T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI İMİN BİLEŞİKLERİNİN ANTİMUTAJENİK AKTİVİTELERİNİN AMES TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI

Esen GEREN
Biyoloji Anabilim Dalı
Tezin Sunulduğu Tarih: **02/02/2015**

Tez Danışmanı:
Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR

ÇANAKKALE

Esen GEREN tarafından Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR yönetiminde hazırlanan ve **02/02/2015** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan "**Bazı İmin Bileşiklerinin Antimutajenik Aktivitelerinin Ames Testi ile Araştırılması**" başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR ……

Başkan

Prof. Dr. Cüneyt AKI ……

Üye

Doç. Dr. Mustafa YILDIZ ……

Üye

Sıra No:……

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Esen GEREN

TEŞEKKÜR

Tez çalışma konumun belirlenmesinde ve yürütülmesinde bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR'e; çalışmada kullanılan test suşlarının temini için Sayın Prof. Dr. Hülya SİVAS'a, bakterilerin ve mayaların temini için Prof. Dr. Kıymet GÜVEN'e; test bileşiklerimin temini için Sayın Doç. Dr. Mustafa YILDIZ'a ve çalışma boyunca yapmış olduğu değerli katkıları için Sayın Prof. Dr. Cüneyt AKI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarının her aşamasında yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen doktora öğrencisi Merve BALLI'ya, Uzman Nuray YILDIRIM'a, Araştırma görevlisi Selin ERTÜRK'e; tez aşamam boyunca beni asla yalnız bırakmayan ve çalışmanın farklı aşamalarında vermiş oldukları desteklerinden dolayı sevgili arkadaşlarım Caner ÇELİK, Gizem YILMAZ, Hayati ÖZCAN' a teşekkürü borç bilirim.

Göstermiş oldukları sabır, anlayış ve fedakarlıklar için her zaman yanımda olan babam Mehmet GEREN'e, annem Fatma Melek GEREN'e; ablalarım Burçin KARDEŞLER'e ve Ezgi ÖĞÜT'e sonsuz teşekkür ederim.

Esen GEREN

Çanakkale, Şubat 2015

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde oranı
°C	Santigrat Derece
2AF	2-Aminofloren
A	Adenin Bazı
$BaCl_2$	Baryum Klorür
C	Sitozin Bazı
cm	Santimetre
Co	Kobalt Elementi
Cu	Bakır Elementi
Dk	Dakika
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
Fe	Demir Elementi
g	Gram
G	Guanin Bazı
Gd	Gadolinyum Elementi
H_2SO_4	Sülfirik Asit
HB	Histidin/Biyotin
HBA	Histidin/Biyotin/Ampisilin
Kg	Kilogram
Kob	Koloni Oluşturan Birim
M	Molarite
MA	Molekül Ağırlığı
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
MGA	Minimal Glukoz Agar
MIC	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
ML	Mililitre
MN	Mikronükleus
Mn	Mangan Elementi
N	Azot Bazı

N	Normalite
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
Ni	Nikel Elementi
NPD	4- Nitro-*o*-Fenilendiamin
OD	Optik Yoğunluk
Ru	Rutenyum Elementi
S9	Sıçan Karaciğer Mikrozomal Enzimleri
SA (NaN_3)	Sodyum Azid
Se	Selenyum Elementi
Sn	Saniye
T	Timin Bazı
UV	Ultraviyole
VO	Vanadyum Oksit Elementi
Zn	Çinko Elementi
β- NADP	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre

ÖZET

BAZI İMİN BİLEŞİKLERİNİN ANTİMUTAJENİK AKTİVİTELERİNİN AMES TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI

Esen GEREN
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR
02/02/2015, 66

Bu çalışmada, 2-hidroksi imin bileşiği (Schiff bazı) ve metal [Mn(II), Fe(II), Co(II), Cu(II)] komplekslerinin antimutajenik aktiviteleri Ames testi ile araştırıldı. Test edilen ligand ve komplekslerin; 500, 50, 5 ve 0.5 ppm'lik çözeltileri hazırlandı. Ames testi için *Salmonella typhimurium* bakterisinin TA98 ve TA100 mutant suşları kullanıldı. Schiff bazı ve komplekslerinin antimutajenik aktiviteleri mikrozomal enzimler içeren metabolik aktivasyon varlığında (S9+) ve yokluğunda (S9-) test edildi. Schiff bazı ve komplekslerinin güçlü antimutajenik aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Aynı zamanda Schiff bazı ve komplekslerinin antimikrobiyal aktiviteleri, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aerouginosa*, *Proteus vulgaris* bakterileri ve *Candida albicans* ile *Candida tropicalis* mayalarına karşı mikrodilüsyon metodu ile çalışıldı. Bileşiklerin mayalara karşı daha aktif olduğu bulundu.

Anahtar sözcükler: İmin Bileşiği (Schiff Bazı), Kompleks, Ames Testi, Antimutajenite, Antimikrobiyal Aktivite.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ANTIMUTAGENIC ACTIVITIES OF THE SOME IMINE COMPOUNDS BY AMES TEST

Esen GEREN

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Chair for Biology Thesis, Master of Science

Advisor: Assist. Prof. Dr. Neslihan DEMİR

02/02/2015, 66

In this research, the antimutagenic effects of 2-hydroxy imine compound and its metal complexes [Mn(II), Fe(II), Co(II), Cu(II)] have been investigated by Ames test system. In this study for testing; 500 ppm, 50 ppm, 5 ppm and 0.5 ppm solutions have been prepared. *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 mutant strains was used for Ames test. Antimutagenic potencies of imine compound and its metal complexes have been tested in presence and absence S9 which contains microsomal enzymes. In antimutagenicity studies, it has been detected that all the compounds have strong antimutagenic activity. Also in this research, the antimicrobial activities of the Schiff base and complexes were investigated against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aerouginosa*, *Proteus vulgaris* bacteria and *Candida albicans* ve *Candidatropicalis* fungi by microdilution method. It has been found that all compounds are more active against fungi.

Keywords: Imine Compound (Schiff Base), Complex, Ames Test, Antimutagenicity, Antimicrobial Activity.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAV SONUÇ FORMU ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI iii
TEŞEKKÜR iv
SİMGELER VE KISALTMALAR v
ÖZET vii
ABSTRACT viii
ŞEKİLLER DİZİNİ xi
ÇİZELGELER DİZİNİ xiii
BÖLÜM 1-GİRİŞ 1
BÖLÜM 2- ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 4
2.1. İmin Bileşikleri (Schiff Bazları) 4
2.1.1. Schiff Bazlarının yapısı ve genel özellikleri 4
2.1.2. Schiff bazlarının biyolojik önemi ve kullanım alanları 4
2.2. Mutasyonlar 5
2.2.1. Kromozom mutasyonları 5
2.2.1.1. Kromozom sayısı mutasyonları 6
2.2.1.2. Kromozom yapısı mutasyonları 6
2.2.2. Gen mutasyonları 7
2.2.2.1. Baz değişimi mutasyonları 7
2.2.2.2. Çerçeve kayması mutasyonları 8
2.3. Antimutajenite 9
2.4. Ames Testi (*Salmonella*/ Mikrozom Testi) 9
2.5. Antimikrobiyal Aktivite 11
2.5.1. Antimikrobiyal maddelerin etki mekanizmaları 11
2.5.2. Antimikrobiyal özelliklerin tayininde kullanılan yöntemler 11
2.5.2.1. Mikrodilüsyon yöntemi 12
BÖLÜM 3 - MATERYAL VE YÖNTEM 22
3.1. Materyal 22
3.1.1. Test edilen Schiff bazı ve kompleksleri 22
3.1.2. Antimutajenite deneylerinde kullanılan test suşları 24
3.1.3. Antimutajenite deneylerinde kullanılan kimyasal maddeler 25
3.1.4. Antimutajenite deneylerinde kullanılan besiyerleri ve stok çözeltiler 25

3.2. Yöntem 33
3.2.1. Schiff bazı ve kompleksleri solüsyonlarının hazırlanması 33
3.2.2. Test Suşlarının genetik özelliklerinin kontrol edilmesi 33
3.2.2.1. Histidin gereksinimi 33
3.2.2.2. *rfa* Mutasyon kontrolü 34
3.2.2.3. *uvrB* Mutasyon kontrolü 34
3.2.2.4. R Faktörü kontrolü 34
3.2.3. Test suşlarının master plaklarının hazırlanması 34
3.2.4. Test suşlarının uzun süre saklanması ve stok kültürlerinin açılması 35
3.2.5. Test suşlarının gecelik kültürlerinin hazılanması 35
3.2.6. Sıvı kültürün mL'sindeki bakteri sayısının belirlenmesi 35
3.2.7. Schiff bazlarının sitotoksik etkilerinin belirlenmesi 36
3.2.8. Antimutajenite çalışmaları 36
3.2.9. Pozitif kontrol 36
3.2.10. Negatif kontrol 37
3.2.11. Spontan kontrol 37
3.2.12. Sonuçların değerlendirilmesi 37
3.2.13. Antimikrobiyal Aktivite 38
3.2.13.1. Mikroorganizmaların Canlandırılması 38
3.2.13.2. 0.5 McFarlandTurbidity Standart Hazırlanması 39
3.2.13.3. Broth Mikrodilüsyon Antimikrobiyal Duyarlılık Testi 39
BÖLÜM 4- ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 40
4.1. Test Suşlarının Genetik Özelliklerinin Kontrolü 40
4.1.1. Histidin gereksinimi 40
4.1.2. *rfa* Mutasyonu 41
4.1.3. *uvrB* Mutasyonu 41
4.1.4. R Faktörü 42
4.2. Antimutajenik Aktivite Sonuçları 42
4.3. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları 52
BÖLÜM 5- SONUÇ VE ÖNERİLER 54
KAYNAKLAR 55
ÖZGEÇMİŞ……..…….……..…....…….....I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Aminlerin karbonil bileşikleriyle verdiği kondenzasyon reaksiyonu 4
Şekil 2.2. Baz değişimi mutasyonları: Transisyon ve transversiyon 8
Şekil 2.3. Çerçeve kayması mutasyonu..... 8
Şekil 3.1. Schiff bazı ligandının kimyasal yapısı 22
Şekil 3.2. Schiff bazı Mn kompleksinin kimyasal yapısı..... 22
Şekil 3.3. Schiff bazı Fe kompleksinin kimyasal yapısı 23
Şekil 3.4. Schiff bazı Co kompleksinin kimyasal yapısı..... 23
Şekil 3.5. Schiff bazı Cu kompleksinin kimyasal yapısı..... 24
Şekil 4.1. *S. typhimurium* TA98 suşunun HB ve MGA plaklarında üreme durumu 40
Şekil 4.2. *S. typhimurium* TA100 suşunun HB ve MGA plaklarda üreme durumu..... 41
Şekil 4.3. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarına uygulanan kristal viyole hassasiyet deneyi..... 41
Şekil 4.4. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları *uvrB* mutasyon kontrolü 42
Şekil 4.5. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları R faktörü kontrolü 42
Şekil 4.6. S9(-) Deneyleri TA98 ve TA100 suşları pozitif kontrol..... 43
Şekil 4.7. S9(+) Deneyleri TA98 ve TA100 suşları pozitif kontrol..... 43
Şekil 4.8. S9(-) Deneyleri TA98 ve TA100 suşları negatif kontrol (DMSO)..... 44
Şekil 4.9. S9(+) Deneyleri TA98 ve TA100 suşları negatif kontrol (DMSO)..... 44
Şekil 4.10. S9(-) Deneyleri TA98 ve TA100 suşları spontan kontrol..... 45
Şekil 4.11. S9(+) Deneyleri TA98 ve TA100 suşları spontan kontrol..... 45
Şekil 4.12. Ligand ve komplekslerinin farklı konsantrasyonlarının S9 yokluğunda (S9-) TA98 suşunda antimutajenik etkileri..... 50
Şekil 4.13. Ligand ve komplekslerinin farklı konsantrasyonlarının S9 varlığında (S9+) TA98 suşunda antimutajenik etkileri..... 50
Şekil 4.14. Ligand ve komplekslerinin farklı konsantrasyonlarının S9 yokluğunda (S9-) TA100 suşunda antimutajenik etkileri..... 51

Şekil 4.15. Ligand ve komplekslerinin farklı konsantrasyonlarının S9 varlığında (S9+) TA100 suşunda antimutajenik etkileri 51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan *Salmonella typhimurium* suşlarının genetik özellikleri 24
Çizelge 4.1. Schiff bazı ve komplekslerinin farklı konsantrasyonlarının *Salmonella typhimurium* TA98 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri 48
Çizelge 4.2. Schiff bazı ve komplekslerinin farklı konsantrasyonlarının *Salmonella typhimurium* TA100 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri 49
Çizelge 4.3. Schiff bazı ve komplekslerinin MIC (µg/mL) değerleri 53

BÖLÜM 1
GİRİŞ

Canlıların DNA'sında kendiliğinden veya herhangi bir sebeple meydana gelen programlanmamış değişimlere mutasyon denir. Mutasyon, lokasyon olarak gamet (eşey) hücrelerinde meydana geliyorsa sonraki nesillere aktarılır. Eğer somatik hücrelerde meydana geliyorsa sonraki nesillere aktarılmaz, yani kalıtsal değildir ve fenotipe etkisi gösterebilir (Ateş, 2002; Campbell ve Reece, 2010). Mutasyonlar kendiliğinden oluşabildiği gibi dışarıdan mutajen denilen fiziksel veya kimyasal ajanların etkisi ile de oluşabilmektedir. Mutajenik maddelerin etkilerini azaltan kimyasallara antimutajen denir (Mitscher ve ark., 1986). Antimutajenler etki mekanizmalarına göre desmutajenler ve biyo-antimutajenler olmak üzere iki başlık altında toplanır (Ferguson, 1994; Bhattacharya, 2011).

Son yıllarda genetik hastalıkların ve kanser vakalarının sayısında önemli bir artış olmuştur. Bu hastalıkların sebepleri spontan mutasyonlara bağlansa da, çevremizdeki maruz kaldığımız dış kaynaklı kimyasal ve fiziksel ajanların katkıları oldukça büyüktür. Bu nedenle mutajen maddelerin etkilerinin ortadan kaldırılmasına, hastalık oluşumlarının engellenmesine ve hastalık tedavilerinde uygulanabilecek yeni antimutajenik kimyasalların sentezlenmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır (Feil ve Metzger, 2007).

Birçok maddenin potansiyel antimutajenik aktiviteleri deney hayvanları ile *in vivo* olarak çalışılmaktadır. Bu çalışmalar maliyetli olup sonuçları da oldukça geç alınmaktadır (Paolini ve Forti, 1997). Buna karşın bakterilerin kullanıldığı kısa zamanda sonuç alınan test sistemleri tercih edilmektedir. Kısa zamanlı test sistemleri hızlı ve oldukça ucuz maliyetli olmaktadır (Josephy ve ark., 1997; Lelie ve ark., 1997).

Mutajenlerin tespitinde Prof. Dr. B.N. Ames ve Dr. D.M. Maron tarafından 1970'li yılların başında *Salmonella typhimurium* mikrozomal test sistemi geliştirilmiştir. Bu test Ames testi olarak bilinir, başta antioksidantlar olmak üzere antimutajenik ve antikanserojenik aktiviteleri olan inhibitör maddelerin tespitinde de kullanılmaktadır (Kalaycıoğlu ve Öner, 1994).

Ames test sistemi uygulanabilirliği kolay olmasından, hızlı ve güvenilir sonuç vermesinden ve düşük maliyetli olmasından dolayı dünya çapında mutajenite/antimutajenite araştırmalarında yaygın olarak kullanılan test sistemlerinden biri olmuştur (Mortelmans ve Zeiger, 2000). Ames testi kimyasal olarak indüklenen

mutajeniteyi belirlemek amacıyla tasarlanmış bir test sistemidir (Ames ve ark., 1975). Bu test sistemi ile kısa sürede 5000'den fazla kimyasalın mutajenik aktivitesi tespit edilmiştir. Aynı zamanda doğal ya da yapay kimyasalların antimutajenik aktivitelerinin tespitinde de kullanılan bir test sistemidir. Yapılan çalışmalar ile Ames testi sonucunda pozitif çıkan bir madde için kesin olarak mutajen/kanserojen ya da antimutajen/antikanserojen demek mümkün değildir. Bu maddenin sadece potansiyel olarak bu özelliklere sahip olduğu söylenebilir. Kesin olarak sonucu yorumlayabilmek için deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalar ile sonucu desteklemek gerekir. Buna bağlı olarak Ames test sistemi, geleneksel hayvan kanserojenite testlerini tamamlayıcı özelliğe sahiptir (McCann ve Ames, 1976).

Bazı kimyasallar memeli vücudunda metabolize olduktan sonra aktive olurlar ve mutajenik/antimutajenik aktivite gösterebilirler. Bu nedenle Ames testinde kimyasalların memeli vücudunda metabolik aktivasyon sonucunda oluşan mutajenik/antimutajenik aktiviteyi ölçmek için rat karaciğeri süpernatantını ve kofaktörleri içeren bir metabolik aktivasyon sistemi kullanılmaktadır. Bakteriler bu enzim sisteminden yoksun olduğu için kullanılan metabolik aktivasyon sistemi metabolik bir ortamı taklit etme olanağı vermektedir. Bu enzim karışımına kısaca S9 denilmektedir (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000; Sakura ve ark., 2004).

Schiff bazları, ilk olarak 1864 yılında Alman kimyager H. J. Schiff tarafından aldehit ve ketonların primer aminler ile reaksiyonundan elde edilmiştir (Schiff, 1864). Schiff bazlarının genel formülü Ar(R)-C=N-Ar(R) şeklinde olup, iminler, azometinler ve aniller olarak da bilinirler.

Schiff bazları elde edildikleri aldehit ya da ketonun isminin sonuna imin, aldimin ya da ketimin ekleri eklenerek adlandırılırlar. Aromatik aminler ile aldehitlerin reaksiyonundan oluşan Schiff bazları oldukça kararlı bileşiklerdir. Aminin ve aldehitin aromatik olması ve aldehitte para pozisyonunda elektron çekici bir sübstitüentin bulunması halinde reaksiyon hızının arttığı, sübstitüentin aminde bulunması halinde ise, reaksiyon hızının azaldığı bulunmuştur.

Schiff bazları ve kompleksleri kimya alanında olduğu kadar, diğer bilim alanları ve endüstride de önemini giderek arttırmaktadır. Özellikle boya ve polimer teknolojisinde, tıp alanındaki biyolojik araştırmalarda, ilaç sanayinde ve tarım alanında bu bileşiklerden büyük ölçüde yararlanılmakta ve yenilerinin sentezlenmesi için çalışmalar yapılmaktadır. Son yıllarda gaz algılayıcı ve sıvı kristal teknolojisinde birçok Schiff bazı sentezlenerek kullanılmıştır (Zhou, 2000; Khuhawar, 2004). Schiff bazlarının fluoresans özellik

göstermesi ve bu özelliğin kompleksleşme durumunda metal konsantrasyonuna bağlı olarak değişmesi, onların sensor olarak kullanılmasına yol açmıştır (Raman, 2005; Yang, 2005). Schiff bazları ve kompleksleri katalizör olarak polimerizasyon reaksiyonlarında, boyar madde olarak tekstil endüstrisinde, antioksidant, dezenfektant ve stabilizatör olarak kozmetik ve ilaç endüstrisinde ve pestisitlerin üretiminde kullanılmaktadır (Clarke,1974; Bradshaw,1992). Schiff bazı ve kompleksleri biyolojik aktivasyonlar konusunda da önemli kullanım alanlarına sahiptir. Bakır komplekslerinin antibakteriyel aktivitelerinin yüksekliği, platin komplekslerinin anti-tümör özellik göstermesi, demir komplekslerinin katodik oksijen indirgenmesinde katalizör olarak kullanılması, mangan ve rutenyum komplekslerinin suyun fotolizini hızlandırması, kobalt komplekslerinin oksijen ayrılması ve taşınması reaksiyonları için model oluşturması, çinko ve krom komplekslerinin polistiren reçinelerin boyanmasında ısı ve ışığa dayanıklı boyar madde olması, nikel komplekslerinin termoplastik reçineler için ışık stabilizatörü olarak kullanılması bu uygulama alanlarına örnek teşkil etmektedir (Syamal, 1981; Zeishen, 1990; Kelland, 1993; Sharma, 2002; Gaballa, 2007).

Schiff bazlarının biyolojik aktiviteleri *in vivo* ve *in vitro* olarak çalışılmıştır. Koordinasyon beileşiklerinin merkez atomun redoks potansiyellerinin ve ligandın yapısı ve konformasyonu bu tür bileşiklerin biyolojik aktivitelerini etkilediği rapor edilmiştir (Durackova ve ark., 1999). Benzen halkası üzerinde bulunan fonksiyonel grupların türüne bağlı olarak inhibitör olarak kullanılan Schiff bazlarının etkilerinin değiştiği İnhibitör olarak da kullanılan Schiff bazlarının, benzen halkası üzerinde bulunan fonksiyonel grupların türüne bağlı olarak inhibisyon etkilerinin değiştiği ve mükemmel inhibitörler olduğu bulunmuştur (Agrawal ve ark., 2004).

Nükleik asitlerle etkileşime girebilen yeni moleküllerin araştırılması ve tasarlanması, kemoterapide DNA'ya bağlanabilen yeni antikanser ilaçların geliştirilmesi günümüzde araştırmacıların üzerinde çok çalıştığı konulardan biridir. Schiff bazları, önemli antibakteriyel ve kemoterapötik potansiyelleriyle medikal kimyada önemli bir bileşik sınıfını temsil etmektedir.

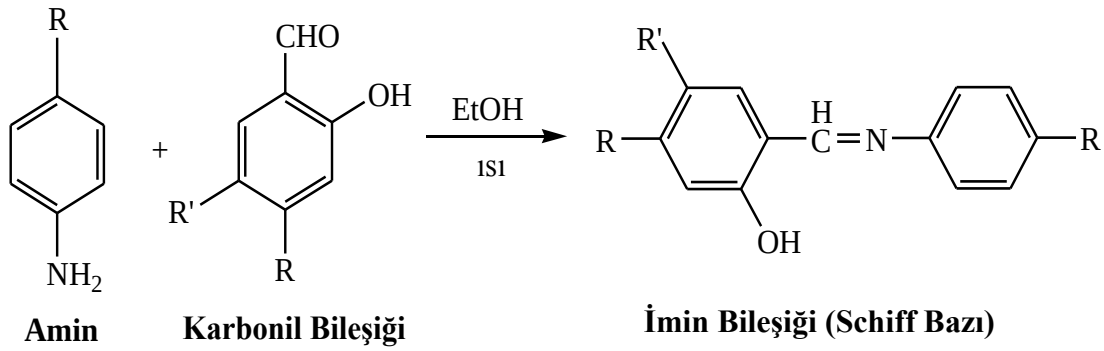
Yukarıda bazı özellikleri ve kullanım alanları verilen Schiff bazları ile kompleksleri oldukça ilginç bileşiklerdir. Bunların tamamı dikkate alındığında yeni tür Schiff bazı ve komplekslerinin daha ilginç özelliklere ve kullanım alanlarına sahip olabilecekleri düşüncesi çalışmamızın ana unsurunu oluşturmuştur. Bu bilgilere bağlı olarak, sentezlenen 2-hidroksi Schiff bazı ve Mn(II), Fe(II), Co(II), Cu(II) metal komplekslerinin antimutajenik ve antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. İmin Bileşikleri (Schiff Bazları)

2.1.1. Schiff Bazlarının yapısı ve genel özellikleri

Hugo Schiff tarafından bir primer amin ve bir karbonil bileşiğinin reaksiyonundan elde edilen ve azometin (-C=N-) grubu içeren bileşiklere imin bileşikleri (Schiff Bazları) denir (Schiff, 1864). Genel olarak Schiff bazları, karbonil bileşikleri ile primer aminlerin reaksiyonları sonucu oluşmaktadır. Reaksiyon sonucu oluşan –C=N- bağına imin veya azometin bağı denir. İmin bileşikleri ve genel elde ediliş reaksiyonları aşağıda verildiği gibidir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Aminlerin karbonil bileşikleriyle verdiği kondenzasyon reaksiyonu (Yıldız ve ark., 1998, 2004, 2005, 2007; Nazır ve ark., 2000; Yıldız 2004)

2.1.2. Schiff bazlarının biyolojik önemi ve kullanım alanları

İmin oluşumu, birçok biyokimyasal reaksiyonda meydana gelmektedir, çünkü enzimler genellikle bir aldehit veya keton ile olan reaksiyonlarda $–NH_2$ grupları kullanırlar. Bir imin bağının oluşumu, biyokimyasal bir reaksiyon olan görme süreci sırasında ara ürün olarak oluştuğundan dolayı önemlidir (Solomons ve Fryhle, 2002).

Koordinasyon bileşiklerinin biyolojik sistemlerde önemi büyüktür. Yeşil bitkilerin O_2 üretmesinde klorofil, kanda O_2 taşımada büyük öneme sahip hemoglobin bunun dışında miyoglobin, fitalosiyanin ve vitamin B12 biyolojik sistemlerde yer alan koordinasyon bileşikleridir (Dığrak ve ark., 1996). İmin bileşikleri koordinasyon bileşiklerinin sentezinde ligand olarak kullanılmaktadır ve askorbik asit, katekol, aminoasitler, serbest oksijen gibi önemli moleküllerin oksidasyonunda rol oynamaktadır (Niederhoffer ve ark.,1984; Karlin ve Tyekkerz, 1993).

İlaç sanayiinde, hastalıkların teşhis ve tedavisinde son zamanlarda metal kompleksleri ilgi görmeye başlamıştır. Özellikle kükürt içeren Schiff bazı metal komplekslerinin antikanser özelliğinin rapor edilmesinden sonra bu komplekslere gösterilen ilgi daha da artmıştır (Klayman ve ark., 1983; Scovill ve ark., 1984; Mirabelli ve ark., 1987; Patel ve ark.,1989; Kim ve Yoong-Hee, 1992; Amirkhanov ve ark.,1999; Zeishen ve ark., 2002).

Schiff bazlarında; aromatik aldehit ve anilinin türüne, üzerlerindeki sübstitüe grupların sayısı ve çeşidine göre bileşiğin tüm özellikleri değişmektedir. Bileşiklerin metaller ile yapmış oldukları kompleksteki metalin türüne, bağlanma şekline ve sayısına göre de özellikleri ve uygulama alanları değişmektedir. Bileşiklerin fluoresans özellik göstermesi ve bu özelliğin kompleksleşme durumunda metal konsantrasyonuna bağlı olarak değişmesi, metallerin tanınması ve kompleks oluşturması açısından kimyanın çeşitli dalları ve çevre açısından çok önemlidir.

Schiff bazları renklidir. Bu özelliklerinden yararlanılarak boya endüstrisinde kullanılabilirler (fenilen mavisi ve naftol mavisi gibi). Ayrıca Schiff bazları, fungisid (mantar öldürücü) ve insektisit (böcek öldürücü) ilaçların bileşimine de katılmaktadırlar.

Bazı ilaçlarda Schiff bazlarının serbest ligandlardan daha çok metal kompleksleri olarak yüksek etkinliğe sahip oldukları bilinmektedir. Schiff bazı komplekslerinin değişik uygulama alanları vardır. Örneğin Cu^{+2} ve Gd^{+2} komplekslerinin pozitron-emisyon tomografisi ve görüntülemede kullanıldığı, platin komplekslerinin antitümör aktivite gösterdiği bilinmektedir. Schiff bazlarının ve metal komplekslerinin antitümör, antiviral, antimikrobiyal, antineoplastik özelliklere sahip olduğu belirtilmektedir (Sur ve ark., 1990; Fioravanti ve ark., 1996; Das ve ark., 1999; Yang ve ark., 2000). Ayrıca, Schiff bazı bileşiklerinin ve Cu(II) komplekslerinin, lipid peroksidasyonunu engelleyerek antioksidatif aktivite gösterdiği de bildirilmektedir (Pires dos Santos ve ark., 1998).

2.2. Mutasyonlar

Kendiliğinden veya çeşitli sebeplerden canlı DNA'sında meydana gelen proglanmamış değişimlere mutasyon denir. Mutasyonlar iki temel gruba ayrılır. Bunlar, yapısal ve fiziksel özelliklerine göre kromozom ve gen mutasyonlarıdır.

2.2.1. Kromozom mutasyonları

Organizmaların kromozom sayıları türlere göre değişiklik göstermektedir ve her türün kendine özgü kromozom sayısı bulunmaktadır. Ökaryotik canlıların somatik

hücrelerinde iki takım kromozom vardır.

Kromozom mutasyonları bunlara bağlı olarak iki temel başlığa ayrılmaktadır. Bunlar; sayısal ve yapısal mutasyonlardır.

2.2.1.1. Kromozom sayısı mutasyonları

Her türün farklı kromozom sayısı olduğu gibi türlerin kendi içerisinde kromozom sayısı sabittir. Mitoz ve mayoz bölünme sırasında kromozomlar bazen ayrılmaz ve kromozom sayısında değişiklikler gözlenir. Bu mutasyonlar aneuploidi ve euploidi olarak iki alt gruba ayrılmaktadır.

❖ Aneuploidi: Bir takımdaki kromozomlardan birinin veya birkaçının sayısının değişmesidir. Bu mutasyon genelde, mayoz I esnasında kromozomların veya mayoz II bölünmesinde kardeş kromatidlerin ayrılmaması sonucunda oluşurken anafaz safhasında kromozomların ayrılmasının gecikmesi ile de oluşabilmektedir (Ahmed ve ark., 2007).

- Monosomi: Diploit bir bireyde tek bir kromozomun eksik olması durumudur. Bu tip bireyler 2n-1 formülü ile gösterilir.
- Nullisomi: Takım içindeki bir kromozomun homoloğu ile birlikte eksik olması durumudur. Bu tip bireyler 2n-2 formülü ile gösterilirler.
- Polisomi: Takım içerisindeki herhangi bir kromozomun birinin veya birkaçının artmasıdır. Trisomik bireylerde kromozom sayısı 2n+1, tetrasomik bireylerde 2n+2 ve polisomik bireylerde kromozom sayısı 2n+3 şeklindedir (Campbell ve Reece, 2010).

❖ Euploidi: Kromozom takımı sayısındaki değişmelerdir. Takım içerisindeki kromozomların hepsinin sayısının tam katlar halinde ya da haploit artmasıdır.

- Monoploidi: Türün kendine ait kromozom takımının yarısına sahip olması durumudur.
- Poliploidi: Türün sahip olduğu kromozom sayısının hepsinin birden ikiden fazla (3n, 4n, 5n gibi) kat sayısına sahip olması durumudur.

2.2.1.2. Kromozom yapısı mutasyonları

Bu tür mutasyonlarda kromozom sayıları sabit kalmaktadır. Fakat kromozomların bazı parçalarının kaybolması, artması veya yer değiştirmesi gibi durumlarda kalıtım materyali değişime uğrar (Oraller, 1990). Kromozomlar kendisi kırılabildiği gibi dışarıdan maruz kaldığı kimyasal ve radyasyon sonucunda da kırılabilir. Kromozom yapı mutasyonları dört temel başlığa ayrılır (Öner, 2003).

Delesyon: Kromozomun bir parçasının kopup kaybedilmesi durumudur. Parça kopması kromozomların uç kısmından (terminal delesyon= defisiyens) ve ya iç kısmından olabilir.

Duplikasyon: Kromozom üzerindeki bir segmentin tekrarlanması durumudur.

İnversiyon: Kromozomdan kopan parçanın 180º dönüp koptuğu yere ters olarak yapışması durumudur.

Translokasyon: Homolog olmayan kromozomlar arasında segmentlerin yer değiştirmesi durumudur (Akı, 2007; Campbell ve Reece, 2010).

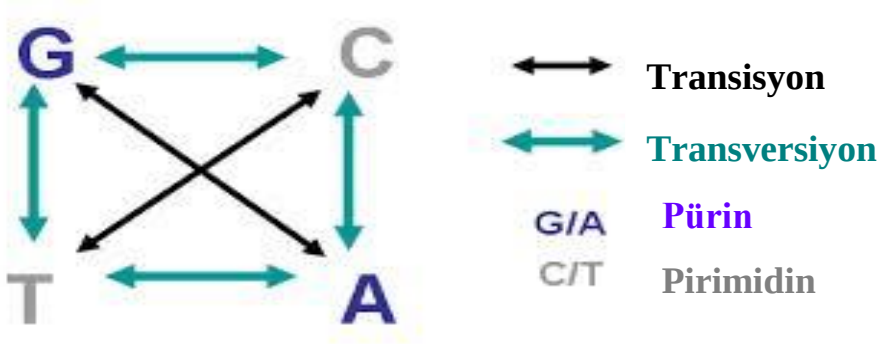
2.2.2. Gen mutasyonları

Genin genomdaki sayısı ve yeri değişmeden yapısında meydana gelen değişimler gen mutasyonlarıdır. Gen mutasyonları kromozom yapısında bir değişikliğe neden olmaz (Demirsoy, 2005).

DNA replikasyonunun kusursuz işleyişi ile genetik materyali nesilden nesile değişmeden aktarılmaktadır fakat bazı nedenlerle genetik materyal değişebilmektedir. Bu değişime sebep; kendi kendine değişme, çeşitli kimyasallar, replikasyon hataları veya radyasyon olabilmektedir. Genetik materyal değişimi kromozomla ilgili değişimle birlikte bir ya da birkaç baz çiftinin değişimi ile de olabilmektedir. Gen mutasyonları baz değişimi mutasyonları ve çerçeve kayması mutasyonları olarak iki temel başlıkta toplanabilir (Karadayı, 2010).

2.2.2.1. Baz değişimi mutasyonları

Gen bölgesi içerisinde bir bazın bir başka bazla yer değiştirmesi (baz substitisyonu) sonucunda oluşan bir mutasyondur. Aynı zamanda nokta mutasyonları olarak da adlandırılmaktadır. Nokta mutasyonları iki şekilde meydana gelmektedir. Gen yapısındaki pürin bazının bir başka pürin bazıyla veya pirimidin bazının başka bir pirimidin bazıyla yer değiştirmesi transisyon (karşılıklı geçiş) mutasyonudur. Mutasyonun diğer bir meydana gelme şekli ise pürin bazının bir pirimidin bazıyla yer değiştirmesi transversiyon (çapraz geçiş)'dur (Şekil 2.2). Baz çifti değişiminden dolayı oluşan mutasyonlarda genin işlevi kalıntı olarak devam etmektedir ve genin ürünü olan protein aktivitesi yitirilmez (Bağcı, 1985).

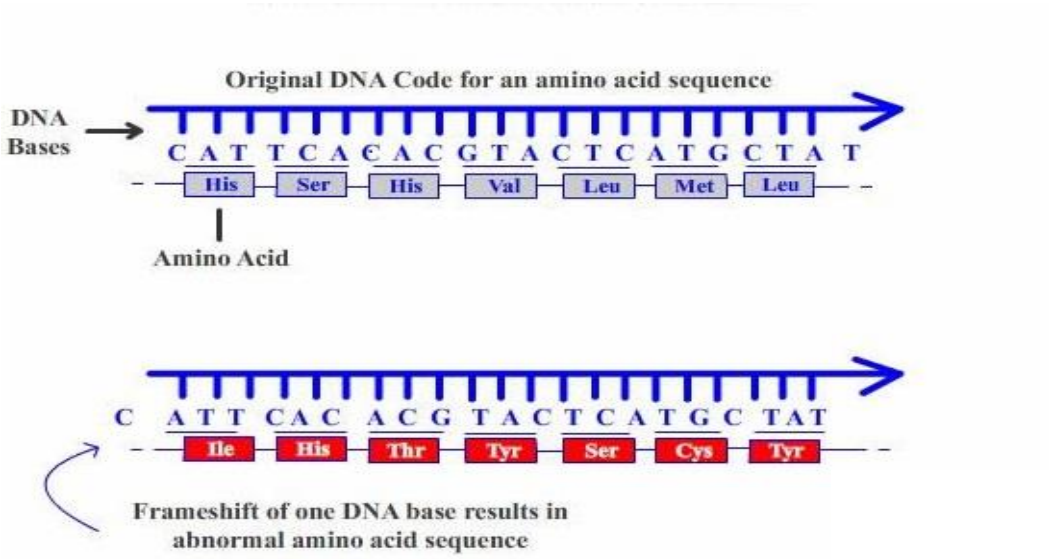


Şekil 2. 2. Baz değişimi mutasyonları: Transisyon ve transversiyon

(http://joinsolver.niaid.nih.gov/number_transversions.htm)

2.2.2.2. Çerçeve kayması mutasyonları

DNA zincirinde baz dizilerinin bulunduğu bölgeye baz çiftinin eklenmesi veya baz çiftinin eksilmesi ile triplet kodonun yanlış şifrelenmesine yol açan mutasyondur (Vural, 2005). Nükleotid eklenmesi insersiyon, eksilmesi ise delesyon olarak adlandırılmaktadır. Mutasyon meydana geldikten sonra bütün kodonlar değişir buna bağlı olarak gen ürünüde değişmektedir. Okuma çerçevesi kaymasından dolayı işlevsiz protein üretimi gerçekleşmektedir (Campbell ve Reece, 2010). Bu mutasyonun oluşması fenotipte etkisini baz çifti değişimi ile oluşan mutasyon etkisinden daha yüksek oranda göstermektedir (Korkmaz, 2005) (Şekil 2.3).



Şekil 2. 3. Çerçeve kayması mutasyonu

(http://www.ebpi-kits.com/TA98% 20Frame% 20Shift %20 Mutation.html).

2.3. Antimutajenite

Mutajenik maddelerin kanserojen veya mutajenik etkilerini azaltan kimyasallara antimutajen denir (Mitscher ve ark., 1986). Antimutajenler etki mekanizmalarına göre iki temel başlık altında toplanabilir. Bunlar desmutajenler ve biyo-antimutajenlerdir (Samejima ve ark.,1995; Özbek, 2006).

- Desmutajenler: Mutajen maddelerin hücreye girişini engelleyen veya bu maddelerin DNA ile etkileşimlerini önleyen antimutajenik ajanlardır (Samejima ve ark.,.1995; Özbek 2006). Pro-mutajenik bir maddenin mutajen bir maddeye dönüşümünü engelleyebilir, mutajen bir maddeyi inaktif bir duruma getirebilirler.
- Biyo-antimutajenler: Bu antimutajenik ajanlar, mutajen maddenin DNA'nın yapısına katıldıktan sonra DNA replikasyonunu, DNA tamir mekanizmasının işleyişini düzenleyerek antimutajenik etkinlik gösterirler (Ferguson, 1994; Bhattacharya, 2011).

Mutajen maddeler başta kanser gibi birçok genetiksel hastalığın sebebi ile ilişkilendirilmektedir. Bu yüzden mutajen maddelerin etkilerinin ortadan kaldırılması, hastalıkların oluşumunun engellenmesi ya da tedavilerde uygulanabilecek yeni antimutajenik kimyasalların sentezlenmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır (Feil ve Metzger, 2007).

Birçok maddenin potansiyel antimutajenik aktivitelerinin deney hayvanları ile *in vivo* çalışmalarla test edilmesi akılcı bir yaklaşımdır. Fakat bu çalışmalar hem maliyetli olmaktadır hem de sonuç elde edilmesi hayli vakit almaktadır (Paolini ve Forti, 1997). Buna bağlı olarak bakterilerin kullanıldığı kısa zamanlı test sistemleri tercih edilmektedir. Kısa zamanlı test sistemlerinde sonuç hızlı elde edilmekte ve maliyeti ucuz olmaktadır (Josephy ve ark., 1997; Lelie ve ark., 1997).

2.4. Ames Testi (*Salmonella*/ Mikrozom Testi)

Ames testi 1970'lerin başında Prof. Dr. B.N. Ames ve Dr. D.M. Maron tarafından geliştirilen kısa zamanlı bakteriyel test sistemidir. Ames testi, tümör oluşumunda meydana gelen nokta mutasyonların saptanmasında kullanılmaktadır.

Ames test sisteminde, *in vitro* mutasyon yöntemleriyle *Salmonella typhimurium* LT2 atasal bakteri suşundan elde edilen histidin oksotrofları (his^-) kullanılmaktadır. Bu mutant suşlar, histidin amino asidinin sentezlenmesinden sorumlu olan gen bölgelerini içeren his operonunda gen mutasyonlarını taşımaktadır. Mutajenite çalışmalarının prensibi, mutajenik etki gösteren maddelerin, mutant bakterilerin DNA'sı ile etkileşimi sonucunda his

operonunda geri mutasyonların gerçekleşmesidir. Meydana gelen geri mutasyonların sonucunda histidini sentezleyemeyen bakteriler prototrof forma dönüşmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda oksotrof olan mutant bakterilerin prototrof bakterilere dönüşmesi test materyalinin mutajenik aktivitesi ile doğrudan ilişkilendirilmektedir. Aynı zamanda bu test sistemi mutajenik aktivite gösteren maddelerin DNA ile etkileşimlerini engelleyen, mutajenik aktivitelerini ortadan kaldıran antimutajen maddelerin tayini için de kullanılmaktadır (Shamberger ve ark.,1979; Rosin ve Stich, 1978; Alekperov ve ark.,1986; Victorin ve ark., 1987).

Salmonella/mikrozom test sisteminde çeşitli maddelerin etkilerini tespit edebilmek için farklı suşlarla çalışılmaktadır. Bu farklı suşlar histidin operonunda değişik tipte mutasyon içermektedir. Örneğin; *S. typhimurium* TA100 suşunda bulunan *hisG46* mutasyonu, histidin biyosentezinde ilk enzimi kodlayan hisG geninde baz çifti değişimi sonucunda meydana gelmiştir. Bu mutasyon hisG geninde lösin aminoasidinin kodonu olan GAG-CTC yerine prolin amino asidinin GGG-CCC kodonunun gelmesine sebep olmuştur. Bu mutasyonun eski haline dönmesi ise baz çifti değişimine sebep olan mutajenlerle olmaktadır (Maron ve Ames, 1983).

S. typhimurium TA98 ve TA1538 suşlarında bulunan hisD3052 mutasyonu ise histidin biyosentezindeki son enzim olan histidinol dehidrogenazı kodlayan hisD geninde çerçeve kayması mutasyonu sonucunda oluşmuştur. Çerçeve kayması mutasyonu HisD geni içerisinde 8 defa tekrarlanan GC dizisine yakın bir bazın delesyonu ile meydana gelmiştir. Bu mutasyonun eski haline dönmesi, çerçeve kayması tipinde mutasyona sebep olan mutajenlerle mümkün olmaktadır (Maron ve Ames, 1983).

Test suşları, kendilerini kuşatan lipopolisakkarit tabakanın yapımından sorumlu olan genlerde bir mutasyon taşımaktadır. Bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit tabakasının kısmen yok olmasını sağlatan *rfa* mutasyonu sonucunda normal şartlarda hücre duvarından geçemeyen büyük moleküller bu mutasyonun gerçekleşmesi ile hücre içine girebilmektedir ve bakterinin ölümüne sebep olmaktadır (Ames ve ark., 1973).

TA102 Suşu haricinde Ames testinde kullanılan tüm suşlar *uvrB* mutasyonu taşımaktadır.Bu mutasyon *uvrB* genindeki delesyon sonucunda oluşmaktadır uvrB, hatasız kesip çıkarma tamir mekanizmasını engellemekte ve hata yapmaya meyilli DNA tamir mekanizmasını devreye sokmaktadır. Bu mutasyon ile biyotin vitamininin sentezinden sorumlu bio geni de delesyona uğradığından, bu mutasyona sahip test suşları üremek için biyotine ihtiyaç duymaktadır (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000).

Ames testinde kullanılan suşların çoğu ampisilin direnç geni taşıyan pKM101 plazmidi içermektedir. pKM101 plazmid, hata yapmaya meyilli DNA tamir mekanizmasını uyarmakla birlikte plazmidin hücredeki varlığını belirlemek için uygun bir marker taşımaktadır (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000).

Bazı kimyasallar memeli vücudunda metabolize olduktan sonra aktive olurlar ve mutajenik/antimutajenik aktivite gösterebilirler. Bu nedenle Ames testinde kimyasalların memeli vücudunda metabolik aktivasyon sonucunda oluşan mutajenik/antimutajenik aktiviteyi ölçmek için rat karaciğeri süpernatantını ve kofaktörleri içeren bir metabolik aktivasyon sistemi kullanılmaktadır. Bakteriler bu enzim sisteminden yoksun olduğu için kullanılan metabolik aktivasyon sistemi metabolik bir ortamı taklit etme olanağı vermektedir. Bu enzim karışımına kısaca S9 denilmektedir (Ames ve ark., 1973; Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000; Sakura ve ark., 2004).

2.5. Antimikrobiyal Aktivite

Mikrobiyal büyümeyi engelleyen biyolojik veya kimyasal maddelere antimikrobiyal maddeler denir. Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde önemli rol oynayan antimikrobiyal maddeler canlılardan ve mikroorganizmalardan elde edilmesinin yanında sentetik olarak da elde edilmektedir (Sevgi, 2010).

2.5.1. Antimikrobiyal maddelerin etki mekanizmaları

Antimikrobiyal maddelerin etki mekanizmaları beş başlık altında toplanabilir. Bunlar;

- Bakteri hücre duvarı sentezini engellemek
- Hücre membranın işlevini bozmak
- Bakteri ribozomlarında protein sentezini engellemek
- Nükleik asit sentezini bozmak
- İntermediyer metabolizmayı bozmak (Brooks ve ark., 2009).

2.5.2. Antimikrobiyal özelliklerin tayininde kullanılan yöntemler

Yeni antibiyotik ilaçların aktivitesini saptamak amacıyla yapılan çalışmalarda duyarlılık testlerinde farklı yöntemlerden yararlanılabilir. Bu yöntemler dilüsyon ve difüzyon teknikleri olarak iki ana başlıkta toplanabilir.

1. Dilüsyon yöntemi
    - Buyyon dilüsyon (Tüp dilüsyon)
        - Makrodilüsyon
        - Mikrodilüsyon
    - Agar dilüsyon
2. Difüzyon yöntemi (Demiryürek, 2010).

Çalışmamızda kolay olmasının yanında güvenilir, hassas ve doğru sonuçlar alınması sebebiyle mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır.

2.5.2.1. Mikrodilüsyon yöntemi

Agar ve sıvı dilüsyon metotları antimikrobiyal maddelerin mikroorganizmaların üremelerini engelleyen ve öldüren minimal konsantrasyonu miligram/mililitre cinsinden tespit etmede kullanılan metotlardır. Sıvı mikrodilüsyon, tek kullanımlık olan mikrodilüsyon plakları ile yapılan yöntemdir ve uluslar arası referans yöntemidir.

Antimikrobiyal aktivitesi ölçülen maddeler iki kat seri dilüsyon yapılarak test edilmektedir. Üremeyi engelleyen en düşük antibiyotik konsantrasyon değeri belirlenir ve bu değer minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) olarak tanımlanmaktadır (Qurbanov ve Attar, 2007; Lambert ve Pearson, 2000). Antimikrobiyal madde için MIC değeri mikroorganizma, inokulum miktarı ve inkübasyon sıcaklığı gibi koşullara bağlıdır (Brooks ve ark., 2009).

Oxo-vanadium(IV) ve oxo-vanadium(V) Schiff bazları ile yapılan çalışmada sentezlenen 23 bileşik antimikrobiyal aktiviteleri açısından test edilmiştir. Çalışmada 23 bileşikten 8 tanesinin özellikle bitki patojeni olan *Agrobacterium tumefaciens* ve *Helminthosporium oryzae* üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir (Datta ve ark., 1982).

Sentezlenen 4-hidroksisalisilaldehit ve L-alanin Schiff bazları ile Co (kobalt), Zn (çinko), Cu (bakır), Ni (nikel) kompleksleri antikanser aktiviteleri açısından incelenmiştir. Çalışma sonucunda komplekslerin *Ehrlich ascites* karsinomasına karşı antikanser özelliğine sahip olduğu saptanmıştır (Zishen ve ark., 1990).

Yapılan bir çalışmada Schiff bazlarının platin komplekslerinin antitümoral aktivitelerine bakılmıştır. Sonuç olarak platin komplekslerinin antitümoral aktivite gösterdiği bulunmuştur (Kuduk ve Trynda, 1994).

İndol-3-karboksiliden-DL-valin, 3-karboksiliden-DL-alanin, 3-karboksiliden-DL-glisin Schiff bazları antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri açısından araştırılmıştır.

Çalışma sonucunda Schiff bazlarının her üçününde etkili olduğu fakat 3-karboksiliden-DL-alanin Schiff bazının yapısındaki alanin grubunun varlığından dolayı daha etkili olduğu gözlenmiştir (Sharma ve Dubey, 1994).

Schiff bazı aminoguanidine bileşiklerinin Ames testi ile araştırılmasında *Salmonella typhimurium* TA97, TA100 ve TA102 suşlarından yararlanılmıştır. Çalışma sonucunda test edilen bileşiklerin mutajenik olmadığı belirlenmiştir. Antimutajenite aktivitelerinin araştırılmasında bilinen bir mutajen olan nitrovin kullanılmıştır. Sonuç olarak bu bileşikler güçlü bir antimutajenik ve antibakteriostatik aktivite göstermiştir. Test bileşikleri çeşitli hastalıkların önlenmesi açısından olası farmakolojik ajan olarak düşünülmüştür (Onuska ve ark., 1996).

İsatin (İndol-2,3-dion) ile 5-kloro ve 5-bromo türevleri, 3-amino-2-metilmerkapto 4(3*H*)-quinazolion bileşiğine katılarak Mannich ve Schiff Bazları sentezlenmiştir. Bu bileşikler antimikrobiyal ve anti-HIV aktiviteleri açısından araştırılmıştır. Çalışma, 26 patojenik bakteriye, 8 patojenik mantara karşı gerçekleşmiştir. Sonuç olarak test edilen bileşiklerin içerisinde, 5-kloro-3-(3'4'-dihidro-2'metilmerkapto-4'oksoquinazolin-3'yl)-1-morfolinometilisatin bileşiğinin aralarında en aktif antimikrobiyal özellik taşıdığı tespit edilmiştir (Pandeya ve ark., 1999a).

İsatin ve türevleri, 4-(4'-klorofenil)-6-(4"-metil fenil)-2aminopirimidin bileşiği ile reaksiyonu sonucu Schiff bazları ve mannich bazları oluşmuştur. Oluşan bu bileşiklerin, agar difüzyon metodu ile 28 patojenik bakteriye ve 8 patojenik mantara karşı antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Aynı bileşikler, anti-HIV aktivitelerine göre de incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre tüm bileşiklerin bakteri ve mantarlara karşı önemli ölçüde aktif oldukları tespit edilmiştir (Pandeya ve ark., 1999b).

Schiff ve Mannich bazlarının antimkrobiyal aktivitelerinin incelendiği çalışmada 28 patojenik bakteri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda 1-[*N*,*N*-dimetilaminometil]-5-bromo isatin-3-*H*19-[40-(p-klorofenil)tiyazol-20-yl]tiyosemikarbazon bileşiğinin test bileşiklerinin arasında en yüksek antimikrobiyal aktivite gösteren bileşik olduğu belirtilmiştir (Pandeya ve ark., 1999c).

Sentezlenen Schiff ve Mannich bazlarının antimikrobiyal aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada, *Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, Shigella dysenteriae, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermis, Streptococcus pneumoniae, Bacillus cereus, Bacillus pumilus, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Proteus vulgaris, Salmonella typhimurium* ve *Klebsiella pneumoniae* patojenik bakterileri kullanılmıştır.

Çalışma sonucunda, 1-Difenilaminometil-3-(4-bromofenilimino)-1,3-dihidro-indol-3-on ve 3-(4-bromofenilimino)-5-nitro-1,3-dihidroindol-3-on bileşiklerinin diğer test edilen bileşiklere göre en aktif antimiktobiyal özellik gösteren bileşikler olduğu görülmüştür. Mannich bazlarının daha yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Sridhar ve ark., 2001).

2-Aminofenol/2-aminotiyofenol ve 1-fenil-2,3-dimetil-4-(4-iminopentan-2-on)-pirazol-5-on Schiff bazları türevlerinden Cu (bakır), Ni, Co, Mn (mangan), Zn ve VO (vanadyum oksit) kompleksleri sentezlenmiş ve aktimikrobiyal aktiviteleri açısından araştırılmıştır. Çalışma, *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Klebsiella pneumonia, Salmonella typhimurium, Pseudomonas aeruginosa, Shigella flexneri, Aspergillus niger* ve *Trichoderma viridi* gibi mikroorganizmalara karşı gerçekleşmiştir. Çalışma sonucunda komplekslerin ligandlardan daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Raman ve ark., 2002).

Oksaldiamid/oksalilhidrazin ve pirol-2-karbaldehit türevi Schiff bazı ve Zn komplekleri sentezlenilen bir çalışmada, *Esherichia coli, Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitelerine bakılmıştır. Sonuç olarak Schiff bazlarının bakterilerin gelişimini inhibe ettiği gözlenmiştir (Chohan ve ark., 2002).

Schiff bazı (panaf) ve onun komplekslerinden panaf Cu ve panaf Ni'in genotoksik potansiyellerinin Ames test sistemi ile araştırıldığı bir çalışmada *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları kullanılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda TA98 suşunda Schiff bazı ve panaf komplekslerinin S9 varlığında ve yokluğunda mutajenik etki gösterdiği tespit edilmiştir. TA100 suşu ile yapılan deneylerde elde edilen değerlere göre test edilen Schiff bazı panaf, S9 fraksiyonu yokluğunda mutajenik yanıt vermezken, S9 fraksiyonu varlığında mutajenik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Panaf Ni, S9 varlığında ve yokluğunda mutajenik etki göstermiştir. Panaf Cu ise S9 yokluğunda zayıf mutajenik aktivite gösterirken S9 fraksiyonu varlığında mutajenik yanıt verdiği tespit edilmiştir (Kahramanoğlu, 2003).

1,2-*bis*(p-aminofenoksi)etan ve 2-hidroksinaftalin bileşiklerinin kondanzasyonu ile yeni oxovanadium(IV) Schiff bazı elde edilmiştir. Schiff bazı ligandının Ni(II) ve Cu(II) kompleksleri sentezlenmiş ve Ames Testi ile araştırılmıştır. Test bileşikleri, mikrozomal enzimler içeren S9 varlığında ve yokluğunda TA100 suşunda mutajenik aktivite göstermiştir. Çalışma sonucunda bu bileşiklerin mutajen olduğu tespit edilmiştir (Temel ve

ark., 2004).

Yeni sentezlenmiş 18 adet Schiff bazının antibakteriyel etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Enterococcus gallinarum, Esherichia coli, Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri kullanılmıştır. Disk difüzyon metodu kullanılan çalışma sonucunda antibakteriyel etki gösteren Schiff bazlarının yapısında kükürt bulunduğu tespit edilmiştir (Esen, 2006).

Triazole Schiff bazlarından, 2,4-dichloro-5-fluorophenyl bileşiği taşıyan mannich bazları sentezlenmiştir. Sentezlenen bazların disk difüzyon metodu ile antimikrobiyal ve plate dilüsyon metodu ile antifungal aktiviteleri araştırılmıştır. Çalışma, *Esherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae* bakteri suşlarına ve antifungal çalışması için *Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus, Penicillium marneffeii Trichophyton mentagrophytes* türlerine karşı gerçekleştirilmiştir. Aralarında kodlanan bileşiklerden 3c, 4c, 4e ve 4f bileşikleri antimikrobiyal özellikler gösterirken 3c, 5c, 5e ve 5f bileşiklerinin antifungal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Karthikeyan ve ark., 2006).

Farklı Schiff bazı ligandları ve bunların metal komplekslerinin genotoksik etkileri Ames testi *Salmonella typhimurium* bakterisi TA98 ve TA100 suşları üzerinde araştırılmış ve mutajenik etkilerinin olduğunu rapor edilmiştir (İspir ve ark., 2008).

Sentezlenen H_2L^1-H_2l^3 Schiff bazı liganları ve ligandların Co, Fe (demir) ve Ru (rutenyum) metal komplekslerinin genotoksisitesi Ames Testi ile araştırılmıştır. Çalışma sonucunda *Salmonella typhimurium* TA98 suşunda S9 varlığında ve yokluğunda H_2L^1-H_2l^3 ligandları mutajenik aktivite gösterdiği gözlenmiştir. TA100 suşunda ise S9 varlığında ve yokluğunda H_2L^1 ve H_2L^2 mutajenik aktivite gösterirken H_2L^3 mutajenik aktivite göstermemiştir (Tümer ve ark., 2008).

Ziraat, tıp ve endüstri alanındaki uygulanma potansiyelleri açısından Schiff bazları mutajenik ve antimutajenik aktiviteleri açısından incelenmek istenmiştir. Yapılan çalışmada Ames testi kullanılmıştır. Sentezlenen Schiff bazları 1, 2 ve 3 numaraları ile kodlanmıştır. Çalışma sonucunda 1, 2 ve 3 numaralı test bileşikleri *Salmonella typhimurium* TA1535, TA100 ve TA97 suşlarında mutajenik aktivite göstermemiştir. Fakat TA102 suşunda 1 ve 3 numaralı Schiff bazları mutajenik aktivite göstermezken, 2 numaralı Schiff bazı oksidatif mutajen olarak rol oynamış ve mutajenik olarak gözlenmiştir. Antimutajenite çalışmaları sonucunda ise test bileşenlerinin birer desmutajen gibi DNA'yı doğrudan koruyamadıkları dolaylı yoldan mutajenleri inhibe ederek ve DNA tamir

mekanizmasında rol alarak korudukları tespit edilmiştir (Ashram ve ark., 2009).

İlaç ham maddesi olarak sentezlenen 2-(N-feniliminometil)-fenol, 2-(N-p-bromofeniliminometil)-fenol, 2-(N-p-metilfeniliminometil)-fenol ve 2(N-p-anilinfeniliminometil)-fenol Schiff bazları mutajenik aktiviteleri açısından umu-test sistemi kullanılarak araştırılmıştır. Schiff bazları 5 farklı konsantrasyon olarak belirlenmiş ve DMSO (dimetilsülfoksit) içerisinde çözdürülmüştür. Sonuç olarak değerler pozitif mutajen olan 4-nitroquinoline n-oxide (4NQO) maddesinden yüksek çıkmamıştır (Ceyhan ve ark., 2010).

Yapılan bir çalışmada terefaldehitten türetilmiş Schiff bazı ve metal kompleksleri hücre kültürü ortamına ilave edilmesi ile lipit peroksidasyonunun derecesini gösteren malondialdehit (MDA) düzeyleri üzerine olan etkisi, *in vitro* şartlarda antioksidan özelliği ve anti tümör aktivitesi açısından araştırılmıştır. Deney grupları arasındaki karşılaştırılmalarda MDA düzeylerinin istatistiksel olarak değiştiği ve deney süresince canlı hücre sayısına bakıldığında ligand ve komplekslerinin insan göğüs kanseri hücre tipinde (MCF-7) etkili bir antitümör aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Selçuk, 2010).

N-(8-kuinoil)salisilaldimin (HL^1) ve N-(8-kinoil)napthaldimin (HL^2) ligandlarından türevli Ni(II) ve Fe(III) Schiff Bazı kompleksleri ile yapılan bir çalışmada bu bileşiklerin metal iyon şelatlama özelliğinden dolayı klastojenik olduğu ve sıçan kemik iliği hücrelerinde kromozom anomaliliklerini artırdığı saptanmıştır (Saleh ve ark., 2011).

İnsan hepatik karsinoma hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada novel quinolinone Schiff Bazı ve Co komplekslerin sitotoksisitesine, mutajenitesine ve antikanser aktivitesine bakılmıştır. Çalışma sonuçları novel quinolinone Schiff bazı Co kompleksinin sitotoksisiteyi arttırdığını göstermiştir. Ames testi sonucunda ise kompleksin mutajenik aktivite göstermediği tespit edilmiştir. Ayrıca kompleksin hepatosellüler karsinomaya karşı tedavi edici bir rol oynayabileceği bildirilmiştir (Duff ve ark., 2012).

Birbirinin türevi 1-(N-feniliminometil)-2-naftol ve 1-(N-para-iyodofeniliminometil)-2-naftol naftolik Schiff bazlarının antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ile gram pozitif (*Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Enterococcus faecalis, Micrococcus luteus, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus*), gram negatif bakteriler (*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter aerogenes*) ve mayalara (*Candida albicans, Candida utilis,Candida glabrata, Kluyveromyces lactis, Schizosaccharomyces pombe, Saccharomyces cerevisiae*) karşı denenmiştir. Sonuç olarak test bileşiklerinin bu

mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite göstermediği tespit edilmiştir (Özöğüt ve ark., 2012).

L-glutamine ve L-asparagine ekli Schiff bazlarının antimutajenik ve antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirilmiştir. Test bileşeninin antimikrobiyal aktiviteleri *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Shigella dysenteria type 7, Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Staphylococcus epidermis, Micrococcus luteus, Bacillus cereus, Pseudomonas putida, Brucella abortus,* bakterilerine karşı değerlendirilirken, antifungal aktiviteleri *Candida albicans* türüne karşı değerlendirilmiştir. Bu bileşiklerin antimutajenik özelliklerini belirleyebilmek amacıyla Mikronükleus (MN) Testi ve *in vitro* İnsan Lenfosit Hücre Kültürü yöntemi kullanılmıştır. MN testinde mutajen olarak Aflatoxin B_1 (AFB_1) kullanılmıştır. Sonuç olarak Schiff bazlarının koruyucu etkisinin dozlara bağlı olduğu ortaya çıkmıştır (Şakiyan ve ark., 2013).

Schiff bazları dışında kalan diğer kimyasal bileşiklerde bu çalışmalarda kullanılmıştır. 2-Chloroacrolein, karsinojenik herbisitlerin metabolizması üzerinde oluşan bir bileşiktir. Yapılan çalışmalar ile varılan sonuçlara göre 2-bromo-,2,3-dichloro ve 2,3,3-trichloro analogları Ames testi sonucunda çok daha mutajenik potansiyele sahip olduğu görülmüştür (Rosen ve ark., 1980).

İmidazol ve ilişkili bileşiklerinin mutajenite ve genotoksisitesi test edilmiştir. İmidazol ve histamin primer sıçan hepatositlerinde proglanmamış DNA sentezi (UDS=unscheduled DNA synthesis) testi ile incelenmiştir. Imidazol, Ames testi ve UDS Testi sonucunda negatif sonuçlar vermiştir. Imidazol bileşiğinin üç türevi; hydantoin, hydantoic asit, *N*-acetyl-imidazole Ames testinde mutajenik olmadığı gözlenmiştir. UDS testinde de benzer sonuç vererek genotoksik aktivite göstermemiştir (Forster ve ark., 1992).

Nitroimidazol ve imidazol türevi olan 48 adet kimyasalın mutajenik ve genotoksik potansiyellerinin araştırıldığı bir çalışmada Ames testi ve SOS kromo testi kullanılmıştır. Ames testi için *Salmonella typhimurium* TA100 suşu, SOS kromo testi için *Escherichia coli* PQ37 suşu kullanılmıştır. Her iki test sistemi metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğunda gerçekleşmiştir. Metronidazole ve dimetridazole bileşikleri de dahil olmak üzere 45 bileşiğin mutajenik ve genotoksik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Méo ve ark., 1992).

İlaç ham maddesinde kullanılmak üzere sentezlenen, 2, 4, 5 tri- fenil imidazol ve dokuz türevinin Ames testi ile TA98 ve TA100 suşları kullanılarak mutajenik aktiviteleri

araştırılmıştır. Sonuç olarak TA98 suşunda test bileşeni anlamlı sonuçlar verdiği gibi bileşenlerin çerçeve kayması mutasyonuna neden olduğu için mutajenik etkili olduğu saptanmıştır (Ayaz, 1993).

Nitrobenzenler ve nitroanilinler ile yapılan bir çalışmada, Ames testi uygulanmış ve *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmıştır. Test edilen kimyasalların % 71'i mutajenik bulunmuştur (Abmann ve ark., 1997).

Nitrobenzen ve nitroanilin bileşiklerinin Ames testi ile mutajenik aktiviteleri araştırılan başka bir çalışmada *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları kullanılmıştır. Deneyler mikrozomal enzimler içeren S9 varlığında ve yokluğunda gerçekleşmiştir. Test edilen 14 bileşikten 10 tanesinin mutajenik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. TA98 suşunda tüm bileşikler pozitif sonuçlar verirken, 4 tanesi TA100 suşu için de mutajenik bulunmuştur. 3-diaminobenzen ve 4-nitroanilin sadece S9 varlığında mutajenik aktivite göstermiştir. Nitrobenzen, 1,2-dinitrobenzen, anilin ve 2-nitroanilin her suş içinde negatif sonuç vermiştir. Sonuç olarak yapısında *meta*- veya *para*- grubu bulunanların mutajenik olduğu görülmüştür. Nitrobenzen ve anilin bileşiklerinin *orto* türevlerinin mutajenik olmadığı belirtilmiştir (Emmrich ve ark., 1997).

Antibakteriyel, antifungal, antiinflamatuar, analjezik ve antitümör etkileri bilinen ve bir ilaç öncül maddesi olarak sentezlenen 2-sübstitüe fenil benzotiyazolün BT-3, BT-10, BT-15, BT-18 ve BT-26 kodlarıyla isimlendirilen 5 türevinin çeşitli dozlarındaki olası mutajenik aktivitesi Ames testi ile araştırılmıştır. Test sonuçlarına göre fenil halkasına *orto* ve *para* konumunda nitro grubu bağlı BT-18 ve BT-26 kodlu benzotiyazol türevleri S9 varlığında ve yokluğunda mutajenik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Ayaz, 2001).

Benzalaseton (BZ) türevlerinin antimutajenik aktiviteleri; UV mutajeni uygulanarak *Escherichia coli* WP2s (*uvrA trpE*) testinde ve γ mutajeni uygulanarak Ames testinde *Salmonella typhimurium* TA2638 suşunda gerçekleştirilmiştir. Benzalacetone ve analogları, cinamaldehyde ve trans-1,1,1-trifloro-4-fenil-3-buten-2-on(TF) her iki formdaki mutajeni inhibe ettiği fakat methyl cinnamate, cinnamic asit ve cinnamamide bileşiklerinin mutajeniteyi inhibe edemediği tespit edilmiştir (Yamagami ve ark., 2002).

Perimidin türevlerinin (8 adet) mutajenik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları kullanılmıştır. Değerlendirme sonucunda test edilen maddeler toksik etkili bulunmuşlardır ve mutajenitelerinin toksisiteleri nedeniyle maskelenebildiği bildirilmiştir (Korkmaz, 2005).

Benzinidenilin türevlerinin (8 adet) mutajenik aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada, metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda Ames/*Salmonella*/Mikrozom testi uygulanmıştır. Deneyde *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda, test bileşiklerinin revertant koloni sayısında artışa neden olduğu saptanmış olup zayıf mutajenik olarak değerlendirilmiştir (Yüksel, 2005).

Memeliler için temel mikro besinlerden olan iz element Selenyum (Se)' un potansiyel bir toksisitesi olduğu bilinmektedir. Buna rağmen organoselenyum bileşiği diphenyl diselenide (DPDS), antioksidan ve nöroprotektif özellikler göstermiştir. Diğer yandan bu bileşiğin pro-oksidant ve mutajenik etkisi olduğu bilinmektedir. DPDS bileşiğinin yapısal analoğu olan 3'3-ditriflorometildifenil (DFDD) bileşiği farelerde antipsikotik aktiviteler göstermiştir. Yapılan çalışmada organoselenyum bileşiği DFDD bileşiğinin genotoksisitesi incelenmiştir. Sonuçlara göre DFDD bileşiği *Salmonella typhimurium* ve *Saccharomyces cerevisiae* suşlarında mutajenik bir aktivite göstermemiştir. Comet testi sonucunda ise V79 hücrelerinde 25 μM'dan yüksek dozlarında DNA hasarına yol açtığı gözlenmiştir. Sonuç olarak DFDD bileşiğinin mutajenik bir bileşik olmadığı fakat memeli hücrelerinde zayıf bir genotoksik etki yarattığı tespit edilmiştir (Henriques ve ark., 2009).

ONNO içerikli azometin ligandlarının ve metal komplekslerinin TA98 ve TA100 suşları ile çalışılan bileşiklerin test edildiği çalışmada muhtemel genotoksik bileşik olduğu bildirilmiştir (Kara ve ark., 2011).

9-Sübstitüye fenantren türevi 3 farklı ilaç ön maddesi sentezlenmiştir. Sentezlenen bu ön maddelerin Ames testi ile mutajenik aktivitelerine bakılmıştır. Ames testinde *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları kullanılmıştır. Araştırma, mikrozomal enzimler içeren S9 varlığında ve yokluğunda beş farklı doz ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda, S9 yokluğunda bileşiklerden sadece biri çerçeve kayması mutasyonuna, diğer iki tanesinin de baz çifti değişimi mutasyonuna sebep olduğu görüşmüştür. S9 varlığında yapılan deney sonuçlarında ise iki maddenin baz çifti değişimi mutasyonuna neden olurken, hiçbirinin çerçeve kayması mutasyonunu indüklemediği görülmüştür (Kutlu ve ark., 2011).

Yeni sentezlenen 1-etil-2,4,5-trifenil-1*H*-imidazol ve 6 farklı türevinin mutajenik aktiviteleri Ames test sistemi ile incelenmiştir. Çalışma *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları ile mikrozomal enzim içeren S9 varlığında ve yokluğunda gerçekleşmiştir.

Sonuç olarak test bileşiklerinin hiçbirinin mutajenik aktivite göstermediği tespit edilmiştir (Korkmaz ve Mercangöz, 2012).

Afrika tripanozomiyazı hastalığı parazitik bir insan hastalığıdır ve uyku hastalığı olarak bilinmektedir. Bu hastalık son derece ölümcül bir hastalık olmakla birlikte tedavisi uzun süre etkisini koruyamayan veya toksik ilaçlar ile olmaktadır. Bu nedenle yeni, güvenilir ve kolay uygulanabilir bir tedaviye ihtiyaç duyulmaktadır. Tinidazol gibi birçok nitroimidazoller, antibakteriyel ve antiprotozoal aktiviteye sahiptir fakat toksisitesi açısından kaygılar vardır. Feniksidazol kısa sürede etkili, güvenilir ve oral tedavide etkili akut ve kronik tripanozomiyazı tedavisinde kullanılabilir potansiyeline sahip olduğu düşüncesiyle genotoksisitesi araştırılmak istenmiştir. Yapılan çalışmada fenixidazole ve iki metaboliti; sülfoksit ve sülfon türevleri araştırılmıştır. Yapılan Ames testi sonucunda üç bileşik de mutajenik bulunmuştur. Feniksidazol ve türevlerinin düşük redoks potansiyeline sahip olduğu görülmüştür. Gerçekleştirilen *in vivo* ve *in vitro* genetik toksisite testlerinde negatif sonuca ulaşılmıştır. Buna bağlı olarak feniksidazol ve türevlerinin genetik toksisite açısından bir tehlike oluşturmadığı sonucuna varılmıştır (Tweats ve ark., 2012).

Saf olmayan yabancı maddeler, kullanılan herhangi bir ilacın ham maddesinde veya ilaç ürünlerinde bulunabilmektedir. Bu maddeler ilacın raf ömrü boyunca ham maddesin bozunmasına da yol açabilmektedir. Bu maddeler sigara bırakma yardım amacıyla veya antidepresan olarak kullanılan Bupropion ilacının içerisinde de 2-Bromo-3'-chloropropiophenone olarak bulunmaktadır. Çalışmada 2-bromo-3'-kloropropiyofenon bileşiğinin Ames testi ile mutajenitesine ve *in vitro* mikronukleus (MN) testi ile genotoksisitesine bakılmak istenmiştir. Ames testinde TA100 ve TA1535 suşları kullanılmıştır. Ames testi sonucunda 2-bromo-3'-kloropropiyofenon bileşiğinin mutajenik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. *In vitro* MN testinde ise MN frekansını arttırdığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlara bağlı olarak 2-bromo-3'-kloropropiyofenon bileşiğinin mutajenik ve genotoksik bir bileşik olduğuna karar verilmiştir (Chen ve ark., 2013).

Yapılan bir çalışmada imidazol[1,2-a]pridin türevlerinin (I-VIII) antimutajenik aktiviteleri araştırılmıştır. Çalışmada Ames test sistemi kullanılmıştır. Bileşiklerin antimutajenik aktiviteleri sodyum azid ve benzopiren mutajenlerine karşı belirlenmiştir. Toksik olmayan konsantrasyonlarda merkez imidazopyridin grubu VII ve VIII türevleri mutajenik aktivite göstermezken, terminal imidazopyridin ve I, II, III ve V türevleri mutajenik aktivite göstermiştir. IV, VII ve VIII türevleri mikrozomal enzimler içeren S9 varlığında sodyum azid ve benzopirene karşı güçlü antimutajenik aktivite göstermiştir. VII bileşiği aralarında en aktif antimutajen olarak belirlenmiştir (El-Sayed ve ark., 2013).

Sentezlenen β-aminoketon bileşiklerinin mutajenik ve antimutajenik aktiviteleri Ames/*Salmonella* ve *Escherichia coli* WP2 bakteriyal test sistemleri ile değerlendirilmiştir. Test bileşikleri *E.coli* WP2 *uvr*A ve *Salmonella typhimurium* TA1535 suşları üzerinde herhangi bir mutajenik aktivite göstermezken 3 farklı doz dışında antimutajenik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (Ozurkcan ve ark., 2013).

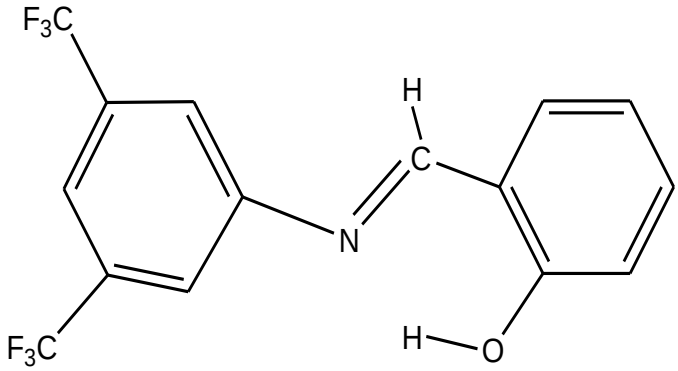
İnsan lösemi karsinojeni olarak bilinen 1,3-butadiene bileşiğinin iki ayrı alternatif metaboliti olan 1-kloro-2-hidroksi-3-buten (CHB) ve 1-kloro-3-buten-2-on (CHO) sitotoksisite, mutajenite ve genotoksisite açısından incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda CHB bileşiğinin CHO bileşiğinden 100 kat daha güçlü genotoksik olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda CHB direkt olarak DNA kırıklıklarına sebep olmazken, CHO bileşiğinin direkt olarak DNA kırıklıklarına neden olduğu görülmüştür. Ames testi sonucunda CHB bileşiğinin nokta mutasyonuna sebep olurken, çerçeve kayması mutasyonunu indüklemediği görülmüştür. Sonuçlar değerlendirildiğinde iki bileşiğinde mutajenite ve karsinojeniteye neden olabildiği tespit edilmiştir (Zhang ve ark., 2013).

BÖLÜM 3
MATERYAL VE YÖNTEM

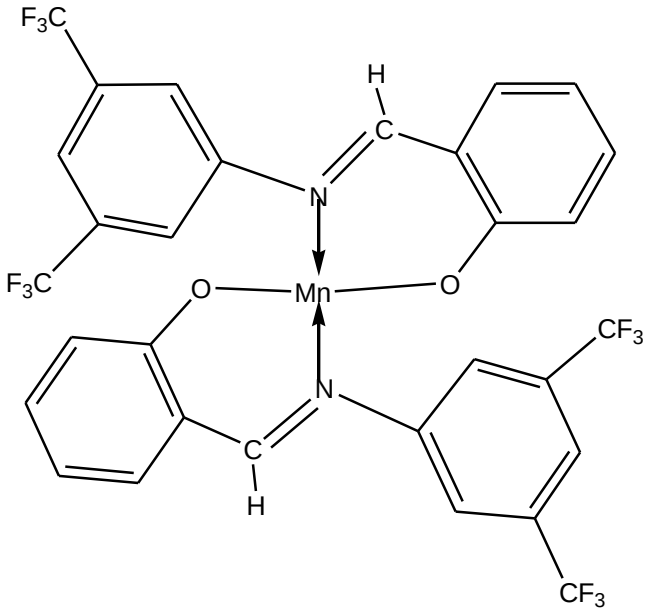
3.1. Materyal

3.1.1. Test edilen Schiff bazı ve kompleksleri

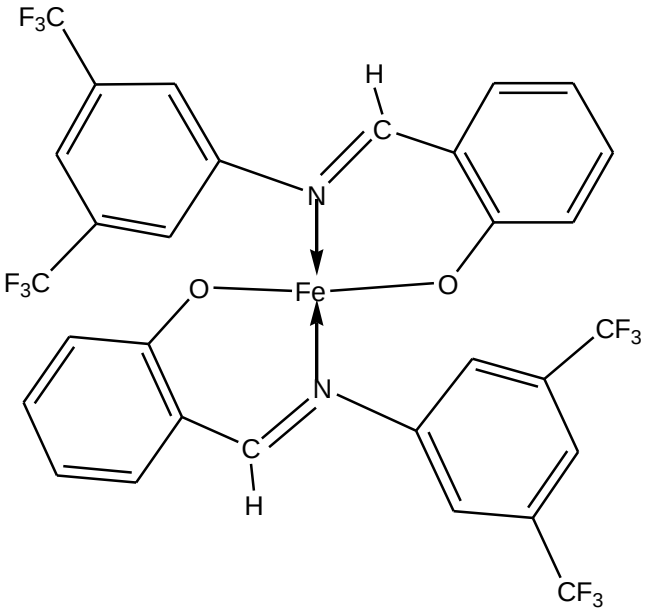
Çalışmalarda Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya bölümü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Mustafa Yıldız tarafından sentezlenen Schiff bazı ve kompleksleri kullanılmıştır (Karpuz, 2013). Kullanılan Schiff bazı ve komplekslerinin kimyasal yapıları Şekil 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 ve 3.5' de verilmiştir.



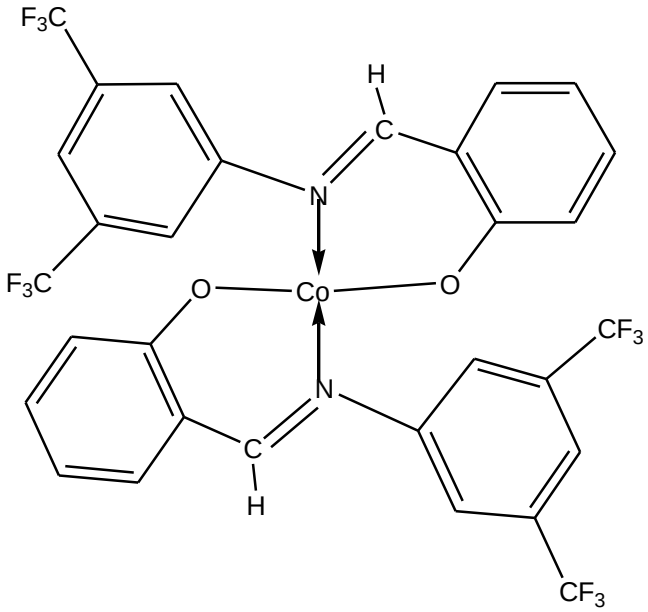
Şekil 3. 1. Schiff bazı ligandının kimyasal yapısı



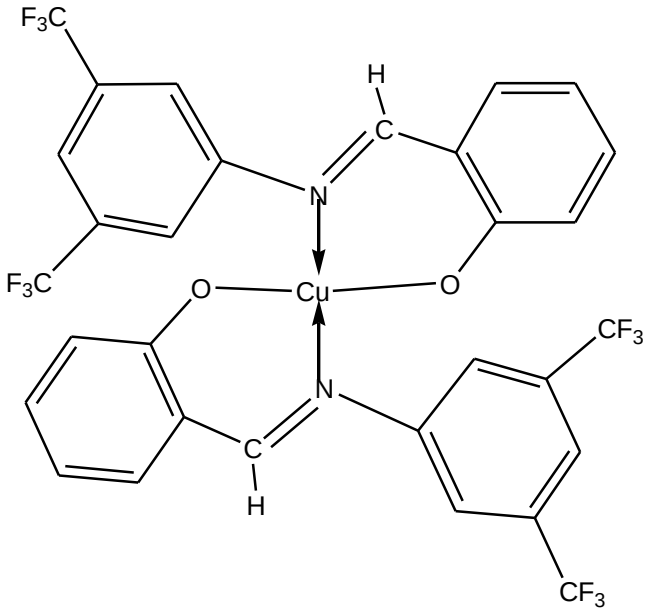
Şekil 3.2. Schiff bazı Mn kompleksinin kimyasal yapısı



Şekil 3.3. Schiff bazı Fe kompleksinin kimyasal yapısı



Şekil 3.4. Schiff bazı Co kompleksinin kimyasal yapısı



Şekil 3.5. Schiff bazı Cu kompleksinin kimyasal yapısı

3.1.2. Antimutajenite deneylerinde kullanılan test suşları

Antimutajenite deneylerinde Prof. Dr. Ames ve Dr. Maron tarafından *Salmonella typhimurium* bakterisinin *in vitro* mutasyonlar sonucu LT2 atasal suşundan elde edilen TA98 ve TA100 suşları kullanıldı. TA98 suşu çerçeve kayması mutasyonlarını, TA100 suşu ise baz çifti değişimi mutasyonlarını saptamak amacıyla kullanıldı (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000) (Çizelge 1). Suşlar, Prof. Dr. Hülya Sivas (Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü) tarafından hediye edildi.

Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılan *Salmonella typhimurium* suşlarının genetik özellikleri

Suşlar	**Histidin Mutasyonu**	**LPS**	**Onarım**	**R Faktörü**	**Mutasyonun Niteliği**	**Belirlenecek Bileşik Sınıfları**
TA98	*hisD3052*	*Rfa*	*ΔuvrB*	pKM101	CG yanından – 1	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA100	*hisG46*	*Rfa*	*ΔuvrB*	pKM101	AT→GC transisyon	Baz çifti değişimine neden olan mutajenler

*****LPS: Lipopolisakkarit, *Δ*: Delesyon

3.1.3. Antimutajenite deneylerinde kullanılan kimyasal maddeler

Schiff bazı ve komplekslerinin hazırlanmasında çözücü olarak dimetilsülfoksit (DMSO) kullanıldı ve Sigma Aldrich'den temin edildi. Antimutajenite deneylerinde standart mutajen olarak ve pozitif kontrollerde kullanılan 4-nitro-*o*-fenilendiamin (NPD) Sigma-Aldrich'den, sodyum azid (SA, NaN_3) ve 2-aminofloren (2AF) Merck'den satın alındı. Çalışmada potasyum fosfat (K_2HPO_4), sitrik asit monohidrat ($C_6H_8O_7.H_2O$), magnezyum sülfat heptahidrat ($MgSO_4.7H_2O$), sodyum dihidrojen fosfat monohidrat ($NaH_2PO_4.H_2O$), sodyum hidroksit (NaOH), disodyum hidrojen fosfat dihidrat ($Na_2HPO_4.2H_2O$), sodyum klorür (NaCl), magnezyum klorür hekzahidrat ($MgCl_2.6H_2O$) ve potasyum klorür (KCl) (Merck); nutrient broth (Oxoid) ve agar (Difco), L- histidin, D-biyotin, glukoz-6-fosfat, sodyum amonyum fosfat tetrahidrat ($NaHNH_4(PO_4.4H_2O)$), β-NADP ve sıçan karaciğeri S9 fraksiyonu Sigma–Aldrich' den temin edildi.

3.1.4. Antimutajenite deneylerinde kullanılan besiyerleri ve stok çözeltiler

Histidin/Biyotin (HB) Agar

Kullanımı: Histidin gereksinimi kontrolünde kullanıldı.

	500 mL için
Agar ……	7,5 g
Distile su ……..	420 mL
50X VB tuz çözeltisi ……...	10 mL
% 20 Glukoz çözeltisi ……...	50 mL
% 0,5 Histidin çözeltisi …….....	5 mL
0,5 mM Biyotin çözeltisi ……..	3 mL

Agar ve distile su karıştırılarak 121°C'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi. Steril edilen karışım 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra sırasıyla steril 50X VB tuz çözeltisi, glukoz ve histidin çözeltisi yavaşça eklendi. Eklenen çözeltilerin çözünmesi beklendikten sonra biyotin çözeltisi ilave edildi. Karışım distile su ile 500 mL'ye tamamlandıktan sonra her petriye 25 mL olacak şekilde paylaştırıldı.

Histidin/Biyotin/Ampisilin (HBA) Agar

Kullanımı**:** Test suşlarının ampisiline dirençlilik özelliklerinin kontrolünde ve master plakların hazırlanmasında kullanıldı.

	500 mL için
Agar …….....	7,5 g
Distile su …….	450 mL
50X VB tuz çözeltisi ……..	10 mL
% 20 Glukoz çözeltisi ……	50 mL
% 0,5 Histidin çözeltisi ……..	5 mL
0,5 mM Biyotin çözeltisi …….....	3 mL
(% 0,8/0,02 N NaOH) Ampisilin çözeltisi …….	1,575 mL

Agar ile su karıştırılarak 121°C'de 15 dk otoklavda steril edildi. Steril olan karışımın 50°C'ye kadar soğuması beklendikten sonra sırasıyla karışıma 50X VB tuz, glukoz ve histidin çözeltileri yavaşça eklendi. Eklenen çözeltilerin çözünmesi gerçekleştikten sonra biyotin çözeltisi ilave edildi. Bu plaklarda bakteriler 2 ay süreyle +4°C'de saklanabilmektedir.

Nutrient Agar (NA)

Kullanımı: Gecelik kültürün mL'sindeki bakteri sayısının bulunmasında ve genotip kontrolü (UV ve kristal viyole hassasiyeti) için kullanıldı.

	500 mL için
Nutrient broth (Oxoid, No:2) ……...	12,5 g
Agar ……	7,5 g
Distile su ……	500 mL

Nutrient broth ve distile su karıştırılarak 121°C'de 15 dk süreyle otoklavda steril edildi. Steril hale gelen karışımın soğuması beklendi daha sonra her petriye 25 mL olacak şekilde paylaştırıldı.

Minimal Glukoz Agar (MGA)

Kullanımı: Antimutajenite deneylerinde ve histidin gereksinimi kontrolünde kullanıldı.

	1000 mL için
Agar ……	15 g
Distile su ……	830 mL
50X VB tuz çözeltisi ……...	20 mL
% 20 Glukoz çözeltisi …….	100 mL

Agar ile distile su karıştırılarak 121 °C'de 15 dk süreyle otoklavda steril edildi. Karışım steril edildikten sonra 50X VB tuz çözeltisi eklendi ve çözünmesi beklendi. Sonra steril glukoz çözeltisi ilave edildi. Karışım, distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı. Sıcaklık olarak 40-45 °C'ye ulaşan besiyeri her petriye 25 mL olacak şekilde paylaştırıldı.

Top (Üst) Agar

Kullanımı: Antimutajenite deneylerinde kullanıldı.

	1000 mL için
Agar (Difco) …….	6 g
Sodyum klorür (NaCl) …….	5 g
Distile su ……..1000 mL	

Distile su içerisine agar ve NaCl eklendi. Isıtıcılı manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünen karışım her tüpe 2 mL olacak şekilde aktarıldı. Tüpler içerisindeki agar 121 °C'de 15 dk süre ile otoklavda steril edildi. Otoklavdan steril halde alınan tüpler 42 °C olan su banyosuna alındı.

Nutrient Broth (NB)

Kullanımı: Gecelik kültürde test suşlarının üretimi için kullanıldı.

	200 mL için
Nutrient broth (Oxoid, No:2) …….....	5 g
Distile su ……	200 mL

Distile su içerisine nutrient broth eklenerek çözünmesi sağlandı. Çözünen karışım 50 mL olan erlenlere 20'şer mL olacak şekilde paylaştırıldı. Hazırlanan sıvı besiyerleri, 121

°C'de 15 dk süreyle otoklavda steril hale getirildi. Besiyeri +4 °C'de muhafaza edildi.

Vogel-Bonner E ortamı (50X VB tuz çözeltisi)

Kulllanımı: Minimal glukoz agar (MGA), histidin/biyotin (HB) ve histidin/biyotin/ampisilin (HBA) agar plaklarının hazırlanmasında kullanıldı.

	1000 mL için
Distile su (45 ºC) …….	670 mL
Magnezyum sülfat heptahidrat ($MgSO_4.7H_2O$)	10 g
Sitrik asit monohidrat ……..	100 g
Potasyum fosfat (K_2HPO_4) …….	500 g
Sodyum amonyum fosfat tetrahidrat ($NaNH_4HPO_4.4H_2O$) ..	175 g

Ilık distile suya kimyasallar sırasıyla eklendi. Her biri çözündükten sonra çözelti distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı. Daha sonra 121 °C'de 15 dk süreyle otoklavda steril hale gelen çözelti oda sıcaklığında saklandı.

% 20 Glukoz Çözeltisi

Kullanımı: MGA, HBA ve HB plaklarının hazırlanmasında karbon kaynağı olarak kullanıldı.

	100 mL için
Glukoz ……	20 g
Distile su ……..…	100 mL

Isıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerinde distile suya glukoz ilave edildi ve tamamen çözünmesi sağlandı. Otoklavda 121°C'de 15 dk süreyle steril edildikten sonra +4 °C'de saklandı.

% 0,5 Histidin Çözeltisi

Kullanımı: HBA ve HB plaklarının hazırlanmasında kullanıldı.

	100 mL için
L-Histidin ……	0.5 g
Distile su …….	100 mL

Isıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerinde distile su içerisine histidin eklendi ve tamamen çözünmesi sağlandı. Çözünen karışım 0.22 µm çaplı membran filtre ile steril edildi. Karışım +4 °C'de muhafaza edildi.

0,5 mM Biyotin Çözeltisi

Kullanımı: HBA ve HB plaklarının hazırlanmasında kullanıldı.

	100 mL için
D-Biyotin (MA 244,3 g/mol) ……..……	0,01 g
Distile su …….	100 mL

Isıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerinde ısıtılan distile su içerisine biyotin ilave edildi ve tamamen çözünmesi sağlandı. Çözünen karışım 0.22 µm çaplı membran filtre ile steril edildi. Karışım +4°C'de muhafaza edildi.

0,02 N NaOH Çözeltisi

Kullanımı: Ampisilin çözeltisinin hazırlanmasında kullanıldı.

	100 mL için
Sodyum hidroksit (NaOH) (MA 40 g/mol) …….....	0,08 g
Distile su …….	100 mL

Distile su içerisinde NaOH çözünmesi sağlandı ve karışım 100 mL'ye tamamlandı.

(% 0,8/0,02 N NaOH) Ampisilin Çözeltisi

Kullanımı: pKM101 plazmidi taşıyan suşların kontrolünde ve HBA (master) plaklarının hazırlanmasında kullanıldı.

	100 mL için
Ampisilin trihidrat …….	0,8 g
0,02 N NaOH ……	100 mL

0.02 N NaOH içerisinde ampisilin trihidrat çözdürüldükten sonra 0.22 µm çaplı membran filtre ile steril edildi. Karışım +4°C'de muhafaza edildi.

0,5 mM Histidin/Biyotin Çözeltisi

Kullanımı: Antimutajenite deneylerinde top agara ilave edilerek kullanıldı.

	500 mL için
D-Biyotin (MA 244,3 g/mol) …….……	0,062 g
L-Histidin.HCl (MA 191,7 g/mol) …….……	0,048 g
Distile su …….....	500 mL

Isıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerindeki distile suya biyotin ilave edildi ve tamamen çözündükten sonra histidin eklendi. Çözünen karışım 0.22 µm çaplı membran filtre ile steril edildi. Karışım +4°C'de muhafaza edildi.

% 0,1 Kristal Viyole Çözeltisi

Kullanımı: *rfa* mutasyonu kontrolünde kullanıldı.

	100 mL için
Kristal viyole ……..	0,1 g
Distile su ……	100 mL

Distile su ile kristal viyole karıştırıldı. Cam şişe içerisinde karanlıkta ve +4°C'de saklandı.

% 0,9 Tuz çözeltisi (Serum Fizyolojik)

Kullanımı: Bakteri kültürlerinin seyreltilmesinde kullanıldı.

	500 mL için
NaCl ……	4,5 g
Distile su …….	500 mL

Hazırlanan çözelti 121°C'de 15 dk süreyle otoklavda steril edildi.

0,1 µg/µL 4-Nitro-*o*-fenilendiamin (NPD)

Kullanımı: S9 yokluğunda antimutajenite deneylerinde direkt mutajen olarak ve TA98 suşu için pozitif kontrol olarak kullanıldı.

	10 mL için
NPD ……	1 mg
Dimetilsülfoksit (DMSO) ……..	10 mL

DMSO içersinde NPD çözdürüldü ve 0.22 µm çaplı membran filtre ile steril edildi.

Deneylerde 10 µg/plak olacak şekilde kullanıldı. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

0,01 µg/µL Sodyum Azid (SA)

Kullanımı: S9 yokluğunda antimutajenite deneylerinde direkt mutajen olarak ve TA100 suşu için pozitif kontrol olarak kullanıldı.

	10 mL için
SA (NaN_3)	0,1 mg
Distile su	10 mL

Distile su içerisinde NaN_3çözdürüldü ve 0.22 µm çaplı membran filtre ile steril edildi. Deneylerde 1 µg/plak olacak şekilde kullanıldı. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

0,05 µg/µL 2-Aminofloren (2AF)

Kullanımı: S9 varlığında antimutajenite deneylerinde indirekt mutajen olarak ve her iki suş için pozitif kontrol olarak kullanıldı.

	10 mL için
2AF	0,5 mg
DMSO	10 mL

DMSO içerisinde 2AF çözdürüldü ve 0.22 µm çaplı membran filtre ile steril edildi. Deneylerde 5 µg/plak olacak şekilde kullanıldı. Oda sıcaklığında saklandı.

0,2 M Sodyum-Fosfat Tamponu (pH=7,4)

Kullanımı: S9 karışımında kullanılmak üzere ve S9 yokluğunda gerçekleşen deneylerde top agara ilave edilerek kullanıldı.

	250 mL için
0,2 M Sodyum dihidrojen fosfat monohidrat ($NaH_2PO_4.H_2O$)	30 mL
(6,9 g/250 mL) (MA 137,99 g/mol)	
0,2 M Disodyum hidrojen fosfat dihidrat ($Na_2HPO_4.2H_2O$)	220 mL
(8,9 g/250 mL) (MA 177,99 g/mol)	

0.2 M'lık her iki karışım ayrı ayrı hazırlandı ve cam bir şişede karıştırıldı. pH değeri 7,4'e ayarlandıktan sonra 121°C'de 15 dk süreyle steril edildi.

0,1 M β-NADP Çözeltisi

Kullanımı: S9 karışımında kullanılmak üzere hazırlandı.

	5 mL için
β-NADP (MA 765,4 g/mol) ……..…….	0,383 g
Steril distile su …….	5 mL

Steril distile su içerisinde β-NADP çözdürüldü ve 0.22 µm çaplı membran filtre ile steril edildi.

1 M Glukoz-6-Fosfat Çözeltisi

Kullanımı: S9 karışımında kullanılmak üzere hazırlandı.

	5 mL için
Glukoz-6-fosfat (MA 260,13 g/mol) ……..….	1,3 g
Steril distile su ……..	5 mL

Steril distile su içerisinde glukoz-6-fosfat çözüdürüldü ve 0.22 µm çaplı membran filtre ile steril edildi.

Tuz Çözeltisi (0,4 M $MgCl_2$+1,65 M KCl)

Kullanımı: S9 karışımında kullanılmak üzere hazırlandı.

	50 mL için
Magnezyum klorür hekzahidrat .....……	4,07 g
($MgCl_2.6H_2O$) (MA 203,3 g/mol)	
Potasyum klorür (KCl) (MA 74,55 g/mol) ……...	6,15 g
Distile su ……	50 mL

Distile su içerisinde sırasıyla $MgCl_2$ ve KCl tuzları çözüdürüldü. Karışım otoklavda 121°C'de 15 dk süreyle steril edildi.

S9 Karışımı (Sıçan Karaciğeri Mikrozomal Enzimleri + Kofaktörleri)

Kullanımı: Antimutajenite deneylerinde metabolik aktivasyon amacıyla kullanıldı.

	50 mL için
Steril distile su ……..	19,75 mL

0,2 M Sodyum-fosfat tamponu (pH=7,4) ……. 25 mL

0,1 M β-NADP çözeltisi …… 2 mL

1 M Glukoz-6-fosfat çözeltisi …….. 0,25 mL

$MgCl_2$-KCl tuz çözeltisi ……... 1 mL

Sıçan karaciğeri S9 fraksiyonu ……. 2 mL

Deneyden hemen önce taze olarak hazırlanan karışımda öncelikle distile su içerisine tampon eklendi. Daha sonra diğer çözeltiler sırasıyla ilave edildi. En son S9 fraksiyonu karışıma eklendi. Bu işlemlerin hepsi buz içerisinde steril bir kapta gerçekleşti ve karışım deney boyunca buz kalıpları içerisinde tutuldu.

3.2. Yöntem

Bu çalışmada kullanılan *Salmonella typhimurium* bakterisinin TA98 ve TA100 suşlarının stok kültür ve master plaklarının hazırlanması, bakterilerin genetik özelliklerinin kontrol edilmesi ve antimutajenite deneyleri Maron ve Ames (1983)'in geliştirdiği plak inkorporasyon metoduna uygun olarak gerçekleştirildi.

3.2.1. Schiff bazı ve kompleksleri solüsyonlarının hazırlanması

Bu çalışmada antimutajenik aktivitelerini ve antimikrobiyal aktivitelerini değerlendirmek üzere sentezlenen Schiff bazı ve kompleksleri kullanıldı. Schiff bazı ve komplekslerinin hazırlanmasında çözücü olarak DMSO kullanıldı. Test bileşenlerinin 500 ppm'lik konsantrasyonu antimutajenite deneyleri ile birlikte antimikrobiyal aktivite deneylerinde kullanıldı. 500 ppm'lik konsantrasyon için; 0.005 g Schiff bazı ve kompleksleri, 10 mL DMSO içerisinde çözdürüldü. Hazırlanan 500 ppm'lik çözeltilerden Ames testi için seyreltme yapılarak 50, 5 ve 0.5 ppm'lik stok solüsyonları hazırlandı.

3.2.2. Test Suşlarının genetik özelliklerinin kontrol edilmesi

Yapılan deneyin güvenilirliği açısından test suşlarının orjinal mutasyonlara sahip olup olmadığını kontrol etmek gerekmektedir. Bu nedenle bu çalışmada bakterilerin genetik özellikleri aşağıda belirtilen testlerle kontrol edildi.

3.2.2.1. Histidin gereksinimi

Minimal glukoz agar (MGA), histidin ve biyotin içermemesi nedeniyle kontrol plağı olarak kullanıldı. Bakteriler bu agar üzerine ekildiklerinde histidin oksotrofu (his^-) bakteriler his^+ bakterilerden ayırt edilir. Histidin sentezleme yeteneğini kaybetmiş mutant suşlar MGA plaklarında üreyemezken, HB agar plaklarında üreyebilmektedirler (Ames ve

ark., 1973). Buna bağlı olaran bir gece nutrient broth (NB)'da taze kültür üretildi ve HB agar ve MGA plaklarına çizgi ekim yapıldı. Ekim yapılan plaklar 37°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakıldı.

3.2.2.2. *rfa* Mutasyon kontrolü

rfa Mutasyonu, hücre yüzeyini saran lipopolisakkarit tabakasını zayıflatarak büyük moleküllerin hücre içerisine girmesini sağlayan mutasyondur. Çalışmada kullanılan test suşlarının *rfa* Mutasyonuna sahip olup olmadıkları ise kristal viyole hassasiyeti testi ile belirlendi. Mutasyon kontrolü için gecelik kültürden 100 µL bakteri alındı ve nutrient agar (NA) plaklarına ekildi. 0.5 cm çapına sahip olan steril disk plağın ortasına yerleştirildi ve üzerine % 0,1'lik kristal viyole çözeltisinden 10 µL alınıp diske emdirildi. Plaklar 37 ºC'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında disklerin çevresinde şeffaf bir zon gözlendi. Yaklaşık 14 mm olarak gözlenen zon inhibisyon zonudur ve hücre duvarından geçemeyecek büyük boya moleküllerinin *rfa* taşıyan bakteri hücresine girerek oluşan zondur. Bu mutasyonun varlığını kanıtlamaktadır (Ames ve ark., 1973).

3.2.2.3. *uvrB* Mutasyon kontrolü

uvrB Mutasyonu, bakterilerin ultra viyole (UV) ışınlarının sebep olduğu replikasyon hatalarının düzeltilmesi için gerekli olan DNA onarım mekanizmasını engellemektedir. Test suşlarının uvrB mutasyonuna sahip olup olmadıkları UV ışınlarına duyarlılık testi ile tanımlanmaktadır. Tanımlamak için NA plağına paralel çizgi şeklinde ekim yapıldı. Petrinin yarısı çizgileri kesecek şekilde plastik bir tabaka ile kapatıldı. Plaklar, 30 watt'lık germisidal UV lambası ile 33 cm yükseklikten 8 sn ışınlara maruz bırakıldı ve 37 ºC'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucu plağın yarısında (UV ışını almayan kısım) üreme görüldüğünde test suşlarının *uvrB* delesyonu taşıdıkları belirlenmektedir (Ames ve ark., 1973).

3.2.2.4. R Faktörü kontrolü

Ampisilin direnç faktörü (R faktörü) içeren pKM101 plazmidinin varlığının kontrolü için test suşları HBA plaklarına ekildi. 37 ºC'de 24 saat inkübasyon sonucunda HBA plaklarında üreyen suşlar pKM101 plazmidi taşıyan suşlardır (Ames ve ark., 1973).

3.2.3. Test suşlarının master plaklarının hazırlanması

HBA plaklarına bakteri kültürlerinden çizgi ekim yapıldı. Ekim yapılan plaklar 37 ºC'de 48 saat inkübe edildi. Süre sonunda normal büyüklükte ve iyi izole olmuş bir koloni seçildi. Seçilen koloni öze ile alınarak 6,3 µL ampisilin çözeltisi içeren 2 mL NB ortamına ekildi ve 37 ºC'de 12 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında hazır olan taze

kültürden HBA plaklarına ekim yapıldı ve 37 ºC'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda elde edilen master plaklar +4 ºC'de muhafaza edildi

3.2.4. Test suşlarının uzun süre saklanması ve stok kültürlerinin açılması

Genetik kontrolü yapılarak HBA plaklarına ekilmiş suşlardan normal büyüklüğe sahip olan ve iyi izole olmuş bir koloni seçildi. 6,3 µL ampisilin çözeltisi içeren 2 mL NB içerisine ekildi ve 37 ºC'de 12 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında steril ependorf tüplerine 0,1 mL DMSO ve 0,9 mL bakteri kültürü eklendi. Tüpler sıvı azotta bekletildikten sonra -80 ºC'de muhafaza edildi.

Stok kültürlerinin açılması için, -80 ºC'de tutulan bakteri kültürü alındı ve oda sıcaklığında eritildi. Öze yardımı ile ampisilin içeren NB ortamına edilen bakteriler 37 ºC'de 12 saat inkübe edildi. Süre sonunda alınan bakterilerin HBA plaklarına paralel ekimleri yapıldıktan sonra 37 ºC'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda normal büyüklükte ve iyi izole olmuş bir koloni seçilerek gecelik kültür hazırlandı. Hazırlanan gecelik kültür 37 ºC'de 12 saat inkübe edildikten sonra tekrar HBA plaklarına ekim yapıldı.

3.2.5. Test suşlarının gecelik kültürlerinin hazılanması

Gecelik kültürler, önceden hazırlanmış olan master plaklardan ya da -80 ºC'de saklanan stok kültürlerin açılması ile elde edildi. HBA plaklarından normal büyüklükte ve iyi izole olmuş bir koloni seçilerek 63 µL ampisilin içeren 20 mL NB ortamına ekildi ve 37 ºC'de 16 saat inkübe edildi. Hazırlanan gecelik kültürden 0,5 mL alınarak taze ortama aktarıldı ve 37 ºC'de 6 saat inkübasyona bırakıldı (Akın, 2010). Çalışmada, yaklaşık 1-2x10^9 koloni oluşturan birim (kob)/mL yoğunluğa sahip bakteri kültürleri kullanıldı.

3.2.6. Sıvı kültürün mL'sindeki bakteri sayısının belirlenmesi

Antimutajenite deneylerinde kullanılan test suşlarının sıvı kültürlerinin mL'sinde bulunan bakteri miktarı, spektrofotometre (OD_{540} ~ 0,1-0,2) ve buna paralel olarak yapılan ekimler ile belirlendi. Bakteri yoğunluğunun seyreltilmesi için % 0,9 serum fizyolojik (10^{-1}-10^{-7}arasında) kullanıldı. Her seyreltmeden 0,1 mL alınıp 43 ºC'de tutulan 2 mL top agara ilave edildi. Yavaşça karıştırıldıktan sonra NA plaklarına döküldü. NA plakları 37 ºC'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında koloniler sayıldı ve aşağıdaki formüle göre mL'deki canlı bakteri sayısı saptandı.

Canlı hücre sayısı (kob/mL) = sulandırma faktörü x plaktaki koloni sayısı x 10

3.2.7. Schiff bazlarının sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

Antimutajenite deneylerinde kullanılmadan önce ligand ve komplekslerinin test mikroorganizmaları üzerine olan sitotoksik etkilerinin belirlenmesi gerekmektedir. Test bileşiklerinin deneyde uygulanabilecek en uygun konsantrasyonların belirlenmesi amacıyla sitotoksik etki belirleme deneyleri yapıldı. Sitotoksik dozun saptanması için 4 farklı konsantrasyon belirlendikten sonra (500 ppm, 50 ppm, 5 ppm, 0,5 ppm) deneyde kullanılacak olanları mutant suşlar üzerinde denendi. Geri dönen koloni sayıları belirlenerek spontan kontroldeki koloni sayıları ile karşılaştırıldı ve denenen konsantrasyonların sitotoksik etkiye sahip olup olmadığı belirlendi (Dean ve ark., 1985).

3.2.8. Antimutajenite çalışmaları

Sentezlenen Schiff bazı ve komplekslerinin potansiyel antimutajenik aktiviteleri, standart plak inkorporasyon metoduna dayalı Ames test sistemi ile gerçekleşti. Antimutajenite deneylerinde Schiff bazı ve komplekslerinin belirlenen 4 farklı konsantrasyonu (500 ppm, 50 ppm, 5 ppm, 0,5 ppm) kullanıldı. Deneylerde *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları kullanıldı. Schiff bazı ve komplekslerinin çerçeve kayması ve baz çifti değişimine neden olan kimyasallara karşı inhibe edici aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla yapılan deneyler metabolik aktivasyon varlığında (S9+) ve metabolik aktivasyon yokluğunda (S9-) gerçekleşti.

Deney esnasında 42 ºC'de tutulan HB çözeltisi içeren top agar içerisine sırasıyla 500 µL sodyum-fosfat tamponu ya da S9 karışımı, 100 µL test edilen bileşik (DMSO içerisinde çözünmüş Schiff bazı veya kompleksi), 100 µL standart mutajen ve 100 µL bakteri kültürü eklenip MGA plaklarına döküldü ve homojen dağılımı sağlandı. Donması sağlandıktan sonra MGA plakları 37 ºC'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda his^+ (geri dönen bakteri kolonileri) sayıldı.

Test edilen Schiff bazı ve komplekslerinin her bir konsantrasyonu üç ayrı plağa ekildi ve çalışmalar birbirinden bağımsız bir şekilde gerçekleşti. Deneylere paralel olarak pozitif, negatif ve spontan kontroller yapıldı.

3.2.9. Pozitif kontrol

Antimutajenite deneylerinde standart mutajen olarak metabolik aktivasyon yokluğunda (S9-) *S. typhimurium* TA98 suşu için 4-nitro-*o*-fenilendiamin (NPD) ve TA100 suşu için sodyum azid [SA, (NaN_3)] kullanıldı. Metabolik aktivasyon varlığında (S9+) gerçekleşen deneylerde her iki suş için aynı olan mutajen 2- aminofloren (2AF) pozitif kontrol ve standart mutajen olarak kullanıldı. Deneylerde NPD 10 µg/plak,

SA 1 µg/plak ve 2AF 5 µg/plak olacak şekilde kullanıldı.

Deneylerde gerçekleşen ekimlerde pozitif kontrol için 42 ºC'de tutulan HB çözeltisi içeren top agar içerisine sırasıyla 500 µL sodyum-fosfat tamponu ya da S9 karışımı, 100 µL standart mutajen ve 100 µL bakteri kültürü eklendi ve MGA plaklarına döküldü ve homojen dağılımı sağlandı. Donması sağlandıktan sonra MGA plakları 37 ºC'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda his^+(geri dönen bakteri kolonileri) sayıldı.

3.2.10. Negatif kontrol

Antimutajenite deneylerinde kullanılan standart mutajenleri ve test edilen Schiff bazı ve komplekslerini çözmek amacıyla dimetilsülfoksit (DMSO) kullanıldı. Kullanılan DMSO'nun geriye dönen bakteri sayısının üzerinde bir etkisi olup olmadığını belirlemek amacıyla negatif kontrol yapıldı.

Deneylerde negatif kontrol için 42 ºC'de tutulan HB çözeltisi içeren top agar içerisine sırasıyla 500 µL sodyum-fosfat tamponu ya da S9 karışımı,100 µL DMSO ve 100 µL bakteri kültürü eklendi ve MGA plaklarına döküldü ve homojen dağılımı sağlandı. Donması sağlandıktan sonra MGA plakları 37 ºC'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda his^+(geri dönen bakteri kolonileri) sayıldı.

3.2.11. Spontan kontrol

Histidin oksotrofu olan ve deneylerde kullanılan *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları kendiliğinden (spontan) his^+ duruma gelebilmektedir. Geri dönenler TA98 suşu için 20-50 revertant/plak, TA100 suşu için 75-200 revertant/plak'tır (Mortelmans ve Zeiger, 2000).

Deneylerde spontan kontrol için, 42 ºC'de tutulan HB çözeltisi içeren top agar içerisine sırasıyla 500 µL sodyum-fosfat tamponu ya da S9 karışımı ve 100 µL bakteri kültürü eklendi ve MGA plaklarına döküldü ve homojen dağılımı sağlandı. Donması sağlandıktan sonra MGA plakları 37 ºC'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda his^+ (geri dönen bakteri kolonileri) sayıldı.

3.2.12. Sonuçların değerlendirilmesi

Deneyde test edilen Schiff bazı ve komplekslerinin antimutajenik aktivitesi inhibisyon oranı (mutajen aktivitesini engelleyici etkisi) belirlenerek ölçüldü. İnhibisyon oranı % 25'in altında olan değerler için test bileşiğinin antimutajenik aktivite göstermediği tespit edidi. İnhibisyon oranı % 25-40 arasında olan test bileşikleri için orta dereceli, % 40'tan yüksek olan değerler için test bileşiğinin güçlü antimutajenik aktivite gösterdiği

tanımlandı (Ikken ve ark., 1999; Negi ve ark., 2003).

Test edilen bileşiklerin inhibisyon oranları Hong ve Lyu (2011)'nun belirlediği formüle göre hesaplanmıştır.

İnhibisyon Oranı (%) = $\frac{A-B}{A-C}$ X 100

A: Pozitif kontrolde (sadece mutajen varlığında) geri dönen koloni sayısı/plak

B: Test edilen bileşik ve mutajen varlığında geri dönen koloni sayısı/plak

C: Spontan koloni sayısı/plak

Çalışma sonunda elde edilen verilerin ortalamaları alınarak standart sapmaları hesaplanmıştır.

3.2.13. Antimikrobiyal Aktivite

Sentezlenen Schiff bazı ve komplekslerinin antimikrobiyal aktivitelerini değerlendirmek amacıyla gram pozitif bakteri olan, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Bacillus cereus* (NRLL B-3008), *Bacillus subtilis* (ATCC 29213) ve gram negatif bakteriler *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aerouginosa* (ATCC 27853), *Proteus vulgaris* (NRRL B-123) bakterileri kullanıldı. Aktivite aynı zamanda *Candida albicans* (ATCG 60193) ve *Candida tropicalis* (ATCC 13803) mayalarına karşı değerlendirildi. Bakteriler ve mayalar, Prof. Dr. Kıymet GÜVEN (Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü) tarafından hediye edildi.

Çalışma, Clinical Laboratory Standarts Institute (CLSI)'de gösterilen prosedüre uygun olarak mikrodilüsyon metodu ile gerçekleştirildi (Isenberg, 1998). Test edilen bileşiklerin mikrobiyal aktivite gösterdiği en düşük konsantrasyon (MIC) değeri olarak belirlendi. Antimikrobiyal aktivite tayin deneyleri 3 tekrarlı olarak gerçekleşti.

3.2.13.1. Mikroorganizmaların Canlandırılması

-20°C'de muhafaza edilen kültürler oda sıcaklığına getirildikten sonra sıvı ya da katı besiyerine ekildi. 37 °C 'de inkübasyona bırakıldı.

3.2.13.2. 0.5 McFarlandTurbidity Standart Hazırlanması

Bakteri konsantrasyonu için hazırlandı.

	100 mL için
Baryum Klorür ($BaCl_2$) (% 1.175).....	0.5 mL
Sülfirik Asit (H_2SO_4) (0.36N).....	99.5 mL

$BaCl_2$ ve H_2SO_4 homojen olana kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Hazırlanan karışım spektrofotometrede 625 nm'de okutuldu. Kabul edilebilir aralık 0.08-0.10 O.D.'dir. Optik dansitesi ayarlanan çözelti tüplere dağıtıldı ve parafilm ile kapatıldı.

3.2.13.3. Broth Mikrodilüsyon Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

- İnokulumun Hazırlanması

Direkt Koloni Süspansiyonu: Normal büyüklükte ve iyi izole olmuş bir koloni seçildi. Seçilen koloni öze yardımıyla sıvı besiyerine veya serum fizyolojik tuzlu suyuna su içerisine alındı. 0.5 McFarland standartına eşit olacak şekilde yoğunluğu ayarlandı.

Minimim İnhibisyon Konsantrasyon Testi (MIC Testi)

Bu test için 96 U şeklinde kuyucuklu steril mikropleytler kullanıldı. Schiff bazı ve komplekslerinin 500 ppm'lik konsantrasyonları hazırlanırken çözücü olarak DMSO kullanıldı. Test esnasında test bileşiklerinin seri seyreltmeleri gerçekleştirildi.

Petride üretilmiş olan kolonilerden benzer morfolojik olanlar seçildi. İnokulum süspansiyonu için direkt koloni süspansiyonu veya log fazı büyüme metodu kullanıldı. Hazırlanan süspansiyonun yoğunluğu 1-2 x 10^8 CFU/mLD'dir. İnokulum 0.5 McFarlanda ayarlandıktan sonra süspansiyon karıştırıldı. Orijinal süspansiyondan 2 mL alındıktan sonra 38 mL serum fizyolojiğe eklendi (1:20 dilüsyon). Pipetle her bir kuyucuğa 0.01 mL koyuldu.Her bir kuyucuğa 100 µL Müller Hinton Broth besiyeri eklendi. Mikropleytlerdeki ilk kuyucuklara 100 µL test edilecek Schiff bazı eklendi. Besiyeri ile karıştırıldıktan sonra 100 µL geri çekildi ve bu şekilde test bileşiklerinin seri dilüsyonları yapıldı. En son basamakta 10. kuyucukta fazla olan kısım atıldı. 12. kuyucuk hariç her bir kuyucuğa inokulum süspansiyonu ilave edildi. 11. Kuyucuk Pozitif kontrol (Gentamicin), 12. Kuyucuk ise çözücü kontrol (DMSO) için kullanıldı. Kapağı kapatılarak 24 saat 37 °C inkübasyona bırakıldı.

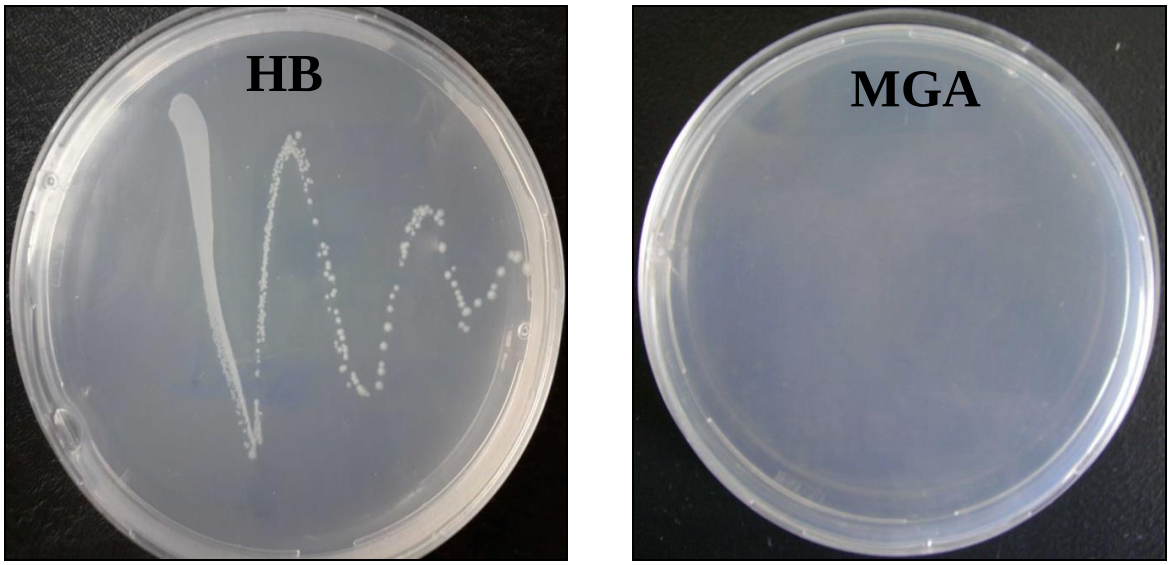
BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Test Suşlarının Genetik Özelliklerinin Kontrolü

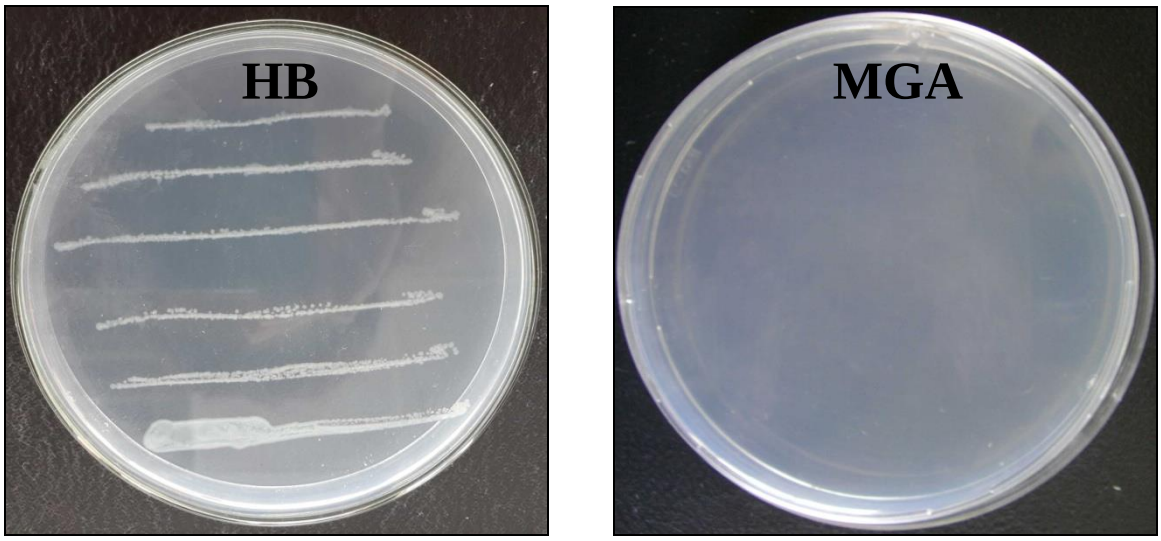
Kullanılan bakteri suşlarının orijinal genetik özelliklere sahip olup olmadığı her aşamada kontrol edildi. Kontrol sonrasında kullanılan *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının antimutajenite çalışmaları için uygun olduğu tespit edildi.

4.1.1. Histidin gereksinimi

Deneylerde kullanılan *S.typhimurium* TA98 ve TA100 suşları, HB agar ve içerisinde bir miktar biyotin bulunan MGA plaklarına ekildi. İnkübasyon sonrasında HB plaklarında üreme gözlenirken, histidin içermeyen MGA plaklarında üreme gözlenmedi. Bu durum suşların his^- özellikte olduğunu kanıtladı (Şekil 4.1 ve 4.2).



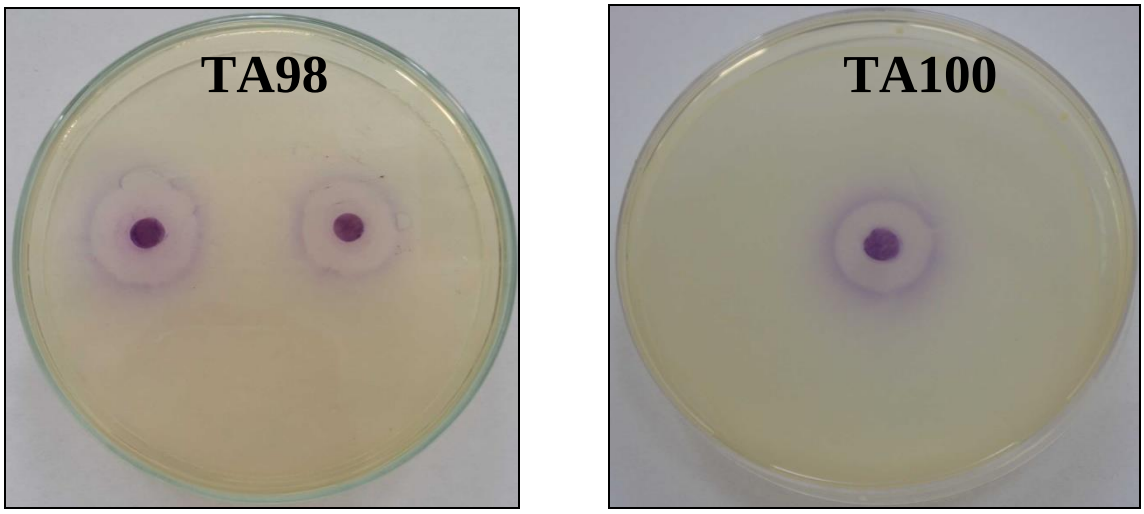
Şekil 4.1. *S. typhimurium* TA98 suşunun HB ve MGA plaklarında üreme durumu



Şekil 4.2. *S. typhimurium* TA100 suşunun HB ve MGA plaklarda üreme durumu

4.1.2. *rfa* Mutasyonu

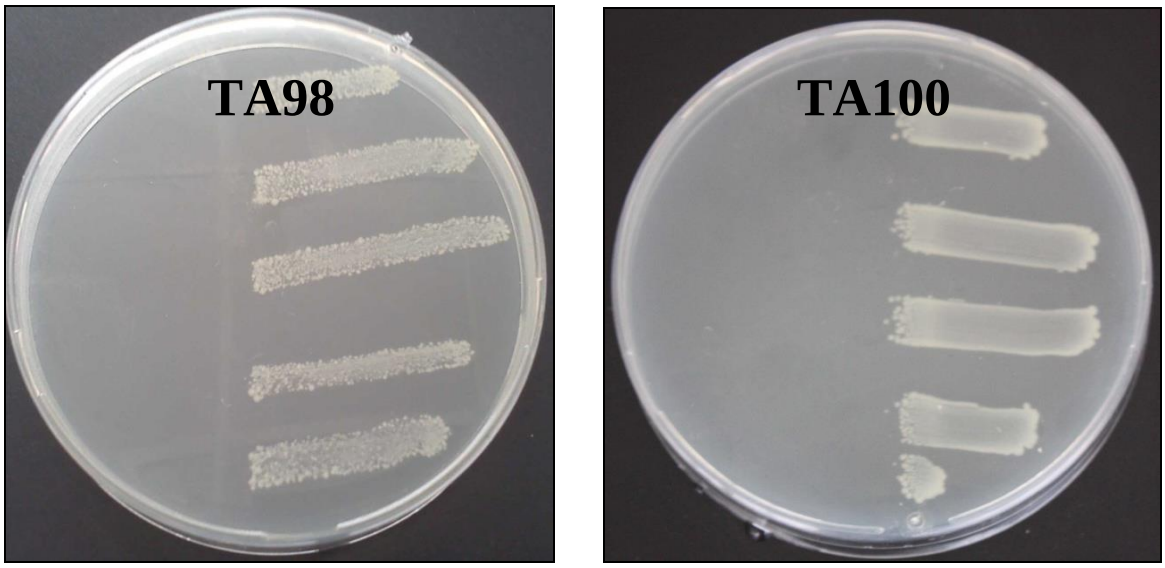
Deneylerde kullanılan *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarına kristal viyole hassasiyeti testi uygulandı. Sonuç olarak, kristal viyole çözeltisi ile muamele edilmiş disklerin etrafında şeffaf bir zon (14 mm) görüldü. Bu şekilde kullanılan her iki suşun *rfa* taşıdığı tespit edildi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarına uygulanan kristal viyole hassasiyet deneyi

4.1.3. *uvrB* Mutasyonu

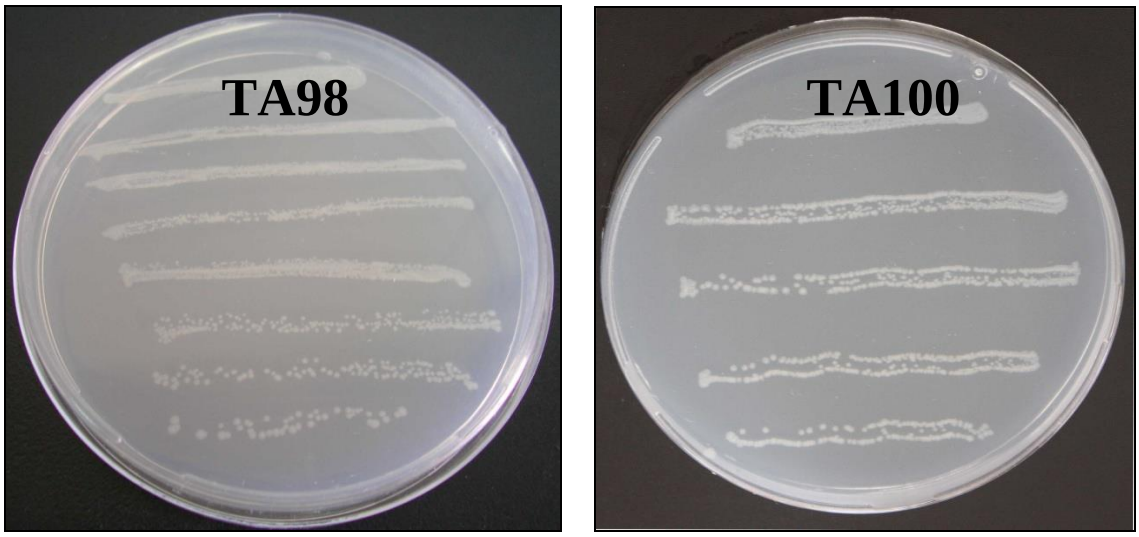
Deneylerde kullanılan *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları için ultraviyole hassasiyeti testi uygulandı. Uygulama sonucunda suşların UV'ye maruz kalan kısımlarda üreme olmadığı fakat korunan bölgede üreme olduğu gözlendi. Bu şekilde kullanılan suşların *uvrB* delesyonu taşıdığı tespit edildi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları *uvrB* mutasyon kontrolü

4.1.4. R Faktörü

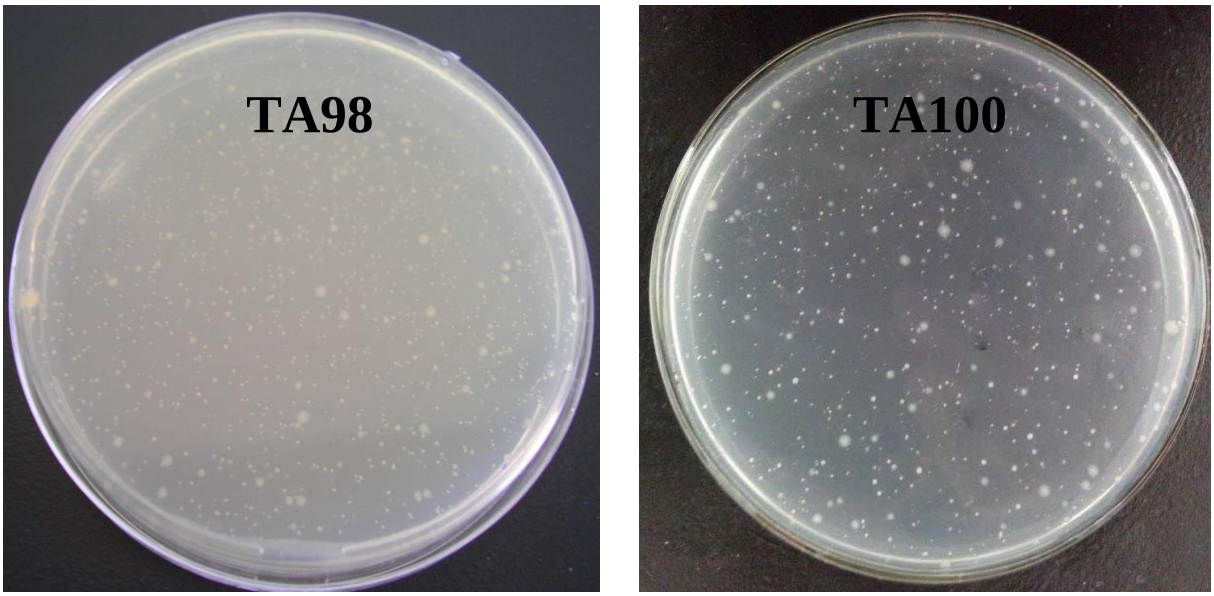
Deneylerde kullanılan test suşlarının ampislin direnç geni taşıyan pKM101 plazmidlerinin varlığı histidin/biyotin/ampisilin (HBA) plaklarında üremesi ile doğrulandı (Şekil 4.5).



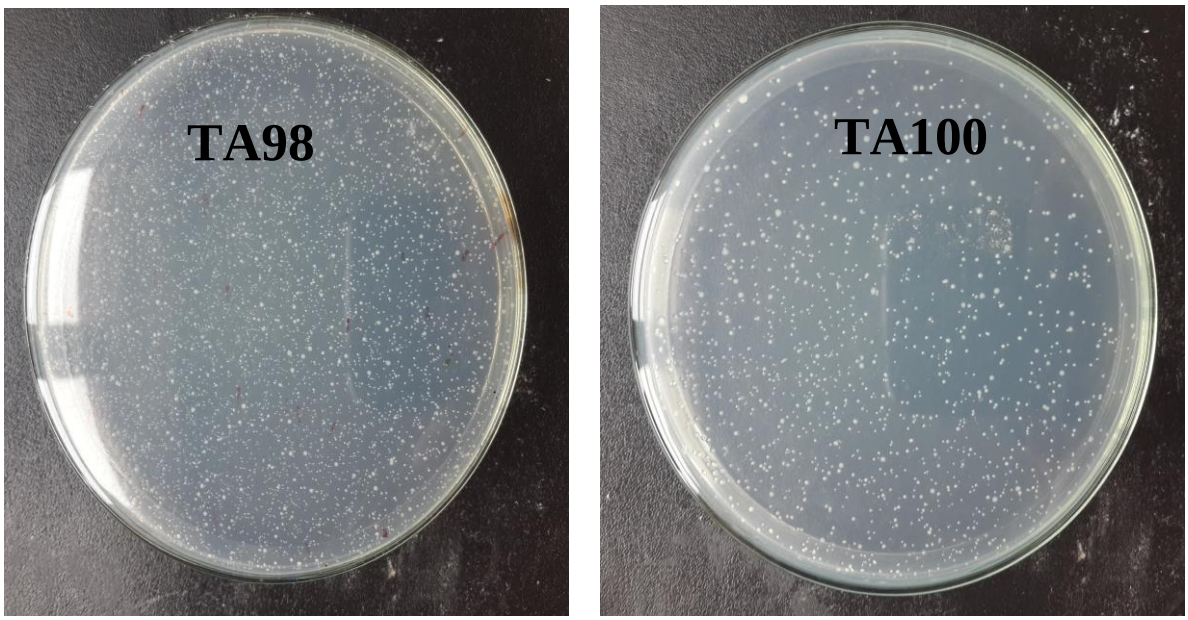
Şekil 4.5. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları R faktörü kontrolü

4.2. Antimutajenik Aktivite Sonuçları

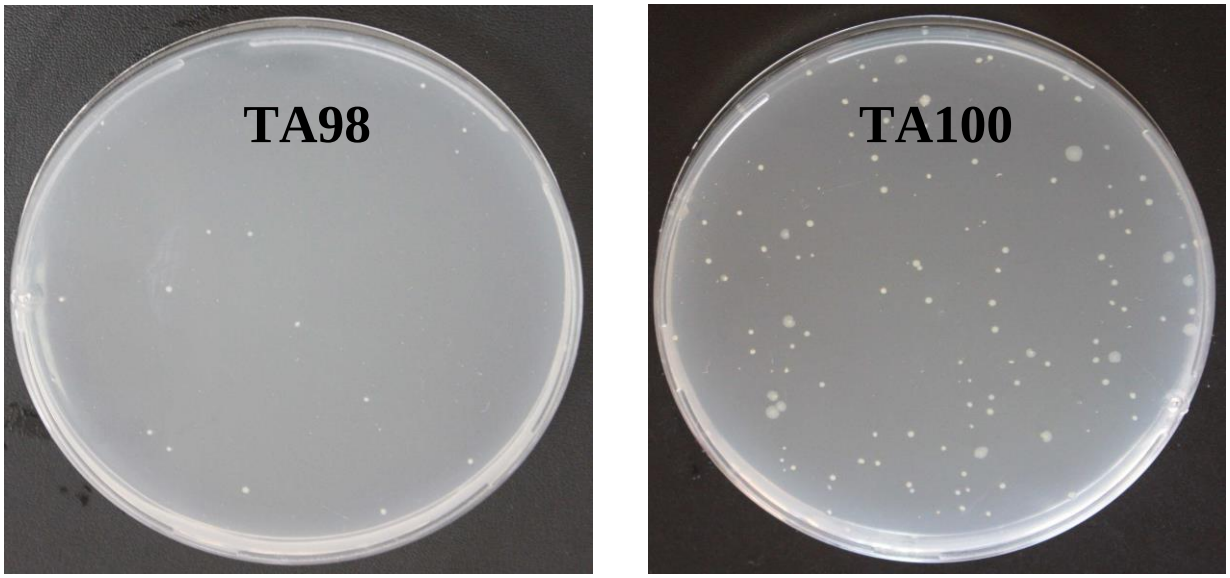
Bu çalışmada, 2-hidroksi Schiff bazı ve Mn(II), Fe(II), Co(II), Cu(II) metal komplekslerinin antimutajenik özelliğe sahip oldukları, Ames (*Salmonella*/ mikrozom) test sistemi ile tespit edildi. Aşağıda pozitif, negatif ve spontan kontrolleri verildi (Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11).



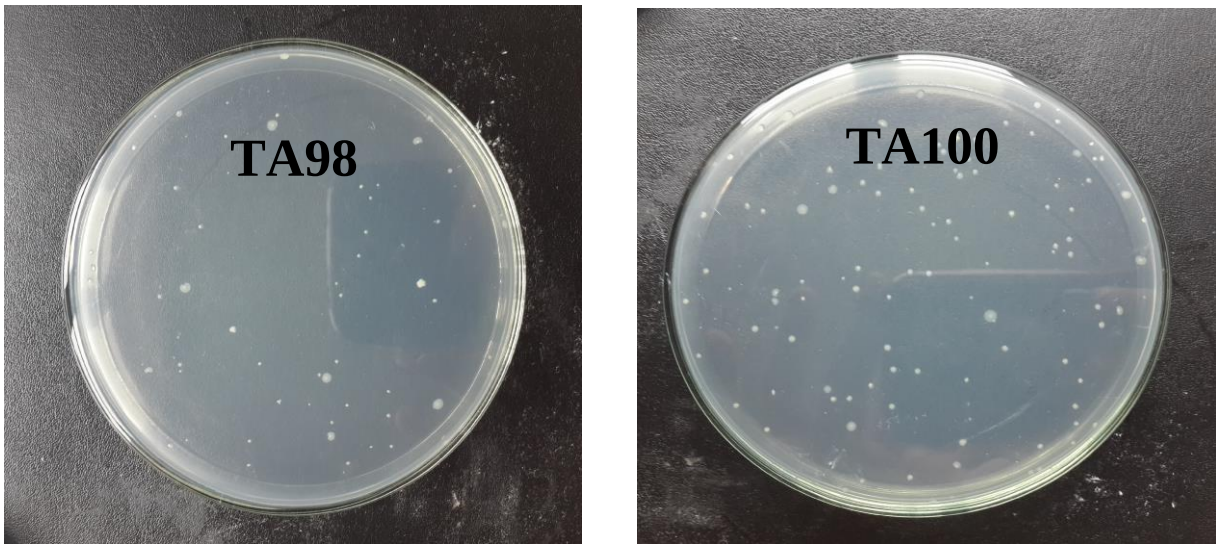
Şekil 4.6. S9(-) deneyleri TA98 ve TA100 suşları pozitif kontrol



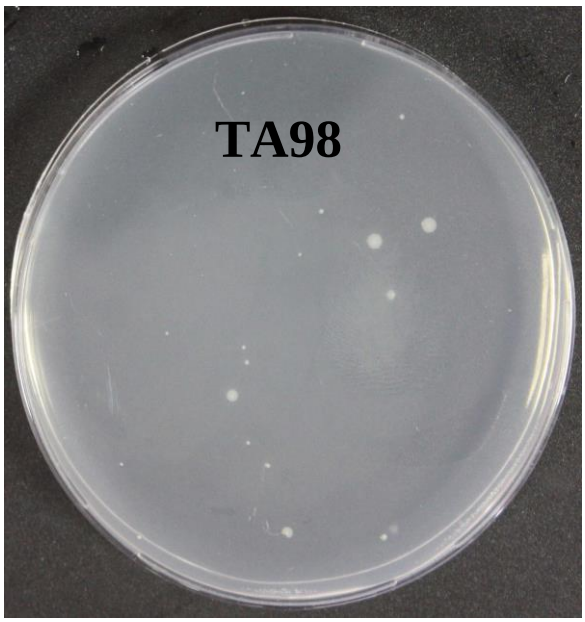
Şekil 4.7. S9(+) deneyleri TA98 ve TA100 suşları pozitif kontrol

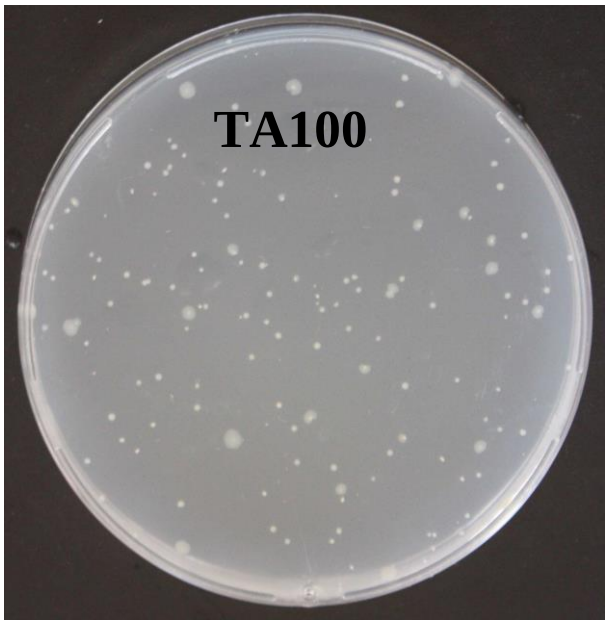


Şekil 4.8. S9(-) deneyleri TA98 ve TA100 suşları negatif kontrol (DMSO)

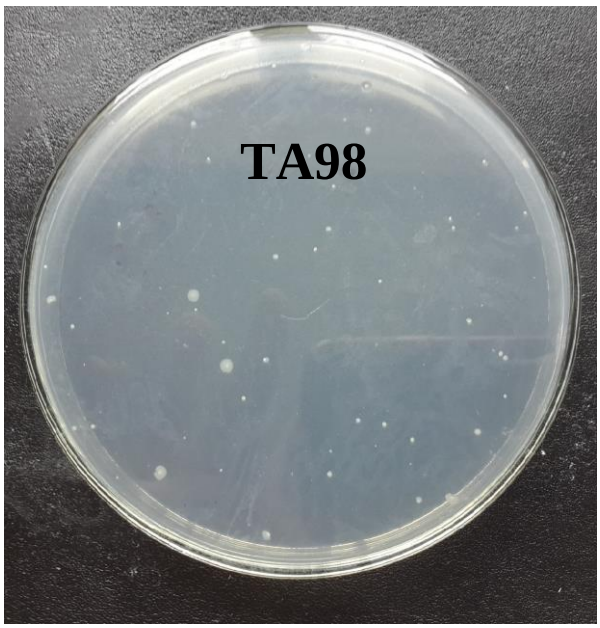


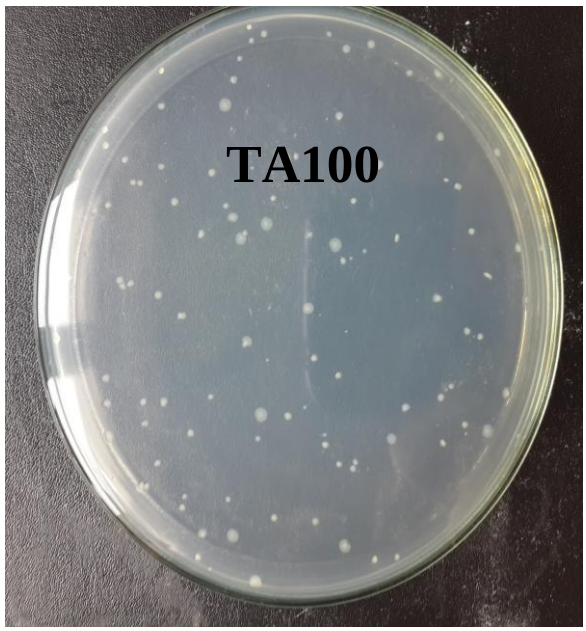
Şekil 4.9. S9(+) deneyleri TA98 ve TA100 suşları negatif kontrol (DMSO)





Şekil 4.10. S9(-) deneyleri TA98 ve TA100 suşları spontan kontrol





Şekil 4.11. S9(+) deneyleri TA98 ve TA100 suşları spontan kontrol

Deney sonrası değerlendirme için pozitif kontrol grubu ile his^+ revertant kolonilerin sayısı karşılaştırıldı.

S9(-) *S. typhimurium* TA98 suşu ile yapılan deneylerde, Cu kompleksinin en yüksek konsantrasyonu ile (500 ppm) Mn kompleksinin en düşük konsantrasyonu (0.5 ppm) haricinde test edilen diğer Schiff bazı ve komplekslerinin güçlü antimutajenik aktivite

gösterdiği saptandı (Çizelge 4.1). Ligandın test edilen bütün konsantrasyonları antimutajenik aktivite göstermiş olup bu etkinin doza bağlı artış gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.12). Cu Kompleksinin en yüksek konsantrasyonunda (500 ppm) antimutajenik aktivitesinin olmadığı fakat kullanılan en düşük konsantrasyonunun % 56 oranında mutajeniteyi engellediği saptandı (Şekil 4.16). Mn Kompleksinin 500, 50 ve 5 ppm konsantrasyonlarının yüksek antimutajenik aktiviteleri olduğu gözlendi (Şekil 4.13). Fe Kompleksinin % 41-% 62 oranında, Co kompleksinin % 48-% 66 oranında doza bağlı olmayan yüksek antimutajenik aktivite gösterdiği gözlendi (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15).

S9(+) İle gerçekleşen deneylerde TA98 suşunda, Co Kompleksi 500 ppm konsantrasyonu (% 41) dışındaki bütün test edilen Schiff bazı ve komplekslerinin güçlü antimutajenik aktivite gösterdiği belirlendi (Çizelge 4.1). Ligandın en yüksek aktivite gösteren konsantrasyonlarının 500 ppm ile 5 ppm (% 78) olduğu tespit edildi (Şekil 4.12). Cu Kompleksinin ise en güçlü aktiviteyi % 74 oran ile 0.5 ppm konsantrasyonunda gösterdiği saptandı (Şekil 4.16). Co Kompleksinin, 0.5 ppm konsantrasyonunda en yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.15) En yüksek antimutajenik aktivitenin, Fe kompleksi (% 82-86) ile Mn kompleksinin en yüksek konsantrasyonunda (% 91) olduğu görüldü (Şekil 4.14 ve Şekil 4.13).

S9(-) *S. typhimurium* TA100 suşu ile test edilen Schiff bazının güçlü antimutajenik aktivitelerinin olduğu gözlendi (Çizelge 4.2). Yapılan çalışmalar sonucunda, Ligandın doza bağlı olmayarak güçlü antimutajenik aktivite (% 72-82) gösterdiği belirlendi (Şekil 4.12). Cu Kompleksinin tüm konsantrasyonlarında yüksek antimutajenik aktivite gözlenmekle birlikte en etkili konsantrasyonunun 5 ppm (% 74) olduğu saptandı (Şekil 4.16). Mn Kompleksinin % 53-73 oranında güçlü antimutajenik aktiviteye sahip olduğu tespit edildi (Şekil 4.13). Fe Kompleksinin test edilen en düşük konsantrasyonunda en yüksek aktivite (% 75) gözlendi (Şekil 4.14). Baz çifti değişimi mutasyonunu engelleyen en etkili (% 86) kompleksin Co (50 ppm) kompleksi olduğu belirlendi (Şekil 4.15).

S9(+) *S. typhimurium* TA100 suşu ile test edilen Schiff bazı ve komplekslerinin güçlü antimutajenik aktiviteye sahip olduğu belirlendi (Çizelge 4.2). En yüksek aktivite Ligandın % 93 oranı ile 5 ppm konsantrasyonunda olduğu tespit edildi. Diğer konsantrasyonlarının ise % 75-82 oranında mutajeniteyi inhibe ettiği gözlendi (Şekil 4.12). Cu Kompleksinin % 71-86 oranında doza bağlı olmayan güçlü antimutajenik aktivitesi olduğu belirlendi (Şekil 4.16). Test edilen bileşikler arasında en yüksek aktiviteye sahip olan Fe kompleksinin mutajeniteyi % 73-91 oranında inhibe ettiği gözlendi (Şekil 4.14). Mn Kompleksinin ise doza bağlı olarak (% 78-90) en güçlü antimutajenik aktiviteye sahip

olduğu belirlendi (Şekil 4.13). Co Kompleksinin ise en yüksek aktiviteyi 500 ppm konsantrasyonunda gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.15).

Yapılan bir çalışmada *Usnea longissima* liken türünden izole edilen usnik asitin, L1, L2 ve L3 olarak kodlanan Schiff bazları türevleri ve Cu(II), Co(II), Ni(II) ve Mn(II) metal komplekslerini sentezlenerek antimutajenik aktivitesi araştırılmıştır. Ligandlar kendi aralarında karşılaştırıldığında Co ve Mn kompleksleri güçlü antimutajenik aktivite göstermiştir. Cu kompleksinin ise farklı konsantrasyonlarında düşük antimutajenik etkiye sahip olduğu saptanmıştır (Koçer, 2012). Yapmış olduğumuz çalışmada ise S9(-) deneylerde Cu kompleksinin TA98 suşu en yüksek dozu hariç güçlü antimutajenik etki gösterdiği, S9(+) deneylerinde ise güçlü etkiye sahip olduğu belirlendi. Çalışmaya paralel olarak, Mn kompleksinin güçlü antimutajenik aktiviteye sahip olduğu görüldü.

Ashram ve ark. (2009) yaptıkları başka bir antimutajenite çalışması sonucunda test edilen bazı bileşenlerinin birer desmutajen gibi DNA'yı doğrudan koruyamadıkları dolaylı yoldan mutajenleri inhibe ederek ve DNA tamir mekanizmasında rol alarak koruduklarını tespit etmişlerdir.

Bazı Schiff bazı bileşiklerin antimutajenik özelliklerini belirleyebilmek amacıyla MN Testi ve *in vitro* İnsan Lenfosit Hücre Kültürü yöntemi kullanılmıştır. Sonuç olarak Schiff bazlarının koruyucu etkisinin dozlara bağlı olduğu ortaya çıkmıştır (Şakiyan ve ark., 2013). Bizim çalışmamızda Ames testi ile elde ettiğimiz sonuçlara göre Schiff bazı ve komplekslerinin sahip olduğu antimutajenik etkinin doza bağlı olmadığı tespit edildi.

Sonuç olarak çalışmamızda test edilen Schiff bazı ve komplekslerinin yüksek antimutajenik aktivite gösterdiği tespit edildi. Ligandın S9 varlığında ve yokluğunda TA100 suşunda yüksek inhibisyon oranı gösterdiği belirlendi. Komplekslerin ise en yüksek aktivitelerinin S9 varlığında olduğu tespit edildi.

Çizelge 4.1. Schiff bazı ve komplekslerinin farklı konsantrasyonlarının *Salmonella typhimurium* TA98 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri

Uygulama		Konsantrasyon	His^+RevertantKoloniSayısı/Plak			
			TA98			
			S9 (-)	% İnhibisyon	S9 (+)	% İnhibisyon
			Ort±SD		Ort±SD	
Pozitif Kontrol	NPD	10^2	743±113.5			
	2AF	$5x10^3$			1448±11	
Schiff bazı (Ligand)		500	343±95.3	55	346±65	78
		50	405±57.0	46	710±93	52
		5	397±88.5	47	352±73	78
		0.5	427±40.4	43	526±2.8	65
Mn		500	311±88.1	59	161±1	91
		50	265±51.0	66	715±86	52
		5	265±18.9	66	504±28	67
		0.5	520±28.2	30	703±75	53
Fe		500	348±68.1	54	234±65	86
		50	356±40.6	53	290±42	82
		5	444±121.1	41	268±23	84
		0.5	293±81.1	62	258±42	85
Co		500	332±36.0	56	866±48	41
		50	389±22.0	48	660±40	56
		5	254±14.0	66	729±62	51
		0.5	313±41.6	59	380±68	76
Cu		500	850±230.4	0	490±26	68
		50	480±105.8	36	564±62	63
		5	505±89.33	32	606±88	60
		0.5	327±51.1	56	402±20	74
Negatif Kontrol		DMSO	12±1.0		54±9	
Spontan Kontrol			12±1.5		45±14	

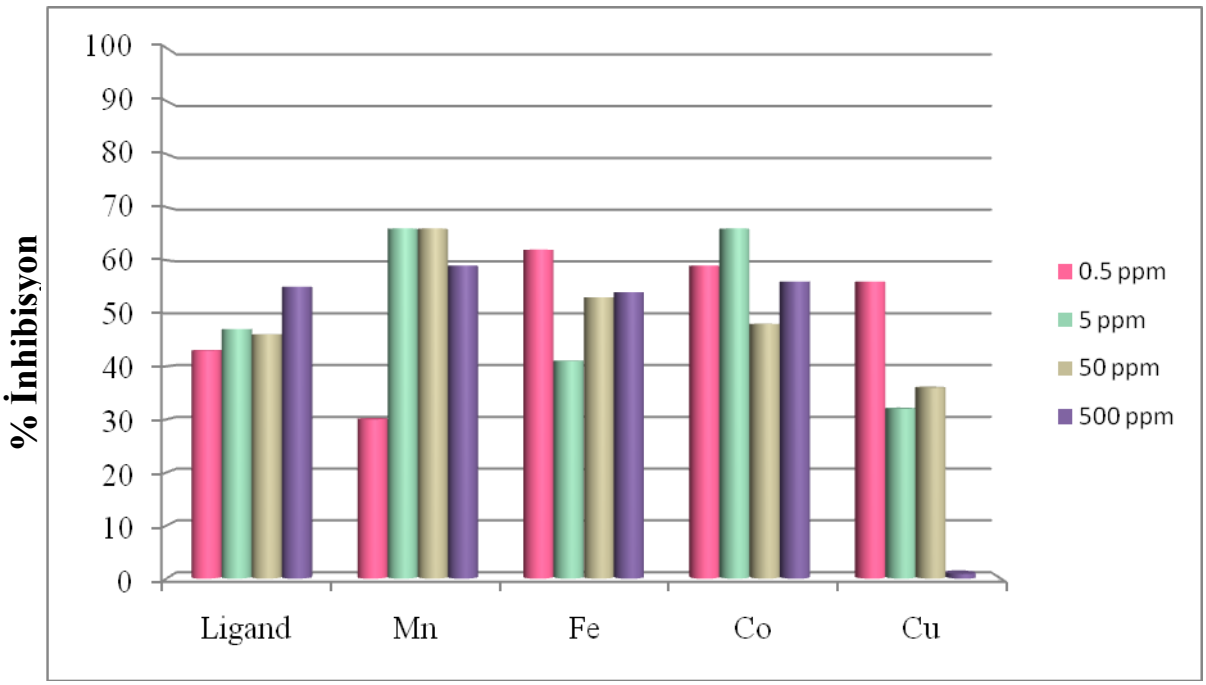
* NPD: 4-Nitro-*o*-fenilendiamin, 2AF: 2-Aminofloren, DMSO: Dimetilsülfoksit
**Ort±SD: Ortalama±Standart Sapma

Çizelge 4.2. Schiff bazı ve komplekslerinin farklı konsantrasyonlarının *Salmonella typhimurium* TA100 suşu üzerindeki antimutajenik etkileri

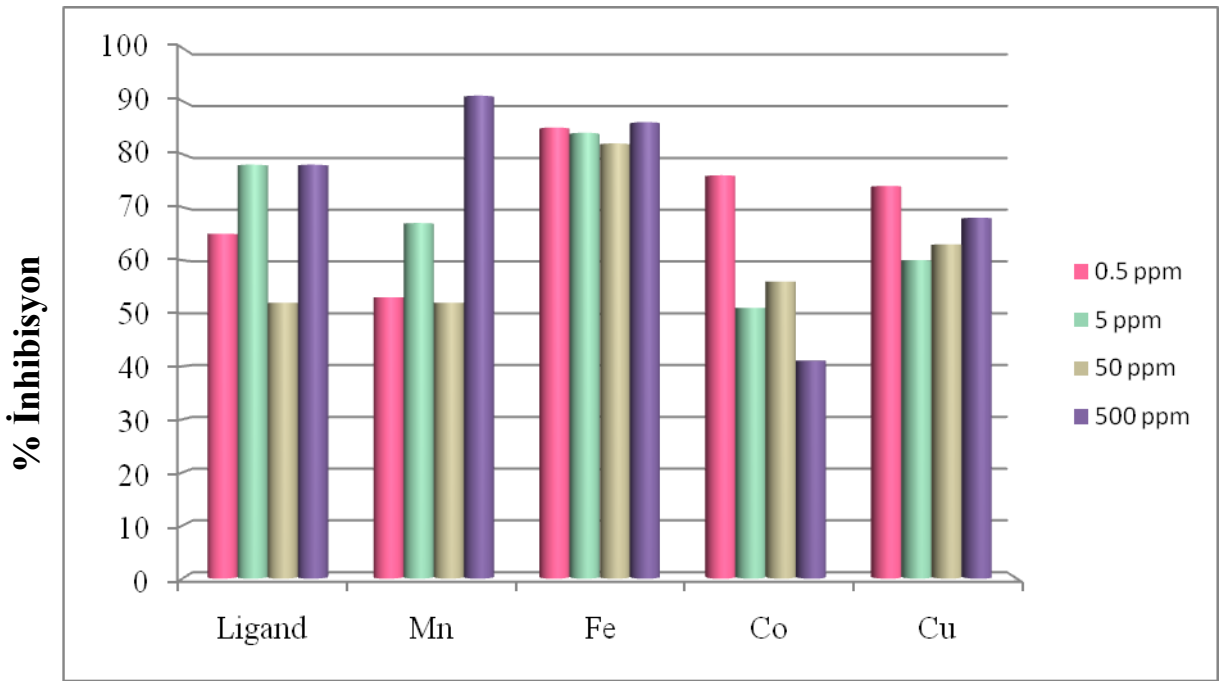
Uygulama		Konsantrasyon	His^+RevertantKoloniSayısı/Plak			
			TA100			
			S9 (-)		S9 (+)	
			Ort±SD	% İnhibisyon	Ort±SD	% İnhibisyon
Pozitif Kontrol	SA	10^3	732±80.3			
	2AF	$5x10^3$			1202±133	
Schiff bazı (Ligand)		500	273±50.3	72	314±14	82
		50	246±74.5	76	328±85	81
		5	265±22.3	73	199±37	93
		0.5	207±95.5	82	391±35	75
Mn		500	325±30.6	64	286±59	85
		50	266±51.3	73	360±57	78
		5	394±103.6	53	277±44	85
		0.5	325±37.0	64	228±57	90
Fe		500	412±117.7	49	216±91	91
		50	309±40.1	67	308±74	83
		5	373±36.3	56	296±96	84
		0.5	256±67.3	75	414±31	73
Co		500	283±33.0	70	332±96	80
		50	181±57.4	86	514±14	64
		5	273±82.3	72	418±20	72
		0.5	263±17.0	74	487±93	66
Cu		500	289±126.1	69	388±51	85
		50	339±22.1	62	434±76	71
		5	261±18.0	74	273±10	86
		0.5	273±95.9	72	330±54	81
Negatif Kontrol		DMSO	76±4.7		93±11	
Spontan Kontrol			96±2.9		125±17	

* SA: Sodium Azide, 2AF: 2-Aminofloren, DMSO: Dimetilsülfoksit

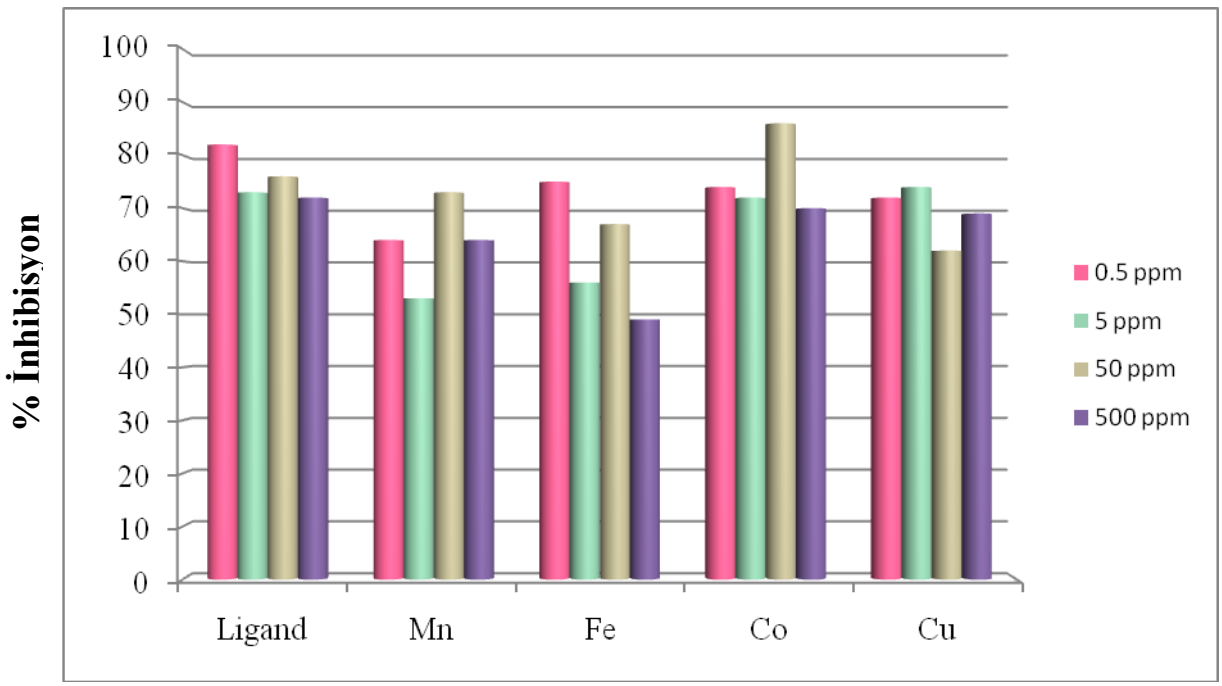
**Ort±SD: Ortalama±Standart Sapma



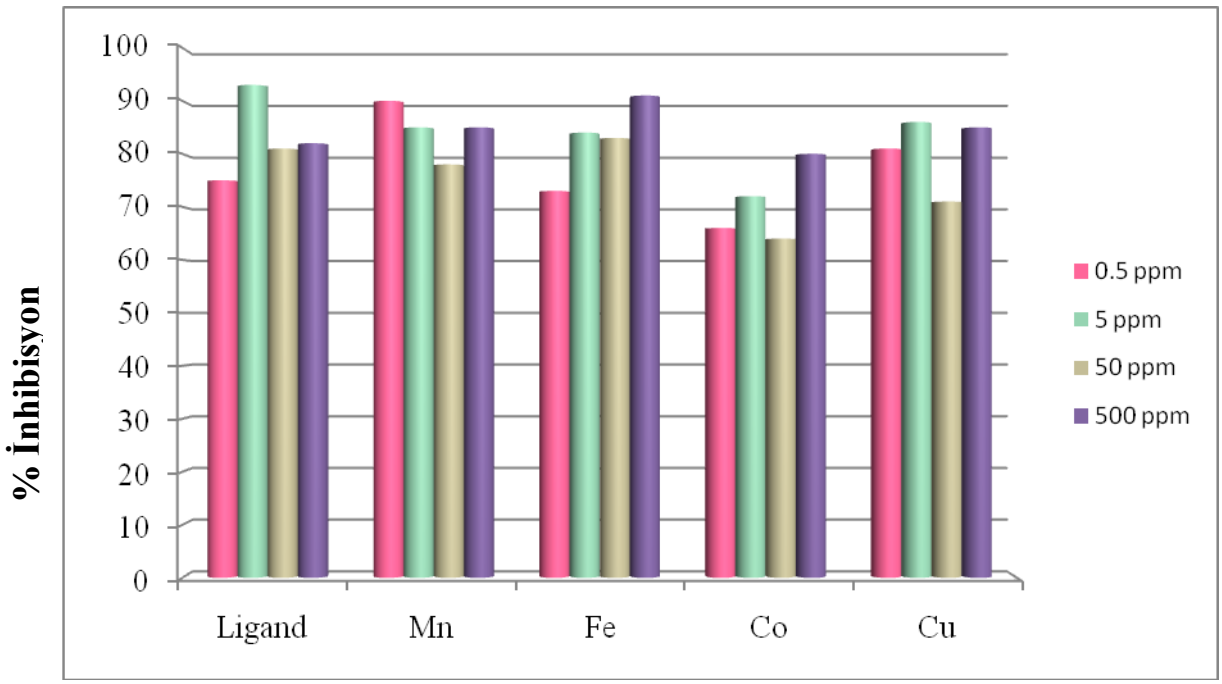
Şekil 4.12. Ligand ve komplekslerinin farklı konsantrasyonlarının S9 yokluğunda (S9-) TA98 suşunda antimutajenik etkileri



Şekil 4.13. Ligand ve komplekslerinin farklı konsantrasyonlarının S9 varlığında (S9+) TA98 suşunda antimutajenik etkileri



Şekil 4.14. Ligand ve komplekslerinin farklı konsantrasyonlarının S9 yokluğunda (S9-) TA100 suşunda antimutajenik etkileri



Şekil 4.15. Ligand ve komplekslerinin farklı konsantrasyonlarının S9 varlığında (S9+) TA100 suşunda antimutajenik etkileri

4.3. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Antimikrobiyal aktivite deney sonucunda Schiff bazı ve komplekslerinin hiçbiri kontrol olarak kullanılan gentamicin ve flucanosolün sahip olduğu MIC değerinin altında bir değer göstermediği belirlendi. En yüksek antibakteriyel aktiviteyi Fe kompleksi (32 µg/mL), *Bacillus subtilis* türüne karşı ve Co kompleksi (32 µg/mL*) Proteus vulgaris* türüne karşı gösterdiği belirlendi. Aynı zamanda Fe kompleksinin gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı yüksek antibakteriyel aktivitesi olduğu belirlendi. Co Kompleksinin en düşük aktivitesi *B. cereus* ve *Escherichia coli* türlerine karşı gösterdiği gözlendi. Ligandın gram negatif bakterilere karşı daha etkili olduğu tespit edildi. Mn Kompleksi ise *S. aureus*, *E. faecalis*, *E.coli* ve *P.aeruginosa* türlerine karşı etkili olduğu (64 µg/mL) gözlenirken diğer türlere karşı daha az etkiye sahip olduğu belirlendi (Çizelge 4.3).

Antifungal aktivite çalışmalarında ise kontrol olarak fluconasol kullanıldı. Schiff bazı ve kompleksleri karşılaştırıldığında en etkili antifungal aktivite gösteren Cu kompleksinin (4 µg/mL) olduğu saptandı. Co Kompleksinin ise 8 µg/mL MIC değeri ile etkili bir antifungal aktiviteye sahip olduğu gözlendi. Ligandın ve Mn kompleksinin *C. albicans* türüne karşı daha etkili olduğu belirlendi (Çizelge 4.3).

Shi ve ark. (2007) yaptıkları bir çalışmada, Schiff bazlarının antimikrobiyal aktiviteleri için; *Bacillus subtilis, Escherichia coli, Pseudomonas fluorescence* ve *Staphylococcus aureus* bakterileri kullanılarak değerlendirilmiştir. Antifungal özellikleri ise *Aspergillus niger, Candida albicans* ve *Trichophyton rubrum* türlerine karşı değerlendirilmiştir. Test edilen bileşikler içerisinde (*E*)-4-kloro-2-((4-fluorobenzilimino)-metil)fenol bileşiği *B. subtilis, E. coli, P. fluorescence, S. aureus* ve *A. niger* türlerine karşı en yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (Shi ve ark., 2007).

Literatürdeki çalışmaların sonuçlarına bakıldığında komplekslerin ligandlardan daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Raman ve ark., 2002). Buna göre çalışmamızda elde edilen veriler komplekslerin, ligandlara göre daha aktif olduğunu göstermiştir. Bu da çalışmalarımızın literatürle paralel olduğunu göstermektedir. Ayrıca komplekslerin yüksek aktivite göstermelerinin sebebi metal şelatlama özelliğine sahip olması ve lipid zarlardan pozitif yüklü metal iyonlarının geçerek enzimleri bloke etmesi gösterilmektedir (Raman, 2003).

Çizelge 4. 3. Schiff bazı ve komplekslerinin MIC (μg/mL) değerleri

	Bakteriler								**Mayalar**	
Bileşikler	***S. aureus* ATCC 25923**	***E. faecalis* ATCC 29212**	***B. cereus* NRRL B-3711**	***B. subtilis* ATCC 6633**	***E. coli* ATCC 25922**	***E. coli* ATCC 35218**	***P. aeruginosa* ATCC 254992**	***P. vulgaris* ATCC 13315**	***C.albicans* ATCC 60198**	***C. tropicalis* ATCC 13803**
Schiff bazı (Ligand)	64	64	128	128	128	64	64	64	32	64
Co	64	64	128	64	64	128	64	32	8	8
Fe	64	64	128	32	64	128	64	64	64	64
Mn	64	64	128	128	128	64	64	64	32	64
Cu	64	128	64	64	128	64	64	64	4	4
Gentamicin	1	1	0.125	0.008	0.125	0.03	0.08	0.125	-	-
Ampisilin	0.016	0.016	0.125	0.06	32	32	2	0.06	-	-
Flucanosol	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0625	0.5
DMSO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Radyasyon, çevre kirliliği, zirai ilaçlar ve stres gibi faktörler hücre içinde kalıtsal materyalde kalıcı hasarlara neden olmaktadır. Bu hasarlara mutasyonlar denilmektedir. DNA'da meydana gelen mutasyonlara bağlı olarak kontrolsüz hücre bölünmesi meydana gelmektedir. Bu durum kansere yol açmaktadır.

Araştırmacılar kanser tedavisinde kullanılabilecek çeşitli antimutajenik, antikanserojenik maddeler araştırmaktadırlar. Kemoterapide DNA'ya bağlanabilen yeni antikanser ilaçların geliştirilmesi günümüzde araştırmacıların üzerinde çok çalıştığı konulardan biridir. Son zamanlarda Schiff bazı ve komplekslerine olan ilgi bu anlamda gün geçtikçe artmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda Schiff bazı ve komplekslerinin antibakteriyel, antifungal, antiülser, antitümör gibi aktivitelerinin olduğu tespit edilmiştir. Sağlık sektörünün her alanında kullanılabilmesinin yanında kemoterapi tedavilerinde kullanılması bu bazlara olan ilgiyi arttırmaktadır.

Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda 2-hidroksi Schiff bazı ve Mn(II), Fe(II), Co(II), Cu(II) metal komplekslerinin antimutajenik ve antimikrobiyal aktiviteleri araştırıldı. Antimutajenik aktivite sonucunda elde edilen verilere göre ligandın S9 varlığında (S9+) yüksek inhibisyon oranı ile baz çifti değişimi mutasyonunu engellediği belirlendi. Komplekslerin en yüksek aktiviteyi S9 varlığında göstermiş olması ileride birçok hastalığın engellenmesi için yapılacak çalışmalara referans oluşturacak niteliktedir. Yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmasında, elde edilen sonuçlara göre ligand ve komplekslerin antimikrobiyal aktivitelerinin olduğu bulundu. Bu sonuçlara göre tüm bileşiklerin antimikrobiyal ajan olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abmann N., Emmrich M., Kampf G., Kaısher M., 1997. Genotoxic Activity of Important Nitrobenzenes and Nitroanilines in the Ames Test and Their Structure Activity Relationship. *Mutation Research*, 395: 139-144.

Agrawal Y.K., Talati J.D., Shah M.D., Desai M.N., Shah N.K., 2004. Schiff Bases of Ethylenediamine as Corrosion Inhibitors of Zinc in Sulphuric Acid. *Corrosion Science*, 46(3): 633-651.

Ahmed N., Dawson M., Smith C., Wood E., 2007. *Biology of Disesase*. Taylor & Francis Group, New York, USA, Chapter:15, 428-441.

Akı C., 2007. Genel Genetik (4. Baskı). Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Teksirleri Serisi No:1, Çanakkale. 60-62.

Akın D., 2010. *Celtis glabrata*'nın Bazı Ekstraktlarının Ames/*Salmonella* Mikrozom Test Sistemi ile Antimutajenik Etkisinin Araştırılması.Yüksek Lisans Tezi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Alekperov U.K., Ames B.N., Kada T., Wattenberg L.W.,1986. Inhibitors of Mutagenesis and Their Relevance to Carcinogenesis: Report by ICPEMC Expert Group on Antimutagens and Desmutagens. *Mutation Research*, 168: 47-65.

Ames B.N., 1971. *The Detection of Chemical Mutagens with Enteric Bacteria*. In: Hollaender, A., Ed. Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection. Plenum, New York. 267-282.

Ames B.N., Lee F.D., Durston W.E., 1973. An Improved Bacterial Test System for The Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70: 782-786.

Ames B.N., McCann J., Yamasaki E., 1975. Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with The *Salmonella*/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Research*, 31: 347-364.

Amirkhanov V.M., Bundya E.A., Trush V.A., Ovchynnikov V.A., Zaitsev V.N., 1999. Coordination Compounds of Co(II), Ni(II), Mn(II), and Zn(II) with New Representative of Carbacylamidophosphates–potential Anticancer Drugs. *5th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry*, Corfu, 13-17,

Greece.

Ashram M., Maslat A., Mizyed S., 2009. Synthesis and Biological Activities of New Azacrown Ether Schiff Bases and Spectrophotometric Studies of Their Complexation with [60] Fullerene. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 91: 1095-1104.

Ateş A., 2002. *Moleküler Biyoloji*, 9. Bölüm, Selçuk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Konya, 113–121.

Ayaz B., 1993. 2, 4, 5 Tri (Substitue) Fenil İmidazol ve Türevlerinin Mutajenik Aktivitesinin Ames/*Salmonella*/Mikrozom Testi ile Araştırılması.Yüksek Lisans Tezi. Anadolu Üniversitesi, Türkiye.

Ayaz T.B., 2001. Bazı İlaç Öncül Maddelerinin Mutajenik Etkilerinin Bakteriyal ve Hücre Kültürü Testleri ile Araştırılması. Doktora Tezi. Anadolu Üniversitesi, Türkiye.

Bağcı H., 1985. Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Yaz Okulu Moleküler Biyoloji Ders Notları.

Bhattacharya S., 2011. Natural Antimutagens: A Review. *Research Journal of Medicinal Plant*, 5 (2): 116-126.

Bradshaw L. J.,1992. *Laboratory Microbiology*. Newyork. 436p.

Brooks G.F., Carroll K.C., Butel J.S., 2009. *Tıbbi Mikrobiyoloji* (24th ed.). Noel Tıp Kitabevi, 161-229 p.

Campbell N.A., Reece J.B., 2010. Biyoloji (3. Baskı). Gündüz, E., Demirsoy, A., Türkan, İ., Eds. Palme Yayıncılık, Ankara. 279-325.

Ceyhan E., Mercangöz A., Karakoç N., Bilgiç S., 2010. İlaç Hammaddesi Olarak Sentezlenen Elektrofilik ve Nonelektrofilik Fenolik Schiff Bazlarının Umu Test Sistemi ile Genotoksik Aktivitesinin Araştırılması. *Journal of Science and Enginering*, 7: 75-86.

Chen G.J., Qiao X., Qiao P.Q., Xu J.Y., Tian J.L., Gu W., Liu X., Yan S.P., 2011. Synthesis, DNA Binding, Photo-Induced DNA Cleavage, Cytotoxicity and Apoptosis Studies of Copper (II) Complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*,105: 119-126.

Chen T., Meng F., Yan J., Li Y., Fu P.P., Fossom L.H., Sood R.K., Mans D.J., Chu P., Moore M.M., 2013. Genotoxicty of 2-Bromo-3'-Chloropropiophenone.

Toxicology and Applied Pharmacology, 270: 158-163.

Chohan Z.H., Farooq M.A., Scozzafava A., Supuran C.T., 2002. Antibacterial Schiff Bases of Oxalyl-Hydrazine/Daimide Incorporating Pyrrolyl and Salicylyl Moieties and of Their Zinc(II) Complexes. *Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chemistry*, 17(1): 1-7.

Clarke E. G. C., 1974. Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals body Fluids and Post Modern Material. *The pharmaceutical Press*, London, 526p.

Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI). Anti-mikrobik duyarlılık testleri için uygulama standartları. On dokuzuncu Bilgi Eki, M100-S23. Ankara*:* Bilimsel Tıp Yayın-evi, (2013).

Das A., Trousdale M.D., Ren S., Lien E.J., 1999. Inhibition of Herpes Simplex Virus Type 1 and Adenovirus Type 5 by Heterocyclic Schiff Bases of Aminohydroxyguanidine Tosylate. *Antiviral Res*earch, 44: 201-208.

Datta S., Banerjee P., Banerjee R.D., Sarkar G.M., Saha S.K., Dey K., Maiti R.K., Sen S.K., Bhar J.K., 1982. Antimicrobial, Insect sterilizing and Ovicidal Activity of Some Oxo-vanadium(IV) and Oxo-vanadium(V) Complexes. *Agents Actions*. 12(4): 543-51.

Dean B. J., Brooks T. M., Hodson-Walker G., Hutson D.H., 1985. Genetic Toxicology Testing of 41 Industrial Chemicals. *Mutation Research*, 153 (1-2): 57-77.

Demirsoy A., 2005. Kalıtım ve Evrim. Meteksan, Ankara.

Demiryürek G., 2010. Bazı Hidroksipiron Türevi Mannich Bazlarının Tasarımı, Sentezi ve Biyolojik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Türkiye.

Dığrak M., Cansiz A., Ahmedov M. A., Bağcı E. 1996. Bazı Tetrahidrofuran Türevlerinin Antimikrobiyal Etkisi Üzerinde *in vitro* Araştırmalar. XIII. *Ulusal Biyoloji Kongresi*, İstanbul.

Duff B., Thangella V.R., Creaven B.S., Walsh M., Egan D.A., 2012. Anti-Cancer Activity and Mutagenic Potential of Novel Copper (II) Quinolinone Schiff Base Complexes in Hepatocarcinoma Cells. *Europen Journal of Pharmacology*, 689: 45-55.

Durackova Z., Mendiola M.A., Sevilla M.T., Valent A., 1999 Thiohydrazone Copper (II) Complexes. The Relationship Between Redox Properties and Superoxide Dismutase Mimetic Activity. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 48: 109-116.

El-Sayed W.M., Hussin W.A., Al-Faiyz Y.S., Ismail M.A., 2013. The Position of İmidazopyridine and Metabolica Activation are Pivotal Factors in the Antimutagenic Activity of Novel İmidazo[1,2-a]. *European Journal of Pharmacology*, 715: 212-218.

Emmrich M., Abmann N., Kampf G., Kaiser M., 1997. Genotoxic Activity of İmportant Nitrobenzenes and Nitroanilines in the Ames Test and Their Structure-Activity Relationship. *Mutation Research*, 395: 139-144.

Esen A.A., 2006. Bazı Schiff bazlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Türkiye.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Test (EUCAST), breakpoint tables for interpretation of MIC's and zone diameters – Version 3.0, (2013).

Feil R., Metzger D., 2007. Conditional Mutagenesis: An Approach to Disease Models. Springer No:178, 500 p, Heidelberg, Germany.

Ferguson L.R., 1994. Antimutagens as Cancer Chemopreventive Agents in The Diet. *Mutation Research*, 307: 395-410.

Fioravanti R., Biava M., Donnarumma S., Poretta G.C., Simonetti N., Villa A., Porta-Puglia A., Deidda D., Maulla C., Pompei R., 1996. Synthesis and Microbiological Evaluations of (N-heteroaryl) Arylmethanamines and Their Schiff Bases. *II Farmaco*,51 (10): 643-652.

Forster R., Blowers S.D., Cinelli S., Marquardt H., Westendorf J., 1992. Mutagenicity Testing of İmidazole and Related Compounds. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 298: 71-79.

Gaballa A. S. Asker M. S., Barakat A. S., Teleb S. M., 2007. Synthesis, Caracterization and Biological Activity of Some Platinum(II) Complexes with Schiff Bases Derived from Salicylaldehyde, 2-furaldehyde and Phenylene-diamine. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 67 (1): 114 – 121.

Henriques J.A.P., Machado M.D.S., Villela I.V., Moura D.J., Rosa R.M., Salvador M., Lopes N.P., Braga A.L., Roesler R., Saffi J., 2009. 3'3-Ditrifluoromethyldiphenyl Diselenide: A New Orgonoselenium Compound with Interesting Antigenotoxic and Antimutagenic Activities. *Mutation Research*, 673: 133-140.

Hong C.E., Lyu S.Y., 2011. Genotoxicity Detection of Five Medicinal Plants in Nigeria. *The Journal of Toxicological Sciences*, 36 (1): 87-93.

Ikken Y., Morales P., Martinez A., Marin M.L., Haza A.I. ve Cambero M.I., 1999. Antimutagenic Effect of Fruit and Vegetable Ethanolic Extracts against *N*-Nitrosoamines Evaluated by The Ames Test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3257-3264.

Isenberg H.D., 1998. Essential Procedures for Clinical Microbiology. *American Society for Clinical Microbiology,*Washingtoon DC, pp 126-223.

İspir E., Toroğlu S., Kayraldız A., 2008. Synthesis, Characterization, Antimicrobial and Genotoxic Activities of New Schiff Bases and Their Complexes Transition. *Metal Chemistry*, 33(8): 953-960.

Josephy P.D., Gruz P., Nohmi T., 1997. Recent Advences in The Construction of Bacterial Genotoxicity Assays. *Mutation Research*, 386: 1-23.

Kahramanoğlu İ.K., 2003. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Ligandı ve Onun Cu(II) ve Ni (II) Komplekslerinin Mutajenik Potansiyellerinin *Salmonella*/Mikrozom Test Sistemiyle Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Dicle Üniversitesi, Türkiye.

Kalaycıoğlu A., Öner C., 1994. Bazı Bitki Özütlerinin Antimutajenik Etkilerinin Ames/*Salmonella* Test Sistemi ile Araştırılması. *Turkish Journal of Botany*, 117–122.

Kara Y., Avar B., Kayraldız A., Güzel, B., Kurtoğlu, M., 2011. Synthesis and Genotoxicity of Schiff Base Transition Metal Complexes. *Heteroatom Chemistry*, 22(2): 119-130.

Karadayı M., 2010. *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*'den Elde Edilen Bazı Etken Maddelerin Ames/*Salmonella* ve *E. Coli* WP2 Test Sistemleri ile Mutajen ve Antimutajen Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Karlin K.D., Tyekkerz L., 1993. Bioorganic Chemistry of Copper. *Chapman and Hill*, NewYork.

Karpuz Ö., 2013. Bazı 2-hidroksi Schiff Bazları ile Metal Komplekslerinin Sentezi ve Yapılarının İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Türkiye.

Karthikeyan M.S., Prasad D.J., Poojary B., Bhat S.K., Holla B.S., Kumari N.S., 2006. Synthesis and Biological Activity of Schiff and Mannich Bases Bearing 2,4-Dichloro-5-Fluorophenyl Moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14: 7482-7489.

Kelland L.R., 1993. New Platinum Antitumor Complexes. Critical Reviews in *Oncology/Hematology*, 15 (3): 191-219.

Khuhawar M.Y., Mughal M.A., Channar A.H., 2004. Synthesis and Characterization of Some New Schiff Base Polymers, *European Polymer Journal* 40: 805-809.

Kim C., Yoong-He L., 1992. Synthesis and Evaluation of Uracil-6-carboxaldehyde Schiff Bases as Potential Antitumor Agents, Korean. *Journal Medicinal Chemistry*, 2(1).

Klayman D.L., Scovill J.P., Bartosevich J.F., Bruce J., 1983. *Journal Medicinal Chemistry*, 26-35.

Koçer S., 2012. Liken Metaboliti Usnik Asitin Bazı Aril-Aminofenoller ile Schiff Bazları Türevleri ve Metal Komplekslerinin Sentezi, Antimutajenik ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması.Yüksek Lisans Tezi. Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Türkiye.

Korkmaz B., 2005. Bazı 2-Sübstitüe Perimidin Bileşiklerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames Mutajenite Testi ile Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Anadolu Üniversitesi, Türkiye.

Korkmaz F., Mercangöz A., 2012. Mutagenicity of 1-Ethyl-2,4,5-Triphenyl-1H-İmidazole and Six Derivates in *Salmonella typhimurium*. *Gazi University Journal of Science*. 25(1): 1-8.

Kuduk J., Trynda L., 1994. Impact of K_2PtCl_6 on the Structure of Human Serum Albumin and its Binding Ability of Heme and Bilirubin. *Journal of Inorganic Biochemisrty*, 53 (4): 249-260.

Kutlu M., Öztaş E., Aydoğan G., Işıkdağ İ., Özkay., 2011. Bazı 9-Sübstitüe Fenantren Türevlerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames / *Salmonella* / Mikrozom Testi ile Araştırılması. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 1: 83-94.

Lambert R.J.W ve Pearson J., 2000. Susceptibility Testing: Accurate and Reproducible Minimum Iinhibitory Concentration (MIC) and Non-Inhibitory Concentration (NIC) Values, *Journal of Applied Microbiology*, 88: 784-790.

Lelie D., Regniers L., Borremans B., Provoost A., Verschaeve L., 1997. The VITOTOX Test, An SOS Bioluminescence *Salmonella typhimurium* Test to Measure Genotoxicity Kinetics. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 389 (2-3): 279-290.

Maron D.M., Ames B.N., 1983. Revised Methods for The *Salmonella* Mutagenicity Test. *Mutation Research*, 113: 173-215.

Meo D.M., Vanelle P., Bernadini E., Laget., Maldonado J., Jentzer O., Crozet MP., Dumenil G., 1992. Evaluation of the Mutagenic and Genotoxic Activities of 48 Nitroimdazoles and Related İmidazole Derivates by the Ames Test and the SOS Chromotest. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 19 (2): 167-81.

Mirabelli C.K., Hill D.T., Faucette L.F., McCabe F.L., Girard G.R., Bryan D.B., Sutton, B.M., Bartus J.O., Crooke S.T., Johnson R.K. 1987. Antitumor Activity of bis(diphenylphosphino)alkanes, Their Gold(I) Coordination Complexes, and Related Compounds. *Journal Medicinal Chemistry*, 30: 2181-2190.

Mitscher L.A., Drake S., Gollapuri S.R., Harris J.A., Shankel D.M., 1986. *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms*. Plenum Press, New York.

Mortelmans K., Zeiger E., 2000. The Ames *Salmonella*/Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Research*, 455: 29-60.

Nazır H.,Yıldız M., Yılmaz H., Tahir M.N., Ülkü D., 2000. Intramolecular Hydrogen Bonding and Tautomerisim in Schiff Bases. Structure of N-(2-pyridil)-2-oxo-1-naphthylidenemethylamine. *Journal of Molecular Structure*, 524: 241-250.

Negi P.S., Jayaprakasha G.K., Jena B.S., 2003. Antioxidant and Antimutagenic Activities of Pomegranate Peel Extracts. *Food Chemistry*, 80: 393-397.

Niederhoffer E.C,, Timmons J.H., Martel A.G., 1984. Thermodynamics of Oxygen Binding

in Natural and Synthetic Dioxygen Complexes. *Chemical Reviews*, 84-137.

Öner C., 2003. Genetik Kavramlar, *Palme Yayıncılık*, 6. baskıdan çeviri, Türkiye, 455-467p.

Onuska K.D., Lahitova N., Carsky J., 1996. Antimutagenic and Bacteriostatic Activities of Schiff-Base Compounds Derived from Aminoguanidine, Semicarbazone and Tthiosemicarbazone and a Copper (II)-Coordination Complex. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 57: 163-170.

Oraler G., 1990. *Genetik*. İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, İstanbul, 177-178.

Özöğüt H., Duran M., Erkal Ü., Kunduhoğlu B., Savaroğlu G., 2012. İlaç, Gıda ve Kozmetiklerde Kullanılması Amacıyla Sentezlenen Naftolik Schiff Bazlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması. *2. Kozmetik Kongresi*.

Özturan O., 2013. Kompleks Bileşiklerin Tıp Alanında Uygulama Alanları. İlaç Kimyası Tezsiz Yüksek Lisans Uzaktan Eğitim Programı. Dicle Üniversitesi, Türkiye.

Ozurkcan S.A., Turhan K., Turgut Z., Karadayi M., Gulluce M., 2013. Ultrasonic Synthesis, Characterization of β-Aminoketones by Bismuth (III) Triflate and Determination of Antigenotoxic Properties. *Toxicology and Industrial Health*. 1-9.

Pandeya S.N., Sriram D., Nath G., Clercq E.D., 1999a. Synthesis, Antibacterial, Antifungal and Anti-HIV Evaluation of Schiff and Mannich Bases of Isatin Derivates with 3-Amino-2-Methylmercapto Quinazolin-(*3 H*)-one. *Pharmaceutica Acta Helvetiac*. 74: 11-17.

Pandeya S.N., Sriram D., Nath G., Clercq E.D., 1999b. Synthesis, Antibacterial, Antifungal and Anti-HIV Activities of Schiff and Mannich Bases Derived From Isatin Derivates and N-[4-(4'-Chlorophenyl)Thiazol-2-yl] Thiosemicarbazide. *Europen Jornal of Pharmaceutical Sciences*, 9: 25-31.

Pandeya S.N., Sriram D., Nath G., Clercq E.D., 1999c. Synthesis and Antimicrobial Activity of Schiff and Mannich Bases of Isatin and its Derivates with Pyrimidine. *II Farmaco*, 54: 624-628.

Paolini M., Forti G.C., 1997. On The Metabolizing Systems for Short-Term Genotoxicity Assays A Review. *Mutation Research*, 387: 17-34.

Patel V.K., Vasanwala A.M., Jejurkar C.R., 1989. Synthesis of Mixed Schiff Base Complexes of Cu (II) and Ni (II) and Their Spectral, Magnetic and Antifungal

Studies. *Indian Journal of Chemistry*, 28A: 719-721.

Pires dos Santos, M.L., Alairo A.F., Mangrich A.S., Ferreira A.M.C., 1998. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 71: 71-78.

Qurbanov A.İ., Attar A., 2007. Bakterilerin Antibiyotiklere Duyarlılığına Antioksidanların Etkisinin İncelenmesi, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 64(2): 14-20.

Raman N., Thangaraja C., 2005. Synthesis, Structural Characterization, Cyclic Voltametric and Antibacterial Studies of tetraaza 13-membered Macrocyclic Copper(II), Nickel(II), Cobalt(II) and Zinc(II) Complexes Derived from the Schiff base 3-salicylidene-2,4-di(imino-4'-antipyrinyl)pentane and o-phenylenediamine *PolishJ.Chem*., 79 (7): 1123 – 1134.

Raman N., Kulandaisamy A., Jeyasubramanian K., 2002. Synthesis, Spectroscopic Characterization, Redox and Biological Screening Studies of Some Schiff Base Transition Metal (II) Complexes Derived From Salicylidene-4-Aminoantipyrine and 2-Aminophenol/ 2-Aminothiophenol. *Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry*, 31: 1249-1270.

Rosen J.S., Segall Y., Casida J.E., 1980. Mutagenic Potency of Haloacroleins and Related Compounds. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 78: 113-119.

Rosin M.P., Stich H.F., 1978. The Inhibitory Effect of Cysteine on the Mutagenic Activities of Several Carcinogens. *Mutation Research*, 54: 73-81.

Şakiyan I., Anar M., Ogutcu H., Agar G., Sarı N., 2014. Schiff Bases Attached L-glutamine and L-asparagine: First Investigation on Antimutagenic and Antimicrobial Analyses. *Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology*, 42(3): 199-204.

Sakura A., Suzuki S., Satoh T., 2004. Improvement of the Ames Test Using Human Liver S9 Preparation. In: Yan, Z. ve Caldwell, G., Eds. *Optimization in Drug Discovery: in vitro Methods*. Humana Press. 325-336.

Saleh N., Khabour O.F., Esmadi F.T., Kofahi E.A., 2011. *In vivo* Cytogenetic Studies on Rat's Bone-Marrow Cells of Structurally Related Schiff Base Complexes. *Drug and Chemical Toxicology*, 34 (1): 92-99.

Samejima K., Kanazawa K., Ashida H., Danno G., 1995. Luteolin: A Strong Antimutagen Against Dietary Carcinogen, Trp-P-2, in Peppermint, Sage, and Thyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 410-414.

Schiff H.,1864. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 131(1): 118-119.

Scovill J.P., Klayman D.L, Lambos C., Childs G.E., Nortsch, J.P. 1984. 2-Acetylpyridine Thiosemicarbazones. 9. Derivatives of 2-Acetylpyridine 1-Oxide as Potential Antimalarial Agents. *Journal Medicinal Chemistry*, 27(1): 87-91.

Selçuk S., 2010. Bazı Schiff Bazı Türevleri ve Metal Komplekslerinin Antioksidan ve Antitümör Özelliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Fırat Üniversitesi, Türkiye.

Sevgi F., 2010. İndollerin Bazı Dioksim Türevlerinin Sentezi, Mikrodalga ile Furazanlara Dönüştürülmesi ve Antimikrobiyal Etkilerinin İncelenmesi. Doktora Tezi. Selçuk Üniversitesi, Türkiye.

Shamberger J.R., Cyntia L., Beaman K.D., Kasten B.L., 1979. Antioksidants Reduce the Mutagenic Effect of Malonaldehyde and β-propiolactone. *Muation Research*, 66: 349-355.

Sharma P.K., Dubey S.N., 2002. Synthesis and Structural Studis of Iron (II) Complexes with N-Salicylidene-and N-(2-Hydroxy-1-Naphthylidene) Amino Acids. *Indian Journal of Chemistry*, 33A: 1113-1115.

Shi L., Ge H.M., Tan S.H., Li H.Q., Song Y.C., Zhu H.L., Tan R.X., 2007. Synthesis and Antimicrobial Activities of Schiff Bases Derived from 5-Chloro-Salicylaldehyde. *Europen Journal of Medicinal Chemistry*, 42: 558-564.

Solomons T.W., Fryhle C.B., 2002. Organik Kimya, *Literatür Yayıncılık*, İstanbul.

Sridhar S.K., Saravanan M., Ramesh A., 2001. Synthesis and Antibacterial Screening of Hydrazones, Schiff and Mannich Bases of Isatin Derivates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 36: 615-625.

Sur B., Chatterjee S.P., Sur P., Maity T., Roychoudhury S., 1990. Studies on the Antineoplasticity of Schiff Bases Containing 5-Nitrofuran and Pyrimidine, *Oncology*, 47(5) : 433-438.

Syamal A., Singhal O. P.,1981. Syntheses and Characterisation of New Dioxouranium(VI) Complexes with Tridentate Sulfur Donor Ligands. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry.*, 43 (11): 2821 – 2825.

Temel H., Çakır Ü., Tolan V., Otludil B., Uğraş H.İ., 2004. Complexation and Mutagenicity Potential Studies with N,N'-*bis*(2-Hydroxynaphthalin-1-carbaldehydene)-1,2-*bis*-(P-aminophenoxy)Ethane and a Novel Oxovanadium(IV) Complex. *Journal Coordination Chemistry*, 57: 571-581.

Tümer M., Akgün E., Toroğlu S., Kayraldız A., Dönbak L., 2008. Synthesis and Characterization of Schiff Base Metal Complexes: Their Antimicrobial, Genotoxicity and Elecrochemical Properties. *Journal of Coordination Chemistry*, 61: 2935-2949.

Tweats D., Trunz B.B., Torreele E., 2012. Genotoxicity Profile of Fenixidazole a Drug Candidate in Clinical Development for Human African trypanomiasis (Sleeping Sickness). *Mutagenesis*. 27: 523-532.

Victorin K., Busk L., Ahlborg U.G., 1987. Retinol (Vitamin A) Inhibits the Mutagenicity of O-aminoazotoluene Activated by Liver Microsomes from Several Species in the Ames Test. *Mutation Research*, 179: 41-48.

Vural N., 2005. Toksikoloji. Ankara Üniversitesi, *Eczacılık Fakültesi Yayınları*, No:73, Ankara, s.210.

Yamagami C., Motohashi N., 2002. Quantitative Structure-Activity Relationship of Antimutagenic Benzalacetones and 1,1,1- Trifluoro-4-Phenyl-3-Buten-2-Ones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 37: 127-133.

Yang D.L., Fokas D., Li J.Z., Yu L., C.M.A., 2005. Versatile Method for the Synthesis of Benzimidazoles From o-nitroanilines and Aldehydes in One Step Via a Reductive *Synthesis*, 1:47-56.

Yıldız M., Kılıç Z., Hökelek T., 1998. Intramolecular Hydrogen Bonding and Tautomerisim in Schiff Bases. Part I. Structure of 1,8-di[N-2-oxyphenyl-salicylidene]-3,6-Dioxaoctane. *Journal of Molecular Structure*, 441: 1-10.

Yıldız M., 2004. Synthesis and Spectroscopic Studies of Some New Polyether Ligands of Schiff Base Type. *Spectroscopy Letters*, 37(4): 367-381.

Yıldız M., Dülger B., Koyuncu S.Y., Yapıcı B.M., 2004. Synthesis and Antimicrobial Activity of bis(imido) Schiff bases Derived from Thiosemicarbazide with Some 2-hydroxyaldehydes and Metal Complexes. *Journal of the Indian Chemical Society*, 81: 7-12.

Yıldız M., Dülger B., Çınar A., 2005. Synthesis and Characterization of New Crown ethers of Schiff base Type and Their Complexes, *Journal of the Indian Chemical Society,* 82: 414-420.

Yıldız M., Kiraz A., Dülger B., 2007. Synthesis and Antimicrobial Activity of New Crown Ethers of Schiff Base Type. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72(3): 215-224.

Yüksel S., 2005. Bazı Sübsititüe Benzinidenilin Türevlerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames *Salmonella* Mikrozom Testi İle Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Anadolu Üniversitesi, Türkiye.

Zeishen W., Zigi G., Zhenhuan Y., 1990. Synthesis, Characterization and Anticancer Activity of L-Alanin Schiff Base Complexes of Copper (II), Zinc (II), Nickel (II) and Cobalt (II). *Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry,* 20: 335-344.

Zhang X.Y., Liu X.J., Zeng F.M., An J., Yu Y.X., Elfarra A.A., 2013. Cytotoxicity, Genotoxicity and Mutagenicity of 1-Chloro-2-Hydroxy-3-Butene and 1-Chloro-3-Buten-2-one, Two Alternative Metabolites of 1,3-Butadiene. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 271: 13-19.

Zhou Y., Zhang L., Zeng X., Vital J. J. ve You X., 2000. A New Structurally Characterized Organotin/Schiff Base Complex with Approximately Rectangular Molecular Boxes Formed Through Hydrogen Bonds. *Journal of Molecular Structure,* 553 (1-3): 25-30.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Esen GEREN

Doğum Yeri : Tavşanlı/ KÜTAHYA

Doğum Tarihİ : 03.01.1990

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü
(2008-2012)

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
(2013-2015)

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

- Ballı,M., Demir,N., Ertürk,S. ve Geren,E., 2013. Preliminary Investigation on Heavy Metal Pollution in *Pecten maximus* in the Dardanelles Bosphorus, Turkey. Second Scientific Conference on Ecology, University of Plovdiv/Bulgaria
- Demir, N., Ertürk, S.,Ballı,M. ve Geren,E., 2013. Seasonal Variation of Heavy Metal Bioaccumulation in The Tissues of *Ruditapes decussatus* from Cardak, Canakkale-Turkey. Second Scientific Conference on Ecology, University of Plovdiv/Bulgaria
- Ertürk,S., Ballı,M., Demir,N. ve Geren,E., 2013. Metal Concentrations in Mantle Tissue of Some Aquatic Invertebrates from Umurbey, Canakkale-Turkey. Second Scientific Conference on Ecology, University of Plovdiv/Bulgaria

İLETİŞİM

E-posta Adresi: e_geren@hotmail.com