBS ilave edildi.
- Pipetle flask içerisindeki hücreler alındı ve steril santrifüj tüpüne aktarıldı.
- Tüpler 5 dakika, 8 °C de, 1300 rpm de santrifüj edildi.
- Buz içerisine saptanarak soğuk tutulan tüplerdeki üst fazlar steril pastör pipeti ile atıldı.
- Hücreler soğuk PBS ile 5 ml ye tamamlandı.
- Çek bırak yardımıyla homojen bir şekilde dağıtılan hücreler lama yayıldı.

#### Hücreleri agara alma işlemi:

Yukarıda anlatıldığı şekilde soğuk PBS içerisine alınmış olan hücreler her bir lamda 10.000-20.000 arasında hücre olacak şekilde hesaplanarak, 50 µl hücre süspansiyonu ile 37 °C'de eritilmiş 100 µl % 0,5'lik LMPA karıştırıldıktan sonra önceden % 1'lik NMPA çözeltisine daldırılıp agar ile kaplanmış lamlara yayıldı. Lamaların üzerine lamel kapatıldıktan sonra buzlu metal yüzey üzerinde yaklaşık olarak 5 dakika bekletilerek agarın katılaşması sağlandı.

#### Lizing:

Lamlar daha önceden hazırlanıp buzdolabında bekletilen soğuk lizing çözeltisine daldırılarak en az 1 saat süreyle buzdolabında bekletildi.

### Alkali uygulaması ve elektroforez:

Elektroforez tankı soğuk elektroforez çözeltisi ile uygun miktarda dolduruldu. Lizing çözeltisinden çıkarılan lamalar agar yayılan kısımları üste gelecek şekilde elektroforez tankının içine yerleştirildi. Lamlar, 20 dakika akım uygulamadan bu çözeltide bekletildikten sonra, 25 V ve 300 mA akım uygulayarak 20 dakika elektroforez uygulandı.

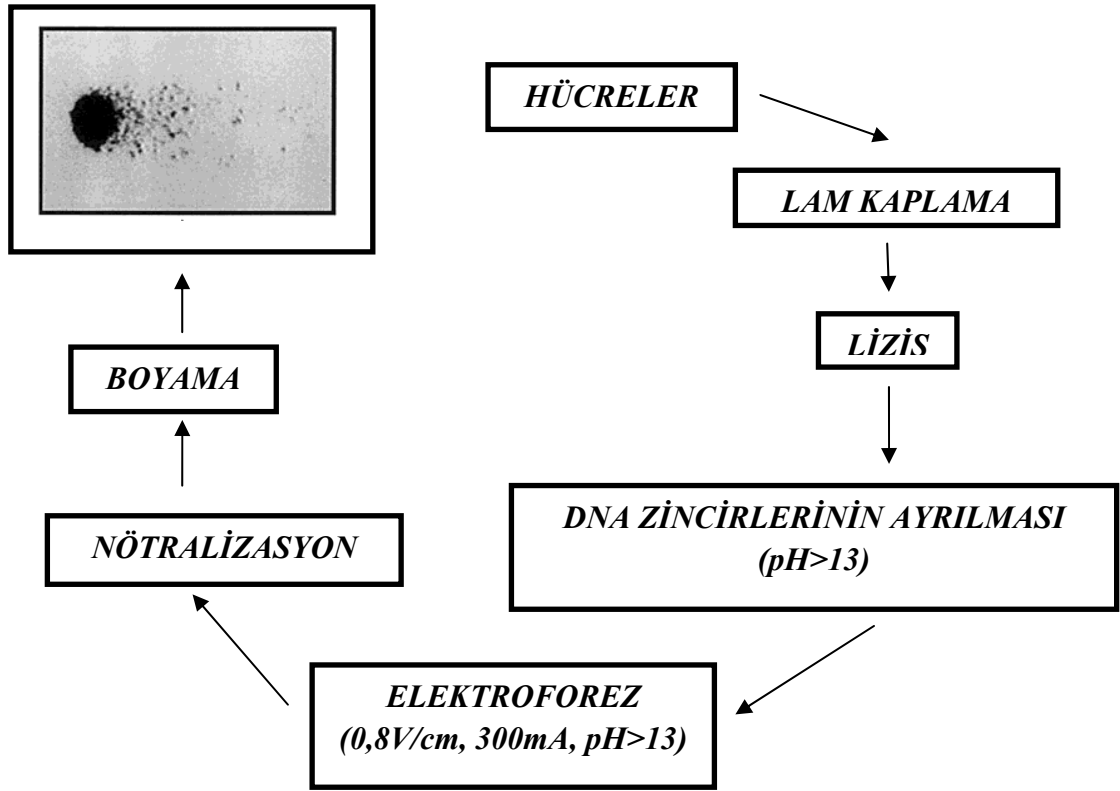
### Nötralizasyon ve hücrelerin fikse edilmesi:

Elektroforez aşaması bittikten sonra elektroforez tankından çıkarılan lamalar nötralize lizing çözeltisi ile yıkandı. Hücreleri lamlara fikse etmek amacıyla alkol içerisine daldırılan lamalar okuma yapıncaya kadar karanlık bir ortamda saklandı.

### Boyama ve mikroskopta değerlendirme:

Değerlendirmesi yapılacak lamalar üzerine 60 µl (20 µg/ml) etidium bromür çözeltisi ilave edildi ve en az 10 dakika beklendikten sonra fluoresan mikroskopta okuma yapıldı. Her lamda 100 hücre okundu. Tüm okumalar Comet Assay IV (perceptive Instruments) programı kullanılarak yapılmıştır.

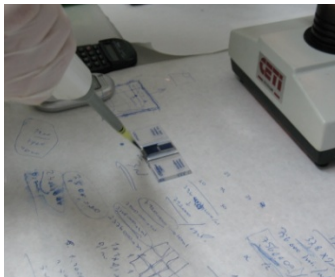
Elde edilen sonuçlardan kimyasal maddelerin ortalama kuyruk yoğunluğu ve ortalama kuyruk momenti kontrol grubu ile kıyaslandı.



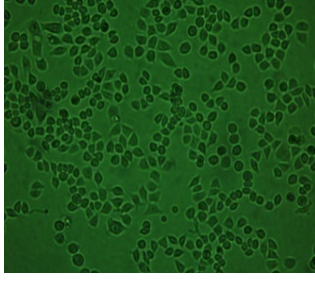
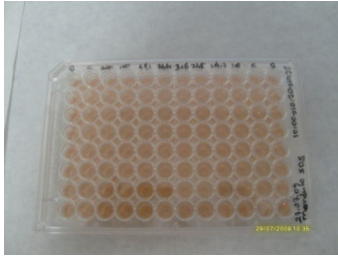
**Şekil 2. 6.** Alkali Comet tekniğinde kritik basamakların şematik gösterimi (Tice ve ark., 2000)

### 2.3. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

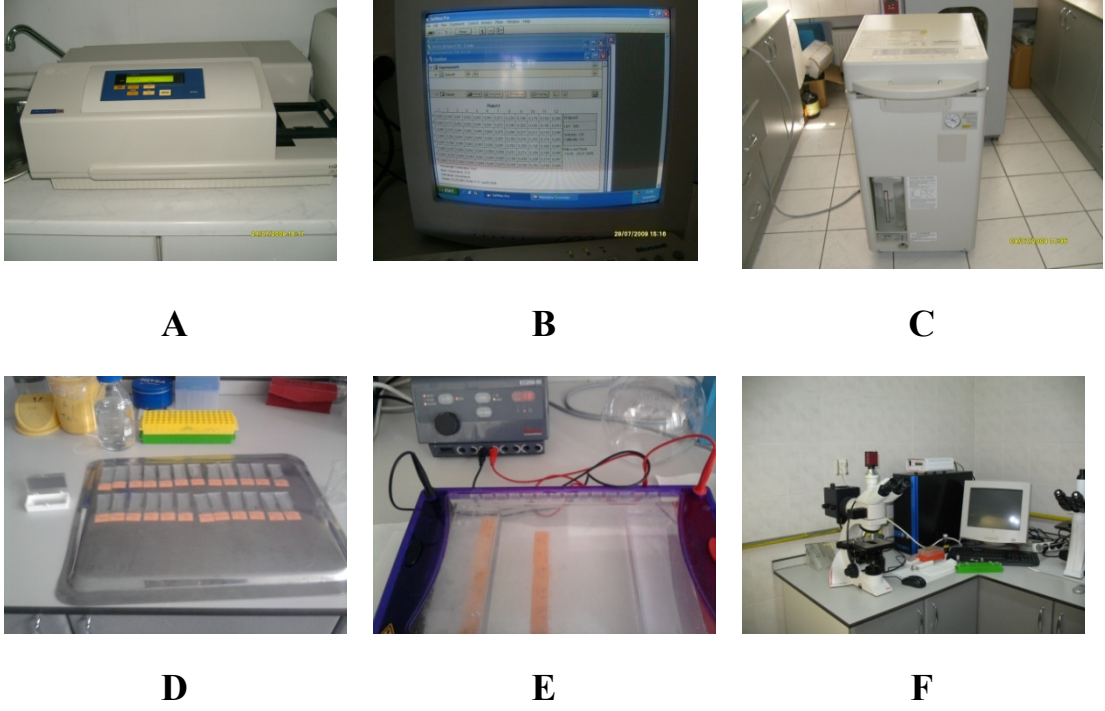
Kimyasal maddelere maruz kalan HeLa hücrelerinde Comet testi uygulanarak hesaplanan kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti değerlerinin, herhangi bir kimyasal maddeye maruz kalmayan HeLa hücrelerinden hesaplanan kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti değerleri ile karşılaştırılarak istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı “t Testi” ile kontrol edilmiştir.

**A****B****C****D****E****F****G****H****I**

**Şekil 2. 7.** A: Buzdolabında korunan çözeltiler, B: 37 °C de bekletilen çözeltiler, C: CO<sub>2</sub> li inkübatör, D: İnkübatörde bekletilen mikropılaka ve reaktifler, E: Hücrelerin laminar hava akımlı kabininde çoğaltılması, F: Hücrelerin tripan mavisi ile muamelesi, G: Hücrelerin sayım için Improved Neubauer lamına yerleştirilmesi, H: Kullanılan mikroskoplar, I: Test edilen kimyasal maddelerin seri dilüsyonları.

**A****B****C****D****E****F**

**Şekil 2. 8.** A: HeLa hücreleri, B: Nötral kırmızısı çözeltisi, C: Mikroplakaların yıkanması ve aspirasyonu, D: Nötral kırmızı çözeltisi uygulanmış bir plaka, E: Mikroplakalardaki fazla çözeltilerin aspirasyonunda kullanılan vakum, F: Mikroplaka çalkalayıcı.



**Şekil 2. 9.** A: Mikroplaka okuyucu, B: Okunan sonuçlar, C: Otoklav, D: Comet testi slaytları, E: Slaytların elektroforez işlemi, F: Floresan mikroskop ve Comet okuma istasyonu.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Nötral Kırmızı Alımı Sitotoksisite Testi ile Elde Edilen Sonuçlar

Her bir kimyasal madde (pozitif kontrol dahil) çift çalışılmıştır. Sonuçlar verilirken ilk olarak spektrofotometrede yapılmış olan okuma sonuçları verilmiştir. Ardından bu okuma sonuçlarından aşağıdaki formül kullanılarak elde edilmiş olan konsantrasyon - % canlılık verileri ve bu veriler ile elde edilmiş olan grafikler gösterilmiştir. Bölüm 2.2.6. da belirtildiği gibi sitotoksisite çalışmalarında pozitif kontrol olarak SDS kullanılmıştır.

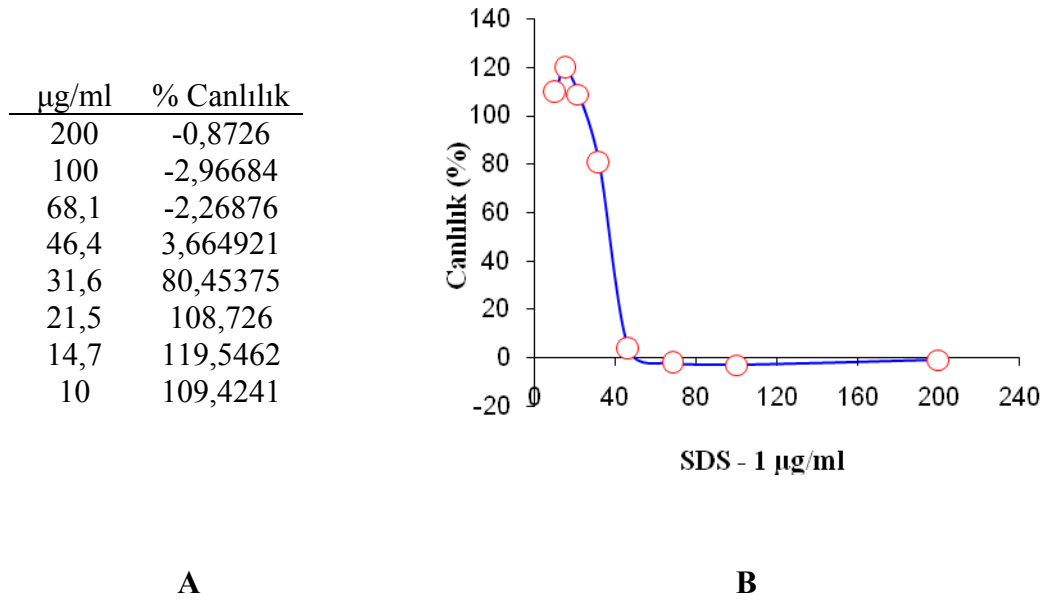
$$\% \text{ Canlılık} = \left( \frac{\text{Ortalama}_K - \text{Ortalama}_{\text{blank}}}{\text{Ortalama}_{\text{SDS}} - \text{Ortalama}_{\text{blank}}} \right) \times 100$$

#### 3.1.1. SDS (Pozitif Kontrol) İçin Elde Edilen Sonuçlar

##### SDS - 1

**Çizelge 3. 1.** HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan SDS - 1 ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	200 µg/ml	100 µg/ml	68,1 µg/ml	46,4 µg/ml	31,6 µg/ml	21,5 µg/ml	14,7 µg/ml	10 µg/ml	C	B
A	0,042	0,119	0,043	0,044	0,041	0,042	0,114	0,122	0,126	0,119	0,136	0,039
B	0,04	0,1	0,069	0,039	0,039	0,044	0,1	0,122	0,128	0,133	0,16	0,041
C	0,042	0,104	0,041	0,04	0,041	0,044	0,109	0,111	0,131	0,118	0,151	0,042
D	0,042	0,117	0,043	0,04	0,041	0,046	0,1	0,117	0,147	0,119	0,146	0,045
E	0,041	0,122	0,042	0,042	0,041	0,046	0,099	0,118	0,116	0,118	0,182	0,045
F	0,04	0,114	0,042	0,04	0,041	0,045	0,093	0,136	0,119	0,129	0,134	0,044
G	0,043	0,077	0,042	0,044	0,052	0,056	0,094	0,105	0,148	0,122	0,087	0,045
H	0,04	0,093	0,041	0,042	0,041	0,045	0,102	0,1	0,12	0,107	0,141	0,043



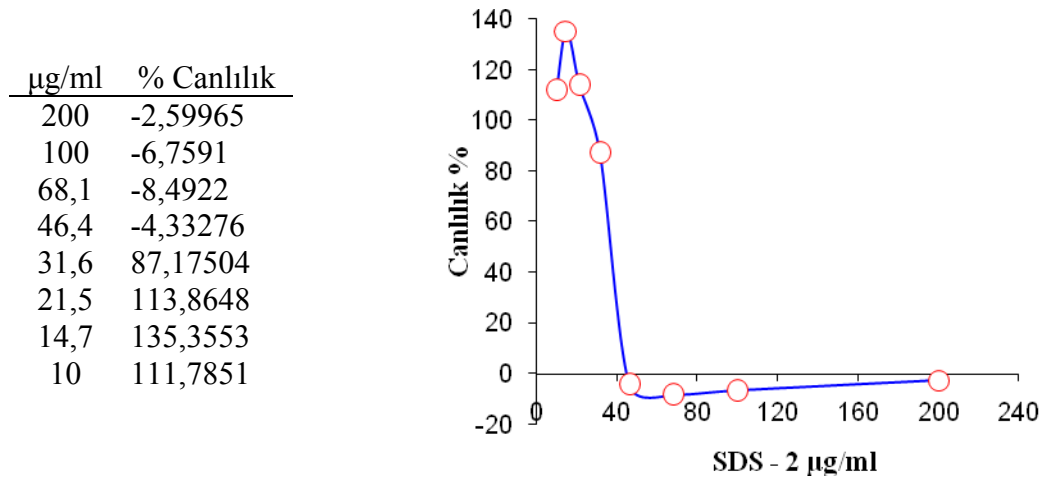
**Şekil 3. 1.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan SDS - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksosite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksosite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

SDS - 1:  $IC_{50} = 40,531 \mu\text{g/ml}$

## SDS - 2

**Çizelge 3. 2.** HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan SDS - 2 ile nötral kırmızı alımı sitotoksosite test sonuçları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	200 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	68,1 $\mu\text{g/ml}$	46,4 $\mu\text{g/ml}$	31,6 $\mu\text{g/ml}$	21,5 $\mu\text{g/ml}$	14,7 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	C	B
A	0,045	0,079	0,04	0,042	0,066	0,043	0,105	0,121	0,85	0,136	0,13	0,043
B	0,042	0,112	0,042	0,038	0,037	0,04	0,104	0,119	0,133	0,128	0,119	0,047
C	0,047	0,117	0,041	0,039	0,039	0,043	0,11	0,13	0,128	0,14	0,129	0,045
D	0,047	0,119	0,043	0,044	0,042	0,046	0,106	0,115	0,141	0,122	0,129	0,047
E	0,045	0,116	0,052	0,045	0,041	0,043	0,113	0,141	0,162	0,133	0,133	0,051
F	0,044	0,125	0,045	0,041	0,042	0,044	0,111	0,131	0,148	0,116	0,134	0,051
G	0,048	0,13	0,047	0,045	0,041	0,045	0,113	0,115	0,121	0,134	0,12	0,049
H	0,043	0,121	0,048	0,042	0,041	0,045	0,105	0,126	0,112	0,113	0,127	0,048



A

B

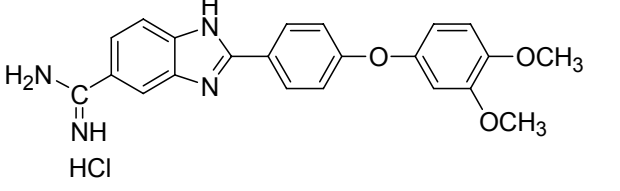
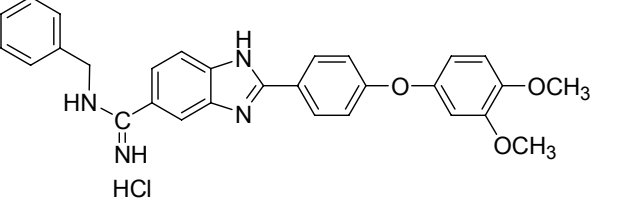
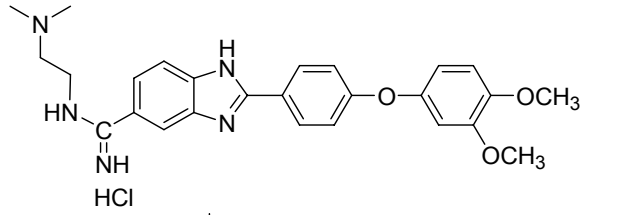
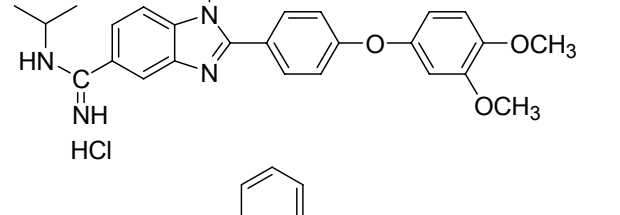
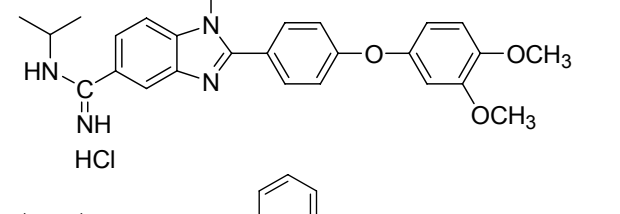
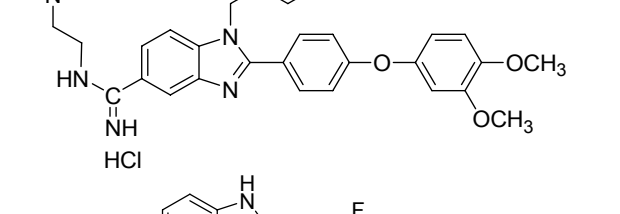
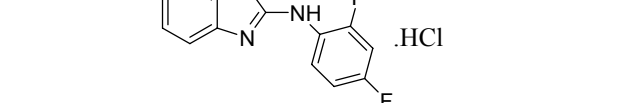
**Şekil 3. 2.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan SDS - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksosite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksosite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

SDS - 2:  $IC_{50} = 40,089 \mu\text{g/ml}$

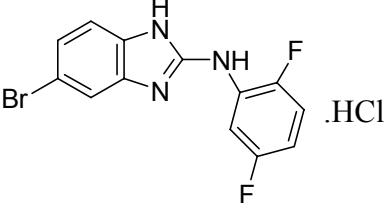
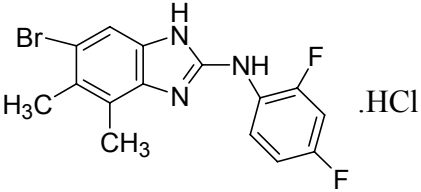
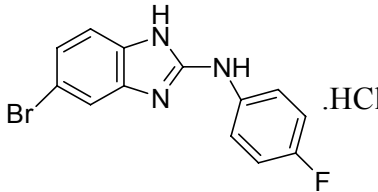
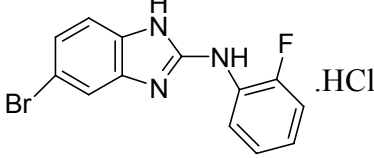
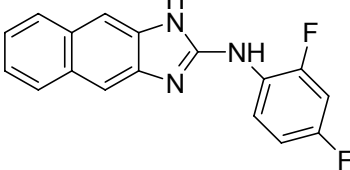
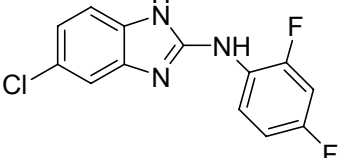
### 3.1.2. Sitotoksosite Testlerinde Kullanılan Test Kimyasalları

Aşağıdaki kimyasal maddeler Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalında sentezlenmiş olan antibakteriel ve antifungal etkili oldukları düşünülen kimyasal maddelerdir.

**Çizelge 3. 3.** Toksikite testlerinde kullanılan ve antibakteriel ve antifungal etkili olması amacıyla sentezlenen kimyasal maddelerin formülleri

Kimyasal Madde Kodu	Kimyasal Madde Formülü
13	
19	
20	
21	
22	
23	
C8	

**Çizelge 3. 3. Devam** Toksikite testlerinde kullanılan ve antibakteriel ve antifungal etkili olması amacıyla sentezlenen kimyasal maddelerin formülleri

Kimyasal Madde Kodu	Kimyasal Madde Formülü
C10	
C11	
C13	
C14	
C26	
C31	

### 3.1.3. Test Edilen Kimyasal Maddelerin Sitotoksosite Test Sonuçları

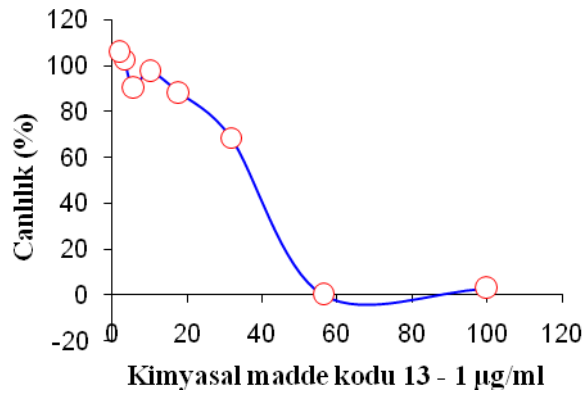
Herkimyasal madde 2 kez (dublikat) test edilmiştir.

#### Kimyasal madde kodu: 13 - 1

**Çizelge 3. 4.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 13 – 1 (13 nolu kimyasal maddenin ilk test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksosite test sonuçları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	100 µg/ml	56,23 µg/ml	31,62 µg/ml	17,78 µg/ml	10 µg/ml	5,62 µg/ml	3,16 µg/ml	1,78 µg/ml	DMSO	B
A	0,041	0,201	0,053	0,043	0,146	0,167	0,17	0,173	0,174	0,185	0,145	0,049
B	0,038	0,212	0,045	0,04	0,145	0,184	0,19	0,194	0,202	0,198	0,185	0,044
C	0,039	0,204	0,044	0,041	0,147	0,162	0,191	0,196	0,218	0,196	0,167	0,043
D	0,041	0,182	0,053	0,043	0,148	0,163	0,183	0,178	0,193	0,192	0,165	0,043
E	0,044	0,171	0,046	0,043	0,12	0,149	0,18	0,157	0,163	0,194	0,154	0,043
F	0,046	0,202	0,044	0,044	0,159	0,215	0,19	0,171	0,201	0,211	0,146	0,042
G	0,039	0,194	0,048	0,044	0,125	0,179	0,17	0,177	0,176	0,21	0,159	0,043
H	0,042	0,199	0,047	0,042	0,146	0,19	0,196	0,194	0,179	0,209	0,15	0,041

µg/ml	% Canlılık
100	2,803738
56,23	0,084962
31,62	68,56415
17,78	88,10535
10	97,45115
5,62	90,31436
3,16	102,7188
1,78	105,7774



A

B

**Şekil 3. 3.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu 13 - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksosite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksosite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

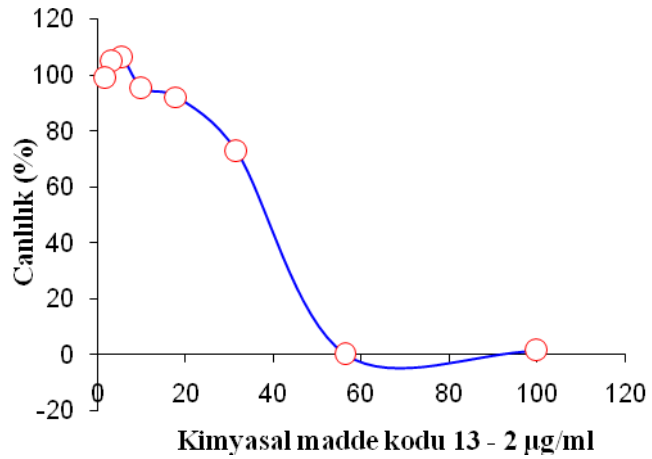
Kimyasal madde kodu 13 – 1: IC<sub>50</sub>= 49,56 µg/ml

**Kimyasal madde kodu: 13-2**

**Çizelge 3. 5.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 13 – 2 (13 nolu kimyasal maddenin ikinci test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	100 µg/ml	56,23 µg/ml	31,62 µg/ml	17,78 µg/ml	10 µg/ml	5,62 µg/ml	3,16 µg/ml	1,78 µg/ml	DMSO	B
A	0,056	0,18	0,043	0,043	0,119	0,157	0,162	0,177	0,182	0,19	0,125	0,042
B	0,04	0,168	0,047	0,042	0,14	0,163	0,199	0,189	0,201	0,222	0,144	0,043
C	0,051	0,208	0,046	0,044	0,152	0,145	0,17	0,182	0,172	0,184	0,152	0,044
D	0,044	0,213	0,046	0,046	0,158	0,217	0,197	0,224	0,217	0,196	0,136	0,045
E	0,041	0,154	0,048	0,044	0,119	0,201	0,178	0,209	0,209	0,181	0,157	0,043
F	0,042	0,208	0,045	0,044	0,187	0,172	0,209	0,204	0,214	0,214	0,112	0,044
G	0,042	0,205	0,046	0,044	0,188	0,196	0,193	0,193	0,186	0,185	0,147	0,046
H	0,042	0,213	0,045	0,043	0,182	0,183	0,181	0,214	0,208	0,201	0,154	0,042

µg/ml	% Canlılık
100	1,320132
56,23	0,165017
31,62	72,44224
17,78	92,07921
10	95,21452
5,62	105,9406
3,16	104,7855
1,78	98,67987



**A**

**B**

**Şekil 3. 4.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu 13 - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

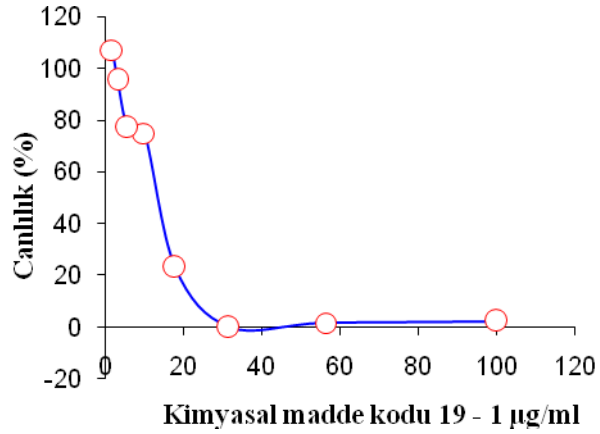
Kimyasal madde kodu 13 – 2: IC<sub>50</sub>= 48,59 µg/ml

### Kimyasal madde kodu: 19-1

**Çizelge 3. 6.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 19 – 1 (19 nolu kimyasal maddenin ilk test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	100 µg/ml	56,23 µg/ml	31,62 µg/ml	17,78 µg/ml	10 µg/ml	5,62 µg/ml	3,16 µg/ml	1,78 µg/ml	DMSO	B
A	0,044	0,145	0,046	0,043	0,043	0,076	0,11	0,132	0,125	0,158	0,129	0,043
B	0,04	0,172	0,044	0,041	0,04	0,069	0,152	0,082	0,171	0,186	0,128	0,043
C	0,04	0,189	0,044	0,043	0,041	0,087	0,176	0,137	0,176	0,18	0,125	0,043
D	0,04	0,188	0,046	0,043	0,042	0,068	0,137	0,145	0,182	0,2	0,138	0,043
E	0,041	0,172	0,047	0,044	0,042	0,067	0,135	0,158	0,183	0,205	0,134	0,044
F	0,041	0,191	0,045	0,047	0,043	0,078	0,149	0,169	0,173	0,196	0,149	0,044
G	0,041	0,168	0,044	0,044	0,047	0,062	0,149	0,176	0,138	0,202	0,131	0,066
H	0,04	0,193	0,045	0,042	0,041	0,073	0,14	0,169	0,14	0,168	0,132	0,04

µg/ml	% Canlılık
100	2,447552
56,23	1,573427
31,62	0
17,78	23,07692
10	75
5,62	77,0979
3,16	95,45455
1,78	107,1678



**A**

**B**

**Şekil 3. 5.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu 19 - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

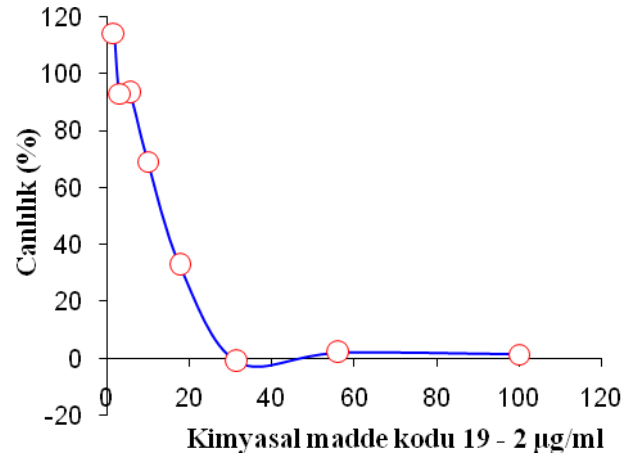
Kimyasal madde kodu 19 – 1: IC<sub>50</sub>= 14,035 µg/ml

### Kimyasal madde kodu: 19 - 2

**Çizelge 3. 7.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 19 – 2 (19 nolu kimyasal maddenin ikinci test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksosite test sonuçları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	100 µg/ml	56,23 µg/ml	31,62 µg/ml	17,78 µg/ml	10 µg/ml	5,62 µg/ml	3,16 µg/ml	1,78 µg/ml	DMSO	B
A	0,042	0,188	0,046	0,041	0,043	0,075	0,118	0,156	0,149	0,2	0,109	0,042
B	0,041	0,209	0,045	0,042	0,04	0,088	0,13	0,202	0,189	0,221	0,13	0,041
C	0,042	0,21	0,045	0,064	0,043	0,081	0,149	0,188	0,19	0,225	0,127	0,042
D	0,042	0,134	0,046	0,041	0,041	0,089	0,137	0,17	0,174	0,205	0,134	0,046
E	0,044	0,206	0,046	0,041	0,04	0,085	0,165	0,197	0,203	0,219	0,136	0,04
F	0,042	0,218	0,044	0,039	0,041	0,113	0,134	0,174	0,16	0,205	0,15	0,045
G	0,043	0,193	0,046	0,042	0,041	0,086	0,126	0,146	0,16	0,203	0,118	0,041
H	0,043	0,168	0,049	0,043	0,057	0,098	0,12	0,155	0,136	0,2	0,151	0,042

µg/ml	% Canlılık
100	1,592624
56,23	2,263202
31,62	-1,08969
17,78	32,94216
10	69,32104
5,62	93,46186
3,16	93,12657
1,78	114,4174



A

B

**Şekil 3. 6.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu 19 - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksosite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksosite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

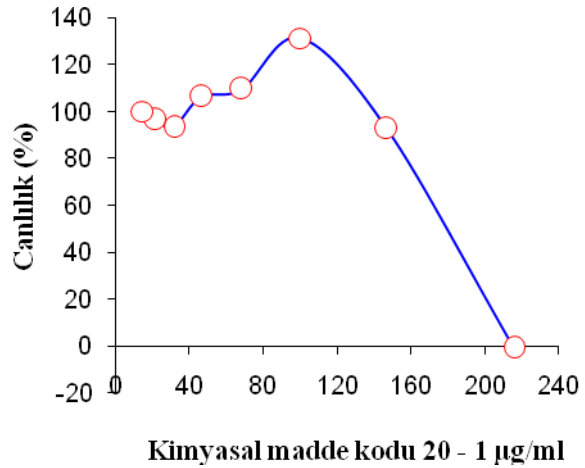
Kimyasal madde kodu 19 – 2: IC<sub>50</sub>= 13,648 µg/ml

### Kimyasal madde kodu: 20-1

**Çizelge 3. 8.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 20 – 1 (20 nolu kimyasal maddenin ilk test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	216,1 µg/ml	147 µg/ml	100 µg/ml	68,1 µg/ml	46,4 µg/ml	31,6 µg/ml	21,5 µg/ml	14,7 µg/ml	DMSO	B
A	0,044	0,047	0,043	0,043	0,047	0,044	0,047	0,044	0,055	0,045	0,042	0,045
B	0,039	0,14	0,053	0,143	0,165	0,164	0,158	0,139	0,124	0,149	0,142	0,053
C	0,044	0,169	0,052	0,156	0,174	0,176	0,136	0,12	0,158	0,168	0,16	0,06
D	0,043	0,138	0,045	0,162	0,204	0,167	0,179	0,157	0,15	0,155	0,164	0,045
E	0,043	0,162	0,043	0,138	0,193	0,167	0,179	0,155	0,151	0,141	0,159	0,05
F	0,045	0,177	0,043	0,157	0,219	0,18	0,181	0,184	0,171	0,183	0,159	0,044
G	0,043	0,111	0,046	0,143	0,189	0,167	0,177	0,163	0,162	0,159	0,159	0,046
H	0,042	0,21	0,08	0,044	0,045	0,046	0,045	0,043	0,043	0,045	0,043	0,044

µg/ml	% Canlılık
216,1	-0,87146
147	92,81046
100	131,3725
68,1	109,5861
46,4	106,3181
31,6	93,46405
21,5	96,51416
14,7	100,2179



**A**

**B**

**Şekil 3. 7.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu 20 - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

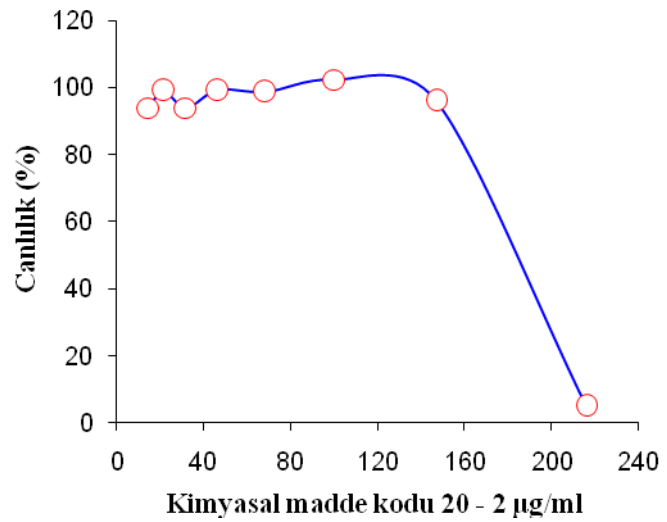
Kimyasal madde kodu 20 – 1: IC<sub>50</sub>= 184,23 µg/ml

### Kimyasal madde kodu: 20-2

**Çizelge 3. 9.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 20 – 2 (20 nolu kimyasal maddenin ikinci test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	216,1 µg/ml	147 µg/ml	100 µg/ml	68,1 µg/ml	46,4 µg/ml	31,6 µg/ml	21,5 µg/ml	14,7 µg/ml	DMSO	B
A	0,042	0,044	0,046	0,048	0,045	0,045	0,044	0,043	0,044	0,047	0,043	0,043
B	0,043	0,114	0,046	0,161	0,166	0,167	0,165	0,14	0,177	0,156	0,105	0,046
C	0,047	0,175	0,055	0,163	0,17	0,16	0,153	0,134	0,167	0,164	0,147	0,048
D	0,043	0,196	0,057	0,164	0,179	0,168	0,186	0,178	0,176	0,152	0,18	0,044
E	0,046	0,183	0,055	0,17	0,18	0,181	0,179	0,178	0,172	0,176	0,165	0,048
F	0,044	0,145	0,044	0,182	0,182	0,183	0,177	0,178	0,179	0,176	0,132	0,05
G	0,044	0,15	0,049	0,17	0,169	0,165	0,164	0,168	0,168	0,17	0,158	0,046
H	0,045	0,044	0,044	0,043	0,046	0,045	0,05	0,043	0,044	0,046	0,044	0,045

µg/ml	% Canlılık
216,1	5,058366
147	96,10895
100	102,3346
68,1	98,63813
46,4	99,22179
31,6	93,96887
21,5	99,02724
14,7	93,96887



A

B

**Şekil 3. 8.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu 20 - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

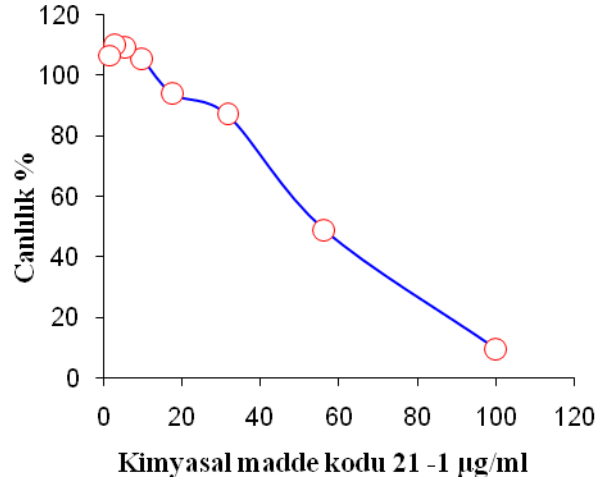
Kimyasal madde kodu 20 – 2: IC<sub>50</sub>= 181,11 µg/ml

### Kimyasal madde kodu: 21 – 1

**Çizelge 3. 10.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 21 – 1 (21 nolu kimyasal maddenin ilk test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	100 µg/ml	56,23 µg/ml	31,62 µg/ml	17,78 µg/ml	10 µg/ml	5,62 µg/ml	3,16 µg/ml	1,78 µg/ml	DMSO	B
A	0,099	0,139	0,047	0,1	0,126	0,112	0,14	0,135	0,123	0,122	0,128	0,041
B	0,038	0,142	0,05	0,098	0,119	0,124	0,129	0,139	0,123	0,113	0,124	0,041
C	0,043	0,14	0,05	0,095	0,118	0,143	0,146	0,14	0,113	0,145	0,131	0,054
D	0,041	0,131	0,054	0,094	0,142	0,119	0,138	0,15	0,183	0,135	0,121	0,046
E	0,042	0,149	0,057	0,085	0,131	0,129	0,156	0,137	0,137	0,142	0,101	0,04
F	0,044	0,142	0,051	0,09	0,121	0,147	0,142	0,17	0,167	0,166	0,144	0,042
G	0,045	0,134	0,057	0,118	0,14	0,132	0,16	0,162	0,167	0,157	0,137	0,042
H	0,043	0,15	0,059	0,12	0,149	0,162	0,118	0,133	0,139	0,139	0,154	0,042

µg/ml	% Canlılık
100	9,326425
56,23	48,70466
31,62	87,04663
17,78	93,78238
10	105,1813
5,62	109,0674
3,16	109,8446
1,78	106,7358



A

B

**Şekil 3. 9.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu 21 - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

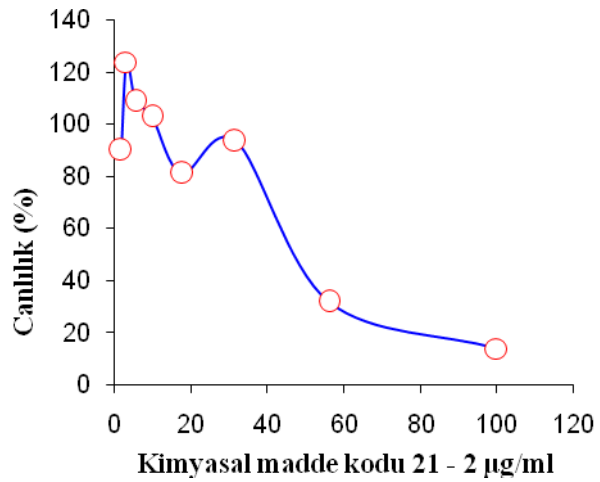
Kimyasal madde kodu 21 – 1: IC<sub>50</sub>= 32,448 µg/ml

### Kimyasal madde kodu: 21 – 2

**Çizelge 3. 11.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 21 – 2 (21 nolu kimyasal maddenin ikinci test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksosite testi sonuçları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	100 µg/ml	56,23 µg/ml	31,62 µg/ml	17,78 µg/ml	10 µg/ml	5,62 µg/ml	3,16 µg/ml	1,78 µg/ml	DMSO	B
A	0,046	0,155	0,055	0,123	0,147	0,15	0,14	0,148	0,156	0,154	0,123	0,051
B	0,04	0,182	0,053	0,1	0,145	0,16	0,133	0,157	0,155	0,154	0,108	0,043
C	0,056	0,154	0,068	0,095	0,158	0,145	0,161	0,173	0,185	0,147	0,114	0,043
D	0,049	0,154	0,06	0,079	0,163	0,152	0,151	0,165	0,199	0,156	0,127	0,049
E	0,042	0,169	0,053	0,091	0,14	0,138	0,169	0,173	0,194	0,146	0,126	0,045
F	0,113	0,176	0,1	0,094	0,164	0,136	0,184	0,18	0,177	0,16	0,139	0,046
G	0,044	0,167	0,073	0,108	0,153	0,15	0,148	0,178	0,18	0,147	0,13	0,046
H	0,042	0,168	0,058	0,124	0,126	0,151	0,143	0,172	0,141	0,155	0,126	0,044

µg/ml	% Canlılık
100	13,78911
56,23	31,8656
31,62	93,51101
17,78	80,99652
10	102,781
5,62	108,8065
3,16	123,6385
1,78	89,80301



A

B

**Şekil 3. 10.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu 21 - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksosite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksosite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

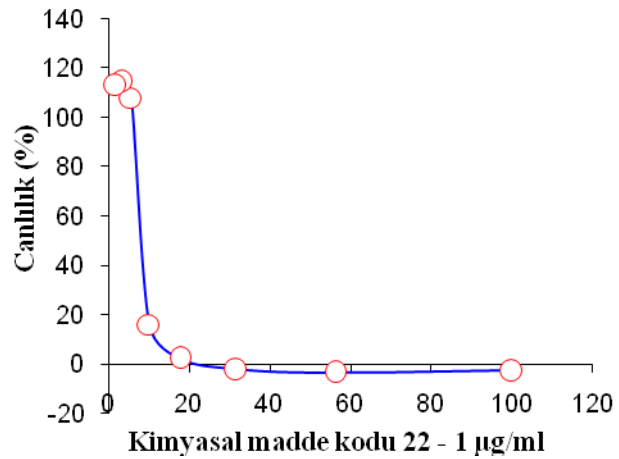
Kimyasal madde kodu 21 – 2: IC<sub>50</sub>= 38,858 µg/ml

**Kimyasal madde kodu: 22 – 1**

**Çizelge 3. 12.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 22 – 1 (22 nolu kimyasal maddenin ilk test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	100 µg/ml	56,23 µg/ml	31,62 µg/ml	17,78 µg/ml	10 µg/ml	5,62 µg/ml	3,16 µg/ml	1,78 µg/ml	DMSO	B
A	0,043	0,178	0,044	0,042	0,044	0,045	0,07	0,171	0,19	0,174	0,15	0,045
B	0,04	0,186	0,039	0,04	0,04	0,04	0,067	0,192	0,181	0,167	0,144	0,045
C	0,043	0,18	0,04	0,04	0,042	0,045	0,065	0,183	0,193	0,184	0,161	0,047
D	0,045	0,157	0,043	0,041	0,043	0,061	0,066	0,176	0,195	0,195	0,154	0,048
E	0,047	0,172	0,043	0,043	0,044	0,044	0,064	0,183	0,183	0,178	0,151	0,046
F	0,044	0,177	0,042	0,041	0,042	0,043	0,068	0,185	0,189	0,196	0,157	0,044
G	0,043	0,181	0,042	0,042	0,042	0,045	0,071	0,196	0,177	0,165	0,153	0,047
H	0,043	0,171	0,041	0,042	0,043	0,046	0,073	0,183	0,185	0,156	0,161	0,046

µg/ml	% Canlılık
100	-2,77778
56,23	-3,37302
31,62	-2,18254
17,78	2,18254
10	16,07143
5,62	108,1349
3,16	114,6825
1,78	113,2937



**A**

**B**

**Şekil 3. 11.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu 22 - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

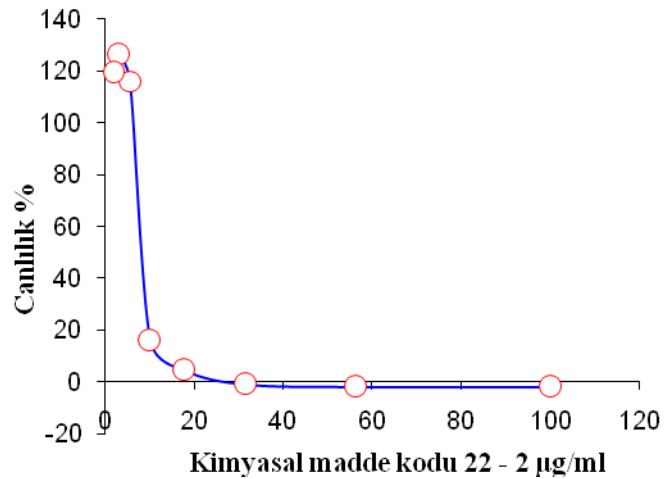
Kimyasal madde kodu 22 – 1: IC<sub>50</sub>= 7,2343 µg/ml

**Kimyasal madde kodu: 22 – 2**

**Çizelge 3. 13.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 22 – 2 (22 nolu kimyasal maddenin ikinci test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksosite test sonuçları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	100 µg/ml	56,23 µg/ml	31,62 µg/ml	17,78 µg/ml	10 µg/ml	5,62 µg/ml	3,16 µg/ml	1,78 µg/ml	DMSO	B
A	0,055	0,184	0,047	0,042	0,042	0,043	0,073	0,229	0,198	0,178	0,189	0,046
B	0,043	0,173	0,042	0,042	0,041	0,041	0,072	0,196	0,202	0,193	0,195	0,043
C	0,045	0,179	0,041	0,042	0,045	0,044	0,075	0,206	0,217	0,211	0,174	0,046
D	0,044	0,16	0,043	0,043	0,044	0,045	0,061	0,189	0,216	0,203	0,174	0,045
E	0,045	0,186	0,044	0,043	0,043	0,056	0,061	0,192	0,208	0,195	0,169	0,045
F	0,045	0,187	0,042	0,042	0,043	0,059	0,068	0,211	0,211	0,206	0,166	0,046
G	0,043	0,182	0,042	0,042	0,042	0,045	0,065	0,199	0,208	0,209	0,174	0,047
H	0,046	0,175	0,042	0,042	0,044	0,045	0,074	0,185	0,195	0,192	0,164	0,046

µg/ml	% Canlılık
100	-1,97554
56,23	-1,97554
31,62	-1,03481
17,78	4,421449
10	15,8984
5,62	116,1806
3,16	126,3405
1,78	119,3791



**A**

**B**

**Şekil 3. 12.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu 22 - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksosite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksosite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

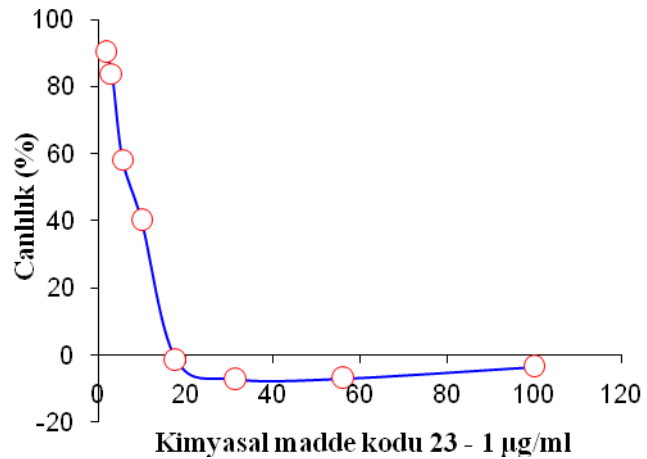
Kimyasal madde kodu 22 – 2:  $IC_{50} = 7,1097 \mu\text{g/ml}$

**Kimyasal madde kodu: 23 – 1**

**Çizelge 3. 14.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 23 – 1 (23 nolu kimyasal maddenin ilk test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksosite test sonuçları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	100 µg/ml	56,23 µg/ml	31,62 µg/ml	17,78 µg/ml	10 µg/ml	5,62 µg/ml	3,16 µg/ml	1,78 µg/ml	DMSO	B
A	0,042	0,164	0,041	0,042	0,042	0,044	0,088	0,113	0,128	0,117	0,123	0,041
B	0,04	0,158	0,039	0,037	0,039	0,046	0,082	0,117	0,114	0,126	0,116	0,045
C	0,042	0,164	0,044	0,04	0,038	0,044	0,093	0,112	0,135	0,17	0,11	0,043
D	0,042	0,156	0,041	0,041	0,041	0,046	0,104	0,116	0,156	0,14	0,129	0,09
E	0,04	0,148	0,047	0,041	0,039	0,047	0,101	0,103	0,142	0,141	0,138	0,044
F	0,043	0,179	0,046	0,04	0,043	0,05	0,077	0,127	0,141	0,152	0,125	0,043
G	0,044	0,191	0,041	0,04	0,039	0,054	0,098	0,112	0,126	0,164	0,144	0,043
H	0,04	0,158	0,044	0,042	0,047	0,051	0,094	0,121	0,143	0,136	0,153	0,042

µg/ml	% Canlılık
100	-3,41786
56,23	-6,94598
31,62	-7,16648
17,78	-1,4333
10	40,02205
5,62	58,32415
3,16	83,90298
1,78	90,29768



**A**

**B**

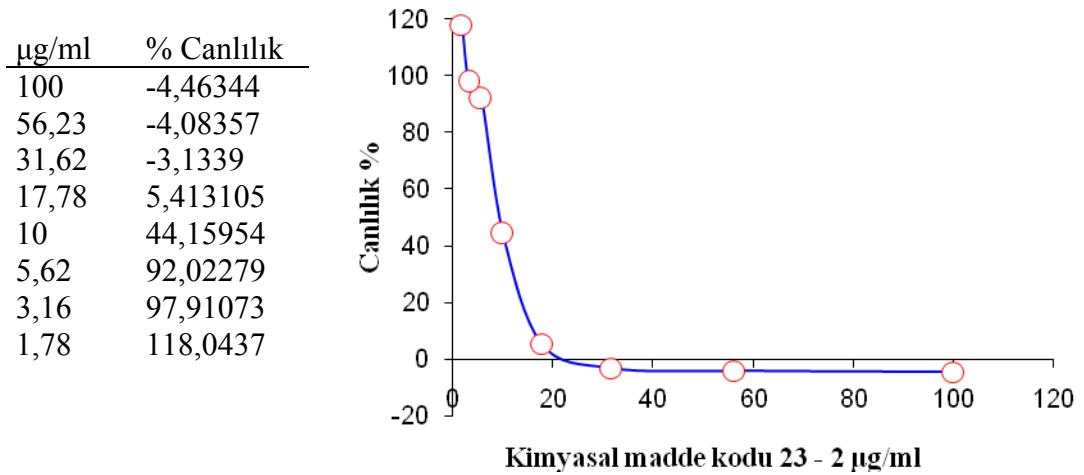
**Şekil 3. 13.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu 23 - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksosite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksosite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

Kimyasal madde kodu 23 – 1: IC<sub>50</sub>= 8,0087 µg/ml

**Kimyasal madde kodu: 23 – 2**

**Çizelge 3. 15.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 23 – 2 (23 nolu kimyasal maddenin ikinci test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	100 µg/ml	56,23 µg/ml	31,62 µg/ml	17,78 µg/ml	10 µg/ml	5,62 µg/ml	3,16 µg/ml	1,78 µg/ml	DMSO	B
A	0,041	0,175	0,041	0,044	0,042	0,055	0,12	0,189	0,161	0,165	0,183	0,043
B	0,042	0,196	0,039	0,039	0,039	0,047	0,116	0,158	0,205	0,188	0,161	0,042
C	0,045	0,194	0,042	0,044	0,042	0,051	0,075	0,17	0,199	0,23	0,142	0,052
D	0,052	0,165	0,042	0,043	0,044	0,052	0,1	0,178	0,178	0,192	0,152	0,046
E	0,052	0,184	0,04	0,041	0,042	0,057	0,124	0,183	0,156	0,196	0,152	0,043
F	0,045	0,173	0,042	0,04	0,045	0,058	0,123	0,143	0,172	0,193	0,173	0,044
G	0,045	0,191	0,043	0,04	0,041	0,058	0,097	0,134	0,165	0,186	0,161	0,045
H	0,043	0,177	0,04	0,04	0,057	0,055	0,099	0,15	0,148	0,153	0,173	0,046



**A**

**B**

**Şekil 3. 14.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu 23 - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

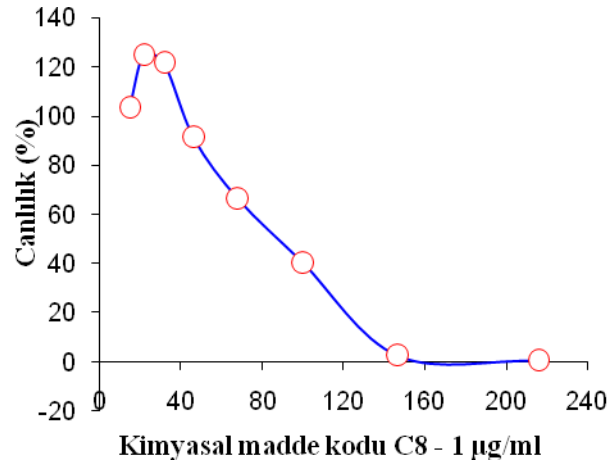
Kimyasal madde kodu 23 – 2: IC<sub>50</sub>= 6,1553 µg/ml

**Kimyasal madde kodu: C8 – 1**

**Çizelge 3. 16.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C8 – 1 (C8 nolu kimyasal maddenin ilk test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksosite test sonuçları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	216,1 µg/ml	147 µg/ml	100 µg/ml	68,1 µg/ml	46,4 µg/ml	31,6 µg/ml	21,5 µg/ml	14,7 µg/ml	DMSO	B
A	0,042	0,045	0,053	0,048	0,046	0,048	0,046	0,045	0,046	0,055	0,047	0,049
B	0,042	0,083	0,043	0,043	0,053	0,068	0,126	0,142	0,155	0,112	0,106	0,045
C	0,046	0,126	0,045	0,047	0,07	0,1	0,124	0,158	0,136	0,125	0,11	0,046
D	0,044	0,124	0,045	0,046	0,071	0,102	0,119	0,149	0,132	0,119	0,152	0,045
E	0,044	0,101	0,047	0,047	0,081	0,098	0,128	0,136	0,155	0,133	0,155	0,045
F	0,044	0,156	0,044	0,047	0,089	0,096	0,107	0,134	0,165	0,141	0,163	0,044
G	0,043	0,139	0,047	0,048	0,077	0,095	0,122	0,15	0,13	0,139	0,135	0,044
H	0,043	0,043	0,045	0,058	0,049	0,053	0,045	0,043	0,046	0,047	0,049	0,045

µg/ml	% Canlılık
216,1	0,609756
147	2,439024
100	40,2439
68,1	66,15854
46,4	91,15854
31,6	121,3415
21,5	124,6951
14,7	103,3537



**A**

**B**

**Şekil 3. 15.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C8 - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksosite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksosite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

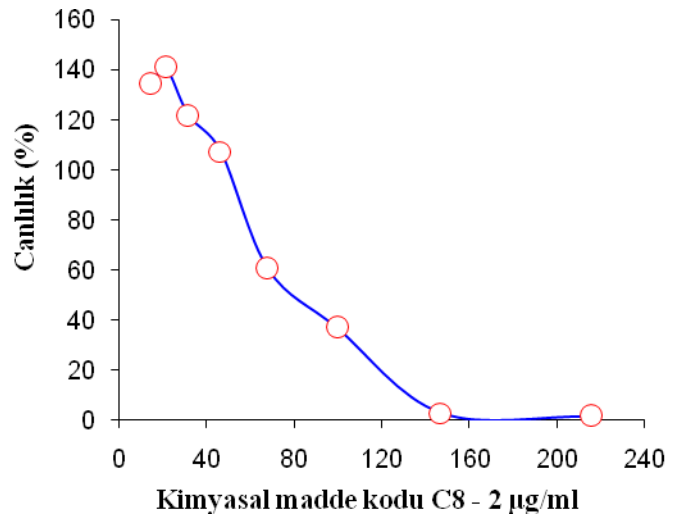
Kimyasal madde kodu C8 – 1: IC<sub>50</sub>= 80,116 µg/ml

**Kimyasal madde kodu: C8 – 2**

**Çizelge 3. 17.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C8 – 2 (C8 nolu kimyasal maddenin ikinci test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	216,1 µg/ml	147 µg/ml	100 µg/ml	68,1 µg/ml	46,4 µg/ml	31,6 µg/ml	21,5 µg/ml	14,7 µg/ml	DMSO	B
A	0,042	0,043	0,045	0,045	0,046	0,058	0,052	0,044	0,046	0,046	0,045	0,043
B	0,043	0,091	0,043	0,045	0,072	0,097	0,105	0,138	0,146	0,143	0,11	0,042
C	0,043	0,094	0,053	0,046	0,082	0,093	0,12	0,142	0,157	0,157	0,137	0,044
D	0,047	0,148	0,045	0,049	0,071	0,092	0,132	0,128	0,148	0,132	0,158	0,044
E	0,045	0,146	0,045	0,049	0,068	0,086	0,124	0,135	0,15	0,161	0,163	0,049
F	0,045	0,096	0,045	0,048	0,073	0,094	0,13	0,144	0,152	0,137	0,141	0,049
G	0,049	0,13	0,045	0,049	0,081	0,094	0,123	0,145	0,129	0,167	0,15	0,046
H	0,046	0,043	0,046	0,047	0,049	0,051	0,046	0,048	0,045	0,048	0,05	0,046

µg/ml	% Canlılık
216,1	1,66113
147	2,990033
100	36,87708
68,1	60,46512
46,4	107,309
31,6	121,5947
21,5	140,8638
14,7	134,2193



**A**

**B**

**Şekil 3. 16.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C8 - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

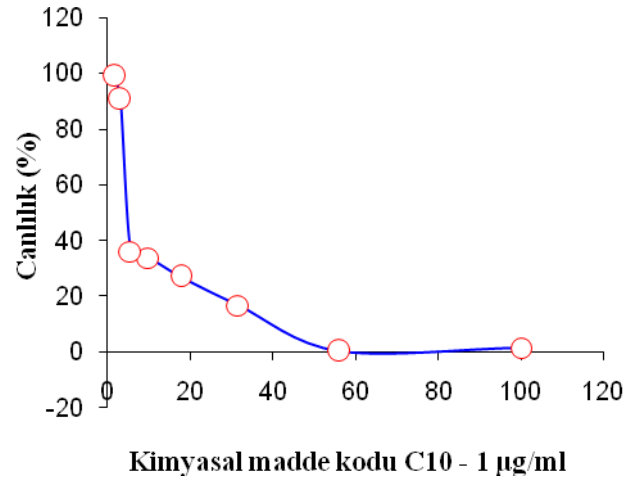
Kimyasal madde kodu C8 – 2: IC<sub>50</sub>= 85,855 µg/ml

**Kimyasal madde kodu: C10 – 1**

**Çizelge 3. 18.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C10 – 1 (C10 nolu kimyasal maddenin ilk test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	100 µg/ml	56,23 µg/ml	31,62 µg/ml	17,78 µg/ml	10 µg/ml	5,62 µg/ml	3,16 µg/ml	1,78 µg/ml	DMSO	B
A	0,042	0,203	0,045	0,045	0,064	0,084	0,091	0,065	0,18	0,216	0,198	0,041
B	0,041	0,198	0,043	0,042	0,094	0,15	0,093	0,125	0,196	0,224	0,159	0,041
C	0,044	0,224	0,046	0,043	0,073	0,093	0,107	0,096	0,228	0,215	0,19	0,041
D	0,042	0,232	0,047	0,045	0,076	0,087	0,1	0,111	0,197	0,204	0,178	0,047
E	0,042	0,205	0,046	0,043	0,072	0,094	0,099	0,109	0,195	0,204	0,187	0,042
F	0,04	0,199	0,043	0,042	0,065	0,084	0,098	0,104	0,176	0,229	0,161	0,046
G	0,041	0,166	0,046	0,044	0,06	0,078	0,093	0,108	0,169	0,22	0,156	0,044
H	0,043	0,194	0,045	0,042	0,064	0,086	0,095	0,1	0,174	0,203	0,155	0,043

µg/ml	% Canlılık
100	1,453488
56,23	0,145349
31,62	16,56977
17,78	27,03488
10	33,72093
5,62	36,04651
3,16	90,69767
1,78	98,83721



**A**

**B**

**Şekil 3. 17.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C10 - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

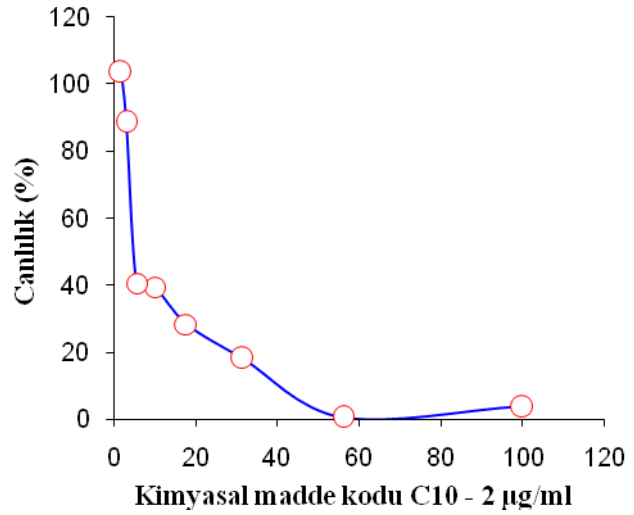
Kimyasal madde kodu C10 – 1: IC<sub>50</sub>= 3,7884 µg/ml

**Kimyasal madde kodu: C10 – 2**

**Çizelge 3. 19.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C10 – 2 (C10 nolu kimyasal maddenin ikinci test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksosite test sonuçları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	100 µg/ml	56,23 µg/ml	31,62 µg/ml	17,78 µg/ml	10 µg/ml	5,62 µg/ml	3,16 µg/ml	1,78 µg/ml	DMSO	B
A	0,041	0,245	0,048	0,045	0,069	0,088	0,101	0,123	0,165	0,191	0,173	0,042
B	0,044	0,219	0,043	0,042	0,064	0,077	0,101	0,1	0,192	0,218	0,161	0,042
C	0,046	0,23	0,045	0,045	0,074	0,086	0,091	0,106	0,193	0,191	0,173	0,045
D	0,046	0,207	0,047	0,045	0,072	0,104	0,105	0,095	0,156	0,223	0,123	0,045
E	0,044	0,134	0,049	0,051	0,073	0,08	0,114	0,121	0,189	0,209	0,15	0,046
F	0,045	0,232	0,064	0,044	0,075	0,088	0,117	0,112	0,194	0,203	0,13	0,047
G	0,064	0,197	0,048	0,051	0,071	0,09	0,101	0,101	0,176	0,216	0,16	0,043
H	0,046	0,24	0,046	0,046	0,071	0,085	0,103	0,088	0,169	0,186	0,166	0,043

µg/ml	% Canlılık
100	3,703704
56,23	0,483092
31,62	18,03543
17,78	28,34138
10	39,4525
5,62	40,57971
3,16	88,56683
1,78	103,7037



**A**

**B**

**Şekil 3. 18.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C10 - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksosite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksosite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

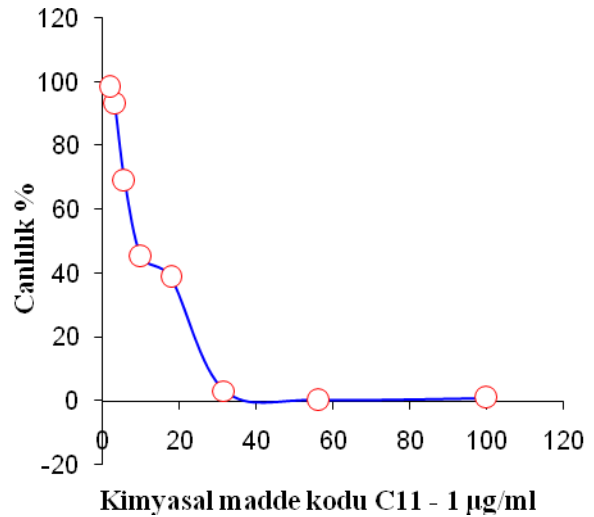
Kimyasal madde kodu C10 – 2: IC<sub>50</sub>= 3,6434 µg/ml

**Kimyasal madde kodu: C11 – 1**

**Çizelge 3. 20.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C11 – 1 (C11 nolu kimyasal maddenin ilk test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksosite test sonuçları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	100 µg/ml	56,23 µg/ml	31,62 µg/ml	17,78 µg/ml	10 µg/ml	5,62 µg/ml	3,16 µg/ml	1,78 µg/ml	DMSO	B
A	0,042	0,245	0,044	0,044	0,044	0,091	0,12	0,192	0,175	0,217	0,205	0,044
B	0,042	0,233	0,047	0,044	0,044	0,105	0,094	0,193	0,233	0,236	0,186	0,044
C	0,043	0,258	0,047	0,044	0,052	0,116	0,132	0,2	0,22	0,256	0,18	0,045
D	0,044	0,22	0,046	0,045	0,05	0,122	0,136	0,169	0,224	0,235	0,175	0,048
E	0,041	0,242	0,046	0,046	0,053	0,118	0,124	0,174	0,217	0,242	0,172	0,044
F	0,042	0,239	0,045	0,044	0,047	0,124	0,138	0,173	0,245	0,214	0,172	0,047
G	0,042	0,232	0,044	0,045	0,048	0,101	0,173	0,199	0,215	0,231	0,181	0,046
H	0,041	0,21	0,047	0,043	0,046	0,071	0,112	0,149	0,176	0,199	0,17	0,044

µg/ml	% Canlılık
100	0,895141
56,23	0,255754
31,62	3,196931
17,78	38,7468
10	45,14066
5,62	68,92583
3,16	93,22251
1,78	98,46547



**A**

**B**

**Şekil 3. 19.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C11 - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksosite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksosite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

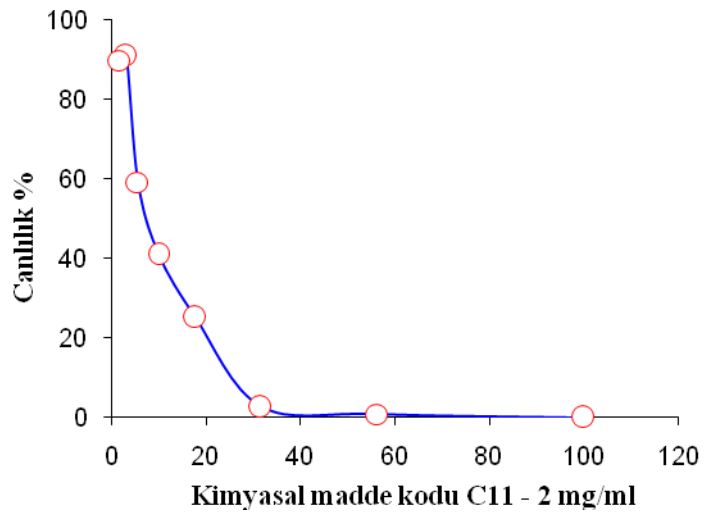
Kimyasal madde kodu C11 – 1: IC<sub>50</sub>= 6,5152 µg/ml

**Kimyasal madde kodu: C11 – 2**

**Çizelge 3. 21.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C11 – 2 (C11 nolu kimyasal maddenin ikinci test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	100 µg/ml	56,23 µg/ml	31,62 µg/ml	17,78 µg/ml	10 µg/ml	5,62 µg/ml	3,16 µg/ml	1,78 µg/ml	DMSO	B
A	0,045	0,194	0,046	0,043	0,045	0,087	0,112	0,168	0,229	0,193	0,182	0,042
B	0,042	0,209	0,042	0,048	0,052	0,108	0,116	0,169	0,257	0,233	0,162	0,041
C	0,045	0,242	0,044	0,047	0,051	0,102	0,118	0,15	0,246	0,238	0,206	0,044
D	0,046	0,273	0,045	0,046	0,052	0,093	0,112	0,203	0,237	0,241	0,181	0,043
E	0,045	0,268	0,046	0,048	0,054	0,102	0,152	0,185	0,255	0,23	0,19	0,044
F	0,048	0,264	0,045	0,046	0,046	0,101	0,154	0,155	0,231	0,25	0,203	0,044
G	0,044	0,258	0,046	0,043	0,05	0,128	0,143	0,152	0,192	0,216	0,183	0,044
H	0,044	0,237	0,046	0,044	0,051	0,11	0,12	0,148	0,169	0,196	0,15	0,042

µg/ml	% Canlılık
100	0,057637
56,23	0,864553
31,62	2,708934
17,78	25,18732
10	41,0951
5,62	59,19308
3,16	91,00865
1,78	89,85591



**A**

**B**

**Şekil 3. 20.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C11 - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

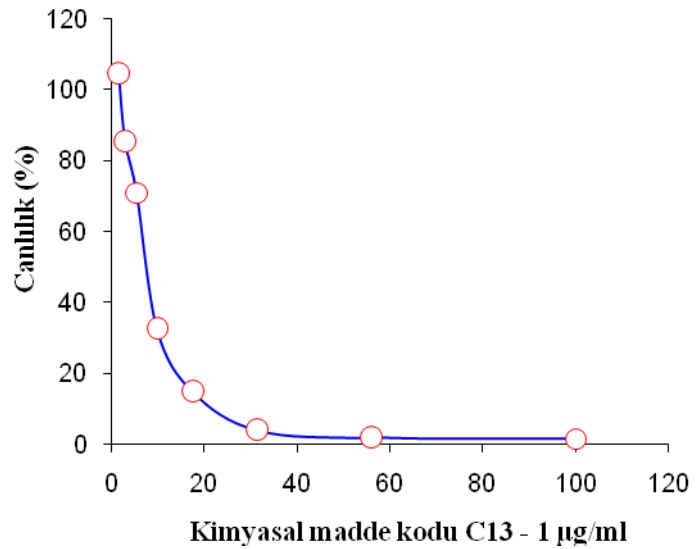
Kimyasal madde kodu C11 – 2: IC<sub>50</sub>= 7,7761 µg/ml

### Kimyasal madde kodu: C13 – 1

**Çizelge 3. 22.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C13 – 1 (C13 nolu kimyasal maddenin ilk test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	100 µg/ml	56,23 µg/ml	31,62 µg/ml	17,78 µg/ml	10 µg/ml	5,62 µg/ml	3,16 µg/ml	1,78 µg/ml	DMSO	B
A	0,04	0,151	0,044	0,055	0,044	0,064	0,08	0,126	0,153	0,155	0,141	0,043
B	0,042	0,142	0,044	0,042	0,043	0,055	0,075	0,119	0,133	0,148	0,144	0,046
C	0,04	0,155	0,044	0,046	0,047	0,061	0,081	0,132	0,142	0,152	0,148	0,045
D	0,044	0,159	0,045	0,045	0,047	0,061	0,079	0,113	0,123	0,165	0,15	0,044
E	0,04	0,143	0,044	0,045	0,049	0,061	0,08	0,11	0,145	0,156	0,142	0,044
F	0,041	0,138	0,045	0,043	0,045	0,051	0,069	0,117	0,123	0,141	0,14	0,044
G	0,046	0,151	0,046	0,045	0,044	0,056	0,095	0,119	0,133	0,146	0,148	0,045
H	0,041	0,139	0,045	0,045	0,048	0,056	0,081	0,121	0,13	0,137	0,154	0,047

µg/ml	% Canlılık
100	1,650943
56,23	1,886792
31,62	4,009434
17,78	14,85849
10	32,54717
5,62	70,99057
3,16	85,37736
1,78	104,4811



A

B

**Şekil 3. 21.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C13 - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

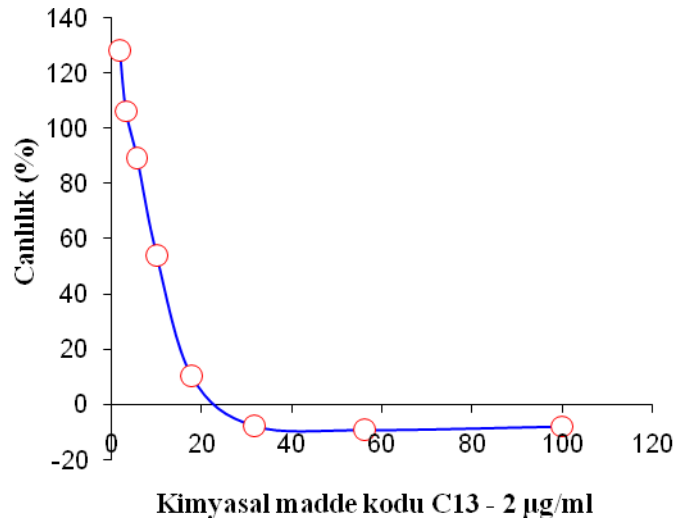
Kimyasal madde kodu C13 – 1: IC<sub>50</sub>= 7,6089 µg/ml

**Kimyasal madde kodu: C13 – 2**

**Çizelge 3. 23.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C13 – 2 (C13 nolu kimyasal maddenin ikinci test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksosite test sonuçları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	100 µg/ml	56,23 µg/ml	31,62 µg/ml	17,78 µg/ml	10 µg/ml	5,62 µg/ml	3,16 µg/ml	1,78 µg/ml	DMSO	B
A	0,043	0,152	0,049	0,046	0,045	0,088	0,1	0,121	0,15	0,141	0,152	0,044
B	0,044	0,164	0,045	0,045	0,045	0,056	0,092	0,117	0,15	0,157	0,15	0,042
C	0,044	0,166	0,046	0,045	0,046	0,066	0,107	0,132	0,166	0,219	0,174	0,046
D	0,046	0,109	0,047	0,046	0,048	0,063	0,116	0,146	0,153	0,161	0,188	0,075
E	0,044	0,162	0,046	0,045	0,046	0,06	0,1	0,144	0,15	0,154	0,173	0,089
F	0,045	0,164	0,046	0,044	0,046	0,066	0,1	0,138	0,156	0,176	0,15	0,043
G	0,049	0,179	0,046	0,045	0,051	0,071	0,101	0,125	0,138	0,16	0,171	0,047
H	0,044	0,156	0,048	0,043	0,047	0,064	0,091	0,127	0,142	0,126	0,163	0,046

µg/ml	% Canlılık
100	-8,05195
56,23	-9,35065
31,62	-7,79221
17,78	10,12987
10	53,76623
5,62	89,35065
3,16	106,2338
1,78	128,3117



**A**

**B**

**Şekil 3. 22.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C13 - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksosite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksosite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

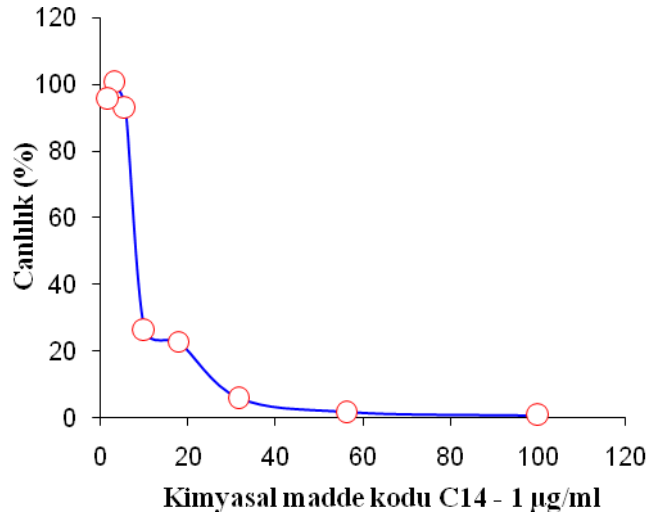
Kimyasal madde kodu C13 – 2: IC<sub>50</sub>= 17,11 µg/ml

### Kimyasal madde kodu: C14 – 1

**Çizelge 3. 24.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C14 – 1 (C14 nolu kimyasal maddenin ilk test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	100 µg/ml	56,23 µg/ml	31,62 µg/ml	17,78 µg/ml	10 µg/ml	5,62 µg/ml	3,16 µg/ml	1,78 µg/ml	DMSO	B
A	0,043	0,156	0,047	0,042	0,046	0,067	0,088	0,15	0,154	0,148	0,15	0,076
B	0,041	0,165	0,044	0,043	0,048	0,066	0,075	0,149	0,153	0,156	0,143	0,042
C	0,042	0,15	0,043	0,045	0,047	0,069	0,077	0,134	0,156	0,14	0,147	0,047
D	0,043	0,176	0,047	0,048	0,051	0,072	0,074	0,153	0,159	0,153	0,148	0,045
E	0,042	0,158	0,045	0,048	0,051	0,069	0,071	0,166	0,164	0,161	0,153	0,043
F	0,044	0,157	0,044	0,042	0,054	0,072	0,076	0,155	0,164	0,166	0,164	0,044
G	0,043	0,135	0,046	0,044	0,049	0,065	0,076	0,149	0,152	0,166	0,146	0,045
H	0,043	0,138	0,049	0,044	0,053	0,07	0,076	0,137	0,142	0,152	0,16	0,042

µg/ml	% Canlılık
100	0,858369
56,23	1,716738
31,62	6,008584
17,78	22,96137
10	26,39485
5,62	92,91845
3,16	100,4292
1,78	95,49356



A

B

**Şekil 3. 23.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C14 - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

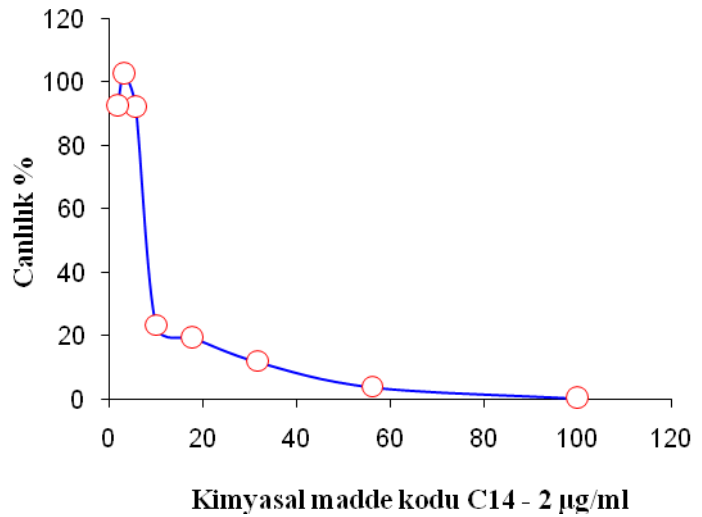
Kimyasal madde kodu C14 – 1: IC<sub>50</sub>= 7,1746 µg/ml

**Kimyasal madde kodu: C14 – 2**

**Çizelge 3. 25.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C14 – 2 (C14 nolu kimyasal maddenin ikinci test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	100 µg/ml	56,23 µg/ml	31,62 µg/ml	17,78 µg/ml	10 µg/ml	5,62 µg/ml	3,16 µg/ml	1,78 µg/ml	DMSO	B
A	0,042	0,177	0,049	0,046	0,064	0,072	0,086	0,136	0,168	0,139	0,163	0,041
B	0,043	0,15	0,043	0,042	0,056	0,066	0,084	0,134	0,179	0,149	0,15	0,041
C	0,046	0,172	0,045	0,045	0,059	0,068	0,069	0,154	0,185	0,161	0,147	0,045
D	0,049	0,147	0,045	0,048	0,058	0,069	0,074	0,153	0,175	0,163	0,165	0,043
E	0,045	0,182	0,046	0,061	0,059	0,069	0,075	0,146	0,158	0,149	0,161	0,041
F	0,046	0,155	0,047	0,046	0,062	0,068	0,074	0,167	0,152	0,148	0,157	0,046
G	0,044	0,157	0,047	0,048	0,056	0,069	0,07	0,127	0,159	0,162	0,165	0,052
H	0,044	0,16	0,046	0,044	0,059	0,074	0,076	0,158	0,127	0,171	0,167	0,042

µg/ml	% Canlılık
100	0,525762
56,23	4,100946
31,62	12,09253
17,78	19,66351
10	23,449
5,62	92,42902
3,16	102,9443
1,78	92,63933



**A**

**B**

**Şekil 3. 24.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C14 - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

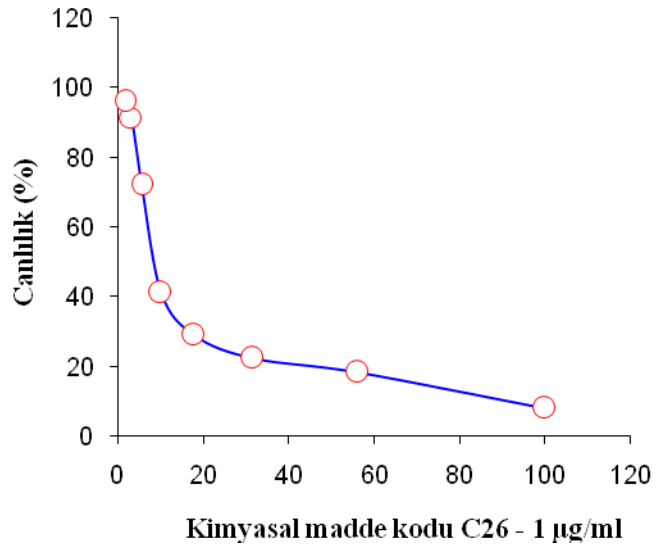
Kimyasal madde kodu C14 – 2: IC<sub>50</sub>= 7,3065 µg/ml

**Kimyasal madde kodu: C26 – 1**

**Çizelge 3. 26.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C26 – 1 (C26 nolu kimyasal maddenin ilk test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	100 µg/ml	56,23 µg/ml	31,62 µg/ml	17,78 µg/ml	10 µg/ml	5,62 µg/ml	3,16 µg/ml	1,78 µg/ml	DMSO	B
A	0,041	0,171	0,057	0,067	0,075	0,078	0,098	0,125	0,143	0,126	0,144	0,043
B	0,041	0,167	0,05	0,061	0,069	0,083	0,093	0,141	0,159	0,161	0,154	0,04
C	0,042	0,178	0,055	0,068	0,069	0,082	0,094	0,135	0,148	0,171	0,16	0,043
D	0,042	0,182	0,055	0,068	0,075	0,081	0,099	0,132	0,17	0,166	0,144	0,042
E	0,042	0,168	0,054	0,067	0,072	0,077	0,103	0,127	0,157	0,156	0,15	0,048
F	0,043	0,162	0,053	0,067	0,075	0,085	0,092	0,153	0,171	0,177	0,161	0,047
G	0,042	0,162	0,057	0,065	0,072	0,081	0,099	0,139	0,156	0,173	0,149	0,046
H	0,042	0,157	0,052	0,061	0,082	0,084	0,093	0,135	0,15	0,166	0,149	0,045

µg/ml	% Canlılık
100	8,244423
56,23	18,5257
31,62	22,59942
17,78	29,19496
10	41,4161
5,62	72,25994
3,16	91,4646
1,78	96,12027



**A**

**B**

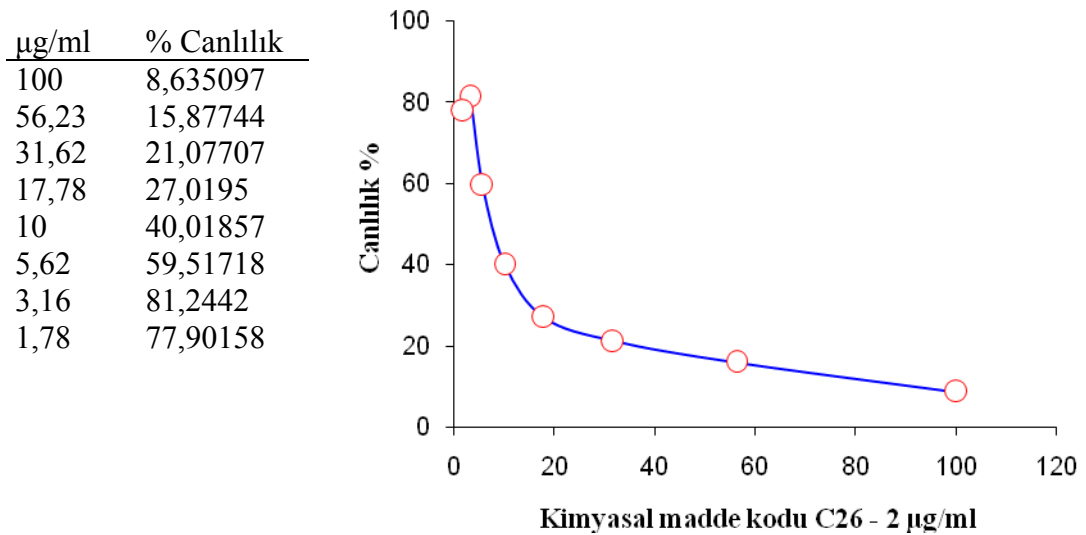
**Şekil 3. 25.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C26 - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

Kimyasal madde kodu C26 – 1: IC<sub>50</sub>= 6,84 µg/ml

**Kimyasal madde kodu: C26 – 2**

**Çizelge 3. 27.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C26 – 2 (C26 nolu kimyasal maddenin ikinci test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	100 µg/ml	56,23 µg/ml	31,62 µg/ml	17,78 µg/ml	10 µg/ml	5,62 µg/ml	3,16 µg/ml	1,78 µg/ml	DMSO	B
A	0,047	0,184	0,061	0,065	0,069	0,069	0,083	0,114	0,13	0,118	0,129	0,044
B	0,042	0,198	0,054	0,065	0,069	0,078	0,083	0,118	0,168	0,142	0,116	0,042
C	0,045	0,193	0,058	0,065	0,075	0,079	0,099	0,125	0,153	0,133	0,157	0,042
D	0,046	0,175	0,059	0,067	0,073	0,09	0,111	0,124	0,161	0,161	0,148	0,05
E	0,046	0,175	0,057	0,071	0,078	0,078	0,091	0,126	0,148	0,15	0,146	0,046
F	0,043	0,177	0,054	0,064	0,069	0,08	0,096	0,127	0,157	0,157	0,156	0,045
G	0,044	0,189	0,056	0,067	0,074	0,074	0,094	0,137	0,155	0,156	0,137	0,047
H	0,043	0,156	0,053	0,059	0,075	0,078	0,102	0,122	0,145	0,161	0,155	0,044



**A**

**B**

**Şekil 3. 26.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C26 - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

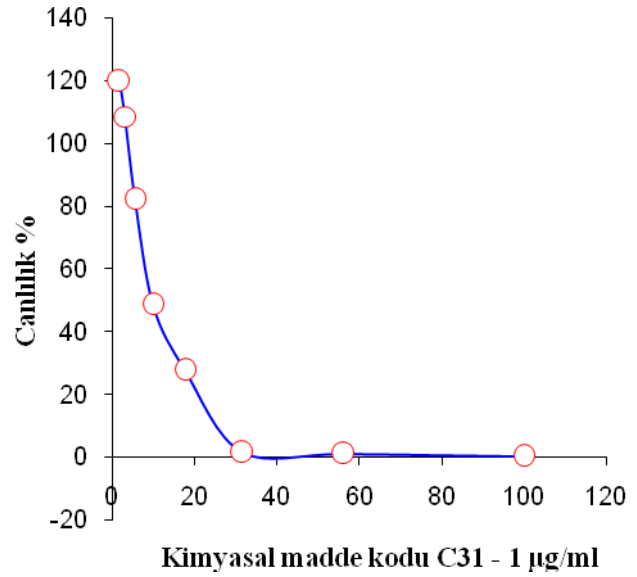
Kimyasal madde kodu C26 – 2: IC<sub>50</sub>= 7,8639 µg/ml

**Kimyasal madde kodu: C31 – 1**

**Çizelge 3. 28.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C31 – 1 (C31 nolu kimyasal maddenin ilk test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksosite test sonuçları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	100 µg/ml	56,23 µg/ml	31,62 µg/ml	17,78 µg/ml	10 µg/ml	5,62 µg/ml	3,16 µg/ml	1,78 µg/ml	DMSO	B
A	0,042	0,161	0,047	0,046	0,046	0,081	0,101	0,123	0,157	0,162	0,151	0,045
B	0,042	0,191	0,046	0,045	0,045	0,077	0,101	0,129	0,121	0,165	0,158	0,049
C	0,042	0,117	0,046	0,045	0,047	0,069	0,091	0,127	0,158	0,157	0,108	0,046
D	0,041	0,107	0,043	0,045	0,046	0,072	0,09	0,114	0,148	0,167	0,13	0,046
E	0,057	0,167	0,048	0,05	0,046	0,071	0,093	0,129	0,156	0,149	0,154	0,044
F	0,042	0,177	0,045	0,045	0,048	0,076	0,095	0,129	0,139	0,172	0,165	0,044
G	0,046	0,175	0,047	0,047	0,048	0,074	0,1	0,118	0,136	0,171	0,156	0,045
H	0,043	0,168	0,047	0,045	0,044	0,072	0,088	0,127	0,136	0,154	0,155	0,049

µg/ml	% Canlılık
100	0,258398
56,23	1,033592
31,62	1,550388
17,78	27,64858
10	48,57881
5,62	82,17054
3,16	108,5271
1,78	119,8966



**A**

**B**

**Şekil 3. 27.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C31 - 1'den nötral kırmızı alımı sitotoksosite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksosite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

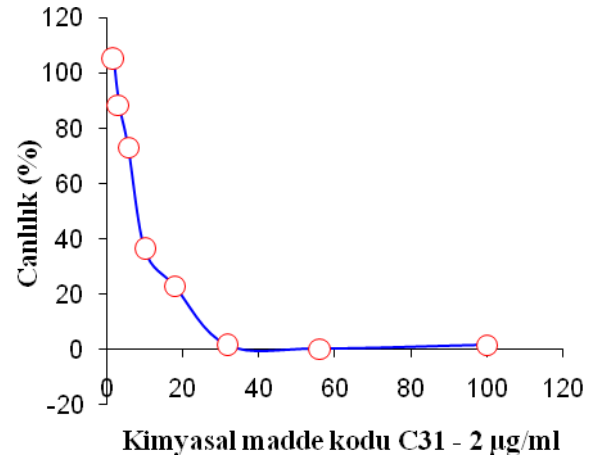
Kimyasal madde kodu C31 – 1: IC<sub>50</sub>= 5,8064 µg/ml

**Kimyasal madde kodu: C31 – 2**

**Çizelge 3. 29.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C31 – 2 (C31 nolu kimyasal maddenin ikinci test sonucu) ile nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	C	100 µg/ml	56,23 µg/ml	31,62 µg/ml	17,78 µg/ml	10 µg/ml	5,62 µg/ml	3,16 µg/ml	1,78 µg/ml	DMSO	B
A	0,043	0,175	0,046	0,05	0,048	0,082	0,099	0,123	0,15	0,166	0,149	0,046
B	0,045	0,177	0,044	0,044	0,045	0,076	0,092	0,105	0,18	0,17	0,137	0,046
C	0,045	0,18	0,047	0,044	0,047	0,079	0,088	0,136	0,163	0,175	0,152	0,046
D	0,044	0,16	0,049	0,045	0,05	0,066	0,096	0,142	0,162	0,18	0,147	0,05
E	0,044	0,174	0,047	0,048	0,046	0,077	0,097	0,137	0,153	0,176	0,151	0,045
F	0,044	0,179	0,047	0,046	0,046	0,077	0,086	0,141	0,156	0,187	0,153	0,045
G	0,045	0,169	0,047	0,044	0,048	0,078	0,093	0,139	0,151	0,166	0,15	0,044
H	0,044	0,148	0,046	0,044	0,046	0,078	0,092	0,12	0,146	0,166	0,132	0,046

µg/ml	% Canlılık
100	1,661779
56,23	0,293255
31,62	1,466276
17,78	22,97165
10	36,26588
5,62	73,21603
3,16	88,4653
1,78	104,8876



**A**

**B**

**Şekil 3. 28.** A: HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan kimyasal madde kodu C31 - 2'den nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık sonuçları. B: Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen konsantrasyon - % canlılık grafiği.

Kimyasal madde kodu C31 – 2: IC<sub>50</sub>= 7,2487 µg/ml

### 3.1.4. Nötral Kırmızı Alımı Sitotoksisite Testi Toplu Sonuçları

Kimyasal maddeler için elde edilmiş olan IC<sub>50</sub> değerleri aşağıda toplu olarak gösterilmiştir.

**Çizelge 3. 30.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal maddelerin nötral kırmızı alımı sitotoksisite test sonuçlarından elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri.

Kimyasal madde kodu	Hesaplanan IC <sub>50</sub> değerleri		Ortalama
	1. test sonucu	2. test sonucu	
13*	49,56 µg/ml	48,59 µg/ml	<b>49,075 µg/ml</b>
19	14,035 µg/ml	13,648 µg/ml	13,8415 µg/ml
20*	184,23 µg/ml	181,11 µg/ml	<b>182,67 µg/ml</b>
21*	32,448 µg/ml	38,858 µg/ml	<b>35,653 µg/ml</b>
22	7,2343 µg/ml	7,1097 µg/ml	7,172 µg/ml
23	8,0087 µg/ml	6,1553 µg/ml	7,082 µg/ml
C8*	80,116 µg/ml	85,855 µg/ml	<b>82,9855 µg/ml</b>
C10	3,7884 µg/ml	3,6434 µg/ml	3,7159 µg/ml
C11	6,5152 µg/ml	7,7761 µg/ml	7,14565 µg/ml
C13	7,6089 µg/ml	17,11 µg/ml	12,35945 µg/ml
C14	7,1746 µg/ml	7,3065 µg/ml	7,24055 µg/ml
C26	6,84 µg/ml	7,8639 µg/ml	7,35195 µg/ml
C31	5,8064 µg/ml	7,2487 µg/ml	6,52755 µg/ml

\*Sitotoksisite test sonuçlarına göre genotoksisite testi yapılan kimyasal maddeler.

Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testinden elde edilen  $IC_{50}$  değerlerine bakılarak ilaç adayı olan kimyasal maddelerden uygun olanlarla genotoksisite çalışmasına geçilmiştir.

### **3.2.Alkali Comet Testi Uygulamaları ile Elde Edilen Sonuçlar**

Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testinden elde edilen  $IC_{50}$  değerlerine göre, antibakteriel ve antifungal etkili olması amacıyla sentezlenen bu kimyasal maddelerden 4 tanesinde (13, 20, 21, C8) Comet testi yardımı ile DNA hasarı oluşturabilme potansiyelleri test edilmiştir. Comet testine uygulanan bu 4 kimyasal madde için elde edilen  $IC_{50}$  değerleri diğer kimyasal maddelerin  $IC_{50}$  değerleri ortalamasından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu nedenle sadece bu 4 kimyasal maddenin DNA hasarı oluşturabilme potansiyeli araştırılmıştır. Diğer kimyasal maddeler zaten oldukça düşük dozlarda sitotoksik olmaları nedeni ile bu kimyasal maddeler için ayrıca genotoksik etki gösterdikleri konsantrasyon araştırılmamıştır.

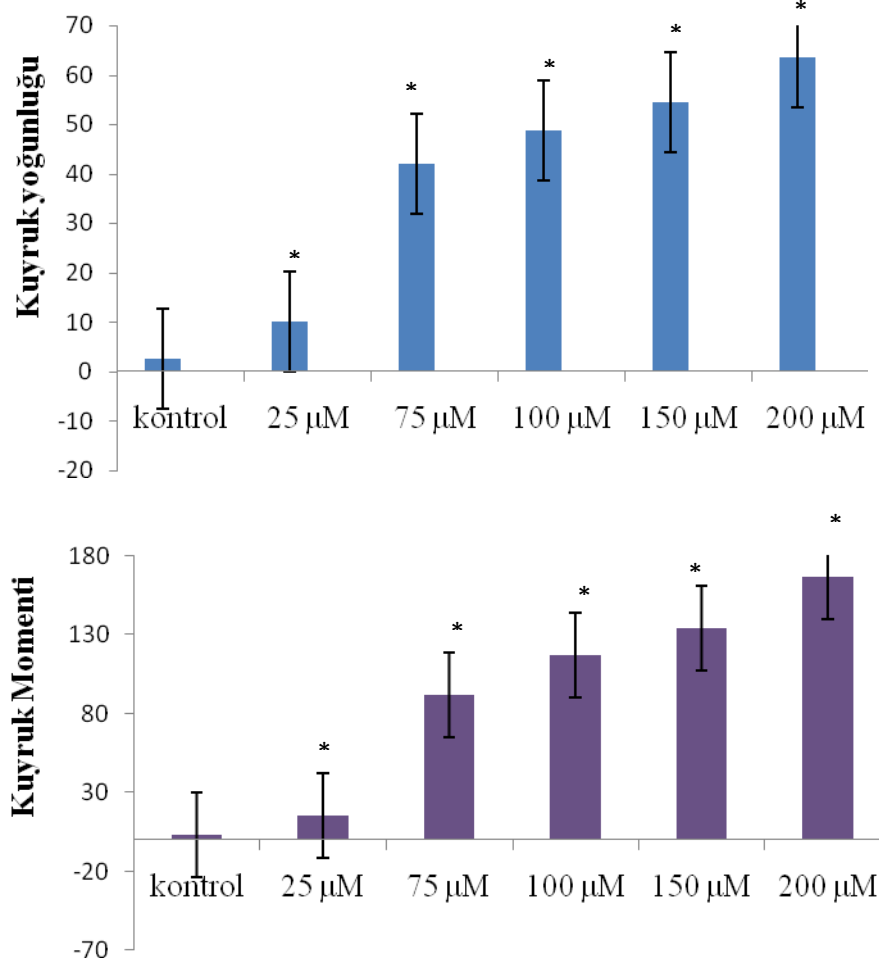
### 3.2.1. Pozitif Kontrol Olarak Kullanılan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile Elde Edilen Sonuçlar

Bölüm 2.2.7.1’de anlatıldığı gibi HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanarak alkali Comet testi ile analiz edildi.

**Çizelge 3. 31.** HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile alkali Comet testi sonuçları.

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ortalama Kuyruk Yoğunluğu (%)	Ortalama Kuyruk Momenti (birim)
Kontrol	2,686655685	3,093008545
25 µM	10,10047043*	15,27835975*
75 µM	41,99106184*	91,84835038*
100 µM	48,87223543*	117,075787*
150 µM	54,37503222*	134,1434875*
200 µM	63,56397792*	166,4482361*

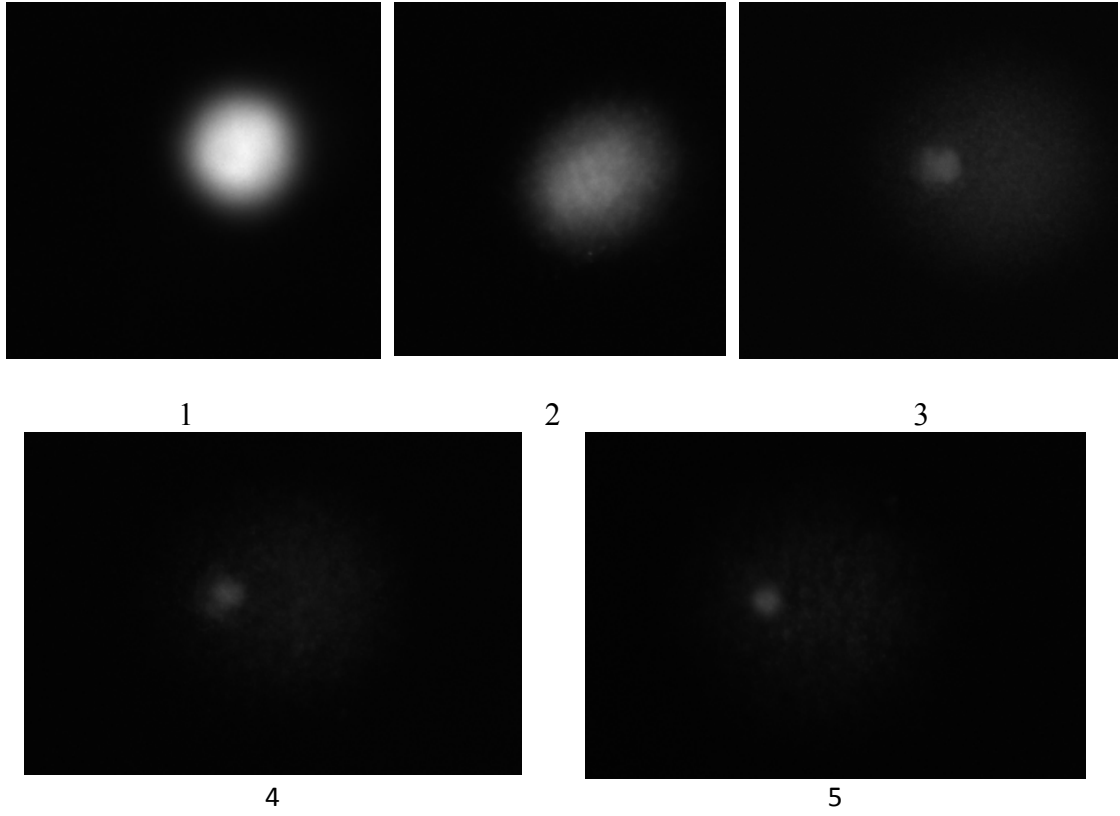
\*p<0,05, t Testi,  
Ortalama Kuyruk Yoğunluğu (%): Tail % Intensity  
Ortalama Kuyruk Momenti: Tail Moment



**Şekil 3. 29.** HeLa hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile alkali Comet testi sonuçları.

\*Kontrolle karşılaştırıldığında DNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlenmiştir (p<0,05, t Testi).

Elde edilen sonuçlara göre 25 µM, 75 µM, 100 µM, 150 µM ve 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile yapılan alkali Comet testinde DNA hasarının kontrole göre anlamlı bir şekilde arttığı istatistiksel olarak gözlemlenmiştir (p<0,05, t Testi).

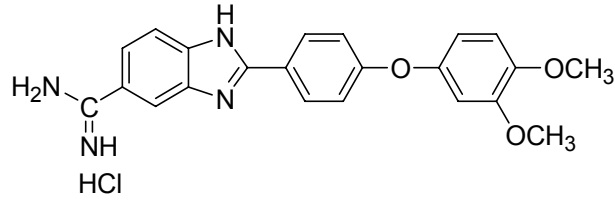


**Şekil 3. 30.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muamele edilen HeLa hücrelerinde oluşan DNA hasarının alkali Comet testi ile görünümü ( 1- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Kontrol, 2- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 25 µM, 3- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 75 µM, 4- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM, 5- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 µM ).

### 3.2.2. Kimyasal Maddelerden Elde Edilen Sonuçlar

#### Kimyasal madde kodu: 13

Kimyasal madde formülü:



IC<sub>50</sub>: 49,075 µg/ml

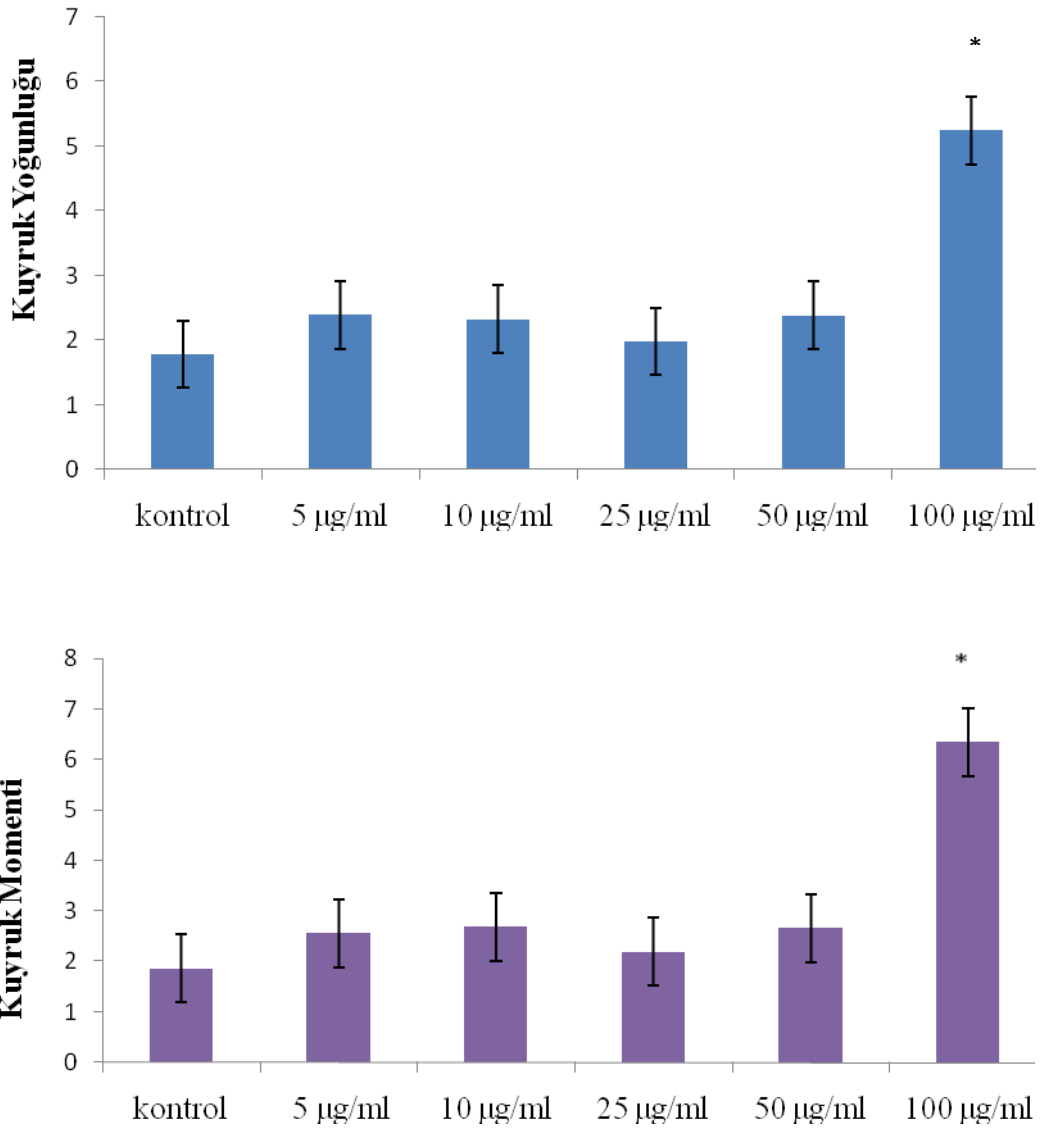
**Çizelge 3. 32.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 13'ün değişik konsantrasyonlarından elde edilen alkali Comet testi sonuçları.

Kimyasal Madde Kodu: 13	Ortalama Kuyruk Yoğunluğu (%)	Ortalama Kuyruk Momenti (birim)
Kontrol	1,780992413	1,855817457
5 µg/ml	2,391722452	2,563529981
10 µg/ml	2,328046684	2,685379657
25 µg/ml	1,979040222	2,187308154
50 µg/ml	2,388632436	2,66310729
100 µg/ml	5,246411368*	6,34859189*

\*p<0,05, t Testi

Ortalama Kuyruk Yoğunluğu (%): Tail % Intensity

Ortalama Kuyruk Momenti: Tail Moment



**Şekil 3. 31.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 13'ün değişik konsantrasyonlarından elde edilen alkali Comet testi sonuçları.

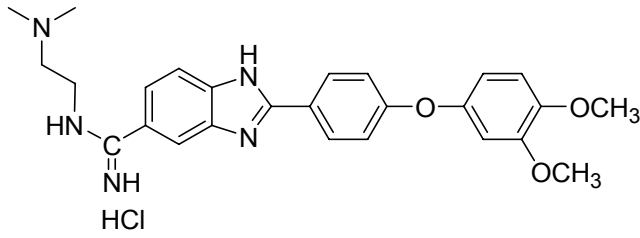
\*Kontrolle karşılaştırıldığında yüksek DNA hasarı ( $p < 0,05$ , t Testi).

Elde edilen sonuçlara göre HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 13'ün değişik konsantrasyonlarından elde edilen alkali Comet testinde 100 µg/ml'lık konsantrasyonun DNA hasarını kontrole göre anlamlı bir şekilde arttırdığı ( $p < 0,05$ , t Testi), diğer değerlerde DNA hasarının kontrole göre anlamlı bir artış göstermediği istatistiksel olarak gözlemlenmiştir ( $p > 0,05$ , t Testi). Bu sonuçlara göre "13"

numaralı kimyasal madde sitotoksik etki gösterdiği konsantrasyonun ( $IC_{50}$ : 49,075  $\mu\text{g/ml}$ ) üzerindeki konsantrasyonlarda DNA hasarı oluşturmaktadır.

**Kimyasal madde kodu: 20**

Kimyasal madde formülü:

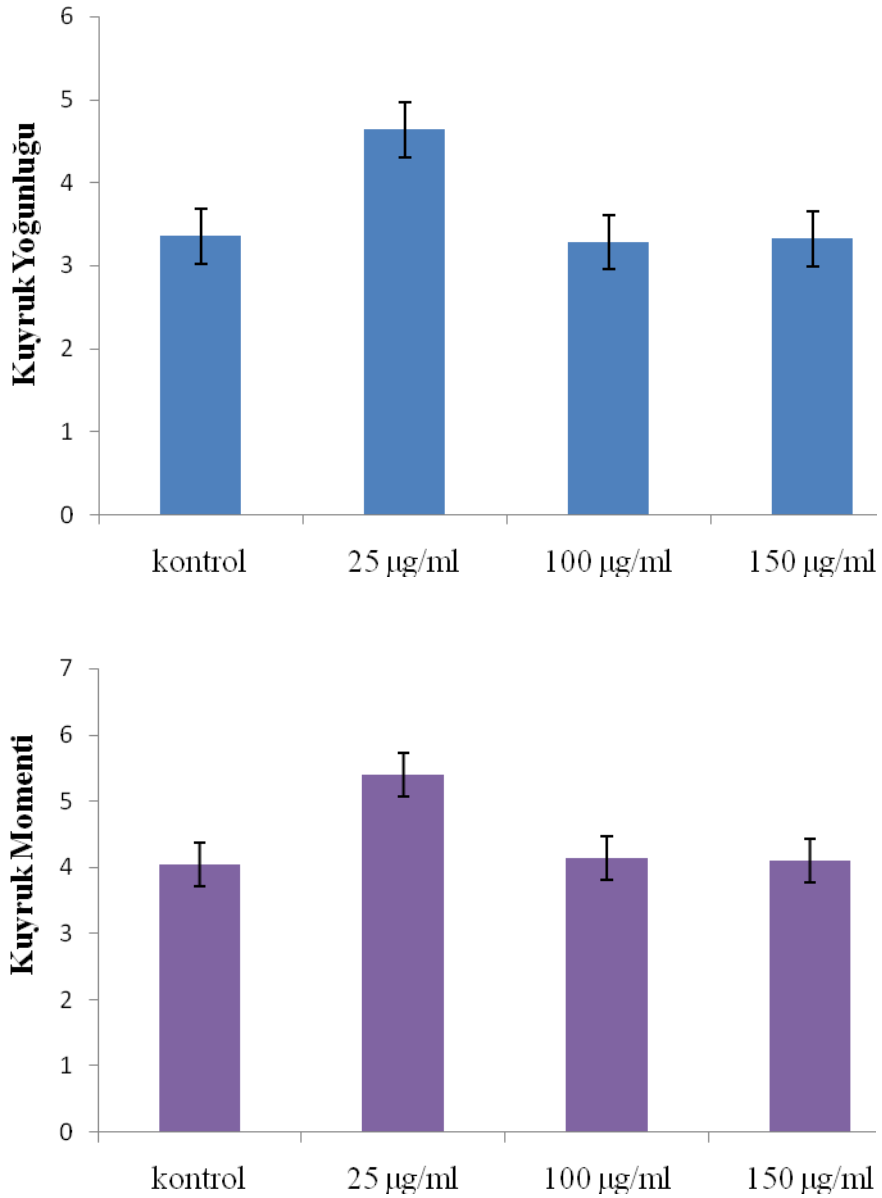


$IC_{50}$ : 182,67  $\mu\text{g/ml}$

**Çizelge 3. 33.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 20'nin değişik konsantrasyonlarından elde edilen alkali Comet testi sonuçları.

Kimyasal Madde Kodu: 20	Ortalama Kuyruk Yoğunluğu (%)	Ortalama Kuyruk Momenti (birim)
Kontrol	3,355829606	4,047878493
25 $\mu\text{g/ml}$	4,633115288	5,39768143
100 $\mu\text{g/ml}$	3,284537621	4,136722719
150 $\mu\text{g/ml}$	3,322496968	4,09472093

Ortalama Kuyruk Yoğunluğu (%): Tail % Intensity  
Ortalama Kuyruk Momenti: Tail Moment

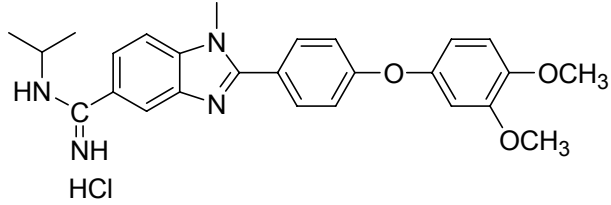


**Şekil 3. 32.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 20'nin değişik konsantrasyonlarından elde edilen alkali Comet testi sonuçları.

Elde edilen sonuçlara göre HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 20'nin değişik konsantrasyonlarından elde edilen alkali Comet testinde hiçbir değerde DNA hasarının kontrole göre anlamlı bir artış göstermediği istatistiksel olarak gözlenmiştir ( $p > 0,05$ , t Testi). Bu sonuçlara göre "20" numaralı kimyasal madde sitotoksik olduğu konsantrasyonun ( $IC_{50}$ : 182,67 µg/ml) altındaki konsantrasyonlarda DNA hasarı oluşturmamaktadır.

**Kimyasal madde kodu: 21**

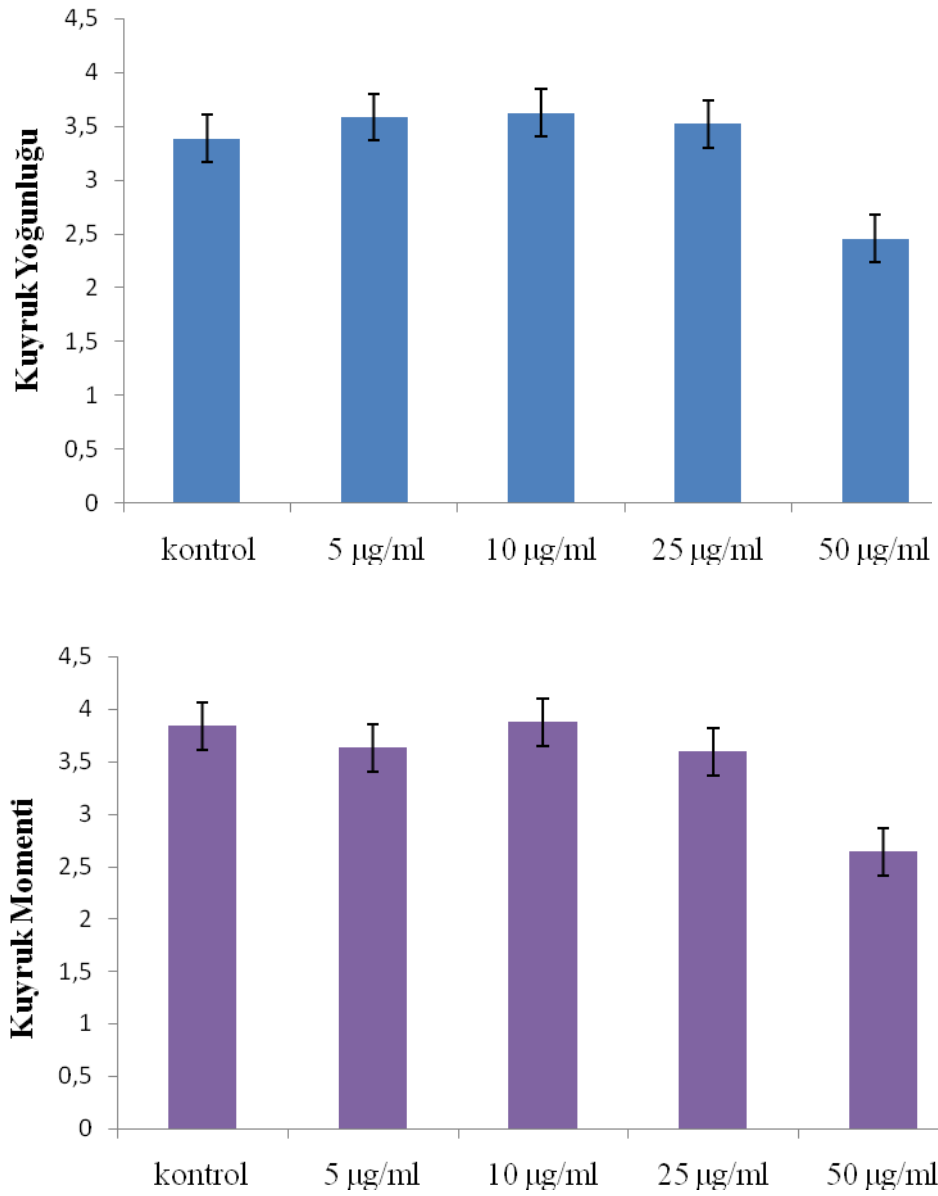
Kimyasal madde formülü:

IC<sub>50</sub>: 35,653 µg/ml

**Çizelge 3. 34.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 21'in değişik konsantrasyonlarından elde edilen alkali Comet testi sonuçları.

<b>Kimyasal Madde Kodu: 21</b>	<b>Ortalama Kuyruk Yoğunluğu (%)</b>	<b>Ortalama Kuyruk Momenti (birim)</b>
Kontrol	3,386635074	3,840733762
5 µg/ml	3,583930017	3,630786986
10 µg/ml	3,623429701	3,877454645
25 µg/ml	3,521681201	3,590552978
50 µg/ml	2,452473225	2,637618133

Ortalama Kuyruk Yoğunluğu (%): Tail % Intensity  
Ortalama Kuyruk Momenti: Tail Moment

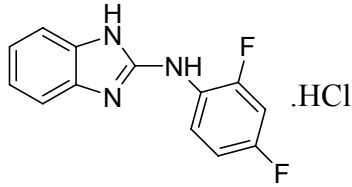


**Şekil 3. 33.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu 21'in değişik konsantrasyonlarından elde edilen alkali Comet testi sonuçları.

Elde edilen sonuçlara göre HeLa hücreleri madde kodu 21 olan kimyasal maddenin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakıldığında bu konsantrasyonlardan hiçbirinin DNA hasarına sebep olmadığı anlaşılmaktadır ( $p > 0,05$ , t Testi). Buna göre "21" numaralı kimyasal madde sitotoksik ( $IC_{50}$ : 35,653 µg/ml) olduğu konsantrasyonun üstündeki konsantrasyonlarda bile DNA hasarına sebep olmamıştır.

**Kimyasal madde kodu: C8**

Kimyasal madde formülü:

IC<sub>50</sub>: 82,9855 µg/ml

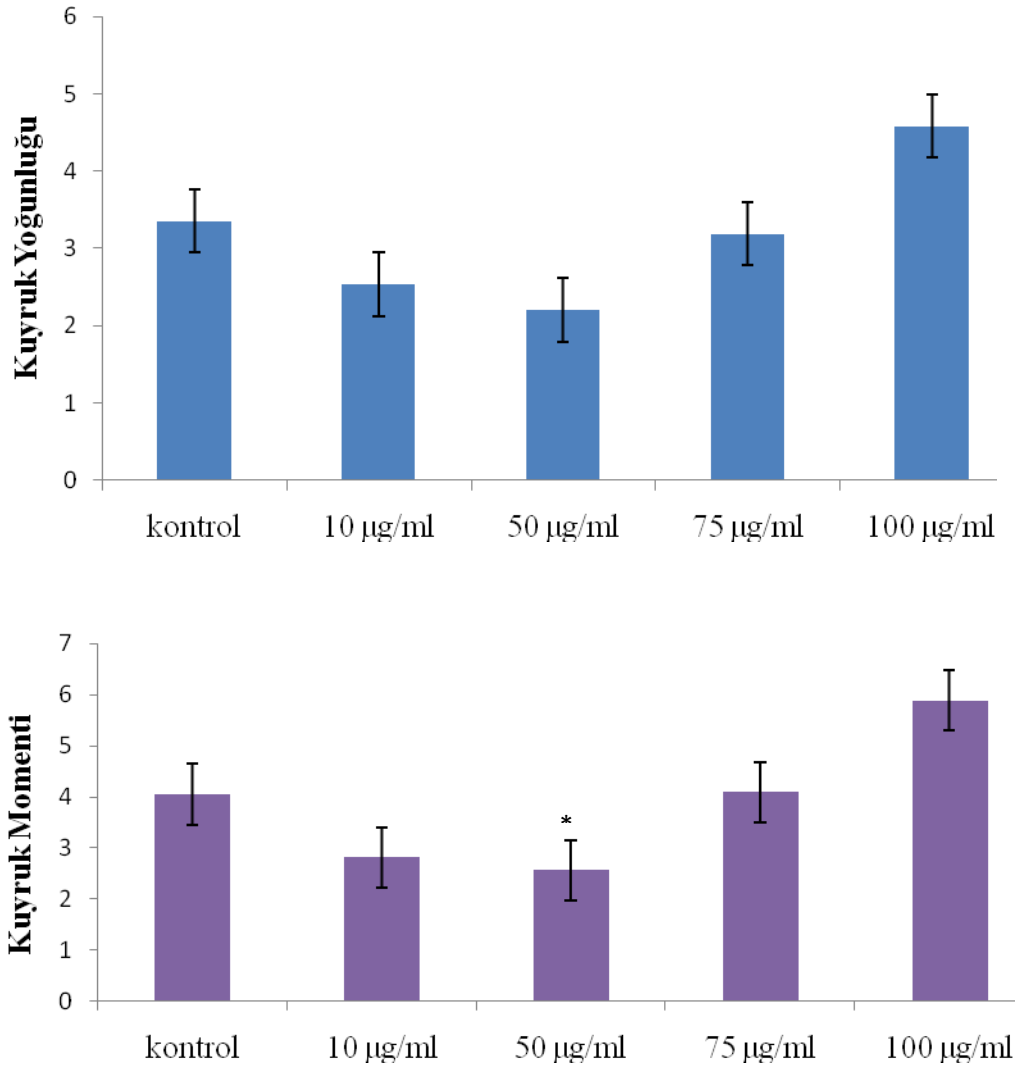
**Çizelge 3. 35.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C8'in değişik konsantrasyonlarından elde edilen alkali Comet testi sonuçları.

<b>Kimyasal Madde Kodu: C8</b>	<b>Ortalama Kuyruk Yoğunluğu (%)</b>	<b>Ortalama Kuyruk Momenti (birim)</b>
Kontrol	3,355829606	4,047878493
10 µg/ml	2,538567676	2,797883966
50 µg/ml	2,204198844	2,558975358*
75 µg/ml	3,186117537	4,09075805
100 µg/ml	4,581556142	5,8818513

\*p&lt;0,05, t Testi

Ortalama Kuyruk Yoğunluğu (%): Tail % Intensity

Ortalama Kuyruk Momenti: Tail Moment



**Şekil 3. 34.** HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C8'in değişik konsantrasyonlarından elde edilen alkali Comet testi sonuçları.

\*Kontrolle karşılaştırıldığında DNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmemiştir ( $p>0,05$ , t Testi).

Elde edilen sonuçlara göre; HeLa hücrelerine uygulanan kimyasal madde kodu C8'in farklı konsantrasyonlarda DNA hasarında anlamlı bir artışa sebep olmadığı gözlenmiştir ( $p>0,05$ , t Testi). Buna göre "C8" kodlu kimyasal maddenin sitotoksik olduğu ( $IC_{50}$ : 82,9855 µg/ml) konsantrasyonların çok üzerinde bile DNA hasarı oluşturmadığı gözlenmiştir.

#### 4. TARTIŞMA

Canlı hücre üzerinde meydana getirdiği etki ile bir hastalığın teşhis ve tedavisini veya bu hastalıktan korunmayı mümkün kılan kimyasal preparatlara ilaç denir. İlaç aktif maddelerinin, yardımcı katkı maddeleri ile belirli oranlarda kombine edilerek, çeşitli ürün formlarında kullanıcıya sunulması ilaç üretimi olarak adlandırılır. Yeni ilaç geliştirme çalışmaları klinik öncesi incelemeler ve klinik denemeler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Klinik denemeler faz I, faz II ve faz III incelemeleri olmak üzere hasta ve sağlıklı gönüllüler üzerinde yapılan uzun soluklu çalışmalardır. Bu çalışmalardaki maliyetlerin azaltılmasında en önemli unsurlardan biri klinik öncesi incelemelerde yapılan tarama testleri ve toksisite testlerinden elde edilen sonuçların doğru yorumlanmasıdır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre umut vaat eden kimyasal maddeler (ilaç adayları) ile klinik denemeler yapılmaktadır.

In vitro sitotoksikite testlerinin amaçlarından biri, hayvanlara uygulanacak kimyasal bileşiklerin akut oral toksisitesinin belirlenmesinde başlangıç dozunu saptamak ve kimyasal bileşiklerin LD<sub>50</sub> (% 50'sini öldürdüğü letal doz) değerlerinin saptanmasıdır (Popiolkiewicz ve ark., 2005). In vitro genotoksikite ve sitotoksikite deneyleri yeni bir kimyasalın ya da ilacın genotoksik (klastojenik, mutajenik) ve sitotoksik etkisinin belirlenmesinde sıkça kullanılmaktadır (Andreoli ve ark., 2003).

Yapılan bu tez çalışması ile de antifungal ve / veya antibakteriyel etkili olması düşünülen ilaç etken maddesi aday adaylarının hücrelerde sitotoksik etki gösterdikleri konsantrasyonların altında genotoksik etki gösterip göstermedikleri araştırılmıştır.

Tez çalışmamızda nötral kırmızı alımı sitotoksikite testinde pozitif kontrol olarak SDS kullanılmıştır. Çalışmamızda yapılan tüm nötral kırmızı alımı sitotoksikite testi uygulamaları pozitif kontrol olarak uygulanan SDS ile paralel yürütülmüştür. Bu çalışma ile yeni sentezlenen kimyasalların HeLa hücrelerine sitotoksik etkileri

hesaplanmıştır. Yapılan bu hesaplama ile hücrelerin yarısını öldüren ( $IC_{50}$ ) kimyasal konsantrasyonları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar çizelge 3. 30.'da gösterilmiştir.

Kimyasallar ile yapılan sitotoksisite testleri sonucunda elde edilen  $IC_{50}$  değerlerinden yola çıkılarak genotoksisite testlerine geçilmiştir. Bu aşamada genotoksisite testini tüm kimyasallara uygulamak yerine sitotoksisite testleri sonucunda  $IC_{50}$  değerleri diğerlerine göre yüksek olan kimyasallar ile çalışılması yoluna gidilmiştir. Bu çalışmada kimyasalların sitotoksik olduğu doz, genotoksisite çalışmalarında doz belirlemede bize ışık tutmuştur. Genotoksisite testleri için seçilen dozların  $IC_{50}$  değerlerinin altında olmasına dikkat edilmiştir. Elde edilen sonuçlar çizelge 3. 32., çizelge 3. 33., çizelge 3. 34. ve çizelge 3. 35.'de gösterilmiştir.

Tezimizde uygulamış olduğumuz Comet testinde  $pH = 13$ 'tür (alkali Comet). Comet testi bu haliyle DNA çift zincir kırıklarını (DSB), DNA tek zincir kırıklarını (SSB) ve Alkali oynak bölgeleri (ALS) tespit edebilmekte ve mümkün olan en yüksek hassasiyete ulaşmaktadır.

Tez çalışmamızda, alkali Comet testinde pozitif kontrol olarak  $H_2O_2$  kullanılmıştır.  $H_2O_2$  ile yaptığımız çalışmalarda çizelge 3. 31.'de gösterildiği gibi, uygulanan  $H_2O_2$  konsantrasyonları için hücre hasarları kontrole göre anlamlı bir artış göstermiştir.

Kimyasal madde kodu 13, 20, 21 ve C8 ile yapılan alkali Comet testinden elde edilen sonuçlara bakıldığında;

➤ **Kimyasal madde kodu 13:**

HeLa hücreleri 13 numaralı kimyasal madeye  $100 \mu\text{g/ml}$  konsantrasyonunda maruz bırakıldığında comet testinde ortalama kuyruk yoğunluğunda ve ortalama kuyruk momentinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Uygulanan diğer konsantrasyonlarda ( $5 \mu\text{g/ml}$ ,  $10 \mu\text{g/ml}$ ,  $25 \mu\text{g/ml}$ ,  $50 \mu\text{g/ml}$ ) ise DNA hasarının kontrole göre anlamlı bir artış göstermediği istatistiksel olarak

gözlenmiştir. Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen  $IC_{50}$  değeri 49,057  $\mu\text{g/ml}$  olduğundan bu artış beklenen bir durumdur. Bu sonuçlar bize kimyasal madde kodu 13'ün HeLa hücrelerinde sitotoksik olmadığı dozlarda genotoksik de olmadığını göstermiştir.

➤ **Kimyasal madde kodu 20:**

HeLa hücreleri, 20 numaralı kimyasal maddeye 25  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , 150  $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda maruz bırakıldığında alkali comet testi kapsamında incelenen her iki parametrenin de kontrole göre anlamlı bir artış göstermediği istatistiksel olarak gözlenmiştir. Diğer bir deyişle uygulanan konsantrasyonlarda DNA hasarı (DNA zincir kırıklarında artış) gözlenmemiştir.  $IC_{50}$  değeri 182,67  $\mu\text{g/ml}$  olan 20 numaralı kimyasal maddenin HeLa hücrelerinde sitotoksik olmadığı dozlarda genotoksik de olmadığı gözlenmiştir.

➤ **Kimyasal madde kodu 21:**

HeLa hücreleri 21 numaralı kimyasal maddeye 5  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$  ve 50  $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda maruz bırakıldığında alkali comet testi kapsamında incelenen her iki parametrenin de kontrole göre anlamlı bir artış göstermediği istatistiksel olarak gözlenmiştir. Diğer bir deyişle uygulanan konsantrasyonlarda DNA hasarı (DNA zincir kırıklarında artış) gözlenmemiştir.  $IC_{50}$  değeri 35,653  $\mu\text{g/ml}$  olan 21 numaralı kimyasal maddenin HeLa hücrelerinde sitotoksik olmadığı dozlarda genotoksik de olmadığını gözlenmiştir.

➤ **Kimyasal madde kodu C8:**

HeLa hücreleri C8 numaralı kimyasal maddeye 50  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonunda maruz bırakıldığında ortalama kuyruk momentinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Bununla birlikte aynı konsantrasyonda ortalama kuyruk yoğunluğunda ki azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir. Uygulanan diğer

konsantrasyonlarda (10 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml) ise DNA hasarının kontrole göre anlamlı bir artış göstermediği istatistiksel olarak gözlenmiştir. Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testi ile elde edilen IC<sub>50</sub> değeri 82,9855 µg/ml dir. C8 numaralı kimyasal maddenin bu konsantrasyonun altındaki konsantrasyonlarda genotoksik etki göstermediği belirlenmiştir. 50 µg/ml'lik konsantrasyonda gözlenen DNA zincir kırıklarındaki azalma hücresel düzeyde ortaya çıkan bir adaptif cevabın sonucu olabilir. Kesin bir değerlendirme yapabilmek için bu kimyasal madde ile çalışılmaya devam edilmelidir. Ancak bu durum bu tezin konusu dışındadır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülkemizde ilaç adayı olarak sentezlenen kimyasal maddeler için gerekli olan tüm klinik öncesi laboratuvar testlerinin yapılması bu yolda karşılaşılan büyük zorluklar ve maliyetler nedeni ile uygulanmayan bir süreçtir. Ülkemizde her yıl sentezlenen yüzlerce ilaç adayı çoğu zaman sadece farmakolojik veya mikrobiyolojik etkinlik yönünden test edilmekte ve ne yazık ki o aşamada kalmaktadır. Bu durumda belkide ilaç olabilme potansiyeline sahip bazı yeni sentezlenmiş moleküllerin bu potansiyellerinin farkına bile varılamamaktadır. Sentezlenen yeni moleküllerin prelinik testlerinin yapılabilmesi yönündeki çabaların başlatılması sürecinde multi-disipliner proje ve ortak çalışmalar son derece önemli bir yer kaplayacaktır. Bu sürecin başlatılması ve geliştirilmesi aşamasında özellikle eczacılık fakültelerinin farmasötik kimya, farmakoloji, farmasötik toksikoloji, farmasötik teknoloji ve mikrobiyoloji anabilim dallarının bir araya gelerek ortak proje ve çalışma grupları oluşturmaları son derece önemlidir. Böyle bir yapılanma, her yıl sentezlenen yüzlerce molekül arasından umut verici olanların fark edilip mümkün olan en iyi şekilde değerlendirilmesinde büyük faydalar sağlayabilecektir.

Bu tez kapsamında yapılmış olan çalışma da aslında üç anabilim dalının (farmasötik kimya, farmasötik toksikoloji, mikrobiyoloji) bir araya gelerek hazırlanmış olduğu ortak projenin belli bir bölümünden oluşmaktadır. Bu projeden elde edilen sonuçlar bile, yukarıda söz edilen multi-disipliner çalışmaların son derece faydalı olacağını belgeler niteliktedir. Yapmış olduğumuz çalışmanın sonucuna göre antifungal / antibakteriel etkili olması amaçlanarak sentezlenmiş olan 13 molekülden 9 tanesinin oldukça düşük dozlarda sitotoksik olduğu tespit edilmiş ve genotoksisite testlerine dahil edilmemiştir. Daha sonra uygulanan Comet testi ile bu 4 kimyasal maddenin belli dozlarda DNA molekülünde zincir kırıkları oluşturabilme potansiyelinin olup olmadığı araştırılmış ve bu 4 kimyasal maddenin sitotoksik olduğu konsantrasyonların altında DNA hasarı (comet testine göre) oluşturmadığı gözlenmiştir. Bu son derece önemli bir sonuçtur. Artık bu aşamadan sonra bu yeni sentezlenen 13 molekülün tamamının mikrobiyolojik aktiviteleri yönünden

incelenmesine gerek yoktur. Çünkü zaten 9 tanesi oldukça düşük konsantrasyonlarda sitotoksik etki göstermektedir. Bu nedenle  $IC_{50}$  değeri diğerlerine göre oldukça yüksek olan ve sitotoksik olduğu konsantrasyonun altında genotoksik etki göstermeyen bu 4 molekülün mikrobiyolojik aktivitelerinin incelenmesi yeterlidir. Eğer bu 4 kimyasal madde sitotoksik ve genotoksik olmadığı konsantrasyonlarda yüksek antifungal ve / veya antibakteriyel etki gösterirlerse önemli bir ilaç adayı olarak düşünülebilirler.

Bu tez çalışmasındaki örnekte görüldüğü gibi sadece 2 toksisite testi uygulayarak bile 13 kimyasal maddeden 9 tanesi elenebilmiş ve sonraki testler için test edilecek molekül sayısı önemli oranda azaltılmıştır. Bu örnek daha geniş ölçekte yüzlerce kimyasal madde için uygulandığında önemli bir zaman ve maliyet tasarrufu sağlayacağı açıktır.

Elbette toksisite testleri sadece bu tez kapsamında yapılmış olan 2 testten ibaret değildir. Yeni sentezlenen moleküllere laboratuvar aşamasında uygulanması gereken pek çok toksisite testi bulunmaktadır. Sadece toksisite testleri düşünüldüğünde bile, bu testlerin tamamının bir kişi tarafından veya tek bir laboratuvar tarafından yapılabilmesi mümkün değildir. Çünkü her bir test farklı bir alt-uzmanlık alanı ve farklı laboratuvar donanımları gerektirebilmektedir. Bu nedenle, farklı eczacılık fakültelerinde konumlanan toksikoloji anabilim dallarının özellikle farklı alanlarda uzmanlaşmaları, büyük multi-disipliner projelerde eksikliği hissedilen spesifik alanlar için bilimsel destek ve laboratuvar altyapısı sağlanabilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Eğer eczacılık fakültelerinde geleceğe yönelik olarak “yeni ilaç araştırmaları” adı altında multi-disipliner projelerin yapılması hedefleniyorsa (ki hedeflenmelidir) yukarıda özetlendiği şekildeki bir uzmanlaşma diğer anabilim dalları içinde geçerli ve gereklidir.

Sonuç olarak; antifungal / antibakteriyel etkili olması amaçlanarak sentezlenmiş olan 13 adet kimyasal maddenin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması amacıyla yapılmış olan bu çalışma, aynı zamanda multi-disipliner ölçekte ve iyi planlanarak yapılacak “yeni ilaç araştırmaları” kapsamındaki projelerin süre ve

maliyet açısından makul seviyelere indirilebileceğini göstermektedir. Bu amaç doğrultusunda ilaç endüstrisini de içine alarak planlanacak büyük projeler, farklı uzmanlık alanlarında çalışan bilim adamlarının da aynı hedef doğrultusunda çalışmalarını teşvik edecek ve zaman içinde her zaman yokluğu hissedilen ortak bilgi birikiminin oluşmasına öncülük edecektir. Oluşacak olan bu ortak bilgi birikiminin Türkiye'deki ilaç sanayinin gelişimine de önemli katkı sağlayabileceği açıktır.

## ÖZET

### **Yeni Sentezlenen Bazı İlaç Adayı Etken Maddelerinin Sitotoksik ve Genotoksik Etkilerinin Araştırılması**

Yeni ilaç araştırmaları çok uzun süren ve oldukça maliyetli bir süreçtir. Bu nedenle kabul edilemeyecek ölçülerde toksik ve aktivitesi zayıf olan ilaçlar adaylarının mümkün olan en erken basamakta elimine edilmesi ve umut vaad eden kimyasal maddeler ile ileri testlere devam edilmesi son derece önemlidir. Bununla ilgili olarak sitotoksik ve genotoksik testleri kimyasal maddelerin hücresel ve moleküler (DNA) düzeydeki toksik konsantrasyonları ile ilgili olarak son derece önemli veriler sunar. Bu tezin amacı; farmasötik kimya anabilim dalında antibakterial ve antifungal etki göstermeleri amacıyla sentezlenmiş olan ilaç aday aday kimyasal maddelerin sitotoksik ve genotoksik etki gösterdikleri konsantrasyonların tespit edilmesidir.

Bu yeni ilaç adaylarının (13 adet) HeLa hücrelerindeki IC<sub>50</sub> değerleri nötral kırmızı alımı testi vasıtası ile tespit edilmiştir. Bu test de sodyum dodesil sülfat (SDS) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Test sonuçlarına göre 4 kimyasal maddeye ait olan IC<sub>50</sub> değerleri diğerlerine göre istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur. Oldukça düşük IC<sub>50</sub> değerlerine sahip olmaları nedeni ile diğer 9 kimyasal madde sitotoksik olarak kabul edilmiştir. Bu nedenle alkali comet testi sadece bu 4 kimyasal maddeye uygulanmıştır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar bu 4 kimyasal maddenin IC<sub>50</sub> değerlerinin altındaki konsantrasyonlarda genotoksik olmadığını göstermiştir.

Bu sonuçlara göre 13, 20, 21 ve C8 kod numaralı kimyasal maddeler diğer kimyasal maddeler içinde en umut vaad eden yeni antibakteriel / antifungal ilaç adaylarıdır.

**Anahtar Sözcükler:** Comet testi, genotoksikite, HeLa, hücre kültürü, nötral kırmızı alımı, sitotoksikite.

## SUMMARY

### **Investigation of Cytotoxic and Genotoxic Effects of Some New Synthesised Drug Candidates**

New drug research is a long lasting and costly process. Therefore it is essential to eliminate the the unacceptably toxic or poorly active drug candidates at the earliest stage of the process and to continue to the further tests with the promising chemicals. In this context, cytotoxicity and genotoxicity test results provides unique data about the toxic concentrations of the chemicals at cellular and molecular (DNA) levels respectively. The aim of this master thesis is to determine the cytotoxic and genotoxic concentrations of the novel antibacterial and antifungal drug candidates synthesized by the pharmaceutical chemistry department.

The novel drug candidates (13 chemicals) were subjected to neutral red uptake (NRU) cytotoxicity test in order to determine the  $IC_{50}$  values of the chemicals in HeLa cell lines. Sodium dodecyl sulphate (SDS) was used as positive control. According to the results of the cytotoxicity tests the  $IC_{50}$  values of 4 chemicals were statistically higher than the rest of the chemicals. The remaining 9 chemicals were considered as cytotoxic due to the quite low  $IC_{50}$  values. Therefore the alkaline comet assay was applied to 4 chemicals only.  $H_2O_2$  was used as positive control. The results revealed that these 4 chemicals were not genotoxic at the concentrations lower than their  $IC_{50}$  values.

According to these results the chemicals coded as 13, 20, 21 and C8 are the most promising novel antifungal/antibacterial drug candidates among the other nine chemicals.

**Key Word:** Cell culture, Comet assay, cytotoxicity, genotoxicity, HeLa, neutral red uptake.

## KAYNAKLAR

- ANDREOLI, C., GIGANTE, D., NUZIATA, A. (2003). A review of *in vitro* methods to assess the biological activity of tobacco smoke with the aim reducing the toxicity of smoke. *Toxicology in Vitro*. **17**; 587-594.
- ARAT, S., TAŞ, A., ÇETİNKAYA, G. (2008). Primer Hücre Kültürü Uygulamalı Kursu, Türkaygen-1 Projesi.Erişim: [http://www.turkaygen.gov.tr/doc/cellculture\_handbook.pdf]. Erişim Tarihi: 25.04.2011
- BARILE, F.A. (1994). Introduction to *in vitro* cytotoxicology mechanisms and methods. CRC Pres., Boca Raton, Florida, USA, 53-55
- BARNES, D., SATO, G. (1980). Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell*. **22**: 649-655.
- BETTGER, W.J., BOYCE, S.T., WALTHALL, B.J., HAM, R.G. (1981). Rapid clonal growth and serial passage of human diploid fibroblasts in a lipid-enriched synthetic medium supplemented with epidermal growth factor, insulin, and dexamethasone. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 5588-5592.
- BIGGERS, J.D., GWATKIN, R.B.L., HEYNER, S. (1961). Growth of embryonic avian and mammalian tibiae on a relatively simple chemically defined medium. *Exp Cell Res*. **25**: 41.
- BULYCHEV, A., TROUET, A., TULKENS, P. (1978). Uptake and intracellular distribution of neutral red in cultured fibroblasts. *Cell Res*. **115**: 343-355.
- COLLINS, A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. *Mol Biotechnol*. **26**: 249-261.
- COLLINS, A.R., DOBSON, V.L., DUSINSKA, M., KENNEDY, G., STETINA, R.(1997). The comet assay: what can really tell us?. *Mutat. Res*. **375**: 183-193.
- CRESPI, C.L., LANGENBACH, R., PENMAN, B.W. (1993). Human cell lines, derived from AHH-1 TK +/- human lymphoblasts, genetically engineered for expression of cytochromes P450. *Toxicology*. **82 (1-3)**: 89-104.
- ÇİÇEK, C., BİLGİÇ, A. (2006). Klinik Viroloji Laboratuvarlarında Uzmanlık Öğrencisine Verilen Hücre Kültürü Eğitim Programı: Bir Model. *İnfeksiyon Dergisi*. **20(3)**: 231-241

- DAS, R.C. (2001). Proteins and antibodies make advantages as therapeutic products. *Am Clin Lab.* **20(5)8**: 10-14
- DULBECCO, R., FREEMAN, G. (1959). Plaque Production by the Polyoma Virus. *Virology.* **8**: 396-397.
- EAGLE, H. (1955). Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science.* 122: 501.
- EAGLE, H. (1959). Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science.* **130**: 432
- EATON, D., KLAASSEN, C. (1996). Principles of Toxicology. Ed. Klaassen, C. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons (5. Baskı), New York: McGraw-Hill
- FENT, K. (2001). Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicology in Vitro.* **15**: 477-488.
- FINTER, N.B., GARLAND, A.J., TELLING, R.C. (1990). Large-scale mammalian cell culture: a perspective. *Bioprocess Technology.* **10**: 1-14.
- FOTAKIS, G.,TIMBRELL, J.A. (2006). *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters,* **160**: 171-177
- FRESHNEY, R.I. (2008). Authentication of cell lines: ignore at your peril! *Expert Rev. Anticancer Ther.* **8(3)**: 311-4.
- GAD, S.C. (2000). *In vitro* toxicology, Second Edition, Taylor & Francis, New York.
- GELAL, A. (2005). Yeni İlaç Geliştirilmesi. Türk Farmakoloji Derneği Klinik Farmakoloji Çalışma Grubu. 1: 6
- GEY, G.O., COFFMAN, W. D., KUBICEK, M. T. (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research.* **12(4)**: 264-265
- GRIFFITHS, B. (2000). Animal cell products, overview. Ed.: Spier, R.E. Encyclopedia of Cell Technology. Vol. 1. New York: John Wiley & Sons. 70-76
- GUNARATNA, C. (2000). Drug metabolism and pharmacokinetics in drug discovery: A primer for bioanalytical chemists, Part I. *Current Separations.* **19 (1)**: 17-23.
- HAM, R. (1965). Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined synthetic medium. *Proc Natl Acad Sci.* **53**: 288.

- HSU, T.C., KELLOGG, D.S. (1960). Primary cultivation and continuous propagation in vitro of tissues from small biopsy specimens. *J Natl Cancer Inst.* 25:221-35.
- HU, W. (2006). Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies, Ed.: S. S. Öztürk, New York London. s.: 1-5, 41-79.
- IWAKATA, S., GRACE, J.T. (1964). Cultivation in vitro of myeloblasts from human leukemia. *NY State J Med* . **64**: 2279-82.
- KOMISSAROVA, E.V., SAHA, S.K., ROSSMAN, T.G. (2005). Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **202**; 99-107.
- LANGDON, S.P., (2004). Cancer Cell Culture, Methods and Protocols. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- M CART, D.G., MCKERR, G., HOWARD, C.V., SAETZLER, K., WASSON, G.R. (2009). Modelling the comet assay. *Biochem. Soc. Trans.* **37**: 914-917.
- MCCOY, T.A., MAXWELL, M., KRUSE, P.F. (1959). Amino acid requirements of the Novikoff hepatoma in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med*. **100(1)**:115-8.
- MOORE, G.E., KITAMURA, H. (1968). Cell line derived from patient with myeloma. *NY State J Med*. **68**: 2054-2060
- MOORE, G.E., GARNER, R.E., FRANKLIN, H.A. (1967). Culture of normal human leukocytes. *The Journal of the American Medical Association*. **199**: 519-524.
- MORGAN, J.F., CAMPBELL, M.E., MORTON, H. J. (1955). Natl Cancer Inst. **16**: 577
- MORGAN, J.F., MORTON, H.J., PARKER, R.C. (1950). Nutrition of animal cells in tissue culture; initial studies on a synthetic medium. *Proc Soc Exp Biol Med* . 73(1): 1-8.
- MORTON, H.J. (1970). A survey of commercially available tissue culture media. **In vitro**. 6:89-108
- MURAKAMI, H. (1989). Advance in Biotechnological Processes. Ed.: Mizrahi, A. Vol. 11. New York, A.R.Liss, 107
- NELSON-REES, W. A., DANIELS, D. W., FLANDERMEYER, R. R. (1981). Cross-contamination of cells in culture. *Science*. **212**: 446-452
- OSTLING, O., JOHANSON, K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biophys. Res. Commun*. **123**: 291-298.

- PARK, M.S., TERASAKI, P.I. (1974). Storage of human lymphocytes at room temperature. *Transplantation*. **18(6)**: 520-524
- PARKER, R. C., CASTOR, L. N., MCCULLOCH, E. A. (1957). Altered cell strains in continuous culture: A general survey. In *Cellular Biology, Nucleic Acids and Viruses, Spec. Publ. N.Y. Acad. Sci.* 5, 303-313
- POPIOLKIEWICZ, J., POLKOWSKI, K., SKIERSKI, J.S., MAZUREK, (2005). A. *In vitro* toxicity evaluation in the development of new anticancer drugs-genistein glycosides. *Cancer Lett.*, **229**: 67-75
- PUTNAM, K.P., BOMBICK, D.W., DOOTITTLE, D.J. (2002). Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicology In Vitro*. **16**: 599-607.
- RAHBARI, R., SHEAHAN, T., MODES, V., COLLIER, P., MACFARLANE, C., BADGE, R. M. (2009). A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. *Biotechniques*. **46** (4): 277-84.
- RYAN, P.A., MAHER, V.M., MCCORMICK, J.J. (1987). Modification of MCDB 110 medium to support prolonged growth and consistent high cloning efficiency of diploid human fibroblasts. *Exp Cell Res*. **172**: 318-328.
- RYDBERG, B., JOHANSON, J.J. (1978). Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: *DNA repair mechanisms*, Ed: P.C. Hanawalt, E.C. Friedberg, C.F. Fox, Academic Press, New York, p.:465-468.
- SAYGI, S. (2003). Deneysel toksikolojide toksisite testleri ve test sonuçlarının önemi. *Gülhane Tıp Dergisi*. **45** (3) : 291 – 298.
- SINGH, N.P., MCCOY, M.T., TICE, R.R., SCHNEDER, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res*. **175**: 184-191.
- SPEIT, G., SCHUTZ, P., BONZHEIM, I., TRENZ, K., HOFFMANN, H. (2004). Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicol. Lett.* **146**: 151-158.
- STANNERS, C.P., ELİCEİRİ, G.L., GREEN, H. (1971). Two types of ribosome in mouse-hamster hybrid cells. *Nat New Biol*. **230**: 52-54.
- SUN, W., WU, R., LAST, J.A. (1995). Effects of exposure to environmental tobacco smoke on a human tracheobronchial epithelial cell line. *Toxicology*. **100** (1-3): 163-74.
- TİCE, R.R., AGURELL, E., ANDERSON, D. (2000). Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. **35**: 206-21.

- ÜSTÜNDAĞ, A. Hiperbarik Oksijen Tedavisinin (HBOT) Sebep Olduğu Genotoksik Etkilerin İncelenmesi, F. Toksikoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, 2010.
- WATAHA, J. C. (2001). Principles of biocompatibility for dental practitioners. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. **86**: 203-9
- WEYERMANN, J., LOCHMANN, D., ZIMMER, A. (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*. **288**; 369–376.
- WOOSTER, R., EBNER, T., SUTHERLAND, L., CLARKE, D., BURCHELL, B. (1993). Drug and xenobiotic glucuronidation catalysed by cloned human liver UDP-Glucuronosyltransferases stably expressed in tissue culture cell lines. *Toxicology*. **82 (1-3)**: 119-29.
- YAMANE, I., MATSUYA, Y., JIMBO, K. (1968). An autoclavable powdered culture medium for mammalian cells. *Proc Soc Exp Biol Med*. **127**: 335-336
- YANO, C.L., MARCONDES, C.C.G. (2005). Cadmium chloride-induced oxidative stress in skeletal muscle cells *in vitro*, *Free Radical Biology & Medicine*, 39, (1378-1384

## ÖZGEÇMİŞ

### I- Bireysel Bilgiler

Adı: Memduha

Soyadı: Erzurum

Doğum yeri ve tarihi: Kırşehir – 1985

Uyruğu: TC

Medeni Durumu: Evli

### II- Eğitimi

Anadolu Üniversitesi Sağlık Kurumları İşletmeciliği,

Anadolu Üniversitesi İşletme Fakültesi İşletme Bölümü, 2010

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 2008

Çankaya Atatürk Anadolu Lisesi- Ankara, 2004

Yabancı Dili: İngilizce

### III- Ünvanları

Eczacı

### IV- Mesleki Deneyimi

Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi- Eczacı

### V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

### VI- Bilimsel İlgi Alanları

### VII- Bilimsel Etkinlikler

“Sitotoksosite Testleri” konulu yüksek lisans semineri, 2010

### VIII- Diğer Bilgiler