

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SULTAMİSİLİN VE SEFUROKSİM AKSETİL
ANTİBİYOTİKLERİNİN GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI GONAD
HÜCRE HATTI-2 (RTG-2) ÜZERİNE SİTOTOKSİK VE
APOPTOTİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ENES TUZCUOĞLU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Muammer KIRICI

BİNGÖL-2025

**SULTAMİSİLİN VE SEFUROKSİM AKSETİL ANTİBİYOTİKLERİNİN
GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI GONAD HÜCRE HATTI-2 (RTG-2) ÜZERİNE
SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Doç. Dr. Muammer KIRICI danışmanlığında, Enes TUZCUOĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma 24/11/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Doç. Dr. Semra ÇİÇEK	İmza	:
Üye	: Doç. Dr. Muammer KIRICI	İmza	:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Reşit TAYSI	İmza	:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun// tarih ve/
nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zafer ŞİAR
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Bingöl Üniversitesi tarafından BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: BAP-GTHMYO.2024.001

ÖNSÖZ

Günümüzde, uygulama kolaylığı ve etik nedenlerden dolayı, bilim dünyasında *in vitro* yöntemlere ilgi artarak devam etmektedir. Özellikle, hücre kültürü çalışmaları, *in vivo* çalışmalarla benzer sonuçlar elde edilmesi, hücresel düzeyde uygulama imkanları, pratik olmaları gibi avantajlarla öne çıkmaktadır. Ksenobiyotiklerin, sucul ekosistemde toksik ve çevresel etkilerinin değerlendirilmesinde, balık hücre kültürleriyle yapılan çalışmalar hiç kuşkusuz önemli bir yer tutmaktadır. Sucul ekosistemde, hücre kültürü çalışmalarında bir çok balık hücre hattı kullanılmaktadır. Bu çalışmamızda, iki önemli antibiyotik olan sultamisilin ve sefuroksim aksetil'in alabalık gonad hücre hattı üzerine sitotoksik ve apoptotik etkileri incelenmiş ve sonuç olarak literatüre önemli veriler kazandırılmıştır.

Bu tez çalışması boyunca her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Sayın Doç. Dr. Mehmet Kadir ERDOĞAN, Sayın Doç. Dr. Semra ÇİÇEK, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ramazan GÜNDOĞDU ve Sayın Doç. Dr. Fatma CAF'a minnetlerimi sunarım.

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bana yol gösteren, her türlü desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Muammer KIRICI'ya bilimsel katkıları, değerli görüşleri ve yönlendirmeleri için sonsuz teşekkürlerimi ve minnetlerimi sunarım.

Çalışmamın her aşamasında maddi ve manevi desteğini esirgemeyen değerli eşim Ebru TUZCUOĞLU'na ve çocuklarım Ali Aras TUZCUOĞLU ve Enes Kayra TUZCUOĞLU'na en içten dileklerimle teşekkür eder ve minnettarlığımı bildiririm.

Enes TUZCUOĞLU
Bingöl 2025

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1. Antibiyotikler	4
2.3. Sultamisilin	8
2.4. Sefuroksim Aksetil.....	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM	16
3.1. Materyal	16
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Biyolojik ve Kimyasal Materyaller	16
3.2. Yöntem.....	18
3.2.1. Hücre Kültürü.....	18
3.2.3. Sitotoksikite Testi	20
3.2.4. Western Blot ile Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	20
3.2.5. İstatistik	21
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	22
4.1. Hücre Canlılığı Analiz Sonuçları	22
4.2. Western Blot Sonuçları	25

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	28
KAYNAKLAR	29

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

°C	: Santigrat derece
Mg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
µg	: Mikrogram
DDD	: Tanımlı günlük doz (defined daily doses)
MTT	: Metil tiazolil tetrazolyum
CO ₂	: Karbondioksit
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
RTG-2	: Gökkuşuğı alabalığı gonad hücre hattı-2
PLHC-1	: Balık hepatoma hücre hattı
EPC	: Sazan epidermal hücre hattı
RTL-W1	: Gökkuşuğı alabalığı karaciğer hücre hattı
RT-gill W1	: Gökkuşuğı alabalığı solungaç hücre hattı
EMEM	: Eagle's Minimal Essential Medium
WST-1	: Water Soluble Tetrazolium-1
BB	: Kahverengi yayın balığı hücre hattı
BF-2	: Güneş balığı hücre hattı
CHSE-214	: Kral somon embriyo hücre hattı
FG-9307	: Dil balığı solungaç hücre hattı
FHM	: Yassı kafalı golyan balığı kas hücre hattı
GSH	: Glütatyon
DPBS	: Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit

FBS	: Fetal Bovine Serum
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HCL	: Hidroklorik asit
IC ₅₀	: Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon
EC ₅₀	: Yarım maksimal etkili konsantrasyon
NaCl	: Sodyum Klorür
NaF	: Sodyum Florür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
nM	: Nanomolar
nm	: Nanometre
PBS	: Phosphate Buffered saline
PMSF	: Fenil Metil Sülfonil Florür
ROS	: Reactive oxygen species
Rpm	: Dakikada Devir Sayısı
TEMED	: N, N, N, N-tetrametietilendiamin
UV	: Ultraviyole
UVA	: Ultraviyole A
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
ddH ₂ O	: Double distillation of water
ECL	: Hassas kemilüminesans görüntüleme
BCL2	: B hücreli lenfoma-2
Bax	: BCL2 ilişkili x proteini
p53	: Tümör protein 53
gr	: Gram
mL	: Mililitre
cm	: Santimetre

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Sultamisilin'in kimyasal yapısı ve kombinasyonu.....	9
Şekil 2.2.	Sefuroksim Aksetil'in kimyasal yapısı.....	10
Şekil 3.1.	RTG-2 hücrelerinin inverted mikroskopta görüntüsü.....	18
Şekil 3.2.	WST-1 hücre canlılığı testi protokolü.....	20
Şekil 4.1.	Hücre canlılığı analiz sonuçları.....	22
Şekil 4.2.	Sultamisilin ve Sefuroksim Aksetil'in RTG-2 hücrelerinde apoptotik proteinlerin ifade düzeylerine olan etkisi.....	26

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2.1.	En yaygın kullanılan antibiyotiklerin fizikokimyasal özellikleri.....	5
Tablo 2.2.	Farklı su ortamlarında tespit edilen antibiyotikler ve ortalama konsantrasyonları.....	7
Tablo 2.3	Sultamisilin ve sefuroksim aksetil için in vitro toksisite çalışmaları...	12
Tablo 3.1.	Çalışmada kullanılan kimyasallar ve üretici firmalar.....	16
Tablo 3.2.	Çalışmada kullanılan cihazlar, malzemeler ve bunların markaları.....	17

SULTAMİSİLİN VE SEFUROKSİM AKSETİL ANTİBİYOTİKLERİNİN GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI GONAD HÜCRE HATTI-2 (RTG-2) ÜZERİNE SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Bu çalışmada, Sucul ekosistemde yoğun şekilde karşılaşılmaya başlanan antibiyotiklerden Sultamisilin ve Sefuroksim Aksetil'in gökkuşağı alabalığı gonad hücre hattı (RTG-2) üzerine sitotoksik ve apoptotik etkileri incelendi. Çalışma sonucunda, RTG-2 hücre hattına 48 saat 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 ve 100 μ M Sultamisilin ve Sefuroksim Aksetil dozlarından uygulanarak IC_{50} konsantrasyonları belirlendi. Bu dozların uygulanmasından sonra Sultamisilin'in IC_{50} değeri $22,80 \pm 1,72$ ve Sefuroksim Aksetil'in IC_{50} değeri $31,33 \pm 0,95$ μ M olarak hesaplandı. Apoptotik etkilerin belirlenmesi içinde western blot tekniği kullanıldı. Bu amaçla apoptoz düzenleyici proteinler olan p53 ve BCL2 protein kullanıldı. Çalışma sonucunda, Sultamisilin ve Sefuroksim Aksetil'in kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p53 protein seviyesini yükselttiği, BCL2 seviyesini ise düşürdüğü görüldü. Elde edilen sonuçlar, Sultamisilin ve Sefuroksim Aksetil'in balıklar için çok düşük seviyelerinin bile zararlı olabileceği ve balıklarda apoptotik etkilere yol açabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Balık hücre hattı, Sitotoksiste, Sultamisilin, Sefuroksim Aksetil, RTG-2, Apoptoz.

INVESTIGATION OF CYTOTOXIC AND APOPTOTIC EFFECTS OF SULTAMICILLIN AND CEFUROXIME AXETIL ANTIBIOTICS ON RAINBOW TROUT GONAD CELL LINE (RTG-2)

ABSTRACT

In this study, the cytotoxic and apoptotic effects of sultamicillin and cefuroxime axetil, antibiotics frequently encountered in the aquatic ecosystem, were investigated on the rainbow trout gonadal cell line (RTG-2). As a result of the study, IC_{50} concentrations were determined by applying 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 μ M Sultamicillin and Cefuroxime Axetil doses to the RTG-2 cell line for 48 hours. After the application of these doses, the IC_{50} value of sultamicillin was calculated as 22.80 ± 1.72 , and the IC_{50} value of cefuroxime axetil was calculated as 31.33 ± 0.95 μ M. Western blot technique was used to determine apoptotic effects. For this purpose, the apoptosis-regulating proteins p53 and BCL2 were used. The study showed that sultamicillin and cefuroxime axetil increased p53 protein levels and decreased BCL2 levels compared to the control group. The results obtained indicated that even very low levels of sultamicillin and cefuroxime axetil may be harmful to fish and may cause apoptotic effects in fish.

Keywords: Fish cell line, Cytotoxicity, Sultamicillin, Cefuroxime Axetil, RTG-2, Apoptosis.

1. GİRİŞ

Antibiyotikler ağızdan, parenteral veya topikal olarak uygulanabilen, antimikrobiyal aktiviteye sahip doğal olarak oluşan, yarı sentetik ve sentetik bileşiklerdir. İnsan ve hayvan sağlığında önemli yararlar sağlayan en önemli farmakolojik ajanlar arasında yer alan antibiyotikler kullanılan antibiyotikler, tıp, hayvancılık, su ürünleri yetiştiriciliği ve tarım alanlarında bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Cook ve Wright, 2022; Bacanlı, 2024). Bununla birlikte antibiyotiklerin yaygın ve kontrolsüz kullanımı, ekolojik çevre ve insan sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır (Yang vd., 2024). Ayrıca, antibiyotiklerin bilinçsiz kullanımı, metabolize olmayan antibiyotikler ve kalıntıları içeren atıkların yetersiz arıtımı ile birleşince, çevresel antibiyotik konsantrasyonlarının artmasına ve dolayısıyla “antibiyotik kirliliğine” yol açmaktadır. Antibiyotik kirliliği, dünya çapında artan etkileriyle antibiyotik veya antimikrobiyal direnç için önemli bir itici güç haline gelerek küresel bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır (Barathe vd., 2024). Bu durum, antibiyotiklerin yalnızca terapötik yönüyle değil, çevresel riskleri açısından da araştırılmasını zorunlu kılmaktadır. Sucul ekosistemler, çevresel kirliliğe en duyarlı biyolojik ortamlardan biridir ve antibiyotik iletimi için önemli bir ortam görevi görmektedir. Bu ekosistemlere taşınan antibiyotik kalıntıları, balıklar gibi ekonomik ve ekolojik açıdan önemli canlıların fizyolojisini doğrudan etkileyebilmektedir. Antibiyotiklerin sucul organizmalar üzerindeki etkilerinin anlaşılması, çevresel risklerin değerlendirilmesi ve sürdürülebilir ekosistem yönetimi açısından büyük önem taşımaktadır (Lu vd., 2025; Peng vd., 2025). 104 ülkede yürütülen, 258 nehri ve 1052 su örneğini kapsayan bir çalışma, hedeflenen 13 antibiyotikğin 9’unun bir örnekleme alanında suda yaşayan organizmalar için güvenilir olan konsantrasyonların üzerinde bulunduğunu ortaya koymuştur (Wilkinson vd., 2022). Bu bulgular, antibiyotik kirliliğinin ekotoksikolojik açıdan ne denli ciddi olduğunu göstermektedir.

Sultamisilin ve sefuroksim aksetil, klinik kullanımı yaygın antibiyotiklerdendir (Durkan vd., 2021; Van Dijkman vd., 2025). Sultamisilin, beta-laktam antibiyotikler grubunda yer alırken, sefuroksim aksetil ikinci kuşak sefalosporinler arasında sınıflandırılmaktadır (Özdemir vd., 2020; Yadav vd., 2024). Geniş spektrumlu etkileri nedeniyle insan

sağlığında sıkça reçete edilen bu antibiyotiklerin çevresel ortamlardaki konsantrasyonları, kaderleri ve gerçek çevresel etkileri hakkında yeterli bilgi bulunmamakla birlikte, onların çeşitli sucul ortamlarda tespitlerine yönelik raporlar bulunmaktadır (Işık ve Akkan, 2021; Kaddah vd., 2022; Ullah vd., 2023; Szarka vd., 2024). Bu nedenle, sucul ortamda kirleticilerin biyolojik etkilerini değerlendirmek için *in vivo* ve *in vitro* olarak kullanılabilecek güvenilir model organizmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle su ürünleri yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılan gökkuşaağı alabalığı ve gökkuşaağı alabalığının gonad dokusundan türetilmiş RTG-2 hücre hattı, hem ekotoksikolojik çalışmalar için uygun bir model hem de çevresel kirleticilerin potansiyel etkilerini yansıtan duyarlı bir türdür (Caminada vd., 2006; André vd., 2024; Oberhoffner vd., 2025). RTG-2 hücre hattı antibiyotiklerin hücresel düzeyde sitotoksikite, oksidatif stres, apoptoz ve genotoksikite potansiyellerini değerlendirmek için kullanılabilen güvenilir bir *in vitro* modeldir (Mushtaq vd., 2025).

Yapılan çalışmalar, özellikle trimetoprim, tetrasiklin, oksitetrasiklin ve sülfonamid türevlerinin bu hücrelerde farklı düzeylerde sitotoksik etkiler oluşturabildiğini göstermiştir (Babín vd., 2005). Örneğin, trimetoprim için hesaplanan EC_{50} değerinin 671,8 $\mu\text{g/mL}$ civarında olduğu ve uzun süreli maruziyetlerde DNA hasarına yol açabildiği bildirilmiştir (Papis vd., 2011). Benzer şekilde, çeşitli antimikrobiyallerin yüksek konsantrasyonlarda RTG-2 hücrelerinde canlılığı azalttığı ve oksidatif stres yanıtlarını tetiklediği rapor edilmiştir (Caminada vd., 2006). Bu bulgular, RTG-2 hücrelerinin çevresel ortamlarda antibiyotiklerin potansiyel ekotoksik etkilerinin öngörülmesinde ve farmasötiklerin güvenlik değerlendirmelerinde önemli bir araç olduğunu ortaya koymaktadır. Sitotoksikite ve apoptoz, hücrelerin zararlı ajanlara karşı verdiği en temel biyolojik yanıtları temsil etmektedir (Shekhawat vd., 2025; Spiess vd., 2025). Sitotoksikite, hücrelerin yaşama ve çoğalma yeteneğinin azalmasıyla ortaya çıkarken; apoptoz, programlanmış hücre ölümü süreci olarak hücresel stres yanıtlarının düzenlenmesinde kritik rol oynamaktadır (Sazonova vd., 2022). Her ne kadar RTG-2 hücrelerinde bazı antibiyotiklerin hücresel etkilerine dair çalışmalar bulunsun da, sultamisilin ve sefuroksim aksetilin konsantrasyona bağlı sitotoksik ve apoptotik etkileri henüz araştırılmamıştır.

Bu verilere dayalı olarak bu tez çalışması, sultamisilin ve sefuroksim aksetil antibiyotiklerinin RTG-2 hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik etkilerinin incelenmesi

üzerine kurulmuştur. Elde edilen bulguların, sultamisilin ve sefuroksim aksetilin hücresel düzeydeki etkilerinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayarak, sucul ekosistemlerde antibiyotik kaynaklı risklerin değerlendirilmesine ve gelecekteki düzenleyici çalışmalara temel oluşturması beklenmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Antibiyotikler

Antibiyotikler, bakterilerin çoğalmasını ve büyümesini durduran (bakteriyostatik) ya da doğrudan bakteri hücrelerini öldüren (bakterisidal) antimikrobiyal ajanlardır. Alexander Fleming tarafından 1928 yılında keşfedilen penisilin 1940'lı yıllarda endüstriyel üretime geçilmesiyle birlikte klinik kullanıma girmiştir. Bu keşfi, streptomisin, tetrasiklin, eritromisin gibi doğal kaynaklı antibiyotiklerin izolasyonu ve daha sonra yarı sentetik türevlerin (ör. amoksisilin, sefuroksim) geliştirilmesi izlemiştir. 1980'lerden itibaren ise tamamen sentetik antibiyotikler (ör. fluorokinolonlar, oksazolidinonlar) klinik pratiğe girmiştir (Bhattacharjee, 2025). Antibiyotikler farklı şekillerde sınıflandırılabilir. Etki tipine göre bakterisidal (bakteriyi öldüren) ve bakteriyostatik (çoğalmasını engelleyen) olarak ayrılırken; etki mekanizmasına göre hücre duvarı sentezini inhibe edenler (β -laktamlar, glikopeptitler), protein sentezini baskılayanlar (aminoglikozidler, tetrasiklinler, makrolidler), nükleik asit sentezini inhibe edenler (fluorokinolonlar, rifamisinler), metabolik yol inhibitörleri (sulfonamidler, trimetoprim) ve hücre membranını bozanlar (polimiksinler) şeklinde gruplandırılmaktadır. Klinik uygulamalarda ise en yaygın kullanılan sınıflandırma, kimyasal yapılarına dayalı olanıdır. Buna göre antibiyotikler β -laktamlar, aminoglikozidler, tetrasiklinler, makrolidler, fluorokinolonlar, glikopeptitler, oksazolidinonlar, sulfonamidler ve diğer çeşitli gruplar altında incelenmektedir (Saikia ve Chetia, 2024). Tablo 2.1'de en yaygın kullanılan antibiyotiklerin fizikokimyasal özellikleri verilmiştir.

Tablo 2.1. En yaygın kullanılan antibiyotiklerin fizikokimyasal özellikleri (Maghsodian vd., 2022)

Sınıf	Antibiyotikler	Sembol	Moleküler Formül	Moleküler Ağırlık	Suda Çözünürlük (mg/L)	Kullanım
Tetrasiklinler	Klortetrasiklin	CTC	$C_{22}H_{24}Cl_2N_2O_8$	478.88	259 (25 °C)	Hayvan
	Doksisiklin	DXC	$C_{22}H_{24}N_2O_8$	444.43	50,000 (25 °C, pH = 2.16)	İnsan,
	Oksitetrasiklin	OTC	$C_{22}H_{24}N_2O_9$	460.43	313 (25 °C)	Hayvan
	Tetrasiklin	TET	$C_{22}H_{24}N_2O_8$	444.43	231 (25 °C)	İnsan, Hayvan, Bitkiler İnsan, Hayvan
Sülfonamidler	Sülfadiazin	SDZ	$C_{10}H_{10}N_4O_2S$	250.28	77 (25 °C)	Hayvan
	Sülfamerazin	SMR	$C_{11}H_{12}N_4O_2S$	264.31	202 (20 °C)	-
	Sülfametazin	SMT	$C_{12}H_{14}N_4O_2S$	278.33	1500 (29 °C)	İnsan,
	Sülfametizol	SMZ	$C_9H_{10}N_4O_2S_2$	270.33	1050 (37 °C)	Hayvan
	Sülfametoksazol	SMX	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$	253.28	610 (37 °C)	İnsan
	Sülfapiridin	SPY	$C_{11}H_{11}N_3O_2S$	249.29	268 (25 °C)	İnsan
	Sülfatiazol	STZ	$C_9H_9N_3O_2S_2$	255.32	373 (25 °C)	- Hayvan
Makrolidler	Azitromisin	AZI	$C_{38}H_{72}N_2O_{12}$	748.98	2.37 (25 °C)	İnsan
	Klaritromisin	CLA	$C_{38}H_{69}NO_{13}$	747.95	1.69 (25 °C)	İnsan
	Eritromisin	ERY	$C_{37}H_{67}NO_{13}$	733.93	4.2 (25 °C)	İnsan,
	Roksitromisin	ROX	$C_{41}H_{76}N_2O_{15}$	837.05	0.0189 (25 °C)	Hayvan
	Tilosin	TYL	$C_{46}H_{77}NO_{17}$	916.10	211	İnsan -
Florokinolonlar	Siprofloksasin	CIP	$C_{17}H_{18}FN_3O_3$	331.34	30,000 (20 °C)	İnsan
	Enrofloksasin	ENR	$C_{19}H_{22}FN_3O_3$	359.39	612	Hayvan
	Levofloksasin	LEV	$C_{18}H_{20}FN_3O_4$	361.37	1440	-
	Lomefloksasin	LOM	$C_{17}H_{19}F_2N_3O_3$	351.35	27,200	-
	Norfloksasin	NOR	$C_{16}H_{18}FN_3O_3$	319.33	280 (25 °C)	-
	Ofloksasin	OFL	$C_{18}H_{20}FN_3O_4$	361.37	10,800 (25 °C)	İnsan
β -Laktamlar	Amoksisilin	AMO	$C_{16}H_{19}N_3O_5S$	365.40	3430 (25 °C)	Hayvan
	Ampisilin	AMP	$C_{16}H_{19}N_3O_4S$	349.40	10,100 (21 °C)	Hayvan
	Sefaleksine	CEP	$C_{16}H_{17}N_3O_4S$	347.39	10,000	İnsan
	Sefazolin	CEZ	$C_{14}H_{14}N_8O_4S_3$	454.51	210 (25 °C)	İnsan
	Penisilin	PEN	$C_{16}H_{18}N_2O_4S$	334.39	210	Hayvan
Diğer sınıflar	Kloramfenikol	CHP	$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$	323.13	2500 (25 °C)	İnsan
	Linkomisin	LIN	$C_{18}H_{34}N_2O_6S$	406.54	927 (25 °C)	İnsan
	Trimetoprim	TMP	$C_{14}H_{18}N_4O_3$	290.32	400 (25 °C)	İnsan

İnsan tüketimi bakımından dünya genelinde antibiyotik tüketimi, geçmiş yıllara kıyasla tanımlı günlük doz (defined daily doses, DDD) cinsinden artış göstermiş olup; örneğin 67 ülkeyi kapsayan son bir analizde 2016'dan 2023'e toplam antibiyotik kullanımı 29,5 milyar DDD'den 34,3 milyar DDD'ye yükselmiş, bunun nüfusa oranla tüketim hızı da 13,7'den

15,2 DDD/1000 kişi/gün düzeyine çıkmıştır (Klein vd., 2024). Artan antibiyotik kullanımı küresel bir halk sağlığı tehdidi olan antibiyotik direncine ve kirliliğine yol açabilmektedir.

2.2. Antibiyotik Direnci ve Antibiyotik Kirliliği

Bakterilerin antibiyotikleri etkisiz hale getirecek şekilde genetik değişiklikler kazanması ve enfeksiyonların tedavisinin zorlaşması olarak ifade edilebilen antibiyotik direnci enfeksiyonların tedavi süresinin uzamasına, artan maliyete ve ölüm risklerine yol açmaktadır (Liu vd., 2024). İnsan vücudundan ilaç kullanım sonrası ortaya çıkan atıklar, hayvanlarda kullanılan antibiyotiklerin gübre barınak vs. yoluyla çevreye geğen atıkları, farmasötik bileşenlerin üretildiği yerlerde atık suların yetersiz arıtılması sonucu ortaya çıkan ilaç atıkları, tarımda ve balıkçılıkta kullanılan ilaç atıkları çevreye hızla yayılmaktadır (Oliveira vd., 2024). Antibiyotiklerin ve kalıntılarının çevreye (suya, toprağa, havaya) yayılması olarak ifade edilebilen “antibiyotik kirliliği” bakteriler üzerinde seçici baskı oluşturarak direnç genlerinin yayılmasını teşvik etmektedir. Antibiyotik kirliliği ve antibiyotik direnci mikrobiyal çeşitliliğin değişmesi, su organizmaları için toksik etkiler, biyolojik zincirlerde birikim gibi ciddi çevresel tehditleri ortaya çıkarmaktadır (Barathe vd., 2024).

Dünya genelinde yapılan bazı çalışmalar deniz ve kıyısal sular, nehirler ile deniz sedimanlarında antibiyotik kalıntılarının tespit edildiğini ve miktarlarının bölgeden bölgeye, antibiyotik türüne ve arıtma standartlarına bağlı olarak büyük farklılıklar gösterdiğini rapor etmektedir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Farklı su ortamlarında tespit edilen antibiyotikler ve ortalama konsantrasyonları

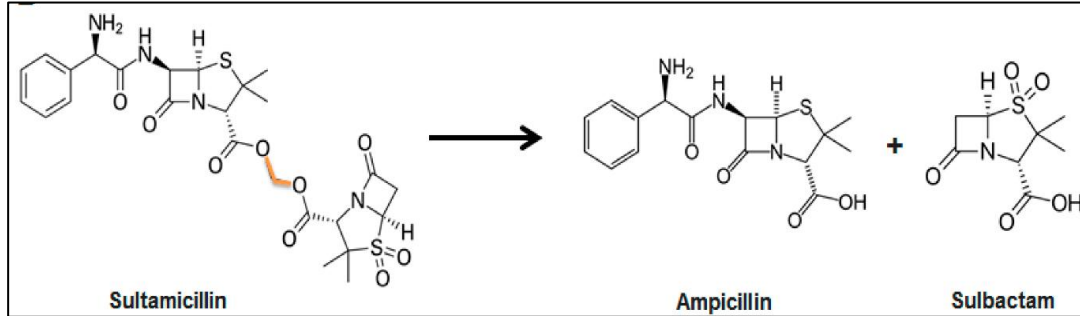
Bölge/Ortam	Antibiyotik Türü	Ölçülen Miktar/Konsantrasyon Mean (ng/L)	Referans
Taizhou Bay, Çin (Kıyılal)	Sulfonamidler (SCM, SPD, SMZ, SMX, SMM, SMD, SDM), Makrolidler (CLR), Florokinolonlar (CFX, NOR, OFX), Tetrasiklinler (DOX)	Sulfacetamide (SCM): 8,83 Sulfapyridine (SPD): 4,89 Sulfamethoxazole (SMZ): 8,21 Sulfadimidine (SMX): 4,79 Sulfamonomethoxine (SMM): 14,816 Sulfameter (SMD): 161,06 Sulfadimethoxypyrimidine (SDM): 159,29 Clarithromycin (CLR): 950,29 Ciprofloxacin (CFX): 0,89 Enrofloxacin (NOR): 66,03 Ofloxacin (OFX): 1,70 Doxycycline (DOX): 0,54	Wang vd., 2022
Hong Kong (Nehir Suyu)	Sulfonamidler (SCT, SCP, SDZ, SDO, SDM, SMX, SPD, SQX, SX, SMR), Makrolidler (RTM), Florokinolonlar (FL, LFX, MAR, NFX, OFX, PEF, SAR, CFX, EFX), Tetrasiklinler (DC, OTC, TC) Diğer (NOV)	Sulfacetamide (SCT): 0,20 Sulfachlorpyridazine (SCP): 0,86 Sulfadiazine (SDZ): 1,15 Sulfadoxine (SDO): 0,69 Sulfadimethoxine (SDM): 0,45 Sulfamethoxazole (SMX): 1,38 Sulfapyridine (SPD): 1,80 Sulfaquinoxaline (SQX): 0,54 Sulfisoxazole (SX): 0,38 Sulfamerazine (SMR): 0,52 Roxithromycin (RTM): 1,29 Fleroxacin (FL): 0,51 Lomefloxacin (LFX): 0,62 Marbofloxacin (MAR): 0,24 Norfloxacin (NFX): 1,13 Ofloxacin (OFX): 1,49 Pefloxacin (PEF): 0,56 Sarafloxacin (SAR): 0,85 Ciprofloxacin (CFX): 1,55 Enrofloxacin (EFX): 0,54 Doxycycline (DC): 1,70 Oxytetracycline (OTC): 2,23 Tetracycline (TC): 2,60 Novobiocin (NOV): 2,46	Liu vd., 2022
Antarktika (Atıksu + Deniz Suyu)	Quinolonlar (ciprofloxacin, norfloxacin), makrolidler (azithromycin, clarithromycin), trimetoprim vs.	Ciprofloxacin: 0,89 Norfloxacin: 0,75 Azithromycin: 0,4 Clarithromycin: 0,4 Erythromycin: 0,003 Metronidazole: 0,17 Clindamycin: 0,1 Trimethoprim: 0,001	Hernández vd., 2019

Çevresel ortamlarda giderek artan antibiyotik kirliliği, bu ilaçların klinikte yaygın ve yoğun kullanımının doğal bir sonucu olarak değerlendirilmektedir. β -laktam antibiyotikler, klinikte en yaygın kullanılan ilaç gruplarından biri olup, yoğun reçetelendirme oranları nedeniyle çevresel kirliliğe potansiyel olarak önemli katkı sağlamaktadır (Kato vd., 2024). Bu grupta yer alan sultamisilin, ampisilin ile β -laktamaz inhibitörü sulbaktamın bir kombinasyonu olup başta solunum ve üriner sistem enfeksiyonları olmak üzere çok sayıda bakteriyel enfeksiyonun tedavisinde kullanılmaktadır (Özdemir vd., 2020). Sefuroksim aksetil ise ikinci kuşak bir sefalosporin olarak, geniş etki spektrumu ve oral uygulanabilirliği sayesinde toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlarda sıkça tercih edilmektedir (Yadav vd., 2024). Ancak, bu β -laktam antibiyotiklerin çevrede nispeten düşük stabilite göstermeleri nedeniyle, sularda çoğu zaman sulfonamidler ve fluorokinolonlar kadar yüksek konsantrasyonlarda rapor edilmemektedir. Dolayısıyla, farklı alt grupları temsil eden bu antibiyotiklerin incelenmesi, klinik kullanımda sağladıkları etkinliğin yanı sıra laboratuvar ortamında çevresel etkilerinin ve direnç gelişimine katkılarının anlaşılması öngörü açısından önemlidir.

2.3. Sultamisilin

Gram negatif bakterilerin β -laktam antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesinin en yaygın yolu, beta-laktamaz enzimi üretimidir. Plazmidle taşınan beta-laktamaz tehdidini etkisiz hale getirmenin etkili bir yöntemi, bu enzimlerin inhibitörlerini bir penisilin türü antibiyotikle birleştirmektir (Khanna ve Gerriets, 2022). Şu anda klinik olarak kullanılan dört inhibitör-penisilin kombinasyonu bulunmaktadır: ampisilin-sulbaktam, amoksisilin-klavulanat, tikarsilin-klavulanat ve piperasilin-tazobaktam. Bununla birlikte, tikarsilin-klavulanatın üretimi ve tedariği birçok bölgede durdurulmuş veya azaltılmıştır. Ampisilin-sulbaktam, 1986 yılında ABD'de geliştirilen ve piyasaya sunulan ilk β -laktam/ β -laktamaz inhibitörü kombinasyonlarından biridir. O tarihten bu yana, farklı enfeksiyon türlerine karşı etkinliğini değerlendiren pek çok klinik çalışma gerçekleştirilmiştir (Yahav vd., 2020; Carcione vd., 2021; Alfei ve Schito, 2022; Tamma vd., 2022). Sultamisilin (CAS 76497-13-7), β -laktamaz inhibitörü sulbaktam (CAS 68373-14-8) ve ampisilinin (CAS 69-53-4) bir metilen grubu aracılığıyla bağlandığı bir ön ilaç kombinasyonudur. Bu kombinasyonda, antibiyotik ampisilin ve beta-laktamaz inhibitörü sulbaktam bir kimyasal reaksiyonla çift ester olarak bağlanarak tosilat tuzu oluşturur. Sultamisilin'in antimikrobiyal etkisi, gram-

pozitif, gram-negatif ve anaerob bakterilere karşı *in vitro* olarak kanıtlanmıştır (Monserrat-Martinez vd., 2019) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Sultamisilin'in kimyasal yapısı ve kombinasyonu (Monserrat-Martinez vd., 2019)

Oral yolla alındıktan sonra, sultamisilin bağırsak duvarında ilk geçiş hidrolizine uğrar ve sistemik dolaşıma geçtikten sonra eşit moleküler oranlarda sulbaktam ve ampisiline ayrışır. Sultamisilin uygulamasıyla ampisilinin farmakokinetiği, ampisilin tek başına verildiğinde gözlemlenen dağılımla benzerdir, bu da sulbaktamın ampisilinin farmakokinetik özelliklerini belirgin şekilde değiştirmediyi göstermektedir. Ayrıca, literatürde belirtildiği üzere, sultamisilinden elde edilen ampisilinin oral biyoyararlanımı, ampisilin tek başına uygulandığında elde edilen biyoyararlanımdan daha yüksek bulunmuştur. Bu nedenle sultamisilin, sulbaktam ve ampisilin için etkili bir ön ilaç olarak kabul edilir. Sultamisilin'in, solunum yolu, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları ile obstetrik ve jinekolojik enfeksiyonlara karşı da etkili olduğu gösterilmiştir (Jubeh vd., 2020; Carcione vd., 2021). Farmakolojik etkinliği iyi tanımlanmış olan sultamisilin ile ilgili literatürde klinik kullanımına dair pek çok veri bulunmakla birlikte, *in vitro* koşullarda toksisite profili üzerine yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bununla birlikte, ilacı oluşturan ampisilin ve sulbaktam bileşenleri çeşitli hücre hatlarında değerlendirilmiş ve yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığı üzerinde etkiler rapor edilmiştir (Meiyazhagan vd., 2015; Wang vd., 2021; Pancu vd., 2022; Faísca vd., 2024).

dirençli suşlar da dahil olmak üzere birçok bakteri türüne karşı güçlü bir antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Faísca vd., 2024; Jakubu vd., 2024). Sefuroksim aksetil, klinik etkinliği ve biyoyararlanımı açısından geniş ölçüde incelenmiş olsa da, *in vitro* toksisiteye ilişkin çalışmalar genellikle yeni formülasyon geliştirme veya ilaç taşıyıcı sistemlerin değerlendirilmesi bağlamında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar, özellikle farklı tuz formlarının veya taşıyıcı sistemlerin hücre canlılığı üzerindeki etkilerine odaklanmaktadır (Khan vd., 2022; Panda vd., 2022). Her iki antibiyotik de β -laktam grubu içerisinde yer almakla birlikte, çevresel kalıntıları ve olası toksik etkileri hakkında bilgiler sınırlıdır. Bu nedenle, literatürde yer alan *in vitro* hücre kültürü çalışmalarının incelenmesi, söz konusu ilaçların potansiyel hücresel etkilerini anlamak açısından önem taşımaktadır.

2.5. Sultamisilin ve Sefuroksim Aksetil için *in vitro* Toksisite Çalışmaları

Sultamisilin için doğrudan *in vitro* toksisite çalışmaları sınırlı olmakla birlikte, bileşenlerinden biri olan sulbaktamın hücre kültürü düzeyinde değerlendirildiği çalışmalar bulunmaktadır. Meme kanseri hücre hatlarında (MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-453 ve MDA-MB-468) yapılan bir çalışmada 2 mM sulbaktam varlığında doxorubicinin sitotoksik etkinliği belirgin şekilde artırdığı rapor edilmiştir (Wen vd., 2018). Bu bulgular, sulbaktamın düşük düzeyde hücre toksisiteye sahip olduğunu, ancak belirli koşullarda sinerjik etkiler gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Öte yandan, sultamisilin diğer bileşeni olan ampisilinin Detroit-562 farinks kanseri hücre hattında yapılan bir çalışmada, 10–100 μ M konsantrasyonlarında 72 saatlik uygulama sonrası hücre canlılığı üzerinde doza bağlı azalmalar gösterdiği rapor edilmiştir (Pancu vd., 2022). Sefuroksim aksetil üzerine yapılan *in vitro* toksisite çalışmaları yeni “tuz formları” veya “taşıyıcı nanoformülasyonlar” ile ilacın çözünürlüğü ve hücre alımı üzerine gerçekleştirilmiş olup, bazı çalışmalarda sitotoksikite değerlendirmeleri de yapılmıştır (Faísca vd., 2024). 3T3 fibroblast hücrelerinde yapılan deneylerde, sefuroksim aksetilin kendisinin hücre canlılığı açısından düşük toksisiteye sahip olduğu, ancak uzun alkil zincirli katyon içeren tuz formlarında sitotoksitenin arttığı rapor edilmiştir (Faísca vd., 2024). Sitotoksikite çalışmaları kapsamında simüle güneş ışını altında sefuroksim aksetilin bozunma çalışmasında L929 hücre hattında metil tiazolil tetrazolyum (MTT) testi ile yapılan *in vitro* toksisite ölçümleri, bozunmuş ürün karışımının başlangıç maddesine kıyasla daha yüksek sitotoksikite gösterdiğini ortaya çıkarmıştır (Žandarek vd., 2023). Ayrıca çeşitli formülasyon çalışmalarında biyoyararlanım ve salım profili incelenmiş,

toksosite parametreleri sınırlı olmakla birlikte genel olarak düşük düzeyli sitotoksosite gözlenmiştir.

Tablo 2.3. Sultamisilin ve sefuroksim aksetil için *in vitro* toksisite çalışmaları

İlaç/Bileşen	Hücre Hattı	Doz/Maruziyet Süresi	Sitotoksosite Testi	Bulgular	Referans
Ampisilin	NIH-3T3 (fare fibroblast)	25-200 µg/mL/24 saat	MTT	Yaklaşık %80-85 canlılık; ancak yüksek konsantrasyonlarda canlılık düşüşü	Meiyazhagan vd., 2015
Sulbaktam	MCF-10A, BT474, MCF-7, MDA-MB-231, vb. insan meme kanseri hücre hatları	Sulbaktam - yalnızca, 1-10 µM; kombinasyonlarda sulbaktam 2 mM + doxorubicin düşük µM/48 saat	MTT	Sulbaktam tek başına 8 mM'ye kadar açıkça toksik etki göstermedi; fakat doxorubicin ile kombinasyon, bazı hücre hatlarında var olan doxorubicin dozlarının etkisini belirgin şekilde artırdı	Wen vd., 2018
Sefuroksim aksetil	3T3 fare fibroblast hücre hattı	100 µM/24 saat	MTT	Orijinal CA (sefuroksim axetil) hücre canlılığı açısından nispeten düşük toksisite gösterirken, uzun alkil zincirli katyon içeren tuz formları daha yüksek sitotoksosite sağladı	Faísca vd., 2024

Sonuç olarak, hem sultamisilin hem de sefuroksim aksetil için literatürde sınırlı sayıda *in vitro* toksisite çalışması bulunmaktadır (Tablo 2.3). Bu çalışmalar, genellikle yüksek konsantrasyonlarda veya özel formülasyon koşullarında belirgin etkiler ortaya koymakta, düşük dozlarda ise hücresel toksisite profillerinin sınırlı olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, bu antibiyotiklerin çevresel kalıntılarının potansiyel etkilerini anlamak için daha kapsamlı hücresel ve ekotoksikolojik araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu noktada, balık gonadından türetilmiş RTG-2 hücre hattı, sucul ekosistemlerde antibiyotik kalıntılarının toksik etkilerini değerlendirmek amacıyla yaygın kullanılan bir model olup, söz konusu antibiyotiklerin çevresel risklerinin araştırılmasında da önemli bir araç olarak öne çıkmaktadır.

2.6. Gökkuşığı Alabalığı Gonad Hücre Hattı (RTG-2 Hücre Hattı)

RTG-2 hücre hattı, Wolf ve Quimby tarafından 1962 yılında bir yaşındaki dişi ve erkek gökkuşığı alabalığının gonad dokusundan geliştirilmiş olup, balıklardan türetilen ilk sürekli hücre hattı olma özelliğine sahiptir (Wolf ve Quimby, 1962). RTG-2 hücreleri, fibroblast morfolojisi gösterir ve 22–24°C arasında sekiz kat farklılık gösteren büyüme hızına sahiptir. RTG-2 hücreleri ekzojen bir metabolik sisteme ihtiyaç duymaz ve toksik maddeleri metabolize etme yeteneklerini korurlar (Işık ve Çiçek, 2024). Bu özellikleri sayesinde, RTG-2 hücre hattı akuatik toksikoloji ve çevresel etki çalışmalarında model sistem olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Çiçek, 2022; 2023a; 2023b; 2024; Çiçek ve Işık, 2025). Caminada vd. (2006) çalışmalarında, PLHC-1 ve RTG-2 balık hücre hatlarında 34 ilacın *in vitro* sitotoksitesi değerlendirmişlerdir. Çalışmada, 34 ilahtan sadece 21 ilahta yarı maksimum etkili konsantrasyon (EC_{50}) değerleri tespit edilmiş olup, EC_{50} değerleri 2,1 μ M ile 8,66 mM arasında değıştiğı görölüp PLHC-1'in RTG-2'den daha hassas olduğıu tespit edilmiştir. İlaç toksisitesi, Log D ile korelasyon göstermiştir. Bulgulardan yola çıkarak, *in vitro* testlerin ilahtların akut toksisitesini taramak için kullanılabileceğini ve *in vivo* testleri azaltılabileceğini belirtmişlerdir. Fernández vd. (2013), bir atık su arıtma tesisi atık sularında ve karışımalarında bulunan kişisel bakım ürünlerinin öldürücü olmayan ve sitotoksik etkilerini analiz etmek için RTG-2 hücre hattını kullanmışlardır. Sitokrom P450 1A enzimi, oksidatif stres, hücresel yaşlanma ve hücre canlılığı ile etkileşimler sırasıyla 7-etoksirezorufin-o-deetilaz (EROD), reaktif oksijen türleri (ROS), β -galaktosidaz (β -gal) ve nötral kırmızı alım testleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Test edilen bileşiklerin tümü önemli etkiler göstermemiştir. Gözlemlenen en düşük etki konsantrasyonları ve EC_{50} , 0,15 ila 784,47 mg/L aralığında tespit edilmiştir. Farklı kişisel bakım ürünlerinin karışımına maruz kalan hücreler için net doz-yanıt eğrileri bulunmuştur. Gözlemlenen en düşük etki konsantrasyonları ve EC_{50} 'ye neden olan konsantrasyonlar, 0,05 ila 54,61 mg/L aralığındaydı. Test edilen yedi karışımın dördü EROD aktivitesini indüklediğı görölmüştür. İki karışımında ROS üretimi tespit edilmiştir. β -gal inhibisyon tepkisi, test edilen yedi karışımın altısında gözlenmiş ve EROD indüksiyon aktivitesi veya ROS üretimi için gözlemlenenden daha yüksek bir konsantrasyonda gerçekleşmiştir. Mevcut çalışma da, atık su arıtma tesisi atık sularında bulunan karmaşık kişisel bakım ürünlerinin karışımalarının kimyasal olarak analiz edilmesinin zor ve pahalı olmasından dolayı hücrelerin, ilk, hızlı ve uygun maliyetli bir değerlendirmede kullanılabileceğini

belirtmişlerdir. Korkmaz (2019) çalışmasında, RTG-2 hücre hattında Lipopolisakkaritin inflamatuvar etkileri ve *Inula viscosa*'nın (IV) anti-enflamatuvar etkisi incelenmiştir. Lipopolisakkarit maruziyeti, TNF- α gen ekspresyonunu artırırken, IV IL-1 β seviyelerini %96 azaltmış, IL-6 ise IV ile %9 artmıştır. IV, Lipopolisakkarit, inflamasyonunu inhibe ederek anti-enflamatuvar etki göstermiştir. Çiçek (2024) tarafından yürütülen çalışmada, gökkuşağı alabalığından türetilmiş RTG-2 hücre hattında öjenol ve α -terpineolün farklı konsantrasyonlarda (öjenol: 18,75–600 μ M; α -terpineol: 3,125–100 μ M) ve sürelerde (24 ve 48 saat) uygulanmasının sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı Sulforhodamin B (SRB) testi kullanılarak belirlenmiştir. Bulgular, öjenolün 24 saatlik tüm uygulama dozlarında hücre canlılığını kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde artırdığını ortaya koymuştur. Ancak 48 saatlik maruziyette, yalnızca 18,75 μ M dışındaki konsantrasyonlarda hücre canlılığında artış gözlenmiş, fakat bu etkinin 24 saatlik sonuçlara göre daha düşük düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık, α -terpineolün 12,5 μ M ve üzerindeki konsantrasyonları her iki sürede de anlamlı sitotoksositeye yol açarak hücre canlılığını düşürmüştür. Daha düşük konsantrasyonlarda (6,25 μ M ve 3,125 μ M) ise kontrol grubuna kıyasla hafif bir artış gözlenmiş, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı rapor edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, öjenolün düşük ve orta konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunu destekleyici potansiyele sahip olabileceğini, α -terpineolün ise belirli bir eşik değerin üzerinde sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Işık ve Çiçek (2024) yaptıkları çalışmada, riboflavinin, RTG-2 hücre hattında 48 saatlik maruziyet süresi boyunca hücre canlılığı, antioksidan enzimlere ait genlerin (gsr ve gpx1a) transkripsiyonel ifadeleri, büyüme (gh1, igf1 ve igf2) ve üreme (bol) genleri ile DNA hasarı üzerindeki etkilerini belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda, Riboflavinin tüm konsantrasyonları (3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 ve 100 μ M), RTG-2 hücre canlılığında anlamlı bir azalmaya yol açmıştır. IC₅₀ değeri 12.5 μ M olarak belirlenen riboflavin, gpx1a, igf1 ve bol genlerinin transkripsiyonel ifadelerini anlamlı düzeyde aşağı yönde düzenlemiştir. Buna karşın, gsr, igf2 ve gh1 genlerinin ifadelerinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmayan artış veya azalışlar gözlenmiştir. Comet assay testi sonuçları, riboflavin uygulamasının DMSO (pozitif kontrol) grubunda kuyruk DNA yüzdesini %10'un üzerinde anlamlı biçimde artırdığını ortaya koymuştur. Elde edilen bulgular, yüksek doz riboflavinin özellikle üreme, DNA hasarı ve hücre ölümü gibi temel hücresel süreçlerde önemli düzenleyici etkilere sahip olabileceğini göstermektedir.

Yapılan kapsamlı literatür taramalarına göre sultamisilin ile sefuroksim aksetilin RTG-2 hücrelerinde toksisitesine yönelik bir bilgiye rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmada, literatürdeki mevcut boşlukları gidermeyi amaçlamakta olup, bugüne kadar balık hücre hatlarında hiç çalışılmamış olan sultamisilin ve sefuroksim aksetil antibiyotiklerinin, RTG-2 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerini incelemeyi hedeflenmiştir. Ayrıca, bu çalışma kapsamında yalnızca hücre canlılığı değil, literatürde balık hücre hatlarında sınırlı sayıda ele alınan apoptotik etkiler de detaylı olarak değerlendirilmiştir. Bu yaklaşım sayesinde, antibiyotiklerin akuatik ekosistem hücreleri üzerindeki potansiyel toksik etkilerine dair kapsamlı bir veri seti elde edilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Biyolojik ve Kimyasal Materyaller

Bu çalışmada kullanılan materyaller Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve üretici firmalar

Kimyasallar	Üretici Firma
Hücre Dondurma Ortamı	Sigma
Penisilin-Streptomisin	Gibco
Fetal Sığır Serumı	Biowest
Eagle’s Minimal Essential Medium (EMEM)	ATCC
BCL2	Santa Cruz
p53	Santa Cruz
Water Soluble Tetrazolium-1 (WST-1) kiti	Boster Biological Technology
Trypsin-EDTA	Gibco
10% Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco
RTG-2 Hücre Hattı	Türkiye Şap Enstitüsü
Trypsin-EDTA	Biological Industries
Dulbecco’s phosphate-buffered saline (dPBS)	Gibco
DTT	BioShop Canada Inc.
PMSF	Sigma
Tris	Fisher Chemical
NaCl	ROTH
EDTA	Sigma
Spektrofotometre kuvvetleri	Biosigma
Sodyum dodesil sulfat (SDS)	Merck
TEMED	Sigma
DMSO	Merck
Tris-HCl	Merck
NP-40 (Nonidet P-40)	Merck
KH ₂ PO ₄	Sigma
KCl	Merck
Na ₂ HPO ₄	Merck
Tween	Sigma

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan cihazlar, malzemeler ve markaları Tablo 3.2’de verilmiştir

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar, malzemeler ve bunların markaları

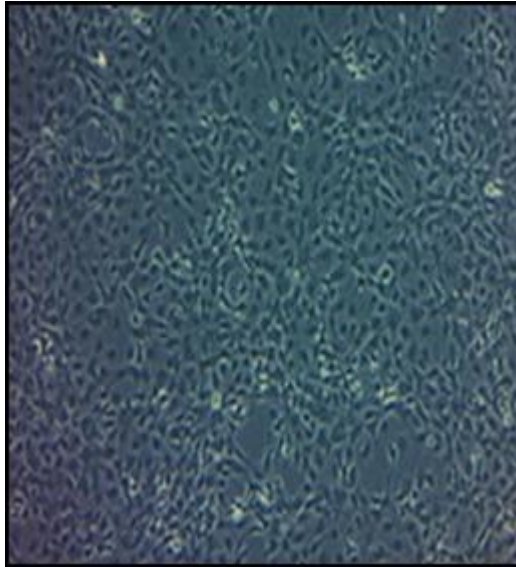
Cihaz ve Malzemeler	Marka
Inverted Mikroskop	Zeiss
Mikroplaka Spektrofotometresi (Eliza/Mikroplaka Okuyucu)	Thermo Scientific
Otoklov	Hirayama
İnkübatör	Nüve
Steril Kabin (Sınıf II)	ESCO Class 2
Su Banyosu	Thermomax
-20 °C Derin Dondurucu	Vestel
-80 °C Derin Dondurucu	Nuare Glacier
Vorteks Cihazı	Velp
Mini Santrifüj	Weightlab Instruments
Santrifüj	Beckman Coulter
Spektrofotometre	Shanghai Metash
Mini Çalkalayıcı	Isolab
Hassas Terazî	Shimadzu
Hücre kültürü flask (25 cm ²)	Nest
Hücre kültürü flask (75 cm ²)	Nest
Western Blot Aparatları	BIO-RAD
PVDF Transfer Membran 0.2 µm, 26.5 cm x 3.75 m	Merck Millipore
Lamelli Cam	Superior
Lam	Isolab
Steril Pipetler	Labsolute
Serolojik pipet	Lab Marker
Mikrosantrifüj Tüpleri	Isolab
Mikropipet	Isolab
Pipet Uçları	Isolab
X-Ray film (18x24 cm)	Carestream MXBE Film
Düz Tabanlı Hücre Kültürü Plakaları	Isolab

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

3.2.1.1. RTG-2 Hücre Kültürünün Deney için Hazırlanması

Atatürk Üniversitesi , Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Semra ÇİÇEK'ten temin edilen 17. ve 20. pasaj aralığındaki dondurulmuş RTG-2 hücreleri (Üretici Firma: Türkiye Şap Enstitüsü) Bingöl Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu'nda yer alan Kanser Araştırma Laboratuvarı'nda deney için hazırlanmıştır. RTG-2 hücreleri için kullanılan büyüme medyumunu steril bir 50 mL falkon tüp içerisine Penisilin-Streptomisin (0,5 mL), Fetal Bovine Serum (5 mL), Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM) (44,5 mL) eklenerek hazırlanmıştır. 25 cm²'lik steril filtresiz kapaklı flask içerisine aktarılan RTG-2 hücreleri, 5 mL medyum varlığında 23-24°C sıcaklığa ayarlı steril bir inkübatör içerisinde inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler her gün kontaminasyon, hücresel kalıntı, medyum rengi ve hücre çoğalması açısından ters mikroskop altında incelenmiştir (Şekil 3.1). Gerekli görülen zaman aralıklarında medyum değişimi yapılmıştır. RTG-2 hücrelerinin flask yüzeyinde en az %80 oranında çoğaldığı anlaşıldığında diğer deneylerin gerçekleştirilmesi için tripsinizasyon işlemi yapılmıştır.



Şekil 3.1. RTG-2 hücrelerinin inverted mikroskopta görüntüsü

Tripsinizasyon için ilk olarak flask içerisindeki hücreler tarafından kullanılmış olan medyum, atık kutusuna dökülmüştür. Daha sonra flaskta yüzeye yapışmayan ölü hücreleri ve metabolit kalıntılarını uzaklaştırmak için 1-2 mL Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen Dulbecco Fosfat Tampon tuzlu suyu ile yıkama işlemi yapılmıştır. Flask içerisine RTG-2 hücrelerini yüzeyden ayırmak için Tripsin-EDTA (25 cm²'lik flask için 650 µL) eklenmiştir ve 1 dk bekletilmiştir. Bu işlemlerim hepsi steril laminar akış kabini içinde gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin yüzeyden ayrılması ters mikroskop altında kontrol edilmiştir. Flask yüzeyinden ayrılan RTG-2 hücreleri 15 mL'lik steril falcon tüplere aktarılmıştır. Hücrelerin tripsin enziminden zarar görmemesi için ayrıca 1,5-2 mL taze medyum eklenmiştir. Hücreler 13000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj işlemine maruz bırakıldıktan sonra tripsin içeren üst faz atık kutusuna dökülmüştür. Falcon tüp içerisindeki hücre peleti üzerine 4 mL taze medyum ilave edilerek pipetaj işlemi ile homojenizasyon yapılmıştır. Daha sonra deney aşaması için hücre sayımı yapılmıştır. Hücre sayımı için homojenize edilmiş hücre içeren medyumdan (10 µL) alınarak hemositometreye aktarılmıştır. Ters mikroskop altında (10X) hücre sayımı gerçekleştirilmiştir ve elde edilen hücre sayısı 10^4 ile çarpılarak 1 mL medyum içerisindeki hücre sayısı tespit edilmiştir. Daha önceki yapılan standardizasyon çalışmaları dikkate alınarak steril laminar akış kabini içerisinde 96'lık plakta 48 saatlik etken madde maruziyeti için kuyu başına 25000 hücre (n=6) ekimi yapılmıştır. Hücrelerin yapışması ve bölünerek çoğalması için plaklar 24 saat boyunca inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

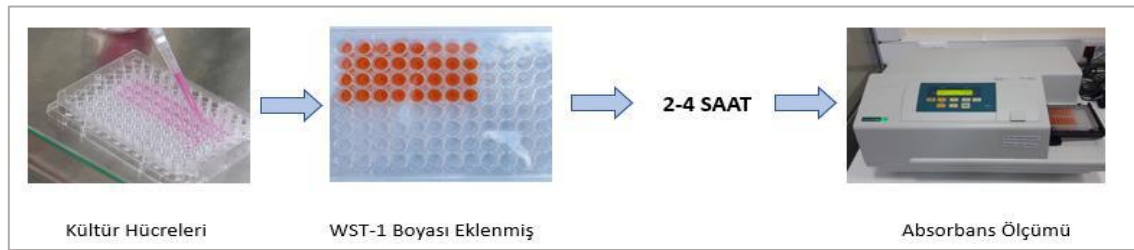
3.2.2. Antibiyotik Çözeltilerinin Hazırlanması ve Maruziyet

Çalışmada antibiyotik olarak Sultamisilin ve Sefuroksim Aksetil kullanılmıştır. Antibiyotikler %1 oranında DMSO ve medyum ile çözündürülerek gerekli antibiyotik dozları hazırlanmıştır. Çalışma sırasında kontrol gruplarına, doza göre DMSO eklenmiştir. İnkübasyona bırakılan hücreler üzerindeki medyum uzaklaştırılmıştır ve farklı dozlarda (3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 ve 100 µM) antibiyotik uygulamaları yapılmıştır. Negatif kontrol olarak büyüme medyumunu kullanılmıştır.

3.2.3. Sitotoksosite Testi

Hücre canlılığı testi için Water Soluble Tetrazolium-1 (WST-1) testi kullanılmıştır. WST-1 testi, tekrarlanabilirliği ve güvenilirliği yüksek bir kolorimetrik yöntem olmasından dolayı hücre canlılığı ölçümünde yoğun şekilde kullanılmaktadır (Aslantürk, 2018).

48 saatlik maruziyetin ardından medyum ortamdan uzaklaştırılmış ve üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda her bir kuyucuğa 10 µl WST-1 çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra çalışma medyumunu ile 100 µL'ye tamamlanarak kuyucuklara aktarılmıştır. Plaklar, ışık geçirmeyecek şekilde korunarak 23-24°C'ye ayarlanmış, CO₂ içermeyen bir inkübatörde 90 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, absorbans değerleri Eliza/Mikroplaka okuyucuda 490 nm dalga boyunda ölçülmüş, ayrıca 630 nm dalga boyu referans olarak kaydedilmiştir. Tespit edilen bu sonuçlardan hücre canlılığı belirlenmiştir.



Şekil 3.2. WST-1 hücre canlılığı testi protokolü (Saruhan, 2022)

3.2.4. Western Blot ile Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Hücrelerdeki protein ekspresyon düzeylerinin belirlenebilmesi amacıyla total proteinler ekstrakte edilerek, hedef proteinlerin ifade düzeyleri Western blot tekniği ile analiz edilmiştir. Protein örneklerinin analizi için dikey SDS-PAGE tank sistemi kullanılmıştır. 6 cm'lik kültür kuyucuklarına ekilen hücreler 48 saatlik uygulamadan sonra öncelikle soğuk PBS tamponu (137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 1,4 mM KH₂PO₄; pH 7,4) ile iki kez yıkanmıştır. Proteinlerin saflaştırılması için, 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, %0,5 (v/v) NP-40, 1 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 1 mM DTT ve proteaz inhibitör kokteyli (Complete, EDTA-free) içeren standart lizis tamponu kullanılmıştır. Kazıyıcı yardımıyla toplanan hücreler PBS içinde süspanse edildikten sonra oda sıcaklığında 1100 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş, ardından süpernatant kısmı aspirasyon ile

uzaklaştırılmıştır. Elde edilen pelet, uygun hacimde lizis tamponu ile yeniden süspansiyon edilmiştir ($0,5 \times 10^6$ hücre için 100 μ L lizis tamponu). Homojenizasyon ve protein eldesinin etkinliği için süspansiyon işlemi sırasında 1 mL'lik pipetler kullanılmıştır. Örnekler 60-120 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra 4°C'de 15000 rpm'de ve 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilecek olan süpernatant yeni bir mikro-santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Bradford metodu kullanılarak örneklerdeki protein konsantrasyonları karşılaştırılmıştır. Protein örnekleri her kuyucukta eşit protein olacak şekilde uygun konsantrasyonlarda SDS-PAGE jel ile ayrılmıştır. Daha sonra, poliviniliden florür (PVDF) membranına transfer edilip ve transfer sonrası bloklama tamponunda (TBS-T içerisinde hazırlanan %5'lik BSA) 1 saat inkübe edilmiştir. Bloklamanın ardından membranların gece boyunca ilgili primer antikoru (%5'lik BSA içerisinde dilute edilmiş) ile 4°C'de roller yardımıyla inkübasyonu sağlanmıştır. Membranlar TBS-T (0,3 M NaCl, 0,1 M Tris-base, 0,5% Tween; pH 7,4) kullanılarak yıkanmış (3x10 dakika) ve sonra HRP ile işaretli ilgili sekonder antikor (%5'lik BSA içerisinde dilute edilmiş) ile 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Membranlar TBS-T kullanılarak tekrar yıkanmıştır (3x10 dakika). Görüntüleme için kemilüminesans yöntemine dayanan ECL kiti kullanılmıştır. Kemilüminesans görüntü, X-ray görüntüleme sisteminin kullanılmasıyla filme aktararak elde edilmiştir. Son olarak, bant yoğunluklarının dansitometrik analizi Image-j programı (National Institutes of Health, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

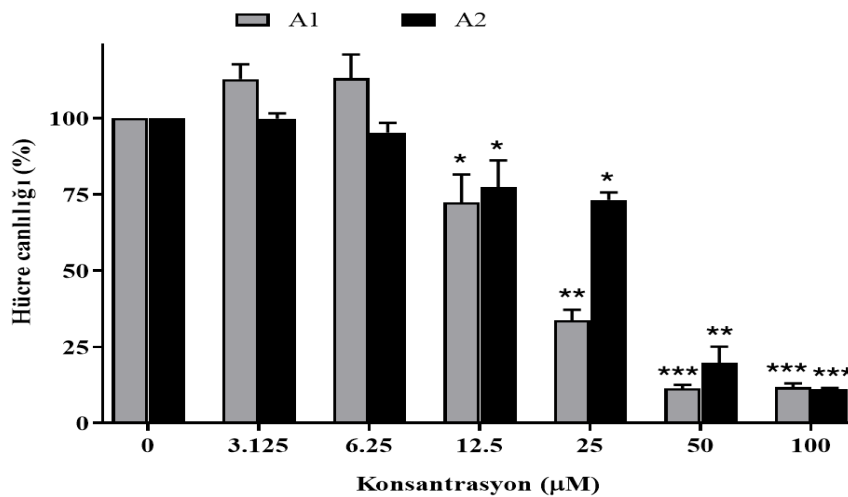
3.2.5. İstatistik

Tüm çalışmalar üç tekrarlı olarak yapılmış ve standart sapma değerleri belirlenmiştir. Grafikler ve istatistiksel analizler, GraphPad Prism (GraphPad Software, USA) programı kullanılarak elde edilmiştir. Çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular, t-testi ve One-Way ANOVA testi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık değeri olarak, $p < 0,05(*)$, $p < 0,01(**)$ ve $p < 0,001(***)$ kabul edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Hücre Canlılığı Analiz Sonuçları

RTG-2 hücrelerinde 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 ve 100 μ M Sultamisilin ve Sefuroksim Aksetil'in 48 saatlik maruziyetlerinin hücre canlılığı üzerine etkileri Şekil 4.1'de verilmiştir. Her iki antibiyotiğin de sitotoksik etkisinin doza bağımlı olduğu görülmektedir. Burada 3,125 ve 6,25 μ M Sultamisilin uygulamasının kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığını belirgin biçimde arttırdığı aynı konsantrasyonlardaki Sefuroksim Aksetil uygulamalarının ise hücre canlılığını koruduğu görülmektedir. 12,5 μ M'den itibaren her iki ilaç da hücre canlılığını anlamlı şekilde azaltmaya başlamıştır. 25 μ M Sultamisilin uygulaması hücre canlılığını kontrol grubuna kıyasla %50'nin altına düşürürken, aynı konsantrasyondaki Sefuroksim Aksetil uygulaması hücre canlılığını yaklaşık %75 civarında korumuştur. 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarındaki uygulamalarda her iki ilaç da ciddi sitotoksosite göstermiştir ve hücre canlılığı %25'in altına kadar azalmıştır. Bu durum, antibiyotiklerin hücrelerde toksik yan etkilerinin belirli bir eşik değerden sonra ortaya çıktığına işaret etmektedir.



Şekil 4.1. Hücre canlılığı analiz sonuçları (A1: Sultamisilin; A2: Sefuroksim Aksetil; p<0,05: kontrol ile kıyaslandığında; ** p<0,01: kontrol ile kıyaslandığında; *** p<0,001: kontrol ile kıyaslandığında)

RTG-2 hücrelerinde 48 saatlik maruziyet sonucunda Sultamisilin için IC_{50} değeri $22,80 \pm 1,72 \mu M$ olarak tespit edilirken Sefuroksim Aksetil için bu değer $31,33 \pm 0,95 \mu M$ olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, Sultamisilin'in RTG-2 hücrelerinde Sefuroksim Aksetil'e göre daha düşük konsantrasyonda toksisiteye neden olduğunu göstermektedir. IC_{50} değerinin daha düşük olması, Sultamisilin'in hücreler üzerinde daha güçlü sitotoksik etki oluşturduğunu ortaya koymaktadır. Literatürde β -laktam türevlerinin hücre membranı bütünlüğü, mitokondriyal fonksiyon ve oksidatif stres üzerinde farklı düzeylerde etkiler oluşturabileceği bildirilmiştir. Sultamisilin'in daha düşük konsantrasyonda toksisite oluşturması, ilacın yapısal özellikleri veya hücre içi metabolik aktivasyonu ile ilişkilendirilebilmektedir. Ampisilin ve sulbaktamın kimyasal olarak esterleşmiş hali olan Sultamisilin, ampisilin ile penisilin bağlayıcı proteinlere bağlanarak bakteri hücre duvarında peptidoglikan sentezini inhibe etmektedir. Bu şekilde bakterilerde hücre duvarı bütünlüğü bozulmakta, osmotik denge kaybolmakta ve sonunda bakteri hücresi lizis olmaktadır. Sultamisilinin yapısındaki sulbaktam ise β -laktamaz enzimlerini inhibe ederek ampisilinin parçalanmasını önlemektedir. Sultamisilinin esas hedefi bakteri hücre duvarı olduğundan memeli veya balık hücrelerinde doğrudan bir hedefi bulunmamaktadır. Ancak β -laktamların mitokondriyal enzimler ile etkileşime girdiğine yönelik mevcut kanıtlar yüksek dozlarda ve uzun maruziyet sürelerinde sultamisilin uygulamasının bu hücrelerde mitokondriyal fonksiyon bozulmasına ve oksidatif stres artışına bağlı olarak ölüme yol açabileceğini göstermektedir. Örneğin, Pochini vd. (2008) ampisilinin rat karaciğer mitokondrilerinden saflaştırılan karnitin/acylkarnitin taşıyıcısının aktivitesini inhibe ettiğini ($IC_{50} \sim 7,6 \text{ mM}$) belirtmişlerdir. Tune ve Hsu (1990) ise cephaloridine, cephaloglycin ve imipenem gibi bazı nefrotoksik β -laktam antibiyotiklerin, tavşan böbrek korteks mitokondrilerinde, özellikle aniyonik substrat alımı ve solunum fonksiyonları üzerinde tersinir ve zamanla tersinmez etkiler (substrat taşıyıcılarının (örn. succinate taşıyıcısı vb.) etkilenmesi, mitokondriyal oksidatif fosforilasyon zincirinin solunum fonksiyonlarının azalması) gösterdiğini raporlamışlardır. Kalghatgi vd. (2013) insan meme epiteli hücre hattı (MCF10A) ve diğer hücre tiplerinde "kliniğe yakın dozlarda" β -laktam antibiyotik (ampisilin) uygulamasının mitokondrial solunum komplekslerini (özellikle kompleks I ve III) etkilediğini, ROS üretimini artırdığını ve DNA, protein ve lipid hasarına yol açtığını ifade etmişlerdir. Bu kanıtlar, β -laktam antibiyotiklerin bakteriyel hedefleri dışında da, eukaryotik hücrelerde mitokondri fonksiyonlarını bozabileceği fikrini desteklemektedir. Bu çalışmada Sultamisilin'in RTG-2 hücrelerindeki sitotoksitesi için

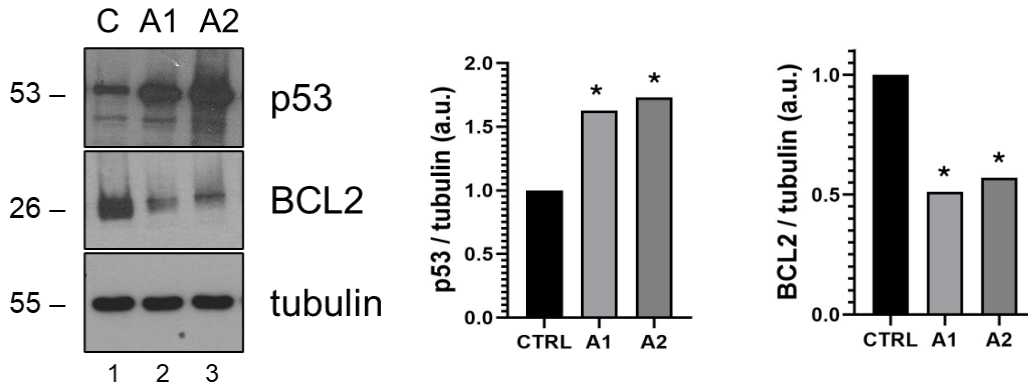
tespit edilen IC_{50} değeri literatürde bahsedilen mitokondriyel taşıyıcı inhibisyonları veya ROS bozulmaları gibi etkilerin ortaya çıkması için gereken konsantrasyonlara kıyasla çok daha düşüktür. Bu durum birkaç olası mekanizmayla açıklanabilir: Öncelikle sultamisilin bir prodrug olarak ampisilin ve sulbaktam'a dönüşmekte; hücre içi metabolitlerden birinin veya iki bileşiğin sinerjistik etkisinin RTG-2 hücreleri içinde daha yüksek ve uzun süreli bir maruziyete yol açması olasıdır. Ayrıca RTG-2 hücre hattına özgü taşıyıcılar veya membran geçirgenliği ilacın hücre içine kolay alınmasını sağlayarak lokal olarak yüksek hücre içi konsantrasyonlara neden olabilir. Diğer yandan test-bazlı hatalar (örn. test reaktifleri ile ilaç etkileşimi) veya çözücü/kontaminasyon gibi teknik nedenler de bu bulguları etkileyebilir; bu nedenle intracellüler ilaç düzeyleri, mitokondriyal fonksiyon, ROS üretimi ve apoptoz belirteçlerini içeren ilave deneyler önerilmektedir. Sefuroksim Aksetil için hesaplanan daha yüksek IC_{50} değeri ise bu ilacın RTG-2 hücreleri açısından daha düşük toksisiteye sahip olduğunu göstermektedir. Literatür taramalarında Sefuroksim Aksetil'in balık hücre hatlarında doğrudan sitotoksik etkisine yönelik çalışma bulunamamakla birlikte insan hücre modelleri (osteoblastlar ya da HepG2/C3A karaciğer hücreleri) üzerinde yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalar düşük ve orta konsantrasyonlarda Sefuroksim maruziyetinin hücre canlılığı üzerinde sınırlı etki gösterdiğini ancak yüksek konsantrasyonlardaki maruziyetin membran hasarına ve hücre metabolik aktivitelerinde düşüşe yol açtığını belirtmişlerdir. Salzmann vd. (2007) Sefuroksim Aksetil (0–1000 $\mu\text{g/mL}$) maruziyetinin osteoblastlarda proliferasyon, LDH aktivitesi, ALP aktivitesi gibi parametrelere etkisini incelemişlerdir. Bu çalışma sonuçlarına göre düşük dozlarda (25–100 $\mu\text{g/mL}$) Sefuroksim Aksetil maruziyeti belirgin olumsuz etkiye sebep olmamakla birlikte yüksek dozlardaki maruziyet LDH artışı, ALP azalması, kireçlenme işlemlerinin bozulması gibi etkilere yol açmaktadır. Doß vd. (2022) 6 gün boyunca sefuroksim (140 μM , 700 μM ve 1400 μM) maruziyetine bırakılan HepG2/C3A hücrelerinde canlılığın konsantrasyona bağlı olarak %32,24'e kadar düştüğünü belirtmişlerdir. Ayrıca bu çalışma sefuroksimin doza bağlı olarak mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesinde artışa ve EROD aktivitesinde ciddi bir azalmaya yol açtığını da göstermektedir. Bu veriler, sefuroksim aksetilin RTG-2 hücre hattında insan hücre modellerine kıyasla daha düşük konsantrasyonlarda sitotoksikite gösterebildiğini ortaya koymaktadır. Bu durum, balık hücrelerinin antibiyotiklere karşı daha hassas olabileceğini veya ilacın bu hücrelerde farklı metabolik/mitokondriyal yollar üzerinden etki edebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca sefuroksim aksetilin prodrug yapısının balık

hücrelerinde farklı şekilde metabolize edilerek daha toksik metabolitler oluşturabileceği de göz ardı edilmemelidir. Çalışmamız bu yönüyle literatürde balık hücreleri üzerinde sefuroksim aksetil sitotoksitesine dair ilk verileri sunmakta ve sucul ekosistemlerde antibiyotik maruziyetinin potansiyel risklerini değerlendirmek için önemli bir temel oluşturmaktadır. Gelecekte yapılacak mekanistik çalışmalar ile mitokondriyal fonksiyon, oksidatif stres ve hücre içi ilaç birikiminin araştırılması, gözlenen toksisitenin altında yatan biyokimyasal mekanizmaların aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

4.2. Western Blot Sonuçları

Apoptoz, hücresel üretim ve eliminasyonu dengeleyerek doku homeostazisini koruyan, genetik olarak kontrol edilen, otonom, sıralı ve periyodik bir hücre ölümü şeklidir. Genellikle hücre morfolojisinde belirgin değişikliklerle karakterizedir; bunlar arasında kabarcıklaşma, hücre bağlanma kaybı, sitoplazmanın büzülmesi, DNA parçalanması ve diğer biyokimyasal değişiklikler bulunur (Elmore, 2007; Obeng, 2021). Sucul ve karasal organizmalar arasında apoptoz yollarının temel bileşenlerinde bazı farklılıklar olsa da, apoptotik mekanizmalar nispeten birbirinin aynısıdır (AnvariFar vd., 2017). p53, birçok hücre tipinde hayati öneme sahip, evrensel ve çok işlevli bir düzenleyici proteindir. Bu protein, çeşitli sinyal yolları aracılığıyla hücre canlılığının sürdürülmesinde kilit rol oynar. p53'ün ekspresyonu, ROS birikimine ve bu durumun yol açtığı oksidatif hasarlara duyarlıdır; böylece p53, farklı hücresel sinyal yollarını düzenleyici bir faktör hâline gelir. Normal fizyolojik koşullarda p53'ün ifade düzeyi endojen mekanizmalar tarafından sıkı biçimde kontrol edilir. Ancak, herhangi bir hücresel stres durumu (örneğin oksidatif stres, DNA hasarı veya genotoksik ajanlara maruziyet), hücre döngüsünde kritik değişikliklere ya da genotoksik hasarlara neden olarak p53 aktivasyonunu tetikleyebilir. Aktive olmuş p53 proteini, stres altındaki hücrelerde apoptoza ve anti-tümör savunmanın temel düzenleyicilerinden biri olarak görev yapar (Shamloo ve Usluer, 2019; Taysı vd., 2019; Sever, 2024). Zebra balığı (*Danio rerio*) beyinde yapılan çalışmalarda, aktive olmuş p53 proteininin hücre döngüsünü durdurarak apoptozu başlattığını ve böylece hasarlı hücrelerin elimine edilmesini sağladığı belirlenmiştir (Hu vd., 2015). Ayrıca p53, hücre canlılığı, DNA onarımı ve apoptoz gibi temel hücresel süreçlerin düzenlenmesinde görev alan önemli bir transkripsiyon faktörüdür (Bensaad ve Vousden, 2007; Yan vd., 2021).

BCL2 ailesi proteinleri, apoptozun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. BCL2 protein ailesi hem apoptozu tetikleyen hem de önleyen proteinleri içerir. Bu iki farklı işlev arasındaki denge, hücrenin yaşamı ve ölümü arasındaki kararın alınmasında kritik bir rol oynar. BCL2 proteini, önemli bir anti-apoptotik faktördür. Ana işlevi, mitokondriyal membranın geçirgenliğini inhibe ederek sitokrom c gibi pro-apoptotik faktörlerin sitoplazmaya salınmasını önlemek ve böylece apoptoz sürecini inhibe etmektir. BCL2 ile Bax ve Bak gibi diğer pro-apoptotik proteinler arasındaki göreceli dengeyi sağlayarak, hücrelerin hayatta kalması için çok önemlidir (Wong, 2011).



Şekil 4.2. Sultamisilin ve Sefuroksim Aksetil'in RTG-2 hücrelerinde apoptotik proteinlerin ifade düzeylerine olan etkisi (CTRL: Kontrol; A1: Sultamisilin; A2: Sefuroksim Aksetil; * $p < 0,05$: kontrol ile kıyaslandığında)

Bu çalışmada, Şekil 4.2'de görüldüğü gibi sağlıklı hücre ile kıyaslandığında p53 gruplarında artış görülmektedir. Apoptotik süreç ve hücrel stres durumunda artan p53 rolü düşünüldüğünde; bu sonuçlar literatür (Taysı vd., 2019; Trivedi vd., 2021; Sever, 2024; Liu vd., 2026) ile uyumlu olarak RTG-2 hücre hattında Sultamisilin ve Sefuroksim aksetil'in tek başlarına kullanıldıklarında stres ve apoptozise yol açtığını görmektedir. Ayrıca, Şekil 4.2'de antiapoptotik protein BCL2 seviyelerinin azalması ile beraber apoptotik etkinin düzenlenmeye çalışıldığı görülmektedir. Sonuçlar, BCL2 proteininin önemli bir anti-apoptotik faktör olarak hücrelerin hayatta kalmasını ve ölümünü düzenlemede temel bir rol oynadığını göstermiştir. Benzer şekilde, genisteinin p53'ün fosforilasyonunu ve aktivasyonunu artırdığı, aynı zamanda BCL2/Bax ve BCL-xL/Bax oranını azalttığı ve fosforile Akt (protein kinaz B) seviyesini düşürdüğü ve bu da hücrelerin apoptoz girmesine neden olduğu öne sürülmüştür (Ouyang vd., 2009). Aynı şekilde Taysı vd. (2019) yaptıkları *in vivo* çalışmada gökkuşağı alabalığı beyin dokusunda inorganin

civanın sublethal dozlarının apoptotik etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, 2 ve 7 günlük zaman aralıklarında inorganin civanın iki subletal dozuna maruz bırakılan gökkuşağı alabalığı beyin dokusunda p53 ekspresyonunda 2. gün artış belirlenirken, 7. gün azalma meydana gelmiştir. Çalışma da, p53 ekspresyonundaki artışın çeşitli hücre hasarı tiplerine karşı hücresel yanıtın bir sonucu olarak meydana geldiği belirtilmiştir. Bununla beraber yapılan bazı çalışmalarda, p53 ekspresyonunun baskılanmasının, özellikle mikroRNA veya hidroksiapatit nanopartikülleri aracılığıyla gerçekleşen inhibisyon durumlarında, transkripsiyonel aktivitenin düzenlenmesinde de bir mekanizma olduğunu göstermektedir (Hu vd., 2007; Cho vd., 2016).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, RTG-2 balık hücre hattında Sultamisilin ve Sefuroksim Aksetil'in sitotoksik etkileri ilk kez değerlendirilmiştir. Sultamisilin için hesaplanan IC_{50} değerinin ($\sim 22,80 \mu M$), Sefuroksim Aksetil'e kıyasla ($\sim 31,33 \mu M$) daha düşük olması, Sultamisilin'in bu hücre hattında daha güçlü toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Sefuroksim Aksetil ise daha yüksek IC_{50} değeri ile RTG-2 hücreleri açısından daha düşük toksisiteye sahiptir. Bu iki antibiyotiğin apoptotik etkisini incelemek için p53 ve BCL2 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Bunun sonucu olarak kontrol grubu ile kıyaslandığında p53 proteinindeki artış apoptotik bir etkiyi göstermektedir, bununla beraber yine kontrol grubu ile kıyaslandığında BCL2 proteinindeki azalma meydana gelen apoptotik etkiyi düzenlemek için oluştuğunu göstermektedir. Çalışmada elde edilen bulgular, literatürde insan hücre modellerinde bildirilen sonuçlarla karşılaştırıldığında, balık hücrelerinin antibiyotiklere karşı daha duyarlı olabileceğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, bu veriler antibiyotiklerin yalnızca antimikrobiyal etkinlik açısından değil, aynı zamanda konak hücreler üzerindeki toksik etkileri bakımından da değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir. İlerleyen çalışmalarda farklı hücre hatlarında benzer analizlerin yapılması, hücresel sitotoksikite mekanizmalarının (örneğin apoptotik yollar, oksidatif stres parametreleri, mitokondriyal fonksiyonlar) detaylı olarak incelenmesi, *in vivo* doğrulamalar ve elde edilen verilerin çevresel toksikoloji perspektifi ile bütünleştirilmesi önem arz etmektedir. Son olarak, antibiyotiklerin kombinasyon hâlinde kullanımlarının olası sinerjistik ya da antagonistik etkilerinin araştırılması, ekotoksikolojik açıdan daha bütüncül bir risk değerlendirmesi yapılmasına imkân verecektir.

KAYNAKLAR

Albarelllos, G. A., Passini, S. M., Lupi, M. P., Aramayona, S., Lorenzini, P. M., Montoya, L. and Landoni, M. F. (2020). Effect of food on the pharmacokinetics of oral cefuroxime axetil in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 43(3), 297–302.

Alfei, S. and Schito, A. M. (2022). β -Lactam antibiotics and β -lactamase enzymes inhibitors, part 2: Our limited resources. *Pharmaceuticals*, 15(4), 476.

André, C., Auclair, J. and Gagné, F. (2024). Acute exposure and biomarkers assessment in rainbow trout exposed to selected pharmaceuticals. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 108, 104472.

AnvariFar, H., Amirkolaie, A. K., Miandare, H. K., Ouraji, H., Jalali, M. A. and Üçüncü, S. İ. (2017). Apoptosis in fish: environmental factors and programmed cell death. *Cell and Tissue Research*, 368(3), 425-439.

Aslantürk, Ö. S. (2018). *In Vitro* Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, And Disadvantages. In: Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World, p. 1–18. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71923>

Babín, M., Boleas, S. and Tarazona, J. V. (2005). *In vitro* toxicity of antimicrobials on RTG-2 and RTL-W1 fish cell lines. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20(1), 125-134.

Bacanlı, M. G. (2024). The two faces of antibiotics: an overview of the effects of antibiotic residues in foodstuffs. *Archives of Toxicology*, 98(6), 1717-1725.

Barathe, P., Kaur, K., Reddy, S., Shriram, V. and Kumar, V. (2024). Antibiotic pollution and associated antimicrobial resistance in the environment. *Journal of Hazardous Materials Letters*, 5, 100105.

Bensaad, K. and Vousden, K. H. (2007). p53: new roles in metabolism. *Trends in Cell Biology*, 17(6): 286-291.

Bhattacharjee, M. K. (2025). Introduction to antibiotics. In: Chemistry of Antibiotics and Related Drugs. Cham: Springer Nature, Switzerland, p. 1-28. https://doi.org/10.1007/978-3-031-96085-7_1.

Bökesoy, T. A., Çakıcı, İ. and Melli, M. (2000). Türk Farmakoloji Derneği Farmakoloji Ders Kitabı. Gazi Kitabevi, Ankara.

Caminada, D., Escher, C. and Fent, K. (2006). Cytotoxicity of pharmaceuticals found in aquatic systems: comparison of PLHC-1 and RTG-2 fish cell lines. *Aquatic Toxicology*, 79(2), 114-123.

Carcione, D., Siracusa, C., Sulejmani, A., Leoni, V. and Intra, J. (2021). Old and new beta-lactamase inhibitors: molecular structure, mechanism of action, and clinical use. *Antibiotics*, 10(8), 995.

Cho, J. G., Park, S., Lim, C. H., Kim, H. S., Song, S. Y., Roh, T. Y., ... and Park, S. G. (2016). ZNF224, Krüppel like zinc finger protein, induces cell growth and apoptosis-resistance by down-regulation of p21 and p53 via miR-663a. *Oncotarget*, 7(21), 31177-90.

Cook, M. A. and Wright, G. D. (2022). The past, present, and future of antibiotics. *Science Translational Medicine*, 14(657), eabo7793.

Çiçek, S. (2022). Cytotoxicity of silver nanoparticles obtained from *Eruca vesicaria* on rainbow trout gonad cell line-2 (RTG-2). *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 12(4), 1093-1101.

Çiçek, S. (2023a). Influences of l-ascorbic acid on cytotoxic, biochemical, and genotoxic damages caused by copper II oxide nanoparticles in the rainbow trout gonad cells-2. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 266, 109559.

Çiçek, S. (2023b). α -tocopherol ameliorates copper II oxide nanoparticles-induced cytotoxic, biochemical, apoptotic, and genotoxic damages in the rainbow trout gonad cells 2 (RTG2) culture. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 101, 104168.

Çiçek, S. (2024). Cytotoxic effects of eugenol and α -terpineol on the rainbow trout gonadal cells. *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7(3), 1272-1280.

Çiçek, S. and Işık, S. (2025). Cytotoxic and genotoxic effects of minor temperature changes and zinc oxide nanoparticles synthesized using *Plantago major* on *Oncorhynchus mykiss* gonadal cells. *Turkish Journal of Zoology*, 49(5), 306-317.

Doß, S., Blessing, C., Haller, K., Richter, G. and Sauer, M. (2022). Influence of antibiotics on functionality and viability of liver cells *in vitro*. *Current Issues In Molecular Biology*, 44(10), 4639-4657.

Durkan, K., Tuncel, A. and Yurt, F. (2021). *In vitro* evaluation of ^{99m}Tc - sultamicillin for infection imaging. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 42(6), 285-293.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516.

Faísca, F., Petrovski, Ž., Grilo, I., Lima, S. A. C., Santos, M. M. and Branco, L. C. (2024). Synthesis, characterization, bioavailability and antimicrobial studies of cefuroxime-based organic salts and ionic liquids. *Pharmaceutics*, 16(10), 1291.

Fernández, C., Carbonell, G. and Babín, M. (2013). Effects of individual and a mixture of pharmaceuticals and personal-care products on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in a rainbow trout gonadal cell line (RTG-2). *Journal of Applied Toxicology*, 33(11), 1203-1212.

Hernández, F., Calisto-Ulloa, N., Gómez-Fuentes, C., Gómez, M., Ferrer, J., González-Rocha, G., ... and Montory, M. (2019). Occurrence of antibiotics and bacterial resistance in wastewater and sea water from the Antarctic. *Journal of Hazardous Materials*, 363, 447-456.

Hu, J., Liu, Z. S., Tang, S. L. and He, Y. M. (2007). Effect of hydroxyapatite nanoparticles on the growth and p53/c-Myc protein expression of implanted hepatic VX2 tumor in rabbits by intravenous injection. *World Journal of Gastroenterology*, 13(20), 2798-802.

Hu, Z., Holzschuh, J. and Driever, W. (2015). Loss of DDB1 leads to transcriptional p53 pathway activation in proliferating cells, cell cycle deregulation, and apoptosis in Zebrafish embryos. *PLoS One*, 10(7), e0134299.

Işık, H. and Akkan, T. (2021). The global problem of the antibiotic and heavy metal resistance in aquatic resources, an examination of Gelevera Creek (Giresun), Turkey. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 6(3), 382-389.

Işık, S. and Çiçek, S. (2024). Impacts of high-dose riboflavin on cytotoxicity, antioxidant, growth, reproductive gene expressions, and genotoxicity in the rainbow trout gonadal cells. *Toxicology in Vitro*, 94, 105730.

Jakubu, V., Vrbova, I., Bitar, I., Cechova, M., Malisova, L. and Zemlickova, H. (2024). Evolution of mutations in the *ftsI* gene leading to amino acid substitutions in PBP3 in *Haemophilus influenzae* strains under the selective pressure of ampicillin and cefuroxime. *International Journal of Medical Microbiology*, 316, 151626.

Jubeh, B., Breijyeh, Z. and Karaman, R. (2020). Antibacterial prodrugs to overcome bacterial resistance. *Molecules*, 25(7), 1543.

Kaddah, M. M., Al - Dokhmaisy, E. H., Mansour, B., Daabees, H. G. and Kamal, M. F. (2022). Quantification of 16 cephalosporins in the aquatic environment by liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 45(22), 4052-4069.

Kalghatgi, S., Spina, C. S., Costello, J. C., Liesa, M., Morones-Ramirez, J. R., Slomovic, S., ... and Collins, J. J. (2013). Bactericidal antibiotics induce mitochondrial dysfunction and oxidative damage in mammalian cells. *Science Translational Medicine*, 5(192), 192ra85.

Kato, G., Mitome, H., Takeda, S., Hidaka, N., Tanaka, M. and Akira, K. (2024). Study on the chemical stability of β -lactam antibiotics in concomitant simple suspensions with magnesium oxide. *Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences*, 10(1), 73.

Khan, A. A., Atiya, A., Akhtar, S., Yadav, Y., Qureshi, K. A., Jaremko, M. and Mahmood, S. (2022). Optimization of a cefuroxime axetil-loaded liquid self-nanoemulsifying drug delivery system: Enhanced solubility, dissolution and Caco-2 cell uptake. *Pharmaceutics*, 14(4), 772.

Khanna, N. R. and Gerriets, V. (2022). Beta-Lactamase Inhibitors. StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), Access date: 01.09.2025. Retrieved from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557592/>

Klein, E. Y., Impalli, I., Poleon, S., Denoel, P., Cipriano, M., Van Boeckel, T. P., ... and Nandi, A. (2024). Global trends in antibiotic consumption during 2016–2023 and future projections through 2030. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 121(49), e2411919121.

Korkmaz, T. M. (2019). Lipopolisakkarit (LPS) ile Uyarılmış Gökkuşığı Alabalığı Gonad Hücrelerinde (RTG-2) *Inula viscosa* L.'nın Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Munzur Üniversitesi.

Liu, B., Wu, C., Meng, X., Yu, T., Zhang, X., Liu, J., ... and Li, M. (2026). Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) Kat5 mediates P53 acetylation to induce apoptosis and promotes GCRV replication. *Fish & Shellfish Immunology*, 168, 110946.

Liu, G. Y., Yu, D., Fan, M. M., Zhang, X., Jin, Z. Y., Tang, C. and Liu, X. F. (2024). Antimicrobial resistance crisis: could artificial intelligence be the solution?. *Military Medical Research*, 11(1), 7.

Liu, J., Deng, W. J., Ying, G. G., Tsang, E. P. and Hong, H. C. (2022). Occurrence and distribution of antibiotics in surface water. *Ecotoxicology*, 31(7), 1111-1119.

Lu, Y., Zhou, X., Zheng, Y., Yang, H. and Cao, W. (2025). How far do we still need to go with antibiotics in aquatic environments? Antibiotic occurrence, chemical-free or chemical-limited strategies, key challenges, and future perspectives. *Water Research*, 275, 123179.

Maghsodian, Z., Sanati, A. M., Mashifana, T., Sillanpää, M., Feng, S., Nhat, T. and Ramavandi, B. (2022). Occurrence and distribution of antibiotics in the water, sediment, and biota of freshwater and marine environments: a review. *Antibiotics*, 11(11), 1461.

Meiyazhagan, G., Raju, R., Winfred, S. B., Mannivanan, B., Bhoopalan, H., Shankar, V., ... and Venkatraman, G. (2015). Bioactivity studies of β -lactam derived polycyclic fused pyrroli-dine/pyrrolizidine derivatives in dentistry: *in vitro*, *in vivo* and *in silico* studies. *PLoS One*, 10(7), e0131433.

Monserrat-Martinez, A., Gambin, Y. and Siernecki, E. (2019). Thinking outside the bug: molecular targets and strategies to overcome antibiotic resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1255.

Mushtaq, M. W., Bhat, I. A., Rather, M. A., Khan, I. A., Bhat, R. A. H. and Iqbal, G. (2025). Beyond the petri dish: fish cell lines pioneering advances in biotechnology, genetic engineering, toxicity and disease solutions. *Blue Biotechnology*, 2(1), 1.

Obeng, E. (2021). Apoptosis (Programmed cell death) and its signals-a review. *Brazilian Journal of Biology*, 81(4), 1133-43.

Oberhoffner, S. J., Daniels, D. E., Cooper, E., Ijaz, A., Richardson, S. A. and DeWitte-Orr, S. J. (2025). Using cationic liposomes as carriers for long dsRNA to trigger an antiviral response in rainbow trout cell lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 61, 591–600.

Oliveira, M., Antunes, W., Mota, S., Madureira-Carvalho, Á., Dinis-Oliveira, R. J. and Dias da Silva, D. (2024). An overview of the recent advances in antimicrobial resistance. *Microorganisms*, 12(9), 1920.

Ouyang, G., Yao, L., Ruan, K., Song, G., Mao, Y. and Bao, S. (2009). Genistein induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis of human ovarian cancer cells via activation of DNA damage checkpoint pathways. *Cell Biology International*, 33(12), 1237-1244.

Özdemir, E., Taşkın, D. and Sungur, S. (2020). Determination of sultamicillin in bulk and pharmaceutical preparations via derivatization with NBD-Cl by spectrophotometry. *Istanbul Journal of Pharmacy*, 50(1), 1-5.

Pancu, D. F., Racea, R. C., Macasoi, I., Sarau, C. A., Pinzaru, I., Poenaru, M., ... and Dinu, S. (2022). Assessment of the *in vitro* cytotoxic profile of two broad-spectrum antibiotics-tetracycline and ampicillin-on pharyngeal carcinoma cells. *Medicina*, 58(9), 1289.

Panda, J., Rao, M. E. B., Swain, S., Patra, C. N. and Jena, B. R. (2022). Formulation development, optimization and characterization of mucoadhesive minitables of cefuroxime axetil: *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* pharmacokinetic evaluation. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 11(1), 123.

Papis, E., Davies, S. J. and Jha, A. N. (2011). Relative sensitivity of fish and mammalian cells to the antibiotic, trimethoprim: cytotoxic and genotoxic responses as determined by neutral red retention, comet and micronucleus assays. *Ecotoxicology*, 20(1), 208-217.

Peng, T., Song, B., Wang, Y., Yuan, J., Yang, Z. and Tang, L. (2025). Trophic transfer of sulfonamide antibiotics in aquatic food chains: a comprehensive review with a focus on environmental health risks. *Environmental Pollution*, 369, 125823.

Pochini, L., Galluccio, M., Scumaci, D., Giangregorio, N., Tonazzi, A., Palmieri, F. and Indiveri, C. (2008). Interaction of β -lactam antibiotics with the mitochondrial carnitine/acylcarnitine transporter. *Chemico-Biological Interactions*, 173(3), 187-194.

Saikia, S. and Chetia, P. (2024). Antibiotics: from mechanism of action to resistance and beyond. *Indian Journal of Microbiology*, 64(3), 821-845.

Salzmann, G. M., Naal, F. D., Von Knoch, F., Tuebel, J., Gradinger, R., Imhoff, A. B. and Schauwecker, J. (2007). Effects of cefuroxime on human osteoblasts *in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 82(2), 462-468.

Saruhan, S. (2022). Akciğer Kanseri Tedavisinde Kan0438757 ve Resveratrol Kombinasyonunun Programlı Hücre Ölümü Üzerine Olan Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bingöl Üniversitesi.

Sazonova, E. V., Chesnokov, M. S., Zhivotovsky, B. and Kopeina, G. S. (2022). Drug toxicity assessment: cell proliferation versus cell death. *Cell Death Discovery*, 8(1), 417.

Sever, A. (2024). Bazı Salvia türlerinin antikanser potansiyellerinin araştırılması. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bingöl Üniversitesi.

Shamloo, B. and Usluer, S. (2019). p21 in cancer research. *Cancers*, 11(8), 1178.

Shekhawat, K. S., Bhatia, P., Bhatnagar, K., Shandilay, S. and Chaudhary, S. (2025). Roadmap to cytotoxicity: exploring assays and mechanisms. *Assay and Drug Development Technologies*, 23(5), 217-236.

Spiess, K. L., Geden, M. J., Romero, S. E., Hollville, E., Hammond, E. S., Patterson, R. L., ... and Deshmukh, M. (2025). Apoptosis signaling is activated as a transient pulse in neurons. *Cell Death & Differentiation*, 32(3), 521-529.

Szarka, A., Vnuková, L., Keršňáková, Z., Viktorová, N. and Hrouzková, S. (2024). Contamination with pharmaceuticals in aquatic environment: focus on analytical methodologies. *Applied Sciences*, 14(19), 8645.

Tamma, P. D., Aitken, S. L., Bonomo, R. A., Mathers, A. J., van Duin, D. and Clancy, C. J. (2022). Infectious diseases society of america 2022 guidance on the treatment of extended-spectrum β -lactamase producing enterobacterales (ESBL-E), carbapenem-resistant enterobacterales (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with difficult-to-treat resistance (DTR-*P. aeruginosa*). *Clinical Infectious Diseases*, 75(2), 187–212.

Taysı, M. R., Söğüt, B., Nedzvetsky, V. S., Kırıcı, M. and Ağca, C.A. (2019). Sublethal doses of inorganic mercury induce dose-dependent upregulation of RPA1 content and inhibit p53 expression in the brain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences*, 6(3), 462-476.

Trivedi, S. P., Ratn, A., Awasthi, Y., Kumar, M. and Trivedi, A. (2021). *In vivo* assessment of dichlorvos induced histological and biochemical impairments coupled with expression of p53 responsive apoptotic genes in the liver and kidney of fish, *Channa punctatus* (Bloch, 1793). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 245, 109032.

Tune, B. M. and Hsu, C. Y. (1990). The renal mitochondrial toxicity of beta-lactam antibiotics: *in vitro* effects of cephaloglycin and imipenem. *Journal of the American Society of Nephrology*, 1(5), 815-821.

Ullah, M., Rana, M. S. and Hossain, M. M. (2023). Simultaneous determination of 11 commonly used cephalosporin antibiotics residue by high performance liquid chromatography-diode array detectors in pharmaceutical waste water-a tool for controlling one of the source of antibiotic resistance. *Journal of Pharmaceutical Research*, 22(2), 69-77.

Van Dijkman, S. C., Kamble, P., Kowalski, J. A. and Della Pasqua, O. (2025). Cefuroxime axetil dosing regimens and probability of target attainment in adults and children. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 91(11), 3213-3224.

Wang, N., Shen, W., Zhang, S., Cheng, J., Qi, D., Hua, J., ... and Qiu, H. (2022). Occurrence and distribution of antibiotics in coastal water of the Taizhou Bay, China: impacts of industrial activities and marine aquaculture. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(54), 81670-81684.

Wang, Z., Zhang, P., Ding, X., Wang, J., Sun, Y., Yin, C., Wang, W., ... and Sun, D. (2021). Co-delivery of ampicillin and β -lactamase inhibitor by selenium nanocomposite to achieve synergistic anti-infective efficiency through overcoming multidrug resistance. *Chemical Engineering Journal*, 414, 128908.

Wen, S. H., Su, S. C., Liou, B. H., Lin, C. H. and Lee, K. R. (2018). Sulbactam-enhanced cytotoxicity of doxorubicin in breast cancer cells. *Cancer Cell International*, 18, 128.

Wilkinson, J. L., Boxall, A. B., Kolpin, D. W., Leung, K. M., Lai, R. W., Galbán-Malagón, C. ... and Teta, C. (2022). Pharmaceutical pollution of the world's rivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(8), e2113947119.

Wolf, K. and Quimby, M. C. (1962). Established eurythermic line of fish cells *in vitro*. *Science*, 135(3508), 1065-1066.

Wong, R. S. Y. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 30(1), 87.

Yadav, A., Yadav, N., Rawat, R., Sharma, S., Gupta, T. And Prasad, D. (2024). Advancing cefuroxime axetil through nanotechnology: Enhancing its effectiveness. *Journal of Bio-X Research*, 7(4), 173-181.

Yahav, D., Giske, C. G., Grāmatniece, A., Abodakpi, H., Tam, V. H. and Leibovici, L. (2020). New β -Lactam- β -Lactamase inhibitor combinations. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(1), e00115-20.

Yan, S., Chen, R., Wang, M. and Zha, J. (2021). Carbamazepine at environmentally relevant concentrations caused DNA damage and apoptosis in the liver of Chinese rare minnows (*Gobiocypris rarus*) by the Ras/Raf/ERK/p53 signaling pathway. *Environmental Pollution*, 270, 116245.

Yang, W., Li, J., Yao, Z. and Li, M. (2024). A review on the alternatives to antibiotics and the treatment of antibiotic pollution: Current development and future prospects. *Science of The Total Environment*, 926, 171757.

Żandarek, J., Archęła, A., Maciag, M., Płazińska, A., Żmudzki, P., Skibiński, R., ... and Dąbrowska, M. (2023). Simulated sunlight irradiation of cefuroxime axetil: Identification of photoproducts by UPLC-MS/MS and testing their potential ecotoxicity. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 444, 114954.