

YENİ SENTEZLENEN İKİ SÜLFONAMİD BİLEŞİĞİNİN *Drosophila melanogaster*'DE TERATOJENİK DEĞERLENDİRİLMESİ

Bahar Özbölük¹, Ayla Karataş^{1*}

¹Kocaeli Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Umuttepe Kampüsü, Kocaeli

*Sorumlu yazar: karatasayla@gmail.com

Öz

Enzimler sık kullanılan ilaç hedefleridir. Karbonik anhidraz enzimleri (KA) sık kullanılan ilaç hedeflerinden biridir. Karbonik anhidrazlar CO₂'nin hidrasyonu veya bikarbonatın dehidrasyon reaksiyonlarını tersinir olarak katalizlenmesini sağlarlar. Aday ilaç hammaddelerinin olası teratojenik etkisinin araştırılması önemlidir. Bu çalışmada insan karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerini inhibe ettiği daha önce tespit edilmiş olan, dolayısıyla ilaç ham maddesi olarak kullanılabilme potansiyeli olan iki maddenin, *Drosophila*'nın bazı gelişimsel özelliklerine etkisi araştırılmıştır. İlk aday olan 6B (4-(((1,3-dimetil-2,4,6-trioksotetrahidropirimidin-5(2H)-iliden)methyl)amino)benzensülfonamid) ve ikinci aday olan 2E (4-(((1,3-dimetil-2,4,6-trioksotetrahidropirimidin-5(2H)-iliden)methyl)amino)benzensülfonamid) moleküllerinin, *Drosophila melanogaster*'in F₁ ve F₂ neslinde ergin birey sayısı ve fenotipik özelliklerine etkisi araştırılmıştır. *Drosophila* toksisite çalışmalarında sık kullanılan bir deney organizmasıdır. Uygulama konsantrasyonlarında K_i değerleri baz alınmıştır. Ki değeri o molekülün toksik inhibisyon değeridir. K_i değerleri baz alınarak üç farklı konsantrasyonda 6B molekülü (0,85µl, 1,706 µl ve 3,4 µl) ve 2E molekülü (2,6 µl, 5,2 µl ve 10,4 µl) hazır besiyerine ilave edilerek beslenme yoluyla uygulanmıştır. Uygulama ergin bireylere yapılmış ve sonraki iki nesil incelenmiştir. Bunun için her iki nesilde birey sayısı, birey fenotipi, gelişimsel özellikler; cinsiyet göz önünde bulundurularak incelenmiştir. Madde uygulaması yapılan bireylerden F₁ nesli elde edilmiş ve incelenmiştir. Bu bireyler daha sonra normal besiyerine (madde içermeyen besi yeri) başlangıç konsantrasyonuna bağlı olarak aktarılmış ve F₂ nesli elde edilerek bu nesil de incelenmiştir. Genellikle araştırmalarda uygulamadan sonraki ilk nesil incelenir. İkinci neslin de incelenmesi araştırmanın özgün yanıdır. 6B molekülü F₁ ve F₂ neslinde ergin birey sayısını arttırmıştır. Ayrıca anormal fenotipli birey oranını her iki nesilde düşürmüştür. Molekülün hem ergin birey sayısını arttırması hem de anormal birey sayısını her iki nesilde düşürmesi oldukça olumlu bir sonuçtur. 2E molekülü ise her iki nesilde hem ergin birey sayısını düşürmüş hem de anormal birey oranını arttırmıştır. Bu verilere göre, 6B molekülünün ilaç olarak kullanılma potansiyelinin yüksek, 2E molekülünün ise düşük olduğu ifade edilebilir. 6B molekülünün her iki nesilde gözlenen pozitif etkisi nedeniyle ilaç hammaddesi olma potansiyeli dışında, besicilik ve biyolojik kontrol için üretilecek böceklerde fertilitiyi artırıcı ajan olarak kullanılma potansiyelinin araştırılması faydalı olabilir.

Anahtar Kelimeler: *Drosophila melanogaster*, toksik etki, karbonik anhidraz inhibitörleri, gelişimsel özellikler.

TWO NEWLY SYNTHESIZED SULFONAMIDE COMPOUNDS TERATOGENIC EVALUATION in *Drosophila melanogaster*

Extended Abstract

Enzymes are common drug targets. Carbonic anhydrase enzymes (CA) are one of the frequently used drug targets. Carbonic anhydrases reversibly catalyze the hydration of CO₂ or the dehydration of bicarbonate. It is important to investigate the possible teratogenic effects of candidate drug raw materials. In this study, the effects of two substances, which were previously determined to inhibit human carbonic anhydrase I and II isoenzymes, and therefore have the potential to be used as raw materials, on some developmental characteristics of *Drosophila* has been investigated. The effects of the first candidate 6B (4-(((1,3-dimetil-2,4,6-trioksotetrahidropirimidin-5(2H)-iliden)methyl)amino)benzensülfonamid) and the second candidate 2E (4-(((1,3-dimetil-2,4,6-

***Sorumlu Yazar (Corresponding Author):**

Ayla KARATAŞ; Kocaeli Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Umuttepe Kampüsü,
Kocaeli 17020, Kocaeli-Türkiye

Geliş (Received) : 02.11.2021

Kabul (Accepted) : 31.12.2021

Basım (Published) : 31.12.2021

trioksotetrahidropirimidin-5(2H)-iliden)methyl(amino)benzensülfonamit) on the adult number and phenotypic characteristics of *Drosophila melanogaster* in the F₁ and F₂ generations has been investigated. *Drosophila* is an experimental organism frequently used in toxicity studies. Application concentrations has been based on K_i values. The K_i value is the toxic inhibition value of these molecules. Based on the K_i values, three different concentrations of 6B molecules (0.85 µl, 1.706 µl and 3.4 µl) and 2E molecules (2.6 µl, 5.2 µl and 10.4 µl) has been added to the prepared medium and applied by feeding. The application has been made to adults and the next two generations has been examined. For this purpose, the number of individuals, individual phenotype, developmental characteristics has been analyzed according to gender in both generations. F₁ generation has been obtained from the individuals who were administered substance and examined. These individuals have been transferred to normal medium (medium-free medium) depending on the initial concentration and the F₂ generation has been obtained and this generation has been also examined. Generally, the first generation after application is studied in research. Examining the second generation is the original aspect of the research. The 6B molecule increased the number of adults in the F₁ and F₂ generations. It also reduced the rate of individuals with abnormal phenotype in both generations. It is a very positive result that the molecule both increases the number of mature individuals and decreases the number of abnormal individuals in both generations. The 2E molecule both decreased the number of adults and increased the rate of abnormal individuals in both generations. According to these data, it can be stated that the 6B molecule has a high potential to be used as a drug, while the 2E molecule has a low potential. Due to the positive effect of the 6B molecule observed in both generations, it may be useful to investigate its potential to be used as a fertility-enhancing agent in insects to be produced for livestock and biological control, apart from its potential as a drug raw material.

Key Words: *Drosophila melanogaster*, toxic effect, carbonic anhydrase inhibitors, developmental features.

1. Giriş

En önemli ilaç hedefleri enzimlerdir. Enzimler bilinen ilaç hedeflerinin yaklaşık %40'ını teşkil etmektedir (Imming vd., 2006; Şen, vd., 2017). Karbonik anhidraz izoenzimleri insan vücudunda hem fizyolojik hem patolojik süreçlerde önemli rol oynamaları nedeniyle ilaç tasarımında oldukça dikkat çekici olmuşlardır (Gelheard, 2009).

1933 yılında ilk kez memeli eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidrazın (KA) temel fizyolojik fonksiyonu, CO₂'nin hidrasyonu veya bikarbonatın dehidrasyon reaksiyonlarını tersinir olarak katalizlenmesini sağlamaktır (Badger ve Price, 1994; Supuran, 2018; İrende, 2019). Bu reaksiyon ile beraber birçok fizyolojik ve patolojik olayda rol oynayan KA'nın en önemli fonksiyonu ise, doku kılcal damarlarında, metabolizma ürünü olan karbondioksitin (CO₂), karbonik asite (H₂CO₃), akciğer pulmoner kapilerde ise H₂CO₃'ün CO₂'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizlemesidir. Bununla beraber pH homeostazisi, kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu, idrar asidifikasyonu, ve daha birçok biyosentez reaksiyonunda görev almaktadır (Pastarekova vd., 2004). KA doğada bulunan en aktif enzimlerden biridir. KA tüm vücutta yaygın olarak bulunan ve fizyolojik öneme sahip bir grup enzimdir. İnsanda KA'nın 14 izoenzimi olduğu gösterilmiştir. H₂CO₃ oluşumunu ve degradasyonunu 10.000 ila 100.000 kez aktive eder. Sadece memelilerde değil diğer hayvan ve bitkilerde de bulunur. İnsanda başta kan olmak üzere, beyin, akciğer, mide, pankreas, karaciğer, böbrekler, kas dokusu gibi pek çok dokuda gösterilmiştir. İnsan vücudunda bulunan en önemli tampon sistemlerindendir (Doğanay ve Fırat, 2007). Son yıllarda çoğu KA izoformunun birçok hastalıkla olan ilişkisi keşfedildiğinden dolayı bu izoformlar ilaç dizaynında hedef olarak kullanılmaktadır (Whittington vd., 2001). KA izoenzimlerini inhibe ederek, bazı insan hastalıklarının tedavi edilmesini sağlayan farmakolojik ajanlara karbonik anhidraz inhibitörleri (KAİ) denir (Babu, 2012). 1940 yılında sülfonamidlerin spesifik bir karbonik anhidraz enzimi inhibitörü (KAİ) gibi davrandığını ortaya koymuşlardır (Mann ve Keilin, 1940). Bilinen en güçlü organik karbonik anhidraz inhibitörleri ise sülfonamidlerdir. Bu sebeple, KAİ ilaçların senteziyle ilgili çalışmalarda motif olarak en çok sülfonamidler kullanılmıştır (Şen vd., 2017).

Yeni ilaçların geliştirilmesinde temel yaklaşım, hastanın yararı için değiştirilmesi gereken fizyolojik ya da patolojik süreçte rol oynayan biyolojik moleküllerin hedef olarak seçilmesi ve bu moleküllerle etkileşime girecek kimyasal moleküllerin sentezlenmesidir (Şen vd., 2017). İlaç üretiminde yapılacak ilk adımlar toksisite testleridir. Aday ilaçların akut, subakut, kronik, subkronik, immunotoksik, nörotoksik, teratojenik, reproduktif toksisite, genotoksisite, karsinojenite gibi etkileri araştırılmalıdır.

Bu çalışmada Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde sentezlenmiş olan iki ayrı karbonik anhidraz inhibitörü ilaç adayının olası toksik, teratogenik ve reproduktif toksisite özellikleri araştırılmıştır. İnsan karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerini inhibe ettiği tespit edilmiş olan dolayısıyla ilaç ham maddesi olarak kullanılabilir potansiyeli olan 4-(((1,3-dimetil-2,4,6-trioksotetrahidropirimidin-5(2H)-

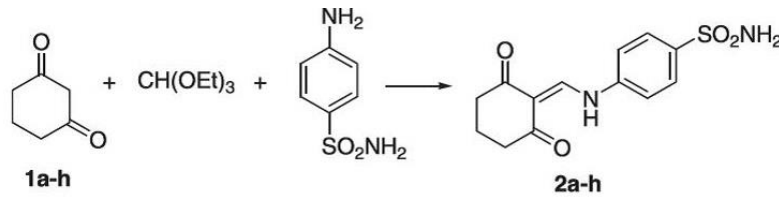
iliden)methyl)amino) benzen sülfonamid (2E) ve 4-(1-methyl-2-oxo-3'H-spiro[indoline-3,2'-[1,3,4]oxadiazole]-5'yl) benzene sülfonamid (6B) bileşiklerin, *Drosophila melanogaster*'in bazı gelişimsel özelliklerine etkisi araştırılmıştır. *In vivo* araştırma olması ve F₂ neslinin de takip edilmesi bu araştırmanın özgün yanıdır.

Model organizma olarak *D. melanogaster*'in tercih edilmesini sağlayan bazı önemli özellikleri vardır. Genom dizileri, insan hastalıklarında belirlenen genlerin %70'ından fazlasının *D. melanogaster* uyumlu olduğunu yani genetik kodlarının insanlara benzediğini göstermiştir (Fortini vd., 2000). *D. melanogaster* ve insan hücre rotasyonları ve düzenleyici yolları birbirine çok yakınlık göstermektedir. Bu da tümör oluşumunda, çoğalma süreci çalışmalarında, model olarak kullanılmasını sağlar (Potter vd., 2000). *D. melanogaster* küçük bir genom hacmine sahip olduğu için mutasyonların incelenmesi daha kolaydır (Graf vd., 1992). İnsanlar ve *D. melanogaster* birçok korunmuş fizyolojik ve biyolojik yolağa sahiptir (Jafari, 2010). Dokuları, kalp ve böbrek de dahil olmak üzere memelilere *Caenorhabditis elegans*'dan daha çok benzerdir (Pipera ve Partridge, 2017). Bu avantajlar göz önünde bulundurulduğunda *D. melanogaster*, günümüzde tercih edilen bir organizmadır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Karbonik anhidraz inhibitörü olan birinci molekül 6B'nin molar kütlesi 358 g/mol, K_i değeri 0,273 µM'dur. İkinci molekül olan 2E'nin ise molar kütlesi 238,34 g/mol ve K_i değeri 5.20 µM'dur (Şekil 1). K_i değeri o molekülün toksik inhibisyon değeridir, bu nedenle deneylerde moleküllerin inhibisyon değerleri altında üç konsantrasyon seçilmiştir. Araştırmada uygulanan maddelerin toksik etkisini karşılaştırmak için pozitif kontrol grubu olarak sodyum arsenit (Molar kütle: 129,91 g/mol) kullanılmıştır (Karataş ve Bahçeci, 2010a). Karbonik anhidraz inhibitörlerin çözülmesi için dimetil sülfoksit kullanılmıştır (Molar kütle: 78,13 g/mol).



Compound	2a	2b	2c	2d	2e	2f	2g	2h
1a-h								

Şekil 1. Metilenaminobenzen sülfonamid türevlerinin sentezi (Demirci vd., 2014).

Çalışmalarda karbonik anhidraz inhibitörlerini uygulamak için toksik inhibisyon değerleri baz alınmıştır. Buna göre deney gruplarında besiyerine, 6B maddesi için 0,85µl, 1,706 µl ve 3,4 µl ve 2E maddesi için 2,6 µl, 5,2 µl ve 10,4 µl çözelti ilave edilmiştir. Negatif kontrol grubu olarak distile su, pozitif kontrol grubu olarak sodyum arsenit (10mM NaAsO₂), çözücü kontrol grubu olarak DMSO kullanılmıştır.

2.2. Morfolojik karakterleri gözlemek için yapılan uygulama

Deney ve kontrol gruplarına ait besi yerlerine, 15 erkek ve 15 dişi birey konulduktan sonra, pupa evresinin gözleendiği gün, parental bireyler besi yerinden uzaklaştırılmıştır. F₁ neslindeki bireyler ilk çıktığı günden itibaren gözlemlenmiş ve bu süreç sekiz gün boyunca devam etmiştir. *Drosophila*'da gelişim süreci ortalama 10 günde tamamlanmaktadır. Bu yüzden çalışmalarda gelişim sürecini sekiz günle sınırlandırılıp F₂ nesli ile karışması önlenmiştir. Deneyler üç tekrarlı yapılmıştır.

F₁ neslindeki fenotipik anormallikleri gözlemek amacıyla, ilk ergin bireyin gözleendiği günden itibaren, sekiz gün boyunca ergin bireyler Olympus SZ 51 Stereo mikroskop altında, dişi ve erkek birey ayrımı yapılarak,

morfolojik açıdan tek tek incelenmiştir. Gözlenen anormallikler not edilmiştir (Mukhopadhyay ve Zimm, 2003; Piper vd., 2005; Suckow ve Suckow, 2006; Keser ve Karataş, 2012).

Araştırmada sadece F₁ nesli değil F₂ nesli de incelenmiştir. F₁ neslinden elde edilen bireyler, başlangıç konsantrasyonlarına bağlı kalınarak, normal besiyerine aktarılmış ve ayrı ayrı çaprazlanmıştır. Bu sayede F₂ neslinde madde uygulanmamış, fakat F₁ neslinde maruz kalınan maddenin etkisini görmek için F₂ nesli elde edilmiştir. Gözlemlerde F₁ neslinde yapılan işlemlerin aynısı F₂ neslinde de tekrar edilmiştir.

Deneyleerde, *D. melanogaster* (Diptera: Drosophilidae)'in kendileşmiş yabanıl tip Oregon-R soyu kullanılmıştır. *Drosophila* kültürleri yabanıl tip *D. melanogaster* için standart kabul edilen 25±1°C sıcaklıkta, %60 bağıl nem koşullarına sahip NÜVE marka iklim dolabında muhafaza edilmiştir. Kültür şişesi olarak, sık sık steril edilen 250ml'lik cam süt şişeleri kullanılmıştır.

3. Bulgular

3.1. 6B maddesinin F₁ neslinde birey sayısına etkisi

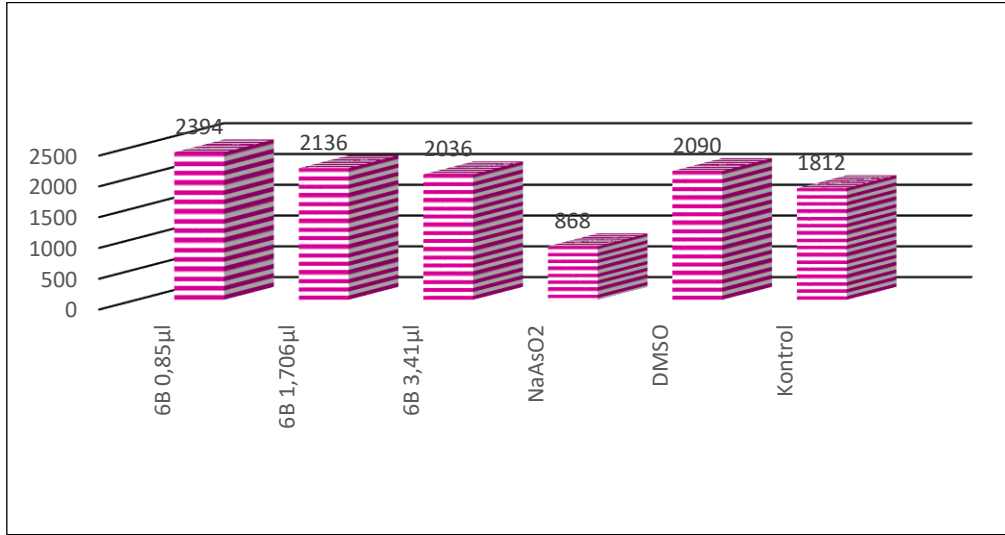
6B maddesi uygulanan üç deney grubunda da ergin birey sayısı negatif kontrol gruplarına göre artmıştır ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu artış 0,85 µl konsantrasyonunda, negatif kontrol grubuna göre %32,12 oranında (**p<0,01), 1,706 µl konsantrasyonunda %17,88 oranında (**p<0,01), 3,41 µl konsantrasyonunda ise %12,36 oranındadır (**p<0,01) (Tablo 1).

Tablo 1. 6B maddesinin F1 neslinde birey sayısına etkisi.

Gruplar	Toplam	Grup Karşılaştırma	Standart Sapma	Z Değeri
0,85 µl	2394 (G1)	(G1-G2)	0,0039	-0,414
		(G1-G3)	0,0038	-0,839
		(G1-G4)	0,0075	3,579**
		(G1-G5)	-1,1741	-1,174
		(G1-G6)	-6,0483	-6,048**
1,706 µl	2136 (G2)	(G2-G3)	0,0038	-0,417
		(G2-G4)	0,0075	3,786**
		(G2-G5)	0,0043	-1,542
		(G2-G6)	0,0060	-6,301**
3,41 µl	2036 (G3)	(G3-G4)	0,0075	4,011**
		(G3-G5)	0,0042	-1,937
		(G3-G6)	0,0060	-6,605**
Pozitif Kontrol (NaAsO ₂)	868 (G4)	(G4-G5)	0,0077	2,834**
		(G4-G6)	0,0088	-1,032
Çözücü Kontrol (DMSO)	2090 (G5)	(G5-G6)	0,0062	-4,980**
Negatif Kontrol (Su)	1812 (G6)			

*p<0,05; **p<0,01

Çözücü kontrol grubunda da ergin birey sayısı, negatif kontrol grubuna göre artmıştır ve bu aradaki fark istatistik açıdan önemli bulunmuştur. NaAsO₂ uygulaması ergin birey sayısını düşürmüştür (Şekil 2).

Şekil 2. 6B maddesinin F₁ neslinde toplam birey sayısı

3.2. 6B maddesinin F₂ neslinde birey sayısına etkisi

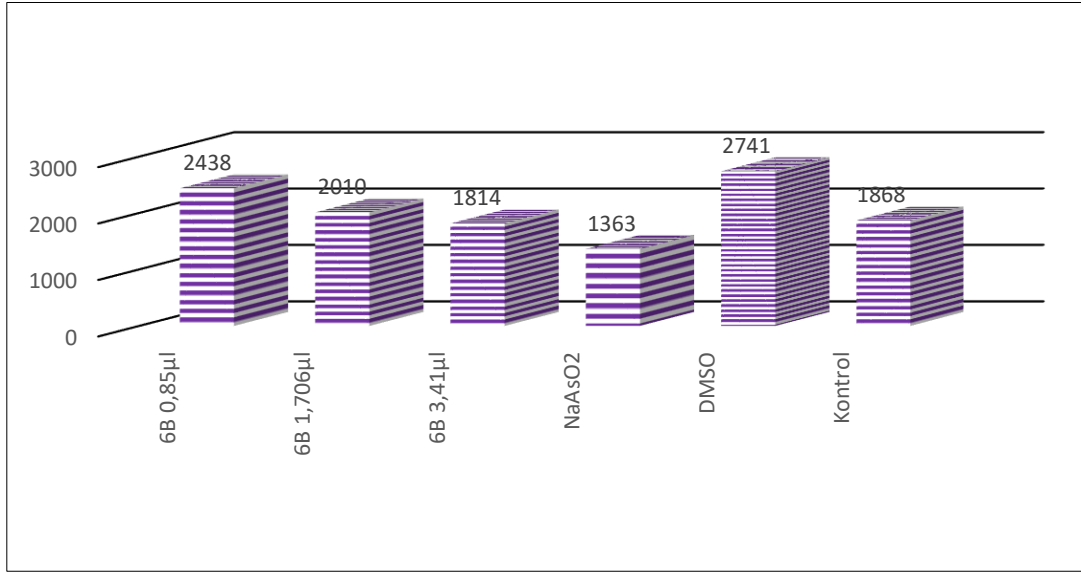
6B maddesi içeren 0,85 µl'lik ergin birey sayısı artmıştır ve diğer tüm gruplarla karşılaştırıldığında istatistik açıdan fark ortaya çıkmıştır (**p<0,01) (Tablo 2).

Çözücü kontrol grubu (DMSO) ergin birey sayısında artış gerçekleşmiştir (Şekil 3) ve bu fark istatistik açıdan anlamlıdır (**p<0,01). Ayrıca çözücü kontrol grubu içerisindeki birey sayısı, pozitif kontrol grubu (1363 birey) ve 6B maddesi içeren diğer konsantrasyonlar (0,85 µl; 1,706 µl ve 3,41 µl) ile istatistik açıdan fark ortaya çıkmıştır (**p<0,01).

Tablo 2. 6B maddesinin F₂ neslinde birey sayısına etkisi.

Gruplar	Toplam	Grup Karşılaştırma	Standart Sapma	Z Değeri
0,85 µl	2438 (G1)	(G1-G2)	0,0061	2,873**
		(G1-G3)	0,0062	2,234**
		(G1-G4)	0,0069	2,183**
		(G1-G5)	0,0045	3,426**
		(G1-G6)	0,0067	-4,188**
1,706 µl	2010 (G2)	(G2-G3)	0,0070	-0,539
		(G2-G4)	0,0077	-0,339
		(G2-G5)	0,0056	5,932**
		(G2-G6)	0,0074	-1,381
3,41 µl	1814 (G3)	(G3-G4)	0,0077	0,155
		(G3-G5)	0,0056	5,188**
		(G3-G6)	0,0075	-1,877
Pozitif Kontrol (NaAsO ₂)	1363 (G4)	(G4-G5)	0,0064	4,762**
		(G4-G6)	0,0081	-1,593
Çözücü Kontrol (DMSO)	2741 (G5)	(G5-G6)	0,0061	-7,052**
Negatif Kontrol (Su)	1868 (G6)			

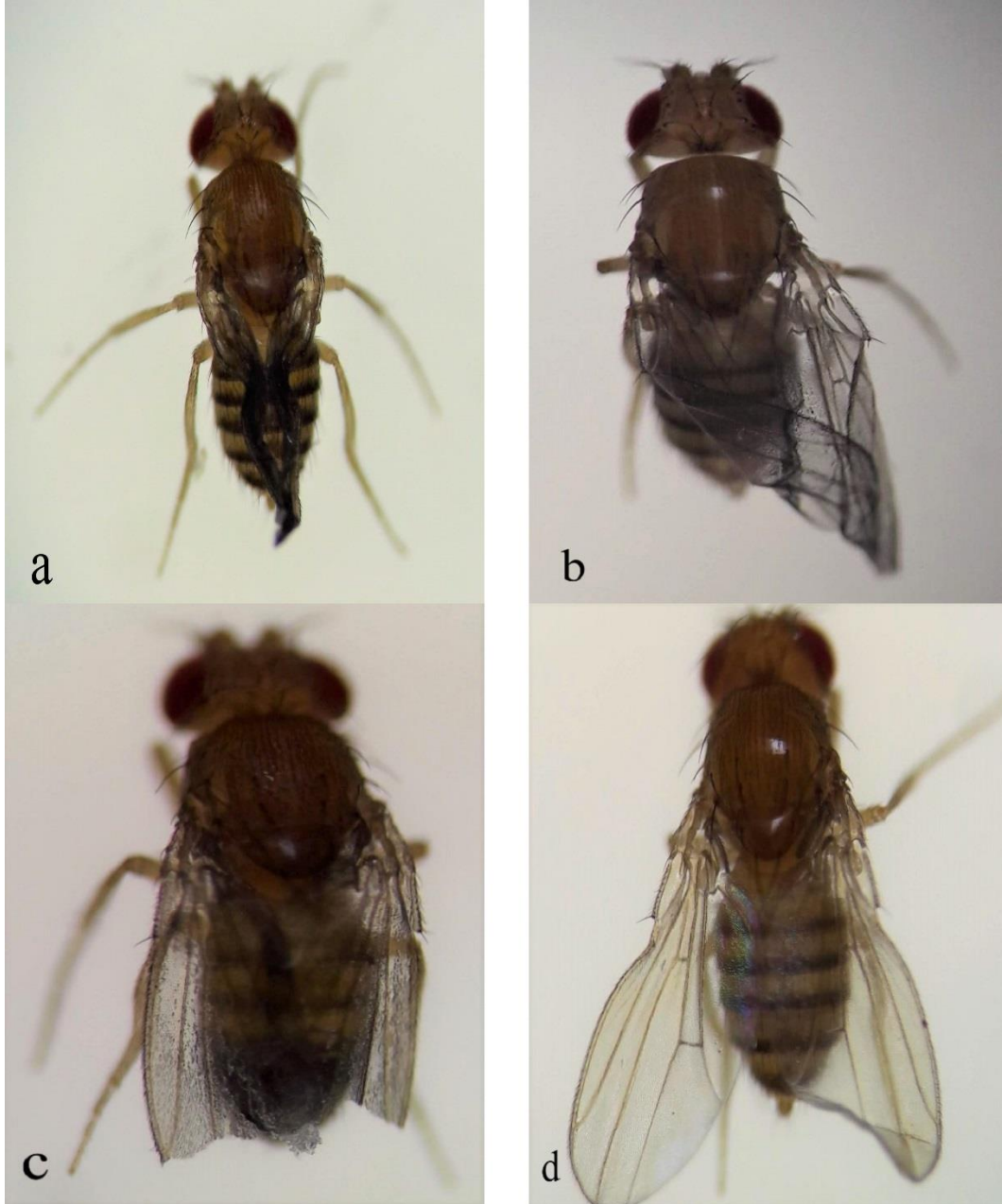
*p<0,05; **p<0,01



Şekil 3. 6B maddesinin F₂ neslinde toplam birey sayısı

3.3. 6B maddesinin fenotipe etkisi

6B maddesi içeren besiyerinde gelişen bireylerde, çözücü kontrol grubu, pozitif kontrol grubu sodyum arsenit ve negatif kontrol grubundaki bireylerde bazı morfolojik anormalliklere rastlanmıştır. Bu anormallikler, kıvrık kanatlılık, kanadın mızrak biçimini alması, kanadın vücuda yapışmış olması, püskül kanatlılık, kanadın abdomene yapışması, kanat körelmesi, segment eksikliği, segmentlerin kaynaşması gibi anormalliklerdir (Şekil 4).



Şekil 4. 6B maddesinin morfolojik karakterler üzerine etkileri (a-Her iki kanat mızrak, b-İki kanat üst üste yapışık ve kıvrık, c-Her iki kanat kırık, d-Sağ kanat kıvrık)

3.4. 6B maddesinin F₁ neslinde anormal birey sayısına etkisi

F₁ neslinde gözlenen anormallikler ve yüzdeler oranlarına ait veriler Tablo 3'te sunulmuştur.

6B maddesi içeren tüm deney gruplarında gözlenen anormal birey oranı negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki önemlidir ($p < 0,01$).

6B maddesi içeren üç konsantrasyonun (0,85 µl, 1,706 µl ve 3,41 µl) anormal birey sayıları, pozitif kontrol grubu (NaAsO₂) ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur. Çözücü kontrol grubu içeren besiyeri içerisindeki 2042 bireyin %2,30'u fenotipik anormallik göstermiştir ve bu oran negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan önemlidir ($p < 0,01$).

Tablo 3. 6B maddesinin F₁ neslinde anormal birey sayısına etkisi.

Gruplar	Normal	(%)	Anormal birey Sayısı	(%) Anormal Birey Yüzdesi	Toplam	Grup Karşılaştırma	Standart Sapma	Z Değeri
0,85 µl	2351	98,2	43 (G1)	1,80	2394			0,415
						(G1-G2)	0,0038	0,841
						(G1-G3)	0,0038	-
						(G1-G4)	0,0075	3,584*
						(G1-G5)	0,0042	*
						(G1-G6)	0,0060	1,176
1,706 µl	2101	98,37	35 (G2)	1,63	2136			0,418
						(G2-G3)	0,0038	-
						(G2-G4)	0,0075	3,791*
						(G2-G5)	0,0043	*
						(G2-G6)	0,0061	1,546
								6,309*
3,41 µl	2006	98,52	30 (G3)	1,48	2036	(G3-G4)	0,0075	-
						(G3-G5)	0,0042	4,017*
						(G3-G6)	0,0060	*
Pozitif Kontrol (NaAs ₂)	829	95,5	39 (G4)	4,50	868	(G4-G5)	0,0077	1,942
						(G4-G6)	0,0088	6,614*
Çözücü Kontrol (DMSO)	2042	97,7	48 (G5)	2,30	2090	(G5-G6)	0,0062	*
Negatif Kontrol (Su)	1714	94,60	98 (G6)	5,4	1812			4,986*

*p<0,05; **p<0,01

3.5. 6B maddesinin F₂ neslinde anormal birey sayısına etkisi

F₂ nesli gözlemleri esnasında da hem deney hem de kontrol grubunda bazı morfolojik anormalliklere rastlanmıştır.

6B maddesi içeren tüm deney gruplarında anormal birey sayısı düşük ve negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan anlamlıdır. Çözücü kontrol grubunda da anormal birey oranı negatif kontrol grubuna göre düşük ve fark istatistik açıdan önemli bulunmuştur. F₁ neslinde gözlemlendiği gibi F₂ neslinde de negatif kontrol grubu en fazla anormal birey yüzdesine sahiptir (Tablo 4).

Tablo 4. 6B maddesinin F₂ neslinde anormal birey sayısına etkisi.

Gruplar	Norma l	(%)	Anorma l birey Sayısı	(%) Anorma l Birey Yüzdesi	Topla m	Grup Karşılaştırm a	Standart Sapma	Z Değeri
0,85 µl	2355	96,60	83 (G1)	3,4	2438			-
								2,876*
						(G1-G2)	0,0061	*
						(G1-G3)	0,0062	-2,236*
						(G1-G4)	0,0070	-2,185*
						(G1-G5)	0,0045	-
(G1-G6)	0,0067	3,432*						
1,706 µl	1906	94,82	104 (G2)	5,18	2010			4,192*
								*
						(G2-G3)	0,0070	0,539
						(G2-G4)	0,0076	0,339
						(G2-G5)	0,0056	-
						(G2-G6)	0,0074	5,940*
3,41 µl	1727	95,2	87 (G3)	4,80	1814			*
								1,382
						(G3-G4)	0,0077	-0,155
						(G3-G5)	0,0056	-
						(G3-G6)	0,0075	5,195*
								*
Pozitif Kontrol (NaAsO ₂)	1296	95,09	67 (G4)	4,91	1363			1,879
						(G4-G5)	0,0064	-
						(G4-G6)	0,0081	4,768*
Çözücü Kontrol (DMSO)	2690	98,13	51 (G5)	1,87	2741			*
						(G5-G6)	0,0061	7,059*
Negatif Kontrol (Su)	1752	93,80	116 (G6)	6,2	1868			*

*p<0,05; **p<0,01

3.6. 2E maddesinin F₁ neslinde birey sayısına etkisi

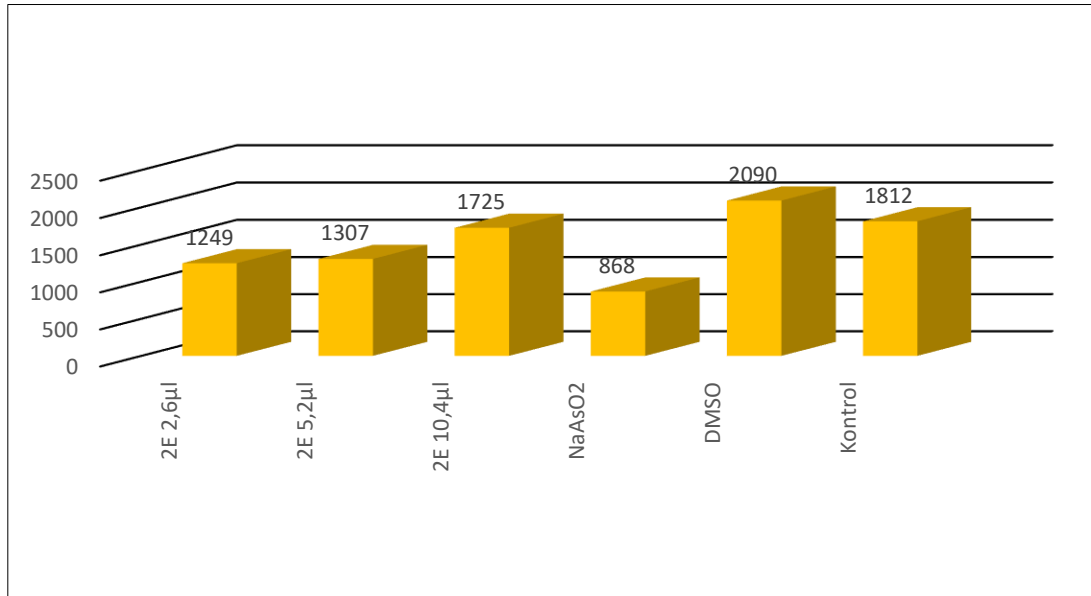
F₁ neslinde 2E maddesi içeren deney gruplarında konsantrasyon azaldıkça birey sayısında da azalma gözlenmiştir (Tablo 5). 10,4 µl'lik konsantrasyon hariç diğer deney gruplarında bu azalma istatistik açıdan anlamlıdır. DMSO grubundaki ergin birey sayısı negatif kontrol grubuna göre artmıştır ve bu bireyler negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan önemli bulunmuştur (Şekil 5).

Tablo 5. 2E maddesinin F₁ neslinde birey sayısına etkisi.

Gruplar	Toplam	Grup Karşılaştırma	Standart Sapma	Z Değeri
---------	--------	--------------------	----------------	----------

2,6 µl	1249 (G1)	(G1-G2)	0,0085	-5,021**
		(G1-G3)	0,0089	-2,580**
		(G1-G4)	0,0101	-2,525*
		(G1-G5)	0,0079	5,974**
		(G1-G6)	0,0089	-1,825
5,2 µl	1307 (G2)	(G2-G3)	0,0068	2,923**
		(G2-G4)	0,0084	2,079*
		(G2-G5)	0,0056	0,822
		(G2-G6)	0,0070	-3,794**
10,4 µl	1725 (G3)	(G3-G4)	0,0087	-0,298
		(G3-G5)	0,0061	4,042**
		(G3-G6)	0,0074	-0,880
Pozitif Kontrol (NaAsO ₂)	868 (G4)	(G4-G5)	0,0078	2,834**
		(G4-G6)	0,0088	-1,032
Çözücü Kontrol (DMSO)	2090 (G5)	(G5-G6)	0,0062	-4,980**
Negatif Kontrol (Su)	1812 (G6)			

*p<0,05; **p<0,01

Şekil 5. 2E maddesinin F₁ neslinde toplam birey sayısı

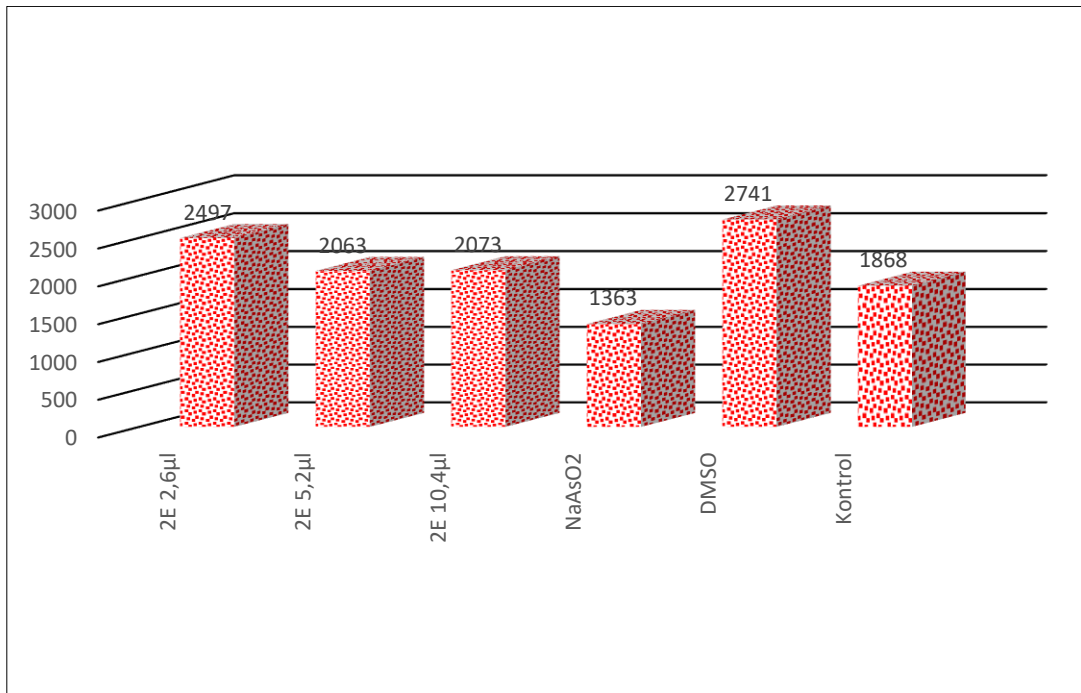
3.7. 2E maddesinin F₂ neslinde birey sayısına etkisi

2E maddesi uygulanan üç deney konsantrasyonunda da ergin birey sayısı negatif kontrol grubuna göre artmıştır ve bu artış konsantrasyon azaldıkça birey sayısında artma şeklinde gözlemlenmiştir (Şekil 6). Tüm konsantrasyonlardaki fark istatistik açıdan önemlidir. Bununla birlikte, 5,2 µl'lik konsantrasyonu ile çözücü kontrol grubu arasında da istatistik açıdan anlamlı bir fark ortaya çıkmıştır ($p<0,01$). DMSO grubundaki ergin birey sayısı negatif kontrol grubuna göre artmıştır. Ayrıca pozitif kontrol grubu ile çözücü kontrol grubu arasında istatistik açıdan anlamlıdır.

Tablo 6. 2E maddesinin F₂ neslinde birey sayısına etkisi.

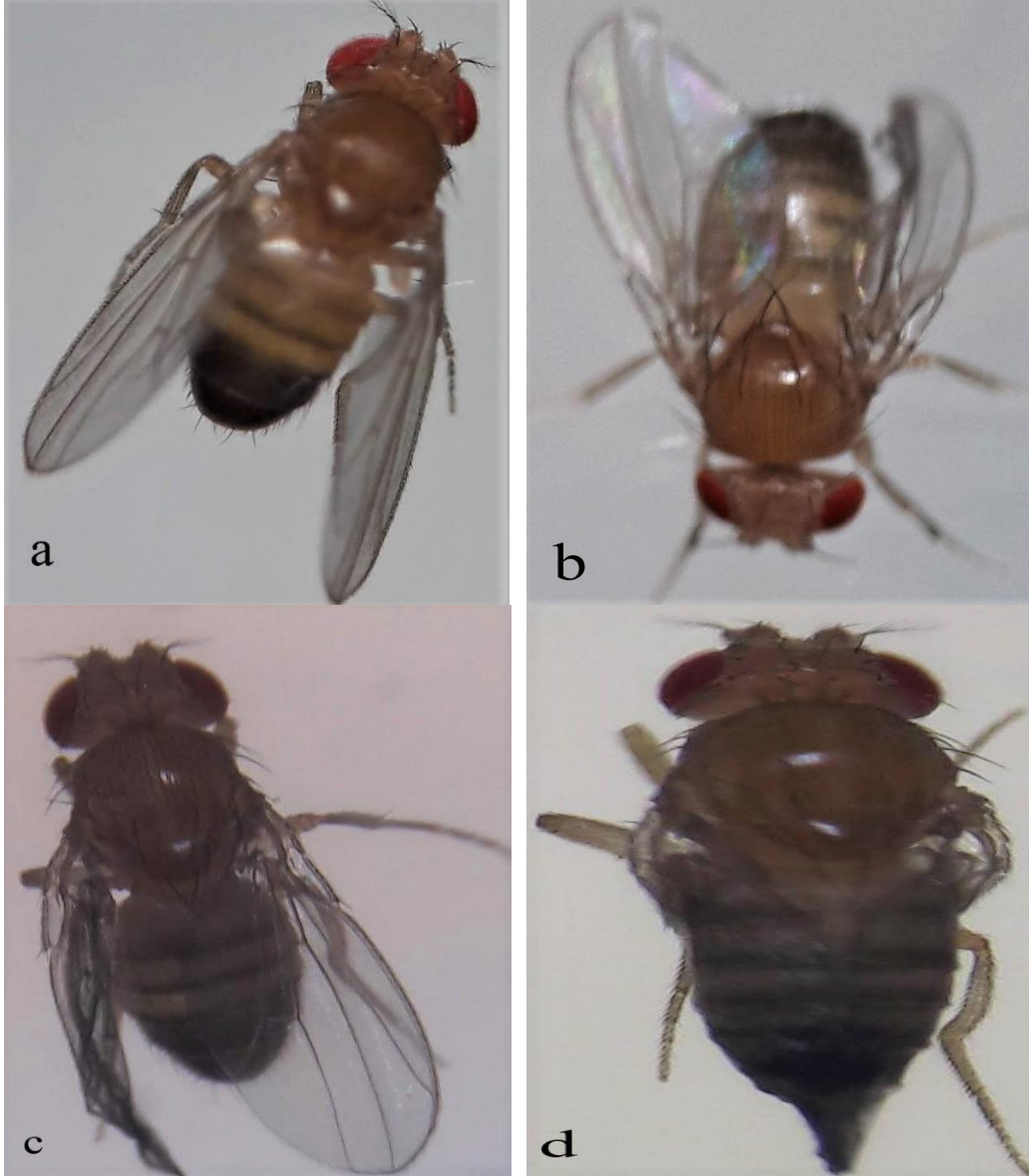
Gruplar	Toplam	Grup Karşılaştırma	Standart Sapma	Z Değeri
2,6 µl	2497 (G1)	(G1-G2)	0,0060	-2,648**
		(G1-G3)	0,0061	-1,902
		(G1-G4)	0,0073	-0,286
		(G1-G5)	0,0051	6,370**
		(G1-G6)	0,0071	-1,517
5,2 µl	2063 (G2)	(G2-G3)	0,0059	0,710
		(G2-G4)	0,0071	1,934
		(G2-G5)	0,0048	3,463**
		(G2-G6)	0,0069	-3,864**
10,4 µl	2073 (G3)	(G3-G4)	0,0072	1,322
		(G3-G5)	0,0050	4,176**
		(G3-G6)	0,0070	-3,197**
Pozitif Kontrol (NaAsO ₂)	1363 (G4)	(G4-G5)	0,0064	4,762**
		(G4-G6)	0,0081	-1,593
Çözücü Kontrol (DMSO)	2741 (G5)	(G5-G6)	0,0061	-7,052**
Negatif Kontrol (Su)	1868 (G6)			

*p<0,05; **p<0,01

Şekil 6. 2E maddesinin F₂ neslinde toplam birey sayısı

3.8. 2E maddesinin fenotipe etkisi

2E maddesi içeren besiyerinde gelişen bireylerde morfolojik anormalliklere rastlanmıştır. Bu anormallikler, kıvrık kanatlılık, mızrak kanatlılık, kanadın vücuda yapışmış olması, püskül kanatlılık, kanadın abdomene yapışması, kanat körelmesi, segment eksikliği, segmentlerin kaynaşması gibi anormalliklerdir (Şekil 7).



Şekil 7. 2E maddesinin morfolojik karakterler üzerine etkileri (a-Sağ kanat kırık, b-Sol kanat kırık, c-Sol kanat mızrak, d-Her iki kanat abdomene yapışık)

3.9. 2E maddesinin F₁ neslinde anormal birey sayısına etkisi

5,2 µl'lik konsantrasyonda gözlenen anormal birey oranı negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan önemlidir (Tablo 7). Diğer madde uygulamalarında fark ortaya çıkmamıştır.

Tablo 7. 2E maddesinin F₁ neslinde anormal birey sayısına etkisi.

Gruplar	Normal	(%)	Anormal birey Sayısı	(%) Anormal Birey	Toplam	Grup Karşılaştırma	Standart Sapma	Z Değeri
---------	--------	-----	----------------------	-------------------	--------	--------------------	----------------	----------

Yüzdesi								
2,6 µl	1161	92,95	88 (G1)	7,04	1249	(G1-G2)	0,0085	5,025**
						(G1-G3)	0,0089	2,582**
						(G1-G4)	0,0101	2,527**
						(G1-G5)	0,0080	-
						(G1-G6)	0,0090	5,979**
								-1,826
5,2 µl	1271	97,24	36 (G2)	2,75	1307	(G2-G3)	0,0068	-
						(G2-G4)	0,0083	2,926**
						(G2-G5)	0,0056	-2,081*
						(G2-G6)	0,0070	-0,823
10,4 µl	1643	95,24	82 (G3)	4,75	1725	(G3-G4)	0,0087	0,298
						(G3-G5)	0,0061	-
						(G3-G6)	0,0074	4,047**
Pozitif Kontrol (NaAsO ₂)	829	95,5	39 (G4)	4,49	868	(G4-G5)	0,0077	-
						(G4-G6)	0,0088	2,837**
Çözücü Kontrol (DMSO)	2042	97,7	48 (G5)	2,29	2090	(G5-G6)	0,0062	4,986**
Negatif Kontrol (Su)	1714	94,60	98 (G6)	5,4	1812			

*p<0,05; **p<0,01

Çözücü kontrol grubu negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan anlamlıdır. En yüksek birey sayısı DMSO uygulanan deney grubundadır buna rağmen, anormal fenotipli birey sayısı negatif kontrol grubuna göre düşmüştür.

3.10. 2E maddesinin F₂ neslinde anormal birey sayısına etkisi

5,2 ve 10,4 µl'lik konsantrasyonda anormal birey oranı düşmüştür ve aradaki fark istatistik açıdan anlamlıdır. Çözücü kontrol grubu negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan anlamlı bulunmuştur (Tablo 8). F₂ neslinde en fazla anormal birey sayısı negatif kontrol grubunda görülmüştür.

Tablo 8. 2E maddesinin F₂ neslinde anormal birey sayısına etkisi.

Gruplar	Normal	(%)	Anormal birey Sayısı	(%) Anormal Birey Yüzdesi	Toplam	Grup Karşılaştırma	Standart Sapma	Z Değeri
2,6 µl	2369	94,87	128 (G1)	5,12	2497	(G1-G2)	0,0060	2,651**
						(G1-G3)	0,0061	1,904
						(G1-G4)	0,0073	0,286
						(G1-G5)	0,0051	-
						(G1-G6)	0,0071	6,379**
								1,518
5,2 µl	1990	96,46	73 (G2)	3,53	2063	(G2-G3)	0,0059	-0,711
						(G2-G4)	0,0071	-1,936
						(G2-G5)	0,0048	-
						(G2-G6)	0,0069	3,469**
							3,868**	

10,4 µl	1991	96,04	82 (G3)	3,95	2073	(G3-G4)	0,0072	-1,324
						(G3-G5)	0,0050	-
						(G3-G6)	0,0070	4,183**
Pozitif Kontrol (NaAsO ₂)	1296	95,08	67 (G4)	4,91	1363	(G4-G5)	0,0064	4768**
						(G4-G6)	0,0081	1,595
Çözücü Kontrol (DMSO)	2690	98,13	51 (G5)	1,86	2741	(G5-G6)	0,0061	7,059**
Negatif Kontrol (Su)	1752	93,79	116 (G6)	6,2	1868			

*p<0,05; **p<0,01

4. TARTIŞMA SONUÇ

Bu çalışma, sentezi yapılan yeni bir bileşik olan sulfonamid sınıfı potansiyel iki ayrı karbonik anhidraz inhibitörü hakkında ilk rapordur.

F₁ ve F₂ neslinde 6B maddesi üç konsantrasyonda da ergin birey sayısını arttırmıştır. Dolayısıyla her iki nesilde ergin birey sayısı açısından fertiliteye pozitif etki gösterdiği düşünülebilir. Öte yandan, yine her iki nesilde anormal birey sayısında azalma meydana gelmiştir. 6B maddesinin K_i değerine göre hazırlanan üç konsantrasyonun da hem ergin birey sayısında artma hem de fenotipik anormallikte azalmaya neden olduğu söylenebilir. Sonuç olarak, karbonik anhidraz inhibitörü olan 6B maddesi uygulandığında, her iki nesilde ergin birey gelişimine olumlu etki gözlenmiştir. Hem fertilitate teşvik edilmiş hem anormal birey oranı azalmıştır. Sülfonamidlerle ilgili *Drosophila* ile yapılan herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Yine de mevcut araştırmalarla literatür desteği yapılmıştır. *D. melanogaster*'de β-CA'nın oldukça aktif bir mitokondriyal enzim olup (Syrjänen vd., 2015a), gelişmekte olan yumurtadaki sınır hücre göçü için gerekli olduğu ve bu nedenle yumurta beslenmesi için, dolayısıyla *D. melanogaster*'in üremesi için gerekli olduğu gösterilmiştir. Hem gelişmekte olan hem de yetişkin sineklerde RNA enterferansı (RNAi)-kaynaklı gen susturma metodu kullanılarak ortaya çıkarılmış olan bu bulgu (Syrjänen vd., 2015b), bizim araştırmamızda kullanılan karbonik anhidraz inhibitörünün *Drosophila*'da yumurta, dolayısıyla ergin birey gelişimini olumsuz etkilemediğinin ispatıdır. Şayet karbonik anhidraz inhibisyonunun yumurta gelişimine toksik etkisi olsaydı, ergin birey sayısında düşme ve ergin birey fenotipinde anormallik oranı açısından istatistik artış ortaya çıkmalıydı. Bir başka araştırmada, aynı gruptan bir sülfonamid olan karbonik anhidraz inhibitörü 2B ve 2E test maddelerinin, *in vitro* insan periferik lenfositlerinde yüksek konsantrasyonda ve uzun süreli maruz kalmada sitotoksik olduğu, ancak klastojenik ve/veya mutajenik olmadıkları ortaya çıkmıştır (Şen vd., 2017).

Sülfonamidlerin böceklerde etkilerine dair araştırmalar, pestisit ve insektisit olarak kullanım için, LD veya /LC değerlerinin ortaya çıkarılması ile ilgili çalışmalarıdır. Beş karbonik anhidraz inhibitörünün (asetazolamid; brinzolamid; diklorfenamid; dorzolamid; metazolamid) *Aedes aegypti*'e karşı toksik ve nörofizyolojik etkileri olduğu, larvalarda toksisite ve felce yol açarak ölümcül olduğu, *D. melanogaster* larvalarında sinir ve kasta toksik etkileri olduğu ifade edilmiştir (Francis vd., 2017). Söz konusu çalışma bizim çalışma bulgularımızın aksini göstermektedir. Bunun nedeni konsantrasyonların farklı olması ile ilgili olabilir. Sözü edilen araştırmada kullanılan konsantrasyonlar 250-1000 ppm arasında kullanılmış olup, en düşük konsantrasyon (250 ppm) bizim araştırmamızda kullanılan en yüksek konsantrasyonun (8,5 µl) ortalama 3 katı kadardır. Benzer şekilde, del Pilar Corena vd. (2004), altı farklı sivrisinek türünün larvaları üzerinde bir karbonik anhidraz inhibitörü olan metazolamid ve asetazolamidi test etmiştir. LC₅₀ değerleri, metazolamid ve asetazolamidin sırasıyla 75 ve 70 ppm olduğu ve etkilerin karbonik anhidraz inhibisyonu ile ilgili olduğu ifade edilmiştir (Francis vd., 2017). Sözü edilen çalışmada kullanılan konsantrasyon bizim kullandığımız konsantrasyonun on katı kadardır. Bir başka araştırmada 4,7-dimetil-3,4,7,8-tetrahidro-3λ6- [1,2] tiazino [4,3-f] kinolin-3,3,8-trion, parazit *Setaria cervi*'nin yetişkinlerine denenmiş ve LD₅₀ konsantrasyonu ile (281.4 µM) ölümcül olduğu bulunmuştur (Mukherjee vd., 2018). Kullanılan konsantrasyon bizim deneyimizdeki en yüksek konsantrasyonun 30 katı kadardır. Bizim araştırmamızda kullanılan konsantrasyonun düşük olması ve bulgularımız bu durumda uyumludur. Bulgularımızı destekleyen bir başka araştırma da farelerde yapılmıştır. 2-(5-mercapto-1,3,4-oxadiazol-2-yl)-N-propylbenzenesulphonamide (MOPBS)

(1, 10, 50 ve 100 mg/kg konsantrasyonlarında uygulanmış; mide, böbrek ve karaciğer fonksiyonu ve kas kuvveti ve motor fonksiyonu üzerinde belirgin bir toksik etki yaratmadığı ifade edilmiştir (Rasheed vd., 2018). Dolayısıyla bizim bulgularımıza göre K_i değeri baz alınarak kullanıldığında toksik etki göstermemektedir. İnsanda denemeden önce yapılan bu *in vivo* araştırma sonucu olumludur diyebiliriz. Uygulanan molekülün fertilitiyeyi olumlu etkilemesi nedeniyle hayvancılıkta verim artışı çalışmalarının araştırılması faydalı olacaktır. Ayrıca biyolojik mücadelede kullanılmaya aday böceklerin üretiminde fertilitiyeye etkisinin araştırılması da faydalı olabilir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar F_1 nesliyle ilgili çalışmalardır. Dolayısıyla bu açıdan bu çalışma bu konuda bir ilktir. İlaç olarak kullanılacağı vakit F_2 ile ilgili araştırmalar yapılmalıdır. F_1 neslinde pozitif etki görülmesi umut verici olmasına rağmen F_2 neslinde gözlenen toksik etki nedeniyle diğer deney hayvanlarında da F_2 nesli verileri incelenmelidir. Sadece F_1 nesli üzerine araştırmalar yapılırsa sakat doğumlara neden olabilmektedir.

Gelişimlerini 2E maddesi içeren besiyerinde tamamlayan F_1 ve F_2 neslinde konsantrasyon azaldıkça birey sayısında azalma ortaya çıkmıştır. Dolayısıyla 2E molekülünün birey gelişimine olumsuz etki gösterdiği düşünülebilir. Öte yandan, deney gruplarında anormal birey sayısında azalma meydana gelmiştir. Sonuç olarak, karbonik anhidraz inhibitörü olan 2E maddesi uygulandığında, konsantrasyon düştükçe ergin birey sayısında düşme ve ergin birey fenotipik anormallik oranı açısından istatistik farklılık ortaya çıktığını söyleyebiliriz. Bulgumuzu direkt desteklemese de Silva ve arkadaşları (2015), antitümör aktiviteye sahip olabileceklerini ve ilaç etken maddesi olarak kullanılabileceklerini düşünerek sentezledikleri şalkon N-{4-[3-(4-nitrofenil)prop-2-enol]fenil} benzen sülfonamid türevlerinin genotoksitesitesini *in vivo* fare kemik iliği mikronukleus testiyle araştırdıkları çalışmada, bu bileşiğin polikromatik eritrositlerdeki MN frekansını önemli derecede arttırdığını ve bu sonucun genotoksik etkinin bir göstergesi olduğunu bildirmiştir. Yine Abou-Eisha ve arkadaşları (2004), antibakteriyel bir sülfonamid türevi olan sulfametoksazol'un nükleer bölünme indeksini düşürdüğünü ve sitotoksik etkili olduğunu bildirmiştir. Villar ve arkadaşları (2004), benzo[b]tiyofen 1,1-dioksit'in lipofilik yapıdaki sülfonamid türevlerinin insan tümör hücre hatları üzerinde sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir.

Mutajenik maddeler, canlıda hem kromozomal düzeyde hem de gen seviyesinde nokta mutasyonlara neden olabilmektedir. Sayısal kromozom değişikliklerini sitolojik olarak gözlemek mümkündür, fakat nokta mutasyonlar ancak fenotipte bir değişikliğin ortaya çıkmasıyla anlaşılabilir (Watson vd., 1987). Araştırmamızda gözlenen anormallikler (Şekil 2, 3), çok çeşitli genlerde meydana gelen nokta mutasyonlar (Lindsley ve Zimm, 1992) nedeniyle ortaya çıkmış olabilir. F_2 nesli maddeyle hiç temas etmemesine rağmen ortaya çıkan bu sonuç, ilgili moleküllerin epigenetik mekanizma ile genetik faktörleri etkilemiş olduğunu gösterebilir. Epigenetik değişimler, çevresel koşullarda gerçekleşen değişiklikler nedeniyle genetik yapıda yapısal olmayan ancak yine de kalıtsal değişikliklere neden olan düzenlemelerdir (Klug vd. 2018). Bu sonuç *in vivo* araştırmalarda F_2 neslinin de incelenmesi gerektiğini göstermektedir. Sonuç olarak, F_1 neslinde maruz kalınan madde, K_i değerinin üstündeki konsantrasyonda kalıtsal değişikliklere neden olarak, ergin birey sayısını düşürmüş, aynı zamanda teratojenik etkiye neden olmuştur diyebiliriz. Bu sonuç potansiyel ilaç hammaddelerinin *in vivo* araştırmalarda F_2 neslinin de incelenmesi gerektiğini göstermektedir.

Araştırmamızda ortaya çıkan hedef dışı bir bulgu ise pozitif kontrol grubunda (NaAsO_2) F_2 neslinin ergin birey sayısının tüm deney ve kontrol gruplarından daha yüksek oluşudur. Sodyum arsenitin F_2 neslinde fertilitiyeyi teşvik eden bir potansiyeli olduğu ifade edilebilir. Nitekim daha önce yaptığımız araştırmada da benzer bir sonuçla fertilitiyeyi teşvik ettiği ortaya çıkmıştır (Karataş ve Bahçeci, 2010b). Ayrıca arsenilik asitin besicilikte domuz ve kümes hayvanları yemine, gelişme ve büyümeyi hızlandırıcı ajan olarak ilave edildiği rapor edilmiştir (Friberg vd., 1986). Tüm bunlar birlikte değerlendirildiğinde sodyum arsenitin biyolojik mücadelede, arzu edilen böcek kültürünü çoğaltmak için, uygun bir ajan olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Sonuç olarak; bu çalışmada kullanılan KA inhibitörü olan sülfonamid türevleri 6B ve 2E'nin toksik etkileri *in vivo* koşullarda araştırılmış ve 6B molekülünün etkisinin pozitif olduğu bulunmuştur. 2E molekülünün ise *Drosophila*'da gelişime etkisinin negatif olduğu ifade edilebilir. Fakat kesin bir sonuca varabilmek için farklı model organizmalarla da desteklenmelidir. Bu çalışmanın ilk olması, devamında gelecek diğer çalışmalara bir kaynak niteliğindedir.

Kimyasal ya da fiziksel ajanların toksikoloji testleri için farklı test yöntemleri ve farklı organizmalar kullanılması daha güvenilir sonuçlar ortaya çıkacaktır. Toplu olarak ele alındığında, yeni bir sülfonamid hakkındaki bu rapor, gelecekte umut verici bir terapötik ajan olabileceğine dair ipucu sunmaktadır. Tüm bu bulgular birleştirildiğinde 6B molekülünün ilaç olarak geliştirilmesi için *Drosophila* ile yapılan bu araştırma pozitif sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Fakat güvenli bileşikler olduğunu söylemek için, yapılacak yeni çalışmalarla toksisite testlerinin

arttırılması gerekmektedir. Bu çalışma bu madde ile yapılmış ilk çalışma olması nedeniyle umut vermektedir, fakat kesin sonucu diğer deney organizmalarında ilave testler uygulandıktan sonra kesin karar verilebilir.

KAYNAKLAR

1. **Abou-Eisha A., Marcos R. & Creus A. (2004).** Genotoxicity studies on the antimicrobial drug sulfamethoxazole in cultured human lymphocytes, *Mutation Research*, 564(1), 51-56.
2. **Babu M.S.C. (2012).** *Synthesis, characterization and anticancer activity of novel sulfonamides.* SRM University, Faculty of Science and Humanities, PhD thesis.
3. **Badger, M. R. & Price G. D. (1994).** The role of carbonic anhydrase in photosynthesis, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45, 369-392.
4. **Demirci, T., Arslan, M., Bilen, Ç., Demir, D., Gençer, N. & Arslan, O. (2014).** Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of 1,3- dicarbonyl derivatives of methylaminobenzenesulfonamide. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 29(1), 132-136.
5. **del Pilar Corena, M., Fiedler, M.M., VanEkeris, L., Tu, C., Silverman, D.N. & Linser, P.J. (2004).** Alkalinization of larval mosquito midgut and the role of carbonic anhydrase in different species of mosquitoes. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*. 137, 207-225.
6. **Doğanay, S. & Fırat P.G. (2007).** Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Glo-Kat*, 2: 213-218.
7. **Francis, S.A.M., Taylor-Wells, J., Gross, A. & Bloomquist, J.R. (2017).** Toxicity and physiological actions of carbonic anhydrase inhibitors to *Aedes aegypti* and *Drosophila melanogaster*. *Insects*. 8, 2.
8. **Friberg, L., Nordberg, G.F. & Vouk, V.B. (1986).** Handbook On The Toxicology Of Metals, 2nd ed., Elsevier, Amsterdam, Holland.
9. **Fortini M.E., Skupski M.P. & Boguski M.S. (2000).** A survey of human disease gene counterparts in the *Drosophila* genome, *The Journal of Cell Biology*. 150, 23-30.
10. **Geldeard, L.J. (2009).** *Fundamental studies on 2,4,6-trichlorophenyl sulfonate esters.* PhD Thesis, University College London, Faculty of Mathematical and Humanities, England.
11. **Graf U., Schaik N.V. & Würzler F.E. (1992).** *Drosophila* Genetics. New York: SpringerVerlag.
12. **Imming, P., Sinning, C. & Meyer, A. (2006).** Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. *nature reviews drug discovery*. 5(10), 821-834.
13. **İrende, İ. (2019).** *Lityumun karbonik anhidraz u enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi,* Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 577337.
14. **Jafari, M. (2010).** *Drosophila melanogaster* as a model system for the evaluation of anti-aging compounds. *Fly*. 4(3), 253-257.
15. **Karataş, A. & Bahçeci, Z. (2010a).** Sodyum arsenit ve krom (III) klorürün *Drosophila melanogaster*'in ergin bireylerinin morfolojisi üzerine etkileri. *Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*. 31(2), 1-21.
16. **Karataş, A. & Bahçeci, Z. (2010b).** Sodyum arsenit ve krom(iii) klorürün *Drosophila melanogaster*'in eşey oranı ve bazı gelişimsel özellikleri üzerine etkisi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 26(2), 102-111.
17. **Keser, D. & Karataş, A. (2012).** The effect of aspirin and acetaldehyde on egg fertility and development of *Drosophila melanogaster*. *Fressenius Environmental Bulletin*. 21, 685-694.
18. **Klug, W.S., Cummings, M.R., Palladino, M.A. & Spencer, C.A. (2018).** Genetik Kavramlar. Palme Yayınevi. Ankara. 681.
19. **Lindsley, D.L. & Zimm, G.G. (1992).** The Genome of *Drosophila melanogaster*. New York, Academic Press.
20. **Mann, T. & Keilin, D. (1940).** Sulphanilamide as a spesific inhibitor of carbonic anhydrase, *Nature*. 146, 164-165.
21. **Mukherjee, S., Joardar, N., Mondal, S., Schiefer, A., Hoerauf, A., Pfarr, K. & Babu, S.P.S. (2018).** Quinolone-fused cyclic sulfonamide as a novel benign antifilarial agent. *Scientific Reports*. 8(1), 12073.
22. **Mukhopadhyay, I., Saxena, D.K. & Chowdhuri, D.K. (2003).** Hazardous effects of effluent from the chrome plating industry: 70 kDa heat shock protein expression as a marker of cellular damage in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ). *Environmental Health Perspective*. 111(16), 1926-1932.
23. **Pastarekova S., Parkkila S., Pastorek J. & Supuran T.C. (2004).** Carbonic anhydrases: current State of the art, therapeutic applications and future prospects, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 19, 199-229.
24. **Piper, M.D.W., Skorupab, D. & Partridge, L. (2005).** Diet, metabolism and lifespan in *Drosophila*. *Experimental Gerontology*. 40, 857-862.
25. **Pipera, M.D.W. & Partridge, L. (2017).** *Drosophila* as a model for ageing. *Biochim Biophys Acta - Molecular Basis of Disease*. 1864 (9), 2707-2717.
26. **Potter C., Turenchalk S. & Xu, I. (2000).** *Drosophila* in cancer research-an expanding role, *Trends Genetics*. 16 (1), 3-39.

27. Rasheed H., Afridi, R., Khan, U., Ullah, M.Z., Khalid, S., Atiq, A., Kashif, H., Ahmed, M.N., Kim, Y.S., & Khan, S. (2018). Anti-inflammatory, anti-rheumatic and analgesic activities of 2-(5-mercapto-1,3,4-oxadiazol-2-yl)-N-propylbenzenesulphonamide (MOPBS) in rodents. *Inflammopharmacology*. 26(4), 1037-1049.
28. Silva C.R.E., Borges F.F.V., Bernardes, A., Perez, C.N., Silva, D.M. & ChenChen, 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), 137-148.
29. Suckow, B. K. & Suckow, M. A. (2006). Lifespan extension by the antioxidant curcumin in *Drosophila melanogaster*. *BioMed Research International*. 2(4): 401–405.
30. Syrjänen, L., Kuuslahti, M. Tolvanen, M., Vullo, D., Parkkila, S. & Supuran, C.T. (2015a). The -carbonic anhydrase from the malaria mosquito *Anopheles gambiae* is highly inhibited by sulfonamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 23, 2303-2309.
31. Syrjänen L., Valanne, S., Kuuslahti, M., Tuomela, T., Sriram, A., Sanz, A., Jacobs, H.T., Rämetsä, M. & Parkkila, S. (2015b). β carbonic anhydrase is required for female fertility in *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Zoology*. 12, 19.
32. Supuran, C.T. (2018). Carbonic anhydrase inhibitors and their potential in a range of therapeutic areas. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 28(10), 709-712.
33. Şen, S., Berber, A. A., Demirci, T., Arslan, M. & Aksoy, H. (2017). Cytotoxic and genotoxic evaluation of some newly synthesized sulfonamide derivatives. *Fresenius Environmental Bulletin*. 26(3), 2243-2250.
34. Villar R., Encio I., Migliaccio M., Gila M.J. & Martínez-Merino V. (2004). Synthesis and cytotoxic activity of lipophilic sulphonamide derivatives of the benzo[b]thiophene 1,1-dioxide, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 12(5), 963-968.
35. Watson, J.D., Hopkins, N.H., Roberts, J.W., Steitz, J.A. & Weiner, A.M. (1987). *Molecular Biology of The Gene*, The Benjamin-Cummings, California, USA.
36. Whittington D. A., Abdul Waheed A., Ulmasov B., Shah, G. N., Grubb J. H., Sly W. S. & Christianson D. W. (2001). Crystal structure of the dimeric extracellular domain of human carbonic anhydrase XII, a bitopic membrane protein overexpressed in certain cancer tumor cells. *PNAS*. 98(17), 95-9550.