

İKİ YENİ BENZİMİDAZOL TÜREVİNİN SENTEZİ, YAPISAL ANALİZİ VE MUTAJENİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Mehtap KUTLU¹, Gözde AYDOĞAN¹, İlhan IŞIKDAĞ²

¹ Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Böl., 26470, ESKİŞEHİR,
hmkutlu@anadolu.edu.tr

² Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fak., Farmasötik Kimya Böl., 26470,
ESKİŞEHİR, iisikdag@anadolu.edu.tr

ÖZET

Bu çalışmada ilaç hammaddesi olarak kullanılması düşünülen ve antispazmodik aktivitesi bulunan iki tetrahidrobenzimidazol türevi bileşiğin kimyasal sentezi yapılmış, yapısal analizleri. Analitik metodlarla belirlenmiş ve Ames Salmonella/mikrozom testi ile mutajenik özellikleri araştırılmıştır. TA 98 ve TA 100 suşları kullanılarak, metabolik aktivasyonlu ve metabolik aktivasyonsuz olarak gerçekleştirilen deneyler sonucunda, negatif kontrolle karşılaştırıldığında bileşiklerin mutajenik özellik göstermediği belirlenmiştir. Ancak, doza bağlı artış göz önüne alındığında bileşiklerin her ikisinin de kullanılan suşlardan biri veya her ikisi için zayıf mutajeniteye sahip olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Tetrahidrobenzimidazol, *Salmonella*/microsome Testi, Kimyasal Tutajenite

SYNTHESIS, STRUCTURAL ANALYSIS AND DETERMINATION OF MUTAGENIC ACTIVITIES OF TWO NEWLY SYNTHESIZED BENZIMIDAZOLE DERIVATIVES

ABSTRACT

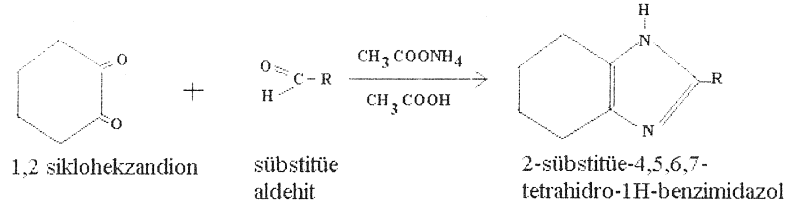
In this study, two benzimidazole derivatives, having antispazmodic activity, were synthesized. Their chemical analyses were performed by using analytical methods and mutagenic activity determined by using Ames/Salmonella /microsome test. The experiments were performed with and without metabolic activation by using the strains both TA 98 and TA 100. The results showed that they are shown to have no mutagenic activity in acceptable doses, but when the dosage were increased, they are observed to have weakly mutagenic effect.

Keywords: Tetrahidrobenzimidazole, *Salmonella*/microsome Test, Chemical Mutagenicity

1.GİRİŞ

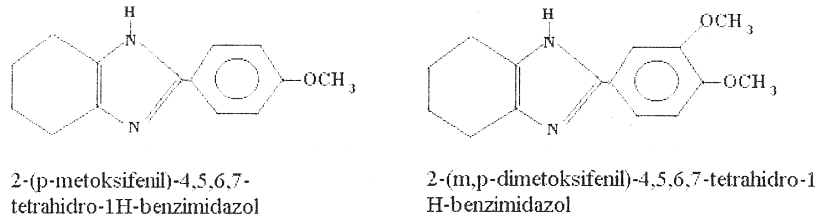
Bazı benzimidazol bileşiklerinin, tarafımızca yapılan önceki çalışmalarda, antispazmodik aktiviteleri ile ilgili bulgular elde edilmiştir [1].

Bu çalışmada, iki adet 2-sübstitüe-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol bileşiği ortak bir sentez yöntemi ile elde edilmiş ve bu bileşiklerin mutajenite testleri gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon şeması Şekil 1' de gösterilmiştir.



Şekil 1. 2-(p-metoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol ve 2-(m,p-dimetoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol bileşiklerinin ortak sentez yöntemine ait reaksiyon şeması

Araştırma kapsamında bazı sübstitüe 4,5,6,7-tetrahidro-1H benzimidazol bileşiklerinin sentezleri gerçekleştirilmiş ve kazanılan türevlerin yapıları aydınlatıldıktan sonra mutajenite testlerine geçilmiştir. Bileşiklerin yapısal formülleri Şekil 2' de gösterilmiştir.



Şekil 2. 2-(p-metoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol ve 2-(m,p-dimetoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol bileşiklerinin yapısal formülleri

İmidazol türevleri antiinflamatuvar, antianaljezik, antispazmodik, kardiyotonik, antihipertansif, antitümör ve gastrik asit salınımını inhibe edici etkilerinden dolayı ilaç sanayinde sıklıkla kullanılan moleküllerdir [2,3,4,5,6,7].

Bu çalışmanın amacı, ilaç hammaddesi olarak kullanılması düşünülerek sentezlenen iki yeni benzimidazol türevi bileşiğin mutajenik özelliklerinin araştırılmasıdır.

2. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada kullanılan aletler; Bileşiklerin erime dereceleri Stuart Scientific Smpl erime derecesi tayin cihazı kullanılarak belirlenmiş ve düzeltilmemiş olarak rapor edilmiştir. Elementel analizler Carlo Erba 1106 Analizör ile gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar; Nutrient Broth ve Bacto Agar Oxoid, mutajenite test tabletleri Boehringer Mannheim Chemical.Co, dimetilsülfoksit (DMSO) ve 4-nitro-o-fenilendiamin (NPD) Aldrich, sodyum azid (SAZ) ve 2 aminofloren (2-AF) Merc, ampisilin trihidrat, 3 metil kolantren, histidin ve biyotin Sigma' dan temin edilmiştir.

Deneyde kullanılan bakteri suşları; *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 mutant suşları, Dr Bruce Ames' den (University of California, Berkeley, Ca., USA) temin edilmiştir.

2-(p-metoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol ve 2-(m,p-dimetoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol bileşiklerinin sentezleri ve elementel analizleri için; hesaplı miktarda 1,2-sikloheksandion ile yine hesaplı miktarda aldehit türevi; amonyum asetat varlığında ve asetik asit içinde yaklaşık 1 saat kadar, geri çeviren soğutucu altında ısıtılarak karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımı soğutulup, amonyak çözeltisi içerisinde nötrleştirilmiştir. Oluşan çökelti süzülerek alınmış, kurutulduktan sonra etanol den kristallendirilmiştir [8].

Bu bileşikler, literatürde kayıtlı olmalarına rağmen, yapı aydınlatma çalışmalarını daha güvenilir hale getirmek amacı ile elementel analizleri yapılmıştır. Ayrıca deneysel erime dereceleri literatür dereceleri ile karşılaştırılarak saflıklarına karar verilmiştir. Sonuçlar Tablo 1 ve Tablo 2' de gösterilmiştir.

Test kimyasallarının farklı konsantrasyonlardaki (0.1, 1, 10, 100, 1000 µg/petri) stok solüsyonları DMSO içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

Bileşiklerin standart test suşları için toksik olmayan dozları Dean ve ark. (1982)' a göre belirlenmiş ve sitotoksik olmayan beş ayrı doz ile çalışılmıştır [9].

Çalışmada kullanılan *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarının stoklarının hazırlanışı, genetik işaretlerinin kontrolü ve plak inkorporasyon yönteminin uygulanışı Maron ve Ames (1983)' e göre yapılmıştır [10]

S9 fraksiyonu, 3-metilkolantren ile indüklenmiş Sprague-Dawley ırkı erkek ratların (180-200g) karaciğerinden elde edilmiştir [10].

Standart plak inkorporasyon yönteminde 45 °C' deki su banyosunda tutulan eritilmiş 2 ml'lik üst agara 0,1 ml test bileşiği ve 0,1 ml bakteri kültürü ($1-2 \times 10^9$ bakteri/ml) eklenerek, minimal tuz ve glukoz içeren agar plaklarına dökülmüştür. S9 fraksiyonu varlığında yapılan deneylerde 0,5 ml S9 karışımı ilave edilmiştir. Plaklar 37 °C'de 48-72 saat inkübe edilmiş ve revertant kolonilerin sayımı yapılmıştır. Her deney negatif kontrol (spektrofotometrik derecedeki dimetilsülfoksit) ve pozitif kontrolleri (20 µg/petri NPD TA98 için ve 1,5 µg/petri SAZ TA100 için) içerecek şekilde üç paralel olarak uygulanmıştır. Metabolik aktivasyon içeren deneylerde 2AF (10 µg/petri) her iki suş içinde pozitif mutajen olarak kullanılmıştır.

3. BULGULAR

Tablo 1. Bileşiklerin formülleri, moleküler ağırlıkları ve erime dereceleri

R	Kapalı Formül	Molekül Ağırlığı	Erime (°C)
Ph-p-OCH ₃	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O	228.293	236 °C *
Ph-m,p-(OCH ₃) ₂	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₂	258.320	258 °C **

* Wiedenhagen ve ark. (1938) [12]

**Demirayak ve ark. (1990) [13]

Tablo 2. Bileşiklerin elementel analizleri

Elementel Analiz					
% C		% H		% N	
Hesaplanan	Bulunan	Hesaplanan	Bulunan	Hesaplanan	Bulunan
73.65	73.71	7.06	6.89	12.27	12.40
69.74	69.87	7.02	6.94	10.84	10.77

Tablo 3. 2-(p-metoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol ve 2-(m,p-dimetoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol bileşiklerinin metabolik aktivasyon yokluğunda TA98 ve TA 100 suşları üzerindeki mutajenik aktiviteleri

Örnekler µg/pt	TA98			TA100		
	Rev/pt	I	M	Rev/pt	I	M
NK	25 ± 4.2		121 ± 25.1			
A						
1000	41 ± 6.2	1.6	-	216 ± 23.9	1.8	-
100	27 ± 9.4	1.1	-	136 ± 15.6	1.1	-
10	30 ± 3.2	1.2	-	86 ± 8.1	0.7	-
1	23 ± 4.3	0.9	-	76 ± 13.0	0.6	-
0,1	30 ± 3.2	1.2	-	83 ± 12.9	0.7	-
B						
1000	39 ± 4.1	1.6	-	169 ± 8.5	1.4	-
100	24 ± 4.8	1.0	-	116 ± 22.3	1.0	-
10	19 ± 6.6	0.8	-	77 ± 25.8	0.6	-
1	24 ± 3.1	1.0	-	80 ± 13.6	0.7	-
0.1	25 ± 3.9	1.0	-	70 ± 15.6	0.6	-

A: 2-(p-metoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol

B: 2-(m,p-dimetoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol

Örnekler: 100 µl örnek/petri

Rev/pt: Revertant sayısı (ayrı zamanlarda yapılan üç deneyin sonuçları olan dokuz petrinin ortalaması alınmıştır.)

I: Mutajenik indeks: Deneylerdeki his⁺ bakteri kolonisi sayısının negatif kontroldeki spontan his⁺ bakteri koloni sayısına oranı

NK: Negatif kontrol: DMSO;

pozitif kontroller: TA 98: NPD (20µg/petri) 1351 ± 312.2 , TA 100: SAZ (1,5 µg/petri) 462 ± 60.8

M: mutajenite

Tablo 4. 2-(p-metoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol ve 2-(m,p-dimetoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol bileşiklerinin metabolik aktivasyon varlığında TA98 ve TA 100 suşları üzerindeki mutajenik aktiviteleri

Örnekler µg/pl	TA98			TA100		
	Rev/pt	I	M	Rev/pt	I	M
NK	33 ± 12.7			99 ± 10.6		
A						
1000	42 ± 6.7	1.3	-	100 ± 9.6	1.0	-
100	35 ± 6.2	1.1	-	93 ± 1.9	0.9	-
10	36 ± 8.9	1.1	-	102 ± 12.3	1.0	-
1	21 ± 4.1	0.6	-	84 ± 11.7	0.8	-
0,1	20 ± 8.0	0.6	-	77 ± 7.6	0.8	-
B						
1000	46 ± 6.6	1.4	-	92 ± 16.1	0.9	-
100	28 ± 3.8	0.8	-	95 ± 34.4	1.0	-
10	31 ± 6.2	0.9	-	61 ± 5.8	0.6	-
1	37 ± 7.4	1.1	-	88 ± 4.3	0.9	-
0,1	27 ± 8.2	0.8	-	104 ± 12.5	1.0	-

A: 2-(p-metoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol

B: 2-(m,p-dimetoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol

Örnekler: 100 µl örnek/petri

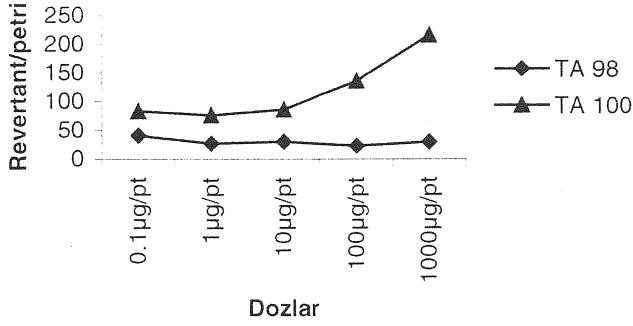
Rev/pt: Revertant sayısı (ayrı zamanlarda yapılan üç deneyin sonuçları olan dokuz petrinin ortalaması alınmıştır.)

I: Mutajenik indeks: Deneylerdeki his⁺ bakteri kolonisi sayısının negatif kontroldeki spontan his⁺ bakteri koloni sayısına oranı

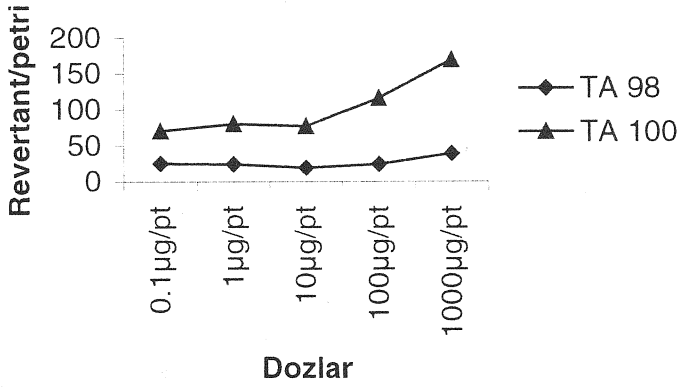
NK: Negatif kontrol: DMSO;

pozitif kontrol: TA 98: 2AF (10µg/petri) 824 ± 45.5, TA 100 2AF (10µg/petri) 651 ± 39.1

M: mutajenite



A

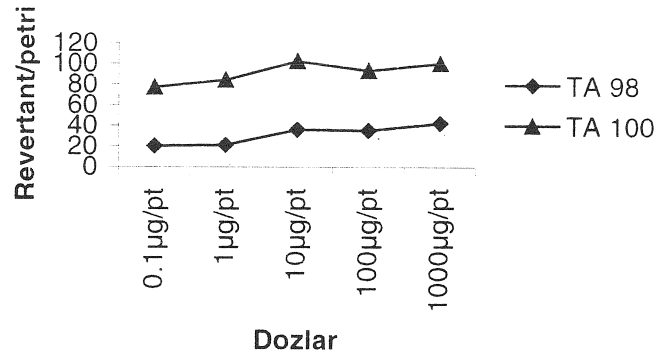


B

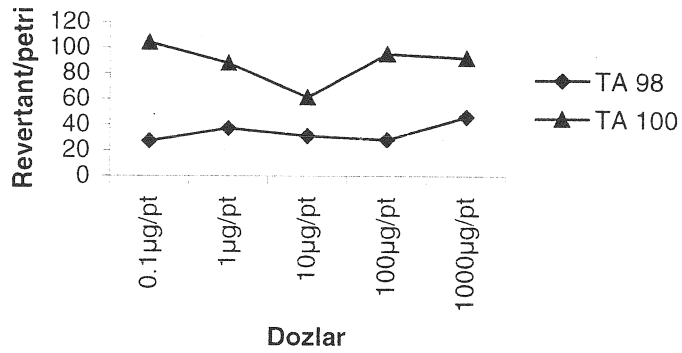
Şekil 3. 2-(p-metoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol ve 2-(m,p-dimetoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol bileşiklerinin metabolik aktivasyon yokluğunda TA98 ve TA 100 suşları üzerindeki mutajenik aktivitelerinin doza bağlı grafiği

A: 2-(p-metoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol

B: 2-(m,p-dimetoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol



A



B

Şekil 4. 2-(p-metoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol ve 2-(m,p-dimetoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol bileşiklerinin metabolik aktivasyon varlığında TA98 ve TA 100 suşları üzerindeki mutajenik aktivitelerinin doza bağlı grafiği

A: 2-(p-metoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol

B: 2-(m,p-dimetoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

İmidazol çekirdeği bazı endojen bileşiklerin ana yapısını oluşturan ve insan organizmasına yabancı olmayan kimyasal bir bileşiktir. Ayrıca, günümüzde kullanılan bir çok ilaç molekülünün yapısına da girmiş bulunmaktadır. İmidazol türevleri insanda karaciğerdeki glukoranidasyon olaylarında, nitrik oksit in oluşumunu sağlayan enzimin izoformlarının inhibisyonu gibi pek

çok olayda rol almaktadır. Ayrıca imidazol türevleri antiinflamatuvar, antianaljezik, antispazmodik, kardiotonik, antihipertansif, antitümör ve gastrik asit salınımını inhibe edici etkilerinden dolayı ilaç sanayinde sıklıkla kullanılan moleküllerdir [2,3,4,5,6,7].

Bu çalışmada, sentezlenen iki ayrı imidazol türevi bileşiğin yapıları aydınlatıldıktan sonra mutajenik aktiviteleri Ames *Salmonella*/mikrozom testi ile araştırılmıştır. Daha önceki çalışmalarda antimikrobiyal etkilerine de rastlanmıştır [11].

Bu bileşikler, literatürde kayıtlı olmalarına rağmen, yapı aydınlatma çalışmalarını daha güvenilir hale getirmek amacı ile analitik yöntemler kullanılarak elementel analizleri yapılmıştır. Ayrıca deneysel erime dereceleri literatür dereceleri ile karşılaştırılarak saflıklarına karar verilmiştir [12,13].

Bu bileşiklerin mutajenik aktivitelerini belirleyebilmek amacıyla Ames *Salmonella*/mikrozom testi uygulanmıştır.

Salmonella/mikrozom testi kimyasal maddelerin mutajenik etkilerini tesbit etmekte kullanılan, test parametreleri açısından iyi standardize edilmiş bir yöntemdir. Bu testle, çok sayıda kimyasalın mutajenik ve buna bağlı olarak şüphelenilen karsinojenik etkilerinin bir ön taraması yapılabilmektedir. Ek olarak, bu testle bir mutajenin çerçeve kayması ya da baz değişimi mutasyonlarından hangisine neden olduğu belirlenebilmektedir [14,15].

Bu çalışmada plak inkorporasyon yöntemi kullanılarak, bileşiklerin *Salmonella typhimurium* bakterisinin TA 98 ve TA 100 suşları üzerindeki mutajenik aktiviteleri rat karaciğeri S9 mikrozomal fraksiyonu içeren ve içermeyen ortamlarda belirlenmiştir.

Bir kimyasalın, bu test sisteminde mutajen olarak kabul edilebilmesi için TA 98 ve TA 100 ile verdiği revertant koloni sayısı, o suşa özgü negatif kontroldeki revertant sayısının en az iki katı kadar olmalıdır. Revertant koloni sayısındaki doza bağlı artış da mutajenite belirlemede göz önünde bulundurulması gereken bir başka unsur olarak kabul edilir [16,17].

Elde edilen sonuçlar, bu kriterlere göre değerlendirilmiş ve sonuçlar Tablo 3 ve Tablo 4'te gösterilmiştir. Revertant koloni sayısındaki doza bağlı değişimi gösteren grafikler Şekil 3 ve Şekil 4'te belirtilmiştir.

Metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğunda uygulanan deneylerde, her iki bileşiğin tüm dozları için mutajeniteye rastlanmamıştır. Ancak, 2-(p-metoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol bileşiğinin gerek metabolik aktivasyon içeren, gerekse içermeyen ortamlarda TA 98 suşu üzerinde göstermiş olduğu etki, revertant kolonilerin sayısının doza bağlı artışı şeklindedir. Bu durum bu bileşiğin çerçeve kayması mutasyonuna neden olabileceğinin göstergesidir. 2-(p-metoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol bileşiği, metabolik aktivasyon içeren ortamda TA 100 suşunun revertant kolonilerinin sayısında da doza bağlı bir artış meydana getirmiştir. Bu maddenin metabolitlerinin zayıf bir mutajenite ile baz değişimi mutasyonuna neden olabileceği gözlenmiştir. 2-(m,p-dimetoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol bileşiğinin ise metabolik aktivasyon içermeyen ortamda özellikle TA 98 suşu için, revertant koloni sayısında doza bağlı olarak belirgin bir artışa neden olduğu görülmüştür. Aynı bileşikle muamele edilen TA 100 suşunun revertant koloni sayısı da, doza bağlı olarak zayıf bir artış göstermiştir. Ancak metabolik aktivasyon varlığında 2-(m,p-dimetoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol bileşiği TA 100 suşunun revertant koloni sayısında belirgin bir artış meydana getirirken, bu etki TA 98 suşu üzerinde gözlenmemiştir. Bu durumda 2-(m,p-dimetoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-benzimidazol bileşiğinin çerçeve kayması mutasyonuna neden olan etkisi, metabolik aktivasyon içeren ortamda baskılanmaktadır.

Salmonella/mikrozom testi ilaç hammadelerini de içeren çok sayıda kimyasalın mutajenik aktivitelerini belirleyebilmek amacıyla çeşitli araştırmalarda kullanılmıştır. Björn ve ark. (2001) tarafından yapılan çalışmada [18], *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde, ilaç üretiminde kullanılan 4-amino-ve 4-nitrostilben bileşikleri' nin mutajenik aktiviteleri araştırılmıştır. $-NH_2$ ve $-NO_2$ fonksiyonel guruplarından uzak bölgelerde bulunan 4'-alkyl guruplarının amino ve nitrostilben bileşiklerinin mutajenik aktivitelerinde boyut bağımlı bir etki gösterdiği belirlenmiştir. Alkil-sübstitüe bileşikler için, mutajenik etkinin moleküler şeklin modifikasyonlarına bağlı olduğu belirlenmiştir.

Bir başka çalışmada, 2-sübstitüe-1H-fenantrö (9,10-d) imidazol bileşiklerinin mutajenik etkileri TA 97, TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde araştırılmıştır. Çalışılan 13 madde, üç suştan en az biri için, S9 içeren ya da içermeyen ortamda, revertant koloni sayısında zayıf fakat istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana getirmiştir. Birçok çalışmada, bazı fenil-sübstitüe imidazol bileşiklerinin ve nitroimidazol bileşiklerinin, kısa zamanlı test sistemlerinde mutajenik ve tümörojenik etkileri bulunmuştur [19].

Benzer çalışmaların diğer kısa zamanlı mutajenite testleriyle karşılaştırmalı olarak yapılması, bileşiklerin mutajenik etkileri konusunda daha kesin kanıtlara varılması açısından yararlı olacaktır.

5. KAYNAKLAR

1. Öztürk Y., Işıkdag İ., Uçucu Ü., Demirayak Ş., Antispasmodic actions of 2-alkylaminomethyl benzimidazole dihydrochloride derivatives on the isolated guineapig ileum, *Fabad. Farm. Bil. Der.*, 13: 326-31, (1998).
2. CIBA Ltd., 4,5-Diarylimidazoles, *Neth. Appl.* 6, 412, 310 (Cl. C07d), April 26, 1965; *Swiss Appl.* Oct. 23, 1963, Feb.28, and Aug. 26, 1964; 16pp (C.A., 63, 11573c-d)
3. Lombardino J.G., Pharmaceutical imidazoles, *Ger. Offen.* 2, 155, 558 (Cl. C. 07d), 29 Jun 1972. *US. Appl.* 90.077, 16 Nov 1970; 65 (C.A., 77, 101607y)
4. Lombardino J.G., Wiseman E.H., Preparation and antiinflammatory activity of some nonacidic trisubstitued imidazoles. *J. Med. Chem.*, 17 (11), 1182-8, (1974).
5. Sircar I., Bristol J.A., Preparation of phenylpyridazinone derivatives as cardiotonics and antihypertensives, U.S. US 4,734,415 (Cl. 514-247; C07D237/04), 29 Mar 1988. *US Appl.* 302,181, 17 Sep 1981; 19, C.A. 111: 97259n.
6. Kawashima S., Matsuno T., Yaguchi S., Watanabe T., Inaba M., Preparation of heterocyclic compounds as antitumor agents, *PCT Int. Appl. WO 99 05, 138* (Cl. C07D403/04), 4 Feb. 1999, *JP Appl.* 97/198,804, 24 Jul 1997; 46, C. A., 130:153673z.
7. Honma Y., Tamaki H., Magaribuchi T., Takido M., Preparation of 1-pyridyl-2-(benzylsulfinyl)imidazoles as gastric acid secretion inhibitors, U.S. US 4,996,217 (Cl. 514-338; A61K31/44), 26 Feb 1991, *JP Appl.* 86/287,512.02 Dec 1986; 29, C.A. 115:136095k.
8. Shinji T., Nobuyuki Y., Koichi K., Preparation of tetrahydrobenzimidazole, *Jpn. Kokai Tokyo Koho JP 08,269,050*.
9. Dean B.J., Brooks T.M., Hudson-Walker G., Hutson D.H., Genetic toxicology testing of 41 industrial chemicals, *Mutat. Res.*, 153, 57-77, (1985).
10. Maron D., Ames B.N. Revised methods for *Salmonella* Mutagenicity test, *Mutat. Res.*, 113, 173-215, (1983).
11. Ören İ., Temiz Ö., Yalçın İ., Şener E., Altanlar N., Synthesis and antimicrobial activity of some novel 2,5-and/or 6-substitued benzoxazole and benzimidazole derivatives, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 7:(2), 153-60, (1999).
12. Wiedenhagen R., Wegner H., Imidazoles VI. Synthesis of tetrahydrobenzimidazole (4,5-cyclotetramethyleneimidazole and its derivatives, *Ber.* 71B., 2124-34, (1938).

13. Demirayak Ş., Turan G., The cytotoxic activity of 2-aryl-4,5,6,7-tetrahydrobenzimidazole derivatives on *Lepidium sativum* roots and quantitative structure-activity relationships. *Acta Pharm. Turc.*, 32:(3), 55-60, (1990).
14. Mortelmans K., Zeiger E., The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.*, 455, 29-60, (2000).
15. Maslat A., Abussaud M., Tashtoush H., AL-Talib, M. Synthesis, antibacterial, antifungal and genotoxic activity of bis-1,3,4-oxidazole derivatives. *Pol. J. Pharmacol.*, 54, 55-59, (2002).
16. Vargas V.M.F., Migliavacca S.B., Melo A.C., Horn R.C., Guidobono R.H., Sá Ferreira I.C.F., Pestana M.H.D., Genotoxicity assesment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mutat. Res.*, 490, 141-158, (2001).
17. Catterall F., King L.J., Ionnides C., Mutagenic activity of the glutathione S-transferase substrate 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB) in the *Salmonella* mutagenicity assay. *Mutat. Res.*, 520, 119-124, (2002).
18. Björn L., Klein M., Erdinger L., Boche G., The effects of 4'-alkyl substituents on the mutagenic activity of 4-amino- and 4-nitrostilbenes in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research*, 491, 195-209, (2001).
19. Zeytinoglu H., Ergene E., Tüylü B., Mutagenicity assay in *Salmonella* for thirteen 2-substitued-1H-phenanthro (9,10-d) imidazoles. *Drug and Chemical Toxicology*, 26:(4), 245-257, (2003).