



## SEFTRİAKSON ETKEN MADDELİ İLACIN İNSAN PANKREAS HÜCRESİ ÜZERİNDE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN MTT TESTİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Asena KURT<sup>1\*</sup>, Zinet ÇÖL<sup>1</sup>, Ömer ERTÜRK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ordu University, Department of Molecular Biology and Genetics, 52200, Ordu, Türkiye

**Özet:** Tıp dünyasında önemli yere sahip olan antibiyotikler bakterilerin sebep olduğu enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde sıklıkla kullanılan bir grup ilaçtır. Yararlı etkilerin yanı sıra yan etkisiz değildir. Her zaman klinikte saptanamayan yan etkilere hücresel düzeyde saptanabilir. Hücresel düzeydeki hasarlar yeni bozukluklara yol açabilir. Seftriakson, üçüncü kuşak sefalosporinler grubuna ait antibiyotiktir. Gram negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde tercih edilir. Bu çalışmada, seftriakson antibiyotisinin insan pankreas hücresinde (hTERT-HPNE) sitotoksitesi araştırıldı. hTERT-HPNE hücreleri, seftriakson etken maddesi içeren ilaca maruz bırakıldı. Deney grubu konsantrasyonu, 0,097 mM, 0,195 mM, 0,390 mM, 0,781 mM, 1,562 mM, 3,125 mM, 6,25 mM, 12,5 mM aralığında hazırlanarak 24,48 ve 72 saatlik maruziyet süresine bırakılmıştır. MTT testi sonuçlarında doza bağlı hücre canlılığında düşüşler görülmüştür. Hücre canlılığında ilk azalma, 24 saatlik maruziyetten sonra 0,781 mM'lik bir konsantrasyonda ve 48 saatlik maruziyette 0,195 mM'lik konsantrasyonda gözlemlendi. 72 saatlik maruziyet süresinde ise uygulanan tüm konsantrasyonlarda hücre canlılığı azaldı. Seftriakson etken maddeli antibiyotinin maruziyeti sonrasında hücrelerin morfolojilerinde değişim ve canlılığını kaybetmiş hücreler gözlemlenmiştir. Sonuç olarak seftriaksonun dozuna bağlı olarak hücre canlılığındaki azalmalar negatif kontrole kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $P < 0,05$ ). Deney sonucunda seftriaksonun hTERT-HPNE üzerinde sitotoksitesine neden olduğu belirlenmiştir. Çalışmamız seftriakson etken maddeli antibiyotinin insan pankreas hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri olabileceği hipotezini desteklemekte ve antibiyotiklerin hücresel düzeyde yan etkilerine dikkat çekmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Seftriakson, Sitotoksitesite, hTERT-HPNE, Pankreas hücresi


### Evaluation of Cytotoxic Effects of Ceftriaxone Active Ingredient Drug on Human Pancreatic Cell by MTT Test


**Abstract:** Antibiotics, which have an important place in the medical world, are a group of drugs that are frequently used in the treatment of infectious diseases caused by bacteria. Besides the beneficial effects, they are not without side effects. Side effects that are not always clinically detectable can be detected at the cellular level. Damages at the cellular level can lead to new disorders. Ceftriaxone is an antibiotic belonging to the third generation cephalosporins group. It is preferred in the treatment of infections caused by gram negative bacteria. In this study, the cytotoxicity of the antibiotic ceftriaxone in human pancreatic cell (hTERT-HPNE) was investigated. hTERT-HPNE cells were exposed to drug containing the active ingredient ceftriaxone. The concentration of the experimental group was prepared in the range of 0.097 mM, 0.195 mM, 0.390 mM, 0.781 mM, 1.562 mM, 3.125 mM, 6.25 mM, 12.5 mM and left for exposure time of 24.48 and 72 hours. Dose-related decreases in cell viability were seen in the MTT test results. The initial reduction in cell viability was observed at a concentration of 0.781 mM after 24 hours of exposure and at a concentration of 0.195 mM at 48 hours of exposure. Cell viability decreased at all applied concentrations during 72 hours of exposure. Changes in the morphology of the cells and cells that lost their vitality were observed after exposure to the antibiotic with ceftriaxone active ingredient. As a result, decreases in cell viability depending on the dose of ceftriaxone were statistically significant when compared to the negative control ( $P < 0.05$ ). As a result of the experiment, it was determined that ceftriaxone caused cytotoxicity on hTERT-HPNE. Our study supports the hypothesis that antibiotics with ceftriaxone active ingredient may have cytotoxic effects on human pancreatic cells and draws attention to the side effects of antibiotics at the cellular level.


**Keywords:** Ceftriaxone, Cytotoxicity, hTERT-HPNE, Pancreatic cell

\*Sorumlu yazar (Corresponding author): Ordu University, Department of Molecular Biology and Genetics, 52200, Ordu, Türkiye

E mail: asena\_05\_61@icloud.com (A. KURT)

Asena KURT  <https://orcid.org/0000-0003-3722-828X>

Zinet ÇÖL  <https://orcid.org/0000-0003-3762-7870>

Ömer ERTÜRK  <https://orcid.org/0000-0001-5837-6893>

**Gönderi:** 14 Mart 2023

**Kabul:** 04 Ağustos 2023

**Yayınlanma:** 15 Ekim 2023

**Received:** March 14, 2023

**Accepted:** August 04, 2023

**Published:** October 15, 2023

**Cite as:** Kurt A, Çöl Z, Ertürk Ö. 2023. Evaluation of cytotoxic effects of ceftriaxone active ingredient drug on human pancreatic cell by MTT test. BSJ Eng Sci, 6(4): 356-362.

### 1. Giriş

Antibiyotik ismi Yunanca anti(karşı) ve bios(yaşam) sözcüklerinden türetilmiştir(Yıldız ve ark., 2010). Waksman 1947 yılında antibiyotik terimini bakterilerin ve diğer mikroorganizmaların büyümesini veya metabolik aktivitelerini inhibe etmek olarak tanımlanmıştır

(Küçükbuğru,2020). XX. Yüzyılın en önemli buluşlarından biri olarak kabul edilen antibiyotikler, mantar veya bakteri gibi mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan ilaç grubudur. Antibiyotikler bu mikroorganizmaların gelişimini durdurma ve hatta bunları öldürebilme



yeteneğine sahip biyolojik kaynaklı ya da sentetik biyoaktif maddelerdir (Topal ve ark., 2015).

Alexander Flemming 1928 yılında *Staphylococcus* varyantları üzerinde çalışmalarını yaptığı kültür ortamına bulaşmış bir küf mantarının çevresinde stafilkokların üreyemediklerini ve öldüklerini şans eseri fark etmiştir. Flemming bu mantarların Penicillium türünden olmalarından dolayı etken maddeye penicillium adını vermiştir. Böylelikle ilk antibiyotik Sir Alexander Flemming tarafından, 1928 yılında keşfedilmiştir (Topal ve ark., 2015). Bilim insanları bu devrim niteliğindeki buluş sonrasında antibiyotikler ile ilgili çalışmalara yoğunlaşmışlardır (Yıldız ve ark., 2010). Günümüzde antibiyotik adı verilen birçok ilaç bulunmaktadır. Bunların önemli bir kısmını sefalosporin grubu antibiyotikler oluşturur. Sefalosporinler  $\beta$ -laktam halkası ve dihidrothiazin halkasından oluşan 7-aminosefalosporanik asid çekirdeğine sahip *Cephalosporium acremonium*'un fermentasyon ürünüdür. Sefalosporinler etki edeceği organizmaların penisilin bağlayıcı proteinlerine (PBP) bağlanarak bakteri hücre duvarındaki peptidoglikan yapının sentezini bozarlar ve bakterisid özellik gösterirler. Bu antibiyotikler antibakteriyel aktivitelerinin genel özelliklerine bağlı olarak beş kuşak şeklinde sınıflandırılırlar (Köksal,2013). Bu sınıflandırma birinci kuşak sefalosporinler, ikinci kuşak sefalosporinler, üçüncü kuşak sefalosporinler, dördüncü kuşak sefalosporinler ve beşinci kuşak sefalosporinler şeklindedir (Yıldız ve ark., 2014).

Güçlü, yarı sentetik ve üçüncü kuşak bir sefalosporin grubuna ait seftriakson antibiyotiği, güçlü bir antimikrobiyal aktivite yelpazesine sahiptir. Seftriaksonun intravenöz uygulaması, özellikle organ enfeksiyonu ve sepsis olmak üzere mikrobiyal enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır (Yıfan ve ark., 2020). Güvenilirlik profili net olarak bilinmemekle beraber olası yan etkileri arasında en sık görüleni makülopapüler döküntülerdir (Yıldız ve ark., 2014). Seftriakson yenidoğan çocuklarda hepatotoksisite, safra koyulaşması ve safra çamuru vakaları yaşanmaması için ilk 2-3 ay içinde tercih edilmemelidir. Anafilaksi riski vardır. Çocuklarda az sayıda da olsa anafilaksi vakaları bildirilmiştir. Çin'de yapılan bir çalışmada seftriaksona bağlı 22 anafilaksi vakasının 4'ünün çocuk olduğu bildirilmiştir (Yao ve ark., 2012). Literatürde üçüncü kuşak sefalosporinlerin çoğunun şaşırtıcı derecede az ciddi yan etkisi bildirilmiştir. Bu durum onları çok çeşitli ciddi enfeksiyonların tedavisinde kullanım için ön planda tutmaktadır.

Antibiyotikler bulunduktan sonra enfeksiyon hastalıklarına bağlı yüksek mortalite ve morbidite hızla azalmıştır (Erdemir ve ark., 2011). Fakat antibiyotiklerin yaygın ve uygunsuz kullanımının artması, mikroorganizmalara karşı dirence, maliyetin artmasına ve ikincil yan etkilerin görülme sıklığında bir artışa yol açar (Güngör ve ark., 2018). Dünya Sağlık Örgütü'ne göre bir ilacın amacına uygun biçimde profilaksi, tanı ya da tedavi amacıyla kullanıldığı dozlarda ortaya çıkan

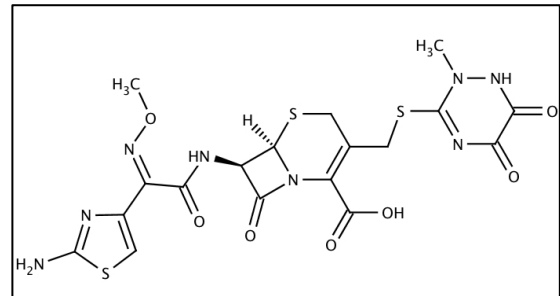
hedeflenmemiş zararlı etkiler yan etkiler olarak tanımlanmaktadır(Gökçe,2017). Klinikte rastladığımız yan etkiler alerjik reaksiyonlar, ishal, cilt reaksiyonları, hepatotoksisite, nefrotoksisite ve hematolojik yan etkiler olarak sınıflandırabiliriz (Öncü, 2013). Bununla birlikte, herhangi bir ilaç için "hücresel düzeyde ne tür bir hasara neden olduğunu" tam olarak söylemek mümkün değildir. Hücresel düzeyde hasarları in vitro kültür ortamında sitotoksisite testleri ile saptanabilir. Sitotoksisite, bir ilacın ya da maddenin hücre ölümüne yol açtığı durumdur (Şahin,2020). İlaçlar hücre zarlarının yapısını tahrip etmesi, protein sentezini baskılaması ve reseptörlere yanlış bağlanma gibi mekanizmalar sonucu hücreler üzerinde sitotoksik etkiye sebep olabilirler (Şahin 2020).

Sitotoksik etkiler hücre canlılığında azalmalar, hücre morfolojisinde değişiklikler olarak karşımıza çıkmaktadır. Hücre ölümlerinin morfolojileri apoptotik hücre ölümlerinde; hücrenin yuvarlaklaşması, hücresel ve çekirdek hacminin azalması, genetik materyal olan çekirdeğin parçalanması, sitoplazmik organellerde değişiklikler, hücre zarı yüzeyinde çıkıntı oluşurken, nekrotik hücre ölümlerinde ise sitoplazmik şişme, sitoplazmik organellerin şişmesi, orta düzeyde kromatin yoğunlaşması ve hücre zarının yırtılmasıdır (Şahin,2020). Literatür araştırmaları sonucunda daha önceki çalışmalarda seftriaksonun hücre üzerindeki toksisitesi hakkında veri eksikliği bulunmamaktadır. Bu çalışmada seftriakson içeren ilacın insan pankreas hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi olup olmadığı araştırılmıştır.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. Seftriakson Etken Maddeli İlaç ve Kimyasallar

Ordu'da bulunan yerel bir eczaneden seftriakson etken maddeli ilaç temin edildi. Seftriaksonun kimyasal yapısı Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Seftriakson grubu antibiyotiklerin kimyasal yapısı

### 2.2. Hücre Kültürü

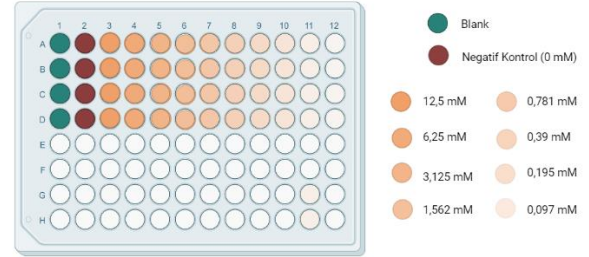
İn vitro model olarak Human Pancreatic Nestin-Expressing cells (hTERT-HPNE) (ATCC® CRL-4023™) insan pankreas epitel hücre hattı American Type Cell Culture'dan (ATCC) (Rockville, MD, ABD) temin edilmiştir. Temin edilen hTERT-HPNE hücrelerinin kültür ortamı için 500 ml Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) besiyeri içerisine 55 ml FBS (%10) ve 0,1 ml penisilin / streptomisin (%1) ilave edilmiş ve homojen

hale getirilmiştir (Cao ve ark., 2022). Uygun kültür kaplarına 5 ml DMEM besiyeri ve 1 ml hTERT-HPNE hücreleri karışımı ekildikten sonra 37°C'de, %95 nem içeren ve %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatöre bırakılmıştır. Her gün invert mikroskopta hücre canlılığı gözlemlenerek besiyerleri üç günde bir değiştirilmiştir. Bu işlem hücre %70-80 yoğunluk olana kadar devam edilmiştir.

### 2.3. MTT Testi

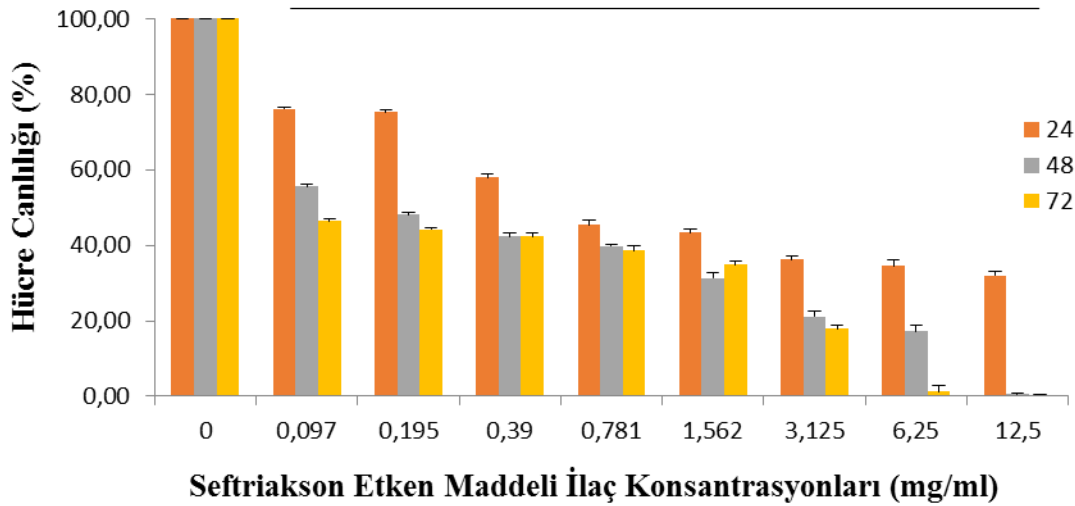
Hücre canlılığı ve sitotoksitesinin kantitasyonunda Tetrazolium tuzu kullanılarak yapılan MTT (3-[4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür]) testi uygulanmıştır. 96 kuyucuklu kültür kaplarının her bir kuyucuğuna 200 µl besiyeri içerisinde 1×10<sup>4</sup> hücrenin ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin normal hücre döngülerini kazanmaları için 1 gün 37°C'de CO<sub>2</sub> inkübatöre kaldırılmıştır. Süre sonunda hücrelerin besiyerleri aspire edilerek taze besiyeri ile yenilenmiştir. Kültür kaplarındaki hTERT-HPNE hücrelerine Şekil 2 ve

Şekil 3'te gösterildiği gibi 100 ml saf su (negatif kontrol) ve seftriakson etken maddeli ilaç 0,097 mM, 0,195 mM, 0,390 mM, 0,781 mM, 1,562 mM, 3,125 mM, 6,25 mM, 12,5 mM dozlarında maruz edilerek, 24 saat, 48 saat ve 72 saatlik maruziyet sürelerinde 37°C'de CO<sub>2</sub> inkübasyonuna bırakılmıştır.



Şekil 2. 96 Kuyucuklu kültür kaplarında seftriakson etken maddeli ilaç için MTT testi uygulama planı.

\*



Şekil 3. 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonrası elde edilen ortalama hücre canlılığı verileri ve standart hata değerlerinin grafiksel olarak gösterimi [\*] çözücü kontrol ile karşılaştırıldığında farklılığı gösterir (P<0,05).

24, 48 ve 72 saatlik muamele süreleri sonunda, kuyucuklara PBS içerisinde hazırlanmış %5'lik MTT solüsyonundan 20 µl eklenmiştir. Kültür kabındaki hücreler 3 saat 37°C'de inkübatörde bekletilmiştir. Süre sonunda içerisinde MTT bulunan besiyeri aspire edilerek formazan kristallerinin çözülmesi için 100 µl DMSO eklenmiş ve 15 dk bekletilmiştir. Kuyucuklardaki mor renkli solüsyonun absorbansı 570 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Kahraman ve ark., 2013).

hTERT-HPNE hücrelerinin, negatif kontrol ve seftriakson etken maddesi ile maruziyet süreleri sonucundaki hücre canlılığı değerleri aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

Hücre canlılığı= (Ortalama doğrulanmış muamele kuyucuğunun absorbans değeri/Ortalama doğrulanmış kontrol kuyucuğunun absorbans değeri) x 100.

### 2.4. İstatistik Analiz

Deney üç kez tekrarlanmış olup veriler bu üç tekrarın ortalamasını ve ± standart hatasını ifade etmektedir.

İnceleme sonucunda elde edilen tüm verilerin homojenliği ve grup ortalamaları arasındaki farkın önemli olup olmadığı SPSS programı kullanılarak tek yönlü varyans analiz metodu (ANOVA) ile belirlenmiştir. Farkın önemli olduğu gruplarda ise, elde edilen sonuçlar Student's t-testi ile karşılaştırılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde P<0,05 anlamlılık seviyesi temel alınmıştır.

## 3. Bulgular

### 3.1. Hücre Canlılığı

MTT testi ile seftriaksonun tüm tedavi süreleri boyunca konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir. Seftriaksonun 24 saatlik maruziyet sonucu hTERT-HPNE hücrelerinin hücre canlılığı değerlerinin konsantrasyon artışına bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Hücre canlılığı değerindeki bu azalmanın ilk olarak 0,781 mM konsantrasyonda %50'nin altına düştüğü görülmüştür. 48 saatlik maruziyet süresi

sonucunda ise, 24 saatlik uygulamaya benzer bir şekilde konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre canlılığında düşüşler tespit edilmiştir. Hücre canlılığı değerindeki ilk düşüş 0,195 mM'lık konsantrasyon ve sonrasında %50'nin altına düşmüştür. 72 saatlik muamele sonrasında seftriaksonun hTERT-HPNE hücrelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisine bakıldığında, doza bağımlı olarak uygulanan tüm doz konsantrasyonlarında

%50'nin altına düşmüştür.

Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldı ve grafiklendirildi. Tüm konsantrasyonlarda seftriaksonun neden olduğu hücre canlılığındaki azalmalar negatif kontrole kıyasla anlamlı bulunmuştur ( $P<0,05$ ). Seftriaksonun aktif bileşeninin hTERT-HPNE hücre canlılığı üzerindeki etkileri Tablo 1'de gösterilmiştir (Tablo 1).

**Tablo 1.** 24,48 ve 72 saatlik seftriakson etken maddesi maruziyet süresi sonrasında konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılıkları ve hesaplanan standart hata değerleri

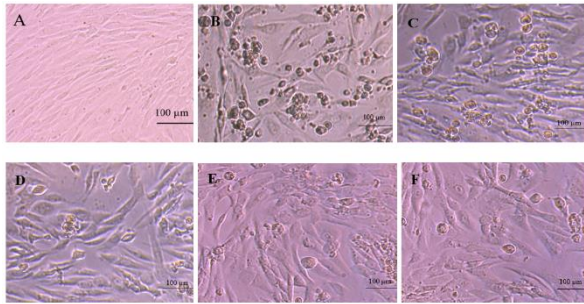
Konsantrasyonlar	24 Saat	48 Saat	72 Saat
Negatif Kontrol	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
0,097	76,18 ± 0,532	55,56 ± 0,50	46,40 ± 0,67
0,195	75,31 ± 0,499	48,15 ± 0,60	44,27 ± 0,25
0,39	57,97 ± 0,817	42,42 ± 0,84	42,40 ± 0,75
0,781	45,36 ± 1,377	39,73 ± 0,64	38,67 ± 1,07
1,562	43,43 ± 0,793	31,31 ± 1,43	34,93 ± 0,85
3,125	36,25 ± 0,876	21,21 ± 1,20	17,87 ± 0,93
6,25	34,50 ± 1,500	17,17 ± 1,55	1,33 ± 1,39
12,5	32,05 ± 1,024	0,67 ± 0,17	0,51 ± 0,58

### 3.2. Morfolojik Değişiklikler

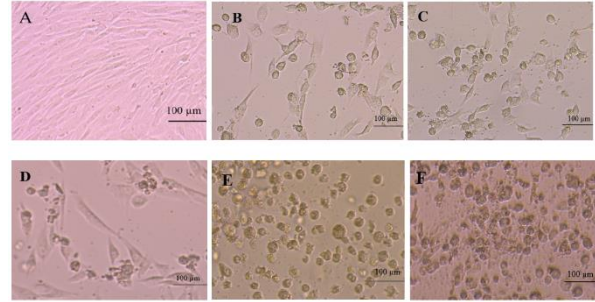
hTERT-HPNE hücre hattı seftriakson etken maddesine, 0,097 mM, 0,195 mM, 0,390 mM, 0,781 mM, 1,562 mM, 3,125 mM, 6,25 mM, 12,5 mM dozlarında 24,48 ve 72 saat boyunca maruz bırakılmıştır. Maruziyet sonucunda hTERT-HPNE hücrelerinde meydana gelen morfolojik değişiklikler Şekil 4,5 ve 6'da gösterilmiştir.

Şekil 4, 5, 6 'da yer alan A görseli negatif kontrol grubunun morfolojisini göstermektedir. Şekil 4, 5, 6'da yer alan B-F görselleri ise hTERT-HPNE hücre hattının seftriakson etken maddesi ile maruziyeti sonucundaki morfolojisini göstermektedir.

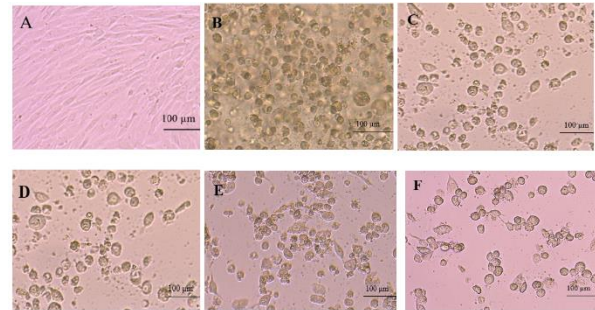
hTERT-HPNE hücre hattının seftriakson etken madde ile maruziyeti doza ve süreye bağlı olarak negatif kontrol ile kıyaslandığında canlı hücrenin morfolojisinin değiştiği, hücre ölümlerinin meydana geldiği görülmektedir.



**Şekil 4.** A Kontrol / B-F seftriakson etken maddeli ilacın hTERT-HPNE hücresi üzerindeki 24 saatlik morfolojik değişimleri.



**Şekil 5.** A Kontrol / B-F seftriakson etken maddeli ilacın hTERT-HPNE hücresi üzerindeki 48 saatlik morfolojik değişimleri.



**Şekil 6.** A Kontrol / B-F seftriakson etken maddeli ilacın hTERT-HPNE hücresi üzerindeki 72 saatlik morfolojik değişimleri.

### 4. Tartışma

Antibiyotiklerin dünyada ve ülkemizde bilinçli ve bilinçsiz şekilde kullanımı çok yüksektir. Antibiyotik ilaçlar bakterilerin büyümesini öldürme (bakterisid) ya da büyümesini engellemek (bakteriyostatik) üzere iki



hedef için kullanılırlar. İlaç ve hedef etkileşimlerinden bağımsız olarak, bakterisidal antibiyotikler bakterilerde yaygın bir oksidatif hasara neden olarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine ve hücre ölümüyle sonuçlanan DNA, protein ve lipid hasarına sebep olabilir (Kohanski ve ark., 2007). Bununla birlikte, bakterilerin öldürülmesinde rol oynayan ortak bir mekanizma olarak oksidatif stres oluşumu tartışılmıştır. Tüm bakterisidal ilaç sınıfları, hidroksil radikali oluşumunu teşvik etmek için demir-kükürt kümelerinden salınan dahili demiri kullanabilir. Hidroksil radikalleri DNA'ya, proteinlere ve lipitlere doğrudan zarar verebilir (Karabulut ve ark., 2016). Bakterisidal antibiyotik etkileri, antioksidan N-asetilsisteinin uygulanmasıyla hafifletilebilir veya bakteriyostatik etkili antibiyotik kullanımı ile önenebilir (Çoşkun, 2017). Bakterisid grubu antibiyotikler memeli dokularına ve hücrelerine de zarar verebilir. Bununla birlikte, etkileri bakterilerde olduğu kadar iyi karakterize edilmez (Savcı, 2016). Moleküler hedefleri ne olursa olsun, başlıca mitokondriyal disfonksiyonu yani mitokondrinin fonksiyonu herhangi bir nedenle bozulursa, hücre ve vücut fonksiyonları uygun şekilde işlev görememesi ile sonuçlanmaktadır. Daha önce yapılan literatür araştırmalarında memeli hücrelerinde, özellikle hepatositlerde bakterisid antibiyotikler tarafından oksidatif ve endoplazmik retikulum (ER) stresinin indüklenmesine odaklanılmıştır ve başta karaciğer olmak üzere çeşitli insan dokularında ve hücrelerinde olumsuz yan etkilere neden olabilir. Mitokondriyal disfonksiyon ve ROS'un aşırı ekspresyonu ile ilişkili, oksidatif strese ve hücre ölümüne yol açtığı bildirilmiştir (Kocasarı ve ark., 2021). Başka bir çalışmada antibiyotiklerin osteojenik hücre canlılığı üzerine etkisi araştırılmıştır. Osteoblastları, 8 farklı konsantrasyonda 21 çeşit antibiyotik ile tedavi ettiklerinden sonra hücre sayısını ve osteojenik aktiviteyi belirlemek için osteoblast deoksiribonükleik asit içeriği ve alkalın fosfataz aktivitesi (ALP) ölçülmüştür. Çoğu antibiyotiğin hücre sayıları ve ALP ölçümleri önemli ölçüde azaldığı sonucuna ulaşmışlardır. Fakat amikasin, tobramisin ve vankomisin çok yüksek konsantrasyonlar kullanılıncaya kadar en az sitotoksikite göstermiştir. Hücre sayısını ve ALP'yi belirgin şekilde etkilemediği sonucuna varmışlardır (Rathbone ve ark., 2011).

Sitotoksikite; canlı hücreler üzerindeki toksik etki oranını ifade eder. Sitotoksikite testleri, toksik olduğu düşünülen maddenin, uygun hücre kültüründe, hücre çoğalma oranı ve hücre üzerindeki toksik etkisi dikkate alınarak değerlendirme yapılan testlerdir. Sitotoksikite çalışmaları sayesinde kimyasal maddelere maruz bırakılan hücrelerin canlılığının deneysel olarak belirlenmesi sağlanır ve çalışma sonunda canlı ve ölü hücre miktarı belirlenebilir (Niles ve ark., 2007). Ayrıca hücreler, sitotoksik etkiye sahip bir maddeye maruz bırakıldıklarında apoptoz, nekroz ve otofaji gibi olaylar sebebiyle ölebilir. Buna ek olarak, hücre gelişiminin durdurulması veya engellenmesi nedeniyle de proliferasyon özelliklerini kaybedebilirler (Galluzzi ve

ark., 2009).

İn-vitro memeli kültürlerinde uygulanan ilaçların hücrelerde oluşturduğu hasarın incelenmesinde sıklıkla MTT testi kullanılır. MTT testinde kullanılacak ilacın farklı molaritelerde hazırlanan derişimleri, kültür flaksındaki hücre hattı ve besiyeri karışımına ekilir. Bu sayede ilaç ve hücre mitokondrisi etkileşime geçer. İlaç toksik bir etkiye sahipse hücre solunumu baskılanır ve MTT test solüsyonu içeriğinde bulunan tetrazolium tuzları ile reaksiyonun azalması görülür. Mitokondriyel iki katmanlı lipoprotein zar yapısına ve yüksek metabolik aktiviteye sahip oldukları için hücrede meydana gelebilecek hasarlardan ilk etkilenir (Okatan,2017).Bir çalışmada protokatekuik asitin (PCA) insan prostat kanseri (DU145) hücreleri üzerindeki sitotoksik, morfolojik ve apoptotik etkileri 0,5 ile 3,5 mM dozlarında 24 ve 48 saatteki sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışma sonucunda hücrelerdeki morfolojik değişiklikler ters ışık mikroskobu ile incelenmiş ve hücrelerdeki apoptotik hücre ölümü, PCA dozlarındaki artışa bağlı olarak hücrelerin yuvarlaklaştığı ve sayıca azaldığı ve bununla beraber hücre çekirdeklerinde yoğunlaşma ve parçalanmaların olduğunu belirtmişlerdir (Öztopcu ve ark., 2018). Başka bir çalışmada insan vasküler endotelial EA.hy926 hücrelerinde valinomisin ve antimisin A'nın sitotoksikitesini değerlendirildi. Çalışmada yapılan MTT analizi sonuçlarına göre iki antibiyotiğin de hücreler üzerinde sitotoksik etkiler gösterdiği hatta valinomisin, antimisin A'ya göre daha güçlü sitotoksik ajan olduğu görülmüştür (Luzak ve ark., 2022). Duwelhenke ve ark. (2007) yaptığı bir çalışmada primer insan osteoblast, MG63 osteosarkom ve Hela epitel hücre dizisi üzerine 20 farklı antibiyotiğin sitotoksik etkisini araştırmışlardır. Primer osteoblast hücreleri üzerinde belirledikleri konsantrasyonlar da siprofloksasin ve moksifloksasin, klindamisin ve eritromisinin farklı oranlarda sitotoksik etki meydana getirdiğini göstermişlerdir. Azitromisin ve roksitromisinin primer insan osteoblast hücreleri üzerinde konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etkinin arttığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada siprofloksasin ve moksifloksasin, primer insan osteoblast hücresi proliferasyonunu durduğunu bildirmişlerdir. Aynı etken maddelerinin MG63 osteosarkom ve Hela epitel hücre dizilerinde de daha yüksek konsantrasyonlarda proliferasyonu engellediğini ifade etmişlerdir (Şahin,2020). Bu çalışmalar son yıllarda yapılmıştır. Literatür araştırmaları her antibiyotiğin farklı sitotoksik etkilerinin olabileceğini ve antibiyotiğin uygulandığı hücreye bağlı olarak da farklı sonuçlara ulaşabileceğini göstermektedir. Bu sebepten, farklı hücrelerde farklı antibiyotikler üzerinde çoklu çalışmalar yapılarak daha net bir fikir birliğine ulaşılabilir.

Bu çalışmamızda ilacın etken maddesi seftriakson içeren bir antibiyotiğin in vitro kültürde sağlıklı insan pankreas hücreleri üzerinde sitotoksikitesini araştırılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız seftriakson disodyum, geniş bir antimikrobiyal aktivite yelpazesine sahip üçüncü nesil

yarı sentetik bir sefalosporin grubu antibiyotiktir. Gram pozitif ve Gram negatif aerobik ve bazı anaerobik bakterilere karşı geniş bir aktivite spektrumuna sahiptir (Richards ve ark., 1984). Seftriakson bakteri hücre duvarı sentezini bozarak transpeptidasyon evresinde penisilin bağlayan proteinleri (PBP) durdurur. Bakteri duvarı tam sentezlenemez ve iç basınçtan dolayı lizise uğrar. Eksitator bir nörotransmitter olan glutamatin fazla salınması, N-metil-d-aspartat (NMDA) reseptörlerini sürekli uyarabilir, bu da nöronlarda kalsiyumun fazla yüklenmesine ve hücreyi apoptotik ölüme uğratar. 2016 yılında yapılan bir çalışmada Seftriaksonun Ekzitatör Aminoasit Taşıyıcı 1 (EAAT1), Ekzitatör Aminoasit Taşıyıcı 2 (EAAT2), Ekzitatör Aminoasit Taşıyıcı 3 (EAAT3) blokeleriyle birlikte kullanımının sıçan GBM hücre hattı üzerindeki etkilerinin incelenmesi üzerine bir araştırma gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmanın sonuçları seftriakson etken maddeli antibiyotiğin çalışmada kullanılan diğer ilaç gruplarıyla kıyaslandığında hücre canlılığı bakımından en çok hücre ölümüne sebep olduğu gözlemlenmiştir (Nalcı, 2016). Bir çalışmada kıkırdak matriksini üreten kondrosit hücreleri üzerinde seftriakson sitotoksitesini araştırılmıştır. Analiz sonuçlarında seftriaksonun apoptotik hücre ölümü indüklendiği hem de transkripsiyon seviyesindeki kondrojenik işaretleyici genler üzerindeki olumsuz etkileri olduğu görülmüştür (Siengdee ve ark., 2017). Bununla birlikte, literatürde MTT ile seftriakson sitotoksitesine çalışmaları çok azdır. Bu çalışmada, hücre canlılığını gözlemlemek için ucuz, hızlı, etkili, kullanımı kolay, güvenilir ve dünya çapında yaygın olarak kullanılan MTT analiz yöntemini kullandık. hTERT-HPNE hücre hattı seftriakson etken maddesine maruz bırakıldıktan sonra mitokondriyal aktivite ölçülerek değerlendirildi. Seftriakson, 24, 48, 72 saatlik maruziyet sonrası hTERT-HPNE hücrelerinde artan konsantrasyonlara bağlı olarak sitotoksitesine neden olduğu görülmüştür. Aynı zamanda hTERT-HPNE hücreleri ve ilaca maruz bırakılan hTERT-HPNE hücrelerinin invert mikroskop ile morfolojileri kıyaslandığında sağlıklı hücre görüntüsünün bozulması ve hücre sayısındaki azalmanın varlığı görülmüştür.

## 5. Sonuç

Antibiyotikler tüm dünyada en çok kullanılan ilaçlar arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Bu çalışmada kullanılan sefalosporin grubuna ait seftriakson antibiyotiği dahil olmak üzere enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin belirlenmesinde hastanın yaşı, cinsiyeti, genetik özellikleri ve immün sistemdeki farklılıklar ilaç etkinliğini değiştirmektedir. Kullanılan diğer ilaçlarla, çeşitli kimyasal maddeler veya alkol ile etkileşime girerek ilaç etkinliğini değiştirebilir ve hedeflenmeyen hücrelerde istenmeyen sonuçlar ile karşılaşmamıza sebep olabilmektedir. Bu sebeplere ek olarak kullanılan ilacın sitotoksik etki gösterme potansiyeli vardır. Bu yüzden tedavide kullanılacak ilaçların doz ve maruziyet ilişkisinin belirlenebilmesi için

bu faktörlerin bilinmesi gereklidir. Yanlış ilaç kullanımı genetik materyalde bozukluklara, tamir edilemeyen DNA hasarına, doku ve hücre hasarlarına ek kanser gibi çeşitli hastalıkların temelini oluşturur. Doğru ilaç kullanımı için ilaçların toksisitesi, yapılacak laboratuvar çalışmaları sayesinde aydınlatılabilir.

Bu çalışmada tüm dünyada enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde sıklıkla tercih edilen sefalosporin grubuna ait üçüncü nesil seftriakson antibiyotiğinin, in vitro insan pankreas hücre kültüründe sitotoksik etkileri çalışılmıştır. Literatür araştırmaları ve incelenmeleri sonucunda seftriaksonun sitotoksitesine çalışmaları çok az ve yetersiz olduğu görülmüştür. Çalışmamızda sitotoksitesini belirlemek için MTT testi kullanılmıştır. Seftriaksonun çalışılan dozlarında doza ve maruziyet sürelerine bağlı olarak negatif kontrole göre kıyaslandığında sağlıklı pankreas hücresi üzerinde sitotoksik özellik gösterdiği görülmüştür. Çalışmamızın bir diğer kısmında seftriakson etken maddeye maruz grup ile negatif kontrol grubu karşılaştırıldığında hücrelerin morfolojisinde de farklılıklar olduğu, seftriakson etken maddeye maruz deney grubunda canlılığını yitirmiş hücrelerin varlığı görülmüştür. Sefalosporin grubuna ait seftriakson ile ilgili yapılan önceki çalışmalarda da bu ilacın farklı hücreler üzerinde de sitotoksik olduğu desteklenmektedir. Yapılan in vitro çalışmaları sayesinde ilaçların en az yan etkiye sahip konsantrasyonları belirlenerek daha ileri aşama olan in vivo deney hayvanı çalışmaları için referans veri kabul edilebilir.

## Katkı Oranı Beyanı

Yazar(lar)ın katkı yüzdesi aşağıda verilmiştir. Tüm yazarlar makaleyi incelemiş ve onaylamıştır.

	A.K.	Z.Ç.	Ö.E.
K	30	30	40
T	100		
Y	60	10	30
VTI	40	30	30
VAY	40	30	30
KT	70	20	10
YZ	60	20	20
KI	40	30	30
GR	100		
PY	40	20	40
FA			100

K= kavram, T= tasarım, Y= yönetim, VTI= veri toplama ve/veya işleme, VAY= veri analizi ve/veya yorumlama, KT= kaynak tarama, YZ= Yazım, KI= kritik inceleme, GR= gönderim ve revizyon, PY= proje yönetimi, FA= fon alımı.

## Çalışma Beyanı

Yazarlar bu çalışmada hiçbir çıkar ilişkisi olmadığını beyan etmektedirler.

## Etik Onay Beyanı

Hayvanlar ve insanlar üzerinde herhangi bir çalışma yapılmadığından dolayı bu araştırma için etik kurul onayı alınmamıştır.

**Kaynaklar**

- Cao H, Högger P, Prieto M, Simal-Gandara J, Xiao J. 2022. Stability of quercetin in DMEM and cell culture with A549 cells. *EFood* 3:e13. <https://doi.org/10.1002/efd2.13>.
- Çoşkun D. 2017. N-asetil-L-Sisteinin ekstrapulmoner etkileri. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 10(2): 154–162.
- Erdemir F, Akman A, Uysal G, Polater E, Çırlak A. 2011. Yeni-Yeniden tanımlanan enfeksiyonlar ve enfeksiyon kontrolü. *Ege Üniv Hemşirelik Yüksek Okulu Derg*, 27(1): 47–60.
- Galluzzi L, Aaronson S, Abrams J, Alnemri E. 2009. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Different*, 16: 1093–1107.
- Gökçe T. 2017. Birinci basamağı sağlık hapsedmesi hastalarının antibiyotik kullanımındaki davranış ve bilgi düzeylerinin araştırılması. *Uzmanlık Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, Türkiye*, ss: 106.
- Güngör A, Çuhaci Çakır B, Yalçın H, Çakır H. T, Karauzun A. 2018. Evaluation of parents' attitudes and behaviors related to the use of antibiotics in children. *Turkish J Pediatric Disease*, 12(3): 215 – 217.
- Kahraman E, Gurhan I, Korkmaz M. 2013. Investigation of possible genotoxic and cytotoxic effects of differential boron compounds in CCL 62 (hela contaminant): human amniotic epithelial cell line. *Medicine Sci, Inter Med J*, 2(1): 454. <https://doi.org/10.5455/medscience.2012.01.8046>
- Karabulut H, Gülay MŞ. 2016. Serbest radikaller. *MAKÜ Sağ Bil Enst Derg*, 4(1): 50-59.
- Kocasarı Ş, Erdemli Köse SB, Garlı S. 2021. Hayvanlarda ilaç ve toksik maddelere bağlı olarak oluşan oksidatif stresin sindirim ve solunum sistemi toksisitesindeki rolü. *Şahindokuyucu Kocasarı F editör. İlaç ve Toksik Maddelere Bağlı Olarak Oluşan Oksidatif Stres ve Antioksidanlar. Türkiye Klinikleri, 1. Baskı, Ankara, Türkiye*, pp: 85-99.
- Kohanski M, Dwyer D, Hayete B, Lawrence C, Collins J. 2007. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, 130(5): 797–810.
- Köksal İ. 2013. Enfeksiyon hastalıkları. *Nobel kitapevi, İstanbul, Türkiye*, ss: 75-78.
- Küçükbuğru N. 2020. Gıdalarda antibiyotik kalıntıları ve halk sağlığına etkileri. *Vet Farmak Toksikol Derneği Bülten*, 11 (3): 161-167.
- Luzak B, Siarkiewicz P, Boncler M. 2022. An evaluation of a new high-sensitivity PrestoBlue assay for measuring cell viability and drug cytotoxicity using EA.hy926 endothelial cells. *Toxicology in Vitro*, 83: 105407.
- Nalci A. 2016. Seftriaksonun eksitator aminoasit taşıyıcı 1 (eaat1): eaat2 eaat3 blokerleriyle birlikte kullanımının sıçan glioblastoma multiforme hücre hattı üzerindeki etkilerinin incelenmesi. *Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı, Edirne, Türkiye*, ss: 69.
- Niles A, Moravec R, Hesselberth E, Scurria M, Daily W, Riss T. 2007. A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Analytical Biochem*, 366(2): 197–206.
- Okutan D. 2017. Antibiyotik g 418'in Toxoplasma Gondii üzerine etkisinin in vitro olarak araştırılması. *Yüksek lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye*, ss: 58.
- Öztopcu-Vatan P, İnan E. 2018. Determination of growth inhibitory and apoptotic effects of protocatechuic acid on prostate carcinoma cells. *Biological Diver Conservat*, 11(1): 80-86.
- Rathbone C, Cross J, Brown K, Murray C, Wenke J. 2011. Effect of various concentrations of antibiotics on osteogenic cell viability and activity. *J Orthopaedic Res*, 29(7): 1070–1074.
- Richards D, Heel R, Brogden R, Speight T, Avery G. 1984. Ceftriaxone a review of its antibacterial activity pharmacological properties and therapeutic use. *Drug Evaluation*, 27: 469–527.
- Savcı A. 2016. Gentamisin sülfat amoksisilin ve sefazolin sodyum antibiyotiklerinin fare kalp dokusunda antioksidan enzim aktiviteleri protein ve gen ekspresyon düzeyleri üzerine etkilerinin incelenmesi. *Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı, Bingöl Üniversitesi, Bingöl, Türkiye*, ss: 100.
- Siengdee P, Pradit W, Euppaya T, Chomdej S, Nganvongpanit K. 2017. Comparison of the effects of cefazolin and ceftriaxone on canine chondrocyte culture. *Vet Pharmacol Therapeut*, 40(6): 604–617.
- strategies. *Washington DC: The National Academies Press* 2010.
- Şahin Y. 2020. Sığırlarda tulatromisin ve gamitromisinin trakea düz kasının kasılması ile trakea epitel hücreleri üzerine apoptotik nekrotik ve sitotoksik etkilerinin araştırılması. *Doktora tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, Türkiye*, ss: 83.
- Topal M, Uslu Şenel G, Arslan Topal E, Öbek E. 2015. Antibiyotikler ve kullanım alanları. *Erciyes Üniv Fen Bilimleri Enstit Derg*, 31(3): 121–127.
- Yao Y, Zhou R, Wang Y. 2012. Fatal adverse effects of injected ceftriaxone sodium in China. *Pharmacoepidemiology Drug Safety*, 21(11): 1197–1201.
- Yıldız İ, Varkal M, Ünüvar E. 2014. Günümüzde sefalosporinler ve antibiyotik direnci. *Çocuk Derg*, 14(1): 22–27.
- Yifan Z, Benxiang N, Zheng X, Luwei X, Lihua Z, Yuzheng G, Ruipeng J. 2020. Ceftriaxone calcium crystals induce acute kidney injury by nlrp3-mediated inflammation and oxidative stress injury. *Oxidative Med Cellular Longev*, 2020: 6428498.