

PAPER DETAILS

TITLE: AN INVESTIGATION OF MUTAGENIC ACTIVITIES OF SOME 9-

SUBSTITUEDPHENANTHRENE DERIVATIVES WITH AMES / SALMONELLA / MICROSOME
TEST

AUTHORS: Mehtap KUTLU,Esin ÖZTAS,Gözde AYDOGAN KILIÇ,Ilhan ISIKDAG,Yusuf ÖZKAY

PAGES: 83-94

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/35733>

**BAZI 9-SÜBSTİTÜE FENANTREN TÜREVLERİNİN MUTAJENİK
AKTİVİTELERİNİN AMES / SALMONELLA / MİKROZOM TESTİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

**Mehtap KUTLU¹, Esin ÖZTAŞ¹, Gözde AYDOĞAN¹, İlhan IŞIKDAĞ²,
Yusuf ÖZKAY²**

ÖZ

Bu çalışmada, ilaç ön maddesi olarak sentezlenmiş olan üç farklı 9-Süstitüye fenantren türevi, Ames test yöntemi kullanılarak, *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları yardımı ile mutajenik potansiyelleri açısından test edilmiştir. Bunun için, her iki suş, mikrozomal enzimler içeren metabolik aktivasyon (S9) varlığında ve yokluğunda, her bir test maddesinin beş ayrı dozu ile iki bağımsız deneyle araştırılmıştır. Metabolik aktivasyon yokluğunda, sentezlenen bileşiklerden yalnızca bir tanesi çerçeve kayması mutasyonlarına neden olurken, ikisinin baz çifti değişimi mutasyonlarını indüklediği belirlenmiştir. Metabolik aktivasyonlu ortamda ise iki madde TA 98 suşu için mutajen özellik gösterirken, baz çifti değişimi mutasyonu hiçbir madde için tespit edilmemiştir. Test edilen bileşiklerin her birinin, S9 varlığında veya yokluğunda, en az bir suş için mutajenik özellikte olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler : Ames test, Fenantren türevleri, Mutajenite.

**AN INVESTIGATION OF MUTAGENIC ACTIVITIES OF SOME 9- SUBSTITUED-
PHENANTHRENE DERIVATIVES WITH AMES / SALMONELLA / MICROSOME
TEST**

ABSTRACT

In this study, three different 9-Substituted phenantrene derivatives that were synthesized to be used as basic matter for drugs were tested for their mutagenic potency in strains TA 98 and TA 100 of *Salmonella typhimurium* by using Ames test. Therefore, both strains were tested in the absence or presence of S9 metabolic activation, for five different doses of each test substances in two paralel independent experiments. In the absence of metabolic activation, while only one of the compounds were causing frame-shift mutations, two of them were determined to induce base pair substitution mutations. In the presence of metabolic activation, while two of the compounds were mutagenic for TA 98, base pair substitution mutations were not detected for any of the substances. Each of the compounds tested were found to be mutagenic for at least one strain in the presence or absence of S9.

Keywords: Ames test, Phenanthrene derivatives, Mutagenicity.

¹ Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 26470 Eskişehir.

Tel:+90-222-3350580/4721, Fax:+90-222-3204910, E-mail adres: hmcutlu@anadolu.edu.tr

² Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 26470 Eskişehir.

1. GİRİŞ

Kimyasal maddelerin birçoğu, canlıların kalıtsal bilgisinde değişikliklere yol açan, genotoksik ve karsinojenik etkilere sahip olan maddelerdir. Genellikle, doğrudan veya metabolize edildikten sonra karsinojenik etki gösteren bu kimyasal maddeler, aynı zamanda mutajenik olarak da kabul edilmektedirler. Ancak, tüm mutajenik maddelerin, karsinojen etki göstermedikleri de bilinmektedir. Örneğin, sodyum nitrit, çok etkili bir mutajen olmasına rağmen, kansere neden olduğu henüz ispat edilememiştir. Bunun nedeni, mutasyonun kalıtsal materyali doğrudan etkilemesi, kanserin ise, çok aşamalı biyolojik olaylar sonucu oluşmasıdır. Bu nedenle, kimyasal maddelerin mutajenler ve karsinojenler diye iki ayrı grupta incelemesi yerine, “mutajen / karsinojen”ler olarak tek bir grupta incelemesi daha uygun olacaktır (Levin ve Ames, 1986; Lawley, 1989; Hansch, 1991; Anders ve Dekont, 1994).

Kimyasal karsinojenlerin, genetik materyal üzerindeki etkileri yapılarından dolayı farklı düzeyde olabilir. Örneğin, primer karsinojen olarak bilinen kimyasal maddeler, molekül yapıları itibari ile, kimyasal ve biyolojik olarak aktif bileşiklerdir. Bu maddeler, çok çabuk serbest değişken (free radical) haline dönüşebilirler ve hücrel makro-moleküllerle (DNA, RNA ve protein) doğrudan tepkimeye girerek, onların yapılarında değişikliğe neden olabilirler (Lawley, 1989; Hansch, 1991).

Sekonder karsinojen diyebileceğimiz grup ise, daha geniş bir yelpazeye sahiptir. Bu maddeler, kimyasal ve biyolojik açıdan aktif değildir. Ancak, çok çabuk primer hale dönüp, aktifleşebilirler. Bunu, ya kendiliğinden veya kimyasal yollarla hidrolize olarak yaparlar ya da özgül metabolik aktivasyonlar sonucu gerçekleştirirler. Bu yüzden, “pro-karsinojen maddeler” olarak da bilinirler (Vrijnsen vd. 1990; Debnath vd. 1991; Watanabe vd. 1997; Gu vd. 2002). Son grup karsinojenler; kendileri karsinojenik etkiye sahip olmayan, ancak primer ve sekonder karsinojenlerin etkilerini arttırabilen maddelerdir. Bu yüzden, “ko-karsinojen maddeler” olarak da bilinirler (Anders ve Dekont, 1994; Arıncı ve Şen, 1994; Gatt vd. 1994; Smith 1996).

Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) raporlarına göre, kansere bağlı ölümler her yıl milyonları bulmaktadır. Bunun nedenlerinden biri, mutajen ve karsinojenlerle dolu bir çevrede yaşıyor olmamızdır. Bu konuyla ilgili diğer çarpıcı açıklamalar, Uluslararası Kanser Araştırma Kurulu

(IARC) da yapılmaktadır. Kimyasal maddeler, doğal olabilecekleri gibi, metabolik olaylar ile de oluşabilir veya laboratuvar ortamında sentezlenebilir. Bugün birçok ilaç ön maddesi, hastalıkların tedavisi amaçlanarak, sentezlenmektedir. Örneğin, malaria hastalığının tedavisinde fenantren diazo-analoglarının kullanıldığı bilinmektedir. Bu grupta yer alabilecek fenantren yapısı taşıyan yeni kimyasal maddelerin sentezlenme sebebi ise, malaria hastalığının tedavisinde çok yoğun olarak kullanılan antimalarial ilaçların artık yetersiz kalması, yani hastalığa neden olan canlının bu ilaçlara dirençlilik kazanmasıdır (Vrijnsen vd. 1990). Ancak, tıp, eczacılık ve kozmetik alanlarında geliştirilen kimyasal maddelerin herhangi bir ilaç yapımında kullanılmadan önce mutlaka mutajenik özelliklerinin bilinmesi gerekmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) bunu zorunlu kılmıştır. Bu amaçla bir çok kuruluş, çeşitli kimyasalları, farklı test yöntemleriyle test etmektedir (Debnath vd. 1991; Lumbley vd. 1992; Vijayalaxami ve Vetice 1992; Cariello ve Piegorsch 1996).

Yukarıda anlatılan nedenlerle, bu çalışmada, malaria hastalığının tedavisine yönelik sentezlenmiş ilaç adayı üç farklı fenantren türevi bileşik, Ames/Salmonella/Mikrozom test yöntemi ile genotoksisiteleri açısından değerlendirilmiştir.

2. MATERİYAL VE YÖNTEM

2.1 Fenantren Türevlerinin Hazırlanması

Bu çalışma kapsamında mutajeniteleri incelenen 1 ve 3 numaralı fenantren bileşikleri, aromatik aldehitlerin 1,2-dion bileşikleri ile amonyum asetatlı ortamda vermiş oldukları halka kapanması tepkime prensibine göre, 2 numaralı fenantren grubu bileşik ise aromatik aldehitlerin o-aminotiyofenol ile sodyumbisülfid varlığında gerçekleştirdiği halka kapanması tepkime prensibine göre sentezlenmiştir (Ridley vd. 1965; Meriç vd. 2002). Elde edilen bileşiklerin yapıları IR, NMR ve Kütle spektrumları alınarak kanıtlanmıştır. Sentezlenen bileşiklere ait spektroskopik analiz sonuçları ve erime noktaları Tablo 1’de kimyasal formüller ise Şekil 1’de gösterilmiştir.

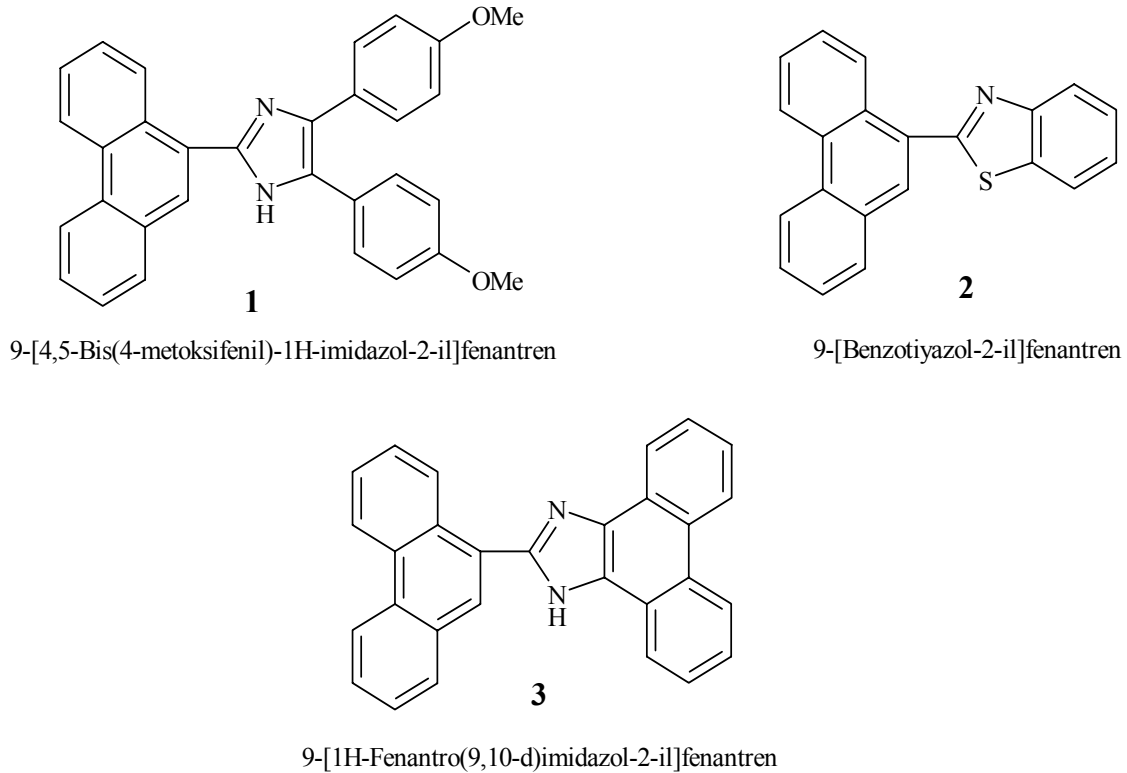
2.2 Ames / Salmonella / Mikrozom Testi

2.2.1 Test suşları

Bu çalışmada kullanılan, *Salmonella typhimurium* test bakterisinin TA 98 ve TA 100 suşları Dr. Bruce AMES (Kaliforniya Üniversitesi, Berkley, CA, USA) tarafından sağlanmıştır.

Tablo 1. Sentezlenen bileşiklere ait spektroskopik analiz sonuçları ve erime noktaları

Bileşik No	Erime Noktası (°C)	IR (KBr, ν cm ⁻¹)	NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	Kütle (Es, M+1)
1	324	3486 (N-H), 1622-1394 (C=N ve C=C)	10.62 (s, H, N-H), 8.12-7.94 (m, 9H, fenantren), 7.52-7.48 (d, 4H, fenil), 6.97-7.02 (d, 4H, fenil), 3.86 (s, 6H, OCH ₃)	457.6
2	296	1628-1389 (C=N ve C=C)	8.14-7.82 (m, 13H, fenantren ve benzotiyazol)	312.3
3	369	3481 (N-H), 1623-1395 (C=N ve C=C)	10.94 (s, H, N-H), 8.22-8.04 (m, 17H, fenantren),	395.4



Şekil 1. Mutajeniteleri incelenmek üzere sentezlenen fenantren türevlerinin kimyasal yapıları

Bu suşlardan TA 98 suşu çerçeve kayması, TA 100 suşu ise baz çifti değişimi mutasyonlarını oluşturan kimyasal ajanlara karşı hassasiyet göstermektedir. *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 test suşları düzenli olarak, histidin ihtiyacı, kristal viyole hassasiyeti, ampisiline direçlilik, UV hassasiyeti ve spontan geri dönüş oranları için Maron ve Ames (1983) yöntemine uygun olarak kontrol edilmiştir.

2.2.2 Sıvı Kültürlerin Mililitresindeki Bakteri Sayısının Belirlenmesi

Deneylerde kullanılan gecelik kültürün mililitresinde bulunan bakteri sayısını belirlemek amacıyla; bakteriler nütrient broth besiyeri içerisinde süspanse edilerek çalkalamalı inkübatörde 37 °C' de 1 gece süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, aynı besiyeri kullanılarak gecelik kültürün 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴

⁴, 10^{-5} ve 10^{-6} 'lık seyreltmeleri hazırlanmış, bu seyreltmelerden nütrient agar (NA) plaklarına 10µl' lik miktarlarda damlatma ekim yapılmıştır. 37 °C' de 24 saat inkübe edildikten sonra plaklardaki koloniler sayılmış ve kültürün mililitresindeki bakteri sayısı belirlenmiştir. Ayrıca, bakteri kültürünün optik densitesi 650 nm dalga boyunda spektrofometre ile ölçülerek daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere hazırlanan gecelik kültürlerdeki bakteri sayısının belirlenebilmesi için referans değer olarak kullanılmıştır.

2.2.3 Karaciğer S9 Karışımının Hazırlanması

3-metil kolantren (80mg/kg) Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlara diseksiyondan 5 gün önce intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Bu sürenin sonunda diseksiyonu yapılan sıçanlardan + 4 C sıcaklıkta ve steril koşullarda S9 fraksiyonu elde edilmiştir. S9 karışımı; 8 mM MgCl₂, 33 mM KCl, 5 mM Glukoz-6-fosfat, 4 mM β-NADP, 100 mM sodyum fosfat tampon (pH: 7.4) ve S9 fraksiyonu (0.04 ml S9/1 ml S9 karışımı)'nu içermektedir (Maron ve Ames, 1983).

2.2.4 Sitotoksik Etkinin Saptanması

Kullanılan test bileşiklerinin, test suşları için öldürücü olmayan dozlarının saptanması amacıyla, üst agara (top agar) 0.1 ml bakteri kültürü ve en çok 0.1 ml olacak şekilde değişik derişimlerdeki test bileşiği çözeltisi eklenmiştir. Karışım, nütrient agar besiyeri içeren petrilere dökülerek plaklar 37 °C' de 12 saat süre ile inkübe edilmiş, inkübasyondan sonra plaklardaki koloni sayıları kontrol plakları ile karşılaştırılarak, toksik dozlar saptanmıştır. Deneyler dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde hazırlanan, toksik dozun altındaki beş farklı doz (0.01, 0.1, 1, 10, 100 µg/plak) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.5 Mutajenite Testi

Ames / Salmonella / Mikrozom testi, gelişebilmek için "Histidin" amino asidine ihtiyaç duyan oksotrofik suşların, potansiyel mutajen olarak kabul edilen test maddelerinin meydana getireceği mutasyonlar ile histidin sentezleyebilme (prototrofik) yeteneğini kazanmaları temeline dayanmaktadır. Mutajenite testi Maron ve Ames (1983)'e göre plak birleştirme metodu kullanılarak yapılmıştır. Deneyler, S9' lu ve S9' suz olmak üzere iki grup halinde gerçekleştirilmiştir. Her doz üç plak halinde denenmiş ve farklı zamanlarda iki bağımsız deney

yapılmıştır. Ayrıca, pozitif kontrol, çözücü kontrol ve spontan kontroller de tüm deneylere paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

S9' suz olarak uygulanan deneylerde, içerisinde 2 ml top agar bulunan tüplere 0.1 ml gecelik bakteri kültürü (yaklaşık 1×10^9 bakteri / ml) ve test bileşiğinin belirtilen dozları (DMSO içinde çözülmüş fenantren türevi) ile bakterilerin ilk birkaç bölünmeyi geçirerek gelişebilmeleri için gerekli olan eser miktardaki histidin-biyotin karışımı ilave edilmiştir. Karışım 37 °C' deki minimal glukoz agar (MGA) plaklarına dökülerek, top agarın plaklara homojen dağılımı sağlandıktan sonra 37 °C' de 48 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Pozitif kontrol olarak TA 98 suşu için, 4-Nitro-o-fenilendiamin (NPD) (20 µg/plak), TA 100 suşu için sodyum azid (AZS) (1.5 µg/plak) çözücü kontroller için DMSO kullanılmıştır.

S9' lu olarak yürütülen deneylerde top agar karışımının içerisine 0.5 ml S9 karışımı ilave edilmiştir. S9' lu deneylerde pozitif kontrol olarak her iki suş için de 2-aminofloren (2-AF) (10 µg/plak) kullanılmıştır.

2.2.6 Sonuçların Değerlendirilmesi

Bir test bileşeninin oluşturduğu revertant kolonilerin sayısında doza bağlı bir artış meydana geliyorsa ve bu dozların oluşturduğu revertant koloni sayıları çözücü kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en az 1 doz için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenebiliyorsa test maddesi mutajen olarak kabul edilmiştir. Sonuçlar SPSS istatistiksel programı "student-t testi" ile $P \leq 0.05$. olan sonuçlar anlamlı kabul edilerek değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR

Bu çalışmada üç ayrı 9-substitue fenantren türevi bileşik, mutajenik aktiviteleri incelenmek üzere sentezlenmiştir. Elde edilen bileşiklerin yapıları IR, NMR ve Kütle spektroskopileri yardımıyla kanıtlanmıştır. IR spektroskopisi analizleri sonucunda, 1 ve 3 numaralı bileşiklere ait N-H gerilme bandlarının 3486 cm^{-1} ve 3481 cm^{-1} frekans değerlerine sahip oldukları belirlenmiştir. Her üç bileşiğin kimyasal yapısında da yer alan C=C ve C=N gerilme bandları ise $1628-1329 \text{ cm}^{-1}$ frekans aralığında gözlenmiştir. IR spektroskopisi analiz bulguları geçmiş çalışmalarda (Meriç vd. 2002; Chary vd. 2008) bildirilen bulgular ile paralellik göstermektedir. Bileşiklere ait ¹H-NMR spektroskopisi analiz sonuçlarına göre, 1 ve 3 numaralı bileşiklerin

kimyasal yapılarında yer alan N-H grubu pikleri 10.94 ve 10.62 ppm değerlerinde gözlenmiştir. Yine 1 numaralı bileşiğin yapısında bulunan -OCH₃ grubu protonlarına ait pik 3.86 ppm değerinde elde edilmiştir. Sentezlenen üç bileşiğin yapısında yer alan diğer protonların tamamı aromatik halka protonlarıdır ve ¹H-NMR spektroskopisi analizi sonucunda, aromatik bölgede pik vermeleri beklenir. Nitekim beklendiği gibi, üç bileşiğe ait aromatik halka protonları da kendi bölgelerinde pik vermişlerdir (8.22-6.97 ppm). NMR spektroskopisi analizi sonucunda gözlemlenen bütün değerler literatür bulguları (Işıkdag vd. 1999; Meriç vd. 2002) ile benzerlik göstermektedir. Bileşiklerin kütle spektroskopisi analizleri sonucunda, gözlenen M+1 piklerinin hesaplanan molekül ağırlıkları ile uyum içerisinde olması, bileşiklerin başarı ile sentezlendiğine yönelik bir başka göstergedir.

Tablo 2. 9-sübstitue fenantren türevlerinin S9 fraksiyonu yokluğunda ve varlığında TA 98 ile verdikleri revertant koloni sayıları

Elde edilen 9-sübstitue fenantren türevlerinin mutajenik aktiviteleri Ames/Salmonella/Mikrozom Test yöntemi ile *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 mutant suşları kullanılarak, metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda araştırılmıştır. Sonuçlar SPSS “student-t testi” ile, çözücü kontrolü olan DMSO sonuçları ile karşılaştırılarak, değerlendirilmiştir. Elde edilen revertant koloni sayıları, S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda, TA 98 suşu için Tablo 2’de, TA 100 suşu için Tablo 3’de verilmiştir. Ayrıca TA 98 ve TA 100 suşları için, deney grupları petrilindeki koloni sayıları ile DMSO kontrol petrilindeki koloni sayısı arasındaki fark alınarak Şekil 2 ve Şekil 3’de gösterilmiştir. İstatistiksel değerlendirmelerin sonuçları da bu tablolar üzerinde gösterilmiştir

Test Bileşiği	Doz (µg/plak)	Revertant Koloni Sayısı	
		TA 98	
		S9 (-)	S9 (+)
9-[4,5-Bis-(4-metoksifenil)-1H-imidazol-2-il]fenantren	0.01	28.6 ± 3.7	49.3 ± 14.4
	0.1	32.0 ± 0.0	41.3 ± 3.2
	1	31.3 ± 10.5	41.6 ± 4.7
	10	26.3 ± 3.2	42.0 ± 3.6
	100	29.6 ± 2.5	55.3 ± 17.6
9-(Benzotiyazol-2-il)fenantren	0.01	37.6 ± 1.5	60.0 ± 13.0
	0.1	27.6 ± 2.0	53.0 ± 3.6
	1	24.0 ± 8.5	52.0 ± 13.8
	10	27.6 ± 3.0	48.0 ± 9.1
	100	26.3 ± 6.5	47.3 ± 5.8
9-[1H-Fenantro(9,10-d)imidazol-2-il]fenantren	0.01	28.0 ± 2.0	63.0 ± 10.8
	0.1	26.6 ± 0.5	52.6 ± 1.5
	1	23.0 ± 4.5	45.3 ± 8.5
	10	29.6 ± 1.1	48.0 ± 4.1
	100	22.6 ± 2.5	57.3 ± 4.7
4-Nitro-o-fenilendiamin	20	985 ± 87.5	-
2-Aminofluoren	10	-	894 ± 27.2
Dimetilsülfoksit	100	23.0 ± 4.1	45.0 ± 3.6

Tablo 3. 9-sübstitue fenantren türevlerinin S9 fraksiyonu yokluğunda ve varlığında TA 100 ile verdikleri revertant koloni sayıları

Test Bileşiği	Doz (µg/plak)	Revertant Koloni Sayısı	
		TA 100	
		S9 (-)	S9 (+)
9-[4,5-Bis-(4-metoksifenil)-1H-imidazol-2-il]fenantren	0.01	84.3 ± 5.8	82.6 ± 3.5
	0.1	86.3 ± 5.5	66.0 ± 6.0
	1	95.3 ± 1.5	69.0 ± 13.4
	10	90.6 ± 10.0	79.3 ± 4.0
	100	111.3 ± 1.5	88.3 ± 11.9
9-(Benzotiyazol-2-il)fenantren	0.01	87.3 ± 2.5	89.0 ± 13.4
	0.1	90.0 ± 13.1	95.0 ± 3.6
	1	101.6 ± 19.4	77.6 ± 10.7
	10	82.3 ± 9.5	74.6 ± 4.7
	100	81.3 ± 2.0	76.6 ± 3.5
9-[1H-fenantro(9,10-d)-imidazol-2-il]fenantren	0.01	83.3 ± 4.1	81.0 ± 2.6
	0.1	84.6 ± 6.6	79.6 ± 4.5
	1	66.6 ± 2.5	72.0 ± 1.7
	10	74.6 ± 1.5	79.6 ± 1.5
	100	98.6 ± 0.5	70.3 ± 2.5
Sodyum Azid	1.5	736 ± 41.7	-
2-Aminofluoren	10	-	886 ± 36.5
Dimetilsülfoksit	100	83.0 ± 11.5	86.0 ± 9.5

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yaşadığımız yüzyılda, kimyasal maddelerin yaşamımızdaki yeri ve öneminin artması nedeniyle bu kimyasal maddelerin biyolojik aktiviteleri ve sağlığımız üzerindeki etkileri yapılan araştırmaların ana konusu haline gelmiştir. Bu yüzden, günlük hayatta farklı nedenlerle ve yollarla maruz kaldığımız kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin araştırılması oldukça önem kazanmıştır. Bu doğrultuda, kimyasal maddelerin mutajenik etkileri çeşitli test yöntemleri ile araştırılmakta ve bu maddelerin Dünya Sağlık Örgütü' nün (WHO) belirlemiş olduğu sınırlar içerisindeki yeri ve özellikleri belirlenmektedir.

Kimyasal maddelerin çokluğu ve çeşitliliği, onların yapı ve aktivitelerini araştırma test sistemlerinin de gelişmesine ve farklılaşmasına neden olmuştur (Nakamura vd. 1987; Abenesi vd. 1992; DeMeo vd. 1992; Hamasaki vd. 1992; Jagdt vd. 1996; Kasamatsu vd. 1996; Katsifis

vd. 1996;). İnsan sağlığı ile ilgili olarak geliştirilmiş kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin tek bir test yöntemiyle test edilmesi yeterli olmamaktadır. Çünkü, farklı test yöntemleri ya da farklı organizmalar kullanılarak yapılan testlerde, farklı sonuçlar alınabilmektedir (Hamasaki vd. 1992; Lee vd. 1994). *Salmonella typhimurium*' un farklı tip mutasyonlara duyarlı modifiye edilmiş suşları ile uygulanan Ames testi, kimyasal maddelerin mutajenite değerlendirilmesinde diğer birçok kısa zamanlı test sistemlerinin arasında uzun zamandır uygulanan ve günümüzde de geçerliliğini koruyan bir yöntemdir (Zsolnai, 1961; Ames ve McCann, 1981; Maron ve Ames, 1983; Glatt vd. 1986; Nakamura 1987; Hera ve Pueyo, 1988; Hirayama vd. 1988; Glatt vd. 1994; Edenharder vd. 2000; Yapi vd. 2000). Çalışmamızda da kullanılan TA 98 suşu, çerçeve kayması mutasyonuna neden olan kimyasal maddelerin teşhisinde kullanılırken, TA 100 suşu baz

değişimi mutajenlerinin teşhisinde kullanılmaktadır (Maron ve Ames, 1983).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, fenantren analogları çeşitli etkileri açısından araştırılmaktadır (Yapi vd. 2000). Fenantren türevleri; polisiklik ya da heterosiklik aromatik halka yapısına sahiptirler. Çevremizde doğal olarak şekillenebilir; havada suda ve toprakta bulunabilirler. Ayrıca, besinlerimiz içinde pişirme sırasında da (ızgara, kızdırma gibi) oluşabilirler (Watanabe vd. 1997; Bostrom vd. 1998; Kato vd. 2000).

Bu çalışmada, sentezlenen 3 adet 9-süstitüe fenantren türevleri bileşik mutajenik potansiyelleri açısından Ames/Salmonella/Mikrozom test yöntemi ile araştırılmıştır. Bu bileşikler, ilaç ön maddesi olarak düşünüldüğünden, genotoksik potansiyellerinin belirlenmesi oldukça önem taşımaktadır.

Bulgular kısmında tek tek ele alınan değerlere bakıldığında, birinci madde olan; 9-[4,5-Bis-(4-metoksifenil)-1H-imidazol-2-il]-fenantren, TA 98 suşu için S9 fraksiyonu varlığında, TA 100 suşu için ise S9 fraksiyonu yokluğunda, mutajenik etki göstermiştir. Metabolik aktivasyon, bu maddenin baz değişimi mutasyonuna neden olan etkisini ortadan kaldırırken, maddenin çerçeve kayması mutasyonuna neden olabilecek şekilde metabolize olmasına neden olmuştur.

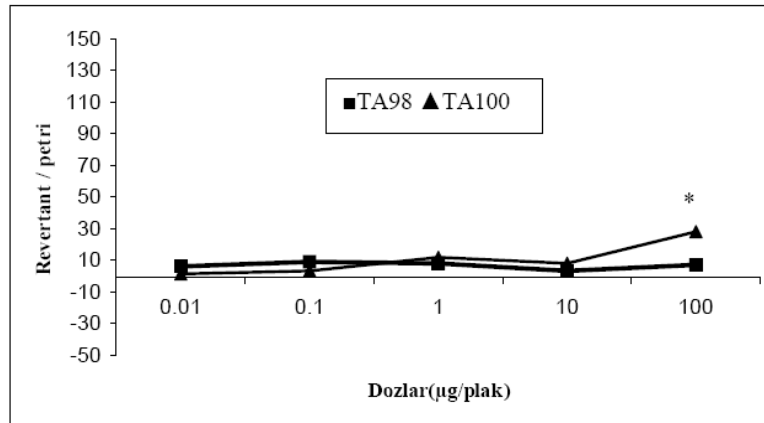
İkinci madde, 9-[Benzotiazol-2-il]-fenantren, benzotiazol çekirdeği taşıyan fenantren bileşiğidir. Bu madde, TA 98 ve TA 100 suşları için S9 varlığında mutajenik etki göstermemiş, ancak her iki suş için de S9 fraksiyonu yokluğunda mutajenik etkiye rastlanmıştır. Bu maddenin göstermiş olduğu direkt mutajenitenin metabolik aktivasyonla ortadan kalktığı görülmüştür.

Üçüncü madde, 9-[1H-fenantro(9,10-d)-imidazol-2-il]fenantren, S9 yokluğunda her iki suş için de mutajenik özellikte değildir, S9 varlığında ise TA 100 suşu üzerinde mutajenik etki yaratmamış, ancak TA 98 suşu üzerinde mutajenik etkiye neden olmuştur. Bu madde çerçeve kayması mutasyonuna neden olacak şekilde metabolize olmaktadır.

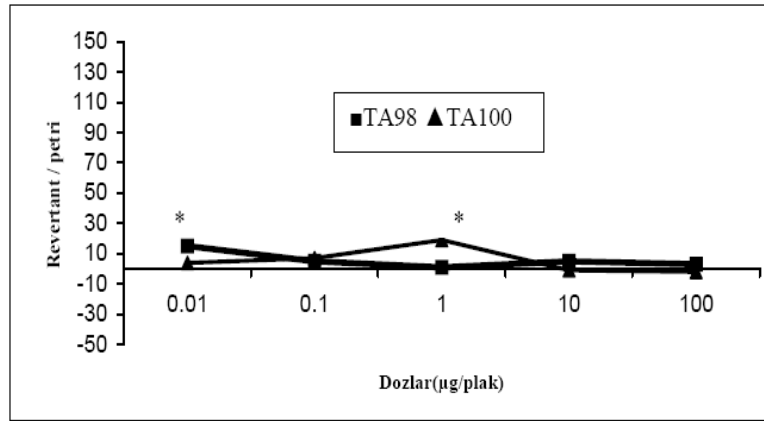
Bu çalışmada elde edilen bulgular, kimyasal yapı ve ortaya çıkan biyolojik aktivite arasında önemli bir ilişki olduğunu ortaya koymaktadır. Kimyasal maddelerin yapısında bulunan halkaların; grup sayılarının, niteliğinin, bağlanma

konumlarının, pozisyonlarının bu yapı-etki ilişkisindeki yeri oldukça önemlidir.

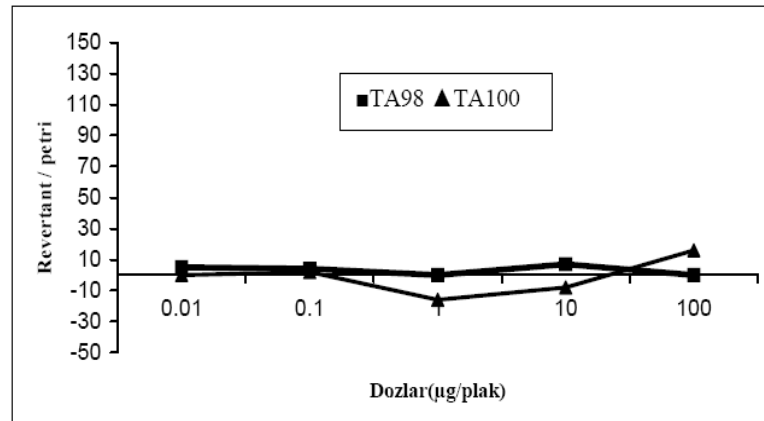
Test sonuçlarımıza göre; 9-süstitüe fenantren türevlerinin metabolik aktivasyon varlığında veya yokluğunda en az bir bakteri suşu üzerinde mutajen özelliğe sahip olduğu görülmektedir. Bu nedenle malaria hastalığının tedavisine yönelik ilaç adayı olarak sentezlenmiş bu üç bileşiğin kullanılması durumunda insan sağlığı açısından tehlikeli sonuçlar doğurabileceği düşünülmektedir. Ancak, bu maddeler farklı genotipik özelliğe sahip test suşları ile ve farklı organizma gruplarının kullanıldığı farklı test yöntemleriyle de test edildikten ve farklı toksisite testlerine tabi tutulduktan sonra genel bir sonuca gidilmelidir.



(a)

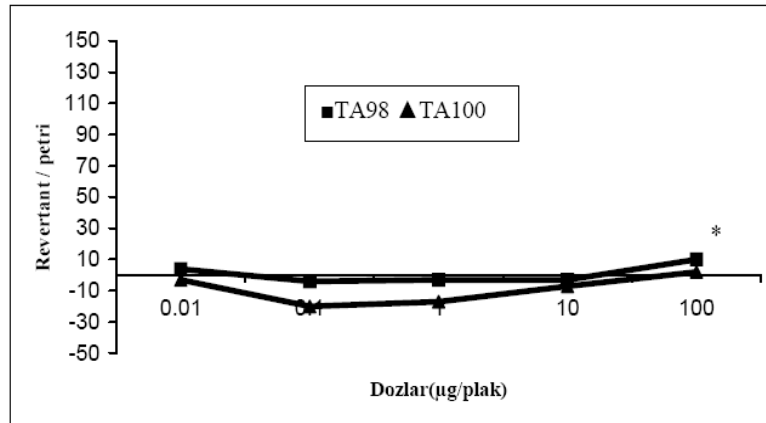


(b)

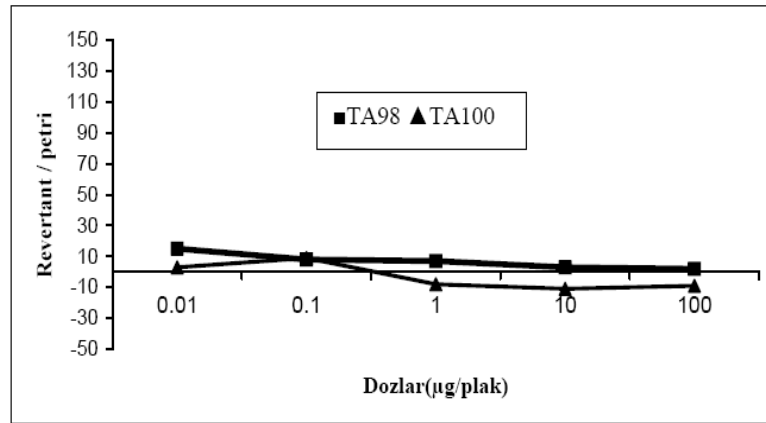


(c)

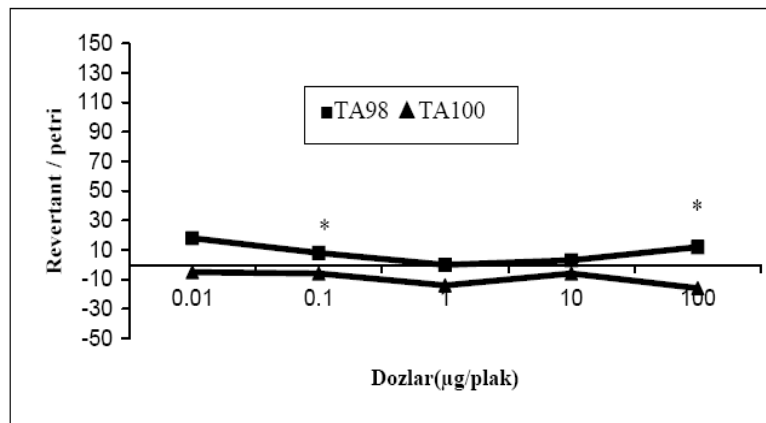
Şekil 2. Test bileşiklerinin S9 fraksiyonu yokluğunda TA98 ve TA100 suşları ile üzerinde, DMSO kontrol petrilerindeki koloni sayıları ile deney grupları petrilerindeki koloni sayıları arasındaki farkın doza bağlı gösterimi. (a) 1 No'lu bileşiğe (b) 2 No'lu bileşiğe (c) 3 No'lu bileşiğe ait test bulgularını göstermektedir. (* $p \leq 0.05$)



(a)



(b)



(c)

Şekil 3. Test bileşiklerinin S9 fraksiyonu varlığında TA98 ve TA100 suşları ile üzerinde, DMSO kontrol petriyelerindeki koloni sayıları ile deney grupları petriyelerindeki koloni sayıları arasındaki farkın doza bağlı gösterimi. (a) 1 No'lu bileşiğe (b) 2 No'lu bileşiğe (c) 3 No'lu bileşiğe ait test bulgularını göstermektedir. (* $p \leq 0.05$)

KAYNAKLAR

- Abenesi, T., Polani, S.L. ve Perticne, P. (1998). DNA strand methylation and sister chromatid exchanges in mammalian cells in vitro. *Mutation Research* 429, 239-248.
- Ames, B.N. ve McCann, J. (1981). Validation of the Salmonella test: A reply to Rinkus and Legator. *Cancer Research* 41, 4191.
- Anders, M.W. ve Dekont, W. (1994). Conjugation-dependent carcinogenicity and toxicity of foreign compounds. *Advance in Pharmacology* 27, 511-519.
- Arınç, E. ve Şen, A. (1994). Effect of in vivo Benzo(a)pyrene treatment on liver microsomal mixed-function oxidase activities of Gilthead seabream (*Spararus aurata*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 107, 405-414.
- Bostrom, E., Engen, S. ve Eide, I. (1998). Mutagenicity testing of organic extracts of diesel exhaust particles after spiling with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Archives of Toxicology* 72, 645-649.
- Cariello, N.F. ve Piegorsch, W.W. (1996). The Ames test: The two-fold rule revisited, *Mutation Research* 369, 23-31.
- Chary, M.V., Keerthysri, N.C., Vupallapati, S.V.N., Lingaiah, N. ve Kantevari, S. (2008). Tetrabutylammonium bromide (TBAB) in isopropanol: An efficient, novel, neutral and recyclable catalytic system for the synthesis of 2,4,5-trisubstituted imidazoles *Catalysis Communications* 9, 2013-2017.
- DeMeo, M., Vanella, P., Bernardini, E., Lagett, M., Maldonado, L., Jentzer, O., Crozet, M.P. ve Dumenill, G. (1992). Evaluation of the mutagenic and genotoxic activities of 48 nitroimidazoles and related imidazole derivatives by the Ames test and the SOS chromotest. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 19(2), 167-181.
- Debnath, A.K., Compadre, R.L., Debnath, G., Shusterman, A.J. ve Hansch, G. (1991). Structure-activity relationship of mutagenic aromatic and heteroaromatic nitro compounds correlation with molecular orbital energies and hydrophobicity. *Journal of Medicinal Chemistry* 34, 786-797.
- Edenharder, R., Ortseifen, M., Koch, M. ve Wesp, H.F. (2000). Soil mutagens are airborne mutagens: Variation of mutagenic activities induced in *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 by organic extracts of agricultural and forest soils in dependence on location and season. *Mutation Research* 472, 23-36.
- Glatt, H., Abu-Shqara, E., Harvey, R.G. ve Blum, J. (1994). Mutagenicity of K-region oxides and imines of chrysene, benzo[c]phenanthrene and benzo[g] chrysene in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research* 308, 135-141.
- Glatt, H., Shtelzer, S., Sheradsky, T., Blum, J. ve Oesch, F. (1986). Mutagenicity of N-substituted phenanthrene-9,10-imines in *Salmonella typhimurium* and chinese hamster V79 cells. *Environmental Mutagenesis* 8, 829-837.
- Gu, Y.S., Kim, I.S., Ahn, J.K., Park, D.C., Yeum, D.M., Ji, C. ve Kim, S.B. (2002). Mutagenic and carcinogenic heterocyclic amines as affected by muscle types/skin and cooking in pan-roasted mackerel. *Mutation Research*. 515, 189-195.
- Hamasaki, T., Sato, T., Nagase, H. ve Kito, H. (1992). The genotoxicity of organic compounds in SOS chromo test and rec-assay. *Mutation Research* 280, 195-203.
- Hansch, C. (1991). Structure-activity relationships of chemical mutagens and carcinogens. *The Science of the Total Environment* 109, 17-29.
- Hera, C. ve Pueyo, C. (1988). Response of the L-arabinose forward mutation assay of *Salmonella typhimurium* to frameshift-type mutagens. *Mutation Research* 203, 39-45.
- Hirayama, T., Watanabe, T., Akita, M., Shimomura, S., Fujioka, Y., Ozasa, S. ve Fukui, O. (1988). Relationship between structure of nitrated arenes and their mutagenicity in *Salomonella typhimurium*; 2- and 2,7-nitro substituted fluorene, phenanthrene and pyrene. *Mutation Research* 209, 67-74.
- Işıkdag, İ., Uçucu, Ü., Özdemir, A., Meriç, A., Öztürk, Y., Aydın, S. ve Ergun, B., "Synthesis and analgesic activities of 2-substituted-1H-phenantro[9,10-

- djimidazoles” Boll.Chim.Farmaceutico 138 (1999) 453-456.
- İ., Uçucu, Ü., Özdemir, A., Meriç, A., Öztürk, Y., Aydın, S. ve Ergun, B. (1999). Synthesis and analgesic activities of 2-substituted-1H-phenantro[9,10-djimidazoles. *Bolletino Chimico Farmaceutico* 138, 453-456.
- Jagdt, B., Warncke, K., Aver, H. ve Rudiger, H.W. (1996). Sleep deprivation does not induce sister chromatid exchange in humans. *Mutation Research* 361, 11-15.
- Kasamatsu, T., Kohda, K. ve Kawazoa, Y. (1996). Comparison of chemically induced DNA breakage in cellular and sub-cellular systems using the comet assay. *Mutation Research* 369, 1-6.
- Kato, T., Michikoshi, K., Minowa, Y. ve Kikugava, K. (2000). Mutagenicity of cooked hamburger is cotrolled delicated by reducing sugar content in ground beef. *Mutation Research* 471, 1-6.
- Katsifis, S.D., Kinney, P.L., Hosselet, S., Burns, F.J. ve Christie, N.T. (1996). Interaction of nickel with mutagens in the induction of sister chromatid exchanges in human lymphocytes. *Mutation Research* 35, 7-15.
- Lawley, P.D. (1989). Mutagens as carcinogens: Devolopment of current concepts. *Mutation Research* 213, 3-25.
- Lee, H., Bian, S.S. ve Chen, Y.L. (1994). Genotoxicity of 1,3-dithiane and 1,4-dithiane in the Cho/Sce assay and the *Salmonella* microsomal test. *Mutation Research* 312, 213-218.
- Levin, D.E. ve Ames, B.N. (1986). Classifying mutagens as to their specifity in causing the six possitive transitions, transversions a simple analysis using the mutagenity assay. *Environmental Mutagenesis* 8, 9-28.
- Lumbley, C.E., Parkinson, C. ve Walker, S.R. (1992). An International appraisal of the minumum duration of chronic animal toxicity studies. *Human and Experimental Toxicology* 11, 155- 162.
- Maron, D.M. ve Ames, B.N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research* 113, 173-215.
- Meriç A., Incesu, Z. ve Isikdag, I. (2002). Synthesis and effects on intracellular calcium of some 1,3-bis-(heteroaryl subsstituted) benzene derivatives. *Il Farmaco* 57, 543-548.
- Nakamura, S., Oda, Y., Shimada, T., Ok, I. ve Sugimoto, K. (1987). SOS inducing activity of chemical carcinogens mutagens in S.L.TA. 1535/pSK 1002; examination with 151 chemicals. *Mutation Research* 192, 239-246.
- Ridley, H.F., Spicket, R.G.W. ve Timmis, G.M. (1965). A new synthesis of benzimidazoles and aza-analogs. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 2, 453-456.
- Smith, C.J., Mc Karns, S.C., Davis, R.A., Livingston, S.D., Bombick, B.R., Avalos, J.T., Morgan, W.T. ve Doolittle, D.J. (1996). Human urine mutagenicity study comparing cigarettes which burn or primarily heat tobacco. *Mutation Research* 361, 1-9.
- Vijayalaxami, R.R. ve Vetice, G.H.S. (1992). Assesment of radiation induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis techniquei. *Mutation Research* 271, 243-252.
- Vrijisen, R., Michutte, Y. ve Bueye, A. (1990). Metabolic activation of quercetin mutagenecity, *Mutation Research* 232, 243-248.
- Watanabe, T., Takashima, M., Kasai, T. ve Hirayama, T. (1997). Comparison of the mutational spesificity induced by environmental genoxin nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in *Salmonella typhimurium* his genes. *Mutation Research* 394, 103-112.
- Yapi, A.D., Mostafa, M., Valentin, A., Chavignon, O., Teulade, J.C., Mallie, M., Chapat, J.P. ve Blache, Y. (2000). New potential antimalerial agents; synthesis and biological activities of original diaza-analogs of phenantrene. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 48, 1886-1889.
- Zsolnai, T. (1961). New fungicides. II. Nitro compounds. *Biochemical Pharmacology* 5, 304-387.



Mehtap KUTLU, 1966 doğumludur. 1988 yılında Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden mezun olmuş, aynı üniversitede 1996 yılında doktorasını tamamlamıştır. 1997 yılında Yardımcı Doçent, 2001 yılında Doçent, 2006 yılında Profesör ünvanlarını almıştır. Evli ve 2 çocuk annesidir.

Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalında Öğretim Görevlisi Doktor olarak çalışmaktadır.



Esin ÖZTAŞ, 1971 Emirdağ doğumludur. Ortadoğu Teknik Üniversitesi Eğitim Fakültesi'nde Biyoloji lisansını, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansını tamamlamıştır. Özel Çağdaş İlköğretim Okulu'nda Fen ve Teknoloji Dersi öğretmeni olarak çalışmaktadır. Evli ve bir çocuk annesidir.



Gözde AYDOĞAN, 1979 Eskişehir doğumludur. Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde 2002 yılında lisansını, Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Bilim Dalı'nda 2010 yılında doktorasını tamamlamıştır. Halen Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.



İlhan IŞIKDAĞ, 1949 Merzifon doğumludur. 1972 yılında İ.T.İ.A. Eczacılık Yüksek Okulu'ndan mezun olmuştur. Aynı yıl bu okulun Farmasötik Kimya Kürsüsü'ne asistan olarak atanmıştır. 1982 yılında Doktor, 1990 yılında Doçent, 1996 yılında Profesör ünvanlarını almıştır. Yabancı Dili İngilizce'dir. Evli ve iki çocuk babasıdır.



Yusuf ÖZKAY, 1981 yılında Karamanda doğdu. Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde lisans eğitimini 2003 yılında tamamladıktan sonra, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans (2005) ve Doktora (2009) eğitimini tamamladı. Halen Anadolu