



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**SUDA ÇÖZÜNÜR Ti (IV) FTALOSİYANİN
BİLEŞİKLERİNİN DNA BAĞLANMA, DNA
KESİM, ANTİOKSİDAN, ANTİMİKROBİYAL
AKTİVİTELERİNİN VE TOPOİZOMERAZ I
İNHİBİSYONUNUN İNCELENMESİ**

Burak BARUT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yrd. Doç. Dr. Arzu ÖZEL

TRABZON-2016



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**SUDA ÇÖZÜNÜR Ti (IV) FTALOSİYANİN
BİLEŞİKLERİNİN DNA BAĞLANMA, DNA
KESİM, ANTİOKSİDAN, ANTİMİKROBİYAL
AKTİVİTELERİNİN VE TOPOİZOMERAZ I
İNHİBİSYONUNUN İNCELENMESİ**

Burak BARUT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yrd. Doç. Dr. Arzu ÖZEL

TRABZON-2016

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Yrd. Doç. Dr. Arzu ÖZEL

Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

(İmza)

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Burak BARUT'un hazırladığı "Suda Çözünür Ti (IV) Ftalosiyanın Bileşiklerinin DNA Bağlanma, DNA Kesim, Antioksidan, Antimikrobiyal Aktivitelerinin ve Topoizomeras I İnhibisyonunun İncelenmesi" başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Yrd. Doç. Dr. Arzu ÖZEL

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Cemal SANDALLI

Yrd. Doç. Dr. Sermet YILDIRMIŞ

Yrd. Doç. Dr. Arzu ÖZEL

Tarih: 06/01/2016

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/....../.... tarih ve ...sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eseri olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

06/01/2016

Burak BARUT

(İmza)

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans çalışmalarım süresince her türlü konuda desteğini ve teşviğini esirgemeyen, uygulama ve değerlendirme aşamasında değerli bilgi ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan, değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Arzu ÖZEL'e; akademik çalışmalarım süresince beni değerli bilgi ve tecrüberiyle yönlendiren, gerek bilimsel gerek ise ahlaki kişiliğini örnek aldığım sevgili hocam Prof. Dr. Feride Sena SEZEN'e; lisans öğrenimimden bu yana engin bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, yardımını ve desteğini eksik etmeyen Fen Fakültesi Kimya Bölümü Başkanı Prof. Dr. Halit KANTEKİN'e; yüksek lisans öğrenimim boyunca bana bilgi ve birikimlerini aktaran Biyokimya Anabilim Dalı'nın öğretim üyeleri Doç. Dr. Atila Taner KALAYCIOĞLU, Doç. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Sermet YILDIRMIŞ'a; yüksek lisans tezimde kullandığım "suda çözünür Ti (IV) ftalosiyanın bileşiklerini" sentezleyen ve tanıdığım günden bu yana hiçbir konuda yardımını esirgemeyen Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Zekeriya BIYIKLIOĞLU'na; antimikrobiyal aktivite çalışmaları için laboratuvarını açan ve her türlü desteği sağlayan Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ'a ve laboratuvar ekibine; tez çalışmalarım boyunca sıkça fikir alışverişinde bulunduğum ve bana yol gösteren, bilgi birikimlerinden faydalandığım sevgili hocam Arş. Gör. Ümit DEMİRBAŞ'a; Eczacılık Fakültesinde göreve başladığım günden bu yana desteklerini esirgemeyen tüm hocalarıma ve Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma; hayatımın her anında beni daima destekleyen, bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim aileme; tez çalışmamın yanı sıra her konuda desteğiyle bana güç veren, anlayış gösteren ve benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan değerli meslektaşım, nişanlım Arş. Gör. Elif Nur GAZİOĞLU'na sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Arş. Gör. Burak BARUT

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR ve SİMGE DİZİNİ	xii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	7
4.1. Ftalosiyeninler	7
4.1.1. Ftalosiyeninlerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	9
4.1.2. Ftalosiyeninlerin Kullanım Alanları	10
4.1.2.1. Fotodinamik Terapi	11
4.2. Deoksiribonükleik Asit (DNA) ve Yapısı	12
4.2.1. DNA'nın Özellikleri	15
4.2.2. DNA ile Moleküllerin Etkileşimi	19
4.2.2.1. DNA ile Kovalent Bağlanma	19
4.2.2.2. DNA ile Kovalent Olmayan Bağlanma	20
4.2.2.2.1. Elektrostatik Etkileşimler	21
4.2.2.2.2. Oluğa Bağlanma Etkileşimleri	21
4.2.2.2.3. İnterkalasyon Etkileşimleri	23
4.2.2.3. DNA Kesim	24
4.3. Topoizomerazlar	27
4.4. Antioksidan Aktivite	29
4.5. Antimikrobiyal Aktivite	32
4.6. Literatür Özeti	33
5. GEREÇ ve YÖNTEM	38

5.1. Gereç	38
5.1.1. Kullanılan Cihazlar	38
5.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler	38
5.1.3. Kullanılan Çözeltiler	40
5.2. Yöntem	41
5.2.1. DNA Bağlanma Deneyleri	41
5.2.1.1 UV-Vis Absorpsiyon Titrasyonları	41
5.2.1.2. DNA Erime Sıcaklığının Belirlenmesi	42
5.2.2. DNA Kesim (Nükleaz) Aktivitesi	42
5.2.2.1. pBR322 Plazmid DNA'sının Hidrolitik Kesimi	43
5.2.2.2. pBR322 Plazmid DNA'sının Işıkla İndüklenmiş Kesimi	43
5.2.2.3. pH'nın pBR322 Plazmid DNA'sının Kesim Aktivitesine Etkisi	44
5.2.2.4. pBR322 Plazmid DNA'nın Oksidatif Kesimi	44
5.2.3. Topoizomeraz I İnhibisyonu	44
5.2.4. Antioksidan Aktivite Çalışmaları	45
5.2.4.1. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi	45
5.2.4.2. DPPH Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi	45
5.2.4.3. Metal Şelat Bağlanma Aktivitesinin Belirlenmesi	46
5.2.5. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	46
6. BULGULAR	47
6.1. DNA Bağlanma Çalışmaları	47
6.1.1. UV-Vis Absorpsiyon Titrasyonları	47
6.1.2. DNA Erime Sıcaklığının Belirlenmesi	49
6.2. DNA Kesim (Nükleaz) Aktivitesi	50
6.2.1. pBR322 Plazmid DNA'sının Hidrolitik Kesimi	50
6.2.2. pBR322 Plazmid DNA'sının Işıkla İndüklenmiş Kesimi	50
6.2.3. pH'nın pBR322 Plazmid DNA'sının Kesim Aktivitesine Etkisi	51
6.2.4. pBR322 Plazmid DNA'nın Oksidatif Kesimi	52
6.3. Topoizomeraz I İnhibisyonu	52
6.4. Antioksidan Aktivite Çalışmaları	53
6.4.1. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi	53

6.4.2. DPPH Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi	54
6.4.3. Metal Şelat Bağlanma Aktivitesinin Belirlenmesi	55
6.5. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	55
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	57
8. KAYNAKLAR	61
9. ÖZGEÇMİŞ	73

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. DNA çift sarmalının yapısal şekillerine ait bazı özellikler	17
Tablo 2. Reaktif oksijen türlerinin sınıflandırılması	30
Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazlar	38
Tablo 4. Çalışmada incelenen bileşiklerin isimleri ve molekül ağırlıkları	40
Tablo 5. Ftalosiyanin bileşiklerinin DNA Erime Sıcaklıkları	50
Tablo 6. Ftalosiyanin bileşiklerinin süperoksit radikal süpürme aktiviteleri (%)	54
Tablo 7. Ftalosiyanin bileşiklerinin DPPH radikal süpürme aktiviteleri (%)	55
Tablo 8. Ftalosiyanin bileşiklerinin metal şelat bağlanma aktiviteleri (%)	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Metalsiz ve Metalli Ftalosiyeninler	7
Şekil 2. Periyodik tabloda ftalosiyenin bileşiği yapılmış elementler	8
Şekil 3. Metalli ftalosiyeninlerin ideal geometrileri	8
Şekil 4. Ftalosiyeninlerin kristal yapılarının gösterimi	10
Şekil 5. Fotodinamik Terapide tedavinin şematik gösterimi	12
Şekil 6. Pürin ve pirimidin yapısı	13
Şekil 7. DNA molekülünün yapısı	13
Şekil 8. DNA molekülünün ikincil yapısının 3 boyutlu gösterimi	14
Şekil 9. DNA molekülünün minör ve majör olukları	15
Şekil 10. DNA molekülünün A-DNA, B-DNA, Z-DNA formları	16
Şekil 11. DNA'nın denatürasyonu	18
Şekil 12. Cisplatinin öngörülen etki mekanizması	20
Şekil 13. Cisplatinin DNA ile koordinasyonu	20
Şekil 14. DNA ile kovalent olmayan etkileşimler	21
Şekil 15. DNA ile moleküllerin elektrostatik bağlanma modeli	21
Şekil 16. DNA ile moleküllerin majör ve minör oluklara bağlanması	22
Şekil 17. Minör oluğa bağlanma gösteren ilaçlar	22
Şekil 18. İnterkalasyon yapan ajanlar	23
Şekil 19. Etidyum bromürün interkalasyonu	24
Şekil 20. Adriamisin ve Daunomisin ilaçlarının yapıları	24
Şekil 21. Hidrolitik ve Oksidatif kesimin gösterimi	27
Şekil 22. DNA çift sarmalının üzerinde topoizomerez I ve II enzimlerinin gösterimi	28
Şekil 23. Topoizomerez I ve II enzimlerinin inhibisyonu	29
Şekil 24. Antioksidanların sınıflandırılması	31
Şekil 25. Cisplatin'in yapısı	33
Şekil 26. <i>cis</i> -[(CH ₃ CH ₂ O) ₂ (bzac) ₂ Ti(IV)]'in yapısı	33
Şekil 27. Titanosen diklorür'ün yapısı	34
Şekil 28. Katyonik Co (II) ve Pd (II) ftalosiyenin bileşikleri	35
Şekil 29. Ball-tipi ftalosiyenin bileşiği	36

- Şekil 30.** Çalışmada incelenen suda çözünür titanyum (IV) ftalosiyanın bileşiklerinin şekilleri ve kodları 39
- Şekil 31.** pBR322 plazmid DNA'nın 650 nm ışıqla uyarılma düzeneği 43

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 1. Pc1 bileşiğinin DNA yokluğunda ve artan DNA konsantrasyonu varlığında absorpsiyon spektrumları	48
Resim 2. Pc2 bileşiğinin DNA yokluğunda ve artan DNA konsantrasyonu varlığında absorpsiyon spektrumları	48
Resim 3. Pc3 bileşiğinin DNA yokluğunda ve artan DNA konsantrasyonu varlığında absorpsiyon spektrumları	49
Resim 4. Işık varlığında ve yokluğunda ftalosiyanin bileşiklerinin pBR322 plazmid DNA kullanılarak kesim aktivitelerinin incelenmesi	51
Resim 5. pH'nın pBR322 plazmid DNA'sının kesim aktivitesi üzerine etkisi	51
Resim 6. Yardımcı reaktiflerin pBR322 plazmid DNA'nın kesim aktivitesi üzerine etkileri	52
Resim 7. Ftalosiyanin bileşiklerinin topoizomerez I inhibisyon aktivitelerinin görüntülenmesi	53
Resim 8. Ftalosiyanin bileşiklerinin antimikrobiyal aktiviteleri	56

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

Kısaltmalar

AA	Askorbik asit
ATP	Adenozin trifosfat
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
CAT	Katalaz
CT-DNA	Calf Thymus – deoksiribonükleik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTT	Ditiyoeritrol
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EB	Etidyum Bromür
EC	Enzim Komisyonu
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
FRAP	Demir iyonlarını indirgeme antioksidan kapasitesi
H₂O₂	Hidrojen peroksit
ME	β-merkatoetanol
MİK	Minimal inhibitör konsantrasyonu
NaCl	Sodyum klorür
NO[•]	Nitrik oksit radikali
O₂	Oksijen molekülü
O₂^{•-}	Süperoksit radikali
OH[•]	Hidroksil radikali
Pc	Ftalosiyanin
PDT	Fotodinamik terapi
ROS	Reaktif oksijen türleri
SF	Serum fizyolojik
SOD	Süperoksit dismutaz
TAE	Tris-Asetik Asit-EDTA
TEAK	Troloks eşitliği antioksidan kapasitesi
Ti	Titanyum
Tris	(tris-hidroksimetil)-aminometan

UV-Vis Ultraviyole visible

Simgeler

K_b Bağlanma Sabiti

T_m Erime Sıcaklığı

μL Mikrolitre

mL Mililitre

Å Angstrom

M Molar

μM Mikromolar

mM Milimolar

nm Nanometre

ng Nanogram

dk Dakika

π→π* π molekül orbitalinden π* antibaę molekül orbitaline geęiş

ÖZET

Suda Çözünür Ti (IV) Ftalosiyanin Bileşiklerinin DNA Bağlanma, DNA Kesim, Antioksidan, Antimikrobiyal Aktivitelerinin ve Topoizomerez I İnhibisyonunun İncelenmesi

DNA, genetik hastalıkların özellikle de kanserin tedavisinde önemli bir hedeftir. Kanser hücrelerinin hızla çoğalması ve kanserde ölüm oranının yüksek olması, klinik tedavide anahtar etkileri nedeniyle, antikanser ilaç niteliği gösterebilecek geçiş metal komplekslerinin biyolojik olarak incelenmesini arttırmıştır. Antikanser ilaçların birçoğu farklı şekillerde DNA'ya bağlanarak etkisini gösterirler. Kanserli hücrede DNA çoğalmasını bloke ederek, kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ederler. DNA bağlanmasının ve kesimin mekanizmasını anlamak, etkili antikanser ilaçlarının dizayn edilmesinin en önemli temelidir. Bu tür ilaçların başarısı, DNA'ya ilgilerine ve bağlanma modlarına bağlıdır.

Bu çalışmada üç farklı suda çözünür tetra substitüe titanyum (IV) ftalosiyanin (Pc) bileşiklerinin CT-DNA ile etkileşimleri UV-Vis spektroskopisi ve termal denatürasyon yöntemleri kullanılarak incelendi. Bileşiklerin bağlanma sabitleri (K_b) sırasıyla 3.75×10^4 , 2.3×10^4 ve $4.57 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ bulunmuştur. Bu sonuçlar bileşiklerin CT-DNA'ya farklı ilgiyle bağlandığını göstermiştir. Bununla birlikte Pc bileşiklerinin DNA kesim ve topoizomerez I inhibisyonu çalışmaları agaroz jel elektroforezi kullanılarak yapıldı. Bu çalışma sonucunda kullanılan Pc bileşiklerinin plazmid pBR322 DNA'yı fotokesim yoluyla kestiği ve topoizomerez I enzimine karşı önemli inhibisyon etkisi gösterdiği görülmüştür. Ayrıca bileşiklerin süperoksit dismutaz (SOD), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ve metal şelat bağlanma metotlarıyla antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Tüm sonuçlar çalışmada kullanılan ftalosiyanin bileşiklerinin fotodinamik terapi için uygun ajan olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: Ftalosiyanin, DNA bağlanma, DNA kesim, topoizomerez I, antioksidan, antimikrobiyal aktivite

SUMMARY

Investigation of DNA Binding, DNA Cleavage, Antioxidant, Antimicrobial Activities and Inhibition of Topoisomerase I of Water Soluble Ti (IV) Phthalocyanine Compounds

DNA is an important target for treating genetic diseases most notably cancer. Since cancer cells proliferate rapidly and mortality is high in cancer, it has increased the biological investigation of transition metal complexes as anticancer drugs because of their key impact in clinical therapy. Many anticancer drugs exert their anticancer effects through binding to DNA in various ways, thereby blocking the replication of DNA and inhibiting the growth of cancer cells. The understanding of DNA binding and cleavage is the basis for the design of new, efficient anticancer drugs, their effectiveness depending on the binding mode and affinity towards DNA.

The calf thymus (CT) DNA binding of three different water soluble peripherally tetra-substituted titanium (IV) phthalocyanine (Pc) compounds were investigated by using UV-Vis spectroscopy and studies of thermal denaturation in this work. The DNA binding constants (K_b) of Pc compounds were 3.75×10^4 , 2.3×10^4 and $4.57 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ respectively. However, DNA cleavage and topoisomerase I inhibition of plasmid pBR322 DNA in the absence and presence of Pc compounds were examined using gel electrophoresis. All Pc compounds cleaved pBR322 DNA via photocleavage pathway and exhibited significant inhibitory effects against topoisomerase I enzyme. In addition, superoxide dismutase (SOD) assay, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay and metal chelating assay were done to examine antioxidant activities of these phthalocyanine compounds. Result of all of these studies that Ti (IV) phthalocyanine compounds can be suitable agent for photodynamic therapy.

Key Words: Phthalocyanine, DNA binding, DNA cleavage, topoisomerase I, antioxidant, antimicrobial activity

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Renkleri maviden sarımsı yeşile kadar değişebilen ftalosiyanınler dört izoindol biriminin 1,3 konumlarından aza köprüleriyle bağlanması sonucu 18π elektronlu düzlemsel aromatik bir makro halkadan oluşmaktadır. Ftalosiyanınler hemoglobin, klorofil A, vitamin B12 gibi porfirinlere yapısal olarak benzemelerine rağmen, doğada bulunmayan sentetik ürünlerdir. Düzlemsel konjuge 18π elektron sistemi sebebiyle ftalosiyanınler de porfirinler gibi yüksek aromatik özellik gösterirler (1).

Ftalosiyanınler optik ve elektriksel özellikleri ve termal kararlılıklarıyla son yıllarda boyama, reaksiyon katalizleme, nükleer kimya, optik veri depolama, elektrokromik görüntüleme, ince film, kimyasal sensör, sıvı kristal ve fotodinamik terapi ile kanser tedavisi alanlarında sıkça kullanılan bileşikler olmuşlardır (2).

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması, işgalci nitelik kazanması ve metastaz yapması ile kendini gösteren ve halen gelişmiş ülkelerin ölüm istatistiklerinde kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer alan ölümcül bir hastalıktır (3). Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu (IARC) 2008 yılında 12.4 milyon yeni kanser vakası, 7.6 milyon kanser nedeni ölüm ve ilk tanıdan bu yana 5 yıl ya da daha az süre geçmiş 28 milyon kanserli hasta olduğunu tahmin etmektedir (4, 5). Kanser oranlarıyla yaş arasındaki güçlü bağlantı göz önünde bulundurulduğunda, 2030 yılında büyük bir nüfusa etki edecek artan bir kanser yükünden söz edilebilir (4).

Günümüzde kanser tedavisinde cerrahi, kemoterapi ve radyoterapinin uygulanmasının yanı sıra son yıllarda tümör teşhisi ve tedavisinde umut verici ve üzerinde yoğun olarak çalışılan yöntemlerden birisi olan fotodinamik terapi (PDT) kanser tedavisinde yeni bir yöntem olarak ortaya çıkmış ve diğer kanser tedavi yöntemleri arasında hasta vücudundaki sağlıklı hücrelere daha az zarar vermesiyle popüler bir çalışma alanı olmuştur.

Fotodinamik terapi (PDT), ışığa duyarlı bir fotoduyarlaştırıcının kanserli dokuda birikmesi ve uygun dalga boyunda ışığa maruz bırakılmasıyla oluşan serbest radikaller ve singlet oksijenin kanserli dokuyu parçalaması esasına dayanan bir kanser tedavi yöntemidir. Belli dalga boyundaki ışığın fotoduyarlaştırıcı madde tarafından absorblanması ve bu tepkimeler sonucu açığa çıkan singlet oksijenin sadece kanserli doku üzerinde bir tahribata neden olması ve böylelikle çevre dokuya zarar vermeden

yalnızca tümörlü bölgedeki hücrelerin yok edilmesi, fotodinamik terapiyi diğer kanserle mücadele yöntemlerinden üstün kılmaktadır (6).

Genetik bilgiyi depolama ve nesilden nesile aktarabilme yeteneği, canlılığın temel bir özelliğidir ve bu olayda en temel rolü DNA üstlenmektedir. DNA'nın genetik bilgi deposu rolü, kararlı olmasına bağlıdır. Uzun süreli bilginin değişmeden korunması hücre için çok önemlidir. Ancak, DNA yapısındaki değişim yavaş bile olsa, fizyolojik önem taşır. Kanserleşme, DNA'da yavaşça biriken geri dönüşümsüz değişimlerle yakından ilişkili olabilir. Bazı kimyasalların, önemli bir hücresel reseptör olan DNA'ya bağlanarak, DNA'nın replikasyonunu değiştirebilmeleri ve tümör hücrelerinin büyümesini inhibe ederek antikanser etkisi gösterebilmeleri, yeni ve daha etkili antikanser ilaçların tasarımında temel oluşturur (7). Ayrıca bu kimyasalların etkinlikleri bağlanma modlarına ve etkilerine göre değişebilmektedir (8).

Geçiş metal kompleksi içeren DNA bağlayıcıları, DNA yapısal probu olarak hastalıkların tedavisinde, ilaç etkinliklerinin geliştirilmesi ve yeni ilaç tasarımlarındaki önemli uygulamaları sebebiyle biyoinorganik çalışmaların odak noktasıdır (9,10). Belirli DNA sıralarına özgü yeni metalonükleazların dizaynı bilinen restriksiyon enzimlerine çeşitlilik katacaktır. Kimyasal nükleazlar DNA'yı oksidatif, ışıkla uyarılmış ve hidrolitik proseslerle kesebilirler (11). Geçiş metal kompleksleri, doğrudan kalıp kesimi ya da baz modifikasyonu oluşturacak DNA kesimini uyaran metal ve dioksijenin redoks özellikleriyle, reaktif oksijen türlerini oluşturacak nükleaz aktiviteleri açısından oldukça çalışılmaktadır (12).

DNA bağlanma, DNA aktivitesi için kritik bir adımdır ve etkili kemoterapötik ajanların ve daha iyi antikanser ilaçlarının dizaynı için metal kompleksin DNA ile etkileşiminin araştırılması önemlidir. Metal içeren bileşiklerin DNA ile farklı etkileşimleri, ilaç aktivitesi ve seçiciliğinde alternatif türlere yol açar (13, 14).

Metal komplekslerin kanser tedavilerinde kullanımı 1969 yılında *cis*-diamindikloroplatinyum(II) (cisplatin) bileşiğinin bulunmasıyla başlamıştır. Ancak platin metalinin yararlı etkisinin yanı sıra toksik etki de yaratması sebebiyle çalışmalarda yeni bir metal atomu arayışı kaçınılmaz olmuştur. 1979 yılında Köpf-Maier ve Köpf titanosen diklorür kompleksinin antikanser aktiviteye sahip olduğunu yayınladıktan sonra ilerleyen yıllarda diğer metalosen türevleri sentezlenerek antikanser

etkileri test edilmiştir. Özellikle titanosen diklorür kolon, akciğer ve göğüs kanserlerine karşı iyi antikanser aktivite göstermiştir. Bunun yanı sıra titanyum komplekslerinin, platin kompleksleriyle karşılaştırıldığında ise daha az toksisiteye sahip oldukları belirlenmiştir. Bu sebeple literatürde kanser tedavilerinde titanyum komplekslerinin antikanser özelliklerine ait oldukça fazla kaynak bulunmaktadır. Benzer şekilde titanyum komplekslerinin DNA bağlanma çalışmalarıyla antikanser ajanların, DNA ile nasıl etkileştiğinin mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır (15).

Topoizomerazlar, hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda DNA replikasyonu, transkripsiyonu, rekombinasyon, kromozom yoğunlaşması ve ayrılması gibi işlemlerde gerekli olan enzimlerdir. Son yıllardaki farmakolojik çalışmalar, genellikle DNA küçük oluğundaki özgül dizilere bağlanarak antikanser aktivite gösteren ilaçların, DNA topoizomeraz enzimlerini inhibe ederek de etkili olduğunu göstermiştir. Hücre çoğalmasında gerekli olan topoizomeraz enzimlerinin bu ilaçlar tarafından inhibisyonu, kontrolsüz ve hızlı bir şekilde bölünen kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurabileceği düşünülmektedir (16). Giderek artan çeşitlilikteki topoizomeraz inhibitörleri, antikanser aktiviteye sahip ilaçların tasarımı için yeni bir kaynak oluşturmuştur (17). Günümüzde tedavi amacıyla sıklıkla kullanılan kemoterapötik etkili bu tip ilaçlara (daunomisin, bleomisin vb.) karşı direnç kazanılması veya istenmeyen yan etkilerinin bulunması bu ilaçların kullanım alanlarını kısıtlamaktadır. Bu durum, araştırmacıları daha etkili ve geniş spektruma sahip, yan etkileri daha az olan kemoterapötik etkili yeni ilaçların aranması çalışmalarına yönlendirmektedir.

Serbest radikaller, atomik orbitali üzerinde eşlenmemiş elektron (e^-) taşıyan moleküller olarak tanımlanır. Serbest radikal oluşumunun artması, oksidatif stresi tetiklemektedir. Temel olarak oksidatif stres biyolojik sistemde prooksidanlarla antioksidanlar arasındaki dengenin, prooksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanır. Hücreler hafif oksidatif stresi tek başlarına tolere edebilseler de genellikle antioksidan enzim sistemlerini aktive ederler. Ancak, hücre içi savunma sistemlerinin yeterli olamadığı durumlarda, oksidatif stresin tanımında belirtildiği üzere, reaktif oksijen bileşikleri ile antioksidanlar arasındaki denge bozulur, dolayısıyla oksidan hasara duyarlı DNA, protein, karbonhidratlar ve lipitler gibi hücresel makromoleküller zarar görür (18). Yapılan çalışmalar, çeşitli kategorideki sitotoksik ajanların hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak serbest radikal üretimine ve antioksidanlarda kayıba neden olduklarını

göstermiştir (19). Klinik çalışmalarda da antioksidanlar kemoterapinin antikanser etkisini arttırmıştır (20). Bu nedenle tasarlanan antikanser ilaçların antioksidan katkısının, kemoterapiye bağlı toksisite şiddetini ve sıklığını azaltacağı düşünülmektedir.

Bakterilerin enfeksiyonlarda kullanılan antibiyotiklere karşı gösterdiği direnç 21. yüzyılda ciddi bir küresel sağlık sorunu haline gelmiştir. Son zamanlarda yeni direnç mekanizmalarının ortaya çıkması ile farklı sınıftan antibiyotiklere dirençli "süpermikroplar" olarak adlandırılan çoğul dirençli bakteriler büyük bir tehlike oluşturmaktadır (21). Mevcut antibiyotiklerin hastalarda gelişigüzel ve dikkatsiz kullanımı, enfeksiyona karşı koruyucu önlemlerin yetersiz oluşu antibiyotik direncinin başlıca nedenleridir (22). Mevcut antimikrobiyal ajanlara karşı dirençli bakteri izolatları endişe verici bir şekilde artış göstermektedir. Bu durum antibiyotiklere dirençli bakterilere karşı yeni etkili ajanlar aramayı gerektirmektedir (23, 24). Bu nedenle yeni bir antibiyotik ilaç olma potansiyeli açısından ftalosiyanin bileşiklerinin etkilerinin araştırılacak olması ilgili konuya farklı bir bakış açısı kazandıracığı düşünülmektedir.

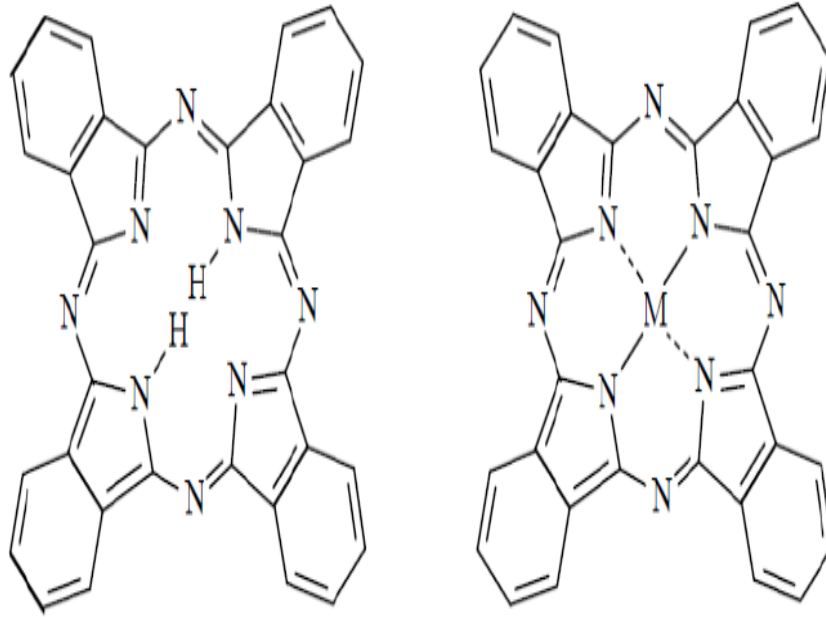
Tüm bu bilgiler ışığında, antikanser etki gösterdiği literatür tarafından belirlenmiş olan titanyum (IV) metali ile ftalosiyanin molekülleri bir araya getirilip bu çalışmanın yapılmasına karar verilmiştir. Bu çalışmada Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Zekeriya BIYIKLIOĞLU tarafından sentezlenen 3 farklı suda çözünür Ti (IV) ftalosiyanin bileşiğinin DNA ile etkileşip etkileşmedikleri UV spektrofotometri tekniği ile incelenecektir. Ayrıca bağlanma modunun tam olarak ortaya konulabilmesi için termal denatürasyon çalışmaları yapılacaktır. Absorbsiyon spektrumlarından elde edilen sonuçlar agaroz jel elektroforezi ile desteklenerek ışık varlığında ve yokluğunda DNA kesim etkinlikleri tespit edilecektir. Ayrıca, topoizomera I inhibisyonu agaroz jel elektroforezi ile incelenecek ve bileşiklerin antikanser potansiyelleri ortaya konulacaktır. Bu bileşiklerin antioksidan aktivitelerini tespit etmek için süperoksit ve DPPH radikalleri süpürme ve metal şelat bağlama aktiviteleri incelenecektir. Son olarak bileşiklerin antimikrobiyal özellikleri agar difüzyon metodu ile incelenecektir. Sentezi ve karakterizasyonu yapılan bu bileşiklerin sahip olduğu potansiyel özelliklerin ortaya konulması açısından bu çalışma disiplinlerarası çalışma olarak bir öneme sahiptir. Bu bileşiklerin önemli biyolojik aktivite göstermesi, onların fotodinamik terapi için uygun ajan olarak değerlendirilmesine temel oluşturacaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1.Ftalosiyaninler

Adını Yunancada mineral yağı anlamına gelen *naphta* ve koyu mavi anlamındaki *cyanine* kelimelerinden alan ftalosiyaninler, 18π elektronuna sahip 16 üyeli (8 karbon, 8 azot) makrosiklik bileşiklerdir. Renkleri maviden sarımsı yeşile kadar değişebilir. Genel olarak tetrabenzotetraazaporfirinler veya dört izoindolin birimlerinin kondenzasyon ürünleri olarak bilinirler. Metalli ftalosiyaninlerin oluşumu molekülün merkezinde bulunan izoindolün hidrojen atomlarının metal atomlarıyla yer değiştirmesiyle olur (25).

Ftalosiyaninler ilk kez 1907 yılında Braun ve Tcherniac tarafından asetik asit ve ftalimit'den *o*-siyanobenzamid sentezi sırasında yan ürün olarak elde edilmiştir. Ftalosiyaninlerin yapısı 1929'dan 1933'e kadar Linstead ve grubunun yapmış olduğu çalışmalar neticesinde aydınlatılmıştır. Linstead ftalosiyaninler üzerine yaptığı çeşitli fizikokimyasal ölçümlerle yapılarını doğrulamış, X-ışını veya elektron mikroskobu gibi metotlarla da ftalosiyaninlerin düzlemselliğini tespit etmişlerdir (26).



Şekil 1. Metalsız ve Metalli Ftalosiyaninler (30)

Günümüze kadar yaklaşık 70 farklı element ftalosiyaninlerde merkez atom olarak kullanılmıştır.

4.1.1. Ftalosiyaninlerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

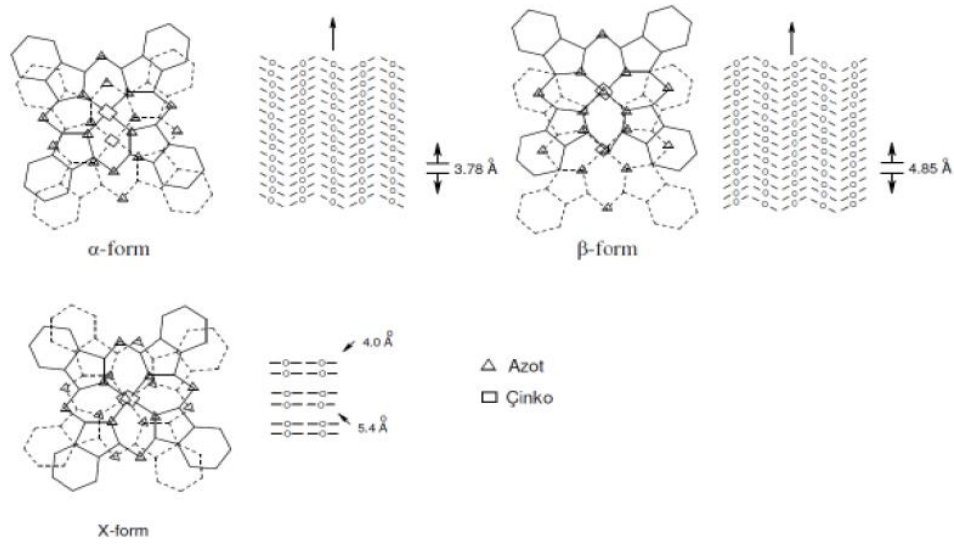
Ftalosiyaninlerin en önemli fiziksel özelliklerinin biri renkleridir. Ftalosiyanin bileşiklerinin renkleri maviden yeşile kadar çeşitlilik gösterir. Farklı renklerde ftalosiyanin bileşiklerinin oluşmasına neden olan temel unsurlar, ftalosiyanin halkasına sübstitüe olan ligandların kimyasal özellikleri ve ftalosiyanin bileşiğinin kristal yapısıdır.

Ftalosiyaninler oldukça yüksek kimyasal ve termal kararlılığa sahiptir. Ftalosiyaninlerinin çoğunun erime noktası yoktur, havada 400-500 °C'ye kadar önemli bir bozunmaya uğramadıkları bilinmektedir. Vakumda metal komplekslerinin büyük bir kısmı 900-1000 °C'den önce dekompoze olmaz. Kuvvetli bazlara ve asitlere karşı oldukça dayanıklıdır (28).

$(4n+2)\pi$ Hückel kuralına uyan ftalosiyanin makrohalkası 18π elektron sistemine sahiptir ve aromatik özellik gösterir. Ftalosiyanin molekülünün kavitesinin çapı 1,35 Å ve kalınlığı 3,4 Å'dur. Kararlı metalli ftalosiyaninlerin oluşmasında ftalosiyanin halkasının kavite çapı ile kaviteye yerleşecek metal iyonunun çapı arasındaki uyum oldukça önemlidir. Metal iyonunun çapı ftalosiyanin halkasının kavite çapından küçük ya da büyük ise oluşacak metalli ftalosiyanin kompleksi kararsız olur çünkü böyle durumlarda metal iyonu kolaylıkla kaviteden ayrılabilir (29).

Ftalosiyaninler genellikle isomorfik kristal yapıdadırlar. Sübstitüe olmamış ftalosiyaninlerin α -yapısı ve β -yapısı olmak üzere 2 tip kristal yapısı vardır. Bu iki tip yapı arasında çözünürlük, renk ve termodinamik kararlılık açısından farklar vardır. β -formu, α -formuna göre daha kararlıdır ve en çok rastlanan yapıdır.

Ftalosiyaninler kolayca yükseltgenir veya indirgenebilirler. Yükseltgenme ve indirgenme metal atomunda olabildiği gibi şartlara bağlı olarak ftalosiyanin halkasında da tersinir veya tersinmez olabilir. Bütün ftalosiyaninler nitrik asit ve potasyum permanganat gibi kuvvetli oksitleyici reaktifler ile ftalimide yükseltgenir (30).



Şekil 4. Ftalosiyanın kristal yapılarının gösterimi (26)

Ftalosiyanın bir diğer önemli fiziksel özelliği ise çözünürlükleridir. Ftalosiyanın en önemli dezavantajlarından biri yaygın çözücülerde veya suda çözünürlüğünün az olmasıdır. Ftalosiyanın çözünürlüğü, onların fiziksel ve kimyasal özelliklerinin araştırılması açısından çok önemlidir. Ftalosiyanın polar solventlerde ve suda çözünürlüğü genellikle periferik pozisyonlara, polar veya iyonik grupların (örneğin $-\text{SO}_3^-$, $-\text{NR}^{3+}$, $-\text{COO}^-$ gibi) eklenmesiyle artar. Apolar organik çözücülerde çözünür yapmak için ise bu grupların uzun alkil veya alkoksizincirleri, büyük süstituentler veya taç eter gibi makrosiklik yapıların bağlanması gerekmektedir (31).

4.1.2. Ftalosiyanın Kullanım Alanları

Ftalosiyanın güzel ve parlak renklere sahip olmaları, oldukça yüksek kimyasal kararlılıkları ve sıcaklığa karşı dayanıklı olmaları sebebiyle bilimsel ve teknolojik alanda oldukça ilgi çekmektedirler (32). Ftalosiyanın; kimyasal sensörlerde (33), güneş pillerinde (34), yarı iletken metallerde (35), sıvı kristallerde (36), veri depolamada (37), giyimde boyarmadde olarak giyinme (38), metal ve plastiklerin yüzeylerini boyamada (38), katalizör olarak yükseltgenme veya indirgenme reaksiyonlarında (39), yüksek enerjili bataryalarda, fotokopi makinelerinde, fotoiletken ajan olarak, biyosensörlerde, fotokatalizör olarak, petrolde oktan oranını artırmakta ve son yıllarda fotoduyarlayıcı özelliklerinden dolayı, alternatif bir kanser tedavi yöntemi olan fotodinamik terapide (6) kullanılmaktadır.

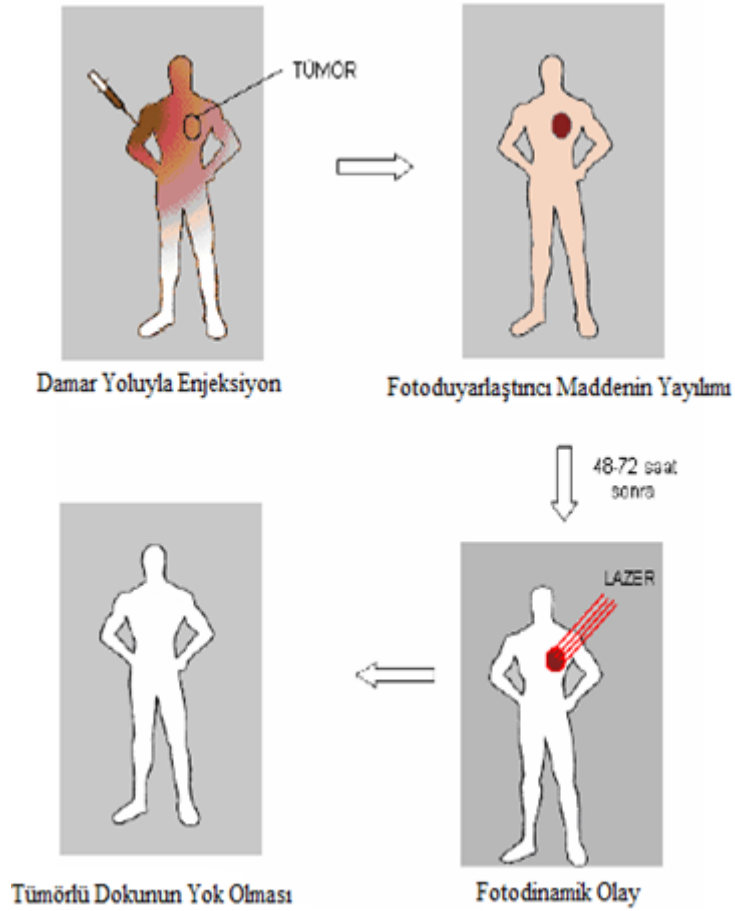
4.1.2.1. Fotodinamik Terapi

Ameliyat, kemoterapi ve radyoterapi günümüzde kanser tedavisinde en yaygın kullanılan 3 yöntem olarak bilinmektedir. Bu yöntemlerin kanserli dokuyu yok etmesinin yanı sıra mide bulantısı, kızarıklık, saç dökülmesi, halsizlik gibi yan etkilerinin bulunması bilim insanlarını alternatif bir kanser tedavisi metodu arayışına sürüklemiştir. Bu araştırmaların sonucunda kemoterapinin alt dalı olarak bilinen fotodinamik terapi (PDT) ortaya çıkmıştır (40).

PDT, ışığa duyarlı bir fotoduyarlaştırıcının kanserli dokuda birikmesi ve uygun dalga boyunda ışığa maruz bırakılmasıyla oluşan serbest radikaller ve singlet oksijenin kanserli dokuyu parçalaması esasına dayanan bir kanser tedavi yöntemidir. Belli dalga boyundaki ışığın fotoduyarlaştırıcı madde tarafından absorblanması ve bu tepkilemeler sonucu açığa çıkan singlet oksijenin sadece kanserli doku üzerinde bir tahribata neden olması ve böylelikle çevre dokuya zarar vermeden yalnızca tümörlü bölgedeki hücrelerin yok edilmesi fotodinamik terapiyi diğer kanserle mücadele yöntemlerinden üstün kılmaktadır. Fotoduyarlaştırıcı olarak davranan ftalosiyanınların yüksek dalga boyundaki ışığı absorblayabilmeleri yüksek triplet hal kuantum verimlerine, triplet halde uzun ömürlere sahip olmaları, yüksek miktarlarda singlet oksijen üretebilmeleri ve ışık kullanılmadığı zaman herhangi bir toksik etkilerinin olmaması fotodinamik terapide etkin olarak kullanılabilirliklerini artırmaktadır (41). 1980'lerin başında Amerikan Yiyecek ve İlaç Kurulu'nun (Food and Drug Administration, (FDA)) hematoporfirin (HpD) türevi olan Photofrin isimli ilacın klinik uygulamalarına onay vermesiyle birçok kanserin tedavisinde bu metot uygulanmaya başlanmıştır (42, 43). PDT, A.B.D, Almanya, Japonya, İngiltere, Fransa, Hollanda, Kanada gibi birçok ülkede sağlık kurumları tarafından çeşitli kanser tedavi uygulamaları için onaylanmıştır (44).

PDT ile tedavide ilk olarak fotoduyarlaştırıcı madde damar yolundan verilmektedir. Fotoduyarlaştırıcı madde hızla tümörlü dokulara lokalize olur ve hedef hücrelerde birikmesi sağlanır. Vücuda verildikten 48-72 saat sonra, fotoduyarlaştırıcı maddenin konsantrasyonu tümörlü dokularda artar. Bunun sebebi, tümörlü dokuların daha büyük dokusal hacme sahip olması, tümör dokusundaki mikrodamarlarda çatlakların bulunması ve tümörlü dokuların büyük miktarlarda kollajen içermesidir. Fotoduyarlaştırıcı madde tümörlü dokuda biriktikten sonra uygun dalga boylu ışın

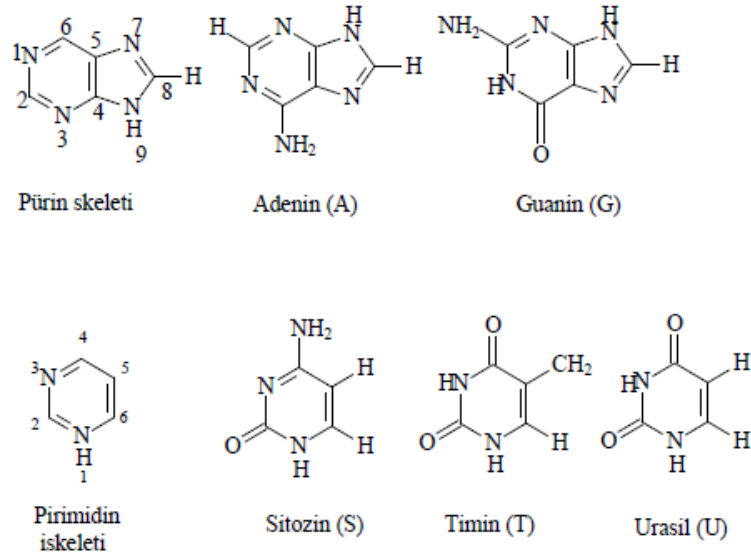
tümörlü dokuya verilir ve fotoduyarlastırıcı madde aktive olur ve fotokimyasal reaksiyonlar sonucunda üretilen singlet oksijenin etkisiyle doku hızlıca yok edilir (45).



Şekil 5. Fotodinamik Terapide tedavinin şematik gösterimi (45)

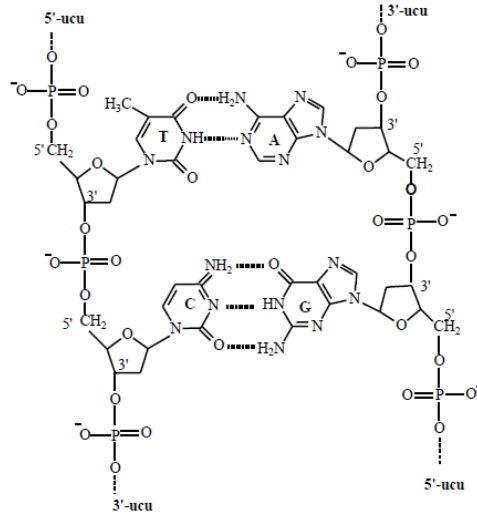
4.2. Deoksiribonükleik Asit (DNA) ve Yapısı

Deoksiribonükleik asit veya kısaca DNA tüm organizmalar ve bazı virüslerin canlılık işlevleri ve biyolojik gelişmeleri için gerekli olan genetik talimatları taşıyan bir nükleik asittir. Çok sayıda deoksiribonükleotid birimlerinden oluşmuş çok uzun ipliğimsi bir makromoleküldür. DNA molekülünde bazların başlıca rolü genetik bilginin saklanması ve depolanması iken, şeker ve fosfat gruplarının yalnız yapısal özellikleri vardır. DNA molekülü 4 çeşit baz ihtiva eder: adenin (A), guanin (G) pürinleri ile timin (T) ve sitozin (S) pirimidinleri. DNA omurgası bütün molekül boyunca aynı olup, fosfodiester köprüleriyle bağlanmış deoksiribozdan ibarettir. DNA molekülünde bazların sırası DNA'nın birincil yapısını oluşturmaktadır (46).



Şekil 6. Pürin ve pirimidin yapısı (53)

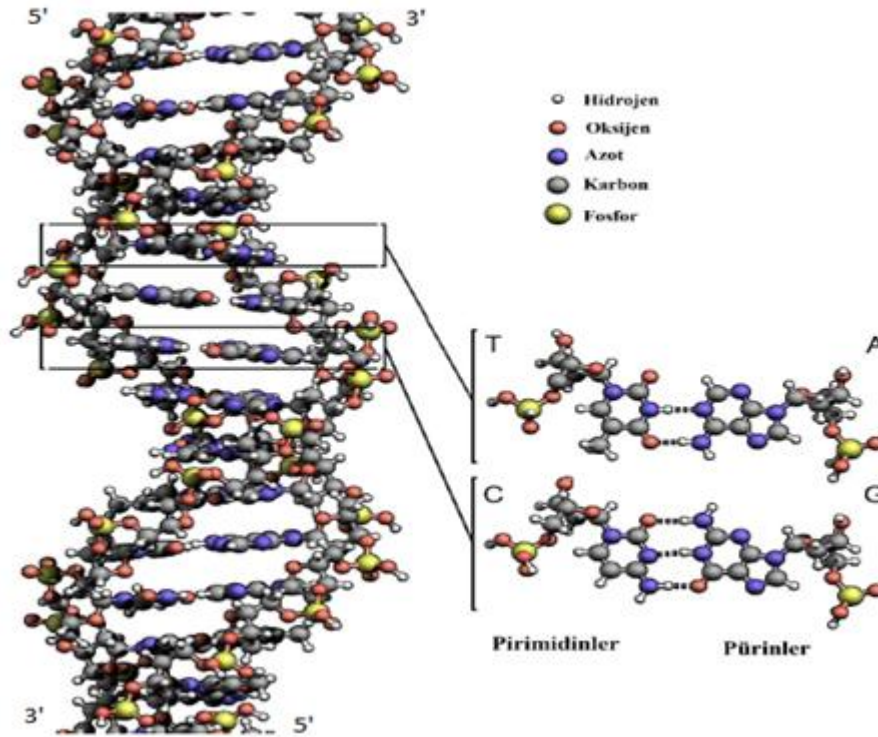
Her bir zincirde şeker molekülünün 3' karbonuna bağlı bir fosfat grubu diğer şeker biriminin 5' karbonu ile esterleşmiş durumdadır. Bu şekilde yeni şeker birimlerinin 3' ucuna bağlanması ile DNA zinciri 5' ucundan 3' ucuna doğru uzanır. Böylece fosfat deoksiriboz iskeleti 5' → 3' şeklinde bir yönlülük gösterir ve DNA dizileri bu sırada okunur (47).



Şekil 7. DNA molekülünün yapısı (53)

1953 yılında James Watson ve Francis Crick, DNA'nın üç boyutlu yapısını ortaya çıkardılar. DNA'nın sarmal olacağı sonucuna varılmış ve pürinlerin pirimidinlerle eşleştiği dikkate alınarak bu sarmalın muhtemel yapısı önerilmiştir. Bu aynı zamanda,

DNA'nın ikincil yapısı anlamına gelmektedir. Bu yapıda DNA molekülü bir çift sarmal halinde iki oldukça uzun deoksiribonükleotit zincirinden oluşmaktadır. Bu iki zincirin fosfat-deoksiriboz iskeleti hidrofilik olduğundan sulu ortam ile etkileşecek şekilde çift sarmalın dışında yer alır. Birbirleri ile hidrojen bağları ile eşleşmiş pürin/pirimidin bazları ise sarmalın iç kısmında, sarmalın uzun eksenine dik bir düzlem üzerinde ve her bir eşleşmiş baz çifti birbiri üzerine istiflenmiş gibi yer alır. Böyle bir istiflenme ise eşleşmiş bazların kuvvetli van der Waals etkileşimleri yapmalarını sağlar. Ayrıca, sarmalda yer alan iki zincir birbirine göre antiparalel olarak yönelmişlerdir. Böyle bir konumda her iki zincir çok sayıda pürin/pirimidin bazları arasındaki hidrojen bağları ile bir arada tutulur. Bütün bu gözlemler ayrıca, lifler halindeki DNA moleküllerinin düzenli bir 3-boyutlu yapıya sahip olması gerektiğini göstermiştir (47).

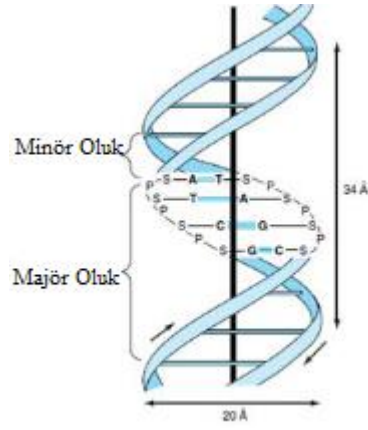


Şekil 8. DNA molekülünün ikincil yapısının 3 boyutlu gösterimi (51)

Hücresel DNA hücre içinde yerleşmek için çok sıkı olarak yoğun bir yapı içinde olmalıdır. Bu yoğun yapılanma, fazla miktarda yapısal bir organizasyonu ifade etmektedir. Çemberimsi DNA moleküllerinin bölgesel çift zincirli ikincil yapıları üzerindeki yüksek derecede katlanmalarla oluşturdukları süpersarmal yapılar molekülün üçüncül yapısı olarak tanımlanmaktadır (47).

4.2.1. DNA'nın Özellikleri

İki uzun polinükleotit zinciri, bir merkez eksen etrafında kıvrılarak, sağ-el iki sarmal yapısı oluşur. İki zincir birbirine antiparaleldirler; yani, iki zincirin 5' ucundan 3' ucuna doğru olan yönleri birbirine göre terstir. Sarmalın eksen etrafında bir zincirin tam dönüşü 10 baz ile olur ve bu uzunluk 34 Å (3.4 nm) kadardır. DNA'nın herhangi bir bölümünde, eksen üzerinde sıra ile geniş olan majör (büyük) oluklar ve daha dar olan minör (küçük) oluklar (Şekil 9) yer alır (48).



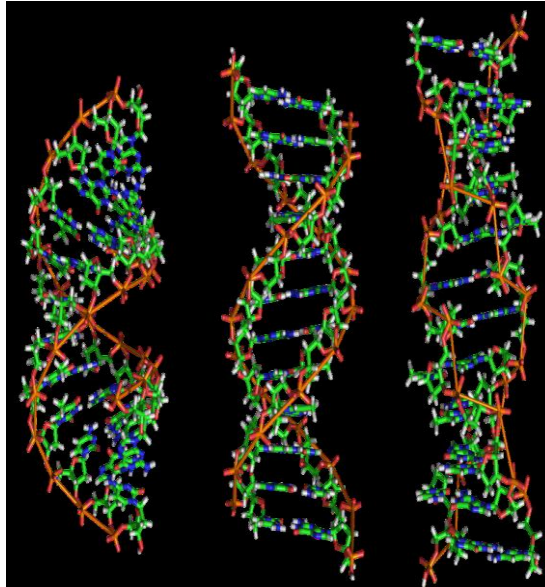
Şekil 9. DNA molekülünün minör ve majör olukları

Prokaryotlarda DNA çift sarmalı oldukça büyük bir bobin gibi bir şekilde düzenlenmiş çemberimsi bir yapıda bulunur. Ökaryotlarda ise DNA sarmalı uzun iplikçiklerin oluşturduğu sıkı bir yığın halinde bulunur ki bu bazı proteinlerle beraber hücre nükleusunun kromozomlarını oluşturur.

DNA sarmalındaki en önemli noktalardan birisi de hidrojen bağları ile eşleşen zincirlerin birbirlerini tamamlayıcı olmasıdır. Adenin sadece timin ile ve sitozin sadece guanin ile hidrojen bağı yapabileceğinden zincirlerden birindeki baz sırası sarmaldaki tamamlayıcı zincirin sırasını belirleyecektir. DNA molekülündeki bazların hidrojen etkileşimleri ile bağ yapması hayatın devamlılığı için oldukça önemlidir. Hidrojen bağları kovalent bağlardan zayıftır ve bu nedenle hidrojen bağları kopup tekrar oluşabilir, bundan dolayı DNA iki zinciri sıcaklık ve mekanik güç ile birbirinden ayrılabilir. Böylece DNA'nın replikasyonuna ve protein sentezine imkan sağlanmış olmaktadır (49).

İki zincirli polinükleotid sarmallarının üç farklı konformasyona sahip olabileceği gözlenmiş ve DNA çift sarmalı için bu konformasyonlar; A–DNA, B–DNA ve Z–DNA

olarak adlandırılmıştır. Her bir konformasyon iki tane antiparalel polinükleotid zincirinin Watson-Crick hidrojen bağlarıyla birbirlerine bağlanması sonucu oluşur, fakat heliks şekilleri farklıdır. B-DNA formu DNA'nın fizyolojik koşullar altında en kararlı halde bulunduğu formdur. Bu nedenle, DNA özelliklerinin çalışılması esnasında bu form standart başlangıç noktası olarak kabul edilir. Su molekülleri uzaklaştırıldığında daha baskın olan A formu, sağ-el durumundaki çift sarmal yapısında düzenlenmiştir. (50). Belirli bir molekülde A formu, B formuna göre daha kısa ve daha geniş çaplıdır. A formunda geniş oluk, daha derin olması ve fosfat gruplarının uçta asılı olması sebebiyle daha az ulaşılabilir. Sonuç olarak bireysel bazlar bu olukta daha derine gömülüdür. Ancak dar oluk tam belli değildir (51).



Şekil 10. DNA molekülünün A-DNA, B-DNA, Z-DNA formları (53)

Z-DNA in vitro koşullarda, Z-DNA çift sarmalının daha ince olan yapısı içinde sıkışan nükleotitler arasındaki artan elektrostatik itmeye karşı koymak için yüksek tuz konsantrasyonunun kullanıldığı alışlagelmemiş koşullarda keşfedilmiştir. Z-DNA'nın in vivo koşullardaki varlığı hakkında bilgiler sınırlıdır. Z-form diğer formlar ile karşılaştırıldığında daha ince yapıdadır ve sol el durumunda çift sarmala sahiptir.

Tablo 1. DNA çift sarmalının yapısal şekillerine ait bazı özellikler

Özellikler	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
Sarmal Dönüş Yönü	Sağ	Sağ	Sol
Dönüş Başına Dönme Açısı	11	10	12
Baz Başına Dönme Açısı	33°	36°	-30°
Sarmal Eksenine Göre Eğiklik	20°	6°	7°
Büyük Çukur	Dar ve Derin	Geniş ve Derin	Düz
Küçük Çukur	Geniş ve Sığ	Dar ve Derin	Dar ve Derin
Bulunma Yeri	DNA-RNA hibritleri ve RNA-RNA çift sarmalı	DNA'nın hücre içi şekli	Ard arda gelen pürin-pirimidin bazlarının oluşturduğu dizilişlerde

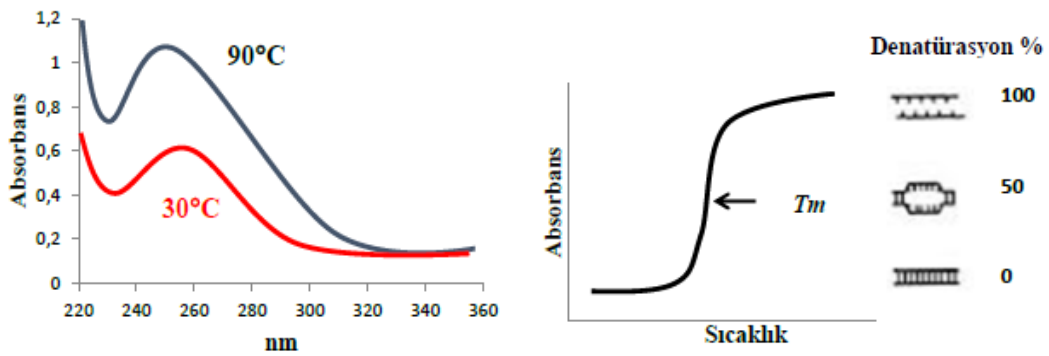
DNA, molekül ağırlığı çok yüksek olduğundan molekül ağırlığından bahsetmek zordur bu yüzden ortalama molekül ağırlığından söz edilebilir. Ortalama molekül ağırlık, DNA'nın içerdiği GC ve AT baz çiftlerinin yüzdesine ya da içermiş olduğu baz çifti sayısına göre hesaplanmaktadır. DNA'yı oluşturan bir çift nükleotidin ortalama molekül ağırlığı 660 Dalton'dur (1 Dalton = 1 g/mol). Çift sarmallı bir DNA molekülünün ortalama ağırlığı ise; içerdiği baz çifti sayısı ile baz çiftinin ortalama ağırlığı (660 Da = 660 g/mol) çarpılarak bulunur (52).

DNA, UV ışığını bazlarının konjuge aromatik yapılarına bağlı olarak soğurmaktadır. DNA'nın maksimum absorbans verdiği dalga boyu 260 nm'dir. DNA'nın absorpsiyon özellikleri; teşhiste, miktar tayininde ve saflığının değerlendirilmesinde kullanılabilir (53). DNA bazlarının λ_{max} 'ı sabit olsa da, bazlarının ekstinksiyon katsayısı (ϵ =absorpsiyon katsayısı) ortama bağlıdır. 260 nm'deki (A_{260}) absorbans, izole edilmiş nükleotitler için en büyük, tek iplikli DNA (ssDNA) için orta, çift iplikli DNA (dsDNA) için ise en küçüktür. Bu etki hidrofobik bir çevrede bazların yığılması ile fıkse edilmesinden kaynaklanmaktadır. Absorbansı bu değişikliği için kullanılan klasik terim hipokromisitedir, yani dsDNA, ssDNA'ya göre hipokromiktir. Alternatif olarak ssDNA, dsDNA ile karşılaştırıldığında hiperkromiktir denilebilir (53).

DNA'nın saflığını belirlemek için; tek iplikli DNA preparasyonlarının yaklaşık saflığı 260 ve 280 nm'deki absorbanslarının oranı ile (A_{260}/A_{280}) belirlemek mümkündür. Absorbsiyon spektrumunun şekli aynı zamanda ekstinksiyon katsayısı, bazların doğası ile değişiklik arz eder. Şöyle ki, saf dsDNA için $A_{260}/A_{280}=1,8$ dir. DNA örneğinde bu değer 1,8'den büyük ise, RNA kontaminasyonunu ve 1,8 den küçük ise protein kontaminasyonunu işaret eder (51).

Çift sarmalın iki zinciri, çiftleşmiş bazların arasındaki hidrojen bağları kırıldığında birbirinden ayrılır. DNA sıvısının pH'sının değiştirilmesi veya ısıtılması bu bağların kırılmasına sebep olabilir. DNA çift sarmalının bozulması durumuna denatürasyon adı verilmektedir. Denatürasyon işlemli çift iplikli yapının tek iplikli yapıya dönüşümündeki absorbans artışı ile rahatlıkla görülebilir. Çünkü yapı tek zincirli olduğunda ışığın ortamda bulunan bazlara daha kolay ulaşması mümkün olmaktadır ve bu durumda absorbans artışı ortaya çıkarmaktadır.

Şekil 11'de erime eğrisinin farklı bölgelerinde DNA molekülünün durumu gösterilmektedir. Artış başlamadan önce, molekül tümü ile çift sarmaldır. Artış bölgesinde, molekülün çeşitli kısımlarındaki baz çiftleri ayrılmaktadır. Ayrılan baz çifti sayısı, sıcaklık artışı ile artmaktadır. Erime geçişini tanımlamak için kullanılan uygun bir parametre, 260 nm'deki absorbans artışının yarısının tamamlandığı sıcaklıktır. Bu sıcaklık, erime sıcaklığı (T_m) olarak adlandırılmaktadır. T_m , sarmalın kararlılığı konusunda önemli bir ölçüm parametresi sağlar. Çünkü, T_m Guanin-Sitozin (G, C) baz çifti oranına bağlıdır. DNA molekülü ne kadar çok GC baz çiftine sahipse iki ipliğin ayrılması için gereken enerji de o denli fazla olmaktadır. T_m , GC içeriğinin her %1'lik artışında yaklaşık olarak 0.4 °C artmaktadır (54).



Şekil 11. DNA'nın denatürasyonu (53)

4.2.2. DNA ile Moleküllerin Etkileşimleri

Genetik bilginin taşıyıcısı olan DNA, hücre büyümesi ve bölünmesinde ana basamak olan DNA replikasyonu ve transkripsiyonuna engel olabilme yeteneklerinden dolayı ilaç etkileşimlerinin ana hedefidir (55). Bazı kanser, viral ve paraziter hastalıklara karşı kemoterapinin ve ilaç geliştirmenin en önemli yollarından biri de nükleik asitlerle geri dönüşümlü olarak etkileşen maddeler bulmayı gerektirir (56).

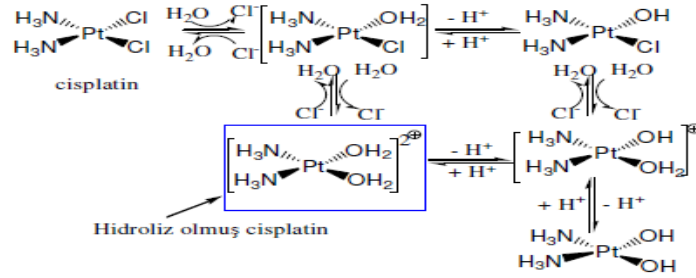
1961 yılında Lerman tarafından yapılan çalışmada düzlemsel ve aromatik bir molekül olan akrinin DNA baz çiftleri arasına yerleştiği görülmüştür (57). Rosenberg ve arkadaşları ise; Peyrone tarafından sentezlenen cisplatinin (58) DNA üzerine etki gösterip göstermediğini araştırmıştır (59). Yapılan çalışmalar sonucunda cisplatinin DNA'ya kovalent bağlandığını ve tümörleri yok ettiği belirlenmiştir. Böylece, DNA ile moleküllerin etkileşimleri çok ilgi çekici bir konu haline gelmiştir.

DNA ile moleküller kovalent ya da kovalent olmayan (elektrostatik etkileşim, oluğa bağlanma, interkalasyon) etkileşimlerle bağlanma gerçekleştirir. Bu bağlanmalar, DNA ile moleküllerin arasındaki ilişki, nükleik asit bağlanma özgülüğü, ligand indüklü konformasyonel değişimler, bağlanmadaki kooperativitenin moleküler temelleri, aminoasit yan zincirlerinin nükleik asitlerle olan etkileşimleri ve diğer nükleik asit etkileşimlerinin ve kimyasının kritik özellikleri hakkında bilgi sağlamıştır (56). DNA ile moleküllerin etkileşim türlerinin belirlenmesinde UV-Vis absorpsiyon titrasyon yöntemi, agaroz jel elektroforez, floresans spektroskopisi, voltametri, termal denatürasyon ve vizkozimetri gibi yöntemler kullanılmaktadır.

4.2.2.1. DNA ile Kovalent Bağlanma

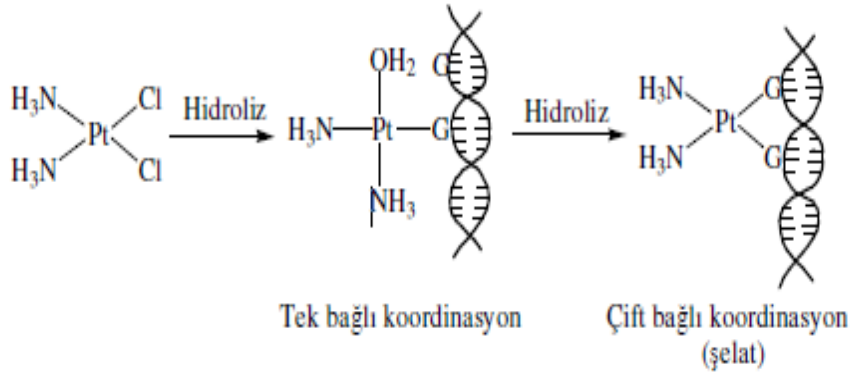
DNA ile kovalent etkileşimler tersinmezdir. Yani DNA proseslerinin tamamen inhibe olmasına, ardından da hücre ölümüne neden olur. Kovalent bağlanma aktivitesi gösteren moleküllerin bir diğer büyük avantajı ise bağlanma kuvvetlerinin çok yüksek olmasıdır. Bu yüksek bağlanma afinitesi sayesinde DNA'ya bağlanan molekül DNA omurgasında bozulmalara neden olur böylece transkripsiyon ve replikasyon proseslerini etkiler (60). Kovalent bağlanma yaptığı bilinen cisplatin (*cis*-diamindikloroplatin(II), *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂]), akciğer, mesane ve yumurtalık kanserinin tedavisinde kullanılmaktadır. Bağlanma, cisplatinin DNA'daki iki komşu guanin bazının N(7) azot atomları ile kovalent bağ oluşturması şeklinde gerçekleşir (61, 62). Öncelikle hücre

duvarını geçen cisplatin sitoplazma içerisine yerleşir. Hücre içerisindeki Cl^- derişimi düşük olduğundan sulu çözeltide kararlı olmayan cisplatin kolayca iki Cl^- ligandı, H_2O ligantlarıyla yer değıştirmesi sonucu hidroliz olur. Oluşan katyonik kompleks $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ dir ve DNA tarafından kolaylıkla elektrostatik olarak çekilir. Şekil 12’de cisplatinin öngörülen mekanizmasını görebilirsiniz.



Şekil 12. Cisplatinin öngörülen etki mekanizması (62)

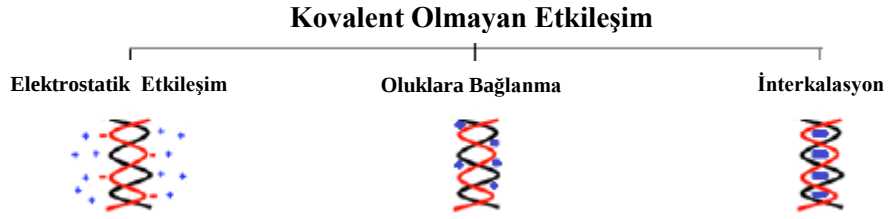
Bu şekilde oluşan katyonik yapı DNA’ya iyice yaklaşır ve ilk olarak guanin veya nadiren de adenin bazının N7 atomuna tek bağla koordine olur. Daha sonra, ikinci bir koordinasyon bağı oluşturarak yakınındaki bir başka guaninin ya da adenin bazının N7 atomu ile tepkimeye girer. Şekil 13’da bu koordinasyonu görebilirsiniz (63).



Şekil 13. Cisplatinin DNA ile koordinasyonu (62)

4.2.2.2. DNA ile Kovalent Olmayan Bağlanma

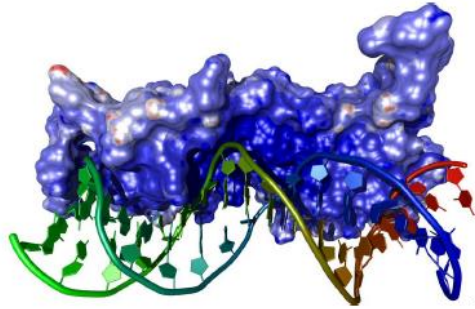
DNA ile moleküller kovalent olmayan etkileşimlerle 3 farklı şekilde bağlanma gerçekleştirir. Bunlar elektrostatik etkileşimler, oluğa bağlanma etkileşimleri ve interkalasyon olarak üç sınıfta incelenmektedir (64). Bu etkileşimler moleküllerin geometrisine, büyüklüğüne ve stereokimyasal özelliklerine bağlıdır (62).



Şekil 14. DNA ile kovalent olmayan etkileşimler (62)

4.2.2.2.1. Elektrostatik Etkileşimler

DNA, her fosfat grubunda bir negatif yükün bulunduğu yüksek derecede yüklü polielektrolittir. DNA hücre içi ortamda katyonlarla kuvvetlice etkileşebilirler ve ilaçların biyolojik aktifliklerinde önemli rol oynar (65). DNA çift sarmalının dış yüzey omurgasında şeker-fosfat gruplarının bulunmasından dolayı Na^+ , Mg^{2+} gibi pozitif yüklü metal iyonlarıyla etkileşimler burada gerçekleşir. Katyonların DNA ile etkileşmesi sonucu fosfat grupları nötr hale gelir ve karşıt iyonlar serbest kalır. DNA polianyonu ile pozitif yüklenmiş karşı iyonun birleşmesinin DNA konformasyonu ve stabilizesi üzerinde önemli bir etkisi vardır.



Şekil 15. DNA ile moleküllerin elektrostatik bağlanma modeli (51)

4.2.2.2.2. Oluğa Bağlanma Etkileşimi

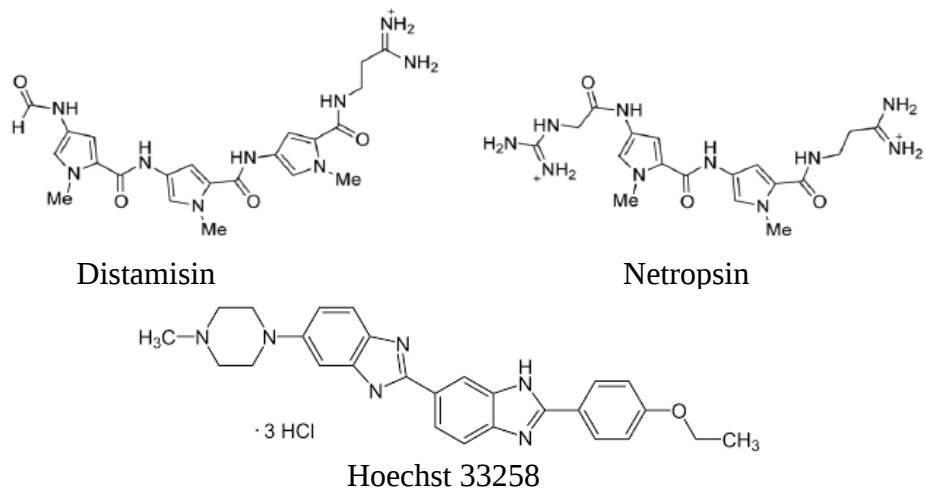
Oluğa bağlanma etkileşimleri, DNA'nın majör veya minör oluklarının birinde yer alan baz çiftlerinin oluğa bakan yüzeydeki fonksiyonel grupları ile diğer moleküllerin doğrudan etkileşimi şeklinde gerçekleşir. Oluğa bağlanma etkileşimini gösteren moleküller genellikle uzun ve hilal şeklindeki bir yapıya sahip olup, majör ve minör oluklardaki bazlar ile etkileşime girer. DNA bazları ile oluğa bağlanan moleküller arasında hidrojen bağları ya da van der Waals etkileşimleri olduğundan DNA'da büyük konformasyonel değişimlere yol açmaz Oluğa bağlanma, DNA-molekül bağlanması anahtar-kilit modeline benzer bir yapıyla tanımlanabilir. Belirgin bir biçimde, küçük

oluğa bağlanan moleküller dönebilme özelliğine sahip bağlarla bağlanmış pirol, furan veya benzen gibi çeşitli aromatik halkalara sahiptirler. Bu durum uygun bir bükülme ile bileşiklerin, suyun oluktan çıkarılmasının ardından küçük oluğun kavisine girebilmesini sağlar. Oluklara bağlanan moleküller, Adenin-Timin (A-T) bölgelerinin Guanin-Sitozin (G-C) bölgelerinden daha dar olmasından dolayı daha az sterik engel ve daha fazla elektrostatik potansiyele sahip olacağından ötürü Adenin ve Timin seçiciliği göstermektedir (65).



Şekil 16. DNA ile moleküllerin majör ve minör oluklara bağlanması (51)

DNA boşluklarına bağlanan ilaçlar gibi küçük moleküller genelde minör oluklar üzerinden etkileşime girerken, oligonükleotitler ve proteinler gibi büyük moleküller ise majör oluklar üzerinden DNA'ya bağlanmaktadır (66). Distamisin, netropsin ve Hoechst 33258 gibi ilaçlar minör oluklara bağlanma gösteren ilaçlardır (67).

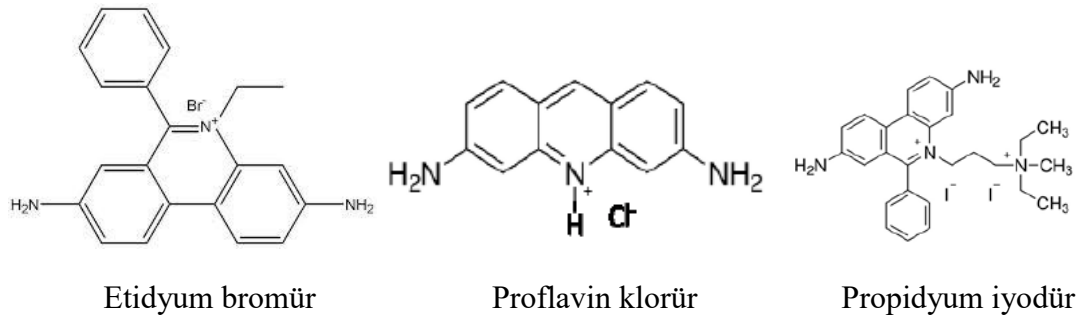


Şekil 17. Minör oluğa bağlanma gösteren ilaçlar

4.2.2.2.3. İnterkalasyon Etkileşimleri

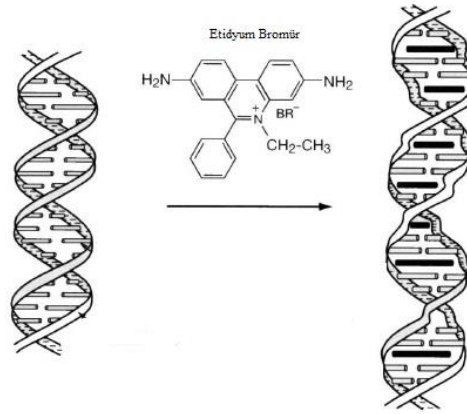
1960'ların başında Lerman, akridin grubu boyalar varlığında DNA'nın etkileşimleri üzerine bir takım çalışmalar gerçekleştirdi ve "interkalasyon" olarak adlandırdıkları bir süreçle aromatik moleküllerin DNA'ya dik bir şekilde girerek kovalent olmayan bağlar ile etkileşebileceğini açıkladı (68, 69). İnterkalasyon sürecinde, aromatik bileşiğin DNA bazlarının arasındaki boşluğa uyması için şeker-fosfat omurgasında değişiklikler meydana gelir. Bu durum sonucunda interkalasyon bölgesinin oluşumu, interkalasyon bölgesindeki helikal dönmenin azalması ve çift sarmalın uzaması ile DNA baz çiftlerinin ayrılmasına neden olmaktadır (69).

Klasik interkalatörler DNA baz çiftinin arasına doğru pozisyonda yerleşebilen çoklu aromatik halkalardır. Tipik örnekleri proflavin klorür içeren akridinyum tuzları ve fenantridinum tuzları, etidyumbromür ve propidyum iyodürdür.



Şekil 18. İnterkalasyon yapan ajanlar

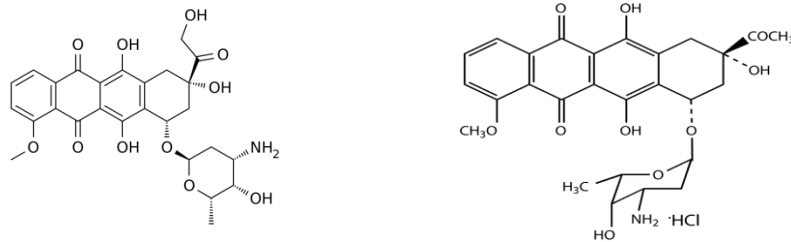
Etidyum bromür aromatik düzlemsel bir molekül olup, nükleik asit sentezini inhibe edecek şekilde DNA ile güçlü interkalasyon oluşturmaktadır (70, 71). Etidyum bromür tek başına zayıf floresans özellik göstermesine rağmen, DNA ile etkileştiğinde floresans spektrumunda 610 nm civarında oldukça şiddetli emisyon gösterir. Agaroz jel elektroforezi gibi laboratuvar tekniklerinde DNA bazlarının arasına yerleşerek DNA'nın görüntülenmesinde boyar madde olarak kullanılmaktadır (62).



Şekil 19. Etidyum bromürün interkalasyonu

Proflavin klorür ve propidyum iyodürün interkalasyonu küçük oluklarda gerçekleşir. İnterkalasyonun meydana gelmesi için, baz çiftleri arasına giren düzlemsel ligand için kavite oluşturmak üzere DNA baz çifti 3.4 Å ayrılır. B- formu DNA'nın normal bir dönüşü 36°'dir ve ligandı oluğa sığdırmak için bu dönmede azalma meydana gelir (72).

Yapılarında birbirine birleşmiş dört halkadan oluşan bir aglikon grubu ve bir amino şeker grubu bulunan adriamisin ve daunomisin klinik olarak kanser tedavisinde kullanılan interkalatif ajanlardır (73). Bu iki bileşiğin kanser tedavisinde geçerliliğinin kanıtlanmasına rağmen kardiyotoksisite gibi önemli bir yan etkisi bulunması kullanımını sınırlamaktadır.



Şekil 20. Adriamisin ve Daunomisin ilaçlarının yapıları

4.2.2.3. DNA Kesim

DNA kesim tüm yaşayan sistemler için gerekli bir enzimatik reaksiyon olarak kabul edilmektedir. DNA'nın tek ya da çift zincirini keserek replikasyonda ve transkripsiyonda oluşan DNA problemlerini ortadan kaldıran topoizomerez enzimleri buna örnek gösterilebilir. Ayrıca virüs enfeksiyonlarına karşı hücreyi koruyan restriksiyon enzimlerinin de yabancı DNA'yı kesme (74) veya etkilenmiş hücrenin

apoptozisi (programlanmış hücre ölümü) (75) sırasında DNA'nın degrade olması bir başka örnek olarak verilebilir (51).

Biyoteknoloji ve ilaç sanayinde yapay kimyasal nükleazların geliştirilmesi son derece önemlidir. Seçici DNA nükleazlarının tasarlanması antikanser ajanların ve antimikrobiyal ilaçların geliştirilmesinde son derece önemlidir (76, 77). Bunun yanı sıra DNA çalışmaları için yapay nükleazlar araştırmacılar için önemli bir ışık tutacaktır. Bundan dolayı geçiş metal kompleksleri yapısal zenginliği ve reaktivitesi nedeniyle son yıllarda yapay nükleaz tasarımı için dikkat çekici bir rol almaktadır. Örneğin DNA-protein etkileşimlerinin detaylı bir şekilde çalışılması için gerekli olan DNA-parmak izi deneyleri için 1,10-fenantrolinin bir bakır kompleksi kullanılmaktadır (78). Geçiş metal kompleksleri çok çeşitli yapısal özellikleri ve kontrol edilebilir redoks potansiyellere sahip olduğundan dolayı yapay nükleaz uygulamaları için uygundur. Ayrıca ligandlar metalloproteinlerdeki aktif gruplara benzer şekilde biyolojik gruplar ve metal iyonları olacak şekilde tasarlanabilir. DNA kesmenin etkinliği, metal bileşiğin DNA'ya ilgisini arttırarak genişletilebilir. Bu iş için uygun olan koordinasyon bileşiklerinin DNA'ya bağlanabilen bir gruba sahip olması gerekir. Böylelikle metal bileşiğin DNA'ya odaklanma yeteneği arttırılabilir (79).

DNA'yı kesim mekanizması oksidatif, hidrolitik ve fotokimyasal kesim olabilir. Oksidatif kesim şeker veya nükleobazlarda meydana gelirken hidrolitik kesim DNA'nın fosfodiester bağından meydana gelir. Fotokimyasal kesim ise temel olarak oksidatif kesime benzer bir mekanizmaya sahip olmasına rağmen tek farkı nükleaz aktivitesi için ışığın kullanılmasıdır.

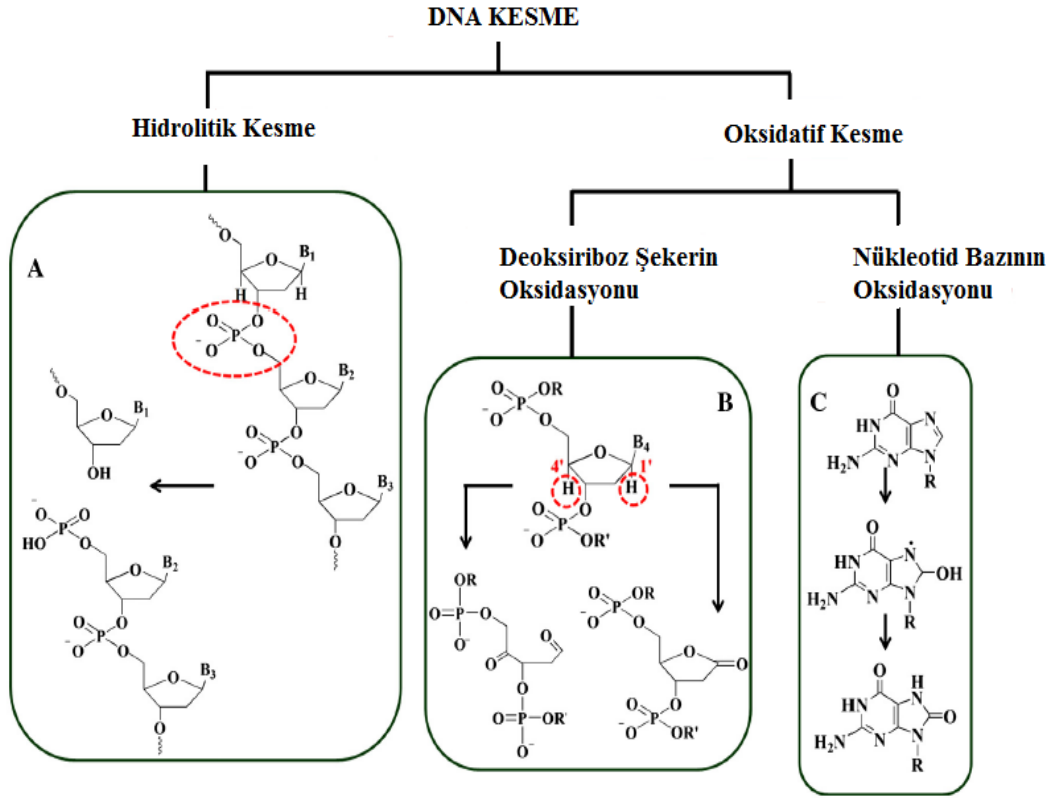
$[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}$ veya $[\text{Cu}(\text{Phen})\text{CHL}_2]$ gibi redoks aktif metal kompleksleri ile tekli veya çift sarmal oksidatif DNA kesmesi hidroksil radikali veya singlet oksijen türleri gibi reaktif oksijen türlerinin oluşmasıyla başlar ve Fenton tipi mekanizma ile yürür. Bu serbest radikallerin şeker hidrojenlerini ayırarak DNA kesmesini başlatır ve DNA kesme ürünleri oluşur. Gerçekte DNA şekerinden çıkarılan hidrojenin yeri kullanılan aktif metallonükleaza bağlıdır. Bu tip metallonükleazlar, DNA'nın seçici olarak tanınması ve DNA parmak izi ajanları gibi uygulamalarda kullanılabilir (80).

DNA'nın omurgası fosfodiester bağlarıyla olduğundan dolayı DNA'nın hidrolizi çok önemli bir enzimatik reaksiyondur. Ancak DNA'nın hidrolize olan olağanüstü

kararlılığı nedeniyle bu reaksiyon oldukça zordur. Fosfodiester bağlarını hidroliz eden enzimlerin aktif bölgelerinde çoğunlukla Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} ve Fe^{2+} gibi katalitik metal iyonları bulunur. Bu yüzden metal kompleksleri fosfodiester bağının kesilmesi için uygun bir araçtır (81).

Fotokimyasal kesim, nükleaz aktivitesi için ışığın kullanımına izin verilmesidir. Görünür ya da UV ışın kullanılarak aktiveleştirilen nükleazlar transkripsiyon, foto DNA-parmak izi gibi proseslerde kullanılabilir. Ayrıca fotoduyarlayıcı özelliğe sahip ilaçlar antikanser tedavilerde kullanılabilir. DNA'nın fotokesimi reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olur. Reaktif oksijen türlerin üretimi içeren 2 mekanizma vardır: Tip I ve Tip II. Tip I'de radikal oluşumu; Tip II'de singlet oluşumu esas alınır (82).

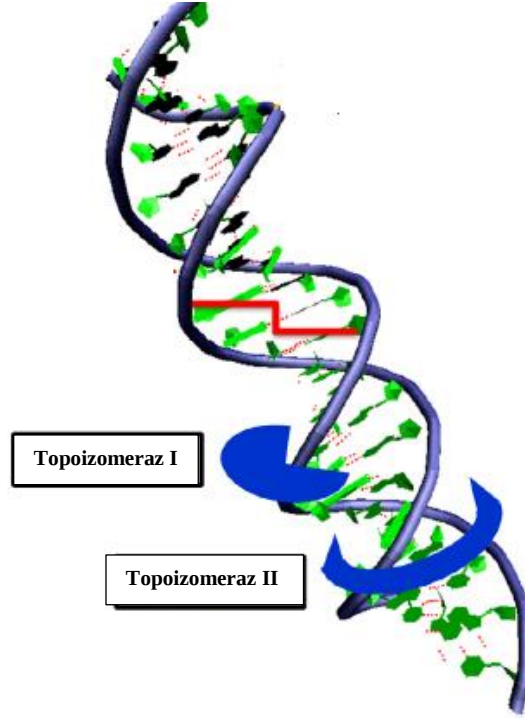
Çift zincirli DNA'nın fosfodiester bağının hidrolizi ile yürüyen hidrolitik kesim, deoksiriboz şeker kısmından veya guanin bazından meydana gelen oksidatif DNA kesim ile karşılaştırıldığında hücre açısından avantajlıdır. Oksidatif kesim singlet oksijen (1O_2), süperoksit (O_2^-) veya hidroksil radikali ($HO^\cdot$) gibi aktif türler meydana getirir. Bu türler şeker ve/veya baza zarar vererek parçalanmış türler oluşmasına neden olurlar. Buna karşılık başka maddeler ilave edilmediği zaman meydana gelen hidrolitik kesimin bu tip olumsuz yan etkileri yoktur. Çünkü kesim ürünleri enzimatik prosesle bertaraf edilebilir (60).



Şekil 21. Hidrolitik ve Oksidatif kesimin gösterimi (82)

4.3. Topoizomerazlar

Topoizomerazlar DNA'nın replikasyonunda, transkripsiyonunda, kromozom segresyonunda ve rekombinasyonunda önemli rol oynayan enzimlerdir. Topoizomerazlar, hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunmaktadır. 2 tip topoizomeraz bulunmaktadır. Topoizomeraz I (EC 5.99.1.2.) DNA çift sarmalının bir zincirini geri dönüşümlü olarak keser. Topoizomeraz I hem nükleaz (zincir kesen) hem de ligaz (zincir birleştiren) aktiviteye sahiptir. ATP gereksinimleri bulunmaz; daha çok kırıkları fosfodiester bağlarının enerjisini depolayarak, aynı enerji kaynağıyla zincir birleştirici etkinlikler gösterirler. Topoizomeraz II (EC 5.99.1.3.) ise DNA çift sarmalının her iki zincirini de kesmektedir. Enzim daha sonra ikinci bir DNA uzantısının bu kırılma noktasından geçmesini sağlar ve sonra kırılma noktasını yeniden kapatırlar. ATP'ye ihtiyaç duyulmaktadır. Hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda, kromozomal replikasyon sonrasında iç içe geçmiş DNA moleküllerinin ayrıştırılması için bu enzimler gereklidir (83-86).

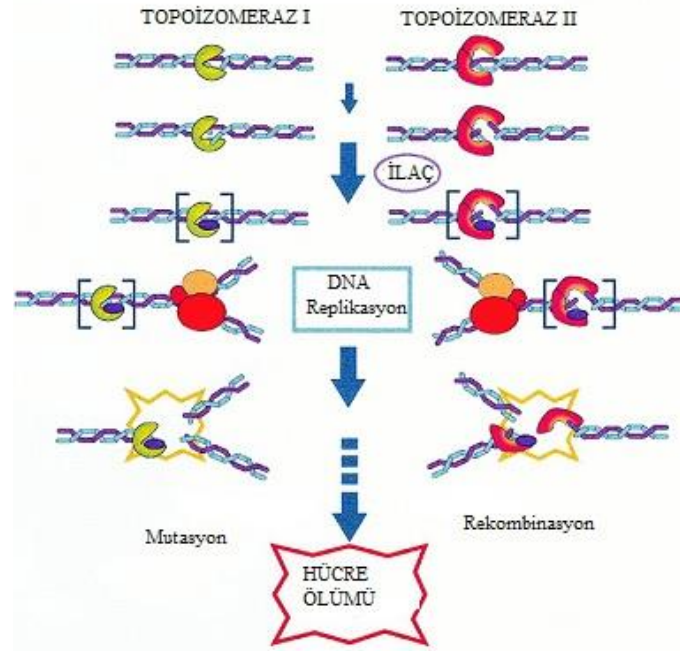


Şekil 22. DNA çift sarmalının üzerinde topoizomerez I ve II enzimlerinin gösterimi (85)

Son yıllardaki farmakolojik çalışmalar, genellikle DNA küçük oluğundaki özgül dizilere bağlanarak antitümör aktivite gösteren ilaçların, DNA topoizomerez enzimlerini inhibe ederek de etkili olduğunu göstermiştir. Topoizomerez aktivitesini inhibe eden mekanizmalar iki sınıfta incelenir. Birincisi; topoizomerez zehirleri, ikincisi; katalitik inhibitörlerdir. Topoizomerez zehirleri, DNA-topoizomerez enzim kompleksini stabilize eder ve DNA’da oluşan kırığın tekrar birleşmesini engeller. Bu bileşikler, hücrelerde tek ya da çift zincir kırıklarını taşıyan DNA parçacıklarının birikmesine neden olur ve buna bağlı olarak hücre ölümü gerçekleşir. Topoizomerezların katalitik inhibitörleri ise DNA’ya bağlanarak veya topoizomerezlara bağlanarak enzimin DNA’ya bağlanmasını engelleyebildikleri gibi topoizomerez katalitik döngüsündeki basamakların herhangi birini durdurarak DNA’da meydana gelen süper kıvrılmaların, düğümlerin ya da karışıklıkların çözülmesini önleyerek mitotik ve mayotik başarısızlıklara neden olurlar. Katalitik döngü sırasında ATP’nin bağlanması veya serbest bırakılmasını engelleyen maddeler katalitik inhibitörler arasında yer almaktadır (87, 88).

Topoizomerez I ve II enzimleri klinikte kullanılan kemoterapötik ajanların moleküler hedefleridir. Klinikte kullanılan topoizomerez I inhibitörleri kamptotesin,

irinotekan, topatekan gibi bileşikler iken, topoizomeraz II inhibitörü olarak kullanılan bileşikler adriamisin, etopozit, elliptisin ve tenipozitdir (89, 90).



Şekil 23. Topoizomeraz I ve II enzimlerinin inhibisyonu

4.4. Antioksidan Aktivite

Antioksidanlar, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve etkin moleküller olarak tanımlanan serbest radikalleri nötralize ederek oksidasyonunu engelleyen, serbest radikal hasarlarını tamir etmeye yardımcı olan bileşiklerdir (91).

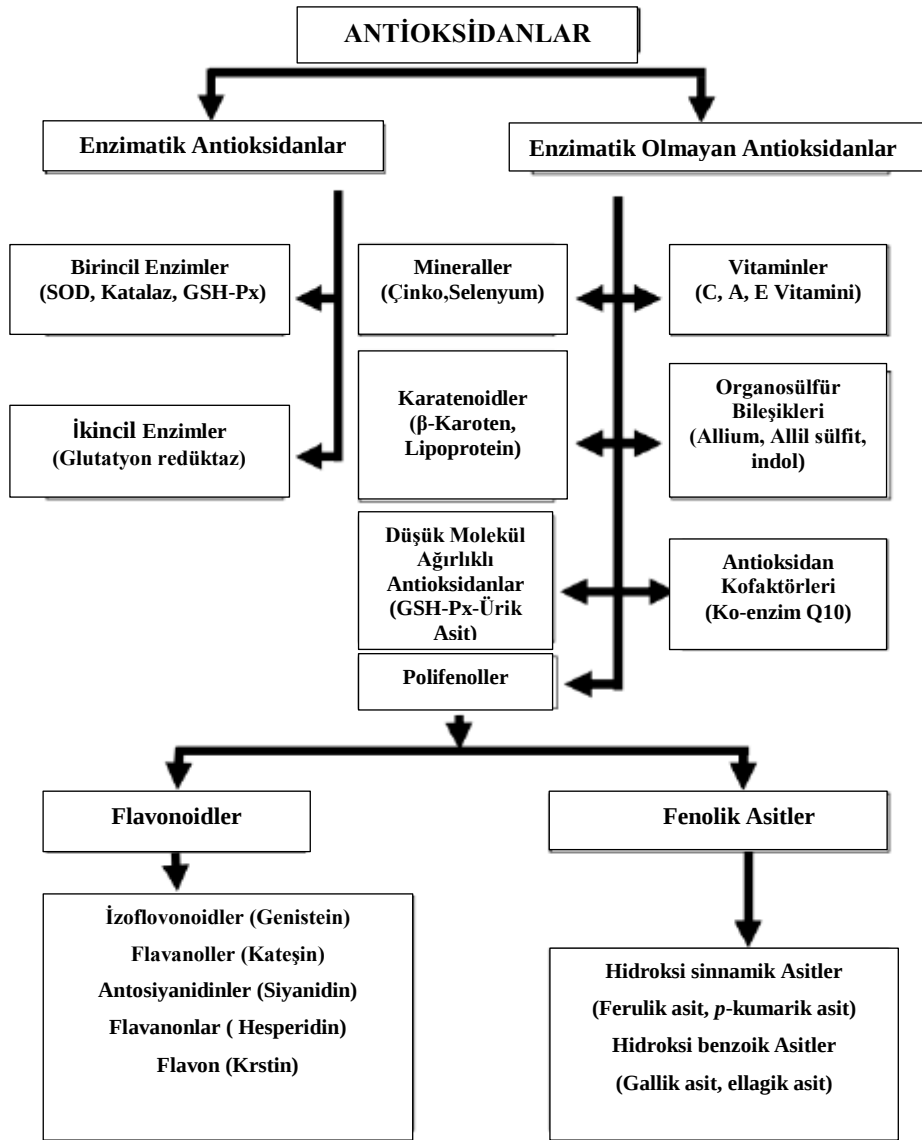
Antioksidanların yokluğunda ve yetersizliğinde oksidatif stres oluşmaktadır. Oksidatif stres, oksidan oluşumu ve antioksidan savunma arasındaki dengenin oksidanlar yönünde bozulması durumudur. Hücrede normal şartlar altında prooksidan ve antioksidanlar dengede bulunmaktadır. Ancak bu denge reaktif oksijen türlerinin üretiminin artması veya antioksidan miktarındaki azalma nedeniyle prooksidanlar yönüne kaymaktadır. Prooksidan yönüne kayması oksidatif stresi oluştururken, oluşan oksidatif stres DNA ve hücre membranları gibi duyarlı biyolojik yapıların oksidatif hasarına neden olan radikalik reaksiyonları başlatır (92). Bunun sonucunda kanser, kalp-damar hastalıkları ve şeker hastalığı gibi hastalıklara yol açar. Doku hasarlarını önlemek için serbest radikallerin giderilmesi önemlidir (93).

Birçok radikal tür olmasına rağmen biyolojik sistemlerde en çok görülen oksijenden oluşan ve genel olarak reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılan radikallerdir. Canlı sistemlerde ROS'un hem yararlı hem de zararlı etkileri vardır. ROS'un yararlı etkileri düşük ve orta konsantrasyonlarda meydana gelir. Örneğin; enfeksiyonlu maddelere karşı savunma etkisi görülürken, enerji üretimi, fagositoz, hücre büyümesinin düzenlenmesi ve hücre içi sinyalizasyonda olumlu bir rol oynar. Diğer bir taraftan ROS; proteinler, lipidler ve DNA gibi temel biyomoleküllere zarar verme yeteneğine sahiptir. Oksijenden üretilen radikaller canlı sistemlerde meydana gelen radikallerin en önemli sınıfını temsil ederler. Reaktif oksijen türleri tanımına giren reaktif türleri Tablo 2'de gösterilmektedir (53).

Tablo 2. Reaktif oksijen türlerinin sınıflandırılması

Serbest Radikaller	Radikal Olmayan Bileşikler
- Atmosferik Oksijen, O_2 (diradikal)	- Hidrojen Peroksit, H_2O_2
- Süperoksit Anyon Radikali, $O_2^{\cdot -}$	- Organik Peroksitler, ROOH
- Hidroksil Radikali, $\cdot OH$	- Lipid Peroksitler, LOOH
- Peroksil Radikalleri, $ROO^{\cdot}$	- Singlet Oksijen, 1O_2

Oksidasyonu önemli derecede engelleyen ve geciktiren maddeler olan antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki sınıfta incelenmektedir. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR) ve glukoz 6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) enzimatik antioksidanlara örnekler iken, enzimatik olmayan antioksidanlar ise; mineraller (Se, Zn), vitaminler (A, C, K ve E), karotenoitler (β -karoten, likopen, lutein, zeaksantin), organosülfür bileşikler (allium, allil sülfid, indoller), düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar (GSH-Px, ürik asit), antioksidan kofaktörler (koenzim Q10) ve polifenoller şeklinde incelenmektedir (94-96).



Şekil 24. Antioksidanların sınıflandırılması (53)

Antioksidanlar etkilerini; serbest radikal oluşumunu engellemesi (başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırıcı etki, oksijeni uzaklaştırıcı veya konsantrasyonu azaltıcı etki) ve oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi (toplayıcı etki, bastırıcı etki, onarıcı etki, zincir kırıcı etki) olmak üzere iki şekilde gösterirler. Antioksidanların vücuttaki aktivitesi, ortamdaki oksijen miktarı, konsantrasyon miktarı, sıcaklık ve substrat çeşidi gibi özelliklere bağlı olarak değişkenlik gösterir (53).

Antioksidan aktivitesini hesaplama yöntemleri iki temel prensibe dayanır. Bunlardan birincisi, ‘Tek Elektron Transferini’ (SET) temel alan analizler, ikincisi ise ‘Hidrojen Atom Transferini’ temel alan analizlerdir.

SET reaksiyon mekanizmasına ait analizler; Antioksidanın, Fe^{3+} gibi bir oksidan tarafından yükseltgenmesi sonucunda bir elektron, antioksidandan oksidana transfer edilir, bu da oksidanın renk değişimine neden olur. UV-Vis ile absorbans değişimi ölçülür. Bu absorbans değişiminin derecesi antioksidan konsantrasyonu ile orantılı olduğundan, antioksidanın indirgeyici kapasitesi tayininde kullanılır. Örnek olarak; troloks eşitliği antioksidan kapasitesi yöntemi (TEAC), demir iyonlarını indirgeme antioksidan kapasitesi (FRAP) ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) yöntemi ve toplam fenolik madde miktarı analizi için Folin-Ciocalteu yöntemidir (97).

HAT reaksiyon mekanizmasına ait analizler; peroksil radikali üretmek üzere bir radikal başlatıcı kullanılır. Eklenen antioksidanlar, radikaller için ortamdaki substrat ile yarışır. Peroksit radikali antioksidandan bir hidrojen atomu alır. Sonuç olarak peroksit radikali ve hedef molekül arasındaki reaksiyon inhibe edilir veya geciktirilir. Örnek olarak; oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC) ve radikal tutuklama antioksidan parametresi (TRAP) yöntemidir (97).

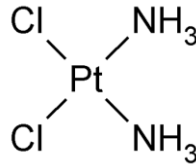
4.5. Antimikrobiyal Aktivite

Antimikrobiyal madde; istenmeyen fakat herhangi bir sebepten dolayı bulunabilen bakteri, küf ve mayaları, her türlü mikroorganizmayı ortamdan yok eden ve çoğalmasını önleyen biyolojik kökenli ikincil metabolitlerdir. Antimikrobiyal maddeler vücut savunması açısından oldukça önemlidir. Antimikrobiyal maddeler mikroorganizmaları 5 farklı mekanizma ile yok etmektedir. Bunlar; hücre duvarı sentezinin inhibisyonu, sitoplazma zarının ve fonksiyonunun bozulması, protein sentezinin inhibisyonu, nükleik asit sentez ve fonksiyonlarının bozulması ve kimyasal yapıdaki benzerliklerden dolayı metabolizmalarının bozulmasıdır. Uygun antimikrobiyal madde seçiminde dikkat edilmesi gereken konular şunlardır; mikroorganizmalar üzerinde az yoğunlukta da sidal etki yapmalı, yan ve toksik etkileri olmamalı, vücutta uzun süre metabolize olmadan etkin formda kalabilmeli, doku enzimleri tarafından inaktive olmamalı, geniş spektrumlu olmalı, kombinasyon durumunda sinergetik etki göstermemeli, ucuz olmalı, kolay bulunmalı ve dayanıklı olmalıdır. Antimikrobiyal aktivite belirlenmesinde kullanılan iki farklı yöntem bulunmaktadır. Bunlardan birincisi Tüp dilüsyon tekniği iken, ikincisi ise disk difüzyon tekniğidir. Tüp dilüsyon tekniğinde antimikrobiyal ilaçların MİK (minimal inhibitör konsantrasyonunu) ve MLK (minimal letal

konsantrasyonlu) değerlerini belirlemede yardımcı olur. Disk difüzyon tekniğinde ise; agar diskler üzerindeki alan çapları ölçümüne dayalı bir analiz uygulanmaktadır (21).

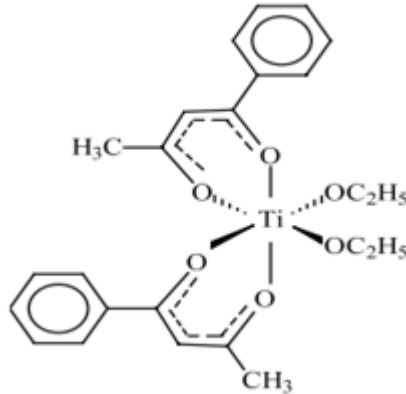
4.6. Literatür Özeti

Metal komplekslerin kanser tedavilerinde kullanımı 1969 yılında cis-diamindikloroplatinyum (II) (cisplatin) (Şekil 25) bileşiğinin bulunmasıyla başlamıştır (98). Platinyum kompleksleri testis, yumurtalık, mesane, baş ve boyun kanserlerine karşı oldukça yüksek etki göstermesine rağmen toksik etkilerinin olması bu komplekslerin klinik uygulamalarda kullanılmasının önünde büyük engel oluşturmaktaydı. Bu sebeple farklı metal kompleksleri arayışları başlamıştır (99, 100).



Şekil 25. Cisplatin'in yapısı (98)

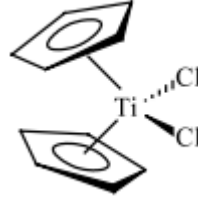
Klinik tedavilerde platinyum kompleksleri dışında ilk olarak cis-[(CH₃CH₂O)₂(bzac)₂Ti(IV)] (Şekil 26) kullanılmış ve kansere karşı iyi bir etki göstermiştir. Aynı şekilde cis-[X₂(bzac)₂Ti(IV)] komplekslerinin de kansere karşı iyi aktivite gösterip düşük toksisite göstermesiyle titanyum komplekslerinin antikanser araştırmalarda kullanılması ilgi çekici hale gelmiştir (15).



Şekil 26. cis-[(CH₃CH₂O)₂(bzac)₂Ti(IV)]'in yapısı (15)

1979 yılında Köpf-Maier ve Köpf metalosen kompleksi olan titanosen diklorürün antikanser özelliklerini yayınlamıştır (101). Bundan sonra Cp₂MX₂ genel formülüne sahip diğer metalosenler sentezlenmiş ve antikanser özellikleri incelenmiştir. Bu

kompleksler Ehrlich asit tümörü, kolon, akciğer kanserlerine karşı iyi etki göstermesinin yanı sıra düşük yan etkiye sahip olması titanyum komplekslerini platinyum komplekslerinden daha popüler hale getirmiştir. Tüm metalosenlerin içinde titanosen diklorür (Cp_2TiCl_2) (Şekil 27) kompleksi kolon, akciğer ve meme kanserine karşı oldukça iyi etkiye sahip olup tıp alanında kullanılan bileşikler haline gelmişlerdir (102, 103).

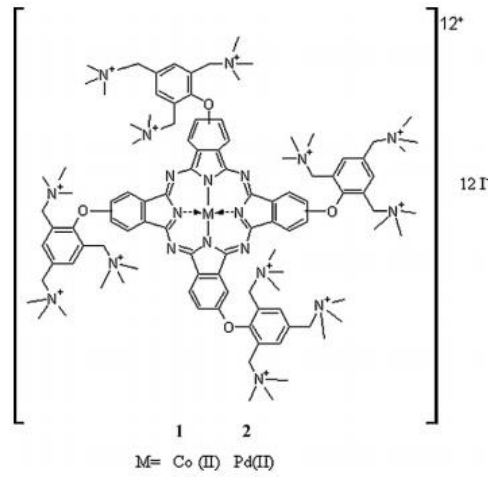


Şekil 27. Titanosen diklorür'ün yapısı (102)

Birçok antikanser ajanın DNA ile etkileşim mekanizmasını anlamak için, biyolojik makromoleküller ile etkileşiminin modunun belirlenmesi açısından çok önemlidir. Bundan dolayı titanosen kompleksinin CT-DNA bağlanma çalışmaları UV-Vis ve floresans spektroskopisiyle gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonunda titanosen komplekslerinin düşük konsantrasyonlarda fosfat grupları ile etkileştiği, yüksek konsantrasyonlarda ise hem fosfat hem de DNA bazları ile etkileştiği belirlenmiştir (15).

İlk sentezlendiği dönemde yalnızca kararlılığı yüksek bir boya olarak kullanılan ftalosiyanın önemi, yeni uygulama alanlarının bulunmasıyla sürekli artmaktadır. Birçok çalışmaya konu olan metalli ve metalsiz ftalosiyanınlar bugün önemli teknolojik sistemlerde kullanılmakta ve gelecekte birçok problemin çözümünde önemli bir anahtar bileşik olarak düşünülmüştür (104). Son yıllarda ise, ftalosiyanın bileşikleri fotoduyarlastıcı ve antioksidan özelliklerinden dolayı tıp ve ilaç sanayinde oldukça ilgi çekici bileşikler haline gelmişlerdir (105, 106).

2011 yılında Burcu Turanlı Yıldız ve arkadaşları CT-DNA ile katyonik kobalt ve paladyum ftalosiyanın bileşiklerinin (Şekil 28) etkileşimini UV/Vis spektrofotometrik metod ve jel elektroforez ile incelenmiştir. Buna ek olarak bileşiklerin ilavesinde CT-DNA'nın termal denatürasyonundaki değişiklikler gözlenmiştir. Elde edilen tüm sonuçlar, bu moleküllerin etkili DNA bağlama aktivitesi gösterdiğini ve biyomedikal alanda kullanılma potansiyeli olduğunu koymuştur (107).



Şekil 28. Katyonik Co (II) ve Pd (II) ftalosiyanin bileşikleri (107)

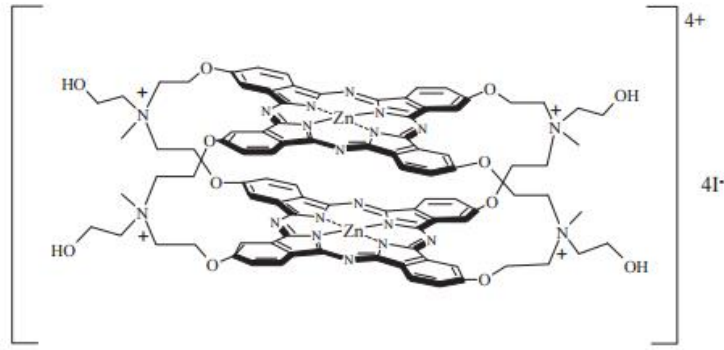
2012 yılında Canan Uslan ve B. Şebnem Sesalan; yeni sentezledikleri bakır(II), kobalt (II) ve çinko (II) hekzametilenimino-etoksi sübtütie ftalosiyanin bileşiklerinin UV/Vis spektrofotometre ve jel elektroforeziyle DNA bağlanma etkileşimlerini incelemiştir. pBR322 DNA'nın fotokesim çalışmaları 600-700 nm'lik diyot lazer yardımıyla gerçekleştirilmiştir. UV/Vis çalışmaları sonucunda bakır (II), kobalt (II) ve çinko (II) bileşiklerinin bağlanma sabitleri (K_b) sırasıyla 1.02×10^5 , 1.1×10^5 ve 1.08×10^5 M^{-1} olarak hesaplanmıştır. Elde edilen tüm veriler ftalosiyanin bileşiklerinin CT-DNA ile elektrostatik olarak etkileştiğini göstermiştir. Sentezlenen ftalosiyanin bileşiklerinin singlet oksijen veriminin yüksek olması hücre ölümüne işaret etmekte olup Tip II mekanizması ile DNA kesimi yaptığını göstermiştir (108).

2013 yılında Didem Evren ve arkadaşları 4-((7-(triflorometil)kinolin-4-il)oksi) sübtütie tetrakatyonik çinko ve metallsiz ftalosiyanin bileşikleri sentezleyerek UV/Vis absorpsiyon spektroskopisi ve floresans spektroskopisi yardımıyla bileşiklerin DNA etkileşimlerini incelemiştir. Bu çalışmalar sonucunda metalli ftalosiyaninlerin, metallsiz ftalosiyaninlere göre daha iyi etkileşime sahip olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra suda çözünür olması ve toksik etkilerinin düşük olması sebebiyle etidyum bromürün yerine kullanılabileceği önerilmiştir (109).

2014 yılında N.C. Lopez Zeballos ve arkadaşları katyonik çinko (II) ftalosiyanin bileşiğinin CT-DNA ile etkileşimini termal denatürasyon, UV/Vis absorpsiyon ve floresans spektroskopisi ile incelemiştir. Bu çalışmada ligandlarda sadece oksijen ve kükürt atomlarının farklı olmasından dolayı elektropozitif atomun bağlanmaya vermiş

olduğu etki araştırılmıştır. Oksijen atomuna sahip olan ftalosiyanin molekülünün daha kuvvetli bir bağlanma gerçekleştirdiği belirlenmiştir (110).

2015 yılında Ebru Yabaş ve arkadaşları ball-type ftalosiyanin bileşiklerini (Şekil 29) sentezlemiş ve antikanser potansiyelinin olup olmadığını araştırılmışlardır. Bu çalışmada CT-DNA ile bileşiğin spektrofotometrik olarak etkileşimi incelenmiştir. Bununla birlikte ftalosiyanin-DNA mekanizmasını anlamak için termodinamik özellikleri termal denatürasyon, elektroforetik ve viskozimetre yöntemlerle araştırılmıştır. Tüm bu çalışmaların sonunda sentezledikleri bileşiğin DNA sarmalının arasına yerleştiğini yani interkalasyon yaptığı belirlenmiştir. Bunun sonucunda sentezlenen ftalosiyanin bileşiğinin fotodinamik terapi için uygun olduğunu kanser tedavilerinde kullanılabilirliği ortaya koyulmuştur (111).



Şekil 29. Ball-tipi ftalosiyanin bileşiği (111)

2009 yılında Li Shuai ve arkadaşları, sentezledikleri ftalosiyanin bileşiklerinin topoizomerez I ve topoizomerez II inhibisyonu üzerine araştırma yapmışlardır. Bu çalışmaların sonucunda sentezledikleri ftalosiyaninlerin antikanser özelliğe sahip olduğunu ortaya koymuşlardır (112).

2009 yılında Guilherme Pires Amaral ve arkadaşları farklı ftalosiyanin bileşiklerinin antioksidan özelliklerini araştırmışlardır. Bu çalışmada ftalosiyanin bileşiklerinin antioksidan özellikleri; lipid peroksidasyon, nitrit oksit süpürme, DPPH radikal süpürme, deoksiriboz bozunma yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaların sonunda kullanılan ftalosiyanin bileşiklerinden mangan ve bakır ftalosiyanin bileşiklerinin dikkate değer antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (113).

2014 yılında Metin Çelebi ve arkadaşları, (2-((2-hidroksietil)(p-tolil)amino)etoksi) ve (2-((2-phenoxyethyl)p-tolil)amino)etoksi)ftalonitril türevli ftalosiyanin bileşikleri sentezleyip antioksidan ve antibakteriyal özelliklerini incelemişlerdir. Bu çalışmada bileşiklerin göstermiş olduğu etkili aktivitelerden dolayı fotodinamik terapi için uygun ajan olabilecekleri belirlenmiştir (114).

Literatürde ftalosiyanin bileşiklerinin farklı metallerinde DNA etkileşim çalışmaları gerçekleştirilmiş olmasına rağmen titanyum metaliyle ilk kez böyle bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu moleküllerin suda çözünür olması, çözücünden gelecek olan toksik etkiyi bertaraf edecek olması çalışmayı daha etkin kılmıştır. Tüm bu bilgiler ışığında, antikanser etkiye sahip olduğu literatür tarafından belirlenmiş olan titanyum metali ile suda çözünür ftalosiyanin moleküllerinin bir araya gelmesi sonucu ortaya çıkan bileşiğin antikanser aktivitenin etkinliğini artıracakı düşünülmüş olup, bu çalışmanın yapılmasına karar verilmiştir.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazlar

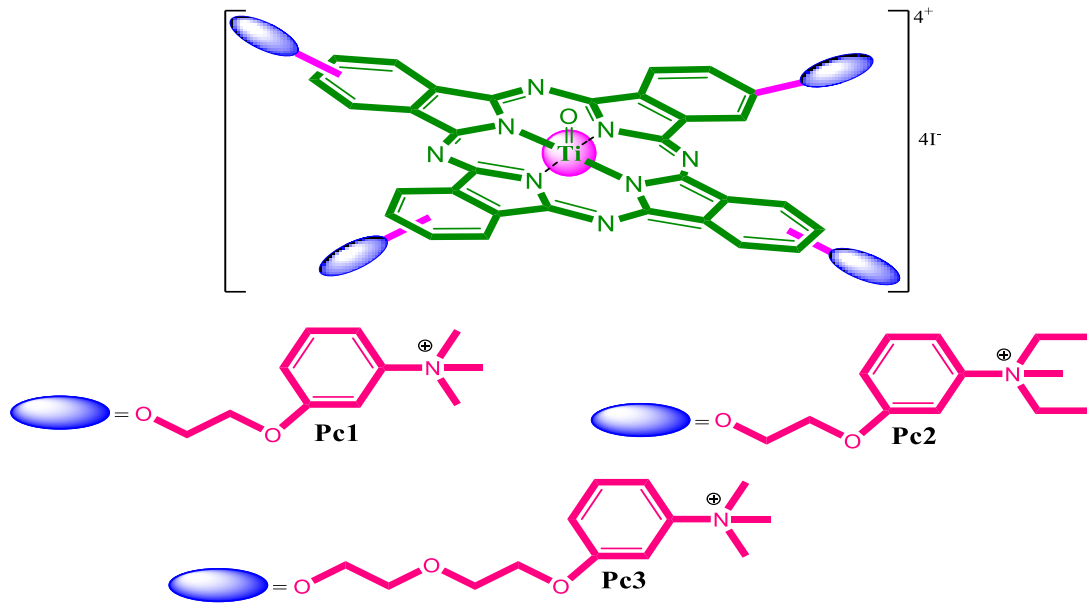
Cihazın Adı	Model	Firma
Su banyolu çalkalayıcı	WNB 7-45	MEMMERT
Vorteks	WM-10 WİSD	WİSEMİX
Terazi	PA 2140	OHAUS
Yatay DNA elektroforezi	Wide Mini-Sub Cell GT System	BIORAD
Güç kaynağı	Bio Rad Power Pac™ Basic	BIORAD
Isıtıcı	MSH-20A	WİSD HOTPLATE
Buzdolabı	190507962400	İNDESİT
Isıtıcılı sallayıcı kuru blok	MS-100	THERMO-SHAKER
Spektrofotometre	LAMBDA-25	PERKİN ELMER
Jel görüntüleme sistemi	Universal Hood imager gel doc™	BIORAD
Saf su cihazı	61316	BİOTECH
pH metre	Starter 3000	OHAUS
Steril kabin	MN120	BİO RAD
Mağnetik karıştırıcı	MS-H-Pro	DRAGON LAB
UV kabin lamba		CAMAG
Derin Dondurucu		ARÇELİK

5.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan agaroz, bromofenol mavisi, bütirillenmiş hidroksianisol, CT-DNA, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, EDTA, etidyum bromür, gallik asit, gliserol, ksilen siyanol, L-metiyonin, nitro mavisi tetrazolyum (NBT), riboflavin, sodyumdodesil sülfat, ve BSA Sigma-Aldrich’den temin edildi. DNA kesim aktivitesi denemelerinde de ticari olarak Fermantas’dan satın alınan %90’dan fazlası süpersarmal formda olduğu

bilinen, 4361 baz çifti içeren, $2,83 \times 10^6$ Da moleküler ağırlığında olan çift sarmal kapalı halkalı pBR322 plazmid DNA'sı kullanıldı. Topoizomeraz I inhibisyon çalışmalarında kullanılan Topoisomerase I Human Assay Kit Topogen'den satın alındı. Çalışmada *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 türleri antibakteriyal, *Candida albicans* ATCC 10231 türü antifungal testi için kullanıldı. Bu mikroorganizmalar Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın stoklarından temin edildi.

Bu çalışmada incelenen ftalosiyanin bileşikleri Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Anorganik Kimya Bilimdalı öğretim üyesi Doç. Dr. Zekeriya BIYIKLIOĞLU tarafından sentezlendi. İncelenen suda çözünür titanyum (IV) ftalosiyanin bileşiklerinin kimyasal yapıları ve kısa kodları Şekil 30'da, isimleri ve moleküler ağırlıkları Tablo 4'de verilmiştir.



Şekil 30. Çalışmada incelenen suda çözünür titanyum (IV) ftalosiyanin bileşiklerinin şekilleri ve kodları

Tablo 4. Çalışmada incelenen bileşiklerin isimleri ve molekül ağırlıkları

Kısa Kod	İsmi	Molekül Ağırlığı
Pc1	2(3),9(10),16(17),23(24)-tetrakis-{2-[3-(dimetilamino)fenoksi]etoksi}ftalosiyanimato oksotitanyum(IV)iyodür	1861.0 g/mol
Pc2	2(3),9(10),16(17),23(24)-tetrakis-{2-[3-(dietilamino)fenoksi]etoksi}ftalosiyanimato oksotitanyum(IV)iyodür	1973.2 g/mol
Pc3	2(3),9(10),16(17),23(24)-tetrakis-(2-{2-[3-(dimetilamino)fenoksi]etoksi}etoksi)-ftalosiyanimato oksotitanyum(IV)iyodür	2037.2 g/mol

5.1.3. Kullanılan Çözeltiler

CT-DNA çözeltisi: DNA stok çözeltisi 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl (pH 7.2) içerisinde 3 gün boyunca 4 °C’de yavaşça karıştırılarak hazırlandı ve 4 °C’de saklanarak bir hafta içinde tüketildi. Konsantrasyonunun hesaplanması için, 260 nm’de molar absorblama katsayısı (ϵ_{260}) $6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ olarak alınarak absorbans ölçümü yapıldı. Ayrıca DNA’nın yeterli düzeyde protein safsızlığından uzak olduğunu ortaya koymak amacıyla 280 nm’deki absorbans ölçümü yapılarak 260 ve 280 nm’lerdeki absorbans değerlerinin 1.8-1.9:1 oranını verdiği dikkat edildi.

Etidyum Bromür (EB) Çözeltisi: Agaroz jel elektroforezi çalışmalarında ise 5 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan stok çözelti kullanıldı.

Jel Yükleme Boyası: %10 sodyumdodesil sülfat (SDS), %0.2 bromofenol mavisi, %0.2 ksilen siyanol ve %30 oranında gliserol içerecek şekilde hazırlandı.

Yürütme Tamponu (10X TAE): 48.4 g Tris, 11.2 mL asetik asit, 20 mL 0.5 M EDTA (pH 8) son hacim 1 L olacak şekilde su içerisinde çözüldü.

Jel Hazırlama: Agaroz 0.8 g tartılarak 100 mL seyreltilmiş TAE içinde, 7 µL EB (5 mg/mL) ilavesi ile hazırlandı.

5.2. Yöntem

5.2.1. DNA Bağlanma Deneyleri

5.2.1.1 UV-Vis Absorpsiyon Titrasyonları

Çoğu durumda DNA kesimi için DNA bağlanması kritik adımdır. Bu yüzden öncelikle bileşiklerin CT-DNA'ya bağlanması UV/Vis absorpsiyonu kullanılarak çalışıldı. Bu metod, DNA-bileşik etkileşimlerinin belirlenmesinde en etkili yollardan birisidir. Optimum koşulları belirlemek, çözeltileri ve yöntemin uygulanabilirliğini test etmek açısından, bileşiklerle ön denemeler yapılmıştır. Bu ön denemeler sonucunda deneylerin Tris-HCl tamponu pH 7.2'de yapılmasına karar verilmiştir.

Bileşiklerin CT-DNA ile etkileşimini içeren tüm çalışmalar 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl (pH 7.2) içinde, su içerisinde hazırlanan stok çözeltiler sabit konsantrasyonda (37.5 μ M) tutularak ve CT-DNA konsantrasyonu değiştirilerek (2.5-20 μ M) gerçekleştirildi. Bu amaçla ilk olarak 37.5 μ M konsantrasyonda olacak şekilde, alınan ftalosiyanın bileşiklerinin çözeltisi 300-750 nm aralığında spektrumu 0.5 nm'de bir değer ölçülebilecek şekilde kaydedilmiştir. Ardından ilk CT-DNA ilavesi yapılmış, oda sıcaklığında 10 dakikalık inkübasyonun ardından, belirtilen dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumu kaydedilmiştir. Bu işlem yapılırken kör çözelti üzerine de eşit miktarda CT-DNA ilave edilerek CT-DNA'nın absorbansı elimine edilmiştir. Bu işleme DNA konsantrasyonu aşamalı olarak artırılarak son konsantrasyon 20 μ M oluncaya kadar devam edilmiştir.

Elde edilen sonuçlardan aşağıdaki eşitlik gereğince her bir DNA konsantrasyonuna ([DNA]) karşı $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ değerleri grafiğe geçirilmiştir. Grafikten elde edilen doğrunun eğimi $1/(\epsilon_b - \epsilon_f)$ 'yi, kesim noktası ise $1/K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)$ olarak bulunmuştur ve iki değer birbirine oranlanarak bağlanma sabitleri K_b hesaplanmıştır (Formül 5.1.). Bu eşitlikte ϵ_f , serbest haldeki bileşiğin sönüm katsayısını, ϵ_b , tam bağlı bileşiğin sönüm katsayısını, ϵ_a ise $A/[M]$ 'yi ifade eder (115).

$$[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [DNA]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/K_b(\epsilon_b - \epsilon_f) \quad (\text{Formül 5. 1.})$$

5.2.1.2. DNA Erime Sıcaklığının Belirlenmesi

DNA erime denemeleri farklı bağlanma modlarını ayırt etmek için uygulanır. Küçük moleküllerin DNA çift sarmalına interkalasyonun sonucunda çift sarmalın tek zincirli DNA'ya denatüre olmasıyla erime sıcaklığının 8-12°C yükselirken, oluğa bağlanma esnasında ise dikkat çekici sıcaklık değişimleri gerçekleşmez (116, 117). Sarmalın erimesi 260 nm'de DNA bazlarının molar absorblama katsayısının çift sarmal formda tek zincirli forma göre daha düşük olması sebebiyle 260 nm'de absorpsiyonun artışına yol açar. Böylece, DNA sarmalının bobine dönüşme sıcaklığı 260 nm'de DNA bazlarının absorbandsının sıcaklığın bir fonksiyonu olarak izlenmesiyle belirlenebilir.

Bu bilgiler ışığında planlanan termal denatürasyon çalışmaları Varian Cary Temperature Controller ünitesine sahip Cary 100 Bio UV-Visible Spectrophotometer cihazı kullanılarak ve [DNA]/[bileşik] oranı farklı olacak şekilde çeşitli denemeler yapılarak gerçekleştirildi. Denemeler, 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl (pH 7.2) tamponu içerisinde yapıldı.

Termal erime programı kullanılarak küveti içeren hücrenin sıcaklığı dakikada 1 °C arttırılarak 60-90 °C aralığında her 0.5 °C'de 260 nm'de absorbands ölçüldü. CT-DNA'nın bileşik varlığında ve yokluğunda 260 nm'deki absorbandsına bağlı olarak çizilen $t(^{\circ}\text{C})$ -Absorbans eğrisinden T_m değerleri cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı (118).

5.2.2. DNA Kesim (Nükleaz) Aktivitesi

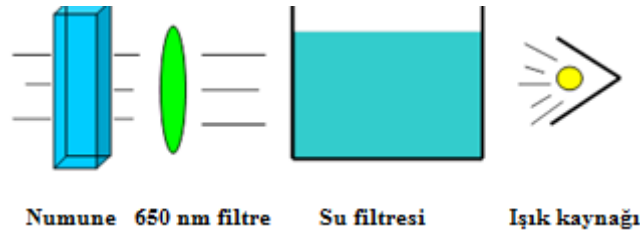
Bileşiklerin DNA ile etkileşimleri süpersarmal pBR322 plazmid DNA'sının kesim denemesiyle incelendi. Kesim reaksiyonu agaroz jel elektroforezi tekniğiyle izlendi. Dairesel pBR322 plazmid DNA'sı elektroforeze maruz bırakıldığında, bozulmamış süpersarmal form (Form I)'un kısmen hızlı göç ettiği gözlenmektedir. Çeşitli maddelerle etkileşimi sonrasında tek bir zincirde kesim gerçekleşirse (kırılma), süpersarmal form daha yavaş hareket eden kırık form (Form II)'u oluşturmak üzere gevşemektedir. Her iki zincirin de kesildiği durumlarda Form I ve Form II'nin arasında göç eden lineer form (Form III) oluşmaktadır (53). Komplekslerin DNA zincir kesimi için nükleaz aktivitelerini değerlendirmek amacıyla pBR322 plazmid DNA'sı belirlenen uygun reaksiyon koşullarında bileşiklerle inkübe edildi.

5.2.2.1. pBR322 Plazmid DNA'sının Hidrolitik Kesimi

pBR322 plazmid DNA'sının kesim aktivitesinin çeşitli koşullara bağlılığını değerlendirmek üzere herhangi ilave bir ajan olmaksızın hidrolitik koşullarda denemeler gerçekleştirildi. Bu çalışmada kuyu içerikleri 10 µL olacak şekilde, 0.5 µL 250 ng pBR322 plazmid DNA, 7.5 µL tampon çözelti (50 mM Tris-HCl (pH 7)), 2 µL Pc bileşiklerinden (kuyu içeriğindeki son konsantrasyon 20 µM olacak şekilde) oluşturuldu. Kuyucuk içeriği %0.8'lik agaroz jele (0.25 µg/mL EB içeren) yüklenmesi esnasında jel yükleme boyası ilave edildi ve jele yüklendi. Yürütme tamponu ilavesinden sonra 90 dakikalık süreyle 100 Voltluk akım uygulanarak elektroforeze maruz bırakıldı. Elektroforez işleminin bitiminde jel, UV ışığı altında görüntülendi ve fotoğrafı kaydedildi (119).

5.2.2.2. pBR322 Plazmid DNA'sının Işıkla İndüklenmiş Kesimi

İncelenen bileşiklerin fotodinamik terapide kullanılabilme potansiyellerini değerlendirmek amacıyla yapılan çalışmada pBR322 plazmid DNA'sının bileşikler tarafından kesimini gözlemleyebilmek amacıyla, bileşiklerin maksimum absorbans gösterdiği 650 nm'deki ışığın kesim aktivitesine etkisi incelendi. Bu çalışmada kuyu içerikleri 10 µL olacak şekilde, 0.5 µL 250 ng pBR322 plazmid DNA, 7.5 µL tampon çözelti (50 mM Tris-HCl (pH 7)), 2 µL Pc bileşiklerinden (kuyu içeriğindeki son konsantrasyon 20 µM olacak şekilde) oluşturuldu. Daha sonra kuyu içerikleri 10 dk süreyle 650 nm ışığa maruz bırakıldı. Işık kaynağı olarak 300 Watt'lık quartz lamba, ultraviyole ve infrared radyasyonları filtre etmek için 650 nm' lik bir filtre ve ayrıca bir su filtresi kullanılmıştır. Bu sürenin sonunda karışımlar 1 saat süreyle 37 °C'de karanlıkta inkübe edildikten sonra yukarıda izlenen yöntemlerle reaksiyonlar durduruldu ve kesim ürünleri agaroz jel üzerinde UV ışığı altında incelendi (44).



Şekil 31. pBR322 plazmid DNA'nın 650 nm ışıkla uyarılma düzeneği

5.2.2.3. pH'nın pBR322 Plazmid DNA'sının Kesim Aktivitesine Etkisi

pBR322 plazmid DNA'nın hidrolitik ve ışıkla uyarılmış kesimi gerçekleştirildikten sonra, 650 nm ışıktaki uyarılan bileşiklerin kesim aktivitelerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bundan dolayı pBR322 plazmid DNA'nın kesim aktivitesinin optimum şartları 650 nm'lik ışıktaki uyardıktan sonra incelenmiştir.

Bu çalışmada kuyu içerikleri 10 µL olacak şekilde, 0.5 µL 250 ng pBR322 plazmid DNA, 7.5 µL tampon çözelti (50 mM Tris-HCl (pH 5-9)), 2 µL Pc bileşiklerinden (kuyu içeriğindeki son konsantrasyon 20 µM olacak şekilde) oluşturuldu. Daha sonra kuyu içerikleri 10 dk süreyle 650 nm ışığa maruz bırakıldı. Bu sürenin sonunda karışımlar 1 saat süreyle 37 °C'de karanlıkta inkübe edildikten sonra yukarıda izlenen yöntemlerle reaksiyonlar durduruldu ve kesim ürünleri agaroz jel üzerinde UV ışığı altında incelendi (53).

5.2.2.4. pBR322 Plazmid DNA'nın Oksidatif Kesimi

Bileşiklerin hidrolitik kesim aktivitelerinin ortaya koyulmasını takiben çeşitli yardımcı reaktifler hidrojen peroksit, askorbik asit, 2-merkaptotanol nihai konsantrasyonları sırası ile 0.4 M, 2.5 mM ve 0.4 M olacak şekilde ortama ilave edilmektedir.

Bu çalışmada kuyu içerikleri 10 µL olacak şekilde, 0.5 µL 250 ng pBR322 plazmid DNA, 5.5 µL tampon çözelti (50 mM Tris-HCl (pH 7)), 2 µL yardımcı reaktif, 2 µL Pc bileşiklerinden (kuyu içeriğindeki son konsantrasyon 20 µM olacak şekilde) oluşturuldu. Daha sonra kuyu içerikleri 10 dk süreyle 650 nm ışığa maruz bırakıldı. Bu sürenin sonunda karışımlar 1 saat süreyle 37 °C'de karanlıkta inkübe edildikten sonra yukarıda izlenen yöntemlerle reaksiyonlar durduruldu ve kesim ürünleri agaroz jel üzerinde UV ışığı altında incelendi (120).

5.2.3. Topoizomeraz I İnhibisyonu

Bu deneme; topoizomeraz enzimi, süpersarmal DNA'yı gevşemiş DNA ve açık dairesel DNA haline dönüştürdüğü için, ilaç etkisi incelenen bileşiklerin süpersarmal DNA'nın gevşemesini etkileyip etkilemediğini belirlemek için dolaysız bir yoldur (121). DNA topoizomeraz I, DNA zincirlerinden birini geçici olarak keserek DNA'nın topolojik değişimlerini etkileyebilir ve yeni antikanser ilaçlarının dizaynı için muhtemel

hücre içi hedef olarak rol oynayabilir (122). Bu amaçla komplekslerin insan Topoizomeraz I üzerindeki etkisini incelemek için standard bir plazmid DNA kesim denemesi gerçekleştirildi. DNA topoizomeraz I aktivitesi süpersarmal DNA'nın gevşemesini ölçerek belirlendi.

Bunun için 0.5 µL 250 ng pBR322 plazmid DNA'sı uygun koşullar altında 7.5 µL tampon çözelti [35 mM Tris-HCl (pH 8.0), 72 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 5 mM spermidin, %0.1 Albümin], 1 µL 1 ünite topoizomeraz I enzimi ve 2 µL Pc bileşiklerinden (kuyu içeriğindeki son konsantrasyon 20 µM olacak şekilde) oluşturuldu. Karışım 10 dakika süreyle 650 nm ışığına maruz bırakıldıktan sonra 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Örnekler %0.8'lik agaroz jeline yüklendi, 3 saat süresince 40 volt akım uygulanarak yürütme tamponu içerisinde elektroforeze maruz bırakıldı ve oluşan formlar agaroz jel üzerinde UV ışığı altında incelendi (121).

5.2.4. Antioksidan Aktivite Çalışmaları

5.2.4.1. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Süperoksit dismutaz aktivitesi Beauchamp ve Fridovich (1971) tarafından geliştirilen nitro mavisi tetrazolyum (NBT) indirgeme metodu kullanılarak belirlendi. O₂⁻ 'nin miktarı ve baskılanma oranı 560 nm'deki absorbans ölçülerek belirlendi. Süperoksit radikalleri (O₂⁻) 0.1 mM EDTA, 2 µM riboflavin, 13 mM L-metiyonin ve 75µM NBT içeren 50 mM fosfat tamponundan (pH 7.8) oluşan sistem ile üretildi. Bileşiklerin farklı konsantrasyonlarda (25-100 µM) hazırlanmış çözeltileri radikal üreten bu çözelti sistemlerine ilave edilerek her bir reaksiyon karışımı 5 dakika floresan ışığında inkübe edildikten sonra örneklerin absorbansı 560 nm'de ölçüldü (A_{örnek}). Test edilen bileşiği içermeyen karışımın absorbansı kör olarak kullanıldı (A_{kör}). NBT indirgenmesinin yüzde inhibisyonu (%IC) aşağıdaki şekilde hesaplandı (123). Referans bileşik olarak BHA kullanıldı. Tüm denemeler 3 tekrarlı gerçekleştirildi ve standart sapması hesaplandı.

$$\%IC = ((A_{kör} - A_{örnek}) / A_{kör}) \times 100$$

5.2.4.2. DPPH Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi

Bu çalışmada incelenen bileşiklerin DPPH serbest radikalini süpürme aktivitesini test etmek için 0.1 mM DPPH çözeltisi kararlı radikal olarak kullanıldı ve 1 mL DPPH

çözeltilisinin 517 nm'deki absorbansı ölçüldü ($A_{k\ddot{o}r}$). DPPH çözeltilisi üzerine değişik konsantrasyonlardaki (25-100 μ M) bileşiklerin çözeltilerinden ilave edilerek karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyonun ardından 517 nm'de absorbans ölçüldü ($A_{\ddot{o}rnek}$). DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi, DPPH radikallerinin süpürme kapasitesi (%IC) şeklinde farklı Pc bileşiklerin konsantrasyonları için aşağıdaki denklemden hesaplandı. Referans bileşik olarak gallik asit kullanıldı. Tüm denemeler 3 tekrarlı gerçekleştirildi ve standart sapması hesaplandı (124).

$$\%IC = (A_{k\ddot{o}r} - A_{\ddot{o}rnek})100/A_{k\ddot{o}r}$$

5.2.4.3. Metal Şelat Bağlanma Aktivitesinin Belirlenmesi

Pc bileşiklerinin metal şelat aktivitesi, Dinis metoduna göre belirlendi. Yönteme göre; bileşiklerin çeşitli konsantrasyonlarından (25-100 μ M) 500 μ L alındı ve üzerine 50 μ L 2 mM $FeCl_2$ ve 100 μ L 5 mM ferrozin ilave edildi. Bileşikler, 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 562 nm'de absorbansı ölçüldü. Referans bileşik olarak EDTA kullanıldı. Tüm denemeler 3 tekrarlı gerçekleştirildi ve standart sapması hesaplandı (106).

$$\%IC = (A_{k\ddot{o}r} - A_{\ddot{o}rnek})100/A_{k\ddot{o}r}$$

5.2.5. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Test edilen mikroorganizmalara karşı test materyallerinin antimikrobiyal aktiviteleri agar difüzyon metodu ile test edildi. Test edilen sentetik kimyasal maddeler 500 μ g/mL konsantrasyonunda distile su yardımı ile çözüldü. Serum fizyolojik (SF) içinde 0.5 McFarland'a ayarlanan bakteri süspansiyonlarından bakteriler için hazırlanan MHA, maya için ise SDA plaklarına 10 μ L (10^8 olmak üzere) inoküle edilip, pamuk eküviyon ile yayma ekim gerçekleştirildi. Besiyerleri üzerine 4-6 mm çapında kuyucuklar açıldı. Bir kuyucuğa negatif kontrol olarak çözücü madde bir kuyucuğa pozitif kontrol olarak gentamisin veya amfoterisin B ilave edildi. Diğer kuyucuklara ise test materyallerinden 30 μ L eklendi. Bu işlem tüm test mikroorganizmaları için ayrı ayrı tekrar edildi. Mikroorganizmalar 37°C'de 24-48 saatlik inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda kuyucuklarda oluşan inhibisyon zon çapları değerlendirildi (114).

6. BULGULAR

6.1. DNA Bağlanma Çalışmaları

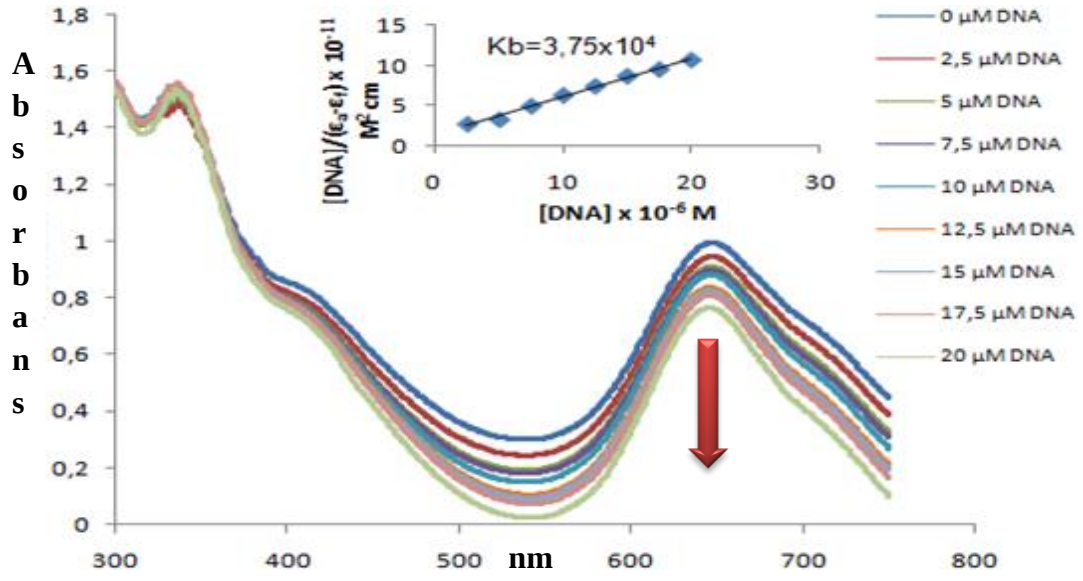
6.1.1. UV–Vis Absorpsiyon Titrasyonları

CT-DNA varlığında ve yokluğunda incelenen ftalosiyanin bileşiklerinin absorpsiyon spektrumu bileşiklerin DNA'ya bağlanma modu hakkında bilgi vermektedir. Bileşikler DNA'ya kovalent ya da kovalent olmayan (elektrostatik etkileşim, oluğa bağlanma ve interkalasyon) etkileşimler ile bağlanabilir. Genellikle interkalatif ajanlar, kromofor grupların arasındaki π - π etkileşimlerinden dolayı büyük dalga boyuna doğru kayma gösterirken, oluğa bağlanma durumunda ise dalga boyunda küçük değişimler meydana gelmektedir (53).

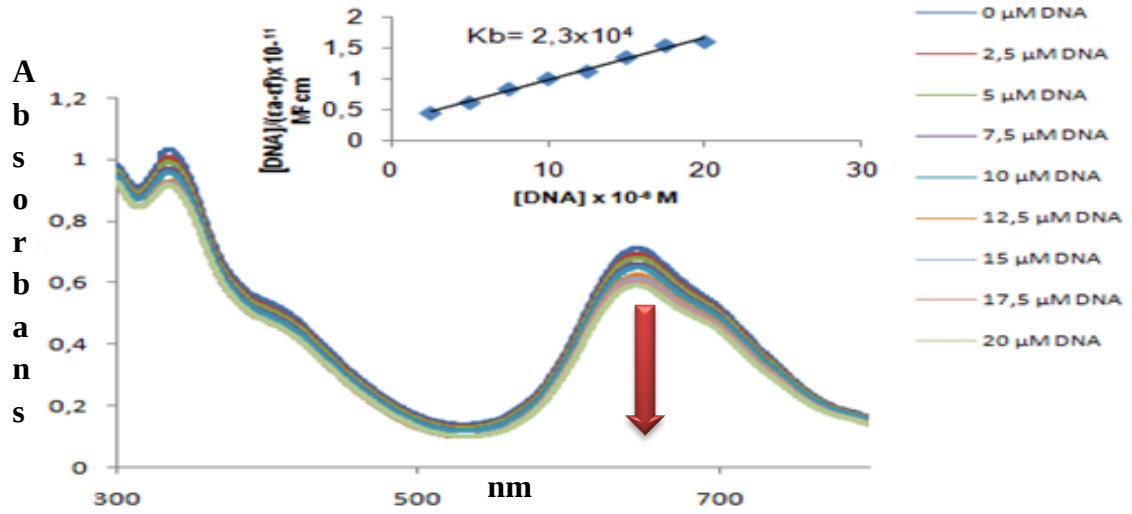
Tez kapsamında incelenen bileşiklerin CT-DNA'ya bağlanması UV/Vis absorpsiyonları ölçülerek belirlendi. Sabit konsantrasyonda tutulan ftalosiyanin bileşiklerinin çözeltisi üzerine konsantrasyonu aşamalı olarak artırılarak CT-DNA çözeltisi ilave edildi ve absorpsiyon spektrumlarındaki değişiklikler kaydedildi (Resim 1-3).

Bu işlem yapılırken referans çözelti üzerine de eşit miktarda CT-DNA ilave edilerek CT-DNA'nın absorbansı bertaraf edilmiştir. Bu işleme DNA konsantrasyonu aşamalı olarak artırılarak daha fazla değişiklik olmayıncaya kadar devam edilmiştir. Absorpsiyon spektrumları kaydedilmiştir.

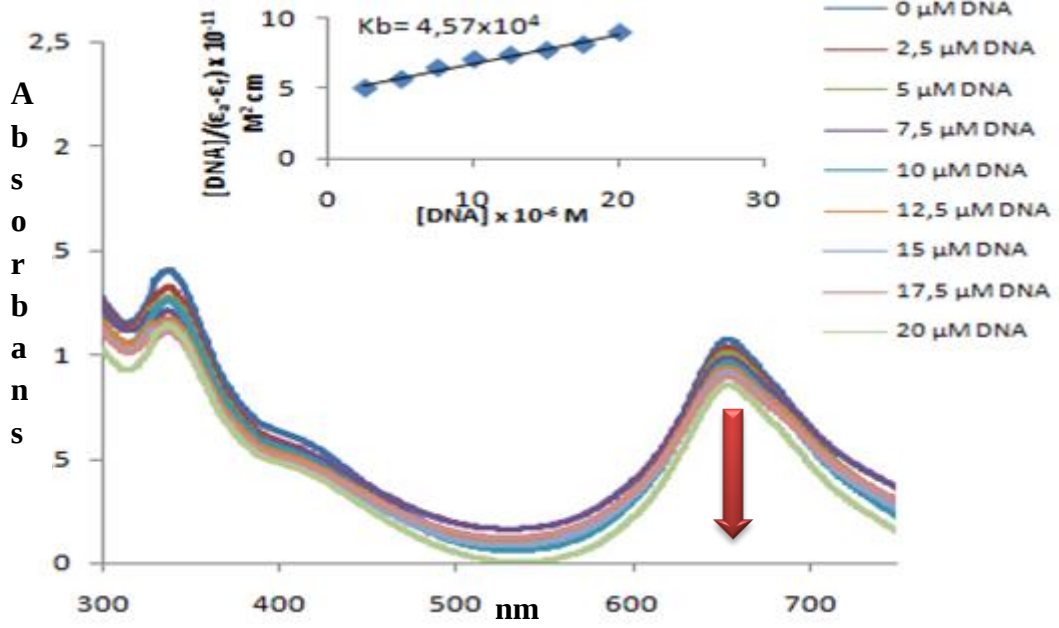
CT-DNA varlığında **Pc1**, **Pc2** ve **Pc3**'ün absorpsiyon spektrumlarında hipokromizm ve kırmızıya küçük kayma gözlenmiştir. **Pc1** bileşiğinde 2 nm kırmızıya kayma gözlenirken (λ_{max} 647 $\rightarrow$ 649), **Pc2** bileşiğinde 1 nm kırmızıya kayma gözlemlendi (λ_{max} 645 $\rightarrow$ 646). **Pc3** bileşiğinde ise herhangi bir kayma gözlenmemiştir. Bu durum Pc bileşikleri ile DNA'nın interkalatif olmayan bir etkileşim içinde olduğunu göstermektedir. Bileşiklerin bağlanma sabitleri (K_b) hesaplandığında; **Pc1**, **Pc2** ve **Pc3**'ün K_b değerleri sırasıyla 3.75×10^4 , 2.3×10^4 ve 4.57×10^4 M⁻¹'dir. Bu değerler interkalasyon ajanlar için görülen 10⁶'dan küçük olduğundan dolayı, interkalatif olmayan etkileşim içinde olduğunu daha da desteklemektedir (110). Yapıda hipokromizm görülmesi, dalga boyundaki kaymaların küçük olması ve K_b değerinin 10⁶'dan küçük olması Pc bileşiklerinin CT-DNA ile etkileşiminin oluğa bağlanma şeklinde olduğunu desteklemektedir.



Resim 1. Pc1 bileşiğinin DNA yokluğunda ve artan DNA konsantrasyonu varlığında absorpsiyon spektrumları. (↓) Artan kompleks konsantrasyonunu gösterir.



Resim 2. Pc2 bileşiğinin DNA yokluğunda ve artan DNA konsantrasyonu varlığında absorpsiyon spektrumları. (↓) Artan kompleks konsantrasyonunu gösterir.



Resim 3. Pc3 bileşiğinin DNA yokluğunda ve artan DNA konsantrasyonu varlığında absorpsiyon spektrumları. (↓) Artan kompleks konsantrasyonunu gösterir.

6.1.2. DNA Erime Sıcaklığının Belirlenmesi

DNA erime sıcaklığı (T_m)'nın belirlenmesi denemeleri bağlanma modunu anlamak için kullanılır. T_m , çift sarmalın kararlılığı ile son derece ilişkilidir. Klasik interkalatörlerin varlığında T_m değeri 8-12 °C'lik artışa neden olurken, oluğa bağlanma durumunda ise T_m dikkat çekici değişikliklere neden olmamaktadır (116, 117).

Bu bilgiler ışığında planlanan termal denatürasyon çalışmaları sırasında termal erime programı kullanılarak küveti içeren hücrenin sıcaklığı dakikada 1 °C arttırılarak 60-90 °C aralığında her 0.5°C'de 260 nm'de absorbans ölçüldü. CT-DNA'nın Pc bileşiği varlığında ve yokluğunda 260 nm'deki absorbansına bağlı olarak çizilen t(°C)-Absorbans eğrisinden T_m değerleri cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı. Hesaplanan T_m değerleri Tablo 5'de verilmiştir. CT-DNA'nın erime sıcaklığı 80.2 °C iken, CT-DNA + **Pc1**, CT-DNA + **Pc2** ve CT-DNA + **Pc3**'ün erime sıcaklığı sırasıyla 81.7 °C, 82.2 °C ve 82.9 °C'dir. Erime sıcaklıklarında dikkate değer bir artış olmaması oluğa bağlanma olduğunu düşüncesini desteklemektedir.

Tablo 5. Ftalosiyanin bileşiklerinin DNA Erime Sıcaklıkları

Kısa Kod	<i>T_m</i> values
CT-DNA	80.2 °C
CT DNA + Pc1	81.7 °C
CT DNA + Pc2	82.2 °C
CT DNA + Pc3	82.9 °C

6.2. DNA Kesim (Nükleaz) Aktivitesi

Çalışmada kullanılan Pc bileşiklerinin DNA kesim aktiviteleri agaroz jel elektroforezi ile ortaya konuldu. Metalonükleaz aktivitesinin varlığı DNA'nın Form I (süpersarmal form)'den Form II (kırık dairesel form) veya Form III (lineer form)'e dönüşümüyle tespit edildi. Nükleaz etkinliğinin bağlı olduğu faktörleri belirlemek için ilk olarak ışık yokluğunda ve varlığında kesim aktivitesi incelendi. Işık varlığında aktivitenin yüksek olduğu belirlendi. Bundan dolayı pH ve oksidatif denemeler ışık varlığında gerçekleştirildi.

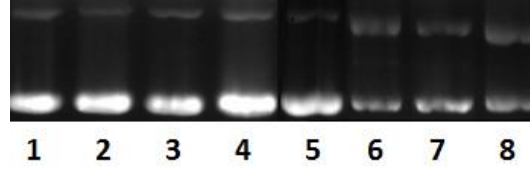
6.2.1. pBR322 Plazmid DNA'sının Hidrolitik Kesimi

Ftalosiyanin bileşiklerinin DNA'yı fosfodiester bağlarının hidrolizi yoluyla kesebilme etkinliğini değerlendirmek için hidrolitik kesim denemesi yapıldı. **Pc1**, **Pc2** ve **Pc3** bileşiklerinin hidrolitik kesim görüntüleri Resim 4'de verilmiştir. Görüntüler incelendiğinde hiçbir ilave ajan olmaksızın ve ışık yokluğunda Pc bileşiklerinin kesim aktivitesinin bulunmadığı gözlemlendi.

6.2.2. pBR322 Plazmid DNA'sının Işıkla İndüklenmiş Kesimi

pBR322 plazmid DNA'nın bileşikler tarafından kesim etkinliğine ışıkla indüklemenin de katkısının olup olmayacağı incelendi. Bu amaçla 50 mM Tris-HCl (pH 7) içerisinde hazırlanan Pc bileşiklerinin 20 µM bileşik konsantrasyonu ile DNA'nın bulunduğu karışım başka hiçbir ilave ajan olmaksızın 650 nm ışık altında 10 dakika inkübe edildikten sonra standartize edilen yol takip edildi.

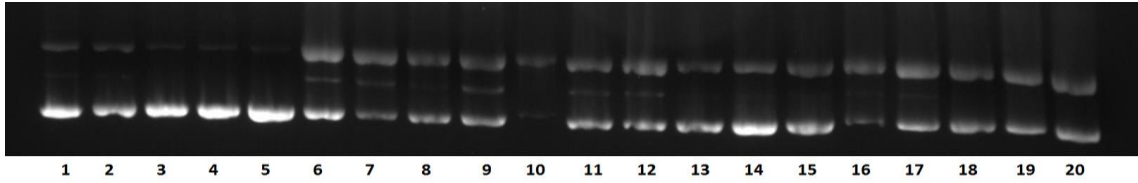
Işık varlığında ve yokluğunda yapılan analiz sonucunda Pc bileşiklerinin fotoduyarlatıcı özelliklerinden dolayı, **Pc1**, **Pc2** ve **Pc3** bileşiklerinin ışık varlığında aktivitesinin yüksek olduğu Resim 4'de görülmekte olup fotodinamik terapi için oldukça umut verici sonuç gözlemlenmiştir. Bundan dolayı pH ve oksidatif kesim denemeleri ışık varlığında yapılmıştır.



Resim 4. Işık varlığında ve yokluğunda ftalosiyanın bileşiklerinin pBR322 plazmid DNA kullanılarak kesim aktivitelerinin incelenmesi. **1:** DNA kontrol: 9.5 µL Tris-HCl+ 0.5 µL DNA, **2:** 7.5 µL Tris-HCl + 2 µL **Pc1** + 0.5 µL DNA, **3:** 7.5 µL Tris-HCl + 2 µL **Pc2** + 0.5 µL DNA, **4:** 7.5 µL Tris-HCl + 2 µL **Pc3** + 0.5 µL DNA, **5:** DNA kontrol: 9.5 µL Tris-HCl+ 0.5 µL DNA (650 nm uyarma), **6:** 7.5 µL Tris-HCl + 2 µL **Pc1** + 0.5 µL DNA (650 nm uyarma), **7:** 7.5 µL Tris-HCl + 2 µL **Pc2** + 0.5 µL DNA(650 nm uyarma), **8:** 7.5 µL Tris-HCl + 2 µL **Pc3** + 0.5 µL DNA (650 nm uyarma).

6.2.3. pH'nın pBR322 Plazmid DNA'sının Kesim Aktivitesine Etkisi

pBR322 plazmid DNA'nın bileşikler tarafından optimal şartlarını belirlemek için kesim reaksiyonlarının pH bağımlılığı incelendi. Bu amaçla 650 nm ışık varlığında her bir bileşik için pH 5-9 aralığında 50 mM Tris-HCl tamponları kullanılarak kesimin etkili olduğu pH belirlendi. Resim 5'de pH'nın pBR322 plazmid DNA'nın kesim aktivitesine etkisi görülmektedir. Resim 5'de görüldüğü gibi **Pc1** bileşiği için en iyi aktivite pH 6 ve pH 9'da görülürken, **Pc2** bileşiği için en iyi aktivite pH 6'da, **Pc3** bileşiği için ise en iyi aktivite pH 5 ve pH 6'da görülmektedir.

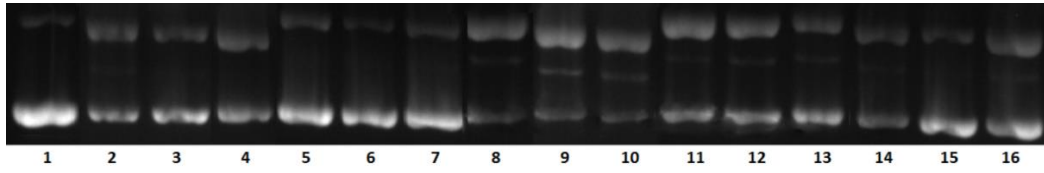


Resim 5. pH'nın pBR322 plazmid DNA'sının kesim aktivitesi üzerine etkisi. **1:** DNA kontrol: 9.5 µL Tris-HCl (pH 5) + 0.5 µL DNA, **2:** DNA kontrol: 9.5 µL Tris-HCl (pH 6) + 0.5 µL DNA, **3:** DNA kontrol: 9.5 µL Tris-HCl (pH 7) + 0.5 µL DNA, **4:** DNA kontrol: 9.5 µL Tris-HCl (pH 8) + 0.5 µL DNA, **5:** DNA kontrol: 9.5 µL Tris-HCl (pH 9) + 0.5 µL DNA, **6:** 7.5 µL Tris-HCl (pH 5) + 2 µL **Pc1** + 0.5 µL DNA, **7:** 7.5 µL Tris-HCl (pH 6) + 2 µL **Pc1** + 0.5 µL DNA, **8:** 7.5 µL Tris-HCl (pH 7) + 2 µL **Pc1** + 0.5 µL DNA, **9:** 7.5 µL Tris-HCl (pH 8) + 2 µL **Pc1** + 0.5 µL DNA, **10:** 7.5 µL Tris-HCl (pH 9) + 2 µL **Pc1** + 0.5 µL DNA, **11:** 7.5 µL Tris-HCl (pH 5) + 2 µL **Pc2** + 0.5 µL DNA, **12:** 7.5 µL Tris-HCl (pH 6) + 2 µL **Pc2** + 0.5 µL DNA, **13:** 7.5 µL Tris-HCl (pH 7) + 2 µL **Pc2** + 0.5 µL DNA, **14:** 7.5 µL Tris-HCl (pH 8) + 2 µL **Pc2** + 0.5 µL DNA, **15:** 7.5 µL Tris-HCl (pH 9) + 2 µL **Pc2** + 0.5 µL DNA, **16:** 7.5 µL Tris-HCl (pH 5) + 2 µL **Pc3** + 0.5 µL DNA, **17:** 7.5 µL Tris-HCl (pH 6) + 2 µL **Pc3** + 0.5 µL DNA, **18:** 7.5 µL Tris-HCl (pH 7) + 2 µL **Pc3** + 0.5 µL DNA, **19:** 7.5 µL Tris-HCl (pH 8) + 2 µL **Pc3** + 0.5 µL DNA, **20:** 7.5 µL Tris-HCl (pH 9) + 2 µL **Pc3** + 0.5 µL DNA.

6.2.4. pBR322 Plazmid DNA'nın Oksidatif Kesimi

Bileşiklerin hidrolitik kesim aktivitelerinin belirlenmesinin ardından ışık varlığında oksidatif kesim kabiliyetlerinin araştırılması amacıyla kesim reaksiyonları hidrojen peroksit (H_2O_2) (0.4 M), askorbik asit (AA) (2.5 mM) ve merkaptetanol (ME) (0.4 M) ajanların ilavesiyle gerçekleştirildi.

H_2O_2 , AA ve ME'ün Pc bileşikleri olmaksızın DNA kesim aktiviteleri ile bu üç ajan ve Pc bileşiklerinin varlığındaki DNA kesim aktiviteleri Resim 6'da görülmektedir. Üç ajan DNA'ya tek başlarına ilave edildiklerinde herhangi bir kesim aktivitesi göstermez iken, Pc bileşikleriyle birlikte ilave edildiklerinde ise aktivatör özellik gösterdikleri belirlenmiştir. 3 ajanın ilavesi sonrasında bileşiklerin kesim aktiviteleri incelendiğinde, en çok kesim aktivitesini artıran ajan hidrojen peroksit olurken, en az etkileyen merkaptetanol olmuştur. Bu üç ajan arasında sıralama yapıldığında etki sırasına göre; $H_2O_2 > AA > ME$ olduğu görülmektedir.

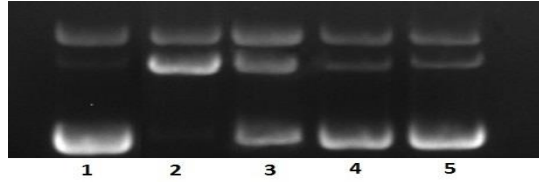


Resim 6. Yardımcı reaktiflerin pBR322 plazmid DNA'nın kesim aktivitesi üzerine etkileri. **1:** DNA Kontrol: 9.5 μ L Tris-HCl (pH 7) + 0.5 μ L DNA, **2:** 7.5 μ L Tris-HCl (pH 7) + 2 μ L **Pc1** + 0.5 μ L DNA, **3:** 7.5 μ L Tris-HCl (pH 7) + 2 μ L **Pc2** + 0.5 μ L DNA, **4:** 7.5 μ L Tris-HCl (pH 7) + 2 μ L **Pc3** + 0.5 μ L DNA, **5:** 7.5 μ L Tris-HCl (pH 7) + 2 μ L H_2O_2 + 0.5 μ L DNA, **6:** 7.5 μ L Tris-HCl (pH 7) + 2 μ L AA + 0.5 μ L DNA, **7:** 7.5 μ L Tris-HCl (pH 7) + 2 μ L ME + 0.5 μ L DNA, **8:** 5.5 μ L Tris-HCl (pH 7) + 2 μ L H_2O_2 + 2 μ L **Pc1** + 0.5 μ L DNA, **9:** 5.5 μ L Tris-HCl (pH 7) + 2 μ L H_2O_2 + 2 μ L **Pc2** + 0.5 μ L DNA, **10:** 5.5 μ L Tris-HCl (pH 7) + 2 μ L H_2O_2 + 2 μ L **Pc3** + 0.5 μ L DNA, **11:** 5.5 μ L Tris-HCl (pH 7) + 2 μ L AA + 2 μ L **Pc1** + 0.5 μ L DNA, **12:** 5.5 μ L Tris-HCl (pH 7) + 2 μ L AA + 2 μ L **Pc2** + 0.5 μ L DNA, **13:** 5.5 μ L Tris-HCl (pH 7) + 2 μ L AA + 2 μ L **Pc3** + 0.5 μ L DNA, **14:** 5.5 μ L Tris-HCl (pH 7) + 2 μ L ME + 2 μ L **Pc1** + 0.5 μ L DNA, **15:** 5.5 μ L Tris-HCl (pH 7) + 2 μ L ME + 2 μ L **Pc2** + 0.5 μ L DNA, **16:** 5.5 μ L Tris-HCl (pH 7) + 2 μ L ME + 2 μ L **Pc3** + 0.5 μ L DNA.

6.3. Topoizomeraz I İnhibisyonu

Ftalosiyanın bileşiklerinin topoizomeraz I enzimine karşı etkisi pBR322 plazmid DNA'nın relaksasyon yöntemine göre incelendi. Resim 7'de görüldüğü gibi, topoizomeraz I'in tek başına kullanılmasıyla gerçekleştirilen kontrol denemesinde süpersarmal DNA kompleksler yokluğunda gevşemiş forma dönüşmektedir. İncelenen

bileşiklerin varlığında ise gevşemiş form azalmakta süpersarmal form oranı artmaktadır. Işık varlığında gerçekleştirilen bu çalışmada ftalosiyanin bileşikleri topoizomeraz I enzimine karşı yüksek inhibisyon aktivitesi göstermektedir. Resim 7 dikkatlice incelendiğinde; **Pc3** bileşiğinin en yüksek inhibisyon aktivitesine sahip olduğu gözlenirken, **Pc2** bileşiği de **Pc1**'den daha yüksek aktivite göstermektedir. Çalışmada kullanılan ftalosiyanin bileşiklerinin DNA'nın oluşuna bağlanma gerçekleştirdiği düşünüldüğünden, topoizomeraz I enziminin DNA'nın oluşuna bağlanmasını engelleyerek inhibe ettiği düşünülmektedir. Topoizomeraz I inhibisyonu çalışmalarıyla ilgili bu veriler değerlendirildiğinde ftalosiyanin bileşiklerinin antikanser potansiyelinin olabileceği düşünülebilir.



Resim 7. Ftalosiyanin bileşiklerinin topoizomeraz I inhibisyon aktivitelerinin görüntülenmesi. **1:** DNA Kontrol: 9.5 μ L Tampon + 0.5 μ L DNA, **2:** 8.5 μ L Tampon + 1 μ L topoizomeraz I + 0.5 μ L DNA, **3:** 6.5 μ L Tampon + 1 μ L topoizomeraz I + 2 μ L **Pc1** + 0.5 μ L DNA, **4:** 6.5 μ L Tampon + 1 μ L topoizomeraz I + 2 μ L **Pc2** + 0.5 μ L DNA, **5:** 6.5 μ L Tampon + 1 μ L topoizomeraz I + 2 μ L **Pc3** + 0.5 μ L DNA.

6.4. Antioksidan Aktivite Çalışmaları

6.4.1. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Yapıları tamamıyla doğal enzimden farklı olsa bile özellikle Mn, Cu veya Zn gibi çeşitli geçiş metallerinin karışık ligandlı kompleksleri metal merkezinin etrafındaki esnek geometrik dönüşümleri ile SOD aktivitesi sergilemektedirler.

Bu bilgiler ışığında ftalosiyanin bileşiklerinin SOD aktivitesi NBT metoduyla incelenmiş ve sonuçlar Tablo 6'de verilmiştir. Yapılan çalışmalar sonrasında ortamda oluşturulan süperoksit radikallerinin 25, 50, 75 ve 100 μ M bileşik konsantrasyonlarındaki çözeltilerinin inhibisyon aktiviteleri yüzde (%) cinsinden belirlenmiştir ve referans bileşik olan BHA ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda ftalosiyanin bileşiklerinin oldukça iyi aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Tablo 6. Ftalosiyanin bileşiklerinin süperoksit radikal süpürme aktiviteleri (%)

μM	Pc1	Pc2	Pc3	BHA
25	55.71 ± 0.35	40.41 ± 0.30	55.77 ± 0.29	17.18 ± 0.30
50	64.79 ± 0.15	55.55 ± 0.19	70.73 ± 0.36	32.11 ± 0.35
75	75.35 ± 0.26	67.64 ± 0.24	72.67 ± 0.32	46.65 ± 0.32
100	85.01 ± 0.15	70.43 ± 0.14	77.49 ± 0.27	59.16 ± 0.24

6.4.2. DPPH Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi

2,2-Difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH) radikal süpürme aktivitesi'nin tespiti bileşiklerin antioksidan özelliklerinin değerlendirilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılan basit, hızlı ve uygun bir metoddur. DPPH bir elektron ya da hidrojen radikali kabul edebilen ve böylece kararlı diyamagnetik bir moleküle dönüşebilen kararlı bir serbest radikaldir. DPPH tek bir elektrona sahiptir bu yüzden 517 nm'de güçlü bir absorbsiyon bandına sahiptir. Bu elektron serbest radikal süpürücünün varlığında eşleşir, bu absorbsiyon kaybolur ve alınan elektronların sayısının stokiometrisine göre renk açılmasıyla sonuçlanır. Absorbanstaki böyle bir değişiklik SR (Serbest Radikal) süpürücü olarak rol oynayan çeşitli moleküllerin kapasitelerini test etmek için yaygın olarak kullanılabilir. Absorbansın hızlı düşmesi, bileşiğin antioksidan aktivitesinin fazla olduğunu gösterir (97).

Bu bilgiler ışığında ftalosiyanin bileşiklerinin DPPH radikal süpürme aktivitesi belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 7'de verilmiştir. Yapılan çalışmada ftalosiyanin bileşiklerinin 25, 50, 75 ve 100 μM konsantrasyondaki çözeltilerinin radikal süpürme aktivitesi yüzde (%) cinsinden belirlenmiştir ve referans olarak kullanılan gallik asit ile karşılaştırılmıştır. Üç ftalosiyanin bileşiği arasında tüm konsantrasyonlarda en yüksek aktiviteyi **Pc3** bileşiği gösterirken, en düşük aktiviteyi ise **Pc2** bileşiği göstermiştir. Referans bileşik ile karşılaştırıldığında ise gallik asitin tüm konsantrasyonlarda çok daha yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Tablo 7. Ftalosiyanin bileşiklerinin DPPH radikal süpürme aktiviteleri (%)

μM	Pc1	Pc2	Pc3	Gallik Asit
25	13.49 $\pm$ 0.40	5.12 $\pm$ 0.10	16.71 $\pm$ 0.32	71.70 $\pm$ 0.07
50	20.13 $\pm$ 0.41	11.64 $\pm$ 0.21	23.58 $\pm$ 0.17	77.44 $\pm$ 0.13
75	23.70 $\pm$ 0.44	18.65 $\pm$ 0.09	37.14 $\pm$ 0.11	81.02 $\pm$ 0.03
100	32.73 $\pm$ 0.90	30.05 $\pm$ 0.13	43.14 $\pm$ 0.30	83.16 $\pm$ 0.06

6.4.3. Metal Şelat Bağlanma Aktivitesinin Belirlenmesi

Bu metotta demir iyonlarının indikatörü olan ferrozin demir iyonlarıyla kompleks oluşturarak çözeltinin renginin değişmesine sebep olur ve bu çözelti 562 nm’de maksimum absorbands verir. Antioksidan maddelerin aktiviteleri, ferrozin molekülüyle rekabet edip ferrozin-Fe²⁺ kompleksi şeklinde, demir iyonlarını bağlayarak çözelti renginin giderek solması ve absorbands değerinin azalması esasına dayanmaktadır. En düşük absorbands değeri en yüksek demir iyonlarını bağlama aktivitesini işaret etmektedir (97).

Bu bilgiler ışığında ftalosiyanin bileşiklerinin metal şelat bağlanma aktivitesi belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 8’de verilmiştir. Yapılan çalışmada ftalosiyanin bileşiklerinin 25, 50, 75 ve 100 μM konstrasyondaki çözeltilerinin metal şelat bağlanma aktivitesi yüzde (%) cinsinden belirlenmiş ve referans olarak kullanılan EDTA ile karşılaştırılmıştır. Referans bileşik olarak kullanılan EDTA’nın tüm konsantrasyonlarda çok daha yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

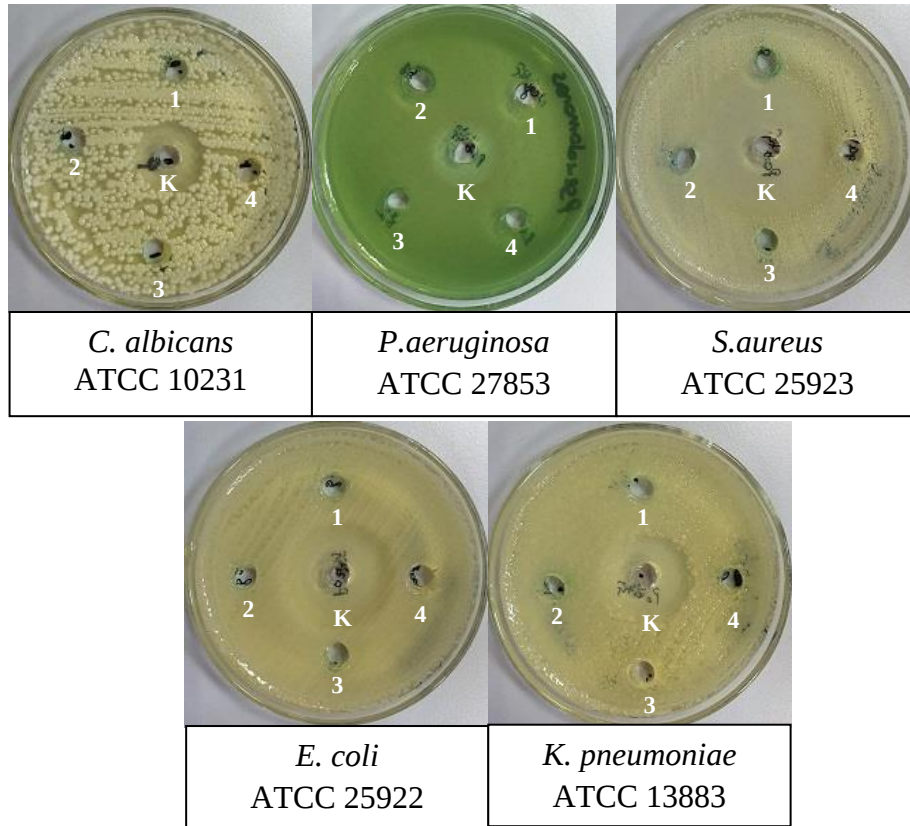
Tablo 8. Ftalosiyanin bileşiklerinin metal şelat bağlanma aktiviteleri (%)

μM	Pc1	Pc2	Pc3	EDTA
25	6.17 $\pm$ 0.17	3.31 $\pm$ 0.81	10.7 $\pm$ 0.19	16.92 $\pm$ 0.10
50	11.56 $\pm$ 0.43	9.83 $\pm$ 0.15	16.97 $\pm$ 0.04	48.19 $\pm$ 0.09
75	26.24 $\pm$ 0.66	21.04 $\pm$ 0.46	21.19 $\pm$ 0.12	84.1 $\pm$ 0.20
100	33.07 $\pm$ 0.11	30.65 $\pm$ 0.04	36.83 $\pm$ 0.13	95.7 $\pm$ 0.13

6.5. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

C. albicans ATCC 10231 türü antifungal, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *S.aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 ve *K. pneumoniae* ATCC 13883 türü antibakteriyel

mikroorganizmalara karşı ftalosiyanin bileşiklerinin antimikrobiyal aktiviteleri agar difüzyon metodu ile test edilmiştir. *C. albicans* ATCC 10231 türü için Amfoterisin B, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *S.aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 ve *K. pneumoniae* ATCC 13883 türleri için pozitif kontrol olarak Gentamisin kullanılırken negatif kontrol olarak üç bileşiğin de çözücüsü olan su kullanılmıştır. Yapılan aktivite testleri sonucunda Resim 8’de de görüldüğü gibi ftalosiyanin bileşiklerinin antimikrobiyal aktivite göstermediği görülmüştür.



Resim 8. Ftalosiyanin bileşiklerinin antimikrobiyal aktiviteleri. **K:** Kontrol, **1:** 30 µL su, **2:** 30 µL 500 µg/mL **Pc1**, **3:** 30 µL 500 µg/mL **Pc2**, **4:** 30 µL 500 µg/mL **Pc3**

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

DNA ile metal bileşiklerin etkileşimi DNA zararını indükleyerek hücre bölünmesini engellemekte ve neticede hücre ölümüne yol açmaktadır (125). Bundan dolayı antikanser ilaçların birçoğunun temel amacı DNA'yı kontrol altına alıp yok etmektir. DNA'yı kontrol altına alabilmenin yolu ise bileşiklerin DNA'ya bağlanma modlarının belirlenebilmesinden geçmektedir (126). Spektrumda gözlenen değişiklikler etkileşimin varlığı ve türü konusunda kanıt sağladığı için, UV spektroskopik titrasyon DNA'nın metal bileşiklerle bağlanma modunu araştırmak için etkili bir metottur (127, 128). Bu sebeple öncelikli olarak bu çalışmada DNA bağlanma çalışmaları gerçekleştirildi.

Çalışılan bileşiklerin absorpsiyon spektrumlarında artan CT-DNA ilavesiyle meydana gelen spektral değişiklikler incelendiğinde **Pc1**, **Pc2** ve **Pc3** bileşiklerinde hipokromizm ve kırmızıya küçük kaymalar gözlenmiştir. Bileşiklerin bağlanma sabitleri ise sırasıyla 3.75×10^4 , 2.3×10^4 ve $4.57 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ hesaplanmıştır. Bileşiklerin hipokromizm göstermesi, kırmızı dalga boyuna küçük kaymalar göstermesi ve interkalasyon etkileşimleri için gereken K_b değeri olan 10^6 'dan daha düşük bağlama sabiti göstermesi bileşiklerin oluğa bağlanma yolu ile etkileşim yaptığı anlamına gelmektedir. Bileşiklerin DNA bağlanma aktiviteleri; sırasıyla **Pc3** > **Pc1** > **Pc2** şeklindedir.

DNA erime sıcaklığı da DNA'nın bağlanma modu hakkında bilgi vermektedir (129). Bu sebeple UV-Vis absorpsiyon titrasyonu ile oluğa bağlanma yoluyla etkileştiği düşünülen tez kapsamında incelenen bileşiklerinin farklı bir teknikle bir kez daha desteklenmesi amacıyla CT-DNA'nın bileşiklerin yokluğunda ve varlığında termal erime eğrilerinin çizilmesiyle elde edilen T_m değerleri incelenmiştir. Literatürden elde edilen bilgiler ışığında erime sıcaklığındaki 8-12 °C arasındaki artış DNA ile interkalasyon yaptığına işaret ederken, dikkat çekici değişimlerin olmaması ise oluğa bağlanmayı işaret etmektedir (116, 117). İncelenen bileşiklerin T_m değerleri **Pc1**, **Pc2** ve **Pc3** bileşikleri için sırasıyla 81.7 °C, 82.2 °C ve 82.9 °C. Bu üç bileşiğinde T_m değerlerinin dikkat çekici ölçüde değişmemesi oluğa bağlanma olduğunu daha da desteklemiştir. Bileşiklerin DNA'ya bağlanma çalışmalarının sonucunda üç ftalosiyanın bileşiğinin de DNA'nın oluğuna bağlanma etkileşimi gösterdiği belirlenmiştir.

Kimyasal nükleazlar DNA'yı oksidatif yolla kesebilen redoks aktif koordinasyon bileşiklerdir (130). Sentetik metalonükleazlar, metal iyonunu etkili bir şekilde DNA kalıbının yakınına ulaştıran ligandlara gereksinim duyarlar (131). Geçiş metal bileşiklerinin nükleaz etkinliğini ortaya koyabilmek için jel elektroforezi yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu metotta moleküllerin izolasyonu bir jel aracılığıyla elektrik alanı etkisi altında hareketlerinin kısmi hızına bağlı olarak gerçekleşmektedir. DNA negatif yüklüdür ve elektrik alana yerleştiğinde anoda doğru hareket eder. DNA'nın göçüne elektrik alanın gücü, tampon ve agaroz jelinin yoğunluğu ile DNA'nın büyüklüğü etki eder. Doğal olarak elde edilen plazmid DNA başlıca kapalı çemberimsi süpersarmal formda (Form I) olduğu kadar, kırık (Form II) ve küçük parçacıklar halinde lineer form (Form III)'dadır. Küçük moleküllerin plazmid DNA ile interkalasyonu süpersarmal formdaki DNA'yı gevşetebilir veya kesebilir bu durum hareket hızını azaltır böylece agaroz jel elektroforez metodu ile ayrı ayrı görüntülenebilirken, küçük moleküllerin DNA ile basit elektrostatik etkileşimi plazmid DNA'nın süpersarmal formunu önemli derecede etkilemez böylece süpersarmal DNA'nın hareketi değişmez (132). Bu çalışmanın amaçlarından biri incelenen ftalosiyanın bileşiklerinin antikanser bileşik olarak değerlendirilip değerlendirilemeyeceğinin ortaya koyulmasıdır ve genel olarak metal komplekslerinin biyoloji aktivitelerinin, bu metal bileşiklerin DNA'ya bağlanma, DNA'nın yapısına zarar verme ve fonksiyonunu bozma özellikleriyle yakın şekilde ilişkili olduğuna inanılmaktadır (133).

Bu bilgiler ışığında ftalosiyanın özelliklerinin ilk olarak hidrolitik kesim aktivite denemesi gerçekleştirildi. Hiçbir ilave ajan olmaksızın yapılan bu çalışma sonucunda ftalosiyanın bileşiklerinin hidrolitik kesim aktivitesinin olmadığı gözlenmiştir. İkinci olarak 650 nm ışık varlığında 10 dakika uyarılan bileşiklerin, plazmid pBR322 DNA kesim aktivitesi denemeleri gerçekleştirildi. Bu çalışmada ftalosiyanın bileşiklerinin kesim aktivitesi gözlemlendiğinden dolayı bundan sonra gerçekleştirilen çalışmalar bileşiklerin 650 nm'de 10 dakika uyarılmasından sonra gerçekleştirildi. Üç ftalosiyanın molekülünün ışık varlığında kesim aktivitesi sıralanırsa, bu sıralama **Pc3** > **Pc1** > **Pc2** şeklindedir. Ftalosiyanın bileşiklerinin fotoduyarlastıcı özelliklerinin literatür tarafından bilinmesi, bu çalışmada 650 nm'de uyarılan bileşiklerin yüksek kesim aktivitesi

göstermesi bileşiklerin fotodinamik terapi ajanı olarak kullanılabilmesine imkan tanımaktadır.

Ftalosiyanin bileşiklerinin, ışık varlığında plazmid pBR322 DNA'sı üzerinde kesim aktivitesi gösterdiğinin belirlenmesinden sonra, şartlarının optimize edilmesi amacıyla kesim pH'nın etkisi incelendi. İlk olarak ftalosiyanin bileşiği ilave edilmeden farklı pH'larda tampon kullanılarak kör çalışma yapıldı ve herhangi bir kesim aktivitesi gözlenmedi. Daha sonra bileşiklerin ilave edilmesi ile yapılan çalışma sonucunda bileşikler tüm pH'larda kesim aktivitesi göstermiştir. Bununla birlikte **Pc1** bileşiği en yüksek aktiviteyi pH 6 ve pH 9'da, **Pc2** bileşiği pH 6'da, **Pc3** bileşiği ise pH 5 ve pH 6'da göstermiştir.

Bileşiklerin 650 nm'de ışıqla uyarıldıktan sonra kesim aktivitesi göstermesinden sonra bileşiklerin kesim aktivitelerine bazı kimyasalların etkisini incelemek amacıyla yapılan deneme de hidrojen peroksit (H₂O₂), askorbik asit (AA) ve β-merkaptöetanol (ME) kullanılarak bu bileşiklerin aktivatör etkileri incelendi. İlk olarak plazmid pBR322 ile aktivatör bileşiklerin kesim aktivitesi incelendi ve tek başına bu bileşiklerin DNA'yı kesmediği ortaya çıktı. Bundan sonra ftalosiyanin bileşiklerinin varlığında aktivatör bileşiklerin DNA kesim aktivitesine artırıcı etki gösterdiği belirlendi. Aktivatör bileşiklerin DNA kesim aktivitesine etkisi sıralanırsa; H₂O₂ > AA > ME şeklindedir.

Topoizomerazlar tüm prokaryot ve ökaryotlarda bulunan, yüksek derecede korunan bir enzim ailesidir. Topoizomerazların ekspresyonu tümör ile bağlantılı olmamasına rağmen, kanserli dokularda normal dokulara göre daha yüksektir. Topoizomeraz enziminin inhibisyonu ile kanserli hücrenin çoğalmasını engelleyip, kontrol altına alınabileceği düşünülmektedir (134). Bu bilgiler ışığında ftalosiyanin bileşiklerinin topoizomeraz I enzimi inhibisyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İlk olarak DNA kontrolü incelendiğinde süpersarmal formda olduğu görülmekteyken, topoizomeraz I enzimi ilave edildiğinde DNA'nın kırık ve lineer forma dönüştüğü görülmüştür. Ftalosiyanin bileşikleri ilave edildiğinde ise süpersarmal formun tekrar kazanıldığı gözlenmiştir. Bu durumda çalışmada kullanılan ftalosiyanin bileşiklerinin topoizomeraz I enzimini inhibe ettikleri belirlenmiş olup, antikanser çalışmalar için uygun bir ajan olduğu belirlenmiştir. Üç bileşiğin topoizomeraz enzimini inhibisyon aktivitesi **Pc3 > Pc2 > Pc1** şeklindedir.

Antioksidanlar insan vücudunu serbest radikallerden ve reaktif oksijen türün etkilerinden koruyabilirler ve hem birçok kronik hastalığın sürecini hem de lipid peroksidasyonunu yavaşlatırlar (135). Bu yüzden tez kapsamında incelenen bileşiklerin potansiyel antioksidanlar olarak araştırılması önemlidir. Yapılan incelemeler sonrasında incelenen bileşiklerin dikkate değer ölçüde antioksidan aktivite gösterdikleri ortaya konulmuştur. Ftalosiyanin bileşiklerinin antioksidan aktivitesi incelendiğinde tüm bileşiklerin aktivitelerinin konsantrasyonla doğru orantılı bir şekilde arttığı görülmüştür. **Pc3** bileşiğinin diğer bileşiklere göre daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Süperoksit radikal süpürme aktivitesi üç bileşiğin de referans madde olarak kullanılan BHA'dan yüksek aktivite göstermesi oldukça ilgi çekici bulunmuştur. DPPH ve metal şelat bağlanma aktivite çalışmalarında ise referans maddelerin daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Süperoksit radikal süpürme metotunda bileşiklerin floresans lamba ile uyarılmasından sonra yapılan ölçümlerde aktivitesinin yüksek olması bileşiklerin fotodinamik terapi için uygunluğunu bir adım daha güçlendirmektedir.

Son olarak ftalosiyanin bileşiklerinin antifungal ve antibakteriyal özellikleri incelenerek yeni bir antibiyotik olma potansiyelleri araştırılmıştır. Ancak *C. albicans* ATCC 10231 türü antifungal, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *S.aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 ve *K. pneumoniae* ATCC 13883 türü antibakteriyal mikroorganizmalara karşı ftalosiyanin bileşikleri aktivite göstermemiştir. Bunun nedeni olarak çalışmada kullanılan ftalosiyanin moleküllerinin büyük olmasından dolayı hücre membranından geçemeyeceği düşünülmektedir. Hücre membranında bu bileşikleri hücre içerisine taşıyacak proteinlerin bulunmamasından dolayı bileşikler hücre içine giremedikleri için antimikrobiyal aktivite göstermedikleri düşünülmektedir.

Tüm bu bilgiler ışığı altında ftalosiyanin bileşiklerinin DNA bağlanma, DNA kesim, topoizomeraaz I inhibisyonu, antioksidan ve antimikrobiyal aktivite çalışmaları sonucunda bileşiklerin CT-DNA ile oluğa bağlanma şeklinde etkileşmesi, yüksek fotokesim aktivite göstermesi, topoizomeraaz I enzimi inhibisyonu aktivitesinin yüksek olması ve antioksidan aktivite özelliklerinin etkili olması sebebiyle fotodinamik terapide kullanılmak üzere uygun ajan adayı olacağı düşünülmüştür.

8. KAYNAKLAR

1. de la Torre G, Bottari G, Hahn U, Torres T (2010). Functional Phthalocyanines: Synthesis, Nanostructuration, and Electro-Optical Applications. In: Jiang J., (Ed), Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Germany, 1-44.
2. Demirbaşı Ü, Akyüz D, Barut B, Bayrak R, Koca A, Kantekin H (2016). Electrochemical and spectroelectrochemical properties of thiadiazole substituted metallo-phthalocyanines. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 153: 71–78.
3. Türker FA, Kayaalp SO (2002). Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik ilaçlar: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 10th ed. Ankara: Kayaalp SO, 380-415.
4. United Nations Department of Economic and Social Affairs (2007). World population prospects. The 2006 revision, 1-37.
5. Boyle P, Levin B, World Cancer Report (2008). International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
6. Çakır D, Göksel M, Çakır V, Durmuş M, Bıyıklıoğlu Z, Kantekin H (2015). Amphiphilic Zinc Phthalocyanine Photosensitizers: Synthesis, Photophysicochemical Properties and in vitro Studies for Photodynamic Therapy. *Dalton Transactions* 44(20): 9646-9658.
7. Cheng H, Huq F, Beale P, Fisher K (2006). Synthesis, characterisation, activities, cell uptake and DNA binding of a trinuclear complex: $[[trans-PtCl(NH_3)]_2\mu-[trans-Pd(NH_3)(2-hydroxypyridine)-(H_2N(CH_2)_6NH_2)]Cl_4]$. *European Journal of Medicinal Chemistry* 41: 896-903.
8. Li Y, Yang ZY, Wang MF (2009). Synthesis, characterization, DNA binding properties and antioxidant activity of Ln (III) complexes with hesperetin-4-one-(benzoyl) hydrazone. *European Journal of Medicinal Chemistry* 44: 4585–4595.
9. Barton J (1986). Metals and DNA: molecular left-handed complements, *Science* 233: 727-734.
10. Sigman DS, Mazumder A, Perrin DM (1993). Chemical nucleases. *Chemical Reviews* 93: 2295-2316.

11. Sheng X, Guo X, Lu XM, Lu GY, Shao Y, Liu F, Xu Q (2008). DNA Binding, Cleavage, and Cytotoxic Activity of the Preorganized Dinuclear Zinc (II) Complex of Triazacyclononane Derivatives. *Bioconjugate Chemistry* 19: 490-498.
12. Burrows CJ, Muller JG (1998). Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. *Chemical Reviews* 98: 1109–1151.
13. Gilad Y, Senderowitz H (2013). Docking Studies on DNA Intercalators. *Journal of Chemical Information and Modeling* 54: 96-107.
14. Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Perez JM (2007). Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 7: 3–18
15. Melendez E (2002). Titanium Complexes in cancer treatments. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 42: 309-315.
16. Pindur U, Lemster T (1998). Antitumor drug design: DNA-binding ligands, which inhibit the topoisomerase I. *Pharmazie* 53 (2): 79-86.
17. Osheroff N (2003). DNA Topology, Topoisomerases and Chemotherapy. *IGP, Autumn*.
18. Gutteridge JMC (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-Biological Interactions* 91: 133-140.
19. Weijl NI, Cleton, FJ, Osanto S (1997). Free radicals and antioxidants in chemotherapy induced toxicity. *Cancer Treatment Reviews* 23(4): 209-240.
20. Simone CB, Simone NL, Simone V, Simone CB (2007). Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival. *Alternative Therapy In Health and Medicine* 13(1): 22-28
21. Alanis AJ. (2005). Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research* 36: 697-70
22. Alam MM, Yasmin M, Nessa J, Ahsan CR (2010). Antibacterial activity of chloroform and ethanol extracts of black cumin seeds (*Nigella sativa*) against multidrug resistant human pathogens under laboratory conditions. *Journal of Medicinal Plants Research* 4(18): 1901-1905.

23. Tanis H, Aygan A, Dıgrak M (2009). Antimicrobial Activity of Four Nigella Species Grown in Southern Turkey. *International Journal of Agriculture & Biology* 11(6): 771-774.
24. Salman MT, Khan RA, Shukla I (2008). In vitro antimicrobial activity of Nigella sativa oil against multi-drug resistant bacteria. *Unimed Kuliyat II* 1: 8-13.
25. Yılmaz İ (1992). Süstitüe Ftalosiyanınlar İçin Yeni Başlangıç Maddelerinin Sentezi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
26. Sarkı G (2014). Metalsiz ve Metalli Ftalosiyanınların Sentezi, Karakterizasyonu ve Kobalt (II) Ftalosiyanınin Benzil Alkol Oksidasyonu Üzerine Katalitik Etkilerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
27. Turek P, Petit P, Andre JJ, Simon J, Even R, Boudjema B, Guillaud G, VeMaitrot M (1987). A New Series of Molecular Semiconductors: Phthalocyanine Radicals. *Journal of The American Chemical Society* 109: 5119-5122.
28. Albay A (2006). 4-kloro-3-nitrofenol Süstitüe Metalli ve Metalsiz Ftalosiyanın Bileşiklerinin Sentezi. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
29. Gökçe S (2013). Metalli Ve Metalsiz Ftalosiyanınların Sentezi, Karakterizasyonu Ve Kobalt (II) Ftalosiyanınin Siklohegzen Oksidasyonu Üzerine Katalitik Aktivitesinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
30. Ömeroğlu İ (2014). Periferel Tetra Süstitüe Metalsiz ve Metalli Ftalosiyanınların Sentezi, Karakterizasyonu ve Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Trabzon.
31. Çakır D, Göl C, Çakır V, Durmuş M, Bıyıklıoğlu Z, Kantekin H (2014). Water soluble {2-[3-(diethylamino)phenoxy]ethoxy} substituted zinc (II) phthalocyanine photosensitizers. *Journal of Luminescence* 159: 79-87.
32. McKeown NB (1998). *Chemistry of Solid State Materials* 6, Phthalocyanine Materials,. Cambridge Univ. Press,
33. Sharman WM, Van Lier JE (2003).; *Phthalocyanines: Synthesis. The Porphyrin Handbook* 15(97): 1-60 .

34. Gürek AG (1996). Tetratiya-Makrohalkaları İçeren Yeni Tip Ftalosiyanimler, Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
35. Bilgin A, Ertem B, Gök Y (2005). Synthesis and Characterization of New Metal-free and Metallophthalocyanines Containing Macrotricyclic moieties. *Polyhedron* 24: 1117-1124.
36. Leznoff CC, Lever ABP (1993). Phthalocyanines properties and applications, vol. 2, VCH Publisher, New York.
37. Emmelius M, Pawlowski G, Vollmann HW (1989). Materials for optical data storage *Angewandte Chemica International Edition* 28: 1445- 1471.
38. Leznoff CC, Lever ABP (1996). Phthalocyanines properties and applications, vol. 4, VCH Publisher, New York.
39. Yılmaz F, Özer M, Kani İ, Bekaroğlu Ö (2009). Catalytic activity of a thermoregulated, phase-separable Pd(II)-perfluoroalkylphthalocyanine complex in an organic/fluorous biphasic system: hydrogenation of olefins. *Catalysis Letters* 130: 642-647.
40. Bonnett R (2000). In *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*. Gordon and Breach Science Publishers, London.
41. Bayrak R (2013). Periferik Çevresinde Triazol Grubu Bulunan Yeni Metalli ve Metallsiz Ftalosiyanimlerin Sentezi, Fotofiziksel ve Fotokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
42. Prasad PN (2003). *Introduction to Biophotonics*. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, 99-270.
43. Zheng H (2005). A Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy. *Technology Cancer Research Treatment* 4(3): 283–293.
44. Uslan C (2012). Yeni Silisyum Ftalosiyanimlerin Sentezi ile Fotokimyasal ve Biyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
45. Demirkapı D (2013). Yeni Silisyum Ftalosiyanimlerin Sentezi ile Fotokimyasal ve Biyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
46. Keha E, Küfrevioğlu İ (2012). *Biyokimya*. Aktif Yayın Evi. 9.Baskı, 521-544.

47. Güner S (2007). Biyokimya-I, Biyomoleküllerin Yapısı ve İşlevi. KTÜ Fen Ed. Yayınları, No.224, Trabzon, 231-243.
48. Klug WS, Cummings MR, Spencer CA (2011). Genetik Kavramlar, 8.baskı, Ankara, 677s.
49. Clausen-Schaumann H, Rief M, Tolksdorf C, Gaub H (2000). Mechanical Stability of Single DNA Molecules. *Biophysical Journal* 78: 1997–2007.
50. Konuk M (2004). Moleküler Biyoloji (Çeviri Notları). Nobel dağıtım, No.121, Ankara, 31-41.
51. Gökçe C (2012). Bazı Geçiş Metallerinin Yeni Hidrazon Schiff Bazı Ligandları ile Koordinasyon Bileşiklerinin Hazırlanması, Yapılarının Aydınlatılması, DNA Etkileşmelerinin ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla.
52. Içsel C (2013). 2-(Hidroksimetil)Piridin ve 2-(2-Hidroksietil)Piridin Ligantları İçeren Palladyum (II) ve Platin (II) Komplekslerinin Sentezi, Kristal Yapıları Spektroskopik ve DNA Bağlanma Özellikleri. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
53. Gürçan N (2014). Ferrosen Aktif Birimi İçeren Yeni Azin Türevlerinin DNA Bağlanma, DNA Kesim ve Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
54. Yıldırım A, Bardakcı F, Karataş M, Tanyolaç B (2007). Moleküler Biyoloji. İkinci baskı. Nobel Yayın Dağıtım, No.1170, Ankara, 613.
55. Braña MF, Cacho M, Gradillas A, Pascual-Teresa B, Ramos A (2001). Intercalators as Anticancer Drugs. *Current Pharmaceutical Design* 7(17): 1745-1780.
56. Blackburn GM, Gait MJ (1996). DNA and RNA structure: nucleic Acids in Chemistry and Biology. 3rd ed. Blackburn GM, Gait MJ. England: Oxford University Press, 28-39.
57. Lerman LS (1961). Structural considerations in interaction of DNA and acridines. *Journal of Molecular Biology* 3(1): 18–24.
58. Rosenberg B, Van Camp L, Grimley, EB, Thomson AJ (1967). Inhibition of growth or cell division in Escherichia Coli by different ionic species of platinum complexes. *Journal of Biological Chemistry* 242(6): 1347–1350.

59. Peyrone M (1844). Ueber die einwirkung des ammoniaks auf platinchlorür [On the influence of ammonia on platinum chloride]. Liebigs Annalen der Chemie 51(1): 1–29.
60. Tekin T (2014). Hidrazon Oksimi İçeren Farklı Metal Komplekslerinin Sentezlenmesi, Karakterizasyonu ve DNA Etkileşimlerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla.
61. Brabec V, Kasparkova J (2005). Modifications of DNA by platinum complexes relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. Drug Resistance Updates 8(3): 131–146.
62. Göçmen E (2014). Bazı Tek ve Çift Disli Tersiyer Fosfin Ligantları İçeren Yeni Gümüş(I) Sakkarinat Komplekslerinin Sentezi, Karakterizasyonu, Yapıları, DNA Bağlanma ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
63. Takahara PM, Rosenzweig AC, Frederick CA, Lippard SJ (1996). Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. Nature (Lond) 377: 649–652.
64. Palchaudhuri R, Hergenrother PJ (2007). DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. Current Opinion in Biotechnology 18(6): 497-503.
65. Blackburn GM, Gait MJ (1996). DNA and RNA structure: nucleic Acids in Chemistry and Biology. 3rd ed. Blackburn GM, Gait MJ. England: Oxford University Press, 28-39.
66. Bischoff G, Hoffmann S (2002) DNA-Binding of drugs used in medicinal therapies. Current Medicinal Chemistry 9(3): 321.
67. Yıldız U (2012). Bazı Metal Komplekslerinin DNA ile Etkileşimlerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Zonguldak.
68. Lerman L S (1961). Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. Journal of Molecular Biology 3(1): 18-30.
69. Martinez R, Garcia LC (2005). The Search of DNA-Intercalators as Antitumoral Drugs: what it Worked and What did not Work. Current Medicinal Chemistry 12(2): 127-151.

70. Newton BA (1957). The mode of action of phenanthridines: The effect of Ethidium Bromide on cell division and nucleic acid synthesis. *Journal of General Microbiology* 17: 718–730.
71. Waring MJ (1965). Complex formation between Ethidium Bromide and nucleic acids. *Journal of Molecular Biology* 13: 269–282.
72. Strekowski L, Wilson B (2007). Noncovalent Interactions with DNA: an Overview. *Mutation Research* 623(1-2): 3-13.
73. Frederick CA, Williams LD, Ughetto G, Van der Marel GA, Van Boom JH, Rich A, Wang AHJ (1990). Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin. *Biochemistry* 29 (10): 2538-2549.
74. Wang JC (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature Review Molecular Cell Biology* 3: 430-440.
75. Bickle TA, Krüger DH (1993). Biology of DNA restriction. *Microbiology Review* 57: 434-450.
76. Addison AW, Palamiandavar M, Driessen WL, Paap F, Reedijk J (1988). Copper Complexes of Some Tetradentate Pyrazolyl Amines. *Inorganic Chimica Acta* 142: 95-100.
77. Addison AW, Rao TN, Reedijk J, Vanrijn J, Verschorr GC (1984). Synthesis, Structure, and Spectroscopic Properties of Copper (II) Compounds Containing Nitrogen–Sulphur Donor Ligands; the Crystal and Molecular Structure of Aqua[1,7-bis(N-methylbenzimidazol-2'-yl)-2,6-dithiaheptane]copper(II) Perchlorate. *Journal of Chemical Society-Dalton Transactions* 7: 1349-1356.
78. De Hoog P, Pachon LD, Gamez P, Lutz M, Spek AL, Reedijk J (2004). Solution Stable Trinuclear Zinc (II) Cluster From 4-methyl-2-N-(2 pyridylmethylene) aminophenol (HPyrimol). *Dalton Transactions* 17: 2614-2615.
79. Kottke T, Stalke D (1993). Crystal Handling at Low Temperatures. *Journal of Applied Crystallography* 4: 615-619.
80. Maheswari PU, Barends S, Ozalp YS, De Hoog P, Casellas H, Teat SJ (2007). Unique Ligand-Based Oxidative DNA Cleavage by Zinc (II) Complexes of Hpyramol and Hpyrimol. *Chemistry-A European Journal* 13: 5213-5222.
81. Neves A, Terenzi H, Horner, R. (2001). Hydrolytic DNA cleavage promoted by a dinuclear iron(III) complex. *Inorganic Chemistry Communications* 4: 388-391.

82. Sangeetha G, Blessy Baby M, Sudhamani CN, Bhojya Naik HS (2014). Mechanism of DNA binding and cleavage. *Biomedicine and Biotechnology* 2: 1-9.
83. Leppard JB, Champoux JJ (2005). Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control. *Chromosoma* 114: 75–85.
84. Pommier Y, Pourquier P, Fan Y, Strumberg D (1998). Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1400: 83–105.
85. Schoeffler AJ, Berger JM (2008). DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. *Quarterly Reviews of Biophysics* 41 : 41–101.
86. Harvey R, Ferrier D (2014). Lippincott: Biyokimya Nobel Tıp Kitapevleri 5. Baskı 401.
87. Baguley BC, Ferguson LR (1998). Mutagenic properties of topoisomerase targeted drugs, *Biochimica et Biophysica Acta* 1400: 213-222.
88. Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A (2003). Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy, *Pharmacology and Therapeutics* 99: 167-181.
89. Foto E (2007). Bazı Benzoksazin Türevlerinin Ökaryotik DNA Topoizomeraz I Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
90. Kaplan Ç (2009). Bazı Benzazol Türevlerinin Ökaryotik DNA Topoizomeraz I ve II Enzimleri Üzerine İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
91. Yıldız L, Başkan K, Tütem E, Apak R (2008). Combined HPLC CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay of parsley, celery leaves, and nettle. *Talanta* 77: 304–313.
92. Yılmaz İ (2010). Antioksidan İçeren Bazı Gıdalar ve Oksidatif Stres. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 17(2): 143-153.
93. Akça A (2012). Biber Çeşitlerinin Antioksidan Kapasiteleri ve Bileşenleri Açısından Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

94. Pellegrini N, Miglio C, Del Rio D (2009). Effect of domestic cooking methods on the total antioxidant capacity of vegetables. *International of Journal Food Sciences and Nutrition* 60(2): 12–22.
95. Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release* 113: 189–207.
96. Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D (2009). Antioxidants and the Comet assay. *Mutation Research* 681: 51–67.
97. Çelebi M (2014). Yeni İşlevsel Fonksiyonlu Ftalosiyanın Sentezi, Karakterizasyonu ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
98. Rosenberg B, Camp LV, Trosko JE, Mansour VH (1969). Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* 222-385.
99. De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (1985). *Cancer, principles and practice of oncology*. Philadelphia: Lippincott.
100. Lippard SJ, Pil P (1997). *Encyclopedia of cancer, cis-platin and related drugs*. San Diego, California: Academic Press 392-410.
101. Köpf H, Köpf-Maier P (1979). Titanocen-dichlorid-das erste metallocen mit cancerostatischer wirksamkeit. *Angewandte Chemica International Edition England* 18-477.
102. Korfel A, Scheulen ME, Schmoll HJ, Gründel O, Harstrick A, Knoche M, Fels LM, Skorzec M, Bach F, Baumgart J, Saß G, Seeber S, Thiel E, Berdel W (1998). Phase I clinical and pharmacokinetic study of titanocene dichloride in adults with advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research* 4: 2701–2708.
103. Luemmen G, Sperling H, Luboldt H, Otto T, Ruebben H (1998). Phase II trial of titanocene dichloride in advanced renal-cell carcinoma. *Cancer Chemotherapy Pharmacology* 42: 415–417.
104. Moustafa TEY (2004). *Synthesis and Characterization of Some New Phthalocyanines for Potential Industrial Application*, Doctoral Thesis, Universität Tübingen, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Tübingen.

105. Nyokong T, Antunes E (2013). Influence of nanoparticle materials on the photophysical behavior of phthalocyanines *Coordination Chemistry Review*, 257: 2401–2418.
106. Ağırtaş MS, Cabir B, Özdemir S (2013). Novel metal (II) phthalocyanines with 3,4,5-trimethoxybenzyloxy-substituents: synthesis, characterization, aggregation behaviour and antioxidant activity. *Dyes and Pigments* 96: 152–157.
107. Turanlı-Yıldız B, Sezgin T, Çakar PZ, Uslan C, Sesaslan BŞ, Gül A (2011). The use of novel photobleachable phthalocyanines to image DNA. *Synthetic Metals* 161: 1720-1724.
108. Uslan C, Sesaslan Ş (2012). Synthesis of novel DNA-interacting phthalocyanines. *Dyes and Pigments* 94: 127-135.
109. Evren D, Burat Kalkan A, Özçeşmeci İ, Sesaslan BŞ (2013). Synthesis of novel tetracationic phthalocyanines and investigation of their DNA-binding properties. *Dyes and Pigments* 96: 475-482.
110. Lopez Zeballos NC, Gauna GA, Garcia Vior MC, Awruch J, Dicello LE (2014). Interaction of cationic phthalocyanines with DNA. Importance of the structure of substituents. *Journal of photochemistry and Photobiology B: Biology* 136: 29-33.
111. Yabaş E, Bağda E, Bağda E (2015). The water soluble ball-type phthalocyanine as new potential anticancer agents. *Dyes and Pigments* 120: 220-227.
112. Shuai L, Wang S, Zhang L, Fu B, Zhou X (2009). Cationic Porphyrins And Analogues as New DNA Topoisomerase I and II Inhibitors. *Chemistry & Biodiversity* 6: 827-837.
113. Pires Amaral G, Puntel Oriane G et al (2012). The antioxidant properties of different phthalocyanines. *Toxicology in Vitro* 26: 125-132.
114. Çelebi M, Ağırtaş MS, Okumus V, Özdemir S (2014). Metallo phthalocyanines bearing (2-((2-hydroxyethyl) (p-tolyl)amino)ethoxy) and (2-((2-phenoxyethyl) (p-tolyl)amino)ethoxy)phthalonitrile substituents: Synthesis, characterization, aggregation behavior, antioxidant and antibacterial activity. *Synthetic Metals* 195: 154-161.
115. Wolf A, Shimer G, Meehan T (1987). In Vitro Studies on Calf Thymus DNA interaction with Quercetin-Palladium (II) Complex. *Biochemistry* 26: 6392–6396.
116. Detmer CA, Pamatong FV, Bocarsly JR (1997). Molecular recognition effects in

- metal complex mediated double-strand cleavage of DNA: Reactivity and binding studies with model substrates, *Inorganic Chemistry* 36: 3676-3682.
117. Hassan MF, Rauf A (2015). Synthesis and multi-spectroscopic DNA binding study of 1,3,4-oxadiazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives of fatty acid. *Spectrochimica Acta Part A* 153: 510-516.
 118. Reddy PR, Shilpa A, Raju N, Raghavaiah P (2011). Synthesis, structure, DNA binding and cleavage properties of ternaryamino acid Schiff base-phen/bipy Cu(II) complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry* 105(12): 1603-1612.
 119. Zhu LN, Kong DM, Li XZ, Wang GY, Wang J, Jin YW (2010). DNA cleavage activities of tetraazamacrocyclic oxamido nickel (II) complexes. *Polyhedron* 29(1): 574–580.
 120. Jiang Q, Xiao N, Shi P, Zhu Y, Guo Z (2007). Design of artificial metallonucleases with oxidative mechanism. *Coordination Chemistry Reviews* 251(15-16): 1951-1972.
 121. Arjmand F, Parveen S, Afzal M, Shahid M (2012). Synthesis, characterization, biological studies (DNA binding, cleavage, antibacterial and topoisomerase I) and molecular docking of copper (II) benzimidazole complexes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 114: 15-26.
 122. Liu XW, Zhang SB, Li L, Chen YD, Lu JL (2013). Ruthenium (II) complexes containing a new asymmetric ligand: DNA interaction, photocleavage and topoisomerase I inhibition. *Journal of Organometallic Chemistry* 729: 1-8.
 123. Beauchamp C, Fridovich I (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44(1): 276-87.
 124. Blois M.S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* 181: 1199-1200.
 125. Chauhan M, Banerjee K, Arjmand F (2007). DNA binding studies of novel Copper (II) complexes containing L-tryptophan as chiral auxiliary: in vitro antitumor activity of Cu-Sn₂ complex in human neuroblastoma cells. *Inorganic Chemistry* 46(8): 3072-3082.
 126. Chitrapriya N, Mahalingam V, Zeller M, Lee H, Natarajan K (2010). Synthesis, characterization, DNA binding and cleavage studies of Ru (II) complexes containing oxime ligands. *Journal of Molecular Structure* 984(1-3): 30–38.

127. Barton JK, Danishefsky A, Goldberg J (1984). Tris(phenanthroline)ruthenium (II): stereoselectivity in binding to DNA. *Journal of the American Chemical Society* 106 (7): 2172–2176.
128. Chao H, Mei W, Huang Q, Ji L (2002). DNA binding studies of ruthenium (II) complexes containing asymmetric tridentate ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry* 92(3-4): 165–170.
129. Reddy PR, Shilpa A, Raju N, Raghavaiah P (2011). Synthesis, structure, DNA binding and cleavage properties of ternary amino acid Schiff base-phen/bipy Cu (II) complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry* 105(12): 1603-1612.
130. Raman N, Jeyamurugan R, Sakthivel A, Mitu L (2010). Novel metal-based pharmacologically dynamic agents of transition metal (II) complexes: designing, synthesis, structural elucidation, DNA binding and photo-induced DNA cleavage activity. *Spectrochim Acta Part A: Molecular Biomolecular Spectroscopy* 75(1): 88-97.
131. Surendra Babu MS, Krishna PG, Reddy KH, Philip GH (2009). Synthesis, characterization, electrochemical studies, DNA binding, and cleavage activity of mixed copper(II)oxime DMSO complexes. *Main Group Chemistry* 8(2): 101–114.
132. Sathiyaraj S, Sampath K, Raja G, Butcher RJ, Gupta SK, Jayabalakrishnan C (2013). DNA binding/cleavage, antioxidant and cytotoxic activities of water soluble cobalt (II) and copper (II) antipyrine complexes. *Inorganic Chimica Acta* 406: 44-52.
133. Liang F, Wang P, Zhou X, Li T, Li Z, Lin H, Gao D, Zhen C (2004). Nickel (II) and cobalt (II) complexes of hydroxyl-substituted triazamacrocyclic ligand as potential antitumor agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14(8): 1901–1904.
134. Korwek Z, Sewastianik T, Bielak-Zmijewska A, Mosieniak G, Alster O, (2012). Inhibition of ATM blocks the etoposide-induced DNA damage response and apoptosis of resting human T cells. *DNA Repair* 11 (864): 73.
135. Sathiyaraj S, Sampath K, Raja G, Butcher RJ, Gupta SK, Jayabalakrishnan C (2013). DNA binding/cleavage, antioxidant and cytotoxic activities of water soluble cobalt (II) and copper (II) antipyrine complexes. *Inorganic Chimica Acta* 406: 44-52.

9. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı	: BARUT, Burak
Uyruğu	: T.C
Doğum tarihi ve yeri	: 01.10.1988 – TRABZON
Medeni hali	: Bekar
Telefon	: 0462 377 88 44
E-Posta	: burakbarut@ktu.edu.tr

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Biyokimya	2014-
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü	2013-
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü	2008-2013
Lise	Tevfik Serdar Anadolu Lisesi	2002-2006

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
1. Araştırma Görevlisi	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2014-

YABANCI DİL

İngilizce

UZMANLIK ALANI
Biyokimya

YAYINLAR/BİLDİRİLER

1. Demirbaş Ü, Akyüz D, Barut B, Koca A, Kantekin H (2016). Electrochemical and spectroelectrochemical properties of thiadiazole substituted metallo-phthalocyanines. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular And Biomolecular Spectroscopy* 153: 71-78.
2. Renda G, Özel A, Yaylı B, Barut B, Çol Ayvaz M, Akyüz Turumtay E (2015). Analysis of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Three *Ornithogalum L.* Species. 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, 9-12 Haziran, 340.
3. Barut B, Yıldırım S, Özel A, Yaşar A (2015) Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Lichen *Pertusaria sp.* 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, 9-12 Haziran 2015, 206.
4. Barut B, Özel A, Demirbaş Ü, Bıyıklıoğlu Z (2015). Titanyum (IV) Ftalosiyanın Bileşiklerinin DNA Etkileşimleri ve Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi. XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Antalya, 3-6 Kasım 2015, 256.
5. Barut B, Sevgi S, Renda G, Özel A, Yalçın F N (2015). Cholinesterase and Tyrosinase Inhibitory Activities of Two *Astragalus L.* Species From Turkey. Gazi Pharma Symposium, Antalya, 12-15 Kasım 2015, 114.

ÖDÜLLER/ TEŞVİKLER/ BURSLAR

1. Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Birinciliği
2. Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Birinciliği

