

Kas Gevşetici Etki Gösteren ve Anksiyolitik Özelliğe Sahip Bir Etken Madde Olan Mefenoksalon'un Mutajenik Aktivitesinin Ames/Salmonella/Mikrozom Yöntemi İle Test Edilmesi

Mehmet ARSLAN¹, Nurcan ERBİL^{1*}

Ardahan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Yüksekokulu, Hemşirelik Bölümü, Ardahan, TÜRKİYE

(Geliş Tarihi/Received: 19.02.2016, Kabul Tarihi/Accepted: 11.03.2016)

ÖZET

Bu çalışmada kas gevşetici bir ilaç etken maddesi olan Mefenoksalon (Dorsilon®)'un mutajenik etki potansiyeli, Ames test yöntemi kullanılarak *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları yardımı ile test edilmiştir. Çalışmalar esnasında *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları Mefenoksalon (Dorsilon®)'un altı farklı dozu ile muamele edilmiş olup, sonuçta Mefenoksalon (Dorsilon®)'un kullanılan hiçbir dozunun çerçeve kayması ve baz çifti değişimi mutasyonlarına neden olmadığı tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Mefenoksalon, Ames testi, Mutajen etki, *Salmonella typhimurium*

Investigation of Mutagenic Activity of Mephenoxalone as a Muscle Relaxant and Mild Anxiolytic with Ames/Salmonella/Microsome Test

ABSTRACT

In this study, Mephenoxalone (Dorsilon®) which is a muscle relaxant and mild anxiolytic were tested for its potencial muganic activity in TA 98 and TA 100 strains of *Salmonella typhimurium* by using Amest test. TA 98 and TA 100 strains of *Salmonella typhimurium* were exposed to six doses of Mephenoxalone (Dorsilon®). Consequently, it was determined that none of these doses used in this study caused frame-shift mutations and base pair substitution mutations.

Keywords: Mephenoxalone, Ames test, Mutagenic effect, *Salmonella typhimurium*

1. Giriş

Mefenoksalon kas gevşetici (Magnenat, 1961) ve anksiyolitik olan bir etken maddedir (Tablo 1). Bu madde nöron iletimini inhibe eder ve refleks arkını inhibe ederek iskelet kasını gevşetir. Kas gevşetici olarak mefenoksalon mental durumu etkiler ve asabiyet ve anksiyete için de bir iyileştirme sağlar (URL, 2016). Mefenoksalonun sentezi Lunsford tarafından rapor edilmiştir (Lunsford vd., 1960); ancak bunun dışında literatürde mefenoksalon sentezi ile ilgili

sadece birkaç tane çalışma bulunmaktadır (Takahashi vd., 1990; Vigroux vd., 1995; Lee vd., 2003; Bredikhin vd., 2007).

Kimyasal maddelerin birçoğu canlılar üzerinde genotoksik ve karsinojenik etkiye sahiptir. Dolayısıyla bu maddelerin canlılar üzerinde mutajenik etki de gösterebilecekleri kabul edilmektedir. İnsanların bu tarz kimyasal maddelerin karsinojenik ve mutajenik etkilerinden korunabilmesi için bu maddelerin tespit edilmesi ve etkilerinin test edilmesi önem taşımaktadır (Levin ve

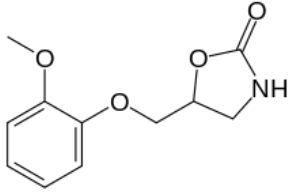
Ames, 1986; Lawley, 1989; Hansch, 1991; Anders ve Dekont, 1994). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) de tıp, eczacılık ve kozmetik alanında kullanılmak üzere sentezlenmiş olan kimyasal maddelerin kullanılmadan önce mutajenik etkilerinin var olup olmadığı konusunda test edilmesini zorunlu kılmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Test Maddesinin Hazırlanması

Bu çalışmada test maddesi olarak Mefenoksalon (Dorsilon®) kullanılmıştır. Çözücü olarak dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılmış olup, 200 mg Mefenoksalon (Dorsilon®) tablet 2 ml DMSO (dimetil

Tablo 1. Mefenoksalona ait kimyasal bilgiler

Kimyasal Yapısı	Kimyasal Formülü	Moleküler Ağırlığı	CAS No	Sistemik (IUPAC) Adı
	C ₁₁ H ₁₃ NO ₄	223.225 g/mol	70-07-5	5-[(2-methoxyphenoxy)methyl]-1,3-oxazolidin-2-one

sülfoksit) içerisinde çözdürülerek stok solüsyon hazırlanmıştır.

2.2. Ames/Salmonella/Mikrozom Testi

2.2.1. Test suşları

Bu çalışmada *Salmonella typhimurium*'un TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmıştır. Bunlardan TA 98 suşu çerçeve kayması, TA 100 suşu ise baz çifti değişimi mutasyonlarına neden olan ajanlara karşı duyarlılık göstermektedir. Bu test suşları düzenli olarak Rfa mutasyonu, R faktör varlığı, kristal viyole duyarlılığı, histidin ihtiyacı, UVr B mutasyonu, ampisiline dirençlilik ve spontan geri dönüş oranları için Maron ve Ames (1983) tarafından önerilen metoda göre kontrol edilmiştir.

2.2.2. Sitotoksik etkinin belirlenmesi

Mefenoksalon (Dorsilon®)'un *Salmonella typhimurium*'un TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde öldürücü olmayan dozlarının belirlenmesi amacıyla, 2 ml top agar içerisine 16 saat süre ile inkübe edilmiş olan bakteri kültürlerinin her birinden 100 µl ve Mefenoksalon (Dorsilon®)'un değişik derişimlerdeki çözeltisinden eklenmiştir. Bu karışım homojen bir hale getirildikten sonra MGA besiyeri içeren petrilere dökülerek 37 °C'de 48-72 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında test maddesi içeren plaklarda gelişen koloni sayıları kontrol plakları ile karşılaştırılmış ve böylece toksik özellik göstermediği belirlenen altı doz tespit edilmiştir (0.1, 1, 10, 100, 1000, 10000 µg/petri). Analizler bu dozlar ile yapılmıştır. Sitotoksik doz, LD₅₀'nin altında olması

gerekir. Deneme plaklarındaki koloni sayısı kontrol plağındaki koloni sayısının yarısının altında olmaması durumunda, doz toksik olarak kabul edilmemektedir.

2.2.3. Mutajenite testi

Mutajenite testi Maron ve Ames (1983) tarafından belirtilen metoda göre plak inkorporasyon tekniğı ile yapılmıştır. Analizler esnasında içerisine histidin ve biyotin eklenmiş olan 2 ml top agar içerisine 16 saat süre ile inkübe edilmiş olan bakteri kültürlerinin (yaklaşık 1×10^9 bakteri/ml) her birinden 100 µl ve Mefenoksalon (Dorsilon®)'un belirtilen dozlarından 100 µl eklenerek homojen olarak karıştırıldıktan sonra MGA besiyeri içeren petrilere dökülmüştür. Ayrıca pozitif kontrol olarak TA 98 suşu için 4-nitro-o-phenylenediamine (4-NPD) (100 µg/petri), TA 100 suşu için ise sodyum azid (SA) (10 µg/petri) kullanılmış olup; çözücü kontrol olarak ise DMSO (dimetil sülfoksit) (100 µL/petri) kullanılmıştır. Çalışmalar üç tekrar olarak yapılmış olup, ekimler sonrasında petriyer 37 °C'de 48-72 saat süre ile inkübe edilmiştir.

2.2.4. İstatistiksel analizler

Analizler sonucunda Mefenoksalon (Dorsilon®)'un etkisiyle gelişen revertant koloniler sayılmıştır. Elde edilen değerler neticesinde, kontrol plakları ile Mefenoksalon (Dorsilon®)'un farklı dozlarının çalışıldığı plaklarda gelişen kolonilerin sayıları arasındaki farkın önemli olup olmadığı SPSS paket istatistik programında ANOVA (Dunnett Testi) test metodu kullanılarak belirlenmiştir.

3. Bulgular

Bu çalışmada elde edilen veriler incelendiğinde *Salmonella typhimurium*'un TA 98 ve TA 100 suşlarında Mefenoksalon (Dorsilon®)'un denenen tüm dozları için revertant koloni sayısının kontrol ve çözücü kontrole göre önemli seviyede bir artış göstermediğı belirlenmiştir. ($P>0.05$). Tablo 2 incelendiğinde TA 98 suşunda revertant koloni sayısında 1 µg ve 100 µg dışındaki tüm dozlarda çok hafif bir artış meydana geldiğı gözlenirken, bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. TA 100 suşunda ise kontrol ve çözücü (DMSO/dimetil sülfoksit) kontrole göre sadece 1000 µg'da revertant koloni sayısında hafif bir artışın meydana geldiğı tespit edilmiş; ancak bu artışın da istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca test gruplarındaki revertant koloni sayısının, pozitif kontrol ile muamele edilen gruplara nazaran önemli derecede düşük çıktığı belirlenmiş olup (Tablo 2), bu önemli düşüş mutajenik olmayan kimyasallar için beklenen bir sonuçtur.

Sonuç olarak analizler neticesinde, Mefenoksalon (Dorsilon®)'un uygulanan farklı dozlarının *Salmonella typhimurium*'un TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde herhangi bir mutajenik aktiviteye sahip olmadığı tespit edilmiştir.

4. Sonuçlar ve Tartışma

Ames/Salmonella/Mikrozom yönteminde test edilen maddenin etkisiyle gelişen revertant kolonilerin sayısında doza bağılı olarak bir artış meydana gelmişse ve revertant kolonilerin sayıları çözücü kontrol

grubunda gelişen bakterilerin sayıları ile belirlenmiş sınırlar içerisinde mümkündür. Bu karşılaştırıldığında en az bir doz için sınırlar TA 98 için 20-50 revertant/plak; TA istatistiksel olarak anlamlı bir fark 100 için 75-200 revertant/plak'tır. gözlenebiliyorsa bu madde mutajen olarak Çalışmamızda belirlenen revertant koloni kabul edilmektedir. Mutant bakteri sayıları uygun değerde bulunmuştur (Maron suşlarının kendiliğinden (spontan) his (-) ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, durumundan his (+) durumuna dönüşmesi 2000).

Tablo 2. Mefenoksalon (Dorsilon®)'un farklı dozlarının *Salmonella typhimurium*'un TA 98 ve TA 100 suşları üzerindeki mutajenik etkileri

Test Maddesi	Konsantrasyon	Revertant koloni±SS	
		TA 98	TA 100
Kontrol		16 ± 0,577	99 ± 1,15
Çözücü Kontrol (DMSO) ⁽¹⁾	100 µL/petri	13 ± 2,52	120,33 ± 2,91
4-NPD ⁽²⁾	100 µg/petri	2523 ± 29,4 ^{a3}	-
SA ⁽³⁾	10 µg/petri	-	1482 ± 20,8 ^{a3}
Mefenoksalon ⁽⁴⁾	0,1 µg/petri	21,67 ± 2,03 ^{c3}	93 ± 2,89 ^{c3}
Mefenoksalon	1 µg/petri	12 ± 1,15 ^{c3}	89 ± 6,35 ^{c3}
Mefenoksalon	10 µg/petri	18 ± 4,04 ^{c3}	85,67 ± 6,01 ^{c3}
Mefenoksalon	100 µg/petri	15,67 ± 1,45 ^{c3}	85,7 ± 19,1 ^{c3}
Mefenoksalon	1000 µg/petri	19 ± 3,21 ^{c3}	125,3 ± 18,0 ^{c3}
Mefenoksalon	10000 µg/petri	27,3 ± 10,2 ^{c3}	90 ± 13,7 ^{c3}

*Revertant kolonilerin tespiti için toplam üç petri kutusu değerlendirilmiştir.

(1): dimetil sülfoksit; (2): 4-nitrophenylene daimine; (3): Sodyum azid; (4): Mefenoksalon (Dorsilon®); (5): Standart sapma; a: kontrol ile aradaki fark önemli; b: çözücü kontrol ile aradaki fark önemli; c: Pozitif kontrol ile aradaki fark önemli; a₁b₁c₁: P<0,05; a₂b₂c₂: P<0,01; a₃b₃c₃: P<0,001

Literatürde farklı kas gevşetici ilaçların mutajenik aktiviteleri ile ilgili bazı çalışmalara rastlanmıştır. Kas gevşetici bir ilaç olan Diazepam'ın mutajenik aktivitesi ile ilgili yapılan bir çalışmada *Salmonella typhimurium*'un TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 ve TA 1538 suşları ile geri mutasyon testi uygulanmış ve sonuçta metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda negatif sonuç verdiği belirlenmiştir. Aynı ilaç

Saccharomyces cerevisiae geri mutasyon testinde ise sadece metabolik aktivatör yokluğunda negatif sonuç vermiştir (Balbi vd., 1980). Benzer bir çalışmada ise Benzodiazepinler ve Benzodiazepin analoglarının çoğunun *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae* geri mutasyon testlerinde metabolik aktivatör (S9 karışımı) varlığında ve yokluğunda negatif sonuç verdiği gözlenmiştir (Balbi vd., 1980; Staiano vd., 1984; Kier vd., 1986; Wakisaka ve Nishimoto, 1987; Stoyanov vd., 1987; Black vd., 1987; Yamakage vd., 1994; Chlopkiwicz vd., 2001; Brambillaa vd., 2007). Tarafımızca yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ile literatürdeki bu çalışmaların sonuçları uygunluk göstermektedir.

Farklı kimyasal maddelerin mutajenik aktivitesi üzerine de çeşitli çalışmalar literatürde mevcuttur. Kutlu vd. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada malaria hastalığının tedavisine yönelik olarak sentezlenmiş olan ilaç adayı üç farklı fenantren türevi mutajenik aktivite yönünden Ames/Salmonella/Mikrozom yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Sonuçta ise metabolik aktivasyon yokluğunda, sentezlenen bileşiklerden yalnızca bir tanesinin çerçeve kayması mutasyonuna neden olduğunu, iki tanesinin ise baz çifti değişimi mutasyonuna neden olduğunu belirlemişlerdir. Metabolik aktivasyonlu ortamda ise iki maddenin TA 98 suşu için mutajenik aktivite sergilediğini tespit etmişlerdir.

dos Santos vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada orak hücre anemisinin tedavisinde kullanılması planlanan bazı yeni bileşiklerin mutajenik aktivitelerini *Salmonella typhimurium*'un TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde test etmişlerdir. Sonuçta test edilen kimyasal bileşenlerin 0-4.803 revertants/ μ mol arasında değişen oranlarda mutajenik potansiyele sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Silva vd. (2015) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olan "sülfonamis kalkon N- $\{4[3-(4\text{-nitrofenil})\text{prop-2-enol}]\text{fenil}\}$ benzensülfonamid" (CPN)'in genotoksik, sitotoksik, antigenotoksik ve antisitotoksik özelliklerini *Salmonella typhimurium* geri mutasyon testi (Ames) ve fare kemik iliği mikronükleus testi ile çalışılmıştır. Sonuçlar göstermiştir ki CPN, *Salmonella typhimurium*'un TA 98 ve TA 100 suşlarının histidin revertant kolonilerinin sayısında küçük bir artışa neden olmuş; ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

Bir diğer çalışmada dokuz farklı sistostatik ilacın mutajenik etkisi Ames revizyon testi kullanılarak *Salmonella typhimurium* suşları ile çalışılmıştır. Çalışma sonucunda bu ilaçlardan 6-merkaptopürin, cloturin, adriamisin, mitoksantron, siklofosfamid ve lomustin'in mutajenik etkiye sahip olduğu; ancak butosin, orasin ve tris(2-kloroetil)amin'in negatif sonuç verdiği belirlenmiştir (Marhan, 1995).

Konu ile ilgili önceki çalışmalar incelendiğinde aynı test maddesinin farklı test yöntemleri ile denendiği zaman farklı sonuçlar verebildiği görülmektedir. Tarafımızca yapılan bu çalışmada Mefenoksalon (Dorsilon®)'un *Salmonella typhimurium*'un TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde matajenik aktivite göstermediği belirlenmiştir. Bu sonuç çalışılan bu ilaç etken maddesinin bağımsız bir kişi/kuruluş tarafından test edilerek güvenilirliğinin ortaya konulması açısından önemli bir basamaktır. Ancak güvenilirliğinin tam olarak kanıtlanabilmesi için farklı test yöntemleri ile de test edilmesi gerekmektedir.

5. Kaynaklar

Anders, M.W., Dekont, W. 1994. Conjugation-Dependent Carcinogenicity and Toxicity of Foreign Compounds. *Advance in Pharmacology*, 27, 511-519.

Balbi, A., Muscettola, G., Staiano, N., Martire, G., De Lorenzo, F.1980. Psychotropic drugs: evaluation of mutagenic effect. *Pharmacological Research Communications*, 12, 423-431.

Black, H., Szot, R., Arthaud, L., Massa, T., Mylecraine, L., Klein, M., vd. 1987. Preclinical safety evaluation of the benzodiazepine quazepam. *Arzneim - Forsch*, 37, 906-913.

Brambillaa, G., Carrozzinob, R., Martellia, A. 2007. Genotoxicity and carcinogenicity studies of benzodiazepines.

Pharmacological Research, 56(6), 443-458.

Bredikhin, A.A., Bredikhina, Z.A., Zakharychev, D.V., Pashagin, A.V. 2007. *Tetrahedron: Asymmetry*, 18, 1239.

Chlopkiewicz, B., Ejchart, A., Anuszewska, E. 2001. Tofisopam-evaluation of mutagenic and genotoxic properties. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 58, 31-34.

dos Santos, J.L., Varanda, E.A., Lima, L.M., Chin C.M., 2010. Mutagenicity of New Lead Compounds to Treat Sickle Cell Disease Symptoms in a *Salmonella* /Microsome Assay. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 779-788.

Hansch, C. 1991. Structure-Activity Relationships of Chemical Mutagens and Carcinogens. *The Science of The Total Environment*, 109, 17-29.

Kier, L., Brusick, D., Auletta, A., Halle, E.V., Brown, M., Simmon, V., et al. 1986. The *Salmonella typhimurium* /mammalian microsomal assay. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*, 168, 69-240.

Kutlu, M., Öztaş, E., Aydoğan, G., Işıklıdağ, İ., Özkay, Y. 2011. Bazı 9-Süstitüe Fenantren Türevlerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames /*Salmonella* /Mikrozom Testi ile Araştırılması. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi-C Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji*, 1(1), 83-94.

- Lawley, P.D. 1989. Mutagens as Carcinogens: Development of Current Concepts. Mutation Research, 213, 3-25.
- Lee, F.Y., Huang, T., Chung, C.H. 2003. US Patent No. 6,562,980 B1.
- Levin, D.E., Ames, B.N. 1986. Classifying Mutagens as to Their Specificity in Causing The Six Possitive Transitions, Transversions A Simple Analysis Using The Mutagenity Assay. Environmental Mutagenesis, 8, 9-28.
- Lunsford, C.D. Mays, R.P. Richman, J.A., Murphey, R.S. 1960. Journal of the American Chemical Society, 82, 1166.
- Magenat, M. 1961. The utilization in psychotherapy of a tensiolytic agent with muscle relaxant effect, Control OM (mephenoxalone), alone or associated with thymoleptics. Therapeutische Umschau, Revue therapeutique, 18, 516-520.
- Marhan, J. 1995. Mutagenicity of Cytostatic Drugs in A Bacterial System .1. Ames Test. Folia Microbiologica, 40(5), 457-461.
- Maron, D., Ames, B. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research, 113, 173-215.
- Mortelmans, K., Zeiger, E.E. 2000. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. Mutation Research, 455(1-2), 29-60.
- Silva, C.R., Borges, F.F., Bernardes, A., Perez, C.N., Silva Dde, M., Chen-Chen, L. 2015. Genotoxic, Cytotoxic, Antigenotoxic, and Anticytotoxic Effects of Sulfonamide Chalcone Using the Ames Test and the Mouse Bone Marrow Micronucleus Test. Plos One, 10(9), e0137063.
- Staiano, M.N., Belisario, R., Morte, C.D., Farina, P., Rimondelli, G. 1984. Muscettola Mutagenic effects of flunitrazepam. Boll Soc It Biol Sper, 60, 2247-2253.
- Stoyanov, I., Nikolov, I., Chernozemskii, I., Stoichev, I. 1987. Assessment for mutagenicity of 10 pharmaceutical products following Ames, micronucleus, and sperm morphology testing. Toxic Assess, 2, 207-215.
- Takahashi, H., Sakuraba, S., Takeda, H., Achiwa, K. 1990. Journal of the American Chemical Society, 112, 5876.
- URL:<https://en.wikipedia.org/wiki/Mephenoxalone>, 27.01.2016.
- Vigroux, A., Bergon, M., Zedde, C. 1995. Journal of Medicinal Chemistry, 38, 3983.
- Wakisaka, Y., Nishimoto, Y. 1987. Mutagenicity study of a new sleep inducer, a 1H-1,2,4-triazolylbenzophenone derivative (450191-S) and its metabolite in bacteria. Iyakuin Kenkyu, 18, 12-20.
- Yamakage, K., Katoh, M., Sakamoto, K., Sasaki, K., Hashimoto, K., Ishihara, N., vd. 1994. Mutagenicity tests of clobazam. Iyakuin Kenkyu, 25, 874-885.