

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANTİNEOPLASTİK İLAÇLARIN DNA İLE  
ETKİLEŞMELERİNİN UV-GÖRÜNÜR BÖLGE  
SPEKTROSKOPİSİ İLE İNCELENMESİ**

**Ecz. Levent ATMACA**

**Analitik Kimya Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA**

**2020**



**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANTİNEOPLASTİK İLAÇLARIN DNA İLE  
ETKİLEŞMELERİNİN UV-GÖRÜNÜR BÖLGE  
SPEKTROSKOPİSİ İLE İNCELENMESİ**

**Ecz. Levent ATMACA**




**Analitik Kimya Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Nuran ÖZALTIN**

**ANKARA  
2020**


**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ****SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ****ANTİNEOPLASTİK İLAÇLARIN DNA İLE  
ETKİLEŞMELERİNİN UV-GÖRÜNÜR BÖLGE  
SPEKTROSKOPİSİ İLE İNCELENMESİ****Öğrenci: Ecz. Levent ATMACA****Danışman: Prof. Dr. Nuran ÖZALTIN**

Bu tez çalışması 29.01.2020 tarihinde jürimiz tarafından Analitik Kimya Programı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı:**  
*Prof. Dr. Sedef Kır**Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi***Tez Danışmanı:**  
*Prof. Dr. Nuran Özaltın**Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi***Üye:**  
*Prof. Dr. Nursabah Elif Başcı Akduman*  
*Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi***Üye:**  
*Prof. Dr. Incilay Süslü*  
*Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi***Üye:**  
*Doç. Dr. İ. Murat Palabıyık*  
*Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi*

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

11 Şubat 2020

  
*Prof. Dr. Diclehan ORHAN*  
**Enstitü Müdürü**

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan *“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”* kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>

o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>

o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. <sup>(3)</sup>

06.01.2020



Ecz. Levent ATMACA

<sup>(1)</sup> Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

<sup>(2)</sup> Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

<sup>(3)</sup> Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.

\* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Prof. Dr. Nuran ÖZALTIN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



**Ecz. Levent ATMACA**

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, karşılaştığımız sorunlar karşısında her zaman yol gösteren, bu süreçte desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için her türlü olanağı sağlayan, değerli hocam Prof. Dr. Nuran ÖZALTIN'a,

Özellikle ders döneminde öğrettikleriyle üzerimde büyük emeği olan değerli hocalarım Prof. Dr. Sacide ALTINÖZ'e, Prof. Dr. Nursabah Elif BAŞCI AKDUMAN'a, Prof. Dr. Sedef KIR'a, Doç. Dr. Mustafa ÇELEBİER'e ve tüm Analitik Kimya Anabilim Dalı çalışanlarına,

Tüm yaşamım boyunca bana sonsuz sevgi, anlayış ve sabırla destek olan; babam Erdal ATMACA'ya, annem Nermin ATMACA'ya ve hayatımda özel bir yere sahip olan Ecz. Gizem TILKI'ye en içten dileklerle minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca Gemsitabin Hidroklorür ve İrinotekan Hidroklorür standart maddelerinin temininde yaptıkları katkılardan dolayı Mustafa Nevzat İlaç Sanayii A.Ş.'ye teşekkürü bir borç bilirim.

## ÖZET

**Atmaca, L., Antineoplastik İlaçların DNA ile Etkileşmelerinin UV-Görünür Bölge Spektroskopisi ile İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2020.** Çok hızlı bir şekilde çoğalan hücreler sebebiyle ortaya çıkan kanser hastalığının tedavisinde öncelikli amaç, hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalmasını baskılamaktır. Farklı yöntemler kullanarak DNA'nın bazı kimyasal maddelerle (ilaç, metal, çevresel atıklar vb.) etkileşme türünün belirlenebilmesi, yeni ilaç tasarımlarının geliştirilmesi için önemlidir. Birçok kanser ilacı DNA molekülü ile etkileşmektedir. Bu tez çalışmasında; pirimidin nükleozidi, antineoplastik etkili, sentetik bir madde olan Gemsitabin HCl'nin (GMB) ve *Camptothecin* alkaloidinin semisentetik türevi, antineoplastik etkili bir madde olan İrinotekan HCl'nin (İTN) DNA ile etkileşmelerinin UV spektrofotometrik yöntemle incelenmesi ve DNA'ya bağlanma mekanizmalarının aydınlatılması için çalışmalar yapılmıştır. Çalışmalar hem sulu ortamda, hem de iki farklı pH (pH 7,4 ve pH 4,7) değerindeki tampon çözelti ortamında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; GMB'nin DNA ile etkileşmesinin oluğa bağlanma, İTN'nin DNA ile etkileşmesinin ise interkalasyon yoluyla gerçekleştiği görülmüştür. DNA-GMB kompleksi için pH 7,4 tampon çözeltisindeki bağlanma sabiti değeri  $1948 \text{ M}^{-1}$  olarak hesaplanırken, pH 4,7 tampon çözeltisindeki bağlanma sabiti değeri  $956 \text{ M}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. DNA-İTN kompleksi için 220 nm'deki pike göre pH 7,4 tampon çözeltisindeki kompleksin bağlanma sabiti değeri  $12632 \text{ M}^{-1}$  olarak hesaplanırken, pH 4,7 tampon çözeltisindeki kompleksin bağlanma sabiti değeri  $10825 \text{ M}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. 255 nm'deki pike göre pH 7,4 tampon çözeltisindeki kompleksin bağlanma sabiti değeri  $6348 \text{ M}^{-1}$  olarak hesaplanırken, pH 4,7 tampon çözeltisindeki kompleksin bağlanma sabiti değeri  $2798 \text{ M}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Bu verilerin ışığında bağlanma sabitinin kan pH'ında daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. DNA-ilaç etkileşmeleri ile ilgili analizlerde UV spektrofotometrik yöntemden faydalanılabileceği görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** DNA-Antineoplastik ilaç etkileşmeleri, Gemsitabin hidroklorür, İrinotekan hidroklorür, UV-GB spektroskopisi.



## ABSTRACT

**Atmaca, L., Investigation of Interactions of Antineoplastic Drugs with DNA by UV-Visible Region Spectroscopy, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Department of Analytical Chemistry Master's Thesis, Ankara, 2020.** The primary goal in the treatment of cancer, which is caused by rapidly proliferating cells, is to suppress the uncontrolled proliferation of cells. Determining the type of interaction of DNA with some chemical substances (drugs, metals, environmental wastes, etc.) using different methods is important for the development of new drug designs. Many cancer drugs interact with DNA molecules. In this thesis; studies were performed to investigate the interactions of DNA and Gemcitabine HCl (GMB), which is a pyrimidine nucleoside, antineoplastic effective synthetic substance and Irinotecan HCl (ITN), which is an antineoplastic effective semisynthetic derivative of *Camptothecin* alkaloid by UV spectrophotometric method and illuminate their DNA binding mechanisms. The studies were performed both in aqueous medium and two different pH (pH 7.4 and pH 4.7) buffer solutions. According to the results obtained; it has been observed that the interaction mechanism with DNA for GMB and ITN is groove binding and intercalation, respectively. For the DNA-GMB complex, the binding constant value in the pH 7.4 buffer solution was calculated as  $1948 \text{ M}^{-1}$ , while the binding constant value in the pH 4.7 buffer solution was calculated as  $956 \text{ M}^{-1}$ . For the DNA-ITN complex, the binding constant value of the complex in the pH 7.4 buffer solution was calculated as  $12632 \text{ M}^{-1}$ , while that of the complex in the pH 4.7 buffer solution was calculated as  $10825 \text{ M}^{-1}$  according to the peak at 220 nm and the binding constant value of the complex in the pH 7.4 buffer solution was calculated as  $6348 \text{ M}^{-1}$ , while that of the complex in the pH 4.7 buffer solution was calculated as  $2798 \text{ M}^{-1}$  according to the peak at 255 nm. In the light of these data, it is understood that the binding constant is higher in blood pH. It has been observed that UV spectrophotometric method can be used in analysis of DNA-drug interactions.

**Keywords:** DNA-Antineoplastic drug interactions, Gemcitabine hydrochloride, Irinotecan hydrochloride, UV-VIS spectroscopy.

## İÇİNDEKİLER

|  |      |
|--|------|
| ONAY SAYFASI   | iii  |
| YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI   | iv   |
| ETİK BEYAN   | v    |
| TEŞEKKÜR   | vi   |
| ÖZET   | vii  |
| ABSTRACT   | viii |
| İÇİNDEKİLER  | ix   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR  | xi   |
| ŞEKİLLER   | xii  |
| <b>1. GİRİŞ</b>  | 1    |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b>   | 2    |
| 2.1. DNA'nın Yapısı ve Özellikleri   | 2    |
| 2.2. DNA'nın Görevleri   | 5    |
| 2.3. DNA-İlaç Etkileşmeleri  | 7    |
| 2.3.1. Kovalent Bağlanma Yöntemi   | 9    |
| 2.3.2. Non-kovalent Bağlanma Yöntemi   | 10   |
| 2.4. DNA-İlaç Etkileşmesi Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler                                | 15   |
| 2.4.1. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopisi ile DNA-İlaç Etkileşmelerinin İncelenmesi | 24   |
| 2.4.2. Floresans Emisyon Spektroskopisi ile DNA-İlaç Etkileşmelerinin İncelenmesi            | 25   |
| 2.4.3. Dönüşümlü (Siklik) Voltametri ile DNA-İlaç Etkileşmelerinin İncelenmesi               | 27   |
| 2.5. Antineoplastik İlaçlar  | 29   |
| 2.5.1. Gemsitabin Hidroklorür  | 29   |
| 2.5.2. İrinotekan Hidroklorür  | 32   |
| 2.6. DNA-İlaç Etkileşmeleriyle İlgili Yapılan Çalışmalar                                     | 35   |
| 2.6.1. Gemsitabin HCl ile İlgili Yapılan Çalışmalar  | 38   |
| 2.6.2. İrinotekan HCl ile İlgili Yapılan Çalışmalar  | 38   |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>  | 40   |

|  |    |
|--|----|
| 3.1. Kullanılan Cihazlar   | 40 |
| 3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler  | 40 |
| 3.3. Kullanılan Cam ve Sarf Malzemeler   | 40 |
| 3.4. Çözeltilerin Hazırlanması   | 41 |
| 3.5. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopisi ile DNA-İlaç Etkileşmelerinin İncelenmesi | 42 |
| <b>4. BULGULAR</b>   | 43 |
| 4.1. DNA-Gemcitabin HCl Etkileşimi Bulguları   | 43 |
| 4.2. DNA-İrinotekan HCl Etkileşimi Bulguları   | 49 |
| <b>5. TARTIŞMA</b>   | 54 |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>  | 57 |
| <b>7. KAYNAKLAR</b>  | 58 |
| <b>8. EKLER</b>  |    |
| <b>EK-1:</b> Dijital Makbuz  |    |
| <b>EK-2:</b> Orijinallik Raporu  |    |
| <b>EK-3:</b> Gemcitabin Hidroklorür Analiz Sertifikası                                     |    |
| <b>EK-4:</b> İrinotekan Hidroklorür Analiz Sertifikası                                     |    |
| <b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>   |    |

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

|                   |  |
|-------------------|--|
| <b>Cis-platin</b> | Cis-diklorodiaminplatinyum (II)                                |
| <b>CYP3A4</b>     | Sitokrom P450 3A4  |
| <b>dFdCDP</b>     | 2,2-Diflorodeoksisitidin Difosfat                              |
| <b>dFdCTP</b>     | 2,2-Diflorodeoksisitidin Trifosfat                             |
| <b>DNA</b>        | Deoksiribo Nükleik Asit  |
| <b>dsDNA</b>      | Çift Zincirli DNA  |
| <b>EB</b>         | Etidyum Bromür   |
| <b>GMB</b>        | Gemsitabin Hidroklorür   |
| <b>GPTS</b>       | [3-(2,3-Epoksipropoksi)propil]trimetoksisilan                  |
| <b>HSA</b>        | İnsan Serum Albumini   |
| <b>IR</b>         | Kızılötesi   |
| <b>İTN</b>        | İrinotekan Hidroklorür   |
| <b>MTX</b>        | Mitoksantron   |
| <b>NFC</b>        | 4-Nitrofenilferrosen   |
| <b>NMR</b>        | Nükleer Manyetik Rezonans                                      |
| <b>RNA</b>        | Ribo Nükleik Asit  |
| <b>SN-38</b>      | 7-Etil-10-hidroksikamptotesin                                  |
| <b>SPION</b>      | Süperparamagnetik Demir Oksit Nanopartiküller                  |
| <b>ssDNA</b>      | Tek Zincirli DNA   |
| <b>TMPyP4</b>     | 5,10,15,20-Tetrakis-(N-metilpiridinyum-4-il)-21H,23H-porfirin  |
| <b>TPrPyP4</b>    | 5,10,15,20-Tetrakis-(N-propilpiridinyum-4-il)-21H,23H-porfirin |
| <b>UGT1A1</b>     | UDP Glukronozil Transferaz 1A1                                 |
| <b>UV-GB</b>      | Ultraviyole-Görünür Bölge                                      |

## ŞEKİLLER

### Şekil

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 2.1.  | DNA'nın yapısı ve bileşenleri.   | 3  |
| 2.2.  | DNA'daki organik bazlar.   | 3  |
| 2.3.  | DNA'daki bağlar.   | 4  |
| 2.4.  | DNA'daki oluk yapıları.  | 5  |
| 2.5.  | DNA'nın replikasyonu.  | 6  |
| 2.6.  | Transkripsiyonun ve translasyonun mekanizması.   | 7  |
| 2.7.  | A. DNA'ya kovalent olarak bağlanmış cis-platin. B. (a) Cis-platinin Guanin'e (G) ve Adenin'e (A) bağlanma şekilleri. (b) 1,2-arazincir GpG (yapı a), 1,2-arazincir ApG (yapı b), 1,3-arazincir GpNpG (yapı c), 1,2-arazincir GpG (yapı d).   | 9  |
| 2.8.  | (A) DNA'ya düzlemsel ligand kompleksinin interkalasyonu. (B) DNA'ya giren rutenyum kompleksi. (C) DNA'ya giren N1,N5-bis[piridin-2-metilen] tiyokarbohidrazon'un Co (II) ve Cu (II) kompleksleri.  | 12 |
| 2.9.  | Benzo[a]pirenin klasik interkalasyonu.   | 12 |
| 2.10. | Düğümleme interkalasyonu.  | 13 |
| 2.11. | (A) Minör oluğa bağlanan Netropsin-DNA kompleksi. (B) Akridin bis-imidazolidinonların (R = Etil) GC bölgelerine minor oluk kısmından bağlanması. (C) [Ru(TMP) <sub>3</sub> ] <sup>+2</sup> 'nin DNA oluklarına bağlanması. (D) N <sup>1</sup> ,N <sup>5</sup> -bis[piridin-2-metilen] tiyokarbohidrazonun Ni (II) ve Zn (II) metal komplekslerinin oluğa bağlanması. | 14 |
| 2.12. | DNA polielektrolit iyonlarına dış bağlanan bir kompleks.   | 14 |
| 2.13. | Elektromanyetik spektrum.  | 16 |
| 2.14. | UV-GB spektrofotometresinin şematik gösterimi.   | 16 |
| 2.15. | Absorpsiyon spektrumu.   | 17 |
| 2.16. | Işığın madde içerisinden geçişi.   | 19 |
| 2.17. | Kalibrasyon eğrisi.  | 20 |
| 2.18. | Elektronların uyarılma enerji seviyeleri ve elektronik geçiş tipleri.  | 22 |
| 2.19. | Absorpsiyon pikindeki olası kaymalar.  | 23 |
| 2.20. | GMB'nin kimyasal yapısı.   | 30 |
| 2.21. | GMB'nin etki mekanizması.  | 31 |
| 2.22. | İTN'nin kimyasal yapısı.   | 33 |
| 4.1.  | a) $3 \times 10^{-5}$ M GMB, b) $5 \times 10^{-6}$ M DNA çözeltilerinin UV spektrumları.   | 43 |

- 4.2.** DNA'nın artan derişimlerdeki UV spektrumları. a)  $14 \times 10^{-6}$  M, b)  $16,86 \times 10^{-6}$  M, c)  $25,29 \times 10^{-6}$  M, d)  $33,72 \times 10^{-6}$  M, e)  $42,16 \times 10^{-6}$  M, f)  $50,59 \times 10^{-6}$  M, g)  $59,02 \times 10^{-6}$  M, h)  $67,45 \times 10^{-6}$  M, i)  $75,88 \times 10^{-6}$  M. 43
- 4.3.** GMB'nin artan derişimlerdeki UV spektrumları. a)  $1,5 \times 10^{-5}$  M, b)  $3 \times 10^{-5}$  M, c)  $4,5 \times 10^{-5}$  M, d)  $6 \times 10^{-5}$  M, e)  $7,5 \times 10^{-5}$  M, f)  $9 \times 10^{-5}$  M, g)  $10,5 \times 10^{-5}$  M, h)  $12 \times 10^{-5}$  M, i)  $13,5 \times 10^{-5}$  M, j)  $15 \times 10^{-5}$  M. 44
- 4.4.** DNA üzerine artan derişimlerde GMB eklenmesi ile elde edilen UV spektrumları. 45
- 4.5.**  $5 \times 10^{-5}$  M DNA çözeltisi üzerine GMB yerine Şekil 4.4'teki derişimleri oluşturan hacimlerde su eklenmesi ile elde edilen UV spektrumları. 45
- 4.6.** pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde  $3 \times 10^{-5}$  M GMB üzerine artan derişimlerde DNA eklenmesi ile elde edilen UV spektrumları. a) 0 M, b)  $10^{-5}$  M, c)  $1,5 \times 10^{-5}$  M, d)  $2 \times 10^{-5}$  M, e)  $3 \times 10^{-5}$  M, f)  $4 \times 10^{-5}$  M, g)  $5 \times 10^{-5}$  M. 46
- 4.7.** pH 4,7 fosfat tampon çözeltisinde  $3 \times 10^{-5}$  M GMB üzerine artan derişimlerde DNA eklenmesi ile elde edilen UV spektrumları. a) 0 M, b)  $10^{-5}$  M, c)  $1,5 \times 10^{-5}$  M, d)  $2 \times 10^{-5}$  M, e)  $3 \times 10^{-5}$  M, f)  $4 \times 10^{-5}$  M, g)  $5 \times 10^{-5}$  M. 47
- 4.8.** pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde DNA-GMB etkileşimi için 268 nm dalga boyunda yapılan ölçüm sonucunda  $1/[DNA]$ 'ya karşı  $A_0/(A-A_0)$  grafiğı (n=6). 48
- 4.9.** pH 4,7 fosfat tampon çözeltisinde DNA-GMB etkileşimi için 268 nm dalga boyunda yapılan ölçüm sonucunda  $1/[DNA]$ 'ya karşı  $A_0/(A-A_0)$  grafiğı (n=6). 48
- 4.10.** a)  $10^{-5}$  M İTN, b)  $3 \times 10^{-5}$  M DNA çözeltilerinin UV spektrumları. 49
- 4.11.** İTN'nin artan derişimlerdeki UV spektrumları. a)  $10^{-5}$  M, b)  $2 \times 10^{-5}$  M, c)  $3 \times 10^{-5}$  M, d)  $4 \times 10^{-5}$  M, e)  $5 \times 10^{-5}$  M, f)  $6 \times 10^{-5}$  M, g)  $7 \times 10^{-5}$  M. 49
- 4.12.**  $3 \times 10^{-5}$  M İTN üzerine artan derişimlerde DNA eklenmesi ile elde edilen UV spektrumları. a) 0 M, b)  $2 \times 10^{-6}$  M, c)  $5 \times 10^{-6}$  M, d)  $10^{-5}$  M, e)  $2 \times 10^{-5}$  M, f)  $4 \times 10^{-5}$  M, g)  $6 \times 10^{-5}$  M, h)  $8 \times 10^{-5}$  M, i)  $10^{-4}$  M. 50
- 4.13.**  $10^{-4}$  M DNA çözeltisi üzerine İTN yerine Şekil 4.12'deki derişimleri oluşturan hacimlerde su eklenmesi ile elde edilen UV spektrumları. 50
- 4.14.** pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde  $3 \times 10^{-5}$  M İTN üzerine artan derişimlerde DNA eklenmesi ile elde edilen UV spektrumları. a) 0 M, b)  $2 \times 10^{-6}$  M, c)  $5 \times 10^{-6}$  M, d)  $10^{-5}$  M, e)  $2 \times 10^{-5}$  M, f)  $4 \times 10^{-5}$  M, g)  $6 \times 10^{-5}$  M, h)  $8 \times 10^{-5}$  M, i)  $10^{-4}$  M. 51
- 4.15.** pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde  $3 \times 10^{-5}$  M İTN üzerine artan derişimlerde DNA eklenmesi ile elde edilen UV spektrumları. a) 0 M, b)  $2 \times 10^{-6}$  M, c)  $5 \times 10^{-6}$  M, d)  $10^{-5}$  M, e)  $2 \times 10^{-5}$  M, f)  $4 \times 10^{-5}$  M, g)  $6 \times 10^{-5}$  M, h)  $8 \times 10^{-5}$  M, i)  $10^{-4}$  M. 52

- 4.16.** pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde DNA-İTN etkileşimi için  $1/[DNA]$ 'ya karşı  $A_0/(A-A_0)$  grafiği (n=6). 53
- 4.17.** pH 4,7 fosfat tampon çözeltisinde DNA-İTN etkileşimi için  $1/[DNA]$ 'ya karşı  $A_0/(A-A_0)$  grafiği (n=6). 53



## 1. GİRİŞ

Kanser, dünyanın gelişmiş ve gelişmekte olan birçok ülkesinde kalp hastalıklarından sonra ilk sıralarda yer alan ölüm nedenlerinden biridir. Çok hızlı bir şekilde çoğalan hücreler sebebiyle ortaya çıkan bu hastalığın tedavisinde öncelikli amaç, hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalmasını baskılamaktır. Tümör adı verilen katı kitle ya da kemik iliği veya kan ile ilişkili kanser, bir veya daha çok hücrenin büyüme kontrolünü kaybetmesine neden olur. Kanserli hücre oluşumunun temel nedeni, hücre bölünmesi sırasında gerçekleşen hatalı DNA replikasyonudur. Hücre bölünmesi; doku tamiri ve yenilenmesi amacıyla gerçekleşmektedir. DNA'nın hatalı eşleşmesinin sebep olduğu faktörlere hazırlayıcı faktörler denir.

Farklı yöntemler kullanarak DNA'nın bazı kimyasal maddelerle (ilaç, metal, çevresel atıklar vb.) etkileşme türünün belirlenebilmesi, yeni ilaç tasarımlarının geliştirilmesi için önemlidir. Birçok kanser ilacı DNA molekülü ile etkileşmektedir. DNA-ilaç kompleksini bazı moleküller kovalent bağlar aracılığıyla oluştururken, bazıları kovalent olmayan bağlar aracılığıyla oluşturur. Bu moleküllerin DNA ile etkileşmelerinin kanıtlanması ve bu etkileşmelerin türlerinin tespit edilmesi için analitik yöntemlere önemli derecede ihtiyaç bulunmaktadır. DNA-ilaç etkileşmelerini araştırmak amacıyla çoğunlukla spektroskopik ve elektrokimyasal yöntemler kullanılması yanı sıra, kromatografik yöntemlerden de faydalanılmaktadır.

Pirimidin nükleozidi, antineoplastik etkili, sentetik bir madde olan Gembisabin HCl (GMB); günümüzde lokal ileri pankreas kanseri ve metastatik pankreas kanserinde standart tedavide tercih edilen en önemli antikanser molekül durumundadır.

*Camptothecin* isimli alkaloidin semisentetik bir türevi ve Topoizomeras-I grubu antineoplastik etkili bir madde olan İrinotekan HCl (İTN); günümüzde akciğer, kolorektal, mide ve serviks gibi birçok kanser türünün standart tedavisinde tercih edilen en önemli moleküllerden biridir.

Bu tez çalışmasında; antineoplastik ilaçlardan GMB ve İTN'nin DNA ile etkileşmeleri hakkında kaynaklarda yeteri kadar çalışmaya rastlanmadığı için bu maddelerin DNA ile etkileşmelerinin spektroskopik yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. DNA'nın Yapısı ve Özellikleri

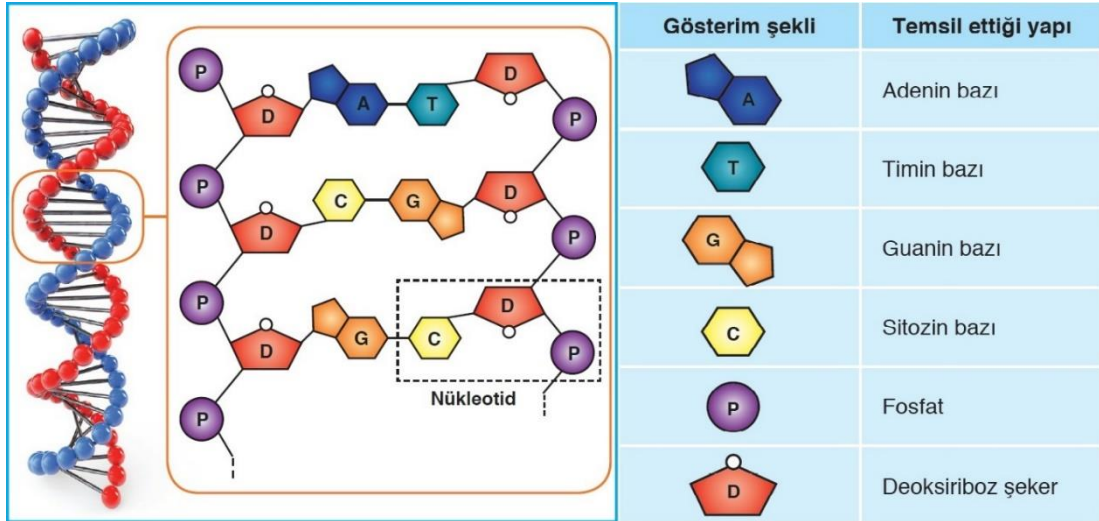
Prokaryot hücreler (bakteri vb.) hariç her hücrede sitoplazma içerisinde çekirdek bulunur. Çekirdekte ise hücrenin ve organizmanın genetik bilgisini depolayan Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) bulunur. DNA, özgül proteinleri sentezlemekten sorumlu olan ve gen adı verilen birimlerden oluşmaktadır. DNA'yı önemli bir biyomolekül yapan özelliği; bilginin uzun süreli saklanmasında, kalıtsal özelliklerin belirlenmesinde ve genetik bilginin kopyalanmasında oynadığı roldür (1).

DNA; karbon, oksijen, azot ve fosfor atomlarından oluşan, hücrenin hayati fonksiyonlarında önemli rolü olan bir moleküldür. DNA molekülünün parçası olan her bir gen, insan vücudunda belirli bir özelliği kontrol eder. Organizmanın canlılığının korunması, organların işleyişi, iş bölümü, hücrelerde üretilecek proteinlerin genetik kodlarının ve miktarının kontrolü gibi olaylar genetik bilgi deposu olan DNA aracılığıyla planlanır.

DNA molekülleri ilk olarak 19. yüzyılın sonunda A. F. Miescwer tarafından incelenmiştir. 1953'te ise Watson ve Crick tarafından DNA yapısını tanımlamak için çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda DNA'nın çift zincirli heliks şeklinde olduğu keşfedilmiştir (2).

DNA hücrede kromozomları oluşturur. DNA ökaryot hücrelerde (bitki, hayvan, mantar vb.) hücre çekirdeği içindeyken, prokaryot hücrelerde sitoplazmada yer alır (3).

Ester bağları ile birbirine bağlanmış şeker ve fosfat gruplarından oluşan polimer omurgaları, nükleotidlere destek sağlamaktadır. DNA'yı oluşturan iki iplik birbirlerine zıt yönlendirilmiştir. Her şeker grubuna organik baz olarak adlandırılan dört tür molekülden biri bağlıdır. Her sarmalda Adenin (A), Timin (T), Sitozin (C) ve Guanin (G) olmak üzere dört tür organik baz bulunmaktadır. Bir organik baz, beş karbonlu bir şeker ve bir fosfattan oluşan nükleotidler birbirine 3', 5' fosfodiester bağlarıyla bağlıdır (Şekil 2.1) (4).



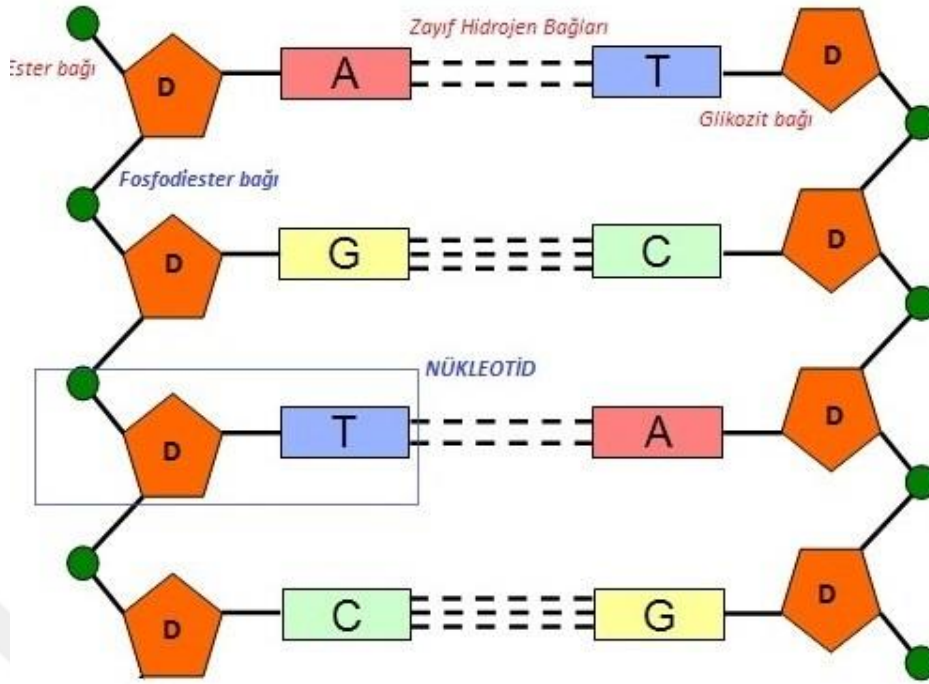
**Şekil 2.1.** DNA'nın yapısı ve bileşenleri (S, Merve., DNA ve Genetik Kod [Internet]. 2016 [28.11.2017]. Erişim adresi: <https://13010161merve.wordpress.com/2016/12/03/dna-ve-genetik-kod>).

Deoksiriboz; fosforik aside 5, organik baza 1 numaralı karbon ile bağlıdır. Organik bazlar; pürin ve pirimidin bazları olmak üzere ikiye ayrılır. A ve G pürin bazlarını, T (RNA'da Urasil (U)) ve S ise pirimidin bazlarını oluşturur (Şekil 2.2) (1).



**Şekil 2.2.** DNA'daki organik bazlar.

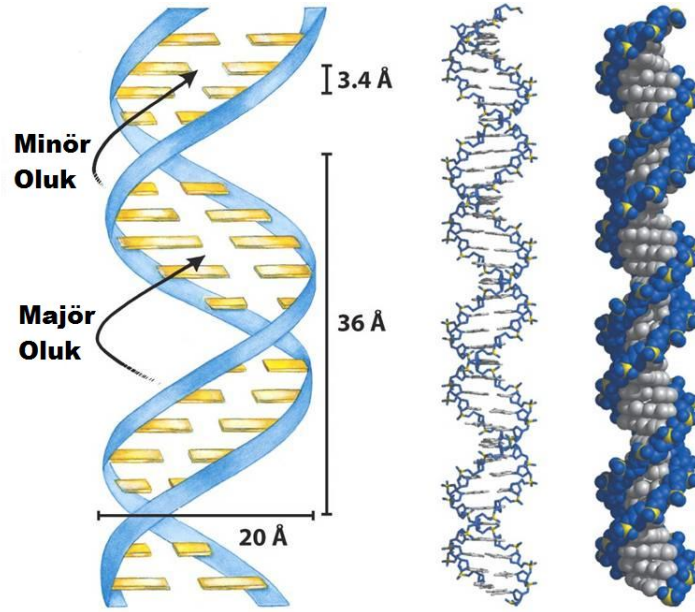
Organik bazlar arasındaki hidrojen bağları DNA molekülünün zincirlerini bir arada tutmaktadır. Çift zincirli sarmalda organik bazlar sarmalın iç kısmında, fosfat ve şeker omurgası ise dış kısmında yer aldığı için sarmalın iç tarafı hidrofobik, dış tarafı ise hidrofilik özelliğe sahiptir (Şekil 2.3) (5).



**Şekil 2.3.** DNA'daki bağlar (DNA'nın Yapısı [Internet]. 2015 [28.11.2017]. Erişim adresi: <http://www.biyolojidefteri.com/index.php/dna-nin-yapisi>).

DNA sarmalı, birbirine paralel uzanan iki polinükleotid zincirinden oluşur. Pürin ve pirimidin nükleotidleri arasındaki eşleşmeler (A-T ve G-C) spesifik olduğu için DNA zincirleri birbirinin tamamlayıcısıdır. Bu iki zincirin C-5' ucundan C-3' ucuna doğru olan yönleri birbirine göre terstir ve bir merkez eksen etrafında sarmal yapı oluşturur. Sarmalı oluşturan organik bazlar düzlemsel yapıdadır ve düzlemleri eksene diktir. Bazların arasında 3,4 Å mesafe bulunur. Karşıt zincirlerdeki organik bazlar hidrojen bağları ile bağlanarak birbirleri ile eşleşir. Sarmalın her bir tam dönüşü 36 Å uzunluğundadır, çapı ise 20 Å'tur. Yani her dönüşte 10 organik baz yer alır. DNA'nın genetik açıdan en önemli özelliği baz eşleşmesidir. DNA çift sarmalını bir arada tutan kuvvetler; sarmalın apolar yapıdaki iç kısmı ile polar yapıdaki dış kısmı arasındaki hidrofobik etkileşim ve bazlar arasındaki hidrojen bağlarıdır.

Eksen boyunca uzanan bu yerleşimin yapısından kaynaklanan büyük ve küçük oluklar bulunmaktadır. DNA sarmalının birbirine en yakın olduğu noktaya minör, en uzak olduğu noktaya majör oluk adı verilir. DNA sarmalının olukları ile etkileşmeye girerek DNA'ya van der Waals bağları ile bağlanan moleküller genellikle bu oyuklara uyum sağlayabilecek biçimde hilal şeklindedir. Bu moleküller DNA'ya bağlanıp DNA'nın fonksiyonlarını bozarak hastalığın kontrol veya tedavi aşamasında ilaç davranışı sergiler (Şekil 2.4) (6, 7).



**Şekil 2.4.** DNA'daki oluk yapıları (Fidancı, UR., Nükleik Asitler [Internet]. 2009 [28.11.2017]. Erişim adresi: [http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders\\_Notlari/Ders\\_Notlari/Nukleik\\_Asitler.html](http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/Ders_Notlari/Nukleik_Asitler.html)).

DNA ısıtıldığında, heliks yapısı bozularak ikiye ayrılır. G ve C arasında ( $G \equiv C$ ) 3, A ve T arasında ( $A = T$ ) 2 hidrojen bağı bulunduğu için yüksek oranda G ve C taşıyan DNA daha yüksek sıcaklıkta denatüre olmaktadır (1, 8).

Nükleozitler bazik yapıda olmasına rağmen omurgada bulunan fosforik asit grubu, DNA zincirinin asidik yapıda olmasına neden olmaktadır (9).

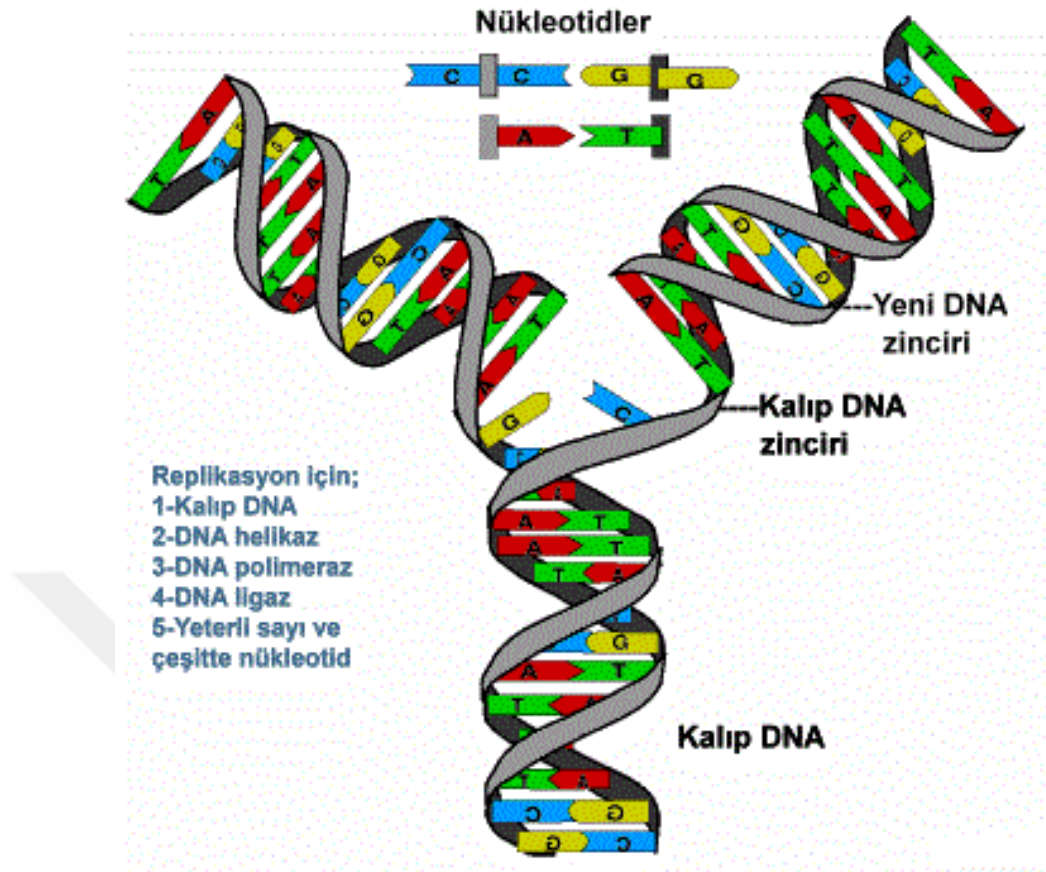
## 2.2. DNA'nın Görevleri

DNA molekülünü oluşturan zincirler birbirinden kolaylıkla ayrılabilir ve yeniden bir araya gelebilir. Bu durum DNA replikasyonuna ve protein sentezine olanak tanımaktadır (10).

DNA'da bulunan hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler, nükleotidler arasındaki kovalent bağların çözülmesini sağlar. Buna denatürasyon denir (11).

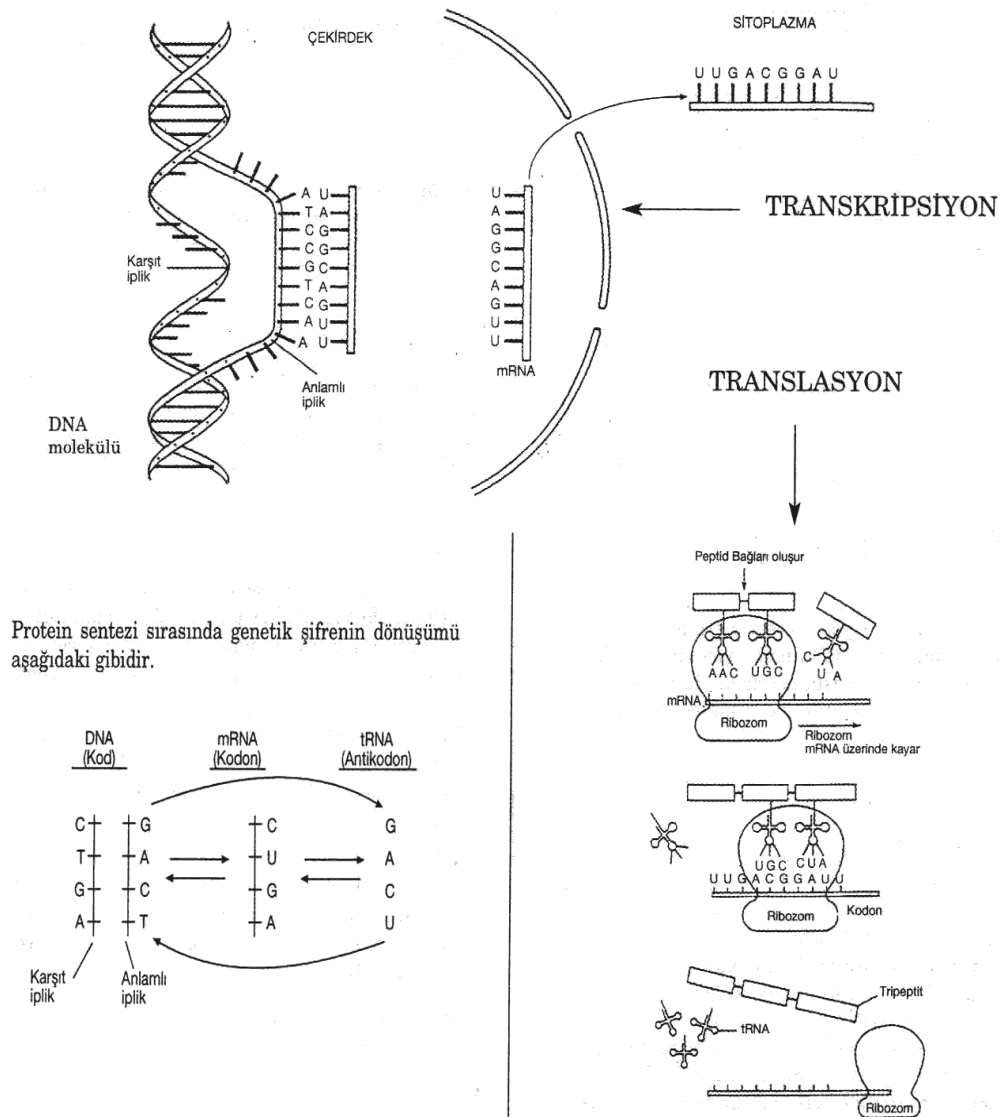
Çözülmüş hidrojen bağlarının yeniden oluşumu, nükleotidlerin birleşerek sarmal yapıyı yeniden oluşturmasını sağlar. Buna renatürasyon denir (12).

DNA'nın iki ana görevi vardır. Birinci görevi; hücre bölünmeye hazırlandığı sırada DNA'nın kendini kopyalamasıdır. Buna replikasyon denir. Bu olayda iki sarmal zinciri bir arada tutan hidrojen bağları bir fermuar gibi açılır. Açıkta kalan nükleotidler hücrede önceden sentezlenmiş nükleotidlerle tamamlanır. Böylece birbiriyle aynı iki DNA oluşur (Şekil 2.5).



**Şekil 2.5.** DNA'nın replikasyonu (İ, AGK., DNA ve Genetik Kod [Internet]. 2016 [02.12.2017]. Erişim adresi: <https://slideplayer.biz.tr/slide/3650120>).

İkinci görevi ise; kendinde bulunan bilgiyi Ribo Nükleik Asit'e (RNA) aktarmasıdır. Buna transkripsiyon denir. Bu olay sonucunda RNA'da toplanan bilgi, ribozomlarda protein, enzim gibi maddelerin sentezlenmesini sağlar. Buna işleme ise translasyon denir (Şekil 2.6) (13).



**Şekil 2.6.** Transkripsiyonun ve translasyonun mekanizması (Kalıtım ve Genetik: RNA'nın Yapısı [Internet]. 2017 [02.12.2017]. Erişim adresi: <https://bikifi.com/biki/kalitim-ve-genetik-rnanin-yapisi>).

### 2.3. DNA-İlaç Etkileşmeleri

Hızlı ve kontrolsüz şekilde çoğalan hücreler nedeniyle ortaya çıkan kanser hastalığı, hücrede büyüme kontrolünün kaybolmasına sebep olur. Hücre bölünmesi, doku onarımı ve yenilenmesi amacıyla gerçekleşir. Kanserli hücre oluşumunun temel sebebi, hücre bölünmesi sırasında meydana gelen hatalı DNA replikasyonlarıdır. Bu duruma neden olan faktörlere hazırlayıcı (predispozan) faktörler denir. Kanser tüm türlerinde temel patolojik mekanizmalar benzer olsa da ilerlemeleri farklı şekildedir. Hastalığın gelişimi ve tedavisi; başlama yaşına, büyüme hızına, bulunduğu organa, yayılma hızına, evrelerine ve tedaviye verdikleri yanıtı göre farklılık gösterir (14).

Tüm kanser hücrelerinde, anormal hücre çoğalması ve yayılması (metastaz) gözlenir. Bu hastalık, vücuttaki en küçük birim olan hücrelerin içinde başlasa da tüm vücudu etkileyebilir. Kanser hücresinin en temel özellikleri; hızlı çoğalma ve planlı hücre ölümünden korunmadır. Farklı organ ya da dokuları etkileme yeteneği de bulunur. Sağlıklı bir hücrenin yaşam döngüsü büyüme, bölünüp çoğalma ve hücre ölümünden oluşurken hücrenin normal döngüsünün dışına çıkmasıyla kanserli hücre meydana gelir. Bu anormal hücreler ya ölümlük bağışıklık sistemi tarafından yok edilir ya da çevresine uyum gösterir (8).

Kanser; hücre içi fonksiyon bozukluklarına sebep olan mutasyonlar, radyasyon, kimyasal etmenler ya da diğer kanserojen ajanlara maruz kalma sonucunda ortaya çıkar. Kanserli hücreler normal büyüme sinyalleri olmadan da yaşayabilir ve sınırsız bir replikasyon potansiyeline sahip oldukları için kontrolsüzce yayılır (15).

DNA'nın kimyasal bazı maddelerle etkileşmesi ve bu etkileşmelerin farklı yöntemler kullanılarak tayin edilebilmesi, yeni ilaçların geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir. Çünkü birçok kanser ilacı DNA molekülü ile etkileşmektedir. Etkileşmelerin bir kısmı kovalent bağlar ile, bir kısmı ise kovalent olmayan etkileşimler ile meydana gelmektedir. Bu etkileşmelerin sonucunda DNA-ilaç kompleksi oluşur. Klinikte kullanılabilir olan ve yan etkileri en aza indirilmiş bir ilacı sentezleyebilmek için, ilacın etki mekanizmasının aydınlatılmasının yanı sıra hücre özelliklerinin de iyi bilinmesi gerekir. Hücrelerde meydana gelen değişikliklerin saptanması ve açıklanması giderek zorlaşmaktadır. Antikanser ilaçların DNA ile etkileşmeye girip girmediğine ve bu etkileşmelerin türünün belirlenmesine yönelik analitik metotlar son derece önemlidir. DNA-ilaç etkileşmelerini araştırmak için çoğunlukla spektroskopik ve elektrokimyasal yöntemler kullanılmakla birlikte, kromatografik yöntemlerden de yararlanılmaktadır (16).

DNA-ilaç etkileşmeleri temel olarak 3 mekanizma ile gerçekleşir (17):

- Transkripsiyon faktörleri ve polimerazlar aracılığıyla
- DNA-RNA etkileşimi ile oluşan üçlü sarmal aracılığıyla
- Küçük aromatik moleküllerin DNA ile etkileşmesiyle

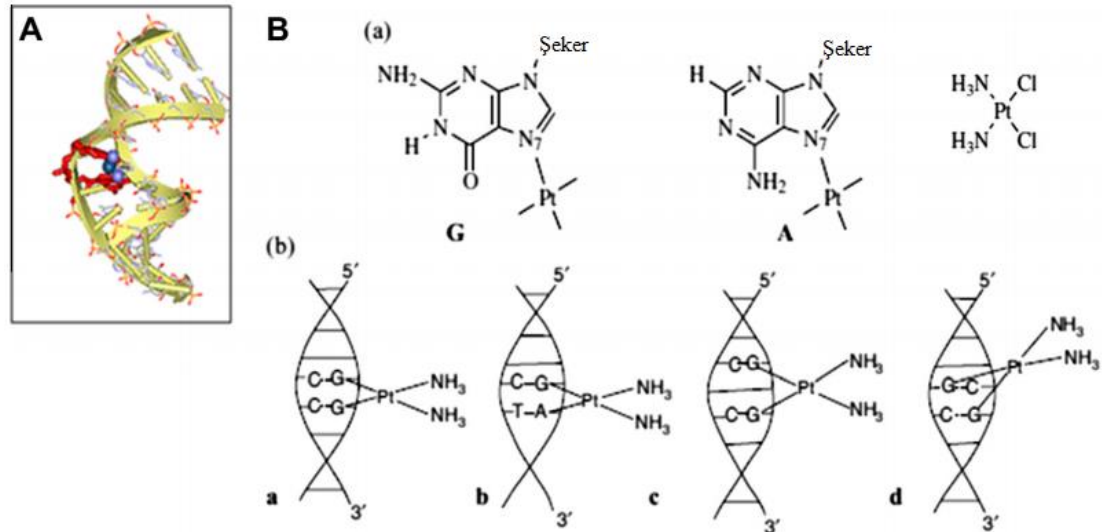
İlaç molekülleri DNA ile yapısal olarak 2 yolla etkileşebilir (18):

- Kovalent bağlanma
- Non-kovalent bağlanma

### 2.3.1 Kovalent Bağlanma Yöntemi

Klinik kullanımdaki birçok antikanser ilaç, etkisini DNA ile etkileşmeye girerek göstermektedir. DNA-ilaç arasındaki kovalent bağ geri dönüşümsüzdür. Bu ilaçlar DNA döngüsünü inhibe ederek hücre ölümüne sebep olur. Kovalent bağlayıcıların en önemli avantajlarından biri, yüksek bağlanma gücüne sahip olmalarıdır. Ayrıca büyük kovalent sübstitüentler; DNA'nın protein alımını bozarak, hem replikasyonu hem de transkripsiyonu etkileyen bir omurga bozulmasına neden olabilmektedir (19, 20).

Cis-diklorodiaminplatinyum (II) (Cis-platin) antikanser ilaç olarak kullanılan bir kovalent bağlayıcıdır. Bu madde klor grupları üzerinden DNA organik bazlarındaki azotlarla çapraz bağ oluşturur (Şekil 2.7).



**Şekil 2.7.** A. DNA'ya kovalent olarak bağlanmış cis-platin. B. (a) Cis-platinin Guanin'e (G) ve Adenin'e (A) bağlanma şekilleri. (b) 1,2-arazincir GpG (yapı a), 1,2-arazincir ApG (yapı b), 1,3-arazincir GpNpG (yapı c), 1,2-arazincir GpG (yapı d) (21).

Organik interkatalörlerin geçiş metal komplekslerine kovalent olarak bağlanması, biyolojik aktiviteyi etkileyen yeni DNA etkileşmelerine yol açabilmektedir. R-bağlanmış aromatik yan kollara sahip olan metal kompleksleri hem metal koordinasyonu, hem de bağlı aromatik ligandın interkalasyonu DNA'ya bağlanabilir (21).

Kovalent bağlayıcılar alkilleyici ajanlardır, DNA'ya bir alkil grubunun ( $C_nH_{2n+1}$ ) bağlanması yoluyla kanser tedavisinde kullanılırlar (22).



### ***Alkilleyici Ajanlar***

DNA alkilleyici ajanlar, önemli derecede DNA hasarına yol açan antikanser maddeler olarak kullanılmıştır. DNA'da Guanin ile reaksiyona girerek veya başka konumları alkilleyerek etki gösterirler. Bu ilaçlar, serbest moleküllere metil veya başka alkil gruplar ekler. Bu da organik bazların doğru eşleşmesini engeller ve DNA'nın yanlış kodlanmasına neden olur. Alkilleyici ajanlar üç mekanizma ile etkileşime girer:

Birinci mekanizmada; bir alkilleyici ajan, DNA'nın organik bazlarına alkil gruplar bağlar. Bu değişiklik sonucunda DNA, onarım enzimleri tarafından parçalanır.

İkinci mekanizmada; iki adet DNA bağlanma bölgesine sahip alkilleyici bir ajan tarafından DNA'nın iki farklı zincirinde bulunan organik bazlar birbirine bağlanır. Bu çapraz bağlanma; DNA'nın replikasyon ve transkripsiyon için şablon olarak kullanılmasını önleyerek hücre ölümüne yol açar.

Üçüncü mekanizmada; alkilleyici ajanlar DNA ile kimyasal etkileşmeye girerek kovalent bağlar oluşturur. Bunun sonucunda DNA'da meydana gelen sorunlu eşleşmeler, süstitüsyon veya eksizyon ile sonuçlanabilen hatalara neden olur. Bu hatalar DNA sentezini önleyerek programlı hücre ölümüne neden olabilmektedir (22).

Alkilleyici ajanlar, yaygın olarak kullanılan antikanser ilaçların en eski sınıfıdır. Çeşitli kanser türlerinin tedavisinde önemli bir rol oynarlar. Alkilleyici ilaçların çoğu monofonksiyonel metilasyon, bifonksiyonel alkilasyon veya kloroetilasyon ajanıdır (23, 24).

### **2.3.2 Non-Kovalent Bağlanma Yöntemi**

DNA ile etkileşen kovalent ajanlar, non-kovalent ajanlara göre genellikle daha sitotoksiktir. DNA ile non-kovalent şekilde etkileşen bileşiklerin moleküller ve biyokimyasal yollar üzerindeki etkisi çok iyi tanımlanamamıştır. Ancak en önemli etkilerini; DNA'daki yapısal bozulmalara yol açarak ve DNA'nın protein ile etkileşimlerine müdahale ederek göstermektedirler. Non-kovalent bağlanma yöntemi geri dönüşümlüdür. İlaç metabolizması ve toksik etkiler de göz önünde bulundurularak, bu yöntemeye dayalı tedavi daha fazla tercih edilmektedir. DNA ile etkileşen non-kovalent ajanlar DNA konformasyonunu ve bükülme gerilimini değiştirebilir, DNA-protein bağlarını kesebilir ve DNA zincirinde kırılmalara yol açabilir. Bu olaylar protein üretimi üzerinde önemli etkilere sahiptir (19).

Non-kovalent DNA-ilaç etkileşimleri 3 mekanizmayla gerçekleşir (25):

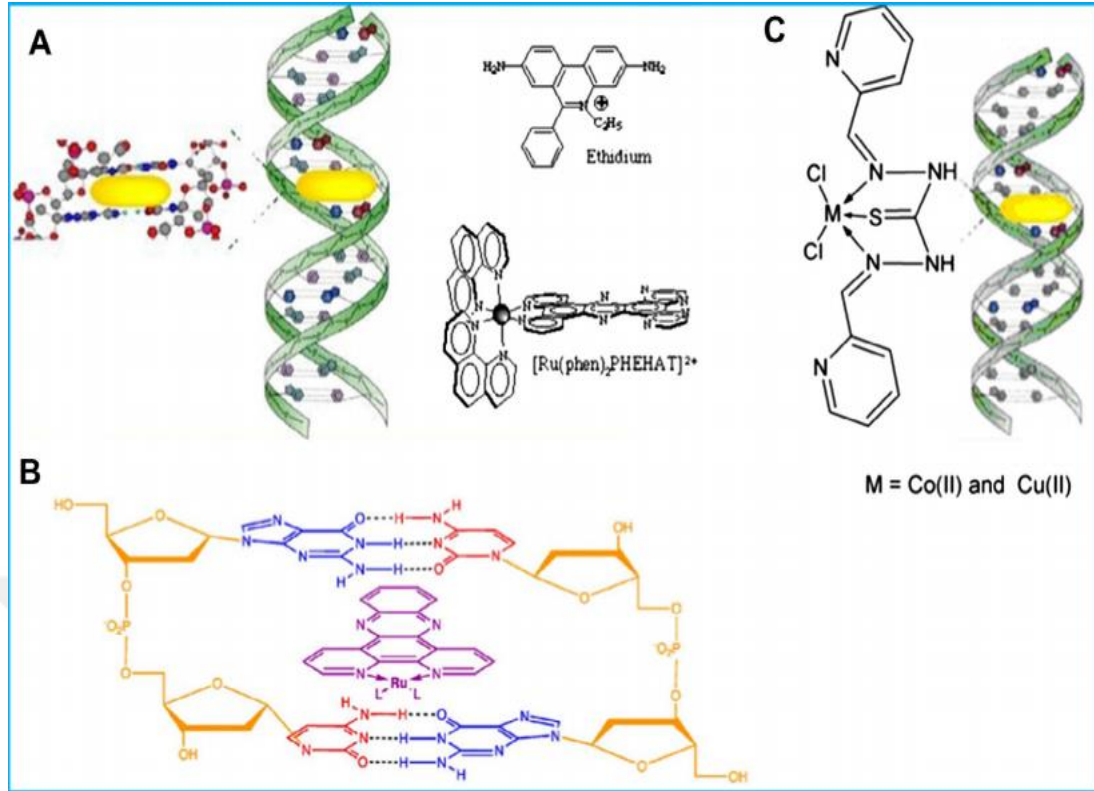
- İnterkalasyon,
- Oluğa bağlanma
- Dış (sarmal dışı) bağlanma

### *İnterkalasyon*

DNA'ya düzlemsel organik bileşiklerin eklenebileceği teorisi ilk olarak Lerman (26) tarafından, bazı heterosiklik aromatik maddelerin DNA'ya karşı güçlü afinitesini kanıtlamak amacıyla öne sürülmüştür. Düzlemsel heterosiklik bileşikler, DNA'nın karşılıklı organik baz çiftleri arasına istiflenen birer interkalatör görevi görmektedir. İnterkalatörler, kovalent bağlar oluşturmadan ve DNA bazları arasındaki hidrojen bağlarını parçalamadan DNA omurgasına dik bir şekilde yığınlar yapan moleküllerdir. DNA-interkalatör kompleksinin kararlılığını sağlayan kuvvetler; van der Waals bağları, hidrojen bağları, hidrofobik bağlar ve yük transfer etkileşimleridir. DNA interkalatörleri, hızla büyüyen kanser hücrelerinde DNA replikasyonunu inhibe etmesi amacıyla kemoterapötik tedavide kullanılmaktadır.

DNA-interkalatör kompleksi  $\pi$ - $\pi$  istifleme etkileşimi sayesinde kararlıdır. Bu nedenle de iyonik kuvvetlere diğer iki bağlanma türüne (oluğa bağlanma ve dış bağlanma) göre daha az duyarlıdır. İnterkalatörler tarafından DNA'da yapısal değişiklikler indüklenmektedir. İnterkalasyon işlemi DNA zincirini kararlı hale getirir, uzatır, sertleştirir ve açar. Bir interkalatörün DNA'ya girebilmesi için DNA genişerek kendi organik baz çiftleri arasında bir alan açar. Açılma miktarı interkalatöre göre değişir. Bu yapısal değişiklikler; transkripsiyonu, replikasyonu ve DNA onarımını engeller. Ayrıca interkalatörleri potansiyel mutajenler haline getiren değişikliklere yol açar (27-34).

İnterkalasyon genellikle baz sıralanışından bağımsızdır. Bu bağlanma yöntemi genellikle kaynaşmış büyük bir aromatik ligand varlığında gerçekleşmektedir. Daha küçük aromatik ligandların varlığında yardımcı ligandların fosfodiester omurgasıyla uyuşmaması, genellikle interkalasyonu engellemektedir. Böyle durumlarda  $[\text{Ru}(\text{fenil})_3]^{2+}$ 'li durumdaki gibi kısmi interkalasyon oluşmaktadır (Şekil 2.8) (35-39).



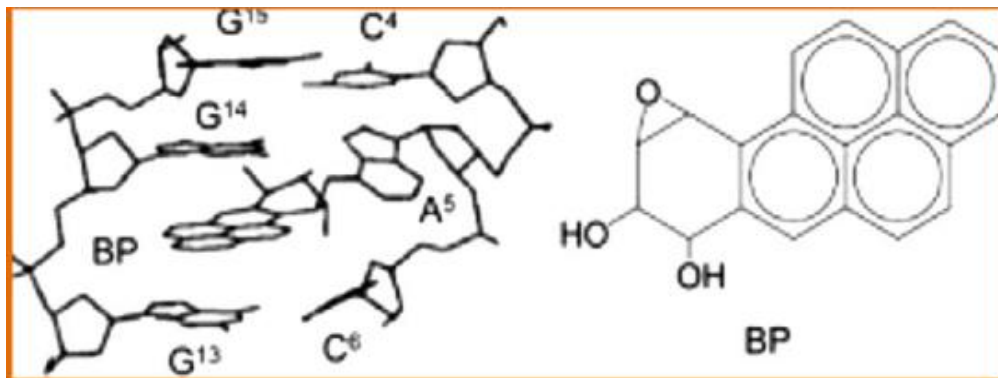
**Şekil 2.8.** (A) DNA'ya düzlemsel ligand kompleksinin interkalasyonu. (B) DNA'ya giren rutenyum kompleksi. (C) DNA'ya giren N1,N5-bis[piridin-2-metilen] tiyokarbohidrazon'un Co (II) ve Cu (II) kompleksleri (37).

2 tür interkalasyon yöntemi bulunmaktadır (20, 40):

- Klasik interkalasyon
- Düğümlenme interkalasyonu

### *Klasik İnterkalasyon*

Benzo[a]piren gibi klasik interkalatörler, bağlanma bölgesini oluşturan tüm aromatik sistemleriyle birlikte DNA'ya bağlanmaktadır (Şekil 2.9) (41).

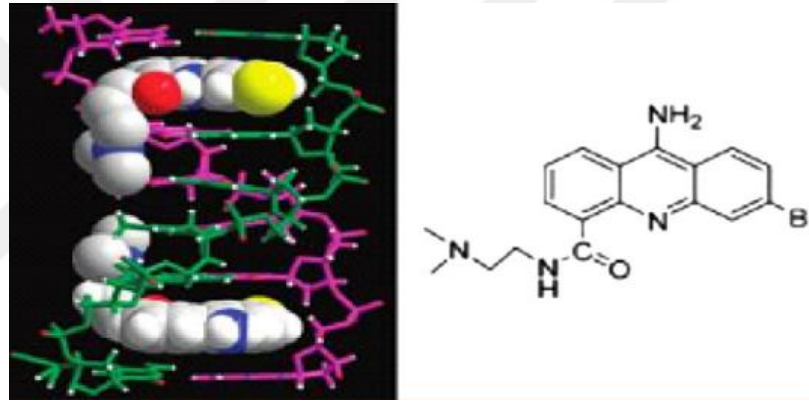


**Şekil 2.9.** Benzo[a]pirenin klasik interkalasyonu (41).

### *Düğümleme İnterkalasyonu*

Bu interkalatörler genellikle zıt taraflarında iki yan zincire sahip düzlemsel aromatik halka sistemleridir. DNA ile kompleks oluşum süreci klasik interkalasyona göre daha karmaşıktır. Bu interkalasyonda kompleksi oluşturmak için yan zincirlerden biri ara boşluk boyunca uzanır. Düğümleme interkalatörleri DNA'nın minör ve majör oluklarını işgal ederek DNA ile etkileşmeye girer. Bu da interkalatörün kararlılığına katkıda bulunmaktadır (42, 43).

Topoizomeraz enzimleri, DNA zincirinin bölünmesini başlatmak için gerekli olan hedefleme enzimleridir. Düğümleme interkalatörlerinden olan akridin bileşikleri; bu enzimleri inhibe ederek DNA hasarı oluşturmakta, böylece DNA replikasyonunu ve onarımını bozarak hücre ölümüne neden olmaktadır (Şekil 2.10) (44).

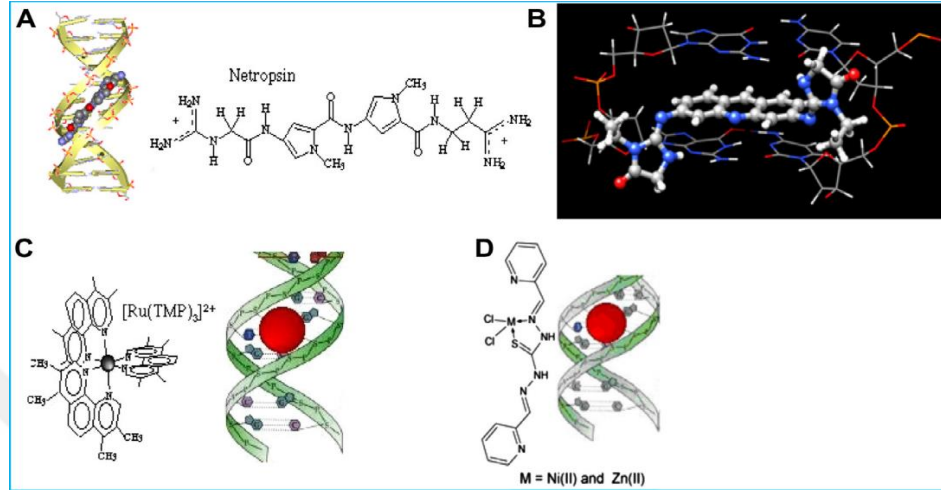


**Şekil 2.10.** Düğümleme interkalasyonu (43).

### *Oluğa Bağlanma*

Bazı küçük bileşikler van der Waals ve hidrojen bağlarıyla DNA'nın minör oluklarına bağlanır. Bu bileşiklerde tipik olarak pirol, furan veya benzen gibi çeşitli aromatik halkalar bulunur. Böylece ilaçlar DNA'daki minör oluk eğrisine izohelikal olarak dar ve kavisli bir şekilde konumlanır. Bu durum van der Waals bağlarının oluşmasına imkan tanır. Ek olarak bu ilaçlar Adenin'in 3 numaralı azot (N) atomu ve Timin'in 2 numaralı oksijen (O) atomu ile hidrojen bağları oluşturabilmektedir. Adenin-Timin (AT) grubu uygun elektronegatif cep niteliğinde olduğu için, oluğa bağlanan ilaçlar AT grubu bakımından zengin bölgelere yönelmektedir. Bu yönelim ayrıca; hem AT bölgelerinin GC bölgelerinden daha dar olmasından, hem de Guanin bazının 2 numaralı C atomuna bağlı N tarafından oluşturulan sterik girintiden dolayı bu bölgede daha iyi van der Waals bağları oluşturabilmesinden kaynaklanır (45).

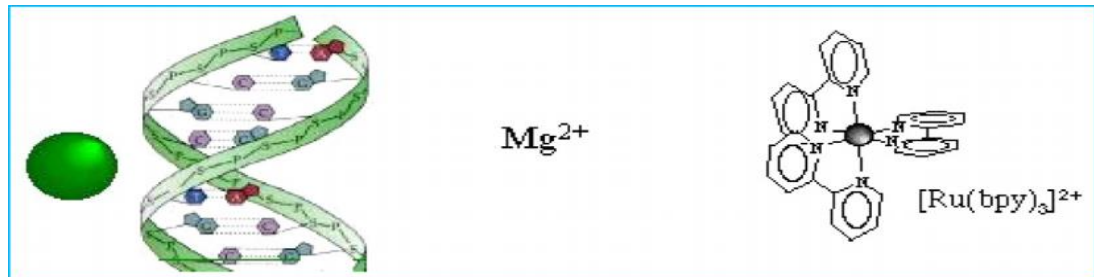
Araştırmacılar oluklardaki GC bölgelerine afinitesi olan birkaç sentetik poliamit sentezlemiştir. Kararlılık sağlayan hidrofobik bağlar ve/veya hidrojen bağları bu bağlanma işleminin önemli bileşenleridir. Netropsin, oluk kısmına bağlanan iyi bir antibiyotiktir (Şekil 2.11) (38, 46, 47).



**Şekil 2.11.** (A) Minör oluğa bağlanan Netropsin-DNA kompleksi. (B) Akridin bis-imidazolidinonların (R = Etil) GC bölgelerine minor oluk kısmından bağlanması. (C) [Ru(TMP)<sub>3</sub>]<sup>+2</sup>'nin DNA oluklarına bağlanması. (D) N<sup>1</sup>,N<sup>5</sup>-bis[piridin-2-metilen] tiyokarbohidrazonun Ni (II) ve Zn (II) metal komplekslerinin oluğa bağlanması (38, 46).

### *Dış Bağlanma*

Bu bağlanma elektrostatik bir şekilde gerçekleşir. Bazı ligandlar DNA fosfat omurgasının dış tarafına istiflenebilmektedir. Bu olay genellikle ligandın agregat oluşturduğu durumda olmaktadır. Bazı metal kompleksleri de DNA ile etkileşmeye dış bağlanma yoluyla girmektedir. [Ru(bpy)<sub>3</sub>]<sup>+2</sup>'nin DNA'ya bağlanması sonucunda gözlenen lüminesans artışı iyonik kuvvetlerle güçlü bir şekilde bağlantılı olduğu için molekülün bu yöntemle bağlandığı düşünülmüştür. Mg<sup>2+</sup> gibi katyonlara sahip ligandlar da DNA ile genellikle bu yolla etkileşmektedir (Şekil 2.12) (48).



**Şekil 2.12.** DNA polielektrolit iyonlarına dış bağlanan bir kompleks (48).

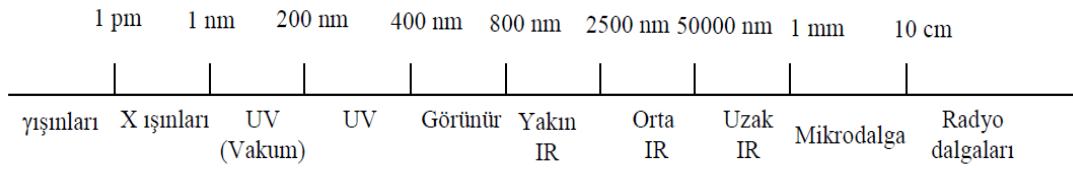
## 2.4. DNA-İlaç Etkileşmesi Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler

DNA-ilaç etkileşmelerini aydınlatmak amacıyla kullanılan yöntemlerden bazıları; Kızılötesi (IR), Raman, Sirküler Dikroizm, Kütle, Ultraviyole-Görünür Bölge (UV-GB) ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopileri, Dönüşümlü, Kare Dalga ve Diferansiyel Puls Voltametrileri, Atomik Kuvvet Mikroskobu, Elektroforez, Viskozite Ölçümleri ve Termal Denatürasyon çalışmalarıdır. Bu teknikler, ilacın DNA ile kompleks oluşturmasının ve bu etkileşmenin DNA yapısı üzerindeki etkilerinin incelenmesinde önemli birer araç olarak kullanılmıştır. UV-GB ve Floresans Spektroskopileri ile Dönüşümlü Voltametri yöntemleri daha yaygın olarak kullanılmaktadır (49).

### *UV-Görünür Bölge Spektroskopisi*

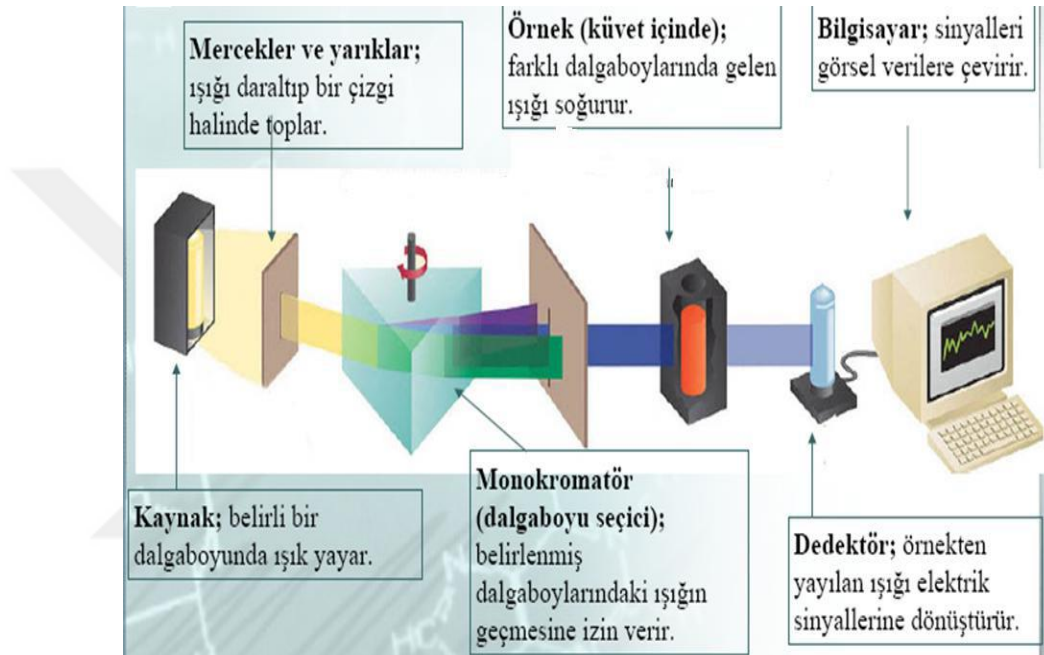
Spektroskopi, en temel anlamıyla ışık ile maddenin etkileşiminin incelenmesidir. Spektroskopik analiz yöntemleri; moleküler ya da atomik maddelerin absorpladığı, yaydığı, saçılan ve yansıtılan ışın miktarının ölçülmesine dayanır (50).

Bir madde kendi özelliğine bağlı olarak, üzerine düşürülen ultraviyole ışınlarından radyo dalgalarına kadar çeşitli dalga boylarındaki ışınların bazılarını absorplar, bazılarıyla ise hiç etkileşime girmez. Maddenin bu özelliğinden yararlanılarak yapısı ve derişimi tayin edilebilir, yani nitel ve nicel analizi yapılabilir. Bu amaçla madde üzerine dalga boyu birbirinden çok farklı olan ışınlar düşürülür ve özelliğine bağlı olarak bunların hangilerinin madde tarafından absorplandığı cihaz yardımıyla saptanır. Ancak pratikte bütün bu dalga boylarında ışın verecek ve bunların arasından da hangilerinin absorplandığını saptayacak tek bir cihaz yapmak uygun olmadığından, belirli dalga boyları arasında çalışan cihazlar geliştirilmiştir. Örneğin; dalga boyları binlerce metreye varan radyo dalgalarıyla analizlerin yürütüldüğü cihazlara Nükleer Manyetik Rezonans, dalga boyu 200-750 nm arasındaki ışınlarla çalışan cihazlara Ultraviyole-Görünür Bölge ve 2500-25000 nm dalga boylarındaki ışınlarla çalışan cihazlara de Infrared Spektrofotometresi adı verilir (Şekil 2.13). Bu cihazlardan yararlanılarak yürütülen analiz yöntemlerine de sırasıyla NMR, UV-GB ve IR Spektroskopisi denir.



**Şekil 2.13.** Elektromanyetik spektrum.

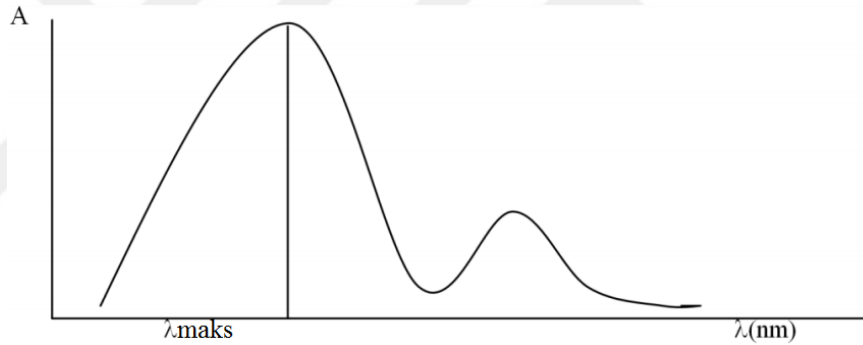
UV-GB spektrofotometresi Şekil 2.14’te gösterilen bileşenlerden meydana gelmektedir.



**Şekil 2.14.** UV-GB spektrofotometresinin şematik gösterimi (Arge ve Kalite [Internet]. 2014 [04.02.2020]. Erişim adresi: [http://kalitece1.blogspot.com/2014/10/kromotografik-ve-spektroskopik\\_30.html](http://kalitece1.blogspot.com/2014/10/kromotografik-ve-spektroskopik_30.html)).

Işının birden çok temel özelliği (dalga boyu, periyodu, frekansı, hızı, dalga sayısı vb.) bulunmaktadır. Işının dalga özelliğinin yanında, parçacık özelliği de vardır ve bu parçacıkların herbirine foton denir. Yani ışın hem dalga hem de tanecik özelliği gösterir ve cinsi frekans veya foton başına düşen enerji ile belirtilir. Işığın şiddeti, ışık demeti içindeki foton sayısı ile ilgilidir ve enerji birimleriyle ölçülür. Işık enerjisinin absorpsiyonunda, molekül kuantlanmış (değişken) miktarda enerji alıp vereceğine göre, belli düzeydeki tek frekanslı bir ışını absorplar. Bu bileşiğin bütün molekülleri için geçerlidir ve böylece spektrumda absorpsiyon çizgileri görülür. Fakat belli bir elektronik seviyede olan her molekül aynı zamanda değişik titreşim ve dönme seviyesinde olduğundan, spektruma absorpsiyon bantları ve pikleri şeklinde yansır.

10-200 nm arasındaki ışınlar havada bulunan oksijen tarafından absorplanır. Bu bölgede özel düzenekler yardımı ile havadan arınmış ortamda (vakumda) çalışıldığından bu bölgeye Vakum UV (Uzak UV) denir. 200-400 nm'deki ışınlardan yararlanılan bölgeye de mor ötesi (UV) bölge denir. Ancak bu bölgedeki ışınlar da adi cam tarafından absorplandığı için UV spektroskopisinde kullanılan prizma cam ve mercekler kuvars camdan yapılmıştır. Görünür bölge sınırları ise 400-780 nm'dir. Cihazlarda farklı dalga boylarında ışın elde etmek amacıyla UV ve görünür bölgeler için farklı tipte ışık kaynaklarından yararlanılmaktadır. Gelişmiş spektrofotometreler her iki tipteki ışın kaynağına da sahiptir, frekansı düzgün ve otomatik olarak değiştirir. Sonuçta gönderilen ışın demeti arasından absorplanan ışın veya ışın demetleri, cihaz tarafından dedektör aracılığıyla duyarlı bir biçimde saptanır ve spektruma absorbans bandı olarak aktarılır. Işığın dalga boyu veya frekansına karşı absorpsiyon miktarının grafiğe geçirilmesine “absorpsiyon spektrumu” denir (Şekil 2.15).



**Şekil 2.15.** Absorpsiyon spektrumu (51).

Işığın diğer temel özellikleri ise aşağıdaki gibi sıralanabilir:

**Dalga boyu ( $\lambda$ ):** Bir ışının dalga hareketinde art arda gelen iki tepe noktası arasındaki uzaklığa, o ışının dalga boyu denir. Dalga boyu, metre, cm, mm, mikron ( $\mu$ ), nanometre (nm), angström ( $\text{Å}$ ) gibi birimlerle ifade edilir. Bunların arasındaki ilişki;  $1 \text{ cm} = 10^4 \mu = 10^7 \text{ nm} = 10^8 \text{ Å}$  ( $1\mu = 1000 \text{ m}\mu$ ), ( $1 \text{ nm} = 1 \text{ m}\mu = 10 \text{ Å}$ ) şeklindedir.

**Frekans ( $\nu$ ):** Birim zamandaki (saniyedeki) titreşim sayısıdır. Aynı zamanda bir ışının saniyedeki periyot sayısına ( $1/P$ ) da frekans denir. Birimi hertz dir (1 milyon Hertz: 1 MegaHertz).

**Periyot (P):** Birbirini izleyen iki dalga tepesinin belli bir noktadan geçmesi için gerekli süredir. Birimi saniyedir (s).



**Hız (c):** Işığın birim zamanda aldığı yoldur. Her çeşit ışığın vakumdaki hızı aynıdır ve (c) ile gösterilir ( $c = 3.101 \text{ cm/s}$ ). Bir ışığın hızı vakumdan, herhangi bir ortama geçişte azalır ve ( $c_i$ ) ile gösterilir. Buna göre herhangi bir ortamdaki ışın hızı;  $c_i = v \cdot \lambda$  denklemiyle ifade edilir.

**Dalga sayısı:** Birim uzaklıktaki (örneğin 1 cm'deki) dalga sayısıdır. Birimi ise  $\text{cm}^{-1}$  dir.  $1/\lambda$  olarak ifade edilir.

Fotonlar belli bir enerjiye sahiptir ve bu, radyasyonun (ışığın) frekansını belirler. Radyasyonun sahip olduğu enerji yukarıda verilen temel özellikler dikkate alınarak bulunur. Buna göre bir molekülün ışını absorplaması durumunda enerji artışı;

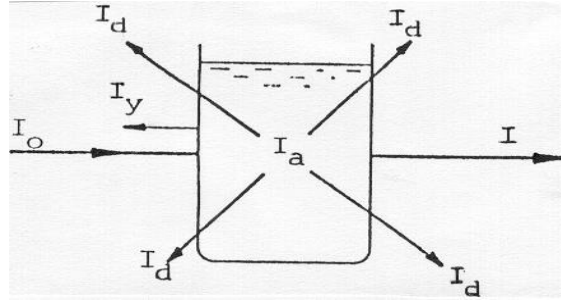
$$E = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda \text{ eşitliğiyle bulunur (h = Planck sabiti: } 6.63 \times 10^{-27} \text{ erg.s). (2.1.)}$$

Formül 2.1, fotonların kütlelerinin (N) birbirinden farklı olduğu göz önüne alınarak;  $E = N \cdot h \cdot \nu = N \cdot h \cdot c / \lambda$  şeklinde yazılabilir ve buradan da fotonun (ışığın) enerjisi ile dalga boyunun ters orantılı olduğu anlaşılır.

Her bir spektroskopik yöntemin uygulanışı sırasında; fotonların sahip olduğu ve yukarıda sözü edilen enerjiler, moleküller tarafından farklı amaçlarla absorplanır. Absorlanan ışınların yöntemine uygun spektrofotometre tarafından saptanıp değerlendirilmesiyle elde edilen spektrum, absorpsiyonu yapan maddeye ilişkin analizin sonuçlandırılmasına yardımcı olur.

Madde ile ışığın etkileşmesi sonucu meydana gelecek olaylardan en önemlisi ışığın absorplanmasıdır. Çeşitli dalga boylarında ışın içeren bir demet saydam bir ortamdan geçirilirse, içinden bazı dalga boylarının kaybolduğu görülür. Buna ışığın absorplanması denir. Belli dalga boyundaki ışınlar absorplandığında ışığın enerjisi maddeye geçer ve maddenin molekülleri, atomları ve elektronları daha yüksek enerjili hale geçer. Bu olaya atom veya moleküllerin uyarılması denir.

Uyarılmış halde  $10^{-8}$  s kalan atom veya moleküller tekrar temel enerji seviyesine döner ve uyarılmış halde iken aldıkları enerjiyi ısı veya ışık şeklinde geri verebilir. Enerjinin ışık olarak yavaşça geri verilmesine fosforesans, daha kısa sürede (anında) geri verilmesine ise floresans denir. Sonuçta maddeye belli bir doğrultuda gelen  $I_0$  gücündeki bir ışığın gücü, aynı doğrultuda maddeyi terk ederken azalır ve  $I$  olur. Işığın bir kısmı çözelti tarafından absorplanır ( $I_a$ ), bir kısmı dağılır ( $I_d$ ) ve bir kısmı da yansır ( $I_y$ ) (Şekil 2.16).



**Şekil 2.16.** Işığın madde içerisinde geçişi (Başak Ateş [Internet]. 2016 [04.02.2020]. Erişim adresi: <https://docplayer.biz.tr/1286956-Spektroskopi-madde-ile-ışın-arasındaki-etkilesmeyi-inceleyen-bilim-dalidir.html>.

$I_0$  ve  $I$  değerleri arasındaki ilişki Lambert-Beer Kanunu ile ifade edilir ve UV spektroskopisinde de bu kanundan nicel analizde yararlanılır. Bu kanuna göre; saydam bir çözeltiliye gönderilen ışın demetinin şiddetinin azalması, gönderilen ışın demetinin şiddeti kadar, içinden geçtiği çözeltilideki moleküllerin derişimleri ve gönderilen ışın demetinin geçtiği yolun uzaklığı ile de ilgili ve doğru orantılıdır. Dolayısıyla gönderilen ışığın şiddeti ve katettiği yol açısından çalışma koşulları sabit tutulursa, sonuç doğrudan çözeltilideki atom ve moleküllerin derişimi ile ilişkili hale gelir ve bundan da UV spektroskopisinde nicel analiz amacıyla yararlanılır. Lambert-Beer Kanunu şöyle ifade edilebilir:

$$\log I_0/I = A \text{ (Absorbans)} = k.b.C \quad (2.2.)$$

$I_0$  = Gelen ışığın şiddeti

$I$  = Örnekten çıkan ışığın şiddeti

$b$  = Işığın örnek içinden geçtiği yolun uzunluğu

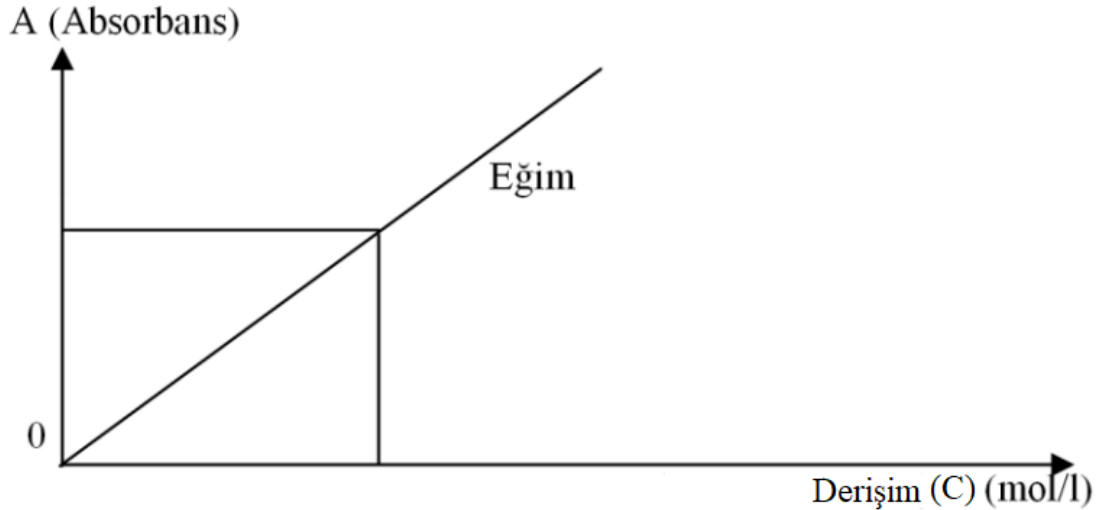
$C$  = Derişim (g/L)

$k$  = Absorpsiyon katsayısı

$\epsilon$  = Derişim mol/L ise absorpsiyon katsayısı  $\epsilon$  ile gösterilir ve molar absorptivite olarak adlandırılır.

$A$  = Absorbans (Optik dansite, Ekstinksiyon) değeri olup bunun tersi de transmittans ( $T$ ), yani geçirgenliktir ve  $T = I/I_0$  şeklinde ifade edilir.

Lambert-Beer Kanunu ile absorptivitenin; derişim, hücrenin kalınlığı ve ışığın şiddetinden bağımsız bir sabit olduğu belirtilir. Absorbans ( $A$ ) derişime ( $C$ ) karşı grafiğe geçirilecek olursa, Lambert-Beer kanununa göre sıfır noktasından geçen bir doğru elde edilir (Şekil 2.17).



**Şekil 2.17.** Kalibrasyon eğrisi (51).

Bazen Lambert-Beer kanunundan da sapmalar olabilir. Bunlar genelde kimyasal örneğin çözücü ile etkileşmesinden, polimerleşmeden ve cihazdan ileri gelen sapmalar şeklindedir. Derişime karşı absorbans (A-C) grafiğinde elde edilen bu doğru belli bir bileşik için çizildiğinde, kalibrasyon eğrisi olarak kullanılabilir ve bu bileşiğin bilinmeyen derişiminin absorbansı okunarak bu eğri yardımıyla miktar tayini yapılabilir. Mecbur kalınmadıkça bu tür çalışmalarda 0.2-0.9 absorbans değerleri dışına çıkmamak gerekir. Doğrusal ilişkiyi kurup hassas sonuç elde etmek için en iyi sonuçlar, çözeltinin molar derişimi  $10^{-3}$  ile  $10^{-5}$  arasında iken alınır.

Işın enerjisi veya elektromanyetik enerjisi, maddenin en dış tabaka elektronları veya bağ elektronları absorplar. Böylece daha yüksek enerji seviyelerine çıkarlar. Bazı bağların enerjileri düşüktür ve düşük enerjili (uzun dalga boylu) ışınları absorplar. Bazı bağların enerjileri ise daha büyüktür ve bunlar da daha yüksek enerjili (kısa dalga boylu) ışınları absorplar. Farklı dalga boyundaki ışınların farklı bağlar tarafından absorplanması analiz yapılmasına imkan sağlamaktadır. Örneğin; tek bağlı ve üzerinde fonksiyonel grup taşımayan bir molekül oldukça kısa dalga boylu, yani enerjisi yüksek ışınları absorplar. Ancak aynı ışınlar havadaki diğer moleküllerce de absorplandığından bu tür moleküllerle çalışmak için havasız ortamda, yani vakumda çalışmak gerekir. Fonksiyonel grup taşıyan moleküllerdeki elektronlar daha kolay şekilde üst enerji seviyelerine çıkabildiğinden, bunların uyarılması için daha düşük enerjili (dalga boyu daha uzun) ışınlar yeterli olabilmektedir.

Konuya ilişkin diğer bazı teorilerin yanında, absorpsiyon ve spektrumların oluşumunun açıklanmasında yararlanılan esas teori Moleküler Orbital Teorisi'dir. Teorinin esası analizlenen moleküllerdeki moleküler bağ orbitallerinin, anti-bağ orbitallerinin ve absorpsiyondan sorumlu elektronların varlığına dayanmaktadır.

**Moleküler Orbital:** İki atom arasında bağ elektronları tarafından işgal edilen ve lokalize olmamış elektron bulutuna, ya da diğer bir deyişle bindirilmiş atom orbitallerine moleküler orbital denir.

**Moleküler Bağ Orbitali:** İki atom orbitalinin birbiri üstüne binmesiyle (iç içe girmesiyle) oluşan ve bu atomların orbitallerinin enerji seviyeleri toplamından daha düşük enerji seviyesinde meydana gelen orbitale moleküler bağ orbitali denir. İçindeki elektronların monovalan (tek) bağ yaptığı orbitale; sigma molekül orbitali denir ve  $\sigma$  ile gösterilir. Tek bağlar aynı zamanda sigma elektronlarının oluşturduğu  $\sigma$  bağları olarak da anılır. İçindeki bağların çift bağ yaptığı orbitale pi molekül orbitali denir ve  $\pi$  ile gösterilir. Çift bağlar aynı zamanda  $\pi$  elektronlarının oluşturduğu  $\pi$  bağları olarak da anılır.

**Anti-Bağ Orbitali:** İki atom orbitalinin birbiri üstüne binmesiyle (iç içe girmesiyle) oluşan ve bu atomların orbitallerinin enerji seviyeleri toplamından daha yüksek enerji seviyesinde meydana gelen orbitale karşı/anti-bağ orbitali denir. Bu da  $\sigma^*$  ve  $\pi^*$  şeklinde gösterilir.

Organik bir moleküle absorpsiyon özelliği kazandıran, absorpsiyondan sorumlu olan elektronlar şu şekilde sıralanabilir:

- Moleküldeki atomları birbirine bağlayan elektronlar
  - Tek bağ, ( $\sigma$ ) elektronları halinde
  - Çift bağ, ( $\pi$ ) elektronları halinde
- Moleküldeki (O, S, N ve X gibi) hetero atomlar üzerinde ortaklanmamış halde bulunan (n) elektronları

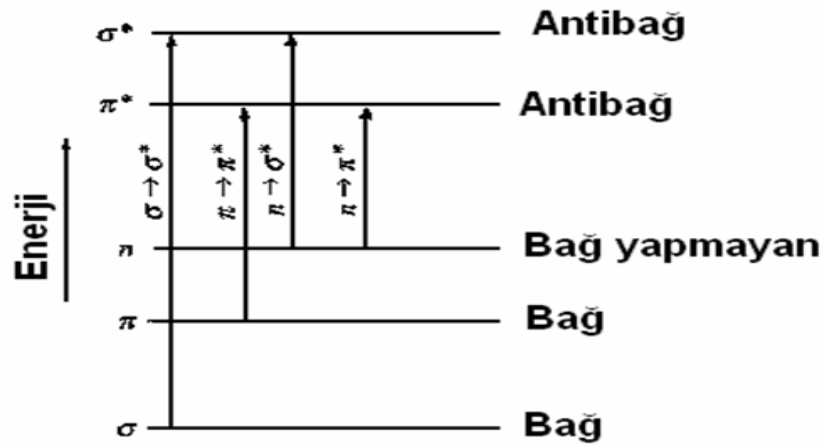
Bu elektronların kendilerine uygun seviyedeki enerjilere sahip ışınlarla karşılaşmaları durumunda absorplanırlar ve başlangıçtaki  $\sigma$ ,  $\pi$  ve n, yani bağ-orbitali enerji düzeyinden  $\sigma^*$  ve  $\pi^*$ , yani anti-bağ enerji düzeylerine sıçrar. n-elektronları da enerji aldıklarında  $\sigma^*$  ve  $\pi^*$  seviyelerine sıçrar.

UV veya görünür bölgedeki absorpsiyon pikleri de analizlenen moleküldeki bir elektronun bağ orbitalinden daha yüksek enerjili bir orbitale sıçraması sonucu oluşur.

Moleküllerin böyle bir sıçramayı gerçekleştirebilmesi için enerjiye ihtiyacı vardır. İhtiyaç duydukları enerji düzeyindeki ışınlarla karşılaştıklarında bunları absorplayarak bu enerjiye erişirler ve eksilen bu ışın ya da ışın demetlerinin spektruma yansınmasıyla pikler oluşur. Bu geçişe ait enerji orbitallerin durumuna bağlı olup, molekülün geri kalan kısmı ile pek ilgili değildir. Bundan dolayı basit bir fonksiyonlu grup, örneğin -C=C- çifte bağı, daima aynı bölgede absorpsiyon yapar. Bu şekilde absorpsiyon yapan gruplara “kromofor” denir. UV spektrumu doymamışlık içeren bileşikler için analizde yararlanılabilecek bilgiler verir.

Bağ yapmayan (ortaklanmamış n) elektronların enerji seviyeleri, bağ yapan elektronların ( $\sigma$  ve  $\pi$  (moleküler bağ orbitalleri)) enerji seviyeleri ile bağa karşı olan elektronların ( $\sigma^*$  ve  $\pi^*$  (anti-bağ orbitallerin)) enerji seviyeleri arasındadır.

Şekil 2.18'den de anlaşılacağı gibi sigma ( $\sigma$ ) ve pi ( $\pi$ ) orbitalindeki bir elektron ışın enerjisi absorpladığında yalnızca kendisinin üst enerji seviyesi olan anti-bağ moleküler orbitallerine ( $\sigma\text{-}\sigma^*$  ve  $\pi\text{-}\pi^*$ ) geçtiği halde, bağ yapmayan (ortaklanmamış n) elektronlar her iki bağda da anti orbitallerine ( $n\text{-}\sigma^*$  ve  $n\text{-}\pi^*$ ) geçebilmektedir.



**Şekil 2.18.** Elektronların uyarılma enerji seviyeleri ve elektronik geçiş tipleri (51).

Geçişlerin kendilerine has özellikleri şu şekilde açıklanabilir:

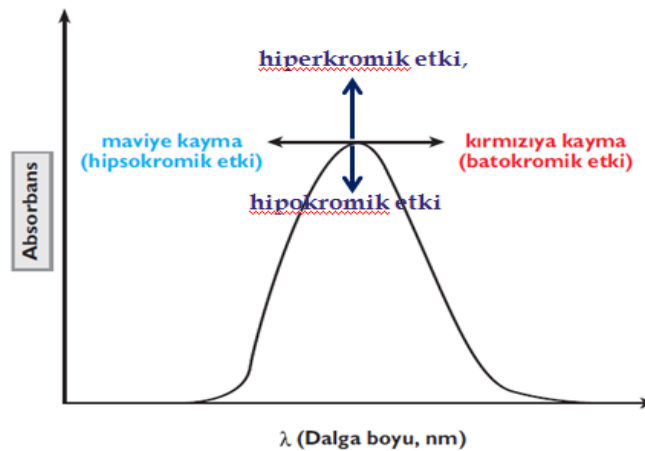
**$\sigma\text{-}\sigma^*$  Geçişleri (125-150 nm):**  $\sigma\text{-}\sigma^*$  geçişleri en çok enerjiye ihtiyaç duyan geçişlerdir. Uzak UV ışınlarına (125-150 nm) ihtiyaçları vardır. C-H bağındaki bir elektronu uyarıp  $\sigma^*$  seviyesine çıkarabilmek için 125 nm dalga boyunda bir ışına ihtiyaç olduğu halde, C-C bağındaki bir elektronu  $\sigma^*$  seviyesine çıkarmak için 135 nm dalga boyunda bir ışına ihtiyaç vardır. Örneğin metan ve etanın spektrumları alındığında metan 125 nm’de tek, etan ise 125-135 nm’de iki pik verir.

**$\pi$ - $\pi^*$  Geçişleri (200-700 nm):** Çok rastlanan geçişlerden biridir. Bu geçişler, dalga boyu 200-700 nm olan daha az enerjili ışınlarla gerçekleştirilebilir. Böyle geçişlere elverişli çifte bağı olan maddelerin spektrumları daha kolay alınır. Bu tip geçişlerin bir yönü de, çözeltiliye bağlı olarak çözücünün polarlığının artmasıyla absorpsiyon pikinin daha uzun dalga boyuna kaymasıdır. Çözücüye bağlı olarak meydana gelen bu kaymaya batokromik kayma veya kırmızıya kayma adı verilir.

**$n$ - $\sigma^*$  Geçişleri (150-250 nm):** Bu geçişler, üzerinde ortaklanmamış serbest elektron çifti bulunduran bileşiklerde görülür. Yüksek enerji gerektiren geçişlerdir. Çözücü polarlaştıkça maksimum absorpsiyon da düşük dalga boyuna doğru kayar. Bu kaymaya hipsokromik kayma veya maviye kayma denir. Tespiti çok güçtür. Vakumda çalışmak gerekir.

**$n$ - $\pi^*$  Geçişleri (200-700 nm):** UV alanda yapılan çalışmaların pek çoğunda elde edilen pikler  $n$ - $\pi^*$  geçişlerinden ileri gelir. Bunların tespit edilmesi oldukça kolaydır, çünkü daha çok görünür bölgede gözlenir. Bu geçişi meydana getiren maddelerde  $n$  elektronlarına ek olarak  $\pi$  elektronlarının da bulunması gerekir. Absorpsiyon pikleri, çözücünün polaritesinin artması ile kısa dalga boyuna doğru kayar (hipsokromik kayma-maviye kayma). Bu bazen 30 nm'yi bulabilir. Hipsokromik kaymanın nedeni; DNA'daki organik bazların, molekülün ortaklanmamış elektron çiftleri ile hidrojen bağları vermesidir (51).

Absorpsiyon şiddetinin artmasına hiperkromik etki, azalmasına ise hipokromik etki denir. Kayma çeşitleri Şekil 2.19 ile gösterilmiştir.



**Şekil 2.19.** Absorpsiyon pikindeki olası kaymalar (Gür B. Merosiyanın 540 DYE Bileşiğinin İnce Filmlerinin Hazırlanması ve Fotofiziksel Özelliklerinin İncelenmesi [Doktora tezi]. Erzurum: Atatürk Üniversitesi; 2015).

#### 2.4.1. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopisi ile DNA-İlaç Etkileşmelerinin İncelenmesi

UV-GB absorpsiyon spektroskopisi, nükleik asitlerin küçük moleküllerle etkileşmesinin detaylandırılması için kullanılan en yaygın ve basit yöntemlerden biridir. Moleküllerin kendilerine gerekli olan enerjyi sağlamak amacıyla absorpladıkları ışınların verdiği spektrumların değerlendirilmesi esasına dayanır (51).

İlaç ile DNA-ilaç kompleksinin UV-GB absorpsiyon spektrumları genellikle farklı olduğu için, DNA-ilaç etkileşmeleri incelenirken bu farklılık karşılaştırılır. Değişimin büyüklüğü DNA ile ilaç arasındaki etkileşmenin miktarını gösterir. DNA'nın absorpsiyon spektrumu; maksimum absorpsiyonun 260 nm'de olduğu, 200-350 nm aralığında geniş bir bant vermektedir. Bu değerler, pürin (Adenin ve Guanin) ve pirimidin (Sitozin ve Timin) bölgelerindeki kromofor gruplarındaki elektronik geçişlerin etkisiyle oluşmuştur. Bu geçişler kolaylıkla gerçekleşebilmektedir ve molar absorptivite ( $\epsilon$ )  $6,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  düzeyindedir. Bu bilginin yardımıyla 260 nm'de absorbans değeri ölçülerek DNA'nın molar derişimi ölçülebilmektedir. Ayrıca absorbans oranları ölçülerek ( $A_{260} / A_{280}$  ve  $A_{260} / A_{230}$ ) DNA'nın saflığı da hesaplanabilmektedir. Bu oranın 1,8-1,9 aralığında olması DNA'nın yeterince proteinsiz (saf) olduğu anlamına gelir. Ortamın pH değeri ve iyonik kuvvetlerdeki değişimler sebepleriyle, maksimum absorpsiyon ve molar absorptivite değerlerinde küçük değişimler gözlenebilmektedir (52-54).

Bileşiklerin DNA'ya interkalasyon yoluyla bağlanması, genellikle hipokromik etkilere ve batokromik kaymalara neden olmaktadır. Hipokromik etki interkalatif etkileşmenin gücüyle orantılıdır. Etkileşme gücü DNA organik bazı ile kromofor arasındaki mesafenin küpüyle orantılı olarak azalmaktadır. Mesafe azaldığında da  $\pi$ - $\pi^*$  elektronik geçişinin enerji seviyesi düşmekte ve bu durum kırmızıya kaymaya neden olmaktadır (54-56).

Hiperkromik etki, denatürasyona bağlı olarak DNA absorbansındaki olağan dışı artıştır. DNA ile bileşik arasında elektrostatik çekim bulunduğu durumlarda, DNA-ilaç etkileşmesi gerçekleştikten sonra DNA'nın şeklinde ve yapısında meydana gelen değişikliklerden dolayı hiperkromik etki gözlenmektedir. DNA zincirlerini bir arada tutan ana etmenler; istiflenme etkileşimleri, hidrofobik bağlar ve hidrojen bağlarıdır. Hidrojen bağları aromatik halkanın rezonansını sınırladığı için numunenin

absorbansını da sınırlar. Hiperkromik etki, çoğunlukla DNA omurgasının fosfat grubuna elektrostatik çekim yoluyla bağlanan ve sonunda DNA'nın sekonder yapısında hasara neden olan yüklü katyonların varlığı nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Bunun yanında; dış (elektrostatik) bağlanma, DNA'nın sarmal yapısının kısmen açılması ve daha fazla DNA bazına maruz kalması da bu etkiyi yapabilir. DNA zincirinin denatüre edici ajanlarla karşılaşması durumunda, çift sarmal yapıyı oluşturan güç bozulduğu için 2 ayrı iplikçik oluşmaktadır. Böylece organik bazların birbiriyle etkileşimi azalarak birçok organik baz serbest hale geçer ve organik bazlar arası hidrojen bağları oluşamayacağı için DNA'nın absorbansı %40 artar (57-59).

İlacın DNA ile etkileşme miktarını gösteren bağlanma sabiti (K) değeri, Benesi-Hildebrand denklemine göre belirlenebilir:

$$\frac{A_0}{A-A_0} = \frac{\epsilon_G}{\epsilon_{H-G}} + \frac{\epsilon_G}{\epsilon_{H-G}} \times \frac{1}{K[DNA]} \quad (2.3.)$$

K = Bağlanma/birleşme sabiti

A<sub>0</sub> = İlacın absorbansı

A = DNA-ilaç kompleksinin absorbansı

ε<sub>G</sub> (ε<sub>a</sub>) = İlacın absorpsiyon katsayısı

ε<sub>H-G</sub> (ε<sub>f</sub>) = DNA-ilaç kompleksinin absorpsiyon katsayısı

K değerinin hesaplanması için DNA-ilaç kompleksinin artan DNA derişimine karşı absorbansı ölçülür. 1 / [DNA] değerlerine karşı A<sub>0</sub> / (A-A<sub>0</sub>) değerleri grafiğe geçirilir. Çizilen doğrusal grafiğin y eksenini kestiği nokta ε<sub>G</sub> / (ε<sub>H-G</sub>-ε<sub>G</sub>) değerini, eğimi ise [ε<sub>G</sub> / (ε<sub>H-G</sub>-ε<sub>G</sub>)] / K değerini verir. Buradan bulunan K değeri ilacın DNA'ya bağlanma sabitidir (53).

UV-GB spektroskopisinde genellikle hiperkromik etki elektrostatik etkileşimi ve hipokromik etki ile birlikte 15 nm'den büyük batokromik kayma interkalasyonu, 8 nm'den az batokromik kayma ise oluğa bağlanmayı göstermektedir (57, 93).

#### **2.4.2. Floresans Emisyon Spektroskopisi ile DNA-İlaç Etkileşmelerinin İncelenmesi**

Floresans spektroskopisi, DNA ile küçük ligand molekülleri arasındaki etkileşmeleri incelemek için en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntemin



avantajlarından bazıları; yüksek hassasiyet, geniş doğrusal derişim aralığı ve seçiciliktir. En iyi floresans, düşük enerjili  $\pi-\pi^*$  geçiş seviyelerine sahip aromatik fonksiyonel grupları bulunan bileşiklerden elde edilmektedir. Alifatik ve alisiklik karbonil yapıları veya yüksek derecede konjuge çift bağ yapıları içeren bileşikler de floresans özellik gösterebilir ancak bu bileşiklerdeki geçişlerin sayısı aromatik bileşiklerdekilere göre daha azdır (60, 61).

Floresans emisyonu çok hassas bir işlemdir ve florofor transferi genellikle ilaçların emisyon spektrumlarında 10-20 nm'lik spektral kaymalara neden olmaktadır. DNA ile etkileşme sonucunda floresans yoğunluğu önemli bir oranda artmaktadır. Serbest moleküllerin yönü, uyarılmış atomların radyasyonsuz bir şekilde eski haline dönmesini sağlar. DNA'ya interkalasyon yapan bir ilacın bağlı olması durumunda, bu geçiş floresans emisyonu ile sağlanır. Bu sırada floresans emisyonunda belirgin bir artış görülmektedir. Oluğa bağlanan ajanlarda hidrojen bağları, elektrostatik veya hidrofobik etkileşimler söz konusudur. Ayrıca bu bileşikler şeker-fosfat omurgasına da yakındır. Bu durum DNA varlığında floresans yoğunluğunda bir düşüşe neden olabilmektedir. Doğru yerleştirilmiş sönmüleyicilerin (halojenür iyonlarının) kullanılmasıyla, oluğa bağlanan ilaçların DNA'ya bağlanması hakkında daha fazla bilgi edinmek mümkündür. Bu moleküller, halojenürlerin sönmüleyici etkisine interkalasyon ajanlarına göre daha duyarlıdır. Çünkü organik baz çiftleri, sönmüleyicilerin ilaca ulaşmasını engellemektedir. Ayrıca anyonik sönmüleyicilerin kullanılması, DNA üzerindeki fosfat grupları arasındaki elektrostatik itme kuvvetlerinden dolayı sönmüleyicinin etkilerini azaltmaktadır. Dolayısıyla, sönmüleyici varlığında interkalasyon ajanlarının  $K_{SV}$  değerlerinde azalma gözlenmektedir. Stern-Volmer eşitliğine göre (52, 62-64);

$$F_0/F = I_0/I = 1 + K_{SV} \times [Q] \quad (2.4.)$$

$F_0$  veya  $I_0$  = Sönmüleyici yokluğunda floresans yoğunluğu

$F$  veya  $I$  = Sönmüleyici varlığında floresans yoğunluğu

$K_{SV}$  = Stern-Volmer sönmüleme sabiti

$[Q]$  = Sönmüleyici derişimi

Etidyum bromür (EB), DNA'ya bağlanan bir florofordur. DNA varlığında EB'nin floresansı, organik baz çiftleri arasındaki güçlü interkalasyona bağlı olarak

artmaktadır. Bilindiği üzere, floresans olayı ikinci bir molekülün ilavesi ile sönmülenebilmektedir. İkinci molekül DNA'ya interkalasyon yoluyla bağlanırsa EB ile rekabete gireceği için bu durum DNA-EB'nin floresans yoğunluğunda bir azalmaya yol açacaktır. DNA ile ikinci molekül arasındaki bağın kuvveti, DNA'ya rekabetçi olarak bağlanan EB'nin floresansı sönmüleme miktarına göre ölçülebilir (64-66).

Floresans spektroskopisinde genellikle floresans şiddeti artışı interkalasyonu, floresans şiddeti düşüşü ise oluğa bağlanmayı, dış bağlanmayı veya elektrostatik/hidrofobik etkileşimler bulunduğunu göstermektedir (63).

#### **2.4.3. Dönüşümlü (Siklik) Voltametri ile DNA-İlaç Etkileşmelerinin İncelenmesi**

Zayıf absorpsiyon bantları verdiği veya elektronik geçişleri DNA molekülü ile çakıştığı için uyumsuzluk gösteren küçük moleküller, voltametrik tekniklerle incelenebilmektedir. Pik potansiyellerindeki kaymalar aracılığıyla bağlanma sabitleri (K) hesaplanarak DNA'nın bu molekküler ile etkileşme miktarı belirlenebilmektedir. Voltametrik yöntemler elektron transferine bağlı olan kimyasal reaksiyonlara karşı hassas olduğu için, akım ve potansiyel ölçümlerinden kinetik veriler elde etmek de mümkün olmaktadır (67).

İlacın etki mekanizmasının ve DNA'ya bağlanma gücünün değerlendirilmesinde dönüşümlü voltametri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem, redoks tepkimelerine girmeleri sebebiyle daha çok olarak metal bazlı bileşikler için kullanışlıdır. Bileşiklerin pik potansiyelleri ve pik akımlarındaki çeşitlilik, bağlanma parametrelerinin belirlenmesinde kullanılabilir. Artan miktarda DNA ilavesi sonucunda pik akımlarındaki ( $I_p$ ) bozunmalar bağlanma sabiti ve bağlanma bölgesi boyutunun belirlenmesinde kullanılırken, pik potansiyellerindeki kaymalar da etkileşme yolunun saptanması için kullanılabilir. Bağlanma sabiti (K), aşağıdaki denklemlerle bulunmaktadır (68):

$$\log (1/[DNA]) = \log K + \log (I/(I_0-I)) \quad (2.5.)$$

K = Bağlanma sabiti,

$I_0$  = DNA yokluğunda ilacın pik akımı,

I = DNA varlığında ilacın pik akımı

Bağlanma sabitinin hesaplanmasında kullanılacak bir başka eşitlik (69):

$$1/[DNA] = [K \times (1-A)/(1-I_0/I)] - K \quad (2.6.)$$

A = Oransal bir sabit

K = Bağlanma sabiti,

$I_0$  = DNA yokluğunda ilacın pik akımı,

I = DNA varlığında ilacın pik akımı

DNA ile ilaç arasındaki etkileşme sonucunda elde edilecek bazı verilere ulaşmak için kullanılan bir başka eşitlik (70):

$$C_b/C_f = K \times \{[\text{serbest baz çiftleri}]/s\} \quad (2.7.)$$

s = Organik baz çiftlerindeki bağlanma bölgesinin boyutu

$C_f$  = Serbest moleküllerin derişimi

$C_b$  = DNA'ya bağlı moleküllerin derişimi

K = Bağlanma sabiti

Baz çifti derişimi  $[DNA]/2$  şeklinde yazılabilir. Bu durumda:

$$C_b/C_f = K \times \{[DNA]/2s\}$$

$C_b/C_f$  aşağıdaki eşitlikle de hesaplanmaktadır (71):

$$C_b/C_f = (I_0 - I)/I \quad (2.8.)$$

Bu denklemin sağ tarafı doğrudan deneydeki pik akımlarından elde edilebilmektedir. Bu nedenle deneysel veriler toplam DNA derişimine karşı  $C_b/C_f$  grafiği olarak da gösterilebilir. Redoks tepkimeleri veren moleküllerin bağlanma sabitleri, DNA'nın bu moleküllere karşı titre edildiği voltametrik deneylerden hesaplanabilmektedir. Aşırı miktarda nükleik asit varlığında difüzyon akımının ölçüldüğü deneyler, DNA'ya bağlı moleküllerin difüzyon katsayısının serbest moleküllerinkinden daha düşük olduğunu göstermiştir (71-73).

Dönüşümlü voltametrde pik potansiyelinin artışı interkalasyonu, düşüşü elektrostatik etkileşimi, pik akımı düşüşü ise oluğa bağlanmayı göstermektedir (49).

## 2.5. Antineoplastik İlaçlar

Antineoplastik ilaçlar aşağıdaki şekilde sınıflandırılır (74).

### *Alkilleyici Ajanlar*

Temozolomit, Siklofosfamid, Klorambusil, İfosfamid.

### *Antimetabolitler*

Metotreksat, Merkaptopürin, Fludarabin Fosfat Sodyum, Sitarabin, Gemsitabin HCl, Kapesitabin.

### *Bitkisel Alkaloidler ve Diğer Doğal Ürünler*

Vinblastin, Vinkristin, Vinorelbin, Paklitaksel, Dosetaksel.

### *Sitotoksik Antibiyotikler ve Benzerleri*

Doksorubisin, Epirubisin, Blemisin.

### *Diğer Antineoplastik İlaçlar*

Sisplatin, Karboplatin, Okzaliptin, İrinotekan HCl.

Tez kapsamında Gemsitabin HCl ve İrinotekan HCl'nin DNA ile etkileşimleri incelenmiştir.

### 2.5.1 Gemsitabin Hidroklorür

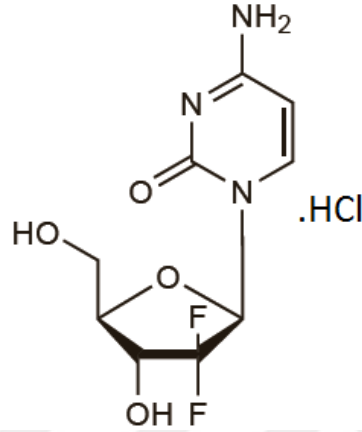
GMB, tümör hücrelerini ışına hassaslaştıran ve sitotoksikite özelliği gösteren bir sitidin analogudur (75-77).

#### *Fiziksel Özellikleri*

Beyaz veya kirli beyaz renkte katı bir maddedir. Suda çözünür (51,3 g/L), metil alkolde az çözünür, alkolde ve polar organik sıvılarda pratik olarak çözünmez. % 1'lik sulu çözeltisinin pH'ı 2-3 arasındadır. Hava geçirmeyen kaplarda saklanmalıdır (78).

### *Kimyasal Yapısı*

Molekül yapısı 4-amino-1-[(2*R*,4*R*,5*R*)-3,3-difloro-4-hidroksi-5-(hidroksimetil)oksolan-2-il]pirimidin-2-on hidroklorür şeklindedir. Basit formülü  $C_9H_{12}ClF_2N_3O_4$  olarak gösterilir (Şekil 2.20). Molekül ağırlığı 299,66 g/mol'dür. Sulu çözeltisi UV spektrofotometrede 232 ve 268 nm'de pik verir (79).



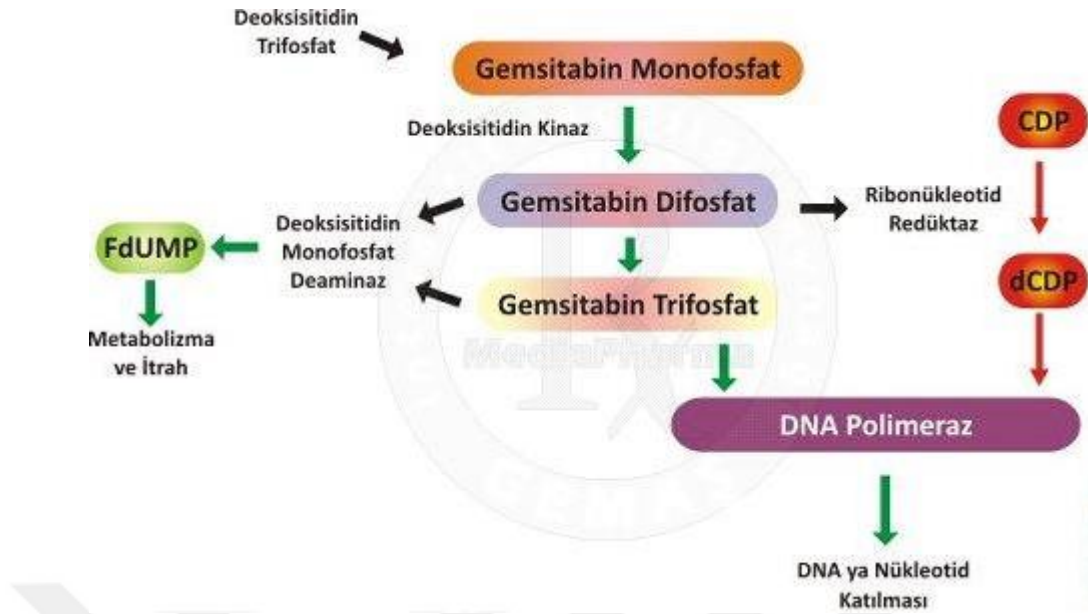
**Şekil 2.20.** GMB'nin kimyasal yapısı.

### *Etki Mekanizması*

GMB hücre içinde nükleozid kinazlar yoluyla aktif difosfat (dFdCDP: 2,2-diflorodeoksisitidin difosfat) ve trifosfat (dFdCTP: 2,2-diflorodeoksisitidin trifosfat) nükleozidlerine metabolize olur. GMB'nin, dFdCDP ve dFdCTP'ye bağlı iki ayrı mekanizma ile DNA sentezini inhibe ederek sitotoksik etkisini gösterdiği düşünülmektedir.

Birinci mekanizmaya göre; dFdCDP, DNA sentezi için gerekli olan deoksinükleozid trifosfatların oluşmasını sağlayan reaksiyonları katalizlemekten sorumlu olan ribonükleotid redüktaz enzimini inhibe eder. Bu durum deosiribonükleozidlerin derişimlerinde ve özellikle de dFdCTP'de azalmaya yol açar.

İkinci mekanizmaya göre; dFdCTP, DNA yapısına girmek için dFdCTP ile yarışır. Bu sırada dFdCTP'nin hücre içi derişiminin azalması sonucunda, dFdCTP'nin DNA yapısına girmesi kolaylaşır. Böylece DNA polimeraz enzimi GMB'yi uzaklaştırılmaz ve uzayan DNA zincirlerini onaramaz. GMB, DNA yapısına girdikten sonra DNA sentezi inhibe olur. Bu da apoptoz olarak adlandırılan programlı hücre ölüm sürecini başlatır (Şekil 2.21) (80).



Şekil. 2.21. GMB'nin etki mekanizması (74).

### *Metabolizması*

GMB; karaciğerde, böbrekte, kanda ve diğer dokularda bulunan sitidin deaminaz tarafından hızla 2',2'-diflorodeoksiuridin oluşturacak şekilde metabolize edilir. Bu molekül de dokulara dağıtılır ve daha ileri bir transformasyona uğramaksızın vücuttan idrar yoluyla atılır (81).

### *Farmakokinetiği*

Cinsiyet ve yaş, farmakokinetik üzerinde etkili olan faktörlerdir. İlacın itrah miktarı kadınlarda erkeklerin %60-80'i arasındadır ve vücut yüz ölçümü ile orantılı olarak da değişmektedir. Yine de kadınlarda 1000 mg/m<sup>2</sup>'lik dozlar kullanıldığında GMB dozunun azaltılması gerekmez.

30 dakikalık infüzyonla verilen 100 mg/m<sup>2</sup>'lik tek dozdan sonra plazmada GMB'nin pik derişimi 10-40 µg/mL arasındadır ve yarılanma ömrü 17 dakikadır. 1,1 saatlik infüzyonla verilen 1000-2500 mg/m<sup>2</sup>'lik tekli dozlarda yarılanma ömrü 11-26 dakikadır. Daha uzun süreli (3.6-4.3 saat) infüzyonlarla verilen 2500-3600 mg/m<sup>2</sup>'lik tekli dozlarda yarı ömrü 18,5-57,1 dakika arasında değişir. Çoklu dozlardan sonra yarılanma ömrü infüzyon süresinden bağımsız olarak tekli dozlarla gözlenenlere göre daha uzundur. GMB ortalama böbrek atılımı 2-7 L/saat/m<sup>2</sup> arasında değişir. GMB dozunun her hafta tekrarlanması durumunda bir sonraki dozdan hemen önce ölçülen plazma derişimi 0,07-1,2 µg/mL arasında değişir ve vücutta birikim oluşmaz. Periferik

kandaki mononükleer hücrelerde aktif metabolit olan dFdCTP'nin yarı ömrü ise 0,7-12 saat arasında değişir. dFdCTP derişiminin 35-350 mg/m<sup>2</sup>/30 dakika arasında değiştiği infüzyon hızlarında GMB dozlarının uygulanmasıyla bu süre orantılı olarak artar ve 0,4-5 µg/mL arasında değişen maksimum plazma derişimleriyle sonuçlanır. 1000 mg/m<sup>2</sup>/30 dakikalık bir GMB dozundan sonra ilk 30 dakika boyunca 5 µg/mL'nin üzerinde kalan plazma GMB derişiminin, sonraki 1 saat boyunca da 0,4 µg/mL'nin üzerinde olması beklenir (81).

### ***Endikasyonları***

Akciğer, meme, mesane, over, pankreas ve safra kanalı kanserleri ve mezoteliyoma hastalıklarında kullanılmaktadır (74).

### ***Kontrendikasyonları***

Aşılama yoluyla, intramüsküler enjeksiyon olarak, çocuklara, kadınlara veya yaşlı hastalara (65 yaş ve üzeri) uygulama ve diş hastalığı, ekstrevasiyon, hepatik hastalık, herpes enfeksiyonu, kardiyovasküler hastalık, kemik iliği depresyonu, nötrope ni, radyasyon tedavisi, renal hastalık, renal yetmezlik, su çiçeği hastalığı ve trombositopeni durumlarında kullanılması sakıncalıdır. Emzirme, enfeksiyon ve gebelik durumlarında kesinlikle kullanılmamalıdır (74).

### ***Yan Etkileri***

İlacın kullanımını sonucunda anafilaktoid reaksiyonlar, hematüri, proteinüri, alopesi (saç dökülmesi), makülopapüler döküntü, enfeksiyon, pnömoni, bulantı, diyare, konstipasyon, kusma, stomatit, ateş, enjeksiyon yeri reaksiyonu, letarji, malez, periferik ödem, hepatik enzim düzeylerinde yükselme, anemi, hemolitik-üremik sendrom, nötrope ni, trombositopeni, pareteziler, sersemlik hissi, dispne ve kanama görülebilmektedir (74).

## **2.5.2. İrinotekan Hidroklorür**

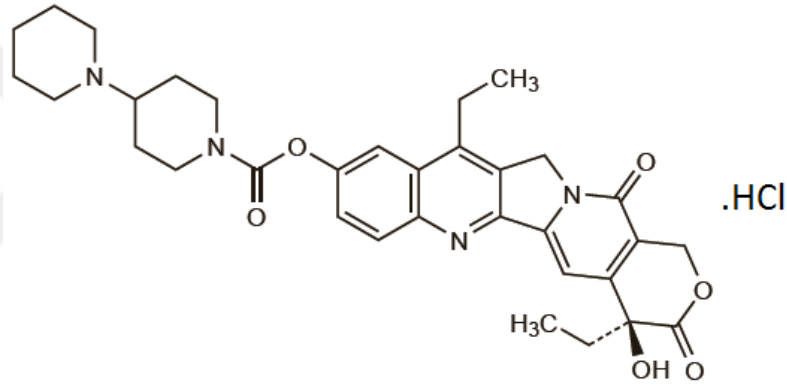
İTN, *Camptotheca acuminata* isimli bir bitkiden elde edilen *Camptothecin* isimli alkaloidin semisentetik ve suda eriyebilen bir türevi olan, Topoizomeraz-I grubu antineoplastik bir ilaçtır (82, 83).

### ***Fiziksel Özellikleri***

Sarı veya açık sarı renkte kristal bir tozdur. Erime sıcaklığı 222 derecedir. Suda ve organik sıvılarda az çözünür. Sulu çözeltisinin pH'ı 4'tür. Hava geçirmeyen kaplarda saklanmalıdır (84).

### ***Kimyasal Yapısı***

Molekül yapısı [(19S)-10,19-dietil-19-hidroksi-14,18-diokso-17-oksa-3,13-diazapentasiklo[11.8.0.0<sup>2,11</sup>.0<sup>4,9</sup>.0<sup>15,20</sup>]henikosa-1(21),2,4(9),5,7,10,15(20)-heptaen-7-il]-4-piperidin-1-il-piperidin-1-karboksilat hidroklorür şeklindedir. Basit formülü C<sub>33</sub>H<sub>39</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>6</sub> olarak gösterilir (Şekil 2.22). Molekül ağırlığı 623,1 g/mol'dür. Etanoldeki çözeltisi UV spektrofotometrede 221, 255, 359 ve 372 nm'de pik verir (84).



**Şekil 2.22.** İTN'nin kimyasal yapısı.

### ***Etki Mekanizması***

İTN, hücredeki Topoizomeraz-I kompleksleriyle etkileşir ve S fazına spesifik olarak sitotoksik etki gösterir. Topoizomerazlar, hücrenin hayati olaylarının gerçekleştiği DNA bölgelerindeki katlanmaları ve süper sarmal oluşmasını redükler. DNA'daki fosfodiester bağlarını açar ve tekrar birleştirir. Tek ya da çift zincirli DNA'nın oluşmasına öncülük eden DNA-enzim bağımlı oluşturur. Topoizomeraz-I, tek zincir DNA kırıklarına geri dönüşümlü olarak bağlanır. Topoizomeraz-I-İTN kompleksinin kendisi hücre için ölümcül değildir. Fakat replikasyon çatalları ile olan etkileşimleri, DNA'da zincir kırıklarına yol açar. Bu durum G2 fazında gecikmeye, geri dönüşümsüz replikasyon sorunlarına ve hücre ölümlerine sebep olur. Daha yüksek derişimlerde İTN, DNA hasarına ve apoptoza yol açarak S fazında olmayan hücreleri de öldürür (85).



### ***Metabolizması***

Günümüzde florourasil-lökovorinle kombine edilen İTN, 4. evre kolon kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. İnsan karboksilesterazları İTN'yi aktif metaboliti olan 7-etil-10-hidroksikamptotesine (SN-38) dönüştürür. SN-38, İTN'ye göre 100-1000 kat daha yüksek sitotoksik etkiye sahiptir. Bu metabolit Topoizomerez-I enzimini DNA'ya geri dönüşümsüz olarak bağlar. Bu da gen hasarına ve apoptoza yol açar (86).

SN-38, Üridin-Difosfat Glukronosiltransferaz tarafından SN-38G'ye (inaktif glukronid) konjuge edilir. Daha sonra safra yollarından salgılanır ve fazlası idrarla atılır. Bu konjugasyondaki majör enzim UDP Glukronozil Transferaz 1A1'dir (UGT1A1). Bu enzimin azalması durumunda SN-38'in inaktif formuna dönüşümü azalır. SN-38'i, hem kanser hücreleri hem de karaciğer hücreleri UGT1A1 aracılığı ile inhibe edebilmektedir (87).

İTN; SN-38'e hidrolize olmasının yanısıra, sitokrom P450 3A4 (CYP3A4) aracılıklı oksidatif yollara da duyarlıdır. Bu yollar ile inaktif metabolitler olan 7-etil-10-(5-aminopentanoik asid)-karboniloksi-kamptotesin ve 7-etil-10-(4-amino-1-piperodino)-karboniloksi-kamptotesin oluşmaktadır. Bu da, direkt olmasa da aktif metabolit olan SN-38 düzeylerini etkilemektedir. CYP3A alt ailesinde CYP3A4, CYP3A5 ve CYP3A7 fonksiyonel genlerdir. Bunlardan CYP3A4 ve CYP3A5 dominant olanlardır. CYP3A aktivitesinin kalıtsal olduğu düşünülmektedir. CYP3A gen ailesindeki bazı tek nükleotid polimorfizmlerinin İTN farmakokinetiği ve farmakodinamiği ile direkt olarak ilişkili olduğu bulunsa da, bu ilişkinin mekanizması henüz tam olarak keşfedilmemiştir (88).

### ***Farmakokinetiği***

İTN vücut dokularındaki karboksilesteraz ile aktif SN-38'e hidroliz edilir. SN-38, yaklaşık 14 saatlik bir yarı ömre sahiptir. İTN'nin ve SN-38'in plazma protein bağlanmaları sırasıyla yaklaşık %65 ve %95'tir. SN-38, UGT1A1 enzimi tarafından glukuronidasyon ile elimine edilir. İTN ayrıca kısmen sitokrom P450 izoenzimleri olan CYP3A4 veya CYP3A5 tarafından metabolize edilir. İntravenöz dozun toplamda %50'sinden fazlası (%30 safrayla ve %20 idrarla) değişmemiş ilaç olarak atılır (78).

### ***Endikasyonları***

Akciğer, kolorektal, küçük hücreli akciğer, küçük hücreli olmayan akciğer, meme, mide, over, pankreas ve serviks kanserleri ile rabdomiyosarkom, glioblastoma multiforme ve malign glioma hastalıklarında kullanılmaktadır (74).

### ***Kontrendikasyonları***

Aşılama yoluyla, çocuklara veya yaşlı hastalara (65 yaş ve üzeri) uygulama ve biliyer kanal hastalığı, diş hastalığı, diş tedavisi, diyabet, ekstremitasyon, emzirme, enfeksiyon, gebelik, göz ile temas, hepatik hastalık, herpes enfeksiyonu, intramüsküler enjeksiyon, kaza sonucu maruz kalma, nötropeni, radyasyon tedavisi, sarılık, su çiçeği hastalığı, trombositopeni ve viral enfeksiyon durumlarında kullanılması sakıncalıdır. Diyare ve kemik iliği depresyonu durumlarında kesinlikle kullanılmamalıdır (74).

### ***Yan Etkileri***

İlacın kullanımı sonucunda anafilaktoid reaksiyonlar, lenfopeni, renal yetmezlik, alopesi (saç dökülmesi), cilt döküntüsü, diyaforez (terleme), hipokalemi, enfeksiyon, abdominal ağrı, bağırsak iskemisi, bulantı, dispepsi, diyare, flatulans, hipersalivasyon, ileus, kolit, konstipasyon, kusma, pankreatit, stomatit, tiflitis, asteni, ateş, ödem, lakrimasyon, miyozis, hepatik enzim düzeylerinde yükselme, anemi, lökopeni, nötropeni, trombositopeni, miyokard infarktüsü, sinüs bradikardisi, sırt ağrısı, anoreksi, dehidratasyon, hiperglisemi, hiponatremi, kilo kaybı, uykusuzluk, baş ağrısı, baş dönmesi, üşüme, titreme, dispne, öksürük, pulmoner embolizm, rinit, al basması, hipovolemi, kanama, ortostatik hipotansiyon ve tromboembolizm görülebilmektedir (74).

## **2.6. DNA-İlaç Etkileşmeleriyle İlgili Yapılan Spektroskopik Çalışmalar**

DNA-ilaç etkileşmelerinin spektroskopik yöntemlerle analizleri yapılırken çok farklı ilaç etkin maddeleriyle çalışılmıştır.

Aslanoğlu ve Öge (70) 2005 yılında yaptıkları çalışmada, norepinefrinin DNA ile etkileşmesini incelemiştir. Araştırma sırasında UV-GB spektroskopisinden, ayrıca voltametrik ve viskometrik yöntemlerden faydalanılmıştır. Araştırmanın sonucunda, norepinefrinin DNA'ya bağlandığı gözlenmiştir. Vizkozite ölçümlerinden; düşük derişimlerdeki norepinefrinin DNA'ya elektrostatik etkileşimlerle bağlandığı,

ancak derişim arttıkça interkalasyonla da bağlanabildiği keşfedilmiştir. 25 °C'de standart Gibbs serbest enerji değişimi yaklaşık -21.17 kJ/mol olarak ölçülmüştür. Böylece norepinefrinin DNA'ya bağlanması için dışarıdan enerjiye ihtiyaç olmadığı anlaşılmıştır.

Li ve ark. (89) 2005 yılında yaptıkları araştırmada, antitümör ilaç olan Mitoksantron'un (MTX) asetat tampon çözeltilerinde DNA ile etkileşmesini incelemiştir. Araştırma sırasında dönüşümlü voltametri ve UV-GB, floresans ve raman spektroskopileri yöntemlerinden faydalanılmıştır. Araştırmanın sonucunda; floresans spektrumundaki emisyon sönümlenmesinde ve dönüşümlü voltametrideki pik akımlarında önemli derecede düşüş, UV-GB spektroskopisindeki absorpsiyon spektrumunda ise hipokromik etki ve barokromik kayma gözlenmiştir. Bu bulgular sayesinde MTX'in DNA'ya interkalasyonla bağlandığı keşfedilmiştir. Raman spektroskopisinden elde edilen verilerin yardımıyla, MTX'teki kromoforun sadece bir kısmının DNA zincirine bağlandığı anlaşılmıştır.

Wei ve ark. (90) 2010 yılında yaptıkları araştırmada, 5,10,15,20-tetrakis-(N-metilpiridinyum-4-il)-21H,23H-porfirinin (TMPyP4) ve bir başka porfirin türeviden olan 5,10,15,20-tetrakis-(N-propilpiridinyum-4-il)-21H,23H-porfirinin (TPrPyP4) polietilen glikol varlığında paralel dört zincirli G-kuadruplekse (G<sub>4</sub>T<sub>4</sub>G<sub>4</sub>)<sub>4</sub> bağlanmasını incelemiştir. Araştırma sırasında dairesel dikroizm, görünür bölge moleküler absorpsiyon spektroskopisi ve floresans spektroskopisi yöntemlerinden faydalanılmıştır. Araştırmanın sonucunda, her C molekülünün 4 adet TMPyP4 veya TPrPyP4 molekülünü bağlayabildiği keşfedilmiştir. Yüksek ve düşük bağlanma özelliğine sahip iki farklı bağlanma bölgesi gözlenmiştir. Bu bölgelere ait bağlanma katsayıları sırasıyla; (G<sub>4</sub>T<sub>4</sub>G<sub>4</sub>)<sub>4</sub>-TMPyP4 için  $2,74 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  ve  $8,21 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , (G<sub>4</sub>T<sub>4</sub>G<sub>4</sub>)<sub>4</sub>-TPrPyP4 için ise  $2,05 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  ve  $1,05 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  olarak bulunmuştur. G-kuadrupleksin iki ucuna iki porfirin molekülü daha güçlü bir şekilde bağlanırken, diğer iki porfirinin iki adet dış oluğa zayıf bir şekilde bağlandığı anlaşılmıştır.

Shah ve ark. (91) 2010 yılında yaptıkları araştırmada, potansiyel antikanser bir ilaç olan 4-nitrofenilferrosen (NFC) ile DNA arasındaki etkileşmeyi incelemiştir. Araştırma sırasında UV-GB ve floresan spektroskopileri ve dönüşümlü voltametri yöntemlerinden faydalanılmıştır. Araştırmanın sonucunda; dönüşümlü voltametri negatif potansiyel kayması, UV-GB spektroskopisinde az miktarda batokromik

kayma, floresans spektroskopisinde tamamlanmayan sönümlenme ve vizkozitede azalma gözlenmiştir. Bu bulgular sayesinde pozitif yüklü NFC ile DNA'daki anyonik fosfatlar arasında elektrostatik etkileşim bulunduğu keşfedilmiştir. İlacın serbest ve DNA'ya bağlı formlarına ait difüzyon katsayıları, Randles–Sevcik eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır. Dönüşümlü voltametriden elde edilen verilerin yardımıyla; bağlanma sabiti, bağlanma oranları, bağlanma bölgesinin büyüklüğü ve bağlanma serbest enerjisi gibi bazı bağlanma parametreleri elde edilmiştir. Bağlanma sabiti ayrıca UV-GB ve floresans spektroskopileriyle de hesaplanmış olup, dönüşümlü voltametriyle yakın değerlere ulaşılmıştır.

Bhadra ve Kumar (92) 2011 yılında yaptıkları çalışmada, insan telomerik kuadrupleks DNA'sı ile izokinolin alkaloidleri olan berberin, palmatin, koralin ve sanguinarinin etkileşmesini inceleyerek etidyum ile karşılaştırmıştır. Araştırma sırasında dairesel dikroizm, optik erime, mikroklorimetri, absorpsiyon spektroskopisi ve floresans spektroskopisi yöntemlerinden faydalanılmıştır. Araştırmanın sonucunda, tüm moleküllerin DNA'ya 1:1 oranında bağlandığı keşfedilmiştir. Koralin en yüksek bağlanma sabitine sahipken ( $10^6 \text{ M}^{-1}$ ), diğerlerinin bağlanma sabitlerinin  $10^5 \text{ M}^{-1}$  civarında olduğu gözlenmiştir. Etidyumun bağlanma sabiti sanguinarine yakın bulunmuştur. Kolilen ve sanguarin, berberin ve palmatine göre DNA'ya daha fazla istiflenmiştir. İncelenen tüm alkaloidlerin DNA ile etkileşmesi ekzotermik bir şekilde gerçekleşmiştir. Koralin, sanguinarin, berberin ve palmatin için sırasıyla  $-169$ ,  $-198$ ,  $-105$  ve  $-95 \text{ kal/mol K}$  olan ısı kapasitesi değerlerinden, DNA'ya bağlanmalarına etki eden hidrofobik özelliklerinde önemli ölçüde farklılıklar bulunduğu anlaşılmıştır.

Sirajuddin ve ark. (56) 2012 yılında yaptıkları çalışmada; yeni bir azometin olan 3-[(3,5-dimetilfenilimino)metil]benzen-1,2-diol sentezleyerek onu enzimatik, antioksidan, antibakteriyel ve antifungal özellikleri, sitotoksitesi ve DNA ile etkileşmesi bakımından incelemiştir. Araştırma sırasında Fourier Dönüşümlü Infrared,  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopileri ile tek kristal analizi yöntemlerinden faydalanılmıştır. Araştırmanın sonucunda; bileşiğin, interkalasyon ve oluğa bağlanma olmak üzere 2 yolla DNA ile etkileşmeye girdiği keşfedilmiştir. Bileşiğin interkalasyonda DNA'daki organik baz çiftleri arasına yerleştiği, oluğa bağlanmada ise organik bazlarla hidrojen bağı oluşturduğu gözlenmiştir. Ayrıca etkili bir antioksidan olduğu bulunmuştur.

### 2.6.1. Gemsitabin HCl ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Kalanur ve ark. (93) 2009 yılında yaptıkları araştırmada, antikanser bir ilaç olan GMB'nin DNA ile etkileşmesini incelemiştir. Araştırma sırasında dairesel dikroizm, UV-GB ve floresans spektroskopileri ve diferansiyel puls voltametri yöntemlerinden faydalanılmıştır. Araştırmanın sonucunda, elektrokimyasal veriler yardımıyla ilacın DNA'ya bağlanma sabiti  $2,22 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  ve bağlanma oranı 1:2 olarak bulunmuştur. Elektrokimyasal ve spektroskopik veriler yardımıyla da ilacın DNA'da oluğa bağlandığı keşfedilmiştir. Ayrıca GMB'nin farmasötik preparatlardan tayini için diferansiyel puls voltametrisinde  $5 \times 10^{-6} - 7,5 \times 10^{-4} \text{ M}$  aralığında doğrusal olan bir yöntem geliştirilmiştir. Gözlenebilme sınırı  $1,06 \times 10^{-6} \text{ M}$  olarak ölçülen bu yöntemin GMB tayininde başarıyla uygulanabildiği belirtilmiştir.

### 2.6.2. İrinotekan HCl ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Tamyürek (94) 2015 yılında yaptığı çalışmada; İTN'nin hemoglobin, globulin ve insan serum albumini gibi serum proteinlerine bağlanması incelemiştir. Bu amaçla [3-(2,3-epoksi propoksi)propil]trimetoksisilan ile modifiye edilmiş süperparamagnetik demir oksit nanopartikül (GPTS-SPION) yüzeyi kullanılmıştır. Bu nanopartiküller  $\text{NH}_4\text{OH}$  ile  $\text{Fe}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{3+}$  tuzları birlikte çöktürülerek sentezlenmiş ve sonra SPION yüzeyinde fonksiyonel epoksi grupları elde etmek için GPTS ile modifiye edilmiştir. Sonuçlar sırasıyla 20 mg GPTS modifiye SPION yüzeyine; insan serum albuminin (HSA) 44,1, globulinin 21,2 ve hemoglobinin 32,6  $\mu\text{g}$  kadar bağlandığı bulunmuştur. İTN'nin serum proteinlerine bağlanma miktarlarının belirlenmesi amacıyla, İTN'nin spektrofotometrik yöntemle uyarma ve yayılma dalga boyları belirlenmiştir. Buna göre uyarma dalga boyu 299 nm iken, yayılma dalga boyu 448 nm bulunmuştur. 25 mg GPTS modifiye SPION yüzeyin serum protein-SPION yüzeylerine İTN bağlanma miktarları HSA için 37,3, globulin için 43,2 ve hemoglobin için 40,8  $\mu\text{g}$  kadar bulunmuştur. Nanopartikül yüzeyine HSA, globulin ve hemoglobin ile İTN'nin bağlanmaları IR spektroskopisi ile doğrulanmıştır. Ayrıca yüzey karakterizasyonu için Taramalı Elektron Mikroskopu analizi yapılmıştır. GPTS-SPION yüzeyinde serum proteini-İTN etkileşmesinin termal davranışı, termogravimetrik analiz kullanılarak incelenmiştir. Termal parçalanmanın kinetik parametreleri, Horowitz-Metzger metodu kullanılarak tayin edilmiştir.

Temerk ve ark. (95) 2018 yılında yaptıkları çalışmada, antikanser bir ilaç olan İTN'nin ssDNA ve dsDNA ile etkileşmesini incelemiştir. Araştırma sırasında voltametrik ve spektroskopik yöntemlerden faydalanılmıştır. Araştırmanın sonucunda, İTN molekülünün interkalasyonla DNA zincirindeki organik bazların arasına yerleştiği ve bu etkileşmenin iyonik güçlerden bağımsız bir şekilde gerçekleştiği keşfedilmiştir. dsDNA varlığında spektrumda hiperkromik etki gözlenmiştir. Bu durum, ilaçtaki kromofor grubun DNA'daki organik bazlarla interkalasyon yaptığını göstermektedir. ssDNA varlığında ise DNA'nın dış kısmındaki negatif yüklü fosfat grupları ile İTN arasında elektrostatik etkileşim gerçekleştiği keşfedilmiştir. Daha sonra İTN-dsDNA ve İTN-ssDNA komplekslerinin bağlanma sabitleri, stokiyometrik katsayıları ve termodinamik parametreleri değerlendirilmiştir. ssDNA ile yapılan çalışmalar dsDNA ile yapılanlara göre daha etkili sonuç vermiştir. İTN'nin pik akımlarının, DNA derişimiyle orantılı olarak değiştiği anlaşılmıştır. dsDNA ve ssDNA'nın gözlenebilme sınırları sırasıyla  $5,49 \times 10^{-7}$  ve  $1,87 \times 10^{-7}$  M olarak bulunmuştur.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Cihazlar

|                          |  |
|--------------------------|--|
| UV-GB spektrofotometresi | Shimadzu UV-1700 PharmaSpec                          |
| Buzdolabı                | Bosch  |
| Hassas terazi            | Mettler Toledo AG285                                 |
| Manyetik karıştırıcı     | Jeno Tech MS-51M                                     |
| Otomatik pipet           | Eppendorf Research Plus (100-1000 µL / 1000-5000 µL) |
| pH metre                 | Mettler Toledo MA235                                 |
| Saf su sistemi           | Bornstead Nanopure Diamond                           |
| Ultrasonik banyo         | Bandelin Sonorex Super RK 514 BH                     |
| Vortex karıştırıcı       | IKA Vortex Genius 3                                  |

#### 3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

|                          |   |
|--------------------------|---|
| DNA                      | Sigma   |
| Fosforik asit            | H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (Merck)  |
| Gemsitabin HCl           | C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> ClF <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .HCl (Mustafa Nevzat İlaç Sanayii A.Ş.) |
| İrinotekan HCl           | C <sub>33</sub> H <sub>39</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>6</sub> .HCl (Mustafa Nevzat İlaç Sanayii A.Ş.)               |
| Sodyum dihidrojen fosfat | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck)  |
| Sodyum fosfat            | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck)  |
| Sodyum hidroksit         | NaOH (Merck)  |

#### 3.3. Kullanılan Cam ve Sarf Malzemeler

|                         |   |
|-------------------------|---|
| Balon joje              | Pyrex (10, 25, 50, 100, 250 ve 2000 mL) |
| Beher                   | 250 mL                                  |
| Otomatik pipet ucu      | 1000 µL / 5000 µL                       |
| Ölçekli santrifüj tüpü  | 15 mL                                   |
| Piset                   | 500 mL                                  |
| Spatül                  | Metal                                   |
| Spektrofotometre küveti | Kuvars (1x1x3,5 cm)                     |
| Tartım kabı             | Plastik                                 |
| Vial                    | Plastik (1,5 mL / 2 mL)                 |

### 3.4. Çözeltilerin Hazırlanması

#### *DNA Stok Çözeltisi*

Hassas terazide 40 mg DNA tartılarak balon jøjeye aktarılmış ve saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Vortex karıştırıcı kullanılarak homojen karışması sağlanan çözeltinin derişimi  $1,376 \times 10^{-3}$  M'dir. DNA çalışma çözeltileri bu stok çözeltiden pH 7,4 ve pH 4,7 fosfat tampon çözeltileri ile uygun seyreltmeler yapılarak günlük olarak hazırlanmıştır. DNA'nın absorbans oranları ölçülerek ( $A_{260} / A_{280}$  ve  $A_{260} / A_{230}$ ) DNA'nın saflığı da hesaplanabilmektedir. Bu oranın 1,8-1,9 aralığında olması DNA'nın yeterince proteinsiz (saf) olduğu anlamına gelir. Yaptığımız ölçümlerde DNA'nın saflık oranı 1,81 bulunmuştur.

#### *Gemcitabin HCl Stok Çözeltisi*

Hassas terazide 90 mg GMB tartılarak balon jøjeye aktarılmış ve saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Vortex karıştırıcı kullanılarak homojen karışması sağlanan çözeltinin derişimi  $3 \times 10^{-3}$  M'dir. GMB çalışma çözeltileri bu stok çözeltiden tampon çözeltiler ile uygun seyreltmeler yapılarak günlük olarak hazırlanmıştır.

#### *İrinotekan HCl Stok Çözeltisi*

Hassas terazide 62,4 mg İTN tartılarak balon jøjeye aktarılmış ve saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Vortex karıştırıcı kullanılarak homojen karışması sağlanan çözeltinin derişimi  $10^{-3}$  M'dir. İTN çalışma çözeltileri bu stok çözeltiden tampon çözeltiler ile uygun seyreltmeler yapılarak günlük olarak hazırlanmıştır.

#### *Fosforik Asit Çözeltisi (0,5 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)*

250 mL'lik balon jöje, yarısına kadar saf su ile doldurulmuştur. 1,71 g/mL yoğunluğa sahip %85'lik H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisinden 8 mL alınarak bu balon jøjeye aktarılmış ve saf su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır. Manyetik karıştırıcı kullanılarak, hazırlanan çözeltinin homojen karışması sağlanmıştır.



### ***Sodyum Hidroksit Çözeltisi (0,2 M NaOH)***

Hassas terazide 2 g NaOH tartılarak balon jøjeye aktarılmış ve saf su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır. Manyetik karıştırıcı kullanılarak, hazırlanan çözeltinin homojen karışması sağlanmıştır.

### ***pH 7,4 Fosfat Tampon Çözeltisi***

Hassas terazide 7,098 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tartılarak balon jøjeye aktarılmış ve saf su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra hazırlanan bu 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> üzerine, pH 7,4'te sabitlenene kadar 0,5 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> eklenmiştir. Manyetik karıştırıcı kullanılarak, hazırlanan tüm çözeltilerin homojen karışması sağlanmıştır.

### ***pH 4,7 Fosfat Tampon Çözeltisi***

Hassas terazide 7,8 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tartılarak balon jøjeye aktarılmış ve saf su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra hazırlanan bu 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> üzerine, pH 4,7'de sabitlenene kadar 0,2 M NaOH eklenmiştir. Manyetik karıştırıcı kullanılarak, hazırlanan tüm çözeltilerin homojen karışması sağlanmıştır.

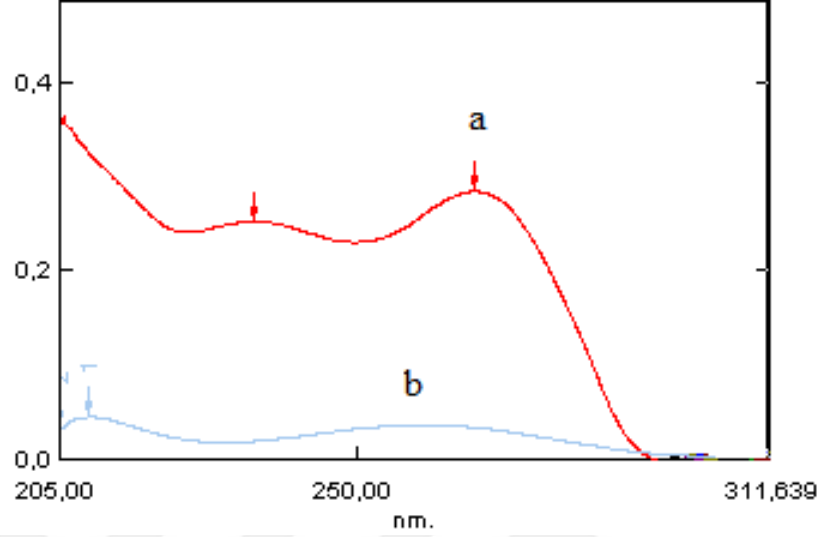
## **3.5. UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektroskopisi ile DNA-İlaç Etkileşmelerinin İncelenmesi**

DNA-ilaç etkileşmesinin belirlenmesi için spektrofotometrik titrasyon yöntemi kullanılmıştır. Bunun için sabit derişimdeki ilaç çözeltisi üzerine artan derişimlerde DNA çözeltisi ilave edilmiştir. İlaç çözeltisinin tek başına ve her DNA çözeltisi ilavesinden sonra UV-GB spektrumları alınmıştır. Her deney pH 7,4 ve pH 4,7 fosfat tampon çözeltilerinde 6 defa tekrarlanmıştır. Elde edilen UV spektrumlarında absorbans değerindeki değişimler izlenmiştir. Bu spektrumlardan yararlanarak, 1/[DNA]'ya karşı  $A_0/(A-A_0)$  değerleri grafiğe geçirilmiştir. Daha sonra Benesi-Hildebrand eşitliği uygulanarak bağlanma sabitleri hesaplanmıştır.

## 4. BULGULAR

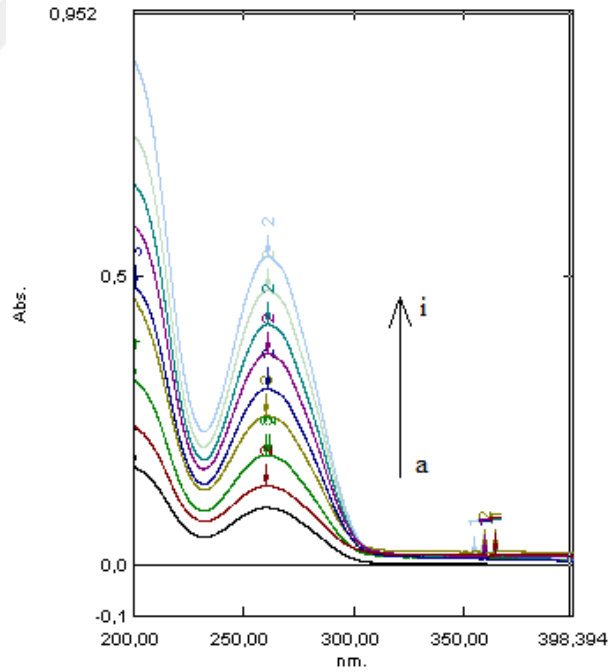
### 4.1. DNA-Gemsitabin HCl Etkileşimi Bulguları

DNA ve GMB çözeltilerinin UV spektrumları Şekil 4.1 ile gösterilmiştir.



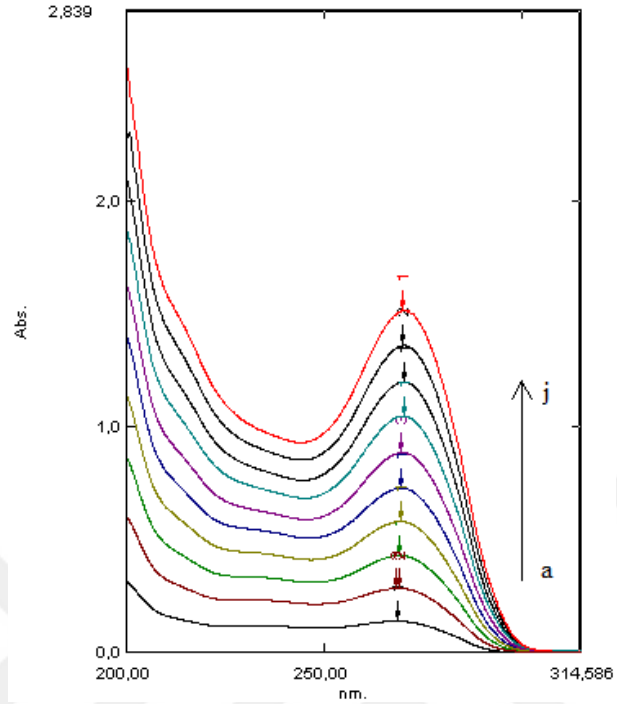
Şekil 4.1. a)  $3 \times 10^{-5}$  M GMB, b)  $5 \times 10^{-6}$  M DNA çözeltilerinin UV spektrumları.

DNA'nın artan derişimlerdeki UV spektrumları Şekil 4.2 ile gösterilmiştir.



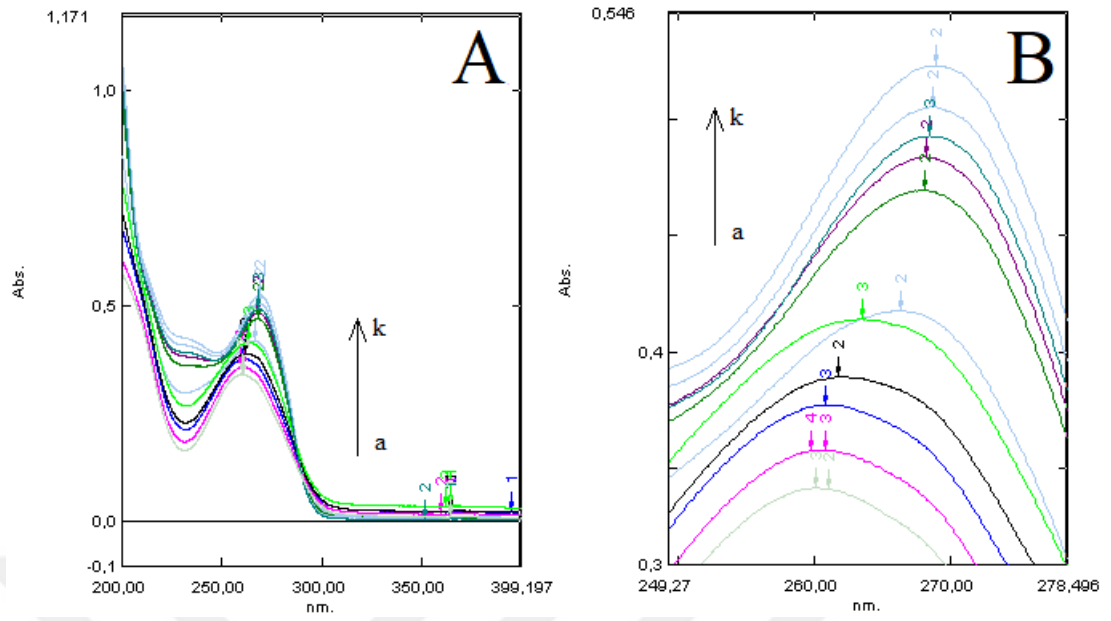
Şekil 4.2. DNA'nın artan derişimlerdeki UV spektrumları. a)  $14 \times 10^{-6}$  M, b)  $16,86 \times 10^{-6}$  M, c)  $25,29 \times 10^{-6}$  M, d)  $33,72 \times 10^{-6}$  M, e)  $42,16 \times 10^{-6}$  M, f)  $50,59 \times 10^{-6}$  M, g)  $59,02 \times 10^{-6}$  M, h)  $67,45 \times 10^{-6}$  M, i)  $75,88 \times 10^{-6}$  M.

GMB çözeltilisinin artan derişimlerdeki UV spektrumları Şekil 4.3 ile gösterilmiştir.

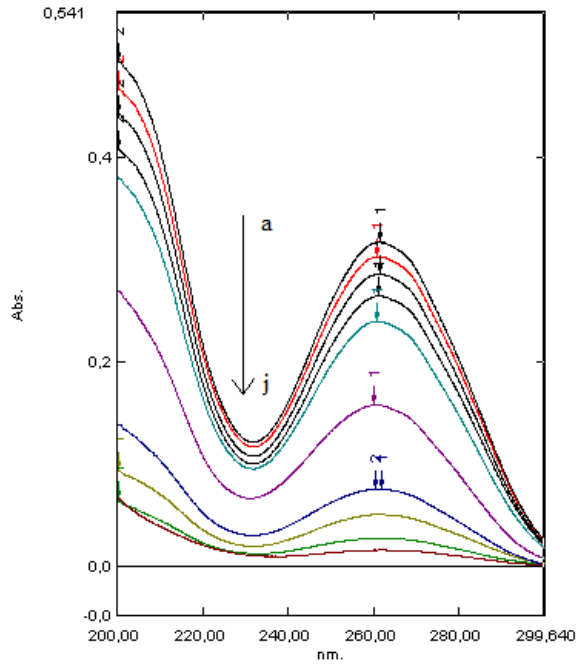


**Şekil 4.3.** GMB'nin artan derişimlerdeki UV spektrumları. a)  $1,5 \times 10^{-5}$  M, b)  $3 \times 10^{-5}$  M, c)  $4,5 \times 10^{-5}$  M, d)  $6 \times 10^{-5}$  M, e)  $7,5 \times 10^{-5}$  M, f)  $9 \times 10^{-5}$  M, g)  $10,5 \times 10^{-5}$  M, h)  $12 \times 10^{-5}$  M, i)  $13,5 \times 10^{-5}$  M, j)  $15 \times 10^{-5}$  M.

DNA-GMB kompleksinin oluşumunu saptamak amacıyla Job yöntemi uygulanmıştır. Sabit hacimde GMB ve DNA'nın birbirine göre derişimleri değiştirilerek elde edilen UV spektrumları (Şekil 4.4) ve DNA çözeltilisi üzerine GMB yerine aynı hacimlerde su eklenmesi ile elde edilen UV spektrumları (Şekil 4.5) karşılaştırılmıştır. Şekil 4.4'te azalan DNA derişimlerine rağmen sinyalde artış gözlenmesi, kompleksin oluştuğunu göstermiştir.

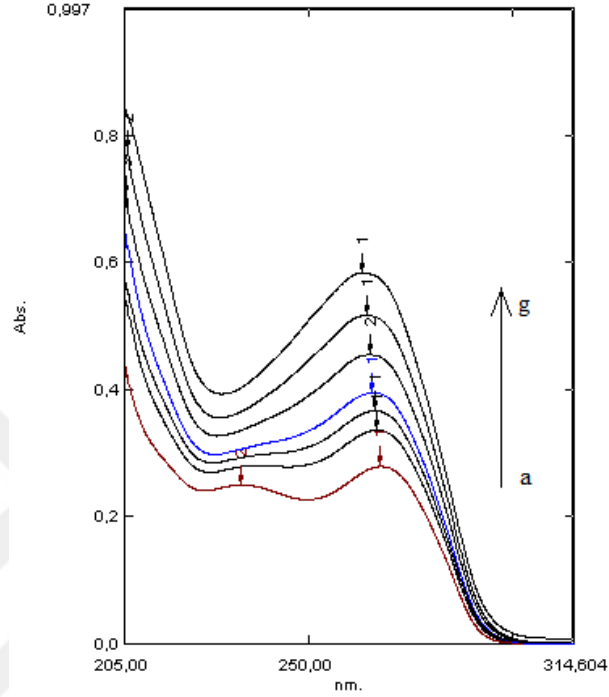


**Şekil 4.4.** DNA üzerine artan derişimlerde GMB eklenmesi ile elde edilen UV spektrumları. A. a)  $5 \times 10^{-5}$  M DNA + 0 M GMB, b)  $4,76 \times 10^{-5}$  M DNA +  $0,24 \times 10^{-5}$  M GMB, c)  $4,55 \times 10^{-5}$  M DNA +  $0,45 \times 10^{-5}$  M GMB, d)  $4,16 \times 10^{-5}$  M DNA +  $0,84 \times 10^{-5}$  M GMB, e)  $3,75 \times 10^{-5}$  M DNA +  $1,25 \times 10^{-5}$  M GMB, f)  $2,5 \times 10^{-5}$  M DNA +  $2,5 \times 10^{-5}$  M GMB, g)  $1,25 \times 10^{-5}$  M DNA +  $3,75 \times 10^{-5}$  M GMB, h)  $0,84 \times 10^{-5}$  M DNA +  $4,16 \times 10^{-5}$  M GMB, i)  $0,45 \times 10^{-5}$  M DNA +  $4,55 \times 10^{-5}$  M GMB, j)  $0,24 \times 10^{-5}$  M DNA +  $4,76 \times 10^{-5}$  M GMB, k) 0 M DNA +  $5 \times 10^{-5}$  M GMB. B. Yakınlaştırılmış spektrumlar.

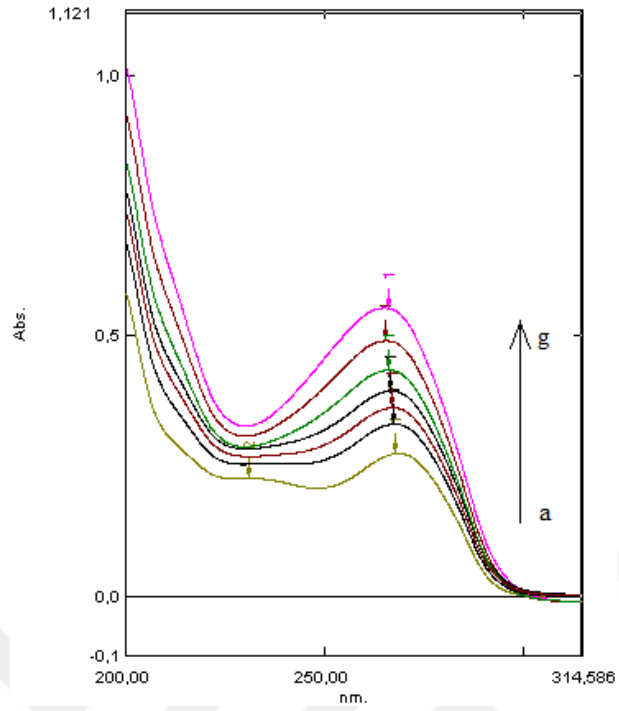


**Şekil 4.5.**  $5 \times 10^{-5}$  M DNA çözeltisi üzerine GMB yerine Şekil 4.4'teki derişimleri oluşturan hacimlerde su eklenmesi ile elde edilen UV spektrumları.

Kan ve mide pH'larında DNA-GMB etkileşmeleri arasında fark olup olmadığını test etmek amacıyla kan pH'ında (pH 7,4) (Şekil 4.6) ve mide pH'ında (pH 4,7) (Şekil 4.7) DNA-GMB etkileşmesi için ayrı ayrı çalışmalar yapılmış ve UV spektrumları her pH için kaydedilmiştir.

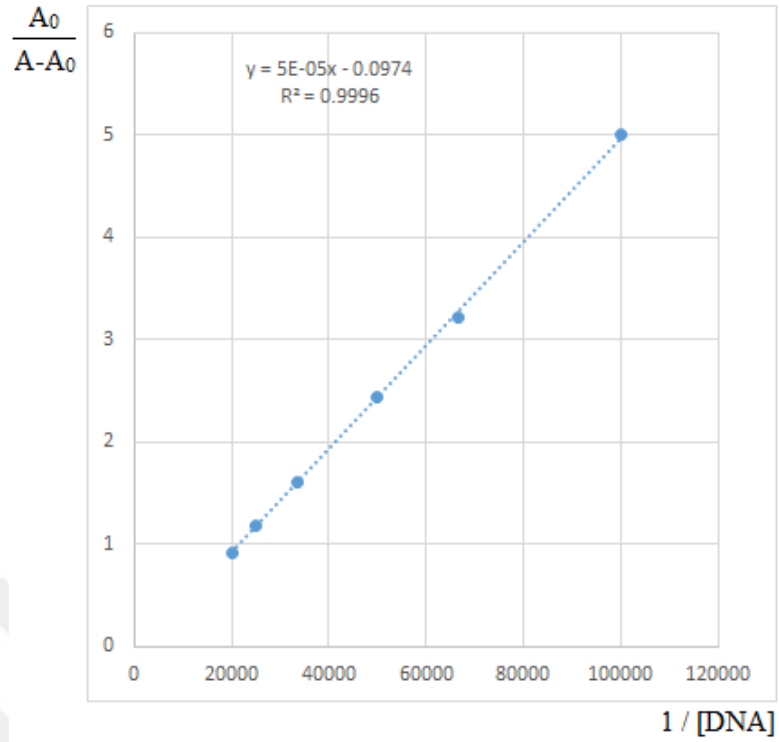


**Şekil 4.6.** pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde  $3 \times 10^{-5}$  M GMB üzerine artan derişimlerde DNA eklenmesi ile elde edilen UV spektrumları. a) 0 M, b)  $10^{-5}$  M, c)  $1,5 \times 10^{-5}$  M, d)  $2 \times 10^{-5}$  M, e)  $3 \times 10^{-5}$  M, f)  $4 \times 10^{-5}$  M, g)  $5 \times 10^{-5}$  M.

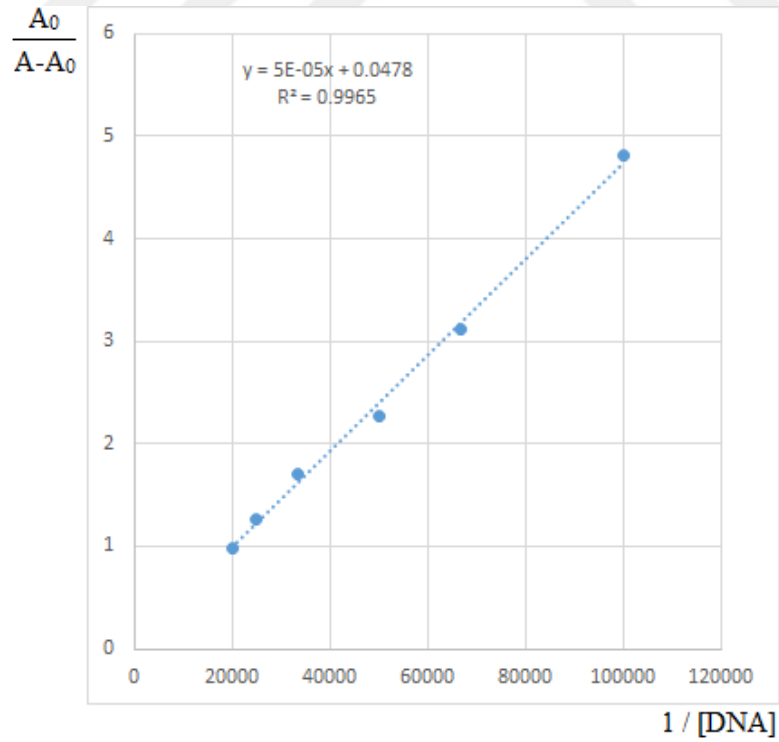


**Şekil 4.7.** pH 4,7 fosfat tampon çözeltisinde  $3 \times 10^{-5}$  M GMB üzerine artan derişimlerde DNA eklenmesi ile elde edilen UV spektrumları. a) 0 M, b)  $10^{-5}$  M, c)  $1,5 \times 10^{-5}$  M, d)  $2 \times 10^{-5}$  M, e)  $3 \times 10^{-5}$  M, f)  $4 \times 10^{-5}$  M, g)  $5 \times 10^{-5}$  M.

pH 7,4 ve pH 4,7 fosfat tampon çözeltilerinden elde edilen UV spektrumlarından yararlanarak, 268 nm'de  $1/[DNA]$ 'ya karşı  $A_0/(A-A_0)$  değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9). Daha sonra Benesi-Hildebrand eşitliği uygulanarak bağlanma sabitleri hesaplanmıştır.



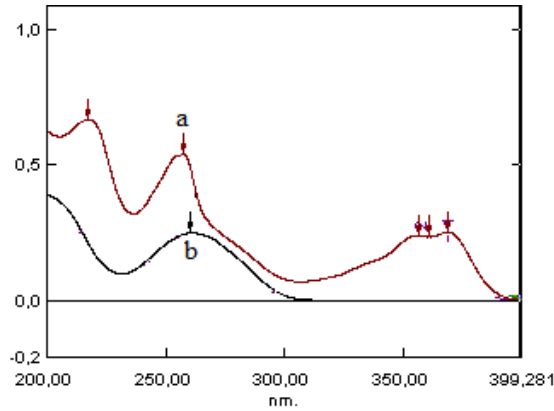
**Şekil 4.8.** pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde DNA-GMB etkileşimi için 268 nm dalga boyunda yapılan ölçüm sonucunda  $1/[DNA]$ 'ya karşı  $A_0/(A-A_0)$  grafiği (n=6).



**Şekil 4.9.** pH 4,7 fosfat tampon çözeltisinde DNA-GMB etkileşimi için 268 nm dalga boyunda yapılan ölçüm sonucunda  $1/[DNA]$ 'ya karşı  $A_0/(A-A_0)$  grafiği (n=6).

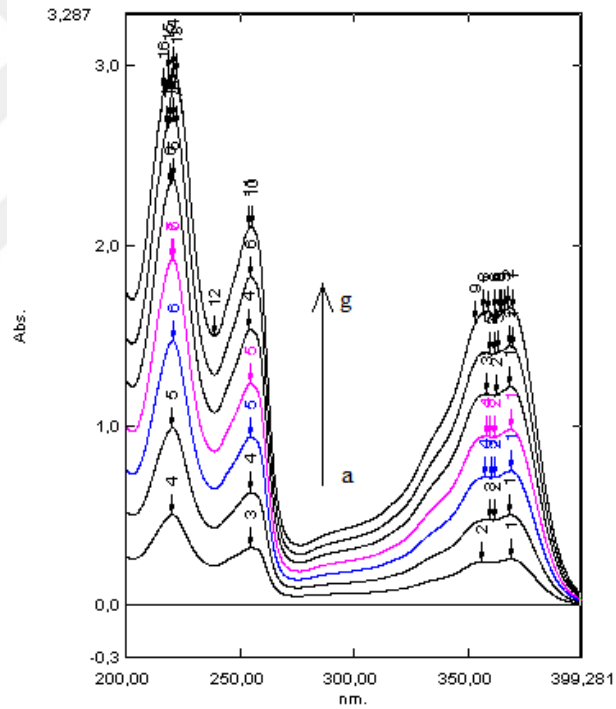
#### 4.2. DNA-İrinotekan HCl Etkileşimi Bulguları

DNA ve İTN çözeltilerinin UV spektrumları Şekil 4.10 ile gösterilmiştir.



Şekil 4.10. a)  $10^{-5}$  M İTN, b)  $3 \times 10^{-5}$  M DNA çözeltilerinin UV spektrumları.

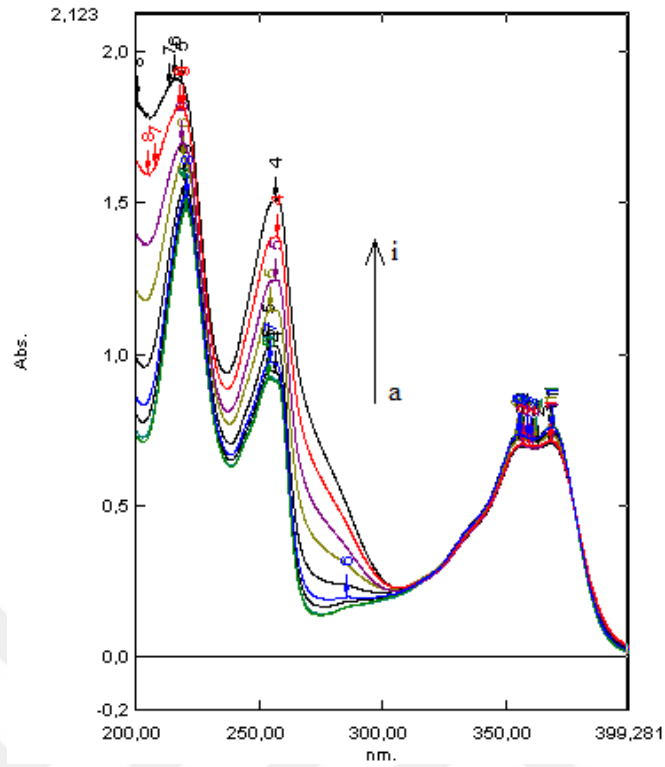
İTN çözeltisinin artan derişimlerdeki UV spektrumları Şekil 4.11 ile gösterilmiştir.



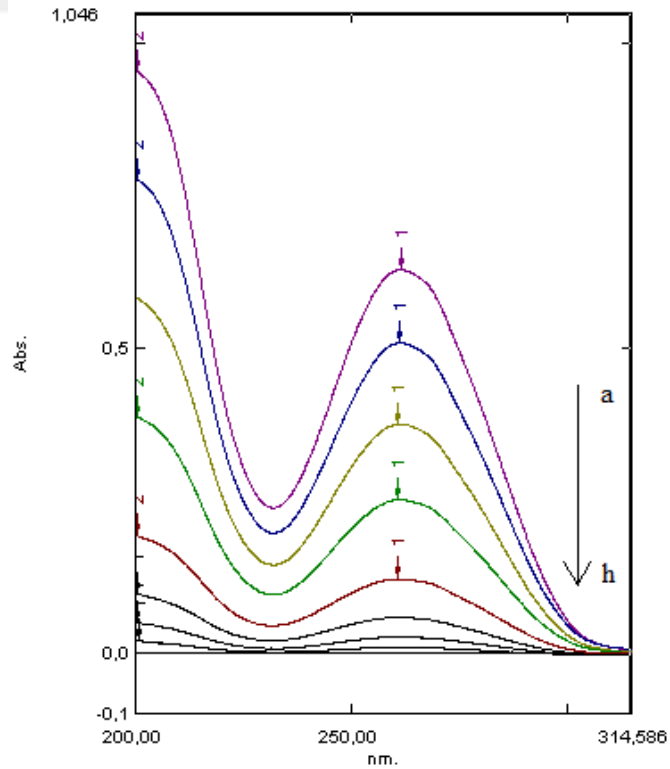
Şekil 4.11. İTN'nin artan derişimlerdeki UV spektrumları. a)  $10^{-5}$  M, b)  $2 \times 10^{-5}$  M, c)  $3 \times 10^{-5}$  M, d)  $4 \times 10^{-5}$  M, e)  $5 \times 10^{-5}$  M, f)  $6 \times 10^{-5}$  M, g)  $7 \times 10^{-5}$  M.

DNA-İTN kompleksinin oluşumunu saptamak amacıyla İTN çözeltisi üzerine artan derişimlerde DNA eklenmesi ile elde edilen UV spektrumları (Şekil 4.12) ve DNA çözeltisi üzerine İTN yerine aynı hacimlerde su eklenmesi ile elde edilen UV spektrumları (Şekil 4.13) karşılaştırılmıştır.



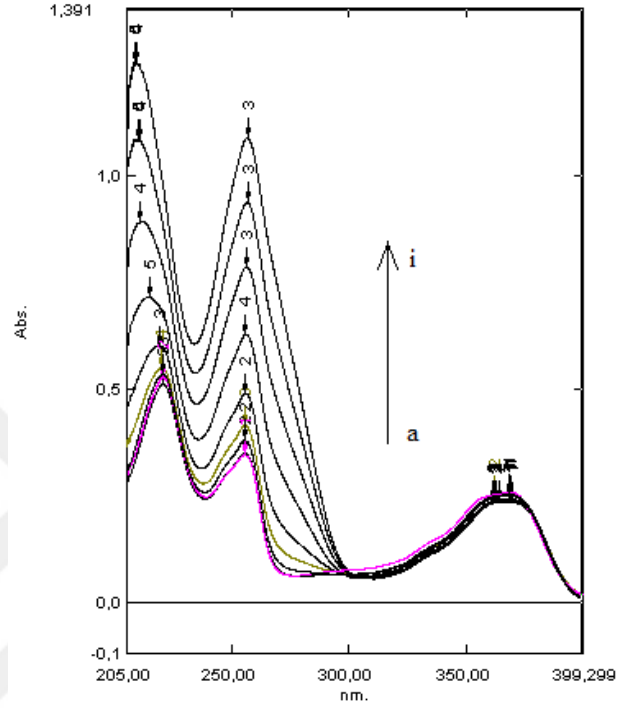


**Şekil 4.12.**  $3 \times 10^{-5}$  M İTN üzerine artan derişimlerde DNA eklenmesi ile elde edilen UV spektrumları. a) 0 M, b)  $2 \times 10^{-6}$  M, c)  $5 \times 10^{-6}$  M, d)  $10^{-5}$  M, e)  $2 \times 10^{-5}$  M, f)  $4 \times 10^{-5}$  M, g)  $6 \times 10^{-5}$  M, h)  $8 \times 10^{-5}$  M, i)  $10^{-4}$  M.

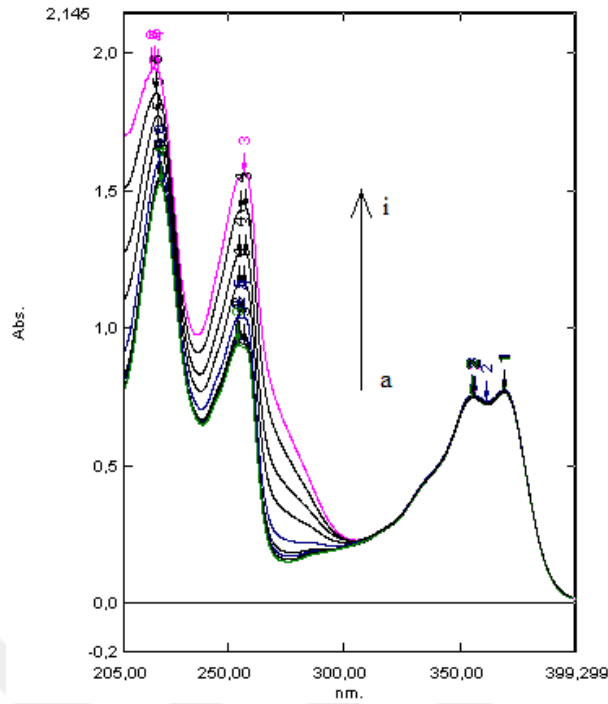


**Şekil 4.13.**  $10^{-4}$  M DNA çözeltisi üzerine İTN yerine Şekil 4.12'deki derişimleri oluşturan hacimlerde su eklenmesi ile elde edilen UV spektrumları.

Kan ve mide pH'larında DNA-İTN etkileşimleri arasında fark olup olmadığını test etmek amacıyla kan pH'ında (pH 7,4) (Şekil 4.14) ve mide pH'ında (pH 4,7) (Şekil 4.15) DNA-İTN etkileşmesi için ayrı ayrı çalışmalar yapılmış ve spektrumları her pH için kaydedilmiştir.

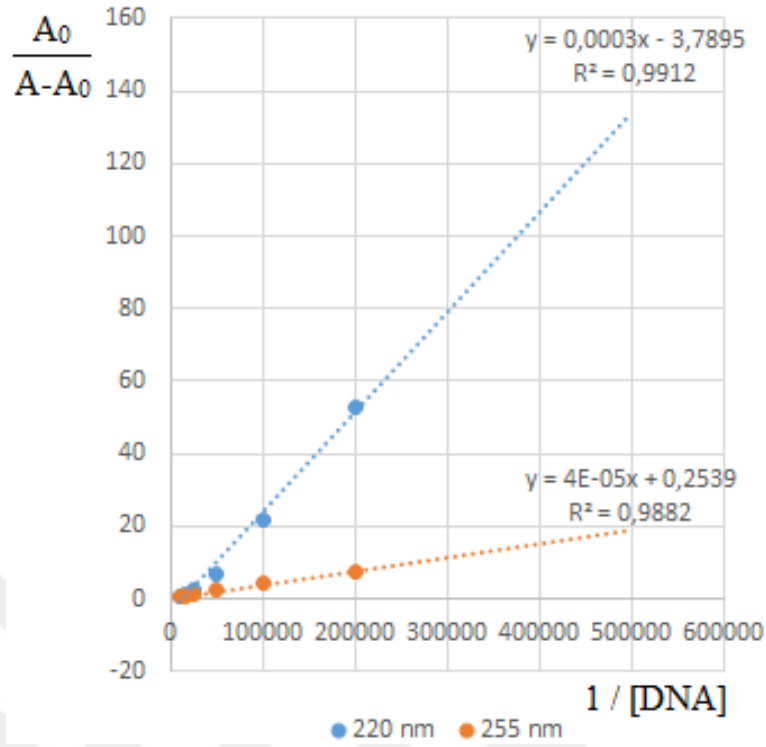


**Şekil 4.14.** pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde  $3 \times 10^{-5}$  M İTN üzerine artan derişimlerde DNA eklenmesi ile elde edilen UV spektrumları. a) 0 M, b)  $2 \times 10^{-6}$  M, c)  $5 \times 10^{-6}$  M, d)  $10^{-5}$  M, e)  $2 \times 10^{-5}$  M, f)  $4 \times 10^{-5}$  M, g)  $6 \times 10^{-5}$  M, h)  $8 \times 10^{-5}$  M, i)  $10^{-4}$  M.

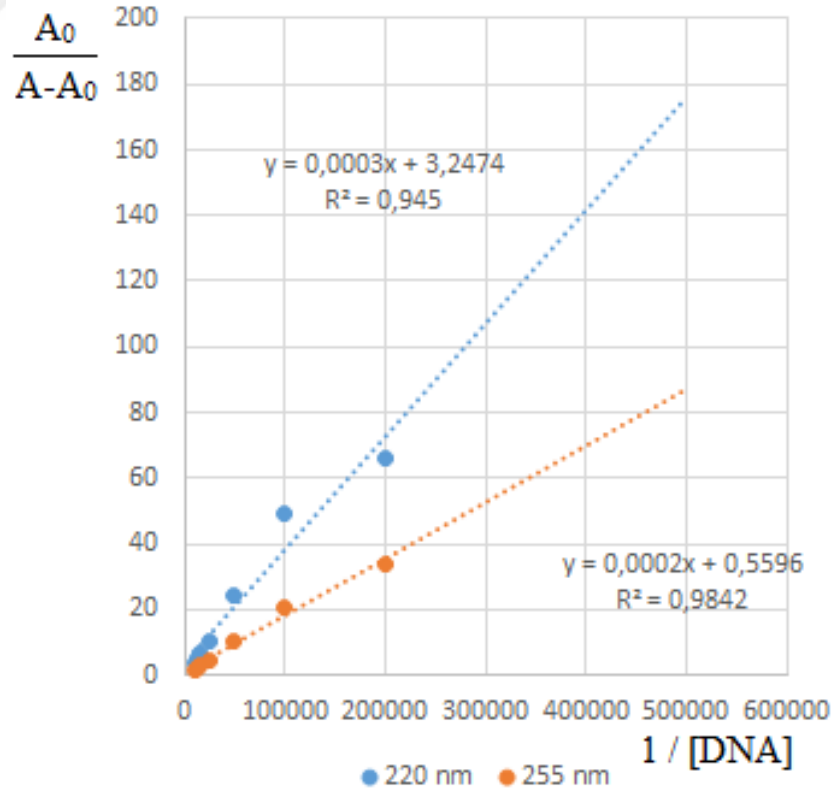


**Şekil 4.15.** pH 4,7 fosfat tampon çözeltisinde  $3 \times 10^{-5}$  M İTN üzerine artan derişimlerde DNA eklenmesi ile elde edilen UV spektrumları. a) 0 M, b)  $2 \times 10^{-6}$  M, c)  $5 \times 10^{-6}$  M, d)  $10^{-5}$  M, e)  $2 \times 10^{-5}$  M, f)  $4 \times 10^{-5}$  M, g)  $6 \times 10^{-5}$  M, h)  $8 \times 10^{-5}$  M, i)  $10^{-4}$  M.

pH 7,4 ve pH 4,7 fosfat tampon çözeltilerinden elde edilen UV spektrumlarından yararlanarak, 220 nm ve 255 nm dalga boylarındaki piklerin  $1/[DNA]$ 'ya karşı  $A_0/(A-A_0)$  değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17). Daha sonra Benesi-Hildebrand eşitliği uygulanarak bağlanma sabitleri hesaplanmıştır.



Şekil 4.16. pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde DNA-İTN etkileşimi için  $1/[DNA]$ 'ya karşı  $A_0/(A-A_0)$  grafiği (n=6).



Şekil 4.17. pH 4,7 fosfat tampon çözeltisinde DNA-İTN etkileşimi için  $1/[DNA]$ 'ya karşı  $A_0/(A-A_0)$  grafiği (n=6).

## 5. TARTIŞMA

Antineoplastik ilaçlardan GMB'nin ve İTN'nin DNA ile etkileşmelerinin kanıtlanması ve etkileşme türlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bu tezde her iki madde için de çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

Öncelikle maddelerin ve DNA'nın spektrumları çizdirilmiştir. DNA 260 ve GMB 268 nm'de birer pik verirken İTN 220, 255, 355 ve 370 nm'de 4 adet pik vermiştir.

DNA'nın ve maddelerin düzenli artan derişimlerde UV spektrumları çizdirilmiştir. Artan derişimle maksimum absorbands yaptıkları dalga boyları genel olarak sabit kalmıştır. Derişimle orantılı olarak absorbandsların arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.11).

DNA-madde kompleksine ait dalga boyu ve absorbands değerlerinin zamana bağlı olarak değişip değişmediğini saptamak amacıyla sulu ortamda maddelerin üzerine artan derişimlerde DNA eklenmiştir. Eklenme anında ve sonrasındaki 2., 4., 6., 8. ve 10. dakikalarda ölçümler yapılarak bulguların değişmediği gözlenmiştir.

GMB-DNA kompleksinin oluşumu için gerekli derişim aralığının saptanması amacıyla Job (devamlı değişmeler) yöntemi uygulanmıştır (96). Bu amaçla toplam hacim sabit tutularak GMB ve DNA'nın birbirine göre derişimleri değiştirilmiş ve her bir durum için UV spektrumları kaydedilmiştir (Şekil 4.4). Karşılaştırma yapabilmek için DNA çözeltisi üzerine GMB yerine aynı hacimlerde su eklenmiştir (Şekil 4.5). Elde edilen spektrumların karşılaştırılması sonucunda, GMB eklenen çözeltiden elde edilen absorbands değerlerinde artış, DNA-su çözeltisinden elde edilen absorbands değerlerinde seyrelmeden dolayı azalma gözlenmiştir (Şekil 4.5). Ayrıca DNA-GMB çözeltisindeki piklerde DNA derişiminin artmasıyla hipsokromik kayma gözlenmiştir. Bu durum DNA ve GMB arasında kompleks oluştuğunu göstermektedir (54, 55).

Kan ve mide pH'larında DNA-GMB etkileşmeleri arasında fark olup olmadığını test etmek amacıyla kan pH'ında (pH 7,4) ve mide pH'ında (pH 4,7) DNA-GMB etkileşmesi için fosfat tamponları kullanılarak ayrı ayrı çalışmalar yapılmış ve spektrumları her pH için kaydedilmiştir. Her iki pH değerinde de kompleks oluşumuna bağlı olarak hiperkromik etki ve 4 nm kadar hipsokromik kayma gözlenmiştir. Hipsokromik kaymanın sebebi; DNA'daki organik bazların, molekülün ortaklanmamış elektron çiftleri ile hidrojen bağları vermesidir (51). İnterkalasyonda

DNA ile molekül arasındaki  $\pi$  bağlarına bağlı olarak 15 nm'den büyük bir kayma gözlenirken oluğa bağlanmada bu miktar 8 nm'den küçüktür (93). Ayrıca oluğa bağlanan moleküllerde, birbirine bağlı ancak kaynaşmamış aromatik halka sistemleri bulunmaktadır (97). Bu da GMB'nin DNA ile oluğa bağlanma yoluyla etkileştiğini göstermektedir. Bu verinin literatür bulgusuna (93) uygun olduğu görülmektedir.

GMB'nin hangi pH değerine sahip ortamda DNA'ya daha güçlü bağlandığını test etmek amacıyla, spektrumlarından yararlanarak, pH 7,4 ve pH 4,7 için 268nm'de  $1/[DNA]$ 'ya karşı  $A_0/(A-A_0)$  değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.8, Şekil 4.9). Daha sonra Benesi-Hildebrand eşitliği uygulanarak bağlanma sabitleri hesaplanmıştır. pH 7,4 tampon çözeltisindeki kompleksin bağlanma sabiti değeri  $1948 M^{-1}$  olarak hesaplanırken, pH 4,7 tampon çözeltisindeki kompleksin bağlanma sabiti değeri  $956 M^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Bu durum kan pH'ında DNA-GMB etkileşmesinin daha güçlü olduğunu göstermektedir.

DNA-İTN kompleksinin oluşumunu saptamak amacıyla sulu ortamda DNA çözeltisi üzerine artan derişimlerde İTN eklenmiştir. Karşılaştırma yapabilmek için DNA çözeltisi üzerine İTN yerine aynı hacimlerde su eklenmiştir (Şekil 4.12 ve Şekil 4.13). Elde edilen spektrumların karşılaştırılması sonucunda, İTN eklenen çözeltiden elde edilen absorbans değerlerinde artış, DNA-su çözeltisinden elde edilen absorbans değerlerinde seyrelmeden dolayı azalma gözlenmiştir (Şekil 4.13). Ayrıca DNA-İTN çözeltisinde DNA derişiminin artmasıyla 220 nm'deki pikte hipsokromik kayma ve 255 nm'deki pikte batokromik kayma gözlenmiştir. Bu durum DNA ve İTN arasında kompleks oluştuğunu göstermektedir.

Kan ve mide pH'larında DNA-İTN etkileşmeleri arasında fark olup olmadığını test etmek amacıyla kan pH'ında (pH 7,4) ve mide pH'ında (pH 4,7) DNA-İTN etkileşmesi için fosfat tamponları kullanılarak ayrı ayrı çalışmalar yapılmış ve spektrumları her pH için kaydedilmiştir. Her iki pH değerinde de kompleks oluşumuna bağlı olarak 220 nm ve 255 nm'deki piklerde hiperkromik etki gözlenmiştir. İTN'de  $\pi-\pi^*$  ve  $n-\pi^*$  olmak üzere iki tür elektronik geçiş bulunmaktadır. İTN spektrumundaki geniş absorpsiyon bantları da ligand içi  $\pi-\pi^*$  geçişlerinden kaynaklanmaktadır. Ortama DNA eklendiğinde, interkalasyonla DNA'ya bağlanan maddelerin yapısal olarak sıkışması sonucunda  $\pi-\pi^*$  geçiş bölgesinde DNA-İTN kompleks oluşumuna bağlı olarak hiperkromik etki oluşmaktadır (95). pH 7,4 tampon çözeltisinde 220 nm'deki

pikte 16 nm hipsokromik kayma, 255 nm'deki pikte 2 nm batokromik kayma ve pH 4,7 tampon çözeltisinde 220 nm'deki pikte 2 nm hipsokromik kayma, 255 nm'deki pikte 3 nm batokromik kayma gözlenmiştir. Bu da İTN'nin DNA ile interkalasyon yoluyla etkileştiğini göstermektedir. Bu verinin literatür bulgusuna (95) uygun olduğu görülmektedir.

İTN'nin hangi pH değerine sahip ortamda DNA'ya daha güçlü bağlandığını test etmek amacıyla; spektrumlardan yararlanarak pH 7,4 ve pH 4,7 için 220 nm ve 255 nm dalga boylarındaki piklerin  $1/[DNA]$ 'ya karşı  $A_0/(A-A_0)$  değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17). Daha sonra Benesi-Hildebrand eşitliği uygulanarak bağlanma sabitleri hesaplanmıştır. 220 nm'deki pike göre pH 7,4 tampon çözeltisindeki kompleksin bağlanma sabiti değeri  $12632 M^{-1}$  olarak hesaplanırken, pH 4,7 tampon çözeltisindeki kompleksin bağlanma sabiti değeri  $10825 M^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. 255 nm'deki pike göre pH 7,4 tampon çözeltisindeki kompleksin bağlanma sabiti değeri  $6348 M^{-1}$  olarak hesaplanırken, pH 4,7 tampon çözeltisindeki kompleksin bağlanma sabiti değeri  $2798 M^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Bu durum kan pH'ında DNA-İTN etkileşmesinin daha güçlü olduğunu göstermektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında; antineoplastik ilaçlardan GMB ve İTN'nin DNA ile etkileşmelerinin UV spektrofotometrik yöntemle incelenmesi ve etkileşme mekanizmalarının aydınlatılması için çalışmalar yapılmıştır. Çalışmalar hem sulu ortamda, hem de iki farklı pH (pH 7,4 ve pH 4,7) için tampon çözelti ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışılan moleküllerin DNA ile etkileşmesinin zamana bağlı olmadığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; GMB'nin DNA ile etkileşmesinin oluğa bağlanma, İTN'nin DNA ile etkileşmesinin ise interkalasyon yoluyla gerçekleştiği görülmüştür. DNA-GMB kompleksi için pH 7,4 tampon çözeltisindeki bağlanma sabiti değeri  $1948 \text{ M}^{-1}$  olarak hesaplanırken, pH 4,7 tampon çözeltisindeki bağlanma sabiti değeri  $956 \text{ M}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. DNA-İTN kompleksi için; 220 nm'de pH 7,4 tampon çözeltisindeki kompleksin bağlanma sabiti değeri  $12632 \text{ M}^{-1}$ , pH 4,7 tampon çözeltisindeki kompleksin bağlanma sabiti değeri  $10825 \text{ M}^{-1}$  olarak hesaplanırken, 255 nm'de pH 7,4 tampon çözeltisindeki kompleksin bağlanma sabiti değeri  $6348 \text{ M}^{-1}$ , pH 4,7 tampon çözeltisindeki kompleksin bağlanma sabiti değeri  $2798 \text{ M}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Bu verilerin ışığında bağlanma sabitinin kan pH'ında daha yüksek olduğu anlaşılmıştır.

Tezden elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucunda DNA-ilaç etkileşmeleri ile ilgili çalışmalarda UV spektrofotometrik yöntemden faydalanılabileceği görülmüştür.



## KAYNAKLAR

1. Brett AMO, Diculescu V, Piedade JAP. Electrochemical oxidation mechanism of Guanine and Adenine using a glassy carbon microelectrode. *Bioelectrochem.* 2002;55:61-62.
2. Dursun Ö. An application of information theory for DNA structure [Yüksek lisans tezi]. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi; 2009.
3. Ng HZ, Ng M, Eng CM, Gao Z. Deoxyribonucleic acid glycosylase assays: Progress and prospects. *Trends in Analytical Chemistry.* 2016;83:102-115.
4. Swift L, Golsteyn R. Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences.* 2014;15:3403-3431.
5. Kamal S, Ripon S, Dey N, Ashour A, Santhi V. A map reduce approach to diminish imbalance parameters for big deoxyribonucleic acid dataset. *Computer Methods and Programs in Biomedicine.* 2016;131:191-206.
6. Zhu K, Hu X, Ge Q, Sun Q. Fluorescent recognition of deoxyribonucleic acids by a quantum dot / meso-tetrakis (N-methylpyridinium-4-yl) porphyrin complex based on a photo induced electron-transfer mechanism. *Analytica Chimica Acta.* 2014;812:199-205.
7. Chelton E, Jones A, Walker R. The chemical composition of the nucleic acids and the proteins of some mycoplasma strains. *J. Gen. Microbiol.* 1968;50:305-312.
8. Suggitt M, Bibby C. 50 years of preclinical anticancer drug screening: Empirical to target-driven approaches. *Clinical Cancer Research.* 2005;11:971-981.
9. Lerman L. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *J. Mol. Biol.* 1961;3:18-30.
10. Kamanetskii M, Prakash S. Fluctuations in the DNA double helix: A critical review. *Physics of Life Reviews.* 2014;11:153-170.
11. Perez S, Cabrera E, Amoedo H, Acebes S, Koundrioukoff S, Debatisse M, ve ark. USP37 deubiquitinates CdTI and contributes to regulate DNA replication. *Molecular Oncology.* 2016;10:1196-1206.
12. Kuetche V. An initio bubble-driven denaturation of double-stranded DNA: Selfmechanical theory. *Journal of Theoretical Biology.* 2016;401:15-29.
13. Turan A. İlaç-DNA etkileşimi ve DNA analizleri için elektrokimyasal sensörlerin geliştirilmesi [Yüksek lisans tezi]. İzmir: Ege Üniversitesi; 2009.
14. Can G. Side effects of antineoplastic drugs and nursing approaches. *Hemşirelikte Eğitim ve Araştırma Dergisi.* 2005;2(2):8-15.

15. Apetoh L, Tesniere A, Ghiringhelli F, Kroemer G, Zitvogel L. A molecular interactions between dying tumor cells and the innate immune system determine the efficacy of conventional anticancer therapies. *Cancer Research*. 2008;68(11):4026-4030.
16. Kapçak E. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) yöntemi ile kanser tedavisinde kullanılan ilaçların miktar tayini ve ilaç-DNA etkileşimlerinin belirlenmesi [Doktora tezi]. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2017.
17. Rauf S, Gooding JJ, Akhtar K, Ghauri MA, Rahman M, Anwar MA, ve ark. Electrochemical approach of anticancer drugs-DNA interaction. *J. Pharma. Biomed. Anal.* 2005;37:205-217.
18. Snyder RD, Hendry LB. Toward a greater appreciation of noncovalent chemical/DNA interactions: Application of biological and computational approaches. *Environ. Mol. Mutagen.* 2005;45:100-105.
19. Silvestri C, Brodbelt JS. Tandem mass spectrometry for characterization of covalent adducts of DNA with anticancer therapeutics. *Mass Spectrom.* 2012;2:1-20.
20. Liu HK, Sadler PJ. Metal complexes as DNA intercalators. *Acc. Chem. Res.* 2011;44:349-359.
21. Hadjiliadis N, Sletten E. Metal complex-DNA interactions. Oxford, England: Blackwell Publishing Ltd; 2009.
22. Rajska SR, Williams RM. DNA cross-linking agents as antitumor drugs. *Chem.* 1998;98:2723-2796.
23. Kondo N, Takahashi A, Ono K, Ohnishi T. DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. *J. Nucleic Acids.* 2010;19:1-7.
24. Park HJ, Hurley LH. Covalent modification of N3 of guanine by (+)-CC-1065 results in protonation of the cross-strand cytosine. *J. Am. Chem. Soc.* 1997;119:629-630.
25. Ni Y, Lin D, Kokot S. Synchronous fluorescence, UV-visible spectrophotometric, and voltammetric studies of the competitive interaction of bis(1,10-phenanthroline)copper(II) complex and neutral red with DNA. *Anal. Biochem.* 2006;352:231-242.
26. Lerman LS. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *J. Mol. Biol.* 1961;3:18-30.
27. Martínez R, García LC. The search of DNA-intercalators as antitumoral drugs: What it worked and what did not work. *Curr. Med. Chem.* 2005;12:127-151.
28. Shui X, Peek ME, Lipscomb LA, Gao Q, Ogata C, Roques BP, ve ark. Effects of cationic charge on three-dimensional structures of intercalative complexes structure of a bisintercalated DNA complex solved by MAD phasing. *Curr. Med. Chem.* 2000;7:59-71.
29. Waring MJ, Bailly C. The purine 2-amino group as a critical recognition element for binding of small molecules to DNA. *Gene.* 1994;149:69-79.

30. Rehn C, Pindur U. Molecular modeling of intercalation complexes of antitumor active 9-aminoacridine and a [d,e]-annelated isoquinoline derivative with base paired deoxytetranucleotides. *Monatsh. Chem.* 1996;127:645–658.
31. Baginski M, Fogolari F, Briggs JM. Electrostatic and non-electrostatic contributions to the binding free energies of anthracycline antibiotics to DNA. *J. Mol. Biol.* 1997;274:253.
32. Bauer W, Vinograd J. The interaction of closed circular DNA with intercalative dyes: III. Dependence of the buoyant density upon superhelix density and base composition. *J. Mol. Biol.* 1970;54:281–298.
33. Neidle S, Abraham Z. Structural and sequence-dependent aspects of drug intercalation into nucleic acid. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 1984;171:73–121.
34. Keck MV, Lippard SJ. Unwinding of supercoiled DNA by platinum–ethidium and related complexes. *J. Am. Chem. Soc.* 1992;114:3386–3390.
35. Moucheron C, Mesmaeker AKD. New DNA-binding ruthenium(II) complexes as photo-reagents for mononucleotides and DNA. *J. Phys. Org. Chem.* 1998;11:577–583.
36. Haq I, Lincoln P, Suh D, Norden B, Chowdhry B, Chaires J. Interaction of DELTA- and LAMBDA-[Ru(phen)<sub>2</sub>DPPZ]<sup>2+</sup> with DNA: A calorimetric and equilibrium binding study. *J. Am. Chem. Soc.* 1995;117:4788–4796.
37. Lincoln P, Norden B. DNA binding geometries of ruthenium(II) complexes with 1,10-phenanthroline and 2,20-bipyridine ligands studied with linear dichroism spectroscopy. Borderline cases of intercalation. *J. Phys. Chem.* 1998;102:9583–9594.
38. Ambrosek D, Loos PF, Assfeld X, Daniel C. A theoretical study of Ru(II) polypyridyl DNA intercalators: Structure and electronic absorption spectroscopy of [Ru(phen)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2+</sup> and [Ru(tap)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2+</sup> complexes intercalated in guanine–cytosine base pairs. *J. Inorg. Biochem.* 2010;104:893–901.
39. Tiwari AD, Mishra AK, Mishra SB, Mamba BB, Maji B, Bhattacharya S. Synthesis and DNA binding studies of Ni(II), Co(II), Cu(II) and Zn(II) metal complexes of N1,N5-bis[pyridine-2-methylene]-thiocarbohydrazone Schiffbase ligand. *Spectrochim. Acta.* 2011;79(5):1050–1056.
40. Bulnes LG, Gallego J. Indirect effects modulating the interaction between DNA and a cytotoxic bisnaphthalimide reveal a two-step binding process. *J. Am. Chem. Soc.* 2009;131:7781–7791.
41. Yeh HJC, Sayer JM, Liu X, Altieri AS, Byrd RA, Lakshman MK, et al. NMR solution structure of a nonanucleotide duplex with a dG mismatch opposite a 10S adduct derived from trans addition of a deoxyadenosine N6-amino group to (+)-(7R,8S,9S,10R)-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene: An unusual syn glycosidic torsion angle at the modified dA. *Biochemistry.* 1995;34:13570–13581.
42. Paul A, Bhattacharya S. Chemistry and biology of DNA-binding small molecules. *Curr. Sci.* 2012;102(2):212–231.

43. Todd AK, Adams A, Thorpe HJ, Denny WA, Wakelin LPG, Cardin CJ. Major groove binding and a "DNA-induced" fit in the intercalation of a derivative of the mixed topoisomerase I/II inhibitor DACA into DNA; X-ray structure complexed to d(CG(5BrU)ACG)<sub>2</sub> at 1,3 Å resolution. *J. Med. Chem.* 1999;42:536–540.
44. Janovec L, Kozurkova M, Sabolova D, Ungvarsky J, Paulikova H, Plsikova J, ve ark. Cytotoxic 3,6-bis((imidazolidinone)imino)acridines: Synthesis, DNA binding and molecular modeling. *Bioorg. Med. Chem.* 2011;19:1790–1801.
45. Mei HY, Barton JK. Chiral probe for A-form helices of DNA and RNA tris(tetramethylphenanthroline)ruthenium(II). *J. Am. Chem. Soc.* 1986;108:7414–7416.
46. Kopka ML, Yoon C, Goodsell DS, Pjura P, Dickerson RE. Binding of an antitumor drug to DNA: Netropsin and C-G-C-G-A-A-T-T-BrC-G-C-G. *J. Mol. Biol.* 1985;183:553–563.
47. Haq I, Ladbury J. Drug–DNA recognition: Energetics and implications for design. *J. Mol. Recognit.* 2000;13:188–197.
48. Kelly JM, Tossi AB, McConnell DJ, Uigin CO. A study of the interactions of some polypyridylruthenium(II) complexes with DNA using fluorescence spectroscopy, topoisomerisation and thermal denaturation. *Nucl. Acids Res.* 1985;13:6017–6034.
49. Sirajuddin M, Ali S, Badshah A. Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 2013;124:1-19.
50. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. *Analitik Kimya Temel İlkeler.* 8. Baskı. Ankara: Bilim Yayıncılık; 2004.
51. Özden S, Ertan R, Şener EA, Yalçın İ, Nebioğlu D, Büyükbingöl E, ve ark. *Farmasötik Kimya Pratikleri.* Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi; 2004.
52. Gonzalez-Ruiz V, Olives AI, Martin MA, Ribelles P, Ramos MT, Menendez JC. An overview of analytical techniques employed to evidence drug–DNA interactions. Applications to the design of genosensors. Komorowska MA, Olszynska-Janus. *Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies.* London, England: In Tech; 2011.
53. Benesi HA, Hildebrand JH. Spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* 1949;71(8):2703–2707.
54. Liu J, Zhang T, Lu T, Qu L, Zhou H, Zhang Q, ve ark. DNA-binding and cleavage studies of macrocyclic copper(II) complexes. *J. Inorg. Biochem.* 2002;91:269–276.

55. Sirajuddin M, Ali S, Haider A, Shah NA, Shah A, Khan MR. Synthesis, characterization, biological screenings and interaction with calf thymus DNA as well as electrochemical studies of adducts formed by azomethine [2-((3,5-dimethylphenylimino)methyl)phenol] and organotin(IV) chlorides. *Polyhedron*. 2012;40(1):19–31.
56. Sirajuddin M, Ali S, Shah NA, Khan MR, Tahir MN. Synthesis, characterization, biological screenings and interaction with calf thymus DNA of a novel azomethine 3-((3,5-dimethylphenylimino)methyl)benzene-1,2-diol. *Spectrochim. Acta*. 2012;94:134–142.
57. Arjmand F, Jamsheera A. DNA binding studies of new valine derived chiral complexes of tin(IV) and zirconium(IV). *Spectrochim. Acta*. 2011;78:45–51.
58. Pratviel G, Bernadou J, Meunier B. DNA and RNA cleavage by metal complexes. *Adv. Inorg. Chem*. 1998;45:251.
59. Shahabadi N, Kashanian S, Khosravi M, Mahdavi M. Multispectroscopic DNA interaction studies of a water-soluble nickel(II) complex containing different dinitrogen aromatic ligands. *Tran. Met. Chem*. 2010;35:699–705.
60. Jaumot J, Gargallo R. Experimental methods for studying the interactions between G-quadruplex structures and ligands. *Curr. Pharmaceut. Des*. 2012;18(14):1900–1916.
61. Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd ed. New York, USA: Springer; 2006.
62. Suh D, Chaires JB. Criteria for the mode of binding of DNA binding agents. *Biorg. Med. Chem*. 1995;3(6):723–728.
63. Li WY, Xu JG, Guo XQ, Zhu QZ, Zhao YB. Study on the interaction between rivanol and DNA and its application to DNA assay. *Spectrochim. Acta*. 1997;53(5):781–787.
64. Li N, Ma Y, Guo L, Yang X. Interaction of anticancer drug mitoxantrone with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods. *Biophys. Chem*. 2005;116:199–205.
65. Wu HL, Li K, Sun T, Kou F, Jia F, Yuan JK, et al. Synthesis, structure, and DNA-binding properties of manganese(II) and zinc(II) complexes with tris (N-methylbenzimidazol-2-ylmethyl) amine ligand. *Tran. Met. Chem*. 2011;36:21–28.
66. Wu H, Jia F, Kou F, Liu B, Yuan J, Bai Y. A Schiff base ligand N-(2-hydroxyacetophenone)-3-oxapentane-1,5-diamine and its nickel(II) complex: Synthesis, crystal structure, antioxidation, and DNA-binding properties. *Tran. Met. Chem*. 2011;36:847–853.
67. Carter MT, Bard AJ. Voltammetric studies of the interaction of tris(1,10-phenanthroline)cobalt(III) with DNA. *J. Am. Chem. Soc*. 1987;109:7528–7530.
68. Feng Q, Li NQ, Jiang YY. Electrochemical studies of porphyrin interacting with DNA and determination of DNA. *Anal. Chim. Acta*. 1997;344:97–104.

69. Li YT, Sun W, Wu ZY, Zheng YJ, Yan CW. Synthesis, structure and voltammetric studies of copper(II) polymer with DNA interaction: The first 1-D coordination polymer alternately bridged by oxalate and oxamidate ligands. *J. Inorg. Organomet. Polym.* 2010;20:586–591.
70. Aslanoglu M, Öge N. Voltammetric, UV absorption and viscometric studies of the interaction of norepinephrine with DNA. *Turk. J. Chem.* 2005;29:477–485.
71. Aslanoglu M, Ayne G. Voltammetric studies of the interaction of quinacrine with DNA. *Anal. Bioanal. Chem.* 2004;380:658–663.
72. Chu X, Shen GL, Jiang JH, Kang TF, Xiong B, Yu RQ. Voltammetric studies of the interaction of daunomycin anticancer drug with DNA and analytical applications. *Anal. Chim. Acta.* 1998;373:29.
73. Johnston DH, Thorp HH. Cyclic voltammetry studies of polynucleotide binding and oxidation by metal complexes: Homogeneous electron-transfer kinetics. *J. Phys. Chem.* 1996;100(32),13829.
74. Üstünses, L. RxMediaPharma İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı [Internet]. 2019 [20.12.2019].
75. Doyle TH, Mornex F, McKenna WG. The clinical implications of Gemcitabine radiosensitization. *Clinical Cancer Research.* 2001;7:226-228.
76. Pauwels B, Korst AEC, Pattyn G, Lambrechts H, Kamphuis JAE, De Pooter C ve ark. The relation between deoxycytidine kinase activity and the radiosensitising effect of gemcitabine in eight different human tumour cell lines. *BMC Cancer.* 2006;6:142.
77. Ostruszka LJ, Shewach DS. The role of cell cycle progression in radiosensitization by 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* 2000;60(21):6080-6088.
78. Sweetman SC, Blake, PS. Martindale: The Complete Drug Reference. 36th ed. Grayslake, USA: Pharmaceutical Press; 2009.
79. Gemcitabine hydrochloride (Compound) [Internet]. 2019 [20.12.2019]. Erişim adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gemcitabine-hydrochloride>.
80. Johnson,SA. Clinical pharmacokinetics of nucleoside analogues: Focus on haematological malignancies. *Clin.Pharmacokinet.* 2000;39:5-26.
81. Gemcitabine Hidroklorür. Analiz Sertifikası. Lilly; 2008.
82. Bleiberg H. CPT-11 in gastrointestinal cancer. *Eur J Cancer.* 1999;35:371-379.
83. Blanke CD, Haller DG, Benson AB. A phase II study of irinotecan with 5-fluorouracil and leucovorin in patients with previously untreated gastric adenocarcinoma. *Ann Oncol.* 2001;12:1575-1580.
84. Irinotecan hydrochloride [Internet]. 2019 [20.12.2019]. Erişim adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/74990>.
85. Liu LF, Desai SD, Li TK, Mao Y, Sun M, Sim SP. Mechanism of action of camptothecin. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;922:1-10.

86. Ban N, Takahashi Y, Takayama T, Kura T, Katahira T, Sakamaki S, ve ark. Transfection of glutathione S-transferase (GST)-pi antisense complementary DNA increases the sensitivity of a colon cancer cell line to adriamycin, cisplatin, melphalan, and etoposide. *Cancer Res.* 1996;56:3577-3582.
87. Crea F, Nobili S, Paolicchi E, Perrone G, Napoli C, Landini I, ve ark. Epigenetics and chemoresistance in colorectal cancer: An opportunity for treatment tailoring and novel therapeutic strategies. Elsevier. 2011;14:280-296.
88. Winder T, Lenz HJ. Molecular predictive and prognostic markers in colon cancer. *Cancer Treat Rev.* 2010;36(7):550-556.
89. Li N, Ma Y, Yang C, Guo L, Yang X. Interaction of anticancer drug mitoxantrone with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods. *Biophysical Chemistry.* 2005;116:199-205.
90. Wei C, Wang J, Zhang M. Spectroscopic study on the binding of porphyrins to (G<sub>4</sub>T<sub>4</sub>G<sub>4</sub>)<sub>4</sub> parallel G-quadruplex. *Biophysical Chemistry.* 2010;148:51-55.
91. Shah A, Zaheer M, Qureshi R, Akhter Z, Nazar MF. Voltammetric and spectroscopic investigations of 4-nitrophenylferrocene interacting with DNA. *Spectrochimica Acta.* 2010;75:1082-1087.
92. Bhadra K, Kumar GS. Interaction of berberine, palmatine, coralyne, and sanguinarine to quadruplex DNA: A comparative spectroscopic and calorimetric study. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2011;1810:485-496.
93. Kalanur SS, Katrahalli U, Seetharamappa J. Electrochemical studies and spectroscopic investigations on the interaction of an anticancer drug with DNA and their analytical applications. *Journal of Electroanalytical Chemistry.* 2009;636:93-100.
94. Tamyürek E. İrinotekan'ın magnetik nanopartikül üzerine immobilize edilmiş serum proteinlerine bağlanmasının incelenmesi [Yüksek lisans tezi]. Konya: Selçuk Üniversitesi; 2015.
95. Temerk Y, Ibrahim M, Ibrahim H, Schuhman W. Comparative studies on the interaction of anticancer drug irinotecan with dsDNA and ssDNA. *RSC Adv.* 2018;8:25387.
96. Gündüz, T. *İnstrümental Analiz.* 10. Baskı. Ankara: Gazi Kitabevi; 2007.
97. Dey S, Sarkar S, Paul H, Zangrando E, Chattopadhyay, P. Copper(II) complex with tridentate N donor ligand: Synthesis, crystal structure, reactivity and DNA binding study. *Polyhedron.* 2010;29(6):1583-1587.



## Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Levent Atmaca  
Ödev başlığı: Levent Tez  
Gönderi Başlığı: ANTİNEOPLASTİK İLAÇLARIN DNA..  
Dosya adı: Levent\_Tez2.docx  
Dosya boyutu: 3.28M  
Sayfa sayısı: 60  
Kelime sayısı: 10,762  
Karakter sayısı: 73,930  
Gönderim Tarihi: 06-Şub-2020 04:27PM (UTC+0300)  
Gönderim Numarası: 1252524534

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTİNEOPLASTİK İLAÇLARIN DNA İLE  
ETKİLEŞMELERİNİN UV-GÖRÜNÜR BÖLGE  
SPEKTROSKOPİSİ İLE İNCELENMESİ

Ecz. Levent ATMACA

Analitik Kimya Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Nuran ÖZALPIN

ANKARA  
2020



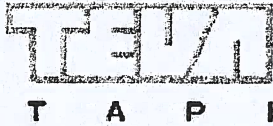
# ANTİNEOPLASTİK İLAÇLARIN DNA İLE ETKİLEŞMELERİNİN UV-GÖRÜNÜR BÖLGE SPEKTROSKOPİSİ İLE İNCELENMESİ

## ORIJINALLIK RAPORU

|                   |                        |            |                  |
|-------------------|------------------------|------------|------------------|
| % <b>17</b>       | % <b>9</b>             | % <b>1</b> | % <b>10</b>      |
| BENZERLİK ENDEKSİ | İNTERNET<br>KAYNAKLARI | YAYINLAR   | ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |

## BİRİNCİL KAYNAKLAR

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| <b>1</b> | <b>Submitted to Savitribai Phule Pune University</b>  | % <b>2</b> |
|          | Öğrenci Ödevi   |            |
| <b>2</b> | <b>es.scribd.com</b>                                  | % <b>2</b> |
|          | İnternet Kaynağı                                      |            |
| <b>3</b> | <b>Submitted to Canakkale Onsekiz Mart University</b> | % <b>1</b> |
|          | Öğrenci Ödevi   |            |
| <b>4</b> | <b>Submitted to Selçuk Üniversitesi</b>               | % <b>1</b> |
|          | Öğrenci Ödevi   |            |
| <b>5</b> | <b>Submitted to Anadolu University</b>                | % <b>1</b> |
|          | Öğrenci Ödevi   |            |
| <b>6</b> | <b>acikerisim.pau.edu.tr:8080</b>                     | % <b>1</b> |
|          | İnternet Kaynağı                                      |            |
| <b>7</b> | <b>www.scribd.com</b>                                 | % <b>1</b> |
|          | İnternet Kaynağı                                      |            |
| <b>8</b> | <b>docplayer.biz.tr</b>                               | % <b>1</b> |
|          | İnternet Kaynağı                                      |            |



**PRODUCT  
SPECIFICATIONS  
AND  
CERTIFICATE OF ANALYSIS**

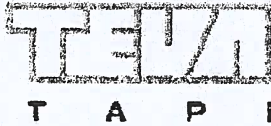
Page 1 of 4

**Product Name:** GEMCITABINE HYDROCHLORIDE  
**Control No.:** 896602217      **Order No.:** 6U80029001  
**Customer Name:** MUSTAFA NEVZAT ILAC SANAYI A.S.      **Client Packing Order:** 5000011215  
**Quantity:** 7875.000 GR      **Quality Market:** EUR  
**Manufacturing Site:** PLANTEX LTD. - NETANYA      **Original Analysis Date:** 27-June-2018  
**Manufacturing Date:** June 2017      **Re Test date:** June 2022  
**Packaging and storage:** Store at Up to 25°C. Do not freeze.  
Keep in a tight container.

| TESTS AND METHODS  | SPECIFICATIONS   | RESULTS*       |
|--|--|----------------|
| <b>Ph.Eur. TESTS</b>   |  |                |
| <b>Characters</b>  | white or almost white powder.  | Conforms       |
| <b>Identification by FTIR</b><br>(2.2.24)<br>A. Infrared absorption (2.2.24) | The absorption maxima in the spectrum obtained with the substance to be examined correspond in position and relative intensity to those in the spectrum obtained with gemcitabine hydrochloride CRS. | Conforms       |
| <b>Identification by Chlorides</b><br>(2.3.1.)                               | It gives reaction (a) of chlorides   | Conforms       |
| <b>Appearance of solution</b><br>(2.2.1)<br>Clarity                          | Solution S is clear. (2.2.1)   | Conforms       |
| <b>Appearance of solution</b><br>(2.2.2, Method II)<br>Colour                | The solution is not more intensely coloured than reference solution BY7  | Less than BY~7 |
| <b>pH</b><br>(2.2.3)   | 2.0 to 3.0   | 2.6            |
| <b>Specific optical rotation</b><br>(2.2.7)                                  | $[\alpha]_D^{20}$ Between (+43.0°) and (+50.0°)  | +45.6°         |

Plantex Ltd  
5 Basel Street, P.O.Box 3190 Petach-Tikva 4951033, Israel

Manufacturing site : 1 Hakadar St., Industrial Zone, PO. Box 160 Netanya 4210101, Israel      TEL. 972-9-8604333  
FAX. 972-9-8339063



**PRODUCT  
SPECIFICATIONS  
AND  
CERTIFICATE OF ANALYSIS**

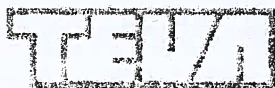
Page 2 of 4

**Product Name:** GEMCITABINE HYDROCHLORIDE  
**Control No.:** 896602217 **Order No.:** 6U80029001  
**Client Packing Order:** 5000011215  
**Customer Name:** MUSTAFA NEVZAT ILAC SANAYI A.S.  
**Quantity:** 7875.000 GR **Quality Market:** EUR  
**Manufacturing Site:** PLANTEX LTD. - NETANYA **Original Analysis Date:** 27-June-2018  
**Manufacturing Date:** June 2017 **Re Test date:** June 2022  
**Packaging and storage:** Store at Up to 25°C. Do not freeze.  
 Keep in a tight container.

| TESTS AND METHODS                       | SPECIFICATIONS   | RESULTS*            |
|---|--|---------------------|
| <b>Ph.Eur. TESTS</b>                    |  |                     |
| <b>Heavy metals</b><br>(2.4.8)          | Maximum 10 ppm   | Less than 10ppm     |
| <b>Sulphated ash</b><br>(2.4.14)        | Maximum 0.10%  | Less than 0.05%     |
| <b>Bacterial endotoxins</b><br>(2.6.14) | Less than 0.05 IU/mg   | Less than 0.01IU/mg |
| <b>Related substances</b><br>(2.2.29)   |  |                     |
| impurity A (Cytosine)                   | Not more than 0.15%  | Less than 0.02%     |
| impurity C                              | Not more than 0.2%   | Less than 0.02%     |
| Any unspecified impurity                | Not more than 0.10%  | Less than 0.02%     |
| Total impurities                        | Not more than 0.4%   | Less than 0.02%     |
| <b>Assay</b>                            | 98.0 % - 102.0 %   | 100.2%              |
| <b>IN-HOUSE for EUR TESTS</b>           |  |                     |
| <b>Identification</b><br>by HPLC        | The retention time of the main peak in the Gemcitabine Hydrochloride sample solution has the same value as the retention time of the main peak of the Gemcitabine Hydrochloride standard solution in the assay method. | Conforms            |

Plantex Ltd  
 5 Basel Street, P.O.Box 3190 Petach-Tikva 4951033, Israel

Manufacturing site : 1 Hakadar St., Industrial Zone, PO. Box 160 Netanya 4210101, Israel TEL. 972-9-8604333  
 FAX. 972-9-8339063



T A P I

**PRODUCT  
SPECIFICATIONS  
AND  
CERTIFICATE OF ANALYSIS**

Page 3 of 4

**Product Name: GEMCITABINE HYDROCHLORIDE****Control No.: 896602217****Order No.: 6U80029001****Client Packing Order: 5000011215****Customer Name: MUSTAFA NEVZAT ILAC SANAYI A.S.****Quantity: 7875.000 GR****Quality Market: EUR****Manufacturing Site: PLANTEX LTD. - NETANYA****Original Analysis Date: 27-June-2018****Manufacturing Date: June 2017****Re Test date: June 2022****Packaging and storage: Store at Up to 25°C. Do not freeze.  
Keep in a tight container.**

| TESTS AND METHODS                             | SPECIFICATIONS           | RESULTS*                |
|---|--------------------------|-------------------------|
| <b>IN-HOUSE for EUR TESTS</b>                 |                          |                         |
| <b>Residual solvents (by GC)</b><br><8966-RS> |                          |                         |
| Methanol                                      | Not more than 1000 ppm   | Less than 29ppm         |
| Ethanol                                       | Not more than 4000 ppm   | 553ppm                  |
| Acetone                                       | Not more than 3000 ppm   | Less than 84ppm         |
| Dichloromethane                               | Not more than 400 ppm    | Less than 26ppm         |
| <b>IN-HOUSE Microbial TESTS</b>               |                          |                         |
| <b>Bacterial endotoxins</b>                   | Not more than 0.05 EU/mg | Less than<br>0.01E.U/mg |
| <b>Microbiological test</b>                   |                          |                         |
| Total aerobic microbial count                 | Not more than 100 CFU/g  | Less than 10CFU/g       |
| Total Yeast and Molds count                   | Not more than 50 CFU/g   | Less than 10CFU/g       |
| Staphylococcus aureus                         | Absent/1g                | Absent                  |
| Pseudomonas aeruginosa                        | Absent/1g                | Absent                  |
| E.Coli  | Absent/1g                | Absent                  |
| Salmonella spp.                               | Absent/10g               | Absent                  |

**Remarks:**

1. Conforms to the requirements of the Ph.Eur. and IN-HOUSE for EUR and IN-HOUSE Microbial Specifications.
2. Benzene test is performed at least in 1 of each 20 batches.
3. The product meets the requirements for residual solvents USP <467> and ICH guide Q3C. The non-ICH solvents are supported by suitable qualification information.

Plantex Ltd  
5 Basel Street, P.O.Box 3190 Petach-Tikva 4951033, Israel

Manufacturing site : 1 Hakadar St., Industrial Zone, PO. Box 160 Netanya 4210101, Israel TEL. 972-9-8604333  
FAX. 972-9-8339063



**PRODUCT  
SPECIFICATIONS  
AND  
CERTIFICATE OF ANALYSIS**

Page 4 of 4

**Product Name:** GEMCITABINE HYDROCHLORIDE  
**Control No.:** 896602217      **Order No.:** 6U80029001  
**Customer Name:** MUSTAFA NEVZAT ILAC SANAYI A.S.      **Client Packing Order:** 5000011215  
**Quantity:** 7875.000 GR      **Quality Market:** EUR  
**Manufacturing Site:** PLANTEX LTD. - NETANYA      **Original Analysis Date:** 27-June-2018  
  
**Manufacturing Date:** June 2017      **Re Test date:** June 2022  
  
**Packaging and storage:** Store at Up to 25°C. Do not freeze.  
Keep in a tight container.

4. Corresponds to Current European Pharmacopeia.
5. \* Caution - Gemcitabine Hydrochloride is a potent cytotoxic agent. Great care should be taken to prevent inhaling particles and exposing the skin to it.

**Released by Quality Control Manager:**

**Orna Cohen Zedek**

**Signature\*\*:** PP\Leonid Goldstein

**11 December 2018 12:40:02**

**Print Date:** 11 December 2018

(\*) Upon completion of the 'Results' column this document becomes a certificate of analysis      **End of C.O.A.**

(\*\*) This document was signed electronically and this is the manifestation of the electronic signature.

Plantex Ltd  
5 Basel Street, P.O.Box 3190 Petach-Tikva 4951033, Israel

Manufacturing site : 1 Hakadar St., Industrial Zone, PO. Box 160 Netanya 4210101, Israel      TEL. 972-9-8604333  
FAX. 972-9-8339063



齐鲁制药有限公司

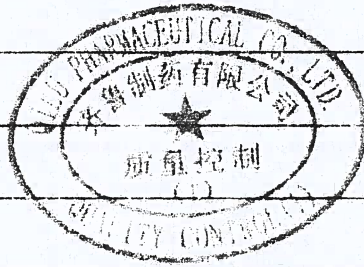
QILU PHARMACEUTICAL CO.,LTD.  
NO. 243 GONG YE BEI ROAD, JINAN CITY, P.R.CHINA

产品检验证书

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Page 1/3

|                         |                                    |                                 |                     |
|-------------------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------------|
| 产品名称:<br>Product Name:  | 盐酸伊立替康<br>irinotecan Hydrochloride | 生产日期:<br>Manuf. Date:           | 日/月/年<br>29/09/2018 |
| 代号:<br>Code:            | 210700025004                       | 包装规格:<br>Package Size:          | 1.5kg/drum          |
| 生产批号:<br>Batch No.:     | 8J015C81                           | 报告日期:<br>Report Date:           | 日/月/年<br>28/12/2018 |
| 批量:<br>Batch Size:      | 8.514kg                            | 复验日期:<br>Retest date:           | 日/月/年<br>28/09/2020 |
| 化验单号:<br>COA No.:       | A70181204                          | 质量标准号:<br>Specification Number: | QS-210700025004C    |
| 检验标准:<br>Specification: | 《美国药典》39版<br>USP 39                |                                 |                     |

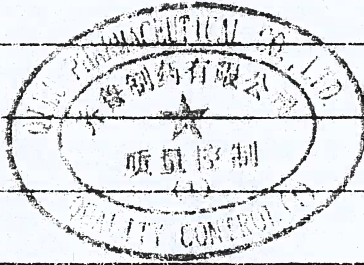


检验结果  
Analytical Results

| 项目<br>Item   | 检验标准<br>Acceptance criteria   | 结果<br>Result                                |
|--|---|---|
| [性状]<br>Description  | 类白色至黄色结晶性粉末<br>Almost white to yellow crystalline powder  | 类白色结晶性粉末<br>Almost white crystalline powder |
| [鉴别]<br>Identification   | A.本品的红外光吸收图谱应与对照品的图谱一致<br>The infrared absorption spectrum of the sample must be concordant with that of the reference substance  | 符合规定<br>Conforms                            |
|  | B.在盐酸伊立替康对映体的限度项下记录的色谱图中,供试品溶液主峰的保留时间应与鉴别溶液伊立替康峰(S-对映体)的保留时间一致<br>The retention time of the major peak of the Sample solution corresponds to the irinotecan(S-enantiomer) peak in the identification solution, as obtained in the test for Limit of Irinotecan Hydrochloride Enantiomer | 符合规定<br>Conforms                            |
|  | C.应显氯化物的鉴别反应<br>Meets the requirements of the tests for Chloride  | 呈正反应<br>Positive reaction                   |
| [检查]<br>TESTS  |   |   |
| 炽灼残渣<br>Residue on ignition  | 不得过0.1%<br>NMT 0.1%   | 0.02%                                       |
| 盐酸伊立替康对映体的限度<br>Limit of irinotecan hydrochloride enantiomer(HPLC) | 不得过0.15%<br>NMT 0.15%   | 未检测到<br>Not detected                        |
| 水分测定<br>Water Determination  | 应为7.0%~9.0%<br>Between 7.0% and 9.0%  | 8.1%  |
| 有机杂质(方法二)<br>Organic impurities(Procedure 2)(HPLC)                 |   |   |
| 7-脱乙基伊立替康<br>7-Desethyl irinotecan                                 | 不得过0.15%<br>Not more than 0.15%   | 未检测到<br>Not detected                        |

产品检验证书  
CERTIFICATE OF ANALYSIS

|                         |                                    |                                 |                     |
|-------------------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------------|
| 产品名称:<br>Product Name   | 盐酸伊立替康<br>Irinotecan Hydrochloride | 生产日期:<br>Manuf. Date:           | 日/月/年<br>29/09/2018 |
| 代号:<br>Code:            | 210700025004                       | 包装规格:<br>Package Size:          | 1.5kg/drum          |
| 生产批号:<br>Batch No.:     | 8J015GB1                           | 报告日期:<br>Report Date:           | 日/月/年<br>28/12/2018 |
| 批量:<br>Batch Size:      | 8.514kg                            | 复验日期:<br>Retest date:           | 日/月/年<br>28/09/2020 |
| 化验单号:<br>COA No.:       | A70181204                          | 质量标准号:<br>Specification Number: | QS-210700025004C    |
| 检验标准:<br>Specification: | 《美国药典》39版<br>USP 39                |                                 |                     |

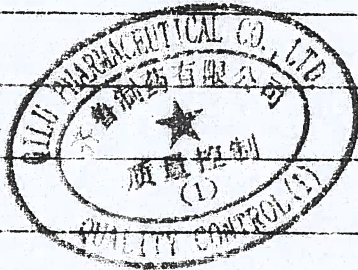


检验结果  
Analytical Results

| 项目<br>Item  | 检验标准<br>Acceptance criteria           | 结果<br>Result         |
|---|---------------------------------------|----------------------|
| 伊立替康有关化合物A<br>Irinotecan related compound A               | 不得过0.15%<br>Not more than 0.15%       | 未检测到<br>Not detected |
| 11-乙基伊立替康<br>11-Ethyl irinotecan                          | 不得过0.15%<br>Not more than 0.15%       | 未检测到<br>Not detected |
| 喜树碱<br>Camptothecin                                       | 不得过0.15%<br>Not more than 0.15%       | 0.001%               |
| 伊立替康有关化合物B<br>Irinotecan related compound B               | 不得过0.15%<br>Not more than 0.15%       | 0.01%                |
| 7-乙基喜树碱<br>7-Ethylcamptothecin                            | 不得过0.15%<br>Not more than 0.15%       | 0.001%               |
| 7,11-二乙基-10-羟基喜树碱<br>7,11-Diethyl-10-hydroxy camptothecin | 不得过0.15%<br>Not more than 0.15%       | 未检测到<br>Not detected |
| 单一非指定杂质<br>Any unspecified impurity                       | 不得过0.10%<br>Not more than 0.10%       | 低于忽略阈值<br>LTDL       |
| 总杂质<br>Total impurities                                   | 不得过0.50%<br>Not more than 0.50%       | 0.01%                |
| 残留溶剂<br>Residual Solvents(GC)                             |                                       |                      |
| 石油醚<br>Petroleum ether                                    | 不得过100 ppm<br>Not more than 100 ppm   | 1ppm                 |
| 丙酮<br>Acetone   | 不得过5000 ppm<br>Not more than 5000 ppm | 59ppm                |
| 乙酸乙酯<br>Ethyl acetate                                     | 不得过5000 ppm<br>Not more than 5000 ppm | 未检测到<br>Not detected |
| 甲醇<br>Methanol  | 不得过3000 ppm<br>Not more than 3000 ppm | 141ppm               |
| 二氯甲烷<br>Dichloromethane                                   | 不得过600 ppm<br>Not more than 600 ppm   | 28ppm                |
| [含量测定]<br>Assay   |                                       |                      |

产品检验证书  
CERTIFICATE OF ANALYSIS

|                         |                                    |                                 |                     |
|-------------------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------------|
| 产品名称:<br>Product Name   | 盐酸伊立替康<br>Irinotecan Hydrochloride | 生产日期:<br>Manuf Date:            | 日/月/年<br>29/09/2018 |
| 代号:<br>Code:            | 210700025004                       | 包装规格:<br>Package Size:          | 1.5kg/drum          |
| 生产批号:<br>Batch No.:     | 8J015GB1                           | 报告日期:<br>Report Date:           | 日/月/年<br>28/12/2018 |
| 批量:<br>Batch Size:      | 8.514kg                            | 复验日期:<br>Retest date:           | 日/月/年<br>28/09/2020 |
| 化验单号:<br>COA No.:       | A70181204                          | 质量标准号:<br>Specification Number: | QS-210700025004C    |
| 检验标准:<br>Specification: | 《美国药典》39版<br>USP 39                |                                 |                     |



检验结果  
Analytical Results

| 项目<br>Item  | 检验标准<br>Acceptance criteria   | 结果<br>Result     |
|---|---|------------------|
| 含量<br>Assay(HPLC)                                 | 按无水物计算, 含盐酸伊立替康应为98.0%~102.0%<br>Contains NLT 98.0% and NMT 102.0% of Irinotecan Hydrochloride, calculated on the anhydrous basis | 100.7%           |
| [细菌内毒素]<br>Bacterial endotoxins                   | 应小于0.29 EU/mg伊立替康<br>Less than 0.29 EU/mg irinotecan  | <0.29EU/mg       |
| [微生物限度]<br>Microbial Limits                       |   |                  |
| 需氧菌总数<br>Total aerobic microbial count            | 不得过1000 cfu/g<br>Not exceed 1000 cfu/g  | 20cfu/g          |
| 霉菌和酵母菌总数<br>Total combined molds and yeasts count | 不得过100 cfu/g<br>Not exceed 100 cfu/g  | 20cfu/g          |
| 符合客户要求<br>Conform to the client's requirements    |   |                  |
| 酸度<br>pH  | pH应为3.5~5.0<br>3.5 to 5.0   | 4.2              |
| 溶解度<br>Solubility                                 | 应在水中或氯仿中微溶, 在丙酮中几乎不溶<br>Slightly soluble in water or chloroform, practically insoluble in acetone                                 | 符合规定<br>Conforms |
| 溶液的颜色<br>Color of solution                        | 应不得深于黄绿色3号标准比色液<br>Not more intensely coloured than reference solution GY3  | 浅于黄绿色6号<br><GY6  |
| 比旋度<br>Specific rotation [α]                      | 应为+61°至+69°<br>Between +61°and+69°  | +65°             |

结论: 本品按《美国药典》41版 检验, 结果符合规定。  
Conclusion: This product conforms to USP 41.

核准放行

QC负责人: 王超  
QC Manager: 王超  
质量授权人: 宋超  
Qualified Person: 宋超

复核人: 宋超  
Checker: 宋超

报告人: 王超  
Reporter: 王超



## 9. ÖZGEÇMİŞ

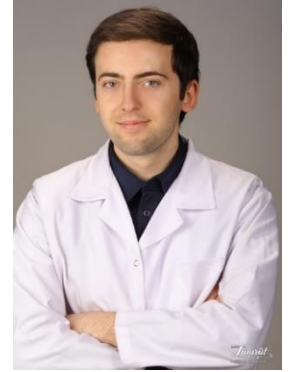
**Levent ATMACA**  
**Eczacı**

### İletişim Bilgileri

**E-Posta:** [leventmails@hotmail.com](mailto:leventmails@hotmail.com)

**Adres Bilgileri:** Ankara – Etimesgut - Eryaman

**Cep Telefonu:** 90 (505) 597 78 01



### Kişisel Bilgiler

- **Toplam Tecrübe:** 6 yıl 2 ay (2 yıl Staj)
- **Çalışma Durumu:** Çalışıyor (Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu)
- **Eğitim Durumu:** Üniversite (Mezun)
- **Medeni Durumu:** Bekar
- **Uyruk:** Türkiye Cumhuriyeti
- **Askerlik Durumu:** Yapıldı
- **Doğum Tarihi:** 28.07.1991
- **Doğum Yeri:** Merzifon
- **Sürücü Belgesi:** B (2009)

### İş Deneyimleri

#### Eczacı

Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu

**03.2016 – Çalışıyor – Ankara, Türkiye**

- 1) Fiyat Birimi (Ekonomik Değerlendirmeler ve İlaç Tedarik Yönetimi Dairesi)
- 2) İlaç Takip Sistemi Birimi (Bilgi Sistemleri Dairesi)
- 3) Sağlık Beyanı Denetim Birimi (Kozmetik Denetim Dairesi)

### **Stajyer Eczacı**

Akcenter Eczanesi

**02.2015 - 05.2015 (75 İş Günü) Ankara, Türkiye**

Serbest eczacılık uygulamalarının pratik olarak pekiştirilmesi.

### **Stajyer Eczacı**

Drogsan İlaçları Sanayi ve Ticaret A.Ş.

**06.2014 - 07.2014 (30 İş Günü) Ankara, Türkiye**

Endüstri eczacılığı uygulamalarının pratik olarak pekiştirilmesi.

### **Stajyer Eczacı**

Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri

**09.2013 - 06.2014 (Yıllık Staj) Ankara, Türkiye**

Klinik eczacılık uygulamalarının pratik olarak pekiştirilmesi.

### **Stajyer Eczacı**

Gençtoy Eczanesi

**06.2012 - 09.2012 (30 İş Günü) Ankara, Türkiye**

Serbest eczacılık uygulamalarının pratik olarak pekiştirilmesi.

### **Stajyer Eczacı**

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Uygulama Eczanesi

**10.2011 - 06.2012 (Yıllık Staj) Ankara, Türkiye**

Serbest eczacılık uygulamalarının pratik olarak pekiştirilmesi.

## Eğitim Bilgileri

- **Üniversite (Lisans)**

09.2010 - 06.2015

**Hacettepe Üniversitesi - (Örgün Öğretim) Eczacılık Fakültesi, Eczacılık (Türkçe)**

**2,72 / 4**

- **Lise - 06.2009**

**Çorum Fen Lisesi - Fen Bilimleri**

**80,57 / 100**

### Yabancı Dil

**İngilizce**

**Okuma**  
İyi

**Yazma**  
İyi

**Konuşma**  
İyi

## Yetkinlikler

- **Bilgisayar Bilgileri**

Microsoft Windows  
Microsoft Office  
Microsoft Movie Maker  
Microsoft Paint

- **Sertifika Bilgileri**

### **Clinical Practical Education Completion**

Hacettepe University Faculty of Pharmacy - 06.2015

THIS IS TO CERTIFY THAT LEVENT ATMACA HAS COMPLETED ALL HER/HIS CLINICAL PRACTICAL EDUCATION AT HACETTEPE UNIVERSITY HOSPITALS WHICH ARE ACCREDITED BY JOINT COMMISSION INTERNATIONAL (JCI).

- **Sınav Bilgileri**

**YDS - Yabancı Dil Sınavı (66,25)**

ÖSYM - 09.2015

- **Seminerler ve Kurslar**

**Eczacının Yasal Sorumlulukları**

SS. İstanbul Eczacılar, Üretim, Temin, Dağıtım Kooperatifi - 21.02.2015 (4 Saat)

Y. Doç. Dr. Nezih VAROL tarafından "Litai TBB Konuk Evi Balgat/Ankara" adresinde verilmiştir.

### **Ek Bilgiler**

- **Hobiler / İlgi Alanları:**

Teknoloji, Koleksiyonculuk, Spor (Tenis, Kayak, Masa Tenisi, Yüzme, Fitness), Oyun (Bilgisayar, Kutu vb.), Sinema, Müzik, Seyahat.

- **Üye Olunan Topluluklar:**

Ankara Eczacı Odası

- **Sigara Kullanımı:** Sigara kullanmıyorum.

### **Referanslar**

- Prof. Dr. Sacide Altınöz

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı –  
Emekli Öğretim Üyesi

Tel : 05357099489 | E-Posta : [saltinoz@hacettepe.edu.tr](mailto:saltinoz@hacettepe.edu.tr)

- Uzm. Ecz. Murat Hamamcılar

Akcenter Eczanesi - Eczacı

Tel : 05393307681

